

**キノコでゲノム編集技術を確立
-迅速なキノコ類の機能解明に期待-**国立大学法人
徳島大学**研究の背景**

キノコは、担子菌類に属する菌のうち子実体¹を形成する菌類またはその子実体部分の総称です。食用として利用される子実体を持つ代表的なキノコにはシイタケやマッシュルームがあり、世界中で栽培されているほか、抗ガン作用や抗酸化作用を持つ高機能成分を豊富に含むキノコ類も注目されています。キノコはまた、生態系において分解者として働きます。リグニンなどの難分解性の植物細胞壁成分を分解する能力をもち、自然環境のサイクルを維持する生物としても重要であり、私たちの生活に欠かすことのできない存在です。

このようなキノコの生物としての機能解明や、農作物として有用品種を作り出すためには、従来の育種技術である交配を利用した遺伝学的手法が利用されてきました。しかし、担子菌は接合²した菌糸や子実体が二核である特徴を持っており、交配によって生じる遺伝子型が複雑であるため、キノコ類の詳細で遺伝学的な研究や育種に困難な点が存在していました。また、近年のゲノム科学の発展から、様々なキノコ類で全ゲノム解読が進められており、このようなゲノム情報を活用したキノコ類の機能解明および育種開発が望まれますが、遺伝子機能解析に用いることのできる基本技術の開発も高等動植物などに比べて整備が進んでおらず、キノコ類ゲノム情報の有効活用は進んでいませんでした。

この度、徳島大学大学院社会産業理工学研究部 刑部敬史教授グループの菅野茂夫特任助教（当時；現 立命館大学助教）および大学院学生鈴木博子（当時）らは、担子菌 *Coprinopsis cinerea*（和名ウシグソヒトヨタケ 図1）を用いて、ハイスループット³遺伝子導入技術を開発しました。この技術を基に遺伝子発現に重要なプロモーター配列の迅速な解析技術や、ゲノム編集によるウシグソヒトヨタケゲノム上の遺伝子をノックアウトすることに成功し、キノコ類における逆遺伝学⁴による遺伝子機能解明を可能にしました。

研究の内容と成果

これまでの担子菌類の逆遺伝学を進める上で大きな問題点の一つである、低い遺伝子導入効率を克服するために、モデル担子菌類であるウシグソヒトヨタケを用いて、ハイスループットに遺伝子導入を行う実験系を構築しました。まず、遺伝子導入実験に使用するウシグソヒトヨタケのプロトプラスト細胞を一度に大量調製し、 -80°C の超低温保存を可能にする技術を確立しました。このことにより、従来は実験毎に毎回調製していたプロトプ

ラスト細胞を、超低温冷蔵庫から取り出すだけですぐさま実験を開始でき、また大量の実験を一度に行うことが可能となりました。この実験系を用いてプロモーターレポーターアッセイ⁵を可能にし、ウシグソヒトヨタケの遺伝子の中から高発現プロモーターを複数単離することに成功しました。これにより、迅速な遺伝子機能解析の基盤確立が出来ました。

確立したハイスループット遺伝子導入法と高発現プロモーターを用いて、次に、ゲノム編集による遺伝子ノックアウト技術の開発を進めました。私たちは、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9(クリスパーキャスナイン)を用いて、あらかじめウシグソヒトヨタケゲノム中に組み込んだ *GFP* 遺伝子をターゲットとしてゲノム編集による変異導入を試みました。本実験では CRISPR/Cas9 が働くことで *GFP* 遺伝子がノックアウトされると、もともと *GFP* 蛍光が観察されたキノコ細胞において、蛍光が消失します(図2)。私たちは、Cas9 のコドンや発現プロモーターをウシグソヒトヨタケに最適化し、新規に開発した CRISPR/Cas9 ベクターを用いることで、高頻度で *GFP* 遺伝子への変異導入が可能となりました。得られたゲノム編集キノコ菌糸では 74.7%あるいは 91.4%の割合の細胞で変異が導入され、変異が導入された菌糸では *GFP* 遺伝子の機能を失ったため、*GFP* タンパク質の蛍光も消失していました(図3)。これにより、ウシグソヒトヨタケにおいて、初めてゲノム編集が確立できました。



図1. 研究に役立つキノコ、ウシグソヒトヨタケ
牛や馬の糞あるいは堆肥に生えるキノコ。子実体が出来て、一晩で溶けてなくなることで、「ヒトヨ」タケの名前がついている。モデルキノコとして研究用として使われ、シャーレの中で子実体を作らせることが可能であり、キノコ類では初めて全ゲノムが2009年に解読された。

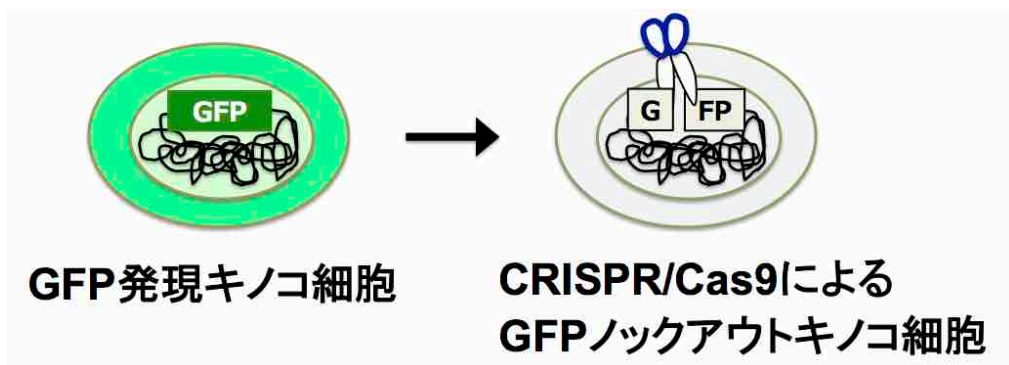


図2. CRISPR/Cas9 による *GFP* 発現ウシグソヒトヨタケ細胞のゲノム編集

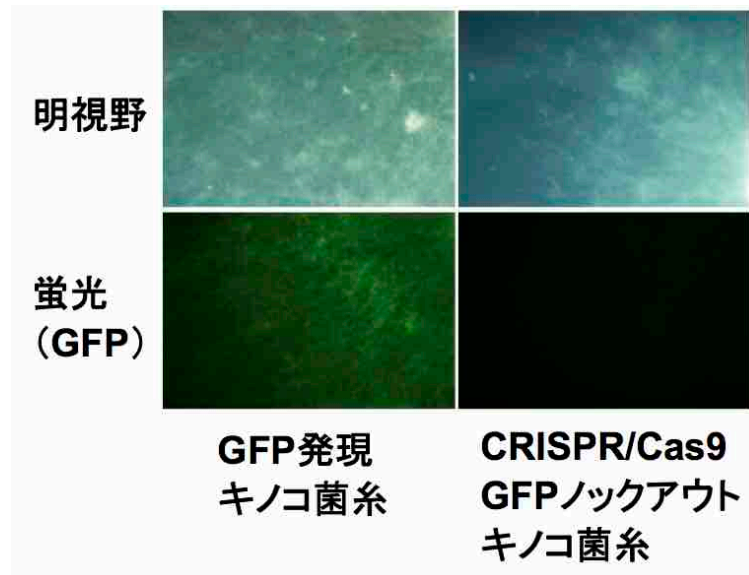


図3. ゲノム編集により *GFP* 遺伝子がノックアウトされたウシグソヒトヨタケ菌糸（右側パネル）

用語解説

1. 子実体：担子菌類が胞子をつくるために形成する複合的な構造のこと。これをいわゆる「キノコ」として私たちは利用している。
2. 接合：担子菌類を含む菌類の中には、菌糸の間で融合がおり、その時に細胞質の融合だけ生じている状態の菌糸のまま成長と分裂を続けるものがある。この菌糸を特別に二核菌糸と呼ぶ。
3. ハイスループット：低コストに多数のサンプルを処理できること。複数の条件を検討する場合、ハイスループットな実験系が構築されていると、最適な条件の探索が容易になる。
4. 逆遺伝学：注目する遺伝子の発現を欠損、抑制、あるいは亢進させて起きる表現型の変化を調べることで、その遺伝子の機能を明らかにする手法。
5. プロモーターレポーターアッセイ：機能未知のプロモーター制御下でレポーター遺伝子を発現させることで、プロモーターの活性を調べる方法。本研究では、活性が知られていないウシグソヒトヨタケの遺伝子のプロモーター制御下でルシフェラーゼ活性を測定した。

今後の展望

本研究において確立したハイスループットキノコ遺伝子導入法およびゲノム編集法を、モデルキノコであるウシグソヒトヨタケだけでなく、様々な有用キノコ類にも活用することで、キノコの多様な機能が急速に解明されていくと考えられます。さらには、キノコの品種開発にも役立つことが期待されます。

参考

本研究は、株式会社大塚製薬工場の支援により行われました。

論文情報

Sugano, SS., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y., and Osakabe, K*. (2017) Genome editing in the mushroom-forming basidiomycetes, *Coprinopsis cinerea*, optimized by high-throughput transformation system. *Scientific Reports*, 7, 1260, doi:10.1038/s41598-017-00883-5

お問い合わせ先

部局名 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部
責任者 教授 刑部敬史
電話番号 088-634-6418
ファックス番号 088-634-6419
メールアドレス kosakabe@tokushima-u.ac.jp