

きのこの遺伝子工学\*

—木質バイオマスの有効利用に向けて—

本田 与一\*\*

Gene Engineering in Mushrooms\*

—for the Efficient Utilization of Wood Biomass—

Yoichi HONDA\*\*

(平成8年8月31日受理)

1. はじめに

「持続可能な社会の形成」に向けた研究の必要性が、声高に叫ばれるようになってきている。このことは、地球環境に負荷を与えないような新しい文明を可能にする技術体系を開発することの重要性が、社会的に強く認識されてきたことを意味している。目先の効率に捕われた従来の尺度ではなく、グローバルなそして長期的な視点での環境調和を達成できるような、新しい科学技術を我々は必要としているのである。そしてまた、これまでに蓄積された地球環境の悪化を取り戻すための、具体的な方法が必要となってきていると言える。

光合成により再生産可能で、使用時における地球に対する負荷が小さい森林資源は、自然調和型の未来資源であるといえる。さらに、生産時には大気中の二酸化炭素を消費し酸素を供給するとともに、治山治水等公益的側面を持ち、消費した後は再び水と二酸化炭素に還元されるという1つの理想的な物質循環サイクルを形成できる。このような森林資源をポスト石油資源の一翼として持続的に利用していくための効率的な方法が確立されることは、持続可能な社会の形成を実現するための大きな一歩となるであろう。しかしながら、森林資源を取り巻く環境は近年悪化の一途を辿っており、森林の大量伐採、未利用森林の荒廃、木材の低効率利用、酸性雨や砂漠化による森林の成育阻害等の多くの問題を有している。これら諸問題の解決に向けて、総合的な研究を今後重点的に推進していくことが必要であると考えられる。

森林資源は、従来よりそのままの形で建材、燃料として利用されることが多いが、その成分を化学物質として利用する観点から見たとき、「木質バイオマス」と呼ぶことができる。一般に「バイオマス」とは、エネルギー・化学工業原料等に利用できる動植物資源のことを指し、したがって木質バイオマスとは、糖・パルプ・エネルギー物質等の種々の有用な化学物質を作り出すプロセスにおける出発物質として森林資源を捕えた呼び方である。

\* 本報の内容は、第51回木研公開講演会（平成8年5月17日、宇治）において発表した。

\*\* バイオマス変換分野（Laboratory of Biomass Conversion）

Key words: Wood biomass, DNA cloning, Basidiomycete, Genetic marker, Transformation

木質バイオマスの利用方法としては、パルプ産業に代表されるように従来より化学的、物理的処理により木質成分を選分けて使う方法が一般的であったが、より効率の良く低公害の、すなわち地球インパクトの少ないプロセスに対する要求度が高まったことにより、バイオテクノロジーの導入が盛んに研究されてきている。ここで言うバイオテクノロジーとは、微生物や微生物が生産する酵素を用いて物質変換を行う技術である。最近では、こうした反応を行う鍵となっている酵素を暗号化している遺伝子の構造にまで踏み込んで、このような生物機能の仕組みを明らかにし、さらに効率の良い制御を行おうという研究が盛んに行われるようになってきた。とりわけ、木質バイオマスの有効利用の鍵となる難分解性の高分子化合物リグニンを白色腐朽菌を始めとしたきのこの仲間を用いて分解しようという試みが、世界中で研究されてきている。

例えば、きのこのリグニン分解能力を、パルプ工業や石油に替わるエネルギーの生産に利用しようという研究が進んでいる。現在のパルプ工業では、製造過程で有害な塩素系有機化合物が生じ、環境保護上問題になってきている。きのこのリグニン分解能を用いて紙を作り出す「バイオパルピング」では、こうした環境汚染物質の削減が期待されている。また、樹木が光合成により固定した太陽エネルギーを、リグニン分解を鍵として利用し、糖化を行いアルコール燃料などの有用な物質に変えてやれば、再生産可能なエネルギーの循環サイクルを作り出すことができる。生態系との調和の中で、もっとたくさん樹を植えて、無公害の「バイオマスエネルギー」へと変換することにより、我々の生活を本当の意味で豊かにしていくことができるであろう。

ここでは、このような特殊な生物機能を可能にするメカニズムを解明し、森林資源に根ざした新しい技術へとつなげるための切り札といえるきのこの遺伝子工学の現状についてまとめることとする。

## 2. 木を溶かす遺伝子

### 2. 1 「生命の設計図」—遺伝子

生物の持つ特殊な能力も、もとを辿ればその生物の遺伝子に帰結している。では、遺伝子は、どんな作りになっているのであろうか。遺伝子の本体（DNA）は、ヌクレオチドと呼ばれる二本の細い鎖がお互いにかみ合ったような構造をしている。これらの鎖を一本、一本に解いてみると、それぞれに構造が違うA、G、T、Cの4種類の物質（塩基）からなるいわば「文字の並び」のようなものがあって、その並び方によって生命に必要な情報が暗号化されている。そして、それらの情報は特定の時期に適当な量だけ発現する様に巧妙な調節がされているのである。人間の遺伝子では約30億もの「文字の並び」が含まれている。生命の神秘的なしくみや生物の持つ様々な能力を、遺伝子のレベルにまでさかのぼって解明しようという研究が、今盛んに行われてきている。

