

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580106

研究課題名(和文)キノコ菌系の光応答遺伝子の全解析と一次代謝産物との相関性の評価

研究課題名(英文) Analysis of Photoresponse Genes of Mushroom Mycelia and Correlation with Primary Metabolites

研究代表者

小嶋 政信 (KOJIMA, Masanobu)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：20153538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：青色光刺激を与えたヒラタケ菌系の一次代謝産物を網羅的に解析した結果、鳥インフルエンザ特効薬として知られるタミフルの製造原料となるシキミ酸が、暗所培養菌系と比較して飛躍的に増加していることを見出した。

ヒラタケ菌系の一次代謝産物解析、遺伝子発現解析、並びにタンパク質発現解析結果に基づいて、このシキミ酸蓄積現象は、解糖系の律速反応酵素(6-ホスホフルクトキナーゼ)、ペントースリン酸経路の律速反応酵素(グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)並びにシキミ酸経路の律速反応酵素(DAHP合成酵素)の各発現量が増加したことに起因することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Shikimic acid is a key intermediate in the aromatic amino acid pathway as well as an important starting material for the synthesis of Tamiflu, a potent and selective inhibitor of the neuraminidase enzyme of influenza viruses A and B.

In oyster mushroom mycelia cultivated in the dark, stimulation with blue light-emitting diodes induces the accumulation of shikimic acid. An integrated analysis of primary metabolites, gene expression and protein expression suggests that the accumulation of shikimic acid caused by blue light stimulation is due to an increase in 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase (DAHPS), the rate-determining enzyme in the shikimic acid pathway, as well as phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, the rate-determining enzymes in the glycolysis and pentose phosphate pathways, respectively. This stimulation results in increased levels of phosphoenolpyruvic acid and erythrose-4-phosphate, the starting materials of shikimic acid biosynthesis.

研究分野：光生物学

キーワード：糸状菌の光応答 青色光刺激 シキミ酸蓄積 遺伝子発現制御 タンパク質発現制御 新規有用物質生産法の開発 一次代謝経路の光制御 発光ダイオード

1. 研究開始当初の背景

菌類の光応答現象に関する研究開始当初の研究には、モデル菌株のアカパンカビを用いた分子生物学的研究として、時計遺伝子発現に関与する青色光受容体と、その生体メカニズムの解明が進められていた (Schwerdtfeger, C., Linden, H. *EMBO J.*, 22, 4846-4855, 2003)。しかし、キノコ菌系の光応答遺伝子を網羅的に解析した研究例は国内外ともに知られていなかった。特に、光刺激を与える光源として、LEDを用いた菌類の光応答に関連する研究事例は、国内外においてきわめて少なかった。

LEDと食用キノコを組み合わせた国内の研究例では、マイタケ、エリンギおよびナメコを用いて、主として光照射が子実体の生体電位に及ぼす影響について解析されていた (平間ら, 植物環境工学, 20(2), 90-97, 2008 他)。また徳島県立農林水産総合技術支援センター森林林業研究所では、シイタケを供試菌とした形態形成・生長に関する研究が行われており、青色光の重要性に注目していた (阿部正範, 森林林業研究所研究報告第5号, 2006)。平成21年より長野県野菜花き試験場 (小山智行, 応用きのこ学会講演発表要旨2010, p44) や長野県林業総合センター (増野和彦, 応用きのこ学会講演発表要旨2010, p45) において、農林水産技術会議委託プロジェクト研究 (中核機関: 独立行政法人森林総合研究所) の中で関連研究が進められていた。光刺激が遺伝子発現に及ぼす影響を解析することにより、キノコ菌系の光応答メカニズムを解明する試みは、申請者らの研究が2010年に報告されたのち、日本きのこ学会大会 (2011年, 9月) で2件の研究発表がなされた状況であった。

