

# キノコ菌系の細胞融合

- バイテク最前線の現場から -

北海道大学農学部  
林産製造学教室

三 浦 清

近頃、バイオテクノロジーに関する報道が種々なメディアを通じてなされています。バイオテクノロジーというのは、生物の生命や生活現象（生態）を科学的に解明する技術学で、きわめて広い基礎研究分野を包含しています。

今回寄稿して戴いた「細胞融合」は、広い意味でのバイオテクノロジーの中で新しく生まれた、「細胞工学」という強力な研究分野で用いられる技術の一つです。細胞融合は、「遺伝子

工学」という分野で用いられる

「組換えDNA技術」とならび、品種改良、育種の分野で最も注目されている技術です。自然界では同一種か、ごく近縁の種類間でしか雑種は生じません。しかし、細胞融合という新しい手法は、たとえ象とノミとの雑種

さえも誕生させる可能性を示したのです。もちろんこの技術は未完成で、現在いろいろな国で、種々な科料（生物）を用いて研究されています。

今回寄稿して戴いたものは、

キノコ菌系を材料として、その細胞融合を行わせるためにどのような手法が使われているのか、そしてどのような困難があるのかを説いたものです。時代の先端をゆく研究であるだけに、多少難解な点はありまじょうが、マツタケの香りを持った白色腐朽菌や、オニフスベのように大きいマッシュルームの誕生に思いをはせながらお読み戴ければ幸いです。なお、表題は編集委員会で付けさせて戴きました。

- 編集委員会 -

## 1. はじめに

“香り”マツタケ，“味”シメジと言う言葉で表現されているように、我々はキノコを秋の味覚として古くから親しんできました。しかし、これらのキノコは生産量も少なく、非常に高価になって一般庶民の食卓では、めったにお目にかかれなくなりました。この生産量が少ない原因の第1に、これらのキノコはアカマツやナラなど生きた木に寄生しており、まだ人工栽培が不可能であることが考えられます。シイタケ、ナメコ、エノキタケなど、スーパーでよく見かけるキノコはほとんど人工栽培が可能になったものであり、一年中収穫が可能になっております。それらの生産高は1984年には約26000トンで、生産額は約2,500億円にも達しており、ミカン、リンゴの生産額よりも多くなっています。最近キノコの生産

高の伸びが横ばいの傾向を示しており、今後は消費者の好みの多様化に対応して、多くの種類のキノコの栽培を行い、かつその生産性を高めていかなければならない状況になってきております。キノコの食用以外の利用としては、抗腫瘍成分を用いた制ガン剤として、また酵素や種々の生理活性物質など多くの有効成分を含んでおり、その利用が大いに注目されているところです。

さて、キノコの品種改良、有効成分の高生産性を有するキノコの育種は、交配により長い期間をかけて行っておりましたが、最近“細胞融合”を用いて行おうとする試みが注目されるようになってきました。細胞融合は遺伝子組換え、組織培養などバイオテクノロジー（生物工学）の中の一技術分野であり、1957年、岡田善雄博士により動物細胞にセンダイウイルスを加えることにより細胞膜

が融合する現象として発見されました。よく知られている例では西ドイツのマックス・プランク研究所のメルヒヤー博士によるトマトとポテトの融合による「ポマト」が有名です。出来たものは地上部には小さなトマト、地中には根の様なポテトが生じましたが、実用にはいたりませんでした。しかしトマトに耐寒性が付与されたことは注目すべき点であります。樹木ではカラタチとオレンジの融合例があります。これはオレンジにカラタチの耐寒性が付与されることをねらっております。現在最も期待されているものに、抗体を作るリンパ球と増殖可能なガン細胞を融合して雑種細胞を作り、これが作るモノクローナル抗体（単一特異性抗体）を、ガンなどの治療や臨床診断薬として利用することが考えられています。細胞融合を実用化している例としては、主に酵母などの醗酵工業に用いられている微生物で高収率のアルコール醗酵を行う菌株を得ることに成功しております。以上述べた事例から、細胞融合による可能性としては従来の交雑法では交配が出来なかった、種間属間での交配が可能となり、耐寒、耐塩性、耐病性、窒素同化作用の付与、味、香りなどの良い品種や、有効成分を大量に作るなどが可能になると考えられます。キノコに対して適応したときは、シイタケのトリコデルマに対する耐病性の付与、マツタケ、シメジのような菌根性の菌とシイタケ、ヒラタケの様な腐朽型の菌とを交雑して栽培可能にし、ヒラタケの高温での発芽を可能にしたり、またマツタケの香りをもったシメジを作り出すなど、多くの可能性をひめており、非常に有効な手法であります。しかし前述したように、実用化には多くの問題点を有しています。

キノコの細胞融合による交配を行うための手順は、大きく分けると次のようになります。

- 1) キノコの細胞の外側にある細胞壁を、細胞壁分解酵素を用いて取り除き、脂質二重層からなる細胞膜だけをもったプロトプラスト（裸の細胞）を作る。
- 2) 異なった菌株のプロトプラスト（例えばヒラタケとシイタケ）をポリエチレングリコール

(PEG)の働きや、電気的な方法により融合させる。

3) 融合したプロトプラストを再生培地に移して細胞壁を再生させる。なおこの時に菌体の特性を用いて、融合した細胞のみを選択する。

4) 優れた性質を持った融合菌体を選択して育種を行う。

細胞融合について記述する前に、キノコの代表的な生活環について簡単にふれておきます（**図1、写真・参照**）。キノコ（子実体）のヒダには子実層があり、若い担子基の中で2個ある核が融合して、複相となり、直ちに減数分裂をおこして写真に示した4個の担子胞子を生じます。この胞子が、放散して適当な培地上で発芽して菌糸を生じます。この時期は核が1個であり、一次菌糸と呼ばれ、一次菌糸は適合する菌糸が互いに接合を起こして、核を2個持った二次菌糸となります。普通キノコ栽培に用いる種菌は二次菌糸であり、この二次菌糸が増殖して子実体（キノコ）を生じ

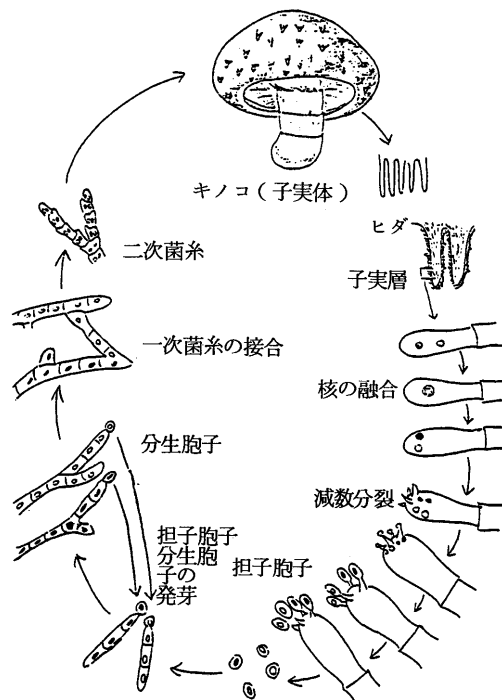
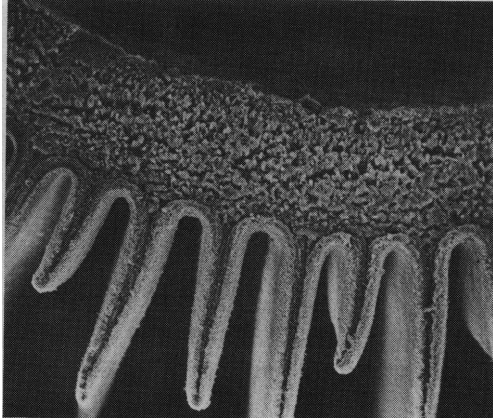
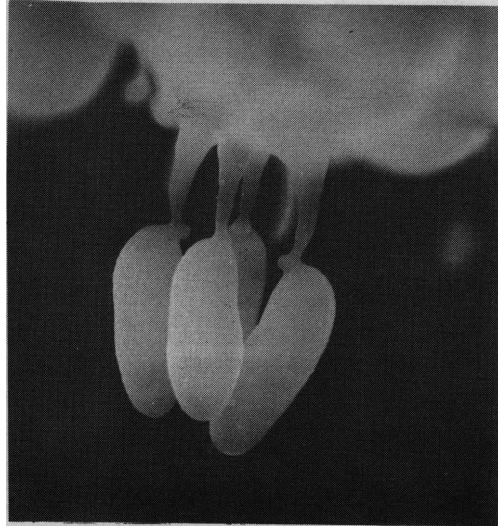


図1 キノコの生活環



キノコのヒダ(タモギタケ)



担子胞子(タモギタケ)

ます。なお、一次菌糸又は二次菌糸が一部無性的に分生胞子を作ることがあります。

## 2. プロトプラストの調製

ここでは我々が現在行っている実際の方法について述べていきます。図2に調製方法の模式図を示しました。

寒天斜面培地に培養した種菌を、しょう油玉ねぎ培地や、麦芽・酵母・グルコース培地を用いて、三角フラスコで7~10日間静置培養を行うか、または通常の振とう培養を行い、その後静置培養を行います。この菌体をかくはん、粉碎して小片にした後、あらためて菌の種類により2~8日間静置培養を行ったものを試料とします。原則的には菌の生活環のどの部分を用いてもプロトプラストを作ることが出来ます。しかし子実体を用いると、大型のプロトプラストを作れますが収率は低くなります。また胞子を用いるときは、酵素による分解が大変困難になります。現在のところ分裂状態にある若い菌体を用いると、収率もよく、かつ活性のあるプロトプラストが得られやすくなります。細胞壁分解はセルラーゼ“オノズカ”R-10、ザイモリアーゼ、キチナーゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼなどの酵素を用いて、温度30℃で菌の種類により1~4時間、酵素処理を行っております。酵素としては、この外にメイセラゼ、ドリセラゼ、ノボザイムなどが用いられており、処理時間も多くは2~3時間ですが、長いものでは、6~12時間処理した報告例もあります。

酵素を溶かす緩衝液の組成は、出来たプロトプラストが浸透圧によって破壊されることを防ぐた

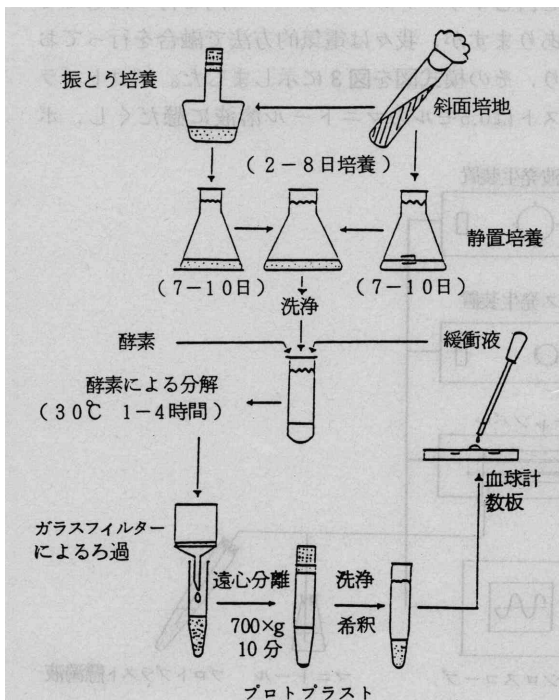
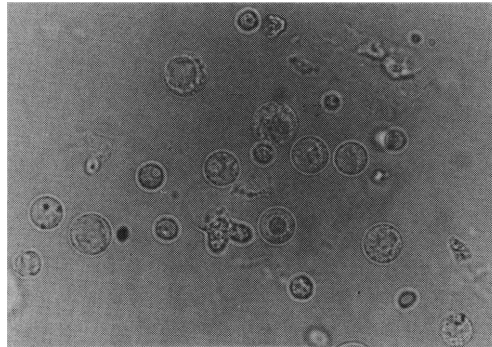


図2 プロトプラスト調製のフローシート

キノコ菌糸の細胞融合



プロトプラストの生成状態



ヒラタケのプロトプラスト (×150倍)

めに、調節剤として、マンニトール、サッカロース、硫酸マグネシウムなどを用い、これに0.05モルのリンゴ酸、またはマレイン酸とカ性ソーダを用いて pH 5.5 近くに調整し、酵素の至適 pH にします。緩衝液の種類によりプロトプラストの収量が、相当影響を受ける様です。酵素、緩衝液・菌体を試験管に入れ、30 で 1~4 時間、振とうしながら加水分解を行うと、写真に示された状態でプロトプラストが生成します。細長い糸状に見えるものが菌糸で、円形がプロトプラストです。所定時間処理した後、まだ加水分解されていない菌体や破片などをガラスフィルターで除去し、遠心分離 (約700g) すると、プロトプラストは遠心

管の底に集まります。上澄の酵素液を除いた後、浸透圧調節剤の入った溶液 (0.5モルマンニトール溶液) で洗浄してから一定量 (1ml) に希釈して、トーマの血球計数板を用いてプロトプラストの数を計数すると収率が算出されます。写真に出来上がったプロトプラストを示しております。この段階でプロトプラストの収率を高くすることは当然ですが、一番重要なことは再生率 (再生

培地上に接種したプロトプラストの数に対する、実際に細胞分裂を生じたプロトプラストの数) が高いプロトプラストを作ることです。これは、融合がうまく進むかどうかに対して大きな影響を与えるものであります。

### 3. プロトプラストの融合

今までに報告されたキノコのプロトプラストの融合は、すべてアルカリ性下で、塩化カルシウムを含むポリエチレングリコール内で行ったものであります。我々は電気的方法で融合を行っており、その模式図を図 3 に示しました。プロトプラストは 0.5モルのマンニトール溶液に懸たくし、ポ

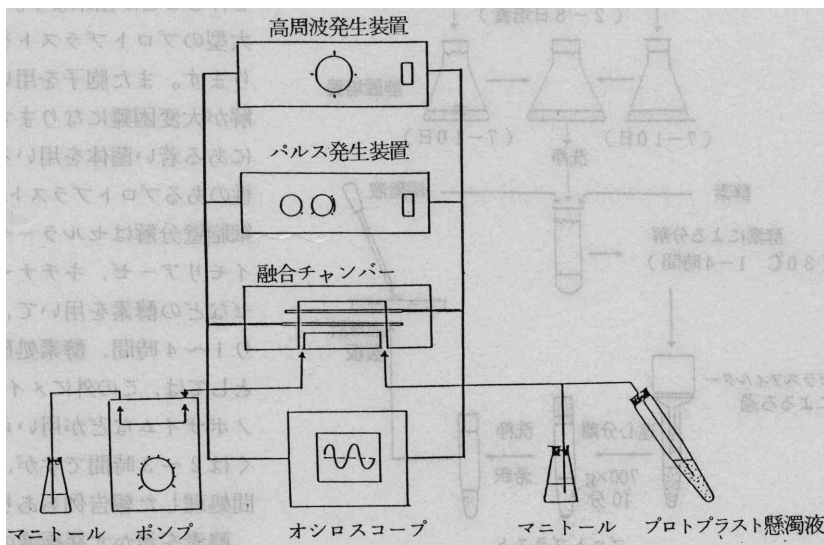
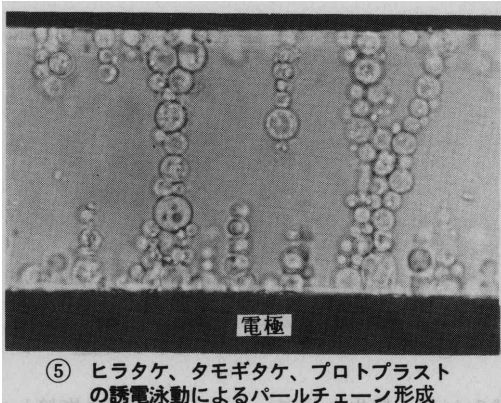
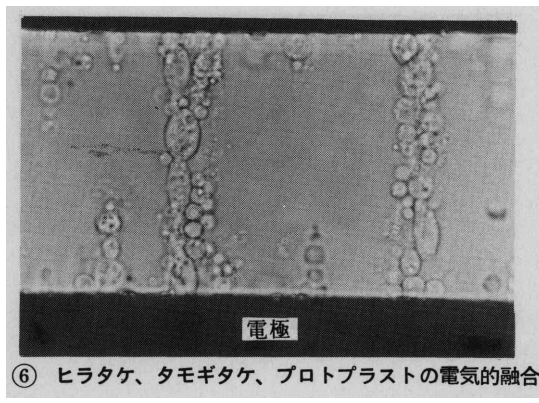


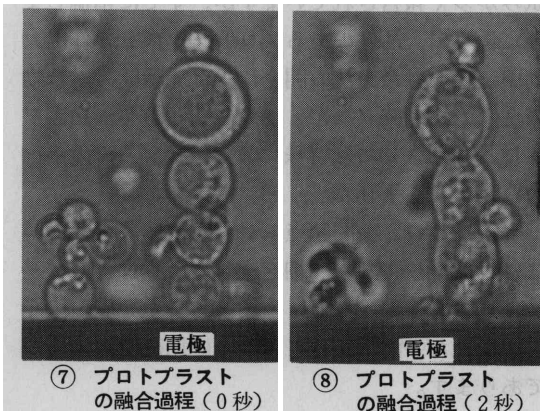
図 3 プロトプラストの電気的融合法の模式図



⑤ ヒラタケ、タモギタケ、プロトプラストの誘電泳動によるパールチェーン形成



⑥ ヒラタケ、タモギタケ、プロトプラストの電氣的融合



⑦ プロトプラストの融合過程(0秒)

⑧ プロトプラストの融合過程(2秒)



⑨ プロトプラストの融合過程(5分)

ンプで融合チャンバーへ導入します。チャンバー内には平行に電極が配置されており、この電極に高周波発生装置より2メガヘルツで400V/cmの交流を流すと、プロトプラストが電極に付着し、さらにその上に他のプロトプラストが付着し、電極間に数珠つなぎになります(パールチェーンの形成)。写真はこの状態を示しています。次にパルス発生装置より振幅3kV/cm、保持時間40 $\mu$ sの直流のパルスを加えるとプロトプラストの融合が開始します。写真における円形のプロトプラストがその融合したものであります。写真・・・は融合過程の連続写真であります。融合完了後、ポンプでチャンバーより取り出して再生を行います。

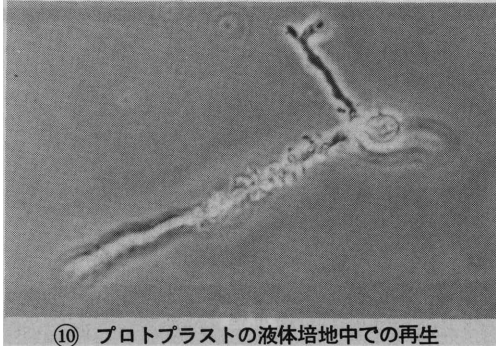
#### 4. 融合プロトプラストの再生・融合細胞の識別

再生は等張の液体培地や固体培地で行われます。

我々は0.5モルのしょ糖を入れたしょう油、玉ねぎ液体培地中で2~3日間融合プロトプラストの再生を行ってみました。写真・は液体培地中でのプロトプラスト(円形の端)の再生状態を示しています。再生菌糸はプロトプラストより2本直角に伸びているもの、1本が伸びているものなどが認められ、再生したプロトプラストをさらに液体培地と同様の組成の固体培地上に接種し直して、再生を完全なものとししました。

用いた菌の種類、酵素の処理方法、処理時間などの条件で、再生率は大きく異なります。融合率も同様の影響を受けるので、異種菌株の融合プロトプラスト(例えばヒラタケ・シイタケ)が出来る割合は非常に低い値になりますので(数千個に1個の割合)、融合株の選抜方法が大きな問題となります。現在のところ栄養要求性の突然変異株を試料に用い、選択培地で融合株を選抜する方法が多く用いられています。これは異種菌株の融合したものだけが増殖出来る最少培地上で再生を行うことにより、融合プロトプラストを選抜する方法であります。その他に、電気泳動を用いて酵素たん白質のバンドを観察して、両親株からのたん白質バンドを有していることで異種間融合株を判

#### キノコ菌系の細胞融合



別する方法があります。

#### 5. 優良菌株の選抜

選抜された異種間融合株は常に望み通りの性質を持った株を選び出す必要があります。しかもこれらの性質が、継代培養の途中で変化することもよく生じることであり、その点も十分検討しなければなりません。

#### 6. おわりに

最近、細胞融合法を用いた新しいキノコを作る

試みが多く報告されていますが、すでに指摘しましたように、活性のあるプロトプラストの作出、効率の良い融合方法の開発、また異種間の融合物の選択方法の確立など、多くの問題点をかかえており、今日までには特殊な菌で、融合・再生が行われたにすぎません。

今後はこれらの問題点を一つずつ解決して行かなければなりません。細胞融合法はDNAやプラスミドの直接導入など、今後ますます発展の可能性をひめた手法であり、おいに期待出来るものであります。