

マッシュルーム菌糸由来プロトプラストへの紫外線照射による突然変異株の作出

星子英次郎, 加瀬谷泰介

Production of Mutants by Ultraviolet Irradiation to Protoplasts prepared from mycelium of *Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach

Eijiro Hoshiko and Taisuke Kasetani

Popular cultivated mushrooms in Japan, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes* and *Hypsizygus marmoreus* etc., have whitish lamella. However, *Agaricus bisporus* and a few others have dark-colored lamella, so they are harvested and on the market only immature stage with pale-colored lamella. In foreign countries, mature fruit body with dark brown lamella of *A. bisporus* is popular foodstuff, therefore we tried to breed pale-colored lamella mutants of *A. bisporus*.

UV-irradiation to *A. bisporus* protoplasts under the condition of 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ - 30 sec, just after spreading the protoplasts on an osmotic stabilized agar medium, demonstrated that lethal ratio of the protoplasts reached 99.9% or more. It was revealed that this was the most suitable condition to introduce mutation.

All of 1,185 UV-irradiated strains were obtained and 1,133 strains were evaluated by mycelial culture and then fruit body formation. Consequently, a few of 140 strains formed fruit body and only 15 strains showed some morphological mutation tending to have narrower and pale-colored lamella compared with their parental strain.

After subculturing of six strains from these lamella-malformed strains, we also examined reproducibility of the mutated phenotypes. As a result, three strains of the six tended to have parental-like wide and dark-colored lamella, and other three strains remained partially the mutation, narrow but rather dark lamella.

Key words: *Agaricus bisporus*, lamella, protoplasts, UV-irradiation, mutation.

日本における食用きのこ生産量は約 42.8 万トンで、その内、エノキタケ (26.8%)、ブナシメジ (24.1%)、シイタケ (21.8%)、マイタケ (10.7%) およびエリンギ (8.5%) の 5 品種が主要な栽培品種となっている¹⁾。一方、世界では、生産量約 490.9 万トンの内、マッシュルームが 37.6% で、特に中国や日本を除くと、市場のほぼ 8~9 割がマッシュルームで占められている²⁾。海外では、菌傘が開く前の未熟な「ボタン」と呼ばれる形状のものだけでなく、菌傘が開き、胞子も成熟した「カップ」や「フラット」と呼ばれる形状のものが一般的に販売されており、その特徴に応じた様々な調理法で食されている。一方、日本の消費者は、菌傘が開く前の「ボタン」の印象が強く、調理法も限られている。また、国内市場は小さく (3 千トン)¹⁾、特定の消費者や飲食業界に限定される傾向がある。

マツタケ、シイタケ、エノキタケ、ブナシメジなど、日本で需要の高いきのこ類は大抵菌傘の裏が白く、成熟して、ひだ (菌褶) が黒化した状態のマッシュルームは昔から敬遠される傾向がある^{3),4)}。そこで、日本の消費者の嗜好に合った、成熟して菌傘が開いた形態でも、菌褶が淡色な品種を作出し、海外同様に、多様な形態のマッシュルームを、

日本の消費者に対して「新しい」食材として提案すべく、育種を試みている。

食用担子菌類 (きのこ) の育種にも一般に交配法が常用されるが、目的とする形質を集積することが主であって、存在する形質を変容、消失させるにはそぐわない。さらに、マッシュルームの生活環は二次的ホモタリズムを示し⁵⁾、その担子胞子のほとんどが「両親」系統由来の異種の核を 2 個有し、交配を経ずに子実体を形成するため、まず材料となる一核菌糸を分別・収集し、交配、選抜する方法が用いられるが^{5),6)}、収集効率は低く、多大な労力を要する。

従って、変異原処理による新たな形質を獲得する手段がより効率的であると考えられる。その素材として、菌糸由来のプロトプラスト (PP) を用いた。PP は元株の遺伝子組合せのままの核を持ち、元株の形質を保持しているため、変異誘導の素材として胞子よりも有利である⁷⁾。

変異誘発方法として、最も簡便で安全性が高い紫外線 (UV: Ultraviolet) 照射を実施した。PP に UV 照射する手法では、マッシュルーム抗真菌剤耐性株の作出⁸⁾ やエリンギの胞子形成能欠損株の作出⁹⁾ が報告されている。

本報では、マッシュルーム菌糸由来の PP に対する UV

照射条件を決定し, さらに, 得られた UV 照射株を小型瓶で栽培して子実体を形成させ, その形質を調査したので報告する.

材料および方法

1. 材料および器具

1-1. マッシュルーム菌糸由来 PP 調製と変異原処理条件の検討

(1) 供試菌株

当研究室保有のマッシュルームの“T” および “7” の 2 株を PP 調製, UV 照射に供した.

(2) 試薬

菌糸および PP の培養には, Potato Dextrose broth (Difco Laboratories 社, 254920) と Potato Dextrose Agar (Difco Laboratories 社, 213400) を同社の定法に従って調製した. 細胞壁溶解酵素は, Glucanex[®] (ノボザイムズジャパン(株), L1412) を用い, その溶媒と PP の分散媒には 10mM リン酸緩衝液 (pH 5.5) を用いた. PP の浸透圧調整剤として 0.6M マンニトール (和光純薬工業(株) 133-00845) を添加した.

(3) 器具

PP 調製用菌糸体の破碎にホモジナイザー (日本精機(株), Excel Auto Homogenizer MX-11), 酵素反応の条件設定にウォーターバスインキュベータ (ヤマト科学(株), BT-23), PP の回収に開口部 20 μ m のナイロンメッシュ 2 枚で整形脱脂綿 (株相互理化学硝子製作所, カット綿 4 \times 4cm) 3 枚を挟む形で組み合わせて 10 ml 注射筒に詰めた自作フィルタと遠心機 (株久保田製作所, 5100) を用いた.

紫外線の光源には, クリーンベンチ (日立アプライアンス(株), PCV-603BNG3) に取り付けられている, 主波長 253.7 nm, 出力 15 W の直管殺菌灯 (三菱電機照明(株), GL-15) を用いた.

1-2. UV 照射株の栽培による評価

(1) 栽培用資材

栽培用樹皮堆肥培地: 市販園芸用資材「1/2 つぶつぶ圧縮バーク堆肥」(アイリスオーヤマ(株)製), ピートモス (泥炭) (Therriault & Hachey Peat Moss Ltd. (カナダ) 製造, 王子木材緑化(株)販売, Main River Peat Moss) および飼料用小麦ふすま (全国飼料卸共同組合) を混合し, 水分含量が 65% (w/w) となるよう加水した後, 炭酸カルシウム (上田石灰製造(株), マルジョウ炭カルTM) を添加した. 配合比を表 1 に示す.

覆土材料: ピートモスと赤玉土 (白井園芸資材 (有), 上質 赤玉土 (中粒) 16L/袋) を混合し, 炭酸カルシウムを添加して, 水分含量が 55% となるよう加水して, 110 $^{\circ}$ C -25 分間殺菌した. 配合比を表 2 に示す.

栽培用容器: ポリプロピレン製栽培瓶 (ホクト産業(株),

555-52) と, 発泡ウレタン製フィルタ内蔵の専用蓋を用いた.

表 1 栽培用培地処方

資材	混合比(容量比)
バーク堆肥	5
ピートモス	2
小麦ふすま	2
炭酸カルシウム	0.6%(w/w)
水分含量65%(w/w)になるよう加水	

表 2 覆土処方

資材	混合比(容量比)
ピートモス	4
赤玉土	6
炭酸カルシウム	4%(w/w)
水分含量55%(w/w)になるよう加水	

(2) 菌褶色の評価

肉眼観察と合わせて, 菌褶全体の外観をデジタルカメラ (パナソニック(株), DMC-LX2) で, 菌褶の側面を PC 用画像スキャナー (セイコー・エプソン(株), GT-X970) で記録した.

菌褶の色を数値化するために, 画像処理ソフト Photoshop CS 5 (アドビシステムズ(株)) を用い, RGB 値を Lab 値に変換した.

2. 実験方法

2-1. PP 調製と UV 照射条件の検討

(1) PP 調製

菌糸の液体培養: ϕ 5 mm の菌糸片 5 片を 20 ml PD broth に接種し, 20 $^{\circ}$ C -95%R.H. で約 1 ヶ月間培養した. 菌体と培養液をホモジナイザーで 5000 rpm -5 分間, 破碎処理後, 処理液 5 ml を新しい PD broth 20 ml に接種し, 20 $^{\circ}$ C -4 日間二次培養した. 培養液を 5000 rpm -15 分間, 遠心して上清を除去し, 菌体を回収した. 培養液 20 mL 当たり菌体 3.0 ~ 6.0 g (湿潤重量) を得た.

酵素処理, 分離・回収: 酵素溶媒に細胞壁溶解酵素 Glucanex を 2% (w/v) となるように溶解して, 孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過除菌し, 酵素液とした. 回収した菌糸体を秤量し, 菌体 1 g 生鮮重当り酵素液を 5 ml の割合で混合し, 25 $^{\circ}$ C -70 rpm で 4 時間, 酵素反応させた.

反応終了後, 自作フィルタで PP と菌糸片を濾別した. 濾液を 894 \times g (ローター半径 20 cm, 2000 rpm) で 30 分間遠心し, 上清を除去して PP 分散媒を添加した後, 同条件で再度遠心して, 沈殿した PP を回収し, 分散媒を 3 ml 添加して, PP 懸濁液とした. トーマ氏血球計算盤で PP 細胞数を計数した. PP 数は平均 4.0×10^7 cell/ml であった.

(2) UV 照射条件の検討

殺菌灯 GL-15 を光源とし、照射距離を光源直下から 10 cm (照度 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$), 15 cm (照度 400 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) の 2 区、照射時間を 10, 20, 30 秒に設定した。照度は Digital Ultraviolet Radiometer Model 8.0 UVC (Solartech Inc. Harrison Township, MI) で実測した。浸透圧を調整した再生用 PDA 平板培地に PP 懸濁液 0.1 ml (10^6 cell/ml 水準) を塗抹し、上記の条件で UV 照射後、23°C-60%R.H. で培養した。経時的に観察して、再生した菌叢数を計数した。各 UV 照度における PP 再生数減少曲線から、一定照度において PP 再生数を 1/10 にするのに要する照射時間、D 値 (sec) を算出した (n=3)。

(3) UV 照射株の単離

瓶栽培による形質調査の対象とする UV 照射株の単離基準は、M. Ramzan et al.¹⁰⁾、および Ikram-ul-Haq et al.¹¹⁾ の報文を参考に、PP 致死率が 99.9% 以上、即ち UV 非照射区の再生 PP 数に対して 3 桁以上減少した照射条件下で再生した菌叢とした。経時的に観察し、適時単離した再生菌株 (UV 照射株) は 23°C-60% R.H. で約 2 週間培養した。

2-2. UV 照射株の菌糸伸長試験による栽培株選抜および瓶栽培による形質評価

(1) UV 照射株の菌糸伸長試験による栽培株選抜

栽培による形質調査を効率化するため、単離した UV 照射株のうち、子実体を形成する見込みのある株を瓶栽培に供する前の段階で選抜した (一次選抜試験)。選抜方法として、 ϕ 25 × H120 mm の平底試験管 (植物培養用 3 号、(株)マルエム) と発泡シリコン栓 (シリコセン[®] T-24, 信越ポリマー(株)) を用い、UV 照射株菌糸片を栽培用培地に直接接種して、培地に対する資化性を評価する菌糸伸長試験を実施した。

一次選抜試験 (菌糸伸長試験) の試験管培地調製、接種、培養および評価: 平底試験管に栽培用樹皮堆肥培地 20 g を充填、滅菌 (120°C-90 分間) し、培養菌株を打ち抜いた (ϕ 10 mm) UV 照射株の菌糸片を接種して、25°C-60%R.H. で 4 週間培養した。培養後、菌糸伸長距離を測定した。

