

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658104

研究課題名（和文） 新規に発見したキノコ類炭酸同化の分子機能解析

研究課題名（英文） Novel molecular function of mushroom in carbon dioxide assimilation

研究代表者

水野 雅史 (MASASHI MIZUNO)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00212233

研究成果の概要（和文）：大気と陸上の生物圏との間での炭素交換は地球温暖化問題を考える上でのキーポイントである。この中で、陸上生態系への炭酸ガス取り込みは光合成によるものとして炭素バランスが考えられてきた。しかし我々は、光合成能力を持たないある担子菌の子実体が炭酸ガスを選択的に吸収する現象を発見した。本研究においてシイタケが炭酸ガス取り込み能力を持つことを示した。今回の発見は炭素循環におけるバランス関係を見直す必要を迫るばかりでなく、光合成以外の生物による炭酸ガス同化システムが存在する可能性も示しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Carbon exchange between the atmosphere and the terrestrial biosphere is a key consideration in assessing the issue of global warming. Photosynthesis has come to be considered as the only process in CO₂ gas uptake to the terrestrial ecosystem. Here we have, however, discovered that Basidiomycetes (mushroom) fruiting bodies, which have no photosynthetic capabilities, selectively absorb CO₂ gas. We demonstrated that the CO₂ gas uptook abilities of *L. edodes*. This discovery not only compels us to re-examine the carbon balance, but also may indicate the possible existence of CO₂ fixation systems other than those involving photosynthetic organisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・境界農学

キーワード：環境修復

1. 研究開始当初の背景

シイタケに含まれる抗腫瘍性多糖として同定されたレンチナンが、貯蔵条件によっていかなる影響を受けるかについてはほとん

ど研究がなされていなかったため、我々は、貯蔵条件とレンチナン含量の変動について研究を行ってきた。その研究の一環として、CA貯蔵によるレンチナン含量の抑制が可能

かを検討していたところ、窒素ガスでは起こらないが、CO₂で大気を置換した区だけ著しく体積が減少することを見いだした。しかしながら、キノコによるCO₂の特異的吸収については、国内外において全く報告が無く、まだその分子機構については、報告されていない。しかもCO₂を特異的に吸収するという現象は、腐植連鎖系の炭素収支解析の一モデルとして利用出来る可能性を包含している。

2. 研究の目的

CO₂の削減目標値が問われる昨今、その基盤となるべき地球上の物質循環そのものが未解明である事実が浮き彫りにされている。例えば、1980-89年の陸上植生が550ギガトンの炭素プールであったのに対して、土壌が1500ギガトンと3倍近くにも達すると16年前に報告されているが、この腐植連鎖系の分子機構は殆ど未解明なままである。地球上の7割を占める海洋表層(1020ギガトン)を超えていること等、腐植連鎖系の研究が脚光を浴びる時代到来を見据え、我々はキノコ(担子菌)を対象とした研究を10年来展開してきた。その過程で、光合成能力を持たないキノコ実体がCO₂を選択的に吸収する現象を発見した。このことは、光合成以外の生物によるCO₂同化システムが存在する可能性も示しているのみならず、物質循環における炭素収支を見直す契機にまでなり得る。そこで本研究では、キノコによるCO₂吸収の機構解明とその代謝経路同定により、本来なされる植物バイオマス異化とCO₂同化の炭素収支解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) シイタケによるCO₂吸収機構の解明

CO₂同化機構を解明するため、安定同位体でラベルされた¹³C₂O₂をシイタケに吸収させ、生体内のどの成分にラベルした¹³Cが取り込まれたか確認する。具体的には、研究分担者である菊地が開発してきた密閉チャンパー中での¹³C₂O₂を用いた安定同位体標識系をシイタケへと適用させる。また、別の実験としてシイタケに液体培地から¹³C-glucoseを吸収させる。後者は腐植連鎖系として、木質バイオマス分解後の有機物異化に関する炭素収支解析を保持するデータと考える。これら2種の異なる安定同位体標識キノコに対して、時系列でサンプリングした後、0.1M-KPi溶液で抽出した代謝混合物に対して多次元NMRメタボノミクス計測を行う。これらの化合物同定には均一標識化の利点を活かし、2D-¹³C-HSQC、3D-HCCH-COSY/TOCSY等の多次元NMR計測法を駆使した代謝中間産物の解析を行う[7]。なお、化合物同定をより正確に行うために必要な主要代謝産物の標準化学シフトデータベースを整備しており、Java言語で開発した専

用解析ソフトウェアも有している。さらに、不溶性物質の解析が可能なシステムとして構築してきたMAS(マジック核回転)装置を用いて不溶性多糖類への¹³C標識化代謝機構を明らかにする。この計測法の場合、抽出後の不溶物も高分解能スペクトルが得られる事や、細胞壁成分等の高分子物質でも相間シグナルが得られる事が大きな特徴である。

