



Title	電気融合法による食用担子菌の品種改良に関する研究：担子菌の生育過程に於ける菌体のプロトプラストの性状について
Author(s)	玉井, 裕; TAMAI, Yutaka; 三浦, 清 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 45(3), 833-854
Issue Date	1988-06
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/21278">https://hdl.handle.net/2115/21278</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	45(3)_P833-854.pdf



# 電気融合法による食用担子菌の 品種改良に関する研究

——担子菌の生育過程に於ける菌体のプロトプラストの性状について——

玉井 裕\* 三浦 清\* 香山 彊\*

Studies on Breeding of Edible Basidiomycetes by Electric-fusion  
—— Characterization of Protoplasts from Various Mycelia ——

By

Yutaka TAMAI\*, Kiyoshi MIURA\* and Tsutomu KAYAMA\*

## 要 旨

本研究では、細胞融合に適したプロトプラストの調製方法を検討することを目的として、4つの形態の菌体（1次菌糸、2次菌糸、子実体、担子孢子）のプロトプラストの性状について、調製方法及び収量、粒度分布、再生率等を電氣的細胞融合法（dielectrophoresis chamber法）を前提として検討した。

1次菌糸及び2次菌糸のプロトプラストは、ヒラタケ、タモギタケ共に、粒度分布幅は3~10  $\mu\text{m}$ （平均粒径約5  $\mu\text{m}$ ）で、菌糸片等の混入が目立った。子実体のプロトプラストは粒度分布幅は4~20  $\mu\text{m}$ （平均粒径約10  $\mu\text{m}$ ）で、分布幅は1次菌糸及び2次菌糸のものに比べて約2倍であった。担子孢子のプロトプラストの粒度分布幅は3~6  $\mu\text{m}$ （平均粒径約4  $\mu\text{m}$ ）で他と比べて若干小径であるが、粒形の均一性は高かった。

再生率が比較的高いこと、再生に要する日数が短いこと、粒径の均一性が高いこと等から判断して、担子孢子のプロトプラストが最も適性が高いと考えられた。

キーワード：食用担子菌，プロトプラスト，電気融合法，融合適性，担子孢子。

## 目 次

I 緒 言	834
-------	-----

1988年2月29日受理 Received February 29, 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.

II 実験操作	835
II-1 供試菌	835
II-2 培地の調製	835
II-3 供試菌体の調製	836
II-3-1 2次菌糸	836
II-3-2 子実体	836
II-3-3 担子孢子	837
II-3-4 1次菌糸	837
II-4 プロトプラストの調製方法	837
II-4-1 加水分解酵素溶液の組成	837
II-4-2 1次菌糸及び2次菌糸からのプロトプラストの調製	838
II-4-3 子実体からのプロトプラストの調製	838
II-4-4 担子孢子からのプロトプラストの調製	838
II-5 粒度分布の測定	839
II-6 再生率の測定	839
III 結果	839
III-1 各菌体からのプロトプラスト調製条件	839
III-1-1 子実体からのプロトプラスト調製条件	839
III-1-1-1 酵素条件	839
III-1-1-2 酵素溶液の浸透圧	841
III-1-2 担子孢子からのプロトプラスト調製条件	842
III-1-2-1 酵素条件	842
III-1-2-2 酵素溶液の浸透圧	843
III-2 プロトプラストの粒度分布	843
III-3 プロトプラストの再生率	852
IV 考察	852
V 総括	853
VI 謝辞	854
参考文献	854

## I 緒 言

現在のキノコの栽培に於ける問題点として、病害または虫害、原木の不足、嗜好の多様化、品質の低下、諸外国との市場に於ける競争等が挙げられる。この様な問題に対してこれまでは、栽培方法及び施設の改善、または従来の育種方法（選抜育種、交配育種等）によって事態の改善を試み、かなりの効果を上げて来た。しかしながらこれらの方法によっても対処しきれない場合が多々あるのも現実である。このような状況下で特にキノコの育種について一際注目されてきたのは、バイオテクノロジーを応用した技術であり、中でもキノコ産業への応用が期待されているのが細胞融合技術である。即ち、細胞融合法の適用により、例えば従来不可能であった異種、異属間雑種の作出の可能性が期待されている。

細胞融合法として現在用いられている方法は、主にポリエチレングリコール (PEG) を用いた融合方法<sup>1)</sup>と電氣的融合方法<sup>2,3,4,5)</sup>である。PEG 法はその手軽さから以前から広く研究され、

また一部には実用化されたものもある。しかし、細胞に対しての毒性、融合頻度が低い等の問題がある。それに対して電気的融合法は、PEG法に比べて設備に若干の費用がかかるものの、細胞に対して殆ど影響を与えずに高い頻度での融合が得られる。

食用担子菌にはその生育過程に於いて数種の生活形態(担子胞子、1次菌糸、2次菌糸、子実体)があるが、一般にプロトプラストを調製する際に使われる菌体の大半は、1次菌糸もしくは2次菌糸である。他の生活形態に於ける菌体のプロトプラストについての報告は少ない。

種々の融合方法を効率よく活用するため、また融合体の判別に関して、対象となる菌株が元来持っている形質を利用した方法や代謝阻害剤を利用した方法等を有効に活用するために、一つの菌株に由来するが、各々異なった形状の菌体から得られたプロトプラストの性状を調べることは重要である。そこで本研究では、細胞融合に適したプロトプラストの調製方法を検索することを目的として、前述の主な4つの形態の菌体のプロトプラストの性状について、調製方法及び収量、粒度分布、再生率等を電気的細胞融合(dielectrophoresis chamber法<sup>4,5</sup>)を前提として検討した。

## II 実験操作

### II-1 供試菌

タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* (Pers.) Rolland) 76-5 系統株

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer) 73-12 系統株

北海道立旭川林産試験場より譲り受けた上記二系統の菌株(2次菌糸)を実験に使用した。

### II-2 培地の調製

#### ● 醤油玉葱培地 (SO 培地)

15%玉葱抽出液 150 ml に醤油 40 ml, グラニュー糖 25 g を加えた後、脱イオン水を加えて 1 l としたものの。但し、寒天培地には寒天を 2%, 再生培地には更にサッカロースを 0.5 M 加えた。

#### ● 振盪培養培地

澱粉 20 g, 砂糖 20 g, ポリペプトン 1.5 g, 粉末酵母エキス 3 g を 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 5.0) 100 ml, 5%硫酸マグネシウム溶液 10 ml, 微量塩類溶液 (0.1%塩化第一鉄, 0.1%硫酸マンガン, 0.04%塩化亜鉛, 0.01%硫酸銅) 10 ml, 5%塩化カルシウム溶液 10 ml 及び脱イオン水 870 ml に溶かしたもの。

尚、培地は大豆油 0.5 ml, 石英砂 (5~8 メッシュ) 4 g の入った 500 ml 容振盪フラスコに 300 ml ずつ分注して使用した。

#### ● 木粉培地

シベリアニレの鋸屑 (10 メッシュ通過) と栄養素を容積比 4:1 で混合し、蒸留水を加え含水率を約 65% に調製したもの。尚、栄養素としてはタモギタケには米糠 (20 メッシュ通過) を、

ヒラタケにはフスマを用いた。

培地は全てオートクレープで 120°C, 1.2 気圧の加圧滅菌を行った後に使用した。滅菌時間は液体培地及び寒天培地については 10 分間、木粉培地については 90 分間であった。

### II-3 供試菌体の調製

プロトプラストの調製に使用した菌体の調製方法のフローチャートを Fig. 1 に示す。また各々の調製方法を、以下に調製順に詳述する。

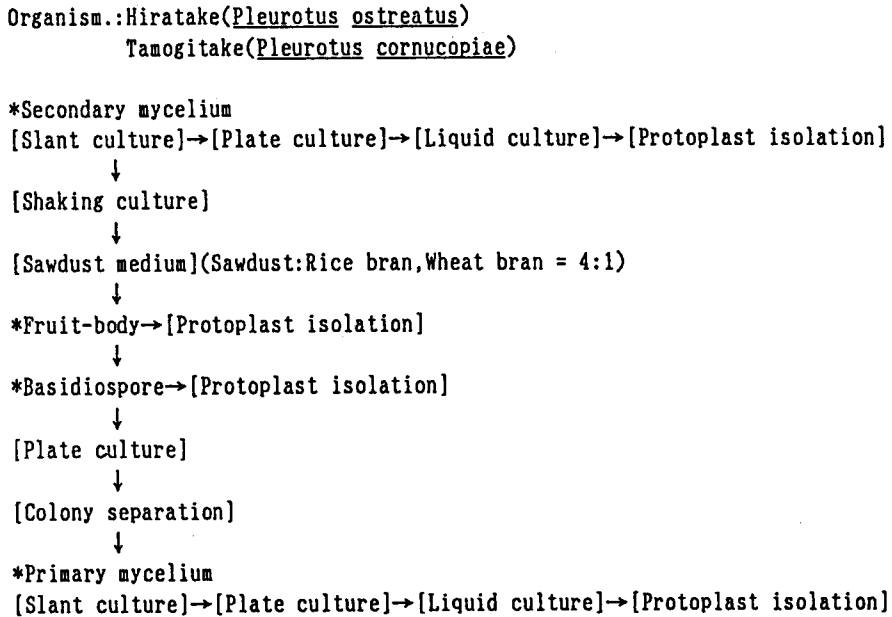


Fig. 1. Preparation procedure of mycelia.

