

リパーゼの機能と食品への応用

1. はじめに

リパーゼは油脂（高級脂肪酸のトリアシルグリセロール）の加水分解を触媒する酵素に与えられた総称で、その存在は古く1834年に J. Eberle により、さらに1856年に Cl. Bernard によって、膵臓中にその存在が確認されて以来、アミラーゼ、プロテアーゼとともに三大消化酵素のひとつとして重要視され、医学、生理学、生化学その他の分野で多くの研究が手掛けられてきた。研究歴史がこのように古いにもかかわらず、他の主要な加水分解酵素に比べるとリパーゼの研究の進展は取り残されてきた。1960年代には、アミラーゼ、プロテアーゼの研究進展はめざましく、その数多くの利用技術が現在の食品産業を始めとする産業界に定着していった。一方、リパーゼは基礎研究が、1970年代に始まり、石油ショック対策の一環として、リパーゼによる油脂の改質などの工業的利用が考えられるようになった。リパーゼの応用研究が立ち遅れた原因は、リパーゼの基質が水に溶けず反応系が不均一で行われるため、その反応速度論的解析が困難であり、研究上、酵素の真の挙動をとらえ難いことが挙げられる。さらに、リパーゼの精製が容易に達成されなかったことも一因である。1980年代になると、先端技術のひとつとして産業界では、バイオテクノロジーが台頭する時期となり、生体触媒（酵素）の利用に注目がさらに集中し、リパーゼの実用化研究も一気に進んだ。リパーゼは動物のみならず、植物、微生物に至るまで広く分布している酵素であるが、リパーゼの応用研究の現況は、医療、薬学の分野を除いては、ほとんどが微生物供給源のリパーゼに関するものである。これは、微生物由来のリパーゼがコファクターを必要とせず不安定に機能を発現することに加えて、精製方法が容易であることも一因になっている。各方面で微生物リパーゼの工業生産が試みられ、その製造技術が確立されるに従って、多種類の微生物リパーゼが純化されるようになった。そして、それらの比較研究から、供給源の相違によるリパーゼの多様性が実証された。この成果は、リパーゼの用途拡大の指標となるとともに、応用に際しては、個々の目的に合致する特性をもつリパーゼを選択することが重要課題であることを示唆していた。

2. リパーゼの構造的特徴と反応特性

1991年に初めて、*Rhizomucor miehei* 由来のリパーゼの立体構造が X 線結晶解析によって解明されてから¹⁾、これまでに、10数種類の動物由来リパーゼや微生物由来リパーゼの三次元構造が報告されている。これらのリパーゼの分子構造比較研究から、多くのリパーゼの活性中心を構成するアミノ酸残基群は、セリン、酸性アミノ酸残基（アスパラギン酸など）、ヒスチジンと同定され、セリン系プ

ロテアーゼと同じ活性中心であることが判明している²⁾。この活性中心を覆うように、シート構造のフタ構造があることがリパーゼの立体構造の特徴である(図1)。リパーゼ自身は水溶性であるが、水溶液中では、リパーゼの疎水性の強い活性中心はフタ構造に覆われている「不活性型」酵素分子が多勢を占めている。この「不活性型」酵素は基質と相互作用することはできない。水溶液中においても、リパーゼに油脂などの疎水性の強い基質が近接したり、エマルジョン化された脂溶性成分が近づいたりして、酵素周辺の環境が疎水的になると、リパーゼのフタ構造が開化し、疎水性の活性中心が外側にむき出しになる「活性型」酵素分子が増えてくる。フタ構造の開いたリパーゼは、疎水性の強い基質との相互作用が可能になる。リパーゼ分子のこの構造的特徴は、その反応特性に大きな影響を与えている。これまでのリパーゼの反応機構の解析から、リパーゼは不溶性基質に作用する酵素であると定義されている。この点で、狭義のエステラーゼ(水に可溶のエステルを加水分解する酵素)と区別される。また、リパーゼが油水界面の生じたところでその活性を発現し、界面面積の増加に従って、酵素活性の作用力が増大するという反応特性も、リパーゼ分子内のフタ構造の機能で説明できる。多くのリパーゼ分子のフタ構造の中に、トリプトファン残基が存在することがわかっているが、このトリプトファンの蛍光変化を追究することで、フタ構造の構造変化を検出することが可能であった³⁾。リパーゼ反応特性のもうひとつの大きな特徴は、広い基質特異性を有することである。本来、リパーゼは、トリアシルグリセロールをグリセロールと脂肪酸に加水分解したり、この逆のエステル化を触媒したりする。しかし、実際には、リパーゼは、トリアシルグリセロールや脂肪酸だけでなく、エステル結合やカルボキシル基、水酸基を有する水溶性および不溶性の様々な物質に作用できる。もちろん、基質の分子構造に依存して、触媒

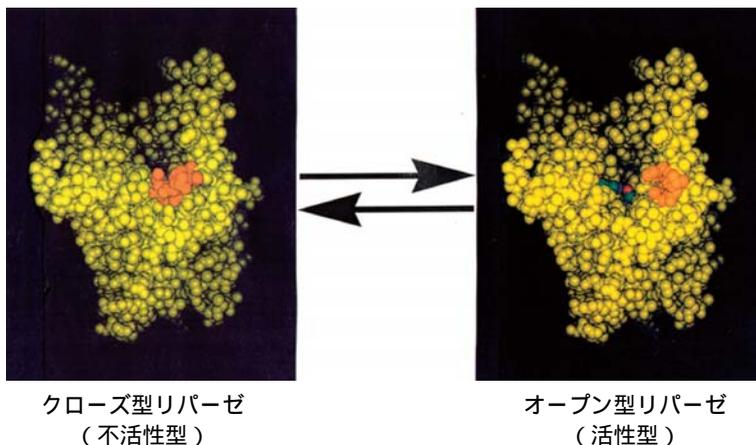


図1 Rhizomucor miehei リパーゼの立体構造変化

速度，生成物の収率は影響を受ける。また，使用するリパーゼの種類によっても，反応速度などは大きく変動する。これらのリパーゼの酵素的特性を利用して，これまでに油脂の改質以外にも，殺虫剤（ピレスロイド）の光学活性アルコールの生産，テルペンアルコールエステル合成，コレステロールエステル合成などの有用物質が工業レベルで生産された⁴⁾。また，診断用試薬の製造分野でもリパーゼを利用した研究が進んでいる。水と油の境界面を有する不均一系で酵素が作用すること，広い基質特異性を有すること，由来種に依存して反応特性に多様性があること，リパーゼのこれらの酵素的特徴を認識することがリパーゼの応用研究には必要である。

酵素活性の阻害は，酵素の利用技術に関する重要なテーマであり，特に不溶性基質に対して不均一反応系で作用するリパーゼの場合，活性化や阻害の機構は，他の一般の酵素に比べてより複雑である（現在までに解明されている膵臓リパーゼの生体内での作用機構のモデルを図2に示す）。これまでに，リパーゼの活性部位に不可逆的に結合して，脂質の加水分解活性を阻害するオリスタットが，研究開発され，肥満予防臨床薬として欧米では処方されている⁵⁾。また，近年では，経口摂取した脂質の腸管からの吸収を阻害する物質として，塩基性タンパク質ポリリジンが見つけられている。ポリリジンは，脂質のエマルジョン形成に影響を与え，脂質の加水分解を阻害することがわかっている。オリスタットが膵臓リパーゼに直接作用する酵素阻害剤であるのに対し，ポリリジンは，酵素反応を阻害する反応阻害剤であると推測されている。また，工業的にリパーゼを触媒として使用する場合には，有機溶媒によるタンパク質の高次構造の変性によるリパーゼ活

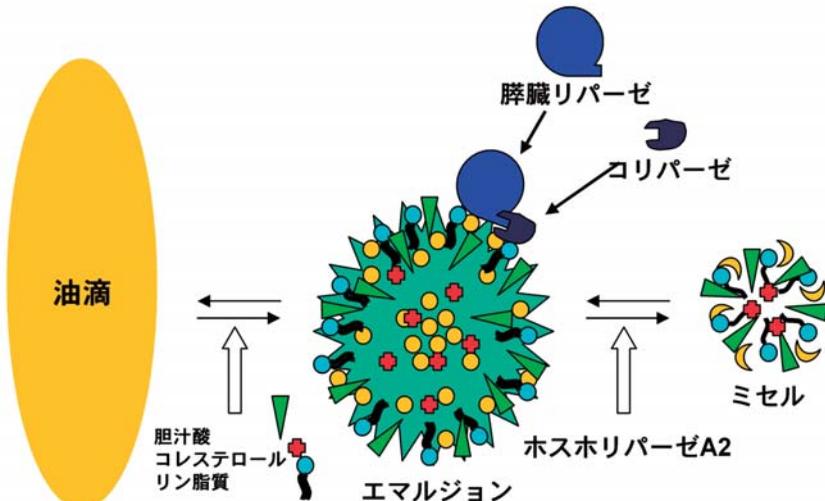


図2 食品に含まれる脂質の消化過程におけるリパーゼの作用

性阻害や、反応生成物による酵素活性阻害、反応系に含まれる水分含量による反応平衡の移動などが問題になってくる。

3. リパーゼの反応系の検討

酵素は、熱処理や化学処理、有機溶媒の影響により、高次構造の一部が破壊されると触媒機能を消失する。しかしながら、リパーゼは、不溶性基質に作用するという特性上、他の加水分解酵素類と比較すると、有機溶媒耐性能が比較的高い。1976年に、*Rhizopus arrhizus* によるオレイン酸グリセロール合成の反応系を有機溶媒 (*n*-ヘプタン) に変換しても、酵素活性が70%も残存することが発見されて以来、リパーゼの触媒系には、様々な有機溶媒が添加されるようになった。リパーゼの反応系に添加する溶媒は、*n*-ヘプタンの他に、*n*-ヘキサン、イソオクタンなど極性の低いものが適している。逆に、アセトンのような極性有機溶媒類はリパーゼ活性をかなり低下させる。また、リパーゼ分子が活性を発現するのに必要な高次構造を維持する上で、有機溶媒は最小限の水を添加しなければならない。一般的有機成分分野でリパーゼ反応に用いられる溶媒の種類は、いろいろあるが、全てのリパーゼ反応に等しく有効であるとは限らず、リパーゼの種類、基質の種類、溶媒の濃度、水の濃度、酵素の濃度や状態、反応温度、反応方法（攪拌条件）、反応時間などによって、溶媒の効果は多様に異なるので、個々の利用目的に応じて詳細な検討が必要である。概して、リパーゼの利用には、エステル分解合成のいずれの場合でも非極性有機溶媒がよく用いられている。水に不溶の基質に作用するリパーゼの場合、適当な有機溶媒存在下に反応が著しく増大する理由については、まず、第一に有機溶媒により基質分子の存在状態が変化すること、第二には、酵素と溶媒との相互作用により、酵素の高次構造に変化が生じ、その結果安定性や活性発現に影響が及ぶことが考えられる。さらに、反応溶液の水の濃度を低くすると、反応平衡が合成側に傾くことなどが考えられる。

4. リパーゼの修飾

エステル合成反応などのリパーゼを触媒とした合成反応には、有機溶媒の使用が可能であったが、一方では、反応系への有機溶媒添加で、著しく活性を損ねるリパーゼもあった。有機溶媒による酵素分子の変性を阻止するために、リパーゼを固定化させたり、修飾したりする方法が考案された。また、リパーゼを応用の視点から人為的に改質する試みも最近増加しつつある。それらは、大別して、担体による酵素の固定化によるリパーゼの反応性の変化と特定の高分子化合物や生体成分（リン脂質、糖）による酵素分子の修飾による改質である。例えば、*Geotrichum.candidum* リパーゼをポリアリルアミンビーンズにより共有結合で固定化すると、有機溶媒（イソオクタン）に対する耐性が増大し、pH 安定性の範囲もアルカリ側に広がった。また、反応の至適温度も約10 上昇して50 となった。

さらに、エステル合成反応における基質特異性が広がった。このように、固体油脂の分解や合成へのリパーゼの利用の観点からは、固定化による耐熱性の変化が注目の対象となるが、*Geotrichum.candidum* のリパーゼのように固定化で、60 での反応が可能になると、固体エステル合成への利用も期待される。また、酵素タンパク質のアミノ基に両親媒性の高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を結合させて酵素分子の高次構造に変化を与え、その性質を改善し、利用価値を高めた実例がある。筆者らも、両親媒性物質であるジドデシルグルコシルグルタメイトを用いて、微生物由来のリパーゼ数種類を修飾して、有機溶媒中での基質特異性の変化を調べた。その結果、修飾リパーゼの有機溶媒に対する耐性が未修飾リパーゼと比較すると上昇することの他に、疎水性の強いより長鎖の脂肪酸に対する親和性が高くなったことがわかった⁶⁾。ジドデシルグルコシルグルタメイトは、合成両親媒性物質であったが、市販されている糖脂質を用いて、同様に微生物リパーゼの修飾について検討した。この場合、修飾リパーゼを構成するリパーゼの種類と糖脂質の種類のリパーゼの組み合わせに依存して、修飾リパーゼの有機溶媒中での活性や基質特異性が異なることが判明した。この他に、リパーゼをセライトに吸着させ、これを光架矯性樹脂 (ポリプロピレングリコール) に包括固定し、ヘキサン中でエステル合成を行う触媒に使用した研究や、*Rhizopus dele-mar* のリパーゼをリン脂質で修飾し、リン脂質に結合したリパーゼの高次構造の変化とそれに伴う酵素的性質や基質特性の変化について検討した研究もある。

5. リパーゼの固定化技術

種々の酵素を生体触媒として有用物生産を工業的レベルで行う利点は、反応が温和な条件下 (常温, 常圧, 中性付近) で進むこと、化学工業のプロセスよりエネルギーの節減になること、精工な生体触媒の特異性による反応工程の簡易化、製品の高品質化、などが挙げられる。さらに、リパーゼについては、不飽和脂肪酸関連の有用物質の生産 (例えばポリエンの生産など)、それらのエステル化やエステル交換による生理活性物質の生産も可能である。一方、リパーゼのバイオリクターに附随して生じる問題は、酵素の再利用を目的とする「酵素の固定化法」である。酵素の固定化技術の開発については、酵素分子の修飾による安定性の向上や、基質特異性の改良の可能性も期待される。酵素を不溶性担体に固定化する方法には、以下の3種類がある。①酵素と担体を共有結合、イオン結合、物理的吸着あるいは生化学的な特異性や親和性により結合させる (担体結合法) ②2個またはそれ以上の官能基を持つ試薬 (グルタルアルデヒドなど) を介して、酵素分子と担体を結合させる (架橋法) ③ゲルの格子中に酵素を包み込む「格子型」や半透膜性ポリマーの皮膜、リボソームや中空繊維に酵素を封じ込む「マイクロカプセル型」などがある⁷⁾。個々の応用目的によっていずれの固定化法が適するかは異なるので、リパーゼの反応特性を考慮した上での固定化法の検討が必

要である。具体例としては、膵臓リパーゼをステンレスビーズやポリアクリルアミドに固定化し、カラムに充填し、油脂の加水分解を行った、膵臓リパーゼをヨードプロピルー多孔性ガラスに固定し、鎮痛剤の中間体である d-3-クロロ-2-メチルプロパノールプロピオネートを合成した、*Geotrichum candidum* リパーゼをクロマト活性炭に吸着させ、アミンポリマーで固定化し、水系およびイソオクタンの系でオリーブオイルを効率良く加水分解した、などがある。また、*Candida antarctica* リパーゼを多孔性樹脂（非イオン性アクリル樹脂）に固定化し、70 で第一、および第二アルコールに対するエステル交換反応を行なった事例もある。

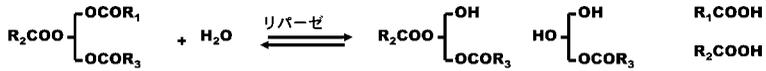
6．リパーゼの食品産業への応用

1) 油脂の改質

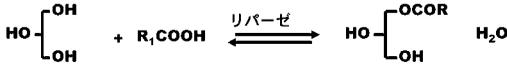
普通、食用に使用されている油脂には、動物由来のものと同植物油来のものがある。動物由来のもの多くは、脂肪と呼ばれ、比較的融点の高い固型脂が大勢を占める。その融解点はほぼその動物の体温に近く、乳脂であるバターでは、30 前後、牛脂では35-50、豚脂で28-48 程度である。これに対し、植物油来の油は、椰子油、パーム油、パーム核油のように20-30 で流動化する植物油を除いて、ほとんどの食用油脂は、常温（15）付近では液状である。

現在、世界各国で広く実施されている食用油脂の改質、加工技術の代表的なものとして次の3つが挙げられる。(1) 水素添加、油脂の硬化 (Hydrogenation)、(2) 固液油脂の分別 (Fractionation)、(3) エステル交換 (分子間、分子内、Inter-, Intra-esterification) である。これらの、基本技術を組み合わせて、使用目的にあった物性をもつ食用油脂を製造して、舌触りの良いマーガリン、加工特性の良い、使い易いショートニング、口解けの優れたカカオ脂代用油脂などの製造が行われている。このうち、リパーゼが油脂産業で実際利用されている側面は、(3) のエステル交換、および油脂の加水分解においてである。リパーゼによる触媒反応について図3にその代表的なものを示した。まず、油脂の主成分であるトリアシルグリセロールの加水分解反応である。油脂の加水分解により、遊離脂肪酸とモノアシルグリセロールやグリセロールが生成する。また、エステル交換反応というのは、トリアシルグリセロールや他の脂肪酸エステルを基材として、エステル同士または、遊離脂肪酸やアルコールと反応させて、その構成脂肪酸群を相互に交換して、新しい性質を備えた脂肪酸エステル、グリセリドを生成する反応をいう。普通、次の3つの交換反応に区別される。①エステル交換 (Interesterification, Transesterification) : トリアシルグリセロール同士、あるいは、他の脂肪酸エステルとの間で、脂肪酸基を交換する場合であり、他分子間での交換反応を、分子間エステル交換反応 (Interesterification) といい、同一分子内での脂肪酸の結合位置を取り替える場合を分子内エステル交換 (Intraesterification) という。これらを併せて、Esterinterchange とか、Transesterification

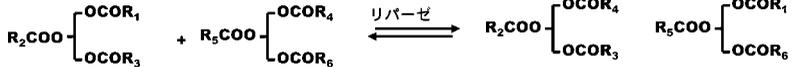
(1) 加水分解反応



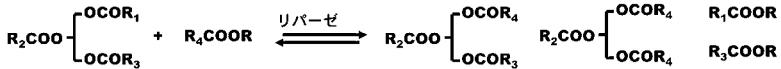
(2) エステル化反応



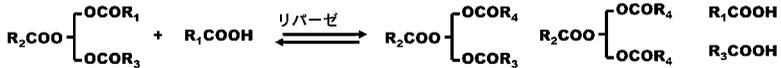
(3) インターエステル化反応



(4) トランスエステル化反応



(5) アシドリシス



(6) アルコリス

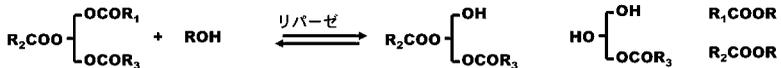


図3 リパーゼにより触媒される油脂の修飾反応

という場合もある。分子間の交換反応を、Intermolecular Rearrangementということもある。②アシドリシス (Acidolysis) : トリアシルグリセロールや脂肪酸エステルと、遊離脂肪酸を反応させて、その結合脂肪酸基を取り替える反応をアシドリシスという。これは、グリセロール分子中に、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸を導入し、アセチンファットなどを合成する際に利用される。③アルコリス (Alcoholysis) : 油脂をメタノール、エタノールなどの低級アルコールと反応させ、グリセロールを遊離して、脂肪酸メチルエステル、エチルエステル合成をしたり、トリアシルグリセロールと遊離のグリセロールを反応させて、モノアシルグリセロールやジアシルグリセロールを製造したりする。また、ソルビトールやショ糖と油脂を反応させて、食品用界面活性剤を合成したりするのに応用される。油脂とアルコールの反応であるから、アルコリスといわれている。

2) 油脂の加水分解へのリパーゼの利用

天然油脂を分解して目的の脂肪酸を製造し、あるいはまた、特定の構造のモノアシルグリセロールを製造する方法は、従来の高圧分解法や化学合成法によるエステル化や油脂のアルカリによる加水分解に比べて、省エネルギー、精製工程の簡易さ、製品純度や収率の向上などの利点をもつ。この目的に適するリパーゼの

選択とその反応工程においては、以下のような問題点が挙げられる。まず、用いるリパーゼの種類によって生成物の収率が異なることがある。また、基質の種類によって、同一の酵素でも、合成物の収率が異なるときもある。従って、特定の脂肪酸の製造を目的とする場合、原料油脂の選択、その目的脂肪酸の結合位置とリパーゼの位置特異性および脂肪酸特異性に留意して適切なりパーゼを選択する必要がある。また、分解に伴う逆反応（エステル化）の影響も考慮しなければならない。

モノアシルグリセロールは、乳化剤や抗菌剤として、食品や医薬の製造に広く用いられる。通常、この製造には、トリアシルグリセロールからグリセロールへのアシル基転移、すなわち、210・240 で、Sn や Pb 化合物を触媒とする化学的なアルコールシス反応が用いられる。そのため、反応後、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、脂肪酸およびグリセロールの混合系から、モノアシルグリセロールを分離しなければならない。この混合系からの分離精製の工程は煩雑となり、金属触媒の使用も問題となる。その上、トリアシルグリセロールのモノアシルグリセロールへの変換率は低く、40・50%に留まる。一方、Holmberg らは、*Rhizomucor delemar* リパーゼを用いて、パーム油に作用させて、モノアシルグリセロールを80%の収率で得ることができた。

3) 油脂の加水分解用バイオリクター

既存の油脂の機能性を高め高付加価値化するために微生物リパーゼを触媒とした反応系が検討されている。近年は、微生物由来リパーゼが工業生産されて、容易にリパーゼが入手できることから、バイオリクターの研究も加速度的に進むようになった。油脂はリパーゼによって加水分解されて脂肪酸とグリセロールになる。しかし、基質である油脂は水に不溶であるため、水に可溶なりパーゼと油/水の界面のみ反応は生じる。したがって界面面積を増加させることが必須であり、この目的でリパーゼ反応では界面活性剤を添加したり、攪拌や振とうを行っていた。その一方で、反応過程に生じる部分分解アシルグリセロール（ジアシルグリセロールやモノアシルグリセロールなど）およびリパーゼが乳化剤の役目を果たし、反応終了時において生産物の分離精製が困難になることが多かった。加水分解用バイオリクターの開発にあたっては、界面面積の増加、乳化の回避などが重要なポイントになっており、次のようなバイオリクターがこれまでに考案されている。①膜型リアクターでは油層と酵素水をテフロンやポリプロピレンなどの微細孔を持つ膜を介して接触させてオリーブ油や牛脂を90%以上分解した。②さらに、膜表面を広げたフォロファイバー型バイオリクターを用いてオリーブ油を加水分解した。③攪拌によって乳化した反応溶液を疎水、親水膜でそれぞれ分離し、反応生成物とリパーゼを回収するリアクターなどが開発された。④乳化した反応混合液を遠心分離によって油層と水層に分離して、さらに、界面層に含まれるリパーゼを回収し、再利用して連続的に加水分解を行い、大豆油を

98%加水分解した。また、反応効率を高めるために攪拌を用いずに、微細孔を持つ親水膜によって油脂を微粒子化して酵素水内に分散してオリーブ油や魚油を加水分解した不均一型バイオリクターなどが報告されている。

油脂加工への酵素反応の応用ではリパーゼがそのコストのほとんどを占めているといわれており、リパーゼを反応混合液から回収してくり返し利用することが実用化のためには必須の条件であり、固定化リパーゼの開発も行われている。固定化法および固定化担体のリパーゼ活性発現に対する影響は大きく、多くの素材が検討されている。例えば、固定化リパーゼを固定床として用いるバイオリクター、膜やフォロファイバーにリパーゼを固定化したバイオリクターなどが報告されている。また、リパーゼを固定化することにより再利用が可能になるばかりでなく、熱安定性が向上して、より広範囲な pH において安定化することなどが報告されている。元来、油脂の乳化は油水の 2 層系で反応を行うことに起因しており、リパーゼを有機溶媒中で加水分解の触媒として使用することが検討されている。これまでに、イソオクタンなどの非極性溶媒に牛脂やパーム油を溶解させてリパーゼ水溶液で加水分解がなされている。また、ラウリルガレートや *n*-ダンシルアクリジンなどによってリパーゼ自体を溶媒に可溶化してテトラヒドロフランやジクロロメタン中で加水分解することも報告されている。

4) 油脂のエステル化へのリパーゼの利用

天然に産出する油脂は、それぞれ固有の脂肪酸組成をもち、かつトリアシルグリセロールにおける脂肪酸のグリセリンとの結合位置にもそれぞれ種によって個性があり、特有の規則性に従って、その配置がきめられている。そして、それらが、その油脂特有の物理的、化学的性質を総合的に決めている。例えば、植物油では、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸のような C18 の不飽和脂肪酸は、優先的にグリセロールの *sn*-2 の位置に分布し、飽和脂肪酸や C20, C22 のモノエン酸は主として *sn*-1 または *sn*-3 に位置している。また、陸産ほ乳動物脂では、一般的に *sn*-1 には飽和脂肪酸、*sn*-2 には不飽和脂肪酸や短鎖脂肪酸、*sn*-3 には長鎖の脂肪酸が分布している。魚油に含まれる高度不飽和脂肪酸は、*sn*-2 に多く分布することが分かっている。このように、それぞれの種の求めるところに対応して、脂肪酸の結合位置がきめられているように見える。これら天然の油脂を、その用途に応じて、より適する物性を与える「油脂の改質」が望まれている。これらの油脂を単に高温に加熱したり、適当な触媒の存在下で、加熱、攪拌したりすることで、油脂の融点や可塑性に変化を生じることが 1920 年代から知られていた。1940 年代には、ナトリウムメトキシドを使用すれば、低温においても、油脂の反応が速やかに進行することが見い出されてから、急速にその技術が開発され、実用的な油脂の加工手段として採用されるようになった。この方法は、まず粒状化し易い、天然の豚脂（ラード）の改質に適用された。しかし、化学触媒によるエステル交換法では、脂肪酸の種類や結合位置の選択ができず、シャープな融点を

もつ油脂への改質が困難であった。

一方、リパーゼの開発が進むにつれて、リパーゼ反応機構や特異性についての知見が確立され、そのトリアシルグリセロールに対する位置特異性を利用するエステル交換技術によって、従来の化学法で不可能であった油脂の改質が可能になった。リパーゼによるエステル交換反応は、トリアシルグリセロールの中での結合脂肪酸の種類、脂肪酸の結合位置を変えることにより、そのトリアシルグリセロールの融点や物理的性状に少なからずの変化をもたらす、更に、その化学反応性や消化性に対しても、大きな影響をおよぼす効果がある。酵素を触媒とする油脂の改質は、従来の化学法と比較すると、はるかに少数の種類グリセロール分子種から構成される油脂を温和な条件のもとで高収率で得ることができる。実際これまでに、リパーゼ利用による代用カカオ脂の製造を始め、パーム油などの天然油脂の改質、近年では、消化性のよいMCT(中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール)の合成、安定性の高い高度不飽和脂肪酸含有油脂の開発などに応用され、特にこの分野では、位置特異性、基質特異性に優れた酵素を利用した技術の進歩が著しい。

5) エステル交換反応の実際

a) 化学触媒を利用する油脂の改質

エステル交換は、トリアシルグリセロールである油脂を250℃以上の高温におくと、無触媒でも進行するが、その速度は遅く、油脂自体が分解したり、重合したりするので、普通には、酸、アルカリ、金属塩などの触媒を添加して、その反応温度を下げ、速度を促進する。このとき生じる交換反応は、ランダムエステル交換反応(Random interseterification)といわれている。トリアシルグリセロール構造をもつ油脂に対して適当な触媒の共存下、融解状態で反応させ脂肪酸の結合位置をランダム化し、天然の油脂とは異なる性状を付与方法である。現在では、実用的な触媒として、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキド、金属ナトリウム、Na-K合金などが良く用いられる。しかしながら、金属ナトリウムなどは、空気に触れると発火し、水と激しく反応する恐れがあり、その取扱いには注意が必要なものもある。さらに、原料油脂中の水分含量には特段の配慮が必要とされ、反応前の油脂の精製の度合いが反応の成否を左右する。通常、原料油脂中の水分含量は、0.01%以下が望ましいとされている。

b) 化学的エステル交換反応の実施例

食用固型油脂を食品に使う場合には、その固化性、融解性に注目されることが多く、製品の調製に当って、その加工性を高めたり、外観や食感、風味をよくする工夫がなされる。油脂の固化性、融解性は、基本的にアシルグリセロールの組成と構造によって決まる。天然油脂の脂肪酸組成は変えず、その結合位置を変えるだけで、その性状に変化を与え、加工適正、食味の改善を行うことができる。この分子内エステル交換の代表的なものは、豚脂(ラード)の改質がある。また、

パーム油の固型脂含有量を高めるために、化学的エステル交換反応が用いられている。また、種類の異なる油脂を混合して分子間での脂肪酸交換を行い、元の油脂では求めがたい物性を新規の油脂で獲得しようとする試みもなされている。例えば、大豆油とその極度硬化油をエステル交換して、トランス脂肪酸含量の少ないマーガリンが製造されたり、ラウリン系油脂の硬化油と長鎖アシルグリセロールの硬化油をランダムエステル交換して、これを液体油と配合して、ソフトマーガリンの調製に使用する際に用いられたりしている。カカオ脂代用脂の製造は、極度硬化綿実油とオリーブ油とのエステル交換が使用されたり、綿実硬化油とラウリン系油脂の配合油のエステル交換油が用いられたりする。このようにして、化学的エステル交換反応は、必要な物性を備えたマーガリンやショートニング用油脂の製造に役立っている。

c) 酵素を利用するエステル交換反応

生体触媒である酵素、特に油脂の分野で多く利用されるリパーゼは、常温、常圧、中性付近という温和な条件下で、極めて高い触媒機能を発揮し、その反応特性として、トリアシルグリセロールの結合位置に関わる基質特異性と、結合脂肪酸の化学構造に関わる基質特異性を持つことが知られている。リパーゼは、本来、生体内での脂質代謝に関与するものであるが、反応系内の水分の多寡によって、加水分解の他、エステル合成やエステル交換反応にも効果的に働く(図4)。リパーゼの機能発現には、水分の存在が必須であり、水のない系では反応は起こらない。リパーゼによるエステルの分解と合成の平衡関係は、反応系に存在する水の濃度により支配されるので、エステル交換を促進するには、この点に留意しなければならない。また、その位置特異性には、トリアシルグリセロールの *sn*-1位、*sn*-3位だけに作用する1,3特異性のあるものと、すべての位置に区別なく作用するものがある(ランダムエステル交換反応)。トリアシルグリセロールのエステル交換反応のランダム化のための触媒としては、*Candida rugosa*、*Geotrichum candidum* などのリパーゼがある。1,3位置特異性のリパーゼでは、原料となるトリアシルグリセロールの *sn*-2位の脂肪酸を固定したまま、*sn*-1,3位の脂肪酸を目的の脂肪酸に変換することが可能である(選択的エステル交換反応)。*sn*-1,3特異性を示すものとして、膵臓リパーゼや *Rhizomucor miehei*、*Rhizopus arrhizus* などの微生物由来のリパーゼがよく利用される。油脂のエステル交換に利用されている市販のリパーゼを表1にまとめた。酵素法エステル交換で最も良く知られているのは、カカオ脂代用脂の製造である。*sn*-1,3位に選択的に作用するリパーゼを用いて、*sn*-2位にオレイン酸を保持するトリアシルグリセロールであるオリーブ油やパーム油の中融点区分(パルミトイル-オレイル-パルミトイルグリセロール、POP)を材料として、ステアリン酸(S)あるいはステアリン酸エチルエステルとのエステル交換を行うと、POSとSOSが得られ、カカオ脂に良く似た物性をもつ固型脂が得られる。天然カカオバターの入手し難いころ盛ん

水分濃度	反応相	リパーゼの応用
% 100 10 1	不均一相	油脂の除去 多段分散膜バイオリアクター
		油脂の加水分解 微水系バイオリアクター
		モノアシルグリセロール生産 エステル交換バイオプロセス カカオ脂代用脂生産
ppm 1000 100 10 1	均一相	超微水系バイオリアクター 低アシルグリセロールパーム 油の生産

図4 反応液中の水分含量とリパーゼの酵素反応との関連性

に行われた。

6) 油脂のエステル交換反応用バイオリアクター

油脂を構成する脂肪酸組成は油脂の持つ物理化学的な性質に大きく関わっている。例えば、カカオ脂は体温近辺に融点があるため製菓用原料として利用されている。しかし供給が不安定であるため、パーム油やオリーブ油などの安価な油脂の構成脂肪酸をエステル交換してカカオ脂様油脂を製造することが報告されており、工業的な生産も行われている⁸⁾。さらに、*Alcaligenes* 属や *Rhizomucor* 属のリパーゼによって油脂を液状化することなども同様の考え方である。また、生理活性物質である EPA や DHA をエステル交換によって高濃度にトリアシルグリセロールに導入した。パーム油や米ぬか油は生体組織中に含有するリパーゼによってトリアシルグリセロールの一部がジアシルグリセロールと遊離脂肪酸に分解される。このジアシルグリセロールは、結晶遅延化によるハンドリング性の低下や結晶の粗大化、熱安定性の低下などの原因となり商品価値が著しく低下するた

表1 インターエステル化反応に用いられるリパーゼ

リパーゼ	第1トリアシルグリセロール	第2トリアシルグリセロール
<i>Aspergillus niger</i> (Lipase -A)	パーム油	
<i>Candida antarctica</i> (SP435)	大豆油、ナタネ油 大豆硬化油、ナタネ油	魚油
	トリカブリン	トリリノレイン
	トリカプロイン	トリリノレイン
	トリステアリン	トリオレイン
	ラード	高オレイン酸ヒマワリ油
<i>Candida cylindracea</i> (Lipase -OF)	単細胞オイル ピーナッツ油 月見草油 ポラージ油 ツナ油 魚油	トリカブリン
<i>Candida rugosa</i>	パーム油	
<i>Candida sp.</i> (SP382)	ピーナッツ油	トリカブリン
<i>Fusarium heterosporum</i>	単細胞オイル	
<i>Geotrichum candidum</i> (Lipase-GC)	単細胞オイル ピーナッツ油	トリカブリン
<i>Humicola lanuginosa</i>	トリカブリン	ピーナッツ油
<i>Mucor miehei</i> (Lipase-M)	パーム油 バターファット	
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM-20)	パーム油 トリカプロイン	トリリノレイン
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM-49)	トリカブリン	ピーナッツ油
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM-60)	大豆油、ピーナッツ油 ナタネ油、大豆硬化油 トリカプロイン トリカブリン トリカブリン トリカブリン	魚油 トリリノレイン ナタネ油 トリリノレイン トリステアリン
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM)	DHA 部分アシルグリセリン	魚油
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme)	牛脂 牛脂 バターファット 月見草油、ポラージ油	ナタネ油 大豆油、ヒマワリ油 ヒマワリ油
<i>Rhizopus delemere</i>	単細胞オイル	
<i>Rhizopus javanicus</i> (Lipase-F)	パーム油	
<i>Rhizopus riveus</i> (Lipase-N)	トリカブリン	
<i>Rhizopus sp.</i>	トリカブリン	ピーナッツ油
<i>Chromobacterium viscosum</i>	トリカブリン	ピーナッツ油
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	メロン種子油	ピーナッツ油
<i>Pseudomonas sp.</i> (Lipase-PS30)	トリカプロイン	高オレイン酸ヒマワリ油
<i>Pseudomonas sp.</i> (Lipase-PS)	トリカプロイン	トリリノレイン
<i>Pseudomonas sp.</i> (Lipase-AK)	メンハーデン油	トリリノレイン
<i>Pseudomonas sp.</i> (Lipase-P)	アンチョビー油 パーム油	

め、分解して生成されたジアシルグリセロールと遊離脂肪酸をリパーゼで再度トリアシルグリセロールに合成した。エステル合成・交換反応では、いずれも反応系中の水分含量が反応に大きく影響を与えており、水分含量の制御が重要な課題である。反応系によってはリパーゼが活性を発現しうる最低限の水分含量までに制限する必要があり（微水系および超微水系なる概念が提案された）、このような反応系においてはリパーゼの固定化が必要となり、種々の担体による固定化や固定化菌体法などが開発された。これらの固定化リパーゼを用いたバイオリクターとしては、脱水工程を併せ持った充填層型、流動床型のバイオリクターが報告されている。また、リパーゼ表面をポリエチレングリコール（PEG）で修飾してベンゼンやトルエンなどの有機溶媒に溶解して無条件下でエステル合成・交換反応を行うことが試みられている。油脂加工へのバイオリクターの応用に際しては基質や目的生産物に見合った特異性の高いリパーゼの選択や長時間安定な活性を保ち、くり返し使用が可能なリパーゼの固定化技術の開発などが今後期待される点である。バイオリクターを食品へ展開する際の安全基準の作成も必要である。

7) リパーゼによる機能性構造脂質の製造

近年、医学、生理学、栄養学の進展に伴い、脂質は、生物の構成要素である生体膜の形成とその維持、免疫や生体防御など、ヒトの生命の営みに欠くことのできない必須成分の供給源としても極めて重要な意義を持つことが明らかになり、食用油脂の摂取のあり方に、大きな関心が寄せられてくるようになってきている。特に、脂質の分子構造とその生理活性機能の関連性については期待が寄せられている。このような観点から、リパーゼを触媒として、比較的温和な条件下で、天然油脂の良さを失わずに、その改質に効果を挙げているものに、構造化脂質がある。その代表的な例は、易吸収性油脂への油脂の改質である。一般的に、構造化油脂中の *sn*-2 位に位置する脂肪酸は吸収され易く、カイロミクロン中の脂質でも *sn*-2 位に位置していることが多い。このため、吸収効率の上昇が望ましい機能性脂肪酸を優先的にトリアシルグリセロール中に取り込む脂質への改質が、易吸収性油脂の目的である。このような構造化脂質として、現在注目されているものは、トリアルグリセロールの *sn*-1, *sn*-3 位に、カプロン酸 (C6)、カプリル酸 (C8)、カプリン酸 (C10) などの中鎖脂肪酸 (MCFA) を含み、*sn*-2 位に必須脂肪酸 (リノール酸 C18:2) や高度不飽和脂肪酸 (例えば、ドコサヘキサエン酸 C22:6) の結合したトリアシルグリセロールの合成である。ヒトの体内で消化吸収され易い、炭素数 6 - 10 の脂肪酸からなる中鎖脂肪酸トリアシルグリセロールの構造を参考にして、その *sn*-2 位に必須脂肪酸や高度不飽和脂肪酸を導入して、腸管から吸収され易く、かつ栄養価の高いトリアシルグリセロールを合成した⁹⁾。この構造化脂質は、病院における治療食あるいは、乳児用ミルクへの添加用油脂として利用が進められている。また、C8, C18:2, C8 の脂肪酸側鎖

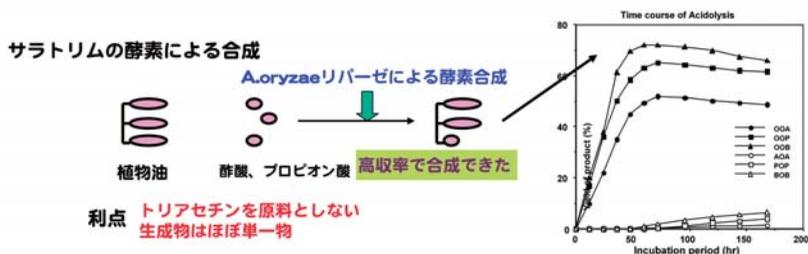


図 5

をもつ構造化油脂がナタネ油，サフラワー油，トリカプリン，カプリン酸などを原料として，*Rhizomucor miehei* や *Rhizopus* 属のリパーゼを含むバイオリアクターで生産する方法も示されている¹⁰⁾。逆に，脂質の代謝・吸収の過程を考慮したローカロリー脂質も考案されている。筆者らは，ローカロリー脂質のひとつであるサラトリムの一種の構造化脂質をリパーゼを触媒として合成する方法を開発した¹¹⁾（図 5）。もうひとつの構造化脂質の例は，高度不飽和脂肪酸含有油脂への改質である。リノレン酸や EPA，DHA などの高度不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロールは，酸化を受け易く，オフフレーバーや毒性をもつ酸化生成物が生じ易いが，その脂肪酸のグリセロール部分の結合位置によって，酸化の受け易さは影響を受ける。トリアシルグリセロールの *sn*-2 位に結合している不飽和脂肪酸は，*sn*-1 位や *sn*-3 位に結合している場合と比較すると，酸化を受け難いと言われている。酵素的にエステル交換を行うことによって，脂肪酸組成を変えることなく，安定性を変化させることも可能である。高度不飽和脂肪酸含有油脂の合成のためには，イコサペンタエン酸（EPA），ドコサヘキサエン酸（DHA）やそのエステルと，ナタネ油，ラッカセイ油，大豆硬化油などを原料として，*Rhizomucor miehei* リパーゼや *Candida antarctica* リパーゼを触媒としたエステル交換反応で製造する技術も確立された。また，*Candida cylindracea* リパーゼが高度不飽和脂肪酸区分に作用し難い性質を利用して，魚油中の高度不飽和脂肪酸の濃縮が行われている。また，バイオリアクターで使用するリパーゼの形態として，固定化遊離リパーゼではなく，リパーゼ活性を持つ固定化乾燥カビをそのまま使用する方法も検討されている。

8) リパーゼによるその他の有用物生産

リパーゼをエナンチオ選択性を利用して，有用物質の生産工程に重要なキラル合成原料の調製をする報告もある。抗生物質，生理活性物質，農薬，殺虫剤，除草剤などの有用物質の分子構造は，概して複雑であり，従来の有機合成法も煩雑である。目標とする生理活性は，光学対象体の一方のみが示す場合も多い。そこで，生体触媒（酵素）の立体特異性（stereospecificity），すなわちエナンチオ選

択性を利用して、目標とする光学対象体のみを効率良く生成させる方法や、あるいはまた、全合成のプロセスに有効な光学活性中間体（キラル合成原料）を調製する方法の開発が、現在、有機合成化学の分野で注目されている。リパーゼについては、これまでに、メバロノラクトン、家庭用殺虫剤ピレスロイドS体、マクロライド系抗生物質やムスク香料などの大環状ラクトン、糖エステル、などの合成の生体触媒としての利用が可能であることが示されている。また、有機溶媒系でのリパーゼのエナント選択性は、水系よりも強くなる場合も見い出されている。さらに、ペプチド合成において、ブタ膵臓リパーゼを用いて、酵素が効率的に作用するアミノ酸のC末端ならびにN末端の側鎖や保護基を検討し、ジペプチドの合成が可能であることも示された。この反応の場合、トルエンやテトラヒドロフランの他に、キシレン、*tert*-ブチルアルコール、イソプロパノール、スチレン、シクロヘキサン等の溶媒が有効であったが、酵素の立体特異性が水系と有機溶媒系とでは、著しく異なっていることも判明した。薬剤合成のために、キラル合成原料をリパーゼで調製する例として、 β -ブロッカー、ビオチンの原料の合成方法がある。また、コレステロールの脂肪酸エステルは、医薬や化粧品の製造に有用であるが、この合成のために、イソオクタン中で、*Candida cylindracea* リパーゼを用いて、コレステロールのオレイン酸エステルを合成した報告がある。

9) リパーゼの分析試薬としての利用

酵素を分析試薬として応用するアイデアが応用酵素の一分野を開拓しつつある。生体成分のように不安定で、複雑な組成の試料については、特定の成分のみを定量し、あるいはその構造を決定する場合には、酵素の特異性を利用すれば、煩雑な前処理を必要とせず、迅速簡易に目的物の分析ができる。この分野におけるリパーゼの実用化については、現在注目されているふたつの例がある。そのひとつは、リパーゼによるトリアシルグリセロールの脂肪酸分布の分析である。グリセロールの *sn*-1、*sn*-3 位にだけ特異的に作用するリパーゼ（例えば、*Rhizomucor delemar* 由来リパーゼ）を用いて、トリアシルグリセロールを2モノアシルグリセロールに加水分解し、薄層クロマトグラフィーでトリアシルグリセロールの *sn*-2 位に結合した脂肪酸を分析した後、*sn*-1 および *sn*-3 位に結合した脂肪酸をガスクロマトグラフィー法で決定する。グリセロールの *sn*-1 位と *sn*-3 位に結合した脂肪酸を区別する場合には、膵臓リパーゼと蛇毒ホスホリパーゼを併用して立体特異性を分析する。分析試薬としてのリパーゼの応用例のもうひとつは、血中のトリアシルグリセロール分析である。血中のトリアシルグリセロールは、リポプロテインの1成分として存在するので、その分析には、リパーゼ以外にも、リポプロテインリパーゼやプロテアーゼを併用して行われる。

10) 微生物による油脂の生産

微生物がその代謝過程において脂質を生体内に含蓄することは広く知られている。しかし微生物は、一般に炭素効率が低く、しかも高炭素濃度培地において培

養ができないことなどから経済性が従来の油脂資源に較べて劣っていた。このため微生物油脂生産の実用化に関する報告は少ない。しかし、高付加価値を持つ微生物油脂についてはいくつかの報告がある。カカオ脂と同様に、トリアシルグリセロールの *sn*-1, *sn*-3 位に飽和脂肪酸, *sn*-2 位に不飽和脂肪酸を持つトリアシルグリセロールを含有する微生物の選択が試みられている。これまでに, *Rhodotorula rubra*, *Lipomyces lipofer*, *Molutilierella vinacea* などの微生物からの脂質の抽出が試みられている。また, 生理活性をもつ油脂を微生物によって生産しようという試みがなされ, γ -リノレン酸 (GLA), ジホモ γ -リノレン酸 (DGLA), アラキドン酸 (AA), エイコサペンタエン酸 (EPA), ドコサヘキサエン酸 (DHA) など高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の生産が報告されている¹²⁾。GLA は *Mortierella* 属の菌株に含有されていることが見い出されて工業化されている。DGLA は AA 生産菌株である *Mortierella alpina* をピーナッツ油またはゴマ油を添加して培養することにより AA への変換が抑制され, DGLA が菌体内に含蓄されることが見い出された。AA は *M. alpina*, *M. heterosporus* などで産生が認められている。さらに *M. alpina* を 2000 リットルタンクで培養することにより脂質中の AA 含有量を 60・70% まで高めることに成功しており, AA の微生物由来脂質は商品化されている。魚油の主要構成脂肪酸である EPA を生産する微生物としてサバ, イワシなどの腸内微生物である *Alteromonas* 属などが分離された。このリン脂質の構成脂肪酸の PUFA は EPA のみであり, 他はモノエン酸や飽和酸であることから精製は有利であった。また AA 生産菌株である *M. alpina* を低温 (6) で培養し, AA が EPA に変換されることが見い出された。DHA は藻類による生産が報告されている。この油脂の構成脂肪酸もやはり他の PUFA をほとんど含まず, DHA の精製に有利であった。微生物油脂の例は, 現状ではそれほど多くはない。しかしながらモノエン酸, 分岐酸, ケト酸や奇数飽和酸など微生物が産生する油脂の生理活性等の研究が進むに従って, 微生物油脂の有意性が注目されるであろう。また, 遺伝子操作やタンパク質工学などのバイオテクノロジーの応用によって生産量の向上や特殊な油脂の微生物による生産が期待できる。

11) リパーゼ生産菌株へのバイオテクノロジーへの応用

油脂生産微生物の遺伝子操作法による生産性の向上や新規の油脂資源の製造などについての報告は見られない。バイオリクターなどによって酵素プロセスを工業的に実用化するには酵素コストの低減が重要な点である。従って, リパーゼの生産効率をバイオテクノロジーによって高めることは有意義である。しかし, これらの技法の応用についての報告はまだ少ない。その中で, *Pseudomonas* 属リパーゼに関する研究が進んでいる。すでに, リパーゼ遺伝子がクローン化され, 塩基配列から一次構造も明らかになっており, 活性中心にセリンが存在することなどが確認されている。また, このリパーゼ遺伝子の下流域にリパーゼ活性化遺伝子 (aCt) の存在が報告されている。この活性化因子は, リパーゼ活性発現に

必須であり、将来はクローニングなどによる活性化因子の増強などによって、高い生産性を得ることが期待できる。

7. 終わりに

従来、水系では不可能と見られていた有用物質の酵素利用による生成が、有機溶媒中で可能になるという研究成果は、将来、有機合成技術や酵素利用技術、さらに生理活性物質の製造技術などの分野で発展的な成果をもたらすことが期待される。

リパーゼの工業的利用については、その目的にあうリパーゼの選択が先決の課題となる。現在、市販されているリパーゼ以外にもユニークな特性を備えたいわゆる「新奇」なリパーゼの開発が、医薬や生理活性物質などのファインケミカルの製造プロセスを進展させる手がかりとなる。そのような利用形態が、特にリパーゼの場合、現在の種々の観点から最も適切で有効なものと考えられる。

脂質分野におけるバイオテクノロジーの応用は他分野に比べると報告が少ない。油脂の食品として持つ新しい生理活性などの機能に関する研究が今後進むにつれて、微生物油脂の実用化の可能性は高まってくるだろう。これらの油脂生産菌株にバイオテクノロジーを応用することで、有利な培養条件で高収量をあげることで菌株や新規な機能性を持たせた油脂の生産などが期待できよう。また、油脂加工に利用されるリパーゼの生産菌株に対しても同様に高収量株やリパーゼの特異性の改変などが期待できる。

(食品素材科学研究領域 脂質素材ユニット 都築和香子)

参考文献

- 1) Brzozowski, A.M., et al., (1991) *Nature (London)*, 351, 491.
- 2) Schrag, J.D., and Cygler, M. (1997), *Methods Enzymol.*, 284, 85.
- 3) Tsuzuki, W., et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1998) 75, 535.
- 4) Baillargeon, M.W. and Sonnet, P.E. (1988) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1812.
- 5) Sternby, B., et al. *Clinical Nutr.* (2002) 21, 395.
- 6) Tsuzuki, W. et al. (1991) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1991, 1245.
- 7) Baker, R.A. and Wicker, L. (1996) *Trends Food Science Technology*, 7, 279.
- 8) Fomuso, L.B., and Akoh, C.C. (2002) *Food Research International*, 35, 12.
- 9) Kimura, Y., et al. (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 107.
- 10) Xu, X., et al. (2000) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 1035.
- 11) Tsuzuki, W., (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1256.
- 12) 鈴木修, (1992) 油化学41, 779.

