



Title	食用担子菌の細胞学的研究：細胞融合の材料としての菌糸及びプロトプラストの評価
Author(s)	西口, 恭彦; NISHIGUCHI, Yasuhiko; 三浦, 清 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 44(4), 1435-1473
Issue Date	1987-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21254
Type	departmental bulletin paper
File Information	44(4)_P1435-1473.pdf



食用担子菌の細胞学的研究

——細胞融合の材料としての菌糸及びプロトプラストの評価——

西口 恭彦* 三浦 清*
藤川 清三** 香山 彊*

Ultrastructure of mycelia and protoplasts
of edible basidiomycetes

—— Evaluation of mycelia and protoplasts as the materials for cell fusion ——

By

Yasuhiko NISHIGUCHI*, Kiyoshi MIURA*, Seizo FUJIKAWA**
and Tsutomu KAYAMA*

要 旨

ヒラタケの菌糸及びヒラタケとタモギタケの菌糸から得られたプロトプラストを用いて菌糸の培養期間別にそれらの微細構造を観察し、微細構造変化とプロトプラストの再生の関係について精査した。

3日目及び、7日目の菌糸から得られたプロトプラストで細胞質の密度が高いものと中間のもの二核を含む割合は1日目の菌糸から得られたプロトプラストより高いことを示した。しかも、これらのプロトプラストの培養期間別による再生の変化も同様な傾向となった。このことより、二核のプロトプラストが主に再生に関与していると考えられた。この仮定は再生コロニーを観察した結果、二核菌糸の数が一核菌糸の約6.5倍となった事実より裏づけられた。

異なった培養期間の菌糸より得られたプロトプラストの粒度分布を比較した結果、二核を持っている可能性が高い大きいプロトプラストは培養期間が長くなるに従い増加していた。しか

キーワード： 食用担子菌，プロトプラスト，細胞学的研究，核，細胞融合。

1987年2月27日受理 Received February 27, 1987.

* 北海道大学農学部林産製造講座

Laboratory of Chemical Technology of Forest Products, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

** 北海道大学低温科学研究所生理学部門

Department of Physiology, Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University.

し、7日目のプロトプラストは他の期間のプロトプラストよりも変形などが多くみられた。

これらの結果より、プロトプラストは二核を持ったものが再生し、二核を多く含むと考えられる3日目の菌糸から得られたプロトプラストが再生に適していると結論づけることができた。

目 次

I	結 言	1437
II	実 験	1438
II-1	供試菌	1438
II-2	菌糸の調製	1438
II-2-1	培地組成	1438
II-2-2	菌糸の調製	1439
II-3	菌糸の成長予備試験	1439
II-4	プロトプラストの調製	1439
II-5	プロトプラストの再生	1440
II-5-1	培地組成	1440
II-5-2	プロトプラストの再生	1440
II-5-3	再生コロニーの観察	1440
II-6	電子顕微鏡観察	1440
II-6-1	超薄切片	1440
II-6-2	フリーズ・フラクチャー	1440
II-6-3	電子顕微鏡観察	1441
III	結果と考察	1441
III-1	菌糸の電子顕微鏡観察	1441
III-1-1	菌糸のエイジング	1441
III-1-2	培養期間別サンプルの決定	1442
III-1-3	菌糸の微細構造	1442
III-1-4	培養期間別菌糸の微細構造変化	1443
III-1-5	微細構造からみた培養期間別菌糸の評価	1445
III-2	プロトプラストの単離	1446
III-2-1	プロトプラスト単離経過の顕微鏡観察	1446
III-2-2	培養期間別菌糸からのプロトプラストの単離	1447
III-2-3	プロトプラスト単離からみた培養期間別菌糸の評価	1448
III-3	プロトプラストの電子顕微鏡観察	1448
III-3-1	培養期間別のサンプルの決定	1448
III-3-2	プロトプラストの形態的特徴	1449
III-3-3	プロトプラストの微細構造の培養期間別変化	1450
III-3-4	プロトプラストの核	1452
III-3-5	微細構造からみた培養期間別プロトプラストの評価	1454
III-4	プロトプラストの再生	1455
III-4-1	培養期間別プロトプラストの再生	1455
III-4-2	再生と微細構造	1456
III-4-3	再生と核	1456

III-4-4 再生と粒度分布	1458
III-4-5 培養期間別プロトプラストの評価 (総括)	1458
IV 結 論	1460
参考及び引用文献	1462
Summary	1462
写真説明	1463
写 真	1465

I. 結 言

きのこは日本人の食生活にとって欠くことのできない食物である。特に最近になって、きのこに微量に含まれている制ガン性物質が確認されるにおよんで、その関心は一層深くなって来た。栽培されているきのこの種類は多いが、その代表的なものはシイタケ、ナメコ、エノキタケ、ヒラタケ、タモギタケであって、その生産量は年々増加の傾向をたどっている。その一方で数種のきのこは特定の場所にしか生えず、しかも栽培が困難なため天然物の乱獲、価格の高騰を招いた。マツタケ、シメジなどが食用菌としてその例にあげることができる。さらに、栽培材料である原木の不足や病害等で生産上の問題も現れてきた。

栽培が盛んになるにつれ、きのこの優良品種の開発や栽培不可能のものを栽培可能にする努力を求める声が高まってきている。このような状況下で、最近遺伝子工学や細胞融合などのバイオテクノロジーをきのこの分野に取り入れようとする動きが出てきた。この技術によって、種または属の異なるきのこ間の遺伝子を交換して新しい品種を作り出したり、今まで栽培が不可能であったものを可能にしたりすることが期待される。これは、バイオテクノロジーが動物細胞に始まり高等植物及び微生物に応用できる技術として過去に多くの努力が成され、効果的に再現性のある技術として発達してきたためである。

細胞融合は遺伝子工学などに比べ比較的とりつきやすいバイオテクノロジーであり、動物細胞、高等植物細胞、微生物細胞などに広く応用されてきている。高等植物の細胞融合の研究は古くから行われてきた。細胞融合は細胞から細胞壁をとった裸の細胞、つまりプロトプラストを使用する。したがって、プロトプラストの研究もいろいろな植物について行われてきた。このような研究成果により、効果的な再現性のある融合技術が発達してきた。この技術をステップとして、きのこつまり担子菌についての細胞融合の研究も始まった。

担子菌についての細胞融合の研究もここ5年間に数多く行われてきた。プロトプラスト化された菌の種類も数十種類に及んでいる¹⁾。その中でも、細胞融合の結果、体細胞雑種まで到達したものはウシグソヒトヨタケとその変異株²⁾、ヒラタケとトキイロヒラタケ³⁾、ヒラタケとタモギタケ⁴⁾等で同じ種間及び属間のものであり、体細胞雑種まで到達した例は非常にわずかである。我々の以前の研究⁵⁾では、残念ながら体細胞雑種を育成できなかった。これは、プロトプ

ラスト自体のプレート効率（再生率）が最高20%（ヒラタケ）前後しかなく、融合しても雑種が生き延びる確率が低くなってしまふためと思われる。しかし、逆に、もしプレート効率が80%くらいであっても融合率が数%であれば同じような結果となるであろう。このように、プロトプラストがどのような状態にあるとき（例えば、プロトプラストがたくさん再生するときの状態）に一番体細胞雑種が作りやすいか、という研究はまだ行われていない。

プロトプラストは菌糸から単離されるので、当然菌糸の状態によりプロトプラストの性質は大きな影響を受けることが考えられる。したがって、再生に適したプロトプラストを得るためには、プレート効率に関連して菌糸の培養期間の検討は、大きな位置を占めるとと思われる。細胞の状態を調べるには、細胞の微細構造を明らかにすることは重要であり、菌糸及びそのプロトプラストの微細構造については数多く報告^{6,7,8)}されている。しかし、これらの微細構造と再生等の関係を示した報告はほとんど存在しない。

以上のことより、我々は、培養期間別の菌糸及びそのプロトプラストの微細構造の変化を明らかにし、さらにこれらとプロトプラストの再生との関係を精査して、再生に適したプロトプラストを得るための菌糸の培養期間をベースにした諸条件、プロトプラストの評価のための諸要素を明らかにすることを目的とした。

II. 実 験

II-1. 供試菌

実験には次の菌を用いた。

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* ; 73-12 株)

タモギタケ (*Pleurotus citrinopileatus* ; 76-5 株)

供試菌は、道立旭川林産試験場より譲りうけた菌株より分離してしょう油、たまねぎ(OS)寒天培地でスラント培養したものを使用した。

II-2. 菌糸の調製

II-2-1 培地組成

菌糸の培養には、次の培地を用いた。

固体培地

OS プレート寒天培地(しょう油 4%・砂糖 2.5%・たまねぎ抽出液 15%・寒天 3.5%)

液体培地

OS 液体培地(しょう油 4%・砂糖 2.5%・たまねぎ抽出液 15%)

なお、たまねぎ抽出液は、細かく刻んだたまねぎ 150 g に蒸留水 150 m l を加え、60~70 °C で 1 時間加温後ガーゼでろ過し調製した。

液体培地は 100 m l の三角コルペンに 40 m l ずつ分注し、オートクレーブでゲージ圧 1.2 気圧、20 分滅菌処理し、放冷後使用した。菌体をかくはんするためにあらかじめかくはん

子とガラスビーズを入れた。

II-2-2 菌糸の調製

培養方法は、Fig. 1 に示すように行った。

スラント培養菌を OS プレート寒天培地に接種し、プレートに同心円状に延び始めて来た菌糸の先端をコルクボーラで打ち抜き、それを液体培地に接種した。液体培地で7日間前培養した後再び液体培地に接種し、1~20日間本培養したものをサンプルとした。培養中は原則的に、接種やプロトプラストの単離及び電子顕微鏡の試料として用いる前の日と本培養2日目、6日目に15~30分かしくはんした。

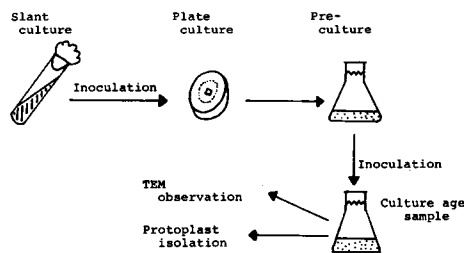


Fig. 1. Preparation of mycelium.

