

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780149

研究課題名（和文）効率的な遺伝子発現抑制技術を利用した担子菌類の遺伝子解析手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of effective gene disruption tools for gene functional analysis in basidiomycetous fungi.

研究代表者

坂本 裕一（SAKAMOTO YUICHI）

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：80390889

研究成果の概要（和文）：食用担子菌類（きのこ）において、効率的な遺伝子破壊技術を確立する目的で、遺伝子破壊ベクターの構築、及び耐性マーカー遺伝子回収技術開発を試みた。シイタケにおいて、DelsGate 法により、効率的に遺伝子破壊ベクターを構築する手法を開発した。更にそのベクターに loxP 配列を挿入することに成功した。現在のところ、シイタケにおいて、得られたベクターによる破壊株はまだ得られていないことから、条件検討が必要である。また、シイタケにおいて、一核菌糸体において子実体形成を負に制御していると考えられる *pcc1* 遺伝子、及び非相同組み換えに関わる *Ku80* 遺伝子のクローニングに成功した。今後これらの破壊株を作出することで、一核菌糸体で子実体を発生し、かつ遺伝子組換え効率の高い菌株が得られると期待できる。また、シイタケにおいては、遺伝子組換えに時間がかかることから、条件検討を効率化するために、ウシグソヒトヨタケの系を利用することとした。そこで、ウシグソヒトヨタケの遺伝子破壊用カセットに、loxP 配列を挿入した。今後はまず、ウシグソヒトヨタケにおいて、マーカー回収技術を確立し、その後シイタケにおける破壊系を確立することを予定している。

研究成果の概要（英文）：To establish effective gene disruption tool for edible basidiomycetous fungi (mushrooms), gene disruption vector system and resistant marker gene recycling system were constructed in *Lentinula edodes*. First, a gene disruption vector system was constructed by using DelsGate method, and then the loxP sequences were inserted the vector construction system. Unfortunately, no gene disrupted mutant was obtained yet. The *pcc1* gene that is a negative regulator in monokaryotic strain, and the *ku80* that is involved in non-homologous DNA joint were cloned in *L. edodes*. If the gene could disrupted, the strain can form fruiting body without mating, and the strain have high efficiency for homologous recombination. To test Cre-loxP system in basidiomycetous fungi, faster than *L. edodes*, loxP sequences were inserted gene disruption cassette for *C. cinerea*. Marker recycling system will be test in *C. cinerea* in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生産、育種

1. 研究開始当初の背景

シイタケは日本で古来より栽培されている食用きのこ（担子菌類）で、現在日本で最も栽培されており、林業経営における貴重な収入源となっている。一方近年は中国など、海外でも盛んに栽培されており、国際競争にさらされている。そこで、従来の経験に基づいた交配育種にかわる、効率的な育種手法の開発が急務となっている。また、シイタケにはエリタデニン（血圧の調整作用）やレンチナン（抗腫瘍活性）などの薬用成分も含むことから、生理活性を有する成分に着目した育種手法の開発も求められている。

効率的な育種のためには、子実体形成や薬用成分合成経路に関わる分子機構の解明が必須である。シイタケを含む担子菌類は、胞子由来の二核菌糸体（n:半数体）が交配することでヘテロな核を持つ二核菌糸（n+n）となり、大型の子実体（きのこ）分化能を獲得する。このように、担子菌類は動植物や真菌類と比較してもユニークな生活環を持つ。しかしながら、子実体形態形成等に関する分子機構の研究は、植物の形態形成に関する研究と比較して非常に遅れている。

（財）生物工学研究センター（以下岩手生工研）では、世界で初めてシイタケにおける遺伝子組換えが可能であることを実証し⁽¹⁾、相同組み換えによる遺伝子組換え技術の確立を行った。また申請者らは、標的遺伝子に変異の入った菌株を迅速にスクリーニングする **TIILING** 法をシイタケに適用する研究を進めており、遺伝子組換えを行わない育種法を開発している。そこで、より多くの育種目標に対応するために、効率的な遺伝子機能解析技術が不可欠である。遺伝子発現抑制には遺伝子破壊法があるが、きのこ類はヘテロな2核を持つこと、及び遺伝子破壊には長い遺伝子配列情報が必要であることから、これまできのこ類にはほとんど適用されていなかった。しかしながら、近年他の菌類において効率的な遺伝子破壊技術が確立されたこと、及びシイタケにおいても全ゲノム配列が明らかにされつつあることから、遺伝子破壊技術開発のための基盤が整っている。