ホスホリラーゼ工学による有用オリゴ糖の調製

1. はじめに

糖質を加リン酸分解する酵素であるいわゆる「ホスホリラーゼ」は、その厳密な反応位置特異性から特定のオリゴ糖調製に有用であることは知られていた。最近になりこれらのホスホリラーゼを用いた実用的なプロセスも報告されはじめている。筆者らはホスホリラーゼの特性改変およびホスホリラーゼを利用したオリゴ糖製造プロセスを「ホスホリラーゼ工学」と呼ぶことを提唱している。本稿ではホスホリラーゼ工学に関する研究について紹介する。

2. ホスホリラーゼとは^{1,2)}

生物は糖類のグリコシド結合の生成・分解を酵素反応により行っている。グリコシド結合の消長に關与する酵素は、主に加水分解酵素、合成酵素(糖核酸エステル転移酵素)、加リン酸分解酵素(ホスホリラーゼ)の3種類に分類される(図1)。アミラーゼ・セルラーゼなどの加水分解酵素は言うまでもなく工業的に最も重要な酵素であり、特にデンプン糖産業で工業的に大量に使用されている。合成酵素(糖核酸エステル転移酵素)は生体内での糖鎖合成に關与する酵素であり、その生物化学的意義から基礎的な研究例が多く報告されている。しかしながら合成酵素は不安定なものが多く実用的なオリゴ糖生産には使いにくい。ホスホリラーゼは、加水分解酵素と合成酵素の中間的な特性を示す酵素であり、その反応は可逆的である。反応の可逆性を利用すれば、実用的なオリゴ糖合成に用いることも可能である。しかしながら、これらのホスホリラーゼの研究例は少なく、まだまだ新しい発見の余地は残っている。

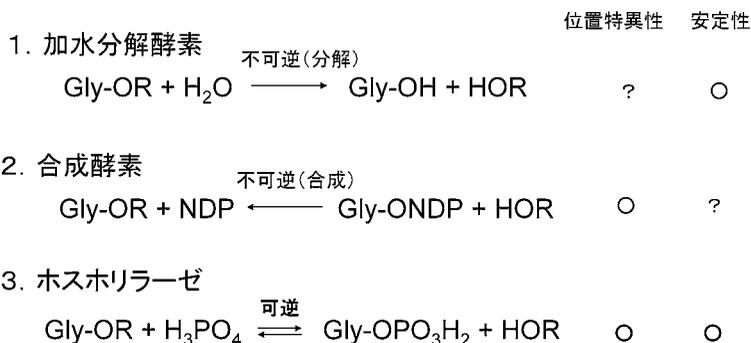


図1 グリコシド結合の消長に關与する酵素

酵素反応は水溶液で行われるため、加水分解酵素による反応は大量に存在する水のため事実上分解方向の不可逆反応となる。また、合成酵素はリン酸ジエステル結合による高エネルギーのため合成方向への不可逆反応となる。

表1 現在までに報告されている加リン酸分解酵素

EC 2.4.1.	酵素名称	切断される結合	生成物	ファミリー
1	(glycogen) phosphorylase	G1ca1-4	α -Glc1P	GT35
7	sucrose phosphorylase	G1ca1-2	α -Glc1P	GH13
8	maltose phosphorylase	G1ca1-4	β -Glc1P	GH65
20	cellobiose phosphorylase	G1cb1-4	α -Glc1P	GH94
30	1,3- β -oligoglucan phosphorylase	G1cb1-3	α -Glc1P	遺伝子未知
31	laminaribiose phosphorylase	G1cb1-3	α -Glc1P	遺伝子未知
49	cellodextrin phosphorylase	G1cb1-4	α -Glc1P	GH94
64	trehalose phosphorylase	G1ca1-1	β -Glc1P	GH65
97	β -1,3-glucan phosphorylase	G1cb1-3	α -Glc1P	遺伝子未知
211	lacto-N-biose phosphorylase	Galb1-3	α -Gal1P	未分類
216	trehalose 6-phosphate phosphorylase	G1ca1-1	β -Glc1P	GH65
230	kojibiose phosphorylase	G1ca1-2	β -Glc1P	GH65
231	trehalose phosphorylase	G1ca1-1	α -Glc1P	GT4
nd	chitobiose phosphorylase	G1cNAcb1-4	α -GlcNAc1P	GH94

注．ファミリー分類は CAZY (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) による。

現在までに知られているホスホリラーゼは14種類であり、そのうち11種類の遺伝子がクローニングされている(表1)。既知のホスホリラーゼはすべて非還元末端グリコシド結合を単糖単位で加リン酸分解するエキソ型酵素である。デンプンあるいはグリコーゲンの加リン酸分解酵素であるホスホリラーゼを除いて、基質+ホスホリラーゼ(phosphorylase)と命名されている。大部分がグルコシド結合切断酵素であるが、ガラクトシル結合及び*N*-アセチルグルコサミン結合に関与するものが近年報告された。すべてのホスホリラーゼは反応位置選択性が極めて高く、特定のグリコシド結合のみに作用する。そのため逆反応を利用すれば特定グリコシドを選択的に合成することを可能である。既知のホスホリラーゼはすべて菌体内あるいは細胞内酵素であり、分泌型酵素は知られていない。これらの酵素の生化学的意義は細胞内貯蔵多糖の代謝あるいは細胞外多糖の部分分解物の細胞内での代謝であると考えられている。ホスホリラーゼの反応では糖1-リン酸エステルが生成するために、加水分解酵素による分解物と比べて代謝系に入る前にATP 1分子が節約できる。

3. ホスホリラーゼを利用した種々のオリゴ糖調製の実例

ホスホリラーゼの逆反応を用いることにより糖1-リン酸エステルとアクセプター糖から選択的にオリゴ糖を合成することができる。ここにオリゴ糖合成の実例を示す。

(1) セロピオースホスホリラーゼを用いたオリゴ糖合成

一般的なホスホリラーゼと同様にセロピオースホスホリラーゼの基質の位置特異性は非常に厳密であり β 1,4結合のみを生成する。本酵素の重合度特異性も厳密であり三糖以上のセロオリゴ糖に全く作用しないため、二糖のみを選択的に合成することができる。しかしながら逆反応においてアクセプター基質特異性は必ずしも厳密ではなく、種々のセロピオース誘導体の合成を行うことが可能である。例えば *Cellvibrio gilvus* 由来セロピオースホスホリラーゼはアクセプター分子の2位および6位の認識が甘いため、種々の単糖をアクセプターとして認識することができる(図2)。アクセプターとしてキシロース、マンノースなどのグルコース以外の単糖を用いれば、 β 1,4-グルコシルヘテロ二糖を合成することができる。また、6位の認識性の甘さからゲンチオピオース、イソマルトースなどの1,6結合二糖をアクセプターとした場合は還元末端のグルコース単位の4位にグルコースが付加し、セロピオースの還元末端側グルコースの6位に糖が結合した構造の分岐三糖が生成する。ドナー基質も例えばグルコース1-リン酸以外にもグルコサミン1-リン酸やグルカルを用いることが可能でありセロピオースの非還元末端側の糖をグルコサミンや2-デオキシグルコースにした誘導体を合成することも可能である。筆者らが本酵素を用いて現在までに合成したセロピオース誘導体を図3に示した³⁻⁹⁾。

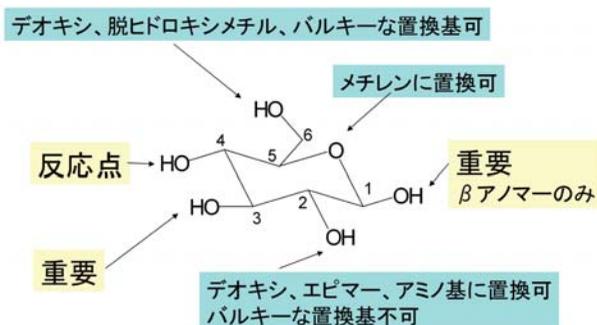


図2 *Cellvibrio gilvus* 由来セロピオースホスホリラーゼのアクセプター基質認識

(2) 高重合度ラミナリオリゴ糖の調製

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) は菌体内貯蔵多糖パラミロン (β -1,3グルカン) の代謝酵素としてラミナリピオースホスホリラーゼと β -1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼを持つことが知られている。これらの酵素を含んだ無細胞抽出液を触媒としてグルコース1-リン酸とグルコースから種々の平均重合度を持ったラミナリオリゴ糖混合物を調製した。グルコース1-リン酸とグルコースの初濃度

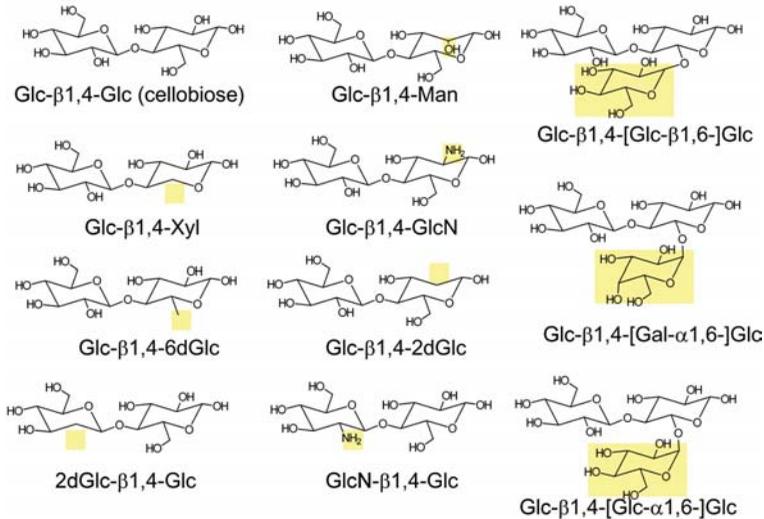


図3 セロピオースホスホリラーゼを用いて合成したセロピオース誘導体

着色部は置換箇所

比を変化させることにより種々の平均重合度のラミニオリゴ糖を合成した¹⁰⁾。グルコース1-リン酸/グルコースが1の場合、検出されたラミニオリゴ糖の組成は重合度1~9であり平均重合度は1.8であったが、比が20の場合は重合度2~14であり平均重合度は8.4であった。この方法を用いると従来法であるカードランなどのβ-1,3グルカンの酸あるいは酵素による限定分解では得ることの難しい10糖以上のラミニオリゴ糖を調製することも可能であった。

(3) グルコ/キシロヘテロオリゴ糖ライブラリーの調製

セルロース、キシラン、キチン、キトサンはそれぞれ単糖(グルコース、キシロース、*N*-アセチルグルコサミン、グルコサミン)がβ-1,4結合した構造の多糖であり、それぞれ特異的な酵素(セルラーゼ、キシラーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ)により加水分解される。これら多糖の結合のコンフォメーションは同一であるため、酵素は構成単糖のわずかな違いを認識して特異性を発現していると考えられる。酵素のこのような微妙な認識機構を研究するためには、単糖の混在したオリゴ糖に対する作用を調べるのが重要であると考えられる。そこでまず手始めに、セルラーゼ/キシラーゼの認識機構解明に有用であると考えられるβ-1,4グルコ/キシロヘテロオリゴ糖ライブラリー(図4)の構築を試みた¹¹⁾。

合成触媒として *Clostridium thermocellum* YM-4由来のセロデキストリンホスホリラーゼを用いた。本酵素は重合度3以上のセロオリゴ糖を可逆的に加リン酸分

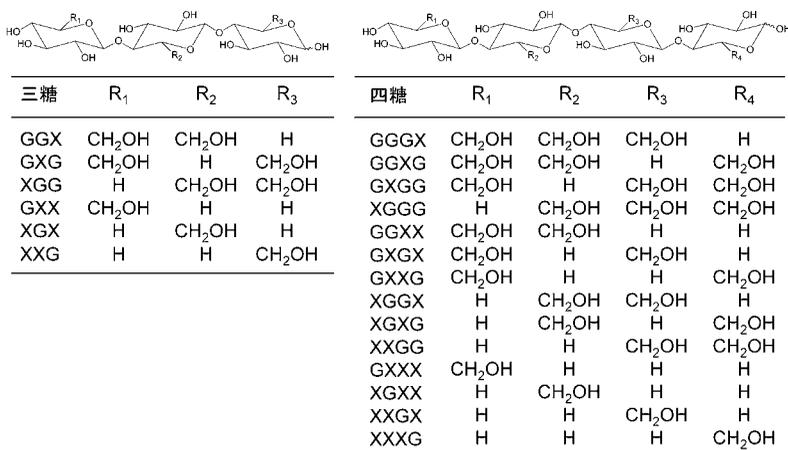


図4 β1,4-グルコ/キシロヘテロオリゴ糖ライブラリー

解する酵素である。本酵素がドナー基質としてキシロース - 1 - リン酸，アクセプター基質としてキシロピオースを認識することが可能であれば原理的に任意の配列のβ-1,4グルコ/キシロヘテロオリゴ糖を合成することが可能になる。本研究ではアクセプターとして4種のβ1,4二糖（GG，GX，XG，XX），ドナーとしてグルコース - 1 - リン酸，キシロース - 1 - リン酸を用いてヘテロ三糖および四糖の合成を行った。その結果，6種すべてのヘテロ三糖および14種中10種のヘテロ四糖の合成に成功した。しかしながら，非還元末端にXGの配列を持つヘテロ四糖4種類は酵素の特異性の問題から合成できなかった。合成されたヘテロオリゴ糖の構造を二次元NMRによりで解析した結果予想通りすべてβ-1,4結合であることを確認した。

ヘテロ三糖ライブラリーを用いて好アルカリ性菌 *Bacillus halodurans* ゲノムから見つかった新種の酵素活性の同定を行った。この酵素はキシロオリゴ糖からキシロースを遊離するが，基質のキシロオリゴ糖の還元末端を修飾すると活性が見られなくなる。そのため通常キシロシダーゼとは異なり還元末端側から単糖を切り出す可能性が考えられていた。実際にヘテロ三糖を作用させてみると生成物を分析するだけでどの位置で切断されたか容易に判別することができる(図5)。その結果本酵素は還元末端の単糖を遊離していることが証明された¹²⁾。

4．実用的なオリゴ糖合成へ - ホスホリラーゼ工学の考え方

特定のオリゴ糖を選択的に調製するためには酵素の基質特異性を利用することが必須である。酵素反応は水溶液中で行われる。オリゴ糖は通常デンプンのような多糖あるいはスクロース（砂糖）のようなオリゴ糖を原料として，分解または

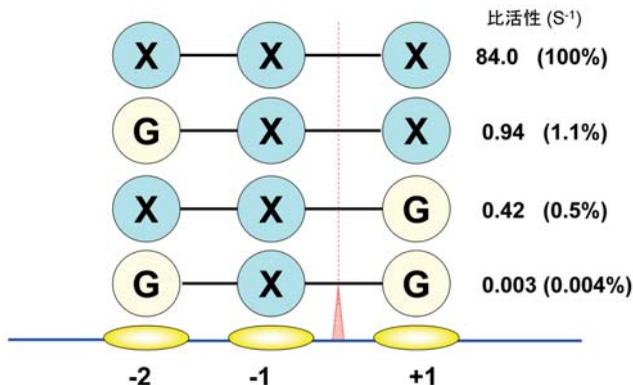


図5 ヘテロ三糖の切断パターン分析による新規キシラナーゼの還元末端特異性の決定

糖転移反応により製造される。これは単糖からオリゴ糖を製造することが困難であることに起因する。単糖からオリゴ糖を生成する反応は脱水縮合反応であり一分子の水を生成するため、水が大過剰反応系に存在する水溶液中では非常に不利な反応となる。そのためよほど高濃度の出発基質にしない限り十分な収率を得ることは難しい。

天然に安価に得られる原料多糖やオリゴ糖は限定されている。例えばデンプン、スクロース以外にはマルトースなどのデンプン分解物、ラクトース（乳糖）、キチン、セルロース、キシランなど数えるほどしか存在しない。ここで、加水分解酵素あるいは糖転移酵素によるオリゴ糖製造を考えた場合、得られるオリゴ糖の結合は元の原料と同じものしか作れないため製造できるオリゴ糖はどうしても原料により限定を受けることになる。実質的にデンプンとスクロースが主要なオリゴ糖原料であるので α グルコシド系および β フラクトフラノシド系以外のオリゴ糖の製造は困難である場合が多かった。

ところで前項で述べたホスホリラーゼによるオリゴ糖の調製法はグルコース1リン酸などの高価な原料を使用するために、実用的な大量調製法として用いることができない。この目的のためには安価な原料を出発原料にすることが必須である。ホスホリラーゼ工学においては二つのホスホリラーゼを組み合わせることににより新たなオリゴ糖を製造することを図る。幸い安価な原料であるデンプン、スクロースおよびマルトースを加リン酸分解するホスホリラーゼは既に知られている。そこで、ホスホリラーゼ工学においてはこれらの安価な原料を出発材料にしてオリゴ糖を製造することが基本である。その際酵素の組合せ方により従来の方では不可能であった α 型の出発原料から β 型のオリゴ糖を生産するプロセスなども可能になる。以下にホスホリラーゼ工学の実例を示す。

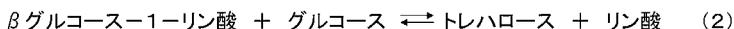
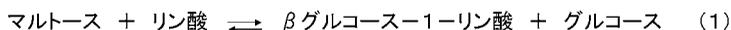
(1) マルトースのトレハロースへの変換

複数のホスホリラーゼを組み合わせたプロセスはまずマルトースからトレハロースを生成する反応についての報告されたものが最初である¹³⁾。この方法ではマルトースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼを組み合わせて用いる(図6)。当初は酵素源としてミドリムシ由来のトレハロースホスホリラーゼ(反転型)を用いていたため実用性に乏しかったが、後に細菌由来の酵素を用いて実用化された。このプロセスは残念ながらデンプンから直接トレハロースを生成する酵素プロセスが実用化されたことにより淘汰されたが、トレハロースを製造するためのプロセスとして本命視された時期もある。

(2) スクロースのセロビオースへの変換

筆者らはホスホリラーゼ工学によるスクロースを原料としたセロビオースの生産法を提案した¹⁴⁾。この方法ではスクロースホスホリラーゼとセロビオースホスホリラーゼに加えてグルコースイソメラーゼを同時に作用させることによりスクロースを余すところ無くセロビオースに変換する(図7)。高濃度スクロースを出発原料とすれば生成したセロビオースが系内に結晶化して容易に分離できることを利用して反応の半連続化にも成功している(図8)¹⁵⁾。最終的に反応の半連続化により90%以上の収率でスクロースをセロビオースに変換することに成功した。

この方法の別の利点としてセロビオースホスホリラーゼを他のホスホリラーゼに変えることによりスクロースからグルコ二糖を製造する方法として一般化することが可能であることがあげられる。実際に筆者らはセロビオースホスホリラー



- | |
|---|
| (1) マルトースホスホリラーゼ (<i>Lactobacillus brevis</i>)
(2) トレハロースホスホリラーゼ (<i>Euglena gracilis</i>)-ミドリムシ |
|---|

S. Murao, et al., *Agric Biol. Chem.*, **49** (7), 2113-2118 (1985)

トレハロースの製造方法 特開昭58-216695 大塚食品工業



後に両酵素を同時に生産する細菌の発見により工業化



デンプンからトレハロースを製造する系により淘汰される

図6 ホスホリラーゼ工学によるマルトースのトレハロースへの変換

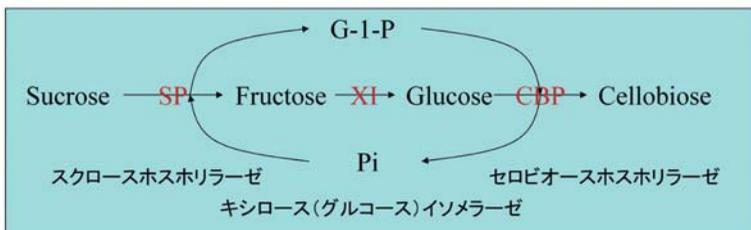
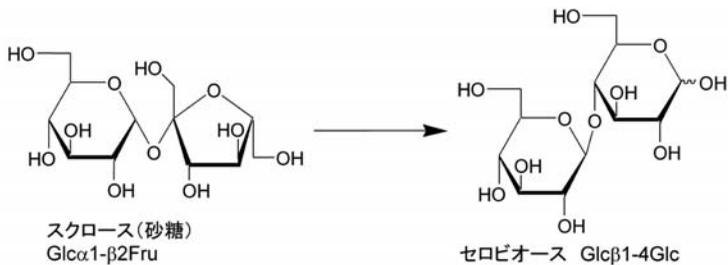


図7 三酵素の同時作用によるスクロースのセロビオースへの一段階変換

SP, スクロースホスホリラーゼ; XI, キシロースイソメラーゼ;
CBP, セロビオースホスホリラーゼ

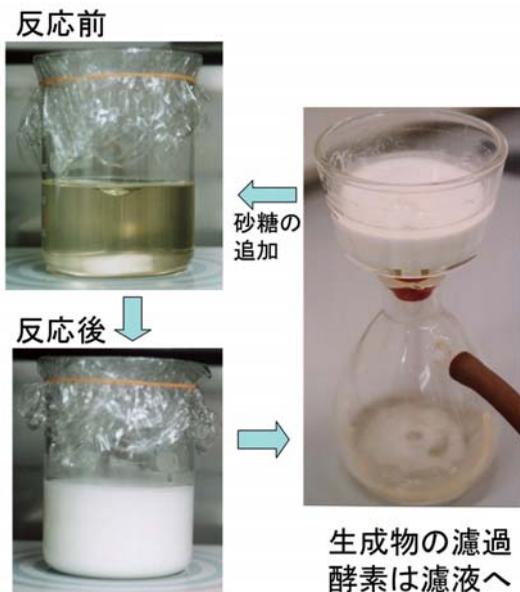


図8 高濃度スクロースを原料としたセロビオースの半連続的生産

ゼをラミナリピオースホスホリラーゼに変えることによるラミナリピオースの製造法¹⁶⁾を開発した。また、トレハロースホスホリラーゼ(保持型)に変えることによるトレハロースの製造法¹⁷⁾も報告されている。

(3) スクロースを原料としたアミロースの生産

2005年に江崎グリコ(株)より、スクロースを原料としたアミロースの製造プロセスの工業化が発表された。これは、スクロースホスホリラーゼと(グリコーゲン)ホスホリラーゼを組み合わせることにより重合度の均一なアミロースを製造する方法であり、ホスホリラーゼ工学の新たな実用例である。

5. ホスホリラーゼ工学の新展開

(1) ホスホリラーゼの立体構造とその改変の可能性

ホスホリラーゼ工学においては、現在まで知られているホスホリラーゼの種類が少ないが反応のバリエーションを限定していた。特に最近までグルコシド結合以外に関与するホスホリラーゼが知られておらずホスホリラーゼ工学の対象はグルコシドに限定されていた。最近ガラクトシド^{18,19)}および*N*-アセチルグルコサミニド^{20,21)}を分解するホスホリラーゼが報告されたが、これらは組み合わせるべき酵素が存在せず現状では実用的なプロセスに用いることが難しい。

このバリエーションの少なさを克服する方法としては、ホスホリラーゼの立体構造情報を元にその基質特異性を改変することが考えられる。グリコーゲンホスホリラーゼの構造は1970年に明らかにされていたが、最近になりそれ以外の数種のホスホリラーゼの立体構造が明らかにされ、基質特異性の改変が現実的な課題になってきた。

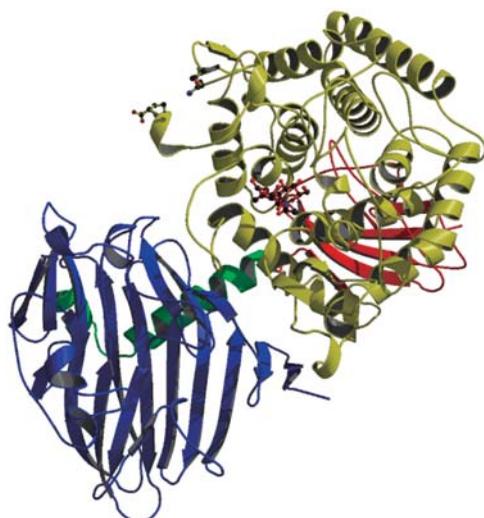


図9 キトピオースホスホリラーゼの立体構造

我々は、キトビオースホスホリラーゼの立体構造を明らかにした(図9)²²⁾。その結果意外なことにグルコアミラーゼの構造と非常に類似していることがわかった。 β 結合を加リン酸分解するキトビオースホスホリラーゼと α 結合を加水分解するグルコアミラーゼは基質結合サイトおよび活性中心アミノ酸に至るまで比較的良く保存されていた。この結果は、加水分解酵素 - ホスホリラーゼおよび α 切断酵素 - β 切断酵素の相互変換の可能性を示唆するものである。また、ホスホリラーゼの基質認識かわる部位が明らかになったことから、今後基質特異性の改変による有用酵素の構築が期待される。また、キトビオースホスホリラーゼと相同性の高い酵素であるセロビオースホスホリラーゼの立体構造解析にも成功した²³⁾。これらの結果を比較することによりグルコースと*N*-アセチルグルコサミンの認識機構の違いについて考察することが可能になった。

(2) ホスホリラーゼから推定されるピフィズ菌増殖因子の実体

ラクト-*N*-ビオースホスホリラーゼ(LNBP)は、Gal β -1,3GlyNAc [GlcNAc (ラクト-*N*-ビオース), or GalNAc (ガラクト-*N*-ビオース)]を可逆的に加リン酸分解して α ガラクトース1-リン酸とGlyNAcを生じる酵素であり、*Bifidobacterium bifidum* 菌体内酵素として1999年にはじめて報告された¹⁸⁾。筆者らは本酵素を精製し遺伝子の取得を行った¹⁹⁾。*B. bifidum* 菌体抽出液から疎水性クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことによりLNBPを単一蛋白まで精製した。精製タンパクのN末端及び内部アミノ酸配列を自動プロテインシーケンサーにより決定したところ、*Bifidobacterium longum* NCC2705株のBL1641遺伝子産物と高い相同性を示した。BL1641遺伝子は機能未知のタンパクをコードしておりホモロジーサーチの結果からも機能既知蛋白と有意な相同性は示さなかった。次に*B. longum* NCC2705ゲノム情報を元に基準株*B. longum* JCM 1254からLNBP遺伝子を単離し、大腸菌で発現させた。BL1641相当の遺伝子産物を大腸菌で発現させ活性を調べたところLNBPであることを確認した。LNBP遺伝子(BL1641)は、遺伝子クラスター(BL1638・BL1644)内に存在する。BL1638・1640はABCタイプの糖輸送タンパク、BL1642・1644はそれぞれ、ムチン脱硫酸酵素、Gal 1-P ウリジリル転移酵素、UDP-Glc 4-エピメラーゼと推定されている(図10)。クラスターの構成タンパクから判断すれば、本クラスターは新規なガラクトース代謝オペロンであり、ムチン糖鎖を代謝することにより腸管内に定着するために重要な役割を果たしていることが考えられる。*B. longum* ゲノム中には他のガラクトース代謝オペロンは存在しないことから、本オペロンが主要なガラクトース代謝系であると推定できる。

本クラスターにより母乳栄養児の腸管内のピフィズ菌の定着機構についても合理的に説明することができる。母乳栄養児と人工乳栄養児の腸内細菌叢が異なることは古くから知られており、この違いは母乳中に含まれるオリゴ糖によるものであると推定されていた。しかしながら母乳オリゴ糖がどのようにピフ

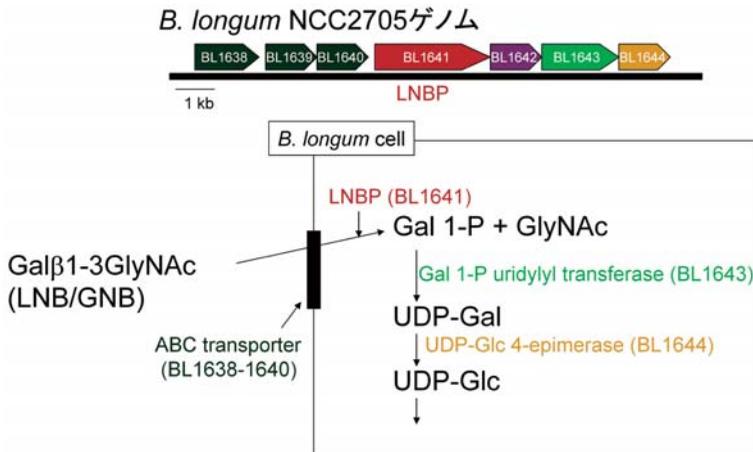
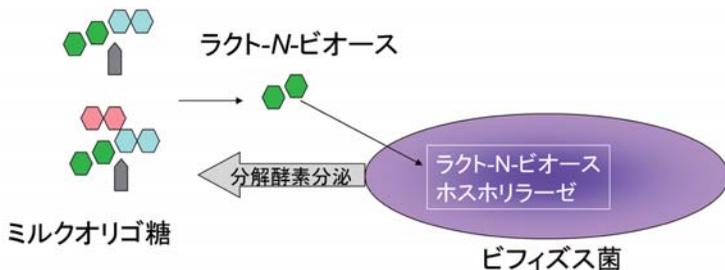


図10 ラクト・*N*・ピオースホスホリラーゼオペロンとその役割



ラクト・*N*・ピオースがヒトミルクオリゴ糖中のビフィズス因子の実体

図11 ラクト・*N*・ピオースホスホリラーゼの存在により示唆されるヒトミルクオリゴ糖によるビフィズス菌の選択的増殖メカニズム

ィズス増殖因子として作用するかについては未だに明らかにされていない。本遺伝子クラスターの存在は、ラクト系列の母乳オリゴ糖の非還元末端に存在するラクト *N* ピオース構造こそが真のビフィズス因子として働き、ビフィズス菌を選択的に増殖させることを示唆している (図11)。

この結果から、ラクト・*N*・ピオースが機能性食品素材として有用であることが考えられる。しかしながら現在までにラクト・*N*・ピオースの有効な製造方法は開発されていない。LNBP はラクト・*N*・ピオース製造の有用な触媒であり、将来ホスホリラーゼ工学を適用することにより本酵素を利用した実用的な製造法の開発が期待される

6. おわりに

本稿で紹介してきたとおりホスホリラーゼは組み合わせるによりオリゴ糖を実用的に生産するプロセスに利用することが可能である。しかしながら使用可能な酵素のバリエーションが少ないことがホスホリラーゼ工学の最大の問題点であった。今後は酵素の遺伝子工学的改変などの技術を駆使することによりホスホリラーゼのバリエーションを広げることによりさらなるホスホリラーゼ工学の発展が期待される。

(食品バイオテクノロジー研究領域 酵素研究ユニット 北岡 本光)

参考文献

- 1) Kitaoka, M. and Hayashi, K., Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **14**, 35-50 (2002).
- 2) 北岡本光, 糖質加リン酸分解酵素研究の新展開. バイオサイエンスとインダストリー, **63**, 171-174 (2005).
- 3) Kitaoka, M., Taniguchi, H. and Sasaki, T., Production of glucosyl-xylose using *Cellvibrio gilvus* cells and its properties. *Kitaoka et al., Appl. Microb. Biotechnol.*, **34**, 178-182 (1990).
- 4) Kitaoka, M., Ogawa, S. and Taniguchi, H., A cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus* recognizes only the β -D-form of 5a-carba-glucopyranose., *Carbohydr. Res.*, **247**, 355-359 (1993).
- 5) Tariq, M. A., Hayashi, K., Tokuyasu, K., and Nagata, T., Synthesis and structural analysis of disaccharides of 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucosamine and 4-O- β -D-glucopyranosyl-2-deoxy-D-glucose. *Carbohydr. Res.*, **275**, 67-72 (1995).
- 6) Tariq, M. A. and Hayashi, K., Synthesis of three hetero disaccharides, 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-6-deoxy-D-glucose, 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannosamine, and 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannose, and confirmation of their structures by C-13 NMR and MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 568-575 (1995).
- 7) Percy, A., Ono, H., Watt, D. and Hayashi, K. Synthesis of β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-arabinose, β -D-glucopyranosyl-(1-4)-L-fucose, and β -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-altrose catalysed by cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*. *Carbohydr. Res.*, **305**, 543-548 (1998).
- 8) Percy, A., Ono, H. and Hayashi, K., Acceptor specificity of cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*: synthesis of three branched trisaccha-

rides. *Carbohydr. Res.*, **308**, 423-429 (1998).

