

担子菌(きのこ類)のプロトプラスト融合研究の展望

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	柳, 園江
巻/号	8巻1号
掲載ページ	p. 23-27
発行年月	1985年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



担子菌 (きのこ類) のプロトプラスト 融合研究の展望

柳 園 江

1. はじめに

酵素法によって多数のプロトプラストが作り出されたのは、高等植物よりも微生物が数年早く、1950年代末には、細菌、カビ、酵母等に関するいくつかの文献報告が挙げられるが、担子菌 (きのこ類) についてのプロトプラスト形成とその再生の報告は、1970年代になってからであった。担子菌の子実体 (きのこ) は、昔から食物として親しまれてきたのであるが、生育地が主として山野であって、人畜への病原性であるとか、食品腐敗の原因になるとか、発酵食品として利用されるとか、その生活環全体が身近かにある微生物ではなかったこともあって、研究の歴史は比較的浅い。細菌、放線菌、カビ類、酵母等では、同種間のプロトプラスト融合雑種はもとより、異種間も、さらには異属間の融合再生も報告されているものがある。担子菌の文献報告は白色腐朽菌で同種内融合コロニーの形成が報告されている。しかし、学会報告では既に異種間融合も発表され、私達の実験でも、接合型が和合性のもも、不和合性のもも、同種間の融合ができ、和合型融合株では子実体も形成されており、今後、実例は急速に増していくものと予想される。

放線菌やカビ類が抗生物質生産で一躍脚光を浴びた様に、微生物にはまだ未知の利用価値が多々あるものと思われるが、昔からきのこは薬効が言われてきた上、近年は学会でも、経口、非経口投与共に抗腫瘍効果等が報告されている。高価なマツタケや本物のシメジ等嗜好食品を栽培可能にするというだけ

Sonoe O. YANAGI: A Review for the studies on basidiomycetes (mushrooms) protoplast fusion.

でなく、健康食品、医薬品原料、酵素等生理活性物質、特殊成分の宝庫として、またさらには、未利用ないしは廃物資源のリサイクルの一環としての担子菌利用が注目される。担子菌はまた自然界でも菌系融合を行うなどの現象があり、子実体のような形体形成もはっきりしている微生物なので、生物界全体の研究という観点からも興味ある結果が得られるものと思われる。

現在までの、担子菌に関する文献報告例を表1に示したが、前記のように、この他に学会報告は数多くあり、研究グループも多くなっている。これらを見渡し、私達の最近の結果も混じえて、担子菌の細胞融合研究の現状についてどのようなことが問題かを述べてみる。

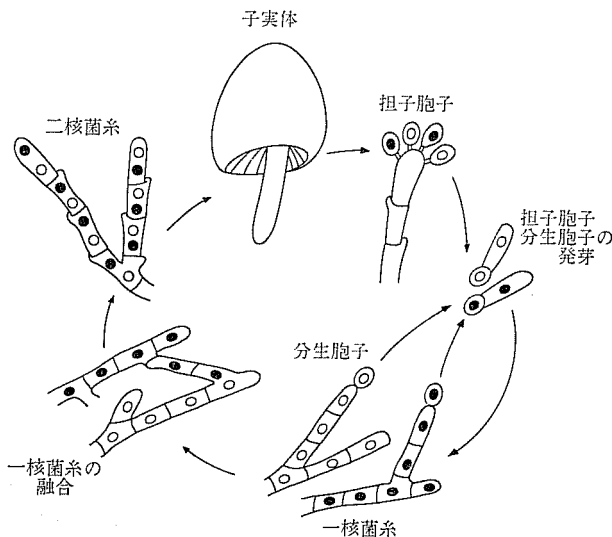
2. プロトプラストの素材

高等生物の各組織の違いの様には、微生物もその生活環の時期や生育のしかたによって著しく細胞壁の状態が異なる。したがって、素材の時期を限定して酵素その他の条件を捜すだけでなく、試料として入手しやすく、かつ入手しやすい酵素類によってプロトプラストのできやすい形態を選び出すことが必要である。

