

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580086  
 研究課題名（和文） エノキタケ子実体誘導に関する遺伝子群の機能解析と遺伝子操作系の開発  
 研究課題名（英文） Analysis of genes related to fruiting body induction and development of gene manipulation system in the basidiomycete *Flammulina velutipes*  
 研究代表者  
 下坂 誠（SHIMOSAKA MAKOTO）  
 信州大学・繊維学部・教授  
 研究者番号：90187477

研究成果の概要（和文）：一般に「キノコ」と呼ばれる「担子菌の子実体」ができる仕組みを遺伝子のレベルで解明することを目指した。まず、エノキタケを材料に用いて、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入用バイナリーベクター-pFungiway を構築した。このベクターは、目的遺伝子の高発現あるいは RNA 干渉を利用した発現抑制が可能となるように設計した。実際にエノキタケ複核菌糸で発現する 2 種の遺伝子を用いて、pFungiway ベクターの有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify a molecular mechanism of fruiting-body formation in the basidiomycetes (mushrooms). Binary vectors (named pFungiway) were constructed, which could be used for introduction of foreign genes into cells of Enokitake (*Flammulina velutipes*) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The vectors were designed to make it possible to increase or suppress a level of expression of the objective genes. Availability of the constructed vectors was confirmed by using two kinds of genes that were expressed in the vegetative mycelium of *F. velutipes*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：担子菌キノコ、子実体、エノキタケ、遺伝子操作、RNA 干渉、アグロバクテリウム

## 1. 研究開始当初の背景

担子菌キノコの子実体は食用として、また、種々の生理活性物質の供給源として重要である。自然界には多様な担子菌が存在し、これまでに数多くの種が分離同定されてきた。しかし、人工栽培によって子実体を安定に生産

できる種はごく限られている。この原因として、栄養菌糸体から子実体を生ずる分化の過程について、分子レベルでの理解がほとんど進んでないことが挙げられる。

これまでに、担子菌の子実体形成過程を分子レベルで解明する目的で、我が国で人工裁

培されている代表的なキノコであるエノキタケ (*Flammulina velutipes*) を実験材料に用いて、子実体原基で特異的に発現する遺伝子群を約600個単離した。その結果、シグナル伝達や細胞増殖制御に関わることが予想されるタンパク質、細胞壁や構造タンパク質の分解代謝に関わる酵素をコードする遺伝子が単離できた。その一方で、解析した遺伝子の約半数は、相同配列を有するタンパク質がデータベースに登録されておらず、機能未知であった。

これまで担子菌キノコの研究は、形態および分類学的なものが中心であり、従来の応用微生物学が展開してきた代謝制御や分子育種などの手法の適用例はほとんどなかった。そこで、エノキタケの子実体形成時に特異的に発現する遺伝子のはたらきを調べるため、効率的な遺伝子操作実験系の開発が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

エノキタケのみならず、幅広い担子菌及び菌類全般に適用可能な遺伝子操作系を開発するため、以下の項目について研究を展開した。

### (1) 担子菌遺伝子解析用バイナリーベクターの構築

既に、アグロバクテリウムを介してエノキタケ複核菌糸細胞へ T-DNA 領域を導入し、ゲノムへ組み込むことに成功した。そこで、T-DNA 領域内に、目的遺伝子を挿入することで、エノキタケ細胞で該当遺伝子を高発現もしくは発現抑制させることが可能なバイナリーベクターを作成することにした。その際に、菌類全般での使用を可能とする汎用性を持たせることを検討した。

### (2) RNA 干渉による発現抑制の有効性確認

未知遺伝子の機能解析には、ゲノム中の該当遺伝子を破壊し表現型の変化を観察するのがひとつの有力な手段である。しかし、担子菌は複核菌糸であり、一方の核遺伝子を破壊しても他方の核遺伝子により機能の相補が起こると予想される。したがって、遺伝子機能を調べるためには、2本鎖 RNA 分子を利用した RNA 干渉 (RNAi) 法が有効と考え、上述のバイナリーベクターにも RNAi を適用可能なタイプを構築した。実際に、エノキタケ複核菌糸細胞で RNAi による遺伝子発現抑制

が可能であるか検討した。

### (3) エノキタケで使用可能なレポーター遺伝子の検討

エノキタケ複核菌糸細胞では、子実体形成のための外部条件が整うと、誘導に関与する遺伝子のスイッチが入り、次々に子実体形成に必要な遺伝子の発現が誘起されると考えられる。この過程ではたらく鍵遺伝子を明らかにし、その発現条件を調べることは子実体形成の分子機構を知る上で重要である。そこで、エノキタケにおいて、目的遺伝子の発現をモニタリングするためのレポーター遺伝子について検討を加えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 担子菌遺伝子解析用バイナリーベクターの構築