- 9) Kitaoka, M., Nomura, S., Yoshida, M. and Hayashi, K., Reaction on D-glucal by an inverting phosphorylase to synthesize derivatives of 2-deoxy- β -D-arabino-hexopyranosyl-(1 4)-D-glucose (2ⁱⁱ-deoxycellobiose). *Carbohydr. Res.*, **341**, 545-549 (2006).
- 10) Kitaoka, M., Sasaki, T. and Taniguchi, H., Synthesis of laminarioligosaccharides using crude extract of *Euglena gracilis* z cells. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1431-1432 (1991).
- 11) Shintate, K., Kitaoka, M., Kim, Y.-K. and Hayashi, K., Enzymatic synthesis of a library of β -(1 4) hetero-D-glucose and D-xylose based oligosaccharides employing cellodextrin phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, **338**, 1981-1990 (2003).
- 12) Honda, Y. and Kitaoka, M., A family 8 glycoside hydrolase from *Bacillus halodurans* C-125 (BH2105) is a reducing-end-xylose releasing exo-oligoxylanase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55097-55103 (2004).
- 13) Murao, S., Nagano, H., Ogura, S. and Nishino, T., Enzymatic synthesis of trehalose from maltose. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2113-2118 (1985)
- 14) Kitaoka, M., Sasaki, T. and Taniguchi, H., Conversion of sucrose into cellobiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and cellobiose phosphorylase. *Denpun Kagaku*, **39**, 281-283 (1992).
- 15) 北岡本光, スクロースからセロビオースを生産する: 高純度, 高収率, 経済的な調製を可能にした“スクロース異性化酵素”とは? . *化学と生物*, **40**, 498-500 (2002).
- 16) Kitaoka, M., Sasaki, T. and Taniguchi, H., Conversion of sucrose into laminaribiose using sucrose phosphorylase, xylose isomerase and laminaribiose phosphorylase. *Denpun Kagaku*, **40**, 311-314 (1993).
- 17) Saito, K., Kase, T., Takahashi, E., Takahashi, E. and Horinouchi, S., Purification and characterization of a trehalose synthase from the basidiomycete *Grifola frondosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4340-4345 (1998).
- 18) Derensy-Dron, D., Krzewinski, F., Brassart, C. and Bouquelet, S., β -1,3-Galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082: characterization, partial purification and relation to mucin degradation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 3-10 (1999).
- 19) Kitaoka, M., Tian, J. and Nishimoto, M., A novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase found in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3158-3162 (2005).
- 20) Park, J. K., Keyhani, N. O. and Roseman, S., Chitin catabolism in the

- marine bacterium *Vibrio furnissii*: identification, molecular cloning, and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 275, 33077-33083 (2000).
- 21) Honda, Y., Kitaoka, M. and Hayashi, K., Reaction mechanism of chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*: Identification of family 36 glycosyltransferase in *Vibrio*. *Biochem. J.*, 377, 225-232 (2004).
- 22) Hidaka, M., Honda, Y., Kitaoka, M., Nirasawa, S., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H. and Fushinobu, S., Chitobiose phosphorylase from *Vibrio proteolyticus*, a member of glycosyl transferase family 36, has an $(\alpha/\alpha)_6$ barrel fold like clan GH-L. *Structure*, 12, 937-947 (2004).
- 23) Hidaka, M., Kitaoka, M., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H. and Fushinobu, S., Structural dissection of the reaction mechanism of cellobiose phosphorylase. *Biochem. J.*, 398, 37-43 (2006).

細胞壁分解酵素の機能と食品への利用

1. はじめに

全世界で1年間に生産される植物の量は、乾燥重量として陸上で1000億トン、海で500億トンと見積もられている。植物の乾燥重量の約60%以上は細胞壁であり、植物細胞壁は地球上に最も多く存在するバイオマス資源である。植物細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロースといった多糖類であるが、人類は古くからこれら糖類を甘味料、保水剤、繊維等として食品、化粧品、衣料等の分野で利用してきた。しかしながら、利用されているのは限られた極く一部のみであり、大部分は未だ有効な利用には至っていない。近年、環境問題に関連して、カーボンニュートラルとなることからバイオマスを燃料として利用することに関心が高まっている。石油価格の上昇に伴い、バイオマス燃料、特にバイオエタノールの製造熱は加速的に高まってきている。植物細胞壁（セルロース系バイオマス）はデンプンやショ糖を利用するよりCO₂削減効果が大いことから、これまでにセルロース系バイオマスよりエタノールを製造するための研究は盛んに行われてきているが、全世界をみても殆ど実用化に至っておらず、カナダのIogen社が国の補助金に支えられ、麦わらからエタノールを製造しているのみである。セルロース系バイオマスを原料とした場合、エタノールの製造コストが高いことが実用化に向けて大きな障壁になっているが、こうした問題点を解決するために、バイオマスから複数の化学製品を生産し、余すことなく利用することで、バイオ製品市場の拡大、収入の安定化、生産コスト低減を実現すると同時に、新しい生産物を中心とした新規事業展開を狙ったバイオマスリファイナリーという考えが一般的になりつつある。この様なカスケード利用を可能にするためには植物細胞壁の主成分である多糖類の利用用途を拡大する必要がある。多糖類の構造を修飾することにより、分子量の大きさや枝分かれの数を調整する等を意図的に行い、物性や機能性を自在に調節できれば、その利用価値が高まると考えられる。

植物細胞壁多糖の構造の修飾に欠くことができないのは糖質関連酵素である。これら酵素の多くは通常その触媒機能を有するドメインのみではなく、酵素の基質となる糖類へ結合するドメインと繋がったモジュラー構造をしていることが知られている。Henrissatらは糖質関連酵素の分類を行っているが、現在のところ、糖加水分解酵素：108ファミリー、糖転移酵素：87ファミリー、多糖脱離酵素：18ファミリー、糖エステラーゼ：14ファミリー、糖結合モジュール：49ファミリーが存在している（CAZy website: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>）。このファミリー分類は酵素のアミノ酸配列中に見られる疎水性アミノ酸クラスターのパターンから判断しているため、タンパク質の立体構造を反映する物となっている。実際に同一のファミリーに分類された酵素は一つの例外もなく、同じフォールディ

ングをしており、活性中心の位置が保存され、同一のメカニズムにより酵素反応を行うことが知られていることから、ゲノム情報より目的とする糖質関連酵素を探す場合や精製した酵素の部分アミノ配列情報を得た様な場合には酵素の機能についてもある程度推定することが可能であり、有益な情報を与えてくれる。

本稿では、著者らがこれまで研究を行ってきた放線菌由来のキシラナーゼを例として、植物細胞壁分解酵素の立体構造と機能解析、酵素の食品への応用について解説する。

2. キシラナーゼ

2.1 放線菌キシラナーゼの構造

一般に高等植物の細胞壁は約90%がリグニン及びセルロース、ヘミセルロース、ペクチン等の多糖、残りの10%がタンパク質であるが、キシラナーゼの基質であるキシランはヘミセルロースの成分として最も主要なものであり、セルロースに次いで天然に2番目に多く存在する多糖である。D-キシロースが β -(1-4)結合した基本構造をしているが、殆どの場合は側鎖を有している。側鎖の種類、分岐度は植物の種類、組織、加齢の程度で異なるが、一般的にはD-キシロースのO-3位にL-アラビノース残基、O-2位に4-O-メチル-D-グルクロン酸又はグルクロン酸残基が結合した構造である。また、主鎖にはアセチル基が、側鎖のL-アラビノースのO-5位には*p*-クマル酸やフェルラ酸が部分的にエステル結合していることが知られている。

キシラナーゼはキシランの主鎖であるD-キシロースの β -(1-4)結合をランダムに加水分解するエンド型の酵素である。前述の糖質加水分解酵素のファミリー5, 8, 10, 11の4つのファミリーに分類されているが、ファミリー10と11が大きなファミリーであり、殆どのキシラナーゼはこの2つのファミリーに分類される。ファミリー10と11のキシラナーゼでは触媒ドメインの大きさ、立体構造や基質特異性が異なる事が明らかとなっている(図1)。ファミリー11のキシラナーゼはアミノ酸200個程度で β ジェリーロール構造をしており、酵素反応分解

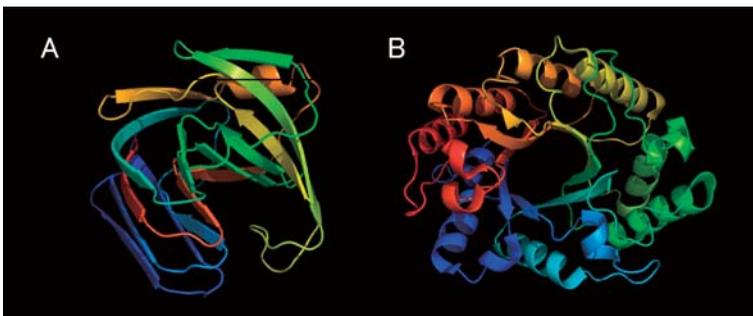


図1 ファミリー10キシラナーゼとファミリー11キシラナーゼの立体構造の比較
A: ファミリー11キシラナーゼ, B: ファミリー10キシラナーゼ

物には単糖であるキシロースがあまり蓄積しない。一方、ファミリー10キシラナーゼはアミノ酸300個程度で構成されるTIMバレル構造を持ち、ファミリー11に比べてサイズの小さいオリゴ糖と単糖であるキシロースを生産する。

著者が研究対象としてきたキシラナーゼは放線菌 *Streptomyces olivaceoviridis* E-86が生産する分子量45,000の酵素 (SoXyn10A) であるが、アミノ酸配列や立体構造の情報が全くなかったことから、遺伝子のクローニングと結晶構造解析を行った^{1,2)}。SoXyn10Aのゲノム遺伝子をクローニングしたところ、本キシラナーゼは1,431bpの塩基からなり、477アミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列の解析によると、N末端側41アミノ酸は分泌シグナル配列に相当し、成熟タンパク質のN末端側の約300アミノ酸がファミリー10キシラナーゼと類似しており、C末端側の約120アミノ酸はガラクトース結合レクチンと類似していた。そこで、C末端側のレクチン様ドメインの機能を調べるため、本ドメインを欠失した変異体酵素を構築し、キシランの分解性を天然型酵素と比較した(図2)。可溶性キシランに対しては両酵素に分解性の違いは見られなかったが、不溶性キシランに対しては、C末端ドメインを欠失した変異体酵素の活性が低下していたことから、本ドメインはキシランと結合する機能を持つ基質結合ドメインであると考えられ

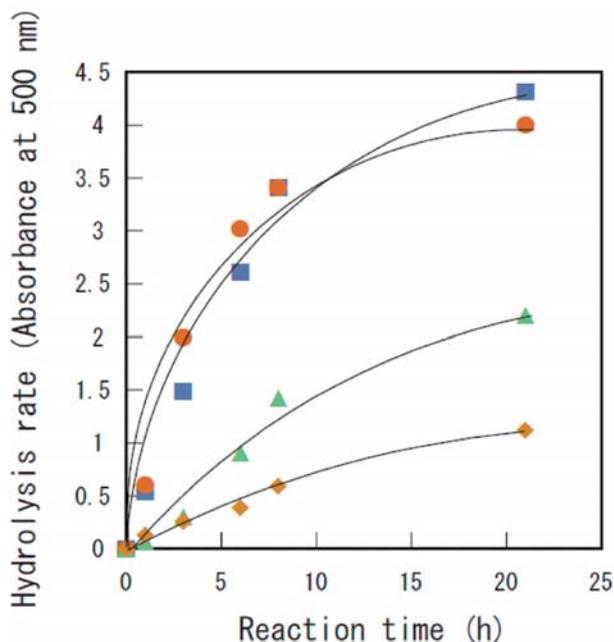


図2 C末端ドメイン欠失変異体のキシランに対する活性

: 天然型 SoXyn10A(可溶性キシラン), : C末端ドメイン欠失変異体(可溶性キシラン),
 : 天然型 SoXyn10A(不溶性キシラン), : C末端ドメイン欠失変異体(不溶性キシラン)

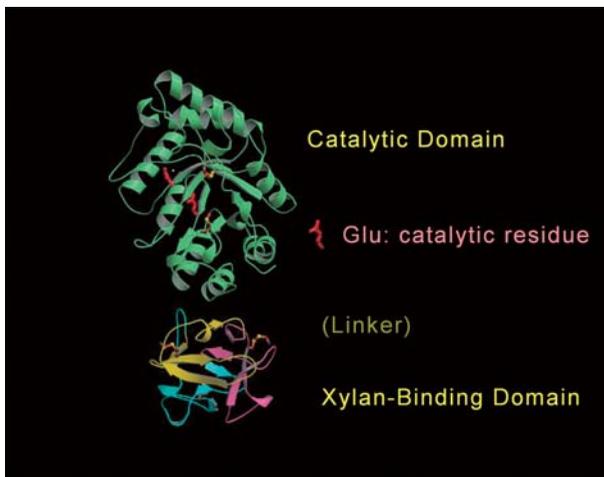


図3 SoXyn10Aの結晶構造

た。一方、X線結晶構造解析により1.9 Åの分解能でSoXyn10Aの構造が決定された(図3)。触媒ドメインは他のファミリー10キシラーゼと同様(β/α)₈-バレルからなっており、C末端側のキシラン結合ドメインはサブドメインα、β、γの3つのサブドメインからなる3回繰り返し配列でできたβ-トレフォイル構造をしていた(図3)。両ドメインはプロリンとグリシンに富むリンカー配列で繋がっていることが明らかとなった。リンカー配列で繋がった2つのドメインを含むインタクトな状態での構造決定は、数多く研究されている糖質関連酵素の中でも極めて珍しく、本酵素において初めてなされた物である。この構造を用いて研究を行うことで、これまで解明されていないモジュラー構造を持つ酵素の機能解析を優位に進められることが期待された。

次にSoXyn10Aの結晶に様々な糖をソーキングし、本キシラーゼがどのように基質を認識しているのかについて調べた^{3,4)}。図4にSoXyn10Aにキシロピオースが結合した構造を示したが、基質であるキシロオリゴ糖は触媒ドメイン、キシラン結合ドメインの両方に結合していたのに対し、グルコース、ガラクトース、ラクトース等の糖は基質結合ドメインにのみ結合していた(図5)。興味深い事に、基質結合ドメインにおいて糖との結合に関与するアミノ酸は全く同じであったが(図6)、糖のリングの向きがガラクトースとキシロースで異なり、ラクトースとの結合はガラクトース結合レクチンであるリシンと同じ様式であり、基質結合ドメインに突き刺さる様な方向に結合するのに対し、キシロースは基質結合ドメインに横たわる様に結合し、多糖であるキシランと結合するのに適した結合様式をしていた(図7)。一方、触媒ドメインに結合したキシロオリゴ糖の結合様式から本キシラーゼは5個のキシロースを認識するポケット(サブサイト・3

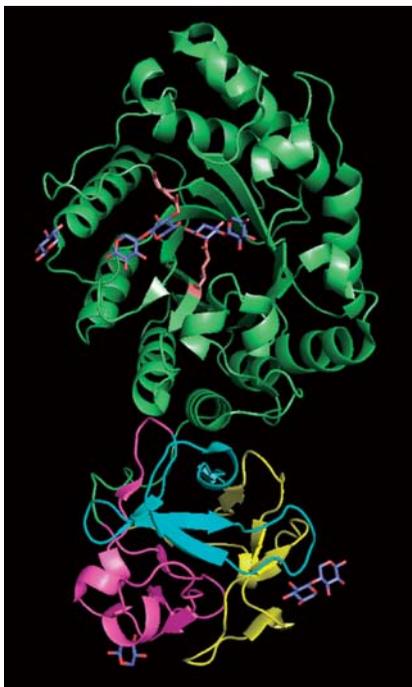


図4 SoXyn10A のキシロピオース結合構造

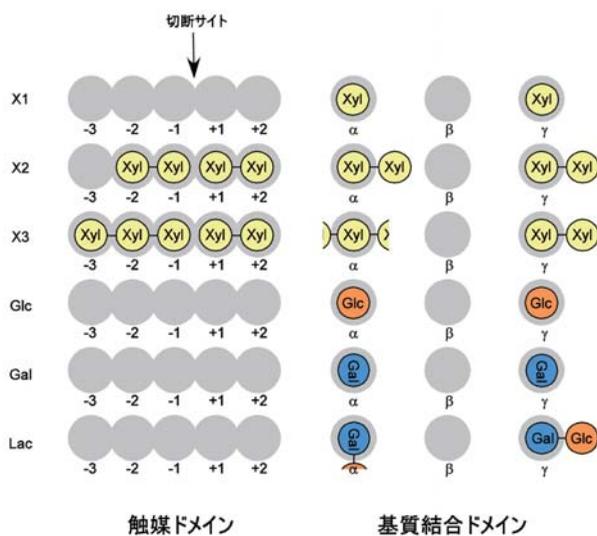


図5 SoXyn10A の糖結合様式

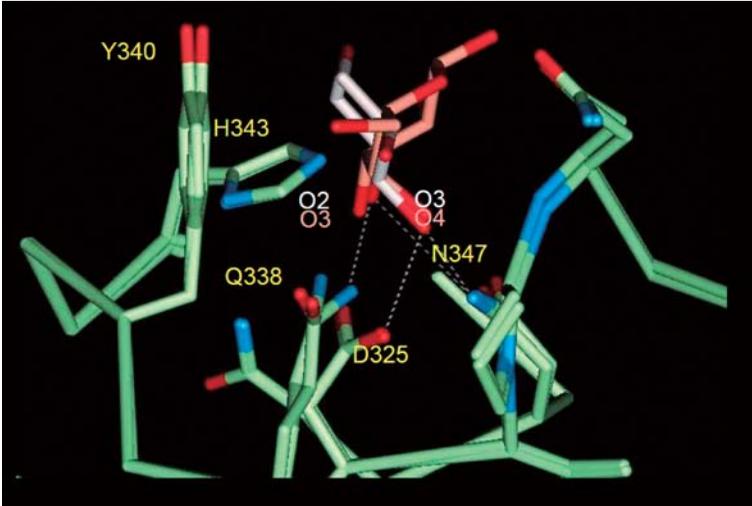


図6 キシラン結合ドメインとキシロース及びガラクトースとの結合様式
白：キシロース，赤：ガラクトース

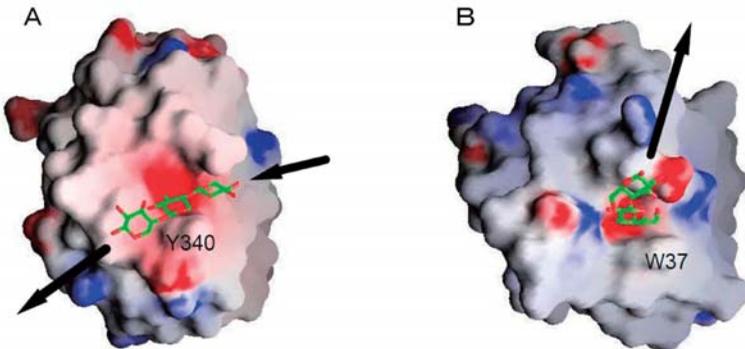


図7 キシラン結合ドメインの基質結合様式

A：キシラン結合ドメインとキシロトリオースの結合様式，
B：リシン（ガラクトース結合レクチン）とラクトースの結合様式

~ + 2) を有していると判断された。また、天然基質に近いアラビノフラノースや4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するオリゴ糖との結合構造についても解析したが、これらの基質も触媒ドメインと基質結合ドメインの両方に結合していた(図8)。基質結合ドメインにおいてはキシロースのC-2位及びC-3位の水酸基が基質結合ドメインの糖認識に関わるアミノ酸と水素結合しているが、これら

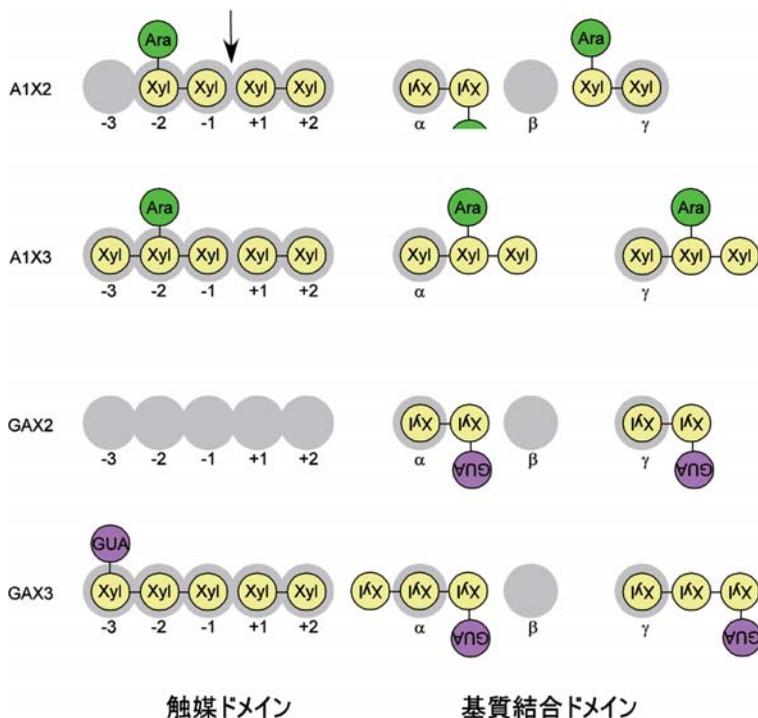


図8 側鎖を有するオリゴ糖に対する SoXyn10A の結合様式

の水酸基はトランスの位置関係にあり、180度回転しても同じ位置関係になることから、リバーシブルに結合がなされることが予想されていたが、側鎖付きの基質を用いることで、実際にリバーシブルな結合が可能であることを証明した(図8)。一方、触媒ドメインにおいてはアラビノフラノース側鎖を持つキシロース残基はサブサイトの-2の位置に結合していたのに対し、4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するキシロース残基はサブサイト-3の位置に結合していた(図9, 10)。アラビノース側鎖は α -1,3-結合であり、主鎖のキシロースと並行方向に伸びるために障害を生じることなくサブサイト-2に入ることができるが、4-O-Me-グルクロン酸の結合は α -1,2-結合であり、酵素の内側方向に伸びるために立体障害が起これ、4-O-Me-グルクロン酸の側鎖を有するキシロース残基はサブサイト-2には入れないと考察された。この結合様式は SoXyn10A がキシランを分解したときに生産するオリゴ糖の構造を反映しており、この結合構造から SoXyn10A により特定の構造をした側鎖を有するキシロオリゴ糖が生産されるメカニズムが解明された(図11)。

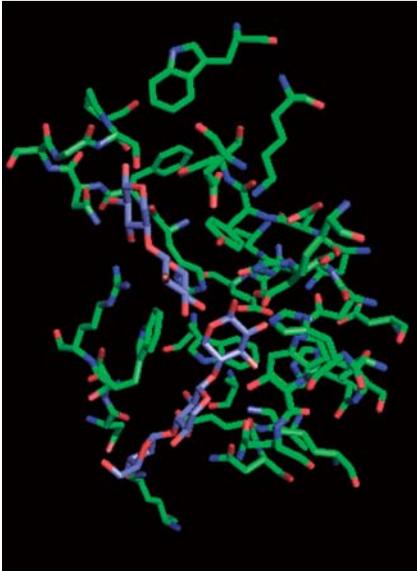


図9 SoXyn10Aのアラビノシルキシロトリオース結合構造

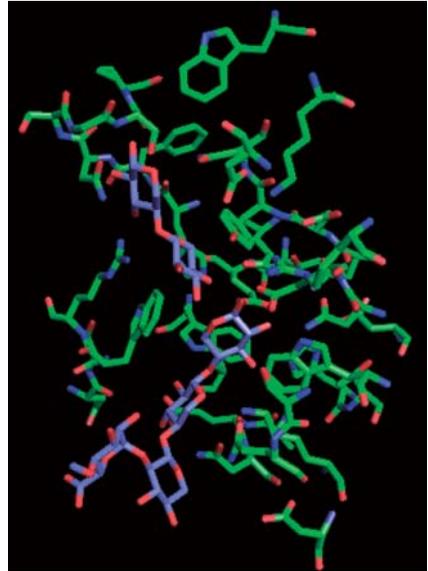


図10 SoXyn10Aのグルクロノシルキシロトリオース結合構造

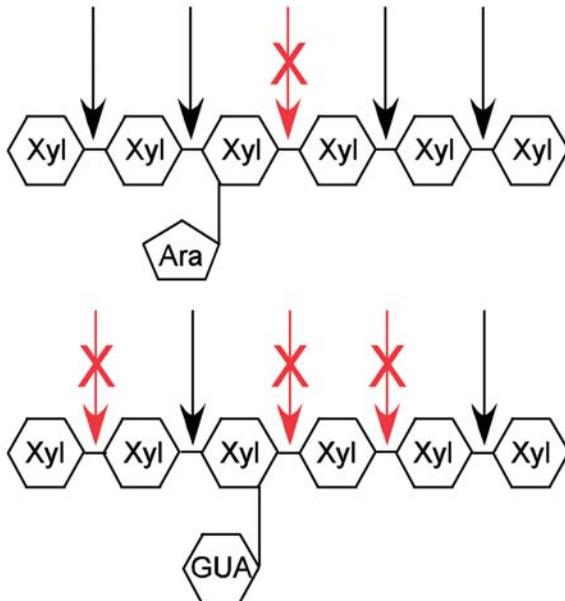


図11 キシランの側鎖と SoXyn10A が切断できるサイトの関係

2.2 機能解析

これまでに構造の明らかになっているファミリー10のキシラナーゼの構造と SoXyn10A の構造を比較するとサブサイトの -3 ~ +1 までは非常に構造が保存されているが、サブサイト+2の構造はそれぞれの酵素に特異的であった。そのことから酵素の基質特異性を決定しているのはサブサイト+2の構造であるという仮説が考えられた。同じファミリー10に属し、立体構造が明らかになっている *Cellulomonas fimi* の Cex (CfXyn10A) と SoXyn10A の基質結合クレフトの構造を比較すると SoXyn10A にはサブサイト+2の部分に余分なループが存在し、この部分が直接基質との結合に関与するが、CfXyn10A にはそれが存在しない為、異なる様式で基質と結合していると考えられる(図12)。実際にキシロオリゴ糖やキシランに作用させると酵素分解産物や反応速度に違いが見られた。

