

フード ケミカル

月刊

食品のおいしさと安心を科学する技術情報誌
A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals.

2015

11

vol.367

Pick Up!
編集部イチ押し

グリコ栄養食品(株)
GMIX[®]シリーズ②

特集1

ヘルシードーナツの提案

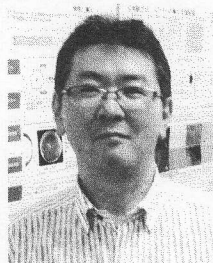
特集2

大豆の機能再発見

特集3

乳化剤の新たな用途展開



マイタケゲノム解析からマツタケの
人工栽培への夢

藤森文啓 Fumihiko Fujimori

東京家政大学 家政学部 環境教育学科 教授

ふじもり・ふみひろ

●略歴 2001年に東京理科大学にて博士の学位取得。日本ロシュ研究員、理化学研究所研究員、東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 助手、講師を経て現大学にて教授。



佐藤真之 Masayuki Sato

株式会社雪国まいたけ 研究開発室 主任研究員

さとう・まさゆき

●略歴 2007年に東洋大学大学院生命科学研究所 生命科学専攻博士前期課程修了。2015年に東京家政大学大学院にて博士(学術)取得。現在、東京家政大学に委託研究員として出向中。専門はキノコなどの分子生物学。

1. はじめに

キノコは古くから食用として利用されており、近年は人工的な栽培によって生産されている。日本国内での生産量は2013年の統計で年間約43万tであり、主要な栽培キノコはエノキタケ(約13万t)、ブナシメジ(約12万t)、シイタケ(約7万t)、マイタケ(約5万t)、エリンギ(約4万t)となっている。

また、キノコおよび菌糸体の抽出成分は抗腫瘍作用や抗酸化作用などの生理活性を示すことが報告されており、医薬品分野でも重要な資源として研究が進められている。栽培キノコの多くが属する白色腐朽菌は地球上で最も難分解性のリグニンを分解できる。この難分解物質の分解能を利用して、穀類の茎や葉、雑草などの植物バイオマス資源の活用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、工業用染料などさまざまな難分解性物質の分解を目的とした研究が行われている。当研究室ではマイタケ(*Grifola frondosa*)の遺伝子情報を解析することで、食用生産への応用に加えて、医学、薬学、工学、農学などへの応用技術の開発を目指して研究を行っている

1-8)。今回のこの誌面ではマイタケのゲノム解析結果からマツタケの人工栽培への夢の実現をどのように模索しているかについて述べたい。

2. マイタケの全遺伝子情報の取得

昨今の遺伝子配列解読技術はシーケンサーの精度向上によって格段に進歩し、例えばヒト全ゲノムであればその昔十数年かかったゲノム解読が数日で完了できる時代となっている。その反面、ゲノム配列中の遺伝子領域、つまりmRNAがコードされている部位の特定をコンピュータで行う「遺伝子予測」の精度はあまり向上していない。設計図であるゲノム配列を読む技術(新規の生物の遺伝子配列決定を*de novo*シーケンス解析という)は進んだが、遺伝子領域の特定にはmRNAを網羅的に扱うトランスクリプトーム情報がないと正確に把握できないのである。公共データベースに登録されているゲノム情報のほとんどは*de novo*として配列を解読しただけであり、重要なmRNAデータが付随しないデータである。

そこで私たちはマイタケのゲノム情報とトランスクリプトーム情報の両方を取得する戦略を採用した^{1,2)}。表1に示すように、マイタケ

表1 5種のキノコゲノムの解読結果の比較

	マイタケ	カワラタケ	マツノオオズラタケ	スエヒロタケ	ツクリタケ	ヒラタケ
シーケンス手法	454+Illumina	454+Illumina+Sanger	454+Illumina	Sanger	Sanger	454+Sanger
ゲノムサイズ (Mb)	33.8	44.79	42.8	38.5	30	35.6
総スキャホールド数	280	283	542	36	29	572
総コンティグ数	1,186	1,443	2,852	352	254	3,272
カバレッジ	×229	×40	×51	×8	×9	×21

マイタケのゲノムデータと公開されているほかの担子菌キノコ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シーケンサーを使用している場合を454、Illumina社のシーケ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。

表2 ゲノムデータにトランスクリプトームデータを参照すると遺伝子予測数が増大する

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	トランスクリプトームデータ	16,097	1196	6,310

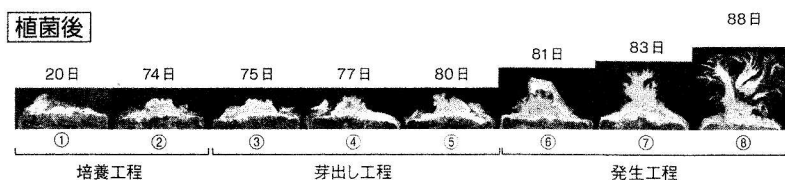
上段は参照情報を用いずに AUGUSTUS の ab initio 法でマイタケゲノム配列から遺伝子予測を行い、下段は先に取得していたマイタケの13生育段階における EST データを参照情報に用いて遺伝子予測を行った結果を示した。

のゲノム解析結果はほかの研究機関が取得した担子菌ゲノムと遜色ない高い精度のデータである。例えばサンガー法などのようにコストのかかるゲノム解読手法で構築されたツクリタケやスエヒロタケのゲノムデータでは総スキャホールド数が29や36となって染色体数に近付いており理想的である。次世代シーケンサーである454シーケンサーとIlluminaシーケンサーで読んだわれわれの結果は、スキャホールド数が280であり同様な方法で読んでいるほかのものよりも少なく精度が高いといえる。また信頼度を高めるカバレッジ数に関しては229倍と群を抜いて高い値であるのが特徴である。このように、低コストで精度の高いゲノム解析によって構築されたマイタケのゲノム情報から、遺伝子予測を行うわけだが、われわれはトランスクリプトーム情報を加味することで、その精度を高めることに成功したのである(表2)。ゲノム情報だけから遺伝子予測を行うと予測遺伝子数は10505であるのに対し、トランスクリプトーム情報を加えて予測するとその数は16097と大幅に増やすことができたのである。これらの結果は、ゲノム解読結果のみで構築されたデータからの遺伝子数予測は過少に見積もられていることを示している。

3. マイタケの生育過程で使われる遺伝子群

一度ゲノム情報を取得できると、網羅的に遺伝子の使われ方を解析できる手法論としてのマイクロアレイ技術を適用することが可能となり研究が格段に進む。取得した遺伝子配列情報をもとに、人工合成した核酸配列をスライドガラス上に数万から十数万ほどスポットされたマイクロアレイを作成することで、検体サンプル中のどの遺伝子がどの程度使われているのかを網羅的に解析することが可能となる。

このような方法でマイタケの菌糸体からキノコと呼ばれる子実体を形成するまでの8段階に及ぶ生育段階(図1)で使われる遺伝子群を網羅的に解析したところ、図2に示すような遺伝子の使われ方をしていることが判明した。すなわち、菌糸生長する培養工程では、培地成分を分解することで子実体の形成に必要な栄養を獲得する、リグニン分解酵素群や糖質関連酵素群の遺伝子が高発現していることがわかった。さらに菌糸から子実体へと生育・分化する時期の芽出しや発生工程では、培地成分の分解に関わる遺伝子群の発現が低下し、その代わりに低分子熱ショックタンパク質であるHSP9やシトクロムP450、プロテアーゼなどの遺伝子群の発現が上昇することが判明した¹⁾。以上のように、マイタケが菌糸から子実体へと分化・生育するときに使われる全遺伝子の動きを捉えることに成功したのである。このマイタケで得られた子実体形成に使われる遺伝子群はおそらくほかのキノコにおいても共通に機能する遺伝子群と推定され



マイタケ栽培工程の八つの段階におけるキノコ生育状況を示した。培養工程で菌糸を十分に培養させ、芽出し工程でキノコの基となる原基の成熟を促し、発生工程でキノコを発生させる。

図1 マイタケの栽培工程におけるキノコ生育の様子

る。もっといえばこれらマイタケで見出された遺伝子と共通のマツタケ遺伝子は、マツタケの子実体形成に関与しているといえるのである。

4. 分化全能性とマツタケ

植物は古くから分化全能性を用いた試験管内での純粋培養ができる生物である。つまり、ニンジンであれば茎、葉、根のどの場所からの細胞もカルス細胞としたのち、ホルモン処理や純化操作によって元の親と同じ形のニンジンへと発生させることができるのである。このような技術を使って蘭や希少植物などの花卉生産が行われている。つまり植物には分化全能性が備わっていて、植物の体細胞を用いて無限にクローンを生産できるのである(図3a)。一方、哺乳類などの受精卵は将来どの臓器や組織にもなることのできる分化全能性がある。しかし成熟した体細胞は発生・分化に伴いその能力は消えて二度と受精卵の状態に戻らないとされていた。

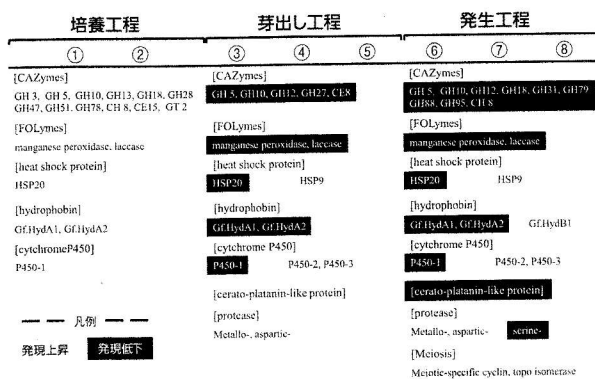
しかし、ノーベル賞で知られるiPS細胞は特定の遺伝子を導入すると、分化が進んでしまった体細胞であっても卵細胞のごとく全能性を再獲得して、ある程度自由に再分化させることが可能になるという意味で、ヒト体細胞も全能性を回復することができるといえる。すなわち全能性を人為的にコントロールできれば、体細胞から自由にどの

ような細胞へも分化をさせられるのだ。キノコもシイタケやマイタケなどは人工栽培で生産されている。菌糸をオガ粉培地や倒木に蔓延させ、最終的にキノコと言われる子実体を発生させることができるのである(図3b)。この場合、菌糸は卵細胞に近い細胞で、子実体は分化した組織・臓器と同様に考えることができる。つまり人工栽培可能なキノコの体細胞から分離培養した菌糸には分化全能性が備わっており、菌糸から子実体を形成させることができるわけで、植物に近いといえる。

しかしマツタケやポルチーニ、トリュフなどは昔から人工栽培に成功していない。この理由はおそらく菌糸体内の全能性を動かす内部遺伝子のスイッチを人為的にコントロールできないからと考えられる。マイタケやシイタケは栽培環境要因や用いる栄養源などの未知の因子によって、比較的簡単に分化全能性の遺伝子スイッチをオンにできるから人工栽培が可能なのだ。一方で分化全能性のスイッチングをコントロールできないかオフのままオンにできない状態がマツタケなのだろう。マツタケは自然界では赤松の根に寄生しながら菌糸の状態生きており、そこから栄養分を得ながら秋に気温が下がるという条件などで、子実体を形成して土の中から出てくる。マツタケの人工栽培の試みは、培地の組成を研究したり、発生条件としての温度や外部環境の刺激をいろいろ試みたり、中には磁力や電気刺激などを試みたりと、いろいろな研究がなされているが人工栽培は実現できていない。つまり、自然界で起こっている菌糸から子実体へと変化するスイッチを人為的に押すことができていないからである。マツタケは菌糸培養まで確立されているのにも関わらずである(図3c)。

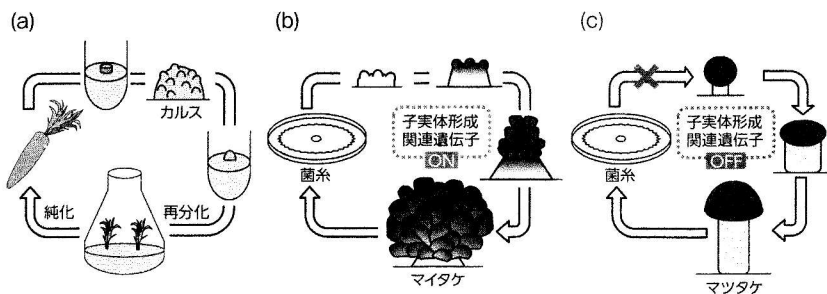
5. 人工栽培モデルとしてのマイタケ

遺伝子組換えは、人為的に外部から遺伝子を細胞に組み込んで働くようにする技術で、分



マイクロアレイによる全遺伝子の発現パターン結果から代表的な発現変動遺伝子に絞って図式した。

図2 栽培工程で発現する遺伝子とその発現パターン(抜粋)



(a)植物の再生。どの体細胞でもカルス誘導後にもとの植物体にもどる。(b)人工栽培できるキノコ。菌糸から子実体を誘導することができる。(c)マツタケは、菌糸からの子実体誘導ができない。

図3 細胞の分化様式の比較

子生物学, 医学, 薬学などの研究に欠かせない手法となっている。われわれは、マイタケでも遺伝子組換えを可能にする技術を確認している⁷⁾。これにより、ある遺伝子の働きを知りたい場合には、組換え操作により目的の遺伝子の働きを高めたり、抑えたりすることで、その遺伝子の機能を推定することが可能となっている⁸⁾。マイタケが菌糸体から子実体形成する時に使われている遺伝子群のリストアップは完了し、それぞれの遺伝子が子実体形成のどのような場面で機能しているのかを詳細に解析する段階へと到達している。マイタケで特定されたこれらの遺伝子群とATGCの配列が類似しているマツタケの遺伝子は、マツタケの子実体形成にも共通に働いている可能性があり重要である。

すなわち、将来的にはマツタケの子実体形成に重要な遺伝子、もしくは遺伝子スイッチ部位を探し出せば、マツタケの人工栽培が可能になると考えている。このように分子生物学的解析の基盤が整備されたマイタケをモデルにして得られた知見を、いまだ解析が難しいマツタケに波及させることで、いまだに成功していないマツタケの人工栽培を実現したいと考えている。

6. まとめ

分化全能性は、受精卵や植物細胞に備わっている特性であるが、成長する過程で逆戻りができ

ないように遺伝子制御されているのが通常である。しかし、iPS細胞のように遺伝子組換え技術で分化全能性の獲得に必要な遺伝子を導入することによって、成熟した体細胞を受精卵の状態に戻すことが可能となってきている。栽培されているキノコは、人為的に菌糸体から子実体を形成させることが可能であり、その一つであるマイ

タケの遺伝子解析から子実体形成時に働く遺伝子群を特定している。これらの遺伝子が適切な時期に働くからこそ子実体が形成されるのであって、それを制御している条件が子実体形成を誘導するための鍵ともいえる。まだ人工栽培できていないマツタケなどのキノコでも子実体形成時に働く遺伝子が共通であれば、それらの遺伝子のスイッチをオンにしてあげればよいのである。

以上のようにマイタケという人工栽培が確立されているキノコの遺伝子情報や遺伝子組換え技術などを駆使しながらマツタケの人工栽培を試みている。このように書くと、遺伝子組換えマツタケを作るのかとよく聞かれるが、分子生物を駆使しつつも最終的には遺伝子改変をせずにマツタケの人工栽培を試みているとだけ述べて終わりにしたい。

参考文献

- 1) Kurahashi A., et al.: Bull. Tokyo Kasei Univ., **52**, 17-32 (2012)
- 2) Sato M., et al.: Bull. Tokyo Kasei Univ., **53**, 17-30 (2013)
- 3) Kurahashi A., et al.: Mycoscience., **55**, 98-102 (2014)
- 4) Kurahashi A., et al.: Mycoscience., **55**, 113-117 (2014)
- 5) Kurahashi A., et al.: Bull. Tokyo Kasei Univ., **54**, 23-33 (2014)
- 6) Kurahashi A., et al.: Mycoscience., **56**, 177-182 (2015)
- 7) Sato M., et al.: Mycoscience., **56**, 364-372 (2015)
- 8) Sato M., et al.: Mycoscience., **56**, 516-522 (2015)