

学 位 論 文 題 名

シイタケのミトコンドリアDNAの遺伝に関する研究

学位論文内容の要旨

シイタケは我が国で栽培されている重要な食用きのこの一つであり、現在までに栽培特性や子実体の形態などが異なる数多くの栽培品種が育成されている。このため、本菌の遺伝・育種学的な基礎研究は比較的に数多く行われている。しかし、これまでの研究のほとんどは核の遺伝子を対象にしたものであり、ミトコンドリアDNA (mtDNA) など細胞質遺伝子を対象とした遺伝・育種学的研究はほとんど見当たらない。本研究は、シイタケのmtDNAの遺伝に関する知見を得ることを目的として、シイタケを含めた高等担子菌類からのmtDNAの効率的な単離法の確立、およびこれまで未知であったシイタケの生活環におけるmtDNAの遺伝様式の解明を試みた。次に、核の遺伝子構成が同じでmtDNAが異なる細胞質置換株の作製法を考案し、作製した細胞質置換株の諸形質を比較することによりmtDNAがシイタケの形質表現におよぼす影響について考察した。さらに、mtDNAのRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 情報に基づいてシイタケ自然集団内の系統的類縁関係についての解析を行った。

mtDNAのRFLPをマーカーにしてシイタケmtDNAの遺伝様式を解明するために、まずシイタケにおけるRFLP分析のためのmtDNAの単離について検討した。シイタケの凍結乾燥菌糸体から抽出した全DNAをビスベンズイミド/CsCl平衡密度勾配遠心したところ、2本の蛍光バンドが検出された。シトクロムcオキシダーゼサブユニットI遺伝子とのハイブリダイゼーションの結果、上部のバンドがmtDNAであることが確認できた。日本産 (TMI-1158)、パプア・ニューギニア産 (TMI-1485)、ニュージーランド産 (TMI-1569) のシイタケ野生株3菌株から、凍結乾

乾燥菌糸体 1 g 当たり約 30 μ g の mtDNA をそれぞれ単離することができた。単離した mtDNA は紫外線吸収特性から判断して高純度のものであり、制限酵素によって容易に分解された。mtDNA の制限酵素分解物の泳動パターンは 3 菌株間で差が認められ、シイタケ種内における mtDNA の RFLP の存在が明らかになった。また、制限酵素断片の総和から推定したシイタケ 3 菌株の mtDNA のサイズはそれぞれ 87.0 kb (TMI-1158)、76.1 kb (TMI-1485) および 73.1 kb (TMI-1569) であり、シイタケの mtDNA はそのサイズにも変異が認められた。

本研究で行った mtDNA の単離法を応用してシイタケ以外の高等担子菌類 5 種 (ヤナギマツタケ、ウシグソヒトヨタケ、マイタケ、タモギタケおよびヒラタケ) から RFLP 分析に充分量 (乾燥菌糸体 1 g から 20~50 μ g) の mtDNA を単離することができた。2 菌株を供試したヤナギマツタケ、マイタケおよびヒラタケについては、シイタケの場合と同様にそれぞれの菌株間の制限酵素分解物の泳動パターンに差が認められ、これらの種についても mtDNA の多型性が明らかになった。また、制限酵素断片の総和から推定したそれぞれの高等担子菌類の mtDNA のサイズは、79.6 kb (ヤナギマツタケ)、42.7 kb (ウシグソヒトヨタケ)、126.5 kb (マイタケ)、64.2 kb (タモギタケ) および 76.4 kb (ヒラタケ) であった。

シイタケ一核菌糸体間の交配にともなう mtDNA の遺伝様式を mtDNA の RFLP パターンをマーカーにして調査したところ、交配接触部以外から分離した二核菌糸体は全て核受容側の一核菌糸体の mtDNA を保有していた。また、交配接触部から分離した二核菌糸体の mtDNA を分析した結果、シイタケの交配接触部においては mtDNA の組換えはほとんど起こらないことが示された。このことから、シイタケの交配にともなう mtDNA の遺伝様式は交配接触部を境界にして核受容側の一核菌糸体が保有する mtDNA のみを一方的に受け継ぐ片親遺伝であることが明らかになった。また、シイタケの交配接触部から発生する子実体が細胞質キメラであるような興味深い現象も認められたが、シイタケの mtDNA は二核菌糸体から子実体、さらにその担子胞子由来の一核菌糸体へと変異することなく受け継がれることが明らかになった。一方、シイタケのプロトプラスト融合においては、融合親系統

とは異なるRFLPパターンを示すmtDNAを保有する融合株が認められたことから、プロトプラスト融合によって融合親系統のmtDNA間で組換えが起こることが示された。また、非親型のmtDNAを保有するプロトプラスト融合株を継代培養した後もmtDNAのRFLPパターンに変化がなかったことから、プロトプラスト融合によって生じた非親型のmtDNA分子は安定して伝達されていることが示された。

正逆交配とプロトプラスト培養法による脱二核化処理を組み合わせることにより、特定のシイタケ二核菌糸体の核構成を変えることなく別の菌株が保有する細胞質と置換することが可能なことを見出した。作製したシイタケの細胞質置換株は目的とするmtDNAのみを保有するものであることがそのRFLP分析によって確認され、本研究で考案した細胞質置換株の作製法はある菌株の細胞質を別の菌株のものに置換できる有効なものであることが示された。また、正逆交配株間や核構成が同じ細胞質置換株間の諸形質を比較したところ、菌糸生長量、菌叢形態、エステラーゼのアイソザイムバンドの活性および子実体発生量に差が生じる場合が認められ、mtDNAがシイタケの形質表現に少なからず影響をおよぼしていることが明らかになった。

国内外から採集された野生シイタケ51菌株（日本産38菌株、パプア・ニューギニア産7菌株、ニュージーランド産4菌株、ボルネオ産1菌株およびタイ産1菌株）からそれぞれmtDNAを単離し、それらを*Bam*HI および*Eco*RI で分解した。その結果、*Bam*HI 分解では12種類、*Eco*RI 分解では24種類のRFLPパターンにそれぞれ分けることができた。さらに、両制限酵素のRFLPパターンを組み合わせることにより供試したシイタケ野生株51菌株の保有するmtDNAを28種類のRFLP表現型（日本産19タイプ、パプア・ニューギニア産5タイプ、ニュージーランド産2タイプ、ボルネオ産1タイプおよびタイ産1タイプ）として類別することができた。RFLP情報を基に系統樹を作成したところ、概ね地域ごとにまとまった5つのグループに大別され、シイタケ野生株のmtDNAの変異は地理的分布と密接に関係していることが明らかになった。

以上、本研究では高等担子菌類のmtDNAの効率的な単離法を確立し、シイタケ

生活環におけるmtDNAの遺伝様式を解明した。また細胞質置換株を作製し、mtDNAがシイタケの諸形質に及ぼす影響についての知見を得た。さらに、mtDNAのRFLP情報に基づいてシイタケ自然集団内の系統的類縁関係を明らかにした。本研究で得たシイタケのmtDNAに関する新たな知見は、今後mtDNAの影響を考慮した本菌の育種を行う上で有益である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 實
副 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 三 浦 清

学 位 論 文 題 名

シイタケのミトコンドリアDNAの遺伝に関する研究

本論文は6章からなり、図36、表17、文献135を含む頁数137の和文論文であり、別に参考論文15篇が付されている。

シイタケは我が国で栽培されている重要な食用きのこの一つであり、現在までに栽培特性や子実体の形態などが異なる数多くの栽培品種が育成されている。このため、本菌の遺伝・育種学的な基礎研究は比較的に数多く行われている。しかし、これまでの研究のほとんどは核の遺伝子を対象にしたものであり、ミトコンドリアDNA (mtDNA) など細胞質遺伝子を対象とした遺伝・育種学的研究はほとんど見当たらない。本研究では、これまで未知であったシイタケの生活環におけるmtDNAの遺伝様式の解明を行うとともに、mtDNAがシイタケの形質表現にどのような影響をおよぼすかについての検討を行った。さらに、mtDNAのRFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism) 情報に基づいてシイタケ自然集団内の系統的類縁関係についての解析を行った。

mtDNAのRFLPをマーカーにしてmtDNAの遺伝様式を解明するために、まずシイタケにおけるRFLP分析のためのmtDNAの単離について検討した。シイタケの凍結乾燥菌糸体から抽出した全DNAをビスベンズイミド/CsCl平衡密度勾配遠心したところ、2本の蛍光バンドが検出された。シトクロムcオキシダーゼサブユニットI遺伝子とのハイブリダイゼーションの結果、上部のバンドがmtDNAであることが確認できた。日本産、パプア・ニューギニア産、ニュージーランド産のシイタケ野生株3菌株から単離したmtDNAの制限酵素分解物の泳動パターンにはそれぞれ差が認められ、シイタケ種内におけるmtDNAのRFLPの存在を明らかにすることができた。また、本研究で行ったmtDNAの単離法を応用してシイタケ以外の高等担子菌類5種（ヤナギマツタケ、ウシグソヒトヨタケ、マイタケ、タモギタケおよびヒラタケ）からもRFLP分析に充分量（乾燥菌糸体1gから20～50 μ g）のmtDNAを単離することができ、種々の制限酵素によって容易に切断することができた。

mtDNAのRFLPパターンをマーカーにして、シイタケの交配にともなうmtDNAの遺伝様式を解析した。その結果、交配にともなうmtDNAの遺伝様式は交配接触部を境界にして核受容側の一核菌糸体の保有するmtDNAのみを一方的に受け継ぐ片親遺伝であることが明らかになった。また、シイタケのmtDNAは二核菌糸体から子実体、さらにその担子孢子由来の一核菌糸体へと変異することなく受け継がれることが明らかになった。一方、シイタケのプロトプラスト融合においては、融合親系統とは異なるRFLPパターンを示すmtDNAを保有する融合株が認められたことから、プロトプラスト融合によってmtDNAの組換えが起こることが示された。

正逆交配とプロトプラスト培養法による脱二核化処理を組み合わせることにより、特定の二核菌糸体の核構成を変えことなく別の菌株が保有する細胞質と置換することが可能なことを見出した。本研究で作製したシイタケの細胞質置換株は目的とするmtDNAのみを保有するものであることがRFLP分析によって確認され、ある菌株の細胞質を別の菌株のものに置換できる有効な方法であることが示された。また、細胞質置換株間の子実体発生量に差が生じる場合が認められ、mtDNAがシイタケの形質表現に少なからず影響をおよぼしていることが明らかになった。

国内外から採集された野生シイタケ51菌株からそれぞれmtDNAを単離し、それらを制限酵素*Bam*HI および*Eco*RI で分解したところ、*Bam*HI 分解では12種類、*Eco*RI 分解では24種類のRFLPパターンに分けることができた。さらに、両者のRFLPパターンを組み合わせると供試したシイタケ野生株51菌株のmtDNAを28種類のRFLP表現型として類別することができた。RFLP情報を基に系統樹を作成したところ、概ね地域ごとにまとまった5つのグループに大別され、シイタケ野生株のmtDNAの変異は地理的分布と密接に関係していることが明らかになった。

以上、本研究で明らかにしたシイタケのmtDNAの遺伝に関する新たな知見は、今後mtDNAの影響を考慮した本菌の育種を行う上で有益なものになると考える。

よつて審査員一同は、別に行つた学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者福田正樹は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。