アグロバクテリウムを介した植物細胞の形質転換に用いるバイナリーベクターを基本骨格として、T-DNA 領域内に以下の要素を組み入れた。①菌類における選択マーカーとして用いる抗生物質耐性遺伝子、②導入遺伝子を構成的及び子実体特異的に発現させる 2 種類のプロモーターの配置、③Gateway テクノロジーの導入により、制限酵素サイトに頼らずに目的遺伝子を簡便に挿入できること。構築を目指す RNA 干渉による遺伝子発現抑制型バイナリーベクターの原型を Fig. 1 に示した。

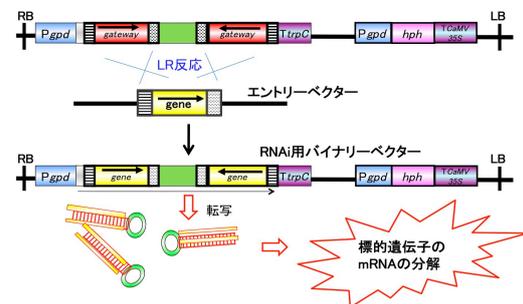


Fig. 1 遺伝子発現抑制 (RNAi) 型バイナリーベクターの構造

目的遺伝子をエンタリーベクター経由で、1段階のインビトロ LR 反応により挿入できるように設計した。該当遺伝子が逆向きに反復して配置されるため、転写物は分子内で相補的に結合し、2本鎖 RNA 分子となって標的遺伝子の分解をもたらす。

## (2) RNA 干渉による発現抑制の有効性確認

エノキタケにおいて、子実体原基で発現量が増大する adenosine deaminase 様遺伝子及び菌糸体で発現する acetyl xylan esterase 様遺伝子について、RNAi 用バイナリーベクターに組み込み形質転換体を得た。形質転換体における該当遺伝子の発現量を RT-PCR により調査し、さらに表現型の変化について調べた。

## (3) エノキタケで使用可能なレポーター遺伝子の検討

遺伝子発現モニタリング用のレポーター遺伝子候補として、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) と当研究室で土壌細菌より分離した赤色蛍光 (urogen III methyltransferase) 遺伝子 (*cob*) を用いた。両遺伝子を高発現用バイナリーベクターに組み込み、得られた形質転換体の菌糸に対して紫外線を照射し、蛍光発生の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 担子菌遺伝子解析用バイナリーベクター pFungiway シリーズの構築

菌類における汎用的な遺伝子機能解析用バイナリーベクターを構築し、pFungiway シリーズと命名した (Fig. 2)。本 pFungiway シリーズベクターの特徴として以下の点を挙げることができる。① gateway システムを採用したことで目的遺伝子を容易に挿入でき、多数の遺伝子の網羅的な解析が可能であること。② 選択マーカーに hygromycin B 耐性遺伝子 (*hph*) を配置したタイプと G-418 耐性遺伝子 (*nptII*) を配置したタイプを構築し、複数遺伝子の相互関係やレポーター遺伝子を用いた遺伝子発現抑制効果の評価を可能としたこと。③ エノキタケ由来 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 (*gpd*) の構成的かつ強力なプロモーターを用いているため、担子菌にとどまらず幅広い菌類において利用できる可能性があること。実際に植物病原性糸状菌である *Fusarium oxysporum* で機能することを確認済みである。④ *gpd* プロモーターは構成的な発現を可能にする反面、子実体形成期特有に生じる現象のみを解析することは困難である。そこで、子実体組織において特異的に高発現する hydrophobin 遺伝子 (*hyd*) のプロモーターを用いたベクターも併せて作成した。

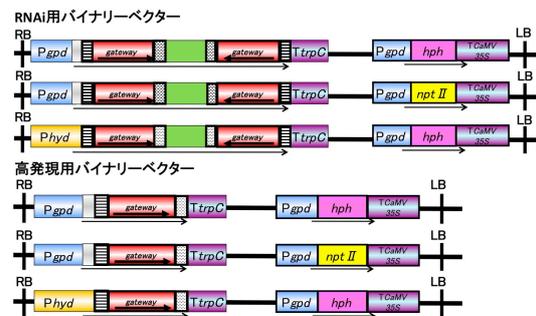


Fig. 2 担子菌遺伝子機能解析用バイナリーベクター pFungiway シリーズの構造

## (2) RNA 干渉型ベクターを用いた遺伝子発現抑制の確認

### ① 細胞増殖因子様タンパク質遺伝子 (*Fv-ada*) の発現抑制

エノキタケ *Fv-ada* は、子実体形成期に強く発現する遺伝子のひとつとして単離したものである。 *Sarcophaga peregrina* (センチニクバエ) から単離された細胞増殖因子 insect-derived growth factor (IDGF) と推定アミノ酸配列で 48% の相同性を示した。 IDGF 細胞増殖因子の特徴として、アデノシンをイノシンに変換するアデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性を有し、細胞の増殖や分化が著しい時期に発現し特定の器官形成への関与が推定されている。 *Fv-ada* ORF の推定アミノ酸配列中にも ADA 活性サイトのモチーフ配列が保存されていた。また、RT-PCR により *Fv-ada* は子実体原基において発現量が増加することから、遺伝子産物が子実体形成期における細胞の増殖や分化を調節している可能性が考えられた。

最初に *Fv-ada* 遺伝子をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現させ、精製した組換えタンパク質を用いて ADA 活性を持つことを確認した。次に、 *Fv-ada* 遺伝子を RNAi 型バイナリーベクターに挿入しエノキタケ複核菌糸細胞に形質転換した。得られた形質転換株の *Fv-ada* 発現量は有意に抑制されていることを RT-PCR によって確認した。また、抑制の度合いが大きい株ほど菌糸成長が顕著に抑制されており、 *Fv-ada* 遺伝子産物が菌糸伸長に関与していることが示唆された (Fig. 3)。

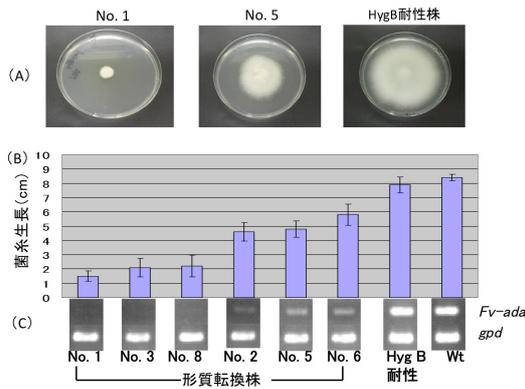


Fig. 3 *Fv-ada* 遺伝子の発現抑制と菌糸の成長遅延

(A) 代表的な形質転換体の培養 10 日目の成長状況、(B) 各形質転換体のコロニー直径の比較、(C) RT-PCR による *Fv-ada* 発現量の比較、構成的に発現する *gpd* 遺伝子を対照として用いた。HygB 耐性株はバイナリーベクターのみを導入した形質転換体である。

### ②acetyl xylan esterase 様遺伝子 (*Fv-axe*) の発現抑制

エノキタケの菌糸細胞において特異的に発現し、菌類の acetyl xylan esterase と相同性を示す *Fv-axe* 遺伝子の発現抑制の影響を解析した。RNAi により得た *Fv-axe* 遺伝子発現抑制株には、おがくず・米ぬかを含む培地で顕著な菌糸生長の遅延が見られた (Fig. 4)。このことから、*Fv-axe* 遺伝子産物がおがくず・米ぬかに含まれるキシランの分解資化に関わっていることが示唆された。*Fv-axe* ORF は、N 末端側にセルロース結合ドメイン、C 末端側にエステラーゼ触媒ドメインを有していた。

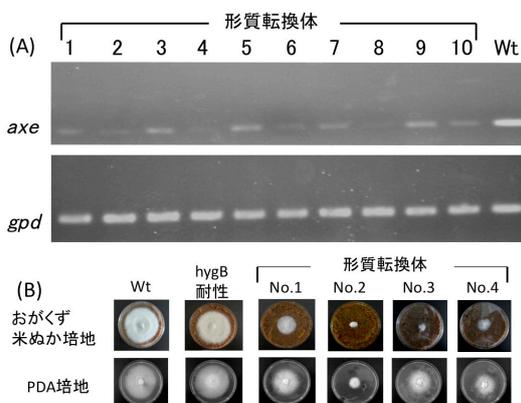


Fig. 4 *Fv-axe* 遺伝子の発現抑制と菌糸の成長遅延

(A)RT-PCR による *Fv-axe* 遺伝子発現量の比

較、(B)おがくず・米ぬか寒天培地における培養 10 日目の増殖比較

### (3)エノキタケ複核菌糸細胞における赤色蛍光遺伝子の発現

高発現型バイナリーベクターを用いて、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) をエノキタケ複核菌糸細胞に導入した。しかし、細胞自体が緑色蛍光域に自家蛍光を持つため、バックグラウンドとの差が不明瞭であった。一方、赤色蛍光遺伝子 (*cob*) は、土壌細菌由来のポルフィリン合成系酵素遺伝子である。本遺伝子の高発現は赤色蛍光を発する異常代謝物を蓄積することが知られている。*cob* 遺伝子を発現させたエノキタケ複核菌糸細胞は明らかな赤色蛍光を発したことから、本遺伝子はエノキタケにおける転写活性モニタリング用のレポーター遺伝子として利用可能であることがわかった (Fig. 5)。

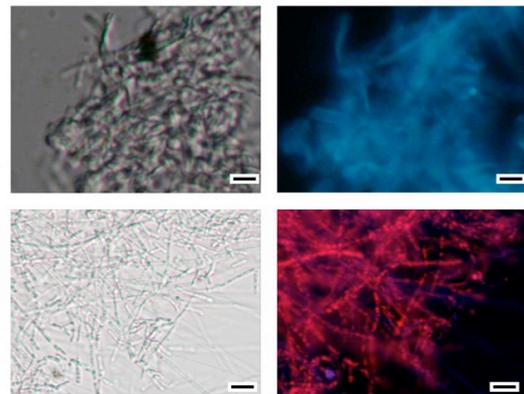


Fig. 5 赤色蛍光遺伝子 (*cob*) を導入した複核菌糸細胞の蛍光顕微鏡写真

(上側) エノキタケ宿主株、(下側) *cob* 遺伝子導入株、(左側) 位相差顕微鏡写真、(右側) 紫外線照射下の蛍光顕微鏡写真、サイズバーは 10  $\mu$ m

本研究によって、エノキタケをはじめ、幅広い担子菌及び菌類に適用可能な「実用レベルの遺伝子操作系」を開発できた。今後はエノキタケにおいて、1) 子実体特異的に発現する遺伝子の網羅的解析、2) 該当遺伝子の子実体形成ステージにおける発現時期の調査、3) 該当遺伝子の発現を抑制した際に子実体形成に与える影響の観察、を通じて子実体誘導の鍵となる遺伝子を探り出す計画である。本遺伝子の発現モニタリング系を作ることができれば、子実体誘導のための外部刺激条件を的

確かつ迅速に評価することが可能となり、エノキタケに限らず、人工栽培が困難であった有用担子菌の子実体人工栽培への途を拓くことが期待できる。

#### 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 Masato Yamada, Kazunobu Yawata, Yohsuke Orino, Satoshi Ueda, Yasuhiro Isogai, Goro Taguchi, Makoto Shimosaka, and Seiji Hashimoto; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of antifungal lipopeptide producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899, *Current Genetics*, 査読有, 55, 147-153 (2009)
- ② Masato Yamada, Michihisa Kurano, Satoshi Inatomi, Goro Taguchi, Mitsuo Okazaki, and Makoto Shimosaka; Isolation and characterization of a gene coding for chitin deacetylase specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有, 289, 130-137, (2008)  
<http://hdl.handle.net/10091/3081>

[学会発表] (計 7 件)

- ① 奥原 徹; エノキタケ *Flammulina velutipes* の acetyl xylan esterase 様遺伝子の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京
- ② 奥原 徹; 菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発 (ポスター発表)、第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009 年 11 月 19 日、東京
- ③ 奥原 徹; 菌類に対する遺伝子高発現および発現抑制用バイナリーベクターの開発 (口頭発表)、第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009 年 11 月 18 日、東京
- ④ 奥原 徹; 担子菌における汎用的な遺伝子機能解析用ツールの開発、日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡
- ⑤ 下坂 誠; 担子菌エノキタケにおける RNA 干渉 (RNAi) を用いた遺伝子機能解析、日本きのこ学会 2008 年度大会、2008 年 9 月 16 日、福岡
- ⑥ 関屋秀一; 担子菌エノキタケにおける形質転換系の開発と遺伝子発現抑制用ベクターの構築、日本農芸化学会 2008 年度大会、

2008 年 3 月 27 日、名古屋

- ⑦ 関屋秀一; 担子菌エノキタケにおける *Agrobacterium* を介した形質転換系と RNAi 用ベクターの開発、日本きのこ学会 2007 年度大会、2007 年 9 月 20 日、旭川

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下坂 誠 (SHIMOSAKA MAKOTO)  
信州大学・繊維学部・教授  
研究者番号: 90187477

##### (2) 研究分担者

田口悟朗 (TAGUCHI GORO)  
信州大学・繊維学部・准教授  
研究者番号: 70252070  
(H20 年連携研究者に変更)

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

稲富 聡 (INATOMI SATOSHI)  
株式会社ホクトきのこ総合研究所・研究員  
研究者番号: なし