では、遺伝子の暗号には何が書かれているのであろうか。その答えは、タンパク質やRNAと呼ばれる物質である。これらの物質は、細胞を形作る部品となるのみならず、細胞のなかで様々な働きをする装置（酵素）となるのである。そして、生き物のからだを構成する様々な物質が酵素の力によって作り出されるのである。言うなれば、細胞は様々な機械を含んでいるオートメーション化された巨大な工場であり、遺伝子はその設計図の様なもので、必要な時に必要なプラントを組み立てて、必要な物を必要な量だけ作らせるのである。

### 2. 2 木を溶かす遺伝子

遺伝子を調べることで、生物の持っている特殊な機能のメカニズムに迫ることが可能である。なぜなら生物の機能を担っているのは酵素であり、遺伝子の文字の並びを解析することによって、酵素の構造や、生産の調節のしくみを知ることができるからである。

木材を分解するきのこは、木材中に含まれている「天然の防腐剤—リグニン」を溶かす酵素を菌体外に分泌していることがわかってきた。このために、きのこは他の生き物には真似のできない「木を溶かす」

という芸当をやったのけることができるのである。現在では、きのこが分泌するリグニン分解酵素が遺伝子のレベルで解析されるようになってきた。このことは人間が、「木を溶かす」鍵を手にしたことを意味している。

リグニンとともに木材の主成分を構成する、セルロース、ヘミセルロース等の多糖類も、きのこによって分解される。きのこの仲間が生産するセルラーゼ、キシラナーゼ等の多糖を分解する酵素遺伝子についても解析が始まってきているが、これらについては他の文献に詳しい<sup>1)</sup>。

## 2. 3 リグニン分解酵素遺伝子

これまでの研究では、木材腐朽菌が分泌するリグニンペルオキシダーゼ (LiP) やマンガンペルオキシダーゼ (MnP), ラッカーゼのようなフェノール酸化酵素が、リグニンの分解に関与しているとされている。重要なことは、複雑で多様な化学結合を持つリグニンの分解においては、個々の化学結合に特異的な酵素が存在するのではなく、これらの酵素によって引き金がひかれるラジカル反応により、次々と開裂反応が起こることである。LiP および MnP は、酵素活性の発現に過酸化水素を必要とし補欠分子としてプロトヘムⅨを含む鉄酵素である。一方ラッカーゼの方は、一般に2価の銅を補欠分子として持ち、分子状の酸素を利用して、フェノール性の基質を酸化しフェノキシラジカルを生成する。これらの酵素は、それぞれアイソザイムとして複数の遺伝子にコードされているものが多く、アイソザイム間の発現制御や生理学的な役割の違いについては、未解明な部分が多い。

### 2.3.1 リグニンペルオキシダーゼ遺伝子 (*lip*)

これまでに、*Phanerochaete chrysosporium* (和名なし) の分泌する各アイソザイム遺伝子をはじめとして、*Phlebia radiata* (コガネシワウロコタケ) や *Trametes versicolor* (カワラタケ), *Bjerkandera adusta* (ヤケイロタケ) の *lip* 遺伝子のクローニングについて多数の報告がある<sup>2-4)</sup>。アミノ酸レベルでの相同性は、*P. chrysosporium* のアイソザイム間で約70%以上、他の担子菌由来の *Lip* との間では、55~60%となっている。とくに、ペルオキシダーゼ間で保存性の高い、活性中心付近のアミノ酸配列は高い相同性を有している。また、*P. chrysosporium* の *lip* 遺伝子は、8ないし9個のイントロンを持つが、これらのイントロンの挿入位置にも保存性が見られる<sup>5)</sup>。

*lip* 遺伝子のプロモーター領域には、TATAA 配列、CCAAT 配列が存在しており、cAMP や芳香族炭化水素に反応して転写を活性化する配列を含むものが存在していた。*P. chrysosporium* のリグニン分解系の発現と細胞内の cAMP 濃度の上昇に相関があるとする報告<sup>6,7)</sup> もあり、LiP の発現制御系解明の糸口として興味深い。それぞれの遺伝子が単離されて、転写レベルでの解析が可能となってきた今、アイソザイムごとの発現調節と機能の解析も可能になってきた。実際、LiP のアイソザイム間では培地中の窒素や炭素源の影響で、それぞれ発現パターンが異なっていることが、メッセンジャーレベルで解析されている<sup>2)</sup>。

また、これらの *lip* 遺伝子のうち3つは、約20kb の範囲内に存在している<sup>8)</sup>。RFLP mapping や CHEF を用いた研究でも、*lip* 遺伝子は染色体上でクラスターをつくって存在していることが報告されている<sup>9)</sup>。今後、ゲノム上でのそれぞれの遺伝子の存在位置が、各アイソザイムの発現制御になんらかの影響を与えているかについても関心が持たれる。

### 2.3.2 マンガンペルオキシダーゼ遺伝子 (*mnp*)

*P. chrysosporium* の OGC101株から MnP をコードする3つの遺伝子 (*mnp1*, *mnp2a*, *mnp2b*) がクローニングされている<sup>5)</sup>。これらの間での相同性は、塩基配列で約70%、アミノ酸レベルでは88%であった。また *lip* とは、それぞれ約60%および50~60%の相同性を有しており、やはり活性中心は保存されていた。*mnp2* には7つのイントロンが存在しているが、1つを除けば *mnp1* の6つのイントロンと同じ位置に存在している。しかし *lip* との間では、イントロンの位置は保存されていない。

