

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06175

研究課題名(和文) マツタケ単核体の取得、および遺伝子導入と破壊法に関する研究

研究課題名(英文) Studies on transformation methods of *Tricholoma matsutake*, and isolation of monokaryon of the fungus

研究代表者

福田 泰久 (Fukuta, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：80609602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マツタケの形質転換法確立を目指し、ホスト株となる単核体の取得と、プロトプラスト PEG法によるマツタケ遺伝子組換え技術の開発を目的に研究を行った。しかしながら、プロトプラストを研究期間中に再生させることはできなかった。現在は、自然界より分離したマツタケ細胞壁成分分解微生物由来の-1,3-グルカナーゼを利用してさらに大量にプロトプラストを調整し、再生実験を継続して行っている。一方、同じ担子菌類を用いた遺伝子組換え実験として、子実体形成が可能なトキイロヒラタケをモデル実験に用いた。本実験で確立した方法により、ピンク色素タンパク遺伝子(PsPCP)の発現を抑制させ、白色子実体が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツタケのプロトプラストを再生させることができていないため、形質転換には成功していない。しかしながら、マツタケ細胞壁分解微生物が生産する酵素群を利用してプロトプラスト量を増加させることで再生率を上げることが期待できる。また新たな知見としてマツタケ細胞壁消化に-1,3-グルカナーゼが重要な役割があることが示唆された。一方、トキイロヒラタケの形質転換法は確立され、塩基配列が明らかであれば、特定遺伝子の発現抑制がある程度可能となった。本研究で開発した手法により、子実体形成に関わる遺伝子を網羅的に抑制させて表現型を観察することで、子実体形成に必須の遺伝子を特定することができる。

研究成果の概要(英文)：With the aim of establishing a transformation method for *Tricholoma matsutake*, research was conducted with the aim of isolation of monokaryon as a host strain, and developing genetic recombination technology using the protoplast-PEG method in the fungi. However, protoplasts could not be regenerated during the study period. Currently, we are using -1,3-glucanase derived from the cell wall of the fungi component degradation microorganism isolated from nature to adjust protoplasts in an even larger amount, and continue regeneration experiments. On the other hand, as a genetic recombination experiment using the same basidiomycetes, *Pleurotus salmoneostramineus*, which can form fruiting bodies, was used in a model experiment. By the method established in this experiment, the expression of the pink colored protein gene (PsPCP) was suppressed, and white fruiting bodies were formed in the experiment.

研究分野：応用微生物学

キーワード：マツタケ トキイロヒラタケ 形質転換 単核体 担子菌 細胞壁 プロトプラスト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

きのこ類微生物の最大の特徴は、肉眼で観察が可能な大型の子実体を形成することである。栽培化されているきのこの子実体形成のコントロール法として、光照射、低温、浸水などが挙げられる。しかしながら、子実体形成のトリガーとなる物質、遺伝子、タンパクについて詳細は不明である。近年、次世代シーケンサーの登場により、きのこ類(担子菌類と一部の子囊菌類)の全ゲノム解析や RNASeq 解析が行われるようになってきた。今後もますますその情報は増加していくと考えられ、次のステップとしてポストゲノム解析が求められている。遺伝子やタンパクの生物学的機能を研究する上で、RNA サイレンシング(遺伝子抑制法)や CRISPER/Cas9 によるターゲティング遺伝子破壊法などがあげられる。しかしながら、RNA サイレンシングはあくまでも抑制法であるため、転写物の一部が残存し、顕著な効果が現れない場合が考えられている。CRISPER/Cas9 システムを用いたターゲティング遺伝子破壊では、ガイド RNA により特異的にターゲット遺伝子へ変異導入もしくは欠損が可能であるが、目的以外の遺伝子への作用が懸念されており、さらにきのこ類微生物では確固たるプロトコルが存在していないのが現状である。そのため、*Aspergillus oryzae* などの糸状菌の遺伝子破壊で用いられてきた、相同組み換えを利用した遺伝子破壊法が確実な方法としてよく用いられている。いずれの手法においても、糸状菌の遺伝子挿入には状態のよい(再生率が高い)プロトプラストを大量に調製する必要がある。

Tricholoma matsutake (マツタケ) は人工栽培化が望まれている高級きのこである。本きのこは、生育スピードが他のきのこ種と比べて非常に遅いが、人工培地上で菌糸を増殖させることは可能である。現段階でマツタケの人工栽培化で最も問題となっているのは、培養法の検討ではなく、子実体原基形成を促す方法の解明である。きのこの子実体形成に関わるターゲット遺伝子の探索方法として、網羅的な遺伝子発現解析(生育段階毎の RNASeq 解析)があげられる。スエヒロタケ、ヒトヨタケ、ブナシメジにおいて RNASeq 解析が報告され、いくつかの遺伝子が子実体形成期に高発現していることが報告された。これらのきのこにおいては、転写因子である *hom2*、*bri1*、*c2h2*、*hom1*、*gat1* 遺伝子などが子実体形成に関わるとされている。これらの因子制御の根拠には、それぞれ遺伝子破壊をしたのちにその表現型を観察する手法が取られており、一連の実験手法が確立されている。しかしながら、マツタケを扱った形質転換、遺伝子破壊実験は全くされていない。

2. 研究の目的

(1) マツタケの形質転換手法を確立させるという研究は、現在のところほとんどなされていない。その要因として、マツタケの培養とプロトプラストの調製が困難であること、それに伴ったプロトプラストの再生率が非常に低いことが挙げられる。これにより、全くこの分野の研究は行われてきていない。本研究課題では、マツタケの形質転換法確立を目指し、ホスト株となる単核体の取得、および大量にプロトプラストを調整する方法を開発することにより、プロトプラスト PEG 法によるマツタケ遺伝子組換え技術を確認することである。

(2) また、子実体形成が可能なトキイロヒラタケ単核体をホスト株に用いたターゲット遺伝子破壊法を用いて、トキイロヒラタケピンク色素タンパク遺伝子(PsPCP)の発現抑制による白色子実体の形成、さらに各種ターゲット遺伝子を破壊することで子実体形成に関わる制御遺伝子を明確することが目的である。

3. 研究の方法

(1) マツタケ単核体取得の検討

YPD 液体培地(グルコース 2%、Yeast extract 0.4%、マルトエキス 2%)で振とう培養、もしくは、細かく切り刻んだマツタケ菌糸体を大量の固体培地(パーミキュライト:押し麦 = 1:1)で生育させ、得られた菌体に培地ごと調製した細胞壁溶解酵素液(Yatalase、Lysing enzyme、Cellulase ONOZUKA シリーズなど)を加え 28℃ で 2 時間酵素反応させた。その後 G1 グラスフィルター(口径 160µm)を用いて濾液を回収した。この際ファルコンチューブの内側に反応液が残らないように 0.5M スクロース溶液を適量加え、同様に G1 グラスフィルターで濾過を行った。その後遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行い、上清を捨て、0.6M スクロース溶液を加え、顕濁した濾液を 1.5ml 容マイクロチューブに 1ml 分注し、さらに遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行った。その後、プロトプラスト数が $10^8/200 \mu\text{l}$ になるよう上清を捨て濃縮した。その後、0.5M スクロースを含む PDA 培地へ添加し、コンラージ棒は使用せずにシャーレを回転させることで植菌、再生を試みた。再生温度は 24℃ のインキュベーター内で行った。1-2 か月の間に再生したマツタケのコロニーは、新たな PDA 培地で継代後、DAPI 染色 - 蛍光顕微鏡で観察を行った。

(2) マツタケ細胞壁消化微生物の分離

様々な細胞壁の消化手法がうまく働かない原因は、マツタケの細胞壁構造が他の担子菌類と

は大きく異なるためと予測される。予想の根拠として、2018年に *Aspergillus nidulans* において、菌糸体が塊を生ずる原因が -1,3-グルカンにあることが報告された。マツタケ菌糸は、他の担子菌類の菌糸とは異なり、その菌糸は非常に密で、菌糸同士が接着した菌塊状に生育することが観察される。このことから、マツタケ菌糸体の細胞壁成分には -1,3-グルカン層が厚く存在することが考えられる。そのため、市販の消化酵素類を用いるのではなく、自然界からマツタケの細胞壁を消化する微生物の分離を試みた。粉碎したマツタケ菌糸の水不溶性画分をマツタケ細胞壁成分とした。凍結乾燥したマツタケ細胞壁成分を唯一の栄養素とした寒天培地上に、様々な場所から採取した土壌の滅菌水懸濁液を摂取し、30℃で培養した。本培地上でハローを形成したコロニーを細胞壁消化微生物として分離した。さらに、-1,3-グルカンのみを炭素源とした液体培地に接種し、30℃、3日間振とう培養した。培養後、遠心分離(15,000×g、10分間)し、その上清を粗酵素液として、硫酸塩析、陰イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにて精製を行った。

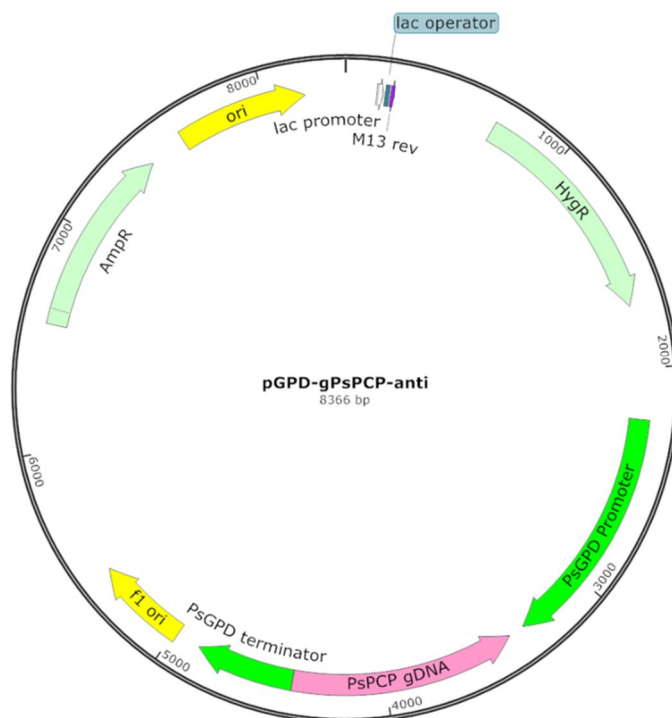


図1 . PsPCP 遺伝子発現抑制ベクタープラスミド

HygR : ハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセット
PsPCP gDNA : PsPCP 遺伝子の逆相補鎖配列

(3) トキイロヒラタケ形質転換法の確立および PsPCP 遺伝子の発現抑制

トキイロヒラタケ NBRC31859 株由来単孢子分離株 N13 株を宿主株に形質転換実験を行った。PDA 培地で培養した菌糸をプラスチックペッセルで剥ぎ取り、ビーズショッカーで粉碎後、液体培地(300ml 容三角フラスコに YPD 培地を 100ml 調整)に接種し、3 日間振とう培養(24℃, 明所)した。その後培養中の菌体をミキサーで粉碎し、1 晩振とう培養(24℃, 明所)した。本培養した菌体(4 日間)を、G1 グラスフィルターを用いて濾過し、50ml 容ファルコンチューブに回収した。得られた菌体に調製した細胞壁溶解酵素液(Lysing enzyme 2%, 0.5M スクロース)を加え 34℃で 2 時間酵素反応させた。その後 G1 グラスフィルターを用いて濾液を回収した。この際、ファルコンチューブの内側に反応液が残らないように 0.6M スクロース溶液を適量加え、同様に G1 グラスフィルターで濾過を行った。その後遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行い、上清を捨て、0.6M スクロース溶液を加え、顕濁した濾液を 1.5ml 容マイクロチューブに 1ml 分注し、さらに遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行った。その後、上清を捨て、STC を 1ml 加えて転倒混和し、遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行い、沈澱が 200 μl になるよう上清を捨て濃縮した。プロトプラスト溶液 200 μl に PsPCP 発現抑制ベクタープラスミド(図 1) 20 μg をピペティングしながら加え、40 分間氷冷した。その後、PTC 液(PEG4000 40%、CaCl₂ 50mM、pH8.0) 500 μl を加えてピペティングした後 20 分間室温(15-25℃)でインキュベートした。その後、遠心分離(2,000g, 4℃, 10 分)を行い、上清を捨てた後 0.6M スクロース溶液を 200ml 加え、その懸濁液 200 μl をハイグロマイシン 100μg/ml を含む選択培地に接種し、24℃で静置培養し、形質転換体の選別を行った。その後、再生したコロニーを 5mm 角に切断し、PDA 培地に接種した。広葉樹オガ粉とフスマ(共に市販品)を 3:1 の割合で混合し、水を加えて水分含有量が 60-65% になるように調製した。培養容器には培養試験管を用いた。培地は試験管に 20g ほどの量が入るように調製し、121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌処理を行った。その後 PDA 培地で培養した再生コロニーを植菌し、24℃・暗所・湿度 70%の恒温室で 2 週間ほど培養した。

4. 研究成果

(1) マツタケ単核体取得の検討

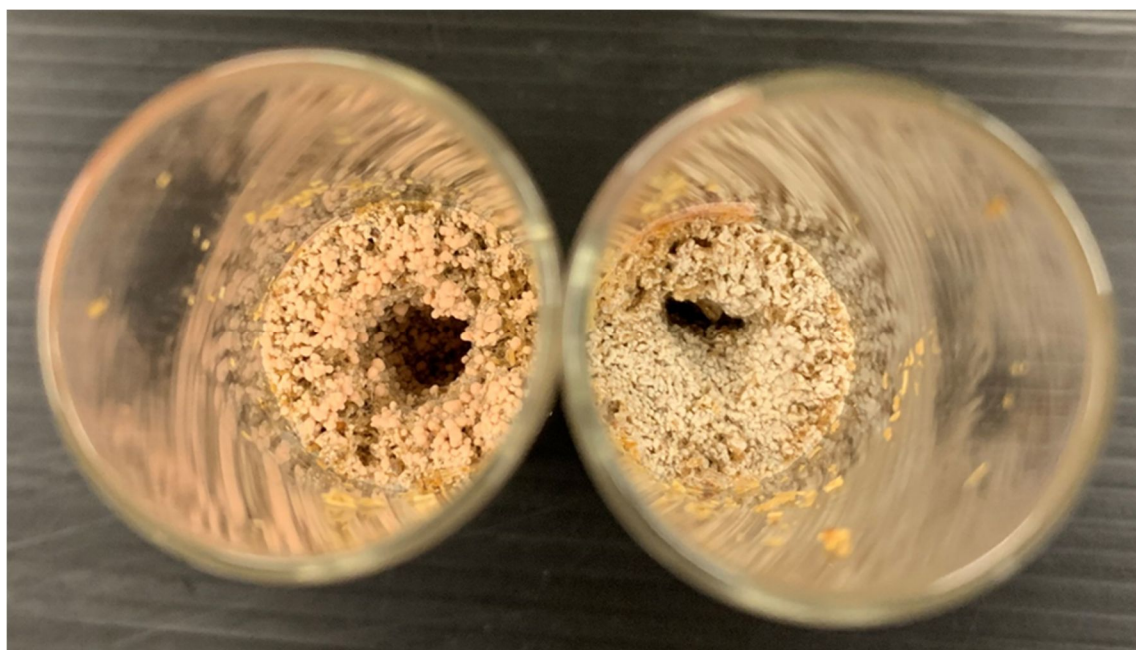
マツタケの形質転換法を確立するために、単核体分離を検討した。目的とする形質転換法は、*Agrobacterium*法ではなく、プロトプラスト PEG 法のことを示す。細かく切り刻んだマツタケ菌糸体を、大量の固体培地で生育させ、新鮮な菌糸を Yatalase (タカラバイオ) Lysing enzyme (Sigma Aldrich) Cellulase ONOZUKA シリーズ (ヤクルト) など、様々な市販消化酵素処理をすることにより従来の数百倍量のプロトプラストの取得を試みた。再生培地には、担子菌類のプロトプラスト再生に用いられる 0.5M スクロースを含む PDA 培地を基本に、マンニトールなどの糖類、NaCl や MgSO₄ などの金属塩を浸透圧調整剤として用いて様々な再生培地の組成を試みた。しかしながら、再生された菌糸を DAPI による核染色後に蛍光顕微鏡観察をすると、すべて二核体であった。プロトプラストが再生したわけではなく、酵素反応で未消化の菌糸が生育したものであったと考えられる。そもそも、目的である形質転換を行うためにはさらに大量のプロトプラストが必要であることがあきらかになったため、以下の(2)に示す実験に方法を移した。

(2) マツタケ細胞壁消化微生物の分離

マツタケのプロトプラスト PEG 法による形質転換法確立のための重要な要因は、如何にプロトプラストを大量に生成させることができるかである。様々な細胞壁の消化手法がうまく働かない原因は、マツタケの細胞壁構造が他の担子菌類とは大きく異なるためと予測される。そのため、市販の消化酵素類を用いるのではなく、自然界からマツタケの細胞壁を消化する微生物の分離を試みた。マツタケ子実体の乾燥粉末を唯一の栄養源とした寒天培地を作成し、土壌細菌をスクリーニングした。分離菌を遺伝子学的手法で同定を行ったところ、最も近い近縁種は *Paenibacillus lupini* であった。いくつか細胞壁消化にかかわる酵素を分析し、そのうち α -1,3-グルカナーゼの精製と性質解析を行った。その結果、比活性が 17.4U/mg、精製倍率 7.4 倍、回収率 0.3% でカラムクロマト的に均一な酵素標品を得た。得られた酵素を SDS-PAGE にて確認したところ、約 150kDa 付近に電気泳動的に単一のバンドを得ることができた。本酵素は、マツタケ子実体の乾燥粉末も消化できることを確認し、現在、その他の諸性質について検討を行っているところである。

(3) トキイロヒラタケ形質転換法の確立および PsPCP 遺伝子の発現抑制

トキイロヒラタケ生活環を通して発現量が高い GPD 遺伝子のプロモーターを利用することで、大腸菌由来のハイグロマイシン遺伝子 (hph) の発現を可能にし、トキイロヒラタケ形質転換体の選抜に有効であることが明らかとなった。そこで、本プロモーターを利用し、トキイロヒラタケピンク色素タンパク遺伝子 (PsPCP) の発現抑制実験を行った。ピンク色の子実体を形成す



るホスト株の PsPCP 遺伝子をアンチセンス RNA 法により抑制させた形質転換株を取得して栽培したところ、白色の子実体原基を形成した(図2)。この実験結果が示すようにトキイロヒラタ

図2. 子実体原基形成期におけるトキイロヒラタケ野生株と PsPCP 遺伝子発現抑制株との比較 (写真左トキイロヒラタケ野生株、写真右 PsPCP 遺伝子発現抑制株)

ケ GPD プロモーター下流にアンチセンス鎖の遺伝子塩基配列を導入することにより、ターゲットとなる遺伝子を抑制することが可能であると考えられる。今後は、同様の手法を用いることにより子実体形成に関わるとされる、各種のプロテアーゼ遺伝子や塩基配列を明らかにした糖質分解酵素の遺伝子なども発現抑制させ、その表現型を観察することにより担子菌類の子実体形成に関わる因子が解明されることが期待できる。

Y Fukuta et al., Gene cloning of the pink-colored protein from *Pleurotus salmoneostramineus* (PsPCP) and its species-specific chromoprotein are effective for colorization of the fruit body, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 83, 2019, 1354-1361

K Miyazawa et al., Molecular mass and location of α -1,3-glucan in cell wall control the degree of hyphal aggregation in liquid culture of *Aspergillus nidulans*, *frontiers in Microbiology*, 9, 2018, article 2623

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuhisa Fukuta, Tomomi Hirayama, Norifumi Shirasaka	4. 巻 28 (3)
2. 論文標題 Screening of non-fruiting monokaryons from basidiospore isolates from <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> NBRC31859	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhisa Fukuta, Tomomi Hirayama, Shuya Kitano, Kaito Sato, Taketo Uokawa, Norifumi Shirasaka	4. 巻 28 (4)
2. 論文標題 Efficient transformation of monokaryons from <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> using the GPD promoter for hygromycin B resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 171-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuta Yasuhisa, Kamei Kengo, Matsui Aoi, Fuji Yosuke, Onuma Hiroki, Shirasaka Norifumi	4. 巻 83
2. 論文標題 Gene cloning of the pink-colored protein from <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> (PsPCP) and its species-specific chromoprotein are effective for colorization of the fruit body	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1611406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Onuma Hiroki, Hara Kento, Sugita Kayo, Kano Akiko, Fukuta Yasuhisa, Shirasaka Norifumi	4. 巻 128
2. 論文標題 Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from <i>Tricholoma matsutake</i> grown on barley based solid-state medium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 669 ~ 676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 泰久 平山 朋美 白坂 憲章
2. 発表標題 トキイロヒラタケ単孢子分離単核体株における遺伝子発現差解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平山朋美、福田泰久、白坂憲章
2. 発表標題 <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> NBRC31859株由来、子実体形成および非形成単核体の生活環におけるRNA Seq解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田泰久
2. 発表標題 担子菌類が生産する糖質およびタンパク質分解酵素に関する研究
3. 学会等名 日本きのこ学会第23回大会（受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北野修也、福田泰久、白坂憲章
2. 発表標題 <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> （トキイロヒラタケ）における色素タンパク（PsPCP）遺伝子抑制による色素欠乏子実体の形成
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部2021年度合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷春花、福田泰久、白坂憲章
2. 発表標題 Pleurotus salmoneostramineus (トキイロヒラタケ) NBRC31859株ネオハプロントおよびミトコンドリアDNAの全ゲノム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部2021年度合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小西康仁、福田泰久、白坂憲章
2. 発表標題 Paenibacillus属由来の -1,3-グルカナーゼによるマツタケ細胞壁成分の消化
3. 学会等名 日本きのこ学会第24回(2021年度)大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------