

キノコ類の遺伝子組換え実験における拡散防止措置

宇都宮大学・鈴木智大

岩手生物工学研究センター・矢野 明、坂本 裕一

1. 基本概念

(1) 遺伝子組換え体の拡散防止に関するキノコ類の特性

キノコとは、真菌類のうち比較的大型の子実体 (Fruiting body) あるいは担子器果を形成するものとされており、一般的にその多くは担子菌門 (Basidiomycota) または子囊菌門 (Ascomycota) に属する。組換え実験に用いられている種に限っても、孢子や分裂子 (分生子; 用語説明を参照) 形成の頻度や飛散のしやすさなどが異なるため、生態に合わせた適切な拡散防止措置が必要である。本項ではそのうち、担子菌門に属すキノコを例に、拡散防止措置を紹介する。

一般的な担子菌門の生活環を図に示す (図 1)。これまでに、子実体を形成するウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) やマッシュルーム (*Agaricus bisporus*)、シイタケ (*Lentinula edodes*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) 等で遺伝子組換え技術が報告されている。例えば、キノコのモデル生物とされ

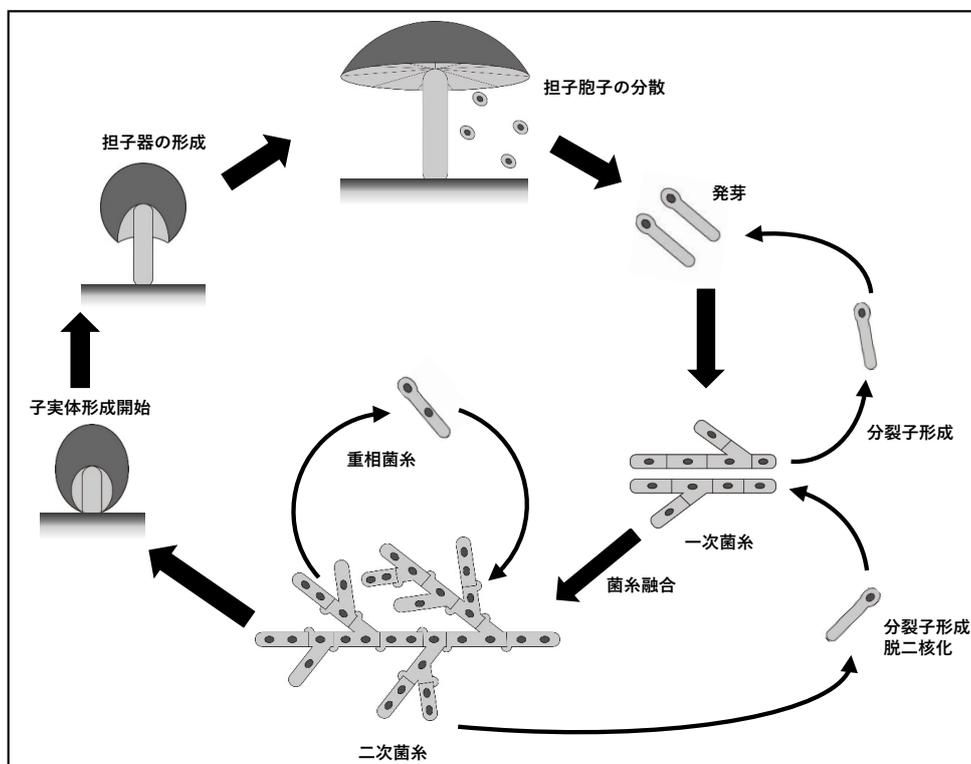


図1 担子菌門の生活環

るウシグソヒトヨタケでは担子菌共通の子実体形成機構の解明に向けて、また木材腐朽菌ではリグニン等の難分解性物質の分解技術の開発に向けて、ヒラタケ等では各種遺伝子の機能解析のために遺伝子組換え技術が利用されている。遺伝子導入には、菌糸プロトプラストを用いたポリエチレングリコール (PEG) 法、エレクトロポレーション法や、分裂子を用いたアグロバクテリウム法等が報告されている。

担子菌門の遺伝子組換え体の拡散防止では、担子胞子の分散のための器官となる子実体の取り扱いが重要であるが、菌糸体で生産される分裂子や分節菌糸の飛散の可能性と安定性に注意しつつ、実験に使用する生活環に対応した拡散防止措置を執ることが望まれる。

