

Short Report

ウシグソヒトヨタケ傘成長欠損突然変異体の組織学的・遺伝学的解析

傘成長欠損突然変異体#299 の解析

煙山和樹<sup>1</sup>, 村口 元<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

担子菌のモデル生物ウシグソヒトヨタケは、傘と柄を持つ典型的なキノコを形成する。この菌の一核性子実体形成株#326に紫外線を照射して作出した子実体形成過程の発生突然変異体の中に傘組織が成長しない（傘成長欠損: *cap-growthless*: *cag*）突然変異体#299を見出した。傘組織が成長する分子のメカニズムを解明するために、この傘成長欠損突然変異体の組織学的・遺伝学的解析を行った。子実体原基の外見はさほど違いがないが、*cag* 突然変異体では子実体原基内部で子実層の分化が起こっていないように思われた。遺伝解析の結果から、*cag* 表現型が1遺伝子の突然変異によることが分かったので、この原因遺伝子を *cag1* と名付けた。RAPD マーカーとの連鎖解析により、*cag1* 遺伝子が第 IX 染色体に座乗していることが分かった。野生型 *cag1* 遺伝子を特定するために、野生型 Okayama-7 株から構築した BAC ライブラリーより、第 IX 染色体由来の BAC クローンを選んで *cag1* 突然変異体に導入し、相補活性を調べた。その結果、BAC クローン 7H8 と 1F2 が相補活性を持っていることを突き止めた。

キーワード：担子菌，ウシグソヒトヨタケ，子実体形成，傘成長

序文

担子菌ウシグソヒトヨタケは、担子菌のモデル生物となっており、担子菌の生理・遺伝・形態形成・ゲノム解析の材料として世界各地で研究され情報が蓄積されて来ている (Stajich et al., 2010)。この菌の子実体形成は、栄養菌糸の中に菌糸塊 (hyphal knots) が形成されるところから始まる (図 1)。菌糸塊の中心は細胞が密に存在し、その周囲にはペイル細胞に似た拡散伸展成長 (diffuse extension growth, Kamada, 1994) する細胞がつながって放射状に外部に伸びている (van der Valk & Marchant, 1978)。次に菌糸塊の大きさが 1~2 mm となると菌糸塊の片側 (通常は下方) が原基軸 (primordial shaft) へと分化し、その反対側 (上方) に傘組織が分化して子実体原基となる (Muraguchi & Kamada, 1998)。傘の上部にはペイル細胞が数珠つなぎとなって伸びてくる。

数 mm の大きさになった子実体原基は、光刺激に

より子実体成熟期に入り、続く暗期中に担子器細胞中にて核融合が起こり、すぐに減数分裂に入る。

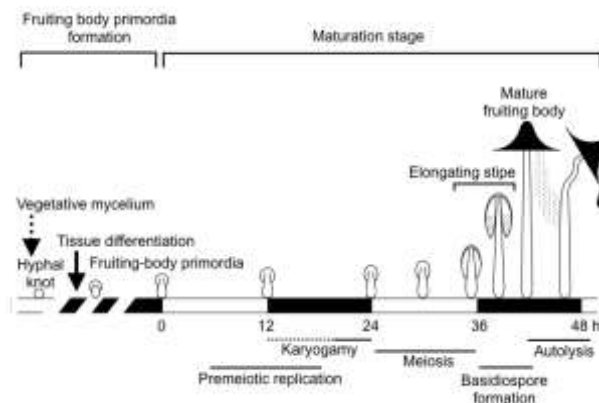


図 1 ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程  
子実体成熟の引き金となる光刺激の時期を 0 hr として 12 hr-light/12 hr-dark の明暗周期を与えた場合の子実体形成過程を描いている。下段には、担子器細胞中での出来事を示している。

減数分裂が終わる頃に、柄が伸長して傘が開き、減数分裂の結果として形成される担子胞子が担子器上に出現する。ウシグソヒトヨタケの担子胞子は表面が黒いため、担子胞子形成に伴い傘全体が黒くなる。担子胞子形成後、傘組織は自己分解を起こし、子実体全体が溶け、一夜で姿を消すことになる。

私たちの研究室では、このウシグソヒトヨタケの子実体形成の分子的機構を明らかにするために、子実体形成過程に異常を示す発生突然変異体を誘発し、その原因遺伝子を同定し、解析して来た (Muraguchi and Kamada, 1998; Muraguchi & Kamada, 2000; Terashima et al., 2005; Muraguchi et al., 2008a, 2008b; Kuratani et al., 2009; Shioya et al., 2013)。本研究では、傘組織の一部が分化しているものの、その成長が起らない傘成長欠損突然変異体 (cap-growthless) #299 の解析を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 菌株と培養条件

本研究に使用したウシグソヒトヨタケの菌株を表 1 に示す。

表 1. 使用したウシグソヒトヨタケの菌株

Strain	Genotype	Description
#326	<i>AmutBmut pab1-1</i>	Honokaryotic fruiting
#299	<i>AmutBmut pab1-1 cag1-1</i>	Honokaryotic fruiting
#292	<i>A381 trp1-1, 1-6</i>	
KF3#2	<i>A91 B91</i>	
KF3#10	<i>A92 B92</i>	
F1#58	<i>A3 B1 trp1-1, 1-6 cag1-1</i>	Recipient
F1#2	<i>A92 B92 cag1-1</i>	Tester

栄養菌糸の生育や子実体形成のために MYG (1% malt extract; 0.4% yeast extract; 0.4% glucose) 培地 (Rao & Niederpruem, 1969) を用い、28°C で 12 時間明期/12 時間暗期の光条件で培養を行った。

### 突然変異誘発

一核性子実体形成株 #326 のオイディア (無性胞子) を滅菌蒸留水に懸濁し、オイディア懸濁液をシャーレ内で攪拌しながら致死率 90% 程度になるよ

うに暗黒下で紫外線を照射した。オイディア懸濁液を MYG 培地に撒いて、暗黒下で 4 日間 28°C にて培養し、生存菌株を MYG スラント培地に植菌して、子実体を形成させて、子実体形成過程の発生突然変異体をスクリーニングした。この発生突然変異体の中に、傘成長欠損突然変異体 #299 を見出した。

### 遺伝解析

#299 株と KF3#2 株を交配して子実体を形成させて、F1 胞子からの発芽体を Miles ら (1966) の方法に従って実体顕微鏡下で針で拾い上げ、MYG 培地に植菌して F1 子孫約 100 株を単離した。この F1 子孫株に検定用株 (Tester) を交配し、表現型の分離を観察した。

### RAPD 解析

上記の F1 子孫から野生型 20 株と突然変異体 20 株を選び、各株のゲノム DNA を CTAB 法 (Zolan & Pukkila, 1986) を使って抽出して RAPD PCR の鋳型とした。本菌の 13 本の染色体に位置付けられた RAPD マーカー (Muraguchi et al., 2003) の中から、表 2 に示すように、1 つのプライマーで違う染色体由来のより多くの RAPD バンドを生じるプライマーを選んで、RAPD PCR を行った。

表 2. 連鎖染色体特定に使用した RAPD プライマー

RAPD プライマー	RAPDが座乗する 染色体番号
R9	IX, IV, VIII, X
G5	XI, II
R7	IV
R5	XII
G4	VII, V, II
E18	III
A11	IX, XIII, VI, II, VII
A3	XIII, VII
E7	IX, XI
E19	IV, VIII, X

### 形質転換実験

形質転換受容菌株 #58 を MYG 培地に植菌して、28°C で約 10 日培養し、菌糸体を生育させた。9 cm シャーレ 1 枚に育った菌糸体の上に、5 mL の MM

溶液 (0.5 M Mannitol, 0.05 M Maleate, pH5.5) を注ぎ、菌糸体上をスプレッダーで擦って、オイディア懸濁液を得た。このオイディアからプロトプラストを調製して、PEG-Ca<sup>2+</sup>法 (Binniger et al., 1987) によって形質転換を行った。子実体形成過程の表現型を観察するために、トリプトファン要求性の回復した株をテスター株 F1#2 と交配して二核菌糸を作り、スラント MYG 培地に植えて、子実体を形成させた。

## 結果

### 傘成長欠損突然変異体の表現型解析

一核性子実体形成株#326 に紫外線を照射して子実体形成過程の発生突然変異体を誘発し、得られた発生突然変異体の中に傘成長欠損突然変異体#299を見出した (図2)。野生型と傘成長欠損突然変異体の子実体原基に外見上はあまり差がない。しかし、切片を切り、内部構造を観察すると、壁組織が分化していないように思われた (図3)。

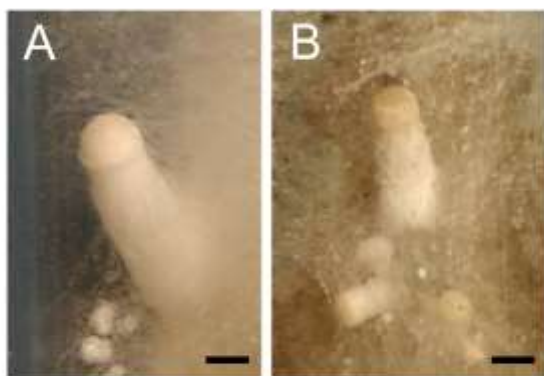


図2 傘成長欠損突然変異体

A: 野生型の子実体原基, B: 傘成長欠損突然変異体 (*cag1-1*) の子実体原基. スケールバー: 1 mm

傘成長欠損突然変異体#299 株の突然変異形質が幾つの遺伝子変異に基づくものかを決定するために、#299 株と野生型一核菌糸株 KF3#2 を交配し、その F1 子孫をテスター株と交配して子実体形成過程の表現型を観察したところ、野生型: 突然変異型が 47: 65 に分離した。この分離比は、1つの遺伝子が

突然変異したことによって、傘成長欠損が起こっていることを意味している。この変異した1つの遺伝子を *cap-growthless1* (*cag1*) と命名した。

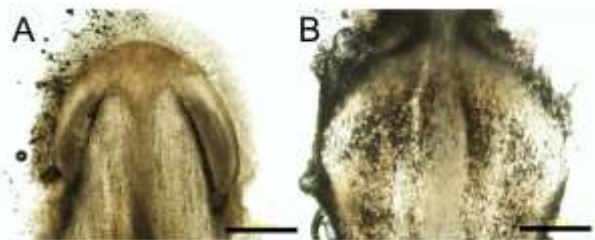


図3 傘成長欠損突然変異体の内部構造

A: 野生型の子実体原基の縦断面, B: 傘成長欠損突然変異体 (*cag1-1*) の子実体原基の縦断面. スケールバー: 0.5 mm

### 傘成長欠損突然変異体の遺伝解析

*cag1* 遺伝子座がどの染色体に座乗するのかを決定するために、上記の F1 子孫から野生型 20 株と突然変異体 20 株を選抜してマッピング集団とした。各株のゲノム DNA を抽出して RAPD PCR の鋳型として、表現型と連鎖する RAPD マーカーを探したところ、図4に示すように、組換え率 15%で連鎖する RAPD マーカー G13-900B を見出した。このマーカーは第 IX 染色体に位置していたので、*cag1* 遺伝子座は第 IX 染色体にあることが判明した。

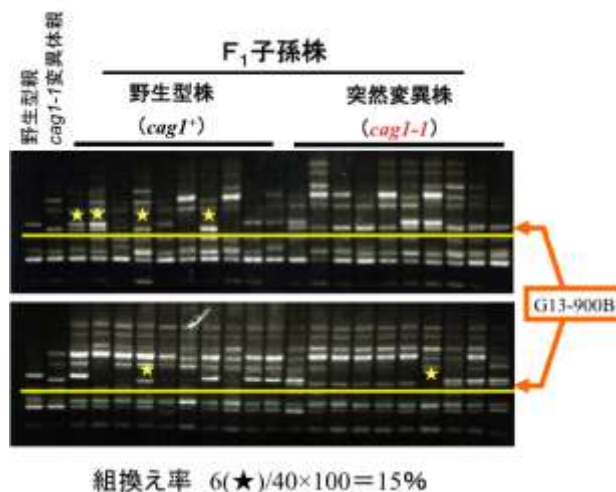


図4 G13 RAPD プライマーによって増幅された DNA の電気泳動

G13-900B のバンドが *cag1-1* と組換え率 15%で連鎖している。

## 相補活性試験

野生型 *cag1* 遺伝子を特定するために、第 IX 染色体由来で G13-900B マーカー近傍の BAC DNA を形質転換受容菌株#58 に導入し、トリプトファン要求性が回復した形質転換体 (Trp<sup>+</sup>株) について子実体形成過程の表現型を観察した。導入した BAC DNA のゲノム上の位置と Trp<sup>+</sup>株数あたりの Cag1<sup>+</sup>株数を図 5 に示す。BAC クローン 7H8 と 1F2 が *cag1-1* を相補する活性を持っており、この領域に野生型 *cag1* 遺伝子があることを示唆していた。

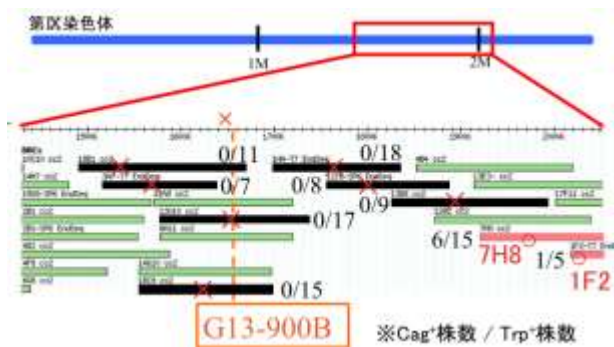


図5 第 IX 染色体由来の BAC クローンの相補活性  
黒塗りのバーは相補活性がなかった BAC クロ  
ーンを示し、赤塗りのバーは相補活性のあったク  
ローンを示している。

## 考察

一核性子実体形成株#326 に紫外線を照射して、傘成長欠損突然変異体を得た。その表現型は傘部分が認められるものの、内部構造的には子実層の分化が起こっていないように思われた。子実層には、将来、減数分裂する細胞である担子器細胞が分化する。担子器細胞が分化するための経路に Cag1 タンパク質の機能がどのように関与しているのか興味深い。

今後は、相補活性を持っていた BAC DNA 内のどの遺伝子が *cag1* 遺伝子であるのかを突き止め、*cag1* 遺伝子がコードするタンパク質を明らかにする必要がある。

## 文献

- Binniger, D.M., Skrzynia, C., Pukkila, P.J., Casselton, L.A. (1987). DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J.* 6, 835–840.
- Kamada, T. (1994). Stipe elongation in fruit bodies, in: Esser, K., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota I*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 367–379.
- Kuratani, M., Tanaka, K., Terashima, K., Muraguchi, H., Nakazawa, T., Nakahori, K., Kamada, T. (2009). The *dst2* gene essential for photomorphogenesis *Coprinopsis cinerea* encodes a protein with a putative FAD-binding-4 domain. *Fungal Genet. Biol.* 47, 152-158.
- Miles, P.G., Takemaru, T., Kimura, K. (1966). Incompatibility factors in the natural population of *Schizophyllum commune*. I. Analysis of the incompatibility factors present in fruit bodies collected within a small area. *Bot. Mag. (Tokyo)* 79, 693–705.
- Muraguchi, H., & Kamada, T. (1998). The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development* 125, 3133-3141.
- Muraguchi, H., & Kamada, T. (2000). A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome P450 of *Coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis. *Fungal. Genet. Biol.* 29, 49-59.
- Muraguchi, H., Ito, Y., Kamada, T., Yanagi, S.O. (2003). A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs and restriction fragment length polymorphisms. *Fungal. Genet. Biol.* 40, 93-102.
- Muraguchi, H., Kamada, T., Yanagi, S.O. (2005). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience* 46, 49-53.
- Muraguchi, H., Fujita, T., Kishibe, Y., Konno, K., Ueda, N., Nakahori, K., Yanagi, S.O., Kamada, T. (2008). The *exp1* gene essential for pileus expansion and

- autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein. *Fungal Genet. Biol.* 45, 890-896.
- Muraguchi, H., Abe, K., Nakagawa, M., Nakamura, K., Yanagi, S.O. (2008). Identification and characterisation of structural maintenance of chromosome 1 (*smc1*) mutants of *Coprinopsis cinerea*. *Mol. Genet. Genomics.* 280, 223-232.
- Rao, P.S., & Niederpruem, D.J. (1969). Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J. Bacteriol.* 100, 1222-1228.
- Stajich, J., Wilke, S., Ahren, D., Au, C.H., Birren, B., Borodovsky, M., Burns, C., Canback, B., Casselton, L., Cheng, C.K., Deng, J., Dietrich, F., Fargo, D., Farman, M., Gathman, A., Goldberg, J., Guigó, R., Hoegger, P., Hooker, J., Huggins, A., James, T., Kamada, T., Kilaru, S., Kodira, C., Kües, U., Kupfer, D., Kwan, H.S., Lomsadze, A., Li, W., Lilly, W., Ma, L.J., Mackey, A., Manning, G., Martin, F., Muraguchi, H., Natvig, D., Palmerini, H., Ramesh, M., Rehmeier, C., Roe, B., Shenoy, N., Stanke, M., Hovhannisyan, V.T., Tunlid, A., Velagapudi, R., Vision, T., Zeng, Q., Zolan, M., Pukkila, P. (2010). Genome evolution in mushrooms: Insights from the genome and assembled chromosomes of *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11889-11894.
- Shioya, T., Nakamura, H., Ishii, N., Takahashi, N., Sakamoto, Y., Ozaki, N., Kobayashi, M., Okano, K., Kamada, T., Muraguchi, H. (2013). The *Coprinopsis cinerea* septin Cc.Cdc3 is involved in stipe cell elongation. *Fungal Genet. Biol.* 58-59 : 80-90.
- Terashima, K., Yuki, K., Muraguchi, H., Akiyama, M., Kamada, T. (2005). The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics* 171: 101-108 (2005).
- van der Valk, P., Marchant, R., (1978). Hyphal ultrastructure in fruit-body primordia of the basidiomycetes *Schizophyllum commune* and *Coprinus cinereus*. *Protoplasma* 95, 57-72.
- Zolan, M.E., & Pukkila, P.J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell Biol.* 6, 195-200.

謝辞

本研究の一部は、平成25年度学長プロジェクト「再チャレンジ研究」の支援を受けて行った。

The authors would like to thank Enago ([www.enago.jp](http://www.enago.jp)) for the English language review.

〔平成26年8月9日受付〕  
〔平成26年9月19日受理〕

## Histological and genetical analyses of a cap-growthless mutant in *Coprinopsis cinerea*

Analysis of the cap-growthless mutant #299

Kazuki Kemuriyama<sup>1</sup>, Hajime Muraguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

*Coprinopsis cinerea* is one of the model organisms of basidiomycetes. We have isolated developmental mutants defective in fruiting body morphogenesis, and found a cap-growthless mutant #299, which produced fruiting body primordia but failed to undergo cap enlargement. Vertical sections of the mutant primordia revealed the absence of gills in its upper region. Genetic analysis of the mutant indicated that its phenotype is caused by a mutation in a single gene, which was named *cap-growthless1* (*cag1*). We screened for rapid amplified polymorphic DNA (RAPD) markers that were linked to the *cag1* gene and identified RAPD marker G13-900B, which is located on chromosome IX. G13-900B is linked to *cag1*, with 15% of recombination rate. To identify the *cag1* gene, we transformed a mutant recipient strain #58 using bacterial artificial chromosome (BAC) DNAs derived from chromosome IX of the wild-type strain Okayama-7. We identified BAC clones, 7H8 and 1F2, which harbored DNA that can completely rescue the mutant phenotypes. These results suggest that the *cag1* gene is located within the overlapping region between 7H8 and 1F2.

**Keywords:** basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*, fruiting body morphogenesis, cap growth