博士（農 学） 安 藤 聡

学 位 論 文 題 名

エノキタケの子実体誘導処理後に
発現する遺伝子に関する研究

－hydrophobin遺伝子*fvhl*を中心として－

学位論文内容の要旨

エノキタケは我が国において最も多く生産されている担子菌きのこである。その子実体原基形成は、二核菌糸体を低温下におくことで誘導され、光照射により傘の形成が誘導される。木粉培地を用いた栽培では子実体誘導に際して、子実体発生を同調化するために「菌かき」という培地表面の菌糸に機械的傷害を与える操作が行われている。その子実体生産に関する応用研究は数多く為されてきたが、子実体分化の根幹を為す分子機構は不明のままである。この機構の解明に資するため、本研究ではエノキタケの子実体誘導処理（温度低下、光照射、菌かき）後に顕著に発現する遺伝子を検索し、その構造ならびに発現解析を行った。単離された遺伝子のうち*fvhl*については、糸状菌類の形態形成において重要な役割を担うことが知られているタンパク質hydrophobinをコードしていることが明らかとなり、その翻訳産物の分離同定を含め詳細な解析を行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 子実体誘導処理により発現する遺伝子の検索および構造解析

まず、子実体誘導処理後7日目すなわち子実体原基が形成される3日前の菌糸体由来のcDNAライブラリから、子実体誘導処理前および処理後7日目の菌糸体のcDNAプローブを用いたディファレンシャルスクリーニングにより、後者のプローブと特異的にハイブリダイズする16個のcDNAクローンを単離した。これらの内、子実体形成過程に顕著な発現を示す*FDS*、*FVFD16*および*fvhl*について、cDNAの塩基配列を決定したところ、誘導処理直後に最も顕著な発現を示す*fvhl*は、分泌シグナルを含む113アミノ酸残基から成るhydrophobinをコードしていることが判明した。*fvhl* cDNAをプローブとして、エノキタケゲノムライブラリより*fvhl*のゲノムクローンを単離し、塩基配列の決定を行った結果、*fvhl*はコード領域中に三つのイ

ントロンを持ち、プロモータ領域にはTATA box、二つのCAAT boxおよびCT-rich motifを有することが明らかとなった。また、ゲノムDNAのサザンブロット解析により、*fvh1* はエノキタケゲノム中に単一コピーで存在することが確認された。*FDS* と *FVFD16* については既知配列との相同性は認められなかったが、両者のプロモータ領域およびイントロンの内部配列には、*fvh1* のそれと類似した部分が複数存在していた。

2. 単離された遺伝子の発現解析

子実体誘導処理における温度低下、光照射、菌かきの三要素のそれぞれが単離した遺伝子の発現に与える影響をノーザン解析により検討した結果、*fvh1* は子実体形成の有無に関わらず、菌かき後にのみ一過性の強い発現を示すことが明らかとなった。さらに、様々な分化段階にある菌糸中での発現を精査した結果、*fvh1* は一核、二核菌糸ともに栄養菌糸の先端成長に伴って発現していることが明らかとなった。*FVFD16* は全ての試料において *fvh1* と類似した発現パターンを示した。一方、*FDS* は温度低下により発現が誘導され、その発現は光照射および菌かきにより促進かつ増強される傾向を示した。また、子実体を形成できない条件下で菌かきのみを行った場合は一過性の発現をみせた。*FDS* の発現は、成熟子実体とそれを支持する培地中菌糸体の両者において最も高レベルに達したのに対し、子実体誘導処理以前の栄養菌糸においては、全く検出されなかった。加えて、子実体形成時に特異的に発現するタンパク質の 2D-PAGE スポットより、FDS と高い相同性を持つ 2 つのタンパク質が検出され、*FDS* が翻訳レベルにおいても子実体形成時に発現している可能性が支持された。以上の結果から、*FDS* は子実体形成に関わる新規遺伝子であり、その機能は菌かきにより菌糸が被った機械的損傷の補償と子実体分化に共通して必要とされるものである可能性が考えられた。

3. hydrophobin タンパク質の単離および構造解析

菌糸から分泌され、親水性/疎水性界面において自己集合し、両親媒性の不溶性膜を形成するという既知の hydrophobin の性質を基に、*fvh1* の翻訳産物 FVH1 の単離を行った。まず、菌糸体の細胞壁画分を熱 SDS 抽出し、その残渣を TFA（トリフルオロ酢酸）抽出して得られた画分より FVH1 を得た。N 末端シークエンシングおよび MALDI-TOF MS による質量分析により、FVH1 は推定アミノ酸配列の 30 残基目を N 末端に持ち、共有結合による修飾も受けていない 84 残基からなる成熟型タンパク質（分子量 8,241）となることが明らかになった。また、FVH1 は液体培養基質中からも単離されたため、基質中への分泌及び液体培地中では可溶状態で存在することが

確認された。FVH1 は常にもう一つの hydrophobin と考えられるタンパク質 FVH2 を伴って単離されてきたが、FVH2 は *fvh1* がコードし得ない N 末端配列を持つことに加え、糖鎖染色および質量分析により、複数の isoform を持つ糖鎖により修飾されていることが明らかとなった。また、細胞壁の SDS 不溶画分の TFA 抽出残渣を再度 TFA 抽出したところ、FVH1 はほとんど検出されず FVH2 のみが多く得られたことから、FVH2 は糖鎖の介在によって FVH1 より強固に細胞壁に付着している可能性が考えられた。子実体からは FVH1、FVH2 共に検出されず、両者とは異なる N 末端配列を持つ新たな hydrophobin と考えられるタンパク質 FVH3 が検出された。FVH3 は子実体の各組織から一様に検出されたが、その量は非常に少なく、等量の SDS 可溶タンパク質を含む菌体試料から得られる重量は FVH1 の 1/10 程度であった。

以上の結果から hydrophobin FVH1 および FVH2 は、栄養菌糸の先端成長に伴って分泌され、気中菌糸においては既知の hydrophobin と同様に親水性（細胞壁）/疎水性（空気）界面において両親媒性の膜を形成し、菌糸を外的環境から保護する役割を持つ可能性が示唆された。一方、両タンパク質は液中の潜入菌糸の細胞壁にも比較的多く存在することから、親水性/疎水性界面における機能とは異なる機能をも有する可能性が考えられた。*fvh1* と非常に類似した発現パターンを持つ *FVFD16* は、分泌シグナル配列を持ち、細胞外または細胞壁に移行すると予測されるタンパク質をコードしていることから、*fvh1* と同様に栄養菌糸の壁形成に関わりを持っているものと思われた。また、*fvh1* は菌かき後に一過性の強い発現を示し、FVH1 の蓄積量は菌かきを行わない場合の約 10 倍にも達することから、菌かきにより菌糸が被った損傷の補償において FVH1 が重要な役割を担っている可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主　査	教　授	寺　沢	実
副　査	教　授	藤　川	清　三
副　査	講　師	玉　井	裕

学位論文題名

エノキタケの子実体誘導処理後に発現する遺伝子に関する研究

− hydrophobin 遺伝子 *fvh1* を中心として −

本論文は、図 51、表 3、引用文献 153 を含み、6 章からなる 159 頁の和文論文である。別に参考論文 5 編が添えられている。

本研究は、担子菌エノキタケの子実体分化の分子機構を明らかにすることを目的とし、子実体誘導処理により発現が誘導される遺伝子の構造ならびに発現解析を行うと共に、*fvh1* の機能について翻訳産物の分離同定を含め詳細に検討したもので、内容は以下のように要約される。

1. 子実体誘導処理により発現する遺伝子の検索および構造解析

まず、子実体誘導処理を施した菌糸体由来の cDNA ライブラリから、誘導処理前の菌糸体との間のディファレンシャルスクリーニングにより、誘導処理後特異的に発現する遺伝子の 16 個の cDNA クローンを単離した。これらの内、子実体形成過程に顕著な発現を示す *FDS*、*FVFD16* および *fvh1* について cDNA の塩基配列を決定したところ、*FDS* と *FVFD16* については既知配列との相同性は認められなかったが、*FVFD16* および *fvh1* は分泌シグナル配列を持ち、*fvh1* には糸状菌の形態形成において重要な役割を担うことが知られている hydrophobin がコードされていることが判明した。また、エノキタケゲノムライブラリより各遺伝子のゲノムクローンを単離し、周辺領域を含めたゲノム構造を明らかにした。三者のプロモータ領域およびイントロンの内部配列には、類似した領域が複数存在していた。

2. 単離された遺伝子の発現解析

子実体誘導処理における温度低下、光照射、菌かき（機械的傷害）の三要素のそれぞれが単離した遺伝子の発現に与える影響をノーザン解析により検討した結果、

fvh1 および *FVFD16* は菌かきを行った場合にのみ一過性の強い発現を示すことが明らかとなった。さらに、様々な分化段階にある菌糸中での発現を調べた結果、両者は一核、二核菌糸ともに栄養菌糸の先端成長に伴って発現していることが明らかとなった。一方、*FDS* は子実体原基誘導に必須な温度低下のみで発現が誘導されていたが、その発現は光照射および菌かきにより促進かつ増強される傾向を示した。また、子実体を形成できない条件下で菌かきのみを行った場合は一過性の発現をみせた。*FDS* の発現は、成熟子実体とそれを支える培地中菌糸体の両者において最も高レベルに達したのに対し、子実体誘導処理以前の栄養菌糸においては、全く検出されなかった。以上の結果から、*FDS* は子実体形成に関わる新規遺伝子であり、菌かきにより機械的損傷を受けた菌糸体で起こる補償反応と子実体分化に共通して必要とされる役割を担っている可能性が考えられた。

3. hydrophobin タンパク質の単離および構造解析

菌糸から分泌され、親水性/疎水性界面において両親媒性の不溶性膜を形成するという既知の hydrophobin の性質を基に、*fvh1* の翻訳産物 FVH1 の単離を行った。まず、菌糸体の細胞壁画分を熱 SDS 抽出し、その残渣をトリフルオロ酢酸抽出して得られた画分より FVH1 を得た。N 末端シークエンシングおよび MALDI-TOF MS による質量分析により、FVH1 は推定アミノ酸配列の 30 残基目を N 末端に持ち、84 残基からなる成熟型タンパク質となることが明らかになった。FVH1 は主に気中菌糸の細胞壁から抽出されたが、液体培地中にも存在することから、伸長中の菌糸から分泌され培地中に拡散する一方で、気中菌糸の細胞壁において不溶化し蓄積するものと考えられた。FVH1 は常にもう一つの hydrophobin と考えられるタンパク質 FVH2 を伴って単離されてきたが、FVH2 は *fvh1* がコードし得ない N 末端配列を持つことに加え、糖鎖染色および質量分析により糖鎖修飾されていることが明らかとなった。子実体からは FVH1、FVH2 共に検出されず、両者とは異なる N 末端配列を持つ新たな hydrophobin 様タンパク質 FVH3 が検出された。

以上の結果から、FVH1、FVH2 および *fvh1* と同様な発現挙動を示す *FVFD16* は、菌糸の先端成長に伴う壁形成に関わっている可能性が示唆された。また、*fvh1* は菌かき後に著しく発現し、FVH1 の蓄積量は菌かきを行わない場合の約 10 倍にも達することから、菌かきにより菌糸が被った傷害の補償において FVH1 が重要な役割を担っている可能性が考えられた。

以上のように、本研究によって得られた成果は、エノキタケの形態形成の分子機構に関する基礎的知見を提起すると共に、エノキタケの子実体誘導に伴う変化を初めて遺伝子レベルで捉えたものであり、先駆性を有する研究として関係学会で高く評価されている。よって審査員一同は、安藤　聡が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。