

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 6月13日現在

機関番号：15101
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008年度～2010年度
課題番号：20580175
研究課題名(和文) 交配育種技術によるマツタケの腐生能力の向上
研究課題名(英文) Improvement of the saprophytic ability in Matsutake mushroom by cross breeding technology
研究代表者
会見 忠則 (AIMI TADANORI)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：90264928

研究成果の概要(和文)： 外生菌根菌 *Tricholoma matsutake*の核型解析のために、交配型やデンプン代謝に関わるいくつかの遺伝子を交配型および核型を調査するためにクローニングした。それらを利用した分子生物学的な解析により、マツタケの組織分離株は、ヘテロカリオンであることが解った。次に、一核株の分離のために、二核菌株のプロトプラスト化とその再生条件について検討を行った。その結果、トレハロースは、プロトプラスト化および菌糸体増殖を促進したが、キシロースは菌糸体増殖を著しく阻害した。

研究成果の概要(英文)： Several genes related for mating type and starch metabolism were identified to use for investigation of mating type and karyotype in the *T. matsutake* isolates. From these results indicated that the *T. matsutake* isolates from the fruiting body tissue were essentially heterokaryon. Secondly, we examined the condition of protoplast formation and its regeneration in order to isolate homokaryon in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. As the results, when trehalose was used as osmotic stabilizer, the protoplast formation and mycelial growth of *T. matsutake* was promoted, however, xylose completely inhibited mycelial growth.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,300,000 | 690,000 | 3,990,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

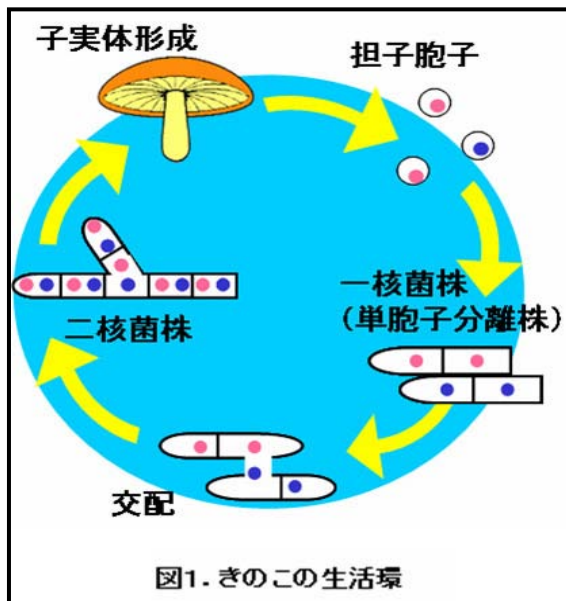
研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：マツタケ、プロトプラスト、グルコアミラーゼ遺伝子、育種、一核株、核相、再生、ホメオドメインタンパク質

1. 研究開始当初の背景

菌根性きのこの多くは腐生能力（デンプンなどの高分子物質の分解・利用能力）を欠き、炭素源を共生相手の樹木に依存しているため、生きた樹木がなければ、栽培は不可能であると考えられていた。しかし、同じ菌根性きのこであるホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) において、大麦デンプンを用いると人工栽培が可能であることが報告された。その成功の背景は、ホンシメジが利用しやすいアミロース含量の高い大麦デンプンを使用し、その利用性の高い菌株の選抜に成功したことによる。ホンシメジの子実体形成能力のある菌株は、子実体形成能のない菌株に比べ、アミラーゼ活性が高く、特にグルコアミラーゼの活性が高いことが報告されている。以上の結果は、菌根性きのこも本来弱い腐生能力をもつ



ており、それをうまく引き出すことができた結果であると考えられる。

一方、マツタケ (*Tricholoma matsutake*) に関する研究では、マツタケの菌体外の α -アミラーゼ活性、セルラーゼ活性などが、わずかに検出されており、マツタケも弱いながら

腐生能力を持っていることが報告されている。ホンシメジと比べると特にグルコアミラーゼの活性が弱く、 β -グルコシダーゼの活性が非常に高い。しかし、これらの酵素の活性は、菌株によって差が見られることから、それぞれの酵素の活性が高い菌株を相互に交配する（例えば、アミラーゼ活性が高い菌株とグルコアミラーゼ活性が高い菌株を交配する）ことにより、腐生能力を強化した菌株を作出することができると考えられる。

2. 研究の目的

きのこの交配育種は、図1に示すような、きのこの生活環の中で行われる。

まず、子実体から担子胞子を分離し、それを発芽させ、一核菌株を取得する。和合性の一核菌株どうしを交配し、二核菌株を作出する。その後、子実体形成を行い、一核菌株の分離を行うという過程を繰り返す中で、有用な形質を持つ菌株を選抜するという手法である。

現在でも、腐生性の食用きのこの場合、様々な新品種が交配育種により作出されている。しかし、この育種法は、容易に子実体形成が可能であり、一核菌株の取得が容易な種において適用可能な手法であり、一核菌株が取得できないマツタケの場合、交配育種はできない。

特にマツタケなどの菌根性きのこにおいては、

- ① 人工栽培ができない（子実体が発生しない）。
- ② 自然界での子実体の採取が困難である。
- ③ 子実体が取得できた場合でも担子胞子の発芽率が低く、発芽しても成長しない。

などの理由により、一核菌株を取得することができないために、交配育種ができない。特

にマツタケについては、①～③の全てが当てはまり、これまで一核菌株の分離や交配育種の報告は全くない。

以上の問題を解決するため、我々は、マツタケと同じ菌根性きのこであるホンシメジをモデルとして新しい育種技術を開発した。

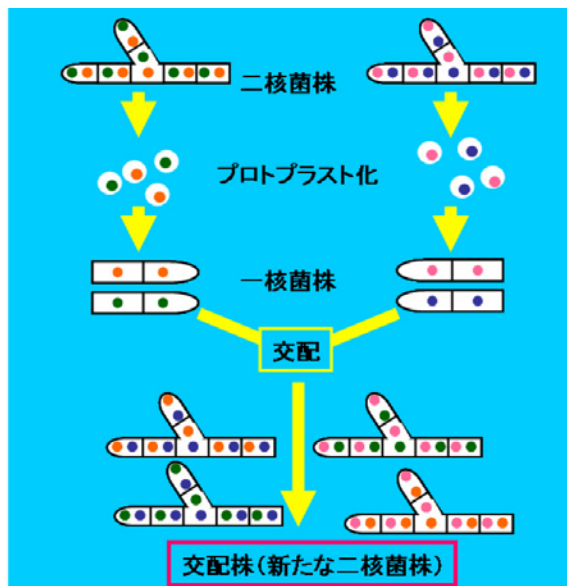


図2. 菌根性きのこの交配育種の模式図

図2に示すように、二核菌株をプロトプラスト化し、それを再生させることにより、二核菌株から一核菌株（単孢子分離株に相当する）を分離することに成功した。分離した一核菌株は、由来の異なる他の一核菌株と交配が可能であった。このことにより、人工培地上での子実体形成が不可能な菌根性きのこにおいても、二核菌株から、それぞれ一核菌株を作出・交配し、自然界には、存在しない新たな二核菌株の作出を行うことが可能となった。以上のような、育種技術を用いて腐生能力を強化したマツタケの新菌株の作出を試みることにした。そのため、まず、マツタケ組織分離株の核型の解析を行った。ホンシメジの場合は、二核菌糸体（ヘテロカリオン）には、明確なクランプ細胞が存在するが、それが一核菌糸（ホモカリオン）には存在し

ないため、交配が成立したか否かの識別が容易である。しかし、マツタケに関しては、子実体からの組織分離株が、ヘテロカリオンなのかホモカリオンなのか？すら明らかではない。そこで、本研究では、分子生物学的研究技術を駆使し、マツタケの組織分子株の核型について検討を行った。ついで、モノカリオン（ホモカリオン）作出を目的に、マツタケ組織分離株のプロトプラスト化とその再生を試みたので報告する。

3. 研究の方法

(1) A交配型遺伝子およびグルコアミラーゼ遺伝子の同定とマツタケ菌糸体の核型の推定

まず、はじめに、デンプン代謝と密接な関係を持つグルコアミラーゼ遺伝子およびA交配型遺伝子であるホメオドメインタンパク質遺伝子の同定を行った。次に、これらの遺伝子の塩基配列を基にプライマーの設計及び、ポリメラーゼ連鎖反応—制限酵素断片長多型解析を行った。

(2) マツタケ菌糸体の培養

改変浜田平板培地で培養したマツタケ菌糸体を、メスで5 mm×5 mm×5 mm角に切り取り、改変浜田液体培地に接種し、静置培養した。

(3) プロトプラストの作出及びその再生

液体培養したマツタケ菌糸体を濾過して、培地を取り除き、滅菌水で洗浄後、浸透圧調整剤入り Mcllvaine バッファー で2回洗浄した。その後、浸透圧調整剤入り Mcllvaine バッファーに細胞壁溶解酵素を溶解し、ろ過滅菌した。この酵素液を、洗浄した菌糸体に加え、プロトプラスト化を行った。プロトプラ

スト及びプロトプラスト内の核の確認は、酵素反応液を取り、DAPI 染色液を一滴加えた後、血球計算盤 (Thoma) に滴下し蛍光顕微鏡下でカウントした。

作出したプロトプラストは滅菌済みナイロンメッシュで濾過し、浸透圧調整剤入り McIlvaine バッファーで洗浄し、マツタケプロトプラスト再生用液体培地に接種した後、培養した。また、適宜、プロトプラスト再生培地を取り、スライドガラスに滴下し菌糸が再生しているか観察した。

4. 研究成果

(1) グルコアミラーゼ遺伝子およびA交配型遺伝子の同定

マツタケのグリコシルハイドロラーゼファミリー 15 に属するグルコアミラーゼ遺伝子 (*TmGlu1*) の同定を行った。本遺伝子は、アミロースによって高度に転写が誘導され (図 3),

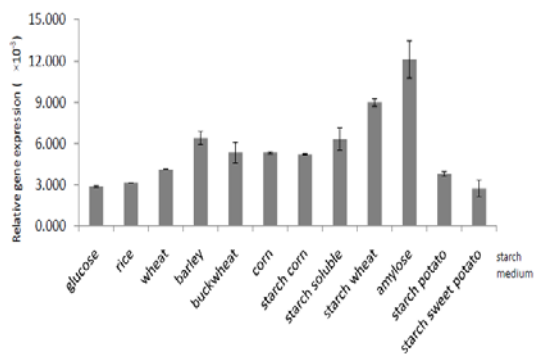


図3. 各種炭素源によるグルコアミラーゼ遺伝子の誘導

また、酵素の活性も誘導されたため、デンプン利用に深く関わっていることが解った (図 4)。

また、本遺伝子と相同性をもつ遺伝子は、菌根菌から腐生菌まで幅広く存在し (図 5),

この (*TmGlu1*) とそのホモログは、きのこにとって必須の遺伝子であり、本酵素の活性を強化することで、マツタケの人工栽培につながる可能性が示唆された。

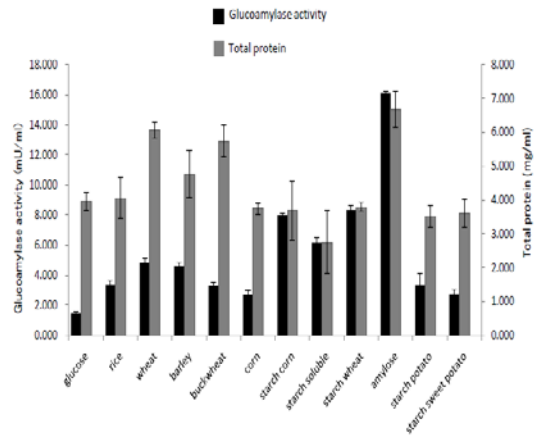


図4. 各種炭素源によるグルコアミラーゼ酵素活性の誘導

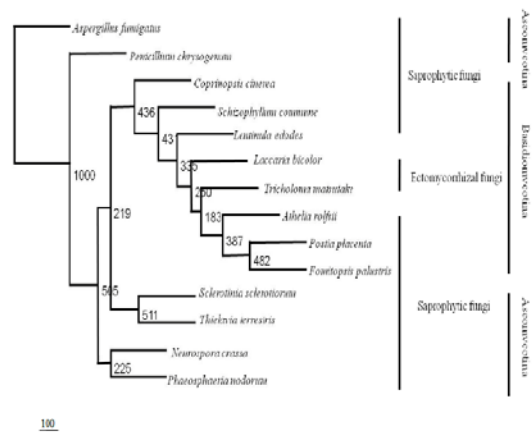


図5. 担子菌類におけるグルコアミラーゼアミノ酸配列の系統関係

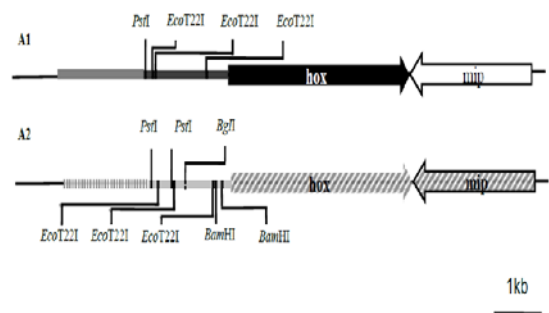


図6. マツタケA交配型遺伝子座周辺の模式図

(2) A交配型遺伝子の同定

マツタケの組織分離株から、ミトコンドリア中間体ペプチダーゼの遺伝子を増幅し、その塩基配列を手掛かりに、マツタケのA交配型遺伝子の周辺をゲノミックウォーキングした。その結果、92%の相同性をもつ2種類のA交配型遺伝子およびその周辺領域が同定できた。この結果から、マツタケ組織分離株のA交配型遺伝子の対立遺伝子が同定できたと思われる。

(3) マツタケ組織分離株の核型の解析

核型を解析するための分子マーカー遺伝子を探索するため、グルコアミラーゼ遺伝子ならびに交配システムに関わる重要な遺伝子であるホメオドメインタンパク質遺伝子について、周辺領域と合わせ、塩基配列を決定し構造解析を行った。その結果、ホメオドメインタンパク質遺伝子とその周辺領域は、腐生菌とは全く異なる構造をしており、難培養性（人工栽培が困難である）の菌根菌に特徴的な構造があることが解った。また特にホメオドメインタンパク質遺伝子については、使用した組織分離株から、対立遺伝子と思われる二つの遺伝子を単離することに成功した。このことは、マツタケ組織分離株が、ヘテロカリオンであることを証明する一つの手掛かりになるものと思われる（図3）。今後は、得られた分子マーカーを最大限に利用し、マツタケの各菌株の交配型および核相を明らかにしていき、交配育種技術を開発したいと考えている。

(4) プロトプラストの作出及びその再生

マツタケ二核菌糸のプロトプラスト化を行

うにあたり、浸透圧調節剤に使用するための糖及び糖アルコールが菌糸体伸長に対して、過剰なストレスとなっていないかどうかを調べるために菌糸伸長試験を行った(図7)。

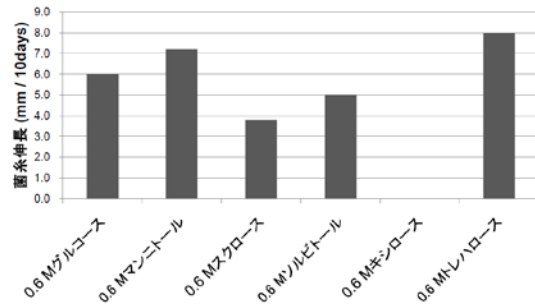


図7. 菌糸体伸長試験

改変浜田寒天培地にそれぞれの糖及び糖アルコールを0.6 M ずつ加えたものを準備し、ここに浜田改変培地で25°C、3週間培養したマツタケの含菌寒天を直径5 mmにコルクボーラーで打ち抜き接種した後、菌糸の伸長量(直径)を測定した。その結果、トレハロースでは8.0 mm/10 daysと最も良好な成績であった。一方、以前の研究で、プロトプラスト化には適していたキシロースでは10日間の内に菌糸伸長は見られず、菌糸体増殖を著しく阻害した。このことから、キシロースを浸透圧調節剤として使用したプロトプラスト化は菌糸の再生を妨げる可能性が考えられた。

次に、その一核株の分離のために、二核菌株のプロトプラスト化の条件特に浸透圧調整剤について検討を行った(図8)。

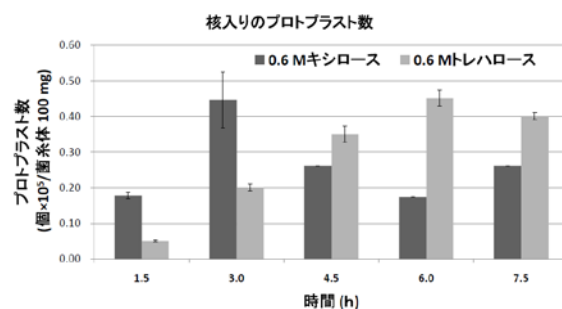


図8. 浸透圧調節剤の検討

市販の細胞壁溶解酵素を組み合わせ、様々な浸透圧調節剤で1.5 hから7.5 h反応を行ったところ、 5×10^5 個程度のプロトプラストが得られるようになった。このとき、総プロトプラスト数に関しては、これまでの研究の通りキシロースの成績が非常に良かったが、今回の研究で著しく菌糸体増殖を阻害することが明らかになったことから、使用するべきではないと考えた。一方、トレハロースにおいては、総数でこそキシロースには劣るものの、プロトプラストの再生に必要な条件の一つと思われる核の入ったプロトプラスト数ではキシロースとほぼ変わらなかった。さらに、トレハロースではキシロースに比べ、プロトプラストの作出数が最大となった時点からの減少量が少なく、プロトプラストの安定性が高いことが示唆された。これらのことから、トレハロースはキシロースよりもプロトプラストの再生に適した浸透圧調節剤であると考えられたため、今後のプロトプラスト作出にはトレハロースを使用することにした。その他にも、緩衝液のpHについても検討し、pHを5.0とした場合が、プロトプラスト化には最適であった。以上の条件を用いることにより、プロトプラストから再生してきたと思われる菌株を、数株得ることに成功した。現在、その株の核相を解析している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 山中勝次・曹暉・陳明杰・万佳寧・会見忠則：アジアのマツタケおよびマツタケ近縁種の宿主樹木。日本きのこ学会誌，印刷中

[学会発表] (計5件)

- ① Wan, J., Yi, R., Li, Y., Masuda, K., Yamanaka, K., Yamaguchi, T., Shimomura, N. and Aimi, T.: Distinguishing karyotype in *Tricholoma matsutake*. The 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, October, 6th, 2011, Arcachon (発表確定)
- ② Wan, J., Yi, R., LI, Y., Kinjo, Y., Terashita, T., Yamanaka, K., and Aimi, T.: Cloning, characterization and expression of glucoamylase gene from ectomycorrhizal basidiomycete, *Tricholoma matsutake*. The 6th Meeting of East Asia for Mushroom Science, November 13, 2010, Gyeongju, Korea
- ③ 万佳寧・蟻瑞榮・李燕・寺下隆夫・山中勝次・山口武視・会見忠則：マツタケの(*Tricholoma matsutake*)のグルコアミラーゼ遺伝子のクローニングと発現解析。日本きのこ学会第14回大会，2010年9月17日，東京
- ④ 貞島亜紀・寺下隆夫・山中勝次・会見忠則：マツタケ及びホンシメジのグルコアミラーゼ遺伝子の解析。日本きのこ学会第13回大会，2009年9月10日，兵庫県西宮市
- ⑤ 山中勝次，持田裕介，会見忠則：ブータンのマツタケ。日本菌学会第52回大会，2008年6月1日，三重県津市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

会見 忠則 (AIMI TADANORI)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：90264928