キノコの生理学的機能の活用に関する基礎的研究

A fundamental study on utilization of physiological functions of mushroom

2012

工藤卓伸

新潟大学大学院 自然科学研究科 博士後期課程

生命・食料科学専攻

目次

略語一覧 vi

緒論 1

第 1 章 キノコの香気生合成機構の解明
緒論 3

第 1 章第 1 節 ER の精製および諸性質の解明
1 緒言 9
2 実験材料および実験方法 10
2-1 実験材料および試薬
2-2 粗酵素液の調製
2-3 ER 活性の測定
2-4 反応生成物の分析
2-5 ER の精製
2-6 SDS-PAGE
3 結果 14
3-1 様々なキノコの ER 活性および反応生成物
3-2 ヒラタケ ER の精製
3-3 分子量
3-4 補酵素要求性
3-5 pH および温度の影響
3-6 金属イオンの影響
3-7 基質特異性
4 考察 26
4-1 キノコの ER
4-2 ER の精製
4-3 ER の諸性質

第 1 章第 2 節 *Poer1* と *Poer2* 遺伝子の解析
1 緒言 30
2 実験材料および実験方法 31
2-1 実験材料および試薬
2-2 Edman 分解による内部アミノ酸の解析

2-3　質量分析による内部アミノ酸配列の解析
2-4　Total RNA の抽出
2-5　cDNA クローニング
2-6　DNA シーケンシング
2-7　バイオインフォマティクス解析
2-8　定量的 Real-time RT-PCR
2-9　ER 活性の測定
2-10　香気の分析
3 結果 37
3-1　内部アミノ酸配列の解析
3-2　ERI と II をコードする遺伝子の解析
3-3　ER 活性、3-オクタノン量、*Poer1* および *Poer2* 発現量の季節的変化
4 考察 50
4-1　PoER1 と PoER2 の構造
4-2　3-オクタノン生合成における PoER の役割

第 1 章第 3 節　1-オクテン-3-オール生合成における LOX とリノール酸代謝物の関係
1 緒言 56
2 実験材料および実験方法 57
2-1　実験材料および試薬
2-2　LOX 活性の測定
2-3　LOX 反応生成物の分析
2-4　HPOD 異性体の調製
2-5　基質添加による 1-オクテン-3-オール生成量の変化
2-6　定量的 Real-time RT-PCR
2-7　脂肪酸の分析
2-8　ヒドロペルオキシドの定量
2-9　バイオインフォマティクス解析
3 結果 60
3-1　様々なキノコの LOX 活性および反応生成物
3-2　リノール酸および HPOD の添加が 1-オクテン-3-オール生合成におよぼす影響
3-3　ヒラタケにおける LOX 活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量の季節的変化

4 考察 68
4-1 キノコの 1-オクテン-3-オール生合成におよぼすリノール酸代謝物の影響
4-2 菌類の LOX
4-3 LOX 活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量の季節的変化
4-4 菌類の DOX

第 1 章第 4 節 ヒラタケにおける揮発性 C8 化合物の酸化還元反応
1 緒言 82
2 実験材料および実験方法 83
2-1 実験材料および試薬
2-2 揮発性 C8 化合物の季節的変化
2-3 粗酵素液に添加した揮発性 C8 化合物の経時的変化
3 結果 84
3-1 揮発性 C8 化合物の季節的変化
3-2 外因性基質の添加による揮発性 C8 化合物生成量の季節的変化
3-3 粗酵素液における揮発性 C8 化合物の経時的変化
4 考察 95
4-1 揮発性 C8 化合物の季節的変化
4-2 揮発性 C8 化合物の酸化還元反応

第 1 章第 5 節 ヒラタケの異なる組織における香気生合成機構
1 緒言 101
2 実験材料および実験方法 102
2-1 実験材料および試薬
2-2 ヒラタケ菌糸体の培養
2-3 粗酵素液の調製
2-4 LOX 活性の測定
2-5 ER 活性の測定
2-6 定量的 Real-time RT-PCR
2-7 可溶性タンパク質量の測定
2-8 香気の分析
3 結果 104
4 考察 107

第 1 章 総合討論 109

第 2 章 ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構の解明
緒論 113

第 2 章第 1 節 *pdi* 遺伝子の塩基配列の解析と機能の推定
1 緒言 119
2 実験材料および実験方法 120
2-1 実験材料および試薬
2-2 菌糸体の培養
2-3 Total RNA の抽出
2-4 cDNA クローニング
2-5 デリーション
2-6 DNA シーケンシング
2-7 バイオインフォマティクス解析
3 結果 125
3-1 *pdi* 遺伝子の解析
3-2 PDI タンパク質の機能の推定
4 考察 137
4-1 リン酸エステル加水分解酵素
4-2 トランスポーター
4-3 栄養素の分解
4-4 菌糸生長および付着
4-5 レクチン
4-6 ストレス応答タンパク質
4-7 ミトコンドリア局在タンパク質
4-8 細胞核局在タンパク質
4-9 機能未知の分泌タンパク質
4-10 ナメコ菌糸体のリン酸欠乏適応機構

第 2 章第 2 節 ナメコ由来クラス I ハイドロフォビンの界面活性剤としての利用
1 緒言 162
2 実験方法 164
2-1 実験材料および実験試薬
2-2 GST-PNH1 発現用大腸菌の作製
2-3 組換えタンパク質の発現誘導

2-4　GST-PNH1 の精製
2-5　抗 GST-PNH1 抗血清の作製および精製
2-6　ハイドロフォビンの単量体化 (TFA-EtOH 処理)
2-7　SDS-PAGE
2-8　ウェスタンブロット解析
2-9　菌糸体、子実体、廃菌床からのハイドロフォビンの抽出
2-10 乳化試験
3 結果 169
3-1　GST-PNH1 の発現
3-2　アフィニティークロマトグラフィーによる GST-PNH1 の精製
3-3　抗 GST-PNH1 抗血清の作製および精製
3-4　PNH1 の単量体化
3-5　GST-PNH1 の乳化活性
3-6　P−培養したナメコ N2 株菌糸体における PNH1 の発現
3-7　ナメコ子実体および廃菌床からのハイドロフォビンの抽出
3-8　ナメコから抽出したハイドロフォビンの乳化活性
4 考察 183
4-1　大腸菌によるクラス I ハイドロフォビンの発現
4-2　GST-PNH1 の特性
4-3　P−培養したナメコ N2 株菌糸体における PNH1 発現量の変化
4-4　ナメコ子実体および廃菌床から抽出したハイドロフォビンの利用

第 2 章 総合討論 192

総括 194

参考文献 197

謝辞 247

Supplemental figures 248

略語一覧

ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosine diphosphate
AOS	Allene oxide synthase
ATP	Adenosine triphosphate
BHT	Butylated hydroxytoluene
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovine serum albumin
C6	Six-carbon
C8	Eight-carbon
C9	Nine-carbon
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	Complementary DNA
CipC	Concanamycin-induced protein C
CVNH	Cyanovirin-N homolog
DES	Divinyl ether synthase
DiHOD	Dihydroxyoctadecadienoic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOX	Dioxygenase
EAS	Epoxy alcohol synthase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Enone reductase
EST	Expression sequence tag
EtOH	Ethanol
FAME	Fatty acid methyl esters
FID	Flame ionization detector
GC	Gas chromatography
GroPCho	Glycerophosphocholine
GroPIns	Glycerophosphoinositol
GST	Glutathione *S*-transferase
HOD	Hydroxyoctadecadienoic acid
HOM	Hydroxyoctadecenoic acid
HPL	Hydroperoxide lyase
HPLC	High performance liquid chromatography

HPOD	Hydroperoxyoctadecadienoic acid
HRP	Horse radish peroxidase
HSP	Heat shock protein
IgG	Immunoglobulin G
IPR	InterPro record
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
IR	Infrared
JGI	Joint Genome Institute
KIP	Ketoisophorone
LDS	Linoleate diol synthase
LOX	Lipoxygenase
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization
MAP	Mitogen-activated protein
MFS	Major facilitator superfamily
MnLOX	Manganese LOX
mRNA	Messenger RNA
MS	Mass spectrometry
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N.D.	Not detected
NLS	Nuclear localization signal
ODA	Oxo decenoic acid
ORF	Open reading frame
OYE	Old yellow enzyme
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Phosphate deficiency-inducible
Ppo	Psi-producing oxygenase
PSD	Phosphatidylserine decarboxylase
Psi	Precocious sexual inducer
PSSM	Position-specific scoring matrix
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RACE	Rapid amplification of cDNA
rDNA	Ribosomal DNA
RLM	RNA ligase-mediated

RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
RTase	Reverse transcriptase
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGD	*Saccharomyces* Genome Database
SPITC	4-Sulfophenyl isotiocyanate
TBST	Tris buffered saline containing Tween 20
TFA	Trifluoroacetic acid
TOF	Time of flight
TPP	Triphenylphosphine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDP	Uridine diphosphate glucose

緒論

菌類とは菌界 Fungi に属する生物の総称である。現在、約 8 万種の菌類が発見されているが、推定される現存種は少なく見積もって約 150 万種とも言われ、昆虫に次いで生物の世界で 2 番目に大きな生物群となっている (Hawksworth, 2001)。

菌類と細菌類は微生物として一括りに扱われる場合もあるが、前者は真核生物、後者は原核生物であり、細胞構造が全く異なる生物群である。菌類は運動性がなく細胞壁を持つことなどから、古くは植物界に分類されていた。しかし、植物はセルロースからなる細胞壁を持つ独立栄養生物であるのに対し、菌類は主にキチンからなる細胞壁を持つ従属栄養生物である。これらのことから、Whittaker (1969) は生物を栄養摂取方法などで分類した五界説を提唱し、現在では菌類は独立した生物群として認められている。

菌界の分類には、古くは Ainsworth (1973) による形態的分類体系が使用されていたが、近年では Hibbett ら (2007) によって分子系統学的手法から導かれた分類が主に使用されている。現在、菌類は 7 門と上位分類不明の 4 亜門に大別されているが、所属不明な菌類も多く存在しており、今も未解明な部分が多い生物である。菌類のうち、多くは Dikarya 亜界の子嚢菌門もしくは担子菌門に属しており、それぞれ約 30,000 種以上の菌類が発見されている (Kirk et al., 2001)。これらは酵母、カビ、キノコといった多様な生活様式を取っており、比較的高等な菌類として知られている。

キノコは一般的に担子菌や子嚢菌が作る比較的大型の子実体の通称と定義されている。ここでいう大型に明確な基準は無いが、肉眼で存在がはっきり確認できる程度の大きさのものをキノコという場合が多い。子実体は胞子を形成、散布する器官であり、典型的には傘と柄が分かれた形状であるが、他にも棍棒状、サンゴ状、耳たぶ状、球状など様々な形状が知られている。

キノコの生活方法は大きく 3 つに分類される。1 つ目は生物遺体や老廃物を基質として分解する腐生という方法である。キノコの多くは枯死した植物を基質として使用し、シイタケ *Lentinula edodes*、エノキタケ *Flammulina velutipes*、ブナシメジ *Hypsizigus marmoreus* など、人工栽培されているキノコの多くが腐生性である。2 つ目はマツタケ *Tricholoma matsutake* やホンシメジ *Lyophyllum shimeji* などが行う共生という方法で、植物の根と菌根と呼ばれる器官を形成し、植物との栄養授受によって生育する方法である。そして 3 つ目は、冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* などでも知られるように、昆虫などの宿主を栄養源とし、害を与える寄生という方法である。しかし、共生や寄生は、視点によって宿主との利害関係が変わってしまうことから、近年では腐生栄養、活物栄養、殺生栄養という概

念も生まれてきている (Cooke and Whips, 1993)。

生態系において、菌類は分解者として大きな役割を果たす。植物を構成するリグニンやセルロース、高次構造のタンパク質などは、菌類等の手助けによって簡単な構造の物質に分解され、再度植物の生長のために使われる。キノコが菌体外に分泌する酵素は有機物を効率よく分解する能力に優れているが、このような分解能はヒトの食生活にも応用されており、醤油や味噌はコウジカビ属 *Aspergillus* spp.、鰹節はカワキコウジカビ *Eurotium herbariorum*、チーズはアオカビ属 *Penicillium* spp.の発酵能を利用して生産されている。また、これらの菌が生産する酵素や化合物はバイオテクノロジー産業でも応用されており、洗剤や繊維加工、デンプン加工、飼料添加物など日常生活品への利用から、抗生物質や免疫抑制剤など医薬品などでも利用されている (国立科学博物館, 2008)。

さらに、菌類の中には真核細胞を研究する上で重要なモデル生物がいくつか存在する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は真核細胞のモデル生物として古くから利用されており、細胞周期、細胞分裂、シグナル伝達経路、染色体構造などの解明において重要な役割を果たしてきた。さらに、出芽酵母 *S. cerevisiae* S288C 株は 1996 年に真核生物として初めて全ゲノム塩基配列が発表され (Goffeau et al., 1996)、近年の分子生物学的研究の発展に大きく貢献した生物でもある。また、アカパンカビ *Neurospora crassa* を使用した栄養要求株の研究では、一遺伝子一酵素説という遺伝学的に重要な発見も行われており (Beadle and Tatum, 1941)、現在でも多くの研究者が真核生物のモデル生物として菌類を研究している。

上記の応用例は主に子嚢菌であり、担子菌 (キノコ) の産業的応用例は少ない。植物バイオマス変換やバイオレメディエーションなどでは、白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* が良く研究されており、この担子菌由来のセルラーゼやヘミセルラーゼは工業的にも利用されている (宍戸, 2002; 国立科学博物館, 2008)。また、ブクリョウ *Poria cocos*、チョレイ *Polyporus umbellatus*、レイシ (*Ganoderma lucidum* and *Ganoderma japonicum*) など、漢方薬として使用されているキノコも知られている。さらに、シイタケ *L. edodes* 由来の Lentinan、スエヒロタケ *Schizophyllum commune* 由来の Sizofiran といった多糖類は抗悪性腫瘍剤 (抗がん剤) として利用されている (Lakhanpal and Rana, 2005; Aida et al., 2009)。

このように、キノコは有用な生理学的機能をいくつも有しているにも関わらず、酵母やカビなどの子嚢菌と比べて基礎的研究が遅れている。そこで本研究では、キノコの生理学的機能の有効的活用法を見出すため、2 つの基礎的研究を行った。1 つ目は食としてのキノコに着目し、嗜好を左右する香気成分の生合成機構について研究した (第 1 章)。2 つ目は生態系でのキノコに着目し、リン酸欠乏適応機構について研究した (第 2 章)。

第 1 章 キノコの香気生合成機構の解明

緒論

キノコは古くから世界各地で親しまれてきた食材である。食用かどうかは、ヒトにとって毒物が含まれているかどうか、味や香りが好ましいかどうかで決まるが、食用になるものはキノコ全体の 10%以下であろうと推測されている (Mattila et al., 2000)。食用キノコの中でも簡単に栽培、収穫できるキノコは市場で安く手に入るが、トリュフやマツタケのように人工栽培が困難なキノコは小規模にしか流通せず、高価である。

世界で最初のキノコの人工栽培は中国で行われ、西暦 600 年頃にはキクラゲ *Auricularia auricula*、800 年頃にはエノキタケ *F. velutipes*、1000 年頃にはシイタケ *L. edodes* が栽培されていたと言われている (Chang and Miles, 2004)。日本では江戸時代の豊後国 (今の大分県付近) でシイタケの粗放的栽培が始まったとされている。以後、日本の近代的キノコ栽培はシイタケの原木栽培から始まり、ナメコやヒラタケの原木栽培を経て、エノキタケ、ヒラタケ、ナメコ、ブナシメジのおが屑培地ビン栽培へと進歩していった (Yamanaka, 1997)。近年では、マイタケ *Grifola frondosa* やエリンギ *Pleurotus eryngii* などの新しい栽培キノコも台頭し、様々なキノコの人工栽培が試みられている。

農林水産省林野庁が公表する特用林産物需要動態調査によれば、統計が開始された 1960 年からキノコ生産量は年々増加し、2010 年には 46.8 万トンにも達している。2010 年の都道府県別のキノコ生産量を見ると、長野県の 15.5 万トンに続き、新潟県は 9.0 万トンものキノコを生産しており、両県だけで全国生産量の 52.3%を占める (長野, 33.1%; 新潟, 19.2%)。新潟県のマイタケ生産量は全国 1 位であり、エノキタケ、ブナシメジ、エリンギ、ヒラタケも全国 2 位の生産量を誇っており、キノコの生産は新潟県の主要な地場産業の 1 つとなっている。

キノコを食用形態や栄養学的視点から見ると、高等植物である野菜に類似している。キノコ類は生鮮野菜と同じように水分や食物繊維が多く、タンパク質や脂質が少ない (Kurtzman, 1997; Sadler, 2003; Cheung, 2010)。キノコの食品的な価値に最も大きな影響を与えているものはフレーバー (風味) であり、昔から「香りマツタケ、味シメジ (ホンシメジ)」と言われるように、香気と旨味が嗜好を左右する重要な要因として挙げられる。

キノコの香気分子は 8 個の炭素原子からなる揮発性 C8 化合物を主体とすることが明らかになっており (Lizárraga-Guerra et al., 1997; Rapior et al., 1996; Tressl et al., 1982)、中でも多くのキノコの主要な香気分子である 1-オクテン-3-オールは閾値も低く、キノコの香気品質を決定する上で最も重要な香気分子とされてい

る (Maga, 1981; Mau et al., 1994)。1-オクテン-3-オールは岩出 (1936 and 1937) および村橋 (1936 and 1937) によってマツタケ抽出物から発見された香気であり、慣用名としてマツタケオール、マツタケアルコールとも呼ばれている。1-オクテン-3-オールには 2 つの光学異性体が存在し、通常発生する *R*-(−)-体はキノコ様であるのに対し、*S*-(+)-体はカビもしくは草の様な香りと表現されている (Mosandl et al., 1986; Zawirska-Wojtasiak, 2004)。キノコからは 1-オクテン-3-オール以外にも多くの揮発性 C8 化合物が同定されており、官能基の違いや位置、二重結合の有無の違いによって様々な香りを放つことが報告されている (Table I-1)。また、マツタケ特有の桂皮酸メチル (Yajima et al., 1981) や乾燥シイタケ特有のレンチオニン (Morita et al., 1967) など、揮発性 C8 化合物以外の香気分子もキノコの香りを特徴付ける重要な分子として同定されている。

キノコの香りは生物学的に重要な役割を持つことが知られている。例えば、キノコは特有の強い香りを放出することで動物や昆虫を誘い出し、その体表面へ胞子を付着させることによって効率的な胞子の散布を行っている (Chiron and Michelot, 2005)。中でも 1-オクテン-3-オールは、ツェツェバエ *Glossina pallidipes* や *Glossina morsitans* (Hall et al., 1984)、ノコギリヒラタムシ *Oryzaephilus surinamensis* やオオメノコギリヒラタムシ *Oryzaephilus mercator* (Pierce et al., 1989) に対して誘因物質としての機能を持つ。一方、タイコバエ *Megaselia halterata* は 1-オクテン-3-オールの香りを忌避することが報告されており (Pfeil and Mumma, 1993)、バナナナメクジ *Ariolimax columbianus* (Wood et al., 2001) やヒメツチトビムシ *Proisotoma minuta* (Sawahara et al., 2008) にとっては摂食阻害物質として機能すると報告されている。また、1-オクテン-3-オールはツクリタケ (マッシュルーム) *Agaricus bisporus* の原基形成に影響を及ぼすことも報告されており (Noble et al., 2009)、キノコの生育への関与が示唆されている。

揮発性 C8 化合物の生理学的機能はいくつも報告されているにも関わらず、その生合成経路についてはほとんど明らかにされていない。植物において、揮発性 C6/C9 化合物の生合成に関する研究は古くから行われており、リポキシゲナーゼ (Lipoxygenase, LOX) による脂肪酸の酵素的過酸化とヒドロペルオキシドリアーゼ (Hydroperoxide lyase, HPL) による開裂により生成することがよく知られている (Andreou et al., 2009)。LOX は 1*Z*,4*Z*-ペンタジエン構造を持つ多価不飽和脂肪酸に分子状酸素を導入し、その過酸化物であるヒドロペルオキシドを生成する非ヘム鉄含有酵素である。また、HPL は LOX により生成したヒドロペルオキシドを揮発性 C6/C9 化合物とオキソ酸に開裂する酵素であり、植物では 13-ヒドロペルオキシドから揮発性 C6 化合物が、9-ヒドロペルオキシドから揮発性 C9 化合物がそれぞれ生成される。

キノコにおける揮発性C8化合物も植物と類似した生合成経路によって作られ

Table I-1. Main C8 volatile compounds in mushrooms.

compound	threshold value (ppm)	aroma
1-octen-3-ol	0.010	mushroom like, sweet
1-octen-3-one	0.004	boiled mushroom
3-octanol	0.018	cod liver oil, nutty, sweet
3-octanone	0.050	sweet, fruity, musty, lavender

Manning, 1985.

ると推測されており、1-オクテン-3-オールの生合成に関して 2 つの経路が提案されている。1 つはハラタケ *Agaricus campestris* で提案されているリノール酸 (9*Z*,12*Z*-オクタデカジエン酸, C18:2) から 13-9*Z*,11*E*-ヒドロペルオキシリノール酸 (Hydroperoxyoctadecadienoic acid, 13-HPOD) から 1-オクテン-3-オンを経て 1-オクテン-3-オールが生成される経路であり (Tressl et al., 1981)、もう 1 つはツクリタケ *Psalliota bispora* (*A. bisporus*)、マツタケ *T. matsutake*、シイタケ *L. edodes* で提案されているリノール酸から 10-8*E*,12*Z*-ヒドロペルオキシリノール酸 (10-HPOD) を経て 1-オクテン-3-オールが生成される経路である (Figure I-1; Wuzenberger and Grosch, 1982 and 1984a–c; Akakabe et al., 2005)。しかし、Chen と Wu (1984) がツクリタケ *A. bisporus* において 1-オクテン-3-オンから 1-オクテン-3-オールへの還元反応が主要な経路ではないこと、Assaf ら (1995 and 1997) がウスヒラタケ *Pleurotus pulmonarius* 菌糸体において 1-オクテン-3-オールの生合成が 13-HPOD に由来しないことを報告して以降、一般にキノコの 1-オクテン-3-オール生合成は 10-HPOD を経由する経路に由来すると考えられている。しかし、どちらの生合成経路も関与する酵素の研究が不十分であることに加え、1-オクテン-3-オールがヒドロペルオキシドの非酵素的開裂反応によっても生じることが報告されており (Badings, 1970)、揮発性 C8 化合物の生合成機構については不明な点が多い。

本研究室では、食用キノコの LOX 活性に着目し、8 菌種のキノコの LOX 活性を測定した結果、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* の傘に非常に高い LOX 活性が存在することを見出した (高桑, 1998)。また、Assaf ら (1995 and 1997) とは対照的に、栗林 (2003) はヒラタケ傘とリノール酸もしくは 13-HPOD のホモジナイズにより、1-オクテン-3-オールの生成量が増加すると報告した (栗林, 2003)。そこで、栗林はリノール酸から 13-HPOD への過酸化反応を触媒する LOX をヒラタケ傘から精製し、その諸性質を解明した (Kuribayashi et al., 2002)。さらに、Tressl ら (1981) が 1-オクテン-3-オールの前駆体として提唱した 1-オクテン-3-オンの添加により、3-オクタノンが濃度依存的に増加するという結果も示した (栗林, 2003)。以上の様に、ヒラタケにおいても、リノール酸から 1-オクテン-3-オールが生合成されることが明らかになったが、その生合成機構はこれまで提唱されてきた経路と異なっている可能性が示唆された。

キノコの香気はその生育温度や湿度などの栽培条件によって大きな影響を受けることが経験的に知られている。もし、キノコの香気生合成機構が解明できれば、その反応を触媒する酵素活性を制御することで香気の放出を安定化させる技術の開発が進み、栽培条件に影響されない、香気品質の安定したキノコの生産、貯蔵が可能となる。その結果、キノコの消費が拡大し、新潟県が誇る地場産業の活性化に繋がる可能性がある。しかし、キノコの香気に関する研究は、

Figure I-1. Formation of C8 volatile compounds as proposed by Tressl et al. (1981; pathway A), Wurzenberger and Grosch (1982 and 1984a–c; pathway B) and Chen and Wu (1984; pathway C). HPL, hydroperoxide lyase; HPOD, hydroperoxyoctadecadienoic acid; LOX, lipoxygenase; ODA, oxo decenoic acid.

香気分子の同定や 1-オクテン-3-オールの生合成にのみ着目した研究が多く、キノコの揮発性C8化合物生合成機構の全体像を明らかにする研究は非常に少ない。また、その生理学的機能を理解するためにも、生合成機構や制御機構の解明が必要である。

本研究では 1-オクテン-3-オールだけでなく、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールなど他の揮発性 C8 化合物の生合成にも着目し、特にヒラタケにおける香気生合成機構の解明に取り組んだ。本章第 1 節では 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応に着目し、その反応を触媒する酵素エノンレダクターゼ (Enone reductase, ER) の精製を試みた。また、第 2 節では ER をコードする遺伝子を解析し、3-オクタノン生合成との関係について調べた。次いで、第 3 節では 1-オクテン-3-オール生合成の基質であるリノール酸やその代謝物 HPOD が 1-オクテン-3-オールの生合成におよぼす影響について試験した。さらに、第 4 節では揮発性 C8 化合物の酸化還元反応に焦点を絞り、ヒラタケにおける揮発性 C8 化合物生合成経路の推定を試みた。最後に、第 5 節ではヒラタケの他の組織に傘と同じ香気生合成機構が存在するのかどうかを調べた。

第1章第1節 ERの精製および諸性質の解明

1 緒言

1-オクテン-3-オールはリノール酸を出発物質とし、13-HPOD もしくは10-HPODを経由して生合成されると提唱されている (Figure I-1)。しかし、1-オクテン-3-オール以外の揮発性 C8 化合物の生合成に関してはほとんど研究されていない。

Tresslら (1981) は、1-オクテン-3-オールの前駆体が1-オクテン-3-オンであると提唱した。ツクリタケ *A. bisporus* において、1-オクテン-3-オンは1-オクテン-3-オールおよび 3-オクタノンに変換されると報告されている (Chen and Wu, 1984)。しかし、1-オクテン-3-オンの消費量は3-オクタノンに対して高い相関を示したのに対し、1-オクテン-3-オールの生成量に対しては相関が低かったことから、1-オクテン-3-オンから1-オクテン-3-オールへの還元反応は1-オクテン-3-オール生合成の主要な経路ではないと推察されている。近年の研究では、1-オクテン-3-オールはホモジナイズなどの菌体の破砕によって特異的に生じる香気であり、非破砕時には3-オクタノンが主要な揮発性C8化合物として検出されるとの報告もある (Combet et al., 2009)。すなわち、1-オクテン-3-オールだけではなく、他の揮発性C8化合物、特に3-オクタノンの生合成機構の解明はキノコ全体の香気生合成機構を解明する上で重要であると思われる。

キノコにおいて、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒する酵素の単離は報告されていないが、一部の生物ではその反応を触媒する酵素が精製されている。出芽酵母 *S. cerevisiae* からは1-オクテン-3-オンを基質とするNADPH依存性のE IおよびNADH依存性のE IIが精製されている (Wanner and Tressl, 1998)。また、タバコ *Nicotiana tabacum* からは1-オクテン-3-オンを還元する能力を持つ NADPH 依存性の p74 レダクターゼの精製が報告されている (Shimoda et al., 2002)。

栗林 (2003) は、ヒラタケ *P. ostreatus* の傘に1-オクテン-3-オンを添加してホモジナイズした結果、1-オクテン-3-オールおよび 3-オクタノンの生成量が増加すると報告した。このことは 1-オクテン-3-オンのエノン基を還元し、3-オクタノンを生成する酵素エノンレダクターゼ (ER) の存在を示唆している。しかし、キノコ由来のERに関する情報は全く報告されていない。そこで本節では、キノコの3-オクタノン生合成機構を解明するために、ヒラタケの傘からERの精製を試みた。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

ヒラタケ、アワビタケは新潟県新潟市南区の白根観光きのこ園 (Niigata, Japan)、他のキノコは新潟市内のスーパーマーケットで購入したものを使用した (Table I-2)。購入したヒラタケは柄を切り落とした後、傘のみを液体窒素で凍結し、−80°C で保存した。

1-オクテン-3-オールは東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。1-オクテン-3-オンは Brown と Garg (1961) の方法に従い、1-オクテン-3-オールの酸化反応により調製した。NADPH と NADH はナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。3-ブテン-2-オン、3-ノネン-2-オン、2-シクロヘキセン-1-オン、プレゴンは和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。

2-2 粗酵素液の調製

4 g の新鮮なキノコの傘に 2 倍量 (w/v) の 50 mM 緩衝液 (使用した緩衝液および pH はキノコの種類によって異なる) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (PT 10-35, Kinematica AG, Littau, Switzerland) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。3,000×g、30 秒間、25°C で遠心分離後、上清を粗酵素液として回収した。

2-3 ER 活性の測定

ER 活性は補酵素 NAD(P)H の吸光度の減少を測定することで求めた。反応液は、粗酵素液、75 μl の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 5 mM 1-オクテン-3-オン、50 μl の 4 mM NAD(P)H を 50 mM 緩衝液で 1.5 ml に定容することで調製した。紫外可視分光光度計 (U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) を使用し、340 nm における吸光度の減少を 1 分間、25°C で測定した。1 unit は NAD(P)H のモル吸光係数 (6,220 M^{-1} cm^{-1}) を用い、1 分間に 1 μmol の NAD(P)H が消費される酵素量として定義した。

タンパク質量は 280 nm における溶液の吸光度、もしくは Bradford (1976) の方法に従って測定した。Bradford 法では Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, California, USA) を染色液として使用し、牛血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質とした検量線により定量した。

2-4 反応生成物の分析

50 μl の粗酵素液、100 μl の 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 5 mM 1-オクテン-3-オン、33 μl の 4 mM NAD(P)H を 50 mM 緩衝液で 1.0 ml に定容し、1 時間、25°C

Table I-2. Used mushrooms in this study.

scientific name	Japanese name	kingdom/phylum/class/order/family [a]
Pleurotus ostreatus	hiratake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Pleurotaceae
Pleurotus eryngii	eringi	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Pleurotaceae
Pleurotus sp.	awabitake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Pleurotaceae
Agaricus bisporus	tsukuritake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Agaricaceae
Lentinula edodes	shiitake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Marasmiaceae
Hypsizygus marmoreus	bunashimeji	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Lyophyllaceae
Flammulina velutipes	enokitake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Agaricales/Physalacriaceae
Grifola frondosa	maitake	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycetes/Polyporales/Meripilaceae

[a] According to database Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org/).

で静置した。反応終了時に 0.2 mg の *n*-ノナノールを含む 1 ml の *n*-ペンタンを加え、30 秒間混和した。3,000×g、5 分間、25°C で遠心分離後、香気を含む有機層を分取した。

香気はガスクロマトグラフィー (Gas chromatography, GC) で分析した。各ピークのリテンションタイムを標準物質と比較することにより成分を同定すると共に、内部標準法により定量した。ガスクロマトグラフは、TC-WAX キャピラリーカラム (i.d. 0.25 mm × 60 m, df 0.25 μm, GL Science, Tokyo, Japan) を装備した GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan)、検出器には水素炎イオン化検出器 (Flame ionization detector, FID) を用いた。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速 1 ml/分、スプリット比は 1:10 に設定した。インジェクターおよびディテクター温度はそれぞれ 200°C と 250°C に設定した。オーブン温度は 50°C から 230°C へ 6°C/分の条件で昇温分析を行った。

3-オクタノンの変換率は、GC 分析で得られた 1-オクテン-3-オンと 3-オクタノンの合計量を 100%とし、3-オクタノンが占める割合から求めた。

2-5 ER の精製

ER の精製は全てリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、4°C 以下で行った。180 g の凍結した傘に 2 倍量 (w/v) の 20 mM 緩衝液、1/20 量 (w/v) の 100 mM フッ化フェニルメチルスルホニルを加え、Osterizer blender (Oster, Mexico) で 16,800 rpm、15 秒間、2 回ホモジナイズした。ホモジネートを 25,000×g、20 分間遠心分離後、上清をさらに 100,000×g、1 時間遠心分離した。上清を透析用セルロース膜 (Viskase Companies, Inc., Illinois, USA) に移し、ポリエチレングリコール#20,000 で 20–30 ml 程度まで濃縮した (Pohl, 1990)。

濃縮液のタンパク質量の 1/2 量 (w/w) の硫酸ストレプトマイシンを秤量し、超純水を加えて 25% (w/v) 硫酸ストレプトマイシン溶液を作製した。濃縮液をスターラーで攪拌しながら、25% 硫酸ストレプトマイシン溶液を徐々に滴下した。20 分間攪拌後、10,000×g、20 分間遠心分離し、核酸を沈殿させた (Oxenburgh and Snoswell, 1965)。

上清をスターラーで攪拌しながら、冷メタノールを 20% (v/v) になるまで滴下し、−20°C で一晩静置した。10,000×g、20 分間遠心分離後、上清をスターラーで攪拌しながら、さらに冷メタノールを 60% (v/v) になるまで滴下し、−80°C で 1 時間静置した。10,000×g、20 分間遠心分離後、沈殿を 4 ml の 20 mM 緩衝液に懸濁し、10,000×g、20 分間遠心分離後の上清を回収した。

20 mM 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200HR カラム (2.6 × 60 cm, GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) に上清をアプライし、流速 0.5 ml/分で溶出させた。溶出液はフラクションコレクター (SF-2120, Advantec, Tokyo,

Japan) で 2 ml ずつ試験管に分画した。ER 活性とタンパク質量を測定後、分子量の大きな活性画分を ER I、小さな画分を ER II としてそれぞれ回収した。回収した活性画分を等量 (v/v) の 1 M 緩衝液と混和し、500 mM 緩衝液で平衡化した Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) カラム (1.4 × 7.0 cm, GE Healthcare UK Ltd.) にアプライした。カラムを流速 0.5 ml/分で洗浄後、500 mM 緩衝液から 1 mM 緩衝液へのリニアグラジエントでタンパク質をカラムから溶出した。溶出液は 3 ml ずつ分画した。活性画分を回収し、20 mM 緩衝液で一晩透析後、20 mM 緩衝液で平衡化した TOYOPEARL AF-Red-650ML カラム (1.4 × 7.0 cm, Tosoh, Tokyo, Japan) にアプライした。流速 0.5 ml/分で洗浄後、20 mM 緩衝液から 0.5 M KCl を含む 20 mM 緩衝液へのリニアグラジエントでタンパク質をカラムから溶出した。溶出液は 2 ml ずつ分画し、活性画分を回収した。

2-6 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) は Laemmli (1970) の方法に従い、12% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。タンパク質はクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色、もしくは銀染色 (Oakley et al., 1980) で可視化した。

3 結果

3-1 様々なキノコの ER 活性および反応生成物

8 種類のキノコ (Table I-2) から粗酵素液を調製し、1-オクテン-3-オンを基質として使用した ER 活性の測定およびその反応生成物の分析を行った。なお、反応は各キノコで揮発性 C8 化合物が最も多く生成された pH で行った。

NAD(P)H の消費を指標に ER 活性を測定した結果、シイタケ *L. edodes* とブナシメジ *H. marmoreus* では添加した補酵素に関わらず ER 活性は検出されなかったが、これら以外の粗酵素液で NADPH 依存的 ER 活性が認められた (Table I-3)。また、NADH 依存的 ER 活性は全て NADPH 依存的 ER 活性より低かった。エリンギ *P. eryngii* (1.60 units/g)、マイタケ *G. frondosa* (0.58 units/g) では比較的高い ER 活性が認められたのに対し、他 4 種類のキノコ (ヒラタケ、アワビタケ *Pleurotus sp.*、ツクリタケ *A. bisporus*、ブナシメジ *H. marmoreus*) では同程度の活性だった (0.35–0.38 units/g)。

ER 活性は NAD(P)H の消費を指標としており、1-オクテン-3-オンから本当に 3-オクタノンが生成しているかは確認できない。そこで、キノコ粗酵素液に 1-オクテン-3-オンと補酵素 NAD(P)H を添加し、反応生成物を GC 分析した。その結果、ほとんどのキノコで 3-オクタノンの増加が認められ、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの変換率を求めた結果、シイタケ *L. edodes* を除く 7 種類のキノコ粗酵素液において、NADPH の添加によって 3-オクタノンの生成が促進された (Table I-3)。一方、NADH の添加では、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの変換率は低かった。また、ツクリタケ *A. bisporus* とエノキタケ *F. velutipes* は比較的高い NADPH 依存的 ER 活性を示していたが、その変換率は 50%以下と低かった。

以上の結果より、多くのキノコは NADPH 依存的 ER 活性を持ち、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒する能力を持つと示唆された。

3-2 ヒラタケ ER の精製

本研究室では長年、比較的香りの強いヒラタケを実験材料として使用し、香気生合成機構に関する研究を行ってきた。ヒラタケ粗酵素液は比較的高い ER 活性を示し、1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの高い変換率が認められた (Table I-3)。そこで、次にヒラタケから ER を精製することにした。ER の精製に先立ち、粗酵素液中の内在性基質や補酵素を除去した透析粗酵素液を用いて、pH と補酵素の影響を詳細に検討した。

透析粗酵素液の ER 活性を様々な pH で測定した結果、NADPH 依存的 ER 活性は pH 5.0–9.0 で比較的高く、pH 7.0 で最も高かった (Figure I-2)。一方、NADH

Table I-3. ER activity and the conversion of 1-octen-3-one into 3-octanone in the caps of various mushrooms.

mushroom	activty (units/g mushroom)		conversion (%)	
	NADPH	NADH	NADPH	NADH
P. ostreatus (hiratake) [a]	0.37	N.D.	94.1	7.1
P. eryngii (eringi) [b]	1.60	0.02	97.7	5.8
Pleurotus sp. (awabitake) [a]	0.38	N.D.	98.5	10.2
A. bisporus (tsukuritake) [a]	0.37	<0.01	32.1	15.0
L. edodes (shiitake) [d]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H. marmoreus (bunashimeji) [c]	N.D.	N.D.	10.4	N.D.
F. velutipes (enokitake) [b]	0.35	0.28	50.0	3.6
G. frondosa (maitake) [a]	0.58	<0.01	100.0	16.3

The reaction was assayed with the following buffers: [a] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0); [b] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0); [c] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0); [d] 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0). N.D., not detected.

Figure I-2. Effects of coenzymes and pH on the ER activity in the dialyzed crude enzyme from the caps of *P. ostreatus*. The activity was assayed spectrophotometrically in the presence of coenzyme, NADPH (black) or NADH (white), with the following buffers: circle, 50 mM citrate buffer (pH 3.0−5.5); triangle, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.5−8.0); square, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0−10.0).

依存的 ER 活性は全ての pH を通して低かった。次いで、透析粗酵素液に 1-オクテン-3-オンを添加し、反応生成物を GC 分析した結果、NADPH の添加によって 1-オクテン-3-オンは消費され、3-オクタノンへの生成が確認された (Figure I-3A)。一方、NADH の添加、もしくは補酵素を添加しなかった透析粗酵素液では、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの変換は確認されなかった (Figure I-3B and C)。以上の結果より、ER の精製における活性の測定は pH 7.0 (リン酸カリウム緩衝液) で行い、補酵素として NADPH を添加することにした。また、透析粗酵素液の ER 活性はこの pH で長時間最も安定に保たれたことから (データ示さず)、ER の精製で使用する緩衝液もリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いることにした。

ヒラタケの傘からの ER 精製の要約は Table I-4 に示した。硫酸ストレプトマイシン沈殿、メタノール分画で精製した粗酵素を Sephacryl S-200 HR を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。その結果、ER 活性は 2 つのピークに分離したため、分子量の大きなピークを ER I、小さなピークを ER II と名付けた (Figure I-4A)。ER I と II はそれぞれ Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) を用いた疎水クロマトグラフィーで分離し (Figure I-4B and C)、ER II はさらに TOYOPEARL AF-Red-650ML を用いたアフィニティークロマトグラフィーで分離した (Figure I-4D)。

疎水クロマトグラフィー後の ER I、およびアフィニティークロマトグラフィー後の ER II を SDS-PAGE した結果、単一のバンドが得られた (Figure I-5)。ER I は回収率 2.4%、精製度 21 倍であったのに対し、ER II は回収率 11.2%、精製度 107 倍であった (Table I-4)。

3-3 分子量

SDS-PAGE の結果、ER I と II の分子量はそれぞれ 47,000 と 37,000 と推定された (Figure I-5)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、分子量はそれぞれ 219,000 と 43,000 と推定された (Table I-5)。以上の結果より、ER I はホモ四量体、ER II は単量体と推定された。

3-4 補酵素要求性

精製した酵素の ER 活性を測定した結果、ER I と II は共に優先補酵素として NADPH を使用し、NADH 依存的活性は NADPH 依存的活性のそれぞれ 3%と 9% だった (データ示さず)。また、精製した酵素に 1-オクテン-3-オンと NAD(P)H を添加し、反応生成物を GC 分析した結果、ER I と II は共に NADPH 依存的に 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒した (データ示さず)。

Figure I-3. Effect of coenzymes on the reaction products by ER in the dialyzed crude enzyme from the caps of *P. ostreatus*. The products in the reaction mixture cantaining NADPH (A) or NADH (B) and not containing coenzyme (C) were analyzed by GC. Peaks: 1, 3-octanone; 2, 1-octen-3-one; 3, 1-octen-3-ol; 4, *n*-nonanol (internal standard).

Table I-4. Summary of purification of ER I and II from the cap of *P. ostreatus*.

	protein (mg)	activity (units)	specific activity (units/mg)	recovery (%)	purification (fold)
crude enzyme	844.2	24.86	0.029	100.0	1.0
streptomycin sulfate precipitation	747.8	25.20	0.034	101.4	1.1
methanol precipitation	61.4	14.38	0.234	57.9	8.0
ER I					
Sephacryl S-200 HR	5.9	1.97	0.336	7.9	11.4
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	1.0	0.60	0.603	2.4	20.5
ER II					
Sephacryl S-200 HR	42.4	5.06	0.119	28.5	4.0
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	2.3	1.18	0.513	6.6	17.4
TOYOPEARL AF-Red-650ML	0.1	0.31	3.100	1.2	106.9

Figure I-4. Purification of ER I and II from the caps of *P. ostreatus*. (A) Sephacryl S-200 HR gel filtration chromatography of ERs; (B) Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) hydrophobic interaction chromatography of ER I; (C) Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) hydrophobic interaction chromatography of ER II; (D) TOYOPEARL AF-Red-650ML affinity chromatography of ER II.

Figure I-5. SDS-PAGE analysis of the purified ER I and II from the caps of *P. ostreatus*. ER I after Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) chromatography and ER II after TOYOPEARL AF-Red-650ML chromatography were submitted to electrophoresis and visualized with silver staining. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

Table I-5. Summary of characterization of ER I and II from the cap of *P. ostreatus*.

	ER I	ER II
molecular weight		
Sephacryl S-200 HR	219,000	43,000
SDS-PAGE	47,000	37,000
optimum pH	7.0	6.5
pH stability	5.0–10.0	4.0–10.0
optimum temperature (°C)	30	25
temperature stability (°C)	<50	<40
K_m (mM)	0.12	0.47
V_{max} (units/mg/min)	0.92	5.61

3-5 pH および温度の影響

精製した ER I と II の最適 pH 調べた結果、それぞれ 7.0 と 6.5 であった (Table I-5)。pH 安定性は各 pH で 48 時間、4°C でインキュベートした後の ER 活性を測定することで調べた。ER I は pH 5.0−10.0、ER II は pH 4.0−10.0 の幅広い pH 領域で共に安定であったが、最も安定な pH は ER I が 6.0、ER II が 8.0 と異なっていた。

精製した ER I と II の最適温度はそれぞれ 30°C と 25°C であった (Table I-5)。温度安定性は各温度で 5 分、pH 7.0 でインキュベートした後に活性を測定することで試験した。その結果、ER I は 50°C 以下、ER II は 40°C 以下で比較的安定だった。

3-6 金属イオンの影響

金属イオンが ER 活性におよぼす影響はゲルろ過クロマトグラフィー後の ER I と II を使用して調べた。酵素活性は金属イオンを添加していない時の ER 活性を 100%とし、金属イオンを添加した時の活性を相対的に示した。ER I と II の活性は共に 1 mM Cu^{2+}と Mn^{2+}によって阻害され、Mn^{2+}は ER I より ER II に対して高い阻害活性を持っていた (Table I-6)。一方、Co^{2+}は両酵素を活性化した。

3-7 基質特異性

基質特異性はゲルろ過クロマトグラフィー後の ER I と II を使用して調べた。酵素活性は 5 mM の基質溶液を使用し、1-オクテン-3-オンを使用した時の ER 活性を 100%として相対的に示した。ER I と II は共に 1-オクテン-3-オンに対して最も高い ER 活性を示した (Table I-7)。1-オクテン-3-オンより短鎖の 3-ブテン-2-オンは ER I で還元されたが、ER II では還元されなかった。一方、1-オクテン-3-オンより長鎖の 3-ノネン-2-オンは両酵素とも低い還元活性だった。環内二重結合を持つ 2-シクロヘキセンは両酵素により還元されたのに対し、環外二重結合を持つプレゴンは ER II でのみ還元された。

1-オクテン-3-オンを基質として使用し、ER I と II の K_m 値と V_{max} を Lineweaver-Burk plot から決定した。ER I と II の K_m 値はそれぞれ 0.12 と 0.47 mM と推定され、V_{max} はそれぞれ 0.92 と 5.61 units/mg/分だった (Table I-5)。

Table I-6. Effect of various metal ions on the activity of ER I and II from the cap of *P. ostreatus*.

	relative activity (%)			
	ER I		ER II	
metal ion	0.1 mM	1 mM	0.1 mM	1 mM
control	100	100	100	100
Ca^{2+}	98	101	93	101
Cu^{2+}	105	88	97	86
Mn^{2+}	103	77	110	49
Co^{2+}	115	119	101	136

Table I-7. Substrate specificity of ER I and II from the cap of *P. ostreatus*.

substrate	relative activity (%)	
	ER I	ER II
1-octen-3-one	100	100
3-buten-2-one	97	18
3-nonen-2-one	11	18
2-cyclohexen-1-one	46	44
pulegone	1	17

4 考察

4-1 キノコの ER

1-オクテン-3-オールや 1-オクテン-3-オン、3-オクタノンなどの揮発性 C8 化合物はキノコの香気を特徴付ける重要な香気であるが、その生合成機構はまだ明らかにされていない。1-オクテン-3-オールはキノコの主香気成分であると報告されているが、その量は抽出、濃縮、分析方法によって大きく異なることが示されている (Jeleń, 2003; Larsen and Frisvad, 1995)。近年、Combet ら (2009) は、固相マイクロ抽出した無傷のツクリタケ *A. bisporus* の香気を分析した結果、3-オクタノンが主要な揮発性C8化合物として検出されることを報告した。しかし、キノコの 3-オクタノン生合成を触媒する酵素は報告されていなかった。

本研究ではまず、キノコの傘から粗酵素液を調製し、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒する ER 活性の測定とその反応生成物の分析を行った。8 種類のキノコ (Table I-2) を試験した結果、6 種類のキノコで NADPH 依存的 ER 活性が認められ、それらのキノコでは 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応が行われていた (Table I-3)。この結果より、NADPH 依存的 ER 活性は多くのキノコに共通した酵素反応であると推測された。

また、ヒラタケ *P. ostreatus*、ツクリタケ *A. bisporus*、エノキタケ *F. velutipes* の NADPH 依存的 ER 活性は 0.35–0.37 units/g と近似していたが、3-オクタノンへの変換率はそれぞれ 94.1、50.0、32.1%であり、大きく異なっていた (Table I-3)。Chen と Wu (1984) はツクリタケ *A. bisporus* において、1-オクテン-3-オンが酵素的に 3-オクタノンだけでなく 1-オクテン-3-オールにも還元されると報告している。そのため、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応は主に NADPH 依存的 ER 活性によって触媒されているが、一部のキノコは 1-オクテン-3-オンが 3-オクタノン以外の揮発性C8化合物に変換される機構を持つ可能性が示唆された。

4-2 ER の精製

ヒラタケの傘から調製した粗酵素液を用い、硫酸ストレプトマイシン沈殿、メタノール分画、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、2 つのアイソザイム ER I と II を精製することができた (Figure I-4 and Table I-4)。キノコでこの反応を触媒する酵素の精製は報告されておらず、本研究が初めての報告となる。1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を優先的に触媒する ER の精製は出芽酵母 *S. cerevisiae* でのみ報告されている (Wanner and Tressl, 1998)。また、1-オクテン-3-オンの還元反応は調べられていないが、他にもミドリムシ *Euglena gracilis Z*

(Shimoda et al., 1998)、ユーグレナ藻 *Astasia longa* (Shimoda and Hirata, 2000)、子嚢菌酵母 *Candida macedoniensis* (Kataoka et al., 2002)、藍藻 *Synechococcus* sp. (Shimoda et al., 2004) などからエノン基の炭素二重結合を還元する酵素の精製が報告されている。

SDS-PAGE の結果から、ER I と II の分子量はそれぞれ 47,000 と 37,000 と推定された (Figure I-5)。一方、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、ER II の分子量は 43,000 であり、SDS-PAGE の結果とほぼ同じであったのに対し、ER I は 219,000 と推定され、SDS-PAGE の結果と大きく異なっていた (Table I-5)。そのため、ER I はホモ四量体、ER II は単量体であると推定された。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の E I と E II (Wanner and Tressl, 1998) はそれぞれヘテロ二量体、タバコ *N. tabacum* 由来の p44、p90 (Tang and Suga, 1992)、p74 レダクターゼ (Shimoda et al., 2002) はそれぞれホモ二量体である。一方、ミドリムシ *E. gracilis Z* (Shimoda et al., 1998) もしくはユーグレナ藻 *A. longa* (Shimoda and Hirata, 2000) から精製された酵素は単量体である。生物種によってアイソザイム数、分子量、サブユニット数などに違いが見られることから、ヒラタケ由来の ER もそれぞれ構造が異なる酵素であると考えられた。

4-3 ER の諸性質

精製した ER I と II の諸性質を調べた結果、ER I と II の最適 pH や pH 安定性は互いに近似する値を示した (Table I-5)。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の E I と E II (Wanner and Tressl, 1998) の最適 pH は 4.8 であったが、他の生物の ER で報告された値は pH 7.0 付近であり (Shimoda et al., 1998 and 2002; Shimoda and Hirata, 2000)、ヒラタケの結果は一般的な ER の最適 pH と類似していた。

また、精製した ER I と II の最適温度はそれぞれ 30°C と 25°C であり、ER I は 50°C 以下、ER II は 40°C 以下で安定していた (Table I-5)。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の E I と II (Wanner and Tressl, 1998) の最適温度は 30−38°C、子嚢菌酵母 *C. macedoniensis* 由来のケトイソフォロン (KIP) レダクターゼ (Kataoka et al., 2002) は 60°C と報告されており、ヒラタケ由来の ER I と II はそれらに比べ、やや低い最適温度を持っていた。Kuribayashi ら (2002) は、ヒラタケの 1-オクテン-3-オール生合成への関与が示唆される LOX が低い温度でも比較的高い活性を保持していることを報告している。香気生合成の過程で生じる 10-ODA (Oxo decenoic acid) は子実体の生長促進物質としての生理活性が報告されているため (Mau et al., 1992b; Champavier et al., 2000)、ヒラタケの香気生合成に関与する ER と LOX の最適温度が低いことは、ヒラタケ子実体の発生が比較的低い温度 (13−16°C) で起こることと関係があるのかもしれない (Kües and Liu, 2000)。

補酵素要求性を調べた結果、ER I と II はどちらも NADPH 依存的活性を示し、

NADH 依存的活性は NADPH 依存的活性の 10%未満であった。出芽酵母 *S. cerevisiae* (Wanner and Tressl, 1998) やタバコ *N. tabacum* (Tang and Suga, 1992) から精製された ER は NADH もしくは NADPH どちらか一方を補酵素として要求したが、ユーグレナ藻 *A. longa* 由来の Reductase-II (Shimoda and Hirata, 2000) は NAD(P)H どちらでもほぼ同じ活性が得られると報告されている。しかし、これらの酵素は調べられた基質が異なっており、生体内での役割も不明である。そのため、ヒラタケ中には 1-オクテン-3-オン以外を基質とする他のアイソザイムが存在する可能性もあり、様々な補酵素要求性を示す ER が存在する可能性も推測される。

金属イオンの影響を調べた結果、ER I と II は 1 mM Co^{2+}で活性化され、1 mM Cu^{2+}および Mn^{2+}で阻害される傾向を示した (Table I-6)。1-オクテン-3-オンを基質とする出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の NADPH 依存的 E I の活性は 2.5 mM Ca^{2+}および Mg^{2+}によって完全に阻害されると報告されており (Wanner and Tressl, 1998)、ヒラタケ由来の ER とはその影響が異なっていた。また、子嚢菌系酵母 *C. macedoniensis* 由来の KIP レダクターゼの活性は 1 mM の Ag^{+}、Hg^{2+}、Cu^{2+}、Pb^{2+}などの重金属イオンで顕著に阻害されると報告されており (Kataoka et al., 2002)、Cu^{2+}での阻害はヒラタケ由来の ER と共通していた。ER の金属要求性に関する知見は報告されてなく、これらの金属イオンが ER 活性に対してどのような活性、阻害作用を示すのかは不明である。

構造の異なる α,β-不飽和カルボニル化合物を用いて基質特異性を試験した結果、精製した ER I と II は 1-オクテン-3-オンを基質とした時、最も高い活性を示した (Table I-7)。そのため、精製した ER はヒラタケの香気生合成に関与する酵素であると示唆された。しかし、1-オクテン-3-オン以外の α,β-不飽和カルボニル化合物に対しては、2 つの酵素は異なる活性を示した。ER I は 1-オクテン-3-オンより短鎖の 3-ブテン-2-オンも還元したが、ER II は還元できなかった。また、ER II は環内二重結合を持つ 2-シクロヘキセン-1-オンと環外二重結合を持つプレゴン両方を少し還元できたのに対し、ER I は 2-シクロヘキセン-1-オンしか還元できなかった。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の E I と II においても、1-オクテン-3-オンより短鎖の 1-ヘキセン-3-オンをよく還元し、環外二重結合を持つプレゴンより、環内二重結合を持つ 2-シクロヘキセン-1-オンや 2,6,6-トリメチル-2-シクロヘキセン-1,4-ジオンを優先して還元する基質特異性が報告されている (Wanner and Tressl, 1998)。また、子嚢菌系酵母 *C. macedoniensis* 由来の KIP レダクターゼは KIP よりむしろ、3-ブテン-2-オンや 2-シクロヘキセン-1-オンに対して高い活性を示したと報告されている (Kataoka et al., 2002)。

ヒラタケから精製された 2 つのアイソザイム ER I と II は共に構造の異なる様々な α,β-不飽和カルボニル化合物を還元した。α,β-不飽和カルボニル化合物を

還元して得られる α-キラルケトンは医薬品合成の中間体として有用であり、近年、還元反応を触媒できる酵素は生体触媒として盛んに研究されている (片岡, 2007; Toogood et al., 2010)。また、脂質過酸化で生成される α,β-不飽和カルボニル化合物は、反応性カルボニルとして生体分子に障害を与えることが知られており、これらを除去する機構についても様々な研究が行われている (Yamauchi et al., 2011)。ヒラタケの生体内における ER の役割が 3-オクタノン生合成のみであるかどうかは現在のところ不明である。そのため、産業的応用や生体内での役割の解明には、キノコ由来の ER の触媒機構のさらなる研究が必要であると考えられる。

第1章第2節 *Poer1* と *Poer2* 遺伝子の解析

1 緒言

菌類において、3-オクタノンは形態形成などで重要な役割を果たすと推測されている。例えば、糸状子嚢菌 *Trichoderma* spp.やコウジカビ属 *Aspergillus nidulans* において、3-オクタノンは分生子の形成を誘導することが報告されている (Nemčovič et al., 2008; Herrero-Garcia et al., 2011)。一方、担子菌では、ツガサルノコシカケ *Fomitopsis pinicola* およびツリガネタケ *Fomes fomentarius* の胞子形成が 1-オクテン-3-オールと 3-オクタノンの増加と共に起こると報告されており、これらの揮発性C8化合物は胞子散布のための昆虫誘引物質として機能すると推察されている (Fäldt et al., 1999)。また、無傷のツクリタケ *A. bisporus* では、3-オクタノンが主要な揮発性 C8 化合物として検出されており (Combet et al., 2009)、菌類の生活において 3-オクタノンは重要な分子であると推測される。

第1章第1節の結果より、多くの食用キノコはNADPH依存的ER活性を持ち、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒する能力を持つことが示された (Table I-5 and I-7)。また、ヒラタケから精製した ER I と II は分子量が大きく異なっていたが、どちらも 1-オクテン-3-オンを基質として使用する酵素であり、様々な基質を還元する能力を持っていた。現在まで 1-オクテン-3-オンの還元能を有する酵素をコードする遺伝子は報告されていないが、α,β-不飽和カルボニル (アルデヒドやケトン) の炭素二重結合を還元する酵素はいくつか報告されている。中でも OYE (Old yellow enzyme) は古くから研究されている酵素の 1 つであり、細菌 (Chaparro-Riggers et al., 2007; Müller et al., 2007; Opperman et al., 2008)、酵母 (Niino et al., 1995; Swiderska and Stewart, 2006)、植物 (Hall et al., 2007) など、様々な生物で報告されている。OYE は炭素二重結合を不斉水素化することでキラル化合物を生成するため、有機化学合成における選択的不斉変換反応を行う生体触媒としても注目されている (Stuermer et al., 2007; Toogood et al., 2010)。また、OYE 以外にもシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の P1-ζ-crystallin (Mano et al., 2002) や Alkenal/one oxidoreductase (Yamauchi et al., 2011) などの Medium-chain dehydrogenase/reductase ファミリーに属する酵素の一部はエノン還元能を持つことが報告されている。

本節では、第 1 章第 1 節で精製した ER I と II の内部アミノ酸配列を解析し、これらをコードする遺伝子の全長 cDNA 塩基配列の決定を試みた。また、秋から冬にかけて ER 活性、3-オクタノン量、ER I と II をコードする遺伝子の発現量を経時的に測定し、どちらのアイソザイムが主に 3-オクタノン生合成に関与するのか推定した。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

ヒラタケ子実体は白根観光きのこ園で購入した。購入したヒラタケは柄を切り落とした後、傘のみを液体窒素で凍結し、−80°C で保存した。

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 由来の V8 プロテアーゼは Worthington biochemical Corp. (New Jersey, USA) から購入した。V8 プロテアーゼは 20% (v/v) グリセリン、0.1% (w/v) SDS、1 mM EDTA を含む 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) で 40 μg/ml に調製し、−20°C で保存した。トリプシンは Promega (Wisconsin, USA)、SPITC (4-Sulfophenyl isotiocyanate) は Sigma Aldrich (Missouri, USA) から購入した。

2-2 Edman 分解による内部アミノ酸配列の解析

第 1 章第 1 節 2-5 に従って精製した ER I と II を SDS-PAGE で分離後、CBB 染色で可視化したバンドをゲルから切り出し、ゲルを破砕した。破砕したゲルを 15% (w/v) ポリアクリルアミドゲルのウェルにアプライ後、20 μl の V8 プロテアーゼ溶液を重層し、濃縮ゲル内で 30 分間ゲル内消化した。SDS-PAGE 後、ペプチド断片を PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜にエレクトロブロット (AE-6675, ATTO, Tokyo, Japan) し、CBB 染色で可視化した。可視化されたバンドはプロテインシーケンサー (Model PPSQ-21, Shimadzu) を使用した Edman 分解法で解析し、ペプチド断片の N 末端アミノ酸配列を決定した。

2-3 質量分析による内部アミノ酸配列の解析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析法 (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF MS) による *de novo* シーケンスは Awang ら (2010) の方法に従って行った。

概略としては、第 1 章第 1 節 2-5 に従って精製した ER I と II を SDS-PAGE で分離後、CBB 染色で可視化したバンドをゲルから切り出し、CBB を脱色した。ゲル片をジチオスレイトールで還元後、ヨードアセトアミドでアルキル化し、トリプシンを用いてゲル内消化した。ゲル片から抽出したペプチドは非誘導体化ペプチドとして使用し、一部を SPITC で誘導体化処理した (Wang et al., 2004b)。これらのペプチドを脱塩処理後、MTP 384 target ground steel T F (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) 上でマトリックス溶液と混和し、Bruker Daltonics Autoflex III TOF/TOF-NN (Bruker Daltonics GmbH) の Positive reflectron モードで MALDI-TOF MS スペクトルおよび MALDI-TOF/TOF MS スペクトルを解析した。

SPITC 誘導体化処理したペプチドと非誘導体化ペプチドの MALDI-TOF MS スペクトルを比較し、*m/z* が 215 増加した SPITC 誘導体化ペプチドのフラグメントイオン (*y* イオン) を FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics GmbH) で解析し、Biotools 3.1 の RapiDeNovo プログラム (Bruker Daltonics GmbH) でアミノ酸配列を決定した。

2-4 Total RNA の抽出

Total RNA の抽出は 0.5 g の凍結破砕した組織粉末に対して 5 ml の ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を使用し、取扱説明書のプロトコル 1-3 に従って抽出した。

2-5 cDNA クローニング

逆転写反応 (RT) は FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion, Texas, USA) の標準的プロトコルに従って行った。5'-RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA) で使用する cDNA の合成は、10 μg の Total RNA を使用し、まず Calf intestine alkaline phosphatase による mRNA 以外の RNA の 5'末端リン酸基の除去、Tobacco acid pyrophosphatase による mRNA の 5'末端 ^{7m}G の除去、T4 ligase による 5'-RACE adapter ライゲーション処理を行った。その後、M-MLV RTase (Reverse transcriptase) と Random decamer を使用し、42°C、1 時間インキュベートすることで 5'末端に 5'-RACE adapter を付加した cDNA を合成した。3'-RACE で使用する cDNA は、1 μg の Total RNA と M-MLV RTase、3'-RACE adapter を使用し、42°C、1 時間インキュベートすることで 3'末端に 3'-RACE adapter を付加した。

5'-RACE および 3'-RACE PCR (Polymerase chain reaction) は *Takara Ex Taq* Hot Start Version (Takara Bio, Shiga, Japan) を使用した標準的プロトコルに従って行った。Table I-8 のプライマーによる Nested PCR もしくは Semi-nested PCR は、PCR サイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL, TaKaRa Bio) を使用して行った (Figure I-6)。

DNA Ligation Kit ver. 2.1 (Takara Bio) を使用し、*Bam*H I (Takara Bio) で制限酵素処理した PCR 断片を、*Bam*H I 制限酵素処理および脱リン酸化処理した pUC118 プラスミドにライゲートした。ヒートショック法により組換えプラスミドを導入した宿主大腸菌 *Escherichia coli* DH5α 株は、アンピシリンを添加した YT 寒天培地 [0.8% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast extract, 0.25% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) Agar (pH 7.6)] 上での青白選択により選抜した。

Table I-8. Sequences of oligonucleotide primers used in this section.

primer	sequence	Tm (°C)
5'- and 3'-RACE PCR		
3'-RACE outer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	56.9
3'-RACE inner	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	64.4
5'-RACE outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	60.5
5'-RACE inner	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	69.9
Poer1-S1	TACTGGATCCGAGTCTCCTACTGAGAGCTT	64.6
Poer1-S2	CAAGAAGATAGAACAGGCTGGTGAT	58.8
Poer1-S3	TTGAGGATCCACCCAAATTCCTCCAGACCA	64.6
Poer1-S4	ATAGGGATCCGCCTGGACAAAGAGAGATCG	66.0
Poer1-AS1	GGGATATACTGGTCGTCAATCTGGATGT	62.0
Poer1-AS2	AATAGGATCCCACGGAGGTGATGAACGACT	64.6
Poer1-AS3	TCAAGGATCCGAAGTGGTCCCAAGAGGTGA	66.0
Poer2-S1	CAATGGATCCAATGGCTACACTTCCTCCGA	64.6
Poer2-S2	ATACGGATCCAAATCACTGCCCTTGTACGG	64.6
Poer2-S3	AACAGGATCCCCGCTTGCTATGTTTCTTCC	64.6
Poer2-AS1	CTGAGGATCCTTGCTACCCATGGATGATCT	64.6
Poer2-AS2	TAGAGGATCCCCGTGTCCAGTATCTTGCTT	64.6
Poer2-AS3	TATAGGATCCGCCAGTTGCCTCGAACTTAG	64.6
DNA sequencing		
IR-labeled M13 forward	CACGACGTTGTAAAACGAC	53.9
IR-labeled M13 reverse	GGATAACAATTTCACACAGG	52.2
quantitive real-time RT-PCR		
Po18S rDNA-S	TACACTGACAGAGCCAGCGAG	60.4
Po18S rDNA-AS	GGACGTAATCAACGCGAGCTG	60.4
Poβ-tubulin-S	GTGCGTAAGGAAGCTGAGGG	60.4
Poβ-tubulin-AS	TGTGGCATTGTACGGCTCAAC	58.5
Poer1-S	GCTCGGTGCCTTATCTTCATTCG	60.5
Poer1-AS	GCCTTCCCTCACTGTCATCTCA	60.4
Poer2-S	AGTACTTCCGAGGGAGATCA	56.3
Poer2-AS	TCCACGTCGATTAGGCTTTC	56.3

Restriction site (*Bam* H I, GGATCC) was underlined.

Figure I-6. Relative positions of primers used for PCR amplification of *Poer1* (A) and *Poer2* (B). Black and white arrows are the primers for outer and inner PCR, respectively. Primer names correspond to those in Table I-8. ORF, open reading frame.

2-6 DNA シーケンシング

組換えプラスミドの抽出は Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad) の標準的プロトコルに従って行った。DNA シーケンシング用試料は SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies, Wisconsin, USA) の標準的プロトコルに従い、Table I-9 のプライマー (IR-labeled M13 forward/reverse primer) による PCR で調製した。塩基配列の解析は Gene Readir 4200 (LI-COR, Nebraska, USA) および Base Image IR Software ver. 4.2 (LI-COR) を使用して行った。

2-7 バイオインフォマティクス解析

Poer1 と *Poer2* がコードするアミノ酸配列の機能の推定および系統樹解析は Table I-9 のプログラムを使用して行った。

2-8 定量的 Real-time RT-PCR

cDNA の合成は、PrimeScript II 1ststrand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) の標準的プロトコルに従って行った。1 μg の Total RNA、PrimeScript II RTase、Oligo dT primer を使用し、42°C、1 時間インキュベート後、95°C、5 分間インキュベートすることで酵素を失活させた。

定量的 Real-time RT-PCR の試料は Table I-9 のプライマーを使用し、LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland) の標準的プロトコルに従って調製した。PCR および発現量の解析は LightCycler 1.5 (software version 3.5, Roche) を使用して行った。

2-9 ER 活性の測定

ER 活性の測定は第 1 章第 1 節 2-3 に従って行った。

2-10 香気の分析

4 g の新鮮なヒラタケの傘に 2 倍量 (w/v) の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。3,000×g、30 秒間、25°C で遠心分離後、1 ml の上清に 0.2 mg の *n*-ノナノールを含む 1 ml の *n*-ペンタンを加え、30 秒間混和した。3,000×g、5 分間、25°C で遠心分離後、香気を含む有機層を分取した。

GC 分析は第 1 章第 1 節 2-4 に従って行った。

Table I-9. Bioinfomatics programs used in this section.

program	URL	reference
homology search		
NCBI BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Altschul et al., 1990 and 1997
JGI *Pleurotus ostreatus* PC9 version 1.0 BLAST	http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=PleosPC9_1	–
JGI *Pleurotus ostreatus* PC15 version 2.0 BLAST	http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=PleosPC15_2	–
JGI Agaricomycotina BLAST	http://genome.jgi-psf.org/pages/blast.jsf?db=agaricomycotina	–
SGD *Saccharomyces cerevisiae* WU-BLAST2	http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl	Cherry et al., 1998
alignment		
ClustalW version 2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Larkin et al., 2007; Goujon et al., 2010
BOXSHADE version 3.21	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	–
molecular weight		
Compute pI/Mw tool	http://web.expasy.org/compute_pi/	Bjellqvist et al., 1993 and 1994; Gasteiger et al., 2005
motif search		
InterProScan version 4.8	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/	Quevillon et al., 2005; Hunter et al., 2009
Conserved domain-search	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml	Marchler-Bauer and Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2011
signal peptide prediction		
SignalP version 4.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Nielsen et al., 1997; Petersen et al., 2011
Mitoprot version 1.101	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html	Claros and Vincens, 1996
localization prediction		
WoLF PSORT	http://wolfpsort.org/	Horton et al., 2007
PSORT II	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html	Horton and Nakai, 1997; Nakai and Horton 1999
iPSORT	http://ipsort.hgc.jp/	Bannai et al., 2002
TargetP version 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	Emanuelsson et al., 2000
Predotar version 1.03	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html	Small et al., 2004
phylogenetic tree analysis		
BioEdit version 7.0.9.0	–	Hall, 1999
MEGA version 5.05	–	Kumar et al., 1994; Tamura et al., 2011

3 結果

3-1 内部アミノ酸配列の解析

ER I と II をコードする遺伝子の塩基配列を解析するため、アミノ酸シーケンサーを用いた Edman 分解および MALDI-TOF/TOF 質量分析装置を用いた *de novo* シーケンスによって内部アミノ酸配列を解析した。まず、SDS-PAGE で得られた単一バンド (Figure I-5) を V8 プロテアーゼ処理し、SDS-PAGE で分離した結果、ER I は 3 個、ER II は 4 個の断片に消化された (データ示さず)。得られたバンドをアミノ酸シーケンサーで解析した結果、ER I では 3 個、ER II では 1 個のペプチド配列が得られた (Table I-10)。また、トリプシン消化したペプチドの MALDI-TOF/TOF MS スペクトルを解析した結果、ER I では 6 個、ER II では 2 個のペプチド配列が得られた (Table I-10)。なお、非変性状態で SDS-PAGE により分離した多量体の ER I のバンドをトリプシン消化し、MALDI-TOF/TOF MS スペクトルを解析した結果、SDS-PAGE で得られたペプチド配列と同一のものが 2 個得られた (Table I-10)。

3-2 ER I と II をコードする遺伝子の解析

ER I と II をコードする遺伝子の塩基配列を得るため、Table I-10 で得られた内部アミノ酸配列からプライマーを設計し、3'-RACE PCR を行った。その結果、ER I の TVK/QVPGTYYAESPTESFDDER および ER II の QMATLPP/MTQI から設計した縮重プライマー (Poer1-S1 および Poer2-S1) を用いた Semi-nested PCR で増幅が確認された。3'末端の塩基配列を決定後、さらに 5'-RACE PCR 等による未解析領域の増幅、解析を行い、全長 cDNA 塩基配列を決定した (Figure I-6)。なお、ER II をコードする遺伝子に関しては 5'-RACE PCR での増幅がうまくいかず、FirstChoice RLM-RACE Kit を使用した 5'-RACE は困難であると判断した。そこで、全ゲノム配列が公開されているヒラタケ PC9 株および PC15 株の配列を参照して作製したプライマー (Poer2-S2 および Poer2-S3) を使用し、5'末端側塩基配列の増幅、解析を行った。

ER I をコードする遺伝子は *Poer1* (*P. ostreatus* enone reductase 1) と名付けた。*Poer1* の cDNA は 1,511 bp であり、443 個のアミノ酸 (分子量 49,617.74) をコードする 1,329 ヌクレオチドの ORF (Open reading frame) を含んでいた (Figure I-7)。*Poer1* がコードするタンパク質 PoER1 を NCBI BLASTP もしくは JGI Agaricomycotina BLASTP で相同性検索した結果、キウロコタケ *Stereum hirsutum* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 128099)、カワラタケ *Trametes versicolor* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 54134)、白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 136448) と高い相同性を示した (Figure

Table I-10. Partial amino acid sequences of ER I and II analyzed by Edman degradation or *de novo* sequencing.

sequence	method	protease
ER I		
PRXLTRQPIG	amino acid sequencer	V8
STVYRVA/NYDV/D	amino acid sequencer	V8
NYMSMLV/NLFV/D	amino acid sequencer	V8
VAYDVK/QPR	MALDI-TOF/TOF	trypsin
I/LFK/QPGK/QR	MALDI-TOF/TOF	trypsin
GHFGGWMPR	MALDI-TOF/TOF	trypsin
I/LVDNDAI/LVHSA	MALDI-TOF/TOF	trypsin
GPNI/LSK/QSFI/LTSVAAR [a]	MALDI-TOF/TOF	trypsin
TVK/QVPGTYYAESPTESFDDER [a]	MALDI-TOF/TOF	trypsin
ER II		
QMATLPP/MTQI	amino acid sequencer	V8
I/LVDI/LGI/LSN	MALDI-TOF/TOF	trypsin
SMK/QI/LPGI/LV	MALDI-TOF/TOF	trypsin

X indicates any amino acid residue, and a forward slash (/) indicates either/or.
[a] The partial amino acid sequences were the same as those sequenced in the native ER I isolated under nondenatured condition.

```
   1  AACCAACCAACCTTCTCTCAAACATTCGTTGGAAATGCCTCGACACTTGACGCGTCAACC   60
                                         M  P  R  H  L  T  R  Q  P
  61  CATAGGTCACTTTGGCGGATGGATGCCTCGAAACGCAGCCGTCCTCAAATCATGGCTCGC  120
       I  G  H  F  G  G  W  M  P  R  N  A  A  V  L  K  S  W  L  A
 121  CAAGAAGATAGAACAGGCTGGTGATCCGGAAGCCAACTCGAGCAGCTGGCATTCGGTCAT  180
       K  K  I  E  Q  A  G  D  P  E  A  N  S  S  S  W  H  S  V  I
 181  TCGCGACTTCCAACGGTTGATCGAAGACACCCCAGAGATCTACAAAGGATTCCACGAGAT  240
       R  D  F  Q  R  L  I  E  D  T  P  E  I  Y  K  G  F  H  E  M
 241  GTTCACCCAAATTCCTCCCGACCACGAGGACGACCCCACAGGCCAGCCTCAGGTCGAAAA  300
       F  T  Q  I  P  P  D  H  E  D  D  P  T  G  Q  P  Q  V  E  N
 301  TTACATGTCCATGCTGAATCTTTTCGACGTAATCATCAGTGAGGCACCAGCATGGCACTA  360
       Y  M  S  M  L  N  L  F  D  V  I  I  S  E  A  P  A  W  H  Y
 361  CGATCCTGAAAATCCGACAGCGAACAATCTCGTTGGATTTCCAATCAATGCTGTCCTCGA  420
       D  P  E  N  P  T  A  N  N  L  V  G  F  P  I  N  A  V  L  D
 421  CTGGCCGATGGGAACCGACGCGGGGTACGCGATGTTCATCAACCCCGCGGTCAATGCGCA  480
       W  P  M  G  T  D  A  G  Y  A  M  F  I  N  P  A  V  N  A  Q
 481  GCTCAAGAAGATGTTCGACGTCTGGTCTACTTACTTGACGTCGTACGCGTCCACCGACGT  540
       L  K  K  M  F  D  V  W  S  T  Y  L  T  S  Y  A  S  T  D  V
 541  TCTTTCGGACCGCGATAACGGGTGGTTCGGTCCTTCTGCGATTGAGCAACTGCCTGACTT  600
       L  S  D  R  D  N  G  W  F  G  P  S  A  I  E  Q  L  P  D  F
 601  CACTAGCACCTATGTTTGCGACCCCGACGATCCTTCGGGGCACTGCGGATTCACCTCTTG  660
       T  S  T  Y  V  C  D  P  D  D  P  S  G  H  C  G  F  T  S  W
 661  GGACCACTTCTTCACTAGACTCTTTCAGCCTGGACAAAGAGAGATCGACCCCGAGCTCGT  720
       D  H  F  F  T  R  L  F  Q  P  G  Q  R  E  I  D  P  E  L  V
 721  CGATAATGACGCTATTGTTCACAGCGCTTGCGAATCCACAGTCTATCGCGTTGCGTATGA  780
       D  N  D  A  I  V  H  S  A  C  E  S  T  V  Y  R  V  A  Y  D
 781  TGTCCAACCCCGCGATCGATTTTGGATCAAGGGCCAGCCATACTCAGTCATCCATATGCT  840
       V  Q  P  R  D  R  F  W  I  K  G  Q  P  Y  S  V  I  H  M  L
 841  CAATAACGACCCCTACGCACCTGCCTTCGTTGGTGGAGCCATCTTTCAAGCGTTCTTGAG  900
       N  N  D  P  Y  A  P  A  F  V  G  G  A  I  F  Q  A  F  L  S
 901  TGCCACCAAGTATCACCGTTGGCACAGCCCCGTAACTGGGGTCATAGTGAAAACCGTCCA  960
       A  T  K  Y  H  R  W  H  S  P  V  T  G  V  I  V  K  T  V  Q
 961  AGTACCGGGGACGTACTACGCCGAGTCTCCTACTGAGAGCTTTGACGACGAACGGGGCGC 1020
       V  P  G  T  Y  Y  A  E  S  P  T  E  S  F  D  D  E  R  G  A
1021  CGATCGCGCCGGTCCTAATCTTTCCCAGTCGTTCATCACCTCCGTGGCCGCTCGGTGCCT 1080
       D  P  A  G  P  N  L  S  Q  S  F  I  T  S  V  A  A  R  C  L
1081  TATCTTCATTCGCGCGAAAAACCCCCGTATCGGATTGATGTGCTTCGTCGCCGTCGGGAT 1140
       I  F  I  R  A  K  N  P  R  I  G  L  M  C  F  V  A  V  G  M
1141  GGCAGAGGTCTCCACCTGTGAGATGACAGTGAGGGAAGGCGACACTGTCGTGAAAGGCCA 1200
       A  E  V  S  T  C  E  M  T  V  R  E  G  D  T  V  V  K  G  Q
1201  GGAAATTGGGATGTTCCACTTTGGTGGATCTACGCATTGCCTCCTGTTCAGGCCGGAGAC 1260
       E  I  G  M  F  H  F  G  G  S  T  H  C  L  L  F  R  P  E  T
1261  CAACATCCAGATTGACGACCAGTATATCCCGAAGAGCGATACCGGTAGCCCGGAAGTGCA 1320
       N  I  Q  I  D  D  Q  Y  I  P  K  S  D  T  G  S  P  E  V  H
1321  CGTCAAGGCTGCTATTGCATGGGTTGGAGACAAGCCGTACAATTGAGCCCACGGAGAAGA 1380
       V  K  A  A  I  A  W  V  G  D  K  P  Y  N  *
1381  ACTCTGCGCGAAGAGTGGGGGCAATGAATTCATGATGTAGAACAGATTCTAGCAGATCGC 1440
1441  AAGGATATCAGCGTTTACGCATGTATAACGATGTACACAAATTTGACGTGAATAACCAGA 1500
1501  AAAAAAAAAAA  1511
```

Figure I-7. The DNA sequence of *Poer1* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk. The partial amino acid sequences determined by Edman degradation or *de novo* sequencing shown in Table I-10 are underlined. A GGST motif which is predicted to be the cleavage site of the two subunits (α and β) in Psd2 from *S. cerevisiae* is double underlined.

