

# ヤナギマツタケのSporeless突然変異体に関する細胞学的研究

|       |   |
|-------|---|
| 誌名    | 財団法人日本きのこセンター菌茸研究所研究報告 = Reports of the Tottori Mycological Institute |
| ISSN  | 03888266  |
| 著者名   | 村上,重幸   |
| 発行元   | 日本きのこセンター菌茸研究所  |
| 巻/号   | 36号   |
| 掲載ページ | p. 29-35  |
| 発行年月  | 1998年12月  |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ヤナギマツタケの Sporeless 突然変異体に関する細胞学的研究 \*

村上重幸

---

### Cytology of sporeless mutants of *Agrocybe cylindracea*

S. Murakami

#### Abstract

Nuclear behavior of all stages of basidiospore formation in the 11 sporeless mutants and in the 6 wild-type strains of the basidiomycete *Agrocybe cylindracea* was microscopically studied by using the HCl-Giemsa staining method in order to determine precisely which process was blocked in the mutants. In all the wild-type basidia, after karyogamy and meiosis had occurred in a basidium, each of the resultant four haploid nuclei migrated on each into four basidiospores and divided once mitotically to produce binucleate basidiospores (Pattern D defined by Duncan and Galbraith, 1972). According to the stages of the blockage, these mutants were classified into the following four types: (1) meiosis stopped at prophase I; (2) meiosis stopped at meta-anaphase I; and (3) basidial development stopped at the sterigma stage; and (4) basidial development stopped at the sterigma stage and the post-meiotic mitosis took place in the basidium.

**Key Words:** *Agrocybe cylindracea*, cytology, post-meiotic mitosis, sporeless mutant.

---

#### 緒 言

きのこの担子胞子は、その菌種にとって繁殖のための重要な器官であるが、栽培きのこより放

出される大量の胞子は (i) アレルギー・きのこ肺の起因, (ii) 商品価値の低下, (iii) 栽培施設内の汚染, (iv) 自然集団における遺伝資源の多様性の浸食, など幾つかの問題を起こす。これらの問題の

---

\* 菌茸研究所研究業績, 第 330 号, (財) 日本きのこセンター・菌茸研究所, 〒 689-1125 鳥取市古郡家 211. Contribution No. 330 of the Tottori Mycological Institute, 211 Kokoge, Tottori, 689-1125 Japan.

解決策として、無孢子性 (Sporeless) の菌株の育成は極めて有効である (Imbernon and Labarere, 1989; Murakami, 1993)。

担子菌類の Sporeless 変異体に関しては、ウシグソヒトヨタケ *Coprinus cinereus* (Schaeff.: Fr.) S.F. Gray [= *C. lagopus* Fr.; = *C. macrorhizus* (Pers.: Fr.) Rea] (Day, 1954; Takemaru and Kamada, 1972; Gibbins and Lu, 1982; Kanda et al., 1989) やヒラタケ属 *Pleurotus* spp. (Eger et al., 1976; Ohira, 1979), スエヒロタケ *Schizophyllum commune* Fr. (Bromberg and Schwalb, 1977), シイタケ *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [= *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] (Hasebe et al., 1991) など幾つかの報告があり、これらは減数分裂や担子胞子形成過程における遺伝的調節機構を解明する上でも重要である。

筆者は、ヤナギマツタケ *Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.) Maire [= *A. aegerita* (Briganti.) Singer] の二核菌糸体片を紫外線処理することにより、多数の Sporeless 変異体を誘発した (Murakami, 1993)。これらの幾つかの菌株について、胞子形成過程のどのようなステージで変異が起きるかを観察したので報告する。

### 材料および方法

供試菌株：Sporeless 変異体内、継代培養に於いても比較的形質の安定した 11 株 (LLS 1, LLS 2, LLS 3, LLS 9, LLS 10, LLS 19T, LLS 21, LS 80, LS 88T, LS 207, TS 48) について調査した。これらはいずれも、菌蕈研究所保存の TMIC 30197 の二核菌糸体片を紫外線処理して、人為的に得た変異体である。また、ヤナギマツタケの胞子形成過程における基本的な核行動を調査するため、TMIC 30197 に加え、菌蕈研究所保存の野生型株 (TMIC 30196, 30198, 30572, 30573, 32404) の 5 菌株についても観察した。

培養：菌株の保存ならびに通常の培養および交配には、CY-2 寒天培地 (グルコース 20g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, ポリペプトン 2g, 酵母エキス 2g, 粉末寒天 20g, 水 1L)

を用いた。子実体の形成は、200ml の PP 瓶に詰めた鋸屑培地 (ブナ鋸屑：米糠 = 3:1, v/v) を用い、20°C, 散光下で行った。

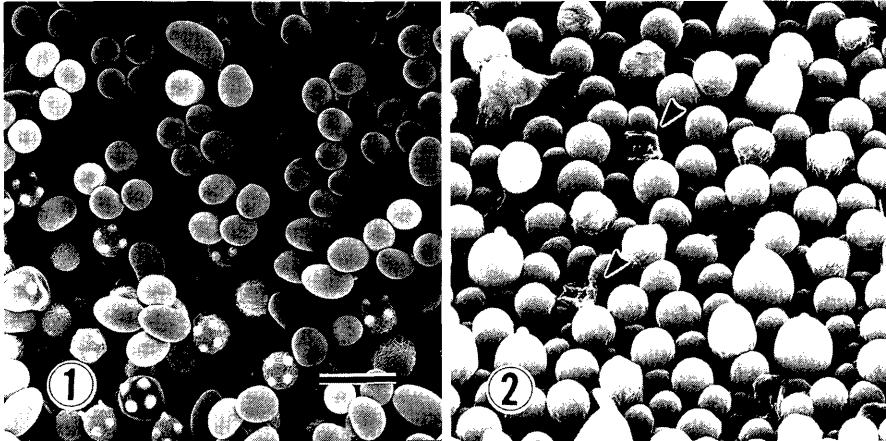
細胞学的観察：核の染色は、Aist (1969) のギムザ染色法に準じて行った。十分に成熟した子実体から、適当な大きさに切り出したひだを、100% エチルアルコールと氷酢酸 (3:1, v/v) の混合固定液に浸し、5°C で 2 時間以上固定した。固定液を 35% エチルアルコールで洗い流し、水道水で 15 分間水洗した。試料を 60°C の 1N-HCl で 7-8 分間加水分解した後、直ちに冷水で洗浄した。この試料を染色ビンに取り、約 1ml の 1/15M リン酸緩衝液を加えて数分間浸漬した後、数滴の塩酸ギムザ液を直接混入して染色した。観察は、染色後 2 時間以降に、押しつぶし法によって行った。走査型電子顕微鏡観察における試料の調製は、Tsuneda et al. (1986) の方法を用いた。

### 結果

観察には、十分に開傘した成熟子実体を用いた。野生型のひだ表面には、Fig. 1 に示すように、様々な発育段階の担子器が並んでおり、成熟した担子器は通常 4 個の長楕円形の担子胞子をつける。一方、Sporeless 変異体のひだ表面には、Fig. 2 に一例を示すごとく、成熟した担子胞子はほとんど観察されず、生育途中で停止し萎縮してしまったものが頻繁に観察された。なお、本菌の担子胞子は褐色の細胞壁で覆われており、胞子形成の有無は肉眼的にも容易に判別できた。

#### 野生型担子器成熟過程における核行動

変異体の観察に先立ち、TMIC 30197 の子実体について、ギムザ染色法を用いて観察した。本菌の担子器における核の融合から減数分裂の過程は、シイタケやスエヒロタケなど多くの担子菌類で報告されているものと、基本的には同じであった。即ち、若い担子器で対合した 2 個の単相核は、担子器の肥大成長に伴い、融合した。融合核はすぐに減数分裂にはいり、2 回の分裂を経て 4 個の四分子核を形成した。減数分裂終了後、担子器先



FIGS. 1 and 2. Scanning electron micrographs of gill surface of a wild strain and a sporeless mutant of *Agaricus cylindracea*. Fig. 1. Wild-type (TMIC 30197). Abundant basidia bearing four basidiospores are shown. Fig. 2. Sporeless mutant (LLS 1). Arrowheads indicate the autolyzed basidia. Both figures are the same magnification. Scale bar = 10  $\mu$ m.

