

二極性および四極性担子菌におけるブラー現象に関する研究

(Studies on the Buller phenomenon in bipolar and tetrapolar mushrooms)

野上 友美

A Dissertation For Doctor Degree

Supervisor :

Prof. Yutaka Kitamoto

The United Graduate School of Agricultural Sciences,
Tottori University, Department of Microbial Biotechnology

2002

目次

第1章 緒言	1
第2章 二極性担子菌きのこ <i>Pholiota nameko</i> のダイ・モン交配 における核の選択	8
第3章 四極性担子菌きのこ <i>Flammulina velutipes</i> のダイ・モン 交配における核選択の規則性	20
第4章 四極性担子菌 <i>Lentinula edodes</i> および <i>Pleurotus ostreatus</i> の ダイ・モン交配における核選択の規則性	37
第5章 四極性きのこ <i>Flammulina velutipes</i> の不和合性ダイ・ モン交配における不和合性因子の体細胞組換による新核 形成の検討	48
摘要	61
Abstract	65
謝辞	71
引用文献	72
公表論文のリスト	76

第1章

緒論

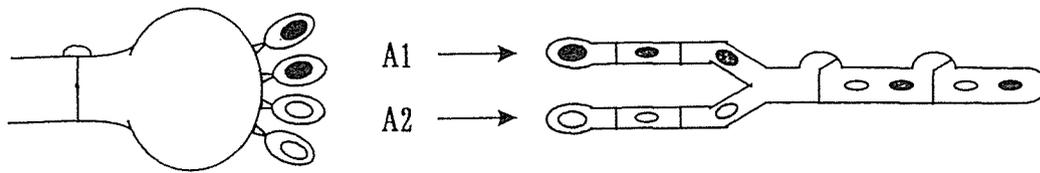
多くの食用きのこは性的にヘテロタリズムの担子菌に属している (Whitehouse, 1949). その菌糸体や子実体の細胞の核相は, 一つの細胞に異なったふたつの半数体の核で構成されるヘテロカリオンである (Fig1-1). 一般的な担子菌の生活環を Fig1-2 に示す. きのこにおける一核菌糸体の二核化は交配型が異なる二つの一核菌糸体, 例えば二極性きのこの場合では $A1 \times A2$, 四極性きのこの場合は $A1B1 \times A2B2$ あるいは $A1B2 \times A2B1$ などの相補的な不和合性因子をもつ一核菌糸細胞同士の接合により交配が行われることで完遂する.

一方, Buller(1930, 1931)はヒトヨタケ属の四極性きのこである *Coprinus lagopus* の一核菌糸体の周縁部に同菌の二核菌糸体を少量接種したところ, 一核菌糸体が速やかに二核化し, その菌糸体コロニーの全周縁部に二核菌糸体が新生することを見出した. この現象はその後, 多くのきのこでも見られることがわかり, 発見者の名に因んで Buller 現象 (Quintanilha, 1937), もしくはダイ・モン(Di-mon)交配(Papazian, 1950)と呼ばれている. この現象は, 二核菌糸体から一核菌糸体へ核が移動して新しい供役核の組み合わせができ, 二核化するものである. ダイ・モン交配にはいろいろな組み合わせがあるが, Raper(1966)は次のように分類している.

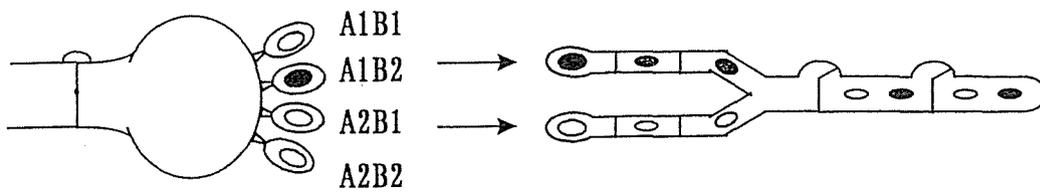
まず, 一核菌糸体の核が二核菌糸体の両方と和合できる場合, 例えば,

Heterothallism

Bipolar (A factor)

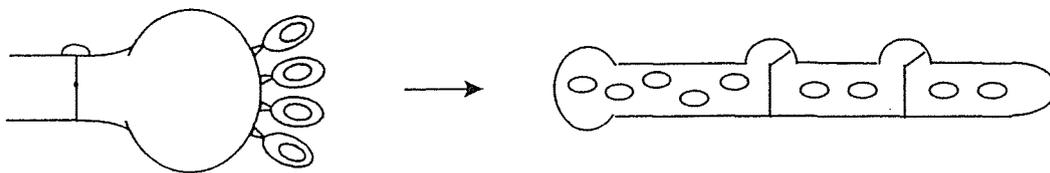


Tetrapolar (A and B factors)



Homothallism

Primary



Secondary

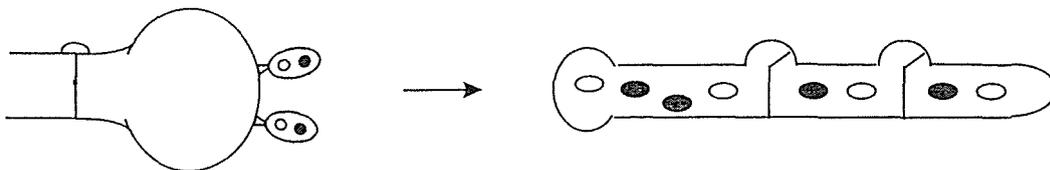


Fig. 1-1.. Mating systems in Basidiomycetous mushrooms.

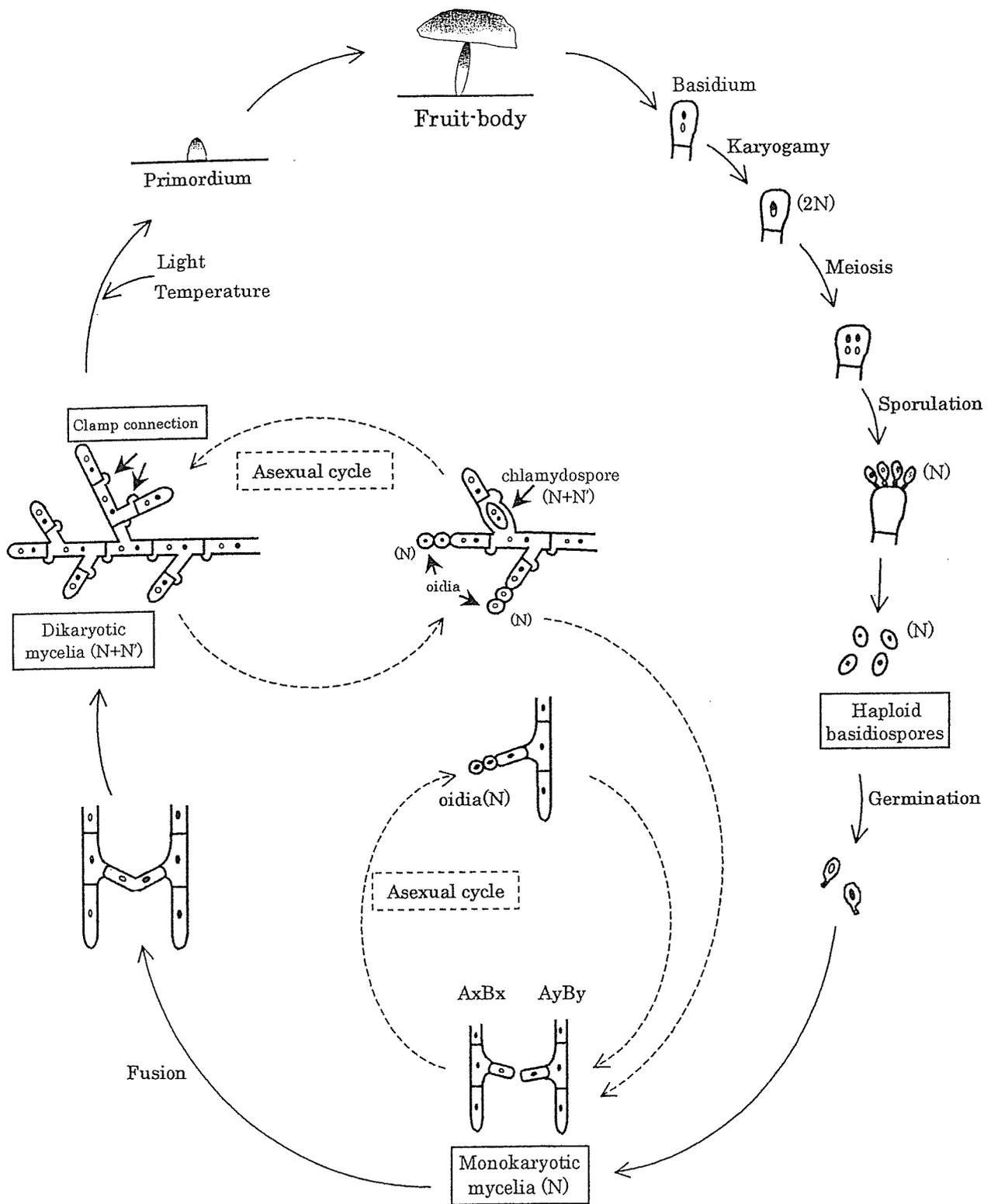


Fig. 1-2. Life cycle of basidiomycetous mushrooms.

二極性きのこの場合 $(A1+A2) \times A3$, 四極性きのこの場合 $(A1B1+A2B2) \times A3B3$ という和合性組み合わせのダイ・モン交配である. この場合, 二極性きのここでは $(A1+A3)$ と $(A2+B3)$, 四極性きのここでは $(A1B1+A3B3)$ と $(A2B2+A3B3)$ の2種類の二核菌糸体が同じ頻度で出現すると考えられるが, 二核菌糸体の二つの核は一核菌糸体の核と等しい確率で移動せず, 二核菌糸体の核の構成により一核菌糸体に二核菌糸体の核のどちらか一方が移動し, 二核化の割合に偏りが生じることが明らかにされた(Quintanilha, 1939 ; Oikawa, 1939 ; Papazian, 1950 ; 木村, 1966, 1975).

つぎに, 一核菌糸体の核が二核菌糸体の一方の核とだけ和合できる場合, 例えば二極性きのこの場合 $(A1+A2) \times A1$ または $A2$, 四極性きのこの場合 $(A1B1+A2B2) \times A1B1, A1B3, A3B1$ という半和合性組み合わせのダイ・モン交配である. この場合では二核菌糸体の二つの核のうち和合性を示す核のみが一核菌糸体に移動して二核化が生じるものと考えられているが(Buller, 1931 ; Quintanilha, 1939), 二核菌糸体の二つの核とも移動したと考察した相反する報告もある(Dickson, 1934, 1936 ; Quintanilha, 1939 ; 木村, 1958 b).

さらに, 一核菌糸体の核が二核菌糸体のどちらの核とも和合できない場合, 二極性きのこの場合は該当組み合わせはないが, 四極性きのこの場合では $(A1B1+A2B2) \times A1B2$ または $A2B1$ という不和合性組み合わせのダイ・モン交配が存在する. この組み合わせでも一核菌糸体の二核化が生じ, その場合, 二核菌糸体の二核間で体細胞組換えにより和合性の新核が生じる仮説(Quintanilha, 1939 ; Ellingboe, 1964), あるいは二核菌糸体の二

つの核とも移動したとする相反する仮説が提起されている(Papazian, 1950).

本研究では、まず、このダイ・モン交配について二極性担子菌である *Pholiota nameko* および四極性担子菌である *Flammulina velutipes* と *Lentinula edodes* を供試菌として、和合性および半和合性ダイ・モン交配時に二核菌糸体と一核菌糸体が接合して一核菌糸体の二核化が生じるか、またその二核化の規則性について検討した。

ところで、二極性担子菌のきのこである *Pholiota nameko* (Arita, 1964, 1979 ; Masuda et al., 1995) および四極性担子菌のきのこである *Flammulina velutipes* (Ashan, 1952 ; Aschan-Aberg, 1960) の二核菌糸体コロニーの先端部では一核菌糸体が生じることが報告されている。また、*Pholiota nameko* の二核菌糸体コロニー外縁部から分離した一核菌糸体の大部分は二核菌糸体の片方の核型を示したことから、二核菌糸体の一核化において核の選択に比較優位性が機能すること、その比較優位性に序列があることが見いだされている(Masuda et al., 1995)。また、Fig1-3 に示すように *Flammulina velutipes* (Brodie, 1936), *Coprinus cinereus* (Rao and Niederpruem, 1969), *Pholiota nameko* (Arita, 1979 ; Cao et al., 1999) の二核菌糸体から形成されるオイディアの多くは一核性であることが報告されている。さらに、*Pholiota nameko* (Cao et al., 1999) *Flammulina velutipes* (Kitamoto et al., 2000) の二核菌糸体からの一核性オイディア形成における核選択にも同様な比較優位性の序列が見いだされている。一方、二核菌糸体が一核化しない、例えば *Pleurotus ostreatus*

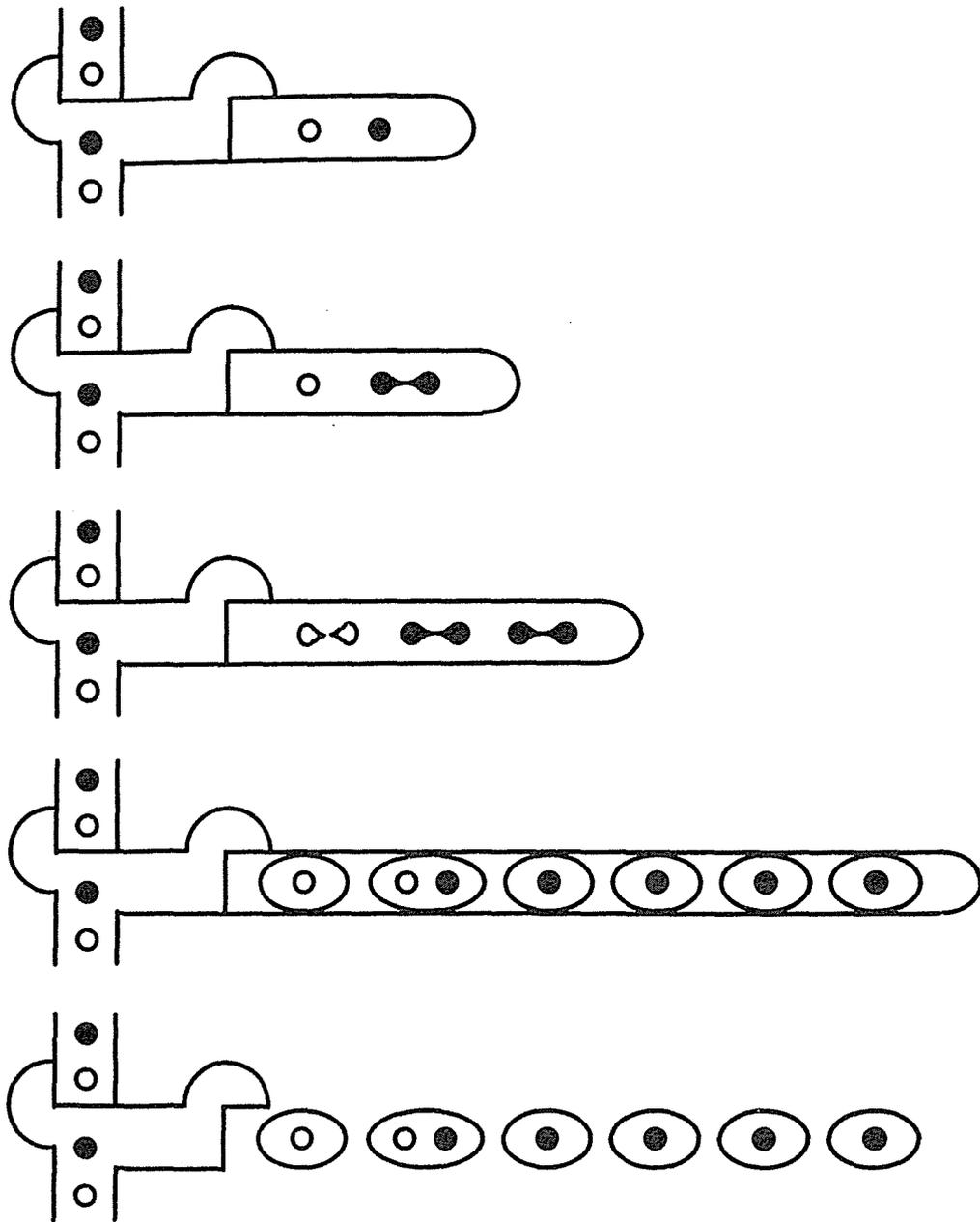


Fig. 1-3. Oidium formation by the segmentation of cell units from branched mycelia of Pholiota nameko.

などのきのこにおいてもダイ・モン交配における親二核菌糸体での核の選択的移動が考えられるが、それを例証した論文は見られない。

以上の報告から、ダイ・モン交配は二核菌糸体と一核菌糸体が接合して生じるのではなく、二核菌糸体コロニーの先端部が脱二核化して生じた一核菌糸体あるいは一核性オイディア由来の一核菌糸体と相補的な核をもつ一核菌糸体が接合して生じる可能性も考えられる。そこで、二種の担子菌 *Pholiota nameko* および *Flammulina velutipes* の二核菌糸体において一核菌糸体を生じることが普遍的に起きているのかを調査した。さらに、一核化における核選択の序列とダイ・モン交配における序列とを比較検討した。また、親二核株の一核化が例証されていない *Lentinula edodes* についても核選択の序列について検討を行った。

さらに、不和合性ダイ・モン交配において、体細胞組換が生じて和合性の核が新生するかどうかを、*Flammulina velutipes* を供試材料として、その一核性オイディアを分離して不和合性因子を解析することにより解明した。

第2章

二極性担子菌きのこ *Pholiota nameko* のダイ・モン交配における核の選択

緒言

多くの食用きのこは性的にヘテロタリズムの担子菌類に属している (Whitehouse, 1949). その菌糸体や子実体の細胞は, 一つの細胞に異なった交配型の二つの半数体の核で構成されるヘテロカリオンである. きのこにおける一核菌糸体の二核化は交配型が相補的な二つの一核菌糸体により交配が行われることにより完遂する. Buller (1930, 1931) は, 四極性のきのこである *Coprinus lagopus* の一核菌糸体の周縁部に同菌の二核菌糸体を接種したところ, 一核菌糸体が速やかに二核化し, 一核菌糸体の全周縁部に二核菌糸体が新生することを見出した. それ以降, 多くの研究者が同様の二核化について報告している (Dickson, 1934; 木村, 1957a, 1957b, 1958a, 1958b; Oikawa 1939; Quintanilha, 1937, 1939). このように, 二核菌糸体 (親二核株) によって一核菌糸体 (親一核株) が二核化する現象はダイ・モン交配 (Papazian, 1950) あるいは発見者の名にちなんで Buller 現象と呼ばれてきた (Quintanilha, 1937). 四極性きのこのダイ・モン交配には, 和合性 ($AB \times (ab + A'B')$), 半和合性 ($AB \times (AB + ab)$), 不和合性 ($AB \times (Ab + aB)$) の組み合わせが存在する. 四極性きのこにおいて Quintanilha により見いだされた Buller 現象に関する二つの主課題をまとめると, (a) 和合性・半和合

性組み合わせによるダイ・モン交配において、親二核株の二つの核うちの一つの核が選択されるかどうか。(b) 体細胞組換え、すなわち不和合性ダイ・モン交配時に和合性の遺伝子型が新生するのかどうかである (Raper, 1966). しかし、二極性きのこの場合、二核菌糸体と一核菌糸体のすべての交配組み合わせは、和合性 ($A1 \times (A2 + A3)$) および半和合性 ($A1 \times (A1 + A2)$) の二種類のダイ・モン交配しか存在しない. Raper (1966) によると二極性交配系は四極性の交配系よりも核選択の研究において、四極性きのこで生じる可能性のある交配型 A 因子と B 因子間の相互作用を避けることができる有用な実験系と言及している.

Pholiota nameko はアジア諸国、特に日本で栽培されている二極性の食用きのこである. 本菌は菌糸体培養時にコロニーの周縁部分に常に菌糸体の一核化が生じる (Arita, 1964, 1979; Masuda et al., 1995). 二核菌糸体の一核化は、本菌のオイディア形成でも生じる (Cao et al., 1999). 本菌における二核菌糸体あるいはオイディア形成による一核化では核の選択が介在する (Masuda et al., 1995; Cao et al., 1999). すなわち、二核菌糸体コロニーの外縁部から分離されたほとんどの一核菌糸体は親二核株の片方の核型を示す (Masuda et al., 1995). それ故、菌糸体の一核化における優位核の選択が介在する. 菌糸体の一核化における親二核株からの核選択の比較優位性には序列が見いだされている. また、同一の核選択の規則が本菌の一核性オイディア形成においても見いだされている (Cao et al., 1999).

そこで本研究では、不和合性因子を異にする栄養要求性変異株を用い、二極性きのこの和合性および半和合性のダイ・モン交配において同様な核選択

の機能の介在を検証した。さらに本菌における和合性および半和合性組み合わせのダイ・モン交配における核選択の比較優位性の序列について検討を行った。

材料および方法

供試菌株

本研究には、*P. nameko* の一核株 NA11, NF8, NX6 を紫外線照射することにより作出した三つの栄養要求性突然変異株 NA11-26 (*A1/ade-*), NF8-267

(*A5/pdx-*), NX6-582 (*A6/his-*) を用いた。栄養要求性突然変異株の作出は衣笠および北本 (1997) らの方法に従った。菌糸体の培養は 12 ml の PDA 培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd) を分注したプラスチック製のペトリ皿 (Iwaki, 90 x 15 mm) で行った。保存菌株から切り出した寒天のブロック (3×3×3 mm) を接種し 20~22°C, 暗黒下で培養した。

二核交雑株の作出

ダイ・モン交配に用いる二核菌株は、和合性を示す二つの栄養要求性一核株同士を交配し、作出した。PDA 平板培地の中央に 4 mm 離して二つの和合性を示す二つの一核株を接種した。約 10 日間、25°C で培養後、PDA 平板培地上のコロニーを検鏡し、クランプ結合を確認したものを、二核菌糸体と見なした。このように二核化を確認した後、PDA 斜面培地に接種し、2 週間、25°C で培養し、実験に使用するまで 5°C で保存した。

ダイ・モン交配における二核化の検証

まず、栄養要求性マーカーを付与した一核菌糸体をPDA平板培地の中央部分に接種して25°C、5日間培養した。生長した一核菌糸体に二つの異なった栄養要求性マーカーをもつ二核菌糸体を接種し、ダイ・モン交配させた。10日間培養後、一核菌糸体側のコロニー外縁部から10サンプルの菌糸体を切り出し、PDA斜面培地に移植した。培養後、小片を最少培地(MM)およびMMにアデニン(ade)、ピリドキシン(pdx)、ヒスチジン(his)をそれぞれ10 mg/l 添加した培地に接種し、培養した。一核菌糸体は生長のためにこれらの物質を必要とすることから、ade⁻、pdx⁻、his⁻と分類した。MMの組成は、グルコース 20 g/l、(NH₄)₂PO₄ 1.5 g/l、KH₂PO₄ 0.46 g/l、K₂HPO₄ 1.0 g/l、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/l、チアミン塩酸塩 120 μg/l、精製寒天 15 g/l であり、殺菌前にpHを5.5に調整した。供試菌株が一核菌糸体の状態ならば菌糸体の生長にade、pdxもしくはhisを要求するが、菌糸体細胞中に二種類の核が存在すれば栄養要求性を相補することによりMMで生育可能である。

ダイ・モン交配による二核菌糸体からの一核性オイディア形成における核型の決定

ダイ・モン交配により作出した新生二核菌糸体の核型はそれからの一核性オイディア形成により生じる優位核と従属核の核型の解析によって判定した(Cao et al, 1999)。ダイ・モン交配により作出した二核菌糸体からの一核性オイディアの分離はCao et al. (2000) に従った。オイディアの培養は25°C、暗黒化で行った。オイディア細胞は通常3日後に発芽し、菌糸体コロニーを形成する。コロニーの直径が2 mm程度に生長した頃、平板培地から

分離し、その栄養要求性マーカーを利用して核型を決定するためにMMおよびMMに三つの化学物質をそれぞれ添加した平板培地に移植した。MMには生育せず、MMにこれらの物質の一つを含むものでは生長することにより菌糸体の核型を判断した。

二核菌糸体の一核菌糸体化の検証

親二核株の一核化を供試菌株の栄養要求性検定で検証した。異なる栄養要求性マーカーを付与した二核菌糸体をペトリ皿の端から6 mm 離して接種し培養した。9~12日間培養後、菌糸体コロニーの先端部分から接種部分に向かって1 mm 切り出し、PDA斜面培地に接種した。さらに、分離した一核菌糸体の核型を、それぞれの栄養要求性マーカーによるMMとMMに各種栄養素を添加した培地での生長テストで決定した。

結果

和合性ダイ・モン交配における核の選択

三つの異なる栄養要求性一核菌糸体と両方とも異なる不和合性因子を有する和合性組み合わせの栄養要求性二核菌糸体との間のダイ・モン交配結果をTable 2-1に示す。

親一核株 NX6-582 (*A6/his*-) と親二核株 NA11-26 (*A1/ade*-) + NF8-267 (*A5/pdx*-) 間での交配では、一核菌糸体側のコロニーから分離したすべてのサンプルで一核菌糸体の二核化が確認された。同様に和合性組み合わせの

Table 2-1. Nuclear selection in compatible the di-mon matings between auxotrophic monokaryons and dikaryons of a bipolar mushroom, *Pholiota nameko*.

Parental monokaryon	Parental dikaryon	Dikaryotization of parental monokaryon*	Nuclear type of oïdial monokaryon** dikaryon obtained	Nuclear type of
NX6-582 (A6/his-)	NA11-26 (A1/ade-) + NF8-267 (A5/pdx-)	10/10	0 (his-):96 (pdx-)	NF8-267 + NX6-582
NF8-267 (A5/pdx-)	NA11-26 (A1/ade-) + NX6-582 (A6/his-)	10/10	2 (his-):66 (pdx-)	NX6-582 + NF8-267
NA11-26 (A1/ade-)	NF8-267 (A5/pdx-) + NX6-582 (A6/his-)	10/10	0 (ade-):19 (pdx-)	NF8-267 + NA11-26

*Isolates were subcultured on PDA slants before their nuclei were examined.

**Nuclear types were identified by nutritional requirement tests described in Materials and Methods.

親一核株 NF8-267 (*A5/pdx-*) と親二核株 NA11-26 (*A1/ade-*) + NX6-582 (*A6/his-*) および親一核株 NA11-26 (*A1/ade-*) と親二核株 NF8-267 (*A5/pdx-*) + NX6-582 (*A6/his-*) の二つの異なる組み合わせにおいても分離したすべてのサンプルで二核化が確認された。最初の和合性ダイ・モン交配の組み合わせで二核化した菌糸体の核型を調査したところ、分離した 96 の一核菌糸体はすべてピリドキシン要求性を示した。この結果から、形成された二核菌糸体は親一核株 NX6-582 (*A6/his-*) の核と二核親株 NF8-267 (*A5/pdx-*) の核とで構成されることが推測された。最初の組み合わせのダイ・モン交配の二核化のプロセスに NA11-26 (*A1/ade-*) と NF8-267 (*A5/pdx-*) の間に核選択の序列が介在した。次の組み合わせのダイ・モン交配では、二核化した菌糸体の核型は 66 (*pdx-*) : 2 (*his-*) の分離比であった。すなわち、形成された二核株は NX6-582 (*A6/his-*) と NF8-267 (*A5/pdx-*) の二つの核によって構成された。三番目の組み合わせでのダイ・モン交配の核型は NA11-26 (*A1/ade-*) の核と親二核株からの NF8-267 (*A5/pdx-*) の核とで構成されると推測した。以上の三つの結果から、ダイ・モン交配による一核菌糸体の二核化において親二核株の核の選択が関与することが示された。和合性ダイ・モン交配に供試した親二核株を構成する三つの核間の核選択には NF8-267 → NX6-582 と NX6-582 → NA11-26 の序列が推測された。

半和合性ダイ・モン交配における核の選択

三つの異なった栄養要求性一核菌糸体と一つの核型が親一核株と同じ不和合性因子を構成する核を有する栄養要求性二核菌糸体間の半和合性ダ

イ・モン交配について調査した結果を Table 2-2 に示す.

親一核株 NA11-26 (*A1/ade*-) と親二核株 NA11-26 (*A1/ade*-) + NF8-267 (*A5/pdx*-) とのダイ・モン交配では親一核株側から分離したすべてのサンプルで二核化が確認された. しかしながら, 一方の親一核株 NF8-267 (*A5/pdx*-) と同じ親二核株とのダイ・モン交配では二核化は確認できなかった. また, 親一核株 NA11-26 (*A1/ade*-) と親二核株 NA11-26 (*A1/ade*-) + NX6-582 (*A6/his*-) とのダイ・モン交配では 10 サンプルとも二核化が確認されたが, NX6-582 (*A6/his*-) と親二核株 NA11-26 (*A1/ade*-) + NX6-582 (*A6/his*-) とのダイ・モン交配の場合は 5 サンプルでしか二核化が認められなかった. 親一核株 NF8-267 (*A5/pdx*-) と親二核株 NF8-267 (*A5/pdx*-) + NX6-582 (*A6/his*-) とのダイ・モン交配ではすべてのサンプルに二核化が認められたが, 親一核株 NF8-267 (*A5/pdx*-) 側から分離したサンプルは 30% しか二核化していなかった. これらの結果から, 核選択の序列において相補核が優位核の場合も従属核の場合でも二核化のための供与核となり得た. しかし, 親二核株中の相補核が核選択の序列において従属核の場合, 親二核株の優位核と比較して二核化の確率は低いものとなった. この点から考察すると, 半和合性ダイ・モン交配の場合, 核の選択において 3 つの二核菌糸体を構成する二つの核間には NF8-267 → NX6-582 と NX6-582 → NA11-26 の序列があると推測された.

栄養要求性を付与した二核菌糸体の一核化における核選択の規則性

三つの二核菌株 NA11-26 + NF8-267, NA11-26 + NX6-582, NF8-267 + NX6-582

Table 2-2. Nuclear selection in hemicompatible di-mon mating between auxotrophic monokaryons and dikaryons with one nucleus of a similar to the incompatibility factor of the parental monokaryon.

Parental monokaryon	Parental dikaryon	Dikaryotization of parental monokaryon*	Nuclear type of dikaryon obtained
NA11-26 (<i>AI/ade</i> ⁻)	NA11-26 (<i>AI/ade</i> ⁻) + NF8-267 (<i>A5/pdx</i> ⁻)	10/10	NF8-267 + NA11-26
NF8-267 (<i>A5/pdx</i> ⁻)		0/10	-
NA11-26 (<i>AI/ade</i> ⁻)	NA11-26 (<i>AI/ade</i> ⁻) + NX6-582 (<i>A6/his</i> ⁻)	10/10	NX6-582 + NA11-26
NX6-582 (<i>A6/his</i> ⁻)		5/10	NX6-582 + NA11-26
NF8-267 (<i>A5/pdx</i> ⁻)	NF8-267 (<i>A5/pdx</i> ⁻) + NX6-582 (<i>A6/his</i> ⁻)	3/10	NX6-582 + NF8-267
NX6-582 (<i>A6/his</i> ⁻)		10/10	NX6-582 + NF8-267

* Isolates were subcultured on PDA slants before their nuclei were examined.

のコロニー先端部から 1 mm 内側の菌糸体小片を切り出して一核化を調査した結果を Table 2-3 に示したが、一核化の割合はそれぞれ 48%, 5%, 83% であった。また、三つの二核菌糸体から一核化した菌糸体の核型はそれぞれ NF8-267, NX6-582, NF8-267 であった。これらの結果から、二核菌糸体の一核化において、三つの核の比較優位性の序列を NF8-267→NX6-582 および NX6-582→NA11-26 と決定した。

考察

多くの研究者が四極性きのこの和合性ダイ・モン交配において親二核株の二つの核のうちの一つの核が期待値以上の頻度で二核化に関わることを見出したが、この核選択の規則性に関する報告は見当たらない（木村, 1966, 1975; Oikawa, 1939; Papazian, 1950; Quintanilha, 1939)。二極性きのこである *P. nameko* の和合性ダイ・モン交配では、親二核株の二つの核のうちの一つの核が選択され、親一核株に移動し、二核化が完遂すると推測された。和合性ダイ・モン交配に供試した三つの核における比較優位性の序列は NF8-267→NX6-582 および NX6-582→NA11-26 と決定した。この序列は同菌の二核菌糸体の一核化の序列 (Masuda et al., 1995) および一核性オイディア形成の序列 (Cao et al., 1999) と一致した。

二極性きのこである *P. nameko* の半和合性ダイ・モン交配では、親二核株の相補核が二核菌糸体の一核化における核選択について優位核でも従属核の場合でも二核化の供与核となり得た。しかし、親二核株の相補核が核選択

Table 2-3. Nuclear types of monokaryotized isolates in mycelial monokaryotization from dikaryons in di-mating.

Dikaryon	Number of monokaryons/total isolated from the margins of dikaryotic colonies*	Nuclear types of monokaryons**
NA11-26 (<i>AI/ade-</i>) + NF8-267 (<i>A5/pdx-</i>)	23/48	0 (NA11-26) : 23 (NF8-267)
NA11-26 (<i>AI/ade-</i>) + NX6-582 (<i>A6/his-</i>)	2/44	0 (NA11-26) : 2 (NX6-582)
NF8-267 (<i>A5/pdx-</i>) + NX6-582 (<i>A6/his-</i>)	40/48	40 (NF8-267) : 0 (NX6-582)

*The number of monokaryons from mycelial isolates dissected into 1-mm sections starting from the farthest edge of the dikaryotic mycelial colonies.

**Nuclear types were identified by the nutritional requirement tests described in Materials and Methods.

の序列において二核菌糸体の他方の核よりも優位性を示す場合、親一核株側から分離したすべてのサンプルにおいて二核化が認められた。親二核株の相補核が核選択の序列が従属性を示す場合、親一核株側から分離したサンプルの二核化の割合は0-50%にすぎなかった。Masudaらは本菌のいくつかの二核菌株で菌糸体の一核化において出現する核型に偏りが生じることを報告している (Masuda et al., 1995)。本研究において供試した二核菌株においても優位核よりも従属核が出現する割合は大変低いという同様な核選択の偏りが確認された。半和合性ダイ・モン交配において見られた従属核の関与による見かけ上低頻度を示した二核化の例は、従属核が移動することによるごく稀に生じる二核菌糸細胞がそれにつづく核分裂と核の移動により親一核株のコロニーの二核細胞領域に拡大したものと推測された。

本菌では一般的に二核菌糸体の生長中に二核菌糸の一核化が生じる。菌糸体の一核化は興味深く、担子菌の二核細胞中での共役核分裂における不安定要因となり、供役核分裂のメカニズムを解析するいとぐちとなりうる。先に、二核菌糸体の細胞分裂の際、最初に分裂する核（一核化細胞中で確認された核）を主導核とし、他方の核を従属核とする Cascade プロセスが介在するとする仮説を提起した (Masuda et al., 1995)。ナメコのダイ・モン交配における詳細はまだ解明されていないが、本研究で得られた知見ならびに既往の知見に基づき、親一核株と親二核株の一核化菌糸から産出される一核細胞との交配の可能性が示唆された。

第 3 章

四極性担子菌きのこ *Flammulina velutipes* の和合性および半和合性ダイ・モン交配における核選択の規則性

緒言

四極性きのこ *Coprinus lagopus* における二核菌糸体による一核菌糸体の二核化は, Buller (1930, 1931) により発見された。その後, 同様の二核化現象が多数報告されている (Dicson, 1934; Quintanilha, 1937, 1939; Oikawa, 1939; 木村, 1957a, 1957b, 1958a, 1958b)。親二核株による親一核株の二核化はダイ・モン交配 (Papazian, 1950), あるいは Quintanilha (1937) により発見者の名にちなんでブラー現象と呼ばれてきた。四極性きのこにおけるブラー現象に関連した未解明の主たる課題は, (a) Legitimate な組み合わせの状態でのダイ・モン交配 (和合性および半和合性) で親二核株の二核のうちの一核の選択が生じるのかどうか, (b) 不和合性組み合わせのダイ・モン交配の際に和合性の交配型因子が体細胞組換えにより新生するのかどうかである (Raper, 1966)。

我々は二極性きのこである *P. nameko* の和合性ダイ・モ

ン交配において親二核株の二核が選択され、その優位核が親一核株へ移動し二核化すると推測した (Nogami et al., 2002). このダイ・モン交配に供試した二核菌糸体株を構成する2核間での比較優位性の序列が示され、その結果は本菌における二核菌糸体 (Masuda et al., 1995) およびオイディア (Cao et al., 1999) の一核化の序列と一致した. 半和合性ダイ・モン交配の場合、相補性を示す親二核株の核が二核化時の供与体となり得た. しかし、親一核株と相補する核が他の二核株の核より序列の低い場合は、親一核株側コロニーから採取したサンプルの二核化は0%~50%であった. さらに、和合性ダイ・モン交配に見られる同一の核選択の規則が半和合性ダイ・モン交配においても機能していると推測された. 本菌におけるいわゆるダイ・モン交配は、親一核株と親二核株の一核化菌糸体から産出された一核細胞との交配によることが示唆された. これらの結果が四極性きのこでも適用されるかどうか、比較検証する必要があろう.

