

学 位 論 文 題 名

Interspecific Heterokaryon Formation Between *Auricularia*
auricula-judae And *Auricularia polytricha*
By Electrical Protoplast Fusion

(キクラゲとアラゲキクラゲの電氣的プロトプラスト融合
によるヘテロカリオンの形成)

学位論文内容の要旨

本研究はキクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合を行うにあたりプロトプラストの調製、培養条件を検討し、また雑種細胞を選抜するため代謝阻害処理を行いその諸条件について検討した。そしてプロトプラスト融合によって得られた融合株の性質を明らかにするため様々な解析がなされた。

1. キクラゲとアラゲキクラゲの性質

供試菌として用いられるキクラゲとアラゲキクラゲの菌糸伸長に関する温度特性及び木粉培地の適性を検討し、また両菌株の栽培特性も明らかにした。キクラゲとアラゲキクラゲの菌糸伸長に関する最適温度は共に PDA (20% ジャガイモ抽出液, 1% デキストロース, 1.5% 寒天) 培地上で25~30℃であった。また菌糸伸長速度に関しては、両菌株共に同程度であった。

ブナ、シラカンバ及びミズナラの木粉培地を用いて菌糸伸長の比較を行った結果、キクラゲ、アラゲキクラゲ共にシラカンバ培地で最も良い結果が得られた。アラゲキクラゲの場合、ブナ培地でも比較的良い菌糸伸長が得られた。しかしながら、ミズナラの木粉培地においては両菌株の菌糸伸長は認められなかった。木粉培地上でのキクラゲ、アラゲキクラゲの菌糸伸長速度においては、ブナ培地を用いた場合に顕著な差が認められ、アラゲキクラゲの菌糸伸長速度が優れていた。また、シラカンバ培地においてもアラゲキクラゲの方が良い伸長速度を示した。

添加物の影響を検討するため、両菌株に対して菌糸伸長が良かったシラカンバ培地に米糠及びフスマが添加された。その結果、米糠、フスマ共に無添加培地よりもキクラゲ、アラゲキクラゲ

の菌糸伸長に対して促進効果が認められた。特にフスマを用いた場合に最も良い結果が得られた。栽培特性においては、アラゲキクラゲの方が、子実体を形成するまでの培養日数が短く、また子実体の収量も良い結果が得られた。

以上の結果により、供試菌の性質が明らかにされ、アラゲキクラゲはキクラゲに比べ栽培が容易であることが見いだされた。

2. キクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラストの調製・培養

キクラゲ及びアラゲキクラゲのプロトプラストの調製に影響を及ぼすと考えられる細胞壁溶解酵素、菌糸の培養日数等が検討された。その結果、菌糸の培養培地をSMY（1%ショ糖，1%麦芽エキス，0.4%酵母エキス）でキクラゲでは4日間，アラゲキクラゲでは6日間培養し，酵素処理液つまり，ノボザイム234 1%とキチナーゼ0.1%の処理液1mlに対して約200mgの生菌体を用いた場合にプロトプラストの高い収量（ $5 \sim 7 \times 10^7$ 個/ml）が得られた。

作出されたプロトプラストを菌糸まで復帰させるため，菌糸の培養日数及び再生培地に関するプロトプラストの培養条件を検討した。その結果，キクラゲでは培養4日目，アラゲキクラゲでは6日目の菌体を用いて前述した条件でプロトプラストを単離し，それらをpH7付近のStMY（1%澱粉，1%麦芽エキス，0.4%酵母エキス）再生培地に塗布した場合に高い再生率（6.5～7.5%）が得られ，融合処理後のプロトプラストの再生（融合率）に期待がもたれた。

3. キクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合

人為的に誘導した遺伝的マーカーを用いることなく体細胞雑種をスクリーニングするため，キクラゲとアラゲキクラゲから誘導した一核菌糸（MoA11，MoP16）に対し融合前処理として代謝阻害処理を行った。処理後のプロトプラストの破壊率と再生率の結果により，MoA11のプロトプラストに対しては4%のヨード酢酸ナトリウム，アラゲキクラゲのプロトプラストに対しては4%のジエチルピロカーボネートによる4℃，30分間の処理が適当であると判断された。それらのプロトプラストを用いて，電気的な融合条件を検討した。0.1mMの塩化カルシウムおよび0.5mM塩化マグネシウムを含む0.5Mマンニトール溶液に懸濁したプロトプラストを2MHz，500V/cmの高周波を10分間印加しプロトプラストのパールチェーンを形成させ次いで10μsec，3kV/cmの直流パルスで1秒間隔で2～5回印加して融合処理を行った。そして，それらのプロトプラストをStMY再生培地に塗布した結果高い融合率（1.2%）が得られた。

4. 融合株の性質

プロトプラストの融合によって得られた5株の融合株の性質を明らかにするため菌糸伸長の温度特性および木粉培地の選択性、対峙培養、アイソザイム及び生化学的な分析に関して両親株及び一核菌糸との比較検討を行った。また、融合株の子実体の形成も試みた。更に遺伝子レベルでの分析を行うため、融合株のミトコンドリア DNA を解析した。

5株の融合株の菌糸伸長に関する最適温度は、PDA 培地上で30℃であり、これは Mo11と類似していた。また、菌糸伸長速度は親株及び MoP16と類似していた。

ブナ、シラカンバ及びミズナラの木粉培地を用いて菌糸伸長の比較を行った結果、5株の融合株のすべは親株と同様、シラカンバ培地で良い結果が得られた。また、木粉培地に添加物（米糠、フスマ）を加えた場合に無添加培地よりも菌糸の伸長が促進された。すべての融合株は親株、一核菌糸より菌糸密度が濃かった。

融合株を親株、一核菌糸のそれぞれと対峙培養した結果、5株の融合株すべては両方に対して拮抗線を形成した。また、その融合株はクランプコネクションを有していた。

エステラーゼのアイソザイム分析において、すべての融合株はそれぞれの一核菌糸に特異的なバンドを併せ持っていることが確認された。

α -ガラクトシダーゼ活性においてはすべての融合株に活性が認められたが、フェノールオキシダーゼ活性においては5株の融合株のうち1株においてそれが認められた。

融合株の子実体形成を試みたところ、1つの融合株において幼子実体の形成が認められ、その融合株のミトコンドリア DNA の解析を行った。その結果、ゲノムサイズが90kbp であることが確認された。Hind IIIを用いた制限酵素断片パターンにおいては、その融合株はそれぞれの一核菌糸に特異的なバンド（3.2, 3.5kbp）を併せ持っていた。また、その融合株に一核菌糸と異なる2つのバンド（2.1, 2.5kbp）が存在することから、それらの断片は両菌株のミトコンドリア DNA がプロトプラストの融合によって相互に組み換えが起こった結果生じたものと考察された。

以上の結果により、5株の融合株はキクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合によって得られたヘテロカリオンであることが結論された。

本研究において、遺伝的なマーカーを用いず、キクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合によってヘテロカリオンを得ることができた。そのヘテロカリオンは幼子実体を形成したので、発生操作の詳細な検討により成熟した子実体に成長する可能性がある。親株、一核菌糸及び融合株のミトコンドリア内にプラスミド様の DNA の存在が確認されたことは興味深く、それを用いた食用キノコの遺伝子組換えによる育種が今後期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 實

副 査 教 授 笹 谷 宜 志

副 査 教 授 深 澤 和 三

副 査 助 教 授 三 浦 清

本論文は、4章からなり、図32、表8引用文献87を含む総頁106の英文論文である。別に参考論文8編が添えられている。

本研究はキクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合を行うにあたり、プロトプラストの調製、培養条件の検討、また融合雑種細胞選抜のための代謝阻害前処理の諸条件の検討、プロトプラストの電氣的融合、および融合によって得られた体細胞雑種株の性質の解明を行ったものである。

第1章では、供試菌として用いられるキクラゲとアラゲキクラゲの性質を明らかにした。

二次菌糸伸長に関する最適温度は、両供試菌株共にPDA(20%ジャガイモ抽出液、1%デキストロース、1.5%寒天)培地上で25~30℃である。両菌株ともシラカンバ培地で最も良い結果が得られ、ミズナラの木粉培地においては両菌株の菌糸伸長は認められない。ブナ培地を用いた場合には、アラゲキクラゲのみ菌糸伸長が顕著に認められる。また、フスマを添加した場合に最もよい菌糸成長が得られる。栽培特性においては、アラゲキクラゲの方が、子実体を形成するまでの培養日数が短く、また子実体の収量も高い。以上の結果、アラゲキクラゲはキクラゲに比べ栽培が容易であること、およびこれら人工培養の際の木粉培地の適性への指標を見いだした。

第2章では、キクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラストの調製・培養に影響を及ぼすと考えられる細胞壁溶解酵素、菌糸の培養日数等を検討した。

その結果、キクラゲでは4日間、アラゲキクラゲでは6日間培養した生菌体を細胞壁溶解酵素液(ノボザイム234 1%とキチナーゼ0.1%)で処理した場合に、プロトプラストを高い収量(5~7×10⁷個/ml)で得た。前述した条件でプロトプラストを単離し、それらをpH7付近のStMY(1%澱粉、1%麦芽エキス、0.4%酵母エキス)再生培地に接種した場合に高い再生率(6.5~7.5%)を得た。

第3章では、キクラゲとアラゲキクラゲ・プロトプラストの電氣的融合の条件、体細胞雑種のスクーリング条件を検討した。

人為的に誘導した遺伝的マーカーを用いることなく体細胞雑種をスクリーニングするため、両菌株から誘導した一核菌糸 (MoA11, MoP16) に対し融合前処理として代謝阻害処理を行い、処理後のプロトプラストの破壊率と再生率の結果から、キクラゲ MoA11 のプロトプラストに対しては 4 % のヨード酢酸ナトリウムによる処理が、アラゲキクラゲのプロトプラスト MoP16 に対しては 4 % のジエチルピロカーボネートによる処理が適当であること、それらの前処理プロトプラストを用いて、電気的な融合条件を検討し、プロトプラスト懸濁液を 2 MHz, 500 V/cm の高周波を 10 分間印加し、次いで 10 μ sec, 3 kV/cm の直流パルスを 1 秒間隔で 2 ~ 5 回印加して融合処理を行うことで、高い融合率 (1.2%) を得ることを明らかにした。

第 4 章では、プロトプラストの電気的融合によって得られた 5 株の融合株の性質を明らかにした。

5 株の融合株の菌糸伸長に関する最適温度は、PDA 培地上で 30℃ であり、これは MoA11 と類似し、また、菌糸伸長速度は親株及び MoP16 と類似している。5 株の融合株のすべては親株と同様、シラカンバ培地で菌糸成長が良好であった。また、木粉培地にフスマを添加した場合に無添加培地よりも菌糸の伸長が促進される。すべての融合株は親株、一核菌糸より菌糸密度が濃い。融合株を親株、一核菌糸のそれぞれと対峙培養した結果、5 株の融合株すべては両親株に対して拮抗線を形成する。また、その融合株はクランブコネクションを有する。種々の酵素のアイソザイム分析をし、エステラーゼは、すべての融合株にそれぞれの親株の一核菌糸に特異的なバンドが共存していることを認めた。1 つの融合株において幼子実体の形成が認められたが、この融合株のミトコンドリア DNA の解析を行い、ゲノムサイズが 90 kbp であることを確認した。Hind III を用いた制限酵素も分解による断片 DNA の電気泳動パターンにおいては、その融合株はそれぞれの親株の一核菌糸に特異的なバンド (3.2, 3.5 kbp) を併せ持ち、かつ、親株の一核菌糸には存在しない新たな 2 つのバンド (2.1, 2.5 kbp) の存在が認められた。これはプロトプラストの融合によって、ミトコンドリア DNA 相互に組み換えが起こった結果生じたものと考えられる。以上の結果により、5 株の融合株はキクラゲとアラゲキクラゲのプロトプラスト融合によって得られたヘテロカリオンであることが結論された。

また、親株、一核菌糸及び融合株のミトコンドリア内にプラスミド様の DNA の存在を発見した。

以上、本研究は、担子菌の異種間の体細胞雑種 (ヘテロカリオン) 作出のための基礎的研究を行ったものであるが、その結果、突然変異株などの遺伝的なマーカーを用いることなく、その両者のプロトプラストを電気的に融合させ、融合株のアイソザイム分析、ミトコンドリアの DNA

分析等により、細胞融合を確認するとともに、そのヘテロカリオンから幼子実体の形成に成功した。また、親株、一核菌糸及びその融合株のミトコンドリア内にプラスミド様 DNA の存在を発見し、今後の食用キノコの遺伝子組換えによる育種への応用への可能性を示した。

以上の研究成果は、担子菌の異種間の体細胞雑種（ヘテロカリオン）作出による育種を行う際の貴重な知見を示したもので、学術上また、応用の面からも高く評価される。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文提出者の砂川政英は、博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。