

きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ
等有用食用きのこ類の人工栽培化技術確立への
応用を目指した研究基盤形成
(S1512004)

平成 27 年度～平成 29 年度
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研究成果報告書

平成 30 年 5 月

学校法人名 近畿大学

大 学 名 近畿大学

研究組織名 近畿大学農学部

研究代表者 白坂 憲章

(近畿大学農学部)

はしがき

私ども、近畿大学農学部の研究グループは、文部科学省からの支援を受け、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこの類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」というプロジェクトを、平成 27 年度より 3 年間にわたって進めてまいりました。これまで、このプロジェクトにおいて研究を進めていただいた皆さま、また計画調書の作成から予算執行に関わる事務手続き等において懇切丁寧に教えていただき、ご協力いただいた大勢の皆さまにも心から感謝申し上げます。

本プロジェクトは、手探りで荒野に道標を一つ一つつけながら地図を作っていくような困難を極めたものでしたが、若手の研究メンバーを中心に積極的に取り組んでいただいた結果、きのこを扱った研究の中では際立って独創的で先駆的な成果を残すことが出来たと思っております。このような成果をもとに、今後は学術的な意味で研究が発展していくことはもちろんのこと、マツタケの人工栽培化の実現など、近畿大学の得意とする研究成果の社会実装が進んでいくことを心から祈念する次第です。

最後に、先生方、若手研究者、院生諸君、そしてこれらの研究に関わったすべての皆さん、今後のご活躍を心からお祈りいたしまして御礼の言葉と返させていただきます。皆様どうもありがとうございました。

研究代表者
白坂 憲章

目 次

研究報告書概要	1
研究の概要	2
研究発表の状況	7
その他の研究成果等	11
留意事項及び対応	12
添付資料	13
研究成果報告書	17
栽培検証・研究用きのこ株供給グループ	17
遺伝子・タンパク質解析グループ	29
ビジネスモデルグループ	45
付録	62
プレスリリース等	
原著論文集	

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

平成 27 年度～平成 29 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究成果報告書概要

- 1 学校法人名 近畿大学 2 大学名 近畿大学
- 3 研究組織名 近畿大学農学部
- 4 プロジェクト所在地 奈良市中町 3327-204
- 5 研究プロジェクト名 きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこの類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成
- 6 研究観点 大学の特色を活かした研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
白坂 憲章	農学部応用生命化学科	教授

8 プロジェクト参加研究者数 9 名

- 9 該当審査区分 理工・情報 生物・医歯 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
白坂憲章	農学部・教授	マツタケ等有用新規食用きのこの栽培法開発	マツタケ等有用新規食用きのこの栽培化技術の確立：生化学的アプローチ
種坂英次	農学部・教授	マツタケ等有用新規食用きのこの栽培法開発	マツタケ等有用新規食用きのこの栽培化技術の確立：生態学的アプローチ
岸本憲明	農学部・教授	きのこ類微生物の全ゲノム配列の決定	きのこ類微生物のゲノムデータベースの構築
森 美穂	農学部・准教授	子実体形成機構解明に向けた遺伝子発現動態解析	きのこ類微生物のゲノムデータベースの構築
福田泰久	農学部・講師	子実体形成機構解明に向けたきのこ類微生物のプロテオーム解析	きのこ類微生物のタンパク質データベースの構築
倉田淳志	農学部・准教授	きのこ類微生物の全ゲノム配列の決定	きのこ類微生物のゲノムデータベースの構築
澤畠拓夫	農学部・准教授	マツタケ等有用きのこ菌株の新規分離	有用きのこの類の新規ライブラリー化
大石卓史	農学部・准教授	きのこのブランディングおよびマーケティング戦略	栽培食用きのこのマーケティング戦略の確立
財満信宏	農学部・准教授	きのこに含有される有用成分の分析	栽培食用きのこのマーケティング戦略の確立

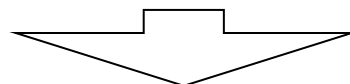
法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 年 月 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1)研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

1980 年代において、日本のきのこの栽培技術は大学から民間の企業へと発信され、大学の研究者が牽引し成長を遂げた分野であったが、それらの技術はシイタケやマッシュルームなど古くから栽培が可能であったきのこの栽培を行ってきた歴史の中で経験的に蓄積されたノウハウを体系的にまとめたものであり、なぜ、どうやって“きのこ”ができるかといった重要な問題はいまだ解決できていない。すなわち、きのこの栽培技術は経験的なノウハウに頼った方法がほとんどであり、同様の発想でこれまで人工栽培が成功していないマツタケを従来通りのアプローチで栽培化するのは困難であると思われる。

本プロジェクトでは、マツタケなど有用食用きのこの類の人工栽培化という課題に立ち向かうためのアプローチとして、きのこの類微生物がどのようにして“きのこ”を作るのかという長い間不明であった問題に取り組み、その研究によって得られた知見を応用して従来の経験的なノウハウに頼らない科学的な裏付けを基礎とした新たなきのこの栽培法を開発しマツタケの人工栽培法の確立を目指した。そのために、現在、断片的にしか存在しないきのこの類微生物のゲノム情報やタンパク質アミノ酸配列情報などのデータベースをエノキタケ、ブナシメジ、エリンギをはじめとする栽培技術及び学術的な知見がある程度蓄積しているきのこや、マツタケと同じ菌根菌で唯一人工栽培が可能となっているホンシメジなどについて構築することが必要である。また、民間企業が自社において栽培のノウハウを開発・発展させるに従い、時代に合わないものとなってきた大学が有する栽培に関する施設や技術を現状に合ったものに更新することにより、大学の持つきのこの類微生物に関する研究開発力を社会に発信し、きのこの栽培へと応用することができるようになると考えられる。また、同時に本プロジェクトで導入する解析機器や栽培施設は、現在のきのこの類微生物の研究分野において最新のものであり、導入後は本学が当該分野の最新データを蓄積・発信するきのこの研究の拠点となると考えられる。その結果として、何よりもマツタケというこれまでに多くの人々が人工栽培に挑戦して成しえなかったきのこの栽培技術を最新の科学によって実現することは、産業的にも科学技術的にも有意義なことであるとともに、同様に栽培化が困難なトリュフやポルチーニといった高付加価値の食用きのこの栽培化技術確立にも寄与できると考えられる。さらに、本プロジェクトでは栽培化技術を確立した新しい栽培したきのこの消費者ニーズを調査し、適正な価格で流通するためのビジネスモデルについても検討することで、きのこ産業の継続的な活性化につないでいくための検討にも取り組んだ。

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

(2) 研究組織

上記の目的を達成するために、相互に関連する 3 つのグループ、①栽培検証・研究用きのこ株供給グループ、②遺伝子・タンパク質解析グループ、③ビジネスモデルグループ、を設定し、それぞれのグループに関連する分野の研究者を配置した。栽培検証・研究用きのこ株供給グループには、種坂教授(栽培施設の維持・管理・運用を担当)、白坂教授(マツタケ等有用新規食用きのこの栽培化技術の確立を担当)、澤島准教授(有用きのこの類の新規ライブラリ化を担)の 3 名、遺伝子・タンパク質解析グループには、きのこ類微生物のゲノムデータベースの構築を担当する岸本教授、倉田准教授、森准教授ときのこ類微生物のタンパク質データベース構築および遺伝子組換え系の開発を担当する福田講師の 4 名、ビジネスモデルグループには大石准教授(きのこのマーケティング担当)、財満准教授(きのこに含有される有用成分の分析担当)の 2 名が配置された。各グループ内において適宜担当者同士の小規模な打ち合わせを、研究代表者(白坂)を交えて行いながら研究を実施した。また、研究代表者はこれら 3 つのグループの研究の進行を統括した。

このプロジェクトに関わった人員ののべ人数は 3 年間で、定時職員 4 名、実験補助(院生)8 名であった。内訳は栽培検証・研究用きのこ株供給グループで定時職員 2 名、実験補助(院生)2 名、遺伝子・タンパク質解析グループで定時職員 2 名、実験補助(院生)5 名、ビジネスモデルグループで PD1 名であった。

本プロジェクトにおいては各研究グループの研究をシームレスに進めるため、以下のような研究グループ間の連携関係を研究代表者を中心として構築した。①遺伝子・タンパク質解析グループの実験に用いるきのこを栽培検証・研究用きのこ株供給グループにより供給する。②遺伝子・タンパク質解析グループで作出した遺伝子組み換え株の栽培検証を栽培検証・研究用きのこ株供給グループで行う。③ビジネスモデルグループにおいて明らかとなったきのこ由来の機能性成分を強化したきのこ栽培を栽培検証グループでおこなう。

(3) 研究施設・設備等

研究施設として、平成 27 年度にきのこ栽培施設(196mm²)を設置し、施設の核となる栽培装置を研究装置として導入した。本施設・装置は連続的に新規きのこの栽培検証、研究用きのこの供給のための栽培に利用されており、栽培検証・研究用きのこ株供給グループの研究者(種坂・白坂)が属する研究室の 35 名が年間を通じて断続的に利用し(8760 時間/年)、月当たり約 60 床(栽培ポット、菌床ブロック合算)、年間総量として 750 床程度の栽培を行った。

一方、研究設備として、平成 27 年度に次の以下の件の機器を導入した。①次世代ゲノムシーケンサー(きのこ類微生物の全ゲノム配列および発現遺伝子の網羅的な解析を行う機器)、②MALDI-TOF/MS(きのこ類微生物のタンパク質データベースの構築および機能性成分の質量顕微鏡解析をおこなう機器)、③プロテインシーケンサー(タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定する機器)。それぞれの機器は、現在、農学部 4319 室に設置されており、本プロジェクトの解析拠点として、各研究グループ間の有機的な連携を図りながら利用されている。①の次世代ゲノムシーケンサーののべ使用回数は 13 回/年、使用時間は 360 時間/年であった。②の MALDI-TOF/MS ののべ使用回数は 252 回(タンパク解析 217 回、質量顕微鏡解析 35 回)/年、使用時間は 5760 時間/年であった。③のプロテインシーケンサーののべ使用回数は 120 回/年、使用時間は 1440 時間/年であった。これらの機器は本プロジェクトの遂行のために効果的に運用されてきた。

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び*を付すこと。

栽培検証・研究用きのこ株供給グループ:

マツタケの栽培化や子実体形成機構の解明など、本プロジェクトにおいては“きのこ栽培”が根幹的な技術として必要であることは明らかである。本課題においては、導入したきのこ栽培施設を運用することにより、これまで大学ではできないといわれていた「きのこを安定的に栽培できる環境」を運用するシステムを構築することが出来た。また、本施設を運用することで研究に利用するきのこの安定的に供給できる体制を確立したとともに、新規に分離したきのこ株の栽培検討を行える環境を整えた。その結果として、マツタケを含む様々な栽培を検討するための基礎的な環境を整えることが出来たといえる。

また、研究に使用する菌株ライブラリの充実という点からは、新たなマツタケ菌株の取得のみならず、アミガサタケ、ショウロ、ホンシメジ、シャカシメジといった新たに栽培化検討を行うための菌株や、^{*1} 子実体形成能を有するトキイロヒラタケ単核株を分離することに成功した。

さらに、マツタケの栽培化に関しては、固体培養において菌糸量を数値化できる手法を新たに開発するとともに、大麦を栄養体とする固体培地を用いることで従来よりも高密度の菌糸の蔓延を短期間で達成できる培養方法を確立できた。

遺伝子・タンパク質解析グループ: ^{*2} マツタケ、^{*3} ブナシメジ、^{*4} エノキタケ、^{*5} トキイロヒラタケなど、これまでにデータベースがなかった全ゲノム情報や発現遺伝子情報などを DDBJ などの公的なデータベースに登録した。

新たに構築したデータベースを利用して、きのこ類微生物のタンパク質をマスペクトル分析のデータから同定するためのスキームを確立し、^{*6} マツタケのグルコアミラーゼ、^{*7} ブナシメジのアミノペプチダーゼ、^{*8} トキイロヒラタケの色素タンパクなどの同定を行うことが出来た。

トキイロヒラタケ孢子由来の単核体全ゲノムデータを詳細に解析し、比較することによって、^{*9} 各単核株間において、保存される SNPs のような小さな変異ではなく、領域ごと遺伝子が欠損するなど現象が認められることが明らかとなった。

さらに、単核体で子実体を形成する能力を持つトキイロヒラタケ単核体を取得するとともに、^{*10} 単核体を用いた異種遺伝子の導入及び発現の手法を確立できた。

ビジネスモデルグループ: ^{*11} 人工栽培されたマツタケに潜在的なニーズが一定以上あることが確認でき、人工栽培に成功した後は比較的高い価格帯でも購買層が存在する可能性が示された。また、^{*12} きのこに含まれる脂質代謝および骨代謝に関わる機能性成分としてシリング酸が同定されるとともに、^{*13} こういった機能性に関して消費者がある程度関心を示す傾向が明らかとなった。

全体的な達成度については、①栽培検証グループにおいて、導入された栽培施設において安定的にきのこが栽培できるようになり、本プロジェクトの根幹である技術を確立することができ、これまで大学において実現できていなかった、きのこ研究の基礎的な環境を整えることが出来たこと、②これまで高密度の菌糸を培養で得ることが出来なかったマツタケにおいて、菌糸体密度の高い菌床を調製できる条件を確立でき人工栽培への道筋をつけることができたこと、③単核体で子実体を形成できるトキイロヒラタケの研究株を取得し、形質転換による異種遺伝子の導入方法を開発できたこと、④アンケート調査の結果、人工栽培マツタケや機能性強化きのこには一定のニーズがあり、取り組むべき課題であることが明らかになったことから、きのこの研究を進めるための研究基盤を形成することが出来た。しかし、マツタケの子実体を形成させるところまでは達成できず、子実体形成機構の解明のための遺伝子破壊のターゲティング手法の確立には至らなかったため、全体としての達成度は 85%程度であると判断した。

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

＜優れた成果が上がった点＞

栽培検証・研究用きのこ株供給グループ: 導入したきのこ栽培施設を運用し、きのこを栽培できる環境を構築できたことにより、これまで大学では不可能とされてきた栽培条件の詳細な検討が可能になった。この成果により、研究に利用するきのこの供給および新規に分離したきのこ株の栽培検討を行えるだけでなく、マツタケなどこれまで栽培方法が明らかになっていないきのこの栽培条件を検討できる環境を整えることが出来た。また、固体培養におけるマツタケの菌糸体量を測定する方法を開発したことにより、これまで、評価できなかった固体培地での菌糸成長を評価できるようになった。その結果、従来よりも高密度に菌糸が蔓延した菌床を短期間で調製できる技術を確立し検証することが可能となった。

遺伝子・タンパク質解析グループ: ^{*2} マツタケ、^{*3} ブナシメジ、^{*4} エノキタケ、^{*5} トキイロヒラタケなど、これまでにデータベースがなかった食用きのこの全ゲノム情報や発現遺伝子情報などをDDBJなどの公的なデータベースに登録し、利用できるようにした。また、^{*1} トキイロヒラタケ胞子由来の単核体より子実体形成能を有する単核株を取得したことにより、遺伝子破壊の影響を従来より簡便に確認できる実験系を確立できた。また、^{*9} 胞子由来の単核体同士的全ゲノム情報の比較から、領域単位での遺伝子の欠損が認められることを明らかにした。さらに、^{*10} トキイロヒラタケ単核体を用いた異種遺伝子の導入及び発現法を確立した。

ビジネスモデルグループ: ^{*11} 人工栽培されたマツタケに潜在的なニーズが一定以上あることが確認でき、人工栽培に成功した後は比較的高い価格帯でも購買層が存在する可能性を明らかにした。また、^{*12} きのこに含まれる脂質代謝および骨代謝に関わる機能性成分としてシリンガ酸が同定されたとともに、^{*13} こういった機能性に関して消費者がある程度関心を示す傾向を明らかにした。

＜課題となった点＞

栽培検証・研究用きのこ株供給グループ: 新たに設置したきのこ栽培施設を運用するうえで、運用1年目において多くの技術的問題が発生した。特にきのこの栽培に使用する栽培試験室は理化学機器である通常の恒温恒湿室とは温度・湿度の調整原理が異なるため、季節ごとにも管理方法が異なり、同じ設定できのこの発生ができない状況が頻発したが、こまめな状況チェックと条件の調整によって、この問題を克服できた。また、固体培地を用いることで従来よりも高密度の菌糸の蔓延を目視では確認できる菌床を調製することに成功したものの、従来の方法と比べてどの程度改善できたかについて定量的な検討が出来ないという問題があったが、固体培地での菌糸体量測定法を開発することにより、この問題を克服できた。

遺伝子・タンパク質解析グループ: マツタケ、ブナシメジ、エノキタケ、トキイロヒラタケなど、これまでにデータベースがなかった全ゲノム情報や発現遺伝子情報などのデータベース登録を開始したが、情報量が多く、解析は終了しているが未登録のデータがまだ多く残っているため、今後も継続的に登録を進めていく必要がある。また、トキイロヒラタケ単核体を用いた異種遺伝子の導入及び発現法を確立できたものの、遺伝子破壊のターゲッティングが可能な実験株の取得には至っておらず、今後も継続的に検討を進めていく必要がある。

ビジネスモデルグループ: 人工栽培されたマツタケに潜在的なニーズが一定以上あることは示されたが、消費者がマツタケのこういった品質に重きを置いているかについての解析は不十分であったため、品質水準(香り、食味等)の検討や、人工栽培マツタケの効果的なマーケティング戦略の検討などを進めていくことが重要である。また、きのこの機能性に期待するに消費者像を特定していくとともに、機能性食品・農産物の認知度を増加させていくためのマーケティング戦略を検討していく必要がある。

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

＜自己評価の実施結果と対応状況＞

プロジェクトメンバーが研究の進捗状況を評価しあうために、平成 28 年 3 月 12 日(土)、平成 29 年 3 月 28 日(火)、そして最終回として平成 30 年 3 月 27 日(火)に近畿大学農学部 311 教室にて研究成果報告会を開催した。このような報告会の後、研究グループごとのミーティングが開催され、プロジェクト代表(白坂)との協議を経て、次年度における研究内容および予算執行について決定した。

＜外部(第三者)評価の実施結果と対応状況＞

京都菌類研究所・所長の山中勝次博士、鳥取大学農学部菌類きのこ遺伝資源センターの霜村典宏教授、京都大学大学院農学研究科の田中千尋教授に、本プロジェクトの研究成果について外部からの評価を依頼し、プロジェクト発足時、年度末成果報告会、最終成果報告会にて進捗状況を評価していただいた。成果報告会等での外部評価委員の意見を参考に次年度のプロジェクトの実施と予算執行の方針を決定した。また、最終成果報告会での成果報告を受けてプロジェクト全体に対して別添えのような評価を得ている(添付書類1、添付書類2、添付書類3)

＜研究期間終了後の展望＞

栽培検証・研究用きのこ株供給グループ:継続的に新規の菌株、特にマツタケの菌株を分譲株・分離株問わず国内外から収集し、栽培に適した菌株の取得を目指していく。また、マツタケの菌床については、現状の 2.5kg サイズからのさらなるスケールアップについて検討し、最終的にはこれまでに移植シロ土壌を用いた子実体発生報告がある 30kg スケールの菌床作成を実現する。並行して、現状の菌床(2.5kg)に対しても子実体形成誘導に必要な刺激(温度、栄養、化合物など)についての検討を進めていく。

遺伝子・タンパク質解析グループ:すでに解析は終了しているが、データベース登録が完了していないバカマツタケ、ホンシメジタケ、マイタケ、タモギタケなどの全ゲノム情報の登録を継続して行っていく。また、さらなるゲノムデータベースの充実を進めることにより、PMF によるきのこ類微生物由来のタンパク質同定の精度を向上させていく。さらに、ゲノム編集などの手法を用いて、トキイロヒラタケ単核体ゲノム中の非相同末端結合(NHEJ)関連遺伝子(Ku70、Ku80、lig4 など)をノックアウトした株を取得し、遺伝子破壊のターゲッティングが可能な実験株の作成を進めていく。

ビジネスモデルグループ: 人工栽培マツタケにおいては、香り、食味といった求められる品質の検討を行うとともに、効果的なマーケティング戦略を検討していく。また同時に、既存のマツタケ産地や市場流通への影響についても検証していく。

きのこの機能性とマーケティング戦略については、きのこの機能性を評価する消費者像を特定していくとともに、機能性の PR 方法等を検討し、販売促進のための機能性の取り扱い方策についても検討を進める。

＜研究成果の副次的効果＞

本プロジェクトにおいて導入した栽培施設は、現状で日本有数の栽培施設であり、特に大学において同等のきのこ栽培ができる環境を運用できる大学は国内にはないといつてよい。また、次世代ゲノムシーケンサーやタンパク質データベース検索機能を有する MALDI-TOF/MS などの分析機器類をきのこ類微生物の研究に用いているケースは少ないことより、きのこ類微生物の研究における国内共同利用の環境を整備することが出来た。この

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

成果により、今後きのこ類微生物のデータベース整備などの事業を推進することが出来るとともに、当該分野における国内外の研究拠点となりうる。

また、ビジネスモデルグループの研究において、新たにきのこに含まれるシリング酸の機能が明らかになったが、本研究成果はすでに特許を申請している。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) マツタケ (2) 人工栽培きのこ (3) 子実体形成機構
 (4) 全ゲノム解析 (5) ゲノムデータベース (6) きのこの形質転換
 (7) タンパク質同定 (8) きのこのマーケティング

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

栽培・研究用きのこ供給 G

1. *Phylloporia lonicerae* (Hymenochaetales, Basidiomycota), a new species on *Lonicera japonica* from Japan and an identification key to worldwide species of *Phylloporia*.; W.M. Qin, X.W. Wang, T. Sawahata, L. Zhou; MycoKeys 30:17-30 (2018)

遺伝子・タンパク質解析 G

1. Taxonomy of actinomycetes in the deep-sea Calyptogena communities and the antibacterial compound produced by *Actinomadura* sp. DS-MS-114, Biotechnology & Biotechnological Equipment, (2017) 31:5, 1000-1006.; Kurata A, Minamino S, Sugiura M, Kokoda K, Tsujimoto H, Numata T, Kato C, Nakasone K, Kishimoto N.
2. Degradation of ionic liquids by UV/H₂O₂ process and CMCase from novel ionic liquid-tolerant alkaliphilic *Nocardia* sp. SSC4, Biotechnology & Biotechnological Equipment, (2017) 31:4, 749-755.; Kurata A, Shimizu S, Shiraishi Y, Abe M, Naito N, Shimada M, Kishimoto N.
3. Antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247. World Journal of Microbiology and Biotechnology, (2017) 33:73, 1-8.; Kurata A, Yamaura Y, Tanaka T, Kato C, Nakasone K, Kishimoto N.
4. *4 Draft Genome Sequence of the Basidiomycetous Fungus *Flammulina velutipes* TR19.; Genome Announc (2016) 4: e00505-16; Kurata A, Fukuta Y, Mori M, Kishimoto N, Shirasaka N.
5. A high-molecular-weight, alkaline, and thermostable β -1,4-xylanase of a subseafloor *Microcella alkaliphila*, Extremophiles (2016), 20, 471-478.; Kuramochi K, Uchimura K, Kurata A, Kobayashi T, Hirose Y, Miura T, Kishimoto N, Usami R, Horikoshi K.
6. Properties of an ionic liquid-tolerant *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 and its extracellular protease. Extremophiles, (2016), 20, 415-424.; Kurata A, Senoo H, Ikeda Y, Kaida H, Matsuhara C, Kishimoto N.
7. Complete genome sequence of the xylan-degrading subseafloor bacterium *Microcella alkaliphila* JAM-AC0309, Journal of Biotechnology. (2016) 221, 32-33.; Kurata A, Hirose Y, Misawa N, Wakazuki S, Kishimoto N, Kobayashi T.

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

8. Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo-shu). Journal of Applied Microbiology 118.4 (2015): 873–880.; Ando, H., Kurata, A., Kishimoto, N.

ビジネスモデル G

1. イメージング質量分析の食品科学への応用: 久後裕菜・山本彩実・森山達哉・財満信宏; J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 64, 11–15(2016)
2. 質量分析イメージング法による脂質の可視化: 久後裕菜・山本彩実・森山達哉・財満信宏; オレオサイエンス 16:225–231.(2016)
3. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry.; Y. Yoshimura, N. Goto-Inoue, T. Moriyama, N. Zaima; Food Chemistry 210: 200–211 (2016)
4. ^{*12} Anti-osteoporotic activity of syringic acid diet in ovariectomized mice.; T. Tanaka, N. Kawaguchi, N. Zaima, T. Moriyama, Y. Fukuta, N. Shirasaka; J. Nat. Med. 71:632–641 (2017)

<図書>

1. 現代菌類学大鑑; 堀越孝雄監修(共訳) 2016 年刊行
2. 食品学Ⅱ; 栢野新市ら編(羊土社)(分担・きのこ類) 2016 年刊行
3. きのこの生理機能と応用開発の展望; 監修 江口文陽(S&T 出版)(分担・マツタケ) 2017 年刊行

<学会発表>

2015 年度

1. Fukuta Y, Iwanaga T, Terashita T, Shirasaka N, Characterization and gene cloning of poroteases from *Lentinula edodes*, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Dec 19, 2015
2. Onuma H, Fukuta Y, Kusuda M, Terashita T, Shirasaka N, cDNA cloning of β -glucosidase gene from *Tricholoma matsutake*, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Dec 19, 2015
3. Fuji Y, Fukuta Y, Shirasaka N, Internal amino acid sequence of pigment from *Pleurotus salmoneostramineus*, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Dec 19, 2015
4. Shirasaka N, Iwamoto K, Fukuta Y, Enzymes for GABA formation in edible mushroom, RGJ congress, June 12, 2015
5. 藤井陽介・山口裕加・白坂憲章・福田泰久, トキイロヒラタケ (*Pleurotus salmoneostramineus*) 由来色素タンパクの構造解析, 日本菌学会第 59 回大会, 沖縄, 2015 年 5 月 17 日
6. 福田泰久・松下朋加・寺下隆夫・白坂憲章, *Lentinula edodes* 由来菌体外酸性プロテアーゼの遺伝子クローニング, 日本菌学会第 59 回大会, 沖縄, 2015 年 5 月 17 日
7. 岩本和子・福田泰久・白坂憲章, 食用きのこ子実体における GABA 生成に関する酵素について, 日本きのこ学会第 19 回大会, つくば, 2015 年 9 月 5 日
8. 大沼広宜・福田泰久・楠田瑞穂・寺下隆夫・白坂憲章, マツタケ(*Tricholoma matsutake*)培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析, 第15回糸状菌分子生物学コンファレンス, 調布, 2015 年 11 月 19 日
9. 福田泰久・白坂憲章, シイタケ培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析, 日本農芸化学会2015年度大会, 札幌, 2016 年 3 月 29 日

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

10. 大庭将矢・福田泰久・白坂憲章, ブナシメジ栽培工程におけるアミノペプチダーゼ群の活性の変動, 日本農芸化学会2015年度大会, 札幌, 2016年3月29日
11. 大沼広宜・福田泰久・亀井健吾・白坂憲章, マツタケ(*Tricholoma matsutake*)培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析, 日本農芸化学会2015年度大会, 札幌, 2016年3月29日

以上を含めて26件

2016 年度

1. Kamei K, Shirasaka N, Purification and Characterization of Xylan Degrading Enzyme from Mycelium of *Tricholoma matsutake*, ISMS 2016, Amsterdam, June 1, 2016
2. Fukuta Y, Shirasaka N, Enzymatic characterization and gene expression analysis of proteases from *Lentinula edodes* ISMS 2016, Amsterdam, June 1, 2016
3. Onuma H, Fukuta Y, Shirasaka N, Expression analysis of polysaccharide hydrolyzing enzyme genes from *Tricholoma matsutake*. ISMS 2016, Amsterdam, June 1, 2016
4. ^{*3,7} 大庭将矢・福田泰久・白坂憲章, ブナシメジ由来アミノペプチダーゼの精製及び遺伝子クローニング, 日本きのこ学会第20回大会, 静岡, 2016年9月8日
5. ^{*2} 大沼広宜・福田泰久・白坂憲章, *Tricholoma matsutake* NBRC30605 株の De novo 解析及び糖質分解酵素の特定, 第68回日本生物工学会大会, 富山, 2016年9月29日
6. ^{*5} 福田泰久・大沼広宜・白坂憲章, *Pleurotus ssalmoneostramineus* L. Vass NBRC31859 株の Whole genome shotgun 配列決定, 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 京都, 2016年11月17日
7. 白坂憲章, キノコ類微生物の子実体形成機構の解明を目指したゲノムデータベースの構築(シンポジウム発表), 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 京都, 2016年11月18日
8. 原健人・大沼広宜・亀井健吾・福田泰久・白坂憲章, マツタケ(*Tricholoma matsutake*)由来菌体外グルコアミラーゼの精製と性質, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月18日
9. ^{*6} 大沼広宜・原健人・亀井健吾・福田泰久・白坂憲章, マツタケ(*Tricholoma matsutake*)由来菌体外グルコアミラーゼの *Pichia pastoris* による分泌発現, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月18日
10. 大庭将矢・福田泰久・白坂憲章, *Hypsizygus marmoreus* 由来アミノペプチダーゼに関する研究, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月19日
11. 田中照佳・川口信久・財満信宏・森山達哉・福田泰久・白坂憲章, キノコに含まれるシリング酸はエストロゲンレセプター非依存的に骨粗鬆症モデルマウスの骨密度減少を抑制する, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月19日
12. ^{*11} 大石卓史・白坂憲章・福田泰久, 人工栽培マツタケに対する消費者選好, 林業経済学会 2016 年秋季大会, 島根, 2016年11月12日

以上を含めて17件

2017 年度

1. Shirasaka N, Kamei K, Onuma H, Fukuta Y, Purification and characterization of a Xylan-degrading enzyme from *Tricholoma matsutake*, IUMS 2017, Singapore, July 18, 2017
2. Onuma, H., Uchiyama, H., Fukuta, Y., Shirasaka, N., Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 15 protein, glucoamylase from ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* and secretory expression in *Pichia pastoris*, IUMS 2017, Singapore, July 18, 2017

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

3. Fukuta, Y., Oba, M., Fuji, K., Shirasaka, N., Studies on functional analysis of metalloprotease and aminopeptidase from *Hypsizygus marmoreus*, IUMS 2017, Singapore, July 18, 2017
4. 波多野彩子・熊谷椎菜・中西祐二・平山朋美・福田泰久・白坂憲章, *Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859 由来メタロプロテアーゼに関する研究, 日本きのこ学会第21回大会, 宮崎, 2017年9月7日
5. ^{*8} 松井葵・米田雄紀・福田泰久・白坂憲章, *Pleurotus salmoneostramineus* 人工栽培における色素タンパク遺伝子発現量の継時的変化, 日本きのこ学会第21回大会, 宮崎, 2017年9月7日
6. ^{*10} 魚川岳登・佐藤魁・川野雄亮・清原昂輝・阿部美穂・福田泰久・白坂憲章, *Pleurotus salmoneostramineus* における形質転換系の開発, 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス, 佐賀, 2017年11月17日
7. ^{*1,9} 佐藤魁・中筋千晶・福田泰久・白坂憲章, *Pleurotus salmoneostramineus* L. Vass NBRC31859 株の単核体の配列解析及びデータベースの構築, 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス, 佐賀, 2017年9月17日
8. 林 紅甫・金村実奈・坂上吉一・城島 透・森 美穂, 有害真菌に対する植物由来の新規抗菌活性物質の探索, 日本防菌防黴学会第44回大会, 大阪, 2017年9月27日
9. 柴富妃那野・楠本 祐介・坂上吉一・城島 透・森 美穂, きのこと由来の有用生理活性物質の探索, 日本防菌防黴学会第44回大会, 大阪, 2017年9月27日
10. ^{*13} 大石卓史・財満信宏・白坂憲章・福田泰久, きこの消費の現状と機能性への期待, 林業経済学会 2017年秋季大会, 福岡, 2017年11月11日
11. 福田泰久・魚川岳登・佐藤魁・川野雄亮・清原昂輝・阿部美穂・白坂憲章, *Pleurotus salmoneostramineus* における形質転換法の開発とその応用, 日本農芸化学会 2018年度大会, 愛知, 2018年3月17日