端部に通常 4 本の小柄を形成した。小柄先端が膨らんで出来た前胞子体はかなり成熟した頃、四分分子核は小柄を通して胞子中に移行した。胞子中の核は、その後 1 回の体細胞分裂 (post-meiotic mitosis) を行い 2 個の娘核を形成した。この 2 核を保持したまま胞子は成熟して離脱した。同様な核行動が、観察した他の野生型株総てについて確認された。

#### Sporeless 変異体の核行動

上記野生型株の担子器成熟過程における核行動を基準に、変異体がどの様な成熟ステージで異常を生じるかをギムザ染色法を用いて調査した。

ウシグソヒトヨタケでは、担子器の成熟過程に高い同調性があるため (Raju and Lu, 1970)、その変異体の生じた変異ステージの同定が比較的容易である。しかしながら、ヤナギマツタケの担子器の成熟過程には同調性がないため、変異ステージの同定は困難であった。したがって、本研究では、比較的頻繁に観察される担子器の最終成熟ステージを、その変異体の表現形質とみなした。その結果、各々の変異体は以下の 4 つのタイプに類別された。

**Pro-1 タイプ**：これらの変異体のひだは、核融合前 (Prefusion, Fig. 3) あるいは減数第一分裂前期 (Prophase I, Fig. 4) の担子器で大半が占められていた。なお、これらの担子器の中には減数第一分裂前期の核が凝縮傾向にあるもの (Fig. 5) や、非染色性の棍棒状のもの (Fig. 4, 矢印) がしばしば観察されたことから、これらの変異体は、減数第一分裂前期初期に異常を呈するものと思われた。その後の分裂過程に至るものは極めて稀であった。このタイプには、LLS 2, LLS 21 および TS 48 が属した。

**Meta-ana I タイプ**：LS 80 および LS 207 では、減数第一分裂前期には顕著な異常は見られず、Fig. 6 に示すように、担子器の肥大成熟にともない、減数分裂第一中・後期 (Meta-anaphase I) に至った像が高頻度に観察された。しかし、このステージにおいて、Fig. 7 のように染色性の退化と共に細胞質の崩壊を示すものや、染色性を失ったかなり肥大した担子器がしばしば観察された。これらの変異体の担子器は、減数分裂第一中・後期直後に分裂異常や細胞質の崩壊を起こし、その後の成熟が停止したものと考えられた。



FIGS. 3-14. Various stages of sporulation in basidia of the sporeless mutants of *Agrocybe cylindracea*. HCl-Giemsa staining. Fig. 3. Prefusion nuclei in young basidia. Fig. 4. Prophase I (arrowheads) and degenerated basidium at this stage (arrow). Fig. 5. Condensed nucleus at prophase I. Fig. 6. Meta-anaphase I. Fig. 7. Meta-anaphase I. Cytological abnormality occurs at this stage. Fig. 8. Basidium bearing sterigmata and prespores (arrow). Fig. 9. Nuclear migration toward abortive sterigma. Fig. 10. Shrank tetrad nuclei. Figs. 11 and 12. Eight-nucleate basidia resulting from mitotic divisions of the four post-meiotic nuclei within the basidium. Figs. 13 and 14. Abnormally swelled basidia. Figs. 3-5. Pro I type. Figs. 6 and 7. Meta-ana I type. Figs. 8-10. St type. Figs. 11-14. PMM type. All figures are the same magnification. Scale bar = 10 μm.

