

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450245

研究課題名(和文) シイタケ子実体形成関連遺伝子の同定手法の開発とその機能解析

研究課題名(英文) Development of the method to identify the gene involved in fruiting body formation of *Lentinula edodes*

研究代表者

目黒 貞利 (Meguro, Sadatoshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50112321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シイタケ子実体形成メカニズム解明にむけて、特定遺伝子のノックダウンによる逆遺伝学的アプローチを可能にするための形質転換手法の確立と、RNAiを用いた遺伝子ノックダウンを試みた。既報のシイタケ光受容体タンパク質をコードしているphrA遺伝子のクローニングを行い、全長cDNAおよびゲノムDNAを得たうえで、コード領域約600 bpを対象にGUS部分配列をリンカーとしたRNAiコンストラクトを構築した。構築したベクターをシイタケプロトプラストに導入し、形質転換を行った。その結果、一部の形質転換体で菌糸伸長速度の低下や着色が観察された。

研究成果の概要(英文)：This study developed the transformation method with RNAi construct for knockdown of specific gene involved in the fruiting-body formation of edible mushroom *Lentinula edodes*. Photoreceptor gene A of *L. edodes* (*Le.phrA*) was cloned and 600 bp of coding region was used for RNAi construct ligated with the partial sequence of GUS gene. RNAi construct for *Le. phrA* was successfully introduced with selection marker vector into protoplast of *L. edodes*. Some transformants showed brown color mycelium, and that the growth was inhibited remarkably. This phenotype might be caused by RNAi knockdown of *Le. phrA*.

研究分野：森林化学

キーワード：シイタケ 子実体形成 RNAi 形質転換 光受容体 きのこ

1. 研究開始当初の背景

日本の栽培キノコの中で最もよく普及している食用担子菌の一つにシイタケ (*Lentinula edodes*) がある。シイタケは、古来より日本の食文化において重要な位置をしめ、現在もなお重要な栽培作物の一つである。また、シイタケは、抗腫瘍活性や血中コレステロール低下作用を示す生理活性成分が含まれることが報告されて以来、健康食品としても見直されており、今後ますますその重要性が増すものと考えられる。しかしながら子実体形成の分子レベルでのメカニズムについては不明なままであった。

担子菌における子実体形成機構についてはネナガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) やスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) を中心に多くの研究がなされている。子実体形成の引き金となることや、促進効果のあることなどが示唆される物質として、cAMP が複数の菌種について報告されている。他に、フェノール酸化酵素やキチナーゼ等の関与についての議論もある。しかしいずれも菌種間によって効果に大きな差があり、無効果の場合も多い。また近年、バイオテクノロジー分野の技術が進歩し、子実体形成関連遺伝子のクローニング例が複数の菌種で報告されている。シイタケについては、子実体形成期に特異的発現を示す複数の遺伝子について報告がある。しかし、形質転換系が未確立であること等から主要な分子機構の解明には至っていなかった。

2. 研究の目的

申請者はシイタケ子実体を三角フラスコ内で発生させる独自の技術確立し、シイタケ子実体形成に関与する因子について検討を進めてきた。シイタケ子実体の形成は光や Cu、Mn などの微量元素およびチアミンが必須であることや、子実体形成直前にラッカーゼ活性が上昇する現象など、本培養システムでこそ観察できる因子を明らかにしており、これらの知見を基にした子実体形成分子機構の解明に向けた評価基盤が確立している。一方、研究分担者は近年、担子菌類の遺伝子組換えによる形質転換系を用いた研究を展開しており、リグニン分解酵素の高発現株の取得等をおこなっている。そこで、形質転換体作成とその表現型解析の双方を組み合わせた手法を確立し、シイタケ子実体形成メカニズム解明のブレークスルーとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロトプラストの調製

プロトプラストの生成及び再生における最適条件を決定する目的で、前培養および本培養、再生培地について検討した。

前培養

500 mL 容三角フラスコに、CYM 液体培地もしくは PGY 液体培地をそれぞれ 100 mL 加えオートクレーブ後 PDA 平板培地から直径 5 mm のシイタケ (森 4 6 5 株) 菌糸ディスクを 1 片接種し、暗所 25 °C で所定期間培養した。

本培養

100 mL 容三角フラスコに、CYM 液体培地もしくは PGY 液体培地をそれぞれ 20 mL 分注しオートクレーブした。それぞれの培地は 20 本ずつ用意した。前培養した菌糸体を培地ごとワーリングブレンダでホモジナイズし、得られた菌糸体破砕液を先に調製した培地に 1 mL 植菌し 20 日間培養した。

また 500 mL 容三角フラスコに PGY 液体培地をそれぞれ 100 mL 分注しオートクレーブした培地を 4 本用意し、同様に前培養した菌糸体破砕液を 10 mL 接種し 7 日間培養した。