*P. chrysosporium* では、リグニン分解酵素系は二次代謝で発現し、培地中の窒素源欠乏を必要とするときとされてきた。遺伝学的な実験からは、LiP<sup>-</sup> で MnP<sup>+</sup> のミュータントが単離されたことから、LiP と MnP の

制御系にはかなり大きな隔たりがあることも考えられる<sup>10)</sup>。実際、それぞれのプロモーター領域の配列の特徴はかなり異なっていた。*mnp1* のプロモーター領域には TATAA 配列、CCAAT 配列の他に、SP-1 の認識配列 (GGGCGG) さらに 4 つの heat shock element (HSE: C--GAA--TTC--G) と 5 つの metal response element (MRE: TGCRICYCG) が含まれていた。こうした配列は *mnp2* のプロモーター内にも存在していることが確認された。

MnP の発現については、培地中への Mn イオンの添加が転写レベルで発現を誘導すること、また菌体を 45℃ にさらしてやることによっても mRNA の誘導が相加的に起こることなどが明らかにされた<sup>11,12)</sup>。また、Godfrey らは、*mnp1* の上流約 1500bp のプロモーター領域に *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) のウラシル生合成酵素 ODase (orotidylate decarboxylase) 遺伝子をレポーター遺伝子として連結した組換えプラスミドを作成し、ODase を欠失している *P. chrysosporium* に形質転換を行った<sup>13)</sup>。こうして得られたクローンでは、ODase 活性が培地中への Mn イオンの添加によって発現し、その活性の消長は内在性の MnP 活性の変化と同調していた。この結果は、*mnp1* の発現を制御する配列がこの 1500bp の領域内に存在していることを意味している。今後、この領域内に存在している HSE 配列や MRE 配列などの調節配列の機能が明らかにされていくだろう。さらに、同じグループは *P. chrysosporium* の *gpd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) プロモーターを用いて、一次代謝において MnP を発現させることに成功している<sup>14)</sup>。この系では、内在性の MnP と人工的に導入した組換え MnP を別々に発現することが可能であり、部位特異的突然変異によって、酵素の構造と活性の相関について明らかにする研究が始まっており、基質である 2 価のマンガンイオンを認識するアミノ酸残基の特定が行われている<sup>15)</sup>。

*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) では、クローニングされた遺伝子の塩基配列解析の結果、全体としては *P. chrysosporium* の LiP と MnP に対して 50% 程度の相同性を示したが、活性発現に必須と考えられているヒスチジン残基等の部位では著しい保存性が示された<sup>16)</sup>。プロモーター領域には、やはり HSE 配列や MRE 配列などの調節配列の存在が複数確認されている。また、最近 *Coriolus hirsutus* (アラゲカワラタケ) でも *mnp* 遺伝子がクローニングされ、*gpd* プロモーターの制御下で大量発現系を構築する実験が進められている<sup>17)</sup>。

木材腐朽菌の中には、*Lentinula edodes* (シイタケ) や、*P. ostreatus* のように MnP 活性は発現しているが、LiP 活性を持たない種も存在している。また、*Dichomitus squalens* では、MnP の発現とリグニンの分解がいずれも Mn イオンの存在下でのみ起こることが報告されている<sup>18)</sup>。こうした種の存在は、リグニン分解において MnP が果たしている役割が、従来考えられてきたものより重要であることを示すものである。

### 2.3.3 ラッカーゼ遺伝子 (*lac*)

これまでに、*C. hirsutus* のラッカーゼに相当するフェノールオキシダーゼをコードする遺伝子とその cDNA がクローニングされ塩基配列が決定されている<sup>19)</sup>。その結果、10 個のイントロンによって分断されるエキソンが 499 個のアミノ酸をコードしており、補欠分子である銅を配位すると考えられる領域が予想された。

また、*P. ostreatus* では、実に 19 個のイントロンを含み、シグナルペプチドを含めて 529 アミノ酸をコードする *pox1* と、この遺伝子に 84% の相同性を示す *pox2* と名付けられた cDNA が単離されている<sup>20)</sup>。

さらに最近、白色腐朽菌 *Pycnoporus cinnabarinus* (ヒヒロタケ) においては、菌体外に 1 種類のラッカーゼを大量に生産すること、またこの菌が LiP 活性、MnP 活性共に持たない種である<sup>21)</sup> ことから、この菌における木材腐朽でリグニン分解を引き起こしている鍵となる主要な酵素が、ラッカーゼであることが示唆された。こうしたことは、再びラッカーゼのリグニン分解における重要性にスポットを当てると同時に、脱リグニン反応に応用することの可能性を支持するものである。

以上に示した、リグニン分解酵素の遺伝子解析を含めたこれまでの一連の実験結果からは、一口に白色腐朽菌によるリグニン分解と言っても、生物種によって分解のメカニズムは様々であり、高分子リグニン

の分解メカニズムを明らかにするためには、リグニン分解系の諸反応を総合的に解析していくことが重要であることが、今後ますます認識されてくるであろう。したがって、リグニン分解酵素自身のアイソザイムレベルでの発現制御と、反応機構を明らかにしていくとともに、ラジカル反応による高分子リグニンの連鎖的な分解を制御している生物機能の解明が期待される。

