

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名 (本 国 籍)   | 小 田 亜 紀 (神奈川県)  |
| 学 位 の 種 類     | 博士 (農学)   |
| 学 位 記 番 号     | 農博甲第 234 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 13 年 9 月 13 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |
| 研 究 科 及 び 専 攻 | 連合農学研究科<br>生物資源科学専攻   |
| 研究指導を受けた大学    | 信州大学  |
| 学 位 論 文 題 目   | 担子菌の子実体形成過程に特異的に発現するタン<br>パク質の解析  |
| 審 査 委 員 会     | 主査 信州大学 教授 柴 井 博四郎<br>副査 信州大学 助教授 千 菊 夫<br>副査 岐阜大学 教授 中 村 征 夫<br>副査 静岡大学 教授 岡 部 満 康<br>副査 信州大学 教授 大 政 正 武 |

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

子実体の形成は、生活環の他の段階と比べて非常に特徴的な大きさや形態をもつ器官を作り上げる、形態的に著しい変化を示す現象である。また、食料資源として産業的な観点からも重要である。しかし、子実体形成に関わる遺伝子や、それら遺伝子の役割、遺伝子産物の機能、などの分子レベルでの子実体形成のメカニズムは、よくわかっていない。本研究は、担子菌類の子実体形成に関わるタンパク質を解析し、子実体形成の分子生物学的なメカニズムを解明する目的で行ったものである。

実験ではまず第 1 に、エノキタケ子実体形成過程におけるタンパク質の発現を SDS-PAGE によって分析し、子実体に大量に発現するタンパク質について分子的な特徴を明らかにした。SDS-PAGE によって、子実体に大量に発現する 34, 27, 17 kDa タンパク質を見いだした。これらのうち、34 kDa タンパク質と 17 kDa タンパク質を精製し、N 末端アミノ酸の配列の解析を行ったが、2 つのタンパク質はいずれも N 末端アミノ酸が修飾されていて、解析できなかった。17 kDa タンパク質について、内部部分アミノ酸配列を解析し、LYDDVVPK および FADENFQLK という配列を得た。これらの配列はペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼの一種であるサイクロフィリンと一致し、17 kDa タンパク質がサイクロフィリンであることが明らかになった。

サイクロフィリンは、情報伝達にかかわり、免疫抑制剤サイクロスポリン A と複合体を形成してカルシニューリンを阻害し、免疫を抑制する。また、ペプチド中のプロリンペプチド結合のシス体とトランス体を変換する異性化酵素でもあるという 2 つの面をもつ。以上のことから、子実体形成における 17 kDa タンパク質の役割は、低温という情報の伝達に関わって細胞を子実体形成へ向かわせる、または、低温状況下において細胞内のタンパク質を変性から保護し、そのことによって細胞の生存を維持する役割を担っている、の

2通りの可能性がある。17 kDa タンパク質が比較的大量に発現することから、前者の可能性は低いと考えられる。

第 2 に、サイクロフィリンの阻害剤であるサイクロスポリン A の、エノキタケへの栄養生長と子実体形成への影響を調べることによって、サイクロフィリンの生理的な役割を解析した。

サイクロスポリン A は 25℃における菌糸生長にはほとんど影響しなかった。しかし、13℃および 4℃における生長は阻害した。25℃から 13℃または 4℃への温度シフトによって誘導される子実体形成も阻害された。このことはサイクロフィリンのストレスタンパク質としての性質を示している。サイクロフィリンは子実体形成をになう諸タンパク質の低温下における活性保持に働くストレスタンパク質であると思われる。

また、サイクロスポリン A の他の微生物に及ぼす効果をエノキタケの場合と比較検討するために、原核生物として大腸菌、真核生物として、キノコに近い 2 種類の酵母、すなわち出芽酵母と分裂酵母を、またさらにキノコ類としてヒラタケ、ナメコ、タモギタケに対するサイクロスポリン A の影響を調べた。サイクロスポリン A の微生物に及ぼす影響は、3 種類に大別できると考えられる。第 1 はまったく影響を受けない大腸菌、第 2 は、サイクロスポリン A 高感受性の *F. oxysporum*, *A. niger*, 及びヒラタケ、ナメコ、タモギタケ、第 3 は、サイクロスポリン A 低感受性の出芽酵母、分裂酵母とエノキタケである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

子実体の形成は、生活環の他の段階と比べて非常に特徴的な大きさや形態をもつ器官を作り上げる、形態的に著しい変化を示す現象である。また、食料資源として産業的な観点からも重要である。しかし、子実体形成に関わる遺伝子や、それら遺伝子の役割、遺伝子産物の機能、などの分子レベルでの子実体形成のメカニズムは、よくわかっていない。本研究は、担子菌類の子実体形成に関わるタンパク質を解析し、子実体形成の分子生物学的なメカニズムを解明する目的で行ったものである。

実験ではまず第 1 に、エノキタケ子実体形成過程におけるタンパク質の発現を SDS-PAGE によって分析し、子実体に大量に発現するタンパク質について分子的な特徴を明らかにした。SDS-PAGE によって、子実体に大量に発現する 34, 27, 17 kDa タンパク質を見いだした。これらのうち、34 kDa タンパク質と 17 kDa タンパク質を精製し、N 末端アミノ酸の配列の解析を行ったが、2 つのタンパク質はいずれも N 末端アミノ酸が修飾されていて、解析できなかった。17 kDa タンパク質について、内部部分アミノ酸配列を解析し、LYDDVVPK および FADENFQLK という配列を得た。これらの配列はペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼの一種であるサイクロフィリンと一致し、17 kDa タンパク質がサイクロフィリンであることが明らかになった。

サイクロフィリンは、情報伝達にかかわり、免疫抑制剤サイクロスポリン A と複合体を形成してカルシニューリンを阻害し、免疫を抑制する。また、ペプチド中のプロリンペプチド結合のシス体とトランス体を変換する異性化酵素でもあるという 2 つの面をもつ。以上のことから、子実体形成における 17 kDa タンパク質の役割は、低温という情報の伝達に関わって細胞

を子実体形成へ向かわせる、または、低温状況下において細胞内のタンパク質を変性から保護し、そのことによって細胞の生存を維持する役割を担っている、の2通りの可能性がある。17 kDa タンパク質が比較的大量に発現することから、前者の可能性は低いと考えられる。

第2に、サイクロフィリンの阻害剤であるサイクロスポリン A の、エノキタケへの栄養生長と子実体形成への影響を調べることによって、サイクロフィリンの生理的な役割を解析した。

サイクロスポリン A は 25℃における菌糸生長にはほとんど影響しなかった。しかし、13℃および 4℃における生長は阻害した。25℃から 13℃または 4℃への温度シフトによって誘導される子実体形成も阻害された。このことはサイクロフィリンのストレスタンパク質としての性質を示している。サイクロフィリンは子実体形成をになう諸タンパク質の低温下における活性保持に働くストレスタンパク質であると思われる。

また、サイクロスポリン A の他の微生物に及ぼす効果をエノキタケの場合と比較検討するために、原核生物として大腸菌、真核生物として、キノコに近い2種類の酵母、すなわち出芽酵母と分裂酵母を、またさらにキノコ類としてヒラタケ、ナメコ、タモギタケに対するサイクロスポリン A の影響を調べた。サイクロスポリン A の微生物に及ぼす影響は、3種類に大別できると考えられる。第1はまったく影響を受けない大腸菌、第2は、サイクロスポリン A 高感受性の *F. oxysporum*, *A. niger*, 及びヒラタケ、ナメコ、タモギタケ、第3は、サイクロスポリン A 低感受性の出芽酵母、分裂酵母とエノキタケである。

このように本論文では、エノキタケの子実体に発現するタンパク質を検索し、その機能および生理的な役割について解析し、子実体形成について興味深い知見が得られた。

以上の結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 小田亜紀, 千菊夫, 黒澤辰一 (2001). エノキタケの子実体形成に関連したタンパク質の解析. 日本農芸化学会誌 75, 21~28.
- 2) 小田亜紀, 中井亮介, 千菊夫, 黒澤辰一 (2001). エノキタケ(*Flammulina velutipes*)の子実体形成におけるサイクロフィリンの役割. 生物工学会誌 79, 127~132.