

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07612

研究課題名(和文) エノキタケの半数体ミュータントパネルの作出と食用きのこ育種モデルの基盤構築

研究課題名(英文) Construction of haploid mutant-panel of *Flammulina velutipes* as a model fungus for edible mushroom breeding

研究代表者

種坂 英次 (Tanesaka, Eiji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80188391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：単核性発菌特性を示すエノキタケ系統(bmHY4)について、アグロバクテリウムを介した形質転換(AMT)の効率化を進めた。アグロバクテリウム株LBA4404とC58C1ではEHA105と比較して4～5倍の形質転換効率を得た(Tanesaka et al. 2018)。一方、トランスポソンの自律性転移による変異体の作出を試みた。真菌類 *Fusarium oxysporum* 由来の自律性転移因子 *impala* の全長を含む pUC-*imp160* 領域をバイナリベクター(pPZP-HYG2)のT-DNA領域に導入し(pPZP-*imp*)、pPZP-*imp*を用いたAMTによるエノキタケ形質転換体を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エノキタケは我が国で栽培化された産業的に極めて重要な食用菌である。本研究ではエノキタケのアグロバクテリウムを介した形質転換系を改良することによって、多数の変異系統群(ミュータントパネル)の作出を目指した。しかしながら、アグロバクテリウム株の変更によっても、効率的な形質転換効率を得ることができなかった。そのため、トランスポソンを介した変異創出を目指し、*Fusarium* 菌由来の自律性トランスポソン *impala* をエノキタケに導入することに成功した。*Impala* がエノキタケゲノム内で転移することによって、多数の遺伝子がタグ付けされ、本菌を食用菌の育種モデル生物として開発するための有効なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：Compatibility of three bacterial strains in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AMT) of haploid-fruiting strain (bmHY4) of *Flammulina velutipes* was compared. The bacterial strains LBA4404 and C58C1 yielded four- to five-fold higher transforming efficiencies than did EHA105. Nevertheless, the transforming efficiencies observed in this study are still not sufficient for practical construction of a *F. velutipes* mutant library. Then we attempted to obtain transposon tagging mutants. An autonomously transposable element *impala* from a fungus *Fusarium oxysporum* was ligated into a binary vector pPZP-Hyg2 and successfully transformed bmHY4 mycelia via AMT.

研究分野：菌類育種学

キーワード：食用きのこ エノキタケ 育種 半数体 ミュータントパネル アグロバクテリウム トランスポソン *impala*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エノキタケ (*Flammulina velutipes*) はわが国で独自に人工栽培法が確立され、産業的にも重要な食用担子菌である。本菌はフラスコ内で短期間に生活環を完結し、単核性発芽特性 (haploid fruiting) をもつなど、食用菌の育種モデル生物としての潜在的な特性を有する。本菌では、DNA マーカーに基づく連鎖地図の構築 (Tanesaka et al. 2007)、染色体 DNA の分離技術の確立と各連鎖群との対応 (Tanesaka et al. 2003, 2012) など、基礎ゲノム情報が蓄積されてきた。近年、全ゲノム情報が公開され、さらに形態形成に関わる遺伝子群の探索も進みつつある。このような背景で、T-DNA タグラインおよびトランスポゾンタグラインの2種類の突然変異誘発技術を応用したミュータントパネルの構築は、本菌のみならず菌類遺伝学および育種学の新たな展開に向けての突破口となる。

2. 研究の目的

(1) T-DNA タグラインの作成

アグロバクテリウムを介した形質転換法 (AMT) について、エノキタケ単核性発芽系統の形質転換に適したアグロバクテリウム株を選別し、大量の T-DNA タグラインを作成する。

(2) AMT を用いて *Fusarium oxysporum* の自律性トランスポゾン *impala* をエノキタケ単核性発芽系統に導入し、トランスポゾンタグラインを作成するとともに、トランスポゾンの転移の嗜好性とタグリング効率の関係を明らかにする。

(3) ミュータントパネルの表現型スクリーニングおよび原因遺伝子の同定

子実体をはじめとする形態形成に関わる変異体をスクリーニングし、タグ挿入領域近傍の塩基配列の解析から、関係する原因遺伝子群を網羅的に同定する。

3. 研究の方法

(1) AMT: エノキタケの初期栽培品種「初雪」の担子孢子由来の単核系統群 (bmHYs) を作出し、単核性発芽特性と菌糸体着色を示す系統 (bmHY4) を選抜した。ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*hph*) と *Cryptococcus neoformans* のアクチンプロモーターを付加したバイナリベクター-pPZP-HYG2 をもつアグロバクテリウム株を用いた。bmHY4 菌糸体断片とアグロバクテリウムを混合して 200 μ M アセトシリニンゴンを含む IM 培地中に懸濁した。懸濁液 200 μ l を IM プレートに置いたセルロースアセテート製フィルター上に滴下し、25 $^{\circ}$ C で共培養した (2-4 days)。その後、フィルターをセフォタキシム、テトラサイクリンおよびハイグロマイシン B (各 50 μ g/ml) を含む IM プレートに移して 3-4 週間培養し、エノキタケ形質転換体コロニーを分離した。

(2) トランスポゾン: *Fusarium oxysporum* の自律性トランスポゾン *impala* の全長 (1281 bp) を PCR した DNA 断片をバイナリベクター-pPZP-HYG2 に挿入した (pPZP-imp)。上記 (1) と同様に AMT を実施した。

4. 研究成果

(1) AMT 条件の検討: アグロバクテリウム株 EHA105 を用いた AMT (Hatoh et al. 2013) を基本に AMT 条件の改良を試みた。ハイグロマイシン B (50 μ g/ml) を含む選択培地上で形成されたコロニーにハイグロマイシン抵抗性遺伝子 *hph* 領域の保持が検出され (図 1)、形質転換体のスクリーニングに有効であることが示された。

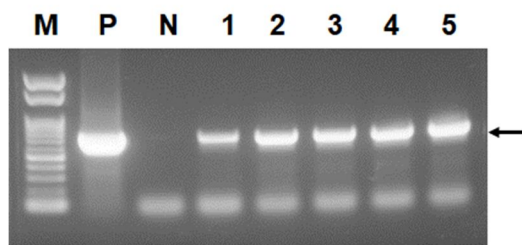


図 1 エノキタケ形質転換体の *hph* 遺伝子をターゲットとする PCR.

