

令和 5 年 8 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06161

研究課題名(和文) アガリクス茸の交配に伴う細胞質遺伝様式と形質発現に及ぼす細胞質の影響の解明

研究課題名(英文) Studies on cytoplasmic inheritance in sexual crosses and effects of cytoplasm on biological properties in *Agaricus subrufescens*

研究代表者

福田 正樹 (Fukuda, Masaki)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：40208963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アガリクス茸(ヒメマツタケ)の交配に伴う細胞質(ミトコンドリアDNA)の遺伝様式の解明を主な目的として行った。

異なるミトコンドリアDNAを保有する親ホモカリオン系統間の対峙培養で得られた交配株(ヘテロカリオン)は、どちらか一方の親系統のものを受け継いでいたことから、本菌の交配に伴う細胞質の遺伝様式は片親遺伝であることが示された。

交配株を無性孢子培養して細胞質置換ホモカリオンを、また細胞質置換ホモカリオンを親系統にして細胞質置換ヘテロカリオンを作出した。細胞質置換株間で菌叢形態や菌糸生育に差が認められたことから、アガリクス茸においても細胞質が表現形質に影響を及ぼすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞質がきのこの形質発現に影響を及ぼすことが示されているにも関わらず、交配に伴う細胞質の遺伝様式が明らかにされているきのこの種は少ない。また、アガリクス茸の交配株は親系統の接触部からセクター状に形成されるので、どちらの親系統の細胞質が伝達されているのかが不明瞭であった。

本菌の交配に伴う細胞質の遺伝様式は原則片親遺伝であることを示した本研究の結果から、セクター状に形成される交配株は細胞質的に均一なものとして扱えることを提示できた。また、ヒメマツタケの細胞質置換株の作出が可能になると細胞質が表現形質に影響を及ぼすことが示されたことにより、核遺伝子のみに着目したきのこの育種に一石を投じたと言える。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to determine the mode of mitochondrial inheritance for newly established heterokaryons from sexual crosses of *Agaricus subrufescens*, by using mtDNA RFLPs as genetic marker.

Newly established heterokaryons from the sexual crosses were found to retain mtDNA genotype from one of the parental homokaryons, suggesting that mitochondrial inheritance is principally uniparental in sexual crosses between homokaryons. Thus, one of parental strains would be selectively nuclear recipient homokaryon. On the other hand, cytoplasm-substitute strains could be constructed by using de-heterokaryotization, and their colony morphologies and mycelial growth rates were different from original strains. This suggests that biological properties of *A. subrufescens* are influenced by mtDNAs.

These findings obtained from this study will be useful for planning effective breeding programs of this fungus.

研究分野：きのこ遺伝育種学

キーワード：アガリクス茸 ヒメマツタケ 交配 細胞質遺伝 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

アガリクス茸（ヒメマツタケ *Agaricus subrufescens*）は、薬理効果の高い機能性食物として、また医薬品の素材としても有望な担子菌きのこであり、きのこ（子実体）の人工栽培方法もほぼ確立されている。人工栽培の歴史が長いきのこ種では、主に交配育種による品種改良が推進され、異なる特性の数多くの栽培品種が育成されている。しかし、商業的な栽培の歴史が浅いアガリクス茸では、栽培用の種菌は野生の子実体から分離された株（野生株）がそのまま利用されているのが現状である。今後は、アガリクス茸についても、交配育種により生産性や機能性に優れた品種を効率的に開発することが求められている。

ところで、きのこの形質発現に細胞質が影響を及ぼすことがいくつかのきのこで知られており、核の構成が同じで細胞質が異なる正逆交配株間の菌糸生育が異なる場合がある。このような正逆交配株間の表現型に差が生じるのは細胞質に起因していると考えられる。従って、交配に伴う細胞質の遺伝についての知見を得ることは、アガリクス茸を含めたきのこの交配育種を進める上で極めて重要である。特に、アガリクス茸は一次菌糸（ホモカリオン）の接触部に交配株がセクター状に形成されるので、どちらの親系統の細胞質が伝達されるのかは不明瞭である。また、一次菌糸の接触部では、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の組換えが起こることが数種のきのこで知られている。従って、細胞質的に均一なアガリクス茸の交配株を得るためには、本菌の交配に伴う細胞質の遺伝様式を明らかにすることが必要かつ重要である。我々はこれまでに、アガリクス茸の栽培系統間の遺伝的類縁関係の解析を行うとともに、本菌の交配（ヘテロカリオン化）は和合性のホモカリオン菌糸体間の接触部でのみ起こることなどを明らかにしてきたが、本菌の細胞質遺伝に関する知見は全く得られていない。

2. 研究の目的

上述のように、アガリクス茸の細胞質遺伝に関する知見は全く得られていない。そこで本研究では、アガリクス茸のホモカリオン間の交配時に細胞質がどのように伝達されるのかを解明すること、および細胞質置換株の作出とそれらの表現形質を分析することで、細胞質がアガリクス茸の形質発現に影響を及ぼすか否かについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 交配株の作出

研究室保存のアガリクス茸のヘテロカリオン 4 系統（SA514, SA515, SA519 および SA527）に由来する単胞子分離系統（ホモカリオン系統）27 系統を親系統とし、細胞質（mtDNA）の異なる複数の組合せで対峙培養した（計 40 組合せ）。なお、SA514 と他の 3 系統間で mtDNA の RFLP が異なることが先行研究で明らかになっており、本研究では SA514 の mtDNA タイプを A (mt-A)、その他 3 系統の mtDNA タイプを B (mt-B) として表した（図 1）。

対峙培養は、各単胞子分離系統の BMA（パーク堆肥 200 g の熱水抽出物、マルトエキス 20 g、粉末寒天 20 g/L）培養菌糸体（約 5 mm 角）を直径 9 cm のシャーレ内の BMA 平板培地中央部に約 1 cm 離して接種する方法で行った。25℃、暗黒下で約 2 週間培養後、対峙培養コロニーの菌糸体接触部を中心として、短冊状に菌糸体片（約 2×35 mm）を切り取った。切り取った菌糸体片を新たな BMA 平板培地中央に接種し、25℃、暗黒下で培養した。2 週間以上培養後、肉眼で短冊状菌糸体片から交配の結果生じるセクター状菌糸体（交配の結果生じた新生ヘテロカリオン）の形成を観察した。対峙培養接触部から出現したセクター状菌糸体（交配株）の 4 ヶ所（上部セクター 3 ヶ所、下部セクターから 1 ヶ所）から直径約 5 mm の菌糸体片を切り取り、新たな BMA 平板培地に分離した（図 2 参照）。

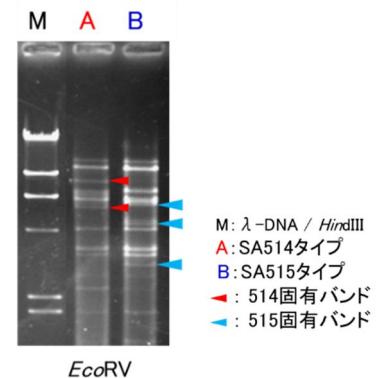


図 1. SA514 および SA515 の mtDNA の RFLP

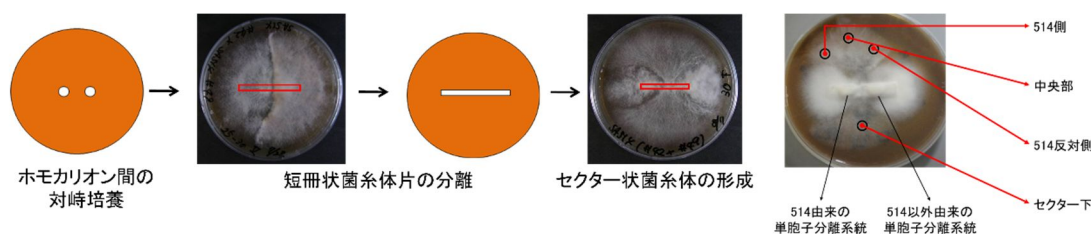


図 2. 対峙培養試験とセクター状菌糸体からの交配株の分離位置

(2) 交配株の細胞質の調査

分離した交配株の凍結乾燥菌系体から全 DNA を抽出し、ビスベンズイミド/塩化セシウム等密度勾配遠心して mtDNA を単離した。単離した mtDNA を制限酵素 (*EcoRI* あるいは *EcoRV*) 処理して RFLP パターンを分析することにより交配に伴う細胞質遺伝様式 (片親遺伝 or 両親遺伝, mtDNA の組換えの有無) を検討した。また, SA514 および SA515 系統を用いて, 複数のミトコンドリア遺伝子 (mt-L-rDNA, *atp6* および *cox3*) を PCR 増幅し, それら領域が mtDNA のマーカーとして利用できるか否かを検討した。

(3) 細胞質置換株の作出と形質調査

交配株由来の無性孢子再生菌系体の中から, 細胞質が置換したホモカリオン系統を選抜した。さらに, 細胞質が置換したホモカリオンを利用した対峙培養により, 細胞質が置換した交配株 (ヘテロカリオン) の作出を行なった。なお, 核の構成は交配試験と SRAP プロファイルにより検討した。そして, 形質発現に及ぼす細胞質の影響の有無を明らかにするために, 元株および細胞質置換株の菌叢形態および菌糸伸長速度を比較した。

4. 研究成果

(1) 交配株の作出と細胞質 (mtDNA RFLP) の調査

SA514 由来の単孢子分離系統と SA514 以外由来の単孢子分離系統間の計 40 の組合せで対峙培養を行った結果, 20 組合せでセクターが形成された。そこで, セクター状菌系体が形成された 20 組合せの中から, 任意に選んだ 15 組合せについて菌系体を分離し, それらの mtDNA の RFLP パターンを分析した (図 3 および表 1)。

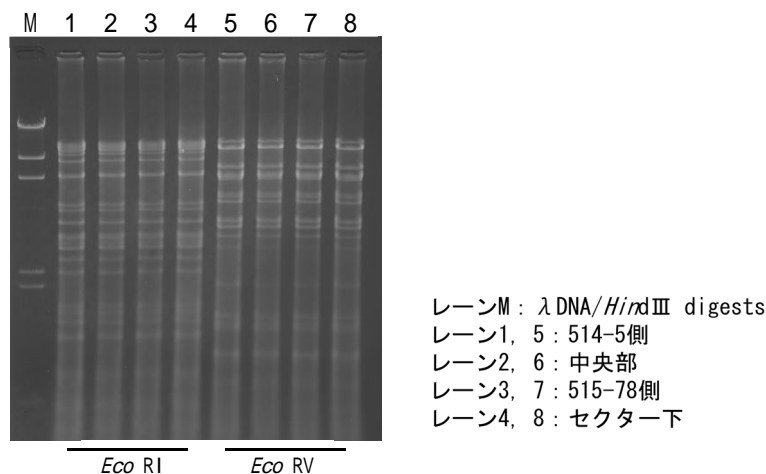


図 3. 514-5 と 515-78 間の対峙培養で形成されたセクター状菌系体からの分離株 (交配株) の mtDNA RFLP パターン (全て B タイプ)

15 組合せすべてにおいて, セクター状菌系体の mtDNA の RFLP パターンはどちらか一方の親系統のタイプと一致し, 混合型や組換え型と考えられる RFLP パターンは検出されなかった。したがって, アガリクス茸の交配における mtDNA の遺伝は, 核受容側のホモカリオン系統のものを受け継ぐ片親遺伝であることが強く示唆された。アガリクス茸の交配における片親遺伝のメカニズムは不明であるが, 菌糸融合後の単相核の移動速度が関与していることも考えられ, 一方の核が速く移動し, 先に生じたヘテロカリオンがセクター状菌系体として出現している可能性がある。何れにせよ, セクター状菌系体は細胞質的に均一であり, 分離したセクター状菌系体は遺伝的 (細胞質的) に単一の菌株として扱えることが示された。

(2) ミトコンドリア遺伝子の増幅

mt-L-rDNA および *atp6* 領域ともに供試した両系統において増幅 DNA バンドが検出され, サイズはそれぞれ約 1,000 bp (mt-L-rDNA) および約 400 bp (*atp6*) であった (図 4)。両領域の塩基配列 (業者委託) には, SA514 および SA515 間で差が認められなかったため, mt-L-rDNA および *atp6* 領域では有用な mtDNA マーカーを作出することはできなかった。一方, *cox3* においては SA514 および SA515 の両者とも複数のバンドが検出され, 異なる泳動パターンを示した (図 5, レーン 1 および 2)。そこで, 分離した一部のセクター状菌系体について *cox3* 領域を分析したところ, RFLP 分析と

表 1. セクター状菌糸体からの分離株 (交配株) のミトコンドリア DNA タイプ*

組合せ	514 側	中央部	514 反対側	セクター下
514-1 × 515-2	B	B	B	B
514-1 × 515-72	B	B	B	B
514-5 × 515-2	A	A	A	A
514-5 × 515-8	A	A	A	A
514-5 × 515-72	B	B	B	B
514-5 × 515-78	B	B	B	B
514-7 × 515-42	B	B	B	B
514-11 × 515-72	B	B	B	B
514-12 × 520-20	A	A	A	A
514-12 × 520-57	B	B	B	B
514-20 × 515-42	B	B	B	B
514-30 × 515-72	B	B	B	B
514-36 × 519-23	B	B	B	B
514-36 × 519-27	B	B	B	B
514-36 × 520-57	B	B	B	B

* A : SA514 タイプ, B: SA514 以外のタイプ

cox3 分析の結果は一致した (図 5, レーン 3~5)。今後, PCR の条件などの精査が必要であるが, mtDNA タイプを識別する新たなマーカーとして利用できる可能性がある。今後この手法による分析を確立することができれば, RFLP 分析と比較して簡易に mtDNA タイプを分析できる。なお, *cox3* 領域で複数のバンドが検出された原因は不明であるが, *cox3* 領域内にプライマーと相補的な配列が複数存在している可能性もある。この点については, 今後検討が必要である。

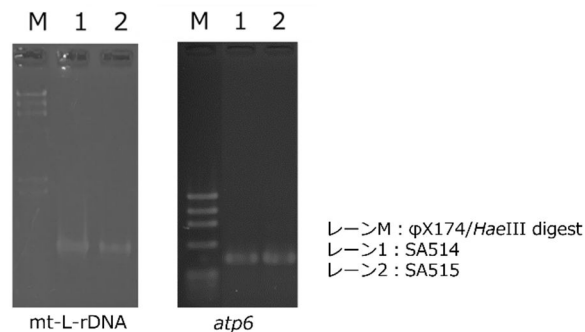


図 4. mt-L-rDNA および *atp6* 領域の PCR 産物の電気泳動像

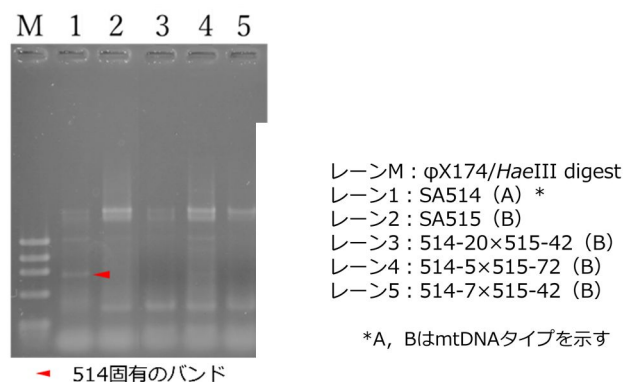


図 5. *cox3* 領域の PCR 産物の電気泳動像

(3) 細胞質置換株の作出と形質調査

BタイプのmtDNAを保有する交配株514-5×515-78の無性孢子由来の再生菌糸体を30個体(#1-1~30)分離後、それらの中から菌叢や菌糸伸長速度などを指標にしてホモカリオンと思われる8個体を選び、両親系統(514-5および515-78)と対峙培養した。その結果、8個体のうち2個体(#1-27および#1-28)が515-78との間でのみ、また1個体(#1-4)が514-5との間でのみそれぞれセクター状菌糸体を形成した。そこで、#1-28についてSRAP分析を行なった結果、そのSRAPパターンは514-5と概ね一致した(図6)。これらのことから、再生菌糸体2系統(#1-27および#1-28)は514-5(mt-A)の細胞質がBタイプに置換したホモカリオン系統であることが示された。

次に、514-5の細胞質置換株#1-27および#1-28(mt-B)と515-8(mt-B)を対峙培養したところ、両組合せともセクター状菌糸体が形成された。ここで得られたセクター状菌糸体(交配株)は、先に作出した交配株514-5×515-8(mt-A)(表1参照)の細胞質がBタイプに置換したヘテロカリオンである。したがって、無性孢子培養による脱ヘテロカリオンにより作出した細胞質置換ホモカリオンを利用すれば、ヘテロカリオンの細胞質置換株が作出できることが示された。

再生菌糸体2系統(#1-27および#1-28)とホモカリオン系統(514-5)間、および細胞質が異なるヘテロカリオン間における1週間の菌糸伸長速度を比較した(図7)。#1-27(mt-B)および#1-28(mt-B)の伸長速度は514-5(mt-A)よりも遅かった。ヘテロカリオンにおいても、514-5×515-8(mt-A)に比べ細胞質がBタイプに置換したヘテロカリオン[#1-27×515-8(mt-B)および#1-28×515-8(mt-B)]の菌糸伸長速度は遅かった。ホモカリオンおよびヘテロカリオンの両者とも細胞質がAからBに置換したことで、菌糸伸長速度が遅くなったことから、菌糸生育に関してはAタイプの方が優れている可能性がある。今後はより多くの細胞質置換株を作出し、さまざまな核とミトコンドリアの組み合わせを検討する必要がある。また、今後は菌糸伸長速度に加えて、菌糸体乾燥重量や有用成分含量の比較、子実体形成試験などの評価を行う必要があると考える。

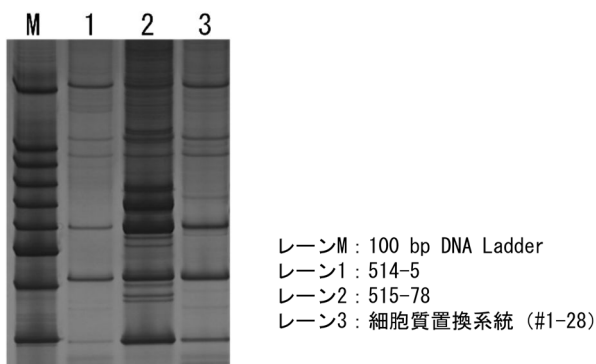


図6. 両親系統(514-5および515-78)と#1-28のSRAPパターン

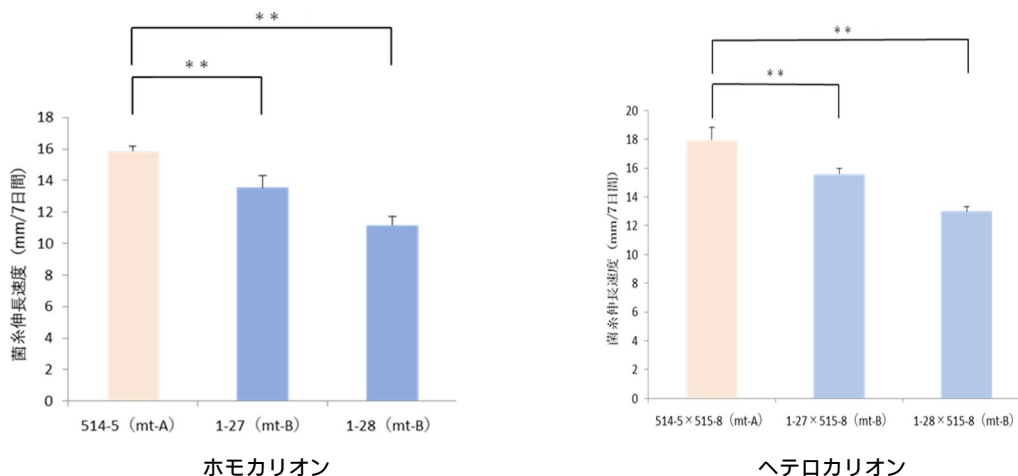


図7. 細胞質置換株の菌糸伸長速度
 **有意差あり(p<0.01)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎 哲, 鈴木珠美, 福田正樹
2. 発表標題 ヒメマツタケの交配株に伴うミトコンドリアDNAの遺伝
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田正樹
2. 発表標題 ヒメマツタケの遺伝・育種学的研究
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会 きのこ研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田正樹, 櫻井香菜子, 土屋成美
2. 発表標題 ヒメマツタケ交配株の効率的作出方法の検討
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河岸洋和	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 360
3. 書名 きのこの生物活性と応用展開	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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