

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06148

研究課題名（和文）遺伝子破壊手法を用いた外生菌根菌ホンシメジの共生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigating the Symbiotic Mechanisms of Ectomycorrhizal Fungus *Lyophyllum shimeji* Using Gene Disruption Techniques

研究代表者

泉津 弘佑 (Izumitsu, Kosuke)

滋賀県立大学・環境科学部・准教授

研究者番号：20579263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：外生菌根菌と腐朽菌（白色腐朽菌や褐色腐朽菌）の大規模なゲノム比較試験をおこなひ、外生菌根菌が進化的に喪失している遺伝子群を多数特定した。その中で最も顕著な差が認められたヘミセルロース分解に関与するGH115 (Glycosyl hydrolase 115) 遺伝子を、外生菌根菌ホンシメジにおいて異種発現する菌株を作成した。さらに、mCherry遺伝子を発現するホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) を作成し、蛍光タンパク質による菌糸の可視化に成功した。これらの菌株を用いて宿主植物アカマツ (*Pinus densiflora*) との共生試験をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外生菌根菌は森林生態系を支える非常に重要な微生物群である。しかし、外生菌根共生の分子メカニズムや分子進化機構についてはほとんどわかっていない。外生菌根菌と腐朽菌の大規模ゲノム比較試験の結果や作成した遺伝子組換え株は、これらを解明していくための一助となるはずである。さらに、マツタケやトリュフなどの難栽培きのこのほとんどは外生菌根菌であり、共生メカニズムおよび腐朽メカニズムを解明することは人工栽培への基礎的な知見となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Through a large-scale genome comparison method between ectomycorrhizal fungi and decay fungi (such as white rot fungi and brown rot fungi), we identified numerous genes that have been evolutionarily lost in ectomycorrhizal fungi. Among them, the GH115 (Glycosyl hydrolase 115) gene, which is involved in hemicellulose degradation, showed the most significant difference. We created a strain of the ectomycorrhizal fungus *Honshimeji* (*Lyophyllum shimeji*) that expresses this gene heterologously. Additionally, we succeeded in visualizing the fungal hyphae by creating *L. shimeji* that expresses the mCherry gene, a fluorescent protein. Using these strains, we are advancing symbiosis tests with the host plant Japanese red pine (*Pinus densiflora*).

研究分野：菌類分子遺伝学

キーワード：外生菌根菌 ホンシメジ GH115

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 外生菌根菌 (*Ectomycorrhizal fungi*) は主に樹木の根と共生し、森林生態系を支える重要な微生物群である。しかし、外生菌根共生の分子メカニズムや分子進化機構が十分に明らかになったとは言い難い。これまで、植物病原菌や木材腐朽菌などの菌類と比較して、外生菌根菌の分子遺伝学的な研究例は非常に少ない状況にある。

(2) 申請者らは、代表的な外生菌根菌の1種である担子菌ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) の遺伝子組換え系の構築に成功した。外生菌根共生の分子メカニズムについての知見は非常に少ないが、先行する植物病原菌の研究から、植物との相互作用に普遍的に関与する可能性のある *LsKSS1*、*LsHOG1*、*LsMPK1*、*LsATG8* などの遺伝子破壊株を作出した。

(3) “外生菌根菌” と呼ばれる菌類は非常に多数存在する。しかし、外生菌根菌は単系統ではなく、複数の系統 (少なくとも6系統以上) において独立に進化・出現した収斂進化であると考えられている。このため、外生菌根共生において「普遍的なメカニズム」が存在するののかは不明であり、系統によって全く異なる可能性も十分に考えられる。

(4) 先行研究において、外生菌根菌は植物細胞壁分解酵素 (PCWDEs) をコードする遺伝子群を喪失する傾向があることがわかっている。PCWDEs を喪失し、植物への攻撃性を低下させることは、外生菌根共生において普遍的な役割を持つ可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、外生菌根共生における普遍的な分子メカニズムおよび分子進化機構を明らかにすることを最大の目的とした。そのために、インシリコ解析を用いたゲノム比較試験を詳細におこない、「外生菌根菌が共通して喪失している遺伝子群」および「共通して保有している遺伝子群」をそれぞれ探索し、分子遺伝学的手法を用いて外生菌根共生における役割を明らかにすることを狙いとした。

(2) これまでに遺伝子組換え系の構築に成功している担子菌ホンシメジに加え、子嚢菌の代表的な外生菌根菌であるセノコッカム (*Cenococcum geophilum*) についても遺伝子組換え系を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 「外生菌根共生をする担子菌」と「外生菌根共生をしない担子菌 (白色腐朽菌や褐色腐朽菌)」の大規模なゲノム比較試験をおこない、外生菌根菌が共通して喪失している遺伝子群および共通して保有している遺伝子群をそれぞれ探索した。

(2) ゲノム比較試験で“共生成立の鍵”となると考えられた遺伝子について、外生菌根菌ホンシメジを研究モデルに遺伝子組換え試験をおこない、宿主植物アカマツとの共生試験によってその役割の解明を目指した。

(3) 外生菌根菌ホンシメジに蛍光遺伝子 (*eGFP* または *mCherry*) を導入することで、植物細胞内での挙動を可視化することを目指した。

(4) 子嚢菌の代表的な外生菌根菌であるセノコッカムについて、プロトプラスト法およびアグロバクテリウム法を用いて遺伝子組換え系の構築を目指した。

### 4. 研究成果

(1) 「外生菌根共生をする担子菌」と「外生菌根共生をしない担子菌 (白色腐朽菌や褐色腐朽菌)」の大規模なゲノム比較試験をおこなった。その結果、外生菌根菌が共通して進化的に喪失したと考えられる遺伝子群が多数特定された。その多くは植物細胞壁分解酵素 (PCWDEs) をコードしており、先行研究の知見と一致した。

これらの遺伝子群の中で特に、白色腐朽菌と褐色腐朽菌のほとんどが保有しているにも関わらず、外生菌根菌のほとんどが保有していない (進化的に喪失した) 遺伝子群を探索した。その結果、最も顕著な差異が認められたのは GH115 (Glycosyl hydrolase 115) をコードする遺伝子であった。ゲノム比較に用いた担子菌のうち、白色腐朽菌および褐色腐朽菌と分類されている菌の全て (100%) が GH115 を保有していたのに対し、外生菌根菌として分類されている菌で GH115

を保有していたのはわずかに 5-7%程度であった。申請者らの知る限り、GH115 は先行研究においても言及されておらず、新規の発見と考えられる。

一方、驚くべきことに、外生菌根菌が共通して保有し、白色腐朽菌や褐色腐朽菌の多くが保有しない遺伝子群も少数ながら発見することに成功した。そのうちの 1 つは Crinkler 型エフェクターと呼ばれ、アーバスキュラー菌根菌において共生に重要な役割を持つと報告されている遺伝子であった。また、その他に、機能未知の 1 回膜貫通型タンパク質や機能未知の 4 回膜貫通型タンパク質もそれぞれ見出すことに成功した。これらの遺伝子群は外生菌根菌の進化に重要な役割を果たした可能性も考えられる。これらの外生菌根菌が特有に保有する遺伝子群の由来や機能については今後、詳細な解析を進める予定である。

## (2)

大規模ゲノム比較試験において発見した GH115 は植物細胞壁の中でも特にヘミセルロースの一種であるグルクロノキシランの分解（グルクロン酸残基の切断）に重要な遺伝子である。この遺伝子は、白色腐朽菌、褐色腐朽菌のいずれも 100%保有している重要な遺伝子であるにも関わらず、独立進化したはずの外生菌根菌のほとんどが喪失していた。このことから、GH115 を保有することは樹木類の抵抗性反応を誘導する可能性が極めて高いと推測した。

そこで、腐朽菌由来の GH115 遺伝子を外生菌根菌に導入することでこの仮説を実証することを試みた。具体的には、白色腐朽菌であるヒラタケ由来の GH115 遺伝子をアグロバクテリウム法を用いて外生菌根菌ホンシメジに導入することに成功した。現在、宿主植物アカマツとの共生試験をすすめているが、共生試験系が安定せず十分な結果が得られていない。

(3) 菌根共生時の挙動を可視化するために、ホンシメジに蛍光遺伝子を導入することを試みた。担子菌 *Cryptococcus neoformans* 由来の Actin プロモーター制御下に蛍光遺伝子 *eGFP* または *mCherry* を融合させたプラスミドをそれぞれ構築し、アグロバクテリウム法を用いてホンシメジ野生株 (b11 株) へと導入した。その結果、*eGFP* 遺伝子導入株では蛍光が全く検出できなかったが、*mCherry* 遺伝子導入株では明確な蛍光が確認でき、蛍光による可視化に成功した (図 1)。

以前から、*eGFP* 遺伝子を導入してもホンシメジで蛍光が確認できないという問題があったが、今回新たなプラスミドを設計しても結果は変わらなかった。



図 1. ホンシメジの *mCherry* 遺伝子導入株

(4) 子嚢菌の代表的な外生菌根菌であるセノコッカムの遺伝子組換え系の構築を試みた。まず、アグロバクテリウム法ではハイグロマイシン、ノーセオスリシン、ジェネティシンなどの薬剤に対する耐性マーカー遺伝子 (HPH, NAT, NPT2) の導入をそれぞれ試みたが、現在までに遺伝子組換え体は得られていない。

プロトプラスト法では各種条件検討の結果、大量のプロトプラストを安定して作成することに成功した。プロトプラストの大きさや数は、遺伝子組換えが成功している他の複数の子嚢菌 (トウモロコシごま葉枯病菌、灰色かび病菌、ウリ類炭疽病菌) と比較してもそれほど遜色はなかった。しかし、再生培地でプロトプラストは全く再生しなかった。各種浸透圧条件で比較してみると、1) セノコッカムのプロトプラストは他の子嚢菌と比較して、極めて高い浸透圧条件でなければ維持することができないこと、一方で、2) セノコッカムは他の子嚢菌と比較すると著しく高浸透圧条件に弱いこと、から再生が難しいものと考えられた。

現在もセノコッカムの遺伝子組換え法の構築をすすめているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------