

機関番号：10106

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510193

研究課題名（和文） 逆遺伝学的手法による食用担子菌の子実体関連遺伝子の解析

研究課題名（英文） Construction of novel RNAi vectors for analysis of fruiting body-related genes in edible basidiomycete fungi *Lentinula edodes* by reverse genetic 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

研究成果の概要（和文）：食用担子菌シイタケの子実体関連遺伝子の機能解析を目的に、特定の遺伝子発現を抑制する道具（遺伝子発現抑制ベクター）の作成（構築）に関して検討を行った。遺伝子発現抑制ベクターとして、遺伝子発現を制御する配列（プロモータ）2種類で発現抑制遺伝子配列を挟む形のベクターを構築した。これにより、発現抑制遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖を同時に発現させ、RNA 干渉（遺伝子発現抑制を引き起す減少）を誘導できる。このベクターにより子実体関連遺伝子の解析が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To analyze genes related fruiting body, we constructed novel RNAi vectors for *Lenitnula edodes*. Novel RNAi vectors carry two convergent opposing promoters, and a target gene between promoters. Independent transcription of a target gene from each promoter would produce a sense and antisense RNAs in the cell, which would induce RNAi. It is expected that the obtained vectors are useful for the function analysis of fruiting body related genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：食用担子菌、シイタケ、RNAi ベクター、遺伝子発現抑制、子実体関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 担子菌は、通常は異なる haploid の2つの核からなる2核菌糸 (dikaryon) として栄養増殖するが、最終的に生殖器としての子実体を形成するという、生物界において特異

な生活環を有している。この子実体が、いわゆるキノコであり、食用として利用され、医薬品の原料になる場合もある。また、近年、食用担子菌の栽培技術が確立され、その生産が増加している。しかし、子実体形成に係わ

る遺伝子やその分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。また、その育種は、現在でも時間のかかる交雑法（従来法）で行われているため、育種に要する時間を短縮するためにも、食用担子菌の遺伝子解析技術の開発が望まれている。

(2) 担子菌の遺伝子解析は、モデル生物としてのウシグソヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) において、最近ゲノム配列が決定されるなど、比較的進んでおり、子実体関連遺伝子として、子実体の開傘に関与する遺伝子 *expl* (Muraguchi *et al.*, Fungal Genet Biol, 45, 890-896, 2008) や、キノコの柄の伸長に関与する遺伝子 *eIn3* (Arima *et al.*, Fungal Genet Biol, 41, 805-12, 2004) などが単離されている。担子菌の逆遺伝学的解析手法としての遺伝子発現抑制法に関しては、相同組換えを利用した遺伝子破壊法が確立されているスエヒロタケとクロボ菌を除くと、最近スエヒロタケとウシグソヒトヨタケで RNAi 法が報告されているだけである (Namekaawa *et al.*, Microbiology, 151, 3669-3678, 2004; Malti *et al.*, Eukaryot Cell, 5, 732-744, 2006; Heneghan *et al.*, Mol Biotechnol, 35, 283-96, 2007)。RNAi 法は、相同組換えを利用した遺伝子破壊法に比べて、手法的に比較的簡便で、目的の組換え体が得られる効率が高いなどの利点がある。また、RNAi 法は、dikaryon であるキノコの解析としては、遺伝子破壊法よりも有利である。

(3) これまでに申請者らは、シイタケ子実体関連遺伝子として、子実体特異的に発現している遺伝子をクローニングした (Hirano *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem, 68, 468-472, 2004)。また、シイタケに含まれている抗癌多糖レンチナン（細胞壁成分の β -1,3-グルカン）が子実体の保存中に減少す

