

氏 名	いり え とし かず 入 江 俊 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1150 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 林 産 工 学 専 攻
学位論文題目	Development of Transformation and Recombinant Gene Expression Systems in <i>Pleurotus ostreatus</i> (ヒラタケにおける形質転換系と組換え遺伝子発現系の開発)
論文調査委員	(主 査) 教 授 栗 原 正 章 教 授 酒 井 富 久 美 教 授 島 田 幹 夫

論 文 内 容 の 要 旨

担子菌 *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) は高いリグニン分解能を示す代表的な白色腐朽菌であり、現在広く食用として栽培されているほか、工学的に利用し得る菌種としても注目されている。しかし、本菌の遺伝子解析が十分ではないため、遺伝子工学的な育種技術の開発が遅れている現状にある。本研究は、*P. ostreatus* におけるリグニン分解に関与する鍵酵素と考えられるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を対象遺伝子として、本菌の高効率の形質転換系と遺伝子発現系の開発を目的としている。本論文は4つのSectionからなるChapter Iと、2つのSectionからなるChapter IIにより構成されている。得られた主な結果は以下のとおりである。

(1) *P. ostreatus* のコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体を構成する Iron-sulfur protein (Ip) サブユニット遺伝子 (*sdi1*) をゲノムおよび cDNA からクローン化し、その塩基配列の解析を行った。得られた配列は、5つのイントロンを含み、268のアミノ酸をコードし、黒穂病菌などの同遺伝子と高い相同性を示した。次いで、得られた *sdil* に変異導入 (His257→Leu) することにより殺菌剤カルボキシシン耐性を付与し、それを選択マーカーとして用いる安定な形質転換体選択系を作成した。

(2) 同種遺伝子発現ベクターを作成するため、*sdil* のプロモーターをクローン化し、その塩基配列を明らかにし、この領域における種々のたんぱく合成制御因子の存在を示した。また、対立遺伝子の解析を行い、制限断片長多型を利用した遺伝子マーカーとしての *sdil* 利用法を示した。

(3) *Lentinula edodes* (シイタケ) の発現シグナルで制御した大腸菌由来ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつベクター pLG-*hph* を用いて *P. ostreatus* の形質転換を行い、この発現ベクターが *P. ostreatus* においても有効に機能することを確認した。

(4) λファージをキャリアとして用いることにより形質転換効率が向上することを認めた。すなわち、一本鎖 DNA を用いることにより形質転換効率が数十倍高まること、また、二本鎖 DNA を用いた場合にも数倍程度の形質転換効率が上昇することを認めた。本研究は、真菌類のプロトプラストを用いた形質転換において、一本鎖 DNA が形質転換効率を顕著に高めることを示した初めての実験例であり、これにより食用担子菌において最も効率の高い遺伝子導入系が作成された。

(5) *P. ostreatus* の生産する MnP のうち、主要なアイソザイム MnP3 の合成をコードする遺伝子を本菌のゲノムからクローン化し、塩基配列を決定した。無根系統樹解析から、本菌の MnP はこれまでに知られているリグニンペルオキシダーゼ (LiP) と MnP とのハイブリッド的なアミノ酸配列を持つ、新しい酵素であることが示唆された。

(6) *mnp3* 構造遺伝子に構成的遺伝子 *sdil* の発現シグナルを結合させ、形質転換プラスミドを作成した。本プラスミドと、別に得られている *sdi1* を含むプラスミドにより *P. ostreatus* を共形質転換したところ、多数の高 MnP 発現株を得た。しかし、それらは野生型に比べて生育速度が低かった。そこで、相互に異なる2株の高 MnP 発現株を交配させて野生型とほぼ同じ生育速度を持つ形質転換株 (TMG9-C1) を得た。TMG9-C1 は液体培養において、野生株の生産する MnP3 のほかに、それよりも培養の前期に新たな MnP を生産した。この MnP の活性は野生株由来のレベルよりもはるかに高かった。

競争的 RT-PCR を用いた解析により、TMG9-C1 においては、新たに生産された MnP は野生株 *mnp3* よりも高いレベルで転写されていることが示された。これらの結果は形質転換株によって生産された MnP が、導入された組換え遺伝子に由来することを強く示唆した。本研究は選択マーカー以外の遺伝子を食用担子菌において同種発現させた初めての実験例である。

論文審査の結果の要旨

白色腐朽菌や食用きのこを含む担子菌類は、利用可能な種々の性質を有しているにも関わらず、他の微生物に比べて遺伝子解析や遺伝子工学的な育種技術が十分には進展していない。その一因として、安定で高効率な形質転換系や遺伝子発現系の開発が遅れていることがあげられる。本論文はわが国における重要な食用きのこであり、代表的な白色腐朽菌である *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) における高効率形質転換系を開発し、この系を用いて *P. ostreatus* における主要なリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ遺伝子 (MnP) の同種発現系を開発したものであり、成果として評価できる点は以下の通りである。

(1) *P. ostreatus* 由来のコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体中の iron-sulfur protein (Ip) サブユニットをコードする遺伝子 (*sdi1*) をゲノムおよび cDNA からクローン化し、その塩基配列を明らかにした。次いで、*sdi1* に変異を導入する手法により His237 を Leu に変換し、殺菌剤カルボキシシンに対する耐性遺伝子を得て、これを選択マーカーとして用いる *P. ostreatus* の形質転換系を作成した。これは、薬剤耐性を白色腐朽菌の形質転換株の選択マーカーに用いた最初の成功例である。

(2) 殺菌剤ハイグロマイシン B に対する耐性遺伝子を用いた *P. ostreatus* 形質転換系を作成した。

(3) 一本鎖キャリアー DNA の真菌類プロトプラストに対する顕著な形質転換効率の上昇効果を初めて示した。これにより食用担子菌で最も高い効率の系を開発した。

(4) *P. ostreatus* の主要マンガンペルオキシダーゼアイソザイムである MnP3 をコードする遺伝子 *mnp3* をクローン化し、プロモーター領域および酵素タンパクをコードする領域の塩基配列を明らかにした。また、本菌の MnP が従来知られているリグニンペルオキシダーゼ (Lip) と MnP のハイブリッド的なアミノ酸配列を有することを示した。

(5) *mnp3* 構造遺伝子および cDNA に構成的発現シグナルとして *sdi1* のプロモーターおよびターミネーターを結合させて組換え *mnp3* 遺伝子を得た。それを共形質転換系を用いて *P. ostreatus* プロトプラスト内に導入することにより液体培養条件下で高い MnP 活性を示す形質転換株を得た。形質転換体は本来の MnP のほか、組換え *mnp3* 遺伝子による MnP の生成が認められた。このことにより、*P. ostreatus* における同種形質転換系を用いる MnP の生産が可能になったことを確認した。

以上のように、本論文は担子菌の遺伝子工学において重要な基礎的技術である、同種形質転換系の開発を行ったものであり、得られた結果は、担子菌の持つリグニン分解機構の解析や利用に大きく寄与するばかりではなく、食用菌としてのきのこの分子育種などにも応用可能であり、その利用性は大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年6月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。