

# ビタミンDが豊富なシイタケ品種の作出

土屋 慧・小野寺 杏仁

## 要約

ビタミンDが豊富なシイタケ品種を作出することを目的として、県内から収集した野生株を用いた交配株を作出し、菌糸伸長速度、ビタミンD含有量、栽培形質および子実体形質の評価により選抜を行った。550株の交配株を菌糸伸長速度により選抜し、得られた67菌株の子実体のビタミンD含有量の分析により、上位10株を選抜した。上位10株のうち、栽培形質および子実体形質が相対的に優れる菌株3菌株を選抜し、対照品種と比較した結果、選抜菌株は対照品種よりビタミンD含有量が多いことが分かり、選抜菌株の優位性が示された。一方、栽培形質や子実体形質が劣ったことや光で分解されやすいビタミンDの性質から、生鮮品ではなく加工品としての流通が好ましいと考えられた。

## I はじめに

青森県におけるきのこ生産量は435トン（全国39位、農林水産省2023）と少なく、価格競争の激化や生産資材、光熱費の高騰により、中小生産者は厳しい経営を強いられている。中小生産者からは、大手企業の商品との差別化によるきのこの販売単価向上が求められている。きのこの持つ成分には、疾病の予防や治療の効果を示すことが医学的に確認されているものもあり、消費者の注目度は高い。

シイタケは青森県内のきのこ生産量の4割以上を占める最も主要な品目（青森県2024）である。シイタケの特徴的な成分の一つであるビタミンDは、カルシウム代謝に重要な役割をもつが、近年、ガンや感染症に効果があるとする研究結果が報告されており注目されている。一方、カルシウムとビタミンDの不足は、東アジアを中心として、世界的な問題となっている（Ohta et al. 2016）。ビタミンDはヒトの皮膚に紫外線が照射されることで生成するが、近年、美容意識の高まりなどから、紫外線を避け日光に当たる機会が減少する中、食事によるビタミンD栄養改善が望まれる。シイタケは日々の食卓に根付いた食品であり、日常的なビタミンD摂取源として有望である。そこで本研究では、ビタミンDが豊富なシイタケ品種を開発することを目的とした。

## II 材料と方法

### 1. 供試菌株

供試菌株は、青森県産業技術センター林業研究所でPDA培地（Difco Laboratories, Detroit MI USA）を用いて継代培養法により保存を行っているシイタケ野生株9菌株を使用した（表-1）。

表1 供試菌株

菌株名	採取地	採取年
9607	青森県東津軽郡平内町	1996
K1	青森県十和田市	2018
T1	青森県十和田市	2019
T2	青森県十和田市	2019
T4	青森県十和田市	2019
T5	青森県十和田市	2019
Y1	青森県むつ市	2017
Y3	青森県むつ市	2017
Y4	青森県むつ市	2017

## 2. 野生株のビタミンDの評価

ビタミンD分析用の試料は、以下の手順で栽培した子実体を使用した。培地は、ナラおが粉とフスマを乾燥重量比 10:3 で混合し含水率 65%に調整後、ポリプロピレン製栽培袋に 1kg 充填し、121℃で 90 分間高圧殺菌して作成した。接種は、培地に供試菌株のおが粉種菌約 20mL を接種して行った。培養は、1 次培養が、温度 21℃、湿度 65%RH、暗黒条件で 70 日、2 次培養が、温度 20℃、湿度 65%RH、24 時間照明で 30 日、その後、温度を 26℃に上げて 10 日培養した。発生は、栽培袋を全て取り除き、温度 15℃、湿度 95%RH 以上の室内で行った。収穫は、子実体の膜切れを目安に行い、1 番取りの子実体を試料として用いた。

ビタミンDの合成処理は、収穫した子実体 3 個または 6 個を柄つきのまま子実層を上向きでステンレスバットに並べ、21℃の室内で殺菌灯（出力 15W、GL-15、NEC）を 50~60cm の距離から 3 時間照射して行った。殺菌灯照射後の子実体は、柄と傘に切り分け、傘を 5mm 幅に縦断したものをチャック付きポリ袋に入れて凍結させ、凍結乾燥機（FD-1、東京理科器械株式会社）で乾燥後、粉砕機（LAB MILL、大阪ケミカル）で粉砕した。

ビタミンD含有量の定量は、池田（2017）に準じて以下の方法で行った。褐色遠沈管に試料 0.5g、1% (w/v) 塩化ナトリウム溶液 0.6mL、1% (w/v) ピロガロール-エタノール溶液 2mL、60% (w/v) 水酸化カリウム溶液 1mL を加え、70℃のヒートブロックで 60 分間加温し、水冷した。試料に 1% (w/v) 塩化ナトリウム溶液 3.8mL、酢酸エチル-n-ヘキサン混液(1:9 v/v) 3mL を加え、振動攪拌後、2,000rpm で 5 分間遠心分離し、酢酸エチル-n-ヘキサン混液層を分取した。下層に酢酸エチル-n-ヘキサン混液 3mL を加えて、上記と同様の手順で酢酸エチル-n-ヘキサン混液層を分取した。分取した液体は、窒素置換しながら 40℃で乾固し、残留物を 90% (v/v) メタノール溶液に溶解、固相抽出（Bond Elut C18 100mg, 1mL）して分析に供試した。分析は、超高速液体クロマトグラフ（ACQUITY UPLC H-Class システム、Waters）を用いて行った。分析条件を表 2 に示す。標準試薬はエルゴカルシフェロール（ビタミン D<sub>2</sub>、以下 V. D<sub>2</sub>）を用いた。対照品種として、森 XR1 号（森産業株式会社）、北研 607-S（株式会社北研）を用いた。供試数は各菌株 1 試料とし、同一試料を 3 回分析した。

表 2 超高速液体クロマトグラフの分析条件

項目	分析条件
カラム	AMLQ-TAG ULTRA C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm
移動相	A: メタノール B: 90%メタノール
グラジエント条件	0~1 min: A:B = 80:20 1~5 min: A:B = 100:0 5~8 min: A:B = 80:20
流速	0.5 mL/min
カラム温度	40℃
検出波長	265nm
注入量	1.0 $\mu$ L
標準試薬	エルゴカルシフェロール（ビタミン D <sub>2</sub> ）

### 3. 交配株の選抜

#### 1) 交配株の作出

野生株のビタミンDの評価の結果、ビタミンD含有量が相対的に多かった野生株3菌株を交配親として用いた。交配用の菌株は、交配親から単孢子分離して得た単核菌糸各10菌株を用いた。交配は、異なる交配親由来の単核菌糸を用いた任意のmon-mon交配により行い、菌糸の対峙部分を境に、両側の菌叢から菌糸を分離しそれぞれ交配株とした。

#### 2) 1次選抜

交配株を用いて、低温下での菌糸伸長速度を選抜指標として相対的に優れる菌株を選抜した。培地は、直径6cm、高さ1.5cmのシャーレにPDA培地を10mL入れたものを用い、PDA平板培地で前培養しておいた菌糸体を2mm角で切り出して接種した。10℃の恒温器で培養し、21日後のコロニー直径を計測した。各菌株の供試シャーレ数は1枚とした。

