

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05700

研究課題名（和文）シイタケゲノム編集技術の確立と子実体保存性関連遺伝子の解析

研究課題名（英文）Establishment of Lentinula edodes genome editing technology and analysis of genes related to preservation of fruiting body

研究代表者

佐藤 利次（Sato, Toshitsugu）

北見工業大学・工学部・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）：シイタケでは、Cas9タンパク質gRNA複合体（RNP）によるゲノム編集技術がいまだに確立されていない。本研究では、2核株の確実な遺伝子破壊・改変のための1核胞子の保存条件と、RNPによるゲノム編集技術の確立を目的にsgRNAの設計とシイタケ由来の薬剤耐性遺伝子を用いたドナーベクターの構築を行なった。その結果、採取直後の発芽率約3%の胞子が、発芽率を1%維持できる日数が-80℃で60日であることが明らかとなった。また、シイタケ由来のsdci-p遺伝子を人工的に1塩基置換によってカルボキシン耐性を付与するcbxへ変換するドナーベクターと、lcc1遺伝子を破壊するためのドナーベクターを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シイタケではいまだに確立されていない、外来遺伝子を細胞に残さないCas9タンパク質gRNA複合体（RNP）によるゲノム編集技術を確立することを目的としている。この技術の確立は、遺伝子組換え体とならない実用化可能なシイタケの育種技術となるため、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：In *Lentinula edodes*, genome editing technology by Cas9 protein-gRNA complex (RNP) has not yet been established. In this study, we examined the conditions for spore preservation, and also the design of sgRNAs for the *sdci-p* and *lcc1* genes and the construction of donor vectors for each gene modification in order to establish genome editing by RNPs. As a result, it was revealed that spores with a germination rate of approximately 3% immediately after collection from fruiting body could maintain a germination rate of 1% for 60 days at -80°C. We also constructed donor vectors to convert the *sdci-p* gene in *L. edodes* to *cbx*, which confers carboxin resistance by artificial single nucleotide substitution, and to replace the *lcc1* gene with *cbx* to destroy the *lcc1* gene.

研究分野：農学

キーワード：シイタケ ゲノム編集 CRISPR/Cas9 RNP 胞子 sgRNA ドナーベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シイタケは、重要な食用キノコの1つであるが、遺伝子組換え技術は未だ発展途上にある。これまでシイタケの遺伝子機能を解明する研究としては、我々がアンチセンス法(Sato et al., J Biosci Bioeng, 2019年)とRNAi法(Sato et al., Microbiol Res, 2011)を報告した他は、RNAi法に関しては2報が報告されたのみ(Konno et al., J Agric Food Chem, 2014, Wang et al., Fung Genet Biol, 2018)であった。近年、遺伝子機能解析技術は、CRISPR/Cas9によるゲノム編集が簡便かつ有効なことから主流になっているが、担子菌に関する報告は、2021年時点では4報のみであり(Sugano et al., Sci Rep, 2017, Qin et al., Proc Biochem, 2017, Chen et al., Front Microbiol, 2018, Vonk et al., Sci Rep, 2019)シイタケでは未だに確立されていなかった。その後、2021年と2023年にCas9発現ベクターを導入する方法で、シイタケでのゲノム編集が報告された(Moon et al., Mycobiology, 2021, Kamiya et al., FEMS Microbiol Lett, 2023)しかし、この方法では、得られた形質転換体は遺伝子組換え体となり、実用化には適さない。

この方法とは別に、試験管内でCas9タンパク質とsgRNAの複合体(Cas9タンパク質sgRNA複合体:RNP)を形成させて、細胞に導入する方法があり、この方法では外来遺伝子を細胞に残さないため、得られた細胞は組換え体とならずに実用化が可能である。しかし、この方法によるシイタケのゲノム編集技術は、未だに確立されていない。我々は、当初よりこの方法によるシイタケのゲノム編集技術の確立を目指した。

