

食用きのこ類の品種改良に関する研究 (第3報)

—細胞融合菌株の作出とDNA解析の試み—

1991年度～1995年度 (県単)

加藤龍一 門屋 健

要 旨

ヤナギマツタケとカオリヒラタケの2核菌糸各々からプロトプラストを単離し、ポリエチレングリコールで融合させた。融合処理した菌糸及び、親株のプロトプラスト再生菌からDNAを抽出し、制限酵素 (BamH1) で処理後アガロース電気泳動法で分画、サザンハイブリダイゼーション法で泳動像を得た。この結果、融合菌と親株との間には、バンドのパターンに明らかな違いがみられた。これらの結果から、融合処理で新菌株が作出されたと推察された。

I. はじめに

キノコの品種や菌株の違いを判別する1つの方法として、DNAによる解析法が有効であることはこれまでの試験結果から予測されてきた。

この解析方法は、RFLP (制限酵素断片長多型) といわれ、品種改良や新系統作出の判定に際し、従来の培養や栽培特性、対峙培養やアイソザイム分析等の手法を補うものとして威力を発揮すると思われた。

そこで今回は、まず、2種類の異なるキノコからそれぞれのプロトプラストを単離し、両者のプロトプラストをポリエチレングリコールを用いて融合させた。次に、融合細胞を寒天培地に移し、再生 (発菌) したコロニーをさらに液体培地で培養した。DNAの解析は、これら液体培養の菌糸体からDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーション法により解析し、親株の2種類の解析像との比較を試みた。

II. 試験方法

〈対象としたキノコ (親株)〉

1. ヤナギマツタケ (*Agrocybe cylindracea*)

2. カオリヒラタケ (*Pleurotus eryngii*)

〈プロトプラストの調製〉

1. 試験管内の斜面培地 (1.5% - PDA培地: ポテト・デキストロース・寒天培地) に親株からの菌糸を移し、23℃で培養し、菌糸が全面に蔓延した状態でした。(約7日)
2. 試験管内の蔓延した菌糸に、以下の液体培地を10 ml加え、白金耳で寒天表面の菌糸をかきとりながらよく遠中に懸濁させた。

(液体栽培地 - MYPG培地 - の組成)

0.6% - 麦芽エキス (M)

0.4% - 酵母エキス (Y)

0.4% - ペプトン (P)

0.4% - グルコース (G)

3. 120 μのナイロンメッシュで菌糸の懸濁液を濾過し、上記と同じ組成の液体培地に移しかえ、4日前後培養した。

液容量は、100 mlフラスコに30 ml。

4. 酵素、緩衝液 (浸透圧調整液 + pH調整液) を以下の処方で調整した。

(酵素の組成)

2.0% - セルラーゼ・オノズカRS

0.2% - キチナーゼ

0.2% - β -グルクロニダーゼ

0.1% - ザイモリアーゼ 100 T

(浸透圧調整液: 1 M - マンニトール)

200 ml の脱イオン水に 36.4 g を 100 ml の脱イオン水に溶かし、1 N の水酸化ナトリウム (NaOH) を加え (約 40 ml)、pH 5.5 に調整後、200 ml になるまで脱イオン水を加えた。

5. 細胞壁溶解酵素液をよく混合 (約 10 分) した後、4000 rpm、10 分間遠心し、上清を試験管に移し、使用時まで、-20°C に冷凍保存した。

(細胞壁分解酵素液の組成)

各 (%) - 酵素 (濾過滅菌済)

20 ml - 浸透圧調整液

10 ml - pH 調整液

10 ml - 脱イオン水

6. 液体培養で培養した菌糸(2)をシャーレに取り出し水分を軽く絞り、生重量を測る。

菌糸を試験管に移し、酵素液(4)を加え (菌糸生産量 150 mg 当たり 1 ml) 充分混和し菌糸を酵素液になじませた。

7. 試験管を恒温振とう機に移して、80 ストローク/分、30°C、2~3 時間処理し反応させた。処理の途中で 20 分おきに試験管を攪はんし、酵素反応を促進させた。

8. 上記の処理時間中に、プロトプラストの希釈液、培養用の最少シャーレ寒天培地、洗浄液及び融合液を調整した。

希釈液 - 0.5 M サッカロース

(最少シャーレ寒天培地の組成)

脱イオン水 100 ml 中

50 mg - 硫酸マグネシウム

50 mg - リン酸水素 1 カリウム

100 mg - リン酸水素 2 カリウム

150 mg - リン酸水素 2 アンモニウム

50 μ l - チアミン (2.5 mg / 10 ml)

2 g - グルコース

2 g - 寒天

10 mg - 栄養要求物質 (チアミン等)

(洗浄液の組成)

