玉川大学農学部研究教育紀要　第10号：65–71（2025）
Bulletin of the College of Agriculture, Tamagawa University, 10, 65–71（2025）

【研究報告】

殺線虫活性を有するヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）P456株の単核菌糸体作出とテスター株の選抜

石﨑孝之

要　約

きのこの育種，特に分子育種学的アプローチにおいて，交配可能な単核菌糸体ペアを確保することは極めて重要である．しかし，殺線虫活性が報告されているヒラタケP456株では，これまで単核菌糸体が作出されていなかった．本研究では，P456株の子実体由来担子胞子から20系統の単核菌糸体を作出し，総当たり交配試験により各系統の交配型（*A1B1*，*A2B2*，*A1B2*，*A2B1*）を同定した．また，これらの形態的特徴，菌糸伸長速度，および気中菌糸密度を評価した結果，交配型に依存せず少なくとも6タイプに分類された．以上の結果を踏まえ，本菌を分子育種研究における標準株として利用するため，不和合性組み合わせにおける生理反応が明瞭であり，かつ菌糸伸長速度が互いに類似しているという基準で，各交配型から1系統ずつテスター菌株を選抜した．

キーワード：ヒラタケ，交配型因子，単核菌糸体，二核菌糸体

緒言

ヒラタケ（*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.）は，低カロリーでありながらビタミン・ミネラルなどの重要な栄養素を含み，抗酸化作用や免疫調整効果が知られている．消費者の健康志向を受け世界的に需要が拡大している．また，培地適応性が高く広葉樹・針葉樹おが粉だけでなく，稲わら，コーヒーかすなどの農業副産物を分解できることから，世界中で商用栽培されている（Chang and Miles, 2004）．わが国においては，製造コストの高さからきのこ栽培は年々減少傾向にあるが，ヒラタケ・エリンギを含むヒラタケ類のきのこの新品種の作出が行われ，現在の品種登録数は72にのぼる（農林水産省輸出・国際局知的財産課，2025）．

Thorn et al.（1984）はヒラタケの殺線虫活性について初めて報告し，以来「総合的病害虫・雑草管理」の考え方に基づき，線虫捕食菌を使った線虫病害の防除の試みがされてきた（Kamata, 2008）．ヒラタケによる線虫不動化は，菌糸上に形成するロリポップ状の構造（突起構造）から分泌される毒素によるものとされる（Barron and Thorn, 1987）．この毒素の成分は炭素数10のジカルボン酸である*trans*-2-decenedioic acidと同定されている（Kwok et al., 1992）．さらに，揮発性ケトンである3–オクタノンも，同様の殺線虫活性成分として同定されている（Lee et al., 2023）．これらの生理活性物質は，細胞内の生合成経路によって産生が制御されていると予想され，鍵酵素の遺伝子の過剰発現や遺伝子破壊によりその機能の解明につながると考えられる．筆者は，ヒラタケP456株の殺線虫活性を解析し（Ishizaki et al., 2015），その活性化合物の推定生合成経路に基づく関連遺伝子の研究を，分子育種のアプローチから進めている．

ヒラタケをはじめとする高等担子菌は，その生活環において単核菌糸体と二核菌糸体による2つの栄養増殖ステージを有する．単核菌糸体は，一倍体の担子胞子より発芽した菌糸体である．一方，二核菌糸体は，交配可能な2つの単核菌糸体の接合によって生じる二倍体細胞であり，自然界では特定の条件下で子実体を形成する（Crous et al., 2010）．二核菌糸体は，細胞内に2つの核が共存し，核の分裂および細胞内移動は共役して行われた結果，隔壁部分にクランプ結合（かすがい連結）と呼ばれる特徴的な構造体が形成される．

4極性きのこであるヒラタケの交配型は*A*因子，*B*因子からなる四極性であることが知られている．*A*因子および*B*因子の遺伝情報が両方異なる単核菌糸体の組合せ

