

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870730

研究課題名(和文) シイタケとブナシメジ由来プロテアーゼの遺伝子解析

研究課題名(英文) Gene analysis of proteases from *Lentinula edodes* and *Hypsizygus marmoreus*

研究代表者

福田 泰久 (FUKUTA, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：80609602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：きのこの子実体形成には、各種プロテアーゼ群の活性化と不活化が深くかわり、形態変化の制御因子として働いていることを報告してきた。シイタケゲノムデータベースよりプロテアーゼ様遺伝子群16種を抽出し、それぞれの遺伝子発現量を培養菌糸期と子実体原基形成期で相対定量比較し、子実体原基形成期では、g10056、g584、g1220、g4055遺伝子の発現量が顕著に増加し、子実体形成因子に関わることが示唆された。また、ブナシメジの子実体形成に深く関わるホスホラミドン感受性メタロプロテアーゼのアミノ酸配列を決定し、Fungalysin(Peptidase M38 family)であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Fruit-body formation of Basidiomycetes was accelerated by the addition of carboxyl protease inhibitor (S-PI), and no occurrence of fruit-body by the addition of metallo protease inhibitors (Talopeptin, Phosphoramidon, and EDTA). Several putative protease genes were selected using ForestGEN (*L. edodes* whole genome database). Among them, g876 (putative Eukaryotic aspartyl protease) showed high expression in mycelium stage of the fungus. In fruit-body (primordium) stage, g10056 (Eukaryotic aspartyl protease), g584, g1220 (Peptidase family 28) and g4055 (Peptidase family M13) were expressed higher than other putative protease genes. It seemed that g10056, g584, g1220 and g4055 have important role on fruit-body formation in *L. edodes*.

On the other hand, phosphoramidon sensitive metalloprotease from *Hypsizygus marmoreus* was purified, and the gene was cloned. The protease gene sequence showed high similarity with Fungalysin (Peptidase M36 family).

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロテアーゼ シイタケ ブナシメジ

1. 研究開始当初の背景

1960年代に、きのこ類微生物の子実体形成メカニズムに関する研究が始まったが、未だ生化学的に解明されていない。子実体形成開始のシグナル物質の特定や、酵素化学的なアプローチからきのこの子実体形成メカニズムを探索することは常套手段であり容易に研究テーマとなりうるが、他の微生物と比べると、きのこ類微生物は生育が著しく遅く、培養の難しいものが多いことから、酵素化学的および遺伝子発現解析に関する研究が進んでいない。

2. 研究の目的

きのこ類微生物の最大の特徴は、きのこ(子実体)形成という形態的变化であるが、生化学的なメカニズムは未解明である。当研究室では、プロテアーゼの特異的な阻害剤を用いた研究により、これまでに菌体内における各種プロテアーゼ群の活性化と不活化が、子実体形成に深くかわり、形態変化の制御因子として働いていることを報告してきた。本研究では、日本の代表的なきのこであるシイタケ (*Lentinula edodes*) とブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) が栄養菌糸期から子実体成熟期にかけて生産するプロテアーゼ群の遺伝子クローニング、および塩基配列とアミノ酸配列の決定、各種プロテアーゼ遺伝子の発現時期の解明をし、子実体形成メカニズム解明の更なる発展を目的とした。

(1)シイタケ菌糸体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

シイタケの生活環は、胞子の発芽、一核菌糸から二核菌糸への細胞融合、菌糸の生長(菌糸体の形成)、子実体原基の形成、成熟子実体の形成、胞子の形成というように大きく分けて6つの生育ステージがある。特に子実体形成に深く関わるから の生長段階をターゲットとし、種々のプロテアーゼ遺伝子の発現量変化を解析することを目的とした。

