



# 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。



【 3 4 0 】

氏 名・（本 籍） 伊藤 康博 （ 広島県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

学 位 記 番 号 博ろ第71号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年9月16日

【 学位論文題目 】

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

審 査 委 員

主 査 教 授 上島 脩志  
教 授 中村 千春  
教 授 水野 雅史

(別紙様式3)

## 論文内容の要旨

氏名 伊藤 康博

## 論文題目：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

キノコは近年、食品・医薬品として、また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。キノコとは糸状細胞で体が形成されている真核性の菌類のうち、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」を形成する菌類の総称で、担子菌及び子のう菌の一部などが含まれる。そのうち、シイタケ、エノキタケ、マツタケ、スエヒロタケなど多くの有用種が担子菌に含まれる。担子菌類は実用的に非常に重要な種であるに関わらず、他生物に比べ遺伝子情報が少ないなどその研究基盤は十分に整備されていないのが現状である。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図るためには、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。担子菌の一種ネナガノヒトヨタケは、多くの有用種と共通する特性を示しつつ2週間程度の短期間で生活環が進むため、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、ネナガノヒトヨタケを用い、担子菌研究に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目的として、①random amplified polymorphic DNA (RAPD)法を適用したDNAマーカーの確立とその種・系統識別への利用、②DNAマーカーによる遺伝地図の作成、③遺伝子組換え体選抜マーカーとなる遺伝子の開発について検討を行った。

まず第1章では、担子菌について、その利用と研究に関する現状、またその特異な生態を概説するとともに、本研究の目的と本論文の構成について述べた。

第2章では、RAPD法を利用した担子菌の種及び系統識別法の確立に関する研究を行った。従来、担子菌の種や系統の識別は主に子実体の形態によって行われており、菌糸の形態からこれを識別することは容易ではない。しかし、多くの種において実験室の環境では菌糸培養は容易でも子実体を形成させることは困難であり、菌糸から種や系統を識別できる簡便な方法の開発が望まれている。

そこで本章では操作が容易なDNA多型性検出法であるRAPD法に着目し、種及び系統の識別が可能であるか否かを検討した。まずネナガノヒトヨタケ及び近縁5種のRAPDパターンを比較したところ、種内系統間では類似したRAPDパターンを示すのに対し、異種間では著しく異なるパターンが認められた。これを利用し、ヒトヨタケ属の種不明株について種の同定ができた。またネナガノヒトヨタケ7系統、ヤケノヒトヨタケ4系統を供試し、それぞれ1または2プライマーを用いたRAPD解析を行うことにより、各系統を完全に識別できた。さらに、本法の適用によりマツタケ及び近縁4種に関しても種識別ができた。これらのことから、本法が担子菌の種及び系統識別に利用可能であることが分かった。なお、ネナガノヒトヨタケの一核菌糸2系統を交配し、減数分裂を経て得られた担子胞子由来の菌株をRAPD法で解析した結果、交配及び減数分裂の過程を通してRAPDマーカーが後代へ伝達されることが明らかとなった。このことから、担子菌においても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単離などにもRAPD法の適用が可能であると考えられた。

第3章では、ネナガノヒトヨタケの遺伝地図構築に関する研究を行った。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源となるが、これまでにネナガノヒトヨタケでは、表現型マーカーなどによる部分的な連鎖地図が作成されているのみである。そこで本研究では、RAPD及びRFLPマーカーによるネナガノヒトヨタケの遺伝地図の構築を行った。まず、野生型株KF<sub>3</sub>#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(*Amu1Bmu1*)#326を交配して得られた担子胞子後代40株からなるマッピング集団を育成した。次にこの集団を用いて、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遺伝子座の分離様式を調べ、1346 cMをカバーする13の連鎖群からなる連鎖地図を構築した。本菌のゲノムは13本の染色体よりなることが知られている。そこで、同定された13の連鎖群が、contour-clamped homogenous electric field (CHEF)電気泳動で分離した13本の染色体と対応していることをサザン解析により確認した。さらに、CHEF電気泳動による核型解析から両親及び後代の株間で多くの染色体長多型(chromosome length polymorphisms; CLP)を検出し、このうち染色体III及びXIIIに関しては、連鎖地図上におけるマーカーの配置状態を解析することによりCLPの原因となる候補領域を同定することができた。本研究でマッピング集団の親系統に用いた#326株は交配を経ずに性的生長が進行する変異体であり、新たに子実体形成や減数分裂などの性的形質に関わる遺伝子に変異が生じた場合、当代でその表現型が現れるので形質評価が容易である。本研究で構築された連鎖地図は本株に対応しているので、そのような変異遺伝子のマッピングを迅速に行うことができるため、高い利用価値があると言える。

第4章では、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利用できる薬剤耐性遺伝子の開発を行った。これまで本菌では、遺伝子組換え体選抜マーカーとして主に栄養要求性相補遺伝子が用いられてきたが、その利用は宿主株が栄養要求性株に限られるという問題点があるため、野生株でも利用できる薬剤耐性遺伝子のようなマーカー遺伝子の開発が望まれていた。そこで第1節ではまず、5種の薬剤及び5種の担子菌類を用いて薬剤耐性菌のスクリーニングを行ったところ、スエヒロタケのみが薬剤フルトラニルに耐性を示すことを見出した。そこで原因と考えられるスエヒロタケ由来 *sdhIP* 遺伝子を単離し、これをネナガノヒトヨタケに導入して耐性を付与できるか否かを検討したところ、この遺伝子には耐性付与能は認められなかった。しかし、この実験の過程で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変異株 (FR-1) を取得することができた。そこで第2節ではこの耐性変異遺伝子の単離を試みた。まず、RAPD マーカーを利用した連鎖解析によりこの遺伝子が座乗する染色体を同定し、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た。次にこのライブラリからネナガノヒトヨタケ野生株に薬剤耐性を付与する能力があるコスミドクローンを選抜した。このクローンの解析から、本変異はコハク酸脱水素酵素(SDH)複合体のチトクロム *b<sub>500</sub>* サブユニットをコードする *sdhC* 遺伝子の一塩基置換により生じたことが明らかとなった。ネナガノヒトヨタケに対して本変異遺伝子の組換え処理を行いフルトラニルによる選抜を行ったところ、多数の組換え体を取得できた。このことから、本遺伝子は組換え体選抜マーカーとして利用可能であると結論付けた。フルトラニルは人体に対して毒性が低いこと、本遺伝子は比較的短い DNA 断片 (1.4 kb) で利用できるため扱いが容易であることなどの点からも、この遺伝子組換え系は優れた実験系であるといえる。次に本変異遺伝子の性質を明らかにするために、変異株(FR-1)及び2系統の変異型 *sdhC* 遺伝子組換え株について SDH 活性を測定した。フルトラニル 5  $\mu$ M 存在下において、野生株の酵素活性はほぼ完全に抑制されるのに対し、FR-1、5 コピーの変異型遺伝子を持つ組換え株、及び1 コピーの組換え株では、それぞれ無処理区の 41.1%、25.6%及び9.7%の酵素活性を維持しており、本変異遺伝子によるフルトラニル耐性は、SDH が薬剤耐性型になることにより獲得されることが示唆された。また組換え株の SDH は野生株と変異株 FR-1 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野生株を上回る耐性を示さなかった。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た。FR-1 株では細胞内すべての SDH 複合体が耐性型である。一方、組換え株では内在の野生型及び導入された変異型 *sdhC* 遺伝子の発現により感受性型及び耐性型の両タイプの SDH 複合体が存在するが、導入遺伝子の発現により *SdhC* の総数が増加しても、SDH 複合体を構成する他のサ

ブユニットの数は細胞内で限定されているので、無制限に SDH 複合体の量が増加することはない。したがって供試した多コピー導入株では細胞あたりの変異型 SDH 複合体の数が FR-1 のそれを上回らなかったため、変異株を超える薬剤耐性を示さなかったと考えられた。また本変異により、フルトラニルと類似構造を持つ薬剤カルボキシニンに対しても交叉耐性が獲得されることを見出した。他生物においてカルボキシニン耐性は SDH 複合体におけるサブユニット *SdhIP* 及び *SdhD* をコードする遺伝子の変異により獲得された例が知られているが、*sdhC* における変異で耐性を獲得することを示したのは本研究が初めてであり、フルトラニル及びカルボキシニンの作用機作について新たな知見を得ることができた。

第5章では以上の研究の総括を行うとともに、本研究で得られた遺伝地図及び遺伝子組換えマーカーに関して今後の担子菌研究の発展に果たす役割について考察を行った。

|      |                                  |    |       |
|------|----------------------------------|----|-------|
| 氏名   | 伊藤 康博                            |    |       |
| 論文題目 | 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 |    |       |
| 審査委員 | 区分                               | 職名 | 氏名    |
|      | 主査                               | 教授 | 上島 脩志 |
|      | 副査                               | 教授 | 中村 千春 |
|      | 副査                               | 教授 | 水野 雅史 |
|      | 副査                               |    |       |

印

要旨

キノコとは、糸状細胞で体が形成されている真核性菌類のうち、子実体をつくる菌類の総称で、これには担子菌及び子のう菌の一部などが含まれ、シイタケ、エノキタケ、マツタケ、スエヒロタケなど多くの有用種は担子菌に属する。キノコは食品・医薬品として、また特異的酵素を生産する生物として貴重な遺伝資源であり、近年その利用が盛んになっている。しかし、研究基盤が十分に整備されていないため、他生物に比べ遺伝子情報は少なく、染色体数すらはつきり分かっていない食用種も多い。今後、育種の効率化あるいは有用成分・酵素の高度利用を図るためには、遺伝的情報を十分に集積し、分子生物学的手法を活用していく必要がある。担子菌の一種ネナガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) は、多くの有用種と共通する特性を示し、しかも2週間程度の短期間で生活環が進むので、担子菌のモデル生物としての条件を満たしている。そこで本研究は、ネナガノヒトヨタケを用い、担子菌研究に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目的として、①random amplified polymorphic DNA (RAPD)法を適用したDNAマーカーの確立とその種・系統識別への利用、②DNAマーカーによる連鎖地図の作成、③遺伝子組換え体選抜用のマーカー遺伝子の探索とその機能解析を行ったものである。

第1章では、担子菌について、利用と研究の現状およびその特異な生態を概説するとともに、本研究の目的と論文の構成について述べている。

第2章では、RAPD法を利用した担子菌の種及び系統識別法の確立に関する研究を行っている。従来、担子菌の種・系統の識別は主に子実体の形態によって行われてきたが、多くの種において実験室の環境では菌糸培養は容易でも子実体を形成させることが困難であるため、菌糸から種・系統を識別できる簡便な方法の開発が望まれている。そこで本章では、菌糸から抽出したDNAを用い、操作が容易なDNA多型検出法であるRAPD法によって種・系統の識別が可能であるか否かを検討した。まず、ネナガノヒトヨタケとその近縁5種16系統及びヒトヨタケ (*Coprinus*) 属の種が不明な1系統についてRAPDパターンを比較し、種内系統間では類似したパターンを示すが異種間ではそれが著しく異なること、種の不明な1系統はネナガノヒトヨタケであることを明らかにした。また、ネナガノヒトヨタケ7系統、ヤケノヒトヨタケ (*C. angulatus*) 4系統については、それぞれ1または2プライマーを用いたRAPD解析により、供試系統のすべてが識別できることを示した。さらに、RAPD法はマツタケ (*Tricholoma matsutake*) 及びその近縁種の種識別にも有効であることを確認し、本法が担子菌の種及び系統の識別に利用可能であると結論している。なお、2系統のネナガノヒトヨタケの交配で得た子実体由来する担子胞子から生じた18菌株を用いてRAPD解析を行い、RAPDマーカーが交配及び減数分裂の過程を通して後代へ遺伝することを明らかにし、連鎖地図の作成やこれを利用した遺伝子クローニングなどにもRAPD法の適用が可能であることを示唆している。

第3章では、ネナガノヒトヨタケの連鎖地図構築に関する研究結果を記述している。染色体全域にDNAマーカーが配置された連鎖地図はゲノム解析や遺伝子単離等の研究を行う際の基礎的情報源となるが、ネナガノヒトヨタケでは、これまで表現型マーカーによる部分的な連鎖地図が作成されているのみであった。そこで本章では、野生型株 KF<sub>3</sub>#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 (*AnutBmut*) #326 とを交配して得られた担子胞子後代 40 株からなるマッピング集団を育成し、これを用いて、219 の RAPD マーカー、28 の RFLP マーカーならびに A 及び B 遺伝子座

|    |       |
|----|-------|
| 氏名 | 伊藤 康博 |
|----|-------|

の分離様式を調べ、13の連鎖群からなる全長1346 cMの連鎖地図を構築した。また、本菌のゲノムは13本の染色体よりなることが知られているので、contour-clamped homogenous electric field (CHEF)電気泳動法で分離した13本の染色体に対するサザン解析を行い、同定された各連鎖群と染色体との対応関係を明らかにした。さらに、CHEF電気泳動により、ほとんどの染色体において両親及び後代の株間で染色体長多型(chromosome length polymorphisms; CLP)が存在することを見出し、これらのうち染色体 III 及び XIII に関しては、連鎖地図上におけるマーカー間の組換え位置と染色体長との関係を解析することにより、CLPの原因となる候補領域を推定している。

第4章では、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利用できる薬剤耐性遺伝子の探索とその機能解析を行っている。これまで本菌では、遺伝子組換え体選抜マーカーとして主に栄養要求性相補遺伝子が用いられてきたが、その利用は宿主株が栄養要求性株に限られるため、野生株でも利用できる薬剤耐性遺伝子のようなマーカー遺伝子が求められている。そこで第1節では、5種の薬剤及び5種の担子菌類を用いて薬剤耐性菌のスクリーニングを行った。その結果、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) のみが薬剤フルトラニルに耐性を示すことを見出した。そこで原因と考えられる *sdh1P* 遺伝子をクローニングし、これをネナガノヒトヨタケに導入して耐性を付与できるか否かを検討したところ、この遺伝子には耐性付与能は認められなかった。しかし、この実験の過程で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変異株 (FR-1) を取得することができた。そこで第2節ではこの変異の原因遺伝子の単離を試みた。まず、原因遺伝子と組換え価約16%で連鎖する RAPD 断片 (OPG10-1000) をプローブとして13本の染色体に対するサザンハイブリダイゼーションを行い、この遺伝子が約3.2 Mbpの染色体に座乗することを同定した。次いで、この染色体断片を組み込んだ864クローンからなるコスミドライブラリの中から、ネナガノヒトヨタケ野生株にフルトラニル耐性を付与する能力があるコスミドクローンを選抜し、このクローンの解析から、本変異はコハク酸脱水素酵素(SDH)複合体のチトクロム *b<sub>500</sub>* サブユニットをコードする *sdhC* 遺伝子の一塩基置換により生じたことを明らかにした。そして、ネナガノヒトヨタケに対して本変異遺伝子の組換え試験を行った結果、フルトラニル耐性を有する多数の組換え体を選抜することができたことから、本遺伝子は組換え体選抜マーカーとして利用可能であると結論付けている。さらに、変異株(FR-1)及び2系統の変異型 *sdhC* 遺伝子組換え株についてSDH活性を測定したところ、フルトラニル5 µM存在下において、野生株の酵素活性はほぼ完全に抑制されるのに対し、FR-1ではフルトラニル無添加区の41.1%、変異型 *sdhC* 遺伝子が5コピー導入された組換え株#292-1では25.6%、1コピー導入株#292-4では9.7%の酵素活性を維持していたことから、本変異遺伝子によるフルトラニル耐性は、コハク酸脱水素酵素が薬剤耐性型になることにより獲得されたと推察している。また、フルトラニルによるSDH活性抑制の程度が、変異株FR-1より組換え株で大きかった理由として、変異株FR-1株の細胞内において生産されるSDH複合体のすべてが耐性型であるのに対し、組換え体では外来の変異型と内在の野生型 *SdhC* がともに発現する結果、細胞内の耐性型SDH複合体の量はFR-1株のそれを超えなかったためであることを示唆している。なお、本変異により、フルトラニルと類似した構造をもつ薬剤であるカルボキシニンに対しても交差耐性が獲得されることも見出している。

第5章では以上の研究の総括を行うとともに、本研究で得られた連鎖地図及び遺伝子組換えマーカーが今後の担子菌研究の発展に果たす役割について考察している。

以上のように、本研究はネナガノヒトヨタケを用いて、RAPD法の適用によるDNAマーカーの確立とその種・系統識別への利用、DNAマーカーによる連鎖地図の作成とその染色体への対応付け、遺伝子組換え体選抜マーカーとしてのフルトラニル耐性遺伝子の同定とその機能解析を行ったものであり、担子菌研究に分子生物学的手法を適用するための基礎となる重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。

よって、学位申請者の伊藤康博は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。

- ・特記事項 なし
- ・特許登録数 0件
- ・発表論文数 12編