



I. 背景と目的

・食用キノコの多くは担子菌類に属する。 ・キノコの生活環(成長と子実体形成)に関する分子機構は未解明。

食用キノコの子実体形成の分子機構の解明に貢献する。 ヤナギマツタケ(Agrocybe cylindracea)の子実体で高発現するタンパク質を見出し、 その遺伝子クローニングと発現部位の解析を行う。

ヤナギマツタケ Agrocybe cylindracea (写真: 福岡県産株) ハラタケ綱 ハラタケ目 オキナタケ科 フミヅキタケ属

Ⅱ.タンパク質抽出と二次元電気泳動

Ⅲ. 柄 E1スポットの質量分析と Database検索

IV. cDNAクローニング

TCATCCACACC<mark>AT</mark>

GTCATCCACACC

ICATC-----

CCTGACTTCACCTCTCTCACACACACAGTCATCCACACCA



蛍光標識 Cy2 (ex:491 nm, em:509 nm) Cy3 (ex:553 nm, em:569 nm) Cv5 (ex:645 nm, em:664 nm)

pH 3-10 NL, 13 cm

2% Pharmalyte

13% Acrylamide

二次元電気泳動 一次元目:等電点電気泳動

トリプシン	ン処理したペプチ	ドの MS 解析	
ີ⇒x10 ⁴ ຮູ້1.50 - ເຊ		1954.003	
1.25		3	
-	2		3×100 1 2-

This study と Ac-Pri4	などとの OF	RF 塩基配列の比較
※開始コドン・終始コドン(赤) ※ORF:313nt(黄)および38nt(緑)	This study Ac-PRI4 Aa41-PRI4	15: 273:TTCTTCATCGTCCGTTCCCTGACTTC 270:TTCTTCATCGTCCGTTCCCTGACTTC
ホモロジー	Aa1-PRI4	467:TTCCCTAACATCCGTTCACAG
<u>313ntの比較</u>	This study Ac-PRI4 Aa41-PRI4	37 : CCAACACAAGCTTCGCGACCATCAAA 333 : CCAACACAAGCTTCGCGACCATCAAA 330 : CCAACACAAGCTTCGCGACCATCAAA









VI. *in situ* hybridization

ーク 730 の MSMS 解析

V. ノーザンブロッティング

原基(長さ1~1.5 mm)



RNA

antisens





少し伸長した 2~2.5 mmの原基では、シャフト部分で発現されている。 傘に分化する領域では発現されていない。







子実体(長さ4.5 mm)



柄の根元(原基シャフト)付近ほど発現が高いが、 傘では発現されていない。





約600 baseの位置にバンドが見られ、 菌糸と傘に比べて 原基と柄で特異的に発現が高いことが示された。

Ⅶ. まとめと展望

- 1. ヤナギマツタケ(Agr. cylindracea)のプロテオーム解析から、菌糸に比べて柄で存在量が高いスポット E1を見出し、質量分析の結果、Pri4遺伝子産物(機能は未知)と同定された。
- 2. Agr. cylindracea 由来 Pri4 の cDNAをクローニングし、全長ORFの塩基配列を決定した。 その配列は、これまで部分配列が報告されていたタイ産Agr. chaxinguのPri4と一致した。
- 3. ノーザンブロッティングにおいて、Pri4のmRNAは、原基および子実体の柄で特異的に発現しているこ とが示された。
- 4. *in situ* hybridization の結果から、*Pri4* のmRNAの発現は、 原基(長さく1.5 mm):ほぼ全域 原基(長さ≈2.5 mm):傘に分化する領域を除く全域(原基シャフト)。 子実体(長さ ~ 4.5 mm): 柄の根元付近(原基シャフト)ほど発現が高い。 柄の傘に近い領域と、傘では発現されない。

5. Pri4 は組織特異的に発現されていることから、子実体形成において重要な役割を果たしている可能性 がある。今後、PRI4タンパク質の組織・細胞における存在様式(局在など)を調べる予定である。