

第1章 *Grifola gargal* の形態学および分子生物学的検討

1. 目的

Grifola gargal (アンニンコウ)は、チリ中南部からアルゼンチン南部のパタゴニア地方に分布する木材腐朽菌で、白色から淡黄色の花びらを開いたような形をしており、味が良く、食感にも優れ、杏仁またはアーモンドのような独特の香りを有している。また、同属の *Gfrondosa* (マイタケ)からはさまざまな機能が明らかになっており、*Ggargal* も *Gfrondosa* と同じように機能性に富む食用きのことして期待できる。しかし、*Ggargal* は上述のように生育分布が限られているため、現在までに分類学および分子生物学等の基礎的研究の報告例はほとんどみられない。

このため、本研究では、Singer³⁾ および Rajechenberg ら¹⁹⁾ の南米パタゴニア地方における *Grifola* 属の形態分類と比較しながら、*Ggargal* の形態観察を行ない、さらに rDNA の塩基配列に基づいた *Ggargal* の分類学的な位置を検討するために、internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列を決定した。

2. 材料および方法

2-1 供試菌

G.gargal の形態観察には、株式会社 岩出菌学研究所保有の菌株のうち、人工栽培にて子実体を形成させた IWADE-GG010, 2002 年から 2003 年にかけてチリの Osorno および Valdivia にて採取した野生株 GG014, GG015 および GG016 を用いた。

rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析および RFLP 解析には、ペプトン・グルコース・酵母エキス・寒天培地 (PGYA 培地: グルコース 4%, 酵母エキス 0.3%, ポリペプトン 0.3%, 硫酸マグネシウム七水和物 0.1%, リン酸二水素カリウム 0.1%, 寒天 1.5%) で培養した IWADE-GG000 および GG010 を使用した。

2-2 培養方法

G.gargal の子実体形成は以下の方法により行なった。広葉樹木粉とフスマを 4:1 の割合で混合し、水を加えて含水率を約 65% に調整後、その 2.5kg をポリプロピレン製栽培袋に充填し、121℃で 120 分間滅菌した。これにあらかじめ培養しておいた供試菌を接種して、20℃の培養室にて暗黒下で培養し、菌糸体を培地全体に蔓延させた後に、15℃、湿度 95%RH の発生室に移動させ子実体を発生させた。

2-3 rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

DNA の抽出:PGYA 培地で前培養した *G.gargal* 菌糸体をピンセットで引っ掻く程度, 1.5mlの遠心チューブにいれ CTAB 法¹¹⁰⁾ を用いて DNA を抽出した. 試料に 300 μ l の 2 \times CTAB を加え, チューブごと液体窒素中に入れて凍結させ, その後 65 $^{\circ}$ C の水槽にいれる融解の操作を 3 回繰り返す, その後、ホモジナイザーで組織を破壊した. 65 $^{\circ}$ C の水槽中に 1 時間入れた後, 300 μ l のクロロフォルム:イソアミルアルコール=24:1 を加えて攪拌した. 13,000rpm で 10 分間遠心分離を行い, 上層を新しいチューブに移した. 300 μ l のイソプロパノールを加えて転倒攪拌し, -20 $^{\circ}$ C で 20 分間保存した後に, 15,000rpm で 10 分間遠心分離を行なった. 上澄みを除き, 70%エタノールを 500 μ l 加えチューブ内壁を洗浄した. 15,000rpm で 5 分間遠心分離を行い, 上澄みを取り除き乾燥させた. 乾燥後 60 μ l の TE Buffer を加え, TE サンプルとした. TE サンプルを滅菌水で希釈し, rDNA-ITS 領域の塩基配列の決定および RFLP 分析に用いた.

rDNA-ITS 領域の PCR 増幅:rDNA クラスターの 5.8S 領域を含む ITS 領域を PCR 法により増幅した. PCR 反応は, チューブ当たり 25 μ l の容量で行い, 反応液の組成は 5unit の *rTaq* polymerase, 2.5 μ l の 10 \times PCR Buffer, 2.5 μ l の dNTPmixture, および ITS 領域の増幅用プライマーとして, ITS1, ITS4を各 1 μ l ずつ加え, 1 μ l の希釈 TE サンプルを加えて計 25 μ l とした. 反応条件は熱変性 95 $^{\circ}$ C で 35 秒, アニーリング 55 $^{\circ}$ C で 55 秒, 伸長 72 $^{\circ}$ C で 45 秒を1サイクルとして 40 サイクル行い, 最初の熱変性を 94 $^{\circ}$ C で 1.25 分間, 最後の伸長を 72 $^{\circ}$ C で 10 分間行なった.