担子菌の代表的な生活環は、図1のように示すことができるが、量の多少と難易を問わなければ、どの時期もプロトプラストの素材となり得る。しかし、きのこの傘からは、大きくて比較的弱いプロトプラストができ、再生には適さないし、担子胞子のプロトプラスト化はいろいろの点で魅力的であるが、細胞壁は各種酵素に抵抗性が強い。結局、静置液体培養の若い水中菌糸が最も再生力のある大量のプロトプラストを得るのに適している。現在、最も大量に

第1表 担子菌のプロトプラストとその再生の文献報告例

種	年	報告者	内 容
スエヒロタケ	1972	{ De Vries Wessels	Trichoderma viride からの抽出酵素で 10^8 /ml/5h のプロトプラストを得る
	1973	同上	上記抽出液中の α -1,3-glucanase と chitinase が有効
	1975	同上	0.5M・MgSO ₄ 中で 2.5×10^7 /ml/3h 得たプロトプラストは45%再生
	その後彼等のグループは詳細な細胞壁研究
ヒトヨタケ	1975	Moore	市販キチナーゼで 10^7 /ml/24h のプロトプラスト
	1983	Akamatsu et al	10^6 分生孢子/ml をセルラーゼ処理して90%以上をプロトプラスト化。35%以上が再生
	1984	{ Yanagi Takebe	セルラーゼ、キチナーゼ、ザイモリアーゼの混合で $2 \sim 7 \times 10^8$ /ml/2h のプロトプラストを得る。再生率は50%に達する。再生率の向上にN-アセチルグルコサミンが有効。
(含その他)	1985	Yanagi et al	ヒラタケ・ナメコ・キクラゲ・シイタケで $2 \sim 5 \times 10^7$ /ml のプロトプラスト。
シイタケ	1977	{ Ushiyama Nakai	プロトプラストの電顕観察
マツタケ	1982	Abe et al	プロトプラストの10%が再生。PEGはプロトプラストをこわす。PEGを用いない融合観察
エノキタケ	1983	Yamada et al	3.6×10^7 /3h, 5.1×10^7 /9h のプロトプラスト, 再生観察
ヒラタケ	1983	同上文獻	1.7×10^7 /3h, 4.1×10^7 /9h のプロトプラスト
シメジ	1984	Abe et al	5.5×10^5 /ml/3h のプロトプラスト。 3.7×10^{-2} % 再生, 再生にイノシトールが効果
Phanerochaete chrysosporium (和名なし) 白色腐朽菌	1983	Gold et al	3×10^8 /g 生菌/3h のプロトプラスト。5%再生, 栄養要求菌で種内のプロトプラスト融合再生。 融合コロニーのプロトプラストは, 栄養要求株と非要求株に分れる。



第1図 担子菌の生活環

思われる。他の菌種、例えばエノキタケでも、ヒトヨタケと同様に、接種時の古い菌系の持ち込みの少ない菌糸を3、4日で培養できるようにすると、市販酵素の組合せで 10^8 /ml/2h の大量のプロトプラストを得ることができる。

3. 細胞壁溶解反応液

細胞壁溶解反応液で最も重要なのはもちろん酵素であるが、その種類、組合せ、濃度が本当に最適に近いところにきているかどうかを徹底的に調べるには多大な労力を要するので、ある程度のところで満足せざるを得ない。例えば、濃度だけを調べるのにも、1つの酵素濃度が他の酵素の最適濃度を変

えるし、もちろんその組合せも、pHも、試料の量も、反応時間も影響するし、さらには、プロトプラストの再生率からも検討しなければならない。濃い

プロトプラストを得ることのできる種がヒトヨタケである(最高 7×10^8 /ml/2h)のも、一つにはこの若い菌糸を均一に手早く得られるということにあると

酵素液で一時に多数のプロトプラストが得られても、必要以上に反応が進んでいき破壊されてしまったり、再生する viability がなかったりしては融合実験の目的に合わない。そして、他に浸透圧調整剤や緩衝液の種類や濃度等々いくつもファクターがある。

