

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03013

研究課題名(和文)きのこのゲノム編集技術を利用した木材腐朽現象の理解とバイオマス変換系の構築

研究課題名(英文) Understanding of wood decay phenomena and construction of biomass conversion system using genome editing technology of mushroom

研究代表者

五十嵐 圭日子 (Igarashi, Kiyohiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80345181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：きのこの多くは、木材を栄養源として生育する木材腐朽菌である。きのこが作る子実体を食品や薬として古来から利用しているが、木材分解メカニズムや子実体形成メカニズムには依然として不明な点が多い。本研究の目的は、ゲノム編集技術を利用して木材腐朽現象を理解し、新しいバイオマス変換系の構築に応用することである。本研究では、これまで散漫な情報しか無かった木材腐朽菌の薬剤耐性に対する網羅的なデータ取得に成功するとともに、ゲノム編集技術を用いて担子菌ウシグソヒトヨタケ(*Coprinopsis cinerea*)のバイオマス分解関連酵素の変異にも成功し、木材腐朽現象の理解に繋がる実験手法を獲得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、木材の物質変換を司っている木材腐朽菌(きのこ)にゲノム編集技術を応用し、木質バイオマス新しいバイオマス変換系の構築を試みた。木質バイオマスを前処理無しで糖化できる技術開発や、セルロースナノファイバーなどの高付加価値な素材を木材から低エネルギーで生産する技術開発を行い、それをきのこ生産現場で展開することによって林業や林産業への雇用創出や気候変動への貢献につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Most mushrooms are wood-rotting fungi that grow on wood as a nutrient source. Although the fruiting bodies produced by mushrooms have been used as food and medicine since ancient times, the mechanisms of wood decomposition and fruiting body formation remain largely unknown. The purpose of this study is to understand the wood rot phenomenon using genome editing technology and to apply it to the construction of a new biomass conversion system. In this study, we succeeded in obtaining comprehensive data on antibiotic resistance of wood-rotting fungi, for which only scattered information had been available so far. We have also succeeded in mutating enzymes related to biomass degradation in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, suggesting that we were able to acquire experimental techniques that lead to a better understanding of wood decay phenomena.

研究分野：バイオマス生物学

キーワード：木材腐朽菌 きのこ ゲノム編集 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

きのこの多くは、木材を栄養源として育つ「木材腐朽担子菌」に属する糸状菌であり、一般的にはエノキタケやシイタケのような食品として認識されているのは、それらの子実体と呼ばれる部分である。きのこ生産の市場規模は年間 2,000 億円程度であるが、これは（木材や紙生産を含めた）全林産物の市場規模の約半分、特用林産物（きのこや炭、栗など）の市場の約 9 割を占める重要な産業であると同時に、木質バイオマスを利用して純利益を生み出しているバイオマス利用の鏡とも言える産業である。一方、きのこを生物学的に見てみると、地球上で唯一単独で木材の三大成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを分解することができる生物であり、自然界の炭素循環で重要な役割を担っていることが知られている。きのこは、木材を分解する時に木材成分を分解する酵素を細胞外に分泌し、固体である木材の主要成分を水に可溶性化合物にまで分解し、その酵素反応生成物である糖分を主な栄養源として生きている。言い換えると、体外に木材の消化系を有する強力な生物と言える。人類が長年きのこを栽培しそれらを食品として利用してきた事実や、きのこによる木材の分解機構に関する研究がすでに 100 年近くの歴史があることを考えると、きのこによる木材分解メカニズムや子実体形成メカニズムがすでにきちんと理解され、その上でコントロールできていると誤解されるかも知れないが、実はきのこの生態や様々な有機物の分解メカニズムはほとんど理解されておらず、人類に極めて近いところで生活している未知の生物というのがその実態なのである。そのような木材を溶かすことができる生物の酵素系は、特に国土における森林率の高い我が国では非常に魅力的な研究テーマであると言える。きのこを食用として食べるだけでなく、きのこの生産する酵素を使うことで木材（特に廃木材や間伐材など）から目的に合わせて化学成分を取り出すことができることになる。昨今、欧州を中心に盛んになってきているバイオエコノミー（環境に負荷をかけない経済活動）を実現するためにも、すでに市場としてできあがっており、さらに木質バイオマスの利用に大きく貢献できる酵素系を持つきのこを自由に使いこなすことは、森林国に住む私たちにとって極めて重要と言える。

しかしながら、この様に様々な化合物に対する分解力の強さは、研究を行う上では諸刃の剣である。一般的にこのような微生物の遺伝子組換えを行う時は、成長することができない濃度の抗生物質を添加し、組換えが成功した場合にそれを単離できるように抗生物質耐性を発現する遺伝子との組合せで研究を行うが、きのこは野生種であっても市販の抗生物質に対してかなりの高濃度まで耐性を持つため、安定な遺伝子組換え系の構築が極めて難しい生物なのである。そのためきのこの分子生物学的研究は、同じ真菌に含まれる酵母やカビなどと比較して極端に遅れており、それがきのこによる木材分解メカニズムの解明を阻んでいると言っても過言ではない。「きのこはどのように木材を分解しているのか」を明らかにする事で、木質バイオマスの高度利用のヒントを得るのが本研究の大命題であるとともに重要なテーマである。

2. 研究の目的

本研究では、近年分子生物学の分野で注目されているゲノム編集技術をきのこに応用し、そのバイオマス変換機構を明らかにするとともに、きのこの生産システムを木質バイオマス変換系として利用するという独創的なアプローチで研究を行う。研究代表者はこれまで、遺伝子組換え系の使えない木材腐朽菌において、全ゲノム配列情報や全分泌タンパク質（セクレトーム）解析手法を世界に先駆けて導入し、細胞外木質バイオマス分解酵素群に関する情報を集めてきた。さらにそれらを、メタノール資化性酵母によって大量生産する実験系を立ち上げ、酵素による生化学的なバイオマス変換を目指してきた。これらのアプローチは全て、一般的な分子生物学的手法が適用しにくいきのこを用いるための苦肉の策として行ってきた研究であるが、その経験を活かして本申請においてもきのこの特殊性を考慮した解析法やスクリーニング法を試みる。

3. 研究の方法

I. 抗生物質の選抜

木材腐朽菌は様々な化合物の分解性を有する生物種であり、そのため分子生物学的手法を用いるための抗生物質がうまく機能しないことが難点である。そこで、これまで木材腐朽菌およびその他の糸状菌に用いられてきた抗生物質 6 種 (Blasticidin S, Carboxin, Geneticin, Hygromycin B, Puromycin, Zeocin) を、4 菌種 (*Coprinopsis cinerea* #326、*Gloeophyllum trabeum* NBRC 6430、*Phanerochaete chrysosporium* K3、*Postia placenta* MAD 698-R) に対して MYG 培地または Wood 培地で様々な濃度で再検討する実験を行った。

II. *Coprinopsis cinerea* を用いたゲノム編集実験

Coprinopsis cinerea (ウシグソヒトヨタケ) の様々な遺伝子 (Cel16A, Cel16B, Cel16C, Cel16D, Cel17A, Cel17B, Cel17C, GH51Ara, CDH, PDH) 破壊用の CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。*C. cinerea* のプロトプラストを調製し、ポリエチレングリコール (PEG) /CaCl₂ 法を用いて遺伝子導入を行った。

4. 研究成果

I. 抗生物質の選抜

表 1 に示すように各菌の各抗生物質耐性を比較したところ、*P. chrysosporium* がどの抗生物質にも非常に高い抵抗性を示した。これは、本菌が長年木材腐朽菌のモデル生物として使われてきたにもかかわらず、未だに組換え系が構築できていない主原因であることが確認できた。その一方で全ての菌において Carboxin が非常に低濃度で成長を阻害することが分かり、本抗生物質を組換えに用いることが重要であると考えられた (図 1)。

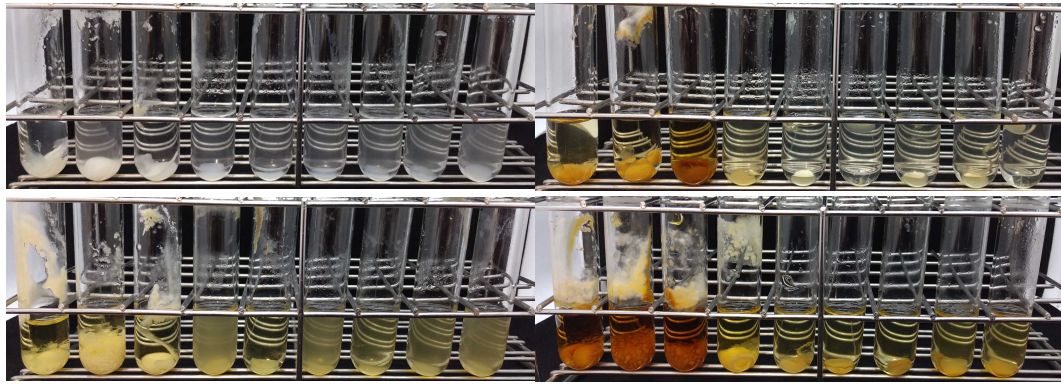


図1 Carboxin を加えた Wood 培地(上段)およびMYG 培地(下段)で *P. chrysosporium* (左) および *G. trabeum* (右) を培養した結果。Carboxin 濃度はいずれも左から 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml

表1 菌糸成長させないために必要な抗生物質の最低濃度 (µg/ml)

	Zeocin		Hyg B		Geneticin		Blasticidin		Puromycin		Carboxin	
	Wood	MYG	Wood	MYG	Wood	MYG	Wood	MYG	Wood	MYG	Wood	MYG
<i>Ccin</i>	*	(-)	*	10	*	300	*	(-)	*	(-)	*	5
<i>Pchr</i>	(-)	500	300	200	300	500	(-)	(-)	(-)	(-)	10	25
<i>Gtra</i>	(-)	(-)	300	50	500	50	(-)	(-)	(-)	(-)	10	25
<i>Ppla</i>	(-)	300	500	10	(-)	50	(-)	(-)	(-)	(-)	5	5

(-) : 100 µg/ml 以下では完全に阻止できない。

* : *C. cinerea* はグルコースを炭素源とした wood 培地では抗生物質を添加しない対照区においても生育が悪かったため、比較できない。

II. *Coprinopsis cinerea* を用いたゲノム編集実験

表2に示すように、遺伝子破壊を試した10種類の遺伝子のうち5種類に関してはコロニーの選抜に成功し、それぞれの挿入もしくは欠失の状態をシーケンシングによって明らかにした。以上の結果から木材腐朽菌でバイオマス分解関連遺伝子のゲノム編集に始めて成功したと言える。

表2 *C. cinerea* 変異株のうち、PCR, シーケンシングで変異が入ったと確認されたもの

酵素	コロニー	in/del	酵素	コロニー	in/del	酵素	コロニー	in/del
GH6B	#4	67 塩基挿入	CDH	#1	1 塩基挿入	CDH	#11	1 塩基挿入
GH6B	#13	41 塩基挿入	CDH	#2	1 塩基挿入	CDH	#16	1 塩基挿入
GH6C	#4	48 塩基挿入	CDH	#3	1 塩基挿入	CDH	#17	1 塩基挿入
GH6C	#15	37 塩基欠失	CDH	#4	1 塩基挿入	CDH	#18	1 塩基挿入
GH51	#14	14 塩基欠失	CDH	#9	1 塩基挿入	CDH	#20	28 塩基欠失
PDH	#19	1 塩基欠失	CDH	#10	1 塩基挿入			

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Uchiyama, T., Uchihashi, T., Ishida, T., Nakamura, A., Vermaas, J. V., Crowley, M. F., Samejima, M., Beckham, G. T., and Igarashi K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Lytic polysaccharide monooxygenase increases cellobiohydrolases activity by promoting decrystallization of cellulose surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Adv.	6. 最初と最後の頁 eade5155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ade5155	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 該当する
1. 著者名 Kojima, K., Sunagawa, N., Yoshimi, Y., Tryfona, T., Samejima, M., Dupree, P., and Igarashi, K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Acetylated xylan degradation by glycoside hydrolase family 10 and 11 xylanases from the white-rot fungus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Appl. Glycosci.	6. 最初と最後の頁 35-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2021_0017	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 該当する
1. 著者名 Kojima, K., Sunagawa, N., Mikkelsen, N. E., Hansson, H., Karkehabadi, S., Samejima, M., Sandgren, M., and Igarashi, K.	4. 巻 298
2. 論文標題 Comparison of glycoside hydrolase family 3 -xylosidases from basidiomycetes and ascomycetes reveals evolutionarily distinct xylan degradation systems.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 101670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101670	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 該当する
1. 著者名 Matsuyama Kaori, Kishine Naomi, Fujimoto Zui, Sunagawa Naoki, Kotake Toshihisa, Tsumuraya Yoichi, Samejima Masahiro, Igarashi Kiyohiko, Kaneko Satoshi	4. 巻 295
2. 論文標題 Unique active-site and subsite features in the arabinogalactan-degrading GH43 exo- α -1,3-galactanase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18539 ~ 18552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.016149	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 Yamaguchi Sora, Sunagawa Naoki, Tachioka Mikako, Igarashi Kiyohiko, Samejima Masahiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Thermostable Mutants of Glycoside Hydrolase Family 6 Cellobiohydrolase from the Basidiomycete <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ;	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 79 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0004	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 Igarashi, K., Kaneko, S., Kitaoka, M., and Samejima, M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of C-6 methylol groups on substrate recognition of glucose/xylose mixed oligosaccharides by cellobiose dehydrogenase from the basidiomycete <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Appl. Glycosci.	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0003	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 Fujii, T. Igarashi, K., and Samejima, M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Single amino Acid mutation of pyranose 2-oxidase results in increased specificity for diabetes biomarker 1,5-anhydro-D-glucitol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Appl. Glycosci.	6. 最初と最後の頁 73-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0002	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kiyohiko Igarashi
2. 発表標題 Nordic Polymer Conference/Nordic Polymer Days 2021
3. 学会等名 Enzymatic degradation and synthesis of crystalline cellulose (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐 圭日子
2. 発表標題 セルロース分解酵素の中性子構造と古くて新しい加水分解反応メカニズム
3. 学会等名 iBIXタンパク質構造研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐 圭日子
2. 発表標題 植物細胞壁の生分解と生合成を模した循環型もの作り
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会 (つくば) 大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyohiko Igarashi
2. 発表標題 Breaking and making cellulose by enzymes: Perspective on biomass research in Japan and Scandinavia
3. 学会等名 JSPS-ACD hybrid seminar: Biosustainable Chemistry from Biomass (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐 圭日子
2. 発表標題 次世代バイオマス変換技術: サーキュラーバイオエコノミー実現のためにいかに酵素を利用するか
3. 学会等名 神戸大ワークショップ2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木根啓太, 五十嵐圭日子, 大霜晶子, 刑部祐里子, 刑部敬史
2. 発表標題 担子菌Coprinopsis cinereaにおけるゲノム編集を用いた糖質関連酵素ノックアウト株の作出
3. 学会等名 第70回木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐圭日子
2. 発表標題 糸状菌が生産するバイオマス分解酵素の分子から原子レベル解析
3. 学会等名 植物バイオテク談話会特別セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五十嵐圭日子
2. 発表標題 微生物の力を借りて「機構崩壊」を止める：バイオエコノミー
3. 学会等名 SEEDS Conference 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>セルロースの表面を溶かして分解する酵素の機能を解明 70年にわたる議論に終止符 https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20221224-1.html キノコとカビにおけるヘミセルロース分解戦略の微妙な違い https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20220225-1.html 枝をよけながら幹を切る:複雑な糖鎖を分解できる酵素のユニークな構造 https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20201027-2.html</p>

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	飛松 裕基 (Tobimatsu Yuki) (20734221)	京都大学・生存圏研究所・教授 (14301)	
研究分担者	高畠 幸司 (Takabatake Koji) (50446621)	琉球大学・農学部・教授 (18001)	

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0件

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			
英国	ケンブリッジ大学			
スウェーデン	スウェーデン農業科学大学	ウプサラ大学		
米国	ミシガン州立大学	国立再生可能エネルギー研究所		