

杉山産業化学研究所 2021-22年度「研究助成」研究報告書

研究課題：シイタケによる漆ラッカーゼの発現と解析及びその利用

研究者：佐藤 利次

所属：北見工業大学・地域未来デザイン工学科・バイオ食品工学コース

研究目的：

ラッカーゼは、担子菌から植物まで広く生物に存在するポリフェノール酸化酵素で、その基質特異性の広さから応用範囲の広い有用な酵素である。実際に、担子菌由来のラッカーゼは飲料等の色や濁りの除去などに利用されており、フェノール性環境汚染物質の除去に有効であることも報告されている。しかし、担子菌由来ラッカーゼの至適pHはほとんどが酸性側であることから、その用途は限定的である。それに対して、漆のラッカーゼは至適pHが中性域とアルカリ性域であり、新たな応用が期待できる。漆のラッカーゼを有効利用するためには異種発現が不可欠であるが、これまで報告されていない。また、これまでに担子菌ラッカーゼを植物で発現させる研究は報告されているが、植物のラッカーゼを担子菌で発現させる研究は報告されていない。

一方、漆のラッカーゼ遺伝子に関しては、生漆から精製したラッカーゼのN末端配列情報から分泌後のラッカーゼのDNA配列情報がDDBJに登録されているが、完全長cDNA配列情報は報告されていなかった。そこで我々は、この情報をもとに、漆の葉から2種類のラッカーゼ遺伝子を単離し、分泌シグナルを含む完全長cDNA配列を明らかにした（未報告）。また、我々はこれまでにシイタケの遺伝子導入系と各種遺伝子発現ベクターを独自に開発してきた¹⁾。また、開発したベクターのうち、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*gpd*)プロモーターを外来遺伝子発現用プロモーターとしたpChGベクターを構築して、シイタケによるラッカーゼ¹⁾とチロシナーゼ²⁾の高発現に成功した。これまでに、担子菌による有用酵素の高発現の報告は我々の研究以外には少なく、シイタケを用いて応用性の高い漆のラッカーゼを高発現させることは、担子菌による新たな高発現系の確立という点でも、基礎と応用両面から意義のある研究である。そこで、本研究では、pChGベクターを用いた漆のラッカーゼ遺伝子のシイタケでの発現を目的とした。

実験方法

これまでに単離した漆ラッカーゼ遺伝子Tv1cc1遺伝子のコドン使用頻度とシイタケラッカーゼ遺伝子のコドン使用頻度を比較し、漆ラッカーゼ遺伝子の

DNA配列をシイタケコドン使用頻度に合わせた変異Tv1cc1のDNA配列を設計した。また、N末端の分泌シグナルをシイタケラッカーゼlcc1遺伝子の分泌シグナルに入れ替えたシイタケ発現用変異mTv1cc1を設計した。さらに、C末端側にHis-Tagを付加したシイタケ発現用変異漆ラッカーゼ遺伝子 mTv1cc1を設計した。mTv1cc1の合成は、変異導入プライマーを設計し、PCRにより15個の増幅断片としてつなぎ合わせる手法で検討した。また、合成mTv1cc1は、シイタケ高発現ベクターpChGへ挿入した。

結果と考察

これまでに漆の葉から抽出したmRNAを解析した結果、完全長の漆ラッカーゼ遺伝子が2種類得られたことから、この2種類の遺伝子配列上のコドン使用頻度の平均値と、シイタケゲノム上に存在しているラッカーゼ遺伝子Lelcc1~Lelcc16の配列のコドン使用頻度の平均値を比較した。その結果、LelccとTv1cc1では、Tv1cc1の61ヶ所のアミノ酸配列をコードしているDNA配列に、14種類のアミノ酸、17種類のコドンに明らかな相違が認められた。この相違部位に関しては、シイタケの使用頻度の高いコドンへの改変を行った。また、シグナルペプチド配列が、Tv1cc1とシイタケ分泌型ラッカーゼでは異なることから、Lelcc1のシグナルペプチドに入れ替える設計を行った。さらに、異種発現の確認と精製を容易にするために、C末端側にHisタグ配列を付加した約1.7kbの塩基配列を設計し、mTv1cc1とした。当初、mTv1cc1の合成は、15個の増幅断片としてつなぎ合わせる手法で検討したが、全合成が達成できなかったことから、最終的には全合成を委託した。これをシイタケ発現ベクターpChGに導入し、pChG-mTv1cc1を構築した。また、CRISPR/Cas9システムを利用したlcc1遺伝子座位へのmTv1cc1のノックインを新たに検討しており、Lelcc1のsgRNAの設計が完了し、ドナーベクターを構築中である。今後、これらのベクターをシイタケに導入し、mTv1cc1遺伝子の発現を解析していく。

(参考文献)

- 1) 佐藤利次 (2021)、シイタケの遺伝子導入研究、きのこ研だより、44 巻、10-22.
- 2) T. Sato, Y. Suzuki, M. Nito, A. Minami, N. Suzuki, K. Yaegashi, and H. Hirano (2019), Overexpression of the laccase gene, *lcc1*, in *Lentinula edodes* using the pChG vector., *Mycoscience*, 60, 246-249.
- 3) T. Sato, M. Takahashi, J. Hasegawa, and H. Watanabe (2019), Overexpression and repression of the tyrosinase gene in *Lentinula edodes* using the pChG vector. *J Biosci Bioeng*, **128**, 1-7.