

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19241

研究課題名(和文) ホルモン様物質の単離から始めるキノコの子実体形成機構解明に向けた新たな挑戦

研究課題名(英文) Novel challenging toward the molecular mechanism of fruiting-body formation starting from isolation of the endogenous active substance

研究代表者

西村 健(Nishimura, Takeshi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：10353799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラタケの3つの培養ステージ(菌糸、原基、子実体)菌体からのアセトン粗抽出物のカラムクロマト・TLCにより、それぞれ16, 8(9), 18つの画分を分離し、NMRによって構造を把握した。PD法による活性試験の結果、トリグリセリドやグルコシルセラミド等にごく微量で子実体(原基)を誘導(促進)する可能性が示唆された。cDNA-RAPD法により原基および子実体のステージで特異的に増幅されたcDNA断片を3つ得た(T5, W7, A9)。これらはスエヒロタケのハイドロホビン遺伝子、シイタケのキチン分解酵素遺伝子、*A. nidulans*の-1,3グルカン分解酵素の遺伝子と相同性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコの子実体形成機構は今なお未解明の課題であり、その解明は学術・実用の両面で大変意義が大きい。本研究で得られたヒラタケの子実体誘導物質やその子実体形成期における特異的発現遺伝子に関する新規知見は、「キノコがいつ・どのような物質の関与によって子実体形成を行うのか」その分子基盤の確立に向けたさらなる学術的展開に大いに資すると期待される。子実体形成機構の解明はきのこの栽培技術の高度化にも資する重要課題であり、「森林・林業基本計画」(平成28年5月24日閣議決定)の「森林及び林業に関し、政府が総合的かつ計画的に講ずべき施策」中に挙げられている「山村の振興・地方創生への寄与」に対応した取組である。

研究成果の概要(英文)：Acetone extract from three stages of mycelium, primordium, and mature fruiting body of *Pleurotus ostreatus* were separated and purified into fractions using silica gel column chromatography and TLC, and structurally characterized by NMR. From the screening assay for their fruiting inducing activities using paper disk, it was suggested that an endogenous fungal type glucosylceramide and triglycerides may be substances that involve in fruit-body formation of *Pleurotus ostreatus* at fairly low concentration. cDNA-RAPD analyses were performed with cDNAs from three stages of mycelium, primordium, and mature fruiting body. Three cDNA clones (T5, W7, A9) specifically expressed in primordium or mature fruit body were detected. Sequence analysis and database searches revealed significant similarity with hydrophobic gene of *Schizophyllum commune*, gene of chitin degrading enzyme in *Lentinula edodes* and gene of -1,3 glucan degrading enzyme in *Aspergillus nidulans*.

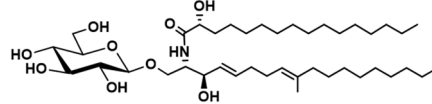
研究分野：木材化学

キーワード：ヒラタケ 子実体誘導物質 トリアシルグリセロール グルコシルセラミド 子実体形成期特異的発現遺伝子 ハイドロホビン キチン分解酵素 -1,3グルカン分解酵素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

木材腐朽性担子菌であるキノコは地上における物質循環の有力な貢献者であり、食用・薬用等の利用を含め、人類にとってその恩恵と経済価値は計り知れない。このキノコに残された最大の生物学的な謎の1つにその子実体形成機構が挙げられ、その解明は学術・実用の両面で大変意義が大きい。光・温度・物理的刺激(菌かき、落雷による衝撃など)などの環境ストレスはキノコ子実体発生のトリガーとなることが知られているが、その子実体形成に関わるホルモン様のシグナル物質については多くが未解明である。スエヒロタケ栄養菌系から同菌の子実体形成を誘導するグルコシルセラミド(スフィンゴ糖脂質の一種)の単離報告があるものの(Kawai et al. 1983, 右図), その分子生物学的な発現作用機構に関する続報は見当たらない。



真菌類に特徴的なセラミド構造(長鎖塩基成分: 9-メチル-オクタデカ-4,8-スフィンガジエン)を有するグルコシルセラミド

代表者らは、様々な試薬を寒天培地に添加してヒラタケに子実体を作らせる物質がないか長年検索を行っており、これまでシュガーエステル、キラヤサポニン(天然サポニン的一种)、ベチュリン配糖体、3-O-アルキルグルコース等を見出した(Magae et al. 2005, 2009)。これらはいずれも糖に疎水性置換基が結合したハイブリッド構造を有し、このような構造がヒラタケ子実体形成に有効に働く事、さらに自然界でヒラタケ自身の作り出す子実体形成物質があるとすれば、それは類縁構造の物質である事を想像させた。他方、分担者はヒラタケの子実体形成時に特異的に発現する遺伝子の RAPD 法による解析手段を確立している (Sunagawa & Magae 2005)。

2. 研究の目的

上記背景のもと、「ヒラタケがいつ・どのような物質の関与によって子実体形成を行うのか」その分子基盤の確立を究極の目的とし、ヒラタケの3つの培養ステージ(栄養菌系 子実体原基 子実体)について、(1)ヒラタケ自身からのホルモン様の劇的な活性を持つ子実体誘導物質の探索、(2)子実体形成時に特異的に発現する遺伝子解析を行う。(1)と(2)で得た知見のリンクにより(3)キノコの子実体形成機構解明に向けた新たなアイデア(研究の新展開)を提案する。

3. 研究の方法

培養・収穫: ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) の二核菌系 (FMC456) を用いた。供試菌株の子実体を発生させるため、ブナおがこ・米ぬか(容積比 3:1) 培地で栽培を行った。

遺伝子解析: 栽培過程における培養菌系、原基および子実体の各ステージ(図1)からキアゲンカラムを用いて total RNA を抽出した。次に、total RNA から Oligotex-dT30 (宝酒造) で mRNA を単離し、逆転写酵素反応により cDNA を合成した。それぞれのステージから得られた cDNA を 10mer のランダムプライマー(オペロン社)で PCR を行い(RAPD)、増幅産物を比較した。各ステージで特異的に増幅した DNA 断片を TA Cloning Kit (インビトロジェン社)でクローニングし、塩基配列を決定した。

子実体誘導物質の抽出・構造決定・生物検定: 液体培養(SMY 培地)により栄養菌系を収穫した他は遺伝子解析と同じ収穫試料を用いた。H₂O系、MeOH/クロロホルム/H₂O系、アセトン系を抽出に用いた。凍結乾燥・凍結破砕(1/10程度に重量減少)した菌体試料を抽出に供した。脂溶性成分の分離・精製はシリカゲルカラムクロマト/TLCにより行い、構造決定は主にブルカー製 400MHz クライオプローブ NMR を用い、産総研データベース(SDBS)を適宜活用した。生物活性試験は PD 法による(図2)。試料添加 disk (8mm 径)を配置した MA 培地上で一定期間ヒラタケ同株を培養し(暗室: 25°C, 10 日 きのこ発生室: 100 ルクス光照下, 15°C, 8~12 週), disk 周辺における菌系の aggregation, 原基及び子実体の発生状況を観察した。



図1. ヒラタケの栽培ステージ

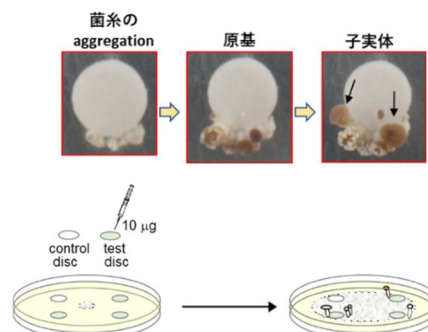


図2. ペーパーディスク (PD) 法

4. 研究成果

(1)各培養ステージのヒラタケ菌体からの活性物質の探索 ~ による粗抽出物に含まれる予備的な活性確認試験を実施した(PD法:100 μ gをdisk添加)。本株は実験系で比較的子実体(原基)をつくりにくい株である事が判明したが、きのこ発生室に移しておよそ8週後には菌糸のアグリゲーションや子実体原基の形成が開始され、栄養菌糸・原基・子実体からのいずれの脂溶性抽出物においても有意に活性が検出された。水溶性抽出物にも活性が含まれる事が示唆されたが、本課題では抽出物添加 disk における原基等の発生頻度が比較的高かった脂溶性抽出物に重点を置き、スフィンゴ糖脂質の抽出にも用いられ毒性が比較的低いアセトンで以後用いた。次いで、シリカゲルカラムクロマト・TLCによる多段階の分画を実施した。子実体抽出物(58mg)についての結果を右図に示すが、TLC的に概ねワンスポットの状態でA-Kまでのおよそ18の画分を得た。A-C3は不飽和脂肪酸が結合したトリアシルグリセロール、D1・D2・E2は遊離型の不飽和脂肪酸、D3・E1はエルゴステロール、Kはスエヒロタケでも先行報告のある真菌型のグルコシルセラミド(前頁)である事が判明した。他の画分は主に脂肪酸骨格がメチル基・水酸基・2重結合等により様々に修飾を受けた脂質系混合物と推察され、Iはステロイドである可能性が推察された(詳細は検討中であるためステロイドXとした)。同様の分画を原基抽出物(29.5mg 9画分:イ~ト、9.9mg 8画分:①~⑩mix)ならびに栄養菌糸抽出物(18.5mg 16画分:い~ほ)についても行い、NMRにより内容物の構造を把握した。得られた結果をステージ別に取りまとめた(図3)。真菌タイプのグルコシドセラミドがヒラタケの全てのステージに存在する事が明らかとなり、子実体形成の始動期ともいえる原基の段階で比較的多く存在した事は興味深い。得られたほぼ全ての画分についてPD法(微量の10 μ g disk添加)による子実体誘導活性試験を行い、positiveと判定した候補物を表1に示す。図3の結果も踏まえ、ヒラタケ自身に存在するトリグリセリド(GC-MSにより結合脂肪酸の構造の詳細を検討中)やグルコシルセラミド等がその子実体形成過程においてごく低濃度で原基形成を誘導もしくは促進する可能性が示唆された。

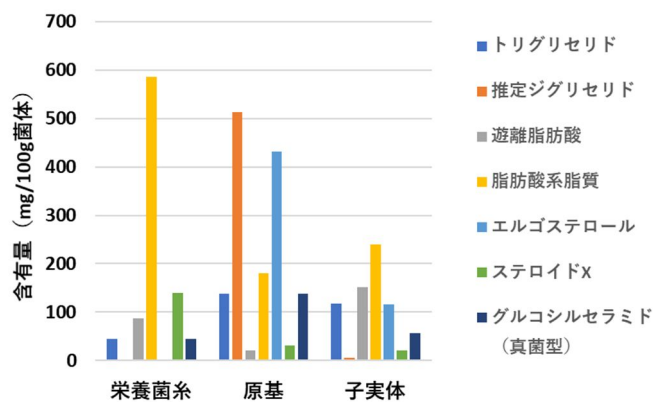
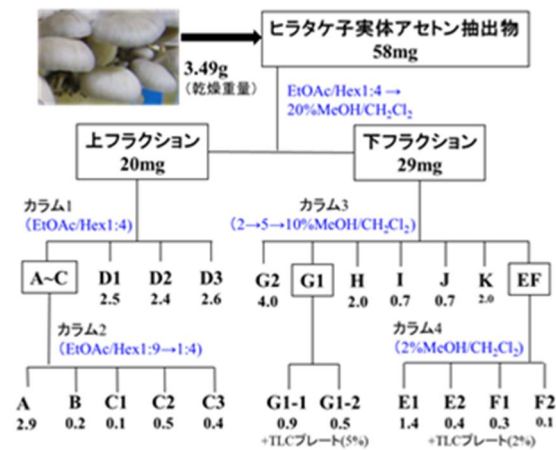


図3 培養ステージ別存在量

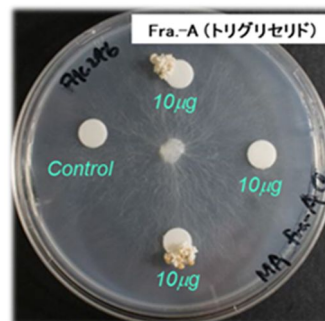


図4 PD法による試験結果

表1 PD法による活性成分(画分)のスクリーニング結果

Origin	Fraction code	Rf	展開溶媒	内容物	菌体含量* (mg/100g)	活性**
栄養菌糸	い	0.57	酢エチ/Hex1:9	トリグリセリド	45	++
	にC	0.64	2%MeOH/CH ₂ Cl ₂	脂質系混合物	54	++
	にE1	0.38	2%MeOH/CH ₂ Cl ₂	脂質系混合物	117	++
原基	①	0.52	酢エチ/Hex1:9	トリグリセリド	45	++
	A	0.58	酢エチ/Hex1:9	トリグリセリド	83	++
子実体	B	0.38	酢エチ/Hex1:9	トリグリセリド	5.7	++
	C1	0.67	酢エチ/Hex1:4	トリグリセリド	2.9	++
ステージ共通	K, ホ, ほ	0.36	15%MeOH/CH ₂ Cl ₂	真菌型グルコシルセラミド	図3参照	+- (1回目) ++ (2回目)

*対乾燥菌体重量, **繰り返し数2(シャーレ2枚)とし positive と判定したシャーレを+で示した。

(2)ヒラタケ子実体形成期における特異的発現遺伝子解析 ヒラタケの3つの培養ステージ(菌糸、原基、子実体)から得られたcDNAをテンプレートとして、150種類のランダムプライマーによるRAPD分析を行った。その結果、それぞれの培養ステージで、482, 484 および 483 の DNA断片が得られた。150 プライマーのほとんどで、3つの培養ステージのDNA断片パターンは同じであったが、W7, T5, A9 プライマーを用いた場合、原基および子実体のステージで特異的なDNA断片が検出できた(図5)。それらの分子量は500bp前後であった。それら3つのDNA断片をクローニングし、塩基配列を決定した。推定されるアミノ酸配列についてデータベースを検索したところ、原基のステージで得られたT5クローンは、スエヒロタケのハイドロホビン遺伝子と相同性があった。ハイドロホビンは菌類にみられる細胞表層タンパク質で、細胞の表層に撥水性を与える。子実体形成過程においては、特有の細胞壁関連のタンパク質が関わっていると考えられるため、今回得られたT5クローンが原基のステージで確認できたことは興味深い。また同ステージで得られたW7クローンは、シイタケのキチン分解酵素遺伝子と相同性があった。キチンは糸状菌の細胞壁構成成分のひとつである。カビ類の形態形成における、キチン合成酵素および分解酵素の役割はよく調べられており、これらキチン関連酵素を欠損した変異体では、菌糸形態や孢子形成に影響が出ることが知られている。W7クローンがキチン分解酵素遺伝子と相同性があったことは、ヒラタケの形態形成に大きな役割を果たしていると考えられる。一方子実体のステージで得られたA9クローンにおいては、*Aspergillus nidulans*の β -1,3グルカン分解酵素の遺伝子と相同性があった。 β -1,3グルカンは菌類の細胞壁を構成する成分であり、グルカンを合成する酵素は、細胞が肥大化した後に細胞壁を強固にするために働く。子実体成熟期では、柄の部分の菌糸細胞伸長が抑えられ、細胞壁が合成されるのを阻止するため、グルカン分解酵素の遺伝子が発現していると考えられる。

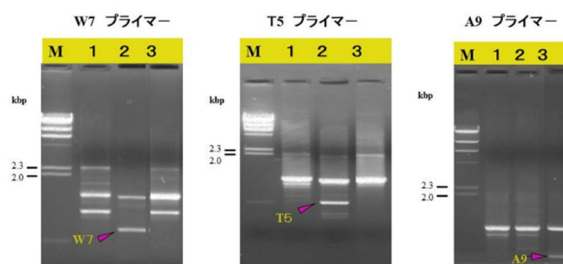


図5. cDNA-RAPD分析

M: 分子量マーカー 1: 菌糸 2: 原基 3: 子実体
W7, T5, A9はそれぞれのステージで特異的な断片

(3)研究成果の総括ならびに今後の展望 ヒラタケ脂溶性成分のステージ別の発現量が一部明らかとなり、ヒラタケ自身から単離されたトリグリセリドやグルコシルセラミド等がごく低濃度で子実体形成を誘導(もしくは促進)する可能性が示唆された。一方で、菌類の形態形成への関与が推察されている「ハイドロホビン・キチン・ β -1,3グルカン」遺伝子が、ヒラタケ子実体形成期における特異的発現遺伝子として確認された。これらと上記抽出物との関連付けにより、キノコ形成のしくみを説明する新たな包括的ストーリー(仮説)の展開が期待される。ただし上記抽出物は、現段階ではPD法を根拠とした候補物質に過ぎず、真の誘導物質として位置付けるためにはヒラタケの生化学的機構との紐づけが必要と考えられる。このための研究戦略として、抽出物を培地へ添加した際の遺伝子応答発現解析や遺伝子破壊株の有効活用などの多角的アプローチが提案され得る。

< 引用文献 >

- Kawai G. and Ikeda Y. (1983) *BBA*, 719, 612-618.
- Magae Y., Nishimura T., Ohara S. (2005) *Mycol. Res.* **109**, 374-376.
- Magae Y., Nishimura T., Ohara S. (2009) *Current Chemical Biology* **3**, 231-237.
- Sunagawa M., Magae Y. (2005) *FEMS Microbiology Letters*, **246**, 279-284.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nishimura T, Ohara S, Magae Y, Sunagawa M
2. 発表標題 Fruit-body induction of <i>Pleurotus ostreatus</i> by glucosylceramide and glyceroglycolipid analogous compounds
3. 学会等名 25th International symposium on glycoconjugate (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sunagawa M, Nishimura T
2. 発表標題 Isolation of genes differentially expressed during the fruitbody development of <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 Asian Mycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 培養ステージの異なるヒラタケ菌体からの脂溶性・水溶性抽出物の調製と子実体誘導活性
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村健
2. 発表標題 糖部分にマンノースを有するグリセロ糖脂質アナログの合成とヒラタケに対する子実体誘導活性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂川政英、馬替由美
2. 発表標題 きのこの変異株について
3. 学会等名 日本菌学会関東支部年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 ヒラタケ子実体アセトン抽出物からの同菌に対する子実体誘導物質の網羅的探索
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 ヒラタケ菌体からのグルコシルセラミドの単離とその子実体誘導活
3. 学会等名 第39回日本糖質学会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	砂川 政英 (Sunagawa Masahide) (30370282)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------