



Title	食用担子菌の担子胞子に由来する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, 46(2), 425-440
Issue Date	1989-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/21295">https://hdl.handle.net/2115/21295</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	46(2)_P425-440.pdf



# 食用担子菌の担子胞子に由来する プロトプラストの性状について

玉井 裕\* 三浦 清\* 香山 彊\*

## Characterization of Protoplasts from Basidiospore of Edible Basidiomycetes

By

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

### 要 旨

前回の報告に於て、電氣的細胞融合に関して適性が高いと評価された担子胞子のプロトプラストについて、その調製方法及び性状について今回更に精査した。

加水分解酵素の組成と反応時間を変えることにより収量は、最大で約20倍になり、孢子残存率は約5分の1となった。再生率に関しては、未だ若干のばらつきがあるものの10~20%の範囲に納まった。得られたプロトプラストの内の約80%は、有核であった。電気融合実験に於いては、非常に良好な融合挙動を示した。また担子胞子は、冷蔵保存により3ヵ月間は安定してプロトプラストの調製に使用できることが判った。以上のことから担子胞子プロトプラストの電氣的細胞融合に対する適性が、安定性及び実用性の面からも評価された。

キーワード： ヒラタケ、タモギタケ、担子胞子、プロトプラスト、電気融合法。

### I 結 言

著者らは、前回の報告<sup>1)</sup>に於いて、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報告した。その中でヒラタケ及びタモギタケの1次菌糸、2次菌糸、子実体、担子胞子より得られたプロトプラストについて、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以下の4つの項目を念頭に検討を行った。

---

1988年8月31日受理 Received 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。

その結果、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た。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。

そこでこれらの問題点について対処するために、今回は、担子胞子からのプロトプラストの調製方法についての再検討、及び長期間に渡って担子胞子の保存が可能であれば、実験系の煩雑化は幾らか軽減されるであろうと考えられることから、担子胞子の保存性についての検討を行った。また有核率を求めるために、核染色の検討、及び実際に電氣的融合を行い融合の様子を観察した。

## II 実験操作

### II-1 供試菌

タモギタケ (*Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira)

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。

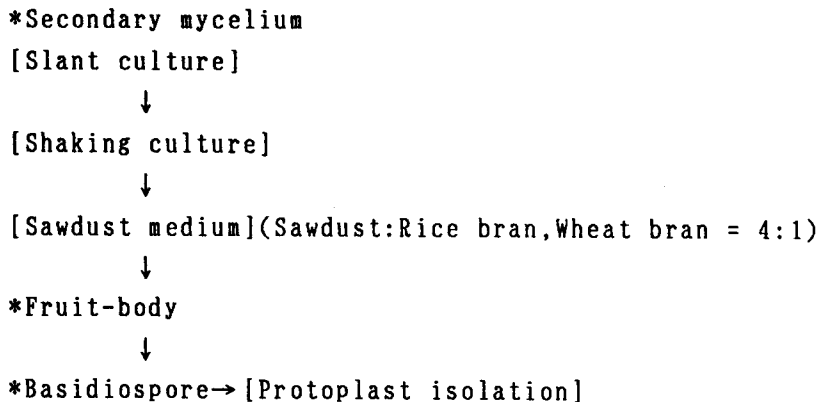


Fig. 1. Preparation procedure of basidiospore.

## II-2 担子胞子の調製

担子胞子調製のフローシートを Fig. 1 に示す。

先ず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, 蛍光灯照明下で発茸させた。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胞子を集めた。

## II-3 加水分解酵素

プロトプラストの調製に使用した酵素は以下に示す通りである。

ウスキザイム (*Trichoderma sp.* 由来)

(WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)

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

(YAKULT HONSHA CO., LTD.)

以上の酵素を 0.6 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) にウスキザイム単独, もしくはセルラーゼと混合して溶かし, 孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターで濾過除菌して使用した。

酵素濃度はウスキザイムについては, 0.1~1.0%, セルラーゼについては 2% で使用した。

## II-4 プロトプラスト調製手順

プロトプラスト調製のフローシートを Fig. 2 に示す。

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

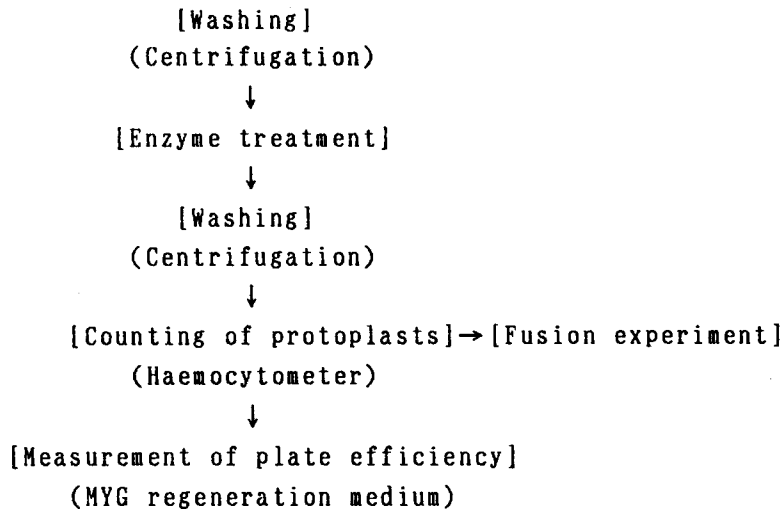


Fig. 2. Preparation procedure of protoplast.