ることから、その抑制を目的にレンチナン分解酵素である β -1,3 グルカナーゼ遺伝子 (Sakamoto *et al.*, Plant Physiol, 141, 793-801, 2006; Sakamoto *et al.*, Curr Genet, 48, 195-203, 2005) を2種類 (*exg2* と *tIgl1*) クローニングした。これらの遺伝子は子実体保存過程後半で高発現している細胞壁分解酵素であることから、老化関連遺伝子と考えられる。また、シイタケの遺伝子発現抑制法に関して、開始コドンから約 40bp の長さの inverted repeat 配列を発現するベクター (*ivr* ベクター) 導入により遺伝子発現抑制を示す予備的結果を得ている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、日本で重要な食用担子菌であるシイタケに関して、RNAi 法による遺伝子発現抑制の効果を子実体の成熟と老化に関連する遺伝子に関して検討し、その有効性を確認することを目的とする。遺伝子発現抑制の効果を確認する遺伝子として、前述の *expl* と *eIn3* 相同性遺伝子、及び、*exg2* と *tIgl1* を候補とする。

(2) 申請者らは、シイタケに関して子実体形成時の遺伝子解析を行い、この時期に特異的に発現している遺伝子として、新規の機能未知の遺伝子などを得ている (Hirano *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem, 68, 468-472, 2004)。また、シイタケ子実体の成熟と老化関連遺伝子に関して、新鮮な子実体と保存後の子実体をサブトラクション法で解析し、それぞれのステージで特異的に発現している遺伝子を多数単離した (研究業績文献④)。さらに、この時期に特異的に発現している遺伝子としては、他の生物種と相同性を有する遺伝子が少なく、新規遺伝子が多いという予備的な結果を得ている。しかしながら、遺伝子解析技術の開発が遅れている食用担子菌に関しては、有効な遺伝子発現抑制技術が確

立されていないために、その機能解析ができていないのが現状である。その点で、産業的にも重要な食用担子菌における遺伝子発現抑制技術としての RNAi 法を確立することは、非常に意義のある研究である。

(3) 一方、申請者らは、これまでにシイタケ遺伝子由来のプロモータを利用したベクター-pLG-hph (Hirano et al., Mol. Gen. Genet., 263, 1047-1052, 2000) やシイタケ由来の薬剤耐性遺伝子ベクター-pL-Cbx (Irie et al., Biosci Biotechnol Biochem, 67, 2006-2009, 2003) を開発した。これらのベクターを基に、遺伝子発現抑制技術としての RNAi 法が開発できれば、遺伝子組換え体とみなされないセルフクロニング株の造成も可能となる。したがって、シイタケの RNAi 法を確立することは、非組換え体有用株育種への応用が可能となり、実用上もその意義は大きい。

(4) 上述のように、ウシグソヒトヨタケ子実体の開傘に関与する遺伝子 *exp1* や柄の伸長に関与する遺伝子 *eIn3* (Arima et al., Fungal Genet Biol, 41, 805-12, 2004) の相同性遺伝子 (研究業績文献④) が、シイタケでも同様の形質に関与することが RNAi 法によって確認できれば、モデル担子菌の遺伝子機能が食用担子菌においても共通性を有していることが証明できることになる。これによって、モデル担子菌のウシグソヒトヨタケのゲノム情報が、食用担子菌の育種に応用できる可能性が示され、極めて意義深いといえる。

3. 研究の方法

(1) inverted repeat 配列発現ベクター及びアンチセンス鎖発現ベクターの構築

ベクター構築に当たっては、シイタケ・グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子

(*gpd*) プロモータを利用した既存のベクター-pLG-hph を基に、新たに単離したシイタケキチン合成酵素遺伝子 (*chs*) プロモータを組合せた新規ベクター-pChG ベクターに、マルチクロニングサイト (MCS) を付加した改良型ベクター-pChG' (図 1) をベクターの鋳型として利用した。目的の発現抑制遺伝子は、開始コドンから約 40bp の構造遺伝子領域のセンス鎖とアンチセンス鎖の間に、約 60bp のシイタケラッカーゼ 1 遺伝子 (Sakamoto et al., Appl Microbiol Biotechnol, 79, 971-980, 2008) のイントロン 2 配列が並ぶような配列 (約 150bp) をデザインし、その全長のセンス鎖とアンチセンス鎖を合成した。この配列は、それぞれ発現抑制遺伝子の 5' 末端構造遺伝子約 40bp が inverted repeat 配列を形成することになる。次に、このセンス鎖とアンチセンス鎖の合成遺伝子は、アニール後に、pChG' ベクターの MCS への挿入を試みた。本ベクターに関しては、発現抑制の対象遺伝子として、*exp1* と *exg2* の 2 種類に関して検討した。また、*tlg1* に関しては、ゲノム DNA の coding 配列のアンチセンス鎖を pChG' ベクターに挿入した。