以上を含めて15件

<研究成果の公開状況> (上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
<既に実施しているもの>

プロジェクト開始時に、<http://www.nara.kindai.ac.jp/mext/mext-kinoko/index.html> を開設し、この中でプロジェクトの内容、メンバー、業績、事業報告などを取り扱っている。

<これから実施する予定のもの>

該当なし

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

14 その他の研究成果等

招待講演

1. 白坂憲章, キノコ類微生物の子実体形成機構の解明を目指したゲノムデータベースの構築(シンポジウム発表), 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 京都, 2016 年 11 月 18 日
2. 白坂憲章, マツタケ研究最前線, 千葉県立博物館 きのことワールド, 2017 年 11 月 23 日, 千葉県立博物館
3. 白坂憲章, 応用微生物が挑むキノコ研究 –マツタケは人工栽培できるか–, 徳島大学研究クラスター 指定クラスター特別セミナー, 2017 年 12 月 1 日, 徳島大学
4. 財満信宏・大石卓史・白坂憲章・森山達哉, 「食品分野における MSI データ使用に対する一般消費者の意識調査」, 質量分析イメージングセミナー2018, 2018 年 2 月 28 日, 島津製作所

メディア・プレスリリース等

1. NHK 「ガッテン」2016 年 4 月 27 日
「新発見！鶏むね肉がこんなにもやわらかくなるとは！」
マイタケを使ったわざについて解説
2. 朝日新聞「あのとき それから」 2016 年 9 月 28 日(夕刊)
マツタケ人工栽培についてコメント
3. 関西テレビ 関ジャニ∞のジャニ勉 2017 年 6 月 21 日放送
「関ジャニ∞の頑固道; 渋谷すばるのしいたけは絶対に食わねえ」でコメント
4. 日本テレビ系 スッキリ 2017 年 11 月 10 日
学祭対決(vs 東農大) きのこと屋 & マツタケ研究
5. 読売新聞 西日本版「大学の経営力 近畿大学4; 産学連携ビジネス」2018 年 2 月 25 日
マツタケ人工栽培についてコメント

特許

1. 白坂憲章、福田泰久、田中照佳、川口信久、沼田史江
骨代謝改善用組成物及び骨代謝改善食品
出願番号: 特願 2017-040722
出願日: 平成 29 年 3 月 3 日
2. 白坂憲章、福田泰久、田中照佳、川口信久、沼田史江
脂質代謝改善用組成物及び脂質代謝改善用食品
出願番号: 特願 2017-040682
出願日: 平成 29 年 3 月 3 日

法人番号	271017
プロジェクト番号	S1512004

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

外部評価を適切に受けること

<「選定時」に付された留意事項への対応>

外部評価を適切に受けるため、きのこの生理・生化学の分野で著名な研究者の方々にプロジェクト開始時より外部評価委員に就任していただき、年度ごとの成果報告会にて成果の評価を行っていただいた。また、外部評価委員の意見を参考にして、研究方針および予算執行の検討を行った。

<「中間評価時」に付された留意事項>

該当なし

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

該当なし

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこの類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」の外部評価についてのコメント

1. 栽培検証・研究試料供給グループ

マツタケの純粋培養菌糸体による人工栽培では、いかに大量のマツタケ菌糸体を培養できるかが前提となる。すなわち、子実体の発生に見合う菌糸体量を有する大型菌床を作ることがマツタケ人工栽培の第一歩である。その点で、本事業におけるきのこ栽培施設の導入は大型菌床の作製を可能にしたといえる。

大型菌床の作製には、栽培培地の基材（支持体）や糖質源の検討によって大きな改善が図られた。通常、きのこ菌床の菌糸まん延程度は外見でしか判断できず、子実体形成に必要な菌床菌糸体量の合理的な測定法の開発が求められてきた。本プロジェクトにおいて、マツタケ菌床中の菌糸体量の新規な定量法が確立された。菌糸体定量により、培地基材や栄養源の配合、菌株間差、培養速度などを客観的に評価することが可能となり、マツタケ人工栽培の最大の課題である大型菌床の効率的な作製とその評価法を確立したことは高く評価できる。なお、マツタケについては、さらに国内外の菌株収集につとめられたい。

2. 遺伝子・タンパク質解析グループ

担子菌きのこの遺伝子解析をおこない情報のデータベースを構築した。トキイロヒラタケの孢子由来単核体の次世代シーケンサーによる遺伝子解析（全ゲノム解析）をおこない、単核体からの子実体形成能をもつ菌株が取得された。また、同単核体を用いた汎用性のある形質転換系が開発された。単核体への異種遺伝子の導入と発現法を確立したことは、トキイロヒラタケのみならず、担子菌きのこの子実体形成を誘導するメカニズムを解明するうえで評価しうる成果である。

3. 本プロジェクトの成果の当該分野におよぼす役割

マツタケの大量かつ大型の菌床作製は、マツタケの純粋培養菌糸体による人工栽培においては避けて通れない課題であった。また、菌床の大型化をめざしても、菌床のもつ菌糸体量が把握できていなければマツタケ子実体発生の可能性すら予測できない。マツタケ菌床作製技術は、栽培培地や菌株を検討することにより、培養期間の短縮や大型化が可能となった。菌床の菌糸体量を指標にしてマツタケ子実体発生の判断基準とする手法は独創的な成果であり、当該分野において先端的な技術を提供した。菌床菌糸体量の合理的・客観的な定量法はマツタケのみならず広く担子菌きのこ、とりわけ栽培きのこの菌床からの収量を的確に予測する方法として今後普遍的に利用しうるものと評価できる。また、きのこ栽培施設の導入が大型菌床の大量かつ連続的な作製を可能にしたのはいうまでもない。

トキイロヒラタケの子実体形成能のある単核株のスクリーニングや、形質転換実験法の確立、子実体形成機構に関わる遺伝子の破壊による逆遺伝学的解析、異種遺伝子発現によるタンパク機能の解析などは、きのこの子実体形成メカニズムを分子生物学的に解明する分野にあらたな知見を提供し、この分野の進展に大きな役割をおよぼすものと期待される。

2018年5月8日

外部評価委員

京都菌類研究所 所長

山中 勝次

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこ類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」

これまで、3年間外部評価委員として携わってきましたが、その3年間における成果についてコメントいたします。多彩かつ多くの成果が放出されつつある中、特に以下の3点が高く評価できると判断致しました。

1. きのこ栽培設備の整備

大学におけるきのこ栽培研究の課題は、きのこ生産現場に準じた生産設備がない点でありました。具体的には、培地基質の種類、培地作製方法、さらには、種菌接種方法などが挙げられます。このことが、大学における研究成果を社会に還元する上での障害となっていました。しかしながら、本事業で整備された栽培設備は、きのこ生産現場に忠実に沿ったものであります。従いまして、得られた研究成果を即、社会に還元できる環境が整ったと言えます。本事業で整備された設備が、将来のきのこ産業の発展に貢献すると思いますので、今後の有効活用に大いに期待いたします。

2. マツタケの大型菌床作製技術の確立

きのこの子実体を得るためには、その基盤となる培養基質に菌糸体を蔓延させることが前提であります。特に、マツタケのように、宿主樹木と共生する外生菌根菌を、宿主の無い条件下で蔓延させることは極めて困難であります。しかし、本事業において、培地に添加する栄養剤や菌株選抜等の試行錯誤を積み重ね、本難題を克服しています。今後、新たに整備されたきのこ栽培設備をフル活用して、マツタケの大型菌床作製技術の精度向上と生産個数の増大を図れば、マツタケの人工栽培の可能性が高まると思われます。

3. トキイロヒラタケにおける単核子実体形成菌株の分離

本事業においてトキイロヒラタケの担子孢子分離系統から子実体を形成する菌株の分離に成功しています。このことから、遺伝的バックグラウンドがホモな菌株を用いて子実体形成に関する実験が可能となるため、子実体形成関与遺伝子の追跡が容易になります。今後は、本菌株を利用することで子実体形態形成に関する分子生物学的研究が飛躍的に加速すると思われます。

2018年5月15日

外部評価委員 鳥取大学農学部

附属菌類きのこ遺伝資源研究センター

教授

霜村典宏

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用きのこ類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」評価報告書

本事業は、①きのこ形成菌類のゲノム情報やタンパク質アミノ酸配列情報に関するデータベースの構築②汎用性のあるきのこ形成菌類の遺伝子組換えモデルの開発③キノコ栽培環境の整備等に取り組み、研究環境を整えることにより、きのこ形成菌類が「きのこ」を作る仕組みを解明し、最終的にはマツタケの人工栽培化技術開発へと応用することを目指したものである。3カ年の研究プロジェクトの成果として以下の事項が評価できるものとして挙げられる。

きのこ形成菌類の全ゲノム *de novo* 解析ならびにデータ公開：*Tricholoma matsutake*, *Flammulina velutipes*, *Hysizygus marmoreus*, *Pleurotus salmoneostramineus*.について全ゲノム解読ならびにアッセンブル作業を行い、DDBJに登録して、広く利用できる形にした。すでに公開されている種のゲノム情報と合わせて本プロジェクトで明らかにされた情報は、今後、菌株間差異あるいは菌株特性の解明など、きのこ形成菌類の応用面において資するところが多いと評価できる。

Pleurotus salmoneostramineus (トキイロヒラタケ) を用いた分子生物学的手法ならびに実験系開発：本プロジェクトにおいてトキイロヒラタケの単担子孢子分離株を作出、スクリーニングし、子実体形成能を有する単核菌糸株を得た。さらに、これら単核菌糸株を宿主として形質転換実験手法の確立を行なっている。一般に担子菌は、「きのこ」形成（子実体形成）には重相化（二核菌糸形成）が必要であり、特にヘテロタリズムを持つ菌株では、和合的な2菌糸が必要不可欠である。子実体形成に重相化が必要な菌類では、突然変異あるいは遺伝子の破壊による子実体形成研究が極めて困難である。数多の担子菌において子実体形成機構研究の進捗が緩慢な理由はここに起因し、研究の進捗はこの問題を解決できた限られた菌種によってのみもたらされている。本プロジェクトで得られた単核発茸系統は、本研究領域のリーディングプラットフォームになる可能性を秘めており、遺伝子タギングを含む発茸突然変異株を作出、解析することにより、この研究領域をリードすることが十

分に期待できる。

マツタケ菌床作製技術の開発：固体培養法を用いて条件検討を行い、マツタケ菌床作製を試みた。マツタケの人工栽培において発茸の問題は古くから認識されているが、もう一つ重要な要素は子実体生育に必要なバイオマスである。マツタケの野外発生調査研究から、1本の子実体が生育するのに少なくとも30cm立方のシロ・菌根バイオマスが必要であり、菌根を通してのリソース供給が得られない人工栽培ではこれ以上の菌体バイオマス形成をさせる必要があると考えられている。本プロジェクトでは、種々の条件を検討し、従来法に比べて短時間で菌体バイオマスを得る培養法を見出した。人工栽培の実現には発茸メカニズム解明の問題が未だ存在しているが、子実体生育が可能と考えられる菌体バイオマスを形成させうる菌床作製技術はマツタケの人工栽培にまつわる諸問題の解決において一つの進歩であると評価できる。

本事業で整備されたきのこ栽培設備を活用し、解析途上のトキイロヒラタケ子実体形成時のRNAseqデータなどを用いて、子実体形成に関わる研究を展開し、菌体バイオマス中のリソースがどのように子実体生育に分配されるのかを明らかにできれば、基礎生物学に著しい貢献をもたらし、さらにマツタケをはじめとする有用きのこ形成菌類に対して、産業としての応用展望が図れるものとして強く期待できる。

平成30年5月14日

評価委員

京都大学農学研究科教授

田中千尋 

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこの類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」
(平成 27 年度～平成 29 年度)
研究成果最終報告書

研究組織：栽培検証・研究用きのこ株供給グループ

研究課題・研究担当者：

①マツタケ等有用新規食用きのこの栽培法開発(教授・種坂英次、教授・白坂憲章)

②マツタケ等有用きのこ菌株の新規分離(准教授・澤畠拓夫)

研究協力者：定時職員：森本佳代子、鎌田弘子

実験補助：原健人、波多野彩子

1. 研究目的

1980 年代前半までの日本におけるきのこ産業は、きのこ農家と都道府県の試験場を中心に展開されており、栽培方法などはノウハウとして伝わっていたに過ぎなかった。その後、1980 年代後半頃からきのこ類微生物に関する科学的な研究成果が蓄積し始めたことを受け、きのこ栽培を科学的に検証できるようになるとともに、情報が大学から発信され、大学の研究者が牽引し成長を遂げた分野となった。しかし、それらの技術はシイタケやマッシュルームなど古くから栽培が可能であったきのこの栽培を行ってきた歴史の中で経験的に蓄積されたノウハウを体系的にまとめたものであり、きのこの栽培技術は依然として経験的なノウハウに頼っているのが現状である。その後、民間のきのこ業者が栽培に関するノウハウを独自に蓄積するになると、大学におけるきのこ栽培技術は低下していき、近年では栽培そのものをできなくなってきた。

本事業では、マツタケなど有用食用きのこの類の人工栽培化という課題に立ち向かうためには、そもそも“きのこが栽培できないといけない”と考え、現状のきのこ栽培に即した施設に更新するとともに、導入した施設を運用し、市販のきのここと同等のきのこを栽培できる技術の確立を目指した。また、マツタケの人工栽培研究においては、子実体形成に必須と考えられる菌糸密度の向上に向けての検討を進めた。

2. 研究内容

1) 栽培施設運用による各種栽培きのこの栽培検証

本事業の根幹として必要な重要な技術の一つとして、「きのこの栽培」があるが、きのこの栽培にはノウハウが非常に多く、科学的に解明されていない部分が多く残されている。例えば、ブナシメジなどの発生条件では室温を 18℃、相対湿度 95%という、通常の研究用恒温恒湿装置では再現できない条件設定が必要であるなどがその例として挙げられる。きのこの栽培施設ではごく普通に運用されているこういった条件は、きのこの発生には必要な条件であることがノウハウとして知られており、通常の研究用恒温恒湿装置ではきのこの発生そのものが再現できないことも広く知られている。そのため、きのこ栽培を安定的に再現するには栽培施設の運用が不可欠であるが、栽培施設の運用は装置の数値上のスペックのみではむづかしく、施設ごとの微調整が必要になってくる。本課題では導入された栽培施設による各種栽培きのこの栽培条件の設定を行い、研究に用いる栽培きのこの類の安定的な供給を目指すとともに、マツタケ栽培条件検討の基盤を作ることを目的とした。

栽培きのこの栽培条件はきのこ毎に少しずつ異なっており、エノキタケやブナシメジなどの通常秋以降に発生するきのこは、子実体を発生させるために低温（18℃以下）にする必要があるが、キクラゲやタモギタケなどの自然では夏～秋に発生するきのこは培養から発生まで 24℃で行うことが出来る。そのため、様々なきのこを栽培するために、栽培試験室の温度を 15℃（芽だし）、18℃（低温きのこ）、21℃（中温きのこ）、24℃（高温きのこ）に、湿度をいずれも 98%（RH%）に設定した。光照射は栽培用の棚に設置した LED 光源により行い、6 時間ごとの明暗サイクルで行った。

表 1 に施設にて栽培に成功した各種栽培きのこをまとめた。

表 1 栽培施設栽培実績

栽培きのこ	種菌	栽培温度 (°C)
シイタケ	森産業 XR-1 株	18
エノキタケ	TR19	18
ヤマブシタケ	JA 全農長野株	21
トキイロヒラタケ	NBRC31859	24
ブナシメジ	NN12	18
ウスヒラタケ	近大分離株	18
クロアワビタケ	近大分離株	18
アワビタケ	近大分離株	24
バイリング	食微保存株	18
アラゲキクラゲ (茶)	日本農林種菌	21
アラゲキクラゲ (白)	日本農林種菌	21
マンネンタケ	近大分離株	18
タモギタケ	日本農林種菌	24
マスタケ	NBRC9647	24
ヒラタケ	近大分離株	18
ササクレヒトヨタケ	近大分離株	18
マッシュルーム (ツクリタケ)	日本農林種菌	18
エリンギ	森産業	18

また、栽培した代表的なきのこを図1にまとめた。



シイタケ



エノキタケ



ブナシメジ



トキイロヒラタケ



アワビタケ



アラゲキクラゲ(茶)



マンネンタケ



ササクレヒトヨタケ



マスタケ



マッシュルーム



タモギタケ

図1 栽培施設での栽培例(写真)

2) 新規栽培きのこ株の分離とライブラリ化

ホンシメジの人工栽培化が可能となった背景には、数多くの菌株を組織培養により取得し栽培検討を行ったことが理由の一つとして挙げられる。マツタケにおいても現状で数多くの菌株を手にいれることが出来るが、その多くは 1980 年代を中心に組織培養によって株化されたものであり、長期間にわたって人工培地上で継代培養によって保存されてきたものである。こういった保存環境は必ずしも良いとはいえず、凍結保存などの保存法が確立されていないきのこの保存方法は継代培養に頼るしかないのが現状であるが、シイタケなどでは継代培養の末に子実体を形成できなくなってしまうケースも見られる。こういった状況の中、マツタケの人工栽培を目指すには、できるだけ多くの菌株を収集することも重要であり、組織培養による新規分離株の収集にも積極的に取り組むべきである。

本課題においては、マツタケに限らず様々なきのこを自然界から採種し、組織培養法にて菌株の分離を行うことによって、研究用の菌株の収集を進めた。

表 2 新規取得菌株のリスト

きのこ	購入元・分離・供給源	数量
組織分離株		
マツタケ	市場購入（丹波・岩手・長野）	3
ホンシメジ	青森県黒石市	2
シャカシメジ	福島県川俣町	1
ツチグリ	福島県川俣町	
ウスヒラタケ	近畿大学農学部	1
クロアワビタケ	近畿大学農学部	1
アワビタケ	近畿大学農学部	1
ヒラタケ	近畿大学農学部	1
ショウロ	近畿大学農学部	2
ササクレヒトヨタケ	近畿大学農学部	1
購入株		
マスタケ・アイカワタケ	NBRC	5
キクラゲ	NBRC	7
ツクリタケ	NBRC	3
ハラタケ	NBRC	4
バカマツタケ	NBRC	4
アミガサタケ	ビナンバイオ	1
トキイロヒラタケ（単核体）	NBRC31859 単孢子分離	68

表 2 に本事業の実施期間に分離もしくは購入により新規に取得した菌株を示した。マツタケに関しては 3 年間でかなりの数の組織分離を試みたが、多くは菌糸の伸長が認められず、3 株の取得にとどまった。トリュフと同様の地下性菌であるツチグリやショウロに関しては、数は少ないものの組織分離に成功しており、今後、地下性菌の検討を行う際に活用できると考えている。また、トキイロヒラタケにおいては栽培施設にて栽培を行ったものから胞子を取得し、交配・遺伝子組換え・ゲノム解析などに利用するための単核体の取得を進めた結果、現状で合計 68 株の単核体の単離が確認できている。単核体の取得については菌糸の蛍光観察による単核の確認が必要であるため、現在継続して確認作業を行っているところであり、今後数は増加していく予定である。

3) マツタケ人工栽培化を目指した菌床調製方法の確立

本格的なマツタケの人工栽培研究は、1970 年代に子実体からの組織培養法が確立されて以来 50 年近くなされているが、偶発的な子実体形成についての報告はあるものの、再現性のある栽培法の確立には至っていない。1970 年代のマツタケ研究の成果として、組織培養により多くのマツタケ菌株が確立され、確立は低いもののフラスコなどで子実体原基を発生させることに成功した例も複数報告されている。しかし、その後、研究が生化学・生理学にシフトする際に、培養方法として液体培地による培養へと変化していき、その過程において、マツタケは生育が非常に遅く、利用できる生育基質に制限があるという基本的な考え方が形成されるに至った。本研究課題においては、マツタケの栽培を可能にするためには大量の菌糸体を比較的短期間で確保することが必要であると考え、1970 年代後半～1980 年代前半の子実体原基形成の報告があった時期の研究報告を参考に、マツタケの栄養獲得特性について再検証を行い菌体の大量培養法の確立を目指した。

3-1) マツタケの栄養獲得特性の再評価

マツタケのように樹木と共生関係を築いて生育する、いわゆる菌根菌の多くは人工栽培が困難であるとされており、ほとんどの菌根菌が栽培化できていない。その中で、ホンシメジは大麦デンプンを主たる栄養源として栽培が可能となっている。そこで、本研究では、マツタケの栄養源としてのデンプン可能性を検証したところ、デンプンを炭素源として継代培養したマツタケ菌株でグルコース培養に比べてデンプン培地での菌糸体収量の増加が認められた(図 2A)。また、同様の条件でデンプン利用の鍵酵素となるグルコアミラーゼの活性も大幅に向上したことより(図 2B)、デンプンを炭素源として用いることによりデンプンの利用性が大幅に向上することが明らかとなった。

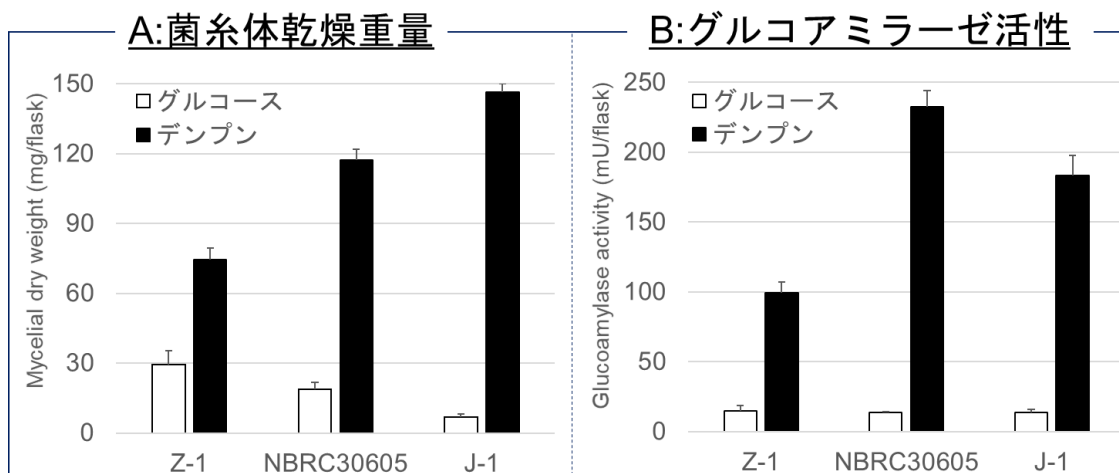


図2 マツタケ菌株のデンプン利用能力

各菌株はグルコース□もしくはデンプン■で継代培養をしたのちデンプンを含む培地で生育させた

この結果より、マツタケは従来の報告にあるような低いデンプン利用性しか持たないのではなく、培養条件によってはデンプン利用性を向上させられることが明らかとなった。これは、マツタケがホンシメジと同様の培養系で培養できる可能性を示唆しており、大麦などのデンプンを豊富に含む穀類を栄養源に用いることで、ホンシメジと同様に人工栽培が可能となる可能性を示唆する結果が得られた。

一方、マツタケの培養検討においても同様で、これまで菌体収量を検討するためには、液体培地で培養を行う必要があり、菌体収量をあげることが実質的にできなかったことが考えられる。そこで、菌糸体収量の向上を目指すためには固体培地での培養検討が必要となることが示唆された。

3-2) 固体培養における菌糸体収量測定法の開発

これまでのマツタケ研究における培養培地に液体培地が選択されてきたのは、他に糸状菌と同様に培養系を比較的均一にできること、また、菌糸をろ過によって濾別できるため菌糸体収量を容易に測定できるといった理由からであった。しかし、マツタケに限らず、きのこ類を栽培するには、おが屑をベースとする菌床を用いることが一般的であるため、菌糸の蔓延状態は目視で確認するしかなく、正確な菌糸の量を測定する方法はこれまでなかった。本課題ではマツタケ菌糸の固体培養における蔓延度を測定し、数値化するために、麹菌で用いられている方法を参考に図3に示す方法による菌糸体量の測定方法を考案した。

清酒や味噌の製造にもちいられている麹（*Aspergillus oryzae*）を培養し、発酵に利用するための“麹”の状態にするためには、穀類に菌糸を蔓延させる必要がある。麹菌はこのような生育状態になることで穀類のデンプンやタンパク質を分解する酵素を分泌できるようになることが知られている。麹菌の生育をモニターし、麹の完成度を分析するには、こういった状態の糸状菌の菌体量を測定する必要があり、その方法として菌糸に含まれるキチンの含量モニターする方法が利用されている。この方法を参考にして、図 3 に示した方法を菌体量測定法として考案した。

菌体量測定は、液体培養にて得られた菌糸体を用いて検量線を作成し、固体培養から抽出された N-アセチルグルコサミン量を定量することで数値化した。



図 3 キチン量測定による菌体量の測定

この方法を用いることにより、マツタケの培養の経時変化における目視による菌糸蔓延の判断が実際の菌体量と相関することが確認できた（図 4）。

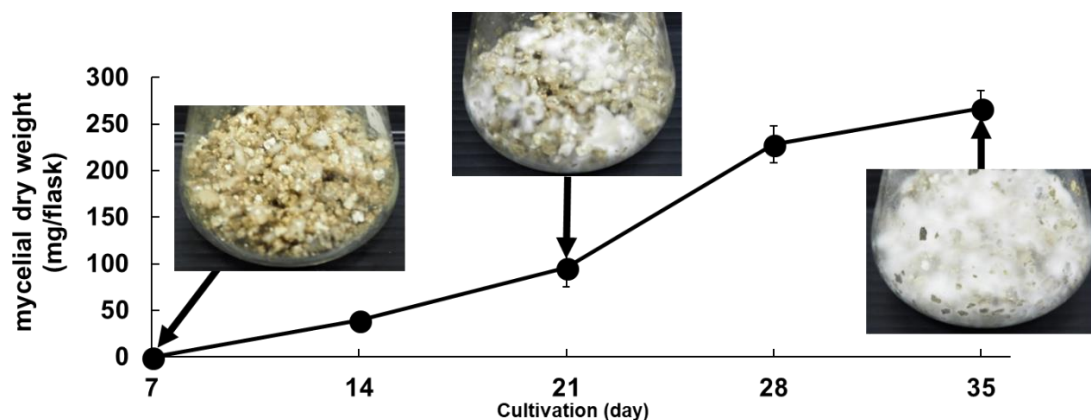


図4 キチンによる菌体量測定と目視による判断の相関

3-3) 大麦を栄養源とするマツタケ培養用固体培地の設計とスケールアップ

ここまでの検討で、固体培養での菌糸体の蔓延度を数値化できる方法が確立できたため、マツタケ培養のための固体培地として、栄養源を大麦、支持体をバーミキュライトとした培地の設計を行った。その結果、培養35日目において、菌糸量測定値、目視による判断共に大麦：バーミキュライト＝2：1の培地で最も強い菌糸蔓延が確認された（図5）。また、この条件を用いて32株のマツタケ菌株の培養検討を行ったところ、これまでの報告よりも短期間（30日）で、高い菌糸体収量を得ることが出来た（表3）。

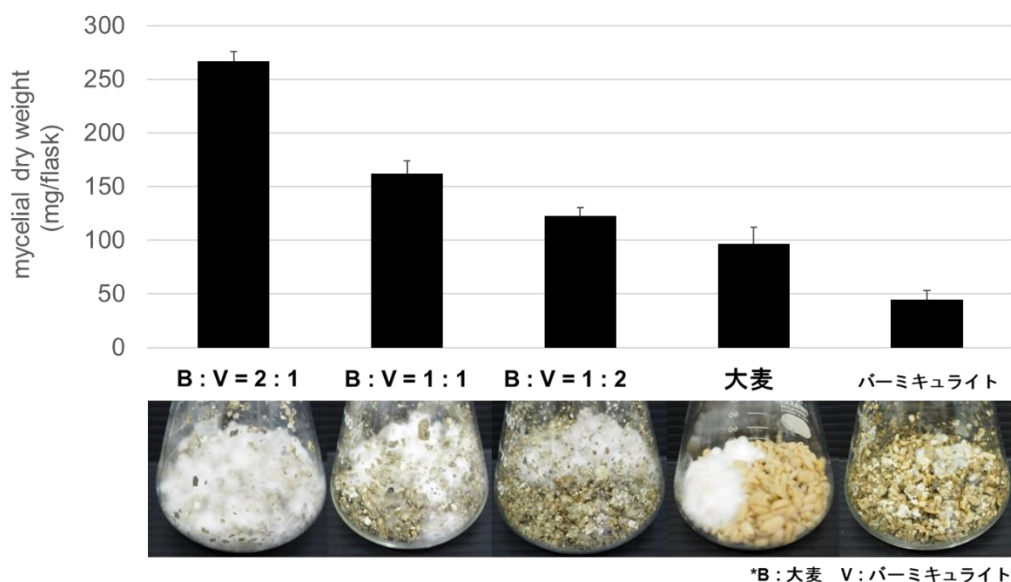


図6 固体培地における大麦／バーミキュライト比率の検討

表3 マツタケ菌糸培養における固体培養の優位性

乾燥菌体収量 (mg/flask)	固体培養 (30 days)	*液体培養 (80 days)
200–250	2 株	—
150–200	13 株	2 株
100–150	17 株	15 株
100 >	—	1 株

* Kusuda et al., *Mycoscience*, **49**, 291-297, (2008)

これらの結果を受けて、子実体発生に必要な量の菌糸体を調製するために固体培養のスケールアップに取り組んだ。

手法としては、大麦：バーミキュライト＝2：1で調製した4本のフラスコサイズの固体培養(25g/フラスコ)を、栽培袋（小）サイズ（500g/袋）に植菌し、菌糸の蔓延が確認できるまで（約30日）培養を行った。この固体培養の全量を、栽培袋（大）サイズ（2500g/袋）の培地に移し培養をおこなった。約35日で培地全体に菌糸の蔓延を確認することが出来た（図7）。またこの菌床中に存在する菌糸体の量は、キチン含量による菌糸体測定法により、培地2.5kgあたり、乾燥菌体19.5gと測定され、2カ月程度で菌糸体の湿重量としては約200gとかなり大量の菌糸体を調製する方法を確立できた。

