

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05763

研究課題名(和文)マイタケのアルビノ変異の遺伝的特性の解明と育種への展開

研究課題名(英文)Elucidation of molecular genetic characteristics of albino mutation of Maitake mushroom and its application for breeding

研究代表者

会見 忠則 (AIMI, Tadanori)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：90264928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マイタケの子実体の着色はメラニンにより起こり、チロシナーゼ2により生産される。変異型と野生型間のチロシナーゼ2遺伝子の塩基配列を比較すると、変異型の遺伝子のコード領域に1塩基の欠失が発見され、フレームシフトを引き起こしていた。また、PCR法により、担子孢子分離株の中から、変異型、野生型のそれぞれの遺伝子を持つ菌株を選抜する技術開発に成功した。この技術を使って選抜した変異型×変異型と野生型×変異型の交配株の子実体の色は、それぞれ全て白とベージュであり、本研究の成果は、マイタケの白色品種の育種に新たな戦略を提供し、優良白色品種の育種を容易にするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイタケは、日本で人気の食用きのこであり、人工栽培も可能で、非常によく食されている。しかしながら、汁物の多い和食では、マイタケ特有の褐色色素が、煮汁に出てくることで料理の色合いが悪くなるため、鍋などの汁物には使いにくい食材の一つであることから、褐色色素を生産しない有用な白色品種の開発が熱望されている。しかし、現有する白色品種は、収量が低く、生産しても採算が取れないため、普及していない。本研究の成果で、マイタケの白色化の原因遺伝子が見つかったこと、そして、その変異型遺伝子の検出が容易になったことで、今後、加速度的に収量の高い、白色マイタケ品種を育種することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：The coloration of maitake fruiting bodies is caused by melanin, which is produced by tyrosinase 2. A comparison of the tyrosinase 2 gene sequence between the mutant and wild type revealed a single nucleotide deletion in the coding region of the mutant gene. A single nucleotide deletion was found in the coding region of the mutant gene, and frameshift mutation was occurred. In addition, we succeeded in developing a technique for selecting albino mutant strains among basidiospore isolates by PCR, efficiently. The color of the fruiting bodies of the mutant × mutant and wild type × mutant dikaryon selected by using this technology were white and beige, respectively. The results of this study will provide a new strategy for breeding white varieties of maitake and facilitate the breeding technique of useful white varieties.

研究分野：菌類遺伝育種学

キーワード：アルビノ マイタケ 育種 メラニン チロシナーゼ 遺伝マーカー フレームシフト変異 新品種

### 1. 研究開始当初の背景

マイタケは、日本で人気の食用きのこであり、人工栽培も可能で、非常によく食されている。しかしながら、汁物の多い和食では、マイタケ特有の褐色色素が、煮汁に出てくることで料理の色合いが悪くなるため、鍋などの汁物には使いにくい食材の一つであることから、褐色色素を生産しない有用な白色品種の開発が熱望されている。白色品種として育種され、広く流通しているきのこには、定番のエノキタケ (*Flammulina velutipes*) や野生型は、傘色が類白色～淡褐灰色であり表面頂部に大理石模様を有するブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*, 白色品種商品名: ブナピー) が知られ、鍋などの定番の食材として使用されているが、実のところ、シイタケ (*Lentinula edodes*) を含めて、これらのきのこは、野生型においてもマイタケの様に褐色の色素が煮汁に溶出して、見栄えを悪化させることはないため、その点では、特に白色品種である必要性は乏しい。一方、マイタケのアルビノ変異体は、僅かながら生産され流通しているもののほとんど普及しておらず、その育種も行われていないのが現状である。有用な白色品種開発が進まない一つの原因として、マイタケの栽培には高度な技術を必要とするため、生産施設の栽培環境に適した多収量かつ安定に子実体を形成する菌株の選抜に重点が置かれ、今のところ子実体の品質に関わるような品種改良を行う余裕がないこと、そして、図1の様なアルビノ変異の遺伝学的特性が明らかになっていないため、マイタケの育種を行う技術者は育種に着手出来ていないことが挙げられる。以上の様な背景から、本研究における核心となる学術的「問い」は、“きのこの子実体がなぜ白くなるのか?”である。