10 ml - 浸透圧調整液: (1 M - マンニトール)

5 ml - pH 調整液: (200 mM マイレイン酸 - pH 5.5)

5 ml - 脱イオン水

(融合液の組成)

25 ml - pH 調整液: (200 mM マイレイン酸 - pH 5.5)

10 ml - 塩化カルシウム

3.0 g - ポリエチレングリコール

(PEG-4000)

9. 恒温処理後の懸濁液を、60 μ のナイロンメッシュで濾過し、プロトプラストを得た。

<プロトプラストの融合処理>

1. 血球計算盤で得られたプロトプラストを少量ずつ数回に分けて数量を計測し、これらの平均値を基に、両キノコの当初の単位溶液中のプロトプラスト量 (濃度) を算出した。
2. 両キノコのプロトプラスト溶液の当初の濃度を基に各々を希釈液で薄め濃度が (10⁷個/ml) になるように調整した。
3. 上記のプロトプラスト希釈液各 1 ml ずつを試験管に移し、2000 rpm、3 分間遠心し、上清を除いた。(酵素液の除去)
4. 沈澱に 2 ml の洗浄液を加え緩やかに混和後、上記と同じ条件で遠心し上清を除きプロトプラストを洗浄精製した。なお、この操作は 2 回繰り返した。
5. 試験管に沈澱した精製プロトプラストに、融合液を入れ、恒温振とう機に移して、80 ストローク/分、25°C、30 分処理し反応させた。

最初と途中攪はん操作を行った。

6. 反応処理液を、3000 rpm、3分間遠心して上清 (PEG) を除いた。
7. 沈澱 (融合したプロトプラスト) に洗浄液 1 ml を入れ、2000 rpm、3分間遠心し、上清を除いた。(融合液の除去)
8. 沈澱 (融合処理洗浄細胞) を希釈液で一定の濃度に希釈し、これを基に各オーダーの溶液 ($10^2 \sim 10^3$ 個/ml) を調整した。
9. これらの溶液を、希釈液を加えた MYPG 寒天培地 (寒天濃度 1%) 及び最少培地に、蒔き (0.1 ml/シャーレ)、23°C で数日間培養した。

〈DNAの解析〉

今回、融合株の DNA の解析には、上記のシャーレで培養したプロトプラスト融合細胞の中で、最少寒天培地に再生 (発菌) したものをを用いた。

この再生コロニーそれぞれ 1 個ずつを、MY 液体培地 (1.0% 麦芽エキス、0.4% 酵母エキス) に接種し直し、数日間培養後の菌糸体から DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーション法で解析を行った。

解析方法の詳細については、前報で述べてきたとおりである。

III. 結果と考察

写真-1 は、シイタケのプロトプラスト再生菌の DNA を泳動した結果である。

但し、10 レーン中、右の 2 本は、親株 (異なる 2 系統の子実体から組織分離した菌糸体) から抽出した DNA、3~10 レーンが再生株 (親株から単離したプロトプラストの再生菌) から抽出した DNA である。

この泳動結果をみると、6.2~4.3 kb の間、4.3~3.5 kb の間、及び 2.7~1.9 kb の間に現れている 3 ケ所のバンドは、全てのレーンとも同じ位置にあ

らわれている。

つまり、塩基配列が等しければ、制限酵素で切られる DNA 断片の長さも同じになり、これをアガロース電気泳動にかけると、同じ位置に DNA のバンドがあらわれることになる。

一方、およそ、6~19.3 kb 間のバンドの位置には、それぞれのレーン間で僅かな違いがみられた。これらの結果から、全レーンに共通の 3 本のバンドは、種類の特徴 (ここではシイタケ) をあらわし、その他の異なった位置のバンドが、系統の違いやプロトプラスト化による変異をあらわしているものと推察された。

しかし、全体的にみて親株と再生株のバンドの位置には、大きな違いは見られない。

これは、キノコの種類が同じ場合は、塩基配列の違いも僅かなためと推察された。

一方の写真-2 は、ヤナギマツタケとカオリヒラタケのプロトプラスト融合株 (細胞融合) から抽出した DNA の泳動結果である。

但し、10 本のレーン中、右からの 2 本が、種類の違う 2 つのキノコ、つまり、親株 (ヤナギマツタケ及びカオリヒラタケ各々の子実体から組織分離した菌糸体) で、1 番目がヤナギマツタケ、2 番目がカオリヒラタケより抽出した DNA のバンドである。他の 8 本は、両者の融合株の DNA のバンドである。

この泳動結果をみると、親株とした 2 種類のキノコのバンド位置は、写真-1 とは対比的に、両者の間で全く共通性がみられない。

これは、2 種類のキノコが分類上、属も種も違うため DNA の塩基配列が、系統間の塩基配列の違いよりも大きく、このため、現れるバンドの位置に差異がみられたものと推察された。

ところが、3~10 レーンのヤナギマツタケとカオリヒラタケとの融合株の各バンドの位置をみると、とくに、1.9~2.7 kb 間と 19.3 kb 付近の 3 本の

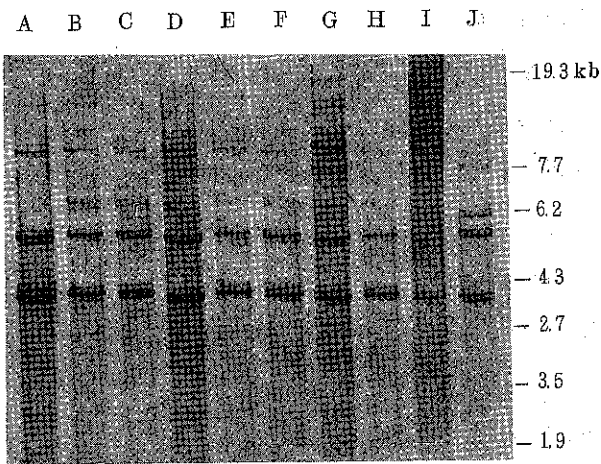


写真-1

RFLP解析像(全DNA)
(制限酵素: Hind-III シイタケ)
(A~H: プロトプラスト再生菌)

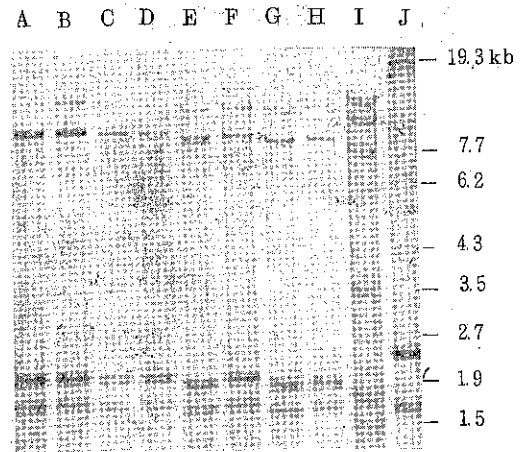


写真-2

RFLP解析像(全DNA)
(制限酵素: EcoRI)
J: ヤナギマツタケ I: カオリヒラタケ

バンドは、いずれもほぼ共通した位置にある。しかし、両親株のバンドの位置と比べると、全くかけはなれた位置に現れている。

これらの結果から、3~10レーンの融合株と、1及び2レーンの親株の間には、DNAの塩基配列に明らかな違いがあることがわかった。

中でも、写真の下部にある2本のバンドをみると、融合株の最下位のもの、両親株の各々最下位のバンドの間の位置に、また、同様に、前者の次のバンドは、後者の次のバンドの間に位置しているようにおもわれた。この点について、DNAマーカーのkb位置を基準に、バンドの位置とDNAの断片長との関係を見ると、融合株のDNA断片長は、両親株各々のDNA断片の長さの和のおよそ半分の長さであるようにみえる。

以上のように、親株と融合株とを比べた場合、バンドの位置(塩基配列)違いや、DNA断片長の変化等からみて、融合株は、親株どうしの遺伝子が交叉した菌株になったものと推察された。

つまり、互いに独立していた各々の親株のDNAの制限酵素認識部位が、両者が融合したことで変わったため、融合株のDNA断片長は親株とは異なってくる。この結果、アガロース電気泳動のバンドに一定の変化が起きたものと思われた。

IV. おわりに

細胞融合で融合株(雑種細胞)やプロトプラスト由来の突然変異株作出の試験で重要かつ不可欠なものは、これらの同定法である。

今回は、これまで改善を積み重ねてきた、DNAによる一連検定方法を用い、融合株の同定を試み、融合株と親株とでは全く異なる泳動像を得ることが出来た。しかし、今回の融合株は、2核菌糸由来の、おそらく、2核のプロトプラスト同士融合株と考えられるので、今後は、1核菌糸からの1核のプロトプラスト由来の融合株を用いて融合株のより客観的な結果を出し、新系統を早期段階(菌糸)で判別する方法に利用したい。

V. 参考及び引用文献

1. 加藤龍一: 食用キノコ類の品種改良に関する研究(第1報)-DNAによるキノコの種類及び系統の判別法一、愛知県林業センター報告、No.29, P. 27~30, 1992
2. 加藤龍一: 食用キノコ類の品種改良に関する研究(第2報)-プローブの単離及び精製と標識一、愛知県林業センター報告、No.29, P. 28~32, 1993