

ナメコプロトプラストの巨大化

誌名	愛媛県林業試験場研究報告
ISSN	03892875
著者名	仲田,幸樹
発行元	愛媛県林業試験場
巻/号	16号
巻号補足	
掲載ページ	p. 54-60
発行年月	1995年3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



ナメコプロトプラストの巨大化

仲 田 幸 樹

要 旨

1系統のナメコ二核菌糸からプロトプラスト化を経て得られた交配型の異なる2つの一核菌糸を酵素溶液中で培養することにより巨大化処理を行い、巨大化のための最適な培養時間を検討した。プロトプラストの粒径は培養時間の経過とともに大きくなり、調整直後では平均4 μm 程度のものが48時間培養では平均7～8 μm に、72時間培養では平均12～17 μm に巨大化した。しかし、プロトプラスト数は大きく減少し、 $10^4 \sim 10^5$ 個/mlに減少した。再生率は24時間後では調整直後よりも低下しその後上昇する、という傾向がみられた。

また、蛍光試薬で染色して細胞壁の再生を観察したところ、調整直後では染色されるプロトプラストは認められなかったが、24時間後から染色されるものが観察されるようになり、その数は培養時間の経過とともに増加した。

I はじめに

食用キノコの育種においてもプロトプラストを用いた細胞融合技術は、交配育種では望めない雑種細胞の作出が可能な方法として注目され研究が盛んに行われるようになってきている。対象とする株から得た2種類のプロトプラストを一对一で融合させる個別電気融合法は、人為突然変異処理による遺伝子マーカーを付与しないので、遺伝子に及ぼす影響が少ないと考えられるが、担子菌のプロトプラストは植物に比し粒径がずっと小さく、顕微鏡下での操作が難しい。江口・檜垣(1991)はヒラタケ、シイタケ、ヤナギマツタケの3種についてプロトプラストを単離に用いたのと同じ組成の酵素溶液中で静置培養することにより、粒径は3.5倍に巨大化し、再生率もやや向上することを報告している。本研究ではナメコのプロトプラストについて酵素溶液中で培養することにより巨大化処理を行い、単離数、再生率、粒径組成の変化と細胞壁の再生について観察を行ったので報告する。

II 研究期間

平成2～5年度

Ⅲ 実験方法

1 供試菌

当场保存の1系統のナメコ *Pholiota nameko* 二次菌糸（菌株番号150902-1、ナメコ栽培施設付近でスギ材に発生していた子実体より組織分離してヒノキ原木で栽培試験を行い、発生した子実体から分離保存した菌株）よりプロトプラスト化を経て得た交配型の異なる一次菌糸No. 7 (A¹) とNo. 21 (A²) を用いた。

2 菌糸体の培養

PDA平板培地で9日間培養した菌糸体を内径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、100mlメリクロン用三角フラスコに40ml入れたSMY培地（1% Saccharose、1% Malt extract、0.4% Yeast extract、pH 5.5）に2個投入し23℃暗黒下で7日間前培養した。培養後ホモジナイザー（日本精機エクセルオートDX-3型）のカップに移し、20mlのSMY培地を新たに加えて7000回転で30秒間破碎した。次にこの菌糸断片浮遊液10mlをカルスピペットで前培養時と同様に100ml三角フラスコ中のSMY培地に接種し、23℃暗黒下で3日間培養した。

3 酵素液と緩衝液の調整

プロトプラストの単離には市販の細胞壁溶解酵素2% Novozym 234 (Novo Nordisk) と0.2% Chitinase (from *Serratia marcescens*, SIGMA Chemical Co.) を組み合わせて使用した。酵素は浸透圧調節剤として0.5M マンニトールを含む0.05M マレイン酸-NaOH 緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、0.20 μ m のシリンジフィルター（セルロースアセテート）で濾過除菌して用いた。また、この緩衝液は菌糸体の洗浄、プロトプラストの精製・稀釈などの操作にも使用した。

4 プロトプラストの作出

Ⅲ-2で得た培養菌糸体をポリエステルメッシュ（孔径59 μ m）で濾過集菌し緩衝液で数回洗浄後16.5×105mmの試験管に入れ秤量した。酵素液は菌糸体湿重0.1gあたり1mlを加え、振盪恒温水槽で29.5℃、60回/分の条件で3時間振盪した。次にプロトプラストを含む酵素液をMIRACLOTH (Calbiochem Co.) で濾過して未溶解の菌糸断片を除去後濾液を700×Gで5分（5℃）遠心して上澄みを取り除き、前述の緩衝液を加えて沈殿しているプロトプラストを懸濁させた。再び700×Gで5分遠心して上澄みを除いて緩衝液を加え、プロトプラストを懸濁させた。この手順を2回繰り返してプロトプラストを精製した。単離されたプロトプラストはThoma氏血球計算盤で計数した。粒径の測定は写真撮影を行い、現像後ポジフィルムを実体顕微鏡で検鏡して接眼マイクロメーターで1処理区につき複数のコマからランダムに60～200個以上計測した。

5 プロトプラストの巨大化

前項で精製されたプロトプラスト浮遊液を0.5ml試験管にとり、Ⅲ-3で調整した酵素溶液の2倍の濃度の酵素溶液（4% Novozym 234, 0.4% Chitinase）0.5mlを少しずつ加え（従って混合完了したときにⅢ-3と同じ濃度になる）、29.5℃、60回/分の条件で所定の時間振盪し、巨

大化プロトプラストを得た。振盪時間は24、48、72時間とした。プロトプラストの精製、計数、粒径の測定は前項と同様に行った。

6 プロトプラストの再生

Ⅲ-4、5で得られた精製プロトプラストを分注入器で 10^4 個/ml程度に稀釈し、内径85mmのシャーレに20mlずつ分注したSMY寒天培地（浸透圧調節剤として0.5Mのサッカロースを含む。寒天濃度1.5%）に稀釈したプロトプラスト浮遊液を0.1ml滴下した。直ちにあらかじめ調製して40℃に溶解したまま保っていた同じ組成のSMY寒天培地（但し寒天濃度は0.7%、低温固化性寒天使用）10mlを重ねて軽く攪拌し静置した。培養は23℃、暗黒下で15日間行い、再生してくるコロニーを計数した。プロトプラストの再生率はシャーレ5枚の平均値で算出した。ただし、対照区としてプロトプラストを滅菌水に懸濁させて破裂させたものを培地に播き、再生するコロニーがあればその数を引いて再生率を算出した。

7 細胞壁再生の観察

実験の各段階で調製、精製されたプロトプラスト浮遊液を $500\times G$ で5分遠心して分離し、緩衝液に溶解した0.01%Cellufluor purified (Calcofluor white M2R, Polysciences Inc.)に懸濁して細胞壁を染色し、落射蛍光位相差顕微鏡（オリンパスBHS-RFC、UV励起）で透過光位相差観察を併用しながら検鏡した。染色液は不溶物を取り除くため、あらかじめ $2250\times G$ で10分間遠心して不溶物を沈降させてから上澄みを取り出し、さらに $0.45\mu m$ のPVDF（ポリフッ化ビニリデン）フィルターで微粒子を除去して使用した。

Ⅳ 結果と考察

1 プロトプラストの単離数と再生率

プロトプラストの単離数は調製直後で酵素溶液1mlあたりNa7が 1.37×10^7 個、Na21が 6.70×10^6 個であり、菌糸体1.0g（湿重）あたりではNa7が 1.16×10^8 個、Na21が 6.70×10^7 個とNa7がNa21のほぼ2倍となった。再生率はNa7、Na21で差はなく、11.2%であった。

巨大化処理にともなうプロトプラスト単離数と再生数の変化を図-1に示した。但し、Ⅲ-5で述べたように0.5mlのプロトプラスト浮遊液に等量の酵素溶液を加えているので、培養開始時（0時間）の単離数及び再生数は調整直後の1/2となっている。Na7、Na21ともに24時間後には大きく減少し、Na7は 4.00×10^5 個、Na21は 5.90×10^4 個となり、Na21の減少の度合いは大きかった。新しい酵素溶液を加えたことによる浸透圧の変化が原因と考えられるが、酵素溶液混入直後に急速に減少したのか、或いは次第に減少したのかは確認していない。Na7はその後殆ど単離数は一定だが、Na21は48時間後では変わらないが72時間後では 1.33×10^4 個と再び大きく減少した。檜垣・江口（1991）も酵素溶液中で培養すると調製直後よりも数が減少することを述べているが、減少率は30%程度であり、本実験結果とは異なっている。

再生率は24時間培養では調整時よりも減少し、No.7は9.7%、No.21は3.7%となった。48時間培養ではそれぞれ12.6%、8.1%とやや向上し、72時間ではNo.7は18.1%とさらに向上した。No.21も再生率そのものは17.4%と向上しているがプロトプラスト数が減少しているので再生したプロトプラスト数は48時間培養時の43%である。

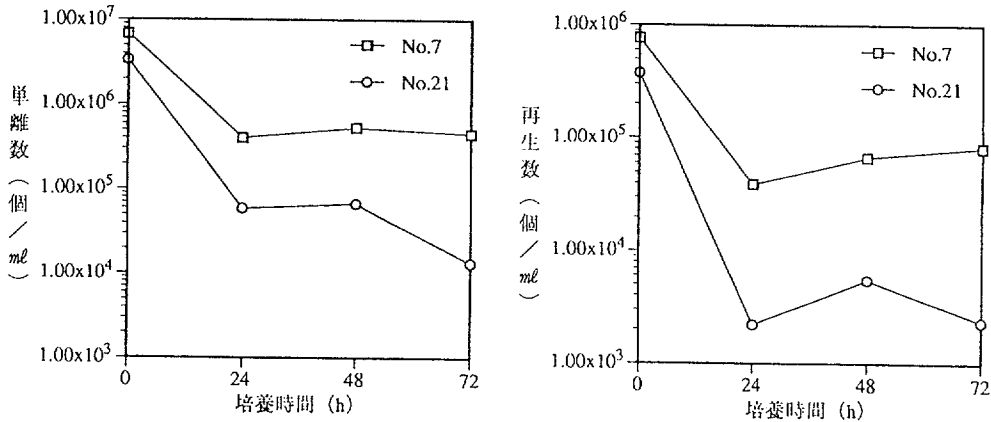


図-1 プロトプラストの巨大化における単離数の変化（左図）と再生数の変化（右図）

2 プロトプラストの粒径

図-2に培養時間毎のプロトプラストの粒径分布を示した。調製直後の粒径は $2 \sim 7 \mu\text{m}$ で平均値はNo.7が $4.4 \mu\text{m}$ 、No.21が $4.2 \mu\text{m}$ であり、 $8 \mu\text{m}$ 以上のものは存在しなかった。粒径の分布は平均値付近にピークを持つ正規分布型になり、玉井（1988）の示したタモギタケ、ヒラタケの菌糸由来のプロトプラストの粒径分布と良く似ている。培養時間の経過につれ平均値付近のピークは減少して $8 \mu\text{m}$ 以上の粒径域に分布が拡大し、72時間培養後には $20 \mu\text{m}$ に達する巨大なプロトプラストも出現した。（写真-1，2）

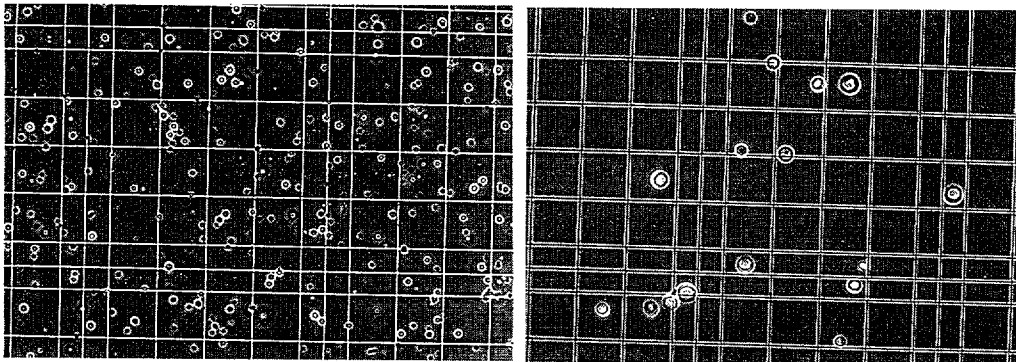


写真-1. 2 調製直後のプロトプラスト（写真-1，左）と巨大化したプロトプラスト（写真-2，右）

いずれもNo.7。巨大化プロトプラストは72時間培養後のもの。背景のメッシュの大きさは $50 \mu\text{m}$ 。

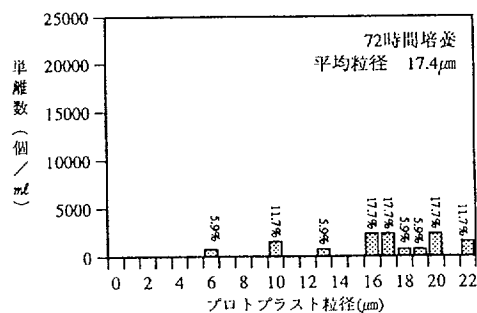
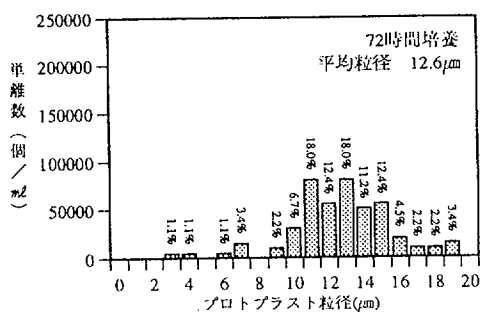
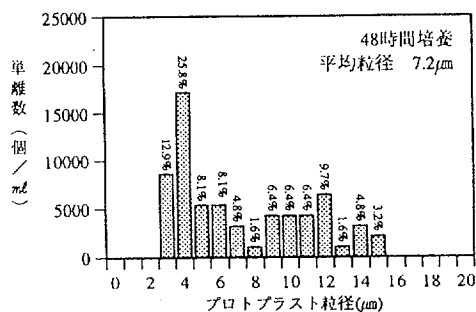
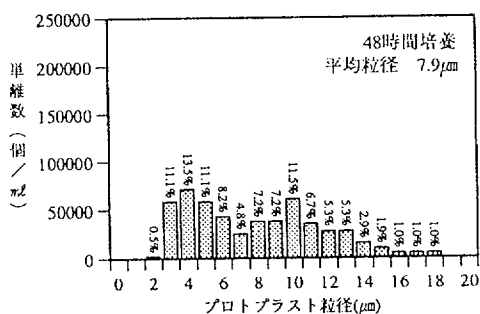
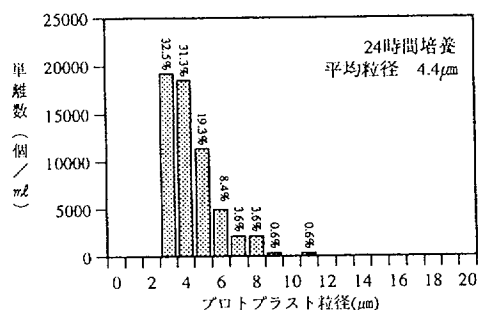
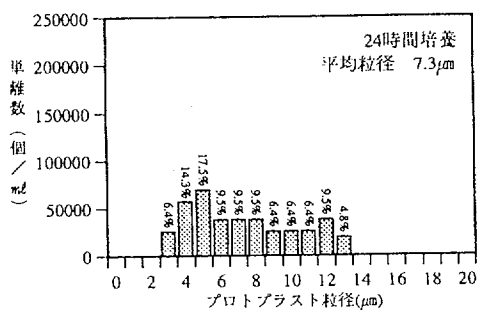
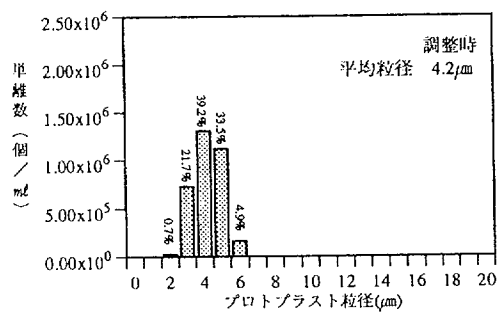
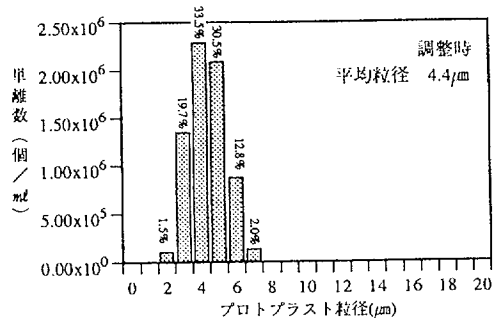


図-2 プロトプラストの巨大化の過程における粒径分布の変化

左側：No. 7、右側：No. 21

平均粒径は24時間培養後ではNo.7が $7.3\mu\text{m}$ 、No.21が $4.4\mu\text{m}$ 、48時間培養後ではNo.7は $7.9\mu\text{m}$ 、No.21は $7.2\mu\text{m}$ 、72時間後ではそれぞれ $12.6\mu\text{m}$ 、 $17.7\mu\text{m}$ であった。

3 細胞壁の再生

プロトプラストはしだいに細胞膜の外側にキチンやグルカンの微細繊維を集積して細胞壁を再生し、やがて菌糸に復帰するが、酵素溶液中では酵素の働きにより細胞壁再生が阻害されるので細胞が増殖しようとしても単一の細胞膜中に原形質が増大し、結果として巨大化すると考えられる。酵素溶液中で放置しておくくと菌糸が観察されるようになることから、プロトプラストは酵素に不純物として含まれる蛋白質や緩衝液中の物質を栄養源として必要な物質の合成に利用していると考えられる。

本実験に先立って行った同一株の二次菌糸を用いた予備実験においてDNAの特異的蛍光色素であるDAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole, 0.01mg/ml , Kuroiwa and Suzuki (1980))でプロトプラストを染色して核数を観察したところ、単離直後の有核プロトプラストでは1~2個であったが、巨大化プロトプラストには7~10数個あり、多核細胞になっていることを観察している。

ナメコプロトプラストは再生培地上では24~48時間後までに全面に細胞壁を再生して菌糸へ復帰することが知られている(前田・中井ら1988)が、酵素溶液中では再生までの時間はより長くかかるものと思われた。細胞融合に用いるプロトプラストは細胞壁を欠くことが条件のひとつであり、細胞壁再生までの時間を知らため、Ⅲ-7よりセルロース合成マーカーの蛍光試薬である、Calcofluor

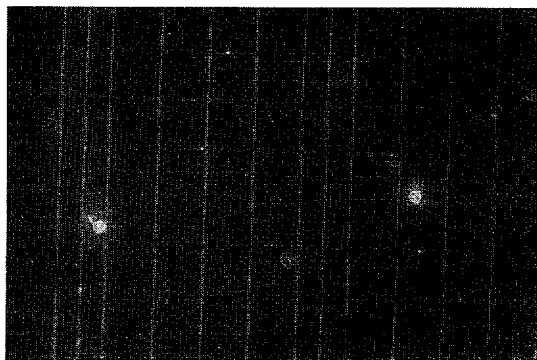


写真-3 巨大化プロトプラストの蛍光染色像
No.7. 72時間培養。細胞壁を再生したプロトプラストは蛍光を示す。

white M2Rで細胞壁を染色して細胞壁再生の有無を観察・判定した。調製直後ではNo.7、No.21ともに蛍光を示さなかったが24時間経過後から蛍光を示すものが観察され始め、72時間では蛍光を示すものが増加した。(写真-3)

少量であるが、No.7では24時間経過後から、No.21では48時間経過後から数個のプロトプラストが数珠状に連なったものが観察された。それらは殆どが蛍光を示し、菌糸への復帰過程にあるものと判定された。72時間経過後では明らかに菌糸へ復帰したものも観察された。

V まとめ

本研究においてナメコプロトプラストは単離に用いたのと同じ酵素溶液中で培養すると容易に巨大化し、48時間培養で調製時の2倍弱、72時間培養で3~4倍の大きさの巨大化プロトプラス

トが得られることがわかった。個別電気融合に用いるプロトプラストはなるべく大きく、粒径がそろっており、細胞壁を欠くことが望ましい。菌株により差があろうが粒径分布や再生率、細胞壁再生の観察結果を総合すると最適な培養時間は48時間前後であると考えられる。

しかし、巨大化プロトプラストは単離数が大幅に減少し、 $10^{4\sim5}$ 個/mlレベルとなった。24、48時間培養の単離数がほぼ一定であること、再生率、再生数ともに24時間後が最も低かったことから新たな酵素溶液の添加時に何らかの原因があったと考えられる。菌株の特性、酵素の種類の影響もあると思われるので詳細な検討を行い、単離数の低下を回避する必要がある。

参考文献

- 1) 江口文陽・田代政弘ほか2名(1990) 食用キノコ類のプロトプラストの調製とその再生. 木材学会誌 36(3): 232-240
- 2) 江口文陽・檜垣宮都(1991) 食用キノコ類の細胞学的観察(第2報). 木材学会誌 37(9): 865-868
- 3) 檜垣宮都・江口文陽(1991) 食用キノコ類のプロトプラストの調製と巨大化. 木材学会誌 37(2): 172-176
- 4) Kuroiwa, T. and Suzuki, T. (1980) An improved method for demonstration of the *in situ* chloro plast nuclei in higher plants. Cell Struct. Funct. 5:195-197
- 5) 前田好之・中井幸孝ほか2名(1988) ナメコプロトプラストの作出と菌糸復帰. 菌茸研報 26: 55-64
- 6) 西口恭彦・三浦 清ほか2名(1987) 食用担子菌の細胞学的研究, 北大農学部演習林研報44 (4): 1435-1473
- 7) Ohmasa, M., Abe, Y., Furukawa, H., Taniguchi, M. and Neda, H. (1987) Preparation and culture of protoplasts of some Japanese cultivated mushrooms. Bull. For. Prod. Res. Inst. 343: 155-170
- 8) 高畠幸司(1992) ナメコ二核菌糸体からのプロトプラスト作出とその再生. 富山県林技研報 6: 16-28
- 9) 玉井 裕・三浦 清・香山 彊(1988) 電気融合法による食用担子菌の品種改良に関する研究. 北大農学部演習林研報 45(3): 833-854