玉川大学農学部生産農学科　東京都町田市玉川学園6–1–1
責任著者：石﨑孝之　ishizaki@agr.tamagawa.ac.jp

（$A \neq B \neq$）は互いに和合性があり，交配によってクランプ結合が生じて，子実体形成能を持つ二核菌糸体が形成される．一方，*A*因子が同一で，*B*因子が異なる単核菌糸体の組合せ（*A*因子共通組合せ（$A = B \neq$））では，菌糸体間で核移動は行われるものの，隔壁形成が不全となる．また，*B*因子が同一で，*A*因子が異なる単核菌糸体の組合せ（*B*因子共通組合せ（$A \neq B =$））では，菌糸体接触部にバラージ反応と呼ばれる明瞭な対峙線の形成が確認され，接触部付近の一部の菌糸に偽クランプが形成され核移動は不全となる．さらに，*A*因子および*B*因子の両方が同一の単核菌糸体の組合せ（*A*因子*B*因子共通組合せ（$A = B =$））では，明瞭な菌糸の形態変化は観察されない（堀越ほか，1990）．自家交配株では，父方母方由来の*A*因子と*B*因子の組合せにより*A1B1*，*A1B2*，*A2B1*，*A2B2*の4つの交配型の単核菌糸体が得られ，その存在比は1：1：1：1となる．

きのこの育種プログラムにおいて，単核菌糸体の交配型を同定し，交配可能な単核菌糸体ペアを獲得することは極めて重要である．また，分子育種学的アプローチにおいても，発現ベクター導入の際に用いるレシピエント細胞として，交配型の確定した単核菌糸体が必要とされる．しかし，これまで殺線虫活性を有するP456株においては，単核菌糸体が作出されていなかった．そこで本研究では，P456株の子実体由来の担子胞子から単核菌糸体を20系統作出してそれぞれの交配型を決定したのち，形態的特徴，菌糸伸長速度および気中菌糸蜜度を評価した．これらの結果から各交配型から1系統ずつテスター株の選定を行ったので報告する．

材料および方法

菌株

本研究に用いたヒラタケ二核菌糸体P456株は，独立行政法人森林整備機構森林総合研究所から供与を受けた．

単核菌糸体の作出と形態的特徴

岩瀬ら（2000）の方法を参考にP456株を菌床栽培して子実体を発生・成長させた（図1）．得られた新鮮な成熟子実体の菌傘部を滅菌メスで切断した後，竹串を刺して滅菌水（30 ml）を入れたビーカーの上に，菌摺部が下向きになるように配置した．さらに，その上部を食品用ラップフィルムで覆い室温にて一晩静置した．翌日，ビーカー底部の滅菌水中の担子胞子を遠心分離にて回収し，胞子懸濁液を調製した．血球計算盤を用いて胞子懸濁液濃度を，9 cmシャーレ1枚当たり1.0×10^2個の胞子になるよう調製し素寒天培地上に塗布し，25℃・暗黒下で6日間培養した．

担子胞子から発芽して形成された単核菌糸体は，実体顕微鏡下にて有柄針を用いて切り出し，PDA培地に移植し培養した．その後菌糸が伸長した段階で光学顕微鏡（×400）により観察を行い，単核菌糸体であるかをクランプ構造の形成の有無で確認した（図2）．得られた単核菌糸体20菌株を，P456-sp1からP456-sp20とした．

気中菌糸の密度およびコロニーの形態的性状は肉眼にて観察した．気中菌糸のテクスチャーは，Stalpers（1978）による分類に従った．菌糸伸長速度は，各単核菌糸体をPDA培地の端部に接種し25℃にて7日間培養し，1日あたりの菌糸生長として算出した（矢口，1997）．反復数はn=5とした．



図1　ヒラタケP456株の子実体

交配系解析

単核菌糸体20系統について，1/10PDA培地（PDA粉末3.9 g，寒天末13.5 g，蒸留水1000 ml）上にて，全組合せによる交配試験を実施した．交配試験では，培地上に2系統の菌糸体片（約2 mm×2 mm）を，約5 mm離して接種し，25℃で培養した．両菌糸体の接触部及び周辺部を中心に顕微鏡観察を行い，クランプの形成が認められた組合せを和合性組合せと判断した．さらに，肉眼にて両菌糸体の接触部における対峙線の形成（バラージ反応）の有無を観察し，単核菌糸体の交配型を判定した（野上・北本，1995）．