#### II-3-1 2次菌糸

SO 斜面培地から SO 平面培地上に生育させた菌体の先端部をコルクボーラーで打ち抜き、それを攪拌子とガラスビーズの入った SO 液体培地に接種し、タモギタケについては 10 日間、ヒラタケについては 7 日間、23°C で培養した。培養期間中一日置きにマグネチックスターラーにより攪拌を行った。

#### II-3-2 子実体

振盪培養によって増やした種菌（2次菌糸）を小型栽培瓶（ワンカップ瓶）の木粉培地に接種し、23°C, 湿度 70%, 暗黒下で 14 日間培養したものを種菌とした。更にその種菌を小型栽培瓶の木粉培地に接種し、同上の条件で培養した後に湿度 90%, タモギタケについては 23°C, ヒラタケについては菌掻きを行った後 16°C, 蛍光灯照明下（約 700 lux）で発茸させた。発茸に要した日数はタモギタケが約 5 日間、ヒラタケが約 10 日間であった。

## II-3-3 担子孢子

成熟した子実体から傘を切り取り、滅菌したビーカー中で無菌的に担子孢子を集めた。

## II-3-4 1次菌糸

無菌的に集めた担子孢子を滅菌水で数回洗浄した後、SO平面培地上にプレートし、形成されたコロニーを分離し、顕微鏡下でクランプを形成していないことを確認した上でSO斜面培地上に保存した。実験には2次菌糸と同様の手順で培養した菌体を使用した。

## II-4 プロトプラストの調製方法

プロトプラストの調製手順のフローチャートを Fig. 2 に示す。

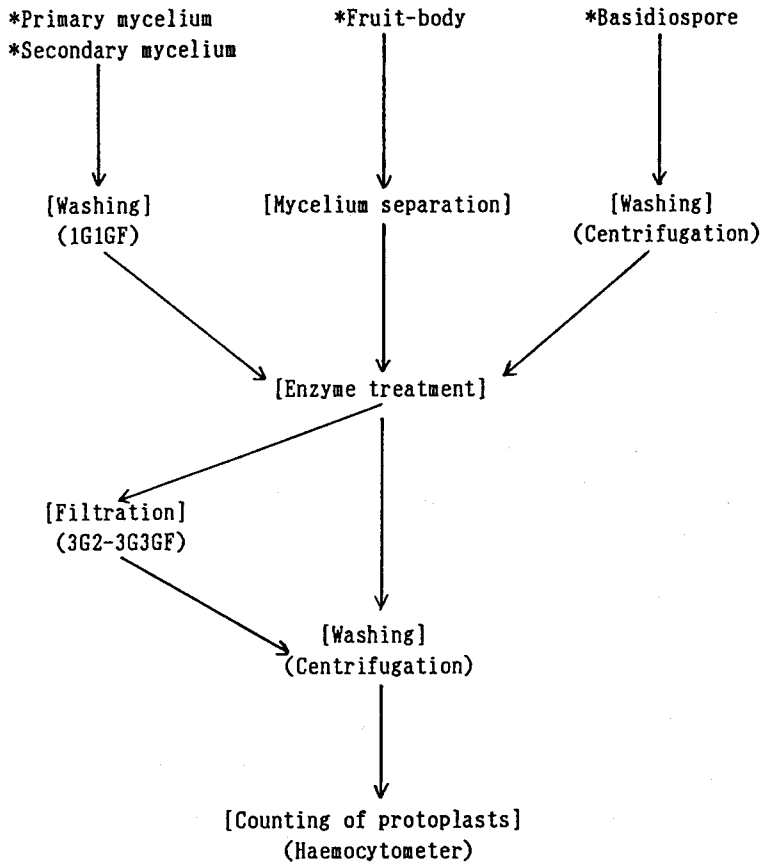


Fig. 2. Isolation procedure of protoplasts.

## II-4-1 加水分解酵素溶液の組成

プロトプラストの調製に使用した酵素は以下の通りである。

セルラーゼオノズカ R-10 (*Trichoderma viride* 由来)

(Yakult HONSHA CO., LTD.)

ザイモリアーゼ 20 T (*Arthrobacter luteus* 由来)

(Seikagaku kogyo CO., LTD.)

キチナーゼ No. C-6137 (*Streptomyces griseus* 由来)

(Sigma Chemical Company)

ウスキザイム (*Trichoderma sp.*由来)

(Usukiseiyaku CO., LTD.試作品)

酵素の組合せについてはIII-2で述べる。

以上の酵素を0.5~0.7 M マニトール+0.05 M リンゴ酸溶液 (1 N 水酸化ナトリウム溶液でpH 5.6に調整したもの)に溶かし、孔径0.2  $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過滅菌して使用した。尚、浸透圧調整剤として加えたマニトールの濃度は、1次菌糸及び2次菌糸の場合は0.5 Mとし、子実体及び担子胞子の場合は0.5 M, 0.6 M, 0.7 Mの3条件を用いて検討した。

#### II-4-2 1次菌糸及び2次菌糸からのプロトプラストの調製

前記の手順で培養した菌体を1 G 1 グラスフィルター上に集め、脱イオン水で数回洗浄した後、菌体約100 mgを取り、セルラーゼ2%, ザイモリアーゼ0.6%, キチナーゼ6 unitsを含む酵素溶液1 mlに懸濁して、30°C, 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。加水分解終了後、3 G 2-3 G 3のグラスフィルターで未加水分解の菌体を除去し、700×g, 10分間の遠心分離による洗浄を3回行った後に、一部をトーマ血球計数盤上に取り、プロトプラスト収量を測定し、以後の実験に使用した。

#### II-4-3 子実体からのプロトプラストの調製

子実体基部から無菌的に分離した菌体約100 mgを酵素溶液1 mlに懸濁し、デシケーター内で2分間減圧し酵素溶液を菌体に浸透させた後、30°C, 3~6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。その後、前述と同様の手順で収量の測定を行い調製条件を検討し、最適条件によって得られたプロトプラストを以後の実験に使用した。

#### II-4-4 担子胞子からのプロトプラストの調製

子実体から無菌的に集めた担子胞子を滅菌水で遠心分離により数回洗浄した後、血球計数盤により担子胞子数を計数した。計数値をもとに担子胞子数が $1 \times 10^8$ になるように調整した。遠心分離により担子胞子を沈澱させ、上澄みを除いたところに酵素溶液1.5 mlを加え、タッチミキサーにより十分に懸濁し、30°C, 1~6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。その後、前述と同様の手順で収量の測定を行い、調製条件を検討し、最適条件によって得られたプロトプラストを以後の実験に使用した。

プロトプラスト収量は1次菌糸, 2次菌糸及び子実体については、菌体100 mgに対して得られたプロトプラスト数を1 ml当たりの個数に換算しプロトプラスト収量とした。また担子胞子については、担子胞子 $1 \times 10^8$ 個に対して得られたプロトプラスト数を1 ml当たりの個数に換算しプロトプラスト収量とした。

## II-5 粒度分布の測定

各々のプロトプラストの形態を顕微鏡下 (1500 倍) で観察した後, ランダムに 1 サンプル当たり 10 枚ずつ写真を撮影した (撮影倍率 375 倍)。写真上で 300~400 個のプロトプラストの径を計り, 粒度分布を測定した。

## II-6 再生率の測定

収量測定後の各々のプロトプラスト懸濁液を適当濃度 (1 次菌糸, 2 次菌糸及び担子孢子: 約 200 個/ml, 子実体: 約 1000 個/ml) に希釈し, SO 再生平面培地上にプレートした。23°C で数週間培養した後, 培地上に形成されたコロニー数 (R) を計数した。また比較として, 各々のプロトプラストを滅菌水で前記と同濃度に希釈してプロトプラストを破壊した後プレートし, 形成されたコロニー数 (B) を計測した。

再生率の算出方法は以下に示す通りである。

$$\frac{(R) - (B)}{(\text{プレートしたプロトプラスト数})} \times 100$$

## III 結 果

### III-1 各菌体からのプロトプラスト調製条件

プロトプラスト調製条件は, 収量が多いこと, 菌糸片等の混入が少ないこと, 不整形のものが少ないことを検討基準とした。

2 次菌糸からのプロトプラスト調製条件は, 西口の研究<sup>6)</sup>に於いて最適とされた条件 (II-4-2) を使用した。プロトプラスト収量は, タモギタケ  $7 \times 10^6$ , ヒラタケ  $4 \times 10^6$  であった。1 次菌糸については予備実験として同条件を適用したところ, 良好な結果が得られたため, 同条件を使用した。プロトプラスト収量は,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  であった。

#### III-1-1 子実体からのプロトプラスト調製条件

##### III-1-1-1 酵素条件

実験に使用した酵素の組合せは以下に示す通りである。

- セルラーゼ 2%, キチナーゼ 6 units, ザイモリアーゼ 0.6%
- セルラーゼ 2%, キチナーゼ 12 units, ザイモリアーゼ 0.6%
- ウスキザイム 1%
- ウスキザイム 2%

以後, 仮にこれらの 4 つの条件を上から順に, CCZ-6, CCZ-12, UZ-1, UZ-2 と各々表記する。

各々の酵素を 0.5 M マニトールで浸透圧を調整したリンゴ酸緩衝液 (pH 5.6) に溶かして使用した。加水分解時間を 3 時間から 6 時間まで設定し, 1 時間毎にプロトプラスト収量を測定した。タモギタケの子実体についての結果を Fig. 3 に示す。図に明らかなように, CCZ-6 で

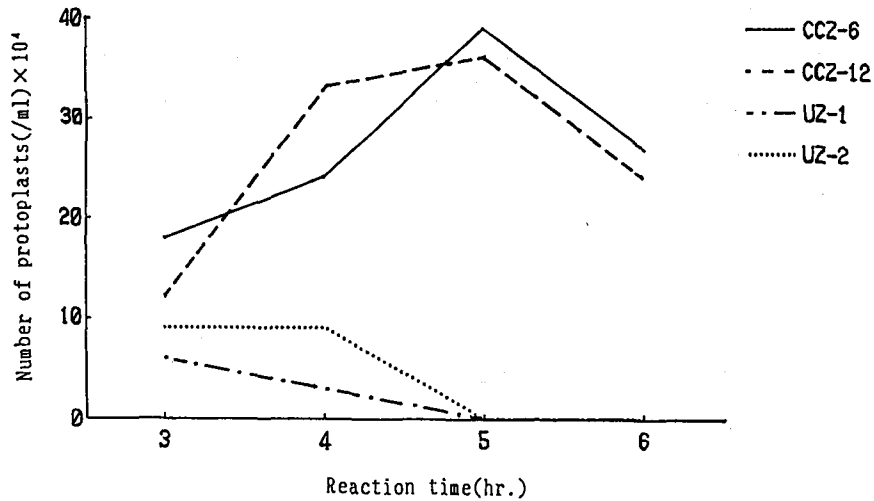


Fig. 3. Influence of enzyme composition in the solution on the formation of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus cornucopiae*).

加水分解5時間目に最大収量 ( $3.9 \times 10^5/\text{ml}$ ) を得たため、ここでは一応酵素条件として、酵素組成セルラーゼ2%, キチナーゼ6 units, ザイモリアーゼ0.6%, 加水分解時間は5時間を採用した。しかし、実用上不十分な収量であるため、植物のプロトプラスト調製法に用いられ<sup>7)</sup>、しかも比較的プロトプラストに対してダメージが少ないと思われる牛アルブミン (BA) を酵素溶液 (CCZ-6) に添加して加水分解を5時間行いその効果を調べた。その結果を Fig. 4 に示す。添加量 0.2% までは収量は増加したが、0.4% 以上では効果が認められなかったため、アルブミ

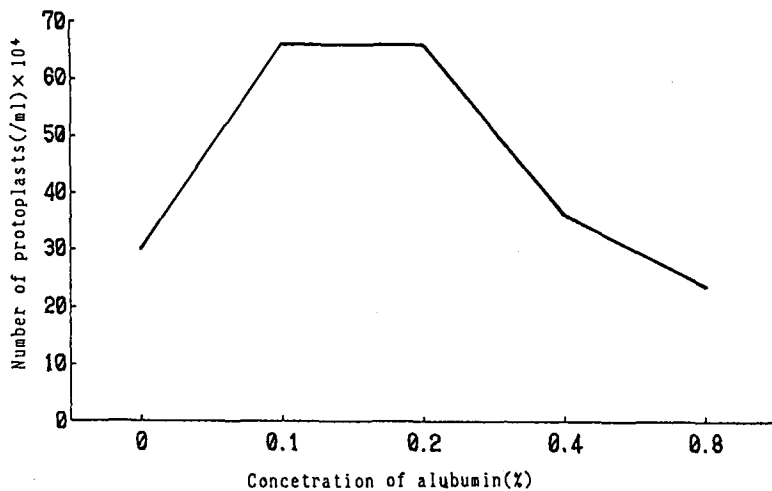


Fig. 4. Influence of concentration albumin on the formation of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus cornucopiae*).

ン添加濃度は0.1%とした。

### III-1-1-2 酵素溶液の浸透圧

前項に於いて、CCZ-6により一応最大収量を得、またアルブミンの添加により収量の増加は認められたものの、まだ実用上不十分な値であった。そこで、更に酵素溶液に加える浸透圧調整剤(マニトール)の濃度を变化させて収量を調べた。その結果をFig.5に示す。収量に関

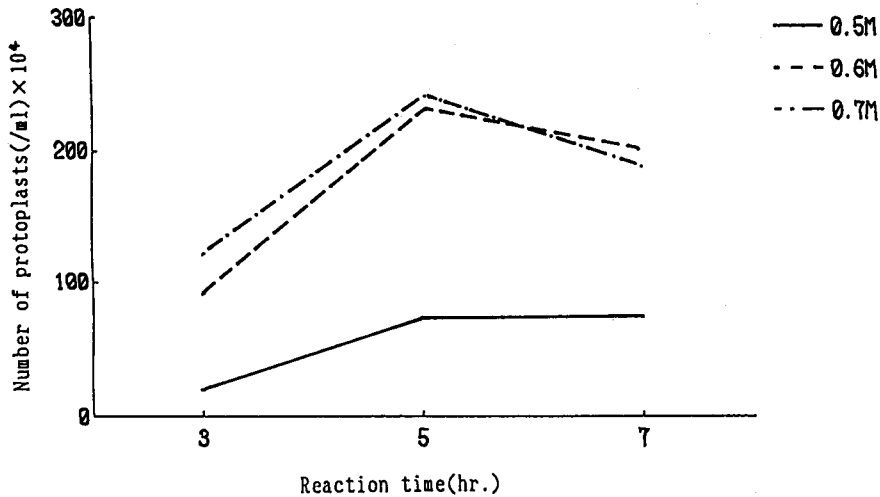


Fig. 5. Influence of concentration of osmotic stabilizer on the formation of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus cornucopiae*).

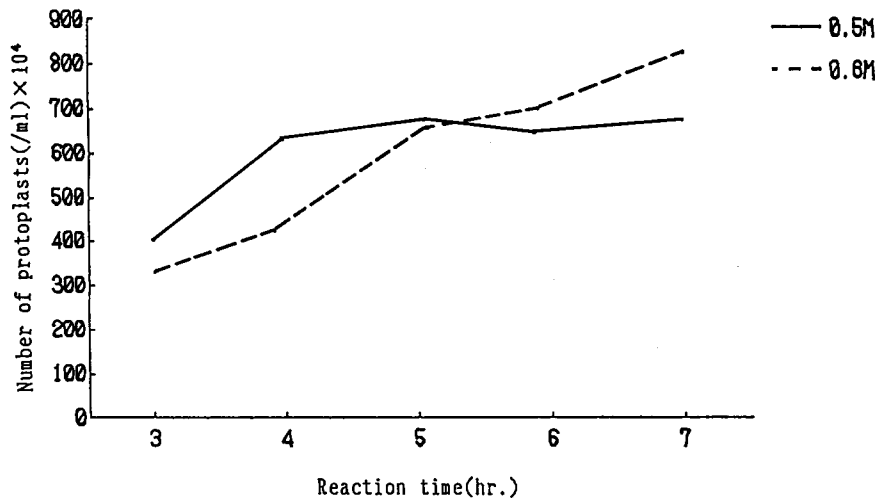


Fig. 6. Influence of concentration of osmotic stabilizer on the formation of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus ostreatus*).

してのみ評価すれば、0.7 M の条件が最も優れていると思われた。しかし、各々の浸透圧調整剤濃度に於いて最大収量を示した条件によって得られたプロトプラストを観察したところ、0.5 M のものには破片もしくは菌糸片が多く見られた。また0.7 M のものには不整形のプロトプラストが多く見られた。0.6 M のものには破片、不整形なもの等は少なかった。そこで浸透圧調整剤濃度は0.6 M を採用した。以上はタモギタケの子実体について検討を行ったものであるが、ここで得られた最適条件をヒラタケの子実体に対して適用した結果を Fig. 6 に示す。収量は時間経過と共に増加しているが、加水分解6時間目以後のプロトプラストには不整形なものが多く見られたため、加水分解時間は5時間が適当と判断した。

以上の結果より、タモギタケ及びヒラタケの子実体からのプロトプラストの調製条件は、酵素組成セルラーゼ2%、キチナーゼ6 units、ザイモリアーゼ0.6%で、牛アルブミン0.1%を添加し、0.6 M マニトールによって浸透圧を調整した酵素溶液により、30°C、5時間加水分解を行うこととし、この条件によって得られたプロトプラストを以後の実験に使用した。尚、同条件適用時のプロトプラスト収量は、タモギタケ $2 \times 10^6$ 、ヒラタケ $6 \times 10^6$ であった。

### III-1-2 担子孢子からのプロトプラスト調製条件

#### III-1-2-1 酵素条件

実験に使用した酵素の組合せはIII-1-1-1に示したものと同一である。各々の酵素を0.5 M マニトールで浸透圧を調整したリンゴ酸緩衝液に溶かした酵素溶液でタモギタケの担子孢子について加水分解を行った結果を Fig. 7 に示す。最大収量を得られたのはUZ-2で1時間の場合であるが、UZ-2により得られたプロトプラストには不整形なものが多かった。またUZ-1についても5時間で得られたプロトプラストには不整形なものが多かったため、ここでは酵

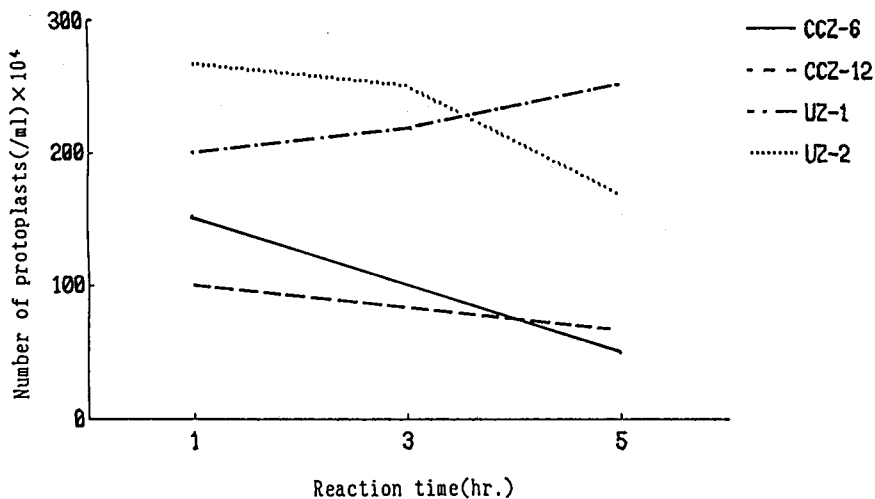


Fig. 7. Influence of enzyme composition in the solution on the formation of protoplasts from basidiospore (*Pleurotus cornucopiae*).

素条件は、ウスキザイム 1%，加水分解時間は 3 時間を採用した。

### III-1-2-2 酵素溶液の浸透圧

子実体の場合と同様に酵素溶液の浸透圧を変えることによって、更に収量が増加するかどうかを検討した。その結果を Fig. 8 に示す。最大収量はマニトール 0.6 M の時であったため浸

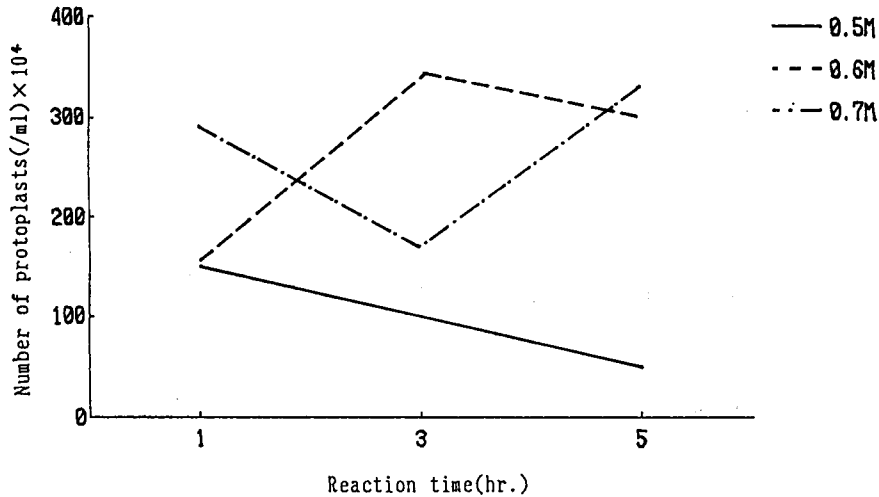


Fig. 8. Influence of concentration of osmotic stabilizer on the formation of protoplasts from basidiospore (*Pleurotus cosnucoopiae*).

透圧調整剤濃度は 0.6 M を採用した。尚、0.7 M では子実体の場合と同様に不整形なものが多かった。以上の実験はタモギタケの担子胞子について検討を行ったものであるが、ここで得られた最適条件をヒラタケの担子胞子に対して適用したところタモギタケとほぼ同程度の収量が得られた。

以上の結果より、タモギタケ及びヒラタケの担子胞子からのプロトプラストの調製条件は、酵素組成ウスキザイム 1% で、0.6 M マニトールによって浸透圧を調整した酵素溶液により、30°C、3 時間加水分解を行うこととし、この条件によって得られたプロトプラストを以後の実験に使用した。プロトプラスト収量は、タモギタケ  $3 \times 10^6$ 、ヒラタケ  $2 \times 10^6$  であった。尚、これらの条件によって得られたプロトプラスト懸濁液には、遠心分離によって精製を行ったが、プロトプラスト数に対して約 20% の未分解の担子胞子が含まれていた。

### III-2 プロトプラストの粒度分布

タモギタケの 1 次菌糸、2 次菌糸、子実体、担子胞子各々のプロトプラストの粒度分布については、Fig. 9, 10, 11, 12 に示す通りである。1 次菌糸及び 2 次菌糸のプロトプラストは、分布幅が各々 3~10  $\mu\text{m}$  (平均粒径 5.0  $\mu\text{m}$ )、3~9  $\mu\text{m}$  (平均粒径 5.3  $\mu\text{m}$ ) と非常に類似性が高かった。子実体のプロトプラストは粒度分布の幅が 5~17  $\mu\text{m}$  (平均粒径 10.0  $\mu\text{m}$ ) と広く、

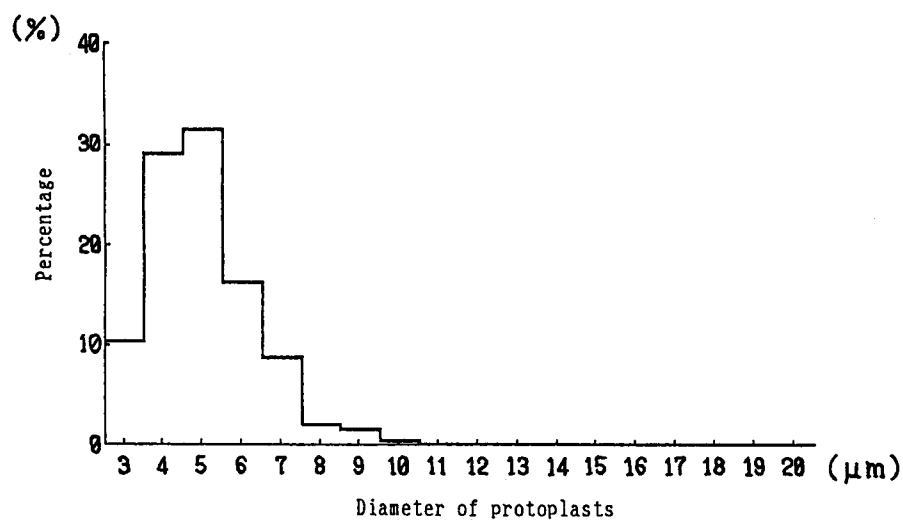


Fig. 9. Size distribution of protoplasts from primary mycelium (*Pleurotus cornucopiae*).

