

学 位 論 文 題 名

エノキタケの子実体誘導要因に対応する
タンパク質の発現挙動

学位論文内容の要旨

多くの食用きのこが含まれる四極性の担子菌類は、和合性を持つ一核菌糸体同士が交配し、核が融合することなく共存しながら栄養成長し、温度変化や光照射などの環境変化により子実体を形成する。このような担子菌類のライフサイクルは非常にユニークであり、その子実体形成機構は非常に興味深い。一般的な食用きのこの子実体形成機構の研究はエノキタケや、シイタケなどで行われているが、それらの研究は、モデル生物であるスエヒロタケなどと比較すると少なく、その子実体形成機構は不明な点が多い。栽培食用きのこの子実体形成機構を研究することは、細胞分化の基礎的な研究としての重要性だけでなく、栽培技術への応用も考えられ、その意味でも重要である。本研究では、日本において生きのことして最も生産量の多いエノキタケを用い、現在までに研究が進んでいる他の四極性担子菌類と比較しながら、子実体形成における分化段階を調べた。また、子実体形成過程におこる細胞内の変化を明らかにするために、子実体形成の各段階におけるタンパク質の発現挙動を詳細に調べた。

子実体形成に関わる諸条件の検討

二核化により発現するタンパク質を調べるために、一核菌糸体の作製を行った。一核菌糸体は、二核菌糸体 Fv-4 菌株を、脱二核化する方法により作製した。その結果、和合性を持つ 2 種類 (M-1, M-5) の菌株を得た。M-1, M-5 は子実体を形成しなかった。M-1, M-5 を交配させた菌株 D-15 は、Fv-4 と同様の子実体形成能を持っていた。

次に、子実体原基形成において環境変化が与える影響について検討した。木粉培地で培養した菌糸体に、それぞれ低温処理、光処理、菌かき処理を別々に行ってその変化を観察した。その結果、エノキタケでは低温処理によって子実体を形成し、光処理、菌かきによって子実体を形成しなかった。また、低温処理によって暗黒下で形成された子実体は傘が未成熟だった (ピンヘッド子実体)。以上のことからエノキタケでは温度低下により子実体原基の形成が誘導されることが明らかになった。

子実体原基が起こった後の、傘の分化段階を調べるために、暗黒下で形成されたピンヘッド子実体に光を照射し、その変化を観察した。光を照射後 2 日目にはピンヘッド子実体の先端が丸く膨らみ、6 日目には柄と傘に分化していた。また、ピンヘッド子実体に光を照射することによって、子実体の着色が観察された。

子実体形成過程の顕微鏡観察

エノキタケの子実体形成過程での分化段階や、各環境変化に対応する形態変化を観察する

ために、顕微鏡による観察を行った。はじめに、通常の子実体誘導処理により形成した子実体原基と、暗黒下で低温処理により形成した子実体原基を比較した。通常の子実体原基では、傘細胞が柄細胞と形態が異なり、すでに分化していることが明らかとなった。また、ピンヘッド子実体は先端付近まで通常の子実体の柄のように細長い菌糸細胞が平行に配列していた。その先端部分はその下部と比べて細胞が短くなっていた。次にピンヘッド子実体に光を照射し、傘が分化する様子を観察した。光を照射して2日目には先端部分が膨らんでいることが確認されたが、傘と柄の接続部分の切れ込みは4日目に観察された。しかし、接続部分の上部と下部では部分的に細胞がつながっており、上部と下部の細胞に明確な形態的な差はみられなかった。光を照射して6日目には、通常の子実体原基の傘と非常によく似た形態を示し、傘と柄が明確に分化していることが確認された。

子実体形成過程に発現する可溶性タンパク質の特定

二核化に伴い発現するタンパク質を調べるために、一核菌糸体と二核菌糸体に発現しているタンパク質を二次元電気泳動により解析した。一核菌糸体と二核菌糸体を比較した結果、二核菌糸体に特異的に発現するタンパク質が5個存在した。一核菌糸体と二核菌糸体に同様の子実体誘導処理を施したところ、一核菌糸体でも二核菌糸体と同様に、子実体誘導処理後新たなタンパク質が発現していることが明らかになった。そのうち二核菌糸体にのみ発現するタンパク質を特定した。二核菌糸体にのみ特異的に発現するタンパク質は、子実体形成に関わる可能性がある。また、子実体に特異的に発現するタンパク質も特定した。

二核化後発現し、子実体形成に関わるタンパク質を特定するために、子実体誘導処理、低温処理、光処理、菌かき処理、それぞれにおいて発現する可溶性タンパク質を二次元電気泳動により解析した。その中でユニークな発現パターンを示したタンパク質は、プロテインシーケンサーにより、その一次構造を解析した。子実体誘導処理により発現するタンパク質の多くは、低温処理により発現が認められた。特に、子実体誘導処理後、培地中の菌糸体から発現が認められ、かつ子実体中にも発現が認められたタンパク質 Pfl, Pf3, Pfd3 は、低温処理によっても非常によく似た発現パターンを示した。しかしながら、子実体誘導処理によって発現するタンパク質のほとんどは、光処理によっても発現が認められなかった。以上のことから、エノキタケの子実体原基の誘導においては、低温処理が最も決定的な役割を果たしていると考えられる。また、Pfl, Pf3 の一次構造解析の結果、子実体誘導処理後発現するとして、エノキタケより単離された遺伝子 FDS と高い相同性を示した。また、子実体中に強い発現を示したタンパク質、FBA1~4 はエノキタケで単離された遺伝子、C1 の推定アミノ酸配列と、高い相同性を示した。C1 は、RGD 細胞接着配列を持っており、FBA1~4 は菌糸同士の接着に関わる可能性が示唆された。

ピンヘッド子実体に光を照射して形成される傘と柄から、可溶性タンパク質を抽出した後、二次元電気泳動にて分離しそれぞれに特異的なタンパク質の特定を行った。傘に特異的に発現したタンパク質は、ピンヘッド子実体及び、光照射後の柄からは検出されなかった。傘に特異的なタンパク質は光によって発現が制御されていると考えられる。また、子実体に特異的な Pfl, Pf3 は、傘と柄の両方に発現が認められた。

子実体形成に関わる細胞壁関連タンパク質の特定

子実体形成過程において、特有の細胞壁関連のタンパク質が関わってと考えられるため、子実体形成の各段階において細胞壁関連タンパク質を抽出し、その発現を比較した。培地中の菌糸体に特異的なタンパク質 (FVH-1) を特定し、一次構造解析を行ったところ、スエヒロタケにおいて子実体形成に関わると考えられているタンパク質、ハイドロホビンと相同性を示した。さらに子実体に特異的なタンパク質、傘に特異的なタンパク質(Pp1)を特定した。

Pp1 は、ピンヘッドタンパク質には存在せず、ピンヘッド子実体に光を照射することにより形成された傘から抽出された。このことから、Pp1 の発現は、光により制御されていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	矢島	崇
副査	教授	寺沢	実
副査	教授	高橋	邦秀
副査	講師	玉井	裕

学位論文題名

エノキタケの子実体誘導要因に対応する タンパク質の発現挙動

本論文は、図 32、表 11、引用文献 204 を含み、7 章からなる総頁数 120 の和文論文であり、他に参考論文 2 編が添付されている。

栽培食用きのこの子実体形成機構を研究することは、細胞分化の基礎的な研究としての重要性だけでなく、その後の栽培技術への応用も考えられ、重要である。本研究では、エノキタケの子実体誘導に関わる環境要因を特定するとともに、各分化段階でのタンパク質の発現挙動を調べ子実体形成過程での細胞内の変化を明らかにした。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 二核菌糸体 Fv-4 菌株を脱二核化する方法により一核菌糸体を作製し、和合性を持つ 2 種類 (M-1, M-5) の菌株を得た。M-1、M-5 は子実体を形成せず、M-1、M-5 を交配させて得た菌株 D-15 は、Fv-4 と同様の子実体形成能を持っていたことから、エノキタケは二核化することにより子実体を形成することを確認した。

次に、木粉培地で培養した菌糸体に、低温処理、光処理、菌かき処理を別々に行ってその変化を観察した。その結果、エノキタケでは低温処理によって子実体を形成し、光処理、菌かき処理によっては子実体を形成しないことが明らかとなった。また、低温処理によって暗黒下で形成された子実体は傘を形成しなかった (ピンヘッド子実体)。以上のことからエノキタケでは温度低下により子実体原基が誘導されることが明らかになった。また、ピンヘッド子実体に光を照射すると、2 週間後には成熟した傘を形成した。このことから、エノキタケでは光により傘が誘導されることが明らかとなった。

2. エノキタケの傘の分化過程を明らかにするために、ピンヘッド子実体に光を照射し、傘が分化する様子を光学顕微鏡にて観察した。ピンヘッド子実体の細胞は、先端付近まで通常の子実体の柄細胞に似た、縦に長い細胞であった。光照射後 2 日目には先端部分が膨らんでいた。光照射後 4 日目には、傘と柄の境界部位組織の陥入が観察されたが、部分的に細胞がつながっており、柄上部と傘下部の細胞には形態的に明確な差はみられなかった。光を照射後 6 日目には、通常の子実体原基の傘と非常によく似た形態を示し、傘が明確に分化していることが確認された。

3. 二核化に伴い発現するタンパク質を調べるために、一核菌糸体と二核菌糸体に発現しているタンパク質を二次元電気泳動により比較し、二核菌糸体に特異的に発現するタンパク質を特定した。さらに、子実体誘導処理後の二核菌糸体にのみ発現するタンパク質、及び子実体に特異的に発現するタンパク質を特定した。

二核化後発現し、子実体形成に関わるタンパク質を特定するために、子実体誘導処理、低温処理、光処理、菌かき処理、それぞれにおいて発現する可溶性タンパク質を二次元電気泳動により解析し、その一次構造を解析した。子実体誘導処理により発現するタンパク質の多くは、低温処理により発現が認められた。しかし、子実体誘導処理によって発現するタンパク質のほとんどは、光処理によっては発現が認められなかった。以上のことから、エノキタケの子実体原基の誘導には、温度低下が最も決定的な役割を果たしていると考えられた。子実体誘導処理、及び低温処理によって発現が認められたタンパク質、Pfl、Pf3 の一次構造解析の結果、子実体誘導処理後のエノキタケ菌糸体中に発現することが知られる FDS 遺伝子と高い相同性を示した。

ピンヘッド子実体及び柄からは検出されず、傘にのみ特異的に発現するタンパク質を特定した。傘に特異的なタンパク質は光によって発現が制御されていると考えられた。また、子実体に特異的なタンパク質 Pfl、Pf3 は、傘と柄の両方に発現が認められた。

4. 子実体形成の各分化段階において発現する細胞壁関連タンパク質を解析し、傘に特異的なタンパク質(Pp1)を特定した。Pp1 は、ピンヘッド子実体には発現せず、ピンヘッド子実体に光を照射することにより形成された傘から発現が認められた。このことから、Pp1 の発現は、光により制御されていることが示唆された。

以上のように本研究では、エノキタケでは二核化により子実体形成能を獲得し、温度低下により子実体原基が誘導され、光照射により傘が誘導されることを明らかにし、さらにそれぞれの過程で発現するタンパク質の特定を行った。これらの結果は担子菌類など栽培食用きのこの子実体形成機構を明らかにする上で重要な知見であり、学術的・応用的に高く評価される。よって審査員一同は坂本裕一が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。