

## 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25年 5月28日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580097

研究課題名（和文） 光シグナル伝達を基盤とした子実体形成機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms for fruiting body formation founded on light signaltransduction

研究代表者

宮崎 安将 (MIYAZAKI YASUMASA)

独立行政法人森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：40343800

研究成果の概要（和文）：きのこの子実体形成には光が必要である。シイタケの光受容体遺伝子 *Le. cry* は、担子菌初のクリプトクロム型光受容体をコードしていた。その産物 *Le. CRY* の解析の結果、青色光領域を吸収し子実体形成に関わることが示唆された。プロテオーム解析の結果、リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾を介して、子実体形成に関わる代謝経路やシグナル伝達経路が存在することが分かった。トランスクリプトーム解析の結果、光応答遺伝子群を網羅・同定した。

研究成果の概要（英文）：Fruiting body formation of mushroom requires light. The *Le. cry* gene in *L. edodes* encoded a cryptochrome photo receptor first isolated from basidiomycetes. The expression product, *Le. CRY*, was suggested to be involved in fruiting body formation via perception of blue light. As a result of proteome analysis, there existed metabolisms and signal transduction pathways involved in fruiting body formation, which were mediated by protein phosphorylation and glycosylation. Photo-responsive genes were comprehensively identified by transcriptome analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：きのこ、光受容体、形態変化

### 1. 研究開始当初の背景

光は生物が生存する上で重要な環境因子の一つである。植物から初めて光受容体が発見されて以来、現在ではヒトから細菌に至るまで様々な生物で研究が進んでおり、植物工場における応用面での発展も期待されている。きのこ以外の菌類（カビ・酵母）の光受容体は分生子（単為生殖）・子嚢胞子（有性

生殖）形成に関与する事が分かっている。現在、2種類のキノコ（シイタケ、ヒトヨタケ）にのみ光受容体を確認されており、子実体形成に重要なタンパク質であることが分かっている (Terashima *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 2007)。この内、シイタケの光受容体 PHRA は申請者らが発見・同定しており、きのこの光受容体研究では最も研究が進んでいる。シ

イタケなどの暗所培養時には子実体形成が起こらないことから、子実体形成における光受容体の重要性が分かる。

## 2. 研究の目的 本研究は

- ①光受容体の子実体形成・形態分化への寄与及び関連性の立証
- ②光刺激による子実体形成時の遺伝子発現・タンパク質修飾の網羅的解析
- ③子実体形成機構に関与する光応答・シグナル伝達経路の解明

を目標とする。「担子菌きのこの子実体形成機構を光受容・応答という観点から分子レベルでより深く解明すること」を目的とした。

## 3. 研究の方法

食用きのこであるシイタケを実験材料とし、光受容体・光応答遺伝子の子実体形成に与える影響を分子生物学・生化学・分子遺伝学的手法を用いて解析した。ゲノム情報を利用し、トランスクリプトーム・プロテオーム解析を行い、子実体形成に寄与する新規光応答遺伝子・タンパク質を探索する。分子生物学・生化学・分子遺伝学的手法を用いてこれらの遺伝子の機能・動態を解析し、子実体形成のスイッチをになう光応答伝達経路の特定を行った。

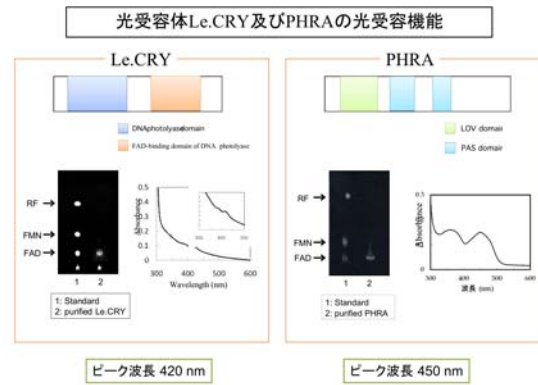
## 4. 研究成果

### (1) 新規光受容体遺伝子 *Le. cry* の単離と同定

シイタケの子実体形成には青色光が必要である。青色光光受容体は二つのクラス、フォトトロピンとクリプトクロムに分類される。我々が報告している PHRA はフォトトロピン・ファミリーに属するが今回、シイタケを含む担子菌から初めてクリプトクロム遺伝子を見出すことに成功し、*Le. cry* と命名した。本遺伝子産物 (*Le. CRY*) は特徴的な DNA フォトリアーゼ・ドメインと FAD 結合領域とを合わせ持ち、クリプトクロム・ダッシュファミリーに高い相同性を示した。

シイタケの子実体形成期及び子実体における各組織において、シイタケの光受容体遺伝子 *phrA*, *phrB*, *Le. cry* のリアルタイム PCR の転写発現解析の結果、*phrA* は構成的であり、*phrB* は菌糸では発現がみられなかった。一方、*Le. cry* は菌糸において最も発現しており、*Le. cry* が介する新たな青色光シグナル伝達経路が子実体形成前段階で働くことが予想された。これら *Le. cry* と *phrA*/*phrB* との異なる遺伝子発現パターンは、*Le. CRY* は PHRA/PHRB とは異なるシグナル伝達系で働く

かもしれないことを示唆した。



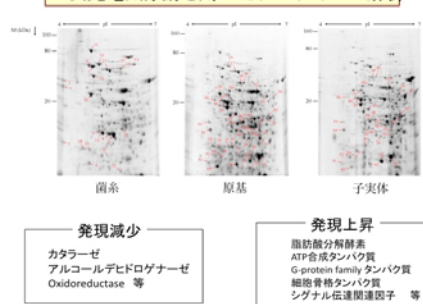
### (2) 子実体形成過程における発現タンパク質の網羅的解析

きのこの子実体形成メカニズム解明のため、2次元電気泳動法を用いたシイタケの子実体形成時において働くタンパク質の網羅的解析に加え、EST データベースを活用し質量分析器 (MS/MS) による発現タンパク質のアノテーションを試みた。

子実体形成を3つの分化ステージ (栄養増殖菌糸体・子実体原基・成熟子実体) に分けた各組織の全タンパク質を等電点電気泳動 (pH3-10) 及び SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った結果、子実体原基には含まれるタンパク質の種類が若干少ないものの、成熟子実体におけるタンパク質発現パターンと非常に似通った分布を示した。対称的に、栄養増殖菌糸体にのみ見られるタンパク質が多数検出された。これらタンパク質の多くは酸性領域に存在し、子実体形成期の分化段階ではタンパク質の発現パターンにさほど大きな相違はないことが明らかとなった。

上記の酸性領域のスポットに対しリン酸化タンパク質染色、糖鎖付加タンパク質染色も行った結果、同様に子実体原基と成熟子実体のタンパク質パターンは非常に似通っている一方、栄養増殖菌糸体のみ非常に顕著に異なることが明らかとなった。これらタンパク質は翻訳後における制御を受けることにより、子実体形成メカニズムに関与していることが考えられた。

### 二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析



また、これらタンパク質のうち、特異的かつ高度に発現しているタンパク質を選択し、LC-MS分析及びMASCOT解析によりタンパク質の同定を試みた。得られた推定アミノ酸配列を様々な EST データベースと照合した結果、約9割のタンパク質の機能に対するアノテーションが得られた(残り約1割は機能未知)。これらは子実体形成のシグナル伝達に関わるタンパク質や重要な代謝に関わる酵素などであることが明らかになった。

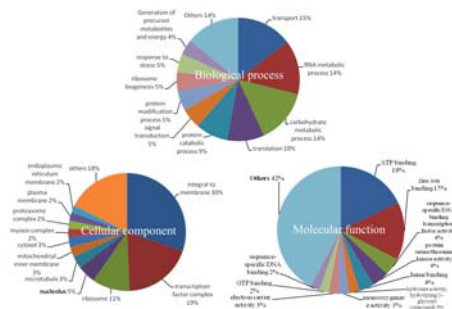
### (3) 光応答遺伝子群の網羅的解析

シイタケの子実体形成には光が必要である。そこで次世代型DNAシーケンサーを用いて網羅的解析を行い、光刺激に応答して発現する遺伝子群を解析・同定した。またそれら遺伝子産物に関して、バイオインフォマティクスの手法による機能推定(アノテーション)を試みた。