I-8 and Table I-11)。ヒラタケ PC9 株の BLASTP で相同性検索した結果、4 個の推定タンパク質 (JGI protein ID: 87121, 100405, 88522 and 100077) と相同性を示し (Table I-11)、PC15 株でも 4 個の推定タンパク質 (JGI protein ID: 168666, 1094176, 1062065 and 1045821) と相同性を示した (E-value < 1.00E−5)。また、出芽酵母 *S. cerevisiae* S288C 株の SGD WU-BLAST2 で相同性検索を行った結果、ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ 2 (Psd2) と相同性を示した (Table I-11)。モチーフ検索を行った結果、InterProScan では 3 種類の PSD 関連モチーフ (IPR003817, D210−D414; IPR005221, G205−P407; IPR022237, H46−L186) 、 Conserved domain-search では 2 個の PSD 関連モチーフ (PSSM ID, 193089 and 194662) が予測された。また、PSD は C 末端側に存在する XGST モチーフで開裂し、その結果形成された α、β サブユニットがヘテロ二量体を形成することで活性型となると推測されている (Schuiki and Daum, 2009)。PoER1 のモチーフを検索した結果、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Psd2 と同じ GGST モチーフが存在していた (Figure I-7 and Table I-11)。しかし、PoER1 のアミノ酸数 (443 個) は、Psd2 のアミノ酸数 (1,138 個) と大きく異なっており、他の特徴的なモチーフも予測されなかった。局在予測を行った結果、ミトコンドリアもしくは細胞質に局在すると予測された。

ER II をコードする遺伝子は *Poer2* と名付けた。*Poer2* の cDNA は 1,268 bp であり、341 個のアミノ酸 (分子量 36,945.04) をコードする 1,023 ヌクレオチドの ORF を含んでいた (Figure I-9)。*Poer2* がコードするタンパク質 PoER2 を NCBI BLASTP もしくは JGI Agaricomycotina BLASTP で相同性検索した結果、ナミダタケ *Serpula lacrymans* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 181652)、カワラタケ *T. versicolor* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 43259)、褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* 由来の推定タンパク質 (JGI protein ID: 126052) と高い相同性を示した (Figure I-10 and Table I-12)。ヒラタケ PC9 株の BLASTP で相同性検索した結果、4 個の推定タンパク質 (JGI protein ID: 56837, 86702, 56125 and 63644) と相同性を示し (Table I-12)、PC15 株では 3 個の推定タンパク質 (JGI protein ID: 1058647, 1078713 and 1046000) と相同性を示した (E-value < 1.00E−5)。なお、PC9 株の 56837、86702、56125 および PC15 株の 1058647、1078713 は同一 Scafford 上に並んでいた。また、出芽酵母 *S. cerevisiae* S288C 株の SGD WU-BLAST2 で相同性検索を行った結果、機能未知の推定タンパク質 Yll056c と相同性を示した (Table I-12)。モチーフ検索を行った結果、InterProScan では NAD(P)-binding ドメイン (IPR016040, N8−G182) および NmrA-like モチーフ (IPR008030, I9−D85)、Conserved domain-search では Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins superfamily モチーフ (PSSM ID, 199420) が予測された。局在予測を行った結果、細胞質に局在すると予測された。

```
PoER1            1 ------------------------------------------------------------
S.hirsutum       1 ------------------------------------------------------------
T.versicolor     1 MAPSSTTWRDTGSRILVQYVSKTPTPACLAQDMAIFSKLGQRTSAIRTYPQPLTNYIPSC
P.chrysosporium  1 --------------MAVSIDSETPKPLHLSR-----------------------------

PoER1            1 ------------MPRHLTRQPIGH-FGGWMPRNAAVLKSWLAKKIEQAGDPE-ANSSSWH
S.hirsutum       1 ----------------VSTKFVQHRLGGWLPNDQAVLESWLAKKIAQVDHPKWRTHQPLA
T.versicolor    61 PAMSRNVSTQPKATRAPQGALVKHRVGGWLPRNDEVLKTWLNKKIAIVEHPS-RVDEPLK
P.chrysosporium 18 ---------TQQNAPGQPT-RWINHRLGGWLPRDHDVLTRWLDKKIAHVEHPS-RINEPLH

PoER1           47 SVIRDFQRLIEDTPEIYKGFHEMFTQIP--PDHEDDPTGQPQ---VENYMSMLNLFDVII
S.hirsutum      45 PVIQDFQRFIEETPVVYVGFHEMFEQVPHKPPYNKDPTGKCQ---VRDYKLMLKLFDQII
T.versicolor   120 PVIQDFQTFVETNPVIYMYCNQMFEQVPTKPPYDNDPTGKPQ---VRDYKLMFKLFNDII
P.chrysosporium 68 IVIQDFKRFIESDPIIYMGFHQMFQQVPHKPPYNHDPTGKPQAYAVRDYHLMLRLFNHII

PoER1          102 SEAPAWHYDPENPTANNLVGFPINAVLDWPMGTDAGYAMFINPAVNAQLKKMFDVWSTYL
S.hirsutum     102 REAPAFED--------NDFVGFPINAILEWPMGTDAGLRTFVLQKVNEHFHKMFDVWSAFL
T.versicolor   177 GTAPSYED--------DDLVGFPINAILDWPMGTPAGMAFFSSPEVNVHFKNMFDVWTSFL
P.chrysosporium 128 TTAPSYED--------NDLVGFPINAILDWPMGTHAGFAMFSDPRVNDMFHRMFYVWSTFL

PoER1          162 TSYASTDVLSDRDNGWFGPSAIEQLPDFTSTYVCDPDDPSGHCGFTSWDHFFTRLFQPGQ
S.hirsutum     155 LSEESCYVLTSEDNGWFGPGASIAIPDFAETFICNPEAP--HYGFTSWDEFFTRLFRPGV
T.versicolor   230 TSSASCTVLDDSANGWFGPAASAALPNFEQTYVCDPTAP--FHGFKSWDDFFTRLFIPGV
P.chrysosporium 181 VSPESCSVLTTADDGWFGPEAVKKMPNFVETFVCDPAAP--HYGFKSWDDFFTRQFRAGV

PoER1          222 REIDPELVDNDAIVHSACESTVYRVAYDVQPRDRFWIKGQPYSVIHMLNNDPYAPAFVGG
S.hirsutum     213 R--PFALPEHDNVINSACESTVYKIEYNVKEHDCFWLKGEPYSLEHMLGGHELASQFVGG
T.versicolor   288 R--PVLFPDED-ITTSACESTVYRIAFDAQETDSFWLKGQPYSLVHMLNNDEFAAQFVGG
P.chrysosporium 239 R--PVQFPDDDSIVNNACESTRYRLAHGVKETDRFWLKGEPYSLAYMLAGAAAAAPFVGG

PoER1          282 AIFQAFLSATKYHRWHSPVTGVIVKTVQVPGTYYAESPTESFDDERGADPAGPNLSQSFI
S.hirsutum     271 TICQAYLSATKYHRWHSPVNGSIKKIVQLPGTYYAESPAMGFRDPNGPDPVGANDSQAFI
T.versicolor   345 TVYQAFLSATKYHRWHAPVNGTIVRVVTVPGTYYAESPEEGFPDP---DAAGPNLSQAFI
P.chrysosporium 297 TVYQAFLSATSYHCWHSPVNGTVVRTAVVPGTYYAESPVTGFPAP---DPAGPNNSQGFI
                                                                        ****
PoER1          342 TSVAARCLIFIRAKNPRIGLMCFVAVGMAEVSTCEMTVREGDTVVKGQEIGMFHFGGSTH
S.hirsutum     331 TAVAARALVFIEANNPDIGLMCFVAVGMAEVSTCEVTVKEGEKVAKGDQIGMFHFGGSTH
T.versicolor   402 TAVATRTLIFIQADNPTIGLLAFLCVGMAEVSTCEATVKAGDVVKKGDQLGMFHFGGSTH
P.chrysosporium 354 TSTAARAMIFVEADNPAIGLMCFLAVGMAEVSTCEVTVREGQKLRKGDPIGKFHFGGSTH

PoER1          402 CLLFRPETNIQIDDQYIPKSDTGSPEVHVKAAIAWVGDKPYN
S.hirsutum     391 CLIFRPETKRPSSLG----------------------------
T.versicolor   462 CLIFGPQVKVTFDPEIVIEAD-----VNLNAPIATVAAA---
P.chrysosporium 414 CLIFRPETKITFSDDLPKDEN-----VPLNAAIATVAS----
```

Figure I-8. Alignment of the deduced amino acid sequences of *Poer1* from *P. ostreatus* strain H1 with the most homologous proteins from *S. hirsutum* (JGI protein ID: 128099), *T. versicolor* (JGI protein ID: 54134) and *P. chrysosoprium* (JGI protein ID: 136448). For alignment, the ClustalW program was used. Identical and similar amino acid residues with PoER1 are shown on black and gray background, respectively. A GGST motifs are marked by asterisks.

Table I-11. The amino acid identities among PoER1 and homologous proteins from *P. ostreatus* strain PC9 and other fungi.

protein ID or name	amino acid size	homology (%)												motif	E-value (PoER1)
		P. ostreatus strain PC9							other fungi						
		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]		
PoER1	443	82	86	38	15	7	5	10	59	53	52	8	18	GGST	–
P. ostreatus strain PC9															
[1] 87121	446		75	37	15	2	3	8	57	53	52	8	19	GGST	0.00E+00
[2] 100405	324			28	14	6	5	9	44	46	42	11	17	–	3.12E–157
[3] 88522	334				15	2	1	13	39	38	39	10	19	GGSS	1.75E–68
[4] 100077	826					45	57	13	18	16	16	15	29	GGST	5.58E–18
[5] 130996	324						3	5	2	8	3	4	17	–	>1.00E–5
[6] 67192	200							11	3	4	3	4	29	–	>1.00E–5
[7] 54407	465								10	7	11	40	15	LGST	>1.00E–5
other fungi															
[8] *S. hirsutum* 128099	405									62	64	10	15	GGST	6.25E–137
[9] *T. versicolor* 54134	495										61	9	17	GGST	8.45E–137
[10] *P. chrysosporium* 136448	446											11	16	GGST	2.17E–131
[11] *S. cerevisiae* Psd1	500												14	LGST	>1.00E–5
[12] *S. cerevisiae* Psd2	1138													GGST	3.80E–14

Five to six digit numbers in left column indicate the JGI protein ID numbers.

```
   1  GGTCCAAGTATTCAGCAGCTGCCCGTGATGGTCTCCTAAATGCCCCTAACGCCTGGCACT   60
  61  TCTTCGTTCGCTCAGTCGAAATGCTGAATAATTCAAAAGTACCAATGATTTCTCAGCACA  120
 121  AGGAGGCCCCGCAAGCTCTTCTTTGTCCCTCTATCAGTGCTAGTAGCTATGCCCGCAAAC  180
                                                      M  P  A  N
 181  GCAGAGATCAACATATTCGTCACCGGAGCAACCGGTTATATCGGAGGAGCAGTACTCCTC  240
      A  E  I  N  I  F  V  T  G  A  T  G  Y  I  G  G  A  V  L  L
 241  AGGTTGCTTGGTCATCCCAGAATCAGCGACTTCAAAATCACTGCCCTTGTACGGTCGCCG  300
      R  L  L  G  H  P  R  I  S  D  F  K  I  T  A  L  V  R  S  P
 301  GACAAGGCTGAAAAGCTTAAATCGTTGGGTGTGGCCCCAGTCGTTGGTTCTCTAGATGAC  360
      D  K  A  E  K  L  K  S  L  G  V  A  P  V  V  G  S  L  D  D
 361  TCTGAGTTACTGAAGAAATTATGCTCCGAGTCCGATGTCGTCATGTCGATGGCTGATGCC  420
      S  E  L  L  K  K  L  C  S  E  S  D  V  V  M  S  M  A  D  A
 421  GATCATTTCCCCTCTGTACAAGCAATGCTGAGCGGACTGAAGACTAAGTTCGAGGCAACT  480
      D  H  F  P  S  V  Q  A  M  L  S  G  L  K  T  K  F  E  A  T
 481  GGCACGCCCCCCATCTTAATTCATACCTCCGGAACTGGTGTCCTGATGGACAACGCTGCC  540
      G  T  P  P  I  L  I  H  T  S  G  T  G  V  L  M  D  N  A  A
 541  GGTATGTACCAGTACGACACGATCTGGAACGACGCAGATCCGGAGCAAATGGCTACACTT  600
      G  M  Y  Q  Y  D  T  I  W  N  D  A  D  P  E  Q  M  A  T  L
 601  CCTCCGACCCAGATCCACCGCGATGTCGATCTAGCAGTTGTAGGCGCTGACGAAGAAGAA  660
      P  P  T  Q  I  H  R  D  V  D  L  A  V  V  G  A  D  E  E  E
 661  TACATCAAATCGTACATCGTATTACCTTCGACTATATGGGGAATCGCACAAGGCCGCCTG  720
      Y  I  K  S  Y  I  V  L  P  S  T  I  W  G  I  A  Q  G  R  L
 721  GTTGATCTCGGCATATCTAACAATCGATCTATGCAGATCCCGGGTCTTGTTCGGGCCAGC  780
      V  D  L  G  I  S  N  N  R  S  M  Q  I  P  G  L  V  R  A  S
 781  CTCGATCGGAAGCAGGGAGGAATGGTGGGTCTTGGAAAGAATCTGTGGCCTAACGTAAAC  840
      L  D  R  K  Q  G  G  M  V  G  L  G  K  N  L  W  P  N  V  N
 841  ATAGAAGAGCAGGGAGATTTGTTCATAATCTTGCTCGATGCGGTGCTCACGAAGCAAGAT  900
      I  E  E  Q  G  D  L  F  I  I  L  L  D  A  V  L  T  K  Q  D
 901  ACTGGACACGGTACCAACGGCTACTACTTTGGCGAGAGCGGCGAGCACTCTCTGTACGAT  960
      T  G  H  G  T  N  G  Y  Y  F  G  E  S  G  E  H  S  L  Y  D
 961  GTCGGGAAGGCGATAGCCGAAGTCCTTGTCGACCTAGGCATTGGGAAAAGCCGTGAACCT 1020
      V  G  K  A  I  A  E  V  L  V  D  L  G  I  G  K  S  R  E  P
1021  ACTACTTTCACGAAAGAGGAAATCGACAAGTACTTCCGAGGGAGATCATCCATGGGTAGC 1080
      T  T  F  T  K  E  E  I  D  K  Y  F  R  G  R  S  S  M  G  S
1081  AATTCGCGTTGCCGCGCAAATCACTCTCGTTCCCTCGGCTGGAACCCGCAGAAGAGCACT 1140
      N  S  R  C  R  A  N  H  S  R  S  L  G  W  N  P  Q  K  S  T
1141  GCAGACATGCTTGCTAGTATCCGGGCGGAAGTGGAGTACACATTGAAAGCCTAATCGACG 1200
      A  D  M  L  A  S  I  R  A  E  V  E  Y  T  L  K  A  *
1201  TGGAATATCTACTTGTTTACGGTAATCGATCCCTTTTTGTTGATGTTATTATGATAAGAC 1260
1261  CAAGGTTGTCACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1299
```

Figure I-9. The DNA sequence of *Poer2* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk. The partial amino acid sequences determined by Edman degradation or *de novo* sequencing shown in Table I-10 are underlined.

```
PoER2          1 MPANAEINIFVTGATGYIGGAVLLRLLGHPRISDFKITALVRSPDKAEKLKSLGVAPVVG
S.lacrymans    1 MPQPCNTHIFITGATGYIGGSVLANLLNHPKSDSFHITVLIRSEEKLPKFISVGVKAVIG
T.versicolor   1 MSRTDRVNVFILGATGYIGGSVLGRLLSSSDPSPFDISVLVRDAAKANKLEQFGVKSVIG
P.placenta     1 MSNSFQTSVFFVGATGYIGGAVLTRILQHPDRPRLDITALVRSPEKAKKLEKLGITPVIG

PoER2         61 SLDDSELLKKLCSESDVVMSMADADHFPSVQAMLSGLKTKFEATGTPPILIHTSGTGVLM
S.lacrymans   61 SHSDITLLSKLASEADVVFACADADNLDAAKAILSGLQKRYDAKGRASILIHTSGIAVLG
T.versicolor  61 KLDDVEKIRTLASRANIVIECADADHLESTKVVLAGLKQQYQDTGKVPTLIHTSGTGVLT
P.placenta    61 SLQDIGRLEHLASKADIVIACADADDLPAAQAILRGMARRKELTRDVPVLIHTSGTGVFS

PoER2        121 DNAAGMYQYDTIWNDADPEQMATLPPTQIHRDVDLAVVGADEEEYIKSYIVLPSTIWGIA
S.lacrymans  121 DNAAGKYGTITYSDLNVEQIESLKPTQMHRDVDLEIVSADQKGFVKTFIVLPSTIYGIA
T.versicolor 121 DHAAGMYATDIIYDDSDAEQLAKLPPEQPHRDVDRAVIAADEEGYVKTYIVLPSTIYGLA
P.placenta   121 DNAAGMHPTSTIYSDADVEQMASLSPNQIHRSIDLAVIDADSKGTIKAYIVLPSTIWGIA

PoER2        181 QGRLVDLGISNNRSMQIPGLVRASLDRKQGGMVGLGKNLWPNVNIEEQGDLFIILLDAVL
S.lacrymans  181 SGPLVDLGMQHSHSQQIPALVKASLDRGQGGMVGEGKNLWPNVHVDDISDLFIAMYDAAT
T.versicolor 181 TGPLVDAGIVNPQSQQIPRLIDVSKRRGQAGMVGEGKNMWPNVHIDDVVQLYEYLLNNVI
P.placenta   181 SGPLIDAQIANPHSQQIPMLIKASLARAQAGMVGEGKNLWPNVNIDEVADLFGMVFSAVR

PoER2        241 TKQDTG----HGTNGYYFGESGEHSLYDVGKAIAEVLVDLGIGKSREPTTFTKEEIDKYF
S.lacrymans  241 KNQPTGGQVGHGLEGMYFGENGEHRLYDISKTVSQVLYDLGKGKSPEPTTFTEEELKYF
T.versicolor 241 GNKDTG----HGKEGYYFGENGEHVLLDVAKTIIAGLKDLGLAESDEPTTFTKEEVDNIF
P.placenta   241 AGRPIG----HGTDGYYIGENGEHMLYDVSRAIIEALVTLGKASIDQVTTFSPEEIDKYF

PoER2        297 RGRSSMGSNSRCRANHSRSLGWNPQKSTADMLASIRAEVEYTLKA----------------
S.lacrymans  301 GG-AYLGSNSRCRAERSRSIGWNPKYITQDMLASIKPEVEASLSG----------------
T.versicolor 297 DGSESLGSNSRCRANRSRAVGWKPKKKRTEDMLASIKPEIQYVLSEKS--------------
P.placenta   297 GGSDYLGTNVRCRAEHSRAIGWKPVKITRHMLASYKLEIEAILQRPEELKILYLRICGKR

PoER2            ----------------------------------------
S.lacrymans      ----------------------------------------
T.versicolor     ----------------------------------------
P.placenta   357 AGPVKGQRAGREDRSVLLTRFSDTALLKHRVSAEYLGPE
```

Figure I-10. Alignment of the deduced amino acid sequences of *Poer2* from *P. ostreatus* strain H1 with the most homologous proteins from *S. lacrymans* (JGI protein ID: 181652), *T. versicolor* (JGI protein ID: 43259) and *P. placenta* (JGI protein ID: 126052). For alignment, the ClustalW program was used. Identical and similar amino acid residues are shown on black and gray background, respectively.

Table I-12. The amino acid identities among PoER2 and homologous proteins from *P. ostreatus* strain PC9 and other fungi.

protein ID or name	amino acid size	homology (%)								E-value (PoER2)
		P. ostreatus strain PC9				other fungi				
		[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	
PoER2	341	93	73	71	25	57	56	56	20	–
P. ostreatus strain PC9										
[1] 56837	339		73	71	25	56	54	53	20	0.00E+00
[2] 86702	329			73	24	53	49	51	18	2.13E–142
[3] 56125	303				26	59	54	56	13	4.51E–125
[4] 63644	354					26	29	23	15	8.31E–28
other fungi										
[5] *S. lacrymans* 181652	344						52	54	20	8.21E–113
[6] *T. versicolor* 43259	343							54	16	5.32E–111
[7] *P. placenta* 126052	395								22	2.15E–110
[8] *S. cerevisiae* YII056c	298									5.40E–11

Five to six digit numbers in left column indicate the JGI protein ID numbers.

PoER1 と PoER2 が相同性を示すヒラタケ PC9 株由来の推定タンパク質および出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の相同タンパク質の間で系統樹解析を行った結果、PoER1 と PoER2 は異なるクラスターに属していた (Figure I-11)。また、PoER1 と PoER2 は、ER 活性が知られている出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Oye2 と Oye3、およびヒラタケの OYE ホモログとも異なるクラスターに属していた。PoER1 には PSD 関連モチーフが予測されたが、ヒラタケ PC9 株には出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Psd1 および Psd2 と高い相同性を示す推定タンパク質がそれぞれ存在しており、これらは PoER1 とは異なるクラスターに属していた。

以上の結果より、PoER1 と PoER2 は 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元を触媒する新規の還元酵素であると推測された。

3-3 ER 活性、3-オクタノン量、*Poer1* および *Poer2* 発現量の季節的変化

秋から冬にかけて、キノコの香気は徐々に減少していくことが経験的に知られている。そこで、ヒラタケ子実体が発生する 10 月から 1 月にかけて、新鮮なヒラタケを新潟県新潟市南区白根の白根観光きのこ園から購入し、ヒラタケの傘の可溶性タンパク質量、ER 活性、3-オクタノン量を測定した。また、ヒラタケの傘由来の Total RNA から cDNA を合成し、*Poer1* と *Poer2* の発現量を調べた。なお、内在性コントロール遺伝子には *β-tubulin* (Cohen et al., 2001; Salame et al., 2010) もしくは 18S rDNA (Nishihara et al., 2007) を使用し、これらの発現を内部標準として *Poer1* と *Poer2* の発現量を補正した。新潟県新潟市の気温は気象庁のホームページ (http://www.jma.go.jp/jma/) を参照した。

新潟市の気温は 2010 年 10 月から 2011 年 1 月にかけて徐々に低下した (Figure I-13A)。ヒラタケの傘における可溶性タンパク質量がほぼ一定量であったのに対し (Figure I-12B)、ER 活性および 3-オクタノン量は気温の低下に伴って徐々に減少した (Figure I-12C and D)。*Poer1* と *Poer2* の発現量を調べた結果、*Poer1* は徐々に減少していく傾向を示したのに対し、*Poer2* は 10 月に減少し、1 月まで徐々に増加していく傾向を示した (Figure I-12E and F)。

ER 活性、3-オクタノン量、遺伝子発現量間の相関係数 (R) を求めた結果、ER 活性と 3-オクタノン量は互いに高い相関を示し (R = 0.88)、これらは *Poer2* より、*Poer1* に対して高い相関を示した (Table I-13)。同様の試験を 2009 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて行った結果でも、ER 活性、3-オクタノン量、*Poer1* 発現量の間で高い相関が示された (データ示さず)。

以上の結果より、ヒラタケの 3-オクタノン生合成は *Poer2* よりむしろ *Poer1* 由来の ER 活性による 1-オクテン-3-オンの還元に起因すると推定された。

Figure I-11. Phylogenetic analysis of PoER1 and PoER2 with the homologous proteins from *P. ostreatus* strain PC9 and *S. cerevisiae* strain S288C. Unrooted tree was constructed using MEGA version 5.05 software based on the ClustalW alignment according to the neighbor-joining method, with 1,000 bootstrapped datasets. Five to six digit numbers indicate the JGI protein ID numbers from *P. ostreatus* strain PC9. The proteins from *S. cerevisiae* strain S288C are underlined.

Figure I-12. Seasonal changes of the temperature in Niigata city (A), the amount of soluble protein (B), the ER activity (C), the amount of 3-octanone (D), and the relative expressions of *Poer1* (E) and *Poer2* (F) from the caps of field cultivated *P. ostreatus*. High, average and low temperatures a day (A) are indicated by black, gray and white circles, respectively. The relative expressions of *Poer1* (E) and *Poer2* (F) were corrected by the expression of *β-tubulin* (black circles) or 18S rDNA (white circles), respectively.

Table I-13. Correlation coefficients among the ER activity, the amount of 3-octanone and the relative expressions of *Poer1* and *Poer2* from the caps of field cultivated *P. ostreatus*.

	correlation coefficient (R)					
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
[1] ER activity	1.00	0.88	0.57	0.51	0.32	0.20
[2] 3-octanone		1.00	0.72	0.61	0.38	0.26
[3] *Poer1*/*β-tubulin*			1.00	0.90	−0.12	−0.16
[4] *Poer1*/18S rDNA				1.00	−0.35	−0.27
[5] *Poer2*/*β-tubulin*					1.00	0.90
[6] *Poer2*/18S rDNA						1.00

4 考察

4-1 PoER1 と PoER2 の構造

1-オクテン-3-オンはエノン骨格を持つ揮発性 C8 化合物であり、加熱キノコ様の香気を発することが知られている (Table I-1, Manning, 1985)。1-オクテン-3-オンは 1-オクテン-3-オールおよび 3-オクタノンの前駆体であると提唱されているが (Tressl et al., 1981; Chen and Wu, 1984)、キノコからその反応を触媒する酵素を単離した例はなく、本研究で行ったヒラタケ由来の ER I と II の精製が初めてである (第 1 章第 1 節)。他の生物では、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の E I と II (Wanner and Tressl, 1998) や *R*-プレゴンの還元反応を触媒するタバコ *N. tabacum* 由来の p74 レダクターゼ (Shimoda et al., 2002) の基質特異性試験において、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元活性が報告されている。しかし、これらの酵素をコードする遺伝子は明らかにされていない。

ER 活性を持つ酵素のうち、最も研究が進んでいるのは OYE である。OYE はエノン骨格を持つ化合物の炭素二重結合を還元するフラビン酵素として発見され、NAD(P)H を補酵素とした酸化還元反応機構が詳細に研究されている (Karplus et al., 1995)。また、一部の OYE は α,β-不飽和 γ-ラクトン、環状酸無水物、環状イミドなどの炭素二重結合も還元することが報告されている (Stuermer et al., 2007)。近年、OYE は不斉水素添加触媒能力を有することが報告され、生体触媒を用いた有機合成化学の研究分野でも非常に注目されている酵素である (Williams and Bruce, 2002; Bommarus and Polizzi, 2006)。ヒラタケ由来の ER も様々な基質を還元する能力を有しており (Table I-7)、香気生合成だけでなく、生体触媒への利用なども考えられる。

本節では、第 1 章第 1 節で精製した ER I と II の内部アミノ酸配列を解析後、これらをコードする遺伝子の cDNA 塩基配列を決定した。*Poer1* と *Poer2* がコードするタンパク質 PoER1 と PoER2 はそれぞれ分子量 49,617.74 と 36,945.04 であり、精製した ER I と II の推定分子量 47,000 と 37,000 とほぼ一致した (Figure I-5)。しかし、BLASTP を用いて相同性検索を行った結果、PoER1 と PoER2 が相同性を示したタンパク質は全て機能が未解析な推定タンパク質だった。そのため、PoER1 と PoER2 は新規の還元酵素であると推定された。

バイオインフォマティクス的手法により機能の推定を行った結果、PoER1 は PSD 関連のモチーフを持つタンパク質だった。PSD はホスファチジルセリンをホスファチジルエタノールアミンに脱炭酸する酵素であり、細菌、植物、動物、菌類などあらゆる生物のリン脂質代謝において重要な役割を果たす (Voelker, 1997; Schuiki and Daum, 2009)。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の PSD は良く研究されており、2 つタイプの PSD が報告されている。1 つはミトコンドリア内膜に局在

する Psd1 (Zinser et al., 1991; Clancey et al., 1993; Trotter et al., 1993)、もう 1 つはゴルジ体や液胞に存在する Psd2 である (Trotter and Voelker, 1995; Trotter et al., 1995)。PoER1 には複数の PSD モチーフが予測されたが、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来 Psd1、Psd2 の特徴とは異なる点が多く存在した。まず、PoER1 は Psd1 より Psd2 に対して高い相同性を示したが、PoER1 のアミノ酸数は 443 個、Psd2 は 1,138 個と大きく異なっていた (Table I-11)。また、PSD の C 末端側には α、β サブユニット開裂モチーフである XGST モチーフが存在するため、このモチーフを PoER1 で検索した結果、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Psd2 と同じ GGST が存在していたが (Figure I-7 and Table I-11)、N 末端側のカルシウム結合に関与する C2 ドメインは予測されなかった (Trotter et al., 1995; Igarashi et al., 1995; Kitamura et al., 2002)。一方、Psd1 のアミノ酸数は 500 個であり、PoER1 と類似していた。しかし、Psd1 は N 末端に Mitochondrial targeting sequence と Intermembrane space sorting signal が存在し、これらの部分の切断を伴ってミトコンドリアの内膜に局在化すると推定されている (Zinser et al., 1991; Clancey et al., 1993; Trotter et al., 1993)。PoER1 を V8 プロテアーゼ消化し、アミノ酸シーケンサーを使用した Edman 分解でそのペプチド断片の配列を解析した結果、PoER1 の N 末端に対応するペプチド配列 PRXLTRQPIG が決定されたため (Table I-10 and Figure I-7)、PoER1 の N 末端は切断されていないと推定された。さらに、ヒラタケ PC9 株には出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Psd1 と高い相同性を示す 54407、Psd2 と高い相同性を示す 37192、100077 がそれぞれ存在しており (Table I-11 and Figure I-11)、これらの PSD ホモログは Psd1 もしくは Psd2 に特徴的なドメイン、モチーフが予測された (データ示さず)。第 1 章第 1 節で精製した ER I はホモ四量体であると推定されたが、PSD は XGST モチーフで開裂し、生成した α と β サブユニットがヘテロ二量体を形成することで活性を得る (Baunaure et al., 2004)。さらに、大腸菌 *E. coli* 由来の PSD1 は α、β サブユニットのヘテロ二量体が多量体を形成していると報告されており (Dowhan et al., 1974)、ER I とは異なっている。なお、出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Psd1 と Psd2 がどのような多量体構造を形成しているのかは明らかにされていない。内部アミノ酸配列を解析した結果、PoER1 の C 末端のペプチド配列は得られず、XGST モチーフで切断されているかどうかは不明であった (Table I-10 and Figure I-7)。そのため、PoER1 の XGST モチーフが切断されているのか、PSD 活性を示すのかどうかは今後の研究課題の 1 つかもしれない。

担子菌の PSD に関する研究は現在まで報告されていないが、EST (Expression sequence tag) ライブラリーなどで得られた PSD と相同性を示す部分塩基配列がいくつか報告されている。Miyazaki ら (2005) は、シイタケ *L. edodes* において、PSD2 と相同性を示す部分配列 pri1n006 が原基と子実体で特異的に発現すると報

告している。また、Morel ら (2005) は、ヒダハタケ *Paxillus involutus* において、PSD と相同性を示す遺伝子の発現が菌糸体より外生菌根で顕著に増加すると報告している。さらに、ヒラタケ N36 株において、低重力下で栽培した子実体は、柄が短く、傘が平たくなると共に、PSD と相同性を示すクローン U082 の発現が増加すると報告されている (Miyazaki et al., 2010)。上記の研究では、キノコの生長にリン脂質の生合成が必須であることから、これらの遺伝子が重要な役割を果たすのではないかと推察されている (Sakai and Kajiwara, 2004)。しかし、PSD であると提案された上記の担子菌由来の部分塩基配列について、ヒラタケ PC9 株由来のタンパク質 (Table I-11 and Figure I-11) との間で相同性を比較した結果、全ての配列が、PSD に相同性を示すタンパク質 (JGI protein ID: 5447, 67192 and 100077) より PoER1 に相同性を示すタンパク質 (JGI protein ID: 87121, 88522 and 100405) と高い相同性を示した (データ示さず)。さらにヒラタケ N36 株由来のクローン U082 がコードする部分アミノ酸配列は PoER1 の I258–D330 と完全に一致した。以上より、*Poer1* と高い相同性を示す遺伝子がキノコの様々な生長段階で発現されていることから、PoER1 は ER 活性だけでなく、キノコの生長においても重要な役割を果たす可能性が推測された。

次いで、PoER2 の機能の推定を行った結果、NAD(P)-binding ドメインを持つ機能未知タンパク質であった。このドメインは Rossmann fold と呼ばれる構造モチーフを持ち、NAD などのヌクレオチド結合型タンパク質で頻繁に見られる (Rao and Rossmann, 1973)。また、PoER2 には NmrA-like モチーフも存在した。NmrA はコウジカビ属 *A. nidulans* の窒素代謝の制御に関与する転写活性化因子 AreA のリプレッサーとして知られている (Andrianopoulos et al., 1998)。近年、NmrA は Short-chain dehydrogenase/reductase ファミリーのウリジン二リン酸 (UDP)-ガラクトース-4-エピメラーゼと類似した立体構造を持ち、NAD と結合できることが報告された (Stammers et al., 2001)。しかし、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼの重要な触媒残基であるチロシン残基が NmrA ではメチオニン残基になっており、その活性はなくなっていると推察されている。第 1 章第 1 節のヒラタケ粗酵素液からの ER の精製において、ER II は TOYOPEARL AF-Red-650ML 樹脂に結合し、アフィニティークロマトグラフィーで精製可能であったが、ER I は樹脂に結合しなかった (データ示さず)。この樹脂に固定化された色素は立体構造が $NADP^+$に類似しており、NADPH 依存的還元酵素の精製などで使用されている (Ishihara et al., 2004; Uzura et al., 2009)。PoER2 は一般的な NAD(P)-binding ドメインを持つためこの樹脂で精製が可能であったと考えられる。一方、PoER1 では NAD(P)-binding ドメインは予測されなかったが、このドメインが存在しない還元酵素としては、フラビン酵素の OYE が挙げられる。OYE による炭素二重結合の還元は補因子である還元型フラビン由来の水素を使用し

て行われ、NAD(P)H はその酸化されたフラビンを還元するために使用されている (Fox and Karplus, 1994)。そのため、PoER1 は直接 NADPH が結合することで基質の還元反応を行っているのではなく、他の補因子の還元を補助することで補酵素として機能している可能性が推測された。また、PoER1 が既知の NAD(P)-binding ドメインではない新規の NADPH 結合部位を持つ可能性も考えられるが、触媒作用の機構についてはさらなる研究が必要だと思われる。

ヒラタケ PC9 株および PC15 株で PoER2 と相同性を示すタンパク質を検索した結果、ヒラタケ PC9 株には 4 個、PC15 株には 3 個の相同性タンパク質が推測された (Table I-12 and Figure I-11)。これら推定タンパク質のうち、PC9 株は 56125、86702、56837 の順番で Scaffold 5 上に、PC15 株は 1078713、1058647 の順番で Scaffold 8 上に連続して並んでいた。他の生物由来の PoER2 ホモログも同一 Scaffold 上に並んでいることから、これらは重複によって生じたと考えられる。また、*Poer2* の塩基配列の解析中、*Poer2* と高い相同性を持つ配列がクローニングされたことから、重複遺伝子のうちいずれかは発現していると考えられる (データ示さず)。

PoER2 は出芽酵母 *S. cerevisiae* における相同性検索の結果、機能未知の推定タンパク質 Yll056c と比較的高い相同性を示した (Table I-12 and Figure I-11)。*YLL056C* は 12 番染色体の 5'末端側に位置する遺伝子であり、硫黄欠乏ストレスによって発現量が増加する (Zhang et al., 2001a)。また、多剤耐性に関与する遺伝子を活性化する 2 つのパラロガス転写因子 Yrm1 と Yrr1 によって活性化されることが報告されているが (Lucau-Danila et al., 2003)、Yll056c がどのような機能を持つタンパク質かは解明されていない。Iwahashi ら (2006) は、出芽酵母 *S. cerevisiae* の培養時にアオカビ属 *Penicillium* やコウジカビ属 *Aspergillus* によって生産されるマイコトキシン Patulin を添加し、トランスクリプトーム解析を行った結果、*YLL056C* の発現量が 59 倍に増加したと報告している。また、それと同時に Aryl-alcohol dehydrogenase や Oye3 などの酸化還元酵素をコードする遺伝子の発現量も数十倍に増加したと報告している。Patulin 以外にも、Coniferyl aldehyde (Sundström et al., 2010) や Furfural (Heer et al., 2009) などの化合物でも *YLL056C* の発現が誘導される。これらの化合物はエノン基を持つ化合物である。エノン基を初めとする α,β-不飽和カルボニル化合物は細胞毒性を持っており、生物はこれらの解毒に関わる酸化還元酵素を多く持っている。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の OYE は α,β-不飽和カルボニル化合物の分解に関与することが知られており、*OYE2* 欠損株では細胞毒性を持つアクロレイン (CH_2=CH−CHO) への耐性が減少することが報告されている (Trotter et al., 2006)。ER II は 2-シクロヘキセン-1-オンやプレゴンなどの環状エノン化合物を還元する能力を持っており (Table I-7)、*Poer2* 発現量の季節的変化が ER 活性や 3-オクタノン量と相関を

示さなかったことから (Figure I-12 and Table I-13)、PoER2 は 3-オクタノン生合成よりむしろ、他の基質の還元に寄与しているのではないかと推測された。

4-2 3-オクタノン生合成における PoER の役割

ヒラタケは冬型のキノコであり、新潟県では 10 月上旬になると子実体が発生し始め、発生から 2–3 日すると株状に生長する。収穫期の間、ヒラタケの品質は一定ではないことが経験的に知られており、一般に旬を過ぎた 11 月下旬頃から子実体は小ぶりになり始め、傘の色が灰色から黒色へ変化し、香気も弱まるなど、品質の低下が引き起こされる。キノコの子実体の発生の条件としては、培地の栄養源、温度、光、炭酸ガス濃度などが挙げられる。これらの条件の中でも、決定的な要因となるのは温度であり、一般に子実体の生育は高温では早く、低温では遅い (Kües and Liu, 2000; Sánchez, 2010)。Uddin ら (2011) は、バングラディシュで栽培されるヒラタケ属 *Pleurotus* spp.の子実体発生の季節的変化について調査した結果、ヒラタケは 14–27°C、湿度 70–80%の季節において、子実体の数、収量が最大となると報告している。バングラディシュにおいて、14–27°C は 12–2 月に相当するが、新潟市では 9–10 月付近の気温であり、ヒラタケが発生し始める時期とほぼ一致する。このように、野生や栽培キノコの発生、収穫量の季節的、気候的変化に関する研究はいくつか報告されているが (Kauserud et al., 2008; Büntgen et al., 2012)、香気などの品質の変化については報告されていない。

本研究室の栗林 (2003) は 10 月から 12 月にかけてヒラタケの傘の LOX 活性と揮発性 C8 化合物量を測定した結果、これらが気温の変化と正の相関を示すことを明らかにした。そこで、気温の変化と ER および 3-オクタノンの生成の関係を明らかにするために、2009 年度と 2010 年度の 2 シーズン、10 月から 1 月にかけて ER 活性、3-オクタノン量、*Poer1* および *Poer2* 発現量を経時的に測定した。その結果、10 月から 1 月にかけて新潟市の気温は徐々に低下し (Figure I-12A)、ER 活性および 3-オクタノン量も徐々に減少した (Figure I-12C and D)。また、*Poer1* と *Poer2* の発現量を調べた結果、*Poer1* 発現量は気温の低下に伴い徐々に減少し (Figure I-12E)、ER 活性および 3-オクタノン量の間で相関が見られた (R = 0.51–0.72; Table I-13)。一方、*Poer2* 発現量との間ではあまり高い相関は見られなかった (R = 0.20–0.38; Figure I-12F and Table I-13)。2009 年度に試験した結果においても、ER 活性と 3-オクタノン量の季節的変化は *Poer2* より *Poer1* 発現量と高い相関を示したことから、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応には *Poer1* の発現に起因する ER 活性が重要な役割を果たしていると推定された。しかし、*Poer1* の発現量が低い日に *Poer2* 発現量がかなり高い場合、ER 活性が十分高い日があったことから (Figure I-12C, E and F)、全ての ER 活性が *Poer1* 発

現量だけに依存している訳ではないと推察された。気温の低下に伴って *Poer1* の発現量は徐々に低下したが、温度によってどのような転写制御を受けているのかは不明である。今後、*Poer1* の転写制御因子などの解析を行うことにより、3-オクタノン生合成機構の詳細がより明らかになると考えられる。

第1章第3節 1-オクテン-3-オール生合成におけるLOXとリノール酸代謝物の関係

1 緒言

揮発性C8化合物のうち、1-オクテン-3-オールは多くのキノコの主要な香気分子として知られ、閾値も低く、キノコの香気を決定する上で最も重要な分子とされている (Maga, 1981; Mau et al., 1994; Table I-1)。近年、ツクリタケ *A. bisporus* (Combet et al., 2009) およびキシメジ属 *Tricholoma inamoneum* (Wood et al., 2004) において、1-オクテン-3-オールは傷害時に特異的に生成される香気であると報告された。1-オクテン-3-オールは昆虫誘引 (Pierce et al., 1989) や抗菌活性 (Beltran-Garcia et al., 1997) などの生理活性も知られており、自己もしくは生物間のシグナル伝達分子として機能している可能性が推測されている。

キノコにおける 1-オクテン-3-オール生合成はリノール酸を出発物質とし、13-HPODもしくは10-HPODを中間化合物として経由する2つの経路が提唱されている (Figure I-1)。しかし、ツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*; Ẃurzenberger and Grosch, 1982) やウスヒラタケ *P. pulmonarius* (Assaf et al., 1995 and 1997) において、13-HPODからの1-オクテン-3-オールの生合成が確認されなかったことから、一般にキノコの1-オクテン-3-オールは10-HPODを経由して生成すると考えられている。また、Akakabe ら (2005) は、シイタケ *L. edodes* およびマツタケ *T. matsutake* において、1-オクテン-3-オールが 10*S*-HPOD から生合成されると報告しているが、その反応を触媒する酵素は発見されていない。

一方、キノコにおける 13-HPOD の生成は本研究室の高桑 (1998) と栗林 (2003) によって報告されている。Kuribayashi ら (2002) はヒラタケの傘からLOXを精製して諸性質を調べ、リノール酸から13-HPODへの過酸化反応を触媒する非ヘム鉄含有酵素であると報告した。この LOX をコードする遺伝子 *Polox1* は Tasaki らによって解析され、LOX 特有のドメインやリガンド残基が保存されていることが確認されている (未公表データ)。Belinky ら (1994) は、ウスヒラタケ *P. pulmonarius* において、LOX 活性と 1-オクテン-3-オールの間に相関があると報告しているが、LOX やリノール酸代謝物がどのように関係しているのかは明らかにされていない。

本節では、リノール酸代謝物と 1-オクテン-3-オール生合成の関係を明らかにするため、リノール酸やHPODの添加が1-オクテン-3-オールの生成量にどのような影響をおよぼすか調べた。また、秋から冬にかけてLOX活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量を経時的に測定し、1-オクテン-3-オール生合成との関係を推定した。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

ヒラタケ、アワビタケは白根観光きのこ園、他のキノコは新潟市内のスーパーマーケットで購入したものを使用した (Table I-2)。

リノール酸、塩酸-メタノール試薬 (HCl: 5−10%) は東京化成工業から購入した。リノール酸溶液は Ben-Aziz ら (1970) の方法に従って調製した。ダイズ *Glycine max* 由来の LOX-1 は Serva Feinbiocheminca GmbH. & Co. (Heidelberg, Germany) から購入した。マルガリン酸はナカライテスクから購入した。FAME (Fatty acid methyl esters) スタンダード (C8−C24)、キシレノールオレンジ、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、トリフェニルホスフィン (TPP) は Sigma Aldrich から購入した。

2-2 LOX 活性の測定

LOX 活性は共役ジエン法 (Sanz et al., 1992) に従い、反応によって生じる共役ジエン型 HPOD (9-および 13-HPOD) の吸光度の増加を測定することで求めた。また、粗酵素液の調製は第 1 章第 1 節 2-2 に従って行った。反応液は、粗酵素液、75 μl の 0.25% (v/v) Tween 20 を含む 2.5 mM リノール酸溶液 (pH 9.0) を 50 mM 緩衝液 (使用した緩衝液および pH はキノコの種類によって異なる) で 1.5 ml に定容することで調製した。紫外可視分光光度計 (Hitachi) を使用し、234 nm における吸光度の増加を 1 分間、25°C で測定した。1 unit は HPOD のモル吸光係数 (25,000 M^{-1} cm^{-1}) を用い、1 分間に 1 μmol の 9-および 13-HPOD が生成される酵素量として定義した。

2-3 LOX 反応生成物の分析

反応液は、1 unit の粗酵素液、1 ml の 0.25% (v/v) Tween 20 を含む 25 mM リノール酸溶液 (pH 9.0) を 100 mM 緩衝液で 10 ml に定容することで調製した。エアーポンプを用いて 5 ml/秒で空気を送りながら 30 分間、25°C で過酸化反応後、反応生成物を Bligh と Dyer (1959) の方法に従って抽出した。分取した下層を窒素気流下で乾固後、2 ml の *n*-ヘキサン/2-プロパノール/酢酸 (989:10:1, v/v/v) に溶解した。

反応生成物は高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) により分析し、得られたリテンションタイムを標準物質と比較することで同定した。HPLC は Mightysil Si 60 (i.d. 4.6 × 250 mm, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) カラムを装備した HPLC システム [Column oven, L-5025 (Hitachi); Intelligent pump, L-6300 (Hitachi); UV-VIS detector,

L-4250; Chromato-integrator, D-2500 (Hitachi)] を用いた。溶媒は *n*-ヘキサン/2-プロパノール/酢酸 (989:10:1, v/v/v) を流速 1 ml/分で流し、共役ジエン型 HPOD (9- および 13-HPOD) は 234 nm、それ以外の HPOD は 205 nm で検出した。

2-4 HPOD 異性体の調製

13-HPOD はダイズ *G. max* 由来の LOX-1 を使用して作製した。9-HPOD は Sekiya ら (1977) の方法に従って、ジャガイモ *Solanum tuberosum* の塊茎から粗精製した LOX を使用して作製した。10-および 12-HPOD は Kermasha ら (2002) の方法に従い、リノール酸を光酸化することで作製した。各 HPOD は第 1 章第 3 節 2-3 に従って HPLC 分析し、目的の HPOD が含まれるピーク部分を分取した。HPOD 溶液は 0.25% (v/v) Tween 20 を含む 50 mM Na_2HPO_4 (pH 9.0)、もしくはエタノール (EtOH) に溶解することで調製した。

2-5 基質添加による 1-オクテン-3-オール生成量の変化

4 g の新鮮なキノコの傘にリノール酸溶液、10-および 13-HPOD 溶液を様々な濃度で添加後、50 mM 緩衝液で 12 ml に定容し、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。

香気の抽出は第 1 章第 2 節 2-10、GC 分析は第 1 章第 1 節 2-4 に従って行った。

2-6 定量的 Real-time RT-PCR

Total RNA の抽出および cDNA の合成は第 1 章第 2 節 2-4 および 2-8 に従って行った。

定量的 Real-time RT-PCR は *Polox1* (Polox1-S, GCACGGCTTCAAACAACGAA, Tm = 56.3°C; Polox1-AS, AAACACCCGCAAGAATGACC, Tm = 56.3°C) および *β-tubulin* (Poβ-tubulin-S/AS)、18S rDNA (Po18S rDNA-S/AS) を増幅するプライマー (Table I-8) を使用し、第 1 章第 2 節 2-8 に従って行った。

2-7 脂肪酸の分析

4 g の新鮮なヒラタケの傘に 2 倍量 (w/v) の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。1 ml のホモジネートを使用し、Bligh と Dyer (1959) の方法を改変した Combet ら (2009) の方法に従って脂質を抽出した。

1 ml の抽出脂質溶液に内部標準として 50 nmol のマルガリン酸 (C17:0) を添加し、70°C、窒素気流下で乾固した。1 ml の塩酸-メタノール試薬 (HCl: 5−10%) を添加し、2 時間、100°C でインキュベートした。室温まで冷却後、2 ml の超純

水と 1.5 ml の *n*-ヘキサンを添加し、激しく混和した。3,000×g、5 分間、25°C で遠心分離後、1 ml の上層を分取し、25°C、窒素気流下で乾固した。乾固した試料を 100 µl の *n*-ヘキサンに溶解し、分析用試料とした。

抽出した FAME を GC 分析し、得られたリテンションタイムを FAME スタンダード (C8–C24) と比較することにより同定すると共に、内部標準法により定量した。ガスクロマトグラフは、TC-WAX キャピラリーカラム (i.d. 0.25 mm × 60 m, df 0.25 µm, GL Science) を装備した GC-2014 (Shimadzu)、検出器には FID を用いた。キャリアガスにはヘリウムを使用し、流速 1 ml/分、スプリット比は 1:50 に設定した。インジェクターおよびディテクター温度はそれぞれ 250°C に設定し、カラム温度は 230°C の恒温分析とした。

2-8 ヒドロペルオキシドの定量

脂質の抽出は第 1 章第 3 節 2-7 に従って行った。

ヒドロペルオキシドの分析は Combet ら (2009) の方法に従って行った。100 µl の抽出脂質溶液を 25°C、窒素気流下で乾固後、100 µl のメタノールに溶解し、30 分間、氷上、暗所で静置した。900 µl の FOX2 reagent (100 µM キシレノールオレンジ、250 µM 硫酸アンモニウム鉄(II)、25 mM H_2SO_4、4.4 mM BHT を含むメタノール; Nourooz-Zadeh et al., 1995) を添加後、30 分間、25°C、暗所で静置し、560 nm における吸光度を紫外可視分光光度計 (Hitachi) で測定した。ブランクは 100 µl の 2.5 mM TPP を含むメタノールに溶解した試料から得られた吸光度を使用した。ヒドロペルオキシドの濃度はそのモル吸光係数 (6,000 M^{-1} cm^{-1}) を用い、試料の吸光度からブランクの吸光度を差し引いた数値から求めた (Gay et al., 1999)。

2-9 バイオインフォマティクス解析

タンパク質の相同性検索、機能の推定、系統樹解析は Table I-9 のプログラムを使用して行った。

3 結果

3-1 様々なキノコの LOX 活性および反応生成物

8 種類のキノコ (Table I-2) から粗酵素液を調製し、リノール酸を基質として使用した LOX 活性の測定およびその反応生成物の分析を行った。なお、反応は各キノコで揮発性 C8 化合物が最も多く生成された pH で行った。

共役ジエン型 HPOD の生成を指標に LOX 活性を測定した結果、ヒラタケで最も高い活性が得られ (1.73 units/g)、マイタケ *G. frondosa* (1.31 units/g)、アワビタケ *Pleurotus* sp. (0.74 units/g) でも比較的高い活性が認められた (Table I-14)。一方、ヒラタケ属 *Pleurotus* のエリンギ *P. eryngii* ではほとんど LOX 活性は得られなかった。

次いで、粗酵素液とリノール酸をインキュベートし、反応生成物を HPLC 分析した。なお、共役ジエン構造を持つ HPOD (9-および 13-HPOD) は 234 nm、それ以外の HPOD は 205 nm で検出した。まず、234 nm で反応生成物を分析した結果、LOX 活性が高かったヒラタケとアワビタケ *Pleurotus* sp.では 13-HPOD、マイタケ *G. frondosa* では 9-HPOD が検出されたのに対し、他のキノコでは共役ジエン型 HPOD は検出されなかった (Table I-14)。一方、205 nm で他の HPOD を分析した結果、9-および 13-HPOD 以外の HPOD は検出されなかった (データ示さず)。

以上の結果より、リノール酸から 13-HPOD への反応を触媒する LOX はヒラタケ属 *Pleurotus* のキノコに特異的に存在する可能性が示唆された。

3-2 リノール酸および HPOD の添加が 1-オクテン-3-オール生合成におよぼす影響

揮発性 C8 化合物の基質であるリノール酸および HPOD がキノコの 1-オクテン-3-オール生合成へおよぼす影響を調べるため、キノコのホモジナイズ時にこれらの基質を添加し、1-オクテン-3-オール生成量の増加を測定した。

まず、ヒラタケにリノール酸を添加してホモジナイズした結果、4 mM の添加まで 1-オクテン-3-オールの生成量は増加し、6 mM の添加で減少した (Figure I-13A)。また、ツクリタケ *A. bisporus* においてもリノール酸の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成量は増加した (Figure I-13B)。LOX 活性を測定した他 6 種類のキノコ (エリンギ *P. eryngii*、アワビタケ *Pleurotus* sp.、シイタケ *L. edodes*、ブナシメジ *H. marmoreus*、エノキタケ *F. velutipes*、マイタケ *G. frondosa*) についても調べた結果、全てのキノコでリノール酸の添加により 1-オクテン-3-オールの生成量が増加し、その生成量はシイタケ *L. edodes* で最も多かった (648.54 μg/g, 6 mM linoleic acid, データ示さず)。

Table I-14. LOX activity and the reaction product with linoleic acid in the caps of various mushrooms.

mushroom	LOX activity (units/g mushroom)	product (234 nm)
P. ostreatus (hiratake) [a]	1.73	13-HPOD
P. eryngii (eringi) [b]	0.10	N.D.
Pleurotus sp. (awabitake) [a]	0.74	13-HPOD
A. bisporus (tsukuritake) [a]	N.D.	N.D.
L. edodes (shiitake) [d]	0.56	N.D.
H. marmoreus (bunashimeji) [c]	0.38	N.D.
F. velutipes (enokitake) [b]	0.37	N.D.
G. frondosa (maitake) [a]	1.31	9-HPOD

LOX activities were measured spectrophotometrically at 234 nm, because conjugated diene system of the reaction products have absorption maximum at the wavelength. The reaction was assayed with the following buffers: [a] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0); [b] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0); [c] 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0); [d] 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0). N.D., not detected.

Figure I-13. Effects of linoleic acid (A and B) and HPODs (C and D) concentration on the increase of 1-octen-3-ol in the caps of *P. ostreatus* (A and C) and *A. bisporus* (B and D). 10- and 13-HPODs are indicated triangles and squares, respectively. Linoleic acid and HPODs were dissolved in 50 mM Na_2HPO_4 (pH 9.0) containing 0.25% (v/v) Tween 20. Error bars are based on ± SD.

次いで、酵素反応もしくは光酸化で 9-、10-、12-、13-HPOD を作製し、0.25% (v/v) Tween 20 を含む HPOD 溶液として調製した。これらの HPOD のうち、10- と 12-HPOD は大量調製が困難であるため、ヒラタケおよび 10-HPOD を経由する 1-オクテン-3-オール生合成経路が報告されているツクリタケ *A. bisporus* (Wurzenberger and Grosch, 1982 and 1984a–c) のみを用いて試験した。各 HPOD をヒラタケに添加してホモジナイズした結果、10-および 13-HPOD の添加では 1-オクテン-3-オールの生成量が増加したのに対し (Figure I-13C)、9-および 12-HPOD の添加では全く増加しなかった (データ示さず)。一方、10-HPOD を経由する生合成経路が報告されているツクリタケ *A. bisporus* では 10-HPOD の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成量が増加し、13-HPOD の添加でもわずかに増加した (Figure I-13D)。

Wurzenberger と Grosch (1982) は、ツクリタケ *P. bisporus* (*A. bisporus*) に添加された 13-HPOD は 1-オクテン-3-オールに変換されないと報告しているが、本研究では、13-HPOD の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成量がわずかに増加した (Figure I-14D)。Wurzenberger と Grosch (1982) とは異なり、本研究でツクリタケ *A. bisporus* に添加した 13-HPOD の濃度はかなり低い。そのため、13-HPOD から 1-オクテン-3-オールが本来微量に生合成されている可能性も考えられるが、13-HPOD 溶液中に含まれている界面活性剤 Tween 20 の影響も考えられた。ヒラタケにおける 1-オクテン-3-オール生成量の増加もこの界面活性剤によって引き起こされている可能性が考えられたため (Figure I-13C)、EtOH に溶解した 13-HPOD 溶液を調製し、その添加の影響についても調べた。なお、13-HPOD の添加による 1-オクテン-3-オール生成量の増加はヒラタケで顕著だったため、同じヒラタケ属 *Pleurotus* であるアワビタケ *Pleurotus* sp.、エリンギ *P. eryngii* でも調べた。EtOH に溶解した 13-HPOD をキノコの傘に添加してホモジナイズした結果、ヒラタケでは 20 μM、アワビタケ *Pleurotus* sp.では 10 μM までは 13-HPOD の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成量が増加したが、それ以上の濃度では減少した (Figure I-14A and B)。一方、エリンギ *P. eryngii* では 13-HPOD の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成量は増加しなかった (Figure I-14C)。

以上の結果より、リノール酸からの 1-オクテン-3-オールの生合成は多くのキノコで共通であり、ヒラタケは中間化合物として 10-および 13-HPOD どちらからでも 1-オクテン-3-オールを生合成可能であることが示唆された。

3-3 ヒラタケにおける LOX 活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量の季節的変化

2010 年 10 月から 2011 年 1 月にかけて、ヒラタケの傘における LOX 活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量を測

Figure I-14. Effect of 13-HPOD concentration on the increase of 1-octen-3-ol in the caps of *P. ostreatus* (A), *Pleurotus* sp. (B) and *P. eryngii* (C). 13-HPOD was dissolved in ethanol. Error bars are based on ± SD.

定した。なお、新潟市の気温、可溶性タンパク質量は Figure I-12A と B に示した。

10 月から 1 月にかけて、新潟市の気温は徐々に低下し (Figure I-12A)、LOX 活性と *Polox1* の発現量も共に減少した (Figure I-15A and B)。また、これらの間では R = 0.75−0.89 の高い相関係数が示され、この LOX 活性が *Polox1* 発現量に起因するものと推察された (Table I-15)。脂肪酸を分析した結果、主要な脂肪酸としてリノール酸 (C18:2) が検出され、他にパルミチン酸 (C16:0)、オレイン酸 (C18:1)、ステアリン酸 (C18:0) も検出された。しかし、その量は気温の低下に関係になく、ほぼ一定量で推移した (Figure I-15C)。また、抽出した脂質中のヒドロペルオキシド (HPOD を含む脂肪酸過酸化物) を測定した結果、気温の低下に伴う減少は見られなかったが (Figure I-15D)、LOX 活性との間で R = 0.67 の相関を示した (Table I-15)。一方、1-オクテン-3-オール量は測定時期によって多少の増減はあるものの、ほぼ一定量で推移したが (Figure I-15E)、他の因子との相関係数は低かった (Table I-15)。

以上の結果より、LOX 活性および *Polox1* 発現量は気温の低下に伴って徐々に減少し、13-HPOD が減少していると推測されるのに対し、ヒドロペルオキシド量や 1-オクテン-3-オール量は減少しなかった。そのため、ヒラタケの 1-オクテン-3-オールは 13-HPOD ではないヒドロペルオキシド、すなわち 10-HPOD を経由して主に生合成されていると推測された。

Figure I-15. Seasonal changes of the LOX activity (A), the relative expression of *Polox1* (B) and the amounts of fatty acids (C), hydroperoxide (D) and 1-octen-3-ol (E) from the caps of field cultivated *P. ostreatus*. The expression of *Polox1* (B) was corrected by the expression of *β-tubulin* (black circles) or 18S rDNA (white circles), respectively. The amounts of linoleic, palmitic, oleic and stearic acids (C) are indicated black, gray and white circles, and black squares, respectively.

Table I-15. Correlation coefficients among the LOX activity, the relative expression of *Polox1* and the amounts of fatty acids, hydroperoxide and 1-octen-3-ol from the caps of field cultivated *P. ostreatus*.

	correlation coefficient (R)								
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]
[1] LOX activity	1.00	0.75	0.89	0.10	0.40	0.45	0.60	0.67	0.17
[2] *Polox1*/*β-tubulin*		1.00	0.93	0.03	0.39	0.53	0.85	0.18	0.03
[3] *Polox1*/18S rDNA			1.00	0.10	0.48	0.56	0.83	0.41	0.22
[4] linoleic acid				1.00	0.69	0.50	0.31	0.02	0.02
[5] palmitic acid					1.00	0.80	0.61	0.09	0.25
[6] oleic acid						1.00	0.65	0.13	0.03
[7] stearic acid							1.00	0.06	0.03
[8] hydroperoxide								1.00	0.21
[9] 1-octen-3-ol									1.00

4 考察

4-1 キノコの 1-オクテン-3-オール生合成におよぼすリノール酸代謝物の影響

キノコにおける 1-オクテン-3-オール生合成はリノール酸を出発物質とし、LOX 由来の 13-HPOD もしくは 10-HPOD を中間化合物として経由する 2 つの経路が提唱されている (Figure I-1)。しかし、Wurzenberger と Grosch (1982) はツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*) において、^{14}C 標識したリノール酸や 13-HPOD が 1-オクテン-3-オールに変換されなかったと報告している。また、ウスヒラタケ *P. pulmonarius* (Assaf et al., 1995 and 1997)、もしくはマツオウジ属 *Lentinus decadetes* (Matsui et al., 2003) においても、13-HPOD の添加は 1-オクテン-3-オールの増加を促進せず、一般にキノコの 1-オクテン-3-オール生合成は 10-HPOD を経由すると考えられている。

本研究室の高桑 (1998) は、ヒラタケの傘に高い LOX 活性が存在すると報告し、その LOX は Kuribayashi ら (2002) によって精製されている。本研究において、8 種類のキノコの LOX 活性を測定した結果、ヒラタケ、アワビタケ *Pleurotus* sp.、マイタケ *G. frondosa* で比較的高い活性が得られた (Table I-14)。また、共役ジエン型 HPOD が検出されたキノコもこの 3 種類のみであり、ヒラタケとアワビタケ *Pleurotus* sp.では 13-HPOD、マイタケ *G. frondosa* では 9-HPOD が検出された (Table I-14)。ヒラタケと同属のアワビタケ *Pleurotus* sp.は比較的 LOX 活性が高かったことから、ヒラタケ由来の LOX に類似した酵素が存在すると推測される。一方、マイタケ *G. frondosa* で検出された 9-HPOD は、HPL 活性により 2*Z*-オクテン-1-オンに開裂し、最終的に 2*Z*-オクテン-1-オールに変換される経路が提案されているが (Tressl et al., 1981)、この揮発性 C8 化合物はキノコの主要な香気成分として報告されていない。

リノール酸の添加が 1-オクテン-3-オールの生合成におよぼす影響について調べた結果、8 種類のキノコ全てで 1-オクテン-3-オール生成量の増加が認められたが、その増加量はキノコ間で大きく異なっていた。リノール酸添加による 1-オクテン-3-オール生成量の増加は様々なキノコで報告されており (Tressl et al., 1982; Assaf et al., 1997; Matsui et al., 2003)、ツクリタケ *A. bisporus* (Husson et al., 2001)、シイタケ *L. edodes*、マツタケ *T. matsutake* (Akakabe et al., 2005) では 10-HPOD の添加による 1-オクテン-3-オールの増加も報告されている。そこで、本研究では 13-HPOD が検出されるヒラタケおよび 10-HPOD から 1-オクテン-3-オールが生合成されることが報告されているツクリタケ *A. bisporus* (Wurzenberger and Grosch, 1982 and 1984a–c) を用いて試験した。その結果、ヒラタケでは 10-および 13-HPOD どちらの添加によっても 1-オクテン-3-オールの生成量は増加した (Figure I-13C)。一方、ツクリタケ *A. bisporus* では 10-HPOD の

添加によって 1-オクテン-3-オールが増加したが、13-HPOD の添加でも 1-オクテン-3-オールの生成量がわずかに増加した (Figure I-13D)。Wurzenberger と Grosch (1982) は、ツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*) に ^{14}C 標識した 13-HPOD を添加した結果、標識された 1-オクテン-3-オールは生成されなかったと報告している。そのため、ツクリタケ *A. bisporus* における 1-オクテン-3-オール生成量の増加は 13-HPOD 溶液に含まれている界面活性剤の影響が考えられ、ヒラタケの 13-HPOD による 1-オクテン-3-オール生成量の増加もこれに起因する可能性が考えられた。そこで、13-HPOD を EtOH に高濃度で溶解した溶液を調製し、添加する溶媒の影響を最小限にした添加試験を行った。その結果、EtOH に溶解した 13-HPOD の添加でもヒラタケの 1-オクテン-3-オール生成量の増加が確認された (Figure I-14A)。また、LOX 反応生成物として 13-HPOD が検出されたアワビタケ *Pleurotus* sp.においても 1-オクテン-3-オール生成量の増加が確認された (Figure I-14B)。以上の結果より、ヒラタケは 10-および 13-HPOD どちらからも 1-オクテン-3-オールを生合成可能であることが示された。

本研究において、基質の過剰な添加は 1-オクテン-3-オール生成の阻害を引き起こすことが示された (Figure I-13 and I-14)。ツクリタケ *A. bisporus* においても、1.5 mM 以上のリノール酸の添加によって 1-オクテン-3-オールの生成が阻害されると報告されている (Husson et al., 2001)。Assaf ら (1997) は、ヒラタケ属 *Pleurotus* であるウスヒラタケ *P. pulmonarius* 菌糸体を使用し、13-HPOD から 1-オクテン-3-オールは生合成されないと報告している。これは菌糸体ホモジネートに 13-HPOD を添加すると、濃度の増加に伴って 1-オクテン-3-オール量が減少する結果から推定されているが、添加された 13-HPOD は本研究で試験した濃度より高濃度である。また、ツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*; Wurzenberger and Grosch, 1982)、もしくはマツオウジ属 *L. decadetes* (Matsui et al., 2003) を用いた試験においても、本研究と比較して、添加された 13-HPOD は高濃度であった。脂肪酸の過酸化によって生じるヒドロペルオキシドは細胞にダメージを与えることが知られており (Evans et al., 1998; Ferreira et al., 2011)、生体内に高濃度で存在するとは考え難い。また、本研究で共役ジエン構造を持たない HPOD を HPLC 分析した結果、10-HPOD は全てのキノコで検出されず (データ示さず)、生体内における HPOD 濃度が極微量、もしくは即座に開裂されている可能性が示唆された。そのため、他の研究で 13-HPOD から 1-オクテン-3-オールが生成されなかった原因は、高濃度の基質の添加が生合成反応を阻害したためである可能性が推測される。しかし、本研究で用いたヒラタケおよびアワビタケ *Pleurotus* sp.においても、13-HPOD が実際に 1-オクテン-3-オールに開裂したかどうかの直接的な証拠は得られていない。そのため、標識したリノール酸もしくは HPOD を用いた試験を行うことにより、その経路の詳細が明らかになると思われる。

4-2 菌類の LOX

8 種類のキノコの LOX 活性および反応生成物を測定した結果、リノール酸から 9-および 13-HPOD を生成するキノコは 3 種類しか確認されなかった (Table I-14)。また、Akakabe ら (2005) は、マツタケ *T. matsutake* で 13-HPOD が検出されると報告しているが、その反応を触媒する酵素については言及していない。LOX は 1Z,4Z ペンタジエン構造を持つ多価不飽和脂肪酸に分子状酸素を導入し、共役ジエン構造 (−C=C−C=C−) を持つヒドロペルオキシドを生成する酵素である。LOX は植物、動物、微生物中に幅広く存在する酵素であり、その反応生成物には位置異性体、立体異性体が多く存在する。脂質の酸化によって生じる化合物はオキシリピンと呼ばれ、生理学的に重要な化合物が多く存在するが、植物のオキシリピン生合成反応の多くは LOX によるリノール酸やリノレン酸の過酸化反応から始まる。LOX によって生成された 9-もしくは 13-ヒドロペルオキシドはシトクロム P450 の CYP74 族に属する HPL (Hydroperoxide lyase)、AOS (Allene oxide synthase)、DES (Divinyl ether synthase)、もしくは EAS (Epoxy alcohol synthase) やペルオキシゲナーゼなどのオキシリピン代謝酵素によって最終化合物に変化する (Feussner et al., 2001; Stumpe and Feussner, 2006; Andreou et al., 2009)。AOS を経由する最終化合物の一種であるジャスモン酸は、植物の防御機構、果実の熟化、塊茎形成など様々な役割を果たす植物ホルモンであり、13-ヒドロペルオキシドを経由して生合成される (Schaller et al., 2005; Schaller and Stintzi, 2009)。また、障害ストレス応答で生成される揮発性 C6 化合物は 13-ヒドロペルオキシド、揮発性 C9 化合物は 9-ヒドロペルオキシドから HPL によって生合成される (Matsui, 2006)。動物では、基質としてアラキドン酸が使用され、LOX 反応生成物からプロスタグランジン類、ロイコトリエン類、リポキシン類などの様々な生理活性物質が生合成される (Smith, 2006)。

菌類の LOX 活性は多くの子嚢菌で確認されているが (Bisakowski et al., 1995 and 2000; Perraud et al., 1999; Perraud and Kermasha, 2000)、単一に精製され、諸性質が解明された LOX は少ない。最初に精製された子嚢菌 LOX は乾腐病菌 *Fusarium oxysporum* 由来の 12 kDa の小さな LOX であり、リノール酸から 9-HPOD を生成すると報告された (Matsuda et al., 1976 and 1978a and b)。その後、子嚢菌由来の LOX は好熱性真菌 *Thermomyces lanuginosus* (Li et al., 2001)、イモタケ属 *Terfezia claveryi* (Pérez-Gilabert et al., 2005a and b)、コムギ病原菌 *Gaeumannomyces graminis* (Hamberg et al., 1998; Su and Oliw, 1998) から精製され、その諸性質が明らかにされている。これらの研究から、菌類には 2 種類の LOX が存在することが明らかとなり、1 つは他の生物と同じく補因子として非ヘム鉄を含有する一般的な LOX で、リノール酸から 9-もしくは 13-HPOD への過酸化反応を触媒する。もう 1 つは補因子としてマンガンを含有する MnLOX であり、コムギ病原菌 *G.*

graminis 由来の MnLOX はリノール酸から 11*S*-HPOD と 13*R*-HPOD を生成すると報告されている (Figure I-16; Oliw, 2002)。

本研究では香気生合成への LOX の関与に着目しているが、子嚢菌の LOX は形態学的、生理学的に重要な役割を果たすと報告されている。例えば、コウジカビ属 *Aspergillus* spp.において、LOX 反応生成物の 13*S*-HPOD の添加は有性胞子形成や菌核形成を阻害すると報告されている (Gardner et al., 1998)。また、コウジカビ属 *Aspergillus ochraceus* の Ao*loxA* 欠損株は生体内の 13-HPOD およびマイコトキシン Ochratoxin A 生成量が減少し、分生子形成の遅延と菌核形成の促進が引き起こされると報告されている (Reverberi et al., 2010)。他の子嚢菌では、酵母型/菌糸型の二形性を示すニレ立枯病菌 *Ceratocystis ulmi* への LOX 阻害剤の添加は、菌糸型から酵母型への形態的変化を引き起こすと報告されている (Jensen et al., 1992)。さらに、イモタケ属 *T. claveryi* においては、子嚢果に多くの脂質が含まれることから、LOX が貯蔵中の脂質酸敗臭の形成に関与すると推察されている (Murcia et al., 2003)。

一方、担子菌における LOX の精製は本研究室の Kuribayashi ら (2002) がヒラタケの傘から精製した酵素以外全く報告されていない。Kuribayashi ら (2002) がヒラタケから精製した LOX はリノール酸から 13-HPOD への過酸化反応を触媒する非ヘム鉄含有 LOX であることが明らかにされている (Figure I-16)。この LOX をコードする遺伝子 *Polox1* は Tasaki らによって解析され (DDBJ accession number AB472334)、LOX 特有のドメインや非ヘム鉄リガンド残基 (H322, H327, H507, N511 and I640) が保存されていることが確認されている (未公表データ)。PoLOX1 を NCBI BLASTP で相同性検索した結果、ヒラタケ属 *Pleurotus sapidus* 由来の Valencene oxygenase と高い相同性を示した (Figure I-17)。Valencene oxygenase は二環セキステルペン (+)-Valencene から (+)-Nootkatone への酸化を触媒する酵素として精製され、その遺伝子は子嚢菌由来の LOX と相同性を示すことが報告されている (Fraatz et al., 2009; Krügener et al., 2010)。ヒラタケ属 *P. sapidus* 由来の Valencene oxygenase は PoLOX1 より N 末端が 244 残基短いが、非ヘム鉄リガンドである 5 残基 (H78, H83, H263, N267 and I396) は保存されており、金属含有タンパク質であることが報告されている (Fraatz et al., 2009)。しかし、その LOX 活性は報告されていない。また、JGI が提供するヒラタケ PC9 株および PC15 株の BLASTP で PoLOX1 を相同性検索した結果、それぞれ 3 個 (JGI protein ID: 62321, 115204 and 89179) と 2 個 (JGI protein ID: 1068582 and 1056091) の推定タンパク質と相同性を示した (E-value < 1.00E−5)。しかし、他の 40 菌種の担子菌ゲノムデータベースで相同性検索を行った結果、3 菌種 (モリノカレバタケ属 *Gymnopus luxurians* で 2 個、クリタケ *Hypholoma sublateritium* で 5 個、オオキツネタケ *Laccaria bicolor* で 3 個) でしか相同性を示すタンパク質は見つか

Figure I-16. Fungal oxylipins from linoleic acid. DiHOD, dihydroxyoctadecadienoic acid; DOX, dioxygenase; HOD, hydroxyoctadecadienoic acid; HOM, hydroxyoctadecenoic acid; HPOD, hydroperoxyoctadecadienoic acid; KOD, keto-octadecadienoic acid; LDS, linoleate diol synthase; LOX, lipoxygenase; ODA, oxo decenoic acid; Ppo, psi-producing oxygenase; psi, precocious sexual inducer.

Figure I-17. Phylogenetic analysis of LOX-like proteins from fungi, plantae, animalia and bacteria. Unrooted tree was constructed using MEGA version 5.05 software based on the ClustalW alignment according to the neighbor-joining method, with 1,000 bootstrapped datasets. PoLOX1 from *P. ostreatus* strain H1 is boxed. Basidiomycota (mushrooms), ascomycota (molds), plantae (*A. thaliana* and moss), animalia (mouse and coral) and bacteria (cyanobacteria and *Pseudomonas*) are indicated by orange, yellow, green, violet and blue signs, respectively. Characterized and predicted LOX-like proteins are indicated by circles and squares, respectively. *Aspergillus flavus* (ACC96233); *Aspergillus fumigatus* (XP_746463 and XP_746844); *Arabidopsis thaliana*: AtLOX1 (Q06327), AtLOX2 (P38418), AtLOX3, (Q9LNR3), AtLOX4 (Q9FNX8), AtLOX5 (Q9LUW0), AtLOX6 (Q9CAG3); *Cyanothece* sp.: CsLOX1 (YP_002372604), CsLOX2 (YP_002373243); *Gaeumannomyces graminis*: MnLOX (AAK81882); *Grosmannia clavigera* (EFX01408); *Magnaporthe oryzae*: MnLOX (EHA49687); *Mus musculus*: 5-LOX (NP_033792), 8-LOX (NP_033791), 12R-LOX (NP_035916), p12-LOX (P39655), e12-LOX (70582), 15-LOX (NP_033790); *Mycosphaerella graminicola* (EGP90986); *Neurospora crassa* (CAD37061); *Nostoc punctiforme*: NpLOX1 (YP_001869751), NpLOX2

(YP_001864265); *Nostoc* sp.: NspLOX (NP_478445); *Physcomitrella patens*: PpLOX1 (CAE47464); *Pleurotus ostreatus*: PoLOX1 (BAI99788); *Pleurotus sapidus*: valencene oxygenase (CAQ87588); *Plexaura homomalla*: Ph8R-LOX (O16025); *Pseudomonas aeruginosa*: LoxA (AAL85880). The predicted LOX-like proteins from basidiomycota refered JGI fungal genome databases. Some predicted LOXs structurally distinct from others were excluded.

らなかった (Figure I-17)。本研究でLOX活性を測定した8種類のキノコのうち、3種類のキノコでしか共役ジエン型HPODが検出されなかったこと (Table I-14)、そして多くの担子菌ゲノム中に PoLOX1 と相同性を示すタンパク質の存在が認められなかったことから (Figure I-17)、担子菌のLOXはキノコにとって一般的な酵素ではないことが示唆された。また、ヒラタケからのLOXの精製において、他の LOX アイソザイムの存在が確認されていないことに加え (栗林, 2003)、PoLOX1 と Valencene oxygenase はそれぞれ異なるヒラタケ PC9 株由来の推定タンパク質と相同性を示したことから (Figure I-17)、これらは基質や反応などが異なる別の酵素である可能性が推測された。

4-3 LOX 活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量の季節的変化

ヒラタケは高いLOX活性を持ち (Table I-14)、その反応生成物である13-HPODから1-オクテン-3-オールを生合成できると推測された (Figure I-13C and I-14A)。しかし、13-HPOD を生成するキノコが少ないことや (Table I-14)、ヒラタケの PoLOX1 と相同性を示すタンパク質が他の担子菌ゲノム中にほとんど存在しないことから (Figure I-17)、13-HPODがヒラタケの1-オクテン-3-オール生合成経路の主要な中間化合物であるかどうかは疑問である。第1章第2節において、ヒラタケのER活性および3-オクタノンの季節的変化を調べた結果、これらは高い相関を示しており (Figure I-12 and Table I-13)、酵素活性と香気量の間に密接な関係があることが推測された。栗林 (2003) は、ヒラタケの LOX 活性は1-オクテン-3-オール生成量と相関を示すと報告しているが、香気の抽出法などの実験手法は本研究と異なっている。そこで、2010年10月から2011年1月にかけてLOX活性、*Polox1* 発現量、脂肪酸量、ヒドロペルオキシド量、1-オクテン-3-オール量を経時的に測定した。

まず、ヒラタケの傘の脂肪酸を分析した結果、リノール酸 (C18:2) が最も多量に存在し、次いでパルミチン酸 (C16:0)、オレイン酸 (C18:1)、ステアリン酸 (C18:0) が検出された (Figure I-15C)。キノコの脂肪酸組成は主にリノール酸、オレイン酸、パルミチン酸の含量が多いと報告されており (Barros et al., 2008; Kalač, 2009; Ribeiro et al., 2009)、ヒラタケにおいてもこれらの脂肪酸が比較的多量に存在すると報告されている (Hadar and Cohen-Arazi, 1986; Dimou et al., 2002; Yilmaz et al., 2006; Pedneault et al., 2007; Lee et al., 2011)。ヒラタケの傘の脂肪酸の季節的変化を調べた結果、気温の低下に伴う減少は認められなかったため、ヒラタケの傘には1-オクテン-3-オール生合成のための基質が十分量存在していると推測された。

LOX 活性は新潟市の気温の低下に伴って徐々に減少し、*Polox1* の発現量も

徐々に減少した (Figure I-15A and B)。ヒラタケ PC9 株中には PoLOX1 と相同性を示す推定タンパク質が 3 個存在するが、LOX 活性と *Polox1* 発現量の間で高い相関が示されたことから (Table I-15)、粗酵素液中の LOX 活性はこの *Polox1* の発現量に起因することが示唆された。しかし、LOX 活性および *Polox1* の発現量が秋から冬にかけて徐々に減少しているにも関わらず (Figure I-15A and B)、その反応生成物である 13-HPOD を含むヒドロペルオキシド量は減少せずに一定量で推移した (Figure I-15D)。LOX 活性とヒドロペルオキシド量は相関を示しているが (R = 0.67; Table I-15)、ヒドロペルオキシド量が気温の低下に伴って減少しなかったことから、ヒドロペルオキシド中には 13-HPOD だけではなく、他の HPOD が含まれている可能性が推測された。また、1-オクテン-3-オール量も減少せずに一定量で推移したが (Figure I-15E)、LOX 活性との間で相関は認められなかった (R = 0.17; Table I-15)。そのため、ヒラタケ中の 1-オクテン-3-オールは 13-HPOD ではないヒドロペルオキシド、すなわち 10-HPOD を経由して生合成されている可能性が推測された。ヒドロペルオキシド中にどのような HPOD が存在するかについては調べていないため、13-HPOD と 10-HPOD がどのような存在比で含まれているのかは不明であるが、ヒラタケの 1-オクテン-3-オールは主に 10-HPOD を経由して生合成されていると推測された。

栗林 (2003) は気温の低下に伴って 1-オクテン-3-オールが徐々に減少すると報告しているが、本研究ではそのような傾向は見られなかった。その理由の 1 つとして、香気の抽出方法の違いが考えられた。栗林はヒラタケ粗酵素液からパージアンドトラップ法により香気を捕集し、ジエチルエーテルで抽出後、窒素気流下で濃縮している。一方、本研究ではヒラタケ粗酵素液から直接 *n*-ペンタンで香気を抽出し、GC 分析した。キノコの香気量は抽出、濃縮、分析方法によって大きく異なることが知られているが (Larsen and Frisvad, 1995; Jeleń, 2003)、本研究では短時間で香気を抽出しているため、栗林 (2003) より香気の分解、変化が少ないと考えられる。

以上より、キノコの 1-オクテン-3-オールは主に中間化合物として 10-HPOD を経由して生合成されると推測された。一方、ヒラタケやアワビタケ *Pleurotus* sp. は高い LOX 活性を持ち、13-HPOD を経由する 1-オクテン-3-オール生合成経路を有するが、13-HPOD が検出されるキノコが少ないこと (Table I-14)、LOX をコードする遺伝子を持つ担子菌が少ないこと (Figure I-17)、ヒラタケの LOX 活性と 1-オクテン-3-オール量の季節的変化に相関が見られなかったことから (Figure I-15 and Table I-15)、13-HPOD を経由した 1-オクテン-3-オール生合成はヒラタケにおいて主要な経路ではないことが示唆された。

4-4 菌類の DOX

上記の結果、考察より、ヒラタケの 1-オクテン-3-オールは 13-HPOD からも生合成されるが、他のキノコと同様、10-HPOD からの生合成が主要な経路であると推測された。キノコだけでなく、子嚢菌 *Penicillium* spp. (Kermasha et al., 2002) や清酒麹 (高橋ら, 2007) の抽出物においても、10-HPOD から 1-オクテン-3-オールが生合成されると報告されている。

リノール酸から 10-HPOD を生成する酵素はキノコで報告されていないが、子嚢菌ではこの反応を触媒する酵素 LDS (Linoleate diol synthase) が報告されている。最初に発見されたコムギ病原菌 *G. graminis* 由来の 7,8-LDS はヘム鉄含有二機能酵素であり、リノール酸を 8*R*-HPOD に過酸化し、次いで 7,8-DiHOD (Dihydroxyoctadecadienoic acid) に異性化する (Figure I-16; Su et al., 1995 and 1998)。この反応は LDS の N 末端側に存在するジオキシゲナーゼ (DOX) ドメインと C 末端側に存在するイソメラーゼドメインによって触媒される (Hamberg et al., 1994; Hörnsten et al., 1999)。コウジカビ属 *Aspergillus* spp.のオキシリピン分析では、リノール酸の反応生成物として 8*R*-HOD (Hydroxyoctadecadienoic acid)、10*R*-HOD、8*R*-HPOD、10*R*-HPOD、5*S*,8*R*-DiHOD、8*R*,11*S*-DiHOD などが検出されているが (Garscha et al., 2007)、これらのうち、8-HOD は Psi (Precocious sexual inducer) Bα、5*S*,8*R*-DiHOD は PsiCα とも呼ばれ、コウジカビ属 *Aspergillus* spp.の有性胞子の形成を促進するオキシリピンとしての生理学的機能が報告されている (Tsitsigiannis and Keller, 2007; Brodhun and Feussner, 2011; Christensen and Kolomiets, 2011)。コウジカビ属 *A. nidulans* のゲノムが公開後 (Galagan et al., 2005)、コムギ病原菌 *G. graminis* 由来 7,8-LDS と高い相同性を示す 3 つの遺伝子が発見され、Psi の生合成に関与することから、これらは Ppo (Psi-producing oxygenase) と名付けられた (Tsitsigiannis et al., 2004a and b and 2005)。その後の研究から、PpoA は 5,8-LDS、PpoB は 8,11-LDS、PpoC は 10*R*-DOX 活性を持つと報告されている (Figure I-16; Garscha et al., 2007; Jernerén et al., 2010)。PpoC はリノール酸から 10*R*-HPOD を生成するだけでなく、ペルオキシゲナーゼ活性による 10*R*-HOD や EAS 活性による 12,13-epoxy-10-HOM (Hydroxyoctadecenoic acid) の生成も行う多機能酵素であることが報告されている (Brodhun et al., 2010)。また、PpoC から生成された 10*R*-HPOD の一部は非酵素的に揮発性 C8 化合物と 10-ODA に変換されると報告されており (Brodhun et al., 2010)、揮発性 C8 化合物生合成に関与する 10-HPOD 生成酵素の候補として考えられる (Figure I-16)。

ヒラタケにおいて 10-HPOD を生成する酵素を探索するために、ヒラタケ PC9 株のゲノムデータベースを用いて PpoC と高い相同性を示すタンパク質を検索した結果、4 個の候補遺伝子 (JGI protein ID: 125737, 117559, 74322 and 106676) が見出された (Figure I-18)。これらの候補遺伝子は子嚢菌由来の Ppo や LDS と

Figure I-18. Phylogenetic analysis of DOX-like proteins from *Aspergillus* spp., *G. graminis*, *Magnaporthe grisea* and *P. ostreatus* strain PC9. Unrooted tree was constructed using MEGA version 5.05 software based on the ClustalW alignment according to the neighbor-joining method, with 1,000 bootstrapped datasets. *Aspergillus flavus*: PpoA (ACO57610); PpoB (ACO57611); PpoC (ACO57612); PpoD (ACO57613); *Aspergillus fumigatus*: PpoA (XP_751750); PpoB(EAL84400); PpoC (XP_754409); *Aspergillus nidulans*: PpoA (AAR88626); PpoB (AAX35769); PpoC (AAT36614); *Aspergillus niger*: PpoA (XP_001401954); PpoC (XP_001399926); PpoD (XP_001395220); *Gaeumannomyces graminis*: 7,8-LDS (Q9UUS2); *Magnaporthe grisea*: 7,8-LDS (AAR21080). The predicted DOXs from *P. ostreatus* strain PC9 refered JGI fungal genome database.