本培養後の菌糸体は、セパレートブナー型漏斗にて吸引濾過し培地を除去後、滅菌済み 100 mL 容三角フラスコに菌体を回収した。

プロトプラスト化

終濃度 2.5% となるように Lysing enzymes from *Trichoderma*, Cellulase Onozuka RS を 0.5 M MgSO₄ 溶液に溶解し、回収した菌糸体ペレットに加えた。酵素溶液添加後 30、60 rpm で 6 時間酵素処理を行い、プロトプラストを遊離した。酵素処理後の菌糸体溶液を 15 mL 遠沈管に 7 mL ずつ取り、Sorb0sm 溶液を重層した。遠沈管をスイングローターにて 3,650 rpm、20 分間遠心分離し、界面に集積したプロトプラストを回収した。回収後のプロトプラストを Sorb0sm 溶液 40 mL で洗浄後、再度 2,500 rpm、10 分遠心し上清を除去し 1 mL Sorb0sm 溶液に懸濁した。回収したプロトプラストを、SLGC 血球計算盤を用いてバクテリアカウンター法で計測した。

(2) ベクターの作成

遺伝子発現用プロモーター及びターミネーターとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) 遺伝子に着目し、既報より配列を取得し、PCR によりクローニングした。これに選択マーカーとしてのハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*) を導入した (図 1 B)。一方で、シイタケ子実体形成へは光照射が必須であることが分かっている。そこで既報の光受容体タンパク質がシイタケ子実体形成にどのように関わっているかを明らかにするために、シイタケ光受容体タンパク質をコードしている *Le.phrA* 遺伝子のクローニングを行い、全長 cDNA およびゲノム DNA を得た。コード領域約 600 bp を対象に、GUS の部分配列をリンカーとした RNAi コンストラクトを構築するため、In-Fusion® HD Cloning Kit を用いて連結した (図 1 A)。

(3) 形質転換

(1) - の実験で得られたプロトプラスト

4.0×10⁷ cells / mL を用い、3 - 2 で構築したベクターを導入する形質転換実験を行った。ハイグロマイシン耐性マーカー及び *Le.phrA* の RNAi コンストラクト (図 1) をそれぞれ 20 µg 使用し、既報の遺伝子導入系プロトコルにしたがって行った。再生培地は PGY 培地を使用した。形質転換操作後、2 日目に顕微鏡下で菌糸再生を確認し、ハイグロマイシンを最終濃度 15 µg/mL になるよう培地に重層した。遺伝子導入後、8 日後と 20 日後に形質転換体コロニーをピックアップし、新しいハイグロマイシン濃度 15 µg/mL の PGY 培地に接種した。

4 . 研究成果

前培養および本培養条件がプロトプラスト収量とその再生率に与える影響を表 1 に示す。

表 1 プロトプラスト調製条件検討

前培養 培地 および 期間	本培養 培地 および 期間	菌糸体 (g)	プロトプ ラスト数	再生培地	再生 の有無
CYM 20日	CYM 20日	1.48		CYM	無
PGY 20日	PGY 20日	5.63	2.5×10 ⁶	CYM	無
PGY 20日	PGY 7日	1.14	7.0×10 ⁷	CYM	有
PGY 20日	PGY 7日	1.19	4.1×10 ⁷	PGY	有
PGY 20日	PGY 5日	1.19	6.0×10 ⁷	CYM	有
MYPG 20日	PGY 5日	2.30	1.8×10 ⁷	MYPG	無
MYPG 20日	MYPG 5日	1.40	2.5×10 ⁷	MYPG	無
MYPG 20日	MYPG 5日	7.26	1.8×10 ⁸	MYPG	無
MYPG 20日	MYPG 5日	4.25	1.5×10 ⁸	MYPG +	無
PGY 20日	PGY 7日	13.6	4.0×10 ⁷	PGY	有

プロトプラスト調製の条件検討では、前培

養期間 20 日、本培養期間 7 日で行い PGY 培地を使用することで再生株を得ることができ、再生にかかる時間も最も短かった。したがって本研究の形質転換実験では前培養期間 20 日、本培養期間 7 日で行い PGY 培地を使用する条件で行うこととした。

シイタケ光受容体タンパク質をコードしている *Le.phrA* 遺伝子のクローニングを行い、全長 cDNA およびゲノム DNA を得た。コード領域約 600 bp を対象に、GUS 部分配列をリンカーとした RNAi コンストラクトを構築した (図 1) 。

