

ナメコニ核菌糸体からのプロトプラスト作出とその再生

高島幸司*

Preparation and Regeneration of Dikaryotic Mycelium Protoplasts form *Pholiota nameko*.

TAKABATAKE, Koji*

Various conditions for preparation and regeneration of dikaryotic mycelium protoplasts from *Pholiota nameko* were examined by using the strain Pn-8 which was isolated from the fruitbody occurred on SUGI wood (*Cryptomeria japonica*).

The components of liquid media for mycelia used to protoplast preparation and the nature of lytic enzyme system remarkably affected the yields of protoplasts. A high yield of protoplasts were obtained when the mycelium cultured on PcMY (1% polypeptone, 0.2% casaminoacid, 1% malt extract and 0.4% yeast extract) medium for 3 days was incubated with 50mM maleic acid-NaOH buffer solution (pH 5.50) containg 1% Novozyme 234, 0.1% chitinase and 0.5M mannitol at 28°C for 3 hours. The maximum yields of protoplasts, 5 ~ 6 × 10⁸ cells/g (fresh mycelium weight) were produced by the combination of these suitable conditions.

The selection of osmotic stabilizer and buffer strongly affected the plating efficiency of protoplasts. Protoplasts cultured in 50mM phosphate buffer solution (pH 5.50~6.00) containing 0.5M saccharose showed the large frequency of them. GA (2% glucose, 0.1% L-Asparagine, 500ppm MgSO₄, 460ppm KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄ and 0.1ppm Thiamine-HCl). SMY (1% saccharose, 1% malt extract and 0.4% yeast extract) and PMY (1% polypeptone, 1% malt extract and 0.4% yeast extract) gave the good frequency of protoplasts. Protoplasts which the mycelia cultured for 3~4 days were reacted with the lytic enzyme for 3 hours were suitable for the reversion of them.

When isolated protoplasts were inoculated on the regeneration medium combined with the suitable conditions, covered with soft agar (conc. 0.7%) and incubated at 24°C for 10 days, About 14.5% of them formed visible colonies.

スギに発生していたナメコ子実体を組織分離して得たPn-8系統を供試菌として、ナメコニ核菌糸体のプロトプラストの作出とプロトプラストの菌糸体への復帰におよぼす諸条件について検討した。

プロトプラストの作出には、プロトプラスト作出用菌糸体の培養培地の組成と細胞壁溶解酵素の組合せが大きく影響した。プロトプラスト作出の最適条件は次のようになった。プロトプラスト作出用菌糸体の培養培地としてPcMY培地、その期間は3日間、細胞壁溶解酵素の組成は1%ノボザイム234+0.1%キチナーゼ、緩衝液として浸透圧調節剤である0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)、酵素反応の時間は3時間となった。これら最適条件を組み合わせることにより $5 \sim 6 \times 10^6$ 個/g(生菌体重)のプロトプラストを得ることができた。浸透圧調節剤と緩衝液の選択によりプロトプラストの再生は大きな影響を受けた。プロトプラスト再生の最適条件は次のようになった。再生培地：GA, SMY, PMY培地、緩衝液：浸透圧調節剤である0.5Mサッカロースを含む50mMリン酸緩衝液(pH6.50~6.00)、プロトプラスト作出用菌糸体の培養期間：3~4日間、酵素反応時間：3時間。これらの諸条件を組み合わせるとプロトプラストを寒天重層法により培養すると接種したプロトプラスト数の14.5%がコロニーとして再生した。

1. はじめに

培養菌糸体のプロトプラストは、細胞壁が取り除かれて原形質膜で覆われた単一細胞であり、菌糸体と同様の細胞小器官を含んでいる¹⁾。プロトプラストの利用により細胞融合や形質転換が可能となったが、これら以外にキノコを育種する上でいくつかの利点がある。すなわち、プロトプラスト再生菌は単細胞由来で遺伝的に均一と考えられるので変異菌の選抜に有利であり、また、二核菌糸体をプロトプラスト化することにより一核性の再生菌を得ることが出来る²⁾。さらに、プロトプラスト再生菌の中には、元の親株より子実体収量が多くなる系統が生じる場合がある³⁾。

これまでにキノコのプロトプラストの作出に関して、約50種余りのキノコで行われており⁴⁾、主要食用キノコであるシイタケ、エノキタケ、ヒラタケ、マイタケのプロトプラストの作出およびその再生に関して詳細な検討がなされている¹⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。ナメコに関しては、一核菌糸体を供試しての詳細な報告はあるが⁹⁾、二核菌糸体による検討はあまり行われていない。

当センター林試構内でスギ材に発生しているナメコ子実体を採取した。5・6年前にスギ材に市販菌を接種し、スギ実験林内に粗放したうちに子実体が発生したものであり、植菌した系統は不明である。接種時から子実体発生時まで長期間を要し、栽培上の管理を全く行っていないので、発生したナメコ子実体はほとんど野生化し、組織分離して得た菌株(Pn-8)には、スギ材に適應する特性を有している

と考えられる。したがって、Pn-8系統をプロトプラスト化し、プロトプラストの利用を図ることにより、スギ材に適したナメコを作出する可能性が大きくなる。

そこで、本研究では、Pn-8系統を供試してプロトプラスト利用の新技術を導入できるように、ナメコ二核菌糸体からの効率的なプロトプラストの単離およびプロトプラストの菌糸体復帰への最適な条件を明らかにすることを目的とした。

なお本研究は、林野庁の「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」の助成を受けて行ったものである。

2. 実験方法

2.1 供試菌

当センター保存菌株、ナメコ *Pholiota nameko* (T.Ito) S.Ito et Imai in Imai, Pn-8系統を供試した。

2.2 プロトプラスト作出用菌糸体

GMV寒天培地で供試菌を24℃にて10日間培養して径5mmのコルクボーラーで寒天ごと打ち抜いたディスクを100ml容三角フラスコに40ml分注したSMY培地に接種して1週間24℃にて静置培養した。培養後、ホモジナイザー(日本精機製AM-7型)で10,000rpm、20秒間の条件で菌糸体を細片して菌糸体懸濁液を調製した。この懸濁液5mlを新たに用意した液体培地に接種し、数日間、24℃にて静置培養してプロトプラスト作出用菌糸体を調製した。

表-1 供試酵素
Mycolytic enzymes used.

酵 素 名 Enzyme	起 源 Source	販売, 製造会社 Supplier/Manufacture
ノボザイム234 Novozyme234	Trichoderma harzianum.	Novo Industri A/S Enzyme division
セルラーゼ "オノズカ" RS Cellulase "ONOZUKA" RS	Trichoderma viride.	Yakult Pharmaceutical Indust,co,Ltd.
ウスキザイム Usukizyme	Trichoderma sp.	Kyowa Chemicald. Products Co,Ltd.
β -グルコニターゼ β -Glucronidase	Helix pomatia.	Sigma Chemical Co.
ザイモリアーゼ20T Zymolyase 20T	Arthrobacter luteus.	Seikagaku Kogyo Co,Ltd.
キチナーゼ Chitinase	Streptomeyus griseus.	Sigma Chemical Co.
ドリセララーゼ Driselase	Irpex lacteus.	Kyowa Hakko Kogaku Co,Ltd.

表-2 供試培地の組成
The composition of medium used.

培 地 medium	組成分(W/V) composition(w/v)
PD	馬鈴薯 20%, グルコース 2% Poteto 20%, Glucose 2%,
OS	玉葱 10%, 醤油 0.05%, グルコース 0.05% Onion 10%, Soy-source 0.05%, Glucose 0.05%
GMV	グルコース 1%, 麦芽エキス 1%, 酵母エキス 0.4% Glucose 1%, Malt extract 1%, Yeast extract 0.4%
SMV	サッカロース 1%, 麦芽エキス 1%, 酵母エキス 0.4% Saccharose 1%, Malt extract 1%, Yeast extract 0.4%
PMV	ポリペプトン 1%, 麦芽エキス 1%, 酵母エキス 0.4% Polypeptone 1%, Malt extract 1%, Yeast extract 0.4%
PbMV	バクトペクトン 1%, 麦芽エキス 1%, 酵母エキス 0.4% Bactopeptone 1%, Malt extract 1%, Yeast extract 0.4%
PcMV	ポリペプトン 1%, カザミノ酸 0.02%, 麦芽エキス 1% 酵母エキス 0.04%, Polypeptone 1%, Casamino acid 0.02%, Malt extract 1%, Yeast extract 0.4%
GA	グルコース 2%, L-アスパラギン 0.02%, MgSO ₄ 500ppm KH ₂ PO ₄ 460ppm, K ₂ HPO ₄ 0.01%, チアミン塩酸塩 0.1ppm Glucose 2%, L-Asparagine 0.02%, MgSO ₄ 500ppm, KH ₂ PO ₄ 460ppm, K ₂ HPO ₄ 0.01%, Thiamine-HCl 0.1ppm,

表-3 供試した緩衝液, 浸透圧調節剤および再生培地の添加物
Variant buffer solutions, osmotic stabilizer and additives of regeneration medium used.

緩衝液 Buffer solution	浸透圧調節剤 Osmotic stabilizer	再生培地の添加物 Additive of medium
MES (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid)	グルコース Glucose	N-アセチルグルコサミン N-Acetyl-glucosamine
コハク酸 Succinic acid	サッカロース Saccharose	リグニンスルホン酸塩 Lignin sulfonate
リン酸 Phosphote acid	マンニット Mannitol	(Vanilex HW, Vnilex N: . 山陽国策パルプ製)
マレイン酸 Maleic acid	イノシトール Inositol ソルビトール Sorbitol MgSO ₄ CaCl ₂ KCl NaCl	ポリビニルピロリドン Polyvinylpyrrolidone

2.3 プロトプラストの作出

キノコ類のプロトプラストを作出するにあたって、細胞壁を溶解する酵素の決定が最も重要である²⁴⁾。そこで、ナメコに有効であると思われる7種類の酵素を選んだ(表-1)。それらの酵素を単独あるいは混合して15組の酵素系を作り、ナメコのプロトプラスト作出に与える影響を大政ら⁷⁾の方法に準拠して行った。すなわち、プロトプラスト作出用菌糸体をナイロンメッシュ(孔径150 μ)で濾過して集菌し、0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)緩衝液で洗浄し、生菌体重100mg当り酵素反応液(0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)緩衝液に細胞壁溶解酵素を溶かし込んで調製)1mlを混合して、28 $^{\circ}$ Cで3時間、振盪培養(振幅35mm, 80往復/分)した。酵素反応液をミラクロスで濾過して細胞壁未分解の断片を除去した後、濾液中のプロトプラストの数をトーマ氏血球計算盤を用いて計数した。

次に、プロトプラストの作出に影響を与える条件として、プロトプラスト作出用菌糸体の培養培地の種類(表-2)、緩衝液のpH、緩衝液の種類(表-3)、浸透圧調節剤の濃度、浸透圧調節剤の種類(表-3)、プロトプラスト作出用菌糸体の培養令、酵素の反応

時間を順次検討していった。ただし、酵素は最もプロトプラストの作出数が多かった酵素系を使用した。プロトプラストの作出数に影響を与える一つの条件を検討する際に、その他の条件は上記と全く同じとした。

2.4 プロトプラストの再生

プロトプラストの再生についても大政ら⁷⁾の方法に準拠して検討した。ミラクロスで濾過したプロトプラストを含む酵素液を遠心処理(500 \times g, 5分間)してプロトプラストを得た。得られたプロトプラストは、0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)緩衝液で前述と同様の遠心処理を2回繰り返して洗浄し、精製プロトプラストとした。

0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH6.00)緩衝液で調製した寒天濃度2%のプロトプラスト再生用培地(以下、再生培地とする)10mlを径90mmのシャーレに分注して下層培地とした。下層培地上に精製プロトプラストを約 2×10^5 個/mlの濃度に0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)緩衝液で希釈したプロトプラスト浮遊液0.1mlを接種し、さらにその上に43 $^{\circ}$ Cに加温融解した寒天濃度0.7%の下層培地と同組成の再生培地10mlを流し込むことによってプロトプラストを重ねた(以

下、寒天重層法とする)。菌糸断片の混入程度をみるために再生培地より浸透圧調節剤を除いた培地で同様にプロトプラストを培養した。24℃、10日間培養して出現したコロニー数を測定し、プロトプラストの再生率を次式で算出した。

$$\text{再生率 (\%)} = (a-b)/c \times 100$$

a : 再生培地に出現したコロニー数

b : 再生培地より浸透圧調節剤を除いた培地より出現したコロニー数

c : 接種したプロトプラスト数

プロトプラストの再生に影響を与える条件として、再生培地の種類(表-2)、緩衝液のpH、緩衝液の種類(表-3)、浸透圧調節剤の濃度、浸透圧調節剤の種類(表-3)、プロトプラスト作出用菌糸体の培養令、再生培地の添加物(表-3)を順次検討していった。プロトプラスト再生に影響を与えるある一つの条件を検討する際に、その他の条件は上記と全く同じとした。

2.5 プロトプラストの接種方法

プロトプラストの接種方法として、2.4に示した寒天重層法以外に次の4方法を試みた。

直接接種法：径90mmのシャーレに寒天濃度1.5%の再生培地20mlを分注し、培地上にプロトプラスト浮遊液0.1mlを接種する方法。

緩衝液混合法：寒天濃度1.5%の再生培地上にプロトプラスト浮遊液0.1mlを接種したのちに0.6mlの浸透圧調節剤を含む緩衝液(0.5Mマンニットを含む50mMマレイン酸-NaOH (pH5.50))を添加してプロトプラストと緩衝液を混合させる方法。

コンラージ棒-直接接種法：寒天濃度1.5%の再生培地上にプロトプラスト浮遊液0.1mlを接種したのちにコンラージ棒でプロトプラスト液をシャーレ全体に展開させる方法。

コンラージ棒-緩衝液混合法：緩衝液混合法においてプロトプラストと緩衝液を混合させたのち、混合液をコンラージ棒でシャーレ全体に展開させる方法。

3. 結果および考察

3.1 プロトプラストの作出

市販酵素7種類を使用して単独あるいは混合してプロトプラスト作出に及ぼす酵素組成の影響について検討した。その結果を表-4に示した。単独使用

では1%ノボザイム234が 1.94×10^8 個/g、1%ウスキサザイムが 1.72×10^8 個/gとそれぞれ比較的良好な作出数を示した。単独で酵素を使用するよりも複数の酵素を組み合わせた方がプロトプラストの数は多くなる傾向にあった。1%ノボザイム234と0.1%キチナーゼを組合せた系では特に、 5.10×10^8 個/gと最も多くプロトプラストが作出された。

スエヒロタケの細胞壁は、R-グルカン、S-グルカン、キチンより構成されており、細胞壁を溶解す

表-4 ナメコ二核菌糸体のプロトプラスト作出に及ぼす酵素組成の影響

Effects of different enzymes in their effectiveness to release protoplasts from dikaryotic mycelium of *P. nameko*.

酵素の組合せ Enzyme combination	プロトプラスト数 Number of protoplasts ($\times 10^8$ /g fresh weight)
N 1%	1.94
Ce 2%	0.04
U 1%	1.72
β -Gl 0.1ml/ml	0.08
Z 1%	0.06
D 2%	0.04
N 1%+Ch 0.1%	5.10
N 1%+ β -Gl 0.1ml/ml	1.94
N 1%+Ce 1%	2.70
N 1%+Ce 0.5%+U 0.5%	1.28
N 1%+Z 0.5%+U 0.5%	2.04
Ce 2%+ β -Gl 0.05ml/ml +U 1%	0.04
D 2%+Ce 2%+U 1%	0.06
D 2%+Ce 1%+Z 1%	0.02
Ce 2%+Ch 0.1%+Z 1%	0.08

注) N:ノボザイム234, Ce:セルラーゼ"オノヅカ"RS, U:ウスキサザイム β -Gl: β -グルコニダーゼ, Z:ザイモリアーゼ20T, D:ドリセラゼ Ch:キチナーゼ
プロトプラスト作出用菌糸体は、PcMY培地で、24℃にて3日間静置培養した。

プロトプラストの作出を次の条件で行った。

緩衝液:50mMマレイン酸-NaOH (pH5.50)

浸透圧調節剤:0.5Mマンニット

酵素反応時間:3時間

N:Novozyme234, Ce:Cellulase"ONOZUKA"RS, U:Usukizyme

β -Gl: β -Glucuronidase, Z:Zymolase 20T, D:Driselase

Ch:Chitinase

Mycelia used to protoplast preparation were statically cultured in PcMY medium for 3 days at 24℃. The conditions for protoplast preparation were as follows. Buffer:50mM maleic acid-NaOH (pH 5.50), Osmotic stabilizer:0.5M mannitol, Enzyme reaction time:3 hours.

るにはβ-グルカナナーゼ、α-グルカナナーゼ、キチナーゼの活性を有する酵素が必要であるとされている¹¹⁾。また、一般にキノコのプロトプラストを作出するには複数の酵素を混合した方が有効であり²⁴⁾、また*Coprinus cinereus*に対しては市販の単品酵素を組み合わせるよりも*Trichoderma harzianum*を培養して得た粗酵素の方が有効であると報告されている¹²⁾。ナメコ菌糸体の細胞壁も内層、外層、粘質層と多層より構成されているので¹³⁾、プロトプラストを作出するには複数の酵素活性が必要となり、複数の酵素を組み合わせた系でプロトプラストの数が多くなったと考えられる。ナメコ一核菌糸体のプロトプラスト作出には、ノボザイム234とキチナーゼの混合酵素が有効であると報告されており⁹⁾、二核菌糸体を供試した本実験の結果と符合した。したがって、ナメコの一核菌糸体と二核菌糸体の細胞壁の組成には大差がないものと推察される。これより以下の実験では、最も作出数の多かった1%ノボザイム234+0.1%キチナーゼの酵素系を使用した。

プロトプラスト作出用菌糸体を培養する培地の組成が作出に及ぼす影響について検討した。その結果を表-3に示した。PcMY培地で培養した場合 5.67×10^8 個/gと最も多く作出し、次いでSMY培地の 4.08×10^8 個/g、PMY培地の 3.92×10^8 個/gであった。ところが、PD培地では作出数がきわめて少なくなった。このことは、PS(馬鈴薯・サッカロース)培地で*Alternaria kikuchiana*, *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium*を培養すると細胞壁にメラニン等の色素沈着を起こして細胞壁に酵素耐性が生じて菌糸体よりプロトプラストが得にくくなる¹⁴⁾という結果と符合した。また、供試培地によるプロトプラスト作出数の相違は、培地組成が異なると微妙に細胞壁の構成成分やその割合に違いが生じることを示唆している。

緩衝液のpHおよび種類、浸透圧調節剤の濃度を変化させて、それぞれのプロトプラスト作出におよぼす影響を検討し、その結果を図-1~3に示した。pHは5.5が 5.23×10^8 個/gと最も多くプロトプラストを作出し、5.5より離れるに従って減少した。

緩衝液は、マレイン酸が 5.15×10^8 個/gと最も多く作出し、リン酸、コハク酸、MESはそれぞれマレイン酸の70%、50%以下、30%以下の作出数にとどま

表-5 ナメコ二核菌糸体のプロトプラスト作出に及ぼす培地組成の影響

Effects of various media in their effectiveness to release protoplasts from dikaryotic mycelium of *P. nameko*.

培地 Medium	プロトプラスト数 Number of protoplasts ($\times 10^8$ /g fresh weight)
PD	0.68
OS	1.62
GMV	2.78
SMY	4.08
PMY	3.92
PbMY	1.22
PcMY	5.67
GA	3.33

注) プロトプラスト作出用菌糸体は、24℃にて3日間培養した。プロトプラスト作出は次の条件で行った。

細胞壁溶解酵素の組成: 1%ノボザイム+0.1%キチナーゼ
緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH (pH5.50)
浸透圧調節剤: 0.5Mマンニト
酵素反応時間: 3時間

Mycelia used to protoplast preparation were statically cultured in each medium tested for 3 days at 24℃.

The conditions for protoplast preparation were as follows.

Enzyme combination: 1% Novozyme+0.1% chitinase.

Buffer: 50mM maleic acid-NaOH (pH 5.50)

Osmotic stabilizer: 0.5M mannitol.

Enzyme reaction time: 3 hours.

った。

浸透圧調節剤の濃度は、0.5Mが 5.25×10^8 個/gと最も多く作出し、次いで0.6~0.7Mとなった。0.3~0.4Mで培養した場合、プロトプラストのバーストが観察され、作出過程でのバーストにより作出数が低下したと推察される。

プロトプラスト作出に及ぼす浸透圧調節剤の影響を検討し、その結果を図-4に示した。マンニトが 5.17×10^8 個/gと最も多く作出し、次いでグルコースが 4.63×10^8 個/gと良好な作出を示した。サケツバタケ¹⁵⁾ではMgSO₄が、キクラゲ・アラゲキクラゲ¹⁶⁾やスエヒロタケ¹¹⁾ではMgSO₄・KClが最も有効であるが、ナメコでは、それらは中庸な結果となった。

プロトプラスト作出におよぼす作出用菌糸体の培養期間の影響を検討したところ、3日間が最適となり5日間以降になると急激に作出数が低下した(図-

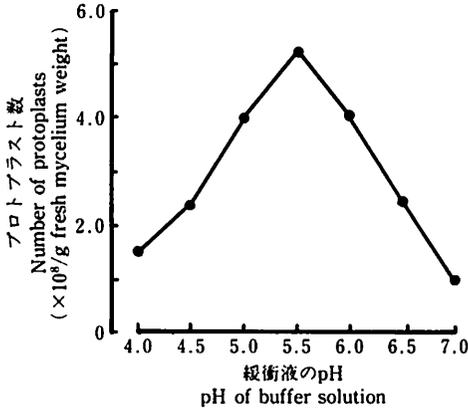


図-1 プロトプラスト作出に及ぼすpHの影響
Effects of pH of buffer solution on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、表-4と同様である。プロトプラスト作出の条件は、緩衝液のpHを除いて表-5と同様である。The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4. The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5, except pH of buffer solution.

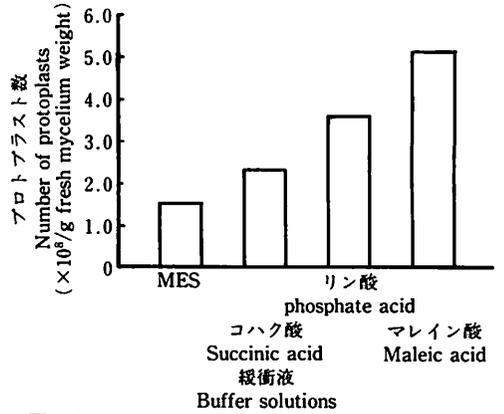


図-2 プロトプラスト作出に及ぼす緩衝液の影響
Effects of various buffer solutions on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、表-4と同様である。プロトプラスト作出の条件は、緩衝液(マレイン酸)を除いて表-5と同様である。The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4. The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5 except Buffer solution (maleic acid).

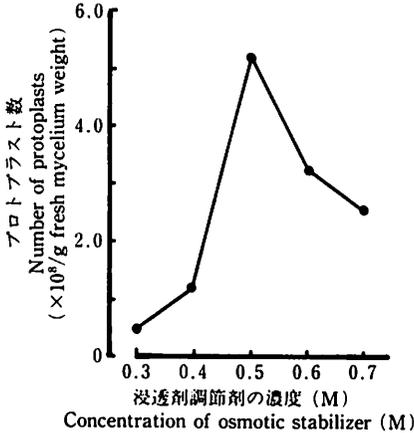


図-3 プロトプラスト作出に及ぼす浸透圧調節剤の濃度の影響
Effects of different concentrations of mannitol in buffer solution for protoplasts preparation on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、表-4と同様である。プロトプラスト作出の条件は、浸透圧調節剤を除いて表-5と同様である。The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4. The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5 except concentration of osmotic stabilizer.

5)。このことは、若令菌糸体では細胞壁が完全に形成されていないためプロトプラストが形成され易く、培養時間が長くなると堅固に細胞壁が形成されて酵素耐性が生じるために作出され難くなったと推察される。

酵素反応時間の影響について検討し、その結果を図-6に示した。使用する酵素により最適反応時間は異なってくると考えられるが、本実験に供試した酵素系では3時間が最適となった。4時間以降では過反応現象であるバーストしたプロトプラストの細片が多く観察された。

以上、プロトプラストの作出に及ぼす数種条件を検討した結果、好適な条件は次のようになった。細胞壁溶解酵素の組成：1%ノボザイム234+0.1%キチナーゼ、プロトプラスト作出用菌糸体の培地：PcMY培地、プロトプラスト作出用菌糸体の培養期間：3日間、緩衝液：50mMマレイン酸-NaOH (pH5.50)、浸透圧調節剤：0.5Mマンニット。

これら作出の好適な諸条件を組み合わせることで、 $5 \sim 6 \times 10^8$ 個/g(生菌体重)のプロトプラストを得ることができた。

3.2 プロトプラストの再生

再生培地の組成がプロトプラスト再生におよぼす影響について検討した。その結果を図-7に示した。

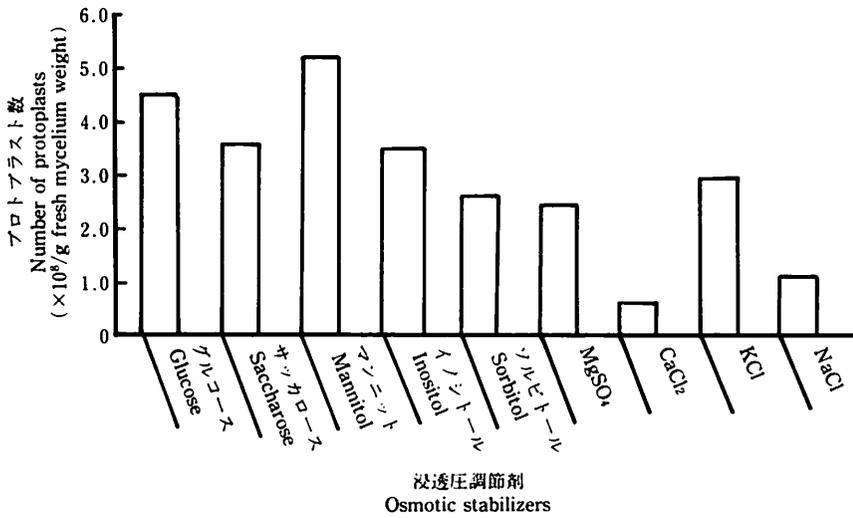


図-4 プロトプラスト作出に及ぼす浸透圧調節剤の影響

Effects of various osmotic stabilizers on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、表-4と同様である。
 プロトプラスト作出の条件は、浸透圧調節剤 (0.5Mマンニット) を除いて表-5と同様である。
 NaClとKClの濃度: 0.25M、他の浸透圧調節剤の濃度: 0.5M
 The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4. The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5 except Osmotic stabilizer (0.5M mannitol).
 NaCl, KCl: 0.25M, the other stabilizers: 0.5M

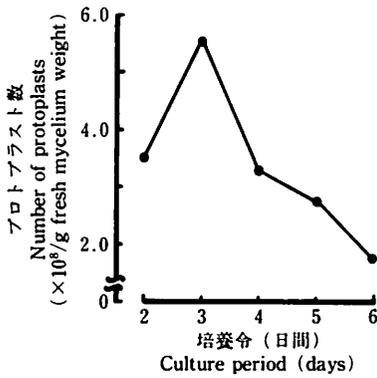


図-5 プロトプラスト作出に及ぼす培養令の影響
 Effects of culture period on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、培養令を除いて表-4と同様である。
 プロトプラスト作出の条件は、表-5と同様である。
 The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4 except culture period.
 The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5.

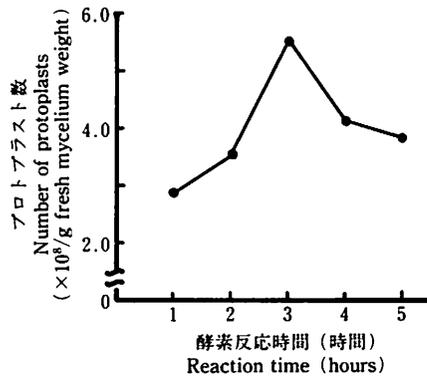


図-6 プロトプラスト作出に及ぼす酵素反応時間の影響
 Effects of reaction time on the release of protoplasts from dikaryonic mycelium of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件は、表-4と同様である。
 プロトプラスト作出の条件は、酵素反応時間を除いて表-5と同様である。
 The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation were the same as Table-4. The conditions of protoplast preparation were the same as Table-5 except Enzyme reaction time.

GA, SMY, PMY培地は0.60%前後の再生率を示したのに対し、GMY, PcMY培地はそれらの培地よりも劣った0.4%前後の再生率となった。以下の実験では、培地調製が簡便で再生率が良好なSMY培地を供試した。

再生培地の調製に供試する緩衝液のpHおよび浸透圧調節剤の濃度を変えて、それぞれの影響を検討し、その結果を図-8~9に示した。再生に好適なpH域は5.5~6.0となり、その再生率は0.63~0.66%となった。ヒラタケ、キクラゲ、アラゲキクラゲでは、pHが中性に近づくにしたがって再生率が向上するようであるが¹¹⁰⁾、本実験では、好適なpH域から外れると極端に再生率が低下しpH5.0で0.23%、pH6.5で0.03%となった。ナメコ核菌糸体由来のプロトプラストでは、pH5.0~7.0で安定な再生率を示すのに対し、本菌では再生の好適なpH域が狭くなった。このことは、一核菌糸体と二核菌糸体の相違によるのか、菌株系統やプロトプラストの作出・再生条件の相違によるのか判然とせず、明らかにするにはさらに詳細な検討が必要である。浸透圧調節剤の濃度は0.5Mで最も良好な再生率を示し、0.5Mから外れるに従い低下した。

プロトプラスト作出の酵素反応時間と再生率との関係を検討したところ、酵素反応時間3時間で0.66%と最も良好な再生率を示し、反応時間4時間、5時間では、反応時間3時間の2/3、1/3以下の再生率となった(図-10)。このことは、過度にプロトプラストを細胞壁溶解酵素で反応させた場合、細胞膜にダメージを与えることになり、プロトプラストの再生に悪影響をおよぼしたためと推察される。

プロトプラスト作出用菌糸体の培養期間と再生率との関係を検討したところ、培養期間3~4日間で0.6%余りとなり、良好な再生率を示した(図-11)。プロトプラスト作出の効率をも考え合わせるとプロトプラスト作出用菌糸体の培養期間を3日間とすることが適切であると考えられる。

緩衝液の種類とプロトプラスト再生との関係を検討したところ、リン酸が2.30%と最も良好な再生率を示し、次いでMESが2.03%となった。コハク酸、マレイン酸はリン酸の1/3、1/4余りの再生率にとどまり、緩衝液の種類により再生率に大きな開きが生じた(図-12)。

