

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580007

研究課題名(和文)栽培きのこ類子実体の発達異常の原因遺伝子同定と検出マーカーの開発

研究課題名(英文) Identification of the gene causes a defect in fruiting body differentiation and development of DNA markers for cultivated mushrooms.

研究代表者

松本 晃幸 (Matsumoto, Teruyuki)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60132825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：栽培きのこの一種、ウスヒラタケ(*Pleurotus pulmonarius*)で見出された子実体が発生後、正常に傘と柄の分化を行うことができない(子実体の奇形化)自然突然変異の原因遺伝子を連鎖地図、ゲノム配列情報、発現解析等により探索し、候補を1遺伝子に絞り込んだ。この成果は栽培現場で偶発的に発生する子実体奇形化の説明につながる可能性がある。今後相補あるいは破壊実験などにより検証し、当該遺伝子の変異検出用DNAマーカーを開発する予定である。

研究成果の概要(英文)：Pleurotus pulmonarius is one of the major cultivated edible mushrooms in the world. We found a spontaneous mutant that shows the abnormal differentiation of both of pileus and stipe in the developmental stage of fruiting body. Despite the severe effect of occurrence of this mutation in the mushroom cultivation, the underlying cause is not entirely clear. In addition, many basic questions involving the biology of fruiting body formation remain unanswered. In this study, we narrowed down a candidate causes mutation to one gene by using the molecular techniques such as linkage analysis, comparative sequence analysis between wild type genome and its mutant, gene expression analysis and so on. This result may lead to the elucidation of the mechanism of this mutation. In future, we will verify the responsible gene for this mutation and develop the DNA markers for detection of this mutation.

研究分野：農学

キーワード：形態形成 食用きのこ 突然変異 遺伝子 担子菌類

1. 研究開始当初の背景

我が国特用林産物の基幹作物である食用きのこ類の生産現場における原因の特定できない子実体の奇形化(伊藤ら、2010; 倉橋ら、2010; 木下ら、2010 など)は、経済的損失につながる重大な問題である。この現象については、病理学的原因でなく、環境要因によるものでないことから遺伝的素質に起因すると考えられている。しかしながら、原因遺伝子は概ね劣性変異であることから、その存在の確認は表現型発現によって初めてなされるだけで、育種素材における分布状況はまったく把握されておらず、またこの現象に対する分子遺伝学的な理解はほとんどなされていない。

<参考文献>

- ・伊藤幹成、奥田康仁、松本晃幸、ウスヒラタケ子実体の発育分化に関わる突然変異体の解析、日本菌学会第54回大会講演要旨集、2010、63p.
- ・倉橋敦ら、マイタケ栽培における生育工程中の子実体分化停止変異株(分化停止株)を用いたマイクロアレイ解析、日本きのこ学会第14回大会講演要旨集、2010、47p.
- ・木下みほら、マイタケ栽培における生育工程中の傘分化形成異常株(傘異常株)を用いたマイクロアレイ解析、日本きのこ学会第14回大会講演要旨集、2010、48p.

2. 研究の目的

本申請課題は、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) 子実体の発達が停止する自然突然変異体(図1)を材料として、この原因遺伝子を同定し、その遺伝子情報からこれまで不明であった奇形化の遺伝的素質を明らかにすることを主目的とする。さらに、その結果をきのこ類育種、種菌製造および子実体生産過程における変異発現防止の新技术に繋げられるよう道筋を導きたい。



図1 ウスヒラタケにおける子実体の発達が停止してしまう(子実体分化異常)自然突然変異体

なお、本変異形質については、伊藤ら(2010)により変異が劣性の単一因子によること、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーに基づく連鎖地図上の第 III 連鎖群に座乗することが推定されている。

3. 研究の方法

(1) 変異遺伝子座周辺領域の塩基配列の決定

基本材料にはウスヒラタケ子実体分化異常変異株 TMIC30058S-1 と野生型 TMIC31664S-1 株を用いた。変異配列および表現型の解析には両株の交配株 TMIC30058S1 × TMIC31664S1 より分離した単孢子由来の F1、150 株を用いた。戻し交雑株などの栽培試験では、木粉・米糠培地による一般的なきのこ栽培法により行った。

変異領域周辺配列は基本的に およびの 2 通りの方法を用いて解析した。

マップベースクローニングによる変異領域配列の取得

下記の図2に示す変異領域近傍マーカーをプローブとして、変異型および野生型ゲノムフォスミドライブラリーを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより変異領域を保有するクローンを選抜した。クローンの塩基配列の解析はサブクローニングおよびプライマーウォーキングを併用して進めた。配列決定等の遺伝子解析は遺伝子情報解析ソフトウェア「GENETYX ver. 9.1.1」を用いて行った。

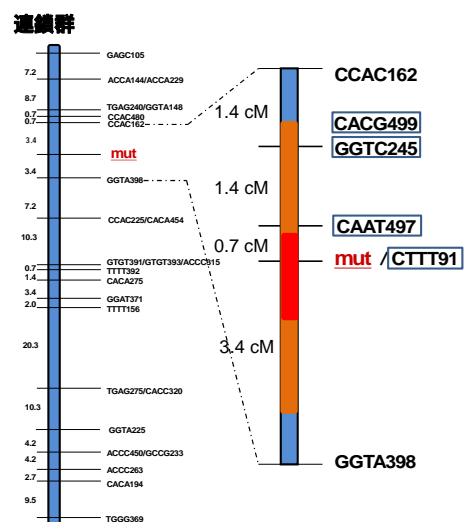


図2 AFLP マーカーに基づくウスヒラタケ連鎖地図第 III 連鎖群における変異形質 (mut) 座乗領域および近傍マーカー (CTTT91, CAAT497, GGTC245, CACG499)

次世代シーケンサーによる野生型および変異型ゲノム配列のドラフトシーケンスタデータの取得

前記の材料株、TMIC31664S-1 および TMIC30058S-1 ゲノムについて、次世代シーケンサー（Roche Genome Sequencer FLX+ System, Illumina HiSeq2000）による解析を行い、公開されているヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）PC15V.2 のゲノムプロジェクトデータ（http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html）とのシニエー解析等を行って、解析したウスヒラタケのゲノム配列を整列化した。

（2）変異形質座乗領域および周辺配列の遺伝子構成の推定

取得配列に対して、ORF 検索、Blast 検索、遺伝子予測ソフトによる解析等を行い、座乗遺伝子領域の推定を行った。また遺伝子予測ソフトで遺伝子のエクソン領域の推定、そのアミノ酸配列の推定を行い、遺伝子機能の推定と発現解析のプライマー情報として用いた。

（3）座乗遺伝子の発現解析

発現解析を行うため、前記の野生型と変異型の交配株 TMIC30058S1 × TMIC31664S1 より分離した単孢子由来の F1、150 株より任意に表現型が野生型および変異型を示す株を選び、栽培を行って子実体を発生させた。変異型は野生型の幼子実体ステージ（生育初期）ですでに明確に観察されるため（伊藤ら、2010）、両株とも幼子実体ステージ子実体よりトータル RNA 調製し、それぞれより mRNA の精製を行い、発現解析に必要な cDNA を調製した。発現量の比較は RT-PCR 法により行った。

（4）遺伝子破壊による検証

遺伝子破壊用ベクターには Honda et al (2000) によりヒラタケの形質転換用として開発されたカルボキシ耐性遺伝子がカットされた pTM1 を用いた。形質転換は野生型株のプロスラストを用いて一般的な PEG 法により行い、カルボキシ含有寒天培地で破壊株を選抜した。

<参考文献>

・ Honda et al, Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*, Current Genetics, 37, 2000, 209-212

4. 研究成果

（1）変異遺伝子座周辺領域の塩基配列の決定

マップベースクローニングによる変

異領域配列の取得

野生型については、AFLP マーカー CTTT91 をプローブとして図 2 の赤で示す約 37.5kb のクローニングに成功し、変異型についても同じプローブで野生型クローンをカバーする数クローンを分離することができた。

次世代シーケンサーによる野生型および変異型ゲノム配列のドラフトシーケンスデータの取得

野生型ゲノムについて、次世代シーケンサー（Roche）による解析を行ない、GSFLX 附属のアッセンブルソフトを用いてアッセンブルを行った。その結果、解析総塩基数は約 246Mb、総コンティグ塩基数は約 36Mb であった。変異型ゲノムについては Illumina HiSeq2000 による解析を行い、野生型シーケンスをレファレンスとして比較解析用配列として整理した。しかし、比較解析を行うだけの品質を得ることができなかったため、参考配列として使用した。

本菌のゲノム配列の決定は本研究が初めてのものであり、今後、DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図との併用により効率的な遺伝子特定が可能になるものと期待される。

（2）変異形質座上領域における遺伝子構成の推定と配列比較

野生型ゲノムライブラリーより分離した約 37.5kb のクローニング配列を土台にして、ヒラタケゲノムプロジェクトの配列と比較した。その結果、ヒラタケとウスヒラタケが近縁種であることを反映し、類似した配列を保有することが明らかとなった。このことを利用して、AFLP マーカー CTTT91 両側約 70kb のウスヒラタケゲノム配列をシニエー解析により推定した。続いて、推定した約 140kb 領域の座乗遺伝子を ORF 検索、Blast 検索、遺伝子予測ソフトで解析し、50 個を推定し、1con から 50con として区別した（図 3）。推定遺伝子領域についてはできる限り変異型ゲノム配列を取得し、比較・整理した。

変異領域の推定

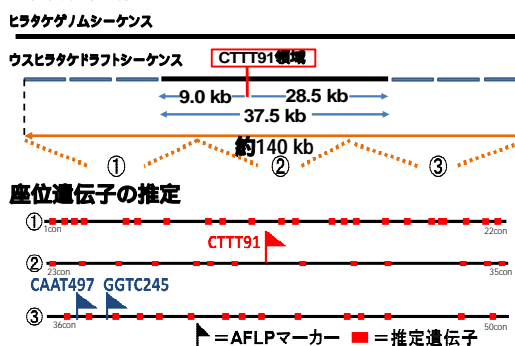


図 3 ウスヒラタケゲノムの変異形質座乗領域（約 140kb）における遺伝子構成の推

定（ の左端から の右端へ順に 1con から 50con の遺伝子を で示す）

（3）座乗遺伝子の発現解析による絞り込みと詳細な変異比較解析

変異形質座上領域約 140kb において推定した遺伝子 50 個について、予測ソフトによって推定した遺伝子配列に基づいてプライマーを設計し、発現解析を実施した。その結果、野生型と変異型で発現差が認められたものが 9 遺伝子あった。そのうち、3 遺伝子については変異型での発現が認められず、明確な発現差が示された（図 4）。続いて、9 候補遺伝子について、ゲノム配列および cDNA 配列を用いて野生型と変異型間で詳細な配列比較を行った。その結果、表 1 に示すように、9 遺伝子全てに塩基配列レベルの多型が存在し、2 塩基から 60 塩基の違いがあった。さらに、9 候補遺伝子の cDNA 配列に基づき、アミノ酸への翻訳を行い比較したところ、9 候補遺伝子のうち、6 候補遺伝子ではアミノ酸レベルの多型（2 アミノ酸から 21 アミノ酸）が明らかとなり（表 1）、そのうち、1 から 5 アミノ酸は非同義置換変異と推定された。6 候補遺伝子と当該変異との関係を推察し、検証するため、下記の遺伝子破壊用ベクターの構築を進めるとともに、並行して、150 株の F1 分離集団における変異型配列の分布と表現型の関係を調べた。その結果、6 候補遺伝子中、5con、6con、32con、34con の 4 候補遺伝子は表現型と一致しない F1 が存在した。このため、残された 14con および 29con の 2 遺伝子について、遺伝子破壊による検証を継続することにした。

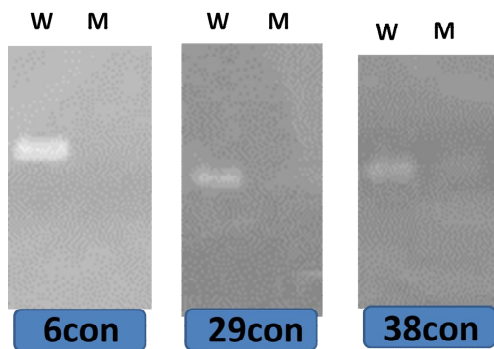


図 4 明確な発現差が認められた 3 遺伝子 (W:野生型、M:変異型)

	推定遺伝子								
	5con	6con	7con	14con	29con	32con	34con	36con	38con
塩基配列	10	10	2	2	60	26	28	7	2
アミノ酸配列	4	4	0	3	21	5	2	0	0

（4）遺伝子破壊による検証

上記の比較解析によって絞り込まれた 2 候補遺伝子の 14con および 29con について、遺伝子破壊実験を実施するため、破壊ベクター

の構築を行った。その結果、研究実施期間内においては、29con についてのみベクター構築ができた。

候補遺伝子 29con について遺伝子破壊実験を実施した結果、破壊株の作出に成功した（図 5）。本破壊株は移植の繰り返しによっても安定であることが確認できたため、遺伝子破壊の表現型への影響を検討するため、変異型株と交配し、栽培試験を行った。その結果、発生した子実体の形状は正常であり、子実体分化への遺伝子破壊の影響は認められなかった。

以上の結果より、6 候補のうち、5 候補が当該変異と関係がないと判断され、14con を最終候補として絞り込むことになった。14con の機能については推定タンパク質をコードするという情報のみであるが、現在、本候補遺伝子に対する相補および破壊実験を進めている。今後、これらの実験により変異との関係を検証し、マーカー利用の可能性を明らかにしていく予定である。

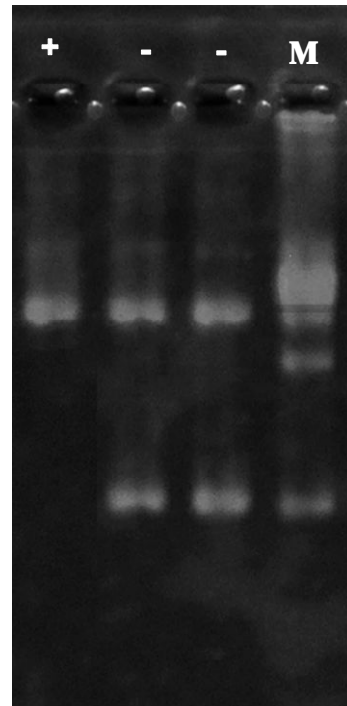


図 5 候補遺伝子 29con の遺伝子破壊 (+ : 破壊成功株、- : 非破壊株、M: サイズマーカー)

以上を要するに、本研究は食用栽培きのこウスヒラタケで見出された子実体分化異常変異の原因遺伝子を 1 候補まで絞り込み、その解明に大きく近づいたものである。この成果は栽培現場で偶発的に発生する子実体奇形化の説明につながる可能性がある。今後相補あるいは破壊実験などにより検証し、当該遺伝子の変異検出用 DNA マーカーの開発に繋げたい。

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)

嶋田有宇・伊藤幹成・奥田康仁・松本晃幸、
ウスヒラタケの子実体分化異常に関わる遺
伝子の探索 第 12 回糸状菌分子生物コンフ
ァレンス 2012 年 11 月 12 日～2012
年 11 月 13 日、名古屋市、ウインクあいち

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 晃幸 (MATSUMOTO TERUYUKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60132825