#### 3) 2次選抜

1次選抜した菌株を用いて、ビタミンD含有量を選抜指標として相対的に優れる菌株を選抜した。ビタミンD分析用の試料は、以下の手順で栽培した子実体を使用した。培地は、ナラおが粉とフスマを乾燥重量比10:3で混合し含水率63%に調整後、ポリプロピレン製栽培袋に500g充填し、121℃で90分間高圧殺菌して作成した。接種は、PDA平板培地で前培養しておいた菌糸体を5mm角で切り出して、培地あたり5片を接種して行った。培養は、1次培養が、温度21℃、湿度65%RH、暗黒条件で43日、2次培養が、温度20℃、湿度65%RH、8時間照明で39日行った。発生は、栽培袋を全て取り除き、温度18℃、湿度95%RH以上の室内で行った。収穫は、傘が9-10分開きの段階で行い、1番取りの子実体を試料として用いた。

ビタミンDの合成処理は、収穫した子実体1~3個を柄つきのまま子実層を上向きでガラスシャーレに置き、プラスチックコンテナに並べて、21℃の室内で殺菌灯（出力15W、GL-15、NEC）を50~60cmの距離から1時間照射して行った。殺菌灯照射後の子実体は、柄と傘に切り分け、傘を5mm幅で縦断したものをチャック付きポリ袋に入れて凍結させ、凍結乾燥機（FD-1、東京理科器械株式会社）で乾燥後、粉碎機（LAB MILL、大阪ケミカル）で粉碎した。

ビタミンD含有量の定量は、2.と同様に行った。対照品種として交配親T4株を用いた。供試数は各菌株1試料とした。

子実体のビタミンD含有量と子実体形質の関係を確認するため、子実体断面に占めるひだの面積を以下の方法で算出した。ビタミンD分析サンプルの子実体断面（傘の中心を含む縦断面）をカメラで撮影し、画像解析ソフトのimagej 1.52aを用いて、子実体断面外周とひだを手動で領域分割して面積を求めた。ひだの面積を子実体断面の面積で除して子実体断面に占めるひだの割合を算出した。子実体個数が複数の場合は平均値を算出して解析に用いた。

#### 4) 3次選抜

2次選抜した菌株を用いて、栽培形質および子実体形質を選抜指標として相対的に優れる菌株を選抜した。培地は、ナラおが粉とフスマを乾燥重量比10:3で混合し含水率65%に調整後、ポリプロピレン製栽培袋に1kg充填し、121℃で90分間高圧殺菌して作成した。接種は、PDA平板培地で前培養しておいた菌糸体を5mm角で切り出して、培地あたり5片を接種して行った。培養は、1次培養が、温度21℃、湿度65%RH、暗黒条件で45日、2次培養が、温度23℃、8時間照明で48日行った。発生は、栽培袋を全て取り除き、温度15℃、湿度95%RH以上の室内で行った。収穫は、傘が8-9分開きの段階で行い、子実体形質として子実体を規格別、サイズ別に分類し、子実体重量と個数を計測した。規格は、規格品（奇形または欠点なし）、規格外（奇形また

は欠点あり)、サイズは、L (傘径 6cm 以上)、M (傘径 4cm 以上、6cm 未満)、S (傘径 3cm 以上 4cm 未満)、SS (3cm 未満) とした。子実体形質は、1 菌床あたり 1~3 個の子実体を選び、菌傘の直径、菌傘の厚さ、ひだの幅、菌柄長さ、菌柄の太さを「しいたけ種特性審査基準」(農林水産省 2021) に準じて計測した。各菌株の供試菌床数は 9 個とした。

#### 4. 選抜株の特性把握

##### 1) 栽培試験

3 次選抜した菌株の栽培形質を把握するために栽培試験を実施した。培地は、ナラおが粉とフスマを乾燥重量比 10:3 で混合し含水率 59% に調整後、ポリプロピレン製栽培袋に 2.5kg 充填し、121℃ で 90 分間高圧殺菌して作成した。接種は、培地に供試菌株のおが粉種菌約 20mL を接種して行った。培養は、1 次培養が、温度 21℃、湿度 65%RH、暗黒条件で 35 日、2 次培養が、温度 21℃、12 時間照明で 59 日または 90 日行った。発生は、栽培袋を全て取り除き、温度 15℃、湿度 95%RH 以上の室内に移し、10 分間散水して行った。収穫は、膜切れを目安に行い、子実体を規格別、サイズ別に分類し、子実体重量と個数を計測した。規格は、A 品 (5 分開き以下)、B 品 (8 分開き未満)、C 品 (8 分開き以上)、規格外 (奇形または欠点あり)、サイズは、L (傘径 6cm 以上)、M (傘径 4cm 以上、6cm 未満)、S (傘径 3cm 以上 4cm 未満)、SS (3cm 未満) とした。対照品種として、森 XR1 号 (森産業株式会社)、北研 607-S (株式会社北研) を用いた。各菌株の供試菌床数は 12 個とした。

##### 2) ビタミン D 分析

3 次選抜した菌株のビタミン D 含有量の特性を把握するために分析を行った。ビタミン D 分析用の試料は、4.1) で栽培した子実体の A 品または B・C 品を試料として用いた。

ビタミン D の合成処理は、収穫した子実体 1~3 個を柄つきのまま子実層を上向きでガラスシャーレに置き、プラスチックコンテナに並べて、15℃ または常温の室内で殺菌灯 (出力 30W、GL-30、NEC) を 195cm の距離から 10 分間照射して行った。殺菌灯照射後の子実体は、柄と傘に切り分け、傘を 5mm 幅に縦断したものをチャック付きポリ袋に入れて凍結させ、凍結乾燥機 (FD-1、東京理科器械株式会社) で乾燥後、粉碎機 (LAB MILL、大阪ケミカル) で粉碎した。

ビタミン D 含有量の定量は、2. と同様に行った。供試数は各菌株の規格別に 3 試料とした。

##### 3) 遊離アミノ酸分析

3 次選抜した菌株の遊離アミノ酸含有量の特性を把握するために分析を行った。遊離アミノ酸分析用の試料は、4.2) でビタミン D 分析に用いた試料とした。

遊離アミノ酸含有量の定量は、以下の手順で行った。遠沈管に試料 0.1g、80% (v/v) エタノール溶液 14mL を加え、超音波洗浄機で 60 分間抽出した。得られた懸濁液を定性濾紙 (No. 1、アドバンテック東洋) でろ過し、メンブレンフィルター (孔径 0.2μm、アドバンテック東洋) を通過させ、分析試料とした。分析は、高速アミノ酸分析計 (L-8900、日立ハイテック) を用いて行った。供試数は各菌株の規格別に 1 試料とした。

##### 4) 官能評価

3 次選抜した菌株の食味の特性を把握するために官能評価を行った。官能評価用の試料は、4.1) で栽培した子実体を用いて、以下の手順で調製した。子実体の柄を切り落とし、傘を放射状に 4 または 8 等分したものを、沸騰水中で 10 分間茹でて、粗熱が取れてから冷蔵した。

官能評価のパネリストは、青森県産業技術センター林業研究所の 20 代~60 代の職員 (5~8 名) とした。

官能評価は、選抜株 1 株と対照品種 1 株を非表示状態で試食し、「見た目」、「香り」、「甘味・うま味」、「苦味・渋味」、「歯切れの良さ」、「食感」、「総合的なおいしさ」の 7 項目について、7 段階の評点法による絶対評価で実施した。