通常の栄養増殖菌糸体に光照射を行ったところ、光を照射した試料は子実体原基を形成したが、暗黒下で光を照射しない試料は子実体原基を形成しなかった。光照射直後の菌糸においては、約5200種類の遺伝子が発現している一方、暗黒下においては約2800種類の遺伝子のみが発現していた。光照射の有無によって、約2500種類の遺伝子に発現の際があった。そのうち、約2000種の遺伝子は光照射によって強く発現が誘導されることが分かった。また反対に、光照射によって発現が減少する遺伝子も約500種類存在することも明らかとなった。

また、バイオインフォマティクスの手法により、これら遺伝子のコードするタンパク質の機能に関しカテゴリー分けを行うと同時に、これらタンパク質が関与すると予想される代謝経路等へのアノテーションを行った。その結果、光に応答して発現が上昇及び減少する遺伝子の中には、きのこ或いは菌類に特有な遺伝子が多数存在していることが明らかとなった。これらのきのこや菌類に特異的な遺伝子は、担子菌きのこの子実体形成という独特な形態形成メカニズムを担っていると考えられた。

光照射時に発現量が上昇する遺伝子の分類



## 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5件)

① Yasumasa Miyazaki, Masahide Sunagawa, Akira Higashibata, Noriaki Ishioka, Katsuhiko Babasaki, Takashi Yamazaki. Differentially expressed genes under simulated microgravity in fruiting bodies of the fungus *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters, 307:72-79 (2010) 査読有

[学会発表] (計16件)

① Hiroaki Sano, Shinya Kaneko, Masaya Nakamura, Yasumasa Miyazaki. A DASH-type cryptochrome gene from *Lentinula edodes*. The 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 2011年10月6日, Arcachon, France

② Yasumasa Miyazaki, Kazuhiko Masuno, Masanori Abe, Hajime Nishizawa, Tetsuo Matsumoto, Sachio Kunitomo, Haruo Sakata, Kimiyoshi Nakamura, Tomoyuki Koyama, Masami Ito, Hiroshi Kazama, Dai Suzuki, Yasushi Obatake, Hiroaki Sano, Masaya Nakamura, Kazuhiro Miyazaki, Yuichi Sakamoto, Shinya Kaneko, Takashi Kamada. Light-stimulative effects on the cultivation of edible mushrooms by using blue LED. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 2011年10月6日, Arcachon, France

③ 佐野広明、中沢威人、金子真也、東端晃、石岡憲昭、角田光利、鎌田堯、宮崎安将. シイタケ子実体形成過程における発現タンパク質の解析. 日本農芸化学会2011年度大会, 2011年3月26日, 京都女子大学(京都府京都市)

④ Hiroaki Sano, Shinya Kaneko, Masahide Sunagawa, Kazuhiro Miyazaki, Mitsutoshi Tsunoda, Masaya Nakamura, Yasumasa Miyazaki. Identification of a cryptochrome gene homolog in the basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes*. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacficchem2010), 2010年12月17日, Honolulu, USA

⑤ Hiroaki Sano, Shinya Kaneko, Akira Higashibata, Noriaki Ishioka, Masahide Sunagawa, Yasumasa Miyazaki. Whole protein analysis by 2-D PAGE during fruiting body formation in *Lentinula edodes*. The 9th International Mycological Congress (IMC9), 2010年8月4日, Edinburgh,

UK

〔図書〕（計4件）

- ①宮崎安将、宮崎和弘、中村雅哉、佐野広明、金子真也、鎌田堯、坂本裕一、増野和彦、古川仁、阿部正範、西澤元、中村公義、小山智行、風間宏、鈴木大、國友幸夫、阪田春生、小島靖. LED 照明を利用したきのこ栽培技術の開発. 森林総合研究所平成24年版研究成果選集, 2012年, 62-63
- ②宮崎安将他. 人工光源の農林水産分野への応用. 社団法人農業電化協会, 2010年, 30-34

〔その他〕

シイタケゲノム・データベース: (独) 森林総合研究所遺伝子データベース ForestGEN  
[http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/info\\_le.html](http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/info_le.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 安将 (MIYAZAKI YASUMASA)  
独立行政法人森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・主任研究員  
研究者番号: 40343800

### (2) 研究分担者

金子 真也 (KANEKO SHINYA)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教  
研究者番号: 10399694

### (3) 連携研究者

なし