ファミリー10キシラナーゼの触媒ドメインは基質結合クレフトに沿った境界で大きな2つの塊に分かれている(図13)。そこで SoXyn10A のサブサイト+2のループ側の塊を CfXyn10A に置換した変異体(図13に示す SoXyn10A の左側部分を CfXyn10A に置換した変異体)を構築し、親酵素である SoXyn10A, CfXyn10A と共に特性の解析を行った⁵⁾。構築したハイブリッド酵素は SoXyn10A と CfXyn10A の中間的な性質を有していたが、サブサイト+2置換の効果は顕著であり、ハイブリッド酵素がサブサイト+2を使う反応様式の場合にはサブサイト+2が由来する CfXyn10A と同様の性質を示した。キシロオリゴ糖の分解速度、

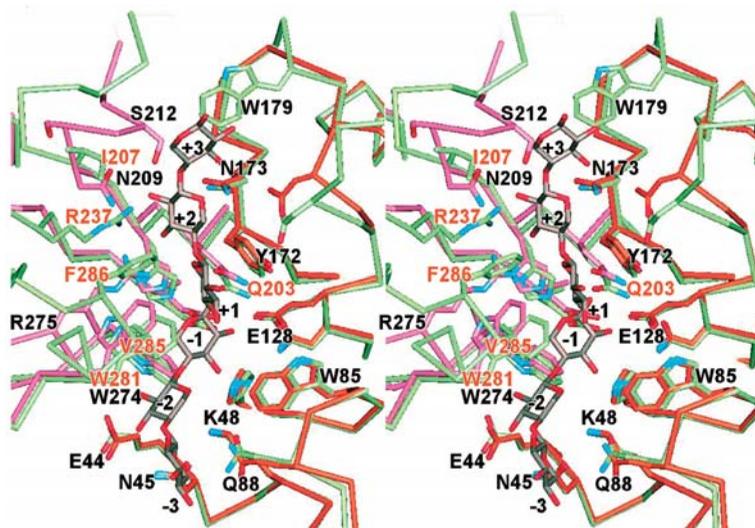


図12 SoXyn10A と CfXyn10A の基質結合クレフトの比較

グリーン：SoXyn10A の N 末端側ブロック，オレンジ：CfXyn10A の N 末端側ブロック，
ピンク：SoXyn10A の C 末端側ブロック

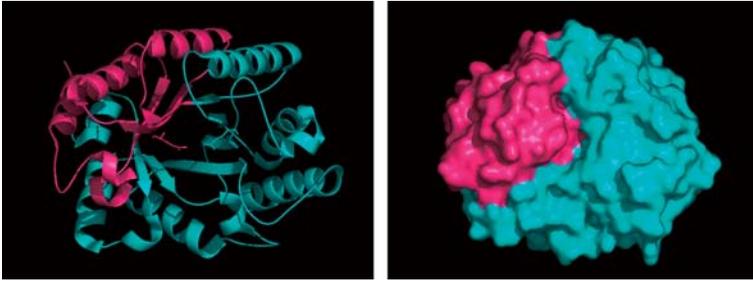


図13 SoXyn10A が基質結合クレフトを境界に2つのブロックに分かれる様子

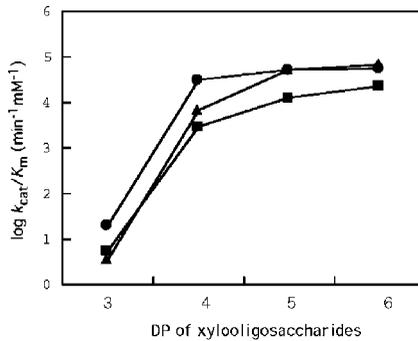


図14 ハイブリッド酵素によるキシロオリゴ糖の分解速度

● : CfXyn10A, ■ : SoXyn10A, ▲ : ハイブリッド酵素

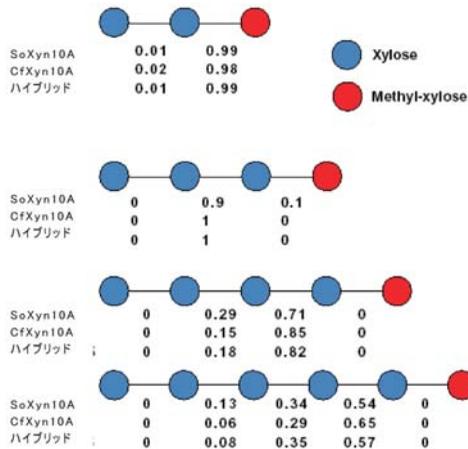


図15 ハイブリッド酵素の Bond Cleavage Frequency

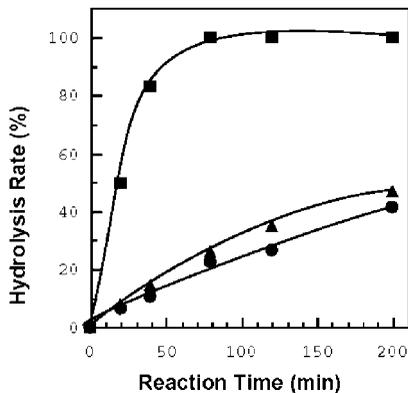


図16 ハイブリッド酵素の4-O-Me-グルクロノシルキシロテトラオースの分解
 : CfXyn10A, : SoXyn10A, : ハイブリッド酵素

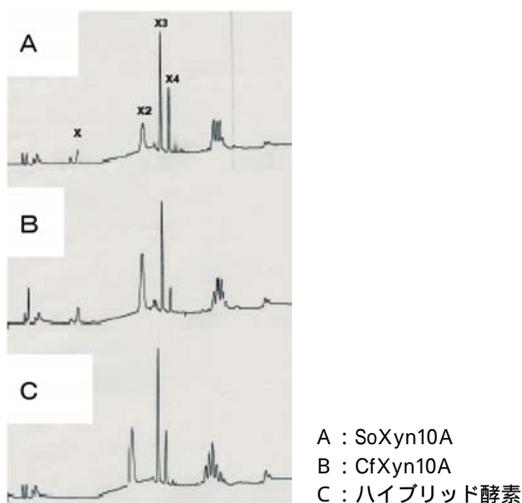


図17 ハイブリッド酵素のキシラン分解物の分解

分解パターン何れもハイブリッド酵素がサブサイト+2を使用するキシロテトラオースより長鎖の基質の分解においては CfXyn10A と一致したが、サブサイト+2を使用しないキシロトリオースの分解については SoXyn10A と一致した(図14, 15, 16)。その結果として、ハイブリッド酵素は分解物にキシロースを生産するキシロトリオース、キシロテトラオース、グルクロノキシロテトラオース等の基質に対しての活性を弱い方の性質のみを両方の親酵素から継承したことになり、キシランに作用した際に親酵素よりキシロースを生産しない性質を持った。

以上の様に、酵素の立体構造、基質との結合様式を解析し、酵素の基質を認識する部分を改変することにより、酵素の基質特異性を改変することが可能であることが示された。この様な実験結果を蓄積することで、酵素の自在なデザインが可能になり、将来的には意図した特性を持つ様に酵素を自在に改変できるようになることが期待される。

3. キシランの利用

キシランの実用化されている利用法には大きく分けて二通りの方法がある。一つは酸分解して、主成分であるD-キシロースを利用する方法であり、もう一つはキシランを酵素分解し、生じたキシロオリゴ糖を利用するものである。

D-キシロースは、既存添加物（天然添加物）である。甘味は上品でさわやかさを呈し、苦味、渋味を伴う不快味はなく、果糖の甘さに類似しており、ショ糖の約60%の甘味度を有する。摂取してもほとんど吸収されないが、動物実験では一時的な白内障を引き起こすことが知られている。しかしながら、米国で一般に安全と認められる物質とされており、安全性に問題はないものと考えられている。

キシロースの一般的な性質を列記すると、溶解度が大きい。浸透圧が大きい。吸湿性が少ない。褐変反応が起こりやすく、独特の香気、抗酸化作用、防腐作用がある。甘味度はブドウ糖より若干少なく、上品で爽快な甘味がある。腸管からの吸収性が非常に低い（ノンカロリー）。難発酵性である。整腸作用がある等であり、これらの特性を利用して下記の様に食品分野において利用されている。

- ・みそ、しょうゆの収量低下を抑え、着色を増進するため、製造時に添加する。
- ・燻製品の発色、風味、保存性等を改善し、燻製時間を短縮するために、塩漬工程へ添加する。
- ・煮豆、つくだ煮、外観、風味、貯蔵性向上のための有機酸と併用する。
- ・ハム、ソーセージ、水産練り製品の光沢、風味をそこなわずに、貯蔵性を向上させるために塩漬液に添加する。
- ・焼菓子、パン、ビスケット、クッキー、パン等の焼きあがりの色合い、品質改良、また風味改善のためのアミノ酸と併用する。
- ・脂質酸化防止、焼菓子、練り製品、揚げ物等の脂質酸化の防止に使用する。
- ・カラメル、キシロースカラメルの独特な香りを食品に利用する。
- ・その他、難発酵性、高溶解、高浸透性を利用する。

現在、キシロースの最も多い利用法はキシリトールの原料としてであり、キシロースに水素添加することにより化学的にキシリトールを製造している。キシリトールは甘く、さわやかな味がするが、虫歯や肥満の原因にならず、細菌の発育を妨げるため、口中の細菌による感染症の予防にもなり、ガム、キャンディーや歯磨き粉に多く利用されている。また、カロリーにはなるが、血糖の上昇はなく、糖尿病患者甘味料として利用されている。

一方、キシランの酵素分解により生産されるキシロオリゴ糖はビフィズス菌の育成を促して腸内環境を改善し、お腹の調子を整える効果が期待できるオリゴ糖として、特定保健健康食品の有効成分として認可されている。ビフィズス菌を増殖させる活性は既存のオリゴ糖の中で最も優れており、少量の摂取で効果が期待できる。キシロオリゴ糖は、腸や小腸などの消化液の影響を受けることなく、そのまま大腸等の下部消化管に到達する。大腸菌を始めとする他の菌に消費されることなく、効率良くビフィズス菌の栄養源になることから、キシロオリゴ糖を摂取すると、徐々にお腹の中でビフィズス菌が増殖するというメカニズムであることが明らかとなってきた。キシロオリゴ糖のカロリーは砂糖の半分程度であり、甘味は約1/3である。消化されにくく、低カロリーで虫歯の原因なりにくい糖であり、継続して摂取することにより、便秘傾向の人の排便を増やす効果があることが報告されている。また、継続して摂取するとカルシウムやマグネシウムなどのミネラル吸収を高める効果もあることが知られている。

著者らが研究している放線菌のキシラナーゼ (SoXyn10A) は中国の山東省にある会社 (山東龍力生物科技有限公司) でトウモロコシの穂軸であるコーンコブよりキシロオリゴ糖を生産する工程に用いられている。同社は現在は年間300t程のキシロオリゴ糖を製造しているが、更に大きなキシロオリゴ糖製造プラントを建築しており、完成すれば年間10,000tものキシロオリゴ糖の生産が可能になるようである。

キシロオリゴ糖を添加してパンを製造すると、ふっくらすることから、欧米においては小麦粉にキシラナーゼを添加してパンの製造を行っている。また、最近では側鎖にウロン酸を持つ長鎖のキシロオリゴ糖にアレルギー改善作用があることが明らかになってきており、新規な構造のオリゴ糖が新しい機能を有する可能性が期待される。キシラナーゼの基質特異性を改変することにより新規なオリゴ糖の製造や新規なキシランの利用法が見出され、キシランの用途が拡大されることが期待される。

4. おわりに

キシラン分解酵素及びキシランの利用を例にして記述してきたが、キシランのみならず植物細胞壁多糖へ目を向けても、利用へ向けた多くの研究がなされてきており、実用化されている技術もあるが、天然に存在する豊富な資源量を考えると未だ充分な利用には至っていないと言わざるを得ない。環境問題、エネルギー問題から、バイオマス燃料の利用技術の開発が大きな課題であるが、利用対照となる植物の種類が多様であり、植物細胞壁の構造が非常に複雑である上に種によって構造が異なるため、詳細な構造が解明されておらず、また、植物細胞壁成分を容易に分画するための酵素が多様な植物種に対してオプティマイズされていない事等が大きな問題となっている。植物細胞壁の最も主要な成分はグルコースの

固まりであるセルロースであり，グルコースはバイオエタノールや生分解性素材等への変換が比較的容易である。従って，ヘテロ多糖類で構造が複雑な上，生物が利用しにくい5炭糖を多く含むヘミセルロースを如何に有効に利用できるかが，植物細胞壁を材料としたバイオマスリファイナリーが成り立つかどうかのキーポイントであり，植物細胞壁バイオマス利用上の最も大きな課題である。今後，酵素のタンパク質工学，酵素生産菌の遺伝子組換え等の技術も含め，多様な植物種各々に対してオプティマイズされた植物細胞壁分解酵素の安価な製造の開発が望まれる。

謝辞

キシラナーゼの構造機能解析の研究は藤本瑞氏（農業生物資源研究所）及び久野敦氏（現産業総合技術研究所）との共同研究として行ったものである。本研究の一部は生研機構基礎研究事業の補助により推進された。

（食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能利用ユニット 金子 哲）

参考文献

- 1) A. Kuno, D. Shimizu, S. Kaneko, Y. Koyama, S. Yoshida, H. Kobayashi, K. Hayashi, K. Taira and I. Kusakabe: PCR cloning and expression of F/10 xylanase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, *J. Ferment. Bioengin.* 86, 434-439 (1998).
- 2) Z. Fujimoto, A. Kuno, S. Kaneko, S. Yoshida, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structure of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 β -xyylanase containing xylan-binding domain, *J. Mol. Biol.* 300, 575-585 (2000).
- 3) Z. Fujimoto, A. Kuno, S. Kaneko, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structure of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase: Sugar binding structure of family 13 carbohydrate-binding module, *J. Mol. Biol.* 316, 65-78 (2002).
- 4) Z. Fujimoto, S. Kaneko, A. Kuno, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, *J. Biol. Chem.* 279, 9606-9614 (2004).
- 5) S. Kaneko, H. Ichinose, Z. Fujimoto, A. Kuno, K. Yura, M. Go, H. Mizuno, I. Kusakabe and H. Kobayashi : Structure and function of a chimeric β -xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 FXYN and *Cellulomonas fimi* Cex, *J. Biol. Chem.*, 279, 26619-26626 (2004).

苦味低減作用を持つアエロモナスアミノペプチダーゼとその関連酵素の特徴

1. はじめに

近年、食品素材に求められる特性として、消化吸収性の向上や健康増進に有用な機能性などが挙げられる。また、アレルギーの原因となる食品中に含まれるタンパク質を分解した低アレルゲン化食品の需要も増加しつつある。これらの食品素材を製造するには、エンド型プロテアーゼを用いて食品の特性を損なわない程度にタンパク質を切断するのであるが、その際に苦味が生ずることが技術開発上の大きなネックとなっている。この苦味の原因は、食品中のタンパク質を加水分解することにより生じた苦味ペプチドである。タンパク質は、アミノ酸が100～1000個、1本の鎖状に結合したものであるが、その鎖は規則的に折り畳まれ、球状の塊として存在している。球状の塊の外側には親水性のアミノ酸が、内側には疎水性のアミノ酸が多く存在しており、タンパク質を加水分解すると、この塊状の構造は破壊され、内側に存在していた疎水性アミノ酸を多く含む部分が露出してくる。この疎水性アミノ酸を多く含むペプチドが苦味の原因となるのである¹⁾。しかしながら、この苦味ペプチドを、アミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼを用いてさらにアミノ酸や低分子ペプチドにまで加水分解すれば、苦味は低減又は消失する。そこで筆者の属する研究グループでは、これまでに疎水性アミノ酸を選択的に加水分解するアミノペプチダーゼの生産菌として、土壌細菌 *Aeromonas caviae* を単離するとともに、得られたアミノペプチダーゼに苦味低減作用があることを明らかにしてきた^{2,3)}。本稿では、アエロモナスアミノペプチダーゼ及び、その類縁酵素である *Vibrio proteolyticus* 由来アミノペプチダーゼの前駆体タンパク質の特徴、並びに前駆体タンパク質をプロセシングするエンドプロテアーゼの単離とその構造などについて解説する。

2. プロテアーゼの前駆体タンパク質

プロテアーゼ群において、これまでに多くの種類の前駆体タンパク質 (zymogen) が見出されており、現在盛んにその研究が行われている。それらのうち、ほとんどの前駆体タンパク質は完全に不活性な状態である。このような前駆体構造をとるタンパク質は消化酵素や血液凝固系に関与する酵素などに多く存在し、本来分解する目的タンパク質以外のタンパク質を分解して組織が破壊されるのを防いだり、必要が生じた際にだけ活性化することで代謝における制御の役割を果たしている。また、前駆体タンパク質のプロ領域が、成熟体領域の正しい折りたたみを補助する作用を有することが報告されており、このような作用を

	Serine protease	Cysteine protease	Aspartic protease	Metallo protease	Other
endo-type	Subtilisin α -Lytic protease Aqualysin <i>Serratia marcescens</i> serine protease Furin	Cathepsin S Cathepsin L <i>Trypanosoma cruzi</i> protease <i>Bombyx mori</i> protease Caspase-3 Streptopain	Cathepsin D Yeast proteinase A	Thermolysin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> elastase Membrane type 1-matrix metallo-proteinase Npr protease PA protease	<i>Clostridium septicum</i> alpha <i>Vibrio cholerae</i> EI Tor cytolyisin <i>Bordetella pertussis</i> filamentous hemagglutinin
exo-type	Carboxypeptidase Y	Cathepsin C		<i>Aeromonas caviae</i> aminopeptidase <i>Vibrio proteolyticus</i> aminopeptidase	Human intestinal lactase-phlorizin hydrolase Galactose oxidase Delta-conotoxin PVIA Human thyroperoxidase

図1 分子内シャペロンを持つ主なタンパク質

もつプロ領域は分子内シャペロンと呼ばれている（図1）。

3. アエロモナスアミノペプチダーゼ前駆体の構造と類縁酵素

Aeromonas caviae T-64株由来アミノペプチダーゼ（apAC）は、19アミノ酸残基のシグナルペプチド、101アミノ酸残基のN末端プロペプチド、273アミノ酸残基の成熟アミノペプチダーゼの3領域からなる前駆体タンパク質（プレプロ体）として生合成される⁴。apACのアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、*Vibrio proteolyticus*の生産するアミノペプチダーゼ（apVP）と56.7%の相同性を示した⁴。*Vibrio proteolyticus*は、以前、*Aeromonas proteolytica*と呼ばれた。この微生物は海洋性細菌で、主に中性プロテアーゼおよびアミノペプチダーゼを分泌する。apVPは活性中心に2つ亜鉛を含む金属酵素であり、また、apVPのX線解析に基づく結晶構造から、この2つ亜鉛は1つのco-catalyticの亜鉛単位として存在することが明らかになっている⁵。

これまでにapVPの生化学的な研究により、この酵素の分子の大きさは30kDaであり、反応の至適温度は65℃で、非常に耐熱性に優れていることが明らかになっている。また、HeekeらによるapVPの遺伝子クローニングとシークエンシングの研究により、apVPはまず初めに、504残基のアミノ酸から構成された分子量54kDaのプレプロアミノペプチダーゼとして生合成されることが明らかにされた⁶。プレプロアミノペプチダーゼは21アミノ酸残基のシグナルペプチド、85アミノ酸残基のN末端プロペプチド、299アミノ酸残基の成熟領域、99アミノ酸残基のC末端プロペプチドの4領域から構成されている。

4. アエロモナスアミノペプチダーゼのN末端プロペプチド（分子内シャペロン様ドメイン）の特性^{7,8)}

1) アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体の大量生産と PA プロテアーゼによるプロセシング

Aeromonas caviae T-64株より単離したゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により各種組み換えアミノペプチダーゼをコードする DNA を取得し、これらを用いて大腸菌用発現ベクターを構築した（図 2）。

まず、発現プラスミド pASNM を用いて、アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体（pro-apAC）の大量生産を行った。その結果、SDS-PAGE で単一バンドを示す分子量約40kDa の pro-apAC を得た（図 3）。つぎに、この精製 pro-apAC に *Aeromonas caviae* T-64株より単離したエンドプロテアーゼ（PA プロテアーゼ）を加えたところ、pro-apAC（約40kDa）は約32kDa のタンパク質（PA プロテアーゼ処理 pro-apAC）にプロセシングされ、天然アエロモナスアミノペプチダーゼ（天然 apAC）の分子量に近い値（約30kDa）を示した（図 3）。さらに、PA プロテアーゼ処理 pro-apAC の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、天然 apAC の N 末端アミノ酸より17アミノ酸残基上流でプロセシングを受けている

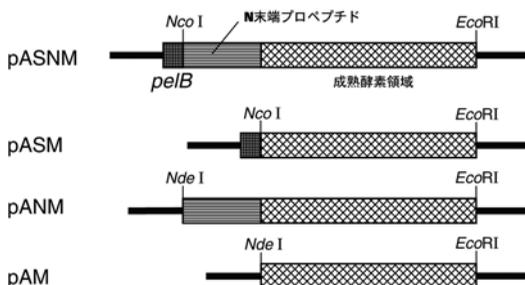


図 2 アエロモナスアミノペプチダーゼ発現用ベクターの構造

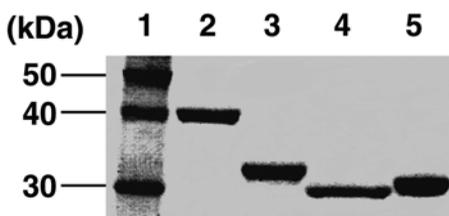


図 3 アエロモナスアミノペプチダーゼの SDS-PAGE

レーン 1, 分子量マーカー, レーン 2, アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体, レーン 3, PA プロテアーゼ処理アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体, レーン 4, 天然アエロモナスアミノペプチダーゼ, レーン 5, 天然 PA プロテアーゼ

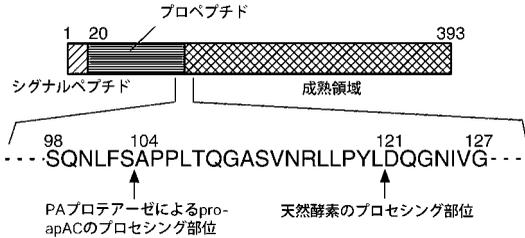


図4 アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体のプロセッシング部位

ことが明らかになった(図4)。

2) 酵素活性に及ぼすN末端プロペプチドの影響

3種類の酵素(pro-apAC, PAプロテアーゼ処理 pro-apAC, 天然 pro-apAC)について, ロイシンパラニトロアニリドを基質として K_m , k_{cat} を測定した。その結果, K_m は3種類の酵素において, ほぼ同等な値を示した(表1)。また, PAプロテアーゼ処理 pro-apAC の k_{cat} は, pro-apAC のそれと比較して, 大きな上昇を示しており, 天然 pro-apAC のそれとほぼ同等な値となった。これに加え, pro-apAC の k_{cat} は, 天然 pro-apAC の1/40程度であり, プロ体にも酵素活性が存在することが明らかになった。

つぎに, 各種基質に対する pro-apAC および天然 apAC の k_{cat} および K_m を測定した。その結果から, pro-apAC 自身も様々な基質において活性を持っており, この活性は成熟酵素のそれと比較すると弱く, その弱さの程度は基質によって異なることが明らかになった。つづいて, その弱さの程度について, 基質の組成との関係を分析するために, k_{cat} プロ体/ k_{cat} 成熟体, K_m プロ体/ K_m 成熟体, (k_{cat}/K_m) プロ体/(k_{cat}/K_m) 成熟体を算出した。基質組成の変化によって, pro-apAC と apAC の k_{cat} , K_m および k_{cat}/K_m 比率も変化する。Leu-pNA の場合では, プロ酵素と成熟酵素の k_{cat} 比率は2.1%であるが, Phe-Phe-Pro-Glu-Ala の場合では, その比率は84%である。 K_m プロ体/ K_m 成熟体も110% (Phe-Phe) から520% (Phe-Gly) まで変化する。(k_{cat}/K_m) プロ体/(k_{cat}/K_m) 成熟体も1.4% (Leu-pNA) から24% (Phe-Phe-Pro-Glu-Ala) まで変化する。以上の結果から, プロ酵素のN末端プロペプチドは酵素成熟領域と基質との親

表1 ロイシンパラニトロアニリドに対するアエロモナスアミノペプチダーゼの酵素活性

酵素	$k_{ca}(s^{-1})$	$K_n(mM)$	$k_{cat}/K_n(s^{-1}mM^{-1})$
pro-apAC	0.93 ± 0.02	0.21 ± 0.02	4.4 ± 0.2
PAプロテアーゼ処理 pro-apAC	40 ± 5	0.14 ± 0.03	285 ± 31
天然 apAC	44 ± 5	0.14 ± 0.03	317 ± 33

和力，酵素成熟領域分子活性ともに，それぞれの基質に対して異なった作用を与えていることが示唆された。

3) 酵素の温度，pH 特性に及ぼす N 末端プロペプチドの影響

pro-apAC は，60 において最大活性を示し（図 5），70 以下の温度帯において 1 時間は安定であった。一方，apAC は 50 において最大活性を示し，65 以下の温度帯において 1 時間は安定であった。この結果から，pro-apAC は，apAC より熱に安定であることが分かった。また，pH の影響については，pH8.5 付近で両酵素とも最大活性を示した。pH8.0～11.0 の範囲において両酵素の安定性はほぼ同じであったが，pH4.0～8.0 の範囲での安定性は pro-apAC のほうが高く，酸性の環境では pro-apAC のほうが安定であった。以上の結果から，pro-apAC の N 末端プロペプチドは成熟領域の構造の安定性を高める機能があることが明ら

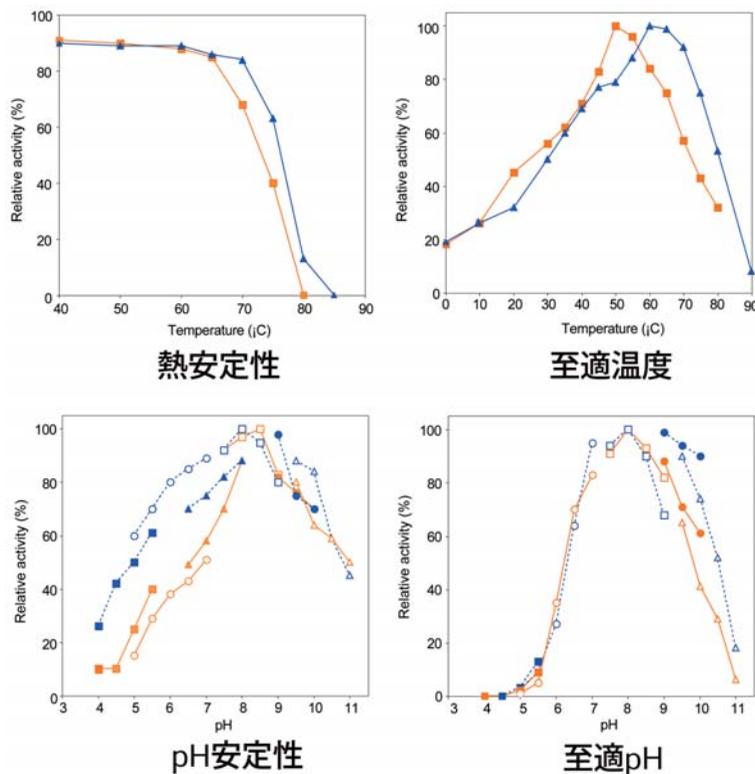


図5 アエロモナスアミノペプチダーゼプロ体の性質

熱安定性，至適温度； - ，プロ体； - ，成熟体。

pH 安定性，至適 pH； ，acetate buffer； ，MES buffer； ，MOPS buffer； ，Tris-HCl buffer； ，CHES buffer； ，CAPS buffer。実線，成熟体；破線，プロ体。

かになった。

4) 酵素の阻害剤に対する特性に及ぼす N 末端プロペプチドの影響

pro-apAC は、金属キレート剤であるオルトフェナンスロリン、EDTA および亜鉛酵素の特異的阻害剤であるベスタチンによって阻害された。その阻害効果を成熟酵素と比較すると、成熟酵素の方が阻害効果が強い。10 mM EDTA と 0.05 mM ベスタチンの阻害効果を測定したところ、プロ酵素の場合では、それぞれ43%と53%の残存活性があったのに対し、成熟酵素の場合では、それぞれ 1.1%と9.3%の残存活性を示した。この結果から、プロ酵素のプロペプチドは成熟領域の活性部位を保護していることが推測された。

5) N 末端プロペプチドを欠失させた pro-apAC (Δ N-pro-apAC) の大腸菌における活性発現

N 末端プロペプチド部分の遺伝子を欠失させ、成熟アミノペプチダーゼ領域のみの遺伝子を組み込んだ発現ベクター pASM を大腸菌において発現させたところ、封入体として生産された。大腸菌において発現させた pro-apAC および Δ N-pro-apAC の活性を測定したところ、培養液および菌体破砕液ともに、pro-apAC には活性が認められた。また、PA プロテアーゼで N 末端プロペプチドを限定分解することにより、酵素活性が上昇している。一方、 Δ N-pro-apAC は、培養液および菌体破砕液ともに、コントロールとほぼ同じ結果となった。さらに、PA プロテアーゼ添加後の酵素活性についても、大きな変化は見られなかった。以上の結果から、N 末端プロペプチドは大腸菌における酵素の活性化に重要な働きをしていることが推察された。

6) 尿素変性透析実験による酵素のリフォールディング

発現ベクター pANM および pAM を大腸菌において発現させたところ、両酵素ともに SDS-PAGE において不溶性画分に存在することが確認された。両酵素を 8 M 尿素溶液に溶解し、精製したのち透析を行い、透析前後の酵素活性および PA プロテアーゼにより処理した後の酵素活性を測定した。その結果、透析前は両酵素ともに酵素活性は示さなかったのに対して、透析後では、pro-apAC のみに活性が認められた。さらに、PA プロテアーゼにより処理したところ、pro-apAC は活性が上昇した。以上の結果から、N 末端プロペプチドは酵素の正しい折り畳みに重要な役割を果たしており、分子内シャペロン様の機能をもつことが明らかとなった。

5. ビプリオアミノペプチダーゼのN末端プロペプチド(分子内シャペロン様ドメイン)の特性³⁾

1) ビプリオアミノペプチダーゼプロ体の大量生産とPAプロテアーゼによるプロセシング

Vibrio proteolyticus より単離したゲノムDNAを鋳型として、PCR法により各種組み換えアミノペプチダーゼをコードするDNAを取得し、これらを用いて大腸菌用発現ベクターを構築した(図6)。

まず、発現プラスミド pVSNMC および pVSNM を用いて、ビプリオアミノペプチダーゼプロ体およびC末端プロペプチドを欠失させたプロ体 (pro-apVP および ΔC-pro-apVP) の大量生産を行った。その結果、SDS-PAGE で単一バンドを示す分子量約50kDa の pro-apVP および分子量約40kDa の ΔC-pro-apVP を得た(図7)。つぎに、この精製 pro-apVP および ΔC-pro-apVP にPAプロテアーゼを加えたところ、ともに約32kDa のタンパク質(PAプロテアーゼ処理 pro-apVP および ΔC-pro-apVP) にプロセシングされ、天然ビプリオアミノペプチダーゼ(天然 apVP) の分子量に近い値(約32kDa)を示した(図7)。

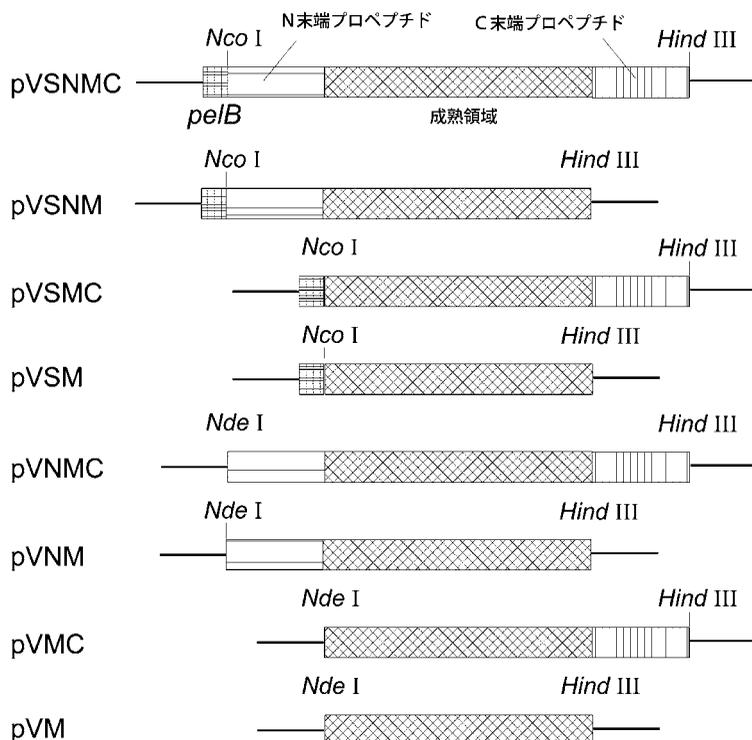


図6 ビプリオアミノペプチダーゼ発現用ベクターの構造

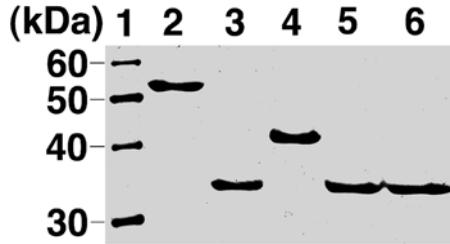


図7 ビプリオアミノペプチダーゼの SDS・PAGE

レーン 1, 分子量マーカー, レーン 2, ビプリオアミノペプチダーゼプロ体 (pro-apVP), レーン 3, PA プロテアーゼ処理 pro-apVP, レーン 4, ビプリオアミノペプチダーゼプロ体 (ΔC -pro-apVP), レーン 5, PA プロテアーゼ処理 ΔC -pro-apVP, レーン 6, 天然ビプリオアミノペプチダーゼ

2) 酵素活性に及ぼすプロペチドの影響

5 種類の酵素 (pro-apVP, ΔC -pro-apVP, PA プロテアーゼ処理 pro-apVP および ΔC -pro-apVP, 天然 apVP) について, ロイシンパラニトロアニリドを基質として K_m , k_{cat} を測定した。その結果, K_m は 5 種類の酵素において, ほぼ同等な値を示した (表 2)。また, PA プロテアーゼ処理 pro-apVP および ΔC -pro-apVP の k_{cat} は, pro-apVP および ΔC -pro-apVP と比較して, 大きな上昇を示しており, 天然 apVP とほぼ同等な値となった (表 2)。また, pro-apVP および ΔC -pro-apVP の k_{cat} 値は, 天然成熟アミノペプチダーゼの約 $1/20 \sim 1/9$ の値を示した (表 2)。

3) プロペチドを欠失させた pro-apVP の大腸菌における活性発現

N 末端プロペチド部分の遺伝子を欠失させ, C 末端プロペチドと成熟アミノペプチダーゼ領域部分および成熟アミノペプチダーゼ領域のみの遺伝子を組み込んだ発現ベクター pVSMC および pVSM を大腸菌において発現させたところ, とともに封入体として生産された。大腸菌において発現させた pro-apVP, ΔC -pro-apVP, ΔN -pro-apVP および $\Delta N\Delta C$ -pro-apVP の活性を測定したところ,

表 2 ロイシンパラニトロアニリドに対するビプリオアミノペプチダーゼの酵素活性

酵素	$k_{cat} (s^{-1})$	$K_m (mM)$	$k_{cat}/K_m (s^{-1}mM^{-1})$
pro-apVP	19 ± 0.3	0.36 ± 0.01	53 ± 1
PA プロテアーゼ処理 pro-apVP	99 ± 3	0.15 ± 0.01	665 ± 31
ΔC -pro-apVP	4.6 ± 0.1	0.39 ± 0.02	12 ± 1
PA プロテアーゼ処理 ΔC -pro apVP	96 ± 2	0.15 ± 0.01	657 ± 16
天然 apVP	102 ± 1	0.14 ± 0.00	723 ± 13

培養ろ液および菌体破碎液ともに，pro-apVP， Δ C-pro-apVP には活性が認められた。また，PA プロテアーゼで N 末端プロペプチドを限定分解することにより，酵素活性が上昇している。一方， Δ N-pro-apVP および Δ N Δ C-pro-apVP は，培養ろ液および菌体破碎液ともに，コントロールとほぼ同じ結果となった。さらに，PA プロテアーゼ添加後の酵素活性についても，大きな変化は見られなかった。以上の結果から，N 末端プロペプチドは大腸菌における酵素の活性化に重要な働きをしていることが推察された。

4) 酵素のリフォールディング実験

発現ベクター pVNMC，pVNM，pVMC，pVM をそれぞれ大腸菌において発現させたところ，SDS-PAGE において不溶性画分に存在することが確認された。各酵素を 8 M 尿素溶液に溶解し，精製したのち透析を行い，透析前後の酵素活性および PA プロテアーゼにより処理した後の酵素活性を測定した。その結果，透析前は各酵素ともに酵素活性は示さなかったのに対して，透析後では pro-apVP， Δ C-pro-apVP に活性が認められた。さらに，PA プロテアーゼにより処理したところ，pro-apVP， Δ C-pro-apVP は活性が上昇した。以上の結果から，N 末端プロペプチドは酵素の正しい折り畳みに重要な役割を果たしており，分子内シャペロン様の機能をもつことが明らかとなった。さらに，N 末端プロペプチドが，酵素のフォールディングにどのように作用するか推測するために，希釈法によるリフォールディング実験を行った。その結果， Δ C-pro-apVP (N 末端プロペプチドがある酵素) の活性は，24 時間後に，最大活性の 28% に到達し，さらに 60 時間後には，34% に到達したのに対して， Δ N Δ C-pro-apVP (N 末端プロペプチド欠失体) の活性は，24 時間後には，1% しか回復せず，60 時間後においても，3.7% の回復率であった (図 8)。この結果から，N 末端プロペプチドが欠失した成熟体だけでも，活性の回復は可能であるが，N 末端プロペプチドが存在することで，より早く活性の回復が可能であることが明らかになった。

6. アミノペプチダーゼをプロセッシングする PA プロテアーゼ¹⁰⁾

1) PA プロテアーゼの精製

A. caviae T-64 の培養上清より，DEAE カラムクロマトグラフィー，Mono-Q カラムクロマトグラフィーを用いて PA プロテアーゼを単離した。酵素は 196 倍に精製され，7.2% の収率で，比活性は 4750 units/mg の精製酵素を得た。精製酵素の純度を SDS-PAGE で検定したところ，単一と認められた。

2) PA プロテアーゼ遺伝子のクローニング

精製 PA プロテアーゼの N 末端部のアミノ酸配列を解析したところ，細菌金属プロテアーゼと高い相同性を示した。この結果を基にして，TAIL-PCR 法に

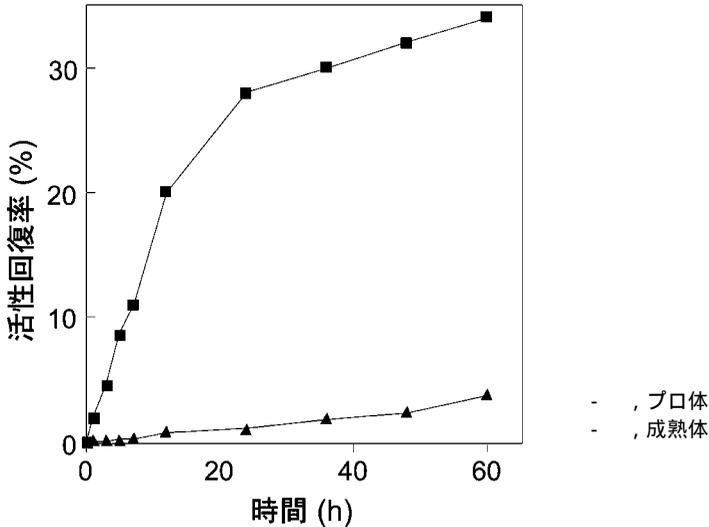


図8 希釈法による *V. proteolyticus* アミノペプチダーゼのリフォールディング

より、全 PA プロテアーゼ遺伝子を取得し、DNA シーケンシングを行った。その結果、得られた DNA 断片は、全長1,773bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を含んでいた。塩基配列から推測されるアミノ酸配列を、天然酵素の N 末端アミノ酸配列と比較したところ、成熟領域の N 末端側に184アミノ酸残基 (Met・1 から His・184まで) が存在していた。これより、His・184・Glu・185が N 末端プロペプチドの切断部位であることがわかった。また、シグナルペプチドの切断部位を Perlman, Halvorson および Vonheijine の方法に従った検索した結果、Als・19・Ala・20であると推測した。以上の結果をまとめると、シグナルペプチドは、Met・1 から Ala・19までの19アミノ酸残基、N 末端プロペプチドは、Ala・20から His・184までの165アミノ酸残基から構成される。また、成熟領域 (Glu・185から Tyr・591まで) は、407アミノ酸残基から構成される分子量45kDa のタンパク質をコードするが、これは天然酵素の分子量30kDa より15kDa も大きい。この結果は、PA プロテアーゼは生合成されたのち、15kDa の C 末端プロペプチドがプロセッシングを受け、分子量30kDa の成熟酵素となるものと考えられる。

3) ホモロジー解析

推定された PA プロテアーゼのアミノ酸配列のホモロジー検索を、データベース EMBL, SWISS-PROT および NFBRS を用いて行った。その結果、PA プロテアーゼは、*Vibrio proteolyticus* 由来プロテアーゼと54.8%、*Vibrio cholerae* 由来プロテアーゼと54.8%、*Vibrio vulnificus* 由来プロテアーゼと53.3%、*Bibrio anguil-*

larum 由来プロテアーゼと52.3% , *Pseudomonas aeruginosa* 由来プロテアーゼと52.5% , *Legionella pneumophila* 由来プロテアーゼと44.3% , *Legionella longbeachae* 由来プロテアーゼと42.7%の相同性をそれぞれ示した。以上の結果から, PA プロテアーゼは, 細菌金属プロテアーゼとアミノ酸の相同性が高いことが明らかになった。N末端プロペプチドの切断部位は, 相同な領域にあるが, 切断部位は各酵素によって異なる。推定される活性部位, 金属結合部位のアミノ酸の相同性は高い。天然酵素の折りたたみの維持に主な作用をする Cys はすべて保存されていた。

4) 大腸菌における PA プロテアーゼの発現

T7 lac promotor と *pelB* シグナルペプチドを含む PA プロテアーゼプロ体および N末端プロペプチドを欠失させた PA プロテアーゼプロ体の発現ベクター pPSNMC および pPSMC を構築した。得られたプラスミドを用いて大腸菌 BL 21(DE3) を形質転換し, 酵素の発現を行った。その結果, 培養上清液および菌体破砕液ともに, PA プロテアーゼプロ体遺伝子を発現させたものでは酵素活性が認められた。一方, N末端プロペプチドを欠失させた PA プロテアーゼプロ体は培養上清液および菌体破砕液ともにコントロールとほぼ同じ結果となった。また, SDS-PAGE の解析から, PA プロテアーゼプロ体は可溶性タンパク質として発現されたが, N末端プロペプチドが欠失した PA プロテアーゼプロ体は不溶性タンパク質として発現していることが明らかとなった。以上の結果から, 大腸菌 BL 21(DE3) においてタンパク質を発現させる際には, N末端プロペプチドは, 活性型酵素を得るのに必要であることが明らかになった。

また, BL21(DE3) /pPSNMC を培養して, 発現させたタンパク質の大きさは約30kDa で, PA プロテアーゼプロ体のアミノ酸配列による推測されたタンパク質の55kDa より約25kDa も小さい。大腸菌に発現させた PA プロテアーゼの N末端アミノ酸配列を解析したところ, N末端アミノ酸配列は Gln-Asp-Ala-Thr-Gly で, *A. caviae* T-64から精製された天然 PA プロテアーゼの N末端アミノ酸配列と同じ結果となった。以上の結果から, PA プロテアーゼはプロ体として発現したのち, N および C末端プロペプチドが自己触媒的にプロセッシングされることが推定された。

5) PA プロテアーゼの比活性

pro-apAC は PA プロテアーゼのほか, トリプシン, パパイン, サーマリシンを用いても, その N末端プロペプチドをプロセッシングすることが出来る。それぞれの比活性を比較すると, トリプシンは5.0U/μg, パパインは13U/μg, サーマリシンは200U/μg であるのに対して, 天然 PA プロテアーゼおよび発現された PA プロテアーゼは4,800U/μg および5,100U/μg であった。この結果から, PA

プロテアーゼは pro-apAC のプロペプチド領域を切断するのに特異的に高い比活性をもつことが明らかになった。

7. アミノペプチダーゼ (apAC, apVP) の N 末端及び C 末端プロペプチドの特徴

アエロモナスおよびビブリオアミノペプチダーゼの N 末端プロペプチドは成熟体領域の酵素活性を部分的に阻害するが、完全に阻害することはできず、プロ体にも酵素活性が存在することが明らかになった。これは、カルボキシペプチダーゼ A のプロ体の場合と同様な結果である。カルボキシペプチダーゼ A プロ体の X 線結晶構造解析から、プロペプチドが活性部位を空間的に阻害していることが知られている。apAC および apVP のプロペプチドも成熟体領域の活性部位に対して空間的な阻害により、インヒビター作用を示している可能性が考えられる。つぎに、シャペロン様機能の解析では、大腸菌において各種組換え体を発現させたところ、N 末端プロペプチドは、活性型酵素を得るのに重要な領域であることが明らかとなった。さらに、各酵素を尿素変性透析法によりリフォールディングをしたところ、同様に N 末端プロペプチドが正しくフォールディングするのに重要な領域であることが明らかになった。以上の結果から、N 末端プロペプチドは分子内シャペロンとしての機能を有していることが示された。さらに、apVP の場合は、タンパク質のフォールディングに C 末端プロペプチドは直接関与しないことも明らかになった。

これまで分子内シャペロンをもつタンパク質には十数例の報告がある。同一分子上にシャペロン様機能を有するペプチド領域が存在し、それがタンパク質のフォールディングを補助する。毒タンパク質や、血液凝固因子なども含め、近年数多くのタンパク質が見出されているが、中でもエンド型プロテアーゼは特に多く発見されている。今回の研究に用いた 2 つの酵素、apAC および apVP がもつ分子内シャペロンは、エキソ型金属プロテアーゼにおいて初めて発見された。apVP のリフォールディング実験において、N 末端プロペプチドを欠失したタンパク質も、時間経過に伴いタンパク質の一部は活性を回復する。すなわち成熟体領域のみでも自発的なフォールディングが可能である。しかし、単独でフォールディングするよりも、N 末端プロペプチドが付加されることで約 10 倍のフォールディング促進効果が得られる。これは N 末端プロペプチドにより、フォールディング過程における中間体が安定化されることで、フォールディングが加速されるものと考えられる。

apVP がもつ C 末端プロペプチドはシグナル領域として機能していることが推測されており、ペリプラズムに到達した分泌タンパク質が、細胞外膜を通過するための必要な領域であると考えられている。この領域のアミノ酸配列に相同性のあるタンパク質には、*Xanthomonas campestris* 由来細胞外プロテアーゼ、*Vibrio alginolyticus* 由来セリンエキソプロテアーゼなどがある。なお、*Xanthomonas camp-*

estris 由来細胞外プロテアーゼおよび *Vibrio alginolyticus* 由来セリンエキソプロテアーゼの C 末端プロペプチドには、活性型酵素を得るのに必要ではないことが報告されている。

pro-apAC の各種性質を解析した結果、プロ酵素は天然成熟酵素より熱、pH に対して安定であり、また、阻害剤による活性阻害率はプロ酵素のほうが低い。以上の結果から、プロ酵素は天然成熟酵素より構造的に安定であることが明らかになった。また、N 末端プロペプチドは成熟領域構造の安定性を高め、活性部位を保護する機能があることも示唆した。Porcine カルボキシペプチダーゼ A と B は、プロ酵素のプロペプチドも成熟領域構造の安定性を高め、活性部位を保護する機能がある。また、各種基質に対する両酵素の k_{cat} および K_m 値を測定したところ、プロ酵素と成熟酵素の比率は基質によって異なることが明らかになった。通常、pro-cathepsin B, pro-cathepsin D のような蛋白質分解酵素は、その多くが活性のないプロ酵素として生合成され、プロセシングを受けて、活性型酵素になる。ズブチリシン、 α -リティックプロテアーゼの場合では、分離されたプロペプチドを入れると、成熟酵素の活性は阻害される。プロカタペシン B, ペプシノーゲン, プロカルボキシペプチダーゼ A, プロペプチド・ズブチリシン複合体の X 線結晶構造解析をしたところ、プロペプチドが活性部位を空間障害していることが示されている。さらに、pro-apAC のプロペプチドの影響と基質組成の関係を調べるために、アミノアシルパラニトロアニリド (Leu-pNA, Met-pNA, Val-pNA), アミノアシルフェニルアラニン (Leu-Phe, Met-Phe, Ala-Phe, Phe-Phe), フェニルアラニンのジペプチド (Phe-Leu, Phe-Met, Phe-Gly, Phe-Ala, Phe-Phe) を用いて酵素活性比率を分析した。この結果、基質組成が異なると成熟酵素に対するプロ酵素の酵素活性の比率が異なることが分かった。これは、基質組成の違いによって、プロペプチドは成熟領域の活性阻害の強さが異なるということを示している。Bovine プロカルボキシペプチダーゼ A についてもこのような結果が得られている。

8. おわりに

本研究では、まず大腸菌において apAC の各種組換え体を発現させ、apAC の N 末端プロペプチドの機能について解析した。次に、N 末端プロペプチドの性質をさらに明らかにするために、アミノペプチダーゼプロ体 (pro-apAC) について、各種基質に対する酵素活性および熱・pH 安定性の測定した。また、apVP について、N および C 末端プロペプチドの機能を解析した。さらに、pro-apAC および pro-apVP を成熟体に変換する酵素 PA プロテアーゼ (pro-aminopeptidase processing protease) を単離し、その遺伝子をクローニングし、大腸菌における生産系の確立を行った。本研究は、金属細菌アミノペプチダーゼの活性化やフォールディング機構の解明に有力な手がかりを与えるものと期待されると

もに，食品産業でのさらなる酵素の利活用の一助になれば幸いである。

(食品バイオテクノロジー研究領域 酵素研究ユニット 蕪澤 悟)

参考文献

- 1) Habibi-Najafi, M.B., and Lee, B. H., Bitterness in cheese. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 397-411(1996).
- 2) Izawa, N., Tokuyasu, K., and Hayashi, K., Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 543-545(1997).
- 3) Izawa, N., Ishikawa, S., Tanokura, T., Ohta, K., and Hayashi, K., Purification and characterization of *Aeromonas caviae* aminopeptidase possessing debittering activity. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4897-4902(1997).
- 4) Izawa, N., and Hayashi, K., Cloning and nucleotide sequencing of the aminopeptidase gene from *Aeromonas caviae* T-64. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 544-548(1996).
- 5) Chevrier, B., Schalk, C., D'Orchymont, H., Rondeau, J. M., Moras, D., and Tarnus, C., Crystal structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family. *Structure* **15**, 283-291(1994)
- 6) Van Heeke, G., Denslow, S., Watkins, J. R., Wilson, K. J., and Wagner, F. W., Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio proteolyticus* aminopeptidase gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 337-340(1992)
- 7) Nirasawa, S., Nakajima, Y., Zhang, Z., Yoshida, M., and Hayashi, K., Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase. *Biochem. J.*, **341**, 25-31(1999).
- 8) Zhang, Z., Nirasawa, S., Nakajima, Y., Yoshida, M. Kusakabe, I., and Hayashi, K., Characterization of the pro-aminopeptidase from *Aeromonas caviae* T-64. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **65**, 420-423(2001).
- 9) Zhang, Z., Nirasawa, S., Nakajima, Y., Yoshida, M., and Hayashi, K., Function of the N-terminal propeptide of an aminopeptidase from *Vibrio proteolyticus*. *Biochem. J.* **350**, 671-676(2000).
- 10) Nirasawa, S., Nakajima, Y., Zhang, Z., Yoshida, M., and Hayashi, K., Molecular cloning and expression in *E. coli* of the extracellular endoprotease of *Aeromonas caviae* T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1433**, 335-342(1999).

