

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03845

研究課題名(和文) 純国産ゲノム編集技術を基軸とした薬用キノコ霊芝の機能性ビルドアップ研究

研究課題名(英文) The build-up study on the functionality of medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi* based on Japanese genomic editing technology

研究代表者

清水 邦義 (shimizu, kuniyoshi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：20346836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：霊芝には百数十種の霊芝トリテルペノイドが含まれると報告されているが、膨大な種類が含まれているがゆえに、個々の成分は必然的に微量である。そこでゲノム編集による霊芝トリテルペノイドの生産量向上に向けて、霊芝含有トリテルペノイドの網羅的な分析方法ならびに、LC-MS/MS (MRM:多重反応モニタリング)を用いた定量を試み、測定方法の確立に成功した。また、霊芝の生育ステージ毎に  $\beta$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定することで、生育ステージによって活性が変化し、さらに子実体が最大活性でないことを見出した。このことから、霊芝の機能性を考える際に、必ずしも成熟した子実体が必要ではないということが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により構築されたトリテルペノイドの分析条件は、これまでその含有量が微量で単離が難しかった霊芝トリテルペノイドの定量分析を可能にした。また、この分析方法は、霊芝の品質管理方法として利用可能であり、市場の霊芝の品質向上、および評価項目の明確化による霊芝の機能性成分を指標とした育種促進につながる。また、 $\beta$ -グルコシダーゼ阻害活性が菌糸体の状態でも成熟した子実体と同等であったことから、これまでのように長い時間をかけて子実体に成長させる必要がなく、成長途中で収穫することで、霊芝の機能性成分を効率的に獲得できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Reishi (*Ganoderma lingzhi*) is reported to contain hundreds of kinds of triterpenoids, but due to the enormous variety, each component is necessarily very limited amount. Therefore, in order to improve the production of *G. lingzhi* triterpenoids by genome editing, we attempted a comprehensive analysis method of triterpenoids derived from *G. lingzhi* and quantification using LC-MS/MS (MRM: multiple reaction monitoring). The *G. lingzhi* triterpenoids analytical method was successfully established. In addition, by measuring the  $\beta$ -glucosidase inhibitory activity at each growth stage of *G. lingzhi*, it was found that the activity changed depending on the growth stage and that the fruiting body was not maximally active. This suggests that mature fruiting bodies are not always necessary when considering the functionality of *G. lingzhi*.

研究分野：木材化学

キーワード：霊芝 キノコ メタボロミクス 分析 トリテルペノイド 成長段階 機能性食品 生薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

霊芝（レイシ、*Ganoderma lingzhi*）は、サルノコシカケ科に属するキノコである。霊芝は、百種以上もの特徴的なトリテルペノイドが単離されており、本トリテルペノイド群には霊芝の持つ多機能性（抗ガン、抗炎症、抗前立腺肥大、抗骨粗鬆症）への関与が示唆されている。また、霊芝には百数十種の霊芝トリテルペノイドが含まれると報告されているが、膨大な種類が含まれているがゆえに、個々の成分は、必然的に、相対的に微量である。したがって、それら個々の霊芝トリテルペノイドについては単離が難しく、そのために、機能性の研究が困難であり、その機能性を現在も十分に研究・活用できていない。

申請代表者である清水はこれまでに霊芝の機能性に関する論文を40報以上報告し、主要な霊芝トリテルペノイド Ganoderic acid DM の抗ガン活性に関わる標的タンパク質の同定に成功した。霊芝からの霊芝トリテルペノイドの単離、機能性の確認、および標的タンパク質の同定に至るまでのノウハウを確立している。一方、近年、従来の技術よりも遙かに効率的かつ選択的に、遺伝子特異的な破壊や、レポーター遺伝子のノックインを行う新しい遺伝子改変技術「ゲノム編集 (Genome Editing)」が開発された。そこで、申請者らは霊芝のゲノム編集による霊芝トリテルペノイドの生産量向上および特定成分の作り分けを試みることで、これまで未利用・未研究であった微量な霊芝トリテルペノイドの単離を容易にし、新たな機能性の探索・検討とともに、その知見に基づいた超高機能化霊芝の創出が可能になると考えた。さらに、そのために重要となってくる霊芝の数百種類とも報告されているトリテルペノイド類の網羅的分析方法の確立を基盤として、研究を展開した。

## 2. 研究の目的

霊芝（レイシ）は産業上最も重要な薬用キノコの一つである。その機能性は多岐に渡る。霊芝の多様な機能性を支える有効成分として、霊芝に含まれるラノスタン骨格を有するトリテルペノイドがある。将来的には、純国産ゲノム編集技術の PPR モチーフを用いたゲノム編集により霊芝トリテルペノイドの生産能を強化することで産業薬用キノコ霊芝の潜在能力を引き出し、機能性ビルドアップを目指す。そのための基盤技術として、霊芝に含まれるラノスタン骨格を有するトリテルペノイド類の網羅的分析方法を確立する。