St タイプ：LLS 1 ならびに LS 88T では、減数分裂の過程は正常に行われ、結果として四分子核が形成され、小柄（Sterigma）を形成した担子器像が頻繁に観察された。これら小柄を形成した担子器の中には、Fig. 8 に示す様に小柄先端が膨らみ前胞子体形成初期のものと見られるものも観察されたが、その数は極めて少なく、大半のものには前胞子体形成の兆候が見られなかった。しかも、小柄形成数に異常が見られ、1-3本の小柄を持つ担子器がしばしば観察された。さらに、四分子核の小柄への移行がみられるものの、侵入できず小柄で止まっているもの (Fig. 9) や、四分子核が異常に凝縮しているもの (Fig. 10)、細胞質が崩壊し萎縮してしまったものと思われる担子器像 (Fig. 2) がしばしば観察された。

PMM タイプ：LLS 3, LLS 9, LLS 10 および LLS 19T には、St タイプ同様の小柄形成期の担子器に加え、Figs. 11-14 に示すように、担子器内で Post-meiotic mitosis が起こり 8 個の核を有する担子器が多数観察された。また、これらの変異体においても小柄形成数の異常を生じたものが多数観察された。さらに、なかには Figs. 12-14 に示すように担子器側部が異常に膨れ、エビ状に曲がった形態変異も観察された。

考 察

ヤナギマツタケ野生型株の担子器成熟過程における核行動を調査した。その結果を Fig. 15 に模式化して示した。図に示すように、減数分裂に引き続き担子胞子内に移行した四分子核は、Post-meiotic mitosis を起こし 2 個のコピー核を生じた。2 個の核はそのまま残存し胞子は成熟した。この一連の核行動は、Duncan and Galbraith (1972) の云う Pattern D に相当する。これらの現象は、調査した野生型株総てに観察されることから、本菌の基本的な核行動パターンと考えられる。

Kanda et al. (1989) は、ウシグソヒトヨタケの Sporeless 変異体の細胞学的研究から、これらの変

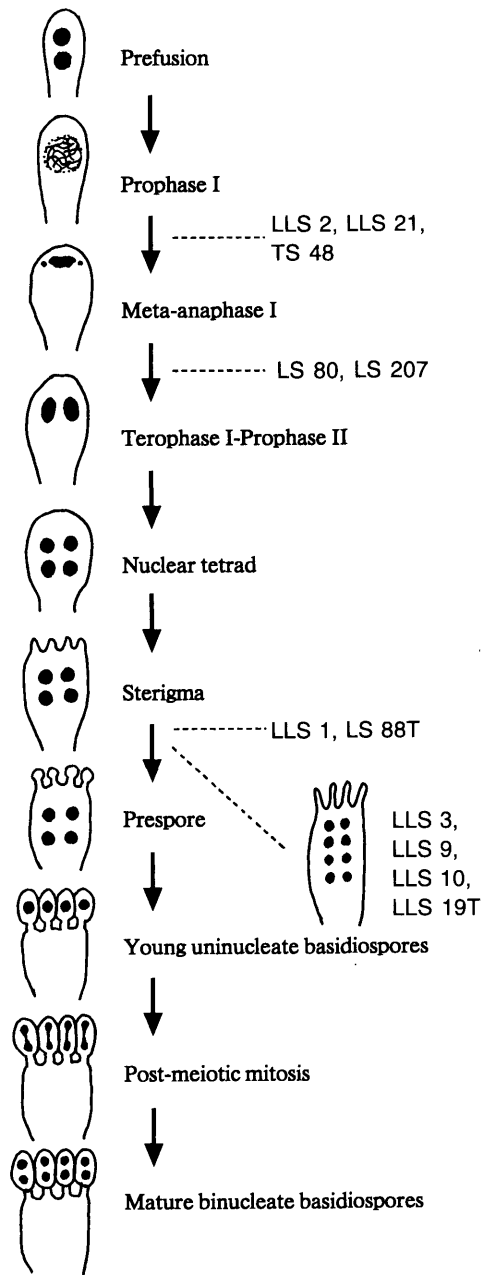


FIG. 15. Successive nuclear events of basidial development in *Agrocybe cylindracea*. The approximate timing of the termination point in each of the mutant strain is indicated by broken line.

異体が4つの変異ステージにクラス分けできることを報告している。今回、ヤナギマツタケにおいて、野生型株の核行動パターンを基本形として、11株の *Sporeless* 変異体の変異ステージの特定を行ったところ、減数第一分裂前期で止まるもの (Pro-I)、減数第一中・後期で止まるもの (meta-ana I)、小柄を生じ前胞子を生じるが成熟しないもの (St)、担子器内で Post-meiotic mitosis を行うもの (PMM)、の4つのタイプに分類できた。各々の変異体株の変異ステージを、野生株の核行動と対比して、Fig. 15 に示した。

Gibbins and Lu (1982) は、ウシグソヒトヨタケの若い担子器において2核の対合状態で停止し、減数分裂に移行しない変異体を検出し、これらが S-phase に DNA 複製を行わないことを報告している。今回 Pro I タイプとして分類したヤナギマツタケの変異体は、明らかに他と比較して若い核融合前の担子器が多く、減数分裂への移行の遅延を思わせる。あるいはヒトヨタケと同様な調節機構の損傷が起こっているのかもしれない。今後、組織化学的な研究が望まれる。

今回特定した St タイプの変異体は、ウシグソヒトヨタケ (Kanda et al., 1989) やシイタケ (Hasebe et al., 1991) に見られる St タイプに相当する。この場合、小柄の異常形成ならびに前胞子体の成熟不良により、四分子核の胞子への移行が妨げられるのに加え、担子器細胞質の急速な崩壊によって異常を呈するものと考えられる。

PMM タイプは、St タイプ同様、小柄の異常形成ならびに前胞子体の成熟不良に起因するが、担子器細胞質の崩壊が比較的緩やかなため Post-meiotic mitosis に至ったものとも考えられ、St タイプのリーケージと見なすこともできる。しかし、ヤナギマツタケ同様、Pattern D の核行動を示すウシグソヒトヨタケにおいて (村上, 1989)、数多くの *Sporeless* 変異体が作出されているにもかかわらず、担子器内で Post-meiotic mitosis を行う変異体は報告されていない。また、Hasebe et al. (1991) は、シイタケにおいて St タイプの変異体に関する詳細な細胞学的観察を行ったが、本菌の

場合も担子器内での Post-meiotic mitosis は見られていない。これらのことから、PMM タイプには St タイプとは別の調節機構の介在も想定されることから区別して提示した。なお、正常なシイタケ (Murakami and Takemaru, 1985) やキツネタケ属 *Laccaria* spp. (Mueller et al., 1993) などで、稀に胞子形成に異常を生じた場合、その担子器内で Post-meiotic mitosis を起こすことが観察されており、このことから小柄への核の移動と前胞子の形成は、互いに独立した事象である可能性が示唆されている。

St および PMM タイプの小柄形成数に異常が観察された。同様な現象は、ウシグソヒトヨタケ (Day, 1954; Tani et al., 1977) やスエヒロタケ (Bromberg and Schwalb, 1977) でも観察され、さらに、Hasebe et al. (1991) は、シイタケの *Sporeless* 変異体の観察から、その形質を支配する遺伝子が小柄形成初期過程にも影響を及ぼすことを示唆した。今回観察した PMM タイプの担子器には形態異常を示すものがあることから、これらの変異は担子器の細胞壁の代謝系にも関与する可能性が考えられる。

## 摘 要

ヤナギマツタケの担子器成熟過程における核行動を、ギムザ染色法により観察した。その結果、本菌の核行動は、Duncan and Galbraith (1972) の提示する Pattern D に相当する事を明らかにした。次に、この基本的核行動パターンを基に、11株の *Sporeless* 変異体の変異ステージの特定を行ったところ、以下の4つのタイプに分類できた。

- (1) 減数第一分裂前期で止まるもの (Pro-I), 3株。
- (2) 減数第一中・後期で止まるもの (Meta-ana I), 2株。
- (3) 小柄を生じ前胞子を生じるが成熟しないもの (St), 2株。
- (4) 担子器内で Post-meiotic mitosis を行うもの (PMM), 4株。

引用文献

- Aist, J.R. 1969. The meiotic apparatus in fungi, *Ceratocystis fagacearum* and *Fusarium oxysporum*. *J. Cell Biol.* **40**: 120–135.
- Bromberg, S.K. and Schwalb, M.N. 1977. Isolation and characterization of temperature sensitive sporulationless mutants of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 477–481.
- Day, P.R. 1954. A cytoplasmically controlled abnormality of the tetrads of *Coprinus lagopus*. *Heredity* **13**: 81–87.
- Duncan, E.G. and Galbraith, M.H. 1972. Post-meiotic events in the Homobasidiomycetidae. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **58**: 387–392.
- Eger, C., Eden, C. and Wissig, E. 1976. *Pleurotus ostreatus* breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theoret. Appl. Genet.* **47**: 155–163.
- Gibbins, A.M. V. and Lu, B.C. 1982. An ameiotic mutant of *Coprinus cinereus* halted prior to premeiotic S-phase. *Curr. Genet.* **5**: 119–126.
- Hasebe, K., Murakami, S. and Tsuneda, A. 1991. Cytology and genetics of a sporeless mutant of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **83**: 354–359.
- Imbernon, M. and Labarere, J. 1989. Selection of sporeless or poorly-spored induced mutants from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and selective breeding. *Mushroom Sci.* **12**(Part 1): 109–123.
- Kanda, T., Goto, A., Sawa, K., Arakawa, H., Yasuda, Y. and Takemaru, T. 1989. Isolation and characterization of recessive sporeless mutants in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 526–529.
- Mueller, G.J., Mueller, G.M., Shih, L. and Ammirati, J.F. 1993. Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales). I. Meiosis and postmeiotic mitosis. *Amer. J. Bot.* **80**: 316–321.
- 村上重幸. 1989. 担子菌ウシグソヒトヨタケにおける倍数性の研究. *菌蕈研報* **27**: 1–55.
- Murakami, S. 1993. Genetics and breeding of spore-deficient strains in *Agrocybe cylindracea* and *Lentinus edodes*. In: "Mushroom biology and mushroom products," (ed. by Chang, S.T., Buswell, A.B. and Chiu, S.W.), pp. 63–69. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Murakami, S. and Takemaru, T. 1985. Nuclear behavior during basidiospore formation in *Lentinus edodes*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **26**: 253–260.
- Ohira, I. 1979. Sporulation-deficient mutant in *Pleurotus pulmonarius* Fr. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **20**: 107–114.
- Raju, N.B. and Lu, B.C. 1970. Meiosis in *Coprinus*. III. Timing of meiotic events in *C. lagopus* (sensu Buller). *Can. J. Bot.* **48**: 2183–2186.
- Takemaru, T. and Kamada, T. 1972. Basidiospore development in *Coprinus macrorhizus*. I. Induction of developmental variations. *Bot. Mag. Tokyo* **85**: 51–57.
- Tani, K., Kuroiwa, T. and Takemaru, T. 1977. Cytological studies on sporeless mutant in the basidiomycete *Coprinus macrorhizus*. *Bot. Mag. Tokyo* **90**: 235–245.
- Tsuneda, A., Murakami, S., Nishimura, K. and Miyaji, M. 1986. Pleomorphism and conidiogenesis in *Rhinocladiella atrovirens* from beetle galleries. *Can. J. Bot.* **64**: 1112–1119.