

γ線や重粒子線による変異マッシュルームの成分評価

笹井 実佐

Ingredients Analysis of Mutant Mushrooms (*Agaricus bisporus*) Induced by gamma ray or Ion-Beam Irradiation

Misa Sasai

Agaricus bisporus mushroom were induced by gamma ray or ion-beam irradiation, then the concentrations of some sugars and amino acids in self-cultivated mushroom mutants were determined. Mutant mushrooms with high Brix or ergothioneine contents were selected, self-cultivated on a large scale, and analyzed. Analytical methods using gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry were developed. The mutants originally selected for their high Brix contents did not have high Brix or sugar contents when cultivated on a large scale. The apparently high Brix contents first found may have been caused by other dissolved solids (except sugars). Mutants selected for their high ergothioneine contents did not have high ergothioneine contents when cultivated on a large scale. The growing environment may strongly influence the amino acid contents of mushrooms. The reproducibilities of mutant phenotypes need to be assessed in more detailed studies.

Key words: Ingredients Analysis, Mushrooms, Mutant, Ion-Beam, gamma ray, *Agaricus bisporus*, sugar, amino acid, ergothioneine, GC/MS, LC/MS, gas chromatography mass spectrometry, liquid chromatography mass spectrometry

1. 背景および目的

マッシュルーム (*Agaricus bisporus*, ツクリタケ) は世界で最も流通しているキノコであるが、日本では全キノコ栽培量の約 1.2% (5,632 トン) の生産量にとどまっている^{1), 2)}。諸外国では成菌すなわち菌傘が開いたフラット形状のマッシュルームが多く食用とされているのに対し、日本では幼菌いわゆるボタン形状のマッシュルームが好まれることにより、収穫時期が狭められていることも生産量の伸張を抑えていると推察される。日本においてフラット形状のマッシュルーム消費が伸び悩む要因の一つとして、開傘に伴う菌褶 (ひだ) の黒色化があると考え、弊所ではマッシュルームの菌糸やプロトプラストに紫外線、γ線または重粒子線 (Ion Beam, IB) を照射することで、ひだ淡色化などの形質的または成分的に優れた子実体の形成を試みてきた³⁾。これらの検討の中で、糖含有量に関与する指標である Brix 値が高い菌株や、高い抗酸化性能を示すアミノ酸の一種であるエルゴチオネイン (Ergothioneine) を高濃度で含む可能性のある菌株が見いだされた。そこで本研究では前述の菌株を弊所にて拡大栽培し、その成分評価を行うことで、その成分的特徴が保持されているかを確認した結果について報告する。それに伴い、分析法の検討も行ったので合わせて報告する。

2. 試料と実験方法

2.1. 試薬

アセトニトリル、クロロホルム、エタノール、フルクトース、*myo*-イノシトール、マンニトール、ガラクトース、スクロース、ピリジン、塩酸、グリセリン、アミノ酸混合標準液 H 型、トリプトファン、アスパラギン-水和物、ヒドロキシプロリンおよびアミノ酪酸は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。また、グルコース、無水トレハロースおよびグルタミンは東京化成工業株式会社製を用いた。エルゴチオネインは CAYMAN CHEMICAL COMPANY 製を、メトキシアミン塩酸塩は SPELCO 製を、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) は Pierce Biotechnology Inc. 製をそれぞれ用いた。

2.2. 試料および選抜方法

(1) 試料

分析法の検討と確立には市販のマッシュルーム (商品名: ホワイトマッシュルーム「とかちマッシュ」, 生産地: 北海道, 販売: 鎌田商事株式会社) を用いた。

実試料は、重粒子線またはγ線照射による変異胞子または菌糸体を所内にて育成し、子実体を形成したものから選抜した。Brix 値またはエルゴチオネイン含有量を測定し、それぞれ高い値を示したもの数種類を選抜試料とし、5 ~

10 株に規模を拡大して再栽培を試み、得られた変異株の子実体を分析に用いた（以後、これらを拡大栽培品と記す）。また、コントロール品として市販マッシュルーム（商品名：六甲シャンプニオン「ホワイトマッシュルーム」、生産地：兵庫県、販売：扇港興産）やタモギタケ（商品名：タモギタケ、生産地：長野県、販売：有限会社 キノコ村）および弊所栽培のササクレヒトヨタケ、未変異の弊所栽培マッシュルームを用いた。タモギタケおよびササクレヒトヨタケは一般的にエルゴチオネイン含有量が高いキノコとして知られている（タモギタケ：126 mg 以上/100 g F.W.⁴⁾、ササクレヒトヨタケ：9.5mg/g F.W.⁵⁾）。

(2) 選抜時の Brix 値およびエルゴチオネイン量測定方法

Brix 値は収穫後すぐに子実体の菌傘部を切り出した一部から得た搾汁を Brix 計（株式会社アタゴ製 ポケット糖度計 PAL-J）にて測定した。また、エルゴチオネイン含有量は以下のように定量した。収穫した子実体菌傘部から 150～500 mg を切り出して裁断し、4 倍量の水を添加して沸騰水中で 10 分以上熱水抽出した。遠心分離した上清を回収し、固相抽出（アジレント・テクノロジー製 Bond Elute C18）により処理した後、LC/MS にて分析をおこなった。

2.3. 分析方法の検討

(1) 試料保存方法の影響

所内栽培のマッシュルームは収穫時期にばらつきが生じるため、成分分析実施まで凍結乾燥処理を施してから保存する必要がある。そこで、保存による含有成分の変動を把握するため、(a) 生、(b) 凍結 12 日間、(c) 凍結

9 日間後 3 日間凍結乾燥（EYELA 東京理化器械株式会社製 FDU-2100）、の 3 種の試料についてアミノ酸分析をおこない、その影響を確認した。それぞれ生の状態で幅約 5 mm にスライスした試料 5 g ずつを量りとり、凍結または凍結乾燥処理した。試料 5 g 全量に超純水 10 ml を添加し、80℃で 30 分間振とう抽出した。5 A ろ紙にてろ過後、超純水 5 ml で 2 回残渣を洗浄し、超純水で 25 ml にメスアップした。抽出液をフィルターろ過し（0.45 μm：デイスポーザブルメンブレンフィルターユニット DISMIC 13HP：東洋濾紙株式会社製）、LC/MS 分析に供した。LC-MS 装置はアジレント・テクノロジー株式会社製 6430 Triple Quad LC/MS を、カラムは Imtakt 製の Scherzo SS-C18 (2.0mm i.d.x150mm, 3 μm) を用いた。分析条件は以下の通りである。移動相：(A) 0.2%ギ酸および 0.2%酢酸混合水溶液、(B) 100mM 酢酸アンモニウム水/メタノール (50/50, v/v)、流速：0.3 ml/min、グラジエント条件：表 1 参照、カラム温度：45℃、注入量：3 μl、ドライガス：350℃窒素、10l/min、ネブライザーガス：55psi、キャピラリー電圧：4000 V、測定モード：SRM、極性：ポジティブ、イオン化方法：ESI。定量アミノ酸とそのイオン化条件を表 2 に示す。

表 1 アミノ酸分析におけるグラジエント条件

時間(分)	%A	%B
0	100	0
1	100	0
4	98	2
15	55	45
25	0	100

表 2 定量したアミノ酸とそのイオン化条件

アミノ酸	分子量	プリカーサー イオン	プロダクト イオン	フラグ メンター電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
Ergothioneine	229.3	230	127	110	14
L-Aspartic acid	133.1	134	74	100	10
L-Serine	105.1	106	60	100	10
Glycine	75.07	76	30	80	5
L-Threonine	119.1	120	74	100	10
L-Proline	115.1	116	70	100	10
L-Valine	117.2	118	72	100	10
L-Methionine	149.2	150	133	100	5
L-Tyrosine	181.2	182	165	100	5
L-Leucine /L-Isoleucine	131.2	132	86	100	5
L-Phenylalanine	165.2	166	120	100	10
L-Arginine	174.2	175	70	100	20
L-Glutamic acid	147.1	148	84	100	10
L-Alanine	89.1	90	44	80	5
L-Lysine	146.2	147	84	100	15
L-Histidine	155.2	156	110	100	10