(2) 拡散が懸念される形態

①菌糸体・分裂子

容器中（実験室内）での培養に適した形態で、遺伝子組換え体の作出作業の多くは菌糸体を材料として実施される。菌糸体の飛散は考えにくいですが、培養条件によっては菌糸体から分裂子を形成する可能性がある。したがって、実験対象とするキノコの菌糸体からの分裂子形成と飛散の程度を事前に確認し、必要に応じて野生型を用いて実験を行うことが望ましい。

【参考データ】ウシグソヒトヨタケをφ90 mmのMYGプレート(1.0%麦芽エキス、0.4%酵母エキス、0.4%グルコース、1.0%寒天)にて10日間培養し、滅菌水を用いて分裂子を回収後、血球計算盤を用いて、分裂子数をカウントした結果、1プレート当たり $10^7\sim 10^8$ 個の分裂子(数 μm 程度)が観察された。

②子実体・担子胞子

子実体は、飛散に適した担子胞子を形成する。一般に担子菌類は、子実体1個あたり、 $10^9\sim 10^{10}$ 個程度の担子胞子を飛散すると考えられている (Buller 1922; Rockett and Kramer 1974)。担子胞子のような有性胞子は環境中の安定性が高い可能性があるため、胞子の封じ込め対策と、実験後の不活化処理を確実に行う必要がある。また、キノコ類の担子胞子はその種によって性質が異なることが考えられるため、野生株を用いた担子胞子の安定性・飛散性などの検討を強く推奨する。

【参考】ウシグソヒトヨタケの担子胞子は数 μm 程度で卵形～楕円形・暗色であり、特徴的な色を示すことからその形成の確認が容易である。飛散性は低く、直下に落ちやすい。

2. 遺伝子組換えウシグソヒトヨタケ(*Coprinopsis cinerea*)を使用する実験室の要件

担子菌の実験モデルとして多く利用されている“ウシグソヒトヨタケ”や、栽培技術が確立され産業利用がおこなわれているキノコは、基本的にヒトへの病原性や毒性が無くBSL1に属する。組換え実験の宿主としてはクラス1であることから本稿ではP1P実験である菌糸

体培養実験および子実体形成実験を前提とした実験を示す。ただし核酸供与体の実験分類(クラス分け)によっては、より高い拡散防止レベルが求められる場合もある。また菌糸体培養実験であっても、培養環境の変化によっては子実体を形成することがあるので留意する必要がある。

(1) ハード要件

菌糸体培養実験 (P1P 実験)

- ・オートクレーブおよび循環型クリーンベンチまたは安全キャビネットを備えること
(吹き出し型のクリーンベンチは適さない)
(換気扇は遺伝子組換え体の分裂子・担子胞子の飛散防止のため使用しない)
- ・実験室の扉は、直接屋外につながっていないこと (廊下等に接続していること)。

子実体形成実験 (P1P 実験)

子実体の形成実験では、子実体からの胞子の飛散・拡散が考えられるため、適切なハード要件が必要である(胞子が屋外に漏出した場合、環境中に多数存在する微生物から特定の実験株を検出することは、実験株が優勢となる環境を確立し繁茂する状態になるまでは困難と考えられるため、拡散防止環境を整備することが重要である。)

菌糸体培養実験に加え、子実体形成を行う樹脂やガラスあるいは袋等の容器の取り扱いが可能な培養器、および循環型クリーンベンチあるいは安全キャビネットを備える。これらに加えて、胞子等を除去可能な空気清浄機等の設置も有効である。

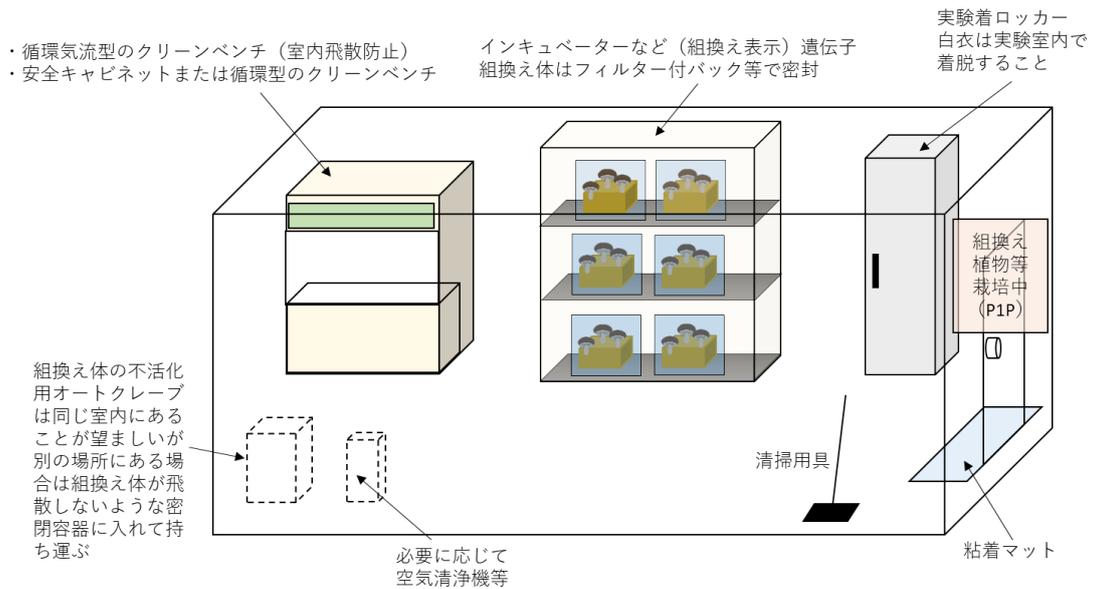


図2 きのご類の基本的な拡散防止措置のイメージ図

- ・ P2Pに準じた設備が望ましいが、適宜、空気清浄機・粘着マット・室内専用白衣・UV灯などを利用して孢子の拡散を防ぐ取組を行う。
- ・ 孢子が飛散する可能性のある実験工程においては、適宜安全キャビネットや室内飛散防止機能付きの循環型クリーンベンチを用いて拡散防止に努める。
- ・ 孢子形成（子実体形成）を含む培養および保管はフィルター付バック等を活用することも有効。
- ・ 実験室の窓は閉め、排気は停止する。（HEPAフィルターを過された排気を除く。）

【参考事例：岩手生物工学研究センターにおける遺伝子組換えキノコ類の拡散防止措置】

環境中に拡散しやすい孢子を形成する子実体や、大型の子実体を形成する組換え実験を行う場合は、P2P 施設に近い設備利用が望ましい。一例として岩手生物工学研究センターの菌茸実験棟を紹介する。

子実体形成実験は二重扉を有する施設（図3）を使用し（実験棟入口の扉（図4）⇒培養室入口の扉（図5）⇒閉鎖系培養装置の扉（図6））、施設内にはオートクレーブおよび安全キャビネットを整備している。また子実体形成には、HEPA フィルター付き排気ユニットを備えた閉鎖系の培養装置（図6）を使用している。さらに、遺伝子組換えキノコを接種した菌床（菌床については以降の3-③を参照）は、孢子拡散を防ぐフィルター付バックまたはガラス容器（図7）を使用して培養を行っている。



岩手生物工学研究センター菌茸培養実験棟

図 3. 遺伝子組換えキノコ類の培養実験棟の外観



図 4 遺伝子組換えキノコ類の培養実験棟入口
遺伝子組換え植物等栽培中の表示



図 5 実験棟内培養室入り口
遺伝子組換え植物等栽培中の表示



↑オートクレーブ

図 6 閉鎖系培養装置

HEPA フィルター
←付き排気ユニット



図 7 おが粉・木粉を用いた種菌培養の様子

(2) ソフト要件

実験内容によって、子実体形成を含めたすべての生活環を経る場合と、菌糸のみで実験が終了する場合などが考えられる。それぞれの実験計画に適した拡散防止措置を講じることが大切である。ウシグソヒトヨタケにおけるソフト要件を下記に示す。

P1P レベルの実施中の遵守事項

1. 実験中は窓を閉め実験室の出入り以外では扉を閉じる
2. 換気扇は通常使用せず、HEPA フィルターを備えた排気口等を使用する
3. HEPA フィルターの交換の際には、薬剤燻蒸などによる付着物の不活化が必要である。専門業者に委託する場合には作業手順について打合せし、不活化の状況を確認することが望ましい。

実験室入り口に「組換え植物等栽培中」(P1P レベルの場合) と表示

4. 培養室および培養装置には遺伝子組換えキノコ栽培中と表示
5. 遺伝子組換え体の孢子等の拡散を防ぐため、容器(シャーレ、チューブ、コンテナ等)またはフィルター付バッグで培養～子実体形成を行う
6. 遺伝子組換え体および使用した容器等は、オートクレーブ処理等による不活化を行う

3. 子実体形成実験について

子実体形成の実験工程は、①種菌および培地(菌床を含む)の準備、②子実体を形成するための培地(菌床等)への植菌、③植菌後の管理、④遺伝子組換え子実体の取扱い、⑤実験後の不活化処理の工程に区分される。

キノコ類では一般的に原木栽培や菌床栽培が知られているが、孢子飛散防止を考慮した容器を利用できること、培地調製のしやすさから、組換え実験には菌床栽培が利用されている。そこで、本項では菌床栽培に関して記述する。

① 種菌および培地(菌床を含む)の準備

種菌の培養は液体培地や寒天培地またはおが粉・木粉などを用いた培地(菌床培地)を使用する場合があげられる(図6)。種菌の培養に関してはアカパンカビの項を参考に、培養中に分裂子の飛散が起らないような容器を用いる。

② 植菌

植菌作業は(1)寒天培地や木粉・おが粉を用いた培地で前培養した種菌を培地ごと新しい培地(または菌床)へ滅菌したスパーテル等で移植する方法、(2)液体培養した菌糸体をマイクロピペットなどで新しい培地(または菌床)へ滴下する方法、で行われる。これらの工程でのエアロゾルの飛散の可能性は考えにくい、分裂子の飛散を考慮し循環型クリーンベンチまたは安全キャビネットを利用して植菌を行うことを推奨する。また、フィルター付きチップやオートクレーブ可能なピペット等の利用も望ましい。

③ 植菌後の管理

植菌後は、フィルター付バッグ（ポアサイズ数 μm ）【例：サカト産業等の企業から購入可能】やプラントボックス【例：SigmaAldrich や BMS から購入可能】、ガラスケースなどで培養することで、分裂子または子実体形成後の孢子拡散を防ぐ（図 8）。



図 8 閉鎖系培養装置内部(左図)および遺伝子組換え体の培養（右図）

④ 遺伝子組換え子実体の取扱い

遺伝子組換え子実体の生物学的機能を評価するなど、子実体を用いた実験を行う際は孢子飛散を考慮し、適切な拡散防止措置を取ることが必要である。容器の開閉を含めて特に子実体の破碎などは安全キャビネットまたは循環型クリーンベンチ内で行うこと、粉碎後に孢子飛散が起きない状態（容器の中など）で安全キャビネット内から出すなどの措置が必要である。

【注】子実体発生処理（浸水処理、菌掻き等）が必要なキノコ類に関しては、分裂子等の飛散や浸水後の水等からの拡散を考慮し、適宜安全キャビネットによる作業、オートクレーブを用いた不活化を行うことが必要である。

⑤ 実験後の不活化処理

実験終了後は速やかに不活化処理を行う。

オートクレーブ（121°C、20分）

菌床内部の菌糸や、容器のオートクレーブは、量や水分によっては内部まで熱の上昇が起らない可能性があるため、インジケーターテープ等を使用し、適切に不活化がなされているかを確認する。或いは、菌床を崩したのちに、1リットル程度にオートクレーブバッグへ小分けしたものの不活化（オートクレーブ）を行う。

次亜塩素酸ナトリウム、エタノール

実験室・実験台・クリーンベンチ内などの清掃には適宜、0.1%（有効塩素濃度）次亜塩素酸ナトリウムや70%エタノールを用いたふき取りを行うことが有効である（下記の参考データ）。また、ふき取りに使用したキムワイブ等は、オートクレーブで不活化する。

【参考データ】

- ウシグソヒトヨタケの次亜塩素酸を用いた不活化
 - ①分裂子懸濁液を 10^5 cells/mL、胞子懸濁液を 10^4 cells/mL に調整した。
 - ②有効塩素濃度が終濃度 0.1% となるように次亜塩素酸を添加し、ボルテックスにより懸濁した。
 - ③次亜塩素酸添加後、0 min (直後)、15 min、30 min 後に PDA 寒天培地のプレートにそれぞれ 100 μ L ずつ塗布し、28°C で 1 日培養後のコロニー生育の有無を確認した。

滅菌時間 (min)	対照	0(直後)	15	30
コロニー生育の有無 分裂子 (10^5 cells/mL)	有り	無し	無し	無し
コロニー生育の有無 胞子 (10^4 cells/mL)	有り	無し	無し	無し

- ウシグソヒトヨタケのエタノールを用いた不活化
 - ①分裂子および胞子懸濁液にエタノール (終濃度 70%) を添加した (添加後の各細胞数は分裂子懸濁液を 10^5 cells/mL、胞子懸濁液を 10^4 cells/mL となるように調整した)。
 - ②エタノール添加後ボルテックスにより懸濁し、0 min (直後)、15 min、30 min 静置した後、PDA 寒天培地のプレートにそれぞれ 100 μ L ずつ塗布し、28°C で 1 日培養後のコロニー生育の有無を確認した。

滅菌時間 (min)	対照	0(直後)	15	30
コロニー生育の有無 分裂子 (10^5 cells/mL)	有り	無し	無し	無し
コロニー生育の有無 胞子 (10^4 cells/mL)	有り	無し	無し	無し

紫外線

クリーンベンチ内などの滅菌には紫外線も有効である。また、実験室内に UV 灯を設置し、作業時間外に 60 分以上の照射による不活化も望ましい(下記の参考データ)。

【参考データ】

- ウシグソヒトヨタケの紫外線を用いた不活化
 - ①分裂子懸濁液を 10^5 cells/mL、胞子懸濁液を 10^4 cells/mL となるように調整した。
 - ②紫外線(TUV-15W:Philips 社)から 60 cm 程度の距離に、調整した懸濁液を静置

し 15 min または 30 min 間 UV 照射した。その後、PDA 寒天培地のプレートにそれぞれ 100 μ L ずつ塗布し、28°C で 1 日培養後のコロニー生育の有無を確認した。

滅菌時間 (min)	対照	15	30
コロニー生育の有無 分裂子 (10^5 cells/mL)	有り	有り	無し
コロニー生育の有無 胞子 (10^4 cells/mL)	有り	無し	無し

その他

(1) 保管

遺伝子組換えキノコ類に由来するグリセロールストック・流動パラフィン重層検体（用語説明を参照）などの保管に関しては、保管庫（ディープフリーザーなど）の外側に「遺伝子組換え生物等保管中」のラベルを貼ること

(2) 運搬

① 遺伝子組換えキノコ類の運搬を行う際には、遺伝子組換え体の情報提供書類を同封すること。

② 輸送中に破損しない構造の容器に入れて輸送する。輸送中の容器の破損を防ぐための措置をとり、組換え体の情報提供書類を同封すること。また破損した際の処理について、受取り機関の発見者への指示書を同封することが望ましい。

(例) 遺伝子組換えキノコ類を、培養したシャーレ、スラント培地等を密封し、さらにビニール袋で2重に密閉する。密閉した容器を発泡スチロール等に入れたのち、さらに段ボール箱等に入れることで、輸送中の破損による拡散を防ぐ。

③ 容器の外側の見えやすい位置に、取扱いに注意する旨を表示する。

(3) 実験終了後

実験終了後は、遺伝子組換え体を拡散しないよう注意しながら実験台、実験室の清掃を行う。拭き取り掃除は使い捨ての紙ワイパー・紙ウエスなどを使用し、滅菌後に廃棄することが望ましい。白衣やスリッパ等は、実験室内専用とし、室内で脱着することが望ましい。また、粘着マットの設置も有効である。

コラム

キノコの中には毒性を持つ、いわゆる毒キノコも多数存在し(食品安全委員会の HP 参照、https://www.fsc.go.jp/sonota/kinoko_tyudoku.html)、キノコを用いたダイオキシン等の難分解性毒物を含む土壌のバイオレメディエーションの実験系も存在する。これらの実験の

場合には、組換え体の拡散防止に加えて、毒物の管理や不活化が必要となるので、事前に確認することが望ましい。また、キノコの入手に関しては、植物防疫法の規制品目になっている場合があるので、必ず事前に確認し、該当する場合には植物防疫法及び関連法令を遵守すること(植物防疫所のHP参照、<http://www.pps.go.jp/eximlist/Pages/exp/condition.xhtml>)。

【用語説明】

- ・分裂子 (oidia)：担子菌類の菌糸が切断されてできる矩形の胞子。
- ・分生子 (conidia)：菌糸から無性的に分裂して生じ、脱落飛散する不動胞子。
- ・流動パラフィン重層法：菌糸を生育させた寒天培地に流動パラフィンという油性の液体を重層すると、培地の乾燥を防ぎ長期保存が可能である。

参考文献

Buller AHR. (1922) Researches on Fungi, vol. 2. Longmans, Green, and Co., London.
Rockett TR, Kramer CL. (1974) Periodicity and total spore production by lignicolous basidiomycetes. Mycologia, 66, 817-829