



担子菌ネナガノヒトヨタケにおける分子遺伝学的解析技術に関する研究

伊藤, 康博

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2005-09-16

(Date of Publication)

2010-07-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2830

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002830>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

担子菌ネナガノヒトヨタケにおける
分子遺伝学的解析技術に関する研究

平成17年8月

伊藤 康 博

目次

第1章 序 論	1
第2章 Random amplified polymorphic DNA (RAPD)法を利用した担子菌の種及び系統識別法の確立	
(1) 緒言	7
(2) 材料及び方法	8
(3) 結果及び考察	10
(4) 要約	21
第3章 Random amplified polymorphic DNA(RAPD)マーカー及び restriction fragment length polymorphisms (RFLP)マーカーによる担子菌 <i>Coprinus cinereus</i> の連鎖地図の構築	
(1) 緒言	22
(2) 材料及び方法	23
(3) 結果	27
(4) 考察	32
(5) 要約	40
第4章 ネナガノヒトヨタケの薬剤フルトラニル耐性遺伝子の単離と解析及び組換え体選抜マーカーへの応用	
第1節 ネナガノヒトヨタケにおける遺伝子組換え体選抜マーカーの探索	
(1) 緒言	41
(2) 材料及び方法	42
(3) 結果	44
(4) 考察	49
第2節 ネナガノヒトヨタケの薬剤フルトラニル耐性遺伝子の単離と解析	
(1) 緒言	54
(2) 材料及び方法	56

(3) 結果	59
(4) 考察	69
(5) 要約	72
第5章 総括	73
謝辞	77
引用文献	79

第 1 章

序論

キノコは近年、食品・医薬品として、または特異的酵素を生産する生物として貴重な遺伝資源であることが認識され、その利用が盛んになっている。食品としての利用だけからみても、キノコ全体の国内産出額は約 2000 億円であり、トマト (約 1900 億円)、みかん(約 1800 億円)よりもその額は大きく (農林水産省統計情報データベース 2000 年資料)、日本人の食生活に重要な位置を占めていることがわかる。また、古くから漢方薬・生薬として利用されてきたが、近年では特にキノコの生産する多糖類の抗腫瘍性や免疫調節機能活性(Wasser 2002)、あるいはアルツハイマー型痴呆症などの中枢神経系疾病や末梢神経系の疾病の予防と治療に応用することが期待される神経成長因子 (nerve growth factor; NGF)の合成促進物質(Kawagishi et al. 1993)に注目が集まるなど、医薬としても重要な資源として利用され、また研究が続けられている。さらに、キノコは難分解性のリグニンを含む木材を分解し得る唯一の微生物で、森林の資源循環に欠かせない存在であると言われてきたが、この難分解性物質の分解能が注目され、芳香族有害塩素化合物であるダイオキシン類、PCB 及び DDT、さらに内分泌攪乱物質 (いわゆる環境ホルモン) であるビスフェノール A などの難分解性有害物質の分解に関する研究がなされている (Yadav et al. 1995; Takada et al. 1996; Dietrich et al. 1995; Hirano et al. 2000; Tsutsumi et al. 2001)。この特異な機能を利用してこれらの有害物質に汚染された土壌を無害化する、いわゆるバイオレメディエーションへの応用も検討されており、これらの物質の分解過程で働くキノコ由来のユニークな酵素群は非常に貴重であるといえる。

キノコとは、糸状の細胞である菌糸で体が形成されている真核性の菌類のうち、胞子を形成する際に、子実体という肉眼でも容易に識別できるほどの大型の生殖器官、いわゆる「きのこ」をつくる菌類の総称である。最近の分類では菌類はツボカビ門、接合菌門、子のう菌門及び担子菌門の 4 グループに大別されるが、きのこを形成するのは担子菌門のうちの約 6 割の種、子のう菌門に属する一部の種、さらにごく少数の接合菌門に属する種である。このうち、シイタケ(*Lentinula edodes*)、エノキタケ(*Flammulina velutipes*)、マツタケ(*Tricholoma*

matsutake)、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)など有用種の多くは担子菌類に属している。

担子菌の代表的な生活史をネナガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) を例に取り、交配から二核菌糸の形成、そして子実体形成に至る過程について Fig. 1-1 に示した。一核菌糸は単相核(n)の菌糸であり、分岐しながら成長してコロニー(菌糸体)を形成する。一核菌糸はオイディアと呼ばれる無性胞子を着生する。二つの一核菌糸が出会うと、両者の間で菌糸融合が起こる。性が互いに異なる菌糸の間で融合が行われた場合には重相($n+n$)の二核菌糸が形成される。二核菌糸において、二核は融合することなく同調分裂を繰り返し、一細胞あたり二核を維持しながら菌糸生長を進める。これは、動物・植物などにおいて、卵と精子の核が受精直後に融合して複相核 ($2n$) を形成するのとは大きく異なり、キノコの生活史における最も大きな特徴の一つである。細胞分裂過程における二核の同調分裂はクランプ結合を伴う。一つの核がクランプ内に入り、もう一つの核はその下に位置し(Fig. 1-1 ①)、同調分裂が起こる(Fig. 1-1 ②)。次に隔壁がクランプと菌糸にそれぞれ形成される(Fig. 1-1 ③)。この段階では先端細胞が二核、クランプ細胞が一核、次端細胞が一核という状態になる。その後、クランプ細胞と次端細胞が融合し、クランプ細胞内の核は次端細胞へ移動する(Fig. 1-1 ④)。このような細胞分裂過程を経て二核菌糸は栄養生長を続け、菌糸体がある程度の大きさになると光、温度、水分、栄養などの様々な環境情報に反応して子実体を形成する。そして子実体内の担子器において核融合による複相($2n$)化と、その直後の減数分裂による単相(n)化が起こり、結果として単核の担子胞子が形成される。担子胞子は発芽して一核菌糸が生じ、有性過程が一巡する。

担子菌の交配はそれに特異な性質がいくつかあるが、その一つとして一核菌糸の性(交配型)を決定する因子の存在が挙げられる。多くの種においてその性は二対の連鎖していない交配型遺伝子、 A 及び B によって決定されており、一核菌糸における交配型は $AXBY$ のように表される。 A 、 B とも対立遺伝子が多数見いだされており、 A 、 B いずれも異なる組み合わせの場合でのみ二核化が起こる。例えば $A6B2$ を持つ菌糸と $A5B5$ を持つ菌糸の場合に和合性となり、それらの間で交配が成立するが、 $A6B5$ と $A6B2$ 、あるいは $A5B2$ と $A6B2$ のような組み合わせでは交配しない。これらの二つの交配型遺伝子のうち A 遺伝子は細胞分裂過程におけるクランプ細胞の形成と二核の同調分裂過程を支配しており、 B 遺伝子は核移動とクランプ細胞の次端細胞への融合を支配している(Fig.

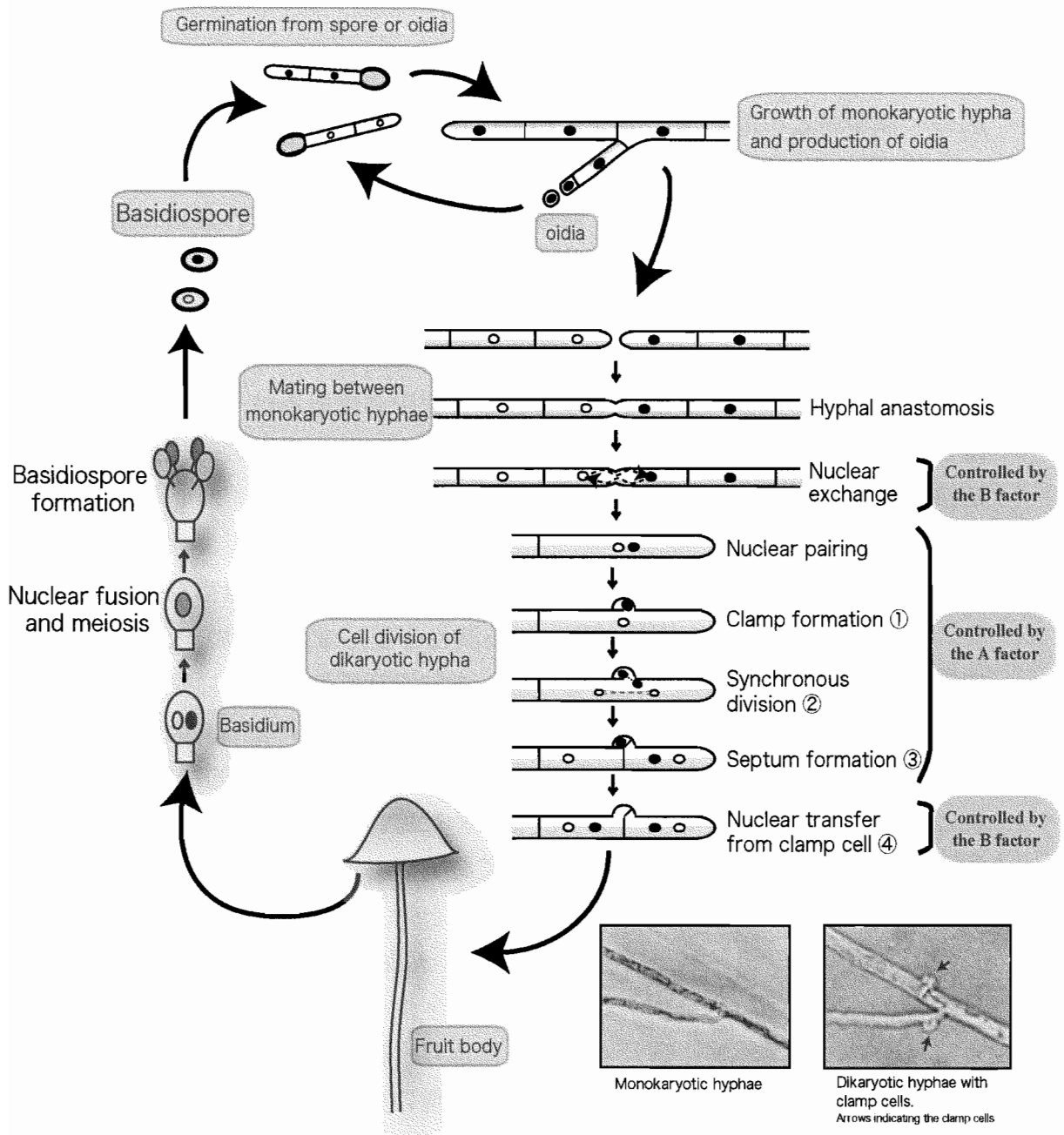


Fig. 1-1 Life cycle of basidiomycete *Coprinus cinereus*.

1-1)。もう一つの担子菌の交配における特徴的な現象として、二核菌糸とまた別の単核菌糸との間の交配の成立が挙げられる。二核菌糸の伸長生育過程において適当な単核菌糸に出会うと、二核菌糸の一方の核はそれまで対合していた核を捨て、その単核菌糸の核と対合を行い、新たな組み合わせの二核菌糸を形成する。この二核菌糸と単核菌糸の間の交配はブラー現象として古くから知られており、“ダイモン交配(dikaryon-monokaryon mating; di-mon mating)”と呼ばれる(Buller, 1930)。上記のような性の決定機構、あるいは一旦成立した二核菌糸でさえもさらに核の交換ができるという交配の仕組みは、結果として多様な遺伝形質の組み合わせを生み出すことになり、様々な環境の変化に適応し、生き抜くための担子菌類の巧みな戦略であると考えられる。

前述のように担子菌を含むキノコ類は食品や医薬などの貴重な遺伝資源であり、きわめて実用的な有用性が高いにも関わらず、哺乳類、酵母、バクテリア、植物などの他の生物に比べて、その遺伝学的研究基盤は十分に整備されていないのが現状である。他生物に比べると、遺伝子情報も少なく、染色体数すらはつきり分かっていない食用種もある。今後、有用品種の効率的な育種法の確立、また有用成分や酵素の高度利用を計るためには、遺伝的情報を十分に集積し、分子生物学的手法を大いに活用していく必要がある。そのためには担子菌のモデル研究系を確立することが効率的であると考えられる。植物の分子生物学的研究においてはシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やイネ(*Oryza sativa*)がモデル生物として扱われ、全ゲノム情報や生理・生化学的情報が急速に蓄積し、その情報を他の有用植物に還元することにより、様々な植物種で種々の解析が急速に進んでいる。このように、あるモデル種の先端的研究情報が他種の研究進行に対して重要な情報源になることは明白である。同様に担子菌でも独自のモデル研究系を確立し情報を蓄積していくことが、担子菌研究全体の発展に繋がるであろう。

担子菌の中で種々の研究が最も進んでいる種の一つにネナガノヒトヨタケが挙げられる。本菌は一般に食用とはされていないが、多くの有用種と共通する生活環を持っており、また比較的簡単な培地上で生育し、同じ培地で植菌後 10 日から 2 週間ほどの短期間で子実体を作り、胞子を形成するという特性を持っている。この短い生育環を活かし、性的接合性に関わる交配型因子や子実体形成に関わる遺伝子の同定と機能解析、さらに染色体構成の解明など基礎的研究

が広範に行われている(PUKKILA and CASSELTON 1991)。これらのことから、ネナガノヒトヨタケは担子菌のモデル生物として扱うための条件を満たしていると考えられる。そこで本研究では、本菌を対象として分子生物学的手法を適用するための基盤となる技術の開発を試みたものである。

近年の生物学の大きな発展として、大腸菌や酵母、ヒト、シロイヌナズナをはじめとするあらゆる種類の生物で全塩基配列の決定、すなわちゲノム情報の解明が進んだことが挙げられる。現在の生物学研究ではゲノム全体を俯瞰しながら個々の遺伝子・蛋白質解析を行い、さらに個々の因子間での相互作用を網羅的に解析し、生命現象全体を明らかにするという流れにある。ネナガノヒトヨタケでは 2003 年に全塩基配列情報が公開され、担子菌においても遺伝情報全体を見据えた研究を行うことが可能となった。その結果、遺伝子レベルでの研究が急速に進むことが予想され、遺伝子解析の基盤となる技術がさらに重要となってくる。そのような状況の中で本研究ではネナガノヒトヨタケの研究基盤となる技術として、簡便な DNA マーカーの開発、それを活用した遺伝地図の作成、さらに遺伝子組換え体選抜に用いるマーカー遺伝子の開発を行った。

まず第 2 章では担子菌における DNA マーカー利用法の確立を目的として、random amplified polymorphic DNA (RAPD)法の適用を試みた結果について述べる。担子菌の種の識別は主に子実体の形態で行われるが、菌糸の段階では形態による同定が困難であるため、DNA マーカーの利用が適していると考えられる。また種内系統を識別できる DNA マーカーが確立すれば、遺伝解析や品種識別、DNA マーカー育種法などに適用できる。しかしながら担子菌類は遺伝子情報がそれほど十分でなく、簡便かつ多数のマーカーを利用する手法の確立が必要である。そこで第 2 章では RAPD 法の適用により得られた DNA マーカーにより、ネナガノヒトヨタケ及び近縁種の種及び系統の識別が容易に行えることを実証し、さらにマツタケとその近縁種へ適用を検討し系統関係を明らかにした。また、ネナガノヒトヨタケにおいて遺伝マーカーとして利用できることを確認した。

第 3 章ではネナガノヒトヨタケのゲノム解析の基盤となる遺伝地図の作成について述べる。遺伝地図はゲノム解析を行う上で、染色体全体を俯瞰するためにも不可欠である。ネナガノヒトヨタケではこれまでに表現型や生化学的マーカーによる連鎖地図が作られているが、染色体全域をカバーする連鎖群は得られていない。そこで本章では、第 2 章でその有用性を示した RAPD マーカーを

主に利用して、ネナガノヒトヨタケにおける連鎖地図を作成した。またこの連鎖地図を応用し、ゲノム解析の一環として染色体長多型(Chromosome length polymorphisms; CLP)の解析を行った。

第4章ではネナガノヒトヨタケの効率的遺伝子組換え系の開発を目的として、遺伝子組換え選抜マーカーとして利用可能な薬剤耐性遺伝子をクローニングした結果について述べる。個々の遺伝子機能解析を行う上で、今や遺伝子組換え法は必須の技術である。これまでネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え試験は、トリプトファン要求変異株を宿主にトリプトファン合成遺伝子を選抜マーカーとして利用する実験系が主に利用されてきている。しかしながら、この系では宿主株が栄養要求性株に限定されるという問題点がある。本研究ではネナガノヒトヨタケの野生型株が生育阻害を起こす薬剤フルトラニルに対して、突然変異により抵抗性を獲得した株から原因遺伝子をクローニングし、この遺伝子が野生型株においても優性を示す組換え選抜マーカーとして利用できることを実証した。さらに抵抗性獲得機構に関しても考察を行った。

最後に第5章では、第2章から4章まで述べた、担子菌の種や系統識別における RAPD マーカーの有効性、ネナガノヒトヨタケの連鎖地図の構築とその応用、さらにネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え体選抜マーカー遺伝子の開発について、総合的な考察を行い、本研究に関する総括を行った。

第 2 章

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)法 を利用した担子菌の種及び系統識別法の確立

(1) 緒言

担子菌の種識別は主に子実体の形態によって行われているが、一旦分離・培養した菌株については、再度種同定を行うことは容易ではない。実験室の環境で子実体を着生させることができる種は限られているため、菌糸から種や系統を識別できる簡便な方法は非常に有用である。これまでに担子菌においては、アイソザイム分析や restriction fragment length polymorphisms (RFLP)法などが、西洋マッシュルーム *Agaricus bisporus*、シイタケ *Lentinula edodes*、*Pleurotus* 属及び *Coprinus* 属に適用され、種や系統の遺伝的変異の解析が行われている (Royse and May 1982; Royse et al. 1983; Wu et al. 1983; Castle et al. 1987, 1988; Loftus et al. 1988; Magae et al. 1990; Kulkarni 1991; Sagawa et al. 1992; Hopple and Vilgalys 1994)。

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)法は、任意配列の約 10 塩基長のプライマーを用いた PCR 法により DNA 断片を増幅する方法で、分子マーカーとしての有効性が示されている (Williams et al. 1990)。RAPD 法は RFLP 法などと同様に DNA の変異を検出することができるが、RFLP 法とは異なり、DNA 配列情報やプローブ用 DNA 断片などが必要なく、非常に簡便な方法である。RAPD 法は様々な生物において系統解析や雑種同定、連鎖解析などに利用されており、担子菌では *Agaricus brunnescens* の種同定、*A. bisporus* 及び *Laccaria bicolor* の連鎖地図作成、*Coprinus psychromorbidus* 及び *Ganoderma licidum* の系統解析に適用されている (Khush et al. 1992; Doudrick et al. 1995; Laroche et al. 1995; Hseu et al. 1996)。

本章ではネナガノヒトヨタケ及びその近縁種 (*Coprinus* 属) へ RAPD 法を適用し、種及び系統識別への利用を検討すると同時に、RAPD の遺伝マーカーとしての有用性を検討した。さらに、その応用としてマツタケを対象に本法の適用を試みた。マツタケは日本において非常に商業的価値が高いため、特に子実体の人工培養に関する研究には大きな期待がかかる。そのため各種研究のため

の菌株管理は重要であり、菌株の維持管理には、簡便な種・系統識別法の開発が必要とされる。また、マツタケ及びその近縁種の子実体は稀少でありその形態を基にした分類が十分でないため、未だ種の分類は曖昧である。したがってこれらの分類を行うことができる材料となり得るような遺伝情報の集積も必要である。本章では RAPD 法の適用によりマツタケを近縁種から識別する手法を確立し、さらに近縁種との系統関係も検討した。

(2) 材料及び方法

1) 菌株及び培養条件

供試したネナガノヒトヨタケ近縁種及びマツタケの近縁種の菌株は Table II-1 に示した。菌糸培養、胞子発芽、交配及び子実体培養には Malt-Yeast-Glucose (MYG) 培地 (10 g/l モルトエキス, 4 g/l 酵母エキス, 4 g/l グルコース; Rao and Niederpruem 1969) に 15 g/l 寒天を添加して用いた。ネナガノヒトヨタケ近縁種は培養温度 30 °C で、12 時間照明と 12 時間暗黒を繰り返す条件で培養を行った。マツタケ近縁種では培養温度を 20 °C とした。DNA 抽出の際には液体 MYG 培地で静置培養を行った。

2) ダイ-モン交配 (dikaryon-monokaryon (di-mon) mating)

ネナガノヒトヨタケの交配試験は MYG プレート培地上で行った。二核株と単核株との対峙培養を行い、単核株側から生じた菌糸コロニーの周辺部に、二核菌糸に特徴的なクランプ構造を持つ菌糸が生じた場合に、交配 (ダイ-モン交配) が成立したと判断した。

3) RAPD 解析

菌糸由来の DNA は Doyle and Doyle (1987) の方法によって抽出した。RAPD-PCR 法については Williams et al. (1990) の方法を一部変更して行った。PCR 反応液は 10 mM TrisHCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 各 0.2 mM の dATP, dCTP, dTTP 及び dGTP, 1 µM の RAPD プライマー, 0.4 U rTaq DNA ポリメラーゼ (Takara), 及び 10 ng ゲノム DNA を含み、液量 10 µl となるように調製し、ミネラルオイルを重層した。反応液は 94 °C で 2 分間熱変性を行った後、1 サ

Table II-1. Strains of *Coprinus* and *Tricholoma* species examined.

Species	Strain	Source (collection sites)
<i>Coprinus angulatus</i> Peck	225	Okayama Univ. ¹⁾
	516	Okayama Univ. ¹⁾
	624	Okayama Univ. ¹⁾
	711	Okayama Univ. ¹⁾
<i>C. atramentarius</i> (Bull. : Fr.) Fr.	MAFF430151	G.B. ²⁾
<i>C. cinereus</i> (Schaeff. : Fr.) S. F. Gray	Wild	NFRI ³⁾
	5005	Okayama Univ. ¹⁾
	5309	Okayama Univ. ¹⁾
	5312	Okayama Univ. ¹⁾
	5338	Okayama Univ. ¹⁾
	5348	Okayama Univ. ¹⁾
	FR1	Protoplast regenerant of Fis ^{c 4)}
<i>C. comatus</i> (Muller : Fr.)	7T	NFRI
	11T	NFRI
<i>C. disseminatus</i> (Pers. : Fr.)	E022	Forestry and Forest Products Research Institute
<i>C. micaceus</i> (Bull. : Fr.) Fr.	A342S	Forestry and Forest Products Research Institute
<i>C. sp</i> (species unknown)	MAFF425079	G.B.
<i>Tricholoma matsutake</i> (S. Ito & Imai) Sing.	MAFF460031	G.B. (Hyogo, Japan)
	MAFF460037	G.B. (Aomori, Japan)
	MAFF460051	G.B. (Yamanashi, Japan)
	MAFF460052	G.B. (Hokkaido, Japan)
	MAFF460057	G.B. (China)
	MAFF460070	G.B. (Kumamoto, Japan)
	MAFF460101	G.B. (Korea)
<i>T. caligatum</i> (Viv.) Ricken	MAFF460044	G.B. (Algeria)
	MAFF460064	G.B. (Algeria)
<i>T. magnivelare</i> (Peck) Readhead comb. nov	MAFF460081	G.B. (U.S.A.)
<i>T. bakamatsutake</i> Hongo	MAFF460025	G.B. (Aomori, Japan)
	MAFF460087	G.B. (Hokkaido, Japan)
<i>T. fluvocastaneum</i> Hongo	MAFF460028	G.B. (Kohchi, Japan)
	MAFF460029	G.B. (Kyoto, Japan)
	MAFF460030	G.B. (Kyoto, Japan)

¹⁾ : Maintained at National Food Research Institute for more than 10 years.

²⁾ : Gene Bank of Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Japan.

³⁾ : National Food Research Institute.

⁴⁾ : Fis^c was supplied from the University of Tokyo, maintained at NFRI for more than 10 years.

イクルあたり 94 °C で 30 秒間の熱変性, 36 °C で 1 分間のプライマーアニーリング, 及び 72 °C で 2 分間の DNA 伸長反応を行う過程を 45 回繰り返す, 最後に 72 °C で 2 分間の伸長反応を行う条件で反応させた。使用した RAPD プライマーは Table II-2 に示した。増幅した DNA は 1.6 % (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、紫外光下で写真撮影した。

4) データ解析

明瞭な多型性を示したバンドについて、系統ごとにその有無を調査した。ある 2 系統 (i 及び j) の類似度 S_{ij} は以下の式、

$$S_{ij}=(a+d)/(a+b+c+d)$$

(a; 2 系統 i 及び j とともに存在するバンド、b; 系統 i にのみ存在するバンド、c; 系統 j にのみ存在するバンド、d; 2 系統 i 及び j とともに存在しないバンド) にて算出した (Sokal and Michener, 1958)。あらゆる 2 系統の組み合わせに関してこの類似度を算出し、unweighted-pair-group 法 (Sneath and Sokal 1973) を用いてクラスタ解析を行った。

(3) 結果及び考察

1) *Coprinus* 属における種の識別

Table II-1 に示した *Coprinus* 属の菌株 17 系統に対し Table II-2 に示した RAPD プライマーで PCR 反応を行った。Fig. II-1A, B に典型的な RAPD 解析の結果を示した。同じ種に属する株間 (それぞれレーン 3~7, 8~11, 及び 12~13) では分子量が同じ数本の DNA 断片がみられ、類似した RAPD パターンを示すのに対して、異種間では RAPD パターンが著しく異なっていた。なお *Coprinus* 属のすべてに共通する DNA 断片は認められなかった。これらのことは他の 10 種のプライマーで分析しても同様であった。これらの結果から *Coprinus* 属において種の識別が可能であると考えられた。

農林水産省農業生物資源研究所のジーンバンクに保存されている菌株のうち属名は *Coprinus* であるが種名が特定されていない菌株 425079 について種の同定を試みた。この株の RAPD パターンは Fig. II-1A 及び B のレーン 2 に示している。供試したすべてのプライマーで 425079 株は明らかにネナガノヒトヨタ

Table II-2. RAPD primers used for discrimination of *Coprinus* strains and *Tricholoma* strains.

	Sequence (5' to 3')		Sequence (5' to 3')
For <i>Coprinus</i> strains	GACTAGCCTC	For <i>Tricholoma</i> strains	GGCTCATGTG
	GTATCGCGGT		GGCACTGAGG
	TGGGCACTGA		AGGGCCGTCT
	TGGTCACCGA		ACGACCGACA
	TGCGTGCTTG		GTCAGGGCAA
	TTCGAGCCAG		GACCGCTTGT
	AGTGGAAGGT		GTGATCGCAG
	ATGCCTACAG		TGCCGAGCTG
	AGCGCCATTG		GTTGCGATCC
	CACCTAGTCC		GGTGACTGTG
	CTCACCGTCC		
	CACCGTATCC		

ケと共通の RAPD バンドを有していたが、他種の株に対しては共通パターンが見られなかった。したがってこの株はネナガノヒトヨタケであると同定した。さらにこの種同定の信頼性を確認するために、交配試験を行った。ここでは特に 425079 株が二核株であるため、ネナガノヒトヨタケの 3 種の単核株 (FR-1, 5005, 及び 5048、それぞれ異なる交配型を持つ) との間でのダイ-モン交配が成立するか否かを検討した。その結果、5005 株と 5048 株のコロニー周辺に二核菌糸に特徴的なクランプ構造が見られ、交配の成立が認められたため、425079 株はネナガノヒトヨタケであることが確認できた。

本研究で得られた RAPD パターンは異なる種間ではほとんど類似性が見られなかったため、供試した *Coprinus* 属の系統関係を RAPD パターンの類似性に基いて推測することは不適切であると考えられる。しかしながら、ここで示したように種名が不明な株の種同定を容易に行うことが可能であったことから、種間の低い類似性は *Coprinus* に属する種の識別を行う上で非常に有効であるといえることができる。

2) ネナガノヒトヨタケとヤケノヒトヨタケ (*C. angulatus*) の株識別

同じ種に属する株間の RAPD パターンには多型を示す DNA 断片も見られた。ネナガノヒトヨタケ 7 株についてプライマー TTCGAGCCAG を用いて得られた RAPD パターンではこの種に共通の断片に加え、多型性を示す 5 本の断片が得られた (Fig. II-2A)。わずか 1 種類のプライマーで得られたこれら 5 本の多型を示す断片の組み合わせで、Fig. II-2B に示すとおりネナガノヒトヨタケ 7 株を識別することができた。

同様にヤケノヒトヨタケ 4 株について株識別を試みた。Fig. II-2C に示す通り、プライマー TGC GTGCTTG では 2 本、もう一種類のプライマー GACTAGCCTC では 1 本の多型を示す断片が得られ、これら 3 本の断片の組み合わせにより、ヤケノヒトヨタケ 4 株についても明確に株の識別を行うことができた (Fig. II-2D)。

以上のように、RAPD 法によりネナガノヒトヨタケ及びヤケノヒトヨタケではそれぞれの株間で多型を示す DNA 断片を容易に得ることができ、これを利用して、株の識別が可能であった。このことから本法はシイタケなどの他の有用担子菌の品種識別にも応用できると考えられる。またこれらの多型断片は種々の遺伝解析に利用できることが示唆される。

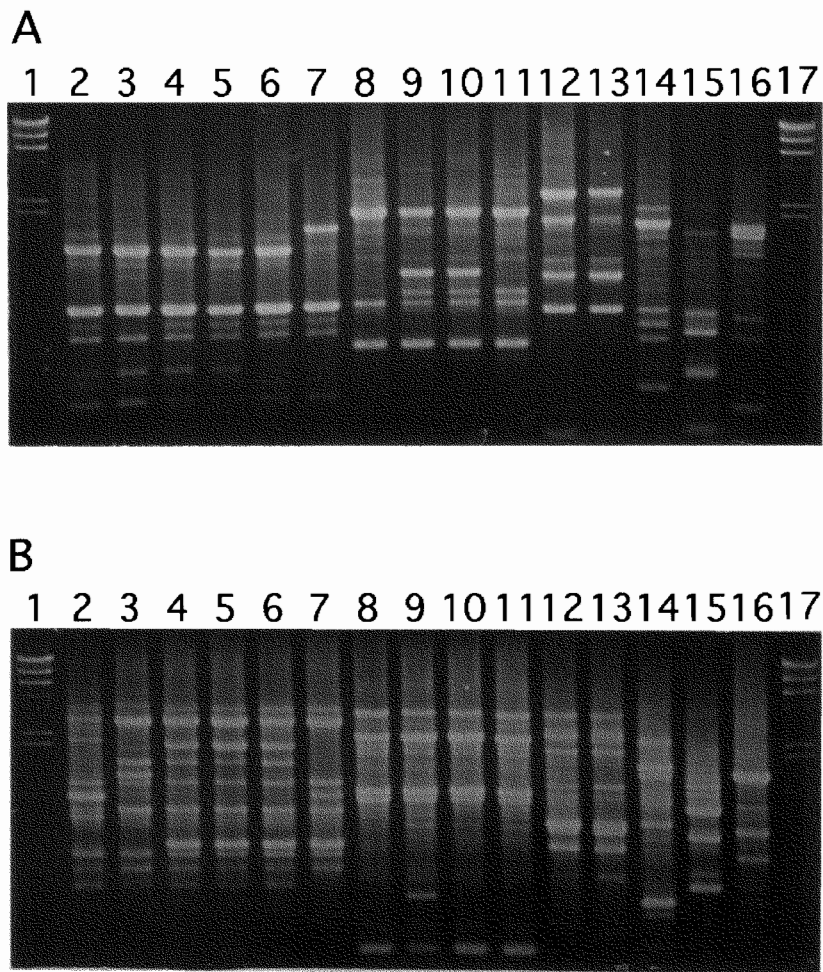


Fig. II-1. RAPD patterns of 15 *Coprinus* strains in 6 species
 A shows the RAPD patterns produced with the primer TGGTCACCGA, and B with AGCGCCATTG. Lanes 1 and 17, molecular size markers (lambda DNA digested with *Hind*III); lane 2, unknown species of *Coprinus* sp. 425079; lanes 3-7, *C. cinereus* wild, 5309, 5312, 5338 and 5348, respectively; lanes 8-11, *C. angulatus* 225, 516, 624 and 711, respectively; lanes 12, 13, *C. comatus* 7T and 11T, respectively; lane 14, *C. micaceus* A342S; lane 15, *C. disseminatus* E022; lane 16, *C. atramentarius* 430151.

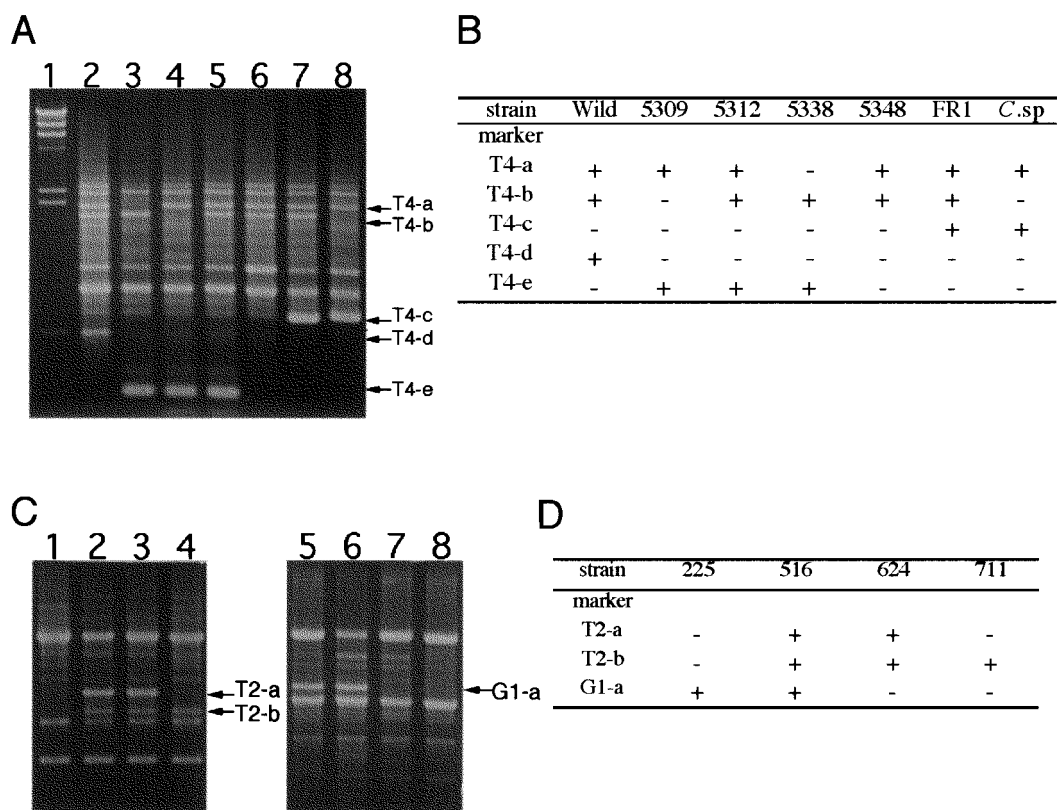


Fig. II-2. Identification of *Coprinus* strains by RAPD markers. A shows RAPD patterns of seven strains of *Coprinus cinereus* produced with the primer TTCGAGCCAG. Lane 1, molecular size marker(λ DNA digested with *Hind*III); lanes 2-8, wild, 5005, 5309, 5312, 5348, FR1, and *Coprinus*. sp. 425079 identified as *C. cinereus* in Fig. I-1, respectively. Arrows indicate polymorphic fragments. B. Presence of polymorphic DNA fragment represented in Fig. I-2A. "+" indicates presence of the marker, and "-" indicates absence. C shows RAPD patterns of four strains of *C. angulatus*. Lanes 1-4, 225, 516, 624, and 711, respectively, produced with the primer TCGTGCTTG; and lanes 5-8, the same strains, respectively, produced with the primer GACTAGCCTC. D. Presence of polymorphic DNA fragment represented in Fig. 2C.

3) ネナガノヒトヨタケの交配と減数分裂過程における RAPD マーカーの遺伝様式

ネナガノヒトヨタケ FR-1 株と 5005 株とを交配して得られた二核菌糸と、そこから減数分裂を経て得られた 18 の担子胞子由来の後代に関して RAPD マーカーの遺伝様式を調べた。2 種のプライマー TTCGAGCCAG 及び CTCACCGTCC を用いて解析したところ、明確な多型性を示す断片 (T4-a, c, e 及び C5-a, b, c) が存在した (Fig. II-3A 及び B, レーン 2 及び 3)。Fig. II-3A 及び B のレーン 4 に示す二核株では、FR-1 由来断片 (T4-a, c 及び C5-b, c) と、5005 由来断片 (T4-e 及び C5-a) の両方が存在していたことから、この株は両親株の DNA を併せ持つ雑種であることが明らかであった。この二核菌糸の担子胞子由来の後代 (一核菌糸) では、多型断片のうち 4 本は互いに独立して分離したが、FR-1 由来 T4-a と C5-b とは連鎖しており、一株でのみ組換えが認められた (Fig. II-3A, B, C)。

Wu et al. (1983) は RFLP 解析によりネナガノヒトヨタケの株間の DNA 多型を検出している。しかしながら RAPD 法は RFLP 法のようにプローブ DNA は必要なく、また多くの担子菌のようにゲノム DNA 情報が十分でない種においても、ゲノムの多様性を解析することができる。したがって RAPD 法は担子菌 *Coprinus* 属においても有用な遺伝マーカーとして利用できると考えられる。担子菌では西洋マッシュルームやシイタケ、ネナガノヒトヨタケなどで交配や減数分裂の過程における遺伝子の伝達が、RFLP マーカーや RAPD マーカーなどの分子マーカーを用いて観察されている (Castle et al. 1988; Loftus et al. 1988; Summerbell et al. 1989; Kulkani 1991; Khush et al. 1992; Freedman and Pukkila 1997)。本研究で示した通り、ネナガノヒトヨタケにおいても RAPD 法によって、株特異的な DNA マーカーを多数検出することができ、それらが交配、減数分裂を通して後代へ伝達することが明らかとなった。したがって RAPD マーカーはネナガノヒトヨタケのゲノム解析のための連鎖地図作成や連鎖地図の利用による遺伝子クローニングなどに適用が可能であると考えられる。

4) RAPD 法による *Tricholoma* 属の種識別法の確立

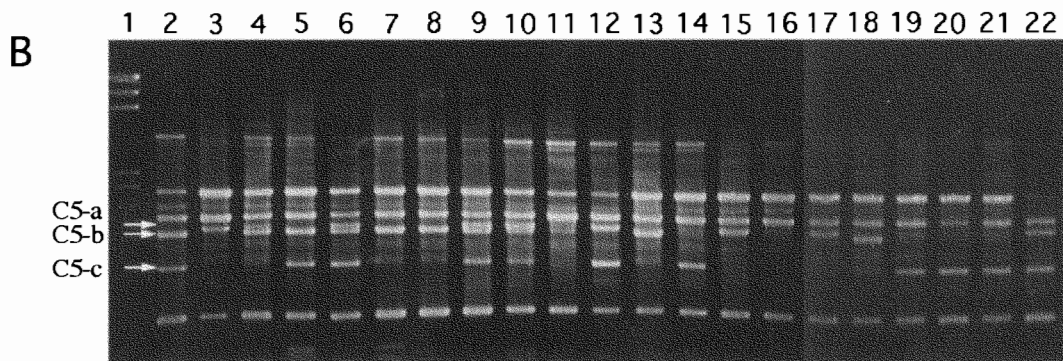
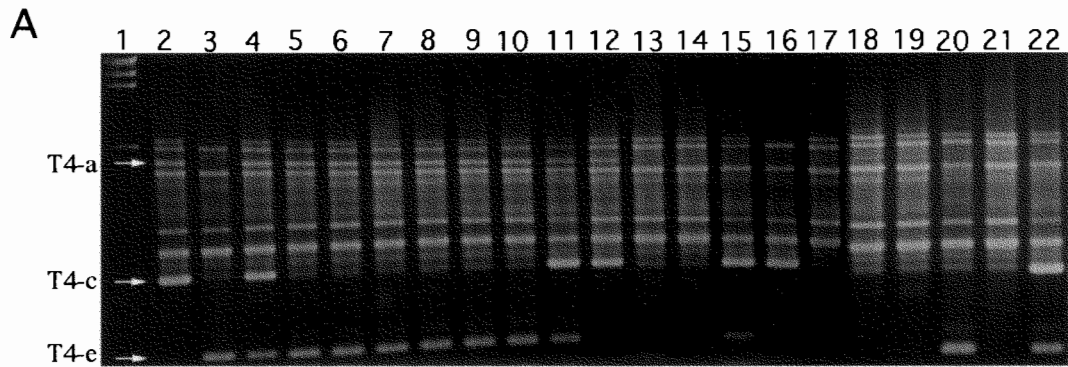
Tricholoma 属に分類されるマツタケとその近縁 4 種の 15 菌株について、Table II-2 に示した 10 種のプライマーを用いて RAPD 解析を行った。ほとんどの RAPD プライマーにおいて同一種内の系統間では共通の増幅断片が得られたが、

異なる種の間ではそれぞれ特異的な RAPD パターンが認められた (Fig. II-4)。しかしながら、マツタケとオウシュウマツタケ (*T. caligatum*) 及びアメリカマツタケ (*T. magnivelare*) との間ではいくつかのプライマーで類似した RAPD パターンを示した。そこでマツタケと他の 2 種との間の関係を、RAPD マーカーの有無により詳細に検討したところ、7つのマーカーはマツタケ、オウシュウマツタケ及びアメリカマツタケに共通して存在し、4つのマーカーはマツタケ及びオウシュウマツタケに、1つはマツタケとアメリカマツタケに共通して存在したのに対し、10の RAPD マーカーはマツタケに特異的であった。

Tricholoma 属の近縁関係を検討するために 5 種 15 系統の菌株から得られた 192 個の RAPD 断片に基づいたクラスター解析を行った。その結果、これら 15 系統は従来の分類と完全に一致した 5 つのグループに分類された (Fig. II-5)。 *Tricholoma* 属 5 種すべてについて、種内系統間の類似度は種間のそれよりも明らかに高かった。すなわち、マツタケ種内の株間での類似度は 85 %を越えているのに対し、オウシュウマツタケ、アメリカマツタケ、ニセマツタケ (*T. fulvocastaneum*)、及びバカマツタケ (*T. bakamatsutake*) のマツタケとの類似度は、それぞれ 52.0, 41.8, 38.7, 及び 24.6 %であった。マツタケに対し比較的類似度が高かったオウシュウマツタケ及びアメリカマツタケでは、マツタケの RAPD パターンと似たパターンを示すプライマーも存在したが、適切なプライマーを選択することにより、これら近縁種からマツタケを識別することは可能であると考えられる。

マツタケには供試した 4 種に加えさらに 2 種 (*T. robustum* 及び *T. zelleri*) の近縁種が知られている。これら 6 種のうちオウシュウマツタケ及びアメリカマツタケは、子実体の形態、特徴的な香り、培養菌糸の特徴、“シロ”と呼ばれる土中の菌塊の形状、さらに針葉樹と形成する菌根等の点からマツタケと非常に近縁であると考えられてきた (Ogawa 1978; Ohara and Ogawa 1982; Zeller and Togashi 1934)。本研究の RAPD 解析の結果は従来の形態学的な分類と一致し、これら 3 種の近縁性を遺伝学的なレベルで確認することができた。

マツタケとその近縁種は北半球に広く分布しているが、*Tricholoma* 属の種の分類は未だ十分に行われていない。オウシュウマツタケ (*T. caligatum*) と称される種は北アメリカ、中央アメリカ、ヨーロッパ、北アフリカに分布しているが、その中にはいくつかの異なる種が含まれているとみられる。マツタケは東アジア在来種と考える研究者もいるが、Kytövuori (1988) は、マツタケ (*T. matsutake*)



C

	FRI 5005 Hyb.			progeny																	
lane	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
T4-a	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4-c	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
T4-e	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
C5-a	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
C5-b	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C5-c	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+

Fig. II-3. Inheritance of RAPD markers in *C. cinereus* strains. A shows RAPD patterns produced with the primer TTCGAGCCAG, and B with CTCACCGTCC. Lane 1, molecular size marker (λ DNA digested with *Hind*III); lane 2, FR1; lane 3, 5005; lane 4, dikaryotic strain formed by the mating of FR1 and 5005; lanes 5-22, basidiospore-clones produced by the dikaryon. T4-a, c, and e, and C5-a-c indicate polymorphic fragments. C shows the summary of the polymorphic DNA fragments shown in panel A and B.

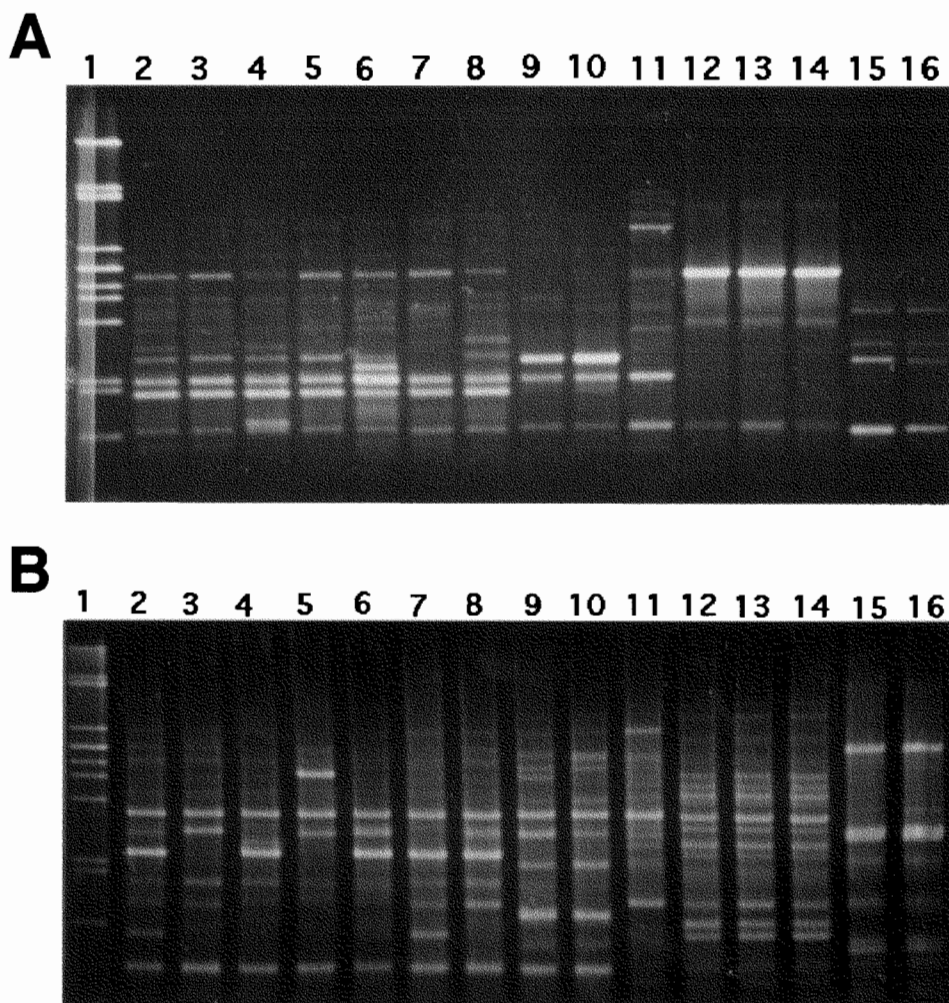


Fig. II-4. RAPD patterns of strains of *T. matsutake* and related 4 species

A shows the RAPD patterns amplified with the primer of GACCGCTTGT, and B with TGCCGAGCTG. Lane 1, molecular size marker(λ DNA digested with *Pst*I); lanes 2-8, *T. matsutake* MAFF 460031, MAFF 460037, MAFF 460051, MAFF 460052, MAFF 460057, MAFF 460070 and MAFF 460101; lanes 9 and 10, *T. caligatum* MAFF 460064 and MAFF 460044; lane 11, *T. magnivelare* MAFF 460081; lanes 12-14, *T. fluvocastaneum* MAFF 460028, MAFF 460029 and MAFF 460030, lanes 15 and 16, *T. bakamatsutake* MAFF 460025 and MAFF 460087.

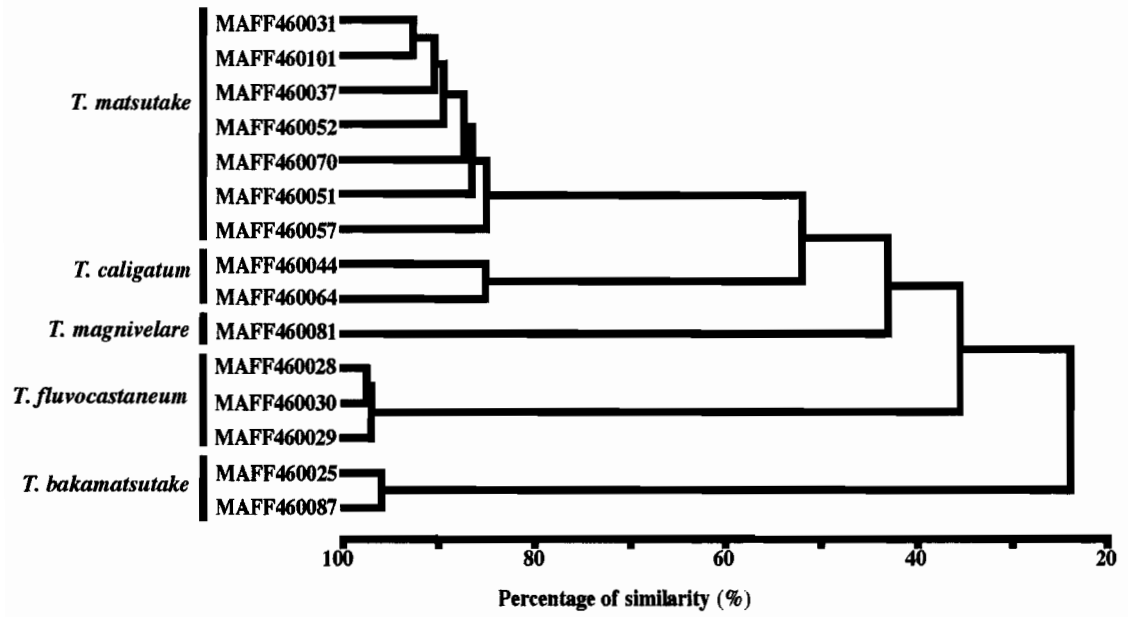


Fig. II-5. Phylogenetic tree of *Tricholoma* species based on 192 RAPD fragments.

は *T. caligatum* グループの一種でヨーロッパや北アフリカに分布する *T. nauseosum* のシノニム（異名）であると述べている。マツタケ及び近縁種の類縁関係を詳細に検討し、種の分類を明確にするためには、RAPD 法などの DNA 解析による遺伝的情報が重要となるであろう。

(4) 要約

担子菌の DNA マーカーとして random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法の利用を検討した。まず担子菌の種識別への利用を検討するため、ネナガノヒトヨタケを含む *Coprinus* 属 6 種の RAPD パターンを比較した。その結果、同じ種に属する系統間では類似した RAPD パターンが認められたのに対し、異種間では著しく異なったパターンが認められたため、本法は *Coprinus* 属の種識別に利用できることが示された。そこで、ヒトヨタケ属に分類されているが種名が不明の株について RAPD パターンを検討し、ネナガノヒトヨタケであることを同定した。また、ネナガノヒトヨタケとヤケノヒトヨタケに関して、それぞれ株間で多型を示す RAPD マーカーが容易に得られ、供試したすべての株を識別することが可能であった。次に、マツタケ及び近縁 4 種に RAPD 法を適用したところ、同様に、異なる種間ではそれぞれ特異的な RAPD パターンが認められ、種同定に利用できることが示された。さらに供試したマツタケ及び近縁 4 種について、RAPD マーカーを用いたクラスター解析により近縁性を検討したところ、形態などから推察されてきた従来の近縁関係と同様の結果が得られた。さらに、ネナガノヒトヨタケにおける RAPD マーカーの遺伝様式を検討した。菌株間で多型性を示す RAPD マーカーは、交配、減数分裂を通してこれらが後代へ伝達することを確認した。したがって、RAPD マーカーは、ゲノム解析のための連鎖地図作成や、連鎖地図を利用した遺伝子クローニングなどに適用が可能であると考えられる。

第 3 章

Random amplified polymorphic DNA(RAPD)マーカー及び restriction fragment length polymorphisms (RFLP)マーカーによる担子菌 *Coprinus cinereus* の連鎖地図の構築

(1) 緒言

染色体全域に DNA マーカーが高密度に配置された遺伝地図はゲノム解析や遺伝子単離等の研究を行う際に基盤となる基礎的な情報を与えるものである。これまでにネナガノヒトヨタケではランダムに選んだ胞子による解析と四胞子解析を組み合わせた連鎖地図がいくつか作られてきた(Day and Anderson 1961; Moore 1967; North 1987; Takemaru 1982)。その後、これらを統合した 10 の連鎖グループからなる連鎖地図が示されている (Casselton 1995; North 1990)。ネナガノヒトヨタケでは、遺伝子クローニングの際に目的の遺伝子が座乗する染色体を同定するための DNA マーカーとして、これまで restriction fragment length polymorphisms (RFLP) (Botstein et al. 1980)が利用されてきた (Muraguchi and Kamada 1998, 2000; Zolan et al. 1992)。一方、random amplified polymorphic DNA (RAPD)法 (Williams et al. 1990)は、前章で述べたように非常に有用な DNA マーカーであるためこれまでに様々な糸状菌において遺伝地図の構築に用いられているが (Forche et al. 2000; Kerrigan 1993; Williams et al. 1991; Xu and Leslie 1996)、ネナガノヒトヨタケにおいては前章で示したように種または系統の識別に適用されているに過ぎない (Ito and Yanagi 1999; Ito et al. 1998)。ネナガノヒトヨタケのゲノムサイズは約 37.5 Mb であり(Dutta, 1974)、13 本の染色体から構成されている。これらの染色体は約 1~5 Mb の範囲のサイズにあり、contour-clamped homogenous electric field (CHEF)ゲル電気泳動により分画することができる (Pukkila and Casselton 1991)。しかしながら、分画された染色体とこれまでに作られた連鎖地図との間には部分的にしか対応が付けられていないのが現状である。

本研究ではネナガノヒトヨタケゲノムの連鎖地図作成を行うために、野生型株 KF₃#2 と交配型 A 及び B 遺伝子の変異株(*AmutBmut*), #326 とを交配して得られた後代を用い、RAPD マーカー、RFLP マーカー、及び交配型遺伝子座(A 及

び *B*)の連鎖関係を調べた。その結果構築された連鎖地図は染色体数 13 本と一致する 13 の連鎖グループから構成されている。ネナガノヒトヨタケは異型接合性の種であり、通常、交配型 *A* 及び *B* がそれぞれ異なっている一核菌糸間の交配により、二核菌糸が形成され、その後の生育に伴い子実体を形成する (Fig. I-1)。一方で、異なる交配型を持つ菌糸間での交配を行わなくても子実体を形成する系統もあり、*AmutBmut* 変異系統 (Swamy et al. 1984) もその一種である。この系統は交配型を決定する二つの因子のうち *A* 遺伝子に変異した株と *B* 遺伝子に変異した株とを交配し、その担子胞子後代から選抜されたものである。野生型菌糸は *A* 及び *B* 遺伝子のそれぞれで異なる対立遺伝子を持つ菌糸間でのみ、交配が起こるのに対し、この二重変異株は自らの菌糸間で和合性を示しホモカリオンを形成することができる。またこの二重変異株は、野生型の二核菌糸と同様、クランプ細胞の形成 (Inada et al. 2001) や、子実体の形成 (Chiu and Moore 1990; Granado et al. 1997; Kanda and Ishikawa 1986; Kanda et al. 1989a,b; Cummings et al. 1999) が起こる。したがって、この二重変異株由来の単胞子に対し、さらに変異処理を行って二核菌糸に特異的な表現型に関わる遺伝子に突然変異が生ずれば、例えばその変異が劣性形質でも、他の株と交配せずに単独で子実体を形成することができるので、当代でその表現型が現れる。このように *AmutBmut* 系統は二核菌糸独特の形質に関わる突然変異遺伝子のスクリーニングに有用であり、数多くの変異が *AmutBmut* 系統の遺伝的背景に蓄積している。したがって、*AmutBmut* 系統のゲノム全体にわたる遺伝地図を構築することにより、これらの変異遺伝子を迅速にマッピングすることが可能になるため、本系統の遺伝地図は担子菌研究の広い範囲、特に形態分化の研究に利用されると考えられる。

(2) 材料及び方法

1) 株と生育条件

野生型株 $KF_3\#2(A91B91)$ と *AmutBmut* 変異株 #326 を交配し、得られた後代をマッピング集団とした。10 系統の *A91B91* 後代について核型分析のために染色体の CHEF 電気泳動を行った。核型の標準として #5302 (*A2B2*) 株を供試した。すべての実験において菌株の培養には MYG 培地 (10 g/l モルトエキス, 4 g/l 酵

母エキス, 4 g/l グルコース, 15 g/l 寒天)を用いた。

2) 交配型の判定

マッピング集団に属する各系統の交配型遺伝子判定は、Fig. III-1 に示す手順で行った。まず菌糸を光学顕微鏡下で観察し、クランプ構造が存在するものを *Amut* 系統、ないものを *A91* 系統と判定した。*Amut* 系統はテスター系統 (*A91B91*) と対峙培養を行い、交配が成立し *A91B91* 側のコロニー周縁部にクランプ構造が見られれば *AmutBmut* 系統、交配が成立しなければ *AmutB91* 系統と判定した。*A91* 系統についても同様にテスター系統(*AmutB91*)と対峙培養を行い、交配が成立しクランプ構造ができれば *A91Bmut* 系統、交配が成立しなければ *A91B91* 系統であると判定した。

3) RAPD 及び RFLP 分析と各マーカーの連鎖解析

RAPD-PCR 反応は 10 mM TrisHCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 各 0.1 mM の dATP, dCTP, dTTP 及び dGTP, 0.2 μM の RAPD プライマー, 0.4 U rTaq DNA ポリメラーゼ (Takara), 10 ng ゲノム DNA を含む 15 μl の反応液に対し、94 °C で 2 分間の熱変性の後、94 °C-1 分, 36 °C-1 分, 72 °C-2 分のサイクルを 45 回繰り返す、最後に 72 °C で 2 分の伸長反応を追加する条件で行った。使用した 10 塩基のオリゴ DNA プライマーは、100 種類がオペロンプライマーセットのうち A, E, G, Q 及び S セット (オペロンテクノロジー社)、10 種類が Genosys kit, GEN1-60 (Genosys Biotechnologies) の R1-R10、さらに 20 種類の独自に設計したプライマー (Table III-1; Ito and Yanagi, 1999; Ito et al. 1998)、以上計 130 種類を用いた。増幅産物は 1.4 % (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色した後、UV 光下でゲルを写真撮影した。

RFLP 分析は、まずゲノミック DNA 5 μg を制限酵素処理した後 0.8 % アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブレンにブロッティングした。次に Gene Images Kit (Amersham-Pharmacia) によりラベルしたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。プローブとしては、#5302 株由来の染色体特異的 DNA クローン (Arima et al. 1996)、既知の遺伝子断片、及び切り出した RAPD バンドを用いた。

RAPD 及び RFLP マーカーの分離パターンは MAPMAKER ソフトウェア (Lander et al. 1987) を用いて解析した。

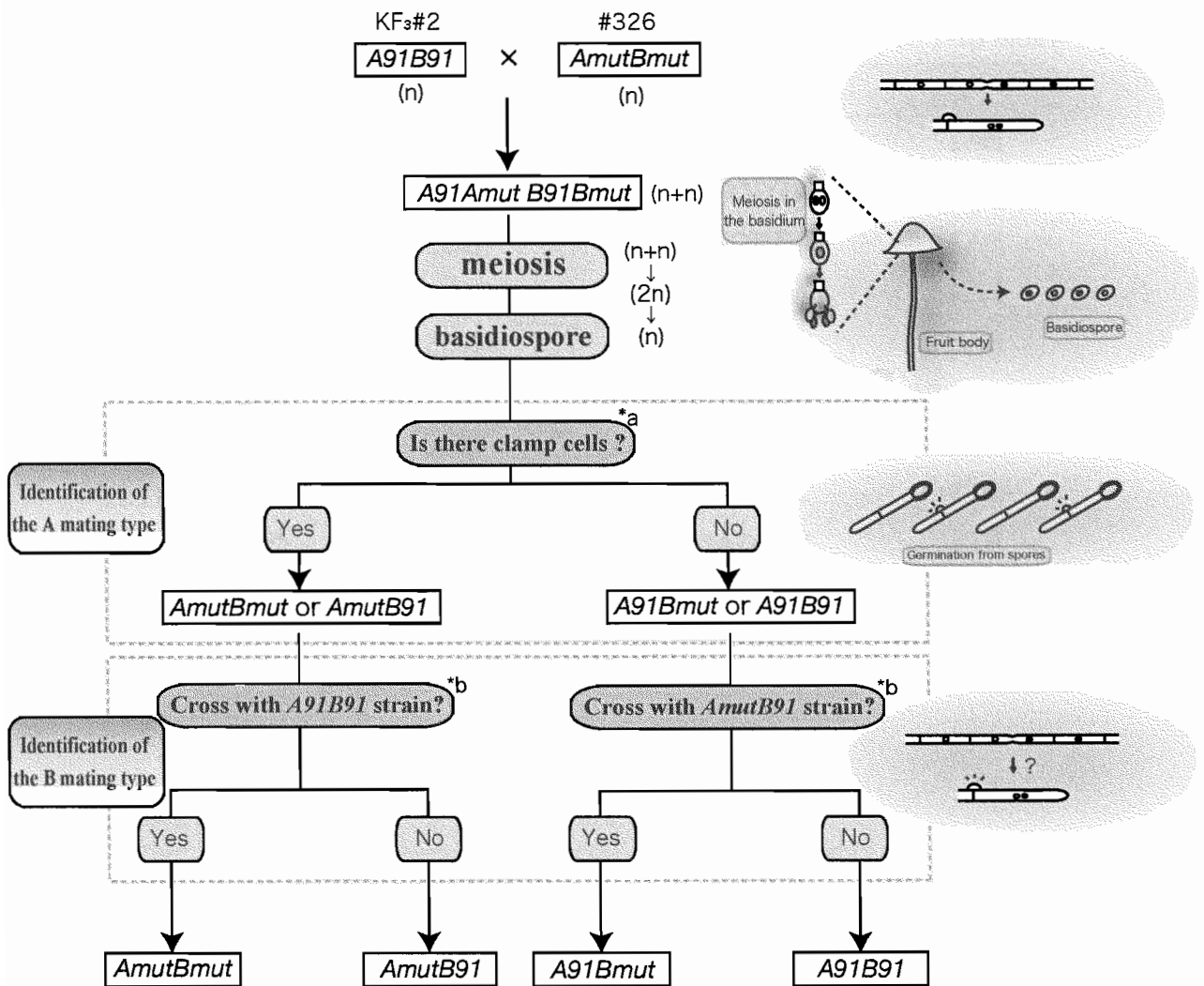


Fig. III-1 Identification of the mating type of the progenies derived from the basidiospore. The mating types of isolated basidiospore that was derived from the dikaryotic strain between KF3#2 (*A91B91*) and #326 (*AmutBmut*) were identified by the observation of clamp cell and crossing ability for the tester strain.

*a : Clamp cell formation is controlled by the mating type *A* gene. Although the structure is normally observed only in the dikaryotic hyphae of the wild type, the monokaryotic hyphae possessing the *Amut* gene can also produce the clamp cell. Thus, if the strain derived from basidiospore had clamp cell, it was identified to possess the *Amut* gene, and if did not, it was identified to possess the *A91* gene.

*b : To identify the *B* mating type, the strain was examined to dual culture with the tester strain (the strains with *A91B91* or *AmutB91*). If the clamp cell was observed at the colony-surrounding area of the strain with *A91*, the strain was determined to cross with the tester strain and identified to possess the *Bmut* gene. If the clamp connection was not observed, the strain was identified to possess the *B91* gene.

Table III-1 Sequences of RAPD primers designed.

	Sequence (5' to 3')		Sequence (5' to 3')
BA1	AGTGGAAGGT	BG1	GACTAGCCTC
BA2	ATGCCTACAG	BG2	GTCTACGAAC
BA3	AGGGCGTAAG	BG3	GTAGACCCGT
BA4	AGCGCCAATTG	BG4	GTATCGCGGT
BA5	ACCGCGAAGG	BG5	GCACGGTACT
BT1	TGGGCACTGA	BC1	CACCGTATCC
BT2	TGGTCACCGA	BC2	CACCTAGTCC
BT3	TGCGTGCTTG	BC3	CTGTACATCT
BT4	TTCGAGCCAG	BC4	CCGCATCTAC
BT5	TTACCGGACG	BC5	CTCACCGTCC

4) CHEF 電気泳動

#5302, KF₃#2, #326 及び 10 系統の後代 (*A91B91*) のオイディア (分裂子) から調製したプロトプラストを用いて、Muraguchi and Kamada (1998)の方法に従い、CHEF 電気泳動用の試料 (プラグ) を調製した。CHEF 電気泳動は 0.5 x TBE 中で 0.8 % Pulse Field Certified Agarose (Bio-Rad) ゲルを用いて行った。泳動装置としては CHEF Mapper (Bio-Rad)を使用した。泳動条件は以下の 3 ステップを連続して行った ; ① 電圧 1.5 V/cm で、電流方向の交換を 25 分間隔からはじめて 48 時間後に 50 分になるよう連続的に増加させる、② 電圧 1.8 V/cm で、電流方向の交換を 15 分間隔からはじめて 30 時間後に 25 分になるよう連続的に増加させる、③ 電圧 2.4 V/cm で、電流方向の交換を 8 分間隔からはじめて 57 時間後に 15 分になるよう連続的に増加させる。泳動後のゲルはエチジウムブロマイド溶液で 30 分染色した後、蒸留水で 1 時間脱色し、写真撮影を行った。その後、ゲルをナイロンメンブレンにプロットイングし、サザン解析に用いた。

(3) 結果

1) マッピング集団

野生型一核株 KF₃#2 と *AmutBmut* 型である #326 (*AmutBmut*)とを交配し、減数分裂を経て得られた担子孢子由来の系統をマッピング集団とした。両親は CHEF ゲル電気泳動において染色体長多型を示したことから、RAPD や RFLP 解析により DNA 塩基配列の多型性が数多く検出されることが予想された。

交配から得られた担子孢子は 90 %以上の高い発芽率を示した。170 の担子孢子由来菌糸について交配型を検定したところ、出現が期待される交配型 *A91B91*, *A91Bmut*, *AmutB91* 及び *AmutBmut* の分離比は 52 : 30 : 39 : 48 であった。これらの担子孢子由来の系統のうち各交配型からそれぞれ 10 系統、計 40 系統をマッピング集団として選抜した。

2) 各種連鎖マーカーの確立

2) -1 交配型遺伝子座

マッピング集団において、同じ交配型を持つ系統を並べて電気泳動することにより、交配型遺伝子 *A* または *B* に連鎖している RAPD 及び RFLP マーカーは、

ゲル上またはプロットメンブレン上で容易に見出すことができた (Fig. III-2)。

2)-2 RAPD マーカー

130 種類の 10 塩基 RAPD プライマーを用いて KF₃#2 と #326 との間で多型を示す RAPD バンドの解析を行った。供試したうち 91 プライマーで多型を示すバンドが得られ(70 %)、多型を示した RAPD バンドの総数は 234 本であった(プライマーあたり 2.57 本)。これらをマーカーとみなし、RAPD マーカー名は、プライマーナンバーの後にバンドのサイズを付け、さらに KF₃#2 特異的バンドには“A”、#326 特異的バンドには“B”を付けて示した。また、これらのバンドのシグナル強度に応じて、強い、中程度、弱い、をそれぞれ “+”、“=”、“-” で記録した。

マッピング集団における 234 個の RAPD マーカーの分離パターンを解析した。解析したうち 15 の遺伝子座で分離比に歪みが生じた($\chi^2 > 3.84$; $P < 0.05$)。15 の遺伝子座のうち 4 個は歪みが特に大きかったため($\chi^2 > 10.8$; $P < 0.001$)、この 4 個のマーカーについては地図の構築には使用しなかった。

2)-3 RFLP マーカー

両親間での RFLP を検出するために 15 個の染色体特異的 DNA 断片(Arima et al. 1996)をプローブとして用いた。15 個のうち 12 個は多型性を示したため、RFLP マーカーとしてマッピング集団における分離を検討した。また、以前の研究で単離された種々の遺伝子を含む 15 個の DNA 断片も RFLP マーカーとして連鎖グループにおける遺伝子座をマッピングするために用いた。さらに、リボゾーム DNA はゲノム中に高コピー存在するため、ゲノム DNA を制限酵素で切断して電気泳動したときにスミアな背景の中で強いバンドとして検出されることを利用し、これも RFLP マーカーとして利用した。染色体と連鎖群の対応を確認するために、これらの RFLP プローブのうちいくつかは CHEF プロットに対してハイブリダイゼーションを行った (Table III-2)。

3) 連鎖地図の構築と連鎖群解析

40 系統のマッピング集団における 260 のマーカーの分離パターンを MAPMAKER ソフトウェア(Lander et al. 1987)により解析した。222 個のマーカー

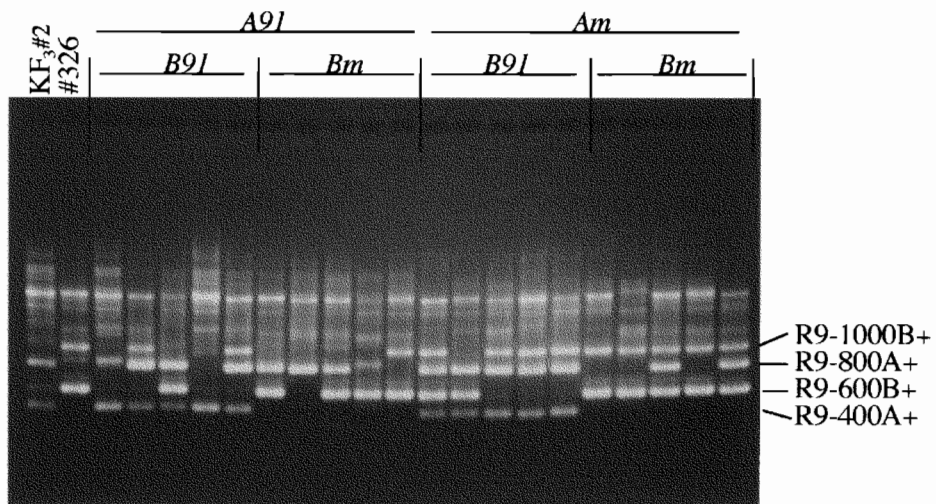


Fig. III-2. A segregation pattern of the RAPD bands generated by primer R9. The first two lanes on the left present DNAs amplified from the parents (KF3#2 and #326) and the other lanes contain DNAs amplified from the progeny, which were set in array according to mating types. This pattern indicates that the marker R9-400A+ is closely linked to B mating factor.

Table III-2 Markers for identification of chromosomes.

Chromosome	Marker (gene)	Type	Clone name (probe)	Confirmation	References
I	<i>A</i>	Phenotype	---	---	Mutasa et al. (1990)
I	<i>hix5</i>	RFLP	Cosmid: 1-8H3 insert ^a	---	Muraguchi, unpublished
I	H1#54	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	---	Arima et al. (1996)
II	Q20-1500B+	RAPD	---	CHEF blots	This study
III	H3#7	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
IV	<i>trp1</i>	RFLP	LLC5200	CHEF blots	Pukkila (1992)
IV	H1-3#72	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	---	Arima et al. (1996)
IV	H5#46	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
V	<i>trp2</i>	RFLP	Entire plasmid	CHEF blots	Pukkila (1992)
V	H1-2#84	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	---	Arima et al. (1996)
V	<i>spo11</i>	RFLP	Cosmid: 207A7 insert ^a	---	Celerin et al. (2000)
V	<i>pcc1</i>	RFLP	Cosmid: V-6E4 insert ^a	---	Murata et al. (1998)
VI	H2#11	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
VI	<i>clp1</i> ^b	RFLP	Cosmid: IV-3A3 insert ^a	---	Inada et al. (2001)
VI	rDNA	RFLP ^c	---	---	Pukkila (1992)
VII	A8-800A+	RAPD	---	CHEF blots	This study
VII	E9-1200B+	RAPD	---	CHEF blots	This study
VII	R7-500A+	RAPD	---	CHEF blots	This study
VIII	<i>rad12 (rad50)</i>	RFLP	Cosmid: VIII-23G1 insert	---	Acharya and Zolan, unpublished
VIII	H6#9	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	---	Arima et al. (1996)
VIII	H6#25	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
IX	2D5	RFLP	Cosmid: IX-2D5 insert ^a	CHEF blots	Kamada, unpublished
IX	<i>msh6</i>	RFLP	Cosmid: 1D8 insert ^a	---	Celerin and Zolan, unpublished
X	H7-2#10	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
X	S6-700B+	RAPD	---	CHEF blots	This study
X	<i>B</i>	Phenotype	---	---	O'Shea et al. (1998)
XI	<i>msh2</i>	RFLP	Cosmid: 202C5 insert ^a	---	Celerin and Zolan, unpublished
XI	H7-3#19	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
XI	G3-1100A+	RAPD	---	CHEF blots	This study
XII	<i>ich1</i>	RFLP	5.4 kbp <i>PstI</i> fragment	---	Muraguchi and Kamada (1998)
XII	H8#6	RFLP	ca. 1 kbp <i>EcoRI</i> fragment	CHEF blots	Arima et al. (1996)
XIII	<i>benA</i>	RFLP	Cosmid: 219K6 insert ^a	CHEF blots	Matsuo et al. (1999)

^a LLC5200 cosmid vector was used in these cosmid clones and the inserts were excised with *NotI* digestion.

^b *clp1* has been mapped on chromosome IV of strain 5302 (Inada et al., 2001).

^c RFLP in the rDNA region was detected by *EcoRI* digestion of genomic DNA.

ーについては minimum LOD の値を 4.0、maximum recombination fraction の値を 0.4 に設定することで 13 の連鎖群に分類することができた。この連鎖群に取り込まれなかったマーカーのうちいくつかは、minimum LOD の値を 3.0 へ下げることにより連鎖群の中へ取り込まれた。minimum LOD の値を 3.0 へ下げても取り込まれなかった RAPD マーカーのうち、いくつかについては座乗染色体を決定するために、CHEF プロットに対してハイブリダイゼーションを行った。これらの RAPD マーカーのうち E9-1200B+は#326 由来の染色体 DNA にのみシグナルが検出された。すなわち、このマーカーの領域は KF₃#2 では欠失していると考えられる。これらのマーカーを含む連鎖群を Fig. III-3 に示した。

本研究で各染色体に番号を割り振る際には、これまでに公表されている染色体番号にできるだけ従うことにした。連鎖群と染色体を対応させるために使用したマーカー及び遺伝子は Table III-2 に示した。交配型 A 遺伝子座は最も大きな染色体である連鎖群 I にマッピングされており (O'Shea et al. 1998; Pukkila 1992)、本研究でも染色体 I を同定するために用いられた。CHEF プロット上で RAPD マーカー Q20-1500B+及び RFLP マーカー H3#7 にハイブリダイズする染色体をそれぞれ染色体 II 及び染色体 III とした (Fig. III-3, Table III-2)。 *trp1*, *trp2* 及び *rRNA* 遺伝子は既にネナガノヒトヨタケ 218 株において染色体 IV, V 及び VI にそれぞれマッピングされている (Pukkila 1992) ため、これらの染色体を同定するために用いた。染色体 VII から XIII については我々の標準株である #5302 においてサイズの大きいものから順に番号を付けた (Fig. III-4)。 *spo11* 遺伝子と *rad2* 遺伝子は Okayama7 株のそれぞれ染色体 V と VIII にマッピングされている (Celerin and Zolan, personal communication; Zolan et al. 1993)。これらの遺伝子は本研究でも同じ染色体にマップされており (Fig. III-3, Table III-2)、本研究での染色体番号は Okayama7 株での番号と一致している。また、本研究で交配型 B 遺伝子座は約 2 Mb の染色体にマッピングされたが (Fig. III-4)、これは B に連鎖している配列が約 2.2 Mb の小さな染色体にハイブリダイズしたという報告 (O'Shea et al. 1998) と一致した。

4) 染色体長多型の遺伝

両親系統及び交配型が A91B91 である後代 10 系統を供試して CHEF 電気泳動による核型の解析を行った。両親間では多数の染色体長多型 (chromosome length polymorphisms; CLPs) がみられた (Fig. III-4)。例えば、III に相当する染色体は

両親間で約 1 Mb の違いがあった。このことを反映し、供試した後代においても多様な CLP をもつユニークな核型が認められた (Fig. III-4)。

染色体 III 及び XIII について、CLP と連鎖地図上のマーカーとの間の対応関係を解析した (Fig. III-5)。染色体 III は KF₃#2 株よりも #326 株の方が大きい。後代のマーカーの分離パターン解析から、#14 系統では染色体 III 上のマーカー H3#7/Bm と BA2-900A-との間で、#17 系統では BG1-1900A-と E1-2000A-との間で、それぞれ交叉が起こっていることが明らかとなった (Fig. III-5)。これら 2 系統の染色体長は #326 株に比較的近いことから、CLP を引き起こす領域はマーカー BA2-900A-の領域よりも下側にあると考えられる。さらに、一番右に示した系統 (#38) の染色体長は #326 株に近いが、マーカーが存在する領域は KF₃#2 株由来であった。このことから、CLP に関与する領域は、末端のマーカー E9-3600A-よりも外側の染色体末端領域であると考えられた。染色体 XIII は #326 株よりも KF₃#2 株の方が大きい。核型分析をした 10 系統の後代のうち 4 系統ではそれぞれ染色体上の異なる領域で一箇所の交叉が見出された (Fig. III-5, #14, #20, #25 及び #36)。交叉の起こった領域と染色体長の関係から、CLP の原因となる領域は A3-1500A-と E14-900A-=の間にあり、染色体の末端領域ではないと考えられた。

(4) 考察

本章では、ネナガノヒトヨタケの遺伝地図を構築した。この地図は 40 系統のマッピング集団を用いて 219 個の RAPD マーカーと 28 個の RFLP マーカー及び 2 種の交配型遺伝子座の分離比に基づいて構築された。これまでに報告された連鎖地図は、生化学的あるいは表現型マーカーにより構築されており (Day and Anderson 1961; Moore 1967; North 1987; Takemaru 1982)、さらにこれらを組み合わせた 10 の連鎖群からなる連鎖地図も作成されている (Casselton 1995; North 1990)。しかしこれらの地図は本菌が持つ 13 本の染色体の一部を表しているに過ぎない。本研究で用いたマッピング集団の規模は比較的小さかったが 13 本の染色体と一致する 13 個の連鎖群を同定できたことから、目的遺伝子を染色体にマッピングするための枠組みを示す連鎖地図の作成にはこの程度の大きさの集団でも十分であると考えられた。

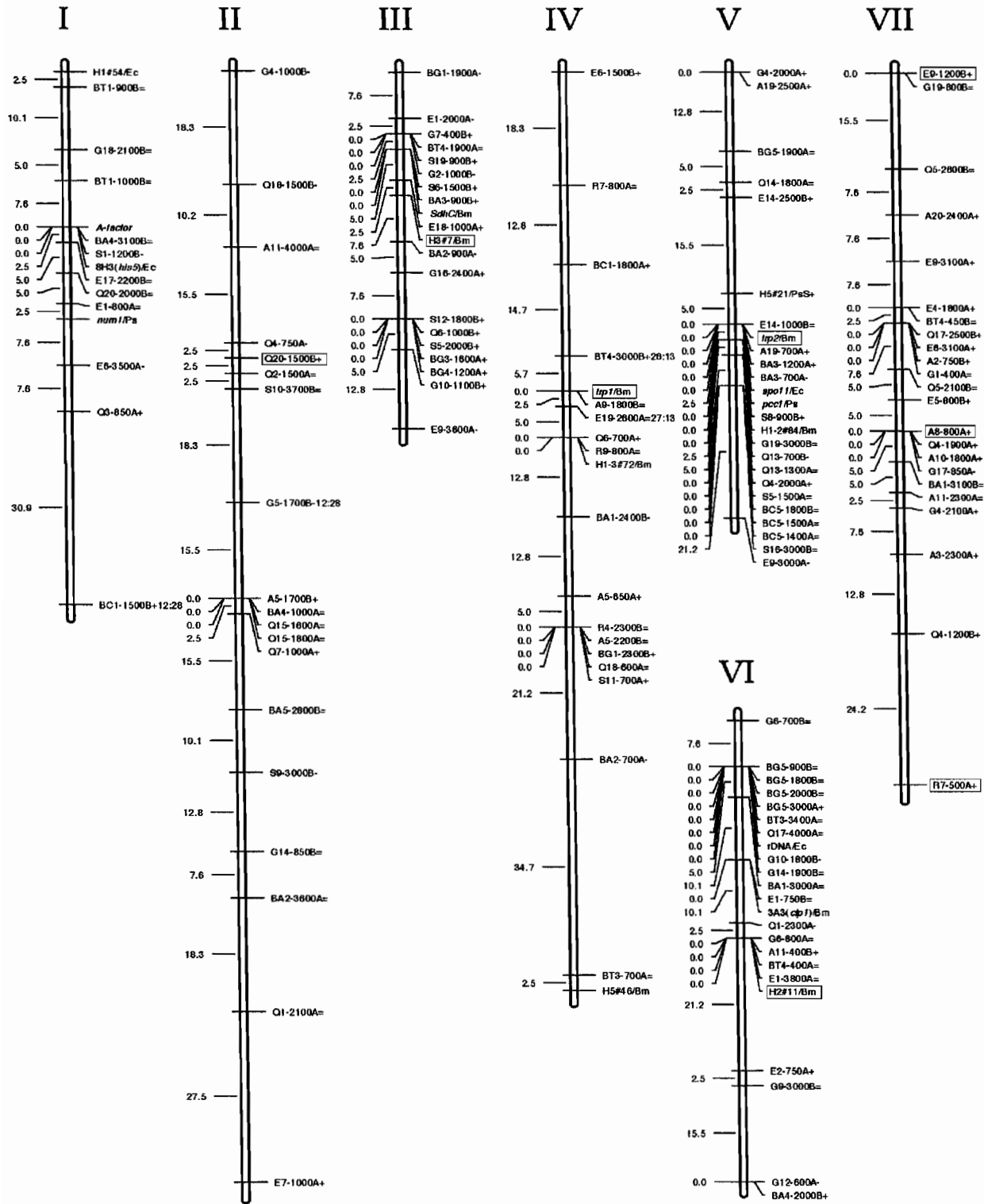


Fig. III-3. A linkage map of *Coprinus cinereus*, which was constructed mainly based on RAPD markers. Data analyses were performed with MAPMAKER version 2.0 for the Macintosh using the Kosambi mapping function (Kosambi, 1944). RAPD markers were designated by beginning with the primer number, followed by a dash and approximate size of the band. The intensity of the RAPD bands, strong, middle, and weak, is shown as +, =, and -, respectively. RFLP markers were designated by beginning with the clone or gene name, followed by a slash and the restriction enzyme used. The restriction enzymes are represented by Bm, *Bam*HI; Ec, *Eco*RI; Ps, *Pst*I; Sa, *Sal*I, and Ev, *Eco*RV. The *num1*, *his5*, and *SdhB* genes are unpublished. Skewed segregations are shown on the right of the markers. Markers used for Southern hybridization of CHEF blots are boxed.

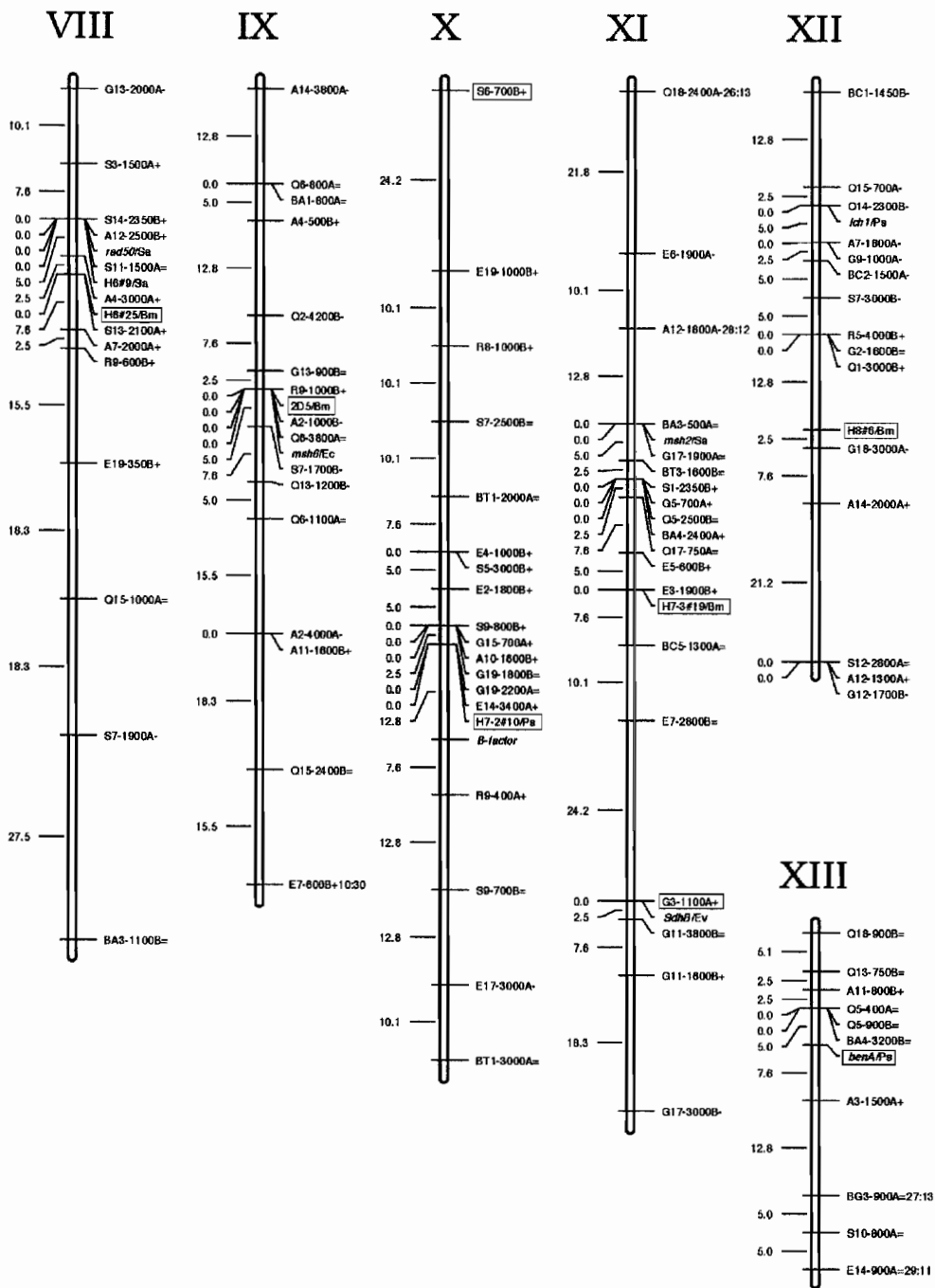


Fig. III-3. (continued)

1) 地図の利用

本研究で示した地図はネナガノヒトヨタケのゲノム全体に及ぶ遺伝地図として初めてのものであり、マッピング集団に *AmutBmut* 系統を片親としていることから、性的形質に関わる遺伝子のマッピングに非常に有用である。野生型株では交配が成立し二核菌糸が形成されると、クランプ構造や子実体の形成などの形態分化に代表されるような、二核菌糸に特有の現象が生じる。これらの現象に関わる遺伝子に変異が生じた場合、劣性の変異であれば、変異株を交配の片親に用いても当代で表現型に現れるないため、その変異を実際に見出すことは非常に困難である。それに対して *AmutBmut* 系統は、交配を経なくてもあたかも交配して得られた二核菌糸のように振る舞うので (Swamy et al. 1984)、この系統において、二核菌糸特有の形質に関わる遺伝子に変異が生じれば、当代でその表現型が現れる。本研究で示した連鎖地図は *AmutBmut* 系統に対応しており、この地図上のマーカーがそのまま利用できるため、変異遺伝子を迅速にマッピングすることが可能である。

また、既にネナガノヒトヨタケの *bacteria artificial chromosome (BAC)* ライブラリが構築されているので (Muraguchi et al. 2005)、この連鎖地図と BAC ライブラリを利用することにより物理地図の作成が可能である。

2) RAPD マーカーの再現性

地図上の RAPD マーカーについては増幅産物のシグナル強度も記録しており、再現性に関する情報として利用できる。RAPD マーカーは再現性の低い場合があることが知られているが、本研究で“強い”シグナルを示した RAPD マーカーは実験条件が多少異なっても高い再現性が得られるはずである。したがって、表現型に連鎖するマーカーを検索することにより変異遺伝子を染色体上にマッピングする際に、これらのマーカーを染色体上の“ランドマーク”として利用することが可能である。弱いシグナル強度の RAPD マーカーは誤データが生じやすくなるため地図上の距離が不正確になる可能性があるが、本研究で“弱い”シグナル強度を示すとされた RAPD マーカーについても、強いシグナルを示すマーカーと同様、3 反復の実験により再現性を確認している。シグナル強度の違いは恐らくプライマーとゲノムの塩基配列における相同性の違いの程度によるものであろう。

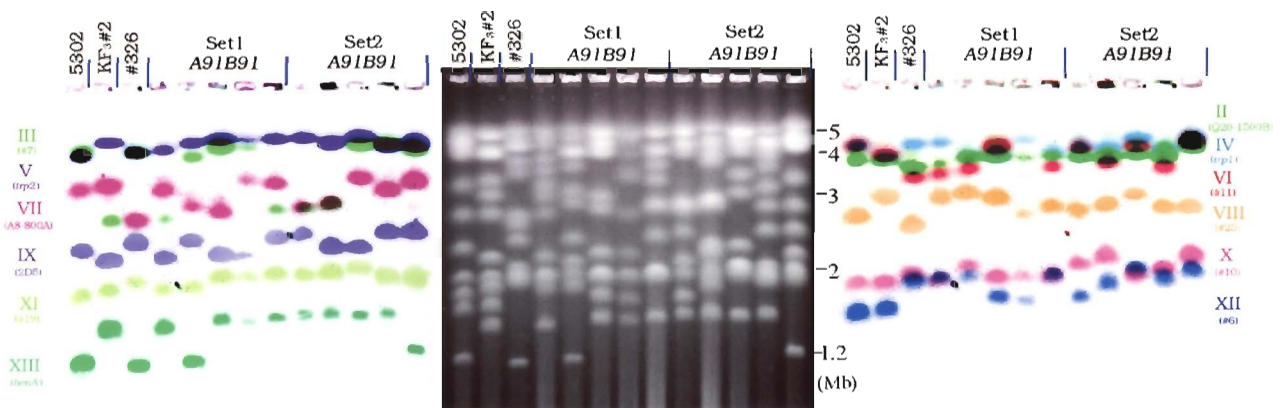


Fig. III-4. Electrophoretic karyotypes of the parents and their ten progeny in the mapping population. Center panel shows chromosomal DNAs separated by CHEF electrophoresis. Strains used are shown on the upper side. The Set 1 progeny of A91B91 are strains #2, #14, #15, #17, and #20, and the Set 2 progeny of A91B91 are strains #25, #30, #36, #37, and #38. Approximate sizes are shown on the right side. Left and right panels represent hybridization signals of chromosomes with odd, except chromosome I, and even numbers, respectively. To distinguish homologous chromosomes, the hybridization signals on the CHEF blots are colored and layered with Photoshop (Adobe) based on probes used, which are shown on both the sides of the panels with chromosome numbers.

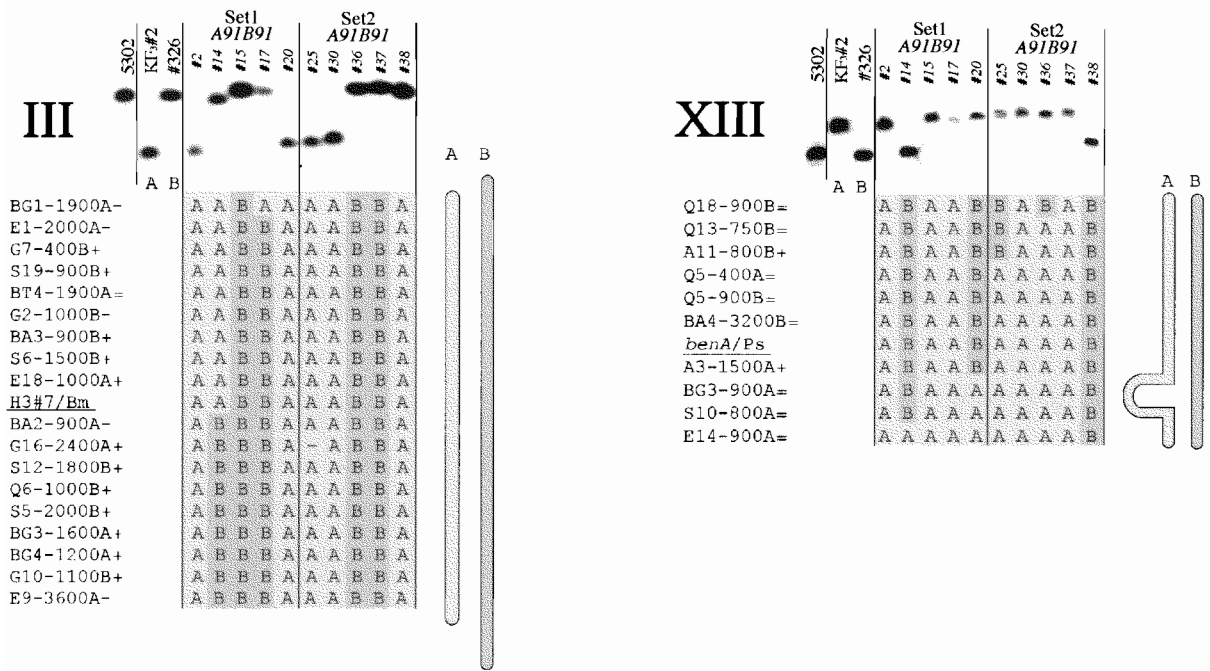


Fig. III-5. Relationship between chromosome length polymorphism and haplotype plots for chromosomes III and XIII. The upper panels are Southern hybridizations of CHEF blots using a probe of the underlined marker in the lower panels. The CHEF gel is the same as that shown in Fig. II-3. The lower panels show haplotype plots on the respective chromosomes. (A) and (B) represent genomic regions that come from KF3#2 and #326, respectively. The presumed structure of the parental chromosomes are shown on the right.

3) 地図のサイズ

この地図は全体で 1346 cM にわたる 13 の連鎖グループで構成されている。この距離は最小遺伝距離の推定値 1300 cM(Holm et al. 1981)とよく一致している。ネナガノヒトヨタケのゲノムサイズ(haploid)は 37.5 Mb と推定されており(Dutta 1974)、これらの二つの値の比は約 27.9 kb/cM となる。これまでに *Agaricus bisporus* (西洋マッシュルーム) で 48.5 kb/cM (Kerrigan 1993)、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) で 35.1 kb/cM(Larraya et al. 2000)という報告があり、ネナガノヒトヨタケにおけるこの値は他の担子菌類より小さい。これらのことから、本研究ではネナガノヒトヨタケの染色体の大部分をカバーするのに十分な数のマーカーが検出できたものとする。ただし、染色体末端部分を検出できていない可能性もあるので、今後さらにマーカーを増やすなどしてより詳細な解析を行う必要がある。

マーカー間の組換え価によって推定される染色体サイズと物理的サイズとは必ずしも一致しない。つまり、減数分裂の間に相同染色体対あたり少なくとも一度の交叉が必要であるので、物理距離と遺伝距離の比は小さな染色体ほど小さくなるはずである(Zickler and Kleckner 1999)。本研究において、物理的に最も長いと想定される染色体 I ではその比が 59.1 kb/cM であるのに対し、比較的短い染色体 XI では 16.0 kb/cM であったことから、従来の考えに一致した結果が得られたといえる。

4) 染色体番号について

本研究で示した連鎖群は CHEF 電気泳動で分画した染色体と対応させた。ネナガノヒトヨタケでは以前に、交配型 A 及び B を持つ連鎖群がそれぞれ I 及び II とされた (Casselton 1995; North 1990; Takemaru 1982)。その一方で染色体は標準株 218 における物理的サイズに基づいて I から XIII の番号を付けられている (Pukkila 1992)。連鎖群 I は幸運にも最も大きい染色体と一致していた(O'Shea et al. 1998; Pukkila 1992)が、交配型 B に関しては本研究でサイズ順に番号を付けた染色体の X にマッピングされた。したがって、従来の遺伝地図と本研究における染色体番号との間には食い違いが生じている。

ネナガノヒトヨタケでは株間で多様な CLP を示し、特に大きな染色体に関してはサイズの違いが著しく、染色体番号とサイズの順序が株によって異なる (Fig. III-4)。したがって、ある株の染色体番号を特定するためには染色体サイズ

の情報だけでは十分でない。本研究において提案している染色体番号は、座乗するマーカーに基づいて定義している (Table III-2)。定義された染色体番号はほぼそのサイズに従って、大きいものから順に番号を割り振った。

5)染色体長多型(CLP)

ネナガノヒトヨタケを含む多くの糸状菌で CLP が報告されている (Zolan 1995)。*Candida albican* でみられる CLP はゲノム上の反復 DNA 配列の長短が原因であるとされており (Chibana et al. 2000)、また、ネナガノヒトヨタケでは染色体の転座がその原因であることが示唆されている (Pukkila and Casselton 1991; Zolan et al. 1994) が、今のところ CLP が起こるメカニズムはほとんど理解されていないのが実状である。本研究において得られた連鎖地図情報が、CLP の原因となる染色体領域の解析に役立つことを示した (Fig. III-4)。核型解析の結果より、染色体 III と XIII で CLP をもたらす可能性のある染色体領域は、それぞれ末端部及び中間部と推定された (Fig. III-4)。しかしながら、テロメアに対するマーカーがないため、マーカーが存在する領域の外側の染色体領域については解析が不十分である可能性がある。例えば連鎖群 XIII 上のマーカー Q18-900B よりも外側に非常に長い染色体領域が存在する可能性は捨てきれない。もしそうであれば、Fig. III-4 に示したデータは異なる解釈も成り立つ。本研究で得られた地図を基に、より詳細な研究を行うことにより、本菌での CLP のメカニズムを解明する糸口がつかめるだろう。

(5) 要約

染色体全域に DNA マーカーが配置された遺伝地図はゲノム解析や遺伝子単離等の研究を行う際に基盤となる基礎的な情報を与えるものであるが、これまでにネナガノヒトヨタケでは生化学的あるいは表現型マーカーによる部分的な地図があるのみである。本研究では、RAPD 及び RFLP マーカーを用いてネナガノヒトヨタケの染色体の大部分をカバーする遺伝地図の構築を行った。まず、野生型株 KF₃#2 と、交配型を決定する 2 つの遺伝子 *A* 及び *B* の 2 重変異株 (*AmutBmut*) #326 とを交配して得られた担子胞子後代 40 株のマッピング集団を育成した。次にこの集団に対し、219 の RAPD マーカー、28 の RFLP マーカー及び交配型を決定する *A* 及び *B* 遺伝子座の分離を基に連鎖地図を構築した。これにより 1346 cM をカバーする 13 の連鎖群が同定された。また CHEF 電気泳動により分画された染色体のプロットに対し、DNA マーカーをプローブにハイブリダイゼーションを行った試験から、13 の連鎖群は本菌が持つ 13 本の染色体と対応していることを確認した。また CHEF 電気泳動による核型解析から両親及び後代の株間で染色体長多型(chromosome length polymorphisms; CLP)を検出し、CLP の原因となる領域を遺伝地図上のマーカーを用いて同定した。*AmutBmut* 株は交配因子 *A* 及び *B* 両遺伝子に変異を持っており、交配することなしに性的生長過程が進む。そのためこの株では、担子菌特有の興味深い現象、つまり二核化、子実体形成及び減数分裂のような性的発達過程に影響する変異が数多く見出されている。本研究の連鎖地図は *AmutBmut* 株に対応しており、本株で誘導された変異に対して原因遺伝子のマッピングを容易に行うことができるため、本遺伝地図は非常に利用価値が高いと考えられる。

第4章

ネナガノヒトヨタケの薬剤フルトラニル耐性遺伝子の単離と解析及び遺伝子組換え体選抜マーカーへの応用

第1節 ネナガノヒトヨタケにおける遺伝子組換え体選抜マーカーの探索

(1) 緒言

遺伝子組換え法は人為的に生物に新たな遺伝子機能を付与することが可能であり、有用物質の量産や作物の飛躍的な育種を可能にするという実用的な有用性に加え、機能が未知の遺伝子に対して生体内でその機能解析を行うための手法としても非常に有効であり、現在幅広い分野でこの手法の開発や応用に関する研究がなされている。担子菌においては、Binninger et al. (1987)がネナガノヒトヨタケにトリプトファン合成遺伝子 (*trp1*) を導入することに成功して以来、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)やスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)など種々の担子菌で遺伝子組換えの成功例が報告されている(Mooibroek et al. 1990; Peng et al. 1992)。

遺伝子組換え試験を行う際、目的の遺伝子が導入された細胞を選抜するために、選抜マーカー遺伝子が利用される。ネナガノヒトヨタケの場合、*trp1* (Binninger et al. 1987; Skrzynia et al. 1989)や *pab1*(Mutasa et al. 1990; Granado et al. 1997)などの栄養要求性相補遺伝子や、ハイグロマイシン B 抵抗性遺伝子 (Cummings et al. 1999)、5-fluoroindole 抵抗性遺伝子(Bhattiprolu et al. 1993)、カルボキシシン抵抗性遺伝子(Challen et al. 2000)などの薬剤耐性遺伝子の利用が報告されている。その中でも、これまでの研究は *trp1* 遺伝子を利用した実験系が主であるが (Pukkila and Casselton, 1991; Muraguchi and Kamada 1998, 2000; Zolan et al. 1992)、このような栄養要求性相補遺伝子を利用する場合、宿主株は当然のことながら栄養要求性を示す株である必要があるため、利用できる株が限られるという問題点がある。そのため、薬剤耐性遺伝子のように野生株に対しても優性を示すようなマーカー遺伝子が開発が望まれる。また、複数の遺伝子を導入し

ようとする場合には、それぞれの導入試験ごとに異なる選抜マーカー遺伝子が必要となる。これらのことから、今後ネナガノヒトヨタケにおいて多様な遺伝子組換え試験に対応するためには、複数の優性マーカー遺伝子を利用できることが必要となってくる。

そこで本研究では、ネナガノヒトヨタケにおいて優性を示す組換え体選抜マーカー遺伝子を探索することにした。そのためにまず、ネナガノヒトヨタケが感受性を示す薬剤のうち、別種の担子菌では抵抗性を示すような薬剤のスクリーニングを行った。その結果、スエヒロタケは他の担子菌類と異なり、薬剤フルトラニルに耐性を示すことを見出した。耐性に関与すると予想されるスエヒロタケ由来の遺伝子をネナガノヒトヨタケに導入し、この遺伝子が本菌に耐性を付与する機能を有するか否かを検討した。

(2) 材料及び方法

1) 供試菌株と培養条件

供試した菌株は Table IV-1 の通りである。菌糸培養、胞子発芽、交配及び子実体培養には Malt-Yeast-Glucose (MYG) 培地 (10 g/l モルトエキス, 4 g/l 酵母エキス, 4 g/l グルコース; Rao and Niederpruem 1969) に 15 g/l 寒天を添加して用いた。フルトラニル抵抗性を検討する場合にはフルトラニル (和光) を MYG 培地に添加した。培養はいずれも 30 °C の人工気象器内で行った。

2) コハク酸脱水素酵素活性の測定

Yui et al. (1988) の方法に従って、培養温度 30 °C で 3 日間液体 MYG 培地にて培養した菌糸よりミトコンドリア画分を調製し、コハク酸脱水素酵素の活性を、これとカップリングしている反応であるチトクロム *c* 還元活性より測定した (Ulrich and Mathre 1972)。

3) DNA 操作

スエヒロタケ由来 *sdhIP* 遺伝子単離のための DNA プローブはスエヒロタケのゲノミック DNA を鋳型とした PCR 反応によって合成した。様々な生物の *sdhIP* 遺伝子の比較から、よく保存されたシステインリッチクラスターが 3 カ

Table IV-1 Basidiomycete strains examined in this study.

Species	strain	genotype	Source
<i>Schizophyllum commune</i>	AHU9383		Hokkaido Univ. (Gift from Dr. Tomita)
	AHU9317		Hokkaido Univ. (Gift from Dr. Tomita)
	AHU9384		Hokkaido Univ. (Gift from Dr. Tomita)
	IFO6502		Institute of Fermentation, Osaka
<i>Coprinus cinereus</i>	Fis ^C		National Food Research Institute
	5005		Okayama Univ.
	5309		Okayama Univ.
	5348		Okayama Univ.
	FR-1	<i>Flt</i> ⁺	This work
<i>Lentinula edodes</i>	#292	<i>trp</i> ⁻	Okayama Univ.
	440		National Food Research Institute
<i>Flammulina velutipes</i>	SP1		National Food Research Institute
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SH63		National Food Research Institute

所存在していることが知られているので(Keon et al.1991)、そのうちのクラスターI と II の部分から以下の PCR プライマーを設計した。

Primer 1: CTGCAGAAATTCGGLATITGCGGITCITGCGCIATGAA

Primer 2: CATCAGGTACCCAGCAIGCGCAIAGIATGCAITCGTA

クローニングのために下線部の *EcoRI* または *KpnI* 認識配列を加えた。1 サイクルあたり 94 °C で 30 秒間の熱変性, 42 °C で 30 秒間のプライマーアニーリング, 及び 72 °C で 1 分間の DNA 伸長反応を行う過程を 30 回繰り返した。得られた約 350 bp の DNA 断片をプローブとして、*EcoRI* 及び *BamHI* で消化したスエヒロタケゲノム DNA に対し、EASY ANCHOR (ニッポンジーン)を用いたスクリーニングを行い、*SdhIP* 遺伝子全長を含むと思われるゲノム DNA を取得した。

サザンハイブリダイゼーションは ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。

4) ネナガノヒトヨタケの遺伝子導入処理

ネナガノヒトヨタケ *Fis^c* 株のプロトプラストの調製は Kiguchi and Yanagi (1985)の方法に従って行った。遺伝子導入処理は Binnering et al. (1987)の方法に従った。0.2 ml の導入処理されたプラスミド溶液を 5 ml の融解 MYG 培地(0.5% 寒天、47°C)と混合し、10 ml の MYG プレート培地(1.5 % 寒天)上に広げた。30°C で 1 日間培養した後、フルトラニルを 10 µg/ml 含む 2 ml の MYG 培地(0.5% 寒天、47 °C)をプレート培地に上層し、培養を行った。

(3) 結果

1) 各種担子菌に対する抗菌剤の影響の検討

様々な抗菌剤についてその効果を検討するため、フルトラニル、シクロヘキサミド、アンフォテリシン B、ケトコナゾール、またはペンシキュロンを加えた培地上で 5 種の担子菌について菌糸培養を行った。Table IV-2 に示すとおり、シクロヘキサミド、アンフォテリシン B、ケトコナゾール、及びペンシキュロンに関してはいずれの担子菌でも同程度の感受性を示すのに対し、フルトラニルに関してはネナガノヒトヨタケ *Fis^c* 株を含む 4 種の担子菌類は高い感受性を

Table IV-2. Effects of antifungals on growth of basidiomycetes

Strain	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^a				
	FT	CH	AB	KC	PC
<i>Scizophyllum commune</i> AHU9383	100<	5	50	25	100<
<i>Coprinus cinereus</i> Fis ^C	1	5	50	50	100<
<i>Pleurotus ostreatus</i> SH63	1	5	100	100	100<
<i>Lentinula edodes</i> 440	1	5	50	50	100<
<i>Flammulina velutipes</i> SP1	1	5	50	25	100<

^a FT, flutolanil; CH, cycloheximide; AB, Amphotericine B; KC, ketoconazole; PC, pencycuron

Table IV-3. Effect of flutolanil on SDH activity of mitochondria

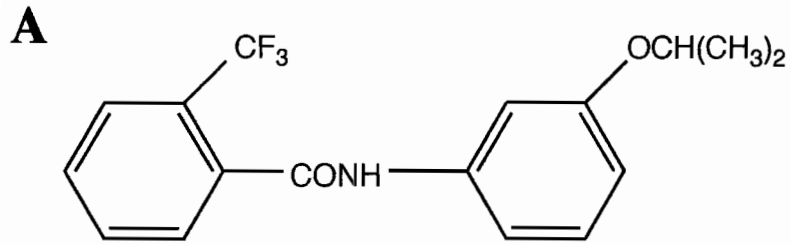
Source of mitochondria	SDH activity (%)		
	Flutolanil concentration (μM)		
	0	2.2	22
<i>Scizophyllum commune</i> AHU9383	100	55	9
<i>Coprinus cinereus</i> Fis ^C	100	9	0

示す一方で、スエヒロタケ AHU9383 株は強い耐性を示した。スエヒロタケの別の3系統 (AHU9317, AHU9384, IFO6502) に関しても同様に強い耐性を示した。フルトラニルはミトコンドリア膜画分に存在するコハク酸脱水素酵素 (SDH) の電子伝達活性を阻害することが知られている (Motoba et al. 1988)。そこで、スエヒロタケ AHU9383 株及びネナガノヒトヨタケ Fis^c 株から抽出したミトコンドリア画分について、フルトラニル存在下における SDH 活性を測定した。Table IV-3 に示すとおり、スエヒロタケ由来ミトコンドリア画分は、ネナガノヒトヨタケに比べ、フルトラニルの SDH 活性阻害作用に対する影響を受けにくかった。

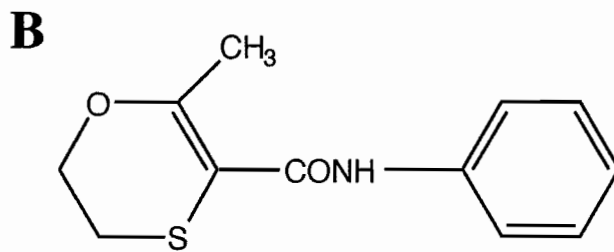
2) スエヒロタケ由来 *sdhIP* 遺伝子のクローニング及びネナガノヒトヨタケへの遺伝子導入試験

抗菌剤カルボキシシン (Fig IV-1B) はフルトラニル (Fig IV-1A) と構造に類似性が認められるアミド系化合物であり、フルトラニルと同様、コハク酸脱水素酵素の活性を阻害することが知られている (Ulrich and Mathre 1972)。 *Ustilago maydis* (黒穂病菌) では *sdhIP* 遺伝子の変異によりカルボキシシン耐性が獲得されることから (Keon et al. 1991)、スエヒロタケの *sdhIP* 遺伝子がフルトラニル耐性に関与している可能性がある。そこで、スエヒロタケの *sdhIP* 遺伝子のクローニングを行った。各種生物における SdhIP のアミノ酸配列比較から保存性の高いシステインリッチクラスター領域2カ所に対するプライマーを設計した。このプライマーを用いてスエヒロタケのゲノム DNA に対して PCR 反応を行ったところ、約 0.35 kb の DNA 断片が得られた (Fig IV-2A)。この断片の塩基配列から予測されるアミノ酸配列は *Ustilago maydis* の SdhIP と高い相同性を示した (Fig IV-2B)。この配列をプローブとして 2.9 kb のスエヒロタケのゲノム DNA 断片をクローニングした。既知の担子菌の *sdhIP* 遺伝子をコードするゲノム DNA の領域はおよそ 1 kb であり (Keon et al. 1991, Irie et al. 1998)、プローブとして使用した 0.35 kb の領域はクローニングした 2.9 kb 断片のほぼ中央に位置することから、この 2.9 kb の断片に *sdhIP* 遺伝子全長が含まれると判断した。

2.9 kb の DNA 断片を含むプラスミド DNA をネナガノヒトヨタケプロトプラストに対して遺伝子導入処理したところ、10⁸ プロトプラストあたり 1 μg の DNA 処理により 2~5 個のフルトラニル耐性コロニーが得られた。対照実験としてインサート配列を含まないプラスミドベクターで導入処理を行ったが、耐性コ



Flutolanil



Carboxin

Fig. IV-1 Chemical structure of flutolanil and carboxin.

A

```

1  GGGATGTGCGGTTTCGTGCGGATGAACATCAACGGACAGAACACGCTCGCTTGCCTTTGC 60
   G M C G S C A M N I N G Q N T L A C L C

61  CGCATCGAGCGCGACGAGTCCAAGGACACCAAGATCTACCTCTTCCGCATAgtagcac 120
   R I E R D E S K D T K I Y P L P H M

121  ggatcatctgcgcaagctttccgtagtaacattgtttcgcccagTGTACATCGTCAAGG 180
                                     Y I V K D

181  ACCTCGTTCCGGACCTGACGTACTTCTACAAGCAGTACAAGTCGATACAGCCCTACCTCC 240
   L V P D L T Y F Y K Q Y K S I Q P Y L Q

241  AGAACGACAACCCGCCCGCACAGGGCGAGTTCTTGCAGTCACAGGAGGACCGTCGGAAGC 300
   N D N P P A Q G E F L Q S Q E D R R K L

301  TCGACGGCTTGTACGACTGCATCCTCTGCGCCTGC 335
   D G L Y D C I L C A C

```

B

```

S.commune 1  G M C G S C A M N I N G Q N T L A C L C R I E R D E S K D T K I Y P L P H M Y I V K D L V P D L T Y F Y K Q Y K S I Q P
U.maydis 1  G I C G S C A M N I D G V N T L A C L C R I D K Q N - - D T K I Y P L P H M Y I V K D L V P D L T Q E Y K Q Y R S I E P

S.commune 61  Y Q N D N P P A Q G E F L Q S Q E D R R K L D G L Y D C I L C A C
U.maydis 59  P L K S N N T P S E S E H L Q S P E R R R R L D G L Y E C I L C A C

```

Fig. IV-2 Sequence analysis of succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (SdhIP) of *S. commune*. A. The partial SdhIP gene sequence of genomic DNA and the deduced amino acid sequence. Small letter represents putative intron region. B. Alignment of the amino acid sequences of SdhIPs between *S. commune* and *Ustilago maydis*.

コロニーは得られなかった。耐性株のうち、20 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のフルトラニルを含む培地上でも生育することができる明確な耐性を示す株が一つ見出され、その系統名を FR-1 とした。しかしながらこの他の耐性コロニーとして選抜された株は継代培養中にその耐性を失った。

FR-1 株及び親株の Fis^c (フルトラニル感受性) のゲノム DNA に対して、スエヒロタケ *sdhC* 遺伝子の DNA をプローブとしてサザンハイブリダーゼーションを行い、導入遺伝子の確認を行った。しかしながら、FR-1 及び Fis^c とともにネナガノヒトヨタケに内在する相同遺伝子由来と思われるシグナルが検出されたものの、導入遺伝子と思われるシグナルはこの試験では検出できなかった(Fig IV-3)。

3) ネナガノヒトヨタケにおけるフルトラニル耐性の遺伝様式

フルトラニル耐性の遺伝様式を検討するため、FR-1 株とフルトラニル感受性株との交配試験を行った。Table IV-4 に示すとおり、FR-1 とフルトラニル感受性株(5005、5309、または 5348)との交配から得られた二核菌糸は、すべてフルトラニル耐性を示した。一方、FR-1 の親株である Fis^c に対し、同様の交配で得られた二核菌糸は、すべて感受性であった。FR-1 と 5005 との交配から得られた子実体から担子胞子を単離し、フルトラニルに対する感受性を検討したところ、耐性と感受性は約 1 : 3 の比で分離した。この担子胞子由来系統のうち耐性を示す一系統と 5005 とをさらに交配し、その子実体から得られた胞子において再び耐性と感受性を検討したところ、今度はほぼ 1 : 1 に近い比での分離を示した (Table IV-4)。

(4) 考察

本研究ではネナガノヒトヨタケにおいて遺伝子組換え体選抜マーカーとして使用できるような薬剤耐性遺伝子を見出すことを目的として試験を行った。まず、スエヒロタケだけが他の担子菌と異なりフルトラニル耐性を示した結果に着目した(Table IV-2)。スエヒロタケの SDH はフルトラニル存在下においても明らかに酵素活性を維持していること(Table IV-3)、また薬剤カルボキシンはフルトラニルと比較的構造が似ており (Fig IV-1)、同様の活性阻害を示すこと(Ulrich

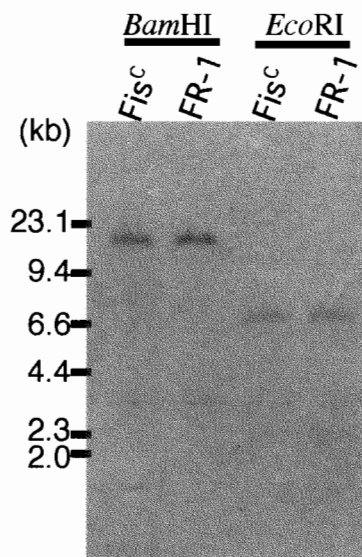


Fig. IV-3. Comparison of genomic *SDH-IP* gene in *C. cinereus*. DNA hybridization of the 0.35 kb PCR-amplified *SDH-IP* DNA of *S. commune* as a probe and *Bam*HI or *Eco*RI-digested genomic DNA of *C.cinereus* *Fis*^c and FR-1.

Table IV-4. Hereditary properties of flutolanil resistance of *Coprinus cinereus* FR-1.

Strains and mating combination	Minimum inhibitory concentration of flutolanil ($\mu\text{g/l}$)
FR-1	50
Fis ^C	0.6
5005	0.6
5309	0.6
5348	0.6
FR-1 x 5005	6.5<
FR-1 x 5309	6.5<
FR-1 x 5348	6.5<
Fis ^C x 5005	0.6
Fis ^C x 5309	0.6
Fis ^C x 5348	0.6
Basidiospores of FR-1 x 5005	
13 spores	1.6<
35 spores	<1.6
Basidiospore of 3C5 ^a x 5005	
55 spores	1.6<
45 spores	<1.6

^a: 3C5 is one of the flutolanil resistance progeny that was yielded from the mating between FR-1 x 5005.

and Mathre 1972; Motoba et al. 1988)、さらに担子菌数種において *sdhIP* 遺伝子の変異によりカルボキシシン耐性が獲得されていること(Keon et al. 1991; Broomfield and Hargreaves 1992; Honda et al. 2000)から、スエヒロタケにおけるフルトラニル耐性は SdhIP サブユニットに原因があると考えた。したがって、スエヒロタケ由来 *sdhIP* 遺伝子を導入することにより、他のフルトラニル感受性菌が耐性を獲得する可能性が考えられた。しかしながら本研究では、スエヒロタケ由来 *sdhIP* の導入によりネナガノヒトヨタケがフルトラニル耐性を獲得したという結果は得られなかった。フルトラニルに明確な耐性を示すネナガノヒトヨタケ FR-1 株を取得したが、スエヒロタケ由来 *sdhIP* 遺伝子の導入が原因であることを示すことができなかったため、この耐性は突然変異が原因である可能性が示唆される。スエヒロタケ由来 *sdhIP* の導入試験を行ってもフルトラニル耐性が付与されなかった原因としては、ネナガノヒトヨタケ細胞内ではスエヒロタケの SdhIP サブユニットが機能しない、または、スエヒロタケの SdhIP はフルトラニル耐性に関与しない、などいくつかの可能性が考えられる。

フルトラニル耐性株 (FR-1) と感受性株との交配より得られた二核株はすべて耐性を示したため (Table IV-4)、耐性は優性形質であると考えられた。FR-1 と感受性株 5005 との交配から得られた子実体由来の担子胞子では、耐性と感受性が再現性よく約 1 : 3 に分離したので (Table IV-4)、当初、この形質は 2 遺伝子に支配されている可能性が考えられた。しかし、耐性を示す後代 3C5 株を再度 5005 株と交配して得られた子実体由来の担子胞子において、耐性と感受性の分離比は今度は約 1 : 1 を示し (Table IV-4)、2 遺伝子による支配とは考えにくい結果となった。この結果から次のモデルのような遺伝様式が考えられた。

「フルトラニル耐性は 1 遺伝子 R によって支配されている。FR-1 株にはこの耐性遺伝子(R)に約 25%の遺伝距離で連鎖する x 遺伝子が存在している。この x 遺伝子が存在すると、減数分裂後の胞子形成が阻害される、あるいは担子胞子発芽を阻害する、などのような現象により、結果として x 遺伝子を持つ担子胞子由来株は得られないとする。5005 株には対立遺伝子 X があり、 X を持つ場合は、正常に胞子が形成され発芽する。5005 株における R 遺伝子の対立遺伝子を r とする。FR-1 株 (Rx) と 5005 株 (rX) の交配から得られる担子胞子において、計算上これらの 2 遺伝子は、 $Rx : rx : RX : rX = 37.5 : 12.5 : 12.5 : 37.5$ に分離することが期待されるが、実際には x 遺伝子を持つ胞子は生育してこないため、生育した胞子由来の系統の遺伝子型は $RX : rX = 12.5 : 37.5 = 1 : 3$ の比となる。ここ

で得られた胞子由来の抵抗性株の遺伝子型は RX であり、この株をさらに rX 遺伝子型を持つ株と交配し担子胞子を分離すれば、抵抗性株と感受性株は 1:1 の分離比で現れる。」このモデルにおいては、致死遺伝子が後代の分離比に影響することを想定しているが、減数分裂に影響を与え、発芽できない胞子を産生するような変異遺伝子の例はいくつか知られている (Rockmill and Roeder 1988)。このモデルが正しいとすると、抵抗性は 1 遺伝子に支配されることになる。ここではこのモデルが適当であると考え、フルトラニル耐性遺伝子は優性の 1 遺伝子であるとして以後の解析を進めることにした。この遺伝子を単離することができれば、本研究の当初の目的である、ネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え体選抜マーカーとして利用できる可能性がある。

第2節 ネナガノヒトヨタケの薬剤フルトラニル 耐性遺伝子の単離と解析

(1) 緒言

第4章第1節において明確なフルトラニル耐性を示すネナガノヒトヨタケの一系統を取得した。ここではこの耐性株からの原因遺伝子単離について述べる。薬剤フルトラニルは担子菌に特異性が高い抗菌剤で、低濃度で菌糸生育が阻害される。フルトラニルは稲の紋枯れ病防除剤として開発されたカルボキシアミド系の薬剤である(Fig IV-1A)。本剤は昭和60年に農薬登録されており、イネ、バレイショ、ムギ類、ナシ、野菜、テンサイ等において担子菌類によって発生する諸病害に対する有効性が認められている。ラット、マウス、及びイヌに対する安全性評価試験において、フルトラニル投与に起因すると考えられる重篤な慢性毒性や催腫瘍性は認められず、変異原性も陰性であったことが報告されている(日本農薬(株) 1988)。フルトラニルの作用点はミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素複合体(SDH または ComplexII ともいう)の電子伝達系にあるといわれている(Motoba et al, 1988)。一方、カルボキシニン(Fig IV-1B)は、フルトラニルに近い構造を持つカルボキシアミド系の薬剤であり、種々の研究から様々な生物においてSDHの電子伝達系を阻害する作用が知られている(Ulrich and Mathre 1972; Tucker and Lillich 1974; Day et al. 1978; White et al. 1978)。SDHはクエン酸回路上の一反応として、コハク酸からフマル酸への酸化反応を触媒し、またユビキノンの還元反応を触媒することにより電子伝達の一端を担っている(Fig IV-4A)。この酵素はflavoprotein(FP)サブユニット(SdhFP)、iron-sulfur protein (IP)サブユニット(SdhIP)、及び2つの膜固定サブユニット(SdhC及びSdhD)の4つのサブユニットから構成されており、真核生物ではミトコンドリアの膜に位置していることが知られている(Fig IV-4B)。カルボキシニン耐性の獲得は、SDHを構成するサブユニットの遺伝子に変異が生じたことが原因であるという報告は数多くあり、*sdhIP* 遺伝子については担子菌 *Ustilago maydis* 及び *Pleurotus ostreatus*、糸状菌 *Mycosphaerella graminicola*、及びバクテリア *Paracoccus denitrificans* において、また *sdhD* 遺伝子については *Paracoccus denitrificans* において、それぞれ耐性変異が知られているが(Keon et al. 1991; Broomfield and Hargreaves 1992; Skinner et al. 1998; Honda et al. 2000; Matsson and

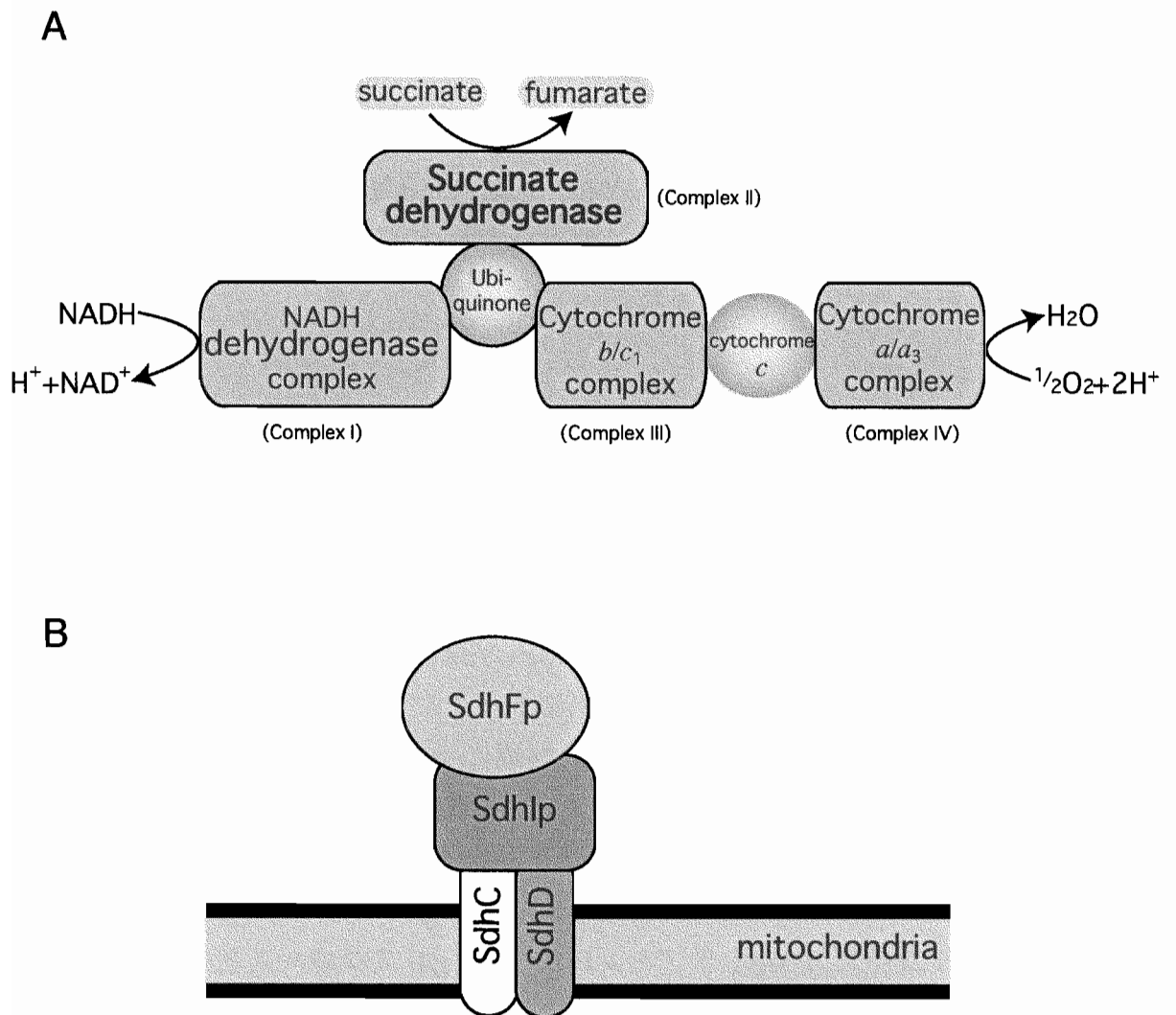


Fig. IV-4 Function and structure of succinate dehydrogenase (SDH).
 A. A schematic diagram for electron transfer system in mitochondria.
 B. A schematic diagram for the structure of SDH complex.

Hederstedt 2001; Matsson et al. 1998)、*sdhFP* 及び *sdhC* については耐性を獲得するような変異は知られていない。ヒラタケではフルトラニル耐性を獲得した突然変異体が取得されているが(Honda et al. 1996)、その原因遺伝子については不明である。

ここではフルトラニルに抵抗性を示すネナガノヒトヨタケの株 FR-1 から、その原因遺伝子をクローニングし、本遺伝子が組換えマーカー遺伝子として利用できることを示すと同時に、変異によりフルトラニル耐性を示すようになった原因について考察を行った。

(2) 材料及び方法

1) 供試菌株と培養条件

供試したネナガノヒトヨタケ菌株は Table IV-1 の通りである。菌糸培養、胞子発芽、交配及び子実体培養には Malt-Yeast-Glucose (MYG) 培地 (10 g/l モルトエキス, 4 g/l 酵母エキス, 4 g/l グルコース) に 15 g/l 寒天を添加して用いた。トリプトファン要求性株には MYG 培地に 0.1 mg/l トリプトファンを添加した MYGT 培地を用いた。トリプトファン要求性株に対する *trp1* 遺伝子組換え体選抜には最小培地 (2.28 g/l L-アスパラギン-水和物, 0.12 g/l $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 1.5 g/l NH_4Cl , 1.35 g/l KH_2PO_4 , 0.29 g/l Na_2SO_4 , 2.74 g/l Na_2HPO_4 , 5 g/l 可溶性デンプン, 5 g/l グルコース, 1 mg/l チアミン) に 171.2 g/l スクロースと 15 g/l 寒天を加えて用いた。フルトラニル抵抗性を検討する場合には 2 μM フルトラニル (和光) を培地に添加した。培養はいずれも 30 °C の人工気象器内で行った。

2) DNA 操作

染色体の電気泳動については Zolan et al.(1992)の方法に基づき、CHEF Mapper System (Bio-Rad)を用いて行った。電気泳動後、ゲルをサザンハイブリダイゼーションに供するときには、60 mj の UV 光を照射し、0.4 N NaOH と 1.5 M NaCl のバッファーに 15 分間浸した後、Hybond-N⁺にプロットティングを行った。

サザンハイブリダイゼーションは ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech)または AlkPhos direct labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。

DNA 塩基配列の決定には DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)を用い、ABI310 genetic analyzer (PE Applied Biosystems)にて解析を行った。

3) ネナガノヒトヨタケへの遺伝子導入処理

ネナガノヒトヨタケへの遺伝子導入は Binniger et al. (1987)の方法に従った。#292 株を MYGT プレート培地で培養し、回収したオイディアに対し、MM バッファー(0.5 M マンニトール, 50 mM マレイン酸, pH 5.5)に 40 mg/l ライジン グエンザイム (Sigma)と 1 mg/l キチナーゼ (Sigma)を溶解した酵素液で 30 °C、3 時間の処理を行った。得られたプロトプラストは MM で 2 回洗浄した後、約 50 μ l の MM に再懸濁し、等量の MM2xC (MM に 100 mM CaCl₂を含む)を加え、その後プロトプラスト濃度が 1~5 x 10⁸ /ml になるよう MMC (MM に 50 mM CaCl₂を含む)で調製した。このプロトプラスト懸濁液 200 μ l に 150 ng/ μ l の導入用 DNA を 20 μ l 加え、さらに 50 μ l PEG 溶液(0.25 g/ml PEG4000, 50 mM CaCl₂, 10 mM TrisHCl, pH7.5)を加え、氷上に 20 分静置した。次に PEG 溶液 2 ml を加え室温で 5 分静置した後に 4ml MMC を加え、静かに攪拌した。この導入処理された溶液を 0.5 ml ずつ組換え体選抜培地上にまき、30 °C で 10~20 日培養した。

4) 特定染色体断片を含むコスミドライブラリの構築とフルトラニル耐性遺伝子の選抜

耐性遺伝子が座乗する染色体を特異的に含むコスミドライブラリの構築は Zolan et. al (1992)の方法に従って行った。CHEF 電気泳動によりネナガノヒトヨタケの染色体を分画した後、目的の染色体が存在する部分をゲルから切り出し、ゲル中で制限酵素 *Mbo*I により部分消化した。DNA をゲルから溶出し、コスミドベクター LLC5200 (Pukkila and Casselton 1991)の *Bg*III サイトヘライゲーション処理を行った。このコスミド LLC5200 はネナガノヒトヨタケの *trp1* 遺伝子を含むので、ネナガノヒトヨタケのトリプトファン要求性株にこのコスミドを導入すると、栄養要求性相補により組換え体を選抜できる。特定染色体を部分消化した DNA 断片とライゲーション処理したコスミドは、Gigapack III XL Packaging Extracts (Stratagene)を用いてファージにパッケージし、できたファージは大腸菌 XL-10 Gold 株に感染させた。得られた 864 クローン(96 穴プレート 9 枚分)からなるコスミドライブラリを抵抗性遺伝子の選抜に用いることにした。

LB アンピシリンプレート 1 枚あたり 12 個のコスミドクローンを培養し、12 クローンまとめて菌体を回収し、FlexiPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech)によりバルクとしてコスミド DNA プールを調製した。コスミドプールをネナガノヒトヨタケ#292 株 (*trp*⁻) のプロトプラストに導入処理し、トリプトファン要求性相補によりコスミドが挿入された組換え体を選抜した。それぞれのプールの処理により得られた組換え体約 50 コロニーを 2 μ M フルトラニルを含む MYG 寒天培地上に移植した。フルトラニル耐性を示す組換え体を産出したプールについて、それを構成する 12 クローンそれぞれから DNA を調製し、これらをさらに組換え試験することによって、耐性遺伝子を含むクローンを同定した。フルトラニル耐性遺伝子を含むコスミドを詳細に解析するために、プラスミド pBluescriptII KS(-) (Stratagene)を用いてサブクローニングを行った。

5) cDNA の単離と解析

全長 cDNA の単離には rapid amplification of cDNA ends (RACE)法を用いた。液体 MYG 培地で 5 日間培養した菌糸から抽出した total RNA に対して、Oligotex-dT30 Super (Takara)で処理を行い poly(A)⁺ RNA を取得した。この RNA に対し、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いて RACE 反応用のアダプター配列を接続した二本鎖 cDNA を合成した。ゲノムクローンの予想遺伝子配列より、RACE 反応用の遺伝子特異的プライマーを設計した。DNA のアダプター配列特異的プライマー AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') と遺伝子特異的プライマー Flt#1 (5'-GGTAAGTCCCAGCACAGCGTAAC-3' ; 5' RACE 用) または Flt#2 (5'-CCATTCTCCTACCACGCCTG-3' ; 3' RACE 用) により cDNA の増幅を行った。PCR 反応は Advantage2 PCR Kit (Clontech)を用いた。得られた増幅産物を TA クローニング法により pCR2.1 ベクター(Invitrogen)にクローニングし、塩基配列決定を行った。単離された遺伝子のオープンリーディングフレーム全体を増幅する場合のプライマーには Flt#3 (3'-CACCAGCAGATTGAAGACCG-5')と Flt#4 (3'-TGACCAAGCAGACGAGCGAC-5')を用いた。予想アミノ酸配列について TargetP ソフトウェア(Emanuelsson et al. 2000)により標的タンパク質の細胞内局在性の予測を行った。また、PHDhtm アルゴリズム(Rost et al. 1996)により膜貫通領域の予測を行った。

6) ノーザンブロッティング解析

10 μ g total RNA を 1.2 % (w/v) アガロース変成ゲル (50 ml/l ホルムアミド, 20 mM MOPS, 5 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA, pH 7.0) を用いて電気泳動し、Hybond-N⁺ にプロットングを行った。RNA プロブの合成には DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用いた。ハイブリダイゼーションと検出は DIG Luminescent Detection Kit (Roche) 及び CDP-Star (Roche) を用いて行った。

7) ミトコンドリア画分の抽出とコハク酸脱水素酵素の活性測定

ミトコンドリア粗画分の抽出は White et. al (1978) の方法に従った。MYG または MYGT 液体培地で 30 °C、48 時間振とう培養した菌糸を回収し、氷冷した抽出バッファー (0.25 M スクロース, 5mM EDTA, 0.15 % (w/v) BSA fraction V, pH7.0) 中でポリトロン (Kinematica) を 3,500 rpm、3 分間処理することにより、細胞を破碎した。4 枚重ねたガーゼで濾過後、3,000 x g で 10 分遠心して得られた上清に対し、さらに 13,000 x g で 20 分遠心を行い、得られた沈殿をミトコンドリア粗抽出画分とした。沈殿をミトコンドリア懸濁液 (0.25M スクロース, 5 mM EDTA, pH7.0) で再懸濁した後、超音波破碎機 (Branson Sonifer) でミトコンドリアを破碎し、タンパク質濃度をプロテインアッセイキット (Bio Rad) により測定し、希釈液 (0.88 M シュクロース, 5 mM コハク酸ナトリウム) で 0.1 mg/ml のタンパク濃度に希釈した。コハク酸脱水素酵素の活性評価には、コハク酸-シトクロム C リダクターゼ活性を測定することにより行った。Ulrich and Mathre (1972) の方法に従い、測定バッファー (50 mM リン酸カリウムバッファー (pH7.4), 5 mM アジ化ナトリウム, 20 mM コハク酸ナトリウム) にミトコンドリア溶液を 3 μ g/ml になるように加え、室温で 2 分間静置した後、終濃度 0.1 % (w/v) になるようシトクロム C を加え、吸光度 550 nm の増加を測定した。

(3) 結果

1) ネナガノヒトヨタケ由来フルトラニル耐性遺伝子の単離と解析

フルトラニル耐性株と感受性株の交配より得られた後代の解析から、フルトラニル耐性は単一の優性遺伝子に支配されていることが予想された。FR-1 株由来耐性株 3C5 と 5005 とを交配し、得られた担子孢子由来 49 系統に対して、抵抗性に連鎖する RAPD マーカーの検索を行った。160 プライマーによるスクリ

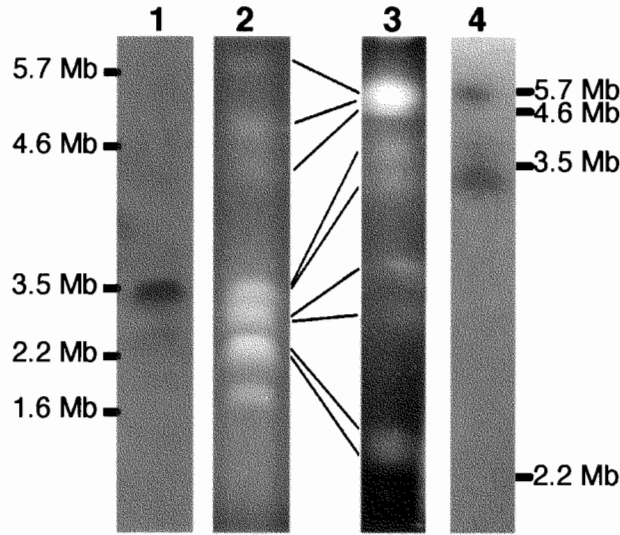
ーニングから、耐性に連鎖する 10 個の DNA 断片が得られた。そのうちの一つ、OPG10(AGGGCCGTCT)により増幅された約 1 kb の DNA 断片は耐性遺伝子座から組換え価約 16 %の位置にあり、この断片を OPG10-1000 とした(Fig IV-5B)。

ネナガノヒトヨタケのゲノムは約 1~5 Mb の染色体 13 本から構成されていることが知られている (Pukkila and Casselton 1991)。耐性遺伝子が座乗している染色体を決定するため、CHEF 電気泳動により分画した染色体に対して OPG10-1000 をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション分析を行った (Fig IV-5A)。まず、比較的高分子の分離がよい条件で泳動を行ったところ、3.5 Mb 付近にハイブリダイゼーションシグナルが得られた(Fig IV-5A, レーン 1, 2)。そこでこの付近の解像度が良い条件で泳動したところ、約 3.2 Mb の染色体に強いシグナルが得られたため(Fig IV-5A, レーン 3, 4)、この染色体上に耐性遺伝子が座乗していると決定した。約 5 Mb の位置に見られた弱いシグナルは、高分子の染色体が数本同じ位置に存在することにより過剰に DNA が集積した結果、非特異的にプローブがハイブリダイズしたものと考えられた。

FR-1 株の 3.2 Mb 染色体断片を含むコスミドライブラリ (864 クローン) を構築し、感受性のネナガノヒトヨタケ株にコスミドクローンを導入することにより、耐性遺伝子を含むクローンを選抜した。その結果、耐性遺伝子を含むコスミドクローン 7C12 を選抜した。7C12 に隣接したクローンを選抜するため、このクローンの両末端部塩基配列情報から PCR 法によりライブラリのスクリーニングを行った。7C12 のインサート部分の両端約 300 bp の DNA 塩基配列を決定し、それぞれの末端部約 200 bp 程度を増幅するプライマーを合成した (Fig IV-5B, arrow heads)。このプライマーを用いて PCR 法によりライブラリのスクリーニングを行った結果、7C12 の一方の末端部を含むクローン 3H4、及び他方の末端を含む 6E7 がそれぞれ得られた。クローン 6E7 は 7C12 と約 33 kb のオーバーラップした領域が認められ、フルトラニル耐性付与能があったのに対し、クローン 3H4 は約 14 kb のオーバーラップ領域が認められたが、耐性付与能はなかった (Fig IV-5B)。この結果から耐性遺伝子の位置をクローン 7C12 中の 14.5 kb の *SpeI* 断片、5 kb の *SpeI* 断片または 6 kb の *SpeI/NotI* 断片に絞った。そこで、それぞれのサブクローンに関してネナガノヒトヨタケへの耐性付与能を検討したところ、6 kb の *SpeI/NotI* 断片に耐性遺伝子が存在していることが判明し、このサブクローンを pB7C12-D とした。

サブクローン pB7C12-D の DNA 塩基配列解析から、これには出芽酵母

A



B

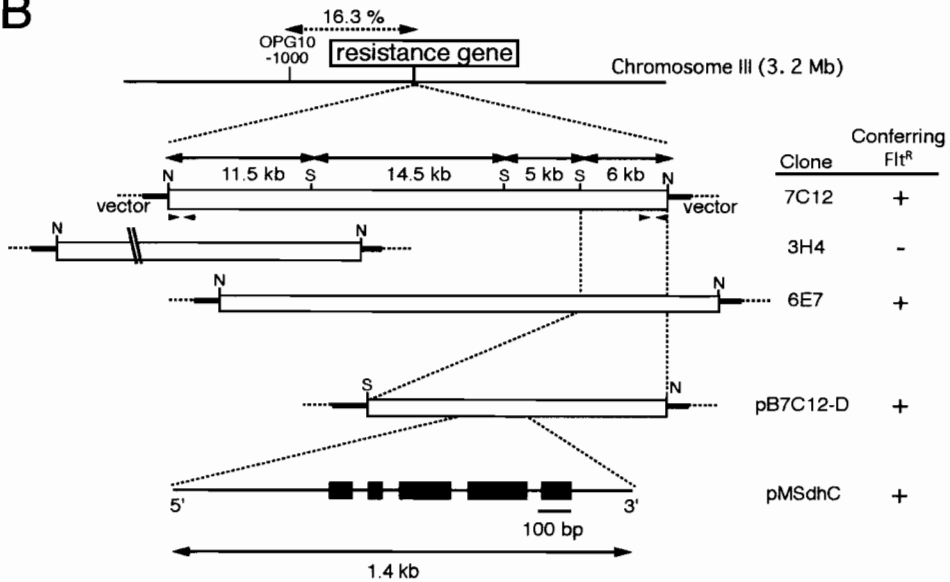


Fig. IV-5 Isolation of the flutolanil resistance gene from the particular chromosome of *Coprinus cinereus* FR-1. A. Chromosome separation in CHEF gel, and determination of the chromosome that contains the flutolanil resistance gene. Lanes 2 and 3 show the CHEF pattern of FR-1 chromosome under the following conditions: for Lane 2, 0.9% Chromosomal Grade Agarose gel (BioRad) in 0.5 x TBE, running at 60 V for 144 hr with 22-min pulse time at 14°C; for Lane 3, 0.9% Pulsed Field Certified Agarose gel (BioRad) in 1x TAE, running at 100 V for 90 hr with 8-min pulse time at 14°C. Lanes 1 and 4 show the Southern blotting analysis of the gels in Lanes 2 and 3, respectively. DNA fragment linked to the resistance gene shown in Figure 2B was labeled and used for the hybridization probe. B. Genetic and physical mapping of the resistance gene. Ability of cosmids or plasmid clone for transforming to flutolanil resistance is shown at right. Cosmid clone 7C12 contained the resistance gene (see text). Clones 3H4 and 6E7 that flank 7C12 were selected from the library by the PCR method using the primers shown by arrowheads. A subclone of 6 kb *SpeI*/*NotI* fragment derived from 7C12 is designated as pB7C12-D. Lower diagram shows the construction of the *sdhC* gene, and boxes indicate the exons. N, *NotI*; S, *SpeI*.

Saccharomyces cerevisiae のコハク酸脱水素酵素シトクロム b_{560} サブユニット (SdhC) をコードする遺伝子と相同性を示す塩基配列が含まれることが判明した。SdhC はコハク酸脱水素酵素複合体(SDH)の膜固定に関わる膜タンパク質である。ゲノム配列を基にこの遺伝子の cDNA を RACE 法により取得し、塩基配列解析を行った。その結果、この遺伝子は 4 つのイントロンで分断された 5 つのエクソンからなっており 179 アミノ酸をコードしていると予想された(Fig IV-6)。さらに、サブクローニングされた約 1.4 kb の DNA 断片を含むプラスミド pMSdhC (Fig. IV-5B; 473 bp の予想プロモータ部、コーディング部、及び 189 bp の予想ターミネータ部を含む)は、フルトラニル耐性を付与する能力が認められた。

Fig IV-7 に示すとおり、予想アミノ酸配列は出芽酵母 *S. cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*、ヒト、及びウシのミトコンドリアにおけるコハク酸脱水素酵素シトクロム b_{560} サブユニットとそれぞれ 30.2 %, 35.8 %, 30.8 %, 31.4%の相同性を示し、バクテリア *Paracoccus denitrificans* 及び *Escherichia coli* のコハク酸脱水素酵素シトクロム B-556 サブユニットとそれぞれ 24.6 %, 17.1 % の相同性を示した。

アミノ酸配列解析により、予想タンパク質はミトコンドリア移行シグナル配列をアミノ末端に持ち (Fig IV-6)、3 回膜貫通する膜タンパク質であると予想された (Fig IV-7)。これらの予想はウシや *S. cerevisiae* の相同性タンパク質の局在性モデル(Yu et al. 1992; Lemire and Oyedotun 2002)とほぼ一致した。配列のうち、ミトコンドリアマトリックスに位置する部分 (Fig IV-7, “Matrix”)は、SDH の他のサブユニットと接していると予想される部分であるが、膜貫通部や膜内部のドメインと比べ、他の生物の SdhC と高い相同性が認められた (Fig IV-7)。また、遺伝子のコード領域の上流、開始コドン ATG より 127 bp 上流に CCAAT ボックスと思われる配列が存在した。この遺伝子は第 3 章で作成した連鎖地図のうち、染色体 III にマッピングされた (Fig. II-3)。

フルトラニル抵抗性を引き起こす変異箇所を見いだすために、FR-1 株と親株である Fis^c 株との cDNA 塩基配列を比較したところ、348 番目の塩基”C”が FR-1 では”A”に置換しており、これにより 80 番目のアミノ酸は Asn から Lys に置換されることが判明した。

2) フルトラニル耐性遺伝子の機能解析

フルトラニル耐性遺伝子による組換え体選抜が可能であることを検討するため、

```

-338  acttcaaaggcttgagacaggagaagaatgagccaacacagcactttaatthaagtgagc
-278  ggctctcctgtgagacaggacaactaataatctctggattcatgttaagcgcaatctgc
-218  agggctcgcaagcgcccatcggcacggcaacggcactcctcagccggcttctcccggaatc
-158  acaccggaacacaatcacgtggaacggaagccagccaatcagcggggcgagtttgattc
-98   gcattgcagaccgggtgctcaccgtgcccgaacagacgacgcatthtaccccaacgacc
-38   accagcagattgaagaccgaccgacggtgacgcaaaaATGATGACCTCTCGAGCTCTTG
      M M T S R A L G      8
23   GATTGGGTTCGACCTTCGAACCGCGCTTTACCCCAAGGACCCgtgcggttacttggtc
      L G S A L R T A A F T P R T L      23
83   gtttgattggaggacagattggctaatacgggggttgagTGCGAAACCAGGTTGTTCTGC
      R N Q V V L R      30
143  GAAACTCCATTACCAGGAGgtgagaaggaacgcgtttattgaaagagactagcgcctaa
      N S I T R R      36
203  atatcgcgattagATTTCGTCCAAACCGAGTCCCTGACCCCGCCGAGAACCTCCAACTCC
      F V Q T E S L T P A E N L Q L L      52
263  TCAACAAGCAACGACTAAAGCGACCCAGCAGCCCCCATTTCACCATCTACCAACCCAGC
      N K Q R L K R P S S P H F T I Y Q P Q L      72
323  TTACATGGCTCGGATCTATTGCTAACCGTGTCACTGGTGTGGCCTCAGTGTCTgtgctg
      T W L G S I A N R V T G A G L S V L      90
383  atgccccggttctcataccggtttacaactagcgttaccagaatctagTGTGTACGGT
      L Y G      93
443  TTCTCGATCGCCTACCTTATCGCCCCCGGCACCTTCGACAGCGCACACGTCGTGAGTTT
      F S I A Y L I A P G T F D S A H V V E F      113
503  GTCGCTGGTCTCCCGACGGTGTCAAGTACGCCGCAAGGCCATCCTCGCCGCTCCATTC
      V A G L P D G V K Y A G K A I L A A P F      133
563  TCCTACCACGCCTGGAACGGCTTGAGGCATTGGCTTGGGATGCTGGCAAATgtgagctc
      S Y H A W N G L R H L A W D A G K F      151
623  cgacggtgtctcccaacacacccttctctgactgtgtaatagTCCTCTCGGTCAAGGGCG
      L S V K G A      157
683  CCTACGCCACCGGTTACGCTGTGCTGGGACTTACCGGTGTTTCCACCGTCGTCTTACTT
      Y A T G Y A V L G L T G V S T V V L T F      177
743  TCTCAAGTAAFtcgatccaagaggaatagtcgctcgtctgcttggtcacaatcactgt
      F K *      179
803  gtcgattgtaaagttcgccatgccttataatthtattcactcattattgagctttttg
863  accatcgctgaggctctgcccgttggtgacgcctcgtctctcccgcaccattggccga
923  tggtaagctgaccttgattc

```

Fig. IV-6 Genomic DNA and deduced amino acid sequence of the *sdhC* gene from the flutolanil-sensitive wild type strain, Fis^C. Gray shading indicates nucleotide substitution and the bold letter indicates the amino acid substitution found in the mutant FR-1. Underline indicates the putative binding site of HAP2/3/4. Dotted line indicates the putative mitochondria targeting sequence.

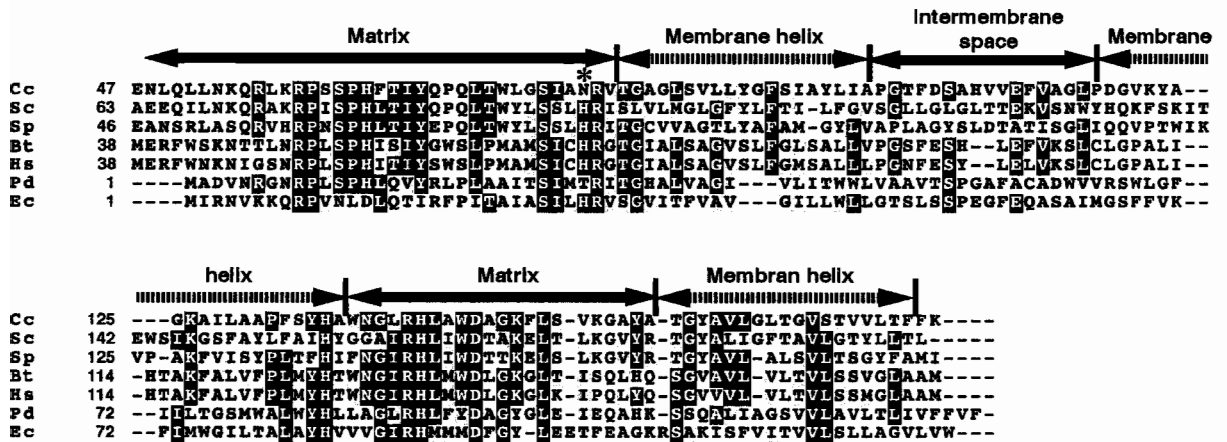


Fig. IV-7 Comparison of the amino acid sequence of SdhC from *C. cinereus* with those from other organisms. Alignment of SdhC from *C. cinereus* (Cc) with homologs from *S. cerevisiae* (Sc, Accession number P33421), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp, T41322), *Bos taurus*, bovine (Bt, P35720), *Homo sapiens* (Hs, Q99643), *Paracoccus denitrificans* (Pd, U31902), and *E. coli* (Ec, P10446). Asterisk shows the mutation residue found in FR-1. Arrows above the sequences indicate the deduced membrane helices and segments localized in matrix and intermembrane space of SdhC of *C. cinereus*.

感受性のネナガノヒトヨタケ#292 株のプロトプラストに、耐性遺伝子を含むクローン pB7C12-D を遺伝子導入処理し、フルトラニルを含む選抜培地で培養した。3 回の反復実験より得られたフルトラニル耐性コロニーの数は、生細胞 10^5 あたり 4.8, 1.0, 及び 2.0 であった。ランダムに選抜した 5 つの形質転換株に対し、*sdhC* 遺伝子をプローブとしてゲノムサザン法により導入遺伝子の検出を行ったところ、内在の *sdhC* 遺伝子に加え、導入遺伝子由来のシグナルが得られ、フルトラニル耐性遺伝子は宿主株ゲノム中のランダムな位置に挿入されていることが示された (Fig IV-8)。

組換え遺伝子の効果を調べるために、導入遺伝子のコピー数が異なる 2 系統の組換え体に関して試験を行った。*sdhC* 遺伝子の転写量に関して、宿主株 (#292) と 5 コピー挿入された組換え体 (#292-1)、及び 1 コピー挿入株 (#292-4) の比較を行った。Fig IV-9A に示すとおり、宿主株と比較して #292-1 の転写量は明らかに増加していた。これは多コピー効果と考えられる。コハク酸脱水素酵素 IP サブユニット遺伝子 *sdhIP* の転写量は宿主株と組換え株の間に変化はなかった (Fig IV-9A)。

組換え株におけるフルトラニルの菌糸生長阻害効果について検討を行った。宿主株は $1 \mu\text{M}$ のフルトラニルで生育が完全に阻害されたが、変異株 FR-1 では $20 \mu\text{M}$ の濃度でも生育可能であった (Fig IV-9B)。組換え株 #292-1 及び #292-4 は両者とも $20 \mu\text{M}$ の濃度で生育可能であったが、菌糸生長速度では若干の違いが見られた。フルトラニルを含まない培地では #292-1 は #292-4 より生育が遅かったが、フルトラニルを含む培地では逆に #292-1 は #292-4 より生育が速かった (Fig IV-9B)。

変異型 SdhC の効果を調べるため、フルトラニル存在下での単離ミトコンドリアにおけるコハク酸脱水素酵素活性を測定した。野生株 (#292)、変異株 (FR-1)、及び組換え株 (#292-1 及び #292-4) について活性を比較したところ、#292 の酵素活性は $2 \mu\text{M}$ のフルトラニルによってほとんど活性を失ったが (3 % 以下)、変異株では $5 \mu\text{M}$ 濃度でも 41.1 % の活性を維持しており、2 つの組換え株は野生株と変異株の中間の酵素活性を示した (Fig IV-9C)。組換え株間の比較では、 $5 \mu\text{M}$ 濃度の場合、#292-1 の活性 (25.6 %) は #292-4 の活性 (9.7 %) よりも明らかに高かった (Fig IV-9C)。

フルトラニル耐性変異株 FR-1 と組換え株 #292-1 及び #292-4 は、薬剤カルボキシシンに対しても明確な耐性を示した (Fig IV-10)。

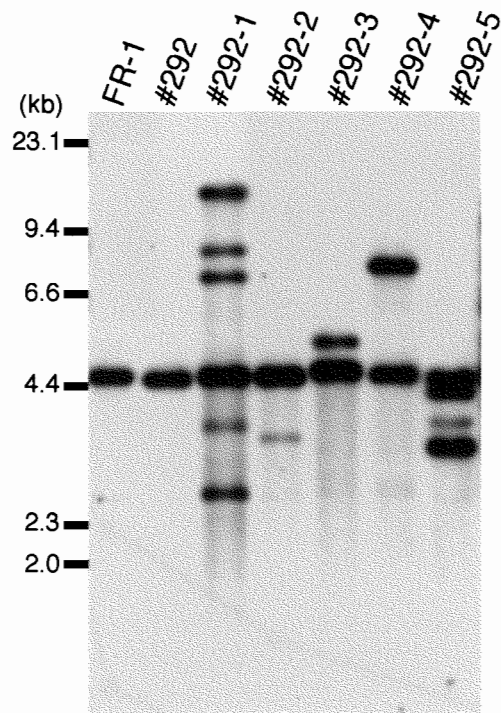


Fig. IV-8. Southern analysis of genomic DNA from the strains transformed with pB7C12-D, which contains the mutated *sdhC* gene. Genomic DNAs from the mutant (FR-1), host strain (#292), and transformants were digested with *Xba*I. The *sdhC* gene fragment was used for the probe.

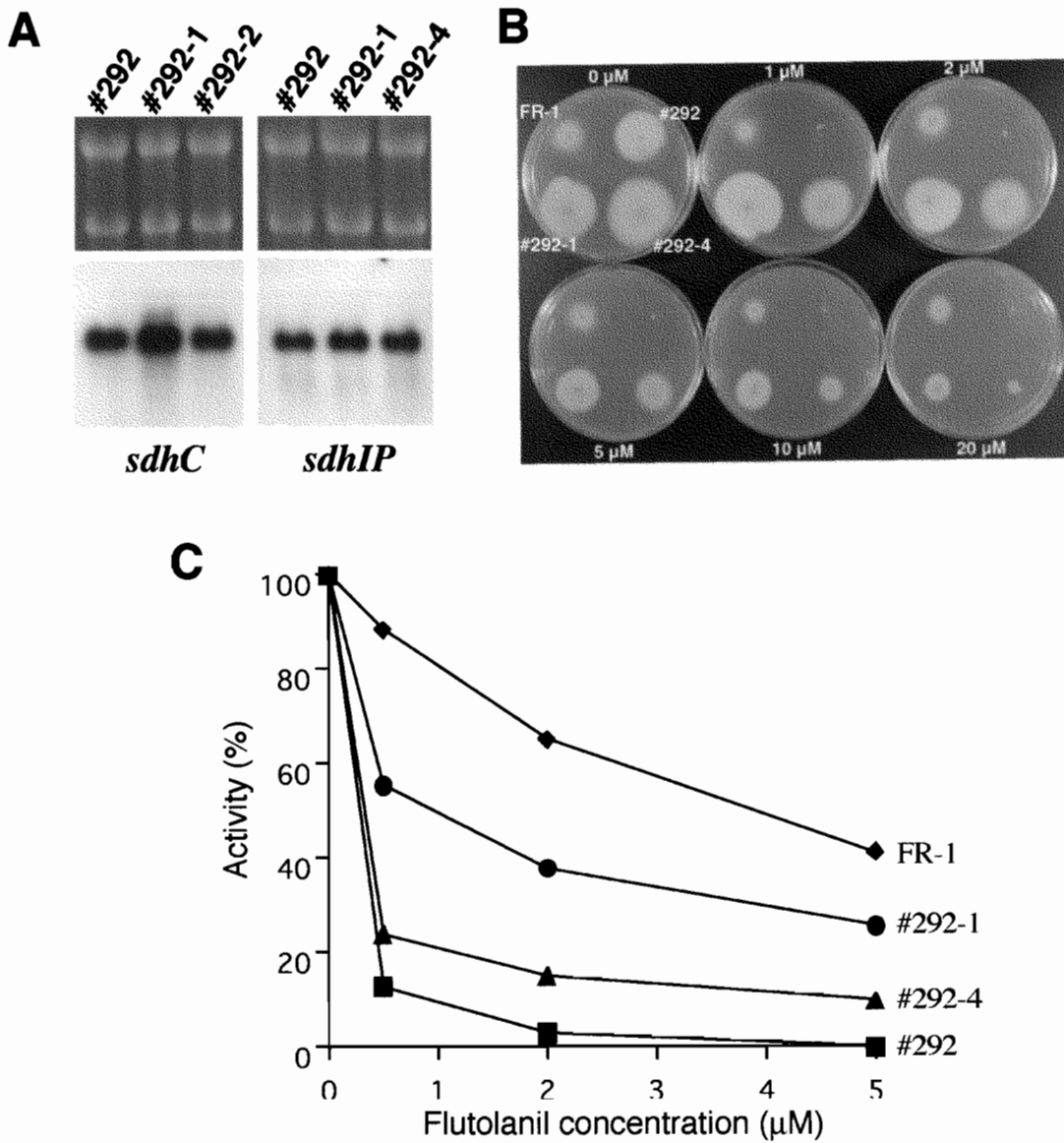


Fig. IV-9. Effects of the flutolanil resistance gene in the transformants. A. Transcriptional analysis of the *sdhC* gene in the host strain and transformants. Upper panels show gels stained with EtBr, showing 26S and 18S rRNA. Lower panels show Northern analysis probed with *sdhC* and *sdhB*. Each transformant corresponds to the strain shown in Fig. III-8. B. Effect of flutolanil on hyphal growth for flutolanil-resistant mutant FR-1, host wild-type strain #292, and two transformant strains #292-1 and #292-4. All four strains were plated on MYGT medium supplemented with flutolanil at indicated concentrations. C. Effect of flutolanil on SDH activity of the mitochondria from #292, FR-1, #292-1 and #292-4. The activity without flutolanil (0 μM) was defined as 100%. The absolute values of the enzyme activity without flutolanil were 0.947 for #292, 0.379 for #292-1, 0.321 for #292-4 and 0.292 for FR-1.

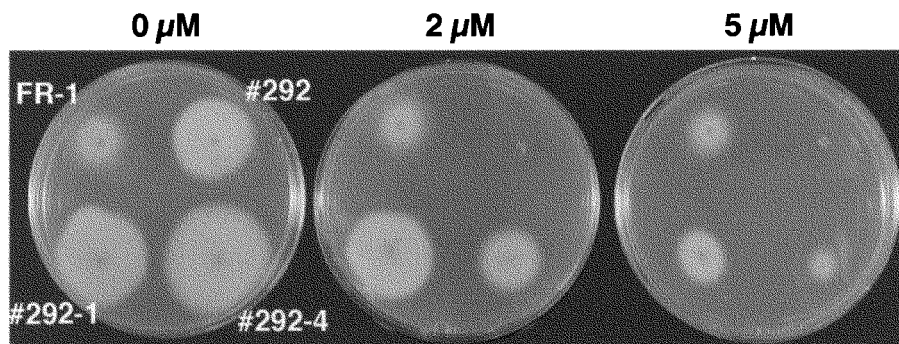


Fig. IV-10. Flutolanil resistance mutation confers cross-resistance to carboxin. FR-1, #292, #292-1, and #292-4 were plated on MYGT medium supplemented with carboxin at different concentrations.

(4) 考察

本研究により、フルトラニル耐性変異遺伝子はコハク酸脱水素酵素複合体におけるシトクロム b_{560} サブユニット (SdhC) 遺伝子の変異が原因であることが明らかとなった。また本変異は、カルボキシ耐性にも関与していることが認められた。これまでにフルトラニル及びカルボキシの標的部位は SDH 複合体の電子伝達経路にあると報告されている (Motoba et al. 1988; Ulrich and Mathre 1972)。以上のことから SdhC におけるフルトラニル及びカルボキシの結合部位は同一か、もしくは非常に近接していると考えられる。Matsson et al.(2001)は SDH 複合体におけるカルボキシ標的部位はミトコンドリア膜表面の周辺に位置する領域であると予想した。この部位では SdhIP, SdhC, 及び SdhD の各サブユニットがお互いに接している (Fig. IV-4)。したがって Matsson et al.(2001)らは、これらの3つのタンパク質をコードする遺伝子の変異によって、カルボキシ耐性が獲得されると仮説を立てた。実際にカルボキシ耐性を獲得した例として *sdhIP* 及び *sdhD* 遺伝子における変異が報告されている (Keon et al. 1991; Broomfield and Hagreaves 1992; Honda et al. 2000; Skinner et al. 1998; Matsson and Hederstedt 2001; Matsson et al. 1998)。しかしながら *sdhC* に関してはこれまでに報告がなく、本研究の結果は、フルトラニルやカルボキシの標的領域に SdhC サブユニットも含まれることを明らかにした初めての例である。

SDH はユビキノンを経た電子伝達に関与している。大腸菌の SdhC においては、膜貫通ヘリックス I のアミノ末端側へ隣接する領域にユビキノン結合部位が位置しており、また 27 番目のセリン及び 31 番目のアルギニンが結合に重要であることが報告されている (Yang et al. 1998)。このドメインはネナガノヒトヨタケを含む様々な生物で高く保存されており、本研究で見出されたアミノ酸置換はこのドメイン中に存在していた (Fig IV-7)。したがってフルトラニルとカルボキシの標的部位は SdhC におけるユビキノン結合部位と同一または非常に近接していると考えられる。本研究で見出された変異がアミノ酸置換による構造変化を引き起こすことにより、SDH 複合体とこれらの薬剤との結合親和性は低下するが、ユビキノンとの親和性には大きな変化がないと考えられ、その結果、薬剤存在下でも酵素機能が維持されると考えられる。

酵素活性の測定により、変異型 *sdhC* 遺伝子組換え体由来の SDH 活性は FR-1 株と組換え宿主株との中間のフルトラニル感受性を示し、多コピーであって

も FR-1 株を越える耐性は示さなかったという結果が得られた (Fig IV-10)。この理由は、変異株及び組換え株の細胞内における薬剤耐性型 SDH 複合体の量比にあると考えられる。FR-1 株においては、変異型 SdhC のみが発現しており、細胞内の SDH 複合体はすべて耐性型である。一方、組換え体では外来の変異型及び内在の野生型 SdhC の両者が存在し、競合して SDH 複合体に取り込まれるため、耐性型及び感受性型の両方の SDH 複合体が存在することになる。この場合、フルトラニル存在下では全 SDH のうち感受性型は機能を失うことになる。変異型 *sdhC* が導入されても、*sdhIP* の発現量には変化はなかったことから (Fig IV-9)、同様に他のサブユニットの発現量も変化がないことが予想される。細胞内の SDH 複合体の総数は最も発現量が少ないサブユニットの数によって制限されることとなるので、変異型 *sdhC* の発現が増加しても、無制限に複合体の総数が増加することはないと考えられる。その結果、限られた SDH 複合体の中には耐性型及び感受性型の両方が共存することになるが、本研究で供試した多コピー導入株でも一細胞あたりの耐性型 SDH 複合体の数が FR-1 のそれを上回ることがなかったと考えられ、その結果、変異株の薬剤耐性を越えなかったと考えられる。

Fig IV-6 に示すとおり、*sdhC* 遺伝子のプロモーター領域には CCAAT ボックス結合蛋白質 NF-Y(または CBF, HAP2/3/4/5 など)との結合配列、CPuPuCCAAT(C/G)(A/G)G(A/C)G と一致する配列があった (Mantovani 1998)。出芽酵母のシトクロム *b₅₆₀* をコードしている遺伝子(*Sdh3p*)は転写因子 HAP2 の存在下で発現が活性化する遺伝子をスクリーニングすることにより単離されている (Daignan-Fornier et al. 1994)。この遺伝子は HAP2/3/4 に結合する共通配列をプロモーター領域に持っており、その発現は炭素源によってコントロールされている。ネナガノヒトヨタケの *sdhC* の発現もプロモーター領域に存在する CCAAT ボックスを介して NF-Y 相同蛋白質によって制御されている可能性がある。

単離した変異型 *sdhC* 遺伝子をマーカー遺伝子として組換え処理を行い、フルトラニル耐性による選抜を行った結果、野生型 (感受性) 株(#292 株)から組換え株を獲得することができた (Fig IV-8)。ネナガノヒトヨタケの他の野生型株 (Fis^c 及び 5005)でも組換え実験は成功している。変異型 *sdhC* 遺伝子は組換え株において優性で明確な抵抗性を示した。またこの遺伝子はプロモーター及びターミネーター部分を含めても約 1.4 kb の短いもので発現するため、組換え操作

においても取り扱いが容易である。また、フルトラニルは動物試験から低毒性で安全性が高い薬剤であることが示されているため（日本農薬（株）1988）、研究室における取り扱いにも問題が少ない。したがって本遺伝子とフルトラニルを利用した遺伝子組換え体選抜系はネナガノヒトヨタケの組換え試験において優れた実験系として利用することができるだろう。

(5) 要約

担子菌に特異性の高い薬剤フルトラニルに対して感受性を示すネナガノヒトヨタケの野生型株から耐性突然変異株を取得した。変異遺伝子を単離するため、耐性に連鎖する RAPD マーカーを探索し、このマーカーをプローブとして染色体を分画した CHEF プロットにハイブリダイズさせることにより、変異遺伝子が座乗する染色体を同定した。この染色体を特異的に含むコスミドライブラリを構築し、フルトラニル感受性のネナガノヒトヨタケ野生株を抵抗性に形質転換することができるクローンを選抜したところ、フルトラニル耐性遺伝子を含むと考えられるコスミドクローン 2 つを見出した。これらのコスミドクローンの解析から、変異遺伝子はミトコンドリア膜に局在するコハク酸脱水素酵素複合体 (SDH) のチトクロム b_{560} サブユニットをコードする *sdhC* 遺伝子において一塩基置換が生じたものであり、その結果翻訳される蛋白質における第 80 番目のアスパラギンはリジンに置換されることが明らかとなった。耐性変異系統及び変異遺伝子を導入した形質転換体の SDH 酵素活性解析により、抵抗性の獲得は、フルトラニル存在下でも SDH 複合体の酵素活性が維持されるためであることが示された。またこの *sdhC* 遺伝子の変異は、薬剤カルボキシシンに対しても交叉耐性を示した。他の生物において、カルボキシシン耐性は *sdhIP* 及び *sdhD* 遺伝子の変異により獲得されることが報告されているが、本研究の結果は *sdhC* における変異でも抵抗性を獲得されることを示した初めての例である。この変異遺伝子をマーカーとして、遺伝子導入株の選抜を行うことが可能であり、今後ネナガノヒトヨタケの遺伝子操作実験において優性の遺伝子組換え体選抜マーカーとして広く利用されることが期待される。

第5章

総括

担子菌はその実用的な有用性に比べ、種々の研究基盤が十分に整備されているとは言い難い現状にある。今後、担子菌をますます活用し、有用品種の効率的な育成や、有用成分・酵素の高度利用を進めるには、遺伝的情報を十分に蓄積し、分子生物学的手法を大いに活用していく必要がある。本研究では担子菌におけるゲノム解析及び遺伝子機能解析に必須の研究基盤を確立することを目的として、担子菌のモデル生物として期待されるネナガノヒトヨタケを材料に、RAPD 法による DNA マーカー利用法の確立、それを基にしたゲノム全体にわたる連鎖地図の作成、さらに組換え体選抜マーカーとして利用できる遺伝子の単離を行った。

まず第2章では、担子菌における DNA マーカーとして RAPD 法の有効性を検討した。RAPD 法は塩基配列情報やプローブとして使用する DNA 断片がなくても容易にゲノム全体を解析するための情報を得ることができるため、遺伝子情報が十分蓄積していない担子菌類には適した手法であると考えた。その適用として、まず、担子菌類の種及び株識別への利用を検討した。ネナガノヒトヨタケとその近縁種については、得られた RAPD パターンにより種の違いを容易かつ明確に示すことが可能であり、さらに種名不明の菌株に対して種の同定を行うことが可能であることを示した。また、系統間で多型を示す RAPD マーカーにより系統識別が可能であり、これらのマーカーが交配及び減数分裂を通して後代へ伝達されることを確認し、各種遺伝解析に利用できるマーカーとして使用できる可能性を示した。また、マツタケ及び近縁種での解析でも種の違いを明確に示す RAPD パターンが得られ、マツタケ近縁種間の識別にも RAPD 法の適用が有効であることを示した。また、本マーカーを利用したマツタケ及び近縁種における系統解析の結果は、これまでに形態から推定されていた近縁関係とほぼ一致しており、このことは RAPD 法による種識別法の信頼性が高いことを示していると同時に、未だ種の分類が十分に確立していない *Tricholoma* 属の分類には、RAPD 法を含む DNA レベルの検討が有効であることが示唆された。

次に第3章ではネナガノヒトヨタケの遺伝地図の構築を行った。この遺伝地図は219のRAPDマーカーと28のRFLPマーカー及び交配因子*A*及び*B*遺伝子座から構成されており、1346 cMをカバーする13の連鎖群が同定された。ネナガノヒトヨタケのゲノムは13本の染色体から構成されていることが知られているが、CHEF法による染色体泳動パターンプロット及びハイブリダイゼーション試験より、13の連鎖群と13本の染色体を対応させた。次にこの連鎖地図情報を利用して担子菌で見られる染色体長多型(CLP)について検討した。担子菌を含む多くの糸状菌類では系統間でCLPが見られることが知られているが、そのメカニズムはほとんど理解されていない。本研究で得られた連鎖地図情報とCHEF電気泳動像を利用した解析から、CLPの原因となる染色体領域を予想することができた。さらにこの連鎖地図の情報を充実させることでCLPのメカニズム解明の糸口とすることができると考えられた。また、この連鎖地図の有用性として、特に、担子菌の有性生殖過程に関連する遺伝子の解析に有効であることが挙げられる。担子菌研究において、交配から二核菌糸の形成、そして子実体形成、さらに減数分裂に至る有性生殖過程は最も興味深い分野の一つである。交配型因子*A*及び*B*遺伝子の二重変異株(*AmutBmut*)は交配を行わなくても有性生長過程が進み、子実体を形成することができる。そのためこの系統において有性生長過程に影響する変異が発生すれば、当代でその表現型が表れるので、容易に変異を見出すことができる。本研究ではこの*AmutBmut*株を片親として連鎖地図を構築しており、この地図上のマーカーが直接利用できるため、*AmutBmut*系統で見出された変異に関して、地図上の位置の迅速なマッピングが可能であり、原因遺伝子の特定に有効である。

第4章ではネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え選抜マーカーとなりうる薬剤耐性遺伝子の単離を行った。本研究ではまず、スエヒロタケはフルトラニル耐性であること、また類似の薬剤カルボキシシンに対する耐性には*sdhIP*遺伝子の変異が関与することから、スエヒロタケの*sdhIP*遺伝子がフルトラニル耐性に関与していると予想し、ネナガノヒトヨタケに対し本遺伝子の導入処理を行った。結果として、残念ながら本遺伝子によるフルトラニル耐性への形質転換は認められなかったが、フルトラニルに明確な耐性を示すネナガノヒトヨタケの突然変異株FR-1を得ることができた。そこで、RAPDマーカーを利用した連鎖解析により変異遺伝子をマッピングし、座乗染色体の特定を行い、この染色体を特異的に含むコスミドライブラリを構築することにより、変異遺伝子の単

離に成功した。変異遺伝子はコハク酸脱水素酵素複合体 (SDH) 膜サブユニットの一つであるチトクロム b_{560} サブユニットをコードする *sdhC* 遺伝子に一塩基置換が起こったものであった。この変異により第 80 番目のアミノ酸がアスパラギンからリジンへと置き換わる。このアミノ酸置換により、フルトラニルと SDH 複合体の結合性が低下するが、チトクロム b_{560} サブユニットが関与する電子伝達系には影響が少ないためにフルトラニル耐性が獲得されたことが示唆された。この耐性遺伝子を利用してネナガノヒトヨタケの遺伝子組換え体をフルトラニル耐性で選抜することができたため、本遺伝子は遺伝子組換え体選抜マーカーとして有用であることが示された。既に本菌においては組換え手法が確立しており、別のマーカー遺伝子も存在するが、今後は複数の遺伝子を導入した組換え体を用いて解析するような研究が増えると予想され、複数の組換えマーカーが利用可能であることが望ましい。したがって、本研究で単離されたフルトラニル耐性遺伝子も重要なマーカー遺伝子としてその利用が期待される。

以上に述べたとおり、本研究では担子菌研究の基盤となる基礎的技術の構築を行った。この研究を進行している期間にネナガノヒトヨタケのゲノムプロジェクトが進行し、2003 年にほぼゲノム全体が含まれていると考えられる塩基配列情報が公開され (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/coprinus_cinereus/)、担子菌においても詳細な遺伝情報の利用が可能となった。このことにより、本研究の成果であるネナガノヒトヨタケの連鎖地図及び薬剤耐性遺伝子を利用した遺伝子組換え系は今後ますます重要となると考えられる。まず、連鎖地図の利用であるが、遺伝子の単離においては、本研究で得られた連鎖地図上に目的の形質をマッピングすることができれば、その位置情報から全塩基配列情報のうち該当する領域において遺伝子の絞り込みを行うことが可能となり、研究の高速化が期待される。また連鎖地図と塩基配列情報を併せて解析することにより、染色体長多型の生物学的な意味についても解き明かすことが可能であろう。次に担子菌における遺伝子解析のための組換え法の重要性について述べる。全塩基配列が明らかになった現在、次の興味は、そこに見出された数多くの遺伝子の実際の機能にある。担子菌は微生物の中では例外的といえる巨大な生殖器官である子実体を形成し、また、リグニン分解に関わる酵素群を持つなど、他生物にはない数々の特徴があるため、担子菌類独自の新奇な遺伝子が数多く存在することが予想される。そのため、全塩基配列解析の結果得られた遺伝子の候補の中には、他生物の遺伝子との比較ではその機能の予測が困難なものも多

数含まれると考えられる。このような遺伝子に関しては組換え法を利用した解析によりその機能を明らかにしていく必要があると考えられる。本研究で確立したフルトラニル耐性遺伝子による組換え系もそのような研究に当然使用可能であり、幅広い利用が期待される。担子菌のモデル生物となったネナガノヒトヨタケのゲノムプロジェクトの成果は、すべての担子菌研究を飛躍的に進めることが予想される。その推進において、本研究の成果が大いに活用され、担子菌独自のユニークな生物学的発見が数多く行われることを期待すると同時に、我々の社会をさらに豊かにするような担子菌の利用法の拡大が行われることを期待する。

謝辞

本研究を実施し、この論文を書き上げる過程で非常にたくさんの方の温かいご指導ご支援をいただきました。その皆様に心からの謝意を表したく思います。

まず、本論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導を賜りました神戸大学農学部、上島脩志教授に心から感謝致します。また本論文の査読を賜りました神戸大学農学部、中村千春教授並びに水野雅史教授に心より感謝申し上げます。

本論文のテーマとなりました担子菌研究は 1995 年に食品総合研究所細胞機能研究室に配属されて以来、柳 園江室長（現秋田県立大学教授）のご指導の元、開始致しました。柳先生には研究の基本から教えていただき、秋田県立大へ異動後も常に暖かいご指導と励ましを賜りました。終始変わらぬ温かいご指導ご支援に、心より感謝申し上げます。

秋田県立大学村口 元助手には担子菌の分子生物学に関する手法を懇切にご指導頂きました。本論文の研究結果が得られたのは村口先生のご指導によるものと言っても過言ではありません。また連鎖地図構築の研究は村口助手が中心となって行われたことを申し添えます。心より感謝申し上げます。

本論文の研究を継続中に食品総合研究所内で異動があり、1999 年に微生物機能研究室、2003 年に再度、細胞機能研究室に配属となりました。越智幸三微生物機能研究室長、矢部希見子細胞機能研究室長には大変お世話になりました。感謝申し上げます。また、戸澤譲主任研究官（現愛媛大学教授）、岡本晋主任研究官、老田 茂主任研究官（現東北農業研究センター加工利用研究室長）、伏見力主任研究官（現国際農林水産業研究センター）、さらに両研究室に在籍したたくさんのポスドク、非常勤職員の方々にも心から感謝申し上げます。

鈴木建夫元食品総合研究所理事長（現宮城県立大学教授）には、私が食品総合研究所に配属された当時から現在に至るまで、機会があるごとに励ましの言葉を頂いてまいりました。心から謝意を表したく思います。

私が在籍していた神戸大学農学部植物育種学研究室の先輩である山田哲也博士（現北海道大学助手）、加賀秋人博士（現農業生物資源研究所主任研究官）には、大学在籍当時、さらに私が食総研に配属された後もお二方が近隣の研究所で研究に従事されていたこともあり、研究のみならず大海への挑戦など様々なご指導を頂きました。その中でも特に、お二方の研究に対する真摯な姿勢を学ばせて頂いたことは私にとって大きな財産です。心より感謝申し上げます。

最後に家族に感謝の言葉を述べたいと思います。私のこれまでの人生を常に支え続け、温かく見守って下さった両親には、その愛情に深い感謝の気持ちを表したく思います。また、これまでの研究生生活は決して順風満帆ではなく、つらいことも多々ありましたが、愛する妻・圭子の存在と、愛する娘・碧の無邪気な笑顔に励まされて、何とか本論文をまとめ上げられました。二人には言葉では表すことができない感謝の気持ちで一杯です。圭子、碧、ありがとう。

引用文献

- Arima T, Okida T, Morinaga T (1996) Behavior of chromosomes after meiosis in *Coprinus cinereus*. *Mycoscience* 37:111-115
- Bhattiprolu GR, Challen MP, Elliott TJ (1993) Transformation of the homobasidiomycete *Coprinus bilanatus* to 5-fluoroindole resistance using a mutant *trp3* gene from *Coprinus cinereus*. *Mycol. Res.* 97:1281-1286
- Binninger DM, Skrzynia C, Pukkila PJ, Casselton LA (1987) DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Embo J* 6:835-840.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331
- Broomfield PL, Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 22:117-121.
- Buller AHR (1930) The biological significance of conjugate nuclei in *Coprinus lagopus* and other hymenomycetes. *Nature* 126:686-689
- Casselton LA (1995) *Genetics of Coprinus*. Springer, Berlin
- Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1987) Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Appl Environ Microbiol* 53:816-822
- Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1988) Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens*(=*A. bisporus*). *Appl. Environ. Microbiol* 54:1643-1648
- Celerin M, Merino ST, Stone JE, Menzie AM, Zolan ME (2000) Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *Embo J* 19:2739-2750
- Challen MP, Gregory KE, Sreenivasaprasad S, Rogers CC, Cutler SB, Diaper DC, Elliott TJ, Foster GD (2000) Transformation technologies for mushrooms. *Mushroom Science XV: Science and cultivation of edible fungi v.1* 15:165-172
- Chibana H, Beckerman JL, Magee PT (2000) Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res* 10:1865-1877
- Chiu SW, Moore D (1990) A mechanism for gill pattern formation in *Coprinus cinereu*.

Mycol. Res. 94:320-326

- Cummings WJ, Celerin M, Crodian J, Brunick LK, Zolan ME (1999) Insertional mutagenesis in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants. *Curr Genet* 36:371-382.
- Daignan-Fornier B, Valens M, Lemire BD, Bolotin-Fukuhara M (1994) Structure and regulation of SDH3, the yeast gene encoding the cytochrome *b*₅₆₀ subunit of respiratory complex II. *J Biol Chem* 269:15469-15472.
- Day DA, Arron GP, Laties GC (1978) The effect of carboxins on higher plant mitochondria. *FEBS Lett* 85:99-102.
- Day PR, Anderson GE (1961) Two linkage groups in *Coprinus lagopus*. *Genet. Res.* 2:414-423
- Dietrich D, Hickey WJ, Lamar R (1995) Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61:3904-3909
- Doudrick RL, Raffle VL, Nelson CD, Furnier GR (1995) Genetic analysis of homokaryons from a basidiome of *Laccaria bicolor* using random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers. *Mycol. Res.* 99:1364-1366
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15
- Dutta SK (1974) Repeated DNA sequences in fungi. *Nucleic Acids Res* 1:1411-1419
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N- terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
- Forche A, Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG (2000) Development and characterization of a genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* using amplified fragment length polymorphisms and other markers. *Fungal Genet Biol* 31:189-203
- Freedman T, Pukkila PJ (1997) A physical assay for meiotic recombination in *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genet* 254:372-378
- Granado JD, Kertesz-Chaloupkova K, Aebi M, Kues U (1997) Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genet* 256:28-36.
- Hirano T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot

- basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1958-1962
- Holm PB, Rasmussen SW, Zickler D, Lu BC, Sage J (1981) Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Carlsberg Res. Commun.* 46:305-346
- Honda Y, Irie T, Atsuji M, Watanabe T, Kuwahara M (1996) Isolation and characterization of *Pleurotus ostreatus* mutant strains resistant to a carboxin-derived fungicide, flutolanil. *Mycoscience* 37:459-461
- Honda Y, Matsuyama T, Irie T, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Genet* 37:209-212.
- Hopple JJS, Vilgalys R (1994) Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* 86:96-107
- Hseu RS, Wang HH, Wang HF, Moncalvo JM (1996) Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl Environ Microbiol* 62:1354-1363
- Inada K, Morimoto Y, Arima T, Murata Y, Kamada T (2001) The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A-regulated sexual development. *Genetics* 157:133-140
- Irie T, Honda Y, Matsuyama T, Watanabe T, Kuwahara M (1998) Cloning and characterization of the gene encoding the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta* 1396:27-31
- Ito Y, Fushimi T, Yanagi SO (1998) Discrimination of species and strains of basidiomycete genus *Coprinus* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mycoscience* 39:361-365.
- Ito Y, Yanagi SO (1999) Discrimination of basidiomycete species and strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *JARQ* 33:149-154
- Kanda T, Goto K, Sawa H, Arakawa H, Yasuda Y, Takemaru T (1989a) Isolation and characterization of recessive sporeless mutants in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genet* 216
- Kanda T, Ishihara H, Takemaru T (1989b) Genetic analysis of recessive primordiumless mutants in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Bot. Mag. Tokyo* 102:561-564

- Kanda T, Ishikawa T (1986) Isolation of recessive developmental mutants in *Coprinus cinereus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 32:541-543
- Kawagishi H, Ando M, Shinba K, Sakamoto H, Yoshida S, Ojima F, Ishiguro Y, Ukai N, Furukawa S (1993) Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericium erinaceum*. Phytochemistry 32:175-178
- Keon JP, White GA, Hargreaves JA (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. Curr Genet 19:475-481.
- Kerrigan RW, Royer JC, Baller LM, Kohli Y, Horgen PA, Anderson JB (1993) Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 133:225-236
- Khush RS, Becker E, Wach M (1992) DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 58:2971-2977
- Kiguchi T, Yanagi SO (1985) Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants. Appl Microbiol Biotechnol 22:121-127
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12
- Kulkarni RK (1991) DNA polymorphisms in *Lentinula edodes*, the shiitake mushroom. Appl. Environ. Microbiol. 57:1735-1739
- Kytovuori I (1988) The *Tricholoma caligatum* group in Europe and North Africa. Karstenia 28:65-77
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181
- Laroche A, Gaudet DA, Schaalje GB, Erickson RS, Ginns J (1995) Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses. Mycol. Res. 99:297-310
- Larraya LM, Perez G, Ritter E, Pisabarro AG, Ramirez L (2000) Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 66:5290-5300
- Lemire BD, Oyedotun KS (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial

- succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1553:102-116.
- Loftus MG, Moore D, Elliott TJ (1988) DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Theor. Appl. Genet.* 76:712-718
- Magae Y, Haga K, Taniguchi H, Sasaki T (1990) Enzymes of strains of *Pleurotus* species (basidiomycetes) compared by electrophoresis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:69-80
- Mantovani R (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* 26:1135-1143.
- Matsson M, Ackrell BA, Cochran B, Hederstedt L (1998) Carboxin resistance in *Paracoccus denitrificans* conferred by a mutation in the membrane-anchor domain of succinate:quinone reductase. *Arch Microbiol* 170:27-37.
- Matsson M, Hederstedt L (2001) The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *J Bioenerg Biomembr* 33:99-105.
- Mooibroek H, Kuipers AG, Sietsma JH, Punt PJ, Wessels JG (1990) Introduction of hygromycin B resistance into *Schizophyllum commune*: preferential methylation of donor DNA. *Mol Gen Genet* 222:41-48
- Moore D (1967) Four new linkage groups in *Coprinus lagopus*. *Genet Res* 9:331-342
- Motoba K, Uchida M, Tada E (1988) Mode of antifungal action and selectivity of flutolanil. *Agric. Biol. Chem.* 52:1445-1449.
- Muraguchi H, Kamada T (1998) The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development* 125:3133-3141
- Muraguchi H, Kamada T (2000) A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 29:49-59
- Muraguchi H, Kamada T, Yanagi SO (2005) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience* 46:49-53
- Murata Y, Fujii M, Zolan ME, Kamada T (1998) Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 149:1753-1761
- Mutasa ES, Tymon AM, Gotgens B, Mellon FM, Little PFR, Casselton LA (1990) Molecular organisation of an A mating type factor of the basidiomycete fungus

- Coprinus cinereus*. Curr Genet 18:223-229
- North J (1987) Linkage map of *Coprinus cinereus* (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- North J (1990) Linkage map of *Coprinus cinereus* (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- O'Shea SF, Chaure PT, Halsall JR, Olesnicki NS, Leibbrandt A, Connerton IF, Casselton LA (1998) A large pheromone and receptor gene complex determines multiple B mating type specificities in *Coprinus cinereus*. Genetics 148:1081-1090
- Ogawa M (1978) Biology of matsutake mushroom. Tsukiji Shokan, Tokyo
- Ohara H, Ogawa M (1982) Microbial ecology of "shiro" in *Tricholoma matsutake* and its allied species XI. Trans. Mycol. Soc. Jpn 23:365-377
- Peng M, Singh NK, Lemke PA (1992) Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. Curr Genet 22:53-59
- Pukkila PJ (1992) Methods of genetic manipulation in *Coprinus cinereus*. Gordon and Breach, Philadelphia
- Pukkila PJ, Casselton LA (1991) Molecular genetics of the agaric *Coprinus cinereus*. In: W. BJ, Lasure LL (eds) More gene manipulations in fungi. Academic Press, San Diego, pp 126-150.
- Rao PS, Niederpruem DJ (1969) Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (*sensu* Buller). J. Bacteriol 100:1222-1228
- Rost B, Fariselli P, Casadio R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. Protein Sci 5:1704-1718.
- Royse DJ, May B (1982) Genetic relatedness and its application in selective breeding of *Agaricus brunnescens*. Mycologia 74:564-575
- Royse DJ, Spear MC, May B (1983) Cell line authentication and genetic relatedness of lines of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. J. Gen. Appl. Microbiol. 29:597-603
- Sagawa I, Tanaka M, Nagata Y (1992) Discrimination of mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length polymorphism. J. Gen. Appl. Microbiol. 38:597-603
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J (1998) A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase

- determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr Genet* 34:393-398.
- Skrzynia C, Binninger DM, Alspaugh JA, 2nd, Pukkila PJ (1989) Molecular characterization of TRP1, a gene coding for tryptophan synthetase in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Gene* 81:73-82.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38:1409-1438
- Summerbell RC, Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1989) Inheritance of restriction fragment length polymorphisms in *Agaricus brunnescens*. *Genetics* 123:293-300
- Swamy S, Uno I, Ishikawa T (1984) Morphogenetic effects of mutations at the A and B incompatibility factors in *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* 130:3219-3224
- Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl Environ Microbiol* 62:4323-4328
- Takemaru T (1982) Genetic map of *Coprinus macrorhizus*. Kyoritsu, Tokyo
- Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida T (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42:271-276.
- Tucker AN, Lillich TT (1974) Effect of the systemic fungicide carboxin on electron transport function in membranes of *Micrococcus denitrificans*. *Antimicrob Agents Chemother* 6:572-578.
- Ulrich JT, Mathre DE (1972) Mode of action of oxathiin systemic fungicides. V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 110:628-632.
- Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258-274
- White GA, Thorn GD, Georgopoulos SG (1978) Oxathiin carboxamides highly active against carboxin-resistant succinic dehydrogenase complexes from carboxin-selected mutants of *Ustilago maydis* and *Aspergillus nidulans*. *Pest Biochem Physiol* 9:165-182.

- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531-6535
- Williams JGK, Kubelik AR, Rafalski JA, Tingey SV (1991) Genetic analysis with RAPD markers. Academic Press, San Diego
- Wu MMJ, Cassidy JR, Pukkila PJ (1983) Polymorphisms in DNA of *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* 7:385-392
- Xu JR, Leslie JF (1996) A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetics* 143:175-189
- Yadav JS, Quensen JF, 3rd, Tiedje JM, Reddy CA (1995) Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl Environ Microbiol* 61:2560-2565
- Yang X, Yu L, He D, Yu CA (1998) The quinone-binding site in succinate-ubiquinone reductase from *Escherichia coli*. Quinone-binding domain and amino acid residues involved in quinone binding. *J Biol Chem* 273:31916-31923
- Yu L, Wei YY, Usui S, Yu CA (1992) Cytochrome b560 (QPs1) of mitochondrial succinate-ubiquinone reductase. Immunochemistry, cloning, and nucleotide sequencing. *J Biol Chem* 267:24508-24515.
- Yui Y, Katayose Y, Shishido K (1988) Two linear plasmid-like DNA elements simultaneously maintained in *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta* 951:53-60
- Zeller SM, Togashi K (1934) The American and Japanese matsu-takes. *Mycologia* 26:544-558
- Zickler D, Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33:603-754
- Zolan ME (1995) Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev* 59:686-698
- Zolan ME, Crittenden JR, Heyler NK, Seitz LC (1992) Efficient isolation and mapping of rad genes of the fungus *Coprinus cinereus* using chromosome-specific libraries. *Nucleic Acids Res* 20:3993-3999.
- Zolan ME, Heyler NK, Stassen NY (1994) Inheritance of chromosome-length polymorphisms in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 137:87-94

Zolan ME, K. HN, A. RM (1993) Gene mapping using marker chromosomes in
Coprinus cinereus. American Society for Microbiology, Washington