

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14382

研究課題名（和文）菌糸イメージングによる、きのこ種菌劣化機構の解析

研究課題名（英文）Microscopic analysis of degenerated fungal culture in edible mushrooms

研究代表者

齋藤 沙弥佳（Saitoh, Sayaka）

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・森林研究本部 林産試験場・研究職員

研究者番号：30804299

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：国内のきのこ生産業は、食資源から高機能な医薬原料まで多様な役割を担っている。特に育種開発された優良なきのこ品種は当該産業を大きく発展させているが、きのこ種菌が長期間の継代培養を経て収量が減少するなどの「種菌劣化」が積年の問題となっている。

本研究では、種菌劣化のメカニズム解明に向けて、マイタケ、タモギタケ、ユキノシタ（エノキタケ野生種）の高収量・低収量を示す各菌株について、細胞生物学の面からの比較解析に取り組んだ。その結果、細胞骨格やミトコンドリアの染色像に差異が観察され、収量性が低下した種菌では接種前の時点から細胞小器官に変化が起きていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種菌劣化については、その要因および機序、そして菌種間における種菌劣化の共通点・相違点は明らかになっていない。一方できのこ産業においては食用きのこが半工業的に大量生産されていることから、きのこ種菌の収量性の劣化は収益性に大きく影響する。顕微鏡イメージングによる菌糸の解析は食用きのこでは報告例が少ないことから、細胞生物学の面から劣化種菌細胞に起きている異常と子実体形成への関連を検証する本研究は、学術面およびきのこ産業の社会面双方において意義ある研究といえる。

研究成果の概要（英文）：The Japanese mushroom industry plays essential roles, from food production to pharmaceutical ingredients, which breeding strains especially contribute to these developments. However, culture degeneration during subsequent culture maintenance occurs in commercial mushroom strains spontaneously, that triggers reduction of fruiting ability and is a longstanding problem. Here, I focused on microscopic properties of cellular organelles in degenerated strains. Comparative analysis between high-fruiting and low-fruiting strains in *Grifola frondosa*, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*, and *Flammulina velutipes* revealed that staining pattern of cytoskeleton filaments and mitochondria varied in low-fruiting strains, suggesting that degenerated strains have alteration in cellular organelles before spawn-inoculation for cultivation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：食用きのこ 種菌劣化 蛍光免疫染色 イメージング解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物と特用林産物の側面を併せ持つきのこは、きのこ種菌の品種改良により消費者・生産者のニーズに沿って開発されている。その結果きのこの発生量や機能性成分が増量した品種を利用して優良なきのこを大量生産し、食料品や医薬原料として供給されている。上記の背景から現代のきのこ産業には優良な栽培特性を持つ種菌とその維持が必要不可欠である。

現在きのこ栽培の現場では、品種改良の末に開発された種菌が、長期間植え継ぐうちに、きのこ発生量の減少など、優良な形質が减弱する「種菌劣化」が問題となっている(図1)。きのこ種菌の劣化は外見で判断することは難しく、発生したきのこを確認する際に初めて判明することが多い。よって、きのこ生産者は劣化した種菌を知らずに接種してしまい、十分な収量・品質のきのこが採れず多額の損失を被るリスクを負っている。また、学術面においても「種菌劣化」は貴重な菌株を安定保存できない問題につながっている。液体窒素による凍結保存は復元した菌株が必ずしも栽培特性を維持できない場合があり、地域のきのこ菌株を保有する公設試験場及び研究機関の一部では、コストやインフラの面から冷蔵保存と継代培養を併用せざるをえない背景もある。以上の事情から、長期継代保存による種菌劣化は看過できない問題となっている。

種菌劣化については、何が直接の引き金となるのか、どのような細胞内シグナル伝達で制御されているのか、菌種間における種菌劣化の共通点・相違点があるのかについては明らかになっていない。顕微鏡イメージングによる菌糸の解析は *Aspergillus nidulans* などの糸状菌レベルにおいては報告例があるが¹⁾、食用きのこの菌糸ではほとんど実施されていないため、きのこ菌糸細胞の異常が子実体の形成や品種としての種菌劣化にどう関連するかの検証は、ほぼ手付かずの状態にある。

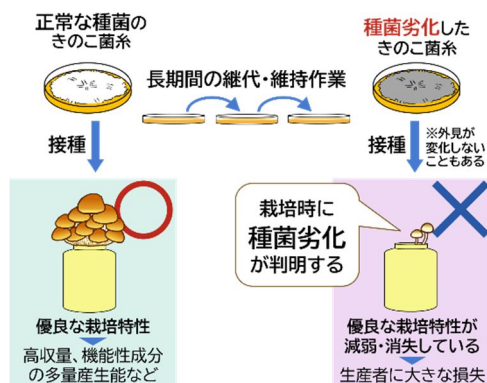


図1：種菌劣化の概要

2. 研究の目的

上述の背景から、本研究は劣化したきのこ種菌の菌糸の特徴を、細胞生物学の視点から横断的に調査し明らかにすることが目的である。

種菌菌糸のストレス等を調査することできのこ種菌の「細胞診断」を行い、解析結果をもとに種菌劣化の劣化診断や予防技術、劣化種菌の回復技術の基盤を確立することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、類似した環境の菌株から得られた劣化種菌と非劣化種菌を比較するため、菌糸片の培養温度による選抜を行い、処理後の菌糸の解析を行った。得られた菌株の中で子実体系性能が劣化した菌糸細胞の特徴をイメージング解析により調査し、解析の結果判明した劣化種菌の形質を改善することで栽培特性の回復が行えるか試行した。

なお、使用菌株は林産試験場で継代維持している以下3種を供試した。

マイタケ (*Grifola frondosa*): HfpriGf08-2

ユキノシタ (*Flammulina velutipes*): HfpriFv92-4

タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*): HfpriPc98-3

4. 研究成果

(1) きのこ種菌の高温選抜処理

既報²⁾を参考に高温選抜処理を施した菌株を用いて栽培試験を行った結果、3菌種すべての選抜株群は多様な収量性を示し、通常より高い温度で培養した選抜株から比較的高収量を示す菌株が分離された。またマイタケとタモギタケについては、高温選抜により開発時に近い収量性の菌株を分離することができた(図2)。

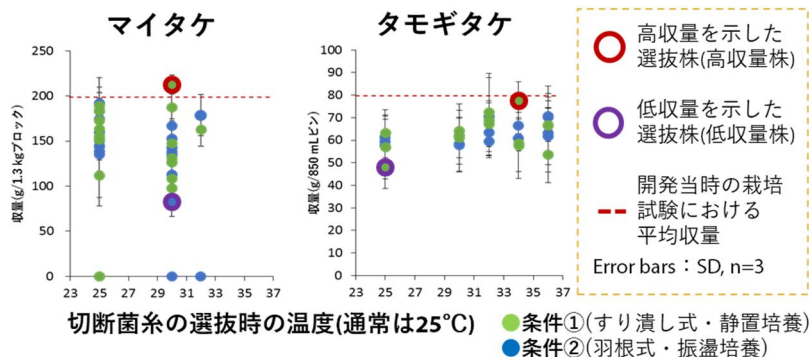


図2：選抜後分離したコクロー由来種菌の子実体収量

高温選抜で得られた高収量株と低収量株（図2、丸印）の間にどのような性質の差異があるのかを検証するため、高温選抜を行った菌株をPDA培地（高栄養）およびMalt培地（低栄養）上で各々培養し、菌糸伸長速度を比較した。その結果、マイタケ・ユキノシタでは高収量性の菌株、タモギタケでは低収量性の菌株において、菌糸伸長速度が大きくなっていた（図3）。また、PDA培地上で培養した際と比較して、Malt培地上で培養した際には高収量性/低収量性株間での菌糸伸長速度の差が大きくなっており、その変化はタモギタケで大きく、ユキノシタでは小さかった。これらの結果から、収量性の異なる種菌間では菌種により菌糸伸長に差異が見られ、低栄養培養時に伸長速度の差が大きくなることが示唆された。

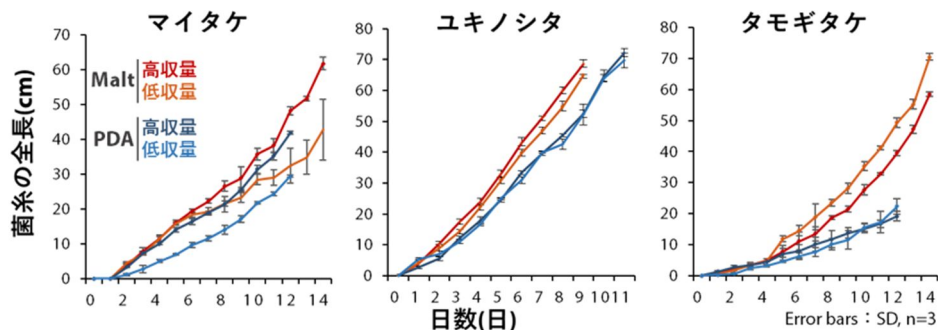


図3：高温選抜で得られた高収量株および低収量株の菌糸伸長速度

(2) 劣化した種菌菌糸のイメージング解析

(3) 回復処理を施した劣化種菌の栽培試験

上記2項の成果については後日公表可能となった際に再提出し、公表する。

【参考文献】

- 1) Lin L., Xiao H., Yongliang X., Guohua X., Peng Z., Chengshu W. : Linkage of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunctions to Spontaneous Culture Degeneration in *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Proteomics. Feb ; 13 (2) : 449-61 (2014).
- 2) 竹原太賀司・熊田 淳：シイタケ、ナメコ等の品種選抜、育種 - 細胞選抜による育種法の研究 - . 福島県林業研究センター研究報告 35 : 1-41 (2002).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 沙弥佳、宜寿次 盛生、米山 彰造
2. 発表標題 北海道産食用きのこ菌株の高温培養を用いた再選抜
3. 学会等名 日本きのこ学会第23回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 沙弥佳、宜寿次 盛生、米山 彰造
2. 発表標題 きのこ菌株の高温培養を用いた再選抜と選抜株の生物学的特徴
3. 学会等名 日本木材学会北海道支部 令和元年度（第51回）研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 沙弥佳、宜寿次 盛生、米山 彰造
2. 発表標題 食用きのこの種菌劣化に対する蛍光イメージング解析
3. 学会等名 第70回 日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 沙弥佳、宜寿次 盛生、米山 彰造
2. 発表標題 食用きのこの種菌劣化に対する蛍光イメージング解析
3. 学会等名 日本木材学会北海道支部 令和2年度（第52回）研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

林産試験場創立 70 年誌、令和2年（2020 年）12月18日発行、pp.38-39 細胞生物学的手法を活用した種菌劣化機構の解析と対策の検討、
<https://www.hro.or.jp/list/forest/research/fpri/gijutsujoho/fpri70th.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------