2. 研究の目的

食用、薬用きのこ（担子菌類）であるシイタケにおいて、遺伝子機能解析技術を確立し、育種上有用な遺伝子を特定する技術を開発する。本研究では、子実体形成などに関わる遺伝子の発現抑制方法の確立を目指し、シイタケにおいて遺伝子破壊法を開発を行う。さらに、遺伝子破壊効率が高く、一核菌糸体（半数体）で子実体を形成するシイタケ菌株を開発することで、子実体形成に関連する遺伝子の機能解析を効率化することを目的として

いる。また、最終目的として、シイタケ栽培に関わる重要形質に関連する遺伝子の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) DelsGate 用のベクター構築

遺伝子破壊用のベクター構築には、**DelsGate 法** (Fungal Genet Biol. 2008:379-388) を改変した手法を用いた。構築方法を図1及び図2に示す。

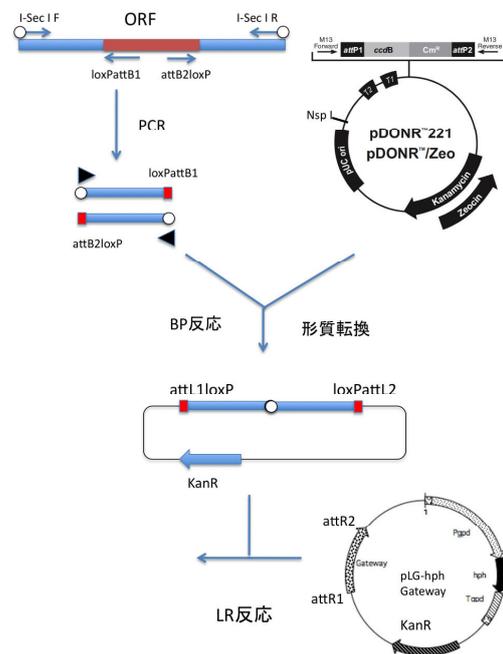


図1.ベクター構築（図2に続く）

はじめに、ベクター構築手法を確立するために、既にゲノム配列情報の明らかになっていた **Lcc1** 遺伝子の破壊用ベクターの構築を試みた。ベクター構築に使用したプライマーは下記の通り。

I-sec-3'-lcc1 の配列

AAAAATTACCCTGTTATCCCTATATACA
GACAACGAGAAGATGCTTG （下線部は、I-Sec I 認識配列）

loxP-attB1-lcc1 配列

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG
CTATATAACTTCGTATAATGTATGCTATA
CGAAGTTATTATTGAGTGGCTGTTTGT
GAGATA （下線部は loxP 配列、斜体文字は att 配列）

I-secI-5'-lcc1 の配列

AAAATAGGGATAACAGGGTAATAAAGA
GAGCGATAATAGGGAATGAT (下線部は、
I-Sec I 認識配列)

loxP-attB2-lcc1 の配列

GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG
GTATATAACTTCGTATAGCATACATTATA
CGAAGTTATCTCGACCTTGTGATTCTA
ATTCT (下線部は loxP 配列、斜体文字は att
配列)

