

## モデルきのこ「ウシグソヒトヨタケ」におけるセプチン動態の観察

## 栄養菌糸のクランプ形成時のセプチン Cc.Cdc3・10・12 の挙動

村口元<sup>1</sup>, 松淵美月<sup>1</sup>, 菅生麻友<sup>1</sup>, 能勢敏明<sup>2</sup><sup>1</sup> 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科<sup>2</sup> 秋田県立大学システム科学技術学部電子情報システム学科

ウシグソヒトヨタケは担子菌のモデル生物であり、担子菌の子実体形成を分子レベルで理解するための手掛かりを与えてくれる。本菌の発生突然変異体の中に、子実体の柄が伸長しない柄伸長欠損突然変異体 (*elongationless*) を見出し、その原因遺伝子の 1 つ *eln8* を特定したところ、出芽酵母の Cdc3 セプチンと相同なタンパク質 (Cc.Cdc3 と命名) をコードしていた。ゲノム情報から、ウシグソヒトヨタケには、少なくとも 6 種類のセプチン (Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.Cdc12, Cc.AspE) が存在すると予想された。本研究では、Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc12 を緑色蛍光タンパク質 (EGFP) あるいは赤色蛍光タンパク質 (mCherry) で標識し、成長中の栄養菌糸 (二核菌糸) について 30 秒毎に緑色蛍光と赤色蛍光を交互撮影し、動画を作成した。クランプ形成時に、クランプ突出部の前後の細胞膜にセプチンが集合した後、後部の集合体が隔壁部に移行する様子を観察することができた。細胞内でセプチンは一過的に集合する場合と長期に渡って集合する場合があることが分かった。

キーワード：担子菌，ウシグソヒトヨタケ，栄養菌糸，セプチン，隔壁形成

ウシグソヒトヨタケは担子菌のモデル生物として 2003 年に全塩基配列が解読され、そのゲノム情報が公開され整備されてきた (Stajich et al., 2010)。このキノコの染色体地図はまず栄養要求性マーカーを使って描かれ (Takemaru, 1982)、その後、分子マーカー (RFLP, RAPD) を使って 13 本の全染色体にわたる連鎖地図が作成された (Muraguchi et al., 2003)。1980 年代後半には形質転換系が確立され (Binniger et al., 1987)、分子生物学的解析が可能となっている。近年、RNA-seq 解析により子実体形成過程における全遺伝子 (約 14000 個) の発現状況も明らかになってきた (Muraguchi et al., 2015)。

通常、担子菌の子実体は、交配型の互いに違う一核菌糸同士が接合してできる二核菌糸によって形成されるが、ウシグソヒトヨタケの特定の菌株では一核菌糸であるにもかかわらず、子実体を形成する。すなわち、核相が n でも子実体を形成する一核性子実体形成株が存在する。1980 年代初めに野外から単

離された二核菌糸株 CopD の F<sub>1</sub> 子孫 CopD5-12 が一核性子実体形成能を持っていた。

一核性子実体形成株が作る無性胞子 (オイディア) に紫外線を照射して突然変異を誘発すると、子実体形成過程における劣性突然変異を容易に見出すことができる。この手法により、子実体形成過程に異常を示す発生突然変異体が多数単離され解析されてきた (Muraguchi et al., 1999)。

一核性子実体形成株 CopD5-12 から誘発された突然変異体の中に、子実体の柄が伸長しない柄伸長欠損 (*elongationless*) 突然変異体があった (図 1)。その原因遺伝子の 1 つ *eln8* を特定したところ、出芽酵母の Cdc3 セプチンと相同なタンパク質をコードしていることが判明した。それゆえ、*eln8* を *Cc.cdc3* と改名することにした (Shioya et al., 2013)。

Cc.Cdc3 の細胞内局在を観察するために、Cc.Cdc3 に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合して、ウシグソヒトヨタケの細胞で発現させ、EGFP の緑色蛍光を

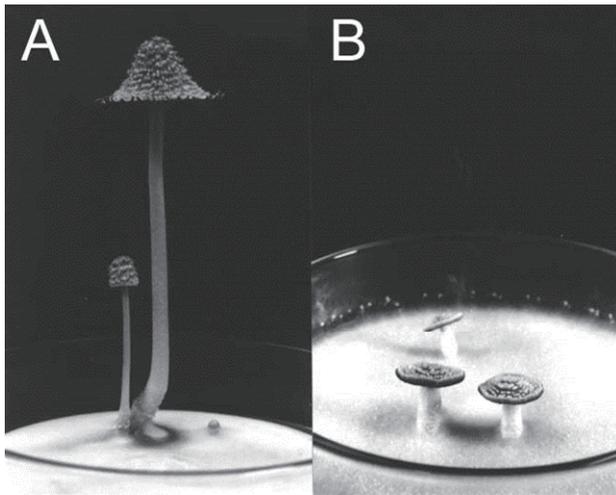


図1 *eIn8-1*柄伸長欠損突然変異体  
 A: 野生型子実体 (CopD5-12)  
 B: *eIn8-1*柄伸長欠損突然変異体  
 (Muraguchi et al., 1999 より)

観察してみると、伸長中の柄細胞の細胞膜直下に多数の繊維を見ることができた。さらに、柄細胞だけでなく、栄養菌糸の先端や隔壁にもEGFPの蛍光を観察することができた。このようなCc.Cdc3細胞内局在性から、Cc.Cdc3セプチンは柄細胞の伸長時だけでなく、栄養菌糸伸長や隔壁形成にも関与することが示唆された (Shioya et al., 2013)。

セプチンは当初、出芽酵母の細胞分裂周期 (Cell division cycle) に異常を示す突然変異体 (Cdc mutants) の原因遺伝子にコードされる一群のタンパク質として見出された (Hartwell, 1971)。出芽酵母の栄養成長時には、Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12, Shs1 という5種類のセプチンが発現する。これらのセプチンは互いに結合して複合体を形成し、さらに重合して繊維を形成することが知られている (Bertin et al., 2008)。ウシグソヒトヨタケのゲノム中には、出芽酵母のセプチンと相同なCc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.Cdc12とコウジカビのAspEに対応するCc.AspEの少なくとも6種類のセプチンをコードする遺伝子が存在している。

本実験では、Cc.Cdc3に赤色蛍光タンパク質mCherryを融合し、Cc.Cdc10とCc.Cdc12にEGFPを融合して、それらを共発現させた二核菌糸を作成し、栄養菌糸中での2種のセプチンの細胞内局在を

観察したので報告する。

## 材料と方法

### 菌株と培地

本研究に使用したウシグソヒトヨタケの菌株は、2種類の二核菌糸株 B87#4 (*A12B1 Cc.Cdc3-1 EGFP-Cc.cdc10*) × F1#5 (*A2B2 mCherry-Cc.cdc3*) と B87#38 (*A12B1 Cc.Cdc3-1 EGFP-Cc.Cdc12*) × F1#5 (*A2B2 mCherry-Cc.cdc3*) である。顕微鏡観察のための栄養菌糸培養には、最少培地 (20g Glucose, 1.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 120 mg Thiamine, 0.46 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /1L) (Takemaru, 1982) を用いた。

### 蛍光タンパク質標識

Cc.Cdc10のN末端側にEGFPを融合するため、Gene sawing法を使って発現ベクターを構築した。また、Cc.Cdc12のN末端側にEGFPを融合するためには、FastCloning法 (Li et al., 2011) を使って発現ベクターを構築した。

### 顕微鏡観察

カバーガラス (55×24 mm) 上に滴下した液体最少培地 200 μL に菌糸片を植え付け、一晚、28℃あるいは37℃で培養した。厚さ 0.4 mm の2% アガロースクッションをスライドガラス上に作成し、栄養菌糸を培養したカバーガラスをアガロースクッション上に被せ、1時間以上室温あるいは28℃で培養した。蛍光顕微鏡 Nikon E600 にデジタルカメラ DP72 (Olympus) をセットし、伸長中の栄養菌糸を観察した。顕微鏡のステージには、37℃にセットしたサーモプレート (東海ヒット) を置き、その上にスライドガラスを置いて、菌糸を成長させた。

### タイムラプス撮影

Lumina Vision (三谷商事) のタイムラプス撮影機能において、撮影間隔を30秒に設定した。フィルター交換は、#1 フィルター：蛍光撮影、#2 フィルター：ダミー、#3 フィルター：明視野撮影を設定した。

### Arduino を使ったシャッター・フィルター交換

蛍光顕微鏡にセットした Arduino, シャッター類の様子を図2に示す. Arduino で3つのサーボモーターを制御し, 励起光用シャッター, 明視野用シャッター, フィルター交換のタイミングをプログラム中で設定した. Lumina Vision の撮影開始時点をモニター画面上にセットした光センサーで感知して, Arduino 中のプログラムが進行するようにした.

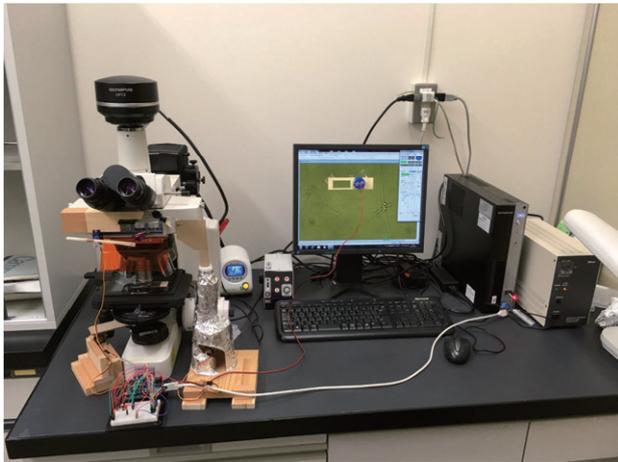


図2 蛍光顕微鏡, Arduino とシャッター類のセット

撮影中にピントがずれないようにするために, #4 明視野撮影の後に, タイムラプス撮影を一時停止し, モニター画面にてピントを合わせた後にタイムラプス撮影を再開させた.

### 画像処理

撮影画像は TIFF フォーマットで保存した. このファイルを Mac Mini(Apple) 中で iMovie を使って, 動画ファイルに変換した. トリミング・画像回転が必要な場合は, XnConvert を用いて加工した.

## 結果

### Cc.Cdc10 と Cc.Cdc3 の挙動

ウシグソヒトヨタケに存在する6種類のセプチンがいつも同じ挙動を示すかどうかを調べるために, 2種類のセプチンに違う色の蛍光タンパク質を融合し, それらを共発現する二核菌糸株を構築した. まず, EGFP-Cc.Cdc10 と mCherry-Cc.Cdc3 を共発現している二核菌糸の栄養菌糸を観察した (図3).

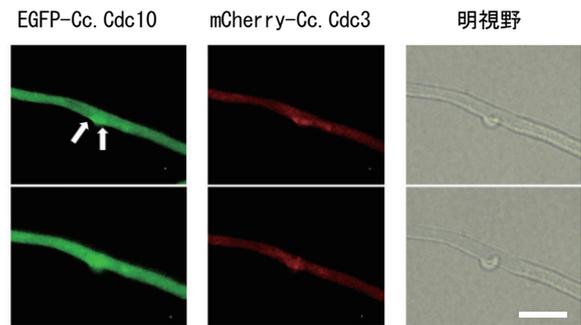


図3 Cc. Cdc10 と Cc. Cdc3 の挙動

上: クランプ突出時 下: 隔壁形成時 bar: 5  $\mu$ m  
左が菌糸先端側 白矢印はクランプ突出前後部位

クランプが突出する際に, Cc.Cdc10 と Cc.Cdc3 は共に突出部位の両脇に集合してくる. 続いて, 隔壁が形成される際には, 突出部位後方に集合していた両セプチンが隔壁部位に移行した.

### Cc. Cdc12 と Cc. Cdc3 の挙動

次に, EGFP-Cc.Cdc12 と mCherry-Cc.Cdc3 を共発現している二核菌糸の栄養菌糸を観察した (図4). Cc.Cdc12 と Cc.Cdc3 の場合でも, クランプ突出時に, Cc.Cdc12 と Cc.Cdc3 は共に突出部位の両脇に集合した. その後, 隔壁形成時の初期において, Cc.Cdc12 と Cc.Cdc3 が共に隔壁部位に移行するが, Cc.Cdc12 が長期にわたって隔壁部位に留まるのに対して, Cc.Cdc3 はより早めに隔壁部位から消失するように思われた (図4下).

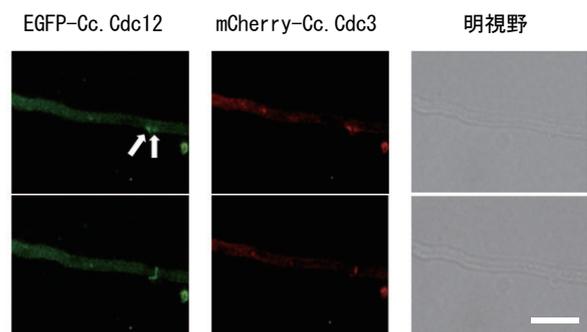


図4 Cc. Cdc12 と Cc. Cdc3 の挙動

上: クランプ突出時 下: 隔壁形成時 bar: 5  $\mu$ m  
左が菌糸先端側 白矢印はクランプ突出前後部位

## 考察

2種類のセプチンにそれぞれ EGFP と mCherry を

融合し、共発現させた栄養菌糸における両セプチンの挙動を観察した。30秒毎の交互撮影によって、クランプ突出時にセプチンが突出部の前後に一過的に集合することが分かった。集合時間が短いために、これまでの蛍光顕微鏡観察では観察できなかったものと推察される。アカパンカビにおける各種セプチンの欠失突然変異体の表現型や局在の違いから、各種セプチンが違った役割を担っている可能性が示唆されている (Berepiki and Read, 2013)。ウシグソヒトヨタケのセプチン間にも役割分担があるのかを調べるために、Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc12 以外のセプチン, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.AspE にも蛍光タンパク質を融合し、セプチン間の動態に差異が見られるかを今後調べる必要がある。

### 謝辞

本研究は平成 28 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。

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

### 文献

Berepiki, A. and Read, N. D. (2013). Septins are important for cell polarity, septation and asexual spore formation in *Neurospora crassa* and show different patterns of localisation at germ tube tips. *PLoS one* 8, e63843.

Bertin, A., McMurray, M. A., Grob, P., Park, S., Garcia III, G., Patanwala, I., Ng, H., Thorner, J. and Nagales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8274-8279.

Binnering, D. M., Skrzynia, C., Pukkila, P. J. and Casselton, L. A. (1987). DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J* 6, 835-840.

Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell

division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69, 265-276.

Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y. and Chang, Y. (2011). FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotech* 11, 92.

Muraguchi, H., Takemaru, T. and Kamada, T. (1999). Isolation and characterization of developmental variants in fruiting using a homokaryotic fruiting strain of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience* 40, 227-235.

Muraguchi, H., Ito, Y., Kamada, T. and Yanagi, S. O. (2003). A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Fungal Genet. Biol.* 40, 93-102.

Muraguchi, H., Umezawa, K., Niikura, M., Yoshida, M., Kozaki, T., Ishii, K., Sakai, K., Shimizu, M., Nakahori, K., Sakamoto, Y., et al. (2015). Strand-Specific RNA-Seq Analyses of Fruiting Body Development in *Coprinopsis cinerea*. *PLoS one* 10, e0141586.

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.

Takemaru, T. (1982). 「担子菌類」. In 『微生物遺伝学実験法』 (ed. 石川辰夫), pp. 243-278: 共立出版.

〔平成29年6月30日受付〕  
〔平成29年7月11日受理〕

## Septin dynamics of *Coprinopsis cinerea*

Behaviour of Cc.Cdc3, Cc.Cdc10 and Cc.Cdc12 in the vegetative hyphae

Hajime Muraguchi<sup>1</sup>, Mitsuki Matsubuchi<sup>1</sup>, Mayu Sugo<sup>1</sup>, Toshiaki Nose<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Electronics and Information Systems, Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University

*Coprinopsis cinerea* is one of the model organisms in basidiomycetes, and has provided clues for our understanding of the molecular mechanisms by which fruiting bodies are formed. We isolated developmental mutants defective in fruiting body morphogenesis and found an elongationless mutant, which fails to elongate the stipe at the final stage of fruiting. The gene responsible for the mutant phenotype encodes a septin protein homologous to Cdc3 in *Saccharomyces cerevisiae*. Database search revealed that *C. cinerea* has at least six septins: Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, Cc.Cdc11a, Cc.Cdc11b, Cc.Cdc12, Cc.AspE. In this study, we tagged Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, and Cc.Cdc12 with EGFP or mCherry, captured photos in 30 sec intervals, and made movies showing septin dynamics in the dikaryotic vegetative hypha. When the clamp protrudes from the hyphal cell wall, Cc.Cdc3, Cc.Cdc10, and Cc.Cdc12 are recruited at the front and rear of the protrusion site. The assembled septins at the rear of the clamp moved to the septum formed in the main hypha. The recruitment of septins at the clamp protrusion site occurred within a few minutes and then disappeared. The movies suggested that the assembled septins at the protrusion site are used in turn for septum formation.

**Keywords:** basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*, fruiting body morphogenesis, septin, vegetative hyphae, clamp formation