## 5. 選抜株の現地実証栽培試験

3 次選抜した菌株を用いて、県内のシイタケ生産者施設 1 か所において、栽培およびビタミン D 含有量の実証を行った。

### 1) 栽培試験

培地は、基材に広葉樹おが粉（チップ割合 20%）を用い、栄養体（米ぬか・フスマ）を培地重量に対し 10%混合し含水率 65%に調整後、ポリプロピレン製栽培袋に 2.7kg 充填し、100℃で 10 時間常圧殺菌して作成した。接種は、培地に供試菌株のおが粉種菌約 20mL を接種して行った。培養は、温度 20℃で 5 月～10 月の 5 か月間行った。発生は、上面発生とし温度 18℃以上の室内で行った。収穫は膜切れを目安に行った。栽培した感想を聞き取り、課題を整理した。対照品種として、北研 607-S（株式会社北研）を用いた。

### 2) ビタミン D 分析

ビタミン D 分析用の試料は、5. 1) で栽培した子実体の B・C 品を試料として用いた。

ビタミン D の合成処理は、殺菌灯または日光を照射して行った。殺菌灯の照射は、収穫した子実体 1 個を柄つきのまま子実層を上向きでガラスシャーレに置き、プラスチックコンテナに並べて、常温の室内で殺菌灯（出力 30W、GL-30、NEC）を 195cm の距離から 10 分間照射して行った。日光の照射は、収穫した子実体 1 個を柄付きのまま子実層を上向きでエビラに並べ、11 月の晴天時に 6 時間天日にさらして行った。殺菌灯または日光照射後の子実体は、柄と傘に切り分け、傘を 10mm 幅に縦断したものを、温風乾燥機を用いて 40℃～60℃で乾燥させ、粉砕機（LAB MILL、大阪ケミカル）で粉砕した。

ビタミン D 含有量の定量は、2. と同様に行った。対照品種として北研 607-S（株式会社北研）を用いた。供試数は各菌株の処理区別に 1 試料とした。

## 6. 統計解析

2 次選抜において、Tukey の HSD 検定により 1 選抜株の交配親間のビタミン D 含有量の平均値の差を検定した。また、子実体のビタミン D 含有量と子実体断面に占めるひだの割合の相関関係を Pearson の積率相関係数で評価した。選抜株の特性把握において、遊離アミノ酸 31 項目を用い Ward 法によりクラスター分析を行った。官能評価値について、t 検定により菌株間の平均値の差を検定した。統計解析には、統計パッケージ R version 3.6.1（R Development Core Team, 2019）を用いた。

### Ⅲ 結果と考察

#### 1. 野生株のビタミンDの評価

野生株9菌株と対照品種2菌株のビタミンDを分析した結果、ビタミンD含有量は野生株が2,787~8,045 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体、対照品種が1,901~1,902 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体となり、野生株は対照品種よりも1.5~4.2倍高い値だった(表3)。竹内ら(1984)は、シイタケ中のV.D<sub>2</sub>濃度は、ひだ>傘肉>柄の順に高いと報告している。今回分析に供した野生株と対照品種の子実体の断面を確認したところ、子実体断面に占めるひだの割合は野生株が多く、対照品種で少なかった(図1)ことから、菌傘に占めるひだの割合がビタミンD含有量に影響した可能性がある。また、分析の結果から、野生株のビタミンD含有量の上位3菌株(K1、T4、Y4)を交配親として選抜した。

表3 シイタケ野生株のビタミンD含有量

菌株名	V. D <sub>2</sub> 濃度 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体)		
	平均値	標準偏差	標準偏差
9607	4107.34	±	99.39
K1	6081.86	±	721.48
T1	2787.04	±	97.37
T2	5569.58	±	573.18
T4	6950.32	±	916.64
T5	5122.06	±	556.13
Y1	4036.89	±	303.31
Y3	3602.52	±	143.79
Y4	8044.68	±	190.95
森 XR1	1901.59	±	271.15
北研 607-S	1901.49	±	194.96

注：表中の値は同一試料を3回分析した平均値±標準偏差を示す。

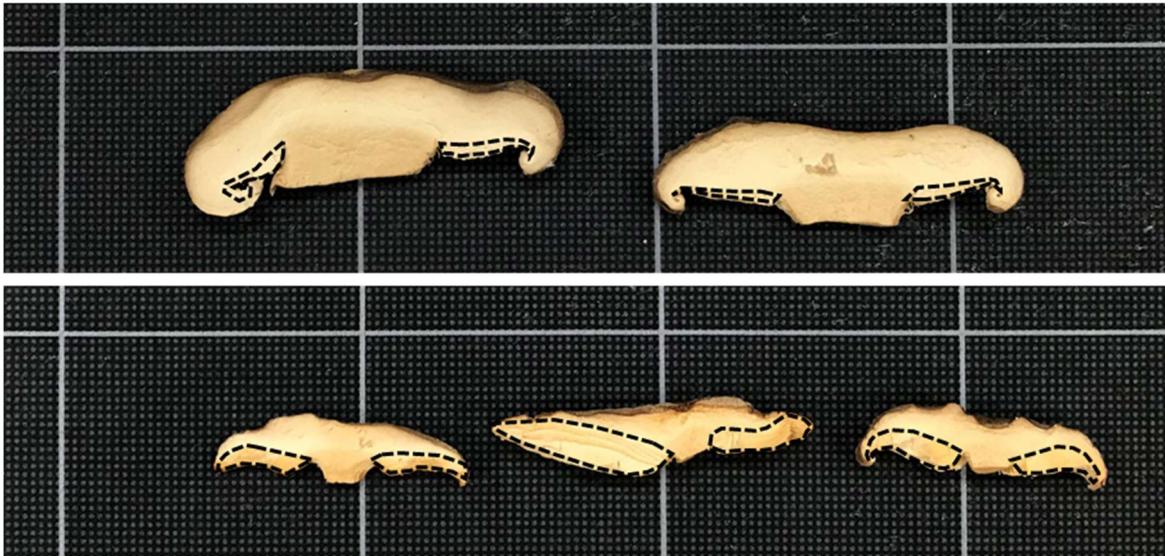


図1 シイタケ野生株と対照品種の子実体断面(凍結乾燥品)

注：上段が対照品種(森XR1号)、下段が野生株(Y3)。

点線の囲いはひだを示す。

#### 2. 交配株の選抜

##### 1) 交配株の作出

野生株のビタミンD含有量上位3菌株(K1、T4、Y4)を交配親として、550菌株の交配株を作出した(表4)。交配親別の交配株数は、交配親3菌株でほぼ同一とした。

表4 交配親別の交配株数

		核供与側			
		K1	T4	Y4	合計
核受容側	K1	0	92	94	186
	T4	91	0	90	181
	Y4	94	89	0	183
	合計	185	181	184	550

## 2) 1次選抜

低温下での菌糸伸長速度を選抜指標とした1次選抜において、交配株 550 菌株の菌糸伸長試験を行った結果、10℃で培養した 21 日後のコロニー直径は 12~50mm だった。菌叢に異常等がみられない上位 67 菌株を選抜した (図 2)。交配親別の 1 次選抜株数は、T4 の核受容側が 13 菌株となり、他の 2 菌株と比べ少なかった (表 5)。

