

## 食用担子菌の担子胞子に由来するプロトプラストの性状

北海道大学農学部林産学科 三浦 清

以前にキノコ菌系の細胞融合という題で報告しました。今回は細胞融合プロセスにおいて重要な役割を担っています、プロトプラストの細胞工学的な意義、および今後の可能性などについて、一例として我々が行っているキノコのプロトプラストの単離、融合、再生における現状と問題点を述べて考察します。

まずプロトプラストとはどのようなものかというところ、一言では“裸の細胞”といえます。菌類を含む一般の植物細胞は細胞の一番外側は細胞壁で覆われています。その内側に細胞膜があり、この膜に細胞質が包み込まれています。この中には核、ミトコンドリア、液胞等が浮遊した状態になっています。裸の細胞とは、この一番外側にある細胞壁を取り除いた状態の細胞のことを意味します。ちなみに動物細胞には細胞壁が存在しません。

ところでプロトプラストを作ることがどのような意味を有しているかというところ、植物細胞は一般に一個の細胞から完全な植物体を作る能力を持っています。すなわち“全形成能”を持っていることが明らかにされており（この事実は日本の長田健部によってタバコを用い1971年に証明されました）、このような能力を持った“裸の細胞”であるプロトプラストを利用することにより、細胞工学的には次のような重要な事項を推進し得る可能性が考えられます。

1. 交配不可能な種間、属間での雑種を作出（細胞融合）。
2. 特定のDNAを直接プロトプラストに導入

して、耐病性など優れた性質を持った個体の作出（直接遺伝子導入）。

3. 微生物などと同様に突然変異株の作出（変異体の作出）。

この中で細胞融合による雑種の作出は、比較的取り付き易い問題として今後大いに発展が期待されるどころです。

キノコの細胞融合を行う場合の手順は次のように大きく分けることができます。

- 1) 細胞の外側の細胞壁を種々の酵素を用いて分解し、プロトプラストを得る。
- 2) 異種のプロトプラストを融合させる。  
主にポリエチレングリコールや電気的な方法で融合を起こさせる。
- 3) 融合したプロトプラストを適当な培地で再生させる。この時点で異種間での融合物を特性（外観、菌の特性など）で選抜する。
- 4) 優れた特性を持った個体を選抜し、育種を行う。

ここでは、主として第1段階であるプロトプラストの調製について我々の行った検討結果について述べます。

担子菌の生活史は、いわゆるキノコの傘の部分に胞子ができ、その胞子が適当な条件下（水分、栄養など）で発芽して1次菌糸という1つの核を持った菌糸となり、さらにこれらの菌糸のうちで、接合するための因子が合ったもの同士が接合して2核の2次菌糸となり、この2次菌糸が生長してキノコを作るというサイクルを持っています。形

態的には子実体（キノコ）、胞子、1次菌糸、2次菌糸の4つに分かれます。

プロトプラストの調製にあたっては、プロトプラストを作る場合に用いる菌体の種類（この場合は形態的に異なる4種類、すなわち担子胞子、子実体、1次菌糸、2次菌糸）、各種菌体の細胞壁を分解する酵素の組み合わせ、処理時間などの処理条件を検討し、また出来上がったプロトプラストの性状として大きさの割合と、得られたプロトプラストが活着している割合（再生率）を測定しました。それらの結果から、どの試料を使うとどのような利点と問題が生じるか、また、その対策はどうかを考察します。

プロトプラストの調製方法はまず試料を洗浄し、次に酵素溶液に試料を漬け、温度 30 で30～480分間処理を行います。なおプロトプラストは水溶液中では水分を細胞膜内に吸収し最後は破裂してしまうため、加水分解溶液中には細胞と等しい浸透圧になるように糖の一種であるマンニトールを入れておきます。加水分解後にプロトプラストは遠心力で試験管の底に集め、マンニトール溶液で洗浄して、収量を測定し、次いで醤油玉葱寒天培地に植え付けて分裂して増殖するプロトプラストの割合を測定します。

