

氏 名 : 倉橋 敦
学位の種類 : 博士 (学術)
学位記番号 : 博乙第1号
学位授与の日付 : 平成26年3月18日
学位授与の要件 : 東京家政大学大学院学位規程第3条3項該当
人間生活学総合研究科
学位論文題目 : マイタケをモデルとした食用きのこの栽培工程における
子実体生育機構に関する研究
論文審査委員 : (主査) 准教授 藤森 文啓
教授 岩田 力
教授 森田 幸雄
准教授 大西 淳之
教授 奥田 徹 (玉川大学)

論文内容の要旨

第1章 緒論

食用きのこは世界中で食され、特に日本の食卓で欠かせない食材の一つとなっている。シイタケやマイタケ等の代表的な食用きのこは、施設栽培が確立されているため年間を通して安定的に提供されている。しかしながら、食用きのこの生産現場における栽培環境条件の設定等は、生産者の長年の経験や勘に基づいていることが多い。食用きのこ生産で行われている栽培方法について科学的な検証を行い、それを基に栽培技術を再構築することで、さらなる生産の効率化や環境の負荷低減等を成し遂げることができると考えている。その一つの方策として、食用きのこの栽培工程で発現している遺伝子を網羅的に解析することによって、各工程で重要な役割を担っている遺伝子を特定し、その遺伝子の発現量を指標にしたマーカー支援型の栽培工程管理等が考えられる。

商業的に生産される食用きのこの多くは担子菌類に属する。その多くはハラタケ目に属し、ツクリタケやシイタケ、エノキタケ等の良く知られた種類がある。次いで、タマチョレイタケ目に属する種類が多く、マイタケやハナビラタケ、ブナハリタケ等がある。しかしながら、生産される種類の多いハラタケ目のきのこを中心に遺伝子解析が行われており、マイタケをはじめとするタマチョレイタケ目の遺伝子解析はほとんど行われていない。そこで、産業上重要な食用きのこであるマイタケをタマチョレイタケ目のモデルとして、マーカー支援型の栽培工程管理の可能性について検証した。

第2章 食用キノコのトランスクリプトーム情報の整備

マイタケに関してはゲノム全体が把握できるような網羅的解析を行った報告はなく、遺伝子解析が行える基盤を構築するためにマイタケの栽培工程で発現する全遺伝子の配列情報(トランスクリプトーム)を、他の食用キノコとの種間比較をかねてエリンギ及びブナシメジ、シイタケとともに第二世代型シーケンサーによって決定し、食用キノコのトランスクリプトームデータベースを構築した。その結果、マイタケ及びエリンギ、ブナシメジ、シイタケからそれぞれ10,150個、13,038個、12,012個、10,639個の遺伝子が予測された。それぞれの遺伝子の配列について公共データベースに登録され

ている遺伝子と相同性のある遺伝子数はマイタケで 38%、エリンギで 43%、ブナシメジで 42%、シイタケで 48%と、ハラタケ目である 3 種が 40%以上であるのに対してタマシメジ目（タマシメジ）のマイタケは 38%と低かった。このことから、食用キノコの全体の遺伝子情報の蓄積は不十分であり、なかでもマイタケは遺伝子情報が不足していることが確認された。

第 3 章 マイタケ栽培全工程における発現遺伝子プロファイルの解析

マイタケの栽培工程は、「培養工程」、「芽出し工程」、「発生工程」の 3 つに大別することができる。このマイタケの栽培工程について、構築したトランスクリプトームデータベースをもとに、マイタケ用のマイクロアレイを作製し、各工程で発現する遺伝子とその発現パターンを取得した。その中から、熱ショック蛋白質 9 (*Gf.HSP9*) 遺伝子等の子実体分化に伴って発現量が増大する遺伝子群を見出した。このような遺伝子の発現パターンは、栽培工程が順調に進んでいるかどうかをモニタリングするためのマーカーとして有用であると考えた。さらに、*Gf.HSP9* 遺伝子は、マイタケのみならずエリンギ及びブナシメジにおいてもそれらの子実体分化に伴って発現量も上昇していた。このことは、本研究で得られたマイタケで特定された子実体生育に関わる遺伝子情報は、その他の食用キノコ一般に有用であることを示している。

第 4 章 マイタケ発生工程における光応答性遺伝子の探索

食用きのこ栽培における環境制御は、光、温度、湿度、ガス濃度、風速と多岐にわたる。光は、子実体生育開始のトリガーとして知られ、重要な環境因子の一つである。そこでマイタケにおける光応答についての知見を深めるために、青色光下と近紫外光下でマイタケの子実体分化・生育を行い、それらで発現している遺伝子の解析を行った。その結果、青色光下と近紫外光下のいずれでも、子実体のメラニン合成に関わる *BMRI* 遺伝子のホモログであり転写因子をコードしている *Gf.BMRI* 遺伝子の発現が強く誘導されていた。青色光下と近紫外光下のいずれも生育した子実体はメラニン含有量に比例して黒く着色していた。このことから、*Gf.BMRI* 遺伝子のように環境と表現型に関連する遺伝子の発現量をマーカーとすることで、色や形などの経済形質を任意に制御することが可能であることを示した。

第 5 章 マイタケの子実体生育不全株を用いた子実体分化に関わる遺伝子の解析

正常な子実体生育の遺伝子解析だけでなく、突然変異による子実体生育不全株との比較を行うことで子実体生育に関与する遺伝子を探索した。その結果、正常な子実体生育では発現が低く抑えられているが、生育不全株ではその 100 倍以上となる高発現を示していた、転写因子をコードしている酵母の *CRZI* 遺伝子のホモログである *Gf.CRZI* 遺伝子を見出した。*Gf.CRZI* 遺伝子は、子実体生育不全株の種菌でも高発現しており、*Gf.CRZI* 遺伝子の発現量をマーカーとすることで、この不良形質を種菌の段階で選別することが可能となった。つまり、遺伝子の発現量をマーカーとすることで優良種菌の選別が可能であることを示した。

第 6 章 総合考察

本研究により、遺伝子の発現量を指標にしたマーカー支援型の栽培工程管理が可能であることを示した。今後は、工程管理を行うための十分な数のマーカーを樹立することが課題である。さらに、本研究を進める過程でマイタケをはじめとする食用キノコのトランスクリプトーム情報を整備するととも

に、マイタケの栽培工程における大規模な遺伝子情報を提供できるようになった。マイタケをはじめとする食用キノコの子実体生育の分子メカニズムを解明していく過程で、意義ある基盤情報になると考えている。

論文審査の結果の要旨

マイタケはわが国の栽培きのこ産業の中でも重要な商品の1つである。マイタケに限らないが、食用きのこの栽培は、経験と知識に頼って環境制御を行ってきた。一方、近年、生物の全ゲノム解析が盛んであるが、その解析結果が実際の産業レベルで効果を発揮した例はまだ少ない。またマイタケが属する担子菌門の *Polyporales* に属する菌類のゲノム解析例はほとんどない。さらに食用きのこの生産は施設栽培や露地栽培などで行われているが、これまでは科学的な知見は乏しく、特に遺伝子解析による生産調整等へ向けた取り組みは殆ど行われていない。すなわち食用きのこの生産は、生産者の長年の経験に基づいていることが多く生物学的な理解のうえで生産を行うようなシステムにないと言える。本論文では、食用きのこ生産で行われている栽培方法について、遺伝子解析を主体とし科学的な検証を行い、それを基にした栽培技術の確立を目指している点で新規性がある研究である。そのための解決方法の一つとして、食用キノコの栽培工程で発現している遺伝子を網羅的に解析することによって、各工程で重要な役割を担っている遺伝子を特定し、それら遺伝子の発現量を指標にしたマーカー支援型の栽培工程管理等を目指した点においても挑戦的であり有用な知見を多数見出している。本論文はそのような目的を遂行するために行われ、以下の点で有用な解析であるといえる。

商業的に生産される食用きのこの多くは担子菌類に属する。その中でもハラタケ目に属する食用きのこの種類は多く、ツクリタケやシイタケ、エノキタケ等の良く知られた種類がある。次いで、タマチョレイタケ目に属する食用きのこのが多く、マイタケやハナビラタケ、ブナハリタケ等がある。しかしながら、ハラタケ目のきのこを中心に遺伝子解析が進み、マイタケをはじめとするタマチョレイタケ目の遺伝子解析はほとんど行われていないことに注目し、本研究の題材を選択したことは理に合っているといえる。本研究ではタマチョレイタケ目のモデル生物としてマイタケを用いて、その栽培工程における子実体生育の分子メカニズムの解明を最終目標とし、基盤となる遺伝子情報の整備を行い、マイタケの栽培工程で発現する遺伝子とその発現パターンについて詳細に研究を行った点で評価に値する。

これまでは、マイタケの遺伝子情報は殆ど公共データベースに登録がなかった。そこで、遺伝子情報解析のためにマイタケの栽培工程で発現する全遺伝子の配列情報（トランスクリプトーム）を取得し、さらには種間比較を行えるようにエリンギ及びブナシメジ、シイタケについても同様の配列情報を第二世代型シーケンサーによって決定し、食用キノコのトランスクリプトームデータベースを構築したことは非常に重要な研究である。本研究では、マイタケ及びエリンギ、ブナシメジ、シイタケからそれぞれ 10,150 個、13,038 個、12,012 個、10,639 個の遺伝子を予測し、それぞれの遺伝子の配列について公共データベースに登録されている相同遺伝子から機能を推定し、推定できた遺伝子数はマイタケで 38%、エリンギで 43%、ブナシメジで 42%、シイタケで 48%であることを解析し、その結果ハラタケ目である 3 種が 40%以上であるのに対してタマチョレイタケ目のマイタケで 38%と低いことを見出している。現在の食用キノコの遺伝子情報は本研究により充実したとも言える。

第二に、構築したトランスクリプトームデータベースをもとに、マイタケ用のマイクロアレイを作製し、マイタケの栽培工程で発現する遺伝子とその発現パターンの解析を行ったことは、本生物資源においては初めてである。その結論として、マイタケの「培養工程」は子実体発生のために菌体量を増やす重要な期間であり、それを示すように培地成分を資化するための木質分解酵素やプロテアーゼなどが多く発現し、菌糸伸長に関わるとされるヒドロフォービン遺伝子が高発現していることを見出している。「芽出し工程」では子実体原基の充実を図り、「発生工程」では子実体を分化・肥大させるが、逆に「培養工程」で高発現している遺伝子はその発現が抑制され、栄養生殖から子実体生育へシフトしていると推論している。さらにこの期間を通して発現量が上昇する熱ショック蛋白質9や金属プロテアーゼなどの多くの遺伝子を特定し、これらは子実体分化に深く関与する遺伝子群だと結論している。特に、熱ショック蛋白質9遺伝子は、マイタケのみならずエリンギ及びブナシメジにおいてもそれらの子実体分化に伴って発現量が上昇していることを見出している。このことは、マイタケにおいて特定した子実体生育に関わる遺伝子は、その他の食用キノコの解析にも有用であることを示している。

食用きのこ栽培における環境制御は、光、温度、湿度、ガス濃度、風速と多岐にわたる。光は、子実体生育開始のトリガーとして知られ、重要な環境因子の一つである。そこでマイタケにおける光応答についての知見を深めるために、青色光下と近紫外光下でマイタケの子実体分化を行い、遺伝子解析を行っている。その結果、青色光と近紫外光のいずれでも発現が強く誘導される転写因子をコードする *Gf.BMRI* 遺伝子を見出した。この遺伝子は、子囊菌のメラニン合成に関わる *BMRI* 遺伝子ホモログであり、原基表面が黒色化するのに *Gf.BMRI* 蛋白質が関与している可能性が考えられ、*Gf.BMRI* 遺伝子を基点に解析していくことで、マイタケ子実体分化の開始、特に光刺激によるシグナル伝達機構が明らかになると期待され、重要な知見である。

さらに、正常な子実体生育の遺伝子解析だけでなく、子実体生育不全株との比較を行うことによって子実体生育に関与する遺伝子を探索した。その結果、正常な子実体生育では発現が低く抑えられなければならないが、生育不全株では 100 倍以上の高発現を示した *Gf.CRZI* 遺伝子を見出した。よって、正常な子実体生育時においては発現抑制されるべき遺伝子が発現していたため、子実体生育不全になっていると結論している。

このようにマイタケの遺伝子情報が全くないという状況下で、まず全遺伝子の配列情報のデータベースを構築し、遺伝子を予測し機能を推定した。さらにマイタケ用マイクロアレイを作製し、栽培工程の各段階で発現が促進される遺伝子と押さえられる遺伝子を見極め、いくつかの子実体文化に深く関わる遺伝子を特定した。その結果、経験と勘に頼らざるを得なかった栽培の論理的品質管理が可能とする端緒を作ったことは非常に重要な研究であると言える。

まとめると、本論文ではマイタケをはじめとする食用キノコのトランスクリプトーム情報を整備するとともに、マイタケの栽培工程の解析及び子実体生育不全株を用いた解析から子実体生育に関与する遺伝子を網羅的に特定し、大規模な遺伝子情報を収集することを行っている。さらに、マイタケの遺伝子情報がその他の食用キノコの子実体生育の分子機構を考えるうえでも重要な知見となることを示している。また本論文では、マイタケの栽培工程における発現遺伝子情報をリスト化し、今後マイタケの子実体生育の分子メカニズムを解明していく過程で、意義ある基盤情報になると考えられる。今後は、本論文で得られた遺伝子群を、遺伝子破壊や遺伝子導入といった遺伝子工学的な機能解析を行うことで、子実体生育の中における役割を明らかにしていくことで子実体生育の分子メカニズムの解明が進むものと思われ、学位論文として十分に価値のある知見を得ていると評価できる。

最後に、本研究ではトランスクリプトームデータの充実が図られた。昨今のシーケンサー技術の向上によりゲノム情報を安価に取得することが可能となっているが、遺伝子 ORF 予測においてはその精度は向上していない。すなわちトランスクリプトームデータ無くして正確な遺伝子位置情報をゲノム情報から捉えることは難しい。本研究で取得したトランスクリプトームデータはゲノムマッピングに利用した場合と利用しない場合にどれほどの精度の差を生むのかの検証にも使えるものと思われる。その意味で今後のキノコバイオインフォマティクスに大きく寄与する第一歩であるとも言える。今後は本論文で得た知見を元に、キノコにおける様々な分子生物学的知見を蓄積することが可能であろう。