

学位論文題名

担子菌エノキタケの子実体形成に関わる遺伝子の単離と解析

学位論文内容の要旨

担子菌の子実体形成のメカニズムは複雑であり、そのメカニズムに関する分子生物学的研究はまだ少ない。担子菌の子実体形成に関わる遺伝子の単離と解析は、子実体形成のメカニズムの解明とともに、まだ食用キノコのうちで栽培が困難であるキノコや栽培キノコの生産における質的、量的な改良への基礎知見として期待される。

本研究は、エノキタケの子実体形成に関わる遺伝子を単離し、その遺伝子の解析と染色体上の位置を調べることを目的として行われた。

研究内容は、以下の項目に大別される。

1. 子実体形成過程に関わる遺伝子の単離

子実体形成に関わる遺伝子の単離のためcDNAを合成し、発茸処理後7日目と14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なった。その結果、7日目の菌体で強く発現する7つのクローンを選抜した。栄養菌糸体0日目から発茸処理後の1、4、7、10、14、21日目の菌体の全RNAを単離し、ノーザン分析を行なった結果、発茸処理後1日目から4日目まで強く発現して14日目まで徐々に下がるパターンを示したクローンをFVFD16(*Flammulina velutipes* Fruit Body Differentiation)、また1日目から7日目まで徐々に強くなって10日目まで下がるパターンを示したクローンをFVFD30(*Flammulina velutipes* Fruit Body Differentiation)と名付けた。

走査型電子顕微鏡を用いて発茸処理後の菌体の形態の観察結果、7日目菌体から初めて菌叢形態の変化が認められた。また、二次元電気泳動によるタンパク質の変動の解析から、発茸処理から5~7日目の菌体は他の時期よりタンパク質の総スポット数も、特異的に存在するスポット数も多い等の結果が得られた。発茸処理から子実体形成初期における特異的遺伝子の関与が予想された。

今回単離したFVFD16とFVFD30遺伝子も、発茸処理後4~7日目に特異的発現が認められたことから、子実体形成に関わっていることが予想された。

2. FVFD16とFVFD30遺伝子の構造解析

FVFD16とFVFD30遺伝子の機能推定を行うため塩基配列を決定した。FVFD16遺伝子は、128アミノ酸残基からなり、13.5 kDaのタンパク質をコードしていることが予測された。またFVFD30遺伝子は319アミノ酸残基からなり、34.5 kDaのタンパク質をコードしていることが予測された。FVFD16とFVFD30遺伝子のデータベースを用いたホモロジー解析と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。PSORTデータベースの検索の結果、FVFD16遺伝子がコードしているタンパク質は、N-ターミナルを有する疎水性の高い、分泌性タンパク質、あるいは膜内に存在するタンパク質と推定された。また、FVFD30遺伝子がコードしているタンパク質は細胞質内に存在するタンパク質か、あるいはペルオキシソームに存在するタンパク質と予想された。

3. FVFD16とFVFD30遺伝子のゲノム遺伝子の構造解析とゲノミックサザン分析

FVFD16とFVFD30遺伝子のゲノム遺伝子の構造解析のため、ゲノムライブラリーを作製した。FVFD16とFVFD30遺伝子のそれぞれ4つのポジティブクローンを選抜して、サブクローニングにより塩基配列の解析を行なった。FVFD16遺伝子は、5'上流部位の99にTATAボックスが、そして108部位にはCAATの存在が認められた。また、ORF領域内に真核生物で通常スプライシングが起こる部位と

してGT/AGルールと一致する2つのイントロンが存在していた。しかし、FVFD16は、ジーンファミリーと思われるゲノムクローンが単離された。FVFD30遺伝子は、5'上流部位の229にTATAボックスが存在し、310領域にCAATと推測される配列が存在した。翻訳開始時に重要な配列と言われるCCACC配列も、5'上流部位の22の部位に存在していた。50bpくらいの短い配列を持つイントロンがORF領域内に4つ存在し、イントロン末端配列はGT/AGルールと一致する配列が存在していた。

FVFD16とFVFD30遺伝子のコピー数の解析のため、ゲノミックサザンを行なった結果、FVFD16とFVFD30遺伝子は2つ以上のジーンファミリーメンバーの存在が推測された。

4. 電気泳動による染色体DNAの分離と各遺伝子の染色体上における存在の解析

エノキクケの二核菌糸と一核菌糸の染色体数とディファレンシャルスクリーニングにより単離した10個の遺伝子の染色体上の位置を調べるため、パルスフィールド泳動法とサザンハイブリダイゼーションを行なった。二核菌糸と一核菌糸は泳動ゲルのエチジウムブロマイド染色により、それぞれ6本と8本の染色体が認められた。しかし、サザンハイブリダイゼーションを行なった結果、エチジウムブロマイド染色では明瞭なバンドが得られなかった二核菌糸のII、VII染色体で明瞭なバンドが得られた。またIV、V、VIの3つの染色体が重なっていることを明らかにした。また、サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブに対して二核菌糸の各染色体の相同染色体が認められた。

こうしたパルスフィールド泳動法とサザンハイブリダイゼーションにより、エノキクケの二核菌糸と一核菌糸の染色体数は、それぞれは6本と12本であることを明らかにした。また、子実体形成過程に特異的に発現する10個の遺伝子はエノキクケ染色体上に散在して位置していることがわかった。

以上の結果より、今回単離したFVFD16とFVFD30遺伝子は、

子実体形成過程の初期になんらかの働きをしている遺伝子と推定される。しかし、まだこれらの遺伝子が子実体形成時にどのような働きをするのかについては明確にわかっていない。

FVFD16 と FVFD30 遺伝子には、ゲノミックサザン分析の結果、2つ以上のコピー数、あるいはジーンファミリーの存在が予測された。今後、FVFD16 と FVFD30 遺伝子の機能の解明と、FVFD16 と FVFD30 遺伝子にそれぞれの2つ以上存在すると思われるジーンファミリーメンバーを明らかにすることは、エノキクケ子実体形成のメカニズム解析に重要な意義を持つものと考えられる。しかし、担子菌ではまだベクター系、プロモーターが開発されていないため、他の方法として *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がない遺伝子破壊による変異体を用いた解析やアンチセンスRNA法による遺伝子発現の特異的抑制による機能の解析などが考えられる。また、もっと多くのプローブを用いてあるいは、染色体そのものを制限酵素処理することなどによりエノキクケの染色体地図を作製することは、エノキクケ子実体形成のメカニズム解析とともに、4つの異なる交配型因子を持つエノキクケの遺伝関係を明らかにするための基礎知見として重要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 実
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に関わる遺伝子の単離と解析

本論文は、第5章からなり、図 34、表 2、引用文献 84 を含む総頁数 125 の和文論文である。別に参考論文 4 編が添えられている。

本研究は、エノキタケの子実体形成に関わる遺伝子を単離し、その遺伝子の解析と染色体上の位置を調べることを目的として行われた。

研究内容は、以下の項目に大別される。

1. 子実体形成過程に関わる遺伝子の単離

エノキタケの子実体形成に関わる遺伝子の単離のため、cDNAライブラリーを作製し、発茸処理後 7 日目と 14 日目の mRNA を単離してディファレンシャルスクリーニングを行なった。その結果、7 日目の菌体で強く発現する 7 つのクローンを選抜した。ノーザン分析を行なった結果、発茸処理後 1 日目から 4 日目まで強く発現して 14 日目まで徐々に下がるパターンを示したクローンを FVFD 16、また 1 日目から 7 日目まで徐々に強く発現して 10 日目まで下がるパターンを示したクローンを FVFD 30 と名付けた。

走査型電子顕微鏡を用いた発茸処理後の菌体の形態の観察結果、7 日目菌体から初めて菌叢形態の変化が認められた。また、二次元電気泳動によるタンパク質の変動の解析から、発茸処理から 5~7 日目の菌体は、他の時期よりタンパク質の総スポット数も、特異的に存在するスポット数も多い等の結果が得られた。発茸処理から子実体形成初期における特異的遺伝子の関与が予想された。

今回単離した FVFD 16 と FVFD 30 遺伝子も発茸処理後 4~7 日目に特異的発現が認められたことから、子実体形成に関わる遺伝子であることが予想された。

2. FVFD 16 と FVFD 30 遺伝子の構造解析

FVFD 16 と FVFD 30 遺伝子の機能推定を行うため塩基配列を決定した。FVFD 16 遺伝子は、128 アミノ酸残基からなり、13.5kDa のタンパク質をコードしていることが予測された。

また、FVFD 30 遺伝子は、319 アミノ酸残基からなり、34.5 kDaのタンパク質をコードしていることが予測された。FVFD 16 とFVFD 30 遺伝子のデータベースを用いたホモロジー解析と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。PSORTデータベースの検索の結果、FVFD 16 遺伝子は、N-ターミナルを持つ疎水性が高いタンパク質として、分泌性タンパク質あるいは膜内に存在するタンパク質をコードしているものと推定された。また、FVFD 30 遺伝子は、細胞質内に存在するタンパク質あるいはペルオキシソームに存在するタンパク質と予想された。

3. FVFD 16 とFVFD 30 遺伝子のゲノム遺伝子の構造解析とゲノミックサザン分析

FVFD 16 とFVFD 30 遺伝子のゲノム遺伝子の構造解析のためゲノムライブラリーを作製した。FVFD 16 遺伝子は、5' 上流部位の 99 にTATAボックス、108 部位にCAATの存在が認められた。また、ORF 領域内にGT/AGルールと一致する2つのイントロンが存在した。FVFD30 遺伝子は、5' 上流部位の 229 にTATAボックス、310 領域にCAATの配列が存在した。また、22 領域にCCACCの配列が存在した。ORF 領域内にGT/AGルールと一致する4つのイントロンが存在した。

FVFD 16 とFVFD 30 遺伝子のゲノム中におけるコピー数を調べるため、ゲノミックサザンを行なった。その結果、FVFD 16 とFVFD 30 遺伝子にはそれぞれ2つ以上のジーンファミリーメンバーの存在が推測された。

4. 電気泳動法による染色体DNAの分離と各遺伝子の染色体上における位置の解析

エノキタケの一核菌糸と二核菌糸の染色体数、およびディファレンシャルスクリーニングにより単離した10個の遺伝子の染色体上の位置を調べるため、パルスフィールド泳動とサザンハイブリダイゼーションを行なった。一核菌糸と二核菌糸には、泳動ゲルのエチジウムブロマイド染色により6本と9本の染色体が認められたが、サザンハイブリダイゼーションを行なった結果、それぞれ6本と12本であることを明らかにした。また、10個のプロープに対して二核菌糸の各染色体の相同染色体が確認され、10個の遺伝子は、エノキタケ染色体上に散在して位置していることがわかった。

以上、本研究は、エノキタケの子実体形成過程に関わる2個の遺伝子の単離と解析を行なった。また、一核菌糸と二核菌糸の染色体数を明らかにし、10個の遺伝子の染色体上での位置を明らかにした。こうした特異的遺伝子の単離と解析とともに染色体上での位置解析は、将来エノキタケの子実体形成のメカニズム解析のための基礎知見として重要である。

よって、審査員一同は、最終試験の結果とあわせ、本論文の提出者金芝伊は、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。