### 担子胞子 からのプロトプラストの調製

担子胞子は厳しい冬の間雪の下で次の年まで生命を維持するための器官ですから、その細胞の外側はかなり頑丈にできており、我々が今日まで菌糸、子実体について、いろいろと実験してきた分解条件では細胞壁を分解できないため、新たな酵素の組み合わせを検討します。ヒラタケの胞子1億個を用いて、使用酵素の構成をセルラーゼ2%に対してウスキザイムを0.2、0.4、1.0%とウスキザイム単独1%に変えた4種類とし、加水分解を行いました。加水分解時間は30～360分間の間で30分間隔で測定を行い、その結果ウスキザイム1.0%、セルラーゼ2%で加水分解時間150分間が最も良い条件であることを見いだしました。この条件下で1ml中に約4千万個のプロトプラスト

が採れます。

このときの加水分解時間に対するプロトプラストの収量を図1に示します。また採れたプロトプラストを写真1に示します。写真で明らかのように未分解残渣などはまったく認められません。かつその大きさが非常にそろっており（3～5/μm、μmは1,000分の1mm）、この性質は電気融合を行う場合に好ましい性質です。その理由としてはプロトプラストにかかる電圧が均等にかかるため、融合が同時にかつ均一に生じることとなるからです。この時の再生率は10～20%となりました。これは100個のプロトプラストの内10～20個が分裂し、増殖していくことを意味しています。

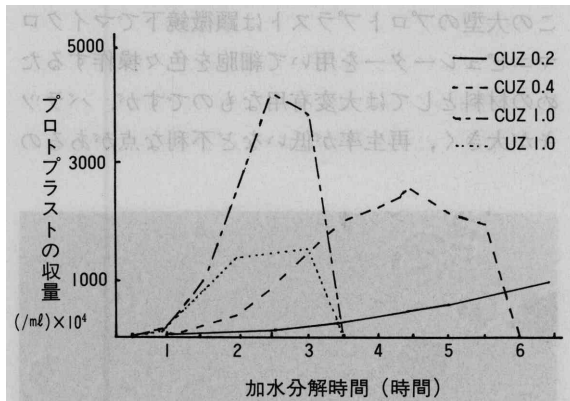


図1 ヒラタケ胞子からのプロトプラスト調製における加水分解時間と酵素組成のプロトプラスト収量に対する影響

|         |            |             |
|---------|------------|-------------|
| CUZ0.2: | セルラーゼ 2.0% | ウスキザイム 0.2% |
| CUZ0.4: | "          | " 0.4%      |
| CUZ1.0: | "          | " 1.0%      |
| UZ1.0:  | "          | " 1.0%      |

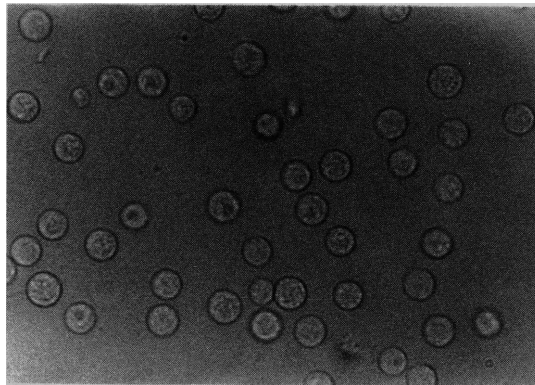


写真1 担子胞子からのプロトプラスト（ヒラタケ）

### 子実体(キノコ) からのプロトプラストの調製

加水分解酵素の組成はセルラーゼ2%, キチナーゼ6ユニット(酵素の単位), ザイモリアーゼ0.6%としました。ただし, 子実体を対象とするものについては, 含有する蛋白質分解酵素の働きが高いため, その保護剤として1%の牛アルブミンを添加しました。加水分解を5時間行って最大収量のプロトプラストが得られ, その個数はヒラタケで1ml中に650万個でした。しかし再生率は低く2%でした。またその大きさは4~20 $\mu\text{m}$ と非常に大型から小型のものまで広い範囲に分布しており, 最大径はほかの試料の2倍から4倍となっていました。この状態を写真2に示します。この大型のプロトプラストは顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用いて細胞を色々操作するための材料としては大変有用なものですが, バラツキが大きく, 再生率が低いなど不利な点があるの

で使用に際しては注意する必要があります。

### 1次菌糸, 2次菌糸 からのプロトプラストの調製

1次菌糸, 2次菌糸からのプロトプラストの単離に関してはすでに我々の報告<sup>1)</sup>がありますが, 次の条件で行います。酵素構成はセルラーゼ2%, ザイモリアーゼ0.6%, キチナーゼ6ユニットで, 加水分解時間は3時間で行っています。ヒラタケでは1ml当たり約1千万個のプロトプラストが得られ, その大きさの分布は2~9 $\mu\text{m}$ で, 再生率も20~30%です。1次菌糸, 2次菌糸からのプロトプラストを写真3, 4に示します。

以上プロトプラストの調製のための試料として1次菌糸, 2次菌糸, 子実体, 担子胞子を用いて実験を行って, それぞれの特性を明らかにしましたが, 電気的な融合法を前提として比較すると, まず融合に適したプロトプラストとは次の項目を満たしたものと考えられます。

- 1) プロトプラストの大きさが均一であること
- 2) 再生率が高いこと
- 3) 菌糸片などの混入が少ないこと
- 4) プロトプラスト化が完全であること

1)の項目に関しては一定のパルス電圧に対するプロトプラストの挙動(融合または破壊)はプロトプラストの大きさに左右されることが明らかになっており, したがって大きさが均一の場合高い確率で融合を生じることが期待されます。

- 2)の項目に関しては効果的に体細胞雑種を作出

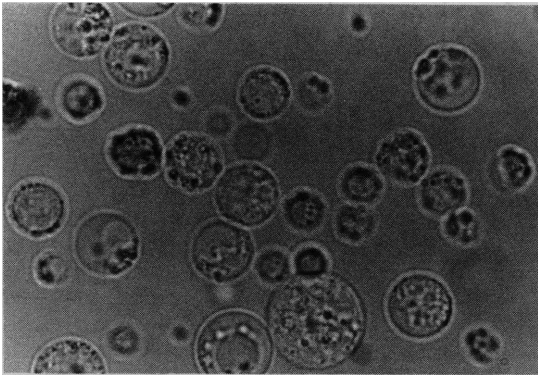


写真2 子実体(キノコ)からのプロトプラスト(ヒラタケ)

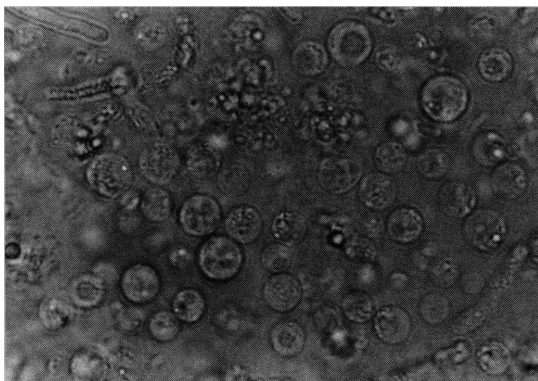


写真3 1次菌糸からのプロトプラスト(ヒラタケ)

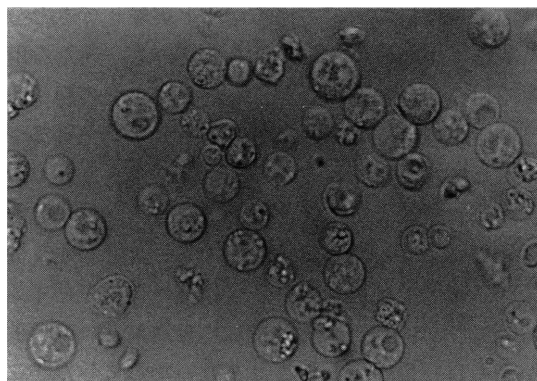


写真4 2次菌糸からのプロトプラスト(ヒラタケ)