盤により担子胞子数を計数した。計数值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、 $30^\circ\text{C}$ 、0～450 分間、1 分間当り 80 回の振盪をしながら加水分解を行った。その間 30 分毎に血球計数盤により取量及び残存胞子数の測定を行い、調製条件を検討した。

プロトプラスト取量は、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取量とした。

#### II-5 再生率の測定

最大取量を示した条件によって得られたプロトプラストについて再生率を測定した。取量測定後のプロトプラスト懸濁液を適当濃度 (約 500 個/ml) に希釈し、MYG (マイトイクストラクト 0.5%，イーストイクストラクト 0.5%，グルコース 2.0%，サッカロース 0.5 M，寒天 2%) 再生培地上にプレートした。 $23^\circ\text{C}$  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、プレートした後に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。

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

#### II-6 有核率の測定

光学顕微鏡下に於いて観察可能な核染色方法の検索を行い、良好な結果が得られた方法を用い、写真上の計測によりプロトプラストの有核率を測定した。尚、染色に供したプロトプラストは、II-5 に於けるものと同一条件で調製したものである。

試行した染色方法は、ギムザ染色法<sup>2,3,4)</sup>、フォイルゲン反応染色法<sup>4)</sup>、酸性ヘマラウン染色法<sup>4)</sup>、プロピオン鉄ヘマトキシリン染色法<sup>5,6,7)</sup>、DAPI (4',6-ジアミジノー-2-フェニルインドール 2 塩酸塩) 染色法<sup>8)</sup> であった。これらの中で良好な結果の得られた DAPI 染色法を以下に示す。

##### (DAPI 染色法)

プロトプラストの懸濁液を 1 滴スライドガラス上に滴下した後、直ちに緩衝液 NS\* に溶かした 1% グルタルアルデヒド 1 滴と、0.1% DAPI 1 滴を滴下し、固定と染色を同時に行った。カバーガラスをかけて 20 分間染色を行った後、CARL ZEISS UMSP-80 を落射型蛍光顕微鏡として用い、UV (365 nm) 励起し、435 nm の吸収フィルターを用い、観察を行った。

\*緩衝液 NS

0.4 M サッカロース

20 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (pH 7.6)

1 mM EDTA (エチレンジアミン 4 酢酸)

- 1 mM 塩化マグネシウム
- 0.1 mM 塩化カルシウム
- 0.1 mM 塩化亜鉛
- 0.8 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド)
- 0.05 % 2-メルカプトエタノール

## II-7 電気的細胞融合法適用時の挙動の観察

最大収量が得られた条件により調製したヒタラケ担子胞子のプロトプラストについて、電気的融合法適用時の挙動を調べた。

### II-7-1 融合システム

実験に使用した融合システムは、エムエス社製細胞融合システム (特別注文品) で、仕様は以下に示す通りである。

- ・高周波：周波数           1 MHz      2 MHz  
          電圧 (0 Ω) 75 V (p-p) 58 V (p-p)  
                  (100 Ω) 35 V (p-p) 40 V (p-p)
- ・直流パルス：パルス幅 5 ~ 99 μsec.  
          電圧 0 ~ 750 V
- ・高周波タイマー：1 ~ 99 sec.
- ・直流パルス回数：1 ~ 99 回
- ・直流パルス間隔：0.1 ~ 9.9 sec.

### II-7-2 融合チャンバー

融合チャンバーは、Photo. 1, 2 に示すように、プラスチックシャーレの底部の長方形の穴を開け、その部分にカバーガラスを内側よりエポキシ樹脂接着剤により接着し、カバーガラス上に断面が三角形の2本のアクリル棒を平行に接着し、その間に断面直径 0.1 mm のニクロム線を2本平行に 0.5 mm の間隔で張ったものである。内部をエタノールにより滅菌を行えば、無菌操作が可能である。

### II-7-3 融合条件

融合条件は以下に示す通りである。

- ・高周波：2 MHz, 400 V/cm
- ・直流パルス：10 μsec., 5KV/cm
- ・直流パルス回数：10 ~ 20 回
- ・直流パルス間隔：1.0 sec.

なお、プロトプラスト懸濁液 (0.5 M マニトール) には、0.5 mM 塩化マグネシウム及び 0.1 mM 塩化カルシウムを添加した。

### II-7-4 融合操作

遠心分離による洗浄済みのプロトプラストを0.5 mM 塩化マグネシウム及び0.1 mM 塩化カルシウムを添加した0.5 M マニトール溶液に懸濁し、プロトプラスト濃度を約 $1 \times 10^7$ /mlとなるように調整した。プロトプラスト懸濁液をパスツールピペットで融合チャンバーの電極間に1, 2滴垂らし、蓋をして倒立型顕微鏡のステージ上にセットした。直ちに高周波をかけ、約20分間放置しパールチェーンを形成させた。パールチェーン形成完了後、直流パルスを10~20回、1秒間隔でかけ、プロトプラストの挙動を観察した。

### II-8 担子胞子の保存性試験

子実体より無菌的に集めた担子胞子を、4°Cの冷蔵庫内で6ヵ月間保存し、1ヵ月毎にMYG寒天培地上に蒔き、発芽率の変異を調べた。

## III 結 果

### III-1 プロトプラスト調製方法の検討

タモギタケの担子胞子をウスキザイム (UZ) 0.1%, 0.2%, 0.4%, 1.0%の4条件によって加水分解を行い、30分毎にプロトプラスト収量を測定した結果をFig. 3に示す。

ウスキザイム0.2%、加水分解210分間の条件によって最大収量 ( $3.5 \times 10^6$ /ml) を得た。これは、前報告に於ける最適条件によるものと比較して、収量及び未分解の担子胞子の残存率も殆ど差異が認められなかった。

そこでウスキザイム0.1%, 0.2%にセルラーゼ (C) 2%を添加して加水分解を行った (Fig. 4)。ウスキザイム0.2%+セルラーゼ2% (CUZ-0.2)、加水分解420分間の条件でP

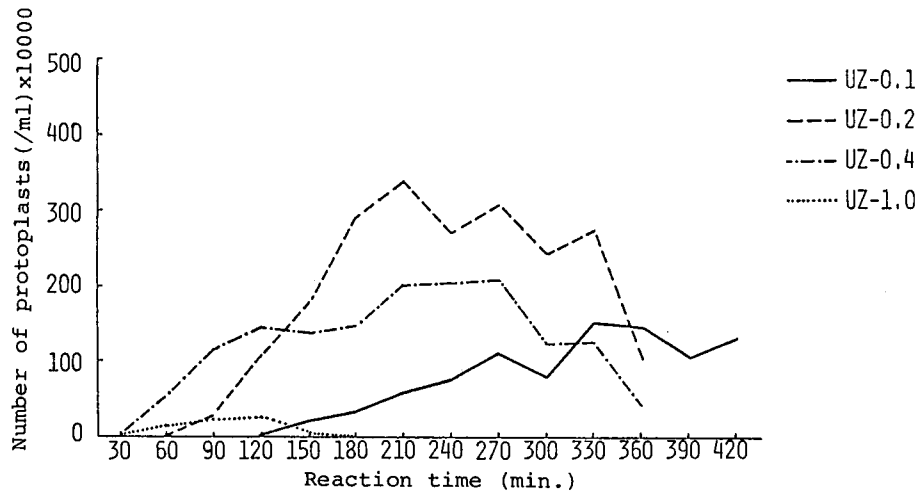


Fig. 3. Influence of composition of enzyme solution (UZ) on the formation of protoplasts from basidiospore. (*P. cornucopiae*)

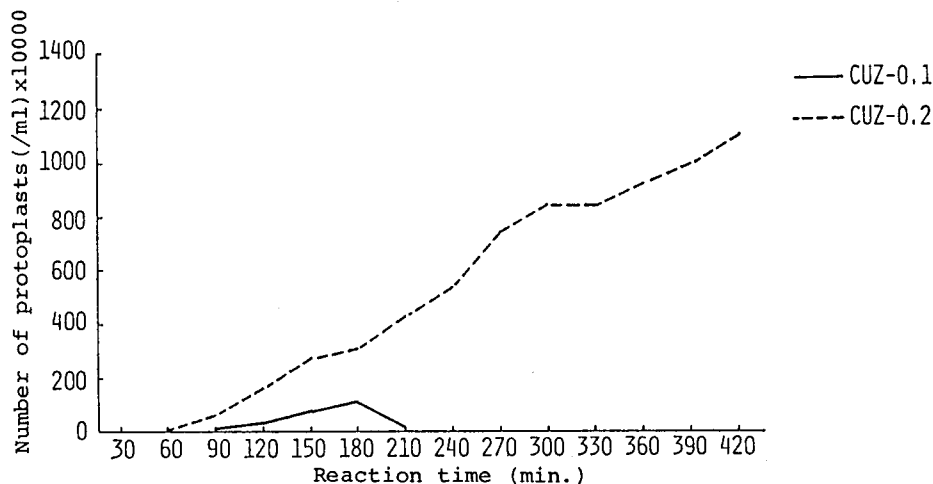


Fig. 4. Influence of composition of enzyme solution (CUZ) on the formation of protoplasts from basidiospore. (*P. cornucopiae*)

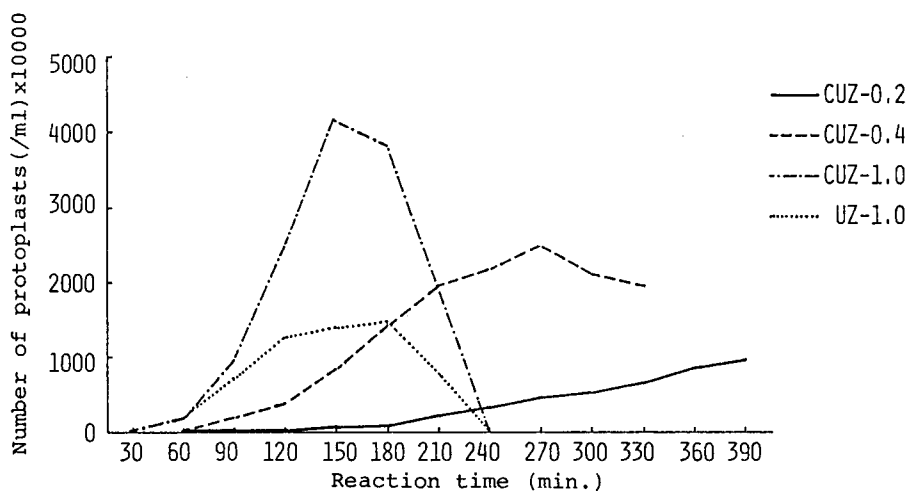


Fig. 5. Influence of composition of enzyme solution (UZ, CUZ) on the formation of protoplasts from basidiospore. (*P. ostreatus*)

プロトプラスト収量に飛躍的な増加が認められ、残存担子胞子数は大幅に減少した。前報告の条件と比較すると、収量については約4倍、残存率については約4分の1になった。

ヒラタケの担子胞子については、ウスキザイム0.2%、0.4%、1.0%にセルラーゼ2%を添加した条件とウスキザイム1.0%の条件で加水分解を行った (Fig. 5)。ウスキザイム1.0%+セルラーゼ2% (CUZ-1.0)、加水分解150分間の条件で最大収量及び最低担子胞子残存率が得られ、前報告の条件によるものとの比較に於いては、収量について約20倍、残存率については約5分の1になった。

各々最大収量を与えた条件によって調製したプロトプラストの再生率を測定したところ、若干のばらつきはあるものの、共に、10~20%の範囲に納まった。また各々のプロトプラストの写真を Photo. 3, 4 に示す。なお、再生に要した時間は両菌共に1~2週間であった。

