

特集：病原力低下因子利用による果樹類紋羽病の遺伝子治療

## ユニバーサルイノキュラムの開発

鳥取大学農学部生物資源環境学科 あ  
い  
会  
も  
り  
森 み  
見  
な  
が  
永 た  
だ  
忠 の  
り  
つ  
と  
む  
力  
広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科

## はじめに

ユニバーサルイノキュラムとは、病原力低下因子（菌類ウイルス）を保持し、それを自然界のすべての非保持株に伝達可能な菌株を意味する。これまで報告されている菌類ウイルスは、細胞外からの宿主細胞への感染機構をもたず、細胞内で複製を繰り返しているだけであるため、ウイルス様粒子（Virus Like Particle：VLP）とも呼ばれる。したがって、菌類ウイルスの伝播は、ウイルス保持株と非保持株間の菌糸融合によってしか起こらないと考えられている（GHABRIAL, 1998）。しかし、菌類には、体細胞不和合性という機構（遺伝的に異なる菌糸同士が融合すると細胞死が起き、菌類ウイルスなどの移行を阻止する機構）が存在し、ウイルスは容易に菌株間を移行することはできない（GLASS et al., 2000）。

紫紋羽病菌 (*Helicobasidium mompa*) は、担子菌類に属し、白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) は子のう菌類に属す糸状菌であるが、これまで、体細胞不和合性を解析する上で重要な細胞学や遺伝学に関する報告はほとんどなかった。筆者らは、ユニバーサルイノキュラムを選抜するためには、まず、ライフサイクルの様々なステージにおける核相や核型の変化を知ることが最も重要であると考え、解析を行った。その結果、両紋羽病菌の細胞学・遺伝学に関するいくつかの知見が得られたので、それを紹介する。

## I 紫紋羽病菌

## 1 紫紋羽病菌の核相

DAPI \*1 染色した紫紋羽病菌の担子胞子および種々の菌株の菌糸の蛍光顕微鏡観察を行った結果、担子胞子、単担子胞子分離菌株および大部分の野生株 \*2 の核数は 2 核であった。したがって、紫紋羽病菌は、ライフサイクルを通じ 2 核であることが示唆された。しかしながら、また、野生株の一部の菌株は継代培養中に 2 核であったものが 1 核化した（モノカリオン株）。このモノカリオン株が、核の脱落により生じたものなのか、あるいは、核融合により生じたものなのかを調べるため、モノカリオン株を単相化試薬（ベノミル \*3）で処理したところ、2 核化した菌株が取得できた（ベノミル処理株）。これらの菌株の倍数性を調べるため DAPI 染色した核の蛍光顕微鏡像の画像処理を行い、各菌株の核の蛍光量を比較した（表-1）。その結果、それぞれの菌株の核の蛍光量の相対的比は、およそ、ベノミル処理株：単担子胞子分離菌株および野生株：モノカリオン株 = 1：2：4 であった。したがって、ベノミル処理株はハプロイド（1 倍体）、単担子胞子分離菌株および野生株はディプロイド（2 倍体）、モノカリオン株はテトラプロイド（4 倍体）であると推定された（表-1）。また、モノカリオン株が 4 倍体であったことから、モノカリオン株は核融合によ

表-1 紫紋羽病菌の各種菌株の主な細胞学・遺伝学的性質

|                       | 核数                | 倍数性                | 異核共存性    |
|-----------------------|-------------------|--------------------|----------|
| 担子胞子                  | 2 核               | 未調査                | ホモカリオン   |
| 単担子胞子分離菌株             | 2 核 <sup>d)</sup> | 2 倍体 <sup>d)</sup> | ホモカリオン   |
| 野生株 <sup>a)</sup>     | 2 核               | 2 倍体               | ヘテロカリオン  |
| モノカリオン株 <sup>b)</sup> | 1 核               | 4 倍体               | ヘテロカリオン  |
| ベノミル処理株 <sup>c)</sup> | 2 核               | 1 倍体 <sup>d)</sup> | ヘテロカリオン？ |

<sup>a)</sup> 自然界から分離した菌糸由来の菌株、<sup>b)</sup> 継代培養することによりモノカリオン化した野生株、<sup>c)</sup> モノカリオン株をベノミル処理して得られた菌株、<sup>d)</sup> 核数・倍数性は不安定。

Development of Universal Inoculums. By Tadanori Aimi and Tutomu MORINAGA

(キーワード：生活環, RFLP, 子のう菌, 担子菌, 核相, 核型)  
\*1 DNA に intercalate する蛍光色素。化学名：4,6-diamidino-2-phenylindole.

\*2 本稿では自然界から分離した菌糸由来の菌株を野生株と称する。

\*3 略名はベンレート。殺菌剤として使われる農薬の一種。菌類のβ-チューブリンの重合を阻害する効果がある。化学名：methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazole-2-ylcarbamate.

り生じたことがわかった。また、このモノカリオン株は安定で、容易に2核菌糸に戻ることはなかった。このような紫紋羽病菌の特異な倍数性は、担子菌でありながらクランプ結合をつくらない本菌の菌糸内の核の分布を均一にするためのメカニズムと関係があるのではないかと考えられる (AIMI et al., 2001)。

## 2 紫紋羽病菌の核型

紫紋羽病菌は、担子菌であるが、きのこ類に特有のクランプ結合をつくらない。また、紫紋羽病菌はライフサイクルを通じ2核であると考えられるため、形態や細胞構造の違いからはヘテロカリオンとホモカリオンを区別することができない。菌類の核型は、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて染色体を分離し菌株間の比較を行い決定するのが一般的であるが (ZOLAN, 1995), パルスフィールドゲル電気泳動を行うためには、 $10^8$ 個/mlのプロトプラスト数が必要である。しかし、市販の細胞壁溶解酵素による紫紋羽病菌菌糸のプロトプラスト化は不可能であった。そこで、それぞれの菌株の核型をテロメリック・フィンガープリント法およびシングルコピー遺伝子をマーカーとしたDNA多型解析法を用いて調べた。

多くの真核生物の染色体の両端(テロメア領域)には、(TTAGGG) $n$ の繰り返し配列が保存されていることが知られている (石川, 1997)。テロメリック・フィンガープリント法は、この(TTAGGG) $n$ をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行い、DNAフィンガープリントを得る方法である。得られるバンドの本数と染色体数の間には、

$$\text{テロメアの数} = \text{染色体数} \times 2$$

の関係があり、本法により染色体数の推定が可能である。紫紋羽病菌の場合、ネガノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) から、クローン化した(TTAGGG) $_{34}$ をプローブとしたハイブリダイゼーションを行うと、単担子胞子分離菌株では11~23本、また、野性株では33~39本のバンドが検出できた。したがって、単担子胞子分離菌株の染色体数は10本前後、大多数の野性株では20本前後であることが推定された。以上の結果から、単担子胞子分離菌株の染色体数は、野性株のものとは約半数であることから、単担子胞子分離菌株はホモカリオン、多数の野性株はヘテロカリオンであると考えられた (AIMI et al., 2003a)。次に、紫紋羽病菌のライフサイクルが、ヘテロタリックであるか、ホモタリックであるか調べるためシングルコピー遺伝子をマーカーとしたDNA多型解析を

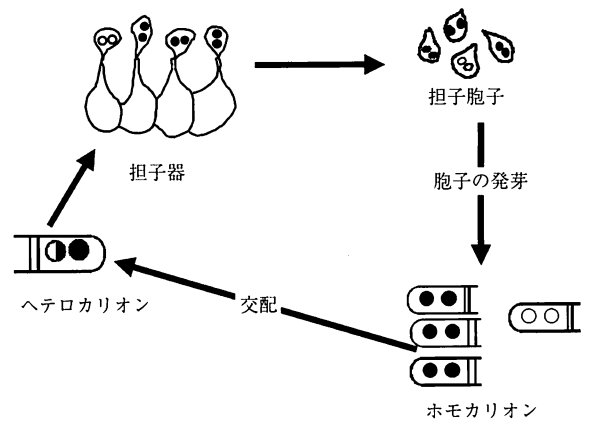


図-1 紫紋羽病菌の生活環

行った。ハプロイドゲノム当たりシングルコピーであるGタンパク質 $\alpha$ サブユニット遺伝子1 (*hga1*)をプローブとして同一子実体から分離した担子胞子由来の単担子胞子分離菌株およびその親株を用いてDNA多型解析を行った。その結果、親株においては、対立遺伝子である*hga1-1*、*hga1-2*の両方が検出できたが、単担子胞子分離菌株からは、*hga1-1*または、*hga1-2*のいずれかしか検出できなかった。このことから単担子胞子分離菌株はホモカリオンであり、その親株である野性株はヘテロカリオンであることがわかった。また、同一子実体から分離した担子胞子由来の単担子胞子分離菌株における*hga1-1*遺伝子と*hga1-2*遺伝子の分離比が1:1ではなく、5:19すなわち約1:3の比であったことは、親株の細胞内の2倍体核が均一ではない可能性を示唆している (AIMI et al., 2003b)。

## 3 紫紋羽病菌の生活環

これまでの研究で、紫紋羽病菌の生活環を明らかにすることができた (図-1)。紫紋羽病菌の場合、2核のホモカリオンの胞子が発芽し、その結果生じたホモカリオンの菌糸同士が交配することによりヘテロカリオン化し2核2倍体となる。その後、子実体形成および減数分裂を経て、2核・ホモカリオンの担子胞子を生成するという、ヘテロタリックな生活環をしていると考えられる。

## 4 紫紋羽病菌のユニバーサルイノキュラム

紫紋羽病菌の場合、自然界から分離した全ての野性株は、2核・2倍体・ヘテロカリオンであるため、これらの菌株間の菌糸融合はすべて不完全融合\*4であったと考えられ、野性株はユニバーサルイノキュラムには適さないことがわかった (AIMI, et al., 2002a)。しかし、単担子胞子分離菌株が、ホモカリオンであることから、担子菌類に特有なダイーモン交配様の交配システム (ホモ-

\*4 不完全融合=吻合部分で細胞死を伴う菌糸融合。

テロ交配)を利用した dsRNA の伝達が期待できる。すなわち、病原力低下因子を保持した交配型の異なる数種の単担子孢子分離菌株を混合した、ユニバーサルイノキュラム・ミックスとしての開発が現実的であると思われる。

## II 白紋羽病菌

### 1 白紋羽病菌の核型と生活環

子のう菌類に属する白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) の子のう胞子は1核であったが、単子のう胞子分離菌株、自然界から分離した菌糸由来の野性株\*2ともに2核であった。

単子のう胞子分離菌株および種々の野生株が、同一の核型を有するかどうかを明らかにするため、上述のテロメリック・フィンガープリント法により核型を解析した。その結果、ネナガノヒトヨタケのクローン (TTAGGG)<sup>34</sup> とハイブリダイズしたバンドの本数は、菌株当たり12~14本であったことから、7本前後の染色体をもっていることがわかった。また、染色体数を野生株のものと同胞子分離菌株のものとを比較した結果、両者に差がなく、野生株と単胞子分離菌株は、同一の染色体数をしていると考えられることから、白紋羽病菌の大部分の菌株は、ホモカリオンであると考えられた (Aimi, et al., 2002b)。

白紋羽病菌の種々の菌株が、ヘテロカリオンか? ホモカリオンか? を調べるため、シングルコピー遺伝子 (*rpo1*: フェノールオキシダーゼ1遺伝子) をプローブとしたDNA多型解析を行った。同一の子のう殻由来の単胞子分離菌株(子株)とその子座から分離した親株(図-2, A株)のゲノムDNAを切断しサザンブロットを行った。その結果、*rpo1* とハイブリダイズしたバンドは、いずれの菌株においても1本であり、*rpo1* 遺伝子は、ハプロイドゲノム当たりシングルコピーであった。しかし、親株と同一のパターンを示す子株と、親株と異なるパターンを示す子株が存在し、同一のパターンを示す子株となるパターンを示す子株の比は、およそ1:1であった。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析においても同様な結果が得られた。このことから、親株も子株と同様に、2核のホモカリオンであり子のう胞子を形成する際には、本実験で用いた親株(図-2, A株)ともう一つの別の親株(図-2, B株)が必要で、この2種類の親菌株同士が交配した後、減数分裂を経て、子のう胞子が生じると考えられる。以上の結果は、白紋羽病菌も子のう菌類の中で非常によく研究されているアカパンカビ (*Neurospora crassa*) と同様なヘテロタリッ

