

氏 名 : 佐藤 真之
学位の種類 : 博士 (学術)
学位記番号 : 博乙第3号
学位授与の日付 : 平成27年9月13日
学位授与の要件 : 東京家政大学学位規程第3条第3項該当
人間生活学総合研究科
学位論文題目 : マイタケのゲノム解析及び遺伝子機能解析に関する研究
論文審査委員 : (主査) 教授 藤森 文啓
教授 森田 幸雄
教授 木元 幸一
教授 岡 純
准教授 福地 佐斗志 (前橋工科大学)

論文内容の要旨

第1章 緒論

きのこは古くから食用または薬用として人々の生活に親しまれてきた。日本の主要な食用きのこであるエノキタケ、シイタケ、マイタケなどは人工的に環境を整えた施設栽培により一年を通じて生産されている。このような施設栽培では一度に大量のきのこを栽培するため、菌株の劣化や変異、環境条件の急激な変化などにより品質低下が生じると甚大な損害を招きかねない。それ故、きのこ種菌の性能維持や品種開発、最適な環境条件を実現するための栽培管理や技術開発が極めて重要となる。しかしながら、きのこ栽培に関する科学的根拠に基づく知見は十分ではなく、生産現場における栽培環境条件の設定及び管理は生産者独自の経験や勘に頼っていることが多い。そこで、栽培に重要な遺伝子群を明らかにし、それら遺伝子の発現をマーカーに栽培条件を最適化できれば、品質と収量が常に安定したキノコ生産を実現できると考えた。これまで、産業上重要なマイタケをモデルに栽培工程で発現する遺伝子の配列情報 (トランスクリプトーム) を取得し、その情報を基にした遺伝子発現解析から各栽培段階で重要な役割を担っていると予想される遺伝子の候補を多数見出している。本研究は、マイタケで見出されたこれらの遺伝子の機能解析に必要な基盤技術を確認するため、最初にマイタケの全ゲノム配列情報を取得して遺伝子情報を拡充し、次にその情報を基にマイタケの宿主・ベクター系を構築し、それをを用いて目的とする遺伝子の発現を亢進または抑制する手法を開発してその有効性を検証した。

第2章 マイタケのゲノム配列情報の取得

マイタケのゲノム配列は、第2世代シーケンサーであるロシュ社 454 GS FLX Titanium (454 FLX) 及びイルミナ社 Genome Analyzer IIx (GAIIx) の2機種 of シーケンサーを用いて解読した。454 FLX は取得できるリード長が長く、アセンブリの際に長いコンティグを得ることができるが、連続して同じ塩基が続く配列 (ホモポリマー配列) の解読精度が低く、読み取りエラーが生じやすい。一方で、GAIIx は取得できるリード長は短い、解読精度が高く、ホモポリマー配列の読み取りエラーが少ない。この特徴の異なる2機種のシーケンサーを組み合わせて使用することは、お互いの利点を活かし、欠

点を補う点で有効なアプローチと考えられるが、その手法は確立されていなかった。そこで、この 2 機種のスークエンサーから得たリードデータを組み合わせたアセンブリ手法を検討したところ、454 FLX から得たデータのアセンブリ結果を主として、GAIIx から得たデータでエラー修正及びギャップクローズをするカスタムアセンブリ法が読み取りエラーやギャップを最小限に抑え、断片化の少ない長いコンティグが得られる点で最適であった。この方法により、ゲノムサイズ約 33.8 Mb、スキマホール数 280、コンティグ数 1,186 のマイタケドラフトゲノム配列を取得した。また、マイタケゲノム配列からの遺伝子予測を行ったところ、ゲノム配列データのみからは予測遺伝子数が 10,505 個であったのに対し、既に取得していたトランスクリプトームデータを参照に予測することでその数は 16,097 個と 1.53 倍に増加した。参照情報がない場合に予測できない遺伝子の数が多かったことから、トランスクリプトームデータの利用が予測精度の向上に有効であることが示された。以上の結果から、今までにドラフトゲノムデータが公開されている生物種に比べても精度の高いマイタケの全ゲノム配列情報を整備することができた。

第 3 章 マイタケの宿主・ベクター系の構築

遺伝子機能解析には、遺伝子組換えにより機能を知りたい遺伝子进行操作して、その影響から機能を調べる手法が有効であるが、マイタケでそれを行うための手法は確立されていない。そこで、マイタケで目的とする遺伝子を発現させることができる宿主・ベクター系の構築を行った。まず、ベクターにより導入した遺伝子を安定して発現させるのに必要な高活性な遺伝子発現制御領域（プロモーターとターミネーター）を選定するため、マイタケの栽培工程で常に高発現している遺伝子のプロモーターとターミネーターを取得し、その間に選択マーカー遺伝子であるハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* を連結して組み込んだ遺伝子発現ベクターを構築した。これをプロトプラスト-PEG 法によりマイタケ細胞内に導入し、ハイグロマイシン B 耐性の形質転換体を得られることを確認した。このときに形質転換効率が高かった *Gf.TEF3* と *Gf.GAPDH* のプロモーターとターミネーターのセットを高活性として選定した。次に、選定したプロモーターとターミネーターのセットを用いて、レポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質遺伝子 *EGFP* やホタルルシフェラーゼ遺伝子 *Luc* の発現ベクターを構築してマイタケに導入したところ、*EGFP* または *Luc* それぞれの活性を有する形質転換体を得ることに成功した。以上の結果から、マイタケで目的遺伝子の発現を可能にする宿主・ベクター系を構築することができた。

第 4 章 推定転写因子 *Gf.CRZI* の過剰発現による機能解析

転写因子と推定される *Gf.CRZI* は、正常に子実体生育する M51 株由来の *Gf-N2* 株に比べて、それと由来を同じくする子実体生育異常を生じる変異体 *Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株で発現が高い遺伝子である。そこで、*Gf.CRZI* 発現ベクターを *Gf-N2* 株に導入し、*Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株と同程度に *Gf.CRZI* が高発現している *Gf.CRZI* 過剰発現株を作出した。この *Gf.CRZI* 過剰発現株で *Gf.CRZI* 以外に発現が変化している遺伝子の有無を調べたところ、*Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株で発現が高い NAD 依存性ギ酸脱水素酵素遺伝子 *Gf.FDHI* の発現が高くなっていることがわかった。さらに、*Gf.FDHI* と同じくシュウ酸分解に関わるシュウ酸脱炭酸酵素遺伝子 *Gf.ODCI* の発現もまた、*Gf.CRZI* 過剰発現株と変異体 *Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株で共通して高かった。これらのことから、*Gf.CRZI* はシュウ酸分解に関わる *Gf.FDHI* と *Gf.ODCI* の発現を正に調節する転写因子であるものと思われた。また、*Gf.CRZI* 過剰発現株を寒天平板培地で培養した時の菌糸生育の様子は *Gf-N2* 株と異なり、菌糸密度が低く、菌叢も薄い点で変異体

Gf-A1 株や Gf-A4 株のそれらと類似していたことから、*Gf.CRZI* の高発現は菌糸の生育異常を引き起こしていると考えられた。本研究により、推定転写因子 *Gf.CRZI* はシュウ酸分解系に係わるとともに菌糸の形態にも関与している可能性が示されたことから、マイタケの遺伝子機能解析の有用なツールとして、ベクターによりマイタケの特定の遺伝子を新たに導入することでマイタケに内在するその遺伝子の発現量を亢進させ、その形質等の変化から機能を明らかにする方法を開発することができたといえる。

第5章 RNAi によるマイタケの遺伝子機能解析

RNA 干渉 (RNAi) は二本鎖 RNA により、それと相同な配列を持つ mRNA が分解される機構であり、これを人為的に誘導することで機能を知りたい遺伝子 (標的遺伝子) の発現を抑制する方法が遺伝子機能解析に利用されている。そこで、マイタケで RNAi による遺伝子機能解析手法を確立するため、標的遺伝子に相同なヘアピンループ状の二本鎖 RNA が発現するように設計した RNAi 用ベクターを構築し、それを導入することで標的遺伝子の発現抑制を試みた。その結果、標的として選んだハイドロフォービン遺伝子 (*Gf.HydA1*)、ファシクリンドメイン含有蛋白質遺伝子 (*Gf.FAS1*)、マンガンペルオキシダーゼ遺伝子 (*Gf.MNPI*) のすべてで、RNAi により発現量が顕著に抑制される形質転換体を得ることに成功した。それらのうち、*Gf.FAS1* 発現抑制株の子実体を発生させたところ、原基からの子実体分化が大きく抑制されたことから、*Gf.FAS1* は子実体分化に重要な役割を担っていることがわかった。この結果は RNAi による遺伝子発現抑制がマイタケでも有効に適用できることを示していることから、本研究によりマイタケの遺伝子機能解析に有用なツールとしての RNAi を開発することができたといえる。

第6章 総合考察

本研究はマイタケの遺伝子機能解析に必要な基盤技術を確立することを目的に、マイタケの全ゲノム配列情報を整備し、次に外来遺伝子導入に不可欠な宿主・ベクター系を構築し、それをを用いて目的とする遺伝子の発現を亢進または抑制できることを実証してきた。よって、本研究によりマイタケで遺伝子機能解析を可能とする基盤技術を確立できたといえる。マイタケの全ゲノム配列情報の取得は世界で初めてであるとともに、これに使用した M51 株は栽培マイタケ菌株として最も古くかつ広範囲に用いられてきていることから、今後これをリファレンスゲノムとして使用することで他のマイタケ菌株のゲノムリシーケンスが容易にできるようになり、個体レベルのゲノム配列比較が可能な状態になった。これにより、変異個体の網羅的な変異同定やゲノム育種などへの新たな展開が可能になった。また、ここで確立したマイタケで遺伝子機能解析を行うための基盤技術は、これから多くの遺伝子を対象に機能解析を進めていく際の有用なツールとなる。本研究で行った方法論はマイタケ以外のきのこにも適用できると考えられ、きのこの分子生物学的研究を進展させる上で有用な知見を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

担子菌類（キノコ）のなかでも、施設栽培が実施されている食用キノコの遺伝子解析とその活用方法については、分子生物学的手法論を用いながら総合的に解析した例はさほどない。ここ数年は第二世代以降のシーケンサー技術の進歩とランニング費用の低下によって多くの生物種のゲノム解析が世界各国で行われており、そのデータもかなり整備されて来ているが、実際にそれらのゲノムデータを用いて栽培への応用を実施している例は少ない。その一つの原因は、解析対象とする生物種のゲノムデータの取得方法が *de novo* シーケンス方法で代表されてしまっている点にある。本論文の中核となるゲノムデータは単に *de novo* シーケンスを実施して遺伝子予測を行う現代の主流方法ではなく、遺伝子の実態データを反映したトランスクリプトームデータを別取得してゲノムデータ上にマッピングしたデータを用いている点にある。このことによって、遺伝子予測としては完成度の高いデータを基に分子生物学的手法論の開発とそれを用いた解析を実施している点が特筆すべき点である。

第1章はキノコの分類学的な位置づけ、実栽培における問題点などを定義し、本論文の中核を構成するマイタケに関する分類的位置づけから、これまでの栽培方法およびその問題点、科学的な栽培方法の必要性とその解決方法の提起を行っている。この中で、ゲノムプロジェクトのこれまでの流れと、その潮流を取り込んでの解析について言及し、本論文の目的としている。

第2章では、マイタケゲノムの配列取得方法を詳細に述べている。本論文を構成するマイタケゲノムデータは公共データベースに登録を行わずに、インハウスデータとして現在も取り扱っているが、この点に関しては学問の公開原則に従えば近い将来速やかに本ゲノムデータが公開されることを望む。これは本研究の真実性を他の研究者が証明するためにも今後必要なことであろう。さて、本章では *de novo* シーケンスとして主流のランダムリードとメイトペアリードのアッセムブリーによって集束率の比較的高い280 スキャホールド数を導き出している。マイタケの染色体数解析が非常に困難な点と、従来型のサンガー法に見られる解析ではコストと時間を要することから、このような実施体制である解析手法を取ったということである。現在はこのような *de novo* シーケンス法が主流であるが、本章では別取得してあるトランスクリプトームデータを合算し、遺伝子予測を行っている。ゲノムデータのみからの遺伝子予測数が10505に対して、トランスクリプトームデータを加味して予測をすると16097と大幅にその予測数が増大する結果を得ている。2015年現在、世界各国の生物ゲノム解析は *de novo* 法による、機械的な遺伝子予測方法で行われていることから考えると、得られる遺伝子数の見積もりはかなり低い状態にあるというのが公共データベースのゲノム情報となる。すなわち、本研究で示された通り、ヒトゲノム解析で実施されたのと同様に、ゲノムデータにトランスクリプトームデータをマッピングすることが重要であるという再確認にもなっており、非常に重要な知見である。

得られた予測遺伝子群の分類学的構成などの解析においても、マイタケ固有の木質分解にはマンガンペルオキシターゼ遺伝子群が優位に機能している予測、それに反してリグニンペルオキシターゼ遺伝子群は機能していないなど、予測遺伝子数が多いことで論ずることのできる状態に到達している点でも本論文は完成度が高い。

第3章では、マイタケの機能解析のために必須な宿主・ベクター系の開発を行っている。形態観察や生化学的データなどからの生物の機能解析には限界がある。特に各遺伝子群の発現挙動解析などによる機能解析研究においては、ノックイン・ノックダウン・ノックアウト等による分子生物学的な解析が必須となる。そのためには、遺伝子導入方法の確立、すなわち宿主ベクター系の開発が必須である。本章では、マイクロアレイ解析により恒常的に高発現している遺伝子群を特定し、その遺伝子群

のプロモーター領域を用いてベクター開発を行った点で論理的である。グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子やキチンシンターゼ遺伝子など他の生物種でよく使用される遺伝子よりも、生体内発現強度の高いホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ、サイクロフィリン、翻訳伸長因子 3 の 3 種のプロモーターの発見とそれを用いたベクターの構築を行ったことは新規性という点で優れている。さらに、このプロモーターを用いて選択マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子の発現とクローン選択、また外来遺伝子である EGFP や Luc 遺伝子の導入と機能の確認を行うことで、宿主ベクター系の完成の証明を行っている点が実質的な検証である。

第 4 章では、マイタケの機能解析の一例として、CRZ1 遺伝子の機能について調べている。通常は他の生物種が有するホモログ遺伝子を用い機能類推を行う。マイタケの CRZ1 は遺伝子操作が可能な近隣生物種としての酵母の CRZ1 に最も近いと類推されているが、そのホモログ解析として唯一欠落している証明は、酵母の CRZ1 欠損株に本マイタケ CRZ1 遺伝子を組み込むことでの表現型解析である。これが酵母の CRZ1 を相補することが証明されれば機能的に類似する遺伝子であると証明できるが、この証明に関しては将来に期待する。しかしながら、マイタケの CRZ1 高発現株と変異株と相関性があることを事前に解析し、そのうえで正常株に対して高発現となるように遺伝子導入を行い、その表現型解析と内部遺伝子の発現解析を実施することで、シュウ酸代謝経路内のシュウ酸分解に本遺伝子が関連していることの類推を行っている点で優れている。生化学的な解析や遺伝子発現解析で陥りやすい、生物学的な根拠証明の欠落に至ることなく解析できている点でも優れている。

第 5 章では、ハイドロフォービン遺伝子と FAS1 遺伝子の機能的欠損株の作出による、それぞれの遺伝子の機能解析を実施している。酵母のように相同組換えの頻度が高くないことと、多核であるためにターゲティング後に四分子解析のような手法を実施できないという実験的な問題があるが、遺伝子の発現量を低下させることのできる RNAi を実施した点でキノコの世界では画期的である。それぞれの解析用に取得できた株は、RNAi がよく機能してターゲット遺伝子の発現を抑えられているものと、そうでないものがあり、特にゲノムへの組込み数が複数あることで良く機能していたのか、組込みの位置的な問題で機能にばらつきがあったのかが解明されていないが、結果論的に遺伝子の発現を抑えた株の取得に成功している。その株の取得によって暫定的な機能の類推を行っているが、詳細な機能解析へとは至っていないので、今後技術的な改良と実質的な機能解析に期待したい。

以上の評価のように、本論文ではキノコの研究分野では行われていない分子生物学的な手法論の開発から実施まで、独創性に富んだ研究展開を行ってきた。ゲノム情報の取得においては、単に文字列の解析に留まり、その応用がなされていない生物種が多い中、本研究では宿主ベクター系の開発から、実際にそれらの技術を用いて遺伝子ノックイン・ノックダウンを実施することで機能解析を積極的に実施し証明を行っている点で優れた研究論文である。今後は、技術的に克服しなければ実施できない手法論をどのようにキノコの研究に応用し、機能解析を実施してゆくのか楽しみである。以上の内容が第 6 章にまとめられている。

以上のことから、本研究論文は独創性、新規性を有し総合的に食用キノコの分子生物学的解析手法論を確立し、各論としての遺伝子機能解析の実例を示している点などから、学位論文に十分に値し価値のあるものであると結論付けられる。