HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	食用担子菌の電気的細胞融合に関する基礎的研究
Author(s)	三浦, 清
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 46(2), 343-391
Issue Date	1989-01
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/21292
Type	bulletin (article)
File Information	46(2)_P343-391.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

食用担子菌の電気的細胞融合に関する基礎的研究

三　浦　　清*

Electrofusion of Protoplasts from Edible Mushrooms

By

Kiyoshi MIURA *

要　　旨

食用担子菌の品種改良を目的として，種々の食用キノコのプロトプラスト調製法をはじめ電気的細胞融合法に関する基本的要因を詳細に検討し，適正条件を提示した。

収量が高く，良好な融合頻度が得られるプロトプラストの調製条件は，ヒラタケの場合はSO液体培地に3～5日培養した菌糸を用い，セルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼの混合酵素溶液で30°C，3時間加水分解することであった。これは10～14日で再生し，再生コロニーから子実体が発生した。電気融合は，2 MHzの交流電場でプロトプラストを電極に付着させ，これに直流パルスを加えることで行なうことが出来た。最大融合率は10％であった。前述の条件で，シイタケ，ヒラタケの融合体を作出した。融合処理プロトプラストから生じたコロニーを分離し，培養，発茸させたところ，両親のいずれとも異なる形態を示す子実体を形成するハイブリドーマが得られた。この菌体の一部について，アイソザイム分析を行なった結果，融合体には，シイタケとヒラタケのアイソザイムパターン（エステラーゼ）が確認できた。しかし一部を培養，子実体を形成させたところ，ヒラタケの子実体との区別は出来なかった。今後はより多くの融合体を調製，選抜し，数代の植え継ぎにより形態保持確認を行なう必要がある。

キーワード：　食用担子菌，プロトプラスト，電気的融合，融合体，アイソザイム分析

目　　次

緒　　言……345

1988年8月31日受理　Receivecl August 31, 1988.

* 北海道大学農学部林産製造学講座
Laboratory of Chemical Technology of Forest Products, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

1　プロトプラストの調製と培養……347
1－1　実験方法……347
1－1－1　供試菌……347
1－1－2　培地組成……347
1－1－2－1　菌体培養の培地組成……347
1－1－2－2　プロトプラスト再生培地……348
1－1－2－3　子実体栽培の木粉培地組成……348
1－1－3　菌体の培養条件……348
1－1－4　プロトプラストの調製……348
1－1－5　プロトプラストの再生……350
1－1－6　プロトプラストの細胞壁の再生……350
1－1－7　プロトプラストからの子実体形成……350
1－2　結果と考察……351
1－2－1　加水分解条件……351
1－2－1－1　酵素組成……351
1－2－1－2　加水分解時間……352
1－2－2　菌体の培養日数と培地組成……353
1－2－3　プロトプラストの再生……355
1－2－3－1　培地組成と浸透圧調整剤……355
1－2－3－2　加水分解……356
1－2－3－3　プロトプラストの細胞壁再生……356
1－3　結　論……357
2　プロトプラストの融合条件の検討……358
2－1　実験方法……358
2－1－1　融合システム……358
2－1－1－1　シグナルジェネレーター……359
2－1－1－2　フュージョンコントローラー……359
2－1－1－3　融合チャンバー……359
2－1－2　融合操作……360
2－1－3　融合条件……361
2－2　結果と考察……361
2－2－1　電場内におけるプロトプラストの挙動……361
2－2－1－1　電気的融合法の概要……361
2－2－1－2　プロトプラストの dielectrophoresis ……362
2－2－1－3　直流パルスによる融合……363
2－2－1－4　プロトプラストの破壊……364
2－2－1－5　プロトプラストの回転……364
2－2－1－6　作成した融合装置の性能評価……365
2－2－2　臨界融合パルス電圧……366
2－2－2－1　0.5 mM 塩化マグネシウム＋0.1 mM 塩化カルシウム添加……367
2－3　結　論……368
3　融合体の判別法の検討（アイソザイム分析）……369
3－1　実験方法……369
3－1－1　試料の調製……369
3－1－2　デンプンゲルの調製……369

3－1－3　緩衝液と染色液の組成…… 369
3－1－4　電気泳動…… 371
3－1－5　活性染色…… 371
3－2　結果と考察…… 371
3－2－1　エステラーゼ…… 371
3－2－2　酵性フォスファターゼ…… 372
3－2－3　マレートデヒドロゲナーゼ…… 372
3－2－4　ロイシンアミノペプチターゼ…… 372
3－3　結　論…… 372
4　シイタケとヒラタケの融合体の作出…… 373
4－1　実験方法…… 373
4－1－1　プロトプラストの調製…… 373
4－1－2　プロトプラストの融合…… 373
4－1－3　融合体の再生と子実体の形成…… 373
4－1－4　融合体からの菌糸の分離…… 374
4－1－5　分離した菌糸のアイソザイム分析…… 374
4－2　結果と考察…… 374
4－2－1　プロトプラストの dielectrophoresis と融合 …… 374
4－2－2　融合体の子実体の性質（形と色）とその安定性…… 374
4－2－3　融合体のアイソザイム分析…… 375
4－3　結　論…… 376
総　括…… 376
文　献…… 378
Summary …… 379
Explanation of photographs …… 380

緒　　言

近年自然食嗜好の高まりの中で“キノコ”は山菜と共に，大いに注目されるようになってきているが，現在生産されている栽培種は，野生の食用キノコと比較するとわずか数種に過ぎない。いわゆる“香りマツタケ，味シメジ”と言われている美味のキノコは菌根菌に属するため栽培は不可能に近く，非常に高価なものとなっている。一方シイタケ，エノキタケ，ヒラタケ，ナメコ，タモギタケ等日本で栽培されているキノコの全生産高[1]は 1984 年は 2,499 億円，1985 年は 2,326 億円，1986 年は 2,284 億円になっているものの，消費者の嗜好の多様化や，生産面においても様々な問題が生じている。例えば原木，培地用のオガクズの不足，通年栽培に伴う労働力やエネルギーの消費の過多，病虫害の発生などが挙げられる。

これらの問題を解決するためには，育種により耐病性で高収量，形，香，色等の良好な，優れた性質を持った品種を育成することや，消費者の嗜好にあわせて栽培種を増すこと，さらには抗腫瘍成分，酵素，種々の生理活性物質等の有効成分の利用も検討していかなければならない。しかしキノコの育種に関しては，その栽培の歴史も浅くまだ手法に関しても未解決の点が多い。しかも従来の手法により品種改良を行う場合には長期間を必要とするため，現在生じている問題点の解決には限界がある。

この様な状況のもとで，最近バイオテクノロジーの手法をキノコの育種へ導入しようとする動きが盛んになって来た。特に細胞融合法は現在の育種の手法では不可能な種間，属間での，遺伝子の交換が可能となり，新しい品種の作出への期待が持たれる手法である。この手法が開発されると，例えば菌根性のマツタケに腐植性菌であるシイタケ，ヒラタケ等が融合され，マツタケの栽培の可能性が生ずる。またシイタケ等病害を受け易い菌への耐病性の付与，エノキタケ，ヒラタケ等の低温で子実体を形成するものに対し，高温での子実体形成能を与えることによるエネルギー消費の効率化，また有用な酵素を高収率で生産する菌を作出し，新しいバイオマスの利用（例えばバイオパルピング）等多くの可能性を秘めている。

細胞融合法によるキノコの育種については，最近研究が始められたばかりであり，その報告も限られ，特に融合体に関しては，2～3種の菌で種内，種間で作られている状況にすぎず，今後大いに発展するものと思われる。

実際に細胞融合法を用いてキノコの品種改良を行う場合には，1）プロトプラストの調製，2）プロトプラストの再生と培養，3）プロトプラストの融合，4）融合体の再生，培養，選抜，5）選抜した融合体からの優良系統の作出，と一連の過程を経なければならず，各段階に多くの要因が存在する。

プロトプラストの調製では，用いる試料に関して，例えば菌糸，子実体，担子胞子，分性胞子等，またそれらの成長課程における採取時期，また同一種内に於ける系統の相違等の要因があり，また細胞壁の加水分解に用いる酵素，緩衝液，処理時間，浸透圧調整剤，pH 等によっても，プロトプラストの収量もその活性も大きく変化する。

プロトプラストの再生では，ヒラタケ，タモギタケ，シイタケ等種の違いで再生率は変化するが，他に再生培地の組成，種類(固体，あるいは液体)，また浸透圧調整剤の種類，濃度によってもその再生率が変化する。

融合方法では，大きく分けて化学的方法として高 pH-高 Ca 法[2,3]，ポリエチレングリコール(PEG)法[4,5]のほかに，電気的方法として，微小電極法[6]と平行電極法[7,8]，Zimmermann ら[9]と Pohl[19]によって開発された dielectrophoresis 法とがある。現在 PEG で融合を行った報告が多くあるが，最近は電気的刺激による報告もなされて来た。融合体の選抜にはマイクロピペットにより直接融合したプロトプラストを取り出す方法，栄養要求性等の突然変異株から調製したプロトプラストを用いる方法，再生子実体の形，色等により直接選抜する方法が考えられる。

本研究では PEG の様に細胞毒性を持たず，しかも高い融合効率が期待でき，また顕微鏡下で融合状態を観察しながら条件をコントロールできる利点を持つと考えられる dielectrophoresis 法を用い，この方法による細胞融合について，プロトプラストの調製から，融合体の再生，培養，選抜に至る各過程における各種の基本的条件，因子に関して検討を行った。また融合体の選抜は，本研究では食用担子菌の電気的細胞融合に関する基礎的知見を得ることを目的としているため，突然変異株を用いた場合には，普通の菌とは異なった性質を有し，かつ栽

培に対して悪い影響を与える可能性[10]を考え，融合操作後，再生して来たコロニー全部を栽培し，その中から子実体の形，色等の外見状の特徴で選抜を行い，その後アイソザム分析を用いて融合体の判定を行った。

なお，研究に融合装置と融合チャンバーとを試作し，研究目的を満足する様に改良を加え，一応実用にたえる条件を備えた装置を考案することができた。

今回の研究を進めて行くに際し種々ご指導を賜った香山彊教授，中村太郎教授，笹谷宜志教授に対し心から感謝申し上げる。また装置作成時には応用電気研究所の坂上岩太博士を始め多くの人達の助力を得，実験に際しては教室員，大学院生の助力を得たことを心から感謝し謝辞を述べる次第である。

なお，本論文は北海道大学審査学位論文である。

1　プロトプラストの調製と培養

プロトプラストの調製を行う場合，菌糸，担子胞子，分生子，子実体のいずれを用いてもプロトプラストの調製は可能であるが，一般には試料調製の容易さから，1次又は2次菌糸の培養したものを分離源として用いる場合が多い。またその培養方法も振盪培養，静置培養等考えられるが，本研究では2次菌糸を用い静置培養を行った。しかし，完全な静置状態での培養では気相菌糸を生じるため，緩やかな攪拌を伴った培養を行った。

1－1　実験方法

1－1－1　供試菌

次の5種類の菌を使用した。

ヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）　（73—12　系統株）

エノキタケ（*Flammulina velutipes*）（83—3　系統株）

タモギタケ（*Pleurotus cornucopiae*）（76—5　系統株）

ナメコ（*Pholiota nameko*）　（70—2 E　系統株）

シイタケ（*Lentinus edodes*）　（71—14　系統株）

供試菌は全て北海道立旭川林産試験場より譲り受けた。

1－1－2　培地組成

1－1－2－1　菌体培養の培地組成

菌体培養には次の2種の液体培地を用いた。

MYG培地（麦芽エキス1％，酵母エキス0.4％，グルコース0.4％）

SO培地（醤油4.5％，砂糖2.5％，玉葱抽出液15％）

なお，玉葱抽出液は，細かく刻んだ玉葱150 gに蒸留水150 mlを加え，60～70°Cで1時間加温後ガーゼで濾過し調製した。

培地は100 ml容の三角フラスコに20 mlずつ分注し，オートクレーブで1.2気圧，120°C，

20分間滅菌し，放冷後使用した。菌体を攪拌するために各フラスコ中に予め攪拌子と径8mmのガラスビーズ10～15個を入れた。

1－1－2－2　プロトプラスト再生培地

プロトプラストの菌体への再生培養には，次の2種類の液体再生培地と2％寒天が含まれている4種類の固体再生培地を用いた。

(a) MYG液体培地＋0.5Mマニトール，(b) SO液体培地＋0.5Mマニトール，(c) MYG固体培地＋0.5Mマニトール，(d) SO固体培地＋0.5Mマニトール，(e) MYG固体培地＋0.5Mサッカロース，(f) SO固体培地＋0.5Mサッカロース

液体培地は試験管に，固体培地はシャーレに各々分注し，前述の条件で滅菌，放冷後使用した。

1－1－2－3　子実体栽培の木粉培地組成

木粉（10メッシュ通過分）と栄養源として米ぬか（20メッシュ通過分），フスマを用い，容積比で木粉：栄養源＝4：1に混合し，含水率を65％として栽培瓶に100ml当り60g（湿重量）詰め，オートクレーブで1.2気圧，120°C，90分間滅菌，放冷後使用した。

1－1－3　菌体の培養条件

SO培地を用いて，斜面培養，平面培養したもの及び1－1－2－1において述べた組成の液体培地を用いて500ml容フラスコ中で振盪培養したものを種菌とした。斜面培養したものは白金耳で適当量取り，平面培養したものはコロニーの周辺部をコルクボーラーで打ち抜き，振盪培養したものは1～2mlの種菌をそれぞれ20mlの液体培地中に接種した。種菌接種後，23°Cで1～10日間培養したものを試料として使用した。培養中は1日1回，10分間攪拌を行った。なお，一部の実験では接種後7～10日間予備培養を行った後に，本培養を行った。

1－1－4　プロトプラストの調製

実験には次の4種の市販酵素を使用した。

(a) セルラーゼ“オノズカ”R-10（*Trichoderma viride* 由来）
(Yakult phamaceutical Industry Co., Ltd)

(b) ザイモリアーゼ20T（*Arthrobacter luteus* 由来）(Seikagaku Kogyo Co., Ltd)

(c) キチナーゼ　No. C-6137（*Streptomyces griseus* 由来）(Sigma Chemical Company)

(d) β-グルクロニダーゼ　No. G-3510（*Escherichia coli* 由来）
(Sigma Chemical Company)

培養した菌体を1G1グラスフィルター上に集め，脱イオン水で洗浄した後，100～200mg取り，セルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼ，およびβ-グルクロニダーゼをいろいろ組合せてえられた混合物を，0.05Mリンゴ酸＋0.5Mマニトール溶液（1N水酸化ナトリウムでpH 5.6に調整した）1mlに加え，30°Cで1－4時間，80回／分で振盪しながら加水分解した。加水分解後，3G2—3G3のグラスフィルターで未加水分解の菌体を濾別し，濾液を700×g，

10分間遠心分離によってプロトプラストを集め，0.5Mマニトールに懸濁した。この操作を2回繰り返し洗浄したプロトプラストは1mlのマニトール溶液に懸濁し，その一部を血球計数盤（THOMA G-6513）に取り，位相差型光学顕微鏡（オリンパスEHCr-Tr-II）下（800倍）で計測した。菌体の培養からプロトプラスト化のフローチャートをFig. 1-1に示す。計測終了後のプロトプラストは再生実験と融合実験に使用した。なお，担子菌のプロトプラストの調製における緩衝液の影響については，Wesselsらの報告[12]があるが，本研究では電気融合法により融合を行うため，イオンが多くなると交流及び直流電圧を高くしなければならず，プロトプラストに対し悪影響を与えるために，0.5Mマニトール溶液を用いることにした。

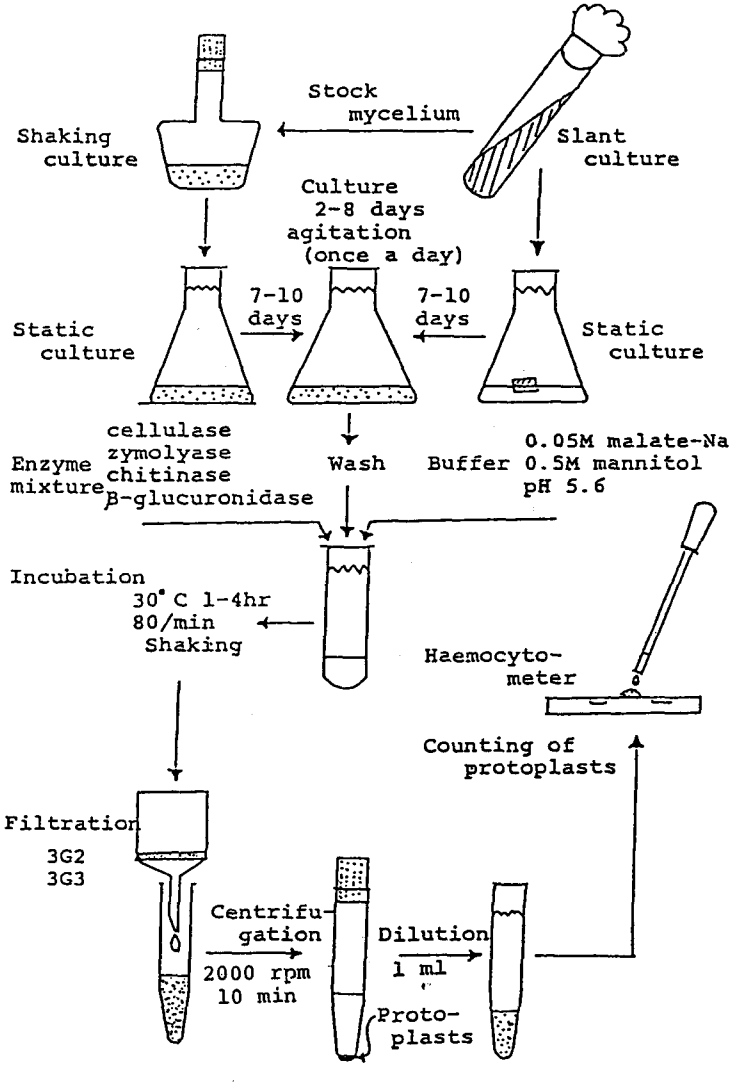


Fig. 1-1. Preparation of protoplasts.

