

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580454

研究課題名(和文) 食用担子菌による効率的なラッカーゼ等の有用タンパク質発現系の確立

研究課題名(英文) Development of an effective laccase gene expression system by the edible basidiomycete *Lentinula edodes*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：食用担子菌による効率的なラッカーゼ等の有用タンパク質発現系を確立することを目的に、シイタケの遺伝子導入法の改良とラッカーゼ遺伝子の発現を試みた。その結果、遺伝子導入法に関しては、プロトプラスト調製法を簡便化できた。また、シイタケラッカーゼ遺伝子 *lcc1* 発現ベクターを構築しシイタケに導入したところ、宿主よりも2倍以上ラッカーゼ活性の高い株を得た。また、異種ラッカーゼとして漆のラッカーゼ遺伝子を単離し、cDNAの全配列を決定した。

研究成果の概要(英文)：To develop an effective useful protein expression system by edible basidiomycetous fungi, improvements of *Lentinula edodes* transformation method and laccase gene expression in *L. edodes* were studied. As a result, we were able to simplify the protoplast preparation method. Further, as a result of *L. edodes* transformation by laccase gene expression vector pChG-clcc1, a transformant exhibited more than two times higher laccase activity compared to the host was obtained. In addition, we isolated a laccase gene of lacquer (*Toxicodendron vernicifluum*) as a heterologous laccase gene for expression by *L. edodes*, and sequenced the full length of the laccase cDNA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：食用担子菌 シイタケ ラッカーゼ プロトプラスト 発現ベクター 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

担子菌類は、産業的に有用な酵素類としてリグニン分解酵素等を特異的に生産し、子実体(キノコ)成分の中には医療・健康面で有用な成分を含むことが明らかになっている糸状菌である(Zaidman *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol, 67, 453-468, 2005)。遺伝子解析技術は、これらの有用成分の生産性を高めるために、その生産メカニズムを解析する上で不可欠の技術である。しかしながら、担子菌類の遺伝子解析技術は他の生物に比べて遅れているのが現状である。

遺伝子解析技術の基本技術の一つは遺伝子導入法であるが、食用担子菌(シイタケやヒラタケなどの食用キノコ)では、従来法(ポリエチレングリコール(PEG)とCaCl₂により遺伝子を細胞内に導入する方法(PEG-CaCl₂法)、Noh *et al.*, J Microbiol, 48, 253-256, 2010)や、エレクトロポレーションによる方法(電氣的に細胞に穴を開けて遺伝子を導入する方法、Kuo and Huang, J Microbiol Methods, 72, 111-115, 2008)などが報告されているが、操作の煩雑さや再現性に問題がある。また、担子菌類の遺伝子発現ベクター系(遺伝子を発現させるための道具)に関しても、再現性に問題がある。したがって、食用キノコでは、より簡便な遺伝子導入法の確立と確実な遺伝子発現ベクター系の開発が望まれている。

一方、リグニン分解酵素は担子菌が分泌するリグニンを分解する酵素類で、産業上有用な酵素である。特にラッカーゼは基質特異性が広く、バイオレメディエーション(環境汚染物質の除去など)や、染料やパルプの脱色など多様な利用が期待されている(Christian *et al.*, Ind J Exp Biol, 43, 301-312, 2005、S. Riva, TRENDS in Biotechnol, 24, 219-226, 2006、Alcalde *et al.*, TRENDS in Biotechnol, 24, 281-287, 2006)。最近では、木質バイオ

マスのバイオエタノール等への変換時の前処理への利用も注目されている。市販ラッカーゼは、比較的発現が高い非食用キノコである *Trametes* 属菌類から生産されているが、これらの菌類に関しても効率的な遺伝子導入法は確立されていない。また、担子菌由来のラッカーゼは至適 pH が酸性に傾いており、実用上の効率やコストなどの点から、バイオレメディエーションに関しては実用化に至っていない。

漆(*Toxicodendron vernicifluum*)のラッカーゼは、至適 pH が中性域のラッカーゼである(Casella *et al.*, J Inorg Biochem, 100, 2127-2139, 2006)。漆は中国などからの輸入が90%以上を占めるが、それらの中には遅乾漆(乾きにくい漆)が存在し、ラッカーゼ活性の低下が一因と考えられている(大藪, 色材, 70, 404-413, 1997)。また、漆は高価であるため、その産業利用は限られている。ラッカーゼの産業利用を考えた場合には、安全性の点で、食経験のある食用キノコによるこれら有用酵素の生産が有効と考えられる。また、食用キノコに関しては、医薬品原料としての需要も期待できることから、食用キノコにおける再現性のある効率的な遺伝子導入法と高効率な遺伝子発現ベクター系の構築は非常に重要であり、その開発が求められている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、日本の食用キノコの中で最も重要なキノコの一つであるシイタケに関して、遺伝子導入法を確立し(Sato *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem, 62, 2346-2350, 1998)、遺伝子発現ベクターを開発した。その一つである pChG ベクターは、構成的発現(常時発現している)が確認されている解糖系の酵素グリセルアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ遺伝子(*gpd*)とキチン合成酵素遺伝子(*chs*)のプロモータ(遺伝子が有してい

るタンパク質情報を、どの時期にどの程度生産するかを指示する DNA 配列) で外来遺伝子を発現させるベクターで、2 種類の薬剤耐性遺伝子発現に有効であることを確認した(発表論文)。また、光誘導性エレメント(光に応答して遺伝子の発現を制御するタンパク質が結合する DNA 配列)を有するシイタケ・チロシナーゼ遺伝子(*tyr*; チロシン等を酸化する酵素で、メラニン合成に関与し、シイタケひだの褐変に関与する)を単離し(Sato *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1042-1047, 2009)。そのプロモータ(光誘導性が期待されるプロモータ)による遺伝子発現ベクター-pChT を構築した(未報告)。本ベクターは、光照射による遺伝子発現の上昇が期待される。

一方、我々はこれまで、シイタケのラッカーゼに関して、分泌型ラッカーゼ 2 種類と細胞内型のラッカーゼ 1 種類が、染料の脱色や環境ホルモン類の減少に有効であることを明らかとし(Nagai *et al.*, *Mushroom Science XVI*, 573-578, 2004)。その遺伝子 2 種類を単離した(Sakamoto *et al.*, *Curr Genet*, 55, 409-42, 2009, Sakamoto *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 971-980, 2008)。

本研究では、申請者らがこれまで進めてきた研究をさらに進展させて、食用キノコ、特にシイタケにおいて簡便で再現性のある遺伝子導入系を確立することと、外来遺伝子を効率よく発現するための確実性の高い遺伝子発現ベクターを開発することを目的とする。発現させる遺伝子としては、リグニン分解酵素の一つであるラッカーゼ遺伝子(*lcc*)を用いる。ラッカーゼは、産業上有用で、キノコで高発現させるには非常に適した酵素である。本研究では、ラッカーゼ遺伝子としては、シイタケ由来の分泌型ラッカーゼ遺伝子(*lcc1*)と、漆由来のラッカーゼ遺伝子を用いる。また、シイタケ等にこれらベクターを導入す

る方法として、エレクトロポレーションによる菌糸への直接導入法に関して、従来法の PEG-CaCl₂ 法による遺伝子導入法の簡便化に関して検討する。

3. 研究の方法

(1) シイタケ用ベクターの構築

シイタケの外来遺伝子発現ベクターとして、構成的発現プロモータである *gpd* 遺伝子プロモータを利用したベクター-pChG(発表論文)と、シイタケの光誘導性プロモータであるチロシナーゼ遺伝子(*tyr*)プロモータを利用したベクター-pChT に、シイタケ *lcc1* 遺伝子を挿入した発現ベクターを構築した。また、これまでに構築した RNAi ベクター-pChG^{aS} で、シイタケ *lcc1* 遺伝子発現抑制を行うベクター-pChG^{aS}-cL1 も用いた。なお、コントロールベクターとしてこれまでシイタケで実績のある pLG-hph(Hirano *et al.*, *Mol Gen Genet*, 263, 1047-1052, 2000)を利用した。

(2) 遺伝子導入法の検討

プロトプラスト(裸の細胞)の調製

従来法の PEG-CaCl₂ 法による遺伝子導入法に関して検討するために、プロトプラストの調製に関して、使用する細胞溶解酵素と、シイタケ菌糸の前培養方法に関する条件検討を行った。特にシイタケでは、申請者らが確立した従来法の細胞壁溶解酵素(前出、Sato *et al.*, 1998)における chitinase 濃度に関して、chitinase を別途廉価なものに変更して検討した。また、プロトプラスト調製時に調製するシイタケ菌糸の前培養方法に関して、簡便化するために本培養菌糸接種時の残存菌糸の再利用に関して検討した。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入

エレクトロポレーションに関しては、菌糸への直接導入法として、裁断菌糸 10⁷ 個の生細胞に対して、pLG-hph ベクターの導入につ

いて検討した。

PEG-CaCl₂法(従来法)による遺伝子導入

PEG-CaCl₂法に関しては、REMI法(前出、Sato *et al.*, 1998)による形質転換を行った。

(3) 漆からのラッカーゼ遺伝子の単離と解析

漆 (*Toxicodendron vernicifluum*) からラッカーゼ遺伝子 (*Tvlcc*) を単離するために、既に報告されている情報 (Nitta *et al.*, *J Inorg Biochem*, 91, 125-131, 2002) を基に、プライマーをデザインした。このプライマーを用いて、漆の葉から抽出した RNA を逆転写した後、PCR 法等により遺伝子の単離を試みた。得られた増幅断片は、配列を確認後、その配列情報を基に、RACE 法によって、全長 cDNA 配列の決定を試みた。また、配列決定後、全長 cDNA を PCR によって増幅して、サブクローニングし、配列決定を行った。

4. 研究成果

(1) シイタケ発現ベクターの導入と解析

発現ベクターの構築に関しては、外来遺伝子発現プロモータとして構成的発現遺伝子 *gpd* プロモータを利用した pChG ベクターと、光誘導性遺伝子 *tyr* プロモータを利用したベクター-pChT に、シイタケ *lcc1* 遺伝子を挿入した pChG-*lcc1* と pChT-*lcc1* をそれぞれ構築した。これらのベクターを、従来法であるプロトプラストを用いた PEG-CaCl₂ 法によってシイタケに導入したところ、形質転換体を得られ、その解析を行った。その結果、pChG-*lcc1* 導入株に関しては、宿主株よりもラッカーゼ活性が 2 倍以上高い組換え株の存在が確認できた(学会発表)。また、*gpd* 遺伝子プロモータからの *lcc1* 遺伝子の発現が、RT-PCR 法により確認できた(学会発表)。

一方、pChT-*lcc1* 導入株に関しては、ベクター導入株は単離できたものの、光照射による *lcc1* 遺伝子発現誘導は確認できなかった。また、シイタケラッカーゼ遺伝子 *lcc1* 発現

抑制ベクター-pChG^{as}-cL1 導入株に関して解析を行ったところ、*lcc1* 遺伝子の発現抑制が確認できた(学会発表)。

(2) 遺伝子導入法の検討

遺伝子導入法に関してはエレクトロポレーションによる裁断菌糸への直接導入法について検討した。その結果、10⁷ 生細胞程度の懸濁液に対して、電圧 1000V による裁断菌糸へのシイタケ薬剤耐性遺伝子発現ベクター-pLG-hph の導入を試みたが、組換え体は得られなかった。

次に、プロトプラスト調製法の簡便化に関して検討を行った。その結果、本培養時に残存する菌糸の再利用が 5 回まで可能であることが明らかとなり、前々培養の省略が可能となった。また、細胞壁溶解酵素のキチナーゼの使用量を約 1/4 まで減少でき、これまで使用してきた高額なキチナーゼを廉価な酵素に代替できることが明らかとなった。

(3) 漆からのラッカーゼ遺伝子の単離と解析

漆からのラッカーゼ遺伝子の単離のために、漆の葉から RNA を調製し、cDNA を合成した後、3' 及び 5' RACE 法によりウルシラッカーゼ遺伝子 cDNA 全長の配列をカバーする *Tvlcc* 遺伝子断片を単離し、その配列を決定した。その結果、既知情報と、DNA 配列で 15 塩基、推定アミノ酸配列で 8 残基の相違があることが明らかとなった。また、本解析の結果、ウルシラッカーゼ遺伝子 cDNA の、5' 非翻訳領域、N 末端のシグナルペプチド領域、及び 3' 非翻訳領域の配列を、新規に明らかにした(学会発表)。次に、この配列情報を基に、全長 cDNA 約 1.7kbp を PCR で増幅後、サブクローニングして DNA 配列を決定した。その結果、既知情報と DNA 配列で 4 塩基の違いが確認され、推定アミノ酸配列には相違がないことが明らかとなった。今後、この遺伝子

断片をシイタケ発現ベクター-pChG に挿入した発現ベクターを構築し、シイタケに導入した後、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4件)

Masaru NAGAI and Toshitsugu SATO (2014) Production of plant cell wall-degrading enzymes in *Lentinula edodes* and the important role of laccase in early stages of solid-state cultivation. *Mushroom Science and Biotechnology* (日本きのこ学会誌), Vol. 22 (3) 114-120 (2014)

Keiko Nakade, Yuko Nakagawa, Akira Yano, Naotake Konno, Toshitsugu Sato, Yuichi Sakamoto (2013) Effective induction of pblac1 laccase by copper in *Polyporus brumalis* ibrc 5015. *Fung Biol*, Vol. 117, 52-61 査読有

Keiko Nakade, Yuichi Sakamoto, Hisayuki Watanabe, Toshitsugu Sato (2011) Gene silencing of *Lentinula edodes lcc1* gene by expression of homologous inverted repeat sequence. *Microbiol Res*, Vol.166, 484-493 査読有

Toshitsugu 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

〔学会発表〕(計6件)

但野健太ら、新規 RNAi ベクターによるシイタケ(*Lentinula edodes*) *lcc1* 遺伝子の発現抑制、日本生物工学会第66回大会、2014年9月9~11日札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

山形明史ら、ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ組換え株の解析、日本生物工学会第66回大会、2014年9月9~11日札幌コン

ベンションセンター(北海道、札幌市)

佐々木優太ら、「組換えシイタケによるラッカーゼの発現とウルシ(*Toxicodendron vernicifluum*)からのラッカーゼ遺伝子の単離」日本農芸化学会北海道支部平成24年度支部講演会、2013年11月29-30日北海道大学農学部(北海道、札幌市)

内藤真良ら、シイタケ・グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータによるシイタケ・ラッカーゼ遺伝子 *lcc1* の発現、日本農芸化学会北海道支部平成24年度支部講演会、2012年11月2-3日、北海道大学農学部(北海道、札幌市)

沢目洋史ら、ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ(*Lentinula edodes*) REMI mutant の解析-第2報-、日本農芸化学会北海道支部平成24年度支部講演会、2012年11月2-3日、北海道大学農学部(北海道、札幌市)

鈴木直之ら、ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ(*Lentinula edodes*) REMI mutant の解析、日本農芸化学会北海道支部平成23年度合同学術講演会、2011年11月5-6日北海道大学農学部(北海道、札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hanadasearch.office.kitami-it.ac.jp/searchja/show/id/1196>

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