

研究ノート

有糸分裂阻害剤を用いたシイタケ高増殖性菌体の構築

外山 英男

発酵利用学研究室

2009年10月7日受付; 2010年1月27日受理

**Construction of higher growing mycelia of the *Shiitake* mushroom,
Lentinula edodes using a mitotic arrester**

Hideo Toyama

*Laboratory of Utilization of Fermentation, Minami Kyushu University,
Miyazaki 880-0032, Japan*

Received October 7, 2009; Accepted January 27, 2010

南九州大学研究報告 40A 別刷

Reprinted from

BULLETIN OF MINAMIKYUSHU UNIVERSITY
40A, 2010

研究ノート

有糸分裂阻害剤を用いたシイタケ高増殖性菌体の構築

外山 英男

発酵利用学研究室

2009年10月7日受付; 2010年1月27日受理

Construction of higher growing mycelia of the *Shiitake* mushroom, *Lentinula edodes* using a mitotic arrester

Hideo Toyama

Laboratory of Utilization of Fermentation, Minami Kyushu University,
Miyazaki 880-0032, Japan

Received October 7, 2009; Accepted January 27, 2010

Autopolyploidization and maintaining of autopolyploid nuclei were attempted in the binuclear fungus, *Lentinula edodes*. When the mycelial mat was treated with colchicine at 26°C, stable autopolyploidization was unsuccessful. But, when the colchicine treatment was carried out at 10°C, autopolyploid nuclei were produced stably (Strain 10-1). The strain, 10-1, showed higher proliferation rate on both PDA plates and wood powder plates. From these results, it was concluded that stable formation of autopolyploid nuclei could be achieved by colchicine treatment at 10°C in the mycelia of *L. edodes*. The higher growing mycelia obtained by the treatment was regarded as useful in breeding.

Key words: colchicine, fruiting body, *Lentinula*, polyploid, nuclei.

緒言

宮崎県は全国的に見てもシイタケの有数の生産地であり、特産品としてシイタケの有用品種育成や高付加価値化が図られるべきである¹⁾。また、シイタケには免疫賦活作用のあるβ-グルカンなどの有用成分が含まれ、これらの増量による機能性の向上や食味の向上も図られる必要がある²⁾。有糸分裂阻害剤であるコルヒチンは植物の倍数体形成に広く使用され、研究報告も数多くある³⁾。微生物についても、植物とは異なる特性や用途があり、倍数体の利用を図るべきであるが、微生物の倍数体形成や利用に関する報告は交配法で育成した酵母の倍数体の報告がある程度で非常に少なかった⁴⁾。そこで、著者はコルヒチンによる微生物の倍数体形成を試みた。まず、セルラーゼ生産性糸状菌であるトリコデルマリーセイ株の菌体や分生子をコルヒチンで処理し、倍数体を得た⁵⁾。また、条件によって、多核化や微小核化が起こることも見いだした⁶⁾。焼酎用麹菌アスペルギルスカワチ株の菌体や分生子を用いて倍数体を形成することにも成功し、トリコデルマの場合と同様に多核化や微小核化が起きることも報告した⁷⁾。続いて、二核性菌体を保持する担子菌類に

着目した。二核性であることがカビ類との決定的な違いであり、このような場合でのコルヒチンによる倍数化に興味を持たれた。そこで、シイタケ、エノキタケ、ヒラタケなどの担子菌類で、カビ類での倍数化条件を基に、コルヒチン処理を行ったところ、二核性を保ったまま、一時的に倍数核が形成されるが、やがて、菌体中に複数の小型の核が形成され、多核化が起き、二核性も消失した⁸⁻¹⁰⁾。

この報告では、コルヒチン処理条件を検討し、担子菌シイタケにおいて倍数核形成を試みた。

方法

菌株と培地

旧発酵研究所の分譲株、*Lentinula edodes* (IFO 30724) をこの実験に使用した。菌体はポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (BBL) に接種して26°Cで培養し、4°Cで保存した。コルヒチン処理用培地として、50ml 三角フラスコに、グルコース0.25g、ペプトン0.13g、コルヒチン (Wako) 0.025g、Czapek培地25mlを加えて使用した (pH 7.0)。コルヒチン濃度は0.1% (W/V) であった。増殖率比較試験用培地と遺伝安定性試験用