ところで、きのこには二核菌糸体から有性生殖過程を経ずに一核化されることに関して、二種類の一核化現象が報告されている. 最初の事例は、*P. nameko* (有田, 1964; Arita, 1979); Masuda et al., 1995) で報告されている二核菌糸体コロニーの外縁部で脱二核化が生じ、一核菌糸体が形成

されるものである。このような二核菌糸体の一核化は Ashan (1952) および Aschan-Aberg (1960) より *Collybia* (= *Flammulina*) *velutipes* でも報告されている。もう一つ事例は, *Coprinus cinereus* (Rao et al, 1969), *Favolus arcularius* (Kitamoto, unpublished data), *F. velutipes* (Brodie, 1936; Takemaru, 1954; Kitamoto et al., 2000), *P. nameko* (Cao et al., 1999; Arita, 1979) などのきのこで, 二核菌糸体のオイディア形成を介した一核化である。*F. velutipes* では, 一核性オイディアの核型分析によりオイディアの核構成が同定され, 二核菌糸体のオイディア形成を介した一核化において核の選択が一定の序列によって行われることが示されている (Kitamoto et al., 2000)。

本研究では, 四極性きのこ, *F. velutipes* のダイ・モンこうはいにおける上述の諸課題の究明を目的に, 不和合性因子の異なる栄養要求性突然変異株を用いて和合性および半和合性ダイ・モン交配での親二核株における核選択の規則を解析した。また, 四極性きのこにおける和合性および半和合性ダイ・モン交配を用いた二核菌糸体の一核化において2核うちの1核が選択されるかどうかを検討した。さらに Legitimate なダイ・モン交配のプロセスに二核菌糸体の一核化が介在するかどうかについても検討した。

材料および方法

供試菌株

本研究には，*F. velutipes* の一核株 A2， A6， D4 を紫外線することにより得られた栄養要求性突然変異株 A2-10 (A1B1/pab⁻)， A6-9 (A2B2/met⁻)， D4-2 (A4B4/ade⁻) を用いた．菌糸体は 12 ml の PDA 培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) を分注したプラスチック製ペトリ皿 (Iwaki, 90×15 mm) で培養した．保存菌株から菌糸体小片 (3×3×3 mm) を切り出し， 25℃ 暗所で培養した．

二核交雑株の作製

ダイ・モン交配に用いる親二核株は，和合性の栄養要求性一核株二つを交配して作製した．PDA 平板培地の中央に 4 mm 離して二つの一核株を接種した．25℃， 10 日間の培養後，PDA 平板培地上のコロニーを顕鏡し，クランプ結合を調査することにより二核菌糸体を確認した．確認した二核菌糸体を PDA 斜面培地に移植し， 25℃ で 2 週間培養後， 5℃ で保存した．

ダイ・モン交配における二核化の検証

栄養要求性マーカーを付与した一核菌糸体を PDA 平板培

地の中央に接種し，25℃で一週間培養した．生長した一核菌糸体のコロニー周縁部に二核とも栄養要求性マーカを有する二核菌糸株を接種した．1週間培養後，一核菌糸体側のコロニーの外縁部から約10 mm内側の菌糸体小片を10個切り出し，PDA斜面培地に移植した．生長した菌糸体を最少培地(MM)とMMに10 mg/lのアデニン，メチオニン，もしくはp-アミノ安息香酸を加えた平板培地に接種し，菌糸体の栄養要求性を試験した．これらの栄養素を必要とする一核菌糸体をそれぞれade⁻，met⁻，pab⁻と分類した．MMの組成は20 g/l glucose，1.5 g/l (NH₄)₂HPO₄，0.46 g/l KH₂PO₄，1.0 g/l K₂HPO₄，0.5 g/l MgSO₄·7H₂O，120 μg/l チアミン塩酸塩，15 g/l 精製寒天であり，殺菌前にpHを5.5に調整した．分離培養された一核菌糸体はade⁻，met⁻，あるいはpab⁻であるが，二種類の核を持つ二核細胞は栄養要求の相補性によりMMで生長可能である．ダイ・モン交配による一核菌糸体の二核化は，各試験区毎に10個のサンプルを用いて検証した．

ダイ・モン交配によって新生した二核菌糸体の核型の決定

ダイ・モン交配によって新生した二核菌糸体の核型は，それから作出された一核性オイディアの核型の分析から同定した(Kitamoto et al., 2000)．二核菌糸体からの一核

性オイディアの分離は，Kitamoto et al. (2000) らの方法に従った．オイディアは 25℃，暗黒下で培養した．オイディアの細胞は通常 3 日後に発芽し，菌糸体コロニーを形成する．コロニーの直径が 2 mm 程度に伸長した後，平板培地から移植し，栄養要求性を検定するために，MM および MM に一つの化学化合物を加えた二つの平板培地に接種した．分離培養された菌糸体の核型は，まず MM では生育しないことを確認し，つぎに同じ化合物を加えた MM での生育テストにより検証した．

二核菌糸体における菌糸体の一核化の検証

ダイ・モン交配で作出した二核菌糸体コロニーの周縁部における菌糸体の一核化の成否を栄養要求性試験で検証した．二つの栄養要求性マーカーを付与した二核菌糸体をペトリ皿の端から 6 mm 離して接種し培養した．9～12 日間培養後，菌糸体コロニーの先端部分から接種部分に向かって 1 mm 切り出し，フック細胞の有無を検鏡した．さらに分離した一核菌糸体の核型を，それぞれの栄養要求性マーカーによる MM と MM に各種栄養素を添加した培地での生長テストで決定した．

結果

和合性ダイ・モン交配における核の選択

異なる栄養要求性マーカーを付与した三つの一核菌糸体と両方とも異なる不和合性因子を有する栄養要求性二核菌糸体の和合性ダイ・モン交配の結果を Table 3-1 に示す.

A6-9 (*A2B2/met*⁻) と A2-10 (*A1B1/pab*⁻) +D4-2 (*A4B4/ade*⁻) の交配について 10 組の試験を行った結果, すべての交配試験で親一核株の二核化が確認された. 同様に, 親一核株 A2-10 (*A1B1/pab*⁻) と親二核株 A6-9 (*A2B2/met*⁻) +D4-2 (*A4B4/ade*⁻) および親一核株 D4-2 (*A4B4/ade*⁻) と親二核株 A2-10 (*A1B1/pab*⁻) +A6-9 (*A2B2/met*⁻) の二つの組み合わせでもすべてのサンプルで試験二核化が認められた. 最初の組み合わせの和合性ダイ・モン交配により得られた新生二核菌糸体の一核性オイディアの核型は *pab*⁻株が 53 株分離されたが, *met*⁻株はわずか 4 株分離されたのみであった. これは, 親二核株から A2-10 (*A1B1/pab*⁻) の核のみが親一核株側に移動したことを示す結果である. したがって, 最初の和合性ダイ・モン交配の二核化の過程に, 親二核株中の D4-2 (*A4B4/ade*⁻) の核よりも A2-10 (*A1B1/pab*⁻) の核が選択的に移動する機能が介在することが示唆された. 2 番目の組み合わせでは, 新生二核菌糸体からの一核性オイディアの核型の割合は 38

Table 3-1. Nuclear selection in compatible the di-mon matings between auxotrophic monokaryons and dikaryons of a tetrapolar mushroom, *Filammulina velutipes*.

Parental monokaryon	Parental dikaryon	Dikaryotization of parental monokaryon*	Nuclear type of oidial monokaryon**	Nuclear type of dikaryon obtained
A6-9 (A2B2/met-)	A2-10 (A1B1/pab-)+D4-2 (A4B4/ade-)	10/10	4 (met-):53 (pab-)	A2-10+A6-9
A2-10 (A1B1/pab-)	A6-9 (A2B2/met-)+D4-2 (A4B4/ade-)	10/10	22 (ade-):38 (pab-)	D4-2+A2-10
D4-2 (A4B4/ade-)	A2-10 (A1B1/pab-)+A6-9 (A2B2/met-)	10/10	25 (ade-):32 (pab-)	A2-10+D4-2

*Isolates were subcultured on PDA slants before their nuclei were examined.

**Nuclear types were identified by nutritional requirement tests described in Materials and Methods.

株が *pab*-株で 22 株が *ade*-株であった。この結果から, A2-10 (*A1B1/pab*-) と D4-2 (*A4B4/ade*-) の核が新生二核菌糸体に内在し, それぞれの核は親一核株と親二核株由来の核であることが判明した。3 番目の組み合わせで得られた二核菌糸体の核は D4-2 (*A4B4/ade*-) の核と親二核株の A2-10 (*A1B1/pab*-) の核で構成されていた。これらの結果は, すべての組み合わせにおいて, 和合性ダイ・モン交配による一核菌糸体の二核化には親二核株から移動する核の選択性が介在することを示している。供試した 3 株の親二核株を構成する三つの核が供与核となる場合に生じる核選択の序列は, A2-10→D4-2 および D4-2→A6-9 であった。

半和合性ダイ・モン交配における核の選択

異なる栄養要求性マーカーを付与した三つの一核菌糸体と, 親二核株の一つは同一の不和合性因子を有する核を, もう一つは相補性の不和合性因子を有する核をもつ栄養要求性を有する二核菌糸体の間で半和合性ダイ・モン交配の成否を検討した。その結果を **Table 3-2** に示す。

親一核株 D4-2 (*A4B4/ade*-) と親二核株 A2-10 (*A1B1/pab*-) +D4-2 (*A4B4/ade*-) を交配させたところ, 10 株すべてのサンプルで二核化が生じた。しかし, 親一核株 A2-10 (*A1B1/pab*-) に同じ親二核株を交配させたところ

Table 3-2. Nuclear selection in hemi-compatible di-mon mating between auxotrophic monokaryons and dikaryons with one nucleus of a similar to the incompatibility factor of the parental monokaryon in *Flammulina velutipes*.

Parental monokaryon	Parental dikaryon	Dikaryotization of parental monokaryon*	Nuclear type of dikaryon obtained
A2-10 (A1B1/pab-) D4-2 (A4B4/ade-)	A2-10 (A1B1/pab-) + D4-2 (A4B4/ade-)	4/10 10/10	D4-2+A2-10 D4-2+A2-10
A6-9 (A2B2/met-) D4-2 (A4B4/ade-)	A6-9 (A2B2/met-) + D4-2 (A4B4/ade-)	10/10 5/10	D4-2+A6-9 D4-2+A6-9
A2-10 (A1B1/pab-) A6-9 (A2B2/met-)	A2-10 (A1B1/pab-) + A6-9 (A2B2/met-)	4/10 10/10	A6-9+A2-10 A6-9+A2-10

*Isolates were subcultured on PDA slants before their nuclei were examined.

二核化の証拠となるMMに生育したのはわずか40%であった。親二核株 A6-9 (A2B2/met-) + D4-2 ((A4B4/ade-) と親一核株 A6-9 (A2B2/met-) の組み合わせの交配では、すべてのサンプルで二核化が生じた。一方、親一核株 D4-2 (A4B4/ade-) との交配では、全サンプルの50%で二核化が観察された。親二核株 A2-10 (A1B1/pab-) + A6-9 (A2B2/met-) と親一核株 A2-10 (A1B1/pab-) の組み合わせの交配では、40%のサンプルが二核化したのみであったが、同じ親二核株と親一核株 A6-9 (A2B2/met-) の組み合わせの交配では、すべてのサンプルが二核化した。したがって、本菌では、半和合性ダイ・モン交配において、例えば親二核株の2つの核が核選択の序列において優位あるいは劣位であっても、親一核株と相補性を示す親二核株の核が二核化の供与核となりうることを確認された。しかし、親一核株と相補する核が核選択の序列で従属核の場合は、親一核株の優位核と比較して二核化の頻度は低率であった。また、半和合性ダイ・モン交配における核選択の序列は和合性ダイ・モン交配の序列と同じであると推測した。

栄養要求性を付与した二核菌糸体の一核化における核選択の規則性

Collybia (=Flammulina) velutipes は生長の周縁部で二

核菌糸体からオイディア形成を経由することなしに一核菌糸細胞を産生することが知られている (Ashan, 1952; Aschan-Aberg, 1960). これは, 本四極性菌において, 和合性および不和合性ダイ・モン交配における親二核菌糸体の一核化のプロセスがダイ・モン交配に介在する可能性を示唆するものである. そこで, 親二核株として用いた三つの栄養要求性二核菌糸体コロニーの周縁部から分離したサンプルの一核化を検討した. その結果を **Table 3-3** に示す.

3株の二核菌糸体のコロニー先端部から 1 mm の小片を切り出し, 一核菌糸体の割合を検査したところ, それぞれ, A2-10 (*A1B1/pab⁻*) + D4-2 (*A4B4/ade⁻*) では 13%, A6-9 (*A2B2/met⁻*) + D4-2 (*A4B4/ade⁻*) では 5%, A2-10 (*A1B1/pab⁻*) + A6-9 (*A2B2/met⁻*) では 10% の頻度で一核菌糸体が検出された. この結果から, これらの二核菌糸体のコロニー周縁部の菌糸先端細胞では一核化が生じているものと推測した. 3株の二核菌糸体から一核化した菌糸体の核型は, それぞれ A2-10 (*A1B1/pab⁻*), D4-2 (*A4B4/ade⁻*), A2-10 (*A1B1/pab⁻*) であった. 菌糸体の一核化におけるこれらの核の比較優位性の序列を総括すると, A2-10 (*A1B1/pab⁻*) → D4-2 (*A4B4/ade⁻*), D4-2 (*A4B4/ade⁻*) → A6-9 (*A2B2/met⁻*) となった. すなわち, この序列は和合性および半和合性ダイ・モン交配の核選択の序列と一致

Table 3-3. Nuclear types of monokaryotized isolates in mycelial monokaryotization from dikaryons in di-mon mating in *Flammulina velutipes*.

Dikaryon	Number of monokaryons/total isolated from the margins of dikaryotic colonies*	Nuclear types of monokaryons**
A2-10 (A1B1/pab-) +D4-2 (A4B4/ade-)	5/40	5 (A2-10) : 0 (D4-2)
A6- 9 (A2B2/met-) +D4-2 (A4B4/ade-)	2/40	0 (A6-9) : 2 (D4-2)
A2-10 (A1B1/pab-) +A6-9 (A2B2/met-)	4/40	4 (A2-10) : 0 (A6-9)

*The number of monokaryons from mycelial isolates dissected into 1-mm sections starting from the farthest edge of the dikaryotic mycelial colonies.

**Nuclear types were identified by the nutritional requirement tests described in Materials and Methods.

するものであった。

考察

四極性きのこのダイ・モン交配は，親一核株と親二核株間のそれぞれが有する *A* および *B* 交配型因子の組み合わせにより，和合性，半和合性不和合性および不和合性ダイ・モン交配の3種類のカテゴリーに分類される．本章では *Flammulina velutipes* の legitimate な和合性および半和合性不和合性ダイ・モン交配について論じ，不和合性ダイ・モン交配については第5章で論じたい．

四極性きのこの和合性ダイ・モン交配については，一核菌糸体が二核化するプロセスで，偶然生じると期待される以上の高い頻度で親二核菌糸体の二つの核のうちのどちらかが親一核菌糸体に移動することが，多くの研究において報告されている (Quintanilha, 1937, 1939; Papazian, 1950; 木村, 1958a, 1966, 1975)．しかしながら，著者は，*F. velutipes* の和合性ダイ・モン交配において，親二核株の2核の一核のみが選択され，親一核株へ移動していくことで二核化が完成することを栄養要求性突然変異株を用いて検証した．二極性きのこである *P. nameko* の和合性ダイ・モン交配においても同様な結果が得られている．また，

F. velutipes の和合性ダイ・モン交配において、供試二核菌糸体を構成する3種の核の間で、このような核の選択に関して、A2-10→D4-2 および D4-2→A6-9 という比較優位性の序列が介在することが示された。さらに、この序列は、本菌の二核菌糸体の一核化の序列と一致することが示された。

四極性きのこの半和合性ダイ・モン交配において、Buller (1931) は、*Coprinus lagopus* において、親二核株に存在する相補核が親一核株へ移動し、二核化が完遂されると推測した。しかし、Dickson (1934, 1936), Quintanilha (1939) および木村 (1958b) らは、それぞれ *Coprinus sphaerosporus* および *Coprinus macrorhizus* f. *microsporus* (= *C. cinereus*) において、半和合性ダイ・モン交配では親二核株の両方の核が一核株に移動し、新しい二核菌糸株が形成されたことを示唆する報告を行っている。著者は、*F. velutipes* において、親二核株中の親一核株に対して相補性の核のみが二核化の供与核となりうることを示した。その際、親二核株の相補核が菌糸体の一核化において示された序列で優位核あるいは従属核のいずれであっても親一核株の二核化の完遂が可能であった。しかし、相補核が二核菌糸体の他核より序列が低い場合は、親一核株側から分離したサンプルの40~50%しか二核化しなていな

かった。この結果は、二核菌糸体中の劣位核が誤って選択されることが低頻度ではあるが生じるため、相補核が劣位核であってもダイ・モン交配が完遂するものと仮定される。相補核が劣位核であって、極低頻度しかダイ・モン交配による二核菌糸体の形成が生じない場合でも、それについて惹起される共役核分裂とコロニーにおける核の移動により新生二核菌糸体の領域が拡大し、ダイ・モン交配で生じる二核化が生じる確率よりも大きく増幅され、その結果、見かけ上、優位核の場合とそれほど劣らない二核株作出率となったと推測された。また、半和合ダイ・モン交配における核選択の序列は和合性の場合と同一であり、和合性ダイ・モン交配で起きている同じ核選択のプロセスが半和合ダイ・モン交配でも介在するものと推測された。

二極性きのこ *P. nameko* および四極性きのこ *F. velutipes* においては、二核菌糸体コロニー周縁部での一核菌糸細胞の形成が報告されている（有田，1964，1979；Masuda et al., 1995；Ashan, 1952；Aschan-Aberg, 1960）。オイディア形成における二核細胞の一核化も *P. nameko*（Arita, 1964，1979；Kitamoto et al., 2000）および *F. velutipes* で報告がある（Cao et al., 1999；Kitamoto et al., 2000）。著者らの研究グループは、二核菌糸体の細胞分裂において、まず最初に分裂する核が主導核として機能し、もう一方の

核は従属核として機能する共役核分裂が“Cascade”して起こるといふ仮説を先に提起している(Masuda et al., 1995). 二核菌糸体の一核化は共役核分裂における不安定さを示すものであり, 担子菌における共役核分裂の解析の糸口となりうる興味深い現象である. ダイ・モン交配の様相は, *F. velutipes* においても詳細の解明に至っていないが, 親一核株と親二核株からの一核化菌糸との間の交配は, 實際上, かなりの頻度で起こりうると推測された.

第 4 章

四極性担子菌 *Lentinula edodes* および *Pleurotus ostreatus* の和合性および半和合性ダイ・モン交配における核選択の規則 性

緒言

著者は、第 2 章および第 3 章において、二核菌糸体のコロニー周縁部で一核化菌糸体が生じる二極性および四極性のきのこ、*Pholiota nameko* および *Flammulina velutipes* における和合性および半和合性ダイ・モン交配を行い、それぞれのきのこにおいて親二核株から一核化した菌糸細胞と親一核菌糸体の間で交配が起こりうるケースを指摘した。これらのきのこは、どちらも一核性オイディアを形成する能力が報告されている（有田，1979；Cao et al., 1999；Brodie, 1936；Kitamoto et al., 2000）。しかしながら、きのこにおけるオイディア形成は担子菌のごく一部と考えられ、例えば、*Lentinula edodes* および *Pleurotus ostreatus* では、オイディア形成は観察されていないし、また、二核菌糸体の一核化も報告がない。

そこで、本章では、これらの四極性担子菌を供試材料と

して、親一核株と親二核株を用いて真性と考え得る和合性および半和合性ダイ・モン交配を行い、第2章および第3章と同様にして、ダイ・モン交配における一核菌糸体の二核化における核選択の規則性について検討した。

材料および方法

供試菌株

本研究には、*L. edodes* の二核株 X-1 および #110 株を UV 照射して作出した栄養要求性変異株 X-1-248 (*A4B3/his-*), X-1-449 (*A3B3/pab-*), X-1-650 (*A3B4/ile-*), X-1-667 (*A4B3/ade-*), X-1-829 (*A4B4/met-*), #110-666 (*A1B2/ade-*), #110-822 (*A1B2/met-*), #110-872 (*A1B1/trp-*) を用いた。また、*P. ostreatus* の栄養要求性変異株として、TD33-100 (*A2B2/nic-*), TD33-118 (*A1B2/ade-*), TD33-138 (*A2B1/met-*), TD33-336 (*A1B2/met-*) を用いた。栄養要求性突然変異株の作出は衣笠および北本 (1997) の方法に従った。菌糸体の培養は 12 ml の P D A 培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) を分注したプラスチック製のペトリ皿 (Iwaki, 90×15 mm) で行った。保存菌株から切り出した寒天のブロック (3×3×3 mm) を接種し 20-22°C, 暗黒下で培養した。

二核交雑株の作製

ダイ・モン交配に用いる二核菌株は、和合性を示す二つの栄養要求性一核株同士を交配して作出した。PDA平板培地の中央に4 mm離して二つの和合性を示す二つの一核株を接種した。約10日間、25℃で培養後、PDA平板培地上のコロニーを検鏡し、クランプ結合を確認したものを、二核菌糸体とみなした。このように二核化を確認した後、PDA斜面培地に接種し、2週間、25℃で培養し、5℃で保存した。

ダイ・モン交配における二核化の検証

まず、栄養要求性マーカを付与した一核菌糸体をPDA平板培地の中央部分に接種して25℃、5日間培養した。生長した一核菌糸体コロニーの周縁部の一カ所に二つの異なった栄養要求性マーカをもつ二核菌糸体を接種し、ダイ・モン交配させた。10日間培養後、接種点とは反対側である一核菌糸体のコロニー外縁部から10サンプルの菌糸体を切り出し、PDA斜面培地に移植した。培養後、小片を最少培地(MM)およびMMにアデニン、ヒスチジン、ニコチン酸アミド、メチオニン、トリプトファン、p-アミノ安息香酸あるいはイソロイシンをそれぞれ10 mg/l添加した培地を用いて培養した。一核菌糸体は生長のためこれらの

物質を必要とすることから, *ade-*, *his-*, *nic-*, *met-*, *trp-*, *pab-*および *ile-*と同定した. MMの組成は, グルコース 20 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 1.5 g/l, KH_2PO_4 0.46 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, チアミン塩酸塩 120 μ g/l, 精製寒天 15 g/l であり, 殺菌前に pH を 5.5 に調整した. 供試菌株が一核菌糸体の状態ならば菌糸体の生長に上記の物質を要求するが, 菌糸体細胞中に二種類の核が存在すれば栄養要求性を相補することにより MM で生育可能であることから, MM での生育の可否により二核化の検証を行った. なお, 親一核株の二核化は, 検鏡によってクランプの存在を確認する方法を併用した.

結果

和合性ダイ・モン交配の二核化の確認

L. edodes の親二核株と異なる不和合性因子を有する親一核株との間でダイ・モン交配を行い, 親一核株側の二核化について調べた結果を, Table 4-1 に示す. *L. edodes* の親二核株 X-1-248 (*A4B3/his-*) + X-1-650 (*A3B4/ile-*) と親一核株 #110-822 (*A1B2/met-*), 親二核株 X-1-650 (*A3B4/ile-*) + X-1-667 (*A4B3/ade-*) と親一核株 #110-872 (*A1B1/trp-*), および親二核株 X-1-449 (*A3B3/pab-*) + X-1-829 (*A4B4/met-*) と

Table 4-1. The results of compatible di-mon mating between auxotrophic monokaryons and dikaryons in *Lentinula edodes*.

Parental dikaryon	Parental monokaryon	Rate of dikaryotization of parental monokaryon
X-1-248 (<i>A4B3/his-</i>) + X-1-650 (<i>A3B4/ile-</i>)	#110-822 (<i>A1B2/met-</i>)	10/10
X-1-650 (<i>A3B4/ile-</i>) + X-1-667 (<i>A4B3/ade-</i>)	#110-872 (<i>A1B1/trp-</i>)	10/10
X-1-449 (<i>A3B3/pab-</i>) + X-1-829 (<i>A4B4/met-</i>)	#110-666 (<i>A1B2/ade-</i>)	10/10

親一核株 #110-666 (*A1B2/ade-*) の 3 種類の和合性ダイ・モン交配した結果, いずれの組み合わせでも一核菌糸体コロニー側から摘出したサンプルに二核化が確認された。

P. ostreatus については, 和合性組み合わせの交配実験は実施しなかった。

L. edodes の半和合性ダイ・モン交配における核の選択

L. edodes を供試材料として, 親一核株に対して, 二核のうち的一方は共通の核型を持ち, 他方は相補的な核型の親二核株をダイ・モン交配して, 親一核株側の二核化について調査した結果を, Table 4-2 に示す。

L. edodes の親二核株 X-1-248 (*A4B3/his-*) + X-1-650 (*A3B4/ile-*) と親一核株 X-1-248 および X-1-650 のダイ・モン交配において, 親二核株と X-1-650 の組み合わせでは親一核菌糸体側から分離したサンプルの全てで二核化が確認されたが, もう片方の親一核株 X-1-248 との組み合わせでは二核化は観察されなかった。また, 親二核株 X-1-650 (*A3B4/ile-*) + X-1-667 (*A4B3/ade-*) と親一核株 X-1-650 および X-1-667 のダイ・モン交配では, 親二核株と X-1-650 の組み合わせの一核菌糸体コロニー側から分離したサンプルの全てで二核化が確認されたが, 一方の親一核株 X-1-667 との組み合わせでは二核化が観察されなかった。

Table 4-2. The results of hemicompatible di-mon mating between auxotrophic monokaryons and dikaryons in *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*.

Parental dikaryon	Parental monokaryon	Rate of dikaryotization of parental monokaryon
<i>Lentinula edodes</i>		
X-1-248 (A4B3/his-) + X-1-650 (A3B4/ile-)	X-1-248 (A4B3/his-)	0/10
	X-1-650 (A4B3/his-)	10/10
X-1-650 (A3B4/ile-) + X-1-667 (A4B3/ade-)	X-1-650 (A3B4/ile-)	10/10
	X-1-667 (A4B3/ade-)	0/10
<i>Pleurotus ostreatus</i>		
TD33-100 (A2B1/nic-) + TD33-118 (A1B2/ade-)	TD33-100 (A2B1/nic-)	9/10
	TD33-118 (A1B2/ade-)	1/10
TD33-100 (A2B1/nic-) + TD33-336 (A1B3/met-)	TD33-100 (A2B1/nic-)	10/10
	TD33-336 (A1B3/met-)	0/10
TD33-118 (A1B2/ade-) + TD33-138 (A2B1/met-)	TD33-118 (A1B2/ade-)	2/10
	TD33-138 (A2B1/met-)	10/10

さらに，親二核株 X-1-449 (*A3B3/pab-*) + X-1-829 (*A4B4/met-*) と親一核株 X-1-449 および X-1-829 のダイ・モン交配では二核菌株と X-1-449 の組み合わせでは全てのサンプルで二核化が確認されたが，一方の親一核株 X-1-829 との組み合わせでは二核化が確認されなかった．これらの結果から，*L. edodes* の半和合性ダイ・モン交配における一核菌糸体への核供与体となる二核株の 2 核のうち，接合時に一核側へ移行する核の選択に X-1-248 → X-1-650，X-1-667 → X-1-650 および X-1-829 → X-1-449 という序列が決定され，また，親二核菌糸体中の相補核の他核に対する比較優位性がダイ・モン交配の正否を決定付けるほどの影響があることが判明した．

P. ostreatus の半和合性ダイ・モン交配における核の選択

P. ostreatus の半和合性組み合わせのダイ・モン交配の結果を，Table 4-2 に示す．

親二核株 TD33-100 (*A2B1/nic-*) + TD33-118 (*A1B2/ade-*) と親一核株 TD33-100 および TD33-118 のダイ・モン交配において，親二核株と TD33-100 の組み合わせでは分離したサンプルの 90% で二核化が確認されたが，片方の親一核株 TD33-110 との組み合わせではサンプルのわずか 10% のみの二核化であった．親二核株 TD33-100 (*A2B1/nic-*) +

TD33-336 (*A1B3/met-*) と親一核株 TD33-100 および TD33-336 のダイ・モン交配では，前者は 100% が二核化していたが後者はわずか 10% に止まった．第 3 の親二核株 TD33-118 (*A1B2/ade-*)+TD33-138 (*A2B1/met-*) と親一核株 TD33-118 および TD33-138 のダイ・モン交配でも，先の交配例と同様に，一方の組み合わせでのみ交配の完遂率は高い結果となった．また，これらの結果から *P. ostreatus* の二核菌株においても，二核の比較優位性について，TD33-118 → TD33-100，TD33-336 → TD33-100，TD33-118 → TD33-138 という序列が決定され，*L. edodes* と同様に核選択がダイ・モン交配の容易さを決定付ける要因であることが示唆された．

考察

著者は，第 2 章および第 3 章において，それぞれ二極性および四極性であるきのこ，*P. nameko* と *F. velutipes* における和合性および半和合性組み合わせのダイ・モン交配に関して栄養要求性株を用いて検証し，いずれにおいても一核菌系体の二核化が生じることを示した．この二核化においては，和合性交配の場合，親二核菌系体中の一核がほぼ絶対的に選択されて二核化が完遂するが，半和合性交配の場合は，親一核菌系体に対して相補性を示す核が選択

における劣位核であっても交配が比較的容易に完遂することが判明した。一方，本章において供試した2つの四極性きのこ，*P. nameko*と*F. velutipes*の場合を半和合性組み合わせの交配で観察したところ，親二核株のうちの核選択で優位性を示す核がダイ・モン交配の完遂においてより有利であり，相補核が劣位核の場合は*P. nameko*と*F. velutipes*の場合より二核化の完遂の困難さを示す結果を得た。この相違が有意であるかどうかはより多くの検体を用いた分析データの蓄積を待たねばならない。なお，*L. edodes*および*P. ostreatus*に関しては，二核菌糸体の一核化や一核性オイディアの形成が見られないため，ダイ・モン交配で新生した二核菌糸体の核型を解析する簡便な直接的手段は確立されていないが，例えば，プロトプラストを作製し，それから一核性プロトクローン（ネオハプロント）を拾う方法などで解析が可能と考えられ，今後，検討されることが期待される。

和合性および不和合性ダイ・モン交配に関して，著者は*P. nameko*と*F. velutipes*の場合，親二核菌糸体の一核化により生じた細胞が親一核菌糸体の細胞と接合して，見かけ上のダイ・モン交配が完遂することがかなりの頻度で生じているとの推測を，第2章および第3章で論じた。しかし，本章において，二核菌糸体の一核化が通常には生じな

いと考えられる *L. edodes* および *P. ostreatus* においても和合性および半和合性組み合わせの交配で一核菌糸体の二核化が、これまでの多くの既報と同様に確認された ((Dicson, 1934; Quintanilha, 1937, 1939; Oikawa, 1939; 木村, 1957, 1958a, 1958b). また, *L. edodes* と *P. ostreatus* におけるダイ・モン交配においても, 親二核株における二核のうちの一核が選択されるプロセスが介在し, おそらく, *P. nameko* や *F. velutipes* で立証されたもの (Cao et al., 1999; Kitamoto et al., 2000) と同様な核の序列を提示することが可能と考えられる. 二核菌糸体の細胞における二核の優劣に関しては, 著者らの研究グループでは, 優位核を共役核分裂における主導核, 劣位核をその従属核と考える仮説を提起している (Maduda et al., 1995). これまでの研究で蓄積されてきたデータを想起すると, 主導核はダイ・モン交配における2つの菌糸細胞の接合後, 速やかに一核菌糸体の細胞内に移動できる菌糸先端細胞内で先端部に位置すると考えると説明が容易になる. 今後, この視点に立った検証が期待される.

第 5 章

四極性きのこ *Flammulina velutipes* の不和合性ダイ・モン交配における不和合性因子の体細胞組換えによる新核形成の検討

緒言

四極性きのこ *Coprinus lagopus* における二核菌糸体による一核菌糸体の二核化は、Buller (1930, 1931) により発見された。その後、同様の二核化現象が多数報告されている (Dicson, 1934; Quintanilha, 1937, 1939; Oikawa, 1939; 木村, 1957, 1958a, 1958b)。四極性きのこにおけるブラー現象に関わる未解明の主題の一つは、体細胞組換え、すなわち不和合性ダイ・モン交配の際に和合性の交配遺伝子型が新生するのかどうかである (Raper, 1966)。

四極性きのこでは、親二核株 ($A1B1+A2B2$) と親一核株 $A1B2$ または $A2B1$ という不和合性組み合わせにおいてもダイ・モン交配が起こる。この組み合わせにおける二核化は二核菌糸体の二核間で体細胞組換えにより和合性の新核が生じ、それが親一核株に移動して二核化が完遂するとする仮説 (Quintanilha, 1939)、あるいは二核菌糸体の二つの核

とも移動したとする相反する仮説が提起されている (Papazian, 1950)が, いずれも仮説に過ぎず, 新生した 2 核菌糸体の核型を直接分析した報告は皆無である.

そこで, 本研究では, 四極性きのこである *F. velutipes* の異なった不和合性因子を有する栄養要求性突然変異株および野生株を用い, 不和合性組み合わせによるダイ・モン交配における体細胞組換により, 和合性の不和合性因子を有する核の新生について, 本菌が二核菌糸体からそれぞれの構成核を有するオイディアを形成する現象 (Kitamoto et al., 2000)を活用して, 新生二核菌糸体の有する 2 核の核型の解析を行った.

材料および方法

供試菌株

本研究には, *F. velutipes* の野生一核株 A2 (A1B1), A6 (A2B2), A7 (A1B2) および A8 (A2B1) を紫外線することにより得られた栄養要求性突然変異株 A2-12 (A1B1/ade⁻), A6-14 (A2B2/met⁻), A7-21 (A1B2/met⁻) および A8-2 (A2B1/his⁻) を用いた. また, 上記の野生一核株は交配型テスター株としても用い, A6 株は二核交雑株の作製にも用いた. 菌糸体は 12 ml の PDA 培地 (Nissui

Pharmaceutical Co. Ltd.) を分注したプラスチック製ペトリ皿 (Iwaki, 90×15 mm) で培養した。保存菌株から菌糸体小片 (3×3×3 mm) を切り出し, 25℃暗所で培養した。

二核交雑株の作製

ダイ・モン交配に用いる親二核株は, 二つの和合性の栄養要求性一核株同士, あるいは栄養要求性一核株と一核野生株を交配して作製した。PDA 平板培地の中央に 4 mm 離して二つの一核株を接種した。25℃, 10 日間の培養後, PDA 平板培地上のコロニーを検鏡し, クランプ結合を検鏡することにより二核菌糸体の形成を確認した。確認した二核菌糸体を PDA 斜面培地に移植し, 25℃で 2 週間培養後, 5℃で保存した。

ダイ・モン交配における二核化の検証

栄養要求性マーカを付与した一核菌糸体を PDA 平板培地の中央に接種し, 25℃で一週間培養した。生長した一核菌糸体コロニーの周縁部の一カ所に二核とも栄養要求性マーカを有する二核菌糸体もしくは野生型の二核菌糸体を接種した。1 週間培養後, 交配接種箇所とは反対の一核菌糸体側のコロニーの周縁部から約 10 mm 内側の菌糸体小片を切り出し, PDA 斜面培地に移植した。生長した菌糸体を最

少培地 (MM) と MM に 10 mg/l の アデニン (ade), メチオニン (met), もしくは p-アミノ安息香酸 (pab) を加えた平板培地に接種し, 菌糸体の栄養要求性を検定した. これらの栄養素を必要とする一核菌糸体をそれぞれ ade-, met-, pab-株と同定した. MM の組成は 20 g/l glucose, 1.5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.46 g/l KH_2PO_4 , 1.0 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 120 $\mu\text{g/l}$ チアミン塩酸塩, 15 g/l 精製寒天であり, 殺菌前に pH を 5.5 に調整した. 本研究で用いた一核菌糸体は ade-, met-あるいは pab-であるので, 栄養要求性の互いに異なる 2 種類の核を有する二核菌糸体の細胞は栄養要求性の相補により MM で生長可能である. 一核菌糸体は栄養要求性を示すことで 2 核菌糸体と判別することができると考えられるが, 体細胞染色体組換え株の新生の可能性も残るため, クランプ結合の検鏡による 2 核菌糸体の確認の方法も併用した. 野生株を用いた場合は, クランプ結合を検鏡して二核化の確認を行った.

ダイ・モン交配により形成される二核菌糸体の核型の決定

ダイ・モン交配により形成される二核菌糸体に存在する 2 核の核型構成は, 本菌において生じる二核菌糸体からの一核性オイディアの核型を分析することにより決定した. 二核菌糸体からの一核性オイディアの分離は Kitamoto et

a1. (2000) の方法に従った。オイディアは 25℃，暗黒下で培養した。オイディアの細胞は通常 3 日後に発芽し，菌糸体コロニーを形成する。コロニーの直径が 2 mm 程度に伸長した後，平板培地から移植し，栄養要求性を検定するために，MM および MM に栄養要求性標識化合物を 1 つ加えた 2 つの平板培地に接種した。分離培養した菌糸体の核型は，MM では生育せず，標識化合物の 1 つを加えた MM での生育の可否により検証した。また，野生株を用いた場合は交配型テスター株との交配によるクランプ結合の確認により核型を決定した。

結果

不和合性組み合わせによるダイ・モン交配における親一核株の二核化

栄養要求性マーカーを付与した二つの親一核株と親二核株の両方の核型が和合できない核をもつ二核菌糸体の不和合性ダイ・モン交配を検討した。その結果を **Table 5-1** に示す。

F. velutipes の親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A6-14 (*A2B2/pab-*)，親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A-6

Table 5-1. The results of noncompatible di-mon matings between auxotrophic monokaryons and dikaryons in *Flammulina velutipes*.

Parental monokaryon	Parental dikaryon	Rate of dikaryotization of parental monokaryon
A7-21 (<i>AIB2/met</i> -)	A2-12 (<i>AIB1/ade</i> -) + A6-14 (<i>A2B2/pab</i> -)	10/10
A7-21 (<i>AIB2/met</i> -)	A2-12 (<i>AIB1/ade</i> -) + A6 (<i>A2B2/wild</i>)	10/10
A8-2 (<i>A2B1/his</i> -)	A2-12 (<i>AIB1/ade</i> -) + A6 (<i>A2B2/wild</i>)	10/10

(*A2B2/wild*) および親一核株 A8-2 (*A2B1/his-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A-6 (*A2B2/wild*) ダイ・モン交配を試みたところ、いずれの組み合わせでも一核菌糸体のコロニー外縁部から分離したすべての菌糸体サンプルは二核菌糸体であることが栄養要求性およびクランプの検鏡から確認された。

不和合性ダイ・モン交配における新生二核株の核型構成の検討

上記の実験で得られた新生二核株の核型を分析するため、三組の不和合性ダイ・モン交配で作出された二核菌糸体から一核性オイディアを分離し、分離株の核型の解析をテスター株と交配させて行った。その結果を、Table 5-2~5-4 に示す。

親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A6-14 (*A2B2/pab-*) の組み合わせの親一核株側の二核化した菌糸体を用いて形成させた 10 株の一核性オイディア由来一核菌糸体の交配型を分析したところ、親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) に由来する *A1B2* 株が 7 株、いずれのテスター株とも交配可能な *ArBr* 株が 3 株の割合で検出された (Table 5-2)。親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A-6 (*A2B2/wild*) の組み合わせの親一核株側の二核化した菌糸体の一核性オイディアの交配

Table 5-2. Mating compatibility tests of ten strains of oidium-derived monokaryons produced from incompatible di-mon mating between a monokaryon A7-21 (*A1B2/met-*) and a dikaryon A2-12 (*A1B1/ade-*)+A6-14 (*A2B2/pab-*).

Oidium-derived monokaryotic strain	Mating testers				Mating type
	A2 (<i>A1B1</i>)	A7 (<i>A1B2</i>)	A8 (<i>A2B1</i>)	A6 (<i>A2B2</i>)	
1	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
2	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
3	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
4	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
5	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
6	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
7	—	—	+	—	<i>A1B2</i>
8	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
9	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
10	—	—	+	—	<i>A1B2</i>

型は，親一核株 A7-21 (*A1B2/met-*) 由来の *A1B2* 株が 2 株，*ArBr* 株が 8 株の割合で検出された (Table 5-3). さらに，親一核株 A8-2 (*A2B1/his-*) と親二核株 A2-12 (*A1B1/ade-*) + A-6 (*A2B2/wild*) の一核株側の二核化した菌糸体のオイディア株においても，親一核株 A8-2 (*A2B1/his-*) 由来の *A2B1* 株が 5 株，*ArBr* 株が 5 株検出された (Table 5-4). したがって，いずれの組み合わせの交配においても，新生した 2 核株の核型は，親一核株の交配型 + 親二核株の *A*, *B* 両因子が組換えられた新たな交配型の核で構成されることが判明した. さらに，第 1 の組み合わせで新生した二核菌糸体の二核の序列は，組換え型の不和合性因子を有する核が優位核，親一核株の交配型を示す核は劣位核であることが推察された. しかし，第 2 の交配組み合わせでは親一核株の交配型を示す核が優位株，組換え型の核が劣位核と推定され，第 3 の組み合わせではオイディアにおける二核の出現頻度が同数であり，優劣は判定できなかった.

考察

四極性きのこでは，Quintanilha(1939)の最初の報告以来，不和合性組み合わせのダイ・モン交配における一核菌糸体の二核化について数多くの報告がなされている. この組み

Table 5-3. Mating compatibility tests of ten strains of oidium-derived monokaryons produced from incompatible di-mon mating between a monokaryon A7-21 (*A1B2/met-*) and a dikaryon A2-12 (*A1B1/ade-*)+A6 (*A2B2/wild*).

Oidium-derived monokaryotic strain	Mating testers				Mating type
	A2 (<i>A1B1</i>)	A7 (<i>A1B2</i>)	A8 (<i>A2B1</i>)	A6 (<i>A2B2</i>)	
1	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
2	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
3	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
4	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
5	-	-	+	-	<i>A1B2</i>
6	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
7	-	-	+	-	<i>A1B2</i>
8	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
9	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
10	+	+	+	+	<i>ArBr</i>

Table 5-4. Mating compatibility tests of ten strains of oidium-derived monokaryons produced from incompatible di-mon mating between a monokaryon A8-2 (*A2B1/his-*) and a dikaryon A2-12 (*A1B1/ade-*) + A6 (*A2B2/wild*).

Oidium-derived monokaryotic strain	Mating testers				Mating type
	A2 (<i>A1B1</i>)	A7 (<i>A1B2</i>)	A8 (<i>A2B1</i>)	A6 (<i>A2B2</i>)	
1	—	+	—	—	<i>A2B1</i>
2	—	+	—	—	<i>A2B1</i>
3	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
4	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
5	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
6	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
7	—	+	—	—	<i>A2B1</i>
8	—	+	—	—	<i>A2B1</i>
9	+	+	+	+	<i>ArBr</i>
10	—	+	—	—	<i>A2B1</i>

合わせにおける二核化は二核菌糸体の二核間で体細胞組換えにより和合性の新核が生じ、それが親一核株に移動して二核化が完遂すると推察されている(Quintanilha, 1939; Ellingboe, 1964). 一方, Papazian(1950)は、二核菌糸体の二つの核とも移動したとする仮説を提起した。しかし、いずれも新生した二核菌糸体の核型を直接分析した報告ではない。本研究においては、*F. velutipes*を供試菌株として不和合性ダイ・モン交配で新生した二核菌糸体の核の構成を二核菌糸体による一核性オイディア形成を活用して解析を行った。その結果、新生した二核株の核型は、親一核株の交配型+親二核株の *A*, *B* 両因子が組換えられた交配型 (*ArBr*)の核で構成されることが明らかになった。すなわち、不和合性組み合わせのダイ・モン交配は、複相核の減数分裂に類似したプロセスにより染色体の組換えにより新規な交配型の核が生じて完遂することを提唱した Ellingboe(1964)の *Schizophyllum commune*における事例の説明を支持する結果を示した。体細胞組換えによる新規な交配型の核の新生については、*A*あるいは *B* 因子が座乗する染色体の組換えによっても親一核株と相補的な核ができることが考えられるが、本研究では両因子とも組換えられた核の新生が確認された。しかし、分析したオイディアのサンプル数が3例の交配組み合わせでそれぞれわずか10

株であり，両因子とも組換えが必然的に生じた細胞でのみ不和合性ダイ・モン交配が完遂すると結論するのは早急であり，今後，数十のサンプルを用いて *A* あるいは *B* 因子の片方が組換えられた新生核ができる事例があるかどうか検証されることが期待される。

摘要

多くのきのこは性的にヘテロタリズムの担子菌類に属し、菌糸体や子実体の細胞は一つの細胞に異なった交配型を有する二つの半数体の核で構成されるヘテロカロイドである。きのこの一核菌糸体の二核化は交配型が相補的な二つの一核菌糸体の交配により完遂する。Buller は四極性のきのこ *Coprinus lagopus* の一核菌糸体の周縁部に同菌の二核菌糸体を接種したところ、一核菌糸体が二核化してその全周縁部に二核菌糸体が形成されることを見いだした。この二核菌糸体によって一核菌糸体が二核化する現象はダイ・モン交配、あるいはブラー現象と呼ばれる。ブラー現象は四極性担子菌については多くの報告があるが、二極性担子菌では皆無である。また、ブラー現象については、①和合性、半和合性ダイ・モン交配における親二核菌糸体の核の選択和合の有無、および②不和合性ダイ・モン交配における体細胞の染色体組換えが主要な問題点として未解明のまま残されている。そこで本研究では、和合性および半和合性ダイ・モン交配モデルとして最適とされる二極性担子菌ナメコを用いて二核菌糸体の一核化の関与も考慮したブラー現象の解析を行い、二核菌糸体の一核化が生じる四極性担子菌エノキタケについても検討した。また、二核菌糸体の一

核化が生じない4極性担子菌シイタケとヒラタケのダイ・モン交配における核選択についても解析した。さらにエノキタケを用いて体細胞の染色体組換えにおける和合性新核の形成について、本菌の一核性分生子形成能力を利用して新生核を解析した。

二極性担子菌ナメコのダイ・モン交配による二核化を栄養要求性変異株を用いて検討した。和合性ダイ・モン交配では、親一核菌糸体の二核化が確認され、親二核株の2核のうち優位核である1核が選択され、親一核株へ移動し二核化が完遂すると推測された。また、供試3菌株の二核株を構成する3種類の核のそのような選択における比較優位の序列は、本菌の二核菌糸体の一核化や一核性オイディア形成における核選択の序列と一致した。半和合性ダイ・モン交配では親二核株の相補核が親一核株の供与核となり得た。しかし、親二核株の相補核の序列が親一核株より低い場合、親一核株側から分離した菌糸体サンプルにおける二核化は低頻度に留まった。このように、半和合性ダイ・モン交配においても親二核株における核選択における同様の規則が認められた。本菌の二核菌糸体先端細胞は一核化するため、ダイ・モン交配の実体は、親一核株と親二核株から生じた一核菌糸体の交配によると推察された。

四極性担子菌エノキタケのダイ・モン交配における核選

択の規則と二核菌糸体の脱二核化の介在の検討では、和合性ダイ・モン交配により一核菌糸体の二核化が生じた。この際、親二核株の二核が選択され、親一核株に移動して二核化が完遂した。供試二核株を構成する核がダイ・モン交配で選択核となる序列は二核菌糸体の一核化での核選択の序列と一致した。半和合性ダイ・モン交配では、親二核株のうちの親一核株と相補する核が優位あるいは従属核でも、二核化で供与核となり得た。しかし、親一核株と相補する核が従属核の場合は、親一核株コロニーから採取したサンプルの二核化の確率は優位核に比較して低率であった。和合性ダイ・モン交配に見られる核の選択規則が半和合性ダイ・モン交配においても機能していると推測された。本菌におけるいわゆるダイ・モン交配は、親二核株がまず脱二核化し、生じた一核細胞と親一核株の間での交配が生じていることが示唆された。

同じ四極性でオイディアを形成しないシイタケおよびヒラタケにおいても、ダイ・モン交配における一核菌糸体の二核化における核選択の規則性について検討した。和合性ダイ・モン交配では、上述のきのこと同様に親一核株の二核化が生じ、核選択の序列が決定された。半和合性ダイ・モン交配でも同様に親二核株中の相補性を示す一核が親一核株の供与核となり得た。しかし、親二核株の選択核が一

核菌糸体の核より序列が低い場合，二核化は低率であった．半和合性ダイ・モン交配でも和合性ダイ・モン交配と同様な核選択の序列が認められた．

エノキタケの不和合性ダイ・モン交配における体細胞染色体の組換え現象を検討した．本菌の不和合性ダイ・モン交配でも親一核株の二核化が確認された．二核化菌糸体の細胞の核の構成を一核性オイディアの形成現象を利用して解析したところ，新生二核菌糸体の二核は，親一核株と同型の核および親二核菌糸体の核型とは異なる組換え型の核で構成されていることが判明した．すなわち親二核菌糸の細胞で染色体の体細胞組換えがまず生じ，その結果，新たな交配型を保有するようになった新生核の1つが親一核菌糸体に移行し，二核化が完遂したと推測した．また，このような親二核株での2つの核間の体細胞組換えは2つの半数体の核間で染色体の交叉・組換えにより生じるものと推測した．

以上，本研究により，きのこの和合性および半和合性ブラー現象において二核菌糸体の重相核における核選択の介在，不和合性ブラー現象における親二核菌糸体の重相核のいずれとも異なる交配型の核の新生を直接証明する知見が得られた．

Abstract

Studies on the Buller phenomenon in bipolar and tetrapolar mushrooms

by Tomomi Nogami

Most edible mushrooms are heterothallic basidiomycetes. Cells forming their mycelia and fruit-bodies are usually heterokaryons with two kinds of haploid nuclei of different mating types in each cell. The crossing of two complementary monokaryons of different mating types results in dikaryotization of monokaryotic mycelia. In 1930, Buller first observed the dikaryotization of monokaryotic mycelia by the dikaryotic mycelia of a tetrapolar mushroom, *Coprinus lagopus*, when they were placed near a large colony of monokaryotic mycelia. The dikaryotization of a monokaryon (the parental monokaryon) with a dikaryon (the parental dikaryon) has been referred to as di-mon mating or as the Buller phenomenon. Many researchers have reported similar dikaryotization phenomenon in many other tetrapolar basidiomycetes thereafter, although no report from bipolar mushrooms. However, the following two major questions about the Buller phenomenon on tetrapolar mushrooms are not clarifying yet; (a)

whether selection of one of the two nuclei in the parental dikaryon in legitimate di-mon mating is involved, and (b) in somatic recombination, whether *de novo* generation of compatible genotypes of mating factors during incompatible di-mon mating occur.

In the present study, the author examined the involvement of similar nuclear selection rules in compatible and hemicompatible di-mon mating in a bipolar mushroom, *P. nameko*, and surveyed the effect of mycelial monokaryotization on legitimate di-mon mating in this mushroom. I also examined the nuclear selection rule in the legitimate di-mon mating in a tetrapolar mushroom, *Flammulina velutipes*, which mushroom involve the mycelial monokaryotization from dikaryotic mycelia. Further, I conducted a similar study by using two tetrapolar mushrooms, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* in which the mycelia might keep at dikaryotic state during growth and expansion. In the final chapter of this study, I examined the somatic recombination in the illegitimate di-mon mating of a tetrapolar mushroom, *Flammulina velutipes*.

The nuclear behavior in Buller phenomenon in a bipolar mushroom, *Pholiota nameko*, was examined with use of auxotrophic mutant strains to demonstrate the involvement of nuclear selection rules in dikaryotization by di-mon mating. During compatible di-mon mating of a parental monokaryon and a parental dikaryon,

dikaryotization of the monokaryotic mycelia occurred. We speculated that only one nucleus of the two nuclei of the parental dikaryon was selected, and the dominant nucleus migrated into the parental monokaryon to complete dikaryotization. The hierarchy of dominance of the three nuclei of the dikaryotic strains tested during such di-mon mating was established. The hierarchy was the same as that for mycelial and oidial monokaryotization. In hemicompatible di-mon mating, the nucleus of the parental dikaryon complementary to the parental monokaryon could be the nuclear donor in dikaryotization. However, when the complementary nucleus was lower on the hierarchy than the other nucleus of the dikaryon, then 0% to 50% of the samples isolated from the parental monokaryon side of the colony had completed dikaryotization. Further, similar nuclear selection rules that apply to compatible di-mon mating may operate in hemicompatible di-mon mating. Crossing between a parental monokaryon and monokaryotic cells produced by mycelial monokaryotization of a parental dikaryon occur at times during what seems to be di-mon mating in this mushroom.

The involvement of nuclear selection rule and mycelial monokaryotization in compatible and hemicompatible di-mon mating of *Flammulina velutipes* has been examined. The compatible di-mon mating between the parental monokaryon and the parental dikaryon

brought about dikaryotization of the monokaryotic mycelia. Only one of the two nuclei of a parental dikaryon was selected, and the nucleus migrated into the parental monokaryon to complete dikaryotization. The hierarchy of dominance among the three nuclei of the dikaryotic test strains during such di-mon mating coincided with that for mycelial monokaryotization of this mushroom. In hemicompatible di-mon mating, one nucleus of the parental dikaryon, complementary to the parental monokaryon, could be preferentially the nuclear donor in dikaryotization. However, when the complementary nucleus in the parental dikaryon was recessive in the nuclear selection, the test samples might complete dikaryotization at a lower frequency than that by the dominant nucleus of the parental dikaryon. A similar nuclear selection rule that applies to compatible di-mon mating may be active in hemicompatible di-mon mating. It is suggested that the crossing between a parental monokaryon and the monokaryotic cells produced by mycelial monokaryotization of a parental dikaryon may occur, at times, during what seems to be di-mon mating.

The examination of nuclear selection rule involved in compatible and hemicompatible di-mon mating of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* which did not produce monokaryotic oidia or monokaryotic mycelia from dikaryotic mycelia were carried out for comparing the above results from oidium forming mushrooms. The compatible

di-mon mating of these mushrooms also brought about dikaryotization of the monokaryotic mycelia by migrating a selected nucleus of the parental dikaryon into the parental monokaryon. In hemicompatible di-mon mating of these mushrooms, the nucleus of the parental dikaryon complementary to the parental monokaryon could be the nuclear donor in dikaryotization although the nucleus was dominant or recessive in nuclear selection that occur in the parental dikaryon. However, when the complementary nucleus was lower in the nuclear selection hierarchy, the apparent rate of the completion of dikaryotization in the samples was very low in the isolated samples tested. It was estimated a similar hierarchy in the nuclear selection of the parental dikaryons might act in the compatible and hemicompatible di-mon matings in the test mushrooms.

The somatic recombination in the illegitimate di-mon mating in a tetra polar mushroom *Flammulina velutipes* was examined by applying the oidium monokaryotization method to isolate and determine the two kinds of nuclei in the resulting dikaryon by di-mon mating. The noncompatible di-mon mating between the parental monokaryon and parental dikaryon brought about dikaryotization of the monokaryotic mycelia. The nucleus of oidia formed from the resulting dikaryon was identified to either one of the two nuclei; the nucleus of the parental monokaryon in the di-mon mating, or the

nucleus that was capable to mate against four tester strains in the mating compatibility test. Therefore, it has been demonstrated that the resulting dikaryon consisted of the nucleus of the parental monokaryon, and the nucleus (*ArBr*) that was newly produced by the recombination of chromosomes occurred in the somatic cells of dikaryon during the process of di-mon mating. One the new nucleus was arised in the parental dikaryotic mycelia, it might migrate into the parental monokaryotic mycelia after conjugation of two mycelia, and completed the dikaryotization of the monokaryons.

From the present study, the author demonstrated the involvement nuclear selection rules in compatible and hemicompatible di-mon matings, and also revealed the de novo generation of the nucleus with a new mating type by somatic recombination in a process of the noncompatible di-mon mating in tetrapolar mushrooms.

謝辞

本学位論文の作成およびそれに伴うきのこの生理・生化学，遺伝・育種学的研究並びに大分県きのご研究指導センターの設立・その後の運営におきまして，15年もの長期にわたり終始懇切なご指導と激励を賜りました鳥取大学農学部教授 北本 豊先生に謹んで感謝の意を表します。

また，長年にわたり有益なご教示と励ましを賜りました元大分県きのご研究指導センター所長 古川久彦先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の実施にあたり多大なご協力をいただきました鳥取大学大学院連合農学研究科 森 信寛教授，鳥取大学農学部微生物工学研究室の亀本弥生様および学生各位に深く感謝の意を表します。

さらに，大学院進学のお機会を与えて頂いた大分県日田地方振興局および大分県きのご研究指導センターの職員の皆様ならびにアルバイト・スタッフの木田佳代子様，岡上悦子様，森孝千代様，首藤みさ子様，太田光恵様，甲斐和恵様に厚くお礼申し上げます。

最後に，鳥取大学大学院での研究に理解を示し，支援してくれた妻 孝子および家族に感謝します。

引用文献

- 有田郁夫. (1964) ナメコ二核菌糸の一核化 (1) 菌蕈研究所研究報告 4:44-51.
- Arita, I. (1979) The mechanism of spontaneous dedikaryotization in hyphae of *Pholiota nameko*. *Mycologia* 71:603-611.
- Ashan, K.: (1952) Studies on dediploidisation mycelia of the basidiomycete *Collybia velutipes*. *Svensk Bot. Tidskr.* 46:336-392.
- Aschan-Aberg, K. (1960) Studies on dediploidisation mycelia and of F1 variation in *Collybia velutipes*. *Svensk Bot. Tidskr.* 54:331-328.
- Brodie, H. J. (1936) The occurrence and function of oidia in the Hymenomyces. *Amer. J. Bot.* 23: 309-327.
- Buller, A. H. R. (1930): The biological significance of conjugated nuclei *Coprinus lagopus* and other Hymenomyces. *Nature (Lond.)* 126:686-689.
- Buller, A. H. R. (1931): "Researches on Fungi IV" Longman's, Green & Co., London.
- Cao, H., Yamamoto, H., Ohta, T., Takeo, K., Kitamoto, Y. (1999) Nuclear selection in monokaryotic oidium formation from dikaryotic mycelia in a basidiomycete, *Pholiota nameko*. *Mycoscience* 40:199-203.
- Dickson, H. (1934) Studies in *Coprinus sphaerosporus* I. The pairing

- behavior and the characteristics of various haploid and diploid strains. *Ann. Bot.* 48: 527-547.
- Dickson, H. (1936) Studies in *Coprinus sphaerosporus* III. The inheritance of factors affecting the growth-rates at different temperatures of certain strains. *Ann. Bot.* 50:219-246.
- Ellingboe, A. H. (1964) Somatic recombination in dikaryon K of *Schizophyllum commune*. *Genetics* 49:247-251.
- 木村勘二 (1957a) 帽菌類の diploidisation における核の行動 II. 両和合性組合わせの場合. *Bot. Mag. Tokyo* 70: 335-339.
- 木村勘二 (1957b) 帽菌類の両和合性組合わせによる diploidisation で和合する核. *Bot. Mag. Tokyo* 70: 391-395.
- 木村勘二 (1958a) 帽菌類の Diploidisation における核の行動 II. 両和合性組合わせの場合. *Bot. Mag. Tokyo* 71: 26-31.
- 木村勘二 (1958b) 帽菌類の Diploidisation における核の行動 III. 和合性組合わせの場合. *Bot. Mag. Tokyo* 71: 65-70.
- 木村勘二 (1966) 標識遺伝子を用いての BULLER 現象の研究. II. 両和合性組合せ. 菌蕈研究所研究報告 5:25-36.
- 木村勘二 (1975) 両和合性組合せによる Buller 現象における核和合の制御の補遺実験. 菌蕈研究所研究報告 12: 69-77.
- 衣笠龍実・北本豊. (1997) エノキタケの一核性オイディアに対する各種変異原処理による栄養要求性株の誘発と分離. *きのこの科学* 4:15-18.
- Kitamoto, Y., Shishida, M., Yamamoto, H., Takeo, K. and Masuda, P.

- (2000) Nuclear selection in oidium formation from dikaryotic mycelia of *Flammulina velutipes*. *Mycoscience* 41:417-423.
- Masuda, P., Yamanaka, K., Sato, Y. and Kitamoto, Y. (1995) Nuclear selection in monokaryotization of dikaryotic mycelia of *Pholiota nameko* as described by leading and following nuclei. *Mycoscience* 36:413-420.
- Nogami, T., Kamemoto, Y., Ohga, S. and Kitamoto, Y. (2002) The Buller phenomenon in a bipolar basidiomycetous mushroom, *Pholiota nameko*. *Micologia Applicada International* (In Press)
- Oikawa, K. (1939) Diploidisation and fruit-body formation in Hymenomycetes. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* 14:245-260.
- Papazian, H. P. (1950) Physiology of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. *Botanical Gazette* 112:143-163.
- Quintanilha, A. (1937) Contribution al' etude genetique du phenomene de Buller. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 205:745-747.
- Quintanilha, A. (1939) Etude genetique du phenomene de Buller. *Bol. Soc. Broteriana, Ser. 2*, 13:425-486.
- Rao, P. S. and Niederpruem, D. J. (1969) Carbohydrate metabolism during morpho-genesis of *Coprinus lagopus* (sensu Buller). *J. Bacteriology* 100:1222-1228.
- Raper, J. R (1966) The "Buller phenomenon, internuclear selection, and somatic recombination. In "Genetics of Sexuality in Higher

Fungi", pp.166-207.

Takemaru, T. (1954) Genetics of *Collybia velutipes*.

II. Dedikaryotization and its genetic implication. Jap. J. Genet.
29:1-7.

Whitehouse, H. L. K. (1949): Multiple-allelemorph hetero-
thallism in the fungi. New Phytol. 48:212-244.

公表論文のリスト

- 1 . Nogami,T.,Kamemoto,Y.,Ohga,S.and Kitamoto,Y. :
THE BULLER PHENOMENON IN A BIPOLAR
BASIDIOMYCETOUS MESHROOM , *Pholiota*
nameko. Mycologia Applicada International.
(Vol.14,No.2,2002)
本論文の第 2 章に相当する.

- 2 . Tomomi Nogami,Yayoi Kamemoto and Yutaka
Kitamoto: Involvement of Nuclear Selection Rule in
Compatible and Hemicompatible Di-Mon Mating of
a Tetrapolar Mushroom,*Flammulina Velutipes*.
Mushroom Science and Biotechnology.
(Vol.10,No.2,2002)
本論文の第 3 章に相当する.

END