



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Analysis of indole-and caffeine-resistant mutations of *Schizophyllum commune* involved in mating and fruiting

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Partha Pratim Samadder メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2479

氏 名 (国籍)	Partha Pratim Samadder (バングラデシュ人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第138号
学位授与年月日	平成10年9月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学位論文題目	Analysis of indole-and caffeine-resistant mutations of <i>Schizophyllum commune</i> involved in mating and fruiting
審査委員	主査 信州大学 教授 黒 沢 辰 一 副査 岐阜大学 教授 中 村 征 夫 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 信州大学 教授 寄 藤 高 光 副査 信州大学 助教授 千 菊 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

真核微生物である担子菌の子実体形成過程は、二核菌糸の無秩序な集合体から条件が整えばその種特有の形態の子実体を形成する過程でありその機構には生物学的にたいへん興味を持たれる。本研究は、論文の著者の属する研究室で行われている担子菌の子実体(キノコ)形成機構に関する研究の一環として計画されたものである。これまでに多数の子実体形成促進物質が報告されているが、その作用を子実体形成機構とむすびつけて解明した例はほとんどない。本研究の予備的実験では、インドールが子実体形成を引き起こすことが半明していた。一方、cAMPは子実体形成に重要な役割を果たす化合物であり、カフェインはcAMPを加水分解する酵素ホスホジエステラーゼ(PDE)の阻害剤としてよく知られている。それゆえ、本研究においては担子菌スエヒロタケの子実体形成におけるインドールとカフェインの作用を明らかにすることを目的とした。この目的のために、スエヒロタケ二核体 T11 株のインドールならびにカフェイン耐性株を単離して、交配型の不和合性と子実体形成の観点から、それら菌株の形態学的変化と遺伝的様相について検討した。研究対象に取り上げたスエヒロタケ *Schizophyllum commune* は木材腐朽菌のひとつであり、高等担子菌の四極性型交配、分化、遺伝子発現の研究対象としてよく用いられている。スエヒロタケの二核化の制御は、4つの多重対立遺伝子($A\alpha$, $A\beta$, $B\alpha$ and $B\beta$)による調節が関わる複雑な過程である。スエヒロタケの子実体形成は一般には和合性交配の後に形成される二核菌糸体から起こる。和合性交配とそれに続く菌糸の有性生長は、2つの交配型因子が遺伝的に異なる時($A \neq B$)のみ進む。

まず、T11 株の菌糸破砕断片を紫外線照射(15 J/s)して、インドール(350~400 $\mu\text{g/ml}$)およびカフェイン(4 mg/ml)を含む選択寒天培地上で、化合物耐性変異株を選抜した。変異株の形態的および遺伝的特性の解析については常法により行った。次に、和合性の一核体を交配することによって二核菌糸を作成し、これらの二核体子実体から得た担子胞子を単離してを遺伝解析を行った。交配の結果できた二核体および部分二核体(半和合性異核共存体)に子実体形成をさせるに当たっては、何種類かの化合物を寒天培地に添加して、それらの効果を評価した。また、培養菌糸の核および隔壁をそれぞれ 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩(DAPI) および Calcofluor White ST で染色して蛍光顕微鏡下で観察した。

In^R-13(インドール耐性, *indl* 変異を持つ)と Caf^R-9(カフェイン耐性, *cfnl* 変異を持つ)の 2 種類の化合物耐性株を選抜することに成功した。これら In^R-13 および Caf^R-9 変異株は、それぞれインドール (350 $\mu\text{g/ml}$) およびカフェイン (4 mg/ml) を含む寒天培地上菌糸の正常生長および抑制をする特徴を有していた。いずれの変異株も非選択培地上ではフラット

(flat) な菌糸形態を示し、それらの細胞内核分布は不規則であった。これらの変異部位を解析したところ、*indl* および *cfnl* の両変異は、A, B いずれの交配型因子にも連鎖していなかった。両化合物耐性変異株と化合物感受性の野生型株との和合性交配を行ったところ、化合物に特異的な耐性変異は優性であることが半明した。これら変異株を用いた交配株は 50~60 $\mu\text{g/ml}$ のインドール存在下で子実体を形成し、それらの子実体形成はジフェニルアミンや安息香酸を添加することで促進された。

また、著者は次のようなことを見出した。親株 T11(*trp1*) は T37(*Bal'β4, trp1*) と完全な和合性を示すのにたいして、In^R-13, Caf^R-9 とすべてのインドール耐性子孫株(*indl, trp1*)、カフェイン耐性子孫株(*cfnl, trp1*) は、T37 株と半和合性を示すこと、および T37 株と同一のクラス III B 交配型因子(*Bal'β4*)を持つ T40(*Bal'β4, TRP1*)とはしかながら和合性を示すことを見出して、*indl* および *cfnl* 変異は、細胞の Trp/Trp⁺ 表現型に依存して、クラス III B 交配型因子(*Bal'β4*)の作用に関わっている、すなわち *indl* および *cfnl* の両化合物耐性変異は、Trp-細胞内においてクラス III B 交配型因子の一つ *Bal'β4* の正常な作用を変化させると結論した。この結論には、*TRP1* 遺伝子産物は、トリプトファンという栄養的供給の役割ばかりではなく *indl* および *cfnl* の変異効果を部分的に抑制する機能も有しており、ある条件下で和合性交配を可能にするという興味ある事実が含まれることを著者は指摘し *indl* および *cfnl* 変異のクラス III B / *trp1* 細胞に対する作用モデルを提出した。

審 査 結 果 の 要 旨

学位申請者 Partha Pratim Samadder 氏の学位論文審査が平成 10 年 8 月 3 日、13 時より信州大学農学部 11 番講義室において実施された。約 30 分間の公開論文発表会が行われ、引き続いて質疑応答が行われた。その後学位論文審査委員会が行われた。本研究の内容及び審査結果は以下のとおりである。

1. 研究の背景と目的:

真核微生物である担子菌の子実体形成過程は、二核菌糸の無秩序な集合体から条件が整えばその種特有の形態の子実体を形成する過程でありその機構には

生物学的にたいへん興味を持たれる。これまでに多数の子実体形成促進物質が報告されているが、子実体形成機構についてはほとんど解明されていない。本研究の予備実験でインドールがスエヒロタケの子実体形成をひき起こすことが判明していた。またカフェインはサイクリック AMP 分解酵素の阻害剤としてよく知られている物質である。そこで著者は、遺伝的解析が進んでおりかつ子実体形成までの期間が比較的短い担子菌スエヒロタケを実験材料にして、その子実体形成におけるインドールとカフェインの作用を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果と審査概要：

本論文は 1～4 章で構成されている。口頭発表は概ね論文の構成にしたがってなされた。その際行われた質疑はその内容のところに示した。序論につづく第 2 章では、まず、T11 株の菌糸破砕断片を紫外線照射することにより化合物耐性変異株 In^R-13 (インドール耐性, *ind1* 変異を持つ) と Caf^R-9 (カフェイン耐性, *cfnl* 変異を持つ) を選抜することに成功した。これらの形態的変化を観察して以下のようなことを見出した。In^R-13 および Caf^R-9 変異株は、それぞれインドール (350 μg/ml) およびカフェイン (4 mg/ml) を含む寒天培地上での菌糸の非抑圧生長および圧扁形の生長をする特徴を有していた。いずれの変異株も非選択培地上ではフラット (flat) な菌糸形態を示し、それらの細胞内核分布は不規則であった。さらにこれらの変異部位を解析して以下のことを明らかにした。*ind1* および *cfnl* の両変異は、A, B いずれの交配型因子にも連鎖していなかった。両化合物耐性変異株と化合物感受性の野性型株との和合性交配を行ったところ、化合物に特異的な耐性変異は優性であることが判明した。これら変異株を用いた交配株は 50～60 μg/ml のインドール存在下で子実体を形成し、それらの子実体形成はジフェニルアミンや安息香酸を添加することで促進された。ここで以上の変異株取得の経過について質問があり、さらに両変異株が優性を示す事について質疑がなされ著者によりの確かな応答があった。つぎに第 3 章では、親株 T11 (*trp1*) は T37 (*Bα1'β4*, *trp1*) と完全な和合性を示すのにたいして、In^R-13, Caf^R-9 とすべてのインドール耐性 子孫株(*ind1*, *trp1*)、カフェイン耐性子孫株 (*cfnl*, *trp1*) は、T37 株と半和合性を示すこと、および T37 株と同一のクラス III B 交配型因子(*Bα1'β4*)を持つ T40 (*Bα1'β4*, *TRP1*)とはしかしながら和合性を示すことを見出して、*ind1* および *cfnl* 変異は、細胞の Trp⁻/Trp⁺表現型に依存して、クラス III B 交配型因子(*Bα1'β4*)の作用に関わっている、すなわち *ind1* および *cfnl* の両化合物耐性変異は、Trp⁻細胞内においてクラス III B 交配型因子の一つ *Bα1'β4* の正常な作用を変化させると結論した。この結論には、*TRP1* 遺伝子産物は、トリプトファンという栄養的供給の役割ばかりではなく *ind1* および *cfnl* の変異効果を部分的に抑制する機能も有しており、ある条件で和合性交配を可能にするという興味ある事実が含まれることを著者は指摘した。そして *ind1* および *cfnl* 変異のクラス III B / *trp1* 細胞に対する作用モデルを提出している。ここで *TRP1* 遺伝子産物の作用、*ind1* 遺伝子の内容について質問がな

された。今後の研究の展開も含めて活発な質疑がなされた。また、説明に用いたトリプトファン合成経路について重要な指摘および指導があった。第4章は全体の考察とまとめがなされている。

論文発表後の審査委員会では研究の内容について好評価が与えられた。論文については、記述ミスの指摘、修正の指導があった。さらに、提出された作用モデルの評価について今後の研究の展開方向も含めて質疑がなされた。その結果本論文の内容は、担子菌の子実体形成の研究分野に貴重な知見をもたらし、学術的に価値あるものと評価された。以上のことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士（農学）の学位論文として合格と判定した。

3. 基礎となる学術論文の発表雑誌名：

① “Isolation and characterization of *Schizophyllum commune* mutants resistant to indole and caffeine” , FEMS Microbiology Letters, 150(1997) 277-282.

② “Indole- and caffeine-resistant mutations of *Schizophyllum commune* are involved in the behavior of a class III B mating-type factor in *trp1* cells” . FEMS Microbiology Letters, 163(1998), 113-120.