1－1－5 プロトプラストの再生

再生実験では，得られたプロトプラストをMYG又はSO液体再生培地5mlを入れた試験管に接種した。固体再生培地の場合はプロトプラストを50～100個/mlになる様に希釈した後シャーレに接種した。プロトプラストは23°Cで1～10日間培養，液体培地では，位相差顕微鏡により再生菌糸の伸長状態を観察した。固体再生培地では，発生したコロニー数を計数し，接種した全プロトプラスト数に対する再生したコロニー数の百分率で再生率を表示した。再生率表示の中には一部に補正を行ったものがある。補正は一定量のプロトプラストを取り，その懸濁液に10倍量の滅菌水を加えプロトプラストを破壊した後，固体再生培地に接種し，形成したコロニー数を滅菌水を加えていない試料からのコロニー数から引いた値を真のプロトプラストの再生コロニー数とした。

1－1－6 プロトプラストの細胞壁の再生

カルコフルオール蛍光染色法を用いてプロトプラストの細胞壁の再生状況を経時的に観察した。プロトプラストの固定は，グルタールアルデヒド溶液を用いて行った。処理操作としては，プロトプラスト懸濁液1mlにグルタールアルデヒド2.5％，塩化カルシウム50 ppmを加え，直ちにタッチミキサーで攪拌を行い，冷蔵庫内(4°C)で24時間固定を行った後，脱イオン水で遠心処理により洗浄を行った。その後，遠心管の底に沈澱しているプロトプラストに1％カルコフルオールを0.3～0.5ml添加し攪拌した後，5分間静置した[11]。処理後，脱イオン水で3回洗浄を行った後，無蛍光スライドグラス上にプロトプラスト懸濁液を1滴落しカバーグラスを載せた後，吸水紙で余分の溶液を取り除き周りを密閉した。ここで用いたカルコフルオールは，キチンとセルロースに吸着する蛍光染色剤である[11]。蛍光顕微鏡観察にはZeissのUMSP-50を用いた。撮影は透過光と落射蛍光の2種を用いて行い，対物40倍で写真を撮影した。

1－1－7 プロトプラストからの子実体形成

ヒラタケおよびシイタケのプロトプラストから子実体形成の実験を行った。前述した固体再生培地のコロニーを斜面培地に接種し，7～10日間23°Cで培養を行い，木粉培地に接種し，その後暗黒下で23°C，湿度70％で菌回しを行った。菌回し完了は次の状態をもって判断した。

ヒラタケ；菌糸が培地全体に回り，かつ培地上部が濃い菌層で覆われた状態（約1ヵ月）

シイタケ；培地全体に菌糸が回った後，約1ヵ月で菌層上部に褐色の変色部分が出来，その後原基が形成された時点（約2～3ヵ月）

菌回し完了後，蛍光灯下で発茸操作を行った。16°C，湿度90％の条件でヒラタケは培地上部の菌層を掻き取り，原基が発生するまで（約2週間）ウレタンシートをかけ水分を保持し，その後シートを除いて空気の流通をよくする。シイタケは原基形成後次のようにして発茸操作を行った。培地の高さより少し深めの容器に針葉樹（トドマツ）の木粉を水分を十分に含ませた状態で詰め，菌回しの完了した培地を埋め込み，この状態で約2ヵ月保持することにより子

実体を発生させた。

1－2　結果と考察

植物プロトプラストを調製する試みは古くから行われている。今日まで数多くの植物プロトプラストの調製例が報告されており，殆ど全ての植物組織からプロトプラストが得られるといっても過言ではない。近年，担子菌のプロトプラストの調製についても数多く報告されている[12~16]。

本研究に於いては，融合実験を前提としてのプロトプラストの調製について検討，考察することにした。細胞融合に適したプロトプラストの条件として以下の3つの条件が挙げられる。

1．ある程度（10^6/ml）以上の収量が得られること。2．細胞壁の除去が完全であること。3．再生率が高いこと。

これらの条件をみたしたプロトプラストを調製するためには，次の様な要因について検討することが必要と考えた。

1．細胞壁加水分解の条件　2．菌体の培養条件と培地組成　3．プロトプラストの再生

1－2－1　加水分解条件

プロトプラスト化するための最適条件を見つけるため，細胞壁加水分解について検討した。この実験に使用する菌体の条件を次のように定めた。

・培　　地：MYG及びSO液体培地

・培養日数：2～4日間

加水分解の条件をここでは2つに分けて検討した。

1－2－1－1　酵素組成

加水分解酵素の組合せについては多くの報告が出されている[12~15]。その中で酵素溶液1ml当り，菌体（湿重量）400—130mg用いており，酵素はセルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼ，β-グルクロニダーゼの組合せを用いていた。この組合せによると，ヒラタケでは3.8×10^7/ml，エノキタケでは6.7×10^7/mlもの高収量のプロトプラストが調製されている報告がある[15]。

使用濃度は，予備実験により5種の供試菌すべての収量が10^6/mlとなった条件は，セルラーゼ1％，ザイモリアーゼ0.1％，キチナーゼ2 units，β-グルクロニダーゼ0.05％（284 units）であり，加水分解時間は3.5時間とした場合（3.0×10^7/mlエノキタケ），β-グルクロニダーゼを加えない時（1.1×10^7/mlエノキタケ）よりも高いプロトプラスト収量であったが，しかし，かなりの微細片が混入し，このものがプロトプラストの融合を妨げるので，β-グルクロニダーゼは使用しなかった。セルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼについて（各々，2％，0.5％，8 units）及び，（2％，0.1％，4 units），（1％，0.1％，2 units），（2％，0.6％，6 units），（5％，1.0％，6 units）の5つの条件について検討した。

その結果，一番高収量が得られた条件は，培養3日目の菌体を使用し，セルラーゼ，ザイ

モリアーゼ，キチナーゼを各々，1％，0.1％，2 units を用いた時で，ヒラタケについて，1.29×10^7/ml のプロトプラストが得られた。また，高い収量が得られ，しかも微細片及び菌糸片を含まない条件は，（1％，0.1％，2 units → 1.1×10^7/ml エノキタケ）及び（2％，0.6％，6 units → 8×10^6/ml ヒラタケ）の濃度の時であった。その他の濃度では，ある程度の収量（10^6/ml 前後）は得られるものの微細片及び菌糸片が混入した。

1－2－1－2　加水分解時間

加水分解時間を1－4時間で変化させた時の収量の変化を Fig.1-2 に示す。菌体は SO 培地で3日間培養したものを使用し，酵素はセルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼが各々2

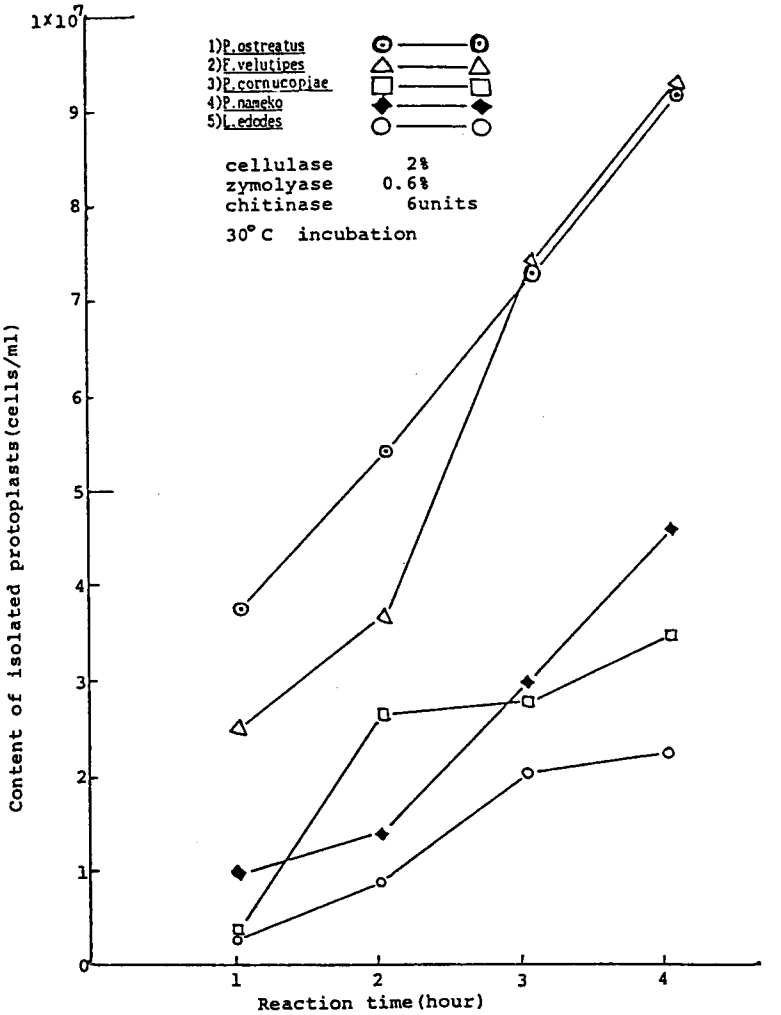


Fig. 1-2. Influence of reaction time on the formation of protoplasts. Mycelium; culture for 3days in SO medium.

%，0.6%，6 units の濃度を用いた。通常の担子菌のプロトプラストの調製は 3 ～ 4 時間の加水分解時間以内に最大収量のプロトプラストを得ることができるが，それ以後は減少する傾向にある[13,17]。しかし，別の報告[15]では，10 時間まで増加し続け，それ以後は一定になっていた。

本実験では，加水分解は 4 時間まである程度，プロトプラストの収量の増加が認められたが，後述の再生実験，及び融合実験の結果も考慮して，加水分解は 30°C で 3 時間とした。

1－2－2　菌体の培養日数と培地組成

MYG，SO 液体培地で培養した菌体からプロトプラストを調製し，培地組成の違いが収量に及ぼす影響を調べた。その結果の一部を Fig. 1-3 に示した。加水分解はセルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼ，が各々 1%，0.1%，2 units の混合溶液中で，30°C，3 時間行った。

ヒラタケでは SO 培地で培養した菌体から調製したプロトプラスト収量は，MYG 培地で培養したそれよりも約 2 倍となった。エノキタケについても SO 培地の方が若干プロトプラスト収量が高かった。タモギタケ，シイタケ，ナメコに関しては，成育した培地によりプロトプラストの収量は影響されなかった。従って，本実験で使用した SO 培地で培養すると菌によっては，プロトプラストの調製が容易になると考えられる。

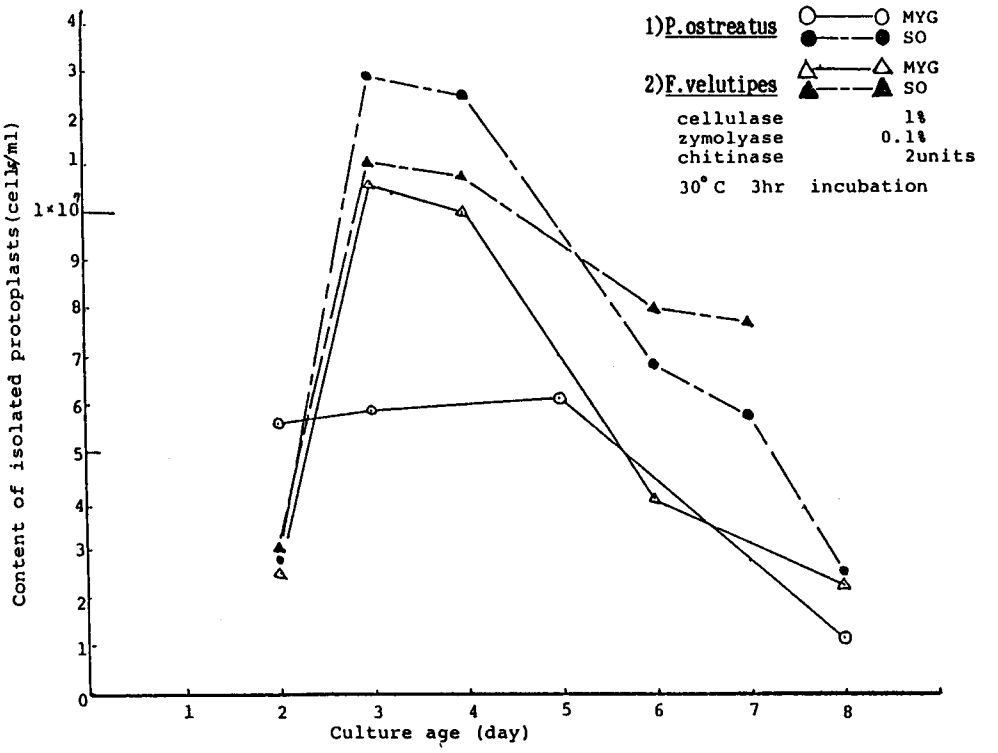


Fig. 1-3. Influence of liquid medium composition and culture age on the formation of *P. ostreatus* and *F. velutipes* protoplasts.

次に菌体の培養日数とプロトプラスト収量との関係を検討した。(Fig. 1-3)。ヒラタケ，エノキタケは共に，SO 培地接種後 3 日目に各々平均 1.3×10^7/ml，1.1×10^7/ml の最高の収量を得ることができ，以後，両菌からのプロトプラストの収量は共に減少していった。従って，ヒラタケ及びエノキタケは培養期間が長くなればプロトプラストの収量も低下する傾向にある。また，タモギタケ，ナメコについても 3 日目まで増加し，それ以後は減少する傾向にあったが，シイタケは 7 日目まで緩やかに増加しそれ以後は減少する傾向にあった。タモギタケ，シイタケ，ナメコの最大収量は SO 培地使用の時で各々5.0×10^6／ml，2.5×10^6/ml，3.3×10^6/ml であった。この条件では，シイタケ以外は 3 日目に最大収量が得られたので，詳細は後に述べるが予備的に SO 培地に 3 日間培養した菌体から上述の条件で調製したプロトプラストを交流電圧 500 V/cm，高周波 2 MHz，直流パルス電圧 10 KV/cm，パルス幅 6 μsec. で融合実験を行ったが，プロトプラストの融合頻度はきわめて低かった。

次に，酵素濃度をセルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼを各々 2 %，0.6 %，6 units とした時の収量に対する影響を調べた。その結果を Fig. 1-4 に示した。SO 培地で培養した菌体からは，3 日目迄は収量の増加を示したが，4 日目以後は，ヒラタケを除きほぼ同じ値を示した。しかし，6 日目以後は菌糸片の混入が認められたので，菌糸片の混入がみられなかった 6 日目以前の菌体から調製したプロトプラストを使って融合実験を行ったところ，プロトプラストの

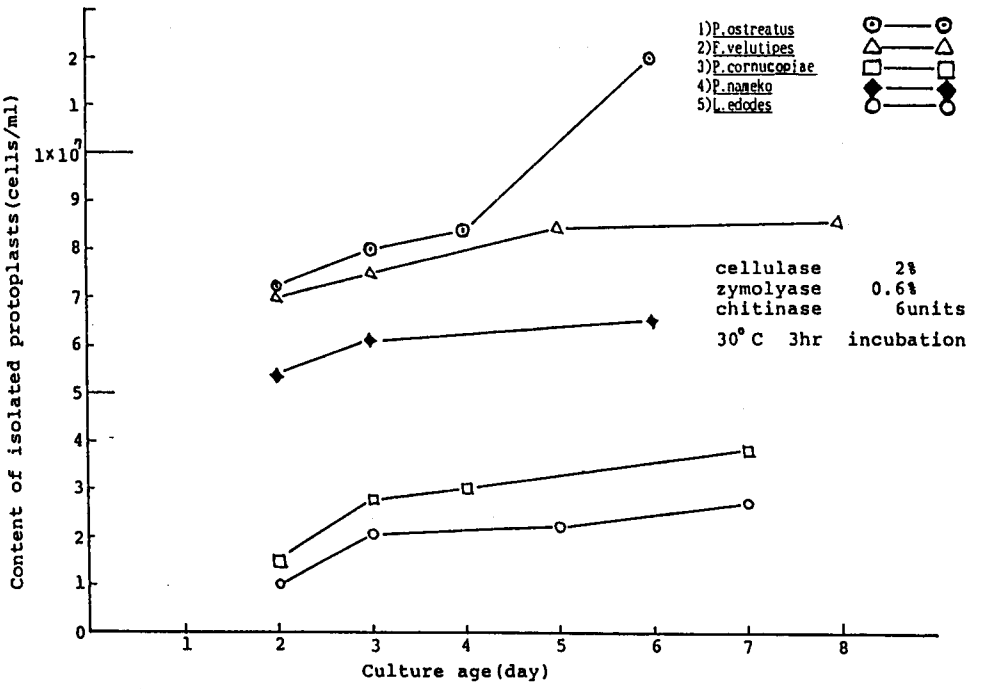


Fig. 1-4. Influence of culture age on the formation of plotoplasts.
Mycelium; cultured in SO medium.

融合が観察された。以上の実験結果より，３つの酵素の最適の組合せは，セルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼを各々２%，0.6%，6 units とし，菌体は，SO 液体培地で２－５日間培養したものを使用することにした。

１－２－３　プロトプラストの再生

担子菌のプロトプラストの再生については，再生培地や浸透圧調整剤の影響について報告されている[15]。本研究に於いてもこの条件等について検討した。

ヒラタケのプロトプラストの再生は，SO，MYG 共に，液体再生培地では２～５日目に，固体再生培地では 10～14 日目に各々再生を確認した。液体培地での再生には３種の特徴的パターンが報告されている[18]。今回の実験に於いても Photo 1, 2, 4 に示すプロトプラストから直接菌糸が生成するものと，Photo 3 に示す酵母型と，Photo 5 に示すいわゆる“bud-like cells”と言う形のものが認められた。固体再生培地ではコロニー形成を再生の目安とした（Photo 6）。１個のコロニーから栽培瓶で子実体が発生した（Photo 7）。この結果より，用いた担子菌のプロトプラストは植物プロトプラストと違い，１個のプロトプラストから容易に子実体まで再生できることが明らかになった。

１－２－３－１　培地組成と浸透圧調整剤

再生培地の組成と浸透圧調整剤の種類の違いの再生率に対する影響を検討した結果を Fig. 1-5 に示す。

a）では，酵素組成，浸透圧調整剤（0.5 M マニトール）が同じで培地（MYG，SO）の違いによる再生率を比較したところ SO 培地の方が再生率が高い結果となった。しかし後述する

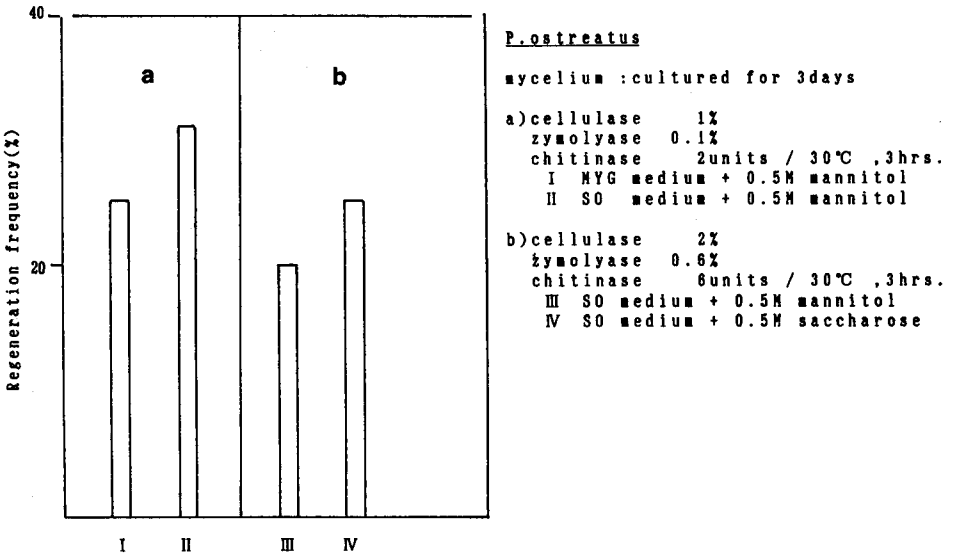


Fig. 1-5. Influence of solid medium composition on the regeneration of *P. ostreatus* protoplasts.

ように，この酵素組成では融合が困難な結果が得られているので，b)に示す酵素組成でSO培地による浸透圧調整剤の違いによる再生率を比較したところ0.5Mサッカロースの方が再生率が高い結果となった。

1－2－3－2 加水分解

次に，再生率に対する加水分解時間の影響を検討した結果をFig. 1-6に示す。

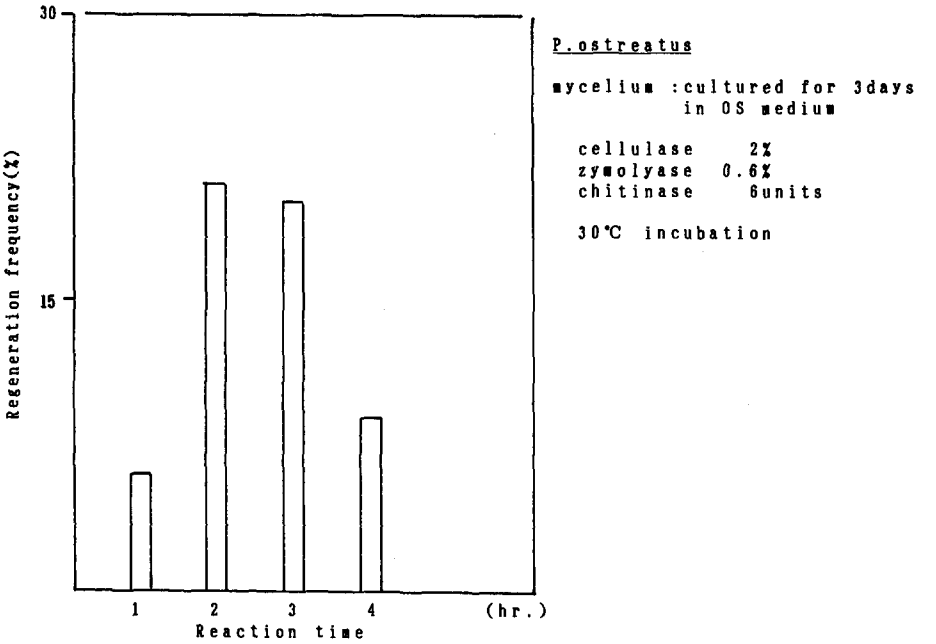


Fig. 1-6. Influence of reaction time on the regeneration of *P. ostreatus* protoplasts.

1－2－1で述べたように，加水分解時間が増加するに従いプロトプラストの収量も増加したが，再生率は2時間加水分解した場合最も高い再生率を示し，収量の多い4時間処理では再生率は2時間の再生率の約43％に低下した。そこで，この2時間又は3時間加水分解したプロトプラストを用い融合試験を行った結果，加水分解時間が2時間のプロトプラストより3時間のプロトプラストの方が融合に適していることが認められた。これらの結果より，加水分解は3時間行うことにした。

1－2－3－3 プロトプラストの細胞壁再生

プロトプラストの再生に関して，蛍光染色によってプロトプラストの細胞壁の再生を観察した。培養時間0時間のヒラタケのプロトプラストでは7.9％がカルコフルオール染色によると思われる蛍光を発しており，培養時間4時間のプロトプラストでは12.1％が蛍光を発していた（Photo 8, 9)。同じく24時間のものは23.1％が蛍光を発していた（Photo 10, 11)。ここで他のプロトプラストも蛍光を発しているが，菌糸の状態では，更に強い蛍光を発する(Photo

12, 13)。

この結果から，0時間に於ける蛍光は，プロトプラストに残存している未分解の細胞壁の蛍光と考え，プロトプラストの細胞壁再生率は0時間で0％，4時間で4.2％，24時間で15.2％と計算された（Table 1-1)。

Table 1.1 Cell wall regeneration of protoplast estimated from the observation by fluorescent optics

Incubation period	0 hr.	4 hrs.	2 4 hrs.
Protoplasts showing fluorescence	7.9％	12.1％	23.1％
Regeneration of cell wall	0％	4.2％	15.2％

1－3　結　　論

〈プロトプラストの調製〉

プロトプラストの調製については，プロトプラストの収量が1×10^6/ml（湿重量100—200 mg当り）以上あり，しかもプロトプラストが融合に適する性質を持つという条件を再生及び融合実験を考慮して検討した結果，菌株によって著しい特性があるが菌体はSO液体培地で3～5日間培養したものを用い，加水分解はセルラーゼ，ザイモリアーゼ，キチナーゼが各々2％，0.6％，6 unitsの酵素溶液で30°C，3時間行う条件が，本研究で使用したプロトプラストの最適調製条件となった。添加効果が認められているβ-グルクロニダーゼは収量の増加を導いたが，融合実験には不利となる微細片の混入を招いた。従って本研究ではプロトプラストが比較的均一でしかも微細片が混入しない調製条件として上述の条件を最適条件とした。同条件に於て調製したプロトプラストは10～14日目にコロニーを形成し，それぞれのコロニーから子実体を形成した(ヒラタケ)。再生率はSO固体再生培地で，浸透圧調整剤が0.5 Mサッカロースのものが良く，また加水分解時間は，2～3時間のものが好結果を与え，再生率は平均20％となった。

〈プロトプラストの細胞壁再生〉

プロトプラストの細胞壁再生過程の観察の結果，ヒラタケのプロトプラストについて24時間後には15.2％のプロトプラストが細胞壁を再生していることが認められた。これは，ヒラタケのプロトプラストの平均再生率が10～20％であるという結果とよく一致している。さらに自家蛍光との区別を明瞭にするため，蛍光波長の測定を行うべきであろう。また実際には固体再生培地での再生を行うが，もし液体再生培地での結果がそのままコロニーの再生として現れるとしたら，液体再生培地での予備培養をすることにより再生率が向上する可能性もある。

従来行われていた再生実験では主に固体培地上のコロニーの数のみで再生を判定していたが，液体培地での細胞壁再生結果より短時間で再生の判定が可能となり，かつ再生率の向上の可能性もかんがえられる。しかし細胞壁の再生機構について，種々の再生条件下で経時的に追

跡する必要がある。同時に液体，固体培地での再生の相違点にかんしては考慮する必要がある。

2 プロトプラストの融合条件の検討

2－1 実験方法

2－1－1 融合システム

本研究で使用した融合システムは，原理的には Pohl[19]の dielectrophoresis 法と Zimmermann ら[9,20]の電気的融合法を組み合わせた方法を基本としたものであり，シグナルジェネレーター，フュージョンコントローラー，融合チャンバー，高周波及びパルスをモニターするためのオシロスコープ，融合状態を観察するためのビデオカメラ(IKEGAMI, TSUUSHINKI, CO.,

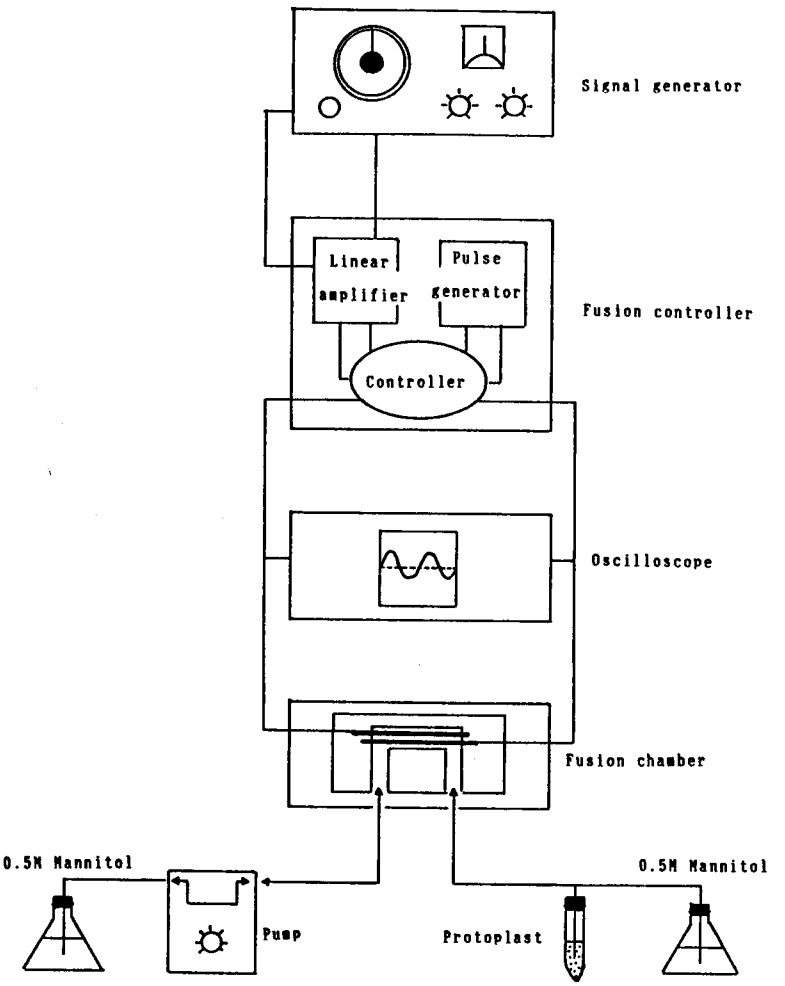


Fig. 2-1. Diagrammatic representation of the experimental set-up used for electrically induced fusion.

LTD.: CTC-2100 type) とモニター用テレビを取り付けてある倒立顕微鏡（オリンパス，IMT-2型）から成っており，各部分を組み合わせて，手作りで Photo 14，Fig. 2-1 に示すようにシステム化して研究に供した。

2－1－1－1　シグナルジェネレーター

シグナルジェネレーター（MEGURO, DENPA, SOKKI, K.K.）は，チャンバー内の電極間にかける交流電場の発生源である。周波数可変域は，50 KHz～30 MHz で最大電圧 15 V（オシロスコープでピークからピークまで）の正弦波をアンプを通した状態で得ることができる。出力インピーダンスは 50 Ω である。

2－1－1－2　フュージョンコントローラー

フュージョンコントローラーは，パルス発生部，高周波直線増幅部，出力混合及びコントロール部からなり，負荷インピーダンスが純低抗で 20 KΩ 以上の時使用可能である。出力に関する仕様は，以下の通りである。

高周波電圧：0～15 V，パルス波形：直流方形波，パルス電圧：0～200 V，パルス幅：6 μsec.～100 μsec.，ラグタイム：100 μsec.～1 msec.（20 μsec.改良前）

2－1－1－3　融合チャンバー

融合チャンバーは，Fig. 2-2 に示すようにスライドグラス上にアクリル板をエポキシ樹脂

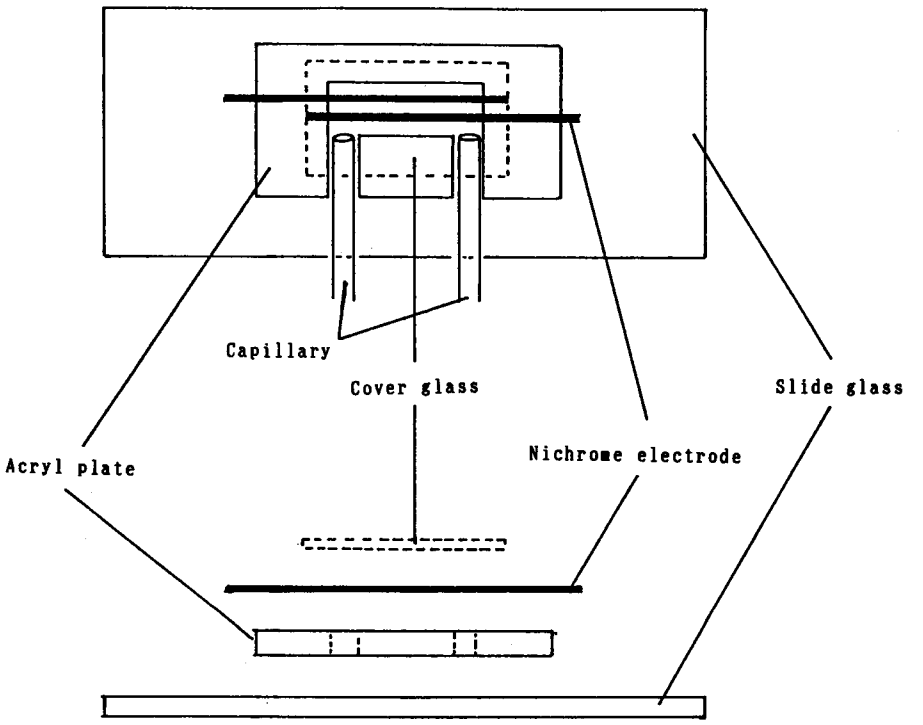


Fig. 2-2.　Fusion chamber.

接着剤で接着してチャンバーを作り，その中に2本のニクロム円柱電極を平行に張って，その上部にカバーグラスを接着することによって密閉したものである。プロトプラストは2本のポリエチレン製のキャピラリー管を通じて出し入れする。円柱電極の直径は100 μm，電極間は40 μm，50 μmの2種類を用いた。

2－1－2 融合操作

SO又はMYG液体培地中で培養した菌糸を1G1グラスフィルターで集め，脱イオン水で洗浄後，50～200 mgを取り，それに前章でプロトプラスト調製のため検討した加水分解酵素の混合液（セルラーゼ2%，ザイモリアーゼ0.6%，キチナーゼ6 unitsを含む0.5 Mマニトール＋0.05 Mリンゴ酸溶液pH 5.6)を加え，30°Cで3時間，1分間当り80回の振盪をしながら加水分解を行った。3G2次いで3G3のグラスフィルターで未加水分解の菌糸を濾別し，濾液を700×g，10分間遠心分離を行った。遠心分離後，上澄みを捨て，沈澱しているプロトプラストを0.5 Mマニトール溶液に再懸濁した。この操作を2回繰り返し洗浄を行った。洗浄後，プ

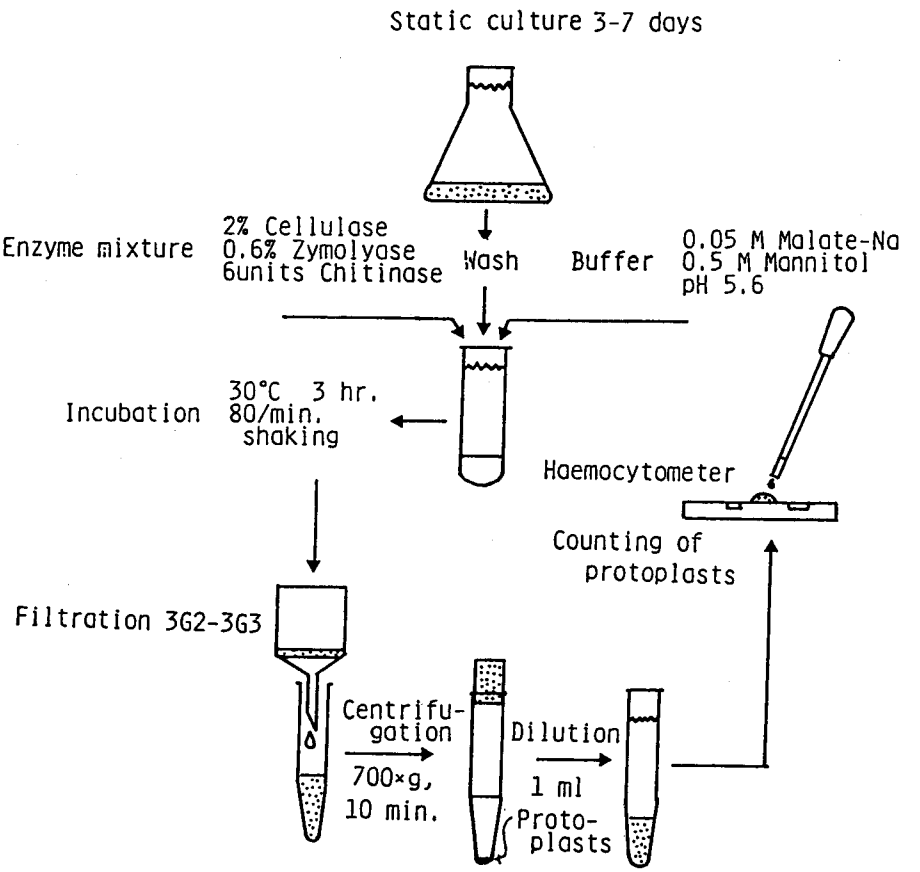


Fig. 2-3. Preparation of protoplasts for electrofusion.

ロトプラストを1mlの0.5Mマニトール溶液に懸濁し，その一部をトーマ血球計数盤に取り，位相差顕微鏡（オリンパスEHCrTr-II）下（800倍）で収量を計測した。2菌株からのプロトプラスト数は各々が等しくなるように調製し，融合実験に使用した。以上の操作のフローチャートをFig. 2-3に示す。融合実験は，倒立型顕微鏡（オリンパスIMT-2型）下（1500倍）で行った。この顕微鏡にはテレビカメラが接続してあり，融合の様子をテレビモニターすると同時にビデオテープに収録することができる。プロトプラスト懸濁液をペリスタティックポンプ（EYELA PM-6 type）で吸引することによって融合チャンバーに入れ，そこで数珠つなぎ状のいわゆるパールチェーンを形成させた。融合完了後ポンプによってプロトプラストを回収した。

2－1－3　融合条件

まず始めに高周波の電圧を変えてプロトプラストのdielectrophoresisの状態を観察し，またパルス電圧，及びパルス幅を変えてプロトプラストの融合状態を観察した。次にパルス電圧及びパルス幅を変化させて，各パルス幅に於ける臨界融合電圧を測定した。またプロトプラスト懸濁液に0.5mM塩化マグネシウム及び0.1mM塩化カルシウムを添加して，臨界融合電圧の変化及び融合の様子の変化を調べた。実験は以下の条件下で行った。

高周波周波数：500KHz～5MHz（臨界融合実験は2MHz）

高周波電圧：50V～2KV/cm（臨界融合実験は400V/cm）

パルス電圧：1～8KV/cm,

パルス幅：6～80 μsec.