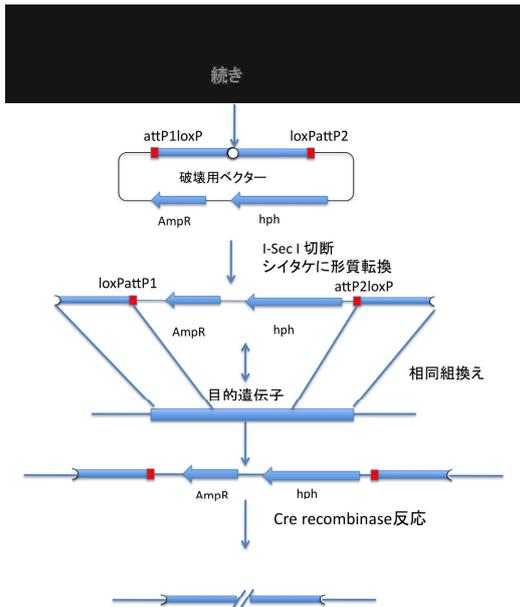


図 2.ベクター構築続き

プライマー-I-sec-3'-lcc1 (図 1 I-sec I F 相当) と loxP-attB1-lcc1(図 1 loxPattB1 相当)のセット、I-secI-5'-lcc1(図 1 I-sec I R 相当)と loxp-attB2-lcc1 (図 1 I attB2loxP 相当)を用い、シイタケゲノム DNA をテンプレートに PCR を行った。得られた断片を pDONR221 と BP 反応を行い、さらに pLG-hph Gateway と LR 反応を行った。得られた破壊用ベクターを I-Sec I で切断し(図 2.)、シイタケに形質転換を行った。

(2) シイタケ形質転換方法

シイタケの相同組み換えによる形質転換法は、入江らの方法 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:2006-2009; 2003 年) をもとに行った。

(3) pcc1 遺伝子、ku80 遺伝子のクローニング

両遺伝子のクローニングには、(公財) 岩手生物工学研究センターで解析を行った、シイタケゲノム配列情報をもとに、プライマー設計し、配列決定を行った。

(4) Lcc1 破壊株の解析

Lcc1 破壊株の作製には時間がかかることから、既に作成していた RNAi 法による遺伝子発現抑制株 (中出ら Microbiol Res. 2011) 166(6):484-93)を解析した。ivrL1#32 株の菌糸形態を走査型電子顕微鏡、及び透過型電子顕微鏡で観察した。

(5) ウシグソヒトヨタケの loxP-破壊ベクターの構築

担子菌類において、Cre-loxP 法による耐性マーカー遺伝子回収技術を早期に開発するために、すでに、Ku70 破壊株が作出されているウシグソヒトヨタケの破壊系 (中沢ら: Fungal Genetics and Biology 48(2011) 939-946) に loxP 配列を導入した。ウシグソヒトヨタケのハイグロマイシン発現カセットを、loxP 配列を付加したプライマーで増幅し、pCR2.1-TOPO に TA クローニングした。

4. 研究成果

(1) Lcc1 破壊ベクター構築

Lcc1 特異的配列を付加したプライマーセット (I-sec-3'-lcc1 × loxP-attB1-lcc1; I-secI-5'-lcc1 × loxp-attB2-lcc1) で PCR を行い、pDONR221 と BP 反応を行ったところ、目的通り pDONR221 に両 PCR 断片が組み込まれた。さらに、シイタケにおけるハイグロマイシン耐性マーカー発現カセット及び Gateway 配列が挿入された pLG-hph Gateway と LR 反応を行ったところ、目的断片が pLG-hph Gateway ベクターに挿入された。さらに、I-sec I で切断したところ、目的の切断断片が確認できた。

そこで、シイタケに形質転換をおこなったところ、残念ながら遺伝子組換え株は得られなかった。現在、相同遺伝子配列の長さなどを検討している。

(2) pcc1 遺伝子のクローニング

ウシグソヒトヨタケの pcc1 遺伝子の配列をもとに、シイタケから pcc1 遺伝子のクローニングを試みた。しかしながら、相同性が低いことから、直接クローニングすることは難しかった。そこで、周辺の遺伝子が保存されていることを利用して、pcc1 遺伝子のクローニングを行った。pcc1 遺伝子を挟んで、RNA binding protein, Acetolactate synthase 遺伝子が保存されていることから (図 3)、両遺伝子の配列をクローニングし、内部の DNA を

PCRにより増幅し、シーケンスを行ったところ、pcc1と相同な配列を得ることが出来た。得られた pcc1 遺伝子の発現をリアルタイムPCRで確認したところ、一核菌糸体で発現が高く、二核菌糸体で発現が高いことから、pcc1 遺伝子そのものであることが確認できた。