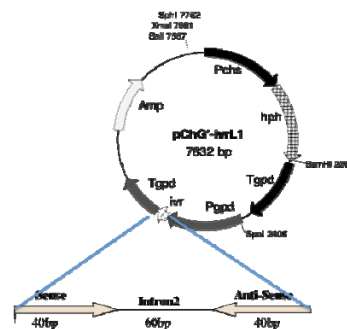


図 1 シイタケ *lcc1* 遺伝子発現抑制ベクター-pChG' -ivrL1 の模式図

(2) 新規 RNAi ベクターの構築

新規 RNAi ベクターとして、2 種類のプロモータで目的遺伝子を挟み、それぞれのプロモータでセンス鎖とアンチセンス鎖を発現

させるベクターの構築を試みた。pChG' ベクター (図 1) を基にして、*gpd* 遺伝子プロモータを一つ目のプロモータとし、2つ目のプロモータとして、シイタケ *chs* 遺伝子プロモータ、あるいは、シイタケ・コハク酸脱水素酵素 IP サブユニットタンパク質遺伝子 (*sdc-ip*) プロモータを、*gpd* 遺伝子プロモータ下流の *gpd* 遺伝子ターミネータと入れ替えることとした。pChG' ベクターを鋳型として、*gpd* 遺伝子プロモータ下流の *gpd* 遺伝子ターミネータを除外するようにプライマーをデザインし、ベクター領域を PCR で増幅した。*chs* 遺伝子プロモータは pChG' ベクターを鋳型に、*sdc-ip* 遺伝子プロモータは pL-Cbx ベクターを鋳型にして、それぞれ約 1 kb を PCR で増幅した。ベクター領域と 2 つ目のプロモータ領域を既存のライゲーションキットを用いてそれぞれ結合させた。

4. 研究成果

(1) inverted repeat 配列発現ベクター及びアンチセンス鎖発現ベクターの構築

pChG ベクターは、シイタケ *gpd* 遺伝子プロモータを利用したシイタケ発現ベクターである pLG-hph (Hirano *et al.*, Mol Gen Genet, 263, 1047-1052, 2000) を基に、新たに単離したシイタケ *chs* 遺伝子 (研究業績③) プロモータを利用して作成した pLCHS-hph ベクター (研究業績②) をそれぞれ PCR で必要部分を増幅した後に、結合させたベクターである。本ベクターは、薬剤耐性遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子発現を *chs* 遺伝子プロモータで発現させ、他にもう一つの遺伝子を *gpd* 遺伝子プロモータで発現させることのできるベクターである (研究業績②)。また、pChG' ベクターは、pChG ベクターの *gpd* 遺伝子プロモータ下流に MCS を付加したベクターである (研究業績①)。本ベクターに関しては、予備的な研究でシイタケ *lcc1* 遺伝子を

方法 1) の手法で構築した約 40bp の inverted repeat 配列発現 (図 1) により、*lcc1* 遺伝子発現抑制が確認できた (研究業績①)。

発現抑制遺伝子としての *exp1* (研究業績文献④) と *exg2* 遺伝子 (Sakamoto *et al.*, Curr Genet, 48, 195-203, 2005) に関しては、それぞれの cDNA 情報を基に、*lcc1* 遺伝子の場合と同様に構築を試みたが、pChG' ベクターへのそれぞれの遺伝子の inverted repeat 配列を挿入することができなかった。Inverted repeat 配列の存在がベクター構築を困難にしていたと考えられる。一方、*tlg1* 遺伝子 (Sakamoto *et al.*, Plant Physiol, 141, 793-801, 2006) に関しては、アンチセンス鎖発現ベクター pChG-tlg1a が構築できたことから、シイタケに導入した。得られた pChG-tlg1a 導入シイタケ菌について、子実体形成させて子実体の保存試験を行ったが、少なくとも宿主株と比較して視覚的な相違は認められなかった。これまでシイタケでは、アンチセンス発現では、RNAi よりも発現抑制が弱いことが示唆されている (未報告) ことから、本結果もそれを反映している可能性が考えられる。そこで、次に構築しやすい RNAi ベクターの改良に取り組んだ。

