

学位論文題名

担子菌エノキタケの子実体形成過程に特異的に発現する
遺伝子の単離と解析

学位論文内容の要旨

担子菌は動、植物には見られない特徴的な生活史を持つが、その中でも子実体の形成は特にユニークな現象である。子実体の形成機構を解明することは、基礎研究的な意義の他に、きのこ生産における質的、量的な改良への応用につながることで将来期待される。

本研究はエノキタケの子実体形成機構を遺伝子発現のレベルで解明するための第一段階として、子実体形成時に特異的に発現する遺伝子を単離し、その解析を行なうことを目的に行なわれた。

研究内容は以下の項目に大別される。

1. 子実体形成過程における形態的変化の観察

エノキタケの子実体形成過程における形態的な変化を顕微鏡観察することにより、発茸処理後の菌糸が示す最初の形態的変化、またそれが認められる時期を確認した。その結果、発茸処理後7日目の菌体において、それまで分枝が少なく比較的まっすぐ伸びていた菌糸が、盛んに分枝し始めるという最初の形態的変化が認められた。そこでこの分枝を始めた菌糸を分化の開始期として、この時期に特異的に発現する遺伝子をディファレンシャルスクリーニングにより単離することにした。

2. 子実体形成に特異的に発現する遺伝子の単離

まずディファレンシャルスクリーニングを行うのに必要な cDNA ライブラリーの作製を行った。木粉培地で栽培した菌体から全 RNA を単離する方法を検討し、従来の AGPC 法から破碎の段階で一部改変することにより、RNase の分解を受けない、純度の高い全 RNA 標品を得ることが出来た。この方法により発茸処理後7日目の子実体形成初期過程の全 RNA から poly(A)⁺ RNA を精製し、さらに cDNA を合成し、λgt10 に挿入することにより、 7.8×10^4 個の形質転換体からなる cDNA ライブラリーを作製した。

作製した cDNA ライブラリーを用いて、発茸処理前の菌体と発茸処理後 7 日目の菌体との間でディファレンシャルスクリーニングを行った。発現量に差の認められた 19 個のクローンについてクロスハイブリダイゼーション、ノーザン解析を行うことにより、7 日目の菌体で強く発現するクローンが 1 つ得られた。このクローンに相当する遺伝子を FDS (*Flammulina velutipes differentiation specific*) 遺伝子と名付け以降の解析に供した。

3. FDS 遺伝子の発現解析

単離した遺伝子の発茸処理前から子実体形成までの発現レベルの変化を調べた結果、発茸処理前、1 日目の菌体では全く発現が認められなかったが、4 日目の菌体で著しい発現が認められその後、21 日目まではほぼ同程度の発現を示した。発茸処理後 4 日目には菌体が部分的に褐色になること、また以前に行なった二次元電気泳動によるタンパク質の変動の解析から、発茸処理後 5 日目の菌体は他の分化段階の菌体よりもタンパク質の総スポット数、特異的なスポット数ともに最大の値を示すことから、この時期の菌体の内部では既に子実体形成に向けて何らかの生化学的な変化が開始していることが予想されており、今回単離した遺伝子もこの時期から既に分化に関わっていること、また子実体の発達にも継続的に関わっていることが予測された。

またヒラタケ、タモギタケ、シイタケの子実体から全 RNA を単離しノーザン解析を行なったが、FDS 遺伝子の発現は全く見られなかった。

4. FDS 遺伝子の構造解析

FDS 遺伝子の同定、または機能推定を行なうため、塩基配列の決定を行なった。単離した cDNA クローンは FDS mRNA 5' 末端を欠失していたが、プライマー伸長法で FDS mRNA 5' 末端を決定することにより全 ORF を含む塩基配列を決定することが出来た。その結果 FDS mRNA は全長 743 b (poly A 鎖を除く) で、612 b の ORF を有しており、この ORF は 204 個のアミノ酸残基からなり、分子量約 22.6 kDa、等電点 4.58 のタンパク質をコードしていることが予測された。データベースを用いたホモロジー解析では高い相同性を示す遺伝子、タンパク質は検出されなかった。またモチーフ検索を行なったが、タンパク質の機能を予測できるようなアミノ酸配列は検索されなかった。

ゲノミックサザン解析により、エノキタケゲノム中の FDS 遺伝子のコピー数を調べたところ、FDS 遺伝子はシングルコピーで存在することが明らかとなった。

またゲノミックサザン解析によりシロタモギタケ、ヒラタケ、タモギタケ、シイタケ、ナメコのゲノム中の FDS 遺伝子の検出を試みたが、ハイブリダイズシグナルは見られなかった。また今回の実験で用いたものを含めた 6 系統のエノキタケでも同様に解析を行なったところ全ての系統においてハイブリダイゼーションシグナルが見ら

れた。またシグナルの位置もほとんどの系統で同じ位置に見られた。このことから FDS 遺伝子の構造は種内ではよく保存されているが、種が異なるとかなり塩基配列が異なっていることが予想された。

5. FDS をコードするゲノミッククローンの選抜と構造解析

エノキタケゲノムライブラリーを作成し、FDS 遺伝子のゲノミッククローンを単離した。5' 上流域約 1 kbp を含む約 2 kbp の塩基配列を決定した。FDS 遺伝子は ORF 中に 1 つ、3' 非コード領域に 1 つのイントロンを有していた。各イントロンの両端の配列は GT-AG ルールと一致していた。また真核生物のイントロン内でよく保存された、3' スプライス部位付近にある分岐点の A ヌクレオチドを含むコンセンサス配列に類似した配列が見られた。転写開始点の 35 bp 上流に基本的転写調節配列である TATA-box が存在した。また同じく 70 bp 上流付近に転写調節配列 CAAT-box に類似した配列が見られた。転写開始点付近には、糸状菌の多量に発現する遺伝子の転写開始点付近、またはすぐ上流によく見られる CT に富んだ配列が存在した。

以上の結果から本研究では、子実体形成に関わると思われるこれまでに報告例のない新しい遺伝子を単離することが出来たと結論される。これまでも他の担子菌で子実体、または原基形成時に強く発現する遺伝子が単離され、一部解析が進められているが、今回単離した遺伝子のように形態的变化が認められる前の、分化の最も初期の段階から発現するというタイプのものはこれまでに例がなく、この遺伝子が子実体分化にどのように関わっているのか非常に興味深い。今回の解析ではこの遺伝子がコードするタンパク質の機能に関する情報は得られなかった。よって今後の研究はこの遺伝子の機能の解明に向けられる。担子菌では、動植物のように、ベクター系、強力なプロモーターが開発されていないため、この遺伝子の機能を調べていくにはこれらの実験系を確立していくことが必要である。他の方法としては *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子の組織的局在の解析、あるいは、担子菌ではまだ報告例は見られないが、遺伝子破壊による変異体を用いた解析などが考えられる。今後解析が進むことによりこの遺伝子の機能が明かとなることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 實
副 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 助 教 授 三 浦 清

学 位 論 文 題 名

担子菌エノキタケの子実体形成過程に特異的に発現する 遺伝子の単離と解析

本論文は、図 40、表 3、引用文献 82 を含む総頁数 95 の和文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

担子菌は動、植物には見られない特徴的な生活史を持つが、その中でも子実体の形成は特にユニークな現象である。子実体の形成機構を解明することは、基礎研究的な意義の他に、きのこ生産における質的、量的な改良への応用につながるものが将来期待される。

本研究はエノキタケの子実体形成機構を遺伝子発現のレベルで解明するための第一段階として、子実体形成時に特異的に発現する遺伝子を単離し、その解析を行なうことを目的に行なわれた。

研究内容は以下の項目に大別される。

1. 子実体形成過程における形態的変化の観察

エノキタケの子実体形成過程における形態的な変化を顕微鏡観察することにより、発茸処理後の菌糸が示す最初の形態的変化、またそれが認められる時期を確認した。SEM による観察を行なった結果、発茸処理後 7 日目の菌体において、それまで分枝が少なく比較的まっすぐ伸びていた菌糸が、盛んに分枝し始めるという最初の形態的変化が認められた。そこでこの変化を子実体分化の開始期とした。

2. 子実体形成に特異的に発現する遺伝子の単離

発茸処理後 7 日目の菌体から cDNA ライブラリーを作製し、発茸処理前の菌体と発茸処理後 7 日目の菌体との間でディファレンシャルスクリーニングを行った。その結果 7 日目の菌体で強く発現する遺伝子が 1 つ得られ、FDS (*Flammulina velutipes* differentiation specific) 遺伝子と名付けた。

3. FDS 遺伝子の発現解析

ノーザン解析により、発茸処理前から子実体形成までの FDS 遺伝子の発現レベルの変化を調べた。その結果、FDS 遺伝子は発茸処理前、発茸処理後 1 日目の菌体では全く発現が認められなかったが、4 日目の菌体で著しい発現が認められその後、21 日目までほぼ同程度の発現を示した。発茸処理後 4 日目にはそれまで白色であった菌体が部分的に褐色になることが肉眼で観察されたこと、また以前に行なった二次元電気泳動によるタンパク質の変動の解析から、発茸処理後 5 日目の菌体はタンパク質の総スポット数、特異的なスポット数ともに最大の値を示すことから、この時期の菌体の内部では既に子実体形成に向けて何らかの生化学的な変化が開始していると考えられ、今回単離した遺伝子もこの時期から既に分化に関わっていること、また子実体の成熟にも継続的に関わっていることが予想された。

また、他種の担子菌の子実体を用いてノーザン解析を行なったが、FDS 遺伝子の発現は全く認められなかった。

4. FDS 遺伝子の構造解析

FDS 遺伝子の同定、または機能推定を行なうため、塩基配列を決定した。この cDNA クローンは FDS mRNA 5' 末端を欠失していたが、プライマー伸長法で FDS mRNA 5' 末端を決定することにより全ての読み取り枠 (ORF) を含む塩基配列を決定することが出来た。その結果 FDS mRNA は全長 743 b (poly A 鎖を除く) で、612 b の ORF を有しており、この ORF は 204 個のアミノ酸残基からなり、分子量約 22.6 kDa、等電点 4.58 のタンパク質をコードしていることが予測された。データベースを用いたホモロジー解析、モチーフ検索を行なったが、タンパク質の機能推定には至らなかった。

ゲノミックサザン解析により、FDS 遺伝子はゲノム中にシングルコピーで存在することが明らかとなった。また別系統のエノキタケでも、ほとんどの系統において同じ位置にシグナルが認められた。しかし他種の担子菌では FDS 遺伝子は検出できなかった。このことから FDS 遺伝子は種により塩基配列にかなり差異があることが予想された。

5. FDS をコードするゲノミッククローンの選抜と構造解析

エノキタケゲノムライブラリーを作成し、FDS 遺伝子のゲノミッククローンを単離した。FDS 遺伝子は ORF 中に 1 つ、3' 非コード領域に 1 つのイントロンを有していた。各イントロン内の 3' 側の領域には真核生物の多くのイントロンに共通のブランチポイントの配列が認められた。転写開始点の 35b 上流には TATA-box が存在し、同じく 70 bp 上流付近には CAAT-box に類似した配列が見られた。また転写開始点付近とその上流域には、糸状菌において多量に発現する遺伝子の上流域によく見られる CT リッチな配列が存在した。

以上、本研究は、エノキタケの子実体形成過程の形態的变化の顕微鏡観察をもとに、

発茸処理後 7 日目に特異的に発現する遺伝子を特定・単離し、その構造を解明した。担子菌の分化に関する分子生物学的研究における基礎的新知見をもたらした。

よって、審査員一同は、最終試験の結果とあわせ、本論文の提出者 東 智則は、博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。