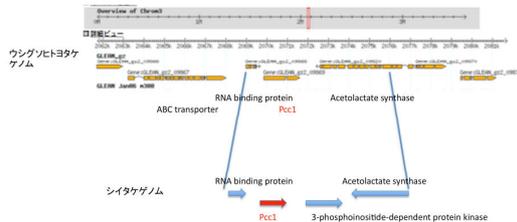


図 3. pcc1 遺伝子付近のゲノム構造

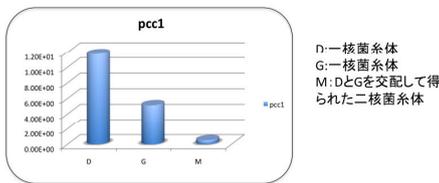


図 4. pcc1 遺伝子の発現様式

(3) Ku80 遺伝子のクローニング

Ku80 は、非相同組換えに関わる遺伝子であり、同遺伝子を破壊すると、相同組み換え効率が格段に上がることが多くの菌類で報告されている。また、担子菌類においても、非常に高く保存されている遺伝子である。ウシグソヒトヨタケの Ku80 と相同性の高い配列がシイタケゲノム配列からも見つかった。そこで、遺伝子をクローニングした結果、ウシグソヒトヨタケ Ku80 と 48%の相同性を示した。

(4) Lcc1 発現抑制株の解析

これまでに、ラッカーゼときのこの形態形成に関して関連があると報告があり、以前に RNAi 法によりラッカーゼを抑制したところ、菌糸形態及び、細胞壁に異常が生じることを明らかにしている(中出ら)。本課題においては、Lcc1 を破壊用ターゲットとして破壊ベクターを構築していることから、その機能について、より詳細に調べた。発現抑制株では、相補試験が行えないことから、Lcc1 酵素を培地に直接添加し、形態変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察した。その結果、菌糸形態が正常に戻ることに及び細胞壁も野生株とほぼ同様の形態に回

復することが明らかとなった。

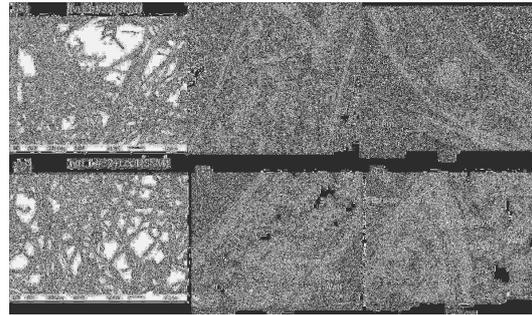


図 5. ラッカーゼ添加による形態変化 (A)ivrL1#32(SEM)ラッカーゼ添加無し (B、C) ivrL1#32(TEM)ラッカーゼ添加無し (D)ivrL1#32(SEM)ラッカーゼ添加有り (E、F) ivrL1#32(TEM)ラッカーゼ添加あり

(5) ウシグソヒトヨタケにおける Cre-loxP システムの開発

シイタケにおいては、遺伝子破壊自体が困難であることが予想されたことから、既に遺伝子破壊技術が確立されているウシグソヒトヨタケにおいて、耐性マーカー回収技術を確認し、その後にシイタケに応用することを考え、ウシグソヒトヨタケにおいて、Cre-loxP 法によるマーカー回収技術をためすこととした。そこで、既存の破壊ベクターに、loxP 配列を挿入することとした。既存のハイグロマイシン耐性マーカー発現カセットの両端に設計したプライマーに loxP 配列を付加し、PCR を行ったところ、目的のバンドを得ることが出来た。得られた PCR 産物を pCR2.1-TOPO ベクターに TA クローニングした。得られた loxP 付加ハイグロマイシン発現カセットは、目的遺伝子特異的配列プライマーを用い、オーバーラップ PCR 法により、遺伝子破壊用カセットを作成することが出来る。

4-6. 今後の予定

本研究により、シイタケにおいて効率的な、遺伝子破壊用ベクター構築手法を確立することが出来たが、残念ながら破壊株の作出までにはいたらなかった。今後は、ウシグソヒトヨタケの系で Cre-loxP 法による耐性マーカー遺伝子回収技術を確認し、シイタケにおいて遺伝子破壊に関する条件検討を進めていく予定である。シイタケにおいて、遺伝子破壊技術が確立できれば、本研究において既に単離した Ku80, pcc1 の破壊株を作出し、