2. 研究の目的

本研究代表者らによるこれまでの研究により、ヒラタケ菌系の生長は、青色光 (475 nm) 刺激により著しく抑制されることが明らかになった (図1)。

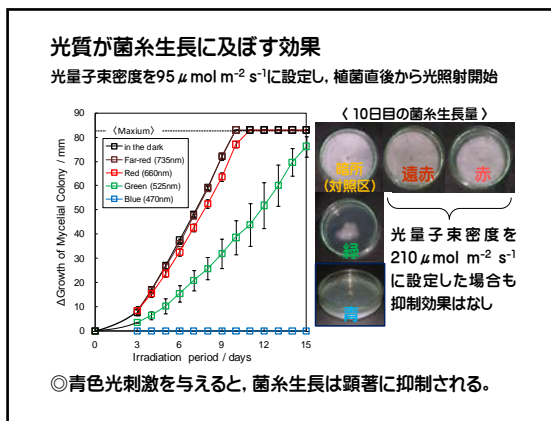


図1. 光質 (光波長) が菌系生長に及ぼす効果

ディフェレンシャルディスプレイ法を用いて、暗所培養した菌糸体コロニーと青色光刺激を与えた菌糸体コロニーの遺伝子発現量を比較して、青色光刺激により誘起された遺伝子15個と抑制された遺伝子13を発見した。これら28個の遺伝子が青色光に応答することは、国内外において始めて見出された知見であり大変興味深いが、ヒラタケの光応答遺伝子を全解析するためには、2009年秋に公開されたヒラタケのゲノム情報を基にして、DNAチップを作成し、時系列的に遺伝子発現解析をすることが不可欠であるとの認識に至った。[Nakano, Y., Fujii, H., Kojima, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2160-2165 (2010); Nakano, Y., Fujii, H., Kojima, M. *J. Light & Vis. Env.* 35, 90-94 (2011)].

さらに、ヒラタケ菌系の一次代謝産物に及ぼす青色光刺激の効果について、暗所・12時間照射・36時間照射の3サンプルで検討したところ、シキミ酸生成量が、暗所培養と比較して、青色光刺激によりそれぞれ約50倍、200倍に増加することを見出した (図2)。新型インフルエンザ特効薬の合成原料となるシキミ酸の生合成経路を、光刺激により制御できる可能性を示す極めて重要な知見であることから、制御機構の解明を目的として研究を開始した。

候補が絞り込まれた代謝化合物		HMT DB ¹			相対的面積比 ²			Comparative Analysis		
ID	Compound name	対象 光照射			Ratio ¹					
		0 h	12 h	36 h	OM-2 vs OM-1	OM-3 vs OM-1	OM-3 vs OM-2			
A_0048	Shikimic acid (シキミ酸)	2.0E-04	1.1E-02	4.2E-02	53	211	4.0			
A_0024	Glutaric acid	1.8E-04	1.9E-03	5.4E-03	11	31	2.9			
A_0074	Shikimate 3-phosphate	8.7E-05	3.7E-03	2.2E-03	42	26	0.6			
C_0047	Anthrnic acid	1.5E-04	1.2E-03	3.7E-03	8.1	25	3.1			
A_0036	Phenylpyruvic acid	1.0E-04	3.2E-04	1.7E-03	3.1	17	5.5			
C_0110	Adenosine	2.6E-04	1.2E-03	3.6E-03	4.7	14	3.0			
A_0020	Benzoic acid	8.7E-05	3.4E-04	1.2E-03	3.9	13	3.5			
A_0016	4-Oxovaleric acid	2.1E-04	5.9E-04	2.6E-03	2.8	12	4.3			

図2. 菌系の一次代謝産物に及ぼす青色光刺激の効果。

3. 研究の方法

(1) カスタマイズDNAチップ (マイクロアレイ) を用いる青色光応答遺伝子の完全解析

① 本研究代表者は、既にディフェレンシャルディスプレイ法を用いてヒラタケ菌系の光応答遺伝子を解析したが、本手法では光応答初期遺伝子を検出できていない可能性が高いこと、また時系列による遺伝子発現変化を完全追跡することが困難である。そこで、2009年末に公開されたヒラタケのゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/>) を基に、カスタマイズDNAマイクロアレイを作成し、短時間照射下における青色光応答遺伝子の解析を実施した。

