



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第2934号
Issue Date	1991-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3052817
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32771
Type	doctoral thesis
File Information	2934.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

林産学専攻 博士後期課程

玉 井 裕

目 次

I 章 緒言	(1)
II 章 供試菌の性状の検討	(5)
II-1 実験方法	(5)
II-1-1 供試菌	(5)
II-1-2 分類学的性質	(6)
II-1-3 培養上の性質	(6)
II-1-4 栽培上の性質	(9)
II-1-5 交配上の性質	(9)
II-1-6 バーベンダム反応	(10)
II-1-6-1 培地の調製	(11)
II-1-6-2 培養	(12)
II-2 結果と考察	(13)
II-2-1 分類学的性質	(13)
II-2-2 培養上の性質	(15)
II-2-3 栽培上の性質	(20)
II-2-4 交配系の性質	(21)
II-2-5 バーベンダム反応	(23)
II-3 まとめ	(29)
III 章 プロトプラスト性状の検討	(30)
III-1 実験方法	(30)
III-1-1 供試菌の調製	(30)

Ⅲ－１－２	プロトプラストの調製	(3 0)
Ⅲ－１－３	プロトプラストの再生	(3 1)
Ⅲ－１－４	粒径分布の測定	(3 2)
Ⅲ－２	結果と考察	(3 2)
Ⅲ－３	まとめ	(3 5)
IV章	融合方法の検討	(3 8)
IV－１	実験方法	(3 8)
IV－１－１	融合チャンバーの製作	(3 8)
IV－１－２	融合システム	(4 1)
IV－１－３	融合条件	(4 2)
IV－２	結果と考察	(4 2)
IV－２－１	融合チャンバー	(4 2)
IV－２－２	融合条件	(4 5)
IV－３	まとめ	(4 5)
V章	融合株選抜方法の検討	(4 6)
V－１	実験方法	(4 6)
V－１－１	代謝阻害剤処理	(4 6)
V－１－２	アイソザイム分析	(4 6)
V－１－２－１	電気泳動	(4 6)
V－１－２－２	活性染色	(5 0)
V－２	結果と考察	(5 6)
V－２－１	代謝阻害剤処理	(5 6)
V－２－２	アイソザイム分析	(6 1)

V-3	まとめ	(62)
VI章	融合株の作出	(63)
VI-1	実験方法	(63)
VI-1-1	プロトプラストの調製	(63)
VI-1-2	代謝阻害処理	(63)
VI-1-3	プロトプラストの融合及び再生	(63)
VI-1-4	アイソザイム分析	(63)
VI-2	結果と考察	(64)
VI-3	まとめ	(65)
VII章	融合株の性状の検討	(66)
VII-1	実験方法	(66)
VII-1-1	顕微鏡観察	(66)
VII-1-1-1	染色方法	(66)
VII-1-1-2	観察方法	(69)
VII-1-2	培養特性	(70)
VII-1-2-1	菌糸生長度	(70)
VII-1-2-2	対峙培養	(70)
VII-1-3	バーベンドム反応	(70)
VII-1-4	栽培特性	(71)
VII-1-5	交配反応	(71)
VII-2	結果と考察	(72)
VII-2-1	細胞核数	(72)
VII-2-2	培養上の性質	(74)

VII-2-3	バーベンドム反応	(74)
VII-2-4	子実体形成能	(76)
VII-2-5	交配反応	(77)
VII-3	まとめ	(79)

VIII章	結論	(80)
-------	----	------

	謝辞	(83)
--	----	------

	参考文献	(84)
--	------	------

	写真	(93)
--	----	------

I 章 緒言

我が国は国土が南北に長く、亜熱帯から亜寒帯に属し、湿度も高く、多種多様なキノコ類が生息している。日本に産するキノコの種類は1500～5000種と言われ、その内食用キノコは約300種以上あると言われている¹⁾。

日本人は古くからキノコに親しみ、多くのキノコを食用としてきた。シイタケについては江戸時代（寛文年間）から原始的ながら栽培が行われていた記録が存在するが、他は全て山野に発生するものを採取し食用としていた。明治から昭和にかけての技術の進歩により、シイタケの純粹培養種菌栽培法が開発され²⁾、その技術がヒラタケ、ナメコ、エノキタケ等に取り入れられ、キノコ産業が発達し、食卓に上る栽培キノコの種類も豊富になってきた。

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、近年の食と健康への関心の高まりから、ダイエタリーファイバー（食物繊維）、薬効性食品及び医薬品開発素材として見直されつつある³⁾。

またキノコの自然界での重要な働きの一つに分解者としての作用がある。キノコは特にリグニン等の難分解性有機物の分解に関与しており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³⁾。

このような用途に対応するためには、育種が不可欠であるが、選抜、交配等の従来の育種方法によっては対処に時間がかかるか、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⁴⁻¹⁰⁾と電氣的融合法¹¹⁻²¹⁾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⁶⁻⁸⁾は以前から広く研究され、一部酵母等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。それに対して電氣的融合法は、化学的融合法に比べて装置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。

電氣的融合法には電気刺激を与える方式により主に次の3つに分けられる。

1) 微小電極法はSendaら¹¹⁻¹³⁾によって開発された、微小なガラス電極を直接プロトプラスト対にあてることにより電気刺激を与え融合させる方法である。この方法によれば選抜を必要とせず、融合細胞を確実に得られ、また融合過程を顕微鏡下で詳細に追求できる等の利点がある。その反面、融合効率が低いこと、またキノコのような微小なプロトプラストに対しては適用が困難であること等の欠点がある。キノコ類に於いてはタモギタケのジャイアントプロトプラストについての融合例があるのみである^{22, 23)}。

2) 平行電極法はNeumannら¹⁴⁻¹⁵⁾によって開発された方法で、一對の平行に並べた金属板（または金属線）電極をガラス板等に固定し、電極間にプロトプラスト懸濁液を入れ、電気パルスを与えて融合させる方法である。この方法の特徴は、一度に多量のプロトプラストに電気刺激を与え融合させることが出来ることである。しかしながら融合効率は低い。

3) dielectrophoresis chamber法はZimmermann¹⁷⁻¹⁹⁾によって開発

された方法で、平行電極法とPohlのdielectrophoresis法^{20,21)}とを組み合わせた方法である。原理及び操作は平行電極法とおおむね同様であるが、最大の特徴は交流高周波による誘電泳動 (dielectrophoresis) によりプロトプラストを数珠つなぎ状 (パールチェーン) とした後に、直流パルスを与えて融合させる点である。この方法によると他の二方法と比べて非常に高い頻度で融合を行うことが可能となる。最近になって市販の融合装置が出始めたが、殆どがこの方法を応用したものである。本研究に於いては、融合効率の高さから dielectrophoresis chamber法を採用した。

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、または同種 (ホモタリック) 融合細胞と異種 (ヘテロタリック) 融合細胞が混在しており、融合操作の後にヘテロタリッ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²⁴⁻²⁶⁾や薬物耐性突然変異株²⁷⁾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変異株の誘導と選抜等に時間がかかり、汎用性にも乏しく、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いる可能性もある。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^{28,29)}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。そこで本研究に於いては人為的な遺伝マーカーを用いずに融合株を選抜する方法を検討した。

前述したような融合方法を効率よく活用するため、また融合株の

選抜に関して、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は、対象となる種及び系統の生理、形態等の性状を詳細に調べ、把握することが必要である。

これまでキノコ（担子菌）類のプロトプラストの調製例は以前から数多く報告されている³⁰⁻³⁸⁾。融合例も幾つか報告されているが³⁹⁻⁴⁷⁾、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。電氣的融合方法による報告例は少なく^{46, 47)}、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⁴⁷⁾は極僅かである。

本研究は人為的遺伝マーカーを用いずに、電氣的細胞融合法によるヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) とタモギタケ (*Pleurotus cornucopiae*) の異種間体細胞雑種を作出することを目的とした。

以下のⅡ章に於いては、先ず融合株の選抜指標となるような各々の系統に固有の特徴を見出すため、形態、培養、バーベンダム反応等に関する基礎的なデータ収集を行った。Ⅲ章に於いては、プロトプラストの収量及び再生率の安定化を目的とし、プロトプラスト調製方法の検討を行った。Ⅳ章に於いては、再現性の高い融合条件を確立するために、融合チャンバーの製作及び融合操作の検討を行った。Ⅴ章に於いては、融合株選抜方法として、代謝阻害剤処理、アイソザイム分析についての検討を行った。Ⅵ章に於いては、二種間の細胞融合を行い、融合株の作出を試みた。最後のⅦ章に於いては、Ⅵ章で得た融合株の性状の検討を行った。

Ⅱ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（親株）の性状を検討した。

Ⅱ－１ 実験方法

Ⅱ－１－１ 供試菌

以下のヒラタケ (Pleurotus) 属二種の各一系統（二次菌糸）を用いた。

・ヒラタケ

[学名] Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) Kummer

[所属] ハラタケ目、ヒラタケ科、ヒラタケ属

[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した。

[入手元に於ける登録呼称] 不明

[本研究室に於ける登録呼称] ヒラタケ-8 (PO-8)

・タモギタケ

[学名] Pleurotus cornucopiae (Paulet) Rolland var.

citrinopileatus (Sing.) Ohira

[所属] ハラタケ目、ヒラタケ科、ヒラタケ属

[由来] 北海道立林産試験場より譲り受けた。

[入手元に於ける登録呼称] 76-5

[本研究室に於ける登録呼称] タモギタケ-2 (PC-2)

両系統の菌株はポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地上で継代保存し、実験に供した。

両種の生活環はFig.2-1に示す通りである。両種は通常生活史の大部分を二次菌糸、即ち重相 ($n+n$) の状態で生活している。二次菌糸から子実体を形成し、子実体のひだの外表面にある担子器の中で二種の核の融合が起こり複相 ($2n$) となるが、直ちに減数分裂を行い、一つの担子器当たり通常四個の担子胞子を生ずる。担子胞子が発芽して生ずる菌糸を一次菌糸と呼び、一種類の核 (n) を持つ。適合する和合性因子を持つ一次菌糸同志でのみ菌糸接合が起こり二次菌糸が生ずる。二次菌糸は二種類の核を持つヘテロカリオンであり、二次菌糸が増殖し、再びその菌糸体から子実体を生ずる。

II-1-2 分類学的性質

木粉培地上で発生させた子実体の外観及び微細形態を観察し、今関と本郷¹⁾による両種の分類に関する記述と比較検討した。

II-1-3 培養上の性質

①寒天培地上での菌糸生長度

以下の3種の培地について菌糸生長度を測定した。

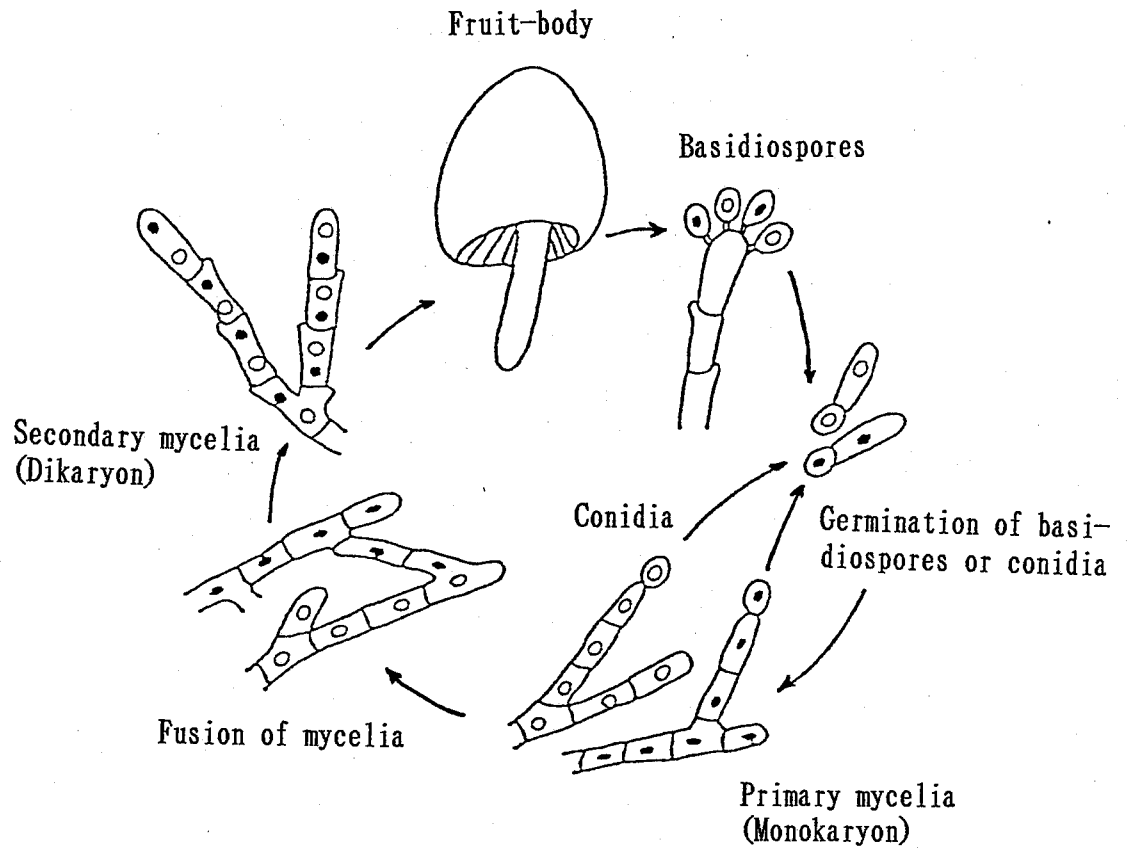


Fig.2-1 Typical life cycle of basidiomycetes.

・ポテトデキストロース寒天培地 (PDA)

日水製薬株式会社製品 39 g/ℓ

組成: ポテト浸出末 4 g

グルコース 20 g

寒天 15 g

・醤油玉葱寒天培地 (SOA)

15% 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% マルトイエクストラクト

0.5% イーストイエクストラクト

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℃、15分間滅菌後、直径9 cmの滅菌済みシャーレに無菌的に分注、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5 mmのコルボラーで打ち抜き、シャーレの中央部に接種し、23℃のインキュベーター内で培養した。培養開始2日目から毎日一定時刻に菌叢直径を測定した。

②温度別菌糸生長度

PDA平面培地の中央部に両菌株を接種し、4℃、10℃、16℃、23℃、30℃、37℃のインキュベーターで各々培養した。培養開始2日目から毎日一定時刻に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℃で培養した。3～10日後、菌叢接触部での対峙帯線の有無、色彩等を観察した。

II-1-4 栽培上の性質

・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℃、90分間滅菌、放冷後使用した。

・培養及び発生

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

II-1-5 交配上の性質

①単孢子分離

Ⅱ－１－４の手順で発生させた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℃で2～5日間培養後検鏡し、他と離れて発芽している孢子の位置をシャーレの底にマジックインキで印をつけた。更に培養を続けコロニー径が1～2mmとなったところで個別にPDA斜面培地に移植した。斜面一杯生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

各々の一核菌糸をPDA平面培地上に5～10mm離して接種した。両菌株が接触してから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。

Ⅱ－１－６ バーベンダム反応

ヒラタケ-8、タモギタケ-2に以下の各々三系統を加えて、性状の系統間比較及び種間比較を行った。

・ヒラタケ-1

[由来] 北海道立林産試験場より譲り受けた栽培株。

・ヒラタケ-4

[由来] 同上

・ヒラタケ-771

[由来] 同上

・タモギタケ-M2-1

[由来] タモギタケ-2の担子孢子より分離した一次菌糸。

・タモギタケ-D213

[由来] タモギタケ-2の担子孢子より分離した一次菌糸同志を交配して得た二次菌糸。

・タモギタケ-5

[由来] 北海道大学構内に発生した子実体より分離した野生株。

各系統はPDA斜面培地上で継代保存されているものから、PDA平面培地に移植し、7～14日間培養した菌糸を接種源とした。

II-1-6-1 培地の調製

・基本培地

基本培地として福住によって報告されている半合成培地を使用した。²⁾

[培地組成]

2.0%	グルコース
0.15%	リン酸1カリウム
0.02%	リン酸2カリウム
0.1%	ペプトン
0.05%	硫酸マグネシウム
0.001%	硫酸第1鉄
3.0%	寒天
pH 6.0 (1N水酸化カリウムにより調整)	
各添加比率は重量/容積である。	

・添加物質

反応検査用物質として以下のフェノール類を各々単独で添加した。

0.36%	(W/V)	タンニン酸
* 0.01%	(V/V)	グアヤコール
* 1.0 mM		α -ナフトール
* 1.0 mM		β -ナフトール
* 0.01%	(V/V)	オイゲノール
* 0.01%	(V/V)	イソオイゲノール
1.0 mM		カテコール
1.0 mM		アントラニル酸
* 0.02%	(V/V)	m-クレゾール
1.0 mM		フロログルシノール
* 1.0 mM		シリンガルデヒド

各々を脱イオン水もしくはエタノール（上記*印）に溶かし、濾過滅菌した後、基本培地に添加した。各溶液の培地に対する最終濃度は1%（V/V）とした。

II-1-6-2 培養

PDA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、直径9 cmのペトリ皿中の各培地の中央部に接種した。23℃、湿度70%、暗黒下で7～10日間培養した後、培地の呈色状況、菌糸生長及び菌叢の形態を調べた。

Ⅱ－２ 結果と考察

Ⅱ－２－１ 分類学的性質

ヒラタケ属に於いては、Pleurotus ostreatusとP. columbinus、P. ostreatusとP. sajor-cajuのような種間で交配反応が認められたり³⁾、カンタケ (P. spodoleucus)⁴⁾やウスヒラタケ (P. pulmonarius) のように帰属の不明確な種が存在するなど、未だ分類上不明瞭な部分が多い。従って、実験に用いる系統毎に分類上の性状を検討し、独自に把握しておく必要がある。そこで、木粉培地上で発生させた子実体の外観及び微細形態を観察し、両種の分類に関する記述と比較検討した。ヒラタケ-8の子実体をPhoto.2-1に、タモギタケ-2の子実体をPhoto.2-2に示す。

[ヒラタケ8]

菌傘は径2～10 cm、初め圧凹形、後開いてろうと形となる。表面は灰褐色もしくは灰白色。肉は薄く、軟らかで脆く、白色。ひだは菌柄に長く垂生し、白色または灰色をおび、初め密であるが、後やや疎となる。菌柄は長さ2～5 cm、幅0.5～1.5 cmで白色、しばしば基部に白色の毛を密生する。基部は癒合しない。菌傘に対する付き方は、中心生、偏心生、側生と発生条件によって変化する。つばはない。胞子紋は白色～紫灰色。胞子は円柱形、6～11×3～4 μm。担子器は長棍棒形、四孢子性。縁シスチジアは棍棒形～紡錘形で、先端に一個のとめ針状の小突起を持つ。側シスチジアはない。

中国では「側耳」もしくは「平茹」と呼ばれ、培養基として棉子

皮を用いた栽培が広く行われている⁵⁾。

同日本産種は、主に初秋から初冬にかけ、広葉樹の枯木や倒木、切株等に多数発生する。強い白色腐朽性を持つ。優秀な食用菌で、広く人工栽培され（主に鋸屑栽培）、一般に「しめじ」の名で売られている。ほぼ全世界に分布する。

[タモギタケ2]

菌傘は径2～7 cm、初め僅かに頂部のくぼんだ饅頭形、後菌傘が開くにつれて速やかにろうと形となる。表面は鮮黄～淡黄色で、滑らかであるか、または菌傘の中央部、或は縁に白くて細かい、繊維状～綿毛状の鱗片を付着する。肉は白色で薄く、脆い。ひだは白色、後やや黄色となり、菌柄に長く垂生する。配列はやや疎。菌柄は2～5×0.5～1.5 cm、ほぼ円柱形、白または僅かに黄色をおび、基部で互いに癒合し株状となる。ほぼ中心生。つばはない。胞子紋は紫灰色。胞子は6～9×3～4 μm、円柱形。担子器は棍棒形、四孢子性。縁シスチジアは10～35×3～6 μm、やや歪んだ紡錘状～棍棒状で、先端に一個のとめ針状の小突起を持つ。側シスチジアはない。

初夏～初秋にかけて広葉樹の倒木、切株等に株状に群生する。白色腐朽性。優秀な食用菌で人工栽培が行われている。分布：日本（北海道・本州北部・九州熊本）・中国東北部・ソ連極東地方。

両系統は同属であるため、分類学的な特性の大部分は非常に類似していた。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、明確な差異が認められた。

Ⅱ-2-2 培養上の性質

①寒天培地上での菌糸生長度

ヒラタケ-8及びタモギタケ-2をPDA、SOA及びMYGA平面培地上で培養し、菌糸生長度を比較した。

ヒラタケ-8の各培地に対する菌糸生長度をFig.2-2に示した。縦軸にコロニー径、横軸に培養日数を示してある。生長速度は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の各培地に対する菌糸生長度をFig.2-3に示した。三種の培地間で生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上での菌糸生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生長速度が不安定になる傾向が認められた。従って、以後菌糸生長度の比較についてはPDAを用いることにした。

②温度別菌糸生長度

PDA平面培地上に於いて4℃、10℃、16℃、23℃、30℃、37℃で各々培養し、菌糸生長度を比較した。

ヒラタケ-8の各温度に対する菌糸生長度をFig.2-4に示した。縦軸にコロニー径、横軸に培養日数を示してある。30℃で最高の生長速度を示し、4℃及び37℃では殆ど生長しなかった。

タモギタケ-2の各温度に対する菌糸生長度をFig.2-5に示した。

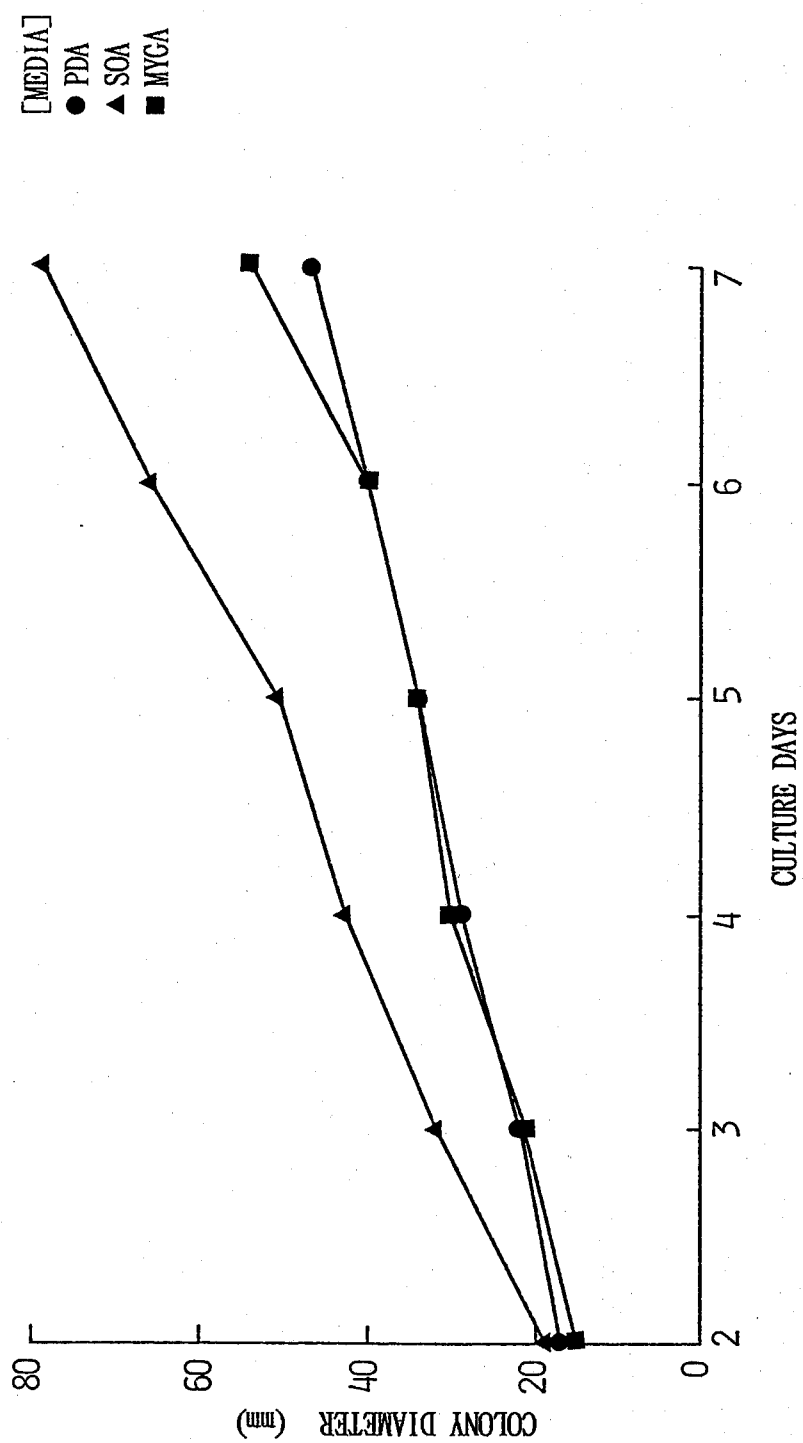


Fig.2-2 Effect of media on mycelial growth of the PO-8 strain.

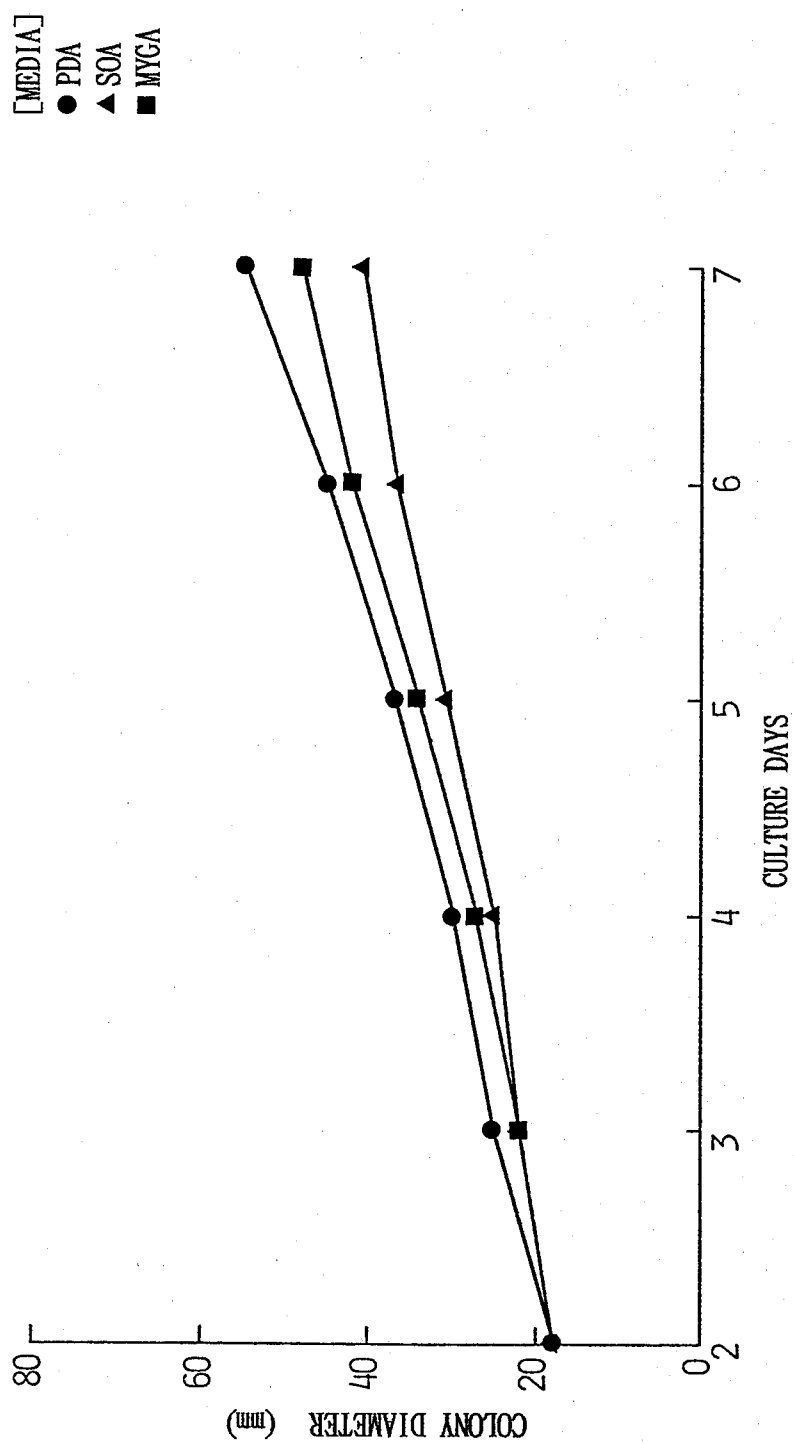


Fig.2-3 Effect of media on mycelial growth of the PC-2 strain.

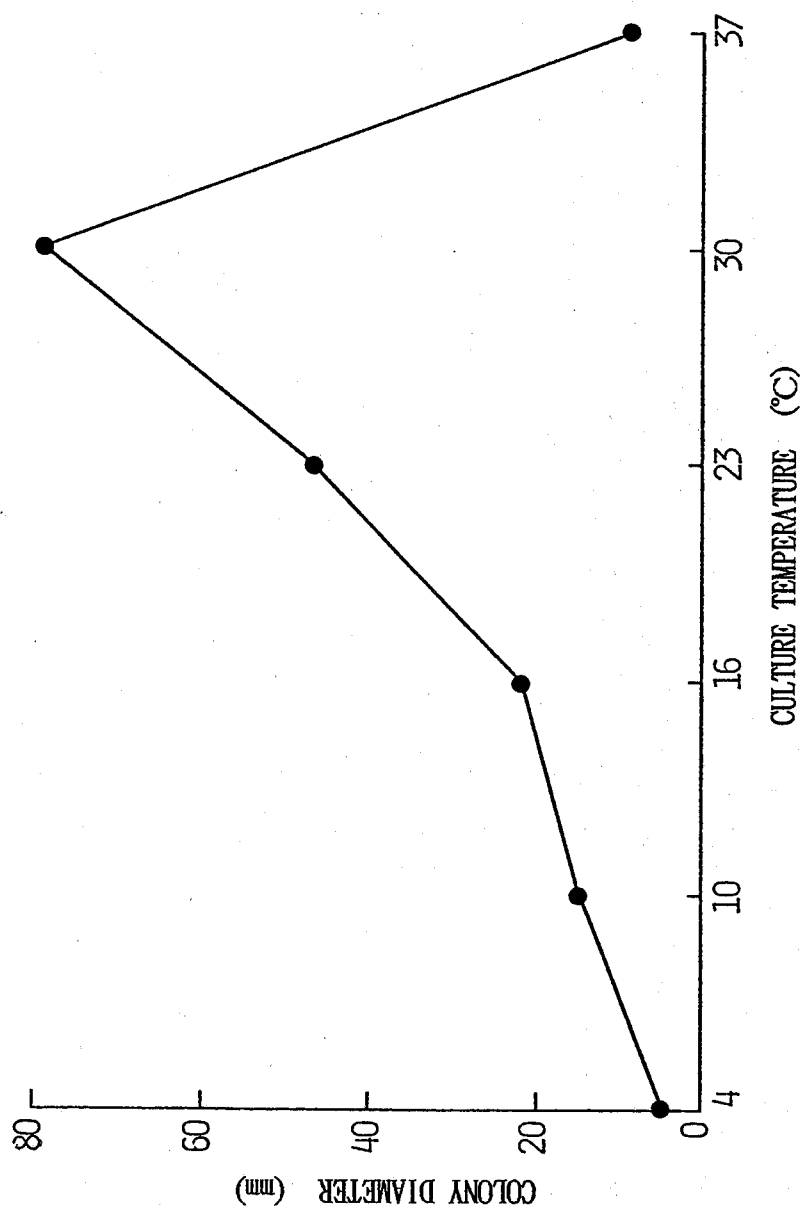


Fig.2-4 Effect of temperature on mycelial growth of the PO-8 strain.

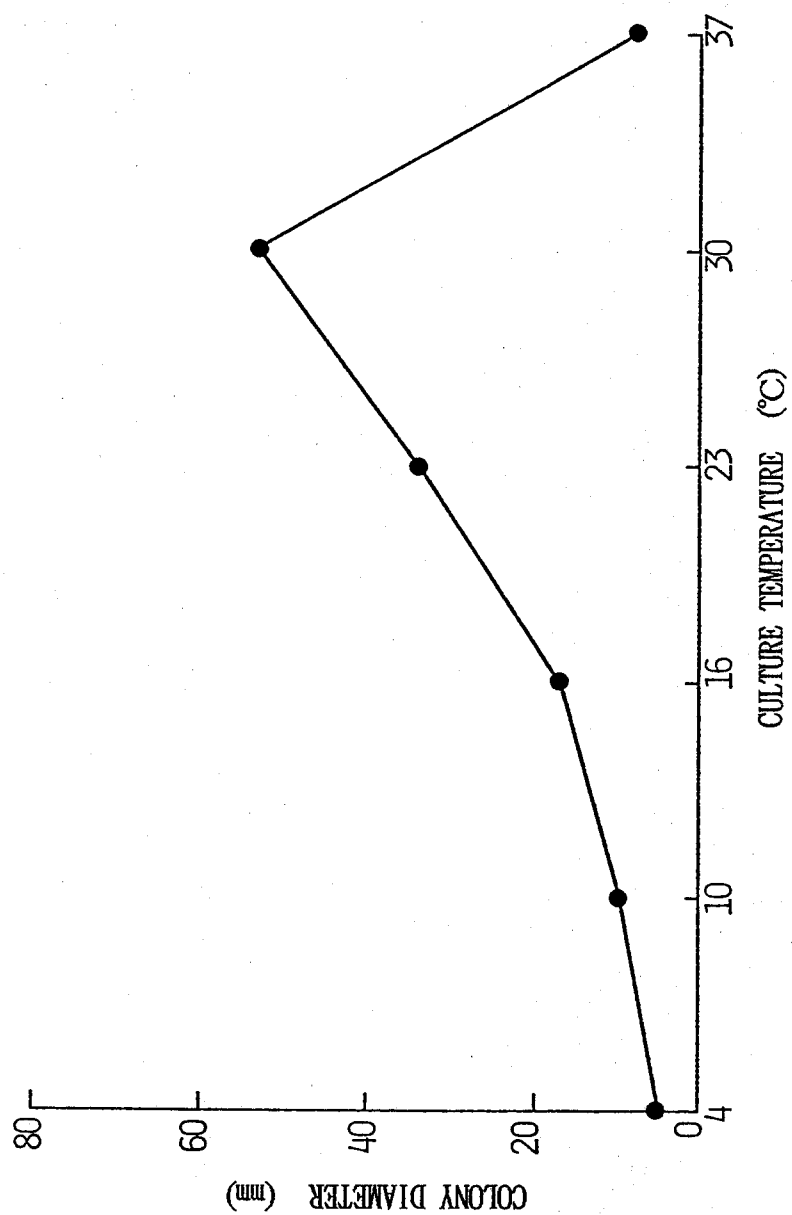


Fig.2-5 Effect of temperature on mycelial growth of the PC-2 strain.

ヒラタケ-8と同様、30℃で最高の生長速度を示し、4℃及び37℃では殆ど生長しなかった。

両系統間に於いて、菌糸生長の温度特性は類似しており、明確な差異は認められなかった。

③対峙培養

同一種または異種の菌株を個体培地上に於いて混合培養を行うことを対峙培養と呼ぶ。同一系統または類縁系統間に於いては多くの場合無反応であり、菌叢は互いに混交して劃線を生じないが、異種または異系統間に於いては各々の菌叢はしばしば互いに嫌触、被覆、抑制等の反応を示す⁶⁾。接触領域に生じた着色帯を特に対峙線と呼び、その有無は系統の異同を判別する際の重要な手掛かりとなる⁷⁾。

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 (Photo.2-3)。

II-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℃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℃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480g当り、二回目の発生迄の合計でヒラタケ-8が約70g、タモギタケ-2が約120g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、奇形子実体の発生頻度が高くなる傾向があっ

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。

II-2-4 交配系の性質

II-1-4の方法により発生させた子実体から担子胞子を無菌的に分離し、各々50系統の一次菌糸を得た。そこから任意に数系統を選び、交配試験を行った。

[ヒラタケ-8]

50系統の一次菌糸から任意に12系統を選び、総当り交配を行った結果をTable2-1に示した。Table2-1から明らかなように、本系統は被覆四極性⁸⁾であり、B因子共通組合せの接触部には偽クランプを形成した。スエヒロタケ (*Schizopyllum commune*) 等に見られる外見上の交配反応として知られる、バラージ反応及びフラット反応⁹⁾は確認されなかった。また、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が二系統確認された。これは、Papazian¹⁰⁾、Raper¹¹⁾ら及び武丸^{12, 13)}が証明しているように、不和合性因子A及びBが各々二座或はそれ以上の座の遺伝子群によって構成され、これらの座の間で組換えが起こり新しい因子が生じたものであらうと考えられた。交配によって得られた二次菌糸は全て正常な子実体を形成した。

Table 2-1 Mating pattern obtained from all possible matings between 12 monosporous mycelia from a fruit-body of P. ostreatus (PO-8). The monokaryon No.1 and No.12 have aberrant mating type A2B.

	4 6 7 10	2 3 11	5	8 9	1 12	
4	- - - -	- - -	(+)	+ +	+ +	A1B1
6	- - - -	- - -	(+)	+ +	+ +	
7	- - - -	- - -	(+)	+ +	+ +	
10	- - - -	- - -	(+)	+ +	+ +	
2	- - - -	- - -	+	(+)(+)	+ +	A1B2
3	- - - -	- - -	+	(+)(+)	+ +	
11	- - - -	- - -	+	(+)(+)	+ +	
5	(+)(+)(+)(+)	+ + +	-	- -	- -	A2B1
8	+ + + +	(+)(+)(+)	-	- -	- -	A2B2
9	+ + + +	(+)(+)(+)	-	- -	- -	
1	+ + + +	+ + +	-	- -	- -	A2B
12	+ + + +	+ + +	-	- -	- -	

A1B1 A1B2 A2B1 A2B2 A2B
+ : clamp was formed, - : no clamp was formed, (+) : pseudo-clamp was formed

[タモギタケ-2]

50系統の一次菌糸から任意に24系統を選び、総当り交配を行った結果をTable2-2に示した。本系統も明らかに被覆四極性であり、四つの交配型A1B1、A2B2、A1B2、A2B1を示し、その内のB因子共通組合せの接触部には偽クランプを形成した。ヒラタケ-8の場合と同様にバラージ、フラット反応は確認されなかった。交配によって得られた二次菌糸は全て正常な子実体を形成した。

II-2-5 バーベンダム反応

Bavendammは培地中にタンニン酸、没食子酸等のフェノール誘導体を添加して木材腐朽菌を培養した場合に、白色腐朽菌は培地を褐変させるが、褐色腐朽菌は褐変させないことを見い出した¹⁴⁾。以来、Davidsonら¹⁵⁾等の研究を経て、この反応はバーベンダム反応として木材腐朽菌研究の重要な一項目となり、腐朽型の類別等に利用されている¹⁶⁻²⁰⁾。

ヒラタケ-8を含むヒラタケ四系統、タモギタケ-2を含むタモギタケ四系統について、培地の呈色状況、菌糸生長及び菌叢の形態により、各系統のキャラクタリゼーションを行った。

基本培地上に於ける、各系統の培養10日目の菌糸生長度をFig. 2-6に示す。横軸にコロニー径、縦軸には各系統名を示した。供試した全ての系統は、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、ある程度の生長抑制を受けた。従って、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生長度の比較を行った。

Table 2-2 Mating pattern obtained from all possible matings between 24 monosporous mycelia from a fruit-body of *P. cornucopiae* (PC-2).

	1 9 12 15 18 23	4 6 7 10 14 17 20 21 24	2 8 16	3 5 11 13 19 22	
1	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	A1B1
9	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	
12	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	
15	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	
18	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	
23	- - - - -	- - - - - - - -	(+)(+)(+)	+ + + + +	
4	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	A1B2
6	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
7	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
10	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
14	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
17	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
20	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
21	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
24	- - - - -	- - - - - - - -	+ + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	
2	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	+ + + + + + + +	- - -	- - - - -	A2B1
8	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	+ + + + + + + +	- - -	- - - - -	
16	(+)(+)(+)(+)(+)(+)	+ + + + + + + +	- - -	- - - - -	
3	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	A2B2
5	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	
11	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	
13	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	
19	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	
22	+ + + + +	(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)(+)	- - -	- - - - -	

A1B1 A1B2 A2B1 A2B2
+ : clamp was formed, - : no clamp was formed, (+) : pseudo-clamp was formed

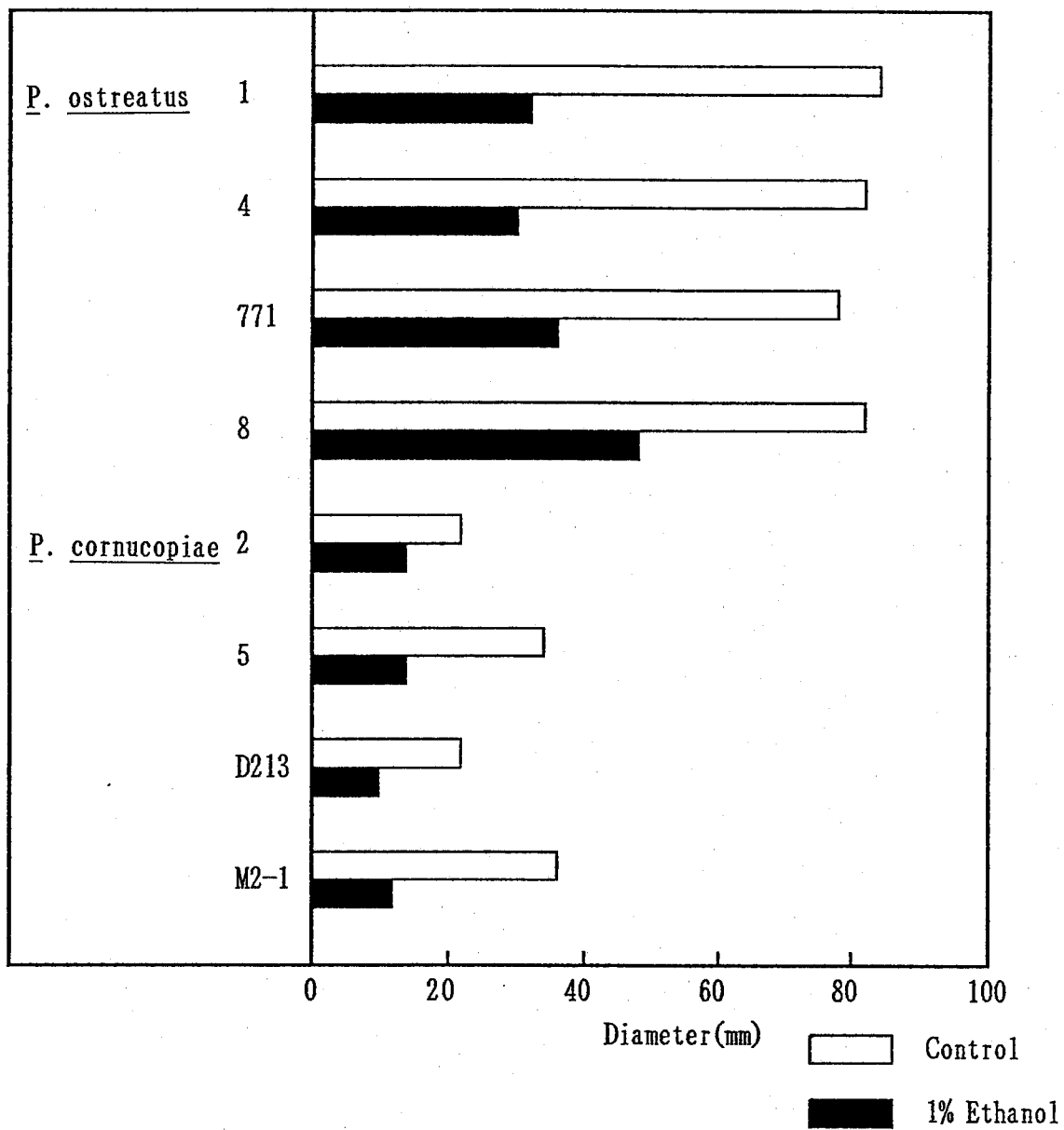


Fig.2-6 Effect of ethanol on the mycelial growth.

①ヒラタケ四系統間に於ける比較

各培地上での呈色状況及び菌糸生長度をPhoto.2-4及びTable2-3に示す。四系統間に於いて呈色反応に顕著な差異は認められなかった。タンニン酸、 β -ナフトール、オイゲノール、カテコール、アントラニル酸、*m*-クレゾールによって著しい生長抑制が認められた。オイゲノール、カテコール、アントラニル酸の生長抑制制度については、系統間で差異が認められた。アントラニル酸は全ての気中菌糸の生長を抑制した。

②タモギタケ四系統間に於ける比較

各培地上での呈色状況及び菌糸生長度をPhoto.2-5及びTable2-4に示す。四系統間に於いて呈色反応に顕著な差異は認められなかった。タンニン酸、 β -ナフトール、オイゲノール、カテコール、*m*-クレゾールによって著しい生長抑制が認められた。タンニン酸、 α -ナフトール、イソオイゲノール、カテコール、アントラニル酸、*m*-クレゾールの生長抑制制度については、系統間で差異が認められた。また全ての系統はアントラニル酸によって気中菌糸の生長抑制を受けた。

③ヒラタケ-8及びタモギタケ-2二系統間に於ける比較

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生長を示さないが、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生長抑制を殆ど受けないが、タモギタケ-2の生長程度はおよそ二分の一に抑制された。

Table 2-3 Coloration of agar media and growth rates of the mycelia. (*P. ostreatus*)

	PO-1	PO-4	PO-8	PO-771
C	83± 1 ^a mm	82± 3 mm	77± 6 mm	82± 2 mm
Et	31± 7 mm	29± 8 mm	35± 3 mm	48± 3 mm
T	12± 8 ^b ●	17± 2 ●	10± 3 ●	23± 3 ●
G *	73± 9 ●	60±11 ●	67± 7 ●	99± 6 ●
α*	64± 2 ●	69± 2 ●	109± 9 ●	71± 6 ●
β*	0 ●	0 ●	0 ●	4± 4 ●
E *	0 ●	0 ●	0 ●	84± 3 ●
iE*	79± 5 ●	82±11 ●	95± 2 ●	69± 3 ●
Ca	19± 2 ●	20± 4 ●	9± 2 ●	32± 1 ●
A	25±15 ●	24±10 ●	21± 1 ●	56± 2 ●
mC*	41±11 ●	31± 5 ●	31± 1 ●	36± 2 ●
P	60± 3 ▲	48±18 ▲	52± 7 ▲	65± 6 ▲
S *	85± 1 ●	108±24 ●	94±16 ●	76± 2 ▲

Legends: ●:coloration, ▲:indistinct coloration,
 C:control, Et:control with 1% ethanol, T:tannic acid, G:guaiacol,
 α:α-naphthol, β:β-naphthol, E:eugenol, iE:iso-eugenol, Ca:catechol,
 A:anthranilic acid, mC:m-cresol, P:phrologlucinol, S:sryngaldehyde
 a:colony diameter, b:growth rate; related value for each control as 100
 *:added with 1% ethanol,

Table 2-4 Coloration of agar media and growth rates of the mycelia. (*P. cornucopiae*)

	PC-2	PC-5	D213	M2-1
C	21± 5 ^a mm	33± 2 mm	22± 1 mm	35± 5 mm
Et	13± 2 mm	14± 4 mm	10± 2 mm	12± 3 mm
T	17± 3 ^b ●	20± 2 ●	6± 1 ●	17± 1 ●
G *	75± 3 ●	78± 1 ●	60± 3 ●	129± 2 ●
α*	45±12 ●	17± 6 ●	60± 2 ●	29± 4 ●
β*	0 ●	0 ●	0 ●	0 ●
E *	0 ●	0 ●	0 ●	0 ●
iE*	57± 5 ●	112±11 ●	120± 1 ●	157± 9 ●
Ca	6± 1 ●	20± 2 ●	12± 1 ●	10± 2 ●
A	40±13 ●	21± 4 ●	12± 4 ●	17± 3 ●
mC*	13± 2 ▲	17± 6 ▲	0 ▲	14± 1 ▲
P	47± 1 ▲	86±18 ▲	35± 2 ▲	63± 1 ▲
S *	64± 8 ●	144±22 ●	80± 5 ●	143± 6 ▲

Legends: ●:coloration, ▲:indistinct coloration,
 C:control, Et:control with 1% ethanol, T:tannic acid, G:guaiacol,
 α:α-naphthol, β:β-naphthol, E:eugenol, iE:iso-eugenol, Ca:catechol,
 A:anthranilic acid, mC:m-cresol, P:phrologlucinol, S:sryngaldehyde
 a:colony diameter, b:growth rate; related value for each control as 100
 *:added with 1% ethanol,

Ⅱ－３ まとめ

両系統の基本的性状の検討及び比較の結果、以下のことが明らかになった。

- ・ 子実体菌傘表面の色と菌柄基部の形態に於いて明確な差異が認められた。
- ・ 両系統共に P D A 上に於ける菌糸生長度は安定していた。
- ・ 菌糸生長の温度特性は類似していた。
- ・ 同一の栽培条件によって子実体の発生が可能であった。
- ・ 対峙培養により、両系統の菌叢接触部に褐色の対峙線が形成された。
- ・ 両系統共に被覆四極性の交配型を示した。
- ・ β -ナフトールに対する呈色程度等に差異が認められた。

Ⅲ章 プロトプラスト性状の検討

Ⅲ-1 実験方法

Ⅲ-1-1 供試菌の調製

PDA斜面培地からPDA平面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、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℃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。

Ⅲ-1-2 プロトプラストの調製

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。

- ・セルラーゼオノヅカ R-10 (Trichoderma viride 由来)
(Yakult HONSHA CO., LTD.)
- ・ザイモリアーゼ 20T (Arthrobacter luteus 由来)
(Seikagaku kogyo CO., LTD.)
- ・キチナーゼ No.C-6137 (Streptomyces griseus 由来)
(Sigma Chemical Company)

以上の酵素を0.5Mマニトールにより浸透圧を調整した0.05Mリンゴ酸溶液(1N水酸化ナトリウム溶液によりpH5.6に調整)に溶かし、孔径0.2μmのメンブランフィルターにより濾過滅菌した後使用した。

②プロトプラストの調製

Ⅲ－１－１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、滅菌水により数回洗浄した後、菌体約100mg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1mℓに懸濁して、30℃、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。

プロトプラスト収量は、菌体100mgに対して得られたプロトプラスト数を1mℓ当たりの個数に換算しプロトプラスト収量とした。

Ⅲ－１－３ プロトプラストの再生

収量測定後の各々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再生培地（MYG寒天培地に浸透圧調整用として0.5Mサッカロースを添加したもの）上にプレートした。23℃で1～3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。

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

Ⅲ－１－４ 粒径分布の測定

各々のプロトプラストの形態を顕微鏡下（１０００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）。写真上に於いてプロトプラストの直径を計り、粒径分布を測定した。

Ⅲ－２ 結果と考察

両系統のプロトプラストの調製条件については、当研究室の以前の研究^{1, 2)}により適当な条件が得られていたが、収量及び再生率の安定度に若干の問題があった。そこでそれらを改善すべく主として菌体の調製方法に重点を置いてプロトプラスト調製条件の再検討を行った。

収量及び再生率を安定化するためには、プロトプラストの調製に用いる菌体の生理状態を実験毎に一定に保つ必要がある。以前の研究に於いては菌体の調製にＳＯ液体培地を用いていた。ＳＯ培地は汎用性が高く優れた培地であるが、天然物培地であり培地調製毎の構成成分の安定度に問題があると思われたため、ＭＹＧ培地のような半合成培地を用いることにした。しかしながら、Ⅱ－２－２に示したように、ＭＹＧＡ上に於いて継代培養を行うと菌糸生長速度が不安定になる傾向があった。また著者の以前の研究³⁾に於いて、ＭＹＧ液体培地により継代培養を行った菌体からプロトプラストを調製した際に、収量及び再生率が不安定になる傾向が認められた。そこで本研究に於いては、Hashibaの報告⁴⁾を参考にして、液体培養前にＰＤＡ平面培地上での前培養を行い、細胞分裂の盛んな菌叢の先

端部を液体培地への接種片として用いた。

2%セルラーゼオノヅカR-10+0.6%ザイモリアーゼ20T+6units/ml キチナーゼを用い、30℃で加水分解を行った際の両系統のプロトプラスト生成状況をFig.3-1に示す。横軸に酵素処理時間を、また縦軸にプロトプラスト収量を示した。タモギタケ-2の収量は3時間で 8×10^6 /ml となり、ほぼ平衡に達した。ヒラタケ-8については、収量は2時間で 1.3×10^7 /ml となり、最大となるが、2時間の処理によって得られたプロトプラストは、細胞壁の除去が不十分であるためか、水に懸濁しても破裂しないものが認められた。また、双方共に4時間以上加水分解を行ったプロトプラストには不整形のものが多くなった。従って、加水分解時間は3時間とした。再生率は両系統共に約10%で安定し、収量も各々安定した。

直流パルスの印加による細胞融合は、プロトプラスト間の接触部位に於ける細胞膜の一時的な電氣的膜離断 (electrical breakdown) によってもたらされる。半径 r のプロトプラストが電場 E に曝された際に、電場方向と θ の角度を為す細胞膜部位 x に二つのプロトプラストの細胞膜を介して発生する電位差 V_x は、以下の式で近似的に表される⁵⁾。

$$V_x = C \cdot r \cdot E \cdot \cos \theta$$

(C : 細胞内外液及び細胞膜の電導度等によって決まる定数)

電位差 V_x が一定限度を越えると、部位 x に於いて細胞膜の electrical breakdown が起こる。印加された電場 E (パルス電圧)

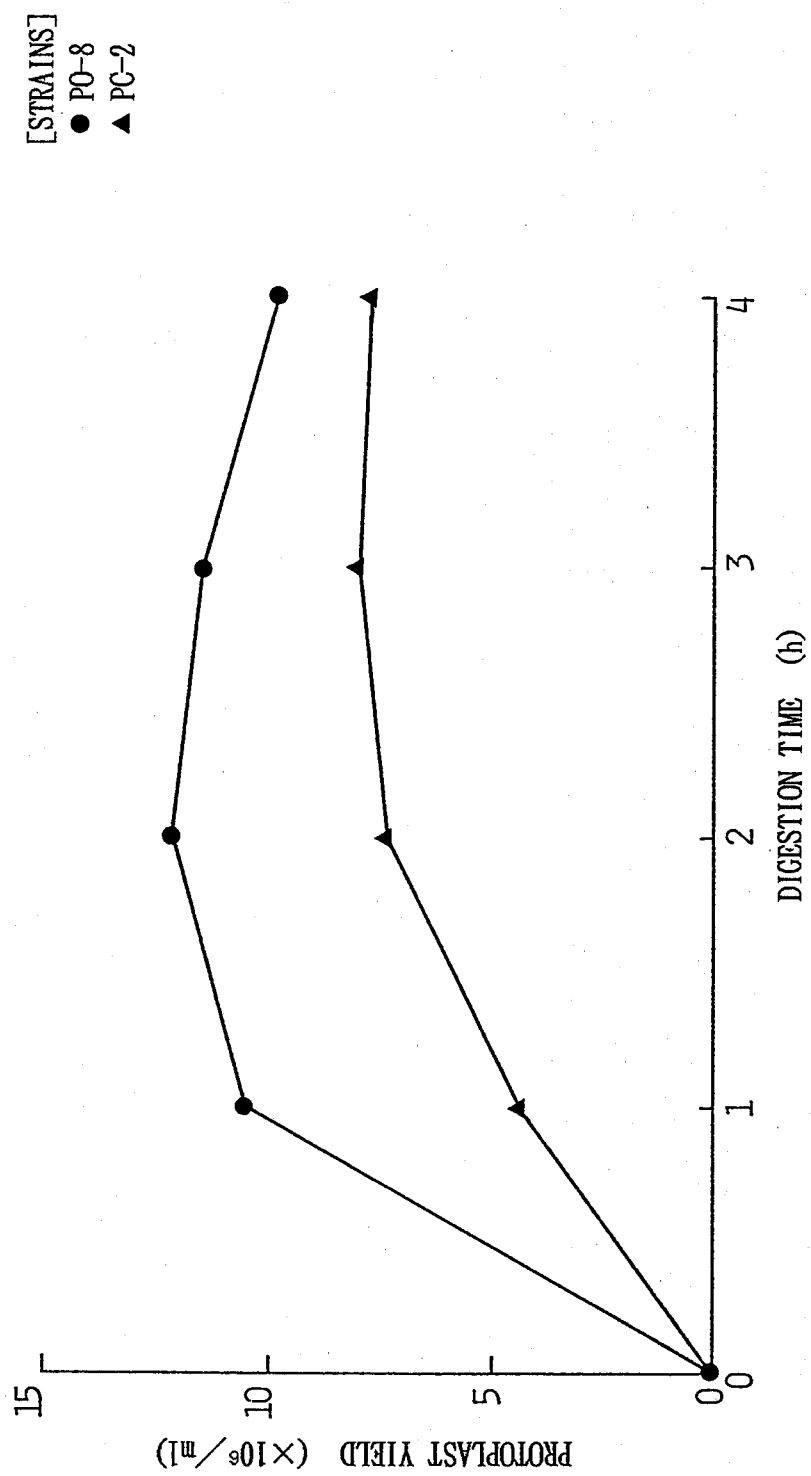


Fig.3-1 Effect of digestion time on the release of protoplasts.

が大きすぎたり、パルス幅が長すぎたりしない限り、electrical breakdownは一時的なものであり、直ちにシールされる。このシールされる過程に於いて、脂質膜の癒合及び細胞膜の融合が連続して起こり、最終的にプロトプラストは融合する。即ち、一定のパルス電圧が印加された際の、プロトプラストの挙動（融合、破裂等）はプロトプラスト径によって異なる。従って、二種のプロトプラストの粒径が極端に異なるとヘテロタリックな融合細胞を得ることが困難になるため、両者のプロトプラスト粒径が均一であるか、もしくは粒径分布が近似していることが望ましい。そのため両系統のプロトプラストの粒径分布を調べた。

Fig.3-2にヒラタケ-8のプロトプラストの粒径分布を示す。分布範囲は3～12 μm で、平均粒径は約4.7 μm であった。Fig.3-3にタモギタケ-2のプロトプラストの粒径分布を示す。分布範囲は同様に3～12 μm で、平均粒径は約5.3 μm であった。両系統プロトプラストの粒径分布は近似しており、電氣的細胞融合法には適当であると思われた。

III-3 まとめ

供試菌の調製段階に於いて、液体培養前にPDA平面培地上での前培養を行い、細胞分裂の盛んな菌叢の先端部を液体培地への接種片として用ることにより、両系統プロトプラストの収量及び再生率は安定した。また両系統プロトプラストの粒径分布は類似しており、電氣的融合には適当であると思われた。

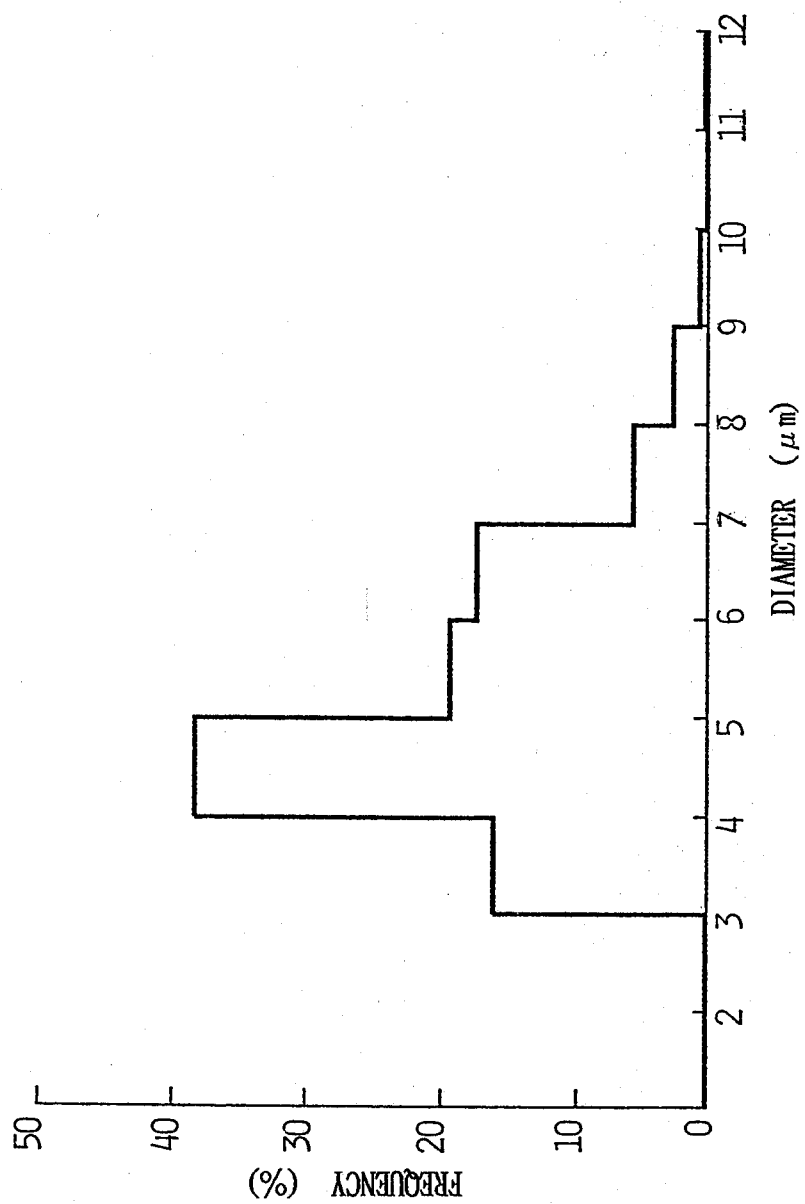


Fig.3-2 Size distribution of protoplasts (PO-8).

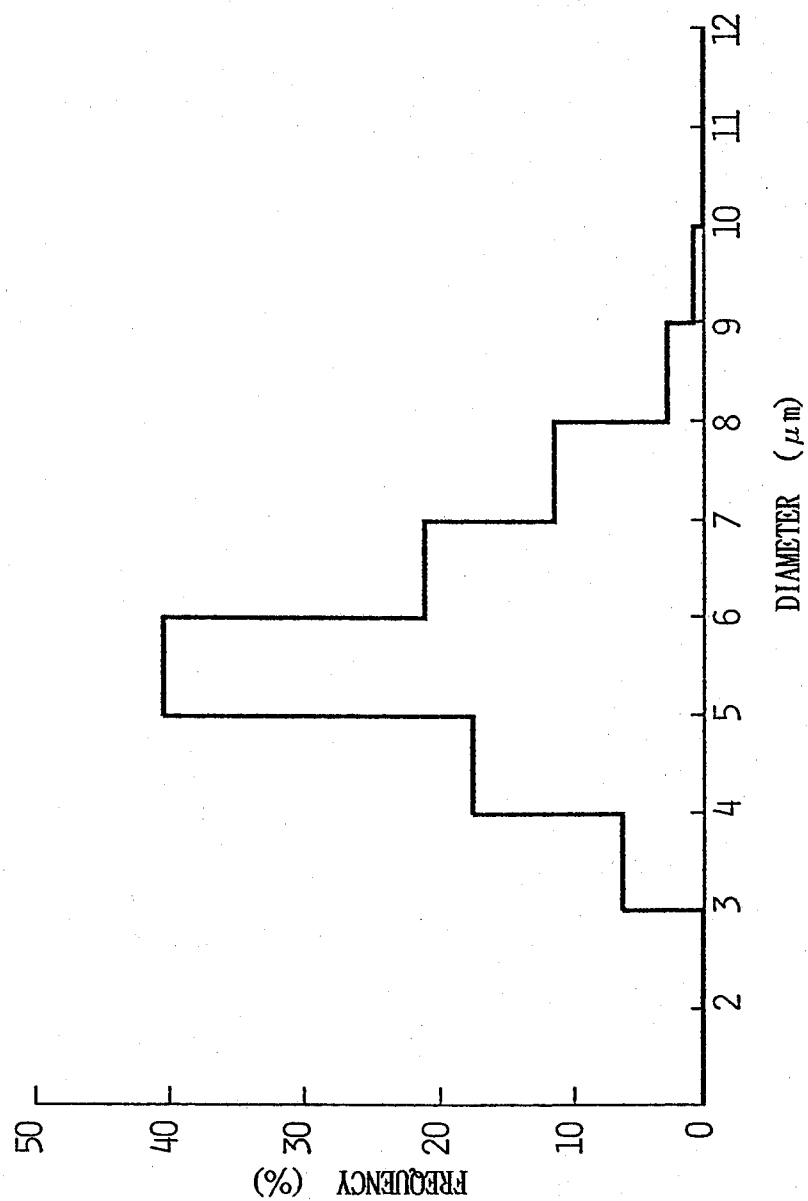


Fig.3-3 Size distribution of protoplasts (PC-2).

IV章 融合方法の検討

IV-1 実験方法

IV-1-1 融合チャンバーの製作

融合用チャンバーとしてPhoto.4-1及びPhoto.4-2に示したⅠ型、Ⅱ型の二つの型を製作し、性能を検討した。

・Ⅰ型

スライドグラス上に加工した2片の亚克力板をエポキシ樹脂接着剤で接着した。亚克力板間にできたチャンバー部分に断面直径0.1mmのニクロム線2本を平行に0.5mmの間隔で張った。プロトプラスト出入用のテフロンキャピラリーを取り付けた後、上部にカバーグラスを接着し、チャンバーを密閉した。(Fig.4-1)

・Ⅱ型

プラスチックシャーレの底部に長方形の穴を開け、その部分にカバーグラスを内側よりエポキシ樹脂接着剤で接着した。カバーグラス上に断面が三角形の2本の亚克力棒を平行に接着し、その間に断面直径0.1mmのニクロム線2本を平行に0.5mmの間隔で張った。(Fig.4-2)

Ⅰ、Ⅱ型共にエタノールにより滅菌を行えば、無菌操作が可能であった。

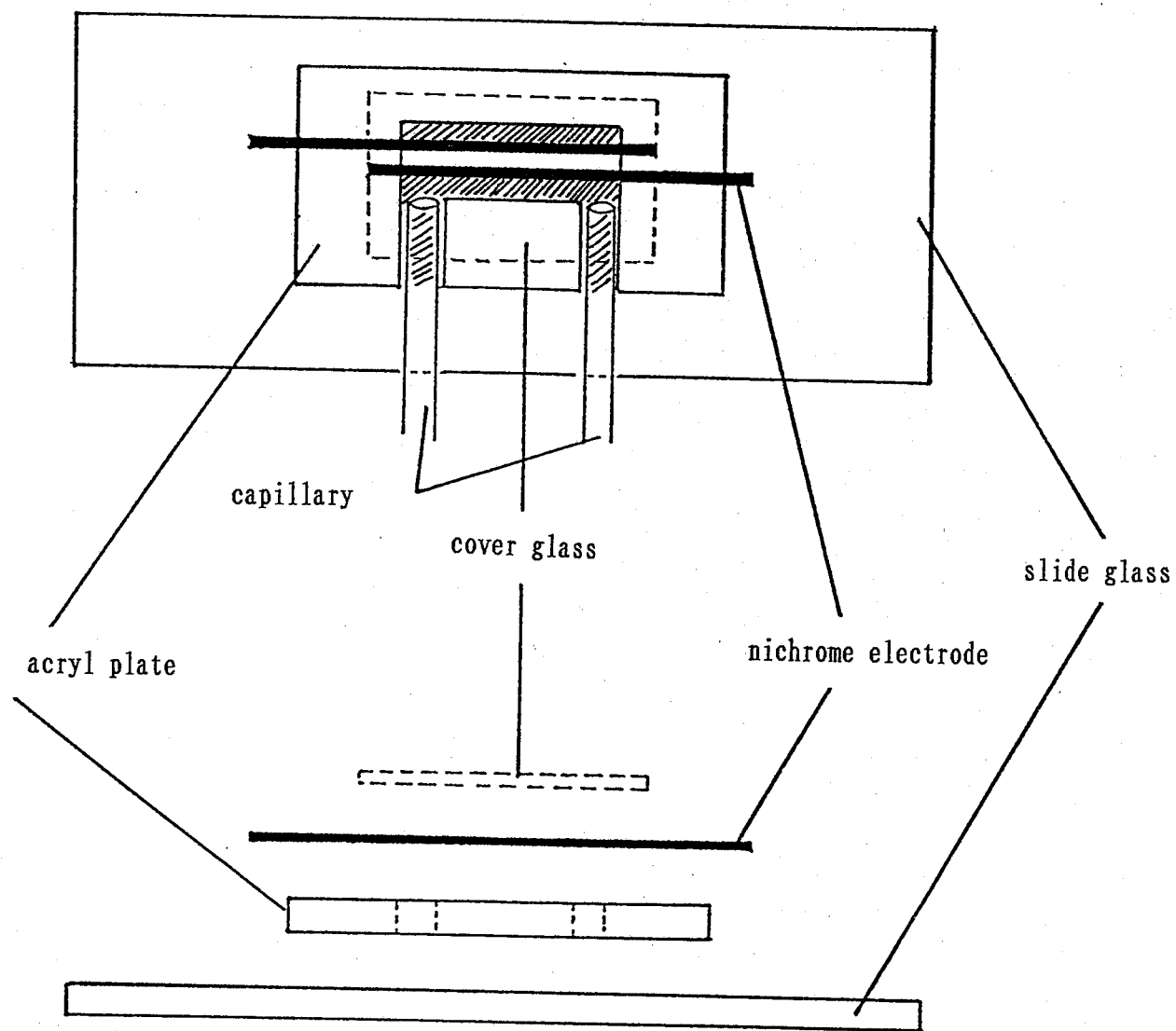


Fig.4-1 Fusion chamber Type I .

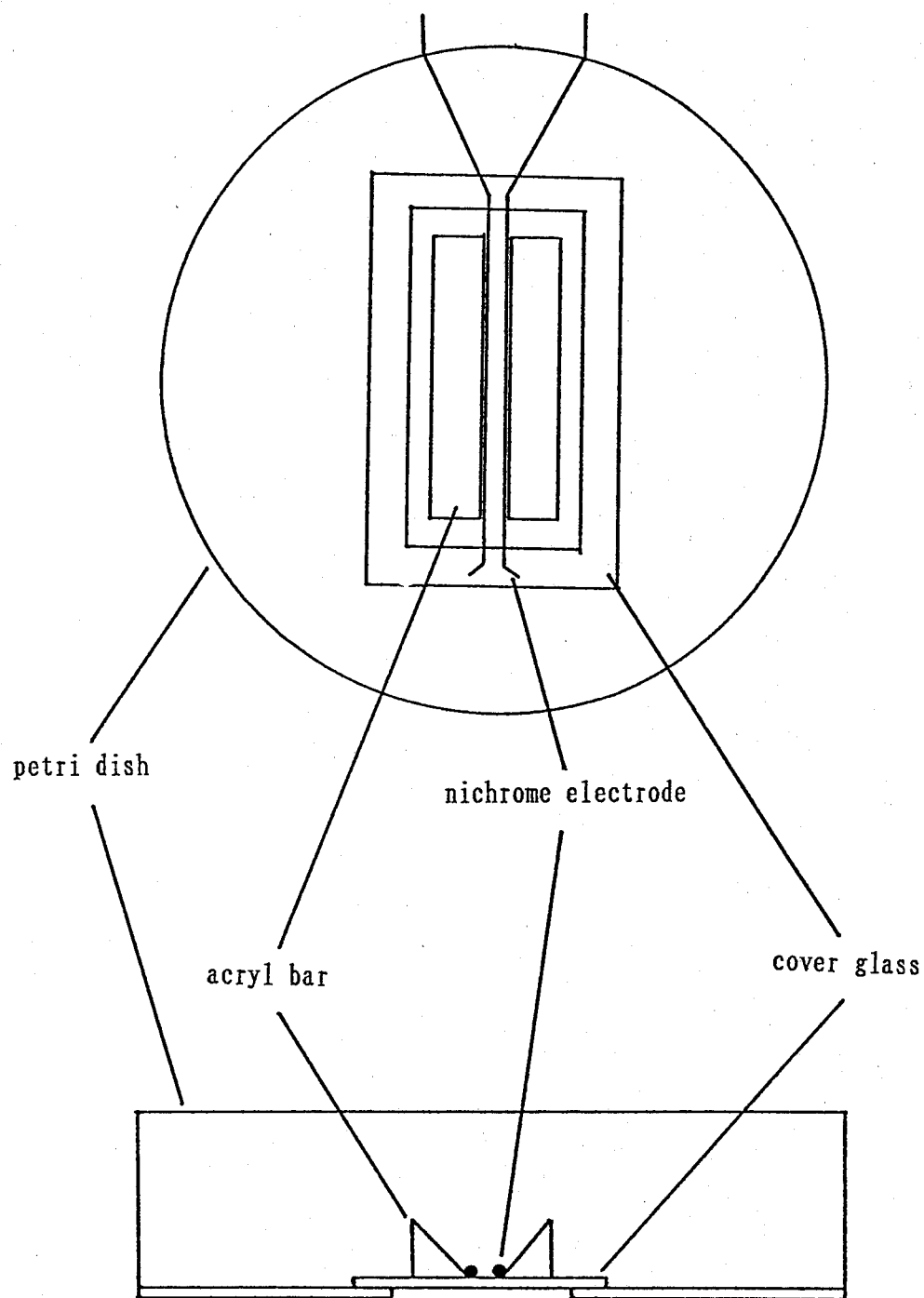


Fig.4-2 Fusion chamber Type II.

