

食用きのこ類の品種改良に関する研究 (第1報)

— DNAによるキノコの種類及び系統の判別法 —

平成3～平成7年度 (県単)

加藤 龍一

要 旨

キノコの種類及び系統間の違いをDNAレベルで判別出来るか否かを目的に、ヤナギマツタケ、シイタケ、ヒラタケの各子実体からDNAを抽出した。このDNAを3種類の制限酵素 (EcoRI、BamHI、XbaI) で切断し、アガロースゲル電気泳動法によって断片の大きさ順に分画し検出する方法、つまり、RFLP (制限酵素断片長多型) による解析を試みた。この結果、DNAの泳動バンドのパターンの差異からキノコの種類や系統間の判別が可能であることが判った。

I. はじめに

遺伝子の本体である4つの塩基、A、T、G、Cの並び方は、生物の種や個体間で異なる。このためDNAの“塩基配列”の違いが検出できれば、外見上の形質や形態に左右されることなく、相互の判別が可能である。キノコは、菌糸の状態を経て子実体になるが、種類によっては、子実体形成が困難なものや長期を要するものがある。一方、子実体は時として形質や形態に大きな差異がみられる。従来、これらの原因が菌糸の変異に由来するのか栽培環境によるのか等の判断は、栽培者の経験に委ねられてきたことが多い。キノコからDNAを抽出し、その“塩基配列”の違いを眼で比較することが可能であれば、これらの原因究明にも役立つと考えられる。また、品種改良に際し、雑種の検定や新系統作出の判定にも威力を発揮すると思われる。先年、名古屋大学農学部分化遺伝制御研究室から“非放射性DNAプローブによる雑種の検定” (本田秀夫、平井篤志) が発表された。

本法はイネのrDNAに着目したものである。

rDNAは、種間で相同性の高い遺伝子領域と種特異的な遺伝子間領域 (IGS) から構成されている。したがって、イネのrDNAをプローブとした全ての植物のrDNAは相同性の高い遺伝子領域を介してハイブリダイズするが、種により塩基配列、長さが異なるIGSにより制限酵素断片長多型 (RFLP) が検出される。このバンドパターンの現れ方の違いにより雑種の同定が可能である。そこで、この方法がキノコにも応用出来るか否かの検討を行なった。

II. 実験材料と実験方法

ヤナギマツタケ、シイタケ、ヒラタケの子実体を供試材料とし、以下の手順に従い実験を行った。検定に用いたプローブは、クローニングベクターpBR325のEcoRIクローニング部位にイネのrDNAリピート単位をクローニングしたプラスミドpRR217をEcoRIで切断し、非放射性のdig

oxygenin (Dig) dUTPでラベルした。ラベリングの詳細は、ベーリンガーの Dig ELISA Kitの説明書に従った。

1. DNAの抽出方法について

- (1) 100mgの子実体をガラスホモジナイザーにとり、1 μ lの2-メルカプトエタノールと600 μ lのエクストラクションバッファー(100mM T o r i s-H C l、50mM E D T A、500mM N a C l、pH8.0)を加えすりつぶす。
- (2) 液をマイクロチューブに移し、20% (W/V) S D Sを40 μ l加え軽く混合する。
- (3) 65°Cの恒温水中に浮かせ10分保温する。
- (4) 5M酢酸カリウム溶液を200 μ l加え混合後、20分以上水中にて静置する。
- (5) 4°C、15,000 r P mで20分冷却遠心後、ミラクロスで濾過した上清を新たなマイクロチューブに移す。
- (6) イソプロパノールを400 μ l加え混合後、-70°C、15分静置冷却する。
- (7) 4°C、15,000 r P mで15分遠心後上清を捨て、沈澱物をデシケーターで乾燥する。(沈澱物: D N A)
- (8) 沈澱に(50、10) T E (50mM T o r i s-H C l、10mM E D T A pH8.0)を140 μ l加え溶解する。
- (9) 4°C、15,000 r P mで10分遠心し夾雑物を沈澱として取り除く。
- (10) 新たなマイクロチューブに上清を移し、3M酢酸ナトリウム、pH5.2を15 μ lとイソプロパノール100 μ lを加え3分遠心後上清を除く。
- (11) 沈澱を80%エタノールで溶解し、4°C、15,000 r P mで20分遠心後上清を捨て、沈澱を軽く乾燥する。
- (12) 沈澱を(10、1) T E (10mM T o r i s-

H C l、1mM E D T A、pH8.0) 50 μ lに溶解する。

2. DNAの泳動方法について

【DNAの制限酵素処理】

- (1) マイクロチューブにキノコから抽出したD N A、0.15M 2-メルカプトエタノール、R N a s e、制限酵素及び至適バッファー、H₂Oを加え(1~10 μ lの範囲)遠心し液を混合する。なお、R N a s eは、沸騰水で10分間の前処理をしたものを使用する。
- (2) チューブごと、37°Cで3時間以上加温する。

【電気泳動】

- (1) 0.7%アガロースを、T A Eバッファー(T o r i s、氷酢酸、E D T A、pH8.0)に溶かし、エチジウムブロマイド(E t B r)を加え、泳動槽(水平)に流し込み、ゲルが固化後、クシを抜く。
- (2) 固化したゲルを泳動槽に据え、E t B rを加えたT A Eバッファーで満たし、電極をセット(クシ穴側が一極)する。

【酵素処理液、マーカーの注入】

- (1) 37°C処理済みのチューブに、D Y E (0.25% B P B、40%シュークロース、0.15% S D S)を加え、遠心する。(液が青変する)
(注) B P B (プロモフェノールブルー) S D S (ソディウムドデシルサルファイト)
- (2) D Y Eを添加した酵素処理液とマーカーを各クシ穴に注入し通電する。

【E t B r染色による泳動の確認】

- (1) 通電終了のゲルをUV照射板上に移し、泳動像をの視認後、ポラロイドカメラで撮影す

る。(この時点で、ゲルにマーカーの位置を示す強い蛍光点と、各レーンの薄い蛍光帯が見える)

【変性及び中和処理】

- (1) ナイロン膜を、(2×)SSC(0.3M塩化Na、0.03Mクエン酸Na)で湿らせた後、減圧装置の中央に広げ、ナイロン膜の上に撮影済みのゲルを重ね合わせる。
- (2) 0.25N HClを注ぎ、ゲルが青から黄色に変化したら液を除く。
- (3) 変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)を注ぎ、ゲルが青色に戻ったら液を除く。
- (4) 中和液(1M Toris-HCl、2M NaCl、pH5.0)で10分処理後、液を除く。

【ナイロン膜へのトランスファー】

- (1) (20×)SSC(3M塩化Na、0.3Mクエン酸Na)を注ぎ減圧状態で1時間静置する。

【トランスファーの確認】

- (1) 処理後のゲルにUVを照射し、泳動の状態を視認する。(この時点でゲルは透明に見える)
- (2) ゲルを廃棄する。

【UV照射によるDNAの固定】

- (1) ナイロン膜を乾燥させた後、表面にUVを照射する。

【ハイブリダイゼーション】

- (1) ナイロン膜をポリ袋に入れ、ハイブリダイゼーション・バッファー(Kitの説明書参照)を注ぎ密閉後、68°C、1時間以上処理する。
- (2) プローブを、沸騰水で10分処理した後、5

分急冷の前処理を行なう。(プローブの1本鎖化)

- (3) ナイロン膜をポリ袋に移し、ハイブリダイゼーション溶液と先に変性処理したプローブの混合液を注入密閉する。
- (4) 袋のまま68°Cでオーバーナイトする。

【洗浄】

- (1) ナイロン膜を容器に移し、洗浄-I液(2×)SSC、0.1%SDS)を注ぎ、2回振とう洗浄する。
- (2) I液を捨て、洗浄-II液(0.1%SSC、0.1%SDS)を注ぎ、68°C、15分、2回振とう洗浄する。
- (3) II液を捨て、バッファーI(100mM Toris-HCl、150mM NaCl、pH7.5)を入れ洗浄後、液を捨てる。
- (4) バッファーIで振とう洗浄後、バッファーII(Kitの説明書参照)で30分振とう洗浄後、液を捨てる。
- (5) ナイロン膜を新たなポリ袋に移し、バッファーI及びバイアル8(Kitの説明書参照)を入れ密封し、30分振とう洗浄後、液を捨てる。
- (6) 膜を新たな容器に移し、バッファーIで15分、2回振とう洗浄後、液を捨てる。
- (7) 膜を、バッファーIII(100mM Toris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂、pH9.5)に浸す。

【DNA断片の検出】

- (1) 新たなポリ袋にナイロン膜を移し、発色液(Kitの説明書参照)を入れ密封する。
- (2) 室温下の暗所に静置し、泳動バンドが明瞭になるまで待つ。

Ⅲ. 結果と考察

1. キノコから抽出したDNAを、制限酵素に、EcoR I、BamH I、Xba Iを、プローブにイネのrDNA (pRR217)を用いて処理した結果、少量の子実体から抽出したDNAからでも、キノコの種類及び菌株の系統によってバンドパターンに違いがみられた。ちなみに、僅か、100mgの子実体からでも、DNAを抽出できることが判った。
2. 抽出したDNAは、-80℃で保存後も再度分析することができた。
3. DNAバンドの検出には従来、放射性物質が使用されてきたが、今回の方法は、放射性物質を用いず、しかも、少量の試料からでも明瞭なバンドが検出できた。
4. プローブに、イネのrDNAが利用出来ることが判った。
5. キノコの種類や系統の違いで、バンドパターンが異なって現れた。ちなみに、菌株の系統が異なるヤナギマツタケを本法で比較した場合、両者のDNAバンドパターンには明らかな違いが認められた。
6. 泳動結果は、写真-1のとおりである。
7. 今後、制限酵素やプローブとの組合せを替えて検討ることによって、より確実な判別が可能であると思われた。

Ⅳ. おわりに

今回の実験にあたり、御指導くださった名古屋大学農学部、平井篤志助教授（現、東京大学農学部教授）はじめ、大学院生の本田秀夫氏、並びに同研究室の皆様深く感謝の意を表します。また、pRR217は、平井先生を通じ、農業生物資源研究所の高岩文雄氏からいただきました。厚く御礼申し上げます。

Ⅴ. 参考及び引用文献

1. 本田秀夫、平井篤志：非放射性DNAプローブによる雑種の検定、植物細胞工学、Vol 3) NO. 2、P. 141~146、1991
2. 渡辺格、杉浦昌弘：クローニングとシーケンス、「植物バイオテクノロジー実験マニュアル」、314pp、農村文化社、東京、1989

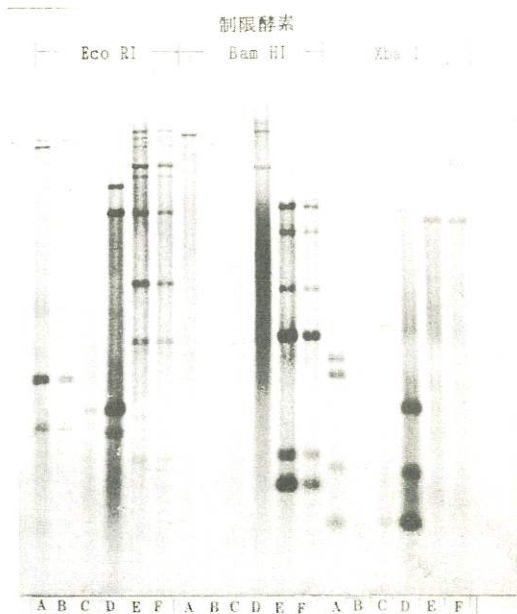


写真-1 キノコDNA断片の解析例

- A : ヤナギマツタケ (系統-1) D : ヒラタケ
 B : " (系統-2) E : タバコ-1 (対照)
 C : シイタケ F : " -2 (")