(2)ブナシメジ由来メタロプロテアーゼの遺伝子クローニング

ブナシメジの栽培工程期間において、芽だし処理(子実体形成の誘導)後に、メタロプロテアーゼの阻害剤であるホスホラミドンを培養基に添加すると子実体が発生しないことが報告されている(近畿大学農学部、寺下ら)。この結果より、ホスホラミドに阻害されるメタルプロテアーゼが、ブナシメジの発芽メカニズムに深く関与することが考えられた。本メタロプロテアーゼは精製され、酵素化学的諸性質が解明されているが、その1次構造は未だ解明されていないため、遺伝子クローニングと配列決定を目的とした。

3. 研究の方法

(1)シイタケ菌糸体内プロテアーゼ遺伝子群

の発現解析

シイタケ菌体外酸性プロテアーゼの遺伝子クローニング

網羅的なプロテアーゼ遺伝子群の発現解析に先駆けて、最初に菌体外酸性プロテアーゼの酵素精製と遺伝子クローニングに着手した。子実体の形成が可能であるポテトデキストロース培地でシイタケを2-3か月培養し、子実体を形成させた。濾過と遠心分離により得た培養濾液を粗酵素液とした。硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより菌体外酸性プロテアーゼを精製した。プロテアーゼ活性は、ヘモグロビン(pH 3.0)を基質とし、casein-Folin法を用いて測定した。SDSポリアクリルアミド電気泳動により高度に分離した後、セミドライプロットングによりPVDF膜に転写して酵素精製を完了した。N末端アミノ酸配列決定のため、プロテインシーケンス分析は、京都大学農学部発酵生理及び醸造学研究室に依頼した。決定されたN末端アミノ酸配列をForestGENシイタケゲノムデータベース内で検索をし、検索結果より得られた配列を基にプライマーを設計して、以下の方法により遺伝子クローニングと遺伝子配列決定を行った。培養菌糸体より全RNAをTakara RNAiso Plus (TakaraBio)を用いて抽出し、Reverse transcriptase M-MLV (TakaraBio)を用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、設計したプライマーを用いたPCRにより、目的の菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子のcDNAクローニングを行った。PCRには、一般的なTAクローニングによく使用されるTakara Ex Taq polymeraseを用いた。増幅して得られたDNA断片は、T4 ligaseを用いてTakara T-Vector pMD20に連結させた。大腸菌JM109株を連結したプラスミドで形質転換した後、プラスミドを増幅させ、シーケンスサンプルとした。シーケンス解析は、株式会社ファスマックDNA合成事業部に依頼した。各塩基配列の情報は、遺伝子配列解析ソフトウェアのMEGA5を使用し、得られた塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。他遺伝子およびタンパク質との相同性は、インターネット上で検索サイトBLASTを使用して解析した。

シイタケ菌糸体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

2011年にシイタケ全ゲノム配列が森林総合研究所により公開された(ForestGEN)。本ゲノムデータベースより、プロテアーゼ様遺伝子を抽出し、それぞれの遺伝子配列を基にインターネット上のPrimer3(v. 0.4.0)を使用してリアルタイムPCR用のプライマー設計を行った。プロテアーゼ遺伝子群の検索条件として、pfam上でそれぞれプロテアーゼとして分類されているものを指標とした。菌床栽培したシイタケの培養菌糸期と子実体原基形成期より、全RNAを抽出し逆転写反応により

cDNA を合成した。本 cDNA を鋳型とし、上記に述べた各種プロテアーゼ様遺伝子のプライマーを用いて、リアルタイム PCR によりそれぞれの遺伝子発現量の相対定量を行った。リファレンス遺伝子には、シイタケの生活環において定常的に発現しているといわれる、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた。リアルタイム PCR は、LyghtCycler®Nano (Roche) と FastStart Essential DNA Green Master (Roche) を用いた。

(2) プナシメジ由来メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニング

プナシメジ供試菌株には、*H. marmoreus* NN12 株を用い、菌床栽培を行った。芽だし処理後の培養菌糸をメタロプロテアーゼ源とし、水道水を用いて、ミキサ内で破碎した。遠心分離後の上清を回収し、粗酵素液とした。硫酸プロタミンの添加による除核酸後、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによりメタロプロテアーゼを精製した。プロテアーゼ活性は、カゼイン (pH 7.0) を基質とし、casein-Folin 法を用いて測定した。SDS ポリアクリルアミド電気泳動により高度に分離した後、ウェスタンブロッティングで PVDF 膜に転写して酵素精製を完了した。N 末端アミノ酸配列決定のためのプロテインシーケンス分析は、PPSQ-31B (島津製作所) を用いて解析を行った。また、本プロテアーゼの内部配列の決定には、autoflex speed TOF/TOF-KN2 (Bruker) を用いた。得られた N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を基に、BLAST 検索した。また、供試菌株である *H. marmoreus* NN12 株のドラフトゲノム配列の決定を、次世代シーケンサー NextSeq500 (illumina) を用いて行い、得られたドラフトシーケンス内でも BLAST 検索を行い、遺伝子配列の決定を行った。

4. 研究成果

(1) シイタケ培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

シイタケ菌体外酸性プロテアーゼの遺伝子クローニング
ヘモグロビン (pH 3.0) を基質として精製したシイタケ菌体外酸性プロテアーゼの N 末端アミノ酸配列を 15 残基解析したところ、ForestGEN シイタケゲノムデータベース上における、g3732 遺伝子と 100% 配列が一致した。本遺伝子のアミノ酸配列を NCBI 上で BLAST 検索したところ、*Fomitiporia mediterranea*, *Leucoagaricus gongylophorus*, *Galerina marginata* などが由来のエンド型セルラーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示した。本酵素はプロテアーゼ活性を指標に酵素精製を行ったが、その 1 次構造はエンド型セルラーゼと高い相同性を示した。プロテアーゼであるのか、セルラーゼであるのか不明

なため、以下のシイタケ 菌糸体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析からは、除外した。

シイタケ 菌糸体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

菌床栽培シイタケの培養菌糸期と子実体原基形成期におけるプロテアーゼ遺伝子群の発現解析に先立ち、ForestGEN 内でプロテアーゼとしてアノテーションされている遺伝子を、16 種類抽出した (表 1)。

表 1. 発現解析に用いたシイタケプロテアーゼ様遺伝子

Transcript ID	Pfam Hit(s)	Transcript ID	Pfam Hit(s)
g7269	Peptidase A4 family	g5196	Eukaryotic aspartyl protease
g7534	Peptidase A4 family	g7258	Eukaryotic aspartyl protease
g7597	Peptidase A4 family Extensin-like protein C-terminus	g10056	Eukaryotic aspartyl protease
g10028	Peptidase A4 family	g584	Transferrin receptor-like dimerisation domain Peptidase family M28
g866	Eukaryotic aspartyl protease Retroviral aspartyl protease	g1220	Peptidase family M28 Transferrin receptor-like dimerisation domain Nicastrin
g867	Eukaryotic aspartyl protease Retroviral aspartyl protease	g2267	Aminopeptidase I zinc metalloprotease (M18) M42 glutamyl aminopeptidase
g2120	Eukaryotic aspartyl protease	g3115	Peptidase family M28
g5195	Eukaryotic aspartyl protease	g4055	Peptidase family M13

表 1 に示されるプロテアーゼ遺伝子群の相対発現量をリアルタイム PCR により測定したところ、培養菌糸期においては、Pepsin-A like protein に分類される g866 遺伝子が顕著に発現していることが分かった。一方、子実体原基形成期においては、Eukaryotic aspartic protease に分類される g10056 遺伝子、peptidase family 28 に分類される g584 遺伝子と g1220 遺伝子、peptidase family M13 に分類される g4055 遺伝子の発現量が顕著に増加していた。しかしながら、培養菌糸期に発現量が多い g866 遺伝子は、子実体原基形成期では顕著に減少していた。以上の結果により、シイタケの生活環において、菌糸期においては g866 遺伝子がコードする酸性プロテアーゼが栄養摂取のためのタンパク質分解に関わり、菌糸体の生長に関わることが示唆された。また、g10056、g584、g1220、g4055 遺伝子は子実体原基形成期に顕著に発現していることから、栄養摂取のためのプロテアーゼの働きの他の作用をもつと考えられる、子実体形成の因子としての働きを持つことが示唆された。