IV-1-2 融合システム

融合操作にはPhoto.4-3に示す、融合装置、融合チャンバー、オシロスコープ、倒立型顕微鏡によって構成される融合システムを使用した。

①融合装置

融合装置は当研究室の横野健氏の設計図を基にエムエス社により製作されたものである。(Photo.4-4)

融合装置の仕様は以下に示す通りである。

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

※正弦波の極大及び極小ピークの二点間垂直距離の読み取り値

②オシロスコープ

高周波及びパルスの波形をモニターするために、KENWOOD製CS-1040型オシロスコープを使用した。測定には10：1プローブを使用し、融合装置のモニター端子に接続した。

③倒立型顕微鏡

プロトプラストの融合状況を倒立型顕微鏡（OLYMPUS, IMT-2型）により観察した。顕微鏡にはテレビカメラが接続しており、融合状況をテレビモニターすることが可能である。

IV-1-3 融合条件

融合には、著者が以前にZimmermannらの報告¹⁻⁵⁾を参考にして行った研究⁶⁾に於いて検討、確立した条件を用いた。

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の直流パルスで1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。

IV-2 結果と考察

IV-2-1 融合チャンバー

・ I 型

I型融合チャンバーはFig.4-3に示すシステムに於いて使用した。

プロトプラストをポンプの吸引力によって融合チャンバー内に導入し、融合処理を行い、その後再度ポンプの操作によってプロトプラストを回収した。融合チャンバーの利点としては、非無菌的雰囲気下で容易に融合操作が行えること、プロトプラストの流入量を調節することにより、ヘテロタリックな組合せでのプロトプラストの

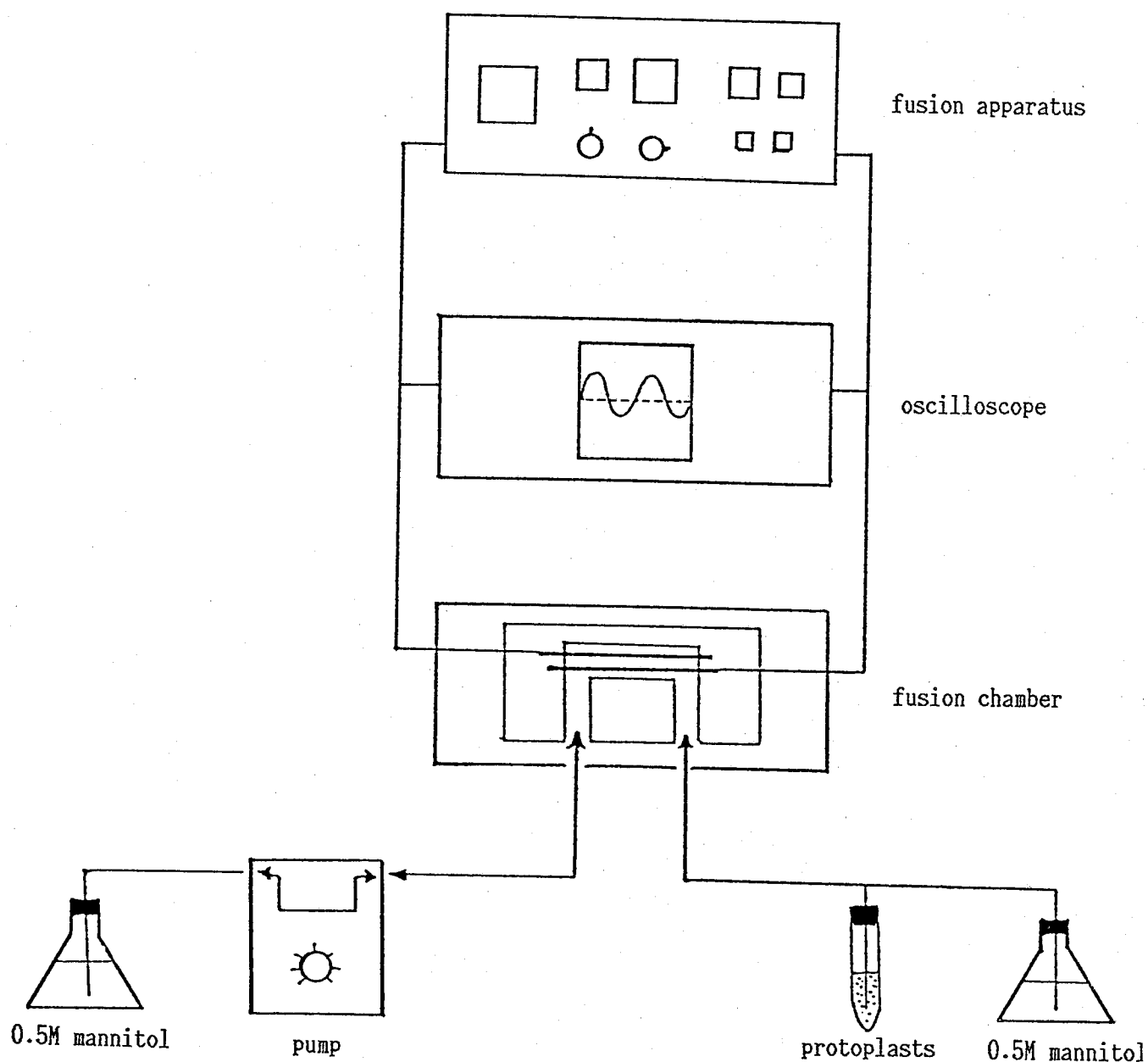


Fig.4-3 Schematic diagram of the fusion system with Type I chamber.

接着及び融合が可能ながことが挙げられた。欠点としては、Fig.4-1中の斜線部分に表したようなデッドスペースがあり、最終的に回収したプロトプラスト全体に於ける融合プロトプラストの割合が低いと考えられること、また製作に熟練を必要とし、同一性能のものを複数個製作することが困難なこと等であった。

・ II 型

以上の欠点を補うべく考案したのが II 型融合チャンバーである。

プロトプラスト懸濁液をアクリル棒間に滴下して融合を行った。アクリル棒間は谷状になっているためプロトプラストは電極付近に集まる。また、デッドスペースは I 型に比べかなり少なくなったため、融合電場に曝されるプロトプラストの割合は高くなると考えられた。また製作は比較的容易で、同一性能のものを多数生産し、継続的に実験を行うことが可能になった。

また dielectrophoresis chamber 法に於いては、Bates⁷⁾ 森川⁸⁾ 及び三浦⁹⁾ が指摘しているように、融合プロトプラストが電極に付着してしまふ現象が時折発生する。この問題に対しては付着し難い材質の電極を用いることが必要と考えられるが、現在のところ適当な材質のものは見つからない。従って今回はこの点については改善することは出来なかったが、I 型では付着したプロトプラストの回収が困難であったのに対して、II 型ではマニトール溶液による洗浄回収が可能となった。

以上の評価から総合的に判断して以後の操作には、II 型融合チャンバーを用いることにした。

II 型融合チャンバーに於ける融合率は、顕微鏡下に於ける計測の

結果約50%であった。

IV-2-2 融合条件

著者の以前の研究⁶⁾に於いて使用した融合装置は、本研究に使用した装置のプロトタイプであり、出力に関する基本的な仕様は、ほぼ同一であるが、操作性が悪く、最適条件の再現が困難であった。

高周波及び直流パルスの印加やプロトプラス回収のタイミング等は、実験毎に顕微鏡下で観察しながら調整しなければならず、融合条件として標準化することは困難であった。しかしながら、本研究に使用した融合装置は、高周波タイマー、各設定値のデジタル表示化等の改良により操作性が向上し、融合条件の標準化が可能となった。

Ⅱ型融合チャンバーを用いた際の最適な融合条件及び操作手順は以下の通りである。

- ①プロトプラス懸濁液を融合チャンバーに導入後直ちに、2 MHz、400 V/cmの高周波を5分間印加する。
- ②40 μ sec、4 KV/cmの直流パルスを1秒間隔で10回印加する。
- ③高周波電圧を100 V/cm迄下げ、10分間放置する。
- ④高周波を切り、プロトプラスを回収する。

IV-3 まとめ

Ⅱ型融合チャンバーの製作と融合条件の標準化により、融合効率及び融合操作に関する再現性が向上した。

V 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。

V-1 実験方法

V-1-1 代謝阻害剤処理

Ⅲ-2-2の方法により調製したプロトプラストについて、代謝阻害剤処理を行った。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。処理条件はWright¹⁾、Nehls²⁾、Sidorovら³⁾及び金田⁴⁾の方法を参考に設定した。

代謝阻害剤は各々0.5Mマニトール+0.05Mリンゴ酸溶液(1N水酸化ナトリウム溶液によりpH5.6に調整)に溶かし、孔径0.2 μ mのメンブランフィルターで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℃、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。

V-1-2 アイソザイム分析

V-1-2-1 電気泳動

電気泳動は白石⁵⁾の方法に準拠して行った。

・ゲルの調製

[I] 分離ゲルの調製

過硫酸アンモニウムを 20 mg 前後秤量し、その重量 (W) から算出した量 $[(W \div 1.4) \text{ m}\ell \text{ (g)}]$ の脱イオン水を加え溶解し、C液とした。A液、B液を各々 5 mℓ とり混合し、C液と共にアスピレーターにより 2～3 分間脱気した。C液 10 mℓ を A+B 液に加えて静かに混合した。A+B+C 液をゲル容器下端から 11 cm の位置まで静かに注入した後、脱イオン水を 2～3 mm の厚さになるまで静かに重層した。重合は約 60 分で完了した。

・ A液 (／100 mℓ)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)

: 18.3 g

1 N-塩酸 : 24.0 mℓ

N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)

: 0.12 mℓ

・ B液 (／100 mℓ)

アクリルアミド : 30.0 g

N,N-メチレン-ビス (アクリルアミド) (BIS アクリルアミド)

: 0.80 g

[II] 濃縮ゲルの調製

D液、E液、F液を、順次、2 mℓ、4 mℓ、2 mℓ ずつとり、混合した後脱気した。分離ゲル上に重層されている水を取り除き、上記混合液約 3 mℓ を用い分離ゲル上部を 2～3 回洗浄した。混合

液を静かに注いだ後、サンプルコムを挿入し、蛍光灯の光を当て重合させた。重合は約30分間で完了した。

濃縮ゲルからサンプルコムを抜き取り、サンプルスロット内を数回洗浄した後、サンプルスロット用緩衝液をサンプルスロットに満たした。冷蔵庫内で1時間冷却した後泳動に使用した。サンプルコムはサンプル数に応じて12～21スロットのものを使用した。

・ D液 (／100mℓ)

トリス	: 2.99 g
1N-塩酸	: 24.0 mℓ
TEMED	: 0.23 mℓ

・ E液 (／100mℓ)

アクリルアミド	: 7.50 g
BISアクリルアミド	: 1.25 g

・ F液 (／1000mℓ)

リボフラビン	: 20 mg
--------	---------

・ 電極用緩衝液 (／1000mℓ)

グリシン	: 28.8 g
トリス	: 6.0 g

※10倍に希釈して使用

・ サンプルスロット用緩衝液 (／100mℓ)

電極用緩衝液 : 10 mℓ (10倍希釈)

ブロムフェノールブルー (BPB)

: 約 2 m g

・サンプル調製

PDA斜面培地上に伸ばした菌体の一部をMYG液体培地に接種し、23℃、14日間、暗黒下で静置培養した後、桐山ロート上に集め、脱イオン水で数回洗浄した。湿重量で約200 m gをマイクロチューブに取り、0.5 mℓの抽出用緩衝液を加え、アイスバス中で超音波破碎器 (Handy Sonic, UR-20P, TOMY SEIKO CO., LTD) により出力10で1分間破碎した。破碎した液を、4℃、11750×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。

サンプルを20 μℓとり、サンプルスロット底部に静かに注入した。

・抽出用緩衝液⁶⁾

磷酸1ナトリウム : 0.94 g

磷酸2ナトリウム : 1.61 g

ジチオスレイトール : 15 m g

アスコルビン酸ナトリウム : 19.81 g

(pH 7.0)

・泳動条件

泳動槽は垂直式を使用し、上槽を陰極 (黒)、下槽を陽極 (赤) とした。電源は定電流モードとし、12 mA / cm² (1 mm厚のゲ

ルで1枚当り17mA)に設定した。BPBマーカ―(青色の線)がゲル容器の下端から2cmの位置に来るまで泳動を行った。約150分間で泳動は終了した。泳動終了後、次項に示す条件により直ちにアイソザイムの活性染色を行った。

V-1-2-2 活性染色

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。染色終了後は以下の固定液により固定を行い、保存した。

・FIX-A液(／1000mℓ)

エタノール : 500mℓ

・FIX-B液(／1000mℓ)

エタノール : 500mℓ

酢酸 : 50mℓ

①エステラーゼ(Est)⁷⁾

〔染色液〕ファーストブルーRR塩150mgを脱イオン水100mℓに溶かした後、アセトン基質溶液1.5mℓ、1M燐酸緩衝液15mℓを加え、脱イオン水にて全量を150mℓとした。沈澱を吸引濾過により除去した後、ゲルの染色に用いた。

〔染色手順〕泳動終了後、濃縮ゲル部分を取り除いたゲルを染色バットに移し、染色液を注ぎゲルを完全に浸した後に、37℃の恒温槽内でゆっくりと振盪した。明瞭なバンドが出現した後、振盪を停止し、染色液を捨て、脱イオン水で1～2回濯いだ後、FIX-A液で一晩固定した。

・ 1M 燐酸緩衝液 (／ 100 mℓ)

燐酸 1 カリウム : 6.81 g

燐酸 2 カリウム : 8.71 g

・ アセトン基質溶液 (／ 100 mℓ)

α-ナフチルアセテート : 1.241 g

アセトン : 80 mℓ

② リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) ⁸⁾

[染色液] B-A 緩衝液 100 mℓ に S-MDH 液 10 mℓ、NAD 液 2 mℓ、NBT 液 2 mℓ を順次加え攪拌した。使用直前に PMS 1 液 2 mℓ を添加した。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色し、FIX-B で固定した。

・ B-A 緩衝液 (／ 1000 mℓ)

トリズマプリセット pH クリスタル 7.0

: 7.76 g

・ S-MDH 液 (／ 100 mℓ)

炭酸ナトリウム : 12.15 g

DL-リンゴ酸 : 13.4 g

・ NAD 液 (／ 30 mℓ)

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)

: 750 mg

・ NBT液 (／ 30 mℓ)

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)

: 300 mg

・ PMS液 (／ 30 mℓ)

フェナジンメトサルフェート (PMS)

: 30 mg

③酸性フォスファターゼ (ACP) ⁹⁾

[染色液] 0.1M McIlvaine緩衝液 (pH4.5) 100 mℓ に、ファーストブルーRR塩 100 mg、 α -ナフチルリン酸2ナトリウム 100 mg を溶かし、沈澱を吸引濾過によって除去した後、染色に使用した。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色を行った。但し、反応は室温で行った。染色終了後 F I X-A で固定した。

④アルカリ性フォスファターゼ (ALP) ¹⁰⁾

[染色液] 0.01M トリス塩酸 (pH8.5) 100 mℓ に、塩化ナトリウム 1.75 g、塩化マグネシウム 102 mg、 α -ナフチルリン酸2ナトリウム 53 mg、ポリビニルピロリドン 500 mg、ファーストブルーRR塩 50 mg を順次加え溶解し、沈澱を吸引濾過によって除去した後、染色に使用した。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色を行い、F I X-A で固定した。

⑤パーオキシダーゼ (POD) ⁸⁾

〔染色液〕 B-POD緩衝液 80 mℓ に POD-1 液 20 mℓ を加え、
濾過した後、使用直前に POD-2 液 1 mℓ を添加した。

〔染色手順〕 エステラーゼと同様の手順、但し反応は室温で行い、
F I X-Aで固定した。

・ B-POD緩衝液 (／1000 mℓ)

トリス : 1.51 g

氷酢酸 : 1.62 mℓ

・ POD-1 液 (／500 mℓ アセトン)

3-アミノ9-エチルカルバゾル

: 1.05 g

β-ナフトール : 725 mg

・ POD-2 液 (／100 mℓ)

30%過酸化水素水 : 10 mℓ

⑥カタラーゼ (CAT) ¹¹⁾

〔染色液〕 2%フェリシアン化カリウム水溶液 50 mℓ と 2%硫酸
第二鉄水溶液 50 mℓ を使用直前に混合した。

〔染色手順〕 ゲルを 0.03%過酸化水素水中に 1 分間浸した後、脱
イオン水中に 10 分間置いた。染色液を加え室温で反応させた。固
定には F I X-Aを用いた。

⑦ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) ⁸⁾

[染色液] B-LAP緩衝液100mℓにLAP-1液2mℓと
LAP-2液5mℓを加えた。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色を行い、FIX-Aで
固定した。

・ B-LAP緩衝液 (／1000mℓ)

無水マレイン酸 : 19.61g

トリス : 24.2g

水酸化ナトリウム : 1.20g

・ LAP-1液 (／25mℓ)

L-ロイシル-β-ナフチルアミド塩酸

: 250mg

・ LAP-2液 (／100mℓ)

ファーストブラックK塩 : 1.0g

⑧アミラーゼ (AMY) ⁸⁾

[染色液] B-AMY緩衝液100mℓに水溶性デンプン300mg
を加え、溶解させた (A液)。脱イオン水100mℓにAMY-1液
2mℓと酢酸1mℓを加えた (B液)。

[染色手順] ゲルをA液に浸し37℃で40分間振盪を行った。脱
イオン水で2～3回洗浄した後、B液に浸した。10分後B液を捨
て、FIX-Aで固定した。

・ B-AMY緩衝液 (／1000mℓ)

リン酸1カリウム : 11.8 g

リン酸2カリウム : 2.30 g

・ AMY-1液 (／100mℓ 1Nヨウ素溶液)

ヨウ化カリウム : 11.6 g

⑨シキミ酸脱水素酵素 (SDH) ⁸⁾

[染色液] B-B緩衝液50mℓにMG 1mℓ、S-SHD 1mℓ、
NADP 1mℓ、MTT 1mℓを順次加え攪拌した。使用直前に
PMS 1mℓを添加した。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色し、FIX-Aで固定
した。

・ B-B緩衝液 (／1000mℓ)

トリズマプリセットpHクリスタル8.0

: 7.09 g

・ S-SHD液 (／25mℓ)

シキミ酸 : 500 mg

・ NADP液 (／30mℓ)

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP)

: 200 mg

・MTT液 (／30mℓ)

MTTテトラゾリウム (MTT)

: 150mℓ

⑩アルコール脱水素酵素 (ADH) ⁸⁾

[染色液] B-A緩衝液50mℓを取り、エタノール5mℓ、NAD 2mℓ、NBT 2mℓをを順次加え攪拌する。使用直前にPMS 5, 1mℓを添加した。

[染色手順] エステラーゼと同様の手順で染色を行い、FIX-Aで固定した。

・PMS 5液 (／30mℓ)

PMS : 150mg

V-2 結果と考察

V-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。

代謝阻害剤処理による融合株選抜の概念¹⁾をFig.5-1に示す。図中の代謝阻害剤Aは細胞内の2, 3, 4, 7, 8の酵素を不可逆的に阻害する。一方、代謝阻害剤Bは細胞内の1, 5, 6, 7, 8の酵素を不可逆的に阻害する。各々の細胞はAまたはBの阻害効果の為に単独で

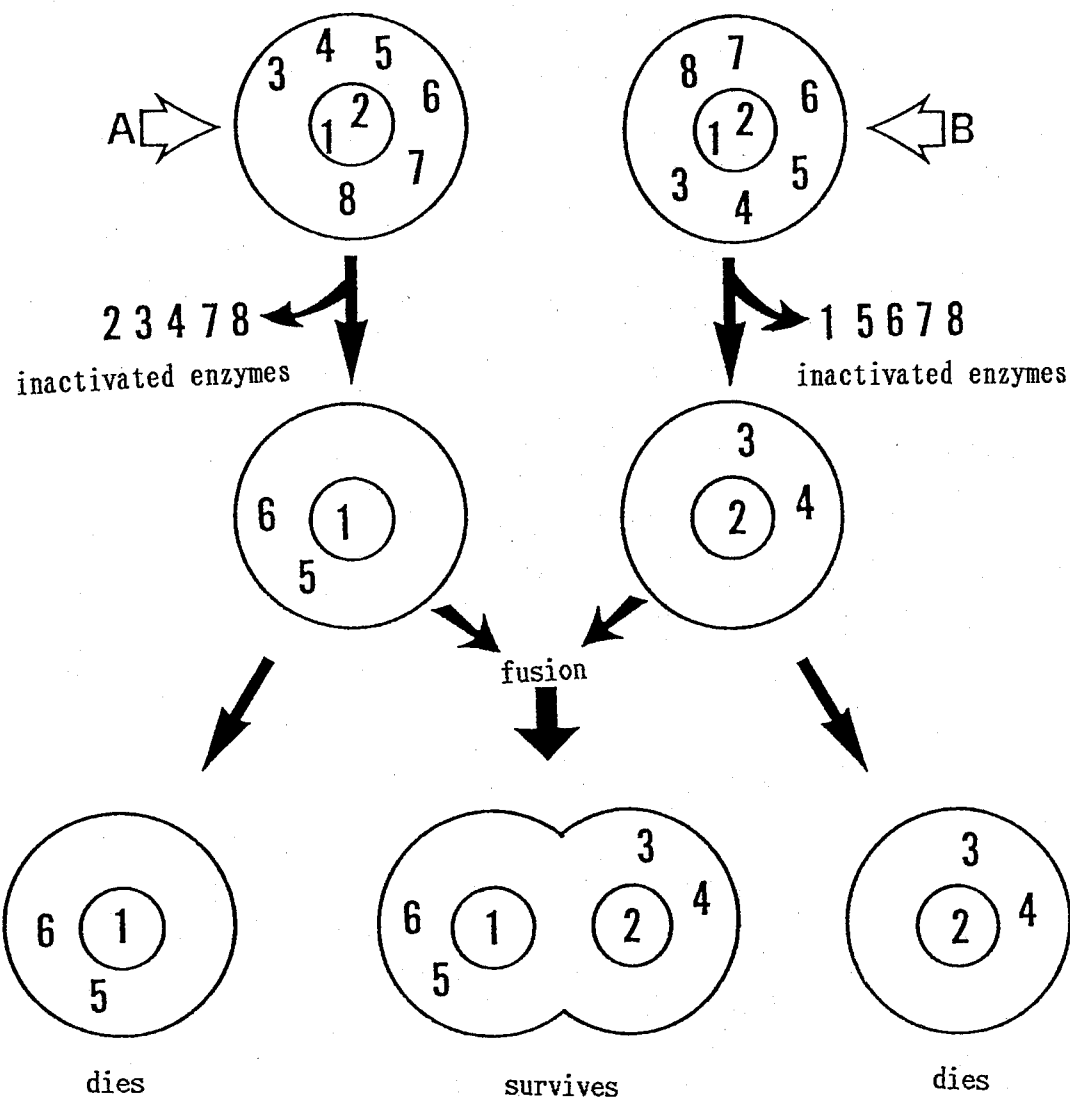


Fig.5-1 Schematic diagram of a selective system based on the use of irreversible biochemical inhibitors.

は生存できない。融合した細胞に於いては、1, 2, 3, 4, 5, 6 の酵素が相補されることにより、酵素系の生合成が行われるようになり、7, 8 の酵素も補われるため生存可能となる。

本研究に使用したジエチルピロカーボネートは、主にアミノ基やイミダゾール基を活性中心に持つ酵素群を阻害し、ヨード酢酸ナトリウムは主にチオール基を活性中心に持つ酵素群を不可逆的に阻害する¹³⁾。

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¹⁴⁾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をFig.5-2に示す。横軸にジエチルピロカーボネートの濃度を、縦軸にプロトプラストの再生率を示した。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。

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をFig.5-3に示す。処理濃度0.05%~0.1%で急激に再生率は低下し、0.5%濃度時には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。

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

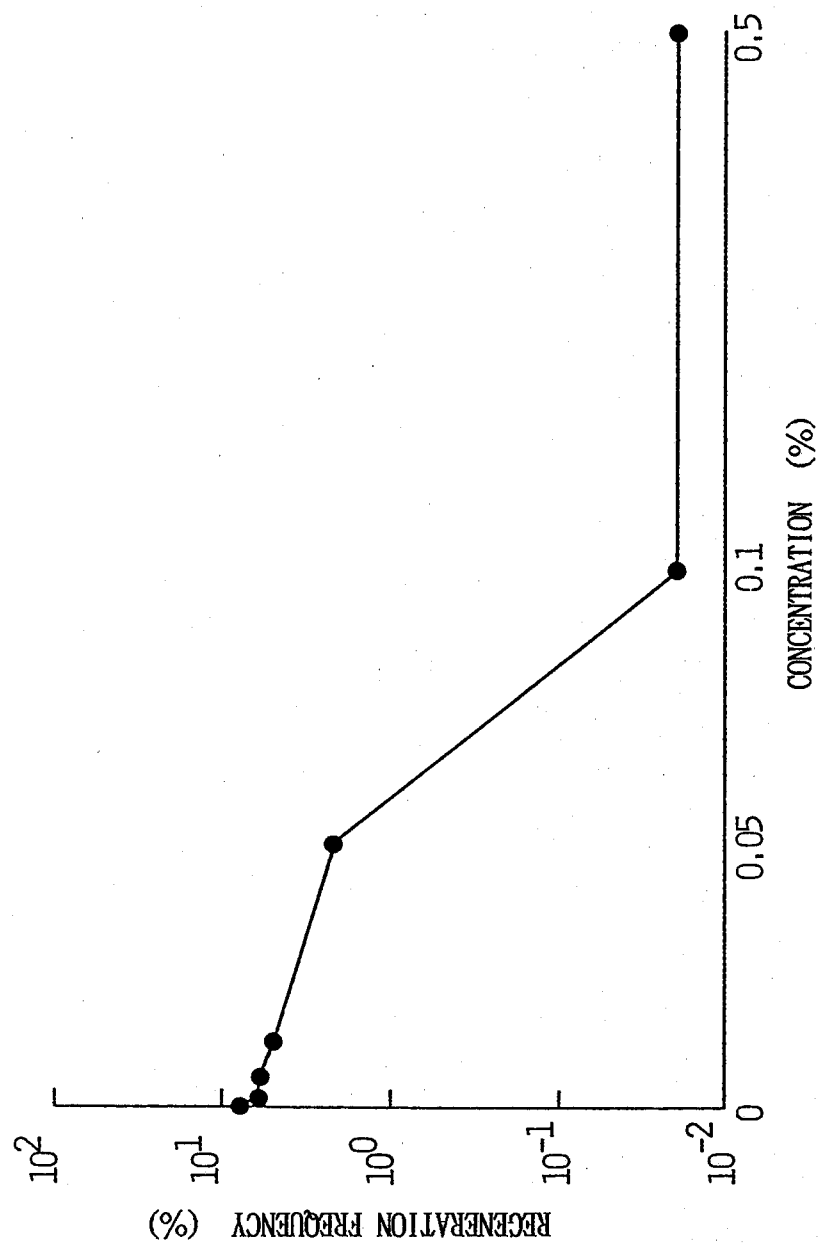


Fig.5-2 Effect of diethylpyrocarbonate concentration on the regeneration frequency of protoplasts. (PO-8)

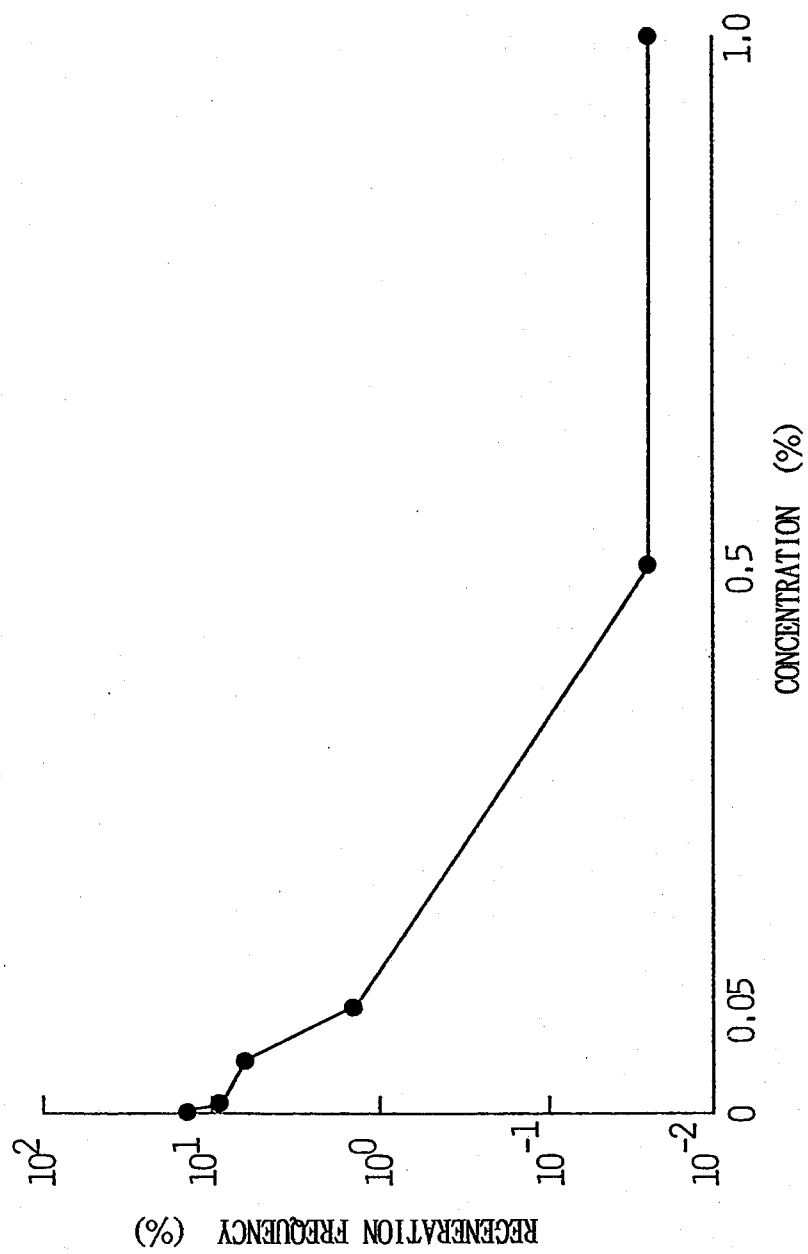


Fig.5-3 Effect of sodium iodoacetate concentration on the regeneration frequency of protoplasts. (PC-2)

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思われた。

V-2-2 アイソザイム分析

アイソザイムとは、基質特異性を同じくするが、電気泳動特性を異にする酵素群のことである。種や個体について種々の特有のアイソザイムパターンが存在することが確認されており、種や個体の識別及び交配の確認等のために広く利用されている。キノコについても種の識別、交配の確認及び栽培品種の識別等への応用が検討されてきたが^{9, 15-21)}、細胞融合株の選抜への応用例は数少ない。

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。またバンドパターンの識別を容易にする為に、バンド数は多過ぎないことが望ましい。

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。両系統のエステラーゼアイソザイムのバンドパターンをPhoto.5-1に示す。バンドの出現位置が重なって識別が困難な箇所が一部あるが、概ね条件に沿うものと評価された。各々の系統に特異的なバンド領域を選定し、ヒラタケ-8についてはregion I、タモギタケ-2についてはregion IIとし、後に融合株を選抜する際の目安とした (Photo.5-1)。

V-3 まとめ

各代謝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%の処理が適当と判断された。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思われた。

アイソザイム分析に於いては、エステラーゼについて、バンドパターンが明瞭かつ、対象系統間で重なり合わない特徴的な部分を持つこと及び高い再現性が確認された。融合株の選抜に利用するために、各々の系統に特徴的なバンド領域（ヒラタケ-8については、region I、タモギタケ-2についてはregion II）を選定した。

代謝阻害剤処理とアイソザイム分析の併用により、ヒラタケ-8、タモギタケ-2間での融合株の選抜は可能と考えられた。

VI章 融合株の作出

VI-1 実験方法

VI-1-1 プロトプラストの調製

ヒラタケ-8及びタモギタケ-2の二系統を用い、Ⅲ-1-2の方法によりプロトプラストを調製した。

VI-1-2 代謝阻害処理

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

VI-1-3 プロトプラストの融合及び再生

代謝阻害処理後の両系統のプロトプラストに対し、Ⅱ型融合チャンバーを用い、Ⅳ-1-2の方法により融合を行った。融合処理後のプロトプラストをⅢ-1-3の方法により再生させた。再生コロニーを分離し、PDA培地上で継代保存した。

VI-1-4 アイソザイム分析

分離した再生株について、V-1-2の方法によりアイソザイム分析を行った。尚、活性染色はエステラーゼについて行った。

VI-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%であったが、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、Region I 及び Region II 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 (Photo.6-1)。各系統と両親株をPDA平面培地上に伸ばした際の菌叢の様子をPhoto.6-2に示す。

菌糸の顕微鏡観察の結果、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 (Photo.6-3)。偽クランプは通常、B因子共通ヘテロカリオンに於いてのみ観察される菌糸構造であり、これまで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、他にも報告例は見あたらない。従って、細胞内に共存する異種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、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は菌糸生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。

VI-3 まとめ

ヒラタケ-8とタモギタケ-2のプロトプラストの融合を行い、再生株50を得た。代謝阻害剤処理による選抜効果は不明瞭であったが、アイソザイム分析により四系統が選抜され、更なる検討の結果、一系統（No.15）を融合株と判定した。

VII章 融合株の性状の検討

VII-1 実験方法

VII-1-1 顕微鏡観察

VII-1-1-1 染色方法

細胞核の染色方法を検討し、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。

試行した染色方法は、ギムザ染色法、フォイルゲン反応染色法、酸性ヘマラウン染色法、プロピオン鉄ヘマトキシリン染色法、酢酸カーミン染色法及び蛍光二重染色法であった。各々の染色方法を以下に示す。

・ギムザ染色法^{1,2)}

菌糸体をスライドグラス上に広げ、適度に乾燥させ、スライドグラスに密着させた後、5%グルタルアルデヒドで2時間、固定を行った。エタノールシリーズ(50→70→90→95→99%)で脱水し、1N塩酸で64℃、6分間加水分解を行った。

水洗し、リン酸緩衝液(14mMリン酸1カリウム、14mMリン酸2ナトリウム、pH7.2)によりpHを調整した(5分間)後、緩衝液1mℓ当たり2滴の割合でギムザ液(Merk製)を加え、120分間染色を行った。リン酸緩衝液で数回洗浄し、プレパラートに封入した後、顕微鏡下1000倍で観察した。

・ フォイルゲン反応染色法³⁾

エタノール：酢酸＝3：1により60分間固定を行った後、エタノールシリーズによる脱水をギムザ染色と同様に行った。1N塩酸に2分間浸した後、60℃の1N塩酸で60分間、加水分解を行った。0℃の塩酸で濯ぎ、次いで水洗した後、シッフの反応を5時間、行った。亜硫酸水で数回洗浄し、10分間水洗した後、0.5%ファーストグリーン（nacalai tesque製）エタノール溶液で10分間細胞質の染色を行った。速やかに100%エタノールで洗浄及び脱水を行った後に、プレパラートに封入し、顕微鏡下1000倍で観察した。

＊シッフの試薬（亜硫酸フクシン液）

塩基性フクシン（nacalai tesque製）1gを蒸発皿の中でよく潰し、沸騰している蒸留水200mℓを上から注いで、ガラス棒でかき混ぜ、完全に溶かした。50℃迄冷めてから濾過し、1N塩酸20mℓを加えて放置した。25℃迄冷めてから無水重亜硫酸ナトリウム1gを加え、更に活性炭を加えて赤紫色に発色している成分を吸着させた後、濾過し、濾液をガラスの共栓瓶に密閉し、冷暗所に約24時間放置した後を使用した。

・ 酸性ヘマラウン染色法⁴⁾

エタノールシリーズによる脱水までフォイルゲン反応と同様に行い、4%鉄ミョウバン溶液で20分間媒染し、15分間水洗を行った。酸性ヘマラウン液を濾過し、濾液により15分間染色を行った。水道水により2時間水洗を行い、ピクリン酸飽和溶液で10分間弁

色した後、希アンモニア溶液に1分間浸した。30分間水洗し、99%エタノールで速やかに脱水した後、プレパラートに封入し、顕微鏡下1000倍で観察した。

＊Mayerの酸性ヘマラウン

試薬瓶にヘマトキシリン (nacalai tesque製) 1 g と蒸留水 1 ℓ を入れて溶かし、完全に溶けたところで、沃素酸ナトリウム 0.2 g とカリミョウバン 50 g を加えて、かき混ぜながら溶かした。次に氷酢酸 20 ml を加え、共栓のガラス瓶に密栓して保存し、使用した。

・プロピオン鉄ヘマトキシリン染色法⁵⁾

EPC固定液により12時間固定した後、菌糸体をプレパラート上に広げ、適度に乾燥させた。70℃、3分間、加水分解(12N塩酸：95%エタノール=1：1)を行った後、1Nの冷塩酸で1分間洗浄した。30秒間媒染(6%鉄ミョウバン溶液：プロピオン酸=1：1)した後、プロピオンヘマトキシリン溶液で染色、プレパラートに封入し、顕微鏡下1000倍で観察した。

＊EPC固定液

99%エタノール：プロピオン酸：クロム酸(10%)
=9：6：2 (V/V)

＊プロピオンヘマトキシリン溶液

2%ヘマトキシリン

50%プロピオン酸

・酢酸カーミン染色法⁶⁾

固定（エタノール：酢酸＝3：1）を10分間行った後直ちに、1N塩酸により60分間、加水分解を行った。エタノールシリーズにより脱水した後、4%鉄ミョウバン溶液により媒染を20分間行った。流水で15分間洗浄した後、余分の水を濾紙で吸い取り、酢酸カーミン溶液（和光純薬製）により30分間染色を行った。プレパラートに封入し、顕微鏡下1000倍で観察した。

VII-1-1-2 観察方法

顕微鏡観察には、オリンパス製IMT-2型倒立顕微鏡を使用した。照明系には、12V50W HALハロゲンランプ及びLBD-2N色温度転換用フィルター（デイライトタイプ用）を、観察光学系には、1.5x中間変倍装置、WHK10x/20接眼レンズ及び2.5xFK撮影レンズを、コンデンサーには、IMT2-LWCD長焦点コンデンサーを、対物レンズとしてSPlan 100xまたはLWD CDPlan 40xPLを各々用いた。通常観察はBI光路により行ったが、必要に応じて光路をOM光路（写真撮影用）もしくはMTU光路（側筒部ビデオモニター用）に切り替えて観察を行った。写真撮影はOMカメラ光路に取り付けたOM-2Nカメラの自動露出モードにより行った。

VII-1-2 培養特性

VII-1-2-1 菌糸生長度

II-1-3の方法に従ってPDA培地上に於ける菌糸生長の温度特性を調べた。

VII-1-2-2 対峙培養

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

VII-1-3 バーベンダム反応

II-1-6の方法により融合株のバーベンダム反応によるキャラクタリゼーションを行った。反应用到に添加したフェノール性物質の種類と添加濃度は以下に示す通りである。尚、参考としてパーオキシダーゼ活性検査試薬であるレマゾールブリリアントブルーR塩^{7,8,9)}を添加した培地を併せて用いた。

0.36%	(W/V)	タンニン酸
* 0.01%	(V/V)	グアヤコール
1.0 mM		没食子酸
* 0.036%		グアヤク脂
* 1.0 mM		α -ナフトール
* 1.0 mM		β -ナフトール
1.0 mM		L-アスコルビン酸
1.0 mM		アントラニル酸

1.0 mM	バニリン
* 1.0 mM	シリンガルデヒド
0.05 %	レマゾールブリリアントブルー R 塩

各々を脱イオン水もしくはエタノール（上記*印）に溶かし、濾過滅菌した後、基本培地に添加した。各溶液の培地に対する最終濃度は1%（V/V）とした。

VII-1-4 栽培特性

II-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200ml容栽培瓶を使用した。

VII-1-5 交配反応

II-1-5の方法に従って融合株の交配反応を調べた。

テスターとしてヒラタケ-8の単孢子分離により得た一次菌糸 No.4 (A1B1)、2 (A1B2)、5 (A2B1)、8 (A2B2)、1 (A2B) 及び、タモギタケ-2より得た一次菌糸 No.1 (A1B1)、No.2 (A2B1)、No.3 (A2B2) 及び No.4 (A1B2)、を用いた。（Table2-1及びTable2-2を参照）

VII-2 結果と考察

VII-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6方法の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り、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。ギムザ染色法による融合株OCD-15系統の細胞核の写真をPhoto.7-1に示す。写真中の細胞内の赤紫色の粒子が細胞核である。1細胞当りの核数は、0～5であった。菌糸の生長は見られることから、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。

被覆四極性の交配因子を持つ担子菌類は通常、AB両和合性因子の適合する一次菌糸間でのみ菌糸接合を起こし正常なクランプ構造を有する二次菌糸となり、Fig.7-1のBに示すように一次菌糸とは異なる細胞核の移送システムにより細胞分裂を繰り返す、増殖して行く。

一方、B因子共通（不和合）の組合せで対峙培養を行うと、両菌叢接触部に於いてのみ偽クランプを持つヘテロカリオンとなる。VI-2 (Fig.6-2) で示したように、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異が生じているものと推測された。

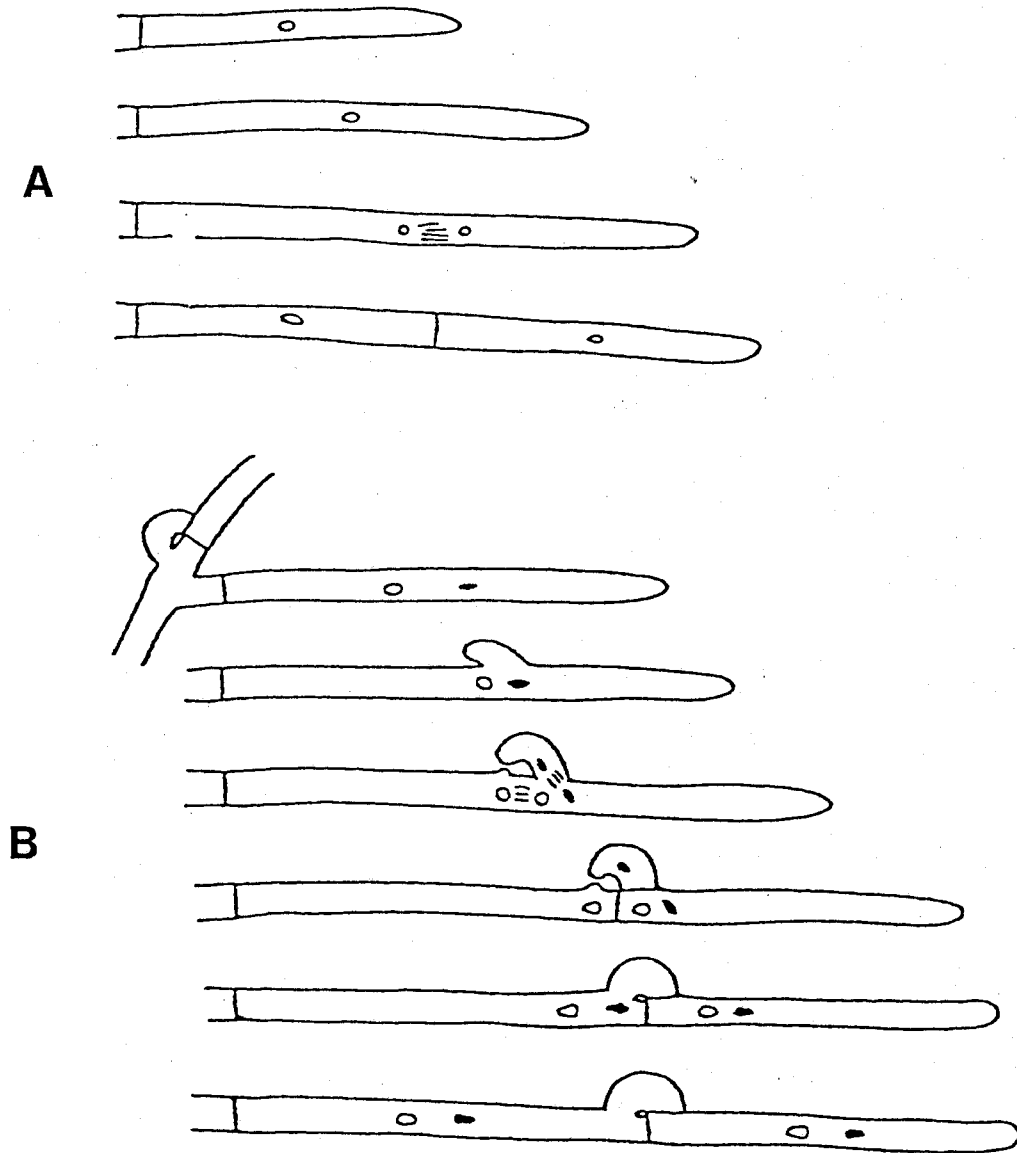


Fig.7-1 Cell division form of mycelium. (A:monokaryon, B:dikaryon)

VII-2-2 培養上の性質

融合株の温度別菌糸生長特性を調べた。PDA平面培地上での菌糸生長度を親株と比較した結果をFig.7-2に示す。横軸に培養温度を、縦軸にコロニー直径を示した。融合株の生長速度は全般的に両親株よりも遅かったが、温度特性は同一であった。

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 (Photo.7-2)。

VII-2-3 バーベンダム反応

バーベンダム反応により融合株のキャラクタリゼーションを行った。培養10日目の呈色反応状況をPhoto.7-3、7-4、7-5、7-6、7-7、7-8に示す。

β -ナフトールの呈色程度については、タモギタケ-2が接種片のみ呈色したのに対して、融合株及びヒラタケ-8は接種片の及びその外側約1.5 cmまで呈色していた (Photo.7-4)。 α -ナフトールに対する菌糸生長度には特徴が認められなかった。ガルス酸については呈色反応に特徴は認められなかったが、呈色後に直ちに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 (Photo.7-3)。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1~2カ月間培養を継続すると、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。この融合株による発色団を迅速に破壊脱色するという興味深い性質は、将来、バイオブリーチング等への応用が考えられる。

レマゾールブリリアントブルーの脱色帯の形成にも特色が認めら

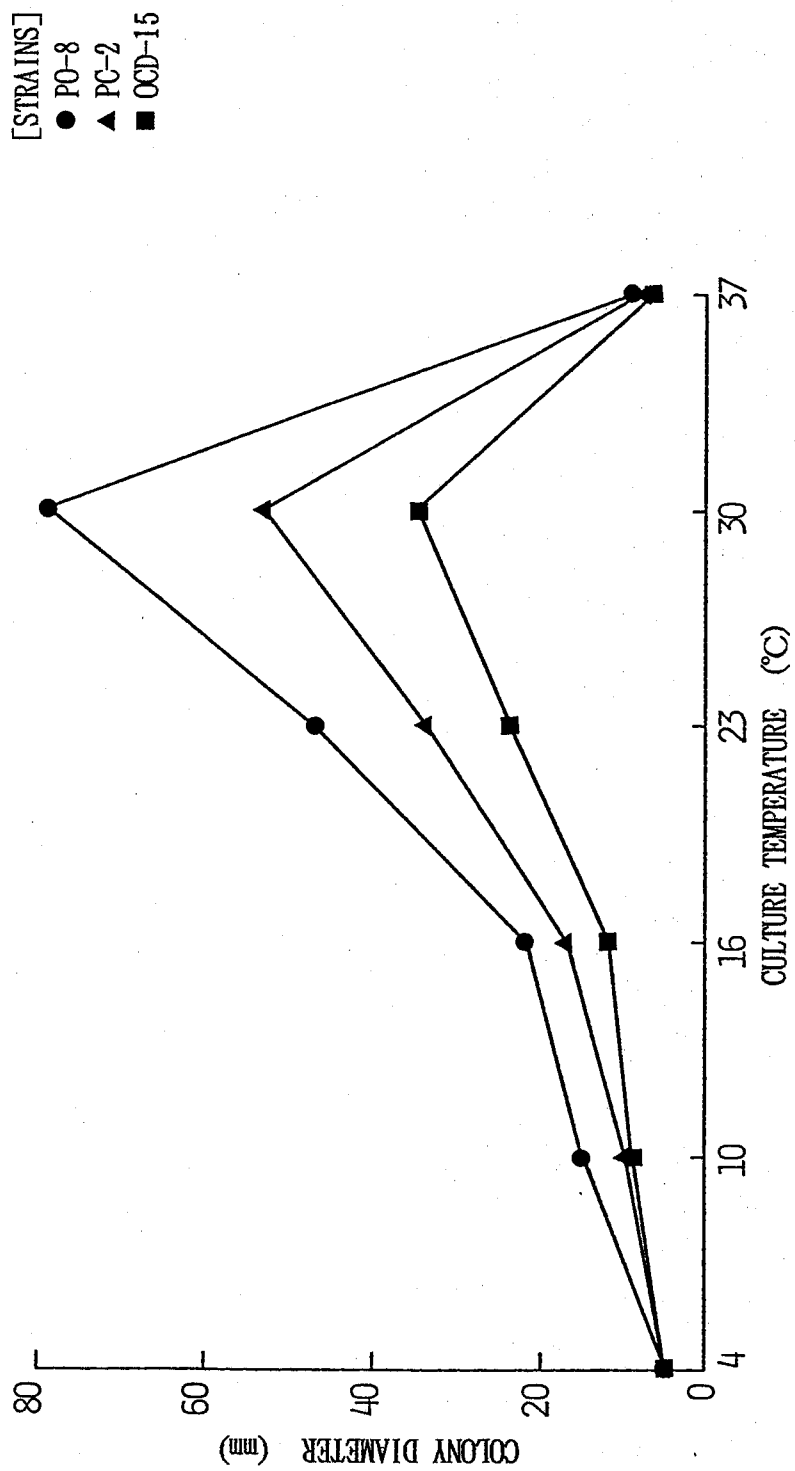


Fig.7-2 Effect of temperature on mycelial growth.

