

学 位 論 文 題 名

電気融合手法の食用菌への適用

学位論文内容の要旨

キノコ（食用担子菌）は日本人の食卓に欠かせない食物である。キノコ栽培は日本では既に100年以上行われてきているが、栽培品種の改良はもっぱら選抜と交配の方法によっている。

細胞融合による育種法は近年植物の改良で注目をあつめており、微生物である酵母については実用段階に達している。キノコは単一の細胞であるプロトプラストから、最終的に食物となる子実体まで比較的容易に誘導することが出来るという特質を持つ。このため、細胞融合による育種に適した生物材料である。

電気融合法は、細胞膜に電荷をあたえることによって隣り合う細胞同志を融合させようとするもので、従来のポリエチレングリコールを用いる方法に比べて細胞に対する融合剤の毒性を考慮する必要がないという利点がある。

本研究は、この電気融合法をキノコ（食用菌）に適用することを目的として行つたものである。

研究内容は以下の項目に大別される。

1) 電気融合装置の製作・検討

Dielectrophoresis法で細胞融合を行うために必要な装置を作製し、一部市販の装置を組みあわせて融合システムとしての予備的評価を行つた。

最初にパルス発生装置として、タイマICと単安定マルチバイブレータICを組み合わせ、高電圧用のスイッチングトランジスタをコントロールするものを作製した。

市販トランシーバを高周波発生装置として用い、パルス発生装置を組み合わせたシステムではプロトプラストを融合させることが出来た。しかしこのシステムは高周波もれが激しく、実験中に手がしびれるなど人体に害があり、改良の必要があつた。

次に、高周波もれを少なくするべく、高周波発振器として2MHz、コルピッツ型のもの、高周波増幅器としてA級1段階のものを作製した。

この高周波発振器、高周波増幅器および先に作製したパルス発生装置を組み合わせたシステムでもプロトプラストの融合がみられた。しかし、このシステムにおいては高周波の電圧が不足であった。単位長さ当たりの電圧をあげるために融合チャンバーの電極間隔を極端に狭くすることが必要であり、このような融合チャンバーの製作は困難を伴った。また、この電極間隔の狭いチャンバーは容易に焼き付きを起こして使用不能になり、融合を再現性良く行うことが困難であった。このため、高周波もれを押さえた上で、システムの高周波電圧そのものを上げるための改良を行う必要が生じた。また、このシステムではパルス用の市販高圧直流電源装置の容量が不足であり、長いパルスでは必要な電圧を維持することが出来ないため、この点についても改良の必要があった。

最終的に、高周波増幅器としてA級2段階のもの、大型の変圧器と倍電圧整流回路を用いたパルス用高圧直流電源装置、より安定した動作を行えるようにスイッチングを2段階式に改良したパルス発生装置を作製した。

市販シグナルジェネレータを高周波発振器として用い、これに2段階式高周波増幅器、高圧直流電源装置、パルス発生装置を組み合わせたシステムで、安定した融合がみられた。

融合チャンバーは、電極材料として、白金平板、ニクロム線、かみそりの刃、ステンレス平板を用いて作製した。電極の形態によって電場の形態が異なる為、機序および効率は異なるものの、全てにおいて融合がみられた。

2) 自作融合装置の評価

安定した融合がみられたシステムで担子菌クモノスコウヤクタケの不完全世代である *Rhizoctonia solani* の栄養要求性変異株プロトプラストを融合させた。

270Vpp/cmを超える高周波はプロトプラストの生存率を下げる事がわかった。また、3.0 kV/cmを超えるパルスはプロトプラストの破壊を促進することがわかった。これらの電氣的条件の範囲内で5.2%の種内融合率が得られた。これは同一の菌株でポリエチレングリコールを用いた場合の2倍の融合率であった。

これにより、担子菌に電気融合が適用可能であることと、自作の融合装置が有効に働くことが明らかになった。

3) 食用菌の栄養要求変異株の作製

以上の結果を食用担子菌に応用するべく、突然変異誘発剤であるMNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) を用いて食用担子菌ナメコ、タモギタケ、ヒラタケの栄養要求変異株を誘導・単離した。

誘導は、各々ホモジナイザー処理した菌糸断片またはプロトプラストをMNNG溶液で処理することによって行った。単離は、完全培地上で再生したコロニーを分離、最少培地および特定の栄養素を含む最少培地で検定することによって行った。

全部で9株の栄養要求変異株を得た。栄養要求変異株の最適誘導条件は、菌糸断片に関しては $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度MNNG・20分または40分、プロトプラストに関しては、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度MNNG・80分、致死率はいずれも90~93%であった。

4) 食用菌の栄養要求変異株の融合

栄養要求変異株のうち、タモギタケ2株およびヒラタケ2株を用いて種間融合を行った。装置については、この時点で最新の市販融合装置を、1) および2) の結果をもとに担子菌に使用可能になる様にメーカーに改造依頼し、これを使用した。

融合の結果、0.64%の種間融合率が得られた。

融合株についてのエステラーゼアイソザイム分析の結果、片方の融合親のものだけを持つものの他に、両親のバンドをあわせ持つ株が認められた。

また、CHEFパルスフィールド電気泳動による融合株の染色体分析の結果、片方の融合親の全部のバンドの他にもう一方の融合親のバンドを一本持つ株が認められた。この株は異種の染色体を核内に持つ一核菌糸であると考えられる。さらに、片方の融合親のバンドのみしか持たないにも関わらず栄養要求性を示さない融合株もあり、これらについては種間での遺伝子の組み替えによる相補が起きているものと考えられる。

融合株のなかには子実体原基を形成する株も存在した。

以上の結果、食用菌の細胞融合に必要な電氣的諸条件を具備した融合装置作製のための基礎が確立されるとともに、食用菌の細胞融合に電気融合法を用いることが有効であることが明らかとなった。

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

学 位 論 文 題 名

電気融合手法の食用菌への適用

本論文は、4章からなり、図20、表17、写真35、引用文献45を含む総頁数134の英文論文である。別に参考論文4編が添えられている。

キノコ（食用担子菌）は日本人の食卓に欠かせない食物である。キノコ栽培は日本では既に100年以上行われてきているが栽培品種の改良はもっぱら選抜と交配の方法によっている。

細胞融合による育種法は近年植物の改良で注目をあつめており、微生物である酵母については実用段階に達している。キノコは単一の細胞から子実体の形成まで誘導出来るため、細胞融合による品種改良や育種に適した生物材料である。

電気融合法は、細胞膜に電荷をあたえることによって隣り合う細胞同志を融合させようとするもので、従来のポリエチレングリコールを用いる方法に比べて細胞に対する融合剤の毒性を考慮する必要がないという利点がある。

本研究は、この電気融合法をキノコに適用することを目的として行つたものである。研究内容は以下の項目に大別される。

1) 電気融合装置の製作・検討

Dielectrophoresis法で細胞融合を行うために必要な装置として、高周波発振器、高周波増幅器、パルス発生装置、高電圧直流電源装置、融合チャンバーを作製した。

高周波発振器は2MHz、コルピッツ型のものを作製した。高周波増幅器は、A級増幅の1段階および2段階のものを作製した。

パルス発生装置はタイマICと単安定マルチバイブレータICを組み合わせて、高電圧用のスイッチングトランジスタをコントロールするものとした。

高電圧直流電源装置には、倍電圧整流回路を用いた。

一部市販の装置を組み合わせたシステムをつくり、装置の評価を行つた。

市販トランシーバを高周波発生装置として用い、パルス発生装置を組み合わせたシステムではプロトプラストを融合させることが出来た。しかしこのシステムは高周波もれが激しく、実験中に手がしびれるなど人体に害があり、改良の必要があつた。

自作高周波発振器と1段階の高周波増幅器の組み合わせでも融合がみられた。しかし、

このシステムは高周波の電圧が不足であった。単位長さ当たりの電圧をあげるために融合チャンバーの電極間隔を極端に狭くすることが必要であった。このような融合チャンバーの製作は困難を伴ったため、システムの電圧そのものを上げるための改良を行う必要が生じた。

最終的には、市販シグナルジェネレータと2段階の高周波増幅器、パルス発生装置の組み合わせで、安定した融合がみられた。

融合チャンバーの電極を白金平板、ニクロム線、かみそりの刃、ステンレス平板などで作製したが、いずれの場合も有効であった。

2) 自作融合装置の評価

安定した融合がみられたシステムで担子菌クモノスコウヤクタケの不完全世代である *Rhizoctonia solani* の栄養要求性変異株を融合させた。

5.2%の融合率が得られ、これは同一の菌株でポリエチレングリコールを用いた場合の2倍の融合率であった。これにより、担子菌に電気融合が適用可能であることと、自作の融合装置が有効に働くことが明らかになった。

3) 食用担子菌の栄養要求変異株の作製

以上の結果を食用担子菌に応用するべく、突然変異誘発剤MNNGを用いて食用担子菌ナメコ、タモギタケ、ヒラタケの栄養要求変異株を誘導・単離した。

各々の菌糸断片およびプロトプラストを用いて、全部で9株の栄養要求変異株を得た。最適誘導条件は、菌糸断片に関しては40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度MNNG・20分または40分、プロトプラストに関しては、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度MNNG・80分であった。

4) 食用担子菌の栄養要求変異株の融合

栄養要求変異株のうち、タモギタケおよびヒラタケの2株を用いて種間融合を行った。装置は、1) および2) の結果をもとにメーカーに改造を依頼した装置を用いた。

その結果、0.64%の種間融合率が得られた。

融合株についてエステラーゼアイソザイム分析およびCHEFパルスフィールド電気泳動の結果、両親のバンドをあわせ持つ株が認められた。融合株のなかには子実体原基を形成する株も存在した。

以上の結果、食用担子菌の細胞融合に必要な電氣的諸条件を具備した融合装置作製のための基礎が確立されるとともに、食用担子菌の細胞融合に電氣的融合法を用いることが有効であることが明らかとなった。

よって、審査員一同は、最終試験の結果とあわせて、本論文の提出者横野 健は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。