



Title	電氣的細胞融合による食用担子菌の品種改良に関する研究
Author(s)	玉井, 裕; TAMAI, Yutaka
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 48(2), 445-461
Issue Date	1991-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21348
Type	departmental bulletin paper
File Information	48(2)_P445-461.pdf



電氣的細胞融合による食用担子菌の 品種改良に関する研究

— ヒラタケ属の種間融合株 —

玉 井 裕*

Electrical Fusion of Edible Basidiomycetes
Interspecific Fusant between *Pleurotus* Species

By

Yutaka TAMAI*

要 旨

ヒラタケ及びタモギタケ二種間の細胞融合を行い、融合株の作出を試み、エステラーゼア
イソザイムの電気泳動パターン及び偽クランプ様の菌糸構造より融合株 OCD-15 系統を得た。

融合株は細胞核数 0～5 個の多核体であった。正常なクランプ構造を持たず、偽クランプ
様の構造を有していた。菌糸成長速度は両親株系統よりも遅かったが、温度特性には変化がな
かった。パーベンダム反応に於いて β -ナフトールについてはヒラタケに類似していた。ガルス
酸及びレマゾールブリリアントブルーについては、両親株系統とは異なる反応を示した。栽培
試験の結果、タモギタケに類似した子実体原基を形成したが、子実体には発達しなかった。し
かしながら、OCD-15 系統よりプロトプラスト化を経て誘導した二次再生株はタモギタケに類
似するが菌柄部を持たない特異な形状の子実体を形成した。子実体には発芽能を持つ担子胞子
が形成された。

キーワード：細胞融合，ヒラタケ，タモギタケ，アイソザイム分析，子実体

結 言

キノコはこれまで主に嗜好性食品として扱われてきたが、近年、食物繊維、薬効性食品及
び医薬品開発素材等としても見直されつつある。またキノコの自然界での重要な働きの一つに

1991年3月31日受理 Received March 31, 1991

* 北海道大学農学部林産学科林産製造学講座

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

分解者としての作用があり、特にリグニン等の難分解性有機物の分解に関してパルプ産業や農業廃棄物の処理への応用が期待されている。

このような用途に対応するためには育種が必要となるが、従来の育種方法によっては対応に時間がかかるか、もしくは現状では困難か不可能であることも多い。このような状況に於いて一際注目されているのは、バイオテクノロジーの導入である。細胞融合法はその中の一方法であり、これまで不可能であった異種、異属間雑種の作出が期待されている。

細胞融合法として現在用いられている方法は化学的融合法¹⁻³⁾と電気的融合法⁴⁻⁸⁾である。化学的融合法の内でもポリエチレングリコール (PEG) 法²⁻³⁾は以前から広く研究され、一部に於いては実用化されているものもある。しかし、細胞に対しての毒性があることや融合頻度が低いこと等の問題がある。それに対して電気的融合法は、装置等に若干の費用がかかるものの、細胞に対して殆ど悪影響を与えずに高い頻度での融合を行うことの出来る利点を持っている。電気的融合法には、主に微小電極法⁴⁾、平行電極法^{5,6)}及び dielectrophoresis chamber 法^{7,8)}の3方法がある。

微小電極法を除く、他の融合方法に於いては非融合細胞と融合細胞、またはホモタリクな融合細胞とヘテロタリクな融合細胞が混在しており、融合操作の後にヘテロタリクな融合細胞を選抜する操作が必要となる。選抜方法として現在多く用いられているのは栄養要求性突然変異株⁹⁻¹¹⁾や薬物耐性突然変異株¹²⁾等の人為的に誘導した遺伝的マーカーを利用した方法である。これらの方法は細胞融合に関する基礎的な研究を行うためには有効な方法であるが、実際の育種に応用するためには安定した変異株の誘導と選抜等に時間がかかること、マーカーとして発現している部分以外の遺伝子にも損傷を与えてしまう可能性があること等の問題がある。実際の育種に応用するための選抜方法としては、融合の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処理等の一時的なマーカーを用いた方法が汎用性が高く、また本来の形質を損なう危険性も少ないため望ましい。

これまでキノコのプロトプラストの融合例は幾つか報告されているが¹³⁻²¹⁾、その内の殆どはPEG法により融合を行い、かつ栄養要求性等の人為的遺伝マーカーを利用して融合株を選抜したものである。電気的融合方法による報告例は少なく、しかも人為的遺伝マーカーを用いずに選抜を行った報告は極僅かである。

そこで本研究に於いては人為的遺伝マーカーを用いずに、電気的細胞融合法によるヒラタケとタモギタケの異種間体細胞雑種を作出することを目的とした。

本研究を進めるに当たり、懇切な御指導、御鞭撻を賜った北海道大学農学部林産学科林産製造学講座の香山彊元教授、寺澤實教授、三浦清助教授、小島康夫助手、同木材理学講座の深沢和三教授、同木材化学講座の笹谷宜志教授に対して厚く御礼を申し上げる。

尚、本論文は北海道大学審査学位論文の概要をまとめたものである。

I 章 供試菌の性状の検討

融合株の選抜指標として利用及び融合株としての性状を評価するための基礎的な資料とすべく、供試菌系統の性状を検討した。

I-1 実験方法

I-1-1 供試菌

以下のヒラタケ属二種の二次菌糸を用いた。

- ・ヒラタケ [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer]

[由来] 中華人民共和国河北省科学院微生物研究所との菌株交換により入手。

[本研究室に於ける登録呼称] ヒラタケ-8 (PO-8)

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

[由来] 北海道立林産試験場より譲渡。

[本研究室に於ける登録呼称] タモギタケ-2 (PC-2)

I-1-2 分類学的性質

子実体の菌傘、菌柄及び髯等の外部形態及び子実層の微細形態について観察を行い、両系統の分類学的性質を比較検討した。

I-1-3 培養上の性質

① 寒天培地上での菌糸成長度

以下の3種の培地について菌糸成長度を測定した。

- ・ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) [日水製薬株式会社製]
- ・醤油玉葱寒天培地 (SOA) [1.5%玉葱煎汁, 4%醤油, 2.5%グラニュー糖, 1.5%寒天]
- ・MYG寒天培地 (MYGA) [0.5%麦芽エキス, 0.5%酵母エキス, 2%グルコース, 1.5%寒天]

各々の培地はオートクレーブにより120°C, 15分間滅菌, 放冷後に使用した。

PDA平面培地上に伸ばした菌叢の先端部を直径5mmのコルボラーで打ち抜き、シャーレの中央部に接種し、23°Cのインキュベーター内で培養した。培養開始2日目からの毎日一定時刻に菌叢直径を測定した。

② 温度別菌糸成長度

PDA平面培地の中央部に両菌株を接種し、4°C~37°Cで各々培養を行い、7日後の菌叢直径を測定した。

③ 対峙培養

PDA平面培地の中央部に両菌株を3cm程度離して接種し、23°Cで培養した。3~10日後、菌叢接触部での対峙帯線の有無、色等を観察した。

I-1-4 栽培上の性質

① 米ヌカ加用木粉培地の調製

ブナ木粉(10メッシュ通過)と米ヌカ(20メッシュ通過)とを容積比4:1で混合し、蒸留水を加え含水率を約65%に調整した。800ml容栽培瓶に100ml当り65gの割合で詰め、オートクレーブで120°C、90分間滅菌、放冷後使用した。

② 培養及び発生

PDA平面培地上に伸ばした菌体を米ヌカ加用木粉培地に接種し、23°C、湿度70%、暗所に培養した後、発生室(湿度90%、照度約200ルクス)に移し、16°C及び23°Cの二条件に於いて子実体発生試験を行った。

I-1-5 交配上の性質

① 単孢子分離

子実体より無菌的に担子孢子を集め、滅菌水で適当濃度に希釈し、PDA平面培地上に接種した。23°Cで培養を行い、コロニー径が1~2mmとなったところでPDA斜面培地に移植した。成長した菌糸の一部を取って検鏡し、クランプの無いことを確かめ、一次菌糸として保存した。

② 交配試験

各々の一次菌糸をPDA平面培地上に5~10mm離して接種した。両株が接触してから3~5日後に接触部の菌糸を取って検鏡し、クランプ及び偽クランプの有無から交配の反応型を判断した。

I-1-6 バーベンダム反応²²⁻²⁵⁾

① 培地の調製

0.36%タンニン酸、0.01%グアヤコール*、1.0mMガルス酸、0.036%グアヤク脂*、1.0mM α -ナフトール*、1.0mM β -ナフトール*、1.0mML-アスコルビン酸、1.0mMアントラニル酸、1.0mMバニリン及び1.0mMシリンガルデヒド*を各々脱イオン水もしくはエタノール(*印)に溶かし、濾過滅菌した後、基本培地²⁴⁾に添加した。

② 培 養

PDA培地上に生育させた菌叢の先端部を直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、ペトリ皿中の各培地の中央部に接種した。23°Cで7~10日間培養した後、培地の呈色状況、菌糸成長度を記録した。

I-2 結果と考察

I-2-1 分類学的性質

両系統の分類学的性質をTable 1に示す。両系統は同属であるため、性質の大部分は類似していた。しかしながら、菌傘表面の色がヒラタケ-8では灰褐色~灰白色であるのに対し、タモギタケ-2では鮮黄色~淡黄色であること、及び子実体の発生形態がヒラタケ-8では子実体菌柄

Table 1. Taxonomic characters of cultivated fruit-bodies of the PO-8 and PC-2.

	<i>P. ostreatus</i> PO-8 strain	<i>P. cornucopiae</i> PC-2 strain
Cap	concave to funnel-shaped, brownish gray to weak gray, 2-9cm	concave to funnel-shaped, yellow, 2-7cm
Flesh	white, fragile	white, fragile
Gill	descending, white, close	descending, white, close
Stalk	White, 2-5cm, ϕ 0.5-1.5cm, central to lateral, separated clusters	white, 2-5cm, ϕ 0.5-1.5cm, central to eccentric, fused clusters
Spore	ellipsoidal, 6-11 \times 3-4 μ m, lilac-gray (spore print)	ellipsoidal, 6-9 \times 3-4 μ m, lilac-gray (spore print)
Basidium	homobasidium with 4 spores	homobasidium with 4 spores

の基部は一本ずつ離れているのに対して、タモギタケ-2では基部は株状に癒合していることの二点に於いて差異が認められた。

I-2-2 培養上の性質

① 寒天培地上での菌糸成長度

両系統の各培地に対する菌糸成長度を Fig. 1 に示す。ヒラタケ-8 の菌糸成長速度は SOA が最も速く、PDA 及び MYGA には差異が認められなかった。タモギタケ-2 については、三種の培地間で成長速度に関する顕著な差異は認められなかった。両系統共に PDA 上での菌糸成長度は安定していたが、SOA 及び MYGA 上で繰り返し継代培養を行うと成長速度が不安定になる傾向が認められた。従って、以後菌糸成長度の比較については PDA を用いることにした。

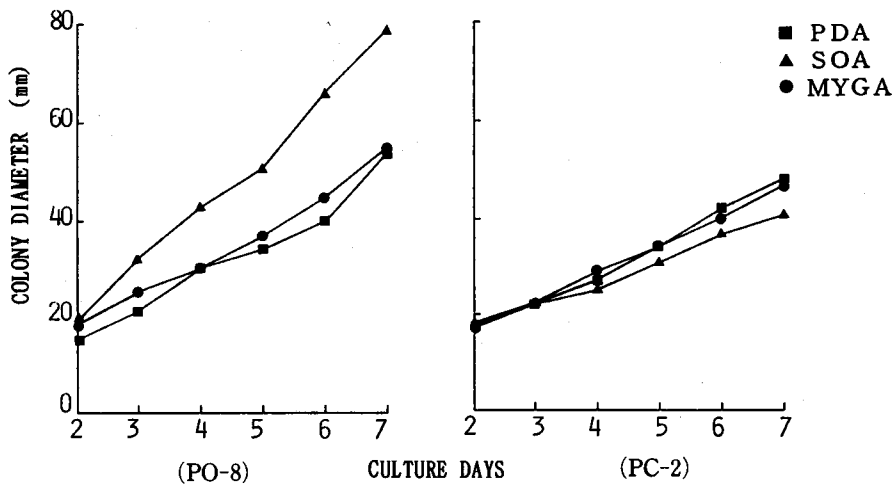


Fig. 1. Effect of media on mycelial growth of the two strains.

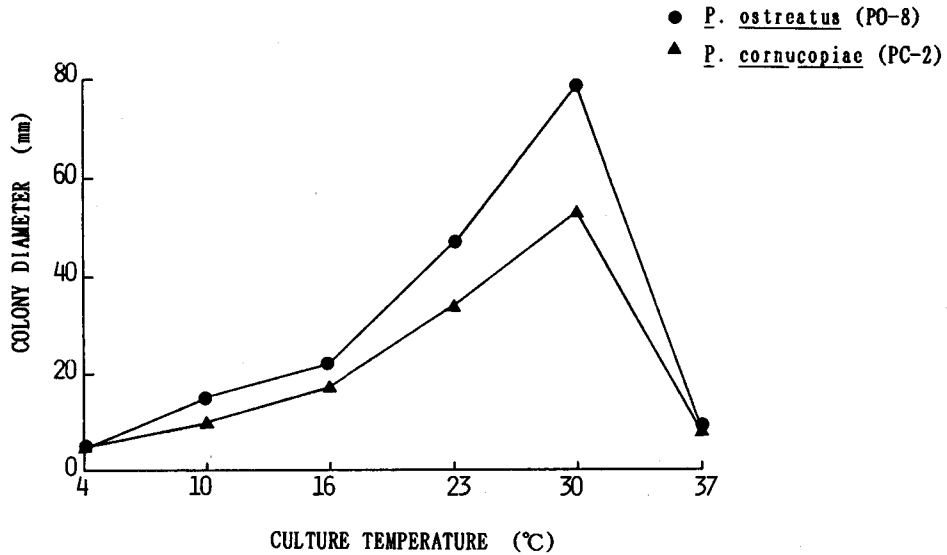


Fig. 2. Effect of temperature on mycelial growth of the two strains.

② 温度別菌糸成長度

両系統の各培養温度に対する菌糸成長度を Fig. 2 に示した。両系統共に 30°C で最高の成長度を示し、4°C 及び 37°C では殆ど成長しなかった。

③ 対峙培養

両系統の対峙培養を行ったところ、接触部に於いてタモギタケ-2 の菌叢はヒラタケ-8 によって被覆され、両菌叢の接触部には褐色の対峙線が形成された。

I-2-3 栽培上の性質

両系統共に種菌接種後、約 3 週間で培養が完了した。16°C では、タモギタケ-2 は子実体を全く形成せず、ヒラタケ-8 は時折子実体を形成したが収量、発生期間共に不安定であった。23°C では、両系統共に発生操作から 5 ~ 7 日後に子実体を形成した。両系統共に発生前に菌かき操作を必要としなかった。子実体収量は培地重量 480 g 当り、二回目の発生迄の合計でヒラタケ-8 が約 70 g、タモギタケ-2 が約 120 g であった。両系統共に二回目以後も子実体の発生が見られるが、奇形子実体の発生する傾向があったため、収量は二回目の発生迄を測定した。両系統共に同一の条件により子実体の発生が可能であることが判った。

I-2-4 交配系の性質

両系統共に和合組合せに於いてはクランプを形成し、B 因子共通組合せの菌叢接触部には偽クランプを形成する被覆四極性を示した。またバラージ及びフラット反応は見られなかった。ヒラタケ-8 については、四つの交配型 A1B1, A2B2, A1B2, A2B1 の他に、二つの交配型 A1B1 と A1B2 とに和合性を持つ変異交配型 A2B が確認された。両系統共に和合組合

せの一次菌糸間の交配によって得られた二次菌糸は、すべて正常な子実体を形成した。

I-2-5 バーベンダム反応

両系統は、フェノール性物質溶解用に使用したエタノール(最終濃度1%(V/V))により、成長抑制を受けたため、エタノールを添加したものと無添加のものとを各々コントロールとして各々の菌糸成長度の比較を行った。

各培地上での呈色状況及び菌糸成長度を Table 2 に示す。両系統の呈色状況は概ね類似していたが、 β -ナフトールの呈色程度に差異が認められた。両系統は共に β -ナフトール上では菌糸成長を示さないが、ヒラタケ-8 は接種片の外側約 2 cm に呈色帯を形成したのに対し、タモギタケ-2 は接種片が呈色したのみであった。ヒラタケ-8 は α -ナフトールに対しては成長抑制を殆ど受けないが、タモギタケ-2 の成長程度はおよそ二分の一に抑制された。

Table 2. Coloration of agar media and growth rates of the mycelia.

	PO-8 strain		PC-2 strain	
Control	-	77 ± 6 ^a mm	-	21 ± 5 mm
Control (Ethanol)	-	35 ± 3 mm	-	13 ± 2 mm
Tannic acid	+++	10 ± 3 ^b	+++	17 ± 3
Guaiacol*	+++	67 ± 7	+++	75 ± 3
Gallic acid	+++	85 ± 8	+++	100 ± 11
Guaiacum*	++	157 ± 10	++	144 ± 4
α -Naphthol*	+++	109 ± 9	+++	45 ± 12
β -Naphthol*	(++)	0	(+)	0
L-Ascorbic acid	-	101 ± 7	-	85 ± 8
Anthranilic acid	+++	21 ± 1	+++	40 ± 13
Vanillin	++	71 ± 5	++	73 ± 3
Syringaldehyde*	+++	94 ± 16	+++	64 ± 8

(+): no growth but coloration in and under inoculum plug only, (++): no growth but colored zone extending beyond plug, -: no coloration, +: coloration in and under inoculum plug only, ++: coloration extending under but not beyond the mycelial mat, +++: colored zone extending beyond edge of mycelium, a: colony diameter, b: growth rate; relative value for each control as 100, *: added with 1% ethanol.

II章 融合株選抜方法の検討

融合株を選抜する方法として、代謝阻害剤処理及びアイソザイム分析の利用を検討した。

II-1 実験方法

II-1-1 プロトプラストの調製

PDA 平面培地上に生育させた菌叢の先端部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、攪拌子とガラスビーズの入った MYG 液体培地に接種し、7~10 日間 23°C で静置培養を行った。培養期間中一日置きにマグネチックスターラーにより 10 分間攪拌を行った。

菌体を 1 G 1 グラスフィルター上に集め、滅菌水により数回洗浄した後、菌体約 100 mg を取り、2%セルラーゼオノズカ R-10 (Yakult HONSHA CO., LTD.), 0.6%ザイモリアーゼ 20 T (Seikagaku kogyo CO., LTD.), 6 units/ml キチナーゼ (Sigma Chemical Company) 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により未加水分解の菌体を濾別し、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-1-2 プロトプラストの再生

プロトプラスト懸濁液を適当濃度に希釈し、MYG 再生培地 (MYG 寒天培地に浸透圧調整用として 0.5 M サッカロースを添加したもの) 上にプレートした後、23°C で培養した。

II-1-3 代謝阻害剤処理²⁶⁻²⁹⁾

ヒラタケに対してはジエチルピロカーボネート、タモギタケに対してはヨード酢酸ナトリウムによって各々処理を行い、再生率の変化を測定した。

代謝阻害剤は各々 0.5 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により pH 5.6 に調整) に溶かし、濾過滅菌して使用した。

洗浄の終了した各々のプロトプラストに対して代謝阻害剤溶液を加え、4°C, 30 分間、80 回/分で振盪させながら処理を行った。処理終了後、遠心分離により洗浄を行い、MYG 再生培地上にプレートした。

II-1-4 アイソザイム分析

泳動担体としてポリアクリルアミドを用い、ゲルの調製及び電気泳動は白石³⁰⁾の方法に準拠して行った。

PDA 斜面培地上に伸ばした菌体を MYG 液体培地に接種し、23°C, 14 日間培養した。洗浄後の菌体 (湿重量で約 200 mg) をマイクロチューブに取り、0.5 ml の抽出用緩衝液³¹⁾を加え、アイスバス中で超音波破砕器により 1 分間破砕した。破砕液を、4°C, 11,750×g, 30 分間遠心分離にかけ、上澄みをアイソザイム分析用粗酵素サンプルとして使用した。

アイソザイムの活性染色は以下の 10 種について検討した。

エステラーゼ³²⁾, リンゴ酸脱水素酵素³³⁾, 酸性フォスファターゼ³⁴⁾, アルカリ性フォスファターゼ³⁵⁾, パーオキシダーゼ³³⁾, カタラーゼ³⁶⁾, ロイシンアミノペプチダーゼ³³⁾, アミラーゼ³³⁾, シキミ酸脱水素酵素³³⁾, アルコール脱水素酵素³³⁾

II-2 結果と考察

II-2-1 代謝阻害剤処理

プロトプラストの再生時に於ける融合株の選抜方法として, 代謝阻害剤処理を検討した。

代謝阻害剤処理終了後のプロトプラスト数は, 両系統共に処理前の約 1/10 に減少していた。これは, 代謝阻害剤, 遠心分離及び時間経過による自動的破壊³⁷⁾の相加的な作用によると考えられた。

ヒラタケ-8のプロトプラストに対して, ジエチルピロカーボネートにより処理を行った結果, プロトプラストの再生率は処理濃度の増加に伴い漸次低下し, 0.1%濃度時に再生率は, 0.03%となり, それ以上の濃度では再生率の低下は認められなかった (Fig. 3)。

タモギタケ-2のプロトプラストに対して, ヨード酢酸ナトリウムにより処理を行った結果, 0.5%濃度時に再生率は0.04%となり, それ以上の濃度では再生率の低下は認められなかった (Fig. 3)。

処理後, 融合を行わなかったプロトプラストの再生率は, 完全に0%であることが望ましいが, 阻害剤の作用限度及びプロトプラストの破壊頻度から, ヒラタケ-8についてはジエチルピロカーボネート 0.1%, タモギタケ-2についてはヨード酢酸ナトリウム 0.5%の処理が適当であると結論された。融合後に再生してきたコロニー全てを融合株と断定することはできないが, 全再生コロニーに対する融合コロニーの割合は高くなると考えられた。

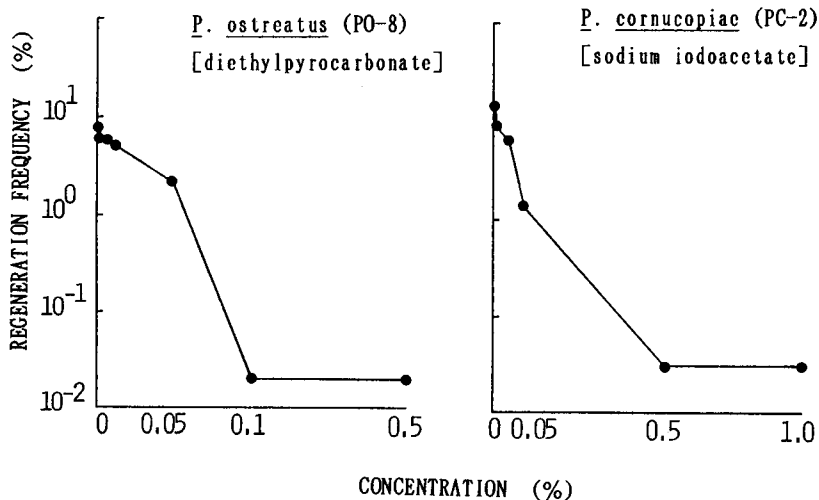


Fig. 3. Effect of metabolic inhibitor concentration on the regeneration frequency of the protoplasts.

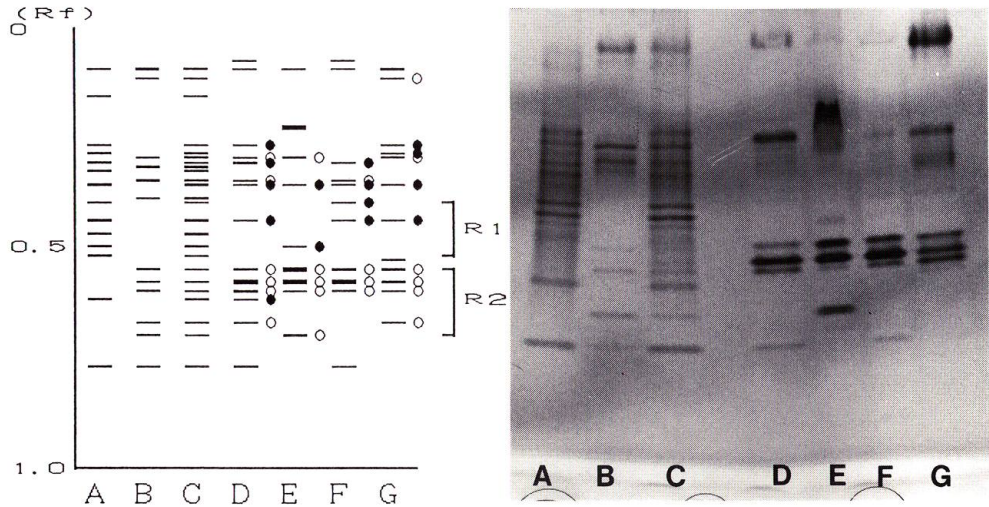


Fig. 4. Esterase isozyme patterns of the parental strains and the regenerants.

A: *P. ostreatus* (PO-8), B: *P. cornucopiae* (PC-2),

C: mixture of the two stains, D: regenerant No. 3,

E: regenerant No. 15, F: regenerant No. 44, G: regenerant No. 45,

R1: specific isozyme band region of the PO-8,

R2: specific isozyme band region of the PC-2,

●: isozyme bands originated in those of PO-8 (A),

○: isozyme bands originated in those of PC-2 (B).

II-2-2 アイソザイム分析

選抜に使用するためには、バンドパターンは明瞭かつ、対象系統間で重なり合わない部分を持つこと及び高い再現性が必要である。

アイソザイム分析を行った10種の酵素の内、バンドパターンが検出されたのは、エステラーゼ、マレートデヒドロゲナーゼ、酸性フォスファターゼ、カタラーゼであった。しかしながら、上述の条件を満たすのは、エステラーゼのみであった。両系統のアイソザイムパターンは明瞭且つ各々に特徴的であった(Fig. 4 A~C)。各々に特徴的なバンド領域を選定し、ヒラタケ-8についてはR1、タモギタケ-2についてはR2とし、後に融合株を選抜する際の目安とした。

III章 融合株の作出

III-1 実験方法

III-1-1 代謝阻害剤処理

両系統のプロトプラストについて、II-1-3の方法により代謝阻害剤処理を行った。ヒラタケに対しては0.1%ジエチルピロカーボネート、タモギタケに対しては0.5%ヨード酢酸ナトリウムによって各々処理を行った。

III-1-2 プロトプラストの融合及び再生

0.1 mM 塩化カルシウム及び 0.5 mM 塩化マグネシウムを添加した 0.5 M マンニトール溶液にプロトプラストを懸濁し、融合チャンバー³⁸⁾内に導入した。その後、2 MHz, 400 V/cm の高周波によりパールチェーンを形成させた後、40 μ sec, 4 KV/cm の直流パルスを一秒間隔で 5~10 回印加することによりプロトプラストを融合させた。

融合処理後のプロトプラストを MYG 再生培地上で再生させ、コロニーを分離し、PDA 培地上で継代保存した。

III-1-3 アイソザイム分析

分離した再生株について、II-1-4 の方法によりアイソザイム分析を行った。

III-2 結果と考察

代謝阻害剤未処理の両系統プロトプラストの再生率は、共に約 10% であった。代謝阻害剤処理後、両系統個別に測定した再生率は、共に 0.1% 以下であった。しかしながら、両系統プロトプラストを混合し、融合処理を行った後の再生率は 1.5% であったのに対して、融合処理を行わなかったプロトプラストの再生率は 1% であった。融合を行ったことにより、再生率の増加は認められたが、代謝阻害剤処理による選抜効果は不明瞭であった。

融合後の再生コロニー 50 株を分離し、PDA 斜面培地上で継代保存した。

エステラーゼについてのアイソザイム分析の結果、R 1 及び R 2 に於いて両親系統のアイソザイムバンドを併せ持つ系統 No. 3, 15, 44, 45 が見いだされた (Fig. 4)。菌糸の顕微鏡観

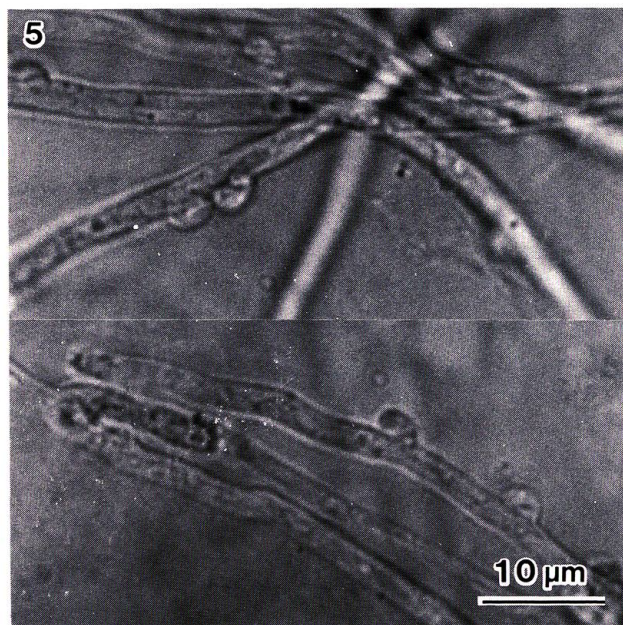


Fig. 5. Pseudo-clamp like structures observed on the hyphae of No. 15 strain.

察の結果、四系統全てにクランプ構造は確認されず、偽クランプ様の構造が見られた(Fig. 5)。これまで両系統について正常なクランプ構造を持つ二次菌糸から、単にプロトプラスト化によって偽クランプ様の構造が形成されたことはなく、融合により細胞内に共存する両系統由来のオルガネラが干渉し合い、正常なクランプ構造の形成が妨げられているものと推測された。

アイソザイム分析、及び菌糸体の偽クランプ様構造から、No. 3, 15, 44, 45 系統を融合株候補として選抜し、アイソザイム分析等の性状について繰り返し検討を行った。しかしながら、継代培養中に No. 3 は死滅し、No. 44 及び 45 は菌糸成長及びアイソザイムパターンが不安定となり、繰り返し性状の確認を行うことが困難であった。従って、性状の安定していた No. 15 を融合株と判定し、融合株 OCD-15 系統として以後の実験に用いた。

IV章 融合株の性状の検討

IV-1 実験方法

IV-1-1 細胞核数の測定

ギムザ染色法^{39,40)}、フォイルゲン反応染色法⁴¹⁾、プロピオン鉄ヘマトキシリン染色法⁴²⁾及び酢酸カーミン染色法⁴³⁾により細胞核染色を試み、結果の良好であった方法により、融合株の細胞核数を測定した。

IV-1-2 培養特性

① 菌糸成長度

I-1-3 の方法に従って PDA 培地上に於ける菌糸成長の温度特性を調べた。

② 対峙培養

I-1-3 の方法に従って培養を行い、対峙線の有無、菌叢接触部の色を観察した。

IV-1-3 バーペンダム反応

I-1-6 の方法により融合株のバーペンダム反応によるキャラクタリゼーションを行った。尚、参考としてパーオキシダーゼ活性検査試薬である 0.05% レマゾールブリリアントブルー R 塩⁴⁴⁻⁴⁶⁾を添加した培地を併せて用いた。

IV-1-4 栽培特性

I-1-4 の方法に従って、培地調製、培養及び子実体発生を行った。但し栽培瓶は 200 ml 容栽培瓶を使用した。

IV-2 結果と考察

IV-2-1 細胞核数

融合株の細胞核数を測定するために最適な核染色方法を検討した。検討した 4 方法中で細胞核が染まったのは、酢酸カーミン染色法とギムザ染色法であったが、安定した染色結果が得られたのは、ギムザ染色法のみであった。顕微鏡下での計数の結果、1 細胞当りの核数は、0 ~ 5 個であった。菌糸の成長が見られることから、オルガネラの増殖は行われているが、細胞

融合により介在している異種のオルガネラが正常な細胞分裂を阻害し、細胞隔壁の形成が不規則になっているものと推測された。また前述のように OCD-15 系統には正常なクランプ構造は存在せず、偽クランプ様の構造が存在することから、分裂時に於ける細胞核の挙動及び移送システムにも何等かの変化が生じているものと推測された。

IV-2-2 培養上の性質

PDA 平面培地上での菌糸成長度を親株と比較した結果、融合株の成長速度は全般的に両親株よりも遅かったが、温度特性は一致していた。対峙培養の結果、OCD-15 系統は、ヒラタケ-8、タモギタケ-2 両親株に対して褐色の対峙線を形成した。

IV-2-3 バーベンドム反応

ガルス酸についての呈色反応に特徴は認められなかったが、呈色後に短時間で脱色帯を形成するという両親株には見られない特性を示した (Fig. 6a)。これは、フェノールオキシダーゼの酸化反応による発色構造の生成に引続き、還元あるいは更に酸化分解が起こっているものと推定された。両親株についても更に 1 カ月程度培養を継続すると、脱色帯を形成するが、7~10 日間の培養で形成されることはなかった。 β -ナフトールの呈色程度については、ヒラタケ-8 に類似していた (Fig. 6 b)。 α -ナフトールに対する菌糸成長度には特徴が認められなかった。レマ

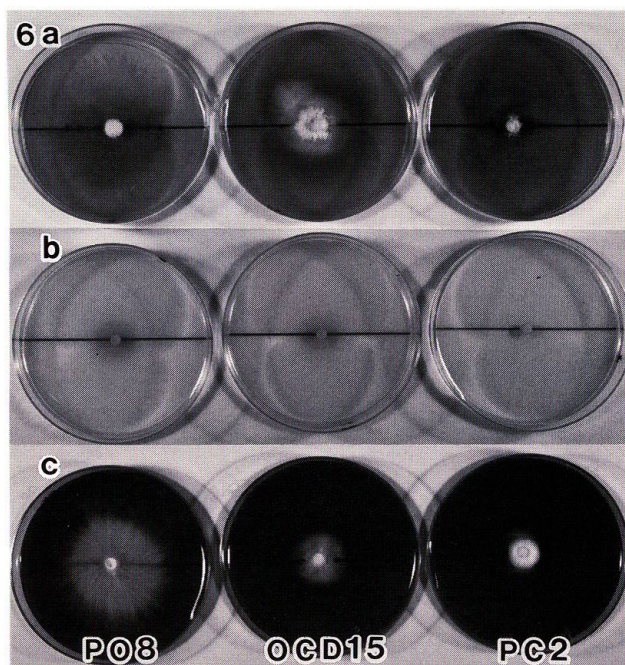


Fig. 6. Bavendamm's reactions of the OCD-15 and its parental strains.

a: gallic acid, b: beta-naphthol, c: remazol brilliant blue R salt, PO8: *P. ostreatus*, PC2: *P. cornucopiae*, OCD15: fusant.

ゾールブリリアントブルーの脱色帯の形成には特徴が認められた。ヒラタケ-8の脱色帯は菌叢先端部より内側に、またタモギタケ-2は菌叢先端部に脱色帯先端部がほぼ一致して形成されたのに対して、融合株は菌叢先端部より外側に形成された (Fig. 6c)。

IV-2-4 子実体形成能

米ヌカ加用木粉培地上に於ける栽培試験の結果、発生操作後5~7日目に融合株はタモギタケ-2に類似した子実体原基を形成したが、子実体には発達しなかった。これも偽クランプ様構造の形成の場合と同様に、異種のオルガネラの干渉によるものと推定された。

二次菌糸をプロトプラスト化することにより二核のプロトプラストと共に無核及び一核のプロトプラストが単離され、再生コロニーからは二次菌糸と共に一次菌糸を得ることが出来る。これは菌糸からプロトプラストが単離される際に、細胞壁の溶解が不均一であることに起因すると思われる。細胞核と同様に他のオルガネラについてもプロトプラストの単離過程に於いて各々のプロトプラストに対して不均一な配分となること考えられる。従ってプロトプラスト化により子実体の発達を妨げているようなオルガネラが欠落し、干渉作用が部分的に解除されることが期待されたため、融合株に対して再度プロトプラスト化を行った。

融合株よりプロトプラスト化を経て二次再生株50系統を分離し、PDA斜面培地上に継代保存した。それらは全て正常なクランプ構造を有していなかったが、栽培試験を行ったところ、発生操作後7~10日目に約70%が子実体を形成した。それらの子実体は、菌傘の色等の分類学的性状はタモギタケ-2に類似していたが、菌柄を形成せず、菌傘部のみから構成される特異なものであった (Fig. 7)。しかしながら、両親株に類似した形状で発芽能を持つ正常な担子胞子が形成された。

また、二次再生株についてのアイソザイム分析の結果、R2、即ちヒラタケ-8に由来するバンド領域に於いてアイソザイムバンドの増加が認められた。

OCD-15系統の形質発現系に於いて、共存する異種のオルガネラの相互の干渉作用がプロトプラスト化により部分的に解除されたことにより、子実体の形成及びアイソザイムバンドの増加が認められたものと推定された。

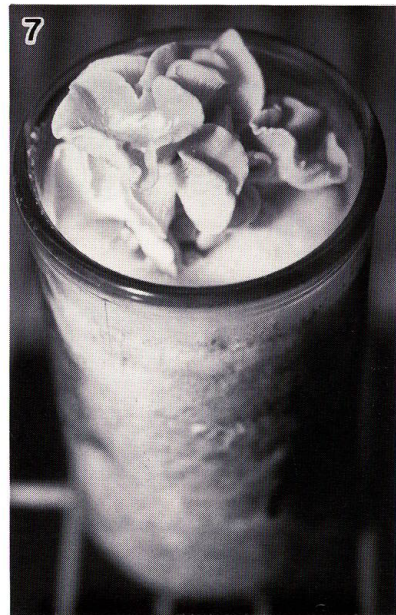


Fig. 7. Fruit-bodies of the regenerated strain from the OCD-15.

V章 結 言

電氣的細胞融合によるヒラタケとタモギタケの異種間体細胞雑種を人為的に誘導した遺伝マーカーを用いずに作出することを目的とし、融合株作出過程に於ける諸条件の検討を行った。

代謝阻害剤処理について高い確率での融合株の選抜を期待できる処理条件を得た。しかしながら、実際に融合を行ったところ明確な選抜効果は認められなかった。今後更に詳細な細胞生理と代謝阻害剤処理条件との関係を検討する必要がある。アイソザイム分析については、エステラーゼのアイソザイムパターンに於いて、両系統に明確な差異が見出された。

二種間の細胞融合を行い、融合株の作出を試み、アイソザイムパターン及び菌糸構造から融合株 OCD-15 系統を得た。融合株は細胞核数 0 ~ 5 個の多核体であり、正常なクランプ構造を持たず、偽クランプ様の構造を有していた。菌糸成長速度は両親株系統よりも遅かったが、温度特性には変化がなかった。パーベンダム反応に於いて β -ナフトールについてはヒラタケ-8 に類似していた。ガルス酸及びレマゾールプリリアントブルーについては、両親株系統とは異なる反応を示した。栽培試験の結果、タモギタケ-2 に類似した子実体原基を形成したが、子実体には発達しなかった。しかしながら、OCD-15 系統よりプロトプラスト化を経て誘導した二次再生株はタモギタケ-2 に類似するが菌柄部を持たない特異な形状の子実体を形成した。子実体には発芽能を持つ担子孢子が形成された。

以上の結果より特定の人為的遺伝マーカーの用いずに、菌株が本来有する性質を利用した融合株選抜の可能性が示唆された。融合株の二次再生株の子実体の形状は特異なものであるが、栽培品種としての評価を行うためには、更に綿密な栽培試験を行う必要がある。しかしながら、発色団の迅速破壊といったフェノール性物質に対する反応性は興味深く、今後パルプ廃液の脱色、バイオブリーチング等への応用を目的とした研究素材として有望であると考えられた。

本研究に於いては、近縁種であるヒラタケとタモギタケを用いたが、クランプの形成や子実体の発生に際して、異種のオルガネラの干渉作用と思われる現象が認められた。将来的に属間等遠い種間での融合を試みる際には、更に強固な干渉作用が現れることも考えられる。従って今後これらの干渉作用を打破する方法の検討も必要となるであろう。

また、担子菌類に於いては、交配和合性因子、クランプ形成、子実体の分化機構等、未だ完全には解明されていない現象が多く存在する。融合株作出過程に於ける諸条件の検討や融合株の性状の解明に対して、これらの現象の解明は大きく関与すると思われるが、一方、多くの融合株を取得しその性状を解析することにより、これらの現象を解明する糸口が見いだされる可能性も大きいと思われる。

参 考 文 献

- 1) Power, J. B.; Cummins, S. E.; Cocking, E. C.: *Nature*, **225**, 1016-1018 (1970).
- 2) Kao, K. N.; Michayluk, M. R.: *Planta*, **115**, 355-367 (1974).
- 3) Anne, J.; Peberdy, J. F.: *Arch. Microbiol.*, **105**, 201-205 (1975).
- 4) Senda, M.; Takeda, J.; Abe, S.; Nakamura, T.: *Plant Cell Physiol.*, **20**, 1441-1443 (1979).
- 5) Neumann, E.; Gerisch, G.; Opatz K.: *Naturwiss.*, **67**, 414-415 (1980).
- 6) Teissie, J.; Knutson, V. P.; Tsong, T. Y.; Lane, M. D.: *Science*, **216**, 537-538 (1982).
- 7) Zimmermann, U.; Scheurich, P.: *Planta*, **151**, 26-32 (1981).
- 8) Zimmermann, U.: *Biochem. Biophys. Acta*, **694**, 227-277 (1982).
- 9) 武丸恒雄, 鎌田 堯: 菌草研究所研究報告, **9**, 21-40 (1971).
- 10) Takemaru, T.; Kamada, T.: *Bot. Mag. Tokyo*, **85**, 51-55 (1972).
- 11) Kim, K. S.; Cho, N. Y.; Pai, H. S.; Ryu, D. D. Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (3), 689-693 (1983).
- 12) Delbruck, M.; Ootaki, T.: *Genetics*, **92**, 27-30 (1979).
- 13) Gold, M. H.; Cheng, T. M.; Alic, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (1), 260-263 (1983).
- 14) Kiguchi, T.; Yanagi, S. O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 121-127 (1985).
- 15) Ohmasa, M.: *Japan J. Breed.*, **36**, 429-433 (1986).
- 16) Toyomasu, T.; Matsumoto, T.; Mori, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **50** (1), 223-225 (1986).
- 17) Toyomasu, T.; Mori, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **51** (3), 935-937 (1987).
- 18) Toyomasu, T.; Mori, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **51** (7), 2037-2040 (1987).
- 19) Sonnenberg, A. S. M.; Wessels, J. G. H.: *Theor. Appl. Genet.*, **74**, 654-658 (1987).
- 20) Ohba, K.; Kawasumi, T.; Yanagi, S. O.: *Trans. mycol. Soc. Japan*, **29**, 271-280 (1988).
- 21) 三浦 清: 北海道大学農学部演習林研究報告, **46** (2), 343-391 (1989).
- 22) Fukuzumi, T.: *J. Jpn. Forestry Soc.*, **35** (4), 139-141 (1953).
- 23) Bavendamm, W.: *Zeitschr. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, **38**, 257-276 (1928).
- 24) Davidson, R. W.; Campbell, W. A.; Blaisdell, D. J.: *J. Agric. Res.*, **57** (9), 683-695 (1938).
- 25) Kirk, T. K.; Kelman, A.: *Phytopathology*, **55**, 739-745 (1965).
- 26) Wright, W. E.: *Experimental Cell Research*, **112**, 395-407 (1978).
- 27) Nehls, R.: *Molec. Gen. Genet.*, **166**, 117-118 (1978).
- 28) Sidorov, V. A.; Menczel, L.; Nagy, F.; Maliga, P.: *Planta*, **152**, 341-345 (1981).
- 29) 金田克己: 昭和63年度北海道大学農学部林産学科卒業論文, 1989.
- 30) 白石 進: 林木の育種, **142**, 23-25 (1987).
- 31) Toyomasu, T.; Matsumoto, T.; Mori, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **50** (1), 223-225 (1986).
- 32) 門松昌彦: 北海道大学農学部演習林研究報告, **40** (1), 1-48 (1983).
- 33) 白石 進: 林木の育種, **143**, 34-37 (1987).
- 34) 北本 豊, 立石貴浩, 香川郁子, 市川吉夫: 鳥取大学農学部研究報告, **39**, 24-30 (1986).
- 35) Brewer, G. J.: "An Introduction to Isozyme Techniques", Academic Press, 1970, p. 92-94.
- 36) 青木幸一郎, 永井 裕: "最新電気泳動法", 廣川書店, 1986, p. 593.
- 37) 久保英二: 昭和61年度北海道大学農学部林産学科卒業論文, 1987.
- 38) 玉井 裕, 三浦 清, 香山 彊: 北海道大学農学部演習林研究報告, **46** (2), 425-440 (1989).
- 39) Colotelo, N.; Grinchenko, A. H. H.: *Can. J. Bot.*, **40**, 439-446 (1962).
- 40) 本山誠治: 採集と飼育, **8**, 388-389 (1982).
- 41) 田中克己, 浜 清: "顕微鏡標本の作り方, 第7版", 裳華房, 1967, p. 199-202.
- 42) Lu, B. C.: *Chromosoma*, **22**, 210-226 (1967).
- 43) 田中克己, 浜 清: "顕微鏡標本の作り方, 第7版", 裳華房, 1967, p. 189-190.

- 44) Ulmer, D. C. ; Leisola, M. S. A. ; Fiechter, A. : J. Biotechnol., 1, 13-24 (1984).
- 45) Kuwahara, M. ; Asada, Y. ; Kimura, Y. ; Aokage, M. : J. Jpn. Wood Res. Soc., 33 (10), 751-828 (1987).
- 46) Nishida, T. ; Kashino, Y. ; Mimura, A. ; Takahara, Y. : J. Jpn. Wood Res. Soc., 34 (6), 530-536 (1988).

Summary

Protoplasts of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. and *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira were fused by the electrical-fusion method. Four strains of the 50 regenerants had both parental isozyme-bands of esterase, and they had pseudo clamp-like structures and multinucleated cells. For the stability of mycelial growth and isozyme patterns, one of the four strains was concluded to be a fusant. It showed characteristic reactions to the gallic acid. It formed a primordium, but did not develop a fruit-body. Regenerated strains that were obtained from protoplasts of the fusant formed fruit-bodies similar to the *P. cornucopiae*, but have no stalk. Intact-shaped basidiospores were formed at the fruit-bodies, and they had germinating ability.