

## マッシュルームからのプロトプラスト調製と子実体の形成

加瀬谷泰介, 岡崎 由朗, 宮川キミ枝, 山崎 昭子  
日置タツエ, 橋本 一哉

### Preparation of Protoplasts from Mushroom *Agaricus bisporus* and Formation of Fruiting Bodies.

Taisuke Kasetani, Yoshiro Okazaki, Kimie Miyagawa, Akiko Yamasaki  
Tatsue Hioki and Kazuya Hashimoto

Protoplasts of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* were prepared and regenerated from multi-spore strain of a commercial strain 'Horst U3' with a commercial enzyme 'Novozym 234'. Fractions of samples were inoculated onto regeneration medium including 0.6M Mannitol as osmotic stabilizer. Other fractions were inoculated onto medium without mannitol for examination of osmotic fragility. Several lots of samples were selected that showed osmotic fragility. Sixty strains were isolated as regenerated protoplasts. The strains from protoplasts were screened with colony morphology and mycelial growth ratio on plate media, and the yields tested in tray culture. Most of these strains indicated higher yields and larger fruiting bodies than the parental commercial strain.

**Key words:** mushroom, *Agaricus bisporus*, Novozym 234, protoplast, osmotic fragility.

一般に真菌類では、おもな繁殖体として少量の有性胞子と広く拡散するために多量の無性胞子を作る。しかし、多数のきのこが属する担子菌類の多くは無性胞子を作らず、飛散と休止期生存の双方に有利な多数の有性胞子を作る。これが担子胞子である (Deacon<sup>1)</sup>)。担子器内で起こる核融合と減数分裂の過程で、高い頻度で遺伝子構成が多様化するために、個々の担子胞子の遺伝形質は同一ではない (堀越, 鈴木<sup>2)</sup>)。栽培きのこの品種改良はこの点を利用して、単胞子の分離と、それから得られる単核菌糸体 [1倍体 (n)] の自家および他家交配、選抜によって行なわれている。これは人為的、計画的な授粉によって高等植物の品種改良を行なうことと同様である。しかしマッシュルーム (*Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach) は、典型的な担子菌類と異なり1つの担子器に重相 (n+n) の2胞子しか着生しない。この胞子から得られる菌糸は最初から複核化しており、マッシュルームでは単胞子を分離しただけでは単核菌糸体を得ることは極めて難しい。このためにほとんど交配ができず、極めて非効率的な育種しか行なえなかった。近年これらを克服するために、プロトプラストの調製や遺伝子操作をマッシュルームに適用する動きが活発になってきた (Wood<sup>3)</sup>)。1950年代にEddy and Williamsonによって菌類のプロトプラストと考えてよい浸透圧感受性体の調製と研究が行なわれ、その後動物細胞の研究に遅れながらも現在では多くの菌類からプロトプラストが調製されている (Villanueva<sup>4)</sup>)。1972年にDe Vries and Wesselによってスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) を材料として、プロトプラストの調製についての問題点が明らかにされ、70年代後半~80年代にかけて種々のきのこ類についてプロトプラストの調製や再生、更にそれを利用した品種改良の研究が進展した (寺下<sup>5)</sup>)。

マッシュルームについてもごく最近になってプロトプラストの調製と再生，更には遺伝子導入などの研究が進展してきた (Wood<sup>3)</sup>, Castle *et al.*<sup>6-7)</sup>, Elliott<sup>8)</sup> ) .

数年前に当研究室では，ネナグノヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*) などの文献 (阿部ら<sup>9-10)</sup>, 赤松ら<sup>11)</sup>, Gold *et al.*<sup>12)</sup>, Kiguchi *et al.*<sup>13)</sup>, 柳ら<sup>14)</sup>) を参考にプロトプラストの調製を試みたが成功しなかった。最近のマッシュルームに関する文献を参考として，プロトプラストの調製と菌糸体への再生に成功し，その内の数種については子実体を形成したので報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 実験材料

- 1) 使用菌株 プロトプラストの調製には当研究室で分離・培養し，栽培実験でも優秀な成績を収めた市販菌株 (Horst U3) 由来の多孢子培養株を使用した。
- 2) プロトプラスト調製・再生培地 プロトプラスト調製および再生培地は，Dahlbergによって改変された麦芽エキス・酵母エキス (MPFYE) 培地を用いた，MPFYE培地は，果糖20g，麦芽エキス20g，酵母エキス2g，ペプトン2g，硫酸マグネシウム・7水和物0.5g，リン酸カリウム1g，リン酸水素2カリウム0.46g，フォーゲル微量要素溶液0.2mlに蒸留水を加え1ℓにし，高圧滅菌 (121°C，15min) した。

フォーゲル微量要素溶液の組成は，クエン酸1水和物5g，硫酸亜鉛・7水和物5g，硫酸鉄 (II) アンモニウム・6水和物1g，硫酸銅・5水和物0.25g，硫酸マンガン・1水和物0.05g，ホウ酸0.05g，モリブデン酸ナトリウム・2水和物0.05gに蒸留水を加え100mlとした。それにクロロフォルム1mlを防腐剤として加えた。

再生培地には上記の組成のほかに，寒天10gと浸透圧調整剤として0.6Mマンニトールを加えた。浸透圧感受性テスト培地には寒天10gのみを加えた。

- 3) プロトプラスト懸濁用等張液 0.01Mリン酸緩衝液 (pH 5.0) に0.6M硫酸マグネシウムと10mMクエン酸ナトリウムを溶解し，メンブランフィルタ (孔径0.2μm) で濾過除菌した。
- 4) プロトプラスト調製用酵素液 市販酵素ノヴォザイム234を10mg/mlの濃度で，プロトプラスト懸濁用等張液に溶解し，メンブランフィルタ (孔径0.2μm) で濾過除菌した。

### 2. 実験方法

- 1) サンプル調製 (液体培養菌糸体) MPFYE培地20mlを分注した100ml三角フラスコに，寒天培地上で培養したHorst U3多孢子培養株の菌糸体片を移植し，3～4週間25°Cで静置培養した (一次培養)。培養後，充分生長した菌糸体を培地ごとブレンダーで破碎 (マセレート) し，新しい培地に駒込ピペットで移植した。これを3～7日間同じ条件で培養した (二次培養)。

- 2) プロトプラスト調製 培養した菌糸体を遠心分離 (10,000×g，10min) にかけて補集した。補集した菌糸体ペレットを滅菌した0.01Mリン酸緩衝液 (pH 6.9) で洗浄し，再び遠心分離で補集した。これを2度繰り返す。培地成分を除いた。ペレットの重量を測定し，メンブランフィルタ (孔径0.2μm) で濾過除菌した酵素液を菌糸体1g当り酵素50～60mgとなるように加えて懸濁した。これをウォーターバスインキュベータ (25°C，60rpm) で4時間反応させ，1時間ごとに試験管ミキサーで2秒間強く攪拌した (細胞壁の分解)。

20ml容量の注射器に滅菌したナイロンメッシュ (90μメッシュ) 2枚，脱脂綿，もう1枚のナイロンメッシュを層にして詰めたフィルタを用い，分解されなかった菌糸断片を濾別した。濾液を遠心分離 (750×g，1h) にかけて，プロトプラストを補集した。補集したプロトプラストを除菌した等張液に懸濁し，血球計算盤でプロトプラスト濃度を測定した。

- 3) プロトプラスト再生  $10^5 \sim 10^6 \text{No.} \cdot \text{ml}^{-1}$ としたプロトプラスト懸濁液を2分し、プロトプラスト再生培地 (0.6Mマンニトール添加MPFYE平板培地) と浸透圧感受性テスト培地 (MPFYE平板培地) に接種した。25°Cで2週間培養し、再生してきたコロニーを観察し、新たな平板培地に分離移植した。移植後同一条件下で2週間培養し、コロニーの直径が大きく生長速度の速いものと形態が優れているものを選抜した。
- 4) 種菌調製 培地は、小麦を15分間煮沸し焼き石こう1.5%と炭酸カルシウム0.5%を添加して高压滅菌 (121°C, 2 h) したものをを用いた。その培地に平板培地上で十分に生長した菌糸体を接種・培養して種菌とした。
- 5) 栽培実験 (箱栽培) マッシュルームの栽培は、プロトプラストの素材として使用した Horst U3多孢子培養株を対照に、これまで当研究室で行っていた方法に準じて行なった。コンポストは、戸外での水分・窒素肥料等を添加したワラの堆積による一次発酵と栽培室内での二次発酵により調製した。次いで底面が格子状のプラスチックボックスに10kgづつ充填し、1% (100g) の種菌を接種した。約2週間培養し菌糸をコンポストに充満させた後、床押し (コンポスト面の平坦化) をして、殺菌後3%炭酸カルシウムでpHを調製した (pH 7.5) ピートモスを覆土として施用した。その後、更に覆土中に菌糸を充満するために培養を続け、覆土中に菌糸が十分に生育した時点で子実体原基の誘導処理をした。以後、マッシュルーム子実体の成熟に伴って順次収穫を行ない、収量を測定した。

発生した子実体は、一般的な商業栽培での収穫適期 (菌膜が破れず、菌褶の見えていない時期、「ボタン」) で収穫した。収穫が遅れ、菌傘が開き始め菌褶が露出したものは「カップ」として区別した。収穫後、石突きの部分を切除する「根切り処理」を行ない、各系統毎に個数と重量を測定した。これを約3週間 (3フラッシュ) 行なった。

## 結 果

### 1. プロトプラストの調製と再生

本報では計3回のプロトプラストの調製実験を行なった。第1回のプロトプラストの調製実験では二次培養時の接種量が少なく、材料として回収できた菌糸体は約0.2gであった。その結果、回収された酵素処理サンプルは極めて少量で、顕微鏡観察しかできなかった。しかし細胞壁の溶解によるとみられる球形細胞と、低張液中でのその破壊が顕微鏡下で観察され、回収されたサンプルがプロトプラストであるという傍証が得られた (Fig. 1)。

第2回の実験では、二次培養の培養齢の異なる2種のサンプルについて検討した (二次培養3日および1週間)。また、前回より接種量をふやしたため約1gの菌糸が回収できた。酵素処理の結果、両者とも多数の球形細胞を生成した。これらをプロトプラスト懸濁用等張液に懸濁し、顕微鏡下で球形形状と低張液中での破壊を確認した。この懸濁液を0.6Mマンニトール添加の再生用培地と0.6Mマンニトール非添加の浸透圧感受性テスト培地に2分して接種し、プロトプラスト生成の確認と再生処理を行なった。その結果、両培養区とも再生培地上にコロニーを確認し、プロトプラストからの再生に成功した。しかし二次培養3日区の浸透圧感受性テスト培地に再生コロニーが1つ観察された (Fig. 2)。

第3回では、浸透圧感受性テスト培地上でのコロニー再生を防ぐため、未反応菌糸分別用のフィルタを改良した。その結果、浸透圧感受性テスト培地上でのコロニー再生はみられなかった。

以上の実験で再生したコロニーは新たな平板培地に分離移植し、合計で92系統のプロトプラスト再生株を得た。浸透圧感受性テスト培地に再生コロニーが観察された二次培養3日区の32系統はプロトプラストであるとの確証に欠けるため除外し、残りの60系統をプロトプラスト再生株と

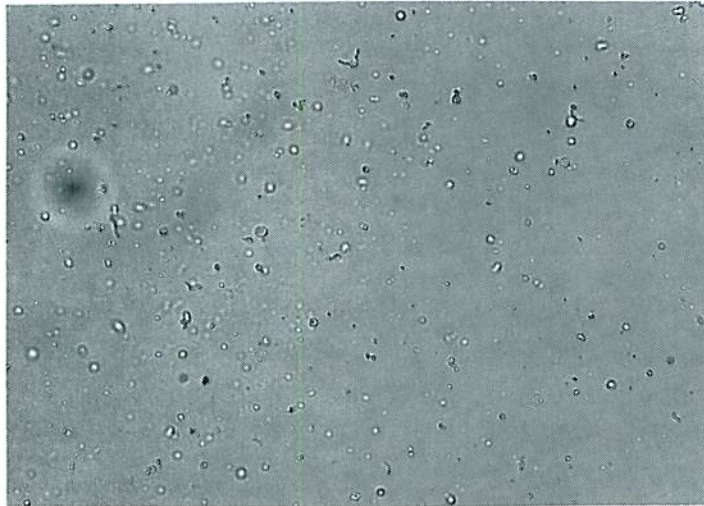


Fig.1. Protoplasts from mycelia of *Agaricus bisporus*.

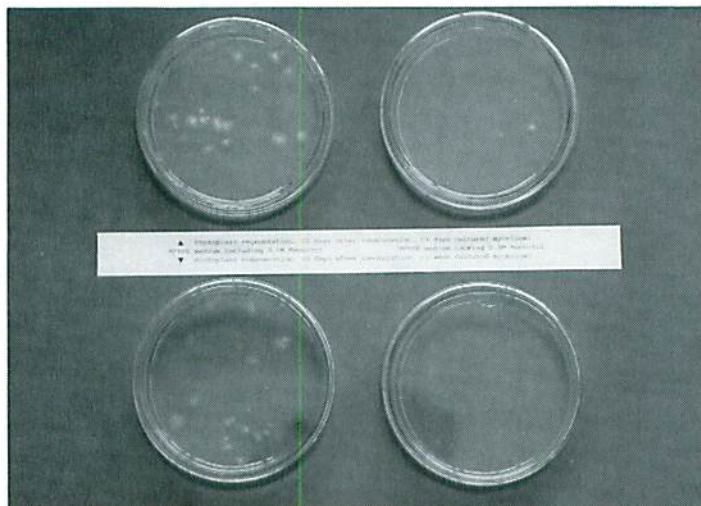


Fig.2. Regeneration of protoplasts of *Agaricus bisporus* on regeneration medium and examination of osmotic fragility.

left : Regeneration medium, MPFYE medium including 0.6M mannitol as osmotic stabilizer.

right : Medium for examination of osmotic fragility, MPFYE medium without mannitol.

した。

この60系統から更に、コロニー形態が円形で菌糸の形態が均一であること、気中菌糸の異常増殖（フラフフィ）の見られないこと、生長速度の速いことを基準に選抜した。その結果、8系統の再生株が条件を満たしたので、種菌を調製し第二次スクリーニングとして栽培実験を行なった。

## 2. プロトプラスト由来系統の栽培結果

PP-60までのプロトプラスト由来系統から、PP-06、-19、-21、-29、-31、-44、-53、-54の8系統を選抜し、プラスチックボックスと培養機を用いて栽培実験を行なった。その結果、収量は各系統によって違っていた（Table 1）。もっとも収量の多かったのはPP-44（プロトプラスト由来系統No.44）の $9.84\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot 3\text{weeks}^{-1}$ であり、もっとも少なかったのはPP-19の $4.93\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot 3\text{weeks}^{-1}$ であった。

Table 1. Yields of PP strains from U3 on trays.

Strains	Yields ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot 3\text{weeks}^{-1}$ )		
	Button	Cup	Total
Cont. U3	4.13	4.13	8.26
PP-06	4.00	1.88	5.88
PP-19	1.99	2.94	4.93
PP-21	4.60	2.56	7.16
PP-29	4.35	2.84	7.19
PP-31	4.26	0.77	5.03
PP-44	6.13	3.71	9.84
PP-53	3.38	1.96	5.34
PP-54	4.39	1.90	6.29

収量全体で比較すると、対照区であるHorst U3が $8.26\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot 3\text{weeks}^{-1}$ とPP-44について第2位であった。しかしボタンのみの収量で比較すると、対照区は6位となり、更にボタンの割合では8位となった。逆に日本では商品価値がないとされるカップの収量では1位、割合では2位となった。

## 考 察

以前マッシュルームのプロトプラスト調製を試みた時には、セルラーゼオノズカR-10、サイモリアーゼ、キチナーゼなどを単独、あるいは混合して使用した。しかしいずれの場合もプロトプラストの調製には成功しなかった（未発表）。本報で調製に成功したのは、新たに使用した市販酵素ノヴォザイム234によるものと思われる。これは菌寄生菌として知られる *Trichoderma harzianum* 由来の酵素であり、単独でマッシュルームのプロトプラスト調製に非常に効果的であった。しかし、他の酵素との併用によるプロトプラスト収量の増加がマッシュルーム以外のきのこ類で報告されており（私信）、酵素系については今後更に検討する。

プロトプラストの収量から考えて、サンプルの菌糸体は1g程度は必要であることがわかった。またマセレート後の菌糸の培養齢は、3日と1週間ではプロトプラスト収量に影響を及ぼさないことがわかった。

プロトプラストは細胞壁の消失によって低張液中では破壊される（浸透圧感受性）。したがっ

て浸透圧感受性テスト培地上でコロニーの再生が見られない場合は、得られたものがプロトプラストであった証拠となる。

再生培地と同時に浸透圧感受性テスト培地に接種するという簡便な方法ながら、酵素処理によって得られたものがプロトプラストであることの証明を得た。今回一部でテスト培地上での再生を確認したが、これはプロトプラストの調製に失敗したか、菌糸残渣との分離に失敗したかである。顕微鏡観察で細胞壁を失った球状細胞を確認していること、更に残渣分離用のフィルタを改良した結果、テスト培地上でコロニーが再生しなかったことから、この原因はプロトプラストと菌糸残渣との分離が不十分で、プロトプラスト懸濁液に菌糸残渣が混入したためと考えられる。

第1次スクリーニングの基準であるコロニー形態が円形で菌糸の形態が均一であること、および気中菌糸の異常増殖（フラフフィ）の見られないことによって、遺伝的変異のない純粋なコロニーであることが期待される。また生長速度が速いことは栽培用品種の必須条件の1つである。

収量全体で比較すると、プロトプラスト調製の材料となった対照区よりも多収であったのはPP-44のみであったが、実際に市場で流通する形態（ボタン）のみを比較すると8系統のうち5系統までが対照区より多く、著しく劣るのはPP-19のみであった。また収量全体に対するボタンとカップの割合を比較すると、PP-19以外の7系統のPP株が対照区よりも優秀であった。逆にカップの量と割合は対照区がそれぞれ1位と2位であり、ここでもPP-19以外のPP株はすべて対照区より優秀であった。

以上のように、より多収穫でボタン（良品）が多くカップ（不良品）が少ないという傾向がほとんどのPP株で見られたことは、プロトプラスト化と再生コロニーの形態などによるスクリーニングを行なうことによって、種々の面で親株より優秀な系統を得られる可能性を示している。

更にボタンをS, M, Lにサイズ分けをして比較すると、対照区はMサイズがもっとも多くPP株の半数ではLサイズであった。これはボタンの割合が対照区より高いこととあわせてその系統の大型化を示している。これは市場品種としては非常に有利なことである。交配などによらずにこのような変化が起こる理由は、プロトプラスト化と再生の過程を経ることで、材料の細胞の中からより活性の高い強靱な系統が生き残るためと考えられる。

一般的にプロトプラストは、球状形態、浸透圧感受性、融合による体細胞雑種の形成、粒子の取り込み、核酸分子の取り込みなど通常の細胞とはかなり異なった性質を持つようになる。植物、菌類では分化した細胞でも全能性 (totipotency) を保持しており、1個の体細胞から完全に個体が再現できる (建部ら<sup>15)</sup>。すなわちプロトプラストという形で単細胞クローンが事実上無制限に得られるということであり、原理的には細胞融合などの方法で体細胞雑種さえ作ればそれが新たな雑種品種となるということである。また直接DNAを取り込ませることで遺伝子の改変が可能となる。無性胞子を形成しない種では、プロトプラストを材料に突然変異誘発処理を行なう。また複核菌糸体を材料としてプロトプラストを調製した場合、特異的な現象として脱二核（単核）化が観察される。すなわち、約10%の再生コロニーが減数分裂を経ずに単相となっているのである。このプロトプラスト由来の単核菌糸はすぐに交配の材料として利用できる (Wood<sup>3)</sup>, Castle *et al.*<sup>7)</sup>。

以上、プロトプラストの調製と再生および子実体の形成に成功したことで、マッシュルームの品種改良に新たな展開が期待できる。

## 要 約

*Trichoderma harzianum*由来の市販酵素ノヴォザイム234を使用してプロトプラストの調製に成功した。サンプルは細胞壁の溶解によるとみられる球形細胞と、低張液中でのその破壊を顕微

鏡下で観察し、0.6Mマンニトールを添加した再生培地と非添加の浸透圧感受性テスト培地に2分して接種することでプロトプラスト形成の確認と再生処理を行なった。その結果一部を除いて、再生培地にはコロニーがみられる一方で浸透圧感受性テスト培地ではコロニーが再生せず、コロニーが浸透圧感受性体、すなわちプロトプラスト由来のものであるとの証明を得た。

材料の二次培養菌糸体が1g程度必要であり、二次培養齢が3日から1週間の間ではプロトプラストの収量には影響なく、酵素処理後プロトプラストと菌糸残渣を分離するためのフィルタが実験の成否を左右することなどがわかった。

また他のきのこ類では、ノヴォザイム234と他の酵素との併用によるプロトプラスト収量の増加も報告されており、酵素系については今後更に検討する必要がある。

計3回の調製実験で、一部浸透圧感受性テスト培地にコロニーの見られたものを除いて60系統のプロトプラスト由来菌糸を得た。平板培地上でのコロニー形態の均一さと異常な気中菌糸の有無、生長速度の速さを基準に、これらをスクリーニングした。その結果、8系統を選抜し栽培実験を行なった。

選抜された8系統(PP-06、-19、-21、-29、-31、-44、-53、-54)を用いて栽培実験を行なった。収量は各系統によって異なり、PP-44がもっとも多く $9.84\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 3\text{ weeks}^{-1}$ で、PP-19がもっとも少なく $4.93\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot 3\text{ weeks}^{-1}$ であった。

収量全体で比較すると、プロトプラスト調製の材料である対照区Horst U3よりも多収であったのはPP-44のみであった。しかし、市場流通形態であるボタンの収量のみを比較すると5系統が、その比率では7系統が対照区よりも優秀であった。対照区と比較して著しく劣るのはPP-19のみであった。

ボタンをS、M、Lにサイズ分けをして比較すると、対照区はMサイズが、PP株の半数ではLサイズがもっとも多かった。これは、系統が大型化したことを示している。交配などによらずにこのような変化が起こることの理由は、プロトプラスト化と再生の過程を経ることで、材料の細胞の中からより活性の高い強靱な系統が生き残るためと考えられる。以上のことからプロトプラスト化とスクリーニングによって、親株より優秀な系統を得る可能性が示された。更にプロトプラストの調製と再生および子実体の形成に成功したことで、今後細胞融合や遺伝子組換えなどマッシュルームの品種改良に新たな展開が期待できる。

## 文 献

- 1) Deacon, J. W. (山口英世, 河合康雄訳): 現代真菌学入門, pp. 15-18, 培風館, 東京 (1982).
- 2) 堀越孝雄, 鈴木 彰: きのこの一生, pp. 8-24, 築地書館, 東京 (1990).
- 3) Wood, D. A.: Abstracts of "World-wide progress of mushroom technology". Satellite symposium of the IUMS Congress 1990, p. 1-2 (1990).
- 4) Villanueva, J. R.: *The Fungi*, (Ainsworth, G. C., Sussman, A. S.), Vol. II, pp. 3-19, Academic Press, New York and London (1966).
- 5) 寺下隆夫: 改定きのこの生化学と利用, pp. 230-256, 応用技術出版 東京 (1989).
- 6) Castle, A. J., Horgen, P. A. and Anderson, J. B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 816-822 (1987).
- 7) Castle, A. J., Horgen, P. A. and Anderson, J. B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1643-1648 (1988).
- 8) Elliott, T. J.: *The Mushroom Journal*, **184**, pp. 528-529 (1988).

- 9) 阿部正実, 梅津博紀, 中井孝雄, 棒 伝吉: 農化, **46**, 1955-1957 (1982).
- 10) 阿部正実, 中井孝雄, 梅津博紀, 棒 伝吉: 農化, **48**, 1635-1636 (1984).
- 11) 赤松健一, 鎌田 堯, 武丸恒雄: 日本菌学会会報, **24**, 173-184 (1983).
- 12) Gold, M. H., T. M. Cheng, and M. Alic: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 260-263 (1983).
- 13) Kiguchi, T., S. Yanagi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 121-127 (1985).
- 14) 柳 園江, 門間 充, 川澄俊之, 日野明寛, 紀藤雅子, 建部 到: 農化, **49**, 171-179 (1985).
- 15) 建部 致ら: 遺伝子組換え実用化技術3, pp. 177-183, サイエンスフォーラム 東京 (1982).