

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24201
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K15287
 研究課題名(和文) 順遺伝学および逆遺伝学的手法を用いた外生菌根菌ホンシメジの共生研究基盤の開発

 研究課題名(英文) Development of forward and reverse genetic methods of ectomycorrhizal fungi
 Lyophyllum shimeji

 研究代表者
 泉津 弘佑 (Izumitsu, Kosuke)

 滋賀県立大学・環境科学部・講師

 研究者番号：20579263
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、外生菌根菌ホンシメジ(Lyophyllum shimeji)の順遺伝学および逆遺伝学的手法を開発し、分子遺伝学的な研究基盤を構築することを目的とした。最初に、非相同性組換えに関するKU80遺伝子の破壊株を作出した。次に、このKU80遺伝子破壊株を親株として用いることで、3種のMAPキナーゼ(KSS1, MPK1, HOG1)およびオートファジー関連遺伝子ATG8の破壊株作出に成功した。KU80遺伝子破壊株を親株として使用した場合の相同性組換え効率は約92%であり、野生株を親株として利用する場合と比較して飛躍的な上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外生菌根共生や子実体形成の分子メカニズムを研究していくための分子基盤が構築できた。これにより、今後は遺伝子発現解析などを用いて菌根共生または子実体形成に関与することが予測された遺伝子群について、速やかに遺伝子破壊株を作出し、機能解析を行うことが可能となる。長期的には、外生菌根菌の応用利用やマツタケ、トリュフなどの人工栽培が困難な外生菌根菌の栽培手法構築にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop forward and reverse genetic methods to establish a basis for molecular genetic research for the ectomycorrhizal fungus Honshimeji (Lyophyllum shimeji). First, we generated a disrupted strain of the KU80 gene, which is involved in non-homologous recombination. Using this KU80 disrupted strain as a parent strain, three MAP kinase genes (KSS1, MPK1, HOG1) and autophagy-related gene ATG8 were successfully disrupted by homologous recombination. Homologous recombination efficiency was about 92% when the KU80 disruption strain was used as the parent strain, which was a dramatic increase compared to the wild strain as the parent strain.

研究分野：菌類分子遺伝学

キーワード：外生菌根菌 遺伝子ノックアウト KU80 MAPキナーゼ オートファジー

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外生菌根菌の共生メカニズムおよび子実体形成メカニズムを分子遺伝学的レベルで解明することは、菌根菌研究の大きな夢の1つである。これらの解明は、菌根共生系の成立機構、生物学的意義、進化機構を解き明かすのみならず、マツタケやトリュフなど難栽培性の高級きのこ類の人工栽培にも大きく貢献できるものと考えられる。しかし、外生菌根菌の分子遺伝学的レベルでの研究は比較的遅れている。特に、特定の遺伝子を狙って相同性組換えを用いて破壊する遺伝子破壊については、我々の知る限り、外生菌根菌において成功例がなかった。

近年、菌根共生菌ではないが、ハラタケ亜門の腐生菌であるスエヒロタケやヒトヨタケ、ヒラタケにおいて相同性組換えを利用した遺伝子破壊の成功例が次々と報告されている。これらの菌類では、いずれも非相同性組換え機構に關与する *KU70*, *KU80*, *LIG4* などの遺伝子をあらかじめ破壊しておくことにより、相同性組換え効率を飛躍的に上昇させ、目的の遺伝子の破壊に成功している。外生菌根菌の多くはハラタケ亜門の担子菌であり、外生菌根菌においても同様のアプローチによって遺伝子破壊手法を構築できる可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

「香りマツタケ、味シメジ」という言葉で知られるように、ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) は古くから日本人に親しまれてきた外生菌根菌である。マツタケやトリュフなどほとんどの外生菌根菌は人工栽培に成功していないが、ホンシメジは例外であり、麦などを培地成分とすることにより人工栽培ができることも知られている。

我々の研究室では、日本を代表する外生菌根菌であるホンシメジと宿主植物アカマツ (*Pinus densiflora*) の実験系を用いて外生菌根共生メカニズムおよび子実体形成メカニズムを分子遺伝学的レベルで解明することを目指している。そのために、本研究ではホンシメジの順遺伝学的手法および逆遺伝学的手法を開発し、分子遺伝学的な研究基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

ホンシメジの遺伝子組換え手法としてはアグロバクテリウム法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) を利用した。まず、ホンシメジの非相同性組換え機構に關与する *KU80* 遺伝子を相同性組換えにより破壊した。薬剤耐性マーカーとしてはハイグロマイシン耐性遺伝子 *HPH* を使用した。次に、この *KU80* 遺伝子破壊株を親株として、3種のMAPキナーゼ遺伝子 (*KSS1*, *HOG1*, *MPK1*) およびオートファジー機構の中心的因子 *ATG8* の破壊試験を行った。薬剤耐性マーカーとしてはノーセオスリシン耐性遺伝子 *NAT* を用いた。

4. 研究成果

(1) ホンシメジの *KU80* 遺伝子破壊株の作出

最初にホンシメジの *KU80* 遺伝子の上流および下流の約 1~2kb と薬剤耐性マーカー *HPH* を含むプラスミドベクターを作出し、アグロバクテリウム EHA105 株のコンピテントセルへと導入した。この *KU80* 遺伝子破壊用アグロバクテリウム菌株を用いて、ホンシメジの野生株である b11 株の遺伝子破壊を試みた。最終的に合計 363 株のハイグロマイシン耐性株を得ることができ、PCR 法によって遺伝子破壊の成功の有無を調べた結果、1 株の破壊株を得ることができた。これは、我々の知る限り外生菌根菌における初めての遺伝子破壊の成功となった。しかし、遺伝子破壊の効率は 0.3% (1/363 株) と極めて低いものであった。

ホンシメジの *KU80* 破壊株は寒天培地上で野生株と同等の生育を示した。また、菌糸形態なども野生株との違いは認められなかった。この *KU80* 遺伝子破壊株を親株として、各種遺伝子の破壊試験を試みることにした。

(2) 3種のMAPキナーゼ (*KSS1*, *MPK1*, *HOG1*) およびオートファジー関連因子 *ATG8* の遺伝子破壊試験



図1. 本研究で得られたホンシメジの各種遺伝子破壊株

外生菌根菌は、宿主根と接触すると根の周りを取り巻くようにマントルと呼ばれる構造を形成し、その後、宿主根の細胞間隙に菌糸を伸ばしハルティヒネットと呼ばれる構造を形成することが知られている。これまでに、外生菌根共生や子実体形成に関与する遺伝子についてはほとんど報告例がないため、本研究ではダイナミックな構造変化を引き起こすような形態形成の制御因子に注目した。植物病原菌類などの糸状菌において形態形成を制御するシグナル伝達因子として MAP キナーゼがよく知られている。多くの菌類はゲノム中に異なる 3 種の MAP キナーゼ遺伝子 (KSS1 型, MPK1 型, HOG1 型) を保有している。また、近年オートファジーも菌類の形態形成に関与していることが明らかとなっている。

そこで、ホンシメジの *KU80* 遺伝子破壊株を親株として、3 種の MAP キナーゼおよびオートファジー機構の中心的因子である *ATG8* の遺伝子破壊を試みた。その結果、*KSS1* の破壊試験では 8 株のノーセオスリシン耐性株が得られ、6 株が遺伝子破壊株であった。*HOG1* 破壊試験ではノーセオスリシン耐性株 2 株中 2 株が、*MPK1* 破壊試験 4 株中 4 株全てが破壊株であった。また、*ATG8* 破壊試験では 11 株のノーセオスリシン耐性株が得られ、11 株全てが遺伝子破壊株であった。

KU80 破壊株を親株にした場合の遺伝子破壊効率は 4 遺伝子合計で 92%(23/25) となり、野生株を親株とした場合の 0.3%(1/363) からは飛躍的な上昇が認められた。以上の結果から、我々の研究チームにおいては外生菌根菌ホンシメジの遺伝子破壊を自在に行うことが可能になったと言える。

また、4 種類の遺伝子破壊株 (*KSS1*, *MPK1*, *HOG1*, *ATG8*) について各種表現型解析をおこなった。菌根共生試験においては、*KSS1* 破壊株が共生能力を欠損しているのではないかという予備的データが得られた。これについてはサンプル数などを増やし、今後詳細に解析をすすめていく予定である。*HOG1* 破壊株は高浸透圧感受性を示し、*HOG1* 経路の異常活性化剤であるフルジオキソニルに耐性を示した。*MPK1* 破壊株においては、寒天培地上で親株とは明確に異なる “シート状” の菌糸生育がみとめられた。*ATG8* 破壊株は親株と比較してコロニーサイズが小さくなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田和穂, 松永有佳理, 広瀬優樹, 重吉沙衣, 田中千尋, 入江俊一, 鈴木一実, 泉津弘佑
2. 発表標題 外生菌根菌ホンシメジにおける2種の MAP kinase の遺伝子破壊および機能解析
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

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