本研究では、ゲノム編集菌株の霊芝トリテルペノイド高生産株を評価するために LC-MS/MS による網羅的霊芝トリテルペノイド分析条件を確立し、機能性を評価した。

産業用林産物である霊芝の付加価値向上は中山間地の新産業構築にも繋がり産業上のブレイクスルーも期待できる。また、霊芝での成功例を構築できれば、霊芝のみならず他の産業用キノコへの付加価値の付与に、本技術・アプローチを普遍的に活用することも可能であり、学術的のみならず、キノコ産業への貢献・インパクトが与えられると考えた。

## 3. 研究の方法

### ① プロトプラストの作出

霊芝ゲノム編集に向けて、まず形質転換効率の良いプロトプラストの作出を目指した。子実体の霊芝より菌糸を採取し、菌糸体からプロトプラストを作成した。さらに、作出したプロトプラストをセルソーターにより分画し、大きいサイズのプロトプラストをゲノム編集の実験に用いることとした。

### ② トリテルペノイド生産能強化霊芝評価系の構築

霊芝由来トリテルペノイド分析条件の確立のため、まず、標準品を用いた定量方法を確立し

た。霊芝に含有されるトリテルペノイドは、ジクロロメタンにより容易に抽出した。得られたジクロロメタン抽出物を調製し、各種クロマトグラフィーを活用して、迅速かつ大量に、ganoderic acid A, B, C, C2, D, DM, E, F, G, H, I, J, K, L等の50化合物以上の単離を行った。

### ③LC-MS/MSによるトリテルペノイド定量方法の確立

生育ステージ毎の18種類のトリテルペノイド類を、LC-MS/MS(MRM:多重反応モニタリング)を用い定量した。質量分析に基づく生育段階における*G. lingzhi*のノンターゲットメタボロミクス分析の方法を検討した。検出された42のピークのうち、26のピークを同定した。そのうち9のピークは標準品より同定し、17のピークは本研究により得られたマススペクトルの開裂と既報の結果から化学構造を推定した。各ピークのピーク面積を比較し、半定量が可能な分析方法を確立した。

### ④霊芝の機能性評価

霊芝の各成長ステージにおける、 $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害活性について評価した。

### ⑤ゲノム編集に向けたターゲット遺伝子の検討

北米産の霊芝の遺伝情報を元に、トリテルペノイドの合成に関わる遺伝子の探索を行った。

## 4. 研究成果

霊芝のプロトプラスト作出を行ってきたがその作出効率も低く、また、作出したプロトプラストを用いて形質転換を行っても、その形質転換効率も低かった。そこで、プロトプラストの性状が形質転換効率に関係している事が示唆されたため、セルソーターを用いてプロトプラストをサイズによって分画することに成功した。

一方、霊芝トリテルペノイドの網羅的解析方法については、質量分析に基づく生育段階(図1)における*G. lingzhi*のノンターゲットメタボロミクス分析の方法を検討した。検

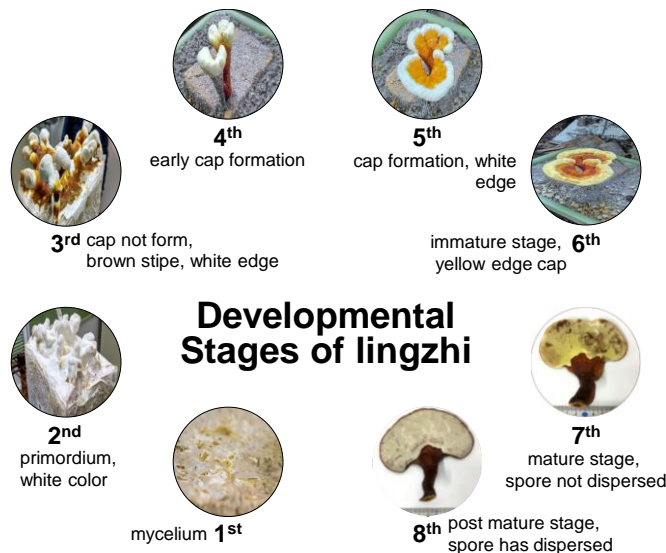


図1 霊芝の各種成長段階

出された42のピークのうち、9のピークは標準品より同定し、17のピークは本研究により得られたマススペクトルの開裂と既報の結果から化学構造を推定することができた。さらに各ピークのピーク面積を比較することで、半定量が可能な分析方法を確立することに成功している。