一方、混合物のまま解析できない複雑な多糖類や脂質が存在していた場合には、¹³C標識化シイタケを凍結乾燥し、極性の異なった溶媒を用いて凍結乾燥物を逐次抽出により各画分に調製する。次に、該当する画分をHPLCによってさらに分画し、NMRやGC-MSにより構造決定を試みる。特に我々が見出ししてきた分岐鎖構造やβ構造を有する多糖類については、生産に関わる経時的变化を検討し、CO₂同化かバイオマス異化かの代謝経路を解明する。

(2) 各種キノコによるCO₂吸収の特異性

CO₂吸収作用がシイタケ独特のものかを、食用キノコ及び我々の研究室で保有している薬用キノコについて検討する。供試用キノコをポリエチレン袋に入れ、CO₂および窒素ガスで完全に置換した後、定温室で所定日数放置し、その間のポリエチレン袋中のCO₂濃度を測定する。対照区としては、同様の条件で大気を充填したものをを用いる。その結果、シイタケと同様の作用が見られたキノコについては、実験項目1と同様に¹³C₂O₂を用いて、¹³Cが取り込まれている物質を同定し、シイタケと比較する。さらに、吸収速度の速いキノコはどれかを判断するために、キノコをデシケータに入れ、CO₂と窒素ガスをそれぞれ封入したデシケータ中における吸引圧力の変化を経時的に調べる。方法としては、300 mL容真空デシケータとU字型開放マンメータを連結したものを使用し、CO₂あるいは窒素ガスで置換後、マンメータの観測による経時的な圧力変化を測定する。これらの結果により、最もCO₂吸収能力が高いキノコを選定する。

(3) 高効率なキノコCO₂同化機能利用のための基盤整備

実験(2)で選抜した高効率CO₂同化機能を有するキノコのオミクス解析を萌芽させるために、2年目にはその予備的検討を行う。まずはゲノムDNAを抽出して、パルスフィールド電気泳動によりゲノムサイズの計測を行う。仮に数MB程度と小さければ、1GB/run以上の解読数をもつSOLEXAギガシーケンサーの断片情報からアセンブリー*de novo*ゲノム解析に踏み込めるかもしれないが、他のキノコ類が30-65MB程度と報告されていることから推察するに、総RNAからの比較トランスクリプトーム解析を選択することが無難と思われる。高効率CO₂同化キノコ10種を選抜し、それらの脱rRNA処理を済ませた総RNA

を cDNA ライブラリーへと逆転写して、Multiplexing 法により 5 種ずつを SOLEXA 2 run 計測する。全ゲノム配列が決定されているウシグソヒトヨタケとオオキツネタケの配列情報を利用し、BLAST 検索により遺伝子アノテーションを行う。この程度の計測では主に発現している数 10 種類の遺伝子しか解析できないと予想されるが、NMR から得られる同サンプルの代謝表現型との相関解析を行うことで、高効率なキノコ CO₂ 同化機能に関わる遺伝子の絞り込みを行う。その手法としては世界のイネ遺伝資源・コアコレクションで有効性を示してきた遺伝的多型と代謝表現型の相関解析手法を援用し、特に前年度に特定した機能性多糖類とその代謝に至る中間体への物質生産との関連を調べる。

4. 研究成果

無機炭酸ガス取り込み（海洋水への溶解等）を除けば、陸上生態系への炭酸ガス取り込みは光合成だけが考慮されてきた。しかしながら、陸上生態系における分解者としてもっぱら評価されてきたキノコに炭酸ガス吸収能力が認められたなら、我々の炭素循環機構に対する考えは再考する必要があるといえる。最初はポリエチレン製のバッグにキノコ (*L. edodes*, 約 100 g) を入れ、約 4 L の炭酸ガス (99% 以上)、窒素ガス (99% 以上) および空気中で room をそれぞれ置換後ラバーバンドで厳封し、暗所室温下で放置・観察した。図 1 はその直後と 20 時間経過後の様子を示したものである。炭酸ガス封入の袋

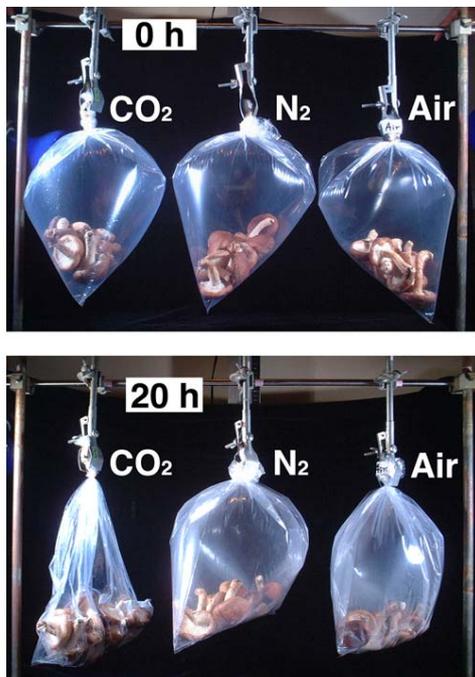


図1. シイタケ子実体によるガス取り込みの差異

は激烈に収縮した一方で、窒素ガスの袋では目視できるような変化は見られず、空気の袋ではわずかな収縮が確認された。なお、20 時間後の袋の内部にはいずれの袋でも *L. edodes* の呼吸にともなう水蒸気による曇りが認められたが、程度に差は認められなかった。同実験は予備試験も含めて 4 回繰り返され、再現性が確認された。この結果は *L. edodes* が窒素ガスは吸収しないが少なくとも炭酸ガスを吸収することを示した。

