

## 四分子分析によるシイタケのセントロメアマッピング

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者	宮崎, 和弘 坂本, 裕一 金子, 真也 宮崎, 安将 白石, 進
巻/号	16巻1号
掲載ページ	p. 13-15
発行年月	2014年3月

## ノート

## 四分子分析によるシイタケのセントロメアマッピング

宮崎和弘<sup>1)</sup>・坂本裕一<sup>2)</sup>・金子真也<sup>3)</sup>・宮崎安将<sup>4)</sup>・白石 進<sup>5)</sup><sup>1)</sup> 森林総合研究所九州支所, 熊本県熊本市, 〒 860-0862<sup>2)</sup> 岩手生物工学研究センター, 岩手県北上市, 〒 024-0003<sup>3)</sup> 東京工業大学, 神奈川県横浜市, 〒 226-8501<sup>4)</sup> 森林総合研究所, 茨城県つくば市, 〒 305-8687<sup>5)</sup> 九州大学農学部, 福岡県福岡市, 〒 812-8581Centromere mapping on the linkage map of *Lentinula edodes* with tetrad analysesKazuhiro Miyazaki<sup>1)</sup>, Yuichi Sakamoto<sup>2)</sup>, Shinya Kaneko<sup>3)</sup>, Yasumasa Miyazaki<sup>4)</sup> and Susumu Shiraishi<sup>5)</sup><sup>1)</sup> *Forestry and Forest Products Research Institute, Kyushu Research Center, Kumamoto, Kumamoto 860-0862, Japan*<sup>2)</sup> *Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan*<sup>3)</sup> *Tokyo Institute of Technology, School of Bioscience and Biotechnology, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan*<sup>4)</sup> *Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan*<sup>5)</sup> *Kyushu University, Faculty of Agriculture, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan*

## キーワード

シイタケ, セントロメア, マッピング, 四分子分析

## はじめに

シイタケ (*Lentinula edodes*) は, 日本において重要な食用きのこの一種である. すでにこれまでに多くの品種が開発されてきているが, 品種開発は従来, 優良品種間の交雑による交配菌株の作出および品質評価による選抜によって行われている. しかしながら, これまでの育種現場では, 栽培形質に関わる遺伝学的な評価や選抜が行われているとは言い難い. そのため, 品種の開発には多大な労力や時間がかかっているのが現状と言える. このような状況を改善するためには, 連鎖地図を利用した QTL (quantitative trait loci) 解析, およびマーカー選抜による早期選抜技術の導入が考えられる. また, 次世代シーケンサーを活用したシイタケのゲノム解析もすすめられており, 今後はこれらの遺伝的な情報を駆使することが現場の効率を上げること, および品種開発の活性化を促すことになると考えられる.

一方, 四分子分析は, 一母細胞由来の孳細胞すべてを解析する方法であり, 菌類の一部で実施可能な遺伝分析手法である. 四分子では, ゲノム情報がすべてそろっており, 四分子分離菌株を使用した遺伝集団では, ランダムに発芽胞子を拾った場合などに生じる発芽率の差や,

発芽後の菌糸伸長速度の違いによるバイアスなどを受けないといった点でも遺伝解析に用いる材料として有利である. また, 四分子分析を用いることで, セントロメア (動原体) と遺伝マーカーの距離を推定することが可能である (Whitehouse 1949). 我々はすでにシイタケにおいて, この四分子分析を利用し 11 の連鎖群からなる連鎖地図を作成している (Miyazaki *et al.* 2008). 今回, この連鎖地図作成時の分離データを再解析し, 各マーカーとセントロメアとの距離を算出することで, 連鎖群内に存在するセントロメアの位置を推定, マッピングすることとした. また, 得られた結果からシイタケの染色体数に関する考察を行った.

## 材料と方法

## 1. 菌株

ニュージーランド産野生菌株 (D703) および鹿児島県屋久島産野生菌株 (G408) 間での遠縁交配菌株である MCR14 株 (Miyazaki and Neda 2004) を親株とし, その MCR14 株の連鎖地図作成時に使用された四分子分離菌株群 (Miyazaki *et al.* 2008) を本研究に使用した.

## 2. マーカー遺伝子とセントロメア間の距離算出方法

異なる染色体上に存在する 2 つのマーカー遺伝子座 (X 遺伝子座, Y 遺伝子座) 間で生じる 4 型四分子の出現頻度と第二分裂分離頻度の間で次式が成り立つことが提唱

編集委員: 北野英己

2014 年 11 月 28 日受理 2014 年 2 月 4 日受理

Correspondence: miyazaki@affrc.go.jp

されている (Whitehouse 1949) (図 1).

$$p = x + y - 3xy/2 \quad (1)$$

p : 4 型四分子 (X1Y1, X1Y2, X2Y1, X2Y2) の出現頻度 (観測値)

x : X 遺伝子座の第二分裂分離頻度

y : Y 遺伝子座の第二分裂分離頻度

さらに、別の染色体上にある Z 遺伝子座でも同様の式が導かれることから、3 遺伝子座の相互関係から、3 つの方程式が得られ、これらの連立方程式の解を算出することで、各遺伝子座とセントロメアとの距離 (unit) を算出する。本試験では、交配因子 A (*matA*) と交配因子 B (*matB*) が属する連鎖群 (LG1 および LG11) 以外の連鎖群に乗っている遺伝子座については、*matA*, *matB* および対象とするマーカー遺伝子座の分離データから導かれる関係式を解くことによって距離を算出した。また、*matA* および *matB* が乗っている連鎖群に属するマーカーについては、*cap* 遺伝子座 (LG5) のデータを使用することによって距離 (unit) を算出した。算出した値が、5 units より小さい値を示した場合、セントロメアに近いと判断した。

### 結果

Miyazaki *et al.* (2008) によって作成されたシイタケ連鎖地図の連鎖マーカーについて、各連鎖マーカーとセントロメアの距離を材料と方法に記述した計算方法で算出

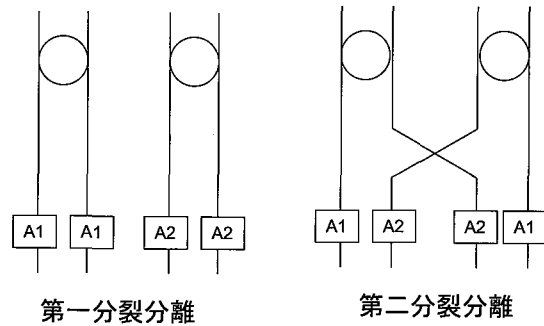


図 1. 第一分裂分離と第二分裂分離

第一分裂分離：注目したマーカー遺伝子座と動原体の間で乗換えが起こらない場合の分離。

第二分裂分離：マーカー遺伝子座と動原体の間で 1 回乗換えが起きた場合の分離。

○：セントロメア

し、セントロメアからの距離が 5 units 以下となるマーカーが存在している箇所を連鎖地図に図示した (図 2)。LG1~LG9 までの連鎖群では、セントロメアとの距離が 5 units 以下となる連鎖マーカーが存在していたが、小さなサイズの連鎖群である LG10 および LG11 内ではセントロメアとの距離が 5 units 以下となる連鎖マーカーは認められなかった (図 2)。また、そのセントロメアに近いと判断されるマーカーの位置は連鎖群内ではほぼ一か所に固まって存在しており、連鎖群内の複数の箇所に分散することは無かった。唯一 LG4 において 2 つに分かれてはいるものの、間に存在する B19-550 とセントロメアとの距離は 5.8 units と、閾値である 5.0 をわずかに超える程度であった。

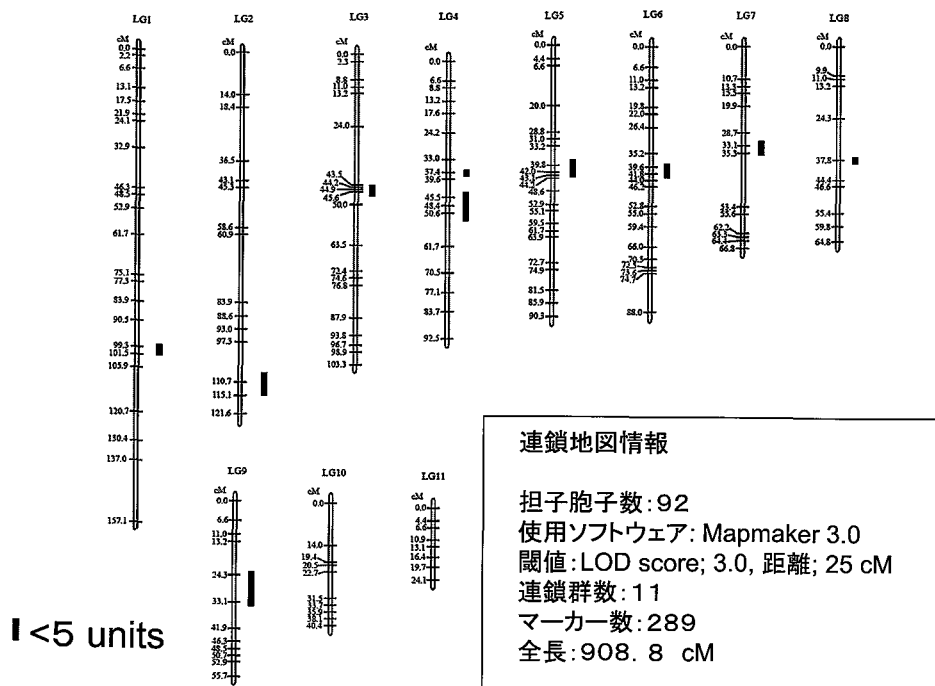


図 2. 四分子分析により推定された連鎖地図上におけるセントロメアの位置

## 考察

今回行った四分子分析から観察される4型四分子の出現頻度から算出される第二分裂分離頻度を利用した、セントロメアとマーカー遺伝子間の距離の推定方法は、シイタケにも適用可能だと考えられた。少なくとも11連鎖群中、サイズの大きなLG1~LG9までの9つの連鎖群においては、各連鎖群中に1カ所のセントロメアに近いと予想される領域が存在していたことから、連鎖群と染色体を対応させることに矛盾はないように思われた。これまで、シイタケの染色体数としては、光学的な観察およびパルスフィールド電気泳動法から、8本であると推定された報告がある(Arima and Morinaga 1993, 中井 1986)が、これまでに報告された2つの連鎖地図の作成に関する研究(Terashima *et al.* 2002, Miyazaki *et al.* 2008)では、いずれも11本の連鎖群が報告されている。しかしながら、マーカー数が低密度の場合、同一の染色体上に存在しているにもかかわらず、異なる連鎖群として判断することがありうることから、これまでの報告ではシイタケの染色体数に関する最終的な決定はなされていない。ここで、我々は今回の四分子分析を利用したセントロメアマッピングの結果から、少なくともシイタケの染色体は9本以上存在することを提唱する。

次に、セントロメアの存在領域が確認されなかった2つの連鎖群(LG10およびLG11)についてであるが、共通しているのはどちらもサイズが小さな連鎖群であるということである。減数分裂時の1染色体において生じる乗り換えは、無制限に起こるものではなく、その回数はある程度制御(干渉)されていることが知られている(Haldane 1931)。また、小さな染色体においては逆に、かならず1カ所では乗り換えが生じる必須乗り換えの現象が報告されている(Haldane 1931, Mather 1936, Henderson 1963)。この必須乗り換えの現象によって、強制的に乗り換えが引き起こされる場合、セントロメアからの物理的な距離が近くても、通常の染色体で起こる確率よりも高い割合で乗り換えが起こることが予想される。このため、本論文で採用した、四分子分析から求められる第二分裂分離頻度をセントロメアからの距離とする方法では、必須乗り換えが乗り換えを制御している小さなサイズの染色体では、セントロメアの位置を推定するこ

とができない可能性がある。よって、セントロメア領域のマッピングができなかったLG10, LG11については、それぞれがひとつの染色体を反映している可能性を残している。しかしながら、それぞれがセントロメアから十分に離れた位置に存在する領域である可能性も否定できない。

以上のことから、シイタケの染色体数は9本以上11本以下である可能性が高いと考える。また、既報の連鎖地図におけるLG1~LG9の連鎖群についてはそれぞれひとつの染色体に対応していると判断した。また、各連鎖群中のセントロメアの位置情報が得られたことは、今後のシイタケ育種への応用を進めるうえで重要な情報となるだろう。セントロメアの位置推定ができなかった2つの連鎖群(LG10およびLG11)については、必須乗り換えの影響が考えられたものの、それぞれがひとつの染色体に対応するかどうかの結論を出すことはできなかった。今後この2つの連鎖群については、集中的に連鎖マーカーを増やすことや、低分子側に注目し再度パルスフィールド電気泳動による解析等を行う、ゲノム解析データを利用し構造を推定する方法によって、染色体との関連付けをすすめていく必要がある。

## 謝辞

本研究は、農林水産省の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「シイタケの高温発生品種を効率的に作出するための技術開発(課題番号:23051)」の成果である。

## 引用文献

- Arima, T. and T. Morinaga (1993) *Trans. Mycol. Soc. Japan* 34: 481-485.
- Haldane, J.B.S. (1931) *Cytologia* 3: 54-65.
- Henderson, S.A. (1963) *Heredity* 18: 173-190.
- Mather, K. (1936) *Cytologia* 33: 207-235.
- Miyazaki, K., F. Huang, B. Zhang, S. Shiraishi, M. Sakai, C. Shimaya and K. Shishido (2008) *Breed. Sci.* 58: 23-30.
- Miyazaki, K. and H. Neda (2004) *Breed. Sci.* 54: 75-78.
- 中井幸隆 (1986) 菌蕈研究所研究報告 24: 1-202.
- Terashima, K., T. Mastumoto, E. Hayashi and Y. Fukumasa-Nakai (2002) *Mycol. Res.* 106: 911-917.
- Whitehouse, H.L.K. (1949) *New Phytologist* 48: 212-244.