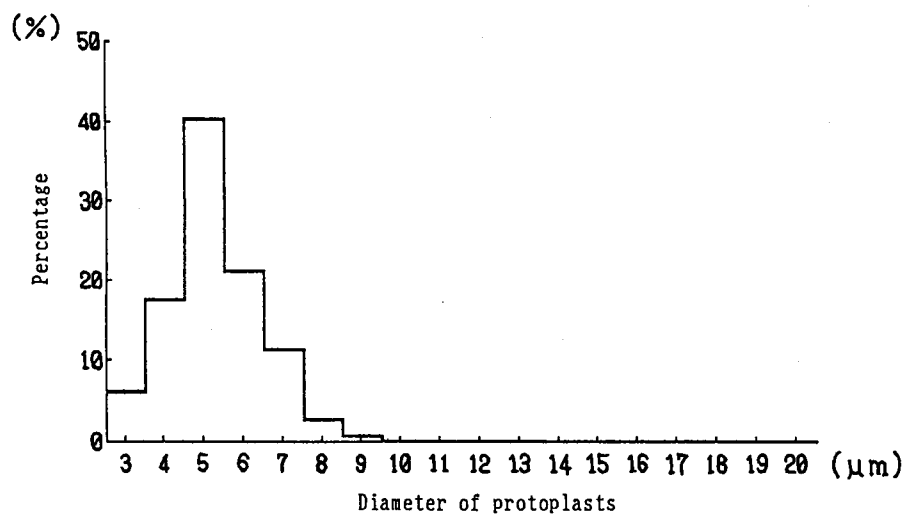


Fig. 10. Size distribution of protoplasts from secondary mycelium (*Pleurotus cornucopiae*).

全体的に他と比べてかなり大型であった。担子胞子のプロトプラストに関しては、他と比べると若干小さめであるが、分布幅は3~6 μm (平均粒径4.3 μm)と狭く、大きさの均一性が高い

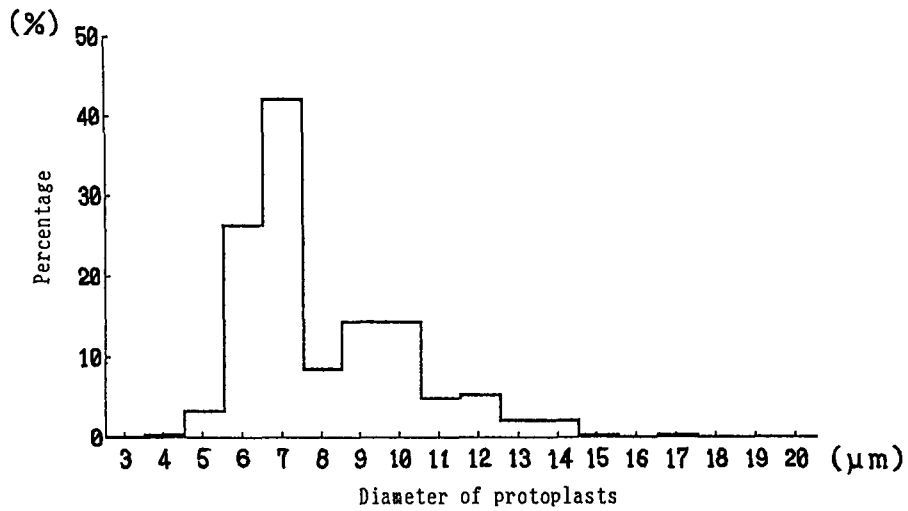


Fig. 11. Size distribution of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus cornucopiae*).

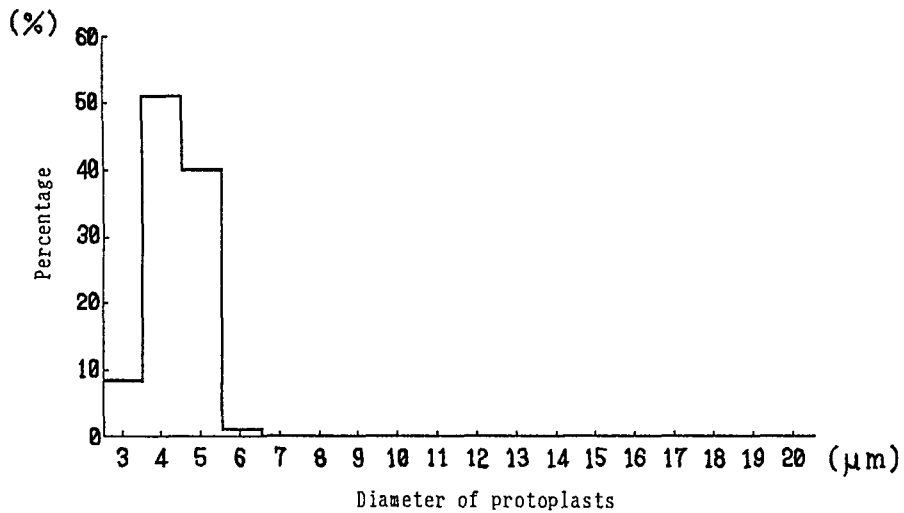
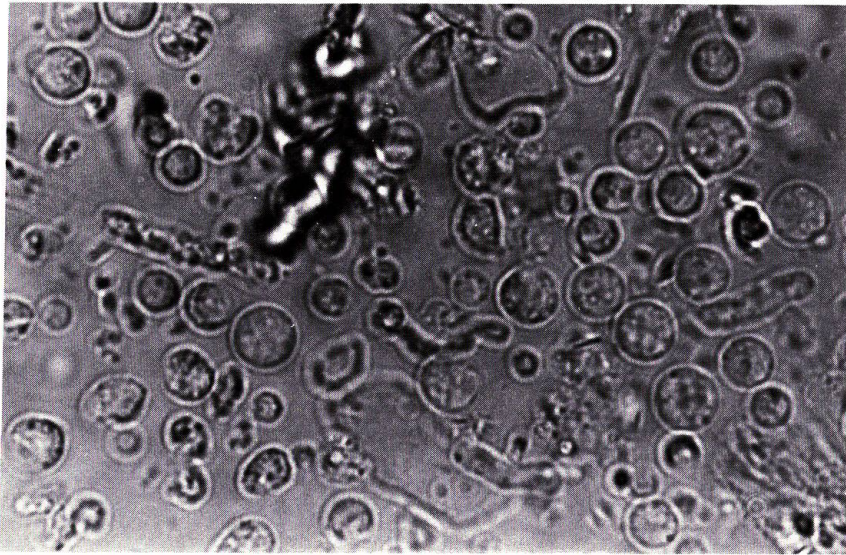
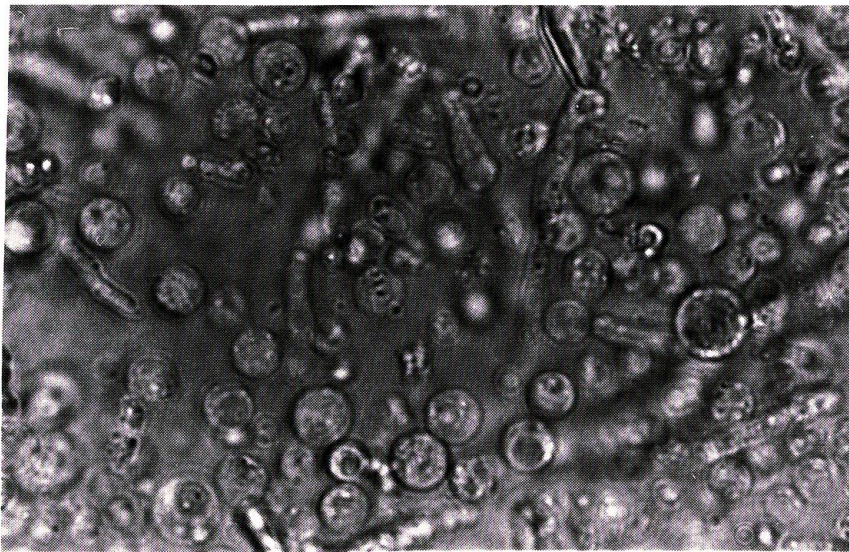


Fig. 12. Size distribution of protoplasts from basidiospore (*Pleurotus cornucopiae*).

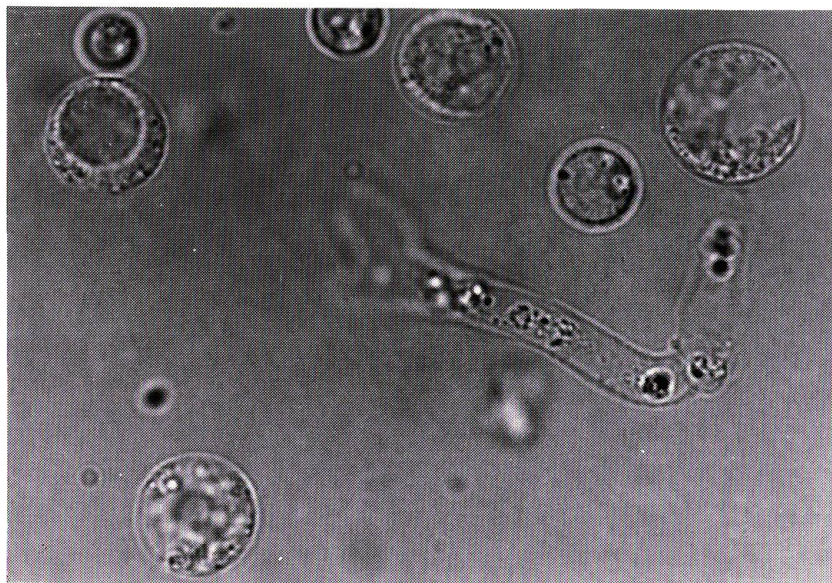
ことが判った。また各々のプロトプラストの写真を Photo 1, 2, 3, 4 に示す。



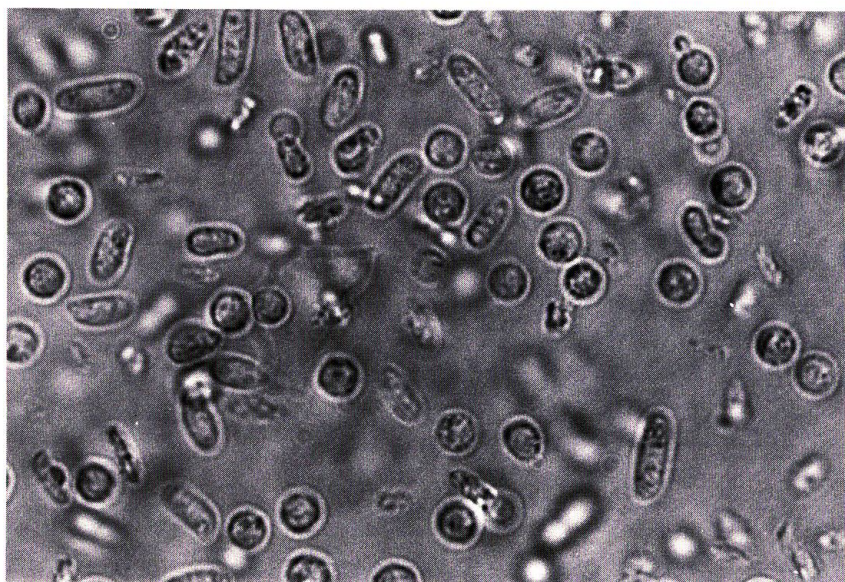
**Photo 1.** Protoplasts prepared from primary mycelium (*Pleurotus cornucopiae*)[x 1200].



**Photo 2.** Protoplasts prepared from secondary mycelium (*Pleurotus cornucopiae*)[x 1200].



**Photo 3.** Protoplasts prepared from fruit-body (*Pleurotus cornucopiae*) [x 1200].



**Photo 4.** Protoplasts prepared from basidiospore (*Pleurotus cornucopiae*) [x 1200].

ヒラタケの、1次菌糸、2次菌糸、子実体、担子胞子各々のプロトプラストの粒度分布については、Fig. 13, 14, 15, 16 に示す通りである。各々の分布幅は、順に 3-8, 3-9, 4-20, 3-5  $\mu\text{m}$  で、平均粒形は、5.7, 4.7, 9.0, 4.0  $\mu\text{m}$  であった。タモギタケの場合と同様に1次菌糸及

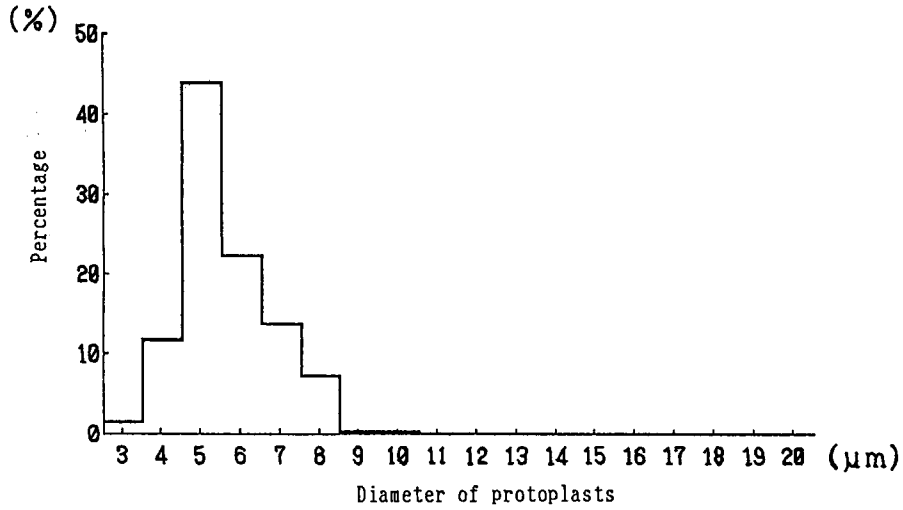


Fig. 13. Size distribution of protoplasts from primary mycelium (*Pleurotus ostreatus*).

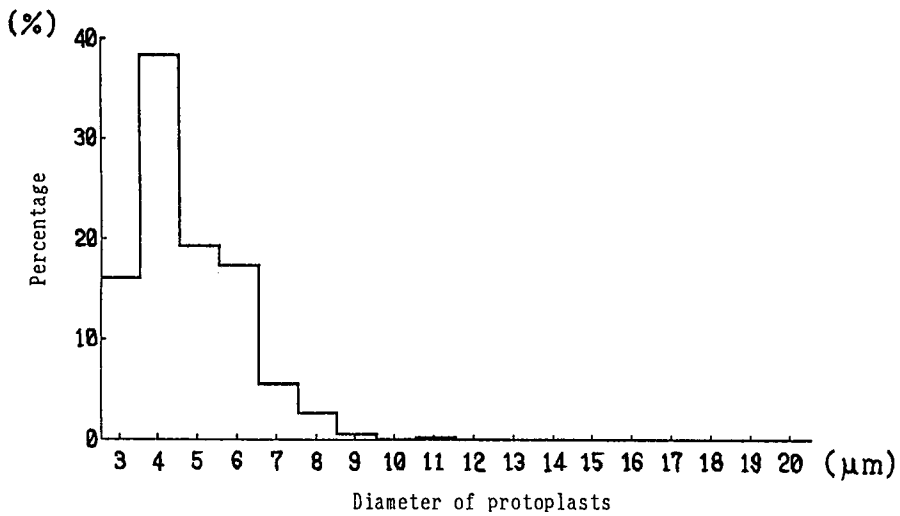


Fig. 14. Size distribution of protoplasts from secondary mycelium (*Pleurotus ostreatus*).

び2次菌糸に関しては類似性が高く、子実体のプロトプラストは全体的に大型で、担子孢子のプロトプラストは均一性が高かった。また各々のプロトプラストの写真を Photo 5, 6, 7, 8 に示す。

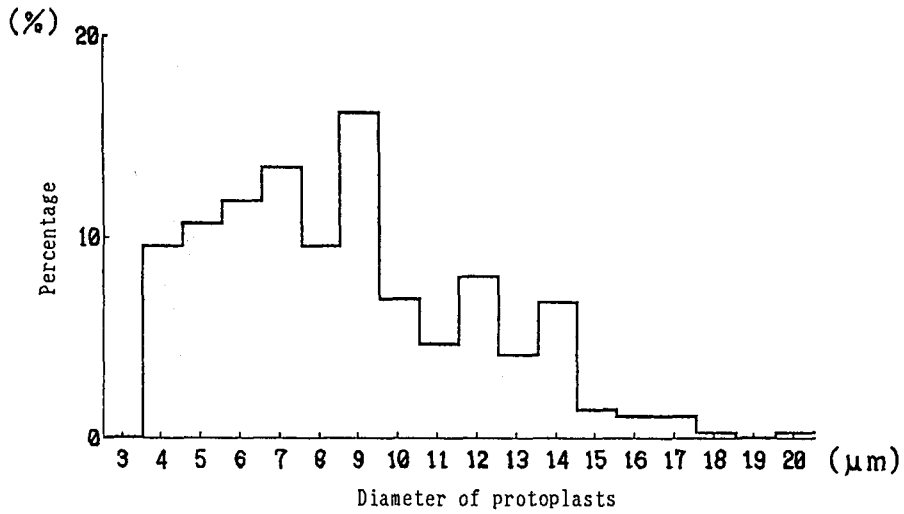


Fig. 15. Size distribution of protoplasts from fruit-body (*Pleurotus ostreatus*).

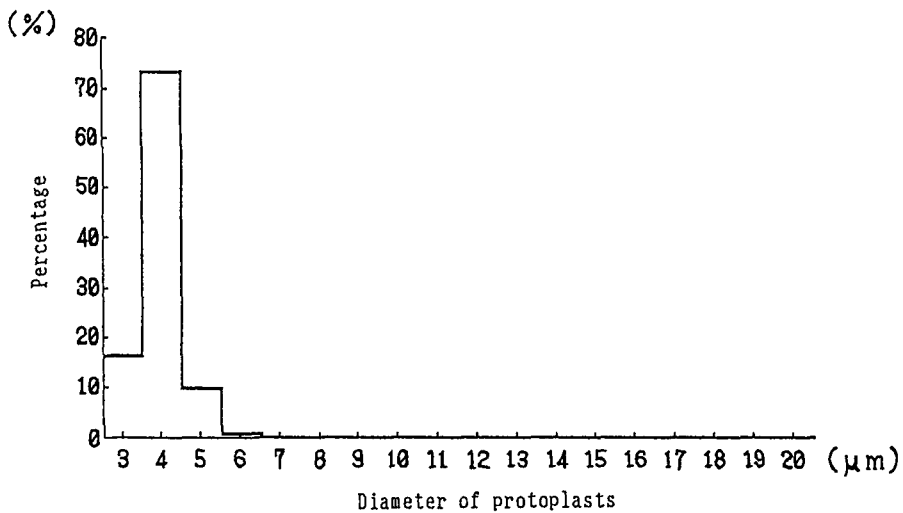
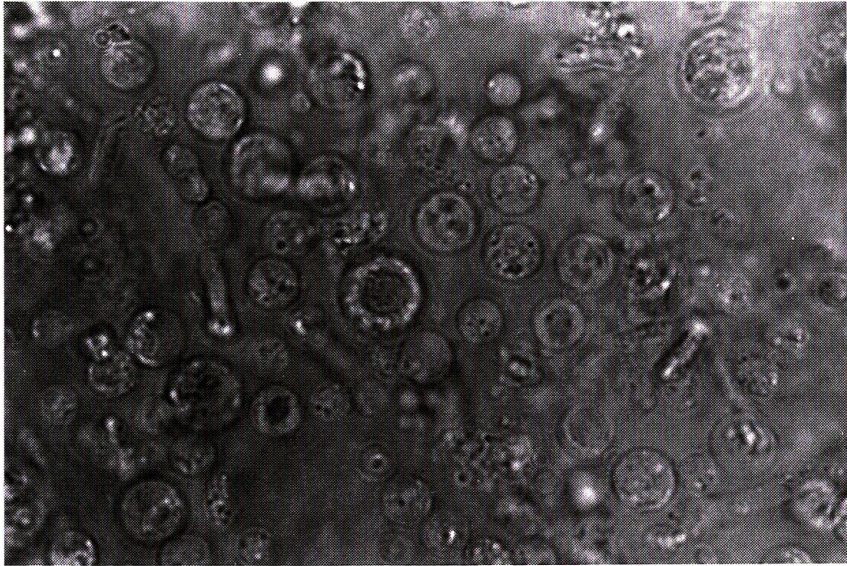
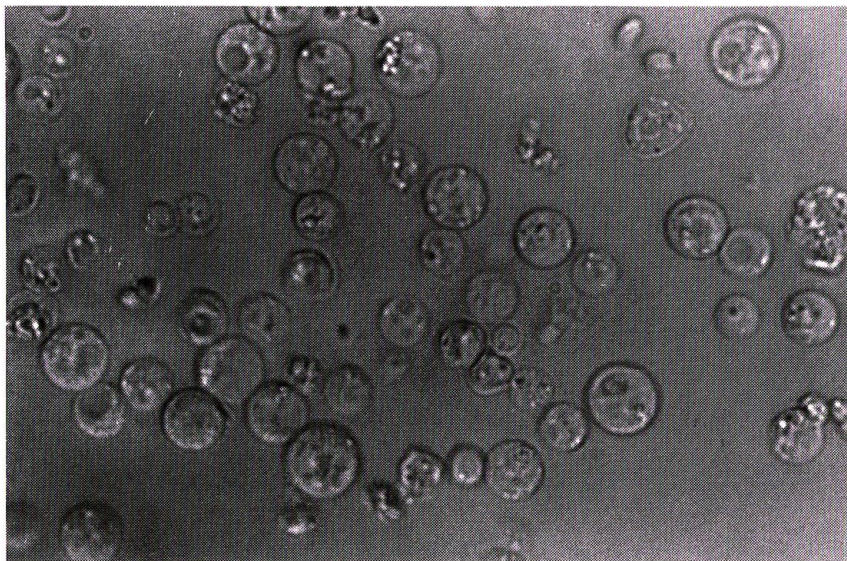


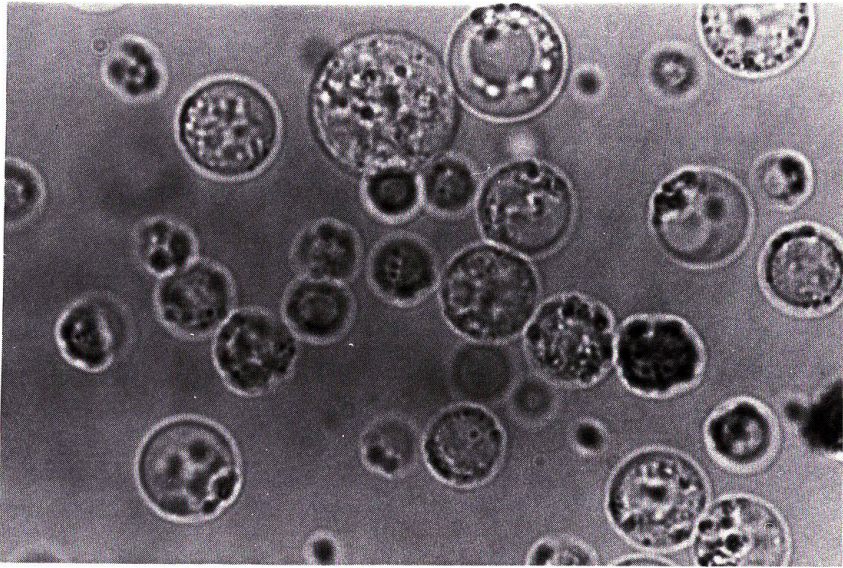
Fig. 16. Size distribution of protoplasts from basidiospore (*Pleurotus ostreatus*).



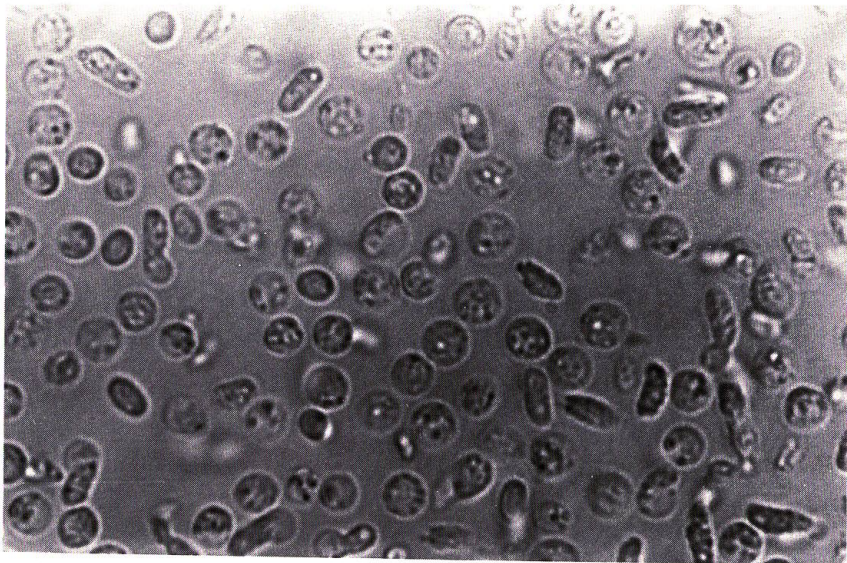
**Photo 5.** Protoplasts prepared from primary mycelium (*Pleurotus ostreatus*)[x 1200].