効率的な遺伝子破壊及び表現型の確認が行えるようになる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Naotake Konno and Yuichi Sakamoto, An endo- β -1,6-glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body autolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有、91(5)、2011、1365-1373、
DOI: 10.1007/s00253-011-3295-2
- ② Sakamoto Y., Nakade K., Konno N., Endo- β -1,3-glucanase, GLU1, from *Lentinula edodes* fruiting body belongs to a new glycoside hydrolase family, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有、77(23)、2011、8350-8354、
DOI: 10.1128/AEM.05581-11
- ③ Konno N., Takahashi H., Nakajima M., Takeda T., Sakamoto Y., Characterization of beta-N-acetylhexosaminidase (LeHex20A), a member of glycoside hydrolase family 20, from *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), *AMB express*, 査読有、2、2012、29、
DOI: 10.1186/2191-0855-2-29
- ④ 坂本裕一、シイタケ収穫後の子実体老化に関与する酵素の研究、*日本きのこ学会誌*、査読有、19(2)、2011、73-78、
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110008711281>
- ⑤ Nakade K., Watanabe H., Sakamoto Y., Sato T., Gene silencing of the *Lentinula edodes* *lcc1* gene by expression of a homologous inverted repeat sequence, 査読有、*Microbiological Research*, 166、2011、484-493、
DOI: 10.1016/j.micres.2010.09.004
- ⑥ Nakade K., Nakagawa Y., Yano A., Sato T., Sakamoto Y., Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis*, 査読有、*Fungal Biology*, 114、2010、609-618、
DOI: 10.1016/j.funbio.2010.05.002
- ⑦ Yuichi Sakamoto, Protein expression during *Flammulina velutipes* fruiting body formation, *Mycoscience*, 査読有、51、2010、163-169、
DOI: 10.1007/s10267-010-0032-0

[学会発表] (計 6 件)

- ① 坂本裕一、環境刺激に応答するきのこの子実体発生、2012、静電気学会バイオプロセス・プラズマ研究会 (招待講演; 岩手大学)
- ② Yuichi Sakamoto, Transcriptome analysis of the autolysis after harvesting of the *Lentinula edodes* fruiting body, 2011、

Asian Mycological Congress (招待講演; 韓国、仁川)

- ③ 中出啓子、坂本裕一、分泌型ラッカーゼ (Lcc1) RNAi 抑制株におけるシイタケ細胞壁構造の変化、2011、糸状菌分子生物学コンファレンス (東京大学)
 - ④ Sakamoto, Y., Nakade, K Characterization of biological function of laccases in *Lentinula edodes*, 2010、International Mycological Congress 9th
 - ⑤ 坂本裕一、シイタケにおける形態形成と細胞壁分解酵素の発現挙動、2010、日本きのこ学会 2010 年度大会 (招待講演; 東京大学)
 - ⑥ Sakamoto, Y., Nakade, K., Konno, N., Enzymes involved in fruiting body senescence in *L. edodes*., 2010、The 6th Meeting of East Asia for Mushroom Science (韓国、慶州)
- [図書] (計 1 件)
- ① Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Naotake Konno, Toshitsugu Sato, Senescence of the *Lentinula edodes* fruiting body after harvesting 書名: Food Quality, 出版社: Intech, 2012
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)

名称: β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ
発明者: 金野尚武、坂本裕一
権利者: 岩手県
種類: 特願
番号: 2012-009380
出願年月日: 2012 年 2 月 14 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: L-DOPA を蓄積する植物細胞及びその利用
発明者: 中塚貴司、高橋秀行、山田恵理、坂本裕一、関口拓史、佐々木伸大、小関良宏、西原昌宏
権利者: 岩手県
種類: 特開
番号: 2012-55208
取得年月日: 平成 23 年 3 月 22 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 裕一 (SAKAMOTO YUICHI)
公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員
研究者番号: 80390889