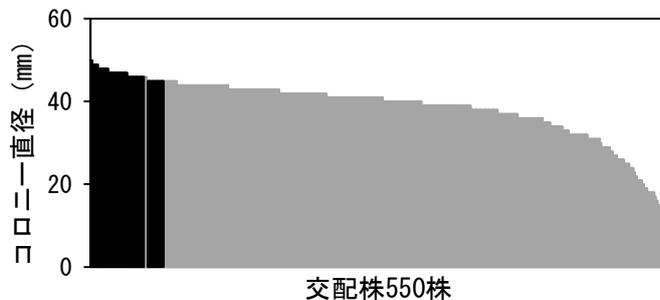


図 2 交配株の菌糸伸長試験結果 (n=1)

注：黒色は 1 次選抜通過を示す。

表 5 交配親別の 1 次選抜株数

		核供与側			
		K1	T4	Y4	合計
核受容側	K1	0	13	16	29
	T4	6	0	7	13
	Y4	16	9	0	25
	合計	22	22	23	67

## 3) 2次選抜

ビタミン D 含有量を選抜指標とした 2 次選抜において、1 次選抜株 67 菌株のうち、栽培によって子実体が得られた 63 菌株のビタミン D 分析を行った結果、ビタミン D 含有量は 1 次選抜株が 639~4,961 $\mu\text{g}/100\text{g}$  乾燥子実体、対照品種の T4 株が 2,220 $\mu\text{g}/100\text{g}$  乾燥子実体となり、21 菌株 (33%) が交配親よりも高い値だった (図 3)。交配親別のビタミン D 含有量は、核供与側では親株間で有意な差はみられなかった。核受容側でも親株間で有意な差はみられなかったが、Y4 > T4 > K1 の順に中央値が高く、野生株のビタミン D の評価結果の順序と同様だった。このことから、ビタミン D 含有量が高い交配親由来の単核菌糸を、交配の核受容側に用いることで、ビタミン D 含有量が高い交配株を得られる確率が高まると考えられる。以上の結果から、ビタミン D 分析試料を得るための栽培において、芽数が多すぎ傘径が小さかった菌株を除き、ビタミン D 含有量の上位 10 菌株を選抜した。交配親別の 2 次選抜株数は、核受容側も核供与側も Y4 株が 5 菌株となり、他の 2 菌株と比べ多かった (表 6)。

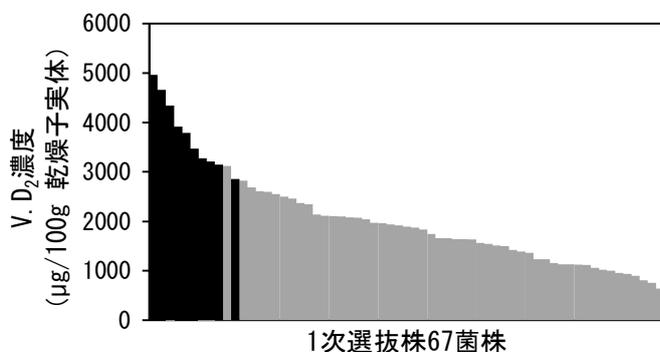


図 3 1 次選抜株のビタミン D 含有量 (n=1)

注：黒色は 2 次選抜通過を示す。

表 6 交配親別の 2 次選抜株数

		核供与側			
		K1	T4	Y4	合計
核受容側	K1	0	0	3	3
	T4	0	0	2	2
	Y4	2	3	0	5
	合計	2	3	5	10

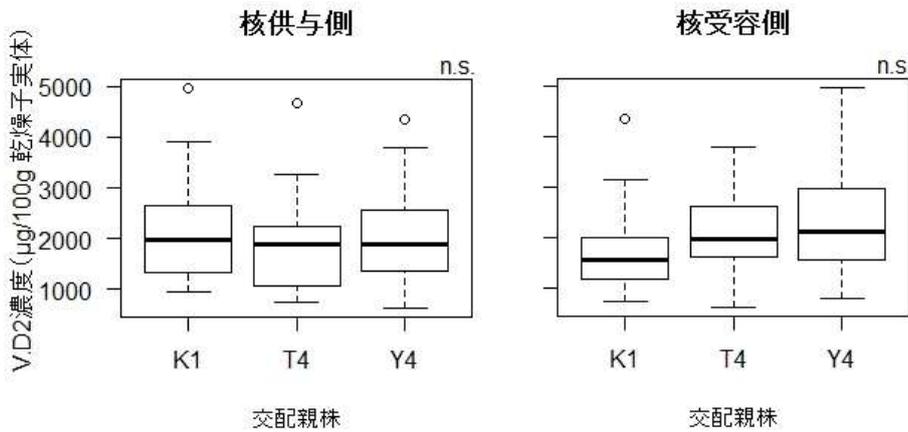


図4 交配親別の1次選抜株のビタミンD含有量  
注：交配親間のV.D<sub>2</sub>濃度に有意差なし (p > 0.05)。

ビタミンD含有量と子実体形質の関係を確認するため、子実体断面に占めるひだの割合を算出した結果、ひだの面積割合は16%～44%で、ビタミンD含有量の相関係数rは0.1256と低く、有意な相関関係はみられなかった(図5)。このことから、子実体断面におけるひだの面積割合がビタミンD含有量に与える影響は少ないと考えられた。

ビタミンD含有量と子実体形質の相関関係については、さらに詳細な検討が必要である。

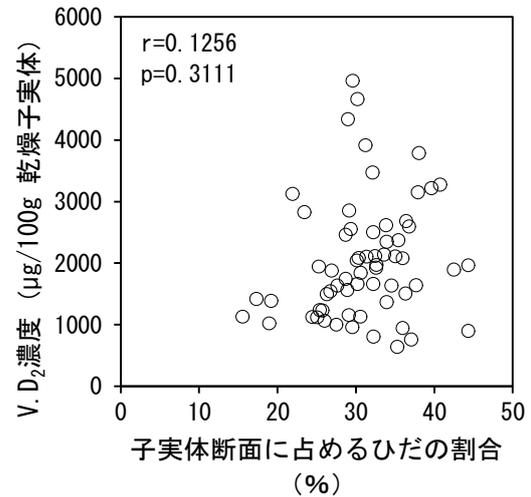


図5 子実体断面に占めるひだの割合と子実体のビタミンD含有量の関係

#### 4) 3次選抜

栽培形質および子実体形質を選抜指標とした3次選抜において、2次選抜株10菌株の栽培試験を行った結果、10菌株の平均値よりも優位な項目が相対的に多い3菌株(菌株No.28, 30, 34)を選抜した(表7, 8)。No.28は、総収量・規格品収量が多い、菌傘厚さ・菌傘直径が大きい、菌柄長さが短い、Mサイズ製品率が高いという点で優位だった。No.30は、規格品収量が多い、初収穫日数が短い、菌柄長さが短い、MLサイズ製品率が高い、Sサイズ以下個数割合が低いという点で優位だった。No.34は、規格品収量が多い、菌傘厚さ・菌傘直径が大きい、Lサイズ製品率・Lサイズ個数割合が高い、Sサイズ以下個数割合が低いという点で優位だった。交配親別の3次選抜株は、K1株とY4株由来の菌株のみが残った(表9)。

表9 交配親別の3次選抜株数

		核供与側			
		K1	T4	Y4	合計
核受容側	K1	0	0	1	1
	T4	0	0	0	0
	Y4	2	0	0	2
	合計	2	0	1	3

表 7 2次選抜株の栽培形質

菌株 No.	交配 組合せ	総収量 (g/菌床)	総個数 (個/菌床)	規格品 収量 (g/菌床)	初収穫 日数 (日)	Mサイズ 製品率 (%)	Lサイズ 製品率 (%)	Sサイズ 以下割合 (%)	Lサイズ 割合 (%)	n
25	y2u-t2	69.5	4.3	0.0	16.5	0.0	0.0	37.5	41.0	6
27	y3-t8u	159.6	13.3	11.4	12.9	2.4	11.7	25.0	17.2	7
28	y3u-k1	165.6	13.0	16.1	15.7	17.0	3.7	12.3	36.2	9
29	y4u-t3	151.5	13.0	19.7	13.6	22.8	4.2	19.5	30.8	7
30	y5u-k1	137.3	12.2	24.1	7.2	14.4	20.8	14.9	36.5	6
31	y6-k4u	103.4	6.0	7.5	13.3	2.8	8.3	16.5	58.6	7
33	y7-k4u	155.3	14.7	4.3	11.4	1.2	3.3	26.8	25.4	7
34	y7-k6u	140.3	4.5	24.9	17.5	0.0	20.2	0.0	91.7	4
36	y7-t8u	182.3	11.6	6.7	9.1	1.6	4.2	13.4	54.0	8
46	y8u-t6	149.7	4.8	0.0	19.0	0.0	0.0	0.0	63.8	4
平均値		141.4	9.7	11.5	13.6	6.2	7.6	16.6	45.5	6.5

注：菌株 No. は 1 次選抜 67 菌株に対して付与した整理番号を示す。

交配組合せは、交配親菌株名の頭文字の小文字と、各交配親由来の単核菌糸 10 菌株の番号の組み合わせをハイフンでつないで表記し、小文字の u は核受容側を示す。

M サイズ・L サイズ製品率は、総個数に対する各サイズの規格品個数の割合を示す。

S サイズ以下・L サイズ割合は、総個数に対する各サイズの個数の割合を示す。

表中の値は平均値を示す。

以下同様。

表 8 2次選抜株の子実体形質

菌株 No.	交配 組合せ	菌傘厚さ (mm)	菌傘直径 (mm)	ひだ幅 (mm)	菌柄長さ (mm)	菌柄太さ (mm)	n
25	y2u-t2	12.5	71.1	5.0	41.4	17.0	7
27	y3-t8u	10.0	56.2	5.6	34.3	14.4	17
28	y3u-k1	13.5	63.1	4.4	34.6	17.0	19
29	y4u-t3	9.7	52.6	5.4	51.2	15.4	17
30	y5u-k1	12.0	57.6	4.0	31.1	14.2	16
31	y6-k4u	9.6	52.5	4.6	24.5	10.7	7
33	y7-k4u	11.0	60.9	4.6	33.2	13.7	14
34	y7-k6u	14.5	82.3	5.0	43.0	18.8	5
36	y7-t8u	10.8	64.0	5.5	42.6	16.2	20
46	y8u-t6	12.3	66.3	5.7	43.6	15.3	6
平均値		11.6	62.7	5.0	38.0	15.3	12.8

### 3. 選抜株の特性把握

#### 1) 栽培試験

3次選抜株3菌株の栽培試験を行った結果、二次培養59日では、対照品種と比較して、選抜株の総収量は少なく、総個数は多かった。規格品率は、対照品種はA・B品が9割を占めたのに対し、選抜株はB・C品が7割以上で、規格外品も1~2割みられ、傘の開きが早く規格品の割合が低かった。サイズ割合は、対照品種はL・Mサイズが8割以上を占めたのに対し、選抜株はM・Sサイズが7割以上を占め、小型な傾向がみられた(表10)。

二次培養90日でも同様に、対照品種と比較して、選抜株の総収量は少なく、総個数は多かった。規格品率は、対照品種はA・B品が6割以上を占めたのに対し、選抜株はC品・規格外が7~9割で、傘の開きが早く規格品の割合が低かった。サイズ割合は、対照品種はL・Mサイズが8割以上を占めたのに対し、選抜株はM・Sサイズが5~7割で、SSサイズが2~4割を占め、小型な傾向がみられた(表10)。

選抜株について、二次培養59日と90日で子実体個数を比較すると、59日より90日の方が1回目収穫の子実体個数が多い傾向がみられた(図6)。子実体個数が多すぎると子実体のサイズが小型化し、市場価値を低下させるため、選抜株にとって二次培養期間90日は不適であると考えられた。特にNo.34は59日でも芽数がかかなり多く、3次選抜の栽培形質と異なった。今後、最適な培養期間について詳細な検討を要する。

表10 3次選抜株の栽培試験結果

二次培養 日数	菌株	総収量 (g/菌床)	総個数 (個/菌床)	規格品率(%)				サイズ割合(%)				n
				A	B	C	規格外	L	M	S	SS	
59日	No.28	840.0	94.5	9.3	30.2	41.9	18.6	11.8	23.2	46.4	18.6	6
	No.30	759.9	82.0	5.1	10.7	73.4	10.7	12.4	45.0	32.0	10.7	6
	No.34	733.3	97.8	9.5	14.1	68.1	8.4	7.3	43.2	41.2	8.4	6
	森XR1号	980.8	55.0	49.9	41.4	8.5	0.1	24.7	57.2	17.9	0.1	12
90日	No.28	696.5	109.2	13.0	17.9	26.9	42.2	6.0	24.3	27.6	42.2	6
	No.30	700.6	100.7	2.4	6.7	67.2	23.7	10.0	40.8	25.5	23.7	6
	No.34	930.8	149.2	4.9	8.4	65.0	21.8	2.2	37.7	38.3	21.8	6
	北研607-S	1426.5	65.8	44.8	19.5	32.3	3.4	42.6	42.9	11.2	3.4	14

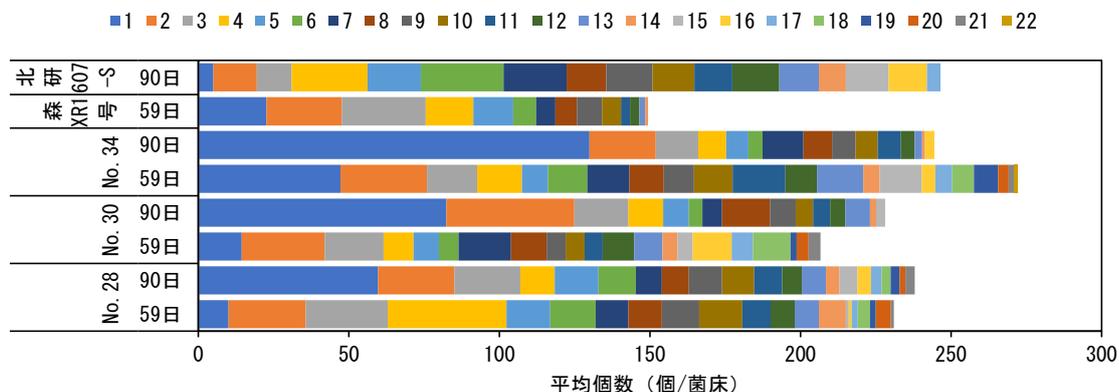


図6 各菌株の二次培養期間と収穫回数別の子実体個数の関係

注：色の塗り分けは収穫回数を示す。

## 2) ビタミンD分析

3次選抜株3菌株のビタミンD分析を行った結果、二次培養日数59日では、対照品種はビタミンDが不検出だったのに対し、選抜株のNo.30はA品とB・C品ともに2検体で検出された。しかし、No.28はA品1検体のみ、No.34はB・C品1検体のみ検出され、検出割合が低かった。ビタミンD含有量はA品が42~62 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体、B・C品が54~55 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体で同程度だった(表11)。

二次培養日数90日では、対照品種はA品1検体のみビタミンDが検出された。選抜株のA品では、No.28の全ての検体でビタミンDが検出されたのに対し、他2菌株は1検体のみ検出された。B・C品では、選抜株の全ての検体でビタミンDが検出された。ビタミンD含有量は、選抜株のA品が58~78 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体、B・C品が230~352 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体となり、B・C品が高かった(表11)。

二次培養日数59日では殺菌灯照射時に室内を15 $^{\circ}\text{C}$ に冷房していたのに対し、二次培養90日では20 $^{\circ}\text{C}$ 以上の常温で殺菌灯照射しており、ビタミンDの検出割合に影響した可能性がある。また、殺菌灯から子実体までの距離が195cmあり、今回の殺菌灯照射時間(10分)では均一なビタミンD合成には不十分だったことも考えられる。以上から、選抜株のビタミンD含有量の特徴を把握するには殺菌灯照射時の温度や照射時間について更なる検討を要する。

表11 3次選抜株のビタミンD含有量 (n=3)

二次培養 日数	菌株	V. D <sub>2</sub> 濃度 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体)							
		A品				B・C品			
		平均	標準偏差	検出	不検出	平均	標準偏差	検出	不検出
59日	No. 28	41.84	-	1	2	-	-	0	3
	No. 30	61.77	7.75	2	1	54.72	1.39	2	1
	No. 34	-	-	0	3	54.33	-	1	2
	森 XR1号	-	-	0	3	-	-	0	3
90日	No. 28	57.91	20.98	3	0	230.10	127.01	3	0
	No. 30	84.65	-	1	2	351.67	72.82	3	0
	No. 34	78.20	-	1	2	331.17	202.74	3	0
	北研 607-S	37.13	-	1	2	-	-	0	3

## 3) 遊離アミノ酸分析

3次選抜株3菌株の遊離アミノ酸分析を行った結果、二次培養日数59日のA品では、対照品種の遊離アミノ酸含有量の合計値2528 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体に比べ、No.28は3493 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で高く、No.34は2654 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で同程度、No.30は2159 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で低かった。No.28では主にアルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジンが高いという特徴がみられた。B・C品では、対照品種の遊離アミノ酸含有量の合計値2432 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体に比べ、No.30は3050 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で高く、No.34は2541 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で同程度、No.28は2197 $\text{mg}/100\text{g}$ 乾燥子実体で低かった。No.30では主にアルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジンが高いという特徴がみられた(表12)。

二次培養日数 90 日の A 品では、対照品種の遊離アミノ酸含有量の合計値 3528mg/100g 乾燥子実体に比べ、No. 28 は 3957mg/100g 乾燥子実体で高く、No. 30・34 は 1889・2279mg/100g 乾燥子実体で低かった。No. 28 では主にトレオニン、ヒスチジンが高いという特徴がみられた。B・C 品では、対照品種の遊離アミノ酸含有量の合計値 2539mg/100g 乾燥子実体に比べ、No. 28 は 3218mg/100g 乾燥子実体で高く、No. 30・34 は 2359・2792mg/100g 乾燥子実体で同程度だった。No. 28 では主にトレオニン、ヒスチジンが高いという特徴がみられた（表 12）。

試験区別の遊離アミノ酸含有量をクラスター分析により解析した結果、試験区は I、II、III の 3 グループに分けることができた（図 7）。遊離アミノ酸含有量の合計値は、グループ I は高く、グループ II、III は同程度で低かった（図 8）。グループ I には、No. 28 が多くグルーピングされたことから、No. 28 は二次培養日数に関わらず遊離アミノ酸含有量が高いと考えられた。グループ II、III には、No. 30・34 が多くグルーピングされた。グループ II、III では遊離アミノ酸組成が異なり、それぞれ二次培養日数 59 日、90 日の試験区がまとまっていることから、No. 30・34 は、二次培養日数により遊離アミノ酸組成が異なることが示唆された（図 8）。

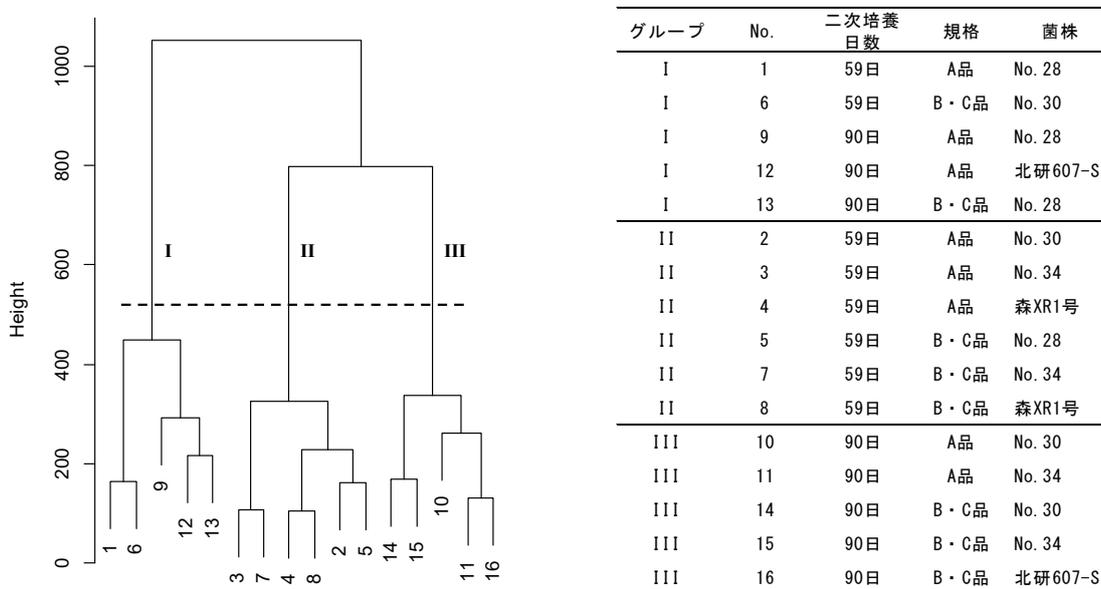


図 7 遊離アミノ酸含有量のクラスター分析結果

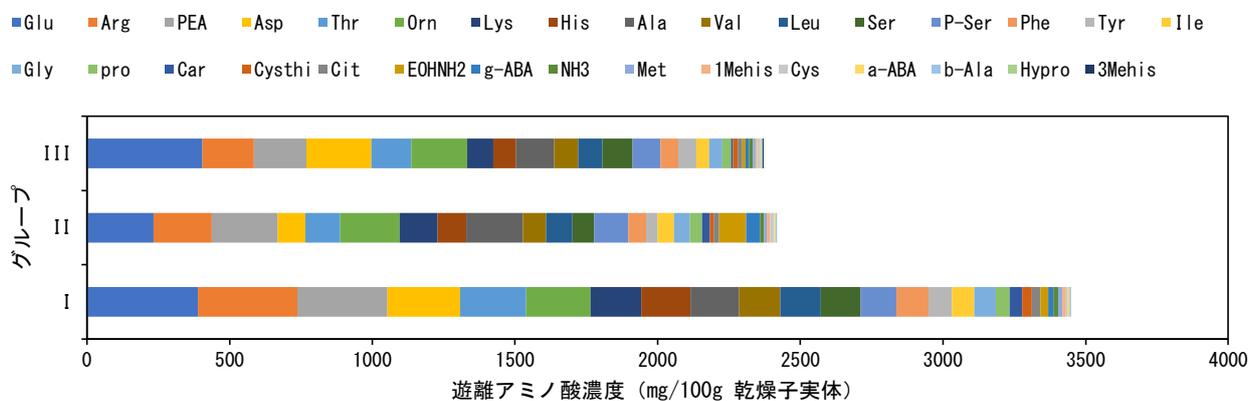


図 8 クラスター分析の 3 グループにおける遊離アミノ酸組成

表 12 3 次選抜株の遊離アミノ酸含有量 (n=1)

アミノ酸略号	遊離アミノ酸濃度 (mg/100g 乾燥子実体)															
	二次培養 59 日								二次培養 90 日							
	A 品				B・C 品				A 品				B・C 品			
	No.28	No.30	No.34	森研1号	No.28	No.30	No.34	森研1号	No.28	No.30	No.34	北研607-S	No.28	No.30	No.34	北研607-S
Arg	<b>393</b>	255	183	216	211	<b>354</b>	172	192	426	198	205	292	281	130	151	214
PEA	365	167	321	248	133	279	285	227	367	72	170	299	266	159	266	252
Glu	315	222	274	211	240	246	245	208	406	331	359	544	433	498	473	366
Thr	<b>237</b>	127	140	119	111	<b>188</b>	118	118	<b>296</b>	123	119	195	<b>236</b>	151	184	124
Ala	233	122	227	231	157	198	271	184	136	102	154	147	138	<b>152</b>	<b>162</b>	97
Asp	<b>223</b>	<b>168</b>	102	68	91	<b>182</b>	52	106	243	220	157	379	248	<b>310</b>	249	203
His	<b>202</b>	101	<b>131</b>	82	98	<b>185</b>	113	78	<b>193</b>	51	99	127	<b>154</b>	69	82	99
Orn	166	166	147	260	236	218	184	253	281	88	220	195	270	194	251	228
Lys	165	107	129	154	115	169	141	154	215	66	95	163	<b>181</b>	69	112	116
Leu	150	87	106	103	74	116	95	97	170	82	89	163	113	54	90	101
P-Ser	144	99	130	124	112	139	124	126	110	89	86	117	113	111	115	92
Val	123	67	92	93	59	93	77	94	194	66	74	175	137	66	102	115
Phe	<b>108</b>	64	78	59	46	82	68	59	<b>169</b>	54	70	105	96	36	76	70
Ser	89	70	82	88	59	92	76	83	179	54	77	165	<b>177</b>	137	151	113
Ile	81	53	63	66	42	65	52	63	91	47	50	99	54	22	39	63
Gly	72	54	64	62	37	80	57	64	85	27	47	72	66	37	59	58
Tyr	<b>71</b>	41	51	45	32	49	40	36	101	68	61	116	79	44	71	79
Car	<b>70</b>	6	0	7	72	72	6	70	<b>64</b>	7	7	8	7	9	7	6
pro	53	40	46	52	32	54	40	46	57	39	30	39	<b>41</b>	21	33	27
EOH <sub>2</sub>	46	49	116	102	91	59	<b>149</b>	63	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	7	9	10	<b>13</b>	7
Cit	<b>42</b>	24	19	20	16	<b>38</b>	17	18	33	21	17	22	19	12	15	18
Cysthi	<b>34</b>	10	19	15	9	16	14	17	<b>51</b>	9	10	31	<b>36</b>	17	22	23
1Mehis	<b>34</b>	3	<b>25</b>	7	7	5	<b>27</b>	6	<b>13</b>	2	<b>15</b>	6	6	0	<b>8</b>	5
g-ABA	28	20	53	46	<b>74</b>	28	<b>68</b>	23	11	15	16	12	11	9	11	12
NH <sub>3</sub>	17	14	14	14	13	17	15	16	16	12	13	16	16	15	15	13
Met	<b>16</b>	8	<b>15</b>	10	6	12	10	9	19	6	9	15	12	5	10	10
a-ABA	<b>6</b>	3	6	4	4	5	5	4	6	3	5	6	6	6	6	4
b-Ala	6	4	5	7	4	6	5	7	6	3	6	5	7	6	<b>8</b>	4
Cys	3	10	16	15	<b>18</b>	8	16	11	7	6	6	8	9	9	11	10
3Mehis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
Hypro	0	0	0	0	0	0	2	0	0	10	0	0	0	0	0	5
合計	3493	2159	2654	2528	2197	3050	2541	2432	3957	1889	2279	3528	3218	2359	2792	2539

注：アミノ酸の順序は二次培養日数 59 日、A 品、No. 28 の遊離アミノ酸含有量の降順で整列。

太字斜体は同試験区の対照品種と比較して 1.5 倍以上の値を示す。

#### 4) 官能評価

3次選抜株3菌株の官能評価を行った結果、二次培養日数59日では、No.28の歯切れの良さが対照品種よりも有意に低い評価で、No.34の渋味苦味、食感、総合的なおいしさが対照品種よりも有意に高い評価だった(表13)。

二次培養日数90日では、No.30の歯切れの良さ、総合的なおいしさが対照品種よりも有意に高い評価だった(表13)。

No.30とNo.34では、対照品種よりも高い評価が得られたが、二次培養日数によって対照品種が異なったため、二次培養日数が食味に与える影響は明らかにできなかった。

表13 3次選抜株の官能評価結果

二次培養 日数	菌株	見た目	香り	甘味うま味	渋味苦味	歯切れの 良さ	食感	総合的な おいしさ	n
59日	No.28	0.2±1.8	0.2±1.7	-0.2±1.1	-0.5±1.2	-0.3±1.1	0.3±1.2	0.3±1.1	7
	森XR1号	1.0±1.3	0.7±1.0	0.3±0.9	-0.7±1.4	1.0±1.3	1.0±0.6	0.3±1.0	7
	No.30	-0.2±1.0	0.4±0.4	0.0±1.2	-1.2±1.4	0.2±0.5	0.0±0.5	-0.2±0.8	6
	森XR1号	0.0±1.0	0.6±0.9	-0.4±0.8	-0.6±1.4	1.0±0.6	0.4±0.6	0.2±0.8	6
	No.34	0.3±0.9	0.7±1.3	1.3±1.9	-0.9±0.8	0.6±0.4	1.1±0.7	1.4±0.8	5
	森XR1号	1.6±0.5	0.6±1.2	-1.1±0.9*	-1.0±1.1	-0.1±0.7	0.0±1.5*	-0.6±1.1*	5
90日	No.28	0.8±1.4	1.0±1.2	1.0±1.5	0.2±1.4	0.8±1.0	0.7±1.0	0.7±1.5	8
	北研607-S	0.5±0.7	0.7±1.1	0.3±0.8	-0.5±1.4	0.3±1.3	0.3±1.2	0.2±0.7	8
	No.30	0.3±0.7	0.3±1.2	0.4±1.1	-0.1±1.1	1.1±0.6	1.1±0.6	0.6±0.5	8
	北研607-S	-0.1±1.0	-0.1±1.2	0.1±1.0	-0.8±1.2	-0.3±1.3	0.1±1.4	-0.4±0.7*	8
	No.34	0.3±0.9	0.1±1.0	0.1±0.6	-0.6±0.8	0.8±1.2	0.8±1.5	0.5±0.8	6
	北研607-S	0.9±1.2	0.6±1.2	0.0±1.0	-0.3±0.5	1.0±1.2	0.9±1.0	0.8±0.8	6

注：表中の値は平均値±標準偏差を示す。

\*は有意差あり(p < 0.05)を示す。

#### 4. 現地実証栽培試験

##### 1) 栽培試験

シイタケ生産者施設において3次選抜株3菌株の栽培試験を実施した結果、全ての選抜株で培養途中に栽培袋内で子実体発生がみられ、初回発生の芽数が過剰に多く、柄も細く小ぶり、傘の開きも早かった。生産者からは、生鮮品で高価格での販売は難しいが、乾燥品であれば通常通りの販売が可能との意見が得られた。

初回発生の芽数が過剰に多い、傘の開きが早い等の形質は、「3. 選抜株の特性把握」でも確認されており、生鮮品として販売する上では大きなデメリットと考えられた。今回はシイタケ生産者が通常実施しているスケジュールで栽培を行ったが、選抜株にとっては培養期間が長すぎたと考えられることから、今後、最適な培養期間について詳細な検討が必要である。また、生産者の通常実施している栽培スケジュールを意識した品種の選抜なども検討する必要があると考えられた。

## 2) ビタミンD分析

シイタケ生産者施設において栽培した3次選抜株3菌株のビタミンD分析を実施した結果、殺菌灯照射10分では、対照品種は不検出だったが、選抜株では全て検出され、ビタミンD含有量はNo. 30・34が684~746 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体と比較的高く、No. 28が136 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体で低かった。殺菌灯照射1時間では、対照品種が1163 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体に対し、選抜株は3731~4220 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体で、3.2~3.6倍高い値だった。日光照射6時間では対照品種が58 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体に対し、選抜株は325~1046 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体で、5.6~18倍高い値だった。(表14)。

No. 30・34は、殺菌灯照射時間が短い場合でもビタミンD含有量が高く、ビタミンD合成速度が速いと考えられた。また、No. 30・34は日光照射でもビタミンD含有量が高く、殺菌灯等の設備を有さない生産者でも一定量のビタミンD合成が可能と考えられた。

表14 シイタケ生産者施設において栽培した子実体のビタミンD含有量 (n=1)

菌株	V. D <sub>2</sub> 濃度 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ 乾燥子実体)			
	無処理	殺菌灯 (30W)		日光 6時間
		10分	1時間	
No. 28	-	136.00	3975.41	324.87
No. 30	-	684.00	4220.31	1017.00
No. 34	-	745.85	3731.25	1045.79
北研 607-S	-	-	1162.53	57.98

## IV まとめ

ビタミンDが豊富なシイタケ品種を作出することを目的として、県内から収集した野生株を用いた交配株を作出し、菌糸伸長速度、ビタミンD含有量、栽培形質および子実体形質の評価により選抜を行った。その結果は、以下のとおりである。

- 1) 野生株9菌株と対照品種2菌株のビタミンD含有量を分析し、ビタミンD含有量上位3菌株を交配親として選抜した。
- 2) 交配親3菌株を用いて、550菌株の交配株を作出し、低温下での菌糸伸長速度による1次選抜を行い、培養温度10 $^{\circ}\text{C}$ で21日間培養後のコロニー直径が大きい上位67菌株を選抜した。
- 3) 2次選抜では、1次選抜株67菌株のうち、63菌株のビタミンD含有量を分析し、上位10菌株を選抜した。
- 4) 3次選抜では、栽培形質と子実体形質を評価し、10菌株の平均値よりも優位な項目が相対的に多い3菌株を選抜した。
- 5) 3次選抜株の特性を把握するために栽培試験、ビタミンD分析、遊離アミノ酸分析を行った結果、栽培試験では、対照の市販品種と比較して、いずれの選抜株も、総収量は少なく、総個数は多く、規格品率とサイズ割合は対照品種よりも劣る傾向がみられた。ビタミンD分析では、A品よりもB・C品の方が、ビタミンD含有量が高くなる傾向がみられた。遊離アミノ酸分析では、選抜株No. 28は二次培養日数に関わらず遊離アミノ酸含有量が高く、No. 30とNo. 34は二次培養期間によってアミノ酸組成が異なる傾向がみられた。選抜株の官能評価を行ったところ、No. 30とNo. 34では対照の市販品種よりも総合的なおいしさに有意に高い評価が得られた。

6) シイタケ生産者施設において3次選抜株の現地実証栽培試験を行ったところ、いずれの選抜株も培養途中で栽培袋内で子実体発生がみられ、初回発生の芽数が過剰に多く、柄も細く小ぶりで、傘の開きも早かったことから、シイタケ生産者が通常実施しているスケジュールでは培養期間が長すぎたと考えられた。生産者施設において栽培された選抜株のビタミンD含有量を分析したところ、対照の市販品種と比較して、殺菌灯照射1時間の場合でビタミンD含有量が3.2~3.6倍高く、日光照射6時間の場合でビタミンD含有量が5.6~18倍高い値だった。

以上から、選抜株は市販のシイタケ品種よりビタミンD含有量が多いことが明らかとなり、選抜株の優位性が示された。一方、栽培形質や子実体形質は劣ったことや光で分解されやすいビタミンDの性質から、生鮮品ではなく加工品としての流通が好ましいと考えられた。

## 謝辞

本研究の実施にあたり、石田惣作氏、青森県産業技術センター林業研究所前所長の木村公樹氏には野生株の収集・提供に協力いただいた。新潟県森林研究所池田裕一氏にはビタミンD分析の手順等についてご教示いただいた。青森県産業技術センター食品総合研究所山谷祥史主任研究員、阿部美菜子主任研究員、青森県産業技術センター農産物加工研究所能登谷典之部長、宮部好克主任研究員にはビタミンDおよび遊離アミノ酸の分析に協力いただいた。ここに深甚の謝意を表す。また、実験に尽力された濱田綾香氏に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 青森県 (2024) . 令和5年度青森県の森林・林業. 10 特用林産物. 97
- 池田裕一 (2017) . 培地組成および栽培環境がアラゲキクラゲ *Auricularia polytricha* のビタミンD含有量に及ぼす影響. 新潟県森林研究所報告. No. 57: 37-41
- 農林水産省 (2021) . しいたけ種 *Shiitake* (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). 農林水産植物種類別審査基準
- 農林水産省 (2023) . 令和4年特用林産物生産統計調査結果報告書. 3きのこ類の生産量
- Ohta H, Uenishi K, Shiraki M (2016) . Recent nutritional trends of calcium and vitamin D in East Asia. *Osteoporos Sarcopenia* 4: 208-213
- R Development Core Team (2019) . R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing
- 竹内敦子ら (1984) . シイタケ中のビタミンD<sub>2</sub>及びエルゴステロールの分布と存在型について. *Vitamins(Japan)*. 58(12): 589-595