

Short Report

ウシグソヒトヨタケ子実体未成熟突然変異体の遺伝学的・組織学的解析

子実体未成熟突然変異体#1016 の解析

村口元, 畑中こずえ

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、子実体形成過程に異常を示す発生突然変異体をスクリーニングしたところ、子実体原基の形が扁平（奇形：malformed）となり、子実体成熟過程に入るが未成熟のまま止まる突然変異体#1016 株を見出した。子実体成熟の分子メカニズムを解明するために、この子実体未成熟突然変異体の組織学的・遺伝学的解析を行った。遺伝解析の結果は表現型が1つの遺伝子の突然変異によってもたらされていることを示していたので、突然変異の原因遺伝子座を *mal1* と名付けた。RAPD マーカーとの連鎖解析により、*mal1* 遺伝子が第 III 染色体に座乗していることが分かった。*mal1* 突然変異体の未成熟子実体の外見は、野生型が連続明条件下で育てられた時の表現型に似ていた。傘の裏にある担子器内で減数分裂中にある染色体の様子を DAPI 染色により観察したところ、成熟が停止する時期の *mal1* 突然変異体でも、野生型と同じく太糸期（pachytene）の染色体を観察することができた。

キーワード：担子菌，ウシグソヒトヨタケ，子実体形成，子実体成熟，減数分裂

担子菌ウシグソヒトヨタケは、担子菌のモデル生物として、担子菌の生理や遺伝、形態形成、ゲノム情報の理解のために世界的に利用され、様々な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、その周囲にはベ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）。傘の上部にはベ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

応答して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。

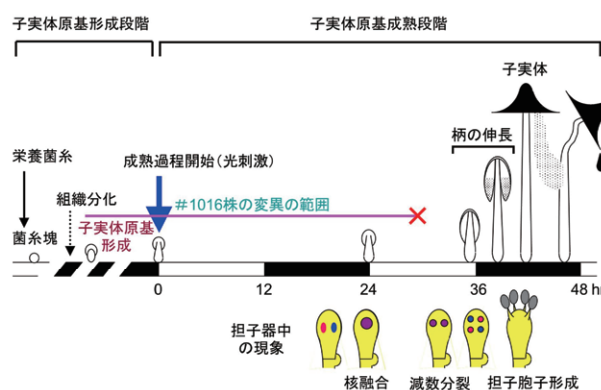


図1 ウシグソヒトヨタケの子実体形成過程

12 hr-light/12 hr-dark の明暗周期を与えて育てると、図中の 0 hr の光によって、子実体成熟過程が

始まる。本研究対象の#1016 突然変異体株は 30 hr 頃に成熟過程が停止する。

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。

ウシグソヒトヨタケの子実体形成の分子メカニズムを解明するために、子実体形成過程に異常を示す発生突然変異体が単離され、その原因遺伝子が同定・解析されてきた (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、子実体原基の形が扁平となり (malformed)、子実体成熟期に入るが、未成熟のままで発育が停止する突然変異体#1016 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>	Monokaryotic fruiter
#1016	<i>AmutBmut pab1-1 mal1-1 mal1-1 mutant</i>	
KF3#2	<i>A91B91</i>	
KF3#10	<i>A92B92</i>	
F1#19	<i>A92B92 mal1-1</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℃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℃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、子実体未成熟突然変異体#1016 を見出した。

遺伝解析

#1016 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を用いて拾い上げ、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、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 (煙山と村口, 2014) を選んで、RAPD PCR を行った。

担子器中の染色体の観察

担子器中の染色体の観察は、Lu (1993)の方法を改変して行った。固定液の調製：16%Formaldehyde Solution(w/v), Methanol-free (Thermo Scientific) に等量の MQ 水を加え、8%にして-20℃で保存した。固定液 A は、保存しておいた 8%Formaldehyde 液に、等量のホウ酸 pH 標準液 (pH9.18, Wako) を加えて 4% Formaldehyde にしたものである。固定液 B は、使用直前に 20 μ L の固定液 A に 1 μ L の 1%SDS を加えて 0.05%SDS にしたものである。

試料の観察：40 μ L の固定液 A を 1.5 mL マイクロチューブに入れて氷中に冷やしておく。傘の辺縁部から約 1 mm 角の襞組織をメスで切り取り、冷えた固定液 A 中に 4 分置いた。ペスツールで組織を 2 分間潰し、液を広口チップで 10 μ L だけ吸い取り、蛍光顕微鏡用スライドガラスに置いた。固定液 B を 10

μL 加え、湿室中で 30 分間固定した。このとき、固定液中では、SDS が 0.025% となって核膜を破壊し、染色体が放出される。固定後、チップで固定液を出来るだけ吸い取り除去し、ドライウェル（等量のホウ酸 pH 標準液 pH9.18 を加え、pH 調整したもの）を 50 μL をそっと置き、すぐに吸い取り、風乾する。10 μL の DAPI 染色液（0.05 μg/mL DAPI, 25%グリセリン）を置き、カバーガラスを掛けて、蛍光顕微鏡で染色体を観察した。

結果

子実体未成熟突然変異体の表現型と遺伝解析

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、子実体原基の形態が少し扁平となり（図 2B）、子実体成熟期に入るものの、正常に成熟しないままで成長が停止する（図 2C）突然変異体を見出した。

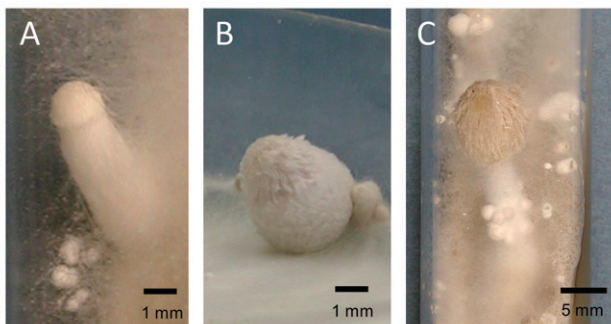


図 2 子実体未成熟突然変異体

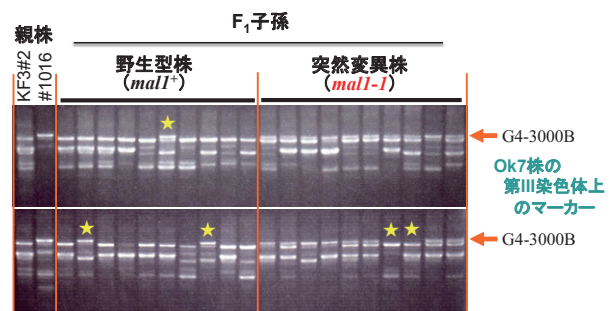
A: 野生型の子実体原基, B: 子実体未成熟突然変異体 (*mal1-1*) の子実体原基, C: 未成熟状態で成長を停止したところ。

子実体未成熟突然変異体#1016 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、#1016 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 41 : 34 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、成熟停止が起こっていることを意味している。この変異した 1 つの遺伝子座を扁平な子実体原基の形に因んで *malformed1*

(*mal1*) と命名した。

mal1-1 突然変異体の連鎖解析

mal1 遺伝子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 12.5% で連鎖する RAPD マーカー G4-3000B を見出した。このマーカーは第 III 染色体に位置していたので、*mal1* 遺伝子座は第 III 染色体上にあると判明した。



組換え率 $5(★)/40 \times 100 = 12.5\%$

図 3 G4 RAPD プライマーによって増幅された DNA の電気泳動像

mal1-1 突然変異体の染色体の観察

mal1-1 突然変異体の表現型は、野生型株が連続明条件下で育てられたときに観察される未成熟原基の形質に酷似していた。未成熟で発生が停止する時期が減数分裂中であつたので（図 1）、減数分裂中の染色体の様子を観察することによって、どの時期まで減数分裂が進行しているのかを観察した。

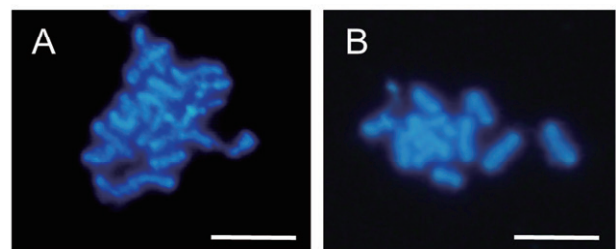


図 4 30hr 時点の担子器中の染色体

A: 野生型, B: *mal1-1* 突然変異体 スケールバーは、5 μm を示す。

図4に示すように、30hr時点で野生型と *mall-1* 突然変異体ともに正常な二価染色体が形成されていた。

考察

一核性子実体形成株に紫外線を照射して得た発生突然変異体の中に、子実体未成熟のまま発生を停止する突然変異 (*mall-1*) を見出した。その表現型は、野生型株が連続明条件下で育てられたときに観察される形質に酷似していた。連続明条件下で育てられた野生型株では、担子器内で2核が融合した後に減数分裂が進行しない。担子器内の染色体を観察してみると、*mall-1* 突然変異体では太糸期まで減数分裂が進行していることが分かった。このことは、Mallタンパク質が太糸期以降の段階で機能することを示唆している。今後、*mall* 遺伝子にどんなタンパク質がコードされているのかを突き止める実験が必要である。

謝辞

染色体の観察法について、アメリカノースキャロライナ大学の P. J. Pukkila 博士にアドバイスを頂いた。本研究の一部は、平成23年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「突然変異育種法を利用した栽培きのこの有用形質創出とそのDNAマーカーの開発」および平成26年度学長プロジェクト「創造的研究」の支援を受けて行った。

文献

- Kamada, T. (1994). Stipe elongation in fruit bodies, in: Esser, K., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota I*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 367-379.
- Kemuriyama, K., & Muraguchi, H. (2014). Histological and genetical analyses of a cap-growthless mutant in *Coprinopsis cinerea*: Analysis of the cap-growthless mutant #299. *Akita Prefectural University Web Journal B*, 1, 1-6.
- 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.
- Lu, B. C. (1993). Spreading the synaptonemal complex of *Neurospora crassa*. *Chromosoma*, 102, 464-472.
- 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., Fujita, T., Kishibe, Y., Konno, K., Ueda, N., Nakahori, K., Yanagi, S.O., Kamada, T. (2008a). The *expl* 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. (2008b). 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.J. (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.
- 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.

The authors would like to thank Enago (www.enago.jp) for the English language review.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Genetic and cytological analyses of *Coprinopsis cinerea* *mall-1* mutant defective in the fruiting body maturation

Analysis of the malformed mutant #1016

Hajime Muraguchi, Kozue Hatanaka

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

The basidiomycete *Coprinopsis cinerea* is one of the model organisms in basidiomycetes. We isolated developmental mutants defective in fruiting body morphogenesis and found one mutant (#1016) which produces malformed fruiting body primordia and fails to mature during fruiting. Genetic analysis of the mutant indicated that its phenotype is caused by a mutation in a single gene, which was named *malformed1* (*mall*). We screened for rapid amplified polymorphic DNA (RAPD) markers that were linked to the *mall* locus, and identified the RAPD marker G4-3000B on chromosome III. G4-3000B is linked to *mall* and has a recombination rate of 12.5%. The appearance of the immature fruiting bodies of the *mall* mutant is reminiscent of that of the wild-type fruiting body grown under continuous light conditions. In the wild-type fruiting, the continuous light conditions result in fused nuclei that never enter meiosis. Because fruiting body maturation is arrested during meiosis in the *mall-1* mutant, we observed chromosomes released from basidial cells. Normal bivalent chromosomes were observed in the *mall-1* mutant during the pachytene stage of meiosis, suggesting that the *mall* gene encodes a protein that plays a role after pachytene.

Keywords: basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*, fruiting body morphogenesis, fruiting body maturation