既報の担子菌の実験例では、スエヒロタケ、ヒトヨタケが比較的これらをよく検討しているが、その他ではあまり報告されておらず、プロトプラストの生成量も少ない。viability を持った多数のプロトプラストを得られるか否かが、融合実験の難易を大きく左右することを実感している現場の実験者としては、この初期の条件検討にもっと集中して耐えねばならない必要性を感じているが、manpower の小さい中で、賭けのような融合実験でも先に進むことにもやはり魅力はあり、結局なかなか General で着実な成果が出てこないのが現状であると思われる。

4. 酵素反応条件

試料と反応液以外にも大切なファクターがいくつかある。温度や時間はもちろんのことだが、容器と液量、攪拌などが、少くとも担子菌では大きな影響がある。深い液の底に試料を沈ませておいたのではよい効率は決して得られず、大量にプロトプラストが必要でも、比例して試料と反応液を同容器で増すことは好結果を示さない。この理由は多分一つではなく、いくつかの原因が重なっているのではないかと考えている。

5. プロトプラストの再生

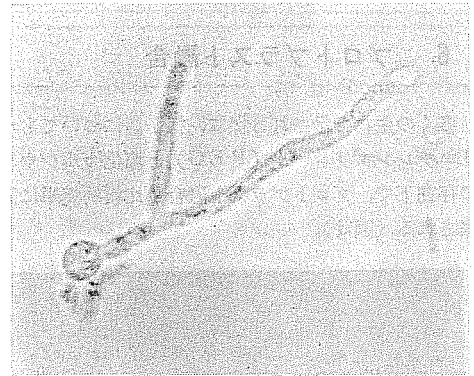
担子菌のプロトプラストも、他の生物種と同じく、種や株やプロトプラストの調製法によって再生能力に大きな相違がある。

まず、接種される状態に持つて行くまでのプロトプラストの扱いの問題がある。調製したプロトプラストは、メッシュで濾過して残存菌糸を取り去るのが一般であるが、やり方によっては菌糸片の混入が多くなる。再生培地に浸透圧調整剤を入れない(菌糸片だけが生える)ものを比較にとるが、特に再生率の低いプロトプラストの場合には、再生と思ったものがほとんど菌糸片からのコロニーであることが考えられ、後の融合実験に続かなくなる。また、 10^6 桁に上るプロトプラストが得られ、かつ数10%に上

る再生率の得られるヒトヨタケの場合には、プロトプラストを遠心等で集めるという操作を必要とせず、稀釈のみで酵素液の影響から脱することができるのであるが、一度密着状態にして集めたプロトプラストは1個1個に懸濁することが難しく、再生率にいろいろの影響がでてくる。

再生培地についても、それほど多くの検討例はない。菌系培養の培地組成に浸透圧調整剤を入れるのが基本であるが、その種類、濃度、pH、そして液体と固体の別、寒天等の濃度、接種のしかた、他の添加物等、ここにも様々の要素がある。酵素反応条件と同様に、他例を参考にしながらある程度のところまで持つて行って先に進まざるを得ないが、特に最小合成培地での再生や栄養要求株の場合の再生、その他再生率の低い担子菌については、より徹底した検討の必要性を感じている。

担子菌のプロトプラストは、球形のまま細胞壁を再合成し、その後菌糸を直接発芽する(図2)。団



第2図 ヒトヨタケのプロトプラストの再生

子状その他別の形状を示す報告もあるが、寒天培地上ではそれらはほとんど見られず、液体培養にのみ少数の異常発芽の形体が観察される。高等植物に見られる細胞のほぼ均等な2分裂というような形をとらずに、発芽と言えるような形をとることは、融合後の再生に対しても影響があるように思われる。担子菌の場合、多プロトプラストの融合体も比較的容易に再生しているのではないかと実験結果から予測している。

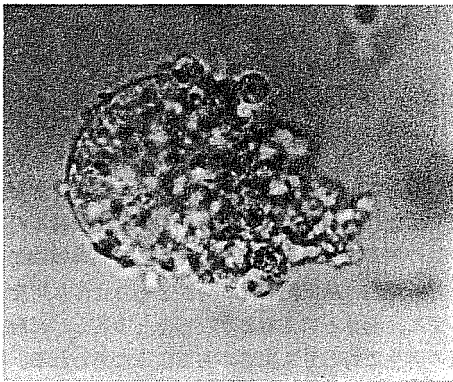
菌糸細胞は細長く、1個の細胞から1つのプロトプラストが完全に出きらないことがあり、有核、無核のプロトプラストが混じっている。有核率は蛍光色素による核染色をして蛍光顕微鏡で観察できるが、担子菌の場合、プロトプラストの調製法によって大

体30~50数%なので、ヒトヨタケの50%程度の再生率は、現在のプロトプラスト調製法での最大値と考えられる。

担子菌は、図1に示した様に、接合型に和合性のあるものどうしが菌糸融合して一核菌糸から二核菌糸になる。普通は、1個の胞子から出た一核菌糸のみでは子実体を作れないので、プロトプラストの再生コロニーも、二核菌糸由来のプロトプラストの時のみそのままで子実体形成の可能性を持っている。しかし、ヒトヨタケ Fis⁰ のように、一核菌糸のままで子実体を作れる特殊な株がまれに存在することが知られており、この場合、各再生コロニーは高浸透圧培地から普通の培地へ移されると、生長して活発に子実体を作る。プロトプラスト化を経るだけでも、様々の生理活性が変わったり、選抜が行われたりということが起り、プロトプラスト化自体を育種に利用する考えもでてくる。事実ヒトヨタケ、ヒラタケ等では、プロトプラストからの再生コロニーの子実体形成率が顕著に高い。

6. プロトプラスト融合

多くの生物で示される様に、担子菌についてもポリエチレングリコール (PEG) と塩化カルシウムの存在下で、プロトプラスト融合が比較的簡単に観察される (図3)。



第3図 融合して巨大化したヒトヨタケのプロトプラスト

表1に示した様に、担子菌の融合条件を報文に記しているのは一短報のみであり、この場合、PEGではプロトプラストが破壊されるとのことで塩類が用いられている。しかし、学会その他で示されたいくつかの例でも、また私達の実験でも、PEGでの

融合およびその後の再生実験が可能な担子菌は確かに存在する。ヒトヨタケで検討した限りでは、PEGを用いた融合条件は、ほぼ他の糸状菌の条件と一致した結果になっている。他の生物種で討論されている様に、真の融合率は、今のところ正確に知り得る方法がないので、融合条件は、融合したと信ずるに足るコロニーの形成率で見なくてはならない。したがって、識別できる融合体の得られる実験系が、融合条件検討の段階から必要である。

7. 融合体の識別と選抜

融合が非常に高頻度に起き、かつその再生率が非常に高ければ、at random にコロニーを拾って結果を見ることも可能であろう。けれども現実に担子菌では現在そういうことはないので、非融合のコロニーあるいは同株融合のコロニーから、異種(異株)融合コロニーを選抜しなくてはならない。高等生物よりも1桁低い数 μ というプロトプラストの径では、顕微鏡下で識別できる方法があっても、それをマニピュレーションで選別することは至難である。もちろんこれも再生率との兼ね合いであるが。将来、Cell Sorter 法が開発されて、様々の特徴を機械的に識別、選別できる様になれば、細胞融合法の育種への利用は完全に実用的になるであろう。現在、微生物では、よく知られている様に、栄養要求性や薬剤耐性等、標識をつけた変異株を用いての実験が一般的である。コロニー形態や、色素等特別な成分の分泌やその欠如、適温や生育速度の違いなど、自然に識別と選別が可能なるものを融合させる場合は好運である。

8. 融合後の再生

融合後の再生は、もちろん遠縁どうしの融合である程、遺伝子発現の制御調整が困難であろうことは言うまでもないが、同株間のPEG処理でも、再生率は数分の一以下に落ちることが多い。完全培地であっても再生率の低い様なプロトプラストであれば、まして栄養要求株を用いてPEG処理後のコロニー再生率を最小培地上で見るとは大変困難になってしまう。プロトプラストの viability が強く求められる所以である。この点、薬剤耐性は完全培地でのスクリーニングができるが、真核生物では特殊な薬剤耐性を見出さなくてはならない。