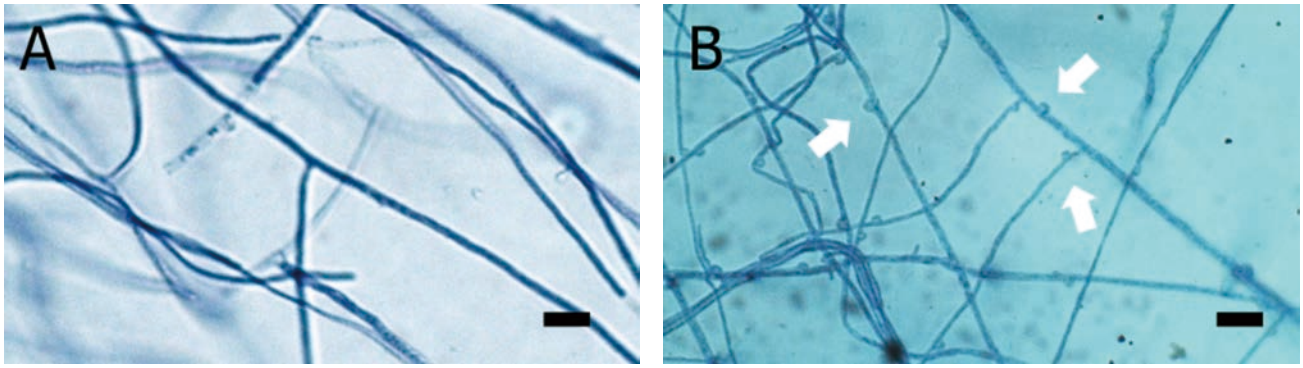


図2　ヒラタケP456株担子胞子由来単核菌糸体（A）とP456株（二核菌糸体）（B）
菌糸体は，ラクトフェノール・コットンブルー染色液にて染色した．クランプ結合を矢印で示す．スケールバーは，10 μmを示す．

結果および考察

ヒラタケP456株子実体の担子胞子より分離した単核菌糸体20株（P456-sp1からP456-sp20）の気中菌糸の密度およびコロニーの形態的性状を観察した．単核菌糸体はPDA培地上において白色の気中菌糸を形成し，親株であるP456株と比較して菌糸密度の低いものが多かった（20株中13株）．形態的には，比較的長い菌糸が放射状に展開する綿毛状（cottony，図3A）と，接種点部分に菌糸クラスターが形成される中央隆起型（centrally raised，図3B）のものが多く，それぞれ11株と5株見られた．その他にも，中心から同心円状に菌糸密度の濃いバンドが形成される輪紋状（zonate，図3C）が3株，菌糸どうしが織り込むように絡み合ってマット状に広がる羊毛状（woolly，図3D）が2株，菌糸束が平行して展開する絹状（silky，図3E）が1株，および菌糸が厚く織り込まれるフェルト状（felty，図3F）が1株から見られ，気中菌糸密度の違いも加えて少なくとも6種類の形態が観察された（表1）．一方二核菌糸体であるP456株はPDA培地上において単核菌糸体に比べ菌糸密度が高く，綿毛状の気中菌糸を形成した．菌糸伸長速度の測定では，単核菌糸体P456-sp11が5.5 mm/dayで最も速く，P456-sp4が2.3 mm/dayで最も遅かった（表1）．Lee et al.（2009）は，ヒラタケ単核菌糸体の菌糸伸長速度は2.4から6.2 mm/dayと報告しており，本研究による結果と大きな違いがなかった．二核菌糸体であるP456株の菌糸伸長速度は2.8 mm/dayであった．Gharehaghaji et al.（2007），Liu et al.（2017）では，ヒラタケ二核菌糸体の菌糸伸長速度は単核菌糸体に比べて速いと報告しているが，本研究においては親株よりも生育の速い単核菌糸体が20菌株中17株作出された．単核菌糸体において，菌糸密度の薄い菌株は菌糸伸長速度が速い傾向があった．P456-sp3およびsp4は菌糸伸長速度が比較的遅く分岐の多い菌糸体を形成しており，結果的に高い菌糸密度を示していた．また，両菌株のコロニーは非同心円状であり，不安定な形質であった．

次に，単核菌糸体の交配型を決定するため20系統について総当たり交配を実施した．両菌糸体の接触部及び

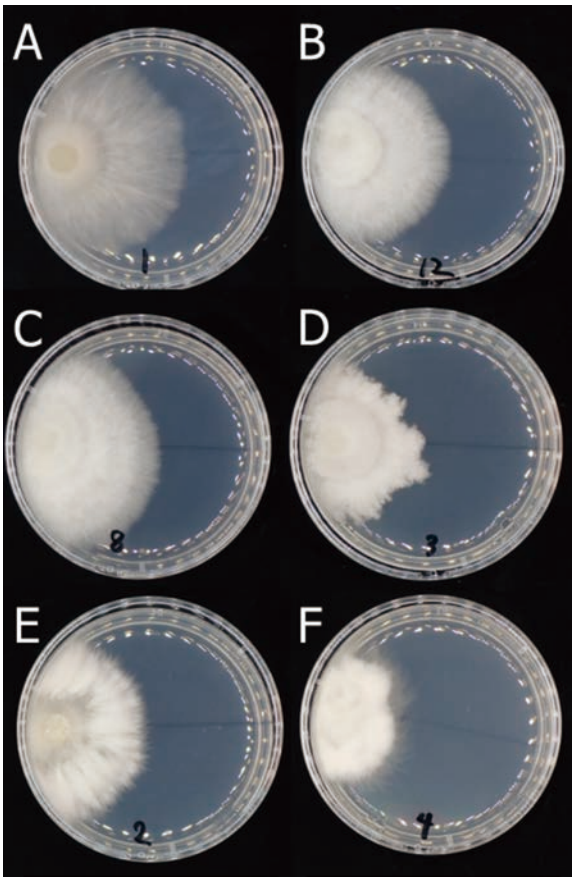


図3　ヒラタケP456株担子胞子由来単核菌糸体の形態的特徴
（A）綿毛状，（B）中央隆起，（C）輪紋状，（D）羊毛状，（E）絹状，（F）フェルト状

表1　ヒラタケP456株担子胞子由来単核菌糸体およびP456株の培養性状

菌株	菌糸伸長速度（mm/day）	気中菌糸密度[a]	コロニーの形態的特徴[b]
P456-sp1	2.9±1.0	＋	A
P456-sp2	3.3±0.6	＋＋	E
P456-sp3	3.9±1.0	＋＋＋	B，D
P456-sp4	2.3±0.6	＋＋＋	D
P456-sp5	3.1±0.7	＋	A
P456-sp6	4.7±0.6	＋	A
P456-sp7	2.8±2.0	＋＋	A
P456-sp8	4.0±0.5	＋＋＋	C
P456-sp9	3.7±0.4	＋	A
P456-sp10	4.2±0.5	＋＋＋	F
P456-sp11	5.5±0.5	＋	A
P456-sp12	3.8±0.4	＋＋＋	B
P456-sp13	4.9±0.1	＋＋	A
P456-sp14	3.6±0.8	＋	A
P456-sp15	3.6±0.2	＋＋＋	B，C
P456-sp16	4.2±0.1	＋	A
P456-sp17	2.5±0.3	＋＋＋	B，C
P456-sp18	3.5±0.3	＋	A
P456-sp19	4.7±1.0	＋＋	A，B
P456-sp20	3.6±1.2	＋	A
P456	2.8±1.4	＋＋＋	A

[a] ＋：薄い，＋＋：厚い，＋＋＋：非常に厚い．
[b] A：綿毛状，B：中央隆起，C：輪紋状，D：羊毛状，E：絹状，F：フェルト状，図3参照．

周辺部を中心に顕微鏡観察を行い，クランプの形成を確認した結果を表2に示す．クランプ形成を確認した組み合わせに着目し，単核菌糸体P456-sp5を不和合性因子*A2B2*とした．本菌株を片親として，P456-sp1，sp10およびsp17を交配させると二核菌糸を生じたため，これらの不和合性因子は*A1B1*であることが示された．反対に，単核菌糸体P456-sp1に対し，P456-sp6，sp7，sp14，sp15，sp18およびsp19は交配可能であったので，これらの不和合性因子は*A2B2*であることが示された．次に，*B*因子共通組み合わせで観察されるバラージ反応に着目した．不和合性因子*A1B1*を持つ単核菌糸体P456-sp1を片親として，P456-sp4，sp9およびsp20を交配させるとバラージ反応を生じたため，これらの菌株の不和合性因子は*A2B1*であると示された．さらに，P456-sp4との組み合わせで交配可能であった，P456-sp2，sp3，sp8，sp11，sp12およびsp13の不和合性因子を*A1B2*と決定された．既報（Eugenio and Anderson, 1968）ではヒラタケは四極性の交配様式を示すことが知られているが．図4および表2に示すように，本結果はこれを支持するものであった．

*A*因子および*B*因子がそれぞれ異なる和合性組合せ（*A1B1*×*A2B2*または*A1B2*×*A2B1*）では，両単核菌糸体の全体にわたりクランプ結合の形成が確認された（図2B）．*B*因子共通組合せ（*A1B1*×*A2B1*または*A1B2*×*A2B2*）では明瞭なバラージ反応が観察された（図4D）．*A*因子共通組合せ（*A1B1*×*A1B2*または*A2B1*×*A2B2*）では両単核菌糸体の接触にともなう変化は観察されなかった．*A*因子*B*因子共通組合せ（*A1B1*×*A1B1*，*A1B2*×*A1B2*，*A2B1*×*A2B1*または*A2B2*×*A2B2*）では，両単核菌糸体の形態変化は観察されなかった．これらの結果は，Lee et al.（2009）の報告を概ね支持するものであった．

単核菌糸体の交配型と気中菌糸密度や形態的特徴に関連性は認められず，それぞれ異なる遺伝子の制御下にあることが考えられた．本研究において解析した20株の単核菌糸体における交配型の分離比は，*A1B1*：*A1B2*：*A2B1*：*A2B2*＝3：7：3：7であったが，解析対象の菌株数を増加させることで，理論的な分離比である1：1：1：1に近づくもの考えられる．以上の結果を踏まえ，菌糸

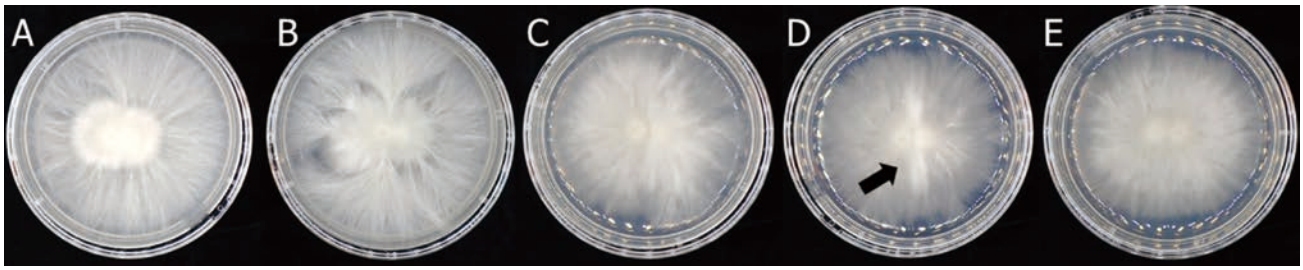


図4　ヒラタケP456株担子胞子由来単核菌糸体の交配
培地の中央付近に単核菌糸体2系統を約5 mm間隔で接種し10日間培養した．バラージ反応を矢印で示す．（A）*A1B1*×*A2B2*（*A*≠*B*≠），（B）*A1B2*×*A2B1*（*A*≠*B*≠），（C）*A1B1*×*A1B2*（*A*＝*B*≠），（D）*A1B1*×*A2B1*（*A*≠*B*＝），（E）*A1B1*×*A1B1*（*A*＝*B*＝）

伸長速度に大きな差がなく明瞭なバラージ反応が確認できる単核菌糸体の組合せを選定し，P456-sp1を*A1B1*テスター株，P456-sp11を*A1B2*テスター株，P456-sp9を*A2B1*テスター株およびP456-sp14を*A2B2*テスター株とし，玉川大学学術研究所菌学応用研究センターに，それぞれTAMA583，584，585および586として寄託した．

本研究において，ヒラタケP456株子実体から得られた担子胞子を用いて単核菌糸体を作出し，その寒天培地上における菌糸の形態的特徴を観察した．その結果から，単核菌糸体20系統の交配型を判定し，P456株が四極性の交配型を有することを再確認した．作出された単核菌糸体は，気中菌糸の密度や形態的特徴に基づき少なくとも6つのタイプに分類された．菌糸伸長速度には，一部関連性が認められたものの，交配型との明確な関係は見られなかった．今後は，ヒラタケP456株の単核菌糸体系統のプロトプラストに発現ベクターを導入することによって，目的遺伝子を過剰発現させることが可能になる．さらに別の遺伝子を高発現する単核菌糸体を作出し，これらを交配させることにより，2遺伝子の二核高発現変異株の作出が期待される．今回，殺線虫活性が詳細に解析されているP456株から交配可能な単核菌糸体系統が得られたことにより，今後，殺線虫活性に関する遺伝子の機能解明がさらに進展することが期待される．

謝辞

本研究の遂行にあたり，菌株を供与頂いた独立行政法人森林整備機構森林総合研究所に感謝申し上げます．菌株の培養をサポートしていただいた玉川大学大学院農学研究科の岸上琴映氏，ヒラタケP456株の栽培子実体を提供していただいた玉川大学農学部生産農学科微生物科学領域の澤村亮太氏に感謝いたします．また本研究を支援してくださった研究室の学生諸氏に感謝いたします．

文献

Barron, G. L. and Thorn, R. G. 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. Canadian Journal of Botany 65: 774–778.

Chang, S. T. and Miles, P. G. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. 2nd ed. CRC Press, London.

Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z. and Samson, R.

表2　ヒラタケP456単核菌糸体の交配結果

		A1B1			*A1B2*							*A2B1*			*A2B2*						
		1	10	17	2	3	8	11	12	13	16	4	9	20	5	6	7	14	15	18	19
A1B1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+
	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+
A1B2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B
A2B1	4	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	20	B	B	B	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A2B2	5	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	14	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	18	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	19	+	+	+	B	B	B	B	B	B	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

＋：クランプ結合あり　—：クランプ結合なし　B：バラージ反応あり

A. 2010. Fungal Biodiversity (CBS Laboratory Manual Series 1). CBS KNAW Fungal Diversity Center, Utrecht.

Eugenio, C. P. and Anderson, N. A. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Mycologia 60(3): 627–634.

Gharehaghaji, A. N., Goltapeh, E, M., Masiha, S. and Gordan, H. R. 2007. Hybrid production of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Kummer. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(14): 2334–2340.

Ishizaki, T., Nomura, N., Watanabe, K. 2015. Screening of mushrooms for nematophagous activity against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Nematological Research, 45(1): 19–25.

岩瀬剛二．2000．ヒラタケ 菌床栽培（日本）．きのこハンドブック（衣川堅二郎, 小川　眞, 編）, pp. 93–97．朝倉書店, 東京.

堀越孝雄, 鈴木　彰．1990．きのこの一生．築地書館, 東京.

Kamata, N. 2008. Integrated pest management of pine wilt disease in Japan: tactics and strategies. in (Zhao B. G., Futai K., Sutherland J. R. and Takeuchi Y., ed.) Pine Wilt Disease, pp. 304–322. Springer, Tokyo.

Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D. and Wicklow, D. T. 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. Journal of Chemical Ecology 18: 127–136.

Lee, B. J., Kim, Y. G., Kim, H. K., Yang, E. S. and Lim, Y. P. 2009. Tetrapolar incompatibility system of *Pleurotus ostreatus* new strain 'Miso'. Journal of Mushroom Science and Production 7(4): 141–149.

Lee, C. H., Lee, Y. Y., Chang Y. C., Pon, W. L., Lee, S. P., Wali, N., Nakazawa, T., Honda., Y., Shie, J. J. and Hsueh, Y. P. 2023. A carnivorous mushroom paralyzes and kills nematodes via a volatile ketone. Science Advantages 9(3), eade4809.

Liu, T., Li, H., Ding, Y., Qi, Y., Gao, Y., Song, A., Shen, J. and Qiu, L. 2017. Genome-wide gene expression patterns in dikaryon of the basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 48: 380–390.

野上友美, 北本　豊．1995．きのこの基礎実験技術（第4回）（実験講座）．きのこの科学 2(4)：177–187.

農林水産省輸出・国際局知的財産課．“農林水産省品種登録ホームページ”．2025．http://www.hinshu2.maff.go.jp（参照 2025–07–15）

Stalpers, J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. Studies in Mycology 16: 1–248.

Thorn, R. G. and Barron, G. L. 1984. Carnivorous mushrooms. Science 224: 76–78.

矢口貴志．1997．実験室における菌類の形態観察と記録法：糸状菌の巨大集落の観察方法．日本菌学会会報 38：41–46.

Isolation and Characterization of the Monokaryotic Mycelia from the Nematocidal *Pleurotus ostreatus* P456

Takayuki Ishizaki

Abstract

In this study, a total of twenty monokaryotic isolates were obtained from basidiospores derived from sawdust- cultivated fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* P456 strain, and their mating types (*A1B1*, *A2B2*, *A1B2*, *A2B1*) were identified through pairwise mating tests. Morphological characteristics, hyphal growth rates, and aerial mycelial densities of these isolates were evaluated, and based on these traits, the twenty isolates were classified into at least six groups, independent of mating type. To establish this strain as a standard for molecular breeding research, tester strains were selected according to the criteria that physiological reactions in incompatible pairings were clearly distinguishable and that hyphal growth rates were mutually similar. This study provides a foundation for molecular breeding using P456 as a standard strain.

Keywords: Oyster mushroom, Mating type factor, Monokaryon, Dikaryon

Department of Agri-production Sciences, College of Agriculture, Tamagawa University, 6−1−1 Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194−8610, Japan