

きのこの系統識別における各種電気泳動法の比較

大分県きのこ研究指導センター 野上 友美・田中 滝二
石原 宏基

1. はじめに

きのこの系統識別法としてオガクズ米糠培地や寒天平板培地を用いる対峙培養法が利用されているが、きのこの種や系統間によっては識別が困難な場合も多いことから電気泳動法によるアイソザイムのパターンを利用した系統識別が行われている。今回、エノキタケ、シイタケを用いた各種電気泳動法の比較及び系統識別を試みたので報告する。

2. 材料及び方法

(1) 供試菌株

本実験に供した菌株を表-1に示した。

表-1 供試菌株

エノキタケ		シイタケ	
供試No.	由来	供試No.	由来
1	大分県野生種	6	大分県野生種
2	茨城県野生種	7	鹿児島県野生種
3	大分県栽培種	8	三重県野生種
4	熊本県栽培種	9	在来品種
5	長野県栽培種	10	在来品種

(2) 培養条件

供試菌株をPD液体培地に接種し、エノキタケ15日、シイタケ30日、25℃、暗所で静置培養した。

(3) 抽出方法

培養終了後、菌糸体を蒸留水で十分洗浄した後、0.05 M トリス・HCl 緩衝液 (pH7.0) で洗浄し-40℃で凍結保存した。泳動時3℃で融解した後、湿菌体2gに対し同上緩衝液4mlを加えワーリングブレンダー20000回転20秒破碎し、さらにセルホモジナイザー4000回転2分破碎、3℃15000回転15分遠心分離、上清みを試料とした。

(4) 泳動方法

泳動方法及び泳動条件を図-1、表-2に示した。電気泳動方法を等電点焦点法(以下IEF)とスラブ法に分け、スラブ法は先ずグラジュエントゲル(以下Grad)によって総括的な移動度を確かめ、それぞれの移動度に適した12.5%ゲル(以下Homo12.5)、20%ゲル(以下Homo20)で行った。

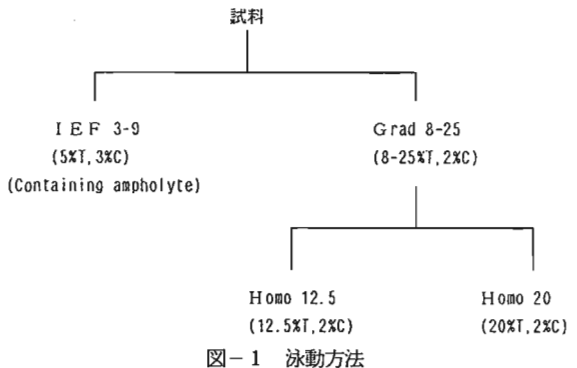


図-1 泳動方法

表-2 泳動条件

泳動方法		泳動条件				
IEF	3-9	1000v	2.5mA	3.5w	410vh	5℃
Grad	8-25	400v	10mA	2.5w	270vh	5℃
Homo	12.5	400v	10mA	2.0w	130vh	5℃
Homo	20	400v	10mA	2.0w	170vh	5℃

(5) 活性染色

活性染色は、エステラーゼ(以下EST) リンゴ酸脱水素酵素(以下MDH)の2種で行った。ESTについては、0.2%ファーストブルー、0.5%αナフチル酢酸を含む0.05M トリス・HCl 緩衝液 (pH7.0) でMDHについては、0.03% NBT、0.15% PMS、0.03% NAD、2.0% リンゴ酸ナトリウムを含む0.1M トリス・HCl 緩

衝液 (pH8.2) でそれぞれ活性染色を行った。

(6) デンシトメトリー

バンドが確認されたゲルは、280mmの吸収でデンシトメトリーを行った。

3. 結果及び考察

電気泳動法の比較、系統識別の結果は以下のとおりであった。

IEFは、一般に分解能が高く、系統識別に利用し易いとされているが今回の実験では、エノキタケ、シイタケ、EST、MDHの相互の組合せにおいて、バンドが波状にゆがみ易く、デンシトメトリー及び系統識別は困難であった。これは、酵素の失活を抑制するため電圧を下げる必要があることより生じたものと思われ、適した条件下で行えば利用可能と考えられる。

GradのESTについては、エノキタケ、シイタケ共にゲル濃度が高い部分に、またMDHについては、エノキタケ、シイタケ共にゲル中央部に明確なバンドが形成されたことから、ESTはHomo20、MDHは12.5の条件が示された。

さらにESTについては、エノキタケ、シイタケ共にHomo20でゲル全域にわたって多数のバンドが確認され、アイソザイムの分離、系統識別が可能であった。エノキタケの場合、No. 3~5については、非常に類似したパターンを示したことから、ほぼ同一の系統であろうと推察された。シイタケのデンシトメトリーを図-2に示した。

MDHについては、エノキタケ、シイタケともにHomo12.5でゲル全域にバンドが確認されたが、系統識別は困難であった。

4. まとめ

エノキタケ、シイタケともにESTについては、高濃度のゲルにより系統間の酵素の移動度差が期待でき、アイソザイムの分離・系統識別が可能であった。MDHについては、泳動方法及び条件等の改善が必要であった。

参考文献

- (1) 駒形和男編：微生物の化学分類実験法，pp. 185～209，学会出版センター，東京，1985
- (2) 日本生化学会編：生化学実験講座1，pp. 222～312，東京化学同人，東京，1987

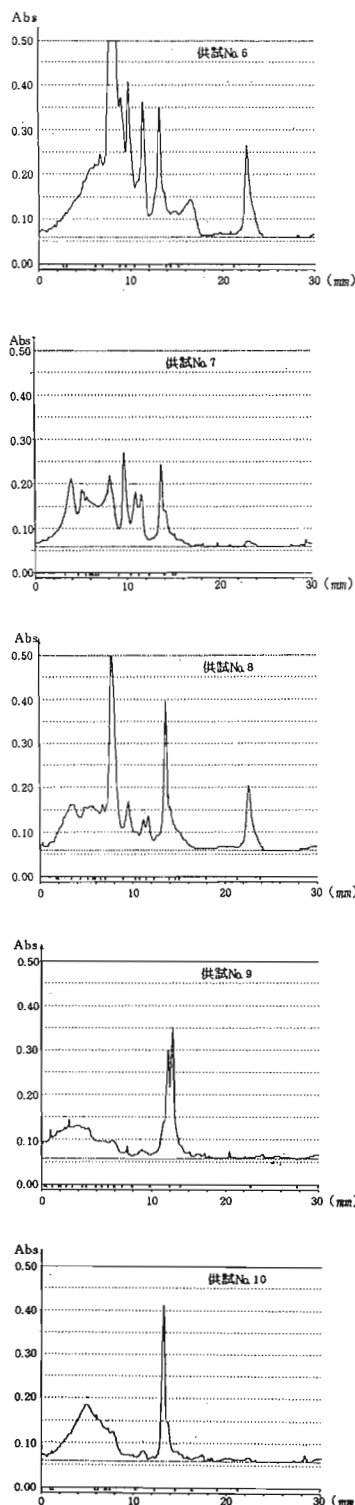


図-2 シイタケのESTアイソザイムにおける泳動パターンデンシトメトリー