

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05828

研究課題名（和文）担子菌の子実体誘導条件応答機構の解析とキノコ生産への効果的応用

研究課題名（英文）Analysis of the response mechanism for fruiting body induction in basidiomycetes and its effective application to mushroom production

研究代表者

渡邊 彰 (Watanabe, Akira)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：90325324

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）：本研究では、*Flammulina velutipes*（エノキタケ）を対象に、その子実体形成に重要な誘導条件（低温誘導）に応答するラッカーゼアイソザイムの異種宿主調製系を構築し、調製酵素の諸性質について解析を実施した。また、本アイソザイムをエノキタケ菌体内で過剰発現させたところ、本酵素が菌糸および子実体の成長促進に寄与することが示唆された。さらに、子実体誘導条件に応答して発現する遺伝子オルソログの情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

担子菌において子実体（キノコ）は、外的刺激に応答して形成され、食用担子菌においては可食部となるだけでなく、生理活性物質を含有する種もあることから有用物質の供給源ともなり得る産業上重要な器官である。よって、本研究で着目したラッカーゼアイソザイムをファクターとするエノキタケの成長促進効果や子実体形成条件に応答する遺伝子オルソログに関する情報は、さらなる解析は必要であるものの、学術的意義のみならず社会的にも重要な意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed a heterologous expression system for the laccase isozyme in response to low temperature, which is significant in the fruiting body formation of *Flammulina velutipes* (enokitake), and analyzed various properties of the prepared enzyme. In addition, overexpression of this isozyme in *F. velutipes* suggested that the enzyme contributes to the growth enhancement of mycelial growth and fruiting body formation. Furthermore, information on orthologs that respond to fruiting body formation condition was acquired.

研究分野：微生物生化学

キーワード：担子菌 子実体形成 遺伝子発現 ラッカーゼ 酵素機能

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

担子菌において子実体（キノコ）は、食用担子菌（エノキタケやシイタケなど）においては可食部となることから、食糧資源として、また産業資源として極めて重要である。さらには、種によっては薬理効果を示す有用な生理活性物質を含むことから、子実体は、それ自体が健康食品としてだけでなく、生理活性物質供給源としても注目を浴びている。

上述のように、実用性の高さから重要な担子菌の子実体であるが、核相の変化を伴う特徴的な生育段階 {孢子(一核)→菌糸(一核→二核)→子実体原基(二核)→子実体(二核)} を経て形成される。しかも、子実体は生育環境が安定した条件下では形成されないが、温度や光、そして栄養飢餓などの外的刺激に応答して形成されるなど、その成長過程は巧みに制御を受けている。このような他の生物には見られない特徴も相まって、担子菌の子実体形成過程の分子メカニズムについては不分明な状況にあった。

そのような状況の中、研究代表者らは、エノキタケの子実体形成条件について検討を行ってきており、子実体の誘導には生育環境の低温への変換（低温誘導）が重要であることを示唆してきている。また、エノキタケの子実体を形成する株（正常株）と子実体形成条件下でも子実体を形成しない株（不良株）の比較解析から、正常株の培地中には高いラッカーゼが検出されるのに対し、不良株では正常株のようにラッカーゼが検出されず、子実体形成過程における両菌株間のラッカーゼの生産において顕著な差異があることが観察されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、担子菌の子実体形成誘導条件応答機構について理解し、キノコ生産への効果的応用を目標としている。具体的には、食用担子菌であるエノキタケを対象に、その子実体形成誘導条件である低温誘導に反応して検出されるラッカーゼの機能を切り口として解析を行った。

また、担子菌の子実体形成過程は、複数の因子が関与し制御されていると考えられることから、エノキタケの子実体形成条件下および非条件下における発現遺伝子解析（RNA-Seq 解析）も合わせて行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) エノキタケの使用菌株

本研究では、エノキタケの子実体を形成する正常株として FVN-1 株を、子実体形成条件下でも子実体を形成しない不良株として FVD-1 株を用いた。

#### (2) エノキタケの子実体形成条件

エノキタケの子実体形成のための培地には、木粉、米ぬか、水を成分とする菌床培地（固体培養系）を用いた。また、エノキタケの子実体形成は、菌床培地に菌糸を植菌し、23℃の暗所で培養を行い、菌糸蔓延の後、15℃の明所に移行（低温誘導）させることにより行った。

#### (3) ラッカーゼ活性の測定

ラッカーゼ活性は、100 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0）下で、基質である 1 mM の 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) の 30℃における Abs 420 nm の吸光度変化から算出した。

#### (4) 宿主麹菌およびエノキタケラッカーゼ発現ベクター

宿主となる麹菌には、*Aspergillus oryzae* NS4 株 (*niaD*, *sC*) を用いた。また、発現ベクターには選択マーカーとして *sC* 領域を保持し、タカアミラーゼ A (*amyB*) プロモーターと *amyB* ターミネーターを保持する pUSA を用いた。さらに、*A. oryzae* においてエノキタケラッカーゼの効果的な分泌生産を促すため、シグナルペプチド (SP) 配列には、対象としているエノキタケのラッカーゼアイソザイムが保持する SP 配列に換え、*A. oryzae* タカアミラーゼ A の SP 配列を用いた。構築ベクターは、図 1 に示す。

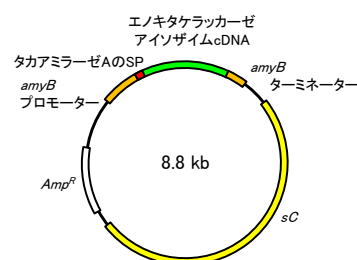


図1: 麹菌 *A. oryzae* におけるラッカーゼアイソザイム発現ベクター

#### (5) 活性染色解析

活性染色は、4℃条件下での Native-PAGE 終了後、ゲルを 100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0）および 1 mM ABTS を含有する酵素反応液に浸し、30℃にて、振盪させることにより行った。

#### (6) エノキタケにおけるラッカーゼ過剰発現ベクター

ラッカーゼアイソザイムを過剰発現させるためのベクターには、恒常的発現プロモーターとして知られるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*gpd*) プロモーターを用いて、そ

の下流に *gpd* の第 1 イントロン含有領域および本アイソザイムの cDNA を組み込んだものを使用した。なお、使用コドンはエノキタケの高頻度使用コドンに最適化している。構築ベクターは、図 2 に示す。

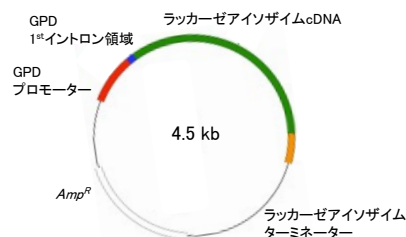


図2: エノキタケにおけるラッカーゼアイソザイム過剰発現ベクター

#### (7) エノキタケからの Total RNA の調製

菌床培地からの Total RNA の抽出は、菌糸が生育した菌床培地を液体窒素存在下で磨砕後、TRI-Reagent を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 正常株の子実体誘導条件に応答して検出されるラッカーゼアイソザイムの酵素学的解析

エノキタケが保持する複数のラッカーゼアイソザイムの内、エノキタケの子実体誘導条件（低温誘導）に応答して顕著に検出されるラッカーゼアイソザイムに着目し、大量調製が期待できる麹菌 *A. oryzae* を宿主に異種発現させ、その諸性質について解析を行った。

図 1 に示したエノキタケラッカーゼ発現ベクターを、プロトプラスト化した *A. oryzae* 細胞にポリエチレングリコールを用いて導入した結果、培養液中に高いラッカーゼ活性を示す *A. oryzae* 株を取得することができた。培養液に対する Native-PAGE・活性染色解析およびエンドグリコシダーゼ H による処理の結果、糖鎖付加の異なる 2 種類のラッカーゼが生産されていることが示唆された。そこで次に、生産された各々の組換えラッカーゼを、硫酸分画および各種クロマトグラフィーを用いて精製し、酵素学的諸性質の解析に供した。それら解析の結果、生産された酵素は、同等の pH 安定性や温度安定性を示した。また、ラッカーゼの既知の各基質に対する動力学定数も同等の値を示した。さらに、両酵素とも、ジチオスレイトール、L-システイン、そしてアジ化ナトリウムの添加において同等の阻害を受けることが明らかとなった。またさらに、FeSO<sub>4</sub> 存在下においても著しく阻害されることが判明した。

### (2) ラッカーゼアイソザイムのエノキタケの成長過程に及ぼす影響の解析

上記の (1) で述べたラッカーゼアイソザイムがエノキタケの成長過程に及ぼす影響を調べるため、調製酵素液の菌床培地中への添加効果について解析を行った。しかしながら、固体培養系に対する添加実験においては、固体培地中への添加方法等の影響が大きいことが考察された。そこで、本取り組みについては、アプローチを変え、分子生物学的にエノキタケにおいて本ラッカーゼアイソザイムを過剰発現させ、その効果を解析する方法に切り替えた。

まず、本アイソザイム過剰発現株の構築は、エノキタケ FVN-1 株から調製したプロトプラスト細胞に、図 2 に示した過剰発現ベクターをハイグロマイシン (Hyg) 耐性付与ベクター（マーカー遺伝子）とともに導入する共形質転換法により行った。共形質転換後、得られた Hyg 耐性コロニーから、本アイソザイムを過剰発現させるための領域が組み込まれた株を PCR により選抜し、高いラッカーゼ生産性を示した株を、ラッカーゼアイソザイム過剰発現株とした。

次に、親株であるエノキタケ FVN-1 株との比較解析の結果、構築した本アイソザイム過剰発現株では、菌糸成長において生育が促されている傾向が観察された。また、子実体成長においても、親株より促されている傾向が観察され、本酵素をファクターとするエノキタケの成長促進効果が示唆された。

### (3) エノキタケの子実体形成条件下・非条件下における RNA-Seq 解析

エノキタケ FVN-1 株の培地中のラッカーゼ活性の推移を指標に、エノキタケの子実体形成誘導（低温誘導）条件付与前後における菌体から Total RNA を調製し RNA-Seq 解析に供した。その結果、顕著な発現量（低温誘導後/低温誘導前）を示す複数の遺伝子オルソログが検出された。特に、低温誘導後の菌体においてハイドロフォービンと呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現量の顕著な上昇が見られた。ハイドロフォービンは糸状菌の気中菌糸や子実体の形成などに関わることが考察されている低分子タンパク質であり、今回の RNA 取得条件が、本解析において適していることが示唆された。また、エノキタケ FVD-1 株の低温誘導を付与した菌体からも Total RNA を調製し RNA-Seq 解析を行った。以上の解析の結果、子実体形成に関わることが推測される複数の遺伝子オルソログの情報を得ることができた。その後の各遺伝子オルソログの子実体形成過程に与える影響については明らかにするには至らなかったが、モデル担子菌を対象に行った CRISPR-Cas9 システムを適用した遺伝子破壊解析の実施結果から、同システムを活用することにより各遺伝子オルソログの機能解明が効率的に進むものと考えられた。

### (4) まとめ

上述の (1) および (2) の取り組みの結果、本研究では、子実体形成誘導条件に応答するラッカーゼをファクターとするエノキタケの成長促進効果を示唆することができた。今後は、(3) の RNA-Seq 解析から得られた情報やその情報に基づいた検討結果と組み合わせながら、担子菌における子実体の形成機構についてさらに解析を進め、キノコ生産へのフィードバックを図りたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Aylin Cesur, Yuya Nada, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe	4. 巻 86
2. 論文標題 Production and properties of a laccase isozyme (FvLcc3) from the edible mushroom <i>Flammulina velutipes</i> , which is undetectable under the culture condition for fruiting body formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 624-627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aylin Cesur, Ryousuke Yamamoto, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe	4. 巻 29
2. 論文標題 Relationship between fruiting body development and extracellular laccase production in the edible mushroom <i>Flammulina velutipes</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101204	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北原昂希, 刑部敬史, 渡邊 彰
2. 発表標題 ゲノム編集を用いた担子菌 <i>Coprinopsis cinerea</i> のオートファジー関連遺伝子 <i>Ccatg4</i> 破壊の取り組み
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuta Nio, Aylin Cesur, Kohei Subana, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe
2. 発表標題 Functional analysis of laccase isozyme (FvLcc2) from the basidiomycete <i>Flammulina velutipes</i> produced using the <i>Aspergillus oryzae</i> heterologous expression system
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics: Environmental and Resource Genomics and Life Sciences- (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北原昂希, 麻田恭彦, 渡邊 彰
2. 発表標題 担子菌Coprinopsis cinereaにおける栄養飢餓とオートファジーの関係
3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仁尾優太, Cesur Aylin, 須鼻浩平, 麻田恭彦, 渡邊 彰
2. 発表標題 麹菌発現系を用いて生産した担子菌Flammulina velutipes由来ラッカーゼアイソザイムの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊 彰
2. 発表標題 担子菌Flammulina velutipes (エノキタケ) の子実体形成について ~ラッカーゼ発現との関係~
3. 学会等名 第468回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 彰
2. 発表標題 担子菌類の子実体形成機構の解析
3. 学会等名 第465回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aylin Cesur, Kohei Subana, Ikuto Goma, Yasuhiko Asada, Akira Watanabe
2. 発表標題 Physiological investigation of laccase isozyme in Flammulina velutipes
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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