

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	奥田 康仁
審査委員	主査 松本 晃幸 (印) 副査 児玉基一朗 (印) 副査 伊藤 真一 (印) 副査 荒瀬 榮 (印) 副査 前川二太郎 (印)
題目	ウスヒラタケの孢子欠損性変異の育種利用に向けた DNA マーカー開発に関する研究(Study on the development of DNA markers for the use of sporeless mutation in breeding of oyster mushroom, <i>Pleurotus pulmonarius</i> )
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>ヒラタケ属 (<i>Pleurotus</i>) 食用きのこは、食味に優れていることから多くの種が栽培されている。その中でもウスヒラタケ (<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.) は、オイスターマッシュルーム (oyster mushroom) の呼称で世界各地において広く栽培されている代表的な種のひとつである。しかし、その栽培現場では、子実体より飛散する担子孢子 (孢子) に起因したアレルギー疾患、栽培施設の汚濁ならびに発生不良や品質低下などの問題が発生しており、これらの諸問題を解消するため、孢子欠損性変異 (sporeless) 形質をもつ無孢子性品種の育成が強く望まれている。加えて、品種開発の過程では育種効率の向上につながる DNA マーカーを用いたマーカーアシスト選抜など、分子育種学的手法の導入が期待されている。本研究は、ウスヒラタケ孢子欠損性変異体 TMIC-30058 株について、無孢子性品種育成の育種素材としての有用性を検証した後、遺伝連鎖地図を作製し、当該変異領域座位を特定している。また、孢子欠損性変異領域に近接するマーカーを探索し、変異検出のための DNA マーカーの開発を行い、さらに遺伝子解析の基盤材料となる変異領域のマッピングベースクローニングを行った結果について述べている。</p> <p>1. 孢子欠損性変異株の孢子形成過程は、減数第一分裂の中期-後期で停止していると推定され、その変異形質は単一遺伝子の劣性変異によるものであり、交配型因子 A と連鎖していることが再確認された。当該変異株および当該変異保有に関して異なる遺伝型の戻し交配株に対する栽培試験において、当該変異保有の有無による子実体発生能および子実体の形態的形質への影響は認められなかった。以上の結果から、本変異株は当該変異遺伝子解析の材料としてだけでなく、育種素材としても有用であると判断された。</p>	

2. 連鎖解析用分離集団 150 株に対して、18 組合せのプライマーペアを用いた AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析を行い、得られた 300 個の AFLP マーカー、2 個の交配型因子および孢子欠損性変異領域の分離に基づき、12 連鎖群、全長 971 cM、平均マーカー間距離 5.2 cM からなる遺伝連鎖地図を構築した。当該変異領域は 40 個の AFLP マーカーと交配型因子 A とともに連鎖群 II に座乗した。そのうち、当該変異領域と最も近接するマーカーは 1.4 cM 離れた位置に座乗した。本遺伝連鎖地図は、ウスヒラタケにおいて初めてのものである。

3. 孢子欠損性変異領域近接マーカーを効率的に取得するため、バルク化した孢子欠損性変異型と野生型のゲノム DNA に対して 238 組合せのプライマーペアを用いた AFLP 解析 (バルク法) を実施した。その結果、変異領域座位に対して遺伝距離 0–9.5 cM の間で連鎖する合計 20 個の AFLP マーカーを同定した。そのうち、12 個の AFLP マーカーは変異領域と同一座位 (0 cM) に位置するものであり、バルク法が極めて効率よく標的形質の連鎖マーカーを同定できる手法であることを示した。続いて、同定した近接マーカーの STS (sequence tagged site) 化を試みた。その結果として、変異形質の検出に有効な 2 個の STS マーカー、SD192 および SD296 を開発した。両マーカーについて地理的起源の異なる 15 野生株ゲノム DNA に対する増幅反応を調査した結果、遺伝的に多様な育種素材を用いた交雑育種における有用性が検証された。さらに、2 個の STS マーカー断片は Multiplex PCR によっても再現性よく増幅され、簡易な PCR による当該変異形質を標的としたマーカーアシスト選抜に利用可能であると考えられる。

4. 孢子欠損性変異関連遺伝子の解析を目的に、当該変異に関わるゲノム領域のクローニングを進めた。野生型菌株のゲノム DNA から Fosmid ライブラリーを構築して、STS マーカーをプローブとしたスクリーニングを行い、4 個のポジティブクローンを得た。それらの挿入配列を解析した結果、4 クローンで合計 67.2 kb のゲノム領域を網羅し、その中に当該変異領域座位 (0 cM) に同定された野生型ゲノム由来の 6 AFLP マーカーのうち、5 個の座乗が明らかとなった。この結果は、作製した連鎖地図の精度を支持し、クローニング領域に標的となる当該変異遺伝子が座位している可能性を示すものであり、食用栽培きのこ種に有用な孢子欠損性変異遺伝子解析への手掛かりになるものと考えられる。

以上のように、本論文はウスヒラタケの無孢子性品種育成への分子育種技術導入の基盤づくりを目指し、DNA マーカーに基づく遺伝連鎖地図を構築するとともに無孢子性品種の育種において実用性が極めて高い STS マーカーを開発している。また、変異領域のクローニングにより変異遺伝子解析への手掛かりを与えている。よって、本論文を学位論文に値するものと判定した。