

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710212

研究課題名（和文）野生菌食動物におけるキノコ毒誘導遺伝子群の網羅的探索

研究課題名（英文）Genome-wide screening of mushroom toxin-responsive genes in wild fungivorous animals

研究代表者

中森 泰三 (NAKAMORI TAIZO)

横浜国立大学・環境情報研究院・講師

研究者番号：50443081

研究成果の概要（和文）：菌類の子実体に含まれている毒素は、菌類と菌食動物の相互作用の形成に寄与していると考えられる。本研究では、キノコ食性のトビムシ（*Ceratophysella denticulata*）がテングタケ属菌の2種の毒素（イボテン酸と α -アマニチン）に対し耐性を有していることを明らかにした。また、その耐性の分子機構を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析手法により、きのこ毒応答遺伝子群の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：Certain toxic chemicals in fungal fruiting bodies may shape the interactions between fungivores and fungi. This study revealed that a mushroom-feeding species of Collembola (*Ceratophysella denticulata*) is tolerant to the toxins (α -amanitin and ibotenic acid) from *Amanita*. For understanding molecular mechanisms of the tolerance, screening of mycotoxin-responsive genes in *C. denticulata* have been carried out using a comprehensive transcriptome method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：化学生態学、トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 菌類の子実体には様々な毒素が含まれている。それらの毒素は菌食動物の食性幅や耐性の進化に影響を及ぼすことで、菌類と菌食動物の相互作用の形成に寄与していると考えられる。テングタケ (*Amanita*) 属菌には子実体に毒素を含むものがあり、キノコ食性のハエにおいてはそれらの毒素に対する耐性が進化している。トビムシと菌類の共存の歴史は古く、デボン紀にまで遡ることがで

きる。共進化の過程でキノコ食性トビムシにはキノコ毒に対する耐性が進化していると期待される。しかしながら、キノコ食性トビムシのきのこ毒に対する耐性については研究がほとんど行われていなかった。

(2) 野生生物におけるきのこ毒耐性の分子機構はほとんど研究されておらず、ショウジョウバエにおいてわずかに研究例がある程度である。きのこ毒に応答する遺伝子群の中

には、きのこ毒の解毒やきのこ毒耐性に関与するものがあると期待される。差次的な発現を示す遺伝子を特定するために、さまざまな手法が開発されてきた。High-coverage expression profiling (HiCEP) 法はゲノムが解読されていない生物にも適用できる網羅的な遺伝子発現解析手法である。しかしながら、塩基配列の決定に多大な労力を要するという欠点がある。ここ数年では、次世代シーケンサーの到来により、網羅的な塩基配列情報の取得が容易になってきている。しかしながら、次世代シーケンサーが適用される遺伝子発現解析手法では、ゲノム情報が既に知られていることが前提とされており、ゲノムがまだ解読されていない野生生物に適用できる手法は 10 年前からほとんど進歩していない。

2. 研究の目的

(1) キノコ毒が菌食動物であるトビムシに及ぼす影響を明らかにする。

(2) キノコ毒に応答する遺伝子群を網羅的に探索する。

3. 研究の方法

(1) テングタケ属菌の 2 種の毒素 (イボテン酸と α -アマニチン) を段階的に異なる濃度で人工餌に添加してキノコ食性トビムシ (*Ceratophysella denticulata*) に与え、産卵数への影響を調べた。また、トビムシ種間の感受性を比較するために土壌性トビムシ (*Folsomia candida*) を用いて同様の実験を行った。

キノコ毒を天然にみられる最高濃度、およびその倍の濃度で添加した。毒性物質のポジティブコントロールとしてカドミウムを用い、ネガティブコントロールとしてペプトンを用いた。また絶食の処理群も用意した。対照群の餌には毒素を添加しなかった。

土壌性種 *F. candida* については、摂食の有無と脱皮サイクルの期間も観察した。

また、野外におけるテングタケ属菌とキノコ食トビムシの関係を探るために、2011 年にテングタケ属菌を中心に子実体を採集し、死亡しているトビムシがないかを調べた。また、生存しているトビムシの種組成も調べた。

野外子実体上での死亡要因が子実体にあるかを明らかにするために、ウスキテングタケの子実体を用いて室内実験を行った。凍結乾燥し -25°C で保存した子実体の各部位 (つば、傘表皮、柄内組織、ひだ、縁部を除いたひだ) を菌食性 (子実体食性ではない) トビムシ *Proisotoma subminata* に与え、2 時間後の死亡率を調べた。対照として、餌なし、および可食餌を与えた処理群を用意した。

(2) テングタケ属菌の 2 種の毒素 (イボテン酸と α -アマニチン) を添加させた人工餌、あるいは対照の人工餌を摂食させたキノコ食性種 *C. denticulata* 個体群から RNA を抽出した。抽出した RNA から mRNA を精製した。mRNA の 5' 末端にアダプターを付加し、cDNA を合成し、アダプター配列をプライマーとして Taq DNA ポリメラーゼを用いて 2 本鎖 DNA を合成した。酵素によりランダムに 2 本鎖 DNA を切断し、切断部に前述のアダプターとは異なるアダプターを付加した。異なるアダプター配列のプライマーを用いて PCR を行い、異なるアダプターを持つ DNA 断片をビオチン: アビジン磁気ビーズを用いて精製した。精製産物をアガロースゲル電気泳動により展開し、200 bp ほどの長さの二本鎖 cDNA 断片を回収し、シーケンサーに試供するサンプルとした。

対照群、アマニチン処理群、イボテン酸処理群の 3 群から上述の 5' 末端 cDNA 断片を調整し Ion PGM 次世代シーケンサーで塩基配列の決定を行った。

4. 研究成果

(1) 土壌性種 *F. candida* では α -アマニチンおよびイボテン酸による産卵数の低下が観察されたが、キノコ食性種 *C. denticulata* では天然最高濃度の 2 倍の濃度でも産卵数の低下が見られなかった (図 1)。*F. candida* における、摂食頻度の観察および脱皮サイクル期間の観察により、 α -アマニチンには成長阻害作用が、イボテン酸には摂食阻害作用があることが明らかになった。これらの結果から、きのこ食性トビムシ *C. denticulata* はきのこ毒であるイボテン酸に対し耐性を有していると考えられた。

また、脱皮サイクル期間のずれは影響を評価する際の鋭敏な指標であることが示唆された。

(投稿準備中)

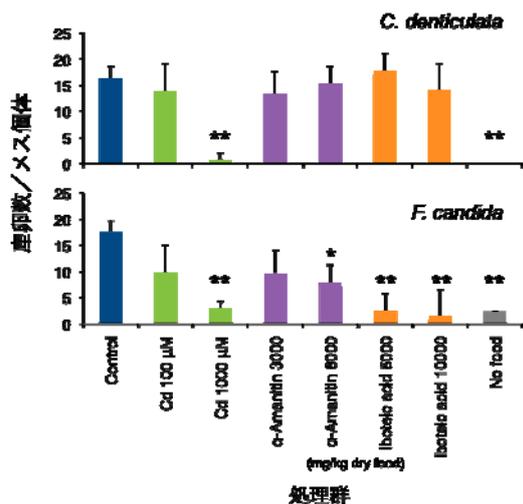


図 1. キノコ毒がトビムシの産卵数に及ぼす影響.

野生のテングタケ属菌 (テングタケ、ウスキテングタケ)、および *Hygrophorus* 属菌の子実体から死亡しているトビムシが得られた。その大部分の個体が傘の表面、ひだの縁に見られ、キノコ食性ではないトビムシ種が多かった (図 2)。

室内実験により、ウスキテングタケの試供したどの部位でも死亡率は対照群より高かった (図 3)。トビムシの野外における子実体上での死因は子実体にあることが示唆された。ただし、部位特異性は観察されなかった。

一方、キノコ食性種の *C. denticulata* は同子実体上で生存している割合が高かった (図 4)。テングタケ属菌子実体上での死亡がキノコ毒によるものなのかは定かではないが、キノコ食種はテングタケ属の被食防衛機構に対して適応している可能性が示唆された。

(Journal of Natural History に投稿中)

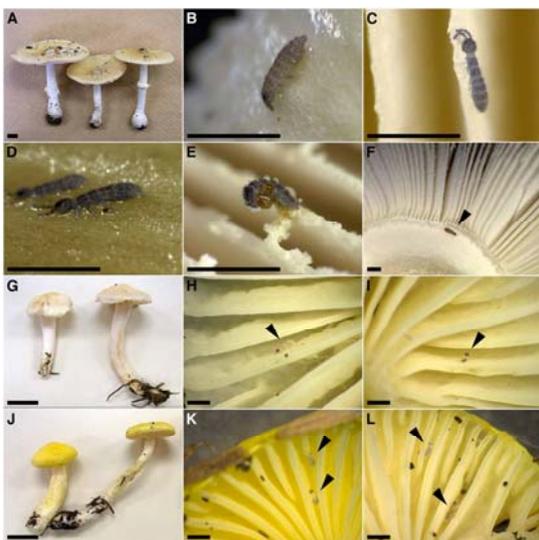


図 2. テングタケ属菌子実体とその上で死亡していたトビムシ

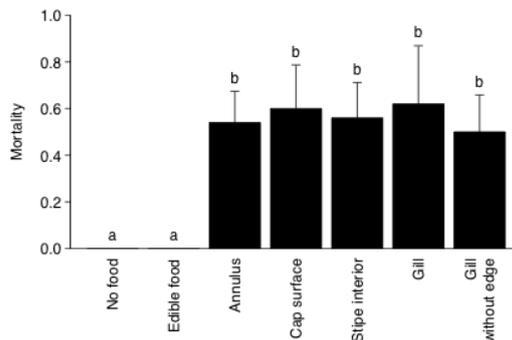


図 3. ウスキテングタケの各部位を与えた 2 時間後のトビムシの死亡率



図 4. テングタケ子実体上で生存していたキノコ食性トビムシ

(2) 本研究では、5' 末端から 100bp 以上の長さの塩基配列を決定するためのサンプル調整を行い、次世代シーケンサーで解析可能であることが確認された。リード数により発現頻度が表されるので、遺伝子発現の半定量手法として、差次的発現遺伝子の探索に利用することが可能である。また、リード長が長いので、ゲノムが読まれていない生物に適用しても遺伝子を特定することが可能である。同手法については、今後、定量性、網羅性についての検証が必要である。

現在、同解析サンプルのリード数をさらに増やし、キノコ毒で応答する遺伝子群を特定するための解析を行っている。また、同データを国際データベースに登録するために、オランダのアムステルダムフリー大学へ研修に行く予定である。

Total number of Reads

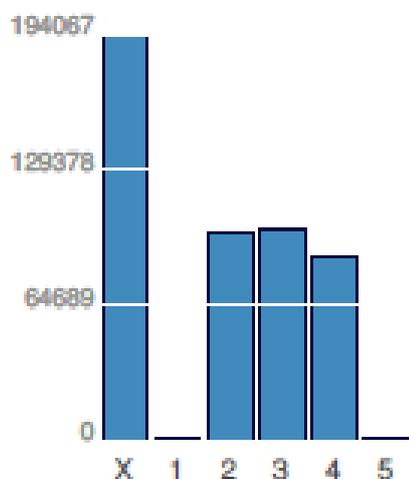


図 4. 各処理群における cDNA 断片リード数. x 軸の 2, 3, 4 がアマニチン処理群、イボテン酸処理群、対照群を示す。各処理群、10 万ほど断片の塩基配列を決定した。

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 2 件)

- ① Nakamori, T., Oritani, M., Kaneko, N.
Death note of Collembola on field mushrooms. The 5th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress. March 18, 2012. Otsu, Japan.
- ② 中森泰三, 金子信博. きのこ食性トビムシ *Ceratophysella denticulata* のアマニチンおよびイボテン酸耐性. 日本菌学会第 55 回大会. 2011 年 9 月 11 日. 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中森 泰三 (NAKAMORI TAIZO)

横浜国立大学・環境情報研究院・講師

研究者番号：50443081