

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05708

研究課題名(和文)異種きのご間のコミュニケーション機構の解明と人工栽培技術への応用

研究課題名(英文)The elucidation of the communication mechanism between the different species of mushroom for application to artificial cultivation

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

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)：本研究では、日本産シロキクラゲ (*Tremella yokohamensis*) が、heterothallicな生活環をもち、二極性の交配システムを有していることを明らかにした。本菌の交配型を a および と定義した。a および の和合性の組み合わせの酵母様細胞を、低塩野菜ジュース寒天培地上で混合培養すると、クランプ細胞をもつ菌糸体を誘導できたが、菌糸体のまま維持、増殖させることはできなかった。また、*Tremella* 属菌の菌糸体は、*Annulohyphoxylon* 属の分泌する Tyrosol により誘導できることが明らかとなり、これは担子菌類と子囊菌類間の Quorum sensing の初めての報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本産シロキクラゲが、ヘテロサリックな生活環であることと二極性の交配型をもつことを明らかにしたこと、本菌の育種技術開発に重要な知見を与えた。また、シロキクラゲのコンパニオン菌であるクロコブタケ属菌が、Tyrosol を生産することを発見し、その Tyrosol が、シロキクラゲの菌糸体を誘導できることを示したことから、子囊菌と担子菌の Quorum sensing の実例を初めて示すことができ、シロキクラゲの純粋培養による人工栽培への道を切り開くことができたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that the Japanese white jelly mushroom, *Tremella yokohamensis*, has a heterothallic life cycle and a bipolar mating system. When yeast-like cells of the a and mating types were mixed and cultured on low-salt vegetable juice agar medium, mycelia with clamp cells could be induced, but could not be maintained or grown as mycelia. Tyrosol was purified and identified from culture filtrate of *Annulohyphoxylon* sp.. The mycelia of the *Tremella* sp. could be induced by Tyrosol secreted by *Annulohyphoxylon* sp. This is the first report of quorum sensing between basidiomycetes and ascomycetes fungi.

研究分野：木質科学

キーワード：Tyrosol Quorum sensing *Annulohyphoxylon* *Tremella* life cycle mating compatibility bipolar heterothallic

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1 . 研究開始当初の背景

シロキクラゲ (*Tremella fuciformis*) は、薬用効果や美容効果が期待される担子菌門に属するきのこであるが、単独では、酵母型の増殖を行い、自らは、酵母型から、菌糸型に形態を変えることができず、子実体を発生することもない。しかし、クロコブタケ (*Annulohyphoxylon truncatum*) という子囊菌門に属する分類学上、大きく異なる種類のきのこが共存すると、酵母型から菌糸型に変身し、子実体すなわち“きのこ”を発生するという、特異な性質をもっているが、そのクロコブタケとの共生の仕組みについては、いまだ解明されていないことから、そのコミュニケーション機構の解明が、本研究の核心的課題である。本研究では、この担子菌類と子囊菌類のコミュニケーション機構を解明し、それを、シロキクラゲの人工栽培技術開発に応用しようとするものである。我々は既にシロキクラゲに変身を指示する物質の存在を突き止めており、本研究では、その物質の精製と構造決定を行い、そして、シロキクラゲの純粋培養による人工栽培につなげることを目指している。

2 . 研究の目的

シロキクラゲ (*Tremella fuciformis*) は、担子菌類で、シロキクラゲ科シロキクラゲ属のきのこで、主に日本、台湾、中国等で食用とされているが、中華料理でおなじみのキクラゲ科キクラゲ属の黒いキクラゲ (*Auricularia auricula-judae*) のアルビノ変異株である、白いキクラゲではなく、全く異なる種である。形は不規則で、花びら状と表される。シロキクラゲは、自然界において、春から秋にかけて、広葉樹倒木や枯枝にクロコブタケとセットで発生する。子実体はゼリー質で白く、半透明で、キクラゲ同様、乾燥すると小さく縮み、湿ると元に戻る。台湾や中国では「銀耳」とも呼ばれ、栽培され、乾燥品として出回っている。主にデザートなどにされる一方、不老長寿の薬としても珍重されており、また、血中や肝臓のコレステロール低下や、動脈硬化、心臓発作に効果的であるとも言われている。しかし、日本では、栽培が難しいため、ほとんど、流通していない。その理由として、シロキクラゲの生活環が、ほとんど理解されていないことがあげられる。

自然界から採取したシロキクラゲの担子胞子が発芽すると、菌糸ではなく酵母型の細胞として増殖する。それが、担子菌類ではなく、子囊菌門に属する全く異なるきのこ種であるクロコブタケ (*Annulohyphoxylon truncatum*) の菌糸と共存することで菌糸型に変身する。勿論、酵母型の細胞から子実体、すなわち“きのこ”が発生することはなく、すなわち、シロキクラゲの栽培にはクロコブタケとの共培養が必要となる。現在のシロキクラゲの栽培は、クロコブタケとの共培養により、栽培されているが、2種の菌糸の増殖を制御し、低コストで安定かつ高収量でシロキクラゲの子実体だけを得ることは、非常に困難であるため、日本では、シロキクラゲ栽培は、普及しておらず、輸入品も高価である。以上のことをふまえ、本研究の核心をなす学術的「問い」は、なぜシロキクラゲの栽培にクロコブタケが必要か？ すなわち、異種菌株間のコミュニケーション機構の解明である。

3 . 研究の方法

(1) 使用菌株

2020年、鳥取県倉吉市の鳥取短期大学附属幼稚園の広葉樹の原木からシロゼリー茸の子実体を発見した。新鮮な担子菌組織をワセリンでシャーレの蓋に貼り付け、胞子を下のシャーレのCJM-1寒天培地上に落下させた。プレート上の落下胞子の位置を顕微鏡で確認し、シャーレの底にマーカーペンで印をつけて胞子の位置を記録した。その後、マーカーペンでマーキングした胞子を1個含む寒天小片をゲルから取り出し、新しい寒天培地に移した。胞子の発芽に成功し、酵母の形で増殖し、15種の担子胞子単離株(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O)が得られ、2%麦芽寒天培地で室温保存した。分離された担子胞子株のうち、交配和合株であったG株とC株は以後の実験に使用し、鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターカルチャーコレクション(TUFC)に寄託した。パウチャー標本のコレクション番号はTUMH65418、単胞子株GおよびCのコレクション番号はそれぞれTUFC101924およびTUFC101925である。T. yokohamensis TUFC101924, T. yokohamensis TUFC101925, の菌糸体誘導物質の探索には、*Annulohyphoxylon truncatum* TUFC65001を最少培地で培養した。

(2) DNA抽出とITS領域の増幅

酵母細胞の単一コロニーを20 mLの最少液体培地に接種した。酵母細胞は、25℃で120 rpmで

2日間振とう培養した後、遠心分離により酵母ペレットとして回収した。最少培地で培養した酵母細胞から、セチルトリメチルアンモニウムプロマイド法を用いてゲノムDNAを抽出した。DNAはDNeasy Plant Mini Kitを用いた。精製したDNAを用いて、rDNA ITS領域をITS1 (5'-TCCGTAGTGAACCTGCGG)とITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATGC)を用いて増幅し、PCR産物の塩基配列の解析を委託した。本研究で報告した分離株G (TUFC 101924) およびC (TUFC 101925) のrDNA ITS領域の塩基配列データは、それぞれDDBJ/EMBL/GenBankデータベースにアクセッション番号LC784256 および LC784255 で公表されている。また、得られた塩基配列は、系統樹を作成し、種の同定を行った。

(3) 交配和合性試験

カゴメ野菜ジュース(KVJ)寒天培地上に各接種液を滅菌ループで少量スポットし、スポットを混合することにより、15種の担子孢子分離株の酵母細胞同士を交配し観察した。

(4) 顕微鏡観察

担子孢子、酵母細胞および菌糸の核相は、紫外線励起装置とデジタルカメラを取り付けた顕微鏡で観察した。4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)を核染色に用いた。

(5) 活性化化合物の抽出と精製

A. truncatum TUFC65001の培養ろ液を酢酸エチルで3回抽出し、溶媒を蒸発させた後、得られた暗褐色の粗生成物を、酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒で溶出したシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにかけた。菌糸体誘導活性のあった画分を酢酸エチル-ヘキサンを溶離液とするシリカゲルカラムに供した。すべてのフラクションを、プレコートシリカゲルプレートと254 nmのUVランプを用いたTLC分析で調べた。UV陽性領域を集め、酢酸エチルで抽出し、濃縮して化合物を無色粉末として得た。

(6) 菌糸体誘導活性試験

菌糸体誘導活性試験は、最少培地中で、和合性の*T. yokohamensis* (TUFC101924 × TUFC101925)株同士のシングルコロニー酵母を交配して酵母懸濁液を調製し、振とう培養した。さらに*A. truncatum* TUFC65001の培養ろ液、粗抽出物、単離画分を加え振とうしながら培養した。菌糸体誘導活性は、デジタルカメラを装着した光学顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 系統解析

平均510塩基対(bp)のrDNA-ITS領域の塩基配列をアライメントし系統樹を作成した。この系統樹には、担子孢子分離株α(TUFC 101924)とα(TUFC 101925)が含まれるG株(TUFC 101924)、C株(TUFC 101925)、*T. yokohamensis* KHU20230328 01株、CBS:11776株、VLA:M-11700株、*C. yokohamensis* JCM 16989株、JCM 16991株は、いずれも*C. yokohamensis* JCM 16990株と同じクレードに分類された。さらに、BLASTを用いたITS領域の類似性検索の結果、*C. yokohamensis* JCM 1691990はG株およびC株と最も近縁であり、塩基の違いは1つだけであった。以上の結果から、担子孢子分離したG株(TUFC 101924)およびC株(TUFC 101925)を*T. yokohamensis*と同定した。

(2) 菌糸の誘導

KVJ寒天培地上で15個の担子孢子コロニーの形態を観察したところ、分離された担子孢子はすべて酵母型に発芽した。GとCの分離株を混合し、KVJ寒天培地で培養したところ菌糸体が観察できた。しかし、これらの菌糸を新鮮なKVJ寒天培地に移すと、菌糸はそれ以上うまく伸長せず、菌糸コロニーは時折酵母の形に戻った。したがって、この菌の菌糸体を維持できるかどうかを調べるには、他の種類の培地をスクリーニングする必要がある。さらに、交配を伴わないホモカリオシス酵母からの菌糸体の発育は困難であり、菌糸体を発育させるためには交配とヘテロカリオンの形成が必要であった。

(3) 核相

本菌の生活環を明らかにするため、DAPIで染色後、蛍光顕微鏡で担子孢子の核の数、分離した担子孢子の酵母形態、発育した菌糸を観察した。担子孢子酵母型担子分離株は単核であった。C株とG株の混合培養の発芽菌糸は二核であり、クランプ細胞も観察された。これらのことから、担子孢子から分離した株はホモカリオティックな一核菌であることが強く示唆された。逆に、混合培養から発芽した菌糸はヘテロカリオン性の二核菌であった。推定される生活環は、担子孢子

から分離された一核の酵母形態を経て、和合性の菌株同士の交配により、クランプ細胞を伴う二核菌系へ至るヘテロサリックであると考えられた。

(4) 交配型の極性

本菌の交配システムを調べるため、15株の担子孢子同士を交配させ、クランプ細胞の形成を光学顕微鏡で観察した。和合の酵母の組み合わせの場合、酵母コロニーの周辺部に菌糸が観察された。逆に、不和合な酵母細胞の組み合わせでは、酵母細胞のままであった。15株の担子孢子分離株を用いた交配適合性試験の結果、15種の担子孢子分離株は、明らかに2つの不和合性グループに分けられた。このグループ分けから、本菌は、ヘテロタリックな二極性きのこであると断定し、グループ1とグループ2の交配型をそれぞれ「a」と「」と定義した。

(5) 化学構造の決定

A. truncatum TUF65001の培養ろ液を酢酸エチルで抽出し、この粗抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。菌糸体誘導化合物が含まれていたフラクションをシリカゲルで再クロマトグラフィーし、酢酸エチル-ヘキサンで溶出した後、得られたフラクションを分取TLCで精製し化合物Aを単離した。¹H-NMRシグナルの化学シフト値とカップリング分割パターンから、2-(4-ヒドロキシフェニル)エタノール(別名 tyrosol)と同定した。

(6) 菌糸誘導

A. truncatum TUF65001の培養濾液および単離画分を用い、*T. yokohamensis* 交配株(TUF6101924 × TUF6101925)の酵母懸濁液で菌糸体誘導活性試験を行った。ネガティブコントロールとして、最少培地中にDMSOを加えた。顕微鏡観察により、*A. truncatum* TUF65001の培養ろ液には菌糸を誘導する活性が検出された。一方、0.5 mg/mLの2-(4-ヒドロキシフェニル)エタノールを含む最少培地では、生殖管は発芽したが、菌糸の伸長は維持できなかった。さらに、tyrosolが存在すると、擬似菌糸が形成された。*T. yokohamensis*の生殖管形成した細胞の割合を定量したところ、培養濾液が最も効果的に菌糸成長を誘導し、15%の細胞が生殖管を形成した。対照的に、tyrosolの存在下では、0.5%の細胞でしか生殖管を形成しなかった。このように、シロキクラゲのコンパニオン菌であるクロコブタケ属菌が、Tyrosolを生産することを発見し、そのTyrosolが、シロキクラゲの菌糸体を誘導できることを示したことから、子嚢菌と担子菌のQuorum sensingの実例を初めて示すことができ、シロキクラゲの純粋培養による人工栽培への道を切り開くことができたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nanthawan Kaeoniwong, Kozue Sotome, Tsuyoshi Ichianagi, Norihiro Shimomura, and Tadanori Aimi	4. 巻 65
2. 論文標題 Life cycle and mating compatibility in the Japanese white jelly mushroom, <i>Tremella yokohamensis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanthawan Kaeoniwong, Taiyo Kobayashi, Kozue Sotome, Tsuyoshi Ichianagi, Norihiro Shimomura, and Tadanori Aimi	4. 巻 32
2. 論文標題 Identification of tyrosol in the culture filtrate of <i>Annulohyphomyces truncatum</i> as a mycelial inducer of the Japanese white jelly mushroom <i>Tremella yokohamensis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	一柳 剛 (Ichianagi Tsuyoshi) (00302240)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	

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
---------	---------