

## 農学部特別研究費

### 平成 24 年度 研究経過報告書

研究者名

福田 泰久

研究課題名

きのこ類の子実体形成に関与するプロテアーゼ群の遺伝子学的解析

#### 研究目的・内容

本研究では、きのこ類が生産するプロテアーゼ群の遺伝子クローニングおよび塩基配列とアミノ酸配列の決定、各プロテアーゼ遺伝子の発現時期の解明を目的とした。本年度は、シイタケとブナシメジを主な供試菌株として用い、菌体外、菌糸体内および子実体内由来の酸性・メタルプロテアーゼの精製と N 末端アミノ酸配列の決定を行った。

#### 研究の経過

きのこ類微生物における、栄養菌糸の状態からの子実体形成という大きな形態的变化の生化学的なメカニズムは、現在でも未解明のままである。寺下らは、きのこ類における種々のプロテアーゼの働きは、「子実体形成の制御因子」としての機能をもち、そのメカニズムに深く関与することを明確にした。しかしながら、これらプロテアーゼをコードする塩基配列、アミノ酸配列（タンパク一次構造）、また、きのこ生長過程における種々のプロテアーゼ遺伝子の発現時期は、いずれのきのこにおいても未解明のままであるため、本研究を開始した。シイタケ (*Lentinula edodes*) 由来プロテアーゼは、菌体外酸性プロテアーゼ、菌糸体内酸性プロテアーゼと菌糸体内中性プロテアーゼを精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した（日本きのこ学会 第 16 回大会、日本菌学会西日本支部 2012 年度支部大会 口頭発表）。しかしながら、それぞれのプロテアーゼ遺伝子全配列の決定は未だ完了しておらず、現在継続中である。今年度まで供試菌株として用いてきた *L. edodes* TMI563 株は、子実体の形成が非常に不安定であり、子実体由来プロテアーゼの精製をすることができなかった。現在は供試菌株を変更し、比較的子実体が容易に形成される *L. edodes* 森 465 株を用いて酵素精製および遺伝子クローニング実験を行っている。本菌株子実体由来メタルプロテアーゼを SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製し、現在 N 末端アミノ酸配列を京都大学農学部において解析中である。

ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) の人工栽培工程における芽だし操作、または熟成菌糸体の移植が栽培工程中のプロテアーゼ活性にどのような関わりをもつか検討を行った（日本きのこ学会第 16 回大会、日本菌学会西日本支部 2012 年度支部大会、口頭発表）。それぞれ 5 つの栽培処理区を設け、1. 培養開始より 40 日目に熟成菌糸移植、2. 培養開始 40 日目に芽だし操作、3. 培養開始 50 日目に芽だし操作、4. 培養開始 70 日目に芽だし操作（通常栽培法）、5. 芽だし操作を行わない、以上の栽培区における菌体内外酸性及び中性プロテアーゼ活性の経時変化を測定した。その結果、芽だし操作を行った後に子実体の形成に伴ってすべてのプロテアーゼが活性化されることが本実験によって明確になった。熟成菌

糸移植の効果は本菌株においてはあまり影響がみられなかった。子実体形成期の菌体内中性プロテアーゼを精製して酵素化学的諸性質の検討を行った。本酵素は、PMSF、Aprotinine、EDTA などの阻害剤に対して感受性を示した。メタルプロテアーゼの特異的阻害剤である Phosphoramidon には感受性を示さなかった。N 末端アミノ酸配列 (15 残基) は、*H. marmoreus* の子実体由来セリンプロテアーゼと 100%一致した。酵素化学的性質においても同一性を示したため、菌糸体と子実体では同一のプロテアーゼが存在していることが明らかとなった。芽だし操作後から菌糸体内で活性化される中性プロテアーゼ群 (無細胞抽出液) に対する、PMSF と EDTA の影響を検討した結果、それぞれ阻害活性を示すものの、完全な失活はみられなかった。また、Phosphoramidon が本無細胞抽出液に対して阻害活性を示したことから、芽だし操作後に活性化される中性プロテアーゼ群は、精製されたセリンプロテアーゼ以外にも存在していることが明確となった (日本きのこ学会誌、投稿中)。

#### 本研究と関連した今後の研究計画

- ・シイタケ; 子実体形成が不安定である *L. edodes* TMI563 株から、*L. edodes* 森 465 株へ菌株を変更して各種プロテアーゼの酵素精製および遺伝子のクローニング実験を継続して行う。酵素精製は計画書通りの手法で行い、N 末端アミノ酸配列決定後、遺伝子クローニングは 2012 年に公開されたシイタケのゲノム配列を参考に行う。

- ・ブナシメジ; 芽だし操作後に活性化されるプロテアーゼ群の酵素精製と遺伝子クローニングを行う。また、芽だし操作における菌かき、低温刺激、光照射の 3 種の物理的刺激的のそれぞれが与えるプロテアーゼの誘導および遺伝子発現の解析を行う。上記に示した物理的刺激は経験的な作業により「芽だし操作」とされているが、現在までにプロテアーゼ活性の様な生化学的知見と関連させたデータは報告がない。

(平成 25 年 3 月 31 日現在)