サイクル・シーケンシング反応:シーケンシング反応は DTCS Quick Start Kit を使用して行

なった。反応は 3 μ l の DNA, Premix 2 μ l, 5 \times シーケンス Buffer 3 μ l, および 4pmol のプライマーITS1もしくはプライマーITS4を含む 20 μ l の溶液中で行なった。反応終了後、反応液を精製し、Genetic Analyzer を用いて塩基配列の決定を行なった。

塩基配列データの解析:塩基配列データの解析は ClastalW¹³⁹⁾ を用いてアライメントを作成した。

系統樹作成:系統樹は、塩基配列データをもとに菌株間の遺伝的距離を算出し、Tree View を使用して編集し、NJ 法 (Phylogram) にて系統樹を作成した。

2-4 RFLP 分析

ITS1とITS4のプライマーを用いたPCR法によりrDNA-ITS領域を増殖させ、制限酵素 *Hinf* I および *Hae*IIIを用いた RFLP 解析を行なった。制限酵素 *Hinf* I および *Hae*IIIの処理は、PCR産物 5 μ l と 4unitの制限酵素 0.4 μ l および制限酵素に添付の Buffer を適量加えた計 5 μ l の溶液中で実施した。反応条件は 37 $^{\circ}$ C, 4 時間~1 晩とした。制限酵素処理した PCR 産物の電気泳動には、エチジウムブロマイド(10mg/ml)を含んだ 4%のアガロースゲル (Nusieve3:1) を用いた。電気泳動装置を使用し、室温条件下において 100V 定電圧で約 30 分の泳動を行った。UV 照射下で検出されたバンドパターンを写真撮影した。

3. 結果および考察

3-1 形態観察

Ggargal の人工栽培した IWADE-GG010 およびチリで採取した野生株 (GG014, GG015, GG016) を供試し形態観察を行なった。これら供試菌の子実体は共通の基部から伸展する多数の花びら状の集合体よりなり、傘は無数に分岐しており、扇状～へら形。表面はクリーム色で平滑。管孔は白色、孔口は不規則に切り込んでおり、肉も白色 [Photo 2-1: (a), (b), (c)], 胞子は楕円形、無色、平滑で非アミロイド、KOH 水溶液を加えると、胞子の内側に粒状の突起が見られる場合が多い [Photo 2-1: (d), (e), (f)]. 担子器は4個の突起が付く棍棒状であることが観察でき [Photo 2-1: (g), (h), (i)], シスチジアは無い。これらの結果は Singer³⁾ および Rajechenberg ら¹⁹⁾ の *Ggargal* の形態分類とほぼ一致した。また、光学顕微鏡下において胞子および担子器の大きさを測定した結果を示した (Table 1-1)。担子器の大きさに関しては Singer および Rajechenberg らの報告と一致したが、胞子の大きさに関しては供試菌では 1 μ m 程度と小形の傾向にあった。これに関しては、*Gfrondosa* の胞子の大きさは 5.5~9 \times 3.5~4¹⁰⁹⁾ と長さにかなり差があることから考慮して、個体差によるものではないかと考えている。

また、Rajechenberg らにより *Ggargal* と同じパタゴニアに発生する *Gsordulenta* との形態的な違いが報告されている。供試菌には無柄で、寒天培地上では繊維状の菌糸は認められず、厚壁胞子も確認できた。これらの点に関しては Rajechenberg らの報告による *Ggargal* の形態的特徴と一致した。しかし、菌糸成長に関しては違いがみられ、GG010 は、Rajechenberg らの

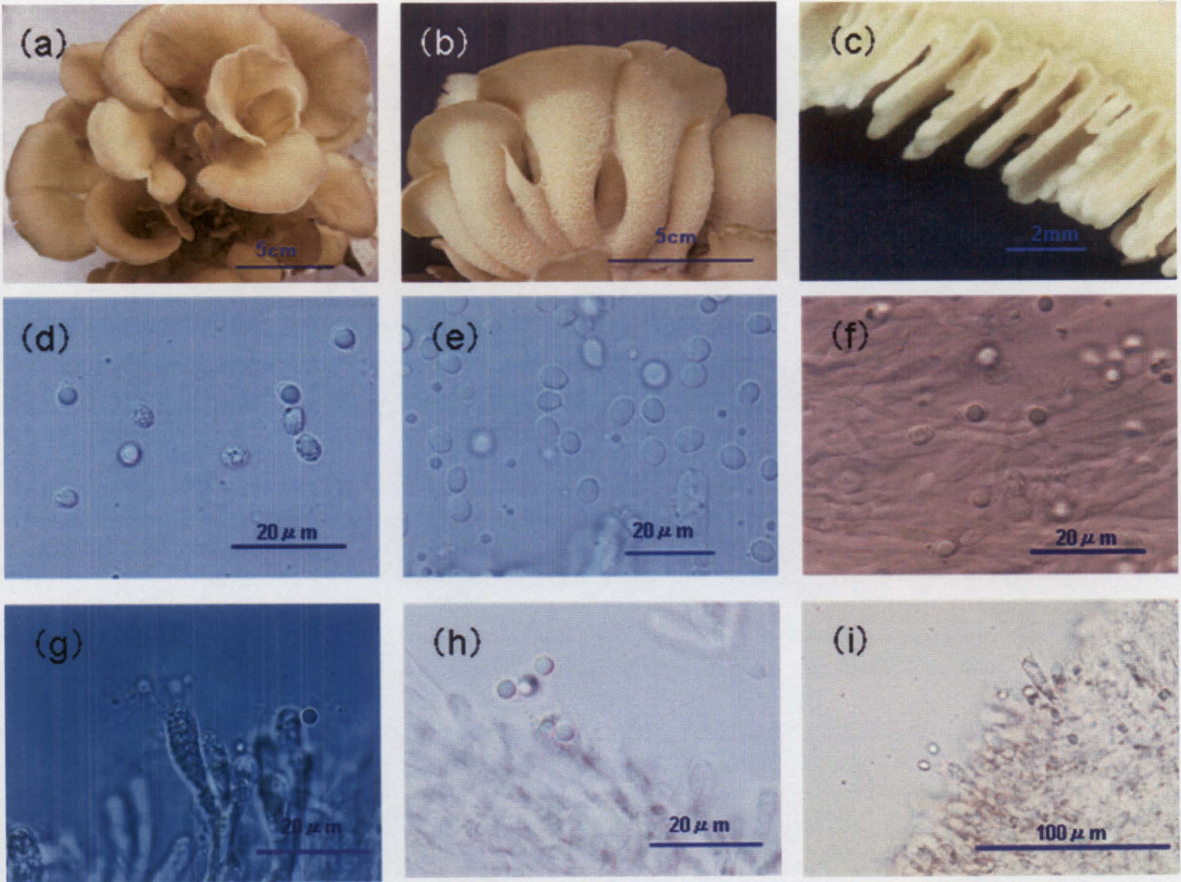


Photo. 2-1 The morphological features of *G.gargal*

Table.1-1 Size of basidiospores and basidia from *G.gargal*

N=30 (μ m)	<i>G.gargal</i> ³⁾	<i>G.gargal</i> ⁹⁾	GG010	GG014	GG015	GG016
Basidiospores	7-7.5 × 5.2-5.5	7-8 × 5-6	5.8 × 4.4	6.0 × 4.7	6.4 × 4.7	6.2 × 4.7
Basidia	24-36 × 7-7.5	25-35 × 7-8	29 × 6.8	27 × 6.7	29 × 6.5	24 × 6.3

報告に比べ約 3 倍も菌糸成長が良かった。*G.gargal* の菌糸成長は培地pH, 培地組成および培養温度に影響されるとの報告⁸⁸⁾もあることから, 菌糸成長が大きく異なるのは培養条件, もしくは菌株の違いによるものではないかと考えられる.

3-2 rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析

近年, 菌類の分類法として従来の形態学特徴を中心とした方法のほかに, 分子生物学手段を援用することが試みられており, きのこにおける分子系統学研究にはrDNA-ITS 領域の解析が多用されている¹¹⁰⁾ことから, *G.gargal* においてもrDNA-ITS 領域を解析し, *Grifola* 属間の比較を行なった. PGY 培地で前培養した *G.gargal* GG010 は CTAB 法で DNA を抽出し, その後 ITS1と ITS4 のプライマーを用いた PCR 法によりrDNA-ITS 領域を増殖させ, 両プライマーを用いた同領域の塩基配列を決定した. その結果, GG010 の ITS 領域の塩基配列は 560bpであった (Fig.1-1). その塩基配列と GenBank から取得した *Grifola* 属の ITS 配列データベースを用いて Blast 検索を行なった結果, 同属の *G.froncosa* (マイタケ)との相同性は 96%であり, 最も相同性が高かったのは *G.sordulenta* の 99%であった.

さらに, ClastalW を用いて多重アライメントを行い, そのデータを基に Tree View を使用し編集して NJ 法 (Phylogram) にて *Grifola* 属菌 3 種の系統樹を作製した (Fig.1-2). 系統樹には Outgroup として, *Polypocus umbellatus* (チョレイマイタケ) の ITS 領域の塩基配列を用いた. ブートストラップ確立は 1,000 回の繰り返しによって求めた. その結果, *G.gargal* と *G.sordulent*

(0-60b) -----GTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTC
 (61-120b) ACGATGCATGTGCACGCCGCTCATCCACTCCCACACCTGTGCACCCTTTGTAGGTCTG
 (121-180b) GTTTGGGTTCCGACGCTTTGTGGCGTTCCGGGCTCCGGCCTTCCTATGTACTTCACACACG
 (181-240b) CTTTAGTATCAGAATGTAATTGCGATAAAACGCACCTTATACAACCTTTCAGCAACGGATC
 (241-300b) TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
 (301-360b) ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT
 (361-420b) GCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATCATCAACCATACATCCTTGTGTTGGATGGGCTTGGAT
 (421-480b) TTGGAGGCTTCTGCCGGCCCTTGTGGTCCGGCTCCTTGAATGAATTAGCTTGATTCTC
 (481-540b) TGCGGATCCGGCTCCCGGTGTGATAATTGTCTACGCGGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGC
 (541-600b) TTCTAACCGTCCTATGGACAACTTATCTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAG-----

Fig.1-1 The internal transcribed spacer of ribosomal DNA (ITS-rDNA) of *G. gargal* (GG010)

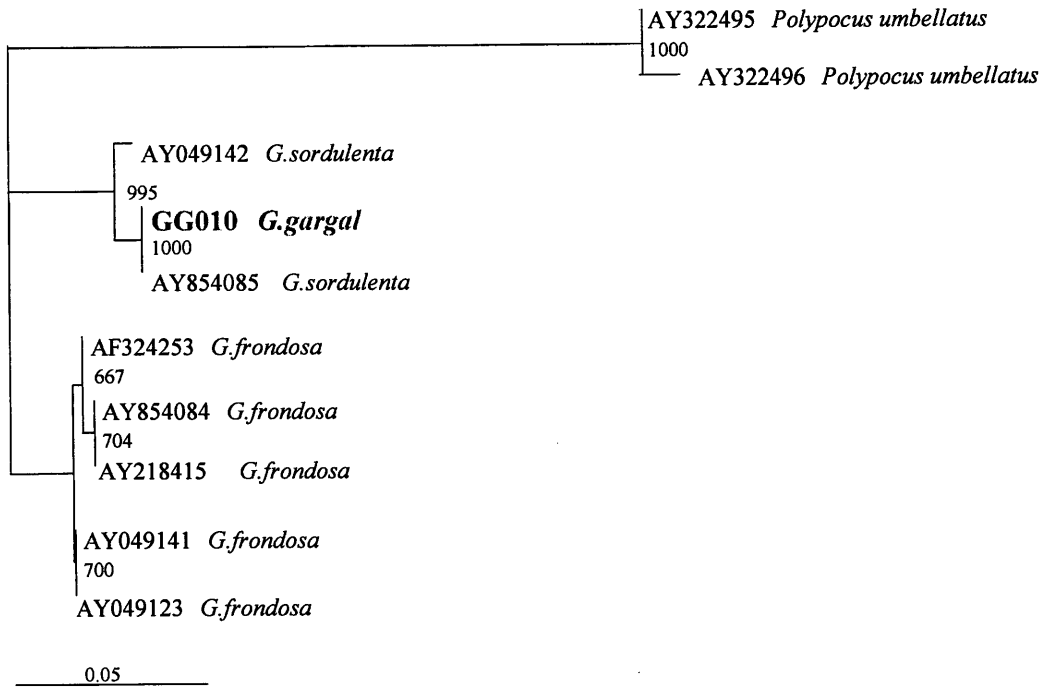


Fig.1-2 The phylogenetic trees of *Grifola* from NJ analysis
 The numbers at the branches a bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 replications of the analysis.

とは同一のクレードを形成し、*Gfrondosa* とは異なるクレードに位置することが明らかとなった。

このことから、rDNA-ITS 領域の塩基配列では *Ggargal* と *Gsordulenta* とを識別することは困難であるということも示唆された。今後は 28SrDNA, β -チューブリン, EF- α 1 等の種々の分子データも集積し、*Ggargal* の分類学的位置および *Grifola* 属の類縁関係の検討を行ないたいと考えている。

3-3 rDNA-ITS 領域の RFLP 分析

人工栽培した *Ggargal* 2 菌株 (GG010, GG000) の子実体および同属である *Gfrondosa* の 1 菌株 (GF555) の子実体を供試し、ITS1 と ITS4 のプライマーを用いた PCR 法により rDNA-ITS 領域を増殖させ、制限酵素 *Hinf* I, *Hae* III を用いた RFLP 分析を行なったところ、*Ggargal* の 2 菌株とも *Gfrondosa* とは異なる位置にバンドが見られ、両者は RFLP 分析にて容易に識別することが判明した (Fig.1-2)。RFLP 分析は *L.edodes* においても融合株の識別に利用できるとの報告¹¹⁾ もあることから、今後 *Ggargal* の品種改良などの応用面において、品種識別、系統の識別および融合株の識別を行なう簡易的な方法として、RFLP 分析が利用できる可能性が示唆された。

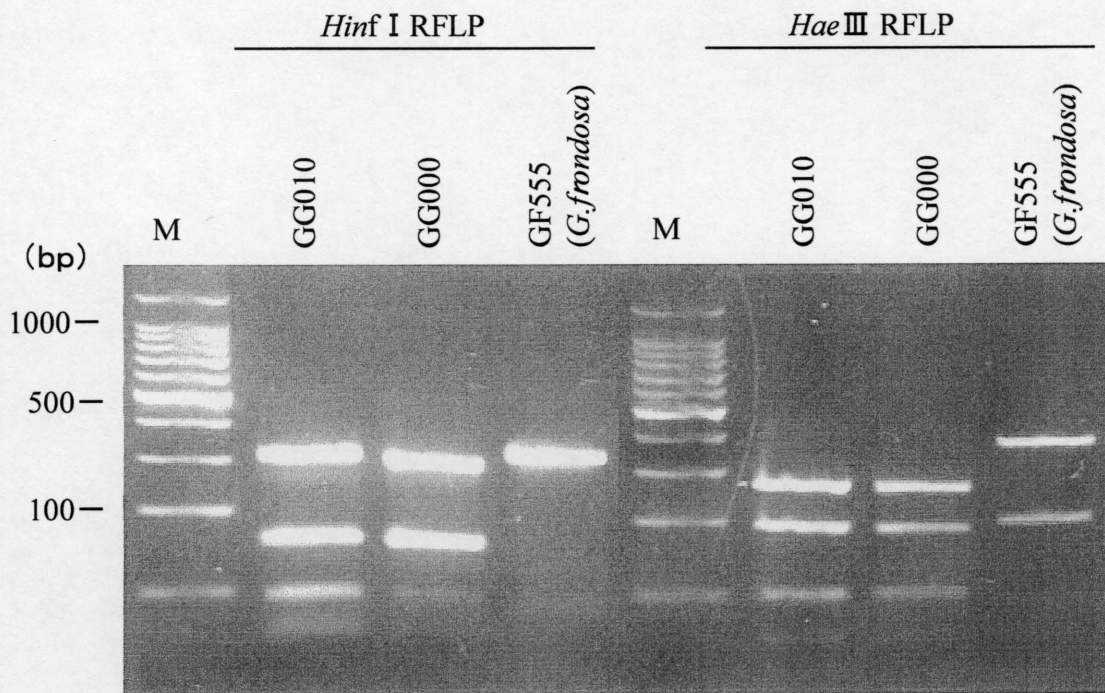


Fig.1-3 The restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of rDNA-ITS region from *G.gargal* and *G.frondosa* using *Hinf* I , *Hae* III.
M= molecular-weight marker

4. まとめ

人工栽培およびチリで採取した *G.gargal* の形態観察を行ない、Singer および Rajechenberg らによる *Grifola* 属菌の形態分類と比較したところ、供試菌は報告されている *G.gargal* の形態特性とはほぼ一致した。さらに、*G.gargal* 菌糸体の rDNA-ITS 領域を増幅させ、同領域の塩基配列を決定した結果、GG010 の ITS 領域の塩基配列は 560bp であり、Blast 検索の結果、同属である *G.frondosa* とは 96%、*G.sordulenta* とは 99% の相同性を持つことがわかった。それらの解析データを基に系統樹を作成したところ、*G.gargal* と *G.sordulenta* とは同一のクレードを形成し、*G.frondosa* とは異なるクレードに位置することが明らかとなった。また、制限酵素 *Hinf* I、*Hae* III を用いた RFLP 分析を行なったところ、*G.gargal* と *G.frondosa* とは異なる位置にバンドが見られ、両者は RFLP 分析にて容易に識別することができることが判明した。