

平成 11 年度修士論文  
担子菌染色体の構造解析  
梶原美紀

【はじめに】

染色体はその生物の遺伝情報の集約体であり、染色体の構造解析は生物の遺伝学、細胞学的研究の重要な指針となる。しかし、菌類における菌糸や分生子での体細胞分裂時に現れる染色体は人間や高等植物の染色体と比較して非常に小さく、そのため顕微鏡での観察は困難であり、これまでキノコの染色体に関する研究はごくわずかであった。

近年、微少な染色体の判別容易な蛍光染色による蛍光顕微鏡観察法と発芽管破裂法 (GTBM) との組み合わせにより数種の植物病原性糸状菌の染色体数及び形態が報告された。また、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) の改良により Mb 単位 DNA の分離が可能となり、多くの菌類の最小染色体数及びそのサイズが判明した。

そこで本研究ではヒラタケを供試材料とし、GTBM による染色体蛍光顕微鏡観察及び PFGE による染色体分離とによる染色体構造解析を目的とした。

【実験方法】

[ 材料 ] ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus* [ Jacq. Fr ] Kummer ) Po-4 株を用いた。

[ 栽培方法 ] ブナ木粉 : 米ぬか = 4 : 1 ( v/v ) 含水率 70% の木粉培地で暗所、23 で 3 ~ 4 週間培養後、菌かきし 16 連続照明下で子実体形成を誘導した。

[ GTBM による蛍光顕微鏡観察 ]

? 孢子培養及び発芽管破裂条件設定

子実体から孢子を得、GTBM による染色体の蛍光顕微鏡観察を行った。そこで中期染色体の出現率を高めるため、実験 発芽に最適な孢子密度及びグルコース濃度の条件設定 実験 中期染色体最大出現率の培養時間設定 実験 最大破裂率の発芽管破裂条件設定を検討した。なお実験においての培養はいずれも暗所、23 で行った。

実験 : グルコース濃度 1 % で 24 時間培養し、孢子密度の違いによる発芽率の差を光学顕微鏡下で計数し、最大の発芽率を示した孢子密度で 24 時間培養し、グルコース濃度の違いによる発芽率の差を光学顕微鏡下で計数した。

実験 : 実験 で最大発芽率を示した孢子密度及びグルコース濃度で培養し、蛍光染色剤 DAPI ( 4 , 6-diamidino-2-phenylindole ) で染色し蛍光顕微鏡下で培養時間の違いによる発芽管内の核数を計数し、その数の増加率から細胞分裂周期を推定した。これをもとに再び同条件で培養・固定・染色し、蛍光顕微鏡下で発芽管最先端の細胞の核の状態を観察し、全体に占める中期状態の核の割合を計測した。

実験 : 実験 で最大発芽率を示した孢子密度及びグルコース濃度で孢子を懸濁し、実験 で最大の中期染色体出現率を示した時間とで培養し、メタノ-

ル：酢酸混合液で固定・破裂後 DAPI で染色して、蛍光顕微鏡下で静置時間及び固定液の組成の違いによる発芽管破裂率を計数した。

#### ?蛍光顕微鏡観察

実験 ~ で判明した最適な孢子培養及び発芽管破裂条件を元に培養し、微少管重合阻害剤を滴下、GTBM にて染色体を発芽管細胞外に放出、固定し DAPI で蛍光染色後、UV 励起下で観察した。

#### [ PFGE による染色体 DNA の分離 ]

Po-4 及びそのプロトプラストから単離した交配型の異なる一核菌系体 2 系統 (Pom-6 及び 24) について PFGE 用 DNA サンプルプラグを調製した。

*Schizosaccharomyces pombe* と *Sacchomyces cerevisiae* をサイズマーカーとし 14 、0.5×TBE 中にて CHEF 電気泳動装置でアガロース濃度 0.85% で PFGE を行った。PFGE 終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、分離染色体 DNA バンドを UV 光下で検出、写真撮影した。

#### 【結果及び考察】

#### [ GTBM による蛍光顕微鏡観察 ]

(1) グルコース濃度 1%、孢子密度  $2 \times 10^5$  個/ml で最大の発芽率を示し、培養時間 12.5?13 時間で最大の細胞分裂率を培養時間 12 時間 40 分で最大の中期染色体出現率を示し、メタノール：酢酸 = 9 : 1 で 30 分静置後、最大の破裂率を示した。

(2) 上記の培養及び破裂条件を用いて GTBM で染色体の蛍光顕微鏡観察を行った (Fig.1)。これにより、観察された染色体の最大数は 8 であった。

#### [ PFGE による染色体 DNA の分離 ]

泳動条件を検討した結果、(70V, 1800s, 48hr) - (70V, 1300s, 24hr) - (70V, 900s, 48hr) - (70V, 600s, 24hr) が最適条件であった。

Pom-6 は 5.4, 3.5, 3.3, 3.1, 2.8, 2.6, 2.3, 2.1Mb の 8 つのバンドが、Pom-24 は 5.4, 4.6, 4.0, 3.5, 3.1, 2.8, 2.5, 2.1Mbp の 8 つのバンドが、Po-4 は 5.4, 4.0, 3.5, 3.3, 3.1, 2.8, 2.6, 2.5, 2.3, 2.1Mb の 11 個のバンドが検出された。

Pom-6 及び Pom-24 はそれぞれ異なったバンドパターンを示し、染色体長多型を有した。また、Pom-6 及び Pom-24 において共通のサイズの染色体 5 本が検出されたことから、Po-4 は 5.4, 4.0, 3.5, 3.1, 2.8, 2.1Mb サイズの染色体 DNA バンドをそれぞれ 2 つずつ持っている と推定された (Fig.2)。したがって、各一核菌系株の染色体バンド数は 8、二核菌系株は 16 であると推定された。

以上、GTBM による染色体蛍光顕微鏡観察と PFGE による染色体 DNA の分離の結果から、ヒラタケの染色体数は  $n=8$ 、総ゲノムサイズは約 53.1Mbp であると判断された。