一方、育種目標である保存性に関与する遺伝子として、シイタケの褐変原因遺伝子としてチロシナーゼ(*tyr*: Sato et al., 2009)とラッカーゼ(*lcc4*: Nagai et al., 2003)や、子実体保存後の遺伝子発現を制御していると考えられる転写因子様遺伝子として *expansionless1* (*exp1*)様遺伝子(Sakamoto et al., 2009)を明らかとしてきたが、それらの遺伝子破壊と褐変抑制の関連については不明のままである。

我々が報告したRNAiベクターによる目的遺伝子の発現抑制研究では、発現抑制は確認できるが、生育時期によっては必ずしも発現が抑制されていないことが明らかになった(未報告)。この原因の1つとして、シイタケを含めた担子菌類が細胞中で2つの核がそれぞれ独立に存在しているという特殊な生活環がある。したがって、特定の遺伝子機能を解析するためには、1核菌系核中の目的遺伝子を確実に破壊した後、交配して解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シイタケでは未だに確立されていないCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を、外来遺伝子の導入の起こらないRNP法により確立すること、未だに解明されていない産業上問題になる子実体の褐変化と保存に関与する遺伝子の機能をゲノム編集技術で明らかにすること、得られた遺伝子破壊株を実用化に直結させることである。

本研究では、ゲノム編集による特定遺伝子の確実な破壊を達成するために、1核菌系である胞子のゲノム編集技術の確立を目指し、胞子の保存条件の検討、ゲノム編集のターゲットとするモデル遺伝子のsgRNAの設計と*in vitro*における切断の確認、及び設計したsgRNAとCas9タンパク質によるRNP法によるシイタケ細胞への導入を試みた。

3. 研究の方法

- (1) 胞子の保存条件の検討シイタケの胞子は、常時入手できないため、子実体を形成させたときに、大量に回収して保存しておき、必要に応じて遺伝子導入実験等に使用する必要がある。そこで、これまで形質転換に用いてきた SR-1 株と市販株の子実体から胞子を回収して、胞子の冷蔵(4)保存あるいは冷凍(-80)保存後における胞子の発芽率を求めた。また、保護剤として、グリセロールとスクロースの影響に関して検討した。
- (2) *sdc-ip* の *cbx* への変換用 sgRNA と *lcc1* 破壊用 sgRNA のデザインと *in vitro* での切断の確認
シイタケにおけるゲノム編集を確立するためのモデル遺伝子として、シイタケ *sdc-ip* 遺伝子に一塩基変異導入によって作成したカルボキシシン耐性遺伝子 *cbx* と、RNAi ベクターによる解析実績のあるシイタケラッカーゼ遺伝子 *lcc1* に注目した。それらの遺伝子の破壊のための sgRNA を、CRISPRdirect により設計し、*in vitro* での切断の有無を確認した。
- (3) *sdc-ip* の *cbx* への変換用ドナーベクターと *lcc1* 遺伝子破壊のためのドナーベクターの構築
cbx ドナーベクターの sgRNA 直下の PAM 配列 AGG をアミノ酸の変異が起こらない AGA への変換を、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit を用いて行った。*lcc1* 遺伝子破壊のためのドナーベクター構築のために、プロモーターとターミネーターを含む *lcc1* のゲノム遺伝子断片を PCR により調製し、構造遺伝子部分を *cbx* に入れ換えたドナーベクターを構築した。
- (4) RNP 法によるシイタケの遺伝子破壊
CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊を行うために、2) で切断が確認できた sgRNA と 3) で調製したドナーベクターを用いて、Cas9 と sgRNA の RNP を形成後、シイタケプロトプラストへの導入を試みた。

4. 研究成果

市販株の子実体から胞子を回収して、胞子の冷蔵あるいは冷凍による保存条件に関して検討した。シイタケの各株の発芽率は2%から3%であり、各株の保存後の発芽率は、4 よりは-80 が高い傾向にあった。また、1%の発芽率が保持される保存期間は、4 では30日、-80 では60日であった。保護剤としてのグリセロールとスクロースには、発芽率向上の効果は確認されなかった。これにより、遺伝子導入のための胞子の収集は、2ヶ月に1回で十分であることが明らかとなった。

シイタケゲノム編集による破壊を想定しているモデル遺伝子 *lcc1* に関して、1本鎖のガイドRNA (sgRNA) を3種類設計し、委託合成後、試験管内で切断が確認できるかどうかに関して検討した。Cas9は市販の酵素を用いて、ターゲット遺伝子をPCR増幅し、3種類の1本鎖のガイドRNAとともに試験管内で反応させたところ、1種類が比較的その切断が良好であることが確認された。また、遺伝子破壊株の選抜のために必要なマーカー遺伝子として、シイタケの内在性遺伝子である *sdc-ip* に1塩基変異を導入して1アミノ酸を変異させたカルボキシシン耐性遺伝子 *cbx* を利用するため、*sdc-ip* 破壊のためのsgRNAを3種類デザインし、*in vitro* での切断を確認した。その結果、3種類とも切断が確認されたが、特に切断効率の高いsgRNAを1種類選抜した。

一方、ドナーベクターを用いて *sdc-ip* を *cbx* に変換する場合、Cas9が認識するPAM配列がsgRNA認識部位に残ってしまうため、*sdc-ip* の *cbx* へ変換されても *cbx* の切断が起こってしま

う。したがって、ドナーベクターのPAM配列をPAM配列でない配列に変換しておく必要がある。そこで、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitを用いて、*cbx* ドナーベクターのsgRNA直下のPAM配列AGGをアミノ酸の変異が起こらないAGAへの変換を行ったところ、Cas9によって切断されない目的のドナーベクターが構築できた。

次に、*lcc1* 遺伝子のsgRNAを利用し、ドナーベクターを利用した相同組換えによる*lcc1* 遺伝子の破壊を試みた。*cbx* を選抜マーカー遺伝子として、*lcc1* 遺伝子の構造遺伝子領域を*cbx* に入れ替えたドナーベクターを用いてシイタケへの導入を試みた。その結果、ドナーベクターのみではカルボキシ耐性株が得られたが、ドナーベクターとCRISPR/Ca9 RNPではカルボキシ耐性株は得られなかった。現在、ドナーベクターの改変を試みている。また、PAM配列を改変したドナーベクターによる2核株と胞子株の*sdc-ip* 遺伝子の薬剤耐性遺伝子*cbx* 遺伝子への変換を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 佐藤利次	4. 巻 44
2. 論文標題 シイタケの遺伝子導入研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 きのこ研だより	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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 Kamiya, A., Ueshima, H., Nishida, S., Honda, Y., Kamitsuji, H., Sato, T., Sumita, T., Izumitsu, K., Irie, T.	4. 巻 370
2. 論文標題 Disruption of the pyrG gene via CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination and its use as a novel selectable marker gene in Lentinula edodes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnad042	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神谷彩音、上島拓輝、本田与一、佐藤利次、上辻久敏、西田翔太、稲垣翔太、泉津弘佑、住田卓也、入江俊一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9発現カセットの一時的導入によるシイタケPyrGの相同組換え
3. 学会等名 22年度日本菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷彩音、上島拓輝、本田与一、佐藤利次、上辻久敏、西田翔太、稲垣翔太、泉津弘佑、住田卓也、入江俊一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた相同組換えによるシイタケpyrGの破壊と選択マーカー遺伝子としての利用
3. 学会等名 23年度木材学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本 郁生、大畑 早弥香、橋本 侑香、吉田 一生、佐藤 利次
2. 発表標題 シイタケ子実体関連遺伝子exp1の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 未由太、野地岡 侑輝、佐藤 利次
2. 発表標題 ラッカーゼ発現に変異が生じたシイタケ組換え体のラッカーゼ遺伝子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷彩音、上島拓輝、本田与一、佐藤利次、上辻久敏、西田翔太、稲垣翔太、泉津弘佑、住田卓也、入江俊一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9発現カセットの一時的導入によるシイタケPyrGの相同組換え
3. 学会等名 2023年度木材学会大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------