

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03798

研究課題名(和文)きのこ類における栄養成長から生殖成長への切換えに関わる分子スイッチの特定

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism for switching from vegetative growth to sexual growth in mushroom forming fungi

研究代表者

坂本 裕一 (Yuichi, Sakamoto)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主席研究員

研究者番号：80390889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウシグソヒトヨタケを用いて、菌糸成長から生殖成長への成長相転換(子実体発生誘導)に関わる遺伝子を特定した。子実体の傘形成などに関わる既知の青色光受容体(dst1, dst2, wc2)が光による子実体発生誘導に関わることを明らかにした。脂質修飾に関わるcfs1遺伝子およびF-boxドメインを持つ遺伝子を破壊すると子実体発生が抑制されたことから、脂質を介したシグナリングが子実体発生誘導に関わる可能性を見出した。光照射後発現し、かつ子実体発生が抑制される高グルコース条件で発現が抑制されるbtb1遺伝子の抑制で子実体発生が抑制された。btb1遺伝子が成長相転換の鍵遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシグソヒトヨタケを用いてきのこ類の子実体発生誘導に必要な遺伝子群を明らかにした。子実体発生誘導において脂質を介したシグナル伝達経路の存在とその受容体候補を発見した。これまで担子菌類の子実体発生誘導に関わるホルモンとその受容体が存在することが証明されたことはなく、大きな可能性を秘めている。また、タンパク質結合に関わると考えられるbtb1遺伝子が子実体発生が抑制される高グルコース条件下で発現抑制を受けており、低グルコース条件下で発現抑制が解除されることで子実体発生誘導が可能になることを見出した。このことはbtb1遺伝子が成長相転換の可否を決める鍵遺伝子であることを示唆し、大きな発見である。

研究成果の概要(英文)：We identified genes involved in induction of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. It is revealed that known blue photoreceptors (dst1, dst2, wc2) which are related to cap formation of fruiting body are involved in the induction of fruiting body development by blue light. Disruption of the cfs1 gene, which is involved in lipid modification, and gene with F-box domain inhibited fruiting body development, suggesting that lipid-mediated signaling may be involved in the induction of fruiting body development. Fruiting body induction was suppressed by the suppression of the btb1 gene. The btb1 is expressed at 1h after light irradiation and whose expression is suppressed under the high glucose condition in which the fruiting body induction is suppressed. The btb1 gene may be a key gene for fruiting body induction in *Coprinopsis cinerea*.

研究分野：森林資源学

キーワード：成長相転換 子実体発生誘導 光受容体 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

きのこは糸状菌の中で特別大型の子実体を形成することから、古くから形態学研究の対象とされてきた。これまでの研究によりきのこの子実体形態形成における環境要因の影響についてはある程度明らかになっている。特に、光照射により子実体形態への影響については研究が進んでおり、遺伝学的な解析から光受容体(dst1, dst2, WC-2)が単離されて、それらの変異株は傘が形成されない。一方環境要因が子実体発生誘導(菌糸成長から生殖成長へと転換する成長相転換)に与える影響については多くは明らかになっていない。その原因として、子実体がいつどこから生えてくるか発生直前まで明確にわからないという理由があった。そこで我々はモデル生物であるウシグソヒトヨタケを用い、青色光照射により、24時間後には同調的かつ同心円状に子実体を発生させる手法を確立した。また、高グルコース条件下では子実体発生が完全に抑制されることを見出した。

その培養系を用いて網羅的なトランスクリプトーム解析を行うことにより、青色光により1時間で多数の遺伝子が発現することが明らかになった。一方高濃度のグルコース添加でそれらの遺伝子発現は抑制されないことを明らかにした。以上のことから1時間以降に発現する遺伝子がグルコースにより制御されている可能性が示唆された。しかしながら、これまで菌糸成長から生殖成長へと成長相転換に必須な遺伝子については明らかになっていない。

また、共同研究者らにより、ウシグソヒトヨタケにおいて、ゲノム編集が可能なが明らかになった。そこで、ゲノム編集、オミクス解析を組み合わせることで、成長相転換に関わる分子メカニズムを明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

きのこの発生誘導(栄養成長から生殖成長への成長相転換)機構を解明することは、栽培の効率化や栽培できないきのこの栽培技術の開発につながると考えられる。しかし、きのこの成長相転換機構は植物などと比較すると不明な点が多い。その主要原因として、子実体がいつどこから生えるか正確に分からないという点があげられる。そこで我々は、ウシグソヒトヨタケを用いて、青色光照射により同心円上に同調的に子実体発生を誘導する培養方法を確立した。さらに富栄養条件下では、光照射後の成長相転換シグナルがキャンセルされることを見いだした。そこで本研究では、我々が開発した系を用いて、新規青色光受容体を単離すること、及び栄養シグナル伝達経路を解明することで、きのこ類の成長相転換を実現する機構を解明することを目的として研究を行った