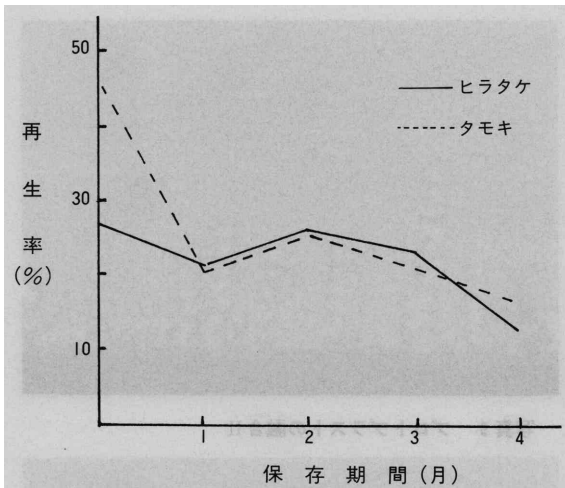


図2 プロトプラストの保存期間と再生率の関係

するためには望ましい条件であります。3)の項目に関しては、菌糸片の混入はしばしば融合を妨げることが観察されています。4)の項目に関してはみかけ上はプロトプラストに見えても細胞膜上に細胞壁断片が残存している場合などは明らかに融合の妨げとなります。以上の条件を考慮すると担子孢子からのプロトプラストが最も適性が高いと思われます。

しかし問題点は、担子孢子を得るために長時間多大な労力をかけ子実体を作りそれから孢子を得なければならないことでもあります。この問題解決のために孢子の長期保存の可能性を検討しました。

### 孢子の保存性に関する検討

採取した孢子を4の冷蔵庫内で長期間保存し、保存期間と発芽率の関係を調べました。その結果を図2に示します。ヒラタケは3か月間は安定であり、タモギタケは最初の1か月で急激に発芽率は低下していますが、その後の3か月までは安定しています。このことから孢子は3か月間は保存が可能であり、孢子採取のための期間と労力の節約が可能となります。

### 電気融合に関する検討

上述した最適条件で作成したヒラタケの担子孢子を用いて電気的融合実験を行いました。

1988年11月号

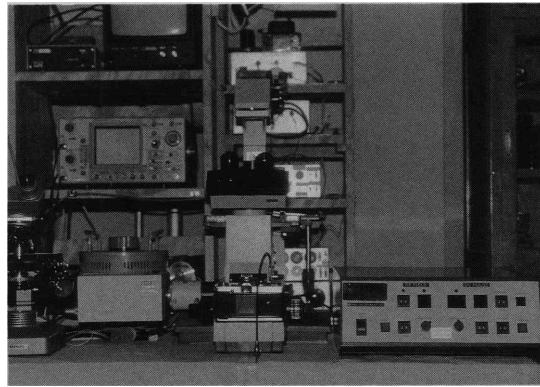


写真5 電気融合システム



写真6 電気融合チャンバー

装置を写真5に示します。倒立顕微鏡、融合装置、ビデオカメラ、モニターからなっています。写真6に融合のチャンバーを示します。これはプラスチック製のシャーレの底部に長方形の穴を開け、その部分にカバーガラスを内側よりエポキシ樹脂接着剤で接着し、カバーガラス上に断面が三角形の2本のアクリル棒を平行に接着し、その間に断面直径が0.1mmのニクロム線を平行に0.5mmの間隔で張ったものです。滅菌はエタノールで行いました。この融合チャンバーを倒立顕微鏡のステージに載せ、モニターで観察しながら融合装置より高周波と直流パルスを加えて融合を行いました。融合状態を写真7, 8, 9, 10に示します。写真7は高周波を加えたために均一なプロトプラストがきれいに並んで付着して“パールチェーン”を形成した状態です。次に写真8~10は直流のパルスを加えることによってプロトプラストが融合してゆく様子です。目測ですが80%は融

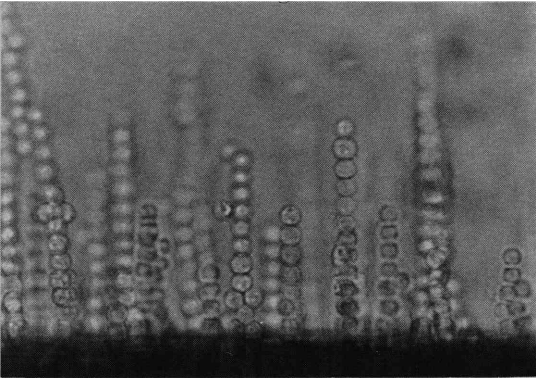


写真7 パールチェーンの形成

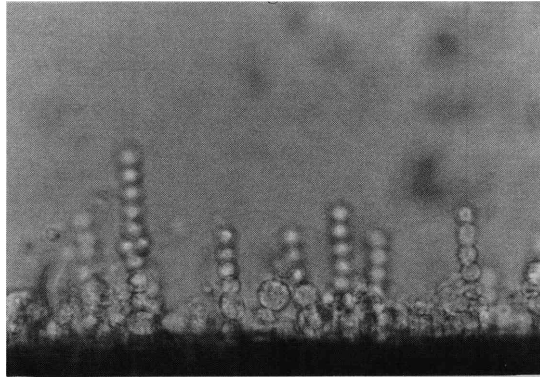


写真9 プロトプラストの融合

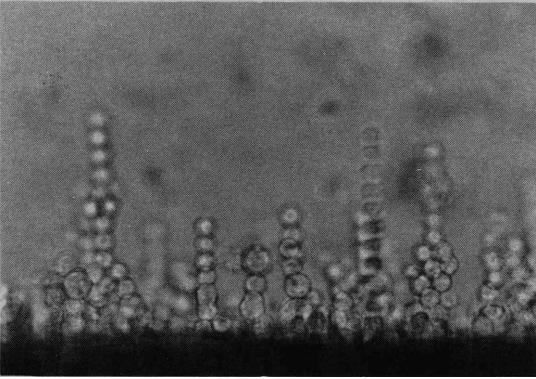


写真8 プロトプラストの融合

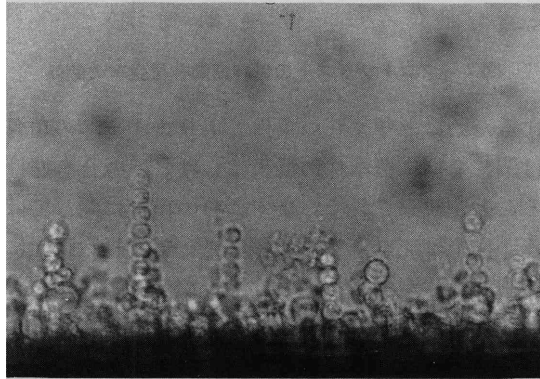


写真10 プロトプラストの融合

合します。

結論としては、担子孢子は粒形がそろい、高い収率で得られ、かつ再生率が高い点を考慮すると電気的融合に最も適しています。実際に融合した場合にも目測ですが約80%の融合率を示します。担子孢子的使用上の問題点としての孢子の保存性は、約3か月間の保存が可能なが明らかになりました。

#### 参考文献

- 1) 西口恭彦, 三浦 清, 藤川清三, 香山 彊: 担子菌の細胞学的研究 - 細胞融合の材料としての菌糸およびプロトプラストの評価 -, 1987年, 44巻, 4号, 1435~1473, 北海道大学農学部演習林研究報告.

