

「ウシグソヒトヨタケ」の歴史と魅力

村口 元

はじめに

キノコというと一般の方は、食材としてのキノコや毒キノコを思い浮かべます。食べることが前提にあるので、ウシグソヒトヨタケを研究しているというと、牛のうんこに生えて、普通は食しないキノコをどうしてわざわざ研究しているのかと不思議に思われます。しかし、ウシグソヒトヨタケ研究の歴史は長く、かなりの情報が蓄積されてきているキノコなのです。読者の中からウシグソヒトヨタケを研究材料として使ってみたいという方が現れることを期待しています。

ウシグソヒトヨタケ研究の歴史

1940年代に岡山大学の木村劫二先生が、簡単に培養できるキノコとして、ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*, 旧学名: *Coprinus cinereus*, 図1) に着目されました。



図1. ウシグソヒトヨタケの子実体

このキノコは糞生菌ですが、腐った芝や畳、生ごみからも生えることがあります。1 cmほどの子実体原基の柄が一晩で10 cmにも伸長し、傘を開いて胞子を飛ばし、翌朝には傘・柄ともに溶けてしまうため「一夜茸」と呼ばれます。岡山大学の武丸恒雄先生が、このキノコの遺伝学的研究を進め、各種栄養要求性マーカーによる連鎖地図を作成されました¹⁾。武丸先生のもとにイギリスのDavid Moore博士から、胞子を送って欲しいという依頼があり、1970年代の初めに岡山のウシグソヒトヨタケの胞子がイギリスに渡りました。Moore博士はその胞子を1つずつ拾って培養し、Okayama-1, Okayama-2, …… , Okayama-7……と番号を付けました²⁾。その後、Moore博士は、アメリカでウシグソヒトヨタケの研究を始めたいというPatricia J. Pukkila博士にOkayama-7株を送りました。1980年頃からPukkila博士らはOkayama-7などを使って、ウシグソヒトヨタケの減数分裂に関する分子遺伝学的研究を開始しました。1980年代の後半には、Pukkila博士らとイギリスのLorna Casselton博士らのグループの共同研究によって、このキノコの形質転換系が確立されました³⁾。柳園江先生らによって確立されていた再生効率の高いプロトプラスト調製法⁴⁾が、PEG-Ca²⁺法による本菌の形質転換を可能にしました。この形質転換法の確立により、交配型遺伝子や各種突然変異の原因遺伝子が、次々と明らかにされるようになりました。1990年代初めに岡山大学の鎌田堯先生もアメリカのMimi Zolan博士のもとで形質転換法を修得されて、遺伝子レベルでの解析が日本でも始まりました。

アメリカの酵母遺伝学者Fink博士が、このキノコに注目して、Pukkila博士がまとめ役となり、Okayama-7株のゲノムプロジェクトがマサチューセッツ工科大学のBroad Instituteで行われ、2003年にはゲノム情報(37.5 Mb)がインターネット上で公開されました。公開された情報を各国のウシグソヒトヨタケ研究者が解析し、その成果が2010年に発表されました⁵⁾。2012年からアメリカエネルギー省管轄のJoint Genome Institute (JGI) で始まったプロジェクトの中で、子実体形成過程のStrand-specific RNA-seq解析が行われ、約14,000個の遺伝子が子実体

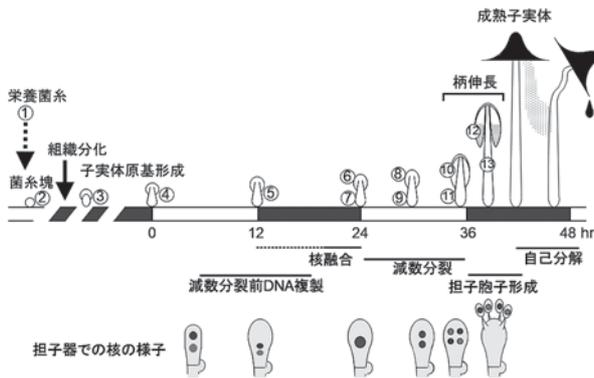


図2. RNA-seq解析に供された13ステージ/組織

形成に伴って(図2), どのように発現変動しているのかも分かってきました⁶⁾.

特徴・利点

担子菌の子実体は, 通常は二核菌糸によって作られます. 本菌を実験材料とする第一の利点は, 二核菌糸を培地に植え付けてから約10日で子実体が形成されることです. このように生活環が短く次世代株を得やすいので, 遺伝学的研究材料として優れています. 遺伝学的研究に突然変異体の作出は不可欠ですが, 本菌の二核菌糸は単相単核の無性胞子(分裂子:オイディア)を作るので, このオイディアに紫外線照射や薬剤処理を行って突然変異を誘発することができます.

本菌の担子胞子は黒く, 1つの担子胞子から発芽した二核菌糸を顕微鏡下で容易に見つけることができます. また, 培地に0.01%フルフラールを添加することで90%以上の担子胞子が発芽します. こうしてF1子孫を確実に得ることができる点も遺伝学的研究を進めるうえでの利点となっています.

1970年代初めに巧みな突然変異体スクリーニングにより, 交配型因子であるA因子とB因子に突然変異を持ち, 二核菌糸(ハプロイド:n)でも子実体を形成する二核性子実体形成株(*Amut Bmut*)が作出されました⁷⁾. 二核性子実体形成株もオイディアを作りますので, この株のオイディアに突然変異誘発処理を行うことで, 子実体形成などの二核菌糸に依存していた表現型に関する劣性突然変異を容易に見いだすことができるようになりました. 筆者らは, 二核性子実体形成株(*Amut Bmut*)を片親にしたマッピング集団を作り, RFLPやRAPDマーカーを使って連鎖地図を作成しました⁸⁾. この地図を使うことにより二核性子実体形成株(*Amut Bmut*)で誘発した突然変異を迅速に染色体にマッピングすることができます. この二核性子実体形成株は, 子実体形成過程の

RNA-seq解析にも使われ, そのゲノム情報はJGIのサイトから入手可能です.

形質転換が容易であるので, GFPなどの蛍光タンパク質を融合したタンパク質を発現させ, タンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察することもできます.

研究の魅力と難しさ

ウシグソヒトヨタケを研究材料として, さまざまな研究が行われてきました. イギリスのCasselton博士らは, 交配型因子の遺伝子を特定し, A因子はホメオボックスを持つ転写因子群をコードしており⁹⁾, B因子はフェロモンとそのフェロモン受容体群をコードしていることを明らかにしました¹⁰⁾. イギリスのMoore博士らは, 子実体形成に興味を持って研究を進めていました. アメリカのPukkila博士らは, 減数分裂を研究する材料として本菌を使っていました. 傘で減数分裂が同調的に進むので, 減数分裂の様子を観察しやすいのが大きな理由です. ウシグソヒトヨタケの子実体成熟には明暗周期が必要です. 岡山大学の鎌田先生らは, この子実体成熟に必要な光条件を詳細に解析する¹¹⁾とともに, 明暗周期を与えているにもかかわらず, 暗黒中で育てたような表現型(dark stipe)を示す突然変異体の原因遺伝子(*dst*遺伝子)を特定し, 光受容系を明らかにしました¹²⁾. ハンガリーのNagy博士や香港のKwan博士もウシグソヒトヨタケの子実体形成の研究をそれぞれの切り口で展開しています.

多くの担子菌の栄養二核菌糸は, 細胞分裂の際に細胞間にクランプを形成します(図3A). クランプの形成, 二核の同調分裂(共役核分裂), 隔壁形成, クランプの次端細胞への融合という一連の過程によって, 二核状態を維持した栄養菌糸の増殖が起こり, 菌糸が成長します(図3B). 出芽酵母や分裂酵母の細胞分裂の分子機構が分子遺伝学的手法で解析され, そこで明らかにされてきた役者の相同タンパク質や細胞骨格タンパク質群が, 各種の糸状菌の菌糸成長にも関わっていることが分かってきています. 担子菌の菌糸成長や細胞形態形成にも, これらのタンパク質群が関わっていることが部分的に分かってきています^{13,14)}. 今後の詳細な解析が期待されます.

担子菌の子実体形成は, 減数分裂を行う担子器を作り出すために起こると言えます. それゆえ, 貧栄養や低温刺激のような環境条件の悪化が一般に子実体形成を促します. ウシグソヒトヨタケの子実体形成開始(発茸)は, 光によって同調的に起こすことができるので, 比較的ステージの揃った組織サンプルを調製でき, 分子レベルの

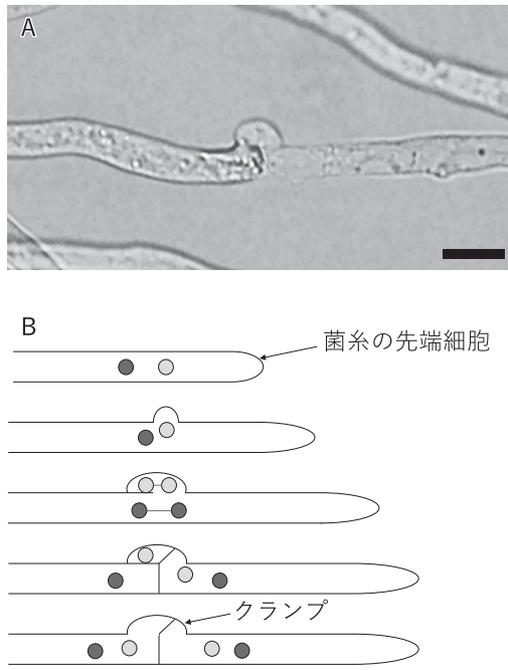


図3. 担子菌の菌糸成長. A:クランプ, 右が菌糸先端方向 (scale bar : 5 μm), B : クランプ形成と二核の共役核分裂の関係.

解析試料が得やすいと言えます¹⁵⁾. また, もう1つの担子菌のモデル生物であるスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)¹⁶⁾ と比べると, ウシグソヒトヨタケの子実体は, 傘と柄の区別がはっきりしているのので, 比較的均一な組織ごとの試料調製が可能です.

ウシグソヒトヨタケでも, Ku70破壊株やCRISPRを使って, 特定の遺伝子を狙って破壊できるようになっています^{17,18)}. しかし, 菌類の中では比較的遺伝子破壊が難しい方だと思います. また, タンパク質を細胞から抽出する際に, タンパク質分解酵素の活性が高いため, タンパク質がすぐに分解されてしまいます. タンパク質を抽出するにはかなりのタンパク質分解酵素阻害剤を入れる必要があります.

今後への期待

ウシグソヒトヨタケでの基礎研究が続けられるとともに, 本菌で蓄積されてきた知見や技術を活用して, 食用キノコ類の育種や栽培条件の改良が迅速に進むことが期待されます. 食材としてのキノコ類研究の他にも, キノコ成分の医薬品への応用やバイオレメディエーション, バイオマス利用など, キノコ類特有の生理活性物質や酵素類を利用した応用展開は広範に考えられています. ウ

シグソヒトヨタケの情報を活用して, 分子レベルでのキノコ研究の進展が加速されることを期待しています.

おわりに

筆者は岡山大学の学部学生時代にウシグソヒトヨタケに出会い, 武丸先生からキノコの遺伝学を学びました. 一度, 故郷の京都に戻って高校教員を10年ほど勤めましたが, シロイヌナズナなどのモデル生物の突然変異体の原因遺伝子が次々に特定されていく時代の流れを知り, 学部の頃に作出・保存していたウシグソヒトヨタケの突然変異体の原因遺伝子を特定するべく, 1995年に博士課程に入学して, 鎌田研にて遺伝子のクローニングを始めました^{19,20)}. 幸い1999年開学の秋田県立大学に職を得て, 今日に至っています.

キノコの分子レベルの研究は, 動物や植物の研究に比べると研究者人口も少なく, まだまだ未知の部分が多く残っています. ウシグソヒトヨタケが, 植物におけるシロイヌナズナのような存在になることを願っています. ご依頼があれば, 各種の菌株やベクターをお送りしております. Googleドライブに形質転換実験の動画やIGVで見ることのできるRNA-seqデータ (Strand-specificな解析結果ではありません) も入れていますので, ご連絡いただければリンク先をお伝えいたします.

文 献

- 1) 武丸恒雄:微生物遺伝学実験法, p. 243, 共立出版 (1982).
- 2) Moore, D. et al.: *New Phytol.*, **83**, 695 (1979).
- 3) Binninger, D. M. et al.: *EMBO J.*, **6**, 835 (1987).
- 4) Yanagi, O. S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 171 (1985).
- 5) Stajich, J. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11889 (2010).
- 6) Muraguchi, H. et al.: *PloS one*, **10**, e0141586 (2015).
- 7) Swamy, S. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 3219 (1984).
- 8) Muraguchi, H. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **40**, 93 (2003).
- 9) Pardo, E. H. et al.: *Genetics*, **144**, 87 (1996).
- 10) O'Shea, S. F. et al.: *Genetics*, **148**, 1081 (1998).
- 11) Kamada, T. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **19**, 263 (1978).
- 12) Kamada, T. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 917 (2010).
- 13) Shioya, T. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **58**, 80 (2013).
- 14) Jung, E. M. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **111**, 85 (2018).
- 15) Sakamoto, Y. et al.: *Microbiol. Res.*, **217**, 81 (2018).
- 16) Ohm, R. A. et al.: *Nat. biotechnol.*, **28**, 957 (2010).
- 17) Nakazawa, T. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **48**, 939 (2011).
- 18) Sugano, S. et al.: *Sci. Rep.*, **7**, 1260 (2017).
- 19) Muraguchi, H. et al.: *Development*, **125**, 3133 (1998).
- 20) Muraguchi, H. et al.: *Fungal Genet. Biol.*, **29**, 49 (2000).