

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2022 年 4 月 21 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 農学研究科

職 名 特定准教授

氏 名 河内 護之

助 成 の 種 類	令和 3 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	困材腐朽菌細胞壁の構造と木材分解における役割の解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) ヒラタケPleurotus ostreatusの $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の同定と機能解析, ○名和 義順1、河内 護之1、中沢 威 人1、坂本 正弘1、阿部 敬悦2、田中 千尋1、吉見 啓1、本田 与一1 (1京大院・農、2東北大院・農) Fungal Cell Wall Integrity and Its Industrial Application, Akira Yoshimi, Ken Miyazawa, Moriyuki Kawauchi, Keietsu Abe, Journal of Fungi, in press			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		精密天秤	319,297	
		小型機器等	221,243	
		旅費	51,320	
事務用品及びソフト		394,413		
デジタル書籍	13,727			
当財団の助成に つ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) おかげさまで、2022年度の科研費(基盤C)を取得することができました。この度の研究支援御礼申し上げます。			

## 成果の概要／河内護之

### 【緒言】

白色腐朽菌ヒラタケは担子菌門に属する糸状菌であり、自然界では木材を分解し利用することで生活する。木質成分の分解利用は、菌体の細胞表層における分解酵素と分解物の出入りを介して進行すると予想される。しかしながら、このメカニズムにどのような細胞構造あるいは分子が関与しているかはほとんど未知である。一方、糸状菌菌糸の細胞表層には、不溶性多糖から構成される細胞壁と呼ばれる強固な構造が存在する。したがって、ヒラタケの細胞壁は木材分解の最前線で機能する細胞構造であり、細胞壁と木材のインターフェイスで繰り広げられるやり取りを理解することは、白色腐朽菌の生態を理解する極めて重要な課題と考えた。一方、白色腐朽菌を含む担子菌細胞壁の研究を俯瞰すると、これまでその構造や機能に関する研究はほとんど展開されていない。そこで、担子菌細胞壁の構成成分とその機能という新たな視点で白色腐朽菌の生理生態に迫ることにした。本研究課題では、その萌芽的研究として $\alpha$ グルカンと呼ばれる細胞壁成分に着目し、ヒラタケにおける合成遺伝子の同定と機能解析を実施した。

### 【実験方法】

まず、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* 20b 株（野生株）の細胞壁成分を熱水アルカリ抽出法により分画し、細胞壁中に $\alpha$ グルカンが存在することを確認した。続いて、 $\alpha$ グルカン合成酵素遺伝子 (*ags*) の同定を行った。*ags* は、担子菌門と進化的に離れた子囊菌門で既に同定されており、その一例である *Aspergillus oryzae* ゲノムには、*ags* が3つコードされている。そこで、ヒラタケゲノム情報に対する *A. oryzae ags* アミノ酸配列を参照配列とした BLAST サーチを実施した。その結果、1つの *ags* ホモログ（以下 *agsA*）が同定された。この結果を踏まえ、本研究では *agsA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta agsA$ ) を作成し、その機能解析を実施した。まず、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いた観察により、野生株と  $\Delta agsA$  株との細胞壁構造を比較した。続いて、 $\Delta agsA$  株細胞壁成分を熱水アルカリ抽出法により分画し、各画分の構成単糖を分析した。また、野生株と  $\Delta agsA$  株を用いて液体振盪培養、キチン合成阻害剤 (calcofluor white)、 $\beta$ グルカン合成阻害剤 (micafungin) 含有プレート上での培養を行い、その形態変化及び薬剤耐性を解析した。さらに、リグニン分解能を調べるため、 $\Delta agsA$  株を木粉培地上で培養し、Klason 法によって培養後の残存リグニン量を定量した。

### 【結果及び考察】

電子顕微鏡を用いた観察により、 $\Delta agsA$  株では菌糸密度の低下及び細胞壁が薄くなることが明らかとなった。また、細胞壁分画実験では $\alpha$ グルカンを含む画分の減少が確認され、*agsA* が $\alpha$ グルカン合成に寄与していることが示唆された。続いて  $\Delta agsA$  株を用いて液体振盪培養並びに細胞壁の必須成分であるキチンの合成阻害を行った。その結果、液体培養時には、野生株に見られない菌糸塊形成が確認された。加えて、キチン、 $\beta$ グルカン合成阻害剤への耐性低下が確認された。したがって、細胞壁構造が変化することで、菌糸凝集性や細胞壁合成阻害剤への耐性などの機能に変化が生じたことが示唆された。最後に、 $\Delta agsA$  株を用いて20日及び30日間の木粉培養を行い、培地中のリグニン減少率を解析した。結果、20日間ではリグニン分解能の軽微な減少傾向が確認されたが、30日間では野生株との間に大きな差は確認されなかった。