

機関番号：81202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880050

研究課題名（和文）担子菌由来の糖質分解酵素を用いた機能性オリゴ糖の開発

研究課題名（英文）Development of functional oligosaccharides using glycoside hydrolases from basidiomycetes

研究代表者

金野 尚武 (KONNO NAOTAKE)

財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員

研究者番号：60549880

研究成果の概要（和文）：担子菌類により形成される子実体（キノコ）中には、強力な糖質分解酵素が含まれている。本研究では、シイタケ中の新規 β -グルカナーゼを用いて、食品・医薬品等へ応用できる機能性グルカンオリゴ糖を開発することを目的とした。シイタケから β -1,3-グルカナーゼ (GLU1) および β -1,6-グルカナーゼ (LePUS30A) を精製することに成功した。両酵素ともエンド型の分解様式を有し、様々な長さの β -グルカンオリゴ糖を生産できた。 β -1,6-グルカンオリゴ糖によるマクロファージ活性化作用を確認した。

研究成果の概要（英文）：The cell walls of fungi are constructed mainly from chitin and β -1,3/1,6-glucan, and fungi are known to produce enzymes associated with cell-wall polysaccharides. In this study, we purified β -1,3- and β -1,6-glucanase, GLU1 and LePUS30A, from the fruiting body of *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom). GLU1 specifically degraded β -1,3-glucans with an endo-type manner. LePUS30A catalyzed depolymerization of β -1,6-glucan endolytically, and the enzymatic products induced TNF α production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,110,000	333,000	1,443,000
22年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物材料科学

科研費の分科・細目：農学・森林科学

キーワード：バイオマス、糖質分解酵素、担子菌、オリゴ糖、機能性食品、シイタケ

1. 研究開始当初の背景

バイオマスからの機能性材料開発が活発化する中で、多糖の低分子化物であるオリゴ糖の機能が注目され、研究成果が高まりつつある。キチン分解物の間接障害改善作用、乳糖分解物の腸内環境改善作用、グルカン分解物 (β -1,3/1,6-グルカンオリゴ糖) の免疫賦活作用や高等植物における防御反応物質とし

ての機能などが報告されている (Walter 他; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4117-4121 (1987)、Jamois 他; *Glycobiology*, 15, 393-407 (2005))。しかしながら、多糖類からのオリゴ糖合成の多くは、化学的な酸加水分解や、カビ・細菌由来の酵素を用いた低分子化法を用いているため、食品等へ応用する場合、安全性への配慮に欠けている。

一方、本申請者は、これまで種々の微生物が生産する糖質分解酵素の単離と機能解析を進めてきたが、その中で、担子菌類が形成する食用キノコ中に、強力な糖質分解酵素が含まれていることに着目した。キノコ類は収穫してから数日経つと自己消化する。キノコ類細胞壁の主成分は、 β -1,3 主鎖と β -1,6 結合した側鎖からなる β -1,3/1,6 グルカンである。岩手生物工学研究センターでは、シイタケ中の β -1,3/1,6 グルカンの分解機構に関する研究を進めてきた結果、シイタケ菌は強力な細胞壁分解酵素『 β -グルカナーゼ』を子実体中に分泌することを確認し、現在までに3種の新規関連遺伝子の特定に成功した。(Sakamoto 他; *Curr. Genet.* 48, 195-203 (2005)、*Plant Physiol.* 141, 793-801 (2006))。

2. 研究の目的

本研究では、シイタケ由来の新規 β -1,3 グルカナーゼを用いて、医薬品、機能性食品等と成り得る β -1,3/1,6 グルカンオリゴ糖を開発することを目的とした。 β -1,3/1,6 グルカンは真菌類の他にもコンブなどの藻類が貯蔵多糖として有しており、その分子量、高次構造、 β -1,6 側鎖構造の割合や長さは生物種によって異なっている。よって、これら種々の側鎖構造を有する多糖を基質として用いれば、様々な β -1,3/1,6 グルカンオリゴ糖を合成することができ、食用キノコ中の酵素を用いることで、安心かつ安全なオリゴ糖を得ることができる。また、キノコ中の糖質分解酵素に関する研究例は少なく、本研究で用いる β -1,3 グルカナーゼは新規酵素である。よって、糖質関連酵素に関する学術的に新しい知見が得られることが期待できる。また、シイタケ中の有用成分の機能を解明することで、近年、中国からの輸入量増加などにより価格および自給率が低迷しているシイタケの付加価値を高めることができる。

3. 研究の方法

(1) シイタケ子実体中の β -グルカナーゼ活性測定

シイタケ菌株として H600 株を使用した。収穫後、25°C、湿度 80%にてデシケーター内で保存し、経時的に回収した子実体を -80°Cにて保存した。凍結した子実体を粉砕し、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) でタンパク質を抽出し、70%飽和硫酸アンモニウムを加えて沈殿させた。沈殿物を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解して、粗酵素液とした。粗酵素液中に含まれる β -グルカナーゼ活性をマコンブ由来ラミナリン (from *Laminaria digitata*, Sigma-Aldrich

Inc., St Louis, MO, USA) および地衣類由来プスツラン (from *Umbilicaria papulosa*, Calbiochem, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

(2) シイタケ子実体からの β -グルカナーゼの単離

収穫から保存4日後の子実体から粗酵素液を上記のように調製した。調製した粗酵素液から各種 β -グルカナーゼを、疎水クロマトグラフィー (HiPrep phenyl column, 1.6 x 10 cm, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)、陰イオン交換クロマトグラフィー 1 (HiLoad Sepharose Q column, 1.6 x 10 cm, GE Healthcare)、サイズ排除クロマトグラフィー 1 (Superdex 75 10/30, 1.0 x 30 cm, GE Healthcare)、陰イオン交換クロマトグラフィー 2 (DEAE- TOYOPEARL PAK 650S column, 0.8 x 7.5 cm, Tosoh Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製した。精製酵素は内部配列解析 (受託分析、APRO Life Science Institute, Tokushima, Japan) に供した。

(3) β -グルカナーゼ遺伝子のクローニング

収穫から保存4日後の子実体から cDNA を調製した (Sakamoto et al. 2005)。精製酵素の N 末端配列もしくは内部配列をもとに縮重プライマーを作成し、RACE 法によりクローニングを行った。解読した塩基配列は NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)、および各種担子菌ゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>) を用いて解析した。

(4) シイタケ由来 β -グルカナーゼの機能解析

種々の β -1,3 および β -1,6 グルカンを基質として分解活性を測定することで基質特異性を調べた。 β -1,3 および β -1,6 グルカン基質として、マコンブ由来ラミナリン、アラメ由来ラミナラン (from *Eisenia bicyclis*, Tokyo Chemical Industry Co., Tokyo)、レンチナン (*Lentinula edodes*, Minato et al. 2004)、プスツラン、ゲンチオビオース、カードラン (Wako Pure Chemicals Co., Osaka)、ラミナリオリゴ糖 (DP= 2-4 and 7, Seikagaku Biobusiness Co., Tokyo)、パキマン (from *Poria cocos*)、CM-パキマン、リケナン (from *Cetraria islandica*) およびパーリーグルカン (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) を用いた。酵素反応は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2)、基質濃度 1%、37°Cにて行い、Somogyi-Nelson 法 (Somogyi; *J. Biol. Chem.* 195, 19-23) を用いて還元末端生成量を測定した。

(5) β -グルカンオリゴ糖群の生産と解析

各種 β -グルカンのシイタケ β グルカナーゼ処理による生成物は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて解析した。酵素反応を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2)、基質濃度 1%、30°Cにて行い、TLC プレートに 1.0-3.0 μ L スポットした。生成物は EtOAc/CH₃COOH /water (3:2:1 by volume) 混合液で展開し、5% (v/v) 硫酸、0.5% (v/v) thymol を含むエタノール溶液で検出した。また、必要に応じて液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) を用いてオリゴ糖の分子量を分析した。

(6) β -グルカンオリゴ糖群の生理活性評価

β -1,3/1,6 グルカンオリゴ糖を 0.4 mg/ml に調製し、RAW246.7 細胞 (1 x 10⁵ / well) に添加した。4 時間後、mRNA を回収し、Cells-to-CT Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で cDNA を合成した。リアルタイム PCR (StepOnePlus Real-Time PCR System、Applied Biosystems) で TNF α の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) シイタケ子実体中の β -グルカナーゼ活性測定

これまでの検討で、シイタケは様々な糖質分解酵素を生産することを明らかにしている。これら酵素群の一部は自身の細胞壁を分解する役割を担い、菌糸や子実体の成長、溶解、形態変化に関与していると考えられている。特に、収穫後の子実体は急激に自己消化されることから、この際に強力な糖質分解酵素が子実体中で生産されていると予想された。そこでまず、シイタケ子実体を採取後、25°C、湿度 80%にて保存し、抽出液中に含まれる β -グルカナーゼ活性を確認した (Fig. 1)。その結果、 β -1,3 グルカナーゼ活性、 β -1,6 グルカナーゼ活性ともに収穫日数が経つにつれて増加することが明らかになった。そこで、収穫後 4 日目に回収した粗酵素から、グルカナーゼの単離を行った。

(2) β -1,3 グルカナーゼの単離と機能解析

不溶性 β -1,3 グルカンであるパキマンの分解活性を基に、各種カラムクロマトグラフィーを用いて分子量 26 kDa のタンパク質を精製し GLU1 と命名した。N 末端配列を基に遺伝子をクローニングしたところ、他の糖質関連酵素とアミノ酸配列において相同性を持たないことが明らかとなった。即ち、新規糖質加水分解酵素ファミリーに属することが示唆された。また、GLU1 遺伝子をメタノール

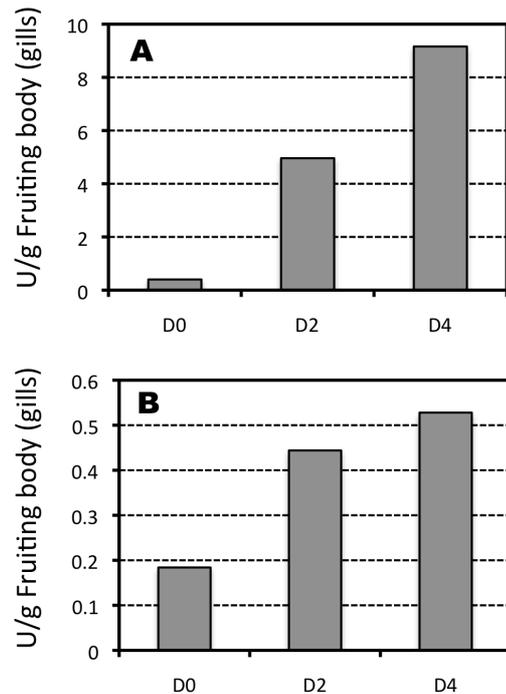


Fig. 1. 収穫後シイタケ子実体 (ひだ部位) 中の β -1,3 (A) および β -1,6 (B) グルカナーゼ活性

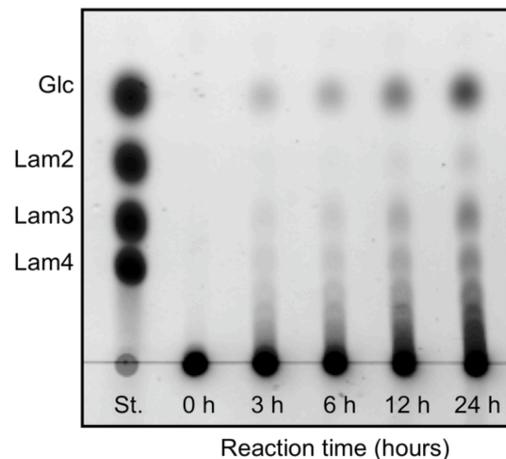


Fig. 2. GLU1 によるラミナリン分解生成物の TLC 分析. Glc, グルコース; Lam2, ラミナリビオース; Lam3, ラミナリトリオース; Lam4, ラミナリテトラオース.

資化酵母 *Pichia pastoris* に導入し組み換え酵素を得ることに成功した。

機能解析を進めたところ、本酵素はマコブ由来の β -1,3/1,6 グルカンであるラミナリン (β -1,3:1,6=7:1) に対して最も高い分解活性を示す β -1,3 グルカナーゼであり、その分解様式はエンド型であることが判明した。ラミナリン分解反応より得られる生成物として、重合度 2-4 の β -1,3 グルカンオリゴ

糖を確認した。本酵素は側鎖を高頻度に有するレンチナン (β -1,3:1,6=3:2) や、カルボキシ化した β -1,3 グルカン (CM-パキマン、CM-カードラン) に対する活性が低いことから、 β -1,3 鎖のみからなる部分を特異的に分解し、 β -1,6 グルカン側鎖や官能基によってその反応が阻害されることが予想された。この GLU1 の厳密かつ狭い基質特異性は新規のオリゴ糖を合成する上でも有効であると考えられる。

(3) β -1,6 グルカナーゼの単離と機能解析

シイタケ子実体を収穫後、25°C、湿度 80%にて保存し、4 日目の子実体 (ひだ部位) 抽出液から各種クロマトグラフィーを用いて β -1,6 グルカナーゼを精製し、LePUS30A と命名した。本酵素は担子菌から初めて単離された β -1,6 グルカナーゼである。精製酵素の内部ププチド配列を基に cDNA をクローニングしたところ、本酵素の 20 残基の予想シグナル配列を含む 524 残基のアミノ酸配列が推定された。BLASTP 検索結果から、本酵素は Glycoside hydrolase (GH) family 30 に属することが判明し、他の GH30 タンパク質とのアライメントしたところ、完全に保存されている、207 番目と 302 番目のグルタミン酸がその活性中心残基であると予想された。また、オオキツネタケ (相同性 63%)、褐色腐朽菌 *Postia placenta* (63%)、スエヒロタケ (62%)、ウシグソヒトヨタケ (58%)、*Phanerochaete chrysosporium* (60%) など担子菌類に広く保存されている遺伝子であることが明らかになった。本遺伝子の転写レベルについてリアルタイム PCR を用いて分析したところ、新鮮な子実体と比較して、収穫後の保存過程 (4

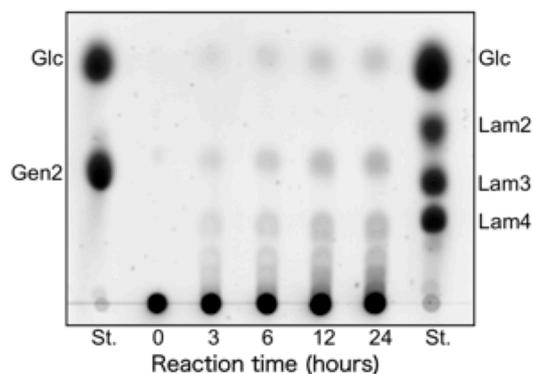


Fig. 3. LePUS30A によるイワタケ熱水抽出物分解生成物の TLC 分析。Glc, グルコース; Lam2, ラミナリビオース; Lam3, ラミナリトリオース; Lam4, ラミナリテトラオース; Gen2, ゲンチオピオース。

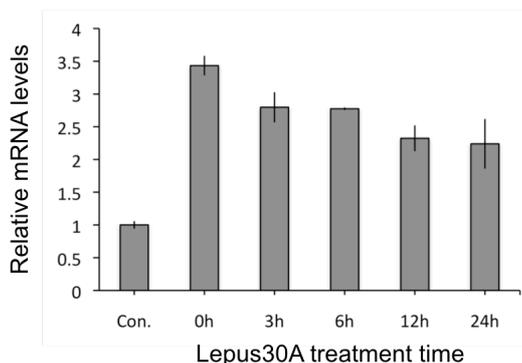


Fig. 4. LePUS30A によるイワタケ熱水抽出物分解生成物の TNF α 発現量分析

日目) では 22 倍多く転写されていた。よって、本酵素のシイタケにおける主な生理的役割は子実体の自己消化であることが示された。

本酵素による β -1,6 グルカン (市販プスツランおよびイワタケ熱水抽出物) 分解生成物を TLC および LC/MS 分析したところ、反応様式はエンド型であると考えられ (EC: 3.2.1.75)、分解反応の過程で 1-6 糖の生成が確認された。数種類のグルカンを用いて、本酵素の基質特異性について検討した結果、 β -1,6 グルカン多糖に対する高い基質特異性が明らかになった。また、海藻類由来の β -1,3/1,6 グルカン分子中の β -1,6 結合 (側鎖) も部分的に解離できることが示唆された。食用地衣類であるイワタケから細胞壁多糖成分を抽出し、シイタケ β -1,6 グルカナーゼで処理したところ、市販のプスツラン同様、様々な長さの β -1,6 グルカンオリゴ糖を合成することができた (Fig. 3)。

(4) β -グルカンオリゴ糖群の生理活性評価

β -1,6 グルカン (イワタケ熱水抽出物) およびその酵素分解物の免疫賦活性を評価するため、RAW246.7 細胞における TNF α 発現を分析した。その結果、 β -1,6 グルカンはマクロファージを活性化し、本酵素で低分子化処理しても活性が維持されることが判明した (Fig. 4)。一般的にグルカンの免疫賦活性は低分子化により消失する。一方で、腸管粘膜を通過させるためには低分子である方が有利であることから、本検討課題で開発した低分子化 β -1,6 グルカンは新規機能性材料としての応用が期待できる。

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1件)

- ① Naotake Konno, and Yuichi Sakamoto. An endo- β -1,6-glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press. DOI: 10.1007/s00253-011-3295-2.

[学会発表] (計3件)

- ① 金野尚武, 坂本裕一 “担子菌シイタケ由来 β -1,6 グルカナーゼの単離と機能解析”, 日本応用糖質科学会平成22年度大会 (2010年9月, 静岡)
- ② Naotake Konno and Yuichi Sakamoto, “Glucanase involved in *Lentinula edodes* fruiting body senescence”, 25th International Carbohydrate Symposium (2010年8月, 千葉)
- ③ 金野尚武, 坂本裕一 “シイタケ由来グルカナーゼ群の特性解析”, 農芸化学会2010年度大会 (2010年3月, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金野 尚武 (KONNO NAOTAKE)
財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員
研究者番号: 60549880

(2) 連携研究者

坂本 裕一 (SAKAMOTO YUICHI)
財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員
研究者番号: 80390889

山田 秀俊 (YAMADA HIDETOSHI)
財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員
研究者番号: 70511955