### III-2 有核率の測定

上述の各々のプロトプラストについて有核率を測定するために、5種類の方法で核染色を試みたが、良好な結果が得られたのは、DAPI法のみであった。DAPI法によるタモギタケプロトプラストの核染色の様子を Photo. 5, 6 に示す。また写真上の計測により有核率を測定したところ、各々約80%であった。

### III-3 電氣的細胞融合法適用時の挙動

ヒラタケの担子胞子のプロトプラストに高周波をかけて15分後に Photo. 7 に示すようにパールチェーンを形成した。その後直流パルスを数回かけるとプロトプラストは効率よく融合した (Photo. 8, 9, 10, 11, 12)。顕微鏡視野内に於ける計測では、約80%のプロトプラストが融合した。なお、写真上の融合していないプロトプラストは、直流パルスの効果が弱い位置にあるため、融合チャンバーの改良が必要かと思われる。

### III-4 担子胞子の保存性

担子胞子の冷蔵保存期間と発芽率の関係を Fig. 6 に示す。6ヵ月間の保存期間に於いては、ヒラタケについては3ヵ月間は安定で、タモギタケについては1ヵ月目に低下しているが、1ヵ月目から3ヵ月目にかけてはほぼ安定していた。

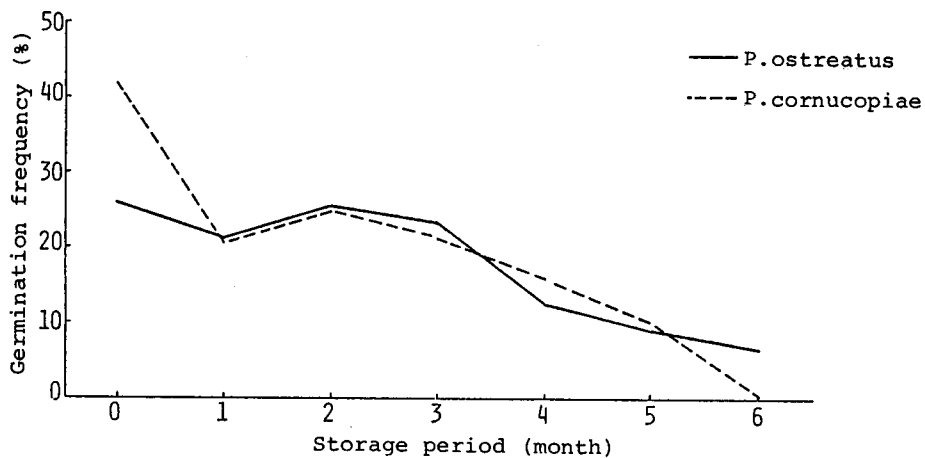


Fig. 6. Influence of cold storage period on the germination frequency of basidiospore.

#### IV 考 察

前報告に於いて問題となった未分解の担子胞子の混入、再生率のばらつきは、プロトプラストの調製条件を変えることにより大幅に軽減された。また収量もそれぞれに顕著な増加を示した。

保存性については、保存方法に関して更に改良の余地があると思われるが、今回の実験に於いては、共に一応3ヵ月間は安定であることが認められた。

有核率については、DAPI法により共に約80%であることが認められた。本研究と同一手法を用いた測定値ではないが、同一菌株を用いた西口の研究<sup>9)</sup>に於ける、2次菌糸のプロトプラストの有核率(電子顕微鏡による測定)が最高で約30%であることと比較すると、高い値であることが判る。しかしながら今後同一手法による比較検討が必要であろう。得られたプロトプラストは効率よく融合させることが出来た。また僅かに残存している担子胞子は融合の妨げにはならなかった。本研究に於いて使用した融合チャンバーの形状及び観察方法では、数値的に正確に比較することは不可能であるが、玉井の以前の研究<sup>10)</sup>に於いて行った2次菌糸のプロトプラストの融合効率と比較すると、かなり高い効率であると思われた。

#### 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、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から判断して、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る。このことは他のプロトプラストについて同条件での比較検討は行っていないが、有核率及び融合効率も高い値を示したことからも支持される。なお、再生率については、安定化させるための条件因子を解明する必要があると思われる。

担子胞子の保存性については、更に長時間の検討が必要と思われるが、3ヵ月間に於いて安定であることが認められたことにより、一度に大量の担子胞子を取獲して冷蔵保存し、集約的に実験を行うことが可能となるため、実用性はかなり高いと思われる。またプロトプラストの再生率との関係等、更に細胞融合に関連する条件因子の解明が必要であろう。

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。この様なことが懸念されるため、現在、担子胞子由来の1次菌糸のアイソザイム分析を行っているが、十数系統の1次菌糸に於いて各々のスポットは、概ね

親株（2次菌糸）のものと一致していたが、僅かであるが親株にはないものや消失しているものもあった。それらの要因については、今後詳細に検討する必要がある。

担子胞子のプロトプラストを用いて細胞融合を行い、融合の対象となる菌株の持つ特定の形質に期待して融合体を作出することは困難である。しかし、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、適応幅の広い品種の作出が可能となるであろう。

[本研究の一部は、昭和62～63年度科学研究費補助金一般研究C(62560161)（研究代表者：三浦清）によって行われた。]

#### 参 考 文 献

- 1) 玉井 裕, 三浦 清, 香山 彊: 北海道大学農学部演習林研究報告, 第45巻, 第3号: 833-854 (1988)
- 2) Colotelo N. and Grinchenko A. H. H.: Can. J. Bot., 40: 439-446, (1962)
- 3) 本山誠治: 採集と飼育 8: 388-389 (1982)
- 4) 田中克己, 浜 清共著: 顕微鏡標本の作り方 裳華房 (1977)
- 5) Lu B. C.: Can. J. Bot., 40: 843-847, (1962)
- 6) Lu B. C.: Chromosoma (Berl.), 22: 210-226, (1967)
- 7) Lu B. C. and Raju N. B.: Chromosoma (Berl.), 29: 305-316, (1970)
- 8) 小川和朗, 中根一穂, 小田琢三, 平野 寛, 藤田哲也, 山田和順編集: 組織細胞化学の技術 核酸と糖 朝倉書店 (1985)
- 9) 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, 第44巻, 第4号: 1435-1473 (1987)
- 10) 玉井 裕: 北海道大学農学部林産学科卒業論文 (1986)

#### Summary

The conditions suitable for preparing protoplasts from basidiospores for electrofusion were investigated using *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cornucopiae* var. *citlinopileatus*. The characteristics of protoplasts prepared under optimum conditions were also investigated.

The use of a particular enzyme in the preparation process changed the overall enzyme composition and reaction time, which resulted in higher yields of protoplasts and a lower number of basidiospores which failed to turn into protoplasts than those prepared by previous methods. The regeneration frequency of the protoplasts from both samples was in the range of 10 to 20 %.

The frequency of the presence of nuclei in the protoplasts was about 80%. Basidiospores kept in cold storage for 3 months could be used for the experiment with confidence in their viability.

In conclusion, the protoplasts prepared from basidiospores by the improved method were well adapted to electrofusion.



Photo 1. Fusion chamber.

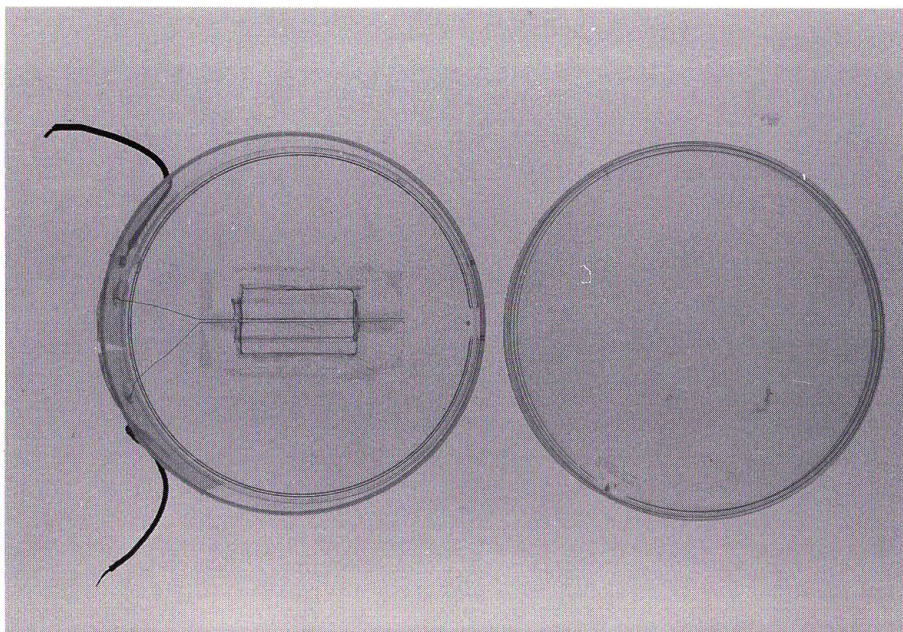
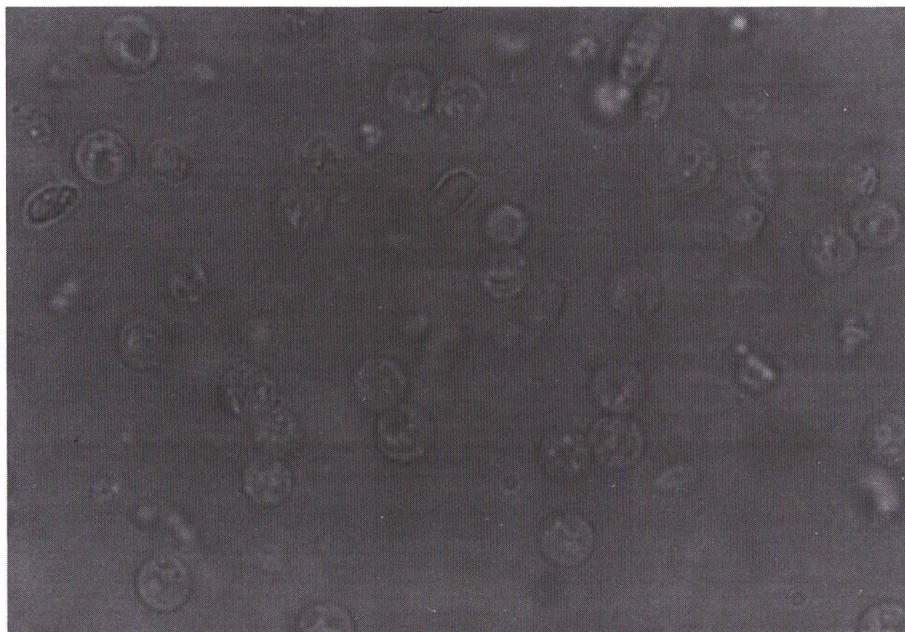
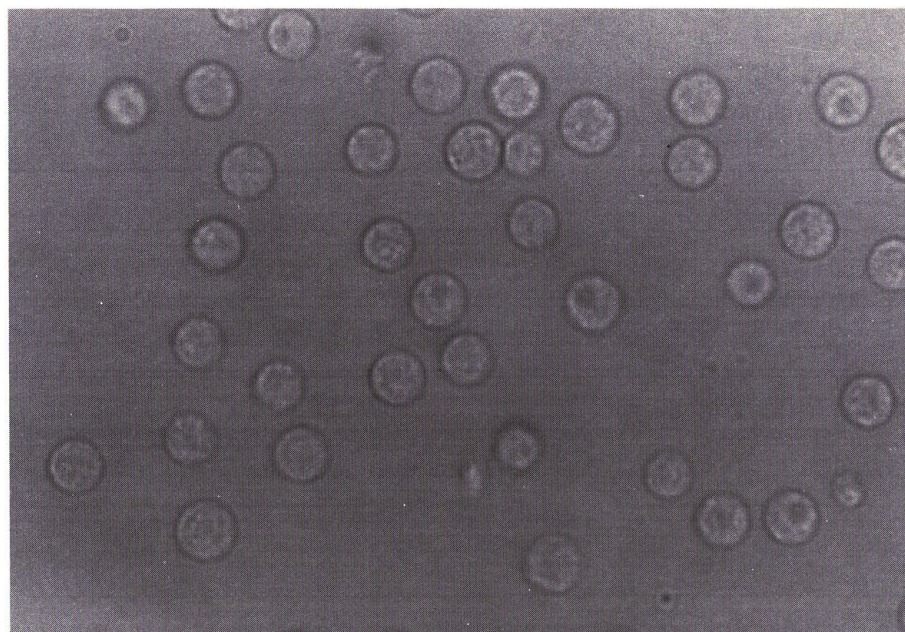


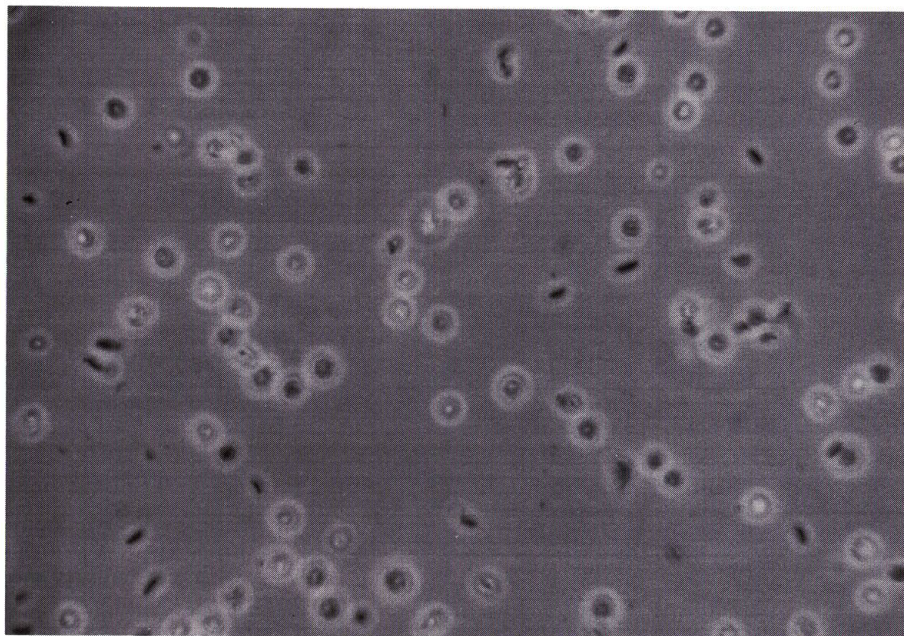
Photo 2. Fusion chamber.



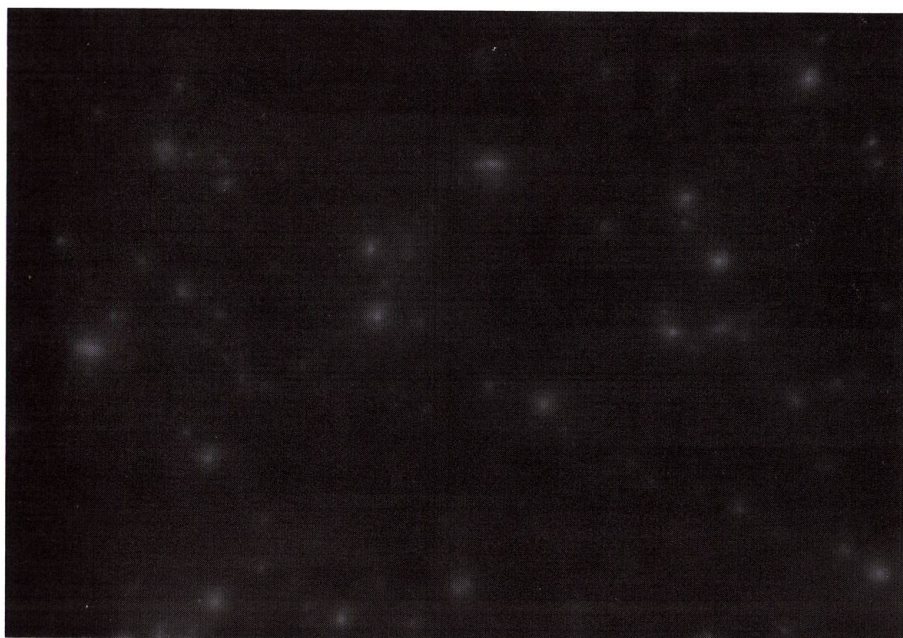
**Photo 3.** Protoplasts prepared from basidiospore. (*P. cornucopiae*)



**Photo 4.** Protoplasts prepared from basidiospore. (*P. ostreatus*)



**Photo 5.** Basidiospore protoplasts with DAPI treatment. (*P. cornucopiae*)  
[under ordinary light]



**Photo 6.** Basidiospore protoplasts with DAPI treatment. (*P. cornucopiae*)  
[under UV ray]

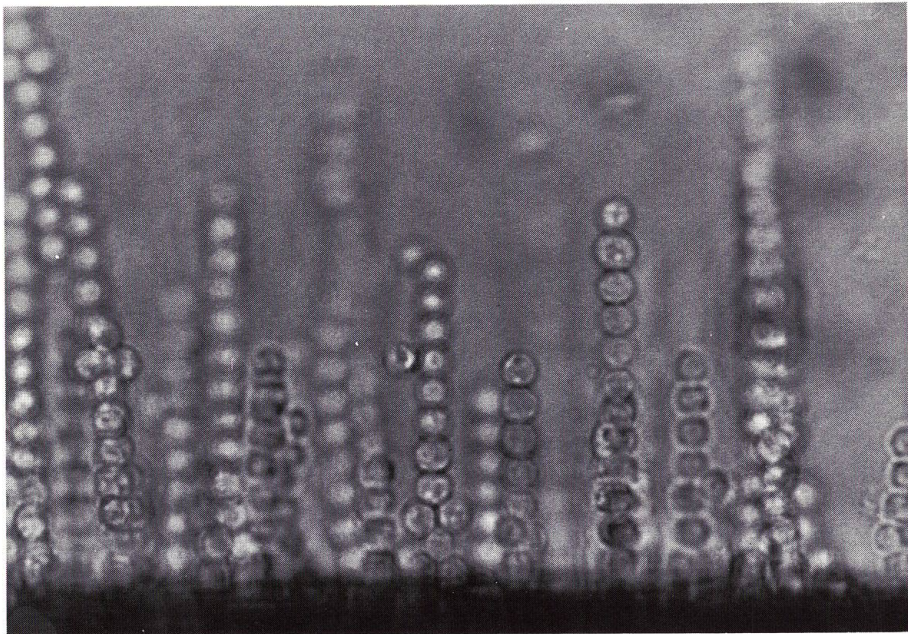


Photo 7. Pearl-chain formation.

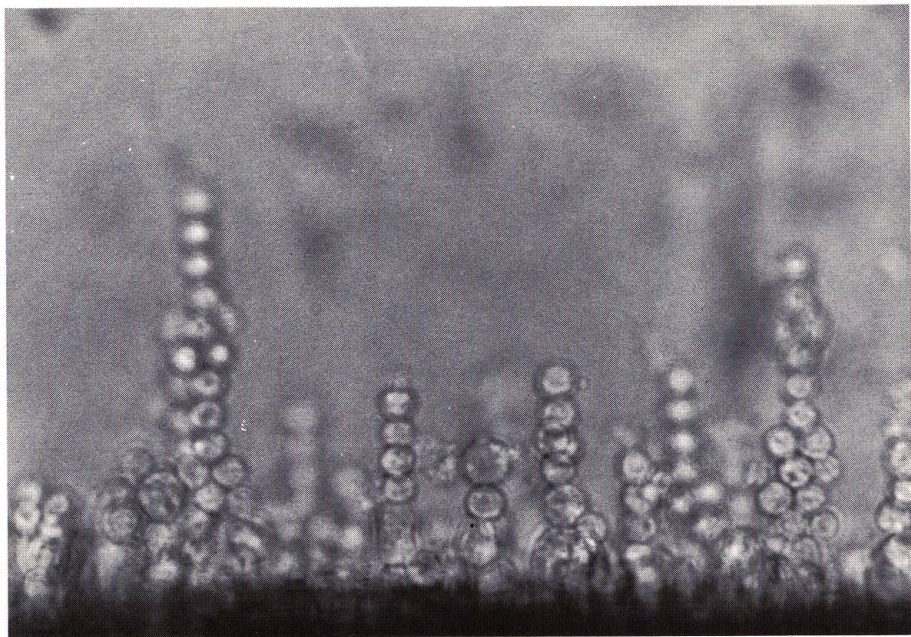
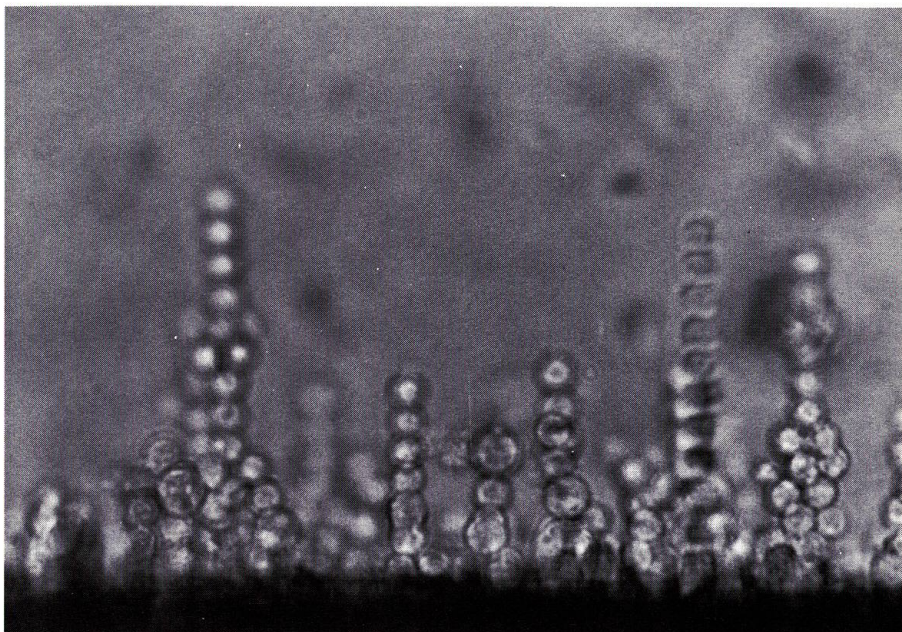
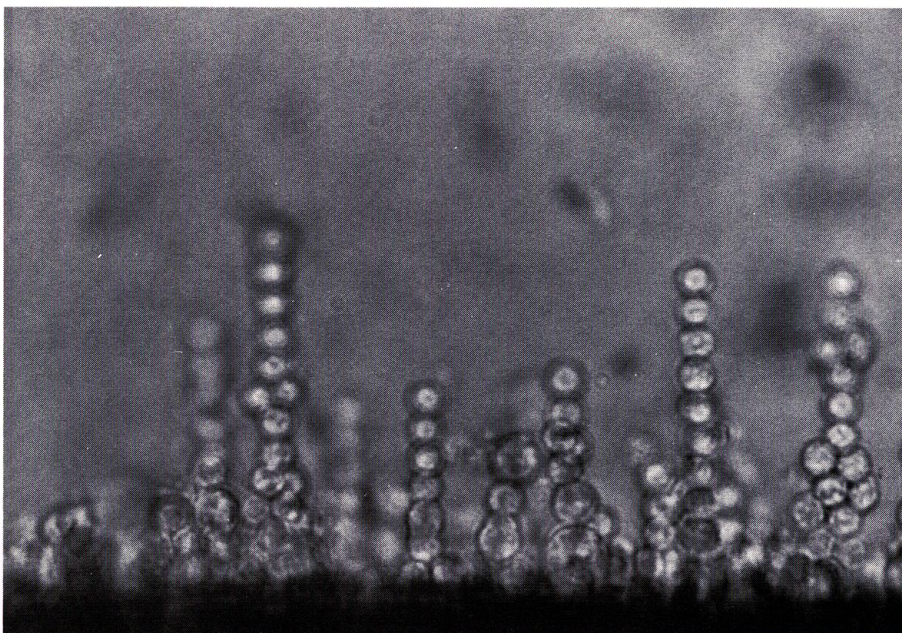


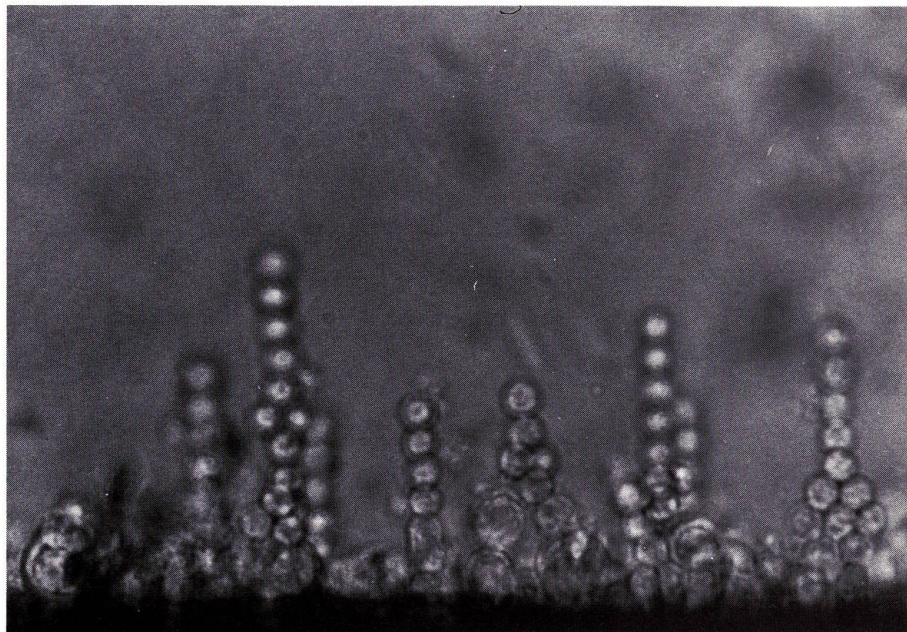
Photo 8. Fusion of protoplasts.(15sec.)



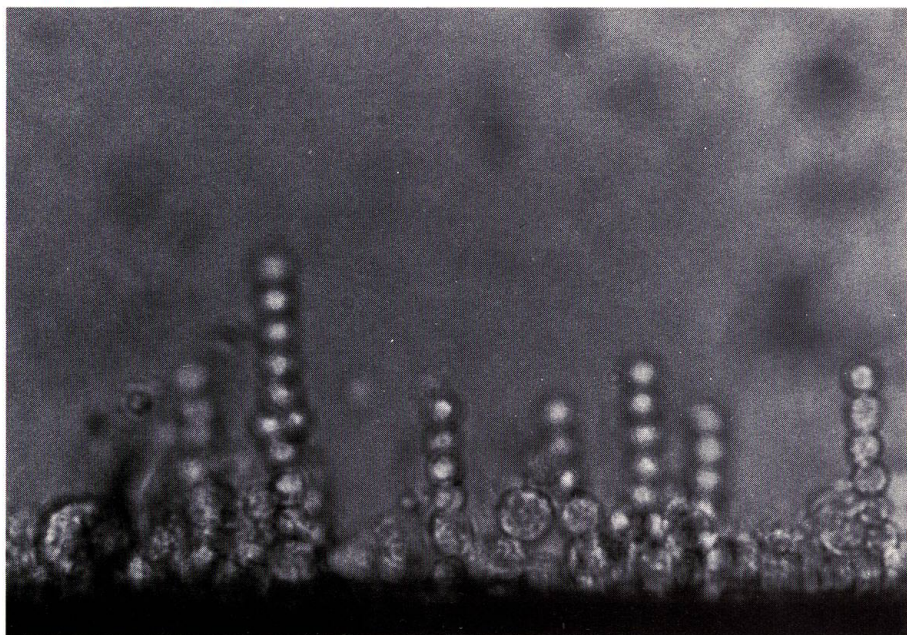
**Photo 9.** Fusion of protoplasts.(30sec.)



**Photo 10.** Fusion of protoplasts. (1min.)



**Photo 11.** Fusion of protoplasts. (3min.)



**Photo 12.** Fusion of protoplasts. (5min.)