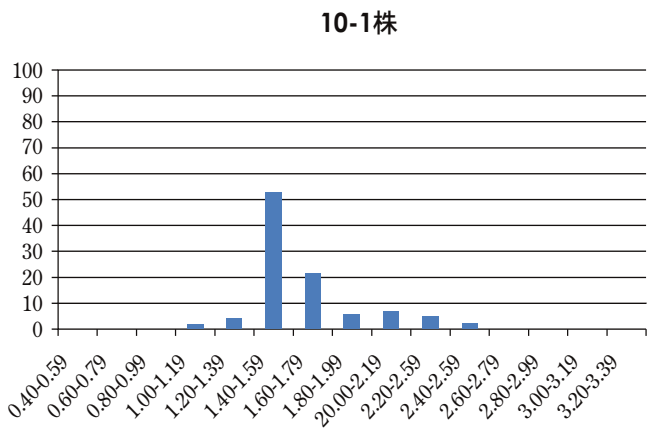
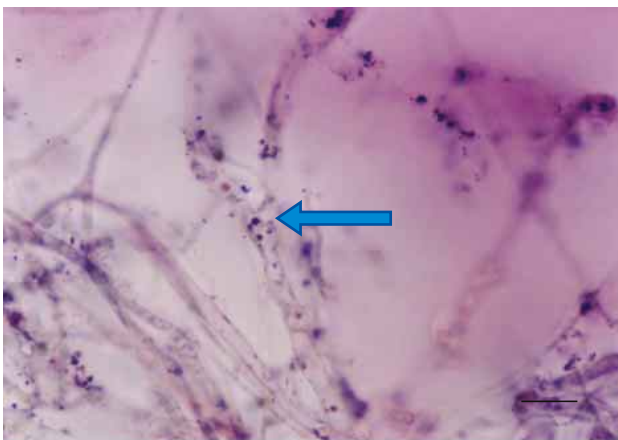
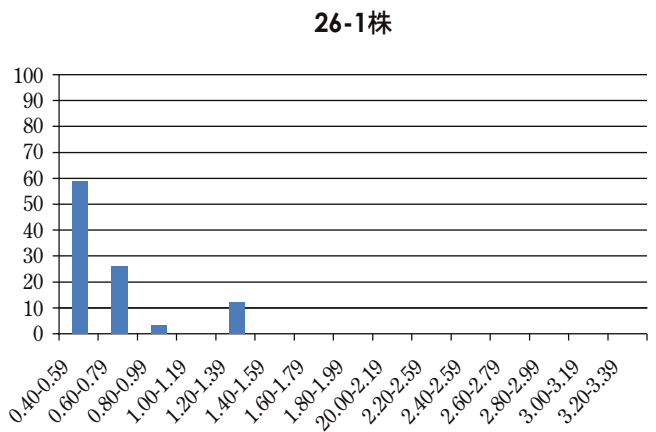
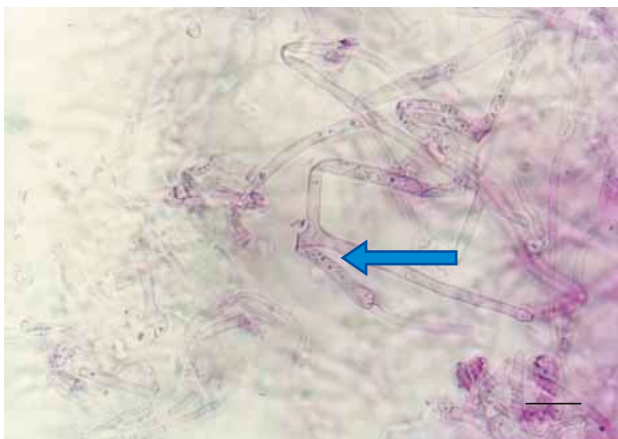
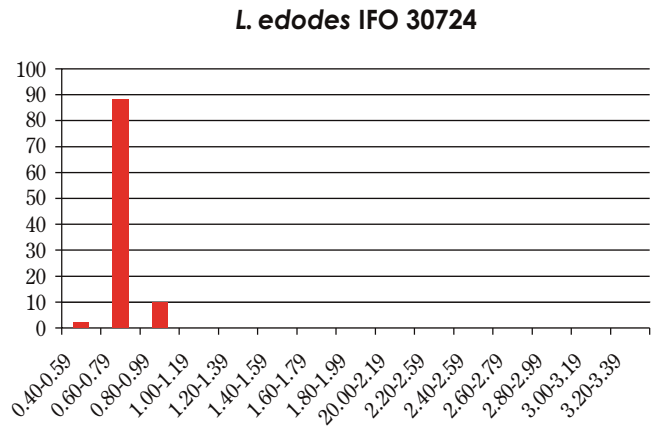
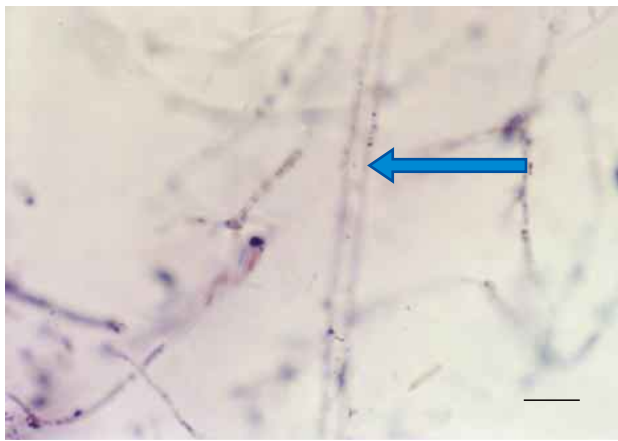


図1. 菌体中の核のギムザ染色

菌体をスライドガラスの上のギムザ染色液に10分間浸漬し、カバーガラスを被せて圧着後、顕微鏡写真撮影を行った。バーは10μmを示す。上：元株，中：26-1株，下：10-1株

図2. 菌体中の核直径の分布

菌体核染色写真を拡大し、各株毎に約100個の核の直径をデジタルノギスで計測しヒストグラムを作成した。核直径の単位はμm。

培地はPDA培地を使用した。

木粉培地としては、ブナチップ粉砕物100g、米ぬか20g、蒸留水70mlを深型ガラスプレート（直径150mm×高さ60mm）に入れてオートクレーブで殺菌後使用した。ブナチップ粉砕物は燻製用ブナチップ（パール金属工業株式会社 No. M-9175）を粉砕機（佑崎有限公司 原泰奇傾斜式粉砕機）で60秒間粉砕して調製した。

コルヒチン処理法

寒天平板（PDA）培地上で26℃、7日間培養したコーニー端部の菌体2cm四方を50ml三角フラスコに入れたコルヒチン処理用培地25mlに加え、静置培養した。

菌体核染色法

菌体の一部を切り取り、スライドガラス上でギムザ液（Merck）に10分間浸漬して核染色を行い、カ

表1. 寒天培地上での増殖率比較結果

	最大コロニー直径(mm)	菌糸伸長率(mm/h)
元株	40.61	0.170
10-1株	60.71	0.253

菌体2mm四方をPDA培地上に置いて26℃, 10日間培養後, コロニー直径をデジタルノギスで計測した. 1検体あたり, PDAプレートを2枚使用し, 最大直径のコロニーを計測した.

バーグラスをかぶせた後, 圧着し, デジタルカメラ (CANON A95) を用いて顕微鏡写真撮影 (OLYMPUS BH-2) を行った. 同様な操作をDAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindol) 液 (Sigma) と蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX-50) を用いて行ない, ギームザ液で染色される箇所が核であることを確認した. 撮影写真は拡大して印刷し, 約100個の核直径を株毎にデジタルノギス (MITUTOYO CD-S15M) で計測した.

