

「キノコの不思議」を逆遺伝学で解く

渡邊 彰

キノコ類とは、大型の生殖器官である子実体（いわゆるキノコ）を作る真菌類を指し、分類学的には、その大部分が担子菌に属する。生長過程における「担子胞子(n)」→「一核菌糸(n)」→「二核菌糸(n+n)」→「子実体(n+n)」という顕著な形態変化や、一つの細胞に核が二つ共存する二核状態(n+n)での生育など、ユニークな生態を持つ。

同時に、われわれの生活にも密接に関わっており、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) やシイタケ (*Lentinula edodes*) など食用として重要な種や、抗腫瘍性物質など種々の有用生理活性物質を生産する種も少なくない。また、植物系バイオマス資源の一つである難分解性高分子化合物リグニンに強い分解能をもつ種もあり(白色腐朽菌)、その能力がダイオキシン類などの分解にも応用できることから、バイオマス資源やバイオレメディエーションの分野での活用も期待されている。

以上のような生物としての面白みと実用性の高さなどから、その性質の解明や応用が試みられ、いくつかの種は全ゲノム解読も行われている。次世代型DNAシーケンサーの登場もあり、担子菌キノコのゲノム情報はますます増えると考えられ、次のステップとして、種々のポストゲノム解析が求められている。そこで本稿では、種々のポストゲノム解析のなかでも、生物学的機能を調べる上で強力なツールとなりうる「RNAサイレンシングを用いた遺伝子抑制法」と「遺伝子ターゲティングを用いた遺伝子破壊法」を取り上げ、担子菌キノコにおけるリバースジェネティクス(逆遺伝学)の現状を紹介する。

RNAサイレンシングは、二本鎖RNAが引き金となって、配列依存的に標的遺伝子の発現抑制を引き起こす現象であり、染色体中に複数存在する相同性の高い遺伝子や、破壊すると致死となる遺伝子の解析にも適用できるといった利点を持つ。ゲノムデータベースを用いた相同性解析から、担子菌キノコにおいても同様の抑制機構が存在することが考えられており、ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*)¹⁾ や植物と共生する菌根菌であるオオキツネタケ (*Laccaria bicolor*)²⁾ など、数種においてRNAサイレンシングが用いられてきた。また担子菌キノコには、二核状態で進行する生育ステージが存在することから、トランスに働くこの方法は、そのような生育ステージに発現する遺伝子の機能解析に有効であるといえる。ただし本法は抑制法なので転写産物の一部が残存し、顕著な効果が出ない場合もあると考えられる。

一方、遺伝子ターゲティングは一般に糸状性真菌類で効率が低く、特に担子菌キノコでは極めて難しかった。そもそも、外来DNAの染色体への組込みは、DNAの二重鎖切断修復機構に関わる二つのDNA修復系〔①相

同組換え(homologous recombination, HR)、②非相同末端結合(nonhomologous end-joining, NHEJ)]を介して起こると考えられている。HRは、相同性のあるDNA領域を用いた配列特異的なDNAの組換え系で、Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Mre11, Xrs2などのタンパク質が関与している。他方NHEJは、DNA配列の相同性に関係なく、外来DNAがランダムに染色体中へ導入される系であり、Ku70, Ku80, Lig4, DNAPKcs, Xrcc4などのタンパク質が関与している。遺伝子ターゲティングを用いた遺伝子破壊はHRを介して起こるが、担子菌キノコを含む糸状性真菌類ではNHEJが優先的に起こっていると考えられており、そのため、HR、すなわち遺伝子ターゲティングが巧く行かないのだとされている。

近年、糸状性真菌類の一種であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) において、Ku70やKu80, Lig4をコードする遺伝子を破壊すると、遺伝子ターゲティング頻度が100%になることが報告された^{3,4)}。この理由としては、NHEJが不活性化されたことによって、HRが優先的に働いた結果であると考えられている。その後、他の糸状性真菌類においても同様の手法で遺伝子ターゲティングの高効率化が行われてきており、最近、担子菌キノコでも、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) においてはku80を、*C. cinerea* においてはku70またはlig4を破壊することで、効率的な遺伝子ターゲティングが可能であることが明らかとなった^{5,6)}。

このように近年、RNAサイレンシングや遺伝子ターゲティングといったリバースジェネティクスの手法が担子菌キノコにおいても整いつつある。遺伝子ターゲティングにはNHEJを不活性化した変異株の構築が必要で、他の担子菌キノコですぐ適用できるわけではないが、今後、これらの手法が担子菌キノコの示すユニークな生命現象、すなわち「キノコの不思議」の解明に大きな役割を果たすことは間違いない。

- 1) Wälti, M. A. et al.: *Eukaryot. Cell*, **5**, 732 (2006).
- 2) Kempainen, M. et al.: *Environ. Microbiol.*, **11**, 1878 (2009).
- 3) Ninomiya, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12248 (2004).
- 4) Ishibashi, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14871 (2006).
- 5) de Jong, J. F. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **310**, 91 (2010).
- 6) Nakazawa, T. et al.: *Fungal. Genet. Biol.* (in press)