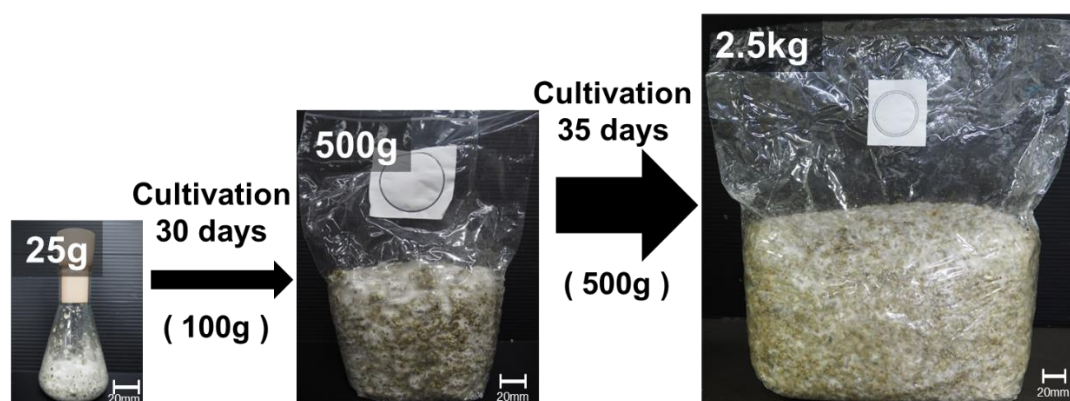


図7 固体培地によるマツタケ菌糸培養のスケールアップ

4) 総括

本課題においては、新たに設置したきのこ栽培施設を運用することにより、各種栽培きのこを安定的に栽培できる環境を構築することが出来た。また、本施設を運用することで研究に利用するときのこの安定的に供給できる体制を確立したとともに、新規に分離したきのこ株の栽培検討を行える環境を整えた。結果として、マツタケを含む様々な栽培を検討するための基礎的な環境を整えることが出来たといえる。

また、研究に使用する菌株ライブラリの充実という点からは、新たなマツタケ菌株の取得のみならず、アミガサタケ、ショウロ、ホンシメジ、シャカシメジといった新たに栽培化検討を行うための菌株や、子実体形成能を有するトキイロヒラタケ単核株を分離することに成功した。

さらに、マツタケの栽培化に関しては、固体培養において菌糸量を数値化できる手法を新たに開発するとともに、固体培地を用いることで従来よりも高密度の菌糸の蔓延が確認できる菌床の作成方法を確立できた。

3. 今後の計画

- ①より効率的な栽培施設の運用
- ②菌株ライブラリのさらなる充実（特にマツタケ菌株の充実）
- ③菌床のさらなるスケールアップと、子実体誘導条件の探索

4. 研究成果

原著論文・総説

Phylloporia lonicerae (Hymenochaetales, Basidiomycota), a new species on *Lonicera japonica* from Japan and an identification key to worldwide species of *Phylloporia*.; W.M. Qin, X.W. Wang, T. Sawahata, L. Zhou; MycoKeys 30:17-30 (2018)

招待講演・セミナー

2015 年度

なし

2016 年度

第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス（京都）；シンポジウム

2017 年度

千葉県立博物館 きのこワールド 「マツタケ研究最前線」：招待講演

徳島大学研究クラスター 指定クラスター特別セミナー講演：招待講演

学会発表

2015 年度

なし

2016 年度

なし

2017 年度

第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス（佐賀）；一般講演 2 件

日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）；一般講演 1 件

特許申請

なし

その他（報道・著書等）

1. きのこの生理機能と応用開発の展望；監修 江口文陽（S&T 出版）

（分担・マツタケ） 2017 年刊行

2. 朝日新聞 「あのとき それから」 2016 年 9 月 28 日（夕刊）

マツタケ人工栽培についてコメント

3. 日本テレビ系 スッキリ 2017 年 11 月 10 日

学祭対決（vs 東農大） きのこ屋&マツタケ研究

4. 読売新聞 西日本版 2018 年 2 月 25 日

「大学の経営力 近畿大学 4；産学連携ビジネス」

マツタケ人工栽培についてコメント

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこ類の人工栽培化技術確
立への応用を目指した研究基盤形成」
(平成 27 年度～平成 29 年度)
研究成果最終報告書

研究組織：遺伝子・タンパク質解析グループ

研究課題：①きのこ類微生物の全ゲノム配列の決定

②子実体形成機構解明を目指した遺伝子発現動態解析

③子実体形成機構解明を目指した遺伝子・タンパク質解析

研究担当者：教授・岸本憲明，准教授・倉田淳志，准教授・森美穂，講師・福田泰久

研究協力者：定時職員：杉田佳代，加納明子

実験補助：大沼広宜，藤井陽介，大庭将矢，佐藤魁，松井葵

1. 研究目的

21 世紀に入ってヒトゲノム計画が終了し，その後の次世代ゲノムシーケンサーの登場により，生物の遺伝情報の解明は急ピッチで進んできた。そういった環境の中で，それまで研究対象となってきた生物の全ゲノムの情報が明らかとなり，データベースとして利用できるようになってくると，研究の興味は大きく変化し，データベース上のゲノム情報をもとに，生理的变化と遺伝子発現の関連や，機能未知の遺伝子配列の機能解析などへと移ってきたといつてよい。そういった中で，研究手法も大きく変化し，生理機能の解析のために代謝系に関わるタンパク質とそのタンパク質をコードする遺伝子を特定していくといった従来からの手法ではなく，データベース上にある代謝系に関連する可能性のある遺伝子を洗い出し，発現解析などを行うことが研究の最初のステップとなってきたことも多く，研究のソリューションも，こういった手法をサポートするものへと変化して久しい。しかし，その一方，本プロジェクトで扱うきのこ類微生物には，信頼性の高い遺伝子データベースの量が絶対的に不足しており，データベースがそろっている生物と同様の研究ソリューションを利用することは困難である。本研究課題では，きのこ類微生物の子実体形成機構を解明するための研究基盤を形成するため，研究対象となるきのこ（担子菌）類の全ゲノムおよび発現遺伝子データベースを構築し，DDBJ などの公的データベースへの登録を進めるとともに，構築したデータベースを利用したタンパク質の同定，遺伝子の機能解析の手法開発を進めた。

2. 研究内容

1) きのか類微生物の全ゲノム配列の決定とデータベース登録

本事業開始時である 2015 年時点において、きのか類微生物の研究に利用できるゲノムデータベースを表 1 に示した。

表 1 ゲノム情報が公開されていたきのか類微生物 (2016 年 3 月時点)

分類	学名	和名	サイト	子実体形成
菌根菌	<i>Tricholoma matsutake</i>	マツタケ	JGI ForestGEN	—
	<i>Boletus edulis</i>	ヤマドリタケ (ボルチーニ)	JGI	—
腐生菌	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	ForestGEN NCBI	可能
	<i>Agaricus bisporus</i>	ツクリタケ (マッシュルーム)	JGI NCBI	可能
	<i>Coprinopsis cinerea</i>	ヒトヨタケ	JGI NCBI	可能
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ヒラタケ	JGI NCBI	可能
	<i>Flammulina velutipes</i>	エノキタケ	NCBI	可能

しかし、これらのデータベースにおいては、利用できるサイトごとに ORF などの情報がわずかに異なっているなど、正確性に欠ける部分も多々見られるなどの問題を抱えていた。全ゲノム情報の構築に利用する次世代シーケンサー解析においては、分析により得られたデータのアセンブルの際に問題が起こる可能性があることが知られているため、先ず本事業にて解読したエノキタケ (*Flammulina velutipes*) の全ゲノム情報と、すでに登録されている情報が整合性を持つものであるかを検証した結果、既知の株と同様の数値を示しており、本事業で得られる解析データでも、遺伝子探索などがかのうであることが確認できた (表 2)。

表 2 *F. velutipes* のゲノム解読, 遺伝子予測情報の比較

Assembly statistics	<i>F. velutipes</i> (エノキタケ)	
	TR19	KACC4780
Geome size (Mbp)	34.9	35.6 (Chr) 0.8 (Mt)
Sequence read coverage depth (fold)	114	37.7
Number of contigs	5,130	500
Contig N50	150,115	252,700
Number of protein-coding genes	13,843	12,218

この結果を受け、近畿大学にて保存している食用きのこ株のうち、マツタケ菌株を中心として次世代シーケンサーによる de novo 解析を行い、ドラフトゲノムのデータを構築した（表3）。現在、全ゲノム情報を公的データベースである DDBJ へ順次登録、公開を行っている。

表3 食用担子菌類の全ゲノム de novo 解析

生物種	菌株	Assembly	DDBJ登録
<i>Tricholoma matsutake</i>	ATCC64715, Hiroshima, Ichikawa, Okayama, NBRC6933, 30604, 30605, 30773, No. 101, No. 114, KMI-J-1, w-1, N-5, Z-1 (計15株)	Done	・NBRC30605 完了
<i>Tricholoma bakamatsutake</i>	NBRC30663, 33138, 107031, 107036, 1070338, 108265, 108266 (計7株)	Done	
<i>Flammulina velutipes</i>	TR19	Done	完了
<i>Hysizygus marmoreus</i>	NN12	Done	完了
<i>Grifora frondosa</i>	分離株	Done	
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	MK	Done	
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	NBRC31859, 単核菌糸 No. 4, No. 60 (計3株)	Done	完了
<i>Lyohyllum shimeji</i>	分離株	Done	

2) データベースを利用したタンパク質同定、遺伝子機能解析手法の確立

現在、広く公開され・利用されているデータベースの多くは、膨大なタンパク質、遺伝子研究の結果にその信頼性を支えられている。例えば、ゲノム上に存在するタンパク質をコードする領域に関しては、イントロンの配列や終止コドンの位置などはタンパク質の配列データとともに実際の実験データをベースに検証・確認されたものであることが多い。しかし、きのこ類微生物のゲノム情報においては、こういったデータは類似した真菌類の配列情報を参考にしたアルゴリズムによって遺伝子予測がされたものが公開されているものが多く存在するため、実際にタンパク質をコードする部分が異なったりするケースも散見される。また、前述のエノキタケのデータもそうであるように、多くのきのこにおいては、きのこの特徴的な形態である二核菌糸（一つの細胞に異なる核が2つ存在する形態、それぞれの核はn体）での解析データであり、配列情報が正確に反映されたものではないという問題も指摘されていた。本研究課題では、本事業にて導入した次世代ゲノムシーケンサーシステムにより取得したきのこ類微生物のゲノム情報をもとに、きのこ類由来タンパク質をコードする遺伝子配列の検索・同定方法の確立について検討を行った。

2-1) マツタケ全ゲノム情報を利用した MASCOT によるタンパク質同定

プロテオーム解析手段の進歩に従い、データベースが充実している生物種におけるタン

パク質同定には、タンパクのトリプシン消化後断片の質量分析、すなわち PMF（ペプチドマスフィンガープリンティング）によって決定できるようになっている。しかし、きのこ類微生物においては利用できるデータベースの精度が低いために、これまでほとんど利用できていないのが現状である。そこで、本事業において解析を行ったマツタケの全ゲノム情報を利用して、マツタケ由来の酵素タンパクの同定に PMF による解析が利用できるかを検証した。

解析するタンパク質としては、デンプンを生育糖質としてマツタケ *Tricholoma matsutake* NBRC30605 を培養した際に活性の顕著な上昇が認められた酵素を菌体外酵素として培養液から精製し、性質の検討からグルコアミラーゼであると予想した。本タンパク質をトリプシン消化し MALDI-TOF/MS による PMF 解析を行ったところ、表 4 に示すペプチド断片の存在が確認された。これらの断片の情報は NCBI nr および JGI *T.matsutake* genome database において NBRC30773 株由来のグルコアミラーゼ (accession no. AB604354) と一致し、本タンパク質をコードする遺伝子の配列を PMF 法で決定できることが確認できたとともに、これまでタンパク質としての活性が確認できていなかった NBRC30773 の上記遺伝子がグルコアミラーゼとしての活性を持つことを確認することができた。

表 4 マツタケグルコアミラーゼのトリプシン分解後のフラグメント

Peptide fragments	Predicted mass (Da)
VNLLANIGPSGSK	1269.45
FNIDETAFTGPWGR	1610.70
DANTVLASIHTFDAAGCDATTFQPCSDR	2999.21
ALANLLTYVDAFR	1466.69
NIYAINSGIATNQGSATGR	1908.04
DNGSPLSAVDLSWSYAALITAFDR	2569.79
The peptide mass spectrometric analysis was performed on MALDI-TOF-MS system; autoflex speed KN2 (Bruker Daltonics).	

また、NBRC30605 由来のグルコアミラーゼ遺伝子 (*TmGlu1*) の機能を確認するために、クローニング後 *Pichia pastris* にて発現させたのち、リコンビナントタンパクの配列確認においては、トリプシン消化後の断片を MS/MS 分析することにより内部アミノ酸配列に相当する配列が確認できた (図 1)。

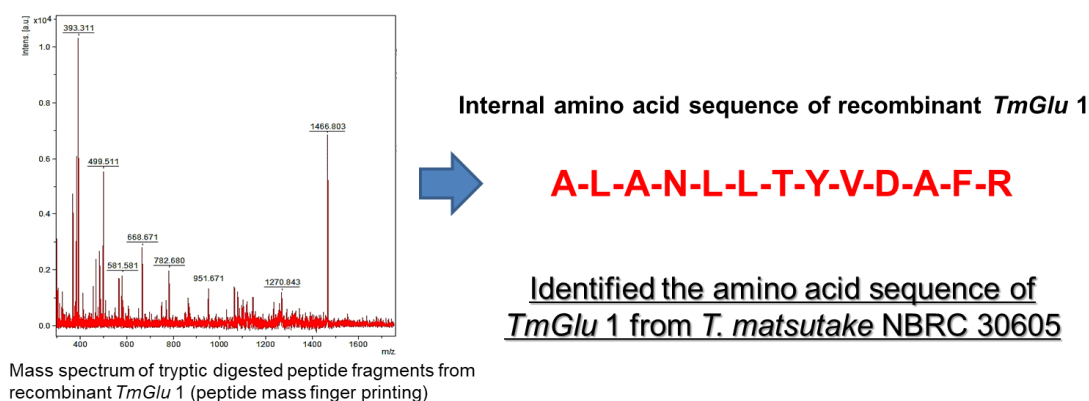


図1 MS/MS 分析による内部アミノ酸配列の決定

これらの結果より、ゲノム配列のデータベースを構築することにより、現在プロテオーム解析の手段として広く利用されている PMF 法や MS/MS 解析をきのこ類微生物で利用できる可能性が示された。

2-2) ブナシメジ由来アミノペプチダーゼ遺伝子の検索

ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) は、菌糸の蔓延後プロテアーゼ阻害剤である *o*-Phenanthroline を培地に添加することにより、子実体の形成が阻害されることが知られている。これは、プロテアーゼがブナシメジの子実体形成機構に関係していることを示唆している。そこで、ブナシメジの子実体原基形成時に発現する *o*-Phenanthroline 感受性のアミノペプチダーゼを精製し、そのアミノ酸配列情報をもとに BLAST 検索を行ったところ、ブナシメジ由来ロイシンアミノペプチダーゼを 100% の相同性が認められた。よって、データベース上の塩基配列情報をもとにプライマーを設計し同遺伝子の cDNA クローニングを試みたが、PCR による遺伝子の増幅が認められなかった。しかし、ゲノム DNA を鋳型にした場合、同じプライマーで PCR による増幅が認められたことから、データベース上の配列情報はイントロン予測が間違っている可能性が示唆された。

そこで、RACE 法を用いて cDNA クローニングを行い、塩基配列を決定したところ、NCBI 登録配列との相同性は 98% 以上であったものの、3' 末端側の塩基配列の相同性が著しく低いことが確認された (図 1)。

10	20	30	40	50	60	70	80
MSLTLSPLPP	LSNDIYPIGR	NSLGNLMTAT	EKAKELPQED	KSAAQFQATS	QESYKSAVSQ	TTKESPSASL	AKFCKEAETA
90	100	110	120	130	140	150	160
YPALYKAIQA	NDSASAKELA	KSIASKLTEV	ATKAGNVAQA	YNQGAAKAQE	GQKLMKSALP	GSHFPVKDSVD	DALQYLSPPA
170	180	190	200	210	220	230	240
QVFTSMQSSL	NESAKNVVAA	ADKVGKVPAN	QIASEDSGEA	IANAWAKLGV	KATAQAEAYN	KWQGNQ	

図3 トキイロヒラタケ色素タンパクのアミノ酸組成
(赤字はプロテインシーケンサーで決定された内部アミノ酸配列)

また、本タンパク質をコードする遺伝子は、色素の生成が始まる原基形成期に特徴的に発現する遺伝子 (contig1047: 赤字で示す) であることが確認できた (図4)。また、同様に原基形成時に発現量が増加する遺伝子の中に、色素タンパク遺伝子と同様に BLAST 検索で相同性が確認できないものが複数存在することも確認された。

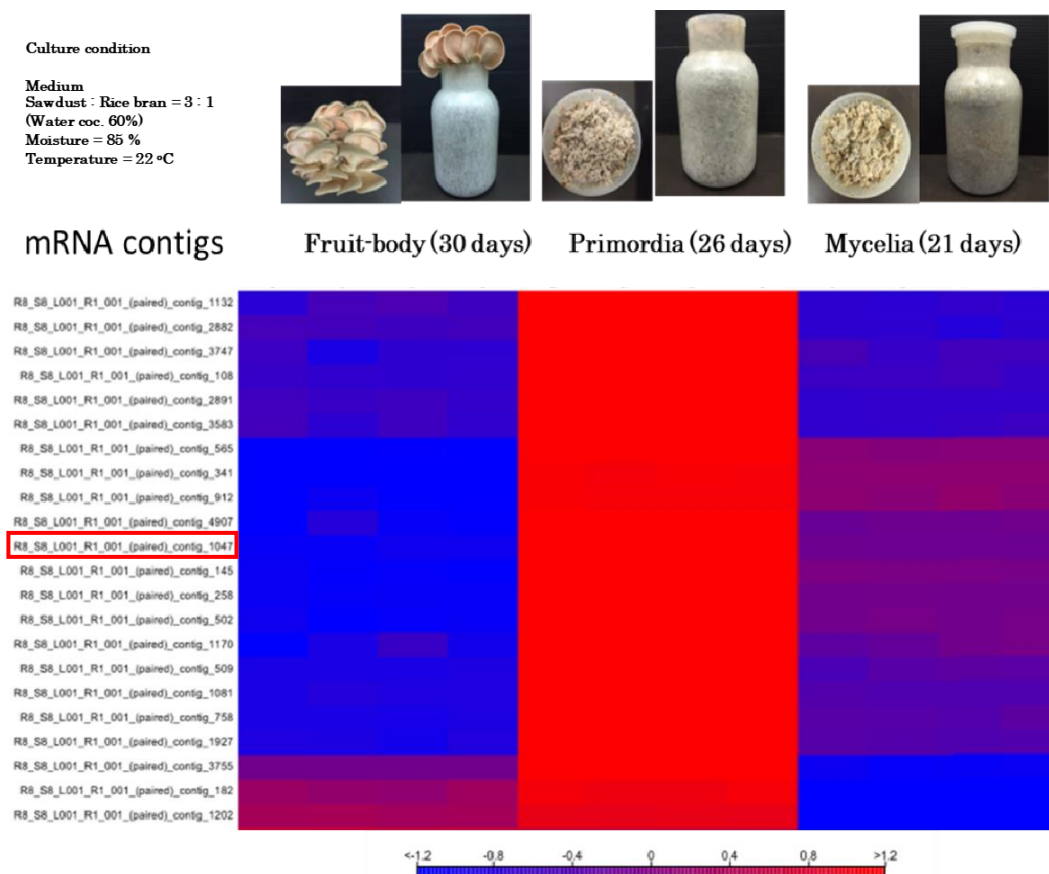


図4 RNA-seq による発現遺伝子の解析 (赤で囲まれたものが色素タンパク質)

以上の結果より、全ゲノム情報や発現遺伝子データベースを構築することによって、対象とするタンパク質が新規なものであっても配列を決定できることが確認できた。

3) トキイロヒラタケを用いた形質転換法および異種遺伝子発現系の開発

一般的に、遺伝子の持つ機能を解析する場合、ターゲットとする遺伝子をロックアウトするなどの手法が利用される。きのこ類微生物の子実体形成機構の解析においては、子実体形成に関与することが示唆される遺伝子が数多く報告されているが、いずれも決定的ではない。こういった研究がなかなか進まない理由の一つに、きのこ類微生物の遺伝子操作に必要な形質転換系のむづかしさや、遺伝子破壊が子実体形成に及ぼす影響を検証する際の手順が煩雑であることがあげられる。図5に遺伝子破壊が子実体形成に及ぼす影響を検証するための一般的なスキームを示した。

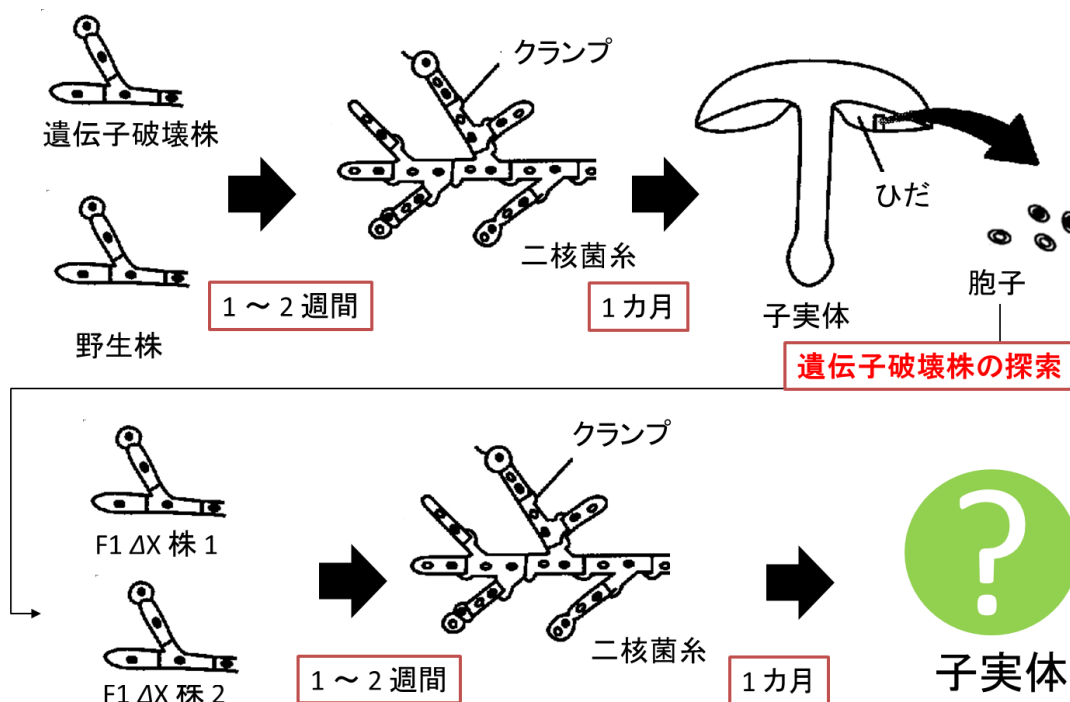


図5 きのこにおける遺伝子機能解析の一般的な流れ

通常、きのこの菌糸は異なる2つの核を細胞内に有する二核菌糸の状態が存在するため、二核菌糸の状態では遺伝子組み換え操作を行ったとしても、どちらの核で破壊が起こったかを特定することはできない。そのため、胞子由来の単核株を用いて遺伝子破壊を行うことが一般的である。しかし、通常きのこは単核体の菌糸では子実体を形成することはできないとされているため、遺伝子破壊株と他の胞子由来単核菌糸（野生株）とを交配させ二核菌糸としたのちに子実体を形成させる。この時点では片方の核にしか破壊が導入されていないため、遺伝子の機能を完全に解析できるわけではない。次に、形成した子実体由来の胞子を分離し、元の遺伝子破壊株と同様の遺伝子破壊が導入されている単核菌糸をスクリーニングし、得られたF1世代の遺伝子破壊株同士を交配させることにより、二核菌糸の両方の核に遺伝破壊が導入された株が作出される。この交配株の子実体を形成させることによって、

破壊した遺伝子の機能が確認できることになる。しかし、このスキームは操作そのものがかかり煩雑であり、実験にかなりの期間を要する。また、トキイロヒラタケの孢子由来単核菌系の全ゲノム解析の結果より、F1 世代の単核菌系においては、SNPs 程度ではなく、contig そのものが欠損するなど、かなりの多様性が認められることが明らかとなり（表 5）、最終的に形成させた子実体の形態が変化したとしても、孢子の遺伝子多様性は反映されたものか、遺伝子破壊の結果かの判断がつかない。

表 5 トキイロヒラタケ孢子由来単核菌系の遺伝子多様性

	各遺伝子のコード領域				各遺伝子のコード領域の上下流15,000bp			
	No.4株	No.13株	No.60株	No.21株	No.4株	No.13株	No.60株	No.21株
26/28S rDNA	N.F	100%一致			N.F	99.1%一致(上流5,000bp, 下流3,800bp)		
PsPCP	100%一致			99.8%一致	100%一致			98.7%一致
Contig108	100%一致				100%一致			
Contig2891	N.F	100%一致		N.F	N.F	99.9%一致(上流15,000bp, 下流10,214bp)		N.F
Contig3583	100%一致				100%一致			
Contig2882	99.6%一致			100%一致	99.3%一致	N.F	N.F	99.3%一致
Contig1132	N.F	N.F	N.F	99.8%一致	N.F	N.F	N.F	—
Contig3747	100%一致				100%一致			

こういった問題を解決するために、本事業においては単核体で子実体を形成する株を用いることで、遺伝子破壊の子実体形成への影響を直接検証できると考え、スクリーニングを行うとともに、トキイロヒラタケ単核体を用いた形質転換系の開発について実験系の確立を進めた。

3-1) 子実体形成能を有する単核株の取得

NBRC31859 株の孢子より調製した単核菌系を対象に子実体形成能を有する株をスクリーニングした結果、表 6 に示した 4 株の単核体を取得することが出来た。単核体では親株と比較して contig の数が 10 分の 1 程度に抑えられており、比較的精度の高いアセンブルができていることを示している。これは、二核と単核の違いであり、二核で解析を行うとアセンブルの精度が低くなることを示唆している。また、形成する子実体の形態も単核体毎に大きく異なり、ここでも遺伝子の多様性が認められた。

表6 トキイロヒラタケ NBRC31859 株および胞子由来の単核体の全ゲノム解析

Assembly statistics	NBRC31859	No.4	No.13	No.21	No.60
Raw reads	27,492,104	<u>88,630,996</u>	28,433,104	28,831,030	<u>81,135,974</u>
Total contig length (Mbp)	65.9	39.8	38.5	39.5	39.1
Coverage	X 61.5	X 144.4	X 148.9	148.3	X 145.9
Putative protein sequence	24,507	11,316	11,021	11,216	11,188
No. of contigs	15,548	1,597	1,227	1,402	1,372
Average contig length	2447 (max 1,481,398, mini 1,000)	24,905 (max 725,831, mini 1,016)	31,356 (max 581,101, mini 1,003)	28,170 (max 443,425, mini 1,014)	28,566 (max 531,472, mini 1,002)

No.4株



No.13株



No.21株



No.60株



上記のように、単核体のままで子実体を形成できる株を複数取得できたことにより、図5のスキームにおいて、破壊株を作成することで中間の操作を飛ばして、直接遺伝子破壊の影響を検証することが可能となった。

3-2) トキイロヒラタケ単核株を用いた形質転換系の確立

単核菌糸のまま子実体形成できる株を取得できたことより、これらの菌株を用いた形質転換系の確立を試みた。形質転換の方法は Nakazawa らによるヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の形質転換法と同様の手法で行った。プロトプラストの調製は細胞壁分解酵素としてヤタラーゼ、セルラーゼ、浸透圧調整剤として硫酸マグネシウムを用いておこない、ウシグソヒトヨタケ由来の β -tubulin プロモーター、ターミネーターを用いた発現プラスミドに薬剤耐性遺伝子 (ハイグロマイシン耐性遺伝子: *hph*) を組み込んだベクター (図6) を用いて PEG 法にて行った。

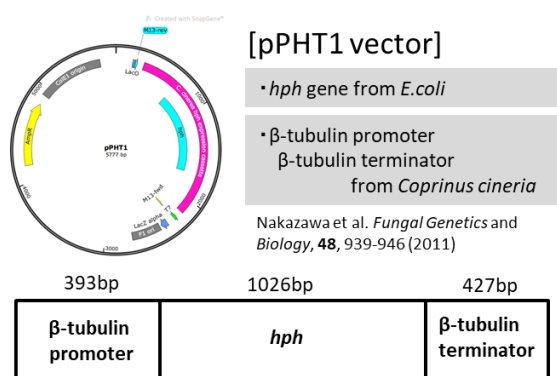


図6 形質転換のためのベクター

形質転換の操作を行った後、再生培地で短時間培養した細胞を、ハイグロマイシンを含有する寒天培地に播種し、1週間後に菌糸生育の見られたものを耐性株として保存した(図7)。

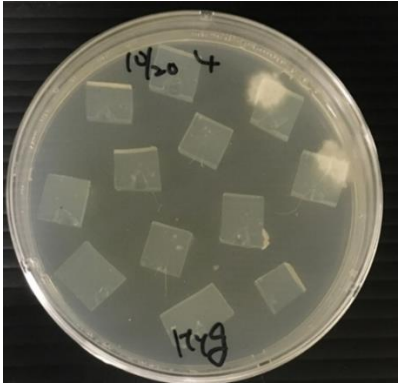


図7 耐性株のスクリーニング

選抜の結果、表6のNo.4株を親株とする耐性株を21株、No.13を親株とする耐性株41株を取得することが出来た。これらの菌株への *hph* 遺伝子の導入の確認はPCRおよびサザンハイブリダイゼーションにより行い、いずれも遺伝子の導入が確認できた(図8)。

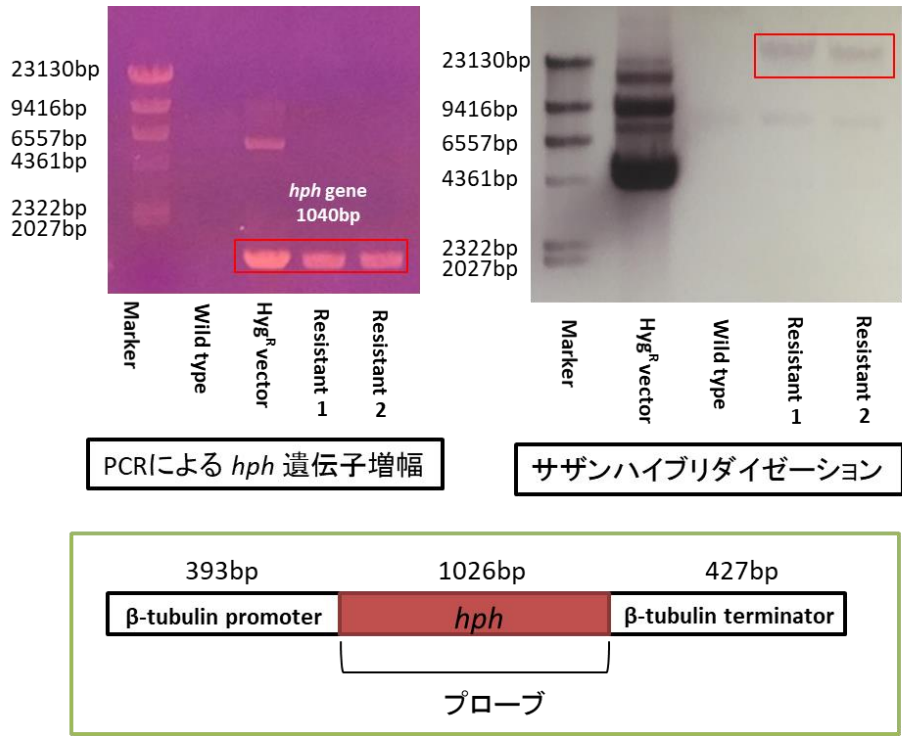


図8 導入された遺伝子の確認

3-3) トキイロヒラタケ形質転換系を用いた GFP 遺伝子の発現

トキイロヒラタケ単核体への薬剤耐性遺伝子の導入が可能であることが確認できたため、選抜マーカーとして薬剤耐性遺伝子を含み、蛍光タンパク質である GFP の発現系を、トキイロヒラタケ由来の GPD プロモーター、ターミネーターとして用いて構築したベクターを用いて発現を試みた (図 9)。

