

白色腐朽菌プロトプラストの

一核化の条件検討

Preparation of monokryons originating
from protoplast of white-rot fungi

物質・環境システム工学コース

1135008 増田 仁

1 要旨

1-1 背景及び目的

白色腐朽菌と呼ばれる担子菌の仲間は、食用としての利用以外にも木質系資源のリグニンやダイオキシンなどの分解で注目されている。成長速度が速く酵素生産量の多い白色腐朽菌を育種することで、より効果的に利用できると思われる。しかし、分子育種の面から見ると白色腐朽菌の研究は進んでいるとは言えない。分子育種の方法としての形質転換法は何種類か存在しているが、本研究室では、白色腐朽菌の形質転換法としては最も一般的なプロトプラスト法を用いることとした。白色腐朽菌の形質転換を行う際には、まず一核菌糸を入手する必要がある。一核菌糸は、二核菌糸をプロトプラスト化し再生する過程で出現すると報告されている。したがって、プロトプラスト化は形質転換と一核菌糸の作出の2つのことに関連している。本研究では、様々な菌種におけるプロトプラスト化の条件検討及び、同時に一核菌糸の発生しやすい条件を求めることとした。一方で、形質転換では選択マーカーが必要である。すでに白色腐朽菌の選択マーカーとしてはヒラタケにおいてカルボキシンの薬剤耐性を用いた例が報告されている。そこで、各供試菌のカルボキシン感受性を測定しカルボキシンを薬剤耐性マーカーとして用いることに適している菌種の判別を行った。プロトプラスト化に関しては、浸透圧調整剤の濃度が再生率及び一核菌糸の発生率に影響を及ぼすことが報告されている。そこで、プロトプラスト化に用いる浸透圧調整剤の濃度を変更して再生率及び一核菌糸発生率を測定することで、菌株ごとに適したプロトプラスト化条件を検討した。又、酵素反応時間を3時間から1時間に短縮し、プロトプラストの作出及び一核化にどのように影響するか調べた。

1-2 方法

Pleurotus ostreatus、*Pl. purmonarius*、*Trametes versicolor*、*Lentins lepideus* および *Phanerochaete sordida* を供試菌としてカルボキシンを 0.5、1.0、2.0 µg/ml の各濃度で添加した PDA 培地に植菌して、成長速度を測定した。濃度と成長速度の関係から各供試菌のカルボキシン最小阻止濃度を求めた。その中から選出した菌株を用い、マンニトールを 0.55 M、0.60 M、0.65 M の3条件で、酵素反応時間を1時間と3時間の計6条件でプロトプラスト化を行った。作出したプロトプラストを再生培地に塗布、コロニーの再生を行い再生率を求めた。その後再生したコロニーのうち10株をランダムに選出して成長速度を測定し、成長速度の遅い株を一核菌糸と判定し一核菌糸率を求めた。

1-3 結果

カルボキシシン感受性については、本研究で用いた全ての供試菌で成長抑止効果は確認された。しかし、同じヒラタケでも NBRC30160 では 0.5 µg/ml 以下で阻止できるのに対して、NBRC32211 では 5.2 µg/ml 必要であると推定されるなど同じ属、種でも菌株によってカルボキシシン感受性には大きな違いがあることが判明した。プロトプラスト化条件については、緩衝液の濃度によって各菌株で再生率が異なった。又、処理時間については、3 時間から 1 時間に短縮することでプロトプラストの再生率は向上した。