菌糸伸長速度が親株と同程度もしくはそれ以上であり、かつ、菌糸の伸長状態、密度等から樹皮堆肥培地に対する資化性を総合的に評価して、二次選抜に供する株を選抜した。

(2) UV 照射株 (栽培株) の瓶栽培、収穫および形質調査栽培用培地の瓶充填、殺菌、UV 照射株の接種および培養: 580 ml 容栽培瓶 (555-52) に、表 1 の処方調製した栽培用培地 420 g を瓶肩部まで充填し、中央に通気孔 (ϕ 20 mm) を開けた。レトルト装置で 120°C-90 分間殺菌、一晩放冷した。一次選抜に用いて菌糸が蔓延した培地を瓶栽培の種菌として用い、約 6 g ずつを 3 本の栽培瓶に詰め、培地の表面と通気孔にそれぞれ接種し、23°C-60%R.H. で培養した。栽培株毎に瓶 3 本を用いた (n=3)。対照株は

親株 “T” および “7” である。

覆土充填および培養: 菌糸が伸長し、培地全体に到達したものから、培地表面の種菌部分および気中菌糸を除去し、栽培瓶の首部に約 3 cm の厚みで覆土 (表 2) を充填し、23°C-60%R.H. で培養した。

発生処理: 菌糸が伸長して覆土表面の 2/3 程度まで到達した時点で、ピンセットで覆土上層を攪拌し、十分に加水した (菌掻き) 後、16°C-95%R.H. に降温して子実体発生を誘導した。

子実体収穫基準: 菌傘が完全に開き、その周縁部が下から外側に向いた、菌褶が充分に露出した段階の子実体を収穫した。

子実体形質評価: 菌褶下面はデジタルカメラで撮影し、子実体側面は菌傘中央部から幅 2 mm 程度に切り出した子実体縦断切片 3 枚を PC 用画像スキャナーで読み取った。条件は W175.6 × H95.0-120.0 mm, Reflective, 24 bit-color, 400 dpi とし、出力は TIFF 形式ファイルとした。子実体側面図の菌褶部分について、画像処理ソフトで R (赤), G (緑), B (青) それぞれの平均値を算出するとともに、Lab 表色系に変換した。

子実体の菌傘直径および菌褶幅の計測: 子実体の菌傘直径および菌褶幅は子実体側面図のスキャン画像から計測した。菌褶幅は子実体側面図の左右 2 つの菌褶中央部の長さを切片 3 枚について、それぞれ計測し、平均と標準偏差を算出した。

子実体の菌褶色調評価: 目視観察で親株である “T” および “7” と比較して、明らかに淡く見えるか否かと、明度 (L 値) を主な評価基準とした。RGB 平均値も目視観察の参考とした。

2-3. 形質変異株の再現性調査

子実体を形成した UV 照射株 (栽培株) のうち、一部、形態が変異した株について、菌糸を継代し、再度、瓶栽培で子実体形成させ、形質が保持されるかどうか調査した。

結果

1. UV 照射条件の決定

PP 再生数の減少曲線を図 1 に、各照射距離 (UV 照度) における D 値を表 3 に示す。

“T” および “7” 菌糸由来 PP に対する UV 照射試験の結果、PP 再生数を 1 桁減少させる時間、即ち D 値は 2 菌株共に照射距離 10 cm (照度 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) で約 10 秒、距離 15 cm (照度 400 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) では約 30 秒であった。従って、UV 照射株作出条件、即ち、PP 再生数を 3 桁減少させる照射条件を照射距離 10 cm、照射時間 30 秒に決定した。

UV 照度が増加すると共に、PP の D 値は減少した。また、図 1 下段グラフより、UV の照度と照射時間の積である照射線量 (mJ/cm^2) が同じであっても、UV 照度が異なると、PP 再生数も異なり、照度が大きいほど PP 再生数は小さくなった。

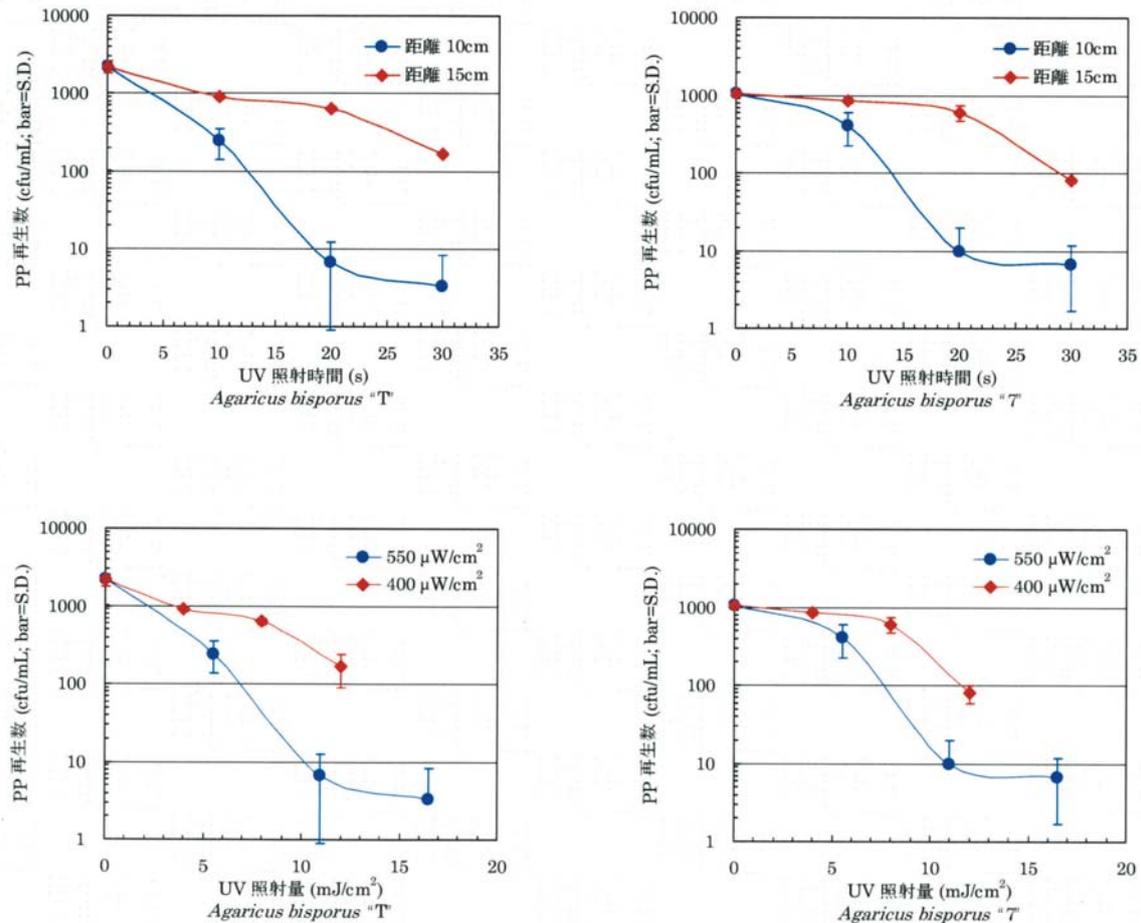


図1 UV照射によるPP再生数減少曲線

(横軸は上段グラフがUV照射時間(秒)、下段グラフがUV照射量 (mJ/cm²))

表3 PPに対するUV照射結果

供試菌株 菌体量(g FW)	PP再生率 (%)	非照射時の PP再生数 (cfu/ml)	照射距離 (cm)	D値 (sec)
"T"	0.0028	2.2×10^3	10	10.8 ± 2.0
6.0			15	28.7 ± 6.5
"7"	0.0049	1.0×10^3	10	12.9 ± 1.4
6.4			15	28.7 ± 3.3

2. UV照射株の単離

PP調製およびUV照射を計29回(菌株“T”24回, 菌株“7”5回)実施した結果, 累積で“T”由来1076株, “7”由来109株, 計1185株のUV照射株を得た。

3. 菌糸伸長試験による栽培株の選抜(一次選抜試験)

初期122株のUV照射株は, 直接, 栽培に供して子実体形成とその評価を試みたところ, 子実体を形成したものは37株(30.3%)に留まり, 非常に効率が悪かった。そこで, この122株と単離後に失われた52株を除いた1011株については, 栽培の前に, 樹皮堆肥培地における菌糸生長を調べることで, 子実体を形成する見込みがあると判断したも

のを選抜した。

その結果, 親株と同程度もしくはそれ以上の菌糸伸長速度を示し, かつ, 伸長した菌糸の形態, 色調, 密度等が良好で, 子実体を形成する可能性があるかと判断した株は216株(21.4%)であった。図2に菌糸伸長の状況(抜粋)を示す(23°C-60%R.H.で, 4週間培養後)。



図2 栽培用培地でのUV照射株菌糸伸長(抜粋)

(“○” PPUV-T-0622, 0857, 1105 を選抜した。右端が親株“T”)

4. UV照射株(栽培株)の瓶栽培および形質評価

UV照射株の培養・発生状況について、表4に示す。瓶栽培に供したUV照射株338株中、子実体形成に至ったのは140株であった。これは、一次選抜株216株の47.7%に当り、照射株の全数栽培時の30.3%と比較して、明らかに高く、堆肥への資化性と菌糸生育の活力を指標とした選抜は全体の効率化に有効であった。

子実体形成株140株の中で、親株と比較して菌褶の幅が非常に小さく、色調も淡い傾向を示す菌褶形成不全株が15株得られた。これは、一次選抜株の7%、全体の1.4%に当たり、UV照射による突然変異誘発で、ある程度の確率で目的とする形質を得られる可能性が示された。15株の菌褶下面図、子実体側面図および算出した菌褶平均色を図3に示す。

表4 UV照射株の培養・発生状況

区分	株数	総数%(栽培総数%)
菌糸蔓延不良・停止	46	4.1% (13.6%)
覆土伸長不良	66	5.8% (19.5%)
原基未形成	58	5.1% (17.2%)
原基形成のみ	28	2.5% (8.3%)
子実体形成 (菌褶形成不良15)	140	12.4% (41.4%)
栽培株総数	338	29.8% (100%)
非選抜株	795	70.2%
総数	1133	100%

	菌褶 下面図	子実体 側面図	菌褶 平均色		菌褶 下面図	子実体 側面図	菌褶 平均色
T(親株)				PPUV-T-0896			
PPUV-T-0288				PPUV-T-0898			
PPUV-T-0295				PPUV-T-0901			
PPUV-T-0453				PPUV-T-0939			
PPUV-T-0463				PPUV-T-0953			
PPUV-T-0466				PPUV-T-0961			
PPUV-T-0534				PPUV-T-0974			
PPUV-T-0871				PPUV-T-0976			

図3 親株“T”と菌褶形成不良株の形質

これら15株の子実体は、親株“T”と比較して菌褶幅が明確に小さく、菌褶すなわち、胞子を形成するための組織である子実層自体の形成が不完全であった。親株30個

体と菌褶形成不全15株について、表5に菌傘直径、菌褶幅および直径に対する菌褶幅の比を、図4に菌傘直径と菌褶幅の関係を示す。

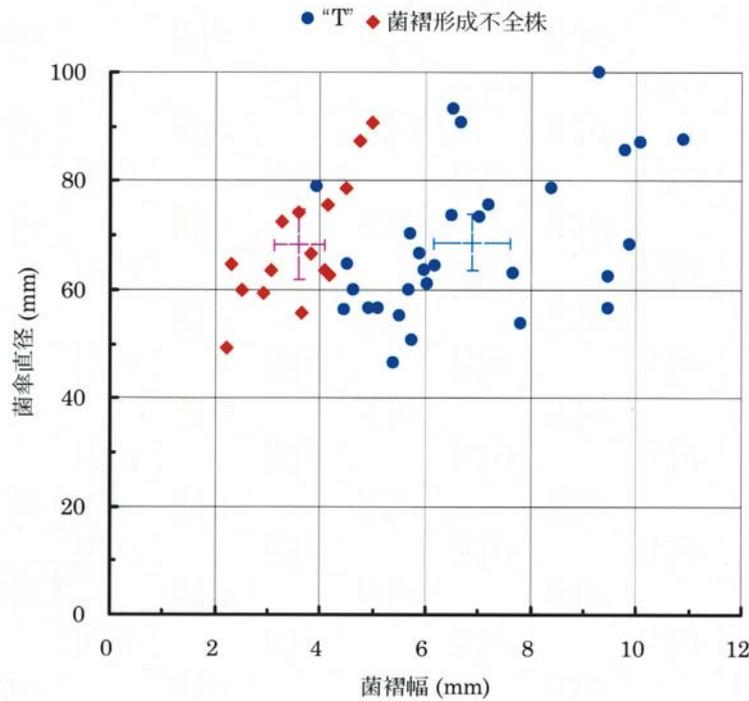


図4 親株“T”および菌褶形成不全株における菌傘直径と菌褶幅の関係
(+ : 平均値, 上下・左右 bar : 95% 信頼区間)

表5 菌褶形成不全株の菌傘直径、菌褶幅および直径に対する菌褶幅の比

	菌傘直径(mm)	菌褶幅(mm)	菌褶幅/菌傘直径 比	“T”の比との 有意差 0.1% ***
親株“T”	68.71 ± 13.80 ^a	6.87 ± 1.96 ^a	0.101 ± 0.026 ^a	
PPUV-T-0288	63.57	3.05 ± 0.96 ^b	0.048 ± 0.005 ^b	***
PPUV-T-0295	66.57	3.81 ± 0.56 ^b	0.057 ± 0.008 ^b	***
PPUV-T-0453	90.71	4.97 ± 1.82 ^b	0.055 ± 0.020 ^b	***
PPUV-T-0463	87.43	4.75 ± 0.42 ^b	0.054 ± 0.005 ^b	***
PPUV-T-0466	75.57	4.14 ± 0.06 ^b	0.055 ± 0.001 ^b	***
PPUV-T-0534	78.71	4.48 ± 0.69 ^b	0.057 ± 0.009 ^b	***
PPUV-T-0871	72.57	3.25 ± 0.67 ^b	0.045 ± 0.009 ^b	***
PPUV-T-0896	63.57	4.09 ± 0.46 ^b	0.064 ± 0.007 ^b	***
PPUV-T-0898	74.14	3.58 ± 0.25 ^b	0.048 ± 0.003 ^b	***
PPUV-T-0901	64.57	2.29 ± 0.01 ^b	0.035 ± 0.000 ^b	***
PPUV-T-0939	60.00	2.50 ± 0.36 ^b	0.042 ± 0.006 ^b	***
PPUV-T-0953	59.43	2.90 ± 0.48 ^b	0.049 ± 0.008 ^b	***
PPUV-T-0961	62.86	4.17 ± 0.67 ^b	0.066 ± 0.011 ^b	***
PPUV-T-0974	55.71	3.65 ± 0.39 ^b	0.065 ± 0.007 ^b	***
PPUV-T-0976	49.29	2.20 ± 0.54 ^b	0.045 ± 0.011 ^b	***

a : 親株“T” 30 個体の平均値 ± 標準偏差, b : 1 個体での菌褶中央部 6 点の平均値 ± 標準偏差

図4に示すとおり, 菌褶形成不全株の菌傘直径は親株“T” 30個体の平均と同じ範囲に分布しており, 有意差はないが, 菌褶幅は2~5mmと, 親株の4~11mmに比べて明らかに小さい. 親株と菌褶形成不全株で, 菌褶幅および直径に対する菌褶幅の比を比較した結果, 全15株ともに, 有意差 ($p < 0.001$) が認められた (表5).

9株 (PPUV-T-0288, 0295, 0466, 0534, 0871, 0896, 0901, 0939, 0976) において, 親株と比較して菌褶色調が淡色化しており (図3), 菌褶の色素量や胞子の形成量が減少した可能性が示唆された. 図5に菌褶色調のLab値を, 図6に菌褶幅とL値の関係を示す.

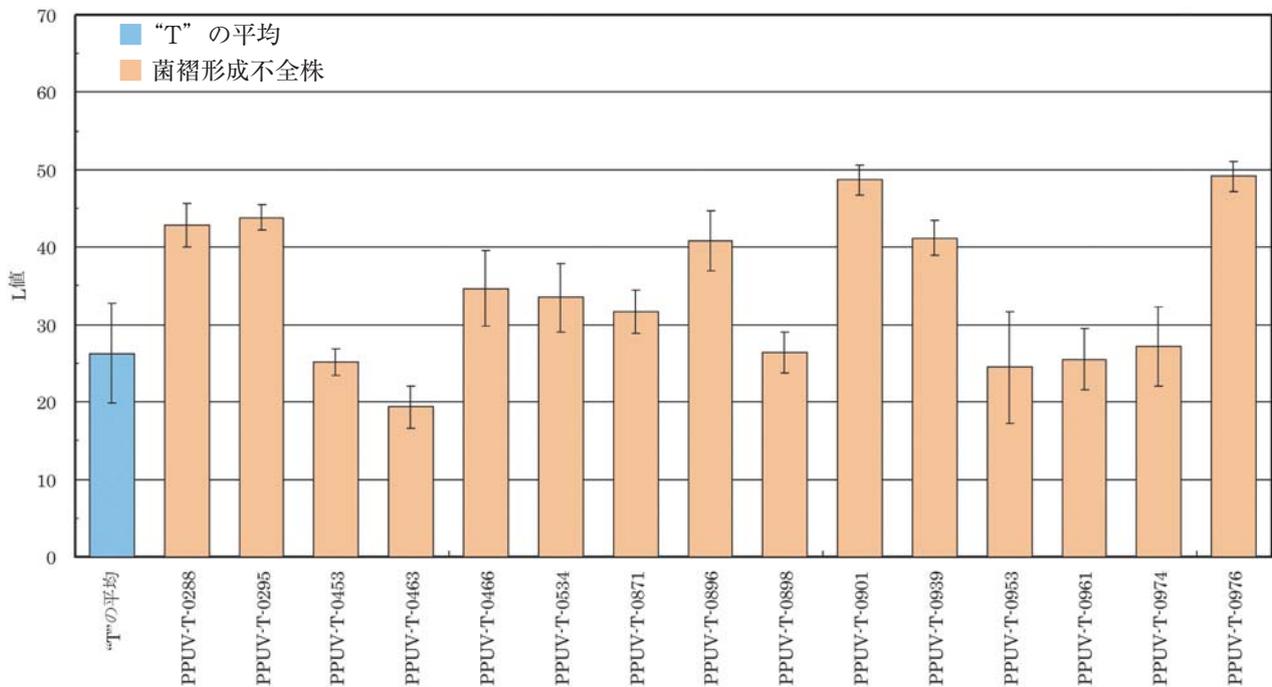
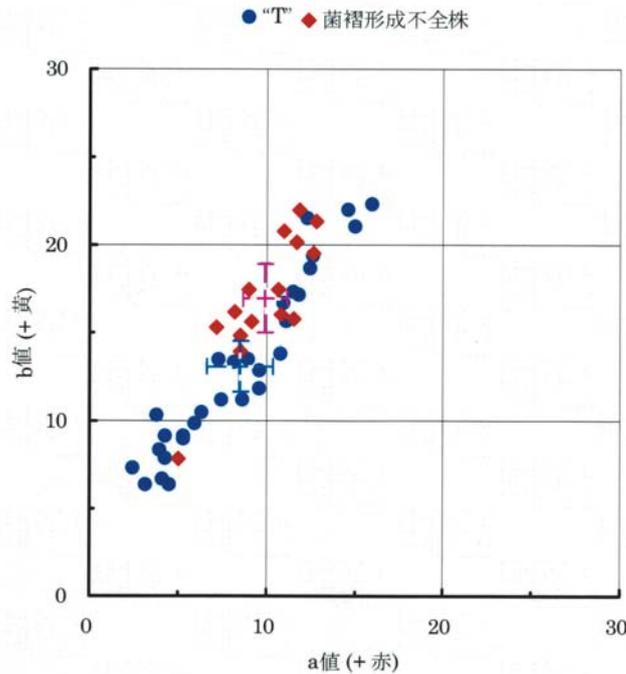


図5 親株“T” および菌褶形成不全株の菌褶色調
(上段: ab座標系, bar: 95%信頼区間, 下段: L値, bar: 標準偏差)

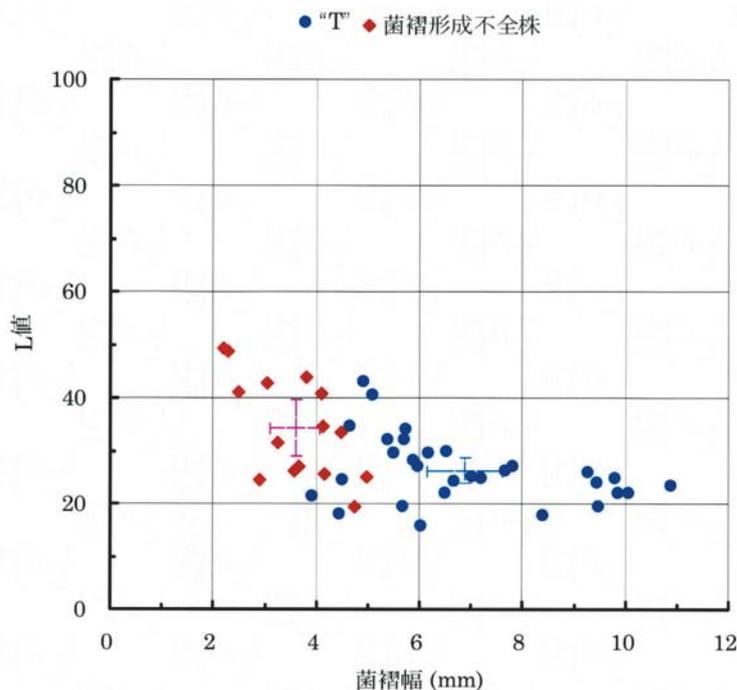


図6 親株“T”および菌褶形成不全株における菌褶幅とL値の関係
(+ : 平均値, 上下・左右 bar : 95% 信頼区間)

ab座標系では、親株30個体のバラツキは大きく、a値、b値共に広い分布を示した。即ち、原点に近い個体は白黒要素が大きく、遠い個体は茶色要素が大きい。L値は平均26.3である。対して、15株の菌褶形成不全株はa値、b値共、比較的に大きい範囲に分布しており、茶色要素が高いことが分かる。L値は6株 (PPUV-T-0288, 0295, 0896, 0901, 0939, 0976) において、40を超えており、肉眼でもそれと分かるほど (図3)、親株と比較して淡色化していることが示された。

5. 形質変異株の再現性調査

菌褶形成不全株6株 (PPUV-T-0288, 0295, 0453, 0463, 0466, 0534) について、菌糸を1回継代して、約3週間培養後に、再度、栽培を行った結果、各株3個体を収穫した。子実体側面図を図7に示す。

継代株による栽培の結果、6株中3株 (PPUV-T-0288, 0453, 0534) では、菌褶の形態に起こっていた変異が親株の形質に復帰、即ち、菌褶幅が太くなっていた。一方、他の3株 (PPUV-T-0295, 0463, 0466) では、初回栽培よりも菌褶の色調が濃くなっているものの、親株と比較してやや淡色化している傾向は維持されており、また菌褶幅が小さくなる形態変異は保持されていた。

考察

効率的に突然変異を誘発する照射条件 (照射距離 = 照度, 時間) を、PP再生数を3桁減少させる10 cm (照度 $550 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), 30秒に決定し、実施したところ、PPへの

UV照射によって再生数が減少すると共に様々な形質に変化が現れた。

照射距離を15 cmから10 cmに短縮し、UV照度が増加すると共にPPのD値は減少した。UV照射によって核酸上の隣接するチミン同士などが二量体 (シクロプタンピリミジンダイマーなど) を形成し、その塩基配列の変化によって遺伝情報や遺伝子発現が攪乱されることが、UVによる殺菌や突然変異の発生原理とされる¹⁴⁻¹⁵。一般に、殺菌灯の効果はUVの照度と照射時間の積である照射線量 (mJ/cm^2) に依存するとされているが、それが同等であっても、UV照度が大きいほどPP再生数が小さくなることが観察された (図1下)。一般論は正常な形態の細菌や真菌に関する殺菌効果に関してであるが、本報の例数が少ないこともあり、PPでは異なるのかも含めてさらに検討を要する。

マッシュルーム菌糸由来プロトプラストへのUV (主波長253.7 nm) の照射によって、多数の変異株が得られた。変異の発生は様々な形質に及んでおり、例えば、PDA培地では生育しても堆肥では十分に生育できない841株は、本来は資化できるリグノセルロースなど腐植質の分解・吸収もしくは代謝に関与する遺伝子に変異を来たしていることが考えられる。すなわち、PDA培地はジャガイモの熱水抽出物にブドウ糖と寒天を添加したもので、比較的低分子の水溶性成分からなっているため、それらを直接に吸収し栄養にできる一方、堆肥は発酵過程で低分子物質を消費してセルロースやリグニンなどの難分解性高分子物質のみとなっており、添加剤の小麦ふすまも主にセルロースと多少の蛋白質、澱粉といった比較的分子量の高

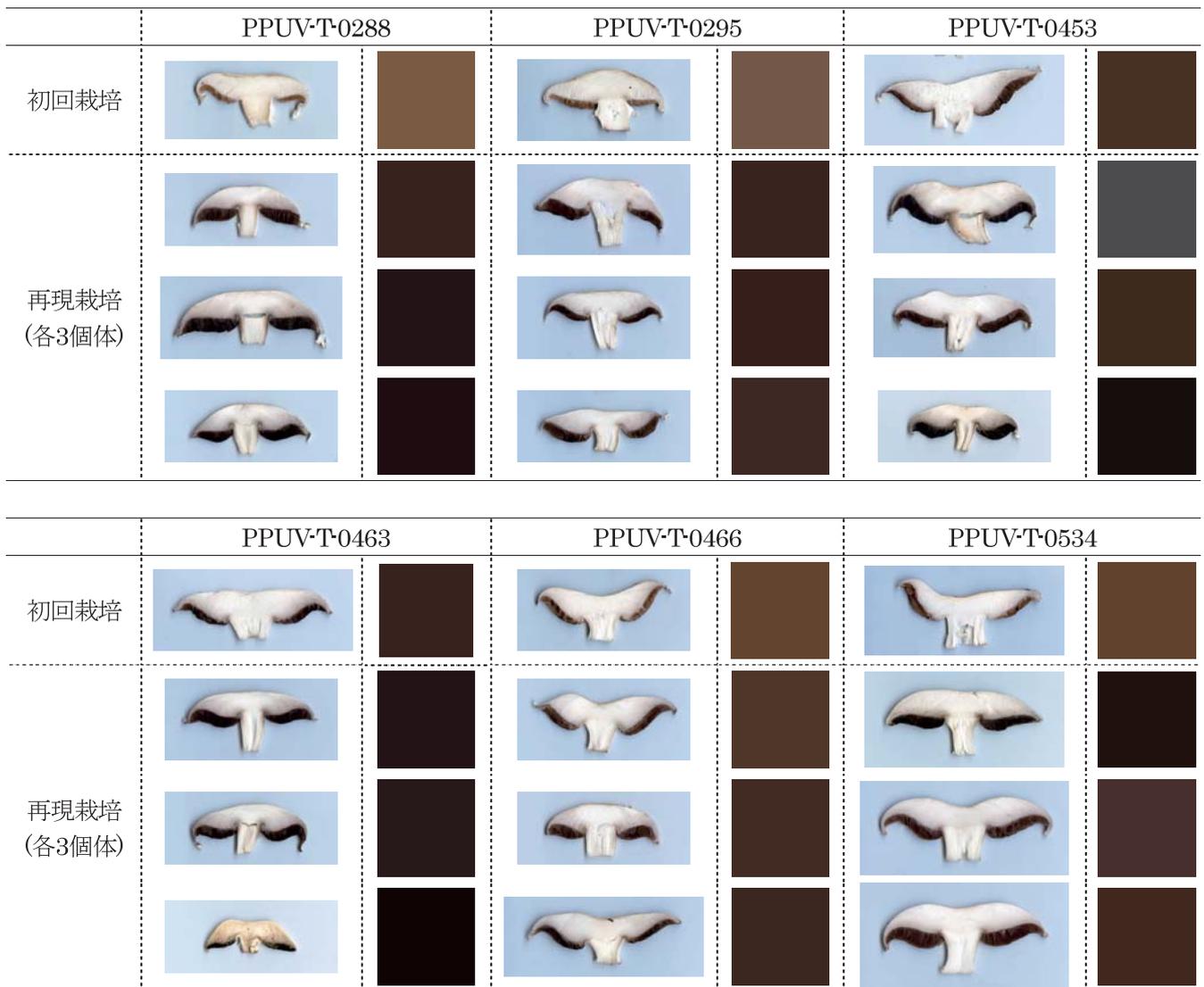


図7 初回栽培および再現栽培における子実体形態比較

い物質からなっているため、それらを栄養とするには高分子物質を低分子化する分解酵素が不可欠であるからである。 *A. bisporus* において代表的な基質分解酵素と遺伝子として、Laccase (*lcc1-2*), Endo-1,4- β xylanase (*xlnA*), Cellulase (*cel1*, *cel3*), 1,4-exocellobiohydrolase (*cel2*) が報告されているが¹³⁾, UV 照射によってランダムに発生するチミン二量体などの形成によって、このような酵素をコードする遺伝子やそれを制御する機構が損傷し、セルロースなどの高分子基質の分解・吸収が困難となって菌糸伸長が減退した可能性が推察された。また、子実体を形成させるための栽培の過程で、堆肥中に菌糸が蔓延しても覆土中に蔓延できない株および覆土中で生育を停止するのが66株見られたが、これについては、富栄養環境(堆肥)にある菌糸から貧栄養環境(覆土)にある菌糸に、生育に必要な物質を供給する機能に支障のあることが考えられる。すなわち、本報では泥炭を供試したが、覆土とは栄養豊富な堆肥層に生育する菌糸を飢餓状態に置くことで子実体を誘導するために、堆肥中に菌糸が蔓延した後、厚さ

5 cm 前後となるよう重層する貧栄養素材であり、覆土に侵入し、周囲から栄養を得られない菌糸が生育し、子実体を形成するには、離れた部分の菌糸より十分な栄養が供給される必要があるからである。

また、子実体原基を形成しない、または途中でその生育が停止する86株は、上述のように子実体の生長や成熟に必要な物質を離れた菌糸から輸送する機能や、形態形成、胞子形成などの生殖機能自体に支障があると推定される。すなわち子実体原基が形成される前後から、子実体の形成と成熟に必要な物質を効率よく供給するために周囲の菌糸がそこに集中し、肉眼観察が可能なほど太い構造(菌糸束)が形成されて植物の根のようになるが、通常菌糸と合わせて十分な栄養が原基に供給されて初めて子実体が成熟するのであり、また、胞子が形成されないと、そこには栄養が供給されなくなるなど、その有無が栄養供給を左右しているからである。子実体形成には Cytochrome P-450 (*cypA*), Septine (*sepA*), α -subunit of ATP-synthase (*atpD*), Hydrophobin (*hypA*) などの遺伝子が関与する

との報告があり¹³⁾, これらを含めた関連遺伝子が損傷した可能性が推察される。

したがって, 子実体を形成した140株のうち, 菌褶形成不全を示した15株を除く125株には全く変異が発生していないと仮定しても, 上記の計1008株には様々な変異が発生しており, その発生率は89.0% (1008/1133) に達する。一見, 表現形が親株から変化していないように見える125株についても, 何らかの変異は内在している可能性があり, 実際の発生率はより高いと考えられる。

一方, UV照射による突然変異誘発の原理から, 変異の発生には方向性や傾向はなく, 目的とする淡色菌褶という形質に少しでも近い特徴を有する15株は, 作出したUV照射株1133株に対して1.3%に留まっており, 労力に対して高効率であるとは言いがたい。

作出した変異株6株を継代後に栽培した結果, 半数の菌褶がほとんど元の形態に復帰し, 半数は色調が濃くなったものの, 淡色化している傾向と菌褶幅が小さく変異した形態が保持されていた。生物にはチミン二量体を復帰させる修復機構があり, 近紫外光・可視光で高速に修復が促進される系や光は不要であるが速度の遅い系がある¹⁴⁻¹⁵⁾。菌糸は暗黒下で培養していたが, 培養期間中(約3週間)や栽培の過程で遺伝子に関する修復機構が働いて, 部分的に還元した可能性が考えられる。

参考文献

- 1) 農林水産省, 野菜生産状況表式調査, http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_yasai/index.html (2012 閲覧)
- 2) Chang, S. T., Mushroom Research and Development - Equality and Mutual Benefit, Mushroom Biology and Mushroom Products, Royse, D. J., (ed.), Penn State Univ. (University Park, PA), pp.1-10, ISBN 1-883956-01-3 (1996)
- 3) 川村清一, 原色版菌類図説, No.165 (ページ番号なし), 大地書院 (東京) (1929)
- 4) 廣江 勇, 茸類の科学, p.71, 富民社 (東京) (1949)
- 5) Horgan, P. A., Jin, T. and Anderson, J. B., The use of Protoplast Production, Protoplast Regeneration and Restriction Fragment Length Polymorphisms in Developing a Systematic and Highly Reproducible Breeding Strategy for *Agaricus bisporus*, Genetics and breeding of *Agaricus*-Proceedings of the First International Seminar on Mushroom Science, van Griensven, L. J. L. D. (ed.), Pudoc; Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Wageningen, the Netherlands), pp.62-72 (1991)
- 6) Robles, C. and Lodder, S., Mushroom Breeding-A Fresh Perspective-, *Mushroom Business*, 41 (July), pp.12-13 (2010)
- 7) 柳 園江, プロトプラスト育種技術 (キノコ編 (II. バイオ技術) 第2章 2.2), キノコとカビの基礎科学とバイオ技術, 宍戸和夫 (編著), (株)アイ・ピー・シー (東京), pp.269-271, IBN4-901493-24-8 (2002)
- 8) Challen, M. P. and Elliott, T. J., Production and evaluation of fungicide resistant mutants in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 88(4), pp.433-439 (1987)
- 9) 長野県農業総合試験場・バイオテクノロジー部担当, 紫外線照射によるエリンギの担子胞子形成欠損突然変異株の作出法, 平成15年度「関東東海北陸農業」研究成果情報, http://narc.naro.affrc.go.jp/chousei/shiryou/kankou/seika/kanto15/09/15_09_08.html (2003)
- 10) Ramzan, Muhammad and Mehmood, Tahir, Enhanced production of glucose oxidase from UV-mutant of *Aspergillus niger*, *Afr. J. Biotechnol.*, 8(2), pp.288-290 (2009)
- 11) Ikram-ul-Haq, Khurshid, Samina, Ali, Sikander, Ashraf, Hamad, Qadeer and M. A., Ibrahim Rajoka, M., Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(1), pp.35-37 (2001)
- 12) 木下 忍, 紫外線と熱処理の併用 (第3章), フレッシュ食品の高品質殺菌技術, 五十部誠一郎, 藤川 浩, 宮本 敬久 (編集), (株)サイエンスフォーラム (東京), pp. 223-228 (2008)
- 13) Stoop, J. M. H. and Mooibroek, H., Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52(4), pp.474-483 (1999)
- 14) Bo Durbeej and Eriksson, L. A., Reaction mechanism of thymine dimmer formation in DNA induced by UV light, *J Photochem Photobiol Chem*, 152, pp.95-101 (2002)
- 15) 新谷英晴, 紫外線滅菌による損傷とその修復メカニズム, *防菌防黴*, 31(7), pp.385-391 (2003)