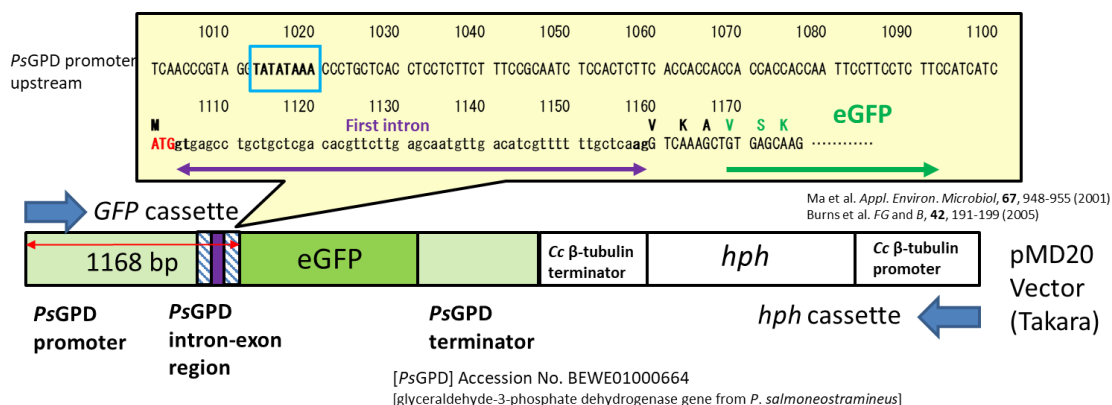


図 9 eGFP 遺伝子のトキイロヒラタケでの発現ベクター

eGFP 遺伝子の発現には、プロモーター配列と eGFP 遺伝子の間に図 9 に示したようなイントロン-エキソンの配列の挿入が必要であったが、形質転換後の菌糸を蛍光観察することで、菌糸が蛍光を発することが確認され、異種遺伝子の発現が可能であることが確認された (図 10)。

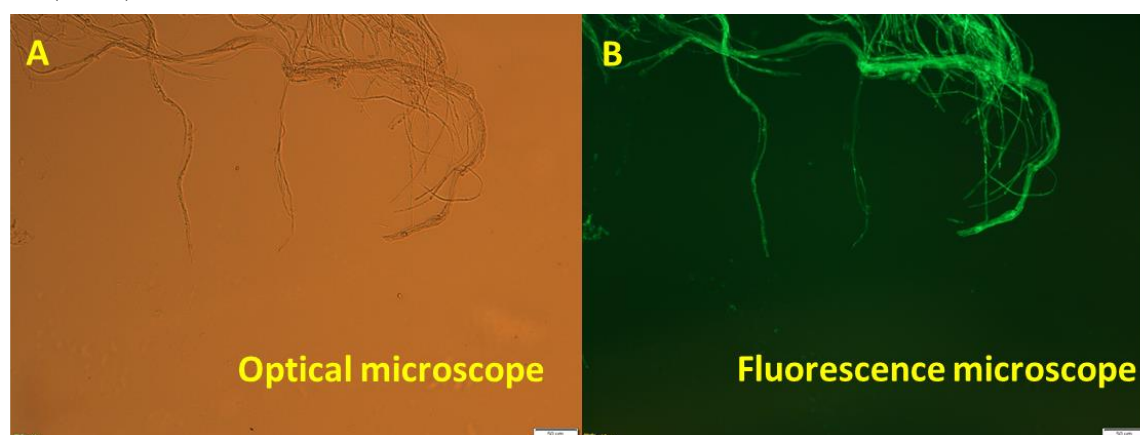


図 10 eGFP 遺伝子導入による菌糸の蛍光発光

4) 総括

本研究課題において、マツタケ、ブナシメジ、エノキタケ、トキイロヒラタケなど、これまでにデータベースがなかった全ゲノム情報や発現遺伝子情報などを DDBJ などの公的な

データベースに登録することで、公に利用できるようになった。また、新たに構築したデータベースを利用して、きのこ類微生物のPMF法によるタンパク質同定のスキームを確立し、マツタケのグルコアミラーゼ、ブナシメジのアミノペプチダーゼ、トキイロヒラタケの色素タンパクなどの同定を行うことが出来た。さらに、トキイロヒラタケの単孢子分離株に単核体のまま子実体を形成する株が存在することを明らかにするとともに、単核体の全ゲノム解析データから、胞子由来の単核体において、ゲノム遺伝子の欠損が認められることが明らかとなった。さらに、トキイロヒラタケ単核体を用いた異種遺伝子の導入及び発現法を確立できた。

3. 今後の計画

- ①解析済み未登録データの DDBJ データベースへの登録
- ②きのこ類微生物由来タンパクの PMF 分析精度の向上
- ③遺伝子ターゲッティングのための Ku70, Ku80 等の非相同末端結合関連遺伝子を破壊した菌株の取得。

4. 研究成果

原著論文・総説

1. Taxonomy of actinomycetes in the deep-sea Calyptogena communities and the antibacterial compound produced by *Actinomadura* sp. DS-MS-114, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, (2017) 31:5, 1000-1006.; Kurata A, Minamino S, Sugiura M, Kokoda K, Tsujimoto H, Numata T, Kato C, Nakasone K, Kishimoto N.
2. Degradation of ionic liquids by UV/H₂O₂ process and CMCase from novel ionic liquid-tolerant alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. SSC4, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, (2017) 31:4, 749-755.; Kurata A, Shimizu S, Shiraishi Y, Abe M, Naito N, Shimada M, Kishimoto N.
3. Antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp. YR247. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (2017) 33:73, 1-8.; Kurata A, Yamaura Y, Tanaka T, Kato C, Nakasone K, Kishimoto N.
4. Draft Genome Sequence of the Basidiomycetous Fungus *Flammulina velutipes* TR19.; *Genome Announc* (2016) 4: e00505-16; Kurata A, Fukuta Y, Mori M, Kishimoto N, Shirasaka N.
5. A high-molecular-weight, alkaline, and thermostable β -1,4-xylanase of a subseafloor *Microcella alkaliphila*, *Extremophiles* (2016), 20, 471-478.; Kuramochi K, Uchimura K, Kurata A, Kobayashi T, Hirose Y, Miura T, Kishimoto N, Usami R, Horikoshi K.

6. Properties of an ionic liquid-tolerant *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 and its extracellular protease. *Extremophiles*, (2016), 20, 415-424.; Kurata A, Senoo H, Ikeda Y, Kaida H, Matsuhara C, Kishimoto N.
7. Complete genome sequence of the xylan-degrading subseafloor bacterium *Microcella alkaliphila* JAM-AC0309, *Journal of Biotechnology*. (2016) 221, 32-33.; Kurata A, Hirose Y, Misawa N, Wakazuki S, Kishimoto N, Kobayashi T.
8. Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo - shu). *Journal of Applied Microbiology* 118.4 (2015): 873-880.; Ando, H., Kurata, A., Kishimoto, N.

招待講演・セミナー

2015 年度

RGJ congress (Pataya, Thailand)；招待講演

Kasetsart University Department of Microbiology (Bangkok, Thailand)：セミナー

2016 年度

第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス（京都）；シンポジウム

2017 年度

千葉県立博物館 きのこワールド 「マツタケ研究最前線」：招待講演

徳島大学研究クラスター 指定クラスター特別セミナー講演：招待講演

学会発表

2015 年度

RGJ congress (Pataya, Thailand)；一般講演 1 件

Pacificchem 2015 (Honolulu, USA)；口頭発表 3 件，ポスター発表 3 件

第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス（東京）；口頭発表 1 件

Meeting for Asia Mushroom Science（米子）；口頭発表 1 件

第 20 回 日本きのこ学会（つくば）；一般講演 1 件

日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）；一般講演 3 件

日本菌学会 第 59 回大会（沖縄）；ポスター発表 3 件

2016 年度

19th ISMS congress (Amsterdam, Netherland)；ポスター講演 3 件

2016 年度 日本菌学会西日本支部大会（奈良）；一般講演 3 件

第 21 回 日本きのこ学会（静岡）；一般講演 1 件

第 68 回 日本生物工学会（富山）；一般講演 2 件

第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス（京都）；一般講演 2 件

日本農芸化学会 2017 年度大会（京都）；一般講演 4 件

2017 年度

19th IUMS congress (Singapore)；ポスター講演 3 件

第 22 回 日本きのこ学会（宮崎）；一般講演 2 件

日本栄養食糧学会（沖縄）；一般講演 2 件

第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス（佐賀）；一般講演 2 件

日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）；一般講演 1 件

日本防菌防黴学会第 44 回大会（大阪）；一般講演 2 件

データベース登録

DDBJ/EMBL/GenBank Accession No.

マツタケ；BDDP00000001-BDDP00088884

ブナシメジ；BDDV01000001-BDDV01010694

エノキタケ；BDAN01000001-BDAN01005130

トキイロヒラタケ（二核体）；BDGN01000001-BDGN01026934

トキイロヒラタケ（単核体 N4）BEWE01000001-BEWE01001597

トキイロヒラタケ（単核体 N60）BEWF01000001-BEWF01001372

特許申請

なし

その他（報道・著書等）

1. 現代菌類学大鑑；堀越孝雄監修（共訳） 2016 年刊行
2. 食品学Ⅱ；栢野新市ら編（羊土社）（分担・きのこ類） 2016 年刊行
3. きのこの生理機能と応用開発の展望；監修 江口文陽（S&T 出版）（分担・マツタケ）
2017 年刊行

4. NHK 「ガッテン」2016 年 4 月 27 日放送
「新発見！鶏むね肉がこんなにもやわらかくなるとは！」
マイタケを使ったわざについて解説
5. 朝日新聞 「あのとき それから」 2016 年 9 月 28 日（夕刊）
マツタケ人工栽培についてコメント
6. 関西テレビ 関ジャニ∞のジャニ勉 2017 年 6 月 21 日放送
「関ジャニ∞の頑固道；渋谷すばるのしいたけは絶対に食わねえ」 でコメント
7. 日本テレビ系 スッキリ 2017 年 11 月 10 日
学祭対決（vs 東農大） きのこと屋&マツタケ研究
8. 読売新聞 西日本版 「大学の経営力 近畿大学 4；産学連携ビジネス」
2018 年 2 月 25 日 マツタケ人工栽培についてコメント

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「きのこの子実体形成機構の解明とそのマツタケ等有用食用きのこ類の人工栽培化技術確立への応用を目指した研究基盤形成」
(平成 27 年度～平成 29 年度)
研究成果最終報告書

研究組織：ビジネスモデルグループ

研究課題：①きのこのブランディング及びマーケティング戦略

②きのこに含有される有用成分の分析

研究担当者：准教授・大石卓史，准教授・財満信宏

研究協力者：博士研究員・田中照佳

1. 研究目的

現在、食用きのこの多くは菌床栽培を中心として人工的に栽培され、市場に供給されるものがほとんどであるが、東日本を中心に、野生のきのこを採取して食する習慣も未だ広い範囲で残っている。しかし、マツタケなどは人工栽培法が確立されておらず、天然のものを採取したものが流通しているために、生産量が減少した国産マツタケの価格は高騰し、高級食材となってきたとともに、外国産のマツタケが国内流通量の 9 割以上を占めるに至っている。

これらを背景に、これまでに数多くのマツタケ人工栽培研究がなされてきているが、偶発的な発生例はあるものの、安定した再現性のある人工栽培法の確立には至っていない。しかし、上記のように国産のみならず外国産のマツタケでさえも、季節の味覚として一般の栽培きのこよりも高い価格帯で取引されている現状から考えると、人工栽培マツタケにもある程度の潜在的ニーズが見込めるとともに、仮に人工栽培が実用化された場合、マツタケの流通・消費にも影響があると考えられる。

一方、上にのべたように現在市場に流通するきのこの多くは人工栽培化されたものが多くを占めるが、その品質、特にきのこに期待される機能性については数多くの研究成果が公表されているにもかかわらず、「きのこは美容によい」というような漠然とした情報しか共有されていない。

これらの食用きのこを取り巻く状況を把握するため、本研究課題ではきのこの消費実態を把握したうえで、①マツタケ人工栽培への期待を把握するとともに、②きのこの機能性への期待を把握し、③きのこの機能性を利用した消費者への PR 方法について検証を行った。

2. 研究内容

1) きこの消費実態の把握と人工栽培マツタケへの期待

人工栽培マツタケに対する消費者選好を分析するため、東京都在住で月 1 回以上の頻度で食品の購入を自ら行っている方 500 名を対象にインターネットによるアンケート調査を行った（平成 28 年 2 月）。パネルは性別（男女）と年代（20 歳代～60 歳代）で均等に割り付けを行った。主な調査内容としては、まずきのこ（マツタケを含む）の購入・消費の実態について調査を行った後、マツタケに関する情報を提供し、その後、マツタケに対するイメージを問うとともに、人工栽培マツタケに対する支払い意思額について CVM（仮想評価法）を用いて評価した。

1-1) 購入・消費の実態

きのこを食べる頻度（内食・中食、外食別）については、内食・中食では、「よく食べる（週 2～3 回程度）（36.8%）」が最も多く、次いで「たまに食べる（月 2～3 回程度）（31.8%）」の順となった（単一回答方式）（図 1）。一方、外食では、「あまり食べない（月 1 回以下、年数回程度）（50.4%）」が最も多く、次いで「たまに食べる（月 2～3 回程度）（31.4%）」「全く食べていない（11.6%）」の順となった（単一回答方式）（図 1）。家庭内におけるきのこの消費頻度が高いことがわかる。

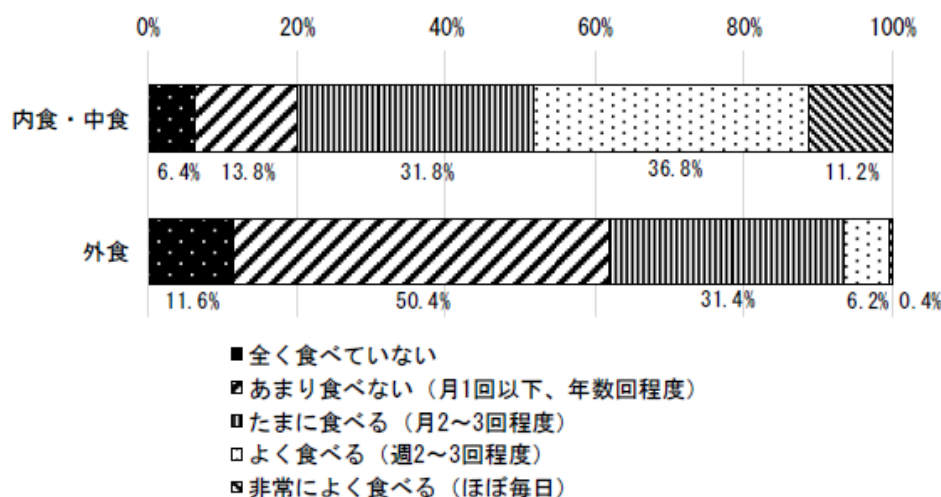


図1 きのこを食べる頻度（内食・中食・外食別；n=500）

次に、好きなきのこ（順位回答（1位～5位））については、1位の割合が最も高くなったのは「シイタケ(27.4%)」で、「マイタケ(14.8%)」「ブナシメジ(13.0%)」「エリンギ(11.4%)」「エノキタケ(10.8%)」「マツタケ(10.0%)」が続いた（図2）。1位～5位の選択割合の合計水準については、「シイタケ（1位～5位計で77.2%）」が最も高くなった。本稿の主たる分析対象であるマツタケについては、1位～5位の選択割合の合計水準でみると低位（1位～5位計で30.6%，全体の8番目）であるが、1位の選択割合のみに着目すると、「マイタケ（14.8%）」「ブナシメジ（13.0%）」「エリンギ（11.4%）」「エノキタケ（10.8%）」等、人工栽培が実用化されて比較的安価で供されている品目と遜色ない水準となっている。この点から、現在でも一定数のマツタケ愛好家が存在することが推察される。

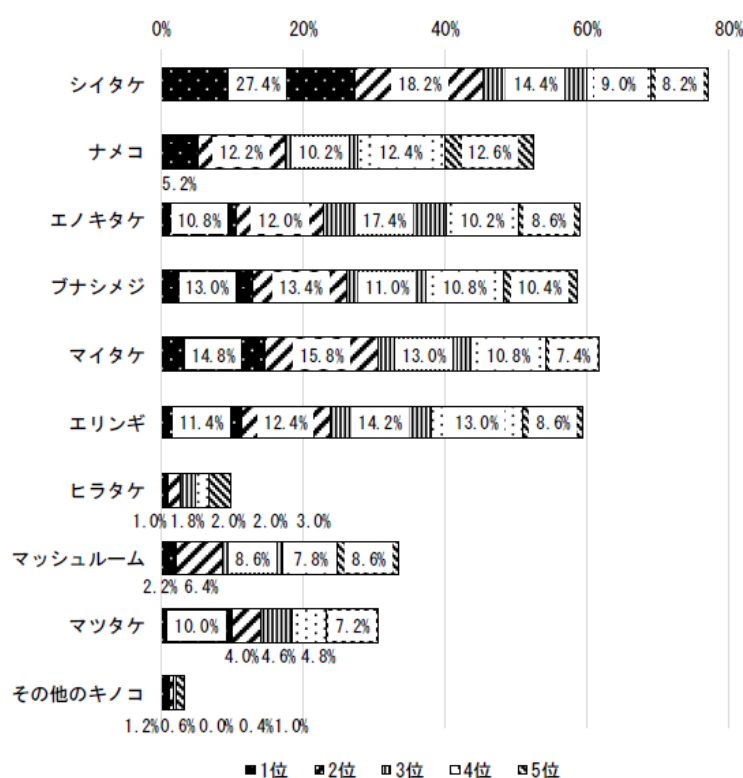


図2 好きなきのこ（1位～5位；n=500）

次に、きのこを食べる頻度（品目別）については、品目毎に異なる傾向となった（品目毎に単一回答方式）（図3）。「非常によく食べる（ほぼ毎日）」「よく食べる（週2～3回程度）」の割合が高くなったのは、「ブナシメジ（計31.9%）」「エノキタケ（計29.2%）」「シイタケ（計23.3%）」「マイタケ（計20.7%）」「エリンギ（計20.6%）」であった。一方、「全く食べていない」「あまり食べない（月1回以下、年数回程度）」の割合が高くなったのは、「マツタケ（計97.3%）」「その他のきのこ（計94.6%）」「ヒラタケ（計82.4%）」「マッシュルーム（計75.9%）」「ナメコ（計50.5%）」であった。

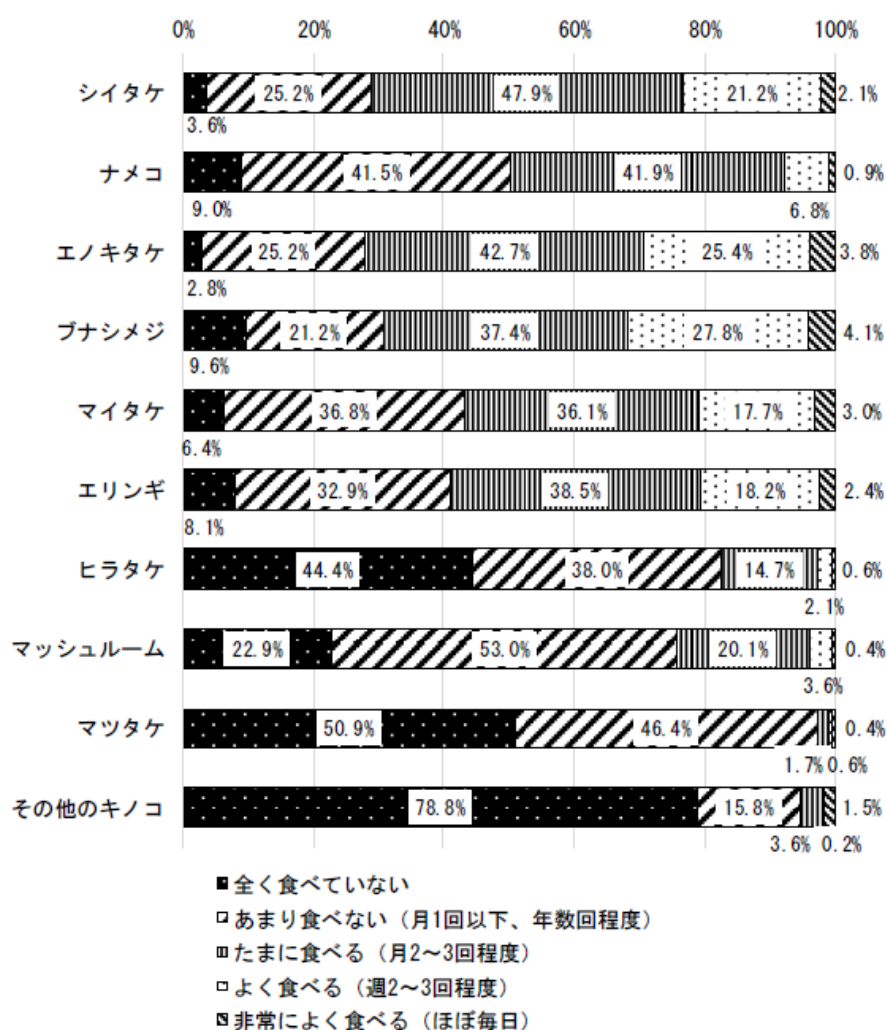


図3 きのこを食べる頻度（品目別；n=468）

次に、マツタケ（生鮮品）の購入時に重視する点については、重視する点毎に異なる傾向となった（品目毎に単一回答方式）（図4）。「非常に重視する」「やや重視する」の割合が高くなったのは、「価格（計86.6%）」「原産国・産地（計78.7%）」「鮮度（計72.6%）」「香り（計70.5%）」「安全性（計69.2%）」「食味（計58.7%）」であった。一方、「まったく重視しない」「あまり重視しない」の割合が高くなったのは、「ブランド（計25.2%）」「栄養素（計25.0%）」「パッケージ・包装（計20.9%）」「栽培方法（天然・人工）（計15.2%）」であった。

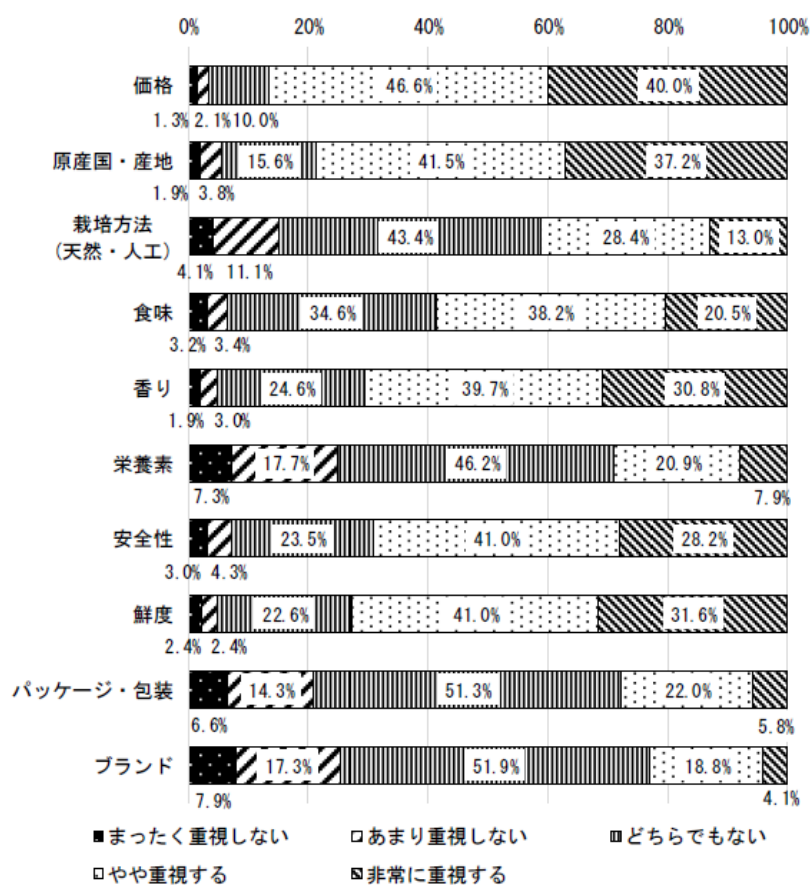


図4 マツタケ（生鮮品）の購入時に重視する点（n=468）

以上の結果から、きのこの購入・消費の実態については、人工栽培技術が既に確立・実用化され、比較的安価に供されている品目を中心に消費がなされていること、現在でも一定数のマツタケ愛好家が存在するがその消費頻度は高くないこと、マツタケ（生鮮品）の購入時には「価格」や「原産国・産地」「鮮度」等、生鮮食料品では一般的に重視される傾向にある点に加え、「香り」を重視する傾向が見てとれる。これらは、マツタケの国内生産量の低迷が続く、国内でのマツタケ流通の9割以上を外国産が占める状態となっている中で得られた回答傾向であるが、マツタケの人工栽培技術の開発・実用化に向けての示唆を与えてい

る。1つは食用きのこの人工栽培に対して、抵抗感を示す消費者が少ないと思われる点である。今後、マツタケの人工栽培技術が開発・実用化された場合、先行して人工栽培品を供している品目と同様に、消費者に受け入れられる可能性が示唆される。もう1つは、人工栽培マツタケの品質に対する消費者の要求水準についてである。マツタケの購入時に「香り」を重視する傾向が見てとれたことからわかる通り、天然マツタケと人工マツタケの品質（例えば「香り」や「食味」等）の差異がどの程度生じるか否かによって、消費者の反応も変わることが考えられる。

1-2) 人工栽培マツタケへの WTP

CVM を用いて、人工栽培マツタケ（生鮮品、200 グラム）への WTP の推定を行った。WTP に用いた標本サイズを表1及び表2に示す。WTP 推定に用いる標本の選択ならびに標本サイズの決定は以下の手順で行った。はじめに、①基本的に WTP 推定に関わるすべてのアンケート項目に回答している被験者の観測値を標本として取り出した。次に、②抵抗回答を表明している被験者の観測値を除外することで標本サイズを決定した。

表1 標本サイズ（ノンパラメトリック推定用）

タイプ	初期 提示額(円)	回答数	YY ^{注1)}		YN ^{注1)}		NY ^{注1)}		NN ^{注1)}		合計		抵抗 回答数 ^{注2)}
			実数	%	実数	%	実数	%	実数	%	実数	%	
1	1,000	100	19	20.0%	43	45.3%	13	13.7%	20	21.1%	95	22.8%	5
2	3,000	100	15	17.2%	23	26.4%	23	26.4%	26	29.9%	87	20.9%	13
3	5,000	100	9	10.8%	18	21.7%	16	19.3%	40	48.2%	83	20.0%	17
4	10,000	100	6	7.9%	10	13.2%	17	22.4%	43	56.6%	76	18.3%	24
5	20,000	100	4	5.3%	8	10.7%	3	4.0%	60	80.0%	75	18.0%	25
全体		500	53	12.7%	102	24.5%	72	17.3%	189	45.4%	416	100.0%	84

注1: 始めの文字は初期提示額に対する回答を、二番目の文字は二段階目の提示額に対する回答を表している。また、Yは「はい（買ってもいい）」を、Nは「いいえ（買いたくない）」を表している。

注2: 抵抗回答を示した回答者はWTP 推定時には対象外としている。

表2 標本サイズ（パラメトリック推定用）

タイプ	初期 提示額(円)	回答数	YY ^{注1)}		YN ^{注1)}		NY ^{注1)}		NN ^{注1)}		合計 ^{注3)}		抵抗 回答数 ^{注2)}
			実数	%	実数	%	実数	%	実数	%	実数	%	
1	1,000	100	15	20.5%	38	52.1%	8	11.0%	12	16.4%	73	21.5%	5
2	3,000	100	13	17.6%	21	28.4%	19	25.7%	21	28.4%	74	21.8%	13
3	5,000	100	9	12.9%	17	24.3%	14	20.0%	30	42.9%	70	20.6%	17
4	10,000	100	6	10.0%	8	13.3%	11	18.3%	35	58.3%	60	17.7%	24
5	20,000	100	4	6.5%	7	11.3%	3	4.8%	48	77.4%	62	18.3%	25
全体		500	47	13.9%	91	26.8%	55	16.2%	146	43.1%	339	100.0%	84

注1: 始めの文字は初期提示額に対する回答を、二番目の文字は二段階目の提示額に対する回答を表している。また、Yは「はい（買ってもいい）」を、Nは「いいえ（買いたくない）」を表している。

注2: 抵抗回答を示した回答者はWTP 推定時には対象外としている。

注3: 標本サイズ（パラメトリック推定用）では、抵抗回答とは別に、WTP 推定に関わる質問に対して無回答の見られた回答者（77名）についても除外している。

ノンパラメトリック推定法により導出された、人工栽培のマツタケ(生鮮品, 200g)に対する WTP を図 5 に示した。これによると、WTP は中央値で 2,178 円、平均値で 6,052 円となった。これは、国産・天然もののマツタケの販売価格帯よりは低いものの、他の食用きのこより高い価格帯である。

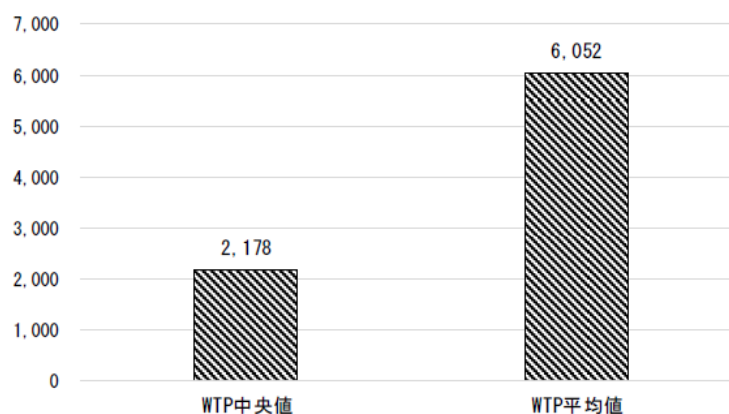


図 5 WTP 推定結果 (ノンパラメトリック推定) (単位: 円)

次に、パラメトリック推定法による支払行動関数の推定結果を表 3 に示した。支払行動関数に含まれている説明変数の係数の符号についてみると、まず、BID (提示額) の係数の符号は負となっている。これは提示額が高くなるほど支払行動をとりにくくなることを示しており、整合的な結果であるといえる。AGE (年齢)、INC (世帯年収) の係数の符号はいずれも正となって

表 3 支払行動関数の推定結果 (パラメトリック推定)

変数名	係数	標準誤差	t値	p値
CONST	7.16	1.37	5.21	0.00
AGE	0.76	0.34	2.21	0.03
INC	0.10	0.04	2.75	0.01
DIET	0.54	0.22	2.41	0.02
PRE	1.52	0.31	4.97	0.00
BID	-1.42	0.09	-15.43	0.00
対数尤度				-395.71
AIC				803.43

