

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07807

研究課題名(和文) RNAi法等によるシイタケ・ラッカーゼの生理的機能及び遺伝子発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the physiological function and gene expression mechanism of Lentinula edodes laccase genes by RNAi method

研究代表者

佐藤 利次 (Sato, Toshitsugu)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：00390881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シイタケのラッカーゼ(Lcc)は産業的に有用な酵素で14個以上の遺伝子が確認されているが、その機能や発現制御メカニズムは不明である。本研究では、シイタケLcc遺伝子の発現制御メカニズムの解明を目的に、デュアルプロモータ型のRNAiベクターpChGaS-cl1を用いた分泌型Lcc1の発現抑制を行った。その結果、RNAiベクターpChGaS-cl1の導入により、宿主株で最も高い発現を示すlcc1が抑制され、宿主株ではほとんど発現していないlcc5が発現することが明らかとなった。組換え体によっては、lcc1の発現に差があったが、lcc5は全ての組換え体で発現が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラッカーゼ(Lcc)は産業上有用な酵素であるが、安全と考えられるシイタケなどの食用担子菌による大量生産システムは確立されていない。それを実現するためには、Lccの発現メカニズムの解明が不可欠であるが、シイタケに関しては、ほとんどわかっていない。今回独自に作成したデュアルプロモータ型RNAiベクターを用いて、シイタケの分泌型Lccであるlcc1遺伝子の発現抑制によって、新規にLcc5が発現してくることが明らかとなった。この結果は、さらにその解析を進めていくことによって、シイタケLccの高発現系確立のための基礎的知見として有用である。

研究成果の概要(英文)：Lentinula edodes laccases are an industrially useful enzyme, and more than 14 genes have been confirmed in the genome, however, the function of laccases and the regulation mechanism of the laccase genes expression are unknown. In this study, the suppression of the secretory Lcc1 gene using a dual promoter type of RNAi vector was studied for the purpose of elucidating the regulation mechanism of L. edodes laccase genes expression. As a result, it was revealed that lcc1 which showed the highest expression in the host strain was suppressed, and newly expressed Lcc5 which was hardly expressed in the host strain. There was a difference in the levels of lcc1 repression depending on the recombinants, while the expression of lcc5 was confirmed in all the recombinants.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ラッカーゼ シイタケ 遺伝子発現抑制 デュアルプロモータ型RNAiベクター リアルタイムPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ラッカーゼ (Lcc) は植物から微生物まで幅広く存在する酵素で、特に木質の分解のために担子菌が生産するリグニン分解酵素としてのLcc に関しては多くの研究が行われている

(Baldrian, FEMS Microbiol Rev, 30, 215-242, 2006、Shraddha et al., Enzyme Res, 2011, Article ID 217861, 2011, Janusz et al., Enz Microbial Technol, 52, 1-12, 2013)。食用担子菌の1種であるシイタケによるLcc の生産は、安全性や人工栽培技術が確立されていることなどから有利であるが、大量生産系は未だ確立されていない。

研究代表者らは、これまでシイタケのLcc に関して、シイタケが生産するLcc の諸性質と遺伝子単離や (Nagai et al., Appl Microbiol Biotechnol, 60, 327-335, 2002, Mycoscience, 50, 308-312, 2009)、子実体保存時のひだの褐変化にチロシナーゼとLcc4 が関与していること (Sato et al., Biosci Biotechnol Biochem, 73, 1042-1047, 2009, Sakamoto et al., Curr Genet, 55, 409-423, 2009, Nagai et al., Microbiology, 149, 2455-2462, 2003) などを明らかにした。また、シイタケLcc は、色素の脱色 (Nagai et al., Mushroom Science, XVI, 573-578, 2004, Nagai et al., Appl Microbiol Biotechnol, 60, 327-335, 2002) や環境汚染物質の減少 (佐藤ら, 日本きのこ学会誌, 17, 11-17, 2009) に有効であることを明らかにした。研究代表者ら以外では、香港大のグループが、4種類のシイタケLcc 遺伝子の酵母による異種発現を報告していた (Wong et al., PLoS One, 8, e66426, 2013, Biores Technol, 104, 157-164, 2012)。

以上のように、シイタケのLcc に関しては、個別のLcc の断片的な知見が蓄積されてきてはいるものの、シイタケにおける個別Lcc の機能解明は一部のLcc に限られており、シイタケ全体としてのLcc の発現メカニズムに関しては、未だに不明であるのが現状である。したがって、シイタケLcc の大量発現系を開発するためには、シイタケLcc の発現制御メカニズムを解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

Lcc は、上述のように環境汚染物質の除去や木質バイオマスのリグニン除去などへの利用が期待される産業上有用な酵素であり、Lcc の生産は、細胞外への分泌能が高く生産量も多い担子菌類が適している。本研究では、担子菌類の中でも、安全性が高い食用担子菌シイタケのLcc に関して、各Lcc の機能の解明とLcc 遺伝子発現制御メカニズムの解明を目的とし、最終的にシイタケによる大量発現系の開発を目指している。具体的には、RNAi 法によるシイタケのLcc の発現抑制実験を行うことと、プラスミドタギング法によって得られたLcc 発現変異株の解析を行う。

研究代表者らは、これまでにシイタケの遺伝子解析技術として、効率の高い遺伝子導入法 (Sato et al., Biosci Biotechnol Biochem, 62, 2346-2350, 1998)、シイタケ用遺伝子高発現ベクター (Sato et al., J Biosci Bioeng, 111, 117-1206, 2011, Hirano et al., Mole Genet Genom, 263, 1047-1052, 2000)、及びRNAiベクターを開発した (Nakade et al., Microbiol Res, Vol. 166, 484-493, 2011)。また、RNAiベクターに関しては、構築しやすいデュアルプロモータ型の新規RNAiベクターを新たに構築し、Lcc1 遺伝子の発現抑制を確認した。

また、薬剤耐性遺伝子発現ベクターpLC-hphを導入した組換え体の中から、宿主株で発現しているLcc1と異なる新規のLcc を発現しているLcc 発現変異株を単離した。この株に関しては、ベクターが挿入された位置のゲノム配列が、Lcc1遺伝子発現の抑制と新規Lcc 遺伝子の発現に関与している制御遺伝子である可能性が考えられる。したがって、これらの新規Lcc 遺伝子を単離して解析することや、後者の組換え体に関しては、ベクター挿入位置周辺の遺伝子配列を明らかにすることにより、Lcc 発現メカニズムの一端が明らかになる可能性がある。

そこで、本研究ではシイタケ由来のLcc 遺伝子に関して、RNAi 法による発現抑制による機

能解析、発現ベクターによるシイタケでの高発現について検討を行う。さらに、ベクター導入変異株に関しては、導入位置周辺の遺伝子配列を明らかにすることにより、Lcc 発現制御遺伝子の存在を明らかにする。また、これらの知見を基に、有用Lcc のシイタケによる高発現系の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) リアルタイム PCR

RNA 抽出は FastRNA PRO Red Kit (MP Biomedicals)、mRNA の逆転写は iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BioRad)、及び PCR は THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix(東洋紡株式会社)を用いて行なった。リアルタイム PCR は LightCycler® Nano(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いた。

#### (2) 新規 lcc1 発現抑制 RNAi ベクターと lcc5 発現抑制ベクターの構築とシイタケへの導入

シイタケ lcc1 遺伝子配列の中から、それ以外のシイタケ lcc 遺伝子と相同性のほとんどない領域を特定し、RNAi ベクター-pChGaS に挿入した。また、同時に、lcc1-lcc5 を同時発現抑制できる連結遺伝子発現抑制ベクター-pChGaS-cl1-cl5 を構築した。シイタケへの遺伝子導入は、Sato et al., ( Biosci Biotechnol Biochem, 62, 2346-2350, 1998 ) の方法に従って行なった。

#### (3) Lcc 発現変異株のベクター導入位置周辺の遺伝子の単離と解析

シイタケゲノム DNA の抽出は、ISOPLANT II(ニッポン・ジーン)、ゲノムウォーキングは、GenomeWalker universal Kit(Clontech)を用いて行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) リアルタイム PCR によるシイタケ遺伝子発現解析のためのリファレンス遺伝子の選定

リファレンス遺伝子候補として、構成的発現遺伝子 6 種類、解糖系酵素遺伝子グリセルアルヒド - 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gpd*)、電子伝達系遺伝子コハク酸脱水素酵素の IP サブユニット蛋白質遺伝子 (*sdci*)、低分子 GTP 結合タンパク質遺伝子 *ras*、キチン合成酵素遺伝子 (*chs*)、ribosomal protein L2 (*Rpl2*)、及び ribosomal protein L4 (*rpl4*) を選択した。宿主株と RNAi ベクター導入株の液体培養菌体を用いて、これらの遺伝子に関してリアルタイム PCR を行なったところ、比較的安定に発現していた *chs*、*ras*、*rpl2* 遺伝子の 3 種類の遺伝子をリファレンス遺伝子として選抜した。

#### (2) デュアルプロモータ型 RNAi ベクター-pChGaS-lcc1 導入株の解析

はじめに、液体培養時の Lcc 活性変動を解析したところ、宿主株が Lcc 活性のピークが 1 回なのに対して、デュアルプロモータ型 *lcc1* 遺伝子発現抑制ベクター-RNAi ベクター-pChGaS-lcc1 導入株は、2 回の活性ピークを示した。また、活性がピーク時の培養液のウェスタン解析を行ったところ、宿主株では Lcc1 が主要な Lcc として検出されたのに対して、組換え株では Lcc1 の発現が抑制傾向にあり、宿主株では発現していない Lcc5 が新たに検出されることが明らかになった。

次に、宿主株に関して 16 種類の *lcc* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により比較したところ、*lcc1* 遺伝子の発現が最も高く、*lcc3*、*lcc5*、*lcc6*、*lcc12* は検出されないことが明らかとなった。*lcc1* 遺伝子発現抑制ベクター-pChGaS-cl1 導入シイタケ株では、宿主株で最も高い発現を示す *lcc1* の発現が抑制傾向を示し、宿主株では検出されなかった Lcc5 が新たに検出されることが明らかとなった。組換え体によって、*lcc1* の発現には差が認められたが、*lcc5* の発現に関しては、全ての組換え体で確認されるという興味深い結果となった。

(3) 新規 *lcc1* 発現抑制 RNAi ベクターと *lcc5* 発現抑制ベクターの構築とシイタケへの導入

(2) の結果から、*lcc1* と *lcc5* 遺伝子のより特異性の高い配列を選択して、それぞれ単独に抑制する RNAi ベクターと、*lcc1* と *lcc5* 遺伝子を同時に抑制するための RNAi ベクターを新規に構築した。シイタケ *lcc1* 遺伝子に関しては、*lcc1* 遺伝子以外の *lcc* 遺伝子と相同性のほとんどない領域を検索し、新たに pChGaS ベクターに挿入した。また、同時に、*lcc1-lcc5* を同時発現抑制できる連結遺伝子発現抑制ベクター pChGaS-cL1-cL5 を構築し、シイタケへ導入した。その結果、*lcc1* 発現抑制 RNAi ベクター導入株が 40 株、*lcc5* 発現抑制 RNAi ベクター導入株が 50 株、および *lcc1* と *lcc5* の同時発現抑制 RNAi ベクター導入株が 26 株得られた。今後、これらの組換え体の解析を進め、*lcc1* と *lcc5* の発現制御メカニズムの一端を解明していく予定である。

また、子実体保存後半のヒダの褐変化に関与しているチロシナーゼ遺伝子 (*tyr*) に関して、アンチセンス法により発現抑制させたところ、単独では褐変化の抑制ができない可能性と、*lcc4* が褐変化に重要である可能性が示唆されたことから (Sato et al., J Biosci Bioeng, 128, 1-7, 2019)、*lcc4* についても *tyr* とともに、その発現抑制ベクターの構築を進めており、*tyr* と *lcc4* 同時発現抑制ベクターも加えて、*lcc4* と *tyr* の生理的役割の解明を進めていく予定である。なお、シイタケ *Lcc1* 発現ベクター pChG-clcc1 を導入したシイタケでは、*Lcc1* の高発現が確認された (Sato et al., Mycoscience, 60, 246-249, 2019)。

(4) *Lcc* 発現変異株のベクター導入位置周辺の遺伝子の単離と解析

*Lcc* 発現変異株に関して、導入ベクター配列を基にプライマーをデザインし、ゲノムウォーキング法により、導入ベクター周辺の遺伝子断片を単離して、その配列を決定した。その結果、ベクター配列から導入位置のシイタケゲノム配列まであと 24bp まで配列が決定できた。また、その位置の少し内側に設計した特異的プライマーを用いて、約 700bp の断片が得られたので、今後、解析を進め、目的の遺伝子を同定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Toshitsugu, Suzuki Yuumi, Naito Masayoshi, Minami Aika, Suzuki Naoyuki, Yaegashi Kaori, Hirano Tatsuya	4. 巻 60
2. 論文標題 Overexpression of the laccase gene, lcc1, in Lentinula edodes using the pChG vector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 246 - 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.02.004">https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.02.004</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Toshitsugu, Takahashi Machiko, Hasegawa Junji, Watanabe Hisayuki	4. 巻 128
2. 論文標題 Overexpression and repression of the tyrosinase gene in Lentinula edodes using the pChG vector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1 - 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.12.013">https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.12.013</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Toshitsugu, Irie Toshikazu, Yoshino Fumihiko	4. 巻 81
2. 論文標題 Heterologous expression of the Pleurotus ostreatus MnP3 gene by the laccase gene promoter in Lentinula edodes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1553 - 1556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1332977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshitsugu Sato
2. 発表標題 Molecular breeding of anticancer polysaccharide lentinan high content Lentinula edodes (Shiitake mushroom)
3. 学会等名 2018年 韓日 共同シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshitsugu Sato
2. 発表標題 Bioremediation by cultivation waste water of Lentinula edodes (Shiitake mushroom) and molecular breeding of L. edodes
3. 学会等名 2018 China (Jinan) Mushroom Processing Technology International Convention (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大畑早弥香、佐藤利次、吉田一生、但野健太、森篤生、橋本侑香、沢目洋史
2. 発表標題 シイタケにおけるデュアルプロモーター型RNAiベクターの解析とexp1遺伝子発現抑制株の造成
3. 学会等名 第12回オホーツク医学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福土涼介、佐藤利次、富井さや香、高橋佑生、楊立風、山岸喬、新井博文
2. 発表標題 食用担子菌発酵ダイズのポリフェノール成分の解析
3. 学会等名 第12回オホーツク医学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 利次
2. 発表標題 シイタケ・ラッカーゼをめぐる研究 -栽培廃液から遺伝子まで-
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会(函館大会)・研究会(バイオマス変換研究会、きのこ研究会、及び抽出成分利用研究会の合同講演会)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤優希、山形明史、佐藤利次
2. 発表標題 pLC-hph導入シイタケ組換え株のラッカーゼ発現の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2016年度大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉田一生、但野健太、佐藤利次
2. 発表標題 新規RNAiベクターを導入したシイタケ形質転換体のラッカーゼの発現
3. 学会等名 日本農芸化学会2016年度大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 本間靖隆、佐々木優太、菅原大希、猪股希、佐藤利次
2. 発表標題 食用担子菌ヒラタケのセルロース分解助長因子エクспанシン様遺伝子Poexp5の単離
3. 学会等名 日本農芸化学会2016年度大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----