異なるクラスターに属し、PpoC とのアミノ酸相同性は 30%程度であったが、Ppo や LDS で明らかとなっている DOX ドメインの重要なヒスチジン残基 (ヘム鉄リガンド) やチロシン残基 (チロシルラジカル生成) が保存されていた (Table I-16)。Ppo や LDS の DOX 反応生成物の位置特異性は、いくつかの重要な触媒残基の置換により変化することが報告されている (Garscha and Oliw, 2008 and 2009; Brodhun et al., 2009 and 2010; Koch et al., in press)。例えば、コウジカビ属 *A. nidulans* 由来の PpoC では、L385A のアミノ酸置換により、10-HPOD の減少と 8-HPOD の増加が導かれる (Brodhun et al., 2010)。ヒラタケ PC9 株由来の Ppo ホモログはコウジカビ属 *Aspergillus* 由来の PpoC (ロイシン残基)、PpoA (バリン残基) とやや異なるアミノ酸残基 (アラニン、バリン、フェニルアラニン残基) であった (Table I-16)。また、PpoA のイソメラーゼドメイン (P450 heme-thiolate ドメイン) は機能的であるのに対し、PpoC はイソメラーゼ活性を示さず、機能が欠損していると報告されている (Brodhun et al., 2010)。これは、PpoA のイソメラーゼドメインに存在するシステイン残基が 5 番目のヘムリガンドとして機能するためであり (Denisov et al., 2005; Van Bogaert et al., 2011)、コウジカビ属 *A. fumigatus* 由来の PpoA における C1006A のアミノ酸置換はイソメラーゼ活性の消失を招く (Brodhun et al., 2009; Table I-16)。しかし、コウジカビ属 *A. nidulans* の PpoC における G1039C のアミノ酸置換ではイソメラーゼ活性は回復せず、他の残基も重要な役割を果たしているのではないかと推察されている (Brodhun et al., 2010; Table I-16)。

Wadman ら (2005) は、ツクリタケ *A. bisporus* の粗酵素液とリノール酸の反応生成物を分析し、8*R*-HOD、10-HOD、8*R*,11*S*-DiHOD、8-HOM が検出されると報告している。また、ヒラタケ *P. ostreatus*、シイタケ *L. edodes*、キヒダマツシメジ *Tricholoma fulvum*、カンバタケ *Piptoporus betulinus* などにおいても 8*R*-HOD や 8*R*,11*S*-DiHOD が検出されており (Wadman et al., 2005)、多くのキノコが Ppo ホモログによる過酸化反応を行っていると推察される。DOX 活性を持つ Ppo ホモログはキノコで 10-HPOD を生成する酵素として期待されているため (Combet et al., 2006)、今後この候補遺伝子の機能を解析することにより、ヒラタケの香気生合成に関与する DOX の新しい知見が得られるかもしれない。

以上より、ヒラタケ中にも 10-HPOD を生成する DOX が存在する可能性が示唆された。しかし、DOX が関与する 1-オクテン-3-オール生合成経路にもいくつか疑問が残っている。PpoC はリノール酸から 10*R*-HPOD への過酸化反応を触媒する DOX 活性を持つが (Brodhun et al., 2010)、シイタケ *L. edodes* では 1-オクテン-3-オールの前駆体として 10*S*-HPOD しか検出されておらず (Akakabe et al., 2005; Garscha and Oliw, 2007)、その光学異性が異なる。子嚢菌と担子菌由来の DOX 反応生成物の光学異性が元々違うのか、その異性化酵素が存在するのかど

Table I-16. Critical residues for DOX and isomerase activities of Ppo or LDS.

		DOX domain							isomerase domain		
organism	protein	His	Tyr	Leu/Val	Val	Arg	Tyr	His	Asn	His	Gly/Cys
A. nidulans	PpoC	H	Y	L385 [d]	V	R	Y427 [d]	H	G	Q	G1039 [d]
A. fumigatus	PpoC	H	Y	L384 [b]	V388 [b]	R	Y	H	A	H	F
A. nidulans	PpoA	H	Y327 [e]	V328 [d]	L	R336 [e]	Y	H	N887 [e]	H	C
A. fumigatus	PpoA	H	Y	V	L	R	Y374 [c]	H	N	H1004 [c]	C1006 [c]
G. graminis	7,8-LDS	H203 [a]	Y329 [a]	V330 [b]	L	R	Y376 [a]	H379 [a]	(N)	–	–
P. ostreatus PC9	125737	H	Y	A	L	E	Y	H	(T)	H	C
P. ostreatus PC9	117559	H	Y	A	L	E	Y	H	(N)	H	C
P. ostreatus PC9	74322	H	Y	V	L	R	Y	H	(H)	Y	L
P. ostreatus PC9	106676	–	Y	F	L	R	Y	H	(D)	Y	A

The His residues of DOX domain are ligands of heam-iron. The Tyr residues of DOX domain require to produce tyrosyl radical which are used for abstraction of hydrogen from C8 of linoleic acid. The Leu, Val and Arg residues of DOX domain determine regiospecificity of reaction products. The Asn, His and Cys residues of isomerase domain are important for the isomerase activity and the Cys residue of PpoA is known as the fifth heme iron ligand. Unclear residues obtained from multiple alignment are parenthesized (X). Critical residues demonstrated by site-directed mutageneses are examined in following references: [a] Garscha and Oliw, 2008; [b] Garscha and Oliw, 2009; [c] Brodhun et al., 2009; [d] Brodhun et al., 2010; [e] Koch et al., in press.

うかは不明である。また、10-HPOD がどのように 1-オクテン-3-オールに開裂するのかについても未解明である。HPOD を開裂する酵素 HPL はシトクロム P450 の CYP74 族であるが、この酵素に特徴的なモチーフを持つタンパク質は菌類では見つからないと報告されている (Lee et al., 2008)。一方、10-HPOD は不安定な化合物であり (Badings, 1970)、10*R*-HPOD の一部は非酵素的に 1-オクテン-3-オールと 10-ODA に開裂することも報告されている (Brodhun et al., 2010)。そのため、HPOD から 1-オクテン-3-オールへの開裂反応が酵素的、非酵素的反応であるのかを明らかにする必要もあると思われる。今後、ヒラタケ由来の脂肪酸代謝酵素のさらなる探索により、揮発性 C8 化合物生合成機構の詳細が明らかになることが期待される。

第 1 章第 4 節 ヒラタケにおける揮発性 C8 化合物の酸化還元反応

1 緒言

キノコには、1-オクテン-3-オール、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールなど、官能基や二重結合が異なる複数の揮発性C8化合物が存在し、様々な香気を示すことが知られている (Table I-1)。これらの香気成分はその構造の類似性から、互いの酸化還元反応により生じていると推測される。

Wanner と Tressl (1998) は、出芽酵母 *S. cerevisiae* の粗酵素抽出物に 1-オクテン-3-オン (不飽和ケトン) を添加し、反応生成物を分析した結果、90%が 3-オクタノン (飽和ケトン)、8%が 1-オクテン-3-オール (不飽和アルコール)、2%が 3-オクタノール (飽和アルコール) に還元されると報告した。類似した還元反応は乳酸菌と出芽酵母 *S. cerevisiae* で発酵させたサワードウの揮発性 C9 化合物でも観察されており、2*E*-ノネナール (不飽和アルデヒド) が 2*E*-ノネノール (不飽和アルコール) やノネナール (飽和アルデヒド) に還元され、両者は最終的にノナノール (飽和アルコール) に還元される (Vermeulen et al., 2007)。また、May ら (1979) は、グラム陰性菌 *Pseudomonas oleovorans* において、1-オクテン-3-オールと 3-オクタノールがそれぞれ 1-オクテン-3-オンと 3-オクタノンへ変換される反応を報告している。一方、キノコにおいては、ツクリタケ *A. bisporus* へ添加された 1-オクテン-3-オンが、1-オクテン-3-オールと 3-オクタノンに酵素的に還元されると報告されているが (Chen and Wu, 1984)、多くの研究が 1-オクテン-3-オールの生合成のみに着目しているため、キノコにおける揮発性 C8 化合物の酸化還元反応は全く研究されていない。

第 1 章第 2 節および第 3 節において、3-オクタノンと 1-オクテン-3-オールの季節的変化を試験した結果、3-オクタノンが気温の低下に伴って徐々に減少したのに対し (Figure I-12D)、1-オクテン-3-オールはほぼ一定量で推移した (Figure I-15E)。この結果より、ヒラタケの 3-オクタノンと 1-オクテン-3-オールは異なる経路で生合成されている可能性が示唆された。そこで本節では、揮発性 C8 化合物量の季節的変化について調べると共に、粗酵素液へ添加した揮発性 C8 化合物の経時的変化を調べることで、ヒラタケに含まれる揮発性 C8 化合物の酸化還元反応の解明を試みた。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

ヒラタケの子実体は白根観光きのこ園で購入した。購入したヒラタケは柄を切り落とした後、傘のみを液体窒素で凍結し、−80°C で保存した。

リノール酸は東京化成工業から購入した。1-オクテン-3-オンは Alfa aesar (Massachusetts, USA) から購入した。

2-2 揮発性 C8 化合物の季節的変化

4 g の新鮮なヒラタケの傘に 2 倍量 (w/v) の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。3,000×g、30 秒間、25°C で遠心分離後、上清を回収した。香気の抽出および分析は第 1 章第 1 節 2-4 に従って行った。

外因性リノール酸もしくは 1-オクテン-3-オンの影響は、4 g の新鮮なヒラタケの傘にそれぞれ終濃度 1 mM になるように 0.25% (v/v) Tween 20 を含む 25 mM リノール酸溶液、もしくは 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 5 mM 1-オクテン-3-オン溶液を添加後、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 12 ml に定容した。ホモジナイズ、遠心分離、香気の抽出、分析は上記と同様に行った。

2-3 粗酵素液に添加した揮発性 C8 化合物の経時的変化

4 g の凍結したヒラタケの傘に 2 倍量 (w/v) の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。20,000×g、20 分間、4°C で遠心分離後、上清を粗酵素液として回収した。

透析粗酵素液は透析用セルロース膜 (Viskase Companies, Inc.) を用い、粗酵素液を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で一晩、4°C で透析することで調製した。

反応液は 1 ml の粗酵素液もしくは透析酵素液に、4 mM NAD(P)H および 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む 5 mM 揮発性 C8 化合物をそれぞれ終濃度 200 μM および 300 μM になるように添加することで調製し、一定時間反応させた。香気の抽出および分析は第 1 章第 1 節 2-4 に従って行った。なお、0 時間目の反応液は、粗酵素液と補酵素および揮発性 C8 化合物を反応させる前に、香気を抽出するための 0.2 mg の *n*-ノニルアルコールを含む 1 ml の *n*-ペンタンを先に添加して香気を抽出した。

3 結果

3-1 揮発性 C8 化合物の季節的変化

秋に収穫したヒラタケの傘から抽出した香気を GC 分析した結果、主に 4 種類の揮発性 C8 化合物、1-オクテン-3-オール (50.1 μg/g)、3-オクタノン (5.8 μg/g)、3-オクタノール (2.0 μg/g)、1-オクテン-3-オン (0.2 μg/g) が検出された。そこで、2010 年 10 月から 2011 年 1 月にかけて、これら揮発性 C8 化合物の季節的変化を調べた。なお、新潟市の気温は Figure I-12A に示した。

10 月から 1 月にかけて、新潟市の気温は徐々に低下し (Figure I-12A)、それに伴って 1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールも徐々に減少した (Figure I-19A, C and D)。一方、1-オクテン-3-オールは気温が徐々に低下しているにも関わらず、ほぼ一定量で推移した (Figure I-19B)。揮発性 C8 化合物間の相関係数を求めた結果、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールの間で互いに R = 0.56–0.96 の相関係数が示されたのに対し、1-オクテン-3-オールは他の揮発性 C8 化合物と相関を示さなかった (R = −0.08–0.14; Table I-17)。同様の試験を 2009 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて行った結果、各揮発性 C8 化合物の季節的変化および相関は類似した傾向を示した (データ示さず)。

以上の結果より、ヒラタケでは 1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールが同じ経路で生合成され、1-オクテン-3-オールはこれらと別の経路で生合成されている可能性が示唆された。

3-2 外因性基質の添加による揮発性 C8 化合物生成量の季節的変化

LOX の基質であるリノール酸、もしくは ER の基質である 1-オクテン-3-オンの添加が揮発性 C8 化合物の季節的変化へおよぼす影響について試験するため、ホモジナイズ時に終濃度 1 mM のリノール酸もしくは 1-オクテン-3-オンを添加し、揮発性 C8 化合物生合成量の増加を調べた。

まず、リノール酸を添加してヒラタケをホモジナイズした結果、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールの生成量はほとんど増加しなかった (Figure I-20A, C and D)。一方、1-オクテン-3-オール生成量は気温の低下に伴って徐々に増加した (Figure I-20B)。この結果より、1-オクテン-3-オールが他の揮発性 C8 化合物とは別の経路で生合成されている可能性が改めて示唆された。

次いで、1-オクテン-3-オンを添加してヒラタケをホモジナイズした結果、添加した 1-オクテン-3-オンは 10 月ではほとんど消費されているのに対し、11 月月以降では残存した (Figure I-21A)。また、ER 反応生成物である 3-オクタノンの生成量は一定で推移した (Figure I-21C)。さらに、3-オクタノールの生成量の増加は 10 月中でしか認められなかったのに対し、1-オクテン-3-オールは気温の

Figure I-19. Seasonal changes of the amount of C8 volatile compounds from the caps of field cultivated *P. ostreatus*. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol.

Table I-17. Correlation coefficients among the amount of C8 volatile compounds from field cultivated *P. ostreatus*.

	correlation coefficient (R)			
	[1]	[2]	[3]	[4]
[1] 1-octen-3-one	1.00	−0.08	0.68	0.56
[2] 1-octen-3-ol		1.00	0.14	0.14
[3] 3-octanone			1.00	0.96
[4] 3-octanol				1.00

Figure I-20. Seasonal changes of the increase of C8 volatile compounds from the caps of field cultivated *P. ostreatus* homogenized with linoleic acid. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol.

Figure I-21. Seasonal changes of the increase of C8 volatile compounds from the caps of field cultivated *P. ostreatus* homogenized with 1-octen-3-one. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol.

低下に伴って徐々に増加した (Figure I-21B and D)。第 1 章第 2 節において、気温の低下に伴う 3-オクタノンの減少は ER 活性および *Poer1* 発現量の低下に起因すると推定したが (Figure I-12C, D and E)、1-オクテン-3-オンが十分量存在すれば 3-オクタノン量は減少しなかった (Figure I-21C)。そのため、気温の低下に伴う 3-オクタノンの減少は、ER 活性の低下よりむしろ基質である 1-オクテン-3-オン量の減少に起因すると推測された。また、気温の低下に伴って徐々に 1-オクテン-3-オールが増加する傾向も認められた (Figure I-21B)。

3-3 粗酵素液における揮発性 C8 化合物の経時的変化

ヒラタケで検出される 4 種類の揮発性 C8 化合物の季節的変化を調べた結果、一部の揮発性 C8 化合物の間で高い相関係数が示され (Table I-17)、互いの酸化還元反応によって生じている可能性が示唆された。そこで 2010 年 10 月に収穫したヒラタケの傘から粗酵素液を調製し、酸化還元反応で必要と考えられる補酵素 NADPH および NADH を添加し、揮発性 C8 化合物の経時的変化を調べた。

まず、粗酵素液に補酵素および揮発性 C8 化合物を添加せずに分析した結果、1-オクテン-3-オールが時間の経過と共に徐々に減少し、3-オクタノールが徐々に増加、3-オクタノンもわずかに増加した (Figure I-22B, C and D)。次に、粗酵素液に補酵素を添加し、香気の経時的変化を分析した結果、NADPH の添加では何も添加していない粗酵素液と比較して大きな変化がなかったのに対し、NADH の添加では時間の経過に伴って 1-オクテン-3-オールが顕著に減少し、3-オクタノールが顕著に増加した (Figure I-22B and D)。また、3-オクタノンも NADH の添加によってわずかに増加した (Figure I-22C)。

1-オクテン-3-オンを添加した粗酵素液の香気を分析した結果、1-オクテン-3-オンは反応 1 時間で即座に減少し、3-オクタノンと 3-オクタノールが増加した (Figure I-23A, C and D)。この粗酵素液に補酵素を添加した結果、反応 0–2 時間までは補酵素の添加による 3-オクタノン、3-オクタノールの変化に大きな違いは見られなかったが、4–6 時間にかけて、NADPH の添加によって 3-オクタノンがわずかに減少し、3-オクタノールがわずかに増加した (Figure I-23C and D)。

3-オクタノンを添加した粗酵素液の香気を分析した結果、時間の経過に伴って 3-オクタノンは徐々に減少し、3-オクタノールが増加した (Figure I-24C and D)。次に、粗酵素液に補酵素を添加した結果、Figure I-23 と同様、反応 4–6 時間にかけて、NADPH の添加によって 3-オクタノンがわずかに減少し、3-オクタノールがわずかに増加した (Figure I-24C and D)。

3-オクタノールを添加した粗酵素液の香気を分析した結果、1-オクテン-3-オールの減少が抑制された (Figure I-25B)。次に、粗酵素液に補酵素を添加した結果、NADH の添加によって 1-オクテン-3-オールが顕著に減少し、3-オクタノールお

Figure I-22. Time courses of the amount of C8 volatile compounds in crude extract from the caps of *P. ostreatus*. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol. The C8 volatile compounds in the reaction mixture containing NADPH (gray squares) or NADH (gray triangles) and not containing coenzyme (white circles) were analyzed by GC.

Figure I-23. Time courses of the amount of C8 volatile compounds in crude extract from the caps of *P. ostreatus* added 1-octen-3-one. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol. The C8 volatile compounds in the reaction mixture added 1-octen3-one (black circles) containing NADPH (gray squares) or NADH (gray triangles) and not containing 1-octen-3-one and coenzyme (white circles) were analyzed by GC.

Figure I-24. Time courses of the amount of C8 volatile compounds in crude extract from the caps of *P. ostreatus* added 3-octanone. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol. The C8 volatile compounds in the reaction mixture added 3-octanone (black circles) containing NADPH (gray squares) or NADH (gray triangles) and not containing 3-octanone and coenzyme (white circles) were analyzed by GC.

Figure I-25. Time courses of the amount of C8 volatile compounds in crude extract from the caps of *P. ostreatus* added 3-octanol. (A) 1-octen-3-one; (B) 1-octen-3-ol; (C) 3-octanone; (D) 3-octanol. The C8 volatile compounds in the reaction mixture added 3-octanol (black circles) containing NADPH (gray squares) or NADH (gray triangles) and not containing 3-octanol and coenzyme (white circles) were analyzed by GC.

よび3-オクタノンが増加した (Figure I-25B, C and D)。一方、1-オクテン-3-オールの減少はNADPHの添加でも抑制された (Figure I-25B)。

粗酵素液中には内在性の補酵素が多量に存在するため、ヒラタケの透析粗酵素液を調製し、同様の試験を行った。その結果、1-オクテン-3-オンを添加した透析粗酵素液へのNADPHの添加によって3-オクタノンの増加が導かれた (データ示さず)。しかし、それ以外の顕著な揮発性C8化合物量の変化は確認されなかった (データ示さず)。

以上の結果より、ヒラタケの粗酵素液中で検出される4種類の揮発性C8化合物は、互いの酸化還元反応によっても生じていると推定された。

4 考察

4-1 揮発性 C8 化合物の季節的変化

第 1 章第 2 節および第 3 節において、ヒラタケの香気生合成関連因子の季節的変化について調べた結果、新潟市の気温の低下 (Figure I-12A) に伴って 3-オクタノン量は徐々に減少したのに対し (Figure I-12D)、1-オクテン-3-オール量は一定量で推移し (Figure I-15E)、この 2 つの揮発性 C8 化合物は異なる経路で生合成されている可能性が示唆された。一方、Combet ら (2009) は、ツクリタケ *A. bisporus* への DOX 活性阻害剤アセチルサリチル酸の添加が 1-オクテン-3-オールと 3-オクタノンの生成のみを阻害することから、これらが同一経路上で生合成されると推察している。

ヒラタケの傘から抽出した香気を GC 分析した結果、主に 4 種類の揮発性 C8 化合物、1-オクテン-3-オール、3-オクタノン、3-オクタノール、1-オクテン-3-オンが検出された。これらの揮発性 C8 化合物は二重結合の有無や官能基の違いはあるものの、類似した構造をとっており、互いの酸化還元反応によって生じている可能性が示唆された。リノール酸や HPOD からの 1-オクテン-3-オールの生合成はよく研究されているが、他の揮発性 C8 化合物の生合成および酸化還元反応は十分理解されていない。そこで、気温の低下に伴うこの 4 種類の揮発性 C8 化合物の季節的変化を調べた結果、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは気温の低下に伴って徐々に減少し (Figure I-19A, C and D)、互いに高い相関を示した (Table I-17)。一方、1-オクテン-3-オールはこれらの揮発性 C8 化合物とは全く相関を示さず (Table I-17)、ほぼ一定量で推移した (Figure I-19B)。そのため、ヒラタケの 1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは同一経路上で生合成され、1-オクテン-3-オールはこれらの揮発性 C8 化合物とは異なる経路で生合成されていると推測された。第 1 章第 3 節において、ヒラタケは 10- および 13-HPOD どちらからでも 1-オクテン-3-オールが生合成可能であるが (Figure I-13C)、主要な中間化合物は他のキノコと同様 10-HPOD であると推測された。揮発性 C8 化合物の季節的変化を調べた結果、1-オクテン-3-オールは季節に関わらず一定量生合成されているが、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは気温の低下に伴って徐々に減少しており、これらの前駆体は 1-オクテン-3-オールとは異なる可能性が推測された (Figure I-19)。揮発性 C8 化合物の前駆体である HPOD としては、LOX 由来の 13-HPOD と DOX 由来の 10-HPOD が候補に挙げられる。DOX 活性や 10-HPOD の季節的変化は調べていないが、LOX 活性は気温の低下に伴って徐々に低下しており (Figure I-15A)、13-HPOD もそれに伴って減少していると推測される。LOX 活性と揮発性 C8 化合物間の相関係数を求めた結果、LOX 活性は 3-オクタノンおよび 3-オクタノー

ルと高い相関係数を示した (R = 0.75–0.76, データ示さず)。そのため、1-オクテン-3-オンは 13-HPOD の開裂によって生じている可能性が示唆された。しかし、ヒラタケと 13-HPOD のホモジナイズは 1-オクテン-3-オールの生成量を増加させる結果が得られている (Figure I-13C and I-14A)。Combet ら (2009) は、ツクリタケ *A. bisporus* とアセチルサリチル酸をホモジナイズした結果、1-オクテン-3-オールと 3-オクタノンの生成は阻害されるが、1-オクテン-3-オンの生成量は変わらなかったと報告している。アセチルサリチル酸は DOX 特異的な不可逆的阻害剤であり、LOX 活性に影響を与えないことが知られている (Meade et al., 1993)。そのため、1-オクテン-3-オンは LOX 反応生成物、すなわち 13-HPOD の開裂によって生じている可能性が推察される。また、Combet ら (2009) は、アセチルサリチル酸の添加によって 1-オクテン-3-オールと 3-オクタノンの生成が完全には阻害されなかったことから、これらが全て DOX 反応生成物に由来する訳ではないと推察している。1-オクテン-3-オンの前駆体が 13-HPOD であるかどうかは標識した基質の添加や阻害剤の添加などの試験が必要になると考えられる。

第 1 章第 3 節において、キノコへのリノール酸の添加は 1-オクテン-3-オール生成量を増加させることが明らかとなった (Figure I-14)。そこで、外因性基質としてリノール酸を添加してヒラタケをホモジナイズし、揮発性 C8 化合物の増加量の季節的変化を調べた結果、1-オクテン-3-オール生成量のみが顕著に増加した (Figure I-20B)。また、この 1-オクテン-3-オール生成量の増加は、気温の低下に伴う LOX 活性の低下 (Figure I-15E) と負の相関を示した (R = −0.60, データ示さず)。ウスヒラタケ *P. pulmonarius* 菌糸体において、LOX 活性は 1-オクテン-3-オールの生合成を阻害すると報告されている (Assaf et al., 1995 and 1997)。秋のヒラタケは LOX 活性が顕著に高いことから 13-HPOD が優先的に生合成されており、その結果 10-HPOD の生合成が抑制され、10-HPOD を経由する主要な 1-オクテン-3-オール生合成経路が阻害されている可能性が示唆された。

次いで、外因性基質として 1-オクテン-3-オンを添加し、揮発性 C8 化合物生成量の季節的変化を調べた結果、3-オクタノンは常に一定量合成されていた (Figure I-21C)。第 1 章第 2 節において、気温の低下に伴う 3-オクタノンの減少は ER 活性および *Poer1* 発現量の低下に起因すると推定した (Figure I-12C and E)。しかし、1-オクテン-3-オンが十分量存在する時、3-オクタノンの生成量が減少しなかったことから (Figure I-21C)、気温の低下に伴う 3-オクタノンの減少は ER 活性の低下よりむしろ、その基質である 1-オクテン-3-オンの減少に起因すると推測された。一方、外因性 1-オクテン-3-オンの添加によって 3-オクタノンが十分量生成されていても、3-オクタノールは徐々に減少した (Figure I-21D)。3-オクタノンと 3-オクタノールの季節的変化は互いに高い相関係数を示すため (Table I-17)、3-オクタノンは 3-オクタノールの前駆体であると推測される。しか

し、外因性 1-オクテン-3-オンの添加によって 3-オクタノンが十分量生成されていても 3-オクタノールは徐々に減少したため (Figure I-21)、気温の低下に伴う 3-オクタノールの減少は、基質である 3-オクタノンの減少よりむしろ、その反応を触媒する還元酵素の活性の低下に起因すると推測された。

さらに、外因性基質として 1-オクテン-3-オンを添加した結果、外因性リノール酸の添加と同様、1-オクテン-3-オール生成量は徐々に増加した (Figure I-20B and I-21B)。そのため、1-オクテン-3-オンから 1-オクテン-3-オールへの還元反応が行われていると推定したが、ヒラタケ粗酵素液を用いた経時的変化では 1-オクテン-3-オンの添加による 1-オクテン-3-オールの増加は確認されなかった (Figure I-23)。また、1-オクテン-3-オールが増加していた冬のヒラタケ粗酵素液でも試験したが、この反応は全く確認されなかった (データ示さず)。外因性基質の添加では、キノコと基質を直接ホモジナイズしているが、経時的変化の試験ではホモジナイズ後に遠心分離によって得られる上清を粗酵素として使用し、基質の添加を行っている。実験手法は異なっているため単純に比較することはできないが、1-オクテン-3-オンの添加による 1-オクテン-3-オール生成量の増加が、添加した基質に直接由来するのか、リノール酸からの過酸化および開裂反応の間接的な促進に起因するのか、さらなる試験が必要であると考えられる。

4-2 揮発性 C8 化合物の酸化還元反応

ヒラタケにおける揮発性 C8 化合物の季節的変化より、これらの香気が互いの酸化還元反応によって生じている可能性が示唆された。Wanner と Tressl (1998) は、出芽酵母 *S. cerevisiae* の粗酵素抽出物へ添加された 1-オクテン-3-オンの大部分が 3-オクタノンに還元され、一部が 1-オクテン-3-オールと 3-オクタノールに変化すると報告している。第 1 章第 1 節において、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応は多くのキノコに共通であり、NADPH 依存的 ER 活性によって触媒されると示唆されたが (Table I-3)、他の酸化還元反応がどのような酵素によって触媒されているかは不明である。そこで、ヒラタケ粗酵素液へ添加した揮発性 C8 化合物の増減を分析し、これらがどのような酸化還元反応を受けているか調べた。

補酵素および揮発性C8化合物を添加したヒラタケ粗酵素液中の香気の変化を経時的に測定した結果、2 種類の還元反応が確認された。まず、最も顕著だった反応は 1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの還元反応である (Figure I-22B and D)。時間の経過と共に、1-オクテン-3-オールは徐々に減少し、3-オクタノールがそれに伴って徐々に増加した。また、この反応は NADH の添加によって顕著に促進され、全ての実験でこの反応は確認された (Figure I-22–25)。1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの変換は炭素二重結合の還元によって

行われるが、NADH 依存的な還元反応であったため、NADPH 依存的な ER とは異なる還元酵素がこの反応を触媒していると推測された。もう 1 つの反応は、3-オクタノンから 3-オクタノールへの還元反応であり (Figure I-23C and D)、この反応は揮発性 C8 化合物の季節的変化でも確認された (Figure I-19C and D)。1-オクテン-3-オンもしくは 3-オクタノンを添加した粗酵素液の揮発性 C8 化合物の変化を経時的に測定した結果、NADPH の添加によって時間の経過に伴う 3-オクタノンの減少と 3-オクタノールの増加がわずかに促進された (Figure I-23 and I-24)。Wanner と Tressl (1998) は、出芽酵母 *S. cerevisiae* において、この反応がアルコールデヒドロゲナーゼによって触媒されると提案しているが、実際に揮発性 C8 化合物がこの酵素の基質となるかどうかは不明である。

一方、還元反応だけでなく、2 種類の酸化反応も推測された。還元型の NAD(P)H は補酵素として使用された後、酸化型の $NAD(P)^+$となるが、これらは生体内の様々な酸化還元反応によってリサイクルされている。まず、NADH の添加は 1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの還元反応を促進するだけでなく、3-オクタノンの増加も導いた (Figure I-22)。これには 1-オクテン-3-オールから 1-オクテン-3-オンもしくは 3-オクタノールを経由する 2 つの経路が推測されるが、どちらも酸化反応を必要とする。May ら (1979) は、グラム陰性菌 *P. oleovorans* において、1-オクテン-3-オールや 3-オクタノールなどの揮発性 C8 アルコールが 1-オクテン-3-オンや 3-オクタノンなどの揮発性 C8 ケトンへ酸化する反応を報告しているが、キノコにおいても同じ酸化反応が行われるかどうかは不明である。NADH の添加による 3-オクタノンの増加が 1-オクテン-3-オールから 1-オクテン-3-オンへの酸化反応と ER 活性によるその還元反応に起因するのか、3-オクタノールからの酸化反応に起因するのかについてはさらなる試験が必要である。なお、この酸化反応で使用される NAD^+は 1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの NADH 依存的還元反応によって生じると推測された。もう 1 つの反応は 3-オクタノールから 1-オクテン-3-オールへの酸化反応である。ヒラタケ粗酵素液へ 3-オクタノールを添加した結果、1-オクテン-3-オールの減少が抑制された (Figure I-25B)。3-オクタノールが十分量存在することで、1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの還元反応がフィードバック阻害を受けた可能性も考えられるが、NADH の添加でこの反応が十分行われていることから、酸化型補酵素を使用した酸化反応が推測された。これらの揮発性 C8 化合物の酸化反応が行われているのかどうかは、酸化型 $NAD(P)^+$を補酵素として添加した試験が必要になると思われる。

以上の結果から、Figure I-26 に示す揮発性 C8 化合物の酸化還元反応が推定された。ヒラタケでは ER 活性が触媒する 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの NADPH 依存的還元反応以外に、1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへ

Figure I-26. Putative redox reaction of C8 volatile compounds in crude extract from the caps of *P. ostreatus*. Black and gray arrows indicate the clarified and unclarified reactions examined in this study.

の NADH 依存的還元反応、3-オクタノンから 3-オクタノールへの NADPH 依存的還元反応が確認された。また、1-オクテン-3-オールから 1-オクテン-3-オン、もしくは 3-オクタノールから 3-オクタノンへの NAD^+依存的酸化反応、3-オクタノールから 1-オクテン-3-オールへの酸化反応も存在する可能性が示唆された。しかし、透析粗酵素液へ添加した揮発性 C8 化合物の経時的変化を調べた結果、NADPH 依存的 ER 活性による 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応しか顕著に行われていなかった (データ示さず)。そのため、ER 以外の酸化還元反応を触媒する酵素は透析によって容易に失活してしまう酵素、もしくは活性の発現に透析によって除かれる低分子の補因子を必要とする酵素であると推測された。また、これらの酸化還元反応を触媒する酵素活性の測定を試みたが、ER 以外の活性は測定できなかったこと (データ示さず)、さらに、これらの酸化還元反応に数時間かかることから、ER 活性以外の反応は非常に弱い活性に由来すると推測された。

第 1 章第 5 節 ヒラタケの異なる組織における香気生合成機構

1 緒言

キノコの香気はキノコの種類や子実体の部位によって異なることが報告されている。例えば、ムラサキシメジ *Lepista nuda* ではヒダ、傘、柄の順に 1-オクテン-3-オール量が多いと報告されているのに対し (Noël-Suberville et al., 1996)、マツタケ *T. matsutake* では柄、傘の順に多いと報告されている (Cho et al., 2008)。しかし、香気生合成がよく研究されているツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*) で報告された 1-オクテン-3-オール量は、菌株、生育段階、貯蔵期間、破砕方法、香気の抽出方法および分析方法などの違いによって異なることから、同じ手法で分析したデータでなければその量の比較は難しい (Wurzenberger and Grosch, 1983; Mau et al., 1992a; Cruz et al., 1997; Combet et al., 2009)。ヒラタケの香気の分析もいくつか報告されているが、それぞれ条件が異なっており、単純に比較することはできない (Beltran-Garcia et al., 1997; Wood et al., 2000; Tsai et al., 2009; Zawirska-Wojtasiak et al., 2009)。

本研究では、第 1 章第 1 節から第 4 節にかけて、ヒラタケの傘における揮発性 C8 化合物の生合成機構に着目して研究を進めてきたが、柄やヒダなど子実体の他の部位や液体培養した菌糸体でも同じような香気生合成が行われているかは不明である。そこで本節では、ヒラタケの各組織における LOX 活性、ER 活性、遺伝子発現量、可溶性タンパク質量、揮発性 C8 化合物量を測定し、他の組織に傘と同じ香気生合成機構が存在するのかどうかを調べた。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

ヒラタケの子実体は白根観光きのこ園で購入した。ヒラタケの菌糸体は大貫菌蕈 (Tochigi, Japan) より分与されたヒラタケ H1 株を使用した。

2-2 ヒラタケ菌糸体の培養

ヒラタケ H1 株はカザミノ酸-グルコース寒天培地上で継代培養した (Joh et al., 1996)。ヒラタケ H1 株菌糸体片を 20 ml のグルコース-カザミノ酸液体培地を分注した 100 ml 容三角フラスコで 15 日間、25°C、相対湿度 65%、暗所で静置培養した (前培養)。生長した菌糸体を滅菌水で洗浄し、乳棒と乳鉢で磨砕した。磨砕物を 50 ml の滅菌水に懸濁し、大きな菌糸体片を 60 メッシュのステンレス篩で除去した。0.5 ml の菌糸体懸濁液を 30 ml のカザミノ酸-グルコース液体培地を分注した 200 ml 容三角フラスコに接種し、25°C、相対湿度 65%、暗所で 30 日間静置培養した (本培養)。

培養した菌糸体は 10,000×g、5 分、4°C で集菌し、20 ml の滅菌水で 2 回遠心分離することで洗浄した。菌糸体はさらに 10,000×g、5 分、4°C で 4 回遠心分離することで脱水した。

2-3 粗酵素液の調製

4 g の新鮮なヒラタケ組織に 2 倍量 (w/v) の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、セット 5 に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 2 分間、25°C でホモジナイズした。菌糸体は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 12 ml に定容し、同様にホモジナイズした。3,000×g、30 秒間、25°C で遠心分離後、上清を粗酵素液として回収した。

2-4 LOX 活性の測定

LOX 活性の測定は第 1 章第 3 節 2-2 に従って行った。

2-5 ER 活性の測定

ER 活性の測定は第 1 章第 1 節 2-3 に従って行った。

2-6 定量的 Real-time RT-PCR

Total RNA の抽出および cDNA の合成は第 1 章第 2 節 2-4 および 2-8 に従って行った。

定量的 Real-time RT-PCR は第 1 章第 2 節 2-8 および第 3 節 2-6 に従い、*Polox1*、

Poer1、*Poer2*、*β-tubulin*、18S rDNA を増幅するプライマーを使用して行った。

2-7 可溶性タンパク質量の測定

可溶性タンパク質量の測定は第 1 章第 1 節 2-3 に従って行った。

2-8 香気の分析

香気の抽出および分析は第 1 章第 1 節 2-4 に従って行った。

3 結果

30 日間液体培養した菌糸体および子実体の傘、柄、ヒダ、ヒダを除去した傘から粗酵素液を調製し、LOX 活性、ER 活性、可溶性タンパク質量、揮発性 C8 化合物を分析した。また、各組織由来の Total RNA から cDNA を合成し、*Polox1*、*Poer1*、*Poer2* の発現量を調べた。

まず、LOX 活性を測定した結果、菌糸体ではほとんど活性が得られず (Figure I-27a)、*Polox1* の発現量も低かった (Figure I-27b)。一方、子実体では柄、傘、ヒダの順で LOX 活性は高く (Figure I-27a)、*Polox1* の発現量も類似した傾向を示した (Figure I-27b)。次いで、ER 活性を測定した結果、LOX 活性と同様、菌糸体ではほとんど活性が得られなかった (Figure I-27c)。一方、子実体では傘やヒダで比較的 ER 活性が高く、柄で低かった (Figure I-27c)。*Poer1* 発現量を測定した結果、ヒダ以外の *Poer1* 発現量は ER 活性と同様の傾向を示した (Figure I-27d)。一方、*Poer2* の発現量は傘、柄、ヒダより菌糸体で高かった (Figure I-27e)。ヒダでは高い ER 活性が示されたのに対し (Figure I-27c)、*Poer1* および *Poer2* の発現量と一致しなかったことから (Figure I-27d and e)、これらの遺伝子以外に起因するヒダ特異的な ER もしくは他の NADPH 依存的還元酵素の存在が示唆された。可溶性タンパク質量は菌糸体で少なく、子実体では柄で比較的少なかった (Figure I-27f)。

各組織から抽出した香気を分析した結果、全ての組織で 1-オクテン-3-オールが最も多く、次いで 3-オクタノン、3-オクタノール、1-オクテン-3-オンの順で多かった (Figure I-27g, h, i and j)。菌糸体の揮発性 C8 化合物を測定した結果、全ての揮発性 C8 化合物が子実体より少なかった (Figure I-27g, h, i and j)。子実体の各部位における揮発性 C8 化合物を測定した結果、1-オクテン-3-オールが柄、傘、ヒダの順で多かったのに対し (Figure I-27h)、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは傘、柄、ヒダの順で多かった (Figure I-27g, i and j)。

以上の結果より、ヒラタケの各組織も傘と同じ揮発性 C8 化合物を生合成しており、LOX や ER が関与する生合成機構を有すると推測された。

Figure I-27. Enzyme activities, the gene expressions and the amounts of soluble protein and C8 volatile compounds in the various tissues from *P. ostreatus*. (a) LOX activity; (b) the relative expression of *Polox1*; (c) ER activity; (d) the relative expression of *Poer1*; (e) the relative expression of *Poer2*; (f) soluble protein; (g) 1-octen-3-one; (h) 1-octen-3-ol; (i) 3-octanone; (j) 3-octanol. M, C, S, G and C−G indicate mycelium, cap, stipe, gill and cap cut off gill. The relative expressions of *Polox1* (b), *Poer1* (d) and *Poer2* (e) were corrected by the expression of *β-tubulin* (black bars) or 18S rDNA (white bars). The left and right axises in (b) and (d) correspond to the value corrected by the expression of *β-tubulin* and 18S rDNA, respectively.

Figure I-27. Continued.

4 考察

本研究では第 1 章第 1 節から第 4 節にかけて、ヒラタケの傘における揮発性 C8 化合物生合成機構の解明に取り組んできたが、他の組織でも同じ機構で香気の生合成が行われているかは不明だった。そこで、菌糸体および子実体の柄、ヒダ、ヒダを除去した傘における香気生合成関連因子について調べた。

30 日間液体培養したヒラタケ菌糸体の酵素活性、可溶性タンパク質量、揮発性 C8 化合物量は子実体の各部位と比較して非常に低かった (Figure I-27)。なお、培養日数 (10–40 日間) や生育温度 (5–25°C) を変えて液体培養したヒラタケでも試験したが、顕著な違いは認められなかった (データ示さず)。1-オクテン-3-オールは昆虫を誘引し、子実体からの胞子散布を補助する重要な化合物として知られている (Hall et al., 1984; Pierce et al., 1989)。また、HPOD の開裂によって 1-オクテン-3-オールと共に生じる 10-ODA は子実体の柄の伸長を促進する物質としても知られている (Mau et al., 1992b; Champavier et al., 2000)。そのため、キノコの菌糸形態における揮発性 C8 化合物の生合成は重要な反応ではなく、生殖形態である子実体において優先的な反応であると推測された。

次いで、各組織から抽出した香気量を比較した結果、全ての組織で 1-オクテン-3-オールが最も多く、次いで 3-オクタノン、3-オクタノール、1-オクテン-3-オンの順で多かった (Figure I-27g, h, i and j)。また、子実体の各部位における揮発性 C8 化合物量を比較した結果、1-オクテン-3-オールは柄、傘、ヒダの順で多かったのに対し (Figure I-27h)、それ以外の揮発性 C8 化合物 1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは傘、柄、ヒダの順で多かった (Figure I-27g, i and j)。1-オクテン-3-オールは、ツクリタケ *A. bisporus* (Combet et al., 2009) では柄、傘、ヒダの順で多く、マツタケ *T. matsutake* (Cho et al., 2008) では柄、傘の順で多いと報告されており、本研究の結果はこれらと一致した。しかし、同じツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*) においても、1-オクテン-3-オール量は菌株、生育段階、貯蔵期間、破砕方法、香気の抽出方法、分析方法などによって異なっており、単純に比較することはできない (Wurzenberger and Grosch, 1983; Mau et al., 1992a; Cruz et al., 1997; Combet et al., 2009)。ヒラタケの各組織で検出された揮発性 C8 化合物の存在量が全て 1-オクテン-3-オール、3-オクタノン、3-オクタノール、1-オクテン-3-オンの順で多かったこと、また 1-オクテン-3-オールのみが柄で多く検出され、他の 3 種類の揮発性 C8 化合物が傘で多く検出されたことから、他の組織でも傘と同様の機構によって香気が生合成されていると推定された。

しかし、揮発性 C8 化合物間だけでなく、酵素活性および遺伝子発現量との比較から、傘とは異なる 2 つの疑問が生じた。まず 1 つ目は LOX と 1-オクテン-3-オールの関係である。第 1 章第 3 節において、LOX 活性と *Polox1* 発現量の季節

的変化は1-オクテン-3-オールの変化と相関を示さず (Figure I-15 and Table I-15)、ヒラタケの 1-オクテン-3-オールの生合成は主に DOX によって生成される 10-HPOD を経由すると推測した。しかし、各組織の LOX 活性と *Polox1* 発現量は 1-オクテン-3-オールと類似した増減を示した (Figure I-27a, b and h)。ヒラタケでは LOX によって生成される 13-HPOD からも 1-オクテン-3-オールが生合成されるが (Figure I-13C and I-14A)、ヒラタケの柄で検出される 1-オクテン-3-オールの多さが LOX 活性の高さに起因するのかどうかは不明である。2 つ目の疑問は、ヒダの ER 活性である。各組織の ER 活性を測定した結果、ヒダの ER 活性は傘と同程度に高かったのに対し (Figure I-27c)、*Poer1* 発現量および 3-オクタノン量は傘よりかなり低かった (Figure I-27d and i)。第 1 章第 4 節において、3-オクタノン量は ER 活性よりむしろ基質である 1-オクテン-3-オン量に起因すると推察した。そのため、ヒダの ER 活性は高いが、基質が少ないため 3-オクタノンの生成量が少ない可能性が考えられる。また、ER 活性は NADPH の消費を指標に測定しているため、基質である 1-オクテン-3-オンの炭素二重結合ではなく、ケトン基の還元が行われている可能性も推測される。さらには、PoER1 と PoER2 とは異なるヒダ特異的な ER の存在も推測される。これらの解明には反応生成物の分析など、さらなる試験が必要である。

第1章 総合討論

キノコは古くから世界各地で親しまれてきた食材であり、その香気は嗜好を左右する重要な要因として挙げられる。キノコの香気分子は 8 個の炭素原子からなる揮発性 C8 化合物を主体とすることが明らかになっており、主要な香気分子である 1-オクテン-3-オールには現在 2 つの生合成経路が提案されている。1 つは、リノール酸から 13-HPOD を経て 1-オクテン-3-オールが生成される経路であり、もう 1 つは 10-HPOD を経る経路である。しかし、どちらの生合成経路も関連する酵素の研究は不十分であり、1-オクテン-3-オールをはじめとする他の揮発性 C8 化合物の生合成機構については未解明な部分が多い。

本研究ではまず、揮発性 C8 化合物の生合成機構の一端を解明するために、1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応を触媒する ER に着目した。8 種類のキノコの ER 活性とその反応生成物を調べた結果、多くのキノコで NADPH 依存的 ER 活性による 1-オクテン-3-オンから 3-オクタノンへの還元反応が認められた。そこで、ヒラタケの傘から粗酵素液を調製し、硫酸ストレプトマイシン沈殿、メタノール分画、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、分子量の異なる 2 つの活性画分が得られ、分子量の大きなピークを ER I、小さなピークを ER II と名付けた。ER I は疎水クロマトグラフィー、ER II は疎水クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィーでさらに精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE の結果より、ER I はホモ四量体、ER II は単量体と推定された。また、どちらも 1-オクテン-3-オンを基質として使用し、NADPH 依存的 ER 活性を示した。ER I と II は pH 安定性、温度安定性、金属イオンの影響は類似していたが、その基質特異性はやや異なっていた (第 1 章第 1 節)。

次いで、ヒラタケから精製した ER I と II の内部アミノ酸配列を解析し、RACE 法で ER をコードする遺伝子 *Poer1* と *Poer2* の全長 cDNA 塩基配列を決定した。機能の推定を行った結果、PoER1 は PSD 関連のモチーフを持つタンパク質であったが、既知の PSD とは異なる構造を持つと推定された。一方、PoER2 は NAD(P)-binding ドメインが予測されたが、相同性を示したタンパク質は全て機能が未解明なタンパク質だった。PoER1 と PoER2 どちらがヒラタケの 3-オクタノン生合成に主に関与するのか推定するため、ヒラタケ子実体が発生する 10 月から 1 月にかけて、ヒラタケの傘における ER 活性、3-オクタノン量、遺伝子発現量の季節的変化を調べた。その結果、気温の低下に伴って ER 活性と 3-オクタノンは徐々に減少し、これらの間で高い相関が示された。また、*Poer1* の発現量は ER 活性および 3-オクタノンと高い相関を示したのに対し、*Poer2* の発現量はこれらと相関を示さなかった。そのため、ヒラタケにおける 1-オクテン-3-オン

から 3-オクタノンへの還元反応には PoER1 が重要な役割を果たしていると推定された (第 1 章第 2 節)。

キノコにおけるリノール酸代謝物と 1-オクテン-3-オールの関係を明らかにするため、まず 8 種類のキノコの LOX 活性とその反応生成物を調べた結果、3 種類のキノコで LOX 活性と共役ジエン型 HPOD の生成が認められた。次いで、リノール酸を添加したキノコをホモジナイズした結果、全てのキノコで 1-オクテン-3-オール生成量は増加し、ヒラタケでは 10-および 13-HPOD どちらの添加によっても 1-オクテン-3-オールが増加した。しかし、LOX 活性と *Polox1* 発現量の季節的変化を調べた結果、これらは気温の低下に伴って徐々に減少するのに対し、ヒドロペルオキシド量と 1-オクテン-3-オール量は減少しなかった。そのため、ヒラタケの 1-オクテン-3-オールは 13-HPOD からも生合成可能であるが、主要な中間化合物は 10-HPOD であると推測された (第 1 章第 3 節)。

ヒラタケの香気を分析した結果、主に 4 種類の揮発性 C8 化合物、1-オクテン-3-オール、3-オクタノン、3-オクタノール、1-オクテン-3-オンが検出された。これらの季節的変化を調べた結果、1-オクテン-3-オン、3-オクタノン、3-オクタノールは気温の低下に伴って徐々に減少したのに対し、1-オクテン-3-オールは一定量で推移した。また、ヒラタケ粗酵素液へ添加した揮発性 C8 化合物の酸化還元反応を調べた結果、1-オクテン-3-オールから 3-オクタノールへの NADH 依存的還元反応、3-オクタノンから 3-オクタノールへの NADPH 依存的還元反応が確認された。また、酸化型補酵素を使用した揮発性 C8 化合物の酸化反応も推測され、ヒラタケ中の揮発性 C8 化合物が互いの酸化還元反応によっても生じていると推定された (第 1 章第 4 節)。

最後に、ヒラタケの傘以外の組織における揮発性 C8 化合物を分析した結果、菌糸体および子実体の柄、ヒダにおいても傘と類似した香気生合成が行われていると推測された。しかし、揮発性 C8 化合物と酵素活性および遺伝子発現量の間で相関が認められない部分があったことから、部位によっては異なる機構が存在する可能性が推測された (第 1 章第 5 節)。

以上の結果より推測されたヒラタケの揮発性 C8 化合物の生合成経路を Figure I-28 に示した。ヒラタケはリノール酸を出発物質とし、PoLOX1 によって過酸化された 13-HPOD から 1-オクテン-3-オールを生合成できるが、DOX 活性によって生成された 10-HPOD を経由した経路が 1-オクテン-3-オール生合成の主要な経路であると推測された (第 1 章第 3 節)。また、13-HPOD は 1-オクテン-3-オールだけでなく、1-オクテン-3-オンにも開裂する可能性が推測され (第 1 章第 4 節)、生成された 1-オクテン-3-オンは主に PoER1 に由来する NADPH 依存的 ER 活性によって即座に 3-オクタノンに還元される (第 1 章第 1 節および第 2 節)。3-オクタノンは NADPH 依存的に、1-オクテン-3-オールは NADH 依存的に 3-オクタ

Figure I-28. Putative biosynthesis pathway for the formation of C8 volatile compounds in *P. ostreatus*. Black and gray arrows indicate the clarified and unclarified reaction examined in this study. DOX, dioxygenase; LOX, lipoxygenase; HPL, hydroperoxide lyase; HPOD, hydroperoxyoctadecadienoic acid; ODA, oxo decenoic acid.

ノールに還元されるが、酸化型補酵素を使用した酸化反応も推測され、揮発性C8化合物は互いの酸化還元反応によっても生じていると考えられた (第1章第4節)。

本研究では主にヒラタケの傘で検出される4種類の揮発性C8化合物に着目して研究を行ったが、これ以外にもキノコでは様々な化合物が同定されている (Venkateshwarlu et al., 1999; de Pinho et al., 2008; Ouzouni et al., 2009; Culleré et al., 2010; Splivallo et al., 2011)。ハラタケ *A. campestris* において、リノール酸の添加は2*Z*-オクテナール、2*Z*-オクテン-1-オール、ヘキサナール (揮発性C6化合物) の増加も導いたと報告されており (Tressl et al., 1981 and 1982)、Figure I-28以外の生合成経路の存在も推測される。また、リノール酸以外の多価不飽和脂肪酸に由来する揮発性C8化合物もいくつか知られている。Tressl ら (1982) は、ハラタケ *A. campestris* にリノレン酸 (C18:3) を添加した結果、1*Z*,5-オクタジエン-3-オン、1*Z*,5-オクタジエン-3-オール、2*Z*,5*Z*-オクタジエナール、2*Z*,5*Z*-オクタジエン-1-オールが増加すると報告した。また、Wurzenberger と Grosch (1986) も、ツクリタケ *P. bispora* (*A. bisporus*) へのリノレン酸の添加は1*Z*,5-オクタジエン-3-オール、2*Z*,5*Z*-オクタジエン-1-オール、10-ODA の形成を促進し、これらが10-ヒドロペルオキシリノレン酸に由来することを明らかにしている。一方、菌類ではないが、ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* 由来のPpLOX1はアラキドン酸から1-オクテン-3-オールへの過酸化、開裂反応を触媒すると報告されている (Senger et al., 2005)。

本研究で諸性質を解明したER、そしてKuribayashi ら (2002) によって精製されたLOXはキノコの揮発性C8化合物生合成に関与する酵素として初めて報告するものであり、他のキノコに同じ機構が備わっているかどうかは不明である。今後、10-HPODの生合成を触媒するDOXや揮発性C8化合物の酸化還元反応を触媒する酵素の諸性質が解明できれば、キノコの揮発性C8化合物生合成機構のより詳細な全体像が明らかとなり、香りによってキノコの生長を制御する技術や香気の放出を安定化させる技術への応用が期待され、キノコの消費の拡大に繋がると思われる。

第 2 章 ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構の解明

緒論

リンは生体の全ての細胞に必要不可欠な元素である。リンは有機態、無機態のリン酸化合物として生体中、土壌中に見出される。生体内において、リンは遺伝情報を伝達する DNA や RNA、生体膜の主成分であるリン脂質、細胞のエネルギー源である ATP など、様々な形態で存在する。また、酵素や輸送体タンパク質はリン酸化/脱リン酸化によって活性化/不活性化が調節されており、リンは細胞内における様々なシグナル伝達や代謝系の制御においても重要な役割を果たしている (Raghothama, 1999; Vance et al., 2003)。

リンは、窒素、カリウムと共に植物の三大栄養素の 1 つとして知られている。植物はリンを可溶性無機リン酸の形態で土壌から吸収しているが、利用可能なリン酸の濃度は 1 μM 程度と極微量であり、欠乏しやすい栄養素の 1 つとされている (Bieleski, 1973; Schachtman et al., 1998)。これは土壌中の無機リン酸が酸性土壌中では鉄やアルミニウム、塩基性土壌中ではカルシウムなどのカチオンによって容易に吸着、固定され、不溶化してしまうことに起因する (Vance et al., 2003)。

植物の生長は活発な細胞分裂を伴うため、多くのリン酸化合物を必要とする。植物において、軽度のリン酸欠乏では葉や花芽、果実などの生育抑制が起こり、著しいリン酸欠乏では枯死することが知られている (Plaxton and Carswell, 1999; 小山, 2001)。土壌中の無機リン酸は不溶化されやすく、移動性も低いため、植物は低リン酸環境下で生育するための適応機構を備えている。しかし、その適応能力はさほど高くはなく、多くの植物はリン酸欠乏下での生育を余儀なくされている。これまで報告されている植物の適応機構は大きく 4 つに分類される。

まず 1 つ目は、土壌中で不溶化したリン酸の可溶化物質の放出である。リン酸欠乏環境の植物は、根からクエン酸やリンゴ酸などの有機酸を放出し、そのキレート作用によって土壌中の不溶性リン酸化合物を可溶化する (Vance et al., 2003)。有機酸以外にも、キマメ *Cajanus cajan* 由来の Piscidic acid (Ae et al., 1990)、アルファルファ *Medicago sativa* 由来の Alfafuran (Masaoka et al., 1993) などのフェノール化合物もリン酸欠乏下で分泌され、金属キレーターとして無機リン酸の遊離に寄与する。一方、可溶化された有機リン酸化合物からの無機リン酸の遊離はリン酸エステル加水分解酵素によって行われる。特にリン酸欠乏による酸性ホスファターゼの誘導はトウモロコシ *Zea mays* (Sachay et al., 1991)、シロイヌナズナ *A. thaliana* (del Pozo et al., 1999)、トマト *Lycopersicon esculentum* (Baldwin et al., 2001) など多くの植物で報告されている。また、フィターゼやリボヌクレ

アーゼなどの他のリン酸エステル加水分解酵素群もリン酸欠乏下で増加すると報告されている (Green, 1994; Bosse and Köck, 1998)。リン酸欠乏下でのホスファターゼの増加は細胞内と細胞外の両方で生じており、細胞内では不必要となったリン酸エステル化合物の分解によるリン酸のリサイクル、細胞外では有機リン酸化合物からの無機リン酸の遊離に寄与し、これらの酵素が協調的に働くことで効率的にリン酸化合物からリン酸を遊離させていると考えられている。

2つ目のリン酸欠乏適応機構としては、土壌からのリン酸吸収能力の強化が挙げられる。通常、植物は低親和性のリン酸トランスポーターを構成的に発現しているが (Shimogawara and Usuda, 1995)、リン酸欠乏下では高親和性のリン酸トランスポーターを誘導し、根からのリン酸吸収量を増加させる (Furihata et al., 1992; Daram et al., 1998)。これらのリン酸欠乏応答もホスファターゼと同様、様々な植物で報告されている (Smith, 2002; Ticconi and Abel, 2004; Raghothama and Karthikeyan, 2005)。また、植物体内の低親和性リン酸トランスポーターも無機リン酸の転流に関与することが報告されている (Versaw and Harrison, 2002; Rausch et al., 2004)。

3つ目は代謝系の変化である。リン酸欠乏下では生体内の ATP や ADP は減少すると報告されている (Ashihara et al., 1988; Duff et al., 1989)。そのため、リン酸欠乏下の植物は解糖系などの代謝経路で、無機リン酸や ATP を必要とするステップを迂回させる (Theodorou et al., 1992)。また、生体膜の主要成分であるリン脂質もリン酸源となることから、リン酸欠乏下で植物はリン脂質を分解し、生体膜からリンを大量に放出すると同時に、膜脂質をガラクト糖脂質に置換する。(小林、太田, 2004)

4つ目は根圏構造の変化である。生息場所を移動できない植物は栄養素の獲得を根からの吸収に依存する。リン酸欠乏下の植物は地中から効率的にリン酸を探索するため、分岐根の形成を促進させると共に、根毛の密度や長さを増加させる。その結果、根の表面へのリン酸到達距離が短縮されると共に、リン酸エステル加水分解酵素などの分泌量やリン酸を吸収する面積が増加する (Vance et al., 2003)。また、ルーピン *Lupinus albus* はリン酸欠乏下において、短い側根が房状に密集したプロテオイド根 (クラスター根) と呼ばれる特殊な根を形成し、有機酸や酸性ホスファターゼの分泌を促進させることが報告されている (Gardner et al., 1982; Johnson et al., 1996)。

このように、植物はリン酸欠乏に対する適応機構を備えているが、これだけでは植物が生長するには不十分な場合が多く、農作物の生産のためには大量のリン酸の施肥が必要とされる。しかし、土壌が改良されていなければ施肥されたリン酸の大部分は土壌中の金属イオンによって不溶化してしまう (Barber et al., 1963; Barber, 1980)。また、植物に吸収されなかった土壌中の過剰なリン酸は、

降雨などで河川や湖沼、海水中へ流出し、その結果、水系の富栄養化による赤潮の発生やアオコの増殖などの環境汚染を引き起こす (Holford, 1997; Richardson, 1994)。さらに、リンは限られた資源であり、今現在のまま使用を続ければ、リン酸肥料などに用いられるリン鉱石は今世紀中に枯渇するとも考えられている (Runge-Metzger, 1995)。

そこで考えられるのが他の生物のリン酸欠乏適応能力の活用である。そもそも多くの陸上植物の根は、土壌中の菌類と共生状態にあり、菌根と呼ばれる特有の構造を形成している。菌根を形成した植物の生育は形成していない植物と比較して良好になる。この理由として、土壌中に伸長した外生菌糸により、無機リン酸の遊離、獲得、吸収能が高まることが挙げられる。外生菌根担子菌 *Hebeloma cylindrosporum* やアーバスキュラー菌根菌 *Glomus* spp.では、リン酸欠乏下で誘導される酸性ホスファターゼや高親和性リン酸トランスポーターが報告されている (Harrison and van Buuren, 1995; Louche et al., 2010)。菌根菌の外部菌糸で吸収されたリン酸はポリリン酸の形態で根の内部へ輸送され、菌糸から植物へのリン酸供給も行われる (Rausch and Bucher, 2002; Karandashov and Bucher, 2005; Raghothama and Karthikeyan, 2005)。また、菌根の形成は植物中のリン酸濃度により調節されており、リン酸欠乏環境では、根の浸出物により外生菌糸の伸長が促進され、菌根形成の度合いが高まることも知られている (Harrison, 2005)。

菌類において、そのリン酸欠乏適応機構が最も研究されているのは子嚢菌の出芽酵母 *S. cerevisiae* である。出芽酵母 *S. cerevisiae* においても、リン酸欠乏下でリン酸エステル加水分解酵素群やリン酸トランスポーター、転写制御因子などの多くのタンパク質が誘導され、リン酸獲得や蓄積、代謝に関与することが報告されている (Dawes and Senior, 1973; Kaneko et al., 1985; Oshima et al., 1996)。これらのリン酸欠乏応答遺伝子 (*PHO* 遺伝子) の発現量は、外部のリン酸濃度に応じ、リン酸シグナル変換経路 (*PHO* 経路) によって調節されている (Lenburg and O'Shea, 1996; Oshima, 1997; Persson et al., 2003)。近年では、DNA マイクロアレイ解析による *PHO* 遺伝子の網羅的解析も行われ、様々な遺伝子の転写がリン酸欠乏に応じて顕著に変化することが報告されている (Ogawa et al., 2000)。

酵母とは異なり、キノコは酵素によって他の動植物を構成する高分子化合物を分解し、外環境から栄養を吸収する高い能力を持っている。特にセルロース、リグニン、コラーゲンといった他の生物にとって分解しにくい高分子化合物を低分子化合物に分解することができるため、これらの物質を生態系のサイクルに戻す『分解者』としての役割を担っている。したがって、キノコは他の生物よりも優れた酵素の誘導分泌機構および高い物質代謝能を有していると考えら

れる (宍戸, 2002)。子嚢菌や担子菌において、窒素欠乏や炭素欠乏応答に関する包括的な研究はよく行われている (Montanini et al., 2006; Tamano et al., 2008; Vanden Wymelenberg et al., 2009)。しかし、リン酸欠乏応答に関する包括的な研究は全く行われていない。

ナメコ *Pholiota nameko* は、食用担子菌の一種であり、日本、中国、台湾、韓国など東アジアを中心に分布している (Arita, 1978)。学名は日本名のなめこ (滑子) に由来するが、近年、*Pholiota microspora* と同一種であり、*P. nameko* をシノニムとして扱う提案もされている (Neda, 2008)。ナメコはすでに培養方法が確立されており、その菌糸体は比較的容易に培養することができる。また、液体培地で培養が可能なことから生育条件の制御が容易であり、実験材料として扱いやすいという利点を持っている。

当研究室ではキノコのリン酸欠乏適応機構に関する研究を長年行っており、これまでの研究から、ナメコ菌糸体は他の生物が生育を大きく抑制されるような低リン酸環境でもリン酸が十分供給されている環境と同程度の生育レベルを維持できることが分かっている。リン酸欠乏下で他の多くの生物はタンパク質量が減少するのに対し、ナメコ菌糸体では菌体内外のタンパク質量が顕著に増加すると報告されていることから、リン酸欠乏下で酵素合成を活発化させることで代謝を変化させ、低リン酸環境に適応していると推測される (Joh et al., 1998a; Tasaki et al., 2001)。また、リン酸欠乏下のナメコ菌糸体では菌糸体内外の酸性ホスファターゼ活性 (Joh et al., 1996; Tasaki et al., 2001) やリボヌクレアーゼ活性 (Joh et al., 2001; Tasaki et al., 2004a) が顕著に高まることから、少ないリン酸を有効に利用することで効率良く生育する能力、すなわちリン酸欠乏適応能力が他の生物より優れていると考えられる。

リン酸欠乏下における特異的なタンパク質の合成はリン酸欠乏による遺伝子の発現変化に起因することから、Tasaki ら (2002) はリン酸欠乏適応機構の全体像を遺伝子レベルで解明するため、リン酸欠乏下で培養したナメコ N2 株菌糸体の cDNA ライブラリーからディファレンシャルスクリーニングにより、リン酸欠乏下で特異的に発現する遺伝子 [*p*hosphate *d*eficiency-*i*nducible (*pdi*) gene] の単離を試みた。その結果、cDNA クローンを 150 個単離し、それらが 31 個の遺伝子に由来することを示した。これらの *pdi* クローンのうち、リン酸トランスポーター (*pdi85*) および代謝トランスポーター (*pdi343*; Tasaki et al., 2002)、ハイドロフォビン(*pdi251*/*pnh1*, *pdi263*/*pnh2* and *pdi315*/*pnh3*; Tasaki et al., 2004b)、リボヌクレアーゼ (*pdi370*; Tasaki et al., 2004a) をコードする *pdi* 遺伝子についてはリン酸欠乏下での発現や機能に関する詳細な考察がなされている。また、Tasaki ら (2001) は、ナメコ N2 株菌糸体の培養ろ液の二次元 PAGE も行い、リン酸欠乏によって誘導、分泌される複数のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析した。

その結果、ナメコ N114 株で精製された酸性ホスファターゼ APase52 (Joh et al., 1996) と APase47 (Yazaki et al., 1997) のN末端アミノ酸配列と一致するタンパク質スポットを発見し、これらをコードする遺伝子 *PNAP1* と *PNAP2* を報告した (Tasaki et al., 2006)。*PNAP1* と *PNAP2* の発現はリン酸欠乏によって誘導され、*PNAP2* はディファレンシャルスクリーニングで得られた *pdi26* と同じ遺伝子であることが明らかにされている。さらに、培養ろ液中で分泌量が顕著に増加するタンパク質 PDIe をコードする遺伝子 *pdie* も解析され、これらがコードするタンパク質の機能の推定、発現量の解析なども行われている (Awang, 2002; 高藤, 2005)。

ナメコ菌糸体におけるリン酸欠乏適応機構を解明し、そのメカニズムを植物に導入することができれば、少ないリン酸でも生育が良好な農作物の作出が可能になると考えられる。また、それらを栽培することにより、リン酸施肥量を減らすことができ、環境保全にも繋がると考えられる。さらに、地球上に広く分布する低リン酸土壌において効率よく農作物を生産することが可能になることから、今後予測される食糧危機に対する手段の 1 つとしても期待される。

Tasaki ら (2002) によって得られた 31 個の *pdi* 遺伝子うち、19 個の全長 cDNA 塩基配列はまだ決まっておらず、推定される機能についても未解明なものが多い (Table II-1)。そこで、本章第 1 節では、全ての *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を決定し、それらがコードするタンパク質の機能を推定することで、ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構の全貌解明を試みた。また、第 2 節では、ハイドロフォビンと呼ばれる糸状菌特異的両親媒性分泌タンパク質をコードする *pdi* 遺伝子に着目し、大腸菌での組換えタンパク質の発現を試みた。また、ナメコ由来ハイドロフォビンの乳化活性を試験し、生分解性界面活性剤としての活用についても模索した。

Table II-1. mRNA and cDNA sizes, and homologies of *pdi* clones.

pdi clone	mRNA size (b)	cDNA size (bp)	number of clones [a]	homology	reference
pdi310	650	624	31	–	–
pdi63	800	794	13	–	–
pdi5	1200	1144	11	–	–
pdi36	700	716	9	–	–
pdi85	2000	1975	8	phosphate transporter	Tasaki et al., 2002
pdi244	600	547	8	–	–
pdi26	1250	1321	6	acid phosphatase	Tasaki et al., 2006
pdi228	450	387	6	–	–
pdi230	1300	867	5	–	–
pdi263	500	503	5	hydrophobin	Tasaki et al., 2004b
pdi315	500	479	5	hydrophobin	Tasaki et al., 2004b
pdi319	700	776	5	MAP kinase	–
pdi343	1600	1588	5	metabolic transorter	Tasaki et al., 2002
pdi88	1100	1019	4	–	–
pdi110	800	859	4	lysozyme	–
pdi373	1350	1030	4	protease	–
pdi370	1400	1395	3	ribonuclease	Tasaki et al., 2004a
pdi201	700	892	2	–	–
pdi205	2000	671	2	alkaline phosphatase	–
pdi251	500	500	2	hydrophobin	Tasaki et al., 2004b
pdi298	700	181	2	–	–
pdi99	1100	1041	1	–	–
pdi252	800	181	1	–	–
pdi259	800	280	1	–	–
pdi284	500	165	1	–	–
pdi301	750	189	1	–	–
pdi308	900	547	1	–	–
pdi348	1400	1404	1	fatty acid desaturase	–
pdi351	800	739	1	–	–
pdi371	1100	1189	1	–	–
pdi372	1100	1063	1	lipase	–

The *pdi* clones completely sequenced in this chapter are underlined. [a] The number of clones obtained by differential screening of about 20,000 recombinant clones in cDNA library (Tasaki et al., 2002). MAP, mitogen-activated protein.

第 2 章第 1 節 *pdi* 遺伝子の塩基配列の解析と機能の推定

1 緒言

多くの植物や微生物は程度に違いはあるものの、リン酸欠乏に適応する能力を有している。菌類、特に出芽酵母 *S. cerevisiae* ではリン酸欠乏適応に関する多くの知見が報告されており、外部のリン酸濃度に応じてその応答遺伝子である *PHO* 遺伝子の発現やタンパク質のリン酸化が行われ、外部環境からの効率的なリン酸獲得を行うことが報告されている (Lenburg and O'Shea, 1996; Oshima, 1997; Persson et al., 2003; Mouillon and Persson, 2006)。類似した機構は分裂酵母 *S. pombe* (Henry et al., 2011) や子嚢菌酵母 *Candida albicans* (宮川, 2003) など、他の酵母でも報告されている。

いくつかの糸状子嚢菌、担子菌、グロムス菌でも一般的なリン酸欠乏応答遺伝子である酸性ホスファターゼ (MacRae et al., 1988; Haas et al., 1991 and 1992; Bernard et al., 2002) やリン酸トランスポーター (Harrison and van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005; van Aarle et al., 2007; Tatry et al., 2009) の発現が外部のリン酸濃度によって調節されていると報告されている。しかし、出芽酵母 *S. cerevisiae* 以外の菌類では包括的なリン酸欠乏応答に関する研究は行われておらず、特にキノコのリン酸欠乏適応機構に関する知見はほとんど報告されていない。分解者として知られるキノコは他の動植物を構成する高分子化合物を分解する高い栄養素獲得能を有しており、酵母とは異なるリン酸獲得機構を有している可能性が考えられる。

これまでの研究で、ナメコ菌糸体は他の微生物が生育を大きく抑制されるようなリン酸欠乏下でも十分な生育レベルを維持することが可能であり (Joh et al., 1996)、同条件下では菌糸体内外のタンパク質量が大きく増加すると報告されている (Tasaki et al., 2001)。タンパク質の特異的合成は遺伝子発現の変化に起因することから、Tasaki ら (2002) はリン酸欠乏状態のナメコ N2 株菌糸体の cDNA ライブラリーからディファレンシャルスクリーニングにより、31 個の *pdi* 遺伝子を単離した。しかし、これらのうち、19 個の *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列は決定できておらず、機能推定が不十分なままである。

そこで本節では、ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構の全貌を解明するため、まず 19 個の未解析 *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を決定した。次いで、全ての *pdi* 遺伝子がコードする PDI タンパク質の機能を最新のバイオインフォマティクス的手法により推定すると共に、新規の配列データベースや学術論文との比較によって、リン酸欠乏適応環境における PDI タンパク質の役割を推測した。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料および試薬

大貫菌蕈より分与されたナメコ N2 株を使用した。

2-2 菌糸体の培養

リン酸供給 (P+) 培地にはカザミノ酸-グルコース培地、リン酸欠乏 (P−) 培地には同培地より KH_2PO_4 を除いた培地を用いた (Tasaki et al., 2001)。なお、用いたビタミンフリーカザミノ酸 (BD Difco, New Jersey, USA) は、リンを KH_2PO_4 として 18.3 mg/g 含んでいたため、P+培地と P−培地の無機リン酸濃度はそれぞれ 555 と 55 mg/L であった (KH_2PO_4 換算)。ナメコ N2 株菌糸体の培養は第 1 章第 5 節 2-2 に従い、P+培地で 15 日間前培養後、P−培地で 20 日間本培養した。

2-3 Total RNA の抽出

Total RNA の抽出はフェノール-SDS 法 (Shirzadegan et al., 1991) の変法 (矢崎, 1998) に従って行った。

2-4 cDNA クローニング

逆転写反応、5'-RACE および 3'-RACE PCR は Table II-2 のプライマーおよび Table II-3 の PCR 条件を使用し、第 1 章第 2 節 2-5 に従って行った。*Bam*H I もしくは *Eco*R I (Takara Bio) で制限酵素処理した PCR 産物は第 1 章第 2 節 2-5 に従ってクローニングした。

2-7 デリーション

pUC118-*pdi205* プラスミドのデリーションは Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (Takara Bio) を用いて行った。*Xba* I (Nippon Gene) および *Pst* I (Takara Bio) で消化後、Exonuclease II によるデリーション、Mung Bean Nuclease による末端平滑化、Klenow Fragment による末端修復を行った。ライゲーション反応後、作製されたデリーションプラスミドは大腸菌 *E. coli* DH5α 株にサブクローニングした。

2-6 DNA シーケンシング

DNA シーケンシングは第 1 章第 2 節 2-6 に従って行った。

2-7 バイオインフォマティクス解析

pdi 遺伝子がコードするアミノ酸配列の機能推定は Table II-4 および II-5 のプログラムを使用して行った。

Table II-2. Sequences of oligonucleotide primers for 5'- and 3'-RACE used in this section.

primer	sequence	Tm (°C)
5'-RACE		
5'-RACE outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	60.5
5'-RACE inner	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	69.9
5'-RACE inner Eco	CGCGAATTCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	67.6
pdi36 5'-RACE outer	TTGCCACTACCTCCAAGACG	58.4
pdi36 5'-RACE inner	CCACGGATCCAGTCGGTAAGATGCCGGTTG	68.7
pdi244 5'-RACE outer	GCAGTCAGCACCTAATCCATC	58.5
pdi244 5'-RACE inner	ATCTGGATCCCGACACTTGAACCACTACCG	66.0
pdi228 5'-RACE outer	GGTGCTTAGCTTTCTCCTTGTC	58.6
pdi228 5'-RACE inner	GCTAGGATCCCGAGAATCTCCTTGGCTTTC	66.0
pdi230 5'-RACE outer	CTTGAGCTCAGCCTTCTTCAC	58.5
pdi230 5'-RACE inner	CAATGGATCCCCTTCAGAGCCTTGTGGAAC	66.0
pdi319 5'-RACE outer	GTCCCTCAGGCAGATACACG	60.4
pdi319 5'-RACE inner	CCACGGATCCAGTAAGAGCAACGCAGACGA	67.4
pdi88 5'-RACE outer	CTTGAAGGCCGTGCGTTTAG	58.4
pdi88 5'-RACE inner	CACCGGATCCGGTTTCTTGCCTTCCACAGC	68.7
pdi110 5'-RACE outer	GGCGGCATCTTTCTCCAAGT	58.4
pdi110 5'-RACE inner	GACCGGATCCAGTGGGCGCTGAATGTAGCA	68.7
pdi373 5'-RACE outer	GCAGGAGAAAGAGTGTCTTCGGTC	61.9
pdi373 5'-RACE inner	CCCGAATTCACACCGATGGACTGCTTGGTT	66.0
pdi201 5'-RACE outer	CCGGAAACCCAGGCTTCTTT	58.4
pdi201 5'-RACE inner	AGCCGGATCCGCAAGATTCGTTGCGACTCC	68.7
pdi205 5'-RACE outer	ACGTGGTAGTGTCGTTGGGATAGG	62.2
pdi205 5'-RACE inner	GTCAGGATCCGTTGCTAATCCTGTTCTGC	64.8
pdi298 5'-RACE outer	CTGTTCGAGCTACATGTCCAAG	58.6
pdi298 5'-RACE inner	GGCCGGATCCCAATGACGCCTTCTTCAAGC	68.7
pdi259 5'-RACE outer	AGAAGGTGCGGTAAGGACTG	58.4
pdi259 5'-RACE inner	GGCCGGATCCGTCCGCAAAGTCCAAGTTTC	68.7
pdi284 5'-RACE inner	CGCCGGATCCACAGAACAAGAACTG	63.8
pdi301 5'-RACE outer	CTACACGAGGAAGGCAAGAAG	58.5
pdi301 5'-RACE inner	CGCGGATCCGTTACAGGTGGGTCGAAAGAC	68.7
pdi308 5'-RACE outer	GAACTAGGCGAGAAATCTGAGC	58.6
pdi308 5'-RACE inner	TGCCGGATCCAGTCCTGCGTTCGTATGTCC	68.7
pdi351 5'-RACE outer	GTCAGAGTGGACAGTCTCGAAT	58.6
pdi351 5'-RACE inner	CCGCGGATCCTGCTGGTGTTGTTTCTGGAG	68.7
pdi371 5'-RACE outer	CAACAATCCACTCGGCGTTC	58.4
pdi371 5'-RACE inner	GGCCGGATCCTTTAAGTCCGTGGAGGTTGG	68.7
3'-RACE		
3'-RACE outer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	56.9
3'-RACE inner	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG	64.4
pdi5 3'-RACE outer	GCATCTGCAACTCACACTTC	56.3
pdi5 3'-RACE inner	ACTTGGATCCATCTTAACCACCGTCACCAC	64.6
pdi36 3'-RACE outer	CGGCATCTTACCGACTGATA	56.3
pdi36 3'-RACE inner	TACTGGATCCCAAGTCATTGGGTGTCATCG	64.6
pdi244 3'-RACE outer	TCGACAGGTGGTGATGTAAC	56.3
pdi244 3'-RACE inner	GATTGGATCCGGCGAAGGATGTACTCTCAT	64.6
pdi228 3'-RACE outer	GCTATGGGTTGGTTTGACAG	56.3
pdi228 3'-RACE inner	TCATGGATCCACAAGGCTGAGCTTTCACAC	64.6
pdi110 3'-RACE outer	CCAACTTCGTCGGATCGTAT	56.3
pdi110 3'-RACE inner	CAATGGATCCGCAAGTCCTATGCGACTCAA	64.6
pdi259 3'-RACE outer	TCCCAGTCACAGAGCTTACA	56.3
pdi259 3'-RACE inner	ACTAGGATCCGGTCCCTGTTACAGATCTCA	64.6
pdi371 3'-RACE outer	ACGTCGAGTTCAGCAGCAAT	56.3
pdi371 3'-RACE inner	TCAAGGATCCTCAAAGTACCTACCCCATCC	64.6

*Bam*H I (GGATCC) and *Eco*R I (GAATTC) restriction sites were single and double underlined, respectively.

Table II-3. Primer combinations and nested PCR product sizes obtained by inner PCR.

pdi gene	nested PCR	primer		product size (bp)
		sense	antisense	
pdi5	outer	pdi5 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi5 3'-RACE inner	3'-RACE inner	480
pdi36	outer	5'-RACE outer	pdi36 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi36 5'-RACE inner	450
	outer	pdi36 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi36 3'-RACE inner	3'-RACE inner	300
pdi244	outer	5'-RACE outer	pdi244 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi244 5'-RACE inner	400
	outer	pdi244 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi244 3'-RACE inner	3'-RACE inner	450
pdi228	outer	5'-RACE outer	pdi228 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi228 5'-RACE inner	300
	outer	pdi228 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi228 3'-RACE inner	3'-RACE inner	380
pdi230	outer	5'-RACE outer	pdi230 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi230 5'-RACE inner	850 [b]
pdi319	outer	5'-RACE outer	pdi319 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi319 5'-RACE inner	550
pdi88	outer	5'-RACE outer	pdi88 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi88 5'-RACE inner	500
pdi110	outer	5'-RACE outer	pdi110 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi110 5'-RACE inner	400
	outer	pdi110 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi110 3'-RACE inner	3'-RACE inner	550
pdi373	outer	5'-RACE outer	pdi373 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi373 5'-RACE inner Eco	500
pdi201	outer	5'-RACE outer	pdi201 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi201 5'-RACE inner	400
pdi205	outer	5'-RACE outer	pdi205 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi205 5'-RACE inner	1400
pdi298	outer	5'-RACE outer	pdi298 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi298 5'-RACE inner	650
pdi259	outer	5'-RACE outer	pdi259 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi259 5'-RACE inner	600 [b]
	outer	pdi259 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi259 3'-RACE inner	3'-RACE inner	350
pdi284	outer [a]	5'-RACE outer	pdi284 5'-RACE inner	
	inner [a]	5'-RACE inner	pdi284 5'-RACE inner	300/600 [c]
pdi301	outer	5'-RACE outer	pdi301 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi301 5'-RACE inner	550
pdi308	outer	5'-RACE outer	pdi308 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi308 5'-RACE inner	500
pdi351	outer	5'-RACE outer	pdi351 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi351 5'-RACE inner	480/550/650 [c]
pdi371	outer	5'-RACE outer	pdi371 5'-RACE outer	
	inner	5'-RACE inner	pdi371 5'-RACE inner	500/600/700 [c]
	outer	pdi371 3'-RACE outer	3'-RACE outer	
	inner	pdi371 3'-RACE inner	3'-RACE inner	700

[a] The 5'-RACE for *pdi284* was amplified by semi-nested PCR; [b] by *Bam*H I, *pdi230* and *pdi259* products were digested to fragments of 300 and 500 bp, and to fragments of 200 and 400 bp, respectively; [c] nonspecifically amplified products were detected. The desired products of *pdi284*, *pdi351* and *pdi371* were 600, 480 and 500 bp amplicon, respectively.

Table II-4. Bioinfomatics programs used in this section.

program	URL	reference
homology search		
NCBI BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Altschul et al., 1990 and 1997
molecular weight		
Compute pI/Mw tool	http://web.expasy.org/compute_pi/	Bjellqvist et al., 1993 and 1994; Gasteiger et al., 2005
alignment		
ClustalW version 2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Larkin et al., 2007; Goujon et al., 2010
motif search		
InterProScan version 4.8	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/	Quevillon et al., 2005; Hunter et al., 2009
Conserved domain-search	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml	Marchler-Bauer and Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2011
PROSCAN	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html	Bairoch et al., 1997
ScanProsite	http://prosite.expasy.org/scanprosite/	de Castro et al., 2006; Sigrist et al., 2010
SMART version 7.0	http://smart.embl-heidelberg.de/	Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2012
signal peptide prediction		
SignalP version 4.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Nielsen et al., 1997; Petersen et al., 2011
SOSUIsignal version beta	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html	Gomi et al., 2004
Mitoprot version 1.101	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html	Claros and Vincens, 1996
cNLS Mapper	http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi	Kosugi et al., 2009
transmembrane region prediction		
SOSUI ver 1.11	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html	Hirokawa et al., 1998
TMHMM ver 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Möller et al., 2001
HMMTOP ver 2.0	http://www.enzim.hu/hmmtop/	Tusnády and Simon, 1998 and 2001
localization prediction		
WoLF PSORT	http://wolfpsort.org/	Horton et al., 2007
PSORT II	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html	Horton and Nakai, 1997; Nakai and Horton 1999
iPSORT	http://ipsort.hgc.jp/	Bannai et al., 2002
TargetP version 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	Emanuelsson et al., 2000
Predotar version 1.03	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html	Small et al., 2004
MultiLoc	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/	Hoeglund et al., 2006
MultiLoc2	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2/	Blum et al., 2009
CELLO version 2.5	http://cello.life.nctu.edu.tw/	Yu et al., 2004 and 2006
BaCelLo	http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/	Pierleoni et al., 2006
Subnuclear Compartments Prediction	http://array.bioengr.uic.edu/subnuclear.htm	Lei and Dai, 2005 and 2006

Table II-5. Basidiomycota genome databases provided by JGI used in homology search.

organism database	abbreviation	phenotype [a]	URL	kingdom/phylum/subphylum/class/subclass/order/family
Agaricus bisporus var. *bisporus* (H97) v2.0	Abi1	SAP	http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbisH97_2/Agabi_varbisH97_2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Agaricaceae
Agaricus bisporus var. *burnettii* JB137-S8	Abi2	SAP	http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbur_1/Agabi_varbur_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Agaricaceae
Laccaria bicolor v2.0	Lbi	ECM	http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Hydnangiaceae
Gymnopus luxurians v1.0	Glu	ECM	http://genome.jgi-psf.org/Gymlu1/Gymlu1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Marasmiaceae
Pleurotus ostreatus PC15 v2.0	Pos1	WR	http://genome.jgi-psf.org/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Pleurotaceae
Pleurotus ostreatus PC9 v1.0	Pos2	WR	http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Pleurotaceae
Coprinopsis cinerea	Cci	SAP	http://genome.jgi-psf.org/Copci1/Copci1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Psathyrellaceae
Schizophyllum commune v2.0	Sco	WR	http://genome.jgi-psf.org/Schco2/Schco2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Schizophyllaceae
Hypholoma sublateritium v1.0	Hsu	WR	http://genome.jgi-psf.org/Hypsu1/Hypsu1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Agaricales/Strophariaceae
Coniophora puteana v1.0	Cpu	BR	http://genome.jgi-psf.org/Conpu1/Conpu1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Boletales/Coniophoraceae
Jaapia argillacea v1.0	Jar	BR	http://genome.jgi-psf.org/Jaaar1/Jaaar1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Boletales/Incertae sedis
Paxillus involutus ATCC 200175 v1.0	Pin	ECM	http://genome.jgi-psf.org/Paxin1/Paxin1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Boletales/Paxillaceae
Serpula lacrymans S7.3 v2.0	Sla1	BR	http://genome.jgi-psf.org/SerlaS7_3_2/SerlaS7_3_2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Boletales/Serpulaceae
Serpula lacrymans S7.9 v2.0	Sla2	BR	http://genome.jgi-psf.org/SerlaS7_9_2/SerlaS7_9_2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Agaricomycetidae/Boletales/Serpulaceae
Auricularia delicata SS-5 v1.0	Ade	WR, J	http://genome.jgi-psf.org/Aurde1/Aurde1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Auriculariales/Auriculariaceae
Botryobasidium botryosum v1.0	Bbo	BR	http://genome.jgi-psf.org/Botbo1/Botbo1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Cantharellales/Botryobasidiaceae
Punctularia strigosozonata v1.0	Pst	WR	http://genome.jgi-psf.org/Punst1/Punst1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Corticiales/Corticiaceae
Gloeophyllum trabeum v1.0	Gtr	BR	http://genome.jgi-psf.org/Glotr1_1/Glotr1_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Gloeophyllales/Gloeophyllaceae
Fomitiporia mediterranea v1.0	Fme	WR	http://genome.jgi-psf.org/Fomme1/Fomme1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Hymenochaetales/Hymenochaetaceae
Fomitopsis pinicola SS1 v1.0	Fpi	BR	http://genome.jgi-psf.org/Fompi1/Fompi1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Fomitopsidaceae
Postia placenta MAD-698	Ppl	BR	http://genome.jgi-psf.org/Pospl1/Pospl1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Fomitopsidaceae
Ganoderma sp. 10597 SS1 v1.0	Gsp	WR	http://genome.jgi-psf.org/Gansp1/Gansp1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Ganodermataceae
Bjerkandera adusta v1.0	Bad	WR	http://genome.jgi-psf.org/Bjead1_1/Bjead1_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Meruliaceae
Phlebia brevispora HHB-7030 SS6 v1.0	Pbr	WR	http://genome.jgi-psf.org/Phlbr1/Phlbr1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Meruliaceae
Ceriporiopsis subvermispora B	Csu	WR	http://genome.jgi-psf.org/Cersu1/Cersu1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Phanerochaetaceae
Phanerochaete carnosa HHB-10118-Sp v1.0	Pca	WR	http://genome.jgi-psf.org/Phaca1/Phaca1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Phanerochaetaceae
Phanerochaete chrysosporium v2.0	Pch	WR	http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Phanerochaetaceae
Phlebiopsis gigantea v1.0	Pgi	WR	http://genome.jgi-psf.org/Phlgi1/Phlgi1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Phanerochaetaceae
Dichomitus squalens v1.0	Dsq	WR	http://genome.jgi-psf.org/Dicsq1/Dicsq1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Polyporaceae
Trametes versicolor v1.0	Tve	WR	http://genome.jgi-psf.org/Trave1/Trave1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Polyporaceae
Wolfiporia cocos MD-104 SS10 v1.0	Wco	BR	http://genome.jgi-psf.org/Wolco1/Wolco1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Polyporales/Polyporaceae
Heterobasidion annosum v2.0	Han	WR, PP	http://genome.jgi-psf.org/Hetan2/Hetan2.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Russulales/Bondarzewiaceae
Stereum hirsutum FP-91666 SS1 v1.0	Shi	WR	http://genome.jgi-psf.org/Stehi1/Stehi1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Agaricomycetes/Incertae sedis/Russulales/Stereaceae
Dacryopinax sp. DJM 731 SSP-1 v1.0	Dsp	BR, J	http://genome.jgi-psf.org/Dacsp1/Dacsp1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Dacrymycetes/Incertae sedis/Dacrymycetales/Dacrymycetaceae
Cryptococcus neoformans var. *grubii* H99	Cne	AP	http://genome.jgi-psf.org/Cryne_H99_1/Cryne_H99_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Tremellomycetes/Incertae sedis/Tremellales/Tremellaceae
Tremella mesenterica Fries v1.0	Tme	WR, J	http://genome.jgi-psf.org/Treme1/Treme1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Agaricomycotina/Tremellomycetes/Incertae sedis/Tremellales/Tremellaceae
Rhodotorula graminis strain WP1 v1.1	Rgr	E	http://genome.jgi-psf.org/Rhoba1_1/Rhoba1_1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Pucciniomycotina/Microbotryomycetes/Incertae sedis/Sporidiobolales/Incertae sedis
Sporobolomyces roseus v1.0	Sro	E	http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Pucciniomycotina/Microbotryomycetes/Incertae sedis/Sporidiobolales/Incertae sedis
Melampsora laricis-populina v1.0	Mla	PP	http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Pucciniomycotina/Pucciniomycetes/Incertae sedis/Pucciniales/Melampsoraceae
Puccinia graminis	Pgr	PP	http://genome.jgi-psf.org/Pucgr1/Pucgr1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Pucciniomycotina/Pucciniomycetes/Incertae sedis/Pucciniales/Pucciniaceae
Malassezia globosa	Mgl	AP	http://genome.jgi-psf.org/Malgl1/Malgl1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Ustilaginomycotina/Incertae sedis/Incertae sedis/Malasseziales/Incertae sedis
Ustilago maydis	Uma	PP	http://genome.jgi-psf.org/Ustma1/Ustma1.home.html	Fungi/Basidiomycota/Ustilaginomycotina/Ustilaginomycetes/Ustilaginomycetidae/Ustilaginales/Ustilaginaceae

[a] AP, animal pathogen; BR, brown rot fungus; E, endophyte; ECM, ectomycorrhizal fungus; J, jelly fungus; PP, plant pathogen; SAP,saprophyte; WR, white rot fungus.

3 結果

3-1 *pdi* 遺伝子の解析

31 個の *pdi* 遺伝子のうち、19 個については全長 cDNA 塩基配列がまだ決定されていない。そこで、5'-RACE および 3'-RACE PCR で未解析領域を増幅し、塩基配列を決定した。

解析した *pdi* 遺伝子の cDNA サイズ、*pdi* クローン数、DDBJ accession number を Table II-6 に示した。全ての cDNA サイズは Tasaki ら (2002) が報告した mRNA サイズとほぼ一致した。なお、全ての *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列とコードするアミノ酸配列は巻末の Figure S1-S31 に示した。*pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を解析した結果、*pdi284* と *pdi310*、*pdi252* と *pdi298* はそれぞれ同一の *pdi* 遺伝子であった。そのため、Tasaki ら (2002) が単離した *pdi* 遺伝子の数は 31 個から 29 個と改め、ディファレンシャルスクリーニングで得られた *pdi310* のクローン数は 32 個、*pdi298* のクローン数は 3 個と改めた。また、*pdi319* クローンは MAP (Mitogen-activated protein) キナーゼをコードする遺伝子と推測していたが (Table II-1)、解析の結果、誤りであることが分かった。

3-2 PDI タンパク質の機能の推定

ディファレンシャルスクリーニングで得られた 29 個の *pdi* 遺伝子に培養ろ液の二次元 PAGE で分泌量の多かった 2 種類のタンパク質をコードする遺伝子 *PNAP1* (Tasaki et al., 2006) と *pdie* (高藤, 2005) を加えた 31 個の遺伝子について、バイオインフォマティクス的手法により、コード化される PDI タンパク質の機能を推定した。なお、BLAST における E-value は JGI BLASTP の標準設定である 1.00E−5 に設定した。NCBI の BLASTP で相同性検索を行った結果、26 個の PDI タンパク質において相同性を示すタンパク質が示された (Table II-7)。そのうち、20 個の PDI タンパク質は担子菌由来のタンパク質と相同性を示し、6 個は次の担子菌以外のタンパク質と高い相同性を示した。PDI310 は植物のイヌカタヒバ *Selaginella moellendorffii*、PDI259 は放線菌 *Actinosynnema mirum*、PDI36 は病原子嚢菌 *Ajellomyces capsulatus*、PDI110 は黒トリュフ *Tuber melanosporum*、PDI371 はコムギ黄斑病菌 *Pyrenophora tritici-repentis*、PDIe は白癬菌 *Arthroderma benhamiae* のタンパク質と最も高い相同性を示した。

一方、ゲノムが解析された担子菌類のうち、多くの遺伝子は NCBI に登録されておらず、独自のデータベースで公開されている。そこで、JGI が提供する 42 菌種の担子菌ゲノムデータベース (Table II-5) を利用した BLASTP で相同性検索を行った。その結果、29 個の PDI タンパク質において相同性を示す推定タンパク質が示された (Table II-8)。そのうち、21 個はナメコと同じモエギタケ科

Table II-6. cDNA sizes and the DDBJ accession numbers of *pdi* genes.

pdi gene	mRNA size (b)	cDNA size (bp)	number of clones	DDBJ accession number
pdi clone				
pdi310 [a]	650	637	32	AB672713
pdi63	800	794	13	AB672714
pdi5	1200	1164	11	AB672715
pdi36	700	726	9	AB672716
pdi85	2000	1975	8	AB060641
pdi244	600	660	8	AB672717
pdi26/PNAP2	1250	1321	6	AB125065
pdi228	450	437	6	AB672718
pdi230	1300	1583	5	AB672719
pdi263	500	503	5	AB079129
pdi315	500	479	5	AB079130
pdi319	700	630	5	AB672720
pdi343	1600	1588	5	AB060656
pdi88	1100	1046	4	AB672721
pdi110	800	817	4	AB672722
pdi373	1350	1413	4	AB672723
pdi298 [b]	800	744	3	AB672724
pdi370	1400	1395	3	AB088045
pdi201	700	862	2	AB672725
pdi205	2000	1829	2	AB672726
pdi251	500	500	2	AB079128
pdi99	1100	1041	1	AB672727
pdi259	800	743	1	AB672728
pdi301	750	637	1	AB672729
pdi308	900	813	1	AB672730
pdi348	1400	1404	1	AB672731
pdi351	800	754	1	AB672732
pdi371	1100	977	1	AB672733
pdi372	1100	1047	1	AB672734
other *pdi* gene				
PNAP1	–	1246	–	AB125063
pdie	–	1123	–	AB672735

Completely sequenced *pdi* genes in this section are underlined. [a] *pdi284* was the same clone as *pdi310*; [b] *pdi252* was the same clone as *pdi298*.

Table II-7. The results of NCBI BLASTP homology search of PDI proteins (E-value < 1.00E–5).

PDI protein	amino acid size	molecular weight	NCBI BLASTP organism	protein	accession number	E-value
PDI310	134	13866.45	*Selaginella moellendorffii*	hypothetical protein	XP_002989919	6.00E–8
PDI63	238	26312.64	–	–	–	–
PDI5	356	41009.90	–	–	–	–
PDI36	127	12593.23	*Ajellomyces capsulatus* H143	zinc finger protein	EER38598	8.00E–13
PDI85	551	59892.43	*Hebeloma cylindrosporum*	phosphate transporter - HcPT1	CAI94746	0.00E+00
PDI244	161	16263.29	*Phanerochaete chrysosporium*	glycopeptide - Glp1	BAF46900	8.00E–69
PDI26/PNAP2	385	42610.14	*Hebeloma cylindrosporum*	secreted acid phosphatase - HcPhoA	CBX23395	0.00E+00
PDI228	104	11394.43	*Moniliophthora perniciosa* FA553	hypothetical protein	XP_002391291	1.00E–50
PDI230	452	49458.59	–	–	–	–
PDI263	110	10891.57	*Pleurotus* sp. 'Florida'	hydrophobin 2 - Vmh2-2	CAD12834	4.00E–36
PDI315	107	10535.09	*Moniliophthora perniciosa* FA553	hypothetical protein	XP_002389333	1.00E–33
PDI319	115	11285.02	*Pleurotus ostreatus*	hydrophobin - POH3	CAA76494	6.00E–43
PDI343	486	52274.74	*Laccaria bicolor* S238N-H82	MFS Git1p-related GroPIns and GroPCho permease	XP_001880920	0.00E+00
PDI88	242	26143.98	*Laccaria bicolor* S238N-H82	predicted protein	XP_001884312	8.00E–96
PDI110	228	24255.13	*Tuber melanosporum* Mel28	hypothetical protein	XP_002841640	6.00E–54
PDI373	409	42801.87	*Laccaria bicolor* S238N-H82	aspartic peptidase A1 - LbPR_A7	XP_001881739	0.00E+00
PDI298	187	19825.52	*Serpula lacrymans* var. *lacrymans* S7.3	hypothetical protein	EGN94730	3.00E–55
PDI370	409	42330.74	*Pleurotus ostreatus*	ribonuclease T2 - RNPo38	BAD16612	0.00E+00
PDI201	205	22135.02	*Laccaria bicolor* S238N-H82	predicted protein	XP_001889651	1.00E–113
PDI205	572	63226.39	*Laccaria bicolor* S238N-H82	predicted protein	XP_001879563	0.00E+00
PDI251	114	11325.95	*Pleurotus ostreatus*	hydrophobin - POH3	CAA76494	6.00E–35
PDI99	322	35025.67	*Laccaria bicolor* S238N-H82	predicted protein	XP_001887567	2.00E–143
PDI259	182	19662.10	*Actinosynnema mirum* DSM 43827	hypothetical protein	YP_003100257	3.00E–37
PDI301	154	17451.31	*Coprinopsis cinerea* okayama7#130	small heat shock protein	XP_001829984	3.00E–71
PDI308	219	23444.67	–	–	–	–
PDI348	418	48004.87	*Laccaria bicolor* S238N-H82	delta-12 fatty acid desaturase protein - FAD12-3	XP_001887077	0.00E+00
PDI351	164	18157.45	–	–	–	–
PDI371	265	27316.32	*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP	acid protease	XP_001932923	1.00E–79
PDI372	300	31463.97	*Laccaria bicolor* S238N-H82	predicted protein	XP_001873582	1.00E–142
PNAP1	374	40308.23	*Hebeloma cylindrosporum*	secreted acid phosphatase - HcPhoA	CBX23395	0.00E+00
PDIe	300	30530.34	*Arthroderma benhamiae* CBS 112371	hypothetical protein	XP_003015316	5.00E–89

GroPIns, glycerophosphoinositol; GroPCho, glycerophosphocholine; MFS, major facilitator superfamily.

Table II-8. The results of JGI BLASTP homology search of PDI proteins (E-value < 1.00E–5).

	the most homologous protein			the second most homologous protein			the third most homologous protein		
PDI protein	organism database	JGI protein ID	E-value	organism database	JGI protein ID	E-value	organism database	JGI protein ID	E-value
PDI310	Shi	162026	2.27E–18	Bbo	41072	3.04E–08	Cpu	158688	4.41E–07
PDI63	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PDI5	Hsu	1049981	4.99E–11	–	–	–	–	–	–
PDI36	Pca	122903	1.94E–18	Sco	1187862	5.40E–10	Tve	53315	8.82E–10
PDI85	Hsu	40465	0.00E+00	Lbi	297291	0.00E+00	Sco	1152149	0.00E+00
PDI244	Gsp	124076	4.67E–63	Hsu	619789	4.91E–61	Bad	37929	8.30E–61
PDI26/PNAP2	Hsu	86572	2.30E–173	Lbi	310810	3.12E–145	Bad	105646	7.50E–90
PDI228	Dsq	159830	1.36E–40	Hsu	76067	2.93E–39	Jar	28177	7.10E–39
PDI230	Hsu	902786	2.65E–35	Lbi	293293	3.15E–07	Bbo	182974	5.23E–06
PDI263	Hsu	185826	1.83E–33	Pos1	1091049	3.60E–30	Fme	22212	1.31E–28
PDI315	Hsu	72210	7.59E–33	Fme	22212	7.41E–30	Gtr	44256	5.03E–26
PDI319	Fme	22212	2.72E–32	Hsu	189720	7.60E–32	Abi2	82987	8.50E–31
PDI343	Hsu	204509	0.00E+00	Pos1	46467	0.00E+00	Cci	11954	0.00E+00
PDI88	Hsu	38256	5.47E–85	Abi1	210556	1.81E–83	Lbi	707881	8.63E–80
PDI110	Hsu	203101	9.45E–107	–	–	–	–	–	–
PDI373	Hsu	33774	2.39E–174	Lbi	250557	2.16E–170	Han	99524	3.31E–156
PDI298	Hsu	35511	7.01E–82	Pos2	117056	1.17E–54	Glu	40307	1.33E–54
PDI370	Hsu	128901	2.14E–178	Pos2	78300	4.56E–159	Abi2	32412	6.90E–157
PDI201	Bad	53983	3.04E–93	Lbi	256021	4.99E–90	Pgi	245613	4.05E–89
PDI205	Glu	44191	0.00E+00	Pbr	30308	0.00E+00	Fme	167770	0.00E+00
PDI251	Hsu	196081	1.77E–35	Fme	22212	1.59E–32	Pos2	48847	6.88E–30
PDI99	Hsu	89262	3.48E–131	Lbi	705885	2.93E–116	Cci	6728	6.65E–110
PDI259	Hsu	44930	3.91E–65	–	–	–	–	–	–
PDI301	Cci	4052	1.49E–57	Lbi	474704	7.50E–56	Pos2	108076	1.57E–54
PDI308	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PDI348	Hsu	207206	0.00E+00	Lbi	309734	0.00E+00	Cci	2242	0.00E+00
PDI351	Hsu	46213	1.57E–12	–	–	–	–	–	–
PDI371	Hsu	190140	1.59E–108	Glu	261978	8.19E–80	Gtr	62581	2.96E–67
PDI372	Hsu	33656	1.02E–143	Lbi	666354	5.18E–130	Abi1	213426	2.37E–127
PNAP1	Hsu	56025	2.70E–174	Lbi	310810	2.14E–153	Pch	30283	4.43E–91
PDIe	Hsu	665737	7.05E–108	Jar	60562	7.39E–100	Gtr	41625	1.96E–97

Abbrebiations of organism database were shown in Table II-5.

Strophariaceae のクリタケ *H. sublateritium* 由来のタンパク質と最も高い相同性を示し、うち 4 個の PDI タンパク質 (PDI5, PDI110, PDI259 and PDI351) はクリタケ *H. sublateritium* 由来のタンパク質とだけしか相同性を示さなかった (Table II-9)。PDI63 と PDI308 は NCBI および JGI のデータベースの推定タンパク質と相同性を示さなかったことから、ナメコ特異的なタンパク質であると推測された。

次いで、InterProScan および Conserved domain-search プログラムを使用して PDI タンパク質のモチーフ検索を行った結果、22 個の PDI タンパク質に既知のモチーフが複数見出された (Table II-10)。一方、9 個の PDI タンパク質 (PDI63, PDI5, PDI36, PDI244, PDI230, PDI298, PDI259, PDI308 and PDI351) には既知のモチーフは見出されなかった。そこで、PROSCAN、ScanProsite、SMART プログラムによりさらにモチーフを検索した結果、PDI5、PDI36、PDI230、PDI259 には Internal repeats、PDI298 には Prokaryotic molybdopterin oxidoreductases signatures、PDI99 には ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) が見出された。

最後に、シグナルペプチド予測、膜貫通領域予測、局在予測プログラムを使用し、PDI タンパク質の局在を予測した (Table II-11)。まず、SignalP、SOSUIsignal プログラムを使用して外分泌シグナルペプチドを予測した結果、22 個の PDI タンパク質で予測され、これらのタンパク質は局在予測プログラムによっても外分泌タンパク質であると予測された。次いで、Mitoprot および cNLS Mapper プログラムを使用してミトコンドリアターゲティング配列および Importin α 依存核局在シグナル (Nuclear localization signal, NLS) を予測した結果、Mitoprot では 11 個、cNLS Mapper では 4 個の PDI タンパク質でそれらの局在化配列が予測された。これらのうち、外分泌タンパク質と予測されたものを除き、局在予測プログラムの結果も加味した結果、PDI88 と PDI351 がミトコンドリア局在、PDI5 が細胞核局在と予測された。TMHMM、HMMTOP、SOSUI プログラムを使用して膜貫通領域を予測すると共に、モチーフ検索の結果 (Table II-10) も加味した結果、PDI85、PDI343、PDI99 が膜貫通タンパク質 (トランスポーター) と予測された。PDI228、PDI301、PDI348 は局在化配列や膜貫通領域は予測されず、細胞質や細胞核などに局在すると予測された。

以上のバイオインフォマティクス的手法を用いた解析結果から推定される 31 個の PDI タンパク質の機能を Table II-12 および Figure II-1 にまとめた。これらの遺伝子がコードするタンパク質は、その役割により以下の 9 個のグループに大まかに分類された。

(i) 有機リン酸化合物から無機リン酸を遊離させるリン酸エステル加水分解酵素 (PDI26, PDI370, PDI205, PNAP1 and PDIe)。

(ii) リン酸エステル加水分解酵素によって遊離した無機リン酸などの吸収、輸

Table II-9. The numbers of homologous protein with PDI protein (E-value < 1.00E–5).

	JGI organism database																																													
PDI protein	Abi1	Abi2	Lbi	Glu	Pos1	Pos2	Cci	Sco	Hsu	Cpu	Jar	Pin	Sla1	Sla2	Ade	Bbo	Pst	Gtr	Fme	Fpi	Ppl	Gsp	Bad	Pbr	Csu	Pca	Pch	Pgi	Dsq	Tve	Wco	Han	Shi	Dsp	Cne	Tme	Rgr	Sro	Mla	Pgr	Mgl	Uma	Total
PDI310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
PDI63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PDI5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PDI36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
PDI85	18	18	18	35	21	22	8	21	15	27	27	26	22	24	22	14	18	28	13	27	35	25	20	22	25	23	20	19	23	29	25	20	23	34	16	8	15	18	14	5	4	14	861
PDI244	1	1	1	7	0	0	0	0	4	12	1	2	3	3	1	1	6	5	8	11	8	10	7	7	4	3	3	6	6	2	11	1	10	3	0	0	0	0	1	3	0	0	152
PDI26/PNAP2	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	30
PDI228	0	0	4	3	1	1	0	1	2	10	9	2	2	3	3	4	2	1	2	2	1	1	3	4	0	3	3	3	3	1	1	1	1	3	1	3	1	2	3	1	0	1	92
PDI230	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
PDI263	21	19	12	35	22	19	31	11	36	28	55	27	17	18	0	0	21	18	17	5	2	24	18	24	17	10	15	16	21	39	3	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	619
PDI315	21	18	13	38	22	21	32	11	36	28	56	27	17	18	1	0	21	18	17	6	2	24	17	23	20	12	14	16	21	39	3	16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	630
PDI319	21	18	12	39	23	23	31	11	36	28	55	27	17	18	0	0	21	18	17	5	2	24	13	24	17	13	15	16	21	40	3	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	625
PDI343	5	5	8	12	7	6	2	5	7	0	8	6	4	4	6	5	5	7	4	13	14	6	9	8	8	9	6	8	6	6	9	4	5	11	3	3	4	4	3	3	1	4	253
PDI88	1	1	2	1	1	1	1	2	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	3	0	0	2	3	1	0	0	0	1	2	1	1	0	1	1	0	0	0	1	36
PDI110	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PDI373	8	7	18	21	13	13	2	16	14	37	17	20	17	16	16	18	29	17	22	26	39	31	26	36	25	52	31	25	28	24	27	14	19	17	5	5	9	9	20	9	4	6	808
PDI298	0	0	0	7	3	3	1	0	1	2	3	0	4	4	1	0	0	1	3	0	0	4	4	1	1	6	4	5	2	3	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70
PDI370	2	2	4	3	3	4	0	1	2	3	3	2	2	2	2	4	4	3	4	3	3	2	2	6	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	2	96
PDI201	1	1	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	4	1	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
PDI205	2	2	1	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	1	0	0	1	2	2	2	1	1	1	1	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	34
PDI251	21	18	12	39	23	23	32	11	36	28	55	27	17	18	0	0	22	18	17	6	2	24	19	23	21	13	15	15	21	41	3	16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	638
PDI99	1	1	2	1	4	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	0	0	2	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	1	1	2	1	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	52
PDI259	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PDI301	4	4	10	7	6	5	7	7	7	9	7	6	5	6	14	5	8	14	6	7	10	7	7	9	5	6	10	4	13	10	7	5	2	0	0	0	0	0	4	4	0	0	247
PDI308	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PDI348	5	5	3	4	6	6	4	6	5	1	5	6	5	6	1	2	5	7	3	10	10	7	8	9	5	5	1	9	4	10	5	5	8	1	1	1	1	2	3	3	1	1	195
PDI351	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
PDI371	0	0	0	12	0	0	0	1	2	25	0	1	0	0	4	0	1	1	0	6	2	8	0	0	0	33	12	14	3	1	0	0	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	135
PDI372	7	7	11	7	10	12	4	7	8	11	11	16	7	7	14	6	10	9	10	5	11	17	6	10	4	9	6	5	13	8	7	9	9	4	0	1	0	0	0	0	0	0	298
PNAP1	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	29
PDIe	2	2	0	5	5	6	0	0	2	0	1	0	0	0	5	3	4	3	2	7	6	6	4	5	5	5	3	4	4	2	3	1	2	0	0	0	0	0	2	2	0	1	102
Total	141	129	137	277	173	171	157	119	226	255	319	201	143	151	97	68	180	173	149	144	148	224	174	218	164	215	169	175	195	263	116	132	100	88	29	23	32	37	51	31	11	38	6043

The putative same proteins in *Coprinopsis cinerea* (Cci) and *Cryptococcus neoformans* (Cne) database were excluded. Abbrebiations of organism database were shown in Table II-5.

Table II-10. The results of motif searches (InterProScan and Conserved domain-search) of PDI proteins.

	InterProScan		Conserved domain-search	
PDI protein	IPR	description	PSSM ID	description
PDI310	IPR011058	cyanovirin-N	192173	CVNH domain
PDI63	–	–	–	–
PDI5	–	–	–	–
PDI36	–	–	–	–
PDI85	IPR004738	phosphate permease	119392	MFS
	IPR005828	general substrate transporter	129965	phosphate:H+ symporter
	IPR005829	sugar transporter, conserved site		
	IPR016196	major facilitator superfamily domain, general substrate transporter		
	IPR020846	major facilitator superfamily domain		
PDI244	–	–	–	–
PDI26/PNAP2	IPR007312	phosphoesterase	199586	phosphoesterase family
PDI228	IPR022234	protein of unknown function DUF3759	153019	protein of unknown function (DUF3759)
PDI230	–	–	–	–
PDI263	IPR001338	hydrophobin, fungi	194316	fungal hydrophobin
PDI315	IPR001338	hydrophobin, fungi	194316	fungal hydrophobin
PDI319	IPR001338	hydrophobin, fungi	194316	fungal hydrophobin
	IPR019778	hydrophobin, fungi, conserved site		
PDI343	IPR005828	general substrate transporter	119392	MFS
	IPR016196	major facilitator superfamily domain, general substrate transporter	143864	sugar (and other) transporter
	IPR020846	major facilitator superfamily domain		
PDI88	IPR016040	NAD(P)-binding domain	199420	Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
PDI110	IPR013781	glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core	198985	GH25 muramidase superfamily
	IPR017853	glycoside hydrolase, superfamily		
PDI373	IPR001461	peptidase A1	133138	pepsin-like aspartic protease
	IPR001969	peptidase aspartic, active site	189350	eukaryotic aspartyl protease
	IPR009007	peptidase aspartic, catalytic		
	IPR021109	peptidase aspartic		
PDI298	–	–	–	–
PDI370	IPR001568	ribonuclease T2	29473	ribonuclease T2
	IPR018188	ribonuclease T2, active site		
PDI201	IPR018532	domain of unknown function DUF1994	192261	domain of unknown function (DUF1994)
PDI205	IPR018946	alkaline phosphatase D-related	163632	Bacillus subtilis PhoD and related protein
			192289	PhoD-like phosphatase
PDI251	IPR001338	hydrophobin, fungi	194316	fungal hydrophobin
PDI99	IPR005226	conserved hypothetical protein CHP00245	163818	uncharacterised protein family (UPF0014)
PDI259	–	–	–	–
PDI301	IPR002068	heat shock protein Hsp20	107221	ACD sHsps-like
	IPR008978	Hsp20-like chaperone	30420	IbpA
PDI308	–	–	–	–
PDI348	IPR005804	fatty acid desaturase, type 1	58173	delta12-FADS-like
	IPR021863	protein of unknown function DUF3474	199333	membrane-FADS-like superfamily
			178121	omega-6 fatty acid desaturase
PDI351	–	–	–	–
PDI371	IPR000250	peptidase G1, eqolisin	145148	peptidase A4 family
	IPR008985	concanavalin A-like lectin/glucanase		
PDI372	IPR002921	lipase, class 3	73213	lipase (class 3)
PNAP1	IPR007312	phosphoesterase	199586	phosphoesterase family
PDIe	IPR002828	survival protein SurE-like phosphatase/nucleotidase	193823	survival protein SurE

ACD, alpha-crystallin domain; CVNH, cyanovirin-N homolog; FADS, fatty acid desaturase; GH, glycoside hydrolase; Ibp, inclusion body-associated protein; IPR, InterPro record; PSSM, position-specific scoring matrix; MFS, major facilitator superfamily; sHsp, small heat shock protein.

Table II–11. The results of signal peptide, transmembrane region, localization prediction of PDI proteins.

	signal peptide prediction				transmembrane region prediction			localizatoin prediction [b]								
PDI protein	SignalP	SOSUIsignal	Mitoprot	cNLS Mapper	TMHMM	HMMTOP [a]	SOSUI [a]	WoLF PSORT	PSORT II	iPSORT	TargetP	Predotar	MultiLoc	MultiLoc2	CELLO	BaCelLo
PDI310	M1–A21	M1–I24	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI63	M1–G18	M1–T24	–	–	1	–	–	S	S	S	S	S	S	S	N	S
PDI5	–	–	–	R52–K86, E66–D98, E90–K120	–	–	–	N	N	–	–	–	N	N	N	C
PDI36	M1–A21	M1–A21	–	–	–	3	3	S	S	S	S	S	S	S	PM	S
PDI85	–	–	–	–	10	12	11	PM	PM	–	–	–	P	C	PM	C
PDI244	M1–A22	M1–R21	M1–A22	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	M	S	S
PDI26/PNAP2	M1–S17	M1–E16	M1–D38	–	–	1	1	S	C	S	S	S	S	E	S	S
PDI228	–	–	–	–	–	–	–	N	C	–	–	–	C	C	C	C
PDI230	M1–A19	M1–A23	–	H186–K214, D198–P227, K286–E315	–	–	–	M	S	S	S	S	S	S	N	S
PDI263	M1–A19	M1–A19	–	–	–	1	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI315	M1–A18	M1–A16	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI319	M1–A20	M1–P24	–	–	–	–	–	S	C	S	S	S	S	S	S	S
PDI343	–	–	M1–I11	–	11	12	9	PM	PM	–	–	M	C	C	PM	M
PDI88	–	–	M1–R34	D129–K161, D151–G182	–	–	–	C	M	M	M	M	C	M	M	M
PDI110	M1–A20	M1–D26	M1–G41	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI373	M1–A18	M1–D24	M1–G59	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	V	PM	S
PDI298	M1–G18	M1–E24	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	V	S	S
PDI370	M1–A16	M1–F20	–	–	–	–	–	S	N	S	S	S	S	S	S	S
PDI201	M1–A17	M1–A17	M1–A32	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI205	M1–A19	M1–A18	M1–A33	–	–	–	–	S	M	S	S	S	S	M	S	S
PDI251	M1–A20	M1–A20	M1–N26	–	–	–	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI99	–	–	–	–	6	7	7	PM	PM	–	–	–	M	G	PM	C
PDI259	M1–A19	M1–T25	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDI301	–	–	–	–	–	–	–	N	CS	–	–	–	C	C	C	C
PDI308	M1–A20	M1–E26	M1–L17	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	V	S	S
PDI348	–	–	–	–	–	6	–	C	C	–	–	–	G	P	PM	C
PDI351	–	–	M1–S36	R96–T125	–	–	–	N	M	–	M	–	N	M	N	C
PDI371	M1–A20	M1–A20	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	V	S	S
PDI372	M1–A22	M1–A14	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PNAP1	M1–A17	M1–D25	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDIe	M1–A20	M1–A20	–	–	–	–	–	S	S	S	S	S	S	S	S	S

[a] The region of putative signal peptide was excluded. [b] C, cytoplasm; CS, cytoskeleton; E, endoplasmic reticulum; G, golgi; M, mitochondria; N, nucleus; P, peroxisome; PM, plasma membrane; S, secreted protein; V, vacuole.

Table II-12. Classification by putative function of PDI proteins.

PDI protein	homology protein or predicted motif	putative localization [a]	Number of clones
phosphate hydrolase			
PDI26/PNAP2	acid phosphatase	S	6
PDI370	T2 ribonuclease	S	3
PDI205	PhoD-like phosphodiesterase/alkaline phosphatase	S	2
PNAP1	acid phosphatase	S	–
PDIe	SurE-like phosphatase/nucleotidase	S	–
transporter			
PDI85	phosphate transporter	PM	8
PDI343	GroPIns/GroPCho transporter	PM	5
PDI99	ATP-binding cassette transporter	PM	1
degradation of nutrients			
PDI244	glycoprotein	S	8
PDI110	glycoside hydrolase	S	4
PDI373	aspartic protease	S	4
PDI371	glutamic protease	S	1
PDI372	lipase	S	1
hyphal growth and attachment			
PDI228	CipC-like protein	C	6
PDI263	hydrophobin	S	5
PDI315	hydrophobin	S	5
PDI319	hydrophobin	S	5
PDI251	hydrophobin	S	2
lectin			
PDI310	cyanovirin-N homolog	S	32
PDI259	L-fucose α-1,6 specific lectin	S	1
response to stress			
PDI301	small heat shock protein	C	1
PDI348	fatty acid desaturase	E	1
mitochondrial localization			
PDI88	NAD(P)-binding domain	M	4
PDI351	–	M	1
nuclear localization			
PDI5	internal repeats	N	11
secreted protein			
PDI63	–	S	13
PDI36	internal repeats	S	9
PDI230	internal repeats	S	5
PDI298	–	S	3
PDI201	DUF1994	S	2
PDI308	–	S	1

[a] C, cytoplasm; E, endoplasmic reticulum; M, mitochondria; N, nucleus; PM, plasma membrane; S, secreted protein. CipC, concanamycin-induced protein C; DUF, domain of unknown function; GroPCho, glycerophosphocholine; GroPIns, glycerophosphoinositol.

Figure II-1. The predicted adaptive mechanism for phosphate deficiency in the mycelium of *P. nameko*. ABC, ATP-binding cassette; AcPTase, acid phosphatase; AlkPTase, alkaline phosphatase; CipC, concanamycine-induced protein C; FA, fatty acid; GroPCho, glycerophosphocholine; GroPIns, glycerophosphoinositol; PDEase, phosphodiesterase; Pi, inorganic phosphate; Po, organic phosphate; PTase, phosphatase; RNase, ribonuclease; sHSP, small heat shock protein.

Figure II-1. Continued.

送に関与するトランスポーター (PDI85, PDI343 and PDI99)。

(iii) タンパク質、脂質、糖質などの分解に関与する分泌タンパク質 (PDI244, PDI110, PDI373, PDI371 and PDI372)。

(iv) 菌糸の分岐や生長を促すと共に、効率的な分解を進めるため生物表面への付着に関与するタンパク質 (PDI228, PDI263, PDI315, PDI319 and PDI251)。

(v) 自己の生体防御や付着に関与すると推測されるレクチン (PDI310 and PDI259)。

(vi) フォールディングや膜脂質の変化など、一般的なストレス環境下での生育維持に関与するタンパク質 (PDI301 and PDI348)。

(vii) ミトコンドリア内で代替経路を誘導し、ATP 合成によるリン酸消費を抑えると推測されるタンパク質 (PDI88 and PDI351)。

(viii) 細胞核内で他の PDI 遺伝子の転写に関与すると推測されるタンパク質 (PDI5)。

(ix) 細胞外に分泌される機能未知のタンパク質 (PDI63, PDI36, PDI230, PDI298, PDI201 and PDI308)。

4 考察

4-1 リン酸エステル加水分解酵素

機能の推定の結果、PDI26/PNAP2 (後述) および PNAP1 は酸性ホスファターゼ、PDI370 は T2 リボヌクレアーゼ、PDI205 は PhoD-like ホスホジエステラーゼ/アルカリホスファターゼ、PDIe は SurE-like ホスファターゼ/ヌクレオチダーゼと推定され、これら 5 個の PDI タンパク質をリン酸エステル加水分解酵素グループとして分類した (Table II-12)。リン酸エステル加水分解酵素は EC 3.1 に分類される酵素群であり、リン酸欠乏下で誘導されるタンパク質として最も研究されている酵素である。ナメコ N2 株菌糸体では既に 3 個のリン酸エステル加水分解酵素 (*pdi370*, *PNAP1* and *PNAP2*/*pdi26*; Tasaki et al., 2004a and 2006) の誘導が報告されていたが、本研究により *pdi205* および *pdie* もリン酸エステル加水分解酵素をコードすると推測された。

pdi26/*PNAP2*、*PNAP1* がコードするタンパク質 PDI26/PNAP2、PNAP1 を相同性検索した結果、菌類由来の酸性ホスファターゼと高い相同性を示した (Table II-7)。酸性ホスファターゼは酸性側に最適 pH を持つホスファターゼであり、リン酸欠乏による誘導は植物や微生物の適応機構の 1 つとしてよく研究されている (Dassa and Boquet, 1985; Sachay et al., 1991; del Pozo et al., 1999; Baldwin et al., 2001)。ナメコ菌糸体もリン酸欠乏下において菌糸体内外の酸性ホスファターゼ活性が顕著に増加すると報告されており (Joh et al., 1996; Tasaki et al., 2001)、ナメコ N114 株ではリン酸欠乏下で分泌される 3 種類の酸性ホスファターゼ APase47、APase48、Apase52 が精製されている (Joh et al., 1996; Yazaki et al., 1997)。近年、ナメコと同じ担子菌に属する外生菌根担子菌 *H. cylindrosporum* においてもリン酸欠乏下で酸性ホスファターゼ活性が上昇すると報告されており (Louche et al., 2010)、他の生物と同様、担子菌においても酸性ホスファターゼの誘導は重要なリン酸欠乏適応機構の 1 つであると推測された。

Tasaki ら (2001 and 2006) はナメコ N2 株菌糸体の培養ろ液を二次元 PAGE し、ナメコ N114 株由来の APase47 と APase52 の N 末端アミノ酸配列と一致するタンパク質が P−培養によって誘導されることを確認し、これらをコードする遺伝子 *PNAP1* と *PNAP2* を解析した。これらの遺伝子の発現量は P−培養期間の経過に伴って徐々に増加していた (Tasaki et al., 2006)。また、*PNAP2* はディファレンシャルスクリーニングで得られた *pdi26* と同じ遺伝子であったことから、これらを PDI26/PNAP2 と表記することとした (Tasaki et al., 2002)。出芽酵母 *S. cerevisiae* ではリン酸欠乏下で誘導される酸性ホスファターゼ遺伝子がよく研究されており、3 種類の相同遺伝子 *PHO5*、*PHO11*、*PHO12* の発現が *PHO* 経路によって調節されている (Ogawa et al., 2000)。リン酸欠乏下で誘導される *PHO5* ホモログは

他の酵母でも報告されており (Kaur et al., 2007; 東江ら, 2011)、JGI が公開する担子菌ゲノムデータベース中でも多くの Pho5 ホモログが推定された (データ示さず)。そのため、Pho5 ホモログはリン酸欠乏下で働くホスファターゼとして重要な役割を果たすと推察されるが、PDI26/PNAP2 および PNAP1 は Pho5 ホモログと相同性を示さなかった (データ示さず)。PDI26/PNAP2 および PNAP1 を相同性検索した結果、コウジカビ属 *A. fumigatus* (Bernard et al., 2002)、アオカビ *Penicillium chrysogenum* (Haas et al., 1992)、外生菌根担子菌 *H. cylindrosporum* (accession number FR692330) 由来の酸性ホスファターゼと高い相同性を示し、これらをコードする遺伝子もリン酸欠乏で発現が誘導されると報告されていた。ナメコ中に *PHO5* ホモログが存在するかどうかは不明であるが、少なくとも cDNA ライブラリーのディファレンシャルスクリーニングや二次元 PAGE ではその存在は確認されていない。出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノム配列中には PDI26/PNAP2 および PNAP1 と高い相同性を示すタンパク質は存在しなかったことから (データ示さず)、ナメコ菌糸体は同じ菌類である出芽酵母 *S. cerevisiae* とは異なる種類の酸性ホスファターゼをリン酸欠乏下で誘導し、リン酸エステルの加水分解を促進していると推測された。

pdi370 がコードするタンパク質 PDI370 を相同性検索した結果、担子菌由来の T2 リボヌクレアーゼと高い相同性を示した (Table II-7)。リボヌクレアーゼは RNA をオリゴヌクレオチドもしくはモノヌクレオチドに分解する酵素であり、塩基特異性、構造、機能、最適 pH、起源などにより分類することができる。T2 リボヌクレアーゼはウイルス、細菌、植物、菌類、動物など幅広い種に見られ、最適 pH 4–5 で、塩基非特異性を示すリボヌクレアーゼである (Deshpande and Shankar, 2002; Luhtala and Parker, 2010)。ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下において菌糸体内外のリボヌクレアーゼ活性が顕著に増加するが (Joh et al., 2001; Tasaki et al., 2004a)、他の菌類における誘導は全く報告されていない。一方、植物のリボヌクレアーゼは酸性ホスファターゼと同様、リン酸欠乏下で誘導されることが知られている (Nürnberger et al., 1990; Löffler et al., 1992; Köck et al., 1995)。リン酸欠乏による T2 リボヌクレアーゼ遺伝子の誘導は、シロイヌナズナ *A. thaliana* 由来の *RNS1* や *RNS2* (Taylor et al., 1993; Bariola et al., 1994)、ハナタバコ *Nicotiana alata* 由来の RNase *NE* (Dodds et al., 1996)、アーモンド *Prunus dulcis* 由来の RNase *PD2* (Ma and Oliveira, 2000) などで報告されている。そのため、リン酸欠乏による T2 リボヌクレアーゼの誘導は植物と同様、菌類でも重要な役割を果たすと推測された。

Tasaki ら (2004a) は活性染色により、P–培養したナメコ N2 株菌糸体の培養ろ液中には 4 個のリボヌクレアーゼが存在し、全てのタンパク質量が P–培養で増加すると報告している。PDI370 を相同性検索した結果、アミノ酸数が異なるナ

メコ由来 T2 リボヌクレアーゼ Pn30 と比較的高い相同性を示し (accession number BAD20773)、この Pn30 にも外分泌シグナルペプチドが予測された (データ示さず)。真正細菌 *Bacillus* spp.では、リン酸欠乏下で T2 リボヌクレアーゼと異なる構造のリボヌクレアーゼが誘導されており (Znamenskaya et al., 1999; Hahnen et al., 2000)、ナメコ N2 株菌糸体の 4 個のリボヌクレアーゼが全て T2 リボヌクレアーゼであるかどうかは不明である。また、Pn30 がリン酸欠乏下で誘導されるかどうかも不明であるが、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下で複数のリボヌクレアーゼを誘導することで RNA の加水分解を促進していると推測された。

pdi205 がコードするタンパク質 PDI205 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、モチーフ検索を行った結果、PhoD-like phosphatase のモチーフが推定された (Table II-10)。PhoD はアルカリ性側に最適 pH を持つ枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来のアルカリホスファターゼである。枯草菌 *B. subtilis* はリン酸欠乏下において、3 種のアルカリホスファターゼ遺伝子 *phoD* (Eder et al., 1996)、*phoA* (Kapp et al., 1990)、*phoB* (Bookstein et al., 1990; Chesnut et al., 1991) の転写を誘導する。また、大腸菌 (Rao and Torriani, 1988) や出芽酵母 *S. cerevisiae* (Kaneko et al., 1987; Plankert et al., 1991) においてもアルカリホスファターゼの誘導が報告されており、リン酸欠乏下におけるアルカリホスファターゼの誘導は無機リン酸の獲得において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、P–培養したナメコ N2 株菌糸体を用いた菌体内外の活性測定ではアルカリホスファターゼ活性の誘導は確認されておらず、ナメコ菌糸体の培養液は生育に伴って pH が徐々に酸性になることから (未公表データ)、PDI205 がアルカリホスファターゼとして機能しているとは考えにくい。

枯草菌 *B. subtilis* 由来の PhoD はアルカリホスファターゼ活性だけでなく、ホスホジエステラーゼ活性も持つ酵素であることが報告されている (Eder et al., 1996)。ホスホジエステラーゼは別名 5'-エキソヌクレアーゼ、5'-ヌクレオチドホスホジエステラーゼとも呼ばれ、オリゴヌクレオチドの 3'ヒドロキシ末端からの 5'-ヌクレオチドの加水分解を触媒する酵素である。しかし、枯草菌 *B. sublitis* のホスホジエステラーゼ活性もアルカリ側に最適 pH を持つと報告されている (Yamane and Maruo, 1978)。PhoD と PDI205 の相同性はあまり高くないため、PDI205 が同じ活性、最適 pH を持つホスファターゼであるかどうかは不明であるが、PDI205 はアルカリホスファターゼよりむしろホスホジエステラーゼとしてリン酸エステルの加水分解を行う酵素であると推測された。

pdie がコードするタンパク質 PDIe を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、モチーフ検索を行った結果、SurE-like phosphatase/nucleotidase のモチーフが推定された (Table II-10)。培養ろ液の二次元 PAGE の結果より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で 23 個

の分泌タンパク質を誘導することが明らかになっており、そのうち比較的分泌量の多かったタンパク質が PDIe である (Tasaki et al., 2001; Awang, 2002; 高藤, 2005)。PDIe と相同性を示した SurE は定常期の大腸菌 *E. coli* の生存に関与するオペロン *surE-pcm-nlpD-rpoS* として発見された遺伝子である (Li et al., 1994a)。その後の研究から、*surE* は高温や高塩濃度などのストレス環境下での生存応力を高めることが明らかとされているが (Li et al., 1997; Visick et al., 1998; Riehle et al., 2001)、その機能はまだ十分解明されていない。近年、Proudfoot ら (2004) は、大腸菌 *E. coli* 由来の SurE が 5'(3')-ヌクレオチダーゼおよびポリホスファターゼ活性を持つと報告した。さらに、細菌 (Lee et al., 2001; Zhang et al., 2001b; Iwasaki and Miki, 2007; Pappachan et al., 2008; Saraiva et al., 2009)、古細菌 (Mura et al., 2003) 由来の SurE の構造的、生化学的解析から、SurE は新規のホスファターゼファミリーに属する二価金属依存性ホスファターゼであることが明らかにされている。

菌類でのリン酸欠乏による SurE の誘導はアルカン資化酵母 *Yarrowia lipolytica* 由来 *PHO2* でのみ報告されており (Tréton et al., 1992)、主要な酸性ホスファターゼ遺伝子を欠損した出芽酵母 *S. cerevisiae* への *PHO2* の導入は、リン酸欠乏下での酸性ホスファターゼ活性を代替可能なことが明らかにされている。本研究室の高藤 (2005) は PDIe の組換えタンパク質の発現を試みたが、その発現を確認することはできず、PDIe がホスファターゼ活性を持つかどうかは不明である。しかし、培養ろ液におけるタンパク質の中で比較的存在量が多いことから (Tasaki et al., 2001)、リン酸欠乏に対して大きく貢献しているタンパク質であると推測された。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下において、酸性ホスファターゼ (PDI26/PNAP2 and PNAP1)、T2 リボヌクレアーゼ (PDI370)、PhoD-like ホスホジエステラーゼ/アルカリホスファターゼ (PDI205)、SurE-like ホスファターゼ/ヌクレオチダーゼ (PDIe) など、様々な基質に作用するリン酸エステル加水分解酵素を分泌していると推測された (Figure II-1)。これらの PDI タンパク質のうち、PDI370 以外は出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノム配列中に相同性を示すタンパク質が存在しなかったことから (データ示さず)、ナメコ菌糸体は酵母とは異なる戦略でリン酸エステルの加水分解を行っていると推測された。また、ナメコ菌糸体では上記の *pdi* 遺伝子以外にも、酸性ホスファターゼ APase48 (Yazaki et al., 1997)、グルコース-1-ホスファターゼ (Joh et al., 1998b) が精製されており、8 種の酸性ホスファターゼの分泌が明らかにされている (高藤, 2005)。そのため、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で様々なリン酸エステル加水分解酵素を分泌することによって外環境の有機リン酸化合物を分解し、それによって遊離した無機リン酸を利用することで生育を維持していると推測された。

4-2 トランスポーター

機能の推定の結果、PDI85 はリン酸トランスポーター、PDI343 は GroPIns/GroPCho (Glycerophosphoinositol/glycerophosphocholine) トランスポーター、PDI99 は ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターと推定され、これら 3 個の PDI タンパク質をトランスポーターグループとして分類した (Table II-12)。あらゆる生物は細胞内外に様々な物質を輸送するための膜タンパク質 (トランスポーター) を有しており、2 つの主要なファミリーが知られている。1 つはイオン濃度勾配に従って物質を輸送する MFS (Major facilitator superfamily) トランスポーター、もう 1 つは ATP の加水分解をエネルギーとして利用する ABC トランスポーターであり、PDI85 と PDI343 は前者、PDI99 は後者のファミリーと推定された。

pdi85 がコードするタンパク質 PDI85 を相同性検索した結果、担子菌由来のリン酸トランスポーターと高い相同性を示した (Table II-7)。リン酸トランスポーターは MFS のサブファミリー9 に属し (Pao et al., 1998)、中央の親水性領域で分離される 6 個の N 末端膜貫通領域と 6 個の C 末端膜貫通領域から構成される 12 回膜貫通型トランスポーターである (Largerstedt et al., 2004)。膜貫通領域予測の結果、PDI85 は 10−12 個の膜貫通領域が存在すると予測され (Table II-11)、モチーフ検索の結果からもリン酸トランスポーターであると予測された (Table II-10)。

細胞膜を通過する無機リン酸の吸収には低親和性と高親和性、2 種類のトランスポーターが関与することが知られている。リン酸が十分存在する時は、構成的に発現する低親和性リン酸トランスポーターによってリン酸の吸収が行われているのに対し、リン酸欠乏下では高親和性リン酸トランスポーターの発現が誘導され、外環境からのリン酸の吸収を増大させる。そのため、高親和性リン酸トランスポーターの誘導は酸性ホスファターゼの分泌と同様、リン酸欠乏に対する適応機構の 1 つとしてよく研究されている (Persson et al., 1999; Rausch and Bucher, 2002)。出芽酵母 *S. cerevisiae* では 3 種類の低親和性リン酸トランスポーターPho87 (Bun-ya et al., 1996)、Pho90、Pho91 (Wykoff and O'Shea, 2001) と、2 種類の高親和性リン酸トランスポーターPho84 (Bun-ya et al., 1991)、Pho89 (Martinez and Persson, 1998) が報告されている。これらのうち、Pho84 は H^+共役型高親和性リン酸トランスポーター、Pho89 は Na^+共役型高親和性リン酸トランスポーターとしてリン酸欠乏下で誘導されるが、最適 pH は前者が酸性、後者がアルカリ性であることから、2 つのシステムを併せ持つことで幅広い pH の環境からリン酸を獲得していると推察されている。ナメコ N2 株菌糸体由来の PDI85 は出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の 5 個のリン酸トランスポーターのうち、Pho84 と最も高い相同性を示した (データ示さず)。また、PDI85 と最も高い相同性を示した外生

菌根担子菌 *H. cylindrosporum* 由来の HcPT1 も H^+共役型リン酸トランスポーターであり、酸性培地でリン酸吸収が促進されることが報告されている (van Aarle et al, 2007; Tatry et al., 2009)。ナメコ菌糸体を培養した P−培地の pH は徐々に酸性になることから (未公表データ)、PDI85 は H^+共役型高親和性リン酸トランスポーターとして効率的なリン酸吸収を行っていると推測された。

リン酸欠乏で誘導されるリン酸トランスポーターは植物だけでなく、菌根を形成する菌類でよく研究されている。タルウマゴヤシ *Medicago truncatula* はリン酸欠乏下でリン酸トランスポーター遺伝子の発現量が著しく増加するのに対し、アーバスキュラー菌根菌 *Glomus intraradices* との菌根が形成されると、植物のリン酸トランスポーター遺伝子の発現量は減少すると報告されている (Chiou et al., 2001)。アーバスキュラー菌根菌 *Glomus* spp. (Harrison and van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005) だけでなく、ナメコと同じ担子菌に属する外生菌根担子菌 *H. cylindrosporum* (van Aarle et al, 2007) や内生菌 *Piriformospora indica* (Yadav et al., 2010) 由来のリン酸トランスポーターもリン酸欠乏によって誘導されており、菌根菌のリン酸トランスポーターは植物のリン酸獲得において重要な役割を果たしていると推察されている (Karandashov and Bucher, 2005; Javot et al., 2007)。しかし、ナメコは木材腐朽菌であり、植物との菌根の形成や共生は行っていない。そのため、リン酸欠乏によるリン酸トランスポーターの誘導はナメコ菌糸体自身のリン酸吸収で重要な役割を果たすと推測された。

pdi343 がコードするタンパク質 PDI343 を相同性検索した結果、担子菌由来の機能未知トランスポーターと高い相同性を示した (Table II-7)。また、モチーフ検索および膜貫通領域予測の結果、PDI343 は 9−12 個の膜貫通領域が存在する MFS と予測されたが、明確な機能は示されなかった (Table II-10 and II-11)。PDI343 は輸送する物質が不明な代謝トランスポーターとして報告されていたが (Tasaki et al., 2002)、担子菌以外の菌類データベースの相同性検索により、機能が解明されている出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Git1 と高い相同性を示した。出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Git1 は GroPIns や GroPCho などのリン脂質代謝物を細胞内に輸送するトランスポーターである (Patton-Vogt and Henry, 1998; Fisher et al., 2005; Almaguer et al., 2006)。リン脂質は細胞膜の主要な構成成分となる他、生体内でのシグナル伝達にも関わる重要な分子である。GroPIns や GroPCho は Git1 によって細胞内に輸送されると、酵素反応によってグリセロール 3 リン酸とイノシトールもしくはコリンに分解される。このグリセロール 3 リン酸はさらに酵素反応を受けてグリセロールとリン酸に分解され、生育維持に使用される (Patton-Vogt, 2007)。培地中に十分量のイノシトールが存在する場合、生体内で生成された GroPIns は細胞外に排出されるが、イノシトール欠乏下では Git1 によ

る GroPIns の取り込みが増加すると報告されている (Almaguer et al., 2004)。

出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の Git1 は高親和性リン酸トランスポーターPho84 と相同性を示すことが知られており (Patton-Vogt and Henry, 1998)、イノシトール欠乏だけでなくリン酸欠乏による誘導も報告されている (Almaguer et al., 2003)。また、Git1 は GroPIns や GroPCho だけでなく、グリセロール 3 リン酸や無機リン酸も輸送可能なトランスポーターであると報告されている (Wykoff and O'Shea, 2001; Popova et al., 2010)。Git1 は H^+共役的に GroPIns を輸送し、酸性側の pH でその吸収を促進する (Almaguer et al., 2004)。そのため、ナメコ N2 株菌糸体は GroPIns/GroPCho トランスポーター (PDI343) によって主に有機リン酸化合物を吸収し、生体内で分解することで無機リン酸を獲得すると共に、高親和性リン酸トランスポーター (PDI85) と協調的に様々なリン酸化合物を吸収していると推測された。

pdi99 がコードするタンパク質 PDI99 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質との相同性を示さなかったが (Table II-7)、6–7 個の膜貫通領域が存在する膜タンパク質であり (Table II-11)、モチーフ検索より、Conserved hypothetical protein CHP00245 ファミリーに属し、ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) が存在すると推定された (Table II-10)。このモチーフが存在する膜タンパク質としては、ABC トランスポーターが挙げられる。ABC トランスポーターは ATP のエネルギーを利用して様々な物質を能動輸送するトランスポーターであり、栄養素の取り込みや、細胞の浸透圧維持、毒性物質の排出を行うなど、生育を維持する上で重要な役割を果たしている。菌類の ABC トランスポーターは薬剤や重金属を細胞外へ汲み出す排出ポンプとしての働きがよく研究されており、ABC トランスポーターの発現亢進により耐性を得ることが知られている (新見ら, 2005; Cannon et al., 2009; Sá-Correia et al., 2009)。一般的な ABC トランスポーターは、ATP 結合領域と 6 回膜貫通領域を 1 つのユニットとし、これが 2 回繰り返された 12 回膜貫通型トランスポーターとして知られている。しかし、PDI99 は 1 つのユニットから構成されており、ATP 結合領域も不完全であった (データ示さず)。

シロイヌナズナ *A. thaliana* (Thibaud et al., 2010) やイネ *Oryza sativa* (Li et al., 2009) では、リン酸欠乏によって ABC トランスポーターの発現が誘導されるが、その役割や機能は解明されていない。近年、Huang ら (2009) は、イネ *O. sativa* において、PDI99 と同じ Conserved hypothetical protein CHP00245 ファミリーに属する STAR2 を報告した。STAR2 はアルミニウム耐性に関与する膜タンパク質であり、膜貫通領域のみからなる不完全な ABC トランスポーターである。STAR2 は、ATP 結合領域を含む STAR1 と複合体を形成することで ABC トランスポーターとしての機能を発揮し、UDP-グルコースの輸送を行う。細胞外に輸送された

UDP-グルコースの役割は不明であるが、Huang ら (2009) は、UDP-グルコースもしくはその代謝産物によって細胞壁が修飾され、アルミニウム耐性を得ると推察している (馬、山地, 2010)。そのため、PDI99 も他のタンパク質と複合体を形成することで ABC トランスポーターとしての本来の機能を発揮し、未知の物質の吸収もしくは排出を行うことで、リン酸欠乏環境に適応していると推測された。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下において、MFS のリン酸トランスポーター (PDI85) および GroPIns/GroPCho トランスポーター (PDI343) によってリン酸化合物の吸収を促進すると共に、ABC トランスポーター (PDI99) による未知物質の能動輸送を行うことでストレス環境へ適応していると推測された (Figure II-1)。P−培養における *pdi85*、*pdi343*、*pdi99* の発現パターンは類似しており、P−培養期間の経過に伴って発現量が徐々に増加する (田﨑, 2001; Tasaki et al., 2002)。また、これらの発現パターンはリン酸エステル加水分解酵素 (*pdi26*/*PNAP2*, *PNAP1* and *pdi370*) の発現パターンとも類似している (Tasaki et al., 2004a and 2006)。従って、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で 3 種のトランスポーターを誘導し、リン酸エステル加水分解酵素によって遊離した無機リン酸や有機リン酸化合物を細胞内に取り込むことで、生育を維持していると推測された。

4-3 栄養素の分解

機能の推定の結果、PDI244 はグリコプロテイン、PDI110 はグリコシドヒドロラーゼ、PDI373 はアスパラギン酸プロテアーゼ、PDI371 はグルタミン酸プロテアーゼ、PDI372 はリパーゼと推定され、これら 5 個の PDI タンパク質を栄養素の分解に関与する分泌タンパク質グループとして分類した (Table II-12)。これらの PDI タンパク質はリン酸エステル加水分解酵素のように直接無機リン酸の遊離に関与する訳ではなく、リグニン、タンパク質、糖質、脂質など、様々な有機物の分解を促すことで、有機リン酸や他の栄養素の遊離に寄与していると推測される。

pdi244 がコードするタンパク質 PDI244 を相同性検索した結果、白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* 由来のグリコプロテイン Glp1 および Glp2 と高い相同性を示した (Table II-7)。これらは分子量約 14,000 の低分子分泌タンパク質であり、リグニン分解に関与すると推定されている (Tanaka et al., 2007)。木材腐朽菌はセルロース、ヘミセルロースを中心に分解する褐色腐朽菌、リグニンも同時に分解できる白色腐朽菌、これらの腐朽菌が腐朽できないような高含水率の木材の表面に軟化現象を起こす軟腐朽菌に大別される。白色腐朽菌は複数のリグニン分解酵素を分泌することでリグニンの分解を行うが、酵素の分子サイズは木材細

胞壁の細孔の直径より大きいため、そのままでは木材細胞壁中に侵入できない。そこで、多くの白色腐朽菌は活性酸素であるヒドロキシラジカル (·OH) を遷移金属の酸化還元反応を介して発生させ、リグニンの芳香族環を攻撃 (ヒドロキシル化) する。その結果、侵食された木材細胞壁には大きな孔が形成され、リグニン分解酵素はその分解が可能となる (渡辺, 2007a and 2007b)。白色腐朽菌はヒドロキシラジカルを発生させるための様々な機構を有しているが、近年、白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* において新規に発見されたのが低分子量のグリコプロテイン Glp1 および Glp2 である (Tanaka et al., 2007)。このタンパク質は NADH などの電子供与体と O_2 間の酸化還元反応 ($Fe^{3+} + O_2 \rightarrow Fe^{2+} + H_2O_2$) を触媒し、過酸化水素 ($H_2O_2$) を産生させる。産生された H_2O_2 は続いてフェントン反応 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$) に使用され、ヒドロキシラジカルが産生する (Tanaka et al., 1996, 1999 and 2007; Enoki et al., 2003)。リグニン分解酵素の活性は木材腐朽率と必ずしも関係せず、このヒドロキシラジカルが木材腐朽率と関係することが報告されており、木材腐朽の重要因子であると推察されている (Tanaka et al., 2000; Yamakawa et al., 2005)。

白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* のリグニン分解は窒素、炭素、硫黄欠乏下で活性化するが、リン酸欠乏下での活性化は起こらなかったと報告されている (Keyser et al., 1978; Jeffries et al., 1981)。また、炭素、窒素欠乏によるリグニン分解酵素の誘導は様々報告されているが (Stewart et al., 1992; Li et al., 1994b; Vanden Wymelenberg et al., 2006 and 2009)、リン酸欠乏による変化は明らかにされていない。他の白色腐朽担子菌がリン酸欠乏下でヒドロキシラジカルの産生やリグニン分解を活性化させるかどうかは不明であるが、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下でリグニン分解を促すために、グリコプロテインを分泌していると推測された。

pdi110 がコードするタンパク質 PDI110 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、モチーフ検索の結果、Glycoside hydrolase family 25 に属していると推定された (Table II-10)。グリコシドヒドロラーゼはグリコシド結合を加水分解する酵素の総称であり、現在 130 種のファミリーが知られている (CAZy, http://www.cazy.org/; Cantarel et al., 2009)。これらのうち、ファミリー25 はリゾチーム活性を有することが知られている (Henrissat and Bairoch, 1993)。リゾチームは別名ムラミダーゼとも呼ばれ、グラム陽性菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素として発見された (Fleming, 1922; Jolles, 1969)。グラム陽性菌の細胞壁は *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミンとが β-1,4 結合した多糖類を主成分とするペプチドグリカン層により構成されており、リゾチームはこの β-1,4 結合の加水分解を触媒する。

Glycoside hydrolase family 25の触媒活性に重要なモチーフ配列は既に明らかにされているが (IPR008270, InterProScan)、PDI110 のモチーフ配列は不完全だった (データ示さず)。糸状子嚢菌 *Chalaropsis* sp.由来のリゾチームには上記のモチーフ配列が存在するが、中でも 2 つのアミノ酸残基 (D6 and E33) が触媒活性に重要であると報告されている (Fouche and Hash, 1978)。PDI110 の配列を調べた結果、2 つのアミノ酸残基 (D26 and E53) がほぼ同じ間隔で保存されていた。また、近年、コウジカビ属 *A. fumigatus* 由来のリゾチームの結晶構造が解析され、D105 と E107 の重要性が示された (Korczynska et al., 2010)。PDI110 の配列を調べた結果、これらの残基は保存されており (D122 and E124)、PDI110 がリゾチーム活性を持つ可能性が示唆された。しかし、PDI110 と上記の 2 種類のリゾチームとの間のアミノ酸相同性は 10−18%であり、相同性はとても低かった。

キノコ由来の細胞外ムラミダーゼ活性は、ツクリタケ *A. bisporus*、ヒラタケ *P. ostreatus* (Fermor, 1983)、スエヒロタケ *S. commune* (Grant et al., 1990) において報告されている。ツクリタケ *A. bisporus* では、ムラミダーゼやプロテアーゼを分泌することで生菌、死菌を分解し、生育のための炭素源や窒素源として利用していることが報告されている (Fermor et al., 1991; Lincoln et al., 1997)。しかし、リン酸欠乏によるリゾチーム活性の誘導は全く研究されていない。白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* のマイクロアレイ解析において、炭素、窒素欠乏下でファミリー25 と予測される遺伝子の発現が増加すると報告されているが (Vanden Wymelenberg et al., 2009)、この遺伝子は *pdi110* と相同性を示さなかった (データ示さず)。PDI110 がリゾチーム活性を示すかどうかは不明であるが、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下でグリコシドヒドロラーゼを分泌し、細菌の加水分解を促していると推測された。

pdi373 がコードするタンパク質 PDI373 を相同性検索した結果、担子菌由来のアスパラギン酸プロテアーゼと高い相同性を示した (Table II-7)。また、モチーフ検索より、Peptidase A1 ファミリーに属していると推測され、2 ヵ所の活性部位モチーフ配列が保存されていた (Table II-10)。タンパク質のペプチド結合を加水分解する酵素をプロテアーゼと総称するが、生物は自己の生命活動のためにこの酵素を産生し、タンパク質をアミノ酸にまで分解して栄養にする。また、生体中の多くのタンパク質に作用し、酵素の活性化や不活性化に関与する極めて重要な生体制御機能を担っている。プロテアーゼは触媒作用によってアスパラギン酸 (A)、システイン (C)、グルタミン酸 (G)、金属 (M)、アスパラギン (N)、セリン (S)、スレオニン (T) の 7 種のファミリーに分類される (MEROPS, http://merops.sanger.ac.uk/; Rawlings et al., 2010)。アスパラギン酸プロテアーゼは別名、酸性プロテアーゼ、カルボキシルプロテアーゼとも呼ばれ、活性中心に 2 個のアスパラギン酸残基が存在する酵素である。その名の通り、酸性領域に最適

pH を持ち、阻害剤であるペプスタチンによって活性が阻害される特徴を持つ。

キノコにおける酸性プロテアーゼは子実体の形成に密接な関わりを持ち、形態形成で働く重要なタンパク質であると報告されている (寺下, 1992)。エノキタケ *F. velutipes* (寺下ら, 1978)、ヒラタケ *P. ostreatus* (寺下ら, 1981)、シイタケ *L. edodes* (寺下ら, 1980; Terashita et al., 1981 and 1985) などの栽培培地へのアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の添加は子実体形成を促進させることが報告されており、子実体形成へのアスパラギン酸プロテアーゼの関与が示唆されている。また、出芽酵母 *S. cerevisiae* では、リン酸欠乏下で誘導される小胞体アルカリホスファターゼ Pho8 の成熟のために酸性プロテアーゼ Pep4 が必要であると報告されている (Kaneko et al., 1982)。しかし、PDI373 の N 末端には外分泌シグナルペプチドが存在するため (Table II-11)、子実体形成や細胞内タンパク質の成熟に関与するプロテアーゼとは機能が異なると推察された。

リン酸欠乏によるアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の誘導は全く報告されていないが、炭素、窒素欠乏による誘導は子嚢菌 *Podospora anserina* (Paoletti et al., 1998) や糸状子嚢菌 *Trichoderma harzianum* (Delgado-Jarana et al., 2002) で報告されている。しかし、これらの遺伝子は *pdi373* と相同性を示さなかった (データ示さず)。*pdi373* と高い相同性を示す遺伝子は子嚢菌 (Suárez et al., 2005; ten Have et al., 2010) や担子菌 (Kobayashi et al., 1989; Sakamoto et al., 2009; Vincent et al., 2012) で報告されているが、栄養欠乏下における発現量の変化は白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* の網羅的解析でしか報告されていない。Vanden Wymelenberg ら (2009) は白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* のトランスクリプトーム解析により、*pdi373* と高い相同性を示す遺伝子 *asp1* の発現が炭素、窒素欠乏培地で増加すると報告しており、このタンパク質 asp1 はセクレトーム解析でも分泌量が増加すると報告されている (Vanden Wymelenberg et al., 2006)。そのため、ナメコ菌糸体は同じ栄養欠乏であるリン酸欠乏下でアスパラギン酸プロテアーゼを分泌することによって、タンパク質の分解を促進し、リンを含む栄養素の遊離を促すと推測された。

pdi371 がコードするタンパク質 PDI371 を相同性検索した結果、子嚢菌由来のグルタミン酸プロテアーゼと高い相同性を示した (Table II-7)。また、モチーフ検索より、Peptidase G1, eqolisin ファミリーに属していると推定された (Table II-10)。PDI320 で詳述したように、プロテアーゼは 7 種の触媒作用型に分類される。Peptidase G1, eqolisin ファミリーは、酸性側で活性を示すプロテアーゼであり、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチン非感受性の新規の酸性プロテアーゼとして発見された (Murao et al., 1972; Oda and Murao, 1974)。その後、分子構造や触媒機構、活性部位残基の解明により、新規のプロテアーゼファミリーとして分類されるようになった (Fujinaga et al., 2004)。

グルタミン酸プロテアーゼの Peptidase G1, eqolisin ファミリーは糸状菌もしくは細菌のみで報告されているプロテアーゼである (Jensen et al., 2010)。菌類では子嚢菌でよく研究されており、炭素、窒素欠乏下での発現量の変化が様々報告されている (Poussereau et al., 2001; Moralejo et al., 2002; Girard et al., 2004; O'Donoghue et al., 2008)。一方、担子菌におけるグルタミン酸プロテアーゼ遺伝子の研究は白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* でしか報告されていない。白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* では 12 個のグルタミン酸プロテアーゼ ORF が推測されているが (Sims et al., 2004)、セクレトーム解析の結果、炭素および窒素欠乏でグルタミン酸プロテアーゼの分泌は誘導されなかったと報告されている (Vanden Wymelenberg et al., 2006 and 2009)。しかし、Vanden Wymelenberg ら (2009) は、高セルロース含有培地において、2 種類のグルタミン酸プロテアーゼ遺伝子の発現が上昇すると報告している。リン酸欠乏によるグルタミン酸プロテアーゼの誘導は全く報告されていないが、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下で同じ酸性プロテアーゼであるアスパラギン酸プロテアーゼ (PDI373) を誘導していることから、これらのプロテアーゼによって協調的にタンパク質の分解を促進していると推測された。

pdi372 がコードするタンパク質 PDI372 を相同性検索した結果、担子菌由来のリパーゼと高い相同性を示した (Table II-7)。また、モチーフ検索を行った結果、Class 3 ファミリーに属すると推定された (Table II-10)。リパーゼは脂質を構成するエステル結合を加水分解する酵素群であり、Class 3 リパーゼはトリグリセリド (トリアシルグリセロール) のエステル結合を加水分解するトリグリセリドリパーゼ 活性を持つことが知られている (Chapus et al., 1988)。

リン酸欠乏によるホスホリパーゼの誘導は植物のリン酸獲得で重要な役割を果たすと報告されているが (Andersson et al., 2005; Cruz-Ramírez et al., 2006; Li et al., 2006)、Class 3 リパーゼの発現誘導は全く報告されていない。また、担子菌における Class 3 リパーゼの研究もほとんど行われていないが、唯一諸性質が解明されているシカタケ属 *Antrodia cinnamomea* 由来の Ac-LIP はトリリノレインからリノール酸への加水分解を触媒することが報告されている (Chu et al., 2008)。白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* のセクレトーム解析より、PDI372 と高い相同性を示す Class 3 リパーゼの分泌が炭素欠乏培地で誘導されると報告されているため (Vanden Wymelenberg et al., 2006)、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下で脂質を分解し、炭素源としてその栄養素を用いて生育を維持していると推測された。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下において、リン酸エステル加水分解酵素だけでなく、グリコプロテイン (PDI244)、グリコシドヒドロラーゼ (PDI110)、アスパラギン酸プロテアーゼ (PDI373)、グルタミン酸プロテアーゼ (PDI371)、リパーゼ (PDI372) など、栄養素の分解に関与する様々なタンパク質

を分泌していると推測された (Figure II-1)。白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* のセクレトーム解析では、炭素、窒素欠乏下で様々な加水分解酵素の分泌が報告されており (Vanden Wymelenberg et al., 2006 and 2009)、ナメコ菌糸体におけるこれらの分泌は、分解能力の高いキノコが持つ優れた栄養欠乏適応機構の 1 つであると推測された。*pdi244* は P–培養 7 日目から誘導されており、培養期間の経過と共に徐々に減少していた (Tasaki et al., 2002)。そのため、白色腐朽菌であるナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏初期からリグニンをターゲットとして分解していると推測された。また、*pdi110*、*pdi373*、*pdi371*、*pdi372* の発現は P–培養後期、特に P–培養 25 日目で最も強く発現する (田﨑, 2001; Tasaki et al., 2002)。そのため、菌糸が生長し、リン酸が顕著に枯渇した P–培養後期では各種加水分解酵素を分泌することで、生物遺体などの分解を通して有機リン酸の遊離を促進させると共に、他の栄養素の遊離、獲得も促進させて生育を維持していると推測された。

4-4 菌糸の生長および付着

機能の推定の結果、PDI228 は CipC (Concanamycin-induced protein C)、PDI251、PDI263、PDI315、PDI319 はハイドロフォビンと推定され、これら 5 個の PDI タンパク質を菌糸の生長および付着に関与するタンパク質グループとして分類した (Table II-12)。相同性検索の結果、これらの PDI タンパク質は菌類以外の生物には存在せず、特に糸状菌で重要な役割を果たすタンパク質であると推定された (データ示さず)。

pdi228 がコードするタンパク質 PDI228 を相同性検索した結果、子嚢菌由来の CipC と高い相同性を示した。CipC はコウジカビ属 *A. nidulans* において、抗生物質コンカナマイシン A により誘導される 7 個のタンパク質のうちの 1 つとして報告された (Melin et al., 2002)。放線菌 *Streptomyces* 属により産生されるコンカナマイシン類やバフィロマイシン類は糸状菌の菌糸の分岐を刺激する物質としても知られ、菌糸に特異的に発現する CipC はその分岐に関与する可能性が示唆されている (Bowman et al., 1997; Melin et al., 2002; Bauer et al., 2009)。また、他の菌類由来の *cipC* ホモログは宿主との共生や寄生で発現が増加するため、菌類の生育において重要なタンパク質であると推測されているが、その機能は十分解明されていない (Steen et al., 2003; Morel et al., 2005; Sexton et al., 2006)。

局在予測から、PDI228 は細胞質もしくは細胞核どちらかに局在すると予測されたが (Table II-11)、コウジカビ属 *A. fumigatus* 由来の CipC (AFUA_5G09330) は細胞質に局在する単量体タンパク質であると報告されており (Bauer et al., 2009)、PDI228 も細胞質に局在すると推測された。

リン酸欠乏に対する CipC の発現誘導は報告されていないが、イネ馬鹿苗病菌

Gibberella fujikuroi (Teichert et al., 2004) やトウモロコシ黒穂病菌 *Ustilago maydis* (Böhmer et al., 2007) では窒素欠乏によって CipC が誘導されると報告されている。植物はリン酸欠乏下で根圏構造を変化させ、分岐根の形成、根毛の密度の増加を促進させる。その結果、根の表面へのリン酸到達距離が短縮されると共に、リン酸エステル加水分解酵素などの分泌量やリン酸を吸収する面積が増加する (小山, 2001)。CipC は菌糸の生長や分岐に関与すると推測されているため、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下で植物の根のように菌糸を生長させることにより、加水分解酵素の分泌やリン酸の吸収面積を増やしていると推測された。

pdi251、*pdi263*、*pdi315*、*pdi319* がコードするタンパク質 PDI251、PDI263、PDI315、PDI319 を相同性検索した結果、担子菌由来のハイドロフォビンと高い相同性を示した (Table II-7)。Tasaki ら (2004b) はリン酸欠乏下で 3 種類のハイドロフォビン遺伝子 *pdi251*、*pdi263*、*pdi315* の発現が誘導されると報告している。本研究で全ての *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を決定し、機能の推定を行った結果、*pdi319* もハイドロフォビンであると推測され、PDI319 は PDI251 と 65%、PDI263 と 57%、PDI315 と 51%のアミノ酸相同性を示した。ハイドロフォビンは糸状菌に特異的に見られる約 100 アミノ酸残基からなる低分子の分泌タンパク質であり、ジスルフィド結合に関与する 8 個のシステイン残基がほぼ同じ位置に保存されている特徴を持つ。システイン残基以外には、極性アミノ酸と非極性アミノ酸の位置が良く保存されており、類似したハイドロパシープロファイルを示すが、全体のアミノ酸配列は生物種間や同じ生物種中でも大きく異なっている。Wessels (1994) はハイドロパシープロファイルおよび物理的特性の違いに基づいて、ハイドロフォビンをクラス I とクラス II の 2 つのサブクラスに分類しており、ナメコ N2 株菌糸体由来のハイドロフォビンは全てクラス I に属すと推定された。

糸状菌特異的なハイドロフォビンは、界面上で自己会合した両親媒性膜によって水性表面張力の著しい低下を引き起こすと共に、親水性表面を疎水的にコーティングする特性を持つ。ハイドロフォビンはこの特性により、気中菌糸の形成、子実体の気体導管の維持、菌糸体細胞壁の成熟、胞子散布、宿主への付着、宿主免疫からの回避、分生子への乾燥耐性の授与、菌根形成、地衣類葉状体の空域維持など、糸状菌生育の様々な生育段階において重要な役割を果たしており、糸状菌の生育に欠かせないタンパク質の 1 つであると考えられている (Whiteford and Spanu, 2002; Gebbink et al., 2005)。ナメコなどの木材腐朽菌は本来、樹木を栄養源として生長しているが、樹木はリグニンのような疎水性成分を含んでいる。そこで、糸状菌は菌体外にハイドロフォビンを分泌し、菌糸表面を疎水的にコーティングすることによってリグニンへの付着を強化すると共に、基質の分解と栄養源としての利用を効率的に行っていると推察されている

(Wösten et al., 1994; Lugones et al., 1998)。そのため、リン酸欠乏下で誘導されるナメコ菌糸体のハイドロフォビンはリグニンなどの基質表面への付着とその分解を補助していると推測された。

リン酸欠乏によるハイドロフォビンの誘導はナメコ N2 株菌糸体以外では報告されていないが (Tasaki et al., 2004b)、子嚢菌由来のクラス I ハイドロフォビン (Talbot et al., 1993; Muñoz et al., 1997; Viterbo and Chet, 2006) およびクラス II ハイドロフォビン (Nakari-Setälä et al., 1997; Segers et al., 1999; Klimes et al., 2008) では炭素、窒素欠乏による発現の誘導が様々報告されている。大畑 (2004) は、ナメコ N2 株菌糸体由来の *pdi251* と *pdi263* がリン酸欠乏だけでなく、窒素欠乏でも誘導されると報告している。そのため、糸状菌は栄養素が欠乏した環境でハイドロフォビンを誘導し、菌糸の生育や基質への付着を促していると推測された。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下において、CipC (PDI228) と 4 種のハイドロフォビン (PDI251, PDI263, PDI315 and PDI319) を誘導することで菌糸の生長、分岐を促進させると共に、分解基質表面への付着を促進させていると推測された (Figure II-1)。ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で様々な加水分解酵素やトランスポーターをコードする *pdi* 遺伝子を誘導していることから、菌糸の生長を促すことでそれらの分泌量、栄養素の吸収量を増加させると共に、基質表面への付着を強化し、その分解を補助していると推定された。

4-5 レクチン

機能の推定の結果、PDI310 はシアノビリン、PDI259 は α1,6-L-フコース特異的レクチンと推定され、これら 2 個の PDI タンパク質をレクチングループとして分類した (Table II-12)。レクチンは糖鎖に結合活性を示すタンパク質の総称であり、動物や植物では細胞内シグナル伝達、細胞分化、細胞間相互作用、生体防御など、生命活動で重要な役割を果たすことが知られている。菌類由来のレクチンについてはその種類や機能について十分研究されているとは言い難いが、菌糸の生長、形態形成、菌根形成、生体防御などに関与すると推察されている (Khan and Khan, 2011)。

pdi310 がコードするタンパク質 PDI310 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、モチーフ検索の結果、Cyanovirin-N ドメインが予測された (Table II-10)。Cyanovirin-N は藍藻 *Nostoc ellipsosporum* 由来の分子量約 11,000 のレクチンタンパク質である (Boyd et al., 1997; De Clercq, 2000)。このレクチンは熱や有機溶媒、pH の変化に対して非常に安定であるのに加え、様々なエンベロープタンパク質に対して抗ウイルス活性を示す (O'Keefe et al.,2003; Barrientos and Gronenborn, 2005; Helle et al., 2006)。中

でも、ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus, HIV) に対して高い抗ウイルス活性を示すことから、薬剤としての利用が期待されている (Dey et al., 2000)。Cyanovirin-N の HIV に対する抗ウイルス活性は、HIV エンベロープ上の糖タンパク質 gp120 の高マンノース残基への結合に起因しており、それによって標的となるリンパ細胞への感染を阻害していると推察されている (奥、森, 2007)。

Percudani ら (2005) は Cyanovirin-N と類似した構造を持つタンパク質を藍藻、子嚢菌、シダ植物で発見し、これらを Cyanovirin-N homolog (CVNH) と名付けた。CVNH の特徴的な構造として、そのドメイン構成が挙げられる。藍藻 *N. ellipsosporum* 由来の Cyanovirin-N のアミノ酸配列は L1–Q50 と P51–E101 が互いに類似しており、単量体は 2 つのドメインがほぼ対照的な構造を形成するのに対し、二量体は 2 つのドメインが互いに交差するドメイン交換 (Domain swapping) という構造を形成している (Gustafson et al., 1997)。PDI310 も E25–C78 と Q79–C134 が互いに類似しており、Cyanovirin-N と同様に 2 つの対照的なドメイン構造を形成していると推測される。

リン酸欠乏や他の栄養素の欠乏による CVNH の誘導は報告されていないが、子嚢菌であるトリュフ *Tuber borchii* 由来の TbCVNH では炭素、窒素欠乏による発現の抑制が報告されている (Montanini et al., 2006; Koharudin et al., 2008)。しかし、PDI310 は N 末端に外分泌シグナルペプチド配列が予測されたのに対し (Table II-11)、TbCVNH や多くの CVNH にはこの配列は予測されていない (Percudani et al., 2005)。この TbCVNH は菌糸表面に存在すると報告されており、同じように外分泌シグナルペプチドを持たない藍藻 *Microcystis aeruginosa* 由来の Microvirin も細胞表面に存在すると報告されている (Kehr et al., 2006)。この Microvirin は細胞間認識や細胞間接着に関与することが示唆されているため (Kehr et al., 2006)、ナメコ菌糸体はシアノビリンを分泌することでそのレクチン活性を利用した細胞認識や基質への付着を促進すると推測された。

pdi259 がコードするタンパク質 PDI259 を相同性検索した結果、クモノスカビ *Rhizopus stolonifer* 由来の RSL と部分的に高い相同性を示した。RSL は分子量約 45,000 のタンパク質が六量体を形成しており、α1,6-L-フコース残基を認識するレクチンである (Oda et al., 2003)。RSL は全長 40 残基のうち N 末端の 28 残基が決定されているが、RSL は PDI259 の 3 ヶ所の内部反復配列 (G26–F73, I82–H129 and G131–F178) それぞれと高い相同性を示した。RSL と相同なタンパク質は他に論文として報告されていないが、特許情報として担子菌のコムラサキシメジ *Lepista sordida* 由来の LSL、ツチスギタケ *Pholiota terrestris* 由来の PTL、サケツバタケ *Stropharia rugosoannulata* 由来の SRL、クリタケ *Naematoloma sublateritium* 由来の NSL が公開されており、これらも 3 ヶ所の内部反復配列を

持つと報告されている (小林ら, 2010; Kobayashi et al., 2011)。小林ら (2010) は、1 つの翻訳されたタンパク質が、何らかの影響で切断され、3 つのイソレクチンとなり、ホモ/ヘテロ六量体を形成することで α1,6-L-フコース特異的レクチン活性を得ると報告している。そのため、PDI259 も 3 つのイソレクチンに切断され、六量体を形成することでレクチン活性を得るのかもしれない。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下において、ウイルスの高マンノースを認識するシアノビリン (PDI310)、動物の α1,6-L-フコースを認識するレクチン (PDI259) を分泌していると推測された (Figure II-1)。しかし、他の生物においてもリン酸欠乏下でのレクチンの役割は全く明らかにされていない。長田 (2000 and 2006) は、キノコ由来のレクチンを分類し、生物自身に対して作用し、形態形成などに関わるものを内務型レクチン、非自己に対して作用し、生体防御などに関わるものを外務型レクチンとした。ウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* 由来のレクチン CGL2 は捕食者である線虫 *Caenorhabditis elegans* に対して成育、生殖阻害作用を有すると報告されている (Butschi et al., 2010)。菌類は抗体を持っていないため、外務型レクチンによって自己防衛していると推測される。そのため、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下でこれらのレクチンを分泌して生体防御を行うと共に、ハイドロフォビン (PDI251, PDI263, PDI315 and PDI319) と共にウイルスや動物表面への付着を補助し、様々な加水分解酵素による分解を効率化させていると推測された。

4-6 ストレス応答タンパク質

機能の推定の結果、PDI301 は熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, HSP)、PDI348 は脂肪酸不飽和化酵素と推定され、これら 2 個の PDI タンパク質を一般的なストレス応答タンパク質グループとして分類した (Table I-12)。これらのタンパク質は高温や低温ストレスによって誘導されることが知られているが、リン酸欠乏による誘導はほとんど研究されていない。

pdi301 がコードするタンパク質 PDI301 を相同性検索した結果、担子菌由来の HSP と高い相同性を示した (Table II-7)。HSP は高温ストレスによって誘導されるタンパク質として発見され、その後の研究から、様々なストレス条件下で生じる非天然型タンパク質の修復およびタンパク質の変性を抑制する分子シャペロンとしての機能が報告されている (Lindquist, 1988)。HSP は分子量によっていくつかのファミリーに分類され (Groenen et al., 1994; Mahmood et al., 2010)、PDI301 はモチーフ検索の結果、HSP20 ファミリーに分類された (Table II-10)。このファミリーに代表される低分子量 HSP は ATP 非依存的ストレス応答シャペロンであり、非天然型タンパク質と複合体を形成することで凝集体の形成を抑制すると共に、ATP 依存的な他のシャペロンシステムへの輸送を担う (Haslbeck

et al., 2005)。しかし、シャペロンの機能、誘導機構、生理的ターゲット分子などの研究は他のHSPファミリーと比べて遅れている (伊東ら, 2003)。

リン酸欠乏における低分子量HSPの誘導は全く報告されていないが、他のファミリーのHSPの誘導は大腸菌 *E. coli* (Spence et al., 1990) や根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* (Summers et al., 1998) で報告されている。ファミリーが異なるためPDI301と単純に比較することはできないが、HSPは様々なストレス条件下タンパク質の変性を防いでいることから、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下でHSPを誘導し、タンパク質のフォールディングを補助していると推測された。

pdi348 がコードするタンパク質PDI348を相同性検索した結果、糸状菌由来のΔ12脂肪酸不飽和化酵素と高い相同性を示した (Table II-7)。脂肪酸不飽和化酵素は脂肪酸の炭素二重結合の形成を触媒する小胞体膜局在酵素である (Los and Murata, 1998)。そのうち、脂肪酸のω6位に二重結合を作る酵素がΔ12脂肪酸不飽和化酵素と呼ばれ、主にオレイン酸 (C18:1) からリノール酸 (C18:2) への不飽和化を触媒する。不飽和脂肪酸は真核生物において膜脂質や貯蔵脂質の構成成分として重要な役割を果たしているが、低温や塩、病原の侵入などの環境ストレスの応答分子としても働くことが知られている (Miquel and Browse, 1994; Okuley et al., 1994; Browse and Xin, 2001)。脂質二重膜の流動性は不飽和度が高く、炭素原子数が少ないほど高くなる。流動性が低下すると、脂質分子の側方拡散や回転頻度が低下し、膜や配置されているタンパク質の活性が低下するため、至適温度の低い生物や低温ストレスを受けた細胞では脂肪酸不飽和化酵素が誘導され、膜構造の変化が起こることが報告されている (Los and Murata, 1998; Aguilera et al., 2007)。菌類においても、低温ストレスは脂肪酸の不飽和度の増加を導くと報告されている (Pedneault et al., 2007; Cheawchanlertfa et al., 2011)。リン酸欠乏下で培養したナメコ菌糸体の脂質二重膜上には複数のトランスポーター (PDI85, PDI343 and PDI99) が誘導されているため、脂肪酸不飽和化酵素によって膜脂質の流動性を高め、物質輸送を効率化している可能性が推測された。

また、キノコにおける低温ストレスは子実体の形成を促すことが知られている (Kües and Liu, 2000)。シイタケ *L. edodes* において、原基や子実体の不飽和脂肪酸量は菌糸体より多くなることが報告されている (Sakai and Kajiwara, 2003)。この時、Δ9脂肪酸不飽和化酵素 *Le-FAD1* とΔ12脂肪酸不飽和化酵素 *Le-FAD2* の発現量は菌糸体と比べ原基および子実体で増加しているため、脂肪酸組成の変化が子実体形成で何らかの役割を果たすと推察されている (Sakai and Kajiwara, 2003 and 2005)。長期的にP–培養したナメコ菌糸体では子実体の形成は確認されていないが、ナメコ菌糸体は脂肪酸組成を変化させることによって子実体を形成する準備を行っている可能性も推測された。

以上より、ナメコN2株菌糸体はリン酸欠乏下において、HSP (PDI301) およ

び Δ12 脂肪酸不飽和化酵素 (PDI348) を誘導していると推測された。ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下でこれらの PDI タンパク質を誘導することにより、正常に機能しなくなったタンパク質を修復すると共に、細胞膜の流動性を改善することでトランスポーターによる栄養素の吸収を効率化させているのかもしれない。

4-7 ミトコンドリア局在タンパク質

pdi88 と *pdi351* がコードするタンパク質 PDI88 と PDI351 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、N 末端にミトコンドリアターゲティング配列が推定され、ミトコンドリアに局在するタンパク質であると予測された (Table II-11)。そのため、これら 2 個の PDI タンパク質をミトコンドリア局在タンパク質グループとして分類した (Table II-12)。

ミトコンドリアの主要な機能は脂肪酸の β 酸化や電子伝達系での酸化的リン酸化による ATP の生産である。しかし、リン酸欠乏下の植物は生体内の ATP や ADP が減少すると報告されている (Ashihara et al., 1988; Duff et al., 1989)。植物のミトコンドリアはリン酸欠乏によって酸素の取り込みや二酸化炭素の排出が低下することから、細胞呼吸による ATP 合成を抑えると共に、代替経路によってリン酸の消費を節約すると推測されている (Theodorou and Plaxton, 1996; Vance et al., 2003)。出芽酵母 *S. cerevisiae* では、リン酸欠乏によってミトコンドリア内のポリリン酸量が減少すると報告されているが、その詳細は十分解明されていない (Kulakovskaya et al., 2010)。PDI88 には NAD(P)-binding ドメインが予測され (Table II-10)、何らかの酵素活性を持つ可能性が推測される。そのため、ナメコ N2 株菌糸体はミトコンドリア局在タンパク質を誘導することにより、ミトコンドリア内で ATP の消費を抑えるために代替経路を誘導している可能性が推測された。

4-8 細胞核局在タンパク質

pdi5 がコードするタンパク質 PDI5 を相同性検索した結果、明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、局在予測を行った結果、細胞核に局在するタンパク質であると予測された (Table II-11)。そのため、この PDI タンパク質を細胞核局在タンパク質グループとして分類した (Table II-12)。

細胞核では DNA の複製や転写、修復、組換えなど、生命維持活動に必要なタンパク質が多く働いている。中でも、細胞核に局在する転写制御タンパク質はストレス応答において重要な役割を果たす。出芽酵母 *S. cerevisiae* のリン酸欠乏応答は主に *PHO* 経路によって調節されており (Persson et al., 1999 and 2003;

Mouillon and Persson, 2006)、転写因子 Pho4 によって制御される *PHO* 遺伝子のプロモーター領域には Pho4 結合モチーフ CACGTG/T が存在することが知られている (Oshima, 1997)。Tasaki ら (2004a and 2006) は、ナメコ N2 株菌糸体由来の酸性ホスファターゼやリボヌクレアーゼのプロモーター領域にもこのシスエレメントが存在しており、出芽酵母 *S. cerevisiae* の Pho4 と類似した転写制御を受けているのではないかと推察している。しかし、近年、東江ら (2011) が担子菌酵母 *C. neoformancs* のリン酸代謝制御系について検討した結果、Pho4 と相同性を示すタンパク質は存在しなかったと報告している。また、担子菌ゲノムデータベースで相同性検索を行った結果、Pho4 ホモログは全ての担子菌に存在しなかった (データ示さず)。東江ら (2011) は変異体の解析から *PHO4* の機能的なホモログ *CnPHO4* を発見しているが、その遺伝子は公開されていない。この *CnPHO4* が同じシスエレメントに結合するのかどうかは不明であるが、担子菌は出芽酵母 *S. cerevisiae* と異なる転写因子によってリン酸欠乏環境に適応している可能性が推測された。また、PDI5 と相同性を示すタンパク質はクリタケ *H. sublateritium* にしか存在しなかったため (Table II-8)、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏に対する独自の機構を持っていると推測された。PDI5 の機能は不明であるが、細胞核内で *pdi* 遺伝子の転写に関与している可能性が推測された。

4-9 機能未知の分泌タンパク質

相同性検索を行った結果、6 個のタンパク質 PDI63、PDI36、PDI230、PDI298、PDI201、PDI308 は明確な機能を持ったタンパク質と相同性を示さなかったが (Table II-7)、N 末端に外分泌シグナルペプチドが推定されたため (Table II-11)、これらの PDI タンパク質を機能未知の分泌タンパク質グループとして分類した (Table II-12)。

これらの PDI タンパク質のうち、PDI36 と PDI230 には内部反復配列が予測された。アミノ酸の内部反復配列を持つタンパク質は多くの生物で見られ、ロイシンリッチリピートや Ankyrin など様々な繰り返し配列を持つタンパク質が知られている (Andrade et al., 2001)。また、他の PDI タンパク質ではレクチンと推定された PDI310 および PDI259 において内部反復配列が確認されている。しかし、これらの内部反復配列を持つタンパク質がナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏においてどのような役割を持っているのかは不明である。

4-10 ナメコ菌糸体のリン酸欠乏適応機構

リンは生体の全ての細胞に必要不可欠な元素であり、ほとんどの生物は能力に違いはあるものの、リン酸欠乏に対する適応機構を備えている。酵母、植物、細菌のリン酸欠乏適応機構は古くからよく研究されており、包括的な研究が

様々行われている (Vershinina and Znamenskaya, 2002; Persson et al., 2003; Vance et al., 2003)。一方、糸状菌、中でもキノコのリン酸欠乏応答はほとんど研究されていない。

本研究では 31 個のリン酸欠乏下で特異的に発現する *pdi* 遺伝子の同定、機能推定を行い、これらがコードするタンパク質の機能を大まかに 9 個のグループに分類した (Table II-12)。しかし、これら PDI タンパク質の中には複数の機能を担うタンパク質も存在すると推測される。例えば、グリコシドヒドロラーゼ (PDI110) はリゾチーム活性を有すると推測されたが、リゾチームは死菌、生菌を関係なく加水分解できるため、レクチンのように生体防御にも関与すると推測される。また、レクチン (PDI310 and PDI348) 自体も生体防御だけでなく、細胞間認識、接着に使用される可能性も推測され、ハイドロフォビンのように生物遺体への付着などにも関与すると推測される。

Tasaki ら (2002) は P–培養 20 日目のナメコ N2 株菌糸体の cDNA ライブラリーを作製し、ディファレンシャルスクリーニングによってリン酸欠乏下で量的に多く発現する 150 個のクローンを単離した。これらは 31 個の *pdi* 遺伝子として分類されていたが、全長塩基配列を解析した本研究により、実際には 29 個であることが明らかにされた (Figure II-6)。これらの中で比較的クローン数が多かったものはシアノビリン (*pdi310*) の 32 個、機能未知の外分泌タンパク質 (*pdi63*) の 13 個、細胞核局在タンパク質 (*pdi5*) の 11 個であった。また、ハイドロフォビンをコードする遺伝子 (*pdi263*, *pdi315*, *pdi319* and *pdi251*) のクローン数も合計すると 17 個となる。得られた *pdi* クローン数は mRNA の量を反映しており、発現量の多いこれらの遺伝子がコードするタンパク質はリン酸欠乏下でのナメコ N2 株菌糸体の生育維持において特に重要な役割を果たしていると推測される。しかし、これらの多くは明確な機能が不明なタンパク質であると共に、ナメコ特異的な遺伝子であったことから (Table II-9)、ナメコは独自のリン酸欠乏適応機構を発達させている可能性が推測された。

Tasaki ら (2002) はリン酸欠乏による *pdi* 遺伝子発現量の経時的変化をノーザンブロットにより解析した結果、31 個の *pdi* 遺伝子の発現パターンが大まかに 12 個に分類できることを示し、同じ発現様式を示す遺伝子は同じ調節機構により制御されていると推察している。まず、P–培養初期で転写物が豊富だった *pdi* 遺伝子は *pdi63*、*pdi5*、*pdi36*、*pdi244*、*pdi228*、*pdi230*、*pdi319* である。これらの中には転写制御に関与する可能性が推測される細胞核局在タンパク質 (PDI5) が含まれているため、まずナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下でこのタンパク質を誘導して他の *pdi* 遺伝子の転写を制御し始め、CipC (PDI228) やハイドロフォビン (PDI319) を誘導して菌糸の分岐や生長を行うと共に、グリコプロテイン (PDI244) を分泌してリグニン分解を促していると推測された。また、*pdi85*、*pdi26*、

pdi343、*pdi88*、*pdi110*、*pdi370*、*pdi201*、*pdi99* の転写物は P–培養期間の経過に伴い徐々に増加した。これらの中には酸性ホスファターゼ (PDI26/PNAP2)、リボヌクレアーゼ (PDI370)、リン酸トランスポーター (PDI85)、GroPIns/GroPCho トランスポーター (PDI343)、ABC トランスポーター (PDI99) など、リン酸化合物の獲得において重要な役割を果たすタンパク質が多かった。なお、酸性ホスファターゼ (PNAP1) の発現パターンもこれらと類似している (Tasaki et al., 2006)。培地中のリン量は P–培養 7 日目でほぼ枯渇するため (Joh et al., 2001)、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下でこれらのタンパク質を徐々に誘導し、無機リン酸の遊離と吸収を活性化していると推測された。また、グリコシドヒドロラーゼ (PDI110) によって細菌の分解を促進させ、ミトコンドリア局在タンパク質 (PDI88) によってリン酸消費を抑えるための代替経路を迂回させている可能性も推測された。次いで、*pdi310*、*pdi315*、*pdi373*、*pdi308*、*pdi371*、*pdi372* の転写物は P–培養後期に豊富であった。これらの中にはシアノビリン (PDI310)、ハイドロフォビン (PDI315)、アスパラギン酸プロテアーゼ (PDI373)、グルタミン酸プロテアーゼ (PDI371)、リパーゼ (PDI372) など、生物遺体などへの付着、加水分解に関与するタンパク質が多かったため、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏後期にこれらのタンパク質を活発に分泌し、既に誘導されているリン酸エステル加水分解酵素やトランスポーターと共に、リンを含む栄養素の分解を促進させていると推測される。一方、*pdi263*、*pdi205*、*pdi251*、*pdi298*、*pdi259*、*pdi301*、*pdi348*、*pdi351* の転写物は P–培養初期と培養後期など、二段階で発現が誘導されていた。Tasaki ら (2002) は、これらの *pdi* 遺伝子は二つの異なる調節機構によって制御されていると推察している。考え得る変化としては、培地の pH の変化や培養フラスコ内での生育の限界などが挙げられるが、これらの二段階での発現調節とその機能との関連は不明である。

高藤 (2005) は、リン酸エステル加水分解酵素としての機能が推定される *pdie* の発現は P–培養 10 日目で最大となり、培養に伴って徐々に減少するのに対し、二次元 PAGE で得られた PDIe のタンパク質スポットは 10 日目以降わずかに減少するものの、ほぼ一定で推移すると報告した。そのため、PDIe は分泌後も分解されずに P–培養後期までリン酸エステルの加水分解に関与している可能性も示唆され、他の PDI タンパク質も発現後に分解されずに機能し続けている可能性も示唆された。Tasaki ら (2001) は P+および P–培養 20 日目のナメコ N2 株の菌糸体および培養ろ液中の可溶性タンパク質を二次元 PAGE した結果、それぞれ 103 個と 23 個のタンパク質がリン酸欠乏下で特異的に増加することを明らかにしている。リン酸欠乏により誘導される 31 個の *pdi* 遺伝子のうち、22 個の PDI タンパク質は N 末端に外分泌シグナルペプチドが予測されたことから、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏により多くの外分泌タンパク質を誘導していることが

改めて示された (Table II-12)。酵母、細菌、植物はリン酸欠乏環境でリン酸を獲得するため、リン酸エステル加水分解酵素やリン酸トランスポーターを主に誘導している (Vershinina and Znamenskaya, 2002; Persson et al., 2003; Vance et al., 2003)。ナメコ N2 株菌糸体においてもリン酸欠乏下でこれらのタンパク質の誘導が確認されたが、それら以外に生物遺体や栄養素などの分解に関わるタンパク質をコードする遺伝子の誘導が多く見られた。中でも、グリコプロテイン (PDI244)、リゾチーム (PDI110)、アスパラギン酸プロテアーゼ (PDI373)、グルタミン酸プロテアーゼ (PDI371)、リパーゼ (PDI372)、ハイドロフォビン (PDI251, PDI 263, PDI315 and PDI319)、レクチン (PDI310 and PDI259) などの PDI タンパク質は他の生物のリン酸欠乏応答では報告されていないナメコ N2 株菌糸体特有の外分泌タンパク質である。キノコは様々な酵素を生産、分泌する能力を持ち、他の生物が分解困難な高分子化合物などを分解する能力が高いことから、生態系の分解者としての役割を担っている。ナメコは白色腐朽担子菌であり、本来の生育環境では枯死した樹木を分解しながら生育している。また、ハイドロフォビンは糸状菌特異的なタンパク質であり、生物遺体などの基質への付着に関与する。そのため、ナメコ菌糸体のリン酸欠乏適応能力が他の生物より優れている要因の 1 つとして、生物遺体などの加水分解に関わるタンパク質の分泌能力、そして基質への付着能力が高さに起因する可能性が推測された。このナメコ菌糸体の持つリン酸欠乏適応機構を植物に導入することができれば、低リン酸土壌で効率よく生育できる植物の育種が可能となり、低リン酸土壌での農作物の生産やリン酸肥料の施肥の軽減に繋がるかもしれない。

真核生物の中で最初にゲノムが解析された出芽酵母 *S. cerevisiae* では、すでに遺伝子破壊株のライブラリー、マイクロアレイ、プロテインチップが作製され、これらを利用した様々なネットワーク解析が行われている。リン酸欠乏に関しても、DNA マイクロアレイ解析によって *PHO* 遺伝子の網羅的解析が行われ、多くの遺伝子がリン酸欠乏に応答して発現していることが明らかにされている (Ogawa et al., 2000)。糸状菌の中では、ゲノム解読が先駆的に行われたアカパンカビ *N. crassa* (Galagan et al., 2003) やイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* (Dean et al., 2005)、コウジカビ属 *Aspergillus* spp. (Galagan et al., 2005; Nierman et al., 2005; Machida et al., 2005) などの子嚢菌において、培養条件、器官、育成ステージに特異的な遺伝子発現の網羅的な解析がマイクロアレイを活用して行われている (Soderlund et al., 2006; Dunlap et al., 2007; Breakspear and Momany, 2007)。近年では、子嚢菌に属する地下性キノコの黒トリュフ *T. melanosporum* のゲノムも報告され (Martin et al., 2010)、様々な生育形態の子嚢菌ゲノムが比較されている。一方、担子菌のゲノム解読は子嚢菌と比較して遅れているのが現状である。担子菌のゲノム解読は白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* (Martinez et al., 2004) で初めて報

告され、担子菌酵母 *C. neoformans* (Loftus et al., 2005)、トウモロコシ黒穂病菌 *U. maydis* (Kämper et al., 2006)、褐色腐朽担子菌 *P. placenta* (Martinez et al., 2009) と続いている。一方、キノコを形成する担子菌としては、オオキツネタケ *L. bicolor* (Martin et al., 2008) とスエヒロタケ *S. commune* (Ohm et al., 2010) でしか報告されていない。しかし、ゲノム解読が終了し、データベースとしてのみ公開されている担子菌も数多く存在し、その数は年々増加している (Table II-5; Martin et al., 2011; Grigoriev et al., 2012)。

JGI が提供する 42 菌種の担子菌ゲノムデータベースを使用し、PDI タンパク質の相同性検索を行った結果、31 個中 21 個のタンパク質がクリタケ *H. sublateritium* 由来の推定タンパク質と最も高い相同性を示した。クリタケ *H. sublateritium* はナメコと同じモエギタケ科 Strophariaceae で唯一ゲノム情報が公開されているキノコである。これらのうち、PDI5 (細胞核局在タンパク質)、PDI110 (グリコシドヒドロラーゼ)、PDI259 (レクチン) はクリタケ *H. sublateritium* でしか相同性を示すタンパク質はヒットせず、モエギタケ科 Strophariaceae に特異的なタンパク質であると推測された。一方、機能未知の細胞外分泌タンパク質 PDI63 および PDI308 は相同性を示すタンパク質が全く存在せず、ナメコ特異的な遺伝子であると推測された。相同性を示すタンパク質が 1 菌種あたり 1 個以下、すなわち 42 菌種で平均 42 個以下だった PDI タンパク質としては、酸性ホスファターゼ (PDI26/PNAP2 and PNAP1)、PhoD-like ホスホジエステラーゼ/アルカリホスファターゼ (PDI205)、グリコシドヒドロラーゼ (PDI110)、レクチン (PDI310 and PDI259)、ミトコンドリア局在タンパク質 (PDI88 and PDI351)、細胞核局在タンパク質 (PDI5)、機能未知外分泌タンパク質 (PDI63, PDI36, PDI230, PDI201 and PDI308) である。これらのうち、リン酸エステル加水分解酵素群である PDI26/PNAP2 は 30 個、PNAP1 は 29 個、PDI205 は 34 個しか相同性タンパク質はヒットせず、担子菌の中でも比較的珍しいリン酸エステル加水分解酵素である可能性が示唆された。また、*pdi* クローン数が多かった上位 4 個の *pdi* 遺伝子 (*pdi310, pdi63, pdi5* and *pdi36*) は相同性を示すタンパク質が全て 4 個以下であり、ナメコ N2 株菌糸体がリン酸欠乏下で生活していく上で、独自に進化させた適応機構を担う可能性が推測された。一方、相同性タンパク質が多かった PDI タンパク質としては、861 個のリン酸トランスポーター (PDI85)、808 個のアスパラギン酸プロテアーゼ (PDI373)、619–638 個のハイドロフォビン (PDI251, PDI263, PDI315 and PDI319) である。トランスポーターやプロテアーゼは最も基本的な生命活動を担うタンパク質ファミリーであり、栄養素の獲得で重要な役割を果たすため、基質が異なる多くの相同タンパク質が存在すると推測される。一方、ハイドロフォビンは糸状菌特異的な両親媒性タンパク質であり、かなり多くの重複遺伝子が存在すると推測された。ナメコ

N2 株菌糸体由来の 4 個のハイドロフォビン遺伝子 (*pdi251*, *pdi26*, *pdi315* and *pdi319*) はそれぞれ生育や栄養素における発現パターンが異なっており (田﨑, 2001; Tasaki et al., 2002)、菌類は多くのハイドロフォビン遺伝子を制御することで、多種多様な生育環境に適応していると推測された。

本研究では主に cDNA ライブラリーのディファレンシャルスクリーニングによって得られた *pdi* 遺伝子を使用し、そのリン酸欠乏適応機構の解明に取り組んだ。本研究の結果より、ナメコ N2 株菌糸体がリン酸欠乏環境で生育するためには様々な遺伝子が関与することが明らかにされたが、機能を明確にすることができなかったものもまだ多く残っている。また、可溶性タンパク質の二次元 PAGE の結果から、さらに多くのタンパク質がリン酸欠乏により誘導されることも確認されている (Tasaki et al., 2001)。白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* やオオキツネタケ *L. bicolor* など、ゲノムが解析された担子菌ではトランスクリプトーム解析やセクレトーム解析などの網羅的な解析が行われ、生育段階や栄養欠乏下における遺伝子やタンパク質の変化が報告されている (Doddapaneni and Yadav, 2005; Vanden Wymelenberg et al., 2006 and 2009; Martin et al., 2008)。ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構のさらなる詳細を明らかにするためには、ゲノム情報もしくは上記のようなオミクス解析を活用すると共に、転写制御因子の解明や変異体の解析、組換えタンパク質の発現など、様々な試験を行う必要がある。また、本研究結果より得られた知見を植物や菌根菌に応用することができれば、作物の生産を効率化させることが可能になるかもしれない。

第2章第2節 ナメコ由来クラスIハイドロフォビンの界面活性剤としての利用

1 緒言

第2章第1節において、ナメコN2株菌糸体はリン酸欠乏下で様々な*pdi*遺伝子を誘導することでその環境に適応していると推測された。ナメコ菌糸体で得られた31個の*pdi*遺伝子のうち、4個をハイドロフォビン遺伝子 (*pdi251*, *pdi263*, *pdi315* and *pdi319*) が占めていた (Figure II-12)。ハイドロフォビンは糸状菌特異的なタンパク質であり、様々なストレス条件下で誘導されることが報告されている (Talbot et al., 1993; Muñoz et al., 1997; Viterbo and Chet, 2006)。従って、ナメコ菌糸体のリン酸欠乏適応機構の中でもハイドロフォビンは重要な働きを担うと推測された。

ハイドロフォビンは水と空気のような親水性-疎水性界面上で自己会合し、水性表面張力の低下や親水性/疎水性表面のコーティングを促す。ハイドロフォビンはこの特性により気中菌糸の形成や宿主への付着を行っており、糸状菌の生育に欠かせないタンパク質の1つであると考えられている (Whiteford and Spanu, 2002; Gebbink et al., 2005)。Wessels (1994) はハイドロパシープロファイルおよび物理的特性の違いに基づいて、ハイドロフォビンをクラスIとクラスIIの2つのサブクラスに分類した。自己会合で形成された両親媒性膜の性質はハイドロフォビンのサブクラスによって大きく異なる。クラスIハイドロフォビンは担子菌、子嚢菌両方で確認され、アルカリ性溶液、有機溶媒、2%熱SDS溶液に不溶であり、ギ酸や過ギ酸、トリフルオロ酢酸 (TFA) などの強酸処理でのみ解離 (可溶化) する非常に強固な両親媒性膜を形成する。一方、クラスIIハイドロフォビンは子嚢菌のみでしか確認されておらず、形成される両親媒性膜は、60% EtOHや2% SDS溶液処理、あるいは加圧や冷却などの物理的処理によっても解離する比較的脆弱な膜である。

このようなハイドロフォビンが持つ両親媒性、自己会合性などの特異な性質は産業への応用が期待されている。例えば、両親媒性タンパク質であることから界面活性剤、乳化剤、安定化剤としての利用、表面コーティング分子であることからバイオセンサーへのタンパク質の固定化や再生医療への利用、酵素集積やタンパク質精製への利用など、食品、医薬品、化粧品、環境分野といった幅広い分野での活用が期待されている (Scholtmeijer et al., 2001; Hektor and Scholtmeijer, 2005; Linder et al., 2005)。ハイドロフォビンの中でも、糸状子嚢菌*T. reesei*由来クラスIIハイドロフォビンはよく研究されており、チョコレートミルクシェイクの泡沫安定剤としての利用や (Cox et al., 2007 and 2009)、ドラッグデリバリーシステムに使用するナノ粒子作製のための生分解性界面活性剤とし

ての利用 (Valo et al., 2010) などが検討されている。それに対し、クラスIハイドロフォビンは強固な不溶性の膜に自己会合するため、その特性が大量調製および実用化する上での障害となっている。

Tasaki ら (2004b) は *pdi251*、*pdi263*、*pdi319* をそれぞれ *pnh1*、*pnh2*、*pnh3* と新たに命名し、これらの遺伝子が特に N2 株のリン酸欠乏によって誘導されると報告した。このことは、リン酸欠乏下で培養した N2 株菌糸体からハイドロフォビンタンパク質を大量に調製できる可能性を示唆している。しかし、その可溶性を検討するにはまず、ナメコ N2 株菌糸体が産生するハイドロフォビンを特異的に検出し、実際にタンパク質レベルでハイドロフォビンを誘導しているかを確認する必要がある。タンパク質の特異的検出法の 1 つに抗原抗体反応を利用したイムノアッセイ法が挙げられるが、抗血清を作製するためにはその抗原となるハイドロフォビンタンパク質が必要となる。本研究室の大畑 (2004) は大腸菌発現系での大量調製を模索するため、ナメコ N2 株菌糸体由来のクラスIハイドロフォビン PNH1 の N 末端にヒスチジンタグを融合させた His-PNH1 の作製を試みたが、その発現を確認することはできなかった。その理由の 1 つとして、ハイドロフォビンが 2%熱 SDS 溶液に不溶な両親媒性膜に自己会合するため、目的タンパク質を可溶化できなかった可能性が挙げられた。不溶性タンパク質の特性を改善する手法の 1 つとして、可溶性の高いタンパク質を融合させて発現させる手法がある。しかし、異種タンパク質との融合は本来の性質を大きく損なう可能性があり、その影響に関しては明らかではない。

本節では、クラスIハイドロフォビンの大量調製法およびその活用法を模索するために、まず、高い可溶性を持つグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) を融合した PNH1 を大腸菌発現系により作製し、その特性について検討した。また、抗 GST-PNH1 抗血清を用いたハイドロフォビンの検出法を確立し、P–培養した菌糸体や廃菌床のハイドロフォビンタンパク質の発現を検出すると共に、これらの資源から同タンパク質を大量に調製可能であるか検討した。

2 実験方法および試薬

2-1 実験材料および実験試薬

ナメコ菌糸体は大貫菌蕈より分与されたナメコ N2 株を使用した。ナメコ子実体および廃菌床は新潟県新潟市南区の白根観光きのこ園から購入した。

イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) および EtOH は和光純薬工業から購入した。還元型グルタチオン、TFA はナカライテスクから購入した。トロンビンは GE Healthcare UK Ltd.から購入した。トロンビンは PBS (Phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH7.4) で 1 unit/μl に調製し、−80°C で保存した。大豆油は関東化学から購入した。

2-2 GST-PNH1 発現用大腸菌の作製

ナメコ N2 株菌糸体は第 2 章第 1 節 2-2 に従って、20 日間、P−培地で培養した。Total RNA の抽出は第 2 章第 1 節 2-3、cDNA の合成は第 1 章第 2 節 2-5 に従って行った。

外分泌シグナルペプチド (M1−A20) と推定された配列を除いた *pnh1* の ORF を以下のプライマーを使用し、*Takara Ex Taq* (Takara Bio) の標準的プロトコルに従って PCR で増幅した: pnh1-Ex-S, AGATGAATTCACGCCCACTCGTCGCAAC (Tm, 64.9°C); pnh1-Ex-AS, CAGGCTCGAGGTCTAGAGGTTGATATTG (Tm, 63.4°C)。PCR 産物を *EcoR* I (Takara Bio) および *Xho* I (Toyobo, Osaka, Japan) で処理し、発現用ベクターpGEX-4T-1 (GE Healthcare UK Ltd.) の GST 遺伝子の下流にライゲートした (Figure II-2)。大腸菌 Origami B (DE3) 株 [F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1 aphC* (DE3) *gor522*::Tn*10 trxB* (Kan^R, Tet^R); Novagen, Wisconsin, USA] を pGEX-4T-1-*pnh1* プラスミドで形質転換し、形質転換体を 50 μg/ml アンピシリン、20 μg/ml カナマイシン、20 μg/ml テトラサイクリンを含む YT 培地上で選抜した。

2-3 組換えタンパク質の発現誘導

pGEX-4T-1-*pnh1* プラスミドを含む大腸菌は、100 μg/ml のアンピシリンを含む YT 培地に接種し、37°C で OD_{600} が 0.3−0.6 程度になるまで前培養した。終濃度 0.1 mM の IPTG を添加し、組換えタンパク質の発現を誘導した。6 時間、30°C で振とう培養後、5,500×g、5 分間、4°C で集菌し、沈殿物を PBS に懸濁した。懸濁液を超音波破砕機 (Ultrasonic Disruptor UD-201, Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan) で破砕後、11,900×g、3 分間、4°C で遠心分離し、上清を可溶性画分として回収した。

Figure II-2. Schematic diagram of the construction of pGEX-4T-1-*pnh1*. The PCR product which is the ORF of *pnh1* excluding the putative signal peptide sequence (M1−A20) was digested with *Eco*R I and *Xho* I, and inserted downstream of the GST gene in expression vector pGEX-4T-1 linearized with the same restriction enzymes. ORF, open reading frame; GST, glutathione *S*-transferase.

可溶性画分中の GST 量は GST・Tag Assay kit (Novagen) の標準的プロトコルに従って定量した。可溶性タンパク質量は第 1 章第 1 節 2-3 に従って測定した。

2-4 GST-PNH1 の精製

GST-PNH1 を含む可溶性タンパク質を Cellulose acetate filter (poresize 0.45 μm; Advantec, Tokyo, Japan) でろ過し、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare UK Ltd.) を充填したカラム上にアプライした。カラムを 5 倍量 (v/v) の PBS で洗浄後、5 倍量 (v/v) の 20 mM 還元型グルタチオンを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で吸着タンパク質を溶出させた。

溶出液は Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (10,000 nominal molecular weight limit, Millipore, Massachusetts, USA) を使用した限外ろ過により濃縮した。

2-5 抗 GST-PNH1 抗血清の作製および精製

抗血清は北海道システム・サイエンス株式会社 (Hokkaido, Japan) に委託して作製した。イエウサギ (日本白色種, メス, 2.5–3.0 kg/body) に抗原として 0.5 mg の精製 GST-PNH1、アジュバンドとして Complete Freund's adjuvant を使用し、皮内へ 2 週間毎、5 回免疫注射した。9 週目に得られた抗血清は防腐剤として 0.05% (w/v) NaN_3 を添加し、4°C で保存した。

抗血清は Trembley ら (2002) の方法を改変して精製した。空の pGEX-4T-1 プラスミドで形質転換した大腸菌 Origami B (DE3) 株を IPTG で発現誘導処理し、GST を含む可溶性画分を回収した。PBS で 1 mg protein/ml に希釈した可溶性画分に 240 cm^2 の PVDF 膜を浸漬後、1.5 時間、4°C で振とうし、1% (w/v) BSA 溶液中で一晩、4°C でブロッキングした。20 μl の抗血清を TBST [Tris buffered saline; 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.001% (v/v) Tween 20, pH 7.4] で 1,000 倍 (v/v) 希釈後、上記の PVDF 膜を浸漬し、1.5 時間、4°C で振とうした (精製抗 GST-PNH1 抗血清)。

2-6 ハイドロフォビンの単量体化 (TFA-EtOH 処理)

1 mg の GST-PNH1 に 10 units のトロンビン溶液を添加し、24 時間、22°C インキュベートすることで GST を切断した。ハイドロフォビンの単量体化は Wösten ら (1993) の方法を改変して行った。凍結乾燥した 50 μg のタンパク質に対し、1 ml の TFA を添加し、1 時間、4°C で超音波処理した (US-102, SND Co., Ltd, Nagano, Japan)。窒素気流下および減圧下で乾固した試料を 60% (v/v) EtOH に溶解後、乾燥させた試料をハイドロフォビン単量体として回収した。

2-7 SDS-PAGE

第1章第1節2-6と同様の方法で行った。

2-8 ウェスタンブロット解析

16% (w/v) ポリアクリルアミドで SDS-PAGE 後、セミドライブロッティング装置を使用し、タンパク質を PVDF 膜にエレクトロブロットした。1% (w/v) BSA で一晩ブロッキング後、目的タンパク質を検出するために、TBST で希釈した抗体で処理した。GST の検出は一次抗体に 100,000 倍 (v/v) 希釈した GST・Tag monoclonal antibody (Novagen)、二次抗体に 2,500 倍 (v/v) 希釈した Goat anti-mouse IgG-HRP (Immunoglobulin G-horse radish peroxidase; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) を使用し、各6時間、4°C で処理した。GST-PNH1 の検出は、一次抗体に第2章第2節2-5で作製した精製抗 GST-PNH1 抗血清、二次抗体に 5,000 倍 (v/v) 希釈した Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、各6時間、4°C で処理した。

シグナルの検出は ECL (Enhanced chemiluminescence) western blotting detection reagents (GE Healthcare UK Ltd.) を使用し、LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) で可視化した。

2-9 菌糸体、子実体、廃菌床からのハイドロフォビンの抽出

ナメコ菌糸体、子実体、廃菌床は凍結乾燥し、ミルサー (IFM-700G, Iwatani Corp., Osaka, Japan) で破砕した。100 mg の凍結乾燥粉末を 5 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) に懸濁し、セット7に合わせた Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG) で 30 秒間ホモジナイズした。11,900×g、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を可溶性画分として回収した。

沈殿は 5 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) に懸濁し、同様のホモジナイズ、遠心分離を2回繰り返して洗浄した。沈殿はさらに 5 ml の超純水に懸濁し、同様のホモジナイズ、遠心分離を2回繰り返して洗浄した。沈殿を 5 ml の 2% (w/v) SDS を含む 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) に懸濁し、10 分間、100°C でインキュベートした。11,900×g、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を熱 SDS 溶液可溶性画分として回収した。

沈殿は 5 ml の超純水に懸濁後、遠心分離で3回洗浄し、凍結乾燥した。凍結乾燥物を第2章第2節2-6の方法に従って処理し、TFA-EtOH 可溶性画分として回収した。

2-10 乳化試験

組換えタンパク質は 100 μg protein/ml、菌糸体、子実体、廃菌床の TFA 可溶性

画分はそれぞれ凍結乾燥物が200、800、200 μg/mlになるよう超純水に懸濁した。各試料と8% (v/v) 大豆油を含む2 mlの液体はボルテックスミキサーを使用して激しく混和した。1 時間後、下層溶液をスライドガラス上に移し、光学顕微鏡 (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) を使用して観察した。

3 結果

3-1 GST-PNH1 の発現

ナメコ N2 株菌糸体由来のハイドロフォビン PNH1 を大腸菌で発現させるため、GST 融合タンパク質発現用コンストラクトを作製した (Figure II-2)。なお、PNH1 の N 末端には外分泌シグナルペプチドが推定されたため (Table II-11)、M1−A20 を除いた *pnh1* の ORF を GST の C 末端に融合させた。

pGEX-4T-1 もしくは pGEX-4T-1-*pnh1* プラスミドで形質転換した大腸菌 Origami B (DE3) 株を前培養し、終濃度 0.1 mM の IPTG を添加することで GST もしくは GST-PNH1 の発現を誘導した。培養物を集菌後、超音波破砕し、遠心分離で得られた上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分として回収した。可溶性画分中の GST 量を測定した結果、GST および GST-PNH1 の発現は IPTG の添加によって増加した (データ示さず)。

GST および GST-PNH1 の可溶性画分を SDS-PAGE した結果、IPTG の添加によって複数のタンパク質の増加が確認された (Figure II-3, left)。一方、不溶性画分の SDS-PAGE では、顕著に増加したタンパク質は確認されなかった (データ示さず)。GST の推定分子量 26,000 に対応するバンドは明瞭に確認されたが、GST-PNH1 の推定分子量 35,000 に対応するバンドは不明瞭だった。そこで、抗 GST 抗体を使用し、GST および GST-PNH1 可溶性画分をウェスタンブロット解析した結果、分子量約 26,000 と約 35,000 にバンドが確認された (Figure II-3, right)。この結果より、GST-PNH1 が IPTG によって誘導され、可溶性画分に含まれていることが確認された。なお、IPTG を添加した GST および GST-PNH1 の可溶性画分において、どちらも分子量約 28,000 のバンドの発現が見られたが、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット解析でバンドが確認されないことから、目的の誘導タンパク質ではないと判断した (Figure II-3)。

3-2 アフィニティークロマトグラフィーによる GST-PNH1 の精製

GST 融合タンパク質はアフィニティークロマトフィーによる精製が可能であることから、GST-PNH1 の精製を試みた。GST-PNH1 可溶性画分を Glutathione Sepharose 4B 樹脂で精製した結果、吸着画分で分子量約 35,000 の目的タンパク質が検出された (Figure II-4)。なお、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、同じ位置にバンドが検出された (データ示さず)。

また、吸着画分の GST 量を測定した結果、大腸菌培養物中の GST-PNH1 は 10 mg/l culture と推定された。

Figure II-3. SDS-PAGE and western blot analysis of soluble fractions from *E. coli* transformed with pGEX-4T-1 (GST) and pGEX-4T-1-*pnh1* (GST-PNH1). Transformants were cultured in the presence (+) or absence (−) of IPTG. Left, proteins containing GST or GST–PNH1 were visualized with CBB after SDS-PAGE; right, after blotting, GST proteins were detected using an anti-GST antibody. The proteins induced by adding IPTG are indicated by black arrowheads.

Figure II-4. Purification of GST-PNH1 by affinity chromatography. Proteins were separated by SDS-PAGE and visualized with CBB. Lanes: 1, unpurified soluble fraction; 2, non-adsorbed fraction; 3, adsorbed fraction. GST-PNH1 is indicated by a black arrowhead. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

3-3 抗 GST-PNH1 抗血清の作製および精製

限外ろ過で濃縮した GST-PNH1 に対して、抗 GST 抗体を用いてウェスタンブロット解析した結果、分子量約 35,000 に GST-PNH1、それ以下に分解もしくは未成熟な GST タンパク質と推定されるバンドが検出された (Figure II-5, lane 2)。このタンパク質をウサギに免疫し、抗 GST-PNH1 抗血清を作製した。

抗原として使用したタンパク質を抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した結果、抗 GST 抗体で検出されたバンド以外に大腸菌由来のタンパク質と推測される非特異的なバンドが検出された (Figure II-5, lane 3)。この状態では PNH1 を特異的に検出する抗血清としての利用が困難なため、Trembley (2002) の方法を参考に、GST 可溶性画分を固定化した PVDF 膜を用いて、抗血清を精製した。この精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した結果、抗 GST 抗体と同じ位置にバンドが検出された (Figure II-5, lane 4)。

3-4 PNH1 の単量体化

GST と PNH1 の間には切断のためのトロンビン認識部位が存在する (Figure II-2)。そこで、トロンビンで GST-PNH1 を処理後、SDS-PAGE した結果、分子量 26,000 の GST のバンドは確認されたが、分子量約 10,000 の PNH1 は確認されなかった (データ示さず)。ハイドロフォビンは自己会合により不溶性の両親媒性膜を形成するため、GST が切断されたことで PNH1 の可溶性が減少し、不溶化してしまったと推測された。

クラス I ハイドロフォビンはギ酸や TFA などの強酸処理によって単量体化 (可溶化) し、60% EtOH に懸濁することによって再凝集を防げると報告されている (Wösten et al., 1993)。そこで、TFA と EtOH を用いて処理を行った結果、TFA のみの処理では明瞭な PNH1 のバンドが確認できなかったのに対し (データ示さず)、TFA-EtOH 処理によって分子量約 12,000 に PNH1 の単量体と思われるバンドが確認された (Figure II-6, left)。また、分子量約 19,000 には二量体と推測されるバンドが確認されたが、SDS-PAGE の試料調製のための加熱処理を行わなかった場合、このバンドは確認されなかった (Figure II-6, left)。精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、分子量約 26,000、19,000、12,000 にバンドが確認され、それぞれ GST、単量体 PNH1、二量体 PNH1 と推測された (Figure II-6, right)。なお、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット解析では分子量約 19,000 と 12,000 の PNH1 のバンドは確認されなかった (データ示さず)。

以上の結果より、Figure II-7 に示されるモデルが推定された。GST-PNH1 はトロンビン消化によって GST と PNH1 に切断されるが、PNH1 は即座に自己会合によって不溶化する。不溶化した PNH1 は TFA-EtOH 処理によって単量体化し、

Figure II-5. SDS-PAGE and western blot analysis of purified GST-PNH1. Purified GST-PNH1 were visualized with silver staining after SDS-PAGE (lane 1), and detected using an anti-GST-antibody (lane 2), and unpurified (lane 3) and purified (lane 4) anti-GST-PNH1 antiserum after blotting. GST-PNH1 is indicated by black arrowheads. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

Figure II-6. SDS-PAGE and western blot analysis of thrombin-digested and TFA-EtOH-treated GST-PNH1. Left, silver staining after SDS-PAGE; right, western blot analysis using purified anti-GST-PNH1 antiserum. The sample treated with (+) or without (−) heating was subjected to SDS-PAGE. GST and PNH1 are indicated by white and gray arrowheads, and dimer of PNH1 is double gray arrowheads. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

Figure II-7. Proposed model for GST-PNH1 and PNH1 in solution. Proteins were visualized with silver staining after SDS-PAGE. GST-PNH1 was cleaved into GST and PNH1 by thrombin, and monomerized PNH1 was rapidly insolubilized by self-assembling. The insolubilized PNH1 was monomerized by TFA-EtOH treatment and the monomerized PNH1 was dimerized by heating. Lanes: 1, purified GST-PNH1; 2, thrombin-digested and TFA-EtOH-treated GST-PNH1 with heating. GST-PNH1, GST and PNH1 are indicated by black, white and gray arrowheads, and dimer of PNH1 is double gray arrowheads. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

加熱によって二量体化 (自己会合) すると推定された。

3-5 GST-PNH1 の乳化活性

ハイドロフォビンは両親媒性タンパク質であるため、特性の 1 つとして乳化活性を持つ。そこで、GST-PNH1 およびトロンビン消化した GST-PNH1 が乳化活性を持つか試験した。水、GST、GST-PNH1、PNH1 の大豆油に対する乳化活性を試験した結果、GST-PNH1 および PNH1 で乳化が観察された (Figure II-8, top)。また、この乳化活性は GST-PNH1 の濃度に依存して増加し、トロンビンのみによる乳化作用は観察されなかった (データ示さず)。

水および GST-PNH1 の乳化溶液から下層を分取し、顕微鏡観察した結果、水ではまったくミセルは確認されなかったが、GST-PNH1 では乳化によるミセルの形成が観察された (Figure II-8, bottom)。

以上の結果より、調製した GST-PNH1 およびこれをトロンビン消化して得られた PNH1 はハイドロフォビンの特性の 1 つである乳化活性を保持していた。

3-6 P−培養したナメコ N2 株菌糸体における PNH1 の発現

第 2 章第 1 節において、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で 4 個のハイドロフォビン遺伝子を特異的に誘導していた。本節において、精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いたハイドロフォビンタンパク質の特異的検出法が確立できたので、ナメコ菌糸体がリン酸欠乏下で誘導するハイドロフォビンタンパク質の発現をウェスタンブロット解析した。

まず、*pnh1* は P−培養 15 日目で最も発現すると報告されているため (Tasaki et al., 2004b)、P−培養 15 日目の菌糸体から可溶性画分、熱 SDS 溶液可溶性画分、TFA-EtOH 可溶性画分を抽出し、精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した。その結果、可溶性画分、熱 SDS 溶液可溶性画分ではバンドが検出されなかったのに対し、TFA-EtOH 可溶性画分ではいくつかバンドが確認された (Figure II-9)。なお、抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、バンドは全く確認されなかった (データ示さず)。これらの結果から、抗 GST-PNH1 抗血清は PNH1 だけでなく、他のハイドロフォビンタンパク質も認識すると推測された。

次いで、7−30 日間 P+および P−培養したナメコ菌糸体の凍結乾燥物 100 mg から TFA-EtOH 可溶性画分を抽出し、精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した。その結果、P+培養および P−培養した菌糸体は共に 10 日目から比較的強いバンドが検出され、15 日目で最も強くバンドが検出された (Figure II-10)。また、全ての期間を通して P+培養より P−培養した菌糸体で強くバンドが検出された。さらに、P+培養した菌糸体では 30 日目までハイドロフォ

Figure II-8. Emulsifying activities of recombinant proteins. Each solution containing proteins was thoroughly mixed with soy oil and observed after 1 h. Top, picture of emulsified solutions: 1, water; 2, GST; 3, GST-PNH1; 4, thrombin-digested GST-PNH1; bottom, optical microscopy images of the lower phase of water (bottom left) and GST-PNH1 (bottom right). Scale bar indicates 100 μm.

Figure II-9. SDS-PAGE and western blot analysis of the fractions extracted from mycelium of *P. nameko* strain N2 cultured in P− medium for 15 days. Left, silver staining after SDS-PAGE; right, western blot analysis using purified anti-GST-PNH1 antiserum. Lanes: 1 and 4, soluble fraction; 2 and 5, heat-SDS soluble fraction; 3 and 6, TFA-EtOH soluble fraction. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

Figure II-10. SDS-PAGE and western blot analysis of TFA-EtOH soluble fraction extracted from mycelium of *P. nameko* cultured in P+ or P− medium. Top, silver staining after SDS-PAGE; bottom, western blot analysis using purified anti-GST-PNH1 antiserum. Lane H, thrombin-digested and TFA-EtOH-treated GST-PNH1. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

ビンタンパク質が徐々に減少していったのに対し、P−培養した菌糸体では30日目まで強く発現していた。以上の結果から、ナメコN2株菌糸体はリン酸欠乏下で遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでもハイドロフォビンを誘導していると示唆された。

3-7 ナメコ子実体および廃菌床からのハイドロフォビンの抽出

P−培養したナメコ菌糸体はP+培養と比較して多量のハイドロフォビンタンパク質を発現していることが示された (Figure II-10)。そこで、他の組織であるナメコ子実体、そして栄養が枯渇している菌糸体を含む廃菌床からのハイドロフォビンの抽出を試み、これらがハイドロフォビンの調製源として利用可能であるか検討した。

乾燥重量100 mgあたりのハイドロフォビン量が最も多かったP−培養15日目のナメコ菌糸体および子実体、廃菌床のTFA-EtOH可溶性画分をSDS-PAGEし、精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した。その結果、全てのサンプルで分子量約10,000−15,000にバンドが検出された (Figure II-11)。また、菌糸体と廃菌床は類似した位置にバンドが検出されたが、子実体では異なる位置にバンドが検出された。

以上の結果から、子実体や菌糸体が充満した廃菌床からもハイドロフォビンの抽出が可能であり、子実体と廃菌床では異なる種類のハイドロフォビンが誘導されていると推定された。

3-8 ナメコから抽出したハイドロフォビンの乳化活性

ナメコ菌糸体、子実体、廃菌床の TFA-EtOH 可溶性画分の乳化活性を試験した結果、菌糸体および廃菌床では明確な乳化が確認された (Figure II-12, top)。一方、子実体では200 μg/mlで乳化作用は観察されず、800 μg/mlで弱い乳化作用が観察された。

これらの乳化溶液から下層を分取し、顕微鏡観察した結果、全てでミセルの形成が観察された (Figure II-12, bottom)。

以上の結果より、ナメコ菌糸体や廃菌床から抽出した TFA-EtOH 可溶性画分も乳化活性を示し、ハイドロフォビンの調製源として利用可能であることが示された。

Figure II-11. SDS-PAGE and western blot analysis of TFA-EtOH soluble fraction extracted from *P. nameko*. Top, silver staining after SDS-PAGE; bottom, western blot analysis using purified anti-GST-PNH1 antiserum. M, mycelium cultured in P− medium for 15 days; F, fruiting body; W, waste mushroom bed material; H, thrombin-digested and TFA-EtOH-treated GST-PNH1. Molecular weights of the marker proteins are given to the left of the figure.

Figure II-12. Emulsifying activities of TFA-EtOH soluble fractions extracted from *P. nameko*. Each solution was thoroughly mixed with soy oil and observed after 1 h. Top, picture of emulsified solutions: 1, water; 2, mycelium (200 μg/ml); 3, fruiting body (800 μg/ml); 4, waste mushroom bed material (200 μg/ml); bottom, optical microscopy images of the lower phase of mycelium cultured in P− medium for 15 days (M, bottom left), fruiting body (F, bottom center) and waste mushroom bed material (W, bottom right). Scale bar indicates 100 μm.

4 考察

4-1 大腸菌によるクラスIハイドロフォビンの発現

ハイドロフォビンは両親媒性、自己会合性などの特異な性質を持つことから、様々な分野での応用が期待されている。しかし、クラスIハイドロフォビンの大量調製法は十分に確立されていないため、タンパク質分子の詳細な性質の試験も不十分であり、実用化にはまだ多くの問題が存在する。

大腸菌でのハイドロフォビンの発現はヒラタケ*P. ostreatus*由来のFbh1 (class I; Peñas et al., 1998)、コツブタケ *Pisolithus tinctorius* 由来の HYDPt-1 (class I; Tagu et al., 2001)、地衣形成担子菌 *Dictyonema glabratum* 由来の DGH1 (class I; Trembley et al., 2002)、動物病原子嚢菌 *Paracoccidioides brasiliensis* 由来の PbHYD1 (class I; Albuquerque et al., 2004)、ニレ立枯病菌 *Ophiostoma ulmi* 由来の cerato-ulmin (class II; Bolyard and Sticklen, 1992)、糸状子嚢菌 *T. reesei* 由来の HFBI (class II; Nakari-Setälä et al., 1996) などで試みられ、得られた組換えタンパク質は抗血清の作製や局在解析などに使用されている。しかし、大腸菌発現系によるハイドロフォビンの発現効率は一般的に低いと報告されている (Scholtmeijer et al., 2001)。

本研究室の大畑 (2004) は大腸菌での His-PNH1 の作製を試みたが、その発現を確認することができなかった。その理由の 1 つとして、ハイドロフォビンが2%熱 SDS 溶液に不溶な両親媒性膜に自己会合するため、可溶性タンパク質として回収できなかった可能性が挙げられた。実際、ヒスチジンタグを融合させて発現させた他の菌類由来のクラスIハイドロフォビンも不溶性であり、変性剤としてグアニジン塩酸塩で可溶化させなければならなかったと報告されている (Tagu et al., 2001; Trembley et al., 2002)。

本研究では、クラスIハイドロフォビンを大腸菌の可溶性画分から効率よく回収するため、タンパク質の可溶化を高める GST を融合させた。また、大畑 (2002) は宿主大腸菌として BL21 (DE3) 株を使用していたが、本研究では他の大腸菌株を使用した。多くのタンパク質の正しいフォールディングには、安定なジスルフィド結合の形成が必要である。特にハイドロフォビンは 8 個のシステイン残基による 4 つのジスルフィド結合によってその特性を維持していることから (de Vocht et al., 2000)、発現させるタンパク質のジスルフィド結合に関してもさらなる改善を検討する必要があった。そこで、ジスルフィド結合の形成を促進させるチオレドキシンレダクターゼ *trxB* およびグルタチオンレダクターゼ *gor* 変異を持つ Origami B (DE3) 株を宿主として選択した (Stewart et al., 1998; Bessette et al., 1999)。

本研究では、Figure II-2 に示すコンストラクトを作製し、大腸菌で IPTG によ

る GST 融合タンパク質の発現誘導を行った結果、GST-PNH1 は可溶性画分に回収された (Figure II-3)。また、GST-PNH1 は抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって検出可能であり、アフィニティークロマトグラフィーによる精製も容易だった (Figure II-4)。

Tagu ら (2001) は、外分泌シグナルペプチドを除いたコツブタケ *P. tinctorius* 由来クラス I ハイドロフォビン HYDPt-1 をヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させている。しかし、このタンパク質は不溶性であり、可溶化するためには 6 M グアニジン塩酸塩を使用した高変性抽出条件が必要であったと報告している (Tagu et al., 2001)。このようなタンパク質変性剤を使用した回収法では、これを透析や希釈などで除去する作業が必要であり、得られたタンパク質が本来の立体構造や活性を維持していないなどの欠点がある。本研究の GST-PNH1 の場合、N 末端に親水性タンパク質である GST を融合させたことや、タンパク質発現用大腸菌として安定したジスルフィド結合を形成する Origami B (DE3) 株を使用したことにより、組換えタンパク質の可溶性が大きく向上したと推測される。また、GST の分子量は PNH1 の分子量よりかなり大きいため GST による立体障害が起こり、ハイドロフォビン分子同士の自己会合が抑えられた可能性も推察される。

一方、Albuquerque ら (2004) は、外分泌シグナルペプチドを含む動物病原子嚢菌 *P. brasiliensis* 由来クラス I ハイドロフォビン PbHYD1 を本研究と同様に GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させている。しかし、GST-PbHYD1 の発現レベルは低く、その多くが 8 M 尿素で可溶化される不溶性沈殿中に存在していたと報告している (Albuquerque et al., 2004)。本研究で作製した GST-PNH1 と GST-PbHYD1 はほぼ同じ発現ベクターと大腸菌宿主を使用して発現させている。これら 2 つのタンパク質の最も大きな違いは外分泌シグナルペプチドの有無である。GST-PbHYD1 は GST と成熟 PbHYD1 の間に外分泌シグナルペプチドが含まれているのに対し、本研究の GST-PNH1 は外分泌シグナルペプチド (M1−A20) と予測された配列を除去している。外分泌シグナルペプチドは主に疎水性アミノ酸残基からなっており、親水性表面への疎水性アミノ酸の曝露はタンパク質の不安定化を招く要因となる。そのため、大腸菌発現系でのクラス I ハイドロフォビンの可溶化には外分泌シグナルペプチドの除去も有効である可能性が示唆された。

Tagu ら(2001) は His タグ融合クラス I ハイドロフォビン HYDPt-1 を大腸菌で発現させた結果、変性剤での可溶化が必要であったが、1−2 mg/l culture のハイドロフォビンが得られたと報告している。本研究における可溶性画分の GST-PDI251 は 10 mg/l culture と推定され、GST を融合することでクラス I ハイドロフォビンを可溶性タンパク質としてこれまで報告されている以上の収量で

得ることができた。近年、Kirkland と Keyhani (2011) は、N 末端にキチン結合ドメインを融合させた昆虫寄生子嚢菌 *Beauveria bassiana* 由来 Hyd2 を大腸菌で発現させ、7–10 mg/l culture の収量を得たと報告している。この Hyd2 も N 末端のシグナルペプチドを除去しており、本研究で得られた改善法が有用であると考えられる。しかし、クラス I ハイドロフォビンを実用化するためには g/l レベルのタンパク質を調製する技術が必要である。近年、酵母や糸状菌などの菌類を宿主として使用し、クラス I ハイドロフォビンを大量発現させる試みが様々行われている。Schmoll ら (2010) は、糸状子嚢菌 *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*) を使用し、コウジカビ属 *A. nidulans* 由来 DewA を 33 mg/l culture の収量で得たと報告している。一方、メタノール資化酵母 *P. pastoris* を使用し、マイタケ *G. frondosa* 由来 HGFI では 86 mg/l culture (Wang et al., 2010a)、コウジカビ属 *A. fumigatus* 由来 RodA と RodB はそれぞれ 329、262 mg/l culture (Pedersen et al., 2011) の収量が達成されている。他にもコツブタケ属 *Pisolithus* 由来 HydPt-1 では出芽酵母 *S. cerevisiae* や外生菌根担子菌 *H. cylindrosporum* での異種発現が試みられている (Tagu et al., 2002)。糸状子嚢菌 *T. reesei* 由来クラス II ハイドロフォビン HFBI についても、酵母 (Niu et al., in press)、昆虫細胞 (Lahtinen et al., 2008)、植物 (Joensuu et al., 2009) を使用した発現が検討され始めている。異種発現によるクラス I ハイドロフォビンの大量調製は、発現系や発現用コンストラクトをさらに改良することによって、実用化レベルの収量を達成できる可能性がある。

4-2 GST-PNH1 の特性

本研究ではまず、ハイドロフォビンの特異的検出法を確立するために精製した GST-PNH1 をウサギに免疫し、抗 GST-PNH1 抗血清を作製した。しかし、この抗血清は、抗原として用いた GST-PNH1 の精製が不十分であったため、他の不純タンパク質の抗体も生成されており、GST-PNH1 を特異的に検出することができなかった (Figure II-5)。Trembley ら (2002) は大腸菌で作製したクラス I ハイドロフォビン DGH1 を用いて抗血清を作製したが、大腸菌タンパク質に対する非特異的な抗体も存在していたため、大腸菌抽出物を固定化した PVDF 膜で精製することにより、目的のタンパク質以外を認識する抗体の除去を行っている。本研究では Trembley ら (2002) の方法を参考に、PVDF 膜上に GST のみを発現させた大腸菌可溶性画分を固定化し、それを用いて抗血清の精製を行った。その結果、抗 GST-PDI251 抗体以外の抗体が除去され、GST-PDI251 のみを検出可能な抗体に精製された (Figure II-5)。なお、GST・Tag モノクローナル抗体および精製抗 GST-PDI251 抗血清によるウェスタンブロット解析において、25–30 kDa に未成熟 GST 融合タンパク質と推測されるバンドが検出されたが (Figure II-5)、このようなバンドは pGEX-4T-3 を使用した GST-PbHYD1 でも検出

されている (Albuquerque et al., 2004)。より特異性の高い抗血清の作製のためには、抗原タンパク質の精製方法を改良する必要があるが、GST 融合クラス I ハイドロフォビンは大腸菌で容易に作製、精製が可能であり、抗血清作製までの作業を簡略化できるという利点を持つ。

pGEX ベクターシリーズは GST と目的タンパク質の間にプロテアーゼ認識配列が存在し、GST と目的タンパク質を切断することが可能である。本研究で作製した GST-PNH1 は GST と PNH1 の間にトロンビン認識配列が存在するため (Figure II-2)、トロンビン消化した GST-PNH1 を SDS-PAGE したが、PNH1 は確認されなかった (データ示さず)。GST は分子量が大きく、高い親水性を持つため、トロンビン消化によって GST が切断された PNH1 は自己会合し、不溶化してしまうと推測された。自己会合したハイドロフォビンは 2%熱 SDS 溶液に不溶であり、アルカリ性溶液や有機溶媒にも不溶である。一方、強固に自己会合したハイドロフォビンはギ酸や TFA などの強酸によって解離し、単量体化 (可溶化) することが報告されている。さらに、Wösten ら (1993) は、TFA 処理後のハイドロフォビン乾燥物を 60% EtOH で処理することによって、ハイドロフォビンの再凝集を防ぐことができると報告している。

トロンビン消化した GST-PNH1 を TFA-EtOH 処理し、SDS-PAGE した結果、分子量約 25,000 に GST が確認されると共に、分子量約 12,000 と 19,000 に 2 本のバンドが確認された (Figure II-6)。また、加熱処理を行わなかった場合、分子量約 25,000 と 12,000 の 2 本のバンドしか確認されず、ウェスタンブロット解析でも同じ位置にバンドが確認された (Table II-6)。糸状子嚢菌 *T. reesei* (Nakari-Setälä et al., 1996)、麦角菌 *Claviceps fusiformis* (de Vries et al., 1999)、コウジカビ属 *A. fumigatus* (Paris et al., 2003) から抽出されたハイドロフォビンは SDS-PAGE で二量体と推定されるバンドが確認されている。スエヒロタケ *S. commune* 由来クラス I ハイドロフォビン SC3 は溶液中での分子挙動がよく研究されており、界面上では両親媒性膜として存在するが、溶液中では主に二量体として存在することが報告されている (Stroud et al., 2003; Wang et al., 2004a)。そのため、TFA-EtOH 処理によって PNH1 は単量体となるが、加熱処理によってより安定した形態である二量体に自己会合すると推測された (Figure II-7)。

また、SDS-PAGE によって分離した PNH1 は、予想される分子量約 10,000 と若干異なる位置 (分子量約 12,000) にバンドが検出された (Figure II-6)。このような分子量のずれは他のクラス I ハイドロフォビンでも報告されている (Wessels et al., 1991; Lugones et al., 1996 and 1998)。これらはハイドロフォビンが SDS と異常な結合をしている結果であると推察されている。SDS はタンパク質分子の極性のある部分に結合しやすく、疎水性部分にあまり結合しない。また、ジスルフィド結合による高次構造があると結合が阻害される。ハイドロフォビ

ンは強固なジスルフィド結合を形成しているため、β-メルカプトエタノールや煮沸で還元されにくく、その分子表面に疎水性アミノ酸残基が露出しているため、このような分子量のずれが生じたと推測される。

大腸菌から調製した PNH1 は加熱処理によって二量体を形成することから (Table II-7)、ハイドロフォビン本来の特性を保持していると推測された。そこで、クラス I ハイドロフォビンの特性の 1 つである乳化活性を試験した結果、大腸菌で作製した GST-PNH1 および PNH1 は乳化活性を示した (Figure II-8)。クラス I ハイドロフォビンの乳化活性は、スエヒロタケ *S. commune* の培地から精製された SC3 (Wösten et al., 1994)、ヒラタケ *P. ostreatus* 菌糸体から精製された Po.HYD1 (Ma et al., 2008)、酵母発現系で作製したコウジカビ属 *A. fumigatus* 由来の RodA と RodB (Pedersen et al., 2011) で確認されている。大腸菌で発現させたクラス I ハイドロフォビンの特性試験は、マイタケ *G. frondosa* 由来の HGFI を用いた疎水性表面のコーティング特性しか報告されておらず (Wang et al., 2010b)、乳化活性は本研究が初めての報告となる。ハイドロフォビン分子が安定性を保つためには、8 個の特徴的なシステイン残基のジスルフィド結合によるフォールディングが重要であると考えられている (de Vocht et al., 2000)。本研究ではジスルフィド結合を促進させる大腸菌 Origmi B (DE3) 株を宿主として使用したことから、本来の特性を維持した状態でクラス I ハイドロフォビンを調製できた可能性が考えられる。本研究で作製した組換えタンパク質の三次元構造などの詳細な特徴は確認していないが、GST-PNH1 と PNH1 の乳化活性は、乳化相の濁り、ミセルの形成パターンから判断するとほぼ同じであった (Figure II-8)。そのため、GST の融合が PNH1 の本来の乳化活性におよぼす影響は少ないと推測される。

クラス I ハイドロフォビンではその活用法は十分検討されていないが、代表的なクラス II ハイドロフォビンである糸状子嚢菌 *T. reesei* 由来の HFBII は多価不飽和脂肪酸に対して乳化作用を示し (Lumsdon et al., 2005)、すでに食品の泡沫安定剤としての利用が検討されている (Cox et al., 2009)。また、出芽酵母 *S. cerevisiae* の細胞壁局在タンパク質にハイドロフォビンを融合させ、酵母の細胞表面の特性を変化させるなど (Nakari-Setälä et al., 2002)、他のタンパク質を融合させたハイドロフォビンは様々な利用法にも応用されている。単体のクラス I ハイドロフォビンは自己会合して不溶性の膜を形成するため、精製するのが困難であり、現状のままでは生分解性界面活性剤としての利用は難しい。そのため、本研究で用いた GST の様な可溶性の高いタンパク質との融合タンパク質の形であれば、クラス I ハイドロフォビンを容易に工業的に利用できる可能性が期待される。

4-3 P–培養したナメコ N2 株菌糸体における PNH1 の発現量の変化

第 2 章第 1 節において、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で 4 種類のハイドロフォビン遺伝子 (*pdi251*, *pdi263*, *pdi315* and *pdi319*) の発現を誘導していることが明らかとなった。そのため、P–培養したナメコ N2 株菌糸体は通常より多くのクラス I ハイドロフォビンを分泌していると推測され、そこから大量のハイドロフォビンを調製できる可能性が期待された。そこで、本節で確立した PNH1 の検出法を使用し、タンパク質レベルでのハイドロフォビンの誘導を調べた。

Tasaki ら (2004b) は、ナメコ N2 株菌糸体がリン酸欠乏下で誘導するハイドロフォビン遺伝子の発現量を経時的にノーザンブロット解析しており、*pnh1* の発現は P–培養 15 日目で最も誘導されていた。そこで、P–培養 15 日目の菌糸体から抽出した水溶性画分、熱 SDS 溶液可溶性画分、TFA 可溶性画分を SDS-PAGE し、精製抗 GST-PNH1 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した結果、TFA 可溶性画分のみでバンドが検出された (Figure II-9)。また、複数のバンドが検出されたことから、精製抗 GST-PNH1 抗血清は PNH1 だけでなく、他のハイドロフォビンも認識して結合すると推測された。

次いで、7–30 日間、経時的に P+培養および P–培養したナメコ N2 株菌糸体の TFA 可溶性画分をウェスタンブロット解析した結果、どちらも培養 15 日目で強くバンドが検出され (Figure II-10)、*pnh1* 遺伝子発現量の結果と一致した。しかし、*pnh1* は P–培養 20–25 日目でほとんど発現していないのに対し (Tasaki et al., 2004b)、この期間でもハイドロフォビンのバンドは検出された。他のハイドロフォビンのバンドが検出されている可能性が考えられるが、分泌された PNH1 が分解されずに残存し続けていると推測された。また、培養期間を通して P+培養より P–培養したナメコ N2 株菌糸体の方でバンドが強く検出されており、ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下でハイドロフォビンを遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで誘導していると推測された。

炭素や窒素欠乏下でのハイドロフォビン遺伝子の誘導は様々報告されているが (Talbot et al., 1993; Muñoz et al., 1997; Viterbo and Chet, 2006)、タンパク質レベルでの発現は試験されていない。そのため、ストレス応答に対するハイドロフォビンタンパク質の誘導は本研究が初めての報告となる。*pnh1* および *pnh2* の発現はリン酸欠乏下だけでなく、窒素欠乏下でも誘導されると報告されていることから (大畑, 2004)、菌糸体からのハイドロフォビンの大量調製を検討する際には、他の栄養素の欠乏の影響を含め培養条件を検討すると良いかもしれない。

4-4 ナメコ子実体および廃菌床から抽出したハイドロフォビンの利用

本研究ではハイドロフォビン大量調製のための資源の 1 つとして、廃菌床にも着目した。キノコの栽培は原木栽培、菌床栽培、堆肥栽培、林地栽培などに

分けられる。そのうち、菌床栽培は木質基材と米糠などの栄養源を混合した培地で栽培する方法であり、軽労働で短期的に安定した生産が可能なことから、多くのキノコ栽培で利用されている。ナメコの栽培も主に菌床栽培であり、広葉樹のおが屑と小麦ふすまもしくはとうもろこし糠などの栄養源を混合した培地が一般的に用いられている。

キノコは近年その栽培量、種類が増加しているが、菌床栽培後に生じる廃培地 (廃菌床) の処理が問題となっている。廃菌床は堆肥化や暖房用燃料、畜舎の床敷きにされる以外はほとんど野積み、埋立て、焼却処分されており、大気や土壌汚染を引き起こす原因となっている。さらに、建設リサイクル法、循環型社会形成推進基本法、改正廃棄物処理法、資源有効利用促進法などの法律の改正に伴い、工場残材等の木質系廃棄物の焼却処理が事実上困難となってきており、廃菌床の新しい利用法の開発が期待されている (吉田、高橋, 1994a and b; 横田ら, 2006)。廃菌床の新たな利用法の 1 つとして、異なるキノコ栽培培地としての再利用が検討されている (Sharma and Jandaik, 1992; 大賀ら, 1993; 富樫, 1995 and 1996)。また、廃菌床からの有用酵素の抽出や探索 (寺下ら, 1997; 飯田ら, 2001; Makishima et al., 2006)、さらには廃菌床を餌として飼育したシロアリ *Reticulitermes speratus* から燃料として利用可能なシロアリオイルを抽出するなど (板倉, 2006; Itakura et al., 2008)、様々な新規利用法が検討されている。ナメコ廃菌床に関しては堆肥化効率 (横田ら, 2006)、ハタケシメジ *Lyophyllum decastes* (更級, 2006) やヤマブシタケ *Hericium erinaceum* (高畠, 2009) の栽培培地への再利用などが検討されている。

廃菌床中には菌糸が十分生育しており、栄養成分も比較的枯渇していると推測され、栄養欠乏によってハイドロフォビンが誘導されている可能性がある。そのため、このような資源からハイドロフォビンのような有用物質を抽出できれば、廃菌床の新たな活用法を見出すことができる。そこで、本研究では廃菌床の有効利用法の 1 つとして、ナメコ廃菌床からのハイドロフォビンの抽出を試みた。また、それと比較するためにナメコ子実体からの抽出も試みた。ナメコ廃菌床からハイドロフォビンを抽出するため、まず水溶性画分および熱 SDS 溶液可溶性画分を除去した。その結果生じた残渣および TFA 可溶性画分の重量は子実体より廃菌床の方が多かった (データ示さず)。これは、廃菌床中の木質成分が原因であると推測される。次いで、廃菌床の TFA 可溶性画分を SDS-PAGE し、抗 GST-PDI251 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した結果、菌糸体と廃菌床は類似した位置にバンドが検出された (Figure II-11)。廃菌床中の菌の主な存在形態は菌糸であり、廃菌床でも菌糸体と類似したハイドロフォビンが誘導されていると推測された。

一方、子実体では菌糸体や廃菌床とは明らかに異なる位置にバンドが検出さ

れた (Figure II-11)。キノコは菌糸体、子実体など異なる生育形態で様々なハイドロフォビン遺伝子を発現している。ヒラタケ *P. ostreatus* では様々な株から多数のハイドロフォビン遺伝子が報告されており、子実体のみで発現する遺伝子 (*fbh1*, *POH1* and *Po.hyd*) と菌糸体のみで発現する遺伝子 (*POH2*, *POH3*, *vmh1* and *vmh2*) などが明らかにされている (Peñas et al., 1998 and 2002; Ásgeirsdóttir et al., 1998; Ma et al., 2007)。ナメコ子実体由来のハイドロフォビンは報告されていないが、ヒラタケ *P. ostreatus* と同様、ナメコは菌糸体と子実体で異なるハイドロフォビンを誘導していると推測される。

最後に、ナメコ N2 株菌糸体およびナメコ子実体、廃菌床から抽出した TFA 可溶性画分の乳化作用について検討した。それぞれ 200 μg/ml の凍結乾燥物濃度で試料を調製し、大豆油に対する乳化作用を試験した結果、菌糸体および廃菌床で顕著な乳化が観察された (Figure II-12)。一方、子実体の乳化作用はこの濃度では観察されなかったため、4 倍量の 800 μg/ml に調製し直した結果、弱い乳化作用が観察された。菌糸体や廃菌床から抽出した TFA 可溶性画分では複数のハイドロフォビンが検出されているのに対し、子実体では 1 つのバンドしか確認されておらず (Figure II-12)、子実体のハイドロフォビン含量はこれらと比較すると少ないと推測された。また、菌糸体および廃菌床から乳化活性を持つハイドロフォビンが抽出可能だったことから、これらの資源からその大量調製が可能であるかもしれない。

以上より、ナメコ N2 株菌糸体由来 PNH1 は可溶性の高い GST を融合させることによって大腸菌発現系でも可溶性画分に調製可能であり、ハイドロフォビンの特性を維持した状態で比較的多量に調製することができることが明らかになった。また、確立した抗 GST-PNH1 抗血清を用いたハイドロフォビン検出法を用い、P–培養したナメコ N2 株菌糸体がタンパク質レベルでハイドロフォビンを誘導していることを明らかにした。さらに、ナメコ廃菌床や子実体からのハイドロフォビンの抽出も可能であり、菌糸体や廃菌床から抽出したハイドロフォビンで十分な乳化活性が確認されたことから、これらの調製源からのハイドロフォビンタンパク質の大量調製およびその活用の可能性が期待された。

比較的安定性の低いクラス II ハイドロフォビンの場合、糸状子嚢菌 *T. reesei* の HFBI 過剰発現株において 1.4 g/l culture での収量が達成されている (Bailey et al., 2002)。しかし、遺伝子導入形質転換技術が確立されている糸状菌は限られており、過剰発現株の作製は容易ではない。一方、クラス I ハイドロフォビンの場合、スエヒロタケ *S. commune* において、培地中へ最大 60 μg/l の SC3 の分泌が報告されているが (Wösten et al., 1999)、クラス II ハイドロフォビンと比較すると、その量は極微量である。アルカリ性溶液、有機溶媒、2%熱 SDS 溶液に不溶な強

固かつ安定性の高い膜を形成するクラスIハイドロフォビンはクラスIIハイドロフォビン以上に高機能な素材への利用が期待できる。しかし、その特性を持っているが故にタンパク質分子の詳細な性質の試験は容易ではない。本研究で異種発現もしくは菌糸体、廃菌床から抽出したハイドロフォビンは十分な乳化活性を持っていたため、その特性を解析する上で有用であると推察されるが、工業レベルで大量調製するためには培養条件や抽出条件など、多くの改良を検討する必要があると思われる。

第 2 章 総合討論

リンは生体の全ての細胞に必要不可欠な元素であり、窒素、カリウムと共に植物の三大栄養素の 1 つとして知られている。植物はリンを可溶性無機リン酸の形態で土壌から吸収しているが、無機リン酸は土壌中で容易に不溶化してしまうことから、リンは欠乏しやすい栄養素の 1 つとされている。多くの植物は低リン酸環境下で不溶性リン酸化合物の可溶化物質を分泌し、トランスポーターによる吸収を促進すると共に、代謝系や根圏構造を変化させることでその環境に適応している。しかし、その適応能力はさほど高くはなく、多くの植物はリン酸欠乏下での生育を余儀なくされている。そこで考えられるのが他の生物の高いリン酸欠乏適応能力の活用である。

当研究室ではキノコのリン酸欠乏適応機構に関する研究を長年行っており、これまでの研究から、ナメコ菌糸体は低リン酸環境下でもリン酸が十分供給されている環境と同程度の生育が可能であり、リン酸エステル加水分解酵素の分泌が顕著に増加することから、優れたリン酸欠乏適応能力を持つと推測されている。そこで、Tasaki ら (2002) はリン酸欠乏適応機構の全体像を遺伝子レベルで解明するため、リン酸欠乏状態のナメコ N2 株菌糸体の cDNA ライブラリーからディファレンシャルスクリーニングにより、31 個のリン酸欠乏下で特異的に発現する遺伝子 (*pdi* 遺伝子) を単離した。また、培養ろ液の二次元 PAGE により、リン酸欠乏下で分泌量が増加するタンパク質をコードする遺伝子 *PNAP1*、*pdie* が単離されている (Awang, 2002; 高藤, 2005; Tasaki et al., 2006)。

本研究ではまず、未解析だった 19 個の *pdi* 遺伝子の全長 cDNA 塩基配列を決定した。その結果、重複する遺伝子が存在していたため、Tasaki ら (2002) が単離した *pdi* 遺伝子の数を 31 個から 29 個に改めた。次いで、この 29 個の *pdi* 遺伝子と *PNAP1*、*pdie* がコードする PDI タンパク質についてバイオインフォマティクス的手法により、相同性検索、モチーフ検索、シグナルペプチド予測、膜貫通領域予測、局在予測を行い、その機能を推定した。その結果、PDI タンパク質の機能は、(i) リン酸エステル加水分解酵素 (*pdi26, pdi370, pdi205, PNAP1* and *pdie*)、(ii) トランスポーター (*pdi85, pdi343* and *pdi99*)、(iii) 栄養素の分解に関与するタンパク質 (*pdi244, pdi110, pdi373, pdi371* and *pdi372*)、(iv) 菌糸の生長、付着に関与するタンパク質 (*pdi228, pdi263, pdi315, pdi319* and *pdi251*)、(v) レクチン (*pdi310* and *pdi259*)、(vi) 一般的ストレス応答タンパク質 (*pdi301, pdi348*)、(vii) ミトコンドリア局在タンパク質 (*pdi88* and *pdi351*)、(viii) 細胞核局在タンパク質 (*pdi5*)、(ix) 外分泌タンパク質 (*pdi63, pdi36, pdi230, pdi298, pdi201* and *pdi308*)、の 9 個のグループに分類された。ナメコ N2 株菌糸体は多くの生物のリン酸欠乏応答で誘導されるリン酸エステル加水分解酵素やトランスポーター以

外に、生物遺体や栄養素の分解に関与するタンパク質をコードする *pdi* 遺伝子を多く誘導していた。また、その基質への付着を補助するハイドロフォビンやレクチンも多く誘導していた。そのため、ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応能力が他の生物より優れている要因の 1 つとして、リン酸だけでなく他の栄養素の分解に関与するタンパク質の分泌能力、そして基質への付着能力の高さに起因すると推測された。

31 個中 4 個の *pdi* 遺伝子が糸状菌特異的両親媒性タンパク質であるクラス I ハイドロフォビンであった。ハイドロフォビンはその特性から生物由来の界面活性剤やコーティング分子としての幅広い利用が期待されている。しかし、大量調製法が確立されていないため、実用化にはまだ多くの問題が残っている。ナメコ N2 株菌糸体はリン酸欠乏下で複数のハイドロフォビン遺伝子を誘導しているため、その菌糸体からハイドロフォビンタンパク質を大量に調製することが可能かもしれない。また、廃菌床などの廃棄物から調製できれば資源の有効活用にも繋がる可能性がある。ハイドロフォビンを定量するためには特異的な検出法の確立が必要であるが、クラス I ハイドロフォビンは不溶性の両親媒性膜に自己会合する特性を持つため、抗血清作製のための抗原の調製も困難である。

そこで本研究ではまず、ナメコ N2 株菌糸体由来の PNH1/PDI251 の N 末端に高い可溶性を持つ GST を融合し、GST-PNH1 として大腸菌で発現させた。その結果、GST-PNH1 は大腸菌の可溶性画分で確認され、アフィニティークロマトグラフィーによる精製も可能であった。精製した GST-PNH1 をウサギに免疫することで抗 GST-PNH1 抗血清を作製し、この抗血清を用いたハイドロフォビン検出法を確立した。GST-PNH1 をトロンビン消化し、TFA-EtOH 処理で可溶化した結果、単量体の PNH1 が確認され、加熱処理によって PNH1 は二量体に会合した。GST-PNH1 およびトロンビン消化した GST-PNH1 はハイドロフォビンの特性の 1 つである乳化活性を示し、GST を融合させたクラス I ハイドロフォビンは本来の特性を保持した状態で発現、精製可能であることが示された。次いで、7–30 日間 P+および P–培養したナメコ N2 株菌糸体から TFA-EtOH 可溶性画分抽出し、ハイドロフォビンを検出した結果、P–培養によるハイドロフォビンタンパク質の誘導が確認された。また、子実体や廃菌床から TFA-EtOH 可溶性画分を抽出した結果、これらの画分でもハイドロフォビンが検出され、菌糸体と廃菌床から抽出した TFA-EtOH 可溶性画分は十分な乳化活性を示した。これらの結果から、菌糸体、子実体、廃菌床からハイドロフォビンタンパク質を大量に調製できる可能性が示唆された。

総括

我々人間の生活は菌類を利用し、菌類によって支えられていると言っても過言ではない。例えば、菌類は生態系において、セルロースやリグニンなどの難分解性化合物の分解者として働き、その分解能は有害物質で汚染された土壌のバイオレメディエーションにも活用されている。また、菌類が生産する酵素や化合物は食品や医薬品など様々な分野で利用されている。このように、菌類は有用な生理学的機能をいくつも有しているにも関わらず、酵母やカビなどの子嚢菌と比べ、キノコの基礎的研究は遅れている。そこで本研究では、キノコの生理学的機能の有効的活用法を見出すため、2 つの基礎的研究を行った。

第 1 章では食としてのキノコに着目し、キノコの主要な香気成分である揮発性 C8 化合物の生合成機構について研究した。その結果、ヒラタケの揮発性 C8 化合物はリノール酸を出発物質とし、13-HPOD もしくは 10-HPOD を経由して生合成され、その生合成には様々な酵素が関与していることが明らかとなった。

ヒラタケの傘から精製した ER I と II は構造の異なる様々な α,β-不飽和カルボニル化合物を還元した。α,β-不飽和カルボニル化合物の還元能力を持つ酵素は近年、生体触媒としての研究が盛んに行われている (Toogood et al., 2010)。*Poer1* と *Poer2* がこれまで研究されてきた酵素とは異なり、新規の遺伝子であったことから、この触媒機構を解明できれば、生体触媒として利用できるかもしれない。

また、キノコ由来のオキシリピンはその生育において重要な役割を果たす。例えば、1-オクテン-3-オールは細菌に対して抗菌活性を持つことが知られており (Beltran-Garcia et al., 1997)、10-ODA や 9-HPOD などの脂肪酸代謝物も抗菌活性を持つと報告されている (Okull et al., 2003; Cantrell et al., 2008)。また、10-ODA は菌糸体の生長を促進し、子実体の柄を伸長させる働きを持つ (Mau et al., 1992b; Mau and Li, 1999; Champavier et al., 2000; Mau and Ma, 2001 and 2002)。そのため、キノコの揮発性 C8 化合物の制御によってこれらの生長促進物質が制御できれば、キノコの生産量の増加が可能になるかも知れない。

さらに、揮発性 C8 化合物はキノコだけでなく、カビにおいても応用が期待されている。製麹工程における麹の香りは、オハグロ臭、栗香、キノコ香と表現される変化が起こり、製麹管理を行うに当たって重要な情報源とされているが、これらは酒造りの現場で経験的に言い伝えられる感覚的なものとされてきた。高橋ら (2006 and 2007) は、製麹工程における清酒麹の香りを分析した結果、キノコ香は出麹工程以降に強くなり、1-オクテン-3-オールや 1-オクテン-3-オンの増加に起因する可能性を報告した。そのため、揮発性 C8 化合物を分析することで、製麹管理および麹の品質評価の指標として活用できるのではないかと期待されている。

一方、微生物汚染が発生した建築物において、1-オクテン-3-オールが多く検出されることが報告されており、シックハウス症候群との関係が示唆されている (朴, 2003)。実際、屋内空気中の 1-オクテン-3-オール濃度は喘息症状と相関を示すことが知られており (Smedje et al., 1996; Kim et al., 2007)、高濃度の 1-オクテン-3-オールはヒトの細胞に対して細胞毒性を示す (Inamdar et al., 2012)。そのため、揮発性 C8 化合物の量をモニタリングすることによりカビによる室内汚染の指標として活用する方法も検討されている。

1-オクテン-3-オールは日本人によって発見された香気分子であるが (岩出, 1936; 村橋, 1936)、現在でもその生合成機構の詳細は未解明なままである。もし、この生合成機構が解明できれば、その反応を制御することで香気品質の安定したキノコの生産、栽培、貯蔵が可能となり、キノコ産業界の活性化に繋がるかもしれない。また、日本の伝統食品に使われる麹菌への応用も考えられる。今後、これらの活用のためにはさらなる機構の解明を行う必要があると思われる。

次いで、第 2 章では生態系の分解者としてのキノコに着目し、ナメコ N2 株菌糸体のリン酸欠乏適応機構について研究した。その結果、ナメコ菌糸体はリン酸欠乏下で様々なリン酸エステル加水分解酵素やトランスポーターを誘導すると共に、他の生物では報告されていない様々な栄養素の分解を促す多くのタンパク質を誘導していると推定された。

自然条件では、土壌中のリン酸濃度は極めて希薄であり、リンは植物にとって欠乏しやすい栄養素として知られている。かつての日本の土壌ではリン酸不足によって作物の生産が制限されていたが、リン酸施肥によって生産力は飛躍的に向上した。しかし、過剰なリン酸施肥により、現在では適正レベルを超えた土壌が多数出現している (西尾, 2003)。過剰なリン酸は降雨などで河川や湖沼、海水中へ流出し、その結果、水系の富栄養化による赤潮の発生やアオコの増殖などの環境汚染が引き起こされる。多くの植物は菌類と菌根を形成することによって効率的な栄養素の獲得を行っており、菌根菌の能力を活用することで低リン酸土壌での効率的な作物の栽培も可能になると期待される。しかし、菌類のリン酸欠乏適応機構の詳細は出芽酵母 *S. cerevisiae* でしか明らかにされておらず、菌根菌やキノコの適応機構はほとんど解明されていなかった。ナメコ菌糸体のリン酸欠乏応答で誘導される栄養素の分解に関与するタンパク質の分泌は、分解者であるキノコに特異的な能力である。本研究で得られた知見を植物に応用することができれば、リン酸欠乏土壌でも作物の生産性を向上させることができるかもしれない。

また、本研究ではナメコ N2 株菌糸体から得られたハイドロフォビンの大量調製法について模索した。生物由来の両親媒性物質としては、植物由来のレシチンやサポニン、動物由来の胆汁酸、微生物由来のバイオサーファクタントなど

ンやサポニン、動物由来の胆汁酸、微生物由来のバイオサーファクタントなどが挙げられる (北本, 2003 and 2008)。これらの物質の疎水性は中鎖、長鎖脂肪酸やステロイド骨格に依存するのに対し、ハイドロフォビンの疎水性は分子表面の疎水性アミノ酸残基のみに依存する。スエヒロタケ *S. commune* 由来のクラス I ハイドロフォビン SC3 は水の表面張力を 72 mJ/m^2 から 24 mJ/m^2 に低下させることが報告されている (Wösten et al. 1999)。これは生物由来の界面活性物質として最も界面活性作用の強いものの 1 つとされ、市販の界面活性剤並みの作用を持つ。ハイドロフォビンは生分解性と強力な界面活性作用を持つことに加え、アミノ酸残基のみからなるため、遺伝学的改変も容易であり、キノコ中に普遍的に含まれていることから、人体への安全性も保障されている。クラス I ハイドロフォビンの工業的利用にはまだ多くの問題が残っているが、本研究で得られた知見により大量調製技術が開発されていくかもしれない。

以上より、キノコの生理学的機能の活用に関する基礎的研究を行い、多くの酵素や遺伝子を単離し、それらが関与する様々なメカニズムを推察した。キノコの生理学的機能はまだ十分理解されているとは言い難いが、本研究で得られた知見が活用されることで、キノコの研究がさらに発展していくことを期待したい。

参考文献

Ae, N.; Arihara, J.; Okada, K.; Yoshihara, T.; Johansen, C. Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. *Science* **1990**, *248*, 477–480.

Aguilera, J.; Randez-Gil, F.; Prieto, J. A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 327–341.

Aida, F. M. N. A.; Shuhaimi, M.; Yazid, M.; Maaruf, A. G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 567–575.

Ainsworth, G. C. Introduction and keys to higher taxa. In *The Fungi. An advanced treatise, vol. 4A, a taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti.* Ainsworth, G. C.; Sparrow, F. K.; Sussman, A. S. Eds.; Academic Press, New York, USA, **1973**; pp 1–7.

Akakabe, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T. Stereochemical correlation between 10-hydroperoxyoctadecadienoic acid and 1-octen-3-ol in *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake* mushrooms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1539–1544.

Albuquerque, P.; Kyaw, C. M.; Saldanha, R. R.; Brigido, M. M.; Felipe, M. S. S.; Silva-Pereira, I. Pbhyd1 and Pbhyd2: two mycelium-specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 510–520.

Almaguer, C.; Cheng, W.; Nolder, C.; Patton-Vogt, J. Glycerophosphoinositol, a novel phosphate source whose transport is regulated by multiple factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31937–31942.

Almaguer, C.; Fisher, E.; Patton-Vogt, J. Posttranscriptional regulation of Git1p, the glycerophosphoinositol/glycerophosphocholine transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **2006**, *50*, 367–375.

Almaguer, C.; Mantella, D.; Perez, E.; Patton-Vogt, J. Inositol and phosphate regulate *GIT1* transcription and glycerophosphoinositol incorporation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **2003**, *2*, 729–736.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.

Andersson, M. X.; Larsson, K. E.; Tjellström, H.; Liljenberg, C.; Sandelius, A. S.

Phosphate-limited oat: the plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27578–27586.

Andrade, M. A.; Perez-Iratxeta, C.; Ponting, C. P. Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **2001**, *134*, 117–131.

Andreou, A.; Brodhun, F.; Feussner, I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 148–170.

Andrianopoulos, A.; Kourambas, S.; Sharp, J. A.; Davis, M. A.; Hynes, M. J. Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 1973–1977.

Arita, I. *Pholiota nameko*. In: *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Chang, S. T.; Hayes, W. A. Eds.; Academic Press, New York, USA, **1978**, pp 475–496.

Ásgeirsdóttir, S. A.; de Vries, O. M. H.; Wessels, J. G. H. Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology*. **1998**, *144*, 2961–2969.

Ashihara, H.; Li, X.-N.; Ukaji, T. Effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Ann. Bot.* **1988**, *61*, 225–232.

Assaf, S.; Hadar, Y.; Dosoretz, C. G. 1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinolate are products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 484–490.

Assaf, S.; Hadar, Y.; Dosoretz, C. G. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid, and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. *J. Agaric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2173–2178.

Awang, A. ナメコ菌糸体がリン酸欠乏で誘導する蛋白質の構造と機能に関する研究. 修士論文, 新潟大学大学院, **2002**.

Awang, A.; Karim, R.; Mitsui, T. Proteomic analysis of *Theobroma cacao* pod husk. *J. Appl. Glycosci.* **2010**, 57, 245–264.

Badings, H. T. Cold storage defects in butter and their relation to the autoxidation of unsaturated fatty acids. *Neth. Milk Dairy J.* **1970**, *24*, 149–257.

Bailey, M. J.; Askolin, S.; Hörhammer, N.; Tenkanen, M.; Linder, M.; Penttila, M.; Nakari-Sëtalä, T. Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 721–727.

Bairoch, A.; Bucher, P;. Hofmann, K. The PROSITE database, its status in 1997.

Nucleic Acids Res. **1997**, *25*, 217–221.

Baldwin, J. C.; Karthikeyan, A. S.; Raghothama, K. G. *LEPS2*, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 728–737.

Bannai, H.; Tamada, Y.; Maruyama, O.; Nakai, K.; Miyano, S. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 298–305.

Barber, S. A. Soil-plant interactions in the phosphorus nutrition of plants. In *Role of phosphorus in agriculture*. Khasawneh, F. E.; Sample, E. C.; Kamprath, E. J. Eds.; American Society of Agronomy, Wisconsin, USA, **1980**, pp 591–615.

Barber, S. A.; Walker, J. M.; Vasey, E. H. Mechanisms for the movement of plant nutrients from the soil and fertilizer to the plant root. *J. Agric. Food Chem.* **1963**, *11*, 204–207.

Bariola, P. A.; Howard, C. J.; Taylor, C. B.; Verburg, M. T.; Jaglan, V. D.; Green, P. J. The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* **1994**, *6*, 673–685.

Barrientos, L. G.; Gronenborn, A. M. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 21–31.

Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L. M.; Ferreira, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2742–2747.

Bauer, B.; Schwienbacher, M.; Broniszewska, M.; Israel, L.; Heesemann, J.; Ebel, F. Characterisation of the CipC-like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* **2010**, *53*, 296–304.

Baunaure, F.; Eldin, P.; Cathiard, A.-M.; Vial, H. Characterization of a non-mitochondrial type I phosphatidylserine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *51*, 33–46.

Beadle, G. W.; Tatum, E. L. Genetic control of biochemical reactions in Neurospora. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1941**, 27, 499–506.

Belinky, P. A.; Masaphy, S.; Levanon, D.; Hadar, Y.; Dosoretz, C. G. Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *40*, 629–633.

Beltran-Garcia, M. J.; Estarron-Espinosa, M.; Ogura, T. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4049–4052.

Ben-Aziz, A.; Grossman, S.; Ascarelli, I.; Budowski, P. Linoleate oxidation induced by

lipoxygenase and heme proteins: a direct spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 88–100.

Benedetto, A.; Magurno, F.; Bonfante, P.; Lanfranco, L. Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **2005**, *15*, 620–627.

Bernard, M.; Mouyna, I.; Dubreucq, G.; Debeaupuis, J. P.; Fontaine, T.; Vorgias, C.; Fuglsang, C.; Latgé, J. P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **2002**, *148*, 2819–2829.

Bessette, P. H.; Åslund, F.; Beckwith, J.; Georgiou, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 13703–13708.

Bieleski, R. I. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1973**, *24*, 225–252.

Bisakowski, B.; Atwal, A. S.; Kermasha, S. Characterization of lipoxygenase activity from a partially purified enzymic extract from *Morchella esculenta*. *Process Biochem.* **2000**, *36*, 1–7.

Bisakowski, B.; Kermasha, S.; Klopfenstein, M.-L. Partial purified lipoxygenase from *Fusarium oxysporum*: characterization and kinetic studies. *Process Biochem.* **1995**, *30*, 261–268.

Bjellqvist, B.; Basse, B.; Olsen, E.; Celis, J. E. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 529–539.

Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J. C.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 1023–1031.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911–917.

Blum, T.; Briesemeister, S.; Kohlbacher, O. MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 274.

Böhmer, M.; Colby, T.; Böhmer, C.; Bräutigam, A.; Schmidt, J.; Bölker, M. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* **2007**, *7*, 675–685.

Bolyard, M. G.; Sticklen, M. B. Expression of a modified Dutch elm disease toxin in

Escherichia coli. Mol. Plant Microbe Interact. **1992**, *5*, 520–524.

Bommarus, A. S.; Polizzi, K. M. Novel biocatalysts: recent developments. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1004–1016.

Bookstein, C.; Edwards, C. W.; Kapp, N. V.; Hulett, F. M. The *Bacillus subtilis* 168 alkaline phosphatase III gene: impact of a *phoAIII* mutation on total alkaline phosphatase synthesis. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 3730–3737.

Bosse, D.; Köck, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ.* **1998**, *21*, 325–332.

Bowman, E. J.; O'Neill, F. J.; Bowman, B. J. Mutations of *pma-1*, the gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase of *Neurospora crassa*, suppress inhibition of growth by concanamycin A, a specific inhibitor of vacuolar ATPases. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14776–14786.

Boyd, M. R.; Gustafson, K. R.; McMahon, J. B.; Shoemaker, R. H.; O'Keefe, B. R.; Mori, T.; Gulakowski, R. J.; Wu, L.; Rivera, M. I.; Laurencot, C. M.; Currens, M. J.; Cardellina, J. H. II; Buckheit, R. W. Jr.; Nara, P. L.; Pannell, L. K.; Sowder, R. C. II; Henderson, L. E. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1521–1530.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Breakspear, A.; Momany, M. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology* **2007**, *153*, 7–15.

Brodhun, F.; Feussner, I. Oxylipins in fungi. *FEBS J.* **2011**, *278*, 1047–1063.

Brodhun, F.; Göbel, C.; Hornung, E.; Feussner, I. Identification of PpoA from *Aspergillus nidulans* as a fusion protein of a fatty acid heme dioxygenase/peroxidase and a cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11792–11805.

Brodhun, F.; Schneider, S.; Göbel, C.; Hornung, E.; Feussner, I. PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem. *Biochem. J.* **2010**, *425*, 553–565.

Brown, H. C.; Garg, C. P. A simple procedure for the chromic acid oxidation of alcohols to ketones of high purity. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2952–2953.

Browse, J.; Xin, Z. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 241–246.

Büntgen, U.; Kauserud, H.; Egli, S. Linking climate variability to mushroom productivity and phenology. *Front. Ecol. Environ.* **2012**, *10*, 14–19.

Bun-ya, M.; Nishimura, M.; Harashima, S.; Oshima, Y. The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell Biol.* **1991**, *11*, 3229–3238.

Bun-ya, M.; Shikata, K.; Nakade, S.; Yompakdee, C.; Harashima, S.; Oshima, Y. Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 344–351.

Butschi, A.; Titz, A.; Wälti, M. A.; Olieric, V.; Paschinger, K.; Nöbauer, K.; Guo, X.; Seeberger, P. H.; Wilson, I. B.; Aebi, M.; Hengartner, M. O.; Künzler, M. *Caenorhabditis elegans* N-glycan core β-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000717.

Cannon, R. D.; Lamping, E.; Holmes, A. R.; Niimi, K.; Baret, P. V.; Keniya, M. V.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Goffeau, A.; Monk, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 291–321.

Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D233–D238.

Cantrell, C. L.; Case, B. P.; Mena, E. E.; Kniffin, T. M.; Duke, S. O.; Wedge, D. E. Isolation and identification of antifungal fatty acids from the basidiomycete *Gomphus floccosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5062–5068.

Champavier, Y.; Pommier, M.-T.; Arpin, N.; Voiland, A.; Pellon, G. 10-Oxo-*trans*-8-decenoic acid (ODA): production, biological activities, and comparison with other hormone-like substances in *Agaricus bisporus*. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 243–251.

Chang, S.-T.; Miles, P. G. Mushroom formation: effect of pests and diseases in mushroom cultivation. In *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, 2nd ed.; CRC Press, Florida, USA **2004**; pp 159–188.

Chaparro-Riggers, J. F.; Rogers, T.A.; Vazquez-Figueroa, E.; Polizzi, K.M.; Bommarius, A.S. Comparison of three enoate reductases and their potential use for biotransformations. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1521–1531.

Chapus, C.; Rovery, M.; Sarda, L.; Verger, R. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* **1988**, *70*, 1223–1234.

Cheawchanlertfa, P.; Cheevadhanarak, S.; Tanticharoen, M.; Maresca, B.; Laoteng, K. Up-regulated expression of desaturase genes of *Mucor rouxii* in response to low

temperature associates with pre-existing cellular fatty acid constituents. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 3455–3462.

Chen, C.-C.; Wu, C.-M. Studies on the enzymic reduction of 1-octen-3-one in mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1342–1344.

Cherry, J. M.; Adler, C.; Ball, C.; Chervitz, S. A.; Dwight, S. S.; Hester, E. T.; Jia, Y.; Juvik, G.; Roe, T.; Schroeder, M.; Weng, S.; Botstein, D. SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 73–79.

Chesnut, R. S.; Bookstein, C.; Hulett, F. M. Separate promoters direct expression of *phoAIII*, a member of the *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase multigene family, during phosphate starvation and sporulation. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2181–2190.

Cheung, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutr. Bull.* **2010**, *35*, 292–299.

Chiou, T.-J.; Liu, H.; Harrison, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant J.* **2001**, *25*, 281–293.

Chiron, N.; Michelot, D. Mushrooms odors, chemistry and role in the biotic interactions: a review. *Cryptogam. Mycol.* **2005**, *26*, 299–364.

Cho, I. H.; Namgung, H.-J.; Choi, H.-K.; Kim, Y.-S. Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chem.* **2008**, *106*, 71–76.

Christensen, S. A.; Kolomiets, M. V. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 4–14.

Chu, F.-H.; Wang, S.-Y.; Lee, L.-C.; Shaw, J.-F. Identification and characterization of a lipase gene from *Antrodia cinnamomea*. *Mycol. Res.* **2008**, *112*, 1421–1427.

Clancey, C. J.; Chang, S. C.; Dowhan, W. Cloning of a gene (*PSD1*) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant. *J Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24580–24590.

Claros, M. G.; Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 779–786.

Cohen, R.; Hadar, Y.; Yarden, O. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2+}. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 312–322.

Combet, E.; Henderson, J.; Eastwood, D. C.; Burton, K. S. Eight-carbon volatiles in fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience* **2006**, *47*, 317–326.

Combet, E.; Henderson, J.; Eastwood, D. C.; Burton, K. S. Influence of sporophore

development, damage, storage, and tissue specificity on the enzymic formation of volatiles in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3709–3717.

Cooke, R. C.; Whips, J. M. In *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Oxfordshire, UK, **1993**.

Cox, A. R.; Aldred, D. L.; Russell, A. B. Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 366–376.

Cox, A. R.; Cagnol, F.; Russell, A. B.; Izzard, M. J. Surface properties of class ii hydrophobins from *Trichoderma reesei* and influence on bubble stability. *Langmuir* **2007**, *23*, 7995–8002.

Cruz, C.; Noël-Subervill, C.; Montury, M. Fatty acid content and some flavor compound release in two strains of *Agaricus bisporus*, according to three stages of development. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 64–67.

Cruz-Ramírez, A.; Oropeza-Aburto, A.; Razo-Hernández, F.; Ramírez-Chávez, E.; Herrera-Estrella, L. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 6765–6770.

Culleré, L.; Ferreira, V.; Chevret, B.; Venturini, M. E.; Sánchez-Gimeno, A. C.; Blanco, D. Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chem.* **2010**, *12*, 300–306.

Daram, P.; Brunner, S.; Persson, B. L.; Amrhein, N.; Bucher, M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **1998**, *206*, 225–233.

Dassa, E.; Boquet, P. L. Identification of the gene appA for the acid phosphatase (pH optimum 2.5) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **1985**, *200*, 68–73.

Dawes, E. A.; Senior, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **1973**, *10*, 135–266.

de Castro, E.; Sigrist, C. J.; Gattiker, A.; Bulliard, V.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Hulo, N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W362–W365.

De Clercq, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 323–349.

de Pinho, P. G.; Ribeiro, B.; Gonçalves, R. F.; Baptista, P.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of

wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1704–1712.

de Vocht, M. L.; Reviakine, I.; Wösten, H. A. B.; Brisson, A.; Wessels, J. G. H.; Robillard, G. T. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28428–28432.

de Vries, O. M. H.; Moore, S.; Arntz, C.; Wessels, J. G. H.; Tudzynski, P. Identification and characterization of a tri-partite hydrophobin from *Claviceps fusiformis*: a novel type of class II hydrophobin. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262*, 377–385.

Dean, R. A.; Talbot, N. J.; Ebbole, D. J.; Farman, M. L.; Mitchell, T. K.; Orbach, M. J.; Thon, M. R.; Kulkarni, R.; Xu, J.-R.; Pan, H.; Read, N. D.; Lee, Y.-H.; Carbone, I.; Brown, D.; Oh, Y. Y.; Donofrio, N.; Jeong, J. S.; Soanes, D. M.; Djonovic, S.; Kolomiets, E.; Rehmeyer, C.; Li, W.; Harding, M.; Kim, S.; Lebrun, M.-H.; Bohnert, H.; Coughlan, S.; Butler, J.; Calvo, S. E.; Ma, L.-J.; Nicol, R.; Purcell, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J. E.; Birren, B. W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **2005**, *434*, 980–986.

del Pozo, J. C.; Allona, I.; Rubio, V.; Leyva, A.; de la Peña, A.; Aragoncillo, C.; Paz-Ares, J. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J.* **1999**, *19*, 579–589.

Delgado-Jarana, J.; Rincón, A. M.; Benítez, T. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology* **2002**, *148*, 1305–1315.'

Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253–2277.

Deshpande, R. A.; Shankar, V. Ribonucleases from T2 family. *Crit. Rev. Microbiol.* **2002**, *28*, 79–122.

Dey, B.; Lerner, D. L.; Lusso, P.; Boyd, M. R.; Elder, J. H.; Berger, E. A. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4562–4569.

Dimou, D. M.; Georgala, A.; Komaitis, M.; Aggelis, G. Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 925–929.

Doddapaneni, H.; Yadav, J. S. Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Genet. Genomics* **2005**, *274*, 454–466.

Dodds, P. N.; Clarke, A. E; Newbigin, E. Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana alata* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *31*, 227–238.

Dowhan, W.; Wickner, W. T.; Kennedy, E. P. Purification and properties of phosphatidylserine decarboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3079–3084.

Duff, S. M. G.; Moorhead, G. B. G.; Lefebvre, D. D. Plaxton, W. C. Phosphate starvation inducible 'bypasses' of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 1275–1278.

Dunlap, J. C.; Borkovich, K. A.; Henn, M. R.; Turner, G. E.; Sachs, M. S.; Glass, N. L.; McCluskey, K.; Plamann, M.; Galagan, J. E.; Birren, B. W.; Weiss, R. L.; Townsend, J. P.; Loros, J. J.; Nelson, M. A.; Lambreghts, R.; Colot, H. V.; Park, G.; Collopy, P.; Ringelberg, C.; Crew, C.; Litvinkova, L.; DeCaprio, D.; Hood, H. M.; Curilla, S.; Shi, M.; Crawford, M.; Koerhsen, M.; Montgomery, P.; Larson, L.; Pearson, M.; Kasuga, T.; Tian, C.; Baştürkmen, M.; Altamirano, L.; Xu, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. *Adv. Genet.* **2007**, *57*, 49–96.

Eder, S.; Shi, L.; Jensen, K.; Yamane, K.; Hulett, F. M. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, *phoD*. *Microbiology* **1996**, *142*, 2041–2047.

Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 1005–1016.

Enoki, A.; Tanaka, H.; Itakura, S. Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. *ACS Symp. Ser.* **2003**, *845*, 140–153.

Evans, M. V.; Turton, H. E.; Grant, C. M.; Dawes, I. W. Toxicity of linoleic acid hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a respiration-related process for maximal sensitivity and adaptive response. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 483–490.

Fäldt, J.; Jonsell, M.; Nordlander, G.; Borg-Karlso A.-K. Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their functions as insect attractants. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 567–590.

Fermor, T. R. Fungal enzymes produced during degradation of bacteria. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1983**, *80*, 357–360.

Fermor, T. R.; Wood, D. A.; Lincoln, S. P.; Fenlon, J. S. Bacteriolysis by *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 15–22.

Ferreira, T. C.; de Moraes, L. M, P.; Campos, E. G. Cell density-dependent linoleic acid toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2011**, *11*, 408-417.

Feussner, I.; Kühn, H.; Wasternack, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 268–273.

Fisher, E.; Almaguer, C.; Holic, R.; Griac, P.; Patton-Vogt, J. Glycerophosphocholine-dependent growth requires Gde1p (YPL110c) and Git1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36110–36117.

Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and sections. *Proc. Roy. Soc.* **1922**, *93*, 306–317.

Fouche, P. B.; Hash, J. H. The *N,O*-diacetylmuramidase of *Chalaropsis* species. Identificaiton of aspartyl and glutamyl residues in the active site. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6787–6793.

Fox, K. M.; Karplus, P. A. Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. *Structure* **1994**, *2*, 1089–1105.

Fraatz, M.A.; Riemer, S. J. L.;Stöber, R.; Kaspera, R.; Nimtz, M.; Berger, R. G.; Zorn, H. A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *61*, 202–207.

Fujinaga, M.; Cherney, M. M.; Oyama, H.; Oda, K.; James, M. N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 3364–3369.

Furihata, T.; Suzuki, M.; Sakurai, H. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol.* **1992**, *33*, 1151–1157.

Galagan, J. E.; Calvo, S. E.; Borkovich, K. A.; Selker, E. U.; Read, N. D.; Jaffe, D.; FitzHugh, W.; Ma, L. J.; Smirnov, S.; Purcell, S.; Rehman, B.; Elkins, T.; Engels, R.; Wang, S.; Nielsen, C. B.; Butler, J.; Endrizzi, M.; Qui, D.; Ianakiev, P.; Bell-Pedersen, D.; Nelson, M. A.; Werner-Washburne, M.; Selitrennikoff, C. P.; Kinsey, J. A.; Braun, E. L.; Zelter, A.; Schulte, U.; Kothe, G. O.; Jedd, G.; Mewes, W.; Staben, C.; Marcotte, E.; Greenberg, D.; Roy, A.; Foley, K.; Naylor, J.; Stange-Thomann, N.; Barrett, R.; Gnerre, S.; Kamal, M.; Kamvysselis, M.; Mauceli, E.; Bielke, C.; Rudd, S.; Frishman, D.; Krystofova, S.; Rasmussen, C.; Metzenberg, R. L.; Perkins, D. D.; Kroken, S; Cogoni, C.; Macino, G.; Catcheside, D.; Li, W.; Pratt, R. J.; Osmani, S. A.; DeSouza, C. P.; Glass, L.; Orbach, M. J.; Berglund, J. A.; Voelker, R.; Yarden, O.; Plamann, M.; Seiler, S.; Dunlap, J.; Radford, A.; Aramayo, R.; Natvig, D. O.; Alex, L. A.; Mannhaupt, G.; Ebbole, D.

J.; Freitag, M.; Paulsen, I.; Sachs, M. S.; Lander, E. S.; Nusbaum, C.; Birren, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **2003**, *422*, 859–868.

Galagan, J. E.; Calvo, S. E.; Cuomo, C.; Ma, L.-J.; Wortman, J. R.; Batzoglou, S.; Lee, S.-I.; Baştürkmen, M.; Spevak, C. C.; Clutterbuck, J.; Kapitonov, V.; Jurka, J.; Scazzocchio, C.; Farman, M.; Butler, J.; Purcell, S.; Harris, S.; Braus, G. H.; Draht, O.; Busch, S.; D'Enfert, C.; Bouchier, C.; Goldman, G. H.; Bell-Pedersen, D.; Griffiths-Jones, S.; Doonan, J. H.; Yu, J.; Vienken, K.; Pain, A.; Freitag, M.; Selker, E. U.; Archer, D. B.; Peñalva, M. A.; Oakley, B. R.; Momany, M.; Tanaka, T.; Kumagai, T.; Asai, K.; Machida, M.; Nierman, W. C.; Denning, D. W.; Caddick, M.; Hynes, M.; Paoletti, M.; Fischer, R.; Miller, B.; Dyer, P.; Sachs, M. S.; Osmani, S. A.; Birren, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **2005**, *438*, 1105–1115.

Gardner, H. W.; Grove, M. J.; Keller, N. P. Soybean lipoxygenase is active on nonaqueous media at low moisture: a constraint to xerophilic fungi and aflatoxins? *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1801–1808.

Gardner, W. K.; Parbery, D. G.; Barber, D. A. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. II: the effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* **1982**, *68*, 33–41.

Garscha, U.; Jernerén, F.; Chung, D.; Keller, N .P.; Hamberg, M.; Oliw, E. H. Identification of dioxygenases required for *Aspergillus* development: studies of products, stereochemistry, and the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34707–34718.

Garscha, U.; Oliw, E. H. Critical amino acids for the 8(*R*)-dioxygenase activity of linoleate diol synthase. A comparison with cyclooxygenases. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3547–3551.

Garscha, U.; Oliw, E. H. Leucine/valine residues direct oxygenation of linoleic acid by (10*R*)- and (8*R*)-dioxygenases: expression and site-directed mutagenesis of (10*R*)-dioxygenase with epoxyalcohol synthase activity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13755–13765.

Garscha, U.; Oliw, E. H. Steric analysis of 8-hydroxy- and 10-hydroxyoctadecadienoic acids and dihydroxyoctadecadienoic acids formed from 8*R*-hydroperoxyoctadecadienoic acid by hydroperoxide isomerases. *Anal. Biochem.* **2007**, *367*, 238–246.

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel R. D.; Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The*

proteomics protocols handbook; Walker J. M. Eds.; Humana Press, New Jersey, USA, **2005**; pp 571–607.

Gay, C.; Collins, J.; Gebicki, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 149–155.

Gebbink, M. F. B. G.; Claessen, D.; Bouma, B.; Dijkhuizen, L.; Wösten, H. A. B. Amyloids: a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 333–341.

Girard, V.; Fèvre, M.; Bruel, C. Involvement of cyclic AMP in the production of the acid protease Acp1 by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *237*, 227–233.

Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S. G. Life with 6000 genes. *Science* **1996**, *274*, 563–567.

Gomi, M.; Sonoyama, M.; Mitaku, S. High performance system for signal peptide prediction: SOSUIsignal. *Chem-Bio Inform. J.* **2004**, *4*, 142–147.

Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W695–W699.

Grant, W. D.; Prosser, B. A.; Asher, R. A. A bacteriolytic muramidase from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 2267-2273.

Green, P. J. The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1994**, *45*, 421–445.

Grigoriev, I. V.; Nordberg, H.; Shabalov, I.; Aerts, A.; Cantor, M.; Goodstein, D.; Kuo, A.; Minovitsky, S.; Nikitin, R.; Ohm, R. A.; Otillar, R.; Poliakov, A.; Ratnere, I.; Riley, R.; Smirnova, T.; Rokhsar, D.; Dubchak, I. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D26–D32.

Groenen, P. J. T. A.; Merck, K. B.; de Jong, W. W.; Bloemendal, H. Structure and modifications of the junior chaperone α-crystallin. from lens transparency to molecular pathology. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 1–19.

Gustafson, K. R.; Sowder, R. C. II; Henderson, L. E.; Cardellina, J. H. II; McMahon, J. B.; Rajamani, U.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R. Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *238*, 223–228.

Haas, H.; Redl, B.; Friedlin, E.; Stöffler, G. Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum phoA* gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene* **1992**, *113*, 129–133.

Haas, H.; Redl, B.; Leitner, E.; Stöffler, G. *Penicillium chrysogenum* extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1074*, 392–397.

Hadar, Y.; Cohen-Arazi, E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1352–1354.

Hahnen, E.; Znamenskaya, L.; Koczan, D.; Leshchinskaya, I.; Hobom, G. A novel secreted ribonuclease from *Bacillus intermedius*: gene structure and regulatory control. *Mol. Gen. Genet.* **2000**, *263*, 571–580.

Hall, D. R.; Beevor, P. S.; Cork, A.; Nesbitt, B. F.; Vale, G. A. 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Sci. Appl.* **1984**, *5*, 335v339.

Hall, M.; Stueckler, C.; Kroutil, W.; Macheroux, P.; Faber, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes OPR-1 and OPR-3 from *Lycopersicon esculentum* (tomato): a striking change of stereoselectivity. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3934–3937.

Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.

Hamberg, M.; Su, C.; Oliw, E. Manganese lipoxygenase: discovery of a bis-allylic hydroperoxide as product and intermediate in a lipoxygenase reaction. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13080–13088.

Hamberg, M.; Zhang, L. Y.; Brodowsky, I. D.; Oliw, E. H. Sequential oxygenation of linoleic acid in the fungus *Gaeumannomyces graminis*: stereochemistry of dioxygenase and hydroperoxide isomerase reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *309*, 77–80.

Harrison, M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, 59, 19–42.

Harrison, M. J.; van Buuren, M. L. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **1995**, *378*, 626–629.

Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurtner, D.; Buchner, J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 842–846.

Hawksworth, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate

revisited. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 1422–1432.

Heer, D.; Heine, D.; Sauer, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7631–7638.

Hektor, H. J.; Scholtmeijer, K. Hydrophobins: proteins with potential. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 1–6.

Helle, F.; Wychowski, C.; Vu-Dac, N.; Gustafson, K. R.; Voisset, C.; Dubuisson, J. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25177–25183.

Henrissat, B.; Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 781–788.

Henry, T. C.; Power, J. E.; Kerwin, C. L.; Mohammed, A.; Weissman, J. S.; Cameron, D. M.; Wykoff, D. D. Systematic screen of *Schizosaccharomyces pombe* deletion collection uncovers parallel evolution of the phosphate signal transduction pathway in yeasts. *Eukaryot. Cell* **2011**, *10*, 198–206.

Herrero-Garcia, E.; Garzia, A.; Cordobés, S.; Espeso, E. A.; Ugalde, U. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 393–400.

Hibbett, D.S.; Binder, M.; Bischoff, J. F.; Blackwell, M.; Cannon, P. F.; Eriksson, O. E.; Huhndorf, S.; James, T.; Kirk, P. M.; Lücking, R.; Lumbsch, H. T.; Lutzoni, F.; Matheny, P.'B.; McLaughlin, D. J.; Powell, M. J.; Redhead, S.; Schoch, C. L.; Spatafora, J. W.; Stalpers, J. A.; Vilgalys, R.; Aime, M. C.; Aptroot, A.; Bauer, R.; Begerow, D.; Benny, G. L.; Castlebury, L. A.; Crous, P. W.; Dai, Y. C.; Gams, W.; Geiser, D. M.; Griffith, G. W.; Gueidan, C.; Hawksworth, D. L.; Hestmark, G.; Hosaka, K.; Humber, R. A.; Hyde, K. D.; Ironside, J. E.; Kõljalg, U.; Kurtzman, C. P.; Larsson, K. H.; Lichtwardt, R.; Longcore, J.; Miadlikowska, J.; Miller, A.; Moncalvo, J. M.; Mozley-Standridge, S.; Oberwinkler, F.; Parmasto, E.; Reeb, V.; Rogers, J. D.; Roux, C.; Ryvarden, L.; Sampaio, J. P.; Schüssler, A.; Sugiyama, J.; Thorn, R. G.; Tibell, L.; Untereiner, W. A.; Walker, C.; Wang, Z.; Weir, A.; Weiss, M.; White, M. M.; Winka, K.; Yao, Y. J.; Zhang, N. A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509–547.

Hirokawa, T.; Boon-Chieng, S.; Mitaku, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **1998**, *14*, 378–379.

Höglund, A.; Dönnes, P.; Blum, T.; Adolph, H. W.; Kohlbacher, O. MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence

motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1158–1165.

Holford, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* **1997**, *35*, 227–239.

Hörnsten, L.; Su, C.; Osbourn, A. E.; Garosi, P.; Hellman, U.; Wernstedt, C.; Oliw, E. H. Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 28219–28224.

Horton, P.; Nakai, K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1997**, *5*, 147–152.

Horton, P.; Park, K. J.; Obayashi, T.; Fujita, N.; Harada, H.; Adams-Collier, C. J.; Nakai, K. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W585–W587.

Huang, C. F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Yano, M.; Nagamura, Y.; Ma, J. F. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* **2009**, *21*, 655–667.

Hunter, S.; Apweiler, R.; Attwood, T. K.; Bairoch, A.; Bateman, A.; Binns, D.; Bork, P.; Das, U.; Daugherty, L.; Duquenne, L.; Finn, R. D.; Gough, J.; Haft, D.; Hulo, N.; Kahn, D.; Kelly, E.; Laugraud, A.; Letunic, I.; Lonsdale, D.; Lopez, R.; Madera, M.; Maslen, J.; McAnulla, C.; McDowall, J.; Mistry, J.; Mitchell, A.; Mulder, N.; Natale, D.; Orengo, C.; Quinn, A. F.; Selengut, J. D.; Sigrist, C. J.; Thimma, M.; Thomas, P. D.; Valentin, F.; Wilson, D.; Wu, C. H.; Yeats, C. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D211–D215.

Husson, F.; Bompas, D.; Kermasha, S.; Belin, J. M. Biogeneration of 1-octen-3-ol by lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus*. *Process Biochem.* **2001**, *37*, 177–182.

Igarashi, K.; Kaneda, M.; Yamaji, A.; Saido, T. C.; Kikkawa, U.; Ono, Y.; Inoue, K.; Umeda, M. A novel phosphatidylserine-binding peptide motif defined by an anti-idiotypic monoclonal antibody: localization of phosphatidylserine-specific binding sites on protein kinase C and phosphatidylserine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29075–29078.

飯田親; 西井孝文; 伊藤進一郎; 久松眞 食用キノコ廃培地の活用法に関する研究: (第一報) 栽培キノコ菌糸体の簡易活性測定によるリグニン分解酵素群の検索. *三重大生物資源紀要.* **2001**, *27*, 77–83.

Inamdar, A. A.; Moore, J. C.; Cohen, R. I.; Bennett, J. W. A model to evaluate the cytotoxicity of the fungal volatile organic compound 1-octen-3-ol in human

embryonic stem cells. *Mycopathologia* **2012**, *173*, 13–20.

Ishihara, K.; Yamamoto, H.; Mitsuhashi, K.; Nishikawa, K.; Tsuboi, S.; Tsuji, H.; Nakajima, N. Purification and characterization of α-keto amide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 2306–2312.

Itakura, S.; Kankawa, T.; Nishiguchi, H.; Tanaka, T.; Tanaka, H.; Enoki, A. The waste of edible mushrooms (*Hypsizigus marmoreus*) affects differentiation and oviposition of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* **2008**, *52*, 67–80.

板倉修司 シロアリの木質バイオマス資源化機能を活用したきのこ廃菌床からのバイオディーゼル燃料の生産. *ウッディエンス メールマガジン* **2006**, *2*, 1–4.

伊東秀記; 稲熊裕; 加藤兼房 低分子量HSPと細胞内タンパク質凝集体. *日薬理誌.* **2003**, *121*, 27–32.

岩出亥之助 菌蕈類の特殊成分に關する研究 (第 3 報): 其の一"まつだけ"の香成分に就て (第 3 報). *日本林學會誌* **1937**, *19*, 414–420.

岩出亥之助 菌蕈類の特殊成分に關する研究 (第二報): 其一「まつだけ」の香成分に就て (第二報). *日本林學會誌* **1936**, *18*, 528–535.

Iwahashi, Y.; Hosoda, H.; Park, J. H.; Lee, J. H.; Suzuki, Y.; Kitagawa, E.; Murata, S. M.; Jwa, N. S.; Gu, M. B.; Iwahashi, H. Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1936–1942.

Iwasaki, W.; Miki, K. Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 123–136.

Javot, H.; Pumplin, N.; Harrison, M. J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* **2007**, *30*, 310–322.

Jeffries, T. W.; Choi, S.; Kirk, T. K. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42*, 290–296.

Jeleń, H. H. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *36*, 263–267.

Jensen, E. C.; Ogg, C.; Nickerson, K. W. Lipoxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2505–2508.

Jensen, K.; Østergaard, P. R.; Wilting, R.; Lassen, S. F. Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. *BMC Biochem.* **2010**, *11*, 47.

Jernerén, F.; Garscha, U.; Hoffmann, I.; Hamberg, M.; Oliw, E. H. Reaction mechanism of 5,8-linoleate diol synthase, 10*R*-dioxygenase, and 8,11-hydroperoxide

isomerase of *Aspergillus clavatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 503–507.

Joensuu, J. J.; Conley, A. J.; Lienemann, M.; Brandle, J. E.; Linder, M. B.; Menassa, R. Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 622–633.

Joh, T.; Malick, D. H.; Yazaki, J.; Hayakawa, T. Purification and characterization of secreted acid phosphatase under phosphate-deficient condition in *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **1996**, *37*, 65–70.

Joh, T.; Tasaki, Y.; Hara, T.; Hayakawa, T. Induction and secretion of RNA-degrading enzymes by phosphate deficiency in *Pholiota nameko*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2561–2564.

Joh, T.; Tasaki, Y.; Yazaki, J.; Hayakawa, T. Electrophoretic analysis of soluble proteins specifically synthesized under phosphate deficiency in the mycelia of *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **1998a**, *39*, 195–198.

Joh, T.; Yazaki, J.; Suzuki, K.; Hayakawa, T. Isolation and properties of glucose-1-phosphatase from mycelia of *Pholiota nameko*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998b**, *62*, 2251–2253.

Johnson, J. F.; Vance, C. P.; Allan, D. L. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 31–41.

Jolles, P. Lysozymes: a chapter of moleculer biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 227–239.

Kalač, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 9–16.

Kämper, J.; Kahmann, R.; Bölker, M.; Ma, L.-J.; Brefort, T.; Saville, B. J.; Banuett, F.; Kronstad, J. W.; Gold, S. E.; Müller, O.; Perlin, M. H.; Wösten, H. A. B.; de Vries, R.; Ruiz-Herrera, J.; Reynaga-Peña, C. G.; Snetselaar, K.; McCann, M.; Pérez-Martín, J.; Feldbrügge, M.; Basse, C. W.; Steinberg, G.; Ibeas, J. I.; Holloman, W.; Guzman, P.; Farman, M.; Stajich, J. E.; Sentandreu, R.; González-Prieto, J. M.; Kennell, J. C.; Molina, L.; Schirawski, J.; Mendoza-Mendoza, A.; Greilinger, D.; Münch, K.; Rössel, N.; Scherer, M.; Vranes, M.; Ladendorf, O.; Vincon, V.; Fuchs, U.; Sandrock, B.; Meng, S.; Ho, E. C.; Cahill, M. J.; Boyce, K. J.; Klose, J.; Klosterman, S. J.; Deelstra, H. J.; Ortiz-Castellanos, L.; Li, W.; Sanchez-Alonso, P.; Schreier, P. H.; Häuser-Hahn, I.; Vaupel, M.; Koopmann, E.; Friedrich, G.; Voss, H.; Schlüter, T.; Margolis, J.; Platt, D.; Swimmer, C.; Gnirke, A.; Chen, F.; Vysotskaia, V.; Mannhaupt, G.; Güldener, U.; Münsterkötter, M.; Haase, D.; Oesterheld, M.; Mewes, H. W.;

Mauceli, E. W.; DeCaprio, D.; Wade, C. M.; Butler, J.; Young, S.; Jaffe, D. B.; Calvo, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J.; Birren, B. W. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **2006**, *444*, 97–101.

Kaneko, Y.; Hayashi, N.; Toh-e, A.; Banno, I.; Oshima, Y. Structural characteristics of the *PHO8* gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **1987**, *58*, 137–148.

Kaneko, Y.; Tamai, Y.; Toh-e, A.; Oshima, Y. Transcriptional and post-translational control of *PHO84* expression by *PHO* regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **1985**, *5*, 548–525.

Kaneko, Y.; Toh-e, A.; Oshima, Y. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **1982**, *2*, 127–137.

Kapp, N. V.; Edwards, C. W.; Chesnut, R. S.; Hulett, F. M. The *Bacillus subtilis phoAIV* gene: effects of in vitro inactivation on total alkaline phosphatase production. *Gene* **1990**, *96*, 95–100.

Karandashov, V.; Bucher, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 22–29.

Karplus, P. A.; Fox, K. M.; Massey. V. Flavoprotein structure and mechanism 8. Structure-function relations for old yellow enzyme. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1518–1526.

Kataoka, M.; Kotaka, A.; Hasegawa, A.; Wada, M; Yoshizumi, A.; Nakamori, S.; Shimizu, S: Old yellow enzyme from *Candida macedoniensis* catalyzes the stereospecific reduction of the C=C bond of ketoisophorone. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 2651–2657.

片岡道彦 不斉水素添加触媒として注目される「旧黄色酵素 (Old Yellow Enzyme)」. *ビタミン* **2007**, *81*, 631–633.

Kaur, P.; Lingner, A.; Singh, B.; Böer, E.; Polajeva, J.; Steinborn, G.; Bode, R.; Gellissen, G.; Satyanarayana, T.; Kunze, G. *APHO1* from the yeast *Arxula adeninivorans* encodes an acid phosphatase of broad substrate specificity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2007**, *91*, 45–55.

Kauserud, H.; Stige, L. C.; Vik, J. O.; Okland, R. H.; Høiland, K.; Stenseth, N. C. Mushroom fruiting and climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 3811–3814.

Kehr, J. C.; Zilliges, Y.; Springer, A.; Disney, M. D.; Ratner, D. D.; Bouchier, C.; Seeberger, P. H.; de Marsac, N. T.; Dittmann, E. A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 893–906.

Kermasha, S.; Perraud, X.; Bisakowski B.; Husson, F. Production of flavor compounds by hydroperoxide lyase from enzymatic extracts of *Penicillium* sp.. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19*, 479–487.

Keyser, P.; Kirk, T. K.; Zeikus, J. G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **1978**, *135*, 790–797.

Khan, F.; Khan, M. I. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. *Int. J. Biol. Chem.* **2011**, *5*, 1–20.

Kim, J. L.; Elfman, L.; Mi, Y.; Wieslander, G.; Smedje, G.; Norbäck, D. Indoor molds, bacteria, microbial volatile organic compounds and plasticizers in schools: associations with asthma and respiratory symptoms in pupils. *Indoor Air* **2007**, *17*, 153–163.

Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; David, J. C.; Stalpers, J. A. In *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*, 9th ed.; CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, **2001**.

Kirkland, B. H.; Keyhani, N. O. Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 327–335.

北本大 バイオサーファクタントの意外な展開. *化学と生物* **2003**, *41*, 410–416.

北本大 生物が作り出す自己組織化材料: バイオサーファクタントの多彩な機能とその応用. *藥學雜誌* **2008**, *128*, 695–706.

Kitamura, H.; Wu, W.-I.; Voelker, D. R. The C2 domain of phosphatidylserine decarboxylase 2 is not required for catalysis but is essential for *in vivo* function. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33720–33726.

Klimes, A.; Amyotte, S. G.; Grant, S.; Kang, S.; Dobinson, K. F. Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene *VDH1*. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 1525–1532.

Kobayashi, H.; Sekibata, S.; Shibuya, H.; Yoshida, S.; Kusakabe, I.; Murakami, K. Cloning and sequence analysis of cDNA for *Irpex lacteus* aspartic proteinase. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 1927–1933.

Kobayashi, Y.; Hirabayashi, J.; Tateno, H.; Kawagishi, H.; Dohra, H. L-Fucose alpha1-6 specific lectin. US 2011/0129938 A1, Jun 2, **2011**.

小林康一; 太田啓之 リン酸欠乏時における膜脂質合成系の代謝変動と植物ホルモンによる制御. *日農化会誌.* **2004**, *78*, 977–980.

小林夕香; 平林淳; 館野浩章; 河岸洋和; 道羅英夫 (株式会社 J-オイルミルズ; 独立行政法人産業技術総合研究所; 国立大学法人静岡大学). フコース

α1→6 特異的レクチン. 公開特許公報 JP 4514163 B2 20100728, **2010**.

Koch, C.; Fielding, A. J.; Brodhun, F.; Bennati, M.; Feussner, I. Linoleic acid positioning in psi factor producing oxygenase A, a fusion protein with an atypical cytochrome P450 activity. *FEBS J.* [Online early access]. DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08352.x.Published Online: Oct 7, 2011. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2011.08352.x/full (accessed Feb 6, 2012).

Köck, M.; Löffler, A.; Abel, S.; Glund, K. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol. Biol.* **1995**, *27*, 477–485.

Koharudin, L. M. I.; Viscomi, A. R.; Jee, J.-G.; Ottonello, S.; Gronenborn, A. M. The evolutionarily conserved family of cyanovirin-N homologs: structures and carbohydrate specificity. *Structure* **2008**, *16*, 570–584.

国立科学博物館 In *菌類のふしぎ: 形とはたらきの驚異の多様性*. 東海大学出版会, 神奈川, **2008**.

Korczynska, J. E.; Danielsen, S.; Schagerlöf, U.; Turkenburg, J. P.; Davies, G. J.; Wilson, K. S.; Taylor, E. J. The structure of a family GH25 lysozyme from *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66*, 973–977.

Kosugi, S.; Hasebe, M.; Tomita, M.; Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 10171–10176.

小山博之 植物の生育と栄養システム: リンの役割. In *植物栄養学*. 森敏; 前忠彦; 米山忠克 編, 分永堂出版, 東京, **2001**, pp 123–131.

Krügener, S.; Krings, U.; Zorn, H.; Berger, R. G. A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 457–462.

Kües, U.; Liu, Y. Fruiting body production in Basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 141–152.

Kulakovskaya, T. V.; Lichko, L. P.; Vagabov, V. M.; Kulaev, I. S. Inorganic polyphosphates in mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* **2010**, *75*, 825–831.

Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **1994**, *10*, 189–191.

Kuribayashi, T.; Kaise, H.; Uno, C.; Hara, T.; Hayakawa, T.; Joh, T. Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1247–1253.

栗林喬 ヒラタケにおける 1-オクテン-3-オールの生合成機構の解明. 修士論文, 新潟大学大学院, **2003**.

Kurtzman, R. H. Jr. Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. *Mycoscience* **1997**, *38*, 247–253.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.

Lagerstedt, J. O.; Voss, J. C.; Wieslander, Å.; Persson, B. L. Structural modeling of dual-affinity purified Pho84 phosphate transporter. *FEBS Lett.* **2004**, *578*, 262–268.

Lahtinen, T.; Linder, M. B.; Nakari-Setälä, T.; Oker-Blom, C. Hydrophobin (HFBI): a potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein Expres. Purif.* **2008**, *59*, 18–24.

Lakhanpal, T. N.; Rana M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genet. Resour.* **2005**, *3*, 288–303.

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948.

Larsen, T. O.; Frisvad, J. C. Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *J. Microbiol. Methods* **1995**, *24*, 135–144.

Lee, D.-S.; Nioche, P.; Hamberg, M.; Raman, C. S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature* **2008**, *455*, 363–368.

Lee, J. Y.; Kwak, J. E.; Moon, J.; Eom, S. H.; Liong, E. C.; Pedelacq, J.-D.; Berendzen, J.; Suh, S. W. Crystal structure and functional analysis of the SurE protein identify a novel phosphatase family. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 789–794.

Lee, K. J.; Yun, I. J.; Kim, K. H.; Lim, S. H.; Ham, H. J.; Eum, W. S.; Joo, J. H. Amino acid and fatty acid compositions of Agrocybe chaxingu, an edible mushroom. *J. Food Comp. Anal.* **2011**, *24*, 175–178.

Lei, Z.; Dai, Y. An SVM-based system for predicting protein subnuclear localizations. *BMC Bioinformatics* **2005**, *6*, 291.

Lei, Z.; Dai, Y. Assessing protein similarity with Gene Ontology and its use in subnuclear localization prediction. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 491.

Lenburg, M. E.; O'Shea, E. K. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 383–387.

Letunic, I.; Doerks, T.; Bork, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D302–D305.

Li, C.; Ichikawa, J. K.; Ravetto, J. J.; Kuo, H.-C.; Fu, J. C.; Clarke, S. A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **1994a**, *176*, 6015–6022.

Li, C.; Wu, P. Y.; Hsieh, M. Growth-phase-dependent transcriptional regulation of the pcm and surE genes required for stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Microbiology* **1997**, *143*, 3513–3520.

Li, D.-C.; Lui, Z.-W. ; Lu J. Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 190–194.

Li, D.; Alic, M.; Gold, M. H. Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994b**, *60*, 3447–3449.

Li, L.; Qiu, X.; Li, X.; Wang, S.; Lian, X. The expression profile of genes in rice roots under low phosphorus stress. *Sci. China C Life Sci.* **2009**, *52*, 1055–1064.

Li, M.; Qin, C.; Welti, R.; Wang, X. Double knockouts of phospholipases Dζ1 and Dζ2 in Arabidopsis affect root elongation during phosphate-limited growth but do not affect root hair patterning. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 761–770.

Lincoln, S. P.; Fermor, T. R.; Wood, D. A. Production and detection of muramidase and acetylglucosaminidase from *Agaricus bisporus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *25*, 24–29.

Linder, M. B.; Szilvay, G. R.; Nakari-Setälä, T.; Penttilä, M. E.; Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microb. Rev.* **2005**, *29*, 877–896.

Lindquist, S.; Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22*, 631–677.

Lizárraga-Guerra, R.; Guth, H.; López, M. G. Identification of the most potent odorants in huitlacoche (*Ustilago maydis*) and austern pilzen (*Pleurotus* sp.) by aroma extract dilution analysis and static head-space samples. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1329–1332.

Löffler, A.; Abel, S.; Jost, W.; Beintema, J. J.; Glund, K. Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol.* **1992**, *98*, 1472–1478.

Loftus, B. J.; Fung, E.; Roncaglia, P.; Rowley, D.; Amedeo, P.; Bruno, D.; Vamathevan, J.; Miranda, M.; Anderson, I. J.; Fraser, J. A.; Allen, J. E.; Bosdet, I. E.; Brent, M. R.; Chiu, R.; Doering, T. L.; Donlin, M. J.; D'Souza, C. A.; Fox, D. S.; Grinberg, V.; Fu, J.; Fukushima, M.; Haas, B. J.; Huang, J. C.; Janbon, G.; Jones, S. J.; Koo, H. L.; Krzywinski, M. I.; Kwon-Chung, J. K.; Lengeler, K. B.; Maiti, R.; Marra, M. A.; Marra, R. E.; Mathewson, C. A.; Mitchell, T. G.; Pertea, M.; Riggs, F. R.; Salzberg, S. L.; Schein, J. E.; Shvartsbeyn, A.; Shin, H.; Shumway, M.; Specht, C.

A.; Suh, B. B.; Tenney, A.; Utterback, T. R.; Wickes, B. L.; Wortman, J. R.; Wye, N. H.; Kronstad, J. W.; Lodge, J. K.; Heitman, J.; Davis, R. W.; Fraser, C. M.; Hyman, R. W. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **2005**, *307*, 1321–1324.

Los, D. A.; Murata, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1394*, 3–15.

Louche, J.; Ali, M. A.; Cloutier-Hurteau, B.; Sauvage, F. X.; Quiquampoix, H.; Plassard, C. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2010**, *73*, 323–335.

Lucau-Danila, A.; Delaveau, T.; Lelandais, G.; Devaux, F.; Jacq, C. Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52641–52650.

Lugones, L. G.; Bosscher, J. S.; Scholtmeyer, K.; de Vries, O. M. H; Wessels, J. G. H. An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* **1996**, *142*, 1321–1329.

Lugones, L. G.; Wösten, H. A. B.; Wessels, J. G. H. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* **1998**, *144*, 2345–2353.

Luhtala, N.; Parker, R. T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 253–259.

Lumsdon, S. O.; Green, J.; Stieglitz, B. Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2005**, *44*, 172–178.

Ma, A. M.; Shan, L. J.; Wang, H. J.; Du, Z. P.; Xie, B. J. Partial characterization of a hydrophobin protein Po.HYD1 purified from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 501–507.

Ma, A.; Shan, L.; Wang, N.; Zheng, L.; Chen, L.; Xie, B. Characterization of a *Pleurotus ostreatus* fruiting body-specific hydrophobin gene, *Po.hyd. J. Basic Microbiol.* **2007**, *47*, 317–324.

Ma, R.-C.; Oliveira, M. M. The RNase PD2 gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionarily distinct class of S-like RNase genes. *Mol. Gen. Genet.* **2000**, 263, 925–933.

馬建鋒; 山地直樹 植物におけるミネラル関連トランスポーター. *植物の生長調節* **2010**, *45*, 49–57.

Machida, M.; Asai, K.; Sano, M.; Tanaka, T.; Kumagai, T.; Terai, G.; Kusumoto, K.;

Arima, T.; Akita, O.; Kashiwagi, Y.; Abe, K.; Gomi, K.; Horiuchi, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Takeuchi, M.; Denning, D. W.; Galagan, J. E.; Nierman, W. C.; Yu, J.; Archer, D. B.; Bennett, J. W.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T. E.; Fedorova, N. D.; Gotoh, O.; Horikawa, H.; Hosoyama, A.; Ichinomiya, M.; Igarashi, R.; Iwashita, K.; Juvvadi, P. R.; Kato, M.; Kato, Y.; Kin, T.; Kokubun, A.; Maeda, H.; Maeyama, N.; Maruyama, J.; Nagasaki, H.; Nakajima, T.; Oda, K.; Okada, K.; Paulsen, I.; Sakamoto, K.; Sawano, T.; Takahashi, M.; Takase, K.; Terabayashi, Y.; Wortman, J. R.; Yamada, O.; Yamagata, Y.; Anazawa, H.; Hata, Y.; Koide, Y.; Komori, T.; Koyama, Y.; Minetoki, T.; Suharnan, S.; Tanaka, A.; Isono, K.; Kuhara, S.; Ogasawara, N.; Kikuchi, H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **2005**, *438*, 1157–1161.

MacRae, W. D.; Buxton, F. P.; Sibley, S.; Garven, S.; Gwynne, D. I.; Davies, R. W.; Arst, H. N. Jr. A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. *Gene* **1988**, *71*, 339–348.

Maga, J. A. Mushroom flavor. *J. Agric. Food Chem.***1981**, *29*, 1–4.

Mahmood, T.; Safdar, W.; Abbasi, B. H.; Naqvi, S. M. S. An overview on the small heat shock proteins. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 927–949.

Makishima, S.; Nozaki, K.; Mizuno, M.; Netsu, E.; Shinji, K.; Shibayama, T.; Kanda, T.; Amano, Y. Recovery of soluble sugars from waste medium for enokitake (*Flammulina velutipes*) mushroom cultivation with hydrothermal reaction and enzyme digestion. *J. Appl. Glycosci.* **2006**, *53*, 261–266.

Maldonado-Mendoza, I. E.; Dewbre, G. R.; Harrison, M. J. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2001**, *14*, 1140–1148.

Manning, K. Food value and chemical composition. In *Biology and technology of the cultivated mushroom*; Flegg, P. B.; Spencer, D. M,; Wood, D. A., Eds.; Wiley, Chichester, West Sussex, UK, **1985**; pp 211–230.

Mano, J.; Torii, Y.; Hayashi, S.; Takimoto, K.; Matsui, K.; Nakamura, K.; Inzé, D.; Babiychuk, E.; Kushnir, S.; Asada, K. The NADPH:quinone oxidoreductase P1-ζ-crystallin in *Arabidopsis* catalyzes the *α,β*-hydrogenation of 2-alkenals: detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 1445–1455.

Marchler-Bauer, A.; Bryant, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W327–W331.

Marchler-Bauer, A.; Lu, S.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.;

DeWeese-Scott, C.; Fong, J. H.; Geer, L. Y.; Geer, R. C.; Gonzales, N. R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D. I.; Jackson, J. D.; Ke, Z.; Lanczycki, C. J.; Lu, F.; Marchler, G. H.; Mullokandov, M.; Omelchenko, M. V.; Robertson, C. L.; Song, J. S.; Thanki, N.; Yamashita, R. A.; Zhang, D.; Zhang, N.; Zheng, C.; Bryant, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D225–D229.

Martin, F.; Aerts, A.; Ahrén, D.; Brun, A.; Danchin, E. G. J.; Duchaussoy, F.; Gibon, J.; Kohler, A.; Lindquist, E.; Pereda, V.; Salamov, A.; Shapiro, H. J.; Wuyts, J.; Blaudez, D.; Buée, M.; Brokstein, P.; Canbäck, B.; Cohen, D.; Courty, P. E.; Coutinho, P. M.; Delaruelle, C.; Detter, J. C.; Deveau, A.; DiFazio, S.; Duplessis, S.; Fraissinet-Tachet, L.; Lucic, E.; Frey-Klett, P.; Fourrey, C.; Feussner, I.; Gay, G.; Grimwood, J.; Hoegger, P. J.; Jain, P.; Kilaru, S.; Labbé, J.; Lin, Y. C.; Legué, V.; Le Tacon, F.; Marmeisse, R.; Melayah, D.; Montanini, B.; Muratet, M.; Nehls, U.; Niculita-Hirzel, H.; Oudot-Le Secq, M. P.; Peter, M.; Quesneville, H.; Rajashekar, B.; Reich, M.; Rouhier, N.; Schmutz, J.; Yin, T.; Chalot, M.; Henrissat, B.; Kües, U.; Lucas, S.; Van de Peer, Y.; Podila, G. K.; Polle, A.; Pukkila, P. J.; Richardson, P. M.; Rouzé, P.; Sanders, I. R.; Stajich, J. E.; Tunlid, A.; Tuskan, G.; Grigoriev, I. V. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **2008**, *452*, 88–92.

Martin, F.; Cullen, D.; Hibbett, D.; Pisabarro, A.; Spatafora, J. W.; Baker, S. E.; Grigoriev, I. V. Sequencing the fungal tree of life. *New Phytol.* **2011**, *190*, 818–821.

Martin, F.; Kohler, A.; Murat, C.; Balestrini, R.; Coutinho, P. M.; Jaillon, O.; Montanini, B.; Morin, E.; Noel, B.; Percudani, R.; Porcel, B.; Rubini, A.; Amicucci, A.; Amselem, J.; Anthouard, V.; Arcioni, S.; Artiguenave, F.; Aury, J. M.; Ballario, P.; Bolchi, A.; Brenna, A.; Brun, A.; Buée, M.; Cantarel, B.; Chevalier, G.; Couloux, A.; Da Silva, C.; Denoeud, F.; Duplessis, S.; Ghignone, S.; Hilselberger, B.; Iotti, M.; Marçais, B.; Mello, A.; Miranda, M.; Pacioni, G.; Quesneville, H.; Riccioni, C.; Ruotolo, R.; Splivallo, R.; Stocchi, V.; Tisserant, E.; Viscomi, A. R.; Zambonelli, A.; Zampieri, E.; Henrissat, B.; Lebrun, M. H.; Paolocci, F.; Bonfante, P.; Ottonello, S.; Wincker, P. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **2010**, *464*, 1033–1038.

Martinez, D.; Challacombe, J.; Morgenstern, I.; Hibbett, D.; Schmoll, M.; Kubicek, C. P.; Ferreira, P.; Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, A. T.; Kersten, P.; Hammel, K. E.; Vanden Wymelenberg, A.; Gaskell, J.; Lindquist, E.; Sabat, G.; Bondurant, S. S.; Larrondo, L. F.; Canessa, P.; Vicuna, R.; Yadav, J.; Doddapaneni, H.;

Subramanian, V.; Pisabarro, A. G.; Lavín, J. L.; Oguiza, J. A.; Master, E.; Henrissat, B.; Coutinho, P. M.; Harris, P.; Magnuson, J. K.; Baker, S. E.; Bruno, K.; Kenealy, W.; Hoegger, P. J.; Kües, U.; Ramaiya, P.; Lucas, S.; Salamov, A.; Shapiro, H.; Tu, H.; Chee, C. L.; Misra, M.; Xie, G.; Teter, S.; Yaver, D.; James, T.; Mokrejs, M.; Pospisek, M.; Grigoriev, I. V.; Brettin, T.; Rokhsar, D.; Berka, R.; Cullen, D. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 1954–1959.

Martinez, D.; Larrondo, L. F.; Putnam, N.; Gelpke, M. D.; Huang, K.; Chapman, J.; Helfenbein, K. G.; Ramaiya, P.; Detter, J. C.; Larimer, F.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; Berka, R.; Cullen, D.; Rokhsar, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 695–700.

Martinez, P.; Persson, B. L. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na^+-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **1998**, *258*, 628–638.

Masaoka, Y.; Kojima, M.; Sugihara, S.; Yoshihara, T.; Koshino, M. Dissolution of ferric phosphate by alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates. *Plant Soil* **1993**, *155/156*, 75–78.

Matsuda, Y.; Beppu, T.; Arima, K. Circular dichroism of *Fusarium* lipoxygenase from *Fusarium oxysporum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978a**, *85*, 203–208.

Matsuda, Y.; Beppu, T.; Arima, K. Crystallization and positional specificity of hydroperoxidation of *Fusarium* lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1978b**, *530*, 439–450.

Matsuda, Y.; Satoh, T.; Beppu, T.; Arima, K. Purification and properties of Co^{2+} requiring heme protein having lipoxygenase activity from *Fusarium oxysporum*. *Agr. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 963–976.

Matsui, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 274–280.

Matsui, K.; Sasahara, S.; Akakabe, Y.; Kajiwara, T. Linoleic acid 10-hydroperoxide as an intermediate during formation of 1-octen-3-ol from linoleic acid in *Lentinus decadetes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2280–2282.

Mattila, P.; Suonpää, K.; Piironen, V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **2000**, *16*, 694–696.

Mau, J.-L.; Beelman, R. B.; Ziegler, G. R. 1-Octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Food Sci.* **1992a**, *57*, 704–706.

Mau, J.-L.; Beelman, R. B.; Ziegler, G. R. Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* **1992b**, *31*, 4059–4064.

Mau, J.-L.; Li, J.-Y. Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth of *Agrocybe cylindracea*. *Mushroom Res.* **1999**, *8*, 47–54.

Mau, J.-L.; Ma, J.-T. Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on growth ofseveral mushroom mycelia. *Fung. Sci.* **2001**, *16*, 1–12.

Mau, J.-L.; Ma, J.-T. Effect of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid on mycelial growth of *Pleurotus eryngii*. *Fung. Sci.* **2002**, *17*, 1–9.

Mau, J.; Beelman, R. B.; Ziegler, G. R. Aroma and flavor components of cultivated mushrooms. *Dev. Food Sci.* **1994**, *34*, 657–684.

May, S. W.; Steltenkamp, M. S.; Borah, K. R.; Katopodis, A. G.; Thowsen, J. R. Enzymatic production of saturated ketones from allylic alcohols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 845–846.

Meade, E. A.; Smith, W. L.; DeWitt, D. L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6610–6614.

Melin, P.; Schnürer, J.; Wagner, E. G. H. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol. Genet. Genomics* **2002**, *267*, 695–702.

Miquel, M. F.; Browse, J. A. High-oleate oilseeds fail to develop at low temperature. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 421–427.

宮川洋三 *Candida albicans* リン酸代謝制御系 (PHO システム) における負の制御因子 CaPho85 の性状解析. *真菌誌.* **2003**, *44*, 101–105.

Miyazaki, Y.; Nakamura, M.; Babasaki, K. Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, *42*, 493–505.

Miyazaki, Y.; Sunagawa, M.; Higashibata, A.; Ishioka, N.; Babasaki, K.; Yamazaki, T. Differentially expressed genes under simulated microgravity in fruiting bodies of the fungus *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *307*, 72–79.

Möller, S.; Croning, M. D.; Apweiler, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 646–653.

Montanini, B.; Gabella, S.; Abba, S.; Peter, M.; Kohler, A.; Bonfante, P.; Chalot, M.; Martin, F.; Ottonello, S. Gene expression profiling of the nitrogen starvation stress response in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal Genet. Biol.* **2006**, *43*, 630–641.

Moralejo, F. J.; Cardoza, R. E.; Gutierrez, S.; Lombraña, M.; Fierro, F.; Martín, J. F. Silencing of the aspergillopepsin B (*pepB*) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3550–3559.

Morel, M.; Jacob, C.; Kohler, A.; Johansson, T.; Martin, F.; Chalot, M.; Brun, A. Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 382–391.

Morita, K.; Kobayashi, S. Isolation, structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 988–993.

Mosandl, A.; Heusinger, G.; Gessner, M. Analytical and sensory differentiation of 1-octen-3-ol enantiomers. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 119–122.

Mouillon, J.-M.; Persson, B. L. New aspects on phosphate sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 171–176.

Müller, A.; Hauer, B.; Rosche, B. Asymmetric alkene reduction by yeast old yellow enzymes and by a novel *Zymomonas mobilis* reductase. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 22–29.

Muñoz, G.; Nakari-Setälä, T.; Agosin, E.; Penttilä, M. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* **1997**, *32*, 225–230.

Mura, C.; Katz, J. E.; Clarke, S. G.; Eisenberg, D. Structure and function of an archaeal homolog of survival protein E (SurEα): an acid phosphatase with purine nucleotide specificity. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1559–1575.

村橋俊介 松茸の香気成分の研究. *理研彙報.* **1936**, *15*, 1186–1196.

村橋俊介 松茸香気成分の研究 (続報). *理研彙報.* **1937**, *16*, 548–561.

Murao, S.; Oda, K.; Matsushita, Y. New acid proteases from *Scytalidium lignicolum* M-133. *Agric. Biol. Chem.* **1972**, *36*, 1647–1650.

Murcia, M. A.; Martínez-Tomé, M.; Vera, A.; Morte, A.; Gutierrez, A.; Honrubia, M.; Jiménez, A. M. Effect of industrial processing on desert truffles *Terfezia claveryi* Chatin and *Picoa juniperi* Vittadini): proximate composition and fatty acids. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 535–541.

長田嘉穂 キノコのレクチンの働きを探る. *化学と生物* **2000**, *38*, 368–373.

長田嘉穂 菌類のレクチン: その分布,構造,機能および新しい分類基準の提案. *食と緑の科学* **2006**, *60*, 1–18.

Nakai, K.; Horton, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and

predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 34–36.

Nakari-Setälä T.; Azeredo J.; Henriques M.; Oliveira R.; Teixeira J.; Linder M.; Penttilä M. Expression of a fungal hydrophobin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effect on cell surface properties and immobilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3385–3391.

Nakari-Setälä, T.; Aro, N.; Ilmén, M.; Muñoz, G.; Kalkkinen, N.; Penttilä, M. Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*: cloning and characterization of the *hfb2* gene. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *1*, 415–423.

Nakari-Sëtalä, T.; Aro, N.; Kalkkinen, N.; Alatalo, E.; Penttila, M. Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei hydrophobin* HFBI. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 248–255.

Neda, H. Correct name for "nameko". *Mycoscience* **2008**, *49*, 88–91.

Nemcovic, M.; Jakubíková, L.; Víden, I.; Farkas, V. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp.. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *284*, 231–236.

Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1–6.

Nierman, W. C.; Pain, A.; Anderson, M. J.; Wortman, J. R.; Kim, H. S.; Arroyo, J.; Berriman, M.; Abe, K.; Archer, D. B.; Bermejo, C.; Bennett, J.; Bowyer, P.; Chen, D.; Collins, M.; Coulsen, R.; Davies, R.; Dyer, P. S.; Farman, M.; Fedorova, N.; Fedorova, N.; Feldblyum, T. V.; Fischer, R.; Fosker, N.; Fraser, A.; García, J. L.; García, M. J.; Goble, A.; Goldman, G. H.; Gomi, K.; Griffith-Jones, S.; Gwilliam, R.; Haas, B.; Haas, H.; Harris, D.; Horiuchi, H.; Huang, J.; Humphray, S.; Jiménez, J.; Keller, N.; Khouri, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Konzack, S.; Kulkarni, R.; Kumagai, T.; Lafon, A.; Latgé, J.-P.; Li, W.; Lord, A.; Lu, C.; Majoros, W. H.; May, G. S.; Miller, B. L.; Mohamoud, Y.; Molina, M.; Monod, M.; Mouyna, I.; Mulligan, S.; Murphy, L.; O'Neil, S.; Paulsen, I.; Peñalva, M. A.; Pertea, M.; Price, C.; Pritchard, B. L.; Quail, M. A.; Rabbinowitsch, E.; Rawlins, N.; Rajandream, M.-A.; Reichard, U.; Renauld, H.; Robson, G. D.; Rodriguez, de Córdoba, S.; Rodríguez-Peña, J. M.; Ronning, C. M.; Rutter, S.; Salzberg, S. L.; Sanchez, M.; Sánchez-Ferrero, J. C.; Saunders, D.; Seeger, K.; Squares, R.; Squares, S.; Takeuchi, M.; Tekaia, F.; Turner, G.; Vazquez de Aldana, C. R.; Weidman, J.; White, O.; Woodward, J.; Yu, J.-H.; Fraser, C.; Galagan, J. E.; Asai, K.; Machida, M.; Hall, N.; Barrell, B.; Denning, D. W. Genomic sequence of the pathogenic and

allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **2005**, *438*, 1151–1156.

新見昌一; 田辺公一; 和田俊一; 山崎亜希子; 上原至雅; Niimi K.; Lamping E.; Holmes A. R.; Monk B. C.; Cannon R. D. 病原真菌の ABC トランスポーター: 機能解析に関する最近の知見. *真菌誌*. **2005**, *46*, 249–260.

Niino, Y. S.; Chakraborty, S.; Brown, B. J.; Massey, V. A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1983–1991.

Nishihara, M.; Watanabe, A.; Asada, Y. Isolation, characterization, and expression analysis of a class IV chitin synthase gene from the edible basidiomycetous mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* **2010**, *48*, 176–181.

西尾道徳 農業生産環境調査にもとづく我が国のリン酸施用実態の解析. *土肥誌*. **2003**, *74*, 435–443.

Niu, B.; Wang, D.; Yang, Y.; Xu, H.; Qiao, M. Heterologous expression and characterization of the hydrophobin HFBI in *Pichia pastoris* and evaluation of its contribution to the food industry. *Amino Acids* [Online early access].DOI:10.1007/s00726-011-1126-5.Published Online: Oct 29, 2011. http://www.springerlink.com/content/r10q450x12461010/fulltext.html (accessed Feb 6, 2012).

Noble, R.; Dobrovin-Pennington, A.; Hobbs, P. J.; Pederby, J.; Rodger, A. Volatile C8 compounds and pseudomonads influence primordium formation of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **2009**, *101*, 583–591.

Noël-Suberville, C.; Cruz, C.; Guinberteau, J.; Montury, M. Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh blewit (Lepista nuda). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1180–1183.

Nourooz-Zadeh, J.; Tajaddini-Sarmadi, J.; Birlouez-Aragon, I.; Wolff, S. P. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 17–21.

Nürnberger, T.; Abel, S.; Jost, W.; Glund, K. Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiol.* **1990**, *92*, 970–976.

Oakley, B. R.; Kirsch, D. R.; Morris, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1980**, *105*, 361–365.

Oda, K.; Murao, S. Purification and some enzymatic properties of acid protease A and B of *Scytalidium lignicolum* ATCC 24568. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 2435–2444.

Oda, Y.; Senaha, T.; Matsuno, Y.; Nakajima, K.; Naka, R.; Kinoshit,a M.; Honda, E.; Furuta, I.; Kakehi, K. A new fungal lectin recognizing α(1-6)-linked fucose in the

N-glycan. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32439–32447.

O'Donoghue, A. J.; Mahon, C. S.; Goetz, D. H.; O'Malley, J. M.; Gallagher, D. M.; Zhou, M.; Murray, P. G.; Craik, C. S.; Tuohy, M. G. Inhibition of a secreted glutamic peptidase prevents growth of the fungus *Talaromyces emersonii*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29186–28195.

Ogawa, N.; DeRisi, J.; Brown, P. O. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 4309–4321.

大畑孝二 リン酸欠乏下で特異的に発現されるハイドロフォビンの構造と機能. 修士論文, 新潟大学大学院, **2004**.

大賀祥治; 矢野仲太朗; 吉良今朝芳 エノキタケ廃培地を用いたシイタケ菌床栽培. *木材学会誌* **1993**, *39*, 1443–1448.

Ohm, R. A.; de Jong, J. F.; Lugones, L. G.; Aerts, A.; Kothe, E.; Stajich, J. E.; de Vries, R. P.; Record, E.; Levasseur, A.; Baker, S. E.; Bartholomew, K. A.; Coutinho, P. M.; Erdmann, S.; Fowler, T. J.; Gathman, A. C.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Knabe, N.; Kües, U.; Lilly, W. W.; Lindquist, E.; Lucas, S.; Magnuson, J. K.; Piumi, F.; Raudaskoski, M.; Salamov, A.; Schmutz, J.; Schwarze, F. W. M. R.; vanKuyk, P. A.; Horton, J. S.; Grigoriev, I. V.; Wösten, H. A. B. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 957–963.

O'Keefe, B. R.; Smee, D. F.; Turpin, J. A.; Saucedo, C. J.; Gustafson, K. R.; Mori, T.; Blakeslee, D.; Buckheit, R.; Boyd, M. R. Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2518–2525.

奥直也; 森俊介 藻類レクチンの医薬への展開: HIV 感染阻害機構および予防薬への応用. *化学と生物* **2007**, *45*, 312–319.

Okuley, J.; Lightner, J.; Feldmann, K.; Yadav, N.; Lark, E.; Browse, J. Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* **1994**, *6*, 147–158.

Okull, D. O.; Beelman, R. B.; Gourama, H. Antifungal activity of 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium. *J. Food Prot.* **2003**, *66*, 1503–1505.

Oliw, E. H. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 313–323.

Opperman, D. J.; Piater, L. A.; van Heerden, E. A novel chromate reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 related to old yellow enzyme. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*,

3076–3082.

Oshima, Y. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **1997**, *72*, 323–334.

Oshima, Y.; Ogawa, N.; Harashima, S. Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Genetics* **1996**, *149*, 1707–1715.

Ouzouni, P. K.; Koller, W.-D.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A. Volatile compounds from the fruiting bodies of three *Hygrophorus* mushroom species from Northern Greece. *Int. J. Food. Technol.* **2009**, *44*, 854–859.

Oxenburgh, M. S.; Snoswell, A. M. Use of streptomycin in the separation of nucleic acids from protein in a bacterial extract. *Nature* **1965**, *207*, 1416–1417.

Pao, S. S.; Paulsen, I. T.; Saier, M. H. Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1–34.

Paoletti, M.; Clavé, C.; Bégueret, J. Characterization of a gene from the filamentous fungus *Podospora anserina* encoding an aspartyl protease induced upon carbon starvation. *Gene* **1998**, *210*, 45–52.

Pappachan, A.; Savithri, H. S.; Murthy, M. R. Structural and functional studies on a mesophilic stationary phase survival protein (Sur E) from *Salmonella typhimurium*. *FEBS J.* **2008**, *275*, 5855–5864.

Paris, S.; Debeaupuis, J. P.; Crameri, R.; Carey, M.; Charlès, F.; Prévost, M. C.; Schmitt, C.; Philippe, B.; Latgé, J. P. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1581–1588.

朴俊錫 シックハウスと微生物由来揮発性有機化合物 (MVOCs). *エアロゾル研究*, **2003**, *18*, 181–183.

Patton-Vogt, J. L.; Henry, S. A. *GIT1*, a gene encoding a novel transporter for glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1998**, *149*, 1707–1715.

Patton-Vogt, J. Transport and metabolism of glycerophosphodiesters produced through phospholipid deacylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1771*, 337–342.

Pedersen, M. H.; Borodina, I.; Moresco, J. L.; Svendsen, W. E.; Frisvad, J. C.; Søndergaard, I. High-yield production of hydrophobins RodA and RodB from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1923–1932.

Pedneault, K.; Angers, P.; Avis, T. J.; Gosselin, A.; Tweddell, R. J. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. '*citrino-pileatus*' grown at different temperatures. *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 1228–1237.

Peñas, M. M.; Rust, B.; Larraya, L. M.; Ramírez, L.; Pisabarro, A. G. Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3891–3898.

Peñas, M. M.; Ásgeirsdóttir, S. A.; Lasa, I.; Culiañez-Macià, F. A.; Pisabarro, A. G.; Wessels, J. G. H.; Ramírez, L. Identification, characterization, and in situ detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4028–4034.

Percudani, R.; Montanini, B.; Ottonello, S. The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes. *Proteins* **2005**, *60*, 670–678.

Pérez-Gilabert, M.; Sánchez-Felipe, I.; García-Carmona, F. Purification and partial characterization of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, *53*, 3666–3671.

Pérez-Gilabert, M.; Sánchez-Felipe, I.; Morte, A.; García-Carmona, F. Kinetic properties of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps: effect of inhibitors and activators. *J. Agric. Food Chem.* **2005b**, *53*, 6140–3145.

Perraud, X.; Kermasha, S. Characterization of lipoxygenase extracts from *Penicillium* sp.. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 335–342.

Perraud, X.; Kermasha, S.; Bisakowski, B. Characterization of a lipoxygenase extract from *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.* **1999**, *34*, 819–827.

Persson, B. L.; Lagerstedt, J. O.; Pratt, J. R.; Pattison-Granberg, J.; Lundh, K.; Shokrollahzadeh, S.; Lundh, F. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **2003**, *43*, 225–244.

Persson, B. L.; Petersson, J.; Fristedt, U.; Weinander, R.; Berhe, A.; Pattison, J. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1422*, 255–272.

Petersen, T. N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* **2011**, *8*, 785–786.

Pfeil, R. M.; Mumma, R. O. Bioassay for evaluating attraction of the phorid fly, *Megaselia halterata* to compost colonized by the commercial mushroom, *Agaricus bisporus* and 1-octen-3-ol and 3-octanone. *Entomol. Exp. Appl.* **1993**, *69*, 137–144.

Pierce, A. M.; Pierce, H. D.; Borden, J. H.; Oehlschlager, A. C. Production dynamics of cucujolide pheromones and identification of 1-octen-3-o1 as a new aggregation pheromone for *Oryzaephilus surinamensis* and *O. mercator* (Coleoptera: Cucujidae). *Environ. Entomo.* **1989**, *18*, 747–755.

Pierleoni, A.; Martelli, P. L.; Fariselli, P.; Casadio, R. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* **2006**, *22*, e408–e416.

Plankert, U.; Purwin, C.; Holzer, H. Yeast fructose-2,6-bisphosphate 6-phosphatase is encoded by *PHO8*, the gene for nonspecific repressible alkaline phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *196*, 191–196.

Plaxton, W. C.; Carswell, M. C. Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*. Lerner, H. R. Eds.; Marcel Dekker, New York, USA, **1999**, pp 349–372.

Pohl, T. Concentration of proteins and removal of solutes. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 68–83.

Popova, Y.; Thayumanavan, P.; Lonati, E.; Agrochão, M.; Thevelein, J. M. Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 2890–2895.

Poussereau, N.; Creton, S.; Billon-Grand, G.; Rascle, C.; Fevre, M. Regulation of acp1, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology* **2001**, *147*, 717–726.

Proudfoot, M.; Kuznetsova, E.; Brown, G.; Rao, N. N.; Kitagawa, M.; Mori, H.; Savchenko, A.; Yakunin, A. F. General enzymatic screens identify three new nucleotidases in *Escherichia coli*: biochemical characterization of SurE, YfbR, and YjjG. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54687–54694.

Quevillon, E.; Silventoinen,V.; Pillai, S.; Harte, N.; Mulder, N.; Apweiler, R.; Lopez, R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W116–W120.

Raghothama, K. G. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 665–693.

Raghothama, K. G.; Karthikeyan, A. S.; Phosphate acquisition. *Plant Soil* **2005**, *274*, 37–49.

Rao, N. N.; Torriani, A. Utilization by *Escherichia coli* of a high-molecular-weight, linear polyphosphate: roles of phosphatases and pore proteins. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5216–5223.

Rao, S. T.; Rossmann, M. G. Comparison of super-secondary structures in proteins. J. *Mol. Biol.* **1973**, *76*, 241–256.

Rapior, S.; Cavalié, S.; Andary, C.; Pélissier, Y.; Marion, C.; Bessière, J. M. Investigation of some volatile components of seven fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 199–201.

Rausch, C.; Bucher, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **2002**, *216*, 23–37.

Rausch, C.; Zimmermann, P.; Amrhein, N.; Bucher, M. Expression analysis suggests novel roles for the plastidic phosphate transporter Pht2;1 in auto- and heterotrophic tissues in potato and *Arabidopsis*. *Plant J.* **2004**, *39*, 13–28.

Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D227–D233.

Reverberi, M.; Punelli, F.; Scarpari, M.; Camera, E.; Zjalic, S.; Ricelli, A.; Fanelli, C.; Fabbri, A. A. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1935–1946.

Ribeiro, B.; Guedes de Pinho, P.; Andrade, P. B.; Baptista, P.; Valentão, P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: a comparative study. *Microchem. J.* **2009**, *93*, 29–35.

Richardson, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil biota management in sustainable farming systems*. Pankhurst, C. E.; Doube, B. M.; Gupta, V. V. S. R.; Grace, P. R. Eds.; CSIRO, Melbourne, Australia, **1994**, pp 50–62.

Riehle, M. M.; Bennett, A. F.; Long, A. D. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 525–530.

Runge-Metzger, A. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security. In: *Phosphorus in the global environment: transfers, cycles and management*. Tiessen, H. Eds.; John Wiley and Sons, Chichester, UK, **1995**, pp 27–42.

Sachay, J. E.; Wallace, R. L.; Johns, M. A. Phosphate stress response in hydroponically grown maize. *Plant Soil* **1991**, *132*, 85–90.

Sá-Correia, I.; dos Santos, S. C.; Teixeira, M. C.; Cabrito, T. R.; Mira, N. P. Drug:H^+ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 22–31.

Sadler, M. Nutritional properties of edible fungi. *Nutr. Bull.* **2003**, *28*, 305–308.

Sakai, H.; Kajiwara, S. A stearoyl-CoA-specific Δ9 fatty acid desaturase from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2431–2437.

Sakai, H.; Kajiwara, S. Cloning and functional characterization of a Δ12 fatty acid desaturase gene from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Mol. Genet. Genomics* **2005**, *273*, 336–341.

Sakai, H.; Kajiwara, S. Membrane lipid profile of an edible basidiomycete *Lentinula edodes* during growth and cell differentiation. *Lipids* **2004**, *39*, 67–73.

Sakamoto, Y.; Nakade, K.; Sato, T. Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body. *Curr. Genet.* **2009**, *55*, 409–423.

Salame, T. M.; Yarden, O.; Hadar, Y. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 93–106.

Sánchez, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. Appl. *Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1321–1337.

Sanz, L. C.; Perez, A. G. ; Olias, J. M. Purification and catalytic properties of chickpea lipoxygenases. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2967–2972.

Saraiva, A. M.; Reis, M. A.; Tada, S. F.; Rosselli-Murai, L. K.; Schneider, D. R.; Pelloso, A. C.; Toledo, M. A.; Giles, C.; Aparicio, R.; de Souza, A. P. Functional and small-angle X-ray scattering studies of a new stationary phase survival protein E (SurE) from *Xylella fastidiosa*: evidence of allosteric behaviour. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6751–6762.

更級彰史 ナメコ廃培地を用いたハタケシメジ栽培技術の開発. *メッサ・みやぎ* **2006**, *19*, 1.

Sawahata, T; Shimano, S; Suzuki, M. *Tricholoma matsutake* 1-ocen-3-ol and methyl cinnamate repel mycophagous *Proisotoma minuta* (Collembola: Insecta). *Mycorrhiza* **2008**, *18*, 111–114.

Schachtman, D. P.; Reid, R. J.; Ayling, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 447–453.

Schaller, A.; Stintzi, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis: structure, function, regulation. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1532–1538.

Schaller, F.; Schaller, A.; Stintzi, A. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* **2005**, *23*, 179–199.

Schmoll, M.; Seibel, C.; Kotlowski, C.; Wöllert Genannt Vendt, F.; Liebmann, B.; Kubicek, C. P. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 95–103.

Scholtmeijer, K.; Wessels, J. G. H.; Wösten, H. A. B. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 1–8.

Schuiki, I.; Daum, G. Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 151–162.

Schultz, J.; Milpetz, F.; Bork, P.; Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 5857–5864.

Segers, G. C.; Hamada, W.; Oliver, R. P.; Spanu, P. D. Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *261*, 644–652.

Sekiya, J.; Aoshima, H.; kajiwara, T.; Togo, T.; Hatanaka, A. Purification and some properties of potato tuber lipoxygenase and detection of linoleic acid radical in the enzyme reaction. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 827–832.

Senger, T.; Wichard, T.; Kunze, S.; Göbel, C.; Lerchl, J.; Pohnert, G.; Feussner, I. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7588–7596.

Sexton, A. C.; Cozijnsen, A. J.; Keniry, A.; Jewell, E.; Love, C. G.; Batley, J.; Edwards, D.; Howlett, B. J. Comparison of transcription of multiple genes at three developmental stages of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *258*, 150–160.

Sharma, V. P.; Jandaik, C. L. Recycling of mushroom industry waste for growing *Pleurotus sajor-caju* and *Auricularia polytricha*. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* **1992**, *22*, 182–186.

Shimoda K.; Hirata T.; Noma Y. Stereochemistry in the reduction of enones by the reductase from *Euglena gracilis* Z. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 49–53.

Shimoda, K.; Hirata, T. Biotransformation of enones with biocatalysts: two enone reductases from *Astasia longa*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *8*, 255–264.

Shimoda, K.; Izumi, S.; Hirata, T. A novel reductase participating in the hydrogenation of an exocyclic C–C double bond of enones from *Nicotiana tabacum*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 813–816.

Shimoda, K.; Kubota, N.; Hamada, H.; Yamane, S.; Hirata, T. Asymmetric transformation of enones with *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 2269–2272.

Shimogawara, K.; Usuda, H. Uptake of inorganic phosphate by suspension-cultured tobacco cells: kinetics and regulation by P_i starvation. *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*, 341–351.

Shirzadegan, M.; Christie, P.; Seemann, J. R. An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6055.

宍戸和夫 In *キノコとカビの基礎科学とバイオ技術*. アイピーシー, 東京, **2002**.

Sigrist, C. J.; Cerutti, L.; de Castro, E.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Bulliard, V.;

Bairoch, A.; Hulo, N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D161–D166.

Sims, A. H.; Dunn-Coleman, N. S.; Robson, G. D.; Oliver, S. G. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *239*, 95–101.

Small, I.; Peeters, N.; Legeai, F.; Lurin, C. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for *N*-terminal targeting sequences. *Proteomics* **2004**, *4*, 1581–1590.

Smedje, G.; Norbäck, D.; Edling, C. Asthma among secondary schoolchildren in relation to the school environment. *Clin. Exp. Allergy* **1997**, *27*, 1270–1278.

Smith, F. W. The phosphate uptake mechanism. *Plant Soil* **2002**, *245*, 105–114.

Smith, H. S. Arachidonic acid pathways in nociception. *J. Support. Oncol.* **2006**, *4*, 277–287.

Soderlund, C.; Haller, K.; Pampanwar, V.; Ebbole, D.; Farman, M.; Orbach, M. J.; Wang, G. L.; Wing, R.; Xu, J. R.; Brown, D.; Mitchell, T.; Dean, R. MGOS: a resource for studying *Magnaporthe grisea* and *Oryza sativa* interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2006**, *19*, 1055–1061.

Spence, J.; Cegielska, A.; Georgopoulos, C. Role of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 7157–7166.

Splivallo, R.; Ottonello, S.; Mello, A.; Karlovsky, P. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytol.* **2011**, *189*, 688–699.

Stammers, D. K.; Ren, J.; Leslie, K.; Nichols, C. E.; Lamb, H. K.; Cocklin, S.; Dodds, A.; Hawkins, A. R. The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6619–6626.

Steen, B. R.; Zuyderduyn, S.; Toffaletti, D. L.; Marra, M.; Jones, S. J.; Perfect, J. R.; Kronstad, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 1336–1349.

Stewart, E. J.; Åslund, F.; Beckwith, J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **1998**, *17*, 5543–5550.

Stewart, P.; Kersten, P.; Vanden Wymelenberg, A.; Gaskell, J.; Cullen, D. Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5036–5042.

Stroud, P. A.; Goodwin, J. S.; Butko, P.; Cannon, G. C.; McCormick, C. L. Experimental

evidence for multiple assembled states of Sc3 from *Schizophyllum commune*. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 956–967.

Stuermer, R.; Hauer, B.; Hall, M.; Faber, K. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 203–213.

Stumpe, M.; Feussner, I. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 347–357.

Su, C.; Brodowsky, I. D.; Oliw, E. H. Studies on linoleic acid 8*R*-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Lipids* **1995**, *30*, 43–50.

Su, C.; Oliw, E. H. Manganese lipoxygenase: purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13072–13079.

Su, C.; Sahlin, M.; Oliw, E. H. A protein radical and ferryl intermediates are generated by linoleate diol synthase, a ferric hemeprotein with dioxygenase and hydroperoxide isomerase activities. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20744–20751.

Summers, M. L.; Elkins, J. G.; Elliott, B. A.; McDermott, T. R. Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 1094–1101.

Sundström, L.; Larsson, S.; Jönsson, L. J. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *161*, 106–115.

Suárez, M. B.; Sanz, L.; Chamorro, M. I.; Rey, M.; González, F. J.; Llobell, A.; Monte, E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*: identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, *42*, 924–934.

Swiderska, M. A.; Stewart, J. D. Stereoselective enone reductions by *Saccharomyces carlsbergensis* old yellow enzyme. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *42*, 52-54.

Tagu, D.; Marmeisse, R.; Baillet, Y.; Rivière, S.; Palin, B.; Bernardini, F.; Méreau, A.; Gay, G.; Balestrini, R.; Bonfante, P.; Martin, F. Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus HydPt-1* gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur. J. Histochem.* **2002**, *46*, 23–29.

Tagu, D.; de Bellis, R.; Balestrini, R.; de Vries, O. M. H.; Piccoli, G.; Stocchi, V.; Bonfante, P.; Martin, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytol.* **2001**, *149*, 127–135.

高畠幸司 ナメコ，エノキタケ廃菌床を利用したヤマブシタケ菌床栽培．*日本き*

のこ学会誌 **2009**, *17*, 81−85.
高橋美絵; 磯谷敦子; 宇都宮仁; 中野成美; 小泉武夫; 戸塚昭 GC−Olfactometry による清酒麹の香気成分の解析. *醸協*. **2006**, *101*, 957−963.
高橋美絵; 磯谷敦子; 宇都宮仁; 中野成美; 小泉武夫; 戸塚昭 製麹工程における清酒麹の香りの変化. *醸協*. **2007**, *102*, 403−411.
高桑衣重 キノコにおけるリポキシゲナーゼに関する研究. 修士論文, 新潟大学大学院, **1998**.
高藤友哉 ナメコ菌糸体がリン酸欠乏下で特異的に発現する遺伝子の機能と構造. 修士論文, 新潟大学大学院, **2005**.
Talbot, N. J.; Ebbole, D. J.; Hamer, J. E. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1575−1590.
Tamano, K.; Sano, M.; Yamane, N.; Terabayashi, Y.; Toda, T.; Sunagawa, M.; Koike, H.; Hatamoto, O.; Umitsuki, G.; Takahashi, T.; Koyama, Y.; Asai, R.; Abe, K.; Machida, M. Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45*, 139−151.
Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731−2739.
Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. Hydroxyl radical generation and phenol oxidase activity in wood degradation by the white-rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *Mater. Org.* **2000**, *33*, 91−105.
Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*. **1999**, *53*, 21−28.
Tanaka, H.; Itakura, S.; Hirano, T.; Enoki, A. An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron. *Holzforschung*, **1996**, *50*, 541−548.
Tanaka, H.; Yoshida, G.; Baba, Y.; Matsumura, K.; Wasada, H.; Murata, J.; Agawa, M.; Itakura, S.; Enoki, A. Characterization of a hydroxyl-radical-producing glycoprotein and its presumptive genes from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 500−511.
Tang, Y. X.; Suga, T. Characterization of two enone reductases from *Nicotiana tabacum*

cell cultures. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2599–2603.

Tasaki, Y.; Awang, A.; Hara, T.; Joh, T. Effect of phosphate deficiency on growth and protein profile in three strains of *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **2001**, *42*, 489–498.

Tasaki, Y.; Awang, A.; Hara, T.; Joh, T. Structure and expression of a phosphate deficiency-inducible ribonuclease gene in *Pholiota nameko*. *Curr. Genet.* **2004a**, *45*, 28–36.

Tasaki, Y.; Awang, A.; Yazaki, J.; Hara, T.; Joh, T. Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2. *Curr. Genet.* **2006**, *49*, 323–332.

Tasaki, Y.; Kamiya, Y.; Awang, A.; Hara, T.; Joh, T. Gene expression during P_i deficiency in *Pholiota nameko*: accumulation of mRNAs for two transporters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 790–800.

Tasaki, Y.; Ohata, K.; Hara, T.; Joh, T. Three genes specifically expressed during phosphate deficiency in *Pholiota nameko* strain N2 encode hydrophobins. *Curr. Genet.* **2004b**, *45*, 19–27.

田﨑裕二 *Pholiota nameko*菌糸体のリン酸欠乏適応機構に関する研究. 博士論文, 新潟大学大学院, **2001**.

Tatry, M. V.; El Kassis, E.; Lambilliotte, R.; Corratgé, C.; van Aarle, I.; Amenc, L. K.; Alary, R.; Zimmermann, S.; Sentenac, H.; Plassard, C. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J.* **2009**, *57*, 1092–1102.

Taylor, C. B.; Bariola, P. A.; delCardayré, S. B.; Raines, R. T.; Green, P. J. RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 5118–5122.

Teichert, S.; Schönig, B.; Richter, S.; Tudzynski, B. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1661–1675.

ten Have, A.; Espino, J. J.; Dekkers, E.; Van Sluyter, S. C.; Brito, N.; Kay, J.; González, C.; van Kan, J. A. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet. Biol.* **2010**, *47*, 53–65.

Terashita, T.; Oda, K.; Kono, M.; Murao, S. Purification and some properties of metal proteinases from *Lentinus edodes*. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2293–2300.

Terashita, T.; Oda, K.; Kono, M.; Murao, S. Purification and some properties of carboxyl proteinase in mycelium of *Lentinus edodes*. *Agric Biol. Chem.* **1981**, *45*,

1929–1935.
寺下隆夫 きのこ類の生育とプロテアーゼ. *バイオサイエンスとインダストリー* **1992**, *50*, 11–17.
寺下隆夫; 河野又四; 村尾澤夫 シイタケの子実体形成に対する蛋白分解酵素阻害剤 Sreptomyces-PI の添加効果. *日菌報*. **1980**, *21*, 137–140.
寺下隆夫; 河野又四; 村尾澤夫 担子菌の子実体形成に及ぼす酵素阻害剤 Streptomyces-PI の影響: 担子菌の子実体形成に関する研究(第 2 報). *醗工*. **1978**, *56*, 175–181.
寺下隆夫; 小田耕平; 河野又四; 村尾澤夫 酸性プロテアーゼ阻害剤 S-PI による人工しめじ(ヒラタケ)の増産. *醗工*. **1981**, *59*, 55–57.
寺下隆夫; 山田陽子; 吉川賢太郎; 獅山慈考 マイタケ菌床栽培後の廃培地における加水分解酵素類の活性. *近畿大農紀要*. **1997**, *30*, 33–40.
Theodorou, M. E.; Cornel, F. A.; Duff, S. M. G.; Plaxton, W. C. Phosphate starvation-inducible synthesis of the α-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21901–21905.
Theodorou, M. E.; Plaxton, W. C. Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 343–351.
Thibaud, M. C.; Arrighi, J. F.; Bayle, V.; Chiarenza, S.; Creff, A.; Bustos, R.; Paz-Ares, J.; Poirier, Y.; Nussaume, L. Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant J.* **2010**, *64*, 775–789.
Ticconi, C. A.; Abel, S. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 548–555.
富樫巌 ナラタケ属の廃培地を用いたヒラタケ瓶栽培. *林産試験場報/北海道立林産試験場* **1996**, *10*, 9–13.
富樫巌 ナラタケ属の廃培地を用いたヒラタケの瓶栽培. *木材学会誌* **1995**, *41*, 956–962.
東江昭夫; 清水公徳; Li, H.-M.; 西沢正文, 川本進 クリプトコックスのリン酸代謝制御系. *Med. Mycol. J.* **2011**, *52*, 19–23.
Toogood, H. S.; Gardiner J. M.; Scrutton, N. S. Biocatalytic reductions and chemical versatility of the old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892–914.
Trembley, M. L.; Ringli, C.; Honegger, R. Differential expression of hydrophobins *DGH1*, *DGH2* and *DGH3* and immunolocalization of DGH1 in strata of the lichenized basidocarp of *Dictyonema glabratum*. *New Phytol.* **2002**, *154*,

185–195.

Tressl, R.; Bahri, D.; Engel, K. H. Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 1398–1411.

Tressl, R.; Bahri, D.; Engel, K. H. Lipid oxidation in fruits and vegetables. In *Quality of selected fruits and vegetables of North America*; *ACS symposium series 170*; Teranishi, R.; Barrera-Benitez, H., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, USA, **1981**; pp 213–232.

Trotter, E. W.; Collinson, E. J.; Dawes, I. W.; Grant, C. M. Old yellow enzymes protect against acrolein toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4885–4892.

Trotter, P. J.; Pedretti, J.; Voelker, D. R. Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21416–21424.

Trotter, P. J.; Pedretti, J.; Yates, R.; Voelker, D. R. Phosphatidylserine decarboxylase 2 of *Saccharomyces cerevisiáe*: cloning and mapping of the gene, heterologous expression, and creation of the null allele. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6071–6080.

Trotter, P. J.; Voelker, D. R. Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6062–6070.

Tréton, B. Y.; Le Dall, M.-T.; Gaillardin, C. M. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase mutation by a genomic sequence from the yeast *Yarrowia lipolytica* identifies a new phosphatase. *Curr. Genet.* **1992**, *22*, 345–355.

Tsai, S.-Y.; Huang, S.-J.; Lo, S.-H.; Wu, T.-P.; Lian, P.-Y.; Mau, J.-L. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chem.* **2009**, *113*, 578–584.

Tsitsigiannis, D. I.; Keller, N. P. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 109–118.

Tsitsigiannis, D. I.; Kowieski, T. M.; Zarnowski, R.; Keller, N. P. Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **2004a**, *3*, 1398–1411.

Tsitsigiannis, D. I.; Kowieski, T. M.; Zarnowski, R.; Keller, N. P. Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **2005**, *151*, 1809–1821.

Tsitsigiannis, D. I.; Zarnowski, R.; Keller, N. P. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.*

2004b, *279*, 11344–11353.

Tusnády, G. E.; Simon, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 489–506.

Tusnády, G. E.; Simon, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 849–850.

Uddin, M. N.; Yesmin, S.; Khan, M. A.; Tania, M.; Moonmoon, M.; Ahmed, S. Production of oyster mushrooms in different seasonal conditions of Bangladesh. *J. Sci. Res.* **2011**, *3*, 161–167.

Uzura, A.; Nomoto, F.; Sakoda, A.; Nishimoto, Y.; Kataoka, M.; Shimizu, S. Stereoselective synthesis of (*R*)-3-quinuclidinol through asymmetric reduction of 3-quinuclidinone with 3-quinuclidinone reductase of *Rhodotorula rubra*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 617–626.

Valo, H. K.; Laaksonen, P. H.; Peltonen, L. J.; Linder, M. B.; Hirvonen, J. T.; Laaksonen, T. J. Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4*, 1750–1758.

van Aarle, I. M.; Viennois, G.; Amenc, L. K.; Tatry, M. V.; Luu, D. T.; Plassard, C. Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **2007**, *17*, 487–494.

Van Bogaert, I. N. A.; Groeneboer, S.; Saerens, K.; Soetaert, W. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. *FEBS J.* **2011**, *278*, 206–221.

Vance, C. P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **2003**, *157*, 423–447.

Vanden Wymelenberg, A.; Gaskell, J.; Mozuch, M.; Kersten, P.; Sabat, G.; Martinez, D.; Cullen, D. Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4058–4068.

Vanden Wymelenberg, A.; Minges, P.; Sabat, G.; Martinez, D.; Aerts, A.; Salamov, A.; Grigoriev, I.; Shapiro, H.; Putnam, N.; Belinky, P.; Dosoretz, C.; Gaskell, J.; Kersten, P.; Cullen, D. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet. Biol.* **2006**, *43*, 343–356.

Venkateshwarlu, G.; Chandravadana, M. V.; Tewari, R. P. Volatile flavour components

of some edible mushrooms (Basidiomycetes). *Flavour Frag. J.* **1999**, *14*, 191–194.

Vermeulen, N.; Czerny, M.; Gänzle, M. G.; Schieberle, P.; and Vogel, R. F. Reduction of (E)-2-nonenal and (E, E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation. *J. Cereal Sci.* **2007**, *45*, 78–87.

Versaw, W. K.; Harrison, M. J. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* **2002**, *14*, 1751–1766.

Vershinina, O. A.; Znamenskaya, L. V. The Pho regulons of bacteria. *Microbiol.* **2002**, *71*, 497–511.

Vincent, D.; Kohler, A.; Claverol, S.; Solier, E.; Joets, J.; Gibon, J.; Lebrun, M. H.; Plomion, C.; Martin, F. Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 157–171.

Visick, J. E.; Ichikawa, J. K.; Clarke, S. Mutations in the *Escherichia coli surE* gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the pcm repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *167*, 19–25.

Viterbo, A.; Chet, I. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, *7*, 249–258.

Voelker, D. R. Phosphatidylserine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1348*, 236–244.

Wadman, M. W, van Zadelhoff, G.; Hamberg, M.; Visser, T.; Veldink, G. A.; Vliegenthart, J. F. G. Conversion of linoleic acid into novel oxylipins by the mushroom *Agaricus bisporus*. *Lipids* **2005**, *40*, 1163–1170.

Wang, X.; Graveland-Bikker, J. F.; de Kruit, C. G.; Robillard, G. T. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci.* **2004a**, *13*, 810–821.

Wang, D.; Kalb, S. R.; Cotter, R. J. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004b**, *18*, 96–102.

Wang, Z.; Feng, S.; Huang, Y.; Li, S.; Xu, H.; Zhang, X.; Bai, Y.; Qiao, M. Expression and characterization of a Grifola frondosa hydrophobin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **2010a**, *72*, 19–25.

Wang, Z.; Feng, S.; Huang, Y.; Qiao, M.; Zhang, B.; Xu, H. Prokaryotic expression,

purification, and polyclonal antibody production of a hydrophobin from *Grifola frondosa*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **2010b**, *42*, 388–395.

Wanner, P.; Tressl, R. Purification and characterization of two enone reductases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 271–278.

渡辺隆司 バイオリファイナリーの最近の展開と白色腐朽菌によるリグノセルロース前処理. *木材学会誌* **2007a**, *53*, 1–13.

渡辺隆司 選択的白色腐朽菌によるバイオマス変換と脂質関連ラジカル制御因子. *木材保存* **2007b**, *33*, 102–116.

Wessels J. G. H.; de Vries O. M. H.; Ásgeirsdóttir S. A.; Schuren F. H. J. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in Schizophyllum. *Plant Cell* **1991**, *3*, 793–799.

Wessels, J. G. H. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1994**, *32*, 413–437.

Whiteford, J. R.; Spanu, P. D. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 391–400.

Whittaker, R. H. New concepts of kingdoms or organisms. *Science* **1969**, *163*, 150-160.

Williams, R. E.; Bruce, N. C. 'New uses for an old enzyme': the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **2002**, *148*, 1607–1614.

Wood, W. F.; Archer, C. L.; Largent, D. L. 1-Octen-3-ol, a banana slug antifeedant from mushrooms. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 531–533.

Wood, W. F.; Parquar, G. R.; Largent, D. L.; Different volatile compounds from mycelium and sporocarp of *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 89–90.

Wood, W. F.; Largent, D. L.; Henkel, T. W. Headspace analysis identifies indole and 1-octen-3-ol as the "coal tar" odor of *Tricholoma inamoenum*. *Mycol. Prog.* **2004**, *3*, 325–328.

Wösten, H. A. B.; Schuren, F. H. J.; Wessels, J. G. H. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* **1994**, *13*, 5848–5854.

Wösten, H. A. B.; de Vries, O. M. H.; Wessels, J. G. H. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1567–1574.

Wösten, H. A. B.; van Wetter, M.-A.; Lugones, L. G.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J.; Wessels, J. G. H. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 85–88.

Wurzenberger, M., Grosch, W. Origin of the oxygen in the products of the enzymatic

cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim. Biophys. Acta* **1984a**, *794*, 18–24.

Wurzenberger, M., Grosch, W. Stereochemistry of the cleavage of the the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim. Biophys. Acta* **1984b**, *795*, 163–165.

Wurzenberger, M., Grosch, W. The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*) . *Biochim. Biophys. Acta* **1984c**, *794*, 25–30.

Wurzenberger, M.; Grosch, W. Determination of 1-octen-3-ol in mushrooms and in products containing mushrooms. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1983**, *176*, 16–19.

Wurzenberger, M.; Grosch, W. Enzymic oxidation of linolenic acid to 1,Z-5-octadien-3-ol, Z-2,Z-5-octadien-1-ol and 10-oxo-E-8-decenoic acid by a protein fraction from mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lipids* **1986**, *21*, 261–266.

Wurzenberger, M.; Grosch, W. The enzymic oxidative breakdown of linoleic acid in mushrooms (Psalliota bispora). *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1982**, *175*, 186–190.

Wykoff, D. D.; O'Shea, E. K. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2001**, *159*, 1491–1499.

Yadav, V.; Kumar, M.; Deep, D. K.; Kumar, H.; Sharma, R.; Tripathi, T.; Tuteja, N.; Saxena, A. K.; Johri, A. K. A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26532–26544.

Yajima, I.; Yanai, T.; Nakamura, M.; Sakakibara, H.; Hayashi, K. Volatile flavor compounds of matsutake -*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing.-. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 373–377.

Yamakawa, M.; Ozaki, K.; Fujime, T.; Kakimoto, N.; Itakura, S.; Enoki, A.; Tanaka, H. Relationship of phenol oxidase activity and hydroxyl-radical generation to wood degradation by white-rot basidiomycetes. *Biocontrol Sci.* **2005**, *10*, 85–90.

Yamanaka, K. Production of cultivated edible mushrooms. *Food Rev. Int.* **1997**, *13*, 327–333.

Yamane, K.; Maruo, B. Alkaline phosphatase possessing alkaline phosphodiesterase activity and other phosphodiesterases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **1978**, *134*, 108–114.

Yamauchi, Y. ; Hasegawa, A.; Taninaka, A.; Mizutani, M.; Sugimoto, Y. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls

in plants. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6999–7009.

Yazaki, J.; Joh, T.; Tomida, S.; Hayakawa, T. Acid phosphatase isozymes secreted under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **1997**, *38*, 347–350.

矢崎潤史 *Pholiota nameko* 菌糸体の酸性ホスファターゼの構造と機能に関する研究. 博士論文, 新潟大学農学部, **1998**.

Yilmaz, N.; Solmaz, M.; Türkekul, I.; Elmastaş, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chem.* **2006**, *99*, 168–174.

横田信三; 山谷華子; 石栗太; 奥竹史; 飯塚和也; 吉澤伸夫 ナメコ廃培地の生分解と堆肥化. *植物環境工学* **2006**, *18*, 290–298.

吉田兼之; 高橋弘行 食用菌廃培地の土壌改良材としての利用 (第 1 報): 土壌改良材としての原料特性. *林産試験場報/北海道立林産試験場* **1994a**, *8*, 21–27.

吉田兼之; 高橋弘行 食用菌廃培地の土壌改良材としての利用 (第 2 報): 実用規模での堆肥化試験. *林産試験場報/北海道立林産試験場* **1994b**, *8*, 9–12.

Yu, C.-S.; Chen, Y.-C.; Lu, C.-H.; Hwang, J.-K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* **2006**, *64*, 643–651.

Yu, C.-S.; Lin, C.-J.; Hwang, J.-K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1402–1406.

Zawirska-Wojtasiak, R.; Optical purity of (R)-(−)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms. *Food Chem.* **2004**, *86*, 113–118.

Zawirska-Wojtasiak, R.; Siwulski, M.; Mildner-Szkudlarz, S.; Wasowicz, E. Studies on the aroma of different species and strains of *Pleurotus* measured by GC/MS, sensory analysis and electronic nose. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2009**, *8*, 47–61.

Zhang, N.; Merlotti, C.; Wu, J.; Ismail, T.; El-Moghazy, A.-N.; Khan, S. A.; Butt, A.; Gardner, D. C.; Sims, P. F.; Oliver, S. G. Functional Analysis of six novel ORFs on the left arm of Chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae* reveals three of them responding to S-starvation. *Yeast* **2001a**, *18*, 325–334.

Zhang, R. G.; Skarina, T.; Katz, J. E.; Beasley, S.; Khachatryan, A.; Vyas, S.; Arrowsmith, C. H.; Clarke, S.; Edwards, A.; Joachimiak, A.; Savchenko, A. Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase. *Structure* **2001b**, *9*, 1095–1106.

Zinser, E.; Sperka-Gottlieb, C. D. M.; Fasch, E. V.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Daum,

G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2026–2034.

Znamenskaya, L. V.; Vershinina, O. A.; Vershinina, V. I.; Leshchinskaya, I. B.; Hartley, R. W. Expression of the genes for guanyl-specific ribonucleases from *Bacillus intermedius* and *Bacillus pumilus* is regulated by the two component signal transduction system PhoP-PhoR in *B. subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *173*, 217–222.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始多大なるご指導とご高配を賜り、主指導教官として本論文の作成に適切かつ有益なるご助言を賜りました城斗志夫准教授に対して感謝の意を表します。

また、終始適切なるご指導とご助言を賜りました原崇准教授に対して感謝の意を表します。

第1章第3節の *Polox1* の全長塩基配列をご教授して頂くと共に、適切なるご指導と有益なるご助言を賜りました長岡工業高等専門学校の田﨑裕二准教授に対して感謝の意を表します。

また、第1章第2節の内部アミノ酸配列の解析を補助して頂いた Malaysian Cocoa Board の Azwan Bin Awang 博士並びに新潟大学の金古堅太郎博士に対して感謝の意を表します。

さらに、共同研究者として本研究の遂行に協力して頂いた佐藤有希さん、清水亮祐さん、松山遥平さんに対して感謝の意を表します。

最後に、有益なるご助言を頂きました、食品化学研究室の諸先輩および学生の皆様に感謝の意を表します。

```
  1  AACGTCGACATCAAGCTTCACCTGTACCATCTTCGATTTAGCCATGTTTGCATTCTCTCT   60
                                                M  F  A  F  S  L
 61  CCTCAAATTAGCCGCTCTTGCTACAGCCTTGCAGCTCACAGCTGCCATCAACATTCGCGA  120
      L  K  L  A  A  L  A  T  A  L  Q  L  T  A  A  I  N  I  R  E
121  GGCAGACGACAAAGCCGCAGCCAGTTGCACTGACTGGAGCATTATCCCGAACACTGCTAC  180
      A  D  D  K  A  A  A  S  C  T  D  W  S  I  I  P  N  T  A  T
181  TATCGCAGCAGTCTGTCGTGATAGCAACGGTGGCTCGCACAACACCAACATCCCGCTCAG  240
      I  A  A  V  C  R  D  S  N  G  G  S  H  N  T  N  I  P  L  S
241  TGACTGTACAGGAAATCAAAACGGAGTCATTGCGTGCCAACATGATGGTGGCGCAGGTTC  300
      D  C  T  G  N  Q  N  G  V  I  A  C  Q  H  D  G  G  A  G  S
301  TAGCTGCATCTTCAGCAACATTCAATTCAGTAGCACTTTCTTGACGGCCACTGCGTCTTG  360
      S  C  I  F  S  N  I  Q  F  S  S  T  F  L  T  A  T  A  S  C
361  CCTTAACAGAGCTGGACAGAGGGTTGATACTAACAATTTTGATCTCAATGCTTGTTTGAC  420
      L  N  R  A  G  Q  R  V  D  T  N  N  F  D  L  N  A  C  L  T
421  CAACACGGAAGGAACTCTCACCTGTTAATCGACTCATCGATGCCAGATCAAAGCCATCCT  480
      N  T  E  G  T  L  T  C  *
481  CATCGTTAGGAGTAGAAATTGAATATCAGTTGTAAAAATCAGTTCTTGTTCTGTTTCTAA  540
541  TAAATTTATGCTGTATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  600
601  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  637
```

Figure S1. The DNA sequence of *pdi310* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  CTCGTAGCCTGGTGCTCTCGATTTCATTAACTTCAACACATCACAACAATGCGCTTCAAC  60
                                                      M  R  F  N
 61  ATCTTGTTAGCTATCACCGCCATTGCCACTTCGGCTGCTGGTCTTGTTGTTCCGGCTACC  120
     I  L  L  A  I  T  A  I  A  T  S  A  A  G  L  V  V  P  A  T
121  AACGACTTCGACGCTCGTGGCCTTGACTTCCAGCCCGACTCCACTGTTGTTAGACGTGAG  180
     N  D  F  D  A  R  G  L  D  F  Q  P  D  S  T  V  V  R  R  E
181  CCTATGCCAGAGCCCACCAGGGATGCACGGCACGCCGAAGCTTCGCGGCAACACAGGCAG  240
     P  M  P  E  P  T  R  D  A  R  H  A  E  A  S  R  Q  H  R  Q
241  ACTACCGGTCTGCCTCCCCGTCGCTCTACTTTCCATGTTCCAGCTGCGCCAACCACTGGA  300
     T  T  G  L  P  P  R  R  S  T  F  H  V  P  A  A  P  T  T  G
301  AAACATGAGCACCACTACACTGGACATGAGGTCCGGAAAGCAGTATTCGACGGACACATG  360
     K  H  E  H  H  Y  T  G  H  E  V  R  K  A  V  F  D  G  H  M
361  GAACATGAGCGCCTCAAAACAGCTAGCAACAGGCAGAAGAAGTTGTCGCCCCTGAAGGCA  420
     E  H  E  R  L  K  T  A  S  N  R  Q  K  K  L  S  P  L  K  A
421  TTTGGTAACCGACTTCACGAACTCGCCCACCCCGGAGGATCATCCAGGCCCCTTCCCCAC  480
     F  G  N  R  L  H  E  L  A  H  P  G  G  S  S  R  P  L  P  H
481  ATGACTGTACATCCCGGAAGCCACAGCCACCCTCATGGGCGTGAGTTCCCTTTGCCCAAC  540
     M  T  V  H  P  G  S  H  S  H  P  H  G  R  E  F  P  L  P  N
541  CACCACAACCCCGGAACCCCTGGGCCTGCTCGTGTCATTACGCAGAAGACTCCCAGTGGG  600
     H  H  N  P  G  T  P  G  P  A  R  V  I  T  Q  K  T  P  S  G
601  CACCACACCTTCCGCGGTGTCATTGCGCACGACCAATCCAGGACTCCAGGTGCTGGTCAC  660
     H  H  T  F  R  G  V  I  A  H  D  Q  S  R  T  P  G  A  G  H
661  GGCTACAACGACCACTTCCAGGTCCCCGAACGTAAGCCTAGACGCAGCGCAGCTGGTAAA  720
     G  Y  N  D  H  F  Q  V  P  E  R  K  P  R  R  S  A  A  G  K
721  TTTCCTAGCCCATGTACTGTAAAAATTTTAGCCCTGCATTGGTGAATACAGTGACTGTTG  780
     F  P  S  P  C  T  V  K  I  L  A  L  H  W  *
781  CGTTGAAAAAAAAA  794
```

Figure S2. The DNA sequence of *pdi63* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  ATGATGCTGAGCTGATGGAACGGGAATACGACGATTTCGACCTCGAGGCCCGTGATTACA   60
                M  E  R  E  Y  D  D  F  D  L  E  A  R  D  Y  M
  61  TGACGGAAATCGAGGCCCGCGAGCTCCTTGCTGAACTTACTGAGATCGACGCACGCGAGT  120
       T  E  I  E  A  R  E  L  L  A  E  L  T  E  I  D  A  R  E  Y
 121  ACGAAGATTTTGAGGCTCGTGAGCTCGAGGAGGTCTTTGAGTACCTCCGCGATGTTTCCA  180
       E  D  F  E  A  R  E  L  E  E  V  F  E  Y  L  R  D  V  S  K
 181  AATCAACCCCCAAGACCATCACGAAGACCGAGACGTTCCACCCCAAGCCCACAGCTTGCA  240
       S  T  P  K  T  I  T  K  T  E  T  F  H  P  K  P  T  A  C  T
 241  CTGACGAAGAGCTAAAGGTGCAGAAGAAGAAGTGGGATGAAGAGCAGAAGAAGAAGAAAG  300
       D  E  E  L  K  V  Q  K  K  K  W  D  E  E  Q  K  K  K  K  E
 301  AGGCCGACAAGAAGAAGAAGGAAGCTGATAAGAAGAAGAAATCCGACGAGAAGGCTGCCA  360
       A  D  K  K  K  K  E  A  D  K  K  K  K  S  D  E  K  A  A  K
 361  AGAAAGCCGCTAAGAAAGCTAAGCAATTGGCTGACAAGCGCAAGAAGGAGGAGCGCAAGC  420
       K  A  A  K  K  A  K  Q  L  A  D  K  R  K  K  E  E  R  K  H
 421  ACCGCAAGCACCACCACGATAAACATGCCACCACCACCACTTCTACTACCAGCCACGCTA  480
       R  K  H  H  H  D  K  H  A  T  T  T  T  S  T  T  S  H  A  T
 481  CTTCAACCACCGTGAAGAGCTCTGCGCGTGCGACCTCATCGGTTGCATCTGCAACTCACA  540
       S  T  T  V  K  S  S  A  R  A  T  S  S  V  A  S  A  T  H  T
 541  CTTCTTCCTCTGCGAAGGTGACTTCCACTGGCCTCCACAGCCATCACTACCACGAACATG  600
       S  S  S  A  K  V  T  S  T  G  L  H  S  H  H  Y  H  E  H  E
 601  AGCGTGAGGGCGTCCGCCACCACCACGAGCATGAATCGTTCCGTGAGGGTTTCCACCACG  660
       R  E  G  V  R  H  H  H  E  H  E  S  F  R  E  G  F  H  H  G
 661  GTGATGAGTACCGGGAGGAGGAGCATTACCGTCACCGCCACCACCACACCGGGGAGCGGG  720
       D  E  Y  R  E  E  E  H  Y  R  H  R  H  H  H  T  G  E  R  D
 721  ACGCATACGGTCACCACGACGACTTCTATCTTAACCACCGTCACCACCACCACCACACTT  780
       A  Y  G  H  H  D  D  F  Y  L  N  H  R  H  H  H  H  H  T  S
 781  CTTCCACATCCTCGAGTGCTGCTCGGGCTACCAGCACCCACGCCACTTCCACGACCTCGA  840
       S  T  S  S  S  A  A  R  A  T  S  T  H  A  T  S  T  T  S  S
 841  GCGCTGCATCGCACATCACTCCTGCGCCTGCTGCCAAGGCTAAGGCTGCTACCAACGTTT  900
       A  A  S  H  I  T  P  A  P  A  A  K  A  K  A  A  T  N  V  S
 901  CAACCCGCACCGTCACTGGCAAGCACGGTACTGTCACCGTTCAAGTTACGACGACCGCGC  960
       T  R  T  V  T  G  K  H  G  T  V  T  V  Q  V  T  T  T  A  P
 961  CTGTTGCCCAATGCACCAAGCCCAGCTTCCTTCAGAAGATGGCTCGTCACAGGCACCACC 1020
       V  A  Q  C  T  K  P  S  F  L  Q  K  M  A  R  H  R  H  H  H
1021  ACCACCGCCGTGAGCTCGAAGAGGGTATCTTCGCTCGCGAGTATGAGTTCGATGAGCTTG 1080
       H  R  R  E  L  E  E  G  I  F  A  R  E  Y  E  F  D  E  L  D
1081  ATTAAGTACACATCACCTTAGAAGTAGAATAATTTTCGTTGGGGGAATGATATCTGGGCT 1140
       *
1141  TTTGCCTTACACTAAAAAAAAAAA  1164
```

Figure S3. The DNA sequence of *pdi5* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AGGTCGTTCATCATCTACCTCTTTCAACGTTCAACCTTACTACAGCCACATCAATCATGC  60
                                                              M  Q
 61  AGACTACCTTCTGGTACAAGCTTGCAAGCCTCGCTATCCTGGCCCTCAGTGCTGAGGCAG  120
      T  T  F  W  Y  K  L  A  S  L  A  I  L  A  L  S  A  E  A  A
121  CCGCCATACCTGCCCTGTCGTTGCCGGTCGTTGGCGACCCTTTGACCATTCTGGACCCTA  180
      A  I  P  A  L  S  L  P  V  V  G  D  P  L  T  I  L  D  P  I
181  TTACCAGCCTCATTCCTACAGGAATTATTCCTCCAGGCATTCTGCCTACTGGTATTATTC  240
     —T  S  L  I  P  T  G  I  I  P  P  G  I  L  P  T  G  I  I  P
241  CTGCACCTGCCCCAGCAGATCCTATCGGCAGCATCCTCCCCACTGGCATCCTCCCCACTG  300
      A  P  A  P  A  D  P  I  G  S  I  L  P  T  G  I  L  P  T  G
301  GCATCCTCCCCACTGGCATCCTTCCCACTGGAATTCTCCCTACCGGAATTCTCCCTACTG  360
      I  L  P  T  G  I  L  P  T  G  I  L  P  T  G  I  L  P  T  G
361  GTATTTTACCAACCGGCATCTTACCGACTGATATTTTGCCAACTGGCATCCTCCCTACTG  420
      I  L  P  T  G  I  L  P  T  D  I  L  P  T  G  I  L  P  T  G
421  GCCTTCCACTGGGTCTCTAAATGCAATGACTAATTGTTGGGCAAGTCATTGGGTGTCATC  480
      L  P  L  G  L  *
481  GATACTGGACAACGTCTTGGAGGTAGTGGCAACAGAACCGAAGTTGTAGTACCATGGCAT  540
541  CTATAGGATATCACTGCGACATAGCCTCCTTTTCATTATATTTCCTTTTTTCATAGTTCA  600
601  GCTTCTGCCTCAGATTTATTGTAGTTATTGACGAAGTTCGTGGTGTTGCGGAGTACCCCC  660
661  TCGTGGAGTTATTATGGAAATGAATTGTGATCATCTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  720
721  AAAAAA  726
```

Figure S4. The DNA sequence of *pdi36* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  CCCTTTCTTCCGTCGTCTTATCTCGCCAAAATGGCCAGCTATCAGGAAAAGAGCTCCGAC   60
                                   M  A  S  Y  Q  E  K  S  S  D
 61  CGCGACTCGCACGAGAAGGTAGTCCCTGCGAACTCAGGCTACGTGCTAGGCGAGCGTCGT  120
     R  D  S  H  E  K  V  V  P  A  N  S  G  Y  V  L  G  E  R  R
121  CGCGCTGCACTGGCCGAGGTCGATAACGCCAAATTTTCTTGGTTCCATGCTAAAGTTTGC  180
     R  A  A  L  A  E  V  D  N  A  K  F  S  W  F  H  A  K  V  C
181  ATTGTCGCCGGGGTCGGCTTCTTCACCGATGCCTACGACATTTTTGCTATCAACATCGCC  240
     I  V  A  G  V  G  F  F  T  D  A  Y  D  I  F  A  I  N  I  A
241  TCAACGATGTTGGGATATGTTTACGGATCGGGAAAGCCTGGCGCACTCAAGGCTCTCAAC  300
     S  T  M  L  G  Y  V  Y  G  S  G  K  P  G  A  L  K  A  L  N
301  AAGCAGCAGGATCTTGGTGTAAAGGTTGCTACCCCCGTCGGTACTTTGGTCGGTCAACTT  360
     K  Q  Q  D  L  G  V  K  V  A  T  P  V  G  T  L  V  G  Q  L
361  TTGTTTGGATGGCTTGCGGATCTCCTTGGACGCAAGAAGATGTATGGTGTTGAGTTGATG  420
     L  F  G  W  L  A  D  L  L  G  R  K  K  M  Y  G  V  E  L  M
421  ATCATAATTATTGCGACATTCGCGCAGGCCCTGTCCGAAAATGCTCCTGCTGTTCACATC  480
     I  I  I  I  A  T  F  A  Q  A  L  S  E  N  A  P  A  V  H  I
481  ATTGGTGTTCTGGTTGTATGGCGCTTCATAATGGGGGTGGGCATCGGAGGCGATTATCCC  540
     I  G  V  L  V  V  W  R  F  I  M  G  V  G  I  G  G  D  Y  P
541  CTTAGCGCCGTCATCTCTTCTGAGTTCGCATCCACCAAGATACGTGGTCGTATGATGACC  600
     L  S  A  V  I  S  S  E  F  A  S  T  K  I  R  G  R  M  M  T
601  GCGGTGTTTGCTTCTCAAGGCTGGGGCAATTTCACCGCTGCTCTCGTTGGTTTCATCATT  660
     A  V  F  A  S  Q  G  W  G  N  F  T  A  A  L  V  G  F  I  I
661  ACCGCTGCTTACAAGTCCTCCATCCTTAAGGAAGCTTCAATCACAAACCTGCACTCCGTC  720
     T  A  A  Y  K  S  S  I  L  K  E  A  S  I  T  N  L  H  S  V
721  GACGTCATGTGGCGCCTCCTCATCGGTCTCGGTGCTGTTCCCGGTGTTGTAGCATTGTAC  780
     D  V  M  W  R  L  L  I  G  L  G  A  V  P  G  V  V  A  L  Y
781  TTCCGTTTGACCATCCCCGAGACCCCTCGATTCACCATGGATATCGAGCGCAACATTGAT  840
     F  R  L  T  I  P  E  T  P  R  F  T  M  D  I  E  R  N  I  D
841  CAAGCAGCCACTGATATTCAAGCCGTTCTCGCTGGAAGGAAAAGCCATGTCGACGATGAT  900
     Q  A  A  T  D  I  Q  A  V  L  A  G  R  K  S  H  V  D  D  D
901  GCCTTCATCCAACGCATTGAGGCACCCAAAGCTAGCTGGGCTGACTTCAGAGAGCACTTC  960
     A  F  I  Q  R  I  E  A  P  K  A  S  W  A  D  F  R  E  H  F
```

Figure S5. The DNA sequence of *pdi85* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
 961  GGGAAATTTGAAAACTTCAAGATTCTTTTCGGTACAGCTTATTCCTGGTTCGCGCTGGAC  1020
      G  K  F  E  N  F  K  I  L  F  G  T  A  Y  S  W  F  A  L  D
1021  ATAGCATTTTACGGCCTGGGATTGAATTCCGGTATCATCTTGCAAGCCATTGGTTTCGGG  1080
      I  A  F  Y  G  L  G  L  N  S  G  I  I  L  Q  A  I  G  F  G
1081  AACCCGACGAGCACTGGCACCCAAGCCATCTACGACAACTTGAAGAACATTTGCGTGGGA  1140
      N  P  T  S  T  G  T  Q  A  I  Y  D  N  L  K  N  I  C  V  G
1141  AATTTGATTCTTTCGGCTGCCGGCTTGATCCCTGGATACTGGGTCAGCTTCCTCTTCATC  1200
      N  L  I  L  S  A  A  G  L  I  P  G  Y  W  V  S  F  L  F  I
1201  GACAAGTGGGGACGCAAGCCTATCCAACTCATGGGATTCATCGCTCTCACTATCCTCTTC  1260
      D  K  W  G  R  K  P  I  Q  L  M  G  F  I  A  L  T  I  L  F
1261  GTCATCTTGGGCTTCGGCTACGACAAGTTGATCTCCACCCCCTCTTCCAAAAAGGCCTTC  1320
      V  I  L  G  F  G  Y  D  K  L  I  S  T  P  S  S  K  K  A  F
1321  GTCTTCCTCTACTGTCTCGCAGATTTCTTCCAGAATTTTGGACCAAATACTACCACGTTT  1380
      V  F  L  Y  C  L  A  D  F  F  Q  N  F  G  P  N  T  T  T  F
1381  GTGATACCTGGAGAGATTTTCCCCACTCGTTACCGTTCCACCGCCCACGGTATATCTGCT  1440
      V  I  P  G  E  I  F  P  T  R  Y  R  S  T  A  H  G  I  S  A
1441  GCCAGCGGCAAGCTTGGGGCTATTGTCGCCCAAGTCGGTTTCAGTCAGCTCAAGGATATT  1500
      A  S  G  K  L  G  A  I  V  A  Q  V  G  F  S  Q  L  K  D  I
1501  GGCGGGCCTAGCGCATGGGTAAAGCACATTCTCGAAATCTTTGCTTTCTTCATGTTGACT  1560
      G  G  P  S  A  W  V  K  H  I  L  E  I  F  A  F  F  M  L  T
1561  GGTATCGGCTCAACACTCCTCCTCCCCGAGACCAAGAACAGGACTCTCGAAGATTTATCA  1620
      G  I  G  S  T  L  L  L  P  E  T  K  N  R  T  L  E  D  L  S
1621  AACGAAAACCAAGAAGGCTTCGTGCGGGGAACGTCGAACAAGACAGCAGTTATCACTGAT  1680
      N  E  N  Q  E  G  F  V  R  G  T  S  N  K  T  A  V  I  T  D
1681  GCTTGATTTTCATACTCTATTTCCCTTCTATCACCTTTATGTACGCTTTCCTTGTTATAC  1740
      A  *
1741  CGCCTCATGTACTTAATACCGCTCAAAAACGGACCCCTCACTTTTCTGGATCACAATGCT  1800
1801  ATCTTTCTTACCGAATTAGCGGGTTGGATTAAAGGCAAAAGCGACTATTATTATCCACAC  1860
1861  ACGATATACAGATCCTTTCGTTCATTCTTGCTGTGATTTCGAGATCCCGAGTAATTGGCG  1920
1921  CGTAGGATTGAAATGAAGAGACATTAAGTTTCCCTTGGAACAGGGTGGCAGACAA  1975
```

Figure S5. Continued.

```
  1  AGTTCAGTTTGAGTCTTTCCACTCAAATCTAACTGCCCTCACTGCTTTTCGCGCACTCGT  60
 61  TACAACGATGCCTTCCGTTAAATCCATCTTTTCCGCTGTGCTCACCGCTGCTGTCATGAG  120
          M  P  S  V  K  S  I  F  S  A  V  L  T  A  A  V  M  S
121  CATGGTCAGAGCAGAGACTCATACCGTCCACTTCGCCAACAACTGCGGGTTTGGTACTCC  180
      M  V  R  A  E  T  H  T  V  H  F  A  N  N  C  G  F  G  T  P
181  AACTCTGATTCAAGGACCAAATGTCCTCTCGACAGGTGGTGATGTAACTTTCGGCGGTCC  240
      T  L  I  Q  G  P  N  V  L  S  T  G  G  D  V  T  F  G  G  P
241  CCTCCGCTCTGCAATTGCCTACCTCCAAACAGGTGGTTGTGGATTCAACGGCGAAGGATG  300
      L  R  S  A  I  A  Y  L  Q  T  G  G  C  G  F  N  G  E  G  C
301  TACTCTCATTGAGTTAACATTGGCTAACCCAACGACTCCCGGTAGTGGTTCAAGTGTCGA  360
      T  L  I  E  L  T  L  A  N  P  T  T  P  G  S  G  S  S  V  D
361  TATTTCGCTCATCCCACCACATTCGTTCTCGGTCACATCCGGATTTGGATATTTCGGCAG  420
      I  S  L  I  P  P  H  S  F  S  V  T  S  G  F  G  Y  F  G  S
421  TGGATGCGATGGATTAGGTGCTGACTGCACATTTGGAGGTTGCTCAACCGCGTTCCATCA  480
      G  C  D  G  L  G  A  D  C  T  F  G  G  C  S  T  A  F  H  Q
481  GCCCGGCGACACGGGTGTACAGGTCGCCTGCCAGAATAACGATGTCAATCTCGCCATCAC  540
      P  G  D  T  G  V  Q  V  A  C  Q  N  N  D  V  N  L  A  I  T
541  TTTCTGTCTTTGATGAGCTGAAATGTGCAGAGTTAAAGACAAATTGAATGTAAAAATATG  600
      F  C  L  *
601  TAACATTAGTCATGCATATTTAAAAGAGTTGCGAAAGAGTATGAAAAAAAAAAAAAAAAA  660
```

Figure S6. The DNA sequence of *pdi244* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  GATATATAATCCTCTGAAGCAGACTATCGGCAGCTCGGAATGCTTTTATCTTCGTTGATC   60
                                              M  L  L  S  S  L  I
  61  TGTATTGGCCTAATCTTGGGGGCTGAATCCAGACTTATTCTGCCCAAACCCAAGCCTTTC  120
      C  I  G  L  I  L  G  A  E  S  R  L  I  L  P  K  P  K  P  F
 121  AAGAGGCCTATTGTCCCTGGAGCTGTTTTCGACCGATTCATTACGATATGGTTAGAGAAT  180
      K  R  P  I  V  P  G  A  V  F  D  R  F  I  T  I  W  L  E  N
 181  ATCAATTTTGCCTCAGCATCCGCAGATCCCAATTTCGCGGCCATAACGAAACAGGGAATT  240
      I  N  F  A  S  A  S  A  D  P  N  F  A  A  I  T  K  Q  G  I
 241  CAGTTGACCAACTACTTCGCCGTCACTCATCCCTCAGAGCCCAATTATGTCGCTTCAGTC  300
      Q  L  T  N  Y  F  A  V  T  H  P  S  E  P  N  Y  V  A  S  V
 301  GGAGGCGACTATTTTGGAATGAATAACGATAACCTGAACCGAGTCCCTGCCAATATCTCT  360
      G  G  D  Y  F  G  M  N  N  D  N  L  N  R  V  P  A  N  I  S
 361  TCCGTGGTAGATCTCCTCGAGGAAAAGGGTATCTCCTGGGGTGAATATCAGGAGCACATG  420
      S  V  V  D  L  L  E  E  K  G  I  S  W  G  E  Y  Q  E  H  M
 421  CCCACCACTGGGTTCCAAGGCTTCGAGATGTTGAATCCTGACGGAGCTAATGACTATGTA  480
      P  T  T  G  F  Q  G  F  E  M  L  N  P  D  G  A  N  D  Y  V
 481  CGAAAACACAACCCGTTGATTATCTTCGACTCGGTCGCCAATTTCTCCTCACGCGCGAAC  540
      R  K  H  N  P  L  I  I  F  D  S  V  A  N  F  S  S  R  A  N
 541  CAAGTGAAGAACTTCACTTTGTTTGAACAGGATCTTGCCGACGATAATCTTCCTCAATGG  600
      Q  V  K  N  F  T  L  F  E  Q  D  L  A  D  D  N  L  P  Q  W
 601  ATGTTTATCACGCCGAATATGACTAACGACGGGCATGATACAAACATTAGTTTCGCTTCT  660
      M  F  I  T  P  N  M  T  N  D  G  H  D  T  N  I  S  F  A  S
 661  ATATGGGCAAAAGATTTCCTCGAGCCATTGCTGGAGAACCCTAGCTTCAACGCCAAGAAG  720
      I  W  A  K  D  F  L  E  P  L  L  E  N  P  S  F  N  A  K  K
 721  ACTCTAGTCCTGTTAACGTTTGACGAGAATGGATCCACCGATCCTCACAATCGCGTAGAC  780
      T  L  V  L  L  T  F  D  E  N  G  S  T  D  P  H  N  R  V  D
 781  AGTATTCTTCTTGGGACTGCAGTGCCCAGACAGCTGGTTGGTACCCAGGACTCAACCTTC  840
      S  I  L  L  G  T  A  V  P  R  Q  L  V  G  T  Q  D  S  T  F
 841  TACACTCACTATTCCGAGATCGCTACGGTTGAGGCGAATTGGGGTCTTCACACTCTCGGG  900
      Y  T  H  Y  S  E  I  A  T  V  E  A  N  W  G  L  H  T  L  G
 901  CGATTCGATGTCGGCGCCAATGTGTTTAACTTCGTCGCTAAGCACACTCACGACGTTATT  960
      R  F  D  V  G  A  N  V  F  N  F  V  A  K  H  T  H  D  V  I
 961  CGCCCGGCAGATTTGGAACAGTCGTTCCTCAACATATCCTACCCGGGACCTTTTAACAGC 1020
      R  P  A  D  L  E  Q  S  F  L  N  I  S  Y  P  G  P  F  N  S
1021  GCACCTTCGGGTAAATTCACTGTCCCCAACACTAGGCTTATTGTCAACGGGCGTCATGTC 1080
      A  P  S  G  K  F  T  V  P  N  T  R  L  I  V  N  G  R  H  V
1081  TTGCCCAAGATCGTTGAAACATGGGGGTCGTCTCATTTGCAAAGGTGTACATTGTACACA 1140
      L  P  K  I  V  E  T  W  G  S  S  H  L  Q  R  C  T  L  Y  T
1141  GGTGCACTCCAACCTCCAAGCGGCCTCAATCCCCCTACCATTCCGCAAGGTTGTTAATTT 1200
      G  A  L  Q  P  P  S  G  L  N  P  P  T  I  P  Q  G  C  *
1201  CCAATTCCTCGTTATTTTGTCAAATTCCTATCTCCATTTTTTACTTGAACTACACTCTTT 1260
1261  GGACCTCTATGTGTAAAAAAATTCCAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1320
```

Figure S7. The DNA sequence of *pdi26/PNAP2* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AGAGCTTCTCTCCCACATCTCACTTACATATTTACACATATATCTCATTGCTATGGGTTG  60
                                                          M  G  W
 61  GTTTGACAGCGATTCTGACCAAAGCTCTGCCTACGACCAGGTGGTCAACTCCCCTCACAA  120
      F  D  S  D  S  D  Q  S  S  A  Y  D  Q  V  V  N  S  P  H  K
121  GGCTGAGCTTTCACACGAGCTTATCGCCGCTGCCGCTTCGTACGAGGCGGCTAAGGCCTA  180
      A  E  L  S  H  E  L  I  A  A  A  A  S  Y  E  A  A  K  A  Y
181  CGAGAAGCACGTTGAGGCCAACGGAAAGCCCGAATCTCATGCGAAAGCCAAGGAGATTCT  240
      E  K  H  V  E  A  N  G  K  P  E  S  H  A  K  A  K  E  I  L
241  CGCCGGTCTGTCTGGTGCCTTCATTGACCGCATTGTCGAAACCAAGGGCCTTGACTTCGT  300
      A  G  L  S  G  A  F  I  D  R  I  V  E  T  K  G  L  D  F  V
301  CGACAAGGAGAAAGCTAAGCACCACGCCAATGAGCAACTCTACGACGCCTCTTCCGAAGA  360
      D  K  E  K  A  K  H  H  A  N  E  Q  L  Y  D  A  S  S  E  D
361  CTTTTAAAAGAATCGAACATTATTTGTATATGAGTAGCAGCAAGTGAAAATAAAGAATTC  420
      F  *
421  AAGAAAAAAAAAAAAAA  437
```

Figure S8. The DNA sequence of *pdi228* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  GCAAGCCAGGTGCTCATCACTCTCAAATCTTAGGCCGGTCCTTTGATTTTCTCTTCACGC   60
  61  TAACCAGAAAAAAAAAACTTCCAATCTCTTCGTCCTACTTTTCCACACACAACCCTTCAT  120
 121  TAAATCATCATGCAGCTCACCGCCAACTTCATTGTTCTCGCTACCGCTCTTACCAGCGTT  180
                M  Q  L  T  A  N  F  I  V  L  A  T  A  L  T  S  V
 181  GTTGCCGCCCCATTGGCTCGTCGTGATTTGAGGATTGAAGTTGACGCACGCGATCTCGAT  240
      V  A  A  P  L  A  R  R  D  L  R  I  E  V  D  A  R  D  L  D
 241  ACCGTCGAGTACGATGCTCGTGACGTCTACGACCTGTCTCTTGATGCTCGGGAATATGAT  300
      T  V  E  Y  D  A  R  D  V  Y  D  L  S  L  D  A  R  E  Y  D
 301  GATTTCTCCTTGGAAGCGCGTGGCGCCCAGACTCCTCTTTCTGCGCCTGTGACTCCCGTT  360
      D  F  S  L  E  A  R  G  A  Q  T  P  L  S  A  P  V  T  P  V
 361  ACTCCCGTCACCCCGGTGACTCCAGTTACGCCAGTTACACCTGCTACCCCAGCCACTCCC  420
      T  P  V  T  P  V  T  P  V  T  P  V  T  P  A  T  P  A  T  P
 421  TCCGGACTGCAGGACGCCGTCGACATTCACACCATCCCTGAAGATCTCGTTCACTTGAGC  480
      S  G  L  Q  D  A  V  D  I  H  T  I  P  E  D  L  V  H  L  S
 481  TCTGCAGAGAGGACAGCCCGGTATGAGAAAGCTCTCAAGGATCCCAAGGACCCTCACTAC  540
      S  A  E  R  T  A  R  Y  E  K  A  L  K  D  P  K  D  P  H  Y
 541  AAATCCGCCGTTGCTTACAAGGCGTACAAGCAAGCCCTGAACAACCCGGACAGCCCTAAC  600
      K  S  A  V  A  Y  K  A  Y  K  Q  A  L  N  N  P  D  S  P  N
 601  CACGCTGCTGCTGTGAGGCAACACAAGTTCAAGCAGGCATTCTTCGACGTCGCCAACCCT  660
      H  A  A  A  V  R  Q  H  K  F  K  Q  A  F  F  D  V  A  N  P
 661  GGCCACAAAGCCGCTGTCGCTGCCCACAAGCGCAAGGTAGCCTTTGAGAAAGCTCTTGCC  720
      G  H  K  A  A  V  A  A  H  K  R  K  V  A  F  E  K  A  L  A
 721  GATCCCAAGAACCCACACCACGCTGCTGCCCTTAAAAAGGCCCACCAGAAGGCTGCGTTC  780
      D  P  K  N  P  H  H  A  A  A  L  K  K  A  H  Q  K  A  A  F
 781  CACAAGGCTCTGAAGGATCCCAAGAACCCTAAGCACCACCTTGCGAAGAAAATCCAGGCC  840
      H  K  A  L  K  D  P  K  N  P  K  H  H  L  A  K  K  I  Q  A
 841  AAGAAGGATGCTTTCCACAGCGCGCTTGCTGACCGCAAGAACCCCAACCACCGCCACGCG  900
      K  K  D  A  F  H  S  A  L  A  D  R  K  N  P  N  H  R  H  A
 901  GTGAAGAAGGCTGAGCTCAAGGCTGCTCTCCATGACCCCAAGGATCCTAAGCACAAGGTC  960
      V  K  K  A  E  L  K  A  A  L  H  D  P  K  D  P  K  H  K  V
 961  GCTGTTGCAAAGCATGCTGCGAAGAAGGCCGCTAGGAAAGCAAAGCACGCCGCCAAGAAA 1020
      A  V  A  K  H  A  A  K  K  A  A  R  K  A  K  H  A  A  K  K
1021  GCTGAGAAACACGCCAGCAGCAAGGTTGCGCCTACCAGCACCAAGAAGCACGAGTCGGCG 1080
      A  E  K  H  A  S  S  K  V  A  P  T  S  T  K  K  H  E  S  A
1081  AAGAAGTCTAAGTCTACGCCCACCAAGAAGTCGTCTGAGCGCTCCGCTGCGCACCCCACT 1140
      K  K  S  K  S  T  P  T  K  K  S  S  E  R  S  A  A  H  P  T
1141  GCTTCTGGCAAGGCCTCTTCCGCGAAGAAACTCTCGACCGACAAAGTCGGCGAGCACCAC 1200
      A  S  G  K  A  S  S  A  K  K  L  S  T  D  K  V  G  E  H  H
1201  CGCCACCACCTCCACGAGCTTGACGGCGAGCATCGTCACCGTCACTCTCTTGATGGCGAG 1260
      R  H  H  L  H  E  L  D  G  E  H  R  H  R  H  S  L  D  G  E
1261  CGCCGCCACCACCACCTCGAGTCGGAGAGCGAATTTGGAACCCACCGCCACCACCACAGT 1320
      R  R  H  H  H  L  E  S  E  S  E  F  G  T  H  R  H  H  H  S
1321  CTCGAGGCTAAGGAAGGACTCAGGACCCACCGCCACCACAACGCTGACGGATCCCTGAAG 1380
      L  E  A  K  E  G  L  R  T  H  R  H  H  N  A  D  G  S  L  K
1381  TCCTCCGCCACTTCTACGGCTACTGCTTCTGCTACTGCCACCCCCTCGTCCACTGCCAAC 1440
      S  S  A  T  S  T  A  T  A  S  A  T  A  T  P  S  S  T  A  N
1441  GCTCGGGTGCAATCCACCCACAAGGATGTTGAGGAGTTCCCATGGTAAACGGTTAGCATT 1500
      A  R  V  Q  S  T  H  K  D  V  E  E  F  P  W  *
1501  TGAATAGCATTTTCCTACATGATTTTTGAGAAGTAGCTACGAAATAAATATGAAGTTTTT 1560
1561  CGTGGATTTTCTTTTCAAAAAAA  1583
```

Figure S9. The DNA sequence of *pdi230* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AGACAAGTACACCAAGTCTACCAGCTCACTCTGCCACAATGTTTGCTCGCGCAGCCTCCG  60
                                            M  F  A  R  A  A  S  V
 61  TCTTCGTCCTCTCTCTTCCCATCCTTGCGACTGCCAATGTCCTCCCACGCCAGGACAACC  120
      F  V  L  S  L  P  I  L  A  T  A  N  V  L  P  R  Q  D  N  Q
121  AGTGCAACACAGGATCCCTCCAGTGTTGTTCTTCCGTCCAATCCTCGAGCTCTTCCCTTG  180
      C  N  T  G  S  L  Q  C  C  S  S  V  Q  S  S  S  S  S  L  V
181  TTGCAATTCTCCTCGGCCTCTTGGGCGTCGCTGCCGGAGGCTTGACTGGACAAGTTGGCG  240
      A  I  L  L  G  L  L  G  V  A  A  G  G  L  T  G  Q  V  G  V
241  TTACTTGCTCTCCTATCACTGTCATTGGAGTCAGTGGCACATCTTGCTCTGAGCAGCCCG  300
      T  C  S  P  I  T  V  I  G  V  S  G  T  S  C  S  E  Q  P  V
301  TTTGCTGCACCGGAAACACATTCAACGGCGTTATTGCTACTGGTTGCACCCCCGTCAACG  360
      C  C  T  G  N  T  F  N  G  V  I  A  T  G  C  T  P  V  N  V
361  TCAACCTTTGAGCTCGGGTTTCGGACAAGATTTCTGTACATATGCTCAAATTAGTGGAAA  420
      N  L  *
421  ACGATATTTTGGCTGTTGAATAGTATATGTGGAAGTTATTCGAATGAAATGTCAGCATGA  480
481  ACTTGTGCCACACCTTAAAAAAA  503
```

Figure S10. The DNA sequence of *pdi263* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  TTTCACCTTCAATATGCAATTCAAAGTCCTTGCTGCTCTCGTCATTGGTGCTACCCTTGC   60
                 M  Q  F  K  V  L  A  A  L  V  I  G  A  T  L  A
 61  TGCCGCCACTGGATCGCCATCCAACCAGTGCAACACTGGCAGCCTTCAATGCTGCAACAG  120
      A  A  T  G  S  P  S  N  Q  C  N  T  G  S  L  Q  C  C  N  S
121  CACTGGCTCGGCCACTGATCCTGCCATTGCCAAATTGTTCGCACTTTTGGGCATCAACGT  180
      T  G  S  A  T  D  P  A  I  A  K  L  F  A  L  L  G  I  N  V
181  TGAAGACGTGACTGCCCTGGTCGGCGTCACCTGCAGCCCTATCACTGTTGTTGGGGCCTC  240
      E  D  V  T  A  L  V  G  V  T  C  S  P  I  T  V  V  G  A  S
241  CGGAAGCTCTTGCTCCGAGCAGCCTGTATGCTGCACCAATGATAGCTTCAATGGTATCGT  300
      G  S  S  C  S  E  Q  P  V  C  C  T  N  D  S  F  N  G  I  V
301  TGCGCTTGGATGCGCCCCCATCAACCTCAATCTCTAAGCAAACCCACCCTAACAGCTCTA  360
      A  L  G  C  A  P  I  N  L  N  L  *
361  TTTCATAGGGACAAACACAGCGCATATGGGGCGACCAAGTGCTCAAACCTAGTCAAACTT  421
421  AGGACAACATCTTGCCGCTTGTAATCCGACCCCTGAATATTATTGTGGTTCTATACTAA  479
```

Figure S11. The DNA sequence of *pdi315* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  ACTCGAACAACCGCATCGGCATTCGTTCAAGTACTCCACCTACCTACTTACCAAGACCCG  60
 61  CACCAAGCACCCTCTTTTTCAACTATGCAGTTCACCACTCTCTCTACTTTCGCCGCCCTG  120
                              M  Q  F  T  T  L  S  T  F  A  A  L
121  GCCATGGCTACCCTTGCCGCCGCCACACCCGTCCCCACTGATGGCAGCGGACCCTCCGAC  180
     A  M  A  T  L  A  A  A  T  P  V  P  T  D  G  S  G  P  S  D
181  CAATGCAACACTGGCACTCTTCAGTGCTGCAACAGTGTACAGCAGGCGAGCAATCCCGTC  240
     Q  C  N  T  G  T  L  Q  C  C  N  S  V  Q  Q  A  S  N  P  V
241  GTCGGACTTCTTGCCGGGCTCTTGGGCATCGTTCTTGGACCCATCACCGGACAAGTTGGG  300
     V  G  L  L  A  G  L  L  G  I  V  L  G  P  I  T  G  Q  V  G
301  CTTACTTGCTCCCCCATCAGTGTCATCGGCGTTTCCGGAAACTCCTGCTCTGCTCAACCC  360
     L  T  C  S  P  I  S  V  I  G  V  S  G  N  S  C  S  A  Q  P
361  GTTTGCTGCACGGGCAACAGTTTCAATGGCCTCCTTGTCGTGGGTTGCACCCCCATCAAC  420
     V  C  C  T  G  N  S  F  N  G  L  L  V  V  G  C  T  P  I  N
421  CTCAACCTCTAAGATGTCTGCCCTACAAGCCCAGATATGGATATTCGTTAGCTTACTTTG  480
     L  N  L  *
481  ATTGACCATGCGCATGAATCGTCTGCGTTGCTCTTACTAAATCTACGTATATTTTGCTTC  540
541  CGTGTATCTGCCTGAGGGACTTCATAGTTTTCAATATACGTGCGTTGTTGCTCCTTAAAA  600
601  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  630
```

Figure S12. The DNA sequence of *pdi319* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  CTCCCCGGCACTGCGAGCTTTTCTTCGTCATGTCGACCAAGCTCTCTCTCAAGGAACGCA   60
                                    M  S  T  K  L  S  L  K  E  R  I
  61  TCAAGAGTGTCTCTCTCATATTCGCTTGTGGGACAGCGTTGTTCTCTGATGGATATGCCA  120
       K  S  V  S  L  I  F  A  C  G  T  A  L  F  S  D  G  Y  A  N
 121  ACGGTGTCATTGGCAATGTCAACACATTGCTTACTAGGGTATACGGAGCTGACAAACTCG  180
       G  V  I  G  N  V  N  T  L  L  T  R  V  Y  G  A  D  K  L  D
 181  ACCAGCATAATTACAGCAGGACGCTCAGCAGTTTTGGTTTTGCGGGGACTGTCGTAGGAA  240
       Q  H  N  Y  S  R  T  L  S  S  F  G  F  A  G  T  V  V  G  M
 241  TGCTGGTCTTTGGATATCTGTCCGATAAAATTGGAAGGAAATTCGGGATGATGACTGCTG  300
       L  V  F  G  Y  L  S  D  K  I  G  R  K  F  G  M  M  T  A  A
 301  CTGGCATAGTTACCCTATTCTCCGGGCTGTCGGCCGCGTCTTCTGGTGCACATGGAAGCG  360
       G  I  V  T  L  F  S  G  L  S  A  A  S  S  G  A  H  G  S  V
 361  TTGGTGGATTGTTGAGCATGCTCAGTGCGATGCGCTTCCTCCTTGGCATCGGTGTAGGTG  420
       G  G  L  L  S  M  L  S  A  M  R  F  L  L  G  I  G  V  G  A
 421  CAGAATATCCTTGTGGGTCTGTCTCTGCGTCAGAGCAATCGGAAGAGCCTGGTATCAGCA  480
       E  Y  P  C  G  S  V  S  A  S  E  Q  S  E  E  P  G  I  S  K
 481  AGGGCGCCCAAAACCGCTGGTTTGCGTTGGCGACAAATTCAATGATTGATTTTGGCTTTG  540
       G  A  Q  N  R  W  F  A  L  A  T  N  S  M  I  D  F  G  F  V
 541  TCGTCTCTTCGTTCGTTCCTCTGGTGTTATTCTGGATTTTCGGCAACGATCACCTCCGCG  600
       V  S  S  F  V  P  L  V  L  F  W  I  F  G  N  D  H  L  R  A
 601  CTGTCTGGCGTCTCTCGCTTGGCTTGGGCGTTGTCCCCGCTGCCGCCGTTTTCATTTGGC  660
       V  W  R  L  S  L  G  L  G  V  V  P  A  A  A  V  F  I  W  R
 661  GAATCAACATGAAAGAACCGATTCGCTACCAGAAGGATTCCATGAAACATGCCCGCATCC  720
       I  N  M  K  E  P  I  R  Y  Q  K  D  S  M  K  H  A  R  I  P
 721  CTTACATGCTTGTACTTCGCCGCTACGGAGGGCGTCTAGCAGCTATTTCGGCAACCTGGT  780
       Y  M  L  V  L  R  R  Y  G  G  R  L  A  A  I  S  A  T  W  F
 781  TCTTGTACGACATTATCGTTTATCCTTTCGGAATCTACTCCTCCATCATCGTCGATCGTA  840
       L  Y  D  I  I  V  Y  P  F  G  I  Y  S  S  I  I  V  D  R  I
 841  TCACTGGCGGAAAATCTGACCTTGCCGTCGTATTCGGCTGGAATGTTATCATCAATTTGT  900
       T  G  G  K  S  D  L  A  V  V  F  G  W  N  V  I  I  N  L  F
 901  TTTACATGCCAGGAACTCTGGGCGGAGCATTCGTCGTTGACAGACTAGGCCCGAAGAACA  960
       Y  M  P  G  T  L  G  G  A  F  V  V  D  R  L  G  P  K  N  T
 961  CGATGATCACTGGACTCCTACTCCAAGCAGTTATTGGATTCATTATGAGCGGTGCCTACG 1020
       M  I  T  G  L  L  L  Q  A  V  I  G  F  I  M  S  G  A  Y  V
1021  TCAGACTCACCAACAGCATTGCGGCTTTCGCCGTTGTGTATGGTATCTTCTTAAGCTTCG 1080
       R  L  T  N  S  I  A  A  F  A  V  V  Y  G  I  F  L  S  F  G
1081  GAGAGCTTGGTCCTGGAAATTGCCTGGGATTGCTGGCAAGTAAGAGTAGCCCAACTGCCA 1140
       E  L  G  P  G  N  C  L  G  L  L  A  S  K  S  S  P  T  A  I
1141  TCCGCGGTCAATTCTACGGTACCGCGGCAGCCATCGGAAAAATTGGCGCCTTCATTGGCA 1200
       R  G  Q  F  Y  G  T  A  A  A  I  G  K  I  G  A  F  I  G  T
1201  CATGGATATTCCCTCCTATTATCGACGCTTTCGGTGGACCAAAAAGCAACAAGGGAAACA 1260
       W  I  F  P  P  I  I  D  A  F  G  G  P  K  S  N  K  G  N  T
1261  CAGGTCCCTTCTGGATCGGCAGTGGTTTGGCCGTATTGAGCGCAATCATCACTTTCATGT 1320
       G  P  F  W  I  G  S  G  L  A  V  L  S  A  I  I  T  F  M  W
1321  GGATCAAGCCATTGACCACGGACGGTATGATTGAAGAGGACAGGAAGTTCCGCGAGTACC 1380
       I  K  P  L  T  T  D  G  M  I  E  E  D  R  K  F  R  E  Y  L
1381  TAGAAGCTAATGGTTACGACACAAGCGTAATGGGATTGCCTGAGACCCAAAGCGAAGTAG 1440
       E  A  N  G  Y  D  T  S  V  M  G  L  P  E  T  Q  S  E  V  E
1441  AGACCGAGTCGGTGTCCGTTGACGAGAAACACGAGAAGGTTGATGTCTAGATATGTTATG 1500
       T  E  S  V  S  V  D  E  K  H  E  K  V  D  V  *
1501  ATCTTTAATGAGGAGTGCAATGAACGCCGTCCTGTATCCTTTCAAGTAATCTTTCAAGTA 1560
1561  CTTATACCATGCATTCTGTATTTCAAAA  1588
```

Figure S13. The DNA sequence of *pdi343* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  AGTCTACTTCGACTATCTGTTCTATCGCCCATCATTCCCTCTACCAAGAGTCTACTCTTA   60
  61  CTAATCCTCACCATTATCTCGTCCATTGCAATTCTTTCGTCCTTGAAGGCCTCTTCGTCC  120
 121  CGTAGACCTTTTCATCTCTCAGCACAATGTCAAAGAAGGTGGTCATCGTTGGCGGTCATG  180
                                M  S  K  K  V  V  I  V  G  G  H  G
 181  GTAACACGTCCATGCGGCTCACCAAGCTCCTCACTCCTCACCATTCAGTCACGTCCATTA  240
       N  T  S  M  R  L  T  K  L  L  T  P  H  H  S  V  T  S  I  I
 241  TCAGGCGCCCTTCCCAGCAGAACGACATCAAAAACCTCTCAGCAACACCGCTCGTGTTGT  300
       R  R  P  S  Q  Q  N  D  I  K  N  L  S  A  T  P  L  V  L  S
 301  CCGTATCAGATTCACCTGTTGCTTCGTTCACCCAAGCCTTCCAGGGAGCTGATGTCGTTT  360
       V  S  D  S  P  V  A  S  F  T  Q  A  F  Q  G  A  D  V  V  Y
 361  ACTTTTCGTGTGGTGGCGGCTGGTCAGAGATGAAACAAGTCGACTACGAGGGAGCCGTCA  420
       F  S  C  G  G  G  W  S  E  M  K  Q  V  D  Y  E  G  A  V  K
 421  AAGTCGCCGACGCAATCGAGGCTGTGGAAGGCAAGAAACCACTATTCATTCTTGTTTCTT  480
       V  A  D  A  I  E  A  V  E  G  K  K  P  L  F  I  L  V  S  S
 481  CCATCGATTCGCGGGATCCAAATGTGGTTCCACCACACTACAATGTCGAAGATGTCGCCT  540
       I  D  S  R  D  P  N  V  V  P  P  H  Y  N  V  E  D  V  A  F
 541  TCTCGAAACAAGTCAGGAATGTTTTAGGATATTACTTAAAGTGGAAATTCGAGGCCGACA  600
       S  K  Q  V  R  N  V  L  G  Y  Y  L  K  W  K  F  E  A  D  K
 601  AAAACATTGCTAAACGCACGGCCTTCAAGTGGATAATCCTGCGCCCAGGAGAGTTGACTG  660
       N  I  A  K  R  T  A  F  K  W  I  I  L  R  P  G  E  L  T  D
 661  ACGGTCCTGGTAAGGCGAAGGCTTCTCTTGGTCGAACACACATGACCACTTCAATTTCGC  720
       G  P  G  K  A  K  A  S  L  G  R  T  H  M  T  T  S  I  S  R
 721  GACAAGACGTGGCCCATGCTCTTGCACTGCTTGTCGATAGAGAAGATGCGGCAGGCCTGG  780
       Q  D  V  A  H  A  L  A  L  L  V  D  R  E  D  A  A  G  L  V
 781  TAATCGATATGGTCGGCGGCAGTACGCCAATTCAGGACGGTTTGGACGCGTACATCAAGA  840
       I  D  M  V  G  G  S  T  P  I  Q  D  G  L  D  A  Y  I  K  K
 841  AAGGAGAGCCCGGACTGGCTGAAATTGGACTTTGAGAGCTGTCTGATTGCGAATCGGATT  900
       G  E  P  G  L  A  E  I  G  L  *
 901  GTGTAGAAGCTGAGTGCAAGTCACAATTACATAGACTGTCAGCAACAGCAAATATATGAG  960
 961  TAGCATGATGTTTGATCATTTGAACAGTGCTTCAATACGAGGGATGAATATATACAAAAA 1020
1021  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1046
```

Figure S14. The DNA sequence of *pdi88* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk. AB672721

```
  1  ACTGAAAGTAACTCAAGCACTATGGTGAACTTCCCGAAAACACTGCTCCTCCTGCCGGCC   60
                            M  V  N  F  P  K  T  L  L  L  L  P  A
 61  TTCATTGGCTCCTCATATGCTCTAGTCTCGGCTGTTGACTCTTCCAGTCTCGTTCCAACG  120
     F  I  G  S  S  Y  A  L  V  S  A  V  D  S  S  S  L  V  P  T
121  GCGACATACACTAAGGCTCGTGGTGAAGGCTTTACAAAAGCCATCATTCGCGGCTACGAA  180
     A  T  Y  T  K  A  R  G  E  G  F  T  K  A  I  I  R  G  Y  E
181  GAAGCGTGTGGTATCGGAGGTGAAGTCGACCCcAACTTCGTCGGATCGTATAAcAATGCC  240
     E  A  C  G  I  G  G  E  V  D  P  N  F  V  G  S  Y  N  N  A
241  CGCgCCGCCGGTTACACAGACATCGACaCGTATTGGCTCCCATGCAATGGGTCCGGAAAT  300
     R  A  A  G  Y  T  D  I  D  T  Y  W  L  P  C  N  G  S  G  N
301  AATTGCAAGTCCTATGCGACTCAACTGTCAGAAATTGCTGCTACATTCAGCGCCCACTCC  360
     N  C  K  S  Y  A  T  Q  L  S  E  I  A  A  T  F  S  A  H  S
361  ATGAAAATCGGGACTATCTGGATCGACTTGGAGAAAGATGCCGCCATCTGCAACAACTGG  420
     M  K  I  G  T  I  W  I  D  L  E  K  D  A  A  I  C  N  N  W
421  AACTATGGTACCGCAGGAAATCAAGCTCAGGCGAAATCCCTTATCGCCGCTATGAAAGCC  480
     N  Y  G  T  A  G  N  Q  A  Q  A  K  S  L  I  A  A  M  K  A
481  ACTGGGTTCAATTTTGGTATTTATAGTACACCAGGAGAATGGAGCACTCTTTTCGGCTCT  540
     T  G  F  N  F  G  I  Y  S  T  P  G  E  W  S  T  L  F  G  S
541  ACGAGCTTCGTCCTGGATAATTCCGTGCCGCTTTGGTTTGCTACCTTCAATAACGTCCAG  600
     T  S  F  V  L  D  N  S  V  P  L  W  F  A  T  F  N  N  V  Q
601  ACTCTCACCCTGGGGACACCGTTTGGCGGATGGACCAGCGCCGTCGGTCACCAATATACC  660
     T  L  T  L  G  T  P  F  G  G  W  T  S  A  V  G  H  Q  Y  T
661  GACGTCTCTGCGTCTGGCTTATTTGATTTGAGCGTTTTCGCCAATTAGTAGAGACATCAA  720
     D  V  S  A  S  G  L  F  D  L  S  V  F  A  N  *
721  AAGCGGACTGTATTCATCGCAACATTGCTTTGTTCAATTGTCATATGTACATATGAAGCC  780
781  AATAACAGAGTGTTCTGCCGATTCAAAAAAAAAAAAA  817
```

Figure S15. The DNA sequence of *pdi110* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  TCGGATCCCTGTATCTCGAGCACTGCCAGTTTCAGCAATCATGTTCCCCACTACTCTATT   60
                                              M  F  P  T  T  L  L
  61  GACCACCCTTCTCCTCGCTCTCTCTGTCGCTGCTAACCCAGTGTTGGTGGACAGGTCACC  120
       T  T  L  L  L  A  L  S  V  A  A  N  P  V  L  V  D  R  S  P
 121  CGTGACCCTCCCAATCTCCAGACGCCTCAACCTCACCAGCGTCCACAATCTTGTTCGCCA  180
       V  T  L  P  I  S  R  R  L  N  L  T  S  V  H  N  L  V  R  H
 181  CGATCAGACCAGGGCCAAGACTCTGAAACTCAGAGGCTCCGCCAGGTCTGGCCTCGATGA  240
       D  Q  T  R  A  K  T  L  K  L  R  G  S  A  R  S  G  L  D  D
 241  CCGTGCAGTCATCAACGAGGCTGTCGACAACCAGGCCGTTACCTACGTCGCCTCTGTCGG  300
       R  A  V  I  N  E  A  V  D  N  Q  A  V  T  Y  V  A  S  V  G
 301  TGTCGGTAGCCCAGCTACCACCTACTCCCTCCTCATTGATACCGGAAGTTCAAACACTTG  360
       V  G  S  P  A  T  T  Y  S  L  L  I  D  T  G  S  S  N  T  W
 361  GGTTGGAGCTGGCAAGGCTTACGTGAAGACTAGCACCAGTGTCCAGACATCCAACCGGGT  420
       V  G  A  G  K  A  Y  V  K  T  S  T  S  V  Q  T  S  N  R  V
 421  GGCTGTCACTTACGGATCAGGTTCCTTCTCTGGCACTGAGTTCACTGATACCGTCAACCT  480
       A  V  T  Y  G  S  G  S  F  S  G  T  E  F  T  D  T  V  N  L
 481  TGCCTCCGGGCTCACTTTAACCAAGCAGTCCATCGGTGTCGCCTCCCGGTCCACTGGCTT  540
       A  S  G  L  T  L  T  K  Q  S  I  G  V  A  S  R  S  T  G  F
 541  CGACGGTGTCGATGGTATCCTTGGTATTGGTCCAGTTGCCTTGACCGAAGACACTCTTTC  600
       D  G  V  D  G  I  L  G  I  G  P  V  A  L  T  E  D  T  L  S
 601  TCCTGCTACTTCCTCTCTTATACCCACCGTCACAGACAACGCGTTCTCCCAAGGAATCAT  660
       P  A  T  S  S  L  I  P  T  V  T  D  N  A  F  S  Q  G  I  I
 661  CACCTCTAATCTGATCGGTATTTCTTTCGAGCCCACCACAACTGAGGAGATTGTCAACGG  720
       T  S  N  L  I  G  I  S  F  E  P  T  T  T  E  E  I  V  N  G
 721  AGAGCTTACTTGGGGTGGAACCGACAGCTCCAAGTTCACTGGATCTATCAGCTTCATTTC  780
       E  L  T  W  G  G  T  D  S  S  K  F  T  G  S  I  S  F  I  S
 781  CAAGACCACTACCTCGCCTGCCAGCGAGTTCTGGGGTATTAACCAGTCTATCCGCTACGG  840
       K  T  T  T  S  P  A  S  E  F  W  G  I  N  Q  S  I  R  Y  G
 841  TGCCTCCAACACCATCCTTGCTACTACCGCTGGTATCGTTGATACCGGAACAACTCTTGT  900
       A  S  N  T  I  L  A  T  T  A  G  I  V  D  T  G  T  T  L  V
 901  CCTGATCGCCACCAATGCCTTCACTAAGTACAGGACCGCCACAGGAGGTGTTCTCGACAA  960
       L  I  A  T  N  A  F  T  K  Y  R  T  A  T  G  G  V  L  D  N
 961  CAACACTGGCCTGCTGCGCCTGACTTCCACCCAGTTCTCGAACCTTCAAAGTCTGTTCTT 1020
       N  T  G  L  L  R  L  T  S  T  Q  F  S  N  L  Q  S  L  F  F
1021  CATTGCTGGAGGAGCTACTTTCGAGTTGACTGCCAACGCTCAGCTCTTCCCTCGTTCGCT 1080
       I  A  G  G  A  T  F  E  L  T  A  N  A  Q  L  F  P  R  S  L
1081  CAACACCGACATAGGTGGAACCGCTGGCTCCATCTACCTGATCGTCAACGATCTCGGATC 1140
       N  T  D  I  G  G  T  A  G  S  I  Y  L  I  V  N  D  L  G  S
1141  GAACTCTGGTGAGGGTCTTGACTTCATCAACGGCTACACCTTCCTCGAGCGCTTCTACTC 1200
       N  S  G  E  G  L  D  F  I  N  G  Y  T  F  L  E  R  F  Y  S
1201  CGTCTTCGATACCGCCAACAAGCGTGTCGGTTTCGCCACCACTCCTTTCACCACCGCCAC 1260
       V  F  D  T  A  N  K  R  V  G  F  A  T  T  P  F  T  T  A  T
1261  CACCAACTAAGCACGGAAGCTGGATGTGTACGAGGAGGAGCAACGATGTACAGTACCATA 1320
       T  N  *
1321  TTTTCTCTCGGGTTCGCATGGGATTGGAATACTACATTTGAAAGCTGCATCAACCACAAA 1380
1381  TAAATTTATTTTATCACTCTCAAAAAAAAAAAA  1413
```

Figure S16. The DNA sequence of *pdi373* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AAGTTGCTGCAGCTACAGATCGACTCAACATCTACCAGCTTCAGCATGTTATTCCTCTCT  60
                                                M  L  F  L  S
 61  TTCATCGCTCCTCTCTCTCTCTTAGCGCTCGTCGCAGGCAATCCTGTCGCCATTGAAGAC  120
     F  I  A  P  L  S  L  L  A  L  V  A  G  N  P  V  A  I  E  D
121  ATATGCCAGGGAAATAAAGTTGTTACTTCCACCCAGTTCATCGGCGAGAACAAAAACGTG  180
     I  C  Q  G  N  K  V  V  T  S  T  Q  F  I  G  E  N  K  N  V
181  AAGTTGGAGCACATCACTTGCGACGCGATCAAAGCGTCGGAAGTCGCCGAGAAAGGCGCG  240
     K  L  E  H  I  T  C  D  A  I  K  A  S  E  V  A  E  K  G  A
241  CTTCTTCAAGCGCGTCAGACTCCCAACGTTTGCGGTGCACCATGCACCACTGATTGCTTC  300
     L  L  Q  A  R  Q  T  P  N  V  C  G  A  P  C  T  T  D  C  F
301  TTACCTGCTGGTGGAGGACCCGACCCAAATGACTGCCATATCATCGCGGATGCGCTGCGT  360
     L  P  A  G  G  G  P  D  P  N  D  C  H  I  I  A  D  A  L  R
361  TTCGACAGTCAGAACGTTGCTCCCGTCTTCACGGTCACTAACGGAACAAACAACGTCTTG  420
     F  D  S  Q  N  V  A  P  V  F  T  V  T  N  G  T  N  N  V  L
421  TCTCTGACATTCGCGAGCTGCACCAGTTTCTTCTTGAACCAGGCGACCACTTCGTTGACT  480
     S  L  T  F  A  S  C  T  S  F  F  L  N  Q  A  T  T  S  L  T
481  TACTGCCGCACCGACTTTGCTTCCCTCGTCGACTTCATTGCTCCGAACTGCCAAGCCACT  540
     Y  C  R  T  D  F  A  S  L  V  D  F  I  A  P  N  C  Q  A  T
541  CAGAACGCTCACGGTGGACTCTGCGTTGCCAACGACGGCCGCTGGTTCGTACAGGTTCAA  600
     Q  N  A  H  G  G  L  C  V  A  N  D  G  R  W  F  V  Q  V  Q
601  CATGCTTGAAGAAGGCGTCATTGAATTTGATAGAATTTTTGGCGAAACTGGATAGTAGAA  660
     H  A  *
661  ACAAGAGTTAGTCATAGTATCTTGGACATGTAGCTCGAACAGTAAATGTGGAATATACTC  720
721  TGCCATATAACTGTAAAAAAAAAA  744
```

Figure S17. The DNA sequence of *pdi298* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  CCGTATCTCTGCTCCTTGCCTTGCGGTTGAAGCTCGTCAACAAAAATGTTCTTCTCCGTC   60
                                                     M  F  F  S  V
  61  GTAGTCTCCAGCCTTGCAGCCATCGCACTTGCTACACCGTTCTTCTCTCCAAATGATCCA  120
      V  V  S  S  L  A  A  I  A  L  A  T  P  F  F  S  P  N  D  P
 121  ACCTCACAATTGTTTGATCGGGCGAACCTCATCAGTTCAGGATATTCGACAACTGGAACC  180
      T  S  Q  L  F  D  R  A  N  L  I  S  S  G  Y  S  T  T  G  T
 181  CAGTCGTGCCACAACACCTCATCCGTATCCAATTTGTGCTGCTTTGAGGCTCCAGGAGGT  240
      Q  S  C  H  N  T  S  S  V  S  N  L  C  C  F  E  A  P  G  G
 241  CTCTTGTTGCAAACCCAGTTCTGGGATACCAATCCATCTACGGGACCTTCAGACAGTTGG  300
      L  L  L  Q  T  Q  F  W  D  T  N  P  S  T  G  P  S  D  S  W
 301  ACTATCCATGGACTCTGGCCAGATCACTGCGATACTACCTTCAGCGAAAACTGTGACTCC  360
      T  I  H  G  L  W  P  D  H  C  D  T  T  F  S  E  N  C  D  S
 361  TCGCGTGATTACACAGGTATCGGCACGCTATTGAGCAATAACGGAGCCAGCGATACCTTG  420
      S  R  D  Y  T  G  I  G  T  L  L  S  N  N  G  A  S  D  T  L
 421  GCATTCATGCAGACACACTGGGTTGATATTAATGGACAAAATGAACAGTTCTGGGAGCAC  480
      A  F  M  Q  T  H  W  V  D  I  N  G  Q  N  E  Q  F  W  E  H
 481  GAGTGGGCTACACATGGTACATGTATGAGCACCCTCAAACCCTCCTGTCTACCCAGTGGT  540
      E  W  A  T  H  G  T  C  M  S  T  L  K  P  S  C  L  P  S  G
 541  AGTGTGAAAGGCGCTGAGGCTGTCGCATTTTTCCAAACTGTTGTCAAGCTTTTCCAGACC  600
      S  V  K  G  A  E  A  V  A  F  F  Q  T  V  V  K  L  F  Q  T
 601  CTACCCACATTCACATTCCTTTCCAATGAGGGAATCACTCCCAGCACCACCAAGACCTTC  660
      L  P  T  F  T  F  L  S  N  E  G  I  T  P  S  T  T  K  T  F
 661  ACGCTCTCGCAGTTAACTACTGCTTTGAAGGCCCAGACAGGCTTTACACCTGCTCTTGAT  720
      T  L  S  Q  L  T  T  A  L  K  A  Q  T  G  F  T  P  A  L  D
 721  TGTTCCTCCGGCGCGCTCAACCAAATCAGTTGGTATTTCAACTTGAAGGGATCCATTATT  780
      C  S  S  G  A  L  N  Q  I  S  W  Y  F  N  L  K  G  S  I  I
 781  GACGGCACATTCGTCCCAATCAATGCCCCCGAGACCGGATCTTGCCCATCTTCTGGAATC  840
      D  G  T  F  V  P  I  N  A  P  E  T  G  S  C  P  S  S  G  I
 841  AAATATCCCCCAAAGAGCGGAGGTAGCAGCACCACTACTACCGGCGGCTCGTCCCCCACT  900
      K  Y  P  P  K  S  G  G  S  S  T  T  T  T  G  G  S  S  P  T
 901  GGTACTCCAGGTTCGCTTCCAGGAAAGGCGACCATCCACGCCATCAGCTCCTCTGGTACT  960
      G  T  P  G  S  L  P  G  K  A  T  I  H  A  I  S  S  S  G  T
 961  GTAGGAGGGCTCCTCTCCGCAGGAACCTGGTCGACTCAAACTCTCGCAACATACACAATC 1020
      V  G  G  L  L  S  A  G  T  W  S  T  Q  T  L  A  T  Y  T  I
1021  ACTGGTACCGCTTCCAGCTTCACCATGACTTCTTCCAAAGGCAACTGTGGTGTTAGTGGC 1080
      T  G  T  A  S  S  F  T  M  T  S  S  K  G  N  C  G  V  S  G
1081  ACAACTTTCTCATGTGGCAGCGGTGTTACAACGACCAGCTTCTCCGCTGTGACTTCCGGA 1140
      T  T  F  S  C  G  S  G  V  T  T  T  S  F  S  A  V  T  S  G
1141  AGCGACCTGCTCCTTGCTTCTGGCGGTTCGACGAGTTTCAGCAGTGACGGTGTCCCAAGC 1200
      S  D  L  L  L  A  S  G  G  S  T  S  F  S  S  D  G  V  P  S
1201  GGTTCAACTGTGTTCACTGTATTCACCGGAACCAGTCACACAGACCGCTATACCCTTTCT 1260
      G  S  T  V  F  T  V  F  T  G  T  S  H  T  D  R  Y  T  L  S
1261  ATTATCAGCACATAAACAAGAAACAGATCCATTATCTCTGCATGCTTCACGGGTAACAGT 1320
      I  I  S  T  *
1321  AACACGAGTGCAATCTATATGTACATTGAAGGTGCAGGTTCAATAAAACAAATGATGTTT 1380
1381  CCACGAAAAAAAAAA  1395
```

Figure S18. The DNA sequence of *pdi370* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AAGTTCTCCGGGACCCACTTCGCGATTCAACACTATGCATTTGTCTTTCCTTGCTCTTCT  60
                                          M  H  L  S  F  L  A  L  L
 61  GGCAATTGTTTCTGTTTCTCTGGCGACACCTCTCGGTCCTCGAGCGCTCCCTACTCCCAT  120
      A  I  V  S  V  S  L  A  T  P  L  G  P  R  A  L  P  T  P  I
121  TAGTGGAGCGACAGCACGGAGTCAATTGGCAGACCTCATCGTTGCCGTTGACTCCAACAG  180
      S  G  A  T  A  R  S  Q  L  A  D  L  I  V  A  V  D  S  N  S
181  TCCGGCATACTCGAGGGATTTGTTCAAAACCTGGGATATAATCTCCGGTACATGCGACAC  240
      P  A  Y  S  R  D  L  F  K  T  W  D  I  I  S  G  T  C  D  T
241  AAGAGAAACTGTCCTCAAGCGCGATGGTACGAATGTAGTTACGAATACCGCTTGCACCGC  300
      R  E  T  V  L  K  R  D  G  T  N  V  V  T  N  T  A  C  T  A
301  AACCTCCGGAAATTGGGTCTCGCCATATGATGGAGTCGCAACGAATCTTGCTAGCGACCT  360
      T  S  G  N  W  V  S  P  Y  D  G  V  A  T  N  L  A  S  D  L
361  TGACATCGATCACCTTGTCCCACTGAAAGAAGCCTGGGTTTCCGGTGCAAGAAATTGGAC  420
      D  I  D  H  L  V  P  L  K  E  A  W  V  S  G  A  R  N  W  T
421  ACCCGCCCAGAGGGAGGCATTTGCAAATGACCTCACGCGACCGCAGCTAGTCGCTGTCAC  480
      P  A  Q  R  E  A  F  A  N  D  L  T  R  P  Q  L  V  A  V  T
481  TGATAACTTGAATGAATCGAAGGGTGACAGAGATATTGCCAACTGGAAACCACCTTTGGC  540
      D  N  L  N  E  S  K  G  D  R  D  I  A  N  W  K  P  P  L  A
541  TAGCTATGTTTGCACGTACGCACGAGCATGGGTCCAAGTAAAGCACTTCTATGCTCTTAC  600
      S  Y  V  C  T  Y  A  R  A  W  V  Q  V  K  H  F  Y  A  L  T
601  TATCGATTCGGCAGAGAAGACTGCATTGACTTCACTCCTTGCTGATTGTTAACATATAAA  660
      I  D  S  A  E  K  T  A  L  T  S  L  L  A  D  C  *
661  TGGAGCAGTACGATGATGTTTTTTTTGGATAACTTATAGTAGTTAGCATGCTTGGAAACA  720
721  TGTTGTGCTTGTTCCGACAACGTCATATTTGAGATCATAGTGCCGGAAGATGCTGAACTT  780
781  AGCTTTCCCTGATCTCAAGATTTTTTGCTCTGTTGGTGGAGTCAGAAAAAAAAAAAAAAA  840
841  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  862
```

Figure S19. The DNA sequence of *pdi201* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AGGTTGTGGCAAGAGTACTATCATGCGGTTCAGTTGTGTTCCCCTTGTCCAGTTTTCTCT  60
                            M  R  F  S  C  V  P  L  V  Q  F  S  L
 61  AGCAGGCTTCGCTGCTGCCAATTTCTTCCACAGAAATCTAGCATATCATTCTCCATTTGC  120
      A  G  F  A  A  A  N  F  F  H  R  N  L  A  Y  H  S  P  F  A
121  GACACACCCTCAGCTTGCTCATGATACCGCAAAAATTAACGAGAACGGCATCCAGCGCCG  180
      T  H  P  Q  L  A  H  D  T  A  K  I  N  E  N  G  I  Q  R  R
181  CCAGGATATCGATTCCGCGGCCTTCCGAGATGGCCACTATACTACCTTCTATGGTGGCGA  240
      Q  D  I  D  S  A  A  F  R  D  G  H  Y  T  T  F  Y  G  G  D
241  CTTTAGTAACACTCCCTTTATCTGGGGCGGCGGGGTCAACTTTACACATGCGGTTGCAAG  300
      F  S  N  T  P  F  I  W  G  G  G  V  N  F  T  H  A  V  A  S
301  TGGTGATCCATTTGACACATCCGTTCTCCTTTGGACGCGTGCTGTACCATTGTCATCAAG  360
      G  D  P  F  D  T  S  V  L  L  W  T  R  A  V  P  L  S  S  S
361  CAGTGGCGCACTACCAAACGTAGACGTTCCTGTTTGCGTGGCGTACCAAGTTGGTACCAA  420
      S  G  A  L  P  N  V  D  V  P  V  C  V  A  Y  Q  V  G  T  N
421  TCCCGACCTTACGGGACGAATCATCAGTTATGGCGAACGGTTTACGAGTTACGACGTAGA  480
      P  D  L  T  G  R  I  I  S  Y  G  E  R  F  T  S  Y  D  V  D
481  CTGGACCGTAAAAGTAGAAGCTACGGGCCTAAAGGGCGGATACAAAATACTTCTATCAAG  540
      W  T  V  K  V  E  A  T  G  L  K  G  G  Y  K  I  L  L  S  S
541  CAGGATGGTGCAATCTACGCTTCGCGCGCACAACACCACCGCGGATATATTTATTCACCT  600
      R  M  V  Q  S  T  L  R  A  H  N  T  T  A  D  I  F  I  H  L
601  TGGAGATTATATCTACGAGTCTCTGGGAAATGGGGCCCATATCGGCAGGCAAACTCTGGG  660
      G  D  Y  I  Y  E  S  L  G  N  G  A  H  I  G  R  Q  T  L  G
661  CAGAGAATTGGCCACAATTAAGGATTACCGACAGAGATTAAACCAATACAGGACAGACCA  720
      R  E  L  A  T  I  K  D  Y  R  Q  R  L  N  Q  Y  R  T  D  Q
721  AAGCCTTGTATATGCACACATGCACGCCCCCTGGATAACAGTCTGGGATGACCATGAGGT  780
      S  L  V  Y  A  H  M  H  A  P  W  I  T  V  W  D  D  H  E  V
781  TTCCGACAATCCCTGGAAAGCGGGTACAGCCGACTCCAATGACACAGCCGTTGGATGTGC  840
      S  D  N  P  W  K  A  G  T  A  D  S  N  D  T  A  V  G  C  A
841  CTTCTCTGCCTCCGGAGCATGTTTCACGGATCGCAAGCTAGCCGCAGTCCGAGCTTACCA  900
      F  S  A  S  G  A  C  F  T  D  R  K  L  A  A  V  R  A  Y  H
```

Figure S20. The DNA sequence of *pdi205* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
 901  TGAGTGGATGCCAATCCGGCAGGTCGATCCTCAAGACAAGCTCAGGATATGGAGAAACTT  960
       E  W  M  P  I  R  Q  V  D  P  Q  D  K  L  R  I  W  R  N  F
 961  CCAAATAGGGAAATTACTTGACCTGACGATGTTAGATACGCGCCAATACGACAGGGATAT  1020
       Q  I  G  K  L  L  D  L  T  M  L  D  T  R  Q  Y  D  R  D  I
1021  TACAGACATGTATTATAACACAGAATACGTGAACACGATTGCAGCTTTCGCCAATCGGTC  1080
       T  D  M  Y  Y  N  T  E  Y  V  N  T  I  A  A  F  A  N  R  S
1081  CTTGATGGGAGCCGCTCAGGAGAAATGGTTTTTCGATACCGTCTCCGAATCCAAAAATCG  1140
       L  M  G  A  A  Q  E  K  W  F  F  D  T  V  S  E  S  K  N  R
1141  GGGCGCTGTGTGGCGCGTGGTTGGACAACAAATTGTTTTCACACAACTCAATGAATTGGG  1200
       G  A  V  W  R  V  V  G  Q  Q  I  V  F  T  Q  L  N  E  L  G
1201  AGCGTTTGACTTGGACGCATGGGATGGCTATCGAGCCAACAGAAAGCGTGTTCTCGACCA  1260
       A  F  D  L  D  A  W  D  G  Y  R  A  N  R  K  R  V  L  D  H
1261  CATCTCGCAGAACAGGATTAGCAACACGGTCATTCTCTCTGGGGACAGCCATGCAAACTG  1320
       I  S  Q  N  R  I  S  N  T  V  I  L  S  G  D  S  H  A  N  W
1321  GGTCTCTGATCTGGCCTATCCCAACGACACTACCACGTACGATCCCATTTCCGGGAAAGG  1380
       V  S  D  L  A  Y  P  N  D  T  T  T  Y  D  P  I  S  G  K  G
1381  CGCCATCGGTGTTGAGTTTGCTGGCACCGCTGTTACTTCTGGGTCGTCATTTGGCAGCGG  1440
       A  I  G  V  E  F  A  G  T  A  V  T  S  G  S  S  F  G  S  G
1441  AATCACGCCTACTGCTGCCAATGTTATCTCTAACCAATTGATTGACCTCAACCCAGACCT  1500
       I  T  P  T  A  A  N  V  I  S  N  Q  L  I  D  L  N  P  D  L
1501  GCAATGGAGCGAAGGGTCTTACCGCGGCTTCTTCACACTAAGCATTGACCCCAACCATCT  1560
       Q  W  S  E  G  S  Y  R  G  F  F  T  L  S  I  D  P  N  H  L
1561  CAACGCGACATACTACGGAATGAACAACATCACTTTCGCAAACCTCGATGGCTTCGCCAC  1620
       N  A  T  Y  Y  G  M  N  N  I  T  F  A  N  L  D  G  F  A  T
1621  CGCCCAATTCGTTGTCAAAGCAGGCCAGAACAAGCTGTCTCGCCCCGTCGCCGGTGGCAG  1680
       A  Q  F  V  V  K  A  G  Q  N  K  L  S  R  P  V  A  G  G  S
1681  CGTCCTCGCAGGAGTTCTTCAAGCCCAAGTCAATGTAAATAGCACTGATGATAATCACTG  1740
       V  L  A  G  V  L  Q  A  Q  V  N  V  N  S  T  D  D  N  H  *
1741  ATGACAATATGATGGTCCCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1800
1801  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1829
```

Figure S20. Continued.

```
  1  GTTCAAGTAAACAACAGAATTCACAAATATGCAATTCACCAAGATGTCCGCCTTCGCCAC  60
                                   M  Q  F  T  K  M  S  A  F  A  T
 61  TCTGGCCCTCGCTACCCTTGCTGCCGCCACGCCCACTCGTCGCAACGACTCGCCATCCAA  120
      L  A  L  A  T  L  A  A  A  T  P  T  R  R  N  D  S  P  S  N
121  CCAGTGCAATACAGGTAGTCTACAGTGCTGCAACAGCCTTCAGAGTGCCAATAGCGCCTC  180
      Q  C  N  T  G  S  L  Q  C  C  N  S  L  Q  S  A  N  S  A  S
181  CCTCGCTGGGCTTTTGGGGCTTCTGGGAGTCGTCGTCGGGACGATCACTGGACAAGTCGG  240
      L  A  G  L  L  G  L  L  G  V  V  V  G  T  I  T  G  Q  V  G
241  AGTGACCTGCTCCCCTATCACTGGTGTAGGCGTCAGTGGCACGTCTTGCTCTGAGCAACC  300
      V  T  C  S  P  I  T  G  V  G  V  S  G  T  S  C  S  E  Q  P
301  TGTTTGTTGCACCAACAATGCATTCAACGGGGTCATTGCCTTGGGATGCAGCCCCATCAA  360
      V  C  C  T  N  N  A  F  N  G  V  I  A  L  G  C  S  P  I  N
361  TATCAACCTCTAGACGGATAGTTATTCAAGACCGTTGTCGGTCAATAATCAATGCCGCCT  420
      I  N  L  *
421  TTAGTTCAGAGTCGTAACGTTGTACAACATCTATACTTGCACGCGATGGAATACAAATTT  480
481  GTTCTGTCCGAAAAAAAAAA  500
```

Figure S21. The DNA sequence of *pdi251* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  AGATGTCTTTCTAGACTCTTGTGAACCATGTCAGATGTCGAAATCAGCATCCCTACTACA   60
                                  M  S  D  V  E  I  S  I  P  T  T
  61  GGCTCGACGGCGGAATCAGGTTTGACATGGTTGAACGTGGCCATCGGATTCACTTTCATC  120
      G  S  T  A  E  S  G  L  T  W  L  N  V  A  I  G  F  T  F  I
 121  ATCTGCGATATTGGCGTATCGACGGTTTTTCGCCTGGGGATGGGAGCATCCCTGCTCGTG  180
      I  C  D  I  G  V  S  T  V  F  R  L  G  M  G  A  S  L  L  V
 181  GCAGCGCTGAGATGCACAGGTCAATTGGCCGTAGTTGCCACCGTCCTCCACCAAGTTTTC  240
      A  A  L  R  C  T  G  Q  L  A  V  V  A  T  V  L  H  Q  V  F
 241  GAGAACAAAAATCCGTGGACAGTCGCACTAATAAGCTTTGTCCTCAACCTCTTGGGTACA  300
      E  N  K  N  P  W  T  V  A  L  I  S  F  V  L  N  L  L  G  T
 301  TTTGAAACAGTGGTCAATAAGTCATCGCGAAGATTTCAGCATATGTTTCCTGTCGTGTTA  360
      F  E  T  V  V  N  K  S  S  R  R  F  Q  H  M  F  P  V  V  L
 361  GTGGGCATGCTTGGTTCAACCATACCAATTTCAATCATCGGATCTCGATATACAATGGGA  420
      V  G  M  L  G  S  T  I  P  I  S  I  I  G  S  R  Y  T  M  G
 421  ATTCAACCTTTCTGGACACCTATGCAGTATATCCCGATCGTTGGAATGCTATGCGGCGCC  480
      I  Q  P  F  W  T  P  M  Q  Y  I  P  I  V  G  M  L  C  G  A
 481  ACTATATCTGCTGTTGTAGTCGCAGTAACTTATATTCTAAAGGAGTTGCAGGAAAATAAG  540
      T  I  S  A  V  V  V  A  V  T  Y  I  L  K  E  L  Q  E  N  K
 541  GACAAGGTCGAGATTTATCTCGCATTTGGAGCTACGCGGATGGAAGCCTGTCGCCCAATC  600
      D  K  V  E  I  Y  L  A  F  G  A  T  R  M  E  A  C  R  P  I
 601  ATGATCCAAGCCCTCAAGCTAGCGCTGACACCGCTCATAAATAGTATGAGCGTGATTGGA  660
      M  I  Q  A  L  K  L  A  L  T  P  L  I  N  S  M  S  V  I  G
 661  ATAATCGCGATACCCGGTATGATGACGGGCGCGCTCCTCGGCGGAGCCTCTGTTCAGCAG  720
      I  I  A  I  P  G  M  M  T  G  A  L  L  G  G  A  S  V  Q  Q
 721  GCTGCAAAGCTGCAAACCATCATCATGTTTATGATCACCGCAAGCGCCACACTTGCGTCT  780
      A  A  K  L  Q  T  I  I  M  F  M  I  T  A  S  A  T  L  A  S
 781  GTATTCATCACGCTTGCGGCGGTTGTTGTCGTCGTGGACGAGCAGCATCGCGTCCGCGGA  840
      V  F  I  T  L  A  A  V  V  V  V  V  D  E  Q  H  R  V  R  G
 841  GAGCGTATTTCTGGGAAGAGCGGCGGCTGGCTTAATATCAAGCAGTTGAGCTTCCGCAAG  900
      E  R  I  S  G  K  S  G  G  W  L  N  I  K  Q  L  S  F  R  K
 901  ATGATGGGATGGATCAAAGAGAAGCTCCACCGTGAGCCCAAGCTTTTTGCAGCAGAGGAG  960
      M  M  G  W  I  K  E  K  L  H  R  E  P  K  L  F  A  A  E  E
 961  GAAGAGGAAAGATTGCTTATGAATACACTGTCGTAGCCAGCTTGACTTTGACGAGAACAA 1020
      E  E  E  R  L  L  M  N  T  L  S  *
1021  AGGATATAAATGATAAAAAAA  1041
```

Figure S22. The DNA sequence of *pdi99* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  ACTCACCACTCGAGTTCTACGCCTCACACGCACTCAAGCTTTCAAATCATGAACTTCACC  60
                                                      M  N  F  T
 61  GCCAGTTTCTTAGCTCTCCTCGCTGCTGCTCAGAGCATTGCAGCCTTCCCGTTCGGAACA  120
     A  S  F  L  A  L  L  A  A  A  Q  S  I  A  A  F  P  F  G  T
121  ACTGGGGCGAAGACCGCTCTTGCCCCCGTCCCCGTCACCAAGCTTACCTGTGACGGTGCT  180
     T  G  A  K  T  A  L  A  P  V  P  V  T  K  L  T  C  D  G  A
181  AGCTTCATGTGCACTGCCAACCTGGACTTTGCAGACGGCAATTGGGTCGCTCAGTGGACT  240
     S  F  M  C  T  A  N  L  D  F  A  D  G  N  W  V  A  Q  W  T
241  TCCCCCGTGTTCCATCGGGGAAATTTTGGGGCTCCCGACCATAAAGACATTATAGAGCAG  300
     S  P  V  F  H  R  G  N  F  G  A  P  D  H  K  D  I  I  E  Q
301  ATGGCCATGGCCCCCGTCCCAGTCACAGAGCTTACATGTGACGGATCCTCCTTCCTCTGC  360
     M  A  M  A  P  V  P  V  T  E  L  T  C  D  G  S  S  F  L  C
361  ACTGCCAACCTTGATTTTGGTGATGGAAATTGGGTTGCTCAGTGGCCCGCCAACGTTTTT  420
     T  A  N  L  D  F  G  D  G  N  W  V  A  Q  W  P  A  N  V  F
421  CACAGCGGCTTCCACCCCGGTGGCCGTAAATTGTTTGCTCCGGTCCCTGTTACAGATCTC  480
     H  S  G  F  H  P  G  G  R  K  L  F  A  P  V  P  V  T  D  L
481  AATTGTGACGGTGAAACCTTTATGTGCACCGGAAACTTGGACTTTGCGGACGGCAACTGG  540
     N  C  D  G  E  T  F  M  C  T  G  N  L  D  F  A  D  G  N  W
541  AAAGCGCAGTGGAACACAAACGTCTTTCACAACAACAACTTCTTCAAACAGAACTGATGT  600
     K  A  Q  W  N  T  N  V  F  H  N  N  N  F  F  K  Q  N  *
601  ATGAAACCTCCGCAGTCCTTACCGCACCTTCTGGAAACAAGAGACGAGAAATGAGGTTGA  660
661  ATTGGATGCGGTTTTTAGCTGAATCAAAGAAATTGTAGTTTTTTGAAATAAAAATGTGTT  720
721  CTGTTCCATAAAAAAAAAAAAAA  743
```

Figure S23. The DNA sequence of *pdi259* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AACAGATCGAACACGCACTAGTCTACCATGTCTGTCTTCTTCTACGAGCCTTTCTACGAC   60
                                M  S  V  F  F  Y  E  P  F  Y  D
 61  TTCGAGCGTCTCTTCGACGACGCATTTTCTGCTCCTTCAACACGCGCAGGCAACCAAGTT  120
     F  E  R  L  F  D  D  A  F  S  A  P  S  T  R  A  G  N  Q  V
121  GTGCAGCGCAACAATGACGAAGGCGGAGGAGTCGTGCGCTCCTTCAGACCAAGAATGGAC  180
     V  Q  R  N  N  D  E  G  G  G  V  V  R  S  F  R  P  R  M  D
181  CTCCACGAAGACAAGGAAAAGAACCTGGTGACCGCCACATTTGAGTTCCCCGGTGTCAAC  240
     L  H  E  D  K  E  K  N  L  V  T  A  T  F  E  F  P  G  V  N
241  AAGGAGGATATCCACATTGACGTGAACAACGGCCGTCTGGCGGTGTCCTCTGAGACGAAG  300
     K  E  D  I  H  I  D  V  N  N  G  R  L  A  V  S  S  E  T  K
301  CAGTCTAGCGAGCACGAAGAGGGCGGTTACGCTGTACGTGAGCGCCGCTTTGGCCAGTTC  360
     Q  S  S  E  H  E  E  G  G  Y  A  V  R  E  R  R  F  G  Q  F
361  TCGCGCACCCTCCAATTGCCCGAAGGCACAAAGGACACCGAAATCAAAGCGTCCATGGAG  420
     S  R  T  L  Q  L  P  E  G  T  K  D  T  E  I  K  A  S  M  E
421  AATGGTGTCCTGACAGTCACATTCCCCAGATCGACCCCTGAGCAGGCGCCGAAGCGTATC  480
     N  G  V  L  T  V  T  F  P  R  S  T  P  E  Q  A  P  K  R  I
481  ACCATTGCTTGAGCTCATACTTATGATCTTCGTCTTTCGACCCACCTGTAACTATAGACC  540
     T  I  A  *
541  TTGGACTTCTTTCCTTTATTGATACTTCTTTCTTCTTGCCTTCCTCGTGTAGCCAAAATT  601
601  TCCGAATAAAAAGGATCTTGTGTACGTTGTTCAAAAA  637
```

Figure S24. The DNA sequence of *pdi301* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  ATCTTCCAACTTCAAAGTTCGAATTCACAATGCACAGCAAGCTGTTCGCACTCGTTGCTC   60
                                   M  H  S  K  L  F  A  L  V  A  L
 61  TGTTCTCTCTCCTACGCCTCGTCTCTGCGGCGGCGATGCCCCTCGAGCCTTCCTTCAATT  120
      F  S  L  L  R  L  V  S  A  A  A  M  P  L  E  P  S  F  N  L
121  TGGAAGCTCGAGTGGGTAGGACATTTATTGGGTACAACGGCTTTAGCGGTCCTGAGCGCC  180
      E  A  R  V  G  R  T  F  I  G  Y  N  G  F  S  G  P  E  R  P
181  CTCCTCAAGCGAGTGCAGGAGGTGAATTAGGTGCTGTATTTTACGTCGCGGATGCCGTGG  240
      P  Q  A  S  A  G  G  E  L  G  A  V  F  Y  V  A  D  A  V  D
241  ATCTGGCAAGACTGTTCTCTCATGGAGCGAACCCGTCACAGGATCGGATTTGTCTGATTC  300
      L  A  R  L  F  S  H  G  A  N  P  S  Q  D  R  I  C  L  I  H
301  ATGTCGACAGTACCCAATGGACGAATGTCCCTAAGACCTGGGTTCCAGAACGAATTTTGG  360
      V  D  S  T  Q  W  T  N  V  P  K  T  W  V  P  E  R  I  L  A
361  CGCAAGGTGGGAATGCGGTCAATGCCTTTGCACCTGGGGCGGTCGTTTTTGCCGGACATA  420
      Q  G  G  N  A  V  N  A  F  A  P  G  A  V  V  F  A  G  H  T
421  CGAACGCAGGACTTCCACCACAGGCGCCAGCTAGGGTTTTCCAACTTGGTGTCCGCCAGG  480
      N  A  G  L  P  P  Q  A  P  A  R  V  F  Q  L  G  V  R  Q  A
481  CTCAGATTTCTCGCCTAGTTCTTACCTCGACATGTAGTCCAGCAGGGGATTTCGCCAACC  540
      Q  I  S  R  L  V  L  T  S  T  C  S  P  A  G  D  F  A  N  Q
541  AACACCAGACGCTGAATTATGCGAGTTTAAATACCACCTGGAACATACAGCAACCTGCTT  600
      H  Q  T  L  N  Y  A  S  L  N  T  T  W  N  I  Q  Q  P  A  F
601  TTACAGCTGGACAAGTCGATGCGGTGGATCAGTCGGGAGGATTGTGGGGAATTGCCAAGG  660
      T  A  G  Q  V  D  A  V  D  Q  S  G  G  L  W  G  I  A  K  E
661  AATTTCTCATGAAATCCTGGGTGCGCTAGATAGTGTCTCCCAACGGTCGAATCATATGCG  720
      F  L  M  K  S  W  V  R  *
721  CATTCCAGACTCCGGAAACTCTCCTACCTATGTCATGTATTGTGTATATTTTCCAAAGAG  780
781  ACTTTCAATTGAATCACTCGTTCAGCGTCGAAA  813
```

Figure S25. The DNA sequence of *pdi308* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  CTTTGCAAGAGGTGCGAGTGCCGCGAATATCAGCAATGGCGTCCCTATTTTATGATGGAC   60
                                         M  A  S  L  F  Y  D  G  P
  61  CGGAATATATCATGCGCATGAATACACCTTTCAAGCCTACCAACGTCACCTTGGCTGAAG  120
       E  Y  I  M  R  M  N  T  P  F  K  P  T  N  V  T  L  A  E  V
 121  TTCATGCAGTCATTCCAAAGCATCTTCACCAGAAGAACACTCTCAAAGCTCTTTCATACG  180
       H  A  V  I  P  K  H  L  H  Q  K  N  T  L  K  A  L  S  Y  A
 181  CCGTCCGCGACATTGTCTGCGCGGTCATAGTCTACAAACTCGGATGGATGATTGATTCTT  240
       V  R  D  I  V  C  A  V  I  V  Y  K  L  G  W  M  I  D  S  F
 241  TTGCCAATTCTCTCGTTAATAACTATGGCGTTTCTTCTCTTGTCGGCTCTTTTGTTAAAT  300
       A  N  S  L  V  N  N  Y  G  V  S  S  L  V  G  S  F  V  K  W
 301  GGGGCCTCTGGGCACTCTACTGGCACTGGCAAGGTGTTATTCTAGCGGGCTGGTGGTGTC  360
       G  L  W  A  L  Y  W  H  W  Q  G  V  I  L  A  G  W  W  C  L
 361  TGGCGCACGAGGCTGGACACGGAAGTCTCTCCAACTCAAGCTGGGTTAACCATGTCGTCG  420
       A  H  E  A  G  H  G  S  L  S  N  S  S  W  V  N  H  V  V  G
 421  GATTCTCTCTGCACACATTCATCTTGGTACCCTACTATGCCTGGCGTTCATCTCACCATG  480
       F  S  L  H  T  F  I  L  V  P  Y  Y  A  W  R  S  S  H  H  A
 481  CTCACCACAAAGCGACCATGTCAATCGAACGTGACGAGAACTTCGTCCCCCGCACCCGCT  540
       H  H  K  A  T  M  S  I  E  R  D  E  N  F  V  P  R  T  R  S
 541  CCGACTACAACTTGCCCCCTGAATCCAGCGCACACATCTCGGATTATCACGACATCTTTG  600
       D  Y  N  L  P  P  E  S  S  A  H  I  S  D  Y  H  D  I  F  E
 601  AGGAAACTCCAATTTATACGCTTGCACGCATGCTCTTCATGCAGGCTCTCGGCTGGCAAT  660
       E  T  P  I  Y  T  L  A  R  M  L  F  M  Q  A  L  G  W  Q  Y
 661  ACTATCTCCTCACTAACGCTATGGGTTCCCCAATGTATCCCCCCGGCACTAACCATTTCC  720
       Y  L  L  T  N  A  M  G  S  P  M  Y  P  P  G  T  N  H  F  Q
 721  AACCTTCTTCTCCTCTTTTTAAGCCTCACGAGAGGAATGGCATTATTGCTTCCAATATCG  780
       P  S  S  P  L  F  K  P  H  E  R  N  G  I  I  A  S  N  I  G
 781  GGTTGACCGCCATGGCCAGCGTCCTGTACTTATGGACCCGGGAAGTCGGCTCCAGCAACT  840
       L  T  A  M  A  S  V  L  Y  L  W  T  R  E  V  G  S  S  N  F
 841  TCATCAAGCTTTACTTCATTCCTTACATTCTTGCGAACCATTGGATTGTCATGTTGACCT  900
       I  K  L  Y  F  I  P  Y  I  L  A  N  H  W  I  V  M  L  T  Y
 901  ACCTCCATCATACCGACCCCACTATTGCCCACTTCCGCAACAAGCAATGGTCGTTCCTCC  960
       L  H  H  T  D  P  T  I  A  H  F  R  N  K  Q  W  S  F  L  R
 961  GGGGCGCTGTTTCGACTGTCGACAGGCCTCTTCTTGGATGGGCCGGTCGTTTCTTCCTCC 1020
       G  A  V  S  T  V  D  R  P  L  L  G  W  A  G  R  F  F  L  H
1021  ATAATGTCTCCCATGACCATGTCGCTCACCACTTGTTCTCATCTATTCCTTTCTACAATC 1080
       N  V  S  H  D  H  V  A  H  H  L  F  S  S  I  P  F  Y  N  Q
1081  AACCCCAGGTAACTGAAGCCATCAAGAAGGTTCTCAAGGACGACCACAACTACGACTCCA 1140
       P  Q  V  T  E  A  I  K  K  V  L  K  D  D  H  N  Y  D  S  T
1141  CCAACACGTTCCGCGCGCTGTACCGCACATTCACTCAGTGCTGCTTCATCGAGGATGACG 1200
       N  T  F  R  A  L  Y  R  T  F  T  Q  C  C  F  I  E  D  D  G
1201  GCGATATCGTCTTCTACAAGAACAAAGACGGAAAGCTGTCCCGCGTACTCGCCGCCGATG 1260
       D  I  V  F  Y  K  N  K  D  G  K  L  S  R  V  L  A  A  D  A
1261  CTTGCGACAATCCGACGAAGAAGGAGTTGTAGGGCCTTTTATTTTCCTTGGTAACATTTG 1320
       C  D  N  P  T  K  K  E  L  *
1321  TACCGTAATAGAACAACCAACCAACGATCTGTACGACCCCATACGATACATCTCTTGATT 1380
1381  CAAATGAGCTCATAATCCTAAAAA  1404
```

Figure S26. The DNA sequence of *pdi348* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  AAGGCATTCCTTTCCCAACGAGTCATTCACCCCAGGCTAGTTCAAACATCACAATGTCAT  60
                                                            M  S  S
 61  CGCCCATAACTATCCGTCGTTCTTCTCCCTCATCGGAATCTAGTACCGCGTCGTCCTCAT  120
      P  I  T  I  R  R  S  S  P  S  S  E  S  S  T  A  S  S  S  S
121  CCCCGACACAGGCACTATATGTACCCGTTCATAGACGTAGCCCCTCCACTTCCACATCCG  180
      P  T  Q  A  L  Y  V  P  V  H  R  R  S  P  S  T  S  T  S  G
181  GTTTGGATGATGTGACCCATCAGTTTGAAGCGCAAGTAACAGATACTCACGCTCAACGGC  240
      L  D  D  V  T  H  Q  F  E  A  Q  V  T  D  T  H  A  Q  R  R
241  GTATCTACTCAACCGAATACTTACTATCGCTACGGCCGTTCGCCGCAGAGGGAATTAAGG  300
      I  Y  S  T  E  Y  L  L  S  L  R  P  F  A  A  E  G  I  K  E
301  AGAAGATAATTGCGGTTTGCCCCGAGGCAGTTTTACCCCGTCGGGTACACAAACGCGTTG  360
      K  I  I  A  V  C  P  E  A  V  L  P  R  R  V  H  K  R  V  E
361  AAAATTCTCAGCGTAGTGCCACCGAATCGACTCCAGAAACAACACCAGCACCTCTCCGTC  420
      N  S  Q  R  S  A  T  E  S  T  P  E  T  T  P  A  P  L  R  R
421  GTATCACTAGTCGCCGCACTCGACTCGCGGGTCGCGCGCCCGAGAGGAGAAAACAAGCTC  480
      I  T  S  R  R  T  R  L  A  G  R  A  P  E  R  R  K  Q  A  L
481  TTGGTCTGCATAATGATTCCTGGCGCGGCCTGGCCAGCATGCAAGCCCGCCCTCTGGTTT  540
      G  L  H  N  D  S  W  R  G  L  A  S  M  Q  A  R  P  L  V  S
541  CTGTGTAAAGCATTCGAGACTGTCCACTCTGACAAGTACTCAAATCCGAAGTCCATTGTA  600
      V  *
601  CCATAGCCAATCCGTATCAAAATCTCTTACGCCGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  660
661  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  720
721  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  754
```

Figure S27. The DNA sequence of *pdi351* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
  1  ATTCAGTCGATATCACTTGTTTGCTGATCCATCCTCGACATCCAGACATGAAGTTCTCCG   60
                                                      M  K  F  S  A
 61  CCGTTGTCCTTGCTGCCATCTTCCTATTCACCGACGTCGCCGTCGCTCGCCCGTCGCGTC  120
      V  V  L  A  A  I  F  L  F  T  D  V  A  V  A  R  P  S  R  L
121  TCCAGGAGCGTATTGCCGCTCGTGCCCGAAGCTCCCGCGTTCTCGTCCGAGCTGACGGAG  180
      Q  E  R  I  A  A  R  A  R  S  S  R  V  L  V  R  A  D  G  A
181  CAACCGTCCTCAAGGCCTCAGAATCCGTTGGCAACACCAGCCACGTCGAGTTCAGCAGCA  240
      T  V  L  K  A  S  E  S  V  G  N  T  S  H  V  E  F  S  S  N
241  ATTGGTCCGGCGCCGTCCTCGAGACCCCACCAGCTGGTCAGACTTTCACCACCGTTAGCG  300
      W  S  G  A  V  L  E  T  P  P  A  G  Q  T  F  T  T  V  S  G
301  GTACCTTCAAAGTACCTACCCCATCCGGAAACGGTGCTGCATCTGCCTGGGTCGGAATTG  360
      T  F  K  V  P  T  P  S  G  N  G  A  A  S  A  W  V  G  I  D
361  ACGGAGATACCGCCCAGAACTCCATCCTCCAGTCTGGTGTTGACTTCACCGTTAGCGGCG  420
      G  D  T  A  Q  N  S  I  L  Q  S  G  V  D  F  T  V  S  G  G
421  GGCGCGTCTCGTACCAGGCCTGGTTCGAGTGGTTCCCCAACTTCGCCATTGACTTCAGCA  480
      R  V  S  Y  Q  A  W  F  E  W  F  P  N  F  A  I  D  F  S  N
481  ACTTCCCTATCTCGTCCGGACAGACCATCACCGTTAGCGTCCACGCCACCTCCAAGACAA  540
      F  P  I  S  S  G  Q  T  I  T  V  S  V  H  A  T  S  K  T  T
541  CCGGAACTGTCGTTTTGACCAACGTCTCCACTGGCAAGTCCATCACTCAGGCCGTCAGCG  600
      G  T  V  V  L  T  N  V  S  T  G  K  S  I  T  Q  A  V  S  A
601  CCCCATCGTCTTCGGCTGCTCTTGCTGGCCAGAACGCCGAGTGGATTGTTGAGGACTTCG  660
      P  S  S  S  A  A  L  A  G  Q  N  A  E  W  I  V  E  D  F  E
661  AGGAGGGTGGTTCTCTCGTTACTCTCACCAACTTCGGCTCTGTCACCTTCACCGGCGCCA  720
      E  G  G  S  L  V  T  L  T  N  F  G  S  V  T  F  T  G  A  T
721  CTGCTTCCACCGCTTCCCAATCTGTTGGTGTCACTGGCGCTACCATCATCGACATGCAAC  780
      A  S  T  A  S  Q  S  V  G  V  T  G  A  T  I  I  D  M  Q  Q
781  AGAATGGCAAGACCCTCACTAGTGTCTCCACCACTAGCTCCTCTGTTACCGTCAACCACC  840
      N  G  K  T  L  T  S  V  S  T  T  S  S  S  V  T  V  N  H  L
841  TTTAAAATTTGAAGGGTTTCACAGTATTTATGAGATCGCGATTCGTTTATATATCGAAAT  900
      *
901  ATCACATATGTACACAGCGCTTCCCGACGCACAATTGAAACGACAATGTAATACACATTC  960
961  ATGATTCAAAAAAAAAA  977
```

Figure S28. The DNA sequence of *pdi371* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  CTTTTGTCTTCTCTTCCCAAATCATTATCCACCTTCGTCGACAGATGTTTTCCAAACGCT   60
                                                M  F  S  K  R  S
  61  CGCTTCTGACTGCGGTTCTGGGTGCATTAACTGTTGATGCCGCACCAGCGCTTGTGGAGG  120
       L  L  T  A  V  L  G  A  L  T  V  D  A  A  P  A  L  V  E  V
 121  TCTCGAGAAGGCAATCAATTACGGCCTTGTCTACGGCACAGATCAGCACTTTTCGGCCAT  180
       S  R  R  Q  S  I  T  A  L  S  T  A  Q  I  S  T  F  R  P  F
 181  TTTCTTACTTCGCGAGTACGGCGTACTGTCAGCCTAGTACCACTGTTACCTGGAGCTGTG  240
       S  Y  F  A  S  T  A  Y  C  Q  P  S  T  T  V  T  W  S  C  G
 241  GTGCCAACTGTGCCGCCAACGCAGACTTTATCCCCACCGCATCCGGAGGCGATGGATCAA  300
       A  N  C  A  A  N  A  D  F  I  P  T  A  S  G  G  D  G  S  S
 301  GTGTCCAGTTCTGGTACGTCGGCTTCTCGCCGTCGCAGAATACAGTAATTGTGGCTCACC  360
       V  Q  F  W  Y  V  G  F  S  P  S  Q  N  T  V  I  V  A  H  Q
 361  AGGGCACCGATACATCGAAAATCGAAGCTGATGCCACGGATGCCGATGCTTTCTTGGAAA  420
       G  T  D  T  S  K  I  E  A  D  A  T  D  A  D  A  F  L  E  T
 421  CATTGAATACCTCTCTTTTTCCCGGCGTCAGCAGCTCCGTGAAGGCCCACAGCGGATTCG  480
       L  N  T  S  L  F  P  G  V  S  S  S  V  K  A  H  S  G  F  A
 481  CCAATGAGCAAGCGAAGACTGCAACTGCAATCCTCTCAGCTGTTCAGAGCACCATCAAAA  540
       N  E  Q  A  K  T  A  T  A  I  L  S  A  V  Q  S  T  I  K  T
 541  CTCACTCTGCAACTGCAGTGACAGTTGTCGGGCATTCACTCGGCGCTGCTATTGCTCTGC  600
       H  S  A  T  A  V  T  V  V  G  H  S  L  G  A  A  I  A  L  L
 601  TCGACGGAGTTTATTTGCCTTTGCATATCAGCGGCGTTAGCTTCAAGACTATTGGATACG  660
       D  G  V  Y  L  P  L  H  I  S  G  V  S  F  K  T  I  G  Y  G
 661  GATTGCCCAGGGTCGGAAACCAGGCCTTTGCAGACTATGTAGACAGTCATCTGGATCTCT  720
       L  P  R  V  G  N  Q  A  F  A  D  Y  V  D  S  H  L  D  L  S
 721  CACACATTAATAATAAGGAGGACATTGTCCCTATCGTTCCTGGCCGCTTCCTGGGCTACG  780
       H  I  N  N  K  E  D  I  V  P  I  V  P  G  R  F  L  G  Y  A
 781  CCCATCCATCGGGAGAGGTGCACATCATGGATAACAACCAGTGGGTCTCCTGCCCAGGTC  840
       H  P  S  G  E  V  H  I  M  D  N  N  Q  W  V  S  C  P  G  Q
 841  AAGATAACACGAGCACAGAATGCACCGTCGGCGATGTTCCCAACATTTTCGAAGGTGACA  900
       D  N  T  S  T  E  C  T  V  G  D  V  P  N  I  F  E  G  D  T
 901  CAAGCGACCATGATGGCCCATACGACACCGTCACGATGGGCTGTTAAAAAGATGGGTGTC  960
       S  D  H  D  G  P  Y  D  T  V  T  M  G  C  *
 961  AAGTCCGACGTTGAGGTATTTGCTATCAAATCCACAGCACCTGTAGTATATTGTATAGaA 1020
1021  ATCATTTTAAAAGACCTTAAAAAAAAA  1047
```

Figure S29. The DNA sequence of *pdi372* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  AGCTTTCCTGGACAGCTTTGTTCAGCAATGATTTTCTCTGTTGTTCTCTTTTCTAGTTTA   60
                                  M  I  F  S  V  V  L  F  S  S  L
  61  GTATACAGCGCGCAGGCCATCGTCCCAGGCGTGGTCTTCGATCGCTACGTTAGCATCTGG  120
      V  Y  S  A  Q  A  I  V  P  G  V  V  F  D  R  Y  V  S  I  W
 121  TTGGAGAATACCGACTTTTCCAAAGCTGCTGCTGATCCGAACTTCGCCGCCTTGACGAAG  180
      L  E  N  T  D  F  S  K  A  A  A  D  P  N  F  A  A  L  T  K
 181  CAGGGTCTGCAACTCACCAATTTCTTCGCCGTTACGCATCCCTCCGAGCCGAATTATGTT  240
      Q  G  L  Q  L  T  N  F  F  A  V  T  H  P  S  E  P  N  Y  V
 241  TCGGTAGTCGGGGGAGAATATTTCGGAATGAACAACGACAACTTAAACAACATACCTGCT  300
      S  V  V  G  G  E  Y  F  G  M  N  N  D  N  L  N  N  I  P  A
 301  AATATATCCAGTGTTGTAGACCTTCTCGAAGACAAGGGGATCACCTGGGCCGAATATCAA  360
      N  I  S  S  V  V  D  L  L  E  D  K  G  I  T  W  A  E  Y  Q
 361  GAGGATATGCCTTCCACTGGCTTTACGGGCTTTTCGTTCTCCAAGACGTCTGCTAACGAT  420
      E  D  M  P  S  T  G  F  T  G  F  S  F  S  K  T  S  A  N  D
 421  TATGTTCGCAAACACAACCCCCTGATCATCTATGATTCTGTTTCGACGAAGCCTTCTAGA  480
      Y  V  R  K  H  N  P  L  I  I  Y  D  S  V  S  T  K  P  S  R
 481  GCCGCGAACGTCAAAAACTTCACCCTCTTTCAGCAGGATCTCGAGAGCAACAGCTTACCT  540
      A  A  N  V  K  N  F  T  L  F  Q  Q  D  L  E  S  N  S  L  P
 541  CAATGGATGTTCATTACTCCAAACATGACGAACGACGGGCACGATACCAACGTCGCCACG  600
      Q  W  M  F  I  T  P  N  M  T  N  D  G  H  D  T  N  V  A  T
 601  GCATCGACATGGGCTATCAACTTCCTCACCCTGCTCTTGAAGAATCCTAACTTTAACGCT  660
      A  S  T  W  A  I  N  F  L  T  L  L  L  K  N  P  N  F  N  A
 661  GCCAAAACTCTGATCGTACTGACTTTCGATGAAAACGGTACTAACAGCGTAGCTAATCGT  720
      A  K  T  L  I  V  L  T  F  D  E  N  G  T  N  S  V  A  N  R
 721  ATTGATACGATCGTGCTGGGCTCAGCTGTACCAGCGTCACTTGTGGGCACTCAAGACGCA  780
      I  D  T  I  V  L  G  S  A  V  P  A  S  L  V  G  T  Q  D  A
 781  ACTTACTACAACCACTATTCCGAAATTGCTACAGTCGAGGCAAACTGGGATCTACATACA  840
      T  Y  Y  N  H  Y  S  E  I  A  T  V  E  A  N  W  D  L  H  T
 841  CTCGGCCGCTACGACGTCGGTGCTAACGTCTACTCCTTCGTTGCAGCAAAGACAGGCGAC  900
      L  G  R  Y  D  V  G  A  N  V  Y  S  F  V  A  A  K  T  G  D
 901  ATCGTCGACGCACCCACCAATCCAACCTTGGCCAAGATCCTCTTGAATCTTTCATACCCC  960
      I  V  D  A  P  T  N  P  T  L  A  K  I  L  L  N  L  S  Y  P
 961  GGTCCATTTAACAGCGGTGCCTCTGGACCGCTTCCCATTCCAAACACCAGCCTTGTAGTA 1020
      G  P  F  N  S  G  A  S  G  P  L  P  I  P  N  T  S  L  V  V
1021  AATGGCCGCACTGTGCTCCCAGCTATCGCTTCTACTTGGGGAAGTGCTGCCCTGCAAAAA 1080
      N  G  R  T  V  L  P  A  I  A  S  T  W  G  S  A  A  L  Q  K
1081  TGTACGACTTATACGGGCAGCGTCAACGTTCCAAGCAACAGCAATCCCCCAATCCTTCCC 1140
      C  T  T  Y  T  G  S  V  N  V  P  S  N  S  N  P  P  I  L  P
1141  AGTGGATGCTAGACCTTGAAAGATAAGTAGTAGATACAAGATGTCAATTCCATGTCAGAA 1200
      S  G  C  *
1201  TCTTTATGTGATCTTGGGCGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1246
```

Figure S30. The DNA sequence of *PNAP1* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.

```
   1  GTGTATCAAGCTCTCCCCTGCATCGACCTTAACCAGAAGGGCTATAATGGGACGTCTTAC   60
                                                   M  G  R  L  T
  61  AGCTCTGCTCGCTTTCGTATGCTACATCACTGCCACAGCGCAGGCACAGAAGATAATATT  120
       A  L  L  A  F  V  C  Y  I  T  A  T  A  Q  A  Q  K  I  I  L
 121  GACGAACGATGATGGATGGGCAGTAGCTCAGATTAGGGCCGAATATACTGCGCTCACAGC  180
       T  N  D  D  G  W  A  V  A  Q  I  R  A  E  Y  T  A  L  T  A
 181  TGCTGGCTTCGATGTGATTCTCTCTGCGCCTGCAGAAAACGAGTCAGGAACAGGCTCGTC  240
       A  G  F  D  V  I  L  S  A  P  A  E  N  E  S  G  T  G  S  S
 241  TACTACAACCCCAACACCTCTGAAGTCCGCGTGCGAGTTCAATACTTGTACGGTTGGATC  300
       T  T  T  P  T  P  L  K  S  A  C  E  F  N  T  C  T  V  G  S
 301  ACCAGCGGAGGGAGCTAATTCCACGGATGCGCGCATAAACTACGTGAATGGATTCCCCGT  360
       P  A  E  G  A  N  S  T  D  A  R  I  N  Y  V  N  G  F  P  V
 361  CGATTCTGTCCGCTACGGAATCCAAACCTTGGCTCCCAAATTGTTTGGAACCAAACCCGA  420
       D  S  V  R  Y  G  I  Q  T  L  A  P  K  L  F  G  T  K  P  D
 421  TCTCGTCGTCAGTGGATCGAACATTGGCAATAACCTTGGTGCTACTGTTCTCATTTCAGG  480
       L  V  V  S  G  S  N  I  G  N  N  L  G  A  T  V  L  I  S  G
 481  AACTGTGGGAGCTGCAAGCGAGGCTGCGTTAGAAGGCATCCCGTCCATCGCATTCTCTGG  540
       T  V  G  A  A  S  E  A  A  L  E  G  I  P  S  I  A  F  S  G
 541  AGCTTCAGGATCTCAAGTGTCATACACCACTCTTAGCCAGACGACTTCATCCTCCACTCA  600
       A  S  G  S  Q  V  S  Y  T  T  L  S  Q  T  T  S  S  S  T  Q
 601  AGCGGTGAACATATACACCTCCCTTGTGGTCAAATTCACACAAGCGCTGGTTCAAAACCC  660
       A  V  N  I  Y  T  S  L  V  V  K  F  T  Q  A  L  V  Q  N  P
 661  CACCCCGCTCCTCCCGACAGGCACCAGCTTGAACGTCAACTTCGCATCGATAAGCAATTG  720
       T  P  L  L  P  T  G  T  S  L  N  V  N  F  A  S  I  S  N  C
 721  CGCGTCAGCGCCGGCATATAAGTTCGTGTTGACCCGAATCAATGCGAATAGCGGTGCTAC  780
       A  S  A  P  A  Y  K  F  V  L  T  R  I  N  A  N  S  G  A  T
 781  GGATGTGACTACATGCGGGACCAATCACTTGACGGCAGAGTCGACAGCCATTTCTAAAGG  840
       D  V  T  T  C  G  T  N  H  L  T  A  E  S  T  A  I  S  K  G
 841  GTGTATCGCGACTGTCAGCGTATTCAACGCCTCAACGAAGGGTGATGTTGACGCAGCAAC  900
       C  I  A  T  V  S  V  F  N  A  S  T  K  G  D  V  D  A  A  T
 901  GCAGGGTGTTGTTTTGAATAAGCTTACGTCGCTTTTGACTTGTCTGTAGCTTTACGGAGA  960
       Q  G  V  V  L  N  K  L  T  S  L  L  T  C  L  *
 961  TTGGAGGTACATAGTGAACGCCCAACGCCTGAGAAGAATTTATGTATGACAGCATTGTGA  1020
1021  TTGTATCAAAGTGTGAAGCTTGGAACTGATGGAATTAAGCGCCCATAATTCCTATATCGT  1080
1081  AATTAATAAGACACAAACGCAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1123
```

Figure S31. The DNA sequence of *pdie* and the deduced amino acid sequence. Termination codon is indicated by asterisk.