

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450237

研究課題名(和文)きのこにおけるGABA生合成の解析とGABA強化機能性きのこ栽培への応用

研究課題名(英文) Analysis of GABA formation in mushroom and its application for cultivation of GABA enriched mushroom

研究代表者

白坂 憲章 (SHIRASAKA, Norifumi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：20268452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：食用きのこのγ-アミノ酪酸(GABA)生成系を明らかにするために、機能性成分であるGABAの生成に関与する酵素をマイタケ、シイタケ、エノキタケから精製し、その性質を検討した。その結果マイタケ、エノキタケの酵素はグルタミン酸とのみ反応しグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)と推定されたが、シイタケの酵素はグルタミン酸以外にもアスパラギン酸も基質とすることがわかった。シイタケの酵素については内部アミノ酸配列の情報からシイタケのゲノム上でフォスファチジルセリン脱炭酸酵素(PSD)と予測されている遺伝子がコードする酵素であると推定されたが、フォスファチジルセリンの脱炭酸反応を確認することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the mechanisms for gamma-aminobutyric acid (GABA) accumulation in edible mushroom, we purified and characterized the enzymes for GABA formation from *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. The enzymes from *G. frondosa*, and *F. velutipes* enzyme used only L-glutamic acid as substrate for decarboxylation reaction so that these enzymes should belong to glutamic acid decarboxylase. However, the enzyme from *L. edodes* can use aspartic acid, other than glutamic acid, as substrate for the reaction. The internal amino acid sequences of this enzyme showed that the enzyme should be phosphatidylserine decarboxylase (PSD) of *L. edodes*. However, the reaction of PSD couldn't be detected.

研究分野：応用生物学

キーワード：グルタミン酸脱炭酸酵素 フォスファチジルセリン脱炭酸酵素 GABA シイタケ マイタケ エノキタケ

1. 研究開始当初の背景

きのこは古来より日本人の食生活に深くかかわる食材で、食物繊維を豊富に含み低カロリーであるだけでなく、近年は健康食材として広く認知されるようになってきている。しかし、現在栽培きのこは栽培系の合理化によるコスト削減により販売価格が急激に低下しており、利益率の低下が著しく、将来的に産業として成立しなくなる恐れも指摘されている。この状況を打破するには、栽培きのこを適正な価格で売買する必要がある、そのためには適正な価格に見合う品質とはなにであるかという明確な基準が必要になる。その基準の一つとして考えられるのが γ -アミノ酪酸 (GABA) やオルニチン (Orn) などの機能性アミノ酸の含有成分であり、こういった成分を一定以上含むきのこを適正な価格で販売できるようにすることで、きのこの価格低下に歯止めをかけることも可能と考えられる。しかし、これまでに公表されているこういったアミノ酸の含量に関する情報は、きのこの使用する株の違いや栽培条件による含量がばらつき、流通・保存の間の含量変化といった可能性については考慮されていない。

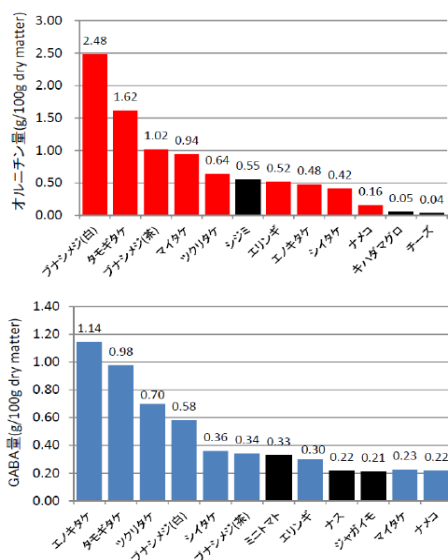


図. 食用きのこの Orn (上) および GABA (下) 含量

本研究を開始するに先立ち、予備的検討と

して代表的な市販栽培きのこのアミノ酸組成の分析を行った。その結果、食用きのこのなかでもエノキタケは乾燥重量 100g あたり 1.14g の GABA を、フナシメジは乾燥重量 100g あたり 2.48g のオルニチンを含み、一般に GABA や Orn を豊富に含むとされるトマト (0.33g GABA /100g 乾燥重量) やシジミ (0.55g Orn/100g 乾燥重量) と比較しても、これらの機能性アミノ酸を同等もしくは多く含んでいることが明らかとなった。(図)。

ここで、GABA および Orn は共にグルタミン酸から生合成されるアミノ酸であり、きのこにおいてはグルタミン酸を GABA や Orn へと変換する酵素系の強弱が、これらの成分の含量に強く関与することが示唆される。つまり、栽培きのこにおけるグルタミン酸代謝系を明らかにすることによって、機能性アミノ酸の含量を栽培時だけでなく、保存・流通時においてもコントロールすることができると考えられる。

2. 研究の目的

食用きのこに含まれる機能性成分として知られる GABA は、きのこに特徴的なアミノ酸であるグルタミン酸 (Glu) から生合成される。栽培きのこに含まれるこれらの成分の含量が栽培・処理・保管の条件によりどのように影響を受けるかを明らかにし、機能性アミノ酸を強化した栽培きのこを安定的に供給できる技術を提案することを最終目的としているが、食用きのこにおいてはこれまで GABA 生成がどのような酵素によってなされているかについてはほとんど明らかになっていない。

食用きのこの GABA 含量はエノキタケにおいて高く、GABA はグルタミン酸の脱炭酸により生成することは報告されているが、反応を触媒する酵素の性質や、酵素をコードする遺伝子についても明らかになっていない。

食用きのこにおける GABA 蓄積を制御するには GABA 生成と代謝に関する酵素系を明らかにする必要があるため、我々は、すでにマイタケ子実体からグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を単一に精製し、その性質を明らかにしてきた。本研究では、エノキタケやシイタケなどからも同様の酵素を精製し、マイタケの酵素との比較を行い、性質を明らかにしていく。さらに、得られた精製酵素のアミノ酸配列を決定し、その情報をもとに酵素遺伝子のクローニングについて検討を行ったので報告する。

3. 研究の方法

(1) シイタケおよびエノキタケの GABA 生成酵素の精製

まず、はじめに市販のシイタケ、エノキタケより GABA 生成に関与する酵素の精製を試みた。市販の子実体をミキサーにて破碎し、遠心上清にグルタミン酸の脱炭酸活性が得られるものをスクリーニングした。酵素の精製は、すでに報告しているマイタケ由来の酵素の精製法にならい、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーにて行った。グルタミン酸の脱炭酸反応は、グルタミン酸を基質として補酵素にピリドキサルリン酸を添加した反応系で生成する GABA を検出することで行った。GABA の分析は薄層クロマトグラフィーで判定的に、もしくはガスクロマトグラフィーで定量分析を行った。精製度合いの確認は SDS-PAGE もしくは HPLC-GPC により行った。

(2) シイタケ GABA 生成酵素の同定とクローニング

シイタケ子実体から得られた精製 GABA 生成酵素をリジルエンドペプチダーゼで消化後、SDS-PAGE で分離したものを PVDF

膜にブロッティングを行った。膜上の該当するバンドの N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーにて決定した。得られたアミノ酸配列情報をもとに森林総合研究所のシイタケ全ゲノムデータベースを用いて検索を行い、該当するたんぱく質の同定を行った。また、得られた情報をもとに cDNA クローニングを試みた。

(3) エノキタケ、マイタケの全ゲノム情報の解析

エノキタケ、マイタケより抽出したゲノム DNA を次世代ゲノムシーケンサーにより解析を行った後、CLC ゲノミクスワークベンチによりアセンブルを行い、精製酵素のアミノ酸配列からデータベース検索が可能な全ゲノム情報のデータベースを作成した。

4. 研究成果

(1) シイタケおよびエノキタケの GABA 生成酵素の精製

市販品として手に入る数種のエノキタケ、シイタケを用いてグルタミン酸の脱炭酸反応の局在性を検討したところ、エノキタケではすべての市販品にて遠心後の沈殿に活性が見られた。一方、シイタケでは上清に活性が確認された。シイタケからの酵素の精製は、子実体破碎上清を実験試料として用い、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより電気泳動的に単一のタンパク質バンドを得ることができた。一方、遠心後の沈殿に活性が見られたエノキタケ由来の酵素に関しては沈殿を用いて酵素の性質の検討を行った。

その結果、マイタケ及びエノキタケ由来の酵素は L-グルタミン酸にのみを基質として脱炭酸反応を触媒するのに対して、シイタケの酵素は L-グルタミン酸以外にも L-アスパラギン酸などの炭素数の異なる α -アミノ酸

にも作用することが明らかとなった。

(2) シイタケ GABA 生成酵素の同定

上記で得られた精製酵素のアミノ酸配列分析を行い、得られた情報を森林総合研究所が提供するシイタケ全ゲノム配列データベースと照らし合わせるにより酵素の同定を試みたところ、フォスファチジルセリン (PS) 脱炭酸酵素 (PSD) と 100% 一致した。PSD は生物の細胞膜の重要な構成成分であるフォスファチジルエタノールアミン (PE) を PS から生成する、リン脂質の生合成系における重要な酵素である。しかし、これまでに PSD が PS 以外にアミノ酸などの脱炭酸を触媒するという報告はなかったため、精製したシイタケ由来の酵素を用いて基質特異性の検討を含めた性質について検討を行った。しかし、PSD 活性を検出することはできなかった。データベース上で PSD とされているアミノ酸配列は BLAST 検索によっても他生物由来の PSD や GAD と相同性はそれぞれ 50% 程度、50% 以下であったことより、本研究にて得られたシイタケの酵素は GAD、PSD のどちらとも異なる酵素である可能性も示唆された。

(3) エノキタケ、マイタケの全ゲノム情報の解析

本研究の開始時にすでに N 末端アミノ酸配列の情報を得ていたマイタケ由来の酵素については、アミノ酸配列情報をもとに設計したプライマーを用いてクローニングを試みたが、PCR による断片の増幅が見られなかった。そのため、マイタケの全ゲノム情報を取得し、データベース化することによりクローニングに必要な情報を得るため、次世代ゲノムシーケンサーを用いた配列解析を行った。しかし、マイタケの全ゲノム情報を得ることはできたが、アミノ酸配列情報に合致するゲノム配列を発見することはできなかつ

た。これは、今回解析に用いたゲノムは、マイタケの二核菌糸から抽出した試料であったため、データのアッセンブルに問題があり、正しいデータベースを作成できなかった可能性も考えられるため、今後、マイタケ細胞のプロトプラスト化もしくは単孢子分離によって一核菌糸を調製し、ゲノム解析に用いることでより精度の高いデータベースの構築を進め、酵素遺伝子の同定と解析を試みていく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

白坂憲章: キノコ類微生物の子実体形成機構の解明を目指したゲノムデータベースの構築, 糸状菌分子生物学コンファレンス, 2016 年 11 月 18 日, 京都大学宇治おうばくプラザ (京都府宇治市)

K. IWAMOTO, Y. FUKUTA, N. SHIRASAKA: Study on the enzyme related with GABA formation in *Lentinula edodes*, Pacificchem 2015, December 18, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

岩元和子・福田泰久・白坂憲章: 食用きのこ子実体における GABA 生成に関する酵素について, 日本きのこ学会第 19 回大会, 2015 年 9 月 5 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

N. SHIRASAKA: Enzymes for GABA formation in edible mushroom, 16th RGJ congress, June 12, 2015, Pattaya, Thailand

岩元和子・福田泰久・白坂憲章: シイタケ (*Lentinula edodes*) における GABA

生成に関する酵素について，日本農芸化学会大会，2015年3月28日，岡山大学（岡山県岡山市）

6．研究組織

(1)研究代表者

白坂 憲章 (SHIRASAKA, Norifumi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：20268452

(2)連携研究者

福田 泰久 (FUKUTA, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：80609602