

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450117

研究課題名(和文)ポリフェノールの高度利用のための酵素の機能解析と開発

研究課題名(英文)Functional analysis and development of enzymes for the application of polyphenols

研究代表者

小関 卓也 (KOSEKI, Takuya)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70372191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンナーゼファミリーに分類される麹菌*Aspergillus oryzae*由来フェルラ酸エステラーゼBの結晶構造解析から、タンナーゼファミリー酵素の触媒残基隣のシステイン194とシステイン502とのジスルフィド結合は酵素活性に重要なことを明らかにした。また、*A. oryzae*タンナーゼのKex2様プロテアーゼによるプロセッシングを受けるLys-Arg配列に着目し、アルギニン311とアルギニン316における変異酵素を作製し、プロセッシング機構及びタンナーゼ活性に及ぼす影響について変異酵素を作成し検討したところ、プロセッシングが阻害された変異酵素では活性が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Based on the crystal structure of feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae* (AoFaeB), which has been classified as a member of the fungal tannase family, the catalytic triad residues of AoTanA are predicted to be Ser195, Asp455, and His501, with the serine and histidine residues brought together by a disulfide bond of the neighboring cysteines, Cys194 and Cys502. *Aspergillus oryzae* tannase (AoTanA), which contains two Kex2 recognition sites at positions Arg311 and Arg316, consists of two subunits that are generated by the cleavage of tannase gene product by the Kex2 proteinase. In this study, we investigated the functional role of the Kex2 recognition sites and disulfide bond between the neighboring cysteines in AoTanA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：タンナーゼ *Aspergillus oryzae* ジスルフィド結合 Kex2

1. 研究開始当初の背景

フィトケミカルはさまざまな分野での応用が進められている。その中には、多様なフェノール酸エステル化合物、フラボノイド配糖体などがあり、食品においては、その味や加工特性に関わり、また、これらは抗酸化性、抗菌性、メタボリックシンドロームパラメータ改善効果など有用機能を有するものが多い。このうち、タンニンやカテキンには没食子酸がデブシド結合(エステル結合)で存在し、茶飲料においてはそれが不溶化して白濁(クリームダウン)する原因となっている。クリームダウンの防止やビールの清澄化等のために、没食子酸を加水分解するタンナーゼが利用されている。また、没食子酸自体にも抗酸化性等の有用機能があり、カテキン分解物は機能性を向上させることができる。タンナーゼに関する研究は1960年代に *Aspergillus oryzae* の酵素の性質が報告され、その後、1990年に当該遺伝子が報告された。これまで、タンナーゼに関する報告は糸状菌由来ではこれのみで、詳細な機能解析は報告がない。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者は既に、*A. oryzae* タンナーゼ遺伝子をクローン化し、*Pichia pastoris* による発現系を構築した。*Pichia pastoris* で発現させたリコンビナントタンナーゼを用いて基質特異性、キネティクス、触媒機構、構造機能相関を明らかにする。タンナーゼは、没食子酸(3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸)を加水分解するが、天然には様々な形態のタンニンおよびカテキンが存在する。没食子酸の結合したカテキンは、(+)および(-)カテキン、(+)および(-)エピカテキン、(+)および(-)エピガロカテキンなどのように化学構造の異なるカテキンが存在することから、タンナーゼの天然基質に対する特異性、キネティクスを明らかにする。

(2) *A. oryzae* タンナーゼの成熟タンパク質は翻訳後の修飾過程で2つのヘテロサブユニットからなると報告されている(Aguilar et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 76, 47-59 (2007))。このようなプロセッシングはフェルラ酸エステラーゼでは見られず、タンナーゼに特異的な機構と考えられ、プロセッシングと触媒機構、構造機能相関から上記のエステラーゼとの基質の認識機構の違いについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *A. oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼのX線結晶構造解析から、本酵素は触媒ドメインとリッドドメインの2つからなり、また、触媒残基のセリン、ヒスチジンの隣のシステイン残基がジスルフィド結合を構成するユニークなモチーフを有し、触媒残基に隣接するジスルフィド結合は酵素活性に重要なことが示唆された(河本ら、日本農芸化学会発

