

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0178

研究課題名（和文）東アジア域における食用担子菌栽培が引き起こす遺伝子汚染の実態とメカニズムの解明

研究課題名（英文）Surveys and mechanism elucidation of genetic pollution caused by edible mushrooms cultivation in east Asia

研究代表者

本田 与一（Honda, Yoichi）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70252517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：農業活動による遺伝子汚染の実態に関する調査のため、海外調査サイトを設けて栽培きのこの種の遺伝的多様性を調査を開始すると共に国際ワークショップを開催した。しかし、コロナ禍のため予定していた海外でのサイト研究が、研究期間を一年延長したにもかかわらず最終的に殆どできなかった。この為、研究の方向性を将来の汚染を阻止するための解決策の実用化を目指した対応策の開発に振り向け、ヒラタケ低胞子株の単離、食用担子菌へのゲノム編集系の導入に初めて成功した。これらの具体的成果により、遺伝子汚染問題に対応する国際国際コンソーシアムが立ち上げられ、将来の遺伝子汚染を阻止するために必要な基盤技術が開発された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、食用担子菌に初めてゲノム編集系を構築することに成功した。このことは、遺伝子汚染を起こさない栽培株の分子育種に取って大きな一歩であるだけでなく、様々な遺伝子の機能を解明し、また効率よく任意の変異を導入する為の技術が開発されたことを意味する。一方で、コロナ禍によって、遺伝子汚染の実態調査、メカニズムの解明は道半ばで途絶えてしまっている。農業活動による生態系の遺伝的多様性の破壊は、持続的な社会の確立のために、制御しなければならぬ極めて重要な問題であり、今後も引き続き、この課題への継続的な調査と取り組みが必要である。

研究成果の概要（英文）：Genetic pollution destroys genetic diversity in a species and reduces genetic variety in the ecosystem. The aim of this project was to investigate genetic pollution caused by agricultural activity and develop technical solution to prevent it in the future. However, COVID-19 pandemics prevented all the overseas research plans after end of fiscal year 2019. So we concentrated to establish a new technology for molecular breeding to isolate a cultivar that do not cause genetic pollution. Finally, we developed a CRISPR/Cas9 genome editing system in the edible mushrooms for the first time.

研究分野：地域環境科学

キーワード：担子菌 きのこと

## 1. 研究開始当初の背景

「遺伝子汚染」は、種の遺伝的多様性を棄損し、自然界における遺伝的資源の豊かさ、ひいては種の多様性を著しく低下させる。ペットなどとして持ち込まれた外来生物との交雑による我が国固有種の駆逐等が取り上げられる事も多いが、実際には農業における単一(外来・遺伝子組換えを含む)品種の大規模栽培により、野生の同種もしくは近縁種において遺伝的な多様性が失われることが地球規模で頻発している。環境に優しく、持続可能な社会を形成するため、農業に起因する遺伝子汚染の現状について世界的な観点で客観的に把握し、またその影響を放置することなく技術的・政策的な対策を打つ必要がある。

しかし、現状では農林産物の栽培に起因する花粉や孢子などによる生態系への侵襲については殆ど野放しとなっている。また、環境中への孢子や花粉の飛散は、花粉症やアレルギー、日和見感染など、人間の健康面にも負の影響を及ぼしている。一般に、農作物や林産物の栽培に起因する多様性消失は、種子や根・栄養体が圃場から漏出することにより個体レベルで生態系へ侵入する場合と、風媒・虫媒を介した花粉や孢子による遺伝的侵襲に分けて考えることができる。前者は適切な管理により防止・排除することが比較的容易であるが、後者については殆どのケースで野放しとなっている。このような「遺伝子汚染」による同一の種内における遺伝的多様性の減少を正確に調べる解析法については、これまで有効なものが無かった。遺伝的多様性の棄損は、目に見えにくい形で進行するため、生態系の種多様性の喪失リスクがはかりにくく、また一旦進行すると回復が難しいという特徴を持つ。

## 2. 研究の目的

本研究では、持続可能で環境に優しい農業の確立を目指し、中国・韓国において食用担子菌(きのこ)類の人工栽培によって生じている遺伝子汚染の実態を精密に調査するとともに汚染メカニズムの解明を行う。具体的には、

中・韓における代表的な食用担子菌類の遺伝資源の多様性について、個体群全ゲノム分析とマーカー解析を用いて明らかにし、遺伝子汚染の実態について定量的に把握する。

現地での詳細なサイト調査を行って、農業活動による遺伝子汚染浸透のメカニズムを解明し、両者の因果関係を科学的に証明することにある。

という2つの目標を掲げて研究を開始した。しかし、2019年度の終盤からコロナ禍により、海外へ出向いての研究が全くできなかった事から、将来における遺伝子汚染の拡大を防ぐための対応策の基盤技術とするべく、ゲノム編集技術の食用担子菌への導入および、組換えによる孢子低生産株の作成

を新たに加えて、期間の後半はこの部分に舵を切って、集中的に行った。

## 3. 研究の方法

中国において重要な食用担子菌であるマンネンタケの分子マーカー開発に参画し、個体間識別可能なマーカーの単離を試みると共に、キクラゲにおいても分子マーカー開発を開始した。さらに、中韓のシイタケおよびキクラゲの個体群全ゲノム分析を開始して、遺伝的多様性の状況および遺伝子汚染の実態について解析を行った。

中国吉林省長春市郊外のキクラゲ大規模生産地の周囲をサイト調査の試験地と定め、周辺領域を含む吉林省各地より菌株の採集を行った。これらの株間の系統的な関係を明らかにすることで、キクラゲ栽培の農業活動による遺伝子汚染浸透のメカニズムを解明し、両者の因果関係を科学的に証明しようとした。

CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術のヒラタケへの導入および、これまでに減数分裂に必要なことが報告されている *mer3* 及び *msh4* 遺伝子を相組換えにより遺伝子破壊した二核菌系を作成し、子実体を発生させて孢子の生産性について調査を行った。

## 4. 研究成果

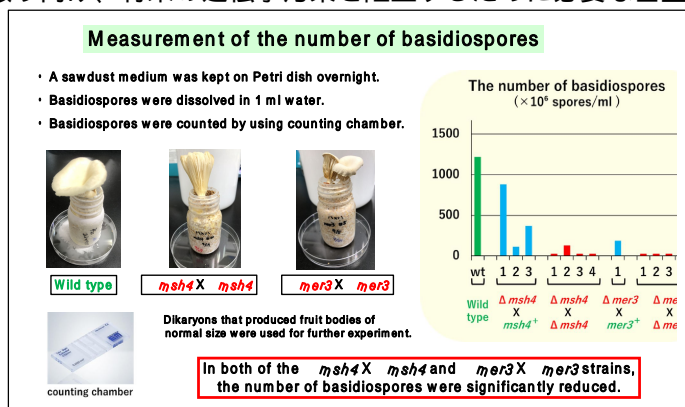
初年度については、中国上海市農業科学院食用菌研究所、および韓国慶尚大学校所有の既存のシイタケおよびキクラゲ株のコレクションについて、本研究の目的に沿った解析となるように様々な地域から単離された株を無作為的に抽出した。これらの株についてプロトプラストからの再生法を用いて単核菌系の単離を行った。単核菌系が単離されたものからゲノム解析に供し、比較ゲノム解析を進めていったが、野生から単離された二核菌系からは単核菌系の単離が進まない物も多く観察された。このことは、二核化された後に様々な遺伝子に変異が入り、優性生殖を経ないと体細胞からの無性生殖的な増殖が不可能になっている菌株が多いことを示している。また、ゲノム解析によらない簡易的な遺伝的相関関係の解析手法として、キクラゲとマンネンタケで用いることが出来るDNAマーカーを整備し、これらについては学術論文のとりまとめを行った。

また、農業活動による遺伝子汚染問題を国際的に提起し、特に食用担子菌類における国際共同研

究を開始する目的で、11月に三重県津市で開催されたアジア菌学会議のサテライトイベントとして国際ワークショップ「Genetic diversity and molecular breeding in cultivated mushrooms」を開催し、11ヶ国から62名の参加者を得て、その後の様々な研究期間および材料についての国際共同研究の契機となった。

2年度目では、東アジア域での栽培きのこ種の遺伝子汚染状況について調査するとともに、サイト研究による汚染メカニズムの解明を行う目的で、中国吉林省の長春近郊、および長白山周辺で現地調査を行った。採取した菌株については、脱二核化処理を実施しており、単核菌系が単離されたものから、ゲノム解析を行う計画をしていた。実際には、吉林農業大学で脱二核化の操作を現地の学生や研究者に伝授してきたが、その後はコロナ禍が始まり、現地に行けなかったことからゲノム情報の解析には至っていない。一方で、国内では研究の再開ができたときに備えて、ゲノム情報を効率よく解析するためのワークステーションやアプリケーションなど *in silico* 解析に必要な研究体制を確立した。また、胞子拡散による遺伝子汚染を阻止する目的で、組換えおよびゲノム編集による減数分裂関連遺伝子 *mer3* 及び *msh4* 遺伝子を遺伝子破壊した株を単離して、無胞子株の育種ができたかどうかについて形質の解析を進めている。

3年度目もコロナ禍のため予定していた海外でのサイト研究がすべてできなかった。この為、研究の方向性を遺伝子汚染の対応策に振り向け、将来の遺伝子汚染を阻止するために必要な基盤技術の開発を進めていく事とするほか、研究期間を一年延長して、実態調査を進められるように最善の努力を果たすこととした。一方、*mer3* 及び *msh4* 遺伝子を *ku80* 遺伝子欠損バックグラウンドで遺伝子ターゲットングによりマーカーと置換したり、遺伝子破壊した株については、胞子の生産能力が1000倍以上低くなっていることが確認された。この結果については、*Mycological Progress* 誌に論文として発表した。



延長した最終年度も、結局コロナ禍のため予定していた海外でのサイト研究がすべてできなかった。将来の遺伝子汚染を阻止するために必要な基盤技術の開発では結果として、ヒラタケをモデルとしたゲノム編集の導入や、および *mer3* 及び *msh4* 遺伝子を相同組換えではなく、CRISPR/Cas9 による破壊を導入することで胞子を作らない株の育種に成功した。より具体的には、Cas9 及び gRNA 発現カセットを含む組換えプラスミド導入による方法や、*in vitro* で会合させた Cas9 タンパク質と gRNA をリポタンパク質として、直接プロトプラストに導入する方法 (AMB express 誌に論文として掲載) さらに導入した Cas9 及び gRNA 発現プラスミドを細胞内で一過的に発現させて、ゲノム編集を行う方法などをあらたに開発した (追加の実験を行っており、データが揃えば論文化の予定)。また、*mer3* や *msh4* の減数分裂関連遺伝子を、野生株のバックグラウンドで CRISPR/Cas9 により遺伝子破壊したりした株を複数単離し、これらの株の子実体に胞子が殆ど生産されないことを示した (論文執筆中)。これらの成果は、今後の遺伝子汚染実態調査の継続と、さらに実用的な栽培種において遺伝子汚染を起こさない株の育種に道を拓くものであり、農業活動による遺伝子汚染の実態解明と、技術的な解決を目指して、今後継続課題の発展が期待される。

このように、将来の遺伝子汚染の拡大をくい止めるための無胞子株を分子育種するための基盤技術が真正担子菌ヒラタケを材料として開発された。しかしながら、担子菌は種が異なると形質転換や組換え遺伝子発現、ゲノム編集系導入などの基盤技術の準備状況に大きな違いがあり、今後はシイタケやエノキタケなどのハラタケ目の実用的な菌株、さらには、異型担子菌に属するキクラゲなどの中国などの外国で需要の大きな食用担子菌に、こうした技術を適用させて実用性が高く、安全な無胞子栽培品種を開発していく必要があるであろう。

また、コロナ禍のために実施できなかったシイタケにおける遺伝子汚染の深刻さの科学的調査や農業活動と遺伝子汚染の関係を解析する為の研究について、しっかりと実施して行くことが望まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Boontawon Tatpong, Nakazawa Takehito, Inoue Chikako, Osakabe Keishi, Kawauchi Moriyuki, Sakamoto Masahiro, Honda Yoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient genome editing with CRISPR/Cas9 in <i>Pleurotus ostreatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-021-01193-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki Fuga, Nakazawa Takehito, Sakamoto Masahiro, Honda Yoichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular breeding of sporeless strains of <i>Pleurotus ostreatus</i> using a non-homologous DNA end-joining defective strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mycological Progress	6. 最初と最後の頁 73～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11557-020-01661-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fang-Jie Yao, Li-Xin Lu, Peng Wang, Ming Fang, You-Min Zhang, Ying Chen, Wei-Tong Zhang, Xiang-Hui Kong, Jia Lu & Yoichi Honda	4. 巻 46
2. 論文標題 Development of a Molecular Marker for Fruiting Body Pattern in <i>Auricularia auricula-judae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mycobiology	6. 最初と最後の頁 72-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する
1. 著者名 CHAO Wen-zheng, TANG Chuan-hong, ZHANG Jing-song, YU Ling, Honda Yoichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of a stable SCAR marker for rapid identification of <i>Ganoderma lucidum</i> Hunong 5 cultivar using DNA pooling method and inter-simple sequence repeat markers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Agriculture	6. 最初と最後の頁 130-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Chikako INOUE, Dong Xuan, NGUYEN, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO, Yoichi HONDA
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 in mushrooms without integration of ectopic DNA
3. 学会等名 ECFG2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Genome editing to fight with, not against, post-genomics in mushroom fungi
3. 学会等名 IUMS2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 technologies in basidiomycetous fungi, Pleurotus ostreatus and Ceriporiopsis subvermispora
3. 学会等名 ISMS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuga YAMASAKI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO and Yoichi HONDA
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-driven simultaneous gene mutations in both nuclei of dikaryotic strain of Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 Asia Mycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuga YAMASAKI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO and Yoichi HONDA
2. 発表標題 Simultaneous genome editing in both nuclei of a dikaryotic strain of <i>Pleurotus ostreatus</i> using CRISPR/Cas9
3. 学会等名 European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孔 令彬, 小野 和子, 中沢 威人, 吉村 剛, 坂本 正弘, 本田 与一
2. 発表標題 食用担子菌栽培が引き起こす遺伝子汚染の実態とメカニズムの解明
3. 学会等名 シンポジウム IF0が繋ぐ京大微生物学のフロントライン
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuga YAMASAKI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO and Yoichi HONDA
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-driven molecular breeding of sporeless strains in <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 シンポジウム IF0が繋ぐ京大微生物学のフロントライン
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chikako INOUE, Dong Xuan NGUYEN, Takehito NAKAZAWA, & Masahiro SAKAMOTO Yoichi HONDA
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 in mushrooms without integration of ectopic DNA
3. 学会等名 European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 FUGA YAMASAKI, TAKEHITO NAKAZAWA, MASAHIRO SAKAMOTO, YOICHI HONDA
2. 発表標題 CRISPR/CAS9-DRIVEN MOLECULAR BREEDING OF SPORELESS STRAINS IN PLEUROTUS OSTREATUS
3. 学会等名 Meeting of Asia for Mushroom Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi HONDA, Chikako INOUE, Dong Xuan NGUYEN, Takehito NAKAZAWA, Keishi OSAKABE & Masahiro SAKAMOTO
2. 発表標題 GENOME EDITING IN MUSHROOMS USING CRISPR/Cas9 WITHOUT INTEGRATION OF ECTOPIC DNA
3. 学会等名 Meeting of Asia for Mushroom Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 風雅、中沢 威人、坂本 正弘、本田 与一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によるヒラタケダイカリオン核内の二核同時変異導入
3. 学会等名 日本きのこ学会第23回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田与一・中沢威人・吉村 剛・小野和子・鮑 大鵬・ヤオ 瑞恒
2. 発表標題 食用担子菌類における遺伝的多様性評価
3. 学会等名 生存圏シンポジウム「DOL/LSFに関する全国共同利用研究成果発表会」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Molecular genetic approaches beyond the post-genomic era
3. 学会等名 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Molecular genetics and genome editing in white rot fungus, <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 Xiamen Forum on Biomass Frontiers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuga YAMASAKI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO, Yoichi HONDA
2. 発表標題 Phenotypic Analysis of <i>msh4</i> and <i>mer3</i> Disruptants in <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎風雅、中沢威人、坂本正弘、本田与一
2. 発表標題 ヒラタケにおける <i>msh4</i> および <i>mer3</i> 遺伝子の破壊が胞子形成に与える影響の解析
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際コンソーシアムについて  
<http://www.biomass.kais.kyoto-u.ac.jp/SPIRITS.html>

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
研究分担者	小野 和子  (Ono Kazuko)  (20815493)	京都大学・生存圏研究所・研究員   (14301)	
研究分担者	吉村 剛  (Yoshimura Tsuyoshi)  (40230809)	京都大学・生存圏研究所・教授   (14301)	
研究分担者	中沢 威人  (Nakazawa Takehito)  (80608141)	京都大学・農学研究科・助教   (14301)	
研究分担者	入江 俊一  (Irie Toshikazu)  (30336721)	滋賀県立大学・環境科学部・教授   (24201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会	開催年
The second workshop on 'Genetic diversity and molecular breeding in cultivated mushrooms'	2019年～2019年

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	上海農業科学院	吉林農業大学		
韓国	建国大学校			
中国	吉林農業大学	上海市農業科学院		
韓国	慶尚大学校			
中国	上海市農業科学院食用菌研究所	吉林農業大学		
韓国	慶尚大学校			
タイ	チェンマイ大学	メイファールアン大学		
米国	クラーク大学			
イスラエル	ヘブライ大学			
ハンガリー	生物学研究センター			
オランダ	ワーゲニンゲン大学			
アルメニア	エレバン大学			
ジョージア	ジョージア農業大学			