**Photo 6.** Protoplasts prepared from secondary mycelium (*Pleurotus ostreatus*)[x 1200].



**Photo 7.** Protoplasts prepared from fruit-body (*Pleurotus ostreatus*) [x 1200].



**Photo 8.** Protoplasts prepared from basidiospore (*Pleurotus ostreatus*) [x 1200].

### III-3 プロトプラストの再生率

プロトプラストの再生に要した時間（コロニーとして確認できるまでは、タモギタケ、ヒラタケ共に1次菌糸及び2次菌糸については2～3週間、子実体については4～5週間、担子胞子については1～2週間であった。

タモギタケの各々のプロトプラストの再生率は、1次菌糸については約10%、2次菌糸については約10%、子実体については約1%、担子胞子については10～50%であった。担子胞子のプロトプラストの再生率は非常にばらつきが大きかった。

ヒラタケの各々のプロトプラストの再生率は、1次菌糸については約30%、2次菌糸については約20%、子実体については約2%、担子胞子については20～70%であった。ヒラタケについてもやはり、担子胞子のプロトプラストの再生率は非常にばらつきが大きかった。

## IV 考 察

電氣的細胞融合法を前提として細胞融合に適したプロトプラストとして要求される項目は、以下の4つである。

- ①プロトプラストの大きさの均一性が高いこと。
- ②再生率が高いこと。
- ③菌糸片等の混入が少ないこと。
- ④プロトプラスト化が完全であること。

①の項目に関しては、プロトプラストにかかる直流パルス電場の刺激の強さは、プロトプラストの半径に比例すること<sup>9)</sup>に基因する。半径 $r$ の球形細胞（プロトプラスト）が電場 $E$ のもとに置かれた際に、細胞膜を介して発生する電位差 $V_x$ （電場刺激の強さ）は、電場方向と $\theta$ の角度をなす細胞膜部位 $x$ に於いて次式により近似的に表される。

$V_x = C \cdot r \cdot E \cdot \cos\theta$ （但し、 $C$ は細胞内外液及び細胞膜の伝導度や、細胞の大きさなどによって決まる定数である）

即ち、このことは一定の電場電圧に対するプロトプラストの挙動（融合もしくは破壊）はプロトプラストの大きさに左右されることを意味する。従って、プロトプラストの大きさが均一であれば、高い確率での融合が期待できる。このことは本研究者の以前の研究に於いても示唆されている<sup>9)</sup>。

②の項目に関しては、効率的に体細胞雑種を作出するためには望ましい条件である。③の項目に関しては、菌糸片等の混入は融合を妨げることがしばしば見受けられることによる。また④の項目に関しては、見かけ上球形に見えるプロトプラストに於いても細胞壁断片が細胞膜上に残存している等（プロトプラスト化が不完全である）の理由により融合が起こり難いことがあるためである<sup>9)</sup>。

以上の4項目を念頭に、1次菌糸、2次菌糸、子実体、担子胞子のプロトプラストを評価

した結果、担子胞子のプロトプラストがこれらの中では最も適性が高いと思われる。即ち、プロトプラストの大きさが揃っていること、再生率が比較的高いこと、異物の混入が比較的少ない、再生に要する日数が少ないこと、核相が単一であること等の理由による。

他のプロトプラストに関しては、先ず子実体のプロトプラストは、再生率は低いが大形であるため、マイクロマニピュレーターを使用しての融合操作に於いて適性が高いと思われる。また細胞組織学的な研究材料として利用することも考えられる。1次菌糸及び2次菌糸については、比較的扱い易いことが利点であろう。1次菌糸のプロトプラストは栄養要求性、薬物耐性等の突然変異株誘導用として有用である。2次菌糸のプロトプラストについては、子実体の形成を経ずに1次菌糸を誘導する材料<sup>10)</sup>、または栽培種の活性化<sup>11)</sup>等の利用が考えられる。

これまでの結果により、担子胞子のプロトプラストが融合に対して最も適性が高いと結論されたが幾つかの問題点も残った。それらは、先ずこの実験で用いた担子胞子のプロトプラストの調製法では、異物の混入が比較的少ないとはいえ、約20%の未分解の担子胞子が残存していることにより、融合効率の低下が予想されること。未分解の担子胞子の存在は、代謝阻害剤を利用して融合株を判別する際に、支障を来すことも考えられる。また再生率は平均的には高いと言えるが、かなりのばらつきがあること等が挙げられる。更に担子胞子を実験系に取り入れる際に問題となるのは、子実体の栽培過程が入って来るために実験系が煩雑になってしまうことである。これらの問題点については、酵素条件、担子胞子の冷蔵保存等により改善が期待され、これは現在検討中であり、二、三良好な結果を得ているが、詳しくは次の機会に報告する。

## V 総 括

電気的細胞融合法を前提として、細胞融合に適したプロトプラストの調製について検討した結果、結論として、担子胞子のプロトプラストは電気的細胞融合に対して適性が高いと思われた。その理由として、粒形が揃っていること、高い収量が得られること、再生に要する日数が短いこと、再生率が多少のばらつきはあるものの比較的高いこと等が挙げられた。今後、担子胞子のプロトプラストを用いて融合体を得るための研究を進めていくに当たって問題となるのは、担子胞子は生活環から判るように、2次菌糸から見れば、有性生殖によって生じた次の世代の菌体であるため、担子胞子もしくはそのプロトプラストから生じた菌体(1次菌糸もしくは融合体)の遺伝的形質(栽培種としての形質、アイソザイムパターン等)を特定するのが困難なことである。特定の形質に期待して融合体の作出することは困難であるが、担子胞子のプロトプラストを細胞融合の材料として使用することの大きな利点は、一度に多くの組合せで、種間もしくは属間の交雑を行うことが出来ることであり、後に綿密にそれらの持つ形質を調べて行くことにより、適応幅の広い育種が可能となるであろう。

## VI 謝 辞

本研究を行うにあたり、酵素を提供して下さった白杵製薬株式会社の大村重男氏、亀井紀子氏の両氏に深く感謝の意を表する次第である。

## 参 考 文 献

- 1) Kao K. N., Michayluk M. R. : *Planta* (Berl.), 115 : 355-367 (1974)
- 2) Senda M., Takeda J., Abe S., Nakamura T. : *Plant Cell Physiol.*, 20 : 1441-1443, (1979)
- 3) Neumann E., Gerisch G., Opatz K. : *Naturwiss.*, 67 : 414-415, (1980)
- 4) Zimmermann U. : *Biochem. Biophys. Acta*, 694 : 227-277, (1982)
- 5) Pohl H. A., Pollock K. and Rivera H. : *Int. J. Quant. Chem. ; Quantum Biology Symposium*, 11 : 327-345, (1984)
- 6) 西口恭彦 : 北海道大学農学部林産学科卒業論文 (1985)
- 7) 竹内正幸, 中島哲夫, 古谷 力編集 : 植物組織培養の技術, 朝倉書店 (1986)
- 8) Zimmermann U., Pilwat G., Riemann F. : *Biophys. J.*, 14 : 881-889, (1974)
- 9) 玉井 裕 : 北海道大学農学部林産学科卒業論文 (1986)
- 10) 大政正武, 阿部恭久, 馬場崎勝彦 : 林業試験場研究成果選集 (1985)
- 11) Magae Y., Kakimoto Y., Kashiwagi Y. and Sasaki T. : *Appl. Environm. Microbiol.*, 42 (2) : 441-442, (1985)

## Summary

Basidiomycetes protoplasts preparation method suitable for electric fusion was investigated. Primary mycelium, secondary mycelium, fruit-body, basidiospore from each strain were used as the samples. Yield, size distribution and regeneration frequency of protoplasts from various types of mycelia were investigated. The size of the protoplasts from the primary mycelium and the secondary mycelium was in the range of 3 to 10 $\mu$ m (av. 5 $\mu$ m), while that from fruit-body was 4 to 20 $\mu$ m (av. 10 $\mu$ m). The protoplasts from basidiospore were distributed in the narrow range (3-6 $\mu$ m av. 4 $\mu$ m) with high uniformity. In conclusion, the protoplasts from basidiospore were the most suitable for electric-fusion because of relatively high regeneration frequency, short regeneration period and high uniformity.