

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22380084
 研究課題名（和文） 外生菌根共生の分子研究基盤整備と共生機構の解明
 研究課題名（英文） Molecular and physiological studies on some ectomycorrhizal symbiotic fungi

 研究代表者
 田中 千尋（TANAKA CHIHIRO）
 京都大学・大学院農学研究科・准教授
 研究者番号：60263133

研究成果の概要（和文）：本研究では、森林樹木アカマツ・コナラなどの代表的外生菌根種であるマツタケ (*Tricholoma matsutake*)、バカマツタケ (*Tricholoma bakamatsutake*)、ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) ならびに非菌根性近縁菌ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) などを対象に、半数体菌株の作出ならびに特性評価、形質転換法の検討を行った。菌根共生解明の研究基盤として利用可能なホンシメジならびにハタケシメジ半数体株それぞれ 1 株ずつを選定し、ゲノム DNA 解析に供試した。

研究成果の概要（英文）：In this study, Japanese ectomycorrhizal fungi, e.g. *Tricholoma matsutake*, *T. bakamatsutake* (an allies of *T. matsutake* with different host spectrum), *Lyophyllum shimeji* and *L. decastes* (saprophytic and phylogenetically closely related species of *L. shimeji*) were featured. We isolated haploid strains of these fungal species by single basidiospore isolations, and compared their phenotypes on colonial growth and ectomycorrhizal formations etc. We also tested competency of these fungal species for Agro-infections. Finally, we chose a representative haploid strain of *L. shimeji* and *L. decastes*, respectively. The genomes were sequenced using HiSeq2000 system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

 キーワード：外生菌根菌, ホンシメジ, バカマツタケ, マツタケ, ハタケシメジ, *Agrobacterium*, 形質転換, ゲノム

1. 研究開始当初の背景

菌類は森林生態系において一般に分解者として有機物を無機物に変える重要な役割を果たしている。さらに、菌類の中でも外生菌根菌類（以下きのこ略記）は森林樹木の共生者として、森林の養分循環や宿主植物の生

存・成長に不可欠である。最近では、きのこの共生を積極的に利用し、森林の育成や保全に応用する試みが世界の各地で行われている。しかし、きのここと宿主植物との共生には、まだ不明な点も多く残されている。中でも、きのこの宿主認識機構や共生メカニズムに

についてはほとんど知見が得られていないのが現状である。一方、最近のゲノム科学や分子的手法の進歩は著しく、これら情報や技術を用いて、多くの生物の特性や機能さらには生物間相互作用までが解析可能となってきた。とくに、菌類では複数の植物病原糸状菌ゲノムが解析され、ゲノム情報に基づいた、宿主植物認識機構や病原性メカニズムの解明が進められつつある。きのこにおいても、欧米が中心となって、2008年にゲノム情報が明らかになったオオキツネタケ *Laccaria bicolor* を利用して菌根共生を解明しようとする動きが急速に拡がっている。一方、我が国では、秋の味覚の代表であるきのこ、マツタケが外生菌根性かつ高価な特用林産物であることから、常に研究の対象としてとらえ続けられている。マツタケについてはゲノム解析が私企業によって既に終了しているが、その遺伝情報は公開されていない。また、分子生物学的解析に必要な形質転換法や遺伝子破壊法、さらには実験室内での菌根形成法等周辺技術も十分開発されていないのが現状である。本研究では、マツタケならびにその近縁菌バカマツタケ、マツタケとらび経済的重要性の高いホンシメジなどを主な対象とし、分子生物手法の開発ならびに遺伝学・生理学的研究を行い、どの菌種が、外生菌根菌研究基盤として有望かを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

本研究では、森林樹木アカマツ・コナラなどの代表的な外生菌根種であるマツタケ (*Tricholoma matsutake*)、バカマツタケ (*Tricholoma bakamatsutake*)、ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) ならびに非菌根性近縁菌ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) などを対象に、(1) 半数体作出手法の確立、(2) 形質転換手法の確立、ならびに(3) ゲノム情報の取得をおこない外生菌根菌分子研究の基盤整備を進め、共生機構の解明に資することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 半数体作出手法の確立

担子菌類における半数体株作出は単担子胞子分離あるいは、プロトプラスト放出に伴うモノカリオン化などを利用するが、一般に、外生菌根菌種の担子胞子は発芽率が低く、また菌糸生育速度が低いいため、プロトプラスト作出も困難な場合が多い。本研究で対象としたバカマツタケは菌糸生育が通常極端に遅く、プロトプラスト作出がきわめて困難である。また、ハタケシメジは腐生性ながら胞子発芽率が極めて低い。一方、マツタケならびにシメジについては、研究協力者の太田博士らの研究により、担子胞子の発芽促進物質が

明らかにされており、単担子胞子分離により半数体作出手法が確立されている。そこで、本研究では、バカマツタケならびにハタケシメジの担子胞子発芽促進物質を探索するとともに、得られた単担子胞子分離株の核数を調べ、以後の実験に供試する半数体菌株を作出した。

(2) 形質転換手法の確立

形質転換手法について、バカマツタケ、マツタケ、ホンシメジならびにハタケシメジなどを用いて検討した。ホンシメジならびにマツタケではプロトプラスト・PEG法による形質転換が可能であるが、バカマツタケは培地における生育がきわめて遅く形質転換に必要なプロトプラストを得ることは困難である。そこで、プロトプラストを用いず形質転換可能な *Agrobacterium* 法を用いた形質転換実験を外生菌根菌種に試みた。また、手法の確立ならびに対比の為に、エノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、ヒラタケ等の材腐朽性の担子菌類もあわせて用いた。

(3) ゲノム情報の取得

ホンシメジ半数体株 b11 ならびに、ハタケシメジ半数体株 13-sa1 をそれぞれ CM 液体培地で2週間振盪培養し、得られた菌体を凍結乾燥後、グアニジン-ガラス法を用いて DNA 抽出ならびに精製を行った。得られたゲノミック DNA は HiSeq2000 を用いペアエンドシーケンスにて解析した。

4. 研究成果

(1) バカマツタケならびにハタケシメジの担子胞子は培地に酪酸を添加することで、発芽率が向上することがわかった。得られた単担子胞子分離株の菌糸形態ならびに核数を、カルコフルオールホワイト・ビスベンズイミド染色法で調査した。マツタケならびにバカマツタケでは子実体分離株ならびに単担子胞子分離株ともクランプコネクションを持たない。細胞壁染色ならびに核染色の結果、マツタケは基本的に単核性であり、バカマツタケの場合は2核性のものが多かった。この両者の担子胞子内の核数を調査したところ、マツタケの担子胞子は単核性であるが、バカマツタケの担子胞子は単核のものと2核のものが混在していることがわかった。この原因を明らかにするため、両者の有性生殖時の各行動を調査したところ、マツタケの post-meiotic mitosis は担子胞子内で同調的に起こり、娘核の一つが担子器内に移行するが、バカマツタケでは非同調的で娘核が担子器に移行しないため、2核性の胞子が生じることを見いだした。このような近縁種間における核行動の異なりは、ナラタケ属菌においても報告されており、2核性の種はホモ

タリックであるとされている。

一方、ホンシメジ、ハタケシメジの単担子孢子分離株では、子実体組織分離株と異なりクランプコネクションを持たず、単核性も確認された。また、1/5GY寒天培地を用いて対峙培養し、重相体の形成の有無を調べた。その結果、両菌とも4極性であることが示された。

(2) *Agrobacterium* を用いた形質転換法を外生菌根菌である、バカマツタケ、マツタケ、ホンシメジならびに腐生性のハタケシメジ、エノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、ヒラタケに適用を試みた。複数菌種ならびに菌株を供試して、詳細に検討を行った結果、宿主担子菌の前培養日数ならびに菌糸分断処理後、感染処理までの培養日数が形質転換効率に影響を及ぼしていること、その条件は、菌種はもちろん菌株によっても異なることが明らかになった。本研究では、形質転換マーカーとして担子酵母 *Cryptococcus neoformans* の actin プロモーター制御下の HPT 遺伝子を用いた。今回の実験では、バカマツタケならびにマツタケをのぞくすべての供試菌において、形質転換体が得られた。このことは、この actin プロモーターが、担子菌類のユニバーサルプロモーターになりうることを示唆している。また、ホンシメジ、ハタケシメジ、エノキタケ、ブナシメジにおいては、形質転換効率が極めて高く、本法がこれらの菌種における優れた形質転換法ならびに遺伝子破壊法となることが明らかになった。さらに、微量サンプルから迅速・簡便に DNA を分離し、PCR 法によって形質転換体を判別する手法を考案、半数体ホンシメジ形質転換体を用いて *Agrobacterium* 法によって挿入した tag 周辺の塩基配列情報を得るための Tail PCR 法のプライマーや反応条件検討を行った。以上の研究結果は、半数体分離株を対象に *Agrobacterium* 法による gene tagging mutagenesis を行えば、外生菌根菌共生を解明する上で必要不可欠な菌根形成能欠失株などの突然変異作出ならびに、それに関与する遺伝子の塩基配列情報の取得が可能となることを示している。

(3) ゲノム情報の取得については、複数のホンシメジ半数体株ならびに、ハタケシメジ半数体株を予備的に供試し、半数体における菌根形成能や菌叢形成能を比較、さらには、和合的な菌株を用いて重相化し、重相株における菌根形成能や子実体形成能を比較し、ホンシメジ半数体株 b11 ならびに、ハタケシメジ半数体株 13-sa1 をそれぞれ代表菌株として選び出した。HiSEQ2000 を用いたゲノムシーケンス解析を行い、それぞれの菌株から約 2.5Gbp の塩基配列を得、現在、アッセンブル作業を行っている。

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10件)

- ① Hatoh K, Izumitsu K, Morita A, Shimizu K, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C (2013) Transformation of the mushroom species *Hypsizigus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* by an *Agrobacterium*-mediated method using a universal transformation plasmid. *Mycoscience* 54: 8–12 [査読有]
DOI: 10.1016/j.myc.2012.08.002.
- ② Ota Y, Yamanaka T, Murata H, Neda H, Ohta A, Kawai M, Yamada A, Konno M, Tanaka C (2012) Phylogenetic relationship and species delimitation of *matsutake* and allied species based on multilocus phylogeny and haplotype analyses. *Mycologia* 104: 1368–1380 [査読有]
DOI: 10.3852/12-068.
- ③ Izumitsu K, Hatoh K, Sumita T, Kitade Y, Morita A, Gafur A, Ohta A, Kawai M, Yamanaka T, Neda H, Ota Y, Tanaka C (2012) Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53: 396–401 [査読有]
DOI: 10.1007/s10267-012-0182-3.
- ④ Wan J, Koike A, Yamanaka K, Sotome K, Morinaga T, Tanaka C, Terashima Y, Aimi T (2011)

Genetic diversity of *Tricholoma matsutake* and close allies associated with broad-leaved trees in Asia. *Mushroom Science and Biotechnology* 19: 167–174 [査読有]

- ⑤ Raut JK, Suzuki A, Fukiharu T, Shimizu K, Kawamoto S, Tanaka C (2011) *Coprinopsis neophlyctidospora* sp. nov., a new ammonia fungus from boreal forests in Canada. *Mycotaxon* 115:227–238 [査読有]
DOI: 10.5248/115.227
- ⑥ Fukiharu T, Bougher NL, Buchanan PK, Suzuki A, Tanaka C, Sagara N (2011) *Coprinopsis austrophlyctidospora* sp. nov., an agaric ammonia fungus from southern hemisphere plantations and natural forests. *Mycoscience* 52:137–142 [査読有]
DOI: 10.1007/s10267-010-0077-0

〔学会発表〕（計8件）

- ① 羽當加奈子, 泉津弘佑, 森田篤, 清水公徳, 太田明, 河合昌孝, 山中高史, 根田仁, 太田祐子, 田中千尋, 汎用的な遺伝子組換えプラスミドを用いたアグロバクテリウム法によるブナシメジ, エノキタケおよびマイタケの遺伝子組換え, 日本菌学会2012年度大会 2012年05月27, 岐阜市
- ② 田中千尋, 植物病原糸状菌の遺伝生理生態学的研究, 日本菌学会2012年度大会 2012年05月26日, 岐阜市
- ③ Tanaka C, Kawai M, Ohta A, Yamazaki M, Ohta Y, Yamanaka T, Neda H, Cytological study in *Tricholoma bakamatsutake*,

International Mycological Congress
9, 2010年8月4日, Edinburgh, UK

〔その他〕
ホームページ等
<http://remach.kais.kyoto-u.ac.jp/~ems>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 千尋 (TANAKA CHIHIRO)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号：60263133

(2)研究分担者

平井 伸博 (HIRAI NOBUHIRO)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：00165151

研究協力者

太田明
滋賀県森林センター
専門員

河合昌孝
奈良県森林技術センター
総括研究員