確立した、霊芝 (*Ganoderma lingzhi*) に含まれるトリテルペノイドの網羅的な分析方法を用いて、*G. lingzhi*の生育段階を菌糸体から子実体の最終段階ま

で8ステージに分けて、各生育ステージにおける42種の代謝産物(25のトリテルペノイ

ド、16の未知物質を含む)の分析をLC/IT-TOF-MSを用いて行った。その結果、生育ステージによって代謝産物の含有量と、含有されている物質が大きく異なることが確認できた。また、網羅的なメタボロミクス解析により、成長段階毎の特徴を明確に分離することに成功した(図2)

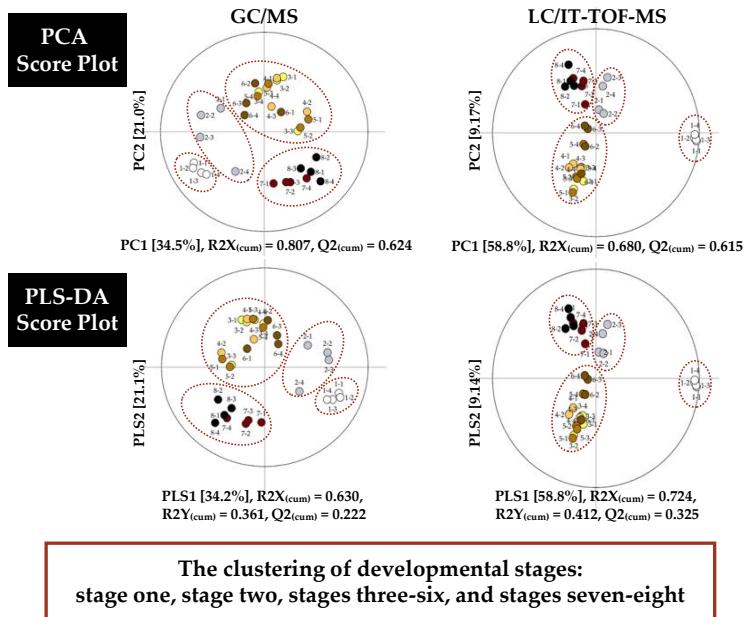


図2 各成長段階の代謝物の網羅的解析データを用いたクラスタリング

霊芝に含まれる薬効成分としてはトリテ

ルペノイドおよび多糖が、その主要な生理活性成分であることが知られている。本研究では、霊芝トリテルペノイド高生産株を作出した際の、機能性評価方法の確立に向けて、各ステージにおける *G. lingzhi* の機能性の変化を評価するため、 $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害活性評価を行った。その結果、菌糸体から成熟子実体になる途中(31-34週目)の状態がもっとも高い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示した(図3)。このことから、霊芝の機能性を考える際に、必ずしも成熟した子実体が必要ではないということが分かった。また、菌糸体の状態でも成熟した子実体と同等の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が確認できたことから、菌糸体の状態でトリテルペノイド等の機能性成分の産生量を増加させることができれば、長い時間をかけて子実体に成長させる必要がなく、効率的に霊芝の有効成分を獲得できることが示唆された。