次いで *L. edodes* による炭酸ガス吸収の現象を数値化するために、炭酸ガスと窒素ガスをそれぞれ封入した *L. edodes* 入りデシケータにおける吸引圧力の変化を経時的に調べた。装置には 300 mL 容真空デシケータと U 字型開放マンメータを連結したものを使用し、*L. edodes* 約 100 g を入れて room を炭酸ガスあるいは窒素ガスで置換後、マンメータの観測による経時的な圧力変化を記録した。試験は 20°C の恒温暗室でおこない、キノコは *L. edodes* kinko-702 の栽培したものを紙袋に収穫後 20°C で 24 時間保存したものをを用いた。結果として図 2 に示したように窒素ガスでは 60 分後まで値が徐々に上昇し（最大値、0.3 kPa）、その後 120 分で半分の値（0.15 kPa）まで減少した。ところが、炭酸ガスでは 90 分まで急激な吸引圧の上昇が見られ、120 分後には窒素ガスの最大値の 4 倍である 1.2 kPa に達した。圧力差から縮小した (*L. edodes* が吸引した) ガス体積を換算するには、より厳密な圧力測定可能な装置と相応の制御された環境とが必要であるが、前項の結果と併せて、*L. edodes* が炭酸ガス取り込み能力を持つことは明らかである。

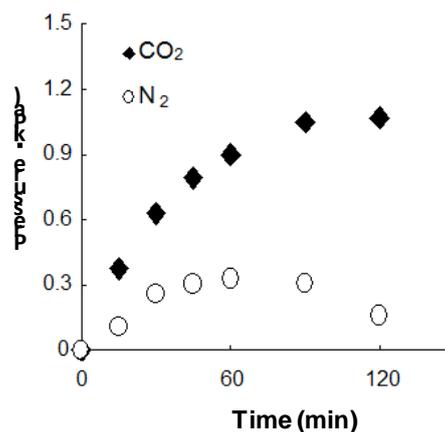


図2. シイタケ子実体によるガスの吸収

L. edodes の炭酸ガス取り込み能力に如何なる選択性があるのか、また、どのような機構でそれがおこなわれているのかについては不明である。他のキノコにも共通した能力があるのか、子実体でなく菌糸体にもその

能力があるのかも不明である。しかし今回の発見はキノコの生息する環境下における炭素バランスを見直す必要を迫るのかもしれない。*L. edodes* は食用種であるため栽培は容易であり、炭酸ガス固定への応用への道が開かれれば、容易な栽培と食用としての付加価値はおおいに利点となる。さらに重要なポイントとして、我々の知らない光合成以外の生物による炭酸ガス同化システムが存在する可能性を提示しているのかもしれない。

一方、分子生物学的研究においては、高効率CO₂同化機能を有するキノコのオミクス解析を萌芽させるために、本課題ではその予備的検討を行った。これまでにゲノムサイズが報告されたキノコ類が30-65MB程度であるため、数GB/run以上の解読速度を有するGA-IIxギガシーケンサーであれば、100bp*2の断片情報でもアセンブリー後のde novoゲノム解析に踏み込めるかもしれないと考えた。しかしキノコ類のゲノム解析競争は熾烈であり、他の研究Grと重ならず実用化に近い対象として、フクロタケに着目した。破碎済みのフクロタケ粉末1, 3, 5, 10mgを用意して、200・Lの10%-SDS/TEで混合・遠心分離した後、上精を回収してEtOH/CHCl₃沈殿法によりゲノムDNAを抽出した。ナノドロップ分光計により、OD₂₆₀/280比ならびに260/230比により高純度であることを確認し、各試料のDNAs量を定量したところ、29.3, 64.5, 76.0, 224・gを得た。これらの試料を理研ジェネシス社のシーケンスサービスに外注し、総計2GBの断片シーケンスを得るところまでは進めることが出来た。しかしながら、アセンブリング、BLASTアノテーションといったゲノム機能・構造解析を進めるには萌芽研究の期間では充足できず、現時点ではデータマイニングの段階にまで至っていないのが現状である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 雅史 (MIZUNO MASASHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00212233

(2) 研究分担者

藤嶽 暢英 (FUJITAKE NOBUHIDE)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50243332

(3) 連携研究者

菊池 純 (KIKUCHI JYUN)
独立行政法人理化学研究所・先端NMRメタボミクスチーム・チームリーダー
研究者番号：00321753