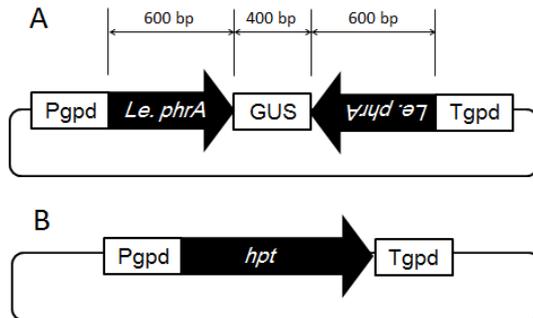


図 1 . シイタケ形質転換に用いたベクターの概要 A : *Le.phrA* 遺伝子に対する RNAi コンストラクト B : 選択マーカーとして用いたハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*) 発現コンストラクト Pgpd : シイタケ *gpd* 遺伝子プロモーター Tgpd : シイタケ *gpd* 遺伝子ターミネーター

上記の形質転換ベクターを用いた形質転換操作を二度行い、合計 20 枚の PGY 培地に 4.0×10⁷ 個のプロトプラストを播種した。顕微鏡観察下でプロトプラストの菌糸再生を観察したところ 1 プレートあたり約 13 株の再生が確認した。総プロトプラスト数当たりで形質転換効率を表すと約 0.00065% であった。

得られた形質転換体の菌糸形態を図 2 に示す。本実験で得られた形質転換体は褐色を呈するものが多く得られた。*Le.phrA* 遺伝子のノックダウンの影響による形態的变化であると考えられた。また、導入したコンストラクトの影響が目的外の遺伝子に及んでいる可能性も考えられたので、DDBJ に登録されている遺伝子やシイタケゲノムと、本研究で RNAi コンストラクトのターゲット配列との相同性検索を行ったが、*Le.phrA* 遺伝子以外では影響を受けるような相同性のある遺伝子は確認されなかった。*Le.phrA* 遺伝子の分子機構として PHRA と PHRB が結合し、*Le.tyr* 遺伝子 (チロシナーゼ遺伝子) を正に制御していることが提案されている。*Le.tyr* 遺伝子は、メラニン合成に関わる遺伝子として知られている。また子実体発生初期や子実体の傘、子実体を採取した後に褐色化することが知

られているが、この際に *Le. tyr* 遺伝子が発現していることが報告されている。さらに詳細な検討が必要であるが、今回得られた *Le.phrA* 遺伝子ノックダウン株が、メラニン合成を常に行っている可能性が考えられ、*Le.phrA* 遺伝子が単に *Le. tyr* 遺伝子を正に制御しているわけではない可能性が示唆された。

本研究では、光受容体タンパク質をモデルターゲットとして、シイタケ子実体形成関連遺伝子のノックダウン手法を開発した。プロトプラスト生成およびその再生には菌糸の前培養および本培養期間が重要であり、最適化することが出来た。薬剤耐性セクションマーカーおよび RNAi コンストラクト発現ベクターを構築し、形質転換に成功した。本条件下で調製したプロトプラストを用いた形質転換効率は良好であり、得られた形質転換株の一部に着色が見られ、RNAi による *Le.phrA* 遺伝子ノックダウンによりもたらされる形質である可能性が示された。

現在子実体形成試験に供しているが、着色の見られた菌糸は栄養成長段階においてすでに著しく菌糸伸長が遅く(図2)、野生株との比較による適切な子実体形成能評価は出来なかった。しかしながら、今回構築したシイタケの形質転換法及び RNAi による目的遺伝子のノックダウンは、他の遺伝子にも適用できると考えられ、シイタケ子実体形成メカニズム解明に向けた逆遺伝学的解析に道が開けたと考えられる。

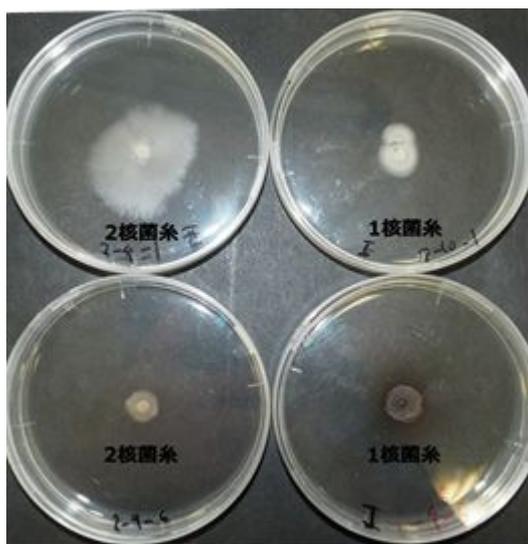


図2. 得られたシイタケ形質転換体の菌糸

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)

[学会発表](計 1件)

1. 前田卓也、目黒貞利、亀井一郎

Lentinula edodes における RNAi 法を用いた

Le.phrA 遺伝子ノックダウン

第66回日本木材学会、2016年3月28日、名古屋大学(名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目黒 貞利 (MEGURO, Sadatoshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 50112321

(2) 研究分担者

亀井 一郎 (KAMEI, Ichiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 90526526