(2) 新規 RNAi ベクターの構築

新規 RNAi ベクターとして、2種類のプロモータで目的遺伝子を挟み、それぞれのプロモータでセンス鎖とアンチセンス鎖を発現させるベクターの構築を試みた。抑制遺伝子配列を挟むシイタケ由来の 2 つのプロモータとして、片方のプロモータは pChG' ベクター由来のシイタケ *gpd* 遺伝子を利用し、もう一つのプロモータとしてシイタケ *chs* 遺伝子、あるいは、*sdc-ip* 遺伝子プロモータを利用した新規 RNAi ベクターの構築を試みた。はじめに、既存の DNA Ligation kit Ver. 2.1

(タカラバイオ) を用いて構築を試みたが、うまく構築できなかった。そこで次に、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech) を用いて、構築を試みた。その結果、2つ目のプロモータとして *chs* 遺伝子プロモータを用いた pChG^C (pSilent-Le1) と、*sdc-1p* 遺伝子プロモータを利用した pChG^S (pSilent-Le2) の2種類のベクターが構築できた (図2)。

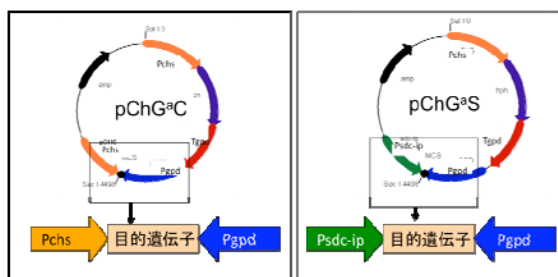


図2 新規 RNAi ベクターの模式図

現在、これらのベクターに上記の子実体関連遺伝子断片の挿入を行っている。今後、目的の RNAi ベクターをシイタケに導入し、得られた組換え体の解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①Keiko Nakade, Yuichi Sakamoto, Hisayuki Watanabe, Toshitsugu Sato (2011) Gene silencing of *Lentinula edodes lcc1* gene by expression of homologous inverted repeat sequence. Microbiol Res, in press 査読有
 ②Toshitsugu Sato, Kumiko Okawa, Tatsuya Hirano (2011) Construction of novel vectors for transformation of *Lentinula edodes* using chitin synthase gene promoter. J Biosci Bioeng, 111, 117-120 査読有
 ③Toshitsugu Sato, Kumiko Okawa, Tatsuya Hirano (2010) Cloning and characterization of *Lentinula edodes* class II chitin synthase gene, *LeChs2*. Biosci Biotechnol Biochem, 74 (8), 1707-1709 査読有

④ Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Toshitsugu Sato (2009) PCR subtraction, Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body. Curr Genet, 55, 409-423 査読有

⑤佐藤利次 (2009) シイタケの形質転換と子実体収穫後に発現する遺伝子、バイオサイエンスとインダストリー、67巻、316-319 査読なし

[学会発表] (計1件)

①中出ら、Establishment of RNAi method in *Lentinula edodes*. 25th Fungal Genetics Conference, 2009.3.17-22, Asilomar, CA, USA

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: プロモーター遺伝子及び発現ベクター
 発明者: 佐藤利次、齋藤久美子、平野達也、江井 仁

権利者: 岩手県

種類: 特許

番号: 特許第 4610044 号

取得年月日: 2010.10.22

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.kitami-it.ac.jp/laboratory/satou/>

<http://koho2.office.kitami-it.ac.jp/cgi-bin/WebObjects/souran.woa/2/wo/YbXmK3P1L1tjg7B9sBdA5w/1.1.19.8.1.0>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし