

ISBN 4-902606-27-5

[森林総合研究所 第1期中期計画成果集23]

樹木ときのこ類のゲノム解析及び生物機能の 解明で未来を拓く

平成13年度～17年度



独立行政法人 森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute

はじめに

森林生物が持つ多様な機能をより有効に利用し、森林資源の循環利用の推進等に対応していくことが求められています。

森林総合研究所は平成13年4月に独立行政法人になるにともない、第一期の中期計画を策定し、11の重点分野のうち、「生物機能の解明と新素材の開発に向けた研究」において、これらの課題に対応して研究を推進することとしました。

5年間の研究を推進するなかで、スギ、ポプラ及びきのこの等のゲノムや生物機能に関する多くの先端的知見を得ることができました。さらに、技術開発に繋がる成果を得ることができました。このパンフレットは、そのうち樹木及びきのこのゲノムと生物機能の解明に関わる主要な成果についてとりまとめ、関係する研究者並びに諸機関への参考に供する次第です。

平成18年9月

独立行政法人 森林総合研究所
研究コーディネータ 田崎 清

本冊子は森林総合研究所の第1期中期計画(平成13年～17年度)の中の重点分野「生物機能の解明と新素材の開発に向けた研究」の主な成果をまとめたものです。

中期計画の概要(コ分野)

コ 生物機能の解明と新素材の開発に向けた研究

(ア) 森林生物のゲノム研究

① 高密度基盤遺伝子地図の作成

(イ) 森林生物の生命現象の分子機構の解明

① 成長・分化及び環境応答等生理現象の分子機構の解明

(ウ) 遺伝子組換え生物の開発

① 遺伝子組換え生物作出技術の開発

② 導入遺伝子の発現機構解明及び安全性評価

(エ) 森林生物機能の高度利用技術の開発

① 森林生物の多様な機能の解明と利用技術の開発

② 森林生物が持つ環境浄化機能の解明と遺伝的改変による機能強化

編集委員会

編集委員長	研究コーディネータ	田崎 清
編集委員	森林遺伝研究領域長	長坂壽俊
	生物工学研究領域長	篠原健司
	バイオマス化学研究領域長	大原誠資
	きのこ・微生物研究領域長	石原光朗

樹木ときのかのゲノム解析及び生物機能の解明で未来を拓く

目次

I ゲノムの解析

- 森林植物ゲノム研究を加速するスギの高密度遺伝子地図を作成しました**..... 1
DNAマーカーを利用してスギの高密度遺伝子地図を作成し、森林植物のゲノム研究に活用しました。
- スギのアレルゲン遺伝子を花粉症対策に活用します**..... 3
スギ花粉症の原因であるアレルゲンの遺伝子を単離・解析し、花粉症対策への活用に見通しをつけました。
- ポプラの環境ストレス関連遺伝子を集めて環境耐性の強化を図ります**..... 5
ポプラの環境ストレス応答に関連する遺伝子を大規模に収集し、機能を推定するとともに、各種ストレスによる発現の様子を明らかにしました。
- 希少種の保全に役立つ遺伝的な多様性を明らかにしました**..... 7
希少種で林床植物のサクラソウの保全に役立つ遺伝的な多様性の実態をDNAマーカーを利用して明らかにしました。
- 緑化樹木の遺伝的多様性を調査して三宅島の復興に貢献しました**..... 9
三宅島災害地の緑化植物の遺伝的多様性を調査して、復興のための植栽にどのような種子を利用すれば、遺伝子の攪乱を防げるかを明らかにしました。
- きのかの子実体が作られる時に働く遺伝子を集めました**..... 11
きのかの子実体が作られる時に発現している遺伝子を収集し、その機能を推定することができました。

II 遺伝子の機能の解明

- スギの細胞増殖を支配する遺伝子を単離しました**..... 13
スギの細胞増殖を調節する因子、ファイトスルフォカイン（PSK）の遺伝子を針葉樹では始めて単離するとともに、培養細胞で機能を確認しました。
- ポプラから傷害に応答する受容体の遺伝子を単離しました**..... 15
ポプラから障害に応答して発現を高める受容体の遺伝子を単離し、その機能をタンパク質のレベルで明らかにしました。
- 針葉樹の採種園には遠距離から花粉が飛んできます**..... 17
外部から飛んでくるスギ花粉がどのように採種園で受粉に関わるかを、DNAマーカーを利用して明らかにしました。
- ホウ素は植物の細胞壁の強化に役立っています**..... 19
植物の細胞壁はホウ素を取り込んで強くなることを明らかにするとともに、植物の進化の過程でホウ素が果たす役割を推察しました。

Ⅲ 生物機能の利用に向けた技術の開発

樹木の材の形成に関わる酵素の測定法を開発しました……………21

糖鎖を高感度で検出する手法を開発し、この手法が細胞壁の生成に関わる酵素の測定に利用できることを明らかにしました。

ヒノキの不定胚を経由して個体を再生する画期的な技術を開発しました……………23

ヒノキの未熟種子から不定胚を誘導し、効率良く個体まで再生する技術を開発しました。

きのこ類で遺伝子を導入するための新しい技術を開発しました……………25

きのこ類の遺伝子組換えに必要な、遺伝子を導入する新しい技術を開発し、各種のきのこに利用できることを明らかにしました。

きのこの子実体の形成を誘導する新たな物質を発見しました……………27

きのこの子実体の形成を誘導する物質を発見し、その効果を各種のきのこで確かめました。

個体識別法の開発でマツタケが多様であることが解りました……………29

レトロエレメントという動く遺伝子をDNAマーカーにしたマツタケの個体識別法を開発して、マツタケの系統を解析しました。

森林植物ゲノム研究を加速するスギの高密度遺伝子地図を作成しました

背景と目的

我が国に固有のスギは重要な造林樹種であることから、遺伝的管理手法の開発や生産性向上のために、遺伝子に関する情報を充実させ、さらにはこの情報をもとにしてDNAマーカー開発及び連鎖地図の構築を行うことが必要となっていました。さらに、DNAマーカーが開発されると、優良なスギの選抜等を効率的に行うことができます。そこで、本研究では、スギ及びヒノキで発現している遺伝子の情報を収集して、DNAマーカーを開発するとともに、高密度の連鎖地図を構築することになりました。

成果

高密度遺伝子地図を作成しました

スギの実生、内樹皮等で発現している遺伝子のcDNAライブラリを作成し、これから多数の部分塩基配列の情報を収集しました。この情報をもとに遺伝解析に利用できるDNAマーカーを開発しました。開発したDNAマーカーを利用して、スギの2家系の連鎖地図の構築を行い、さらに2家系の連鎖地図を統合することで、433遺伝子座で構成されるスギの基本染色体数と同じ11の連鎖群からなる地図を構築することができました(図1)。この連鎖地図の構築は他の針葉樹におけるゲノム研究の基盤になるとして、国際的にも高く評価されました。

オモテスギ系とウラスギ系の分化をDNAマーカーで明らかにしました

開発したDNAマーカーを用いて全国から収集したスギの集団について遺伝的変異性を調査した結果、集団が日本海側と太平洋側に大きく2分されることが明らかになりました(図2)。この結果は形態的な特性から分けられていたウラスギ系とオモテスギ系の2系統がDNAのレベルでも同じ系統に分けられることを示しました。さらに、ヒノキでもDNAマーカーを開発し、これを利用して、部分的な連鎖地図を構築しました。

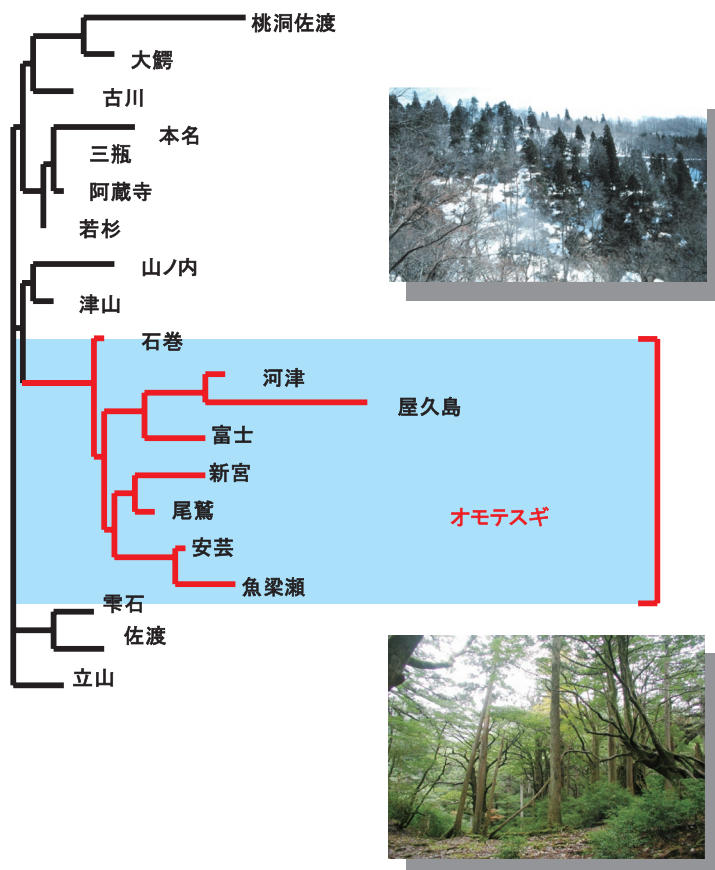
成果の利活用

本研究で開発されたDNAマーカーや連鎖地図はスギやヒノキ等の針葉樹における今後の遺伝研究の推進を加速させることが期待できます。さらに、DNAマーカーは優良な針葉樹の選抜等に活用されることが見込まれます。

関連発表論文

- 1) Iwata, H., T. Ihara-Ujino, K. Yoshimura, K. Nagasaka and Y. Tsumura (2001) Theoretical and Applied Genetics 103: 881-895
- 2) Tani, N., T. Takahashi, H. Iwata, Y. Mukai, T. Ujino-Ihara, A. Matsumoto, K. Yoshimura, H. Yoshimaru, M. Murai, K. Nagasaka and Y. Tsumura (2003) Genetics 165:1551-1568

スギ花粉症の原因であるアレルゲン遺伝子(赤三角印)も地図に位置付けることができました。



2

スギのアレルゲン遺伝子を花粉症対策に活用します

背景と目的

近年、スギ花粉症患者が急増し、我が国の大きな社会問題になっています。この原因の一つに、戦後人工造林されたスギやヒノキ林の多くが着花年齢に達し、花粉の生産量が急激に増加したことがあげられます。スギ花粉症を引き起こす原因物質として、2種類のアレルゲンタンパク質 (Cry j 1, Cry j 2) が同定されています。また、北米で報告されているビャクシン花粉症では、Cry j 1とCry j 2に相当する主要アレルゲンJun a 1とJun a 2の他に、第3のアレルゲンとしてJun a 3が報告されています。本研究では、スギの新規アレルゲンを探索するため、スギ花粉からアレルゲン遺伝子を単離し、それら遺伝子の構造と発現特性を解析しました。

成果

スギ花粉の主要アレルゲン遺伝子を単離し、その発現特性を解明しました

スギのCry j 1遺伝子とCry j 2遺伝子は、スギ科やヒノキ科の樹種ではよく類似していますが、マツ科のものとはかなり異なっていました。また、2種類のアレルゲン遺伝子の発現特性を調べると、これらの遺伝子は花粉で大量に発現しており、成熟した雄花でも発現していました(図1)。

新たなアレルゲン遺伝子を単離し、花粉症との関係を明らかにしました

ビャクシンアレルゲンJun a 3に相当するアレルゲンとして、Jun a 3と42～57%の相同性を示す6種類のCry j 3遺伝子(Cry j 3.1～Cry j 3.6)を単離しました。Cry j 3遺伝子は感染特異的タンパク質をコードしています(表1)。このうち、Cry j 3.5遺伝子は、Cry j 1・Cry j 2遺伝子と同様に花粉での発現レベルが高いことを明らかにしました(図3)。Cry j 1遺伝子とCry j 2遺伝子の配列は、スギ科とヒノキ科の樹種で類似していました。アレルゲンの構造が似ていることが、スギとヒノキの両方に反応する花粉症患者の多い原因となっていることが考えられます。さらに、最近の理化学研究所との共同研究により、Cry j 3の仲間で、アレルゲン活性を示す遺伝子が新たに同定されています。

成果の利活用

今回単離したアレルゲン遺伝子を大腸菌などで発現させて組換えタンパク質を作り、これと花粉症患者の血清との反応性を解析することで、アレルゲン活性を調べることが可能となる等、花粉症対策に活用されることが見込まれます。

関連発表論文

1) Futamura N, Mukai Y, Sakaguchi M, Yasueda H, Inouye S, Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Shinohara K (2002). Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2495-2500

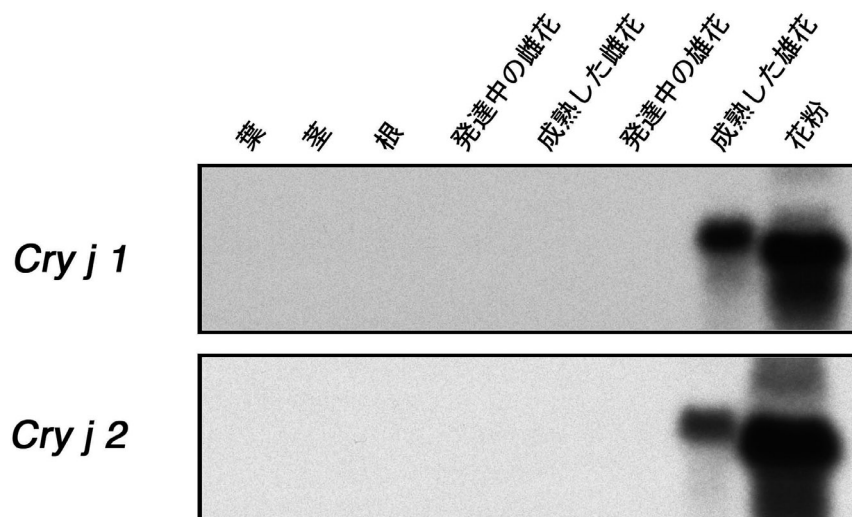


図 1 スギの各器官における *Cry j 1* と *Cry j 2* 遺伝子の発現

表 1 スギ花粉アレルゲン遺伝子の特性

アレルゲン	タンパク質の特性	主な局在の場
<i>Cry j 1</i>	ペクチンリアーゼ	花粉 (外壁表面、オービクル外層、細胞質のゴルジ体、粗面小胞体、生殖細胞壁)
<i>Cry j 2</i>	ポリメチルガラクトソナーゼ	花粉 (細胞質のアミロプラスト内デンプン粒)
<i>Cry j 3</i> (<i>Cry j 3.1</i> ～ <i>Cry j 3.6</i>)	感染特異的タンパク質	<i>Cry j 3.5</i> : 花粉 <i>Cry j 3.5</i> 以外 : 雌花・雄花

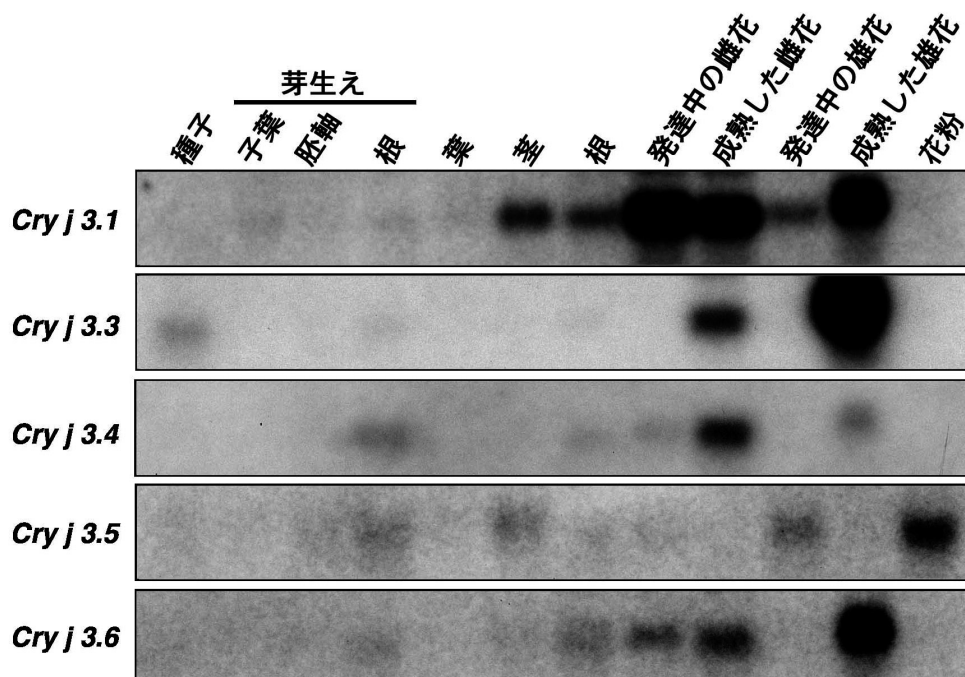


図 2 スギの各器官で発現する *Cry j 3. 1*～*3. 6* 遺伝子

ポプラの環境ストレス関連遺伝子を集めて環境耐性の強化を図ります

背景と目的

樹木の環境ストレス応答機構や耐性機構の解明は、乾燥地の緑化など環境の保全や修復のための基礎として重要な課題です。ポプラは、木本植物で初めてゲノムの全塩基配列が決定されたモデル樹木であり、環境ストレス応答機構等の研究にとって格好の材料です。樹木の生理機能を遺伝子レベルで理解するには、単なる塩基配列の羅列にすぎないゲノム情報だけでは不十分であり、細胞内で機能する遺伝子群の収集とそれら遺伝子群の発現解析が必要です。本研究では、遺伝子機能の解析を目的として、ポプラ完全長cDNAの大規模収集に取り組みました。

成果

ポプラの完全長cDNAを大量に収集しました

完全長cDNAは、遺伝子の機能解析や組換え体の作出にとって有用なバイオリソース(生物資源)になります(図1)。これまでに植物界では、シロイヌナズナ、イネやヒメツリガネゴケなどの完全長cDNAが収集されています。本研究では、30,000個以上のポプラcDNAを収集し、その塩基配列を解析した結果、様々な機能を持つ約4,500種の遺伝子を同定しました(図2)。このような、完全長cDNAの大規模収集は、樹木では世界で初めての報告です。

環境ストレス関連遺伝子の発現特性を明らかにし、遺伝子情報を公開しました

ポプラ完全長cDNAには、多数の環境ストレス関連遺伝子が含まれていました。このうち、ストレス応答性の転写制御因子やペルオキシダーゼをコードする遺伝子群について、環境ストレス処理(乾燥・高塩濃度・低温・高温・アブシジン酸・過酸化水素)毎の発現誘導の差異を明らかにしました。なお、ポプラ完全長cDNAの塩基配列情報は、公的データベースに公開するとともに、国際ポプラゲノムコンソシアムへも情報提供しました。また、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託し、cDNAクローンの配布を開始しています。

今後は、発現遺伝子の重複の少ない均一化したポプラ完全長cDNAライブラリーを用い、完全長cDNAクローンを10,000種以上単離する予定です。

成果の利活用

ポプラ完全長cDNAは、ポプラゲノムの正確な解析に有効な情報をもたらすだけでなく、今後の樹木のポストゲノム研究への貢献が期待できます。また、得られたポプラの環境ストレス関連遺伝子群は、遺伝子組換えによる環境ストレス耐性樹木の開発や、遺伝子マーカーとして用いることで環境ストレス耐性樹木の選抜などにも利用可能です。

関連発表論文

1) Nanjo T, Futamura N, Nishiguchi M, Igasaki T, Shinozaki K, Shinohara K (2004) . Plant Cell Physiol. 45: 1738-1748

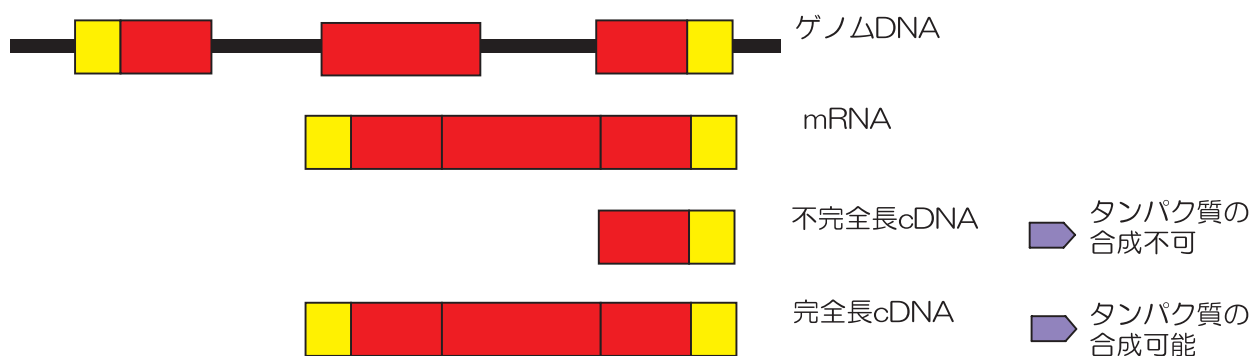


図 1 完全長cDNAの利点

cDNAとは、タンパク質の合成に必要な遺伝情報物質のmRNA(メッセンジャーRNA)を鋳型にして作られたDNAです。完全長cDNAは、不完全長cDNAと異なり、タンパク質合成に必要な全ての情報を保持し、完全長のタンパク質の合成、遺伝子のプロモーター領域の探索、ゲノム解析などに有効利用できます。完全長cDNAライブラリーは、完全長cDNAを高効率で含むライブラリーです。

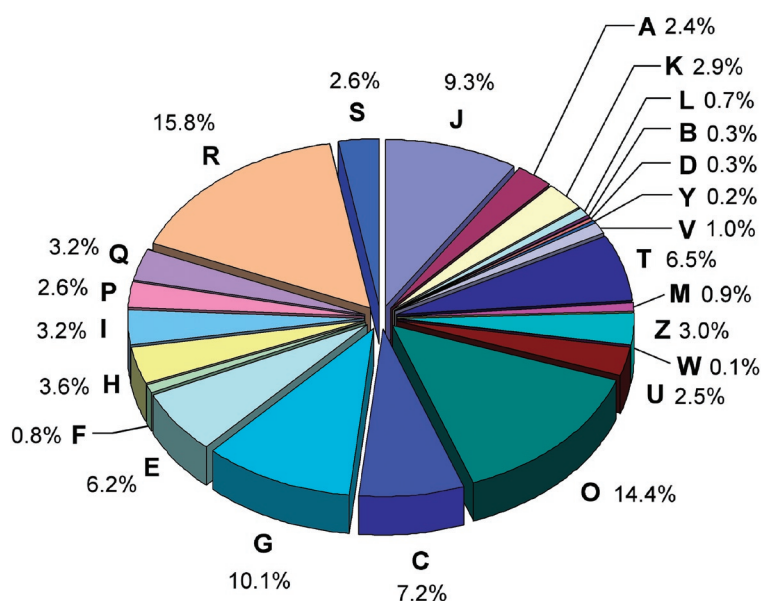


図 2 ポプラ完全長cDNAの機能分類

ポプラ完全長cDNAを、それぞれの塩基配列がコードするタンパク質の機能によって分類しました。J: タンパク質の翻訳、A: RNAのプロセッシングと修飾、K: 転写、L: DNAの複製・組換え・修復、B: クロマチンの構造変換、D: 細胞周期・細胞分裂の制御、Y: 核構造、V: 防御機構、T: シグナル伝達、M: 細胞壁・細胞膜の合成、Z: 細胞骨格、W: 細胞外構造、U: 細胞内輸送・分泌、O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝、C: エネルギー生産・変換、G: 炭水化物の輸送・代謝、E: アミノ酸の輸送・代謝、F: 核酸の輸送・代謝、H: 補酵素の輸送・代謝、I: 脂質の輸送・代謝、P: 無機イオンの輸送・代謝、Q: 二次代謝産物の合成・輸送、R・S: 不明

希少種の保全に役立つ遺伝的な多様性を明らかにしました

背景と目的

絶滅の危機のある森林植物の希少種を保全するためには、遺伝的多様性を維持した保全の手法を開発する必要があります。特に他殖性植物では種内の遺伝的多様性が重要です。遺伝的多様性が低い場合は、近縁関係にある個体間の交配が生じ、次世代では近交弱勢により種の個体群が衰退していく可能性があるためです。本研究は、種内にどれくらいの遺伝的多様性が残っているかを把握するために地域集団内や個体間での遺伝子流動等を明らかにし、保全方法の開発に貢献することを目的としました。

成果

サクラソウの遺伝的多様性を明らかにしました

林床植物であるサクラソウをモデルとして、開発した多くのDNAマーカーを利用して、種の保有する遺伝的多様性等を解析しました(図1)。サクラソウでは、花粉による遺伝子の流動のほとんどが10m以内であることを明らかにしました。次ぎに、全国のサクラソウの分布域から材料を収集して、地域間の遺伝的な違いについて調査した結果、大きく4つに区分できることを明らかにしました(図2)。さらに、東北および北海道の集団は遺伝的多様性が低い集団であることも明らかにしました。

サクラソウ集団における遺伝子の流動を明らかにしました

サクラソウの地域の集団内での遺伝子の流動を明らかにするため、ハヶ岳集団で種子の散布を調査しました。その結果、種子の散布はおもに溪流に沿って行われていることを明らかにしました(図3)。また、人工的に植栽した集団内では遺伝子の流動のほとんどが近隣の個体間で行われていることを明らかにしました。

さらに、サクラソウで開発したDNAマーカーが近縁の植物においても利用可能であることが解りました。そこで、このDNAマーカーを利用して、希少種である、カッコソウやユキワリソウでの遺伝的多様性を明らかにすることができました。

成果の利活用

サクラソウを例として、自然集団における遺伝的多様性、集団内での遺伝子流動の実態を明らかにした成果は、林床植物で希少な遺伝資源の保全や植え戻しなどの再生事業を行う際に必要な基礎情報としての活用が期待できます。

関連発表論文

- 1) Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa (2004) Biological Conservation 120:215-224
- 2) Ishihama, F., S. Ueno, Y. Tsumura, and I. Washitani (2005) Molecular Ecology 14: 983-990
- 3) Kitamoto, N., Honjo, M., Ueno, S., Takenaka, A., Tsumura, Y., Washitani, I., Ohsawa, R., (2005) Molecular Ecology 14: 149-157



図 1 開花しているサクラソウ

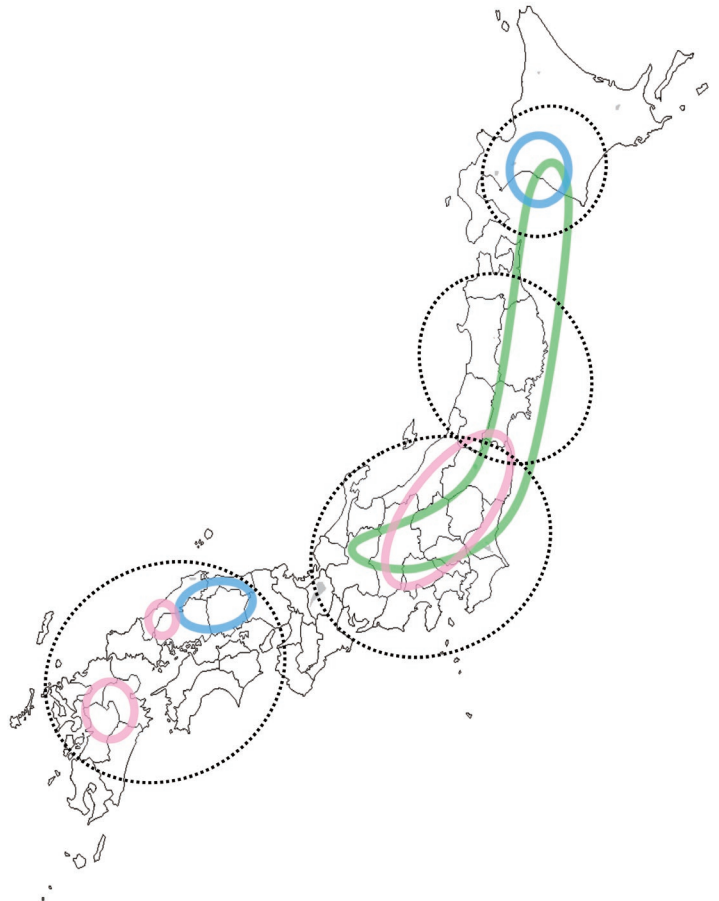


図 2 サクラソウの遺伝学的分化

サクラソウは北海道から九州にかけて広く分布しています。色線はそれぞれの地域集団の葉緑体DNAタイプを示し、同じ色は類似したタイプを示しています。破線は核DNAタイプの遺伝的な類似グループを示しています。

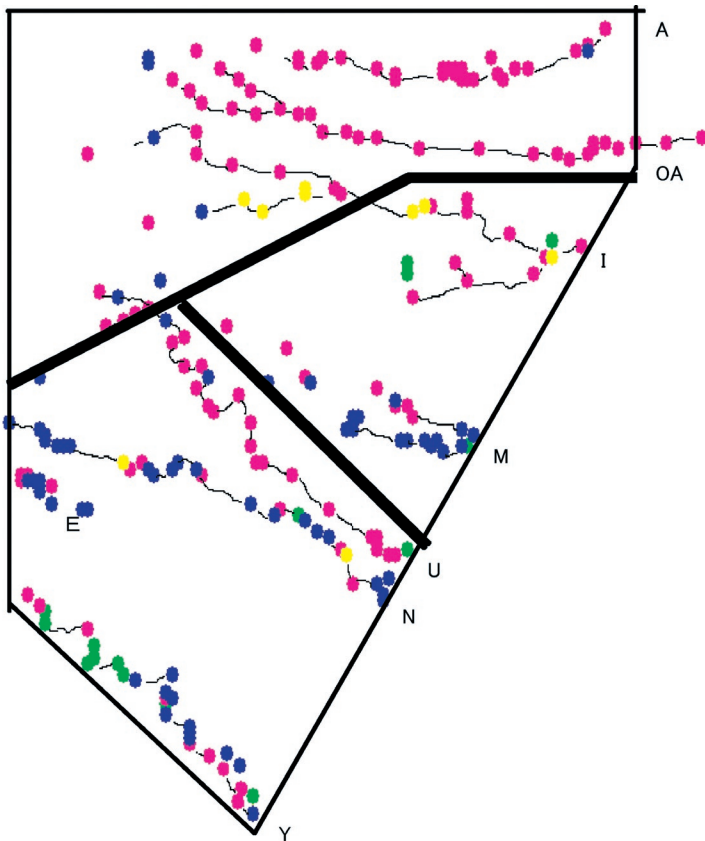


図 3 サクラソウの種子は主に溪流にそって移動します

筑波大八ヶ岳演習林(約50ha)でのサクラソウの持っている葉緑体DNAタイプを調べて明らかにしました。A、Y等は溪流を示し、同じ色は類似した葉緑体DNAタイプを表します。

緑化樹木の遺伝的多様性を調査して三宅島の復興に貢献しました

背景と目的

三宅島の火山による荒廃地域を緊急に治山緑化するには多量の種子をまとめて入手する必要があります。しかし、種子を他の地域から導入する場合に、三宅島の在来集団に対する遺伝的汚染や攪乱を最小限にするように遺伝的に類似した集団の導入が求められています。このため、治山緑化に使われる植物種について、遺伝的変異及び伊豆諸島と近隣の本土との遺伝的分化を明らかにすることで、三宅島の復興に貢献することを目的としました。

成果

オオバヤシャブシは神津島から、ハチジョウススキは御蔵島から

三宅島の緑化のために火山被害に比較的強く、生態遷移の初期に生育する植物であるオオバヤシャブシ、ハチジョウススキ及びハチジョウイタダリの3種について、伊豆諸島及び伊豆半島の各集団での遺伝的多様性及び遺伝的分化をDNAマーカーを利用して調査することで、三宅島の集団に最も近縁な集団を明らかにしました(図1, 2)。その結果、オオバヤシャブシは伊豆諸島の島間での分化は4.15%で、分化の程度は高くはありませんが、有意に分化していることが解りました。そして、三宅島集団に最も遺伝的に類似した集団は神津島集団であることを明らかにしました。ハチジョウススキの場合は島間の分化は5.80%で、その程度は高くはありませんが有意に分化していました。また、三宅島の集団に最も遺伝的に類似した集団は御蔵島の集団であることを明らかにしました。

ハチジョウイタダリの遺伝的多様性

しかし、ハチジョウイタダリの場合は三宅島の集団が他の島の集団とは異なる特有な変異を保有していることを葉緑体DNAのレベルで明らかにしました。従って、ハチジョウイタダリの種子は三宅島の集団から採取するべきで、他の島から導入することは極力避けたほうが良いという結論を得ました(図3)。

このように、3種の緑化植物では、それぞれ遺伝的近縁関係が異なることから、緑化に導入する集団を選定する際には、事前の遺伝的調査が重要であることが明らかとなりました。

成果の利活用

三宅島の雄山の噴火による荒廃地域の緑化の際にハチジョウススキ、ハチジョウイタダリ、オオバヤシャブシ3種で遺伝的な攪乱を引き起こさないような近隣集団の選定に貴重な情報として活用されました。

関連発表論文

Iwata, H., T. Kamijo, Y. Tsumura (2005) Ecological Research 20: 233-238



図1 三宅島でのハチジョウイタダリの材料採取の様子(2002年7月)

本州本土イタドリ系統I

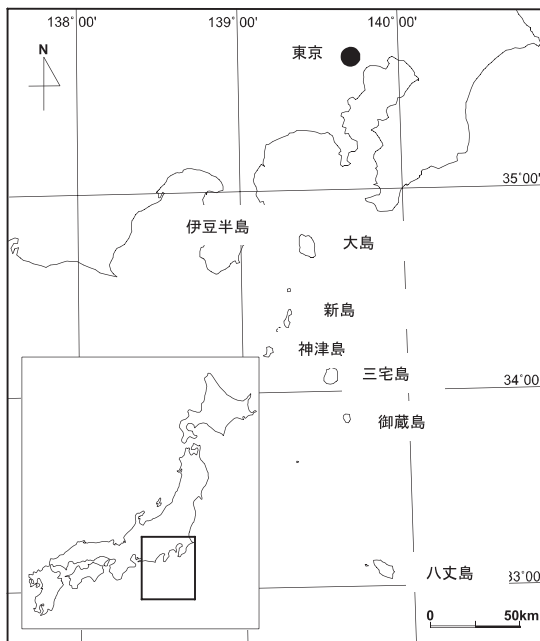


図2 伊豆半島と伊豆諸島の地理的關係

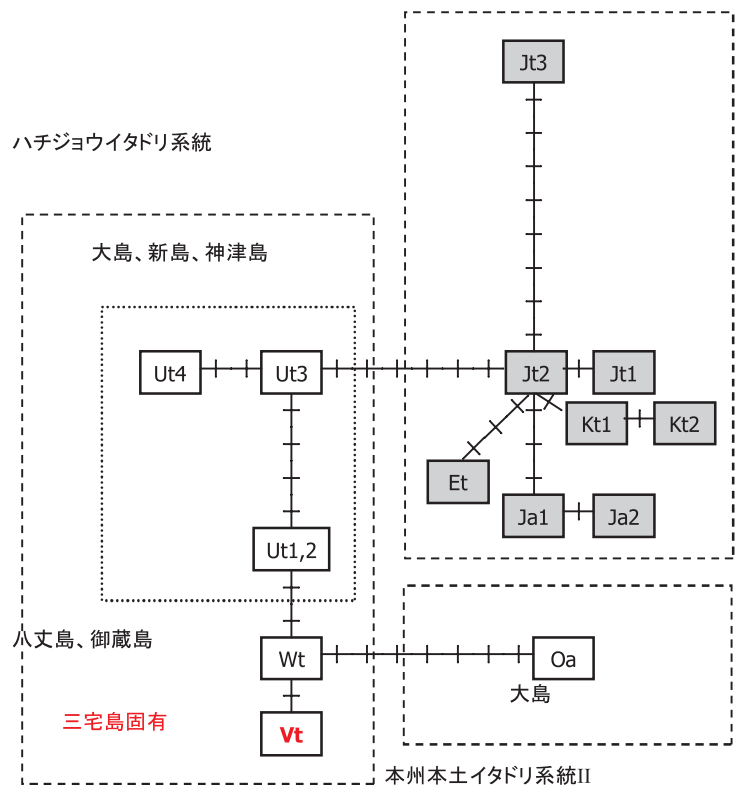


図3 ハチジョウイタダリの葉緑体DNAタイプ
三宅島は他の島にない固有の葉緑体DNAタイプを持っていました。

きのこ類の子実体が作られる時に働く遺伝子を集めました

背景と目的

きのこは年間2600億円を超える市場を抱える特用林産物であり、日本人が好む食材です。しかし、その栽培の現場においては、画期的な品種や育種法の開発が望まれています。このためには、きのこ(子実体)が形成される仕組みを遺伝子のレベルで解明することが必要です。そこで、食用として広く利用されているきのこ類のうちシイタケとヒラタケについて、子実体(きのこの本体)の形成時において特異的に発現し、機能する遺伝子、及びその翻訳産物であるタンパク質の解析を進めることにしました。

成果

ヒラタケの子実体形成に働く遺伝子を単離しました

ヒラタケでは、最終的に、子実体形成時に特異的なcDNA断片が4つ得られました。推定されるアミノ酸配列についてデータベースを検索した結果、CytochromP450 sterol 14 α -demethylaseやtriacylglycerol lipaseと相同性を示しました(図1)。ヒラタケの子実体形成時には、脂質の代謝に関与する酵素が特異的な働きをしていると考えられます。

シイタケの子実体が形成される過程で働く遺伝子を単離しました

シイタケの子実体が形成される過程で、子実体原基に特異的な51クローン、成熟した子実体に特異的な54クローンの遺伝子cDNAの単離に成功しました。これら遺伝子は様々な代謝や細胞の構築などに係わることが推定されましたが、約半数のクローンについては既存のデータベース上で機能の推定ができませんでした(図2)。これらクローンのうち、20個の遺伝子クローンについて発現の様子を詳細に調べたところ、子実体形成過程を通じて構成的に発現しているもの、胞子形成を行う成熟子実体中にのみ発現しているもの及び子実体発生の初期段階である子実体原基にのみ発現しているものという、3種類のパターンに分類することができました。

成果の利活用

シイタケとヒラタケで子実体(きのこ本体)が作られる時に働いている遺伝子を明らかにしたことから、子実体の作られる仕組みを遺伝子のレベルで解明する研究の進展に貢献することが期待できます。

関連発表論文

- 1) Miyazaki Y, Jojima T, Ono T, Yamazaki T, Shishido K.(2004) Biochim Biophys Acta. 1680(2):93-102
- 2) Sunagawa, M., and Magae, Y. (2005). FEMS Microbiol Lett. 246:279-284



菌糸



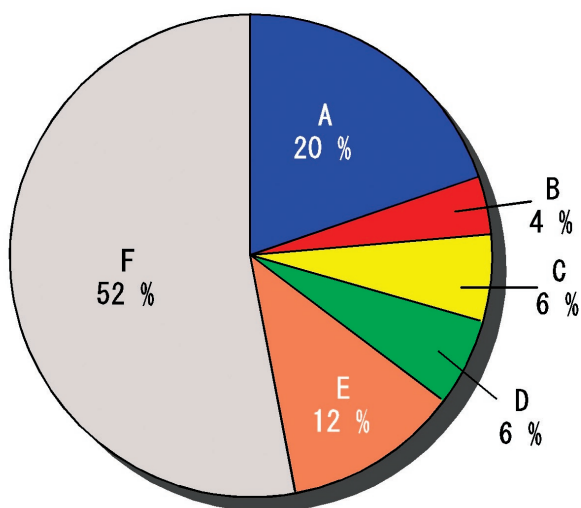
原基



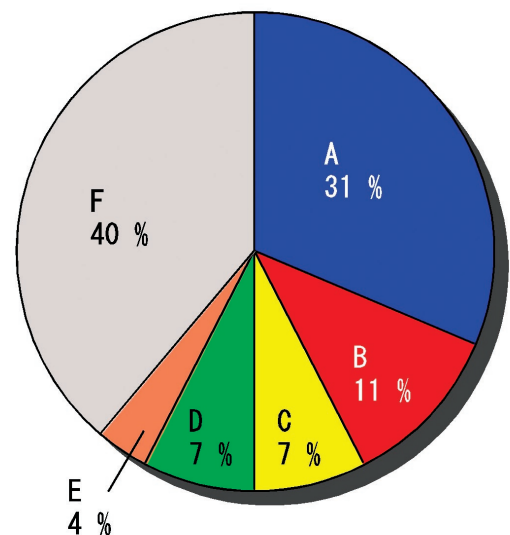
きのこ(子実体)

図 1 ヒラタケのきのこ(子実体)形成の様子

ヒラタケのきのこ(子実体)が形成されるまでの各ステージで発現する遺伝子を調べました。



子実体原基で発現する遺伝子



成熟子実体で発現する遺伝子

図 2 シイタケのきのこ(子実体)が形成される過程で発現している遺伝子の機能の分類

A:一般的代謝、B:転写・翻訳、C:細胞構造、D:シグナル伝達、E:細胞制御、F:不明

スギの細胞増殖を支配する遺伝子を単離しました

背景と目的

遺伝子組換えは遺伝子の機能解析等の基礎研究だけでなく、新たな形質の付与や改良を目指した応用研究にも利用可能な技術です。遺伝子組換えには、遺伝子導入技術とともに個体を再生する技術が必要ですが、現在までのところ、スギで遺伝子組換えに成功した報告例はありません。遺伝子組換えスギを作出するための基礎技術となる培養細胞からの効率的な再分化技術を新たに開発しました。

成果

裸子植物にも細胞増殖因子ファイトスルフォカイン(PSK)が存在しました

PSKは細胞の増殖や特定の組織への分化など、植物ホルモン様の作用を示す5つのアミノ酸からなるペプチド(図1A)で、遺伝子によりコードされる前駆体タンパク質から作られます。これまで、イネやニンジン等の被子植物で、その存在が確認されていましたが裸子植物としては始めて、スギにもPSK前駆体タンパク質をコードする遺伝子が存在し、その遺伝子が発現していることを発見しました。スギPSK前駆体遺伝子は102アミノ酸からなるタンパク質(CjPSK1)をコードし(図1B)、PSK配列以外の部分では他の植物種のPSK前駆体との相同性は極めて低いことを明らかにしました(図1C)。

PSKを用いた効率の良いスギ個体再生系を確立しました

スギ培養細胞の増殖培地にPSKを添加すると、細胞増殖を良好にするとともに、長期間の培養による細胞分裂活性の低下や細胞の褐変を抑制する等、(図2)スギにおいても被子植物の場合と同様にPSKが機能していることを明らかにしました。また、PSKはスギ培養細胞を不定胚に分化させる効率を顕著に上昇させました(図3A、B)。誘導した不定胚は正常に発芽し、幼植物体へと生育しました(図3C)。さらに、PSKを添加した培地で培養細胞を継代すると、不定胚へ分化する能力を高く保持した状態で3年以上にわたって維持することが可能となりました。

成果の利活用

PSKを利用したスギの再分化及び培養技術は、花粉アレルゲンを生産しないスギの作出などに応用が可能であり、スギ花粉症対策の新技术として活用が期待できます。

1) Igasaki T, Sato T, Akashi N, Mohri T, Maruyama E, Kinoshita I, Walter C, Shinohara K (2003) Plant Cell Rep. 22: 239-243

2) Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Shinohara K (2003) Plant Cell Physiol. 44: 1412-1416

A

Y(SO₃H)-I-Y(SO₃H)-T-Q

(チロシン)(イソロイシン)(チロシン)(スレオニン)(グルタミン)

B

```

atggcggaatctctctggaagaagctcttacacccttgcattatgtgtcattctctctctgtactgaccactgcaatggcaaccgc 90
M A N I S G R S P Y T L C I L C V I L L V L T T A M A T R

ccacttaaacagatttgctccacagaggatctgctcaaacagctacagaagacaacttcagggaatcttttaacagggtgctcttaa 180
P L K T D L L H R G S A Q T S T E D N L Q E S F Q Q G A L K

gctgacctgttgaggagagtagacagaggaattaagctgtgaaggtctagaggaagaagaatgctgaaccgtcgctctctggctgtcac 270
A D L L E E S T E E L S C E G L E E E E C L N R R S L A A H

actgattacatctatacacagcaccacaacacccatag 309
T D Y I Y T Q H H K H P *

```

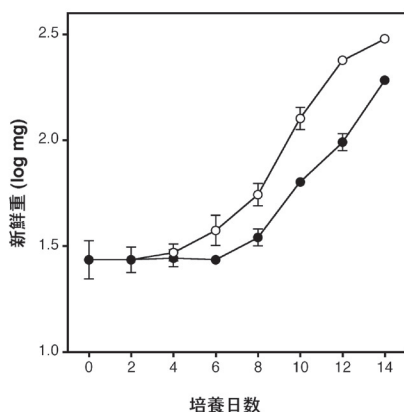
C

CjPSK1	59	LKADLLEESTEELSCGLEEEEC	LNRR	SLAHTDYIYTQHHKHP	102
AtPSK1	43	EKASTKGRDGVCKNSDSEEEC	LVKK	TVAHTDYIYTQDLNLS	87
AtPSK2	44	KIEGKLDDMHVDENCGADDEDC	LMRR	TLVAHTDYIYTQKKHHP	87
AtPSK3	38	SVEEDSVNKLGMGYCGEGDEEC	LRMMTESH	TDYIYTQHHKH	81
AtPSK4	37	SVKEIEGDKVEEESCNGIGEEEC	LIIR	SLVHTDYIYTQNHHP	79
AtPSK5	34	EENSFKKLEQGEVCEGVGEEEC	LIIR	TLVAHTDYIYTQNHHP	77
AtPSK6	44	EMIESKLHEVAGESCDKEDDEDC	LVRR	TLTAHTDYIYTHKNNHH	87
OsPSK1	45	TTTQEPSRENGGSTGSNNNGQLQFDSA	WEEF	HTDYIYTQDVKNP	89

図1 スギのPSK

- (A) PSKの構造
(B) スギのPSK前駆体タンパク質(CjPSK1)遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列(下段の一字表記)、赤字はPSK
(C) シロイヌナズナ及びビネのPSK前駆体遺伝子(AtPSK1~6、OsPSK1)の推定アミノ酸配列の比較。

A



B

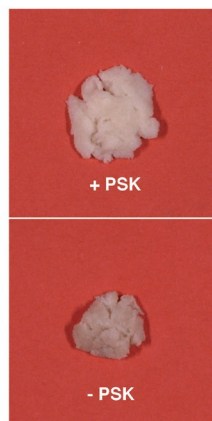


図2 スギ培養細胞に及ぼすPSKの効果

- (A) スギ培養細胞の増殖曲線。PSKを添加した場合(O)には、PSK無しの場合(●)と比較して初期の細胞増殖が早くなります。
(B) (B) 2週間培養した細胞の様子。PSKを添加すると、明らかに細胞が増殖しました。

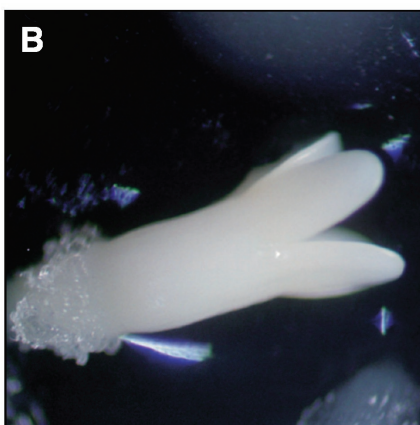
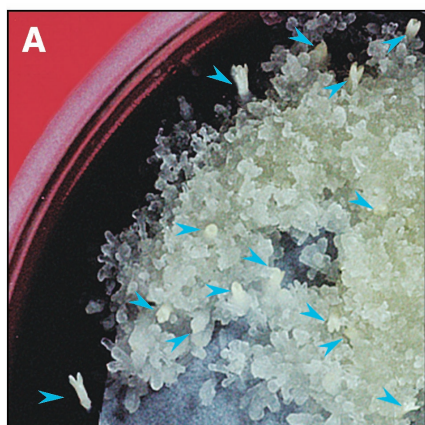


図3 スギの不定胚分化に及ぼすPSKの効果

- (A) 培地上に誘導された不定胚。PSKの添加により、不定胚形成が促進されます。矢頭(青色)は不定胚が形成された箇所を示します。
(B) 不定胚の拡大写真。(C) 不定胚から生育した発芽後約3ヶ月の幼植物体。

ポプラから傷害に応答する受容体の遺伝子を単離しました

背景と目的

生物は「受容体」と呼ばれるタンパク質群により環境要因の変化を感知し、必要な遺伝子群を働かせて抵抗性を強め、生き残りを図ります。受容体の中で受容体型プロテインキナーゼは環境応答の引き金として機能することが知られています(図1)。同じ場所で長期間生育する樹木は虫や動物による食害や病原菌の侵入等に対する応答機能として多様な「受容体」を持つと考えられますが、研究例が無く、早急に研究を開始する必要がありました。そこで、本研究ではポプラから「受容体型プロテインキナーゼ」遺伝子を単離するとともに、その機能について調べました。

成果

ポプラで受容体型プロテインキナーゼの遺伝子(PnLPK)が見つかりました

単離したポプラの受容体型プロテインキナーゼPnLPKの遺伝子から推定されるタンパク質は676のアミノ酸からなり、大きく2つの領域に分けられます。一つはレクチン(糖を結合するタンパク質の一般名)に似た領域であり、もう一つはプロテインキナーゼの酵素活性部位と考えられる領域です(図2)。さらに、PnLPKを細胞膜に留めておくための疎水性アミノ酸に富む膜貫通領域と予想される配列が存在しました。

PnLPKタンパク質はタンパク質をリン酸化します

受容体型プロテインキナーゼは、プロテインキナーゼ活性によるリン酸基の受け渡しで情報を伝達します。そこで、PnLPKタンパク質がプロテインキナーゼ活性を持つのかを明らかにするために、大腸菌で遺伝子組換えタンパク質(rLPK-F、rLPK-C)を作製して調べました。その結果、rLPK-C及びrLPK-Fは実際にプロテインキナーゼ活性を持つことが示されました。(図3)。

PnLPK遺伝子は傷害で発現が誘導されます

PnLPK遺伝子と環境応答との関連を明らかにするため、PnLPK遺伝子の発現を解析したところ、傷害を与えた1時間後にはPnLPK遺伝子の発現が誘導されました。PnLPK遺伝子がポプラの傷害抵抗性に関与していることが示唆されました(図4)。以上のようにポプラにも外部からの傷害等に応答する遺伝子が存在し、防御に関わっている可能性が示唆されました。

成果の利活用

PnLPKの機能をさらに詳しく解明することにより、強い防御能力を持った新しい樹木の開発へつながることが期待できます。

関連発表論文

Nishiguchi M, Yoshida K, Sumizono T, Tazaki K (2002) Mol. Genet. Genomics 267: 506-514

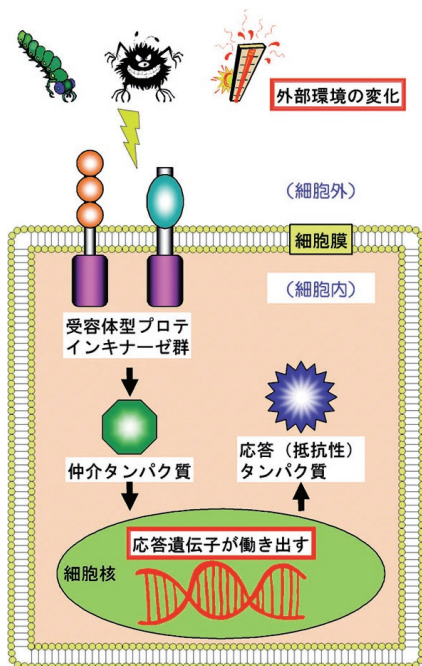


図 1 外部環境の変化に対する細胞の応答機構

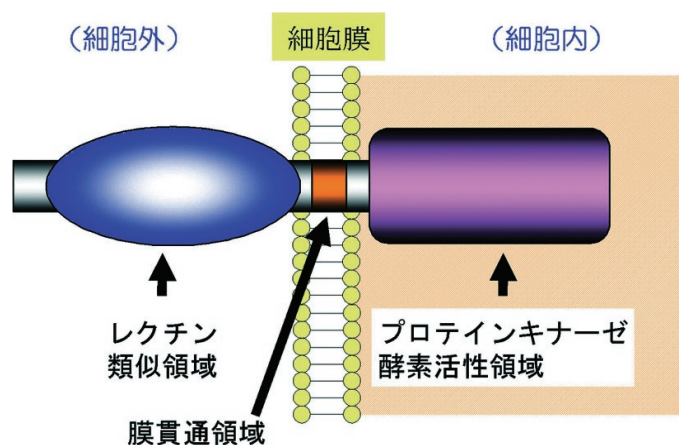


図 2 PnLPKタンパク質の構造模式図

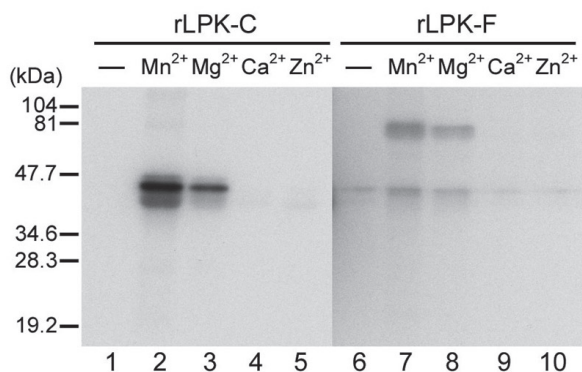
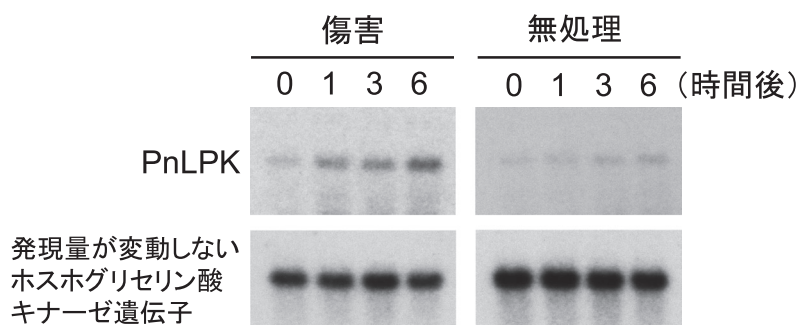


図 3 PnLPKタンパク質の機能解析

PnLPKの酵素活性領域(rLPK-C、◁) および全長タンパク質(rLPK-F、◀)は、リン酸化の活性を備えていました。



(a) パンチによるポプラの傷害実験



(b) 遺伝子発現解析

図 4 PnLPK遺伝子の傷害誘導

PnLPK遺伝子は傷害処理で誘導されることを明らかにしました。

針葉樹の採種園には遠距離から花粉が飛んできます

背景と目的

針葉樹採種園には優良な種苗を作り出すための種子を生産する重要な役割が求められています。そのため、採種園で生産される種子については、花粉親を明らかにする等、遺伝的特性の評価を科学的に客観性のある手法で行うことが必要でした。そこで、スギでDNAマーカーを開発し、このマーカーを利用して、複数のスギ採種園における遺伝子の流動の実態を調査しました。

成果

採種園における花粉混入の実態を明らかにしました

開発したDNAマーカーの中でもっとも多型性が高く、安定したパターンが得られる6遺伝子座を利用して、従来の採種園及び最近使われるようになったミニチュア採種園で母樹別に採種した種子についての遺伝子流動の解析を行いました(図1)。その結果、採種園の外部から花粉が混入する率は35%から66%と幅があり、採種園によって大きく異なることを明らかにしました。そこで、採種園の周囲にあるスギの植栽面積と外部花粉混入率との関係を調べるために、採種園を中心として半径1-10kmでのスギ植栽面積を調査しました。その結果、採種園周辺のスギ植栽面積の割合が高くなる程、外部花粉混入率も高くなる傾向が見られました(図2)。

花粉親としての貢献度を明らかにしました

採種園で植栽されている各クローンの花粉親としての貢献度を調査した結果、各々のクローンの貢献度は一様でなく、有意に偏っていることを明らかにしました(図3)。この結果から、各クローンの花粉生産量及び開花時期の違いにより貢献度の差異が生じていることが示唆されました。

以上のように、針葉樹採種園における外部からの花粉の混入や採種園の中での遺伝子の流動をDNAのレベルで科学的に明らかにすることができました。

成果の利活用

本研究は現在使用されている針葉樹採種園における遺伝子の流動の実態と外部の環境との関係を科学的に明らかにしたもので、研究成果は今後、新たに採種園を造成する場合に有益な基礎情報として活用されることが期待できます。

関連発表論文

1) Moriguchi, Y., N.Tani, S. Ito, F. Kanehira, K. Tanaka, H. Yomogida, H. Taira, Y.Tsumura (2005) Tree Genetics and Genomes 1: 174-183

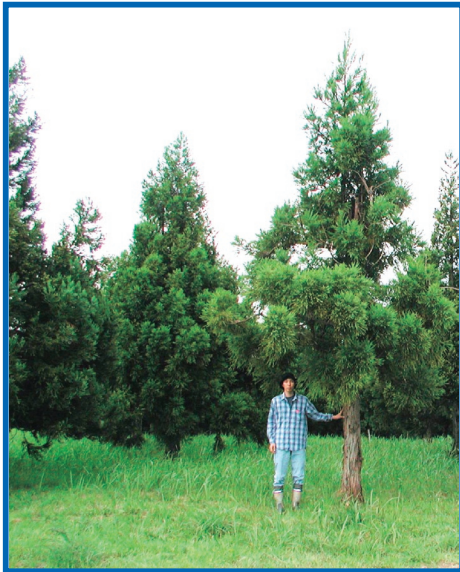


図1 スギの採種園

一般的には樹高が4m程度で、植栽間隔が3m程度になるように造成されています。

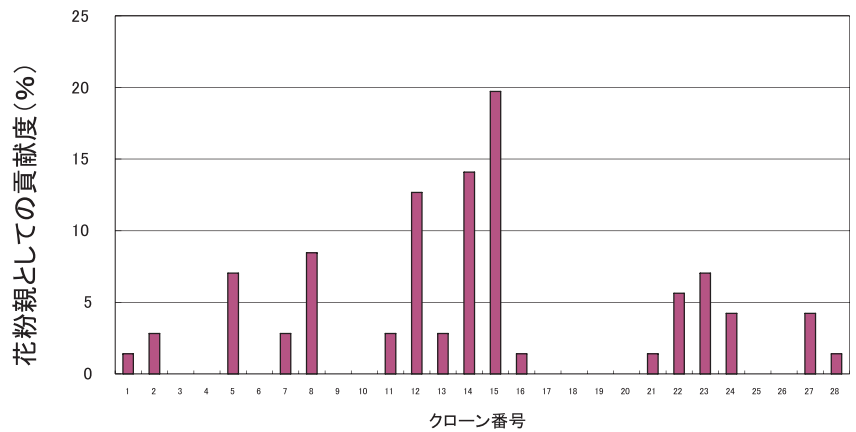


図3 種子生産における各クローンの花粉親としての貢献度

採種園に植栽されている各クローン間での受粉により生産される種子について、花粉親としての貢献度を調べた結果、1クローンで全体の約20%貢献しているものもあれば、全く貢献していないクローンもあることがわかりました。

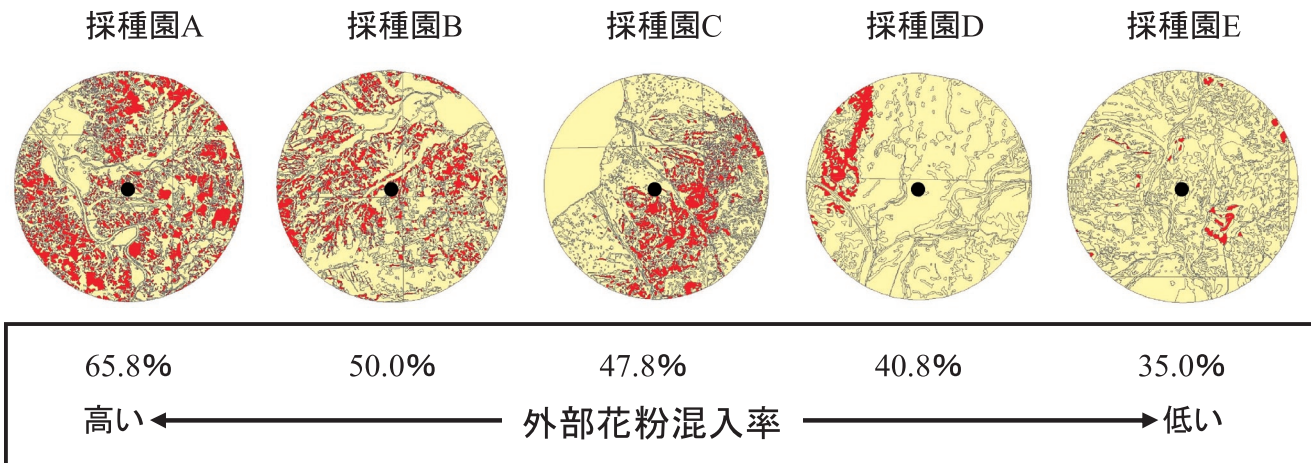


図2 採種園の周辺のスギ林の面積と外部花粉混入率との関係

採種園から半径10kmのスギ林を赤で表示。採種園周囲のスギ林面積が増加すると外部からの花粉の流入も増加します。

ホウ素は植物の細胞壁の強化に役立っています

背景と目的

ホウ素(B)は植物の必須微量元素ですが、植物がなぜホウ素を必要とするかは長い間不明でした。最近、ホウ素は細胞壁の構成成分であるラムノガラクトソナンII と結合することが解ってきましたが、この結合がどのような役割を果たしているかは不明です。そこで、植物の成長におけるホウ素の機能を解明するとともに、コケ植物からシダ植物への陸上植物の進化とホウ素との関係を明らかにしました。

成果

細胞壁におけるホウ素の役割を明らかにしました

ホウ素欠乏したカボチャ(B欠乏)の植物体はホウ素を供給した正常のものに比較して小さくて、もろく、また細胞壁の厚さは正常なものの約4倍に膨潤していました。正常な細胞壁ではペクチン多糖であるラムノガラクトソナン II (RG-II)はホウ酸と結合して二量体(dRG-II-B)を形成していますが、ホウ素欠乏した細胞壁では、RG-IIが単体(mRG-II)として存在していました。また、ホウ素欠乏したカボチャのRG-IIとホウ素が十分なカボチャのRG-IIは化学構造が同じであったので、ホウ素が欠乏しても正常なRG-IIが生合成されることが明らかになりました。以上のことから、ホウ素は細胞壁中でラムノガラクトソナンIIと結合して2量体 (dRG-II-B)を形成し、ペクチンを架橋することで細胞壁構造を安定化する役割を果たしていることを明らかにしました(図1)。

陸上植物への進化で、ラムノガラクトソナンII とホウ素の結合は重要な役割を果たしています

種によってdRG-II-Bの含量に差がありますが、調べた8種類のシダ植物は全てdRG-II-Bを含んでいました(図2、左)。コケ植物からは少量のdRG-II-Bが検出されましたが、その含量はシダ植物の約100分の1でした(図2、右)。以上のことから、水中植物が陸上に上がり、コケ植物が誕生したときにdRG-IIが合成されるようになり、コケ植物からシダ植物に進化する過程で大量のdRG-IIが合成されて、強固な細胞壁の構築が可能になり、維管束組織を発達させたと推察されました。

成果の利活用

本研究の成果は施肥管理が困難な必須微量元素、ホウ素の施肥や管理指針を作成する上で有用な知見になると思われます。さらに、樹木の材形成の基礎となる細胞壁の生成に関する研究の発展に貢献することが期待できます。

関連発表論文

- 1) Ishii T, Matsunaga T, Iwai H, Satoh S, Taoshita J (2002) Plant Physiol. 130, 1967-1973

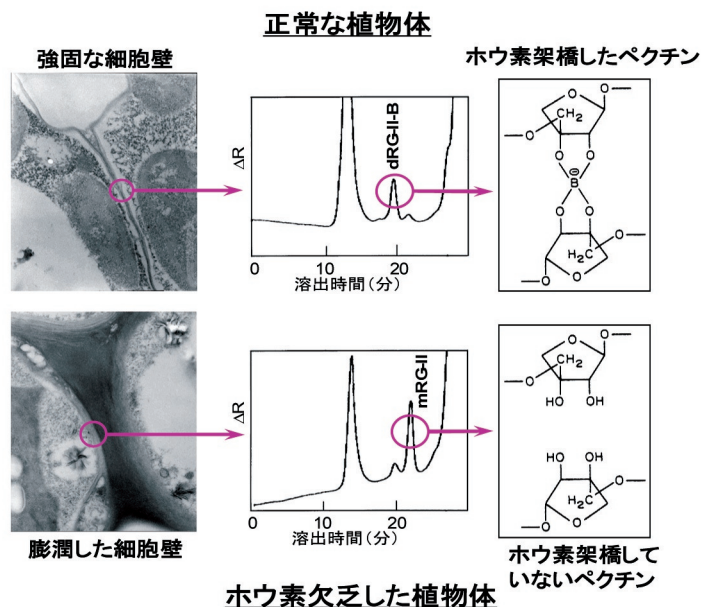


図 1 ホウ素欠乏した植物体とホウ素が十分供給された植物体の微細な細胞壁構造

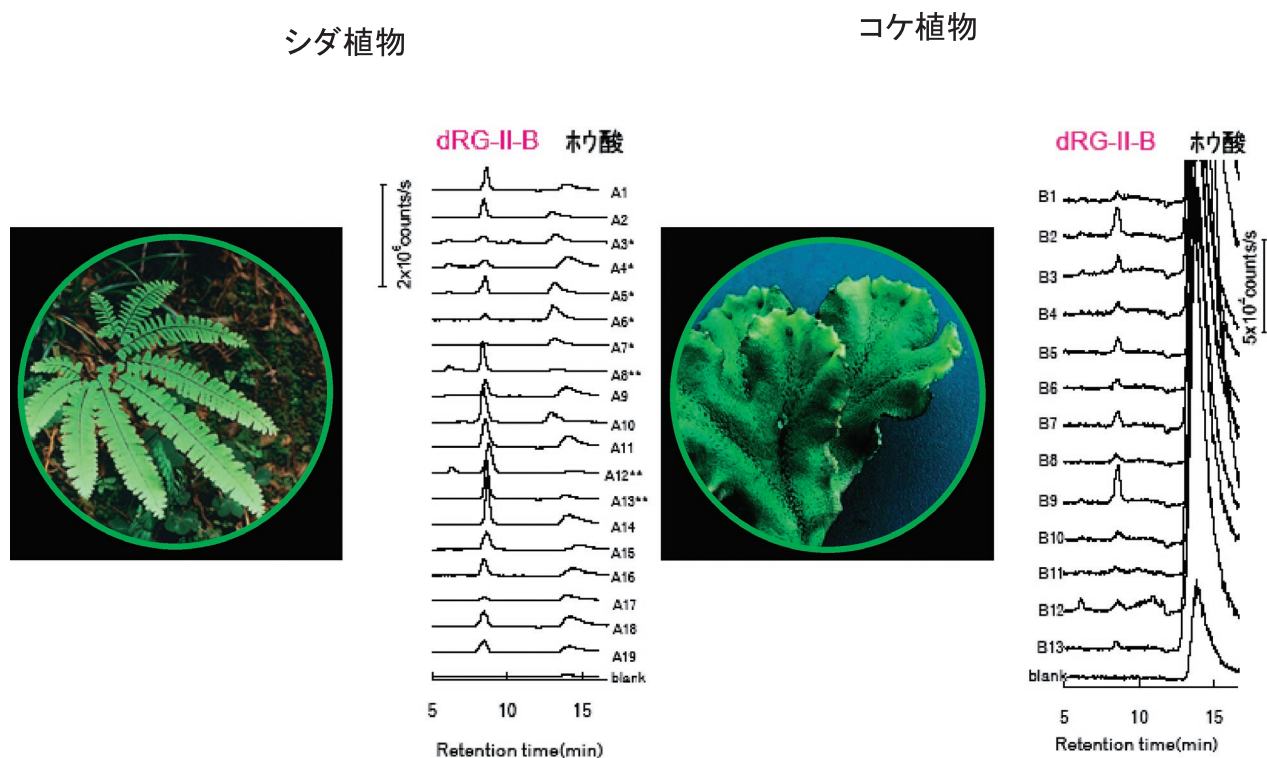


図 2 シダ植物及びコケ植物におけるホウ素と結合したラムノガラクトツロナンⅡの二量体の検出

シダ植物及びコケ植物の細胞壁をサイズ排除HPLC／ICP-MSクロマトグラフィーで分析し、ホウ素と結合したラムノガラクトツロナンⅡの二量体(dRG-Ⅱ-B)を検出することができました。右の図は2倍量の試料を注入し、縦軸を40倍に拡大しています。

樹木の材の形成に関わる酵素の測定法を開発しました

背景と目的

樹木における材の形成は形成層で分裂した細胞の伸長成長とその後の分化(肥厚・木化)の2段階からなります。細胞の伸長成長や分化には細胞壁の生成が深く関わっていますが、この生成過程には不明な点が多く残されています。そこで、細胞壁を構成する多糖類を蛍光標識し、この標識した多糖類を利用して、細胞壁の生成に関わる酵素、すなわちガラクトツロン酸転移酵素、ガラクトース転移酵素及びアラビノース転移酵素の活性測定法を開発を行いました。

成果

細胞壁のオリゴ糖を蛍光標識して、糖の検出感度を上げました

多糖類は他の生体物質に比べ検出が難しい物質です。もし、多糖類が高感度で検出できれば、細胞壁の生成の関する酵素の測定法の開発が可能になります。そこで、植物細胞壁から単離したオリゴガラクトツロン酸、ガラクトオリゴ糖及びアラビノオリゴ糖の還元末端を蛍光物質で標識した多糖類を合成しました。こうして標識した多糖類は、従来の方法による糖の検出に比べて遙かに高い感度で検出を行うことを可能にしました。

細胞壁の生成に関わる酵素の測定法を開発しました

蛍光標識した多糖類を利用して3種類の酵素の測定法を開発しました。まず、標識化したオリゴガラクトツロン酸を用いてガラクトツロン酸転移酵素の活性を高感度で迅速に測定できることを明らかにしました(図1)。生成された糖鎖の解析から、オリゴガラクトツロン酸の基質としての活性に糖鎖の重合度が関係することを明らかにしました。さらに、標識化したガラクトオリゴ糖を用いたガラクトース転移酵素の活性及び標識化したアラビノオリゴ糖を用いたアラビノピラノース転移酵素の活性を、それぞれ測定することが可能になりました(図2)。この結果は、アラビノピラノース転移酵素が植物の細胞中に存在することを初めて示したものです。

成果の利活用

樹木の材形成に重要な働きをしている細胞壁の生成に関わる様々な酵素の測定に利用が可能な手法を開発しました。今後は各酵素の詳細な働きを明らかにすることが可能になり、材形成の機構の解明が進むことが期待できます。

関連発表論文

- 1) Ishii T (2002) Plant Cell Physiol., 43, 1386-1389
- 2) Ishii T, O-Kameyama M, Ono H (2004) Planta, 219, 310-318

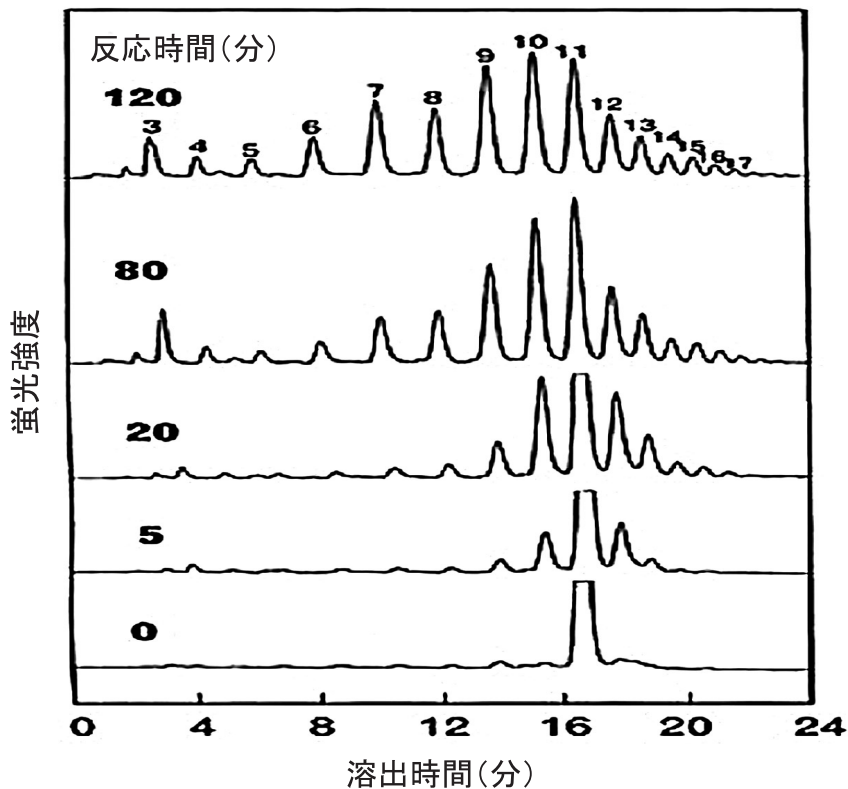


図 1 ガラクトロン酸転移酵素の測定

標識化したオリゴガラクトロン酸を基質としてガラクトン酸転移酵素の活性を測定しました。反応時間が長くなるに従って、後から溶出されるピーク(反応生成物)の数が増えます。

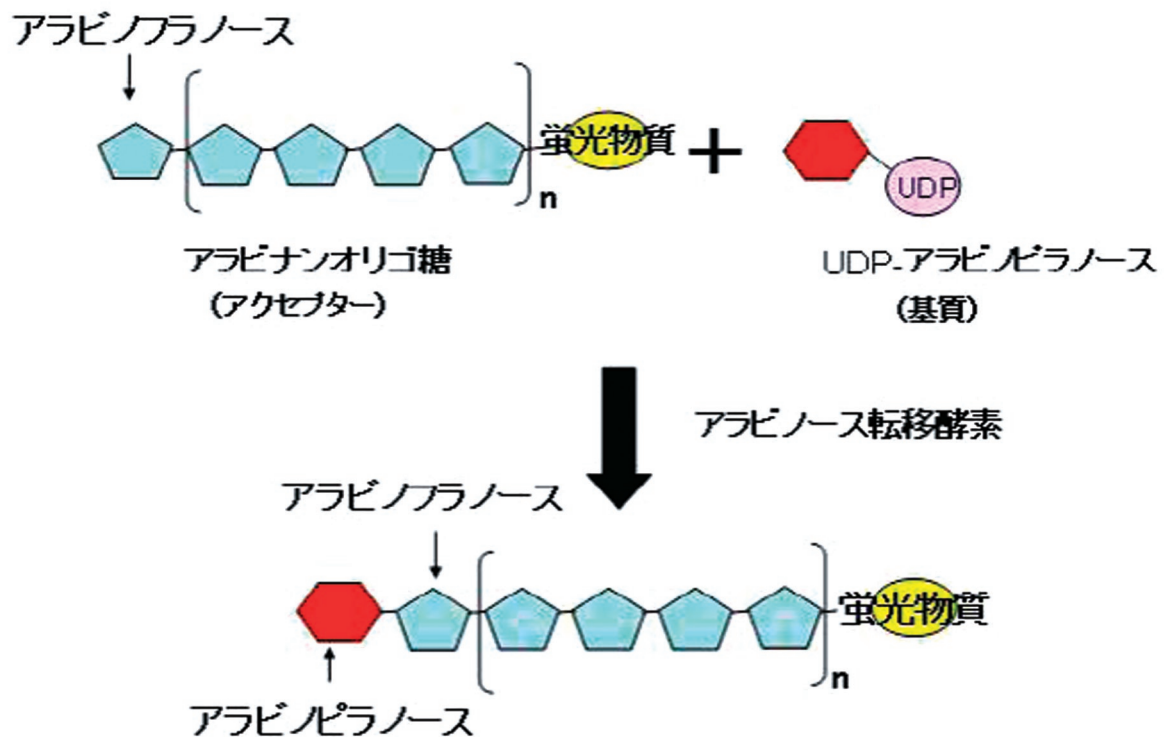


図 2 アラビノース転移酵素による反応

アラビノース転移酵素による反応でアラビノピラノースが付加されて、アラビノオリゴ糖の鎖が長くなりました。

ヒノキの不定胚を経由して個体を再生する画期的な技術を開発しました

背景と目的

樹木の遺伝子組換えを成功させるために、外来遺伝子を導入した僅かな数の細胞から効率的に成熟個体を作り出す技術は不可欠です。重要な造林樹種であるヒノキでは効率的な個体再生技術が開発されてきませんでした。そこで、各種の組織培養条件を検討することで、未熟種子から不定胚(受精によらずに体細胞から生ずる胚、いわば種子の胚に相当する組織)を誘導し、大量のクローンヒノキを再生する技術を開発しました。

成果

不定胚を経由したヒノキの個体再生技術を開発しました

ヒノキ未熟種子(図 1 A)から切り出した胚を、植物ホルモン(ベンジルアミノプリン:BAPと2, 4-ジクロロ酢酸:2, 4-D)を添加した培地で培養すると、活発に増殖する不定胚に分化可能な細胞が得られました(図 1 B, C)。そこで、この細胞をマルトース、ポリエチレングリコール(PEG)、活性炭、植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)を添加した培地で培養すると、不定胚が形成され、成熟させることができました(図 1 D、E、F、G、H)。さらに、成熟した不定胚を、植物ホルモンを添加しない培地で発芽させると、多数の幼植物体が再生しました(図 1 I、J、K、L)。

大量増殖技術へも応用できます

この不定胚を経由した個体再生技術では、種子1個から数万本のクローン苗を短期間に得ることが可能になります。再生したヒノキを、人工気象室で順化させ、苗畑へ移植すると、健全な生育を示しました。また、サワラ等の他の国産主要針葉樹での個体再生技術も開発しました。さらに、不定胚形成細胞を誘導してから長期間の継代培養を続けると、分化能力が低下する問題を解決するために、高い分化能力を保持した細胞を液体窒素中(-196℃)で長期間保存する技術も開発しました。

成果の利活用

本研究で開発したヒノキの不定胚を経由した個体再生技術は、ヒノキの遺伝子組換えの基盤技術として、花粉アレルゲンを生産しない個体や病虫害に強い個体等の作出への応用が期待できます。また、ヒノキ有用品種の大量増殖技術としての活用も見込まれます。さらに、不定胚形成細胞の超低温保存技術は、長期にわたる森林遺伝資源の保存に道を拓きます。

関連発表論文

- 1) Maruyama E, Ishii K, Hosoi Y (2005) J. For. Res. 10: 73-77
- 2) Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2005) J. For. Res. 10: 403-407

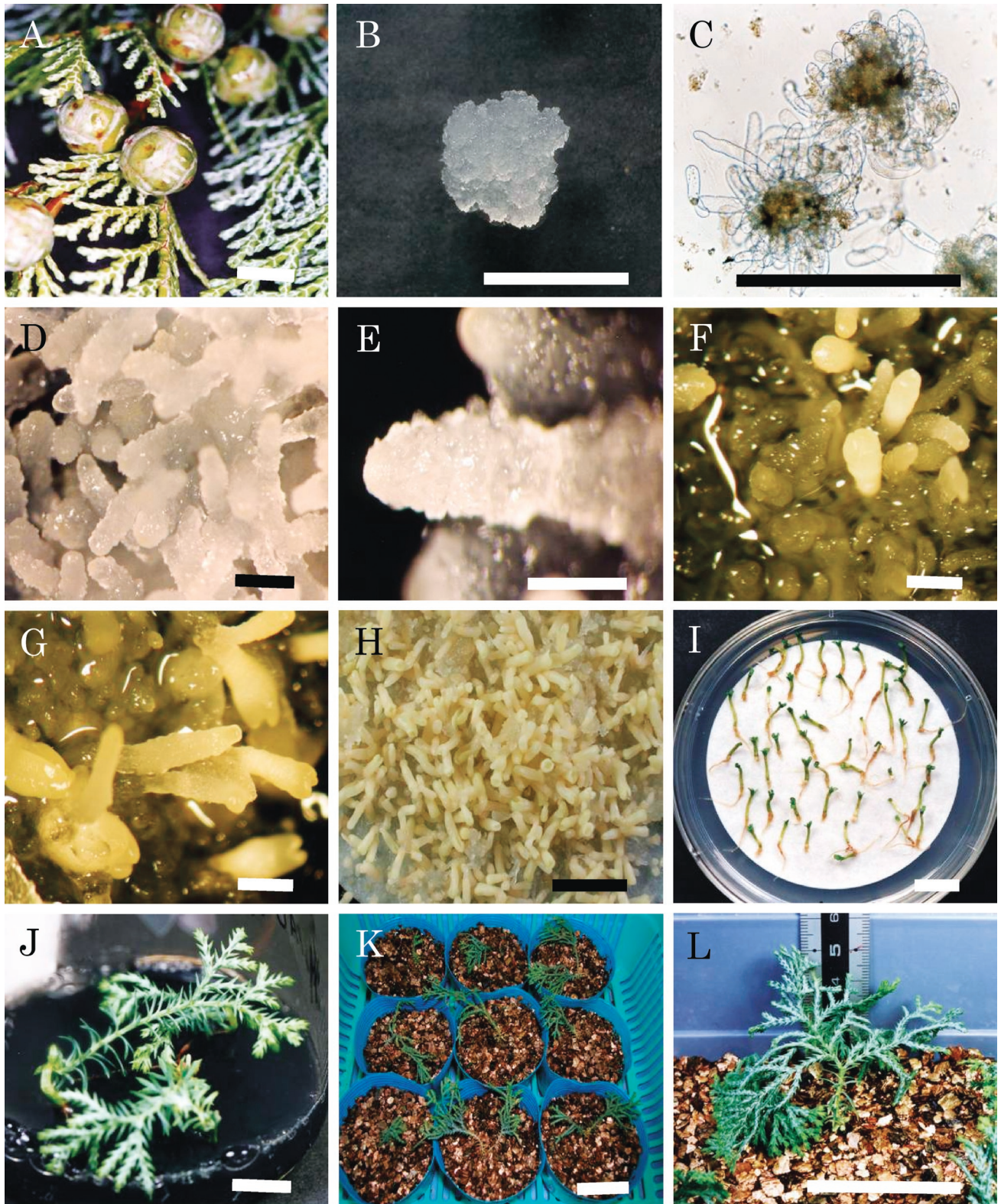


図 1 不定胚を経由したヒノキの個体再生系

A:未熟球果 B, C:不定胚形成細胞 D, E, F, G, H:不定胚の成熟過程

I:不定胚の発芽 J:幼植物体 K, L:順化植物

スケール(C, D, E, F, G: 1 mm; A, B, H, I, J: 1 cm; K, L: 5 cm)

きのこ類で遺伝子を導入するための新しい技術を開発しました

背景と目的

21世紀のきのこ産業の基盤を支える戦略として、遺伝子組換え等のバイオテクノロジー研究を進展させる必要があります。そこで、本研究では、きのこ類では未だ報告の無かったレトロトランスポゾン(動く遺伝子)をマツタケより単離し、これを利用してシイタケの新たな遺伝子組換え技術を開発しました。さらに、遺伝子導入法の一つであるパーティクルガン(遺伝子銃)法をシイタケ、ハナイグチ、アマタケ等のきのこへ応用することにより、実用性のある遺伝子組換え技術の開発を行いました。

成果

レトロエレメントを用いてシイタケ遺伝子組換え技術を開発しました

マツタケからトランスポゾン(動く遺伝子)の仲間であるレトロエレメント2種類をきのこでは初めて単離しました。このレトロエレメント、*marY1*と*marY2N*はトランスポゾンに必要な機能を備えていることを明らかにしました。2種類のレトロエレメントうち、*marY1*の末端部分にあって、反復している配列は、動く遺伝子としての機能を持っていることが解りました。そこで、この配列を使って遺伝子組換え用ベクター(遺伝子の運び屋)を作製しました。このベクターをシイタケへ導入したところ(図1)、遺伝子をシイタケの核に組み込むことができました。この方法で作出した遺伝子組換え体の発生頻度は、きのこのモデル生物として知られているネナガノヒトヨタケでの遺伝子組換えの効率と同程度でした。

パーティクルガンを用いた遺伝子組換え技術を開発しました

ハナイグチ、アマタケおよびヒタラケでパーティクルガン法による遺伝子組換えの効率を向上させるために、遺伝子を運ぶ粒子へ加える圧力、粒子を飛散させる距離の最適条件を検討しました。その結果、ハナイグチ、アマタケ、ヒタラケのそれぞれで最適な圧力と距離の組み合わせが明らかになりました。各々の条件で3種のきのこを遺伝子組換えしたところ、導入した遺伝子が核に組み込まれていることが確認できました。さらに、ヒタラケの遺伝子組換え体で次世代のきのこを形成させたところ、親株と同様に正常な形態のきのこが形成されるとともに(図2)、導入した遺伝子が安定して次世代に伝わっていることを確認することができました(図3)。

成果の利活用

マツタケのレトロエレメントを利用して開発したベクター及びパーティクルガン法による遺伝子組換えの技術は、他のきのこにおける遺伝子組換えにも利用することができる有用な方法で、今後のきのこの遺伝子組換え体の開発に貢献することが期待できます。

関連発表論文

- 1) Sunagawa M, Magae Y (2002) FEMS Microbiol. Lett. 211:143-146
- 2) Murata H, Miyazaki Y (2004) Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:218-221

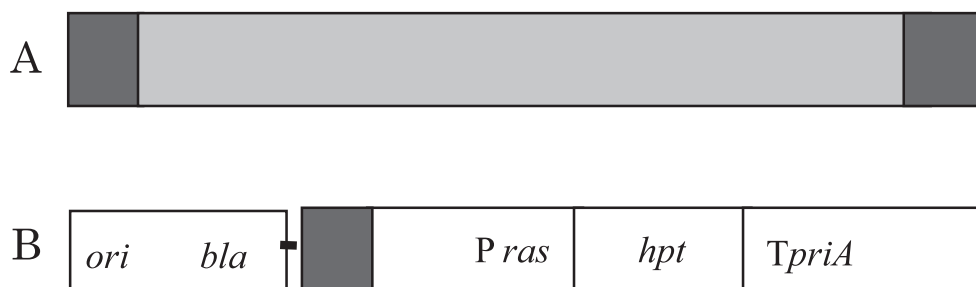


図1. マツタケのレトロエレメント $marY1$ (A)と $marY1$ の末端反復配列を使ったシイタケ形質転換用ベクター
黒塗りのボックス:末端反復配列LTR、灰色のボックス: $marY1$ の翻訳領域、白色のボックス: 基礎ベクター。



図2 ヒラタケの遺伝子組換え体

遺伝子組換え前の親株(左)と遺伝子組換え体(右、TF2株)

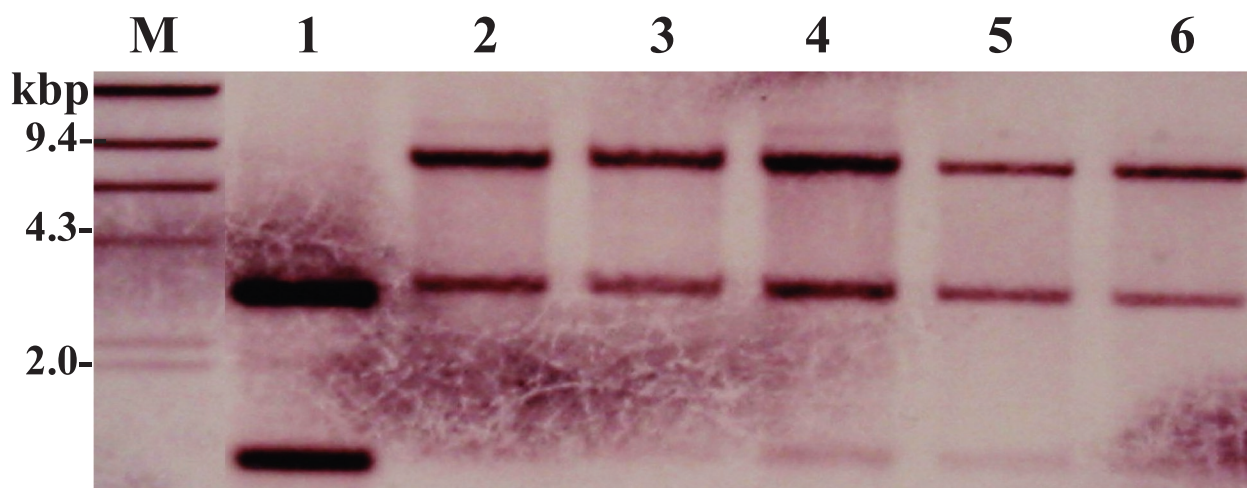


図3 遺伝子組換えヒラタケでの導入遺伝子の確認

組換え第一世代(TF2)と組換え第二世代(TFD2)で導入したベクターが確認できました。
M: サイズマーカー、1: ベクター、 2: TF2(子実体)、3: TFD2(菌糸)、4: TFD2(子実体)、
5-6: TFD2(孢子)

きのこの子実体の形成を誘導する新たな物質を発見しました

背景と目的

きのこ類で子実体(きのこ本体)の形成を引き起こすホルモンのような物質が発見されると、きのこの栽培現場、とくに菌床栽培において安定して効率的な栽培技術の新たな開発に繋がるのが期待できます。市販のサポニンが子実体の形成を誘導することを既に明らかにしましたが、このサポニンには様々な構造の物質が含まれています。そこで、合成したサポニン等を用いて、子実体を誘導する仕組みを明らかにすることを目的にしました。

成果

人工サポニンにより子実体形成が誘導されました

シラカバ樹皮から単離したベチュリン(トリテルペノイド)を出発物質として化学反応および酵素の転移反応によって糖を付加した人工サポニンを合成し、ヒラタケの子実体誘導活性試験を行ったところ、ベチュリンサポニン(図 1)の糖残基数の違いによって、子実体誘導活性の度合いが変化しました(図 2)。特に4個のグルコースを有するものが最も活性が高いことが明らかになりました。

アルキルグルコースによる子実体形成の誘導

一方、アルキル基にグルコースを付加した物質、アルキルグルコース(図 3)、を化学合成してヒラタケに対する誘導活性を調べたところ、実際に子実体を誘導する活性を示しました。このような効果は、ヒラタケだけでなく、褐色腐朽菌オオウズラタケや白色腐朽菌カワラタケなど、実験室で子実体を作り難い木材腐朽菌でも認められました(図 4)。

以上のように、疎水性物質に糖鎖が付加した物質(ベチュリンサポニンやアルキルグルコース)が担子菌の子実体誘導活性を示すことを初めて明らかにしました。さらに、付加した糖鎖の長さが活性を現すうえで重要であることも明らかにしました。

成果の利活用

今回の発見はきのこの栽培現場における安定的な増収や、木材腐朽菌の子実体形成を実験室で促し、それによって菌糸で生育している樹木の病気や木材の腐朽に関わる菌の科学的な分類・同定を行うなど、新たな利用法が期待できます。

関連発表論文

1) Magae Y, Nishimura T, Ohara S. (2005) Mycological Research 109(2): 374-376

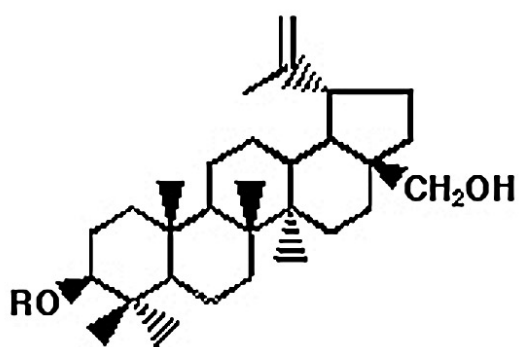


図 1 ベチュリンサポニンの構造式
Rには様々な糖鎖が結合します。

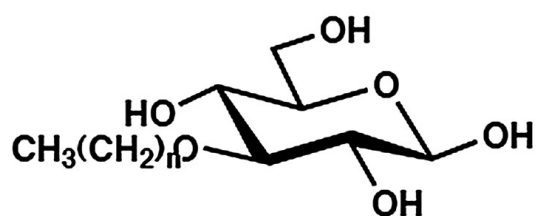


図 3 アルキルグルコースの構造式



図 2 ヒラタケ子実体の誘導

ベチュリンサポニンを添加するとヒラタケの子実体発生が誘導されました(矢印)。

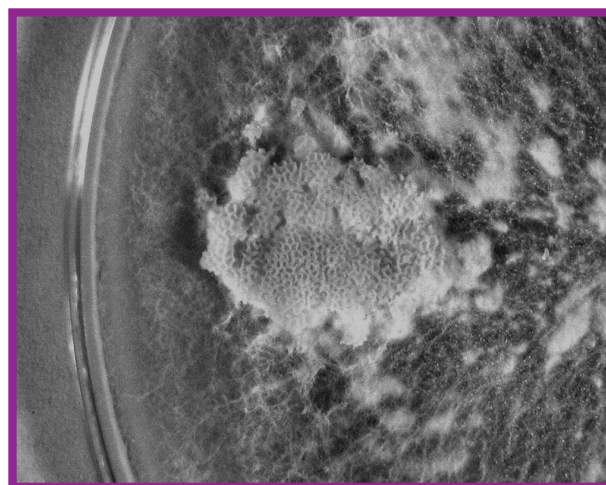
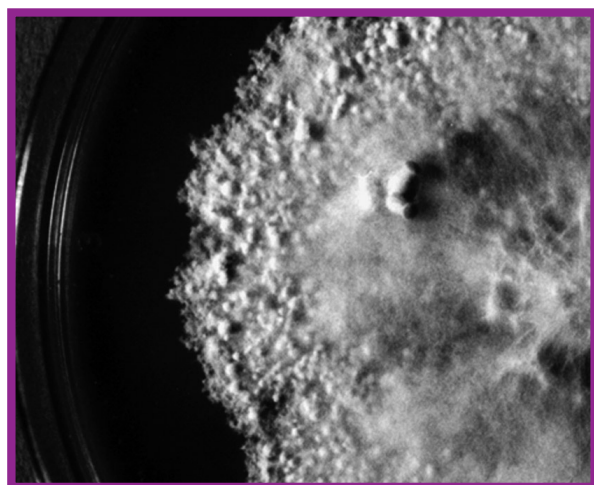


図 4 アルキルグルコースの添加で子実体原基を形成したヒラタケ(左)と
オオウズラタケ(右)

個体識別法の開発でマツタケが多様であることが解りました

背景と目的

マツタケの人工栽培法は未だ開発できていませんが、その要因の一つとして、マツタケの個体識別方法が確立されていないため、菌株間の遺伝的な違いを考慮した技術開発ができなかったことが挙げられます。個体識別法が開発されると、多様なマツタケ遺伝資源の中から栽培化に適した菌株を見つけだすことも可能になります。本研究では、マツタケの*marY*と名付けたレトロトランスポゾンを利用した個体識別法の開発に取り組みました。

成果

マツタケの個体識別法を開発しました

DNAを増幅する技術を利用して、レトロトランスポゾンに隣接する特定の領域のDNAの長さを比較することで、マツタケの個体が識別できることを明らかにしました(図2)。この方法ではマツタケの近縁種であるアメリカマツタケ、バカマツタケ、ニセマツタケ、マツタケモドキのうちアメリカマツタケでも個体が識別できることが解りました。

系統識別により、マツタケの系統が明らかになりました

マツタケは共生する樹木の根圏でシロという菌糸の塊状の集落を作ります(図1)。そこで、滋賀県の2試験地及び茨城県と岩手県のそれぞれ1試験地で発生するマツタケとシロを構成する菌糸を個体識別法で調査しました(図2)。その結果、一つのシロで発生するマツタケ及びシロを構成する菌糸は異なる系統の集まりであることを明らかにしました。滋賀県での調査では、一つのシロで異なる二つの系統のマツタケが発生していることを確認しました(図3左)。さらに、滋賀県、茨城県、岩手県の試験地間での比較でも、遺伝的な均一性はあまり見られず、むしろ様々な系統が混在していることを明らかにしました(図3右)。本研究の結果から、今回調べた地域間だけでなく、一つのシロでも遺伝的に異なる系統のマツタケが混在することが明らかになりました。

成果の利活用

マツタケの個体識別技術は、人工栽培法の開発に適したマツタケ菌株の選抜やマツタケが共生する樹木との相性の解明に活用することができます。さらに、マツタケの市場における産地の識別等への利用が可能になります。

関連発表論文

- 1) Murata H, Babasaki K, Yamada A (2005) Mycorrhiza 15:179-186
- 2) Murata H, Ohta A, Yamada A, Narimatsu M, Futamura N (2005) Mycorrhiza 15:505-512



図 1 マツタケ(左)とマツタケがつくるシロ(右)

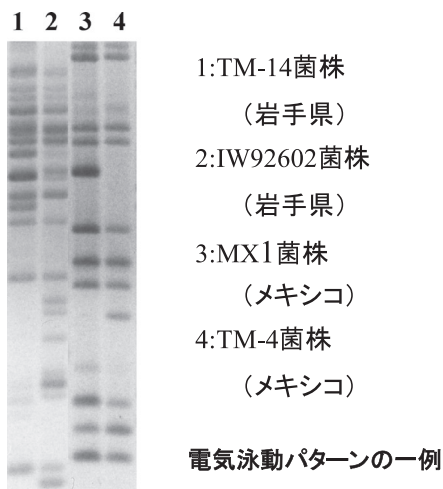


図 2 レトロエレメントをDNAマーカーにした個体識別法

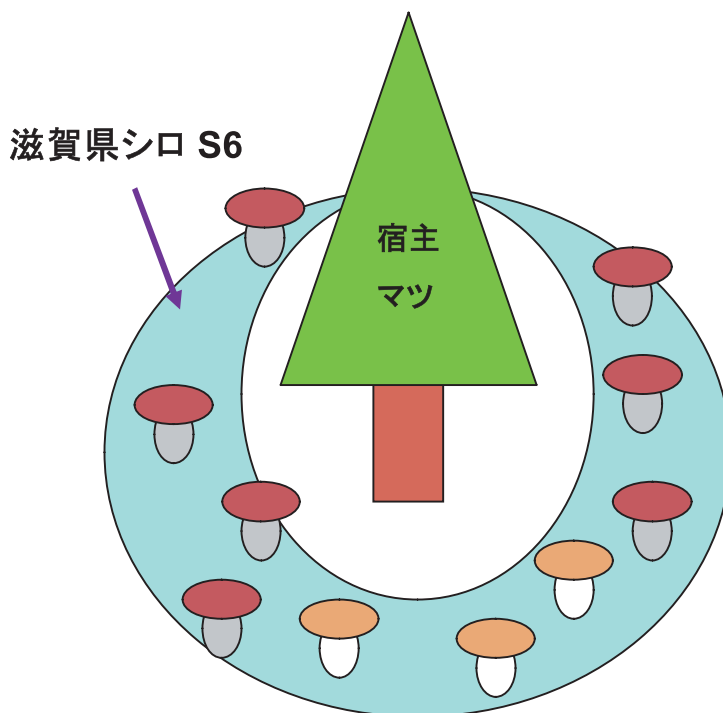
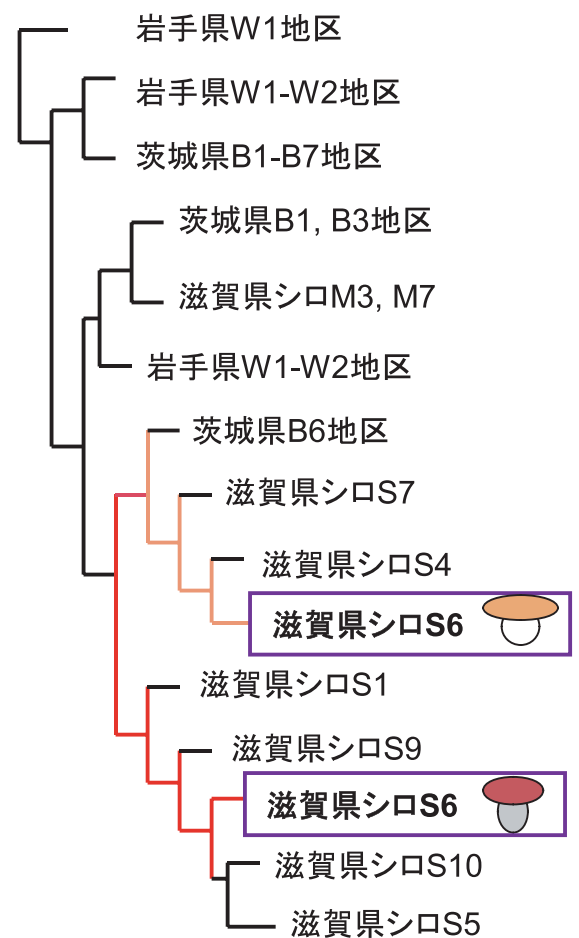


図 3 DNAマーカーを利用したマツタケの系統解析(右)とシロのモザイク現象の証明(左)

ISBN 4-902606-27-5

[森林総合研究所 第1期中期計画成果集23]

樹木ときのご類のゲノム解析及び生物機能の 解明で未来を拓く

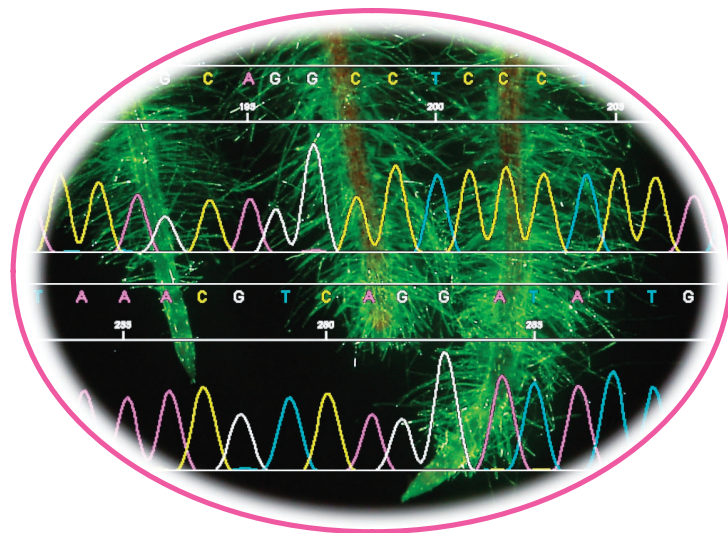
発行日 平成18年12月

編集・発行 独立行政法人 森林総合研究所
〒305-8687 茨城県つくば市松の里1番地
電話029-873-3211（代表）

お問い合わせ 企画調整部研究情報科
メールアドレス kanko@ffpri.affrc.go.jp
ホームページ <http://www.ffpri.affrc.go.jp>

印刷所 黒田印刷株式会社

本誌から転載・複製する場合は、森林総合研究所の許可を得て下さい。



独立行政法人 森林総合研究所