(2) 糖分析方法の検討

マッシュルーム抽出液中の糖分析法を確立するため、TMS 化 GC/MS 法および LC/MS 法を検討した。

(2)-1. GC/MS 法

グルコースとガラクトースは 40 ppm, スクロースは 10 ppm となるように試薬をそれぞれ超純水に溶解したものを試料溶液とし、TMS 化 GC/MS 法による糖分析を行った。調製した試料溶液 1.0 ml を試験管に分取し、遠心エバポレーターを用いて溶媒を乾固した。乾固試料に 20 mg/ml に調製したメトキシアミンの無水ピリジン液 100 μ l を添加して振とう後、室温で 90 分間反応させた。MSTFA 100 μ l を添加して再度振とうし、4 時間以上室温で静置したものを GC/MS 分析試料とした。GC 装置はアジレント・テクノロジー株式会社製 7890A GC System を、質量分析計 (MS) には日本電子株式会社製 JMS-T100GV 型 GCTOF を用いた。カラムはアジレント・テクノロジー株式会社製 DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m) を使用した。分析条件は以下の通りである。キャリアガス: He, 1.0 ml/min, 注入口温度: 260 $^{\circ}$ C, オープン温度: 80 $^{\circ}$ C で 2 分間保持後、毎分 10 $^{\circ}$ C で 320 $^{\circ}$ C まで昇温して 14 分間保持、イオン化モード: EI, 検出器電圧: 2100 V, MS レンジ: m/z =350–650。

(2)-2. LC/MS 法

前項と同様に調製したグルコースおよびスクロース溶液を 0.45 μ m フィルターでろ過し、LC/MS 分析に供した。糖は構造的にイオン化しにくいいため、大気圧化学イオン化 (APCI) 法により、カラム分離後の流路にイオン化助剤として塩素を含む溶液 (クロロホルム/アセトニトリル混液) を添加することで検出感度の向上を図った。HPLC 装置には 1260 Infinity HPLC system, MS には 6120 Quadrupole LC/MS (ともにアジレント・テクノロジー株式会社製) を用いた。カラムは Imtakt 製 Unison UK-Amino (3.0 $\times$ 150 mm, 3 μ m) を用いた。分析条件は以下の通りである。移動相: 5mM 酢酸アンモニウム水/アセトニトリル (15: 75, v/v) アイソクラティック, 流速: 0.3 ml/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, ポストカラム溶媒: クロロホルム/アセトニトリル (50: 50, v/v), ポストカラム流速: 0.3 ml/min, ドライガス: 350 $^{\circ}$ C, 6l/min, ネプライザーガス: 6 psi, キャピラリー電圧: 3500 V, Vaporizer: 350 $^{\circ}$ C, コロナ電流: 10 μ A, フラグメンタ電圧: 80 V, MS レンジ: m/z =100–400。

2.4. 実試料の分析

分析を実施した拡大栽培品の変異マッシュルームを選抜時の分析値と併せて表 3 に示す。高 Brix 値が期待される

表 3 選抜時の変異マッシュルーム一覧

ねらい	識別番号	処理条件	選抜時の分析値 (フラット)		
			重量 (g)	Brix (%)	エルゴチオネイン量 (mg/g D.W.)
高 Brix	γ_2 -SP072-10	γ 線 100 Gy	13.0*	6.2*	—
	γ_2 -SP107-5	γ 線 200 Gy	4.2*	4.7*	—
	γ_2 -SP107-10	γ 線 200 Gy	22.2*	4.7*	—
	γ_2 -MY191-10	γ 線 1200 Gy	7.6*	5.1*	—
高	γ_2 -MY031-03	γ 線 50 Gy	9.80	4.3	9.64
エルゴ	γ_2 -MY031-04	γ 線 50 Gy	9.02	2.9	7.78
チオ	γ_2 -SP048-05	γ 線 50 Gy	29.74	3.0	3.98
ネイン	γ_2 -SP053-03	γ 線 50 Gy	30.82	4.7	10.31
	γ_2 -SP107-10	γ 線 200 Gy	15.75	6.0	5.37
	γ_2 -SP114-07	γ 線 200 Gy	9.07	5.4	4.15, 4.76
	γ_2 -SP145-02*	γ 線 400 Gy	8.85~19.61	3.8~5.4	0.64~4.70
	IB ₁ -MY054-09	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 5 Gy	13.52	3.9	14.32
	IB ₁ -SP128-05	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 20 Gy	20.06	4.8	15.27
	IB ₁ -SP252-06	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 80 Gy	14.15	3.8	4.87
	IB ₁ -SP252-09	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 80 Gy	24.51	5.2	5.73
	IB ₁ -SP257-08	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 80 Gy	—	—	14.84
	IB ₁ -SP350-03	$^{12}\text{C}^{5+}$ IB 140 Gy	39.98	4.6	15.19

γ : γ 線照射、IB: 重粒子線照射

SP: 孢子懸濁液へ照射、MY: PDA 培地上の菌糸体へ照射

*: ボタン形状での測定値

※収穫した 6 本分のデータ

菌株ではボタンとフラットの両形状の子実体を用いて分析を実施し、高エルゴチオネインが期待される菌株については開傘後2～3日後に収穫したフラット形状の子実体のみ分析を実施した。

(1) 糖

拡大栽培品の子実体を収穫後、傘および軸を含めた全量を5～8 mm幅にスライスし、凍結乾燥後にフードミルにて粉碎した。粉碎試料0.3 gに80%エタノール40 mlを添加し、室温で1時間振とう抽出した⁶⁾。抽出液を5 Aろ紙でろ過し、抽出に用いた三角フラスコを2回、残渣を3回、それぞれ3 mlの80%エタノールで洗浄した。ろ液および洗液をあわせ、ロータリーエバポレーターにて濃縮後、80%エタノールにて20 mlにメスアップした。抽出液を適宜希釈した後にフィルター(0.45 mm)ろ過し、LC/MS分析に供した。試料は処理条件ごとに子実体2本を選択し、それぞれn=2で抽出および分析をおこなった。LC/MS分析条件は、2.3. (2)-2. に記した通りである。定量した糖は、マッシュルーム中に高い割合で含まれるマンニトールに加え、フルクトース、*myo*-イノシトール、トレハロースの4種であり、それぞれの試薬を80%エタノールに任意濃度で溶解および適宜希釈して検量線を作製し、定量に用いた。

(2) アミノ酸

傘および軸を含めた拡大栽培品の子実体1本全量を5～8 mm幅にスライスし、凍結乾燥後にフードミルにて粉碎した。粉碎試料0.2 gに0.1 N塩酸20 mlを添加し、室温で1時間振とう抽出した⁶⁾。5 Aろ紙でろ過後、抽出に用いた三角フラスコを2回、残渣を3回、それぞれ2.5 mlの0.1 N塩酸および超純水を用いて洗浄した。得られたろ液を超純水にて50 mlにメスアップした。抽出液を適宜希釈し、フィルター(0.45 μm)ろ過後にLC/MS分析に供した。試料は処理条件ごとに任意で2本を選択し、それぞれn=2で抽出および分析を行った。分析は2.3. (1) 記載の条件で実施した。アミノ酸混合標準液H型、トリプトファン、アスパラギン-水和物、ヒドロキシプロリン、γ-アミノ酪酸、グルタミン、エルゴチオネインをそれぞれ任意濃度に0.1 N塩酸に溶解および希釈して検量線溶液を作製し、定量に用いた。

3. 結果と考察

3.1. 分析方法の検討

(1) 試料保存方法の影響

(a) 生、(b) 凍結12日間、(c) 凍結9日間後3日間凍結乾燥、の3種の試料において、アミノ酸分析をおこなった結果を図1に示す。分析は1系列につき3個の試料を

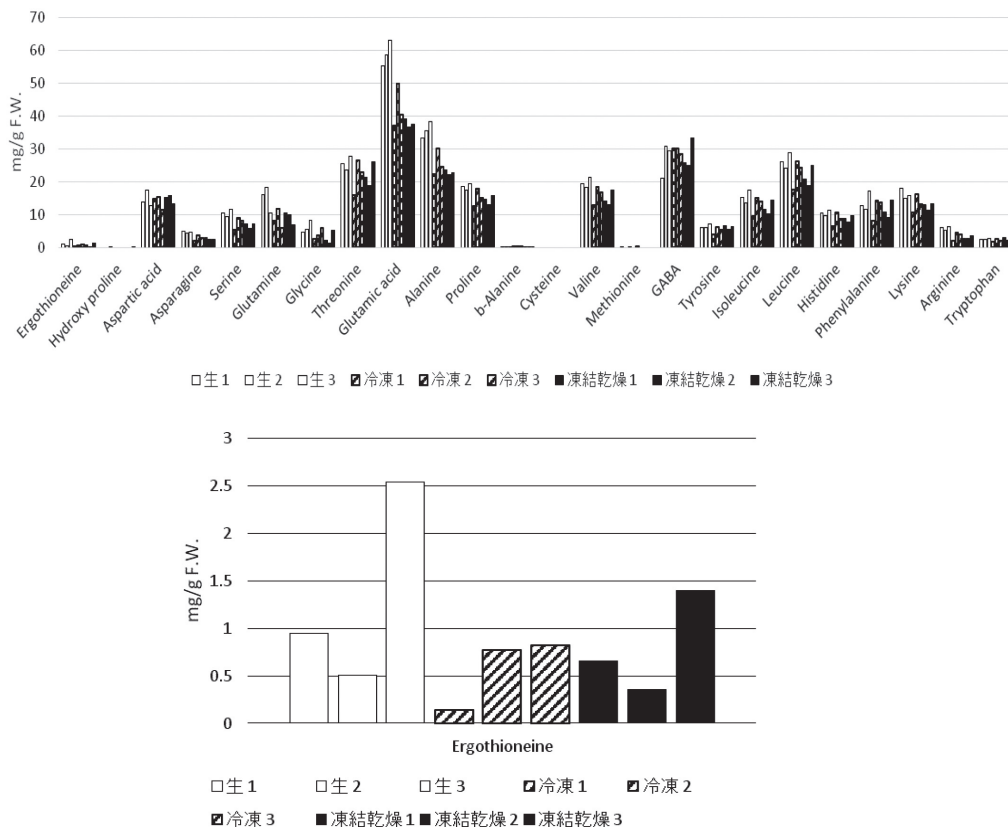


図1 異なる試料保存方法によるアミノ酸量の変化

(上段：全アミノ酸, 下段：エルゴチオネインのみ抜粋)

用い、それぞれ $n=2$ で分析した結果の試料毎の平均値を表した。図1より、ほぼ全てのアミノ酸において、生試料において含有量が最も多く、凍結や凍結乾燥といった処理を重ねることで徐々にアミノ酸含量が減る傾向が示された。本研究で着目したエルゴチオネインでは、ばらつきはあるものの、生と比較して凍結乾燥品で25%から40%程度減少することが示唆された。

(2) 糖

(2)-1. TMS 誘導体化 GC/MS

グルコース 40 ppm 溶液、ガラクトース 40 ppm 溶液およびスクロース 10 ppm 溶液について、TMS 化 GC/MS 分析をおこなった。得られたトータルイオンカレントクロマトグラムを図2、3および4にそれぞれ示す。単糖類であるグルコースやガラクトースでは、標準試料そのものの

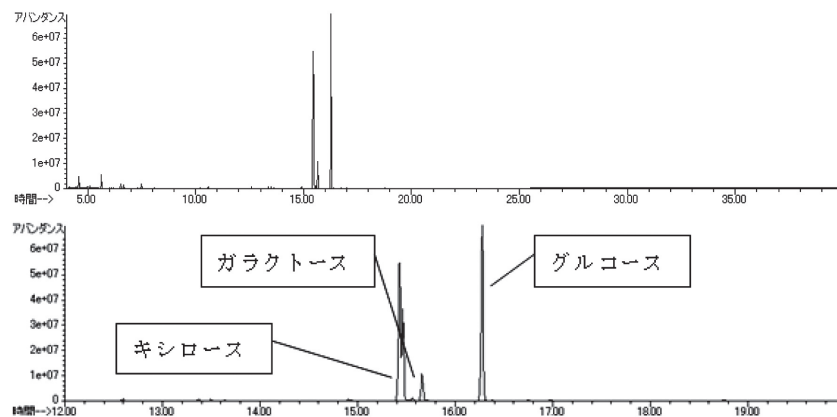


図2 グルコース 40 ppm 溶液のトータルイオンカレントクロマトグラム (下段：拡大)

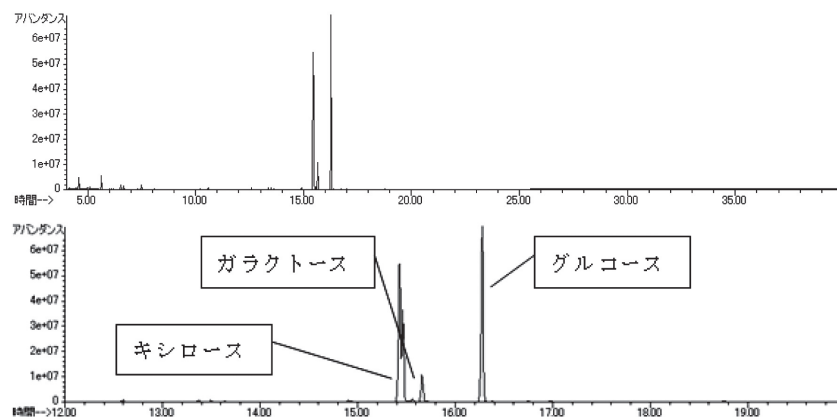


図3 ガラクトース 40 ppm 溶液のトータルイオンカレントクロマトグラム (下段：拡大)

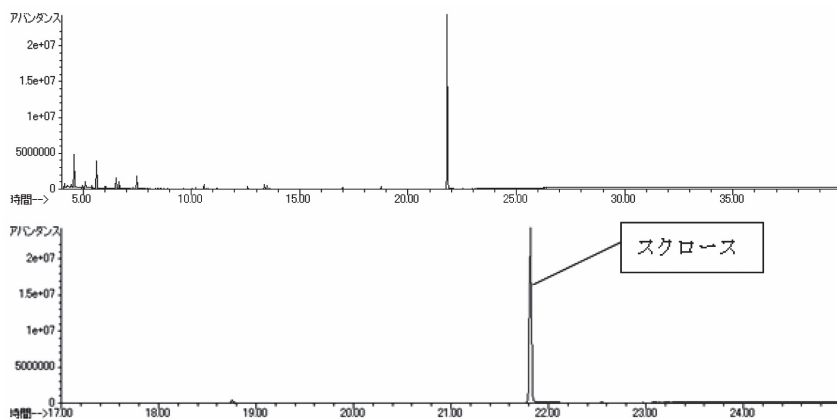


図4 スクロース 40 ppm 溶液のトータルイオンカレントクロマトグラム (下段：拡大)

ピークだけでなく、他の単糖類のピークもみられた。二糖類であるスクロースでは、スクロースのピークのみが検出された。

ガラクトースおよびスクロースの 20, 40, 80 ppm 溶液を同様に測定し、その結果から作成した検量線を図 5 および図 6 にそれぞれ示す。ガラクトースでは、検出された糖由来ピークの総面積から算出した検量線と、ガラクトースのピーク面積のみから算出した検量線を示した。図

5 より、ピーク総面積とガラクトースピーク面積のどちらを用いても同等に良好な検量線が作成可能であった。また、スクロースも良好な検量線を作成することができ（図 6）、検量線法による定量が可能であることが分かった。しかし、単糖類のトータルイオンカレントクロマトグラムにおいて複数のピークが生じることから、数種類の単糖類が試料溶液に存在する場合、それらから生じるピークが重なり合い、正確な定量ができなくなる可能性が示唆された。

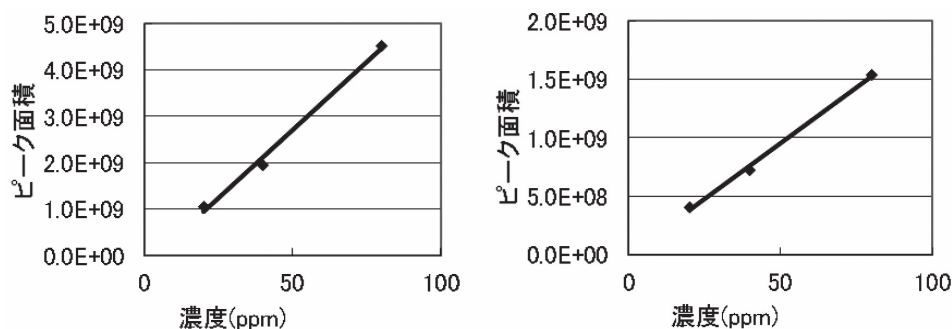


図 5 GC/MS 分析によるガラクトースの検量線
(左：全ピーク面積，右：ガラクトースのピーク面積)

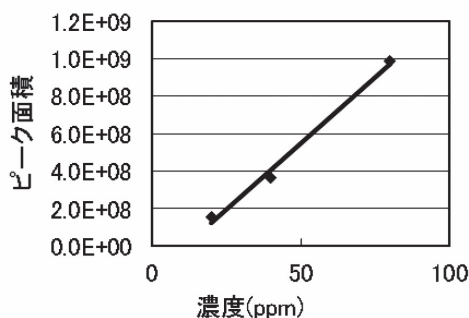


図 6 GC/MS 分析によるスクロース検量線

(2)-2. LC/MS

カラム通過後の流路にクロロホルム／アセトニトリル混液を添加したポストカラム法を用い、LC/MS による糖分析をおこなった。グルコースおよびスクロースの LC/MS 分析より得られたトータルイオンカレントクロマトグラムを図 7 に、得られたマススペクトルを図 8 にそれぞれ示す。GC/MS の結果とは異なり、単独の糖のみが検出された。また、検出されたマススペクトルはグルコースでの $m/z=215$ 、スクロースで $m/z=377$ であり、これはそれぞれの分子（質量数 180.1 および 342.1）に塩素（質量数 35.0）が付加した形でイオン化したことが確認された。続いてグ

ルコースおよびスクロースの 10 ～ 200 ppm 溶液を分析した結果から得られた検量線を図 9 に示す。図 9 より、良好な検量線が得られることが示された。

以上の検討より、GC/MS による糖分析は高感度で定量性はあるが、前処理が煩雑であることや一つの糖からピークが複数生じる、すなわち分析中における糖の構造安定性に劣ること、また、LC/MS による糖分析は希釈やろ過のみの前処理で簡便にかつ高感度で分析可能であることがわかった。この結果より、本研究では糖分析には LC/MS 法を採用することとした。

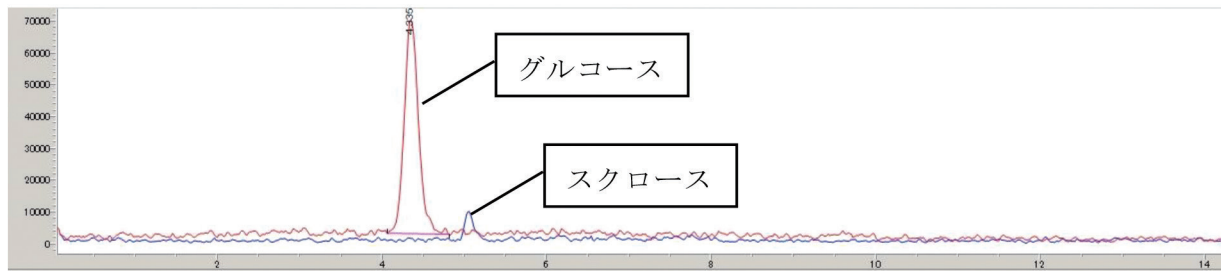


図7 グルコースおよびスクロースのトータルイオンカレントクロマトグラム (LC/MS)

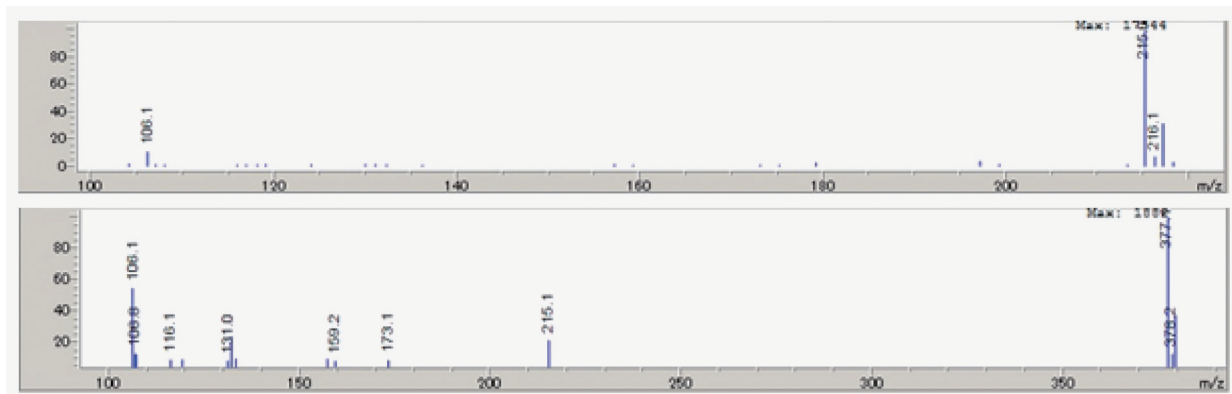


図8 グルコース (上) およびスクロース (下) のマススペクトル

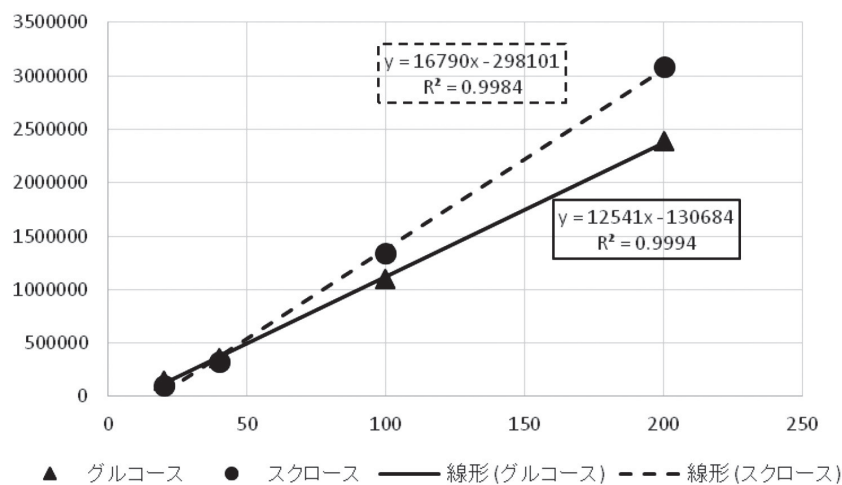


図9 LC/MS 分析によるグルコース (▲) およびスクロース (●) の検量線

3.2. 実試料の分析

(1) 糖

変異マッシュルーム子実体における糖の定量結果を表4-1および表4-2にそれぞれ示す。表中の定量値は、 $n=2$ で測定した値の平均を示した。なお、収穫できた子実体が小さかった γ_2 -SP107-05 ボタン形状品は糖の定量を実施しなかった。また、 γ_2 -MY191-10 フラット形状、 γ_2 -SP053-03 および IB1-SP128-05 に関しては、十分な大きさの子実体が収穫できなかったため、子実体1本についてのみ定量を行い、その結果を示した。

ボタン形状試料では、市販マッシュルームと比較して、所内栽培品はフルクトース、*myo*-イノシトール、マンニトールの含有量が低く、トレハロース含有量は高かった。また、所内栽培のコントロール品と比較すると、変異株ではBrix値は高いが、糖含有量が同等または低かった。フラット形状試料では、マンニトール含量が1割程度増加していた一方で、フルクトース量はわずかに減少していた。高エルゴチオネインが期待される変異株については、IB1-SP350-03 以外の試料において、市販マッシュルームまたは同時に栽培したコントロール品と比較してマンニトール

表 4-1 高 Brix 値試料の糖分析結果

		(mg/g D.W.)									
		ボタン					フラット				
		Brix	Fru	Ino	Man	Tre	Brix	Fru	Ino	Man	Tre
市販マッシュルーム		—	0.47	0.02	196.12	4.18	—	—	—	—	—
		—	0.00	0.00	162.82	6.27	—	—	—	—	—
高 Brix	Ctrl	4.7	0.26	0.08	121.29	13.91	4.8	0.34	0.08	101.70	12.89
		4.9	0.30	0.09	117.02	13.14	4.0	0.24	0.20	84.82	6.54
	Y ₂ -SP072-10	5.6	0.23	0.25	124.14	35.95	6.0	0.14	0.19	121.90	9.80
		5.8	0.30	0.11	126.69	18.49	5.5	0.16	0.13	118.57	9.88
	Y ₂ -SP107-05	—	—	—	—	—	3.8	0.27	0.09	110.32	12.45
		—	—	—	—	—	4.8	0.07	0.06	121.70	14.51
	Y ₂ -SP107-10	6.3	0.25	0.17	100.70	13.94	5.1	0.11	0.09	118.04	12.29
		7.1	0.09	0.06	97.49	20.06	5.2	0.15	0.21	98.33	7.64
	Y ₂ -MY191-10	5.6	0.29	0.07	83.18	12.37	3.9	0.44	0.04	114.25	11.36
		5.9	0.18	0.21	117.02	13.14	—	—	—	—	—

表 4-2 高エルゴチオネイン試料の糖分析結果

		(mg/g D.W.)				
		フラット				
		Brix	Fru	Ino	Man	Tre
市販マッシュルーム		—	0.47	0.02	196.12	4.18
		—	0.00	0.00	162.82	6.27
高 エルゴ チオ ネイン	Ctrl	4.6	0.52	0.44	204.44	8.58
		4.7	0.47	0.40	207.58	9.60
	Y ₂ -MY031-03	3.3	0.72	0.48	142.33	6.85
		3.7	0.65	0.47	120.51	6.67
	Y ₂ -MY031-04	3.5	0.59	0.48	134.72	5.44
		3.5	0.63	0.49	100.13	5.07
	Y ₂ -SP048-05	3.9	0.66	0.59	93.64	5.58
		3.9	0.72	0.51	107.65	5.92
	Y ₂ -SP053-03	3.8	0.63	0.49	109.90	6.38
		4.9	—	—	—	—
	Y ₂ -SP107-10	4.0	0.49	0.56	112.15	6.43
		3.5	0.58	0.41	99.36	6.97
	Y ₂ -SP114-07	3.6	0.57	0.39	132.61	7.51
		4.0	0.55	0.45	153.91	6.25
	Y ₂ -SP145-02	4.1	0.59	0.41	82.87	5.27
		4.4	0.48	0.33	111.87	3.97
	IB ₁ -MY054-09	5.0	0.55	0.41	137.78	4.96
		4.4	0.59	0.36	83.05	3.99
	IB ₁ -SP128-05	3.8	0.62	0.48	137.5	6.97
		3.8	—	—	—	—
	IB ₁ -SP252-06	4.0	0.48	0.37	53.09	4.88
		3.7	0.63	0.44	38.33	3.90
	IB ₁ -SP252-09	4.9	0.48	0.43	64.61	2.79
		3.3	0.47	0.34	82.87	6.00
	IB ₁ -SP257-08	3.6	0.51	0.33	82.30	3.97
		3.4	0.48	0.36	93.34	5.61
	IB ₁ -SP350-03	4.3	0.52	0.40	181.37	5.57
		4.2	0.64	0.39	186.72	4.88

量が大幅に少なかった。

ここで、高 Brix 値が期待された試料について、Brix 値と今回測定した4種の糖の総量をプロットして図 10 に示す。今回の分析試料および分析対象である4種の糖では、Brix 値と糖含有量に相関は見られなかった。このことは、今回分析をおこなった全試料について同様にプロットした

図 11 から示された。Brix 値は糖含有量だけではなく、塩やタンパク質、多糖類などの可溶性固形分量も含む数値であるため、今回の変異マッシュルームにおける Brix 値の増加は、糖含有量の変動というよりは、前述の可溶性固形分量の違いに起因している可能性があると考えられる。

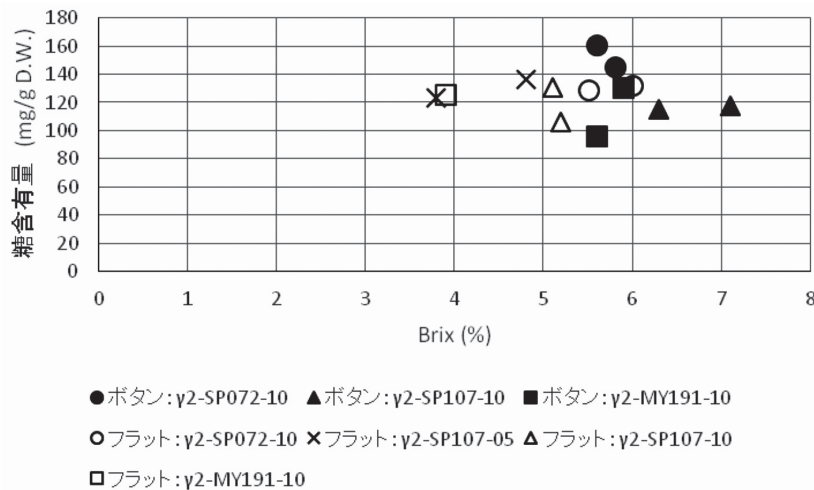


図 10 Brix 値と総糖量の関係 (高 Brix 値試料のみ)

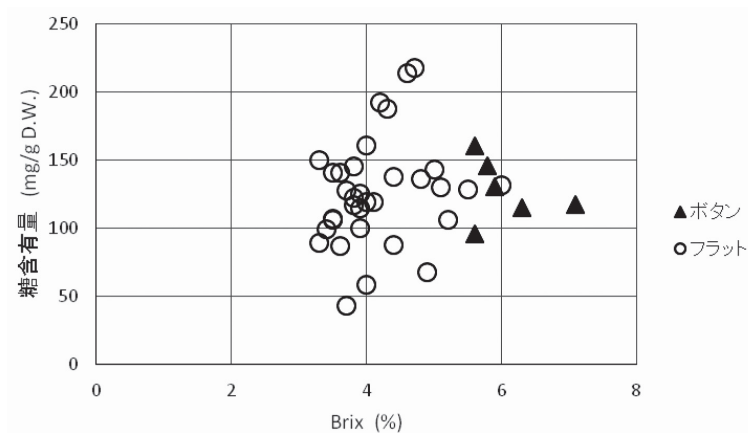


図 11 Brix 値と総糖量の関係 (全試料)

(2) アミノ酸

アミノ酸の定量結果を表 5-1 および表 5-2 にそれぞれ示す。表中の定量値は、 $n=2$ で測定した値の平均を示した。 γ_2 -SP107-05 ボタン形状株は収穫できた子実体が小さかったため、分析を実施しなかった。また、高エルゴチオネイン含量が期待される試料群のうち、高 Brix 試料のコントロール品 (ボタン, フラット), γ_2 -SP107-10 (ボタン)

および γ_2 -SP107-5 (フラット)、高エルゴチオネイン試料のコントロール品および IB₁-SP257-08 については、試料量が十分ではなかったため、 $n=1$ における分析結果を示した。今回、総合的に見て突出して特徴的なアミノ酸量を示す試料はなかったが、以下に、エルゴチオネインおよび変異の有無で含有量に差が見られたアミノ酸について個別に報告する。

表5-1 高Brix値試料のアミノ酸分析結果

試料		アミノ酸																					
		Erg	Hyp	Asp	Asn	Ser	Gln	Gly	Thr	Glu	Ala	Pro	Cys	Val	Met	GA BA	Tyr	Ile/ Leu	His	Phe	Lys	Arg	Trp
マッシュルーム (市販品)		0.46	0.02	5.62	1.18	1.92	4.66	1.44	2.64	8.55	8.12	2.13	0.01	2.26	0.22	1.38	1.81	3.00	0.79	1.49	1.40	—	0.12
		0.34	0.02	7.61	2.34	2.41	6.68	1.50	4.02	9.33	10.49	2.23	0.01	3.39	0.15	0.40	3.14	3.94	1.62	1.80	2.23	—	0.51
高 Brix ボタン	Ctrl	1.40	0.09	8.07	5.33	2.32	2.32	2.07	3.04	13.26	10.28	1.83	0.02	2.29	0.26	0.74	1.98	3.77	1.99	2.16	2.76	2.36	0.02
		0.97	0.11	5.95	2.92	1.76	2.31	1.12	1.55	12.60	7.30	1.35	0.01	1.14	0.18	0.55	1.13	1.79	0.87	0.95	0.70	0.59	0.04
	Y2-SP072-10	1.43	0.08	6.94	3.36	2.37	4.27	1.48	1.90	12.91	8.71	1.54	0.02	1.38	0.26	0.63	1.21	2.16	0.94	1.29	1.43	2.07	0.07
		0.83	0.07	6.89	3.11	1.95	1.86	1.53	2.12	13.50	8.70	1.16	0.02	1.63	0.26	0.85	1.50	2.67	1.44	1.54	1.42	0.69	0.02
	Y2-SP107-05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		1.43	0.08	7.03	3.27	2.01	2.55	1.46	2.23	12.50	10.26	1.32	0.02	1.78	0.26	0.80	1.67	2.75	1.32	1.69	2.14	1.71	0.03
	Y2-SP107-10	1.72	0.09	8.07	5.33	2.32	2.32	2.07	3.04	13.26	10.28	1.83	0.02	2.29	0.26	0.74	1.98	3.77	1.99	2.16	2.76	2.36	0.02
		1.60	0.11	7.50	2.51	1.91	1.82	1.24	1.92	12.94	6.85	1.15	0.04	1.17	0.22	0.55	0.92	2.99	0.79	0.93	0.55	0.32	0.02
	Y2-MY191-10	1.33	0.08	8.98	3.29	2.57	3.34	2.24	3.09	16.10	12.09	1.74	0.07	2.23	0.28	0.75	1.91	6.07	2.14	1.96	2.14	1.50	0.02
高 Brix フラッ ト	Ctrl	0.51	0.08	5.10	2.67	1.92	3.32	0.82	1.39	9.87	5.12	0.80	0.02	0.90	0.13	0.47	0.77	1.25	0.63	0.67	0.63	0.36	0.08
		0.39	0.02	4.33	3.60	1.99	3.20	0.95	1.40	8.44	4.44	0.71	0.01	0.77	0.12	0.58	0.96	0.93	1.65	0.58	0.58	1.14	0.02
	Y2-SP072-10	0.85	0.06	10.59	5.99	3.16	5.68	1.67	2.59	13.21	9.63	1.36	0.03	1.48	0.22	0.90	1.72	2.00	1.91	1.30	1.30	2.25	0.08
		1.08	0.04	11.13	6.20	3.34	6.89	1.84	2.58	13.86	10.07	1.44	0.02	1.48	0.22	1.25	1.81	1.83	2.35	1.24	1.24	2.70	0.03
	Y2-SP107-05	0.24	0.04	6.53	3.22	2.38	3.98	0.83	1.47	12.12	3.53	0.55	0.03	0.96	0.15	0.18	0.95	1.44	0.97	0.65	0.65	0.29	0.10
		0.14	0.03	5.51	2.34	1.89	3.45	0.54	0.93	8.05	2.47	0.50	0.01	0.52	0.09	0.12	0.95	0.86	0.64	0.46	0.46	0.23	0.08
	Y2-SP107-10	1.50	0.12	8.09	3.81	2.51	4.66	1.22	1.72	13.38	5.45	1.33	0.01	1.12	0.20	0.49	1.35	1.68	1.13	1.09	1.09	0.83	0.05
		0.78	0.03	7.82	3.76	1.97	3.00	1.28	1.67	9.99	5.24	0.75	0.01	1.01	0.12	0.48	1.26	1.26	2.64	0.93	0.93	1.21	0.01
	Y2-MY191-10	1.11	0.04	6.74	3.88	2.19	5.15	1.13	1.52	9.82	5.05	0.83	0.01	0.88	0.17	0.30	1.39	1.25	2.63	0.78	0.78	0.60	0.01
		1.00	0.04	6.46	3.76	2.11	4.85	1.14	1.48	9.99	4.73	0.79	0.00	0.91	0.13	0.26	0.22	1.22	2.48	0.73	0.73	0.56	0.04

表5-2 高エルゴチオネイン試料の糖分析結果

試料	アミノ酸																				GA BA	Tyr	Ile/ Leu	His	Phe	Lys	Arg	Trp
	Erg	Hyp	Asp	Asn	Ser	Gln	Gly	Thr	Glu	Ala	Pro	Cys	Val	Met														
ササクレヒトヨタケ (栽培品)	0.06	0.00	4.00	1.47	1.14	5.40	0.43	0.55	5.26	2.24	0.21	0.02	0.47	0.14	0.00	6.92	0.47	0.10	0.77	0.17	1.63	0.12						
	0.06	0.00	3.11	0.58	0.80	4.98	0.29	0.40	3.80	1.99	0.18	0.01	0.47	0.13	0.00	11.10	0.40	0.14	0.47	0.11	0.55	0.10						
タモギタケ (市販品)	5.82	0.00	1.17	0.65	1.93	9.05	4.15	2.40	6.37	5.24	1.74	0.00	2.64	0.14	1.23	2.33	3.41	1.54	1.58	1.14	3.61	0.39						
	5.55	0.00	1.03	0.55	1.88	8.79	4.39	2.06	6.10	4.94	1.45	0.00	2.28	0.13	0.97	2.08	2.90	1.37	1.39	1.10	2.68	0.39						
マッシュルーム (市販品)	0.46	0.02	5.62	1.18	1.92	4.66	1.44	2.64	8.55	8.12	2.13	0.01	2.26	0.22	1.38	1.81	3.00	0.79	1.49	1.40	0.22	0.12						
	0.34	0.02	7.61	2.34	2.41	6.68	1.50	4.02	9.33	10.49	2.23	0.01	3.39	0.15	0.40	3.14	3.94	1.62	1.80	2.23	0.54	0.51						
高エルゴチオネイン	Ctrl	1.52	0.06	6.96	2.91	1.80	4.09	0.87	1.00	9.32	4.12	1.22	0.02	0.53	0.10	0.13	0.57	1.12	0.36	0.33	0.14	0.16	0.00					
		1.37	0.05	6.93	2.35	1.71	3.05	0.91	1.05	8.83	3.77	0.89	0.01	0.51	0.16	0.10	0.67	1.17	0.27	0.49	0.10	0.02	0.00					
	Y ₂ -MY031-03	1.05	0.05	6.09	3.90	2.27	4.87	1.03	1.41	9.23	4.68	0.87	0.07	0.77	0.17	0.17	0.83	1.02	2.50	0.56	0.36	0.27	0.03					
		1.12	0.07	6.49	3.91	2.17	4.93	0.94	1.40	9.48	4.66	1.02	0.07	0.75	0.16	0.18	0.80	1.72	2.54	0.50	0.27	0.19	0.02					
	Y ₂ -MY031-04	0.87	0.02	4.36	3.63	1.87	3.86	0.92	1.06	7.68	5.30	0.87	0.00	0.62	0.15	0.55	0.56	1.23	2.86	0.44	0.50	0.41	0.17					
		0.53	0.02	3.80	3.07	1.79	4.04	0.75	0.93	6.89	3.86	0.73	0.00	0.53	0.14	0.36	0.46	1.23	2.92	0.39	0.27	0.22	0.19					
	Y ₂ -SP048-05	0.11	0.01	3.15	2.20	1.40	3.87	0.58	0.67	6.31	3.39	0.62	0.00	0.38	0.11	0.26	0.53	1.04	3.44	0.31	0.28	0.22	0.00					
		0.08	0.02	6.16	3.45	1.76	3.39	0.81	1.12	7.76	4.19	0.77	0.00	0.54	0.19	0.28	0.61	1.31	2.51	0.59	0.33	0.18	0.00					
	Y ₂ -SP053-03	0.23	0.01	6.24	3.66	2.07	3.31	0.75	1.37	7.88	3.81	0.88	0.01	1.13	0.20	0.12	0.53	1.41	2.10	0.65	0.31	0.26	0.00					
		0.53	0.04	5.95	3.33	1.98	3.55	0.80	1.30	8.78	4.89	1.27	0.00	0.79	0.19	0.23	0.54	1.53	2.10	0.62	0.34	0.18	0.00					
	Y ₂ -SP107-10	0.48	0.01	4.36	3.06	1.61	3.70	0.79	1.07	6.66	4.33	0.85	0.01	0.60	0.17	0.30	0.53	1.32	3.42	0.41	0.36	0.25	0.00					
		0.49	0.01	4.26	2.96	1.60	3.73	0.73	1.06	6.61	4.16	0.82	0.01	0.56	0.15	0.29	0.52	1.25	3.34	0.41	0.36	0.24	0.00					
	Y ₂ -SP114-07	0.62	0.02	4.24	3.19	1.96	4.03	0.87	1.25	7.08	4.89	0.81	0.00	0.64	0.21	0.36	0.65	1.29	3.35	0.50	0.36	0.22	0.08					
IB ₁ -MY054-09	IB ₁ -SP145-02	0.66	0.02	4.00	2.78	1.56	4.82	0.67	0.86	6.32	3.79	0.78	0.00	0.46	0.16	0.30	0.56	1.15	3.47	0.35	0.30	0.23	0.00					
		0.79	0.03	5.67	4.08	2.22	4.45	1.08	1.49	9.25	7.25	1.49	0.01	0.97	0.22	0.69	0.55	1.77	2.53	0.67	0.70	0.45	0.01					
	IB ₁ -MY054-09	0.91	0.02	4.40	3.09	1.76	4.30	0.87	1.07	7.93	5.51	1.04	0.00	0.69	0.16	0.48	0.46	1.32	2.61	0.44	0.40	0.31	0.01					
		0.49	0.01	4.37	3.39	1.98	4.33	1.12	1.31	8.16	4.62	0.62	0.01	0.29	0.10	0.20	1.15	0.63	3.46	0.43	0.35	0.23	0.01					
	IB ₁ -SP128-05	0.50	0.01	5.00	4.09	2.42	3.82	1.20	1.50	10.76	4.62	0.68	0.01	0.37	0.13	0.18	1.39	0.78	5.99	0.57	0.31	0.18	0.01					
		1.05	0.03	5.25	3.51	2.46	4.18	1.41	1.76	9.46	5.30	0.92	0.01	0.77	0.17	0.21	1.02	1.14	0.80	0.66	0.08	0.01	0.01					
	IB ₁ -SP252-06	1.00	0.03	5.57	3.14	2.05	3.72	1.14	1.46	10.07	4.37	0.79	0.01	0.64	0.17	0.23	1.06	1.11	1.06	0.54	0.09	0.01	0.01					
		0.58	0.01	3.85	3.05	1.68	3.87	0.75	1.10	6.69	3.41	0.79	0.00	0.55	0.15	0.20	0.60	1.26	3.51	0.47	0.33	0.22	0.00					
	IB ₁ -SP252-09	0.17	0.01	2.75	1.87	1.37	1.63	0.47	0.73	6.10	2.03	0.52	0.01	0.35	0.13	0.14	0.39	1.02	5.02	0.45	0.13	0.10	0.00					
		0.95	0.01	5.39	3.89	1.89	5.23	1.09	1.27	7.40	6.17	0.89	0.01	0.65	0.17	0.48	0.50	1.42	2.76	0.46	0.68	0.60	0.01					
	IB ₁ -SP257-08	1.56	0.04	6.79	4.02	2.26	5.85	1.14	1.55	8.71	7.49	1.38	0.01	0.93	0.21	0.38	0.66	1.86	1.90	0.81	0.68	0.62	0.22					
		0.18	0.01	3.80	3.31	1.85	4.08	0.79	1.30	7.15	4.57	0.78	0.01	0.61	0.16	0.32	0.51	1.46	3.26	0.51	0.32	0.20	0.00					
	IB ₁ -SP350-03	0.52	0.02	4.02	2.75	1.68	4.47	0.73	0.97	7.36	3.25	0.81	0.00	0.52	0.15	0.21	0.45	1.28	3.14	0.43	0.32	0.28	0.00					
0.92		0.02	4.78	2.78	1.81	4.58	1.03	1.93	7.74	4.00	0.71	0.01	0.33	0.13	0.11	1.00	0.60	1.69	0.43	0.29	0.24	0.05						
	0.87	0.02	4.49	2.70	1.85	4.03	0.95	1.03	8.56	4.27	0.84	0.00	0.28	0.11	0.27	0.93	0.59	2.04	0.40	0.26	0.18	0.00						

a) エルゴチオネイン

エルゴチオネインの定量結果を抜粋して図 12 に示す。市販マッシュルームと比較して、ほぼ全ての変異株においてエルゴチオネイン量が高かったが、コントロールとして栽培した変異前の株と同等の含有量を示した。またその絶対値は試料選抜時の定量値よりも大幅に低かった。比較して表 6 に示す。また、エルゴチオネイン量が高いキノコとして知られる市販品タモギタケではエルゴチオネイン量が高く定量されたのに対し、所内栽培品のササクレヒトヨタケではエルゴチオネインがほとんど検出されなかった。これらのことから、キノコ中で形成されるエルゴチオネインの量は、栽培環境に大きく左右され、今回の栽培条件や

環境ではエルゴチオネインがあまり作られなかったのではないかと推察される。一方で、今回の分析では子実体を凍結乾燥後に -80°C にて保管した試料を用いたのに対し、試料選抜時は子実体収穫後すぐに熱水抽出して分析を実施した。このような試料形態や抽出方法の違いも定量値の相違に影響している可能性があると考えられる。

b) ヒスチジン

ヒスチジンの定量結果を抜粋して図 13 に示す。高エルゴチオネイン量を期待された子実体において、コントロール品と比較してヒスチジン量が増大した菌株がみられた。中でも IB₁-MY54-09 および IB₁-SP252-06 では、市販マッ

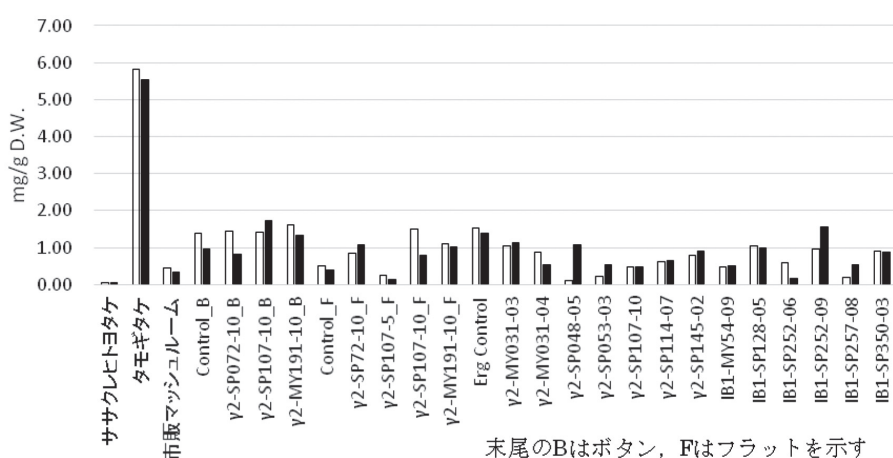


図 12 エルゴチオネイン定量結果

表 6 エルゴチオネイン量の比較 (選抜時と拡大栽培時)

ねらい	識別番号	処理条件	選抜時 (mg/g D.W.)	拡大栽培品 (mg/g D.W.)
高 エルゴ チオ ネイン	Y ₂ -MY031-03	γ線 50 Gy	9.64	1.05, 1.12
	Y ₂ -MY031-04	γ線 50 Gy	7.78	0.87, 0.53
	Y ₂ -SP048-05	γ線 50 Gy	3.98	0.11, 0.08
	Y ₂ -SP053-03	γ線 50 Gy	10.31	0.23, 0.53
	Y ₂ -SP107-10	γ線 200 Gy	5.37	0.48, 0.49
	Y ₂ -SP114-07	γ線 200 Gy	4.15, 4.76	0.62, 0.66
	Y ₂ -SP145-02	γ線 400 Gy	0.64~4.70※	0.79, 0.91
	IB ₁ -MY054-09	¹² C ⁵⁺ IB 5 Gy	14.32	0.49, 0.50
	IB ₁ -SP128-05	¹² C ⁵⁺ IB 20 Gy	15.27	1.05, 1.00
	IB ₁ -SP252-06	¹² C ⁵⁺ IB 80 Gy	4.87	0.58, 0.17
	IB ₁ -SP252-09	¹² C ⁵⁺ IB 80 Gy	5.73	0.95, 1.56
	IB ₁ -SP257-08	¹² C ⁵⁺ IB 80 Gy	14.84	0.18, 0.52
	IB ₁ -SP350-03	¹² C ⁵⁺ IB 140 Gy	15.19	0.92, 0.87

※収穫した 6 本分のデータ

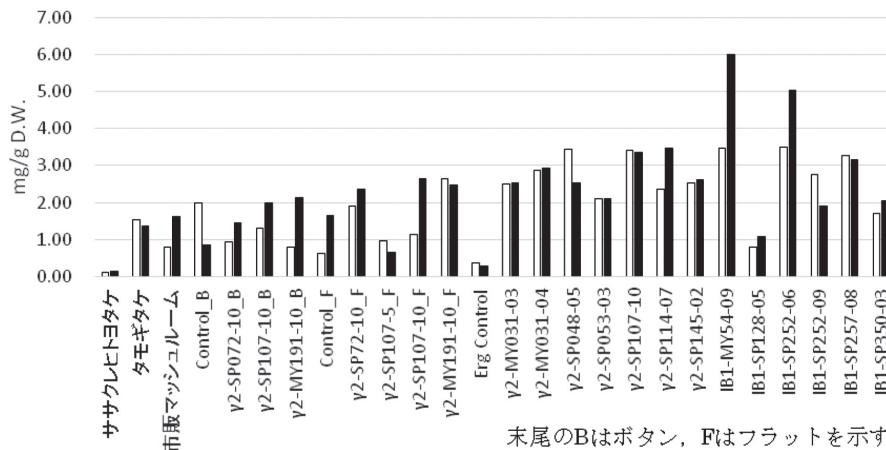


図 13 ヒスチジン定量結果

シュルूमよりも多いヒスチジン量が定量された。ヒスチジンは成長促進や関節炎緩和に効果があり、子どもは体内で合成不可能であることから、変異による増強がある場合は高付加価値マッシュルームとして優位に働く可能性があると考えられる。

4. 総括

マッシュルーム変異株の成分分析をおこなうにあたり、試料保存状態の影響調査や糖分析法の検討を行った。また、実際にγ線や重粒子線（IB）を照射した変異マッシュルームについて糖およびアミノ酸含量の調査を行った。

4.1. 分析方法の検討

試料の凍結、凍結乾燥により、各アミノ酸が減少することが確認され、今回着目したエルゴチオネインでは25～40%の割合で減少する可能性が示された。

糖分析は、GC/MS法とLC/MS法を検討した結果、前処理の容易さ、操作性および検出される糖の構造安定性の見地からLC/MS法を採用した。糖はイオン化しにくく、質量分析計による検出感度が低いため、クロロホルム／アセトニトリル混液をカラム後の流路に添加することで塩素付加体としての検出を行い、かつイオン化には大気圧化学イオン化（APCI）法を用いることで感度よく検出可能であることが示され、本分析法を確立した。

4.2. 実試料の成分分析

1) 糖

変異子実体の糖分析から、変異株において市販マッシュルームより糖含有量が多い傾向が示されたが、その値は、変異前の所内栽培株と同等であった。また、Brix値と糖含有量に良好な相関は見られなかったことから、今回の変異試料では、糖だけでなく塩やタンパク質、多糖類などの可溶性固形分量の違いが高いBrix値に関与していると考えられた。

2) アミノ酸

変異体の拡大栽培品について各種アミノ酸の分析をおこなった。選抜時に高エルゴチオネイン含有量を示した系列において、同成分含有量の増加は見られなかった。一方で、ヒスチジン含有量が多くなった変異体が見られた。今回、高エルゴチオネイン含量という形質が再現されなかったこと、所内栽培品ササクレヒトヨタケ中のエルゴチオネインが低濃度であったことなどから、キノコにおけるアミノ酸の形成が栽培環境などにも大きく影響を受けると推察された。また、変異による形質の安定性についてはさらなる検討を要すると考えられる。

参考文献

- 1) 農林水産省, H26年特用林産基礎資料Ⅱ品目別資料7:きのこ類の生産量, <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00501004&tstat=000001021191&cycle=7&year=20140&month=0&tclass1=000001021192&tclass2=000001082275>
- 2) 農林水産省, 地域特産野菜生産状況調査, http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_yasai/
- 3) 星子英次郎, 加瀬谷泰介, 「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体の作出」, 東洋食品研究所 研究報告書, 29, 9-19, (2013).
- 4) 貫名学, 「天然抗酸化物質「エルゴチオネイン」の量産化と用途展開の可能性」, 「今月の農業」, 2009年1月号, P39-43 (2009).
- 5) 「エルゴチオネインを非常に多く含むコプリノーというきのこは」, <https://www.datumousyou.com/hairfood/vegetables/ergothioneine-mushroom.html>
- 6) Shu-Yao Tsai, Hui-Li Tsai, and Jeng-Leun Mau, Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*, *Food Chemistry*, 107, 977-983 (2008).