増殖率試験法

菌体2mm四方を, 一株につき2枚の増殖率比較試験用培地上に置き, 恒温培養器 (IUCHI IC-450P) を用いて26℃で10日間培養した. 培養後, コロニー直径をデジタルノギスで計測した. 1株につき, 2個のコロニーのうち最大直径を示すコロニーの直径を計測した. 木粉培地を用いた増殖率比較試験では菌体10 mm四方を加え, 26℃, 湿度80%で5日間培養した. 培養後, コロニー直径をデジタルノギスで計測した. 1株につき, 木粉培地を2個使用し, 平均値を算出した.

遺伝安定性試験法

斜面培地上の菌体2mm四方を1株につき5枚の遺伝安定性試験用培地上に摂取し, 恒温培養器 (IUCHI IC-450P) を用いて26℃, 10日間培養し, 扇状セクターの有無を観察した.

表2. 木粉培地での増殖率比較結果

	コロニー平均直径(mm)
元株	52.6 ± 2.2
10-1株	98.1 ± 2.7

菌体1cm四方を木粉培地に接種し, 26℃, 湿度80%で, 5日間培養後, コロニー直径をデジタルノギスで計測した. 1検体あたり, 木粉培地を2個使用し, 平均値を求めた.

結果と考察

コルヒチン処理

L. edodes IFO 30724の菌体2cm四方をコルヒチン処理用培地25 mlを入れた4本の50 ml三角フラスコに加え, 2本を26℃, 2本を10℃で静置培養した. 培養7日目に菌体の核染色を行った. 26℃で培養した菌体中には, 大型の核と小型の核が混在し, 二核性が消失していたが, 10℃で培養した菌体中には, 元株よりもわずかに直径が増大した核が存在し, 26℃で培養した菌体に見られた複数の小型の核は見られず, 二核性も保たれていた.

培養30日目に菌体を核染色すると, 図1に示すように, 26℃で培養した菌体中には多数の小型の核が大半を占め, 大型の核はごくわずかしか存在していなかった. また, 二核性も維持されていなかった. しかしながら, 10℃で培養した菌体中には, 元株よりも明らかに大型の核が存在していた. この菌体を10-1株と称することにし, 各株の菌体内の核の分布を図2に示した. 核直径の計測値から算出すると, 10-1株の菌体中には8倍体程度の倍数核が最も多く存在していることが判明した. 26-1株の菌体中には, 低次の倍数核が少数存在したが, 大半は元株の核と同じか, それより小型の

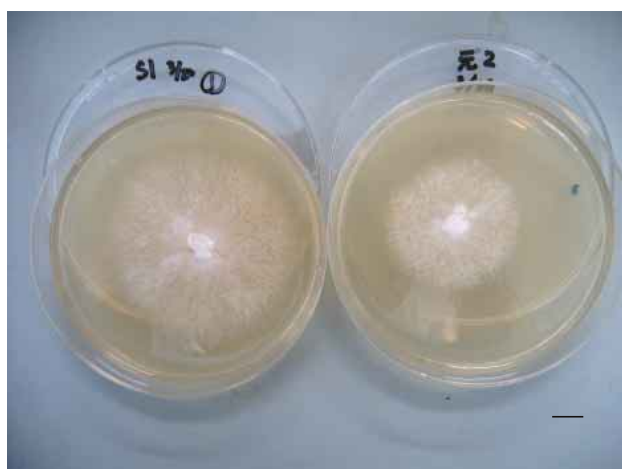


図3. 寒天培地上での増殖性比較

菌体をPDA培地上に置き, 26℃, 7日間培養した. バーは10mmを示す. 右:元株, 左:10-1株



図4. 木粉培地上での増殖性比較

菌体を培地に加え, 26℃, 湿度80%で5日間培養した. バーは10mmを示す. 右:10-1株, 左:元株

核であった。この結果から、26℃で培養すると、一時的に倍数核が形成されるが、その後、倍数核の崩壊が起こり、倍数核は消失するが、10℃で培養すると倍数核を安定に形成、維持できることが示唆された。培養温度26℃では増殖に伴う核分裂が活発となり、その結果多核化が起きるが、培養温度を10℃に設定すると核分裂が緩慢となり、その結果、多核化が抑制され、倍数核も維持されると推測された。

増殖率比較試験

元株と10-1株の菌体（斜面培地培養物）を増殖率比較試験用培地上に摂取し、26℃で10日間培養し増殖率を比較した。その結果、10-1株は表1と図3に示すように、元株よりも良好な増殖性を発揮した。また、木粉培地上でも表2と図4に示すように10-1株は良好な増殖性を発揮した。

遺伝安定性試験

10-1株の遺伝安定性を評価した。斜面培地で培養した10-1株の菌体を5枚の遺伝安定性試験用培地上に接種し、26℃、10日間培養し、形質分離によって生じる扇状セクターの有無を観察した。しかしながら、培養中に扇状セクターの形成は見られなかった。これにより10-1株は遺伝的に安定であると考えた（データ未記載）。

シイタケの有用品種を作るには、これまでは交配法などが主であったが、交配法は熟練と手間を必要とし、有用品種の育成に時間がかかっていた¹¹⁾。しかしながら、今回示した、有糸分裂阻害剤を用いた方法を使用すれば、短期間でしかも熟練を必要とせずに増殖性が向上した菌体を構築することが可能となり、これはシイタケ有用品種の育種上、メリットと考えられる。さらに、外部遺伝子や宿主ベクター系も使用していないので、遺伝子組換え問題に関与しないこともメリットと考えられる。

要 旨

二核性菌体を保持する担子菌、シイタケ (*Lentinula edodes*) の菌体中で有糸分裂阻害剤を用いて同質倍数核を形成、維持することを試みた。菌体を26℃でコルヒチン処理用培地中で培養した場合、培養初期に倍数核の形成が見られたが、その後、倍数核の崩壊が起こり、菌体中に小型の核が多数形成され、二核性は消失した。一方、菌体を10℃でコルヒチン処理用培地中で培養した場合、菌体中に徐々に倍数核が形成され二核性と共に安定に維持された (10-1株)。この10-1株はPDA培地や木粉培地上で元株よりも良好な増殖性を示

した。以上の結果から、シイタケにおいては菌体を低温でコルヒチン処理することにより同質倍数核の形成と維持が可能であり、得られる高増殖性を示す同質倍数核保持菌体には育種的価値があると結論した。

引用文献

- 1) 青木尊重, 坂本格, 吉良今朝芳 (1963) 椎茸生産に関する現状分析(II): 宮崎県における椎茸生産の現状分析 演習林集報 (九州大学) **18**: 25-46.
- 2) Rop, O., Mlcek, J. and Jurikova, T. (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* **67**: 624-31.
- 3) Fragata, M. (1970) A hypothesis concerning the use of colchicine as a polyploidy inducer. *Experientia* **26**: 104-106.
- 4) Takagi, A., Harashima, S. and Oshima, Y. (1983) Construction and characterization of isogenic series of *Saccharomyces cerevisiae* polyploid strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1034-1040.
- 5) Toyama, H. and Toyama, N. (1990) Autopolyploid formation of *Trichoderma reesei* QM9414 by colchicine treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 51-53.
- 6) Toyama, H. and Toyama, N. (1995) Factors affecting formation of micronuclei-like structure after colchicine treatment of *Trichoderma reesei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 326-329.
- 7) Toyama, H. and Toyama, N. (1992) Changes in nuclear nature of *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with colchicine treatment. *Bull. Minamikyushu Univ.*, **22**: 219-226.
- 8) Toyama, H. and Toyama, N. (1992) Autopolyploid formation of *Lentinus edodes* with colchicine treatment. *Bull. Minamikyushu Univ.*, **22**: 211-217.
- 9) Toyama, H. and Toyama, N. (1995) Chromosomal elimination in the formation of micronuclei-like structure in *Flammulina velutipes* induced by colchicine. *Microbios* **81**: 155-166.
- 10) Toyama, H. and Toyama, N. (1995) Nuclear abnormality in the mycelia of *Pleurotus ostreatus* in presence of colchicine. *J. Biotechnol.* **35**: 97-106.
- 11) Kulkarni, R. K. (1991) DNA polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1735-1739.