

平成 27 年度 学位論文

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

東京家政大学大学院
人間生活学総合研究科
人間生活学専攻

佐藤 真之

指導教員 藤森 文啓 教授

論文概要

きのこは古くから食用または薬用として親しまれてきた。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。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、子実体生育機構を遺伝子レベルで解明し、それを基盤にした栽培技術を確立することで、きのこの品質及び生産性の向上を実現できると考えた。これまでに、産業上重要なマイタケの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子実体生育に関わる遺伝子群の候補を見出している。本研究で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立するため、最初にマイタケの全ゲノム配列情報を取得し、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。

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が短い、解読精度が高く、ホモポリマー配列の読み取りエラーは少ない。この 2 機種 of シ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、スキャホールド数 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。以上の結果から、第 2 世代シークエンサーだけを用いて、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。

遺伝子機能解析には遺伝子組換えにより目的とする遺伝子の発現を抑制または亢進させて、その影響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、マイタケに目的の遺伝子を導入して安定に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。ベクターにより導入した遺伝子を安定に発現させるために、マイタケの栽培工程で常に高発現している遺伝子を選定し、その遺伝子のプロモーターとターミネーターの間に目的とする遺伝子を連結して組み込むことで遺伝子発現ベクターを構築した。このように構築したベクターを用いて、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*) をマイタケで発現させることに成功した。よって、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。

転写因子と推定される *Gf.CRZ1* は正常に子実体生育する *Gf-N2* 株に比べて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.CRZ1* 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.CRZ1* が高発現している *Gf.CRZ1* 過剰発現株を作出した。この *Gf.CRZ1* 過剰発現株で *Gf.CRZ1* 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.FDH1*) の発現が高くなっていることがわかった。さらに、*Gf.FDH1* 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.ODC1*) の発現もまた、*Gf.CRZ1* 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。これらの結果から、*Gf.CRZ1* がシュウ酸分解に関わる *Gf.FDH1* と *Gf.ODC1* 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.CRZ1* 過剰発現株を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* 株と類似していたことから、*Gf.CRZ1* の高発現は菌糸生育異常を引き起こしていると考えられた。本結果からマイタケの遺伝子機能解析ツールとして、特定の遺伝子を外部から導入することで過剰発現させ、その形質等の変化から機能を明らかにする方法を開発できたといえる。

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、標的として選んだヒ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.MNP1*) 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と考えられた。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おり、マイタケの遺伝子機能解析に有用なツールを開発することができたといえる。

本研究では、マイタケのゲノムデータを整備し、構築したマイタケの宿主・ベクター系を用いて遺伝子機能解析のための基盤技術を確立した。本研究で確立した基盤技術はマイタケの遺伝子機能解析の推進に有用であり、マイタケをはじめとする食用きのこのゲノム解析から見出される遺伝子の機能解明を促進できると考えている。

Summary of Thesis

Mushrooms have long been valued as edible and medicinal resources. The most common edible mushrooms in Japan, *Flammulina velutipes* (enokitake), *Lentinula edodes* (shiitake), and *Grifola frondosa* (maitake), are commercially produced year-round in artificial cultivation facilities. However, since the molecular mechanisms of fruiting body differentiation remain poorly defined, mushroom cultivation practices are still based mainly on the growers' experiences. If the genes responsible for fruiting body differentiation can be identified, an understanding of the functions of these genes at the molecular level would provide important insights for the development of mushroom cultivation techniques that would improve the quality and productivity of cultivated mushrooms.

We previously characterized the transcriptome of *G. frondosa* during cultivation and identified candidate genes involved in fruiting body differentiation using microarray-based transcriptome analysis. In the present study, we sequenced the whole genome of *G. frondosa* and established genetic engineering techniques in *G. frondosa* that will be useful for functional analysis of targeted genes via knockdown or overexpression.

The whole genome of *G. frondosa* was sequenced using a combination of Roche 454 GS FLX Titanium (454 FLX) and

Illumina GAIIx (GAIIx) technologies. The 454 FLX generates long reads that are useful for generating assemblies with longer contigs. However, 454 FLX reads are prone to indel error accumulation in homopolymers. Conversely, with GAIIx such indel errors in homopolymeric regions are rare and this technology generates notably accurate consensus sequences, although assemblies of short reads generated by GAIIx are more fragmented than those of 454 FLX reads. To determine the best way to assemble the *G. frondosa* genome, we tested various assembly strategies using 454 FLX and GAIIx data. The resulting custom approach using Illumina data for both error correction and gap closure against the assembled 454 FLX data improved the assembly, decreasing the number of contigs and the sum of gap lengths. In conclusion, we were able to obtain the best results using this custom approach, whereby 280 scaffolds and 1186 contigs were assembled into the total genome length of approximately 33.8 Mb. Thus, we obtained a high-quality draft genome sequence for *G. frondosa* generated solely by second-generation DNA sequencing.

Gene function can be investigated using genetic engineering techniques through knockdown or overexpression of targeted genes. However, such techniques had not been previously established for *G. frondosa*. Hence, the first goal of the present study was to establish an efficient host–vector system for *G. frondosa*. To express transgenes efficiently, a

transformation vector was constructed using homologous promoters and terminators from genes that are constitutively expressed during cultivation of *G. frondosa*. Using this vector system, we have successfully expressed the enhanced green fluorescent protein and firefly luciferase reporter genes in *G. frondosa*. Thus, we have established an efficient host–vector system for *G. frondosa* that allows constitutive expression of transgenes.

The putative transcription factor *Gf.CRZ1* has been reported in a previous study as a candidate gene associated with morphological mutant phenotypes, due to its strong expression in *G. frondosa* mutant strains Gf-A1 and Gf-A4 relative to wild-type strain Gf-N2. To elucidate the functional role of *Gf.CRZ1*, we overexpressed *Gf.CRZ1* in wild-type strain Gf-N2 by introducing the *Gf.CRZ1* expression vector and investigated whether other genes are then differentially expressed in *Gf.CRZ1*-overexpressing strains. As a result, we found that the expression of *Gf.FDH1*, which encodes an NAD-dependent formate dehydrogenase, was higher in *Gf.CRZ1*-overexpressing strains and mutant strains (Gf-A1 and Gf-A4) than in the wild-type strain Gf-N2. In addition, an oxalate decarboxylase gene *Gf.ODC1* involved in oxalic acid degradation was also strongly expressed in *Gf.CRZ1*-overexpressing strains and mutant strains (Gf-A1 and Gf-A4) relative to the wild-type strain Gf-N2. These results suggested that *Gf.CRZ1* might positively

regulate the transcription of *Gf.FDHI* and *Gf.ODCI*, which are involved in oxalic acid degradation. Additionally, the *Gf.CRZI*-overexpressing strains exhibited morphological defects including reduced colony growth rate and poorly developed aerial mycelia similar to mutant strains (Gf-A1 and Gf-A4) during plate culture. Thus, we have established an overexpression method for *G. frondosa* that will be an important genetic tool for analyzing gene function based on overexpression phenotypes.

RNA interference (RNAi), whereby double-stranded RNA (dsRNA) introduced into or expressed in cells can induce the degradation of homologous mRNA in a sequence-specific manner, is used to knock down the expression of a targeted gene during functional analysis. To develop an RNAi-mediated gene silencing method suitable for *G. frondosa*, we selected the hydrophobin gene (*Gf.HydA1*), the fasciclin-domain-containing protein gene (*Gf.FAS1*), and the manganese peroxidase gene (*Gf.MNP1*) as targets for downregulation. We examined knockdown of these genes using an RNAi vector designed to express hairpin RNAs homologous to targeted gene sequences. Significant downregulation of each targeted gene was observed in transformants. *Gf.FAS1*-downregulated transformants exhibited phenotypic defects in fruiting body differentiation after primordia formation, which suggested that *Gf.FAS1* might play an important role in fruiting body differentiation. Thus, the

RNAi-mediated gene silencing method for *G. frondosa* established in the present study will be a useful tool for functional analysis of genes.

In conclusion, we obtained whole-genome sequence for *G. frondosa* and established an efficient host–vector system for *G. frondosa* that allows transgene expression or RNAi-mediated gene silencing. The genetic engineering tools described here will be useful for functional analysis of genes in *G. frondosa*, and will facilitate functional genomics studies that will be useful for commercial mushroom production.

平成 27 年度 学位論文

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

東京家政大学大学院
人間生活学総合研究科
人間生活学専攻

佐藤 真之

指導教員 藤森 文啓 教授

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

目次

第 1 章 緒論	1
参考文献	11
第 2 章 マイタケのゲノム配列情報の取得	
2.1. 序論	15
2.2. 実験材料と方法	20
2.2.1. 供試菌株及び培養条件	20
2.2.2. マイタケからのゲノム DNA の抽出・精製	20
2.2.3. ゲノム配列決定とアセンブリ	20
2.2.4. 遺伝子予測	22
2.2.5. 予測遺伝子のアノテーション	22
2.2.6. 系統解析	23
2.3. 結果と考察	26
2.3.1. 第 2 世代シーケンサーによるマイタケのゲノム配 列決定	26
2.3.2. マイタケゲノム配列からの遺伝子予測	33
2.3.3. 予測遺伝子のアノテーション	36
2.4. まとめ	47
参考文献	50

第 3 章	マイタケの宿主・ベクター系の構築	
3.1.	序論	59
3.2.	実験材料と方法	64
3.2.1.	供試菌株及び培養条件	64
3.2.2.	薬剤感受性試験によるマイタケが感受性を示す薬剤の選定	64
3.2.3.	マイタケ遺伝子発現ベクターの構築	65
3.2.4.	大腸菌からのプラスミド調製	65
3.2.5.	プロトプラストの調製	66
3.2.6.	プロトプラスト-PEG 法による形質転換	67
3.2.7.	ゲノム PCR	68
3.2.8.	サザンブロット解析	68
3.2.9.	RNA の調製及び定量 RT-PCR	69
3.2.10.	蛍光顕微鏡観察	69
3.2.11.	ルシフェラーゼアッセイ	70
3.3.	結果と考察	73
3.3.1.	薬剤感受性試験によるマイタケが感受性を示す薬剤の選定	73
3.3.2.	マイタケ由来のプロモーター及びターミネーターを用いたマイタケ遺伝子発現ベクターの構築	76
3.3.3.	マイタケ遺伝子発現ベクターの導入試験	83
3.3.4.	レポーター遺伝子 <i>EGFP</i> 及び <i>Luc</i> の発現	89
3.4.	まとめ	97
	参考文献	100

第 4 章 推定転写因子 <i>Gf.CRZI</i> の過剰発現による機能解析	
4.1. 序論	105
4.2. 実験材料と方法	108
4.2.1. 供試菌株及び培養条件	108
4.2.2. マイタケ遺伝子発現ベクターの構築	108
4.2.3. 大腸菌からのプラスミド調製	108
4.2.4. マイタケの形質転換と形質転換体の選抜	109
4.2.5. RNA の調製及び定量 RT-PCR	109
4.3. 結果と考察	112
4.3.1. マイタケの <i>Gf.CRZI</i> 過剰発現株の作出	112
4.3.2. <i>Gf.CRZI</i> の過剰発現により発現に影響を受ける遺伝子の探索	116
4.3.3. <i>Gf.CRZI</i> の過剰発現が表現型に及ぼす影響の解析	122
4.4. まとめ	126
参考文献	128
第 5 章 RNAi によるマイタケの遺伝子機能解析	
5.1. 序論	131
5.2. 実験材料と方法	138
5.2.1. 供試菌株及び培養条件	138
5.2.2. RNAi 用ベクターの構築	138
5.2.3. 大腸菌からのプラスミド調製	139
5.2.4. マイタケの形質転換と形質転換体の選抜	139
5.2.5. RNA の調製及び定量 RT-PCR	139

5.2.6.	試験管培養によるマイタケの栽培試験	140
5.3.	結果と考察	143
5.3.1.	ハイドロフォービン遺伝子 <i>Gf.HydA1</i> の RNAi による解析	143
5.3.2.	ファシクリンドメイン含有タンパク質遺伝子 <i>Gf.FAS1</i> の RNAi による解析	151
5.3.3.	マンガンペルオキシダーゼ遺伝子 <i>Gf.MNP1</i> の RNAi による解析	160
5.4.	まとめ	171
	参考文献	173
	第 6 章 総合考察	179
	本論文を構成する学術論文及び学会発表等	190
	用語説明	192
	謝辞	196

第1章 緒論

きのこは古くから食用として世界中で利用され、特に日本の食卓では身近な食材の1つとして慣れ親しまれてきた。食用きのこの栽培は、原木栽培や林地栽培等の屋外の環境を利用してきのこを発生させる露地栽培と人工的に環境を調節した屋内できのこを発生させる施設栽培に大別される。近年は菌株育種や栽培技術の発達により、施設栽培が主流となり、きのこの周年栽培が行われている。日本国内における食用きのこの生産量は平成25年の統計で約43万トンであり、その内主要な栽培きのこの種類と生産量はエノキタケ(約13万トン)、ブナシメジ(約12万トン)、シイタケ(約7万トン)、マイタケ(約5万トン)、エリンギ(約4万トン)の順となっている[1]。また、きのこは古くから病気の予防や健康増進のための生薬として珍重されてきた。近年では、きのこまたはその菌糸体から抽出された成分が抗腫瘍作用[2]や抗酸化作用[3, 4]等の生理活性を示すことが報告されており、医薬分野でも重要な資源として研究が進められている。そのため、食事を通してきのこを積極的に摂取することは、悪性腫瘍や過剰産生された活性酸素による各種疾病リスクの予防に繋がり、健康維持に有効であると期待されている。さらに、きのこは枯木や落葉などの植物遺体を分解して栄養分とすることで有機物を無機物に還元する炭素循環に寄与したり、植物と共生して糖類等の養分を受け取る代わりに生長を助けたりすることで、森林生態系において重要な役割を担っている。栄養摂

取の様式から、きのこは腐生菌、寄生菌、共生菌に大別される[5]。腐生菌の中でもマイタケ、シイタケ、エノキタケ、ブナシメジといった栽培きのこの多くが属する白色腐朽菌は地球上で最も難分解性の天然芳香族高分子であるリグニンを単独で分解できる唯一の生物である。この特異な難分解物質の分解能を利用して、未利用植物バイオマス資源の利活用[6]や環境汚染物質であるダイオキシン類、PCB（ポリ塩化ビフェニル）、DDT（有機塩素系の農薬・殺虫剤）、さらに環境ホルモン類、工業用染料など様々な難分解性物質の分解[7, 8]を目的にした研究が精力的に進められている。

「きのこ」とは、菌類の中で肉眼でも容易に識別できるほど大型の子実体を形成する菌の総称、あるいは子実体そのものを指す。菌類は細胞が線状に繋がって糸状に見える菌糸から構成され、有性的あるいは無性的に形成される孢子によって繁殖するが、有性孢子形成の際に形成される生殖器官を子実体という。菌類のうち、食用きのこは生物学的に担子菌類または子囊菌類に分類されるが、一般的に栽培されているマイタケ（*Grifola frondosa*）、シイタケ（*Lentinula edodes*）、エノキタケ（*Flammulina velutipes*）、ブナシメジ（*Hypsizyguis marmoreus*）などのきのこは担子菌類に属している。きのこは多細胞性で、多核の真核生物であり、菌糸から子実体を形成して孢子を飛散する一連の生活環を繰り返しながら繁殖する。きのこの生活環はその菌が属する分類群によって異なるが、担子菌では単相である担子孢子は発芽して一核菌糸（n）を形成する。互いに交配可能な一核菌糸同士が接触した場合に菌

糸融合と核交換が起こり、重相の二核菌糸 ($n+n$) が形成される。この段階では、細胞内の2つの核は融合することなく同調的に細胞分裂を繰り返し、菌糸体として栄養生長を続ける。この二核菌糸体の生長段階がきのこの生態の主要を占める。二核菌糸体は生長を続け、環境等の条件が整うと子実体を形成する。その後、子実体の担子器内で核融合により複相 ($2n$) となり、続く減数分裂により単相 (n) となった担子胞子が形成される [9, 10] (図 1-1)。

食用きのこの栽培は、一般的に生活環における二核菌糸 ($n+n$) 体の栄養生長から子実体形成までを繰り返し行うことに他ならない。子実体形成に至る条件はきのこの種類により異なるため、生産者による栽培環境条件の検討がなされ、様々なきのこで栽培手法が確立されてきた。食用きのこ栽培は使用する培養基の違いにより原木栽培、菌床栽培、堆肥栽培、林地栽培に大別され、日本国内で主流となっているのは菌床栽培である。菌床栽培は、樹木のオガコ等の培養基材、栄養物、水等を混ぜた培地をビン、袋等の容器に詰めたものに菌を植菌して栽培する方法である。菌床栽培の対象となるのは、多くの場合、腐生菌の中の木材腐朽菌であり、生産性を高めるために人為的に環境条件が操作できる空調施設で周年的に促成栽培が行われている。

近年、きのこは機能性成分を多く含むことから健康食品として注目され、需要は拡大傾向にある。それに伴い、栽培するきのこの品質を維持しながら、培地成分の改良、栽培期間の短縮、栽培設備の効率化等による生産コスト低減と生産性

向上を実現することが、生産者にとって重要な課題となっている。また、大規模きのこ栽培における菌株の劣化や変異は甚大な被害を招きかねないことから、きのこ菌株の品種開発と性能維持も極めて重要である。しかしながら、食用きのこの生産現場における様々な栽培環境条件の設定・管理は、生産者独自の経験や勘に頼っていることが多く、科学的な検証による根拠の裏付けや知見は十分ではない。

本研究の対象であるマイタケは、担子菌門 (*Basidiomycota*)、真正担子菌綱 (*Agaricomycetes*)、タマチョレイタケ目 (*Polyporales*) に属するきのこである。エノキタケやシイタケ等の人工栽培される食用きのこの多くがハラタケ目 (*Agaricales*) に属し、子実体の傘と柄が明確に区別できる典型的なきのこの外観であるのに対し、タマチョレイタケ目であるマイタケは傘と柄が明確に区別できない扇型の傘が多数重なり合った子実体を形成する (図 1-2)。マイタケは自然界においては簡単に目にすることができないことから、自然環境における生態を知ることは容易ではなく、ほとんど調べられていない。マイタケは子実体を発生しやすい菌株が野生種から見つかったことから、人工栽培が定着し、現在では一般の野菜等と同じく日常容易に入手できる食材になっている。マイタケの空調施設栽培では、酸素濃度の低下に伴う二酸化炭素濃度の増加や急な温湿度の変化により、子実体生育の遅延や形態異常による品質低下を生じることが知られているように [11]、生育の段階に合わせた精密な環境制御が必要となる。このため、子実体は発生するものの、期待する収量が得

られないことや子実体分化が正常でなく品質が低下するといった栽培上不安定な部分が今でも見受けられることが多々あり、従来の勘や経験に大きく頼った栽培管理では常時安定した品質のマイタケを生産することは難しいのが現状である。そこで、きのこの栽培方法を科学的に検証し、従来の勘や経験則に頼ったきのこ栽培から、科学的根拠に基づくきのこ栽培へとシステムを再構築することで、きのこの品質及び生産性の向上を実現できると考えている。そのためには、きのこの生理生態を遺伝子レベルで解明することが重要と考え、産業上重要なマイタケをモデルに遺伝子解析を進めることにした。遺伝子解析を進めていくには、対象とする生物の遺伝子情報を集積し、分子生物学的手法を駆使して遺伝子の機能を詳細に解析していくことが最も有効な手段となるが、本研究開始当初、公共データベースに登録されているマイタケの遺伝子情報はわずかしかなかく、遺伝子解析を十分に行える状況になかった。

ゲノムプロジェクトが始まった当初は、ゲノム配列を解読するのに莫大なコストと時間を要したことから、ヒト[12]をはじめ、マウス[13]、線虫[14]、酵母[15]等のモデル生物が対象であり、そのモデル生物の先端的な研究情報の蓄積が近縁他種の研究推進に重要な情報源になっていた。近年、新型シーケンサーの普及により、低コストかつ短時間で大規模な塩基配列解析が可能になり、モデル生物はもとより、非モデル生物のゲノム解読も研究室単位でできる時代になり、その解読数は著しく増加している。現在の生物学研究では、ゲノム

解読をはじめとするトランスクリプトーム、プロテオーム解析等の網羅解析情報により複雑な分子間ネットワークを包括的に理解することを目指したオミックス解析が主流となってきた。このような潮流の中で、我々は2008年にマイタケの大規模配列解析に踏み出し、それをモデルに子実体生育機構を解明することを目指し、初めにマイタケの栽培工程中で発現する遺伝子（mRNA）を網羅的に解析したトランスクリプトーム情報を取得した[16]。このトランスクリプトーム情報を基に作製したマイクロアレイを用いて、これまでに栽培工程中の各生育段階や形質の異なる菌株間で発現に差がある遺伝子群を見出してきた[16, 17]。次に、これら見出した遺伝子群の生体での機能を明らかにするには、遺伝子組換えにより機能を知りたい遺伝子を操作してその影響から機能を調べる遺伝子機能解析をする必要があり、それを可能にする宿主・ベクター系をはじめとした基盤技術の確立が求められた。これら分子生物学的解析を行うための基盤技術の確立には、トランスクリプトーム情報だけでなく、転写調節等の様々な調節に関わる非転写領域を含めた全配列情報、すなわちゲノム配列情報の利用が不可欠であった。また、トランスクリプトーム情報だけでは本来保有する全遺伝子をカバーするのは難しいことから、マイタケを遺伝資源として最大限に活用する観点からもゲノム配列情報を整備することの必要性が高まってきた。そこで本研究は、マイタケで遺伝子機能解析するのに必要な基盤技術を確立するため、最初にマイタケの全ゲノム配列の解読を行い、トランスクリプトーム情報に加え

て新たに全ゲノム配列情報を取得し、これらを統合することでマイタケの遺伝子配列情報を拡充した。次に、このゲノム配列情報を基にマイタケの宿主・ベクター系を構築し、それ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ことによる遺伝子機能解析手法を開発してその有効性を検証した。

本論文の構成は以下の通りである。最初に、マイタケで分子生物学的研究を行う上で必要な基盤情報を整備するため、マイタケの全ゲノム配列を新型シーケンサーによって決定し、その配列情報の解析からマイタケが潜在的に有している全遺伝子を推定した（第2章）。次に、取得したゲノム配列情報を基にマイタケに最適化した遺伝子発現ベクターを作製し、それを用いてレポーター遺伝子として使われてい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*）をマイタケに導入して発現させ、その活性を確認することで目的とする遺伝子を発現できることを実証し、マイタケの宿主・ベクター系を確立した（第3章）。確立した宿主・ベクター系を用いて、マイタケの子実体生育異常を示す変異体で高発現している遺伝子として見出された転写因子 *Gf.CRZ1* を強制発現させ、生体での機能と変異との関連を調べた（第4章）。さらに、遺伝子ノックダウン手法の一つである RNA 干渉（RNAi）のマイタケへの適用を試験した。RNAi は機能を調べたい遺伝子（標的遺伝子）の配列に相同な二本鎖 RNA を細胞内に導入、あるいは発現させることで、標的遺伝子の mRNA の分解を誘導し、発現を抑制する手法である。二本鎖 RNA 構造をとるヘアピン型 RNA を発現するように設

計したベクターを作製し、導入することで標的遺伝子の発現抑制が可能であるかを検証した（第5章）。最後に、第2章から第5章で述べた結果を摘要し、総合考察として今後の課題と展望について論じて総括を行った。

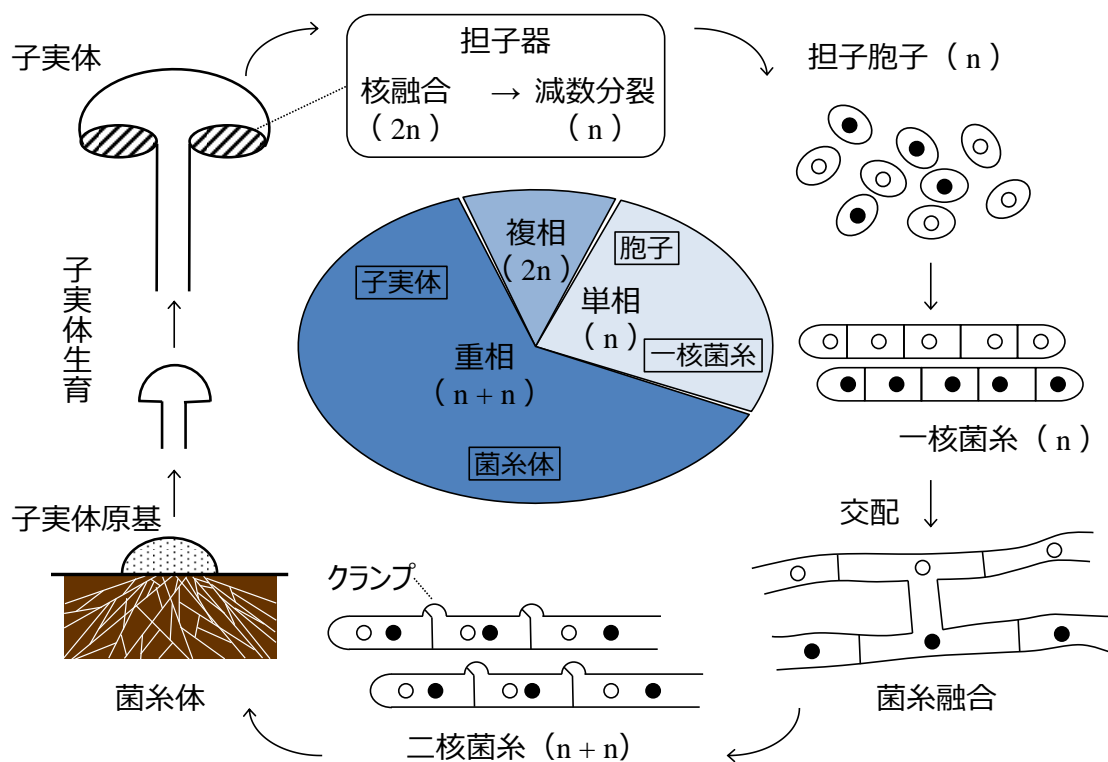


図1-1. 担子菌きのこの生活環

单相である担子胞子は発芽して一核菌糸 (n) となり、互いに交配可能な一核菌糸同士が接触により菌糸融合と核交換が起こり、重相の二核菌糸 (n+n) が形成される。二核菌糸の段階では、細胞内の2つの核は融合することなく同調的に細胞分裂を繰り返し、菌糸体として栄養生長を続け、環境等の条件が整うと子実体を形成する。子実体の担子器内で核融合により複相 (2n) となり、続く減数分裂により单相 (n) になった担子胞子が形成され、サイクルを繰り返す。



図1-2. マイタケ菌床栽培時の子実体の様子

マイタケを菌床栽培した時の子実体の上面（写真左）と側面（写真右）を示した。マイタケの子実体は、無数に分枝した菌柄から分化した扇状の菌傘が多数重なり合って形成される。

参考文献

1. 林野庁 . 平成 25 年 特用林産物の生産動向
<http://www.rinya.maff.go.jp/j/tokuyou/tokusan/1.html>
2. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2: 285–299; doi: 10.1093/ecam/neh107.
3. Dubost NJ, Ou B, Beelman RB (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry* 105: 727–735; doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.030.
4. He JZ, Ru QM, Dong DD, Sun PL (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules* 17: 4373–4387; doi: 10.3390/molecules17044373.
5. 岩瀬剛二 (2002). キノコとカビの基礎科学とバイオ技術 pp. 29–44.
6. Pollegioni L, Tonin F, Rosini E (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal* 282: 1190–1213; doi: 10.1111/febs.13224.
7. Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996). Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4323–4328.

8. Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771–783; doi: 10.1007/s10532-008-9185-3.
9. 鈴木 彰 (2002). キノコとカビの基礎科学とバイオ技術 pp. 17–27.
10. 鎌田 堯 (2002). キノコとカビの基礎科学とバイオ技術 pp. 45–50.
11. 庄司 當 (2000). きのことハンドブック pp. 107–114.
12. International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–45; doi:10.1038/nature03001.
13. Mouse Genome Sequencing Consortium (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562; doi:10.1038/nature01262.
14. The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282: 2012–2018; doi: 10.1126/science.282.5396.2012.
15. Goffeau A1, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 563–567; doi: 10.1126/science.274.5287.546.
16. Kurahashi A, Fujimori F, Nishibori K (2012). Analysis of

- Gene Expression Profiles during cultivation of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 52: 17–32.
17. Kurahashi A, Sato M, Nishibori K, Fujimori F (2014). Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 54: 23–33.

第2章 マイタケのゲノム配列情報の取得

2.1. 序論

ゲノムは、生物の持つ遺伝情報の全体を指す。生物の生命現象をコントロールしている情報はゲノムに由来していることから、ゲノム情報の利用は生物学的研究を進める上で極めて重要である。ゲノム解読が開始された当初は、莫大なコストと時間をかけて解析が行われてきたが、近年は技術革新、特に新型シーケンサーの普及により、低コストかつ短時間で大規模な塩基配列解析が可能になった。その結果、これまでは分子生物学的研究を進めるのが難しかった非モデル生物においてもゲノム解読が比較的容易になり、ゲノム解読される生物種は著しく増えてきている。多くの栽培きのこが含まれる白色腐朽菌では、2002年に *Phanerochaete chrysosporium* のゲノムが最初に解読された[1]。 *P. chrysosporium* は、きのこを形成しないが、リグニン分解能が高く、白色腐朽菌のモデルとして研究が盛んに行われてきた。その後、きのこを形成する担子菌のモデル生物として、2003年にウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinereus*) [2]、2009年にスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) [3]のゲノムが解読された。これらの生物種のゲノム解読には、その当時主流であったサンガー法による従来型のシーケンサーを用いられた。新型シーケンサーが登場した後は、他の生物と同様に、多くの担子菌のゲノム配列が解読され、その数は増え続けている。その多くは、米国エネルギー省の共同ゲノム研究所 (JGI: Joint Geno

me Institute) [4]のプロジェクトで進められたものである。2015年4月現在、158種の担子菌のドラフトゲノム配列情報がJGIで公開されている。しかしながら、JGIのプロジェクトの主眼は、主に未利用の植物系バイオマスのエネルギー利用等に置かれているため、食用きのこのゲノム解析数は未だ少ないのが現状である。食用きのこでは、2009年にツクリタケ (*Agaricus bisporus*) [5]とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、2013年にフクロタケ (*Volvariella volvacea*) [6]とマツタケ (*Tricholoma matsutake*) のゲノムが解読され、JGIで公開されている。また、シイタケ (*Lentinula edodes*) のゲノム配列も2012年に森林総合研究所により解読され、森林生物遺伝子データベース (ForestGEN: <http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/index.html>) で公開されている。

我々は、マイタケをモデルに子実体生育機構を解明することを目標に、2008年には大規模配列解析に着手し、最初に栽培工程の各生育段階で採取したサンプル中の転写産物 (mRNA) を網羅的に配列解析することで、トランスクリプトーム情報を整備した[7]。トランスクリプトーム解析は、マイタケのようなゲノム配列情報のない非モデル生物の遺伝子解析において、例えば子実体生育といった興味ある生体现象に関わる遺伝子群を網羅的に同定できる点で効果的であると考えられる。これまでに、マイタケのマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析から、栽培工程中の各生育段階や形質の異なる菌株間で発現差がある遺伝子群を見出している[7, 8]。それに対して、ゲノム配列情報はトランスクリプター

ム情報だけではカバーできない、転写調節等の様々な制御に関わる非転写領域の配列を含めた、生物が保有する染色体DNAのすべての塩基配列情報である。先に述べたトランスクリプトーム解析により見出してきた遺伝子群の個々の機能を解析し、生体内における機能を明らかにするには、逆遺伝学的な遺伝子機能解析や転写制御機構の解析等の分子生物学的解析を行う必要があり、そのためにはゲノム配列情報の利用が不可欠である。また、トランスクリプトーム情報は取得時に発現している遺伝子しか捉えられていないことから、発現が低い遺伝子や限定的な条件下でのみ発現する遺伝子等をカバーするのは難しく、全遺伝子を網羅するには至っていない。マイタケの保有する全遺伝子の情報をおさえ、遺伝資源として最大限に活用する点からもゲノム情報の整備が更なる研究進展に必要と考えられた。さらに、マイタケは日本国内の食用きのこ生産量第4位の産業上重要なきのこであり、そのゲノムの解読は菌株や栽培技術等の開発促進に大きく寄与することが期待されることから、意義は大きいと考えられた。

そこで本研究では、マイタケの全ゲノム配列を新型シーケンサーにより解読した。ゲノム配列の決定は、ゲノムDNAを短く断片化し、その断片を大量にシーケンシングし、得られたリード（読み取り配列）をコンピューター上でアセンブリ（配列をつなぎ合わせる作業）して再構成することで配列を決定するホールゲノムショットガンシーケンシング法により行った。大規模配列解析において、従来のサンガー法を原理とするキャピラリーシーケンサーを第1世代とする

と、現在の主流は第2世代と呼ばれる新型シーケンサーであり、DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼによる逐次的DNA合成法を用いて、蛍光・発光の検出により、超並列的に塩基配列を決定する技術をもとにしている。その第2世代シーケンサーの中で代表的な機種は、Roche社の454シーケンサーとIllumina社のシーケンサーである。454シーケンサーは、特徴としてリード長が長く（～500 bp）、長いリードはアセンブリの際に有利であることから、まだゲノムが解読されていない生物の新規ゲノム配列決定（*de novo* シーケンシング）に向いているとされる。欠点としては、1ランあたりの取得データ量が少なく、データ量あたりのコストが高い点あげられる。一方、Illumina社のシーケンサーは、リード長は短い（75～100 bp）、1ランあたりの取得データ量が多いためコスト面で優れている。本研究では、第2世代シーケンサーであるロシュ社454 GS FLX Titanium及びイルミナ社Genome Analyzer IIxの機種のシーケンサーを用いて配列解析を行い、特徴の異なるこれらのシーケンサーから得たリードデータを組み合わせることで、読み取りエラーやギャップを最小限に抑え、より長く繋がった配列情報が得られるアセンブリ方法を検討した。次の遺伝子予測には、先に取得していたトランスクリプトームデータであるEST配列データを取得したゲノム配列上にマッピングすることで、ゲノム配列情報のみの場合より高い精度で予測結果が得られるかを検証した。最後に、マイタケのゲノムから予測された遺伝子のアノテーション（機能の注釈）を行い、その中で白色

腐朽菌の木材分解に大きく寄与するとされるセルロースなどの糖質分解に関与する Carbohydrate-Active enzymes (CAZy) 及びリグニン分解に関与する Fungal Oxidative Lignin enzymes (FOLy) に分類される遺伝子群について他の担子菌きのこと比較し、考察した。

2.2. 実験材料と方法

2.2.1. 供試菌株及び培養条件

マイタケのゲノム配列解析には、株式会社雪国まいたけに保存されていた市販マイタケ菌株 M51（森産業，日本）の子実体から得た担子胞子から分離された一核菌糸株である Gf-M1 株を使用した。菌株の継代培養による維持には、ポテトブドウ糖寒天（PDA）培地（Difco, USA）を用い、25°C 暗黒下で培養した。ゲノム DNA の精製には、GPY 培地（2% glucose, 0.2% polypeptone, 0.2% Bacto yeast extract, 0.05% magnesium sulfate, 0.05% potassium dihydrogenphosphate）を用いて、2 週間、25°C 暗黒下で静置培養した菌糸体を用いた。

2.2.2. マイタケからのゲノム DNA の抽出・精製

GPY 培地で培養した菌糸体から培地を除き、液体窒素下で乳鉢により磨砕して粉末状にした後、ISOPLANT II（NIPPON GENE, 日本）を使用して、ゲノム DNA を抽出した。このとき、エタノール沈殿の前に中性飽和フェノールとフェノールクロロフォルム抽出の操作を加え、取扱説明書記載のプロトコールを一部改変して行った。得られたゲノム DNA の濃度と品質の確認には、ナノドロップ（Thermo Fisher Scientific, USA）を用いた。

2.2.3. ゲノム配列決定とアセンブリ

マイタケのゲノム配列決定には、454 GS FLX Titanium（454 FLX; Roche, Switzerland）及び Genome Analyzer IIX（GAIIx;

Illumina, USA) のそれぞれのプラットフォームを用いた。454 FLX ではフラグメントライブラリ及びメイトペアライブラリを作製して配列解析を行った。GAIIx ではペアエンドライブラリを作製して配列解析を行った。すべてのライブラリの作製及びシーケンシングはメーカーの説明書に従った。次に、454 FLX 及び GAIIx から得られたリード（読み取り配列）を以下の5つの方法でアセンブリした。

- (a) 454 FLX 及び GAIIx から得たリードを Newbler Ver 2.5.3 (Roche) または Velvet[9]のアセンブラを用いて、それぞれ単独でアセンブリした。
- (b) 454 FLX と GAIIx から得たリードを混合し、Celera assembler[10]、Velvet、Newbler Ver 2.6 のいずれかのアセンブラを用いてアセンブリした。
- (c) (a)で得られた 454 FLX 及び GAIIx をそれぞれ単独でアセンブリした結果を合わせて、再度、AMOS[11]または Velvet のアセンブラを用いてアセンブリした。
- (d) 454 FLX から得たリードを Newbler Ver 2.5.3 を用いて単独でアセンブリして得た結果を GAIIx から得られたリードを用いて改善した（カスタムアセンブリ）。図 2-1 に示したように、454 FLX のリードをアセンブリして得たスキヤホールドに対して、GAIIx から得たリードを BWA[12]によりマッピングして、エラーの検出と修正を行った。次に、ペアリードの一方がコンティグにユニークマップされ、他方がギャップに位置するリードを局所的アセンブリし、ギャップクローズを行った。

以上のゲノム配列決定からアセンブリは、株式会社ジナリス (横浜, 日本) に委託して行った。

2.2.4. 遺伝子予測

取得したゲノム配列からの遺伝子予測 (開始コドンと終止コドンを含むオープンリーディングフレームの予測) は、遺伝子領域予測プログラムである AUGUSTUS[13]を用いて行った。AUGUSTUS による遺伝子予測を行う際、既知近縁種ゲノムの学習用データとして、ソフトウェアにバンドルされているオオキツネタケ (*Laccaria bicolor*) のパラメーターを適用した。また、遺伝子予測の際に入力できる参照情報として、まったく配列を参照しない場合と先に取得していたトランスクリプトームデータである EST 配列を参照する場合の2つの条件で遺伝子予測を行った。なお、これらの遺伝子予測は、株式会社ジナリス (横浜, 日本) に委託して行った。