レーン: M, 100 bp ラダー; P, pPZP-HYG2; N, bmHY4; 1-5, 形質転換体. 矢印は目的産物.

共培養下で用いる IM 培地に含むアセトシリニンゴン濃度が形質転換効率に及ぼす影響について検討した。アセトシリニンゴン 200 μ M と 800 μ M の形質転換効率 (コロニー/フィルター) はそれぞれ、0.45 と 1.88 であり、高濃度のアセトシリニンゴンにおいて高い効率を示した。

3 種類のアグロバクテリウム株 (EHA105, LBA4404, C58C1) を用いて形質転換効率を比較した。その結果、LBA4404 と C58C1 の形質転換効率は EHA105 のそれと比較して 4~5 倍の値を示した (表 1)。

表 1. アグロバクテリウム株の種類と形質転換効率 (コロニー/フィルター)。

実験	EHA105	LBA4404	C58C1
1st	17/68	34/32	36/32
2nd	6/32	17/16	17/16

(F = 348, P = 0.00028)

アセトシリゴン濃度 (200 ~ 800 μ M) およびアグロバクテリウム株 (EHA105 ~ LBA4404) の変更によって、従来法と比較してそれぞれ 4 倍 (両者で 16 倍) の形質転換効率の向上が達成された。しかしながら、菌糸体断片を用いた共培養ではミュータントパネル作出を目指した効率的な形質転換効率が得られなかったため、プロトプラストとの共培養を試みた。細胞壁溶解酵素 (2% Cellulase 'Onozuka' RS + 1% Lysing enzymes in 0.5M MgSO₄) にてプロトプラストを調製した。アグロバクテリウムとの共培養しないプロトプラストのみを 0.5 M スクロースを含む IM プレート (ハイグロマイシンは含まない) にスプレッドしたところ、十分な菌糸体再生がみられたが、共培養下での形質転換体は得られなかった。

(2) T-DNA タグラインの表現型解析: 得られた 224 系統の形質転換体について、MYP 液体培地で 25°C、3 週間培養し、引き続き 15°C で培養することによって子実体形成を誘導した。その結果、全ての系統で野生株 bmHY4 と同様に子実体形成と菌糸体着色を示し、明らかな表現型の変異は観察されなかった。

(3) トランスポゾンタグライン: *Fusarium oxysporum* の自律性トランスポゾン *Impala* の全長 (1281 bp) を含む DNA 断片をバイナリベクター pPZP-HYG2 の T-DNA 領域に挿入した (pPZP-imp)。得られたベクター pPZP-imp をエレクトロポレーション法によって LBA4404 に導入した。本ベクターを用いて AMT を実施し、エノキタケの形質転換体の作出に成功した (bmHY4 imp)。*Impala* は *Fusarium* のみならず青かび (*Penicillium*) やイネいもち病菌 (*Pyricularia*) のゲノム中でも転移することが知られており、エノキタケゲノム中での転移によるタグライン作出は効率的な手段となることが期待される。現在、トランスポゾン転移による表現型の変異 (例えば、着色コロニー内でのキメラ形成) を観察するとともに、トランスポゾンディスプレイ法によるゲル上での転移の検出を進めている。

<引用文献>

- Hatoh K, Izumitsu K, Morita A, Shimizu K, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ohta Y, Tanaka C. 2013. Transformation of mushroom species *Hypsizygus marmoratus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* by an *Agrobacterium*-mediated method using universal transformation plasmid. *Mycoscience* 54: 8-12.
- Tanesaka E, Kinugawa K, Okabe K, Kitamura Y, Yoshida M. 2003. Electrophoretic karyotype of *Flammulina velutipes* and its variation among monokaryotic progenies. *Mycoscience* 44: 67-69.
- Tanesaka E, Honda R, Nonaka K, Kuba A, Yoshida M. 2007. Linkage analysis of Enokitake, *Flammulina velutipes*, based on RAPD markers with pigmentation factor. *Kinki J. Crop Sci. Breed.* 52: 63-67.
- Tanesaka E, Honda R, Sasaki S, Yoshida M. 2012. Assignment of RAPD marker probes designed from 12 linkage groups of *Flammulina velutipes* to CHEF-separated chromosomal DNAs. *Mycoscience* 53: 238-243.
- Tanesaka E, Mori M, Tsuji K, Tsukiyama T. 2018. Compatibility of three bacterial strains in *Agrobacterium*-mediated transformation of monokaryotic mycelia of *Flammulina velutipes*. *J. Crop Res.* 63: 31-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Tanesaka E, Mori M, Tsuji K, Tsukiyama T	4. 巻 63
2. 論文標題 Compatibility of three bacterial strains in Agrobacterium-mediated transformation of monokaryotic mycelia of Flammulina velutipes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Crop Research	6. 最初と最後の頁 31-33
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
研究分担者	築山 拓司 (Tsukiyama Takuji) (00423004)	近畿大学・農学部・准教授 (34419)	