②さらに、青色光照射時間を変えた菌糸体サンプルの遺伝子発現解析をおこない、光応答遺伝子がどのような順序で発現するか、或いは抑制されていくかを解明した。本解析実験は、DNAチップ研究所への委託解析により実施した。

(2) 相同検索による光応答遺伝子の機能解析
上記(1)により新規に見出された遺伝子については、BLAST 検索等を用いてコードされるタンパク質の機能を検索した。これらの情報をもとに、ヒラタケ菌糸の青色光応答メカニズムについて考察した。

(3) シキミ酸経路代謝産物に及ぼす光波長効果と光強度効果の解析

①ヒラタケ菌糸体への青色光刺激によるシキミ酸経路代謝産物生合成量変化を時系列で追跡した。

②遠赤色光、赤色光、緑色光刺激によるシキミ酸生合成量との違いを解析した。

③強度とシキミ酸生合成量との相関性を明らかにした。

(4) シキミ酸生合成に関わる律速反応酵素の発現量を測定し、律速反応酵素をコードする遺伝子の発現量と比較した。

(5) 以上の実験データを基に、青色光刺激によるシキミ酸蓄積現象のメカニズムを解析した。

4. 研究成果

①ヒラタケ菌糸の一次代謝産物に及ぼす青色光刺激の効果

暗所培養した後、光照射前のサンプル(OM-1)、青色光を12時間照射したサンプル(OM-2)と36時間照射したサンプル(OM-3)を調製した。図3は、3つのサンプルに含まれる約300種の一次代謝産物を分析し、各代謝産物濃度の平均値を0として規格化した解析結果を示している。光照射前のサンプルにおいて、平均値よりも濃度が高い代謝産物は赤の濃淡、平均値よりも濃度が低い代謝産物は緑の濃淡で示されている。

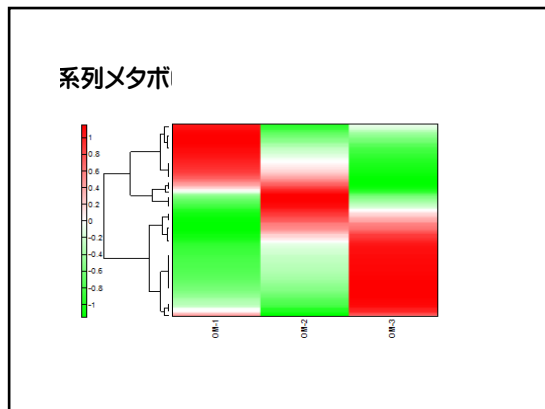


図3. 菌糸の一次代謝産物に及ぼす青色光刺激の効果

青色光刺激を与えると、暗所培養下では濃度が高い代謝産物が、光照射下では濃度が減少し、一方暗所培養下では、濃度の低い代謝産物が、光照射下では濃度が増加する様子が明瞭に確認された。青色光刺激を菌糸に与えた時に、最も蓄積量が増加した代謝産物は「シキミ酸」であることがわかった。

②シキミ酸生合成関連物質の時系列変化

シキミ酸は、生物の中で芳香族化合物が生合成される経路の重要な中間体として知られているが、最近では新型インフルエンザの治療薬として知られるタミフルの製造原料としても大変重要な物質として知られている。シキミ酸は、微生物や植物のなかで、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とエリトロース-4-リン酸(E4P)との縮合反応から合成が開始される(図4)。

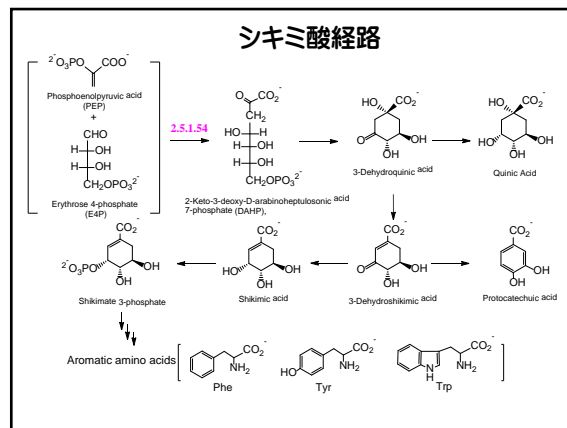


図4. シキミ酸生合成に関連する生体物質

図5に、シキミ酸合成に関連する代謝産物の濃度と光照射時間との相関性を示した。

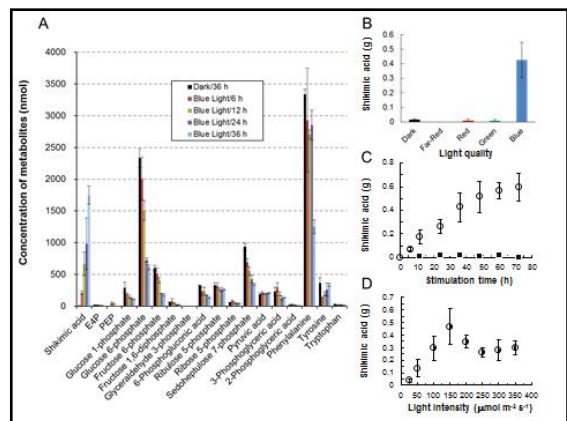


図5. (A) 青色光照射によるシキミ酸生合成関連生体物質濃度の時系列変化, (B) シキミ酸蓄積に及ぼす光波長効果, (C) シキミ酸蓄積濃度と青色光刺激時間との相関性, (D) シキミ酸蓄積濃度と青色光強度との相関性

暗所で36時間培養しても、シキミ酸濃度は増加しないが、青色光刺激とともに濃度が増

加することがわかる。一方、シキミ酸合成原料のE4PとPEP、またこれらの生合成に関連する代謝産物は青色光刺激とともに濃度が減少していることがわかる(図5A)。

シキミ酸濃度の増加は、青色光に特有な現象であり、遠赤色光、赤色光、緑色光では増加しない(図5B)。シキミ酸濃度は、光強度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ において、青色光照射36時間までは直線的に増加すること(図5C)、また青色光照射36時間では、光強度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ がシキミ酸蓄積に最適な光強度であることがわかる(図5D)。ヒラタケ菌糸へ青色光刺激を与えてシキミ酸を蓄積すると、シキミ酸と類似する生体物質の濃度は、ほとんど増加しないことが特徴である。

③シキミ酸生合成に関与する律速反応酵素をコードする遺伝子の発現解析

シキミ酸蓄積を引き起こす光の作用点を明らかにする為、シキミ酸経路の律速反応酵素である DAHP 合成酵素、シキミ酸原料を生合成する解糖経路の律速反応酵素である PFK、及びペントースリン酸経路の律速反応酵素である G6PD をコードする遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により解析した(図6)。

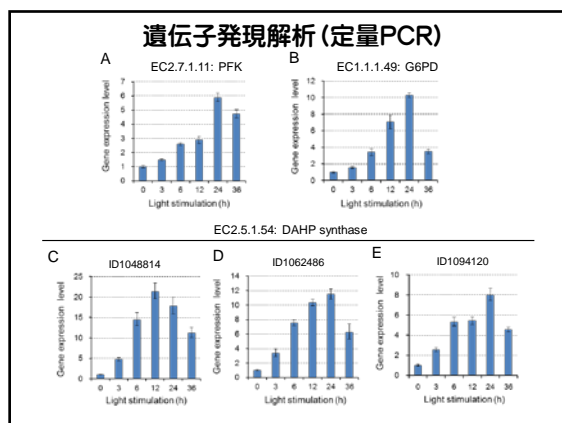


図6. 遺伝子発現解析

律速反応酵素 PFK と G6PD をコードする遺伝子の発現量は、いずれも青色光刺激により増加していることがわかった。DAHP 合成酵素には、3つのアイソザイムが知られているが、いずれのアイソザイムをコードする遺伝子も、青色光刺激により発現量が増加していることが確認された。

④ウエスタンブロットング法によるタンパク質の半定量解析

各律速反応酵素の一次抗体を作成し、ウエスタンブロットング法により各酵素の発現量を解析したところ、前述の遺伝子発現量と良い相関性を示すことが確認された(図7)。

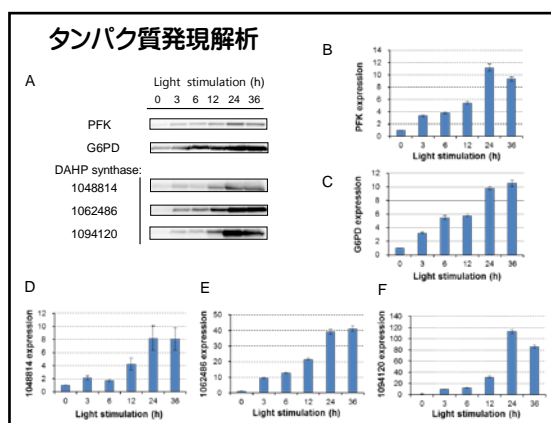


図7. タンパク質の発現解析

⑤結論

以上のことから、ヒラタケ菌糸への青色光刺激によるシキミ酸蓄積現象は、青色光刺激がシキミ酸合成原料を供給する解糖経路とペントースリン酸経路の律速反応酵素、並びにシキミ酸経路の律速反応酵素の発現量を増加させることに起因することが明らかになった。しかしながら、青色光刺激を与えると、菌糸がシキミ酸を蓄積する理由は不明のままである。シキミ酸蓄積に関わる本新発見は、「糸状菌から有用代謝産物を生産する方法」として、産業上の利用価値が大変高いことから、知財運用ファンド会社 LSIP との連携により、日本を含め世界11ヶ国に特許を出願している。

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 1件)

1. Kojima, M.; Kimura, N.; Miura, R., Regulation of Primary Metabolic Pathways in Oyster Mushroom Mycelia Induced by Blue Light Stimulation: Accumulation of Shikimic Acid., *Sci. Rep.* **5**, 8630; DOI:10.1038/srep08630 (2015). 査読有

[学会発表] (計 12件)

1. 小嶋政信・木村仁奈子・三浦竜平, キノコ菌糸のシキミ酸経路を青色光刺激で制御する, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県), 2A37p17 (2015年3月27日)
2. 木村仁奈子・小嶋政信・市村昌紀・三原聡, 青色光刺激によるシキミ酸蓄積能の高いキノコ菌糸のスクリーニング, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山県), 2A37p18 (2015年3月27日)
3. 小嶋政信・木村仁奈子・三浦竜平, ヒラ

タケ菌系の青色光応答：シキミ酸蓄積メカニズムの解明，第 87 回日本生化学会大会，国立京都国際会館（京都府），4T08p-08（4P-480）（2014 年 10 月 18 日）

4. 小嶋政信・木村仁奈子・三浦竜平，青色光刺激が及ぼす遺伝子発現とタンパク質発現によるヒラタケ菌系のシキミ酸蓄積，日本生物環境工学会 2014 年大会，明治大学（東京都）A08（2014 年 9 月 9 日）

5. 小嶋政信・三浦竜平・三原聡・市村昌紀，青色光刺激を与えて糸状菌から有用物質を生産する，第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス，つくば国際会議場（茨城県），0-12（2013 年 11 月 20 日）

〔図書〕（計 1 件）

1. 小嶋政信，花の色と天然色素，朝倉書店，「光化学の事典」，8.1 節 生物の光吸収，蛍光と発光(1)：308-309（2014）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：糸状菌から有用物質を生産する方法

発明者：小嶋政信，藤井博

権利者：国立大学法人信州大学

LSIP ファンド運営合同会社

種類：特許

番号：PCT/JP2012/070017

出願年月日：2012 年 8 月 6 日

国内外の別：国際出願

〔その他〕

ホームページ等

○光制御化学研究室

<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/kojima/>

○信州大学研究者総覧

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.gmSFjakh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 政信 (KOJIMA, Masanobu)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：20153538

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤井 博 (FUJII, Hiroshi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：90165340