パルス回数：1～10（0.5秒間隔）

ラグタイム：20 μsec.（臨界融合実験では1msec.）

2－2　結果と考察

2－2－1　電場内に於けるプロトプラストの挙動

2－2－1－1　電気的融合法の概要

電気融合に関する最初の報告はSendaら[6]によってなされた。彼らは微小電極を直接一対の細胞に接触させ，電気パルスを与え融合を起こさせる方法で，インド蛇木培養細胞のプロトプラストを5mM塩化カルシウムを含んだ0.6Mソルビトール溶液でpH 5.5の条件下でパルスは12 μamp.を5msec.与え融合させた。次に一対の平行電極を並べて，その間にプロトプラスト懸濁液を入れ，電気パルスを与える融合方法がNeumann[21]，山田[22]，Senda[23]らによって報告された。この方法は，多量のプロトプラストに対し一度にパルスをかけることができ，また装置も，操作も簡単である特性を持っている。

本研究に使用した方法は，Pohlのdielectrophoresis法[19]と融合操作は，Zimmermann[24,25,26]の電気融合法を組み合わせた方法で，下記の2段階で融合を行う。

1)　不均一な交流電場を細胞懸濁液に加えることにより，細胞間に密接な接触面を形成す

る。

2) 次にこれらの細胞に対し高い電圧 (KV/cm) の直流パルスを非常に短い時間 (μsec. の範囲) 加えることにより融合を引き起こす。

この方法の特徴は操作を物理的な条件下で行うために，融合が非常に穏やかに進行し，しかも同調的に起こること，また融合過程を顕微鏡で観察しながら操作を進めることができるために，プロトプラストの種，培養期間，調製条件，などの要因と融合との関係を明らかにすることができ，高い頻度で活性のある融合体を得ることができることである。

2-2-1-2 プロトプラストの dielectrophoresis

供試プロトプラストは交流電場内に於て dielectrophoresis により，電極に付着しパールチェーンを形成した。しかしその状況は高周波の電圧，プロトプラスト粒形（例えばヒラタケで 2～7.5 μm，タモギタケで 3～8.5 μm で一定の分布パターンを示す）の相違によって変化した。加える電圧が低い場合 (50～500 V/cm) では，先ず大きなプロトプラストが電極に付着し，小さなプロトプラストは最後に付着した (Photo 15, 16)。かつその付着の速度はゆっくりとしていた。付着は 50 V/cm 以上から見られたが，電圧を上げることにより，より短時間で付着させることが出来た。

また電圧が 750 V/cm 以上ではプロトプラストが数珠つなぎになり完全なパールチェーンを形成した (Photo 17, 18)。1.5 KV/cm 以上になると隣接するパールチェーンが互いに付着する現象も起きた (Photo 19, 20)。またこの場合プロトプラストの大きさに関係なく，電極に近いプロトプラストより順次付着した。交流電場の周波数を 2 MHz, 3 MHz と変えてもパールチェーンの形成に変化は生じなかった。

交流電場の強度が 2.5 KV/cm となると多数のパールチェーンが電極間に急速に形成され，かつ相互のパールチェーンが多数付着する現象が観察された (Photo 20)。なお，交流電場の電圧が 1.25 KV/cm 以上になるとプロトプラストが電極表面に付着してはなれなくなることが認められた (焼き付き)。これは融合操作上大きな障害となるが，適用電圧を 1.25 KV/cm 以下に抑えることにより電極に付着したプロトプラストは，電源を切ることにより直ちに電極から離れ，ポンプにより融合チャンバー外に取り出すことができた。

異種間のプロトプラストの融合を行うためには 2 種のプロトプラストを融合チャンバー内で互いに接触させる必要があるが，それは次の様にして行った。操作は先ず始めに 1 種類のプロトプラストを融合チャンバー内にポンプで送り込み，高流電場 2 MHz, 125 V/cm でプロトプラストを電極に付着させ，一定時間後 0.5 M マニトール溶液で電極に付着していないプロトプラストをポンプで流し去る。次に別種のプロトプラストをポンプで送入し，250 V/cm の電圧を加える。

この操作によって異種のプロトプラストを電極に付着させることが出来，かつプロトプラストの大きさもある程度そろえることが可能となる。

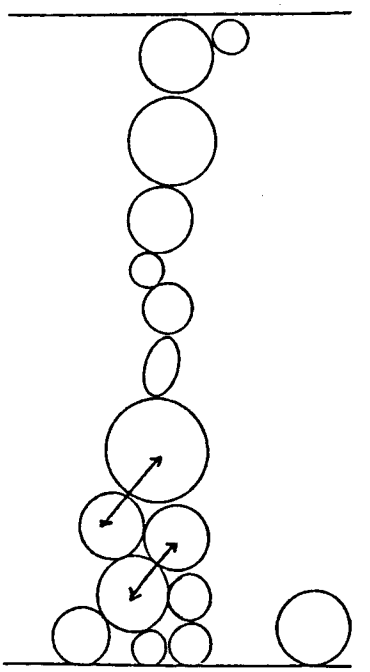
2－2－1－3　直流パルスによる融合

交流電場は周波数2 MHzを用い，所定の電圧を加えてプロトプラストを電極に付着させた後に，パルス電圧をかけて融合を誘発させた。パルス電圧7.5～25 KV/cm，パルスを加える時間を6～15 μsec.の間で融合実験を行い，最適のパルスを加える時間を明らかにした。

理想的なハイブリッド融合は異種のプロトプラストが2個付着した状態で融合を起こすことであり，そのためには，電場条件として前述した様に交流電場の電圧を125～250 V/cm程度にし，プロトプラスト濃度はそれぞれ10^4/ml程度にすることが望ましい。エノキタケとヒラタケの融合をPhoto 21-24に示す。これは初めヒラタケのプロトプラストを融合チャンバーにポンプで導入し，交流電場に125 V/cmの電圧を加え，大型のヒラタケのプロトプラストが電極にある程度付着した時点で0.5 Mマニトール溶液を送入して浮遊プロトプラストを洗い出し，次いで，エノキタケのプロトプラストをチャンバー内に導入しヒラタケのプロトプラストの上に付着させ，パルス電圧12.5 KV/cm，パルス時間6 μsec.で融合を行った。

融合開始時点では，両方のプロトプラストは内部に液胞を持っていることが確認できた（Photo 21）。5分後には，両者の液胞は融合して楕円形を呈しており，融合体の外形は瓢箪型となった（Photo 22）。10分後には内部の液胞の長径と短径の差が小さくなり，融合体の外形もより一体化が進んでいる（Photo 23）。30分後では融合体内部の液泡は完全に円形となり，外形もほぼ円形となり僅かにくびれた点が辛うじて認められる状態となった（Photo 24）。

次に交流電場2 MHz，電圧750 V/cmの条件で出来た比較的プロトプラストの粒径がそろったパールチェーンの融合では，パルス電圧10 KV/cm，パルス時間6 μsec.でPhoto 25に示すパールチェーンに於て，Fig. 2-4の矢印で示すプロトプラストが互いに融合した。融合開始30秒後（Photo 26）にはパールチェーンが破壊し，上方の融合体は楕円形となり下方の融合体も楕円形となっているが内部の液泡はまだ一つになっていない。10分後（Photo 27）には両方の融合体は完全な円形を呈した。



Figz 2-4. Fusion of protoplasts.

前述したように（1－2－1－1），菌体培養日数は2日目まで酵素濃度はセルラーゼ1%，ザイモリアーゼ0.1%，キチナーゼ2 unitsの混合酵素液で，加水分解時間が2時間までの条件で調製したプロトプラストは融合が起こりにくかった。これらは完全なプロトプラストに

なっていないか，または，プロトプラストの膜が酵素液の処理により変質した方が融合し易いのかも知れないが明確な理由は不明である。またパルス電圧が10 KV/cm 以上になると一部が電極に付着してはがれにくくなる現象が確認された。

融合率の測定は，栄養要求性などのマーカーを持ったプロトプラストを作成してからでなければ正確な数値は測定できないが，ビデオの画面，写真を用いて融合前のプロトプラスト数と融合後のプロトプラスト数を比較することにより融合率を概算した。交流電場高周波2 MHz，1 KV/cm，パルス電圧10 KV/cm，パルス幅6 μsec. で最高10 %の融合率を得た。

2－2－1－4　プロトプラストの破壊

一般的な傾向としてパルス電圧が高くなり，かつパルスをかけている時間が長くなるに連れて，破壊するプロトプラストが多くなることが認められている。実際に本研究においてもこの傾向は認められ，まず初めに大きいプロトプラストが破壊された。細胞膜に加わる電位差はプロトプラストの径に比例する[19]ので当然大きなプロトプラストが破壊され易いことになる。また同じ径のプロトプラストでも破壊の程度に大きな差があった。これはプロトプラストの調製のところで説明したように，遠心力が加わっただけで簡単に破壊するものがあるように，物理的強度も大きく異なったプロトプラストが生成するからであろう。このことはヒラタケのプロトプラストの電子顕微鏡による観察でも明らかである[28]。この現象については，パルス幅を12 μsec. 以上かけると膜の透過性が不可逆的に増大したことが考えられる。膜の透過性の増大の理由としてはTsongら[29,30]は膜が多孔性になっていると解釈しており，またZimmermannら[31]は膜に電圧の加えたことにより膜に歪が生じているためと考えているが，融合にはこの様な膜の損傷が可逆的であることが前提であるが，不可逆的にまで損傷が拡大進行した場合にプロトプラストは破壊してしまうのであろう。

2－2－1－5　プロトプラストの回転

プロトプラストの回転現象は，Zimmermannら[31]により赤血球，植物プロトプラスト，酵母細胞，脂質膜小泡等において観察されている。回転現象のためにプロトプラストの融合開始点が常に変動し，隣接したプロトプラスト間の融合が阻害されることになる。この現象の理由としては，プロトプラストが電荷分離して双極子になるため，または膜中永久双極子の配列によって生じるとしているが，未だ完全な理由付けはなされていない。本研究においてもパールチェーンを形成するプロトプラストの一部が回転を起こすことが確認された。

回転は交流電圧250 V/～2.5 KV/cm の範囲，周波数500 KHz～5 MHz の範囲内で観察され，電圧が高い方が激しく回転した。この回転は電圧を250 V/cm 以下に下げることで完全に停止した。

回転はランダムに起きるのではなく，特定のプロトプラストにのみ起きる現象である。それは電圧を下げることにより回転を完全に停止させた後に再び電圧を上げて行くと，先に回転を起こしたプロトプラストのみが再び回転することが認められることにより確認された。また

電圧を下げて250 V/cm付近になると回転が非常に緩やかになるが，その時回転がスムーズに行われなくなり，隣接するプロトプラストの接触面を無理に擦りながら回転している様に見える。これは回転体の表面が不均一で凹凸があるために起こると判断される。すなわち細胞壁の部分的な残存等により完全なプロトプラストになっていないことを意味している。

2－2－1－6　作成した融合装置の性能評価

最近融合装置に関するかなりの数の報告がなされており[20,27,32]，また高価な優れた市販品も出てきている。本研究でも種々の報告を参考に設計を行った。しかし未だ改良すべき点が多く存在する。

先ず，交流電場とパルスの電圧をもう少し高出力にすることである。本装置は高周波で最大15 V，パルスは200 Vまでであり，高電圧の実験をするためには電極間隔の非常に小さなものを作らなければならず，その作成も非常に困難であり，また作ったチャンバーを用いて実験を行う場合プロトプラスト懸濁液の出し入れが困難となる。

融合チャンバーについては，第一に電極に関する検討要因として，その素材，形状，電極間の距離がある。素材には一般に白金が使用されているがニクロムも用いられている。今回の実験にはニクロム線を用いたが，十分に融合実験に用いることができた。形状に関しては，電極の形状が異なると融合率が異なるという報告もある[27]。つまり円柱電極よりも平板電極の方が融合効率がよいと報告している。平板電極は電極間全域に電場が均一に加わるために，全てのプロトプラストに同じ電圧を加えることができるが，円柱電極では不均一の電場となるため電極間の最短部に一番強い電圧が加えられることになり融合が不均一になることを意味する。今回の実験では，交流，直流パルスのいずれの電圧も出力が低かったが，円柱電極を用いることで所定の電場強度が得られ，一応実験目的が達成できた。また円柱電極に於いては冷却装置が必要であるとの報告[23]もあったが，実験結果より，その必要は認められなかった。

融合チャンバーの形状に関しても様々のものが報告されている。Wattsら[33]は真鍮板を5 mm間隔で5枚並べた電極で処理量は1 mlであるチャンバーを用いて多量のプロトプラストの融合を目的とした実験を行っている。Vienkenら[34]は，先ずA種のプロトプラストをシリンジでチャンバー内に送り込み電極に付着させ，次にB種のプロトプラストを同様にチャンバー内に送り込み，先に送り込まれ電極に単層で付着しているプロトプラストや細胞にうまく付着させ，雑種融合体を効率よく作り出すような方法を報告している。日比ら[35]は，金蒸着したガラス板2枚で厚さを調節するスペーサーを挟んだチャンバーを作り，フロー方式で連続的に融合を行わせる方法を提案している。これらは各々一長一短があり，また使用する細胞またはプロトプラストの種類によっても異なる条件が要求され，完全なチャンバーは未だ完成されていない。今回用いたチャンバーはFig. 2-2に示したもので，0.5 Mマニトール溶液を満たし，プロトプラストを電極に付着させるためにチャンバー内に導入し，約10分間放置してプロトプラストを静置した状態にしてから電場を加えることが必要であった。チャンバー内は70％エタノー

ルで完全に殺菌が可能であった。しかし接着剤にエポキシ樹脂を用いているため耐久性に問題があり，接着層より破壊することがしばしば生じた。今後，使用する接着剤について検討する必要がある。

本研究に於ける実験装置システム全体を考えると，プロトプラストを機械的な操作で電極内に注入することが可能である故に，大気下で完全無菌状態での操作が可能となり，また異種のプロトプラストを別々に注入し，高周波を調節することで雑種融合体を効率よく作り出すことができた。かつ電極に注入するところから融合終了後に取り出すところまで全てテレビモニターにより観察しながら行うことができて，プロトプラストの状態，融合の状況などを各段階で調節することが可能になった。

但し，1サイクルが45分とかなり時間を必要とすること，高周波出力，電圧調整，パルスの条件設定の操作がかなり煩雑である。

2－2－2　臨界融合パルス電圧

プロトプラストに直流パルス電圧を加えると，ある電圧以上になって始めて融合が開始され，電圧を徐々に上げて行くと，ある電圧で全てのプロトプラストが破壊してしまう点がある。これらの範囲を明らかにすることにより，最適融合条件の検討が容易になる。なお，これらの条件の内で当然パルスをかける時間も重要な要因となる。

0.5M マニトール溶液にヒラタケのプロトプラストを懸濁し融合を行ったところ交流電場400V/cm で，各パルス幅（10～80μsec.）における臨界融合パルス電圧は，Fig. 2-5に示すようになった。上下2本の折れ線の間の条件で融合が起こった。即ちそれぞれのパルス幅で下部の線以下の電圧では融合はまったく起こらず，上部の線以上の電圧では全てのプロトプラストが

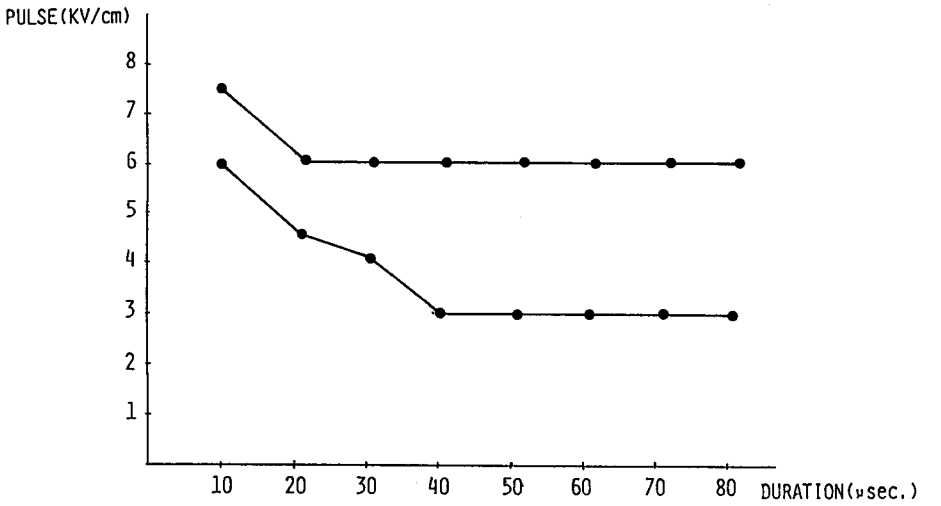


Fig. 2-5. Fields possible to evoke fusion of protoplasts (the area between lower curve and upper curve) (0.5M mannitol).

破壊してしまった。一般にパルス幅が長いほど，融合に必要なパルス電圧は低くなるが，パルス幅50μsec.以上では破壊の頻度が高くなった。プロトプラストの大きさは，およそ3～10μmで，仮に3～4 μmのものを小型，5～7 μmのものを中型，8～10μmのものを大型のプロトプラストと呼ぶことにすると，2線間に於ける各パルス幅でのパルス電圧の低い部分では，大型のプロトプラストは融合したが，中ないし小型のものは融合しなかった。中間の電圧部分では，大ないし中型のものは融合したが小型のものは融合せず，大型のものの一部には破壊が起こった。高い電圧の部分では，小型のものは融合したが大ないし中型のもののほとんどは破壊してしまった。これら結果は，Pohl ら[36]が報告している様にパルス電圧の影響はプロトプラストの大きさに比例することによるものである。

2－2－2－1　0.5 mM 塩化マグネシウム＋0.1 mM 塩化カルシウム添加

前節に述べたように異なる大きさのプロトプラストの混合している標品は予め分画遠心によって大きさを揃えることも融合率の改善に有効な手段と考えるが，ここでは少量の電解質の添加が融合率を高めるという報告[43]をもとに，0.5 M マニトール溶液に 0.5 mM 塩化マグネシウム＋0.1 mM 塩化カルシウムを各々添加して，臨界融合電圧の変化を調べた。臨界融合電圧は，Fig. 2-6 に示すようになった。電解質それぞれを単独で使用した場合に比較して融合に必要な電圧は若干高くなったが，破壊はかなり少なくなり，プロトプラストの大きさに関係なく高頻度で融合が起こった。しかし，やはりパルス幅 50 μsec. 以上では，やや破壊の頻度が高く，またパルス電圧 5 KV/cm 以上では，プロトプラストが電極に付着して，交流電場を切った後も離れづらくなる現象（焼き付き）がみられた。

以上の結果から最適融合条件は 0.5 mM 塩化マグネシウム＋0.1 mM 塩化カルシウムを

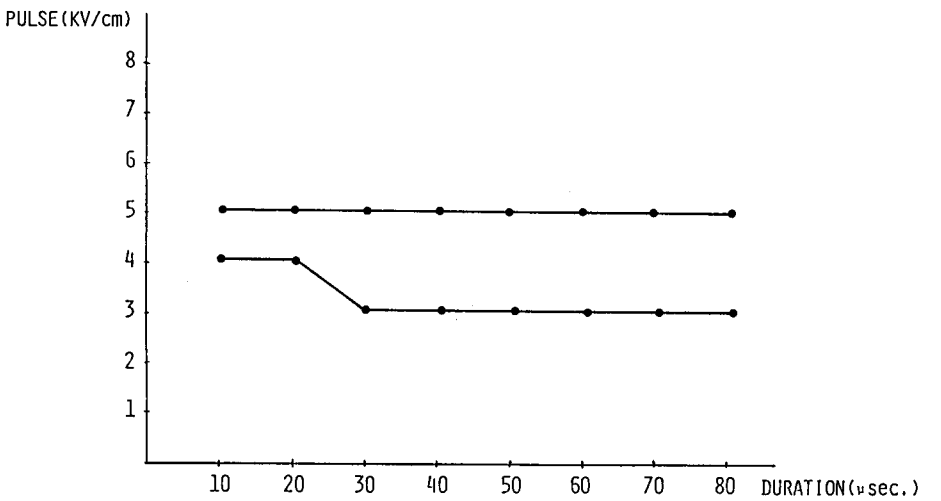


Fig. 2-6. Fields possible to evoke fusion of protoplasts (the area between lower curve and upper curve) (0.5M mannitol ＋0.1mM $CaCl_2$＋0. 5mM $MgCl_2$).