3. 研究の方法

3.-1 培養方法

ウシグソヒトヨタケを MYG 培地 (0.2%グルコース濃度) にて暗黒下 28℃ で 6 日間培養し、青色光 LED を 15 分間照射し、子実体発生誘導処理を行なった。高グルコース条件の場合は、グルコース濃度を 1% に調製した MYG 培地を用いた。

3.-2 RNA-seq

3-1 の方法により培養したのち、青色光 LED 照射し、0, 1, 6, 12, 18 時間後にサンプリングを行った。また、同様に 1% グルコース濃度の培地で培養した菌糸についてもサンプリングを行った。サンプリング後 Quiagen 社の RNeasy を用いて RNA を抽出し、

illumina Truseq ライブラリー調製キットによりライブラリーを調製し、Hi-seq2500 によるシーケンスを行った。シーケンスデータは clc genomics workbench により解析を行った。

3-3 qPCR

3-2 と同様に培養、サンプリング、RNA 抽出を行った。得られた RNA を QuantiTect Reverse Transcription Kit キットにて逆転写反応を行い、Luna Universal qPCR Master Mix により PCR 反応液を調製、QuantStudio3 を用いてリアルタイム PCR を行った。

3-4 ゲノム編集

cas9 とガイド RNA ウシグソヒトヨタケにおいて発現させるベクター pCcPef3_126 を構築した。PEG 法により形質転換を行うことで、ゲノム編集を行った。標的遺伝子を PCR で増幅し、増幅しない、増幅バンドの大きさが異なる、シーケンスを行い変異が確認できる株をゲノム編集株として解析を進めた。

3-5 fas1p-nanoluc 株による解析

光照射後 1 時間で高発現する遺伝子である *fas1* プロモーターに化学発光遺伝子である *nanoluc* を連結し、ウシグソヒトヨタケに形質転換し、光照射により発光する株 (*fas1p-luc*) を作成した。同菌株に UV 照射を行い、発光が消失した株を選抜した。選抜された菌株をゲノム解析し、変異遺伝子の同定を行なった。

3-6 脂質解析

光照射後のウシグソヒトヨタケについてメタノールにより脂質を抽出した。抽出した脂質を質量分析装置により網羅的に解析した。また、野生株から抽出した脂質を脂質合成に関わる遺伝子の変異株に添加し、*knot* が形成されるか確認した。

4 . 研究成果

4-1 RNA-seq

RNA-seq を行った結果、光照射後 1 時間で多数の遺伝子発現が上昇することが明らかになった。特に脂質や細胞膜に関連すると考えられる遺伝子 (*cfs1*, *cfs2*, *nod1*, *fas1* 等) 転写制御に関わると考えられる遺伝子 (*btb1*, *cryA* 等) の発現が多いことが明らかになった。また、6 時間以降に発現が上昇する遺伝子として、フェロモン関連遺伝子 (*fccm1,2*, フェロモンペプチド) 形態形成関連遺伝子 (ハイドロホビン (*hyd1-3*), ガレクチン (*cg11-3*)) F-box 遺伝子などが特定された。

4-2 qPCR

RNA-seq のデータを元に、光照射後発現が上昇する遺伝子についてリアルタイム PCR (qPCR) で発現の確認を行なった。培地中グルコース濃度 0.2% と 1% での遺伝子発現を比較したところ、以前の結果と同様、ほとんどの遺伝子は両者で発現量の変化はなかったが、BTB/POZ ドメインを有する *btb1* 遺伝子に関しては、グルコース濃度 1% では発現が上昇しなかった。6 時間以降に発現が上昇する遺伝子に関しては、ハイドロホビン、ガレクチン、*ich1* (傘の形態形成に関わる遺伝子)、フェロモン関連遺伝子などの多くがグルコース濃度 1% で発現しないことが明らかになった。以上のことから、*knot* 形成に直接関わる遺伝子の多くはグルコース濃度 1% で発現が上昇しないと考えられる。

4-3. ゲノム編集

4-3-1 光受容体 (*dst1*, *dst2*, *wc2*)

これまで単離された光受容体 (*dst1, dst 2, wc2*)は子実体を形成するため、成長相転換には直接関わらないと考えられてきた。ゲノム編集を行った結果、3 遺伝子は全て子実体を形成し、傘を形成せず、既報通りであった。しかしながら、3 遺伝子の変異株全てで光照射による同調的な子実体発生誘導は認められなかった。また、1 時間で発現する遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。以上のことから、光受容体は光照射による成長相転換にも関わることが明らかになった。

4-3-2 1 時間で発現する遺伝子

1 時間で発現が上昇する遺伝子のうち *cfs1* と *btb1* をゲノム編集したところ、*knot* が形成されないことが明らかになった。それ以外の遺伝子で明確に子実体形成が抑制されたゲノム編集株はなかった。*cfs1* は脂質修飾酵素であり、そのホモログである *cfs2* はゲノム編集を行っても表現型が出なかった。*cfs1* 変異株の遺伝子発現を確認したところ、ハイドロホビンや F-box 遺伝子などの多くが発現しないことが明らかになった。以上のことから、*cfs1* により産生される脂質がシグナルとなって *knot* 形成のための遺伝子発現が調節されている可能性が示唆された。

btb1 遺伝子については構造遺伝子部分に cas9 のターゲット配列がなかったため、プロモーター領域にターゲットを設定してゲノム編集を行った。その結果、プロモーター領域が 28 塩基欠損した株を得ることができ、その株では *btb1* 遺伝子の発現が抑制され、子実体が形成されなかった。*btb1* 遺伝子は子実体が発生する領域にのみ特異的に発現し、高グルコース培地では発現が抑制されることから、成長相転換に直接関わる遺伝子である可能性が高い。

4-3-3 12 時間以降に発現する遺伝子

6 時間以降に発現する遺伝子のゲノム編集を行ったところ、いくつか表現型の異なる変異株を得ることができた。*fcm2* のゲノム編集を行ったところ、子実体の発生が途中で止まることが明らかになった。すでに変異株が報告されている *ich1* と似た形態であった。ハイドロホビン (*hyd1*) のゲノム編集株は菌糸成長が遅くなり、最終的に子実体発生も抑制された。F-box ドメインを持つ遺伝子については、完全に子実体発生誘導が抑制された。F-box ドメインを持つタンパク質は植物のホルモン受容体に多いことから、子実体発生誘導に関わる化合物シグナリングに関わっている可能性が高い。

4-5 *fas1p-luc* 株による光シグナリングの解析

光照射後 1 時間で最も高発現する遺伝子である *fas1* プロモーターに化学発光タンパク質である nano-luciferase (*nanoluc*) を結合し、光照射により発光が認められる金株を作成した。得られた菌株を使って *fas1* プロモーターを調節する遺伝子に変異を持つ菌株の選抜を行った (*fas1p-luc*)。UV 照射により、*nanoluc* の発光が顕著に低下した菌株を選抜することができた。選抜した菌株について全ゲノムシーケンスを行い、アミノ酸置換を伴う変異を特定した。さらに、遺伝解析により、発光低下と連鎖している変異を特定した。得られた遺伝子は、プロテインキナーゼや機能未知タンパクなどであった。

4-6 脂質解析

質量分析装置による網羅的な脂質解析を行った。野生株のウシグソヒトヨタケおよび脂質修飾酵素である *cfs1* ゲノム編集株において光照射後の脂質を比較した。その結果野生株において *cfs1* ゲノム編集株と比較してリノール酸やリノレン酸が少ないことが明らかになった。また光照射後 12, 18 時間において脂質の変動が大きいことが明らかになった。その中から、*cfs1* ゲノム編集株ではほとんど変動せず、野生株のみ光照射後増

加する脂質を特定した。

18 時間で脂質の変動が大きかったことから、光照射後 18 時間の菌体から脂質を抽出し、*cfs1* ゲノム編集株に添加した。その結果 *cfs1* ゲノム編集株において knot が形成された。以上のことから、*cfs1* が産生する脂質は子実体発生誘導に関わるシグナル分子の合成に関わっている可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Yuichi, Sato Shiho, Ito Miyuki, Ando Yuki, Nakahori Kiyoshi, Muraguchi Hajime	4. 巻 217
2. 論文標題 Blue light exposure and nutrient conditions influence the expression of genes involved in simultaneous hyphal knot formation in <i>Coprinopsis cinerea</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiological Research	6. 最初と最後の頁 81 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Yuichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Influences of environmental factors on fruiting body induction, development and maturation in mushroom-forming fungi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fungal Biology Reviews	6. 最初と最後の頁 236 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.02.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本裕一, 佐藤志穂, 中沢威人, 村口 元, 石井一夫, 刑部敬史
2. 発表標題 青色光によるウシグソヒトヨタケの子実体発生誘導に関わる遺伝子の解析
3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Sakamoto, Shiho Sato, Takehito Nakazawa, Keishi Osakabe, Hajime Muraguchi
2. 発表標題 Identification of genes involved in fruiting body induction in <i>Coprinopsis cinerea</i>
3. 学会等名 11th International Microbiological Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本裕一, 佐藤志穂, 村口元, 中沢威人, 刑部敬史
2. 発表標題 ウシグソヒトヨタケにおける子実体発生制御に関わる遺伝子の特定
3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本裕一, 佐藤志穂, 刑部敬史, 中沢威人, 石井一夫
2. 発表標題 ウシグソヒトヨタケにおける子実体原基形成に必要な遺伝子の探索
3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高木浩一, 高橋徹, 濱田英介	4. 発行年 2018年
2. 出版社 理工図書	5. 総ページ数 338
3. 書名 工業技術者のための農学概論	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石井 一夫 (Ishii Kazuo) (60449238)	久留米大学・付置研究所・准教授 (37104)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	刑部 敬史 (Osakabe Keishi) (70450335)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・教授 (16101)	
研究分担者	山田 秀俊 (Yamada Hidetoshi) (70511955)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員 (81202)	
研究分担者	中沢 威人 (Nakazawa Takehito) (80608141)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	