

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12888

研究課題名(和文) マンネンタケ由来のプロテアーゼおよびグルカナーゼの分子生物学的手法を用いた解析

研究課題名(英文) Analysis of protease and glucanase of Ganoderma lucidum using molecular biological techniques

研究代表者

熊倉 慧 (Kumakura, Kei)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：80516930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マンネンタケ(*Ganoderma lucidum*)子実体に含まれるプロテアーゼ及びグルカナーゼに着目し、これら酵素遺伝子を複数菌株間で比較解析した。その結果、これらの酵素遺伝子配列は菌株間で高く保存されていた。次いで複数の菌株を用いて、菌糸体から収穫後1週間目までの子実体を生育ステージ別にサンプリングし、発現解析を行った。その結果、グルタミン酸プロテアーゼでは、全ての菌株で培養菌糸体と子実体原基において発現量は多く、一方、 α -1,3-グルカナーゼでは、複数の菌株で、菌糸体や子実体原基での発現量は少なく、収穫後の子実体において発現量は多くなることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、グルタミン酸プロテアーゼにおいて、学術的意義としては、子実体形成メカニズムの解明の一助、社会的意義としては、子実体形成が安定した菌株の選抜や栽培が困難なきのこの栽培への手がかりになると考えられる。 α -1,3-グルカナーゼにおいて、学術的意義としては、きのこ共通の自己消化メカニズムの解明への手がかりとなると考えられ、社会的意義としては、食素材としての収穫適期や保存方法、機能性成分の維持やより品質の安定した菌株の選抜につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on protease and glucanase of *Ganoderma lucidum*. These enzyme genes were compared and analyzed among multiple strains. As a result of comparing the cDNA sequences obtained from mRNA, glutamate protease and α -1,3-glucanase were highly conserved among the strains. Gene expressions of these enzymes were analyzed during growth stages and the harvest storage period on the multiple strains. It was revealed that gene expression of glutamate protease increased in mycelium and primordium of fruiting body stage of all tested strain. On the other hand, gene expression of α -1,3-glucanase was decreased in mycelium and primordium of fruiting body stage and increased in post-harvest fruit body stage in multiple strains.

研究分野：複合領域

キーワード：マンネンタケ プロテアーゼ グルカナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の健康志向に伴い、きのこにおいても食品の三次機能(生体調節機能)が着目されている。中でもマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) は「霊芝」と呼ばれ、和漢薬、民間薬、食品として広く知られており、長い食経験のあるきのこである。また、近年では生化学的、薬理学的研究により、抗腫瘍作用や高血圧抑制作用、抗炎症作用など様々な機能が報告されている。研究代表者は、そのマンネンタケの機能性に関与すると考えられるプロテアーゼ及びグルカナーゼに着目し、遺伝子のクローニングや生育ステージおよび収穫後の保存期間における遺伝子発現解析を行ってきた。しかしながら、これまでの研究で用いた菌株は1種類であったため、同種であっても、菌株間におけるこれら酵素の遺伝子多型や発現は不明である。また、これら酵素がマンネンタケの機能性に関与していることが考えられるため、酵素化学的解析が必要であると考えた。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、大きく2つの研究目的を設置した。

- (1) 異種発現系を用いて、プロテアーゼ及びグルカナーゼの組換え酵素タンパク質の生成を試み、酵素化学的解析を行う。
- (2) 他の菌株における酵素遺伝子のクローニングを試み、菌株間における酵素遺伝子配列の比較及び発現挙動を明らかにする。これらを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) pCold ベクターを用いた大腸菌でのタンパク質発現

グルタミン酸プロテアーゼ (*G/GPA*) および α -1,3-グルカナーゼ (*G/GH128A*) 遺伝子を PCR 法により増幅をし、制限酵素処理した後、pCold ベクターにライゲーションし、コンストラクトを作成した。これらコンストラクトを大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションし、大腸菌内で増幅させ後、精製、シークエンシングにより配列を確認した。配列確認を行ったコンストラクトを発現ベクターとして、タンパク質発現用宿主である大腸菌 BL21 にトランスフォーメーションし、タンパク質発現を試みた。培養後、BL21 からタンパク質を抽出、精製し、SDS-PAGE により目的のタンパク質の発現を確認した。

(2) 菌株間における遺伝子配列解析

高崎健康福祉大学保存菌株および市販菌株を供試菌株とした木粉培地で培養した菌糸体から Total RNA は抽出し、cDNA を合成した。PCR 法によりグルタミン酸プロテアーゼ (*G/GPA*) および α -1,3-グルカナーゼ (*G/GH128A*) の酵素遺伝子を増幅し、ダイレクトシークエンシング法により mRNA の塩基配列情報を得た。得られた塩基配列をもとにアミノ酸配列を予想し、菌株間での比較を行なった。配列情報の比較解析には、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ClustalW version 2.1 を利用した。

(3) マンネンタケ人工栽培とサンプリング

人工栽培には、高崎健康福祉大学保存菌株2菌株および市販菌株3菌株を用いた。オガ粉培地において培養し、サンプリングは以下の5ステージで行った。菌糸体、子実体原基、収穫直後の子実体、収穫後1週間室温保存した子実体、そして、収穫後1週間冷蔵保存した子実体とした。子実体は傘と柄がつながった部分周辺をサンプリングし、 -80°C で保存した。

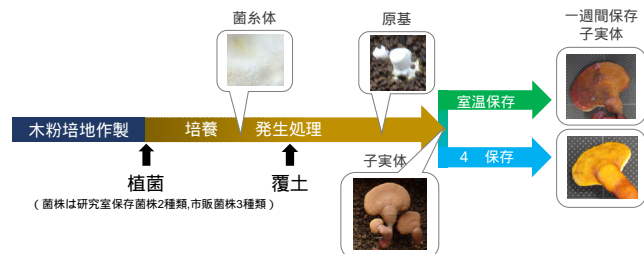


図1. 人工栽培とサンプリング

(4) 菌株間における遺伝子発現解析

凍結したサンプルを、マルチビーズショッカーを用いて粉碎し、total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それらをテンプレートとしてそれぞれの遺伝子発現量を測定した。リアルタイム PCR によりインターカレーター法を用いて、菌株間における発現量の差異を複数の菌株を用いて検討した。RNA 量の補正には、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) 遺伝子を使用した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌によるタンパク質異種発現

本研究では初めに、グルタミン酸プロテアーゼおよび α -1,3-グルカナーゼの大腸菌による異種発現を試みた。その結果、pCold を用いた発現ベクターの構築に成功した。しかしながら両酵素とも明確なタンパク質発現は確認できなかった。今後は発現条件を検討するとともに、無細胞発現系や酵母、麹菌などを用いた異種発現の試みが必要と考えられる。

(2) 菌株間における酵素遺伝子配列の比較

複数菌株間の cDNA および予想アミノ酸配列を比較解析した。グルタミン酸プロテアーゼ遺伝子に着目すると、cDNA の核酸配列は全ての組み合わせにおいて、アライメントスコアが 99.3 以上であった。予想アミノ酸配列は、シグナルペプチドを含む 268 アミノ酸であった。また、全ての供試菌株において活性中心と考えられるグルタミンおよびグルタミン酸が確認された。本研究室保存菌株と比較して、アミノ酸のアライメントスコアは 99.3~99.6 であり、高い相同性が確認された。

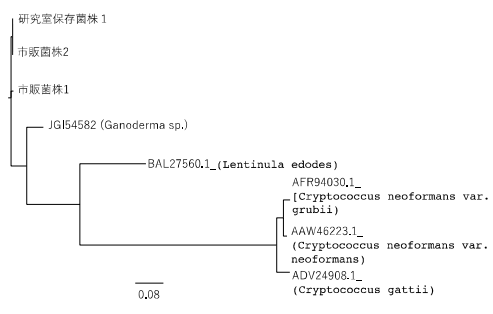


図2. β -1,3-グルカナーゼ遺伝子から予想したアミノ酸配列により作成された系統樹

β -1,3-グルカナーゼに着目すると、cDNA の核酸配列は全ての組み合わせにおいて、アライメントスコアが 98.8 以上であった。予想アミノ酸配列はシグナルペプチドを含む 271 アミノ酸であった。また、活性残基と考えられる 2 つのグルタミン酸残基が保存されており、2 箇所にもジスルフィド結合が予測された。同じ酵素群(糖質加水分解酵素ファミリー128(GH128))であるシイタケの LeGLU1 に見られるジスルフィド結合は 1 箇所であるが、本酵素には 2 箇所予想された。図 2 は、本研究で得られた β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の予想アミノ酸配列を用いた系統樹解析の結果を示す。

(3) 菌株間におけるグルタミン酸遺伝子の発現解析

複数の菌株を用いてグルタミン酸プロテアーゼ(G/GPA)遺伝子の各ステージにおける遺伝子発現量の測定を行なった。その結果、複数の菌株において子実体原基で発現量の増加を示した。図 3 には研究室保存菌株と市販菌株の比較を示す。これまでの研究で、プロテアーゼは菌糸体形成に密接に関わっており、形態形成に重要であることが報告されている。菌糸体において遺伝子発現量の増加が見られたことから、グルタミン酸プロテアーゼが菌糸体形成に深く関わっていると考えられる。また、子実体原基で発現量が大きく増加したことから、子実体発生に本プロテアーゼが関与していることが示唆された。以上のことから、マシタケにおける本グルタミン酸プロテアーゼは、菌糸体形成時から子実体発生に最も関与していることが示唆された。

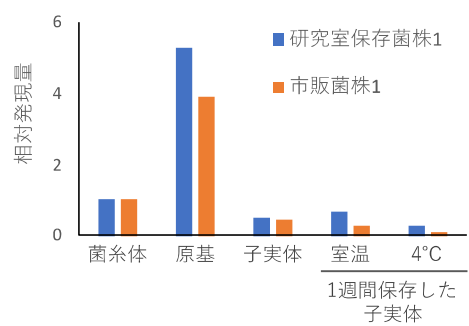


図3. グルタミン酸プロテアーゼの遺伝子発現比較

(4) 菌株間における β -1,3-グルカナーゼ遺伝子の発現解析

次いで β -1,3-グルカナーゼ(G/GH128A)遺伝子の菌株間における発現量の差異を複数の菌株を用いて測定した。その結果、収穫後室温保存した子実体で発現量が増加した。図 4 には研究室保存菌株と市販菌株の比較を示す。4 週間保存した子実体での発現量は少なかったことから、低温で保存することでその発現が抑えられることが明らかとなった。 β -1,3-グルカナーゼは、きのこの自己消化、機能性成分の分解や生成に関与すると考えられる¹⁾。また、本酵素が属する GH128 の酵素は、きのこではシイタケで唯一、機能解析が行われており、収穫後の老化に伴い発現が上昇している²⁾。このことから、GH128 に属する β -1,3-グルカナーゼはきのこの老化、収穫後の貯蔵における鮮度低下に関与していることが考えられ、本酵素の発現の強弱は、きのこの貯蔵期間や鮮度の安定のための指標になることが考えられた。本研究の結果から、本酵素はシイタケのみならず、きのこにおける成熟や老化に深く関与していることが示唆され、本酵素の働きを明らかにすることは、きのこにおける鮮度の保持に大きく貢献するものと考えられる。

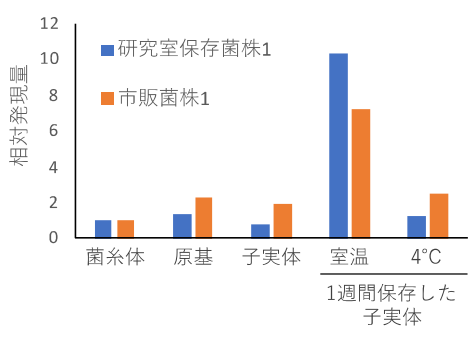


図4. β -1,3-グルカナーゼの遺伝子発現比較

本研究の結果、2 つの目的のうち、1 つについては達成された。しかしながら、異種発現によるタンパク質生成には課題があり、目的を達成するには至らなかった。今後、条件検討等を行い、タンパク質を生成し、酵素科学的研究による本酵素のキャラクタライズが期待される。

< 引用文献 >

- 1) 坂本裕一 日本きのこ学会誌 19 73-38 (2011)
- 2) Yuichi Sakamoto, Keiko Nakade, Naotake Konno APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 77 8350-8354 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊倉慧, 横田優大, 江原百香, 石田勇輝, 永井俊匡, 松岡寛樹
2. 発表標題 マンネンタケにおけるグルタミン酸プロテアーゼ遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本きのこ学会第21回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊倉 慧, 岡本健吾, 松岡寛樹
2. 発表標題 マンネンタケ菌株間における -1,3-グルカナーゼ遺伝子の解析
3. 学会等名 日本きのこ学会第23回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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