図 1. シイタケ培養菌糸期におけるプロテアーゼ遺伝子群の遺伝子発現量

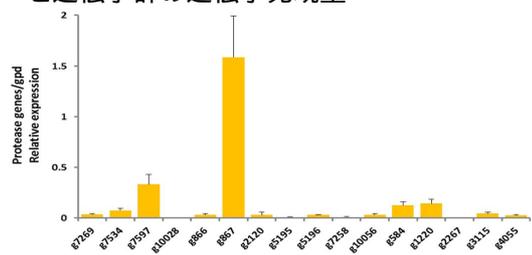
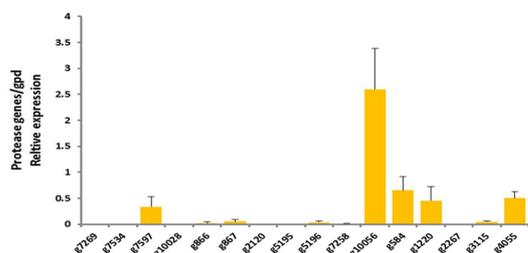


図 2. シイタケ子実体原基形成期におけるプロテアーゼ遺伝子群の遺伝子発現量



(2) プナシメジ由来メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニング

メタロプロテアーゼの阻害剤であるホスホラミドンによって、プナシメジの子実体発生が阻害され、本プロテアーゼがプナシメジの子実体形成に関わることを報告してきた。芽だし処理後のプナシメジ培養菌糸より、本プロテアーゼの酵素精製を行ったところ、約 42,000 の分子量をもつ単量体を示し、ホスホラミドンによって完全に活性を阻害されるタンパク質であった。これは、近畿大学農学部 寺下らが報告したメタロプロテアーゼと同様の結果であったため、本プロテアーゼの N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列の決定を行った。次世代シーケンサー NextSeq500 によって決定した *H. marmoreus* NN12 株のドラフトゲノム配列内で、得られたアミノ酸配列の BLAST 検索したところ、100% 一致する配列が確認された。本遺伝子の全長を NCBI 上で BLAST 検索したところ、*Moniliophthora rorei*、*Hypholoma sublateralitium*、*Hebeloma cylindrosporum*、*Pleurotus ostreatus* などのメタロプロテアーゼの配列と高い相同性を示した。また、本酵素は、Fungalysin (Peptidase M36 family) および Zn-dependent metalloprotease (亜鉛プロテアーゼ) の配列モチーフをもつプロテアーゼであることが解明された。

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 7 件)

Y. Fukuta, Enzymatic Characterization and gene expression analysis of proteases from *Lentinula edodes*, International Society for Mushroom Science, 2016 年 5 月 30 日、Muziekgebouw aan het IJ (BR, Amsterdam, Netherlands)

福田泰久、シイタケ培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Y. Fukuta, Characterization and gene cloning of proteases from *Lentinula edodes*,

2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 16 日、Sheraton Waikikii (Honolulu, Hawaii, USA)

福田泰久、*Lentinula edodes* (シイタケ) 培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析、第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2015 年 11 月 20 日、ルミエール府中 (東京都府中市府中町)

福田泰久、*Lentinula edodes* 由来菌体外プロテアーゼの遺伝子クローニング、日本菌学会第 59 回大会、2015 年 5 月 16 日、那覇市ぶんかテンブス館 (沖縄県那覇市牧志)

福田泰久、シイタケ由来菌体外酸性プロテアーゼ遺伝子のクローニング、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学 津島キャンパス (岡山県岡山市北区津島中)

福田泰久、子実体形成時における各種酵素活性の変化について、日本きのこ学会第 18 回大会シンポジウム、2014 年 9 月 11 日、京都大学 百周年時計台記念館 (京都府京都市左京区北白川追分町)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 泰久 (FUKUTA, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号: 80609602

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし