

P-5 木材腐朽菌の進化仮説を、実験室内で実証する

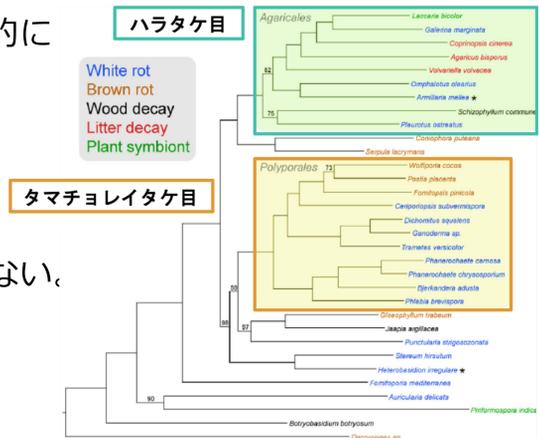


中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)

背景・目的

近年旺盛に行われた木材腐朽菌（担子菌の一部）の比較ゲノム解析の結果、木材分解機構の進化、変遷ならびに多様性に関する幾つかの興味深い仮説が提唱された。例えば、褐色腐朽菌が進化して白色腐朽菌が発生したと考えられる。特にタマチョレイタケ目 (Polyporales) においては、木材中の多糖をほとんど分解しない選択的 白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が、*Trametes versicolor* などの他の白色腐朽菌よりも褐色腐朽菌に進化的に

近く、これらの一般的な白色腐朽菌から選択的 白色腐朽菌へと変化し、その後褐色腐朽菌へと進化した可能性も考えられる。しかし、この仮説を実験的に実証する（再現する）ことは行われていない。



目的:
木材腐朽菌の進化仮説を実験室内で再現および実証する。

本研究の範囲:
Polyporalesに属する腐朽菌における遺伝子変異導入法の確立

方法および結果

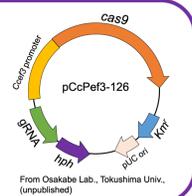
① *C. subvermispora*におけるCRISPR/Cas9系の確立

本菌においては、一過性のハイグロマイシン耐性形質転換系 (Honda et al., 2019 AMB express)が報告されているが、染色体上の遺伝子の改変は達成されていない。そこで、本菌における遺伝子ターゲティング実験系を確立すべく、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による遺伝子変異導入を試みた。

Methods

pCcPef3-126 (右図)に、*CspyrG*を標的とするgRNA配列を挿入したプラスミドを作成し、*C. subvermispora*に導入した。

*pyrG*変異は、5-fluoroorotic acid (5-FOA)耐性を指標として簡便に評価可能である。

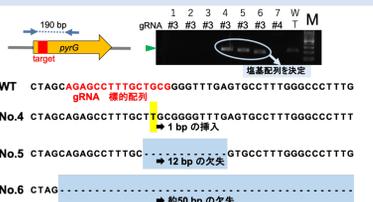


変異効率

二種類のgRNA (#3および#4)を用いて *CspyrG* 遺伝子に変異導入を試みた。

gRNA	HygB耐性株	5-FOA耐性株	割合(%)
#3	43	17	40
#4	24	18	75

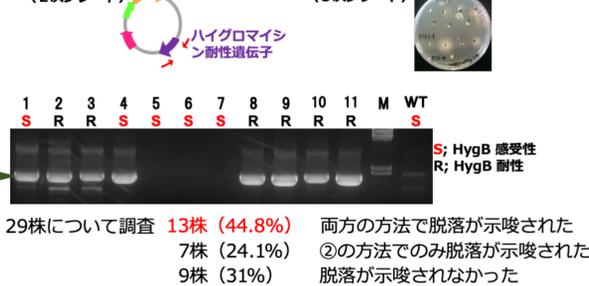
標的配列付近の塩基配列の解析



形質転換体のHygB耐性の欠落頻度

一過性の形質転換により、ゲノム編集株のハイグロマイシン耐性が消失し再度形質転換が可能であることを調査した。

- ① プラスミドの配列が増幅されるか確認 (2次プレート)
- ② 含 HygBプレートで耐性を確認 (3次プレート)

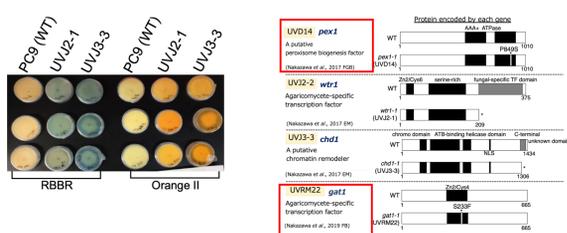


***C. subvermispora*における一過性形質転換系を用いてCRISPR/Cas9を用いた効率的な遺伝子変異導入が可能であることが示された。**

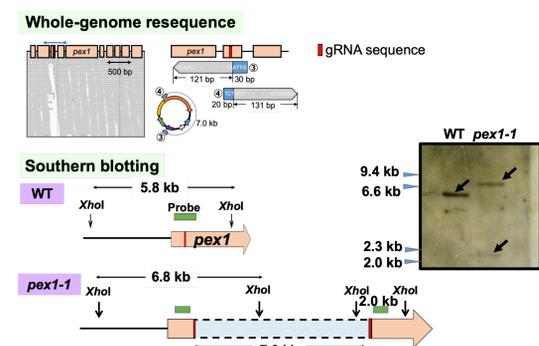
② *Cspex1* および *Csgat1*の単独遺伝子変異株の取得

先行研究では、Agaricalesに分類される白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) のブナ木粉培地中のリグニン分解能の顕著な低下を引き起こす遺伝子変異が多数同定された (右図)。

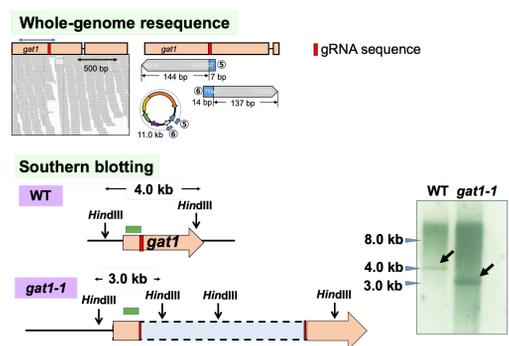
CRISPR/Cas9を用いた遺伝子変異導入によって、*C. subvermispora*の木材分解能を顕著に変動させることが可能か検証するため、これらの遺伝子の変異株を作成した。



Cspex1-1 mutant strain



Csgat1-1 mutant strain



導入したプラスミドの一部が、gRNA 部位付近に挿入された単独遺伝子変異体を取得した。

③ 単独遺伝子変異株におけるリグニン分解能の比較

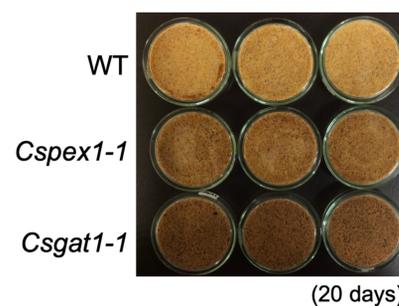
*C. subvermispora*における *gat1* および *pex1* の単独遺伝子変異がリグニン分解能に与える影響を調査するため、以下の実験を行った。

Methods

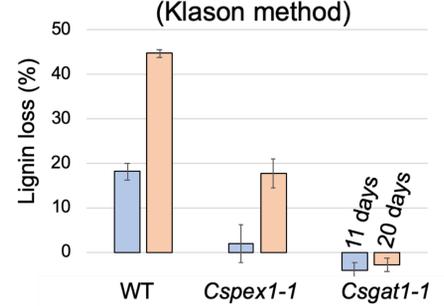
各株をブナ木粉培地上で11および20日間培養した。

Klason法に従ってリグニン減少量を比較した。

After culture on sawdust medium



Quantification of lignin degraded (Klason method)



***C. subvermispora*においても、*pex1*および*gat1*遺伝子変異によってブナ木粉培地中のリグニン分解能が低下することが示された。**

③ *T. versicolor*におけるゲノム編集系確立の試み

*C. subvermispora*よりも白色腐朽菌側 (白色腐朽菌から褐色腐朽菌への変遷前) に位置する *T. versicolor* におけるCRISPR/Cas9を用いた遺伝子ターゲティング系の確立も現在試みている。

pCcPef3-126の導入によるハイグロマイシン耐性形質転換体は取得できたが、*fcy1*遺伝子への遺伝子変異導入 (5-fluorocytosine耐性になることから簡便に評価可能) は成功していない。現在、使用するプロモーターおよびgRNA配列の変更などを行い、引き続き試みている。

結論

本菌におけるCRISPR/Cas9系は、繰り返し形質転換を行うことで、多重遺伝子変異株を作成できる可能性があり、ゲノム上に多コピー存在する木質分解系酵素遺伝子群の大規模改変および機能解析に有用であることが示唆された。

また、実際の本CRISPR/Cas9を用いた遺伝子変異導入によって、木材分解能を変化させることが可能であることも示された。

今後の予定

1. 本実験系を用いた実際に実験室内での進化仮説の実証
2. *T. versicolor*におけるゲノム編集系の確立の続き