2.2.5. 予測遺伝子のアノテーション

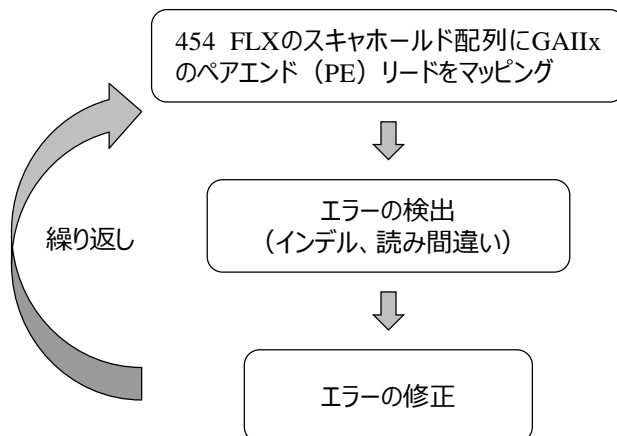
ゲノム配列上で予測されたすべての遺伝子を、図 2-2 に示すアノテーションパイプラインを使って、相同性遺伝子の検索や機能分類等のアノテーション (機能の注釈) を行った。最初に、基本的な自動アノテーションを Blast2GO Ver.2.5.1[14]を用いて行い、BLAST 検索 (BLASTX, e-value $\leq 1e-3$, bit score > 40) による相同性のある遺伝子の情報、遺伝子オントロジー (gene ontology, GO) 用語に基づいた注釈、EC 番号、InterProScan による蛋白質ファミリー・機能モチーフ

フの情報を付与した。次に、アノテーションされたすべての遺伝子について、自動アノテーションの結果を参考に CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) [15] 及び FOLy (Fungal Oxidative Lignin enzymes) [16] のデータベースに基づく分類番号を割り当てた。

2.2.6. 系統解析

マイタケのゲノム配列から予測されたペルオキシダーゼ遺伝子のアミノ酸配列と NCBI データベースに登録されているツクリタケ (*A. bisporus*)、ウシグソヒトヨタケ (*C. cinereus*)、*P. chrysosporium*、ヒラタケ (*P. ostreatus*)、カワラタケ (*Trametes versicolor*)、マツノオオウズラタケ (*Dichomitus squalens*) のペルオキシダーゼのアミノ酸配列を用いて、MEGA5[17]を使用した系統解析を行った。系統樹推定アルゴリズムには群平均法 (UPGMA 法) [18]を用いた。進化距離の推定には、Poisson correction 法[19]を用いた。

シーケンスエラーの修正



ギャップクローズの方法

スキヤホールド配列 (454 FLX)

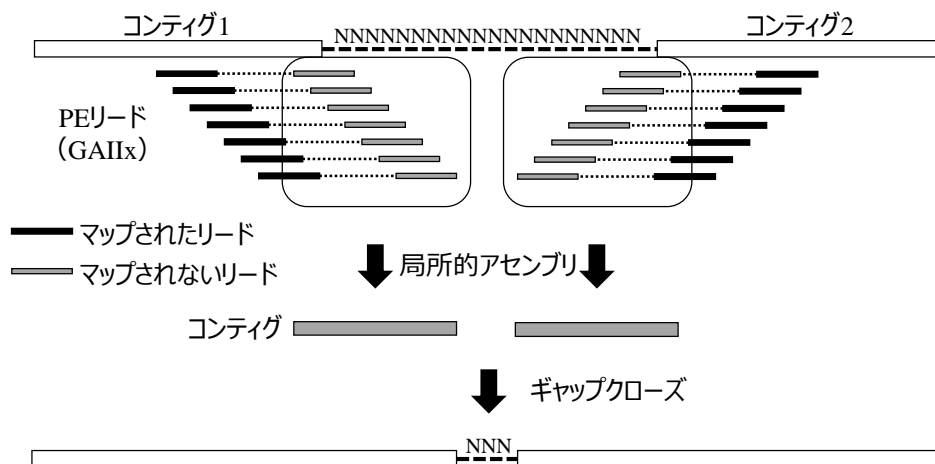


図2-1. カスタムアセンブリの概略

GAIIXから得たペアエンドリードを454 FLXのリードから得たスキヤホールドにマッピングして、エラーの検出と修正を行った。次に、ペアエンドリードの一方がコンティグにユニークマップされ、他方がギャップに位置するリードを局所的アセンブリすることで、ギャップクローズを行った。

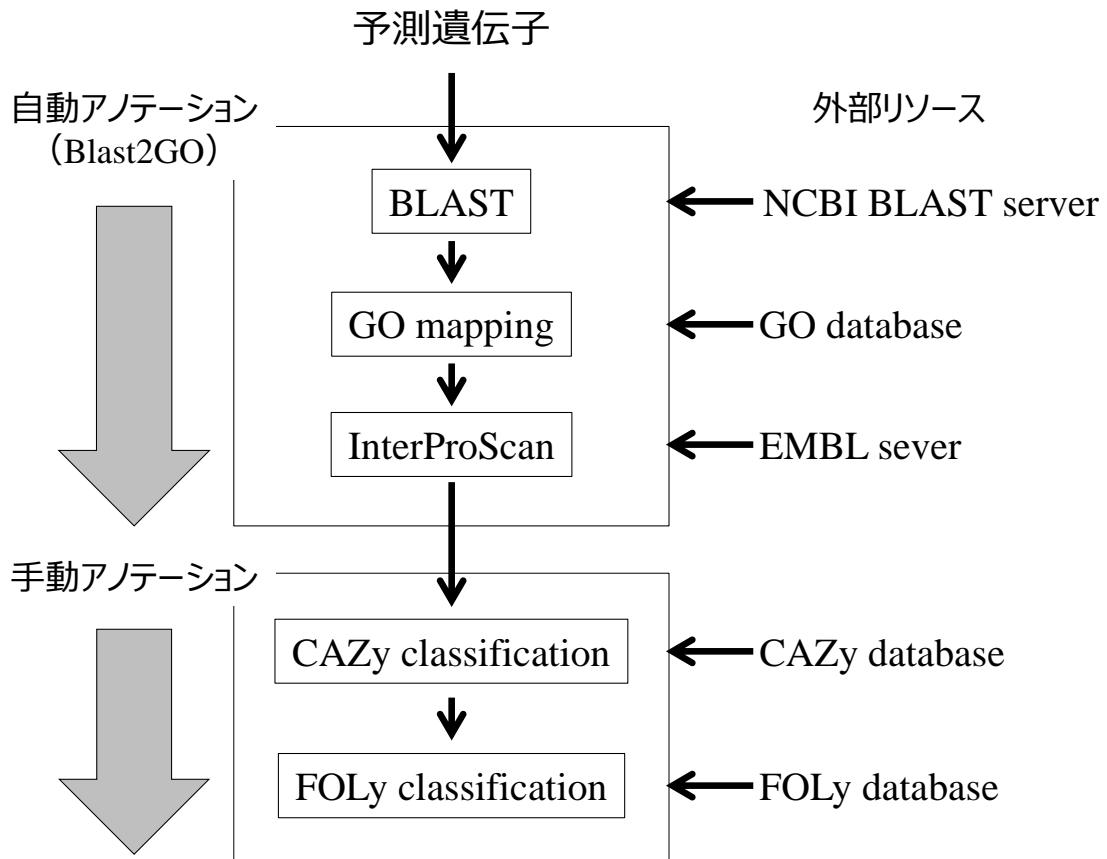


図2-2 アノテーションパイプライン

最初にBlast2GOを用いて、予測遺伝子の自動アノテーションを行い、BLAST検索（BLASTX, e-value $\leq 1e-3$, bit score > 40 ）による相同性のある遺伝子の情報、GO用語に基づいた注釈、EC番号、InterProScanによる蛋白質ファミリー・機能モチーフの情報を付与した。次に手動アノテーションによりCAZyデータベース及びFOLyデータベースに基づく分類番号を割り当てた。

2.3. 結果と考察

2.3.1. 第2世代シーケンサーによるマイタケのゲノム配列決定

マイタケのゲノム配列解読はホールゲノムショットガンシーケンシング法により行い、短く断片化したゲノム DNA の配列をシーケンサーで読み取り、得られた大量のリード（読み取り配列）データをコンピューター上でアセンブリ（配列をつなぎ合わせる作業）することで再構成して、ゲノム配列を決定した。本研究では、第2世代シーケンサーである Roche 社の 454 GS FLX Titanium（454 FLX）及び Illumina 社の Genome Analyzer IIx（GAIIx）を用いて、マイタケの一核菌糸である Gf-M1 株のゲノム配列を解読した。454 FLX のプラットフォームからは、推定されるゲノムサイズの 14 倍の塩基数である 458 Mb のフラグメントリードデータ（カバレッジ 14×）と 336 Mb のメイトペアリードデータ（カバレッジ 10×）が得られた。GAIIx のプラットフォームからは、7 Gb のペアエンドリードデータ（カバレッジ 205×）が得られた。両者の結果を合わせると 7.8 Gb のリードデータを得ることができ、そのゲノムカバレッジは約 230 倍に相当することから、ゲノム配列決定に十分なデータ量を取得できたと判断し、次のアセンブリ作業に進んだ。

機種異なる 454 FLX 及び GAIIx から得た配列データを組み合わせアセンブリすることは、それぞれのプラットフォームが持つ利点を活かす、または欠点を補える点で、有効なアプローチであると考えられる。しかしながら、本研究を開

始した時点では、Roche社とIllumina社のそれぞれの機種から得た配列データを組み合わせて、アセンブリするためのバイオインフォマティクスのパイプラインは存在しなかった。そこで、アセンブリ手法を最適化して精度の高いアセンブリ結果を得るため、454 FLX及びGAIIxの両機種から得た配列データを用いて、アセンブリに用いるデータセットとアセンブリを行うソフトであるアセンブラの組合せを変えた4つの方法（P19-21のa, b, c, dを参照）を試験した。まず、454 FLX及びGAIIxから得たリードをそれぞれ単独でアセンブリした（表2-1 a）。454 FLXのリードデータをシーケンサー付属のアセンブラであるNewbler Ver 2.5.3を用いてアセンブリした結果、得られた総コンティグ数は1,884であった（表2-1 a-I）。コンティグとは、リードをアセンブリして構築されたより長い配列断片であり、コンティグ数が少ないほど、断片化が少なく、連結によるゲノムの再構成が進んでいることを示している。また、454 FLXでは、DNA断片の両末端の配列を読んだメイトペアリードデータを用いて、その位置情報をもとに複数のコンティグを推定される距離間をギャップで繋げたスキマホールドの作製が可能であり、その総数は280であった。一方、GAIIxのリードデータを、Genome Analyzerのデータフォーマットに対応し、最も広く普及しているオープンソースのアセンブラであるVelvetを用いてアセンブリした結果、得られた総コンティグ数は5,553であった（表2-1 a-II）。この結果から、マイタケのゲノム配列解析では、454 FLXの長いリードの方が断片化を抑えられ、*de novo* アセンブリに適して

いることが示された。次に、454 FLX と GAIIx から得られたリードデータを混合してアセンブリする混合リード法(表 2-1 b)と単独リード法によりそれぞれ単独でアセンブリして得たコンティグを混合して再度アセンブリする混合コンティグ法(表 2-1 c)を試験した。アセンブラには、上記の単独のリードデータのアセンブリに使用したものに加え、異なる機種から得たリードデータを混ぜてアセンブリするためのパイプラインを備えた Celera 及び AMOS を使用した。その結果、混合リード法及び混合コンティグ法から得られた総コンティグ数は 454 FLX のリードデータを単独でアセンブリした時に比べて多く、顕著な改善効果は見られなかった。そこで、454 FLX の単独リード法で得たアセンブリ結果に対して、GAIIx のリードデータを使って、エラーの修正及びギャップクローズを行うカスタムアセンブリ法(図 2-1)を試した。その結果、総コンティグ数が 1,884 から 1,186 (-37%)に、総ギャップ長が 647,199 から 393,664 (-39%)に減少し、アセンブリ結果の改善が見られた(表 2-1 d)。以上のことから、マイタケゲノムの *de novo* アセンブリにおいては、カスタムアセンブリ法が最も適しており、最終的に、マイタケゲノムのサイズは約 33.8 Mb、スキヤホールド数 280、コンティグ数 1,186 のアセンブリ結果が得られた。前述のように、Roche 社の 454 シークエンサーは、他社のシークエンサーに比べてリード長が長いいため、より長いコンティグが得られるとともに、メイトペアリードを利用することでコンティグを整列して連結させたスキヤホールド配列を得ることができる。よって、*de novo* シーク

エンシングに適したシーケンサーであるといえる。しかし、欠点として、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、シーケンスエラーによる Indel（挿入または欠失）が生じやすい。これは、解析の原理であるパイロシーケンシングの技術的な問題に起因していると考えられる[20、21]。このようなエラーが遺伝子コード領域に起こった場合はフレームシフトにより正確な遺伝子情報を反映しない可能性がある。一方で、Illumina 社のシーケンサーはリード長が短く、アセンブリの際に断片化を起こしやすいが、ホモポリマー領域でのシーケンスエラーは稀であり、解読精度は高い[22]。したがって、本研究で行ったカスタムアセンブリ法は、Roche 社及び Illumina 社の両シーケンサーの利点を活かすことによって、読み取りエラーやギャップを最小限に抑え、断片化の少ないより長いコンティグ得ることができる点で有効であることが示された。

新型シーケンサーによるゲノム解読から得られるデータは、ドラフトゲノム配列（ギャップ等の未決定領域を含んだ概要配列）である。様々な生物でドラフトゲノム配列が決定されているが、データの品質には特に基準がないので、そのアセンブリ結果の精度は様々であるのが現状である。本研究で取得したマイタケのドラフトゲノム配列は、エラー修正とギャップクローズをしている点で、より品質の高いデータ整備を目指したものである。マイタケと既にゲノム解読されている他の担子菌きのこのゲノムデータの比較を表 2-2 に示した。ゲノム配列データの精度の指標として、総スキヤホール

ド数と総コンテイング数を比較すると、マイタケのゲノムデータは主にサンガー法により時間をかけて解析されたスエヒロタケ (*S. commune*) やツクリタケ (*A. bisporus*) の数値には及ばない部分はあるが、同時期に第2世代シーケンサーで解析されたカワラタケ (*T. versicolor*) やマツノオオウズラタケ (*D. squalens*) とは同等以上の数値であり、公開されているゲノムデータと遜色のない高精度のデータを取得できたといえる。

表 2-1. アセンブリの手法とアセンブラの組合せ

アセンブル方法	(a) 単独リード		(b) 混合リード			(c) 混合コンティグ		(d) カスタム
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
配列データ	454 FLX	GAllx	454 FLX + GAllx	454 FLX + GAllx	454 FLX + GAllx	I + II	I + II	454 FLX + GAllx
アセンブラ	Newbler v2.5	Velvet	Celera	Velvet	Newbler v2.6	AMOS	Velvet	custom
総コンティグ数	1,884	5,533	N/A	5,228	2,215	6,665	11,104	1,186
総スキヤホールド数	280	N/A	482	N/A	358	N/A	N/A	280
N50 スキヤホールド長 (bp)	311,974	94,007	220,935	157,841	230,810	173,887	32,605	312,243
総ギャップ長 (bp)	647,199	171,790	8,373	1,659,751	743,542	310,229	0	393,664

(a) 単独リード法は454 FLX及びGAllxから得たリードをそれぞれ単独でアセンブリした。

(b) 混合リード法は454 FLX及びGAllxから得たリードを混合し、それぞれ異なるアセンブラを用いてアセンブリした。(c) 混合コンティグ法は単独リード法で得た454 FLX及びGAllxのコンティグデータ (I + II) を合わせて、再度それぞれ異なるアセンブラを用いてアセンブリした。(d) カスタムアセンブリ法は単独リード法で得た454 FLXのアセンブリデータをGAllxから得たリードを用いてエラーの修正及びギャップクローズを行った。コンティグはリードを配列の重なる部分で連結してできた連続配列であり、その総数を示した。スキヤホールドは、メイトペアリードの位置情報をもとに複数のコンティグを推定される距離間でギャップで繋ぎ合わせた配列であり、その総数を示した。N50 スキヤホールド長はスキヤホールド配列をサイズの大きい順に塩基数を足していき、ゲノムサイズの50%に達した時のスキヤホールド配列のサイズである。総ギャップ長はアセンブリ結果中のギャップの総塩基数である。

表 2-2. マイタケと他の担子菌きのこのゲノムデータの比較

	マイタケ	カララタケ	マツノオウズラタケ	スエヒロタケ	ツクリタケ	ヒラタケ	オホキツネタケ
	<i>G. frondosa</i>	<i>T. versicolor</i> ^[4]	<i>D. squulens</i> ^[4]	<i>S. commune</i> ^[3]	<i>A. bisporus</i> ^[4]	<i>P. ostreatus</i> ^[4]	<i>L. bicolor</i> ^[23]
ゲノム統計値							
シークエンス手法	454+Illumina	454+Illumina+Sanger	454+Illumina	Sanger	Sanger	454+Sanger	Sanger
ゲノムサイズ (Mb)	33.8	44.79	42.8	38.5	30	35.6	64.9
総スキマホールド数	280	283	542	36	29	572	665
総コンテイング数	1,186	1,443	2,852	352	254	3,272	4,398
カバーレッジ	×229	×40	×51	×8	×9	×21	×25
遺伝子統計値							
総遺伝子数	16,097	14,296	12,290	13,210	10,438	12,206	23,132
平均遺伝子長 (bp)	1,453	1,790	1,890	1,795	1,764	1,692	1,549
平均タンパク質長 (aa)	377	422	419	448	426	413	356
平均エクソン数	5.1	5.8	5.8	5.7	6.1	6.1	5.3
平均エクソン長 (bp)	224	241	254	249	234	215	220
平均イントロン長 (bp)	77	83	86	79	71	77	92

マイタケのゲノムデータと公開されている他の担子菌きのこのゲノムデータの統計値の比較を示した。シーケンス手法の項目では、Roche社の454シークエンサーを使用している場合を454、Illumina社のシークエンサーを使用している場合をIllumina、サンガー法の場合はSangerと示している。

2.3.2 マイタケゲノム配列からの遺伝子予測

ゲノム配列解読から得られた塩基配列情報のままでは、どの領域に遺伝子がコードされているか、どのような遺伝子群がコードされているのかといった情報は簡単にはわからない。ゲノム配列から有用な情報を引出すには、まず、ゲノム配列上の遺伝子の位置や構造などの情報を正確に得ることが必要である。一般的には、ゲノム配列情報を取得した後に、遺伝子予測プログラムでタンパク質をコードしている領域（オープンリーディングフレーム）を予測する。本研究では、マイタケゲノム配列からの遺伝子予測を *ab initio* 法による真核生物用の遺伝子予測プログラムである AUGUSTUS[13]を用いて行った。*ab initio* 法は、塩基配列の統計的な情報に基づいて遺伝子コード領域の統計モデルを構築し、このモデルにマッチした領域があれば、そこに遺伝子がコードされていると推定する方法である。また、AUGUSTUS は、EST 配列やアミノ酸配列などの既知の配列情報を追加情報として組み込む機能を備えており、配列の相同性による推定も可能である。

AUGUSTUS による遺伝子予測は、モデル構築のための学習データセットにオオキツネタケのものを用いて行った。最初に、遺伝子予測の際に追加できる参照情報を用いずに、マイタケゲノム配列から遺伝子予測をした結果、10,505 個の遺伝子が予測された（表 2-3）。次に、既已取得していたマイタケの 13 生育段階における EST 配列を参照情報に用いて遺伝子予測をした結果、EST 配列の 95.9%がゲノム上にマップされ、16,097 個の遺伝子が予測された（表 2-3）。EST 配列情報を参照情報

に使用した時の予測遺伝子数は、参照情報がない場合に比べて、1.53倍に増加した。このように、ゲノム配列情報のみでは予測できない遺伝子が多く存在することから、EST配列情報を組み込んでパラメーターを最適化することで予測精度を向上できることが示された。原核生物においては、遺伝子予測プログラムによる予測精度が極めて高く、90%以上の精度で予測が可能であるといわれている。一方で、真核生物における予測精度はまだ高いとはいえず、近縁種のゲノム情報が少ない生物種の *de novo* 解析では、その精度がさらに低くなる。真核生物における遺伝子予測が原核生物よりも難しい大きな理由として、遺伝子のエクソン・イントロン構造の存在が考えられる。特に担子菌類の遺伝子は基本的にイントロンが多く、短いエクソンが多数存在することから [23]、一般的な真核生物用に構築された予測アルゴリズムでは、すべてのエクソン・イントロン構造を正確に予測するのは難しいと考えられる。したがって、*de novo* シークエンス解析における遺伝子予測は、EST配列をゲノム上にマッピングすることにより直接的に遺伝子構造を同定していくことが現時点では最も有効なアプローチといえる。本研究結果は、ゲノム配列情報の取得だけでなく、ESTやRNA-seq等の遺伝子転写産物(RNA)配列情報も同時に取得することが真核生物ゲノムで正確な遺伝子予測をするのに重要であることを示しており、これは *de novo* シークエンス解析において有用な知見を提供するものと考えられる。

表 2-3. EST配列データの参照による遺伝子予測精度の比較

予測プログラム	参照情報	予測遺伝子数	平均mRNA長 (bp)	BLASTヒット数
AUGUSTUS 2.5.5	なし	10,505	2208	5,813
AUGUSTUS 2.5.5	EST配列データ	16,097	1196	6,310

上段は、参照情報を用いずにAUGUSTUSのab initio法でマイタケゲノム配列から遺伝子予測を行った結果を示した。下段は、先に取得していたマイタケの13生育段階におけるEST配列データを参照情報に用いて遺伝子予測を行った結果を示した。

2.3.3 予測遺伝子のアノテーション

マイタケのゲノム配列から予測された 16,097 個の遺伝子について、Blast2GO による自動アノテーションを行った結果、10,942 個 (68%) の遺伝子が NCBI に登録されている既知の遺伝子と相同性があることがわかった。残りの約 3 割の遺伝子は、公共データベースに登録されている遺伝子とは相同性がなく、現時点では機能注釈が難しい遺伝子であった。このことは、マイタケを含むきのこ類の分子生物学知見の蓄積が未だ少ないことによるものと思われた。相同性が見つかった遺伝子のトップヒットの結果を生物種ごとに並べたグラフを図 2-3 に示した。マイタケの遺伝子の半数以上は同じ白色腐朽菌であるカワラタケ (*T. versicolor*) やマツノオオウズラタケ (*D. squalens*) と相同性が高かった。それに次いで、褐色腐朽菌である *Postia placenta* やナミダタケ (*Serpula lacrymans*) と相同性の高い遺伝子が多かった。それらに比べて、同じ白色腐朽菌であるスエヒロタケ (*S. commune*) や *P. chrysosporium* とは相同性の高い遺伝子が少なかった。褐色腐朽菌は木質中のセルロースとヘミセルロースを分解するが、リグニンの分解は限定的であり、その点でリグニンを分解できる白色腐朽菌とは異なる。マイタケは白色腐朽菌でありながら褐色腐朽菌とも相同性の高い遺伝子があることから、進化的な側面においても興味深い結果といえる。

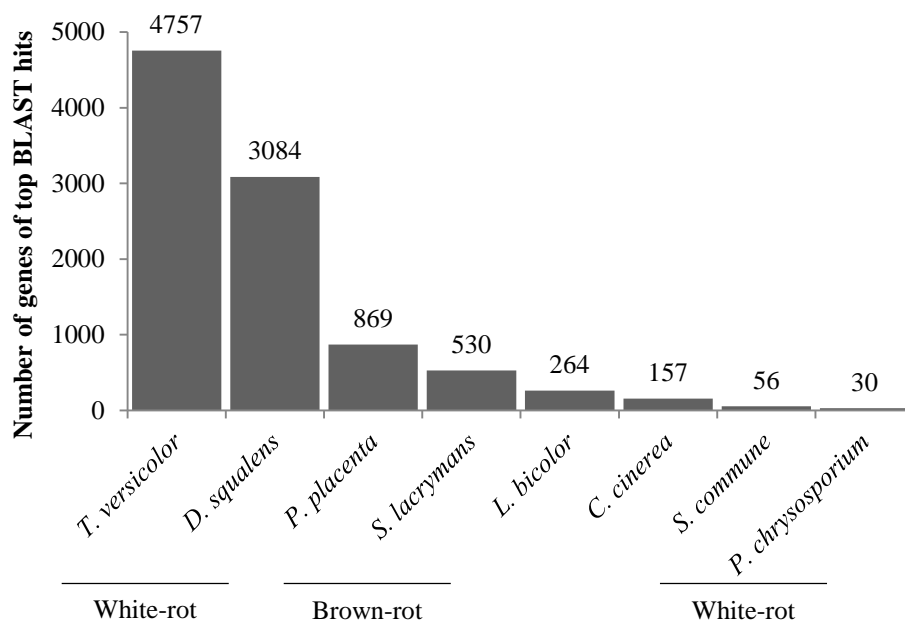


図2-3. BLAST検索結果におけるトップヒット数の生物種の割合

マイタケのゲノム配列から予測された遺伝子をBLAST検索し、ヒットした遺伝子を相同性の最も高いトップヒットした生物種で分けて、その和が多い順に示した。

〔糖質関連酵素〕

きのこは菌糸を伸ばしながら、有機物を分解して栄養物を摂取することで生長し、繁殖している。マイタケが属する木材腐朽菌は、木材中のセルロース、ヘミセルロースといった細胞壁多糖成分を分解して栄養成分としている。その際、セルロース、ヘミセルロースは、セルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの糖質分解酵素により低分子化され利用される。したがって、糖質分解酵素はきのこの生存にとって重要な要素の一つである。これらセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの糖質分解酵素群の情報をまとめたものとしては、アミノ酸の相同性から近い関係にある酵素をファミリーとして分類した糖質関連酵素 (CAZy) データベース[15]がある。CAZy では、糖質加水分解酵素 (GH: Glycoside Hydrolase)、糖転移酵素 (GT: GlycosylTransferases)、炭水化物エステラーゼ (CE: Carbohydrate Esterases)、多糖リアーゼ (PL: Polysaccharide Lyases)、糖結合モジュール (CBM: Carbohydrate-Binding Module) ごとにファミリーに番号が振られて分類されている。マイタケの予測遺伝子について、CAZy データベースをもとにアノテーションをした結果、324 個の遺伝子が CAZy のファミリー群に属し、その内訳は、GH に分類された遺伝子が 211 個、GT に分類された遺伝子が 69 個、GE に分類された遺伝子が 25 個、PL に分類された遺伝子が 8 個、CBM に分類された遺伝子が 11 個であった。GH ファミリーの中でも、セルロース、ヘミセルロース、キシログルカン、ペクチンといった植物細胞壁多糖類の分解に関与するファミリーのいくつか

に着目し、各ファミリーに分類される遺伝子数をマイタケとゲノム情報が公開されている他の担子菌 [3, 4, 24, 25, 26, 27] で比較した (表 2-4)。セルロースの分解に関わるセルラーゼは、その分解様式からエンドグルカナーゼとエキソグルカナーゼに大別され、主に GH5、6、7 に分類される。GH5、6、7 における遺伝子数の分布は、マイタケを含めた白色腐朽菌の間で類似していた。ヘミセルロースの分解に大きく寄与するエンドキシラナーゼは主に GH10、11 に分類されるが、こちらもセルラーゼと同様に分類される遺伝子数は白色腐朽菌の間で類似していた。これらに分類される遺伝子の数は、褐色腐朽菌や他の担子菌類と比べると大きく異なることから、マイタケは白色腐朽菌特有の遺伝子群を保有していると考えられた。

最近の研究では、マイタケをオガコ培地で栽培した時にエンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ、エンドキシラナーゼ等の酵素生産が確認されており、これらの活性は菌糸が培地中に蔓延する培養初期にピークに達することが報告されている [28]。これらの酵素は、おそらく主に GH5、6、7、10、11 に分類されると予想される。マイタケは、栽培工程中に多くの糖質関連酵素を生産することで培地中の培養基質であるオガコに加え、栄養物であるコーンブラン等の植物性の多糖類を分解して利用していると考えられている。したがって、CAZy によるアノテーション結果は、マイタケの生育に影響する因子の特定や培地組成の改良を科学的に検証していく上で有用な情報となる。

表 2-4. マイタケと他の担子菌きのこのCAZy分類の比較

CAZy分類	ターゲット	白色腐朽菌					褐色腐朽菌			糞生菌	堆肥分解菌	外生菌根菌
		マイタケ	カワラタケ	マツノオオシラタケ	スエヒロタケ	ヒラタケ	ナメタケ	ナメタケ	ウシグハヒトヨタケ			
		<i>G. frondosa</i>	<i>T. versicolor</i> ^[25]	<i>D. squadens</i> ^[25]	<i>P. chrysosporium</i> ^[25]	<i>S. commune</i> ^[31]	<i>P. ostreatus</i> ^[4]	<i>S. lacrymans</i> ^[26]	<i>C. cinerea</i> ^[24]	<i>A. bisporus</i> ^[4]	<i>L. bicolor</i> ^[2,4]	
		タマシヨレイタケ目	タマシヨレイタケ目	タマシヨレイタケ目	タマシヨレイタケ目	ハラタケ目	ハラタケ目	イウチ目	ハラタケ目	ハラタケ目	ハラタケ目	
GH5 (CBM1)	セルロース	4	4	4	4	2	3	3	1	3	1	
GH6	セルロース	1	1	1	1	1	3	1	5	0	0	
GH7	セルロース	3	4	4	9	2	16	0	7	0	0	
GH10	ヘミセルロース	5	6	5	6	5	3	1	5	2	0	
GH11	ヘミセルロース	0	0	0	1	1	2	0	6	2	6	
GH28	ペクチン	7	11	7	4	3	4	7	3	4	0	
GH43	ペクチン, ヘミセルロース	3	3	7	4	19	3	2	4	2	0	
GH51	ペクチン, ヘミセルロース	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0	
GH61	植物細胞壁 (不確定)	13	18	15	14	22	7	5	33	5	8	
GH74	キシログルカン	1	1	1	4	1	3	1	1	1	0	

マイタケのゲノム配列から予測された遺伝子をCAZyにより分類し、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、キシログルカン、ペクチンといった植物細胞壁多糖類の分解に関与するGH5, 6, 7, 10, 11, 28, 43, 51, 61, 74に分類される遺伝子数を示し、ゲノム情報が公開されている他の担子菌きのこのデータと比較した。

[リグニン分解酵素]

木材はセルロース、ヘミセルロース、リグニンを主成分とし、セルロースとヘミセルロースがつくる構造体の隙間をリグニンが埋めることによって強固な性質を持ち、微生物などによる分解を受けにくい。リグニンは難分解性芳香族高分子であり、人工的に分解するには高温高压下での酸やアルカリ処理が必要であり、多くのエネルギーを必要とする。きのこは、このような難分解性のリグニンを分解できる生物であり、その中でもマイタケを含む白色腐朽菌は特に強い分解能力を持っている。白色腐朽菌はリグニン分解酵素である酸化酵素群を分泌し、リグニンを酸化的に分解することで、木材の腐朽を進行させていると考えられている。このようにリグニン分解酵素は、きのこの木材腐朽による栄養摂取機構を科学的に理解する目的において、または難分解性バイオマス資源の有効利用の観点においても重要かつユニークな酵素群である。

菌類のリグニン分解酵素群を分類したデータベースとして、FOLy[16]がある。FOLyでは、酵素の配列及び構造をもとに分類され、大きく **Lignin Oxidases (LO ファミリー)** と **Lignin-Degrading Auxiliary enzymes (LDA ファミリー)** の2つのカテゴリがある。リグニンに対して、直接的に作用する酵素群を **LO ファミリー**、間接的に作用する酵素群を **LDA ファミリー**と定義している。マイタケの予測遺伝子を FOLy データベースの分類をもとにアノテーションした結果、**LO1**(ラッカーゼ)に分類された遺伝子が9個、**LO2**(ペルオキシダーゼ)に分類された遺伝子が17個、**LO3**(セロビオースデヒ

ドロゲナーゼ)に分類された遺伝子が2個、LDA1(アリアルアルコールオキシダーゼ)に分類された遺伝子が5個、LDA3(グリオキシル酸オキシダーゼ)に分類された遺伝子が5個、LDA4(ピラノースオキシダーゼ)に分類された遺伝子が1個、LDA6(グルコースオキシダーゼ)に分類された遺伝子が1個、LDA7(ベンゾキノンレダクターゼ)に分類された遺伝子が1個、LDA8(アルコールオキシダーゼ)に分類された遺伝子が3個であった(表2-5)。マイタケの保有するリグニン分解酵素群を他の担子菌[1, 3, 4, 24, 25, 26]と比較すると、LO2に分類されるペルオキシダーゼ遺伝子が他の担子菌に比べて多い点特徴的であり、同じ白色腐朽菌である *T. versicolor* や *D. squalens* と類似していた。また、マイタケはグリオキシル酸オキシダーゼと予測される LDA3 に分類される遺伝子が多く有していることがわかった。グリオキシル酸オキシダーゼは、ペルオキシダーゼの反応に必要な過酸化水素を供給することでリグニン分解に関与することが示唆されており、*P. chrysosporium* ではグリオキシル酸オキシダーゼの活性化にペルオキシダーゼが関わるということが報告されている[29]。したがって、FOLy分類から、マイタケのリグニン分解にはペルオキシダーゼとグリオキシル酸オキシダーゼの関与が大きいことが推察される。

LO2に分類されたペルオキシダーゼ関連遺伝子は、マイタケのリグニン分解において主要な役割を果たすことが予想されることから、構造モチーフをもとに機能的な分類を行った。リグニン分解に関わるペルオキシダーゼとしては、リグニン

ペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ (MnP) が知られている。LiP は、基質から電子を引き抜くことによってラジカルを生成し、それに続く分子内の電子移動によりリグニン分解を引き起こす。*P. chrysosporium* では、LiP の反応性に関わる Trp¹⁷¹ 残基が見出されており [30]、これに相同性のある Trp 残基を持つことが LiP の機能に必須な構造的特徴として定義されている。MnP は、メディエーターである Mn²⁺ を Mn³⁺ に酸化することを介して、リグニン分解に寄与すると考えられている。*P. chrysosporium* の MnP1 では、Mn²⁺ 結合部位を構成する 3 つのアミノ酸残基 (Glu³⁵、Glu³⁹、Asp¹⁷⁹) がわかっており [31]、MnP はこれに相同なアミノ酸残基を有することをもって定義されている。また、LiP と MnP の両方の構造的特徴を有するペルオキシダーゼも存在しており、バーサタイルペルオキシダーゼ (VP) と定義されている [32]。一方で、LiP 及び MnP どちらの構造的特徴を持たないペルオキシダーゼは、ジェネリックペルオキシダーゼ (GP) と定義されている [33]。この構造的特徴による定義をもとに、マイタケで LO2 に分類されたペルオキシダーゼをコードすることが推定される遺伝子を分類し、さらにそのアミノ酸配列を用いて、他の担子菌のペルオキシダーゼとの分子系統解析を行い、両結果を照らし合わせた (図 2-4)。この時、LO2 に分類された 17 個の推定ペルオキシダーゼ遺伝子のうち、2 個は予測されたアミノ酸配列が短く、構造的特徴による分類ができなかったため、結果からは除外している。系統樹から、マイタケの推定ペルオキシダーゼ遺伝子の大部分は、*P. ostreatus*、

T. versicolor、及び *D. squalens* の MnP 及び VP が混在する不均一なクラスタに位置した。マイタケの 15 個の推定ペルオキシダーゼ遺伝子の内、MnP と分類された遺伝子が 7 個、VP と分類された遺伝子が 2 個、Mn²⁺結合に関わる 3 つのアミノ酸残基のうち 1 つまたは 2 つを欠いた不定型の VP に分類された遺伝子が 2 個、GP と分類された遺伝子が 3 個、どのクラスタにも属さない遺伝子が 1 個であった。マイタケの遺伝子の中で LiP と分類される遺伝子は 1 つもなかったことから、マイタケのリグニン分解に寄与するペルオキシダーゼの中心は MnP であると考えられた。過去に、マイタケ栽培工程中の培養時の定性解析で LiP の活性がないことが確認されており [28]、今回の結果から、マイタケが LiP 遺伝子を持たないことがゲノムレベルでも明らかになった。

表 2-5. マイタケと他の担子菌きのこのFOLy分類の比較

FOLy分類	白色腐朽菌						褐色腐朽菌				糞生菌		堆肥分解菌			
	マイタケ	カラタケ	マツノオオズラタケ	スエヒロタケ	ヒラタケ	チミタケ	チミタケ	イグナ目	タマチヨレイタケ目	タマチヨレイタケ目	ウシグシヒトヨタケ	ツクリタケ	ウシグシヒトヨタケ	ツクリタケ	ウシグシヒトヨタケ	ツクリタケ
	<i>G. frondosa</i> タマチヨレイタケ目	<i>T. versicolor</i> ^[25] タマチヨレイタケ目	<i>D. squatalens</i> ^[25] タマチヨレイタケ目	<i>P. chrysosporium</i> ^[1] タマチヨレイタケ目	<i>S. commune</i> ^[5] ハラタケ目	<i>P. ostreatus</i> ^[4] ハラタケ目	<i>S. lacrymans</i> ^[26] イグナ目	<i>P. placenta</i> ^[26] タマチヨレイタケ目	<i>C. cinerea</i> ^[24] ハラタケ目	<i>A. bisporus</i> ^[4] ハラタケ目						
ラッカーゼ	9	10	13	0	6	6	6	8	17							
他のマルチ銅オキシダーゼ																
LO 1																
ヘルオキシダーゼ	17	26	12	16	0	7	0	1	1							
LO 2																
セロピオースデヒドロゲナーゼ	2	1	1	1	1	1	2	0	1							
小合計	28	37	26	17	7	14	8	9	19							
LDA 1																
アリアルアルコールオキシダーゼ	5	1	1	3	2	12	6	8	18							
LDA 3																
グリオキシル酸オキシダーゼ	9	5	5	1	2	0	3	5	0							
LDA 4																
ピラノースオキシダーゼ	1	2	0	1	1	0	0	0	0							
LDA 6																
グルコースオキシダーゼ	1	0	0	1	7	0	0	0	1							
LDA 7																
ベンゾキノンレダクターゼ	1	1	1	4	4	0	2	2	2							
LDA 8																
アルコールオキシダーゼ	3	4	4	0	4	1	1	2	0							
小合計	20	13	11	10	20	13	12	17	21							
総合計	48	50	37	27	27	27	20	26	40							

マイタケのゲノム配列から予測された遺伝子をFOLyにより分類し、ゲノム情報が公開されている他の担子菌きのこのデータと比較した。

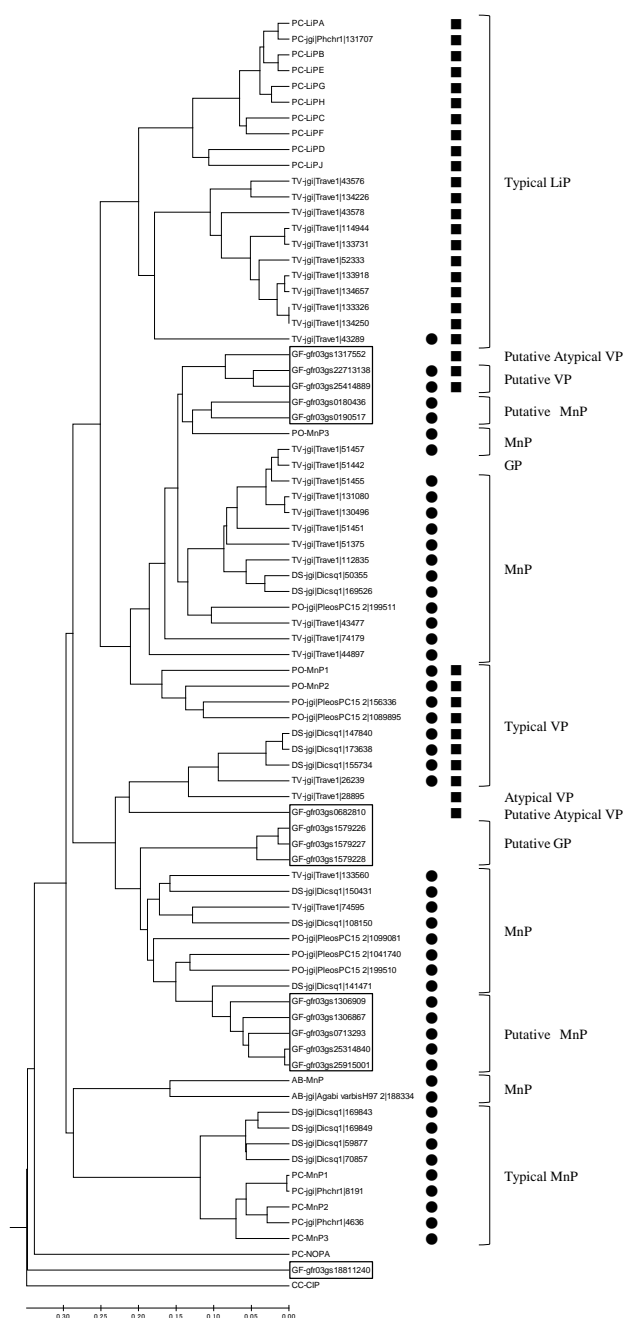


図2-4. 担子菌ペルオキシダーゼの系統樹と構造的分類

分子系統解析はMEGA5により行い、系統樹推定アルゴリズムには群平均法（UPGMA法）を、進化距離の推定にはPoisson correction法を用いた。●：MnPに特徴的な構造を有する、■：LiPに特徴的な構造を有する。生物種の表記：AB, *A. bisporus*; CC, *C. cinerea*; DS, *D. squalens*; GF, *G. frondosa*; PC, *P. chrysosporium*; PO, *P. ostreatus*; TV, *T. versicolor*。エントリしたタンパク質配列：AB-MnP; CAG27835, CC-CIP; CAA50060, PC-LiPA; AAA53109, PC-LiPB; AAA33741, PC-LiPC; AAA33739, PC-LiPD; CAA33621, PC-LiPE; AAA33738, PC-LiPF; AAA33736, PC-LiPG; ABT17199, PC-LiPH; AAA56852, PC-LiPJ; AAD46494, PC-MnP1; AAA33744, PC-MnP2; AAA33745, PC-MnP3; AAB39652, PC-NOPA; AAU82081, PO-MnP1; AAA84396, PO-MnP2; CAB51617, PO-MnP3; BAA33449

2.4. まとめ

本章では、マイタケの分子生物学的解析を行うために必要な遺伝子情報基盤を充実させることを目的に、新型シーケンサーを用いて、マイタケのゲノム解読を行い、データベースとして整備した。結論として、以下のように摘要される。

1. 第2世代シーケンサーであるロシュ社及びイルミナ社の2機種 of シーケンサーを用いて、マイタケのゲノム解読を行った。2機種 of シーケンサーから得られた配列データを用いて、最適なアセンブリ手法を検討した結果、ロシュ社シーケンサーから得たデータのアセンブリ結果を主として、それをイルミナ社シーケンサーのデータで改善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、断片化の少ないより長いコンティグが得られる点で優れていることがわかった。このカスタムアセンブリ法により、ゲノムサイズ約 33.8 Mb、スキャホールド数 280、コンティグ数 1,186 のマイタケドラフトゲノム配列データを取得することに成功した。
2. マイタケゲノム配列からの遺伝子予測をする際に、これまでに取得していた EST 配列データを参照情報にすることで、参照情報がない場合に比べて 1.53 倍多くの遺伝子が予測された。参照情報なしでは予測できない遺伝子が多いことから、EST 配列データの利用は遺伝子予測精度の向上に有効であることが示された。

3. 予測遺伝子をアノテーションした結果、相同性の高い遺伝子が多いのは、マイタケと同じ白色腐朽菌のカワラタケ (*T. versicolor*) であった。約 3 割の遺伝子は公共データベースに登録されている遺伝子とは相同性がなく、マイタケを含むきのこ類の分子生物学知見がまだ不足していることが明らかになった。
4. マイタケの予測遺伝子を CAZy により分類した結果、セルロース及びヘミセルロースの分解に関連する GH5、6、7、10 に分類される遺伝子群を比較的多く持つことが明らかになり、それは同じ白色腐朽菌である *T. versicolor* や *D. squalens* と類似していた。
5. マイタケの予測遺伝子を FOLy により分類し、ゲノム配列情報が公開されている担子菌きのこと比較したところ、マイタケはペルオキシダーゼに分類される遺伝子を多く有することが明らかになった。これらのペルオキシダーゼ遺伝子を構造的特徴により分類した結果、半数近くが MnP で、残りは LiP と MnP の両方の構造的特徴を有する VP と不定型のペルオキシダーゼであり、LiP を有していないことが判明した。よって、MnP がマイタケのリグニン分解において、中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上のように、マイタケの全ゲノム配列情報を取得できたことから、ゲノム上にコードされている全遺伝子が予測できるようになり、マイタケの有する代謝経路の全体像の把握や他の担子菌きのことのゲノムレベルでの比較解析が可能となった。

参考文献

1. Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, and Rokhsar D (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* 22: 695–700; doi: 10.1038/nbt967.
2. Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A, James TY, Kamada T, Kilaru S, Kodira C, Kües U, Kupfer D, Kwan HS, Lomsadze A, Li W, Lilly WW, Ma LJ, Mackey AJ, Manning G, Martin F, Muraguchi H, Natvig DO, Palmerini H, Ramesh MA, Rehmeier CJ, Roe BA, Shenoy N, Stanke M, Ter-Hovhannisyan V, Tunlid A, Velagapudi R, Vision TJ, Zeng Q, Zolan ME, Pukkila PJ (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 11889–11894; doi: 10.1073/pnas.1003391107.
3. Ohm RA, de Jong JF, Lugones LG, Aerts A, Kothe E, Stajich JE, de Vries RP, Record E, Levasseur A, Baker SE, Bartholomew KA, Coutinho PM, Erdmann S, Fowler TJ, Gathman AC, Lombard V, Henrissat B, Knabe N, Kües U,

- Lilly WW, Lindquist E, Lucas S, Magnuson JK, Piumi F, Raudaskoski M, Salamov A, Schmutz J, Schwarze FW, vanKuyk PA, Horton JS, Grigoriev IV, Wösten HA (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology* 28: 957–963; doi: 10.1038/nbt.1643.
4. Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A, Minovitsky S, Nikitin R, Ohm RA, Otilar R, Poliakov A, Ratnere I, Riley R, Smirnova T, Rokhsar D, Dubchak I (2012). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Research* 40: D26–32; doi: 10.1093/nar/gkr947.
5. Morin E, Kohler A, Baker AR, Foulongne-Oriol M, Lombard V, Nagy LG, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Brun A, Aerts AL, Bailey AM, Billette C, Coutinho PM, Deakin G, Doddapaneni H, Floudas D, Grimwood J, Hildén K, Kües U, Labutti KM, Lapidus A, Lindquist EA, Lucas SM, Murat C, Riley RW, Salamov AA, Schmutz J, Subramanian V, Wösten HA, Xu J, Eastwood DC, Foster GD, Sonnenberg AS, Cullen D, de Vries RP, Lundell T, Hibbett DS, Henrissat B, Burton KS, Kerrigan RW, Challen MP, Grigoriev IV, Martin F (2012). Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 17501–17506; doi: 10.1073/pnas.1206847109.

6. Bao D, Gong M, Zheng H, Chen M, Zhang L, Wang H, Jiang J, Wu L, Zhu Y, Zhu G, Zhou Y, Li C, Wang S, Zhao Y, Zhao G, Tan Q (2013). Sequencing and Comparative Analysis of the Straw Mushroom (*Volvariella volvacea*) Genome. *PLoS One* 8: e58294; doi: 10.1371/journal.pone.0058294.
7. Kurahashi A, Fujimori F, Nishibori K (2012). Analysis of Gene Expression Profiles during cultivation of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 52: 17–32.
8. Kurahashi A, Sato M, Nishibori K, Fujimori F (2014). Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 54: 23–33.
9. Zerbino DR1, Birney E (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18, 821–829; doi: 10.1101/gr.074492.107.
10. Miller JR, Delcher AL, Koren S, Venter E, Walenz BP, Brownley A, Johnson J, Li K, Mobarry C, and Sutton G (2008). Aggressive assembly of pyrosequencing reads with mates. *Bioinformatics* 24: 2818–2824; doi: 10.1093/bioinformatics/btn548.
11. Treangen TJ, Sommer DD, Angly FE, Koren S, and Pop M (2011). Next generation sequence assembly with AMOS. *Current protocols in bioinformatics* Chapter 11:Unit 11.8; doi: 10.1002/0471250953.bi1108s33.
12. Li H and Durbin R (2009). Fast and accurate short read

- alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760 doi; 10.1093/bioinformatics/btp324.
13. Stanke M, and Waack S (2003). Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics* 19: 215–225; doi: 10.1093/bioinformatics/btg1080.
14. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676; doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.
15. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, and Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: D233–238; doi: 10.1093/nar/gkn663.
16. Levasseur A, Piumi F, Coutinho PM, Rancurel C, Asther M, Delattre M, Henrissat B, Pontarotti P, Asther M, Record E (2008). FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genetics and Biology* 45: 638–645; doi: doi:10.1016/j.fgb.2008.01.004.
17. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and

- Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739; doi: 10.1093/molbev/msr121.
18. Sneath, P.H.A., Sokal, R.R (1973). *Numerical Taxonomy*, 230–234.
19. Zuckerkandl E., Pauling L (1965). *Edited in Evolving Genes and Proteins by V. Bryson and H.J. Vogel*, 97–166.
20. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380; doi: 10.1038/nature03959.
21. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8: R143; doi: 10.1186/gb-2007-8-7-r143.
22. Erlich Y, Mitra PP, delaBastide M, McCombie WR, Hannon GJ (2008). Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for

- next-generation sequencing. *Nature Methods* 5: 679–682; doi: 10.1038/nmeth.1230.
23. Kupfer DM1, Drabenstot SD, Buchanan KL, Lai H, Zhu H, Dyer DW, Roe BA, Murphy JW (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryotic Cell* 3: 1088–1100; doi: 10.1128/EC.3.5.1088-1100.2004.
24. Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88–92; doi: 10.1038/nature06556.
25. Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho

- PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Górecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kües U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715–1719; doi: 10.1126/science.1221748.
26. Eastwood DC, Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, Asiegbu FO, Baker SE, Barry K, Bendiksby M, Blumentritt M, Coutinho PM, Cullen D, de Vries RP, Gathman A, Goodell B, Henrissat B, Ihrmark K, Kauserud H, Kohler A, LaButti K, Lapidus A, Lavin JL, Lee YH, Lindquist E, Lilly W, Lucas S, Morin E, Murat C, Oguiza JA, Park J, Pisabarro AG, Riley R, Rosling A, Salamov A, Schmidt O, Schmutz J, Skrede I, Stenlid J, Wiebenga A, Xie X, Kües U, Hibbett DS, Hoffmeister D, Högberg N, Martin F, Grigoriev IV, Watkinson SC (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science* 333: 762–765; doi:

10.1126/science.1205411.

27. Martinez D, Challacombe J, Morgenstern I, Hibbett D, Schmoll M, Kubicek CP, Ferreira P, Ruiz-Duenas FJ, Martinez AT, Kersten P, Hammel KE, Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Lindquist E, Sabat G, Bondurant SS, Larrondo LF, Canessa P, Vicuna R, Yadav J, Doddapaneni H, Subramanian V, Pisabarro AG, Lavín JL, Oguiza JA, Master E, Henrissat B, Coutinho PM, Harris P, Magnuson JK, Baker SE, Bruno K, Kenealy W, Hoegger PJ, Kües U, Ramaiya P, Lucas S, Salamov A, Shapiro H, Tu H, Chee CL, Misra M, Xie G, Teter S, Yaver D, James T, Mokrejs M, Pospisek M, Grigoriev IV, Brettin T, Rokhsar D, Berka R, Cullen D (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1954–1959; doi: 10.1073/pnas.0809575106.
28. Montoya S, Orrego CE, Levin L (2012). Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1533–1541; doi: 10.1007/s11274-011-0957-2.
29. Kersten PJ (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America* 87: 2936–2940.
30. Blodig W, Smith AT, Doyle WA, Piontek K (2001). Crystal structures of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology* 305: 851–861; doi: doi:10.1006/jmbi.2000.4346.
31. Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL (1997). Crystal Structures of Substrate Binding Site Mutants of Manganese Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 17574–17580; doi: 10.1074/jbc.272.28.17574
32. Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10324–10330; doi: 10.1074/jbc.274.15.10324.
33. Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Miki Y, Martínez MJ, Hammel KE, Martínez AT (2012). Lignin-degrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 16903–16916; doi: 10.1074/jbc.M112.356378.

第3章 マイタケの宿主・ベクター系の構築

3.1. 序論

マイタケで分子生物学的研究を行うのに必要な基盤情報を整備することを目的に、第2章ではマイタケの全ゲノム配列を取得し、遺伝子機能解析を行う上で基盤となる遺伝子配列情報が整備できたことを述べた。ゲノム配列から予測される遺伝子のうち、配列の相同性や蛋白質ファミリー・機能モチーフの情報が良くわかっている一部の遺伝子では機能の推定が可能ではあるが、その遺伝子の生体での機能や役割を真に同定することはできない。それ故、遺伝子の機能を明らかにするためには、個々の遺伝子について遺伝子機能解析を行う必要がある。遺伝子機能解析には、外部から細胞内に DNA 等を導入し、解析の対象である遺伝子の働きを抑制あるいは亢進することによって起こる影響を調べることでその機能を解析する逆遺伝学的手法が現在のところ最も有効な方法である。そのためには、目的とする DNA を細胞内に運ぶためのベクターの構築とそのベクターを細胞内に導入するための遺伝子導入技術の確立、つまり宿主・ベクター系を構築する必要がある。そこで、本章ではマイタケで遺伝子機能解析を行うために必要な宿主・ベクター系を構築したのでその内容について述べる。

糸状菌の宿主・ベクター系では、一般に選択マーカー遺伝子あるいは目的遺伝子を遺伝子発現制御領域であるプロモーターとターミネーターの間に連結した発現カセットを大腸菌

のプラスミドに組み込んだゲノム挿入型のベクターが用いられる。選択マーカー遺伝子とは、ベクターが導入された細胞だけを栄養要求性や抗生物質等の薬剤で選抜するために、ベクターに組み込む栄養要求性を相補する遺伝子や薬剤に対する耐性を付与する遺伝子である。ベクターの導入有無を効率よく選抜するには、ベクターに組み込んだ選択マーカー遺伝子が導入された細胞内で安定に発現される必要があり、そのためには活性の高いプロモーターとターミネーターを用いて発現カセットを構成することが重要となる。したがって、ベクター構築では対象とする生物種に適合する活性の高いプロモーターとターミネーターのセットを見出すことが最初に必要である。

子囊菌類では、*Aspergillus nidulans* 由来のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子 (*gpdA*) プロモーターとアントラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*) ターミネーター[1]が、目的遺伝子の発現に広く利用されている。しかし、担子菌類では、この *A. nidulans* 由来のプロモーターとターミネーターでは目的遺伝子の発現が成功しないことが報告されている[2]。そのため、担子菌類ではその生物種自身のプロモーターとターミネーターのセットをクローニングして使うことで、スエヒロタケ[2]、ツクリタケ[3]、シイタケ[4]、エノキタケ[5]、エリンギ[6]等で目的遺伝子の発現に成功している。これらの報告では、生物種自身の GAPDH 遺伝子のプロモーターとターミネーターをベクター構築に利用していることが多く、それには GAPDH 遺伝子が酵母や他の高等真核

生物において恒常的に高発現している遺伝子としてよく知られていることが理由として挙げられる [7, 8]。一方で、担子菌のベクター構築において、様々な生育の段階で恒常的に高発現している遺伝子を同定して、その遺伝子のプロモーターとターミネーターを利用している例はほとんどない。

糸状菌でベクターを細胞内に導入する方法としては、プロトプラスト-PEG（ポリエチレングリコール）法が最も一般的である。糸状菌のモデル生物である *A. nidulans* でこの形質転換法が報告されてから [9]、様々な糸状菌でこの手法がとられている。プロトプラスト-PEG 法は、細胞壁溶解酵素により菌糸体から調製したプロトプラストにベクターを混合し、PEG 及び CaCl_2 で処理することでベクターを細胞内に取り込ませる方法である。食用きのこであるツクリタケ [10]、ヒラタケ [11]、シイタケ [4,12]、エノキタケ [5]、エリンギ [13] 等においては、効率的な形質転換体の作出手法が報告されており、これらのほとんどでプロトプラスト-PEG 法が用いられている。また、それ以外のベクター導入方法としては、植物で行われているアグロバクテリウム法（ATMT: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation）が植物以外の酵母、糸状菌などでも適用できることが報告されている。ATMT 法は、アグロバクテリウム自身の DNA を感染した細胞に組み込ませる能力を利用して、目的の DNA を細胞内に導入する方法である。食用きのこにおいては、ATMT 法により、ツクリタケ [3]、ヒラタケ [14]、ブナシメジ [15]、エノキタケ [15]、マイタケ [15] で形質転換体の作出が報告されている。しかしながら、

マイタケではその形質転換効率は低く、遺伝子機能解析が可能な形質転換体数が得られる程ではない。また、マイタケで効率よく形質転換体を作成するための宿主・ベクター系の報告は筆者の知る限りない。そこで、本研究では、遺伝子機能解析に十分な形質転換体を常に得ることができるマイタケの宿主・ベクター系を構築することを目指した。

まず、マイタケで利用できる選択マーカー遺伝子の選定を行った。選択マーカー遺伝子には、栄養要求性株に対して栄養要求性を相補する遺伝子や野生株が感受性を示す薬剤に対して耐性を付与する遺伝子が利用されるが、栄養要求性による選抜では宿主が特定の栄養要求性株に限られるため、薬剤選抜用の選択マーカー遺伝子に絞ることにした。糸状菌で利用された実績があり、かつ入手可能な薬剤とそれに対応する選択マーカー遺伝子の中からいくつかを選び、マイタケがこれらの薬剤に対して感受性があるかを試験することで、選抜に利用可能な薬剤とその選択マーカー遺伝子を選定した。

次に、マイタケで選択マーカー遺伝子や目的遺伝子を安定的に発現させるためのプロモーターとターミネーターの選定を行った。その候補として、マイタケの栽培工程中に恒常的に高発現している遺伝子を発現解析データをもとに選抜し、その遺伝子のプロモーターとターミネーター領域をゲノム配列データから取得した。このプロモーターとターミネーターの間に選択マーカー遺伝子を連結して、組み込んだベクターを構築した。マイタケにおけるベクター導入方法に関しては、これまでに ATMT 法による報告があるが[15]、ATMT 法は専用

のバイナリベクターの構築やアグロバクテリウムとの共培養条件等の検討すべき事項が多く、また、ATMT法よりも簡便なプロトプラスト-PEG法がまだ試されていないことから、本研究ではプロトプラスト-PEG法によるベクターの導入を試みた。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構築した各種ベクターをマイタケに導入し、薬剤耐性を示す形質転換体を取得できることを確認するとともに、その時のそれぞれのベクターによる形質転換効率を比較することで、活性の高いプロモーターとターミネーターのセットを選定した。

最後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(EGFP: enhanced green fluorescent protein) 遺伝子(EGFP)やホタルルシフェラーゼ遺伝子(Luc)を発現させ、選択マーカー遺伝子に加えて、目的とする遺伝子の発現の有無を検証した。

3.2. 実験材料と方法

3.2.1. 供試菌株及び培養条件

マイタケ形質転換実験の宿主には、株式会社雪国まいたけに保存されていた市販マイタケ菌株 M51（森産業，日本）である、二核菌糸の Gf-N2 株を使用した。マイタケ菌株の継代培養による維持には、ポテトブドウ糖寒天（PDA）培地（Oxoid, UK）を用い、25°C 暗黒下で培養した。マイタケ菌糸体の培養には、GPY 培地（2% glucose, 0.2% polypeptone, 0.2% Bacto yeast extract, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KH₂PO₄）を用い、2週間、25°C 暗黒下で静置培養した。組換えプラスミドの増幅には、大腸菌 JM109 株を使用し、100 µg/ml のアンピシリン（Wako, 日本）を含む LB 培地（1% polypeptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, 寒天培地として使用する場合には 1.5% Agar を追加）で培養した。

3.2.2. 薬剤感受性試験によるマイタケが感受性を示す薬剤の選定

宿主・ベクター系において、選択マーカー遺伝子に薬剤耐性遺伝子を用いる場合は、宿主がその薬剤に対して感受性を持つことが前提となる。マイタケが感受性を示す薬剤とその最少生育阻止濃度を知るため、真核細胞用の抗生物質であるハイグロマイシン B（Wako）、G418（Wako）、ゼオシン（Life Technologies, USA）、オーレオバシジン A（TaKaRa, 日本）の感受性を試験した。あらかじめ PDA 培地上で十分に培養したマイタケ菌糸体を同心円状に φ 4 mm コルクボーラーで培地

ごと打ち抜いたものを各種濃度の薬剤を含む GPY 寒天培地上に植菌し、25°C で培養した。培養後、菌糸の生育状態を観察し、菌糸伸長が目視で確認できない場合を感受性ありと判定した。

3.2.3. マイタケ遺伝子発現ベクターの構築

マイタケ遺伝子発現ベクターは、端に 15 bp のオーバーラップを持つ複数の DNA 断片を 1 回の反応で効率よく線状化したプラスミドベクターに連結することができる In Fusion クローニング [16] により構築した。隣接して連結させたい DNA 断片とオーバーラップする 15 bp の配列を配列特異的部分の 5' 末端側に付加するように設計した PCR プライマー（表 3-1 参照）を用いて、各 DNA 断片を PCR により増幅した。PCR 用試薬には、KOD-Plus-Neo（TOYOBO, 日本）を使用した。増幅した各 DNA 断片は、クローニングする前にアガロースゲル電気泳動したゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega, USA）を用いて精製した。精製した各 DNA 断片を In-Fusion HD Cloning Kit（TaKaRa）を用いて線状化したプラスミドに連結し、クローニングした（図 3-1）。

3.2.4. 大腸菌からのプラスミド調製

大腸菌からのプラスミド抽出・精製には、FastGene Plasmid MiniKit（NIPPON Genetics, 日本）を使用し、付属のプロトコルに従って行った。マイタケ形質転換用のプラスミドベクタ

一の大量抽出・精製には、Genopure Plasmid Midi Kit (Roche, Switzerland) を使用し、付属のプロトコルに従って行った。

3.2.5. プロトプラストの調製

マイタケのプロトプラストの調製は、Sato ら (1998) によるシイタケの方法 [12] に変更を加えて行った。マイタケの菌糸体を GPY 培地で、25°C、14 日間静置培養した後、菌糸体を金属メッシュ上で回収し、滅菌水、MM 緩衝液 (0.6 M マンニトール, 50 mM マレイン酸, pH5.6) の順で洗浄した。プロトプラスト化するための細胞壁分解酵素は、セルラーゼ・オノズカ RS (Yakult, 日本) が 1% (w/v)、ヤタラーゼ (TaKaRa) が 0.1% (w/v) となるように MM 緩衝液に溶解し、濾過滅菌した酵素液を使用した。回収した菌糸体 1 g (湿重量) に対して、10 ml の酵素液を加え、25°C、5 時間、50 rpm 程度でゆっくりと振盪しながら細胞壁の分解処理をした後、ブフナ漏斗型グラスフィルター G1 でろ過して未反応の菌糸体を除いた。回収した濾液を 1200 g で 10 分間遠心分離して得られた沈殿部分をプロトプラストとして STC 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM CaCl₂, 1.2 M ソルビトール) に懸濁した。残存する酵素液を除くため、上述のプロトプラスト懸濁液を再度同様に遠心分離した後に上清を除き、集めたプロトプラストを STC 緩衝液に懸濁する操作を 2 回繰り返し行って、プロトプラストを洗浄した。最終的に少量の STC 緩衝液に懸濁したプロトプラストの個数を血球計算盤で数えて、 1×10^7 個/100 μ l になるように STC 緩衝液で希釈して形質転換に使用した。

3.2.6. プロトプラスト-PEG 法による形質転換

プロトプラスト-PEG 法によるマイタケの形質転換は、シイタケの方法[12]をマイタケに合うようにいくつか変更を加えて行った。プロトプラスト懸濁液 (1×10^7 個/100 μ l) 100 μ l に形質転換用ベクター 2.5 μ g 含んだ STC 緩衝液 150 μ l を加えてピペッティングによりゆっくりと混合し、氷上で 20 分間静置した。次に、PEG 溶液 (60% PEG4000, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM CaCl_2) 62.5 μ l を加えて、ピペッティングによりゆっくりと混合し、氷上で 20 分間静置した後、PEG 溶液をさらに 1.25 ml 加えて同様にゆっくりと混合し、時折転倒混和しながら室温下に 20 分間放置した。次に、この混合液に STC 緩衝液 10 ml を加えて混合し、1200 g で 10 分間遠心分離した後、上清を捨て、沈殿したプロトプラストを集めた。集めたプロトプラストに GPYS 培地 (2% glucose, 0.2% polypeptone, 0.2% Bacto yeast extract, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KH_2PO_4 , 0.6 M sucrose) 10 ml を加えて懸濁し、25°C で 3 日間静置培養した。続いてそれをハイグロマイシン B を 20 μ g/ml 含む GPYS 寒天培地上にプレーティングし、その上から同じ組成の培地を重層して 25°C で 7-10 日間培養した。プロトプラストから再生した菌糸体が目視できるようになった段階で、ハイグロマイシン B を 50 μ g/ml 含む GPYS 寒天培地にそれぞれ植え継ぎ、生育したコロニーから得られた菌体をハイグロマイシン B 耐性株とした。

3.2.7. ゲノム PCR

GPY 培地で培養した菌糸体を回収し、培地を除いた後、液体窒素下で乳鉢により磨砕して粉末状にした試料から、ISOPLANT II (NIPPON GENE, 日本) を使用してゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA 約 50 ng 量を鋳型に、KOD FX Neo (TOYOBO) を用いて、PCR を行った。PCR 条件は、94°C で 2 分間の初期熱変性後、98°C で 10 秒間の熱変性、58°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 3 分間の伸長反応を 30 サイクルとした。なお、使用したプライマーの配列は、表 3-1 に示した。

3.2.8. サザンブロット解析

ゲノム DNA 10 µg を制限酵素 *SalI* で消化し、0.7%アガロースゲル (1×TAE) で電気泳動したゲルを変性溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)、中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH7.5) の順に浸して処理し、キャピラリーブロッティングにより 10×SSC (0.15 M Na₃ citrate, 1.5 M NaCl) で Hybond-N+ナイロンメンブレン (GE Healthcare, UK) にトランスファー後、ブロットを UV 固定した。プローブ DNA の標識、ハイブリダイゼーション、シグナルの検出には、ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (GE Healthcare) を使用し、付属のプロトコルに従って行った。

3.2.9. RNA の調製及び定量 RT-PCR

全 RNA は液体窒素下で粉碎した菌糸体から、RNAzol RT reagent (Molecular Research Center, Inc., USA) を用いて抽出した。全 RNA からの cDNA 合成は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて行った。定量 RT-PCR は、PCR 用試薬に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を、リアルタイム PCR 装置に CHROMO4 (Bio-Rad, USA) を使用して行った。PCR 条件は、95°C で 1 分間の初期熱変性後、95°C で 15 秒間の熱変性、60°C で 30 秒間の伸長反応後に蛍光測定することを 40 サイクルとした。マイタケの GAPDH 遺伝子 (*Gf.GAPDH*: AB909026) またはキチンシンターゼ遺伝子 (*Gf.CHS1*: AB909030) の発現量を内部標準として、各サンプルの発現量を正規化した。相対発現量の算出は、 $2(-\Delta\Delta C(T))$ 法 [17] により行った。定量 RT-PCR に使用したプライマーの配列は、表 3-1 に示した。

3.2.10. 蛍光顕微鏡観察

菌糸体における EGFP の発現を確認するため、PDA 培地で培養した菌糸体の一部を掻き取り、滅菌水を滴下したスライドガラス上にのせて、上からカバーガラスを被せてプレパラートを作製した。観察には倒立型蛍光顕微鏡オリンパス IX71 (Olympus, 日本) を使用し、蛍光ミラーユニットはオリンパス WIB ($\lambda_{ex} = 460-490 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 515 \text{ nm}$) に設定した。EGFP 蛍光は、デジタルカメラ EOS Kiss X2 (Canon, 日本) を用い

て検出し、Canon EOS Utility software (Canon) を用いてコンピュータ上にイメージングした。

3.2.11. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイ用のサンプル調製は、Collins らによる方法 [18] を参考にして行った。培養した菌糸体を液体窒素下で粉碎し、1 mM のジチオトレイトール (DTT) 含む 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。この懸濁液を 10,000 g で 10 分間遠心分離し、その上清を細胞粗抽出液として、ルシフェラーゼアッセイに使用した。ルシフェラーゼアッセイは、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて行った。96 ウェルマイクロプレートに予め各サンプルの細胞粗抽出液 100 μ l を分注し、そこに等量の発光試薬を加えて混和し、直ちにルミノメーターであるルミネッセンサー JNR II-AB-2300 (ATTO, 日本) により測定した。各サンプルの発光量は、Bradford assay (Bio-Rad, USA) により測定した総タンパク質濃度により正規化した。ルシフェラーゼ活性は、総タンパク質 1 mg に換算した、1 秒間あたりの光子数 (photon counts/s/mg total protein) で算出した。

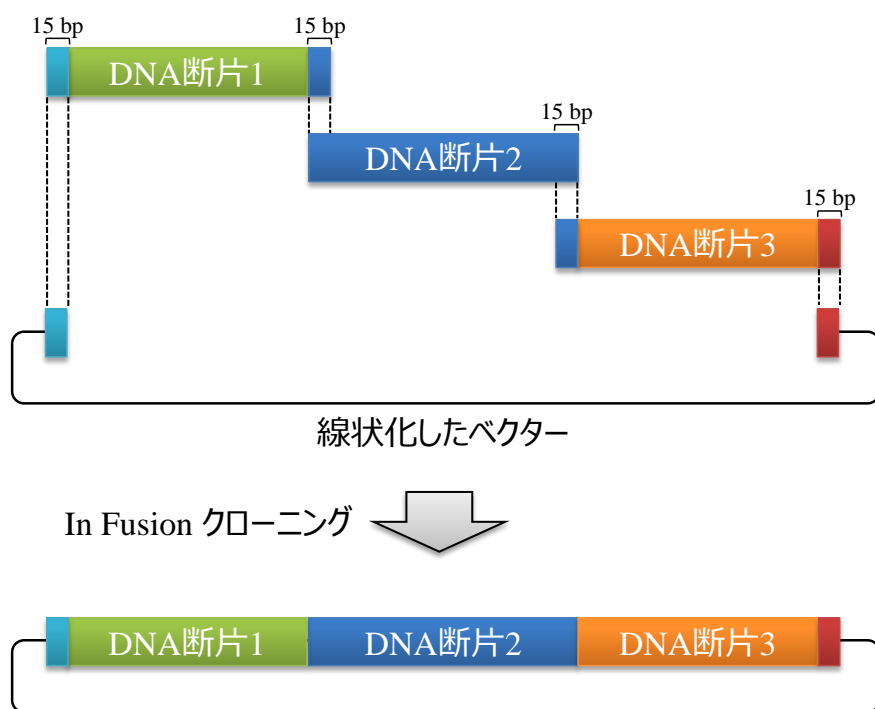


図3-1. In Fusion クローニングによるプラスミドベクター構築の概要

In Fusion クローニングは、末端に15 bpのオーバーラップを持つ複数のDNA断片を1回の反応で効率よく線状化したプラスミドベクターに連結する方法である。この方法により、制限酵素処理やリガーゼを使用することなく、目的のDNA断片を狙った方向でベクターの任意の位置にクローニングすることができる。

表 3-1. 本研究で使したプライマーの配列

Primer name	Sequence (5' - 3')*	Description
Ppsd1-F	CGGTACCCGGGGATCTGTCCAACGTTGGCTCTGCTC	<i>Gf.PSD1</i> プロモーター領域の増幅に使用
Ppsd1-R	TTCAGGCTTTTTCATTGCTCTGGAGGGAGAAATGTC	
Tpsd1-F	AGGGCAAAGGAATAGGGTGCCTTATCGCTCACAAG	<i>Gf.PSD1</i> ターミネーター領域の増幅に使用
Tpsd1-R	CGACTCTAGAGGATCATGTTCCCCATCTGCCGTC	
Pcyp1-F	CGGTACCCGGGGATCATCAACGCCATAGGCACACC	<i>Gf.CYP1</i> プロモーター領域の増幅に使用
Pcyp1-R	TTCAGGCTTTTTCATTATGAAGGCGTGAAGGAAAGG	
Tcyp1-F	AGGGCAAAGGAATAGAACGTTGTTTGTATGTCTGAAGG	<i>Gf.CYP1</i> ターミネーター領域の増幅に使用
Tcyp1-R	CGACTCTAGAGGATCTCTATGGATCAACGCAGGATC	
Ptef3-F	CGGTACCCGGGGATCCACTGGGTGGAAGCTAATAG	<i>Gf.TEF3</i> プロモーター領域の増幅に使用
Ptef3-R	TTCAGGCTTTTTCATTTCGAATATCTGGGCGACCG	
Ttef3-F	AGGGCAAAGGAATAGACGTTGTCCTCGCCGTTGTTG	<i>Gf.TEF3</i> ターミネーター領域の増幅に使用
Ttef3-R	CGACTCTAGAGGATCCCTGCGATTGCATGGCTCATC	
Pgapdh-F	CGGTACCCGGGGATCTCTGCGCGCTTCTCTCACAGTTC	<i>Gf.GAPDH</i> プロモーター領域の増幅に使用
Pgapdh-R	TTCAGGCTTTTTCATTGCTGAGGATAATGGTTTTGGAGAC	
Tgapdh-F	AGGGCAAAGGAATAGGGTGTGGAGTGGATAAGAGAAAAG	<i>Gf.GAPDH</i> ターミネーター領域の増幅に使用
Tgapdh-R	CGACTCTAGAGGATCCAATTAGATGAACCAGTCTTGTCG	
Pchs1-F	CGGTACCCGGGGATCATGCTTGGAGCGGTGGAGC	<i>Gf.CHS1</i> プロモーター領域の増幅に使用
Pchs1-R	TTCAGGCTTTTTCATCGCAAGAGTGCAAAATGGCCG	
Tchs1-F	AGGGCAAAGGAATAGTCGGATTTCTTGTACTCAATATG	<i>Gf.CHS</i> ターミネーター領域の増幅に使用
Tchs1-R	CGACTCTAGAGGATCTGGAGATAGGAATGAAACCCTCG	
hph-F	ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC	<i>hph</i> 全長コード配列の増幅に使用
hph-R	CTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTG	
pUC19-Ptef3-F2	ATCTCTAGAGTCGACACTGGGTGGAAGCTAATAG	pGFght-EGFP及びpGFght-Lucを構築する際の、
Ptef3-R	TTCGAATATCTGGGCGACCG	<i>Gf.TEF3</i> プロモーター領域の増幅に使用
Ttef3-F	ACGTTGTCCTCGCCGTTGTTG	pGFght-EGFP及びpGFght-Lucを構築する際の、
Ttef3-pUC19-R2	TGATTACGCCAAGCTCCTGCGATTGCATGGCTCATC	<i>Gf.TEF3</i> ターミネーター領域の増幅に使用
EGFP-F	GCCCAGATATTCGAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	<i>EGFP</i> 全長コード配列の増幅に使用
EGFP-R	GGCGACGGACAACGTTCACTTGTACAGCTCGTCCATG	
Luc-F	GCCCAGATATTCGAAATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG	<i>Luc</i> 全長コード配列の増幅に使用
Luc-R	GGCGACGGACAACGTTTACACGGCGATCTTCCCG	
M13-F	GTTTCCCAGTCACGACG	
M13-R	GGATAACAATTTACACAGG	プラスミドベクター導入を確認するためのゲノムPCRに使用
pUC19-F	AATTGGATCTCTAGAGTCG	
Gf.CHS-QPCR-F	GACGCAACCTTCAACCCCTA	<i>Gf.CHS1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.CHS-QPCR-R	ACCCGAATAACCGGAAGAGG	
EGFP-QPCR-F	AACCACTACCTGAGCACCCAGTC	<i>EGFP</i> の定量RT-PCR用プライマー
EGFP-QPCR-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	

* In-Fusion クローニングの際に必要な15 bpの付加配列を太字で示した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 薬剤感受性試験によるマイタケが感受性を示す薬剤の選定

宿主・ベクター系で、ベクターが導入された細胞を選別するにはベクターを導入する細胞でベクターが組み込まれたことを表す指標となる形質を発現しうる遺伝子を予めベクターに組み込み、その指標となる形質が表れている細胞をベクターが導入されたものと判断して行うので、この指標となる形質を担う遺伝子（選択マーカー遺伝子）が必要となる。そのときの指標となる形質の一つに抗生物質等の特定の薬剤に対する耐性形質があり、それを付与する遺伝子が選択マーカー遺伝子として利用されている。この場合、宿主がその薬剤に対して感受性を有することが前提としてあり、選択マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子が組み込まれたベクターが導入された細胞のみが薬剤耐性を示すことによって選抜が可能となる。そこで、マイタケが感受性を示す薬剤とその最少生育阻止濃度を知るため、選択マーカー遺伝子となる薬剤耐性遺伝子が市販されていて、入手が可能な真核細胞用の抗生物質であるハイグロマイシン B、G418、ゼオシン、オーレオバシジン A について、薬剤感受性を試験した。

ハイグロマイシン B 及び G418 はタンパク質合成を阻害する抗生物質であり、それを不活性化するホスホトランスフェラーゼ遺伝子がマーカー遺伝子として、これまでに多くの糸状菌で利用されている。ゼオシンはブレオマイシン系の抗生物質で DNA 切断による DNA 合成阻害によって真核生物及び

原核生物に対して作用し、この薬剤をトラップするブレオマイシン結合タンパク質遺伝子がマーカー遺伝子として利用されている。オーレオバシジン A は、スフィンゴ脂質の生合成に関わるイノシトールリン酸セラミド (IPC) 合成酵素を阻害する抗真菌抗生物質であり、酵母または一部の *Aspergillus* 属菌では薬剤の影響を受けない IPC 合成酵素の変異遺伝子がマーカー遺伝子として用いられている。

この4つの抗生物質について、マイタケで薬剤感受性試験を行った結果を表 3-2 に示した。ハイグロマイシン B 及び G418 について、薬剤濃度 10、20、30、40、50、100 $\mu\text{g/ml}$ で試験した結果、ハイグロマイシン B は 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度、G418 は 40 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で菌糸の生育が認められなかった。一方、ゼオシンについて、薬剤濃度 50、100、300、500 $\mu\text{g/ml}$ で試験した結果、500 $\mu\text{g/ml}$ においても薄くではあるが、菌糸の伸長がみられ、完全に生育を抑えることはできなかった。また、オーレオバシジン A については、薬剤濃度 1、2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ で試験した結果、菌糸生育の抑制は認められなかった。したがって、ハイグロマイシン B は 20 $\mu\text{g/ml}$ が、G418 は 40 $\mu\text{g/ml}$ が最少生育阻止濃度であることがわかった。一方、ゼオシン及びオーレオバシジン A はマイタケに対して生育阻止効果を示さず、薬剤選抜には利用できないことが確認された。以上の結果から、ハイグロマイシン B は 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度、G418 は 40 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、ベクター導入の有無を確認する薬剤選抜に利用できることが判明した。

表 3-2. 抗生物質に対するマイタケの感受性試験の結果

抗生物質名	最少生育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	作用機序	選択マーカー遺伝子 (薬剤耐性遺伝子)
ハイグロマイシンB	20	タンパク質合成阻害	ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子 (<i>hph</i>)
G418	40	タンパク質合成阻害	G418ホストトランスフェラーゼ遺伝子 (<i>G418^r</i>)
ゼオシン	500<	DNA切断によるDNA合成阻害	ブレオマイシン結合タンパク質遺伝子 (<i>ble</i>)
オーレオバシジンA	8<	スフィンゴ脂質の生合成に関わる IPC合成酵素の阻害	IPC合成酵素の変異遺伝子 (<i>aurA^r</i>)

マイタケをPDA培地で培養した時の各抗生物質の最少生育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)、作用機序、該当する薬剤に対する耐性を付与するための選択マーカー遺伝子を示した。

3.3.2. マイタケ由来のプロモーター及びターミネーターを用いたマイタケ遺伝子発現ベクターの構築

ベクターに組み込んだ選択マーカー遺伝子や目的遺伝子が導入された細胞内で安定に発現され、その役割を果たすには活性の高い強力なプロモーターとターミネーターを利用することが重要となる。そこで、マイタケで利用可能な活性の高いプロモーターとターミネーターのセットを選定するため、その候補としてマイタケで恒常的に高発現している遺伝子を選抜し、その遺伝子のプロモーターとターミネーターの間にハイグロマイシン B 耐性を付与する選択マーカー遺伝子であるハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (*hph*) を連結して、組み込んだベクターを最初に構築することにした。

我々は以前に、マイタケ栽培工程における 8 つの生育段階でマイクロアレイ解析を行い、各生育段階における遺伝子発現プロファイルを取得している [19]。このマイクロアレイデータから、8 つの生育段階を通じて発現変動が少なく、常に発現が高い遺伝子を絞り込むことにした。遺伝子の絞り込みには、キチンの合成に関わるキチンシンターゼをコードする遺伝子である *Gf.CHS* の発現レベルを基準とすることにした。*Gf.CHS1* を基準としたのは、これまでのマイタケの定量 RT-PCR 解析で菌糸体においても、子実体においても発現量の変動が少なく一定であることが確認されており、発現データを正規化する際の内部標準遺伝子として適しており、使用してきたからである。マイクロアレイデータから、8 つの生育

段階を通して基準とした *Gf.CHS1* よりも高い発現レベルを示す遺伝子を絞り込んだところ、122 個の遺伝子が該当した。これらの遺伝子の中から、発現レベルが高い上位から順にホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ遺伝子 (*Gf.PSD1*: AB909027)、シクロフィリン遺伝子 (*Gf.CYP1*: AB909028)、翻訳伸長因子 3 (*Gf.TEF3*: AB909029) の 3 遺伝子を選んだ (図 3-2)。この 3 遺伝子に基準にした *Gf.CHS1* を加え、さらに *Gf.CHS1* と同じくこれまでの定量 RT-PCR 解析で恒常的に高発現していることがわかっていて、データ正規化の際の内部標準遺伝子として用いている *Gf.GAPDH* を加えた 5 遺伝子を恒常的高発現遺伝子として、それらの遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域をベクター構築に利用することにした (表 3-3)。

これまでに担子菌で解析された遺伝子のプロモーター領域には、真核生物で見出される代表的なプロモーターエレメントである TATA ボックスや CAAT ボックスが概ね保存されているが、その距離関係は遺伝子によって様々であり、それ以外の転写調節に密接に関与するようなプロモーターエレメントについてもまだよくわかっていない。また、ターミネーター領域における転写終結機構に関しても担子菌ではまだわかっていない [20]。したがって、本研究では、遺伝子のプロモーター領域を開始コドンから上流約 1500 bp、ターミネーター領域を終始コドンから下流約 1000 bp と長めに設定し、選んだ 5 遺伝子のそれぞれについてマイタケゲノムデータベースから配列情報を取得した。この時、設定した領域が隣接する

遺伝子のコード領域に被る場合は被らないように、設定より短い領域で配列情報を取得した。そのため、*Gf.PSD1*、*Gf.CYP1*、*Gf.GAPDH* については、設定した長さでプロモーター及びターミネーター領域を取得できたが、*Gf.TEF3* はプロモーター領域が 727 bp、ターミネーター領域が 800 bp となり、*Gf.CHS1* はターミネーター領域が 300 bp と短くなった。この配列情報をもとに 5 つの遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を *Gf-N2* 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR によりそれぞれ増幅した DNA 断片を得た。また、選択マーカー遺伝子であるハイグロマイシン B に対する耐性遺伝子 *hph* (1026 bp) の DNA 断片を、シイタケ用のプラスミドベクターである PLG-*hph*[4]を鋳型とした PCR により増幅して得た。なお、各 DNA 断片の PCR に使用したそれぞれのプライマー配列は、表 3-1 に示した。増幅した DNA 断片を用いて、In Fusion クローニング法により、プロモーター配列とターミネーター配列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* が配置するように pUC19 の *Bam*HI サイトに連結し、クローニングした。その結果、前述の 5 つの遺伝子のプロモーターとターミネーターからなる 5 つのプラスミドベクターとして、pGFpsd-*hph*、pGFcyp1-*hph*、pGFtef3-*hph*、pGFgapdh-*hph*、pGFchs-*hph* を得ることに成功した (図 3-3)。それぞれのベクターについては、導入した DNA 断片が目的とした位置と方向で配置されていることをシーケンス解析により確認した。形質転換の際には、pGFpsd-*hph*、pGFtef3-*hph*、pGFgapdh-*hph*、

pGFchs-hph は *DraI* で、pGFcyp1-hph は *HindIII* で処理し、線状化したものを使用した。

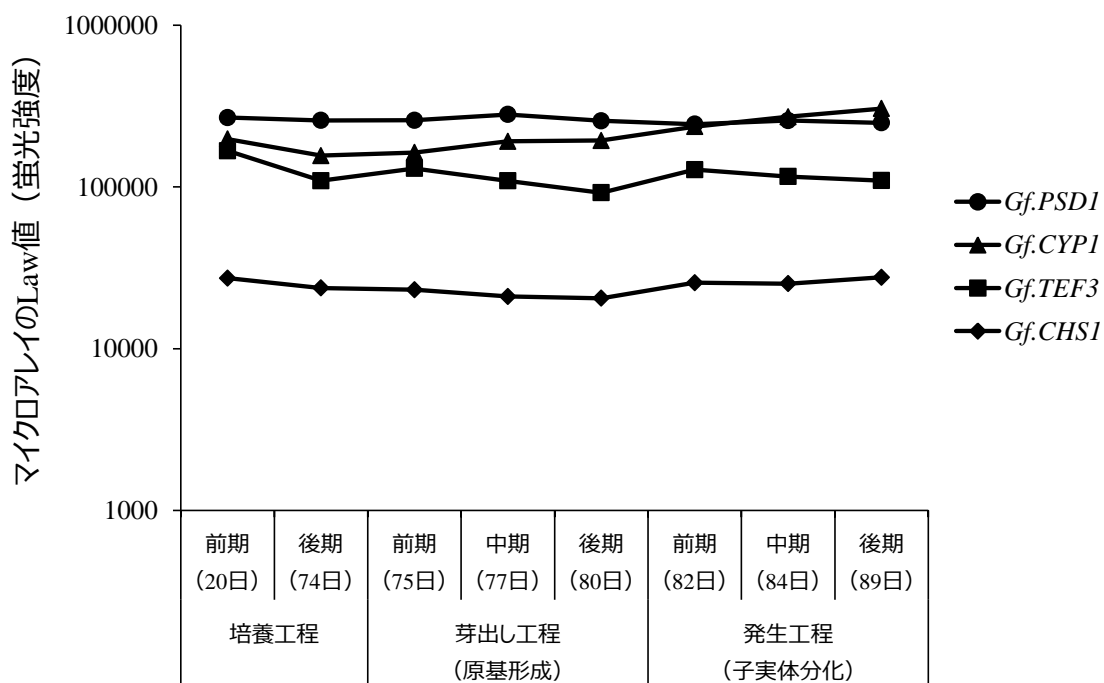


図3-2. 選抜した上位3遺伝子の栽培工程における遺伝子発現プロファイル

マイタケ栽培の培養工程の前期（植菌後20日）－後期（74日）、芽出し工程の前期（75日）－中期（77日）－後期（80日）、発生工程の前期（82日）－中期（84日）－後期（89日）におけるマイクロアレイデータから、ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ遺伝子（*Gf.PSD1*: ●）、シクロフィリン遺伝子（*Gf.CYP1*: ▲）、翻訳伸長因子3（*Gf.TEF3*: ■）、基準としたキチンシンターゼ遺伝子（*Gf.CHS1*: ◆）の発現挙動を示した。

表 3-3. ベクターに組み込むプロモーターとターミネーターの候補となる遺伝子

遺伝子名	推定される翻訳産物	アクセッション番号
<i>Gf.PSD1</i>	ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ	AB909027
<i>Gf.CYP1</i>	シクロフィリン	AB909028
<i>Gf.TEF3</i>	翻訳伸長因子3	AB909029
<i>Gf.GAPDH</i>	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	AB909026
<i>Gf.CHS1</i>	キチンシンターゼ	AB909030

ベクターに組み込むプロモーターとターミネーターの候補として選んだ遺伝子と推定される翻訳産物、NCBIに登録されているアクセッション番号を示した。

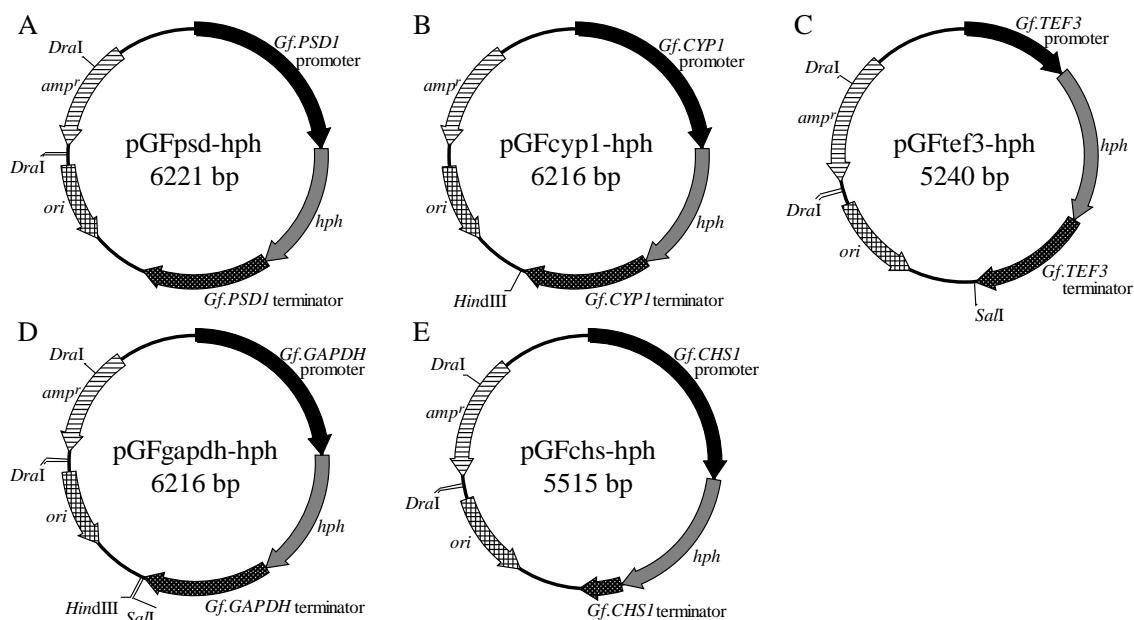


図3-3. 選抜した恒常発現遺伝子のプロモーターとターミネーターを組み込んで構築したハイグロマイシンB耐性遺伝子*hph*発現ベクターの概略図

In Fusion クローニングにより、選抜した恒常発現遺伝子のプロモーターとターミネーターの間にハイグロマイシンB耐性遺伝子*hph*が位置するようにpUC19に連結することで、それぞれのベクターを構築した。A: pGFpsd-hphは、*Gf.PSD1*プロモーター（1500 bp）、*hph*（1026 bp）、*Gf.PSD1*ターミネーター（1005 bp）からなる*hph*発現カセットを有する。B: pGFcyp1-hphは、*Gf.CYP1*プロモーター（1500 bp）、*hph*、*Gf.CYP1*ターミネーター（1000 bp）からなる*hph*発現カセットを有する。C: pGFtef3-hphは、*Gf.TEF3*プロモーター（727 bp）、*hph*、*Gf.TEF3*ターミネーター（800 bp）からなる*hph*発現カセットを有する。D: pGFgapdh-hphは、*Gf.GAPDH*プロモーター（1500 bp）、*hph*、*Gf.GAPDH*ターミネーター（1000 bp）からなる*hph*発現カセットを有する。E: pGFchs-hphは、*Gf.CHS1*プロモーター（1499 bp）、*hph*、*Gf.CHS1*ターミネーター（300 bp）からなる*hph*発現カセットを有する。

3.3.3. マイタケ遺伝子発現ベクターの導入試験

構築したマイタケ遺伝子発現ベクターがマイタケの宿主・ベクター系として機能するかどうかを、選択マーカー遺伝子としてベクターに組み込んだハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* によってハイグロマイシン B 耐性を獲得した形質転換体が得られるかを調べることで確認した。マイタケの菌糸体から調製したプロトプラストに、3.3.2 で作製した 5 種類のベクターをそれぞれ別々にプロトプラスト-PEG 法により導入し、ハイグロマイシン B 耐性を示す菌体を選抜した。選抜した菌体でベクターが細胞内に取り込まれていることを確認するため、ゲノム PCR を行った。ベクターに組み込んだプロモーターとターミネーターの外側にそれぞれ設計したプライマー M13-F 及び M13-R を用いて、菌糸体から抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、プロモーター領域、*hph* 遺伝子、ターミネーター領域からなる発現カセットが増幅されるかを確認した。pGFtef3-*hph* を導入したときのゲノム PCR の結果を例として、図 3-4A に示した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果、薬剤選抜された中からランダムに選んだ 5 つの菌体では、*hph* の発現カセットに相当する約 2.7 kbp のバンドが検出され、細胞内にベクターが取り込まれていることが確認された。それとは逆に、コントロールである形質転換前の Gf-N2 株では、バンドが検出されないことが確認された。

次に、宿主のゲノム上に組み込まれたベクターのコピー数を調べるため、抽出したゲノム DNA に対してサザンブロット解析を行った。解析はベクターの配列部位 1 箇所のみ切断す

る制限酵素でゲノム DNA を消化し、標識した *hph* 配列断片を DNA プローブとしてハイブリダイゼーションすることにより、ベクターが組み込まれた DNA 断片を検出する方法で行い、検出された DNA 断片の数からベクターのコピー数を判断した。ゲノム PCR の結果を例示したときと同じく、pGFtef3-*hph* を導入したときのサザンブロット解析の結果を図 3-4B に示した。その結果、コントロールである Gf-N2 株ではバンドが検出されず、薬剤選抜された 5 つの菌体のすべてでバンドが検出されたことから、ゲノム上に *hph* の配列を含むベクターが組み込まれていることが確認された。また、図 3-4B のレーン 2 と 3 では複数のバンドが検出されたことから、導入されたベクターはゲノム上の 1 箇所だけではなく複数箇所に組み込まれていることも示された。以上の結果から、3.3.2 で構築したマイタケ遺伝子発現ベクターを導入して得られるハイグロマイシン B 耐性を示す菌体では、導入されたベクターがゲノムに組み込まれて継代培養しても消失することなく安定して存在することが確認されるとともに、選択マーカー遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* がマイタケにおいても有効に機能することが示された。

構築した 5 種類のベクターの形質転換効率を評価するため、それぞれのベクターを導入したときに得られたハイグロマイシン B 耐性を示す形質転換体の個数を比較した。3 回の形質転換実験を行い、それぞれのベクターを導入して得られる形質転換体の個数をベクター DNA 1 μg あたりに換算した平均値で示すと、多い順に pGFtef3-*hph* が 11.2 ± 1.7 個、

pGFgapdh-hph が 9.7 ± 2.1 個、pGFcyp1-hph が 8.3 ± 4.9 個、pGFchs-hph が 6.5 ± 2.7 個、pGFpsd-hph が 5.6 ± 1.2 個であった (表 3-4)。これまで報告されている食用きのこのプロトプラスト-PEG 法による形質転換効率 (形質転換体/ μg ベクター DNA) は、シイタケで 6 [12] または 0.8–16 [4]、エノキタケで 1–3.3 [5]、エリンギで 10–40 [13] であり、今回のマイタケにおける形質転換効率はこれらと遜色ないレベルであった。既報の ATMT 法による形質転換で得られているマイタケの形質転換体は、これらより少ないことから [15]、本結果は効率的に形質転換体を得ることができる宿主・ベクター系をマイタケで構築できたといえる。

pGFtef3-hph と pGFgapdh-hph では多くの形質転換体を得られたのに対して、pGFchs-hph 及び pGFpsd-hph ではそれらの半分しか得られなかった。形質転換効率に影響する要因の一つに、宿主細胞中での選択マーカー遺伝子の発現の安定性が挙げられる。選択マーカー遺伝子の発現には連結するプロモーターの性能が大きく関与していると予想されるので、使用した 5 種の遺伝子のプロモーターの中では、*Gf.TEF3* 及び *Gf.GAPDH* のプロモーターが他の遺伝子のそれらに比べて活性が高いと考えられた。また、宿主ゲノムに組み込まれるベクターの数や導入位置が外来遺伝子の発現に影響することも考えられるが、現時点ではそれらを任意に制御できないため考慮しなかった。以上の結果から、*Gf.TEF3* 及び *Gf.GAPDH* のプロモーターとターミネーターのセットが高活性であると判断し、次の遺伝子機能解析のために構築するベクターに組

み込むプロモーターとターミネーターとして利用することにした。

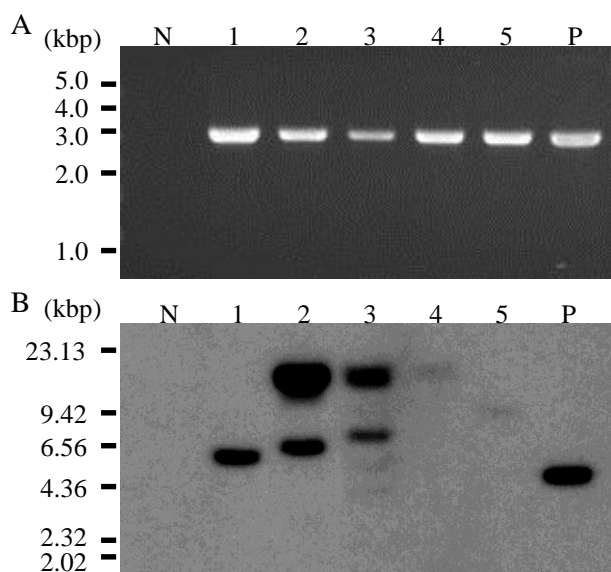


図3-4. ハイグロマイシンB耐性を示す形質転換体におけるベクターの導入確認

A: pGFtef3-*hph*を導入して得られたハイグロマイシンB耐性を示す形質転換体について、ベクターのプロモーターとターミネーターの外側にそれぞれ設計したプライマーM13-F及びM13-Rを用いてゲノムPCRを行い、アガロースゲル電気泳動により増幅されたバンドを検出した。*Gf.TEF3*プロモーター (727 bp)、*hph*コード配列 (1026 bp)、*Gf.TEF3*ターミネーター (800 bp) からなる*hph*発現カセット領域に相当する2693 bpのバンドが検出されることで、ベクターの導入を確認した。B: pGFtef3-*hph*を導入して得られたハイグロマイシンB耐性を示す形質転換体について、サザンブロット解析によりゲノムに組み込まれたベクター配列を検出した。ゲノムDNAをベクターを1箇所切断する*SalI*で消化し、ラベルした*hph*断片配列をプローブとして検出した。レーン N, *Gf-N2*株 (ネガティブコントロール) ; レーン 1-5, ランダムに選んだpGFtef3-*hph*を導入して得られた形質転換体; レーン P, プラスミドベクターpGFtef3-*hph* (ポジティブコントロール)。

表 3-4. 5種のマイタケ遺伝子発現ベクターをそれぞれ導入して得られた形質転換体数の比較

プラスミドベクター	プロモーター及びターミネーターに 利用した遺伝子	形質転換体数/ μg ベクター-DNA
pGFpsd-hph	<i>Gf.PSD</i>	5.6 ± 1.2
pGFcyp1-hph	<i>Gf.CYP1</i>	8.3 ± 4.9
pGFtef3-hph	<i>Gf.TEF3</i>	11.2 ± 1.7
pGFgapdh-hph	<i>Gf.GAPDH</i>	9.7 ± 2.1
pGFchs-hph	<i>Gf.CHS</i>	6.5 ± 2.7

マイタケで恒常的に高発現していることから選んだ5遺伝子のプロモーターとターミネーターの間にハイグロマイシンB耐性遺伝子*hph*を連結して組み込んで構築した5種類のベクターをそれぞれマイタケに導入する実験を3回行い、得られたハイグロマイシンB耐性を示す形質転換体の個数をベクター-DNA 1 μg あたりに換算して、その平均値と標準偏差を示した。

3.3.4. レポーター遺伝子 *EGFP* 及び *Luc* の発現

遺伝子の生体内での機能を調べる方法としては、遺伝子組換えにより機能の知りたい遺伝子を操作してその影響を解析するアプローチが最も一般的である。このような遺伝子機能解析を行うには、選択マーカー遺伝子の発現カセットに加えて、目的とする遺伝子を発現させるための発現カセットを備えたベクターが必要である。そこで、前述の結果から選定した2種の *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用いて、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* を *Gf.GAPDH* のプロモーターとターミネーターの間に連結した選択マーカー遺伝子発現カセットと、目的の遺伝子として導入先の細胞内で遺伝子が発現しているか否かを視覚的に容易に判別することができるレポーター遺伝子を *Gf.TEF3* のプロモーターとターミネーターの間に連結したレポーター遺伝子発現カセットの2つを組み込んだベクターを構築し、マイタケに導入して生体内でのレポーター遺伝子の発現有無を調べた。レポーター遺伝子には、緑色蛍光を発することでタンパク質の細胞内の挙動や局在の観察等に使用されるオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*EGFP*) とプロモーターの活性や遺伝子発現制御等の機能評価系に使用されるホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Luc*) を選び、それぞれの遺伝子を組み込んだベクターを構築した。*EGFP* をコードする配列は、*EGFP* の配列を有する市販ベクター、pCREB-EGFP (Clontech, USA) を鋳型とした PCR により増幅し、In Fusion クローニング法により、*EGFP* が *Gf.TEF3* のプロモーターとターミネ

ーターの間に位置するように *HindIII* と *SalI* 処理により線状化した pGFgapdh-hph と連結・クローニングすることで、*EGFP* 発現ベクター pGFght-EGFP を構築した (図 3-5A)。また、*Luc* をコードする配列は、*Luc* の配列を有する市販ベクター、pTAL-Luc (Clontech) を鋳型とした PCR により増幅し、前述の pGFght-EGFP を構築したときと同様の方法で *Luc* 発現ベクター pGFght-Luc を構築した (図 3-5B)。

EGFP 発現ベクター pGFght-EGFP をプロトプラスト-PEG 法により Gf-N2 株に導入し、ハイグロマイシン B 耐性を示す 27 個の菌体を取得した。この 27 個の菌体について、*Gf.TEF3* のプロモーター及びターミネーターのそれぞれ外側に設計した pUC19-F 及び M13-R プライマーを用いたゲノム PCR を行い、その内の *EGFP* 発現カセットの導入が確認された 15 個を形質転換体とした。これら 15 個の形質転換体で *EGFP* の発現の有無を確認するため、PDA 平板培地で培養した菌糸体における *EGFP* の発現量を定量 RT-PCR で調べたところ、15 個の形質転換体すべてで *EGFP* の発現が確認された (図 3-6)。また、*EGFP* の発現量は形質転換体によって様々であったが、これらの差はゲノムに組み込まれたベクターの数とゲノム内におけるそれらの位置の差異によるものと推測された。

次に、*EGFP* の発現が確認された形質転換体の細胞内で *EGFP* タンパク質が機能しているか否かを、蛍光顕微鏡観察による菌糸内の緑色蛍光の有無で調べた。その結果、コントロールである Gf-N2 株では蛍光が認められなかったのに対して、pGFght-EGFP を導入して得た形質転換体では図 3-7 に示すよ

うに EGFP の蛍光が認められた。これらの結果から、ここで構築した EGFP 発現ベクター pGFght-EGFP は、ベクターに組み込んだ EGFP をマイタケ生体内でタンパク質として十分に活性が確認できるレベルで発現可能な性能を有することが示された。

Luc 発現ベクター pGFght-*Luc* に関しても、プロトプラスト-PEG 法により Gf-N2 株に導入し、ハイグロマイシン B 耐性を示す 20 個の菌体を取得した。これらの内、ゲノム PCR により *Luc* 発現カセットの導入の有無が確認された 10 個の形質転換体で、*Luc* の発現の有無を菌糸体から調製した細胞粗抽出液を用いたルシフェラーゼアッセイで調べた。その結果、2 つの形質転換体 (LT#1 及び LT#2) でルシフェラーゼの活性が確認された (図 3-8)。この結果は、*Luc* 発現ベクター pGFght-*Luc* も、EGFP 発現ベクター pGFght-EGFP を導入した時の結果と同じく、*Luc* を活性があるタンパク質として発現できる性能を有することを示すものであった。

以上の結果から、マイタケ栽培工程で恒常的に高発現する遺伝子 *Gf.TEF3* と *Gf.GAPDH* の 2 種のプロモーターとターミネーターのセットを用いてベクターを構築することで、選択マーカー遺伝子に加えて、目的とする遺伝子を有意に発現できることをレポーター遺伝子である EGFP 及び *Luc* を発現させ、その活性を確認することにより証明した。

これまでに担子菌類で GFP の発現に成功した事例は、スエヒロタケ [21]、ツクリタケ [22]、ウシグソヒトヨタケ [22]、ワカフサタケの一種 (*Hebeloma cylindrosporum*) [23]、ヒラタケ

[14]、エリンギ[6]、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) [24]などで報告されている。その中で、GFPをレポーター分子として遺伝子発現やタンパク質の局在をモニタリングしている報告は、スエヒロタケ[25]、ツクリタケ[26]、ウシグソヒトヨタケ[26]等であるが、少数例にとどまっている。マイタケにおいては、これまでにGFPを発現させた報告はなく、ここで得られた結果が初めての報告である。また、Lucに関しては、担子菌きのこにおいて発現に成功した事例は筆者が知る限りなく、今回が担子菌きのこで初めての報告である。マイタケにおいてGFPやLucをレポーター遺伝子として様々な解析に利用していくには、ベクターをゲノム上の任意の領域に単一で組み込む技術など解決すべき課題は多々あるが、まずは導入する遺伝子の細胞内での発現を可視化または活性が確認できたことは重要な一歩である。

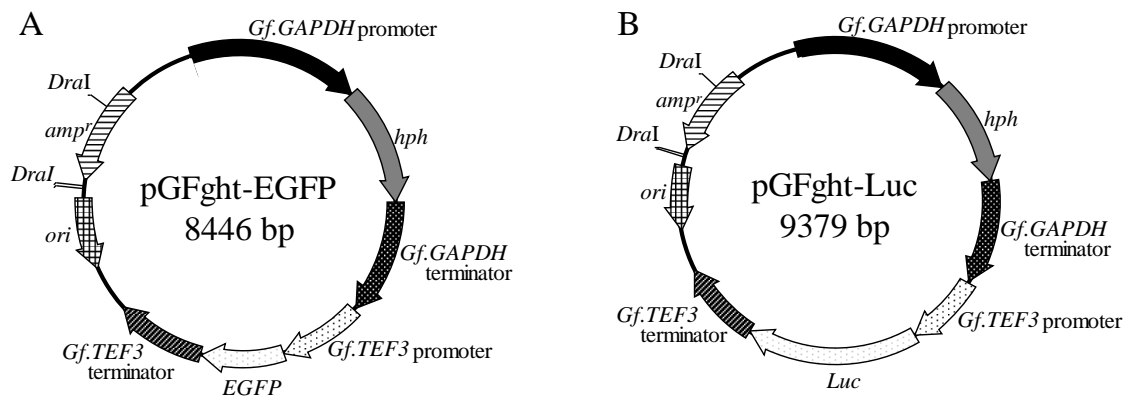


図3-5. EGFP発現ベクターとLuc発現ベクターの概略図

A: EGFP発現ベクター (pGFght-EGFP) は、*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間にEGFPを連結したEGFP発現カセット、*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に*hph*を連結した*hph*発現カセットの両方から構成される。B: *Luc*発現ベクター (pGFght-Luc) は、*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間に*Luc*を連結した*Luc*発現カセット、*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に*hph*を連結した*hph*発現カセットの両方から構成される。

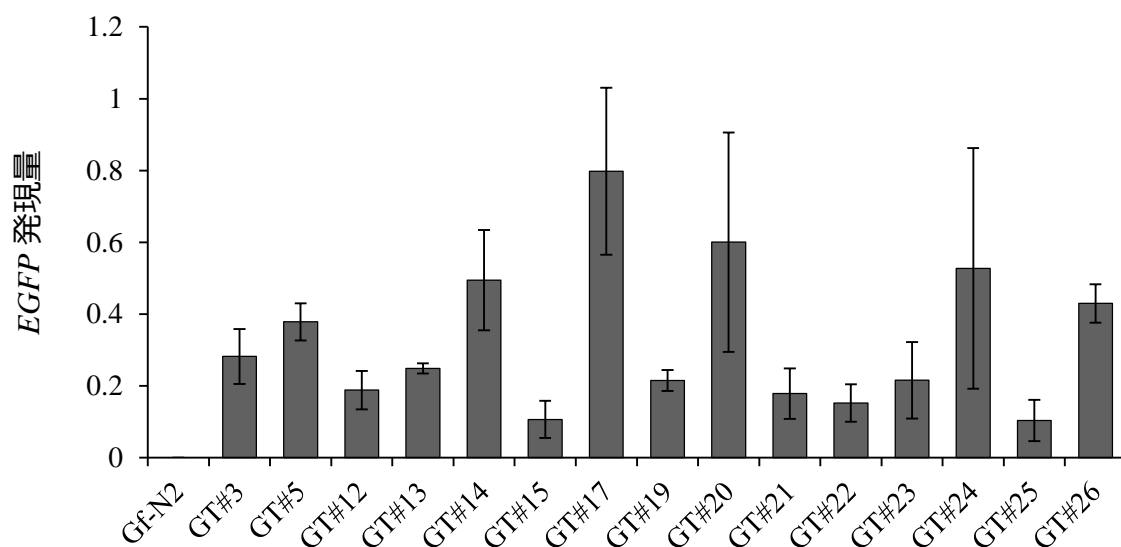


図3-6. pGFght-EGFPを導入して得られた形質転換体におけるEGFPの発現量
 Gf-N2株及びpGFght-EGFPを導入して得られた15個の形質転換体 (GT#) について、PDA培地で培養した菌糸体におけるEGFPの発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルのEGFP発現量は、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、*Gf.CHS1*の発現量を1とした時の相対値で算出した。

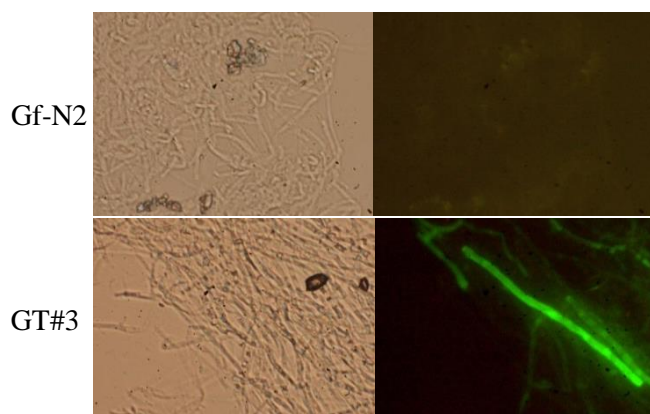


図3-7. 蛍光顕微鏡による菌糸中のEGFP蛍光の観察

Gf-N2株とpGFght-EGFPを導入して得られた形質転換体からランダムに選んだGT#3について、PDA培地で培養した菌糸体におけるEGFPの蛍光を蛍光顕微鏡により観察した。左側に可視光下の顕微鏡画像、右側に青色励起光下の顕微鏡画像をそれぞれ示した。

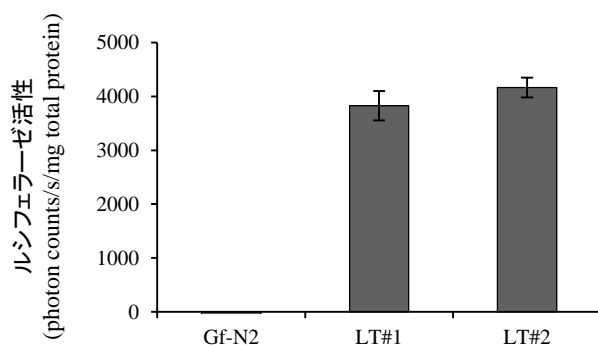


図3-8. pGFght-Lucを導入して得られた形質転換体のルシフェラーゼアッセイ
 Gf-N2株とpGFght-Lucを導入して得られた形質転換体（LT#1, LT#2）について、GPY培地で培養した菌糸体から調製した細胞粗抽出液を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性は、1秒間あたりの光子数を細胞粗抽出液中の総タンパク質量1 mg に換算して示した。

3.4. まとめ

マイタケ栽培における子実体形成を含む様々な生体機構を遺伝子レベルで明らかにするには、それに関わる個々の遺伝子の機能を知る必要がある。そのためには機能を知りたい遺伝子そのものの働きを遺伝子組換え技術により改変し、その影響を調べる逆遺伝学的手法の適用が必要となる。そこで、本研究では、マイタケで遺伝子機能解析に必要な外来から遺伝子の導入を可能とし、かつ導入された遺伝子が発現して機能を有するタンパク質として生産させるための宿主・ベクター系の構築を行った。その結論として、以下のように摘要される。

1. マイタケの宿主・ベクター系に利用可能な選択マーカー遺伝子を選定するため、優性マーカーとなる薬剤耐性遺伝子が存在するハイグロマイシン B、G418、ゼオシン、オーレオバシジン A に対するマイタケの薬剤感受性を調べた。その結果、ハイグロマイシン B は 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上、G418 は 40 $\mu\text{g/ml}$ 以上でマイタケの菌糸伸長が完全に阻害されることがわかり、それらで薬剤選抜が可能であることがわかった。一方で、ゼオシン、オーレオバシジン A は供試濃度では感受性がなく、選択マーカーとして不適であることがわかった。
2. ベクターを介して細胞内に導入された外来遺伝子を安定的に発現させるには活性の高いプロモーターとターミネ

ーターが必要であり、その候補として、マイタケで恒常的に高発現する遺伝子のプロモーターとターミネーターを利用することが考えられた。そこで、マイタケ栽培工程中の遺伝子発現プロファイルから恒常的に高発現している遺伝子として *Gf.PSD1*、*Gf.TEF3*、*Gf.CYP1* と、マイタケの生育に必要不可欠と考えられ恒常的に発現している遺伝子として *Gf.GAPDH* と *Gf.CHS1* を加えた 5 遺伝子のプロモーターとターミネーターをセットとしてそれぞれ用いて、その間に選択マーカー遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* を連結したベクター、*pGFpsd-hph*、*pGFcyp1-hph*、*pGFtef3-hph*、*pGFgapdh-hph*、*pGFchs-hph* を構築した。

3. 2. で構築した 5 つのベクターをプロトプラスト-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 耐性を示す形質転換体を得ることに成功した。ベクター構築に用いた 5 遺伝子のプロモーターとターミネーターのセットの中で活性の高いものを選定するため、5 つのベクターをそれぞれ導入したときの形質転換効率を比較したところ、*pGFtef3-hph* 及び *pGFgapdh-hph* が他の 3 つのベクターより高いことが判明したので、*Gf.TEF3* 及び *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判断し、次の遺伝子機能解析用のベクター構築に用いることにした。

4. 3.で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構築した遺伝子発現ベクターが、導入された宿主細胞でベクターに組み込んだ機能解析したい遺伝子を発現できることを、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*) を組み込んだベクターを作製し、それらによる形質発現の程度から評価した。*EGFP*、ないしは *Luc* を *Gf.TEF3* プロモーターとターミネーターの間に連結して構築した *EGFP* 発現ベクター (*pGFght-EGFP*) や *Luc* 発現ベクター (*pGFght-Luc*) をそれぞれマイタケに導入し、得られた形質転換体を解析したところ、それぞれの菌糸体で *EGFP* に由来する蛍光とルシフェラーゼ活性が確認された。

以上のことから、マイタケ遺伝子由来のプロモーター及びターミネーターを用いて目的とする遺伝子の恒常的発現を可能にするマイタケ遺伝子発現ベクターを作製するとともに、それをマイタケ細胞内に導入する技術を確立することで、マイタケの宿主・ベクター系を構築した。ここで構築したマイタケの宿主・ベクター系は、後述の遺伝子機能解析を行うための基盤技術となる。

参考文献

1. Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124; doi: 10.1016/0378-1119(87)90164-8.
2. Schuren FH, Wessels JG (1994). Highly-efficient transformation of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* to phleomycin resistance. *Current Genetics* 26: 179-183; doi: 10.1007/BF00313808.
3. Chen X, Stone M, Schlaghauser C, Romaine CP (2000). A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4510-4513; doi: 10.1128/AEM.66.10.4510-4513.2000.
4. Hirano T, Sato T, Yaegashi K, Enei H (2000). Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics* 263: 1047-1052; doi: 10.1007/s004380050033.
5. Maehara T, Tomita S, Takabatake K, Kaneko S (2010). Improvement of the transformation efficiency of *Flammulina velutipes* Fv-1 using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74: 2523-2525; doi: 10.1271/bbb.100556.

6. Yin Y, Liu Y, Jin H, Wang S, Zhao S, Geng X, Li M, Xu F (2012). Polyethylene glycol-mediated transformation of fused *egfp-hph* gene under the control of *gpd* promoter in *Pleurotus eryngii*. *Biotechnology Letters* 34: 1895–1900; doi: 10.1007/s10529-012-0985-5.
7. Holland MJ, Holland JP (1978). Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 17: 4900–4907; doi: 10.1021/bi00616a007.
8. Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, Dani C, Panabieres F, El Sabouty S, Fort P, Jeanteur P (1984). Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Research* 12: 6951-6963; doi: 10.1093/nar/12.18.6951.
9. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 201-221; doi: doi:10.1016/0378-1119(83)90191-9.
10. van de Rhee MD, Graça PM, Huizing HJ, Mooibroek H (1996). Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular & General Genetics* 250: 252-258; doi: 10.1007/BF02174382.
11. Yanai K, Yonekura K, Usami H, Hirayama M, Kajiwara S, Yamazaki T, Shishido K, Adachi T (1996). The integrative

- transformation of *Pleurotus ostreatus* using bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 472-475; doi: 10.1271/bbb.60.472.
12. Sato T, Yaegashi K, Ishii S, Hirano T, Kajiwara S, Shishido K, Enei H (1998). Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 2346-2350; doi: 10.1271/bbb.62.2346.
13. Noh W, Kim SW, Dong-Won B, Kim JY, Ro HS (2010). Genetic introduction of foreign genes to *Pleurotus eryngii* by restriction enzyme-mediated integration. *Journal of Microbiology* 48: 253-256; doi: 10.1007/s12275-010-9278-7.
14. Ding Y, Liang S, Lei J, Chen L, Kothe E, Ma A (2011). *Agrobacterium tumefaciens* mediated fused *egfp-hph* gene expression under the control of *gpd* promoter in *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research* 166: 314-322; doi: 10.1016/j.micres.2010.07.001.
15. Hatoh K, Izumitsu K, Morita A, Shimizu K, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C (2013). Transformation of the mushroom species *Hypsizigus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* by an *Agrobacterium*-mediated method using a universal transformation plasmid. *Mycoscience* 54: 8-12; doi: 10.1016/j.myc.2012.08.002.

16. Zhu B, Cai G, Hall EO, Freeman GJ (2007). In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques* 43: 354-359.
17. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408; <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
18. Collins CM, Heneghan MN, Kilaru S, Bailey AM, Foster GD (2010). Improvement of the *Coprinopsis cinerea* molecular toolkit using new construct design and additional marker genes. *Journal of Microbiological Methods* 82: 156-162; doi: 10.1016/j.mimet.2010.05.007.
19. Kurahashi A, Fujimori F, Nishibori K (2012). Analysis of Gene Expression Profiles during cultivation of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 52: 17-32.
20. 山崎 岳, 宍戸和夫 (2002). キノコとカビの基礎科学とバイオ技術 pp. 275-286.
21. Lugones LG, Scholtmeijer K, Klootwijk R, Wessels JG (1999). Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Molecular Microbiology* 32: 681-689; doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01373.x.
22. Burns C, Gregory KE, Kirby M, Cheung MK, Riquelme M, Elliott TJ, Challen MP, Bailey A, Foster GD (2005). Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and

- Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genetics and Biology* 42: 191–199; doi: 10.1016/j.fgb.2004.11.005.
23. Rekangalt D, Verner MC, Kües U, Walser PJ, Marmeisse R, Debaud JC, Fraissinet-Tachet L (2007). Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters* 268: 67–72; doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00564.x.
24. Shi L, Fang X, Li M, Mu D, Ren A, Tan Q, Zhao M, 2012. Development of a simple and efficient transformation system for the basidiomycetous medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28: 283–291; doi: 10.1007/s11274-011-0818-z.
25. Erdmann S, Freihorst D, Raudaskoski M, Schmidt-Heck W, Jung EM, Senftleben D, Kothe E (2012). Transcriptome and functional analysis of mating in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Eukaryotic Cell* 11: 571–589; doi: 10.1128/EC.05214-11.
26. Heneghan MN, Porta C, Zhang C, Burton KS, Challen MP, Bailey AM, Foster GD (2009). Characterization of serine proteinase expression in *Agaricus bisporus* and *Coprinopsis cinerea* by using green fluorescent protein and the *A. bisporus* *SPR1* promoter. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 792–801; doi: 10.1128/AEM.01897-08.

第4章 推定転写因子 *Gf.CRZ1* の過剰発現による機能解析

4.1. 序論

第3章では、第2章で取得したマイタケのゲノム配列から予測される遺伝子の機能解析をするための基盤技術として、マイタケで目的とする遺伝子の恒常的発現を可能にする宿主・ベクター系が構築できたことについて述べた。本章では、この宿主・ベクター系を用いて、子実体生育異常を生じる変異体で高発現していることから見出された転写因子と推定される遺伝子 *Gf.CRZ1* の機能解析を行った結果について述べる。

これまでに、マイタケ M51 株の突然変異体で子実体生育異常の程度が異なる2種類の変異体 Gf-A1 株及び Gf-A4 株と正常に子実体分化する Gf-N2 株を用いた子実体分化時のマイクロアレイによる遺伝子発現差解析から、マイタケの子実体分化に重要な機能を有していると推定される遺伝子を明らかにしている [1]。Gf-A1 株は原基が形成されてから子実体分化が進行しない変異形質を有し、Gf-A4 株は子実体分化が進行するが菌傘が開かない変異形質を有している。これら両変異株と正常に子実体分化が進行する Gf-N2 株を比べて、それぞれ子実体分化時に2倍以上差示的発現を示す遺伝子を絞込み、その中から両変異株に共通して発現差異のある遺伝子を24個見出している。これらの内、転写因子と唯一推定されたのが、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の転写因子 *CRZ1* と同一性を示す *Gf.CRZ1* である。

S. cerevisiae の CRZ1 は、 Ca^{2+} を介した種々の細胞内シグナル伝達を担うカルシニューリンの標的となる転写調節因子であり、カルシニューリン依存的な種々のストレス応答遺伝子の転写調節に関与している [2]。CRZ1 はカルシニューリンにより脱リン酸化されることで活性化し、核内に移行して標的遺伝子の転写を制御する [3]。CRZ1 は構造的に標的遺伝子のプロモーター領域に結合するための C2H2 型のジンクフィンガードメインを有しており [2]、その他にカルシニューリンによる脱リン酸化に必要なカルシニューリン結合モチーフ及び serine-rich 領域を有している [3, 4]。

マイタケの *Gf.CRZ1* は 345 残基のアミノ酸からなるタンパク質であり、他の菌類で知られている CRZ1 との相同性は、酵母 (*S. cerevisiae*) と 24% (NP_014371)、*Aspergillus fumigatus* と 23% (XP_750439)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) と 28% (XP_359644)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) と 29% (XP_001561008)、*Candida albicans* と 23% (EAK97605)、*Cryptococcus neoformans* と 33% (XP_566613) であった。これらとの配列の相同性は、主に C 末端側にある 3 つの C2H2 型ジンクフィンガードメインに位置していた。しかしながら、*Gf.CRZ1* は、*S. cerevisiae* の CRZ1 が有するカルシニューリン結合モチーフ及び serine-rich 領域と類似性のあるモチーフを欠いていた。また、前述のマイクロアレイ解析から、*Gf.CRZ1* は *Gf-N2* 株に比べて変異体である *Gf-A1* 株と *Gf-A4* 株で顕著に発現が高いが、酵母の 1,3- β -グルカン合成酵素遺伝子 (*FKS2*) に代表されるカルシニューリンに制御されていることが知ら

れている遺伝子のホモログとなるマイタケの遺伝子の発現は、*Gf-N2* 株と *Gf-A1* 株及び *Gf-A4* 株との間で大きな差がないことがわかっている [1]。したがって、*Gf.CRZ1* は、おそらくカルシニューリンを介するシグナル伝達経路に関与していないと考えられた。

Gf.CRZ1 は、子実体分化時のマイクロアレイ解析から見出された *Gf-N2* 株と比較して変異体 *Gf-A1* 株と *Gf-A4* 株で共通して差示的に発現する 24 遺伝子の中でも特に発現差が大きく、子実体分化時と菌糸生育時の両方で高発現している [1]。このことから、*Gf.CRZ1* が転写因子として機能しているならば、その標的として転写制御される遺伝子の発現が通常とは異なることで変異体の変異形質を招いていると予想され、*Gf.CRZ1* を除く差示的発現をする 23 遺伝子の中にその遺伝子が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では、第3章で構築したマイタケの遺伝子発現ベクターに発現させる遺伝子として *Gf.CRZ1* を組み込んだものを *Gf-N2* 株に導入し、内在の *Gf.CRZ1* に加えてベクターにより導入した *Gf.CRZ1* を常時高発現させることで、それにより発現に影響を受ける遺伝子が変異体で差示的発現をする 23 遺伝子の中にあるかを調べた。また、*Gf.CRZ1* を過剰発現させた *Gf-N2* 株の形質転換体の菌叢の表現型を変異体 *Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株のそれらとの類似性を比較することで、*Gf.CRZ1* の高発現が菌叢の表現型に及ぼす影響を調べた。

4.2. 実験材料と方法

4.2.1. 供試菌株及び培養条件

マイタケ形質転換実験における野生株として、株式会社雪国まいたけに保存されていた市販マイタケ菌株 M51（森産業，日本）で、正常な子実体生育をする二核菌糸株である Gf-N2 株を、子実体生育異常を示す突然変異体として、M51 株に由来する Gf-A1 株及び Gf-A4 株を使用した。マイタケ菌株の継代培養による維持には、ポテトブドウ糖寒天（PDA）培地（Oxoid, UK）を用い、25°C、暗黒下で培養した。組換えプラスミドの増幅には、大腸菌 JM109 株を使用し 100 µg/ml のアンピシリン（Wako, 日本）を含む LB 培地（1% polypeptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, 寒天培地として使用する場合には 1.5% Agar を追加）で培養した。

4.2.2. マイタケ遺伝子発現ベクターの構築

第3章 3.2.3 に記述したベクターの構築方法に基づき、In-Fusin HD Cloning Kit（TaKaRa, 日本）を用いて、ベクターの構築を行った。ベクター構築に用いる各 DNA 断片の PCR 増幅に使用したプライマーは、表 4-1 に示した。

4.2.3. 大腸菌からのプラスミド調製

大腸菌からのプラスミド調製は、第3章 3.2.4 に記述した方法に基づいて行った。

4.2.4. マイタケの形質転換と形質転換体の選抜

マイタケのプロトプラストの調製とプロトプラスト-PEG法による形質転換は、第3章 3.2.5 及び 3.2.6 に記述した方法に基づいて行った。形質転換体の選抜は、最初に 50 µg/ml のハイグロマイシン B を添加した PDA 培地に生育させ、ベクターに組み込まれた選択マーカ遺伝子であるハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* により耐性を獲得した菌糸体を選抜した。次に、選択マーカ遺伝子と共にベクターに組み込んだ機能を知りたい遺伝子である *Gf.CRZ1* の配列が導入されていることをコロニーダイレクト PCR により確認した。コロニーダイレクト PCR は、掻きとった菌糸を TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁したサンプルを鋳型に、KOD FX Neo (TOYOBO, 日本) を用いて行った。PCR 条件は、94°C で 2 分間の初期熱変性後、98°C で 10 秒間の熱変性、58°C で 30 秒間のアニーリング、68°C で 3 分間の伸長反応を 35 サイクルとした。PCR 増幅に使用したプライマーは、表 4-1 に示した。ベクターの導入が確認された形質転換体が二核菌糸を維持していることは、顕微鏡下で菌糸にクランプコネクションが観察されることで確認した。

4.2.5. RNA の調製及び定量 RT-PCR

PDA 培地で培養した菌糸体を約 100 mg 分掻きとり、ガラスビーズ (Φ1 mm) 0.5 g と RNAzol RT reagent (Molecular Research Center, Inc., USA) 500 µl を入れた 2 ml スクリューキャップチューブに加えて、直ちにビーズ式細胞破碎装置

Micro Smash MS-100 (TOMY, 日本) で 3000 rpm、3 分間破砕した。破砕液からガラスビーズを取り除いた後、RNAzol RT reagent に付属するプロトコルに従い、全 RNA を調製した。全 RNA からの cDNA 合成は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行った。定量 RT-PCR は、PCR 用試薬に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を、リアルタイム PCR 装置には CHROMO4 (Bio-Rad, USA) を使用して行った。PCR 条件は、95°C で 1 分間の初期熱変性後、95°C で 15 秒間の熱変性、60°C で 30 秒間の伸長反応後に蛍光測定することを 40 サイクルとした。各サンプルの発現量を正規化するための内部標準遺伝子には *Gf.GAPDH* を使い、相対発現量の算出は、 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法 [5]により行った。定量 RT-PCR 解析は、解析するそれぞれの遺伝子につき、3 回繰り返して行った。定量 RT-PCR に使用したプライマーの配列は、表 4-1 に示した。

表 4-1. 本研究で使したプライマーの配列

Primer name	Sequence (5' - 3')*	Description
Ptef3-F2	ATCCTCTAGAGTCGAC ACTGGGTGGAAGCTAATAG	Gf.TEF3 プロモーター領域の増幅に使用
Ptef3-R	TTCGAATATCTGGGCGACCG	
Ttef3-F	ACGTTGTCCGTCGCCGTTGTTG	
Ttef3-R2	TGATTACGCCAAGCTC TGCGATTGCATGGCTCATC	Gf.TEF3 ターミネーター領域の増幅に使用
Gf.CRZ1-F	GCCCAGATATTCGAA ATGGAAGTCGACTCGGGATTC	<i>Gf.CRZ1</i> 全長コード配列の増幅に使用
Gf.CRZ1-R	GGCGACGGACAACG TCTACGGCGTCTGGCGGTCG	
CDP-F	AATTGGATCCTCTAGAGTCG	
CDP-R	GGATAACAATTCACACAGG	プラスミドベクター導入を確認するためのコロニーダイレクトPCRに使用
Gf.GAPDH-QPCR-F	TGAACGATCCCTTCATTGACC	
Gf.GAPDH-QPCR-R	AGATAGGCTTGCCCTCAACG	<i>Gf.GAPDH</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.CRZ1-QPCR-F	TCATCCCTCTGCATCGTCATCTC	
Gf.CRZ1-QPCR-R	GCGGATAACATGGAAGAAATCGG	<i>Gf.CRZ1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.FDH1-QPCR-F	TCGCGGACTTATCAATGCTG	
Gf.FDH1-QPCR-R	CAGCGATGGCTTCCTTGTC	<i>Gf.FDH1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.ODC1-QPCR-F	ATTCTCAATGGCACAGGCAG	
Gf.ODC1-QPCR-R	GGAGGGAAGTAGTAGATGTC	<i>Gf.ODC1</i> の定量RT-PCR用プライマー

* In-Fusion クローニングの際に必要な15 bpの付加配列を太字で示した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. マイタケの *Gf.CRZ1* 過剰発現株の作出

Gf.CRZ1 を過剰発現させるためのベクターの構築には、第3章で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* の発現に成功している *Gf.TEF3* のプロモーターとターミネーターを用いた。*Gf.CRZ1* のコード領域は、*Gf.CRZ1-F* 及び *Gf.CRZ1-R* のプライマーを用いて、事前にクローニングしておいた全長 cDNA を鋳型とした PCR により増幅した。*Gf.TEF3* のプロモーター及びターミネーターの領域は、それぞれ *Ptef3-F2/Ptef3-R* 及び *Ttef3-F/Ttef3-R2* のプライマーペアを用いて、*pGFtef3-hph* を鋳型とした PCR により増幅した。In Fusion クローニング法により、増幅した各 DNA 断片が *Gf.TEF3* プロモーター断片、*Gf.CRZ1* コード領域断片、*Gf.TEF3* ターミネーター断片の順になるように、*HindIII* と *SalI* 処理により線状化した *pGFgapdh-hph* と連結してクローニングした。その結果、*Gf.TEF3* プロモーターとターミネーターの間に *Gf.CRZ1* を連結した *Gf.CRZ1* 発現カセットと *Gf.GAPDH* プロモーターとターミネーター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* を連結した *hph* 発現カセットの2つを組み込んだ *Gf.CRZ1* 発現ベクター *pGFght-CRZ1* を構築した (図 4-1)。

pGFght-CRZ1 をプロトプラスト-PEG法により *Gf-N2* 株に導入し、ハイグロマイシン B で選抜することで、ハイグロマイシン B 耐性を示す 40 個のクローンを取得した。この 40 個の

クローンについて、*Gf.TEF3* のプロモーター及びターミネーターのそれぞれ外側に設計した CDP-F 及び CDP-R プライマーを用いてコロニーダイレクト PCR をすることで *Gf.CRZ1* 発現カセットの導入の有無を確認し、そのうち導入が確認された 30 個を形質転換体として得た。次に、取得した形質転換体を PDA 培地で培養した時の *Gf.CRZ1* の発現量を定量 RT-PCR により解析し、ベクターを導入していない Gf-N2 株と比較して 10 倍以上高い *Gf.CRZ1* 発現量を示すものを *Gf.CRZ1* 過剰発現株として選定した。その結果、*Gf.CRZ1* の発現量が Gf-N2 株より 25 倍高い形質転換体 #1 (+*Gf.CRZ1* #1) と 13 倍高い形質転換体 #21 (+*Gf.CRZ1* #21) の 2 つの *Gf.CRZ1* 過剰発現株を取得した。これら *Gf.CRZ1* 過剰発現株における *Gf.CRZ1* 発現量は、Gf-N2 株や *Gf.CRZ1* 発現カセットを持たない pGFgapdh-hph を導入して得たコントロールの形質転換株 (CT) に比べて 10 倍以上有意に高く、変異体である Gf-A1 株や Gf-A4 株のそれらと同程度に高発現している状態を再現することができた (図 4-2)。

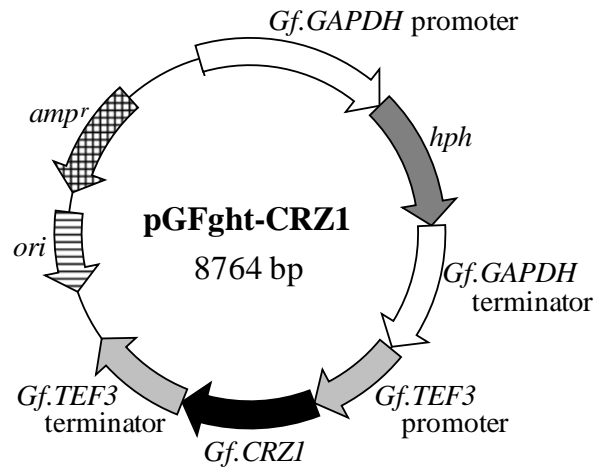


図4-1. *Gf.CRZ1*発現ベクターの概略図

*Gf.CRZ1*発現ベクター (pGFght-CRZ1) は、*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間に*Gf.CRZ1*を連結した*Gf.CRZ1*発現カセット、*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に*hph*を連結した*hph*発現カセットから構成される。

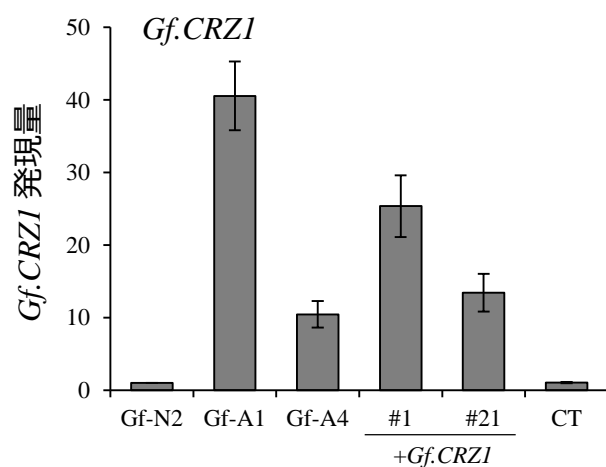


図4-2. *Gf.CRZ1*過剰発現株における*Gf.CRZ1*の発現量

*Gf.CRZ1*過剰発現株+*Gf.CRZ1* #1及び+*Gf.CRZ1* #21、変異体Gf-A1株及びGf-A4株、Gf-N2株、CT株をそれぞれPDA培地で培養した時の菌糸体における*Gf.CRZ1*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.CRZ1*発現量は*Gf.GAPDH*の発現量を内部標準として正規化し、Gf-N2株の発現量を1とした時の相対値で算出した。

4.3.2. *Gf.CRZ1* の過剰発現により発現に影響を受ける遺伝子の探索

Gf.CRZ1 は、Gf-N2 株と比較して変異体 Gf-A1 株と Gf-A4 株で共通に差示的に発現する 24 遺伝子の中で、唯一転写因子をコードしていると推定される遺伝子である。したがって、*Gf.CRZ1* が高発現していることで転写制御されている遺伝子が、*Gf.CRZ1* を除いた残りの 23 遺伝子の中に存在している可能性が考えられた。そこで、Gf-N2 株で *Gf.CRZ1* を過剰発現させた形質転換体（以降、*Gf.CRZ1* 過剰発現株）で発現量に変化している遺伝子が、変異体 Gf-A1 株と Gf-A4 株で共通に差示的に発現する 23 遺伝子の中に存在しているかを調べた。変異体 Gf-A1 株と Gf-A4 株で共通に差示的に発現する 23 遺伝子は、子実体分化時の発現量の比較から見出された遺伝子であり、その中には菌糸生育段階では発現量に差が見られないものもある。また、配列の相同性による機能注釈から機能が推定できないものもある。そこで、23 遺伝子の中から菌糸生育時においても Gf-N2 株と変異体 Gf-A1 株と Gf-A4 株で発現差があることが確認されていて、かつ機能が推定できる遺伝子として、NAD 依存性ギ酸脱水素酵素（FDH）遺伝子（*Gf.FDH1*）、アクアポリン様タンパク質遺伝子（*Gf.AQP1*）、グリコシドヒドロラーゼファミリー29（GH29）タンパク質遺伝子を選び、*Gf.CRZ1* 過剰発現株が PDA 培地で菌糸生育している時のこれら遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により解析した。その結果、*Gf.FDH1* の発現が、Gf-N2 株や CT 株に比べて *Gf.CRZ1* 過剰発現株で高いことが判明し、その発現レベル

は変異体である *Gf-A1* 株及び *Gf-A4* 株と同等であった (図 4-3)。一方で、*Gf.AQP1* 及び *GH29* タンパク質遺伝子の発現量は、*Gf.CRZ1* 過剰発現株と *Gf-N2* 株及び *CT* 株の間で顕著な差は見られなかった (data not shown)。これらの結果から、*Gf.CRZ1* の発現は *Gf.FDH1* の発現に影響を及ぼすことが示唆された。

FDH は、*NAD* 存在下でギ酸を酸化し、 CO_2 と *NADH* を生成する反応を触媒する酵素であり、白色腐朽菌においては細胞内のシュウ酸代謝に関わることが示唆されている [6, 7]。シュウ酸は、基本的にクエン酸 (TCA) 回路及びグリオキシル酸 (*GLOX*) 回路から生合成される有機酸であり [8]、細胞内のシュウ酸は、シュウ酸脱炭酸酵素 (*ODC*) によりギ酸に分解され、続いて *FDH* により CO_2 に迅速に分解される経路が、白色腐朽菌である *Ceriporiopsis subvermispora* [9] とマツノオオウズラタケ (*Dichomitus squalens*) [10] において提唱されている。白色腐朽菌では、シュウ酸の分解の際に *ODC* 遺伝子の発現と *FDH* 遺伝子の発現は同調的であることが示唆されていることから [10]、同じ白色腐朽菌であるマイタケにおいても *ODC* 遺伝子と *Gf.FDH1* は同じ制御を受けている可能性が予想されたので、*Gf.CRZ1* 過剰発現株における *ODC* 遺伝子の発現変動を調べた。まず、マイタケのゲノム配列データの相同性解析から、*ODC* をコードすること推定がされる遺伝子を検索した結果、マイタケには少なくとも *Gf.ODC1*、*Gf.ODC2*、*Gf.ODC3*、*Gf.ODC4* の 4 つの遺伝子が存在することがわかった。次に、これら 4 つの遺伝子に関して、*Gf.CRZ1* 過剰発現

株 +*Gf.CRZ1* #1 及び +*Gf.CRZ1* #21、変異体 *Gf-A1* 株及び *Gf-A4* 株、*Gf-N2* 株、CT 株をそれぞれ PDA 培地で培養した時の菌糸体における発現量を定量 RT-PCR により解析した結果、*Gf.ODC1* の発現が、*Gf-N2* 株や CT 株に比べて *Gf.CRZ1* 過剰発現株 +*Gf.CRZ1* #1 及び +*Gf.CRZ1* #21 と変異体である *Gf-A1* 株及び *Gf-A4* 株で有意に高いことがわかった (図 4-3)。それとは反対に、*Gf.ODC2*、*Gf.ODC3*、*Gf.ODC4* の発現量は、解析した菌株の間で顕著な差が認められなかった (data not shown)。これらの結果から、*Gf.CRZ1* は、*Gf.ODC1* 及び *Gf.FDHI* の転写レベルを直接的または間接的に正に制御している可能性が示唆された (図 4-4)。一方で、その他の 3 つの ODC 遺伝子は、おそらく *Gf.ODC1* とは異なる制御下にあると考えられた。

シュウ酸は、木材腐朽菌の木質分解において、Mn のキレート剤として、あるいは過酸化水素を供給するための基質として、マンガンペルオキシダーゼの活性を刺激することで、リグニン分解に重要な機能を果たしていることが明らかにされている [11, 12]。したがって、木材腐朽菌においてシュウ酸の代謝は、生育する環境条件に応じて制御されていることが予想される。菌類の ODC の制御に関する研究として、低 pH 環境下で ODC の活性が上昇することがカワラタケ (*Trametes versicolor*) で報告されており [13]、また、ODC 遺伝子の発現量が増加することがエノキタケ (*Flammulina velutipes*) [14] と *D. squalens* [10] で報告されている。しかしながら、木材腐朽菌において、シュウ酸代謝の調節に関わる転写因子に関し

てはほとんどわかっていない。したがって、本研究で転写因子と推定される *Gf.CRZ1* とシュウ酸の分解に関わる *Gf.ODCI* 及び *Gf.FDH1* との関連が示唆されたことは、木材腐朽菌におけるシュウ酸代謝制御を理解する上で重要な知見になると考えられる。

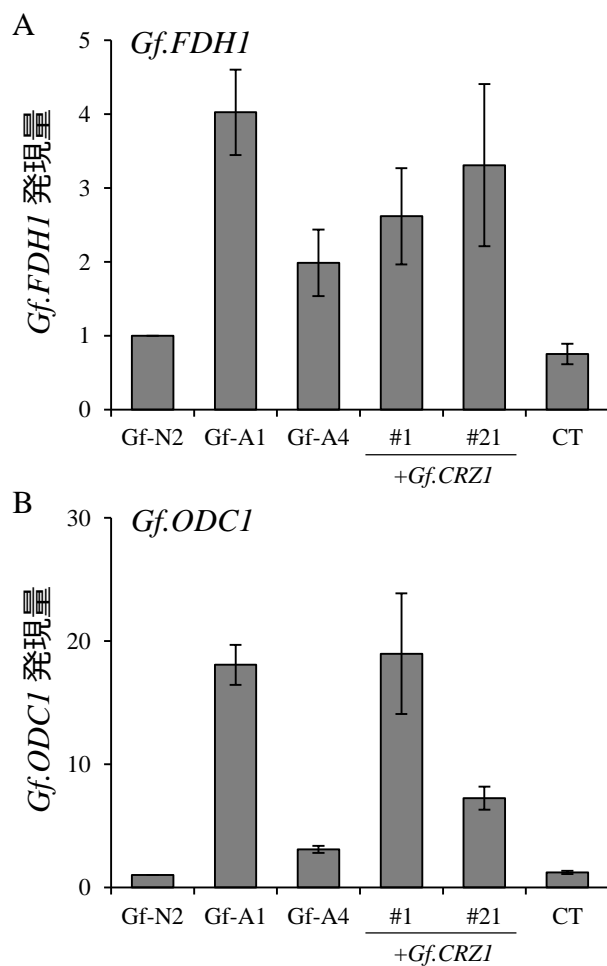


図4-3. *Gf.CRZ1*過剰発現株における*Gf.FDH1*と*Gf.ODC1*の発現量

*Gf.CRZ1*過剰発現株+*Gf.CRZ1* #1及び+*Gf.CRZ1* #21、変異体Gf-A1株及びGf-A4株、Gf-N2株、CT株をそれぞれPDA培地で培養した時の菌糸体における*Gf.FDH1* (A) 及び*Gf.ODC1* (B) の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの発現量は、*Gf.GAPDH*の発現量を内部標準として正規化し、Gf-N2株の発現量を1とした時の相対値で算出した。

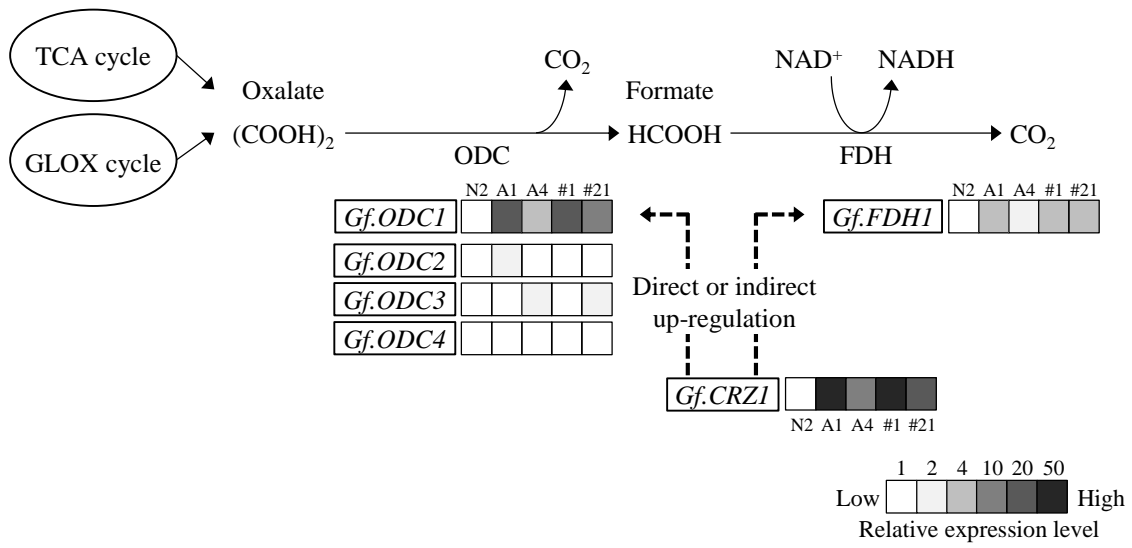


図4-4. 白色腐朽菌におけるシュウ酸代謝経路の概略とシュウ酸分解に関わる遺伝子の発現量比較

白色腐朽菌のシュウ酸代謝経路の概略を実線で、本研究から推定された*Gf.CRZ1*の機能的役割を点線で示した。*Gf*-N2株 (N2)、*Gf*-A1株 (A1)、*Gf*-A4株 (A4)、+*Gf.CRZ1* #1 (#1)、+*Gf.CRZ1* #21 (#21)における各遺伝子の発現量は、定量RT-PCR解析により得た*Gf*-N2株の発現量を1とした時の相対値を右下のグレースケールで表した発現レベルにしたがって示した。

4.3.3. *Gf.CRZ1* の過剰発現が表現型に及ぼす影響の解析

Gf.CRZ1 の発現が高いことが、変異体である Gf-A1 株や Gf-A4 株の子実体生育異常を含む特異的な表現型に寄与しているならば、*Gf.CRZ1* 過剰発現株は、これらの変異体株と共通の生育異常を示すことが予想される。このことを検証するには、*Gf.CRZ1* 過剰発現株の子実体を発生させることが最も有効であるが、遺伝子組換えにより得た形質転換体の子実体発生には、研究室規模でマイタケを栽培できる環境を整える必要がある。しかしながら、マイタケを研究室規模で栽培できるようスケールダウンし、子実体を安定的に発生できるように栽培環境を最適化するには、解決すべき点が多く容易ではない。そこで、変異体である Gf-A1 株と Gf-A4 株は、平板培地上の菌糸生育時においても Gf-N2 株に比べて菌糸密度が低く、菌叢が薄い特徴ある表現型を示すことから、平板培地における菌叢の状態を調べることで *Gf.CRZ1* 過剰発現株の表現型を評価することにした。

平板培地における菌叢を比較するため、*Gf.CRZ1* 過剰発現株である +*Gf.CRZ1* #1 及び +*Gf.CRZ1* #21、変異体である Gf-A1 株及び Gf-A4 株、Gf-N2 株、CT 株をそれぞれ PDA 培地で、25°C、暗黒下で 16 日間培養した菌叢を比較した（図 4-5）。*Gf.CRZ1* 過剰発現株は、Gf-N2 株や CT 株に比べて、菌糸生長が遅いことに加え、菌糸密度が低く、菌叢が薄かった。菌糸密度が低いのは、特に菌叢の周縁部で顕著であり、その形状も歪であった。一方で、変異体である Gf-A1 株と Gf-A4 株は、Gf-N2 株や CT 株に比べて、菌糸生長の速度は変わらないが、

菌糸密度が低く、菌叢が薄かった。*Gf.CRZ1* 過剰発現株と変異株を比較すると、菌糸生長速度には違いが見られるが、菌糸密度が低く、菌叢が薄い点では共通した特徴が認められた。これらのことから、*Gf.CRZ1* の発現が高いことが、異常な菌糸生育を生じる要因の一つとなっていると推察された。特に薄い菌叢の形成は、*Gf.CRZ1* の発現が培地表面上の菌糸よりも気中菌糸の生長に強く影響し、その結果として菌糸密度の低下をもたらしたことによるものと推測された。4.3.2の結果から、*Gf.CRZ1* はシュウ酸の分解に関わる *GfODC1* 及び *Gf.FDH1* の転写レベルを正に制御することが示唆されている。シュウ酸は、生物にとって毒性を示すことから、その濃度は細胞内外で厳密に制御されているものと思われる。白色腐朽菌は、シュウ酸の過剰な細胞内蓄積を防ぐために ODC が細胞内のシュウ酸レベルをコントロールするのに主要な役割を果たしているとの説が提唱されている [15]。したがって、*Gf.CRZ1* の恒常的高発現は、シュウ酸代謝を乱すことに繋がり、その結果として正常な菌糸生長が阻害されていることが考えられる。しかしながら、*Gf.CRZ1* の下流に位置するターゲットとなる遺伝子を同定し、*GfODC1* 及び *Gf.FDH1* の発現上昇や正常な菌糸生育の阻害に繋がるメカニズムを解明するには、更なる解析が必要と考えられる。この次の解析として、*Gf.CRZ1* のターゲットを同定するために、クロマチン免疫沈降法解析、*Gf.CRZ1* 過剰発現株のトランスクリプトーム解析や *Gf.CRZ1* 過剰発現株の子実体を発生させたときの表現型の

確認などを行うことで、*Gf.CRZ1* の詳細な機能解明に繋がると考えられる。

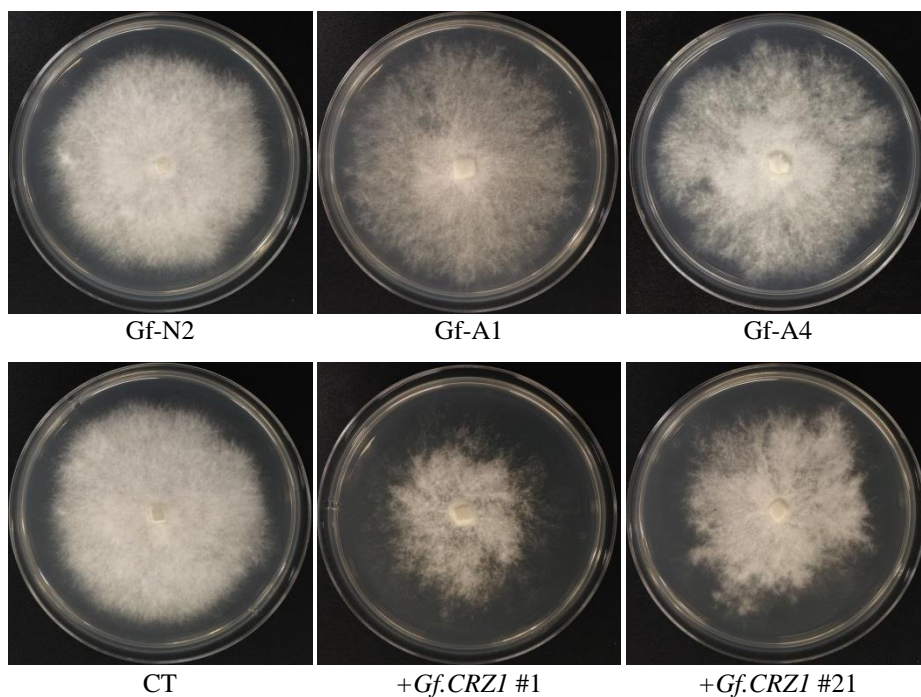


図4-5.平板培地上の菌糸生育における*Gf.CRZ1*過剰発現株の表現型
*Gf.CRZ1*過剰発現株+*Gf.CRZ1* #1及び+*Gf.CRZ1* #21、変異体Gf-A1株及びGf-A4株、Gf-N2株、CT株をPDA培地で、25°C、暗黒下で16日間培養した時の菌叢の状態を比較した。

4.4. まとめ

本研究では、子実体生育異常を生じる変異体である Gf-A1 株と Gf-A4 株で高発現していることから見出された転写因子と推定される *Gf.CRZ1* の機能を明らかにするため、*Gf.CRZ1* 発現ベクターを Gf-N2 株に導入することにより *Gf.CRZ1* を過剰発現させた形質転換体 (*Gf.CRZ1* 過剰発現株) を作出し、その遺伝子発現と菌叢の形質を Gf-A1 株や Gf-A4 株、及び Gf-N2 株のそれらと比較解析した。その結果、以下のように摘要される結論を得た。

1. *Gf.CRZ1* 発現ベクター pGFght-*CRZ1* を構築し、Gf-N2 株に導入することで、Gf-N2 株よりも *Gf.CRZ1* の発現量が 10 倍以上高い *Gf.CRZ1* 過剰発現株を作出した。
2. *Gf.CRZ1* 過剰発現株で *Gf.CRZ1* の過剰発現により発現量が変化している遺伝子が、*Gf.CRZ1* と同じく変異体 Gf-A1 株や Gf-A4 株で共通に差示的発現を示した 23 遺伝子の中に存在するかを調べたところ、NAD 依存性ギ酸脱水素酵素遺伝子 *Gf.FDH1* の発現が高いことがわかった。
3. 白色腐朽菌では、シュウ酸はシュウ酸脱炭酸酵素によりギ酸に分解され、続いてギ酸は NAD 依存性ギ酸脱水素酵素により CO₂ に分解されることが知られているので、マイタケのゲノムから予測された 4 つのシュウ酸脱炭酸酵素遺伝子 *Gf.ODC1*、*Gf.ODC2*、*Gf.ODC3*、*Gf.ODC4* の発現量を解

析したところ、*Gf.ODC1* の発現が *Gf.CRZ1* 過剰発現株と変異体 Gf-A1 株及び Gf-A4 株に共通して高いことがわかった。このことから、*Gf.CRZ1* は、シュウ酸分解に関わる *Gf.ODC1* と *Gf.FDH1* の発現を正に調節していることが示唆された。

4. *Gf.CRZ1* 過剰発現株の平板培地培養時の菌糸生育における表現型を調べたところ、Gf-N2 株に比べて菌糸生長が遅いことに加え、菌糸密度が低く、菌叢が薄かった。このような菌糸密度が低く、菌叢が薄い点は、変異体である Gf-A1 株や Gf-A4 株と類似していたことから、*Gf.CRZ1* の恒常的高発現は正常な菌糸生長を妨げることが示唆された。

参考文献

1. Kurahashi A, Sato M, Nishibori K, Fujimori F (2014). Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 54: 23-33.
2. Stathopoulos AM, Cyert MS (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Development* 11: 3432–3444; doi: 10.1101/gad.11.24.3432.
3. Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS (1999). Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes & Development* 13: 798–803.
4. Boustany L, Cyert MS (2002). Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes & Development* 16: 608–619; doi: 10.1101/gad.967602.
5. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408; doi: 10.1006/meth.2001.1262.
6. Mii K, Hattori T, Shimada M (1996). Occurrence of enzyme systems for production and decomposition of oxalate in a white-rot fungus *Coriolus versicolor* and characteristics of glyoxylate oxidase. *Wood research: Bulletin of the Wood*

- Research Institute Kyoto University* 83: 23–26.
7. Hayashi N, Tokimatsu T, Hattori T, Shimada M (2000). An enzymatic study of an oxalate producing system in relation to the glyoxylate cycle in white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Wood Research: Bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University* 87: 15–16.
 8. Munir E, Yoon JJ, Tokimatsu T, Hattori T, Shimada M (2001). A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11126–11130; doi: 10.1073/pnas.191389598.
 9. Watanabe T, Hattori T, Tengku S, Shimada M (2005). Purification and characterization of NAD-dependent formate dehydrogenase from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* and a possible role of the enzyme in oxalate metabolism. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 68–75; doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.01.032.
 10. Mäkelä MR, Sietiö OM, de Vries RP, Timonen S, Hildén K (2014). Oxalate-metabolising genes of the white-rot fungus *Dichomitus squalens* are differentially induced on wood and at high proton concentration. *PLoS ONE* 9(2): e87959; doi: 10.1371/journal.pone.0087959.
 11. Kuan IC, Tien M (1993). Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1242–1246; doi: 10.1073/pnas.90.4.1242.
12. Urzúa U, Kersten PJ, Vicuña R (1998). Manganese peroxidase dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 68–73.
 13. Zhu CX, Hong F (2010). Induction of an oxalate decarboxylase in the filamentous fungus *Trametes versicolor* by addition of inorganic acids. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 655–664; doi: 10.1007/s12010-009-8571-6.
 14. Azam M, Kesarwani M, Chakraborty S, Natarajan K, Datta A (2002). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the oxalate decarboxylase gene from *Flammulina velutipes*. *The Biochemical Journal* 367: 67–75; doi: 10.1042/bj20011573.
 15. Mäkelä M, Galkin S, Hatakka A, Lundell T (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 542–549; doi: 10.1016/s0141-0229(02)00012-1.

第5章 RNAiによるマイタケの遺伝子機能解析

5.1. 序論

ゲノム配列や RNA 配列の大規模解析やマイクロアレイなどによる網羅的遺伝子発現解析から得られる情報は、生物が持つ様々な遺伝子の役割や機能を推測する上で重要な根拠となるが、各々の遺伝子の生体における機能を確定するには遺伝子個々に機能解析をする必要がある。遺伝子機能解析には、対象とする遺伝子の機能を人為的に破壊あるいは発現を変化させることによってその表現型への影響を調べる、いわゆる逆遺伝学的手法が有効な手段となる。本章では、第3章で構築したマイタケの宿主・ベクター系を用いて、マイタケで逆遺伝学的手法により遺伝子機能解析を行うのに必要な基盤技術の確立を試みた。

解析の対象とする遺伝子（標的遺伝子）の機能を人為的に破壊する一般的方法として、標的遺伝子もしくはそれに隣接する領域と相同な配列を含むように構築した DNA 構築物を細胞内に導入し、生物が本来持つ相同組換え機構を利用して、ゲノム上の標的遺伝子と置換する遺伝子ターゲティング法がある（図 5-1）。酵母では高い確率で遺伝子ターゲティングを行うことができるが、酵母以外の真核生物では非相同組換えにより導入された DNA 構築物はゲノム上の特定の位置ではなくランダムな位置に組み込まれることが多く、標的遺伝子が的確に改変される確立（遺伝子ターゲティング効率）は著しく低い。導入された DNA 構築物がゲノム配列内に組み込ま

れる際には DNA 二本鎖切断修復と同様の機構が働くと考えられており、その主要な修復機構として相同組換え修復と非相同末端結合（非相同組換え）がある。酵母を除く真核生物では非相同末端結合が優先されるため、遺伝子ターゲティング効率が低いと考えられている。そこで、ターゲティング効率を上げる方策として、事前に非相同末端結合に関わる遺伝子（*ku70*, *ku80*, *lig4*）を破壊することでこの修復機構を遮断し、相同組換えが優先的に起こるようにする方法がとられている。この方法により、アカパンカビ（*Neurospora crassa*）においては *ku70* または *ku80* 遺伝子の破壊によりターゲティング効率が 100%に上昇し[1]、*Aspergillus fumigatus* においては *ku70* 遺伝子の破壊によりターゲティング効率が 96%に上昇することが報告されており[2]、他の糸状菌でも報告数が増えてきている。しかしながら、最初に非相同末端結合に関わる遺伝子の破壊株を得るまでに労力がかかることや、これらの遺伝子の破壊により表現型に影響が出る場合は形質転換実験の宿主として利用できないことなど、本方法をも用いるには克服すべき問題が多々あり容易ではない。

遺伝子ターゲティング法による遺伝子機能解析には上述のようにまだ多くの労力と時間がかかるため、それ以外の方法として RNAi（RNA interference）による標的遺伝子の発現を抑制する方法が広く利用されている。RNAi は、二本鎖 RNA（double-stranded RNA; dsRNA）によってその配列に特異的な mRNA が分解される機構であり、哺乳類、昆虫、植物、菌類などの様々な生物種で確認されている[3]。現在提唱されてい

る RNAi 機構を図 5-2 に示した。RNAi は、dsRNA がリボヌクレアーゼである Dicer によって 21-25 塩基の small interfering RNA (siRNA) に分解されることから始まる。この siRNA は複数のタンパク質から構成される RNA Induced Silencing Complex (RISC) に組み込まれて複合体を形成する。RISC は組み込まれた siRNA をガイドに相補的な配列をもつ標的 mRNA を認識して切断する。切断された標的 mRNA は最終的に速やかに分解される。この RNAi を人為的に誘導し、標的遺伝子の発現を抑制することで、遺伝子の機能解析が行われている。RNAi の人為的誘導は、標的とする遺伝子の mRNA 配列と相同な dsRNA あるいは siRNA を直接細胞内に導入する、またはそれを組み込んだベクターを導入して発現させる手法が用いられており、現在もより効率的に RNAi を誘導するための技術開発が様々な生物種で行われている。担子菌類における RNAi を利用した遺伝子発現抑制の事例は、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) [4]、ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinereus*) [5, 6, 7]、オオキツネタケ (*Laccaria bicolor*) [8, 9]、*Phanerochaete chrysosporium* [10]、ツクリタケ (*Agaricus bisporus*) [11]、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) [12]、シイタケ (*Lentinula edodes*) [13]、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) [14]などで報告されている。これらの担子菌では、標的遺伝子の配列をスペーサー配列を挟んで逆方向に配置した逆方向反復配列を発現するためのベクターを導入して、それから転写される mRNA がスペーサー配列を介

してヘアピンループ状の二本鎖 RNA (hpRNA) の構造を生じることによって RNAi を誘導する方法が主に用いられている。

遺伝子機能解析のための遺伝子ターゲティングはゲノム上の遺伝子を直接改変するので完全な遺伝子機能の破壊が可能である点で有効であるが、効率が低く、多大な時間と労力を要する点で障壁がある。特にマイタケを含む担子菌は、生活環のほとんどを二核菌糸で生育するため、遺伝機能を調べるには両方の核に存在する対立遺伝子を破壊する必要があり、遺伝子ターゲティングは更に難しいと考えられる。一方、RNAi は遺伝子機能の完全な破壊は不可能であるが、mRNA を標的とするため、二核であっても関係なく、遺伝子の発現を抑制することができる。以上のことを考慮して、本研究では RNAi によりマイタケの遺伝子機能解析をするための手法の確立を目指した。RNAi により遺伝子発現抑制する標的として、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タンパク質遺伝子 (*Gf.FAS1*)、及びマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 遺伝子 (*Gf.MNP1*) を選んだ。ハイドロフォービンは、糸状菌が特異的に有する低分子量の両親媒性タンパク質で、菌糸表面に撥水作用をもたらすことで、菌糸の気中への立ち上げや気中構造の形成などに関与することが知られている [15, 16]。 *Gf.HydA1* は、マイタケの菌糸生育時に顕著に高発現している遺伝子であり、菌糸伸長に重要な役割を担うことが予想されるため解析対象とした。 *Gf.FAS1* は、細胞接着に関わるファシクリン (Fasciclin) のドメインを有するタンパク質をコードしており、過去に行った正常に子実体生

育する Gf-N2 株と子実体生育異常を生じる変異体 Gf-A1 株のマイクロアレイ解析 [17] から Gf-A1 株で子実体分化時に発現が顕著に低いことがわかっている。Gf.FAS1 の発現が低いことと子実体生育異常の関連を調べるために解析対象として選んだ。MnP は木質中のリグニン分解に関わることが広く知られており、木材腐朽に重要な役割を担っていると考えられている。マイタケに複数存在する MnP 遺伝子の中で、Gf.MNP1 は栽培の培養工程で特に高発現していることから、菌糸生育時の培地成分の分解に大きく関わり、培養時に重要な役割を担っていることが予想されるため解析対象に選んだ。これらの遺伝子について、hpRNA を発現するように設計した RNAi 用ベクターを各々作製し、マイタケにそれぞれ導入することで、RNAi による遺伝子発現抑制を試みた。RNAi ベクターを導入して得られた形質転換体について、標的遺伝子の発現抑制を確認し、得られた遺伝子発現抑制株の表現型を形質転換前の表現型と比較することにより遺伝子機能の解析を行った。

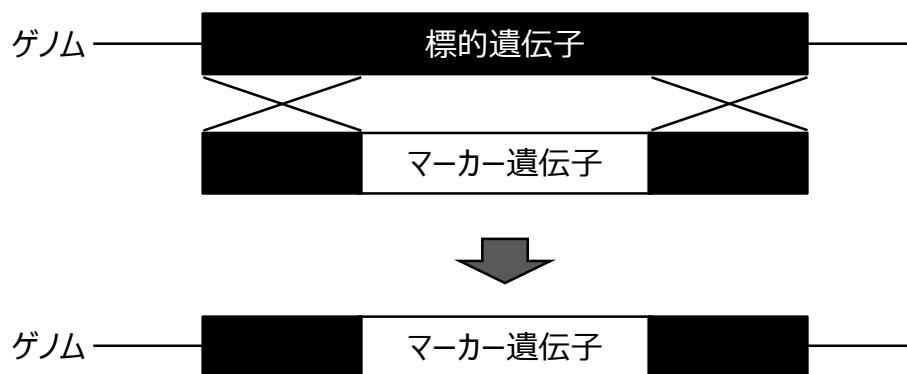


図5-1. 相同組換えによる遺伝子ターゲティングのモデルの概略

標的遺伝子もしくはそれに隣接する領域と相同な配列を含むDNA構築物を細胞内に導入し、相同配列領域で相同組換えが起こることによって、ゲノム上の標的遺伝子と置換する。

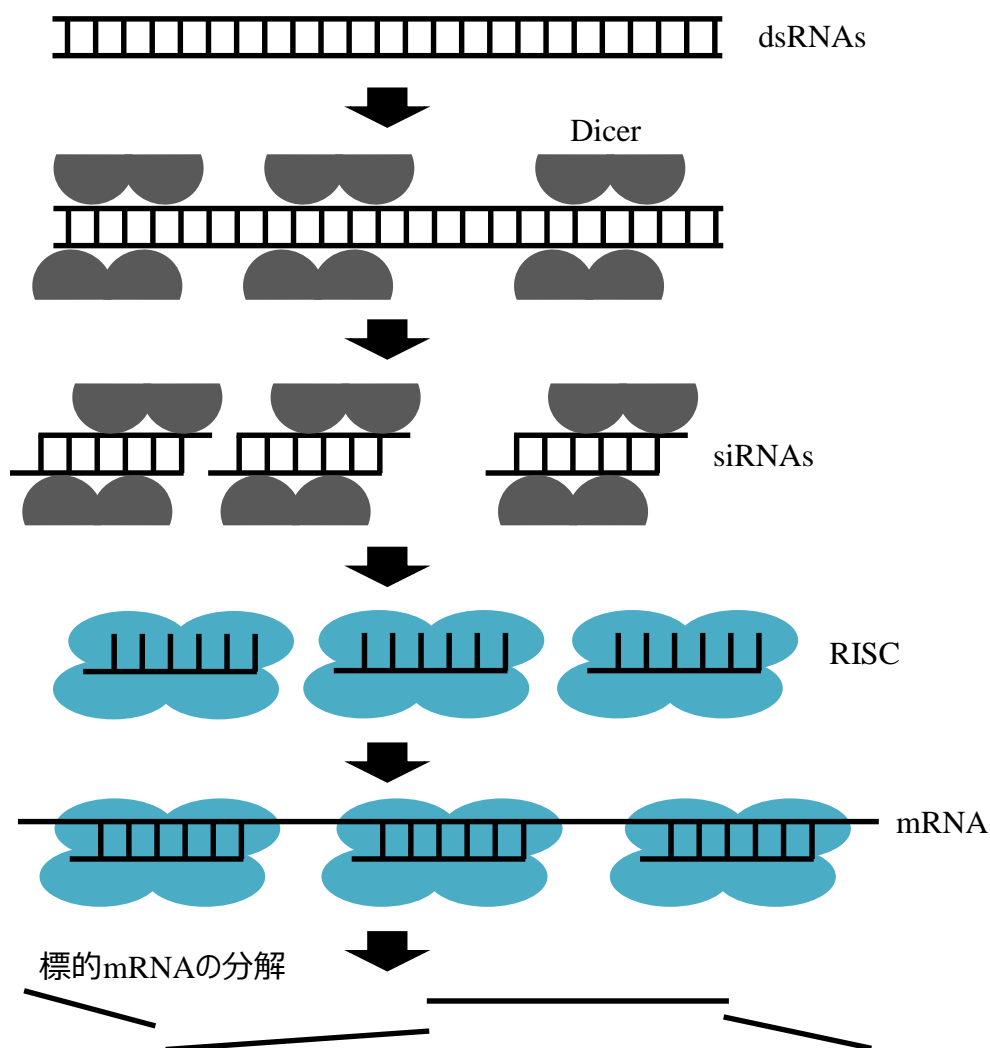


図5-2. RNAiモデルの概略

細胞内の二本鎖RNA (dsRNA) がリボヌクレアーゼであるDicerによって21-25塩基のsmall interfering RNA (siRNA) に分解される。このsiRNAは複数のタンパク質から構成されるRNA Induced Silencing Complex (RISC) に組み込まれて複合体を形成する。RISCは組み込まれたsiRNAをガイドに相補的な配列をもつ標的mRNAを認識して切断する。最終的に切断された標的mRNAは速やかに分解される。

5.2. 実験材料と方法

5.2.1. 供試菌株及び培養条件

第4章で記述した供試菌株と同様に、Gf-N2株を形質転換実験における野生株として使用した。マイタケ菌株の継代培養による維持には、ポテトブドウ糖寒天(PDA)培地(Oxoid, UK)を用い、25°C、暗黒下で培養した。組換えプラスミドの増幅には、大腸菌JM109株を使用し100 µg/mlのアンプシリン(Wako, 日本)を含むLB培地(1% polypeptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl, 寒天培地として使用する場合には1.5% Agarを追加)で培養した。

5.2.2. RNAi用ベクターの構築

RNAi用ベクターは、標的遺伝子と相同な配列を持つhpRNAを発現させるため、標的遺伝子の特定の配列をスペーサー配列を挟んで逆方向に反復するように配置した逆方向反復配列をマイタケ遺伝子由来のプロモーターとターミネーターの間に連結したhpRNA発現カセットを組み込むことで構築した。RNAi用ベクターは、図5-3に示した二段階の工程で構築した。第1段階として、第3章3.2.3及び第4章4.2.2に記述したベクターの構築方法と同様にIn-Fusion HD Cloning Kit (TaKaRa, 日本)を用いたIn Fusionクローニング法により、Gf.TEF3プロモーター断片、標的遺伝子配列断片(センス鎖)、スペーサー配列断片、Gf.TEF3ターミネーター断片の順になるように、HindIIIとSalI処理により線状化したpGFgapdh-hphと連結してクローニングした。この時のスペーサー配列には、

Gf.GAPDH のイントロン配列を利用し、後の逆方向に標的遺伝子配列断片(アンチセンス鎖)を連結するために必要な *NotI* サイト及び *SpeI* サイトを *Gf.TEF3* ターミネーター断片と隣接する側に付加した。第2段階として、末端に *NotI* サイトまたは *SpeI* サイトをそれぞれ持つように増幅した標的遺伝子配列断片(アンチセンス鎖)を *NotI* と *SpeI* で処理し、同じ制限酵素で処理した第1段階目のベクターに DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (TaKaRa) を用いてライゲーションした。ベクター構築に用いる各 DNA 断片の PCR 増幅に使用したプライマーは、表 5-1 に示した。

5.2.3. 大腸菌からのプラスミド調製

大腸菌からのプラスミド調製は、第3章 3.2.4 に記述した方法に基づいて行った。

5.2.4. マイタケの形質転換と形質転換体の選抜

マイタケの形質転換と形質転換体のセレクションは、第4章 4.2.4 に記述した方法に基づいて行った。

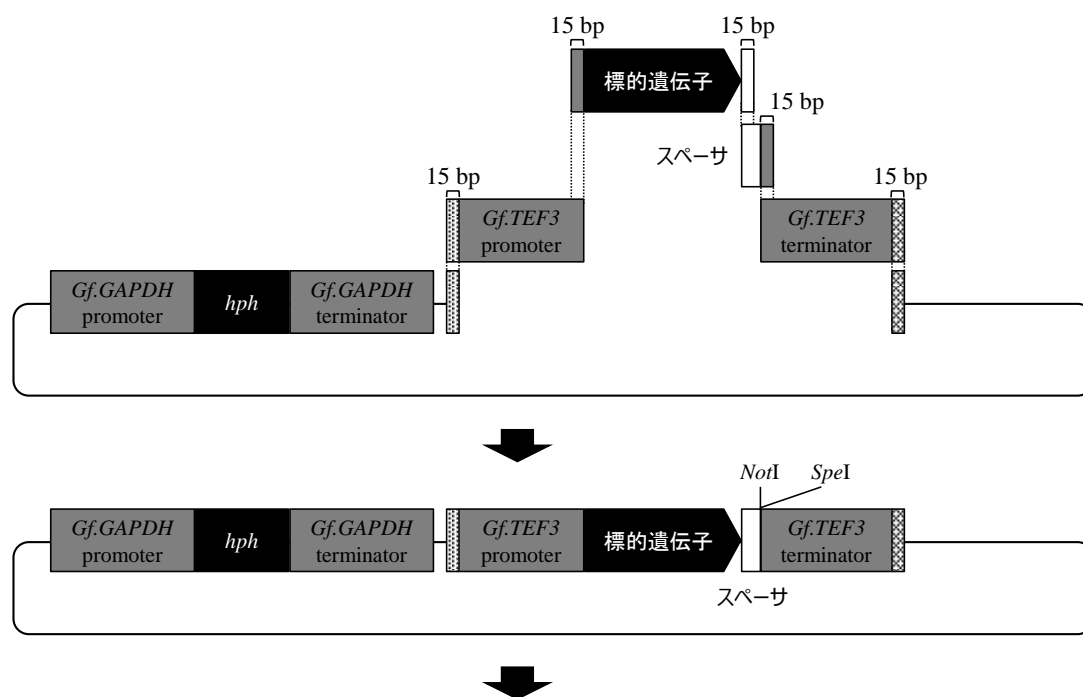
5.2.5. RNA の調製及び定量 RT-PCR

RNA の調製及び定量 RT-PCR は、第4章 4.2.5 に記述した方法に基づいて行った。定量 RT-PCR に使用したプライマーの配列は、表 5-1 に示した。

5.2.6. 試験管培養によるマイタケの栽培試験

マイタケ栽培に使用するオガコ培地は、広葉樹オガコ 24% (w/w)、コーンブラン 8.5% (w/w)、水 65% (w/w) となるように調製し、植物培養用のガラス製平底試験管（直径 40 mm × 高さ 130 mm）に 80 g ずつ充填し、ポリプロピレン製の植物培養用試験管キャップをして滅菌処理した。事前に PDA 培地で培養した菌糸体を直径 10 mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜いた菌糸体ディスクを滅菌済みのオガコ培地の中央に植菌し、キャップをした状態で 25°C、暗黒化で 45 日間培養した。次に、培養した培地を 18°C、白色蛍光灯照射下で 7 日間置くことで子実体原基を誘導した。その後、試験管のキャップを外し、温度 18°C から 20°C、湿度 95% から 100%、白色蛍光灯下で培養することで子実体原基から子実体を分化、生育させた。

第1段階：標的遺伝子のセンス鎖をIn Fusion クローニングにより導入



第2段階：アンチセンス鎖を制限酵素サイトを用いて導入

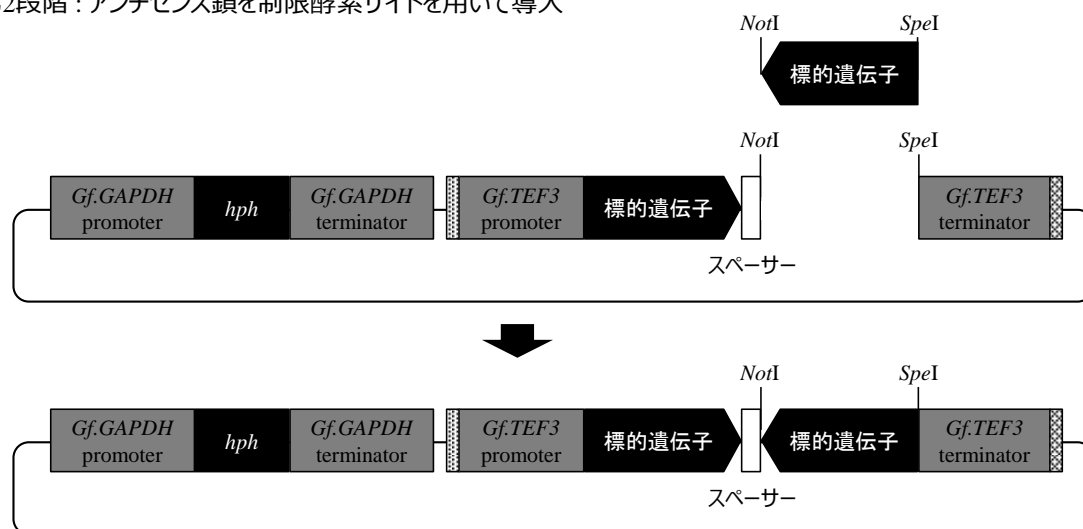


図5-3. RNAi用ベクターの作製手順の概略

第1段階は、In Fusionクローニングにより、*Gf.TEF3*プロモーター断片、標的遺伝子のセンス鎖配列断片、スペーサー配列断片、*Gf.TEF3*ターミネーター断片の順にもととなるベクターと連結した。第2段階は、*NotI*サイト及び*SpeI*サイトを付加した標的遺伝子のアンチセンス鎖配列断片を第1段階目で作製したベクターの同じ制限酵素サイトに導入して連結した。

表 5-1. 本研究で使用したプライマーの配列

Primer name	Sequence (5' - 3')*	Description
Ptef3-F2	ATCCTCTAGAGTCGACACTGGGTGGAAGCTAATAG	<i>Gf.TEF3</i> プロモーター領域の増幅に使用
Ptef3-R	TTCGAATATCTGGGCGACCG	
Ttef3-NotI-SpeI-F	<u>GCGGCCGCGACTAGT</u> ACGTTGTCCGTCGCGGTTGTTG	<i>Gf.TEF3</i> ターミネーター領域の増幅に使用 (下線: <i>NotI</i> サイト, 二重下線: <i>SpeI</i> サイト)
Ttef3-R2	TGATTACGCCAAGCTCCTGCGATTGCATGGCTCATC	
HydA1-F	GCCCAGATATTCGAAGTTCTCCAAGCTCGCCATCTTCG	<i>Gf.HydA1</i> センス鎖配列断片の増幅に使用
HydA1-R	ATTACAAAGAAACGTTTCAGACGTTAACCGGAACACATCCG	
HydA1-AS-F	TT <u>GCGGCCGCT</u> CAGACGTTAACCGGAACAC	<i>Gf.HydA1</i> アンチセンス鎖配列断片の増幅に使用 (下線: <i>NotI</i> サイト, 二重下線: <i>SpeI</i> サイト)
HydA1-AS-R	GG <u>ACTAGT</u> GTTCTCCAAGCTCGCCATCTTC	
gapdhi5-F	ACGTTTCTTTGTAATCTTAACATAGGCCGC	スパーサー配列となる <i>Gf.GAPDH</i> のイントロン配列断片の増幅に使用
gapdhi5-R	ACTAGTCGCGGCCGCACCTAAACGGAACGCGGTGAG	
FAS1-F	GCCCAGATATTCGAACGACCATGTGTTGAACATCC	<i>Gf.FAS1</i> センス鎖配列断片の増幅に使用
FAS1-R	ATAACGCATCCGCCAGGCAAGAGTCATCAAACCAC	
FAS1-AS-F	TT <u>GCGGCCGCG</u> GCAAGAGTCATCAAACCAC	<i>Gf.FAS1</i> アンチセンス鎖配列断片の増幅に使用 (下線: <i>NotI</i> サイト, 二重下線: <i>SpeI</i> サイト)
FAS1-AS-R	GG <u>ACTAGT</u> CGACCATGTGTTGAACATCC	
MNP1-F	GCCCAGATATTCGAAATTGCCAAGCACAACATCTC	<i>Gf.MNP1</i> センス鎖配列断片の増幅に使用
MNP1-R	ATAACGCATCCGCCAGCAGCGACCGAGTGAGAAG	
MNP1-AS-F	TT <u>GCGGCCGCG</u> CAGCGACCGAGTGAGAAG	<i>Gf.MNP1</i> アンチセンス鎖配列断片の増幅に使用 (下線: <i>NotI</i> サイト, 二重下線: <i>SpeI</i> サイト)
MNP1-AS-R	GG <u>ACTAGT</u> ATTGCCAAGCACAACATCTC	
pUC19-F	AATTGGATCCTCTAGAGTCG	プラスミドベクター導入を確認するためのコロニーダイレクタPCRに使用
M13-R	GGATAACAATTCACACAGG	
Gf.CHS-QPCR-F	GACGCAACCTTCAACCCCTA	<i>Gf.CHS1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.CHS-QPCR-R	ACCCGAATAACCGGAAGAGG	
Gf.FAS1-QPCR-F	ATCCTTCCCTTGTTCAACTCG	<i>Gf.FAS1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.FAS1-QPCR-R	GTGACGTTGCCAAATGTGGTG	
Gf.MNP1-QPCR-F	GCCGACGGTTCATAATCACATTC	<i>Gf.MNP1</i> の定量RT-PCR用プライマー
Gf.MNP1-QPCR-R	GGAGATGTTGTGCTTGCCAATG	
MnP 3293-QPCR_F	GCATCGCCATCCGAGCTAT	gfr03 _{gs} 0713293の定量RT-PCR用プライマー
MnP 3293-QPCR_R	GCTCCAATGTCGGCGAGGAAT	
MnP 5001-QPCR_F	GTTCTTCGTCGAGACTCTAC	gfr03 _{gs} 25915001の定量RT-PCR用プライマー
MnP 5001-QPCR_R	AGGGTGGCCGCGCAATATT	
MnP 0436-QPCR_F	CGCCATTGGCATCTCGATGTC	gfr03 _{gs} 0180436の定量RT-PCR用プライマー
MnP 0436-QPCR_R	TACTCAAACCAACCGCACCG	
MnP 4840-QPCR_F	GCTCCAATGTCGGCGAGGAAT	gfr03 _{gs} 25314840の定量RT-PCR用プライマー
MnP 4840-QPCR_R	TCTTGACGGCGGCAAGAAC	

* In-Fusion クローニングの際に必要な15 bpの付加配列を太字で示した。

5.3. 結果と考察

5.3.1. ハイドロフォービン遺伝子 *Gf.HydA1* の RNAi による解析

ハイドロフォービンは、糸状菌において菌糸や胞子の表面に分泌される低分子量の両親媒性タンパク質で、特徴的な 8 個のシステイン残基を持っている。菌糸から分泌されたハイドロフォービンは、菌糸表面上で自己集合し、外側に疎水性の層を形成することで菌糸表面に水を弾く性質をもたらすことが知られている。このような性質から、菌糸の気中への立ち上げや気中構造の形成などに係わっていることが見出されている [15, 16, 18]。担子菌きのこでは、菌糸伸長時に特異的に発現するハイドロフォービン遺伝子としてシイタケの *Le.hyd2* [19]、子実体生育時に高発現するハイドロフォービン遺伝子としてシイタケの *Le.hyd1* [20]、エノキタケの *Fv-hyd1* [21] などが報告されている。

マイタケのゲノム配列データのアノテーションからは、15 個のハイドロフォービン遺伝子が予測され、それぞれ菌糸伸長時（PDA 培地培養）と子実体分化初期（発生工程前期）の発現量の比較から、菌糸伸長時に高発現するタイプが 9 個、子実体分化初期に高発現するタイプが 5 個、発現量が変わらないタイプが 1 個に分けられた。菌糸伸長時に高発現するタイプに分類されるハイドロフォービン遺伝子 9 個中で、特に発現量が高かったのが *Gf.HydA1* である。*Gf.HydA1* は、ハイドロフォービンに特徴的な 8 個のシステイン残基を有する 107 残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており（図

5-4A)、その栽培工程における発現挙動は、菌糸生育が旺盛な培養工程前期(植菌後20日)で顕著に高発現し、原基形成から子実体分化へと進行していくにしたがいその発現量は低くなっていった(図5-4B)。培養工程前期は培地中に菌糸が蔓延する段階であり、最も菌糸生育が盛んであることから、*Gf.HydA1*は菌糸伸長時に重要な役割を担っていることが予想された。また、*Gf.HydA1*は菌糸伸長時に特に発現量が高かったことから、RNAiによる発現抑制効果を菌糸体で評価するのに最適であると考えられた。以上の理由から、マイタケでRNAiによる遺伝子機能解析の有効性を評価するとともに、遺伝子機能解析のための最初の標的遺伝子として *Gf.HydA1* を選んだ。

RNAiを誘導するための *Gf.HydA1* の配列を含む hpRNA を発現させる発現カセットの構築には、第3章及び第4章で目的とする遺伝子を発現させた時と同様に *Gf.TEF3* のプロモーター及びターミネーターを用いた。*Gf.HydA1* の開始コドンを除いたコード領域を、hpRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖となる2つの断片として、それぞれ Gf-N2 株の cDNA を鋳型にした PCR により増幅した。ヘアピン構造をとるためのスペーサー配列として、*Gf.GAPDH* のイントロン配列断片を Gf-N2 株のゲノム DNA を鋳型にした PCR により増幅した。増幅した各 DNA 断片を用いて、*Gf.HydA1* コード配列がスペーサー配列を挟んで逆方向に反復するように *Gf.TEF3* のプロモーターとターミネーターの間に連結し、*HindIII* と *SalI* 処理により線状化した pGFGapdh-hph にクローニングした。その結果、

Gf.TEF3 プロモーターにより二本鎖の hpRNA 構造をとる *Gf.HydA1* の逆方向反復配列を発現させるための hpRNA 発現カセットと選択マーカー遺伝子としてハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* 発現カセットを有する RNAi 用ベクター pGFght-HydA1IR を構築した (図 5-5)。

pGFght-HydA1IR をプロトプラスト-PEG 法により *Gf*-N2 株に導入し、得られたハイグロマイシン B 耐性示す 28 個のクローンについて、ベクターに組み込んだ *Gf.HydA1* の hpRNA 発現カセットが導入されていることをゲノム PCR により確認した。ゲノム PCR では、*Gf.TEF3* プロモーターからスペーサー配列までを含む *Gf.HydA1* のセンス鎖領域とスペーサー配列から *Gf.TEF3* ターミネーターまでを含む *Gf.HydA1* のアンチセンス鎖領域を pUC19-F/gapdhi5-R 及び gapdhi5-F/M13-R のプライマーペアを用いてそれぞれ増幅し、両方の増幅断片が検出されることを確認した。その結果、*Gf.HydA1* の hpRNA 発現カセット導入が確認された 18 個の形質転換体を得られた。この 18 個の形質転換体で、目的通りに *Gf.HydA1* の発現量が抑制されているか否かを確認するため、PDA 培養時の菌糸体における *Gf.HydA1* の発現量を定量 RT-PCR により解析した。それぞれのサンプルにおける *Gf.HydA1* の発現レベルは、内部標準遺伝子である *Gf.GAPDH* の発現量で正規化し、RNAi 用ベクターを導入していない *Gf*-N2 株の発現量を 100% とした時の相対値で算出した。その結果、得られた形質転換体すべてで *Gf.HydA1* の発現量は *Gf*-N2 株のそれより低く、発現抑制が認められた。それらの中で *Gf.HydA1* の発現量が 10% 以下に抑

制されたのは 18 株中 10 株あり、そのうち最も発現抑制されていたのは *Gf.HydA1* 発現抑制株 #2 (HD#2) の 1.3%であった (図 5-6)。また、RNAi 用ベクター構築の際の第 1 段階目である *Gf.HydA1* のセンス鎖方向断片のみを含むベクターを導入して得た形質転換体は、*Gf.HydA1* の発現が抑制されないことも確認された (data not shown)。これらの結果から、*Gf.HydA1* の発現抑制は導入した RNAi 用ベクターにより発現された hpRNA に起因して起こっており、マイタケにおいて RNAi による発現抑制が可能であることが示された。

Gf.HydA1 は菌糸伸長時に高いレベルで発現されていることから、菌糸伸長等に重要な役割を担っているならば、*Gf.HydA1* 発現抑制株と宿主である Gf-N2 株で菌糸生育に何らかの差異が出ることが予想された。しかしながら、*Gf.HydA1* 発現抑制株は、PDA 培地や栽培用のオガコ培地培養下では、野生株の Gf-N2 と比較して菌糸伸長速度、菌糸密度等に顕著な差は確認されなかった (data not shown)。その要因として、菌糸生育時に発現するハイドロフォービン遺伝子は *Gf.HydA1* の他にも複数存在することから、それらが機能的に相補することで *Gf.HydA1* 発現抑制の影響が顕在化しなかった可能性が考えられた。したがって、本方法で *Gf.HydA1* のマイタケにおける機能を解明していくには、本遺伝子を含めてすべてのハイドロフォービン遺伝子の発現が抑制されている形質転換体とともにそれらの中で本遺伝子のみが発現している形質転換体等を作成し、それらの培養時の形質を元の

Gf-N2 株と比較解析することが必要であり、今後の課題である。

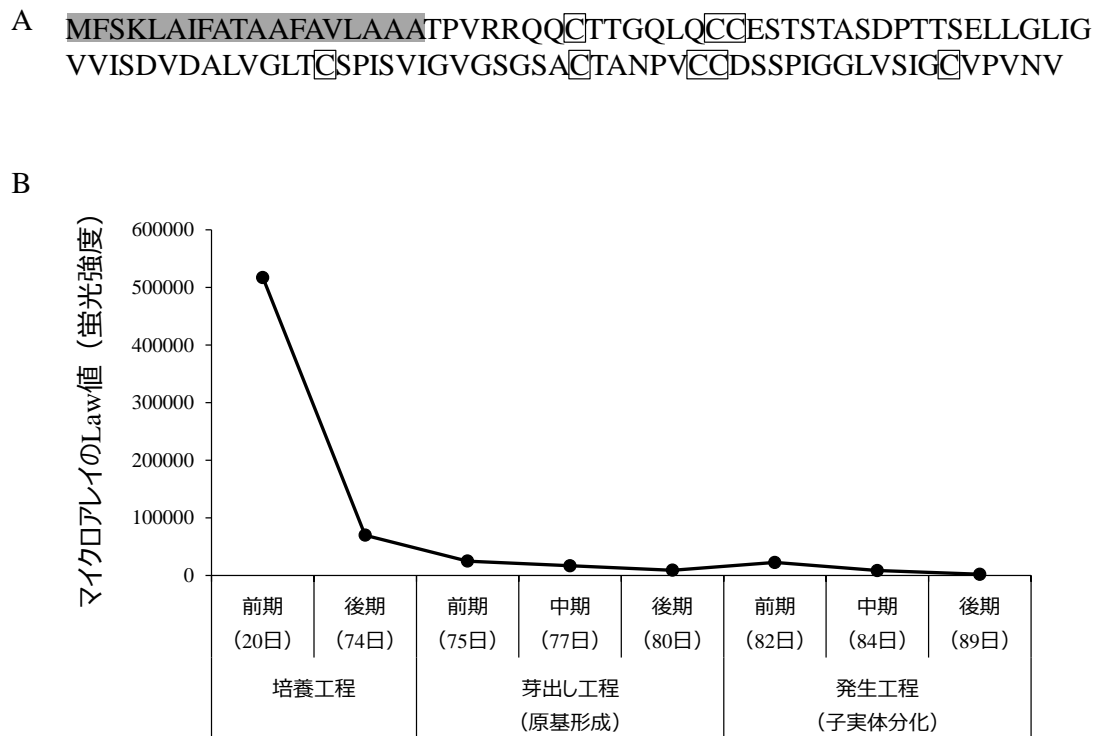


図5-4. Gf.HydA1のタンパク質一次構造とマイタケ栽培工程における発現挙動
 A: Gf.HydA1のアミノ酸配列を示す。グレーのマーカ部分は予測されたシグナルペプチドを示し、四角の囲いはヒドロフォービンに特徴的な8個のシステイン残基を示した。B: マイタケ栽培の培養工程の前期（植菌後20日）及び後期（74日）、芽出し工程の前期（75日）、中期（77日）、及び後期（80日）、発生工程の前期（82日）、中期（84日）、及び後期（89日）におけるマイクロアレイデータから、Gf.HydA1の発現挙動を示した。

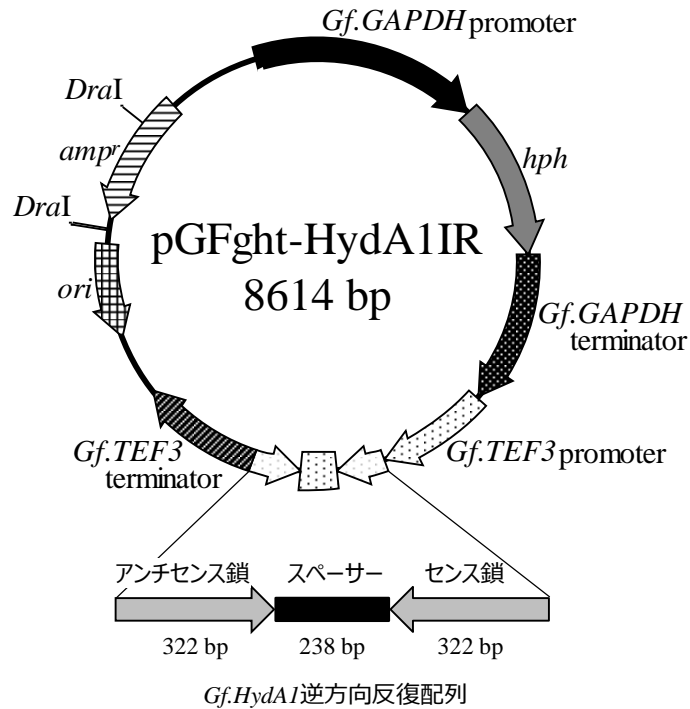


図5-5. *Gf.HydA1*のRNAi用ベクターの概略図

*Gf.HydA1*のRNAi用ベクターであるpGFght-HydA1IRは、*Gf.HydA1*のセンス鎖及びアンチセンス鎖断片をスパーサーを挟んで配置した*Gf.HydA1*逆方向反復配列を*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間に連結したhpRNA発現カセットを有する。また、選択マーカー遺伝子として、ハイグロマイシンB耐性遺伝子*hph*を*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に連結した*hph*発現カセットを有する。

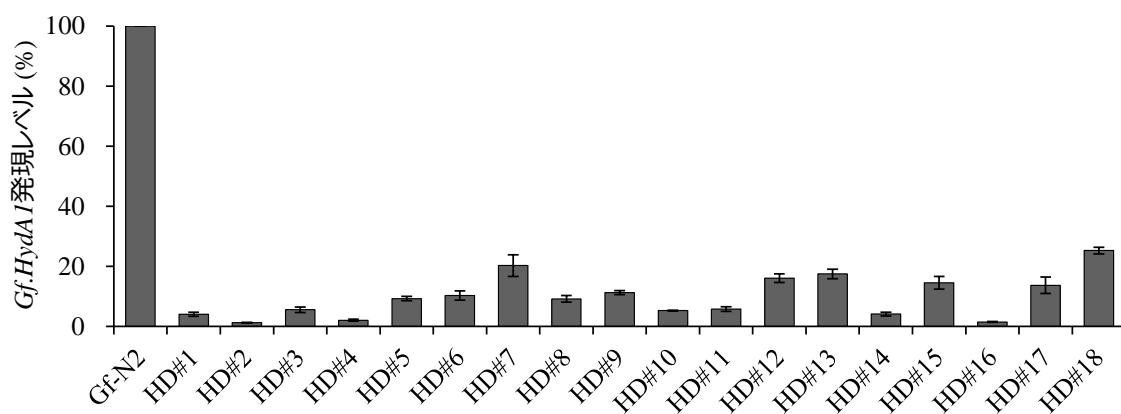


図5-6. pGFght-HydA1IRの導入が確認された形質転換体における*Gf.HydA1*の発現量
 Gf-N2株とpGFght-HydA1IRを導入して得られた18個の形質転換体（HD#）について、PDA培地で培養した菌糸体における*Gf.HydA1*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.HydA1*発現レベルは、*Gf.GAPDH*の発現量を内部標準として正規化し、Gf-N2株の発現量を100%とした時の相対値で算出した。

5.3.2. ファシクリンドメイン含有タンパク質遺伝子 *Gf.FAS1* の RNAi による解析

Gf.FAS1 は、過去に行った正常に子実体生育する *Gf-N2* 株と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* 株の子実体分化時のマイクロアレイによる遺伝子発現差解析[17]から、子実体分化時に *Gf-A1* 株で発現が顕著に低かった遺伝子である。*Gf.FAS1* の発現が低いことが、*Gf-A1* 株の子実体の正常な分化を妨げたとしたならば、*Gf.FAS1* は子実体分化に重要な役割を担っている遺伝子と考えられる。*Gf.FAS1* は、遺伝子長 1481 bp で 5 つのエクソンと 4 つのイントロンから成り、418 残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており、2 つのファシクリンドメインを有している（図 5-7）。ファシクリンは動物、植物等における細胞接着分子として知られているとともに、ファシクリンドメインを有するタンパク質は細胞外分泌タンパク質もしくは膜タンパク質であることが知られている。したがって、*Gf.FAS1* は細胞接着分子として機能しているかは不明だが、細胞表面で機能していることが予想された。マイタケ栽培工程における *Gf.FAS1* の発現挙動は、培養工程前期と発生工程中期に顕著な発現量のピークが認められることから（図 5-8）、菌糸生育が盛んな段階や形態変化が大きい子実体分化の段階で機能していることが予想された。そこで、*Gf.FAS1* の機能を調べるべく、RNAi による発現抑制を試みた。

上述 5.3.1 の *Gf.HydA1* 発現抑制のための RNAi ベクター構築方法と同様に、*Gf.FAS1* をコードしている配列の一部をスペ

ーサー配列を挟んで逆方向反復配列になるように連結した hpRNA 発現カセットを組み込んだ RNAi 用ベクター pGFght-FAS1IR を構築した (図 5-9)。このベクターを Gf-N2 株に導入し、ベクターに組み込んだ *Gf.FAS1* の hpRNA 発現カセット領域の導入が確認された 12 個の形質転換体を得た。得られた 12 個の形質転換体における *Gf.FAS1* の発現抑制の程度を確認するため、PDA 培養時の菌糸体における *Gf.FAS1* の発現量を定量 RT-PCR により解析した。このときの *Gf.FAS1* 発現量は、*Gf.CHS1* を内部標準遺伝子として正規化し、Gf-N2 株の発現量を 100%とした時の相対値で算出した。その結果、得られたすべての形質転換体で、*Gf.FAS1* の発現量が形質転換する前の Gf-N2 株に比べて低く、特に FD#4, FD#10, FD#25 の 3 株は 10%以下となる顕著な発現抑制を示した (図 5-10)。この 3 株を *Gf.FAS1* 発現抑制株として選び、次の表現型の解析に使用することにした。

Gf.FAS1 の発現抑制が菌糸生育に及ぼす影響を *Gf.FAS1* 発現抑制株と Gf-N2 株を PDA 培地で培養し、それらの菌叢の生育の様相を比較することで調べたところ、菌糸生育速度、菌糸密度、菌叢の性状において明確な差異は認められなかった (data not shown)。そこで、子実体生育への影響を調べるため、オガコ培地による栽培試験を行った。マイタケの栽培試験は研究室で実施できる規模にするため、通常、生産に用いられる培地重量約 3 kg の袋培地から約 100 ml 容量のガラス製平底試験管を用いた培地重量 80 g のサイズにスケールダウンして実施した。*Gf.FAS1* 発現抑制株 (FD#4, FD#10, FD#25)、

野生株 Gf-N2 株、及び変異株 Gf-A1 を用いて栽培試験を行い、子実体生育の様子を比較した。その結果、培養工程の菌糸生育時には、*Gf.FAS1* 発現抑制株と Gf-N2 株の間で菌糸蔓延速度に大きな差は確認されなかったが、子実体分化生育の段階になると著しい差異が認められ、正常に子実体分化生育が進行した Gf-N2 株に対し、*Gf.FAS1* 発現抑制株は子実体分化生育が著しく抑制され、菌柄の伸長と菌傘の分化発育が認められなかった。特に *Gf.FAS1* 発現抑制株の FD#4 と FD#25 は、子実体原基表面が白色から暗黒色に変化する段階で分化が停止し、その後の生育が認められなかった。このような *Gf.FAS1* 発現抑制株の表現型は、子実体分化が停止する変異体 Gf-A1 株と類似していた。それらの子実体生育の様子として、子実体分化の中期から後期にあたる発生工程処理開始から 6 日目の写真を図 5-11A に示した。今回確認された子実体生育異常と *Gf.FAS1* 発現量の関連を調べるため、子実体部分から試料を採取し、*Gf.FAS1* の発現量を定量 RT-PCR により解析したところ、確かに *Gf.FAS1* 発現抑制株と変異体 Gf-A1 株は、Gf-N2 株に比べて *Gf.FAS1* の発現量が顕著に低いことが確認された（図 5-11B）。これらの結果は、*Gf.FAS1* の発現が抑制されると子実体分化が妨げられることを示しており、*Gf.FAS1* の発現は子実体の分化生育に重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

なお、シイタケではファシクリンをコードしている *Le.flp1* 遺伝子が子実体の傘、柄、原基の表面部分で発現していることが報告されているが [22]、*Le.flp1* と相同性のある遺伝子を

マイタケゲノム配列データから検索すると *Gf.FAS1* とは異なる遺伝子がヒットすることから、*Gf.FAS1* は *Le.flp1* のホモログではないと考えられる。したがって、*Gf.FAS1* は *Le.flp1* とは異なる機能を持つ、新規のファシクリン様タンパク質をコードする遺伝子である可能性がある。今後、*Gf.FAS1* がコードするタンパク質の性質を明らかにするためのアッセイや組織もしくは細胞中の局在の解析などのタンパク質レベルの解析を進めることで、より詳細な機能の解明に繋がると考えられる。

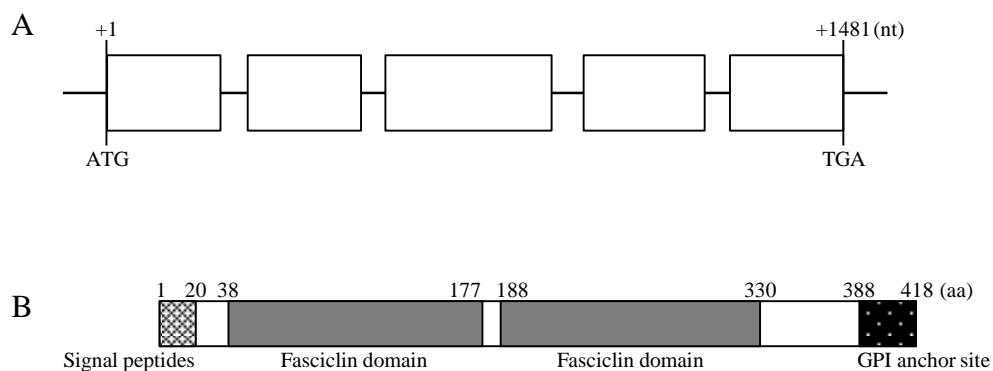


図5-7. *Gf.FAS1*遺伝子の構造

A: *Gf.FAS1*は、遺伝子長が1481 bpであり、5つのエクソンと4つのイントロンから構成される。白抜き四角の部分エクソンを示し、その間がイントロンを示している。
B: *Gf.FAS1*がコードする418残基のアミノ酸からなるタンパク質の構造を模式的に示した。2つのファシクリンドメイン、N末端側にシグナルペプチド、C末端側にGPIアンカーを有していることが予測された。

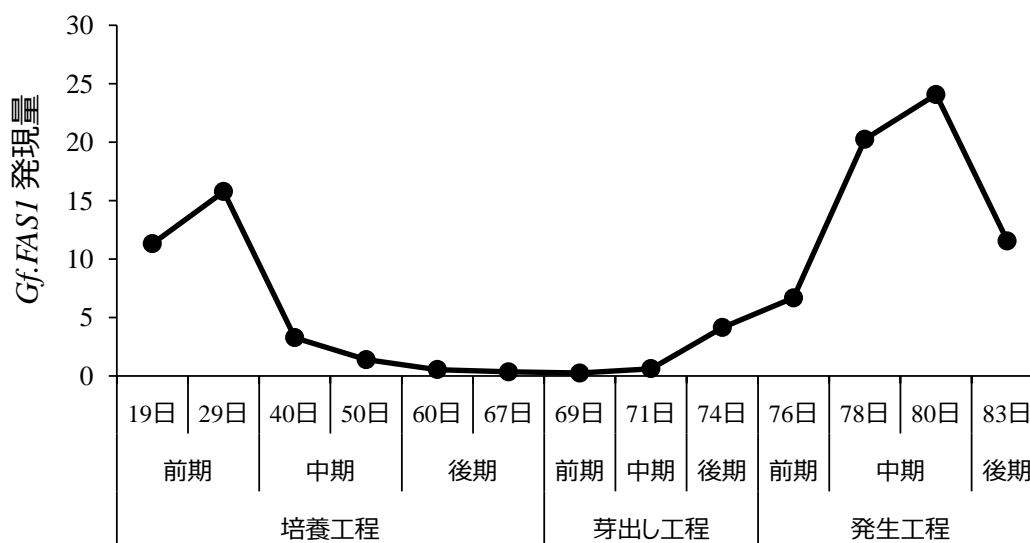


図5-8. *Gf.FAS1*のマイタケ栽培工程における発現挙動

マイタケ栽培の培養工程の前期（植菌後19日, 29日）；中期（40日, 50日）；後期（60日, 67日）、芽出し工程の前期（69日）；中期（71日）；後期（74日）、発生工程の前期（76日）；中期（78日, 80日）；後期（83日）における*Gf.FAS1*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.FAS1*発現量は、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、*Gf.CHS1*の発現量を1とした時の相対値で算出した。

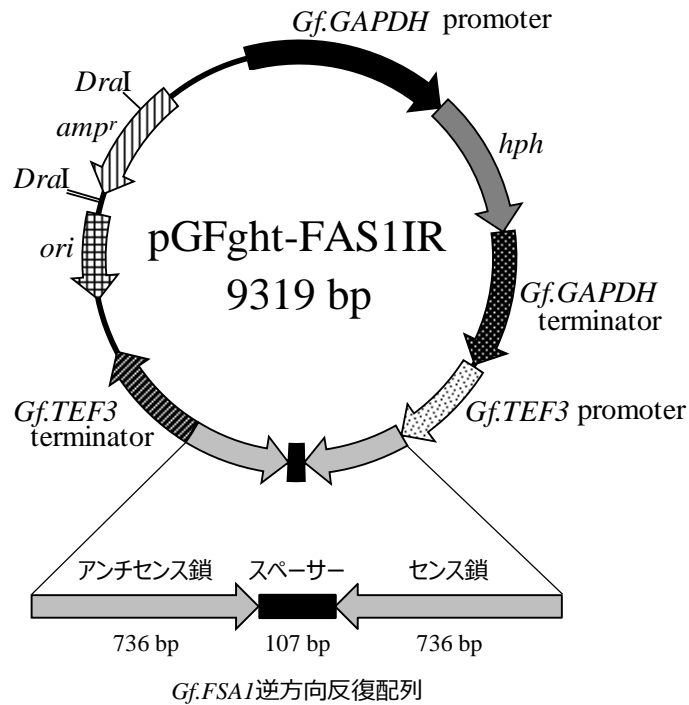


図5-9. *Gf.FAS1*のRNAi用ベクターの概略図

*Gf.FAS1*のRNAi用ベクターであるpGFght-FAS1IRは、*Gf.FAS1*のセンス鎖及びアンチセンス鎖断片をスペーサーを挟んで配置した*Gf.FAS1*逆方向反復配列を*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間に連結したhpRNA発現カセットを有する。また、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*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に連結した*hph*発現カセットを有する。

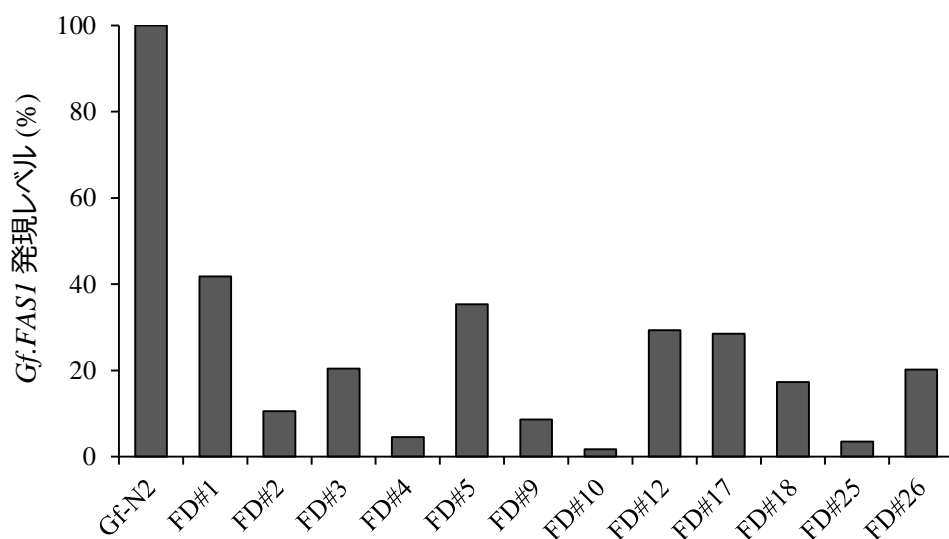


図5-10. pGFght-FAS1IRの導入が確認された形質転換体における*Gf.FAS1*の発現量
 Gf-N2株とpGFght-FAS1IRを導入して得られた12個の形質転換体 (FD#) について、
 PDA培地で培養した菌糸体における*Gf.FAS1*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。
 各サンプルの*Gf.FAS1*発現レベルは、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、
 Gf-N2株の発現量を100%とした時の相対値で算出した。

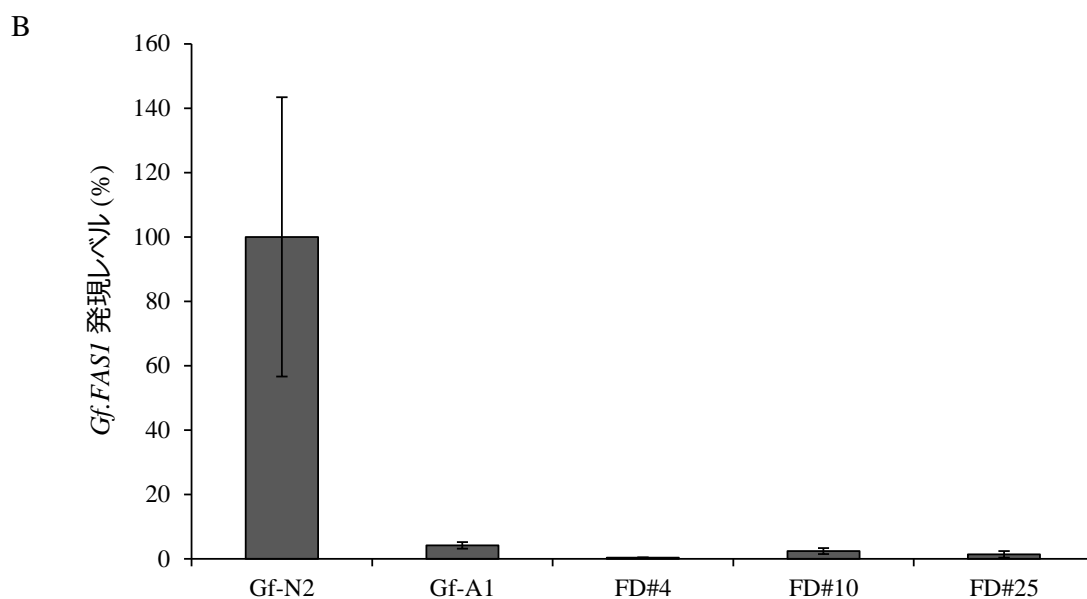
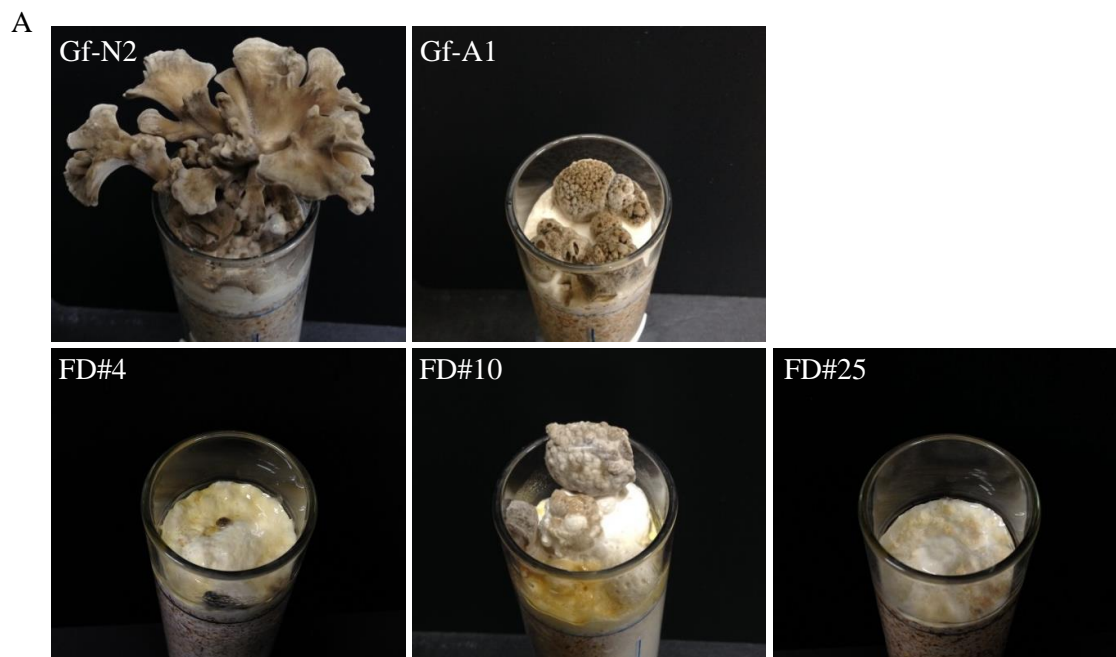


図5-11. *Gf.FAS1*発現抑制株の子実体生育時における表現型

A: *Gf-N2*株、変異体*Gf-A1*株、*Gf.FAS1*発現抑制株 (FD#4, FD#10, FD#25) の栽培試験を行い、発生工程に入ってから6日目の子実体生育の様子を示した。B: 発生工程に入ってから6日目の子実体形成部分における*Gf.FAS1*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.FAS1*発現レベルは、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、*Gf-N2*株の発現量を100%とした時の相対値で算出した。

5.3.3. マンガンペルオキシダーゼ遺伝子 *Gf.MNPI* の RNAi による解析

マイタケを含む白色腐朽菌は、強いリグニン分解能力を持ち、リグニン分解に直接的に作用する酵素として、複数のペルオキシダーゼを分泌する。そのペルオキシダーゼとして、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ (MnP) が知られている。第2章で記述したように、マイタケが有する推定ペルオキシダーゼ遺伝子は、構造的特徴から LiP と分類される遺伝子はなく、MnP と分類される遺伝子が7個、LiP と MnP の両方の構造的特徴を有するバーサタイルペルオキシダーゼ (VP) に分類される遺伝子が4個、LiP や MnP のどちらの構造的特徴を持たないジェネリックペルオキシダーゼ (GP) と分類される遺伝子が3個、どの分類にも属さない遺伝子が1個であった。MnP と分類される中の1つである *Gf.MNPI* は、遺伝子長 1647 bp で 11 個のエクソンと 10 個のイントロンから成り、364 残基のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており、Mn²⁺結合部位と推定される Glu⁶³、Glu⁶⁷、Asp²⁰⁸ の3つのアミノ酸残基を有している (図 5-12)。*Gf.MNPI* は、栽培工程中の培養工程前期で発現量のピークを示すとともに (図 5-13)、MnP に分類される遺伝子の中で培養工程の発現量が最も高いことから、菌糸生育時の培地成分中のリグニン分解に主要な役割を果たすことが予想された。そこで、*Gf.MNPI* がきのこ栽培においてどのような役割を果たしているかを調べるため、RNAiによる発現抑制を試みた。

上述 5.3.1 及び 5.3.2 で述べた RNAi ベクターの構築方法と同様に、*Gf.MNPI* コード配列の一部を用いた逆方向反復配列を連結した hpRNA 発現カセットを組み込んだ RNAi 用ベクター pGFght-MNP1IR を構築した (図 5-14)。このベクターを *Gf-N2* 株に導入し、ベクターに組み込んだ *Gf.MNPI* の hpRNA 発現カセット領域の導入が確認された 17 個の形質転換体を得た。次に、これらの形質転換体の *Gf.MNPI* の発現抑制の程度を定量 RT-PCR により調べた。この時、*Gf.MNPI* の発現は PDA 培地培養時の菌糸体では確認できない程低かったため、オガコ培地培養時の菌糸体を定量 RT-PCR 解析の試料に用いた。*Gf.MNPI* の発現量は、内部標準遺伝子 *Gf.CHS1* の発現量で正規化し、*Gf-N2* 株の発現量を 100% とした時の相対値で算出した。その結果、17 個中 11 個の形質転換体で、*Gf.MNPI* の発現量が形質転換する前の *Gf-N2* 株に比べて 10% 以下を示し、顕著な発現抑制が確認された (図 5-15)。これら 11 個の形質転換体の中で、最も発現抑制された上位から MD#1、MD#10、MD#19 の 3 株を選び、*Gf.MNPI* 発現抑制株として解析に使用した。

マイタケで MnP と推定される遺伝子群は、互いに塩基配列の相同性が高く、*Gf.MNPI* と他の MnP 遺伝子とはそれぞれ約 60% 前後の相同性がある。RNAi により標的遺伝子の発現を抑制する場合、標的遺伝子の配列から設計した二本鎖 RNA の配列をガイドにして相補的な mRNA の分解が引き起こされることで標的遺伝子の発現が抑制されることから、標的とした遺伝子以外にも設計した二本鎖 RNA と配列の相同性が高い遺

伝子が存在するとその遺伝子の発現も同時に抑制される、オフターゲット効果と称する現象が知られている。本実験の *Gf.MNPI* を標的とした RNAi においても、オフターゲット効果により他の MnP 遺伝子の発現にも影響を与えている可能性が考えられたため、*Gf.MNPI* 以外の MnP 遺伝子の発現量も定量 RT-PCR により調べた。その結果、*Gf.MNPI* 発現抑制株 (MD#1、MD#10、MD#19) では、*Gf.MNPI* 以外にも、MnP 遺伝子と推定される *gfr03gs0713293*、*gfr03gs25915001*、*gfr03gs0180436*、*gfr03gs25314840* の発現が抑制されていることがわかった (図 5-16)。このことから、今回 RNAi 用ベクターの構築に用いた *Gf.MNPI* の配列では、オフターゲット効果が大きく現れることがわかった。オフターゲット効果为了避免するには、他の遺伝子と相同性のない標的配列を選ぶことが有効であるが、今回の *Gf.MNPI* に関しては他の MnP 遺伝子との相同性が極めて高いため難しいと考えられた。逆に、塩基配列の相同性が高い遺伝子が重複して複数存在する場合には、RNAi 誘導するための二本鎖 RNA を設計する際に重複する遺伝子間で相同性の高い領域を標的配列に選ぶことで、一度の RNAi の試験で複数の遺伝子を同時に抑制することも、可能であることを示唆する結果であるともいえる。

Gf.MNPI 発現抑制株に関しては、*Gf.MNPI* 以外の MnP 遺伝子も発現が抑制されていることが判明したが、それが子実体生育に及ぼす影響の有無を栽培試験を行って調べた。3 株の *Gf.MNPI* 発現抑制株 (MD#1、MD#10、MD#19) と野生株 *Gf-N2* 株を用いて、前述の *Gf.FAS1* の解析と同様に栽培試験を行い、

子実体生育の様子を比較した。その結果、培地全体に菌糸が蔓延する植菌後 30 日目における菌糸生育を比較すると、Gf-N2 株に比べて、*Gf.MNPI* 発現抑制株は菌糸の生育速度に大きな差異はないが、外観上菌糸密度が低く、試験管上部の菌糸体層が薄かった (図 5-17)。その後、子実体分化の段階になると、図 5-18A に示したように菌柄の伸長に続き菌傘の展開が進行する Gf-N2 株に対して、*Gf.MNPI* 発現抑制株は全て子実体への分化が認められず、菌糸体の状態に止まったままであった。また、菌床内部の色を比較すると、Gf-N2 株は植菌前の培地の色である黒茶色から脱色された薄茶色に変化していたが、*Gf.MNPI* 発現抑制株のそれは培地の色である黒茶色から脱色が進んでいなかった (図 5-18B)。これらの結果から、*Gf.MNPI* 発現抑制株は、培地成分の分解が遅く、栽培試験で設定した培養日数では栄養成分の蓄積が不十分であったがために、子実体生育に至らなかったと考えられた。*Gf.MNPI* を含む MnP 遺伝子が培地中のオガコの分解に大きく関与することを示す結果が得られたので、今後マンガンペルオキシダーゼの活性測定や培地中の成分解析などの生化学的な試験を行うことで、より詳細な機能解明に繋がると考えている。

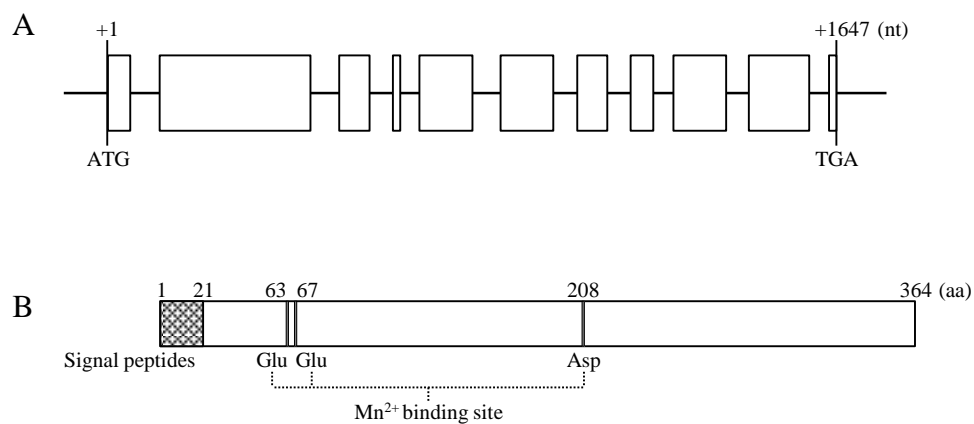


図5-12. *Gf.MNPI*遺伝子の構造

A: *Gf.MNPI*は、遺伝子長が1647 bpであり、11個のエクソンと10個のイントロンから構成される。白抜き四角の部分のエクソンを示し、その間がイントロンを示している。B: *Gf.MNPI*がコードする364残基のアミノ酸からなるタンパク質の構造を模式的に示した。Mn²⁺結合部位と推定されるGlu⁶³、Glu⁶⁷、Asp²⁰⁸の3つのアミノ酸残基とN末端側にシグナルペプチドを有することが予測された。

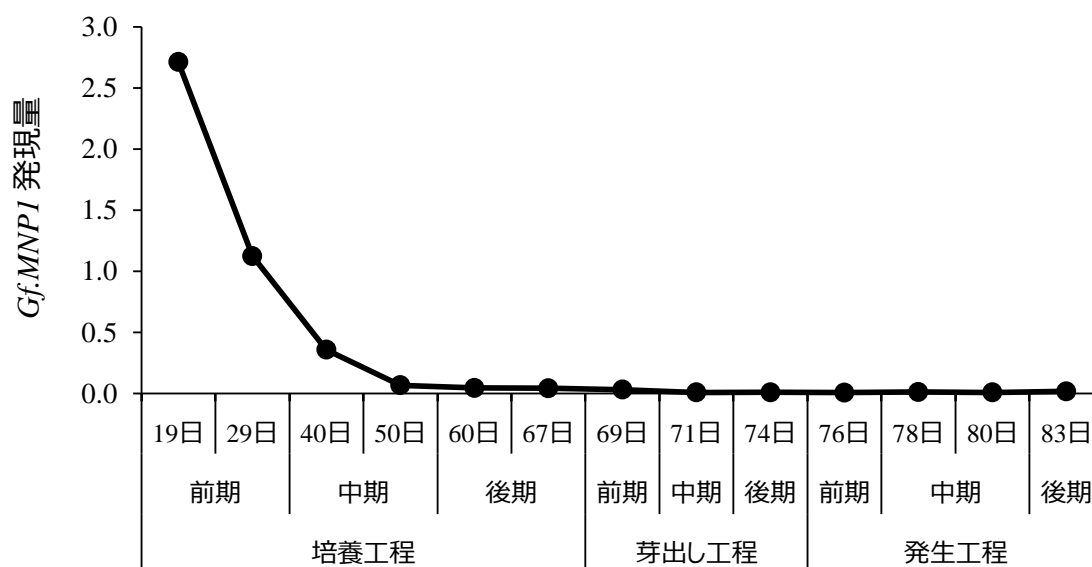


図5-13. *Gf.MNPI*のマイタケ栽培工程における発現挙動

マイタケ栽培の培養工程の前期（植菌後19日, 29日）；中期（40日, 50日）；後期（60日, 67日）、芽出し工程の前期（69日）；中期（71日）；後期（74日）、発生工程の前期（76日）；中期（78日, 80日）；後期（83日）における*Gf.MNPI*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.MNPI*発現は、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、*Gf.CHS1*の発現量を1とした時の相対値で算出した。

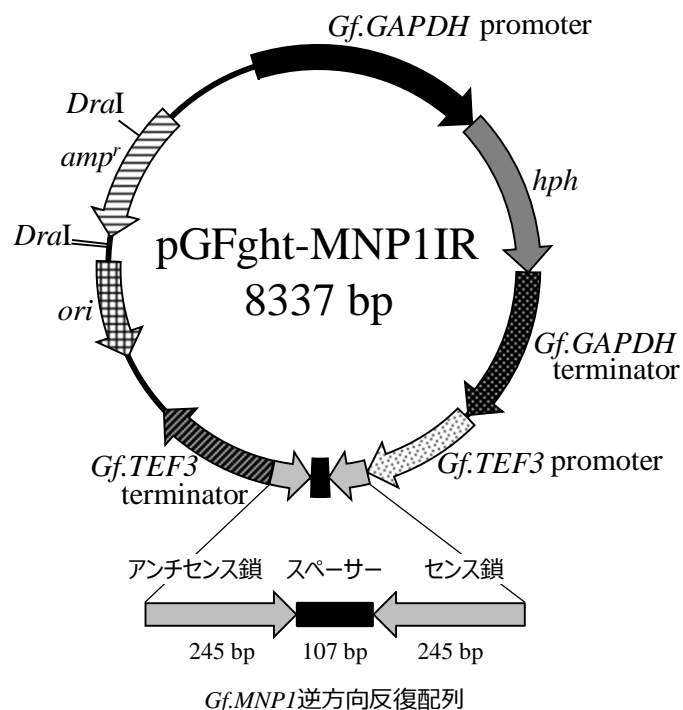


図5-14. *Gf.MNP1*のRNAi用ベクターの概略図

*Gf.MNP1*のRNAi用ベクターであるpGFght-MNP1IRは、*Gf.MNP1*のセンス鎖及びアンチセンス鎖断片をスペーサーを挟んで配置した*Gf.MNP1*逆方向反復配列を*Gf.TEF3*プロモーターとターミネーターの間に連結したhpRNA発現カセットを有する。また、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*Gf.GAPDH*プロモーターとターミネーターの間に連結した*hph*発現カセットを有する。

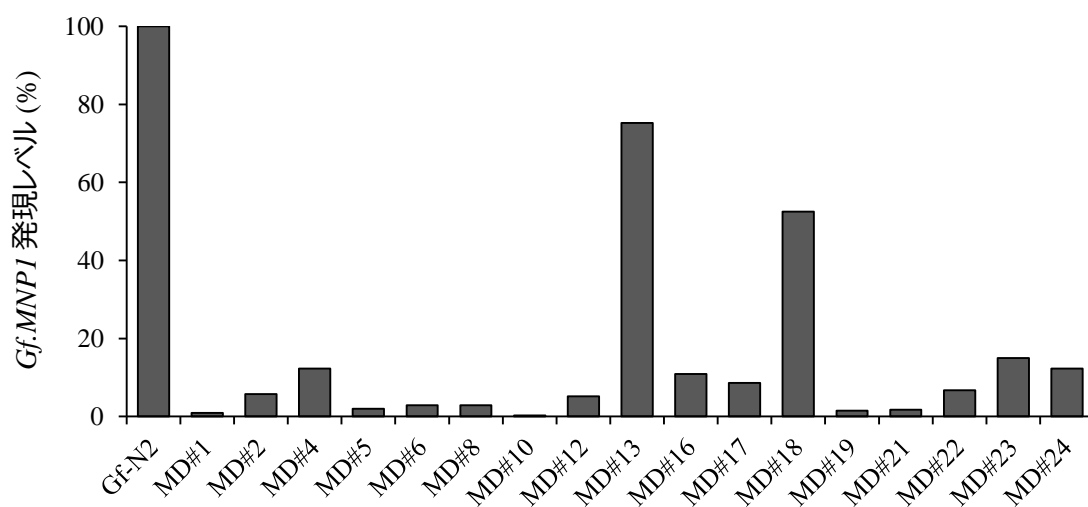


図5-15. pGFght-MNP1IRの導入が確認された形質転換体における*Gf.MNPI*の発現量
 Gf-N2株とpGFght-MNP1IRを導入して得られた17個の形質転換体 (MD#) について、栽培用オガコ培地で培養した菌糸体における*Gf.MNPI*の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.MNPI*発現レベルは、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、Gf-N2株の発現量を100%とした時の相対値で算出した。

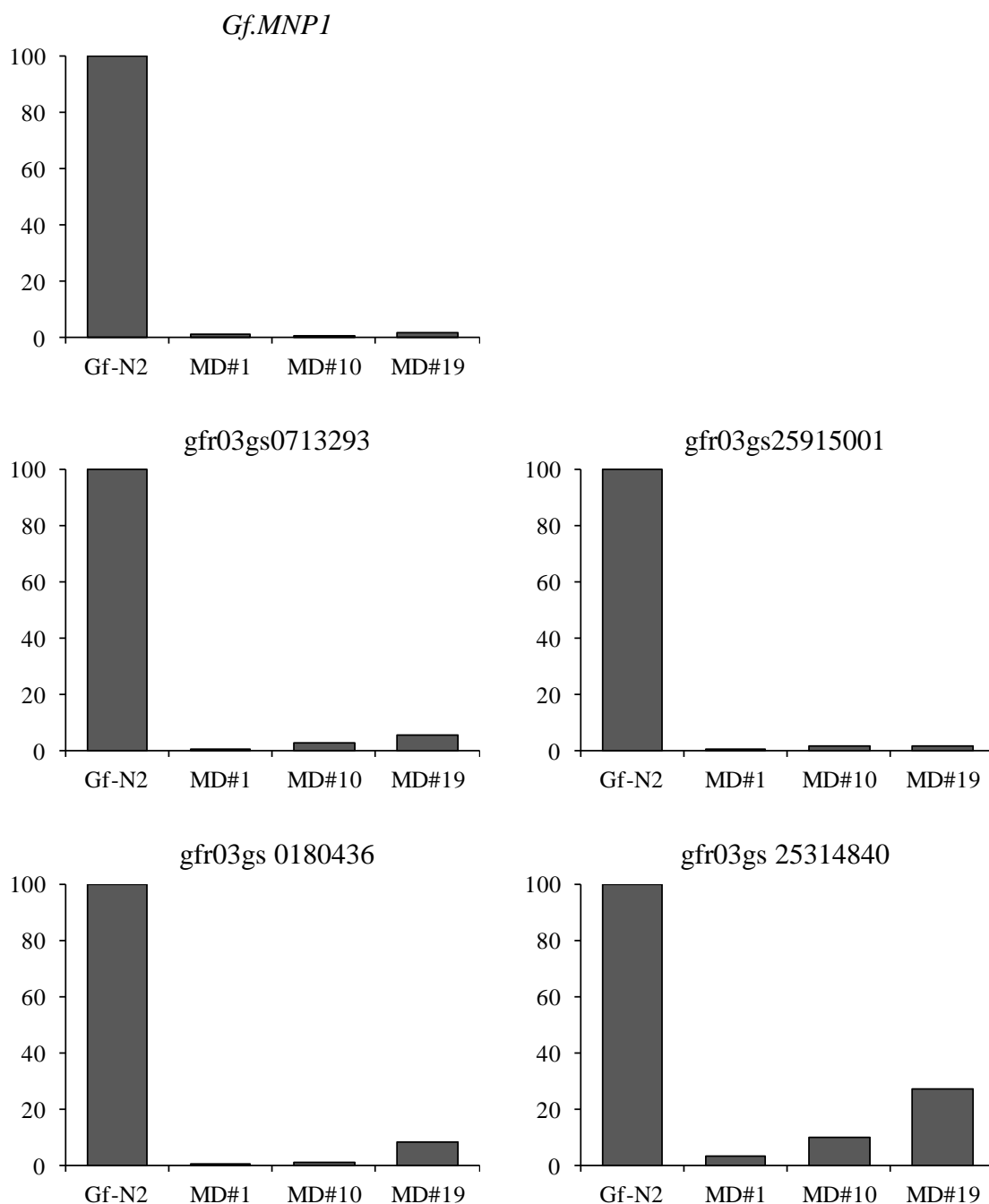


図5-16. *Gf.MNP1*発現抑制株における*Gf.MNP1*以外のMnP遺伝子の発現量
 Gf-N2株と*Gf.MNP1*発現抑制株を栽培用オガコ培地で培養した時の、MnP遺伝子と推定されるgfr03gs0713293、gfr03gs25915001、gfr03gs0180436、gfr03gs25314840の発現量を定量RT-PCRにより解析した。各サンプルの*Gf.MNP1*発現レベルは、*Gf.CHS1*の発現量を内部標準として正規化し、Gf-N2株の発現量を100%とした時の相対値で算出した。

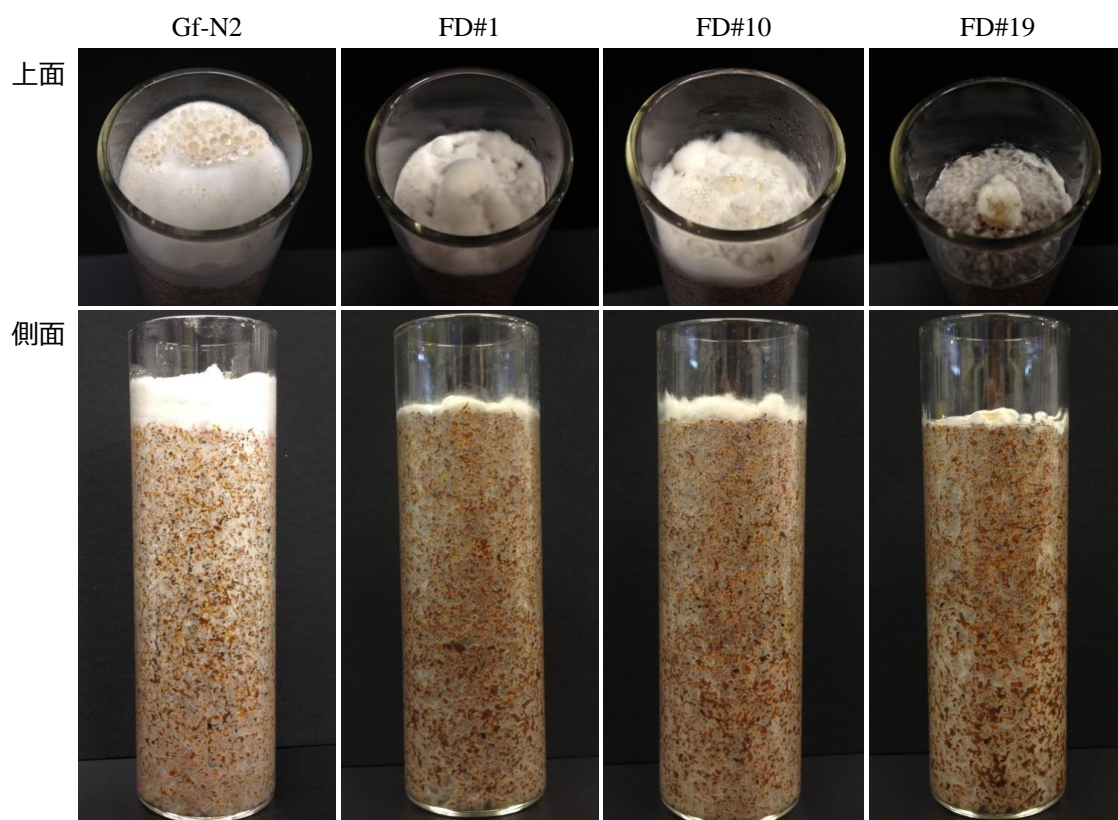


図5-17. *Gf.MNPI*発現抑制株の栽培試験の培養段階における菌糸生育の状態
Gf-N2株、*Gf.MNPI*発現抑制株（MD#1, MD#10, MD#19）の栽培試験における、植
菌後30日目の菌糸生育の状態を写真で示した。

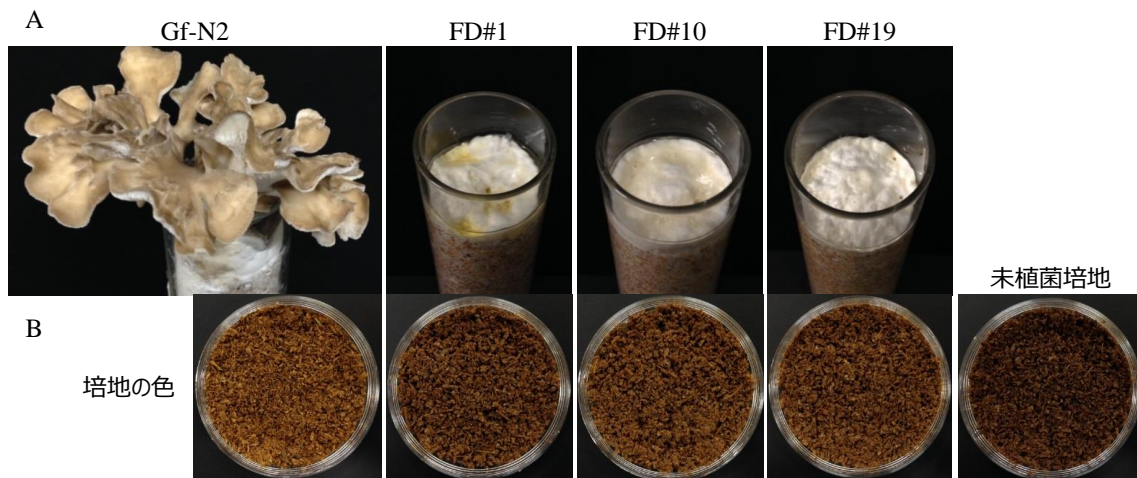


図5-18. *Gf.MNP1*発現抑制株の子実体生育時における表現型

A: *Gf-N2*株、*Gf.MNP1*発現抑制株 (MD#1, MD#10, MD#19) の栽培試験を行い、*Gf-N2*株で十分に子実体分化が進んだ時点での、子実体生育の状態を写真で示した。
B: Aの時点での培地を取り出し、培地の状態を比較した。

5.4. まとめ

本研究では、機能を明らかにしたい遺伝子（標的遺伝子）を人為的に破壊あるいは発現抑制することによって表現型への影響を調べる逆遺伝学的手法をマイタケで適用するために、マイタケの宿主・ベクター系を使って RNAi を行い、標的遺伝子の発現を抑制することで遺伝子機能解析を試みた。その結論として、以下のように摘要される。

1. ハイドロフォービン遺伝子 *Gf.HydA1* を標的に、2 本鎖 hpRNA を発現するようにデザインした RNAi ベクターをマイタケに導入した結果、菌糸生育時に *Gf.HydA1* の発現が顕著に抑制されることが確認され、マイタケにおいて人為的に RNAi を誘導できることが示された。
2. ファシクリンドメイン含有タンパク質遺伝子 *Gf.FAS1* を標的に RNAi を行ったところ、菌糸生育時だけでなく子実体生育時においても顕著に発現抑制されることがわかった。また、*Gf.FAS1* 発現抑制株は子実体の分化が抑制されたことから、*Gf.FAS1* は子実分化の開始に重要な役割を担っていることが推察された。
3. マンガンペルオキシダーゼ（MnP）遺伝子の 1 つである *Gf.MNP1* を標的に RNAi を行い、オガコ培地で顕著に発現抑制されることを確認した。しかしながら、作出した *Gf.MNP1* 発現抑制株は *Gf.MNP1* と塩基配列の相同性が高

い他の MnP 遺伝子の発現もオフターゲット効果により同時に抑制されていることがわかった。また、オガコ培地では、菌糸生育密度が低く、子実体分化も抑制されるとともに、培養後の菌床内部の色調は培養前と変わらなかったことから、培地成分の分解が十分でないことが推測されたので、MnP 遺伝子は栽培工程において培地分解による栄養物の獲得に大きく寄与していることが示唆された。

以上のように、第3章、第4章で述べたマイタケの宿主・ベクター系を基に RNAi 用ベクターを構築し、3つの遺伝子を標的にその発現を抑制できることを実証した。この結果は、マイタケの遺伝子機能解析を行う上で、RNAi が極めて有効であることを示すものである。また、配列の相同性が高い遺伝子群の中の特定の遺伝子を機能解析するには、その遺伝子と相同性の高い他の遺伝子の発現も同時に抑制されるオフターゲット効果に注意しなければならない点等もあり、今後解決すべき課題も浮き彫りにできた。本研究により、マイタケで RNAi により効率的に遺伝子発現抑制株を作出できることが示されたことから、今後、多くの遺伝子を対象に遺伝子機能解析を実施していく上で有用なツールを開発することができたといえる。

参考文献

1. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12248–12253; doi: 10.1073/pnas.0402780101.
2. Krappmann S, Sasse C, Braus GH (2006). Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryotic Cell* 5: 212–215; doi: 10.1128/EC.5.1.212-215.2006.
3. Pickford AS, Cogoni C (2003). RNA-mediated gene silencing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 871–882; doi: 10.1007/s00018-003-2245-2.
4. de Jong JF, Deelstra HJ, Wösten HA, Lugones LG (2006). RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1267–1269; doi: 10.1128/AEM.72.2.1267-1269.2006.
5. Namekawa SH, Iwabata K, Sugawara H, Hamada FN, Koshiyama A, Chiku H, Kamada T, Sakaguchi K (2005). Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing. *Microbiology* 151: 3669–3678; doi: 10.1099/mic.0.28209-0.
6. Heneghan MN, Costa AM, Challen MP, Mills PR, Bailey A,

- Foster GD (2007). A comparison of methods for successful triggering of gene silencing in *Coprinus cinereus*. *Molecular Biotechnology* 35: 283–296; doi: 10.1007/BF02686014.
7. Costa AM, Mills PR, Bailey AM, Foster GD, Challen MP (2008). Oligonucleotide sequences forming short self-complimentary hairpins can expedite the down-regulation of *Coprinopsis cinerea* genes. *Journal of Microbiological Methods* 75: 205–208; doi: 10.1016/j.mimet.2008.06.006.
 8. Kemppainen M, Duplessis S, Martin F, Pardo AG (2009). RNA silencing in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: gene knock-down of nitrate reductase results in inhibition of symbiosis with *Populus*. *Environmental Microbiology* 11: 1878–1896; doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01912.x.
 9. Kemppainen MJ, Pardo AG (2010). pHg/pSILBA γ vector system for efficient gene silencing in homobasidiomycetes: optimization of ihpRNA - triggering in the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology* 3: 178–200; doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00122.x.
 10. Matityahu A, Hadar Y, Dosoretz CG, Belinky PA (2008). Gene silencing by RNA Interference in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5359–5365; doi: 10.1128/AEM.02433-07.
 11. Costa AS, Thomas DJ, Eastwood D, Cutler SB, Bailey AM, Foster GD, Mills PR, Challen MP (2009). Quantifiable

- downregulation of endogenous genes in *Agaricus bisporus* mediated by expression of RNA hairpins. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 271–276; doi: 10.4014/jmb.0806.398.
12. Salame TM, Yarden O, Hadar Y (2010). *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microbial Biotechnology* 3: 93–106; doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00154.x.
 13. Nakade K, Watanabe H, Sakamoto Y, Sato T (2011). Gene silencing of the *Lentinula edodes lccl* gene by expression of a homologous inverted repeat sequence. *Microbiological Research* 166: 484–493; doi: 10.1016/j.micres.2010.09.004.
 14. Mu D, Shi L, Ren A, Li M, Wu F, Jiang A, Zhao M (2012). The development and application of a multiple gene co-silencing system using endogenous *URA3* as a reporter gene in *Ganoderma lucidum*. *PLoS One* 7: e43737; doi: 10.1371/journal.pone.0043737.
 15. Wessels J.G.H (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Science* 1: 9–15; doi: doi:10.1016/S1360-1385(96)80017-3.
 16. Wessels J.G.H (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* 14: 153–159; doi:10.1016/S0269-915X(00)80030-0.
 17. Kurahashi A, Sato M, Nishibori K, Fujimori F (2014). Identification of differentially expressed genes in fruiting

- body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 54: 23-33.
18. Wang X, Shi F, Wösten HA, Hektor H, Poolman B, Robillard GT (2005). The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophysical Journal* 88: 3434–3443; doi: 10.1529/biophysj.104.057794.
 19. Ng WL, Ng TP, Kwan HS (2000). Cloning and characterization of two hydrophobin genes differentially expressed during fruit body development in *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 15: 139-45; doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09052.x.
 20. Nishizawa H, Miyazaki Y, Kaneko S, Shishido K (2002). Distribution of hydrophobin 1 gene transcript in developing fruiting bodies of *Lentinula edodes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66: 1951-1954; doi: 10.1271/bbb.66.1951.
 21. Yamada M, Sakuraba S, Shibata K, Inatomi S, Okazaki M, Shimosaka M (2004). Cloning and characterization of a gene coding for a hydrophobin, *Fv-hyd1*, specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Applied microbiology and biotechnology* 67: 240-246; doi: 10.1007/s00253-004-1776-2.
 22. Miyazaki Y, Kaneko S, Sunagawa M, Shishido K, Yamazaki T, Nakamura M, Babasaki K (2007). The fruiting-specific *Le.flp1* gene, encoding a novel fungal fasciclin-like protein,

of the basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes*. *Current Genetics* 51: 367–375; doi: 10.1007/s00294-007-0133-2.

第6章 総合考察

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。近年は、きのこの健康に対する様々な機能が注目されていることから、食用きのこに対する需要が増え、多くのきのこで栽培が行われている。主要な食用きのこであるシイタケ、エノキタケ、マイタケなどでは、人工的に環境を整えた施設栽培が主流となり、一年を通じて安定的に生産されている。このような大規模きのこ栽培では、一度に大量のきのこを培養するため、菌株の劣化や変異、または環境条件の急激な変化などにより品質低下が生じた場合に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、食用きのこの生産現場における栽培環境条件の設定・管理は、生産者独自の経験や勘に頼っていることが多分にあり、科学的な裏付けや知見は十分ではない。そこで、きのこ形成に関わる様々な事象を遺伝子レベルで明らかにし、それら遺伝子をマーカーにした優良品種の育種や栽培管理システムを構築することで、きのこの品質及び生産性の向上を実現できると考えた。そのためには、きのこの遺伝子情報を集積し、分子生物学的手法を用いて解析していく必要があるが、これらを遂行するための研究基盤が十分に整備されている状況ではなかった。そこで、我々は、最初にマイタケをモデルにして、発現している遺伝子を網羅的に解析したトランスクリプトーム情報を取得し、その情報

を基にした遺伝子発現解析をこれまでに行ってきた。本論文は、遺伝子発現解析から見出された個々の遺伝子の機能、生体での役割を明らかにするための遺伝子機能解析へと研究を進展させることを目的に、マイタケの全ゲノム配列解読による遺伝子情報の拡充（第2章）、その情報を用いて遺伝子機能解析に必須であるマイタケの宿主・ベクター系の確立（第3章）、このマイタケの宿主・ベクター系を用いて機能を知りたい遺伝子（標的遺伝子）の過剰発現（第4章）及びRNAiによる発現抑制（第5章）を行い、遺伝子機能解析のための基盤技術を確立した成果について論じたものである。本章ではそれらから得られた研究成果を摘要し、総合考察を行ったのでそれについて述べる。

第2章では、マイタケの全ゲノム配列を第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結果について述べた。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 of シーケンサーを組み合わせることは、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 of シーケ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データを取得した。次に、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、既を取得していた EST 配列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、EST 配列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。予測された遺伝子について、塩基配列から推定される機能情報を注釈するアノテーションを行い、マイタケが潜在的に有している遺伝子の機能推定を行った。その例として、木材腐朽菌が木質成分を資化していくうえで重要と考えられる Carbohydrate-Active enzymes (CAZy) と Fungal Oxidative Lignin enzymes (FOLy) に属する遺伝子の分類を行い、マイタケが有している木材中の細胞壁多糖成分の分解に関わるセルラーゼやキシラナーゼに分類される遺伝子群やリグニン分解に関わるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を含むペルオキシダーゼ遺伝子群を明らかにした。以上のように、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。また、マイタケのゲノム配列情報を整備することで、先に取得していたトランスクリプトーム情報だけではカバーできなかった全遺伝子の情報やタンパク質をコードしている領域以外の発現制御領域の情報などを得ることができた。

第3章では、マイタケで目的とする遺伝子を発現させるための宿主・ベクター系を構築したことについて述べた。遺伝子機能解析を行うには、遺伝子組換え操作により機能を知りたい遺伝子の機能を人為的に操作し、その影響から機能を調べる逆遺伝学的手法が有効な手法であり、そのためには目的とする遺伝子を細胞内に運ぶためのベクターとそれを細胞内に導入するための遺伝子導入技術である宿主・ベクター系を構築する必要がある。まず、ベクターにより導入した外来遺伝子を安定的に発現させるには、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）を利用することが重要である。その候補としてマイタケで恒常的に高発現している *Gf.PSD1*、*Gf.TEF3*、*Gf.CYP1*、*Gf.GAPDH*、*Gf.CHS1* の5つの遺伝子のプロモーターとターミネーターをセットとして選び、ベクターが導入された細胞のみを効率的に選抜するための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* と連結したベクターをそれぞれ構築した。構築した5つのベクターをそれぞれプロトプラスト-PEG法によりマイタケ細胞内に導入し、5つのベクターすべてでハイグロマイシン 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5つのベクターをそれぞれ導入して得られた形質転換体の個数を

形質転換効率として比較したところ、*Gf.TEF3* や *Gf.GAPDH* のプロモーターとターミネーターのセットを用いて構築したベクターが他の3つのベクターより高かったため、これら2つのプロモーターとターミネーターのセットを高活性と判断し、次の遺伝子機能解析用のベクター構築に用いることにした。実際に遺伝子機能解析を行うには、選択マーカー遺伝子に加えて、目的遺伝子を発現させるための発現カセットを備えたベクターを構築する必要があるため、遺伝子発現を視覚的に容易に判別することを可能とする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* の発現カセットを組み込んだベクターをそれぞれ構築し、それらをマイタケ内で発現できるかを調べた。その結果、それぞれの形質転換体で *EGFP* や *Luc* の発現に起因する蛍光または発光が確認された。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章では、第3章で構築したマイタケの宿主・ベクター系を用いて、転写因子と推定される *Gf.CRZ1* を過剰発現させることで機能解析を行った結果について述べた。*Gf.CRZ1* は、過去に行った正常に子実体生育する *Gf-N2* 株と子実体生育異常を生じる変異体 *Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株の遺伝子発現差解析から見出された24個の差示的発現遺伝子の内の1つであり、*Gf-A1* 株や *Gf-A4* 株で *Gf-N2* 株より発現が顕著に高いことがわかっている。また、*Gf.CRZ1* は、酵母や糸状菌で報告されているカルシニューリンシグナル伝達経路に関与する転写因

子 *CRZ1* と相同性があることから、転写因子をコードする遺伝子であると推定される。*Gf.CRZ1* が転写因子として機能しているならば、その標的として転写制御される遺伝子の発現が通常とは異なることで変異体の変異形質を招いていると予想され、その標的となる遺伝子は *Gf.CRZ1* を除く差示的発現をする 23 遺伝子の中に存在する可能性が高いと考えられた。そこで、マイタケの遺伝子発現ベクターを用いて、*Gf-N2* 株で *Gf.CRZ1* を過剰発現させ、それにより発現に影響を受ける遺伝子の変異体で差示的発現をする 23 遺伝子の中にあるかを調べた。まず、*Gf.CRZ1* 発現ベクターを構築し、マイタケに導入することで、もとの *Gf-N2* 株よりも 10 倍以上高い *Gf.CRZ1* 発現量を示す *Gf.CRZ1* 過剰発現株を作出した。次に、それらで *Gf.CRZ1* の過剰発現により発現量が増えている遺伝子が、*Gf.CRZ1* と同じく変異体との比較解析から見出された差示的発現をする 23 遺伝子の中にあるかを調べたところ、NAD 依存性ギ酸脱水素酵素 (FDH) 遺伝子である *Gf.FDH1* の発現量が高くなっていることがわかった。白色腐朽菌においては、FDH はシュウ酸分解経路のギ酸の分解を担うことから、その前のシュウ酸をギ酸に分解する反応を触媒するシュウ酸脱炭酸酵素 (ODC) 遺伝子の発現を調べたところ、マイタケのゲノムから予測された 4 つの ODC 遺伝子の内、*Gf.ODC1* の発現量が *Gf.FDH1* と同様に高いことがわかった。このことから、*Gf.CRZ1* は、シュウ酸分解に関わる *Gf.ODC1* と *Gf.FDH1* の発現を正に調節している可能性が示唆された。また、*Gf.CRZ1* 過剰発現株は、PDA 培地培養時の菌糸生育が *Gf-N2*

株に比べて遅いうえに、菌糸密度が低く、菌叢が薄かった。この菌糸密度が低く、菌叢が薄い点は、変異体である Gf-A1 株や Gf-A4 株と共通の特徴であることから、*Gf.CRZ1* の恒常的高発現は菌糸生育異常をもたらすことが示唆された。以上の結果から、*Gf.CRZ1* の恒常的高発現は、何らかの遺伝子の発現に影響を与えていることが推測され、その内、少なくともシュウ酸分解に関わる *Gf.ODC1* と *Gf.FDH1* の発現を正に調節していることが示唆された。また、その影響は正常な菌糸生育を妨げることも示された。木材腐朽菌において、シュウ酸代謝の制御に関わる転写因子に関してはこれまでほとんどわかっていないため、これらの制御に関わる遺伝子としては初めての報告であり、新規の転写因子である可能性が示唆された。

第5章では、第3章で構築したマイタケの宿主・ベクター系を用いて、RNAi による機能を明らかにしたい遺伝子（標的遺伝子）の発現を抑制することで機能解析を行った結果について述べた。RNAi は、二本鎖 RNA (dsRNA) 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、哺乳類、昆虫、植物、菌類などの様々な生物種で確認されている。一般的に、標的遺伝子と相同な配列の dsRNA を細胞内に導入または発現させることで RNAi を人為的に誘導して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 による遺伝子発現抑制方法を確立すべく、標的遺伝子に相同なヘアピンループ状の二本鎖 RNA (hpRNA) 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が抑制できるかを試験した。まず、マイタケの菌糸生育時に特異的に高発現しているヒドロフォービン遺伝子 *Gf.HydA1* を標的に RNAi を行った。その結果、得られた形質転換体の半数以上で、*Gf.HydA1* の発現量がもとの Gf-N2 株に比べて 10% 以下に抑制され、それらの中で最も発現量が低かったものは 1.3% であった。このように、*Gf.HydA1* のような発現量の高い遺伝子を顕著に発現抑制できたことから、本手法によりマイタケで効果的に RNAi を誘導できることが示された。ヒドロフォービンは、菌糸表面に分泌されて疎水性を付与するなどの役割が見出されていることから、*Gf.HydA1* の発現抑制は菌糸生育に差異をもたらすことが予想された。しかしながら、*Gf.HydA1* 発現抑制株では Gf-N2 と比較して菌糸生育に顕著な差は確認されなかった。マイタケは *Gf.HydA1* 以外にも複数のヒドロフォービン遺伝子を有することから、これらが機能的に相補していることが考えられた。

次に、子実体生育異常を生じる変異体 Gf-A1 株の子実体生育時において顕著に発現が低いことから見出されたファシクリン含有タンパク質遺伝子 *Gf.FAS1* を標的に RNAi を行った。ファシクリンは動物、植物等における細胞接着分子であり、多くの分泌タンパク質や GPI アンカー型タンパク質がファシクリンドメインを有していることが知られている。*Gf.FAS1* は 2 つのファシクリンドメインを有していることから、細胞表面に分泌されて機能していることが推定された。RNAi により *Gf.FAS1* の発現レベルが 10% 以下に抑制された形質転換体

を *Gf.FAS1* 発現抑制株として選び、栽培試験により子実体を発生させたところ、原基の状態から子実体分化が停止し、菌柄の伸長と続く菌傘の分化が認められなかった。この表現型は、子実体分化が停止する変異体 **Gf-A1** 株と類似していることから、*Gf.FAS1* が子実体分化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後、*Gf.FAS1* がコードするタンパク質の性質を明らかにするためのアッセイや細胞中の局在の解析などタンパク質レベルの解析を進めることで、より詳細な機能解明に繋がると考えられる。

最後に、リグニン分解に関わるマンガンペルオキシダーゼ (**MnP**) 遺伝子の1つである *Gf.MNP1* を標的に **RNAi** を行った。*Gf.MNP1* は、マイタケに数多く存在する **MnP** 遺伝子の中でもオガコ培地で培養した菌糸体で特に発現量が高い遺伝子である。**RNAi** により *Gf.MNP1* の発現抑制を試みたところ、オガコ培地培養時の菌糸体で *Gf.MNP1* の発現量が 1/10 以下に抑制された形質転換体を得られた。しかしながら、得られた形質転換体は、*Gf.MNP1* 以外の複数の **MnP** 遺伝子の発現も同時に抑制されていた。この原因として、**MnP** 遺伝子群は互いに塩基配列の相同性が高いことから、標的とした遺伝子以外にも設計した二本鎖 **RNA** と配列の相同性が高い遺伝子が存在するとその遺伝子の発現も同時に抑制されるオフターゲット効果により、これらの遺伝子の発現も標的遺伝子と同様に発現抑制されたものと推察された。*Gf.MNP1* の発現抑制が顕著であった形質転換体の子実体を発生させたところ、子実体への分化は認められなかった。この結果は、*Gf.MNP1* を含む

複数の MnP 遺伝子の発現が抑制されたことで培地中のリグニン分解が進まず、栽培試験で設定した培養期間内での子実体形成に必要な栄養成分の蓄積が不十分であったがために子実体生育に至らなかったと推測された。これは、*Gf.MNP1* を含む MnP 遺伝子が培地成分の分解に大きく寄与することを示唆している。以上の結果は、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実証するものであることから、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。

以上のように、本研究の大きな成果の 1 つに、マイタケの全ゲノム配列解読を行い、高精度なドラフトゲノム配列情報を整備できたことが挙げられる。近年、多くの生物種でドラフトゲノム配列決定がなされ報告数は増えているが、ゲノムデータの品質には特に基準がないため、その完成度は様々であるのが現状である。その点に関して、本研究では、2 機種の特徴の異なるシーケンサーから得た配列データを最適に組み合わせることでエラー修正やギャップクローズを行い、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を得ることができた点で品質の高いゲノムデータであると考えている。また、マイタケのゲノム配列を栽培マイタケ菌株として最も古くかつ最も広範囲に用いられてきている M51 株を用いて初めて決定できたことで、これをリファレンスゲノムとして、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。

2 つ目の成果としては、マイタケの宿主・ベクター系を確立できたことがあげられる。ゲノム配列から予測される遺伝子の生体での役割を詳細に調べるには、遺伝子組換え技術を用いる遺伝子機能解析手法の確立が不可欠である。本研究では、機能解析したい遺伝子の恒常発現、または RNAi による発現抑制を可能とする宿主・ベクター系を構築し、それを使ってマイタケで目的遺伝子を発現させることや逆に発現抑制することに成功し、これらが遺伝子機能解析の有効なツールとなることを実証した。このように、マイタケで遺伝子機能解析を進めるための基盤技術を構築できたことは遺伝子解析を加速させる上で意義のあることと考えられる。今後、マイタケの子実体生育に関与が予測される遺伝子群の機能解析を進めていくことで、食用きのこの子実体生育メカニズムの解明に繋がると考えている。また、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する。

本論文を構成する学術論文及び学会発表

■ 学術論文（査読付）

- (1) **Sato M**, Kurahashi A, Takeda A, Uemura Y, Ezaki M, Nishi T, Nishibori K, Fujimori F (2013). High quality draft genome sequence analysis of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 53: 17–30.
- (2) **Sato M**, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F (2015). Development of a transformation system for the edible mushroom *Grifola frondosa*: demonstrating heterologous gene expression and RNAi-mediated gene silencing. *Mycoscience* 56: 364–372; <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2014.11.004>.
- (3) **Sato M**, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F (2015). Overexpression of a putative transcription factor *Gf.CRZ1* affects the expression of oxalate-degrading genes and causes morphological defects during mycelium formation in *Grifola frondosa*. *Mycoscience* 56: 516–522; <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2015.03.003>.

■ 国内学会発表

- (1) 佐藤真之, 倉橋敦, 木下みほこ, 西堀耕三, 藤森文啓, 2011. マイタケの形質転換の試み. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都).
- (2) 倉橋敦, 佐藤真之, 西堀耕三, 藤森文啓, 2011. マイタケをモデルとしたキノコ生育機構解明へのゲノミクスアプローチ. 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京).
- (3) 佐藤真之, 倉橋敦, 西堀耕三, 藤森文啓, 2012. マイタケの遺伝子機能解析のための分子生物学的ツールの構築. 日本きのこ学会第 16 回大会 (東京).
- (4) Sato M, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F, 2013. The zinc-finger protein gene (*ZFP*) highly expressed in a fruiting body mutant strain (Gf-A1) of *Grifola frondosa* is involved in oxalic acid metabolism. 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸).

用語説明

用語	説明
アセンブラ	コンピュータ上でアセンブリを行うためのソフトウェアのこと。
アセンブリ	シーケンサーから得られた短いDNA配列断片同士を相同性を有する重なり部分で繋ぎ合わせて、元の長い配列を再構築すること。
アノテーション	得られた遺伝子配列に対して、様々なデータベースに登録されている類似遺伝子情報などから、推定される機能等の情報を付与すること。
EST	expressed sequence tag の略であり、遺伝子転写産物（mRNA）から逆転写酵素を用いた逆転写反応によって合成されたcDNAの配列を決定したものである。
N50スキマホールド長	スキマホールド配列をサイズの大きい順にそれらの塩基数を合計していき、その合計が全ゲノムサイズの50%に達したときのスキマホールド配列のサイズのこと。
カバレッジ	ゲノム解読の際に、ある塩基配列が何度読まれているかを示す指標のこと。
菌糸	菌糸は、菌類を構成する細胞が線状に繋がって糸状に見える構造であり、菌糸を形成する菌類を総称して糸状菌と呼ぶ。
形質転換	外部から細胞内にDNAを導入することで、遺伝的性質が変わり宿主の形質が変化すること、またはその操作のこと。それにより形質が変化した個体あるいは細胞のことを形質転換体と呼ぶ。

コンティグ	contiguous sequenceの略で、シークエンサーから得られたリードのアセンブリを行って構築された連続した長い配列のこと。
子実体	菌類が有性孢子形成の際に形成する生殖器官で、肉眼で確認できるほど大型のものを指し、総称してきのこと呼ぶ。
子実体生育	栄養生長により蔓延した菌糸体の上部に形成された菌糸塊から、環境の変化が刺激となって子実体の基となる原基が形成され、原基の発達に伴って、複雑な形態の子実体に分化する一連の期間のことを、本論文では子実体生育と呼称する。
子実体分化	子実体生育のうち、原基から菌柄となる部分が伸長し、その先端部が伸長展開していくことで菌傘が形成され、その裏側に孢子形成のための管孔が形成されて子実体が成熟する期間を限局的に指して、本論文では子実体分化と呼称する。
スキヤホールド	メイトペアリード等の位置情報をもとに複数のコンティグ配列を推定される距離間でギャップをはさんで繋ぎ合わせた長い配列のこと。
選択マーカー遺伝子	遺伝子組換えの際に、発現させたい遺伝子を組み込んだベクターが宿主細胞内に確実に導入されたことを示す目印として、一緒にベクターに組み込まれる遺伝子のことであり、この遺伝子の発現によりもたらされる形質の違いでベクターが導入された細胞のみを効率的に選抜することが可能となる。選択マーカー遺伝子には、特定の薬剤に対する耐性を付与する遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子などが利用されている。
ターミネーター	遺伝子コード領域の下流に位置する転写終結点を含む領域のこと。

第二世代シーケンサー	<p>鋳型DNAに相補的なDNAをDNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼを用いて合成し、その時に取り込まれたヌクレオチドの種類を逐次的に蛍光や発光等の検出により超並列的に塩基配列決定を行う技術をもとにしたシーケンサーを第二世代シーケンサーと呼ぶ。</p>
<i>de novo</i> アセンブリ	<p>まだゲノムの解読されていない生物に対して、新規ゲノム配列決定の際に行われるアセンブリのこと。</p>
<i>de novo</i> シーケンシング	<p>まだゲノムの解読されていない生物のゲノム配列を新規に決定すること。</p>
定量RT-PCR	<p>mRNAから逆転写により生成されたcDNAを鋳型にPCRを行う逆転写PCR (reverse transcription PCR; RT-PCR) とリアルタイムPCRを組み合わせることで、鋳型となるcDNAの定量を行い、それをもとに遺伝子発現量を解析する手法のこと。</p>
ドラフトゲノム	<p>ギャップ等の未決定領域を含み、すべての配列が完全に繋がられてはいないが、ゲノムの全体は解読できた状態のゲノム配列のこと。</p>
トランスクリプトーム	<p>細胞内に存在する全mRNAないしは全転写産物のこと。</p>
発現カセット	<p>プロモーター配列とターミネーター配列の間に発現させたい目的遺伝子を連結した配列断片のことであり、これを細胞内に導入し、安定に保持されることで目的遺伝子が発現される。</p>
プロトプラスト	<p>植物や糸状菌などの細胞壁を有する生物で、細胞壁分解酵素等で細胞壁を分解して得られる細胞のことであり、本研究では、マイタケのプロトプラストを用いて形質転換を行った。</p>

プロモーター	遺伝子コード領域の上流に位置する転写因子あるいはRNAポリメラーゼが結合し、転写開始部位の決定や転写量の調節を司る領域のこと。
マイクロアレイ	基板上に遺伝子等の部分配列を高密度に配置して固定したものを指し、細胞から抽出したRNAから合成したターゲット（cDNAまたはcRNA）をハイブリダイズさせて、蛍光等でそれらを検出することに用いられる。これにより、一度に数千から数万の遺伝子の発現を網羅的に調べることができる。
メイトペアリード	長いDNA配列断片の両端の配列を解読するために、配列断片を一度環状化し、両端の配列を含む部分のみを抽出して配列決定して得られたリードのこと。
リード	シーケンサーにより読み取られた連続した塩基配列のこと。

謝辞

本研究は、株式会社雪国まいたけから株式会社ハイファジェネシスに派遣され、赴任先の東京家政大学家政学部環境教育学科生物工学研究室において、同大学の藤森文啓教授と雪国まいたけの西堀耕三研究推進役の御指導の下に行われたものです。

藤森文啓教授には、研究員として受け入れていただき、研究方針の決定から日々の実験結果に関する考察、学会での発表や論文作成に至る本研究全般にわたって終始懇切なる御指導を賜りました。また、様々な分野の研究者と交流する機会を設けていただくなど、研究者として多くの貴重な経験を積ませていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

雪国まいたけに入社して以来、企業研究者としての心得をはじめ、きのこ全般に関わる研究について多くのことを学ばせていただき、本研究を遂行するにあたって終始変わらぬ御指導、ご鞭撻を賜りました西堀耕三研究推進役に深く感謝申し上げます。本研究の継続と本論文の作成ができたのは、西堀研究推進役のご理解とご協力があったことです。

本研究の実施にあたり終始適切な御指導と多大なる御協力をいただいたとともに、赴任先で一緒に仕事をさせていただいた時から様々な面でご助言を賜りました雪国まいたけの倉橋敦博士（現 八海醸造株式会社 研究開発室）に心より感謝申し上げます。

マイタケの宿主・ベクター系を構築するにあたって、シイタケ用発現ベクター pLG-hph、pChG' を分譲していただきました公益財団法人岩手生物工学研究センターの坂本裕一博士に御礼申し上げます。

研究補助として、実験をサポートしていただいた株式会社ハイファジェネシスの内田（土屋）有紀氏に心より感謝申し上げます。

最後に、派遣先である株式会社ハイファジェネシスの代表取締役社長 奥田徹博士をはじめ社員の皆様、生物工学研究室の皆様、著者が所属する雪国まいたけ研究開発室の研究員諸氏にも御協力をいただきましたことに深く感謝申し上げます。