野生株                      アルビノ変異株  
図1. マイタケ子実体の色の変異

### 2. 研究の目的

1988年に日本で初めての純白系エノキタケの第1号が品種登録されて以来、約30年間、全く明らかにされていない核心となる学術的「問い」は、“きのこの子実体がなぜ白くなるのか?”であり、それに答えを出すことが、本研究の主たる目的である。次いで、マイタケのアルビノ変異の遺伝学的特性を明らかにできれば、その原因遺伝子を迅速に検出する手法の開発が可能となり、育種技術者に非常に有用なツールを提供し、白色品種の育種が効率化できる。最終目標は、褐色色素の溶出しない高収量の有用白色品種を育種・開発することである。そもそもきのこの色とは、何であろうか?きのこの傘の表面の色は、紫外線による孢子中のDNAの損傷を防ぐために生産されると考えられており、茶色、茶褐色、淡褐灰色等が多いのも一因であると思われる。これまでの研究でマイタケの褐色色素について、物理的、化学的な性質を調査したところ、メラニンであると同定した。そこで、本研究では、マイタケ子実体を着色させるメラニン合成に関わる遺伝子及び、アルビノ変異の原因遺伝子を同定し、有用マイタケ白色菌株の育種技術に応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 子実体形成と連動したメラニン合成関連遺伝子の探索

野生株及びアルビノ株の全ゲノムDNAの塩基配列を次世代シーケンサーにより解析し、マイタケゲノムデータベースを作成した。構築したDNAデータベースから、メラニン合成関連遺伝



菌糸体 → 着色菌糸体 → 子実体原基 → 幼子実体 → 子実体

図2. マイタケの子実体発生過程

子を相同性検索で抽出し、プライマーを設計して、各発達段階（図2）におけるメラニン合成関連遺伝子の発現解析を行った。

次に、特定した子実体に特異的にメラニンを生産する酵素遺伝子の産物が、成熟したタンパク質として子実体で発現していることを確認するために、ウエスタンブロットング及び免疫電子顕微鏡法により解析した。ウエスタンブロットング等を行うための抗体は、特定した遺伝子から推定されるアミノ酸配列の一部を合成し、ウサギを免疫し作製した。

#### （2）白色変異株の遺伝的な背景の解明

特定したメラニン合成関連遺伝子の配列を野生株（褐色株）とアルビノ変異株との間の遺伝子配列（アミノ酸配列）で比較し、その違いについて解析した。同時に、白色株と褐色株を区別するための手法として、野生型遺伝子とアルビノ変異型のそれぞれの遺伝子の特異的に増幅可能なPCRプライマーを設計し、両遺伝子の検出及び、菌株の選抜を行った。次いで、アルビノ変異の遺伝学的解析は、次のようにして行った（図3）。褐色株及び白色株より分離した単孢子分離株（野生1核株及びアルビノ1核株）をそれぞれ掛け合わせ、ヘテロな二核交配株（2核交配株）を作製した。その二核交配株より子実体を発生させ、単孢子分離株（F1世代1核株）を得た。このF1世代1核株とアルビノ1核株とを掛け合わせ、2核戻し交配株を得て、栽培し子実体を発生させ、その子実体の色を調べた。

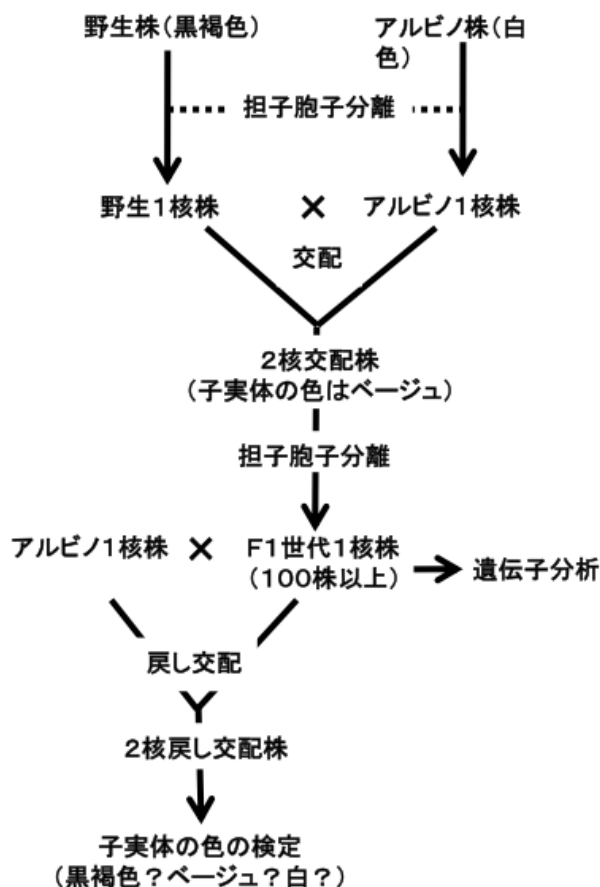


図3. マイタケ子実体の色の遺伝分析

#### 4. 研究成果

##### （1）子実体着色に関連したメラニン合成関連遺伝子の同定

マイタケの子実体から単離された褐色色素の化学的および物理的特性（紫外線スペクトルを含む）は、真菌のメラニンとほぼ同じであった。マイタケの全ゲノム配列から、2つのチロシナーゼ遺伝子（*tyr1*および*tyr2*）及びポリケチドシンターゼ1遺伝子（*pks1*）を見出した。これら3つの遺伝子の各発達段階での転写量を定量したところ、*tyr1*は菌糸体で、*tyr2*は子実体形成開始時から幼子実体（図4.赤枠）で、*pks1*は成熟子実体（図4.青枠）から収穫後子実体顕著な発現が観察できた。従って、*tyr1*は菌糸体の着色、*tyr2*は子実体の着色、*pks1*は成熟子実体の自己消化に関わるものと推察され、子実体の着色には、*tyr2*が深く関わっていることが分かった。また、抗チロシナーゼ2抗体を用いた免疫電子顕微鏡法では、チロシナーゼ2タンパク質（TYR2）が原基の細胞壁に局在することが示された。従って、TYR2は、この多孔菌類であるマイタケのメラニン生合成と密接に関連しており、メラニンは細胞壁で生成されていると考えられる。

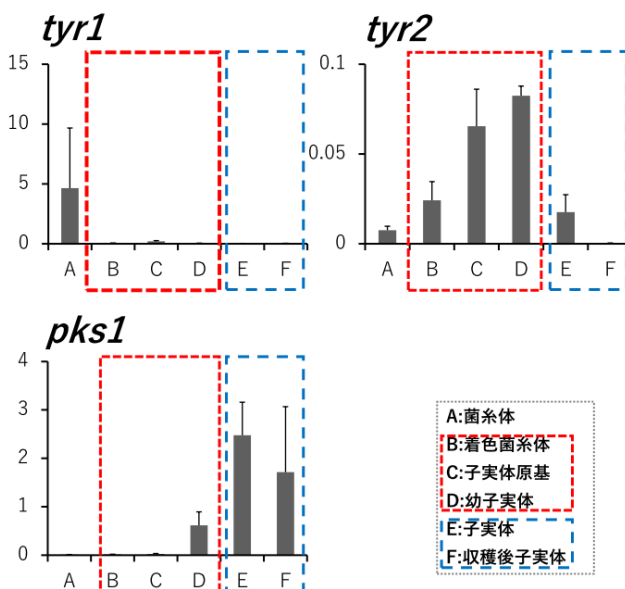


図4. 野生二核株におけるメラニン合成関連遺伝子の発現

##### （2）アルビノ変異原因遺伝子の同定と交配育種

マイタケの2つの和合性株，アルビノ型モノカリオン株と野生型モノカリオン株のチロシナーゼ2遺伝子 (*tyr2*) を増幅し，その特徴を調べた(それぞれ，*tyr2*<sup>25</sup>，*tyr2*<sup>\*</sup>と命名)．その結果，IM-WM1-25の*tyr2*<sup>25</sup>のコード領域に1塩基の欠失が発見され，この変異は翻訳のフレームシフトを引き起こし，不活性なTYR2を生み出すことが予測された(図5)．

野生株	CCCCCATTTTGAATACAGGAGACGGTCACAGTCGTCGCT P I L N T Q E T V T V V A
アルビノ株	CCCCCATTTTGAATAC_CAGGAGACGGTCACAGTCGTCGCT P I L N T R R R S Q S S L

図5. アルビノ株で見出されたフレームシフト変異

そこで，正常な*tyr2*<sup>\*</sup>と変異型*tyr2*<sup>25</sup>を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー対を設計し，野生株×アルビノ型株(*tyr2*<sup>\*</sup>×*tyr2*<sup>25</sup>)株の担子胞子を分離して得られたF1子孫の*tyr2*遺伝子型を解析した．戻し交配(F1子孫×アルビノ型株)を行い，交配株の子実体の色を分析した．その結果，すべての交配株の子実体の色は白とベージュであり，対応する遺伝子型は*tyr2*<sup>25</sup>×*tyr2*<sup>25</sup>と*tyr2*<sup>\*</sup>×*tyr2*<sup>25</sup>であった．これらの結果から，アルビノ変異の原因遺伝子は*tyr2*であることが示唆され，本研究はマイタケに属するアルビノ品種の育種に新たな戦略を提供するものである．



図6. 戻し交配株の子実体の色。  
〔IM-アルビノ株(アルビノー核株) × 単胞子分離株\* (F1) 〕

### (3) まとめと今後の展望

以上の研究から，マイタケの子実体の着色は，チロシナーゼ2によること，そして，このチロシナーゼ2欠損変異株のホモ二核菌糸は，白色の子実体を形成することが，明らかになった．これにより，変異型チロシナーゼ2遺伝子を検出するプライマーを用いたPCR法により，単胞子分離株の中から，チロシナーゼ2欠損変異株を選抜する方法が確立できた．しかしながら，現存のアルビノ変異株は，理由は明らかではないが，子実体の収量が，非常に低いため，採算が合わず，市場に流通していない．今後の課題としては，本研究で確立したチロシナーゼ2欠損変異株を選抜する方法を駆使して，子実体形成能力の高い菌株を選抜することが望まれる．具体的には，アルビノ株×優良野生株のF1世代の菌糸の中から，まず，アルビノ変異株の原因遺伝子をもった1核株を多数選抜する．その菌糸の中から，その後，交配によりアルビノ変異株のホモ二核菌糸を作製し，菌床栽培及び原木栽培において，大型の子実体を形成する収量の良い交配株を選抜していくことになる．この単胞子分離→チロシナーゼ2欠損変異株の選抜→交配によるアルビノ変異株のホモ二核菌糸の作製→子実体形成のサイクルを繰り返すことにより，安定した収量の得られる，鳥取大学農学部ブランドの白色マイタケ品種を実用化することが望まれる．

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi, N., Hayashi, M., Nakano, S., Shimomura, N., Yamaguchi T. and Aimi, T.	4. 巻 60(4)
2. 論文標題 Expression of tyrosinase genes associated with fruiting body formation and pigmentation in <i>Grifola frondosa</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 262-269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.myc.2019.04.003	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 Kawaguchi, N., Hayashi, M., Chen, F.-C., Shimomura, N., Yamaguchi T. and Aimi, T.	4. 巻 65:
2. 論文標題 Genetic analyses of causal genes of albinism (white fruiting body) in <i>Grifola frondosa</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-019-1811-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi, N., Hayashi, M., Chen, F.-C., Shimomura, N., Yamaguchi T. and Aimi, T.	4. 巻 27(2)
2. 論文標題 Expression of polyketide synthase gene 1 (pks1) in the fruiting body of <i>Grifola frondosa</i> post-harvest.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 67-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Numata Fumie, Kawaguchi Nobuhisa, Yamada Chisa, Ota Yuki, Chen Fu-Chia, Hayashi Mirai, Shimomura Norihiro, Yamaguchi Takeshi, Aimi Tadanori	4. 巻 60
2. 論文標題 Mitochondrial DNA dynamics during fruiting body formation in <i>Grifola frondosa</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 147 ~ 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.myc.2019.01.003	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------