注: WTP 分布としては対数ロジスティック分布を仮定。

おり、年齢や世帯年収が高いほど、支払行動をとりにやすくなることを示している。また、DIET (きのこを食べる習慣)、PRE (好きなきのこ) の係数の符号もいずれも正となっており、きのこを食べる習慣がある(食べる頻度が週 2 回以上)ほど、また、好きなきのこの上位(3 位以内)にマツタケが入っているほど、支払行動をとりにやすくなることを示している。以上から、年齢や世帯年収が高いほど、きのこを食べる習慣があるほど、マツタケが好きなほど、人工栽培マツタケに対する支払行動をとりにやすくなる傾向にあることがわかる。

次に、パラメトリック推定法により導出された、人工栽培のマツタケ（生鮮品、200g）に対する WTP を図 6 に示した。これによると、WTP は中央値で 2,451 円、平均値で 5,551 円となった。これはノンパラメトリック推定法による WTP 推定結果と同水準であり、国産・天然もののマツタケの販売価格帯よりは低いものの、他の食用きのこより高い価格帯となった。

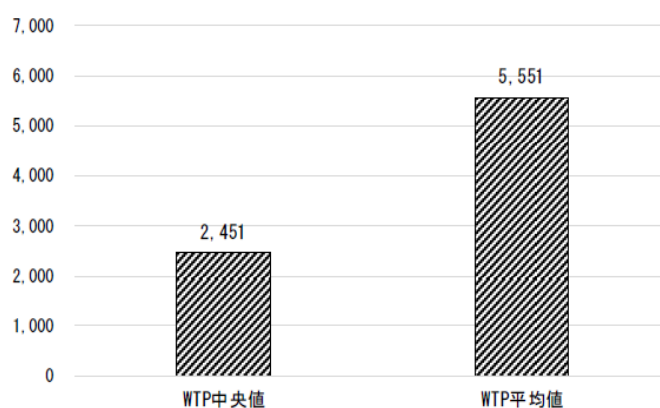


図 6 WTP 推定結果（パラメトリック推定）（単位：円）

以上から、マツタケの人工栽培技術の開発・実用化に対する潜在的なニーズが見てとれるといえる。また、パラメトリック推定法による支払行動関数の推定結果からは、人工栽培マツタケの主たるターゲット層が推察できる。すなわち、人工栽培マツタケのマーケティングにあたっては、年配者である、世帯年収が高い、きのこを食べる習慣がある、マツタケが好きであるといった特徴を有する消費者群へ優先的にアプローチすることが重要となろう。

1－3）総括

本稿では、一般消費者を対象としたアンケート調査の回答データを用いて、人工栽培マツタケに対する消費者の選好の検証を行った。

きのこの購入・消費の実態については、人工栽培技術が既に確立・実用化され、比較的安価に供されている品目を中心に消費がなされていること、現在でも一定数のマツタケ愛好家が存在するが消費頻度は高くはないこと、マツタケ（生鮮品）の購入時には「価格」や「原産国・産地」「鮮度」等、生鮮食料品では一般的に重視される傾向にある点に加え、「香り」を重視する傾向が見てとれた。

また、人工栽培マツタケ（生鮮品、200グラム）への WTP は、WTP 中央値が 2,100 円～2,500 円、WTP 平均値が 5,500 円～6,100 円と推定された。また、パラメトリック推定法による計測結果からは、年代や世帯年収が高いほど、きのこを食べる習慣があるほど、マツタケが好きほど、人工栽培マツタケに対する支払行動をとりやすくなる傾向が見てとれた。

今後は、人工栽培マツタケに求められる品質水準（香り、食味等）の検討や、人工栽培マツタケの効果的なマーケティング戦略の検討、マツタケ産地ならびにマツタケの市場流通への影響の検証等を行うことが重要といえる。

2) きのこと消費の現状と機能性への期待

農産物や食品に含まれる機能性成分を日常的に摂取することは健康の維持や病気の予防に役立つとされ、我が国においてもこれまで様々な研究が進められてきた。また、平成 27 年 4 月に「機能性表示食品」制度が開始されたことを受け、機能性成分についての注目が高まっている状況といえる。きのこも様々な機能性成分を有しているが、その生産拡大や販売促進を考える際には、機能性成分の取り扱いが重要になると思われる。これらを背景として、本研究では、きのこ消費の現状とあわせて、消費者によるきのこの機能性への期待等について、アンケート調査による把握・分析を行った。(大学生向けの調査は 2017 年 9 月に実施。一般消費者向けの調査は 2017 年 12 月実施)。大学生向けの調査の回答者は 531 名である。一方、一般消費者向けの調査の回答者は東京都在住者の 500 名、大阪府在住者の 500 名の計 1,000 名である。一般消費者については、東京・大阪共に、性別(男・女)と年代(20 歳代, 30 歳代, 40 歳代, 50 歳代, 60 歳代)で均等に割り付けを行い、インターネットアンケート調査により調査を実施している。

2-1) きのこと消費の現状ときこの機能性に対する認識

一般消費者を対象としたきのこを食べる頻度(品目別)については、2016 年度の調査と同様の傾向を示し、品目毎に異なる傾向となった(品目毎に単一回答方式)(図 7)。「非常によく食べる(ほぼ毎日)」「よく食べる(週 2~3 回程度)」の割合が高くなったのは、「ブナシメジ」「エノキタケ」「シイタケ」であった。一方、「全く食べていない」「あまり食べない(月 1 回以下、年数回程度)」の割合が高くなったのは、「マツタケ」「マッシュルーム」「ナメコ」であった。

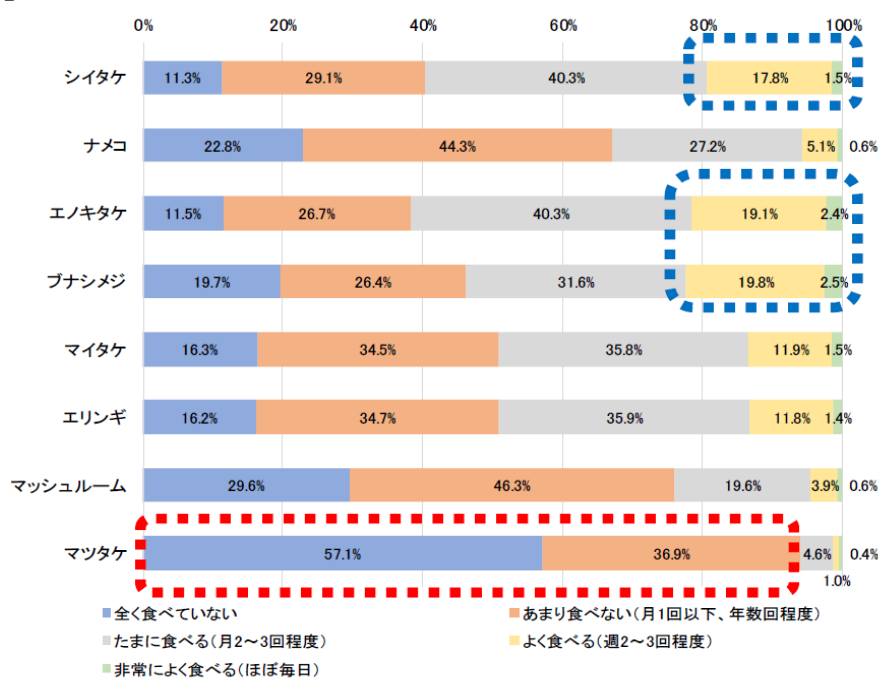


図 7 きのこと(生鮮品)を食べる頻度(一般消費者: n=1000)

次に、好きなきのこ（順位回答（1位～3位））についても前年度と同様に、1位の割合が最も高くなったのは「シイタケ」で、「エノキタケ」「ブナシメジ」「マイタケ」「エリンギ」「マツタケ」が続いた（図8）。マツタケについては、1位～3位の選択割合の合計水準で見ると「エノキタケ」「ブナシメジ」「マイタケ」「エリンギ」よりも低位であるが、1位の選択割合ではこれらのきのこよりも高く一定数のマツタケ愛好家が存在することがここでも推察される。

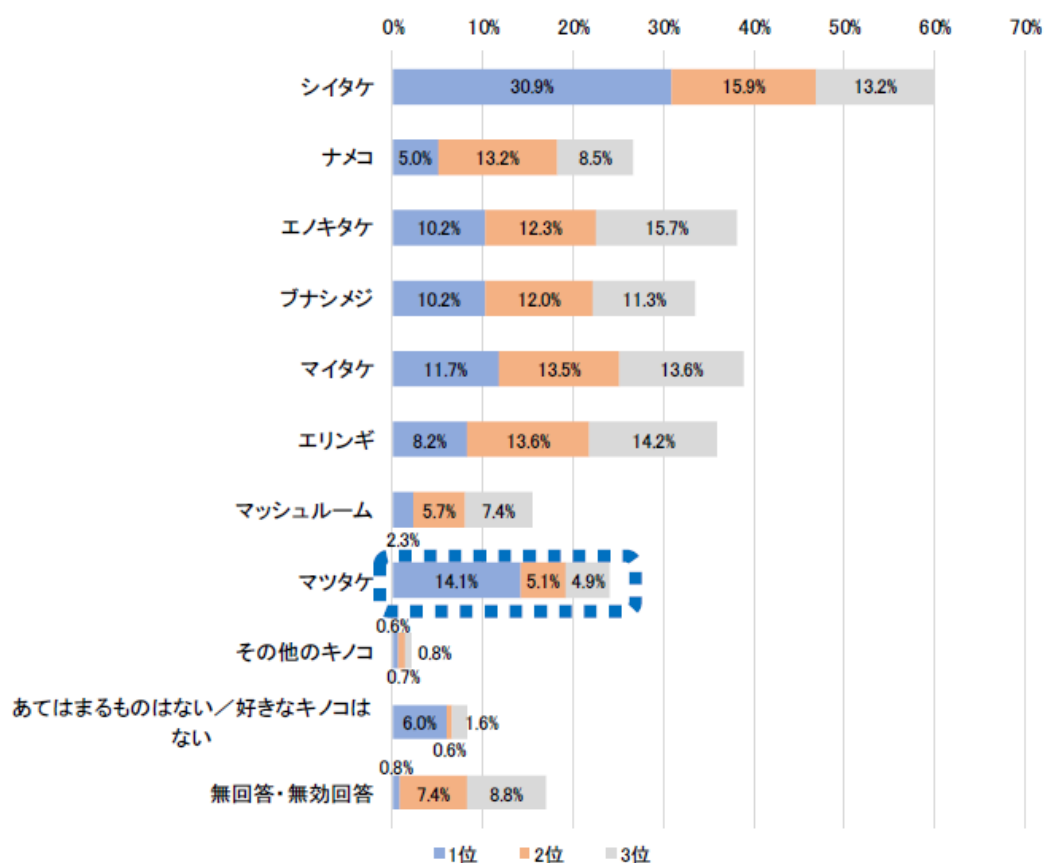


図8 好きなきのこ（1位～3位：一般消費者；n=1000）

そこで、きのこを消費する理由について調査したところ、おいしさ（食味）が最上位となったほか、低カロリー、食物繊維が豊富といった食の健康面への効果に関する回答が一定程度（2～3割）得られた（図9）。

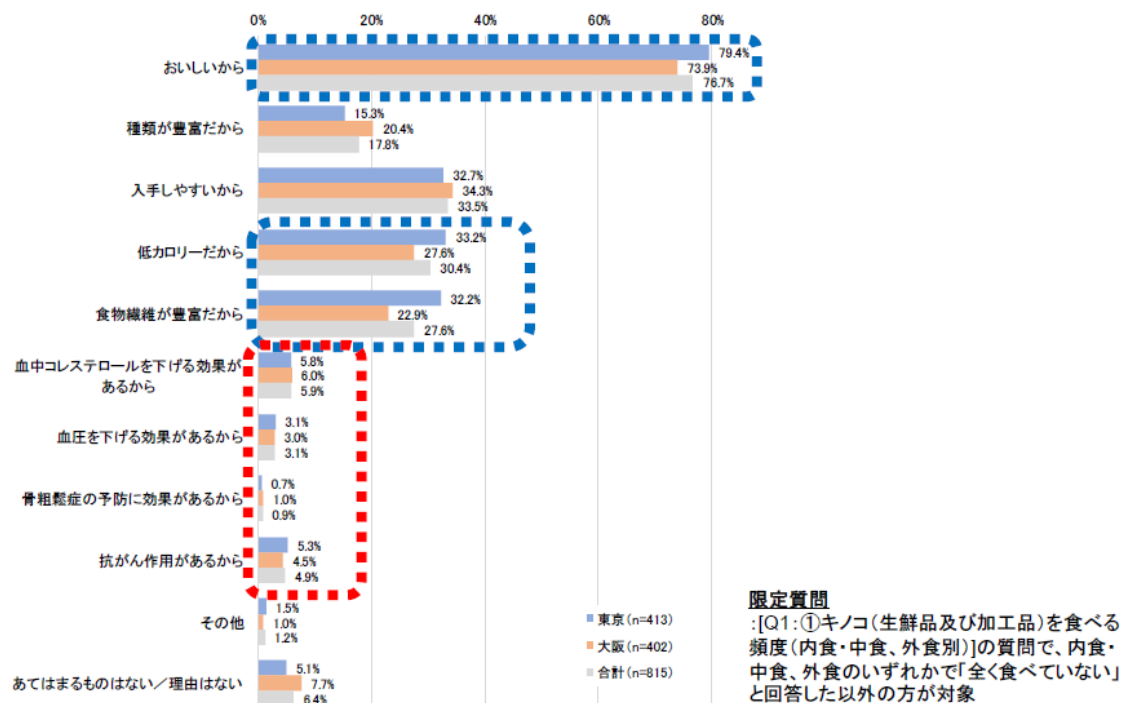


図9 普段きのこを食べている理由（一般消費者：n=815）

この結果を受け、きのこの機能性に対する期待について調査を行ったところ、大学生では、抗がん作用、便秘解消作用、美容効果への期待がやや高い傾向にあった（図 10）。一方、一般消費者においては、血中コレステロール低下作用、便秘解消作用、抗がん作用、血圧低下作用への期待が高くなった（図 11）。

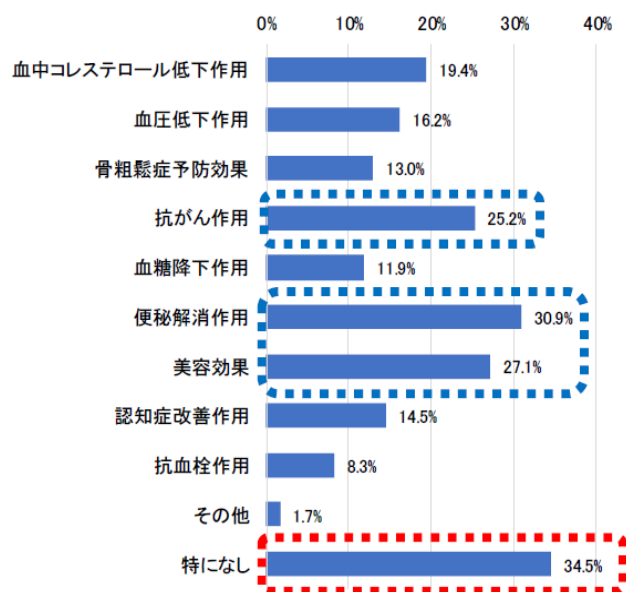


図 10 きのこの機能性への期待（大学生：n=531）

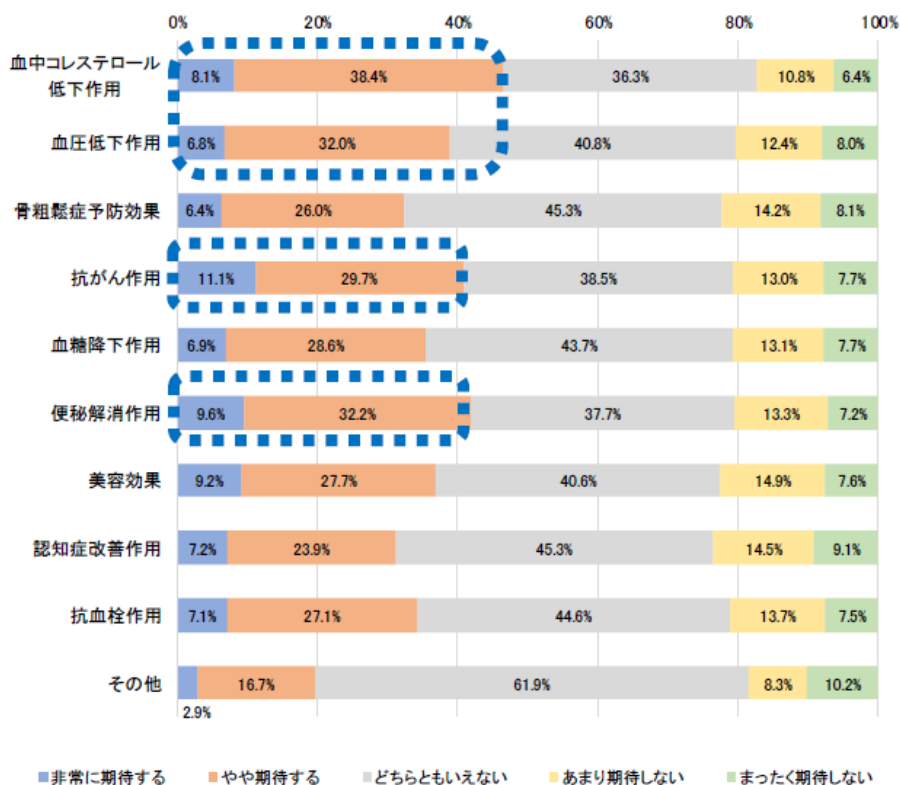


図 11 きのこの機能性への期待（一般消費者：n=1000）

2-2) 機能性農産物・食品についての消費者の考えとPR方法

上記の調査より、消費者はきのこに対して一定の機能性を期待する傾向が少なからず認められた。図12のように食品に含まれる機能性成分についての動物実験結果を示すことにより、どのような感想を持つかについて調査したところ、「動物実験の結果に関心を持った」「マウスがかわいそうである」など、提示された結果や説明内容に関心を示す回答が多く得られた（図13、図14）

次に、下記の「「機能性成分」についての動物実験の結果」の説明をお読みください。

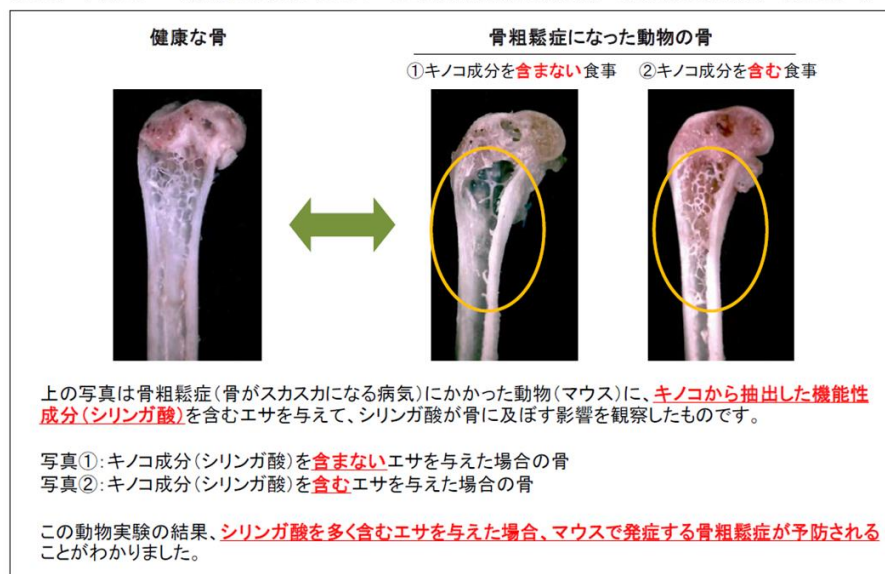


図12 機能性成分の動物実験結果の提示

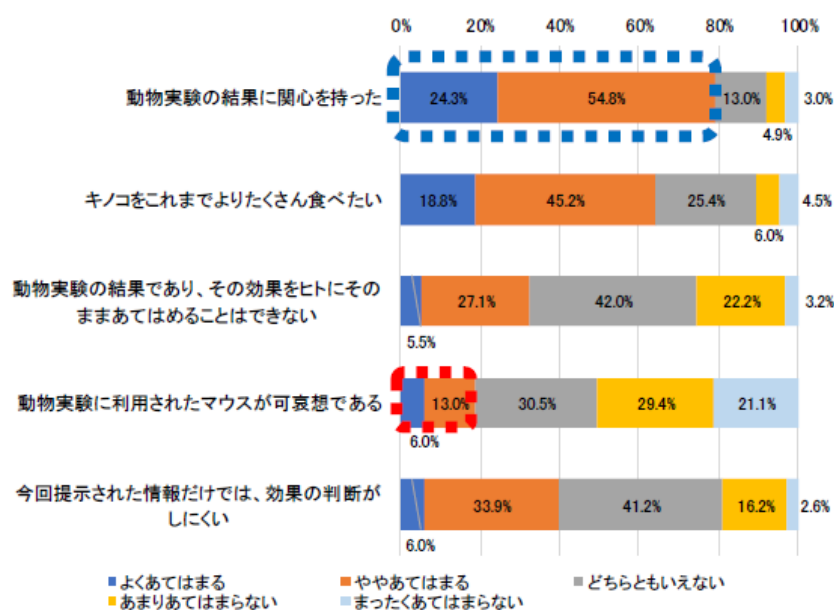


図13 「「機能性成分」についての動物実験の結果」の説明を読んでの感想
(大学生：n=531)

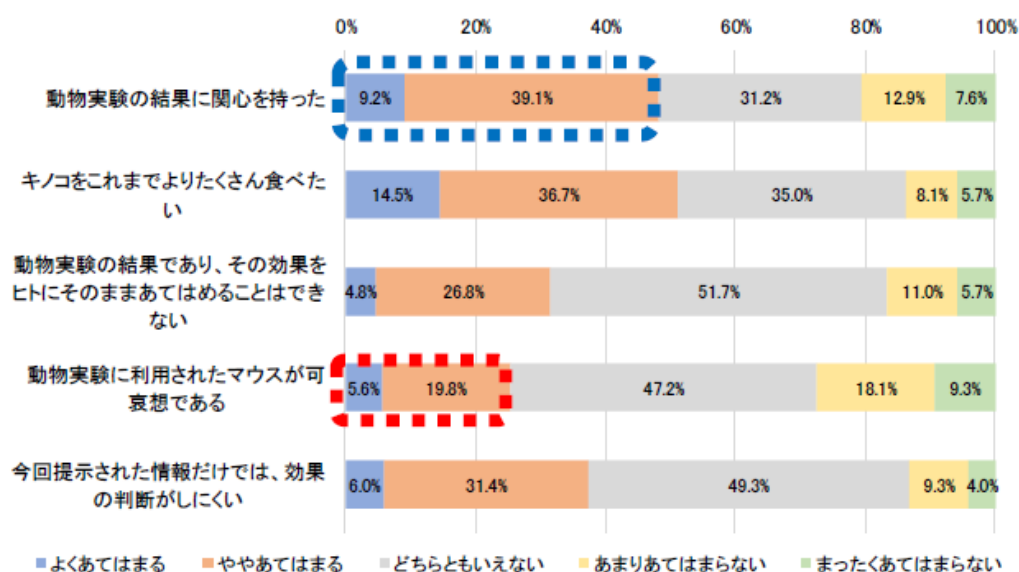


図 14 「「機能性成分」についての動物実験の結果」の説明を読んだ感想
(一般消費者：n=1000)

ここで、食品の持つ機能性を消費者にアピールし、商品を PR する新しい方法として下記の説明（図 15）を読んでもらうことで、消費者がどのように感じるかについて調査を行った。その結果、大学生、一般消費者共に提示した結果や説明内容に関心を示す回答が多く得られたが、特にグラフと画像の両方を一緒に提示したほうがわかりやすいと感じる傾向が見られた（図 16, 17）

まず、下記の「新しく開発した食品の PR 方法」の説明をお読みください。

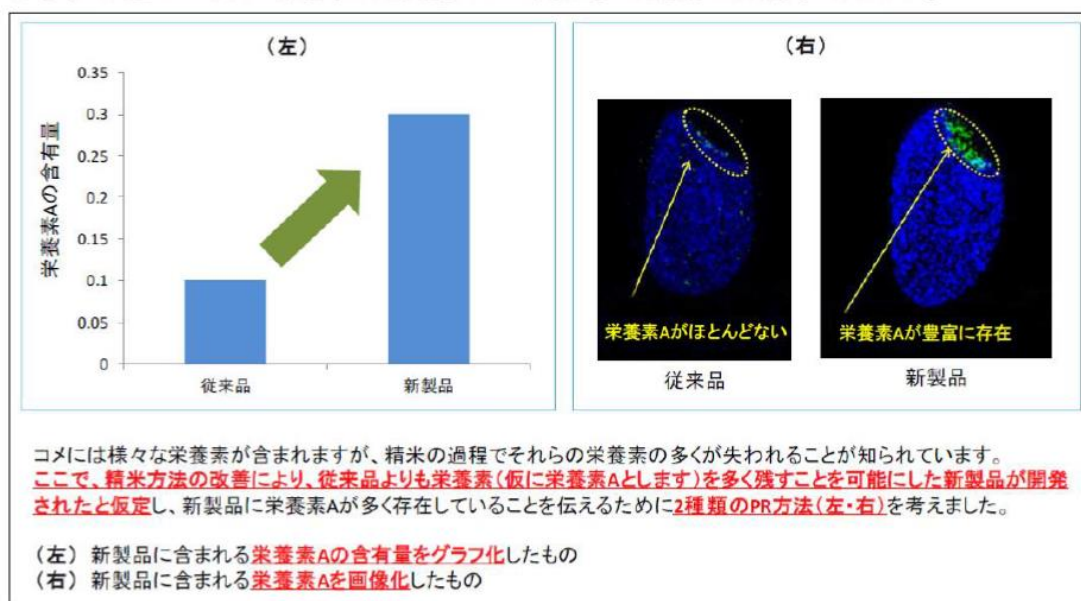


図 15 「新しく開発した食品の PR 方法」の提示

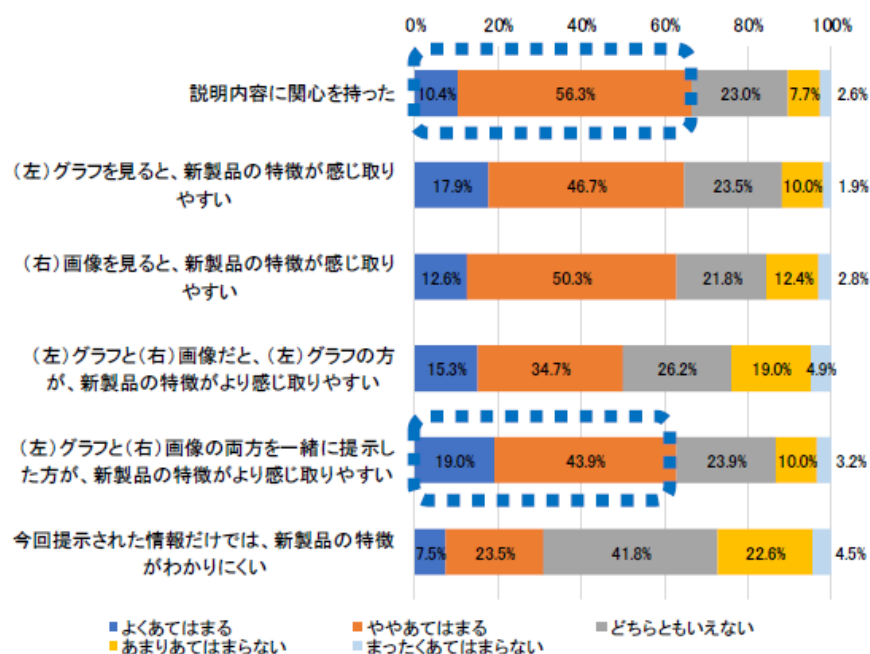


図 16 「新しく開発した食品の PR 方法」を読んでの感想
(大学生：n=531)

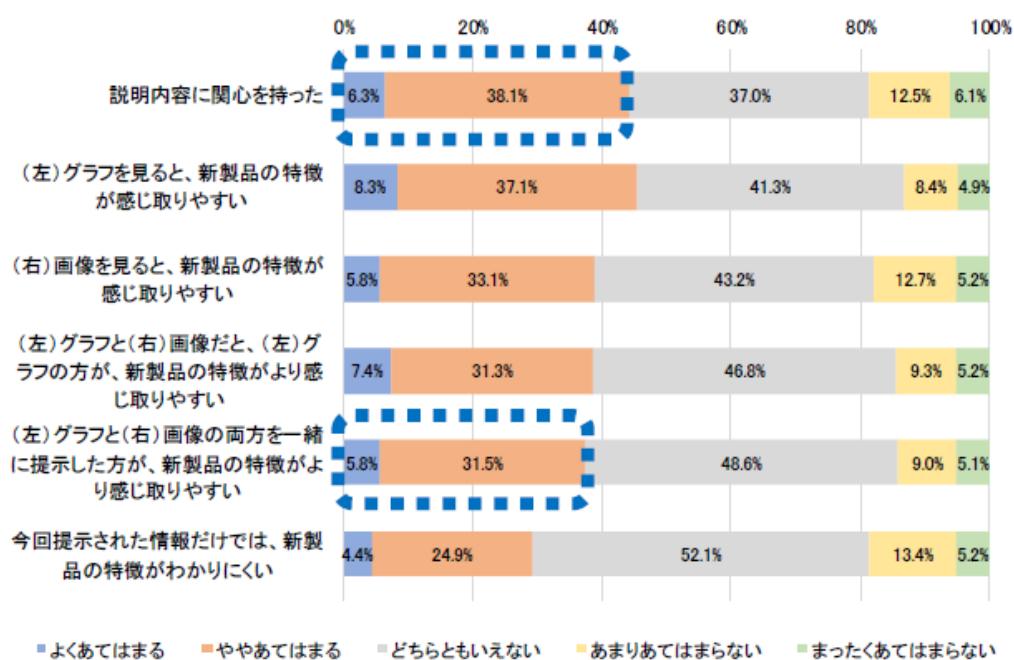


図 17 「新しく開発した食品の PR 方法」を読んでの感想
(一般消費者：n=1000)

2-3) 総括

きのこの機能性については、抗がん活性や美容効果など一定程度以上の期待を集めた効果・作用が複数見られたが、こういった効果に関する関心には年齢層によって異なっていた。よって、今後、きのこの機能性に期待する消費者像の特定をおこなうための詳細な分析が必要であることが示唆された。

また、きのこのに限らず、機能性を示す成分を含む食品に対し関心を示す消費者が一定の割合で存在することが確認されたが、機能性農産物・食品の認知度をこれまで以上に増加させるためにはマーケティング戦略の検討がひつようであることが示唆された。

3. 今後の計画

人工栽培マツタケにおいては、香り、食味といった求められる品質の検討を行うとともに、効果的なマーケティング戦略を検討していくことが必要である。また同時に、既存のマツタケ産地や市場流通への影響についても検証していく必要がある。

きのこの機能性とマーケティング戦略については、きのこの機能性を評価する消費者像を特定していくとともに、機能性のPR方法等を検討し、販売促進のための機能性の取り扱い方策についても検討する必要がある。