### 3. きのこの形質転換系

これまでに、きのこの細胞から遺伝子を取り出して、その構造を分析することが可能となってきた。しかし、これらの遺伝子を切り貼りして組換え遺伝子を作り、それを人間の思うがままに自由に発現させることは、現在の技術ではまだできていない。それは、きのこの遺伝子が機能するには、きのこ独特の「文法」のようなものがあって、大腸菌や酵母のような今日遺伝子の発現によく用いられている他の生物の細胞を借りた状態では、うまく機能を果たさないからである。そこでもし、きのこ自身の細胞のなかで、自在に遺伝子を発現させる技術が手に入れば、組換え遺伝子を導入して有用な酵素を大量に発現させたり、特定の遺伝子を破壊したりして、新しい性質をもったスーパーきのこを作り出すことが可能になる。そのためには、きのこの細胞の中に自由に遺伝子を出し入れする新しい方法（形質転換法）を開発しなければならない。

#### 3. 1 きのこの遺伝マーカー

生きている細胞の中に人工的に遺伝子を入れるには、その遺伝子を取り込んだ細胞と、他の細胞を、あとで簡単に見分ける方法を開発することが重要である。こうした目的のために、細胞に入ると外から簡単に見分けられるような性質を持った「マーカー遺伝子」と呼ばれる遺伝子を利用する方法がある。我々の研究室では、きのこの細胞の中に入ると特定の薬剤に対して抵抗性を与えるマーカー遺伝子（薬剤耐性マーカー遺伝子）の開発を行っている。このマーカー遺伝子を細胞内に取り込んだきのこは、通常のきのこは生えることができない抗菌剤入りの培地の上でも生えることができるようになるのである。したがって人工的に遺伝子を導入した細胞だけを、薬剤選択培地上で簡単に選び出すことができる。このようなマーカー遺伝子は、様々な有用遺伝子をきのこの細胞の中に導入してやるのに必要となるベクターを構築する際に必ず必要とされる。マーカー遺伝子を用いて形質転換操作を行うことで、特定の酵素を大量に発現するなどの新しい機能をもったきのこを次々作り出すことが可能になってくるであろう。また、きのこの特殊な機能のメカニズムを遺伝子のレベルで解析し、その原理を応用していくことに役立つのである。

本稿では、きのこの形質転換系において用いられている栄養要求性および薬剤耐性の遺伝マーカーについてまとめることとする。

##### 3.1.1 栄養要求性マーカー遺伝子

一般に菌類は、外界から得た栄養素をもとに細胞内で、生命に必要とされる様々な物質を合成（生合成と呼ばれる）する能力を持っているが、様々な変異原による突然変異を持つものの中には、こうした生合成経路の一部が遺伝的に遮断されているために、培地にアミノ酸やビタミンなどの成長因子を補わなければ成育できないものがあり、それらは栄養要求性突然変異株と呼ばれている。栄養要求性マーカー遺伝子は、そうした突然変異株が最小培地上で成育することを可能にする遺伝子で、具体的には突然変異により不活性化されている生合成系の特定の酵素に対する野生型の酵素をコードしている。担子菌類の形質転換においても、これまでにトリプトファンやアルギニン、ロイシンといったアミノ酸やアデニン、ウラシルといった核酸の栄養要求性変異株を野生型に復帰させるマーカー遺伝子が用いられてきた（表1）。

これらの栄養要求性マーカー遺伝子は、形質転換の宿主となった生物固有のものもあるが、近縁の他の種由来の遺伝子を用いたものもある。いずれの場合も、宿主細胞にあらかじめ当該栄養要求性の変異を導入しておく必要があるが、汎用性といった面ではやや難しい問題を抱えているといえる。

表1 きのこの形質転換で用いられた主なマーカー遺伝子

宿主きのこ	マーカー遺伝子	由来	特徴	文献
<i>S. commune</i>	<i>TRP1</i>	<i>S. commune</i>	トリプトファン要求性	22
	<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	ハイグロマイシン耐性	23
	<i>URA1</i>	<i>S. commune</i>	ウラシル要求性	24
	<i>ble</i>	<i>St. hindustanus</i>	ブレオマイシン耐性	25
<i>C. cinereus</i>	<i>TRP1</i>	<i>C. cinereus</i>	トリプトファン要求性	26
	<i>trp-2</i>	<i>C. cinereus</i>	トリプトファン要求性	27
<i>C. bilanatus</i>	<i>trp-2</i>	<i>C. cinereus</i>	トリプトファン要求性	28
<i>P. ostreatus</i>	<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	ハイグロマイシン耐性	29
<i>P. florida</i>	<i>Leu 2</i>	<i>F. velutipes</i>	ロイシン要求性	30
<i>A. aegerita</i>	<i>URA1</i>	<i>A. aegerita</i>	ウラシル要求性	31
<i>H. cylindrosporum</i>	<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	ハイグロマイシン耐性	32
<i>L. laccata</i>	<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	ハイグロマイシン耐性	33
	<i>ade2, ade5</i>	<i>S. commune</i>	アデニン要求性	34
<i>P. chrysosporium</i>	<i>ade1</i>	<i>P. chrysosporium</i>	アデニン要求性	35
	<i>Kan<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i>	カナマイシン耐性	36
	<i>URA3</i>	<i>P. chrysosporium</i>	ウラシル要求性	37
	<i>ble</i>	<i>St. hindustanus</i>	ブレオマイシン耐性	38

### 3.1.2 薬剤耐性マーカー遺伝子

薬剤耐性マーカー遺伝子は、前述の通り特定の薬剤に対する抵抗性をきのこに与える遺伝子であり、これまでハイグロマイシン、ブレオマイシン、ピアラフォス等の抗菌剤に対する抵抗性遺伝子を用いたきのこの形質転換が試みられてきた（表1）。薬剤耐性マーカー遺伝子は、形質転換した細胞をポジティブセレクションでできるだけでなく、宿主側の遺伝的なバックグラウンドを必要とせず、その応用範囲は、栄養要求性マーカー遺伝子に比べて格段に広い。しかしながら従来試みられてきた薬剤耐性マーカー遺伝子は、元来担子菌類以外の生物に由来するものが多く、その発現は形質転換されるきのこの種類によって大きく違っており、形質転換効率も著しく低い。そこで、きのこ自身に由来する薬剤耐性マーカー遺伝子の単離が必要となってくる。

我々は、担子菌類に幅広い抗菌スペクトルを持つカルボキシンの類縁体でイネの紋枯病やジャガイモの黒あざ病等の予防薬として広く用いられているフルトラニルを用いた遺伝マーカーの単離に成功した。ヒラタケやシイタケなどの担子菌類は、通常フルトラニルに対して感受性であり、同薬剤が3 ppm 入った寒天培地上では、成育することができない。我々は、紫外線照射による突然変異処理により100ppm以上の濃度のフルトラニル存在下でも成育可能な耐性変異株を多数得た（図1）。これらの耐性変異は、遺伝的に優性の形質を示し（表2）、体細胞分裂あるいは減数分裂を経ても、安定に伝えられることが明らかにされた<sup>39)</sup>。原生担子菌類に属するトウモロコシの病原菌として知られるクロボ菌 (*Ustilago maydis*) では、カルボキシンの耐性を付与する変異遺伝子としてコハク酸デヒドロゲナーゼのIpサブユニットをコードする遺伝子が単離され、マーカー遺伝子としてベクターの構築に用いられている。この変異遺伝子では、酵素の活性中心を構成する3つのシステインに富むクラスターをコードする領域のうち、3番目のクラスター内部に位置する253番目のヒスチジンがロイシンに変化する点突然変異によってカルボキシンの耐性が発現することが確かめられている。我々は、ヒラタケにおけるフルトラニル耐性の原因遺伝子として想定されるコハク酸デヒドロゲナーゼのIpサブユニット遺伝子を野生型のヒラタケから単離し、塩基配列を決定した（図2）<sup>40)</sup>。その結果、3番目のシステインリッチなクラスター内のヒスチジンは保存されていることが明らかになった。現在、フルトラニル耐性変異株におけるIpサブユニット遺伝子の解析を行うとともに

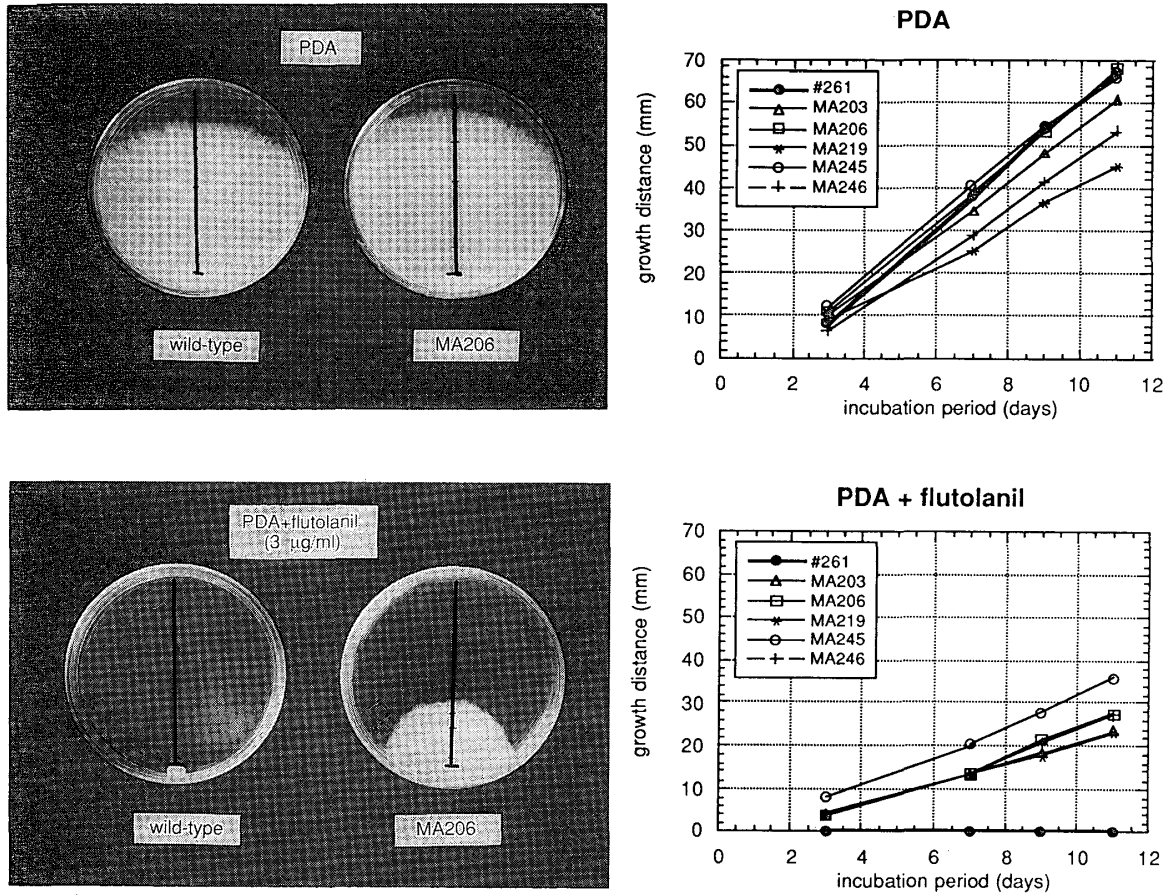


図1 ヒラタケのフルトラニル耐性変異株の成長速度  
 フルトラニル添加, および無添加培地上での菌糸成長速度を測定した結果, 野生型のヒラタケは, フルトラニル添加培地上で生育を示さなかったが, 耐性突然変異株では速度は遅くなるものの安定して成長を続けた。

表2 フルトラニル耐性変異株の交配結果

交配の組み合わせ		フルトラニル耐性
MA203h (R)	X MA203r (S)	R
MA203h (R)	X MA203u (S)	R
MA203h (R)	X #261-21 (WT)	R
MA203h (R)	X #261-26 (WT)	R
MA203k (R)	X MA203r (S)	R
MA203k (R)	X MA203u (S)	R
MA203k (R)	X #261-21 (WT)	R
MA203k (R)	X #261-26 (WT)	R
MA206a (R)	X #261-20 (WT)	R

ヒラタケのフルトラニル耐性(R)のモノカリオンを, 感受性(S)および野生型(WT)のモノカリオンと交配させてできたダイカリオンは, すべてフルトラニル耐性を示した。このことはこれらの耐性変異が, 遺伝的に優性であることを示している。

本田：きのこの遺伝子工学

```

1 :          *atattttctcctcttcacccatcGTCGACGACGTCCCAGGAAACACACAAA

49 : TCATTGAACC ATGCAGGCGCTCACCTCCAGGTCGTTGGCTCGCTCATCTCGCTCGATTCC
      M Q A L T S R S L A R S S R S I R
109 : TGCTTTCTCCACCTCGCCTGGAAGATGGCAGGCTGAGCCCCTCCAGAAGCCCCTCTCCA
      A F S T S P G R W Q A E P L Q K P V L Q
      T GT
169 : GAAAGAATTCAAGATCTACCGTTGG GTGAGCTGAGACCCTTGGATATCCAGACGTGTTC
      K E F K I Y R W
      C
229 : TCACTCGCGGTACAG AACCCAGATGAGCCCGCAAGAAGCCTCATCTCCAATCGTACAC C
      N P D E P A K K P H L Q S Y T
      G C C GC
289 : ATTGACTTGAACCGACAGGCCCATGGTACGTACAAT TCAAAGCGAATGTCTCCATGC
      I D L N Q T G P M
      A C
349 : TCACGGGCTCGTAGATTCTGGATGCTCTTATCAAGATCAAGAACGAAAT TGATCCTACGC
      I L D A L I K I K N E I D P T
409 : TCACATTCCGTCGTTCTGTCAGAGAGGGGATCTGCGGCTCGTGTGCGATGAACATTGACG
      L T F R R S C R E G I C G S C A M N I D
469 : GACAGAACACGTTGGCTTGCCGAAATGACCGCAACGCCAGCAAGGACAGCAAGA
      G Q N T L A C L C R I D R N A S K D S K
529 : TCTACCCCTTGCCGCACA GTATGACATGTCTCCAGCTCCTAATTGCATCGGCTGACGT
      I Y P L P H
589 : CGGCAACAG TGTACATCGTGAAGACCTCGTACCCGATCTCACCCCTGTTCTACAAGCAGT
      M Y I V K D L V P D L T L F Y K Q
649 : ACAAGTCCATCAAGCCTTACCTGCAGAACGACAATGTTCCCGAGAGGGAGCACCTCCAGT
      Y K S I K P Y L Q N D N V P E R E H L Q
709 : CGCCAGAGGACCGCAAGAAGCTGGATGGGATGTATGAATGCATCCTGTGCGCGTGTGCA
      S P E D R K K L D G M Y E C I L C A C C
769 : GCACGTCGTGCCCGAGTTATTGGTGGAAACCAAGACGAGTATCTGGGGCCGGCTGCATTGA
      S T S C P S Y W W N Q D E Y L G P A A L
829 : TGGCTGCATACAGGTGGATTGCGGACTCCCGA GTGCGTGTGTGATGTGTCGTCAGCGCAT
      M A A Y R W I A D S R
889 : CCCATAGACTAACATCTCGTAG GATACGTACGGCGCGCAACGCAAGGAACACTTCCAGAA
      D T Y G A Q R K E H F Q N
      T
949 : CGAGCTGAGTCTGTTCCGCTGCCACACAATCTTCAATT GTAAGTGGCTTTCGCCTTGTTA
      E L S L F R C H T I F N
1009 : TTCACCGACGCTAATCATATCCGTTATCAAG GCTCTCGCACTGTCCAAAGGGCCTCAAC
      C S R T C P K G L N
1069 : CCTGCCAAAGCCATTGCGGAAATCAAGCTCGCGCTGCCACGGAGTAA ACACAAGTTAA
      P A K A I A E I K L A L A T E
      G T
1129 : AGCCACGGATTAAAAGCA CCGAGTCAGAGGCAGATTTCTTTCCTGTAGCAGTTGACAGTT
1189 : CTTTCCACTTCATCATACAGTGTCCATCAGGACATCAAATCATATTCATCTATAAcat
1249 : ccactgttcttgagcctgtctgaggttaggtataccctcggtttcacttgcgatgct
    
```

図2 ヒラタケの野生型コハク酸デヒドロゲナーゼ I<sub>p</sub> サブユニット遺伝子の塩基配列

下線を引いてある部位が翻訳領域（エキソン）、斜字体の部位は対立遺伝子の配列、アスタリスクは、転写開始点を示している。

に、人工的にヒスチジンをロイシンに変換するような突然変異を導入して、フルトラニルに対する抵抗性が発現するかどうかについて解析を行っている。

### 3. 2 きこの形質転換法

きのこの形質転換法としてもっとも多く用いられているのが、PEG/CaCl<sub>2</sub>法である。この方法は、きのこの細胞をセルラーゼやキチナーゼなどの細胞壁溶解酵素で処理して得られるプロトプラストと呼ばれる細胞膜で囲まれた球状の細胞を、導入しようとするDNAの存在下で、PEG（ポリエチレングリコール）と塩化カルシウム溶液につけて処理する方法で、細菌や酵母など他の生物の形質転換においても広く用い



られている方法である。プロトプラスト化される細胞としては、比較的成長の速い菌糸体や、未発芽の胞子あるいは発芽している胞子、場合によっては分生胞子が用いられる。形質転換の効率は1マイクログラムの導入DNAあたり、*P. chrysosporium* で最大約300程度<sup>35)</sup>、きのこ類の中では効率の高いほうの*S. commune* で1000程度<sup>41)</sup> であり大腸菌や酵母等と比較すると著しく低く、このことがきのこの仲間に遺伝子工学的な実験手法を導入していく際の障害となっているといえる。

この他にも、他の生物同様にプロトプラストを電場にかけることによってDNAを導入するエレクトロポレーション<sup>31,42)</sup>、また酢酸リチウムで処理する方法<sup>26)</sup>、さらに菌糸体そのものを使って、パーティクルガンにより微細な金またはタングステンの粒子にDNAをまぶしたものを直接細胞の中に打ち込む方法<sup>43)</sup>などが、報告されているがその効率はいずれも、PEG/CaCl<sub>2</sub>法と同程度かそれ以下である。今後、きのこの細胞内でより安定にマーカー遺伝子を発現し、複製効率がよく安定に分配されるのに必要なDNAフラグメントを挿入することによって、形質転換効率を飛躍的に高めるようなベクターの開発が期待される。

#### 4. おわりに

最近の研究では、きのこのリグニン分解酵素系には、木材中のリグニン以外にもビニールやプラスチック、またダイオキシンやPCBといった難分解性の環境汚染物質を分解する能力を持つものがあることがわかってきた。このように生物の持つ能力を使って環境を浄化・修復しようという考え方は、バイオリメディエーションと呼ばれ、現在様々な汚染に対応した応用技術が開発されてきている。

ここで述べてきたような、遺伝子工学を中心とする現代科学の最先端の技術を導入することによって、きのこの基礎科学についてさらに理解を深め、他の生物には見られない「木を溶かす芸当」を様々な産業や環境保護に活かして、木質資源をさらに有効に活かしていくことが可能になるであろう。このことはまた、これまでに石油、石炭などの化石燃料を無造作に使用することによって、大気中に溜まった二酸化炭素の削減を進め、地球上の生き物たちに酸素と安らぎを供給することにも役立つのである。

#### 文 献

- 1) 桑原正章：木材研究・資料, No. 27, 12-23 (1991)
- 2) P. Stewart, P. Kersten, A. V. Wymelenberg, J. Gaskell and D. Cullen : *J. Bacteriol.*, 174, 5036-5042 (1992)
- 3) A. K. Black and C. A. Reddy : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 179, 428-435 (1991)
- 4) M. Saloheimo, V. Barajas, M.-L. Niku-paavola and K. C. Knowles : *Gene*, 85, 343-351 (1989)
- 5) M. H. Gold and M. Alic : *Microbiol. Rev.*, 57, 605-622 (1993)
- 6) K. Boominathan and C. A. Reddy : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5586-5590 (1992)
- 7) M. J. MacDonald, A. Paterson and P. Broda : *J. Bacteriol.*, 160, 470-472 (1984)
- 8) J. Gaskell, E. Dieperink and D. Cullen : *Nucl. Acids Res.*, 19, 599-603 (1991)
- 9) U. Raeder, W. Thompson and P. Broda : *Molecul. Microbiol.*, 3, 911-918 (1989)
- 10) K. Boominathan, S. B. Dass, T. A. Randall, R. L. Kelley and C. A. Reddy : *J. Bacteriol.*, 172, 260-265 (1990)
- 11) J. A. Brown, M. Alic and M. H. Gold : *J. Bacteriol.*, 173, 4101-4106 (1991)
- 12) J. A. Brown, D. Li, M. Alic and M. H. Gold : *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4295-4299 (1993)
- 13) B. J. Godfrey, L. Akileswaran and M. H. Gold : *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1353-1358 (1994)
- 14) M. H. Gold, H. Wariishi, M. B. Mayfield and K. Kishi : In "Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology" ed. by K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, C. Penel and H. Greppin, University of Copenhagen and University of Geneva, 1993, p. 87-95.
- 15) K. Kishi, M. Kusters-van Someren, M.B. Mayfield, J. Sun, T.M. Loehr and M.H. Gold: *Biochemistry*, 35, 8986-8994 (1996)
- 16) Y. Asada, A. Watanabe, T. Irie, T. Nakamura and M. Kuwahara: *Biochim. Biophys. Acta*, 1251, 205-209 (1995)
- 17) 塚本 晃, 仲山由紀, 喜多幸雄：日本農芸化学会大会要旨集, p 271. (1996年, 京都)

- 18) F. H. Périé and M. H. Gold : *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2240-2245 (1991)
- 19) Y. Kojima, Y. Tsukuda, Y. Kawai, A. Tsukamoto, J. Sugiura M. Sakaino and Y. Kita: *J. Biol. Chem.*, 265, 15224-15230 (1990)
- 20) P. Giardina, R. Cannio, L. Martirani, L. Marzullo, G. Palmieri and G. Sannia: *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 2408-2413 (1995)
- 21) C. Eggert, U. Temp K.-E.L. Eriksson: 第46回日本木材学会大会研究発表要旨集, p373, (1996年 熊本)
- 22) A. Munoz-Rivas, C.A. Spechet, B.J. Drummond, E. Froeliger and C.P. Novotny: *Mol. Gen. Genet.*, 250, 103-106 (1986)
- 23) H. Mooibroek, A.G.J. Kuipers, J.H. Siestsma, P.J. Punt and J.G.H. Wessels: *Mol. Gen. Genet.*, 222, 41-48 (1990)
- 24) F.H.J. Schuren, M.C. Harmsen and J.G.H. Wessels: *Mol. Gen. Genet.*, 238, 91-96 (1993)
- 25) F.H.J. Schuren and J.G.H. Wessels: *Curr. Genet.*, 26, 179-183 (1994)
- 26) D.M. Binninger, C. Skrzynia, P.J. Pukkila and L.A. Casselton: *EMBO J.*, 6, 835-840 (1987)
- 27) L.A. Casselton and A. de La Fuente Herce: *Curr. Genet.*, 16, 35-40 (1989)
- 28) D.M. Burrows, T.J. Elliot and L.A. Casselton: *Curr. Genet.*, 17, 175-177 (1990)
- 29) M. Peng, P.A. Lemke and N.K. Singh: *Curr. Genet.*, 24, 114-121 (1993)
- 30) M.-O. Byun, Y.-B. Yoo, S.-J. Go, C.-H. You, D.-Y. Cha and Y.-H. Park: *Kor. J. Mycol.*, 17, 27-30 (1989)
- 31) T. Noël and Labarère: *Curr. Genet.* 25, 432-437 (1994)
- 32) R. Marmeisse, G. Gay, J.C. debaud and L.A. Casselton: *Curr. Genet.*, 22, 41-45 (1992)
- 33) V. Barret , R.K. Dixon and P.A. Lemke: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 313-316 (1990)
- 34) M. Alic, E.K. Clark, J.R. Kornegy and M.H. Gold: *Curr. Genet.*, 17, 305-311 (1990)
- 35) M. Alic, M.B. Mayfield, L. Akileswaran and M.H. Gold: *Curr. Genet.*, 19, 491-494 (1991)
- 36) T. Randall and C.A. Reddy: *Gene*, 103, 125-130 (1991)
- 37) L. Akileswaran, M. Alic, E.K. Clark, J.L. Hornick and M.H. Gold: *Curr. Genet.*, 23, 351-356 (1993)
- 38) M. Gessner and U. Raeder: *Gene*, 142, 237-241 (1994)
- 39) Y. Honda, T. Irie, M. Atsuji, T. Watanabe and M. Kuwahara: *Mycoscience*, 37, 457-459 (1997)
- 40) 本田与一, 入江俊一, 松山拓郎, 渡辺隆司, 桑原正章: 第69回日本生化学会大会・第19回日本分子生物学学会年会 合同年会発表抄録集, p 934, (1996年 札幌)
- 41) C. A. Spechet, A. Munoz-Rivas, C.P. Novotny and R. Ullrich: *Exp. Mycol.*, 12, 357-366 (1986)
- 42) M. Peng, N.K. Singh and P.A. Lemke: *Curr. Genet.*, 22, 53-59 (1992)
- 43) A. J. Moore, M.P. Challen and T.J.Elliott: In "Science and Cultivation of Edible Fungi" ed. by Elliott, Bal-kema, Rotterdam, 1995, p 63-70