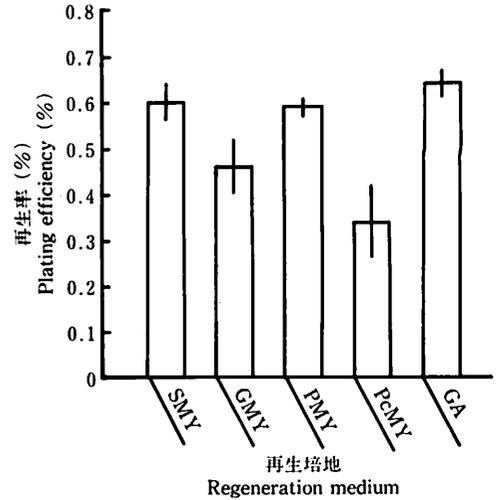


図-7 プロトプラスト再生に及ぼす再生培地の影響
Effects of different regenerated media on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体は、PcMY培地で、24℃にて3日間静置培養した。

プロトプラストの作出を次の条件で行った。

細胞壁溶解酵素の組合せ: 1%ノボザイム234+0.1%キチナーゼ

緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH(pH5.50)

浸透圧調節剤: 0.5Mマンニット、酵素反応時間: 3時間

プロトプラストの再生を次の条件で行った。

緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH(pH6.00)

浸透圧調節剤: 0.5Mマンニット

Mycelia used to protoplast preparation were statically cultured in PcMY medium for 3 days at 24℃. The conditions for protoplast preparation were as follows.

Enzyme combination: 1% Novozyme+0.1% chitinase.

Buffer: 50mM maleic acid-NaOH(pH 5.50). Osmotic stabilizer: 0.5M mannitol. Enzyme reaction time: 3 hours.

The conditions for protoplast regeneration were as follows.

Buffer: 50mM maleic acid-NaOH(pH 6.00). Osmotic stabilizer: 0.5M mannitol.

浸透圧調節剤の種類とプロトプラスト再生との関係を検討し、その結果を図-13に示した。サッカロースが最も良好な再生率を示し5.03%となった。次いで、イノシトールが1.94%、マンニット、グルコース、ソルビトールが0.50~0.65%の再生率を示した。サッカロースは供試した浸透圧調節剤の中では極めて高い再生率を示し、マンニットの8倍近くの再生率を示した。ヒラタケではMgSO₄・KClで、アラゲキクラゲ・キクラゲではMgSO₄で高い再生率を示すようであるが⁷¹¹⁰⁾、本菌では、無機塩類はいずれもプロトプラストの再生に適しておらず、CaCl₂, KCl, NaClではコロニーの形成が全く確認されなかった。

再生培地中へのN-アセチルグルコサミン(NAG)、リグニン関連物質、ポリビニルピロリドン(PVP)の添加がプロトプラストの再生に有効であることが

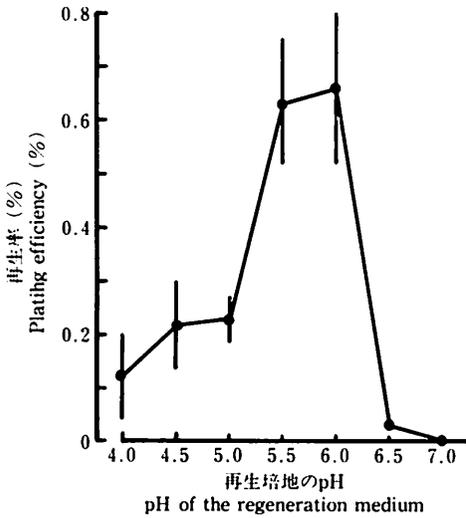


図-8 プロトプラスト再生に及ぼすpHの影響
Effects of pH in the regeneration medium on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は図-7と同様である。
プロトプラスト再生を次の条件で行った。
再生培地: SMY培地、緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH
浸透圧調節剤: 0.5Mマンニット
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7. The conditions for protoplast regeneration were as follows.
Regeneration medium: SMY medium. Buffer: 50mM maleic acid-NaOH.
Osmotic stabilizer: 0.5M mannitol

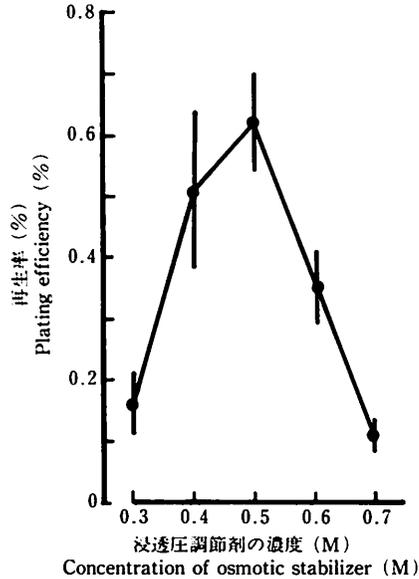


図-9 プロトプラスト再生に及ぼす浸透圧調節剤の濃度の影響

Effects of the concentration of osmotic stabilizer in the regeneration medium on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、図-7と同様である。
プロトプラスト再生を次の条件で行った。
再生培地: SMY培地、緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH (pH6.00)
浸透圧調節剤: マンニット
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7. The conditions for protoplast regeneration were as follows.
Regeneration medium: SMY medium. Buffer: 50mM maleic acid-NaOH (pH6.00).
Osmotic stabilizer: mannitol.

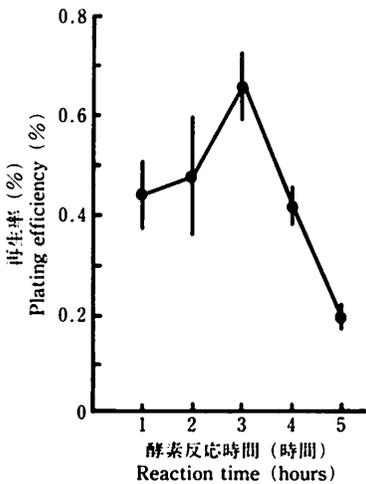


図-10 プロトプラスト再生に及ぼす酵素反応時間の影響

Effects of the reaction time on protoplast reversion of the *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、酵素反応時間を除いて図-7と同様である。
プロトプラスト再生を次の条件で行った。
再生培地: SMY培地、緩衝液: 50mMマレイン酸-NaOH (pH6.00)
浸透圧調節剤: 0.5Mマンニット
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7 except enzyme reaction time.
The conditions for protoplast regeneration were as follows.
Regeneration medium: SMY medium. Buffer: 50mM maleic acid-NaOH (pH6.00).
Osmotic stabilizer: 0.5M mannitol

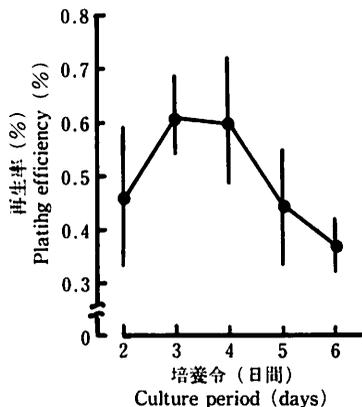


図-11 プロトプラスト再生に及ぼす培養令の影響
Effects of the culture period on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、プロトプラスト作出用菌糸体の培養令を除いて図-7と同様である。プロトプラスト再生条件は、図-10と同様である。
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7 except culture period of mycelia used to protoplast preparation. The conditions for protoplast regeneration were the same as Fig. 10.

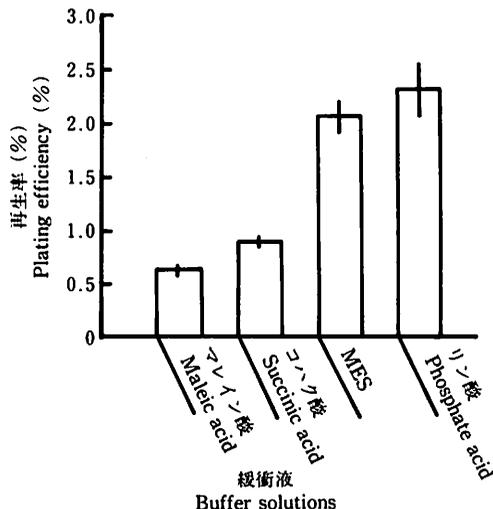


図-12 プロトプラスト再生に及ぼす緩衝液の影響
Effects of different buffer solutions on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、図-7と同様である。プロトプラスト再生条件は、緩衝液を除いて図-10と同様である。
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7. The conditions for protoplast regeneration were the same as Fig. 10 except Buffer solution.

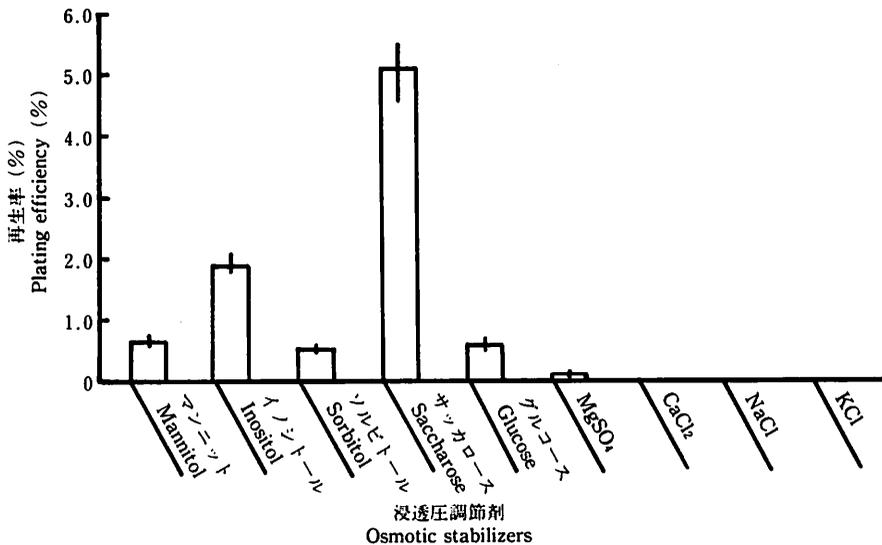


図-13 プロトプラスト再生に及ぼす浸透圧調節剤の影響
Effects of different osmotic stabilizers in the regeneration medium on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出用菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、図-7と同様である。プロトプラスト再生条件は、浸透圧調節剤を除いて図-10と同様である。
NaClとKClの濃度: 0.25M、他の浸透圧調節剤の濃度: 0.5M
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7. The conditions for protoplast regeneration were the same as Fig. 10 except Osmotic stabilizer. NaCl, KCl: 0.25M, the other stabilizers: 0.5M

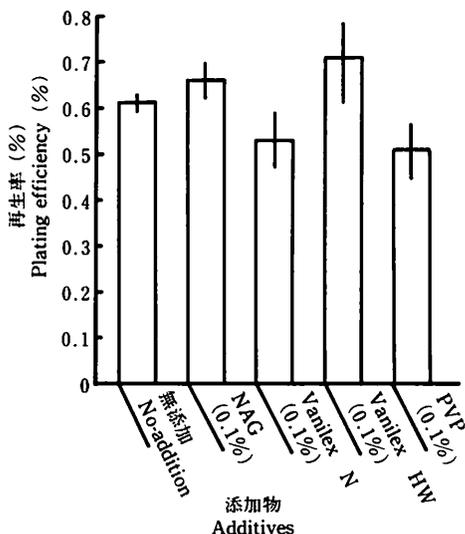


図-14 プロトプラスト再生に及ぼす再生培地への添加物の影響

Effects of different reagents in the regeneration medium on protoplast reversion of *P. nameko*.

注) プロトプラスト作出菌糸体の培養条件及びプロトプラスト作出の条件は、図-7と同様である。

プロトプラスト再生条件は、図-10と同様である。
The incubation conditions of mycelia used to protoplast preparation and the conditions of protoplast preparation were the same as Fig. 7. The conditions for protoplast regeneration were the same as Fig. 10.

報告されている⁶⁾¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。そこで、NAG 0.1%、リグニン関連物質としてリグニンスルホン酸塩 (山陽国策パルプ製)である Vanilex HW 0.1%、Vanilex N 0.1%、PVP 1%を再生培地に添加して再生に及ぼす影響について検討し、その結果を図-14に示した。無添加の再生率0.6%に対し、NAG、Vanilex HWの添加により、無添加の8~16%の促進効果が認められた。NAGは細胞壁の構成成分であり、リグニンスルホン酸塩は食用キノコ菌糸体の生育に促進作用をもたらす¹⁹⁾。したがって、それぞれは、プロトプラストの再生の細胞壁形成に関与し、その結果コロニーの形成を促したと推察される。

以上、ナメコプロトプラストの再生に及ぼす数種の要因について検討したところ、好適な条件は次のようになった。

再生培地: GA, SMY, PMY培地, 緩衝液: 50mMリン酸, pH6.00, 浸透圧調節剤: 0.5Mサッカロース, プロトプラスト作出菌糸体の培養期間: 3日

表-6 プロトプラスト再生に及ぼす接種方法の影響
Effects of plating methods on protoplast reversion of *P. nameko*.

接種方法 ¹⁾ Plating method	再生率 ²⁾ (%) Plating efficiency
寒天重層法 Agar duple layer	14.50±0.45
直接接種 Direct plating	8.18±0.77
緩衝液混合 Buffer mixture	9.33±0.55
コンラージ棒 (直接接種) Spreader (direct plating)	8.20±0.81
コンラージ棒 (Buffer混合) Spreader(buffer mixture)	7.35±0.95

- 1) 寒天重層法: 下層培地上に0.1ml接種し、上層培地を注入
直接接種: 培地上に0.1ml直接接種
緩衝液混合: 接種後、0.6ml Bufferを添加
コンラージ棒: コンラージ棒で展開
Agar duple layer: Plating protoplasts (0.1ml) on the lower medium and overlaid with soft-agar.
Direct plating: Direct plating protoplasts (0.1ml) on the medium.
Buffer mixture: Plating the mixture of protoplasts (0.1ml) and buffer solution (0.6ml) on the medium.
Spreader (direct plating): Direct Plating protoplasts (0.1ml) on the medium and spreading with spreader, glass bar.
Spreader (buffer mixture): Plating the mixture of protoplasts (0.1ml) and buffer solution (0.6ml) and spreading with spreader, glass bar.
- 2) 平均値±標準誤差
Average±Standard error.

間。これらの諸条件の内、特に緩衝液と浸透圧調節剤の選択が、再生率に大きな影響をもたらした。

3.3 プロトプラストの接種方法

3.1および3.2で示した最適条件によりプロトプラストを作出・再生させてプロトプラストの接種方法について検討した。なお、再生培地としてSMY培地を供試し、その結果を表-6に示した。

寒天重層法が最も有効な接種方法となり、14.5%と高い再生率を示した。他の方法は、寒天重層法の1/2~2/3の再生率にとどまり、また、接種にはコンラージ棒を使用しない方が好ましい結果となった。これらのことは、プロトプラストはデリケートな細胞膜のみで覆われているので、ほんの少しの物理的刺激によってもプロトプラストを損傷して再

生に悪影響をおよぼすことを示唆している。寒天重層法は、上層培地でプロトプラストを攪拌しながらシャーレ全体にゆきわたらせて寒天中に埋設するので、プロトプラストに余分な刺激を与えずに寒天でプロトプラストを被覆保護することとなって良好な再生をもたらしたと推察される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なご指導とご教示をいただいた農林水産省森林総合研究所きのこ科長 大政正武氏に、供試菌の採取に協力していただいた富山県林業技術センター林業試験場主任研究員 安田 洋氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) USHIYAMA.R.and Y.NAKAI : Protoplasts of shitake *Lentinus edodes* (BERK.) SING, Rept.Tottori.Mycol.Inst.,15,1-5 (1977)
- 2) 大政正武：キノコの品種改良の新しい流れ, 微生物, 2,611-618 (1986)
- 3) MAGAE.Y.,et all : Fruiting body formation from regenerated mycelium of *Plerotus ostreatus* protoplasts,APPL.ENVIRON.MICROBIOL.,49 (2), 441-442 (1985)
- 4) 大政正武：“バイオテクノロジーと農業技術”, キノコの育種と細胞融合の可能性, 農耕および園芸, 60, 養賢堂, 121-125 (1985)
- 5) TOYODA.H.,et all : Preparation and cell wall regeneration of protoplasts of *Lentinus edodes*,Mem.Fac.Agr.Kinki.Univ.17, 121-130 (1984)
- 6) KAWASUMI.T.,et all : High yield preparation of *Lentinus edodes* (Shitake) protoplasts with regeneration capacity and mating type stability, Agri.Biol.Chem., 51 (6), 1649-1656 (1987)
- 7) OHMASA.M., et all : Preparation and culture of protoplasts of some japanese cultivated mushrooms,Bull,For&For.Prod.Res. Inst., 343, 155-170 (1987)
- 8) 江口文陽ほか 3名：食用きのこ類のプロトプラストの調製とその再生, 木材誌, 36 (3), 232-240 (1990)
- 9) 前田好之ほか 3名：ナメコのプロトプラストの作出とその再生, 菌草研報, 26,55-64 (1988)
- 10) 山田 理ほか 3名：エノキタケおよびヒラタケのプロトプラストの調製とその再生, 日食工誌, 30 (9), 495-500 (1983)
- 11) O.H.H.DE.VRIES and J.G.H.WESSELS : Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichorema viride*,Journal of General Microbiology, 73,13-22 (1972)
- 12) KITAMOTO.Y.,et all:High-productivity protoplasting and reversion of protoplasts in *Coprinus cinereus* with a single preparation of lytic enzyme from *Trichoderma harzianum*,Trans.Mycol.Soc.Japan.,28, 217-227 (1987)
- 13) ARITA.I.,Cytological Studies on *Pholiota*, Rept.Tottori.Mycol.Inst.,17,1-118 (1979)
- 14) 久能 均：真菌プロトプラストとその応用, 日菌報, 24, 341-356 (1983)
- 15) 岩原正宣ほか 4名：サケツバタケのプロトプラスト化とその再生, 農芸誌, 61 (9), 1093-1600 (1987)
- 16) SUNAGAWA.M.,et all:Isolation and reversion of protoplasts of *Auricularia auricula-judae* and *Auricularia polytricha*,Mokuzai Gakkaishi, 35 (12), 1131-1138 (1989)
- 17) 木内信行：ヤナギマツタケ培養二核菌糸体からのプロトプラストの遊離および菌糸復帰, 神奈川県林試研報, 17,11-22 (1990)
- 18) YANAGI.O.S.,et all:Conditions for isolation of and colony formation by mycelial protoplasts of *Coprinus macrorhizus*,Agri.Biol.Chem.,49 (1), 171-179 (1985)
- 19) 越島哲夫：食用きのこの生育促進, 醸協誌, 79 (12), 851-856 (1984)