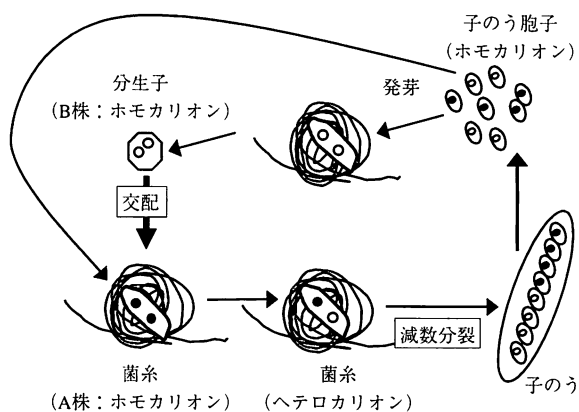


図-2 白紋羽病菌の生活環

ク生活環をしていることがわかった(図-2) (Aimi et al., 2003c)。

### 2 白紋羽病菌の菌糸融合

白紋羽病菌の種々の菌株の遺伝的な背景を推定するため、自然界から分離された菌糸由来の野性株と単胞子分離菌株を、また、同一の子のう殻から分離した単胞子分離菌株とその親株を総当たりで掛け合わせ、スライドカルチャー菌糸融合観察法により観察を行った。菌糸融合部分の細胞死の有無の判定は、菌糸融合部分をエチジウムブロマイド (EtBr)-アクリジンオレンジ (AO) で二重染色し、蛍光顕微鏡で観察する方法を採用した。EtBr-AO二重染色法は、動物細胞などにおいてアポトーシスの検出に利用されている方法である。AOで染色すると生細胞・死細胞を問わず細胞膜を透過し核は緑色に染まる。しかし、EtBrは、細胞膜が正常に保たれていない死細胞の細胞膜は透過できるが、生細胞の細胞膜は透過できない。したがって、死細胞の核のみがオレンジ色に染まることから、細胞の生死の判定ができる (Aimi et al., 2002a)。このEtBr-AO二重染色法を用いて、菌糸融合部分の細胞の生死判定を行った結果、ほとんどすべての掛け合わせ、すなわち、野性株同士、単胞子分離菌株と野性株、同一の子のう殻から分離された単胞子分離菌株同士のいずれの場合においても不完全融合が観察された (Aimi et al., 2002c)。

### 3 白紋羽病菌のユニバーサルイノキュラム

菌糸融合観察の結果から、白紋羽病菌の場合は、ホモカリオンの菌糸同士であっても菌糸融合によるヘテロカリオン化が極めて起こりにくい。したがって、野生株をユニバーサルイノキュラムとして利用する場合は、菌糸同士の融合に頼るのではなく分生子を利用する等の検討が必要であろう。交配も同様な、分生子と菌糸の接触か

ら始まるようなシステムで行われていると思われる。また、菌糸を用いる場合は、種々の変異株を分離し、それを接種源として利用する等の菌株の育種が必要であると考えられる。

### おわりに

両紋羽病菌の細胞学・遺伝学は、これまで誰も手を付かなかった未知の領域であったため、研究を進めていく上では、かなり困難を伴った。しかし、この難易度に比列したかのように、子の菌や担子菌に関する“常識”と一致しない事実が数多く発見できたように思われる。本研究で明らかにできた両紋羽病菌の生活環や細胞学・遺伝学的な知見により、ユニバーサルイノキュラムの開発にある程度の道筋が開けたと考えられる。しかし、菌類の体細胞不和合性の発現に影響を及ぼす因子は、もともと菌が持っている遺伝子に規定されているものだけではない可能性が考えられる。既に述べたように、菌類に体細胞不和合性が存在する理由の一つに、菌類ウイルスの伝播の阻止が挙げられる。筆者らが行った研究では、両紋羽病菌において、遺伝的に同一系統と思われる菌株同士の菌糸融合において、菌類ウイルスを保持していない株間の菌糸融合では細胞死は起きないが、菌類ウイルス保持株と非保持株の間では細胞死が起きた(未発表データ)。いずれの場合も遺伝的に同一系統と考えられる菌株同士の菌糸融合であるため、本来は細胞死が起きな

いはずであるが、菌類ウイルス保持株と非保持株間の菌糸融合で細胞死が起きたことは、ウイルスの存在が原因で細胞死へのプログラムが働いた可能性が考えられる。したがって、菌類ウイルスが菌糸融合後の細胞死に少なからず影響を及ぼしていることが示唆され、体細胞不和合性を解析していくうえで、ウイルスの存在は無視できないと考えられる。今後、ユニバーサルイノキュラムを実用化していくうえでは、各菌株の保持する菌類ウイルスの種類やその保持・非保持の体細胞不和合性の発現に対する影響を調べ、菌株の育種と菌類ウイルスの育種を同時に行っていく必要があるだろう。

謝辞：本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構より委託をうけて実施した新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業「病原性低下因子利用による果樹類紋羽病の遺伝子治療」に関する研究から得られたものである。

### 引用文献

- 1) AIMI, T. et al. (2001) : Mycoscience 41 : 247 ~ 254.
- 2) ——— et al. (2002a) : Curr. Microbiol. 44 : 148 ~ 152.
- 3) ——— et al. (2002b) : FEMS Microbiol. Lett. 217 : 95 ~ 101.
- 4) ——— et al. (2002c) : J. Basic Microbiol. 42 : 147 ~ 155.
- 5) ——— et al. (2003a) : Mycol. Res. 107 : 1055 ~ 1059.
- 6) ——— et al. (2003b) : ibid. 107 : 1060 ~ 1068.
- 7) ——— et al. (2003c) : Mycoscience 44 : 389 ~ 395.
- 8) GHABRIAL, S. A. (1998) : Virus Genes 16 : 119 ~ 131.
- 9) GLASS, N. T. et al. (2000) : Annu. Rev. Genet. 34 : 165 ~ 186.
- 10) 石川冬木 (1997) : 実験医学 15 : 1800 ~ 1805.
- 11) ZOLAN, M. E. (1995) : Microbiol. Rev. 59 : 686 ~ 698.

## 登録が失効した農薬 (15.12.1 ~ 12.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造業者又は輸入業者）登録失効年月日。

### 「殺虫剤」

- アレスリン・マラソンエアゾル  
13689 : ポロボン A (日本農薬(株)) 2003/12/24
- アレスリン・MEP エアゾル  
13690 : ポロボン B (日本農薬(株)) 2003/12/24
- エチオン乳剤  
6632 : トモチオン乳剤 (シンジェンタ ジャパン(株))  
2003/12/19
- エマメクチン安息香酸塩乳剤  
19840 : ホクコーアファーム乳剤 (北興化学工業(株))  
2003/12/22
- 脂肪酸グリセリド乳剤  
20608 : レインコート (富士グリーン(株)) 2003/12/9
- 臭化メチルくん蒸剤  
1546 : メチブロン (警戒剤入 2号) (帝人化成(株))  
2003/12/20
- スピノサド水和剤  
20567 : 日曹スピノエース顆粒水和剤 100 (日本曹達(株))  
2003/12/26
- ダイアジノン粒剤  
11292 : 金鳥ダイアジノン粒剤 3 (大日本除虫菊(株))

2003/12/19

- ピリダフェンチオン乳剤  
19785 : オフナック 100 (シンジェンタ ジャパン(株))  
2003/12/5
- フェンプロパトリン・マシン油乳剤  
18871 : アグロスザンナ乳剤 (住友化学工業(株)) 2003/12/26
- CVMP 水和剤  
15325 : 理研ガードサイド水和剤 ((株)理研グリーン)  
2003/12/17
- DDVP 乳剤  
18865 : ACCDDVP50% 乳剤 (BASF アグロ(株))  
2003/12/26
- 18866 : ACCDDVP 乳剤 75 (BASF アグロ(株)) 2003/12/26
- MEP・NAC 粉剤  
13659 : 住化スミナック粉剤 15 (住友化学工業(株))  
2003/12/10
- MPP 粒剤  
11265 : クミアイバイジット粒剤 (クミアイ化学工業(株))  
2003/12/19  
(46 ページへ続く)