表, 2011)。シークエンスアライメントから *A. oryzae* タンナーゼにも触媒残基と考えられるセリン、ヒスチジン残基の隣にシステイン残基があり、これらシステイン残基はジスルフィド結合を形成していると推察された。これらのシステイン残基をアミノ酸置換した変異酵素を作製し、タンナーゼ活性に及ぼす影響、基質特異性などを調べ、触媒作用とジスルフィド結合との相関を解析する。

(2) *A. oryzae* タンナーゼの成熟タンパク質は翻訳後の修飾過程で2つのヘテロサブユニットからなると報告されている。プロセッシングは316番目のアルギニンのC末端で切断され、リジン315-アルギニン316のように塩基性アミノ酸が連続することから Kex2 様のプロセッシングが考えられる。そこで、316番目のアルギニンをアラニンなどに置換し、プロセッシングが起こらない変異酵素を作製し、酵素精製後、変異酵素の安定性をCDスペクトルなどを用いて検証し、タンナーゼ活性に及ぼす影響を調べ、プロセッシングと触媒作用との相関を解析する。さらに、当該変異酵素の上記システイン残基をアミノ酸置換した二重変異酵素を作製し、酵素精製後、タンナーゼ活性に及ぼす影響、基質特異性などを調べ、野生型酵素との比較からジスルフィド結合の役割を解析する。

4. 研究成果

(1) *Aspergillus oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼのX線結晶構造解析に共同で取り組み、本酵素は触媒ドメインとリッドドメインの2つからなり、また、触媒残基のセリン、ヒスチジンの隣のシステイン残基がジスルフィド結合を構成するユニークなモチーフを有し、触媒残基に隣接するジスルフィド結合は酵素活性に重要なことを明らかにした(Suzuki et al., Proteins, 82, 2857-2867(2014))。

また、*A. oryzae* 由来でフェルラ酸エステラーゼの調査に用いられる4つの合成基質には全く反応せず、天然の基質からフェルラ酸を遊離する新規な酵素を取得した。本酵素のフェルラ酸エステラーゼ活性には活性中心セリン残基の両隣のトリプトファン残基が関わっていることが、変異解析から明らかとなった。本成果は、研究論文として発表した(Koseki et al., J. Mol. Catal. B: Enzym., in press)。

(2) 研究代表者は *A. oryzae* タンナーゼ(AoTanA)にも触媒残基と考えられるセリン、ヒスチジン残基の隣にシステイン残基があり、これらシステイン残基はジスルフィド結合を形成していると推察された。これらのシステイン残基をアミノ酸置換した変異酵素を作製し、タンナーゼ活性に及ぼす影響、基質特異性などを調べ、触媒作用とジスルフィド結合との相関を解析するために、リコンビ

ナントタンナーゼと野生型タンナーゼの酵素化学的性質の比較を行った。これらの研究成果に関しては、投稿論文としてまとめた (Mizuno et al., J. Biosci. Bioeng., 118, 392-395 (2014))。また、AoTanA に特徴的なループ構造及び、ループ内に存在する Kex2 様プロテアーゼによるプロセッシングを受ける Lys-Arg 配列に着目し、該当箇所に関する変異酵素を作製し、プロセッシング機構及び基質認識に及ぼす影響について検討した。A. oryzae RIB40 由来 AoTanA のループ構造内に存在する 2 カ所の Lys-Arg 配列の Arg311、Arg316 をアラニンに変異させた酵素 (AoTanA R311A/R316A) 及び Lys310 から Arg316 を欠失させた酵素 (AoTanA KR) を作製し、各酵素は Pichia pastoris を用いて発現させた。精製酵素の SDS-PAGE から R311A/R316A は wild-type と同様のプロセッシングを受けており、Arg のみの変異はプロセッシング阻害に影響しないことが示唆された。一方、KR 変異酵素ではプロセッシング阻害が確認された。KR 変異酵素では、活性が野生型酵素よりも高くなり、構造の安定化が寄与していると推察された。これらの成果は、研究論文として発表した (Koseki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 482, 1165-1169 (2017))。