含む0.5Mマニトール溶液中でパルス幅40 μsec., パルス電圧4 KV/cmという条件下での融合率が最高となりおよそ60％であった。この条件下での融合の模様をPhoto 28-32に示す。

2－3 結　　論

融合はプロトプラストを交流電場により電極に付着させ直流パルスを与えることにより誘発できた。交流電場電圧が50 V/cm以上でプロトプラストは電極に付着し，750 V/cm以上でパールチェーンを形成した。プロトプラストの回転は，250 V/cm以下で停止し，焼き付きは融合の妨げにならない程度に電圧を落とすことにより防ぐことが出来た。融合はパルス幅6～15 μsec., パルス電圧7.5～25 KV/cmで観察できた。融合は5～30分で完了した。パルス幅を長く，あるいはパルス電圧を高くするに連れてプロトプラストの破壊及び焼き付きが増加した。融合率はパルス幅6 μsec., パルス電圧10 KV/cmの条件で最大10％であった。プロトプラストの融合率は調製条件に大きく左右された。すなわち培養日数が2日目まで，またはセルラーゼ1％，ザイモリアーゼ0.1％，キチナーゼ2 unitsの酵素混液で2時間以内の加水分解で調製したプロトプラストは融合が起こりにくかった。本研究では検討しなかったがプロトプラストの大きさと形態を均一に揃える試みは残された問題と考える。作成した装置に関する問題点として，交流電場とパルスの出力電圧が低いことがある。そのため電極の間隔を非常に狭く（10～50 μm）しなければならず，融合操作も困難になった。融合チャンバーは大気下に於て，無菌状態で操作ができ，かつ殆ど機械的な操作のため調整を微妙に行うことができた。ただし接着剤の耐久性は今後検討の必要がある。

臨界融合パルス実験で最適融合条件は，0.5Mマニトール溶液に0.5 mM塩化マグネシウム＋0.1 mM塩化カルシウム添加した溶液中でパルス幅40 μsec., パルス電圧4 KV/cmの電気刺激により約60％の融合率がえられ，再現性もかなり高いと思われる。しかしながら，これは融合後のプロトプラストの再生ということを考慮していない値である。

細胞融合による体細胞雑種の育成という一連の仕事における各操作段階で生じる様々な要因（菌糸の培養条件，プロトプラストの調製条件，融合条件等）の検討は今後，融合後の再生というところまでを考慮して行わなければならないであろう。なぜならば，ある段階に於て最適と思われた条件が他の段階において必ずしも最適であるとは限らないからである。例えば，収量の高い調製条件でのプロトプラストは再生率が低かったり，再生率の高いプロトプラストは融合率が低かったり等ということも起こり得ることである。従って今回最適であると結論づけた条件により融合を行い再生させた場合に再生率が非常に低いなどということもあり得る。また菌株によってそれらの最適な条件は異なることが予想される。また添加した電解質の再生率への影響も考慮する必要がある。さらに，電解質を添加すると交流電場による誘引効果が弱まる傾向があるため，パールチェーン形成のために交流電場電圧を高くしなければならず，長時間の操作では懸濁液の電気分解及び温度上昇を招く恐れがあり，今後更に検討の必要があると思われる。

3　融合の判別法の検討（アイソザイム分析）

アイソザイムとは，1つの個体内にあって電気泳動特性は異なるが，基質特異性を同じくする酵素群のことで，数種の酵素が，担子菌の種に特異的なアイソザイムとして確認されている。Toyomasuら[37]は，トキイロヒラタケとヒラタケのPEGによる細胞融合の融合体の判別にアイソザイム分析を利用している。本実験では，エステラーゼ，酸性フォスファターゼ，マレートデヒドロゲナーゼ，ロイシンアミノペプチターゼ，の4つの酵素について，融合体の1つの指標としてアイソザイム分析の検討を行った。

3－1　実験方法

3－1－1　試料の調製

供試菌として，シイタケ，ナメコ，エノキタケ，タモギタケ，ヒラタケを各々MYG液体培地中で7～10日間静置培養したものを使用した。菌体を桐山ロート上に集め，脱イオン水で数回洗浄した後，湿重量で0.1～0.5g程度を乳鉢に取り，小量の脱イオン水と石英砂を加え，十分に磨砕した。この細胞抽出液を濾紙片（5mm×5mm）に浸透させ，過剰の細胞抽出液を除去した。

3－1－2　デンプンゲルの調製

水解デンプン30gを，ゲル用緩衝液250mlと共に1l容丸底フラスコに入れ，激しく振盪して，懸濁液とした後，沸騰湯浴中で回転攪拌しながら3～4分間でゲル化させた。フラスコの口を水流ポンプにつなぎ，減圧下で，脱気を行った。その後，予め脚部の底をビニールテープでふさぎ，容器の内面及びカバーに流動パラフィンを塗布しておいた泳動用ゲル容器に分注し，気泡が入らぬように静かにカバーを載せ，重石を載せて約30分放置し，固化させた。固化後，重石をはずし，容器からはみ出したゲルを除き，室温で一晩放置したものを泳動に使用した。

3－1－3　緩衝液と染色液の組成

4酵素のアイソザイムの分析に使用した，緩衝液と活性染色液の組成は，以下に示す通りである。

・エステラーゼ（EC 3.1.1.-）[38]

a）ゲル用緩衝液

0.02Mホウ酸（pH 8.62）

b）電極用緩衝液

0.3Mホウ酸，0.03M塩化ナトリウム（pH 8.0）

c）染色液

0.1M燐酸緩衝液（pH 7.0），1mMα-ナフチルアセテート，0.1％ファースト・ブルー・RR塩

脱イオン水100 mlにファースト・ブルー・RR塩150 mgを加え完全に溶解し，次に燐酸緩衝液15 ml，基質溶液1.5 ml，更に全体で150 mlとなるように脱イオン水を加えた後，グラスウールで濾過して使用した。

なお，基質溶液はα-ナフチルアセテート1.241 gをアセトン80 mlに溶かし，脱イオン水を加えて100 mlとして調整した。

・酵性フォスターゼ（EC 3.1.3.2）[39]

a）ゲル用緩衝液

0.03 Mホウ酸，5.25 mM水酸化ナトリウム（pH 8.5）

b）電極用緩衝液

0.3 Mホウ酸，0.085 M水酸化ナトリウム（pH 8.5）

c）染色液

0.05 M酢酸緩衝液(pH 5.0)，1.4 mMα-ナフチル燐酸2ナトリウム，0.1％ファースト・ガーネット・GRC塩

脱イオン水100 mlにファースト・ガーネット・GBC塩150 mgを15分以内に完全に溶かし，140 mMα-ナフチルリン酸2ナトリウム溶液1.5 ml，酢酸緩衝液15 ml，更に脱イオン水を全体で150 mlとなるように加えた。

・マレートデヒドロゲナーゼ（EC 1.1.1.37）[38]

a）ゲル用緩衝液

5 mMヒスチジン（pH 8.0）

b）電極用緩衝液

0.41 Mクエン酸ナトリウム（pH 8.0）

c）染色液

0.05 Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン，0.2 M DL-リンゴ酸，1 mM NAD^+，0.163 mM PMS，0.43 mMニトロ・ブルー・テトラゾリウム

脱イオン水100 mlにトリスとリンゴ酸を溶かし，4 N水酸化ナトリウムでpH 7.0に調整した後，グラスウールで濾過して使用した。

・ロイシンアミノペプチダーゼ（EC 3.4.1.1）[38]

a）ゲル用緩衝液

5 mMヒスチジン（pH 7.0）

b）電極用緩衝液

0.41 Mクエン酸ナトリウム（pH 7.0）

c）染色液

0.02 Mトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン，0.02 M DL-リンゴ酸，0.68 mM L-ロイシル-β-ナフチルアミド塩酸，0.005％ファースト・ブラック・K塩

脱イオン水 100 ml にトリスとリンゴ酸を溶かし，1 N 水酸化ナトリウムで pH 5.2 に調整した後，L-ロイシル-β-ナフチルアミド塩酸とファースト・ブラック K 塩を溶かし染色液とした。泳動終了後，ゲルを 0.5 M ホウ酸＋0.05 M 塩化マグネシウム溶液中で 5°C，1 時間前処理し，水洗した後，染色を行った。

尚，アイソザイム分析の実験手法に関して上記以外に参考とした文献は Show[40] Maliga[41] である。

3－1－4　電気泳動

ゲルは，端から 10 mm，70 mm の所にコムで各々垂直に切断点を作り，70 mm の所に前述の濾紙片を，10 mm の所には泳動終了の目安とするブロムフェノールブルー（BPB）を染み込ませた濾紙片を挟んだ。試料の挿入を終えたゲル容器を，脚部のビニールテープを剥し，BPB のある側を陰極側となるように，電極用緩衝液を満たした泳動槽にセットした。電気泳動は，ゲルの発熱及び乾燥を防ぐため，泳動槽の上部をラップで覆い，その上から氷嚢を置き，4°C の冷蔵庫内で泳動を行った。始めの 10 分間は，定電圧 100 V で，次いで定電圧 200 V で，BPB がゲルの陽極側の端から 10 mm の所に移動するまで通電した。泳動所要時間は，約 6 時間であった。

3－1－5　活性染色

泳動終了後，直ちにゲルを泳動槽から出して，水平方向にスライスしたゲルを，染色用容器に移した。それぞれの酵素活性を検出するための染色液にゲルを浸漬した。染色中は，容器には蓋をし，室温で 1 分間あたり 20 回の振盪を行った。ゲルが十分呈色した後，脱イオン水で 3～4 回洗浄してからアイソザイムパターンの判定を行った。

3－2　結果と考察

3－2－1　エステラーゼ

エステラーゼについて Photo 33，Fig. 3-1 に示すように，α-ナフチルアセテートを基質と

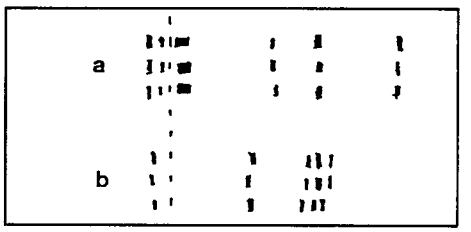


Fig. 3-1 Isozyme pattern of esterase.
a) *Pleurotus ostreatus*
b) *Pleurotus cornucopiae*

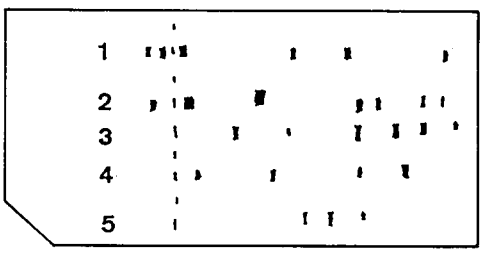


Fig. 3-2. Isozyme pattern of esterase.
1) *Pleurotus ostreatus*
2) *Pleurotus cornucopiae*
3) *Flammulina velutipes*
4) *Pholiota nameko*
5) *Lentinus edodes*

した場合，エステラーゼ活性を示す酵素がヒラタケについて6，タモギタケについて5のアイソザイムとして検出された。ヒラタケとタモギタケの2種間に各々特異的なアイソザイムパターンが存在した。また実験に使用した全ての菌についても同様に，アイソザイムパターンが得られた（Photo 34, Fig. 3-2)。ゲル用及び電極用緩衝液に連続系の燐酸緩衝液を使用した実験では，明瞭なパターンは得られなかった。

3－2－2　酸性フォスターゼ

酸性フォスターゼについてはアイソザイムの存在は明かではなかった。ゲル用緩衝液にほう酸緩衝液を用いた場合，ヒラタケ，タモギ菌株の酵素は電気泳動的に区別できなかったが，ゲル用緩衝液に5 mM ヒスチジン（pH 6.0）を，電極用緩衝液に0.41 M クエン酸ナトリウム（pH 6.0）を使用した場合，両菌株の耐性フォスターゼは異なる易動度を示した。従って，ヒスチジン緩衝液の系を用いることにより，酸性フォスファターゼの起源の推定は可能である。

3－2－3　マレートデヒドロゲナーゼ

ヒラタケには用いた実験条件下で2つのアイソザイムが検出され，タモギタケにはヒラタケと挙動の異なる1つのデヒドロゲナーゼが検出された(Photo 35, Fig. 3-3, 3-4)。ナメコとヒラタケ，タモギタケの比較では明瞭に分離したパターンは得られなかった。

3－2－4　ロイシンアミノペプチダーゼ

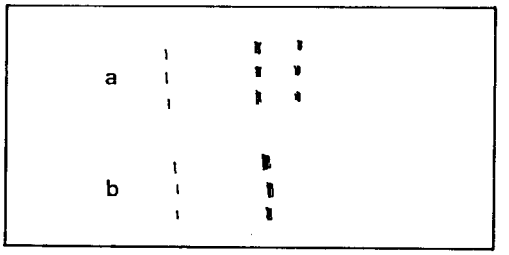


Fig. 3-3. Isozyme pattern of malate dehydrogenase.
a) *P. ostreatus*
b) *P. cornucopiae*

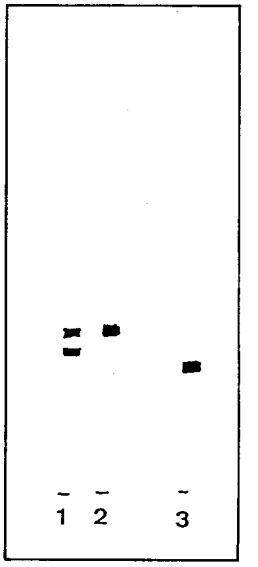


Fig. 3-4. Isozyme pattern of malate dehydrogenase.
1) *P. ostreatus*
2) *P. nameko*
3) *P. cornucopiae*

ロイシンアミノペプチダーゼについては明瞭なパターンは得られなかった。ヒラタケ，タモギタケ，シイタケとも単一の酵素しか確認できず，その易動度も同じであった。

3－3　結　　論

本研究において検討した4つの酵素の内，エステラーゼについて，ヒラタケ，タモギタケ，エノキタケ，ナメコ，シイタケの間に各々特異的な明瞭なアイソザイムパターンが得られた。マレートデヒドロゲナーゼ，酸性フォスファターゼ及びロイシンアミノペプチダーゼについて

得られたパターンはいずれも不明瞭で，また，スポットの位置も互いに重なり合っていた。

融合体の特異性の1つの指標として，数種の酵素について電気泳動の易動度を比較することは貴重な情報が得られる。Toyomasu ら[37]や Anné と Peberdy[42]が指摘しているように両親の何れにも一致しない泳動像が現れる場合がある。本研究でも，理由はわからないが同様な結果が得られ，細胞融合により得られた新しい形質を獲得した個体であることの1つの証拠となるものと考えられる。この様な生化学的解析は，融合体をつくる両親の酵素の電気泳動の挙動の詳細な予備実験を行い，酵素の種類と実験条件とを選ぶことにより，融合体の特性を知る指標の一つとなる。しかしこの方法も融合株の判別方法として決定的なものではなく，他に栄養要求性，薬物耐性など遺伝的に安定したマーカーを利用した判別，菌体（子実体を含む）の形態，色調などを指標にした判別や，また染色体数の測定，蛋白分析，遺伝子解析などの様々な結果を総合して検討していく必要があると思われる。

4　シイタケとヒラタケの融合体の作出

4－1　実験方法

4－1－1　プロトプラストの調製

融合実験に用いたプロトプラストの調製は，先ず SO 液体培地に，スラント培養した菌糸を接種し，菌が馴致した後，新たな液体培地に接種し，ヒラタケは3日間，シイタケは5日間培養し，1－1－4の手法に従って菌子の加水分解はセルラーゼ2％，ザイモリアーゼ0.6％，キチナーゼ6 units の混合した酵素溶液で，3時間 30°C で処理し，プロトプラストを得た。

4－1－2　プロトプラストの融合

初めにヒラタケのプロトプラストをポンプで融合チャンバー内に導入し，10分間放置し，プロトプラストを沈降し安定させた後，2 MHz，250 V/cm の交流電場を加え，プロトプラストを1～2個電極に付着させた。溶液中に浮遊しているプロトプラストを 0.5 M マニトール溶液で流し出し，次にシイタケのプロトプラストを融合チャンバー内に導入し，500 V/cm の交流電場を加え，電極に付着しているヒラタケのプロトプラスト上に付着させた。再び浮遊しているプロトプラストを流し出し，次の条件で融合を行った。

直流パルス電圧 10 KV/cm，パルス幅 6 μsec.，パルス回数は1～5回で最高 10 回加えた。なお，1サイクルは 0.5 秒であった。融合操作終了後，交流電場を切って融合処理を受けたプロトプラストを 0.5 M マニトール溶液で 1 ml 容のバイアル管に流し出した。

4－1－3　融合体の再生と子実体の形成

融合処理したプロトプラストは SO 寒天再生培地に接種した。2～3週間でコロニーが確認され，それを SO スラント培地に移し，23°C の培養器中で2～3週間培養した後，1－1－2－3で記述した木粉培地に接種し，23°C，湿度 65～70％(相対)暗黒下で約1ヵ月間培養後，16°C，湿度 90％蛍光灯下で発茸操作を行った。主にヒラタケが発茸した。尚，菌糸伸長が非常

に遅く2～3ヵ月間かかった培養瓶は1－1－2－3のシイタケの培養方法の手法に準拠し，菌回り完了後，針葉樹（トドマツ）の木粉中に埋め込み，水分を十分に補給し，約2ヵ月後シイタケが発茸した。

4－1－4　融合体からの菌糸の分離

融合体と推定された子実体より菌糸を分離した。クリーンベンチ内で先ず子実体を70％エタノールで表面をよく拭き，2つに裂いて，内部より殺菌したナイフで組織片を取り出し，SOスラント培地に接種し，23℃の培養器で約1ヵ月間培養した。この菌を用いて第2回，第3回の子実体形成栽培試験を行い，一部はアイソザイム分析用の試料とした。

4－1－5　分離した菌糸のアイソザイム分析

分離した菌糸を用いてアイソザイム分析を行った。MYG液体培地中で3～7日間培養した菌糸を試料とし，3－1－1の試料の調製手法に準拠して試料を調製した。分析項目は3－1－3の手法に準拠し，エステラーゼに対してホウ酸緩衝液系を使用して分析を行った。染色は3－1－5，電気泳動は3－1－4の手法に準拠した。

4－2　結果と考察

4－2－1　プロトプラストの dielectrophoresis と融合

ヒラタケのプロトプラストに対して2 MHz，250 V/cmの交流電場を加えたときの電極へのプロトプラストの付着状況をPhoto 36に示す。

交流電場の電圧が低いために，プロトプラストは電極上に1個か2個疎らに付着している。次にこの状態の所にシイタケのプロトプラストをポンプで導入し500 V/cmの交流電場を加えるとPhoto 37に示す状態となった。電圧が2倍になったためにプロトプラストは2～4個付着し，かつ最上部のプロトプラストの径は小さいものが付着した。この状況から少なくとも1組以上の異種間のプロトプラストの付着が生じたものと判断される。ここでパルス電圧10 KV/cm，パルス幅6 μsec.で数回パルスを加えることで融合が生じた。交流電場を切ると融合処理を受けたプロトプラストは電極から離れポンプでチャンバー外に取り出された。一旦バイアル管に貯めた後に，SO寒天再生培地上に接種した。23℃，2～3週間の培養でコロニーを生じた。この状態をPhoto 38に示す。このコロニー250個をそれぞれ試験管に移し，23℃で培養し，栽培用種菌とした。

4－2－2　融合体の子実体の性質（形と色）とその安定性

融合体の選抜には様々な方法があるが，今回は先ず形態（傘，茎）と色を観察し融合体の選定を行った。250本の栽培瓶の内238本からヒラタケの栽培条件で発茸が認められた。12本の栽培瓶は菌回りが遅く，シイタケの栽培法により4本の栽培瓶よりシイタケが発茸した。シイタケの発茸が少ないのは，菌回りに時間がかかった上，栽培瓶に180 ml容の小型のものを用いたために，培地が乾燥気味になった事が考えられる。またシイタケの数が極端に少ないのは，ヒラタケに比較してコロニーの形成が遅いためであろう。

1本の子実体を除き，他はヒラタケ，シイタケ各々の子実体が発生し，形，色に特に変化は認められなかった。変わった形をした子実体を Photo 39 に示す。傘は上向きでラッパ状であり，ひだが外側に向いている。色はヒラタケとほぼ同じであった。比較のために普通のヒラタケの写真を Photo 40 に示す。両者を比較すると融合体と思われるものの形態的特異性が明らかであろう。この様に変わった形のものはこれまで当研究室でヒラタケを数万本栽培した中でも発現したことはなかった。

次にこの子実体より植え継いだ菌体を用いて栽培実験を行った。850 ml 容の栽培瓶を用いて前述のヒラタケの条件で栽培を行ったところ，ヒラタケと形，色において全く同じものが発生した。同様の実験を再度繰り返し，合計2回の発茸操作を行ったが，全てヒラタケと同じものが発生した(Photo 41, 42)。上記の栽培試験の結果，結局変形した融合体と推定されたものは再び発生することはなかった。従って，得られたヒラタケとシイタケの融合体と推定されるものの形における特異性は不安定なものであったと結論される。

4－2－3　融合体のアイソザイム分析

前節で記述した様に，変形した子実体が得られたが，形が不安定で次の代には発現形質は伝わらなかった。そこで融合体確認の一手段として，遺伝子との高い関連性を示すと言われているアイソザイム分析を変形子実体より分離した菌糸について行った。

前述の実験（3－2－1）でエステラーゼのアイソザイムが多くの種で特異的なパターンを示したため，先ずエステラーゼについて分析を行った。なお，マレートデヒドロゲナーゼについても分析し，融合体判定の確かさについて検討を行った。エステラーゼについての分析結

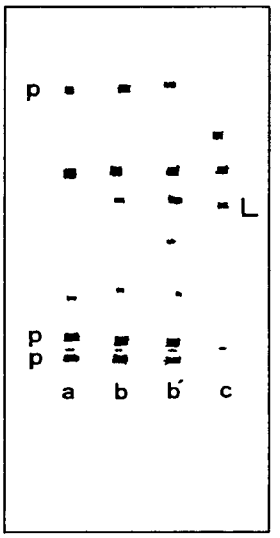


Fig. 4-1. Esterase isozymes of *P. ostreatus* (a), hybridoma (b), *P. ostreatus*, *L. edodes* mix (b'), *L.edodes* (c).

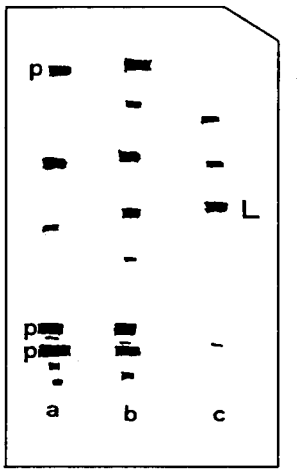


Fig. 4-2. Esterase isozymes of *P. ostreatus* (a), hybridoma (b), *L. edodes*

果を Photo 43, 44 に，その模式図を Fig. 4-1, 4-2 に示す。模式図の最上段のスポットと原点を挟む2つのスポットはヒラタケ特有のもの(P)で，融合体中にも見いだされ，またシイタケで泳動速度が3番目に速いスポットはシイタケに特有のスポット(L)であり融合体中にも存在した。他のスポットについては種特異性が明確ではなかった。マレートデヒドロゲナーゼについては明確な判定結果を得ることは出来なかった。

4－3 結　　論

今回，融合システムを用いて次の操作によりシイタケとヒラタケの融合体を得ることが出来た。

先ずヒラタケのプロトプラストをポンプで融合チャンバー内へ導入し，2 MHz, 250 V/cm の交流電場を加え電極にプロトプラストを付着させ，次にシイタケのプロトプラストをチャンバー内に入れ 500 V/cm の交流電場を加えて，ヒラタケ，シイタケのプロトプラストが接着した状態をつくり，次に 10 KV/cm の直流パルスを加え融合させた。融合処理を施したプロトプラストを再生培地上に再生させ，それから栽培試験を行って 250 個のコロニーより1個の融合体を選抜した。

融合体は子実体の形態的特性により選抜し，エステラーゼについてのアイソザイム分析により融合体であることが確認された。しかし形態的特性は次の世代では発現しなかった。

今後は融合の確認試験を含め，食用菌の種間細胞融合法確立のために，より詳細に，また総合的な研究を進める必要がある。

総　　括

食用担子菌の電気刺激による細胞融合の手法に関する基礎的知見を得る事を目的とした本研究は，菌の培養，プロトプラストの作成，電気刺激，及びプロトプラストの正常細胞への再生，融合体（ハイブリドーマ）の選択，と5つの段階に大別される。従って，各々の個々の段階での実験条件の検討と各段階の操作及び結果の総合した評価が要求され，かつ用いる菌株についてそれらの条件を検討しなければならない。しかし，これらの過程を総合的に研究した報告は少ない。

プロトプラスト化に最適の条件と最良の融合頻度が得られる条件とは必ずしも一致せず，使用したヒラタケでは SO 液体培地に3～5日間培養した菌糸を用い，セルラーゼ2％，ザイモリアーゼ 0.6％，キチナーゼ 6 units の混合酵素溶液で 30°C，3時間加水分解しプロトプラスト化する条件を選んだ。この条件で得られたプロトプラストは，10～14 日間で再生し，再生コロニーから子実体(ヒラタケ)を形成した。プロトプラストの再生条件は SO 固体再生培地で，浸透圧調整剤が 0.5 M サッカロースが最適であり再生率は平均 20％であった。

プロトプラストの再生過程はカルコフルオールを用いて，液体培地中での細胞壁の再生過程を観察し，24 時間で 15.2％の再生が確認できた。なお，この数値は固体再生培地での再生率

とよく一致した。

次にプロトプラストの融合に関しては，先ず電極への付着は 2 MHz, 50 V/cm 以上の交流電場において付着ができ，交流電圧 750 V/cm でパールチェーンが出来た。1.25 KV/cm 以上になると電極からプロトプラストが離れにくくなる現象が生じた。異種間のプロトプラストの接着は，先ず 1 種類のプロトプラストを融合チャンバー内に入れ 2 MHz，125 V/cm の交流電場により電極に付着させ，次に別種のプロトプラストをチャンバーに送入し，交流電圧 250 V/cm を加えることにより可能となった。この状態の所へ直流パルス電圧 10 KV/cm，パルス幅 6 μsec. で融合を起こすことが出来た。融合率は最大 10 %であった。融合を阻害するプロトプラストの回転は交流電圧 250 V/cm 以下で停止した。

本研究に供した装置は手作りであり，操作性には検討を要する点がある。また融合に必要な交流電圧，パルス電圧を得るためには，融合チャンバーの電極を極端に狭くしなければならず (40～50 μm)，チャンバー作成上及び融合操作において困難を生じた。融合チャンバーは完全密閉型であり非無菌的雰囲気下においても無菌状態を保つことが可能であること，また異種のプロトプラストの接着が交流電圧を変えることにより簡単に作り出せること等が非常に優れた点と考えられる。

臨界融合パルス電圧の領域を求め，その範囲内で融合を行わせる必要があるが，0.5 mM 塩化マグネシウム＋0.1 mM 塩化カルシウムを添加することによりパルス電圧を下げかつ融合可能範囲を広げることができ，融合率は 60 %前後になり，融合条件を検討するのに有利な条件となった。なお，塩類使用のため，交流電圧は無添加の場合と比較して，高くしなければならない点，このため発熱の可能性も高くなり，より一層，詳細な検討を要する。

融合体の特性の指標の 1 つとしてアイソザイム分析が用いられる。本研究では，エステラーゼ，酸性フォスフォターゼ，マレートデヒドロゲナーゼ，ロイシンアミノペプチターゼを用いたが，特にエステラーゼが全ての菌に於いて分離もよく，特徴があるパターンが確認された。

前述の融合条件を用いて，シイタケ，ヒラタケの融合体を作出した。ただしこの場合は濃度が低いため，AC をはじめ 250 V/cm とし，次に 500 V/cm を加えた。融合処理プロトプラストから生じた 250 個のコロニーを分離し培養，発茸させたところ，両親の何れとも異なる形態を示す 1 個の子実体を形成するハイブリドーマが得られた。これの色はヒラタケと同様であり，傘が上向きでヒダが側向に出ていた。この子実体より菌体を分離し，培養後，再度子実体を形成させたところ，ヒラタケと区別できない子実体を作るようになった。この菌体を液体培養しそのアイソザイム分析を行った結果，融合体にはヒラタケとシイタケのアイソザイムパターン（エステラーゼ）が確認できた。即ち，新しい形質を持つ子実体を作出する目的であれば，各々のコロニーから子実体を作らせて選択する必要があり且つ数代の植え継ぎに安定して形態が保持されることを確認しなければならないことを示している。本研究は，電気刺激による細胞融合による，有用担子菌の育種のための基礎的諸条件を検討したものであり，今後の研究の進展

に対し重要な知見を加えることができたものと考えられる。

文 献

1) 古川久彦：キノコ年鑑，農村文化社（1987）.
2) Keller, W.A. and Melchers, G.: Z. Naturforsh. 28c, 737-741 (1973).
3) Melchers, G. and Labib, G.: Molec. gen. Genet. **135**, 277-294 (1974).
4) Kao, K.N. and Michayluk, M.R.: planta **115**, 355-367 (1974).
5) Wallin, A., Glimelius, K. and Eriksson, T.: Z. Pflanzen Physiol. **74**, 64-80 (1974).
6) Senda, M., Takeda, J., Abe, S. and Nakamura, T.: Plant Cell Physiol. **20**, 1441-1443 (1979).
7) Neumann, E. and Rosenbeck, K.: J. Membrane Biol. **10**, 279-290 (1972).
8) Kinoshita, K. Jr. and Tsong, T.Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 1923-1927 (1977).
9) Zimmermann, U. and Scheurich, P.: Planta **151**, 26-32 (1981).
10) Murakami, S. and Tsuneda, A.: Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan) **20**, 54-62 (1982).
11) Nagata, T. and Takebe, I.: Planta **92**, 301-308 (1970).
12) Wessels, J.G.H. and de Vries, O.M.H.: Journal of General Microbiology **73**, 13-22 (1972).
13) Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D.: Agric. Biol. Chem. **46**, 1955-1957 (1982).
14) Yanagi, S.O. and Takebe, I.: 6th International Protoplast Symposium 294-295 (1983).
15) Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Shiratori, T. and Sasaki, T.: Nippon Shokuhin Kogyo. Gakkaishi **30** (9), 495-500 (1983)
16) Toyoda, H., Hirai, T., Sumiya, H., Kawakami, Y., Sakamoto, M. and Ushiyama, R.: Men. Fac. Agr. Kinki Univ. **17**, 121-130 (1984).
17) Ushiyama, R. and Nakai, Y.: Rept. Tottori Mycol. Inst. **15**, 1-5 (1977).
18) Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. and Sasaki, T.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **17**, 298-300 (1983).
19) Pohl, H.A.: Dielectrophoresis Cambridge University Press, Cambridge (1978).
20) Zimmermann, U., Grovers, M., Schnabl, H. and Pilwat, G.: Membrane. Biol. **52**, 37-50 (1980).
21) Neumann, E., Gerisch, C. and Opatz, K.: Naturwissenschaften **67**, 414-415 (1980).
22) 山田康之，森川弘道，平林保治：化学 **39**, 10-11（1984）.
23) Senda, M., Morikawa, H. and Takada, J.: Proceedings 5th Intern. plant tissue and cell, plant tissue culture, p. 615 ed. Fujikawa, E. Maruzen, Tokyo (1982).
24) Zimmermann, U., Scheurich, P., Pilwat, G. and Benz., R.: Angew. Chem. Int., Ed. Engl. **20**, 325-344 (1981).
25) Zimmermann, U.: Biochem. Biophys. Acta **694**, 227-277 (1982).
26) Zimmermann, U. and Vienken, J.: Electric Field-Mediated Cell-to-Cell Fusion in: Cell Fusion: Gene Transfer and Transformation. 171-187 editted by Beers, Jr. R.F. and Bassett, E.G. Raven Press, New York (1984).
27) Zachrisson, A. and Bornmann, C.H.: Physi. Plant **61**, 314-320 (1984).
28) 西口恭彦，三浦 清，藤川清三，香山 彊：北海道大学農学部演習林研究報告 44, No. 4, 1435-1473(1987).
29) Teissie, T., Knutson, V.P., Tsong, T.Y. and Lane, M.D., Science **216**, 537-538 (1982).
30) Teissie, J., Knutson, V.P., Tsong, T.Y. and Lane, M.D.: Science **216**, 537-538 (1982).
31) Zimmermann, U., Vienken, J. and Pilwat, C.: Z. Naturforsch. 36c, 173-177 (1981).
32) Kohn, H., Schieder, R. and Schieder, O.: Plant Science **38**, 121-128 (1985).
33) Watts, S.J.W. and King, J.M.: Bioscience Reports **4**, 335-342 (1984).
34) Vienken, J. and Zimmermann, U.: FEBS Letters **137**, 11-13 (1982).

35) Hibi, T., Kano, H., Sugiura, M., Kazami, T. and Kimura, S.: J. Gen. Virol. **67**, 2037-2042 (1986).
36) Pohl, H.A., Pollock, K. and Rivera, H.: International Journal of Quantum Chemistry; Quantum Biology Symposium **11**, 327-345 (1984).
37) Toyomasu, T., Matsumoto, T. and Mori, K.: Agric. Biol. Chem. **50**, 223-225 (1986).
38) Brewer, G.J. and Sing, C.F.: An Introduction to Isozyme Techniques, Academic Press (1970).
39) 遠藤　徹：化学レポート 26, 27, 東洋化学産業 K.K. (1968).
40) Show, C.R. and Prasad, R.: Biochemical Genetics **4**, 297-320 (1970).
41) Maliga, P., Lazar, G., Joo, F., H.- Nagy, A. and Menczel, L.: Molec. Gen. Genet. **157**, 291-296 (1977).
42) Anné, J. and Peberdy, J.F.: Trans. Br. Mycol. Soc. **77**, 401-408 (1981).
43) Schnettler, R. and Zimmermann, U.: Fems Micro Biolog Leiters **27**, 195-198 (1985)

Summary

The aim of present study is to obtain basic information with regard to the process of cell fusion, through the experimental process of applying electrical stimulation to edible basidiomycetes. The study can be roughly divided into five sections: the culturing of mycelia, the preparation of protoplasts, electrical stimulation, the regeneration of protoplasts to yield normal cells, and the selection of hybridoma. The development of test procedures for each of the above processes, and a general evaluation of these procedures for and the results of each process was required. Also, the experimental conditions as they relate to the organisms used must be investigated. However, in only a few reports can be found comprehensive research on these processes.

Optimum conditions for the preparation of protoplasts are not always those in which fusion occurs at the highest frequency. Therefore, in the present study of the Hiratake mushroom, the following conditions were chosen for protoplast preparation:

(1) mycelia cultured for 3-5 days in a SO liquid medium were used,

(2) digestion was carried out for 3 hours at 30°C, in a mixed enzyme solution containing cellulase Onozuka R-10 (2%), zymolyase 20T (0.6%), and chitinase (6 units),

(3) Protoplasts obtained using the above procedure were regenerated into complete cells in 10-14 days, and fruit bodies were produced by the regenerated colony,

(4) Optimum conditions for the regeneration from protoplasts were obtained with a SO solid medium culture with 0.5 M saccharose used as an osmosis pressure regulation agent; under these conditions the average regenerations ratio was 20%.

The cell wall regeneration of protoplasts was observed to be 15.2% after 24 hours in a liquid medium of calcofluor white. This ratio was similar to that obtained in a solid medium.

With regard to protoplast fusion, the following observations were made. Adhesion to the electrode occurred at a frequency of 2 MHz in an AC-field with a field strength of 50 V/cm or more; pearl chains were generated at a field strength of 750 V/cm. At AC field strengths over 1.25 KV/cm, became more difficult for the protoplasts to separate from the electrode. Adhesion between different species of protoplasts was accomplished by first placing one species of protoplast into a fusion chamber, adhering them to the electrode with an AC-field strength of 125 V/cm, and then adding a different species of protoplast to the chamber and applying an AC-field of 250 V/cm. Under these conditions, it was possible to cause fusion with a DC pulse voltage of 10 KV/cm and a duration of 6 sec. The maximum fusion ratio was 10% with this procedure. The rotation of protoplasts, which prevents fusion, halted at voltages less than or equal to 250 V/cm.

The equipment used for the present study was of the author's own design, leaving room for improvement in its operability. In order to obtain the AC and pulse voltages required for fusion, the electrode in the fusion chamber must be extremely narrow (40-50μm), and this resulted in some difficulties with regard to the manufacture of the chamber as well as the fusion of protoplasts. The greatest advantages of the completely closed fusion chamber are: (1) it allows the maintenance of sterile conditions in a non-sterile atmosphere, and (2) adhesion between different species of protoplasts can easily be accomplished by varying the AC voltage.

It was necessary to determine the critical pulse voltages, and carry out the fusion within this range; the addition of 0.5 mM magnesium chlorde and 0.1 mM calcium chloride lowered the minimum pulse voltage, making it possible to widen the range of voltages where fusion could take place. Under these conditions, the fusion ratio reached approximately 60%, thus, resulting in better conditions for studying fusion. However, since the use of bases necessitated the use of higher AC voltages, exothermic reactions increased. Further investigation of this matter is required.

One of the parameters of hybridoma, isozyme, was analyzed. Esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, and leucine aminopeptidase were used in the present study; and among these, esterase consistently showed the greatest ease of separation in all mycelia.

Hybridomas of Shiitake and Hiratake mushrooms were generated with the aforementioned fusion conditions. However, because of lower concentrations, the AC field strength initially applied was 250 V/cm and was subsequently raised to 500 V/cm. As a result of the separation, culturing, and germination of the 250 colonies generated from the fusion-processed protoplasts, a hybridoma, consisting of one fruit body, morphologically different from both parents, was formed. The color of the fruit body was similar to that of the hiratake mushroom, with the edge of its cap facing upward and its gills extending towards the outside. The mycelia were separated from this fruit body and cultured to regenerate another fruit body, which was almost equivalent to the Hiratake mushroom. These mycelia were cultured in a liquid medium and then isozyme analysis was conducted; the isozyme patterns of hiratake and shiitake mushrooms for esterase were observed in the hybridoma. These resulst indicate that in order to produce fruit bodies with new characteritics, the fruit bodies should be produced from the colony, one of which must be selected. The morphological character of the fruit bodies must be examined to assure that it remain consistent through several generations of culture.

In this study the optimal conditions for breeding basidiomycetes by cell fusion were investigated, using electrical stimulation. The results discussed above can be used for the future development of this field of study.

Explanation of photographs

Photo 1. Direct production of germ tubes from Hiratake (*Pleurotus ostreatus*), spherical protoplasts.

Photo 2. Direct production of germ tubes from Enokitake (*Flammulina velutipes*) protoplasts.

Photo 3. Development of hyphae from a "yeast-like cell chain" of Hiratake protoplasts.

Photo 4. Direct production of germ tubes from enokitake protoplasts.

Photo 5. Growth of germ tubes from modified "bud-like cells" Hiratake protoplasts.

Photo 6. Regeneration and colony formation of the protoplasts of *P. ostreatus*.

Photo 7. Fruit body originated from single protoplast of *P. ostreatus*.

Photo 8. Protoplasts after 4hrs. of incubation (Observation by light optics).

Photo 9. Protoplasts after 4hrs. of incubation (Observation by fluorescence of Calcofluor White).

Photo 10. Protoplasts after 24 hrs. of incubation (Observation by light optics).

Photo 11. Protoplasts after 24hrs. of incubation (Observation by fluorescence of Calcofluor White).

Photo 12. Mycelium observed by light optics.

Photo 13. Mycelium observed by fluorescence of Calcofluor White.

Photo 14. System of the apparatus for electrically induced fusion.

a : Signal generater　　d : Osilloscope
b : Inverted light microscope　　e : Fusion chamber
c : Fusion controller　　f : Pump

Photo 15. Dielectrophoresis of protoplasts A.C. field (250 V/cm field strength and 2MHz frequency) Hiratake (*P. ostreatus*) (a-f) protoplasts (a).

Photo 16. A.C. field (500 V/cm, 2MHz) (b)

Photo 17. A.C. field (1 KV/cm, 2MHz) (c)

Photo 18. A.C. field (1.5 KV/cm, 2MHz) (d)

Photo 19. A.C. field (1.5 KV/cm, 3MHz) (e)

Photo 20. A.C. field (2.5 KV/cm, 2MHz) (f)

Photo 21. Electrofusion of protoplasts (1) 0 sec, Condition : A.C. field (125 V/cm field strength and 2MHz frequency), D.C. pulse (12.5 KV/cm) pulse length 6μs, upper protoplast-*P. nameko* lower protoplast-*P. ostreatus*.

Photo 22. Electrofusion of protoplasts (1) at 5min. Condition : same as photo. 21.

Photo 23. Electrofusion of protoplasts (1) at 10min. Condition : same as photo. 21.

Photo 24. Electrofusion of protoplasts (1) at 30min. Condition : same as photo. 21.

Photo 25. Electrofusion of protoplasts (2) at 0sec. Condition : A.C. field (750 V/cm field strength and 2MHz frequency), D.C. pulse (10 KV/cm) pulse length 6μs Hiratake (*P. ostreatus*) protoplasts (0sec.)

Photo 26. Electrofusion of protoplasts (2) at 30sec. Condition same as photo 25.

Photo 27. Electrofusion of protoplasts (2) at 10min. Condition same as photo 25.

Photo 28. Fusion sequence of protoplasts at 0sec. Condition : A.C. field (400 V/cm field Strength and 2MHz frequency) D.C. pulse (2～8 KV/cm) pulse length 10-80 μs (0.5 M mannitol+ 0.1 mM $CaCl_2$+0.5 mM $MgCl_2$)

Photo 29. Fusion sequence of protoplasts at 1sec. (3) at 1sec. Condition same as photo 28.

Photo 30. Fusion sequence of protoplasts at 2sec. (3) at 2sec. Condition same as photo 28.

Photo 31. Fusion sequence of protoplasts at 30sec. (3) at 30sec. Condition same as photo 28.

Photo 32. Fusion sequence of protoplasts at 5min. (3) at 5min. Condition same as photo 28.

Photo 33. Isozyme pattern of esterase.

a) *Pleurotus ostreatus*
b) *Pleurotus cornucopiae*

Photo 34. Isozyme pattern of esterase.

1) *Pleurotus ostreatus*
2) *Pleurotus cornucopiae*
3) *Flammulina velutipes*
4) *Pholiota nameko*

5) *Lentinus edodes*

Photo 35. Isozyme pattern of malate dehydrogenase.
a) *P. ostreatus*
b) *P. cornucopiae*

Photo 36. Dielectrophoresis of Hiratake (*P. ostreatus*) protoplasts (1). Condition: A.C. field (250 V/cm field strength and 2MHz frequency).

Photo 37. Dielectrophoresis of Hiratake and Shiitake (*L. edodes*) protoplasts A.C. field (500 V/cm field strength and 2MHz frequency).

Photo 38. Colonies from protoplasts (Hiratake-Shiitake hybridoma).

Photo 39. Fruit body of hybrid strain obtained by the fusion of protoplasts of Hiratake (*P. ostreatus*) and Shiitake (*L. edodes*).

Photo 40. Fruit bodies of *P. ostreatus*.

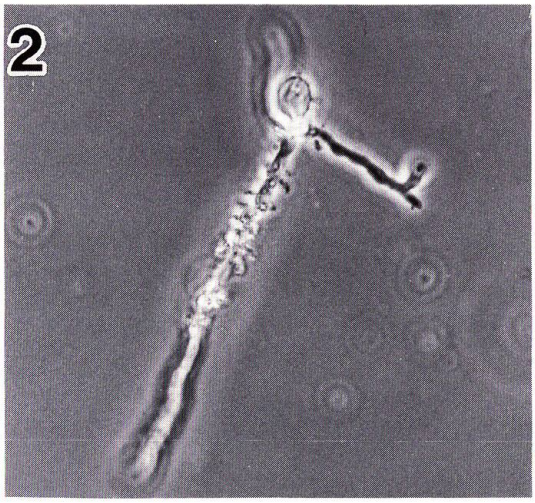
Photo 41. Fruit bodies of hybrid obtained by the fusion of protoplasts of Hiratake (*P. ostreatus*) and Shiitake (*L. edodes*) (second cultivation).

Photo 42. Fruit bodies of hybrid obtained by protoplasts fusion of Hiratake (*P. ostreatus*) and Shiitake (*L. edodes*) (third cultivation).

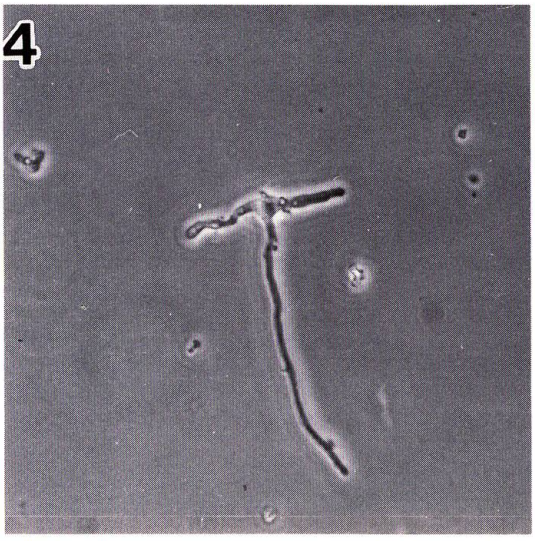
Photo 43. Esterase isozymes of *P. ostreatus* (a), hybridoma (b), *P. ostreatus, L. edodes* mix (b'), *L. edodes* (c).

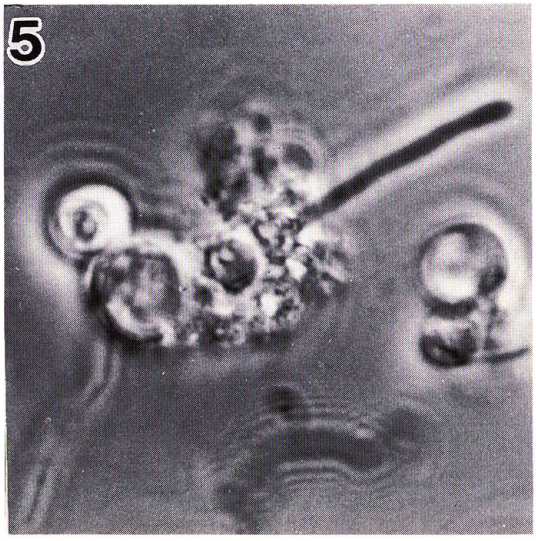
Photo 44. Esterase isozymes of *P. ostreatus* (a), hybridoma (b), *L. edodes* (c).

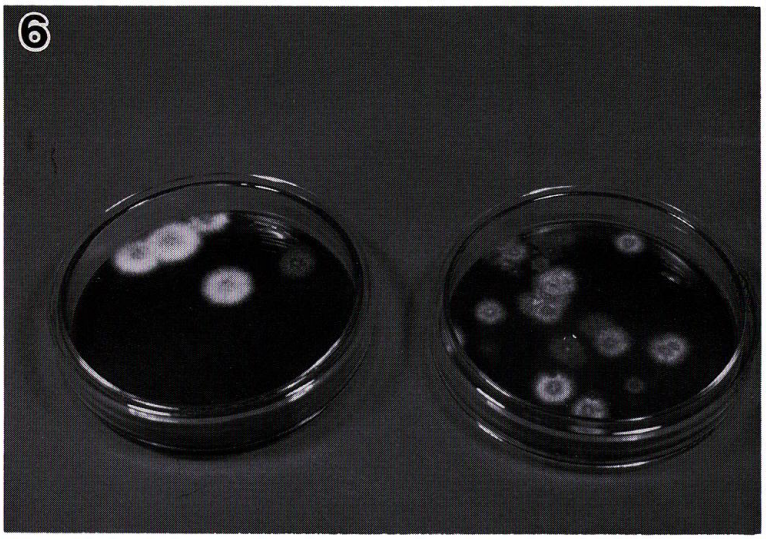
1

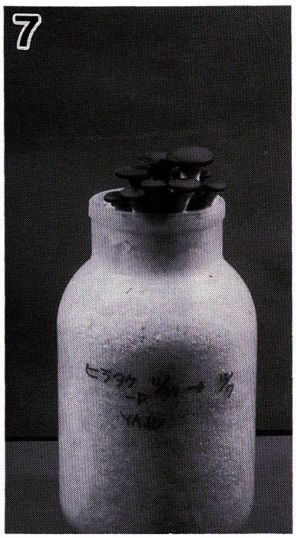

2

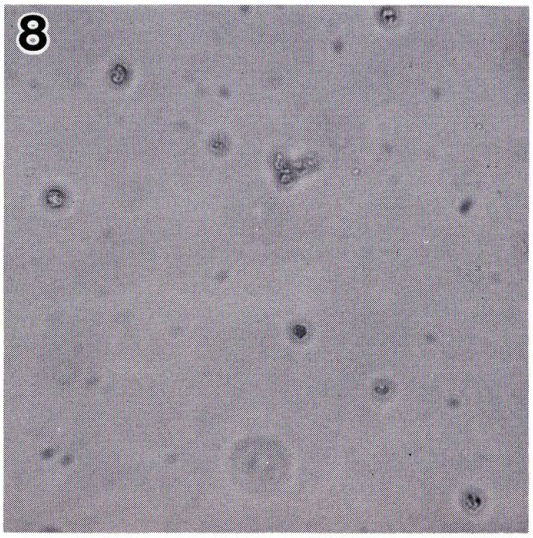
3

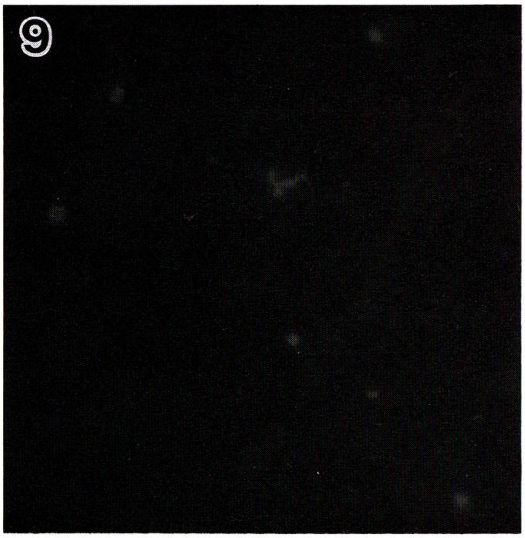

4

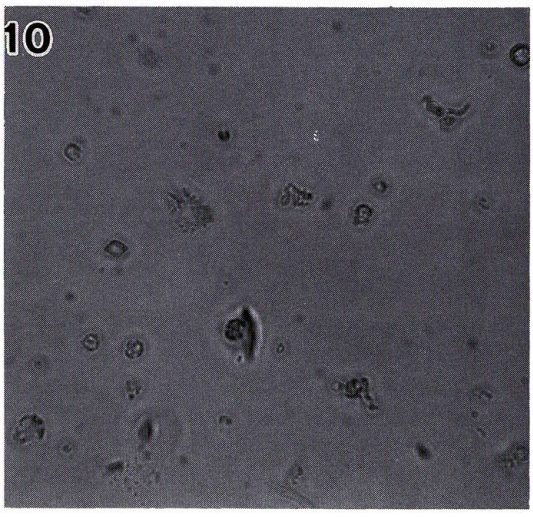

5

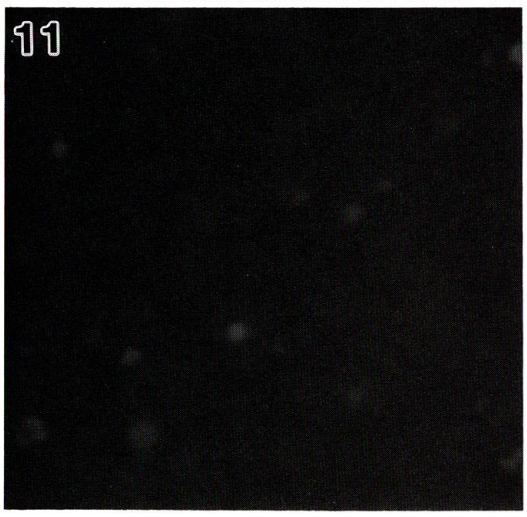

6

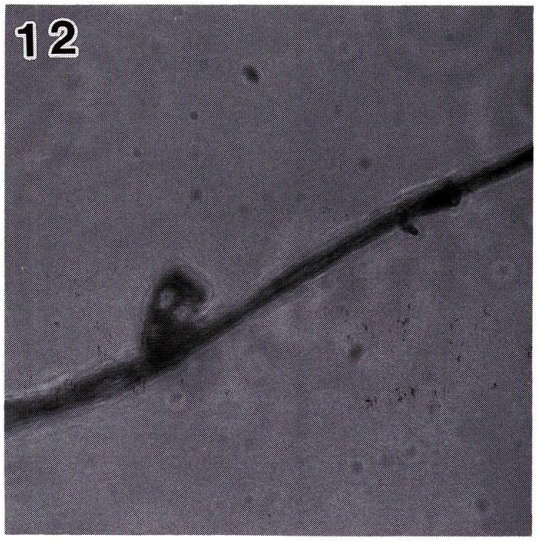

7

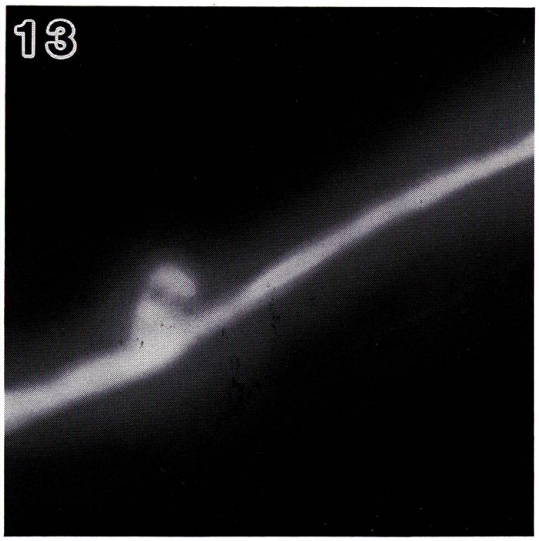

8

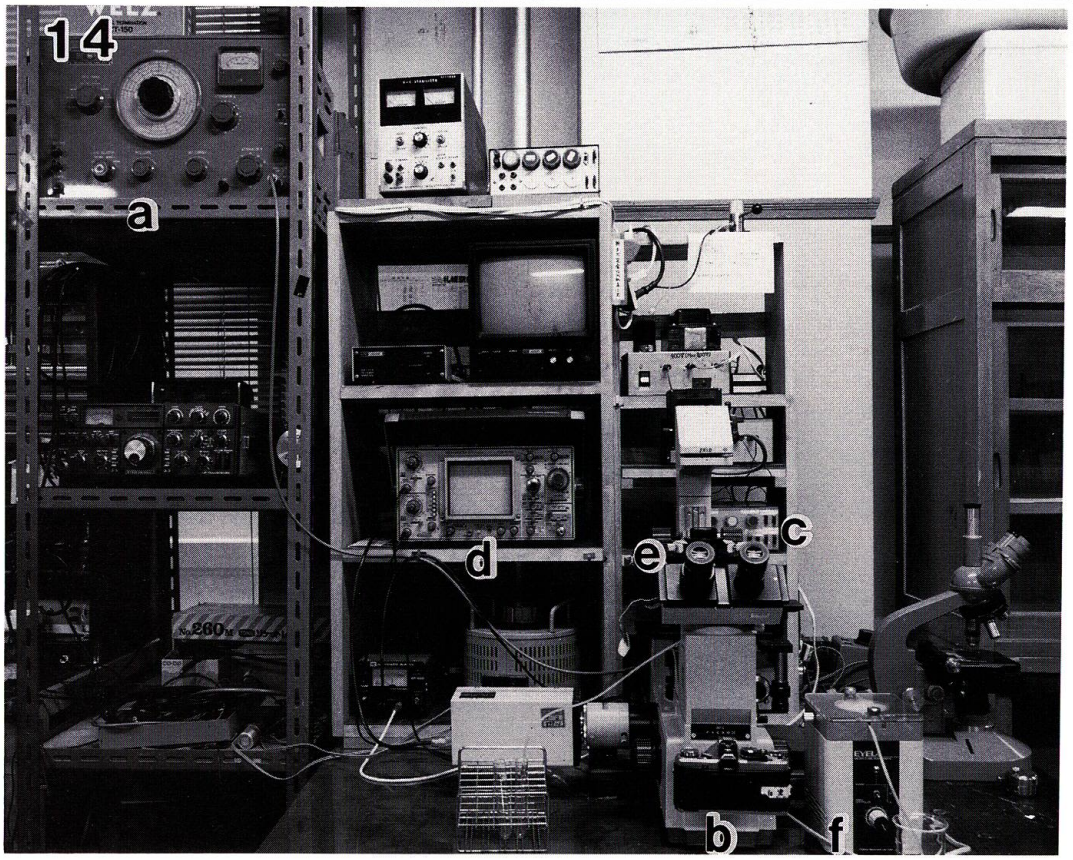

9

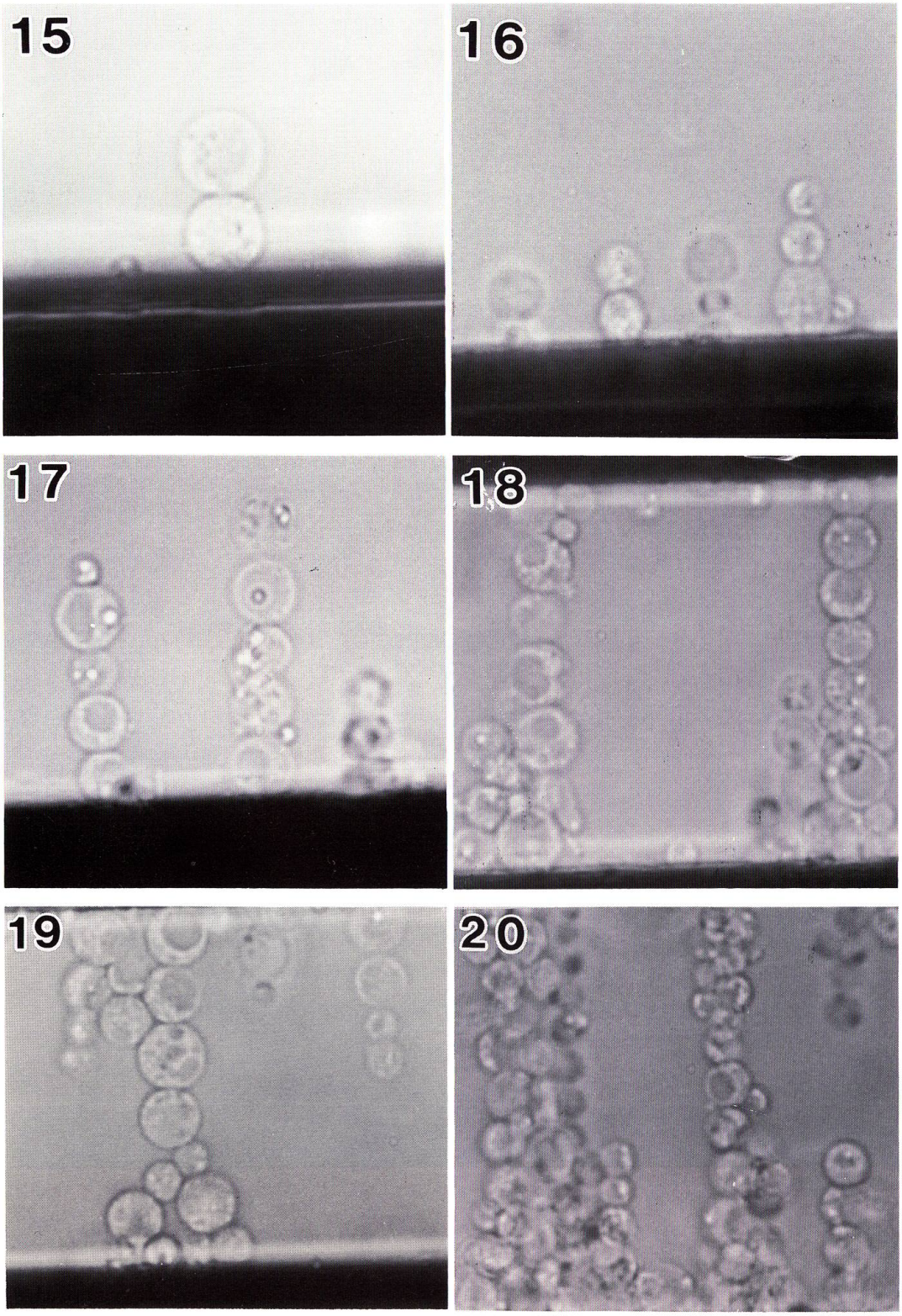

10

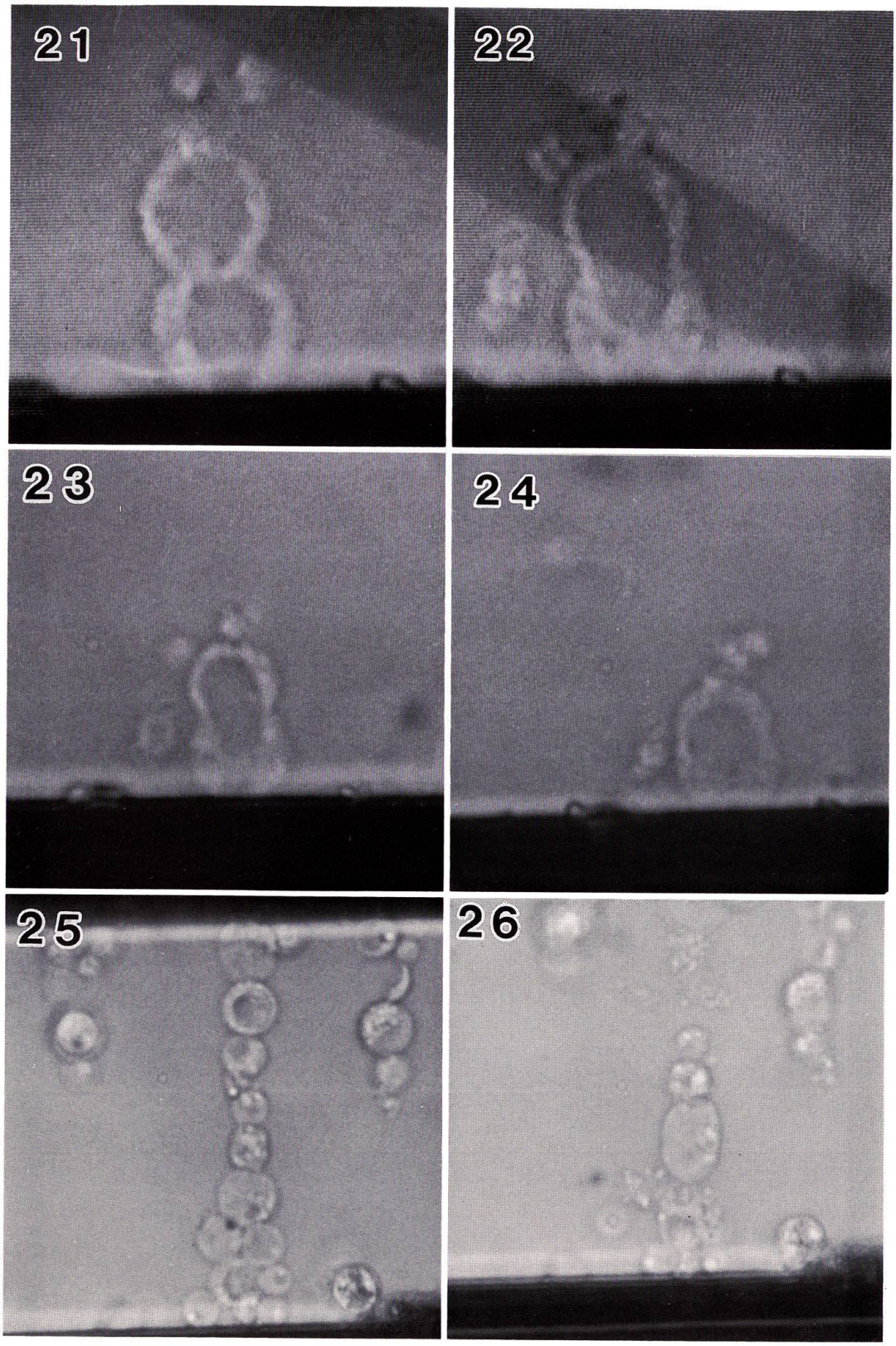

11

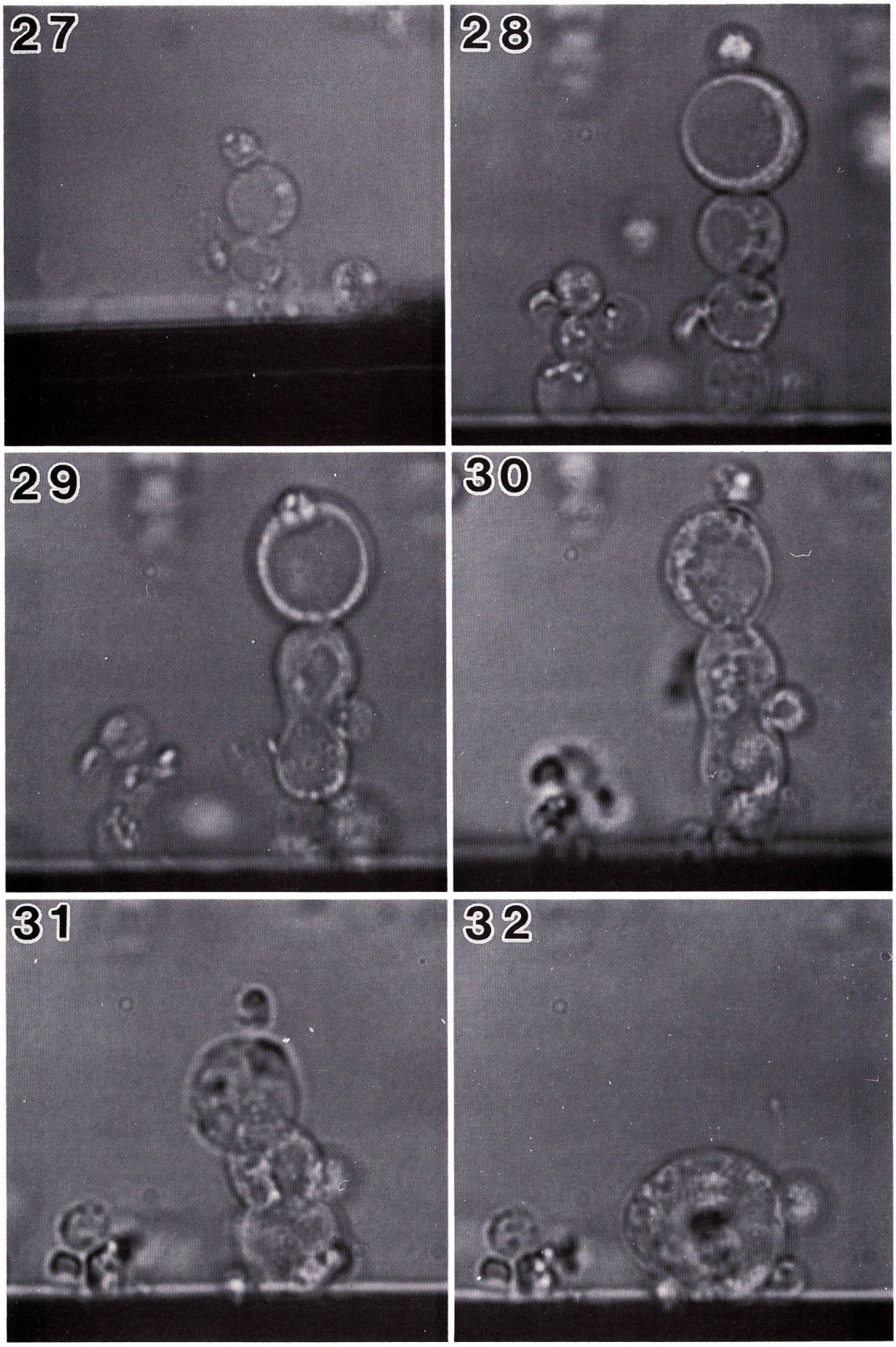

12

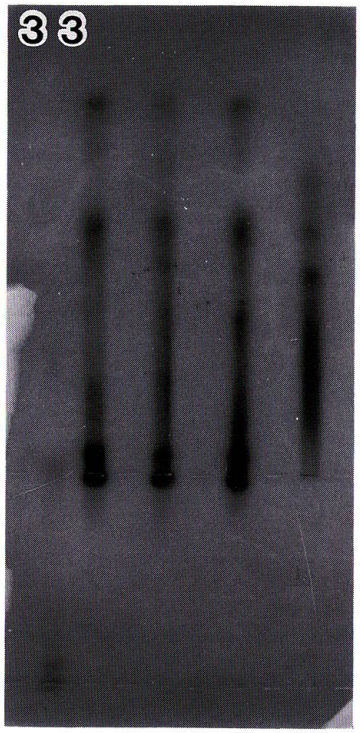

13


14
a
b
c
d
e
f

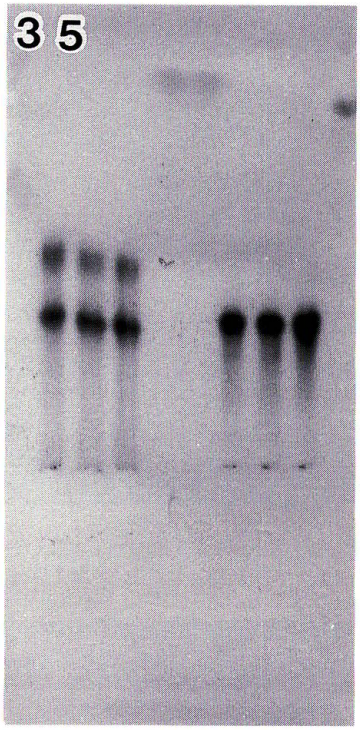

15
16
17
18
19
20

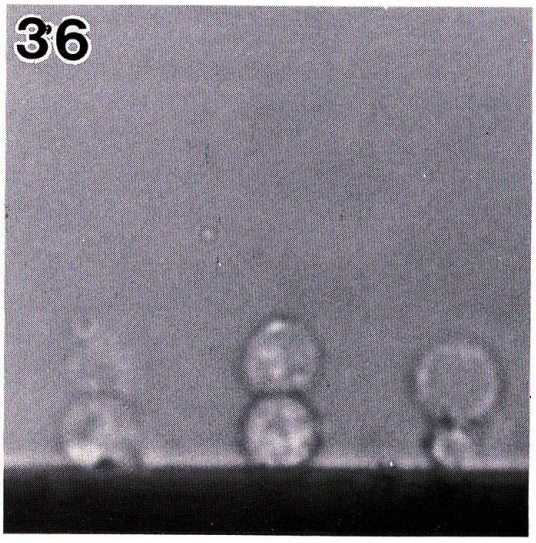

21
22
23
24
25
26

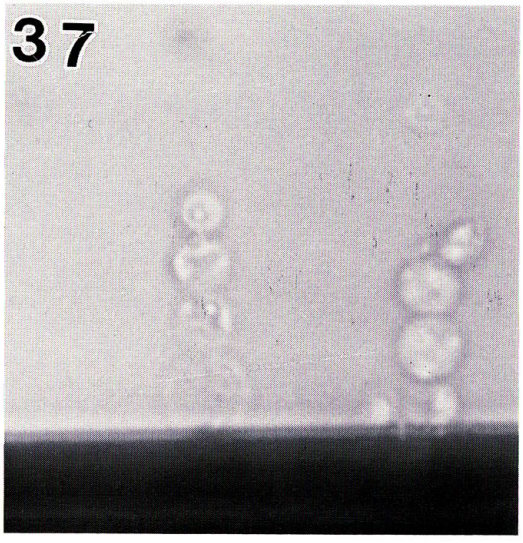

27
28
29
30
31
32

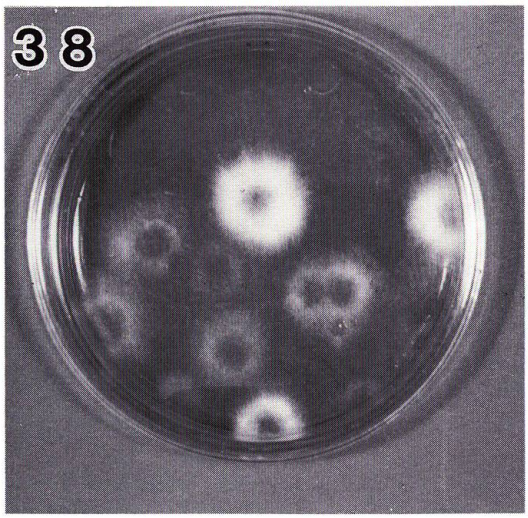

33

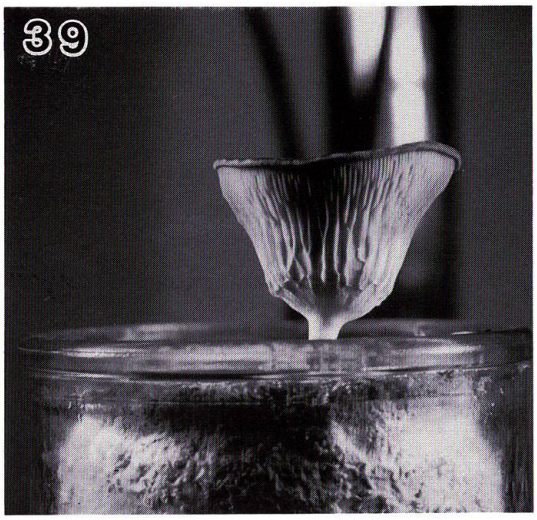
34

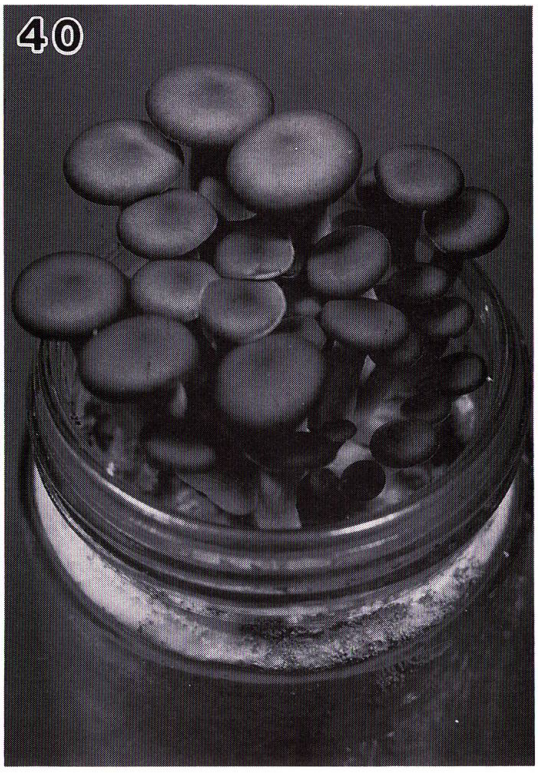

35

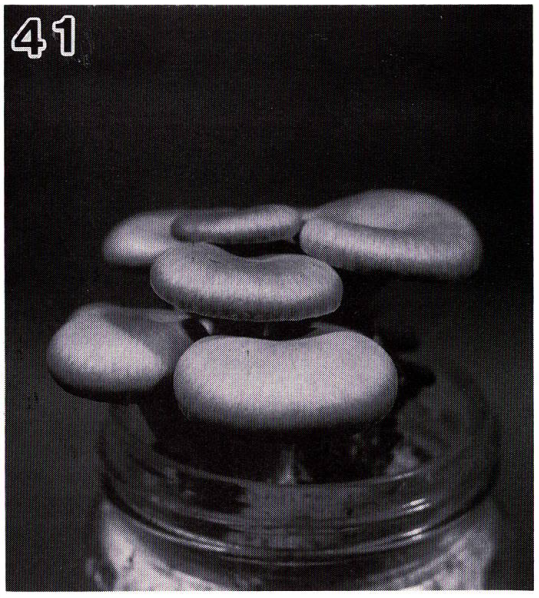

36


37

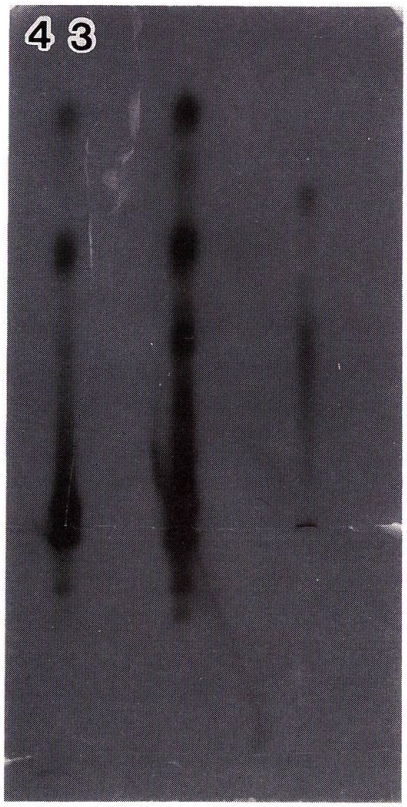

38

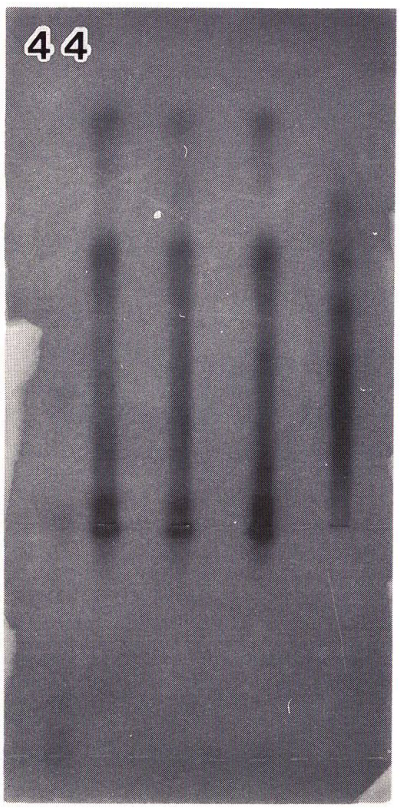

39


40


41

42


43


44