

琵琶湖周辺に生息する草本植物の発酵処理を目指した新規きのこ株の開発

【緒言】

漁船漁業による生産量は1980年以降9千万トン前後で頭打ちであり、養殖業の増加が消費量の増加を支えている。今後も需要の増大が見込まれ、養殖システムのますますの発展とそれを支える新規な飼料、特にタンパク質源の確保が不可欠である。一方、侵略的水生植物であるオオバナミズキンバイ、ナガエツルノゲイトウは琵琶湖において合計15万平方メートル以上（平成28年調べ）も広範囲に繁茂している。強い繁殖力から完全駆除は困難であり、多大な労力をかけて対処的に処理されている。世界の侵略的外来種ワースト100にあげられるクズは滋賀県においても多く見られる。クズは農地や林地などに害を与え、道路に蔓を伸ばして通行の障害となる場合があることから定期的に駆除されている。もし、これらの植物を高性能な飼料材料へと効率的に変換できるのならば、一定の収量が期待できる持続可能資源となる。資金的裏付けができることから生息域のコントロールも比較的容易になると思われる。食用きのこの多くは白色腐朽菌であり、窒素が殆ど含まれていない木質を効率的に分解することから、タンパク質分解を殆ど伴わずに植物繊維を分解することが潜在的に可能と期待できる。2018年に、本研究室においてヒラタケで6月のクズ葉を処理したところ、NDF（中性デタージェント繊維）含有率は43.2%から31.4%、CP含有率は29.4%から30.8%に改善された。しかし、まだ不十分であり、より高性能な発酵菌が求められている。

ヒラタケにおいては *PKAc1* および *PKAc2* 遺伝子を過剰発現させることで木質細胞壁分解性が増加することが我々の解析により判明した。本研究では *PKAc1*、*PKAc2* 遺伝子の破壊株（ $\Delta PKAc1$ および $\Delta PKAc2$ 株）を作成し、逆の効果が得られることを確認して育種ターゲット遺伝子群としての性能を考察する。また、タンパク質分解を正に制御すると予測される転写因子遺伝子 *AreA* の破壊株（ $\Delta AreA$ 株）を作成し、発酵性能の向上を確認する。子囊菌類と比較してヒラタケの遺伝子破壊は困難だが、非相同末端結合経路に関与する *KU80* 遺伝子を破壊した 20b 株（*KU80* :: *Cbx^R*）ならば相同組換えによる遺伝子破壊が比較的簡単であることが他グループの先行研究により示されている。しかし、20b 株を宿主としても遺伝子によっては破壊困難であり、 $\Delta PKAc2$ 株や $\Delta AreA$ 株の取得は困難であることも我々の予備実験で明らかになった。本研究では CRISPR/Cas9 を利用した高効率な遺伝子破壊系の利用も検討する。

【結果】

ヒラタケにおけるゲノム編集技術の開発

近年、CRISPR/Cas9系を用いたゲノム編集が様々な生物に適用されている。菌類においても様々な種で利用されている。しかし、動物細胞とは異なり、筋細胞へのタンパク質導入および導入細胞特定の困難さから、多くは Cas9 タンパク質と gRNA をコードする遺伝子などを導入するトランスジーン型である。目的配列が切断され、非相同末端結合により修復され

れば多くの場合は配列の欠失を伴うノックアウトによる遺伝子破壊が起こる。相同配列で挟まれた薬剤耐性遺伝子などを同時に細胞へ導入して、相同組換えによる修復が起これば、薬剤耐性遺伝子のノックインによる遺伝子破壊が起こる。

本研究では、ヒラタケにおける遺伝子導入型 CRISPR/Cas9 系発現を用いた *PKAc1*、*PKAc2*、*AreA* 遺伝子のノックアウトおよびノックインを試みた。その結果、全てについてノックアウトおよびノックインが確認された。ただし、これらの遺伝子破壊株においては CRISPR/Cas9 系が働き続けており、オフターゲット効果の蓄積が危惧された。そこで、CRISPR/Cas9 系発現のための遺伝子群を一時的に発現させてノックインによる破壊株を得ることを試みて、成功した。得られた破壊株群には Cas9 タンパク質遺伝子配列などは残存していなかった。

Δ *PKAc1* および Δ *PKAc2* 株の諸性質

Δ *PKAc1* および Δ *PKAc2* 株の生育速度を測定したところ、Δ *PKAc1* 株は野生型と同程度だったが、Δ *PKAc2* 株は半分程度に減少した。Δ *PKAc1* 株の木質リグニン分解速度は野生型よりも有意に低かったが、なぜかセルロース・ヘミセルロース分解速度は有意に高くなった。以上のことから、*PKAc1* がヒラタケの木質分解に関わる重要調節因子であることが示唆された。Δ *PKAc2* 株については野生型ヒラタケよりも生育速度が著しく減少したため木質リグニン分解性の評価ができなかった。Δ *PKAc2* 株の生育速度は *PKAc2* 遺伝子を相補することで回復した。

Δ *AreA* 株の諸性質

PDA 培地などでは Δ *AreA* 株は野生型と同様の菌糸伸長速度を示したが、タンパク質 (BSA) を唯一の窒素源とした場合、野生型の半分程度にまで減少した。逆に、アンモニアを唯一の窒素源とした場合、野生型の倍程度になった。現在、相補実験およびクズ葉の処理実験などを行っている。