

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05808

研究課題名(和文)好乾性糸状菌の生産する脂質分解酵素の特性と遺伝子発現の解析

研究課題名(英文)Characterization of extracellular lipases produced by xerophilic molds

研究代表者

竹中 慎治 (Takenaka, Shinji)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：40314512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：鰹節のかび付け発酵熟成工程において脂質分解酵素は香味や保存性を高める鍵酵素として働いていると考えられているが、鰹節カビとその酵素群が、低水分活性下で働く発酵メカニズムは不明な点が多いのが現状である。鰹節の発酵熟成に関わる優占種カビ5種のうち、*Aspergillus chevalieri*および*A. pseudoglaucus*が分泌生産する脂質分解酵素群のタンパク質同定を行った。つづいて、遺伝子のクローニング後、異種発現系を確立し、その組換え酵素の諸性質を解明することで枯節発酵に最も寄与する脂質分解酵素の触媒化学的諸性質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鰹節の製造には、かび付けと呼ばれる好乾性糸状菌が働く発酵熟成工程が含まれる。鰹節カビとその酵素群が、低水分活性下で働く発酵メカニズムには不明な点が多いが、脂質分解酵素群は発酵工程で脂質を分解することで、香味や保存性を高める鍵酵素として働いていることが考えられる。そこで本研究では、2種の優占種が分泌するリパーゼ群について、脂質分解に特化したリパーゼの特定とその性質および同遺伝子の発現様式を明らかにした。これにより、高品質な鰹節製造につながる知見だけでなく、低水分活性下で働く加水分解酵素の耐性機構の解明や利活用にも展開できる。

研究成果の概要(英文)：A mild-flavored soup stock made from katsuobushi is an important element of traditional Japanese cuisine and is the basic seasoning responsible for the taste. Fermented and ripened katsuobushi, known as karebushi, is manufactured by simmering skipjack tuna that is then smoke-dried, fermented, and ripened in a repeated molding process by five dominant *Aspergillus* species. Our aim was to characterize and identify the lipolytic enzymes secreted by the dominant *Aspergillus* species, especially *A. chevalieri* and *A. pseudoglaucus*, which are involved in hydrolyzing lipids during the molding process. Five and three lipolytic enzymes from *A. chevalieri* and *A. pseudoglaucus* were heterologously expressed. Recombinant enzymes, rCLip 1 to 5 and rPLip 1 to 3 were compared in the terms of catalytic properties.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Aspergillus 鰹節カビ 好乾性糸状菌 脂質分解酵素

1. 研究開始当初の背景

鰹節の製造には、かび付けと呼ばれる好乾性糸状菌が働く発酵熟成工程が含まれ、同工程により香味や色調そして保存性が高まる。申請者は、鰹節カビ由来アスパルティックプロテアーゼが鰹肉の色調の変化に関わることを提唱し、発酵工程には 2 種類の優占種が関わることを見出すとともに、プロテアーゼやリパーゼなどの菌体外酵素の生産特性も明らかにした。しかし、鰹節カビとその酵素群が、低水分活性下で脂質の分解といった発酵メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

Aspergillus chevalieri および *A. pseudoglaucus* の 2 種の優占種が分泌するリパーゼ群について、脂質分解に特化したリパーゼの特定とその性質および同遺伝子の発現様式を明らかにする。さらに、優占種間の酵素特性や発現様式を比較し、鰹節カビとリパーゼ群の働きを含めた低水分活性下での発酵メカニズムを考察する。

3. 研究の方法

3.1. 使用菌株

A. chevalieri MK86 および *A. pseudoglaucus* MK88 を用い、これらからそれぞれ 5 種類および 3 種のカルボキシエステラーゼ/リパーゼの酵素および遺伝子を調製した

3.2. 酵素活性測定法

既報の方法に従い、*p*-nitrophenyl acylate を基質として活性測定した。また、Cod liver oil (CLO) をリパーゼ活性測定の天然基質とし、アルカリ滴定法でリパーゼ活性測定を行った。

3.3. *A. chevalieri* MK86 および *A. pseudoglaucus* MK88 由来脂質分解酵素の精製

既報の方法に従って、鰹節粉固体培地で培養し、得られた粗酵素液から MK86 株から 5 種の脂質分解酵素 (cLip 1 ~ cLip 5)、MK88 株から 3 種の脂質分解酵素 (pLip 1 ~ pLip 3) を各種クロマトグラフィーにより精製した。

3.4. *Pichia pastoris*-pPICZαA 発現系による脂質分解酵素の異種発現

既報の方法に従って、pPICZαA 発現ベクターおよび *P. pastoris* GS115 による異種発現を試みた。形質転換株の培養は、BMMY 培地にて行い、メタノールを添加することで目的酵素を誘導生産させた。

3.5. *E. coli*-pCold1 発現系による脂質分解酵素の異種発現

販売元記載の方法に従って、pCold I 発現ベクター大腸菌 HST08 による異種発現を試みた。形質転換株の培養は、LB 培地にて行い、IPTG を添加することで目的酵素を誘導生産させた。

3.6. *A. oryzae*-pUNA 発現系による脂質分解酵素の異種発現

既報の方法に従って、pUNA 発現ベクターおよび *A. oryzae niaD* による異種発現を試みた。形質転換株の培養は、DPY 培地にて培養することで目的酵素を誘導生産させた。

3.7. 組換え脂質分解酵素の精製

各異種発現系により得られた粗酵素液を、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) にて 2~3 日透析した。透析後サンプルを用いて DEAE-Toyopearl による精製を行った。

3.8. 親株由来及び組換え脂質分解酵素の特性解析

3.8.1. *p*-nitrophenyl acylate に対する加水分解特性

精製酵素について鎖長の異なる 8 種類アシルエステル基質を用いてリパーゼ活性測定を行った。

3.8.2. 酵素活性に与える水分活性の影響

鰹節の発酵熟成は、低水分活性下で進行することから、多価アルコールや糖類を反応液に添加することで疑似的に類似した環境下を再現し、酵素活性に与える水分活性の影響を調べることとした。

3.8.2. 酵素反応速度論解析

基質濃度 1-8 mM の範囲で行った。反応温度は 40 とし、反応時間は 30 min とした。

3.9. Cod liver oil (CLO) との反応により遊離した脂肪酸の精製と GCMS による組成分析

CLO を基質とした反応、反応液から遊離脂肪酸の抽出および精製、それらのメチルエステル化と GCMS 分析は既報の方法に従った。

3.10. 脂質分解酵素遺伝子の発現

A. chevalieri MK86 および *A. pseudoglaucus* MK88 を固体培養し、販売元添付のマニュアルに従って、RNA の抽出および cDNA の調製を行った。それぞれの脂質分解酵素遺伝子用の PCR プライマーを設計し、増幅量を調べた。

4. 研究成果

4.1. *A. chevalieri* MK86 および *A. pseudoglaucus* MK88 由来脂質分解酵素の異種発現

MK86 株および MK88 株からそれぞれ 5 種類および 3 種のカルボキシエステラーゼ/リパーゼの異種発現を試みた (Table 4-1)。その結果、MK86 株由来 cLip 3 以外は組換え酵素として

調製する方法を確立できた。

Table 4-1. Heterologous expression of lipolytic enzymes from strain MK86 and strain MK88

Enzyme	Expression host-vector system	Enzyme activity (U/ml)
Strain MK86		
rcLip 1	<i>P. pastoris</i> -pPICZαA	0.81±0.0084
	<i>A. oryzae</i> -pUNA	0.63±0.018
rcLip 2	<i>P. pastoris</i> -pPICZαA	5.3±0.042
	<i>A. oryzae</i> -pUNA	2.7±0.079
rcLip 3		N.A.
rcLip 4	<i>E.coli</i> -pCold I	6.6±0.12
rcLip 5	<i>A. oryzae</i> -pUNA	5.9±0.11
Strain MK88		
pLip 1	<i>A. oryzae</i> -pUNA	2.7±0.62
pLip 2	<i>A. oryzae</i> -pUNA	3.2±0.74
pLip 3	<i>A. oryzae</i> -pUNA	0.030±0.02
Empty vector	<i>A. oryzae</i> -pUNA	< 0.007

4.2. *A. chevalieri* MK86 および *A. pseudoglaucus* MK88 由来脂質分解酵素（組換え酵素）の特性解析

MK86 株および MK88 株由来脂質分解酵素の特性をまとめた (Table 4-2)。

p-Nitrophenyl acylate (C2~C16) に対する加水分解活性を調べた結果、**rcLip 1**、**rcLip 2** および **cLip 3** は **C4**、**rcLip 4** は **C2** に対して高活性を示した。一方、**rcLip 5** は **C6~C12** の幅広い基質で高い活性が確認された。つづいて、魚油 (**CLO, cod liver oil**) に対する酵素活性を調べたところ、**rcLip 5** が最も高い活性を示し、次いで **rcLip 2** が高活性であった。さらに、**CLO** の加水分解後の遊離脂肪酸構成比を調べたところ、*A. chevalieri* 粗酵素液の結果と類似していた。酵素間で比較すると、5 種の中で飽和脂肪酸が占める割合が高かったのは **rcLip 1** および **cLip 3** で、5 種の中で一価不飽和脂肪酸が占める割合が最大となったのは **rcLip 5** であった。

鯉節の発酵熟成は乾燥条件で行われるため、グリセロールもしくはソルビトールにより疑似的に低水分活性を再現した条件で、酵素活性に与える影響を調べた。その結果、**rcLip 1** および **rcLip 4** は水分活性の低下に伴って、酵素活性が増大したが、**rcLip 2** および **cLip 3** は減少した。また、反応速度論パラメーターに与えるグリセロール濃度の影響を調べると、**rcLip 1** および **rcLip 5** は、基質に対する親和性と触媒活性の変化に相違がみられた。親株における各酵素遺伝子の発現量を比較すると、**cLip 1** および **cLip 5** 遺伝子の発現量はその他 3 種の遺伝子と比較して極端に少なかった。得られた結果から鯉節の発酵熟成に関わる脂質分解酵素として遺伝子発現量と **CLO** に対する酵素活性を基にすると **cLip 2**、遺伝子発現量と低水分活性下での酵素発現を基にすると **cLip 4** が働くと言える。また、発現量は少ないが、**CLO** に対して高活性な **cLip 5** も発酵熟成に強く関わると結論した。**rpLip 1** から **rpLip 3** については現在継続して研究を行っており、**rpLip 1** と **rcLip 2**、**rpLip 2** と **rcLip 5** 間で触媒化学的な特性は類似していた。これは、アミノ酸レベルの類似性が **80%** であるためと考えられる。

Table 4-2. Characteristics Analysis of lipolytic enzymes from strain MK86

	cLip 1	cLip 2	cLip 3	cLip 4	cLip 5
Heterologous expression ^a	A	A	N. D.	E	A
pNP ester	C4&C6	C4&C6	C2~C6	C2	C6~C12
Hydrolysis of CLO (/g)	12.1	45.4	2.4	10.1	622
Released fatty acid	$C_{14:0} > C_{16:0} = C_{18:0}$	$C_{16:0} = C_{18:0} > C_{14:0}$	$C_{14:0} > C_{16:0} = C_{18:0}$	$C_{16:0} > C_{18:0} > C_{14:0}$	$C_{16:0} > C_{18:0} > C_{14:0}$
Effect of a_w glycerol ^b	G. Inc.	S. Dec.	Dec.	G. Inc.	S. Dec.
Effect of a_w sorbitol ^b	Inc.	N. Chg.	N. Chg.	G. Inc.	N. Chg.
Gene expression	12	40	54	51	2.4

^a Organism (host): A, *A. oryzae*; P, *P. pastoris*; E, *E. coli*

^b Water activity (a_w)

N. D. : No Data; G. Inc. , Great Increase; Inc. , Increase; Dec, Decrease; S. Dec, Slight Decrease; N. Chg. , No Change.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takenaka Shinji, Ogawa Chiaki, Uemura Mariko, Umeki Tomoya, Kimura Yukihiro, Yokota Satoko, Doi Mikiharu	4. 巻 353
2. 論文標題 Identification and characterization of extracellular enzymes secreted by <i>Aspergillus</i> spp. involved in lipolysis and lipid-antioxidation during katsuobushi fermentation and ripening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 109299 ~ 109299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Shinji, Takada Airi, Kimura Yukihiro, Watanabe Masanori, Kuntiya Ampin	4. 巻 62
2. 論文標題 Improvement of the halotolerance of a <i>Bacillus</i> serine protease by protein surface engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Basic Microbiology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jobm.202100335	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Shinji, Nakabayashi Reina, Ogawa Chiaki, Kimura Yukihiro, Yokota Satoko, Doi Mikiharu	4. 巻 327
2. 論文標題 Characterization of surface <i>Aspergillus</i> community involved in traditional fermentation and ripening of katsuobushi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 108654 ~ 108654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 卓巳, 米子 響, 木村 行宏, 横田 仁子, 土居 幹治, ○竹中 慎治
2. 発表標題 鯉節カビ <i>Aspergillus</i> 属系状菌による鯉節（荒節）の燻煙香成分の代謝分解
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川有咲, 仙波弘雅, 木村行宏, 横田仁子, 土居幹治, 竹中慎治
2. 発表標題 Aspergillus sydowiiの生産する耐塩性 -グルタミルトランスペプチダーゼの特性解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○梅木智哉, 上村真理子, 木村行宏, 横田仁子, 土居幹治, 竹中慎治
2. 発表標題 Aspergillus chevalieri由来カルボキシエステラーゼ/リパーゼの特性解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○斉藤大輔, 木村行宏, 横田仁子, 土居幹治, 竹中慎治
2. 発表標題 好乾性糸状菌が生産する耐塩性セルラーゼの探索と諸性質の検討
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川千晶, 上村真理子, 木村行宏, 横田仁子, 土居幹治, 竹中慎治
2. 発表標題 鯉節カビAspergillus 属糸状菌が生産する脂質分解酵素の特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------