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約1 cm外側に形成された (Photo.7-8)。パーオキシダーゼの菌体外への分泌能力及び分泌様式に変化が生じているものと推定された。

VII-2-4 子実体形成能

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 (Photo.7-9)、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¹⁰⁾。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。

III-1の方法により融合株から二次再生株50系統 (OCD-15-1～50系統) を得て、PDA斜面培地上に継代保存した。それらは全て偽クランプ様の構造を有していた。

栽培試験を行ったところ、発生操作後7～10日目に再生株の約70%が子実体を形成した (Photo.7-10)。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、菌柄を全く形成せず、菌傘部のみから構成される特異なものであった。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。

二次再生株についてのアイソザイム分析の結果、Region II、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 (Photo.7-11)。

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。

VII-2-5 交配反応

融合株OCD-15及び二次再生株OCD-15-5の交配反応を調べた。両系統はタモギタケ-2由来の一次菌糸No.4 (A1B2) 系統との対峙培養に於いてのみ、正常なクランプを形成した。このことにより、両系統の細胞内には少なくとも交配型A2B1を有する核が存在することが確認された。

交配試験に用いた一次菌糸は各親系統 (タモギタケ-2またはヒラタケ-8) とのdi-mon交配に於いてクランプを形成し、二次菌糸となるが、OCD-15及びOCD-15-5については親系統との対峙培養に於いてもクランプは形成されなかった。またOCD-15-5はヒラタケ-8に対してのみ褐色の対峙線を形成した (Photo.7-12)。

OCD-15-5の子実体に形成された担子胞子より得た全ての一次菌糸系統は、タモギタケ-2由来の一次菌糸No.4 (A1B2) との対峙培養によってのみ、クランプを形成した。即ち、全てがタモギタケ-2に由来する交配型A2B1を示し、交配型A1B2及びヒラタケ-8に由来する交配型は検出されなかったことになる。

以上の結果から融合株OCD-15の性状については、次の二つの解釈が可能であろう。

二次菌糸からプロトプラストを調製する際には、複核のプロトプラストと共に単核及び無核のプロトプラストが形成されるが、

①その中のタモギタケ-2の単核(交配型A2B1)プロトプラストとヒラタケ-8の無核プロトプラストが融合し、OCD-15として単離された。

②タモギタケ-2の単核(交配型A2B1)もしくは複核プロトプラストとヒラタケ-8のプロトプラストがランダムに融合し、融合後にヒラタケ-8に由来する核及びタモギタケ-2由来の核(交配型A1B2)の発現抑制、不活性化もしくは脱落が生じた。

これらを立証するためには今後、遺伝子工学及び細胞組織学的なアプローチが必要であろう。

VII-3 まとめ

融合株OCD-15系統の性状を検討した結果、以下の事が明らかになった。

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。菌糸生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。バ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-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系統より誘導した二次再生株はタモギタケ-2に類似した特異な形状の子実体を形成した。子実体には正常な担子孢子が形成され、その担子孢子に由来する一次菌糸は全てが単一の交配型を示した。

子実体の形状は特異ではあるが、栽培品種としての評価は今後の綿密な栽培試験が必要であると思われた。しかしながら、発色団を速やかに破壊し脱色するなど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思われた。

VIII章 結論

電氣的細胞融合によるヒラタケ-8 (*Pleurotus ostreatus*) とタモギタケ-2 (*Pleurotus cornucopiae*) の異種間体細胞雜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。

先ず各々の系統に固有の特徴を見出すため、形態、培養、バーベンドラム反応等に関する基礎的なデータ収集を行った。子実体形態、対峙培養、バーベンドラム反応に於いて両系統に差異が認められた。

プロトプラストの調製方法の検討を行い、前培養条件を改良することにより、収量及び再生率共に再現性が高く、電氣的細胞融合法に適したプロトプラストが得られた。

次に電氣的融合条件に関する検討を行い、融合に適した融合チャンバーを作製し、再現性の高い融合条件を確立した。

融合株選抜方法として、代謝阻害剤処理、アイソザイム分析について検討した。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。従って今後更に他の代謝阻害剤や処理条件を検討する必要があると思われた。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の電気泳動パターンに於いて、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、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により融合株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。菌糸生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。バーベンドム反応に於いて 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-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胞子が形成された。融合株、二次再生株及びその担子胞子に由来する一次菌糸は全てタモギタケ-2に由来するA1B2に対してのみ交配反応を示すが、これらの交配挙動の解明については今後の検討を要する。

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て融合株を選抜ことが出来た。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について細胞融合を行い、融合株を得ることが出来たが、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が大きく寄与することはまちがいないと思われるが、逆に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を見いだすことが出来るであろう。

謝辞

本研究を進めるに当たり、懇切な御指導、有益な助言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、小島康夫助手に心から謝意を表します。

また、論文校閲の労をとられた同大学木材化学講座の笹谷宜志教授、同大学木材理学講座の深沢和三教授に厚く御礼を申し上げます。

実験を行うに当たり、貴重な助言及び協力を頂いた、横野 健氏、西口恭彦氏（現十條製紙）ほか、林産製造学講座の皆様に心から御礼申し上げます。

参考文献

I 章

- 1) 仁和田久雄: “原色北海道のキノコ図鑑”、総北海、1984、
p. 9-10.
- 2) 中村克哉: “キノコの辞典”、朝倉書店、1982、p. 205-212.
- 3) 川合正允: “きのこの利用”、築地書館、1990.
- 4) Power, J.B.; Cummins, S.E.; Cocking, E.C.: Nature, 225,
1016-1018 (1970).
- 5) Keller, W.; Melchers, G.: Z. Naturforsch., 280, 737-741
(1973).
- 6) Kao, K.N.; Michayluk, M.R.: Planta, 115, 355-367 (1974).
- 7) Kao, K.N.; Michayluk, M.R.: Planta, 126, 105-110 (1975).
- 8) Anne, J.; Peberdy, J.F.: Arch. Microbiol., 105, 201-205
(1975).
- 9) Nagata, T.: Naturwiss., 65, 263-264 (1978).
- 10) Kameya, T.: Cytologia, 44, 449-456 (1979).
- 11) Senda, M.; Takeda, J.; Abe, S.; Nakamura, T.: Plant
Cell Physiol., 20, 1441-1443 (1979).
- 12) 千田 貢、竹田淳子、森川弘道: 細胞、12、302-307
(1980).
- 13) 千田 貢、森川弘道、竹田淳子: 生物物理、22、198-205
(1982).
- 14) Neumann, E.; Gerisch, G.; Opatz K.: Naturwiss., 67,
414-415 (1980).

- 1 5) Teissie, J.; Knutson, V.P.; Tsong, T.Y.; Lane, M.D.:
Science, 216, 537-538 (1982).
- 1 6) 森川弘道、山田康之: 細胞工学、3、357-364 (1984).
- 1 7) Zimmermann, U.; Scheurich, P.: Planta, 151, 26-32
(1981).
- 1 8) Zimmermann, U.; Scheurich, P.; Pilwat, G.; Benz, R.:
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 20, 26-32 (1981).
- 1 9) Zimmermann, U.: Biochem. Biophys. Acta, 694, 227-277
(1982).
- 2 0) Pohl, H.A.: " Dielectrophoresis" , Cambridge Univ.
Press, Cambridge (1978).
- 2 1) Pohl, H.A.; Pollock, K.; Rivera, H.: Int. Quant.
Chem.; Quantum Biology Symposium, 11, 327-345 (1984).
- 2 2) Wakabayashi, S.; Magae, Y.; Kashiwagi, Y.; Sasaki, T.:
Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 328-330 (1985).
- 2 3) Magae, Y.; Kashiwagi, Y.; Senda, M.; Sasaki, T.: Appl.
Microbiol. Biotechnol., 24, 509-511 (1986).
- 2 4) 武丸恒雄、鎌田 堯: 菌蕈研究所研究報告、9、21-40
(1971).
- 2 5) Takemaru, T.; Kamada, T.: Bot. Mag. Tokyo, 85, 51-55
(1972).
- 2 6) Kim, K.S.; Cho, N.Y.; Pai, H.S.; Ryu, D.D.Y.: Appl.
Environ. Microbiol., 46(3), 689-693 (1983).
- 2 7) Delbruck, M.; Ootaki, T.: Genetics, 92, 27-30 (1979).

- 2 8) Wright, W.E.: Experimental Cell Research, 112, 395-407 (1978).
- 2 9) Nehls, R.: Molec. gen. Genet., 166, 117-118 (1978).
- 3 0) Vries, O.H.M.; Wessels, J.H.G.: J. Gen. Microbiol., 73, 13-22 (1972).
- 3 1) Ushiyama, R.; Nakai, Y.: Rept. Tottori Mycol. Inst., 15, 1-5 (1977).
- 3 2) Yamada, O.; Magae, Y.; Kashiwagi, Y.; Kakimoto, Y.; Sasaki, T.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 298-300 (1983).
- 3 3) Abe, M.; Nakai, T.; Umetsu, H.; Sasage, D.: Agric. Biol. Chem., 48(6), 1635-1636 (1984).
- 3 4) Iijima, Y.; Yanagi, S.O.: Agric. Biol. Chem., 50(7), 1855-1861 (1986).
- 3 5) Koga, D.; Sueshige, N.; Orikono, K.; Umetsu, T.; Tanaka, S.; Yamada, Y.; Ide, A.: Agric. Biol. Chem., 52(8), 2091-2093 (1988).
- 3 6) 前田好之、中井幸隆、有田郁夫、小松光雄: 菌蕈研究所研究報告、26、55-64 (1988).
- 3 7) Sudo, T.; Higaki, M.: Mokuzai Gakkaishi, 34(2), 181-183 (1988).
- 3 8) 江口文陽、田代政裕、鈴木利克、桧垣宮都: 木材学会誌、36(3)、232-240 (1990).
- 3 9) Gold, M.H.; Cheng, T.M.; Alic, M.: Appl. Environ. Microbiol., 46(1), 260-263 (1983).

- 4 0) Kiguchi, T.; Yanagi, S.O. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 121-127 (1985).
- 4 1) Ohmasa, M.: Japan J. Breed., 36, 429-433 (1986).
- 4 2) Toyomasu, T.; Matsumoto, T.; Mori, K.: Agric. Biol. Chem., 50(1), 223-225 (1986).
- 4 3) Toyomasu, T.; Mori, K.: Agric. Biol. Chem., 51(3), 935-937 (1987).
- 4 4) Toyomasu, T.; Mori, K.: Agric. Biol. Chem., 51(7), 2037-2040 (1987).
- 4 5) Sonnenberg, A.S.M.; Wessels, J.G.H.: Theor. Appl. Genet., 74, 654-658 (1987).
- 4 6) Ohba, K.; Kawasumi, T.; Yanagi, S.O.: Trans. mycol. Soc. Japan, 29, 271-280 (1988).
- 4 7) 三浦 清: 北海道大学農学部演習林研究報告、46(2)、343-391 (1989).

II 章

- 1) 今関六也、本郷次雄: “原色日本新菌類図鑑”、保育社、1987、p. 24-28.
- 2) Fukuzumi, T. : J. Jpn. Forestry Soc., 35(4), 139-141 (1953).
- 3) Toyomasu, T.; Mori, K.: Agric. Biol. Chem., 51(3), 935-937 (1987).
- 4) 今関六也、土岐晴一: 林業試験場研究報告、53、69-82 (1952).

- 5) 周璧華、朱慧真、婁隆后：“食用菌生物学及栽培技術”、
中国林業出版社、1985、p. 167-176.
- 6) 逸見武雄、赤井重恭：植物病学叢書第一冊“木材腐朽菌学”、
朝倉書店、1947、p. 146-151.
- 7) 青島清雄：第32回日本林学会関東支部会論文集、1980、
p. 105.
- 8) 武丸恒雄：植物学雜誌、72、169-176 (1959).
- 9) Papazian, H.P.: Bot. Gaz., 112, 143-163 (1950).
- 10) Papazian, H.P.: Genetics, 36, 441-459 (1951).
- 11) Raper, J.R.; Baxter, M.G.; Ellingboe, A.H.: Proc.
Nat. Acad. Sci. U.S.A., 46, 833-842 (1960).
- 12) 武丸恒雄：植物学雜誌、70、238-243 (1957).
- 13) 武丸恒雄：植物学雜誌、70、244-249 (1957).
- 14) Bavendamm, W.: Zeitschr. Pflanzenkrankh.
Pflanzenschutz, 38, 257-276 (1928).
- 15) Davidson, R.W.; Campbell, W.A.; Blaisdell, D.J.:
J. Agric. Res., 57(9), 683-695 (1938).
- 16) 赤井重恭、寺下隆喜代：木材研究、5、43-48 (1952).
- 17) Kirk, T.K.; Kelman, A.: Phytopathology, 55, 739-745
(1965).
- 18) Sundman, V.; Nase, L.: Paperi ja Puu, 2, 67-71 (1971).
- 19) Fukuzumi, T.; Nishida, A.; Aoshima, K.; Minami, K.:
J. Jpn. Wood Res. Soc., 23(6), 290-298 (1977).
- 20) Ijima, T.; Suzuki, T.; Higaki, M.; Shibamoto, T.:
J. Jpn. Wood Res. Soc., 24(5), 324-334 (1978).

III章

- 1) 西口恭彦：昭和59年度北海道大学農学部林産学科卒業論文、1985.
- 2) 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.
- 3) 玉井 裕：昭和60年度北海道大学農学部林産学科卒業論文、1986.
- 4) Hashiba, T.; Yamada, M.: *Phytopathology*, 72, 239-245 (1982).
- 5) Zimmermann, U.; Pilwat, G.; Riemann, F.: *Biophys. J.*, 14, 881-889 (1974).

IV章

- 1) Zimmermann, U.; Scheurich, P.: *Planta*, 151, 26-32 (1981).
- 2) Zimmermann, U.; Scheurich, P.; Pilwat, G.; Benz, R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20, 325-344 (1981).
- 3) Zimmermann, U.: *Biochem. Biophys. Acta*, 694, 227-277 (1982).
- 4) Pohl, H.A.; Pollok, K.; Rivera, H.: *Int. Quant. Chem.; Quantum Biology Symposium*, 11, 327-345 (1984).
- 5) Schnettler, R.; Zimmermann, U.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 27, 195-198 (1985).
- 6) 玉井 裕：昭和60年度北海道大学農学部林産学科卒業論文、1986.

- 7) Bates, G.W.; Gaynor, J.J.; Shekhawat, N.S.: Plant Physiol., 72, 1110-1113 (1983).
- 8) 森川弘道: 細胞工学, 3(6), 497-505 (1984).
- 9) 三浦 清: 北海道大学農学部演習林研究報告, 46(2), 343-391 (1989).

V 章

- 1) Wright, W.E.: Experimental Cell Research, 112, 395-407 (1978).
- 2) Nehls, R.: Molec. Gen. Genet., 166, 117-118 (1978).
- 3) Sidorov, V.A.; Menczel, L.; Nagy, F.; Maliga, P.: Planta, 152, 341-345 (1981).
- 4) 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.
- 5) 白石 進: 林木の育種, 142, 23-25 (1987).
- 6) Toyomasu, T.; Matsumoto, T.; Mori, K.: Agric. Biol. Chem., 50(1), 223-225 (1986).
- 7) 門松昌彦: 北海道大学農学部演習林研究報告, 40(1), 1-48 (1983).
- 8) 白石 進: 林木の育種, 143, 34-37 (1987).
- 9) 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).
- 10) Brewer, G.J.: "An Introduction to Isozyme Techniques", Academic Press, 1970, p. 92-94.

- 1 1) 青木幸一郎、永井 裕：“最新電気泳動法”、廣川書店、
1986、p. 593.
- 1 2) 日高弘義：“阻害剤研究法-最近の進歩と展開-”、1985.
- 1 3) 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.
- 1 4) Shannon, M.C.; Ballal, S.K.; Harris, J.W.: Amer. J.
Bot., 60(1), 96-100 (1973).
- 1 5) Royse, D.J.; May, B.: Mycologia, 74(1), 93-102 (1982).
- 1 6) Royse, D.J.; May, B.: Mycologia, 74(4), 569-575
(1982).
- 1 7) May, B.; Royse, D.J.: Experimental Mycology, 6,
283-292 (1982).
- 1 8) Royse, D.J.; Spear, M.C.; May, B.: J. Gen. Appl.
Microbiol., 29, 205-216 (1983).
- 1 9) Royse, D.J.; Spear, M.C.; May, B.: J. Gen. Appl.
Microbiol., 29, 217-222 (1983).
- 2 0) Ohmasa, M.; Furukawa, H.: Trans. mycol. Soc. Japan,
27, 79-90 (1986).

VII章

- 1) Colotelo, N.; Grinchenko, A.H.H.: Can. J. Bot., 40,
439-446 (1962).
- 2) 本山誠治：採集と飼育、8、388-389 (1982).
- 3) 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.

- 4) 田中克己、浜 清: “顕微鏡標本の作り方、第7版”、裳華房、
1967、p. 143-149.
- 5) Lu, B.C.: *Chromosoma*, 22, 210-226 (1967).
- 6) 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.
- 7) Ulmer, D.C.; Leisola, M.S.A.; Fiechter, A.: *J. Biotechnol.*, 1, 13-24 (1984).
- 8) Kuwahara, M.; Asada, Y.; Kimura, Y.; Aokage, M.: *J. Jpn. Wood Res. Soc.*, 33(10), 751-828 (1987).
- 9) Nishida, T.; Kashino, Y.; Mimura, A.; Takahara, Y.: *J. Jpn. Wood Res. Soc.*, 34(6), 530-536 (1988).
- 10) Ohmasa, M.; Abe, Y.; Furukawa, H.; Taniguchi, M.;
Neda, H.: *Bull. For. & For. Prod. Res. Inst.*, 343,
155-170 (1987).

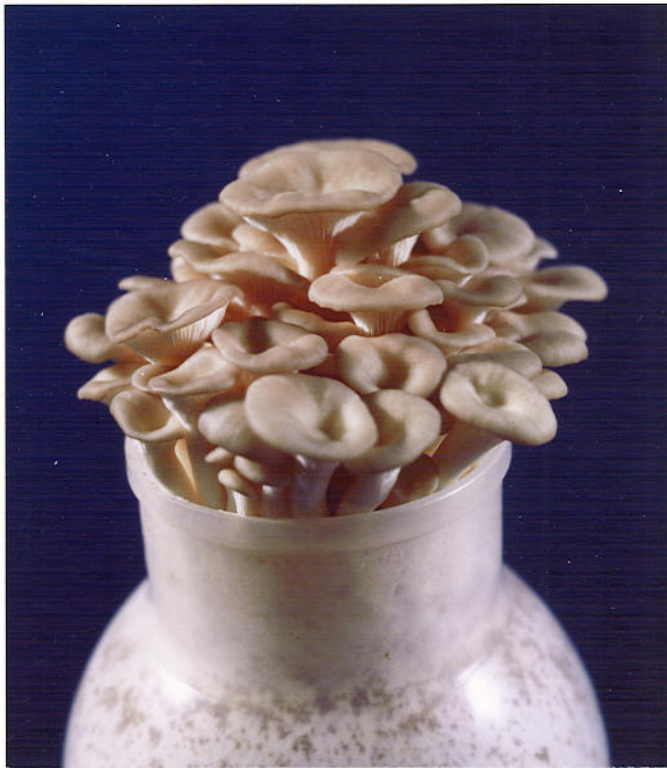


Photo.2-1 Fruit-bodies of P. ostreatus. (PO-8 strain)



Photo.2-2 Fruit-bodies of P. cornucopiae. (PC-2 strain)

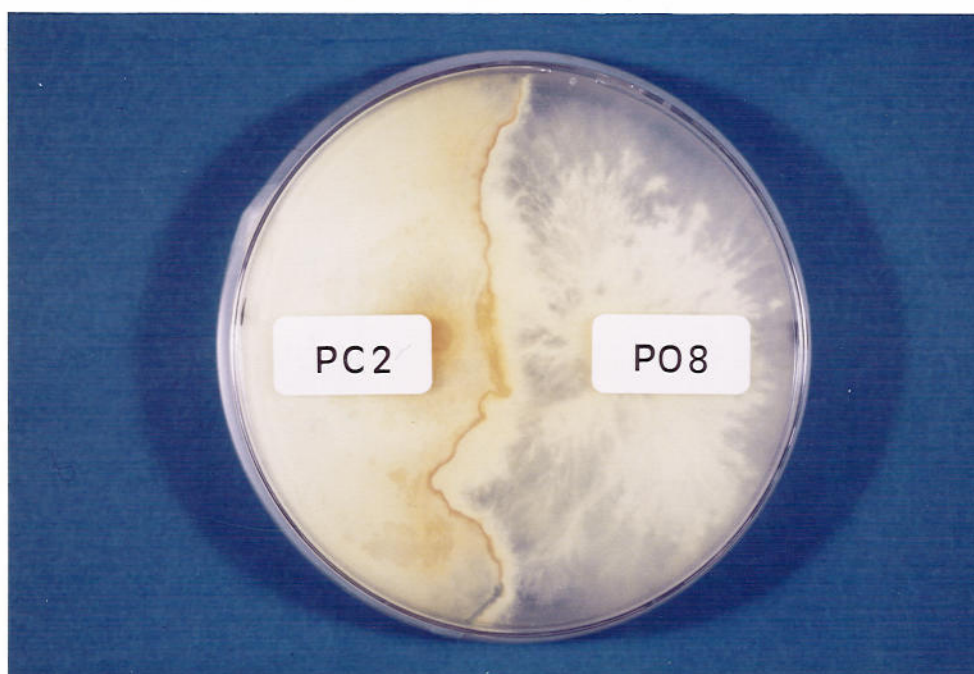


Photo.2-3 Confronting culture.

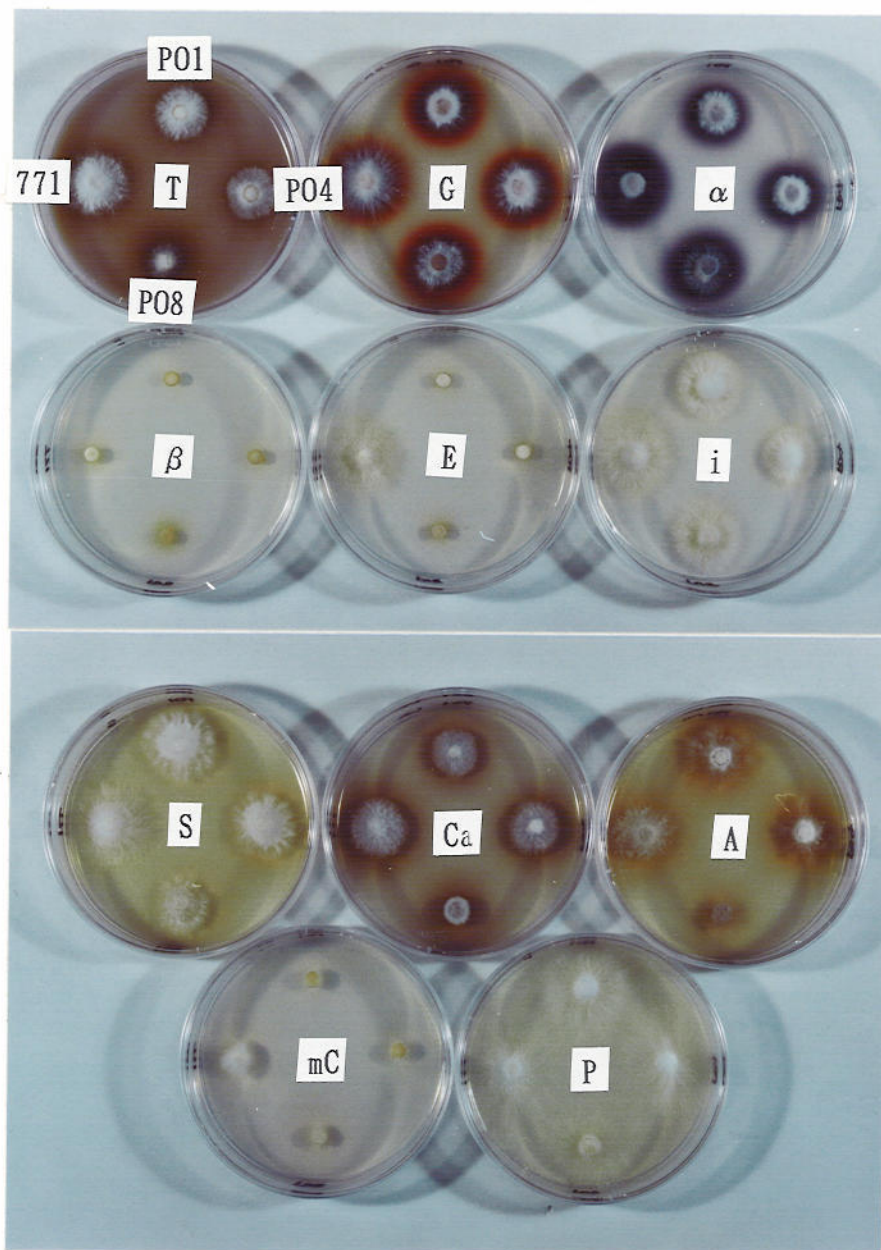


Photo.2-4 Bavendamm's reaction of *P. ostreatus*.

Legends: T:tannic acid, G:guaiacol, α : α -naphthol,
 β : β -naphthol, E:eugenol, iE:iso-eugenol,
 Ca:catechol, A:anthranilic acid, mC:m-cresol,
 P:phrologlucinol, S:sryngaldehyde

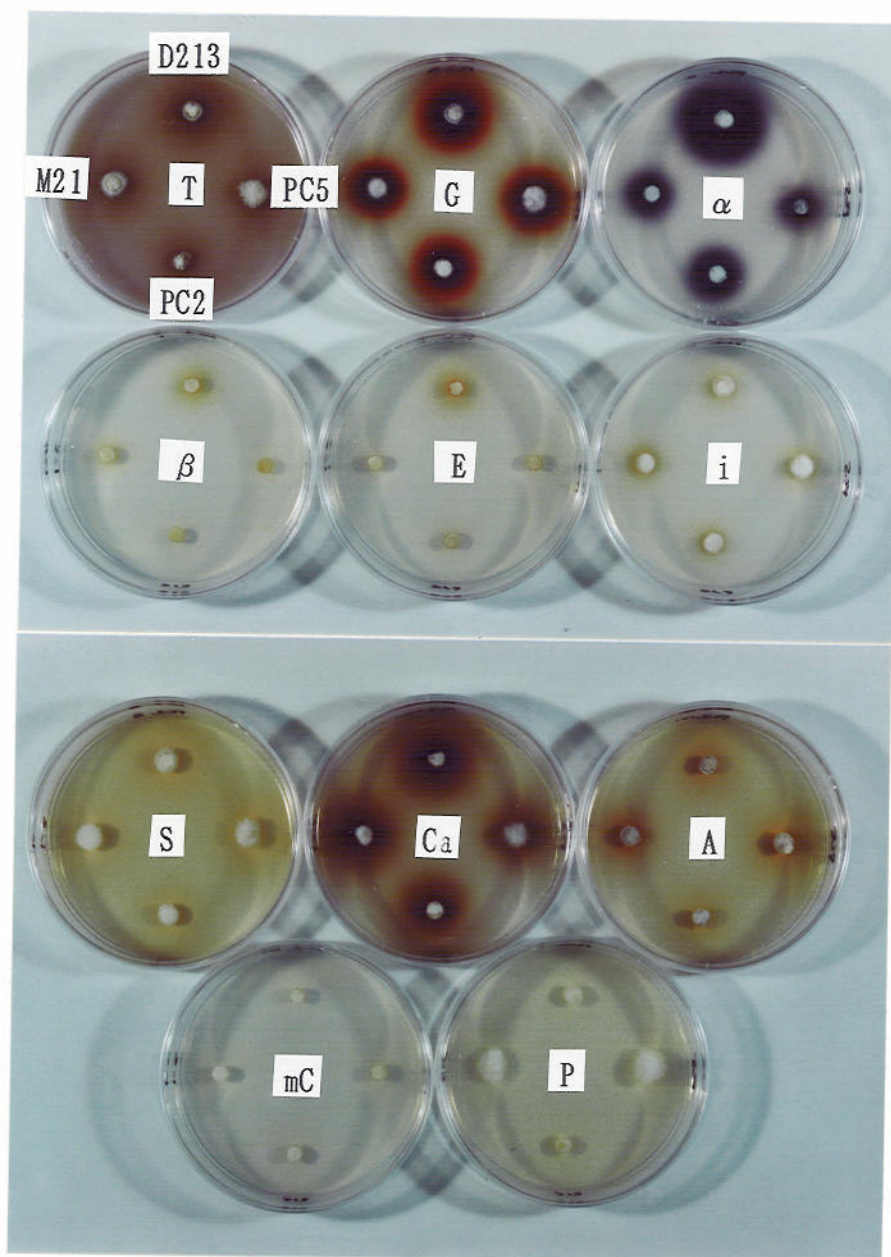


Photo.2-5 Bavendamm's reaction of *P. cornucopiae*.

Legends: T:tannic acid, G:guaiacol, α : α -naphthol,
 β : β -naphthol, E:eugenol, iE:iso-eugenol,
 Ca:catechol, A:anthranilic acid, mC:m-cresol,
 P:phrologlucinol, S:sryngaldehyde

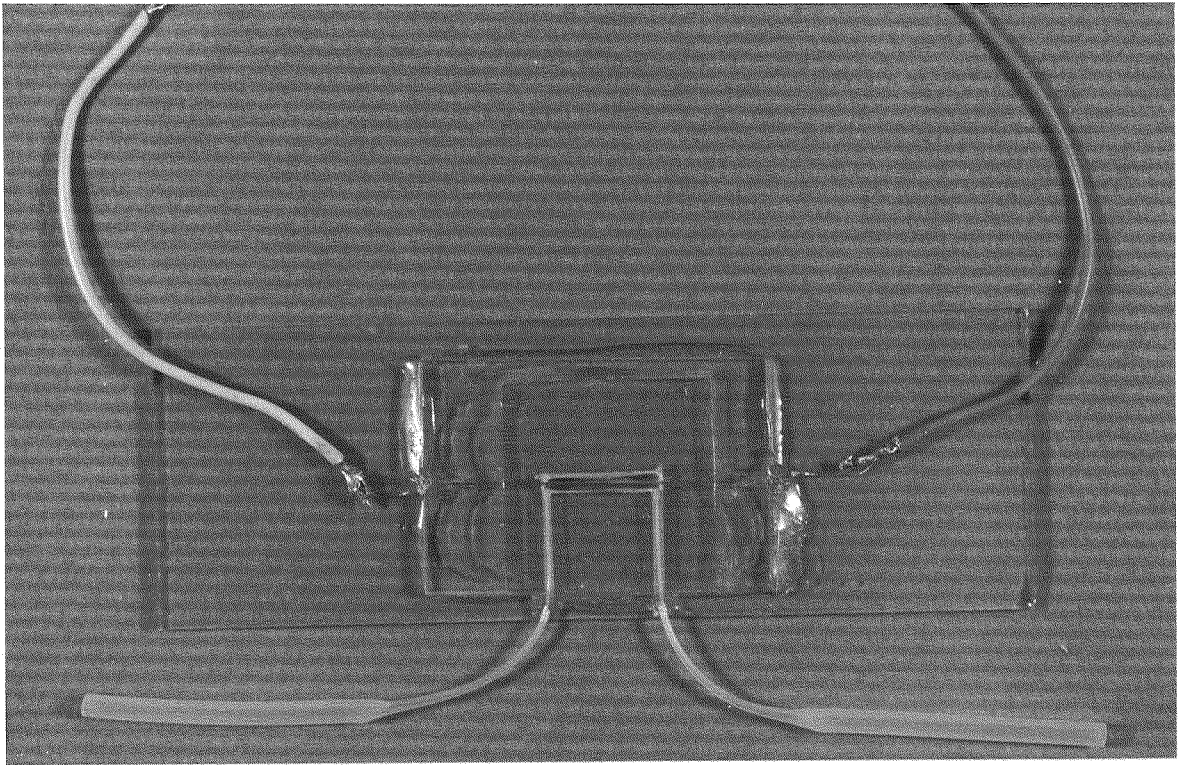


Photo.4-1 Fusion camber Type I .

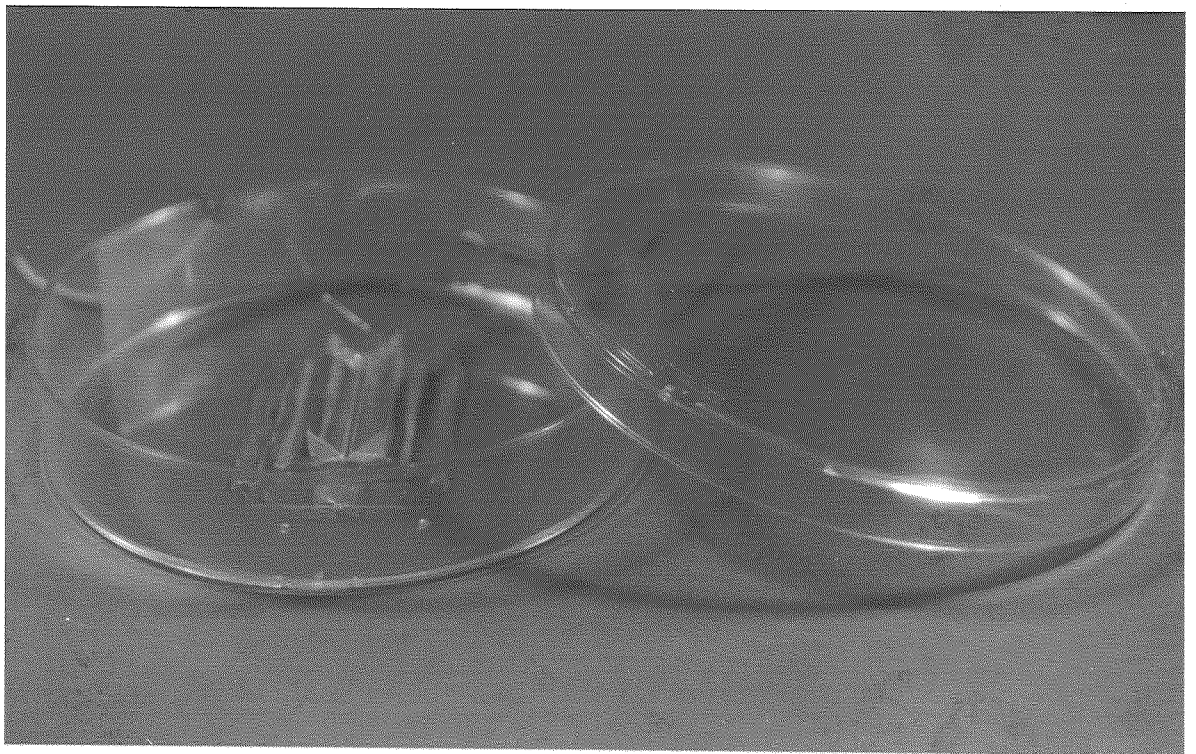


Photo.4-2 Fusion camber Type II .

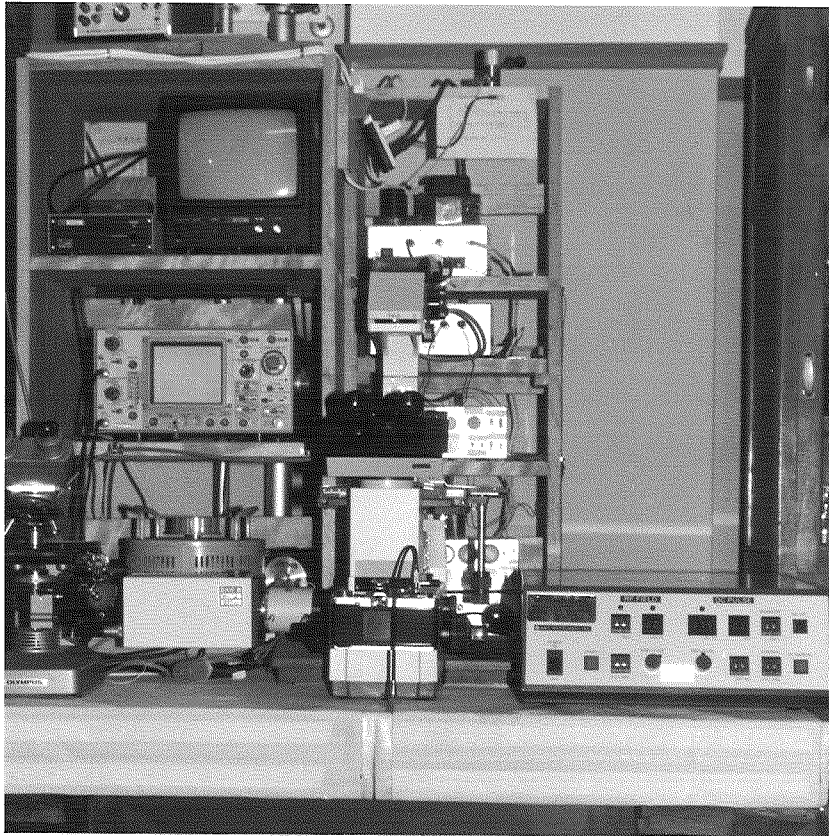


Photo.4-3 Fusion system.

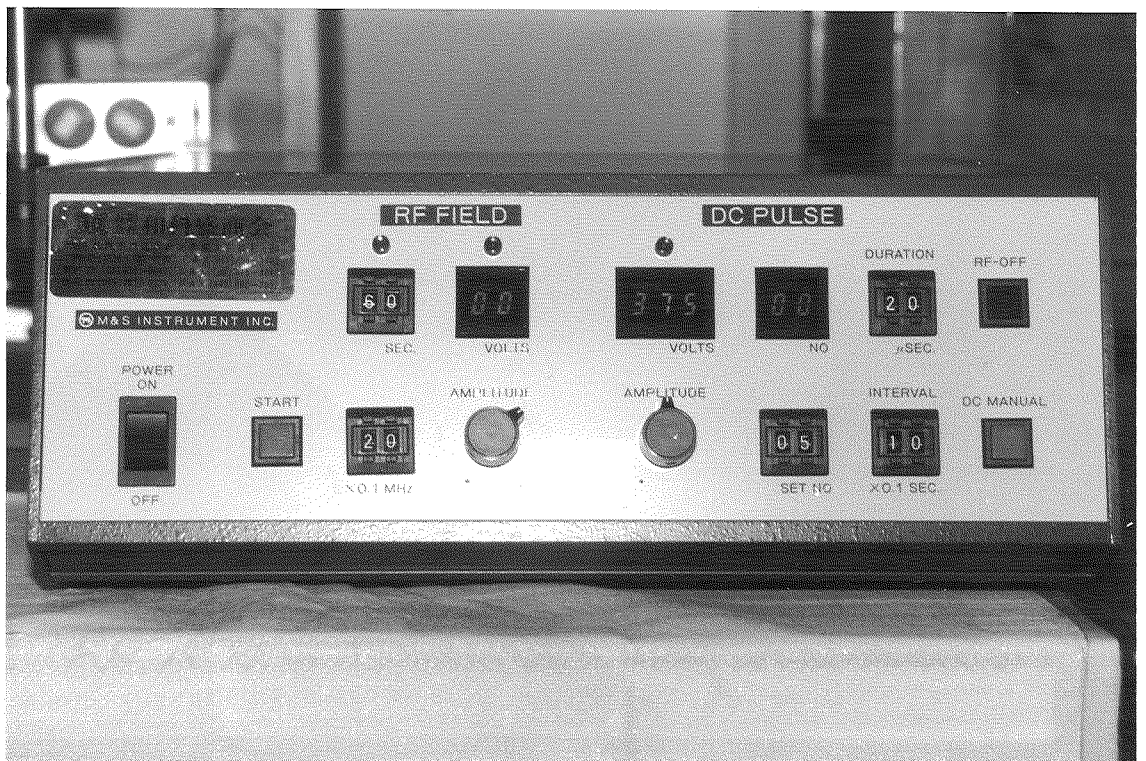


Photo.4-4 Fusion apparatus.

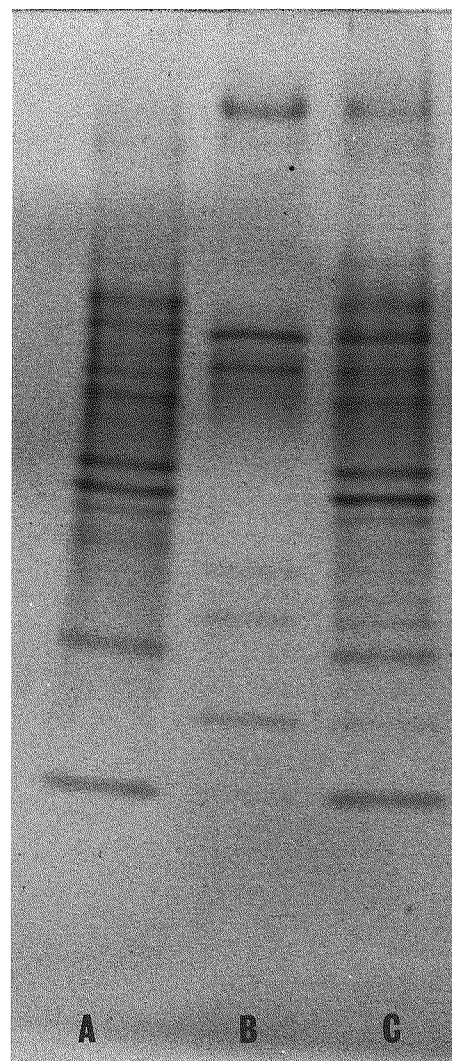
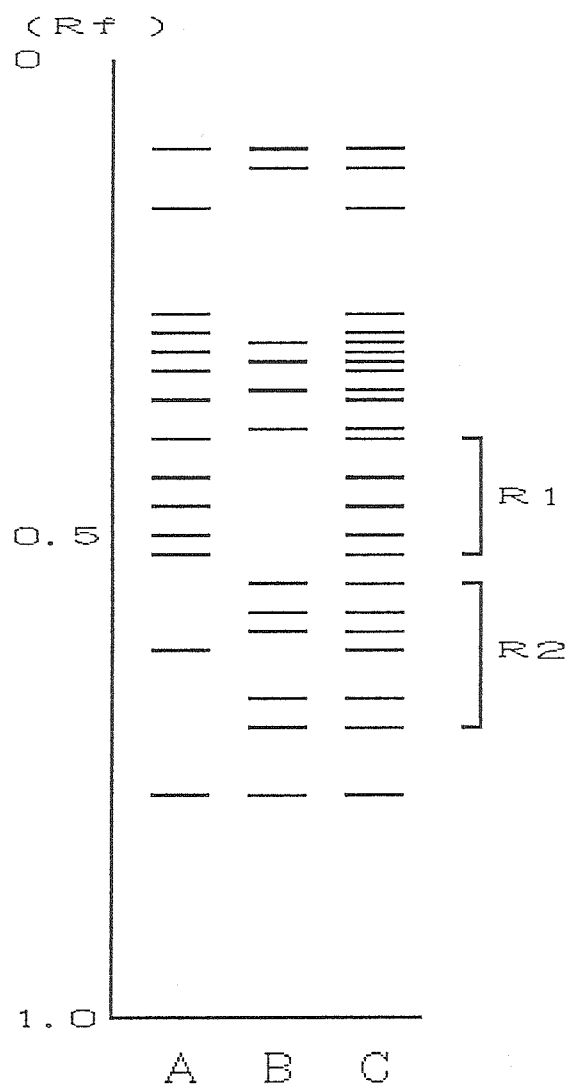


Photo.5-1 Esterase isozyme patterns.

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

C : mixture of the two strains,

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

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

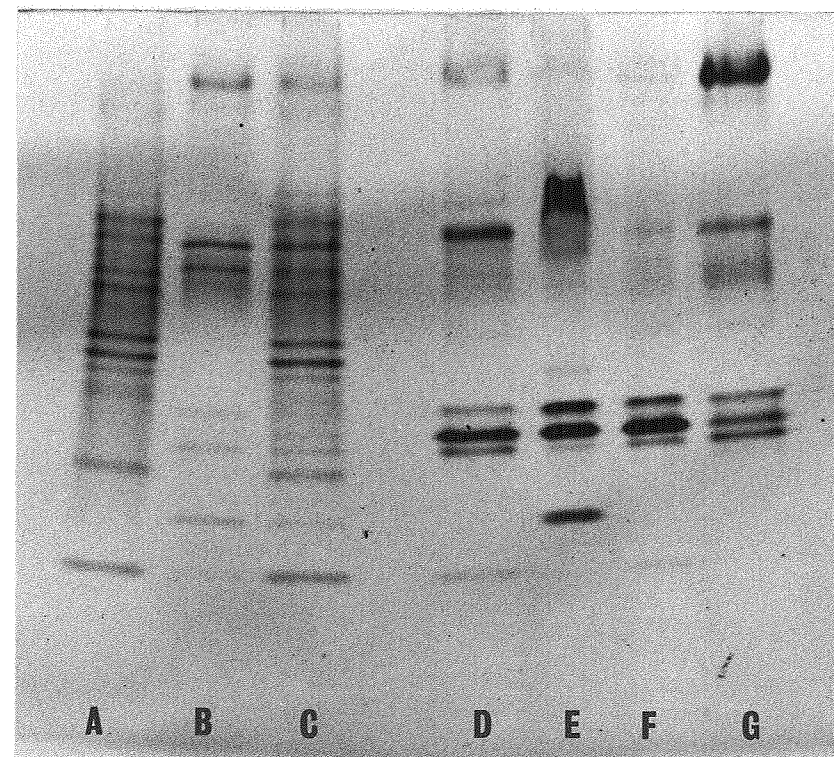
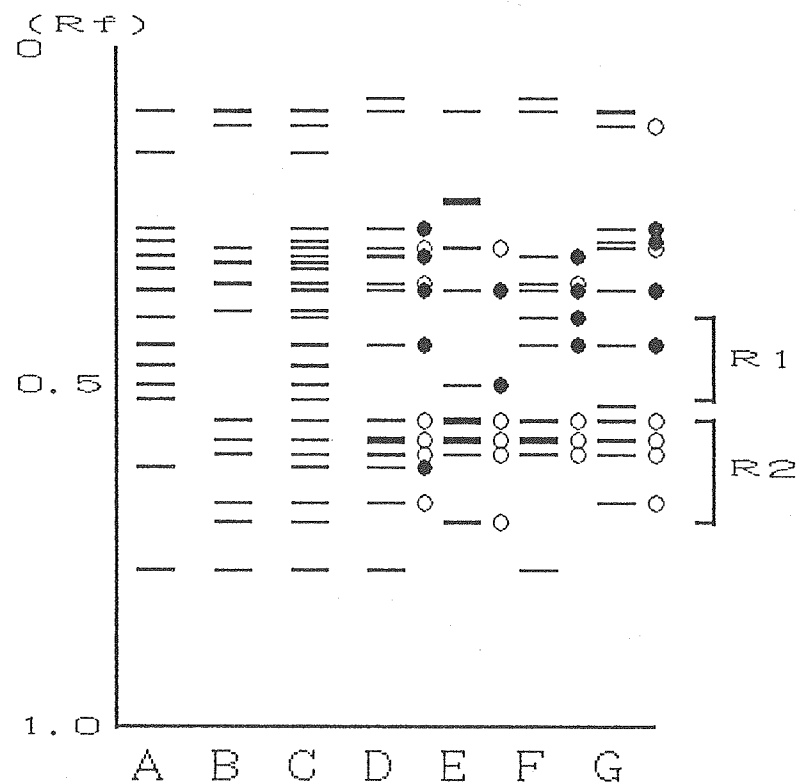


Photo.6-1 Esterase isozyme patterns of the parental strains and the regenerants.

- A : *P. ostreatus* (PO-8), B : *P. cornucopiae* (PC-2),
 C : mixture of the two strains, 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).

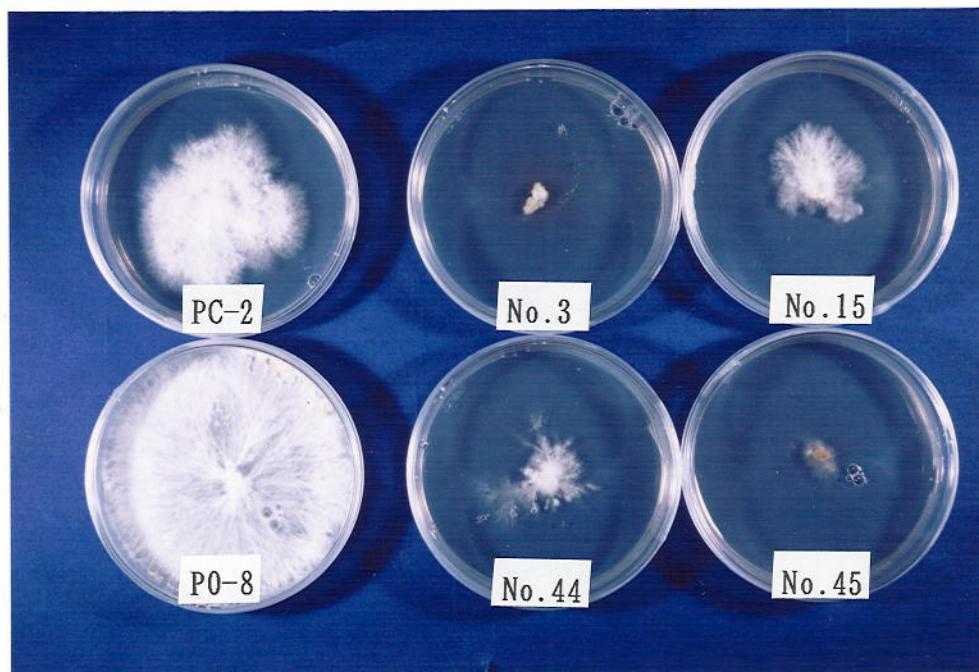


Photo.6-2 Colony forms on the PDA medium.

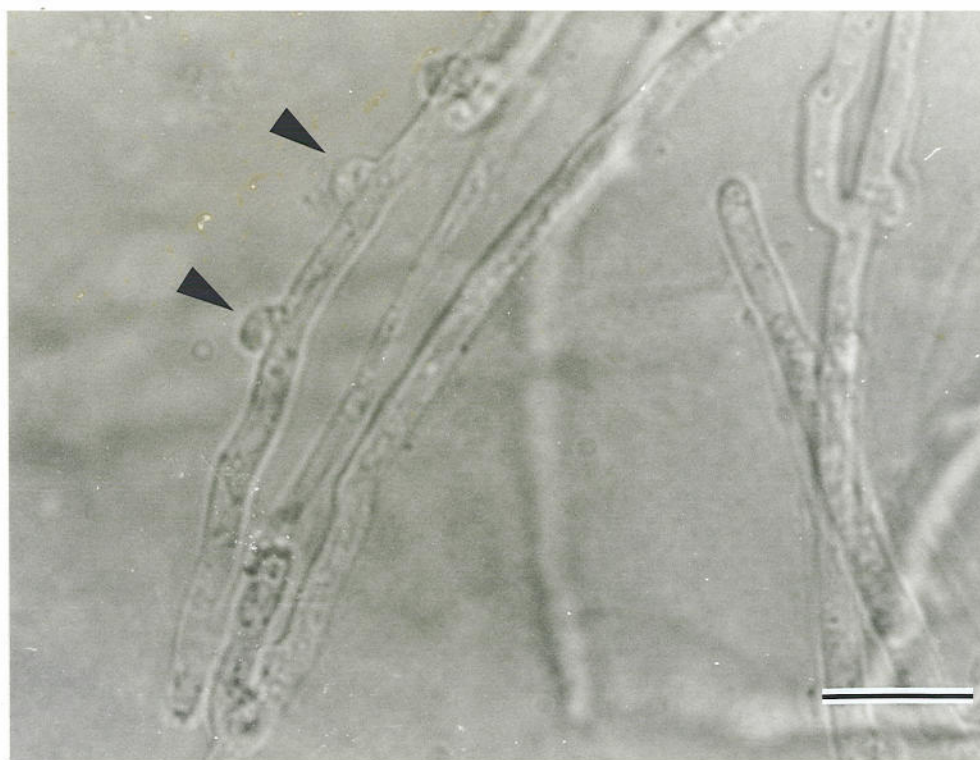


Photo.6-3 Pseudo-clamp like structures. calibration bar = $10\mu\text{m}$



Photo.7-1 Multinucleated cells in the hyphae of OCD-15.
calibration bar = 10 μ m



Photo.7-2 Confronting culture.

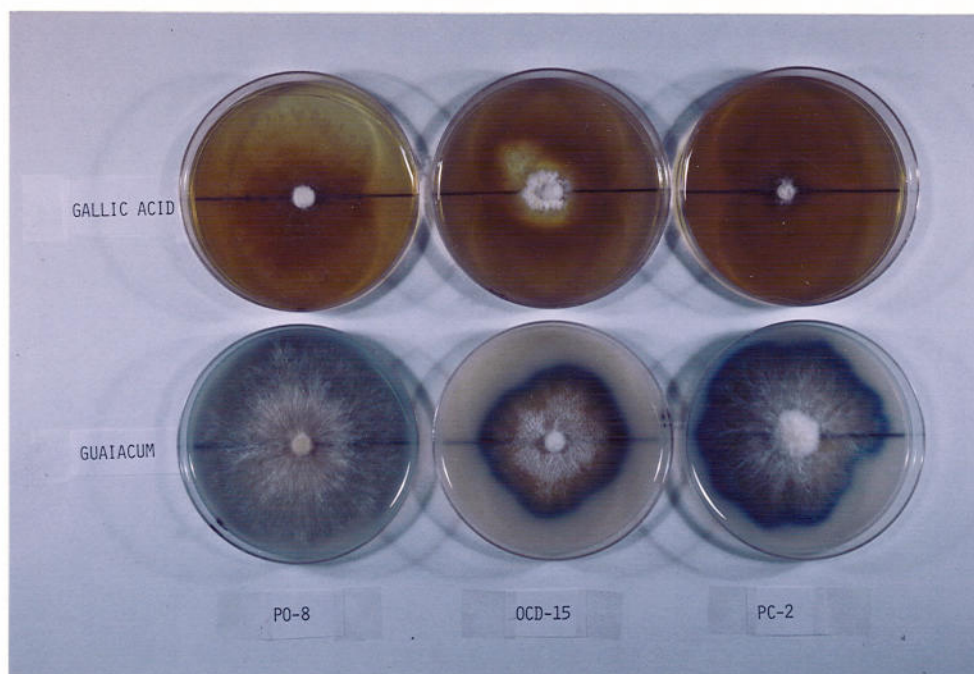


Photo.7-3 Bavendamm's reactions of OCD-15.

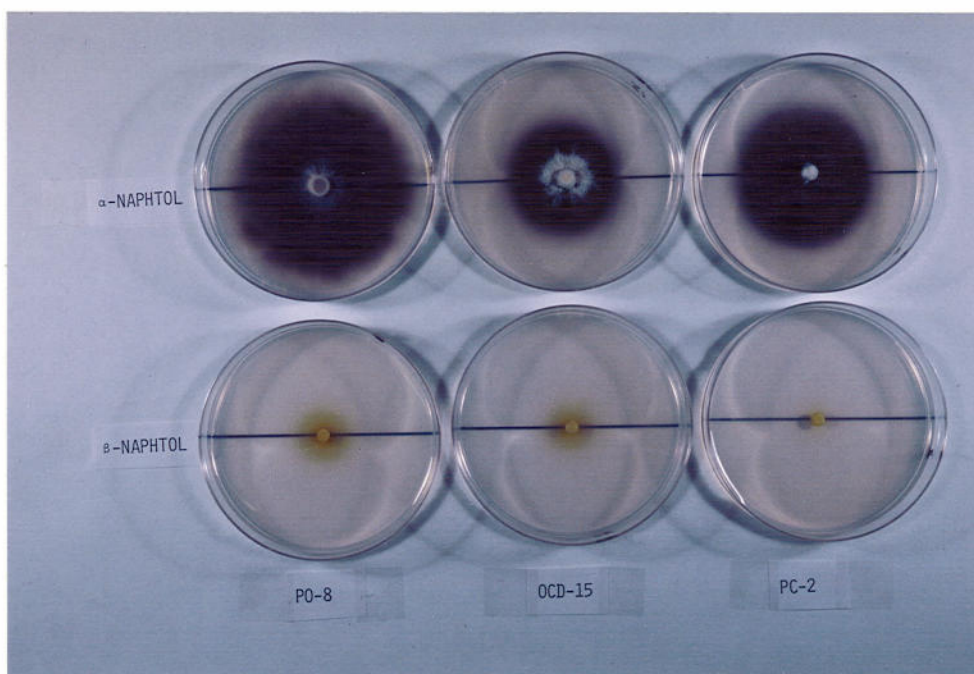


Photo.7-4 Bavendamm's reactions of OCD-15.

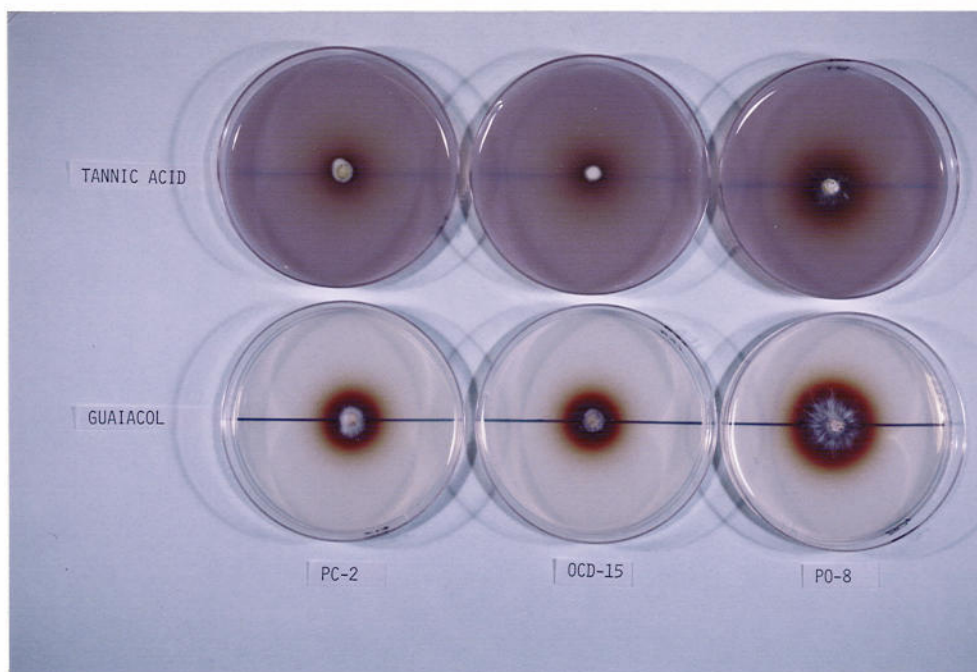


Photo.7-5 Bavendamm's reactions of OCD-15.

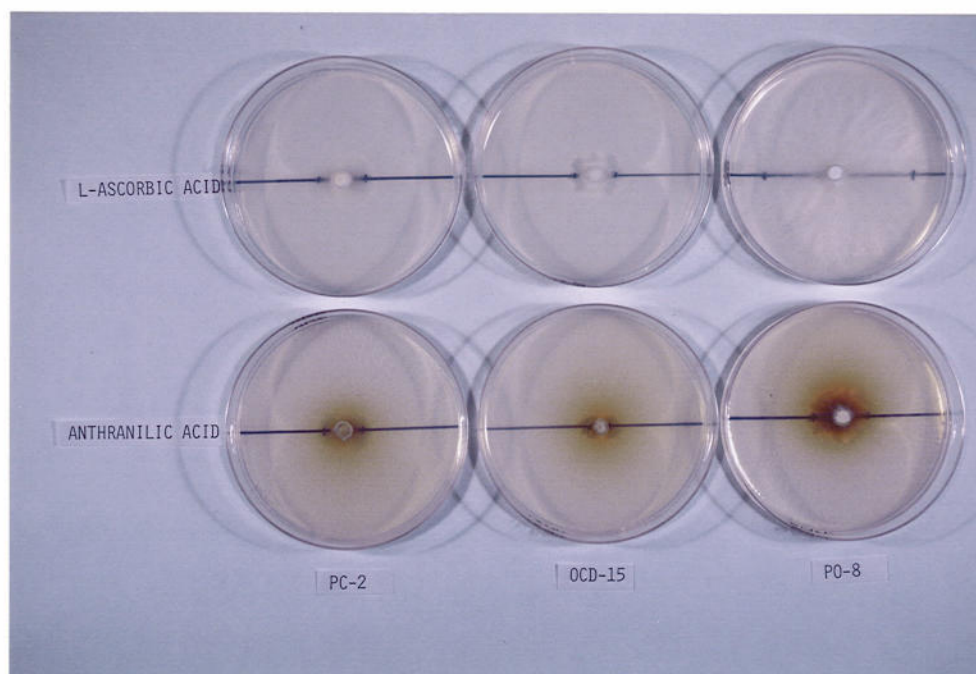


Photo.7-6 Bavendamm's reactions of OCD-15.

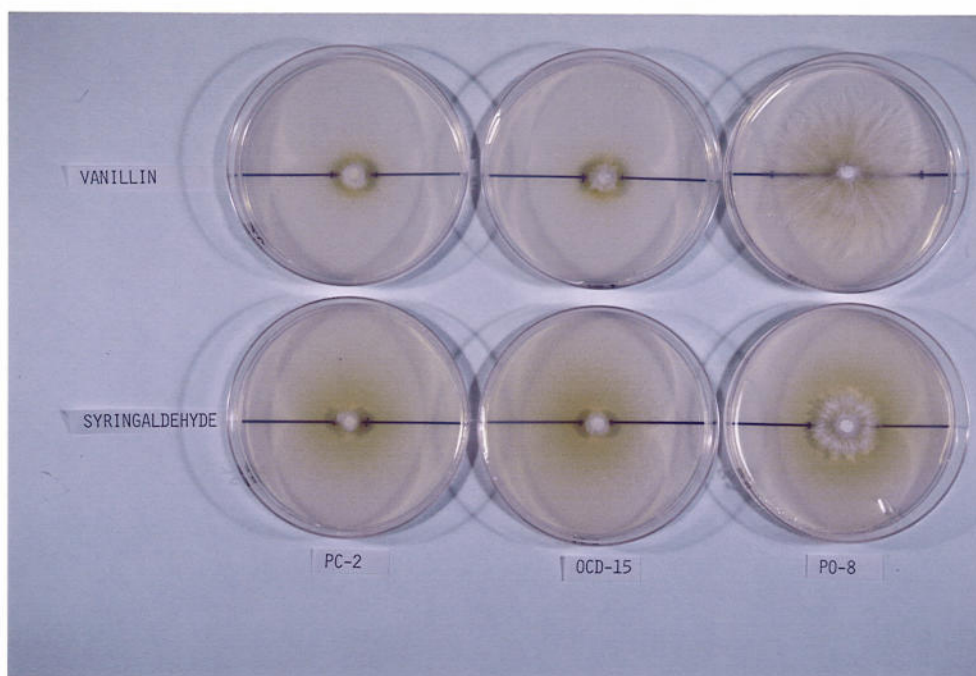


Photo.7-7 Bavendamm's reactions of OCD-15.

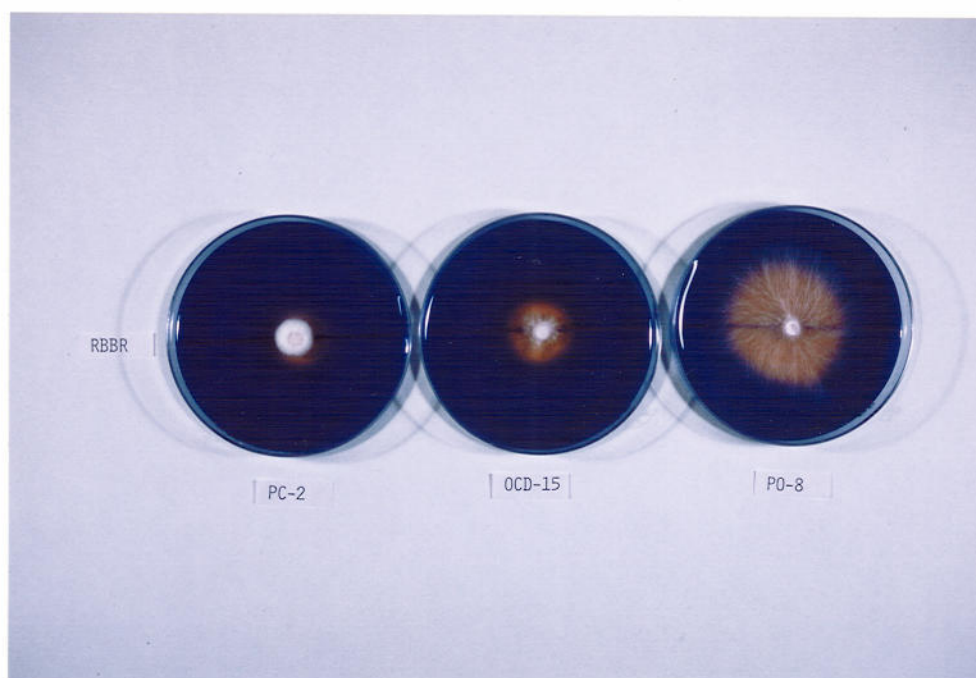


Photo.7-8 Bavendamm's reactions of OCD-15.



Photo.7-9 Primordium of OCD-15.



Photo.7-10 Fruit-bodies of OCD-15-5 derived from OCD-15.

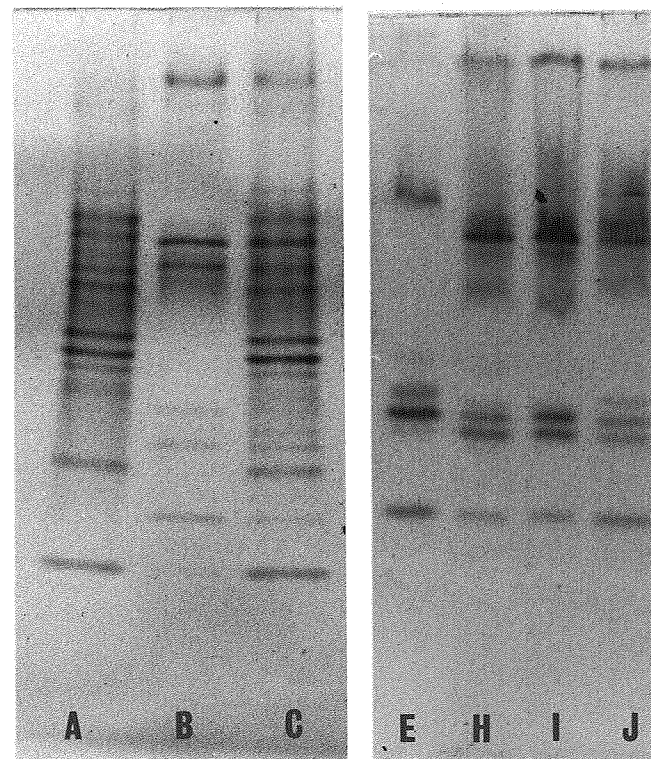
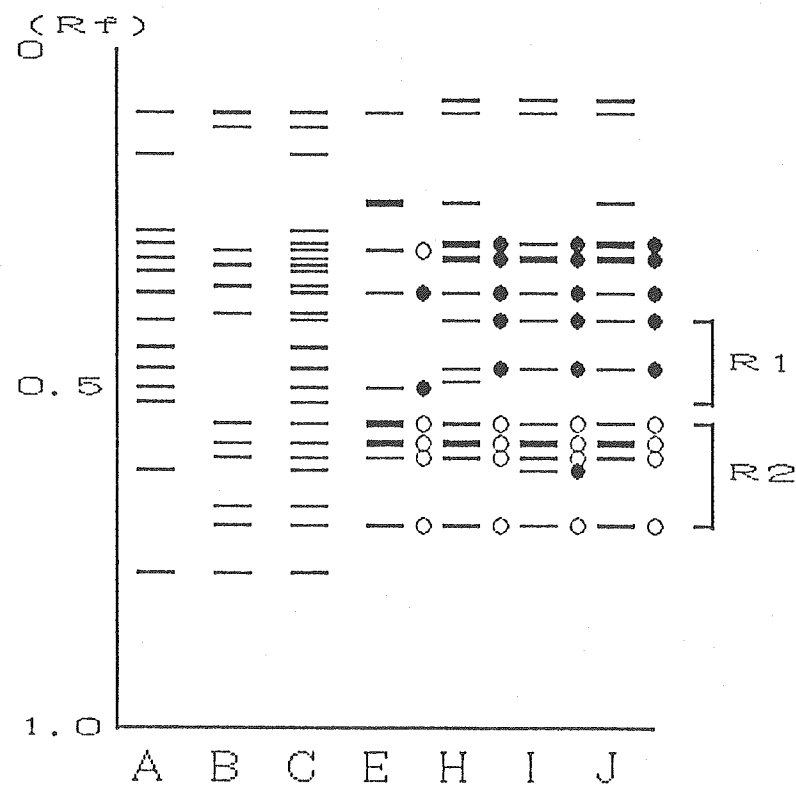


Photo.7-11 Esterase isozyme patterns of the fusant and the regenerants.

- A : P. ostreatus (PO-8), B : P. cornucopiae (PC-2),
 C : mixture of the two strains, E : fusant OCD-15,
 H, I, J : regenerants from OCD-15,
 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).

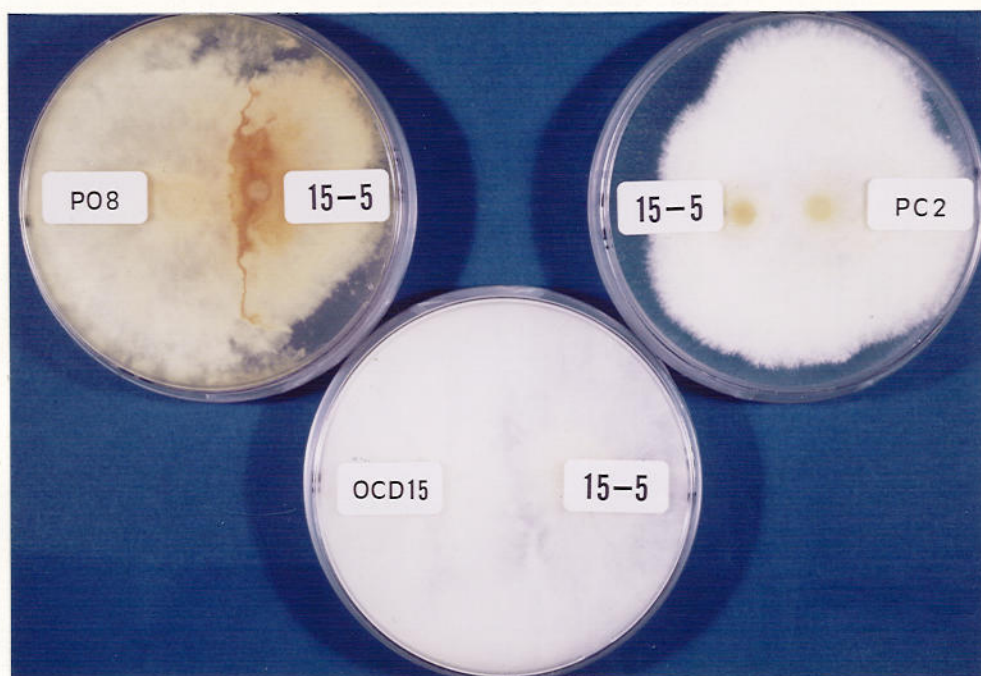


Photo.7-12 Confronting culture.