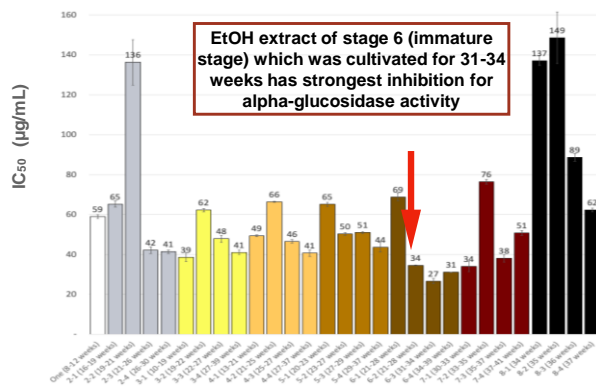


図3 各成長段階の代謝物の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の比較

さらに、トリテルペノイドを多量に発現する霊芝のゲノム編集に向けて、ターゲットとなりうるトリテルペノイドの生産に重要であると思われる遺伝子の検索を行った。日本や中国などの東南アジア産の霊芝の遺伝情報は、現在公開されていない。そこで、今回は北米産の霊芝の遺伝情報を元に、トリテルペノイドの合成に関わる遺伝子の探索を行ったところ、Cytochrome P450 monooxygenaseがトリテルペンの一種であるガノデリン酸の最終段階に関わっていることが分かった。また、この酵素をノックアウトすることで、ガノデリン酸の含有量が劇的に減少しているという報告がなされており(Wangら2019)、Cytochrome P450 monooxygenaseの発現量を増幅させることで、霊芝におけるガノデリン酸の含有量が増加することが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakagawa Toshinori, Zhu Qinchang, Tamrakar Sonam, Amen Yhiya, Mori Yasuhiro, Suhara Hiroto, Kaneko Shuhei, Kawashima Hiroko, Okuzono Kotaro, Inoue Yoshiyuki, Ohnuki Koichiro, Shimizu Kuniyoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Changes in content of triterpenoids and polysaccharides in Ganoderma lingzhi at different growth stages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 734 ~ 744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1213-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Amen Yhiya, Zhu Qinchang, Tran Hai-Bang, Afifi Mohamed S., Halim Ahmed F., Ashour Ahmed, Shimizu Kuniyoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Partial contribution of Rho-kinase inhibition to the bioactivity of Ganoderma lingzhi and its isolated compounds: insights on discovery of natural Rho-kinase inhibitors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 380 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-016-1069-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu Qinchang, Amen Yhiya M., Ohnuki Koichiro, Shimizu Kuniyoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Anti-influenza effects of Ganoderma lingzhi : An animal study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 224 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2017.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Satria Dedi, Amen Yhiya, Niwa Yasuharu, Ashour Ahmed, Allam Ahmed E., Shimizu Kuniyoshi	4. 巻 Feb 19
2. 論文標題 Lucidumol D, a new lanostane-type triterpene from fruiting bodies of Reishi (Ganoderma lingzhi)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2018.1440229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Satria, D., Tamrakar, S., Suhara, H., Kaneko, S., Shimizu, K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Mass spectrometry-based untargeted metabolomics and $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of lingzhi ( <i>ganoderma lingzhi</i> ) during the developmental stages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24112044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohno, T., Hai-Bang, T., Zhu, Q., Amen, Y., Sakamoto, S., Tanaka, H., Morimoto, S., Shimizu, K.	4. 巻 71
2. 論文標題 Tubulin polymerization-stimulating activity of Ganoderma triterpenoids	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 457-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1072-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yusakul, G., Nuntawong, P., Sakamoto, S., Bhuket, P.R.N., Kohno, T., Kikkawa, N., Rojsitthisak, P., Shimizu, K., Tanaka, H., Morimoto, S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Bacterial expression of a single-chain variable fragment (scFv) antibody against ganoderic acid a: A cost-effective approach for quantitative analysis using the scfv-based enzyme-linked immunosorbent assay	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1767-1774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamrakar, S., Nishida, M., Amen, Y., Tran, H.B., Suhara, H., Fukami, K., Parajuli, G.P., Shimizu, K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Antibacterial activity of Nepalese wild mushrooms against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Propionibacterium acnes</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 379-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10086-017-1636-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kuniyoshi Shimizu
2. 発表標題 Lifestyles of Health and Sustainability (LOHAS) for the better future- Multifunctional activity of Ganoderma mushroom
3. 学会等名 INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC SCIENCES AND ITS APPLICATIONS 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 (九州大学, Muh. University of Sumatera Barat) Dedi Satria, (九州大学) Kuniyoshi Shimizu
2. 発表標題 HPLC-Based Metabolomics for Identification of Inhibitory Compound on Alpha-glucosidase: A Study Case on Growth Stages of Ganoderma lingzhi Fruiting Bodies
3. 学会等名 INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC SCIENCES AND ITS APPLICATIONS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniyoshi SHIMIZU
2. 発表標題 Ganoderma mushroom-Source of a variety of triterpenoids with medicinal effects-
3. 学会等名 International Conference on Biodiversity, in Berau, Indonesia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuniyoshi SHIMIZU
2. 発表標題 Multi-utilization of Ganoderma -Medicine, Functional Food-
3. 学会等名 ITS (Institut Teknologi), Surabaya, Indonesia (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 (九州大学, Muh. University of Sumatera Barat) サトリヤデディ, (九州大学, Mansoura University) Yhiya Amen, Ahmed Ashour, (九州大学) 中川敏法, 清水邦義
2. 発表標題 Analysis of Ganoderma lingzhi (Reishi) metabolite during growth stages: a metabolomics approach
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japan Wood Research Society in Kyoto, March 14-16, 2018, Kyoto Prefectural University (Oral)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>森林圏環境資源科学研究室ホームページ  <a href="http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/sffps/results.html">http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/sffps/results.html</a>  <a href="https://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/shinrinken/index.html">https://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/shinrinken/index.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 崇裕 (Nakamura Takahiro) (10464398)	九州大学・農学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	大貫 宏一郎 (Ohnuki Koichiro) (50378668)	近畿大学・産業理工学部・准教授  (34419)	
研究分担者	松本 雅記 (Matsumoto Masaki) (60380531)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授  (17102)	