(3) *Aspergillus oryzae* ラムノシダーゼ様遺伝子 (AorhaA, AorhaB, AorhaC) のうち、AorhaA 遺伝子をリコンビナントの系で発現させ、その培養上清は p-ニトロフェニル -L-ラムノピラノシドに対する活性を示した。天然基質のヘスペリジンに対しては、pNP- -L-ラムノピラノシドと比較してやや高い活性を示し、さらにナリンギンやルチンに対する活性より顕著に高く、またナリンギンとルチンではルチンに対する方がやや低かった。これはアグリコンとの結合様式が関係しており、ルチンの 3-O-グリコシド結合よりもヘスペリジンおよびナリンギンの 7-O-グリコシド結合に反応性が高く、また、ナリンギンのラムノースの -L-(1 2) 結合よりも、ヘスペリジンのラムノースの -L-(1 6) 結合に基質特異性が高いことが示唆され、その成果を学会発表した (石川ら, 日本農芸化学会 2016 年度大会)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

T. Koseki, M. Otsuka, T. Mizuno, Y. Shiono, Mutational analysis of Kex2 recognition sites and a disulfide bond in tannase from *Aspergillus oryzae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 482, 1165-1169 (2017) 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.006

T. Koseki, H. Handa, Y. Watanabe, M. Ohtsuka, Y. Shiono, An unusual feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae*: two tryptophan residues play a crucial role for the activity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, in press 査読有 DOI:

10.1016/j.molcatb.2016.11.008

T. Mizuno, Y. Shiono, T. Koseki, Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 118, 392-395 (2014) 査読有 DOI:

10.1016/j.jbiosc.2014.04.003

小関卓也, ポリフェノールの高度利用を目指したエステラーゼ研究, Peptide Newsletter Japan, 93, 5-8 (2014) 査読無 <http://peptide-soc.jp>

K. Suzuki, A. Hori, K. Kawamoto, R. R. Thangudu, T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, T. Wakagi, T. Koseki, S. Fushinobu, Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: a disulfide bond near a catalytic triad, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 82, 2857-2867 (2014) 査読有 DOI:

10.1002/prot.24649

〔学会発表〕(計 8 件)

石川真衣, 塩野義人, 小関卓也 (2016): 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来

6-O- -L-rhamnosyl- -D-glucosidase (AoRut) の諸性質, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス、京都大学(京都)

T. Koseki, N. Kijima, N. Katsumi, Y. Shiono (2016): Extraction of ferulic acid from fermented rice bran with the fungus *Aspergillus*, The 3rd

International Conference on Rice Bran Oil 2016、東京大学(東京)

石川真衣, 塩野義人, 小関卓也 (2016): *Aspergillus oryzae* 由来 -L-ラムノシダーゼの酵素学的諸性質, 日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター(札幌)

大塚基広、水野聖之、塩野義人、小関卓也 (2015): *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼのループ内に存在する Lys-Arg 配列について、日本農芸化学会東北支部第 150 回大会、東北大学(仙台)

伊藤稔、大塚基広、水野聖之、塩野義人、小関卓也 (2015): 麹菌 *Aspergillus oryzae* のタンナーゼファミリーに属するフェルラ酸エステラーゼ (AoFaeC2) の諸性質, 第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル(鹿児島)

大塚基広、渡辺裕也、塩野義人、小関卓也

(2014): *Aspergillus oryzae* 由来新規なアセチルキシランエステラーゼの特徴づけ, 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス、東北大学(仙台)
大塚基広、河本かずさ、鈴木健太郎、伏信進矢、塩野義人、小関卓也 (2014):
Aspergillus oryzae 由来フェルラ酸エステラーゼ B のリッドドメインの機能解析, 平成 26 年度日本農芸化学会北海道・東北合同支部大会、北海道大学(札幌)
大塚基広、水野聖之、塩野義人、小関卓也 (2014): *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼの触媒残基近傍のジスルフィド結合の役割, 第 66 回日本生物工学会大会、札幌コンベンションセンター(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~yshiono/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 卓也 (KOSEKI Takuya)
山形大学・農学部・教授
研究者番号：70372191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし