

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05794

研究課題名(和文) 高等真菌類によるエネルギー消費削減型糖代謝機構解明のための分子基盤構築

研究課題名(英文) Molecular basis for elucidating the mechanism of carbohydrate metabolism in higher fungi to reduce energy consumption

研究代表者

知久 和寛 (Chiku, Kazuhiro)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：30711618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キノコは担子菌門および子囊菌門に属する高等菌類であり、森の分解者として、生態系における炭素循環システムを維持するのに大きく貢献している微生物種の一つである。本研究では、高等菌類が保有するエネルギー消費の削減化を可能とする新規代謝機構を解明すること目的に、その分子基盤としてキノコを用いた宿主ベクター系の構築とそれを用いたホスホリラーゼが関与する糖代謝機構関連酵素および関連酵素遺伝子の機能解析を行った。関連する食用キノコ菌株11種類について全ゲノム解析を実施し、内部に含まれている糖関連酵素遺伝子を推定することができた。さらに得られた情報を元に、シロキクラゲ属を宿主とした遺伝子発現系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコは糖質分解に秀でた微生物種であり、糖代謝に関連する多様な酵素を保有している。しかしながら、それらを解析するための分子生物学的研究は遅れていた。本研究では、いくつかのキノコのゲノム情報を明らかにし、それぞれから数百の糖関連酵素遺伝子を見出すことができ、ライブラリー調製のため準備を整えた。さらに、大腸菌内での遺伝子発現が難しかったため、キノコ自体を宿主に用いた遺伝子発現系の構築が必要と判断した。そこで比較的成長の早いシロキクラゲ属を用いることで、この問題に対応するための手法を得た。本研究の成果により、高等真菌類によるエネルギー消費削減型糖代謝機構解明のための分子基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Mushrooms are higher fungi belonging to the phylum Basidiomycota and Ascomycota, and as decomposers of forests, they are one of the microbial species that contribute greatly to maintaining the carbon cycle system in the ecosystem. In this study, we constructed a host-vector system using mushrooms as a molecular basis to elucidate a novel metabolic mechanism that enables the reduction of energy consumption in higher fungi. Whole genome analyses of 11 edible mushroom strains were conducted, and the sugar-related enzyme genes contained within the mushrooms were estimated. Based on the information obtained, we constructed a gene expression system using the genus *Tremella* as a host.

研究分野：応用微生物学

キーワード：高等真菌 キノコ 宿主ベクター系構築 酵素 代謝 キノコゲノム ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

キノコは担子菌門および子囊菌門に属する高等菌類であり、森の分解者として、生態系における炭素循環システムを維持するのに大きく貢献している微生物種の一つである。自然界に存在する代表的な多糖であるデンプン、セルロース、キチンなどの植物性・動物性多糖の分解および資化能に長けており、その資化に関わる多様な酵素群をもつ。また多糖・オリゴ糖の合成能にも長けており、β-グルカンやマンナンなどの細胞外多糖やトレハロースなどの貯蓄性オリゴ糖、ムチンなどの無数の糖鎖を配した糖タンパク質や二次代謝産物としての配糖体を生産することが知られている。

近年、多くのキノコのゲノム解読が完了もしくは進行中であり、それら遺伝子情報を用いたキノコの分子生物学的研究が盛んになっている。キノコのゲノムサイズは 30 ~ 80 kbp であり、

細菌の約十倍の遺伝子情報を含むことから、キノコはこれら多種・多様な遺伝子情報を駆使して効率的に多糖・オリゴ糖の代謝を行っている。その一例として、キノコが生命活動を行う上で必要なエネルギーの消費を効率的に削減できる特異的な代謝機構を有する。その鍵タンパク質として加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)が機能する。ホスホリラーゼは、無機リン酸存在下で多糖・オリゴ糖のグリコシド結合を非還元末端側から順次加リン酸分解し、糖 1-リン酸を遊離する酵素である(図1)。また反応可逆性を示すことから、逆反応により糖 1-リン酸と単糖(もしくはオリゴ糖)よりオリゴ糖や多糖を、厳密な反応位置選択性により生産可能な合成酵素としての機能も示す。ホスホリラーゼが関与する糖代謝機構は、既知の糖質加水分解酵素による単糖化と ATP 消費を伴うキナーゼによるリン酸化経路(既知経路)に比べ、単糖の資化に必要な糖 1-リン酸の生成過程において ATP 消費が削減されるため、効率的な代謝経路(新規経路)と言える(図2)。さらに、申請者らはホスホリラーゼにより生成した糖 1-リン酸とヌクレオシド三リン酸を用いて、細胞内外の糖鎖合成の原料となる糖ヌクレオチド(NDP)を合成するサルベージ経路にもホスホリラーゼが関わっていることを示唆した。そのエネルギー消費の効率的な削減を特徴とするホスホリラーゼ関与型代謝は、限られた栄養源や生息圏を確保するための微生物独自の生存戦略として機能しているが、十分な学術的知見の蓄積があるとは言い難い。

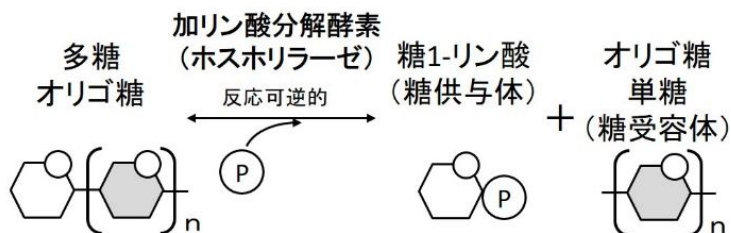


図1. 加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)による反応

細胞内 多糖・オリゴ糖

糖質加水分解酵素 既知経路

ATP消費

キナーゼ

糖代謝(分解資化)

ホスホリラーゼ 新規経路

ATP消費を削減!

糖1-リン酸

糖ヌクレオチド合成酵素

糖ヌクレオチド NDP

糖鎖合成 細胞壁 貯蓄性多糖 など

サルベージ経路

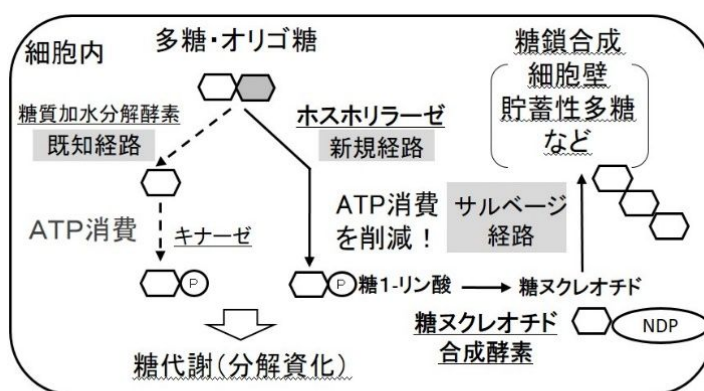


図2. ホスホリラーゼが関与する新規型糖代謝機構

ホスホリラーゼが関わっていることを示唆した。そのエネルギー消費の効率的な削減を特徴とするホスホリラーゼ関与型代謝は、限られた栄養源や生息圏を確保するための微生物独自の生存戦略として機能しているが、十分な学術的知見の蓄積があるとは言い難い。

2. 研究の目的

申請者らは、これまで動物の腸内深部や植物体内環境に生息する嫌気性細菌がエネルギー効率的に優位と考えられるホスホリラーゼ依存型代謝機構を保有することを示唆してきたが、複

数種のキノコからも植物性・動物性多糖の分解産物であるオリゴ糖類の細胞内分解に寄与する加リン酸分解酵素群の活性を見出している。キノコが生産する加リン酸分解酵素として、トレハロースホスホリラーゼの存在は古くから知られている。トレハロースは多くの食用キノコにおいて乾燥重量当たり 1.5~6.0%くらい含まれている貯蔵性のオリゴ糖であり、キノコは自身が生産したトレハロースホスホリラーゼを用いることで、図2のような ATP 消費を抑制した効率的な糖代謝を行っているものと思われる。我々が活性を見出している加リン酸分解酵素群も同様の機能を持ったものと考えられるが、それら酵素の系統学的分類や基質認識機構や反応メカニズム、酵素の誘導化条件などについて十分な学術的知見が得られていない。

ホスホリラーゼは、そのアミノ酸配列の相同性や反応メカニズムの違いにより、糖質関連酵素 (CAZy) データベース上においていくつかの糖加水分解酵素ファミリー (GH) や糖転移酵素ファミリー (GT) に分類されている。このうち、 α -1,4-グルカンに作用するホスホリラーゼ群であり、デンプンやグリコーゲンなどの多糖やマルトースの加リン酸分解に関与する酵素として、それぞれ GT35 に属するグリコーゲン (スターチ) ホスホリラーゼや GH65 に属するマルトースホスホリラーゼが知られている。加えてキノコの細胞壁である β -グリカンの分解産物に対して作用するホスホリラーゼ活性も見られており、GH94 や GT2 に属するホスホリラーゼが関与したサルベージ経路による細胞壁の再構築系に関わっている可能性がある。これらは主に細菌で見出されたホスホリラーゼの分子系統解析に基づいた分類であり、高等真菌であるキノコにおいては別のファミリーに属している可能性や新規ファミリーに分類される可能性もある。

そこで本研究では、高等菌類が保有するエネルギー消費の削減化を可能とする新規代謝機構の全貌を解明すること目的に、その分子基盤としてキノコを用いた宿主ベクター系の構築とそれを用いたホスホリラーゼが関与する糖代謝機構関連酵素および関連酵素遺伝子の機能解析を行うことにした。

3. 研究の方法

本研究では、新規なホスホリラーゼ依存型新規代謝機構の全貌を解明すること目的に、糖関連酵素遺伝子ライブラリーの構築 と遺伝子破壊・導入系を目的としたキノコによる宿主ベクター系の構築 の二つの実施項目を予定している。

(1) 糖関連酵素遺伝子ライブラリー構築

当初先行研究で活性が見出されたホスホリラーゼの基質特異性や部分アミノ酸配列情報を元に、キノコゲノム DNA を用いたインパース PCR 法や Straight Walk 法などにより配列未知の領域をクローニングを、mRNA より逆転写酵素さらには 5'/3'-RACE 法によりホスホリラーゼ遺伝子の配列情報の全長を取得することを計画した。しかしながら、期待通りに実験が進まなかったため、関連するキノコ種のゲノムを全ゲノム解析あるいは mRNA 解析を行い、関連する酵素遺伝子を抽出する方法を検討した。

培養したキノコからゲノム DNA の抽出を行い、次世代シーケンサーを用いてホールゲノムショットガン全ゲノム解析を行い、150 bp ずつのリードデータを取得した。一般的なキノコゲノムは 30~80 Mbp であるため、ガバレッジ x100 以上の信頼度の高い配列データの取得を目指すため 6~12G 塩基 / 試料を取得した。得られたリードデータをもとにアセンブルを行い、より長い DNA 断片を含むコンティグを、さらに長い DNA 断片を含むスキファールドを構築することにより約 1000 程度のリード数まで収束させた。このスキファールドを基に、遺伝子予想プログラムを用いて、遺伝子を推定し、BLAST を用いた相同検索により機能予想を行った。

(2) キノコを用いた宿主ベクター系の構築(図4)

糖関連酵素遺伝子ライブラリーを、キノコを宿主とした発現ベクターに組み込むことで組換え酵素の生産と機能評価を試みた。

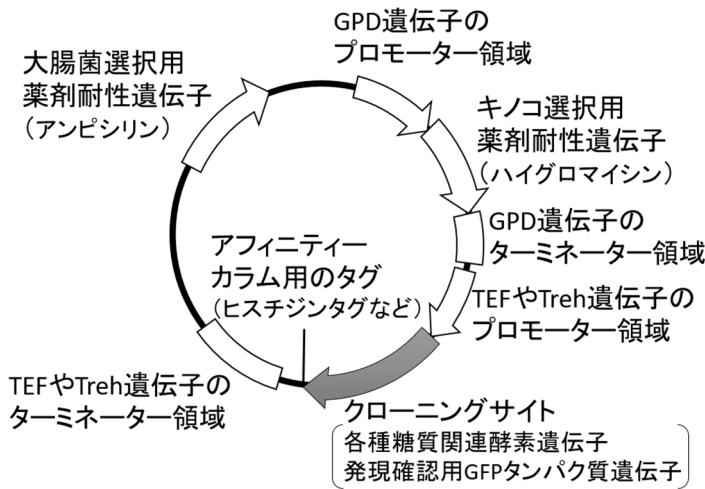


図4. キノコを用いた糖関連酵素遺伝子の発現ベクター

図4に示すように、構築するキノコ用の発現ベクターは形質転換されたキノコ選択用の薬剤耐性遺伝子であるハイグロマイシン遺伝子と組換えタンパク質遺伝子を組み込むクローニングサイトを、真菌類で恒常的に発現する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(GPD)遺伝子や伸長因子(ELF)遺伝子のプロモーターとターミネーター領域あるいは

トレハラーゼ遺伝子(Treh)のプロモーターとターミネーター領域で挟むことにより発現させた。発現ベクターが機能しているかの確認はハイグロマイシンを含む培地で生育させることによる耐性の確認、酵素遺伝子が発現しているどうかは、緑色蛍光タンパク質(GFP)の蛍光を測定することで確認した。さらに生産した組換えタンパク質の精製のためのヒスチジンタグをクローニングサイトの末端に付与したため、アフィニティーカラムへの吸着と溶出を確認することでタンパク質の生産量を確認することにした。キノコの発現ベクターを構築後、クロロプラスト-PEG法を用いて担子菌の形質転換を行った。

4. 研究成果

(1) 糖関連酵素遺伝子ライブラリー構築

研究室に保存されていた、食用キノコ菌株11種類について全ゲノム解析を実施し、以下のドラフトゲノム配列を得ることができ、内部に含まれている遺伝子を抽出することができた。

表1.本研究で解析した食用キノコのドラフトゲノムサイズとそこから抽出された遺伝子数

学名	和名	公表ゲノムサイズ (Mbp)	ドラフトゲノムサイズ (Mbp)	抽出された遺伝子数 (個)
<i>Morchella esculenta</i>	アミガサタケ	ND*	63.6	22,236
<i>Flammulina velutipes</i>	エノキタケ	35.64	34.9	12,726
<i>Agaricus bisporus</i>	ツクリタケ	30.23	28.7	8,670
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	トキイロヒラタケ	39.19	49.4	16,942
<i>Pholiota nameko</i>	ナメコ	ND*	36.2	12,398
<i>Pholiota adiposa</i>	ヌメリスギタケ	54.83	53.7	16,721
<i>Lyophyllum shimeji</i>	ホンシメジ	52.43	59.2	19,872
<i>Hericium erinaceum</i>	ヤマブシタケ	39.68	52.2	18,253
<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	45.59	49.8	14,984
<i>Tremella fuciformis</i>	シロキクラゲ	22.43	22.3	8,925
<i>Tremella yokohamensis</i>	なし	ND*	20.9	8,355

*ND: No data published.

エノキタケ, シロキクラゲ, ツクリタケ, ヌメリスギタケなどの多くの食用キノコから得られたドラフトゲノムサイズはNCBIデータベースで公表されているゲノムサイズとほぼ一致していた。トキイロヒラタケ, ホンシメジ, ヤマブシタケ, シイタケについては公表されているゲノムサイズよりも少し大きい値であった。またアミガサタケやナメコといったゲノム配列が全く明らかになっていない食用キノコのドラフトゲノム配列を取得することができた。ゲノム配列の完全解読がされているツクリタケは10,448個の遺伝子, シイタケは14,392個の遺伝子が含まれていることが報告されている。それらと比較すると, 本研究結果で得られたドラフトゲノムから抽出された遺伝子は, 遺伝子全体の約8割からほぼ全ての遺伝子を抽出できているのではないかと考えている。多くの機能未知遺伝子と共に, 数百以上の糖関連酵素と推定される遺伝子が見出されており, これら遺伝子が多様な多糖やオリゴ糖の分解に関与していると思われる。遺伝子の機能解析は引き続き行っていく予定である。

(3) キノコを用いた宿主ベクター系の構築

GPD 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域は多くの真菌類を用いた発現ベクター内で使用されている。本研究では(1)で全ゲノム解析を実施した担子菌酵母である *Tremella yokohamensis* および *Tremella fuciformis* (シロキクラゲ) のそれぞれの GPD 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域を用いた発現カセットによりハイグロマイシン耐性遺伝子の発現を試みた。その結果, いずれも 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度のハイグロマイシンを含む培地上で良好に生育したため, 上述した GPD 遺伝子関連の発現カセットは機能することを確認した。次に, マイタケを宿主とした遺伝子発現系などで用いられている TEF 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域を上述したプラスミドに追加で組みこみ, GFP タンパク質遺伝子の発現を行った。図4のプラスミドを用いて形質転換した *T. yokohamensis* および *T. fuciformis* はゲノム上に GFP タンパク質遺伝子が組み込まれていることを確認できたものの, GFP タンパク質生産による蛍光物質の発現を観察することが出来なかった。

そこで, *T. yokohamensis* の mRNA 解析の結果, 比較的発現量が多かった Treh 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域を用いた発現カセットの構築を行った。*T. yokohamensis* および *T. fuciformis* はゲノム内に2つの Treh 遺伝子を保有しており, 一つは菌体内分泌型 (Treh1), もう一つは N 末端にシグナル配列を含むため菌体外分泌型 (Treh2, おそらく酸性トレハラーゼ) であると判断した。これら二つの Treh 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作成し, *T. yokohamensis* の形質転換を行ったところ, 特に Treh2 遺伝子を GFP 遺伝子に切り替えた形質転換体はスクロースを唯一の炭素源とする培地での生育が著しく悪くなった。これは菌体外分泌型の Treh2 遺伝子がスクロースの分解に関与しているためであると考えている。スクロースの化学構造は $\alpha\text{-D-}$ グルコピラノシル-(1 \rightarrow 2)- $\beta\text{-D-}$ フルクトフラノースであり, トレハロースは $\alpha\text{-D-}$ グルコピラノシル-(1 \leftrightarrow 1)- $\alpha\text{-D-}$ グルコピラノースである。部分構造「 $\beta\text{-D-}$ グルコピラノシル-(1 \rightarrow)」が一致しているため, Treh2 遺伝子から生産された酸性トレハラーゼの柔軟な基質特異性により, スクロースを加水分解し, 炭素栄養源とすることが出来たのではないかと考えている。

Treh1 および Treh2 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域を用いた発現カセットで形質転換した *T. yokohamensis* は TEF 遺伝子よりは GFP 由来と思われる蛍光性タンパク質の発現が見られたものの, あまり発現量は多くなかった。Treh1 および Treh2 遺伝子のプロモーター領域の鎖長や遺伝子の向き, イントロン部位の導入など関連遺伝子の発現量を増やす試みを継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chiku Kazuhiro, Sugiyama Shiori, Akimoto Kona, Yoshida Mitsuru	4. 巻 11
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Two Basidiomycetous Yeasts, <i>Tremella yokohamensis</i> and <i>Tremella fuciformis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00573-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00573-22	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------