

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750024

研究課題名(和文) マンネンタケ水抽出物に含まれる酵素の発現挙動および酵素化学的解析

研究課題名(英文) Characterization and gene expression analysis of enzymes from a water extract of *Ganoderma lucidum*

研究代表者

熊倉 慧 (Kumakura, Kei)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教

研究者番号：80516930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マンネンタケ(*Ganoderma lucidum*)の水抽出物に含まれる酵素に着目し、酵素遺伝子のクローニング、そして生育ステージおよび収穫後の保存期間における遺伝子発現解析を行った。その結果、グルタミン酸プロテアーゼおよび-1,3-グルカナーゼの完全長cDNA配列情報を取得した。また、遺伝子発現量解析の結果、グルタミン酸プロテアーゼ遺伝子は、菌糸体、子実体原基、成熟前の子実体、収穫後4週目の子実体で相対的に高い発現を示すことが明らかとなった。-1,3-グルカナーゼ遺伝子は、菌糸体から成熟子実体における発現は低く、収穫後の子実体において高い発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on enzymes of a *Ganoderma lucidum* water extract. These enzymes studied were glutamic acid protease (GIGPA) and -1,3-glucanase (GIGH128A). Full-length cDNA sequences of GIGPA and GIGH128A were obtained by using rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR. Further, gene expression of GIGPA and GIGH128A was analyzed during growth stages and the harvest storage period. It was revealed that gene expression of GIGPA increased in mycelium stage, primordium of fruiting body stage, fruiting body before ripening stage, and fruiting body of 4 weeks after harvesting. On the other hand, gene expression of GIGH128A increased in fruiting bodies of 1, 2, and 4 weeks after harvesting. These results suggest that GIGPA and GIGH128A are important for morphogenesis and aging of fruiting body.

研究分野：食品機能学

キーワード：きのこ 酵素 遺伝子 プロテアーゼ グルカナーゼ

1. 研究開始当初の背景

硬質きのこは、“煮る”“焼く”などの調理では食することができない。このことから市場拡大が課題となっており、これらのきのこは高付加価値化が利用拡大に繋がると考えられる。そこで本研究では、和漢薬、民間薬として用いられ、効能効果が確認されていること、長い食経験によりその安全性が確認されていること、栽培方法が確立され利用拡大が期待されていることから、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) に着目した。これまでの研究で報告者らは、マンネンタケの水抽出物中には、複数のタンパク質が含まれることを明らかにした。プロテオーム解析手法を用いて水抽出物中タンパク質の網羅的同定を行った結果、プロテアーゼおよび複数のグリコシドヒドロラーゼの存在を明らかにした。そして、これらの酵素は水抽出物に含まれる少糖およびペプチドの生成など抽出物の機能性発現に関与していることを示唆した。

2. 研究の目的

本研究は、古来、民間薬として利用されてきたマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) に着目し、その機能性に関与すると考えられる酵素について、以下の目的を設定した。(1) 酵素遺伝子をクローニングし、その配列情報を取得する。(2) 各生育ステージ及び保存期間におけるそれら酵素の遺伝子発現を解析する。(3) 組換え酵素タンパク質の生成を試み、それぞれの酵素の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マンネンタケの人工栽培及び収穫後の保存

ナラ木粉および小麦フスマを重量比で5:1の割合で混合し、含水率60%に調整した培地に種菌(M-0601株)を接種し、人工栽培した。菌糸体まではインキュベーター(28℃)で培養し、子実体発生から収穫までを屋外でおこなった。収穫後は、乾燥を避けるために飽和塩化アンモニウム水溶液で満たしたデシケーター内で保存した。サンプルは、菌子体から収穫後4週間目までの子実体とし、液体窒素で急速凍結した後、-80℃で保存した。サンプルは、M:菌糸体、P:子実体原基、YFB:傘の形成が始まった若い子実体、FB:成熟前(孢子形成前)の子実体、HFB0:収穫適期の子実体、HFB1:収穫後1週間目の子実体、HFB2:収穫後2週間目の子実体、HFB4:収穫後4週間目の子実体とした。

(2) 酵素遺伝子のクローニング

本研究では、マンネンタケ水抽出物中に存在が確認されたグルタミン酸プロテアーゼ(GIGPA)及びGlycoside Hydrolase family 128(GH128)に分類される1,3-グルカナーゼ(GIGH128A)に着目して研究を行った。

グルタミン酸プロテアーゼの遺伝子クローニング

マンネンタケ保存菌株(M-0601株)をポテトデキストロス液体培地で培養し、得られた菌糸体からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。United States Department of Energy(DOE)の共同ゲノム研究所(JGI)データベースにおける*Ganoderma sp.*のゲノム情報およびM-0601株の本酵素gDNA配列情報を基にプライマーを設計し、RT-PCR法によりGIGPA遺伝子の発現を確認した。その結果、発現が確認されたことからそのtotal RNAを用いて、5'および3'RACE PCR法により、完全長cDNA配列情報を取得した。得られた塩基配列をもとにアミノ酸配列を予想した。予想アミノ酸配列を用いて、SignalP 4.1 Serverによりシグナルペプチドを予測した。さらに取得した配列情報を用いて、NCBIのデータベースに対してBLAST検索を行った。また、SWISS-MODELによりホモロジーモデリングを行った。

1,3-グルカナーゼの遺伝子クローニング

マンネンタケ保存菌株(M-0601株)をナラ木粉培地で培養し、得られた収穫後の子実体よりtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。JGIデータベースにおける*Ganoderma sp.*の遺伝子配列情報およびM-0601株の本酵素遺伝子のgDNA配列情報を元にプライマーを設計し、RT-PCR法によりGIGH128A遺伝子の発現を確認した。その結果、発現が確認されたことからそのtotal RNAを用いて、5'および3'RACE PCR法により、完全長cDNA配列情報を取得した。得られた塩基配列をもとにアミノ酸配列を予想した。予想アミノ酸配列を用いて、SignalP 4.1 Serverによりシグナルペプチドを予測した。さらにCAZYに登録されている真核生物のGH128アミノ酸配列およびJGIに登録されているアミノ酸配列とともにMAFFTを用いて系統樹解析した。また、I-TASSERによりホモロジーモデリングを行った。

(3) 酵素遺伝子の発現解析

凍結したサンプルを、マルチピースショッカーを用いて粉碎し、total RNAを抽出し、cDNAを合成した。それらをテンプレートとしてGIGPAおよびGIGH128Aの遺伝子発現量を測定した。リアルタイムPCRにより、インターカーター法を用いて、各ステージにおけるmRNAの発現量を比較した。RNA量の補正には、ハウスキーピング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遺伝子を使用した。

4. 研究成果

(1) マンネンタケの人工栽培とサンプリング
インキュベーターと露地栽培を組み合わせることにより、実験室レベルでの人工栽培に成功した。その結果、菌糸体から子実体収

穫後までの各ステージおよび部位別のサンプリングがスモールスケールで可能となった。これにより、マンネンタケ酵素遺伝子の各ステージにおける発現解析が可能となった。

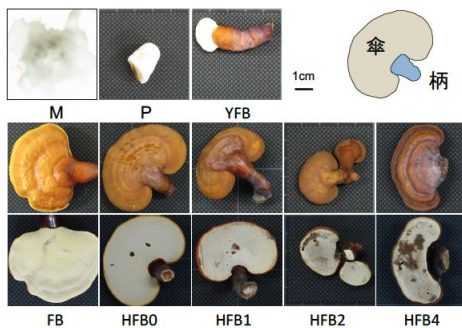


図1 サンプリングしたマンネンタケ

(2) クローニングされた酵素遺伝子の特徴 グルタミン酸プロテアーゼ (GIGPA)

RACE PCR 法により、完全長 cDNA 配列を明らかにした。その結果、予想開始コドンおよび終始コドンを含む配列情報の取得に成功した。gDNA 配列と比較した結果、GIGPA 遺伝子は3つのエキソンから構成されていた。次に得られた核酸配列情報をもとに予想アミノ酸配列を決定した。予想アミノ酸配列は、18 アミノ酸からなるシグナルペプチドを含む 268 残基からなり、活性残基と推測されるグルタミンおよびグルタミン酸残基が保存されていた。ホモロジーモデリングの結果を図2に示す。

BLAST 検索の結果、本グルタミン酸プロテアーゼは硬質きのこにおいて高く保存されていることが明らかとなった。本遺伝子のアミノ酸配列は、*Dichomitus squalens* の acid proteinase に対しては 87%、*Trametes versicolor* の aspergillopepsin に対しては 72%、そして、*Dichomitus squalens* の aspergillopepsin に対しては 70% の相同性を示すことが明らかした。

-1,3-グルカナーゼ (GIGH128A)

RACE PCR 法により、完全長 cDNA 配列を明らかにした。gDNA 配列と比較した結果、GIGH128A 遺伝子は7つのエキソンから構成されていた。次に、得られた核酸配列情報をもとに予想アミノ酸配列を決定した。予想アミノ酸配列は、22 アミノ酸からなるシグナルペプチドを含む 271 残基からなり、活性残基と推測される2つのグルタミン酸残基と2か所のジスルフィド結合に関与すると推測されるシステイン残基が保存されていた。

ホモロジーモデリングの結果、GIGH128A は、GH128 ファミリーが属する GH-A clan にみられる TIM barrel 構造を有し、活性中心を覆うようなループ構造 (Phe231-Thr262) が予想された。

予想アミノ酸配列情報を用いた系統樹解析の結果、GIGH128A は、多くが担子菌門であ

るクラスターに分類され、シイタケ由来の -1,3-グルカナーゼ (LeGLU1) と高い相同性を示した。

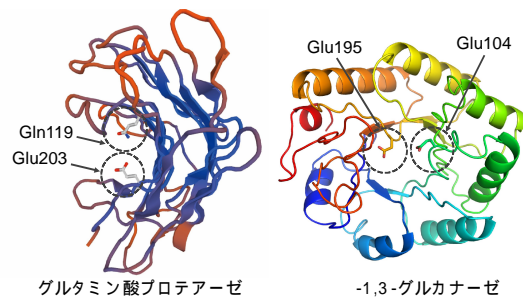


図2 予想アミノ酸配列を用いたホモロジーモデリング

(3) 生育ステージ及び保存期間における酵素遺伝子の発現

グルタミン酸プロテアーゼ (GIGPA) 遺伝子の発現

GIGPA 遺伝子は、菌糸体 (M)、子実体原基 (P)、成熟前の子実体 (FB)、収穫後 4 週間目の子実体 (HFB4) の4つのステージで比較的高い発現を示した。これまでの研究で、プロテアーゼは菌糸体形成に密接に関わり、形態形成に重要であることが報告されている [寺下隆夫・きのこの科学, 1, 9-25 (1994)]。これらのことから、菌糸体での発現量の増加は、菌糸体形成に深く関わっていると考えられる。また、子実体原基での発現量増加は、子実体発生に、成熟前子実体での発現量増加は、胞子形成に関与していることが考えられる。ヒラタケやブナシメジ、エノキタケでは過成熟や収穫後の貯蔵に伴い、酸性のプロテアーゼ活性が上昇し、鮮度低下が急速に進行していることが明らかになっている [中西洋子ら, 日本家政学会誌, 48, 131-136 (1997)、寺下隆夫ら, Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi, 42, 907-912 (1995)]。このことから、GIGPA は収穫後の鮮度低下にも関与していることが考えられた。

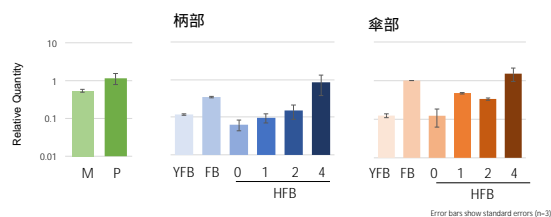


図3 各ステージにおける GIGPA 発現量

リアルタイム PCR により測定した各ステージにおける mRNA の発現量を示す。縦軸は、GIGPA 遺伝子発現量相対値、横軸はサンプル名を示す。平均 ± 標準偏差 n=3

-1,3-グルカナーゼ (GIGH128A) 遺伝子の発現

GIGH128A 遺伝子は、菌糸体から成熟子実体まで発現は低く、収穫後の子実体において高い発現を示した。-1,3-グルカナーゼは、きのこの細胞壁成分の分解、自己消化に関与するとともに機能性成分の分解、生成にも関

与すると考えられている。これまでの研究で GH128 に属し、機能解析が行われた酵素は、唯一、シイタケだけである。シイタケでは収穫後の老化に伴い発現が上昇することが報告されている [Yuichi Sakamoto et al. *Applied and environmental microbiology*, 77,8350-8354 (2011)] このことから、GH128 に属する α -1,3-グルカナーゼはきのこの老化、収穫後の貯蔵における鮮度低下に関与していることが考えられ、この発現は、きのこにおいて共通するものである可能性が示された。つまり、本酵素の発現の強弱は、きのこの貯蔵期間や鮮度安定のための指標になると考える。

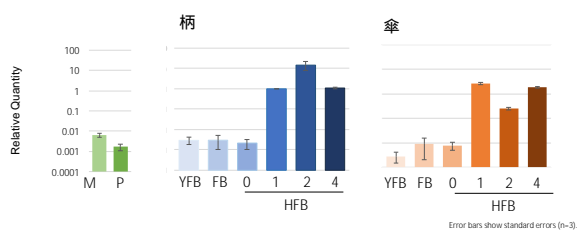


図4 各ステージにおける GIGH128A の発現量
リアルタイム PCR により測定した各ステージにおける mRNA の発現量を示す。縦軸は、GIGH128A 遺伝子発現量相対値、横軸はサンプル名を示す。平均 ± 標準偏差 n=3

本研究の結果から、これらのプロテアーゼ及びグルカナーゼは、マンネンタケのみならず、きのこにおける成熟や老化に深く関与していることが示唆され、これらの酵素の働きを明らかにすることは、きのこにおける鮮度保持に大きく貢献するものと考えられた。しかしながら、本研究では、目的(3)の達成には至っておらず、今後は、異種発現系を用いて、これらの酵素の特徴を明らかにすることが求められる。

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2件)

(1) 熊倉 慧、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 子実体からの α -1,3-グルカナーゼ遺伝子のクローニング、日本きのこ学会第20回大会、2016年9月9日、「静岡県男女共同参画センターあざれあ(静岡県静岡市)」

(2) 熊倉 慧、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 菌糸体からのグルタミン酸プロテアーゼ遺伝子のクローニング、日本きのこ学会第19回大会、2015年9月5日、「つくば国際会議場(茨城県つくば市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊倉 慧 (Kumakura Kei)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教
研究者番号：80516930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし