

平成 22年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007～2009  
 課題番号： 19580004  
 研究課題名 (和文) 食用きのこ類の孢子欠損性変異に関わる遺伝子の同定とその育種的利用に関する研究  
 研究課題名 (英文) Identification of the gene for a sporeless mutation and its application in edible mushroom breeding.  
 研究代表者 松本 晃幸 (Matsumoto Teruyuki)  
 鳥取大学・農学部・教授  
 研究者番号：60132825

## 研究成果の概要 (和文)：

食用きのこヒラタケ類の一種、ウスヒラタケの孢子欠損性変異体を材料として、DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図を作成して当該変異の座上部位を推定し、その超近接マーカーを取得した。これらの成果は DNA マーカーを利用した無孢子きのこの効率的な育種を可能にするものである。連鎖地図情報に基づいて当該変異のゲノム領域をクローニングして塩基配列を決定し、野生型と違いのある複数の遺伝子を明らかにした。今後相補性試験などにより変異遺伝子を特定する予定である。

## 研究成果の概要 (英文)：

In this study, we constructed the genetic linkage map of the sporeless mutant of *Pleurotus pulmonarius* based on the DNA markers, and determined the locus of sporeless mutation. Moreover, we obtained the DNA markers which are very tightly linked to this locus. These results enable to carry out the efficient breeding of a sporeless mushrooms. In addition, we cloned the region related to this mutation, and based on the information of linkage map we determined the whole nucleotide sequences of this region. By the comparison of the sequences from mutant and wild type, we found the differences in several gene structures. In future, we will identify the gene that causes the sporeless mutation of this fungus by using the complementation test and so on.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：(1) 食用担子菌類：(2) 孢子欠損性変異：(3) 連鎖解析：(4) AFLP マーカー：  
 (5) 分子育種：(6) ウスヒラタケ

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の特用林産物において食用きのこ類の総生産額は2,300億円近くに達し、農林業における主要な作物として位置づけられている(平成17年度林野庁統計)。近年、消費嗜好の多様化や健康志向の高まりなどを背景に以前より多種類のきのこが栽培されるようになってきている。たとえば、ヒラタケ類では以前より栽培されてきたヒラタケに加え、ウスヒラタケ、エリンギ、タモギタケ、オオヒラタケなど多くの種類が栽培されるようになった。さらに、食用きのこ類の商業利用価値の向上に伴い、その生産方法は温度と湿度が制御された閉鎖空間で管理されるようになってきている。その結果、栽培過程において子実体より放出される大量の胞子(一般に成熟した子実体で作られる胞子は数十億~百億に達する)がアレルギー、きのこ肺などを引き起こして栽培従事者の健康に悪影響を及ぼし、さらには栽培施設の汚染や病害の発生、子実体の発生不良といった商品価値低下の原因ともなっている(Obatake et al., 2003など)。また健康被害や汚染といった問題以外にも栽培品種の莫大な量の胞子が自然界に飛散することによって、自然集団の遺伝的多様性の画一化が進行していることが、特定の遺伝子を指標とした調査により示唆されている(時本ら、1973など)。

以上のような子実体の生産に伴う大量の胞子飛散に起因する諸問題の解決には無胞子性の菌株の育成が最も有効であることから、これまでにシイタケやヒラタケ、ヤナギマツタケなどの食用栽培きのこにおいて、薬剤あるいはUV照射を用いた突然変異処理により胞子欠損性変異株が作出され、一部のきのこ種では作出した変異株を利用した実用品種の開発に成功している(Murakami, 1993など)。しかしながら、突然変異を用いた育種は膨大な労力を必要とすること、効率が著しく低いこと、実用的な品種への更なる改良が困難であることなどの多くの欠点がある。したがって、突然変異育種に依存しない多くのきのこ種に汎用的に胞子欠損性変異を付与することができる新技術の開発が望まれ、遺伝子レベルでの胞子欠損性変異のメカニズムの解明はその基礎となる重要な課題である。これに対して、胞子欠損に関与する遺伝子レベルの情報は、現在までにきのこ類のモデル生物であるヒトヨタケを材料として、減数分裂過程の解明を目的とした研究の中でいくつか得られているのみであり(Merino et al., 2000など)、現在までに食用きのこ類で分離されている胞子欠損性変異株に由

来する変異の原因遺伝子についてはまだまったく明らかにされておらず、育種利用につながる実用的な遺伝子情報も得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究は栽培過程できのこ子実体より放出される莫大な量の胞子に起因するさまざまな問題の解決を目指し、遺伝・育種学的あるいは遺伝子工学的的手法開発の基礎となる胞子形成の抑制につながる遺伝子を、ヒラタケ類を代表する栽培きのこ、ウスヒラタケ(*Pleurotus pulmonarius*)の胞子欠損性変異体(Ohira, 1979)を材料として単離・同定する。そして、その構造、機能を明らかにするとともに、育種利用に向け当該変異遺伝子と栽培形質との関係に関する遺伝学的情報の取得を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 子実体発生試験と連鎖解析用分離集団の調製

基本材料にはウスヒラタケ胞子欠損性変異株TMIC30058と野生型TMIC31664株を用いた。連鎖解析用分離集団にはそれぞれの株由来の単胞子分離株の交配株、TMIC30058S1 × TMIC31664S1より分離した単胞子由来のF1、150株を用いた。戻し交雑株などの栽培試験では、木粉・米糠培地による一般的なきのこ栽培法により子実体を発生させ、重要な栽培形質(子実体収量、発生温度特性、形態的形質など)について調査した。

### (2) 連鎖地図作製と変異領域のマッピング

変異に関する表現型の調査結果とAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism: 制限酵素断片長多型)マーカーの分離を調査し、連鎖解析用ソフト「MAPMAKER ver. 3.0 (Lander et al., 1987)」を用いて、AFLPマーカーに基づく連鎖地図を構築するとともに、変異領域をマッピングした。AFLP解析はキャピラリーシーケンサーにより行った。

### (3) 近接マーカーの探索とSTS(sequence tagged site)化

バルク法に基づくAFLP解析により変異領域の近接マーカーを探索した。探索したマーカーはHEGS (High efficiency genome scan)電気泳動システム(Kawasaki et al., 2003)を用いてDNA断片として分離し、その塩基配列を決定してSTS化プライマーを設計した。

### (4) 変異領域のクローニング

野生型 TMIC31664S1 株ゲノム DNA の Fosmid ライブラリーを調製し、取得した変異遺伝子領域の近接マーカー DNA をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションにより変異領域を保有するクローンを選抜した。クローンの塩基配列の解析はサブクローニングおよびプライマーウォーキングを併用して進めた。遺伝子解析は遺伝子情報解析ソフトウェア「GENETYX ver. 9.1.1」を用いて行った。

(5) 減数分裂過程における核行動の観察  
担子器内の減数分裂にともなう核行動の光学顕微鏡観察は、Aist (1969) の塩酸ギムザ染色法に準じて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胞子欠損性変異の遺伝性と栽培形質におよぼす影響

検定交配による表現型の分離を調査した結果、 $\chi^2$  乗検定により 1:1 の比で分離することが示され、本変異は劣性の単一因子によるものであると推定された。減数分裂過程における担子器の核行動について細胞学的観



図1 胞子欠損性変異をホモで保有する菌株の子実体形成

察を行った結果、本変異体の子実体では減数分裂が減数第1分裂の中期・終期で停止しているものと推察された。変異の栽培形質への影響を検討した結果、変異形質をホモで持つ場合、野生型とのヘテロである場合、変異形質を全くもたない場合で、接種後の培地全体への菌糸蔓延に要する日数に差はなく、子実体収量についても遺伝型に関係しない傾向が得られた。また、図1に示すように、変異型ホモ株でも子実体の形態的形質の優れたものが得られる可能性が示された。以上のことから、本課題で材料としている自然突然変異体はウスヒラタケの無胞子性品種育成の素材として極めて有用であると考えられる。

##### (2) AFLP マーカーに基づく遺伝連鎖地図作製と胞子欠損性変異形質の座上部位 AFLP 解析により得られた 311 個のマーカー

に胞子欠損性変異形質を含めて連鎖解析を行った結果、12 連鎖群からなる遺伝連鎖地図が作製された。連鎖地図の全長は 1010.3 cM、各連鎖群の長さは最小 53.4 (LG12) ~ 最大 117.2 (LG1) cM、平均マーカー間距離 5.06 cM であった。胞子欠損性変異形質は 40 個の AFLP マーカーからなる LG2 に座乗すると推定された (図2)。DNA マーカーに基づく本連鎖地図はヒラタケ類で 2 番目、ウスヒラタケでは初めてのものである (Okuda et al., 2009)。

##### (3) 胞子欠損性変異形質の近接マーカーの探索と STS 化

効率的な育種選抜法であるマーカーアシスト選抜への利用とポジショナルクローニングに用いるプローブへの利用を目的に胞子欠損性変異関連領域近傍に座乗する AFLP マーカーをバルク解析によって探索した。その結果、変異形質との地図上の距離が 0cM となる 12 個の超近接マーカーを得た (図2)。これらを含めた近接マーカーの STS 化を行ったところ、4 個について成功した。さらに、遺伝的背景の異なる野生株などを用いて、変異検出用マーカーとしての評価を行ったところ、図3に示すように、2 個のマーカーがほぼ完璧に遺伝的バックグラウンドに影響されることなく、検出可能であることが示された。さらに、これらはマルチプレックス PCR、リアルタイム PCR においても再現性よく利用可能であった。以上の結果はきのこ類育種において、実用的な形質に関する初めての DNA マーカーの開発例であり、学術誌 (Okuda et al., 2009) に報告するとともに、これら 2STS マーカーについて特許申請を行った (松本ら, 2009)。

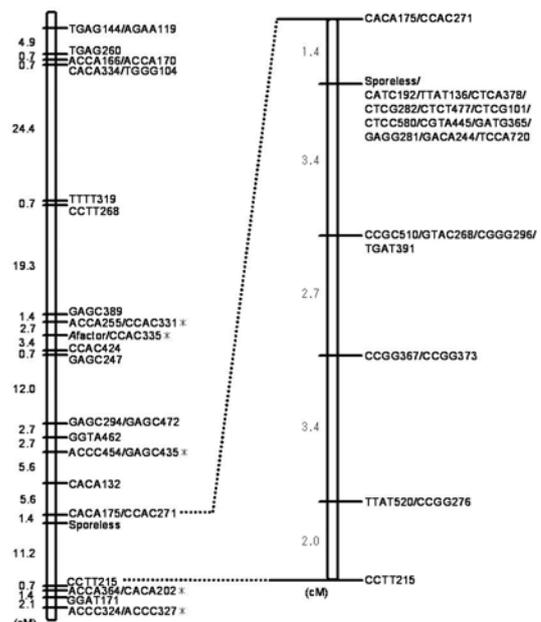


図2 胞子欠損性変異の座上部位と近接マーカー

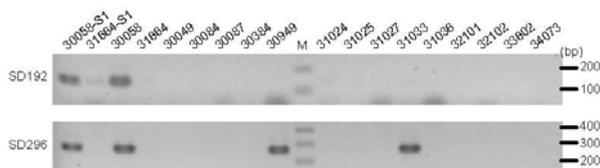


図3 STS化に成功した2マーカー (SD192 および SD296) とその検出例

(4) 変異領域のクローニングと遺伝子解析  
野生型 TMIC31664S1 のゲノムDNAを材料として、 fosmidライブラリーを構築した。ライブラリーより前述の近傍マーカーを DNAプローブとして関連領域保有クローンをスクリーニングし、40kb前後の4個のポジティブクローンを得た。各クローンの塩基配列を決定し、整理化した結果、これらは変異座 (0cM) 位周辺の約67kbを網羅していた (図4)。クローニングした変異領域に対応する約67kbの塩基配列を変異型および野生型両ゲノムについて決定し、当該領域の塩基配列を比較した。その結果、当該領域に両ゲノム間で多くの多型が存在し、その中には他生物において孢子形成に関連する遺伝子として報告されている ORF領域が存在していることを突き止めた。今後、これら ORFの当該変異との関係を形質転換による相補性試験および発現解析により明らかにしていく予定である。

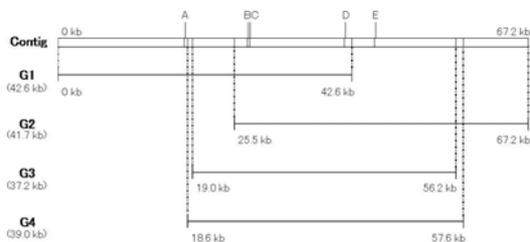


図4 ポジティブクローンの整理化によって得られた67.2kb領域

以上を要するに、本研究は食用きのこウスヒラタケで見出された孢子欠損性変異の遺伝性および育種学的有用性を明らかにし、本種では初めてとなるDNAマーカーに基づく遺伝連鎖地図を作製し、変異領域を推定した。そして、その知見に基づき、実用的な育種利用が可能な変異検出用STSマーカーを開発した。さらに、ポジショナルクローニングにより変異領域の遺伝子構造を明らかにして、野生型との差異を明確にしたものである。これらの成果はきのこ類における無孢子性品種育成への分子育種学的手法導入の基盤になるものであると考える。今後、より汎用的な変異導入技術の構築を目指して、変異原因遺

伝子の特定を進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Okuda, Y.、Murakami, S. and Matsumoto, T.、A genetic linkage map of *Pleurotus pulmonarius* based on AFLP markers, and localization of the gene region for the sporeless mutation、Genome、査読有、Vol. 52、2009、pp483-446
- ② Okuda, Y.、Murakami, S. and Matsumoto, T.、Development of STS markers suitable for marker-assisted selection of sporeless trait in oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius*、Breeding Science、査読有、Vol. 59、2009、pp315-319

[学会発表] (計7件)

- ① 奥田康仁・村上重幸・松本晃幸、AFLPマーカーに基づくウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) の遺伝連鎖地図および孢子欠損性変異領域の座乗部位、日本菌学会第52回大会、2008年5月30日・6月1日、三重県津市、三重大学
- ② 奥田康仁・村上重幸・松本晃幸、Bulked segregant analysisによるウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) の孢子欠損性変異領域近傍マーカーの同定、日本きのこ学会第12回大会、2008年9月16日・9月17日、福岡県福岡市、九州大学医学部
- ③ Okuda, Y.、Murakami, S. and Matsumoto, T.、Identification of markers closely linked to the gene region for sporeless mutation in *Pleurotus pulmonarius* by bulked segregant analysis、The 5th Meeting of East Asia for Collaboration on Edible Fungi、2008年9月16日・9月17日、福岡県福岡市、九州大学国際研究交流プラザ
- ④ 奥田康仁・村上重幸・松本晃幸、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) における孢子欠損性変異検出STSマーカーの開発、第8回糸状菌分子生物学コンファレンス、2008年11月17日・11月18日、石川県金沢市、石川県文教会館
- ⑤ Okuda, Y.、Murakami, S. and Matsumoto, T.、Genetic linkage map and STS markers for breeding of a sporeless strain in oyster mushroom, *Pleurotus*

*pulmonarius*、25th Fungal Genetics Conference at Asilomar、2009年3月17日-3月22日、Asilomar、California、USA

- ⑥ 奥田康仁・村上重幸・松本晃幸、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) 胞子欠損性変異関連領域のマップベースクローニング日本菌学会第53回大会 2009年8月20、8月21日、鳥取県鳥取市、鳥取大学
- ⑦ 奥田康仁・村上重幸・松本晃幸、リアルタイムPCR法を用いたウスヒラタケ無胞子形質の迅速選抜法日本育種学会第117回講演会 2010年3月26、3月27日、京都府京都市、京都大学

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：胞子欠損性変異検出マーカー  
発明者：松本晃幸・村上重幸・奥田康仁  
権利者：国立大学法人鳥取大学  
種類：特願  
番号：2009-054317  
出願年月日：2009年3月8日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 晃幸 (MATSUMOTO TERUYUKI)  
鳥取大学・農学部・教授  
研究者番号：60132825

### (2) 研究分担者

村上 重幸 (MURAKAMI SHIGEYUKI)  
財団法人日本きのこセンター・菌蕈研究所・上席主任研究員  
研究者番号：00072794