

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

平成30年 4月10日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団  
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 農学研究科

職 名 教授

氏 名 本 田 与 一

助成の種類	平成 29 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	ゲノム編集を用いた選択的リグニン分解菌の育種によるリグノセルロースの変換			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	選択的なリグニン分解菌の他に、モデル白色腐朽菌であるヒラタケを材料とした実験等			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 第68回日本木材学会(平成30年3月14-16日 京都市) 欧州菌類遺伝学会議サテライトワークショップ (平成30年2月25日 イスラエル)			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		研究試薬類	820,000	
		ゲノムリシーケンス料	100,000	
オリゴDNA合成料		70,000		
培地類	10,000			
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) ご支援頂きまして有り難うございました。お陰様で、科研費申請の際に計画していた実験の基板となる部分のみを進めることができ、大きな停滞を回避することができました。大学は、研究と教育の両方を車輪の両輪として実施していますので、この間の学生の教育にも大変助かりました。 今後も、京都大学の研究・教育を支えていただきますようお願い申し上げます。			

## 成果の概要/本田与一

現在、白色腐朽菌によるリグニン分解機構の分子遺伝学的研究は主にヒラタケを用いて行われている。これは、本研究室による形質転換法の開発 (Honda et al., 2000) や Salame ら(2012) によって遺伝子ターゲティング実験が可能になり、逆遺伝学的な手法により特定の酵素をコードする遺伝子を破壊した場合の、木質中のリグニン分解への影響を解析することが可能になったことに起因する。一方で生化学的研究や近年のトランスクリプトーム研究により、白色腐朽菌によるリグニン分解機構の多様性が示唆されてきており、これらをより深く理解するためにはヒラタケだけでなく様々な種における分子遺伝学研究、ならびに研究知見の比較が必要であることが考えられる。しかしヒラタケと同様の非相同性末端修復に関与する遺伝子破壊株の取得を通じた分子遺伝学的実験系を、多くの種で確立させる事は困難である。対して CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法は、Cas9 と gRNA を発現させれば、遺伝子変異を導入可能である点で、多様な白色腐朽菌種において遺伝子変異を導入できる可能性がある。本研究は、ヒラタケ及び *Ceriporiopsis subvermispora* に CRISPR/Cas9 系を導入し、これらの菌における遺伝子変異の導入を試みた結果について報告する。

### 【結果】

腐生菌ウシグソヒトヨタケのゲノム編集において利用された Cas9、gRNA 発現カセット、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) をコードした pCcPef3-126 プラスミド (Sugano et al., 2017) を用いた。ヒラタケの *fcy1* 遺伝子 [変異すると 5-Fluorocytosine (5-FC) 耐性になる] の ORF 内部配列を標的とした gRNA を発現するプラスミドを染色体上に導入した結果、得られたハイグロマイシン耐性株の 90.9% (44 株中 40 株) が 5-FC 耐性を示した。*C. subvermispora* については一過性のハイグロマイシン耐性形質転換法を用いて、同様に *fcy1* 遺伝子 *pyrG* 遺伝子 [変異すると 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 耐性になる] を標的とした gRNA を発現させるプラスミドを導入した結果、得られたハイグロマイシン耐性株の内 39.5% (43 株中 17 株) が 5-FOA 耐性を示した。ゲノム PCR で確認したところ、上記 5-FC (ヒラタケ) および 5-FOA (*C. subvermispora*) 耐性株では、標的遺伝子付近の断片が増幅されなかった。また、*C. subvermispora* では得られた *fcy1*、*pyrG* 変異株のうち 29.9% (97 株中 29 株) で継代によるハイグロマイシン耐性の喪失が観察された。ゲノム PCR で確認したところ一部のハイグロマイシン耐性が喪失した株で *hph* 遺伝子を含む断片が増幅されなかった。また同様の方法でヒラタケおよび *C. subvermispora* において、複数のリグニン分解関連遺伝子の破壊も行った。

### 【考察】

本研究では、白色腐朽菌 2 種における CRISPR/Cas9 を用いた高効率遺伝子ターゲ

ティング実験に成功した。他の生物種を用いた研究では、この手法では一般的に小規模な変異が発生するとされているが、今回用いた種においては、大規模な欠損（もしくは組換え）が発生することが示唆された。周辺遺伝子を巻き込んだ欠損などが生じている可能性も考えられ、この大規模欠損を抑制する方法を検討することは、今後の課題である。また、*C. subvermispora* においては導入したプラスミドがゲノム中に組み込まれることなく一過性に発現して、ターゲット領域においてゲノム編集を起こした後で脱落したことが示唆された。このことは、ゲノム上への外来プラスミドの導入の影響を考慮する必要がなく、くり返し使用して多重破壊を導入する事が可能であることを意味している。また、異種生物由来のDNAの導入を伴う、従来の遺伝子組換えとは異なるゲノム編集が本菌を含めた担子菌類で実施可能であることを示唆している。

#### 【参考文献】

Honda Y., Matsuyama T., Irie T., Watanabe T., Kuwahara M. (2000) *Curr. Genet.* 37, 209–212.

Salame T. M., Knop D., Tal D., Levinson D., Yarden O., Hadar Y. (2012) *AEM* 01234–12

Sugano S. S., Suzuki H., Shimokita E., Chiba H., Noji S., Osakabe Y., Osakabe K. (2017) *Scientific Reports* 7: 1260

なお、本研究の成果は、平成 30 年 3 月 14–16 日京都市にて開催された第 68 回日本木材学会大会にて発表された。