4. 研究成果

原著論文・総説

1. イメージング質量分析の食品科学への応用：久後裕菜・山本彩実・森山達哉・財満信宏；J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 64, 11-15 (2016)
2. 質量分析イメージング法による脂質の可視化：久後裕菜・山本彩実・森山達哉・財満信宏；オレオサイエンス 16:225-231. (2016)
3. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry.; Y. Yoshimura, N. Goto-Inoue, T. Moriyama, N. Zaima; Food Chemistry 210: 200-211 (2016)
4. Anti-osteoporotic activity of syringic acid diet in ovariectomized mice.; T. Tanaka, N. Kawaguchi, N. Zaima, T. Moriyama, Y. Fukuta, N. Shirasaka; J. Nat. Med. 71:632-641 (2017)

招待講演・セミナーなど

1. 財満信宏・大石卓史・白坂憲章・森山達哉 (2018) 「食品分野における MSI データ使用に対する一般消費者の意識調査」 質量分析イメージングセミナー2018, 島津製作所

学会発表

1. 大石卓史・白坂憲章・福田泰久 (2016) : 「人工栽培マツタケに対する消費者選好」 林業経済学会 2016 年秋季大会, 島根大学
2. 大石卓史・財満信宏・白坂憲章・福田泰久 (2017) : 「きのこ消費の現状と機能性への期待」 林業経済学会 2017 年秋季大会, 九州大学

特許申請

1. 発明の名称：骨代謝改善用組成物及び骨代謝改善食品
出願番号：特願 2017-040722
出願日：平成 29 年 3 月 3 日
2. 発明の名称：脂質代謝改善用組成物及び脂質代謝改善用食品
出願番号：特願 2017-040682
出願日：平成 29 年 3 月 3 日

プレスリリース集



鉄道で「狩り」庶民の娯楽

里山の開発・荒廃 減る生息地

を現実にしようといふ
 うつゝと増進の途なりといふ
 別のことよりするべきなり。人士
 衆賢。茲來松本府司の爲
 生協を建設院宣々、且中實
 なく(⑤)は、實業進出の途
 外は如何の團體を、監
 外次第に構築するを決定
 究つてゐる。「うつゝと増進
 然る處に」の生協のメロに
 たり、あつた土地に團體的
 にあつて、基礎的の足成を
 なす事は、殊生を口へて
 一にあらうといふにききあつ
 といふことなり。

いざいざと生協大建設
 地蔵堂の山田實地なり(⑥)
 け。團體を定むるに團體長
 かみ方を消去す。うつゝ
 と増進の團體を定むるに
 せられん(⑦)といふこと。た
 りに一團體に成つたこと。
 「茲來の方面に」の⑧團體
 ⑨なり。あつて、⑩といふ
 れど進歩を出るや就處に
 といふことなり。

だに「言はれどは、」と云ふ
 かつ「言はれどは」は恒に恒に。
 「既に取つたも、」能くま
 り、能くまを、改めば「こ
 ち」云々。重山は、能くま
 生物學に必要の手記の、
 作らざるに、通ずるべし。
 能くま、こゝに、云々なる
 味へ、こゝに重山の、
 す。金儲を、云々。云々。
 能くま、生物學、こゝに、
 云々。云々。云々。云々。
 生物學に、人類も、
 なるべし。云々。云々。云々。

へ大きくて自立
 するに必要わけら
 々々狩りは、関西
 の庶民の一大シ
 りました。
 れだけツツ々々が
 ても、海外から輸
 ツツ々々人気が親
 には、不思議でもあ
 りいしきのこは他
 んであります。平安
 へ「都の文化」く
 ツツ々々人気の背
 しれませぬ。

◇次回は「2万5千分の1地形図」の予
 定です。

生物としてのきのこのから
描かれたきのこのこ
きのこにまつわる
文化まで



きのこ ワンダーランド

～第2期～

平成29年

9.16(土)～12.27(水)

千葉県立中央博物館

NATURAL HISTORY MUSEUM AND INSTITUTE, CHIBA

〒260-8682 千葉市中央区青葉町955-2(青葉の森公園内)
TEL 043-265-3111(代表)

入場料／一般:500円(400円) 高校生・大学生:250円(200円)

※中学生以下・65歳以上の方、障害者手帳をお持ちの方は無料 ※()内は20名以上の団体料金
※休館日：毎週月曜日(月曜日が祝日の場合は翌火曜日)

Q 中央博

Follow @chiba_chuohaku

<http://www.chiba-muse.or.jp/NATURAL/>

※詳しくはウェブサイトでご確認ください。

後援：NHK 千葉放送局、主婦の友社、小学館の図鑑 NEO、千葉テレビ放送、
千葉日報、バイ インターナショナル、bayfm78、山と溪谷社

協力：京葉銀行、そごう千葉店、チバきのこ大祭、千葉銀行、千葉菌類談話会、
千葉興業銀行、日本きのこマイスター協会、日本冬虫夏草の会(五十音順)

きのこは森をつくり、森で生まれた

森はきのこがいなくては生きていけません。
森は人々の営みを生み出します。森ときのこと人々の文化。
この不思議な関係を多方面から紹介します。
また、当館が開館以来収集してきた
西洋と日本の菌類図譜集を一挙に公開します。

きのこは動物でも植物でもない

孢子でふえる、きのこの謎を紹介します。



変なかたちのきのこたち

きのこの形は実に様々。
一度見たら忘れられないへんてこな形のきのこを紹介します。

きのこの毒にご用心

ひとくち食べただけで
死んでしまうような猛毒きのこなど
危険なきのこを紹介します。

きのここと森の深い関係

4億年前に陸に植物が上陸した時から、
きのこは森に不可欠な存在です。里山も
きのこをコントロールすることで成立しました。

世界のきのこ文化

きのこをモチーフとした
様々な品々から、きのこをめぐる
文化を紹介します。



分類学の父 カール・フォン・リンネ著 「自然の体系」(1735年刊)の初版本を公開

●公開日
9/16(土)~18(月)、10/28(土)~11/12(日)、12/22(金)~24(日)
世界に希少部数しか確認されていない貴重なものです。

素敵なきのこの博物画がたくさん

近代的な菌類の分類学がはじまった18世紀の西洋の図鑑類や
江戸時代の日本の図譜など、多様な手法で描かれた菌類図譜の魅力を紹介します。
南方熊楠の肉筆画も紹介



〈関連企画〉 ※各講演会 先着150名、入場料必要、講堂にて

講演会「映画の中のきのこ」

9/23(土祝) 13:00~16:00
講師:飯沢耕太郎(きのこ文学研究者/写真評論家)、
藤千恵(ギャラリーきのこ)

講演会「絵画史から見たきのこ」

10/1(日) 13:30~15:30
講師:平松 洋(美術評論家/フリーキュレーター)

講演会「切手に見る海外のきのこ」

10/21(土) 13:30~15:30
講師:石川博己(きのこ切手収集家)

講演会「きのここと健康」

11/12(日) 13:30~15:30
講師:江口文陽(東京農業大学)

講演会「マツタケ栽培最前線」

11/23(木祝) 13:00~16:00
講師:山中高史(森林総合研究所)、
白坂憲章(近畿大学)、吉村文彦(まつたけ山復活させ隊)

講演会「文学・漫画の中のきのこ」

12/9(土) 13:30~15:30
講師:飯沢耕太郎(きのこ文学研究者/写真評論家)

きのこ展オクトーバーフェスト

10/7(土)、8(日) 菌を味わう2日間!

つくって遊ぼう

9/16(土)、18(月)、10/29(日)、11/11(土)、12/24(日)
缶バッチャやマグネットなどのきのこグッズを作ります。

きのこクイズ大会

12/17(日)
なめじろうとチーバくんのクイズ大会、クイズに
参加した人にはすてきなプレゼントを差し上げます。

ミュージアムトーク

9/16(土)、10/7(土)、8(日)、14(土)、15(日)、28(土)、
11/4(土)、18(土)、25(土)、12/2(土)、17(日)、23(土)

※詳しくはウェブサイトをご覧ください。



〈交通案内〉

□電車・バスをご利用の場合

- JR千葉駅(京成千葉駅でも可)東口7番乗り場から
京成バス「千葉大学病院」
「千葉大学病院:南矢作」行き、同6番乗り場から
ちばシティバス「川戸都苑」行きで約15分。
「中央博物館」バス停下車、徒歩約7分。
- JR蘇我駅東口2番乗り場から小湊鉄道バス
または千葉中央バス「大学病院」行きで約15分。
「中央博物館」バス停下車、徒歩6分。
- 京成千葉寺駅から徒歩約20分
(蘇我駅からのバスは千葉寺駅を経由します)。

□自動車をご利用の場合

- 京葉道路「松ヶ丘」インターから大網街道を市地方面へ。
県立青葉の森公園北口駐車場を目指してください。

原著論文集

Draft Genome Sequence of the Basidiomycetous Fungus *Flammulina velutipes* TR19

Atsushi Kurata, Yasuhisa Fukuta, Miho Mori, Noriaki Kishimoto, Norifumi Shirasaka

Faculty of Agriculture, Kindai University, Nakamachi, Nara City, Nara, Japan

All authors contributed equally to this work.

Here, we report the draft genome sequence of *Flammulina velutipes* TR19, which was newly isolated from commercial strains in Japan. The genes related to fruiting body formation in the basidiomycete were identified by whole-genome analysis.

Received 23 April 2016 Accepted 28 April 2016 Published 9 June 2016

Citation Kurata A, Fukuta Y, Mori M, Kishimoto N, Shirasaka N. 2016. Draft genome sequence of the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes* TR19. *Genome Announc* 4(3): e00505-16. doi:10.1128/genomeA.00505-16.

Copyright © 2016 Kurata et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Norifumi Shirasaka, sirasaka@nara.kindai.ac.jp.

Fruiting bodies of basidiomycetous fungi are referred to as mushrooms. The production of mushrooms is important in the food, pharmaceutical, and biotechnological industries (1). Although the demand for mushrooms has expanded all over the world, it is difficult to constitutively develop fruiting bodies in many basidiomycetes (2). Fruiting body formation is proposed to start with the formation of an aggregate from mycelium, the formation of a primordium, and the outgrowth of the mature fruiting body (3). Although insights into fruiting body development have been provided in several basidiomycetes (4–6), the complex molecular mechanism in each developmental stage remains to be revealed.

We newly isolated *Flammulina velutipes* TR19 by mating. *F. velutipes*, which belongs to the order Agaricales, is known as winter mushroom. Strain TR19 stably forms a fruiting body using potato dextrose agar (PDA) liquid medium. In order to elucidate the molecular mechanisms in formation of fruiting body, we sequenced the whole genome of strain TR19 using the Illumina HiSeq (Hokkaido System Science Co., Ltd., Japan). The genomic DNA of dikaryotic TR19 cells was prepared using Isoplant II (Nippon Gene Co., Ltd., Japan). Paired-end libraries of 100-bp fragments were prepared, and the genome sequencing generated 45,722,056 raw reads covering a total of 4,618 Mb (Phred >Q30, 92.52%). Quality-trimmed DNA reads conferring 132-fold coverage were assembled *de novo* by Velvet 1.2.08. As a result, the genome sequence comprised 5,130 contigs totaling 34,792,959 bp, with an average length of 6,782 bp (largest, 792,880 bp; smallest, 169 bp). An N_{50} contig length of 150,115 bp and a N_{90} contig length of 8,389 bp were obtained. The G+C content was 49.6%. All assembly data were deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database.

The gene prediction and annotation were carried out using an Augustus tool (7) and the Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP, <http://www.migap.org>) (8, 9). A total of 13,843 protein-coding genes were predicted. As a result, we identified six genes encoding proteins involved in the fruiting body development by MiGAP and local blast program with Geneious R9 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), namely, two hydrophobin genes (*hyd1* and *hyd2*), one mitochondrial ATP-synthase gene (*atp*),

one fruiting body-specific gene (*fds*), and two transcription factor genes (*fst* and *gat*). The nucleotide sequences of *hyd1*, *hyd2*, and *atp* from strain TR19 were similar to those of the hydrophobin gene *fvh1* (GenBank accession no. AB026721.1) from *F. velutipes*, the hydrophobin gene *Fv-hyd1* (GenBank accession no. AB126686.1) from *F. velutipes*, and the mitochondrial ATP-synthase gene *atp9* (GenBank accession no. NC_021373.1 [83400.83621]) from *F. velutipes*, respectively, with 100% identities. The nucleotide sequences of *fds*, *fst*, and *gat* from strain TR19 exhibited the closest similarities to those of the fruiting body-specific gene *fds* (GenBank accession no. D83658.1) from *F. velutipes* with 81% identity, the transcription factor gene *fst3* (GenBank accession no. XM_003031274) from *Schizophyllum commune* with 80% identity (10), and the transcription factor gene *gat1* (GenBank accession no. XM_003036543) from *S. commune* with 71% identity (10), respectively. We plan to analyze the functions of the genes and detect other genes involved in fruiting body development in the genome of *F. velutipes* TR19.

Nucleotide sequence accession number. The genome sequence of *F. velutipes* TR19 is available in DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [BDAN000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/BDAN000000000).

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Norifumi Shirasaka, was funded by Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) (S1512004).

This study was supported in part by a grant of the Strategic Research Foundation Grant-aided Project for Private Universities from the Ministry of Education, Culture, Sport, Science, and Technology, Japan (MEXT), 2015–2017 (S1512004).

REFERENCES

1. Aida FMNA, Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf AG. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci Technol* 20: 567–575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.007>.
2. Couto SR, Sanromán MA. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *J Food Eng* 76:291–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>.
3. Kües U, Liu Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl*

- Microbiol Biotechnol 54:141–152. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000396>.
4. Ohm RA, de Jong JF, de Bekker C, Wösten HA, Lugones LG. 2011. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. Mol Microbiol 81:1433–1445. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07776.x>.
 5. Park YJ, Baek JH, Lee S, Kim C, Rhee H, Kim H, Seo J-S, Park HR, Yoon DE, Nam JY, Kim HI, Kim JG, Yoon H, Kang HW, Cho JY, Song ES, Sung GH, Yoo YB, Lee CS, Lee BM. 2014. Whole genome and global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. PLoS One 9:e93560. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093560>.
 6. Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A. 2010. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). Proc Natl Acad Sci USA 107:11889–11894. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1003391107>.
 7. Stanke M, Tzvetkova A, Morgenstern B. 2006. AUGUSTUS at EGASP: using EST, protein and genomic alignments for improved gene prediction in the human genome. Genome Biol 7(Suppl 1):S11. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-s1-s11>.
 8. Sugawara H, Ohyama A, Mori H, Kurokawa K. 2009. Microbial genome annotation pipeline (MiGAP) for diverse users, Poster S001-1-2. 20th Int Conf Genome Inform (GIW2009), 14 to 16 December 2009, Kanagawa, Japan.
 9. Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt H-H, Rognes T, Ussery DW. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res 35:3100–3108. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm160>.
 10. Ohm RA, De Jong JF, Lugones LG, Aerts A, Kothe E, Stajich JE, De Vries RP, Record E, Levasseur A, Baker SE, Bartholomew KA, Coutinho PM, Erdmann S, Fowler TJ, Gathman AC, Lombard V, Henrissat B, Knabe N, Kües U, Lilly WW. 2010. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. Nat Biotechnol 28:957–963. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1643>.



Antiestrogenic activity of a syringic acid diet in ovariectomized mice

Teruyoshi Tanaka^{1,2} · Nobuhisa Kawaguchi³ · Nobuhiro Zaima¹ · Tatsuya Moriyama¹ · Yasuhisa Fukuta¹ · Norifumi Shirasaka¹

Received: 7 February 2017 / Accepted: 9 May 2017 / Published online: 5 July 2017
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer Japan KK 2017

Abstract In recent years, the number of patients with osteoporosis has risen with the increase in average longevity. Therefore, the chemoprevention of osteoporosis using food materials or food components has become an increasingly important target. Syringic acid (SA) is a phenolic compound present in the fruit of the açai palm *Euterpe oleracea* and the mycelium of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. This compound has no affinity for estrogen receptors and is potentially useful for disease prevention. However, little is known about the effects of a SA diet on bone metabolism, particularly bone resorption in vivo. Here, we demonstrated the effects of a SA diet on bone loss and uterine weight loss in ovariectomized (OVX) mice. Ten-week-old OVX mice were fed SA-containing diets (100 mg/kg body weight/day) for 10 weeks. After 10 weeks of dietary SA, the body weight, food intake, and uterine weight of the OVX mice were unaffected; however, femoral bone mineral density (cortical bone density, cancellous bone density, and total bone density) was higher in the SA-fed groups than in the OVX-control group. Furthermore, histomorphometric analysis revealed that the number of osteoclasts and osteoblasts was decreased and increased, respectively, in the SA-fed groups. These results

suggest that a SA diet suppresses bone loss by downregulating bone resorption and upregulating bone formation without affecting the uterus in OVX mice. Although further studies are needed, SA may be a compound that can be used to prevent or retard osteoporosis.

Keywords Syringic acid · Ovariectomized mice · Osteoclast · Osteoblast

Abbreviations

SA	Syringic acid
OVX	Ovariectomized
ER	Estrogen receptor
DPD	Deoxypyridinoline
Cre	Creatinine
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
ALP	Alkaline phosphatase
BAP	Bone-specific alkaline phosphatase
CT	Computed tomography
SD	Standard deviation

Introduction

Osteoporosis is characterized by bone mass reduction and microarchitectural deterioration of the bone tissue, with subsequent increases in bone fragility and susceptibility to fracture. The decrease in bone mass is caused by an imbalance between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts, especially following estrogen deficiency in menopausal women, which induces an increase in bone turnover due to excess osteoclast activity. In recent years, the number of patients with osteoporosis in the world has increased as the aging population has grown, and bone health issues are becoming a serious problem.

✉ Norifumi Shirasaka
sirasaka@nara.kindai.ac.jp

¹ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kindai University, 3327-204, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

² Present Address: Department of Biomolecular Science, Fukushima Medical University School of Medicine, 1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan

³ Laboratory, Biological Business Department, Ichimasa Kamaboko Co., Ltd, 77-1 Junishin Agano, Niigata 959-1936, Japan

Soybean isoflavones including daidzein and genistein have been shown to exert antiosteoporotic activity in ovariectomized (OVX) postmenopausal animal models [1–3]. These isoflavones have an affinity for estrogen receptors (ERs), specifically ER β [4, 5], which is the predominant receptor in trabecular bone, but not in cortical bone [6]. However, these compounds also cause the proliferation of ER-positive human breast cancer cells (MCF-7) [5, 7, 8] and promote hyperplasia of the uterus [2, 9]. Hence, a diet with an excess of these isoflavones can have adverse effects on breast cancer and uterine cancer via ERs. Therefore, the identification of compounds that have antiosteoporotic activity independent of ER-mediated pathways is very important.

Syringic acid (SA) (Fig. 1) is a phenolic compound naturally present in many edible plants, such as the fruit of the açai palm *Euterpe oleracea* [10] and the mycelium of the shiitake mushroom *Lentinula edodes* [11]. Importantly, this compound has no affinity for ERs [12] and possesses radical scavenging [13, 14], antioxidative [13, 14], and anti-inflammatory [11, 15, 16] activities. A study by Kang et al. reported the effects of *Drynariae rhizoma* extracts containing small amounts of SA on the antioxidant activity, proliferation, and differentiation of cultured mouse osteoblastic cells in vitro [17]. However, little is known about the effects of SA on bone metabolism, particularly bone resorption in vivo.

In the present study, we investigated whether a SA diet in OVX mice could prevent bone mass and microarchitectural deterioration of the femur caused by ovariectomy. We found that a SA diet in OVX mice improved postmenopausal bone metabolism by downregulating the differentiation of osteoclasts and upregulating that of osteoblasts in the bone marrow.

Materials and methods

Materials

SA (>97% purity) was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). All other chemicals used in this study were of the highest purity available.

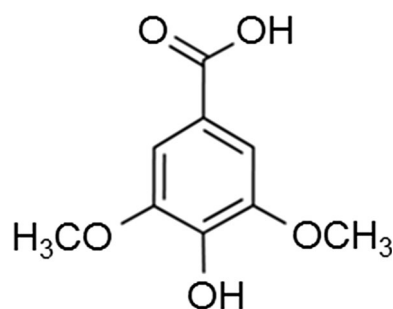


Fig. 1 Chemical structure of syringic acid (SA)

Animals and diets

Slc:ddY female mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). They had been either OVX or sham-operated (Sham) at 9 weeks of age. After 1 week, the sham and OVX mice were divided into the following four groups: sham-control group, sham-SA group, OVX-control group, and OVX-SA group. Each control group was fed a normal diet (Table 1), whereas each SA group received a SA-containing diet (100 mg/kg body weight/day, corresponding to 3 mg of SA/day/30 g mouse in 4.5 g of diet) for 10 weeks. The efficacy of this dosage was determined beforehand based on the elevation of urinary deoxypyridinoline/creatinine (DPD/Cre) following administration to five OVX mice for 4 weeks (data not shown). The mice were housed in individual cages under a 12 h/12 h light/dark cycle at 20 ± 2 °C. The diet and tap water were supplied ad libitum. During the experimental period, body weight and food intake were measured once a week. After 10 weeks, the mice were sacrificed and the uterus was harvested and weighed. The right and left humeri were isolated to determine tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) activity in the bone marrow cells. The left femur was collected and ground to analyze the bone microstructure. The distal area of the right femur was TRAP or ALP stained. All animal experiments were approved by the Kindai University Animal Care and Use Committee.

Collection of urine and blood samples

Urine and blood samples were collected at 0, 4, and 10 weeks. Urine was collected directly from the bladder. Blood samples were taken from the tail vein and then centrifuged to collect the serum. Both urine and blood samples were stored at -80 °C until further analysis.

Table 1 Experimental diet components

Component	Weight (%)
α -Cornstarch	50.58
Casein	22.22
Sucrose	10
Safflower oil	5
Cellulose	7.5
Mineral mix (AIN93)	3.5
Vitamin mix (AIN93)	1
Cholesterol	0.2

Protein extraction from bone marrow cells

Both ends of the excised right and left humeri of mice were cut, and the bone marrow cells were flushed with saline. The collected bone marrow cells were recovered by centrifugation ($1500\times g$, 10 min, 4 °C) and then resuspended in saline and centrifuged ($1800\times g$, 3 min, 4 °C). This washing procedure was repeated three times. Collected samples were resuspended in 200 μL of lysis buffer (pH 7.2; 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.05% Triton X-100, 10% sucrose, 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, and 0.1 mM ALLN), sonicated (Sonifier 450; Branson, Danbury, CT, USA) for 30 s, and centrifuged ($8000\times g$, 5 min, 4 °C). The supernatants containing the protein extracts of bone marrow cells were collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

Bone resorption marker assessment

The DPD level in urine was measured using a commercial kit (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan). Urinary Cre was measured by the picric acid method using a commercial kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). DPD levels were expressed as the ratio of urinary DPD to Cre levels (DPD/Cre, nM/mM Cre).

TRAP activity in both the serum and protein extracts of bone marrow cells was measured by the colorimetric method. Briefly, 10 μL of serum or bone marrow cell extract were added to 40 μL of citric acid buffer containing *para*-nitrophenylphosphoric acid disodium salt and incubated for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 80 μL of 0.1 N NaOH, and the absorbance at 405 nm was measured with a microplate reader (model 680; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). TRAP activity in bone marrow cells was normalized to the bone marrow protein level (U/ μg protein). The protein levels in each sample were determined by Bradford assay using a commercial protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). One unit is defined as the activity that hydrolyzes 1 μmol of substrate per min at 37 °C.

Bone formation marker assessment

Serum bone-specific alkaline phosphatase (BAP) activity was measured by the colorimetric method in the presence of L-phenylalanine (an inhibitor of intestinal ALP) as reported by Dimai et al. [18]. The absorbance at 405 nm was measured with a microplate reader (model 680, Bio-Rad Laboratories).

Histomorphometric analysis

The femur of the distal area was collected and fixed in 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline. The bone

tissue was then embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) and rapidly frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis. Subsequently, the tissues were sectioned with a cryostat and stained with a TRAP staining kit (Primary Cell, Hokkaido, Japan) and Mayer's hematoxylin to observe osteoclasts or with an ALP staining kit (Primary Cell, Hokkaido, Japan) to observe osteoblasts. The stained tissue sections were then examined with a BX53 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Computed tomography (CT) analysis

Both the right and left femurs were scanned with an X-ray CT system (LCT-100; ALOCA, Tokyo, Japan). Tomograms were taken at 0.1-mm intervals, and 60 slices from the end of the distal femoral area were analyzed. The bone mineral densities (cortical bone density, cancellous bone density, and total bone density) and bone mechanical parameters (minimum second moment of area and polar moment of inertia) of each femur were measured. The results for the bone mineral densities and bone mechanical parameters are expressed as the mean of values for the right and left bones.

3D imaging of the spine

The spines of the mice were scanned at 0.5-mm intervals with an X-ray CT system, and tomograms were constructed with 3D imaging software (VGStudio MAX1.2; Nihon Visual Science, Tokyo, Japan). Cross-sections of the constructed images were compared with each other.

Stereoscopic observation of the femoral trabeculae

The distal portions of the isolated left femur were ground with a whetstone. The pulverized preparation was observed with a stereoscopic microscope (SZ61; Olympus, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). For statistical analyses, the Mann–Whitney rank sum test was used to calculate *P* values for highly skewed distributions. For Gaussian-like distributions, two-tailed *t*-tests were used. To test two samples from the same population, the Wilcoxon rank sum test was used. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effects of the SA diet on body weight and food intake

The effects of the SA diet on bone metabolism were investigated in sham and OVX mice. The 10-week-old sham-SA ($n = 6$) and OVX-SA ($n = 7$) groups were fed SA-containing diets (100 mg/kg body weight/day) for 10 weeks. Body weight and food intake changes were measured once a week during the experimental period. Dietary SA did not affect the body weights of the sham and OVX mice (Fig. 2a). The final body weights in the sham-control, sham-SA, OVX-control, and OVX-SA groups were 35.1 ± 1.5 , 34.5 ± 2.4 , 39.1 ± 3.4 , and 38.6 ± 2.4 g, respectively. In addition, food intake did not differ among the groups in this study (Fig. 2b).

Effects of the SA diet on bone metabolic markers in urine and serum

To determine the effects of SA on the bone metabolic state in mice, bone metabolic markers were measured: urinary DPD level was used as a marker of bone absorption, serum TRAP activity was used as a marker of osteoclast differentiation, and serum BAP activity was used as a marker of bone formation. When OVX mice were fed the SA-containing diet for 4 and 8 weeks, urinary DPD levels significantly declined (Fig. 3a). There was no significant difference in urinary DPD levels in sham mice. Serum TRAP activity in the OVX-SA group was significantly reduced compared with that in the OVX-control group throughout the experimental period (Fig. 3b). Dietary SA increased serum BAP activity in sham and OVX mice after 4 and 8 weeks (Fig. 3c).

Next, we measured TRAP activity and BAP activity in the bone marrow protein. Dietary SA significantly reduced elevated TRAP activity in OVX mice; however, there was no significant difference in activity in sham mice (Fig. 4a). On the other hand, dietary SA significantly increased BAP activity in OVX mice and sham mice (Fig. 4b). These results suggest that the SA diet not only improved ovariectomy-induced incremental bone resorption but also promoted bone formation.

Changes in the localization of TRAP-positive osteoclasts and ALP-positive osteoblasts in SA-fed mice

We stained tissues to examine the changes in osteoclast and osteoblast status caused by ovariectomy and the SA diet. Microscopic images of osteoclasts in the distal femoral area are shown in Fig. 5. TRAP-positive osteoclasts were found to localize in the cortical bone area by co-staining with TRAP and hematoxylin. OVX was observed to facilitate the differentiation of preosteoclasts to TRAP-positive osteoclasts and increase the number of mature osteoclasts. Dietary SA decreased the number of TRAP-positive osteoclasts in OVX mice, suggesting that SA downregulated osteoclast differentiation.

Figure 6 shows microscopic images of osteoblasts in the distal femoral area. ALP-positive osteoblasts were mostly observed around the growth plates. Although there was no distinct difference between the sham-control and OVX-control mice, dietary SA increased ALP-positive osteoblasts in sham and OVX mice, suggesting that SA upregulated osteoblast differentiation.

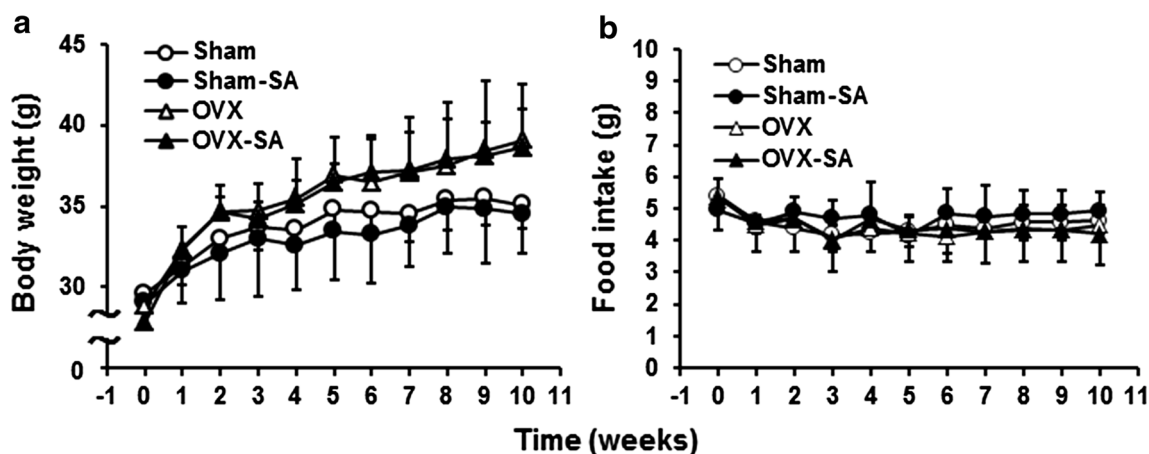


Fig. 2 Effects of the SA diet on **a** body weight and **b** food intake in the sham-control group ($n = 6$, open circles), sham-SA group (100 mg/kg body weight/day, $n = 6$, closed circles), OVX-control

group ($n = 7$, open triangles), and OVX-SA group (100 mg/kg body weight/day, $n = 7$, closed triangles). All data are presented as the mean $\pm$ SD

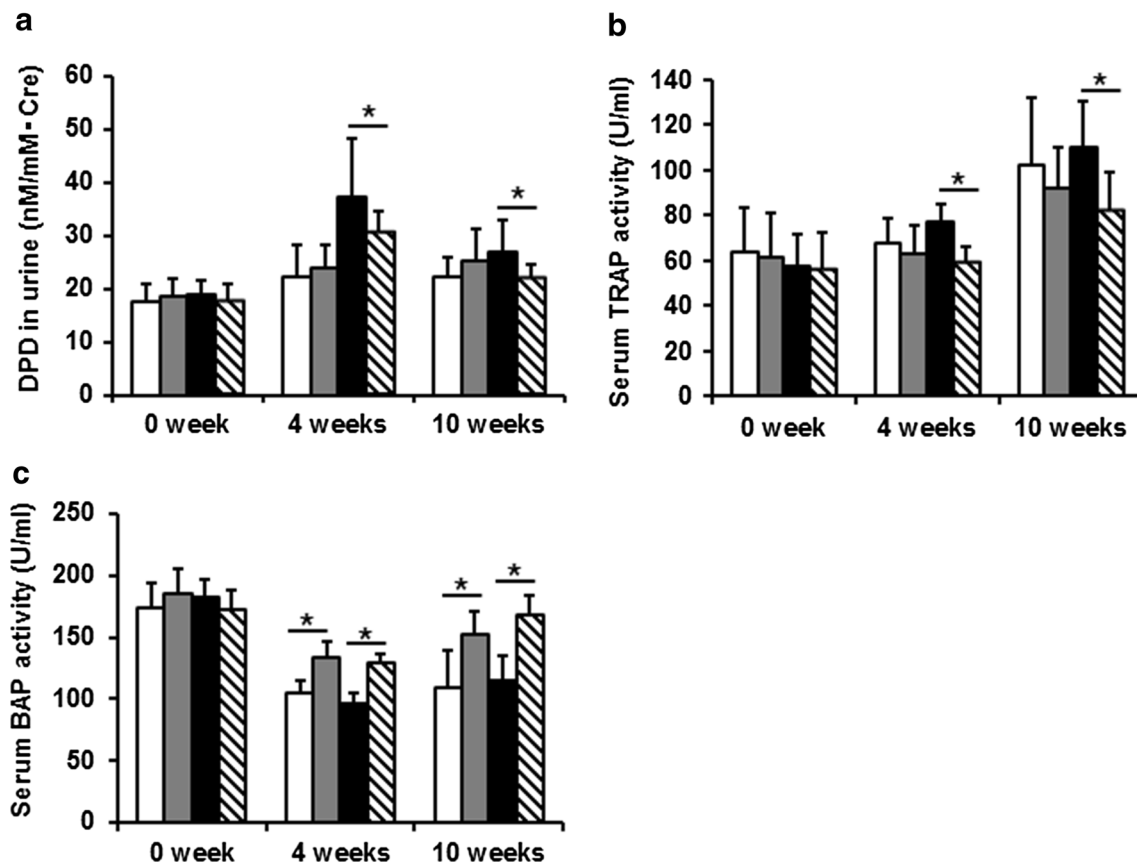


Fig. 3 Effects of the SA diet on **a** urinary DPD, **b** serum TRAP activity, and **c** serum BAP activity in the sham-control group (white), sham-SA group (gray), OVX-control group (black), and OVX-SA group (hatched). All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$

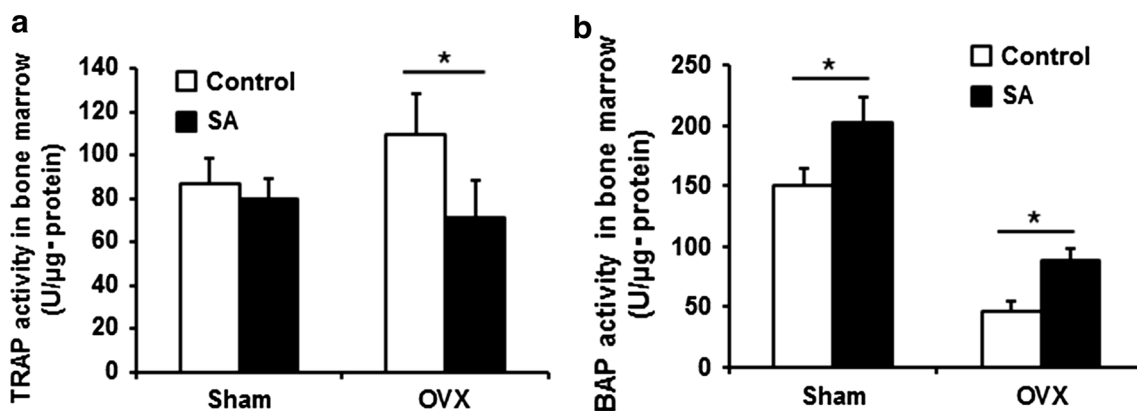


Fig. 4 Effects of the SA diet on **a** TRAP activity and **b** BAP activity in bone marrow. The white and black bars represent the control and SA groups, respectively. All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$

Effects of the SA diet on bone mineral density

The bone mineral density in the SA-fed mice was examined by X-ray CT. Table 2 shows the time-dependent changes in the femoral bone densities of the SA-fed mice. The values of all parameters (cortical bone density, cancellous bone density, and total bone density) in the OVX-SA group were higher than those in the OVX-

control group at 10 weeks, whereas there was no significant difference between the groups at 4 weeks. In addition, there were no significant changes in bone density in sham mice.

At 10 weeks, the relative cortical bone densities, cancellous bone densities, and total bone densities of the OVX-control and OVX-SA groups were 84% and 88, 70 and 77%, and 81 and 85%, respectively, compared to the

Fig. 5 Effects of the SA diet on TRAP-positive osteoclasts in the sham-control group, sham-SA group, OVX-control group, and OVX-SA group. Representative images are shown. The images were taken at 100-fold and 1000-fold magnification, with the scale bars indicating 100 and 20 μ m, respectively

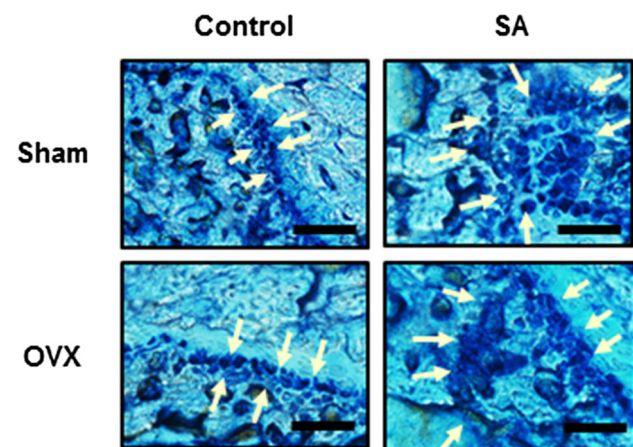
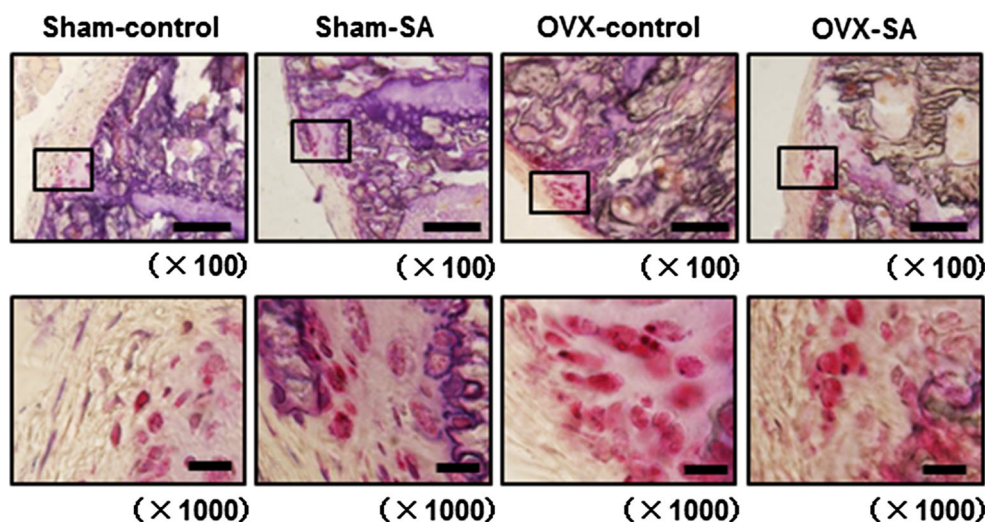


Fig. 6 Effects of the SA diet on ALP-positive osteoblasts in the sham-control group, sham-SA group, OVX-control group, and OVX-SA group. Representative images are shown. The images were taken at 400-fold magnification. White arrows indicate osteoblasts. Each scale bar represents 100 μ m

values of the sham-control group. Thus, dietary SA effectively improved bone mineral densities by 4–7%.

Effects of the SA diet on spine mass

We determined the effects of the SA diet on the backbones of the mice by examining their spines using CT-3D imaging software. CT images of the spine are shown in Fig. 7. These images revealed that the spinal column in OVX-control mice was hollower than that in sham-control mice, as indicated by a decrease in density. Dietary SA improved the spinal structure of OVX mice compared with that of sham mice according to the overall densitometric estimation. These results are consistent with the bone mineral density results from CT analysis (Table 2).

Table 2 Effects of the syringic acid diet on bone mineral densities in mice

Group	<i>n</i>	0 week	4 weeks	10 weeks
Cortical bone density				
Sham-control	6	624 $\pm$ 18	659 $\pm$ 23	654 $\pm$ 43
Sham-SA	6	631 $\pm$ 14	648 $\pm$ 11	653 $\pm$ 39
OVX-control	7	616 $\pm$ 17	546 $\pm$ 20	549 $\pm$ 8
OVX-SA	7	620 $\pm$ 21	568 $\pm$ 25	574 $\pm$ 17*
Cancellous bone density				
Sham-control	6	356 $\pm$ 24	367 $\pm$ 34	367 $\pm$ 46
Sham-SA	6	362 $\pm$ 32	395 $\pm$ 35	379 $\pm$ 58
OVX-control	7	344 $\pm$ 25	267 $\pm$ 16	256 $\pm$ 21
OVX-SA	7	342 $\pm$ 19	275 $\pm$ 28	283 $\pm$ 21*
Total bone density				
Sham-control	6	518 $\pm$ 28	556 $\pm$ 29	547 $\pm$ 47
Sham-SA	6	523 $\pm$ 25	550 $\pm$ 19	547 $\pm$ 36
OVX-control	7	514 $\pm$ 18	445 $\pm$ 15	443 $\pm$ 10
OVX-SA	7	521 $\pm$ 23	464 $\pm$ 25	466 $\pm$ 20*

All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ compared with the OVX-control group

Effects of the SA diet on bone mechanical parameters

The bone mechanical parameters (minimum second moment of area and polar moment of inertia) of the SA-fed mice were determined by X-ray CT. The values of the femoral bone mechanical parameters of the SA-fed mice are shown in Table 3. The values of the parameters in the

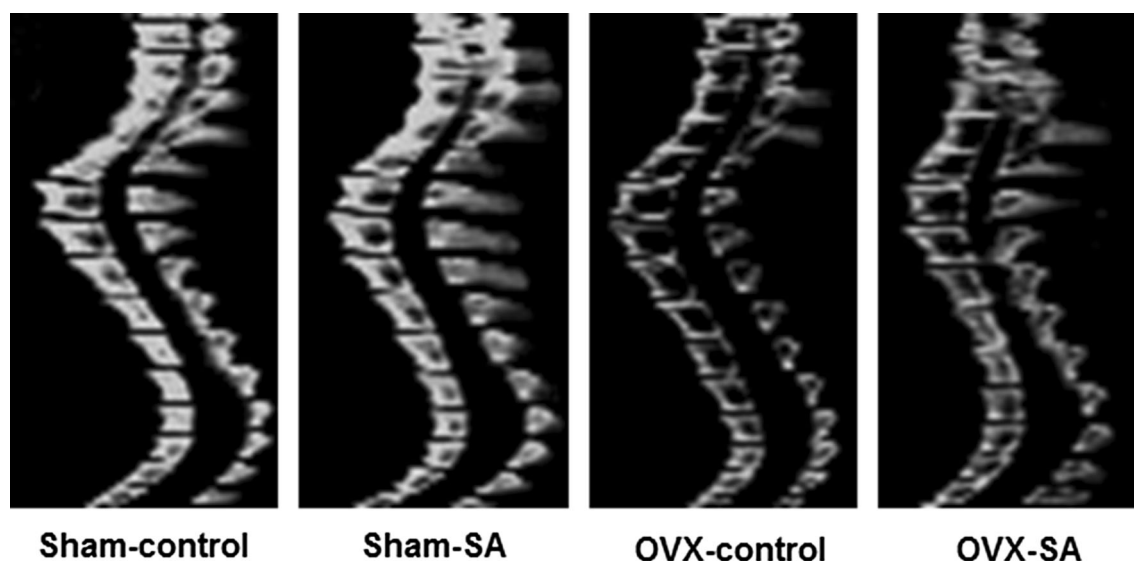


Fig. 7 Effects of the SA diet on the skeletal bone mass in the sham-control group, sham-SA group, OVX-control group, and OVX-SA group. Representative images are shown

OVX-SA group were higher than those in the OVX-control group at 10 weeks; however, these parameters did not increase in sham mice.

Effects of the SA diet on the trabeculae of the femur

We examined the femoral trabecular microstructure, which contributes to bone strength, using a stereoscopic microscope. Isolated left femurs were ground with a whetstone. The ground femur samples are shown in Fig. 8. The number of trabeculae in femurs in the OVX-control group was less than the number in femurs in the sham-control group. The degree of trabecular destruction in OVX-SA mice was improved compared with that in OVX-control mice; however, there was no change in sham mice.

The trabecular lengths in the sham-control, sham-SA, OVX-control, and OVX-SA groups were 5.1 ± 1.4 , 5.4 ± 1.8 , 2.5 ± 0.7 , and 3.2 ± 0.8 mm, respectively. The trabecular length in the OVX-SA group was approximately 0.7 mm longer than that in the OVX-control group, which was not a significant difference. Therefore, these observations indicated that dietary SA can protect the trabecular structure from degradation by osteoclasts. These results are consistent with the bone mechanical parameter results from CT analysis (Table 3).

Table 3 Effects of the syringic acid diet on bone mechanical parameters in mice

	Sham-control	Sham-SA	OVX-control	OVX-SA
Minimum second moment of area	0.100 ± 0.010	0.106 ± 0.013	0.072 ± 0.004	$0.082 \pm 0.006^*$
Polar moment of inertia	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.19 ± 0.01	$0.23 \pm 0.02^*$

All data are presented as the mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ compared with the OVX-control group

Effects of the SA diet on uterine weight and morphology

A uterine hypertrophy test was performed to examine whether SA exerts estrogenic activity *in vivo*. The effects of consuming the SA-containing diet on uterine weight and morphology are shown in Fig. 9. The results demonstrated that 10 weeks of the SA diet did not affect the uterine weights of sham and OVX mice (Fig. 9a). Also, no hypertrophic change in morphology was observed in the uterus (Fig. 9b). The data indicated that SA at this dose did not show any estrogenic activity *in vivo*.

Discussion

In the present study, we demonstrated that a SA diet improved the bone resorption markers (urinary DPD and TRAP activity) and the number of TRAP-positive osteoclasts in OVX mice. Therefore, SA may suppress the differentiation of osteoclasts in the bone marrow. Interestingly, BAP activity in the serum and bone marrow, which is a marker of bone formation, was increased in OVX mice, suggesting that a SA diet can affect not only osteoclasts but also osteoblasts. Consistent with these results, the bone mineral densities in the OVX-SA group were significantly

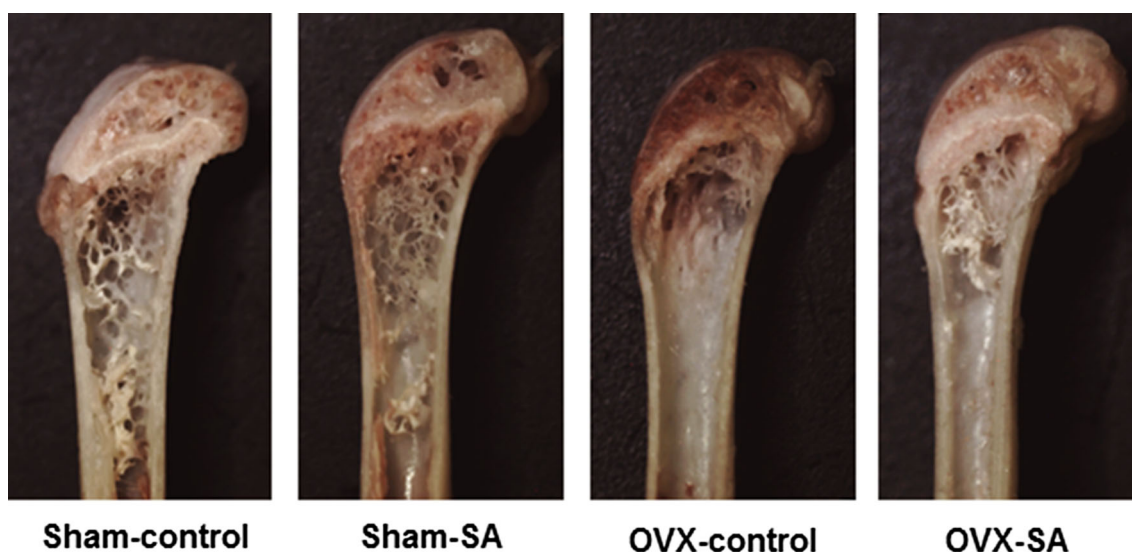


Fig. 8 Effects of the SA diet on the femur microstructure in the sham-control group, sham-SA group, OVX-control group, and OVX-SA group. Representative images are shown

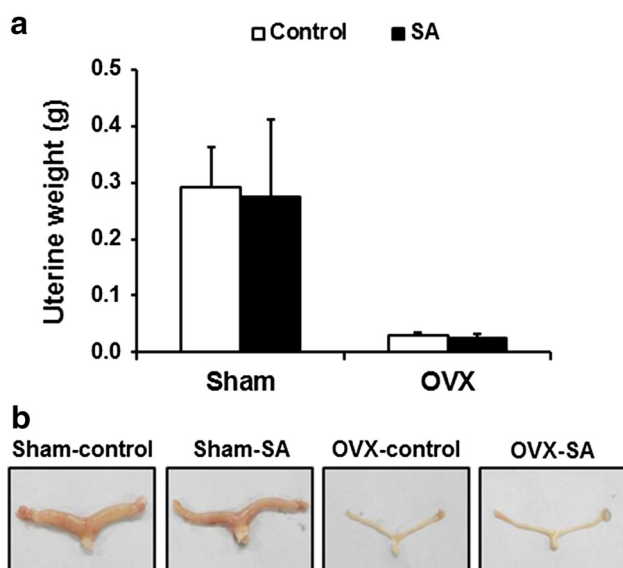


Fig. 9 **a** Effects of the SA diet on uterine weight. All data are presented as mean $\pm$ SD. **b** A representative image of a uterus with a weight closest to the mean is shown for each group of mice

higher than those in the OVX-control group after 10 weeks. Thus, dietary SA appears to improve bone resorption and bone formation, suppressing the decrease in bone mineral density in OVX mice. CT imaging data of the backbone support this claim. All of these results indicate that a SA diet can partially (but not completely) protect the bone from degradation by osteoclasts in OVX mice.

SA did not suppress serum and bone marrow TRAP activity and urinary DPD in sham mice; however, dietary SA had significant effects in OVX mice with activated osteoclasts. These results are consistent with the findings of

our previous study [19]. Therefore, SA did not exert antiosteoporotic activity in sham mice with normal osteoclast activity.

We evaluated the number of TRAP-positive osteoclasts localized in the cortical bone area and the number of ALP-positive osteoblasts around the growth plates. In the present study, a large number of osteoclasts and osteoblasts was observed in these areas. However, osteoclasts and osteoblasts are generally observed in the trabecular bone area. The potential for physiological differences between these areas is a limitation of this study. Therefore, further studies are needed to clarify the localization of osteoclasts and osteoblasts in the trabecular bone area.

In this study, TRAP activity in the serum and bone marrow did not differ between sham and OVX mice; however, the number of TRAP-positive osteoclasts was increased in the cortical bone area in OVX mice. Furthermore, serum BAP activity and ALP-positive osteoblasts around the growth plates did not differ between sham and OVX mice; on the other hand, BAP activity in the bone marrow of OVX mice was significantly lower than in the bone marrow of sham mice. These inconsistent results may be attributed to the diurnal variation of bone metabolism markers.

Bone vulnerability is linked not only to bone mass but also to bone structure. The internal microstructure of bone is an important factor for evaluating bone strength. Therefore, we visualized the femoral trabeculae. The trabeculae in the OVX-control group were greatly decreased compared with those in the sham-control group, whereas the trabeculae in the OVX-SA group were well maintained. These results are consistent with those from the CT analysis of bone mechanical parameters. The findings

consistently indicated that the SA diet improved bone strength in OVX mice.

A possible explanation for the SA-induced improvement in the bone status of OVX mice is the possibility that SA exerts estrogen-like activity. However, this possibility can be excluded because SA does not have an affinity for ER- α and ER- β [12]; moreover, there were no hypertrophic symptoms in the uterus of SA-fed mice. These data indicate that SA can exert antiosteoporotic activity without affecting the uterus via estrogen-like activity. Several previous studies have examined the physiological effects of SA; these include the protection of cells from oxidative stress [20] and inflammation [11, 15, 16] *in vivo*. We hypothesized that these beneficial effects and the bone-protective activity of SA could be associated with the same mechanism of action because intracellular oxidative stress and inflammation are universally detrimental to physiological processes associated with pancreatitis, hepatitis, diabetes, and bone metabolism.

A better understanding of the behavior of orally administered SA in the intestine and liver microsomes and its accumulation in bone cells could contribute to the elucidation of the mechanism by which SA improves bone resorption and bone formation in OVX mice. To our knowledge, there are no reports on drug metabolism by SA. Therefore, further studies are needed to understand the activity of orally administered SA in mice.

Vanillic acid (VA) is another phenolic compound that is naturally present in many edible plants, such as touki (the roots of *Angelica acutiloba*) [21], the fruit of the açai palm *Euterpe oleracea* [10], and the mycelium of the shiitake mushroom *Lentinula edodes* [11]. Similar to SA, the compound VA does not bind to ERs [22] and demonstrates radical scavenging [14], antioxidative [14], and anti-inflammatory [11, 15] activities. However, the antiosteoporotic activity of VA is weaker than that of SA (data not shown).

In conclusion, we have demonstrated that dietary SA can suppress the reduction in bone mass and the microarchitectural deterioration of bone tissues without affecting the uterus in OVX mice, suggesting that SA may affect not only bone resorption but also bone formation. Therefore, SA may be a compound that could be used to prevent or retard osteoporosis.

Acknowledgment This study has been in part funded and supported by the Strategic Project to Support the Formation of Research Bases at Private Universities: Matching Fund Subsidy from MEXT (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology), 2015–2018 (S1512004).

References

1. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS (2004) Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1040–1045
2. Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S (2000) Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 274:697–701
3. Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP (2000) Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130:1675–1681
4. Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague–Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. *Toxicol Sci* 51:236–244
5. Boué SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE (2003) Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51:2193–2199
6. Weitzmann MN, Pacifici R (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 116:1186–1194
7. Gaete L, Tchernitchin AN, Bustamante R, Villena J, Lemus I, Gidekel M, Cabrera G, Astorga P (2012) Daidzein–estrogen interaction in the rat uterus and its effect on human breast cancer cell growth. *J Med Food* 15:1081–1090
8. Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM (1996) Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 17:271–275
9. Rachoń D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2007) Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotrophic effects in ovariectomized rats. *Maturitas* 57:161–170
10. Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST (2008) Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 56:4631–4636
11. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2009) Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 32:1215–1219
12. Simoncini T, Lenzi E, Zöchling A, Gopal S, Goglia L, Russo E, Polak K, Casarosa E, Jungbauer A, Genazzani AD, Genazzani AR (2011) Estrogen-like effects of wine extracts on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Maturitas* 70:169–175
13. Nakajima Y, Sato Y, Konishi T (2007) Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga). *Chem Pharm Bull* 55:1222–1226
14. Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C (2015) Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 77:12–21
15. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 33:983–987
16. Yan SL, Wang ZH, Yen HF, Lee YJ, Yin MC (2016) Reversal of ethanol-induced hepatotoxicity by cinnamic and syringic acids in mice. *Food Chem Toxicol* 98:119–126
17. Kang SN, Lee JS, Park JH, Cho JH, Park JH, Cho KK, Lee OH, Kim IS (2014) *In vitro* anti-osteoporosis properties of diverse Korean *Drynariae rhizoma* phenolic extracts. *Nutrients* 6:1737–1751
18. Dimai HP, Linkhart TA, Linkhart SG, Donahue LR, Beamer WG, Rosen CJ, Farley JR, Baylink DJ (1998) Alkaline phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. *Bone* 22:211–216

19. Tanaka T, Tang H, Yu F, Michihara S, Uzawa Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y (2011) Kudzu (*Pueraria lobata*) vine ethanol extracts improve ovariectomy-induced bone loss in female mice. *J Agric Food Chem* 59:13230–13237
20. Cikman O, Soylemez O, Ozkan OF, Kiraz HA, Sayar I, Ademoglu S, Taysi S, Karaayvaz M (2015) Antioxidant activity of syringic acid prevents oxidative stress in L-arginine-induced acute pancreatitis: an experimental study on rats. *Int Surg* 100:891–896
21. Wei WL, Zeng R, Gu CM, Qu Y, Huang LF (2016) *Angelica sinensis* in China—a review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis. *J Ethnopharmacol* 190:116–141
22. Xiao HH, Gao QG, Zhang Y, Wong KC, Dai Y, Yao XS, Wong MS (2014) Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144:382–391

Phylloporia lonicerae* (Hymenochaetales, Basidiomycota), a new species on *Lonicera japonica* from Japan and an identification key to worldwide species of *Phylloporia

Wen-Min Qin^{1,*}, Xue-Wei Wang^{1,2,*}, Takuo Sawahata³, Li-Wei Zhou¹

1 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China **2** University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China **3** Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

Corresponding author: Li-Wei Zhou (liwei_zhou1982@163.com)

Academic editor: M.P. Martín | Received 25 December 2017 | Accepted 4 February 2018 | Published 14 February 2018

Citation: Qin W-M, Wang X-W, Sawahata T, Zhou L-W (2018) *Phylloporia lonicerae* (Hymenochaetales, Basidiomycota), a new species on *Lonicera japonica* from Japan and an identification key to worldwide species of *Phylloporia*. MycoKeys 30: 17–30. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.30.23235>

Abstract

Phylloporia, in the Hymenochaetales, is a polypore genus with a worldwide distribution. The new taxon *Phylloporia lonicerae* is introduced, which is the first *Phylloporia* species to originate from Japan. This species grows exclusively on living *Lonicera japonica* and is distinguished by annual, sessile basidiocarps that occur in clusters, pileal surface of narrow, concentrically sulcate zones, 6–8 pores per mm, duplex context separated by a black zone, dimitic hyphal system and broadly ellipsoid basidiospores, $3.2\text{--}4 \times 2.3\text{--}3.1\ \mu\text{m}$. Phylogenetically, *P. lonicerae* is nested within the *Phylloporia* clade as a distinct terminal lineage with full statistical supports and sister to the clade of *P. minutispora*, *P. cf. pulla* and *P. terrestris* with weak supports. Besides *Phylloporia bibulosa*, *P. chrysites* and *P. spathulata*, *P. lonicerae* is the fourth species of *Phylloporia* recorded from Japan. An identification key to all accepted 48 species of *Phylloporia* is provided.

Keywords

Hymenochaetales, key, *Lonicera japonica*, polypore, taxonomy

* These two authors contributed equally to this work.

Introduction

Phylloporia Murrill, in the Hymenochaetaceae Donk, was introduced for an unusual polypore species, *P. parasitica* Murrill growing on the underside of living leaves in Columbia (Murrill 1904). For nearly 70 years, *Phylloporia* was forgotten until Ryvarden (1972) transferred five taxa into the genus. Renewed interest in *Phylloporia* was stimulated by Wagner and Ryvarden's (2002) phylogenetic and morphological study in which they accepted 12 species. Since then, a number of new species have been described from Africa (Ipulet and Ryvarden 2005, Decock et al. 2015, Yombiyeni et al. 2015, Yombiyeni and Decock 2017), the Americas (Valenzuela et al. 2011, Decock et al. 2013, Ferreira-Lopes et al. 2016) and Asia, especially China (Gafforov et al. 2014, Cui et al. 2010, Zhou and Dai 2012, Zhou 2013, 2015a, 2015b, 2016, Liu et al. 2015, Chen et al. 2017, Ren and Wu 2017).

Phylloporia began as a monophyletic genus based on phylogenic studies of the large subunit of the nuclear ribosomal gene (nLSU) (Wagner and Ryvarden 2002) but is now paraphyletic with the inclusion of *Coltricia* cf. *stuckertiana* (Speg.) Rajchenb. & J.E. Wright in the *Phylloporia* clade (Valenzuela et al. 2011, Decock et al. 2013). The genus is morphologically quite diverse and includes species with annual or perennial basidiocarps with resupinate, sessile or stipitate habits, homogenous or duplex context, monomitic or dimitic hyphal system and cylindrical to subglobose basidiospores (Wagner and Ryvarden 2002, Cui et al. 2010, Zhou 2015a). Substrate preferences of *Phylloporia* species are equally diverse. Some species are saprobes that colonise woody debris (Ipulet and Ryvarden 2005, Zhou 2015b, Ferreira-Lopes et al. 2016) and others are parasites usually of specific plant hosts (Zhou 2015a, Ren and Wu 2017, Yombiyeni and Decock 2017).

There are three species of *Phylloporia* reported from Japan – *P. bibulosa* (Lloyd) Ryvarden, *P. chrysites* (Berk.) Ryvarden and *P. spathulata* (Hook.) Ryvarden (Núñez and Ryvarden 2000). In this paper, a new species, *Phylloporia lonicerae*, is described from Nara, Japan, growing on living vines of *Lonicera japonica*. Morphological and molecular data support the recognition of this new species. In addition, an updated key to the known species of *Phylloporia* is presented.

Materials and methods

Morphological examination

The studied specimens were deposited at the herbarium of the Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences (IFP) in China. The macroscopic characters were observed from dried specimens with the aid of a stereomicroscope. Specimen sections were mounted in Cotton Blue (CB), Melzer's reagent (IKI) and 5 % potassium hydroxide (KOH) for observation using a Nikon Eclipse 80i microscope at magnification up to 1000×. Special colour terms follow Petersen (1996). All measurements were taken

from sections mounted in CB. When presenting the size variation of basidiospores, 5% of measurements from each end of the range were put in parentheses. Line drawings of microscopic characters were made with the aid of a drawing tube. The abbreviations used in the description are as follows: L = mean basidiospore length (arithmetic average of all measured basidiospores), W = mean basidiospore width (arithmetic average of all measured basidiospores), Q = variation in the L/W ratios between the specimens studied and n = number of basidiospores measured from a given number of specimens.

Molecular sequencing

The PCR products were directly amplified from the extracts of the basidiocarps with the Phire® Plant Direct PCR Kit (Finnzymes Oy, Finland) according to the manufacturer's protocol. The PCR protocol was as follows: initial denaturation at 98 °C for 5 min, followed by 39 cycles of denaturation at 98 °C for 5 s, annealing at 48 °C for 5 s and extension at 72 °C for 5 s and a final extension of 72 °C for 10 min. The primers LR0R and LR7 (Vilgalys and Hester 1990) were used for PCR amplification and subsequent sequencing at the Beijing Genomics Institute, China. The newly generated sequences were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; Fig. 1).

Phylogenetic analysis

To explore the phylogenetic relationship of *P. lonicerae*, six nLSU sequences were incorporated into previous nLSU datasets of *Phylloporia* (Zhou 2016, Chen et al. 2017, Ren and Wu 2017, Yombiyeni and Decock 2017). Several species of *Fomitiporella* Murrill and *Fulvifomes* Murrill were included in the dataset and *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst. was selected as the outgroup taxon.

The nLSU dataset was aligned with MAFFT 7.110 (Katoh and Standley 2013) with the G-INS-I option (Katoh et al. 2005). The best-fit evolutionary model for the resulting alignment that was deposited in TreeBASE (<http://www.treebase.org>; accession number S21971), was estimated as GTR + I + G using jModelTest 2.1.4 (Darriba et al. 2012). Following this model, maximum likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) algorithms were used to infer the phylogeny of the alignment. The ML analysis was conducted using raxmlGUI 1.2 (Silvestro and Michalak 2012, Stamatakis 2006) under the auto FC option for bootstrap (BS) replicates (Pattengale et al. 2010). Mr-Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) was carried out for BI analysis, which employed two independent runs, each including four chains of 10 million generations and starting from random trees. Trees were sampled every 1000th generation. Of the sampled trees, the first 25 % was deleted and the remaining trees were used to construct a 50 % majority consensus tree and calculate Bayesian posterior probabilities (BPPs). Chain convergence was determined using Tracer 1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>).

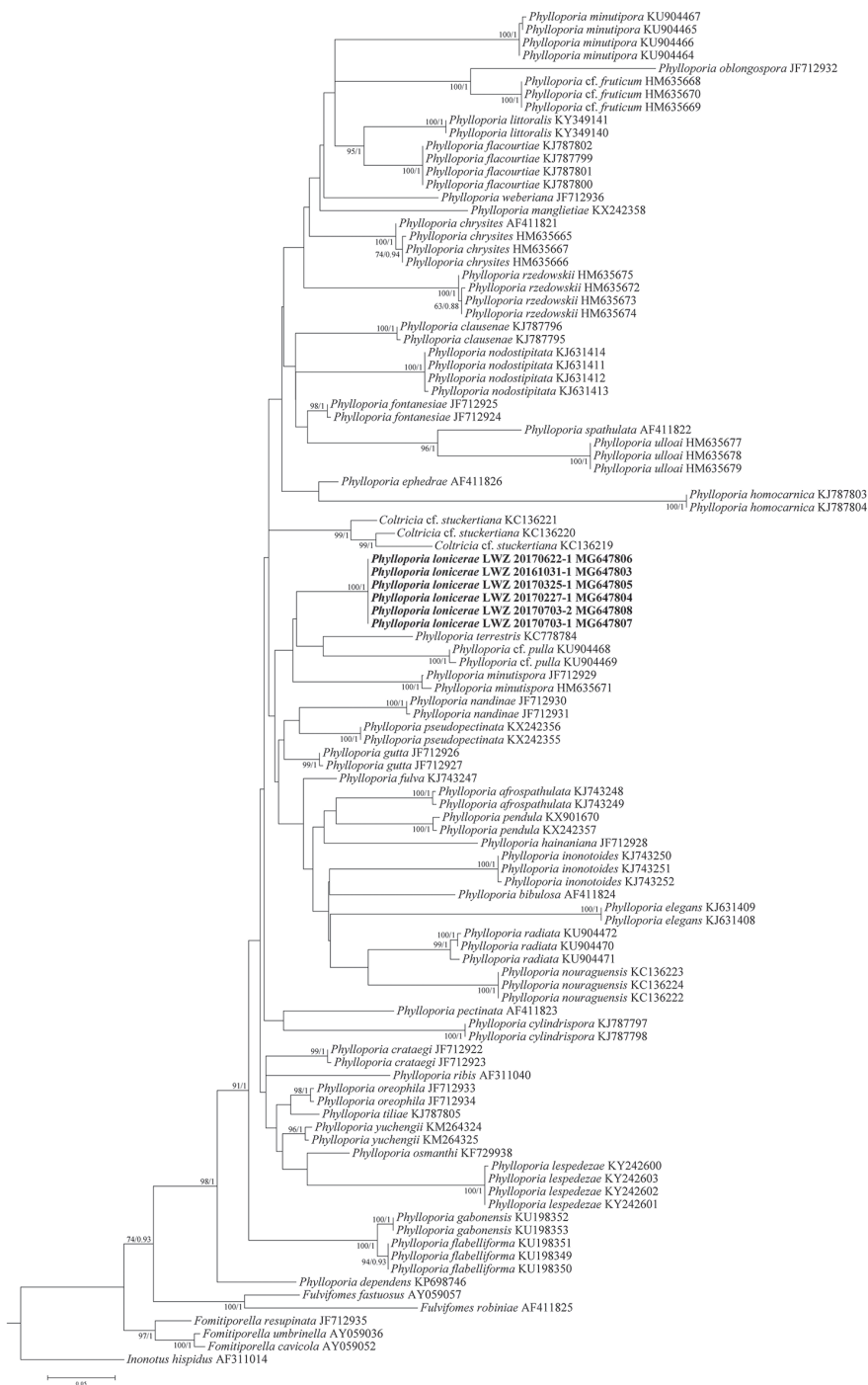


Figure 1. Phylogenetic position of *Phylloporia lonicerae* inferred from the nLSU dataset. The topology is inferred by maximum likelihood algorithm, while bootstrap values above 50 % and Bayesian posterior probabilities above 0.8 are given at the nodes. Newly sequenced specimens are in boldface.

Results

Six nLSU sequences of *P. lonicerae* were generated and included in a dataset of 105 sequences and 942 characters. ML analysis was ended after 250 BS replicates. BI analysis converged all chains as indicated by the effective sample sizes of all parameters above 2000 and the potential scale reduction factors close to 1.000. As the ML and BI analyses generated congruent topologies in main lineages, the ML tree is presented in Figure 1. Values of BS above 50 % and BPPs above 0.8 are given at the nodes. The phylogenetic tree (Fig. 1) shows that the strongly supported *Phylloporia* clade (98 % in ML, 1 in BI) consists of 44 terminal lineages and the six *P. lonicerae* samples formed a new lineage with full statistical supports (100 % in ML, 1 in BI). The *Phylloporia lonicerae* lineage is sister to the clade that includes *P. minutispora* Ipulet & Ryvarden, *P. cf. pulla* (Mont. & Berk.) Decock & Yombiy and *P. terrestris* L.W. Zhou with weak supports.

Taxonomy

***Phylloporia lonicerae* W.M. Qin, Xue W. Wang, T. Sawahata & L.W. Zhou, sp. nov.**

Mycobank: MB823715

Figs 2, 3

Holotype. JAPAN. Nara, Research Forest of Faculty of Agriculture, Kindai University, 3 Jul 2017, on living vine of *Lonicera japonica*, LWZ 20170703-2 (IFP 019172).

Etymology. *Lonicerae* (Lat.): referring to *Lonicera*, the host tree genus.

Description. Basidiocarps annual, sessile, imbricate, rarely solitary, without odour or taste, woody. Pilei semi-circular, flabelliform or fused together, applanate, single pileus projecting up to 1.5 cm long, 3 cm wide and 0.5 cm thick at base. Pileal surface greyish-brown to yellowish-brown, velutinate, concentrically sulcate with narrow zones; margin pale yellow or concolorous, sharp. Pore surface honey-yellow, slightly glancing; sterile margin distinct, curry-yellow, up to 0.5 mm wide; pores circular to angular, 6–8 per mm; dissepiments thin, entire. Context up to 2 mm thick, duplex, with a black zone, lower context olivaceous buff, hard corky, up to 1 mm thick, upper tomentum cinnamon-buff, soft, up to 1 mm thick. Tubes honey-yellow, corky, up to 3 mm long.

Hyphal system dimitic; generative hyphae simple septate; tissue darkening but otherwise unchanged in KOH. Context: in the lower context, generative hyphae hyaline to pale yellowish, slightly thick- to thick-walled with a wide lumen, frequently branched and septate, 2–4 µm in diam; skeletal hyphae golden yellow, thick-walled with a narrow lumen, unbranched, aseptate, interwoven, 2–4.5 µm in diam; in the upper tomentum, generative hyphae infrequent, pale yellowish, slightly thick- to thick-walled with a wide lumen, rarely branched, frequently septate, 2–4 µm in diam; skeletal hyphae golden yellow, thick-walled with a narrow to wide lumen, unbranched, aseptate, loosely interwoven, 2.5–5 µm in diam; in the black zone, hyphae dark brown, thick-walled with a narrow lumen, strongly agglutinated, interwoven. Tubes: generative hyphae hyaline to pale yellowish, thin- to



Figure 2. Basidiocarps of *Phylloporia lonicerae* in situ. **a** LWZ 20170703-2 (holotype) **b** LWZ 20170622-1 (paratype). Scale bars: 2 cm.

slightly thick-walled, occasionally branched, frequently septate, 1.8–4 μm in diam; skeletal hyphae golden yellow, thick-walled with a narrow lumen, unbranched, aseptate, interwoven, 2–4 μm in diam. Setae absent. Cystidia and cystidioles absent. Basidia clavate, with four sterigmata up to 3 μm long and a simple septum at the base, 7–11 $\times$ 4–6 μm ; basidioles in shape similar to basidia, but slightly smaller. Basidiospores broadly ellipsoid, pale yellowish, thick-walled, smooth, indextrinoid, inamyloid, acyanophilous, (3–)3.2–4 $\times$ (2.1–)2.3–3.1(–3.3) μm , $L = 3.61 \mu\text{m}$, $W = 2.77 \mu\text{m}$, $Q = 1.28\text{--}1.33$ ($n = 90/3$).

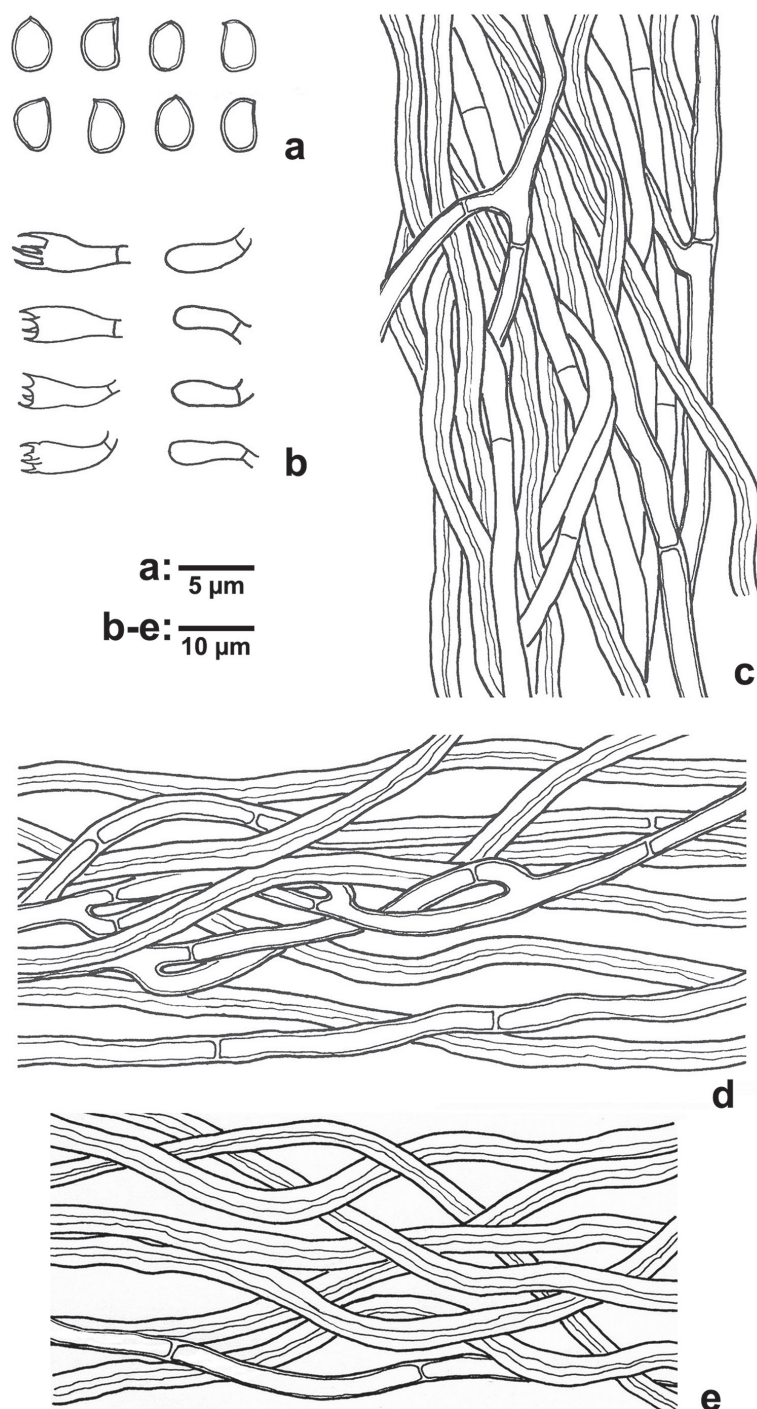


Figure 3. Microscopic structures of *Phylloporia lonicerae* (drawn from the holotype, LWZ 20170703-2). **a** Basidiospores **b** Basidia and basidioles **c** Hyphae from trama **d** Hyphae from lower context **e** hyphae from upper tomentum. Scale bars: **a** = 5 µm, **b–e** = 10 µm.

Additional specimens (paratypes) studied. (All on living vine of *Lonicera japonica*)—JAPAN. Nara, Research Forest of Faculty of Agriculture, Kindai University, 31 Oct 2016, LWZ 20161031-1 (IFP 019173); 27 Feb 2017, LWZ 20170227-1 (IFP 019174); 25 Mar 2017, LWZ 20170325-1 (IFP 019175); 22 Jun 2017, LWZ 20170622-1 (IFP 019176); 3 Jul 2017, LWZ 20170703-1 (IFP 019177).

Discussion

Phylloporia lonicerae is morphologically distinct from other species in *Phylloporia* by its annual, sessile basidiocarps that occur in clusters, pileal surface of narrow, concentrically sulcate zones, 6–8 pores per mm, duplex context separated by a black zone, dimitic hyphal system and broadly ellipsoid basidiospores, $3.2\text{--}4 \times 2.3\text{--}3.1\ \mu\text{m}$. In the field, it is readily identified by fruiting on living vines, >1.5 cm diameter, of *Lonicera japonica*. *Phylloporia lonicerae* is most similar to *P. pseudopectinata* Yuan Y. Chen & B.K. Cui and *P. minutipora* L.W. Zhou by sharing annual, sessile basidiocarps in clusters and a dimitic hyphal system, but easily distinguished from *P. pseudopectinata* by larger pores (8–9 per mm) and subglobose basidiospores (Chen et al. 2017) and from *P. minutipora* by larger pores and basidiospores and the specific host (Zhou 2016). An updated key, based on Zhou (2016), to all accepted 48 species of *Phylloporia* is provided below.

Lonicera japonica is a well-known and important medicinal plant (Li 1578). Therefore, the potential medicinal applications of fungi growing on this plant are intriguing. Li et al. (2010) studied the medicinal metabolites from basidiocarps of *Phylloporia ribis* (Schumacher) Ryvarden that were collected on *Lonicera japonica* in China. Recent phylogenetic evidence, however, indicates that Chinese specimens of *P. ribis* collected on hosts other than *Ribes* are distinct from a *P. ribis* specimen collected on *Ribes* in Germany (Zhou and Dai 2012). As *P. ribis* was originally described from Denmark (Larsen and Cobb-Poulsen 1990), *P. ribis* specimens used by Li et al. (2010) in their study are likely *P. lonicerae* or another undescribed species.

Some species of *Phylloporia* are parasitic and appear to be restricted by host and geographic distribution of its host. For example, *Phylloporia crataegi* L.W. Zhou & Y.C. Dai, which occurs exclusively on living *Crataegus* and *P. fontanesiae* L.W. Zhou & Y.C. Dai, which colonises living *Fontanesia*, are widely distributed in China (Zhou and Dai 2012, unpublished data). Similarly, in central African rainforests, *P. flabeliformis* Decock & Yombiy is found on living trunks of *Dichostemma* and *Anthostemma* whereas *P. gabonensis* Decock & Yombiy occurs only on *Dichostemma* (Decock et al. 2015). In contrast, *Lonicera japonica* has a worldwide distribution and so far is host to a single species of *Phylloporia*. It will be interesting to determine if *P. lonicerae* is found elsewhere on *Lonicera japonica* or if different species of *Phylloporia* are found on living *Lonicera japonica* in other geographic regions.

Since 2010, 21 new species of *Phylloporia* have been described from China (Cui et al. 2010, Zhou and Dai 2012, Zhou 2013, 2015a, 2015b, 2016, Liu et al. 2015, Chen

et al. 2017, Ren and Wu 2017). Yet in Japan, only four *Phylloporia* species, including *P. lonicerae*, are known. It is hoped that this paper will draw attention to this genus in Japan and lead to the discovery of additional species.

Key to worldwide species of *Phylloporia*

1	Basidiocarps resupinate	<i>P. parasitica</i>
–	Basidiocarps sessile or stipitate	2
2	Basidiocarps stipitate and terrestrial (woody debris)	3
–	Basidiocarps sessile and on aerial wood	9
3	Context homogeneous	<i>P. minutispora</i>
–	Context duplex	4
4	Basidiospores > 4 µm long, > 3 µm wide	
	 <i>P. verae-crucis</i> (Berk. ex Sacc.) Ryvarden	
–	Basidiospores < 4 µm long, < 3 µm wide	5
5	Cystidia present	6
–	Cystidia absent	7
6	Hyphae in tomentum short and anticlinal	
	 <i>P. elegans</i> Ferreira-Lopes, Robledo & Drechsler-Santos	
–	Hyphae in tomentum loosely interwoven	
	 <i>P. nodostipitata</i> Ferreira-Lopes & Drechsler-Santos	
7	Pores < 10 per mm	<i>P. spathulata</i>
–	Pores > 10 per mm	8
8	Basidiospores < 3.3 µm long, < 2.3 µm wide	<i>P. terrestris</i>
–	Basidiospores > 3.3 µm long, > 2.3 µm wide	
	 <i>P. afrospathulata</i> Yombiy & Decock	
9	Hyphal system dimitic	10
–	Hyphal system monomitic	18
10	Basidiocarps perennial	11
–	Basidiocarps annual	12
11	Pores 6–8 per mm	<i>P. manglietiae</i> Yuan Y. Chen & B.K. Cui
–	Pores 8–11 per mm	<i>P. pectinata</i> (Klotzsch) Ryvarden
12	Basidiocarps solitary	<i>P. nouraguensis</i> Decock & G. Castillo
–	Basidiocarps in cluster	13
13	Pileal surface lighter (greyish-orange to pale cinnamon)	
	 <i>P. fulva</i> Yombiy & Decock	
–	Pileal surface darker (yellowish-brown to dark brown)	14
14	Pileus attached by a small vertex and pendant	15
–	Pileus widely attached to the substratum	16
15	Pores 7–9 per mm; basidiospores > 3.5 µm long	
	 <i>P. pendula</i> Yuan Y. Chen & B.K. Cui	
–	Pores 11–12 per mm; basidiospores < 3.5 µm long	<i>P. pulla</i>

16	Pores 12–15 per mm; basidiospores < 3 µm long, < 2.5 µm wide.....	<i>P. minutipora</i>
–	Pores 6–9 per mm; basidiospores > 3 µm long, > 2.5 µm wide.....	17
17	Pores 6–9 per mm; basidiospores broadly ellipsoid (Q = 1.28–1.33)	<i>P. lonicerae</i>
–	Pores 8–9 per mm; basidiospores subglobose (Q = 1.21–1.23).....	<i>P. pseudopectinata</i> Yuan Y. Chen & B.K. Cui
18	Pores 2–4 per mm.....	19
–	Pores 4–12 per mm.....	22
19	Basidiospores broadly ellipsoid to subglobose.....	<i>P. fruticum</i> (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden
–	Basidiospores oblong-ellipsoid, subcylindrical to cylindrical.....	20
20	Context duplex.....	<i>P. rzedowskii</i> R. Valenz. & Decock
–	Context homogeneous.....	21
21	Context < 1 mm thick; on living branch.....	<i>P. oblongospora</i> Y.C. Dai & H.S. Yuan
–	Context 2–4 mm thick; on living trunk..	<i>P. inonotoides</i> Yombiy & Decock
22	Basidiocarps annual to perennial, dense and hard consistency	23
–	Basidiocarps annual, soft corky at least at tomentum layer	29
23	Pores 10–12 per mm; on living <i>Tilia</i>	<i>P. tiliae</i> L.W. Zhou
–	Pores 6–9 per mm; on other angiosperms	24
24	Pileal surface zonate and sulcate.....	25
–	Pileal surface azonate	<i>P. yuchengii</i> Gafforov, Tomšovský, Langer & L.W. Zhou
25	Pores 6–7 per mm.....	26
–	Pores 7–9 per mm.....	27
26	Basidiospores ellipsoid; mostly on <i>Ribes</i>	<i>P. ribis</i>
–	Basidiospores subglobose; mostly on <i>Ephedra</i> , <i>Cotoneaster</i> or <i>Jasminum</i>	<i>P. ephedrae</i> (Woron.) Parmasto
27	Basidiospores > 2.7 µm wide.....	<i>P. dependens</i> Y.C. Dai
–	Basidiospores < 2.7 µm wide.....	28
28	Basidiospores ellipsoid to oblong-ellipsoid with a guttule; on <i>Abelia</i>	<i>P. gutta</i> L.W. Zhou & Y.C. Dai
–	Basidiospores broadly ellipsoid without a guttule; on living <i>Crataegus</i>	<i>P. crataegi</i>
29	Basidiospores broadly ellipsoid to subglobose.....	30
–	Basidiospores ellipsoid, oblong-ellipsoid to cylindrical	40
30	Pores 5–6 per mm.....	31
–	Pores 6–11 per mm.....	35
31	Context duplex, separated by a black zone	32
–	Context not separated by a black zone	33

32	Pileal surface azonate, lower context 1–4 µm thick	<i>P. ampelina</i> (Bondartsev & Singer) Bondartseva
–	Pileal surface zonate and sulcate, lower context 1 µm thick.....	<i>P. weberiana</i> (Bres. & Henn. ex Sacc.) Ryvarden
33	Basidiocarps solitary covered by a thick tomentum layer, pileal surface not radially faintly wrinkled	<i>P. littoralis</i> Decock & Yombiy
–	Basidiocarps in cluster without a distinct tomentum layer, pileal surface radially faintly wrinkled	34
34	Pileus < 1.5 mm thick, margin regular	<i>P. flabelliformis</i>
–	Pileus > 1.5 mm thick, margin irregular.....	<i>P. gabonensis</i>
35	Basidiocarps > 8 cm wide, > 15 mm thick; contextual hyphae > 5 µm in diam	<i>P. ulloai</i> R. Valenz., Raymundo, Cifuentes & Decock
–	Basidiocarps < 8 cm wide, < 15 mm thick; contextual hyphae < 5 µm in diam	36
36	Contextual hyphae regularly arranged.....	37
–	Contextual hyphae interwoven	38
37	Pileus distinctly sulcate, not radially striate, margin obtuse, basal context separated by two black zones; hyphae in tomentum > 4 µm in diam; on living angiosperm trunk	<i>P. clausenae</i> L.W. Zhou
–	Pileus faintly sulcate, radially striate, margin sharp, context duplex thoroughly; hyphae in tomentum < 4 µm in diam; on living liana	<i>P. radiata</i> L.W. Zhou
38	Contextual hyphae slightly thick-walled with a wide lumen, frequently septate, large rhomboid crystals absent.....	39
–	Contextual hyphae thick-walled with a narrow lumen, occasionally septate, large rhomboid crystals present in trama and context.....	<i>P. chrysites</i>
39	Pores 10–12 per mm; basidiospores < 3 µm long; on living <i>Fontanesia</i>	<i>P. fontanesiae</i>
–	Pores 7–9 per mm; basidiospores > 3 µm long; on other angiosperms.....	<i>P. oreophila</i> L.W. Zhou & Y.C. Dai
40	Basidiospores mostly > 3 µm wide	41
–	Basidiospores mostly < 3 µm wide	42
41	Pores 4–6 per mm.....	<i>P. hainaniana</i> Y.C. Dai & B.K. Cui
–	Pores 8–10 per mm.....	<i>P. capucina</i> (Mont.) Ryvarden
42	Basidiocarp solitary.....	43
–	Basidiocarp imbricate.....	46
43	Context homogeneous.....	<i>P. homocarnica</i> L.W. Zhou
–	Context duplex.....	44
44	Context not separated by a black zone; on living <i>Flacourtia</i>	<i>P. flacourtae</i> L.W. Zhou
–	Context separated by a black zone; on other angiosperms	45

- 45 Pileal surface azonate, pores 6–8 per mm; basidiospores cylindrical..... *P. cylindrispora* L.W. Zhou
 – Pileal surface zonate and sulcate, pores 8–9 per mm; basidiospores ellipsoid..... *P. lespedezae* G.J. Ren & F. Wu
 46 Basidiospores mostly < 2.5 µm wide 47
 – Basidiospores mostly > 2.5 µm wide *P. bibulosa*
 47 Pores 5–6 per mm, context duplex, not separated by a black zone; basidiospores > 3.5 µm long, contextual hyphae interwoven; on living *Nandina*....
 *P. nandinae* L.W. Zhou & Y.C. Dai
 – Pores 7–9 per mm, context duplex, separated by a black zone; basidiospores < 3.5 µm long, contextual hyphae regularly arranged; on living *Osmanthus*...
 *P. osmanthi* L.W. Zhou

Acknowledgements

Dr. Karen K. Nakasone (CFMR, USA) is thanked for improving the manuscript. The research was financed by the National Natural Science Foundation of China (Project No. 31570014) and Youth Innovation Promotion Association CAS (No. 2017240).

References

- Chen YY, Zhu L, Xing JH, Cui BK (2017) Three new species of *Phylloporia* (Hymenochaetales) with dimitic hyphal systems from tropical China. *Mycologia*. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1410692>
- Cui BK, Yuan HS, Dai YC (2010) Two new species of *Phylloporia* (Basidiomycota, Hymenochaetales) from China. *Mycotaxon* 113: 171–178. <https://doi.org/10.5248/113.171>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Decock C, Amalfi M, Robledo G, Castillo G (2013) *Phylloporia nouraguensis*, an undescribed species on Myrtaceae from French Guiana. *Cryptogamie Mycologie* 34: 15–27. <https://doi.org/10.7872/crym.v34.iss1.2013.15>
- Decock C, Yombiyeni P, Memiaghe H (2015) Hymenochaetales from the Guineo-Congolian rainforest: *Phylloporia flabelliforma* sp. nov. and *Phylloporia gabonensis* sp. nov., two undescribed species from Gabon. *Cryptogamie Mycologie* 36: 449–467. <https://doi.org/10.7872/crym/v36.iss4.2015.449>
- Ferreira-Lopes V, Robledo GL, Reck MA, Neto AG (2016) *Phylloporia spathulata* sensu stricto and two new South American stipitate species of *Phylloporia* (Hymenochaetales). *Phytotaxa* 257: 133–148. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.257.2.3>
- Gafforov Y, Tomšovský M, Langer E, Zhou LW (2014) *Phylloporia yuchengii* sp. nov. (Hymenochaetales, Basidiomycota) from Western Tien Shan Mountains of Uzbekistan based on phy-

- logeny and morphology. *Cryptogamie Mycologie* 35: 313–322. <https://doi.org/10.7872/crym.v35.iss4.2014.313>
- Ipulet P, Ryvarden L (2005) New and interesting polypores from Uganda. *Synopsis Fungorum* 20: 87–89.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511–518. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Larsen M, Cobb-Pouille LA (1990) *Phellinus* (Hymenochaetaceae). A survey of the world taxa. *Synopsis Fungorum* 3: 1–206.
- Li C, Zhang YQ, Li J, Qiu LL (2010) Chemical constituents from fruiting bodies of *Phylloporia ribis* (*Loniceræ japonica* Thunb.). *Natural Product Research and Development* 22: 422–424. [In Chinese]
- Li SZ (1578) *Compendium materia medica*. Reprinted in 1957. Commercial Press, Beijing.
- Liu JK, Hyde KD, Jones EBG, Ariyawansa HA, Bhat DJ, Boonmee S, Maharachchikumbura SSN, McKenzie EHC, Phookamsak R, Phukhamsakda C, Shenoy BD, Abdel-Wahab MA, Buyck B, Chen J, Chethana KWT, Singtripop C, Dai DQ, Dai YC, Daranagama DA, Disanayake AJ, Doilom M, D'souza MJ, Fan XL, Goonasekara ID, Hirayama K, Hongsan S, Jayasiri SC, Jayawardena RS, Karunarathna SC, Li WJ, Mapook A, Norphanphou C, Pang KL, Perera RH, Peršoh D, Pinruan U, Senanayake IC, Somrithipol S, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala KM, Tian Q, Tibpromma S, Udayanga D, Wijayawardene NN, Wanasinghe D, Wisitrassameewong K, Zeng XY, Abdel-Aziz FA, Adamčík S, Bahkali AH, Boonyuen N, Bulgakov T, Callac P, Chomnunti P, Greiner K, Hashimoto A, Hofstetter V, Kang JC, Lewis D, Li XH, Liu XZ, Liu ZY, Matsumura M, Mortimer PE, Rambold G, Randrianjohany E, Sato G, Sri-Indrasutdhi V, Tian CM, Verbeken A, von Brackel W, Wang Y, Wen TC, Xu JC, Yan JY, Zhao RL, Camporesi E (2015) Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity* 72: 1–197. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0324-y>
- Murrill WA (1904) A new polyporoid genus from South America. *Torreya* 4: 141–142.
- Núñez M, Ryvarden L (2000) East Asian polypores Volume 1. *Ganodermataceae and Hymenochaetaceae*. *Synopsis Fungorum* 13: 1–168.
- Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME, Stamatakis A (2010) How many bootstrap replicates are necessary? *Journal of Computational Biology* 17: 337–354. <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0179>
- Petersen JH (1996) Farvekort. The Danish Mycological Society's colour chart. Foreningen til Svampekundskabens Fremme, Greve.
- Ren GJ, Wu F (2017) *Phylloporia lespedezae* sp. nov. (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) from China. *Phytotaxa* 299: 243–251. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.299.2.8>
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic in-

- ference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ryvarden L (1972) A critical checklist of the Polyporaceae in tropical East Africa. – *Norwegian Journal of Botany* 19: 229–238.
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Valenzuela R, Raymundo T, Cifuentes J, Castillo G, Amalfi M, Decock C (2011) Two undescribed species of *Phylloporia* from Mexico based on morphological and phylogenetic evidence. *Mycological Progress* 10: 341–349. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0707-0>
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Wagner T, Ryvarden L (2002) Phylogeny and taxonomy of the genus *Phylloporia* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1: 105–116. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0009-8>
- Yombiyeni P, Balezi A, Amalfi M, Decock C (2015) Hymenochaetaceae from the Guineo-Congolian rainforest: three new species of *Phylloporia* based on morphological, DNA sequences and ecological data. *Mycologia* 107: 996–1011. <https://doi.org/10.3852/14-298>
- Yombiyeni P, Decock C (2017) Hymenochaetaceae (Hymenochaetales) from the Guineo-Congolian phytocorion: *Phylloporia littoralis* sp. nov. from coastal vegetation in Gabon, with an identification key to the local species. *Plant Ecology and Evolution* 150: 160–172. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2017.1289>
- Zhou LW (2013) *Phylloporia tiliae* sp. nov. from China. *Mycotaxon* 124: 361–365. <https://doi.org/10.5248/124.361>
- Zhou LW (2015a) Four new species of *Phylloporia* (Hymenochaetales, Basidiomycota) from tropical China with a key to *Phylloporia* species worldwide. *Mycologia* 107: 1184–1192. <https://doi.org/10.3852/14-254>
- Zhou LW (2015b) *Phylloporia osmanthi* and *P. terrestris* spp. nov. (Hymenochaetales, Basidiomycota) from Guangxi, South China. *Nova Hedwigia* 100: 239–249. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2014/0220
- Zhou LW (2016) *Phylloporia minutipora* and *P. radiata* spp. nov. (Hymenochaetales, Basidiomycota) from China and a key to worldwide species of *Phylloporia*. *Mycological Progress* 15: 57. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1200-1>
- Zhou LW, Dai YC (2012) Phylogeny and taxonomy of *Phylloporia* (Hymenochaetales): new species and a worldwide key to the genus. *Mycologia* 104: 211–222. <https://doi.org/10.3852/11-093>