II-3. 菌糸の成長予備試験

代表的な培養期間を決定するために本培養菌糸の期間別菌体重量(絶乾)を次のように測定した。

1日のサンプル(5本以上)を別々にろ紙(No.4)でろ過し、それを一昼夜乾燥後重量を測定した。サンプルは1~20日間培養した菌糸とし、かくはんはいっさい行わなかった。

II-4. プロトプラストの調製

本培養菌糸のプロトプラストの単離は Fig. 2 に示すように行った。

菌体を1G1ガラスフィルターでろ過し、洗浄後50~200mgの菌体をセルラーゼ・オノヅカR-10, ザイモリアーゼ20T, キチナーゼ(それぞれ, 2%, 0.6%, 6 units)を溶かした0.05Mリンゴ酸と0.5Mマニトール溶液をNaOHでpH5.6に調製した溶液1ml中に加え、30℃で3時間80回/分で振とうした。加水分解後、3G2-3G3のガラスフィルターでろ過し、ろ液を750g, 10分遠心分離した。上澄み液を除去後、再び0.5Mマニトールで懸濁した。ペレット状になったプロトプラストを1mlに希釈した後、位相差型光学顕微鏡(オリンパス タイプEH)を用いて血球計数盤(THOMA G-6513)により収量を測定した。

計測したプロトプラストは、光学顕微鏡観察及び電子顕微鏡観察と再生実験に用いた。

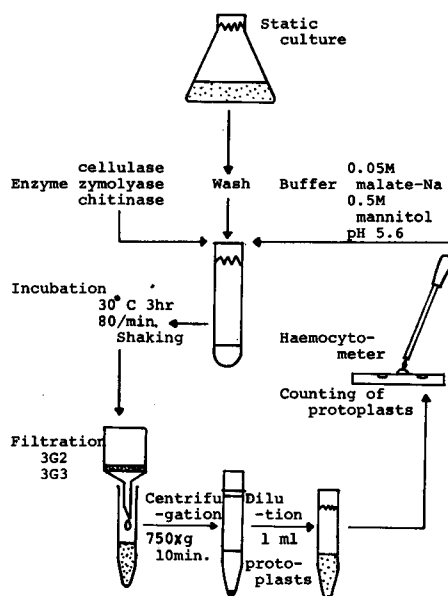


Fig. 2. Preparation of protoplasts.

II-5. プロトプラストの再生

II-5-1 培地組成

プロトプラストの培養には次の培地を用いた。

OSプレート寒天再生培地 (しょう油4%・たまねぎ抽出液15%・寒天2%・0.5M
サッカロース)

シャーレは前述のように滅菌処理して使用した。

II-5-2 プロトプラストの再生

プロトプラストの再生は次のように行った。

得られたプロトプラストをOSプレート寒天再生培地に適量接種し、23℃で2～3週間培養した。

II-5-3 再生コロニーの観察

再生コロニーが一核菌糸であるか二核菌糸であるかを判定するためにコロニーの核の観察を次のように行った。

再生コロニーの先端を切り取り HCl-Giemsa 法により染色した後、光学倒立顕微鏡(オリンパス タイプIMT-2)で観察した。HCl-Giemsa 法は、本山の方法⁹⁾を用いた。

II-6. 電子顕微鏡観察

II-6-1 超薄切片

超薄切片の作製は Fig. 3 に示すように行った。

サンプルを1%グルタルアルデヒドで2時間室温で処理し、さらに2.5%グルタルアルデヒドで12時間固定後洗浄した後、2%OsO₄で24時間、後固定した。洗浄後、アルコールシリーズ(50, 70, 90, 95, 99%)で脱水し、プロピレンオキサイドで1時間、プロピレンオキサイド:エポン・レジンは1:1で3時間浸透させた後、エポンで30℃で24時間、60℃で12時間処理して重合包埋した。試料を包埋したブロックからマイクローム(REICHERT-JUNG ウルトラカット Omu 4)で超薄切片を作製し、酢酸ウラニル(10分)、クエン酸鉛(7分)で染色した。試薬はすべて電子顕微鏡用のものを用いた。

II-6-2 フリーズ・フラクチャー

レプリカの作製はFig. 3に示すように行った。

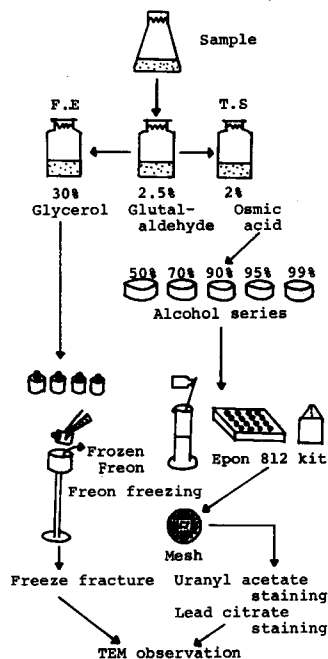


Fig. 3. Procedure of TEM observation.

サンプルを上述したようにグルタルアルデヒドで固定、洗浄した後、30%グリセリンにより置換した。置換後、サンプルを試料台に乗せ液体フロン (アサヒフロン 22) で急速凍結し、凍結割裂装置 (JEOL LTD. JFD-7000) で割裂、白金、カーボンの蒸着を行った後、95% H₂SO₄ と漂白剤で菌体を溶かしてレプリカを作製した。

II-6-3 電子顕微鏡観察

切片及びレプリカは透過型電子顕微鏡 (JEOL LTD. JEM-100 C) を用いて観察した。細胞質及び原形質膜上タンパク粒子 (IMP) の定量的な測定は、代表的な切片及びレプリカを写真撮影することにより写真から計測した。

測定方法は、菌糸の場合では、二つのブロックから任意に切った切片の 20 以上の菌糸を持つ代表的な 2 又は 4 枚の切片を用いて写真撮影し、その写真からデジタイザー (MYPAD-A 3 K-510) を用いて、細胞質の面積、細胞小器官、顆粒などの面積、数、細胞壁の厚さを測定し、平均数及び平均面積、平均厚さを求めた。また、細胞小器官などの存在率はそれらを保有している菌糸数を測定菌糸数で割ったものとした。IMP 数は代表的なレプリカより七つ以上の菌糸の細胞膜 1 μm^2 当りの粒子数を測定し、平均 IMP 数を求めた。一方、プロトプラストの場合では、III-3-3 で示しているように代表的な切片を決定しその切片を用いて菌糸と同様な方法でプロトプラストの平均面積、細胞小器官などの平均数、平均面積、有核率、存在率を測定した。また、IMP 数も菌糸と同様な方法で測定した。

III. 結果と考察

III-1. 菌糸の電子顕微鏡観察

III-1-1 菌糸のエイジング

一般的に、菌糸細胞は細長い円筒形をしており隔壁により仕切られている。その細胞構造は先端から基部へ向かうにしたがって細胞内の構造変化を起こす。したがって、担子菌菌糸も先端から基部にわたって細胞学的にも生理学的にも異なる細胞により構成されているため、一本の菌糸全体としてその成長過程において定常的状态はあり得ない。以上のことから、菌糸集団は全く不均一な細胞の集団ということが出来る¹⁰⁾。

我々は、このような不均一な細胞集団を用いてプロトプラストを単離するので、当然菌糸集団の質 (例えば、増殖能力があるかどうか) によってプロトプラストの質も左右されることが考えられる (例えば、再生しやすいかどうか)。

担子菌からプロトプラストを単離する条件はいろいろある。例えば、酵素、温度、buffer、pH 等は単離のための直接の条件である。しかし、その前段階の菌糸の調製も前述した理由から、プロトプラストの単離には非常に重要な要素である。例えば、我々の研究⁹⁾では、菌糸の培養期間 (培養齢: Culture age) の差によってプロトプラストに収量の差があることを示した。

今回は、プロトプラストの単離の材料となる菌糸を評価するため、培養期間別の菌糸につ

いて考察及び検討することにした。

III-1-2 培養期間別サンプルの決定

実験に用いる菌糸及びプロトプラストの経時的変化を比較するための試料採取時期を決めるために次の実験を行った。1～20日間の期間中にどのように菌糸が増加していくかを細胞量の測定により調べ、その結果より期間を決定した。方法は、間接的細胞量測定法のうち、最も良く用いられている重量測定法とした。菌体重量は、絶乾重量とした。

ヒラタケの菌体重量測定の結果を Fig. 4 に示す。図から明らかのように、菌糸重量は培養期間が1～7日目まではゆるやかに、そして7～18日目までは急激に増加し、18～20日目までは増加していない（ほとんど平衡になっている）。

この結果より、菌糸の微細構造変化を調べる実験の代表的なサンプルとして、次の6種類の菌糸を用いた。

接種した種菌、すなわち前培養7日目のもの（0日目とする）。

プロトプラストの単離条件となる1, 3, 7日目のもの（1, 3, 7日目）。

曲線が最も急上昇している13日目のもの（13日目）。

曲線が平衡となり始める18日目のもの（18日目）。

これらの代表的なサンプルは、増殖経過を示す各増殖期と一致している。例えば、TURNER (1975)¹⁴⁾の名称に当てはめてみると、0, 1, 3, 7日目は誘導期、13日目は均衡増殖期、18日目は貯蔵期となっている。1, 3及び7日目の菌糸は著しい増加はしていないけれども、ここでは、我々の以前の研究結果⁵⁾より、これらの菌糸がプロトプラストの単離に適していると考えられているので、サンプルとして加えることにした。

III-1-3 菌糸の微細構造

ヒラタケの液体培養菌糸の一般的な微細構造を Photo. 1 に示す。これらの細胞はほぼ均一な細胞質を持ち、ミトコンドリア、小胞体、リボゾーム（小胞体に付着しているものも含む）、液胞、小胞、脂肪滴及び周囲に顆粒状の組織を含んでいて、細胞壁や細胞膜により囲まれているのを認めることができた。さらに、樽状壁孔やクランプ構造（Photo. 2）も観察できた。

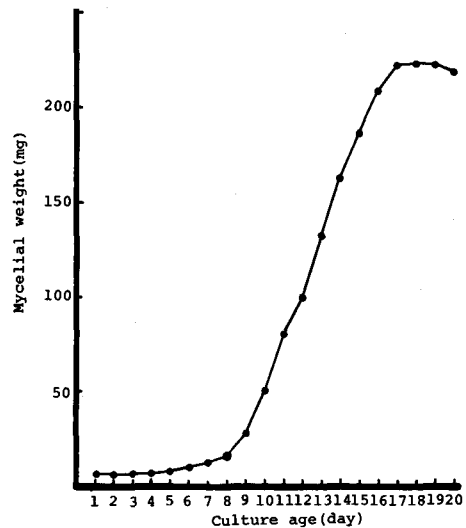


Fig. 4. Change of mycelial weight on the culture age in OS liquid medium.

III-1-4 培養期間別菌糸の微細構造変化

定量分析は、細胞小器官などの数、面積(平均)、存在率、細胞壁の厚さ、IMP数等を測定した。測定は、実験の章で示したように行った。

ヒラタケ菌糸の細胞質、核、ミトコンドリア、液胞、小胞体、脂肪滴、IMPの培養期間別変化の測定結果を Fig. 5 に示す。

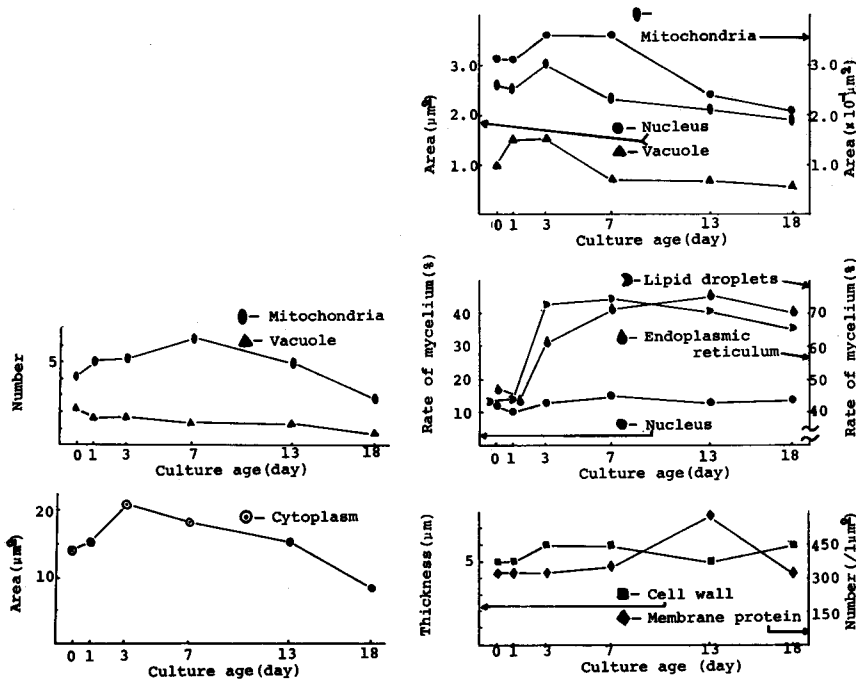


Fig. 5. Morphometry of cell ultrastructure on culture age.

細胞質密度は、一般的な菌糸ではほとんどの期間において差は見られなかった。しかし、細胞質がほとんど無いものや菌糸密度が明らかに高いものは、培養期間が長い方に多く見られた(Photo. 3)。さらに、3日目の菌糸は他の菌糸より細胞質の面積が拡大してそれを頂点として増減していることが判った。接種された菌は3日目までに菌糸をゆっくりと伸ばしながら面積を拡大し、その後急速に伸長成長すると考えられる。そのため、先端の菌糸の成長にともない、基部の菌糸はやや衰え始めたためか、面積の縮小が認められた。

核はすべての期間で観察できた(Photo. 1)。切片上の菌糸の約10~15%は核を持っていた。それらは、しばしば菌糸の長軸方向に延びているのが観察できた(Photo. 4)。しかし、二核を出現させているものはほとんど見られなかった。これは、菌糸の細胞が軸方向に長い反面まっすぐ延びているのではなくいたるところでカーブを描いているため、切片上に出現する細胞質はほとんど細胞の一部であり、したがって、たとえ細胞が二核を持っていたとしても細

胞質に二核が局在化した細胞でなければ、二核を出現させることができないためであろう。

核の平均面積は、0, 1日目よりも3, 7日目が大きく、それから収縮し0, 1日目よりも13, 18日目の方が小さくなる結果となった。存在率は、1日目若若干小さくなっているがほとんど変化していないと考えられた。

すべての期間のミトコンドリアは多くの生物に見られるように、円形、だ円形あるいは細長い形態を保っていた。内膜はクリステを形成し、クリステは一般的にミトコンドリアの長軸方向とおおよそ平行であった (Photo. 5)。7日目までは数の増加が見られ、その後減少した。18日目は7日目の約1/2に減少した。13日目と18日目の切片の中には、ミトコンドリアを持たない細胞質も観察された。一方、平均面積では3日目が最高であった。これらのことより、3日目で大きくなったミトコンドリアは7日目でやや小型となり数を増やしたと考えられる。

液胞も同様にすべての期間で観察された。そして、ほとんどの液胞は、グルタールアルデヒド固定により作られる、と報告¹²⁾されている電子密度の高い内容物を持っていた (Photo. 6)。液胞化の進んでいるのは1日目と3日目である。7日目は液胞が収縮しかつ細分化が進み、それ以降のものは、液胞から顆粒組織への転換が多く認められた。しかし、18日目の菌糸では、液胞を持っているものの多くは、かなり大きい液胞を持っていた (Photo. 6)。0日目のものは、1日目の特徴を持った菌糸と7日目の特徴を持った菌糸が同じくらいの割合で存在していた。

小胞体は1日目を除いて5~7割の切片で観察することができた。切片中の小胞体の数はほとんどが1~3個であった (Photo. 1)。たまに4~8個存在する切片もあった。粗面小胞体は主に7日目に観察され、リボゾームの付着の少ない粗面小胞体はそれ以外のサンプルで時々観察された。

遊離のリボゾームは、すべての期間の菌糸に見られた。それらは、細胞質に均一にあるいは凝集 (ポリゾーム) 又は全体的に集まって存在していた。一般的な傾向として、0, 1日目の菌糸には、細胞質に均一なもの集合化したものが混在し、3~13日目の菌糸ではおおよそポリゾーム化していて、それ以降では再び均一化しているものも数多く見られるようになった。

脂肪滴は、グルタールアルデヒド固定の際に人為的に作られる、という報告¹³⁾があり細胞本来の姿ではないかも知れないが、すべての期間で観察されるので結果として存在率を比較してみた。3日目以降40%前後の菌糸に脂肪滴は存在するけれども、0, 1日目では13~14%の菌糸にしか存在しなかった。つまり、成長の激しい時にできるものと考えられる。

電子密度の著しく低い、膜を持たない顆粒が、ほとんどすべてのサンプルで周囲に点在及び群在する形で観察された (Photo. 6)。これらは SCOTT (1986)¹⁴⁾により Peripheral particle と定義されたものと非常に近いものと考えられる。彼らは、これらの顆粒は炭水化物の貯蔵器官として存在しているという仮説を裏付ける結果を示した。観察された顆粒は直接これと結び

付けるわけにはいかないが、一応これらを Peripheral particle と仮定することにする。観察した結果、これは培養期間が長くなるにつれ細胞質に広がっていく傾向にあった。

細胞壁は、すべての期間で均一な厚さであった。これらは二層からなっていたが、報告されているような培養期間による層の変移や分離¹⁴⁾は観察することができなかった。

原形質膜のIMP数は0~3日目までは変化が少なく、7~13日目まで増加し、その後18日目までに減少しているのが判った (Photo. 7)。期間が長くなるにつれ数がバラツク傾向にあった。

III-1-5 微細構造からみた培養期間別菌糸の評価

一般的に、プロトプラストは再生能力が高いものが良いとされている。このことは、しばしば「Viability」として単離実験及び融合実験等の評価として用いられている。そのため、プロトプラストの材料となる菌糸はある程度の増殖する能力に優れているものが望まれる。したがって、ここでの基準を「元気のある菌糸」として、III-1-4の結果に基づいて菌糸を評価することにする。ただし、前にも述べたように集団としての菌糸のエイジングを考えた場合、特定の菌糸を評価しても無意味である。したがって、菌糸の全体像から判断することにする。

III-1-4の結果より、組織別に最も発達している期間と状態を示すと次のようになった。

細胞質：3日目が一番肥大していて、細胞質の抜けたものも少ない。

核：大きさでは3、7日目が一番発達しているように思える。

ミトコンドリア：大きさでは3日目、数では7日目が一番多い。

液胞：培養期間が長くなるに連れ、菌糸全体として液胞は細胞質に占める割合が小さくなっているが、反面、液胞の大きさは18日目の一部の菌糸ではかなり大きくなる。

小胞体：7日目に一番多数の粗面小胞体が観察される。

リボゾーム：3、7日目に一番ポリゾーム化が進んでいる。

細胞壁：厚さではだいたい同じようなものだが、3日目のものが一番滑らかである。

脂肪滴及び Peripheral particle：13、18日目に両方とも一番多く見られる。しかし、脂肪滴は13日目に、Peripheral particleは18日目に一番多く存在する。

原形質膜上IMP：13日目に一番IMP数が多く見られる。これらのことから培養期間別に菌糸を評価してみると次のようになる。

0日目菌糸：前培養として7日間液体培養したためか、菌糸の全体像は1日目の特徴を持った菌糸と7日目の特徴を持った菌糸が同じ割合で存在している。したがって、この菌糸は1、7日目の所で述べているように成長段階にあると思われる。しかし、我々の実験では、サンプルの安定化を得るため菌糸を馴化させるために前培養したので、後にも述べるように、これらの菌糸はプロトプラストを単離する実験には用いなかった。

1日目菌糸：前培養菌糸がまだ新しい培地に慣れていないためか、細胞小器官の発達がまだわずかしが行われていないように思える。しかし、液胞はかなりめだって存在していた。これは古い菌糸が新しい培地で再び成長を始めたためではないかと考えられる。よって、これら

の菌糸は成長段階初期にあると思われる。

3日目菌糸：細胞質の肥大が一番顕著であることや、ミトコンドリアやリボゾームが発達していることより、若い菌糸を伸ばす準備ができた状態あるいは呼吸やタンパク合成が盛んである状態であるように思われる。したがって、比較的若い菌糸が多いと考えられる。

7日目菌糸：成長に直接関与する細胞小器官の増加又は発達が進行している反面、液胞の縮小や貯蔵物質の蓄積が進んでいる。したがって、菌糸集団としては一番元気のある状態ではないかと考えられる。

13日目菌糸：7日目よりもわずかに衰えが見え始めたが、依然タンパク質合成などは盛んで、さらに、貯蔵物質である脂肪酸の蓄積も行い始めた。このことより、まだ成長段階にあると思われる。

18日目菌糸：かなり細胞全体が収縮し、細胞質は Peripheral particle で占められる領域が増加し一部の細胞は巨大な液胞で占められ、合成組織等も収縮して成長の休止期であるように思われる。

このように、菌糸集団として一番若いあるいは一番元気の良い状態のものは、3、7日目の菌糸ということになる。上述したように、0日目の菌糸は本培養の種菌として用い、種菌の状態を他のサンプルと比較するために培養期間別サンプルに加えたので、ここでは、プロトプラストに関する実験に用いないことにした。

III-2. プロトプラストの単離

III-2-1 プロトプラスト単離経過の顕微鏡観察

一般に、プロトプラストは菌糸全体の消化から単離されるのではなく、一部の弱くなった場所を通して出てくる¹⁵⁾と言われている。この際、ほとんどの細胞は分断され、二つ以上のプロトプラストに分けられる。そして、先端から出てくるものや基部の方から出てくるものがある。出てくる部位により、プロトプラストの形態が異なっているという報告¹⁶⁾もある。我々は、プロトプラストを単離するための加水分解によって菌糸がどのように変化していくかを光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察した。

プロトプラストの単離の仮説を簡単に説明すると、まず、加水分解酵素溶液に含まれるプロトプラストの浸透圧調製剤の0.5 M マニトールの影響で菌糸は原形質分離をおこす (Photo. 8)。そして、酵素が細胞壁を攻撃して局部的に弱い部分ができ、そこが細胞内膨圧により破壊され細胞質は細胞の仕切り内から徐々に膨出し、ついに、プロトプラストが単離される。このサイクルが菌糸間のルーズな場所では、15分以内に起こる。(Photo. 9)。時間がたつに連れ、菌糸の結束部分に酵素溶液が浸透し、さらに菌糸からプロトプラストが単離される。酵素溶液が浸透した結束領域は時間が経過するにしたがいバラバラとなり、さらに酵素の攻撃を容易にしてプロトプラストが単離される。これらの観察では、15分以内にプロトプラストは単離されたが、以前我々は、単離時間の短いプロトプラストは生存能力

が低いことを報告⁵⁾した。このことは次のように考えられるかも知れない。酵素の攻撃時間が短いので、細胞壁の局部的に弱い部分からしかプロトプラストが単離できないためプロトプラストの大きさも小さく、細胞質が十分に含まれていないため、あるいは、加水分解初期にできたプロトプラストが長い時間酵素にさらされているため細胞小器官等が変質してしまったためかも知れない。

我々が良く用いる3時間目のプロトプラストがどのくらいの時間で単離されたものであるのかは判らない。菌糸の加水分解時間と単離されたプロトプラストの微細構造的特徴の関連についての考察は、今後の課題である。

III-2-2 培養期間別菌糸からのプロトプラストの単離

プロトプラストを単離するための条件はいろいろ考えられるということは、前にも記述した。しかし、菌糸集団の変化による、すなわち、菌糸の培養期間によるプロトプラストの単離についての考察はほとんど行われていない。以前の我々の研究⁵⁾においても、その点についてはほとんど議論されていない。そこで、ここでは、菌糸集団の培養期間別変化とプロトプラストの単離について考えることにする。

我々は前回の研究で、ヒラタケからプロトプラストを単離する最適条件について報告⁵⁾した。今回の実験でもこの条件を用いて加水分解を行った。

ヒラタケの培養期間別サンプルからプロトプラストを単離した結果を収量で表したものをFig. 6に示す。この結果より、3日目までは収量が上がり、7日目までで平衡となり、それ以

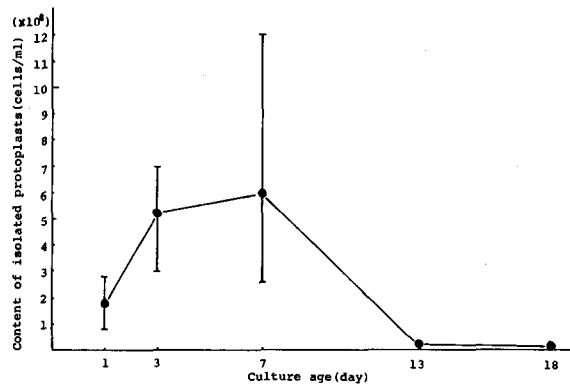


Fig. 6. Influence of culture age on the formation of protoplasts.

降急激に下がり13日目以降ではほとんどプロトプラストは単離できないことが判った。最大収量は、3日目 7.1×10^6 個/ml、7日目 1.2×10^7 個/mlとなったが7日目の収量にはバラツキがあった。全体的に単離されたプロトプラストには微細片の混入が少なく、前回の我々の報告⁵⁾のような菌糸片の混入も認められなかった。これらのことは、融合実験には非常に大事な

条件となっている。

上記のことから、タモギタケについてもヒラタケと同じ加水分解条件を採用することにした。

III-2-3 プロトプラスト単離からみた培養期間別菌糸の評価

プロトプラストを実験に用いる際の必要条件としては、ある程度の数が単離されたものでなければならない。III-2-2の結果より、培養期間が3日目と7日目の菌糸は非常にプロトプラストを単離しやすく、逆に13日目、18日目のものはほとんど単離できないことが判った。このことについて考えられる理由はいくつかあるが、III-1-4の結果を考えあわせると菌糸密度に問題があるのではないかと考えることができる。13日目の代表的な菌糸では、細胞同志がいたるところで癒着しているのが判る(Photo. 3)。これは、おそらく酵素の攻撃から菌糸を守る働きをしているのではないかと考えられる。つまり、酵素溶液の浸透を妨げているということである。Photo. 9は、酵素溶液の浸透しやすい、菌糸密度のルーズな所からプロトプラストが単離されていることを示している。III-1-4の結果より、細胞壁の厚さは培養期間によって著しい違いを示さなかった。もちろん、これらの差は表面上であって実は細胞壁の構造変化が起こっているのかも知れない。我々はこれについての実験は行わなかった。このようなことについての考察は、今後の課題となるであろう。

III-2-1でも述べたように、プロトプラストの単離は細胞壁の部分的な消化により起こる。このことは、菌糸細胞の一つの大きさを考えるとプロトプラストは一つの菌糸細胞からできているのではないということが理解できる。したがって、III-2-1でも指摘したように、菌糸内にあるすべての細胞小器官がすべてプロトプラストに入る訳ではない。よって、細胞小器官の豊富なプロトプラストが単離されるには、菌糸の細胞質に細胞小器官が豊富に存在していることが望ましいと考えられる。そこで、III-1-5の結果より、菌糸中の細胞小器官の発達しているものは3、7日目の菌糸ということになる。したがって、これらの菌糸を用いてプロトプラストを単離すれば、より細胞小器官の豊富なものが得られることが期待できる。

これらの理由より、13日目、18日目の菌糸はプロトプラストの単離及びこれらを用いた実験には適していないと考えられる。0日目の菌糸については上述した通りである。よって、プロトプラストの単離には1、3、7日目の菌糸を用いることにし、以降の実験にはこれらの菌糸より単離されたプロトプラストを用いることにした。以前の我々の研究⁵⁾ではタモギタケのプロトプラストの単離はヒラタケのプロトプラスト単離と同様な傾向を示したためヒラタケの同じ期間の菌糸を用いることにした。

III-3. プロトプラストの電子顕微鏡観察

III-3-1 培養期間別のサンプルの決定

III-2-3の結果より、プロトプラストの微細構造観察及び再生実験には、1、3、7日目のヒラタケ及びタモギタケの菌糸から単離されたプロトプラストを用いて行うことにした。

タモギタケはヒラタケと同じ (*Pleurotus*) 属であり、プロトプラストの単離実験ではヒラタケと同じ条件下で大体同じような結果を示すことが判っているので、ヒラタケとの融合実験には使いやすい菌である。今回は、タモギタケについてはヒラタケのような手順をふまずに、プロトプラストの期間別サンプルを決定した。

III-3-2 プロトプラストの形態的特徴

糸状菌の微細構造及びそのプロトプラストについてはいろいろな報告がある。そのうち、担子菌では菌糸や子実体の微細構造について多くの報告がなされているが、プロトプラストの微細構造の研究はほとんど見受けられない。我々は、ヒラタケとタモギタケを用いてこれらの研究を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて行った。

ヒラタケ及びタモギタケの光学顕微鏡観察によるプロトプラストの粒度分布を Fig. 7 に示す。この結果より、ヒラタケは直径 3~4 μm 、タモギタケは直径 5~5.5 μm 付近のものが多く判った。また粒度分布は、近似的に正規分布することが判った。

ヒラタケ及びタモギタケのプロトプラストの一般的な微細構造を Photo.10 に示す。プロトプラストは円形で菌糸と同じ細胞質を持ち、その中には核、ミトコンドリア、液胞、小胞体、リボゾーム、脂肪滴、Peripheral particle 等が存在していた。しかし、その逆に細胞質がほとんどなく、細胞小器官もわずかしかなかったものも観察された (Photo.11)。細胞壁は、菌糸からきれいに除去されていた (Photo.12)。しかし、細胞膜はスムーズではなくかなり波打っていて所により IMP の無い領域が存在していた (Photo.13)。

プロトプラストは3つのタイプに分けることができた。一番目のタイプは、菌糸と同じ細胞質を持っているもの〔細胞質の密度が高いのでタイプ D (Dense) と呼ぶことにする〕 (Photo.10)、二番目のタイプは、それとは逆にほとんど細胞質がなく、細胞小器官も持っていないもの、あるいは細胞小器官が膨潤して死んだ細胞に近いもので著しく生存能力に欠けていると思われるもの〔タイプ S (Sparse)〕 (Photo.11, 14)、三番目は、その中間にあるもの〔タイプ M (Middle)〕 (Photo.15) である。これらのタイプの比率を培養期間別に比較したものを Fig. 8 に示す。タイプ D の割合はヒラタケでは、3 日目と 7 日目で約 60% 弱であった。タイプ D+タイプ M の割合は、すべての期間にわたって 85~90% くらいであった。タモギタケは全期間を通してタイプ D の割合は約 30% 強、タイプ D+タイプ M の割合は約 50% で

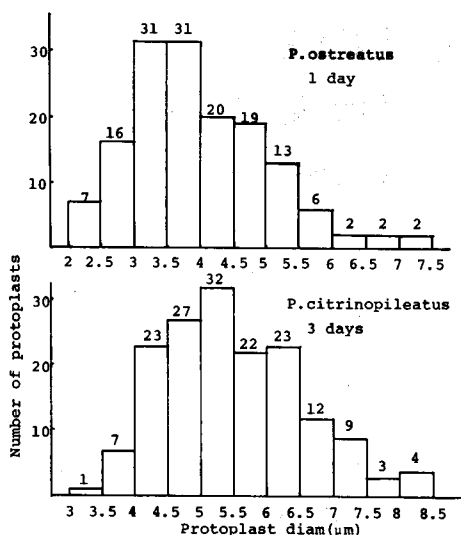


Fig. 7. Size distribution of protoplasts released from mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *P. citrinopileatus*.

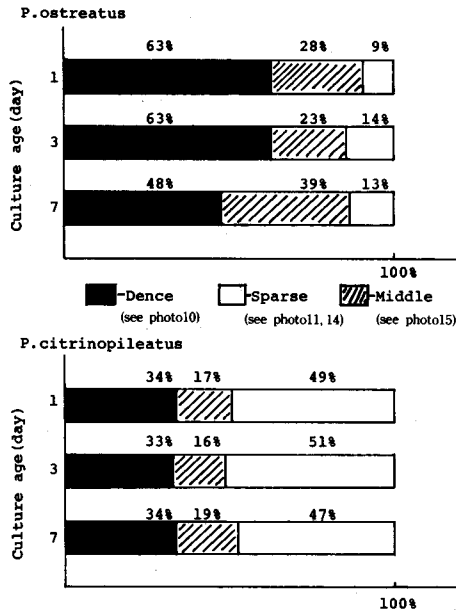


Fig. 8. Rate of three types of morphologically distinct protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *P. citrinopileatus* on different culture ages.

あった。プロトプラストのタイプは、前回の実験¹⁷⁾(ここでは記されていないが)とは異なってタイプDが半分以上となった。これは、タイプDの基準を菌糸の細胞質に近い細胞質を持つものとしたため、範囲が広がったためである(生存能力が高そうなものをDとした)。そのため、中間型(タイプM)の選択が困難であった。あきらかにタイプS(著しく生存能力に欠けていると思われるもの)であるもの以外はタイプMとすることにした。したがって、著しくタイプSが減少する結果となった。

III-3-3 プロトプラストの微細構造の培養期間別変化

III-3-1より決定した培養期間別プロトプラストによる微細構造の変化をヒラタケを用いて比較した。ここでは、材料となった菌糸の微細構造との比較も行うため、ヒラタケのみ取り扱うことにした。

プロトプラストは球形で大きさも違うことがFig. 7により判った。このことは、切片を切る位置によって実際のプロトプラストの大きさ及びその細胞小器官及び顆粒などの存在率と切片上のそれらの大きさ及び存在率に違いがでる恐れがある。この違いを少しでもなくするために、代表的なサンプルを次のように決定した。二つのブロックから任意に20枚の連続切片を4回切り、連続切片を1つずつメッシュに三つに分け、そのうちの一つのメッシュから代表的な切片を決定し、合計四つの切片からサンプルを決定した。

プロトプラストの平均面積、ミトコンドリア、液胞、小胞体、脂肪滴、IMPの観察結果をそれぞれFig. 9に示す。

平均面積の大きさについての考察は後のセクションでふれるが、この結果より、菌糸と同様に培養日数の増加にしたがってだんだん大きくなっていくことが判った。その反面、変形しているものもだんだん多くなっていった(Photo.16)。

単離されたプロトプラストには、核を持たないもの、一核のもの、二核のものが存在した(Photo.17)。プロトプラストの核についての問題は、プロトプラストの評価にとって非常に大事な要素となるので、あらためて次のセクションで議論することにする。

ミトコンドリアの数や大きさはすべての期間にわたってほぼ同じといえるが3日目の方が7日目よりも数値が高くなっている。これらの点は、菌糸の時とは多少違っていた。全体的に

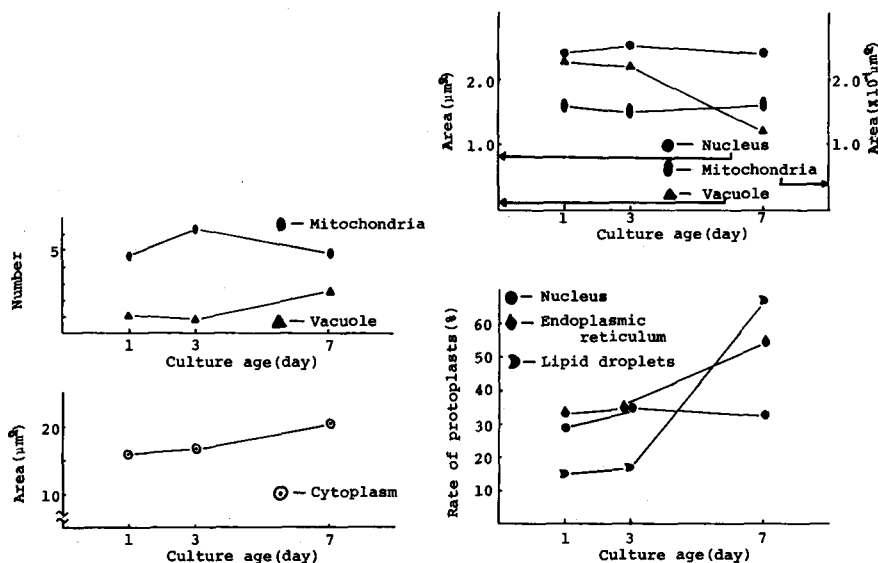


Fig. 9. Morphometry of ultrastructure of protoplasts on culture age.

みて、菌糸の時より小型となっている。このことは、プロトプラストの単離の際に大きいミトコンドリアの大部分は菌糸内に残ってしまうのかも知れない。

液胞は、1、3日目については多少1日目の方が大きい、ほぼ同じと考えられ、7日目はそれより数は多く、大きさは小さかった。液胞は大きいので単離の影響を受けやすいと思われるが、菌糸よりすべて面積が増加していた。また、菌糸の液胞にはほとんど含まれていた液胞内容物は全期間を通して、5割前後のプロトプラストにしか観察されなかった。このことから、プロトプラストの単離の際に液胞の細分化または破壊が起こったと考えることができる。しかし、菌糸の時より面積が増加したのは計測の都合上実際は液胞ではない、はっきりした膜構造を持たない小胞も数えてしまったためかもしれない。

小胞体は、形態的には全く菌糸のものと同様だが、全体の3~5割前後のプロトプラストにしか観察されなかった。しかし、やはり菌糸同様7日目のプロトプラストは他より小胞体の出現する確率は高かった。粗面小胞体もやはり7日目のプロトプラストで観察されたが菌糸の時よりは減少していた。

遊離のリゾームは、菌糸と同じ細胞質を持つプロトプラストに観察された。ポリゾームを有するプロトプラストは数は少ないが、すべての期間にわたって見られた。ポリゾームが減少した理由ははっきりとは判らないが、これも加水分解による影響かも知れない。

脂肪滴は、7日目のプロトプラストは他のものより約4倍の数の脂肪滴を持っていることを示している。この数値は、菌糸の時よりもかなり大きい値となっている。この理由は推察しにくい。

Peripheral particle は、すべての期間にわたって多くのプロトプラストに存在しなかった。これもほとんどの菌糸に見られたので、やはり、単離の影響を受けるものと考えられる。

細胞壁は、切片でもレプリカでもプロトプラストには全く見られなかった(Photo.10, 12)。

プロトプラストの単離のところで菌糸の原形質分離によりプロトプラストの単離が始まるということを述べたが、そこでは原形質分離により細胞壁と細胞膜とがきれいに離れるのではないかと考えられることを示した。上記の事実は、先の推論を裏付ける結果となっている。しかし、実際には、たんなる細胞膜とは思えないものを持っているプロトプラストが存在することがある(例えば、浸透圧ショックを与えても破壊しないもの)。したがって、目には見えないものがまだこれらのプロトプラストに付着していることも考えられる。このようなことについての研究は、今後の課題となるであろう。

細胞膜は上述したように、膜面が波打っているもの、凸凹のもの、さらには、IMPがある領域に集中しているもの、又は存在していないもの等が観察された。これらの膜の状態は、プロトプラストの単離による膜の不安定さを証明している(Photo.13, 18)。ほとんどのプロトプラストがなにかしらこのような特徴を持っていた。一方、IMPの培養期間別比較は、残念ながら3日目のプロトプラストの試料しかなく、他のプロトプラストとは比較できなかったが、3日目のプロトプラストのIMPは同じ3日目の菌糸より数はかなり少なかった。これは、膜タンパクは加水分解の時に酵素により影響をうけることが考えられるからである。これらについても、これからの研究対象となるであろう。

III-3-4 プロトプラストの核

単離したプロトプラストに核があるかどうかという問題は、プロトプラストを評価するための重要なポイントとなっている。担子菌のプロトプラストには核がないものも存在することが知られている¹⁸⁾。一般に、核の存在は染色により判定することが多い。例えば、ヒトヨタケのプロトプラストはDAPI(4'6-Diamidino-2-phenyl-indole)により¹⁸⁾、リゾクトニアのプロトプラストはギムザにより¹⁹⁾核の染色を行っている。しかし、我々の以前の研究⁵⁾では、両方の染色法を用いても核の染色を行えなかった。

そこで我々は、電顕切片からプロトプラストの有核率を求めることにした。ただし、プロトプラストと核の大きさは切片の厚さと比べるとかなり大きいので、実際の核の有核率とみかけの核の有核率の検定を統計的手段を用いて行うことにした。

まず、プロトプラストのみかけの有核率について検討した。

Fig. 9は、代表的な切片中のヒラタケのプロトプラストの有核率及び平均面積を示している。この有核率はみかけの値である。上述したように、切片上の有核率はプロトプラストの大きさによりかなり変化する。例えば、プロトプラストの大きさが核と等しければ、実際の有核率はさらに上がるはずである。この値を検定するために、切片上のみかけのプロトプラストの粒度分布のグラフをFig.10に示す。Fig. 7のプロトプラストの粒度分布のグラフとFig.10の

グラフを比べると、ほとんど同じような分布をしていることが判る。これを調べるため統計処理をすると、有意水準5%で同じ分布になることが判った。Fig. 7のグラフは正規分布しているということができるので、Fig.10のグラフも正規分布していることになる。このことより、単離されたプロトプラストからランダムに切った切片では、その切片上のプロトプラストの大きさの分布はほとんど単離されたものと一致した。したがって、プロトプラストより大きさの小さい核もこの方法で切片を選択すれば、実際存在する割合と非常に近いものが切片上に出現すると考えられる。同様に、二核を持っているか、いないかという判断もこの方法で考えることができる。厳密に言えば、プロトプラストの有核率は切片のランダム性に依存しなければならないが、我々は、上記の検討の結果からこのみかけの数値を実際の数値を代表するものとして取り扱うことにした。

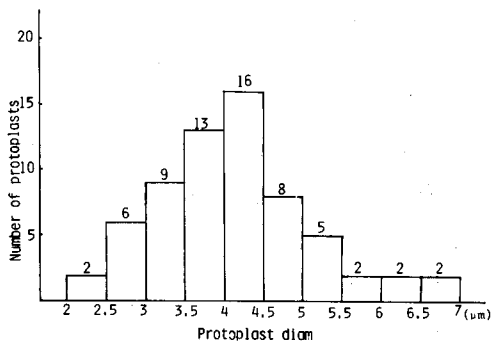


Fig. 10. Size distribution of protoplasts on thin sections.

Table 1は、プロトプラストのタイプ別の有核率及び二核率を示したものである。上段は、

Table 1. Percentage nucleation of morphologically distinct protoplasts.

P. ostreatus (%)	1 day protoplast	3 day protoplast	7 day protoplast
Nucleation	29 (9.7)	35 (17.1)	33 (10.7)
Type D Nucleation	18.8(6.2)	20.0(8.6)	17.9(7.1)
Type D+Type M Nucleation	25.0(6.2)	22.9(11.4)	28.6(10.7)
P. citrinoileatus (%)	1 day protoplast	3 day protoplast	7 day protoplast
Nucleation	17 (3.4)	25 (6.3)	19 (5.7)
Type D Nucleation	10.2(1.7)	15.6(4.7)	11.3(3.8)
Type D+Type M Nucleation	15.3(3.4)	20.3(6.3)	15.1(5.7)

() -Two nucleation

ヒラタケのプロトプラストに核がおおよそ30~35%、下段のタモギタケの場合には17~25%含まれていて、そのうち二核のものはそれぞれ10~17%、3~6%くらいであることを示している。核の大きさは培養期間別では、両方ともほとんど同じであった。この傾向は、菌糸の時と同様であるが菌糸の時よりも面積は小さくなった。これは、プロトプラスト中で球形に近い状態で存在しているため、断面積が小さくなったためではないかと思われる。

次に、タイプ別における核の有無について考察することにする。この結果より、タイプD

で核を持つ割合は、ヒラタケでは培養期間別全サンプルについてほぼ同じ、タモギタケでは3日目がやや高くなっている。タイプD+タイプMの場合も、核を持っている割合はヒラタケでは3日目がやや低くなっているがタモギタケでは逆に3日目が高くなっている。()内は二核の割合を示しているがこれはヒラタケの3日目のものが一番高い値となっている。両菌共にタイプD+タイプMの二核率は現在のプレート効率の最低ラインとほぼ同じ値をとっていることが判った。これについての議論は、再生のセクションで述べることにする。

Fig. 11は、切片上のプロトプラストの大きさと核の有無の分布のグラフである。図より、プロトプラストが大きくなるほど核を持つ割合が高くなることが予想される。しかし、プロトプラストの大きさと核の有無についての真の相関関係は、電子顕微鏡レベルで得ることは非常に困難である。できれば光学顕微鏡レベルで先ほども述べたように、核染色したものにより決定すべきである。タイプ別と核の有無については光学顕微鏡レベルでは不可能なため、電子顕微鏡と光学顕微鏡とを併用しておこなうとよりはっきりした結果がでると思われる。

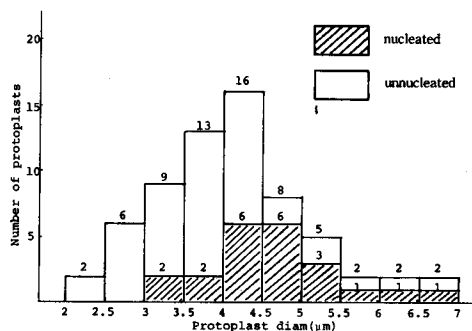


Fig. 11. Size distribution of nucleated and unnucleated protoplasts.

III-3-5 微細構造からみた培養期間別プロトプラストの評価

培養期間別プロトプラストによる微細構造の変化の差は、簡単に述べると次のようになった。

プロトプラストのタイプの比はだいたいどれも同じであるが、7日目のタイプMが他の値より大きくなっている。

大きさは、日がたつにつれてだんだん大きくなっている。しかし、7日目のものは変形しているものが多い。

ミトコンドリアは、3日目のものが数は他に比べてやや多くなっている。

液胞は、7日目のものが他よりやや多くなっている。

小胞体及び脂肪滴は、7日目のものが他よりだんぜん多くなっている。

リボゾームは、全体的にポリゾーム化していない。

Peripheral particleは、全部の期間に渡ってあまり存在していない。

IMPは、3日目菌糸よりかなり減少している。

核は、3日目のものが二核を多くもっている可能性が高い。さらに、タイプD+タイプMの二核率が1日目のものよりも3、7日目のものの方が高い。

これらのことから、プロトプラストの生存能力に影響する結果を示しているのかも知れない。これらの結果をふまえて、期間別プロトプラストを評価すると次のようになる。

1日目, プロトプラスト:大きさが一番小さいため, 次のような危険性がある。つまり, プロトプラストが小さいため核やその他の大きい細胞小器官が単離の際菌糸内に残される確率が高くなるため, 「元気の良い」プロトプラストが少なくなるということである。このことは, 微細構造の観察結果より他の期間のプロトプラストに比べてやや存在率が小さいことなどと一致している。

3日目プロトプラスト:細胞小器官も他に比べて劣る要素もなく, 大きさも三つの中では中間である。ただし, 小胞体と脂肪滴は7日目のプロトプラストには遠く及ばない。しかし, 有核率も一番高く, 二核率についても同様なことがいえるので一番再生能力が高いように思える。

7日目プロトプラスト:細胞小器官については, 3日目のプロトプラストと大体同じようなものである。しかし, 大きさは一番大きいに変形しているものも数多く見られる。このことは, 膜等が変質していてその本来の機能が失われている可能性もある。

これらの評価はほとんどが細胞学的な評価であるので, このように, プロトプラストを評価するためには, やはり再生ということに目を向ける必要がある。したがって, これらについての考察は, 次のセクションで行うことにする。

III-4. プロトプラストの再生

III-4-1 培養期間別プロトプラストの再生

プロトプラストの再生実験は, 単離されたプロトプラストを評価するのに最も重要な実験である。いろいろな担子菌について, 再生実験は行われている。例えば, ヒトヨタケは, プレート効率50%を誇っている¹⁸⁾。一般的に, 担子菌のプレート効率はそれほど高くない。これらのプロトプラストは, 最適の単離条件で単離されたものを用いている。単離条件が一部異なったプロトプラスト同志を, 単離及び再生の結果で総合的に比較した研究はわずかしは見られない¹⁸⁾。我々は, 菌糸の培養期間で比較したプロトプラストを用いて, 再生レベルでプロトプラストの比較を行った。ヒラタケとタモギタケの培養期間別のプロトプラストを用いて, それぞれ再生実験を行った結果を Fig.12 に示す。この結果より, プレート効率は約5~25%の間であり, 1日目はやや低く, 3, 7日目はほとんど同じくらいで1日目よりも高かった。プロトプラストを浸透圧の極端に低い buffer に懸濁したものは, ほとんど再生してこなかった。このことより, 菌糸由来のコロニーは存在しないことが判った。タモギタケはヒラタケよりプレ

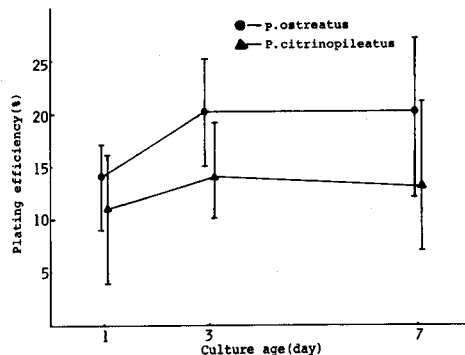


Fig. 12. Influence of culture age on the plating efficiency of *Pleurotus ostreatus* and *P. citrinopileatus*.

ート効率が低く、バラツキも大きい結果となった。これは、タモギタケのプロトプラストがヒラタケに比べて、変形したものや細胞質が崩れているもの (Photo.14) が多かったためであると考えることができる。このことについては、次のセクションで議論することにする。

III-4-2 再生と微細構造

単離されたプロトプラストの細胞小器官、顆粒などの培養期間別の変化は、先に述べたように Fig. 9 のとおりである。この結果と Fig.12 のプレート効率の結果とを比較すると両者の間を関係づけるものは存在していないように思われた。そこで、これらの細胞小器官、顆粒などの各因子のうちプロトプラストの再生に主に関与していると予想される核について詳細に検討し、別の評価をして比較してみることにした。核については、詳細に検討するため次のセクションで述べることにする。

次に、ヒラタケとタモギタケのプレート効率の差について考えてみた。ヒラタケとタモギタケのプロトプラストの電子顕微鏡写真を Photo 10, 14 に示した。タモギタケのプロトプラストは、ヒラタケのそれに比べて全体的に細胞が死んでいる状態に近い変化を起こしていることが判る²⁰⁾。例えば、ミトコンドリアや小胞体の膨潤の進展、リボゾームの破壊、細胞膜の破損、細胞内に認められる器官の消失等がみられる。このようなプロトプラストがヒラタケよりタモギタケの方に多く存在していた。経験的に、ヒラタケよりタモギタケの方がプロテアーゼの働きが強いように思われる。このことが、プロトプラストに影響を与えていて、ひいてはプレート効率の差を代表しているのかもしれない。さらに、タモギタケのプロトプラストはヒラタケのそれより、変形しているものが多く見られた。このことも、プレート効率の差につながっているのではないかと考えられる。

III-4-3 再生と核

プロトプラストの再生にとって、核はなくてはならない存在である。上述したようにヒラタケを例にとると、プロトプラストの有核率は30~35%の間となる。しかし、プレート効率は、5~25%の間にしかない。このことより、核を持っているものはすべて再生できるとは限らないことが判る。特にタイプSのプロトプラストはその大半が再生不能であると考えられる。したがって、これからは、タイプD+タイプMのプロトプラストについてのみ考察することにした。Table 1 よりタイプD+タイプMの有核率及び二核率をヒラタケ及びタモギタケについて Fig.13 に示す。この結果より、有核プロトプラストのうち二核持っているものは、ヒラタケを

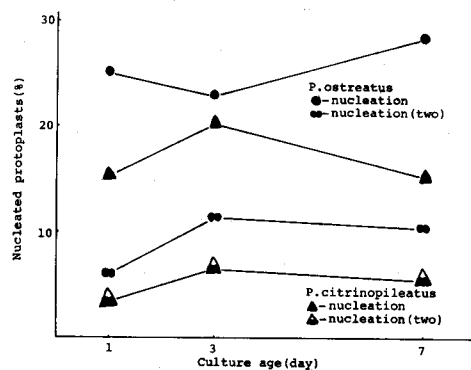


Fig. 13. Influence of culture age on the nucleation and two nucleation of *Pleurotus ostreatus* and *P. citrinopileatus*.

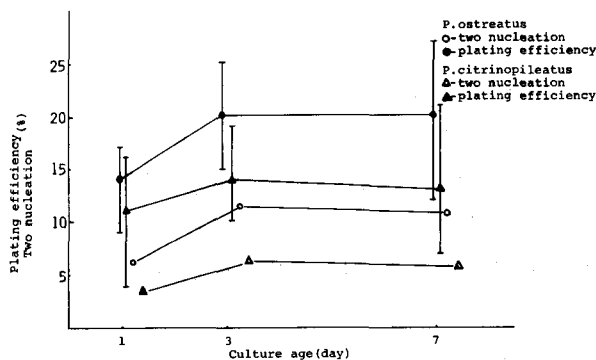


Fig. 14. Influence of culture age on the two nucleation and plating efficiency of *Pleurotus ostreatus* and *P. citrinopileatus*.