ヒトヨタケを用いた私達の実験では、プロトプラスト収率とその再生率が非常に高いので、栄養要求株の融合実験が十分可能であった。メチオニン要求株とヒスチジン要求株を融合させて、最小培地上に生育するものの率は、融合処理をしない単なる混合で再生できる率の200倍以上であった。融合前は両株とも子実体形成能を失っているが、融合処理後拾ったコロニーではほぼ100%子実体が形成され、そのきのこは要求株誘導前の株それぞれの中間形を示した。和合型、不和合型の組合せ共、融合コロニーの形成は同様に可能であったが、子実体形成例は和合型どうしの融合である。また学会発表で、ヒラタケとトキイロヒラタケの異種間融合株を得、電気泳動で両親株の蛋白質バンドが1部ずつ観察されたという報告がされている(日本きのこ研究所)。

9. おわりに

Saccharomyces (酵母) や, Penicillium (アオカビ), Aspergillus (コウジカビ) 等の様に, 担子菌においても異種間融合が次々と証明され, またDNAや細胞内果粒の導入や, 核なしのミニプロトプラストとの融合等が試みられるのもそう速くない将来と思われる。

現在, 特別な標識のない一般の株のプロトプラスト融合体を, 識別選抜できないことが実用上の隘路でもあろうが, 上記のように, 不和合型を乗り越えるなど, 自然交配の育種の域を出ることは既に確かと思われるし, 不和合性のメカニズム等の生命現象に迫ることもできる。開発されている様々の技法を, まだ担子菌に応用しきれていない現状, そして実践されていない故に成否がわからないことが沢山ある現状からすれば, 今後を大いに期待して進む以外ない。

(農林水産省食品総合研究所

食品資源部生物資源研究室長)

(22ページからつづく)

- 21) Melchers, G.: Proc. of an Internat. Symp. on Plant Cell Cull Culture. Ges. f. Strahlenund Umweltforschung, München. 1978. 306 (1978)
- 22) Melchers, G., Sacristan, M.D. & A. A. Holder: Carlsberg Res. Cmmum. 43, 203 (1978)
- 23) Nagata, T.: Naturwiss. 65, 263 (1978)
- 24) Nehles, R.: Plant Sci. Lett. 12, 183 (1978)
- 25) Nehles, R.: Molec. gen. Genet. 166, 117 (1978)
- 26) Nelson, R. S., Grissen, G. P. & S. W. J. Bright: Plant Sci. Lett. 30, 355 (1983)
- 27) Ramulu, K. S., Dijkhuis, P. & S. Roest: Theor. Appl. Genet. 65, 329 (1983)
- 28) Schumann, U., Kobliz, H. & Z. Opatrny: Biochemie und Physiologie der Pflanzen. 175, 670 (1980)
- 29) Schumann, H. & H. Koblitz: Biologia Plantarum 25, 180 (1983)
- 30) Shepard, J. F. & R. E. Totten: Plant Physiol. 60, 313 (1977)
- 31) Shepard, J. F.: Plant Sci. Lett. 18, 327 (1980)
- 32) Shepard, J. F.: Plant Sci. Lett. 26, 127 (1982)
- 33) Shepard, J. F., Bidney, D. & E. Shahin: Science 208, 17 (1980)
- 34) Shepard, J. F., Bidney, D., Barsby, T. & R. Kemble: Science 219, 683 (1983)
- 35) Tomas, E.: Plant Sci. Lett. 23, 84 (1981)
- 36) Tomas, E., Bright, S. W., Frnklin, J., Lancaster, V. A. & B. J. Mifin: Theor. Appl. Genet. 62, 65 (1982)
- 37) Uhrig, H.: Molec. gen. Genet. 181, 403 (1981)
- 38) Upadhya, M.: Potato Res. 18, 438 (1975)
- 39) Wenzel, G., Schieder, O., Prozewozny, J., Sopory, S. K. & G. Melchers: Theor. Appl. Genet. 55, 49 (1979)