例にとると10~17%である。興味深いことにこの二核率の培養期間別変化の傾向は、プレート効率の変化の傾向と非常に近い値となっている。このことをグラフに示したものがFig.14である。我々は以前、ヒラタケのプロトプラストを培養したコロニーを分離して、それらを一つずつ栽培して子実体を発生させる実験を行った。この結果より、プロトプラストは、約96%の割合で子実体を発生した。このことより、ヒラタケのプロトプラストは、二核のものが再生しやすいと仮定することができる。しかし、本当に一核のプロトプラストが再生しないのか、あるいは、二核のプロトプラストに負けてしまうのかどうかははっきりとは判らなかつた。そこで、これらを確認するために、再生コロニーの核及び二核菌糸の特徴であるクランプ構造の観察 (Photo.19) を行い、二核のコロニーの占める割合及び二核菌糸と一核菌糸の成長の違いを観察した。

ヒラタケのプロトプラストについては子実体によって上述した結果となったので、今回はタモギタケのプロトプラストについて実験を行った結果、二核のものは86.5%、一核のものは13.5%の割合で再生していた (Fig.15)。この値より、やはりヒラタケ同様二核のプロトプラストは再生しやすいと考えられる。一核と二核のコロニーの成長の違いを Photo.20 に示す。4つのコロニーのうち、成長の良い3つのコロニーは二核であり、成長の遅いコロニーは一核であった。これらの結果より、一核のプロトプラストは再生するが二核のプロトプラストよりかなり数は少なく成長も遅いことが判った。したがって、プロトプラストのうちで二核のものが、主に再生に関与していると考えられる。なぜ1日目は3、7日目より二核率が低いのであろうか。このことについては、次のセク

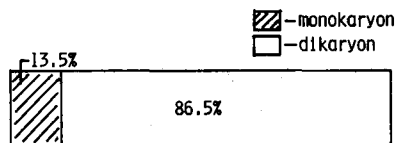


Fig. 15. Rate of monokaryon and dikaryon for regenerative protoplasts of *Pleurotus citrinopileatus*.

ションで考えることにする。

III-4-4 再生と粒度分布

前述したように、細胞小器官は培養期間別のプロトプラストのプレート効率についてほとんど影響を与えないということが推測できた。ただし、核についてだけ、タイプD+タイプMのプロトプラストのうち二核のものの割合を培養期間別に比較した時、プレート効率の変化と同じ傾向を示した。そこで、二核のプロトプラストが主に再生すると考えると、プロトプラストにはある程度の条件が必要となってくる。粒度分布を調べた結果、核の最大直径は約2 μm

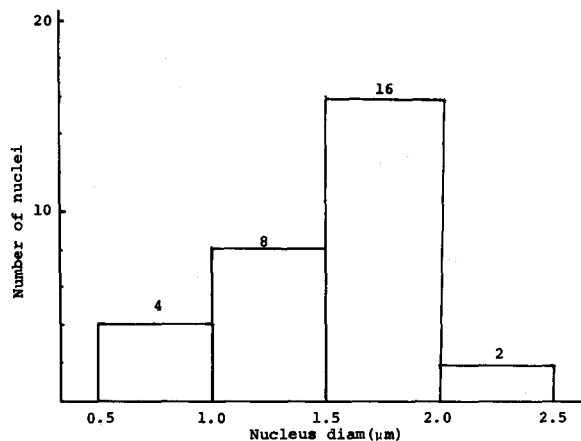


Fig. 16. Size distribution of nuclei in protoplasts.

前後である (Fig. 16) ことから単純に考えるとプロトプラストは最低でも直径4 μm 以上なければならぬ。III-3-4のセクションでも述べたように、核はプロトプラストの直径が大きくなるほどそのプロトプラストに含まれる割合が高くなっている (Fig. 11)。したがって、これが二核の場合はなおさらであると考えられる。そこで、培養期間別にプロトプラストの粒度分布を測定した。Fig. 17, 18はヒラタケ及びタモギタケの粒度分布を示している。これらの結果より、明らかにプロトプラストの直径は培養期間が長くなるにつれ大きくなっていることが判る。つまり、培養期間が長くなるにつれ二核を保有するプロトプラストが多くなっていくと考えることができる。この結果とプレート効率の結果を照らしあわせると、プレート効率は1, 3日目では増加し、7日目では平均値が平衡か又はやや減少するものの、最大プレート効率を比べてみると7日目が一番値は大きくなっているということと、培養期間別による粒度分布が大きい方にシフトするということが一致しているといえる。このように、粒度分布とプレート効率の傾向が一致しているという結果から考えると、一核よりはむしろ二核のプロトプラストにこれらの関係が依存していると考えられるほうが、より正しいと思われる。

III-4-5 培養期間別プロトプラストの評価 (総括)

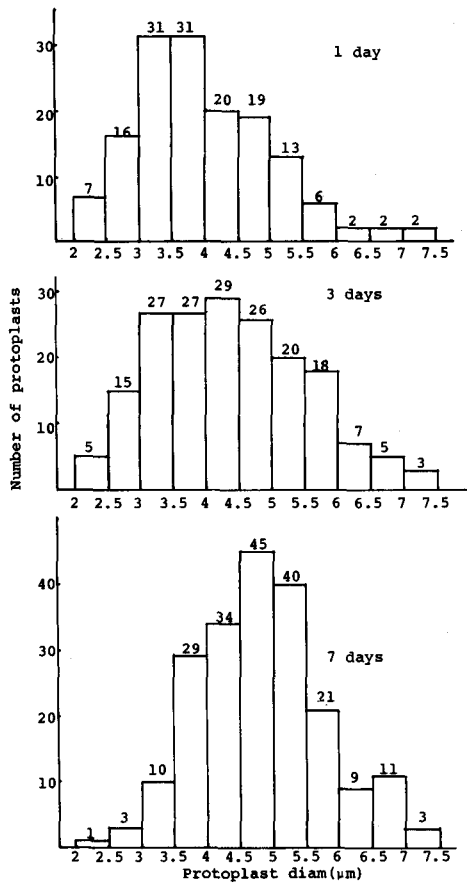


Fig. 17. Size distribution of protoplasts released from each culture aged mycelium of *Pleurotus ostreatus*.

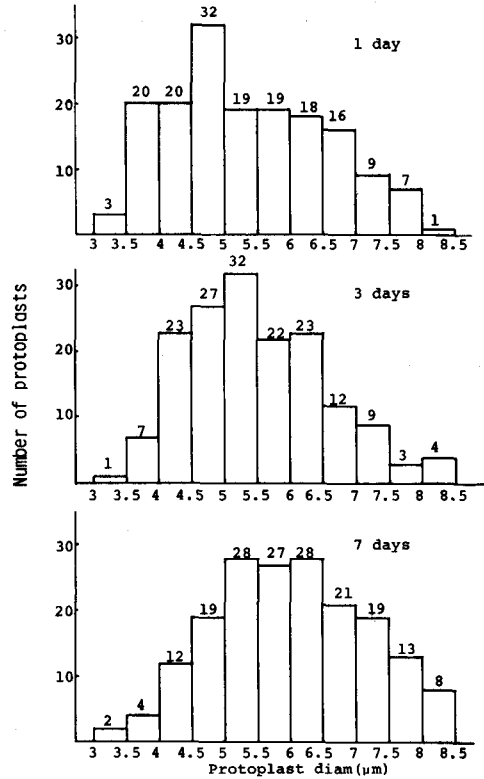


Fig. 18. Size distribution of protoplasts released from each culture aged mycelium of *Pleurotus citrinopileatus*.

以上のような結果より、結論として培養期間別プロトプラストの評価を行うと、プロトプラストの収量が高くなるほどプレート効率も高くなる傾向になっている。核以外の細胞小器官はほとんど期間別プロトプラストのプレート効率に影響を与えない、という評価から再生は核に依存していると考えられる。プレート効率の結果より、培養期間が3~7日と長くなるほうが1日目のプロトプラストより再生しやすいという結果は、プロトプラストの大きさが3, 7日目のほうが1日目のものより大きいため、核がプロトプラストに存在する確率が高くなるためではないかと考えられるからである。さらに、核が二つあるプロトプラストは、一つのプロトプラストより再生コロニーの成長が良いため、大きいプロトプラストを産出する3, 7日目のプロトプラストのほうが1日目のそれより二核を持つ確率が高くなるぶん成長も良い。そのためプレート効率にこのような影響を与えているのではないかと考えられる。また先に述べたように、プロトプラストの収量が高くなるほどプレート効率も高くなる傾向になっているので、

収量が多いときはプロトプラストの大きいものが多く単離されるのではないかと予想される。

したがって、大きいプロトプラストをより多く作る3, 7日目のプロトプラストのほうが1日目のプロトプラストよりいろいろな実験に役に立つと考えられる。しかし、上述したように、7日目のプロトプラストは変形しているものが多く見られた。さらに、単離実験でのバラツキもしばしば起こったので安定した材料となるかどうかは非常に疑問である。

これらのことより、いろいろな実験の材料として適しているのは、3日目のプロトプラストであると考えられることができる。

IV. 結 論

菌糸から単離されたプロトプラストを評価するために次の四つの項目について検討を行った。

- 1) 培養期間別菌糸の電子顕微鏡観察
- 2) それらの菌糸からプロトプラストの単離の様子
- 3) 単離されたプロトプラストの電子顕微鏡観察
- 4) 単離されたプロトプラストの再生

これらの項目ごとの結果は前章で示したとうりである。これらの結果に基づいて以下のよう結論づけることができた。

1) 培養期間別の菌糸の代表的な培養期間を決定するために菌体の絶乾重量を測定し、その結果より、1, 3, 7, 13, 18日目及び種菌(0日目とする)の微細構造を観察、比較した。細胞小器官の発達やその存在率を考慮して検討した結果、菌糸集団として一番若いあるいは一番元気の良い状態のものは3, 7日目の菌糸と考えられた。

2) 培養期間別の菌糸からそれぞれプロトプラストを単離した結果、収量は1~3日目まで増加するが3~7日目ではほとんど平衡で7日目以降減少して、13日目以降ではほとんど単離されなかった。この結果より、収量も良く、再現性もある1, 3, 7日目の菌糸から単離されたプロトプラストについて、観察及び再生実験を行うことにした。これらのプロトプラストは菌糸の由来にちなんで1, 3, 7日目の期間別プロトプラストと呼ぶことにした。

3) 単離されたヒラタケ及びタモギタケのプロトプラストを培養期間別に観察した結果、次のようになった。単離されたプロトプラストの形態的観察の結果、全期間にわたって、細胞壁は観察されず、3つのタイプ、すなわち、細胞質の密度の高いもの、細胞質の密度の低いもの、それらの中間型のもの、の3つに分けることができた。細胞質の密度の低いものは著しく生存能力が欠けていると考えることができた。ヒラタケでは細胞質の密度の高いものと中間型のものが培養期間を問わず、全体の約90%に、タモギタケでは約50%になった。一方微細構造については、1, 3, 7日目のプロトプラストの細胞小器官を比較した結果、核の平均面積及び有核率は3日目のものが1, 7日目のものよりやや大きく、ミトコンドリアの数は3, 7日

目が多くなっている反面、平均面積は他の期間と比べてほとんど同じであった。液胞は培養期間が長くなるにつれ数は増加し、平均面積は減少していった。小胞体及び脂肪滴は1, 3日目はほとんど同じであるが、それぞれ7日目には急増していった。

4) これらのプロトプラストを用いて再生実験をおこなった結果、培養期間別のプレート効率は1日目のプロトプラストが3, 7日目のものよりも低いことを示した。そこで、このプレート効率の傾向と先ほどの微細構造の変化を比較してみた所、核以外に両者を関係づけるものは見あたらなかった。再生に主に参与していると考えられる核について詳細に検討した結果、細胞質の密度の高いものと中間型のものの二核率の変化の傾向が、プレート効率の変化の傾向とほとんど一致していた。このことより、二核のものが主に再生に参与していると考えられた。そこで、それを確かめるため分離したコロニーを観察した結果、二核のコロニーは一核のそれよりも約6.5倍に達していた。このことより、二核のプロトプラストが主に再生に参与していると考えることができた。そこで、さらに培養期間別により二核率が異なる理由を検討したところ、プロトプラストの核はプロトプラストの直径が大きいほど含まれる確率が高いことから、このことはプロトプラストの粒度分布に帰着しているのではないかと考えることができた。培養期間別にプロトプラストの粒度分布を測定してみると、培養期間が長くなるにしたがい、大きいプロトプラストが含まれる割合が高くなっていくことが判った。この結果より、プロトプラストの再生はプロトプラストの大きさに大きく参与しているということが判った。また、プロトプラストの収量もプレート効率と同じ傾向を示すので、収量が多いときは大きいプロトプラストが単離されることができた。しかし、大きいプロトプラストを多く含んでいる7日目のプロトプラストのプレート効率は3日目とほぼ同じかそれ以下を示していた。このことは、7日目のプロトプラストに変形したものが多く含まれていることが原因ではないかと考えられた。

以上のことより、融合実験等の安定した材料としては3日目の菌糸から単離されたプロトプラストが適していると考えられた。

今後は、融合率及びプレート効率の高いプロトプラストを数多く産出する研究が必要であると考えられる。電気融合では、やはりプロトプラストの大きさが大きく、粒度も一定であるプロトプラストを単離することが望ましい。また、今回の結果のように、再生にもプロトプラストの大きさが大きく、変形の数少ないものが適している。したがって、今後は細胞質密度の高い大きいプロトプラストを数多く単離することが必要となる。そのためには、加水分解条件の検討、すなわち細胞壁を広範囲に溶解し、大きいプロトプラストを産出する条件の検討が必要不可欠であると考えられる。したがって、今後はこれらについての詳細な研究が望まれるであろう。また、微細構造については再生に関する評価を核のみについてしか行わなかったため、その各因子についても詳細に検討することが必要であると考えられる。

今回の研究では融合実験を行うことができなかったが、我々の以前の報告⁵⁾では培養期間

が2日目までのプロトプラストでは電気的手法による融合ではほとんど融合が起こらない結果となっていた。このことは、今回の結果と融合レベルの評価を組合わせてプロトプラストを評価した際に、やはり、3日目のプロトプラストが最適条件であるということを示すかも知れない。これらの研究は、プロトプラストを評価するに当たって必要不可欠なものであるため今後の研究成果に対する期待が大きいであろう。

本研究を行うに当たり、多大なる便宜をはかって下さった、低温科学研究所生理学部門の匂坂勝之助教授、木材理学講座の高部圭司助手に謝意を表する次第である。

(本研究の一部は昭和59~61年度科学研究費補助金一般研究C(研究代表者:三浦 清)によって行われた。)

参考及び引用文献

- 1) 大政正武, 農業および園芸第60巻第1号: 200-204 (1985)
- 2) T. KIGUCHI, S. O. YANAGI; Appl. Microbiol. Biotechnol.22: 121-127(1985).
- 3) 豊増啓朗, 松本卓生, 森寛一, 第28回日本菌学会要旨集: 60 (1985).
- 4) 杉山浩一, 小川喜八郎, 日本農芸化学会西日本支部大会発表研究 (1986).
- 5) 西口恭彦, 卒業論文: 1-86 (1985).
- 6) R. USHIYAMA, Y. NAKAI: Rept. Tottori. Mycol. Inst (Japan) 15: 1-5 (1977).
- 7) H. C. HOCH, R. J. HOWARD; Protoplasma 103: 281-297 (1980).
- 8) E. M. SCOTT, S. P. GORMAN, L. R. WRIGHT: Sabouraudia Journal of Medical Veterinary Mycology 23: 31-36 (1985).
- 9) 本山誠治, 採集と飼育第44巻8号: 388-389 (1982).
- 10) 柳田友道, 微生物化学第2巻: 166 (1981).
- 11) 柳田友道, 微生物化学第2巻: 336 (1981).
- 12) Y. NAKAI: Rept. Tottori. Mycol. Inst.(Japan) 14: 91-94 (1976).
- 13) D. C. PEASE: J. Ultrastruct. Res. 21: 98 (1967).
- 14) R. E. SCOTT, J. W. COSTERRON, G. M. GAUCHER: Can. J. Mycobiol. 32: 687-699 (1984).
- 15) J. G. H. WESSELES, O. M. H. DE VRIES: Journal of General Microbiology 73: 13-22 (1972).
- 16) K. R. THOMAS, B. DAVIS, J. MILLS: Trans. Br. Mycol. Soc. 82 (3): 405-411 (1984).
- 17) 西口恭彦, 三浦 清, 藤川清三, 香山 彊, 第36回日本木材学会発表研究 (1986).
- 18) S. O. YANAGI, M. MONMA, T. KAWASUMI: Agri. Biol. Chem 49 (1): 171-179 (1985).
- 19) T. HASHIBA, M. YAMADA; Phytopathology 74: 398-401 (1984).
- 20) A. H. WYLLIE: "Cell death: new classification separating apoptosis from necrosis" in Cell Death in Biology and Pathology: 9-29 Pubrihed Chapman and Hall (1981).

Summary

The ultrastructure of the mycelia and the protoplasts from mycelium were observed at various culture stages of the mycelium. Futhermore, between the differences of the ultrastructures of these samples and the regeneration of these protoplasts were investigated. Mycelia of *Pleurotus ostreatus* and protoplasts from mycelium of *P. ostreatus* and *P. citrinopileatus* were

prepared for the investigation.

The protoplasts from 3 day and 7 day mycelia showed a higher percentage of two nucleated protoplasts among the protoplasts containing a dense or medium concentration of cytoplasm than those from 1 day mycelium. The difference of the rate of regeneration of the protoplasts from the mycelium of the different culture stages was of a similar pattern. This seemed to indicate that the regeneration of protoplasts could be strongly influenced by the presence of two nuclei. This assumption was supported by the fact that the number of dikaryon was about 6.5 times as many as those of monokaryon in the regenerated colony.

On the basis of distribution of the size of protoplasts obtained from the mycelium from different culture stages, it was found that the number of larger protoplasts, which tended to have two nuclei, increased with the longer period of culture. However, larger numbers of deformed protoplasts were observed in the protoplasts from 7 day mycelium than those in other protoplasts.

From these results, it was concluded that the regenerated protoplasts tended to have two nuclei and that the protoplasts from 3 day mycelium, which could also have two nuclei, were the most suitable for regeneration.

写真説明

(Explanation of Photographs)

- Photos 1.** (A) (B) Thin section electron micrographs (TEM) of *P. ostreatus* hypha cultured for 3 days in onion-soy sauce medium.
(C) A freeze-fracture electron micrograph of *P. ostreatus* hypha cultured for 3 days.
(D) A freeze-fracture electron micrograph of *P. ostreatus* hypha cultured for 3 days. Arrows show the cell wall around the hyphal cytoplasm.
- Photos 2.** (A) A TEM of the 7 day cultured *P. ostreatus* hypha, showing a septum.
(B) A TEM of the 3 day cultured *P. ostreatus* hypha, showing a blump connection.
- Photos 3.** A TEM of the 13 day cultured *P. ostreatus* mycelia, which show (A) dispersed cytoplasm, and (B) the cell wall connection between adjacent hypha (between arrows).
- Photos 4.** (A) A TEM of the 1 day cultured *P. ostreatus* hypha.
(B) A freeze-fracture electron micrograph of *P. ostreatus* hypha cultured for 7 days. These nuclei were elongated in parallel to the long axis of the hypha. Arrows show the nuclear membrane.
- Photo 5.** A TEM of the 7 day cultured *P. ostreatus* hypha. The cristae are oriented in parallel with the long axis of the hypha.
- Photo 6.** A TEM of the 18 day cultured *P. ostreatus* hypha, showing intensely vacuolated cytoplasm and widely distributed peripheral particles.

- Photos 7.** A, B, C, D indicate the change of the number of IMP (intramembrane particle) with the elapse of time of culture age. A, 3 day; B, 7 day; C, 13 day; D, 18 day *P. ostreatus*. The number of the particles increases as the culture ages from 3 to 13 days elapse and then decreases to 18 days.
- Photos 8.** A TEM of the 3 day cultured *P. ostreatus*, showing the hypha after 15 min hydrolysis. The hypha cell show the plasmolysis.
- Photos 9.** Light micrograph of the 3 day cultured *P. ostreatus* mycelia and protoplasts released from the hypha, after incubation of 15 min in the enzymes. (solusion at 30 °C.) Protoplasts are reverated from the loosely oriented mycelia, in the initial stage of the enzym treatment.
- Photos 10.** (A) A TEM of *P. ostreatus* protoplast cultured for 3 days.
(B) A TEM of *P. citrinopileatus* protoplast cultured for 3 days.
The protoplasts have dense cytoplasm. (Type D)
- Photos 11.** A TEM of the 3 day cultured *P. ostreatus* protoplast, showing a sparse cytoplasm. (Type S)
- Photos 12.** A freeze-fracture electron micrograph of the 3 day cultured *P. ostreatus* protoplast, showing the complete hydrolization of the cell walls.
- Photos 13.** A freeze-fracture electron micrograph of the 3 day cultured *P. ostreatus* protoplast, showing the nonuniform distribution of IMP on the fracture face.
- Photos 14.** (A) A TEM of *P. ostreatus* protoplast cultured for 7 days.
(B) A TEM of 3 day cultured *P. citrinopileatus* protoplast presumably the apparent lacking their viability.
- Photos 15.** A TEM of *P. citrinopileatus* protoplast cultured for 3 days.
This protoplast has a moderately dense cytoplasm (Type M).
- Photos 16.** A TEM of the 7 day cultured *P. ostreatus* protoplast, showing a deformation of the shape.
- Photos 17.** A TEM of the 7 day cultured *P. ostreatus* protoplast, showing a two nucleation.
- Photos 18.** A freeze-fracture electron micrographs of the 3 day cultured *P. ostreatus*, showing (A) IMP-free areas on the fracture face, (B) and a rough fracture face.
- Photos 19.** A light micrograph of hypha from the regenerated colony of *P. ostreatus* protoplast, showing (A) a clump connection of dikaryon, (B) and the two nucleation of dikaryon, and (C) no clump connection of monokaryon.
- Photos 20.** This shows the difference of mycelial growth between monokaryon and dikaryon of *P. citrinopileatus*. The smallest colony is a monokaryon and others are dikaryon.

Abbreviations in photos: N=nucleus, M=mitochondrion, V=vacuole ER=endoplasmic reticulum, PP=peripheral particle, CW=cell wall, No=nucleolus, L=lipid droplet, IMP=intramembrane particles