納豆菌の粘質物生産機構

1. はじめに

微生物発酵は、チーズ、ヨーグルト、納豆、漬物、パンなどの発酵食品製造やビール、日本酒、ワイン、味噌、醤油などの醸造に不可欠である(伝統的発酵)。食品製造以外にも、酵素やアミノ酸、糖類、抗生物質、微生物農薬の生産や、エタノール、メタンなどの燃料生産に微生物発酵は利用されている(近代発酵)。更に、微生物作用による土壌中の有害物質分解・環境修復(バイオレメディエーション)や、価格が高騰している石油に代わって化学工業原料を微生物発酵で賄うバイオリファイナリーは現代発酵とも呼べる新興分野である。

いわゆるバイオテクノロジーや関連分析技術の発達は、元来この技術が微生物研究から興ったこともあり、発酵産業にも大きな変革をもたらした。伝統的発酵では、発酵過程で作られる代謝産物や素材の分解物、香り物質、味覚物質などの解析や改良が行われるようになり、近代発酵では代謝経路や遺伝子発現の最適化(代謝工学)が行われている。

また、PCR法を応用することにより、難培養性微生物の分析ができるようになった。遺伝資源として利用可能、あるいは研究可能な微生物群が増えたため、腸内細菌や休眠状態で長期間存在している有害微生物、土壌中の未同定微生物に関する研究需要が高まっている。課題山積であり、研究に携わるものとしてはうれしい悲鳴をあげるほかない。

微生物利用研究の対象は多岐にわたるが、本稿では、筆者が行っている「納豆菌粘質物の生産制御機構に関する研究」を一つの例として紹介したい。

2. 納豆菌の粘質物(γ -ポリグルタミン酸)

2.1 納豆菌について

納豆菌(*Bacillus subtilis natto*)は学術的には枯草菌(*Bacillus subtilis*)に属し、粘質物(いわゆる納豆の糸、ねばねば)とタンパク質分解酵素の生産量が多い特徴を持つ。人生経験の長い方にはよく知られていることだが、昔は、煮豆を稲藁で包んで独特の仕様の納豆が日本各地(主に東日本)で家内工業的に作られていた。大量生産の確立した現在でも、山形の「ゴト納豆」などはそうした伝統が受け継がれている例である。大正時代(1911-1925年)、北海道帝国大学(現在の北海道大学)農学部の半沢先生が、稲藁から分離した種菌の純粋培養によって大豆を発酵させ「大学納豆」と称して売り出した。これが近代納豆の始まりである。「大学納豆」をいち早く取り入れてベンチャー企業を起こし、大正10年(1920年)に半沢式納豆製造の産業化を行ったのが宮城野納豆製造所(仙台市)の創設者で、後の初代全国納豆協同組合連合会会長の三浦二郎先生である。納豆種菌の系統名

納豆生成菌に関する研究 (第六報)

農學博士 半澤 洵・田村 芳祐

(昭和九年四月八日受理)

緑引納豆の生成に関する細菌學的研究は最初矢部氏によりて行はれ、3種の球菌と1種の桿菌が分離せられ、香氣の生成は黄色の球菌によるも粘質物形成に関する細菌種類の決定を見るに至らざりき。其の後門前氏は納豆より多數の細菌を分離し、強勢に粘質物を形成する Bacil-

図1 「大学納豆」に関する文献 半沢ら¹⁾

「三浦株」として名前が残っている。

稲藁に枯草菌が多数生育しているとはいえ、今となつては種菌選択の判断基準ははっきりしない。文献には、寒天培地で集落(コロニー)を作らせ、香氣、粘質物、孢子形成能から納豆適正を判断したという記述があるのみである¹⁾(図1)。

一方、枯草菌(*Bacillus subtilis*)は代表的なグラム陽性細菌であり、孢子形成や形質転換能の研究材料として古くから用いられてきた。多種多様な分解酵素を分泌するので、産業用酵素の生産菌としても使われている。枯草菌実験室株(*Bacillus subtilis* 168)の全ゲノム配列が1997年に公開され、プロテオーム解析などのポストゲノム研究が進んでいる。納豆菌と実験室株はゲノムの多くが共通しているが、一部に納豆菌特有の領域もあると考えられている。実験室株は粘質物(γ -ポリグルタミン酸)を作ることは出来ない。後述するように、実験室株は粘質物を作るための遺伝子セットを持っているが、制御系の変異のため発現していない。一塩基変異やプロフェージ配列、挿入配列(Insertion sequence)の存在などによって遺伝子の発現制御に違いが生じ、それが表現型の差となって現れていると考えられる(後述)。ちなみに、土壤などからサンプリングしたフェージタイプの異なる枯草菌を調べると、約4割が寒天培地上で粘質物を作った²⁾。粘質物生産は納豆菌に特有の性質ではなく、枯草菌が持つ一般的特徴の一つなのである。

2.2 粘質物(γ -ポリグルタミン酸)について

納豆の粘質物はアミノ酸の一つグルタミン酸が10000個以上直鎖状につながった高分子である。生体を構成するアミノ酸は通常L-型の鏡像体であるが、粘質物には50 - 80%の割合でD-型が含まれる³⁾。また、グルタミン酸同士の結合(ペプチド結合)に、タンパク質では α 位のカルボキシル基が使われているが、粘質物では γ 位が使われている。このような特徴をもつ物質は自然界でも稀な存在で、*Bacillus* 属細菌の一部(*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*)において見られるだけである。グルタミン酸ナトリウムは言うまでもなく‘Umami’成分であるが、 γ -ポリグルタミン酸は無味無臭であ

る。

粘性以外にも γ -ポリグルタミン酸は吸水性・保湿性、凝集性、金属イオン結合性、生分解性などの性質を持ち、 γ 線照射によってゲル化する。近年、側鎖のアルキル化修飾によって γ -ポリグルタミン酸の化学的性質を改変する研究も行われている。化粧品や飲料、石鹸などに γ -ポリグルタミン酸を添加した製品が市販されている他、カルシウム結合能に注目したサプリメント錠剤も数年前に市場に出ている。動物細胞の培養基材としての活用報告もある。しかし、 γ -ポリグルタミン酸の構造（鏡像体の構成やその並び方、鎖長）とこれら生理的・化学的性質との関係は不明である。

筆者が「納豆粘質物の生産制御機構に関する研究」を始めた端緒は、粘質物の生産機構がほとんど未解明であったことと、 γ -ポリグルタミン酸の発酵生産現場で収量の不安定さや再現性のなさが問題になっていたことである。納豆を1週間くらい放置した場合でも、 γ -ポリグルタミン酸は消失し粘りもなくなる。こうした現象の微生物学的な背景、特に、 γ -ポリグルタミン酸の合成と分解の仕組みとその制御機構の全容解明を目指している。以下、合成と分解に関わるグローバルな制御系である細胞密度応答機構（クオーラムセンシング）、合成酵素 CapBCA、2つの γ -ポリグルタミン酸分解酵素とその発現制御、最後に γ -ポリグルタミン酸の酵素的加工について述べる。

3．細胞密度応答機構（クオーラムセンシング）

3.1 *comQXPA* 遺伝子の働き

納豆の粘質物は発酵の後期に作られる。なぜなら細胞が活発に分裂している対数増殖期後、増殖が止まった定常期に γ -ポリグルタミン酸の合成が開始されるからである（図2）。クオーラムセンシングと呼ばれる細胞密度応答機構がこの現象の背景にある⁴⁾。

クオーラムセンシングとは細菌が自己の密度（仲間が周りにたくさんいること）を感知する仕組みのことで、菌対外に分泌する低分子ペプチド（ComX）の濃度を細胞密度の指標として利用している（図3）。ComXの濃度が一定の閾値に達すると、細胞膜上の受容体型ヒスチジンリン酸化酵素（ComP）と結合して、リン酸化能を活性化する。活性化したComPは自己リン酸化してComP-Pi（Piはリン酸を示す）となり、次いで、リン酸基を応答転写制御因子であるComAに転移する。ComA-Piは活性型転写因子として働き、様々な遺伝子の発現を誘導する。このような受容体型リン酸化酵素とそのリン酸基を受け取る転写制御因子の組み合わせは2成分制御系（Two component system）と呼ばれる。ComQは疎水性の高い膜タンパク質でComXを菌体外へ分泌する機能とComXにイソプレノイド鎖修飾をする機能を持っている（図3）。クオーラムセンシングによって、細胞密度が高い定常期の多くの細胞生理機能が制御されている。DNAを取

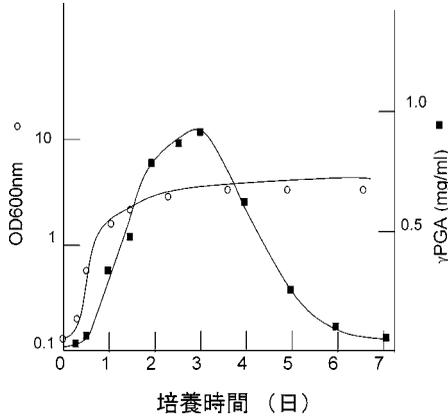


図2 納豆菌の γ -ポリグルタミン酸生産

○ : 納豆菌の増殖 (濁度)

■ : γ -ポリグルタミン酸 (γ PGA) の量

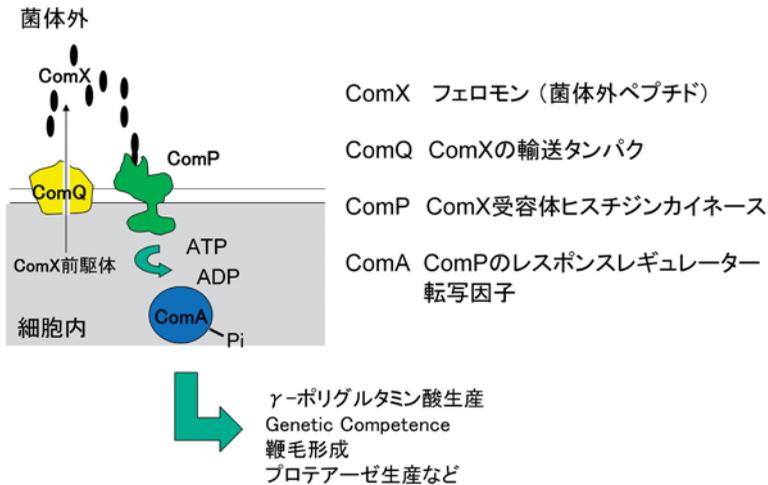


図3 細胞密度応答機構 (クオラムセンシング) の概念図

り込んで自分のゲノムに組み込む形質転換能 (コンピテンス) やプロテアーゼ, アミラーゼなどの菌対外分解酵素の生産, 細菌の移動手段である鞭毛の発現などが ComP-ComA 2 成分制御系の支配下にあることがわかっている。

comQXPA (4つの遺伝子をまとめて表しています) それ自体は生育に必須ではなく, 細胞密度が低く ComP が活性化していない対数増殖期には, 遺伝子破



図4 納豆菌(A)と実験室株(B)のComX前駆体のアミノ酸配列の同源性
赤字：同一のアミノ酸， ：イソプレノイド修飾されるトリプトファン

壊株の生育になんら問題はない。しかし、*comQXPA* いずれかの遺伝子の機能が失われると γ -ポリグルタミン酸は生産されなくなる⁴⁾。ComAは転写因子であるが、 γ -ポリグルタミン酸の合成酵素遺伝子 *capBCA* (*pgsBCA* あるいは *ywsCywTAB* とも呼ばれる)を直接には制御していないようである。

実験室株(168株)は γ -ポリグルタミン酸を生産できないが、形質転換能、鞭毛発現に問題はない。つまりComP-ComA 2成分制御系は正常に働いていると考えられる。また、*capBCA*を破壊した納豆菌に実験室株の合成酵素遺伝子 *capBCA*₁₆₈を導入すると γ -ポリグルタミン酸の生産が回復するので(木村 未発表データ)、実験室株ではComAからCapBCAへ至る情報伝達系・発現制御系のどこかが変異して機能が失われていると考えられる。詳細は省略するが、これまでの研究から納豆菌の γ -ポリグルタミン酸生産制御には*comQXPA*以外に*degS*、*degU*、*degQ*および*yvzD/swrA*の遺伝子産物が必要なことが明らかになった(文献5および木村未発表データ)。実験室株ではプロモーター中の1塩基変異によって*degQ*の発現が低下しているため、原因変異の少なくとも一つは*degQ*である。

3.2 ComX フェロモンの多様性

ComXは前駆体として合成された後、ComQによってプロセッシングとトリプトファン残基へイソプレノイド修飾が施され菌対外へ放出される。*Bacillus subtilis*の*comX*遺伝子と*comP*遺伝子のN末側(ComX結合領域)は非常に多様性に富んでいて、同じ種であるにも関わらず系統間の同源性が2割程度しかない場合もある⁴⁾。一例として実験室株と納豆菌のComXを並べてみた(図4)。このことは、ComXを調べれば種よりもっと狭い系統の検出が可能であることを示している。ComX遺伝子座の多様性の高さは疫学的調査・研究に応用できると考えられる。納豆菌の成熟型ComXの構造決定は今後取り組むべき研究課題のひとつである。

4. γ -ポリグルタミン酸合成系

4.1 CapBCA

γ -ポリグルタミン酸の合成に直接関わる合成酵素の機能解明は、鏡像体含有率や鎖長のコントロール、構成アミノ酸の改変(修飾されたグルタミン酸やアスパラギン酸などの導入)を可能にし、 γ -ポリグルタミン酸の実用的用途の拡大

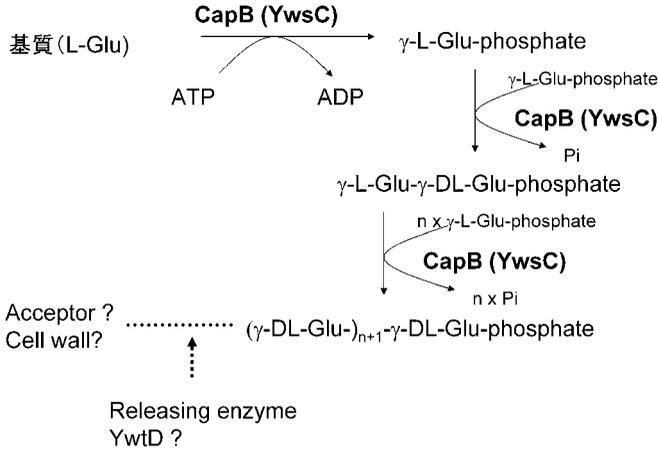


図5 γ -ポリグルタミン酸合成反応の模式図

に役立つと考えられる。

大腸菌に *capBCA* (*pgsBCA* あるいは *ywsCywtAB* と呼ばれる) を含むプラスミドを導入すると、少量ではあるが γ -ポリグルタミン酸を生産し、コロニーは mucoïd (粘液様) になる。このことから、合成には CapB, CapC, CapA の3つがあればよいと考えられている。尚、CapB については分子量の異なる2つの産物 (CapB, CapB') が報告されている。

実は、CapB 以外は機能がほとんど不明である。CapB は ADP-forming MurD and folyl- γ -glutamate ligase family に属し、ATP をエネルギーとして基質 (L-グルタミン酸) を重合する反応中心を担っている⁶⁾ (図5)。高エネルギー中間体 (リン酸化 L-グルタミン酸) が重合する際に反転反応によって D-グルタミン酸が作られると考えられているが、D 型生成の詳細な機構は謎のままで仮説の域を出ていない⁷⁾。培地にマンガン (Mn^{++}) イオンが多く存在すると D-グルタミン酸の含有率が高くなるが、その理由も不明である³⁾。

CapA, CapC の機能は不明である。CapC は全体的に疎水性が非常に高いタンパク質で細胞質膜内あるいは細胞壁内で γ -ポリグルタミン酸が細胞外へ出るための孔 (pore) を作っている可能性がある。CapBCA が合成酵素複合体を形成しているのか? B, C, A が 1 : 1 : 1 の割合で存在して機能を発揮しているのか? などの基本的問題もいまだ未解決である。

納豆菌と異なり *Bacillus anthracis* の作る γ -ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸のみを含み、細胞表層へ強固に(おそらく共有結合で)結合している。*B. anthracis* も納豆菌とよく似た CapBCA を持っている (図6)。最近、仏パスツール研究所の T. Candela らは、CapD (後述する GGT および YwrD と同一性がある)

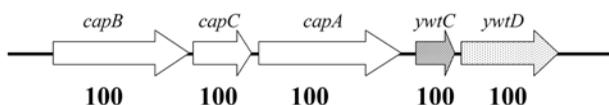
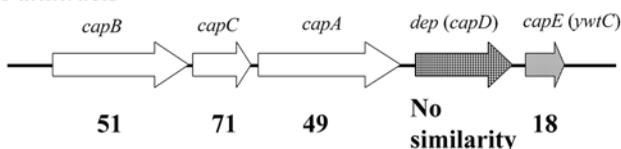
Bacillus subtilis*Bacillus licheniformis**Bacillus anthracis*

図6 *cap* オペロンの相同性比較 数値はアミノ酸配列の相同性(%)を示す

が、 γ -ポリグルタミン酸を細胞表層に繋ぎとめる転移酵素であると報告した⁸⁾。*B. subtilis* および *B. licheniformis* の *cap* オペロンに CapD はないが、*B. anthracis* には存在しない *ywtD* が *cap* オペロンのすぐ後ろにある (図6)。*B. subtilis* および *B. licheniformis* の γ -ポリグルタミン酸は培養液中へ放出される。その為、多くの研究者が YwtD は γ -ポリグルタミン酸を細胞から遊離する機能を持っていると考えている。

B. anthracis の γ -ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸だけで構成されている。*B. anthracis* と納豆菌の *cap* オペロンを入れ替えた株を作成し、生産される γ -ポリグルタミン酸を解析すれば、合成酵素と鏡像体構成に関する新たな知見が得られると期待される。また、高知大学の Ashiuchi らは、L-グルタミン酸だけからなる γ -ポリグルタミン酸の生産菌 *Natrilba aegyptiaca* を報告している。この株の合成酵素の 1 次構造解析が待たれる。

4.2 Troy の実験

γ -ポリグルタミン酸の生合成に関する生化学的解析は、*B. licheniformis* の膜画分を用いて Troy によって最初に行われた⁹⁾。ATP を要求し、非リボゾーム型の膜タンパク質によって合成されること、リゾチーム処理で合成能が失われること、重合反応が transamidation (アミド転移反応) ではないことなどが明らかにされた。合成がリゾチーム感受性であることは、重合に細胞壁成分が必要なことを示唆している。前述の *B. anthracis* CapD の γ -ポリグルタミン酸転移能も重合反応と細胞壁構造の関係を窺わせる。重合されたグルタミン酸は一度ペプチドグリカンのジアミノピメリン酸に存在する遊離アミノ基に転移され、この転移反応に

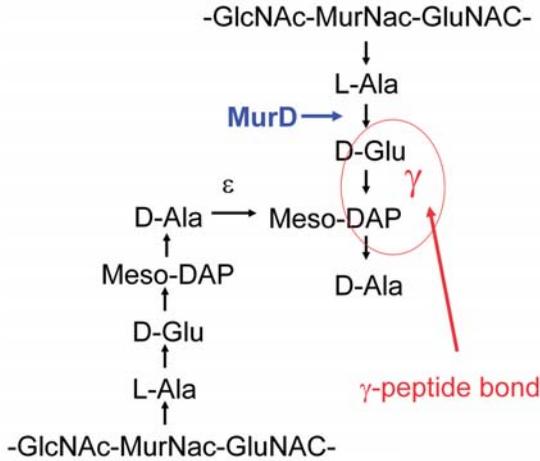


図7 *Bacillus subtilis* のペプチドグリカンの構造と推定上の γ -ポリグルタミン酸転移箇所

よって逐次鎖長が延長されていくのかもしれない(図7)。この仮説は、CapBがペプチドグリカンのD-アラニンとD-グルタミン酸を繋げる酵素MurDと似たアミノ酸配列をもつこととも矛盾しないように思われる。

5. γ -ポリグルタミン酸の分解系

5.1 分解酵素

γ -ポリグルタミン酸は生産者である納豆菌自身によって分解される(図2)。研究の結果、この分解は2段階で行われていることがわかった^{10,11)}(図8)。

γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -glutamyltransferase, GGT)は、グルタチオンなどの γ -グルタミル化合物の γ -グルタミル基を加水分解あるいは他のアミノ酸へ転移する酵素で、細菌から人を含めた高等動物まで生物界に広く分布している。健康診断で γ -GTP値が使われるが、 γ -GTPとは人のGGTのことである。動物ではグルタチオンの再生サイクルに必要とされているが、細菌では主に γ -グルタミル化合物を栄養源として利用するときの分解酵素として働いている。

培養上清から精製した納豆菌GGTは、 γ -ポリグルタミン酸のN末側から1個ずつグルタミン酸を遊離させるエキソ型の分解活性を持ち、D-型、L-型両方のグルタミン酸に同等の効率で作用した¹⁰⁾。納豆菌GGTの特徴は、基質への親和性が非常に強いことである。合成基質 γ -glutamyl *p*-nitroanilideに対するKm値は7.8 μ Mであった。大腸菌、牛(肝臓)のGGTではそれぞれ68 μ M、180 μ Mであったので、納豆菌GGTは約10~20倍の親和性を示したことになる¹⁰⁾。 γ

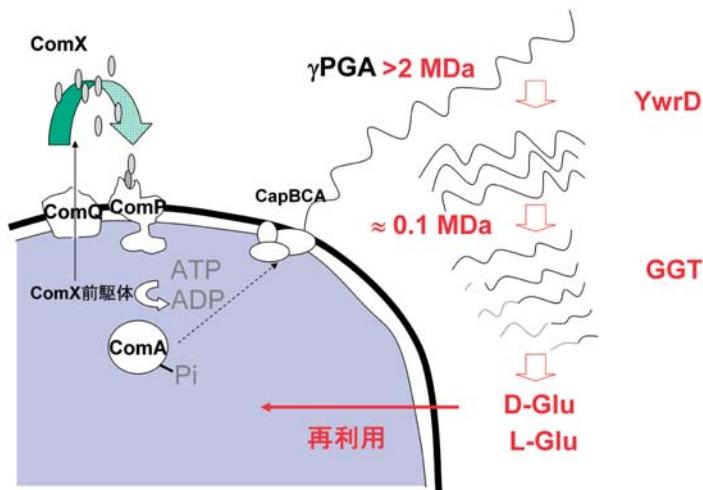


図8 γ -ポリグルタミン酸分解の模式図

・ポリグルタミン酸は分子量が大きいため、重量濃度が大きくてもモル濃度は低くなる。最小培地で液体培養すると1 mg/mlほど作られるが、濃度は $0.5\mu\text{M}$ 程度しかない。納豆菌 GGT は γ -ポリグルタミン酸に対しても親和性が高い ($K_m = 9\mu\text{M}$) が、それでも基質濃度 ($0.5\mu\text{M}$) の約20倍である。納豆菌はエンド型分解によって γ -ポリグルタミン酸を断片化して、この問題を解決している¹⁰⁾(図8)。

YwrD は GGT と相同性を持つ GGT パラログである。合成される γ -ポリグルタミン酸は約2 MDa の分子量を持つが、分子量約0.1MDa の分解中間体への断片化に YwrD が必要である^{10,11)}。今のところ、大腸菌に生産させた YwrD だけでは γ -ポリグルタミン酸分解活性は見られない。YwrD は細胞表層に存在しており(木村, 未発表データ)、活性の発現には他の因子あるいは局在そのものが必要なかもしれない。

大腸菌あるいは牛肝臓の GGT は γ -ポリグルタミン酸の分解活性がなかった。基質親和性が低すぎて反応が進まなかったと考えられる。基質の濃度を上げれば活性が見られる可能性があるが、実際には、 γ -ポリグルタミン酸の分子量が大きすぎて、粘性が極度に高くなるのでそのような実験は不可能だった。

GGT, YwrD の機能は遺伝子破壊株の性質からも支持された^{10,11)}。GGT の欠損株では0.1MDa の分解中間体が培地中に蓄積し、YwrD の欠損株では γ -ポリグルタミン酸の分解が非常に遅くなり分解産物は広範な分子量分布を示した。GGT と YwrD の2重変異株は γ -ポリグルタミン酸を全く分解することができず、未分解(分子量約2 MDa)の γ -ポリグルタミン酸を培地中に蓄積した¹¹⁾(図9)。相補試験 (complementation test) を行って、遺伝子破壊による近傍の遺

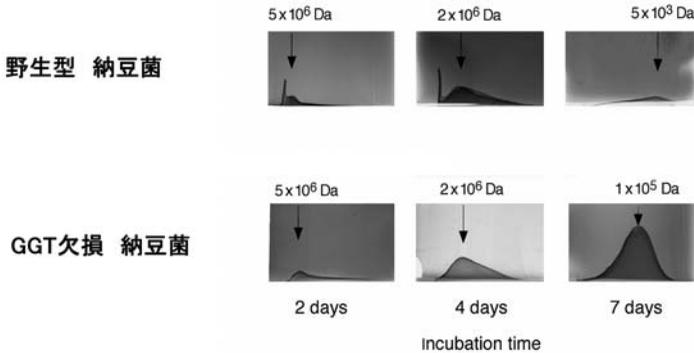


図9 GGT欠損納豆菌による γ -ポリグルタミン酸の生産（2次元免疫電気泳動による解析）

伝子発現への極性効果（polar effects）を排除し、GGTあるいはYwrDそのものが機能的に必要十分であることを確認した^{10,11}。

実は、遺伝子破壊株を最初に作成して機能を推定した後で、生化学実験など必要な検証を行っていったのである。説明の簡便さのため、順序を逆にした。

5.2 分解酵素の発現制御とD-グルタミン酸の代謝

人間は納豆菌を利用して‘おいしい’発酵大豆を食べている。一方、納豆菌にとっての γ -ポリグルタミン酸の生産と分解の意義は、細胞過密で栄養源が不足する定常期に栄養貯蔵物質としてこの物質を利用することである¹⁰。 γ -ポリグルタミン酸の化学構造や特異性の高い分解系は、他の細菌・微生物などに貯蔵物質を横取りされないための工夫と考えることができる（人間に横取りされているのは興味深い）。実際、GGTを欠損した株は合成した γ -ポリグルタミン酸を再利用できないため、定常期に栄養不足（窒素源枯渇）となり胞子化する¹⁰（図10）。野生型株は蓄えを少しずつ取り崩しながら栄養細胞として生き延びることができる。

分解酵素の発現も栄養貯蔵としての γ -ポリグルタミン酸利用に合うよう絶妙に調節されている。分解酵素GGTは合成酵素と同様にクォラムセンシングの制御下にあり定常期に発現している¹⁰（図11）。更に、GGTは分解産物のグルタミン酸によって転写レベルで負に制御され（図11）、YwrDは窒素源の枯渇にตอบสนองして発現する¹⁰。このようなフィードバック制御によって過剰なグルタミン酸の供給が抑えられるため、定常期を通して培地中のグルタミン酸濃度は低く抑えられている^{7,10}。貴重な蓄えは無駄に浪費しないのである。人間も見習うべきかも知れない（^_^；）。

γ -ポリグルタミン酸由来のL-グルタミン酸は、再利用するためにL-グルタミン酸脱水素酵素によって2-ケトグルタル酸へ代謝されるが、D-グルタミン酸

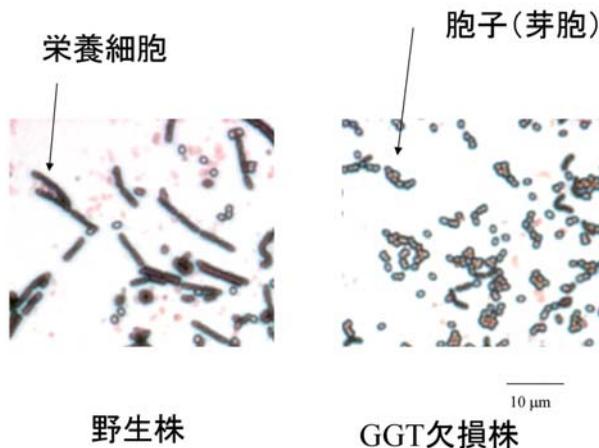


図10 培養5日目の納豆菌の細胞形態（グラム染色像）
GGT欠損株（右）では孢子の形成が進んでいる

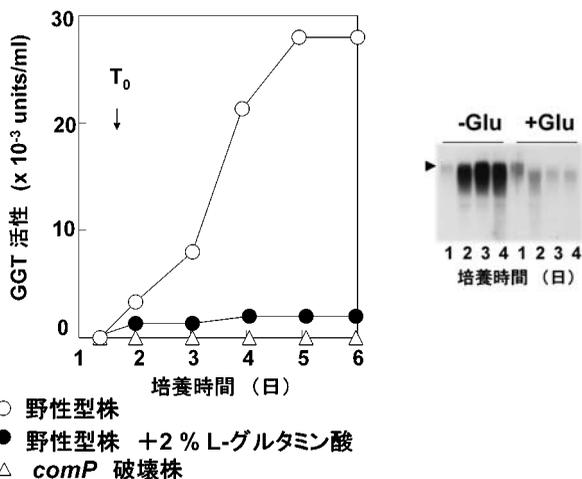


図11 GGTの発現プロファイル(左)とL-グルタミン酸による転写抑制(ノーザンプロット, 右)

はそのままでは代謝できない。D-体はグルタミン酸ラセマーゼによってL-グルタミン酸に変換されてから再資化される⁷⁾。これまでグルタミン酸ラセマーゼは、ペプチドグリカンにD-グルタミン酸を供給するアナボリックな酵素として捉えられてきた。事実、納豆菌が持つ2つのグルタミン酸ラセマーゼ (*racE*, *yrpC*)

の2重破壊株は細胞壁を合成できないため増殖できない⁷⁾。納豆菌の RacE と YrpC はカタボリックな働きもあわせ持ち、多くの代謝系酵素と同様に栄養が豊富な条件で発現が抑えられている。代謝酵素としての性格も強いのである⁷⁾。

5.3 分解酵素欠損株の γ -ポリグルタミン酸生産への利用

γ -ポリグルタミン酸の発酵生産における収量不安定性の一番の原因は分解酵素 (GGT と YwrD) の存在である。GGT と YwrD の両方を欠損した株は、未分解の γ -ポリグルタミン酸 (分子量約 2 MDa) を培地中に蓄積することができる。また、GGT だけを欠損した株は分子量約 0.1 MDa の γ -ポリグルタミン酸を蓄積する。遺伝子組み換え株の使用は、規制や管理業務の煩雑さ、消費者の拒絶反応から敬遠されがちである。そこで、古典的なスクリーニングによって GGT、YwrD の2重欠損変異株、及び GGT 欠損変異株を取得した。 γ -ポリグルタミン酸の大量生産株として特許化している¹¹⁾、産業界で実際に活用されることを願っている。

6. γ -ポリグルタミン酸の加工

6.1 D-グルタミン酸

γ -ポリグルタミン酸は D-グルタミン酸資源として最も安価で豊富なものであろう。しかし、今のところ哺乳類で知られている D-アラニン、D-セリン、D-アスパラギン酸のような生理作用は D-グルタミン酸には見つかっていない。一方、細菌のグルタミン酸ラセマーゼが新規抗生物質の標的酵素として研究されている。D-グルタミン酸はラセマーゼ阻害剤合成の原料物質として使えるかもしれない。

6.2 オリゴ γ -グルタミン酸

ジペプチド、オリゴペプチドは抗酸化機能、味覚機能、生理機能をもつ分子として近年注目されている。筆者らは、 γ -ポリグルタミン酸を酵素的に分解してオリゴ γ -グルタミン酸を作ることに成功した²⁾。納豆工場から分離された納豆菌ファージ Φ NIT 1 は感染時に γ -ポリグルタミン酸分解酵素 (PghP) を大量に生産する。PghP は γ -ポリグルタミン酸をエンド型に分解し、最終的に 5、4、3 量体のオリゴ γ -グルタミン酸を生産する²⁾ (図12)。おそらく、酵素の基質認識部位が 6 量体を認識しているのであろう。この酵素 PghP (Poly-gamma-glutamate hydrolase P) を精製し、その一次構造を解明した。PghP のアミノ酸配列には既知の配列との相同性が見当たらず、新規な構造をもっていると推定している。現在、酵素の結晶化・構造解析に取り組んでいる。

バクテリオファージが PghP 遺伝子を持っている理由は、 γ -ポリグルタミン酸を分解することにより、より効率よく感染・増殖するためであった²⁾。また、Ackermann らが土壌より分離した枯草菌タイピングファージ10種中、4つは PghP 活性を示した。これらは自然界に PghP をもつファージが普遍的に存在す

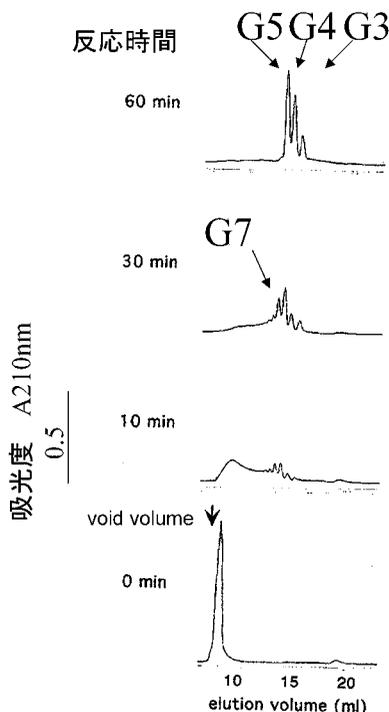


図12 PghP による γ -グルタミン酸分解産物のゲルろ過 HPLC による解析

ることを示している²⁾。予備的な実験だが、切断様式が異なるファージ PghP が存在することが示唆されている。重合度の異なるオリゴ γ -グルタミン酸を用いて、金属イオン結合能などの性質と重合度の関係を明らかにすれば、 γ -ポリグルタミン酸の新たな用途開発に結びつくのではないかと考えている。

尚、PghP によって作られるオリゴ γ -グルタミン酸の味は、まだ試したことがないので不明である。

7. おわりに

納豆菌は日本の伝統的発酵微生物であり、我が国には世界に先駆けて *Bacillus subtilis* のスターター株(納豆種菌)を確立した実績がある。事実、*Bacillus subtilis natto* は世界的に一般的安全性 (generally accepted as safe) が認められている菌株である。日本以外の東・東南アジア各国(韓国, 中国, タイ, ネパール, ミャンマーなど)でも納豆と非常によく似た大豆発酵食品が見られるが¹²⁾、これらの国ではスターター株は使用されていない。産物の一部あるいは、昔の日本のようにイネやバナナの葉が直接使われている。ここでも発酵の主役は *Bacillus sub-*

tilis である¹²⁾。人口比で見れば、人類が最も口にしている細菌が納豆菌およびその仲間であると言っても過言ではない。乳酸菌の研究者人口は多く、企業でも熱心に研究開発が行われている一方で、納豆菌研究はやっと始まったばかりという印象が強い。欧米信仰というわけではないだろうが、納豆菌はあまりに当たり前に生活の一部として溶け込んでいたため、気付かれなかったのかも知れない。昨年来、筆者は納豆メーカーと一緒に農林水産省の助成金事業（産学官連携による食料産業等活性化のための新技術開発事業）に参画している。今後、産学を問わず関連研究が盛んになることを願っている。

本稿で紹介した研究は、筆者が所属する発酵細菌研究室（平成18年4月発酵細菌ユニットへ改組された）において、旧独立行政法人食品総合研究所が執り行ったプロジェクト研究費、農林水産省委託研究費、文部科学省科学研究費補助金などの支援を受けて行われた。試料を提供していただいたタカノフーズ株式会社および日東食品株式会社、共同研究者の伊藤義文博士、Tran Phan Lam-Son 博士に感謝の意を表したい。

納豆菌は γ -ポリグルタミン酸以外に界面活性剤サーファクチンや多糖類、アルカリプロテアーゼやキシラナーゼなどの分解酵素、抗菌物質などを作るが、本稿ではまったく触れなかった。また、納豆菌と腸内細菌の関わりや γ -ポリグルタミン酸の腸管での吸収に関する知見はほとんどない。微生物利用研究に終わりはないようである。

（微生物利用研究領域 発酵細菌ユニット 木村 啓太郎）

用語解説

枯草菌

Bacillus subtilis の和名。グラム陽性土壌細菌。大腸菌とともに細菌研究の代表的モデル生物である。1997年に日欧の研究者が中心となって全ゲノム塩基配列が決定された。実験室株として168株が有名。分類的には、納豆菌(*Bacillus subtilis natto*) は枯草菌の亜種である。

クオラムセンシング

細菌が周囲に自分の仲間が増えたことを感知する仕組み。細胞密度応答機構ともいう。毒素生産やバイオフィーム形成など細菌が集団でおこなう活動を制御する。クオラム (Quorum) は議会の定足数の意味。

形質転換能

細胞内に外から DNA を取り込んで自らの遺伝的性質を変える能力。枯草菌の仲間は細胞表層に DNA を取り込む装置を持っていて、積極的に形質転換できる。クオラムセンシングの制御を受ける。

リゾチーム

細菌の細胞壁を分解する酵素。N・アセチルムラミン酸とN・アセチルグルコサミンの間の β -1,4結合を加水分解する。ニワトリ卵白由来のものがよく使われる。

Km 値

酵素の基質との親和性を示す値、次元は濃度 (mol / L)。Km 値が小さいほど基質との親和性が強く、低濃度の基質にも作用できることを示す。酵素がその最大活性の半分の活性を示すときの基質濃度。

極性効果

ある遺伝子を破壊したときに、その前後の遺伝子の発現に及ぼす影響のこと。IS (挿入配列) やトランスポゾンによる遺伝子破壊では、その上流あるいは下流の遺伝子の発現量が変化する場合がある。

グルタミン酸ラセマーゼ

L・グルタミン酸をD・型にあるいは逆にD・グルタミン酸をL・型に相互に変換する酵素。細菌の細胞壁ペプチドグリカンにはD・グルタミン酸があるので、グルタミン酸ラセマーゼは細菌の増殖に必須な酵素である。

アナボリック (anabolic)

同化作用の、の意。細胞の生命維持活動に必要な物質を生合成する過程で働くこと。

カタボリック (catabolic)

異化作用の、の意。細胞が生命維持活動に必要なエネルギーを得るために、栄養として取り込んだ物質の分解や異性化をする過程で働くこと。

サーファクテン

土壌細菌である枯草菌とその類縁菌が生産する。炭素数10~12のアルキル基とペプチドからなる抗菌物質でペプチド部分はL・グルタミン酸-L・ロイシン-D・ロイシン-L・バリン-L・アスパラギン酸-D・ロイシン-L・ロイシン-L・バリン-L・イソロイシンの構造を持つ。界面活性剤なので土壌改良作用がある。

参考文献

- 1) 半澤 洵, 田村 芳祐, 納豆生成菌に関する研究 (第六報), 農化誌 第十巻, 520-521 (昭和9年)
- 2) Kimura, K. and Itoh, Y. Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly- γ -glutamate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2491-2497 (2003).
- 3) Nagai, T., Koguchi, K., and Itoh, Y., Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (*natto*): evidence that plas-

- mids are not involved in poly- γ -glutamic acid production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43, 139-143 (1997).
- 4) Tran, L.-S. P., Nagai, T., and Itoh, Y., Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 37, 1159-1171 (2000).
 - 5) Stanley, N. R. and Lazazzera, B. A., Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, 57, 1143-1158 (2005).
 - 6) Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y., Characterization of the *Bacillus subtilis* *ywsC* gene, involved in γ -polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.*, 184, 337-343 (2002).
 - 7) Kimura, K., Tran, L.-S. P., and Itoh, Y., Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yrcC*, in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 150, 2911-2920 (2004).
 - 8) Candela, T. and Fouet, A., *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the γ -glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol. Microbiol.*, 57, 717-726 (2005).
 - 9) Troy, F. A. Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl)capsule in *Bacillus licheniformis*. I. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *J. Biol. Chem.*, 248, 305-315 (1973).
 - 10) Kimura, K., Tran, L.-S. P., Uchida, I., and Itoh, Y., Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiology*, 150, 4115-4123 (2004).
 - 11) 木村啓太郎, 伊藤義文, γ -ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株及び該変異株を用いた γ -ポリグルタミン酸の製造法。特許第3682435号
 - 12) Kimura, K., Inatsu, Y., and Itoh, Y., Frequency of the insertion sequence IS4*Bsu*1 among *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast Asia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1994-1996 (2002).

麹菌ゲノム解析と食品利用への期待

麹菌（こうじきん）は、味噌をはじめとするわが国の発酵食品の醸造にとって不可欠の微生物である。麹菌の生命の設計図であるゲノム情報解読の完了が2005年の年末12月22日に発表された。食品に関連する微生物では、これまでに枯草菌¹⁾、出芽酵母²⁾、乳酸菌の仲間などの微生物ゲノム情報の解読が完了しているが、わが国の麹菌もその仲間入りを果たしたということになった。麹菌ゲノム解析は、わが国の産学官の研究者が麹菌ゲノム解析コンソーシアムの中で一致協力してすすめた研究プロジェクトで、研究、生産の現場に近い所から立ち上げられた研究といえる。

1. 麹菌（こうじきん）とは

麹菌は、コウジカビともよばれ、菌類に属する糸状菌である。菌類は真核細胞の微生物であり、単細胞で存在する酵母、糸状細胞で大きな子実体をつくるキノコとともに菌糸状態で生育するカビが含まれている。コウジカビは菌類に属する微生物で、生活環に有性世代をもたない不完全菌類の一つとして分類されており、学名では *Aspergillus* 属に含まれるカビであり、醤油、味噌、清酒などの伝統的発酵食品、醸造産業に使われている有用菌が多く含まれている。コウジカビは、明治時代初期に政府の御雇外国人教師として日本に滞在した Herman Ahlburg が、わが国の米麹から初めて分離し、米によく繁殖することから *Eurotium oryzae* と命名した。その後、このカビは有性生殖をしないことがわかり、不完全菌として *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn と改名されたものである。

酒造などで使われる米麹は、ほぼ自然開放系の状態で造られるため、大気中から他の微生物が混入することがある。現在では、製造管理が行き届いているためほとんど起こることはないが、大気中には、他のコウジカビ、クモノスカビ、ケカビなどのその他のカビ類が浮遊しており、麹のなかに落下して繁殖することがある。これらの混入菌は麹の中で主体となる有用菌ではないので、コウジカビとは明らかに区別される。このため、麹中に混在する一切のカビ類と区別して、コウジカビは麹菌（こうじきん）と呼ばれている³⁾。

2. 発酵食品と麹菌

わが国の伝統的発酵食品である味噌、醤油、酒などの醸造には、必ず麹菌が用いられている。醤油は日本農林規格において、清酒は酒税法において、必ず麹をもちいることがうたわれている。また、味噌は、麹の原料によって、米味噌、麦味噌、豆味噌の区分があり、いずれも麹菌を米、麦、大豆に生育させて麹を造り、これを酵素源として発酵熟成を経て製品を製造している。さらに麹菌は、米麹と

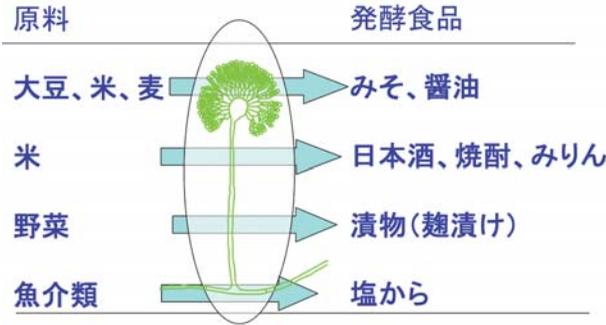


図1 麹菌(こうじきん)と日本の発酵食品

して、麹漬物、魚介類を原料とした塩からの原料としても広く利用されていることから、麹菌はわが国の食事の根底を支えているといえる(図1)。

味噌の醸造工程では、原料大豆、米、麦などの成分、タンパク質、糖質、脂質がそれぞれ麹菌の分解酵素によって分解され、アミノ酸、ブドウ糖、脂肪酸、グリセリンが生成する。麹菌は、米麹などによって固体培養されると、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、アミラーゼ、リパーゼ等の酵素を大量に分泌生産する。プロテアーゼ、ペプチダーゼは大豆タンパク質をペプチド、アミノ酸に加水分解し、呈味アミノ酸を生成する。また、アミラーゼは、デンプンを加水分解してブドウ糖を生成する。リパーゼは大豆の脂質を脂肪酸とグリセリンに分解する。味噌の発酵熟成中には、麹菌の酵素による加水分解反応と同時に耐塩性酵母、乳酸菌が生育し、アルコール、香気成分や乳酸を生成する。酵母、乳酸菌は味噌の香りや味の成分を生産する有用な発酵微生物であるが、これらの働きは麹菌の酵素によって、ブドウ糖、アミノ酸、脂肪酸などが生成しなければ十分に活かされない。すなわち、麹菌は原料成分を消化分解しているとともに酵母、乳酸菌の活躍の場を整備する役割を担っているのである。酒造においても、清酒酵母のアルコール発酵は、麹菌のアミラーゼによって米デンプンからブドウ糖が生成し、これを原料として酵母がアルコールを生産する。酵母は米デンプンから直接アルコール発酵する機能を持っていないので、麹菌のアミラーゼがなければ日本酒は醸造できないことになる。このように、発酵食品の製造では、麹菌の役割がいかに大きなものであるかがわかる。

麹菌の粗酵素粉末は「酵素の宝庫」と言われるように、麹菌は多種類の酵素を大量に生産する能力を持つ。食品加工用アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ等の酵素、繊維工業用アミラーゼ、セルラーゼなどの数多くの種類の食品、工業用酵素剤が、麹菌によって生産されている。このように、麹菌は、発酵食品製造だけでなく工業的にも多く用いられており発酵産業全般にわたって欠く

このできない糸状菌の位置をしめている。

麹菌の近縁のカビには、*Aspergillus flavus* のようにアフラトキシン毒素を生産する危険なカビも存在する。しかし、麹菌はアフラトキシンを産生するものは見つかっていない。また、他の低毒性の物質を作る麹菌はほとんど利用されていない。麹菌は、わが国の発酵食品の製造に長年月にわたって使われ続けてきた。酒造方法は、奈良時代の朝廷において法令として存在しており、味噌の記録は平安時代の延喜式に記載があるほどで、わが国の麹菌は一千年もの歴史をもつ発酵食品の微生物である。また、わが国では、種麹業界が種麹を保存管理し、商業的に営々と維持してきた伝統がある。歴史的に食品として安全に食べられてきたことから、アメリカ合衆国 FDA では麹菌を GRAS (Generally Recognized As Safe) のリストに掲載し、安全性を認定している。

3. ゲノム情報とはなにか

ゲノムとは、一つの生物の全遺伝情報の一式を指す言葉である。すなわち、麹菌ゲノムは、麹菌が持っている全ての遺伝子のワンセットと言うことになり、麹菌の生命の設計図ともいえる。麹菌が麹菌であるためには、細胞、菌体組織を構成し、細胞機能をつかさどる菌体構成タンパク質、酵素タンパク質、代謝関連タンパク質、情報伝達タンパク質など無数のタンパク質が調和して働いている。これらタンパク質の情報は、染色体 DNA を録音テープに見立てると、その上に ACGT の塩基配列によって遺伝情報として記録されている。しかし、この遺伝情報は所々でイントロン（介在配列）と呼ばれる配列で分断されている。この遺伝情報は、イントロン部分をスキップしてメッセンジャー RNA (mRNA) に一旦転写されたのち、タンパク質合成装置であるリボソームによって翻訳され、特有のアミノ酸配列をもつタンパク質が生成されると言う手順で機能を発現する。染色体 DNA に記録されているゲノム情報はタンパク質の設計図と言えるが、そのままでは機能を発揮することはなく、転写、翻訳過程の後に酵素タンパク質などの機能分子が合成されることによって、はじめて生体機能を発現する(図2)。ゲノム情報によれば、酵母は約6千4百、麹菌は約1万2千の遺伝子をもつことがわかってきた。人間は約2万から3万個の遺伝子を持つことが推定されている。人間のゲノムは、微生物に比べて人体の複雑な構成を担うには意外に少ない数の遺伝子で成り立っていることがむしろ不思議に思われるほどである。実際には、これらの遺伝子をもとにして合成されたタンパク質は単独で一つの働きをしているのではなく、相互作用し、協調することによってさらに多様な反応を行い、生体機能全体が成り立っている。さらに最近では、染色体 DNA の非翻訳領域にコードされている短鎖長 RNA が、転写産物の調節に機能していることがわかり、転写制御因子の結合領域が存在することも明らかになり、染色体 DNA はタンパク質の設計図としてだけではなく、発現調節の機能をも担っていることがわかって

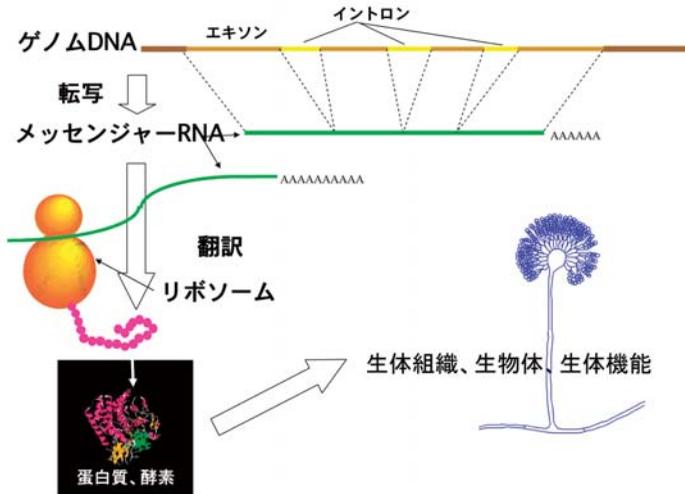


図2 ゲノム情報を解読すれば、麹菌の秘密がすべてわかる!?

きた。

麹菌細胞内の生命反応を芝居にたとえるならば、ゲノム情報は、細胞を構成するタンパク質の役者のプロフィールと台詞を記述した台本とも言える。芝居は、役者が各々の役どころで台詞をしゃべり、ストーリーが進行していく。その日の観客の受けによっても、時々アドリブが入ったりすることがあるかもしれない。タンパク質役者が掛け合いをしながら生命活動が進行し、時々環境ストレスに細胞が応答していく様は、まさに生体の機能を芝居として見ているのと同じことに思われる。

このように、ゲノム情報とはタンパク質の設計図であるとともに、生命活動芝居の台本の役割をも果たしていると考えられる。

4. 麹菌の EST 解析

麹菌ゲノム解析を念頭に置き、海外企業等による遺伝子特許への対抗、ゲノム解析研究が緊急を要することなどから、EST 配列解析を先行して実施することにした。EST 配列解析とは、麹菌が実際に発現している遺伝子を cDNA (相補的 DNA) として捉え、その末端塩基配列 (EST: expressed sequence tags) を決定するものである (図2で mRNA を鋳型として cDNA を作成し、その配列を決定する)。EST 解析の利点は、ゲノム上にコードされている遺伝子の配列情報を cDNA として取得できるため、蛋白質に翻訳される意味のある情報のみを効率的に得ることができる点である。この EST 情報を用いれば、蛋白質の一次構造と各遺伝子の発現頻度の情報を得ることができる。また、ゲノム上への遺伝子

のマッピング、新規有用遺伝子のスクリーニングにも利用することができる。さらに、EST クローンから得られる cDNA を用いて、cDNA マイクロアレイの作成への利用が可能となる。このように、EST 解析研究は、極めて有用な情報源であるとともに、さらに進んだ技術への利用が期待されるものである。ちなみに、ヒトゲノム研究ではこれまでに、ヒトゲノム解析に先駆けて、EST 解析の研究がおこなわれている⁴⁾。また、わが国では、種々のゲノム解析研究に先行してヒトボディマップの作成⁵⁾、イネ EST 解析⁶⁾などの発現遺伝子解析研究が世界に先駆けて行われており、わが国が得意とする研究分野である。そこで、1998年に国税庁醸造研究所（現、独立行政法人酒類総合研究所）、工業技術院生命工学工業技術研究所（現、独立行政法人産業技術総合研究所）、農林水産省食品総合研究所（現、独立行政法人農研機構食品総合研究所）、東京大学、東京農工大学、東北大学、名古屋大学、愛知県食工技センターが分担し、企業等からの協力を得て、1998-1999年の期間で麹菌 EST 配列解析計画が行われた。

供試菌株は、*Aspergillus oryzae* RIB40株を共通して用いた。それぞれの研究機関にて、ふすま麹、富栄養液体、貧栄養液体、分生子発芽、高温富栄養液体、アルカリ性培地等の異なる生育条件にて培養を行い、得られた菌体から定法に従い mRNA 抽出、cDNA 調製をおこない、EST ライブラリーを作製し、得られた EST クローンの塩基配列をランダムに決定した。富栄養液体培養：2,693、高温培養：2,072、貧栄養液体培養：1,953、マルトース炭素源培養：932、アルカリ液体培養：751、固体培養：5,358、発芽分生子：1,049の EST 配列が解析され、約1年6ヶ月の期間で得られた EST クローン総数は約17,000個に達した。これらの EST 配列データに対して、同一配列を持つクローンを結合しグループ化するクラスタリング操作を行った。これには NEDO 事業により産総研と民間企業で製作された遺伝子解析ソフトウェアが用いられた。この結果、約17,000個の EST クローンは約6,000個のクラスター（共通配列をコンティグという）にまとめられた。得られたコンティグの塩基配列を用いて、公開データベースに対して相同性検索を行った結果、約49%が既知遺伝子とは相同性を持たないことがわかった。これらの遺伝子は新規のものであり、麹菌特異的な遺伝子である可能性が高く、産業上有用なものが含まれていることが期待される。

得られた EST 塩基配列データは、DDBJ/GenBank/EMBL ならびにインターネット上にて公開されている（<http://www.aist.go.jp/RIODB/ffdb/welcomej.html>）。本研究にて明らかにされた麹菌発現遺伝子配列情報は、これに続く麹菌ゲノム情報解析において有用な基礎データとなるのみならず、遺伝子機能解析、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現ネットワーク解析など、ゲノム科学解析において有用な貢献が期待されている⁷⁾。例えば、本研究から得られた結果をもとにして、固体培養時特異的に発現する転写制御遺伝子 *atfB*⁸⁾、高温培養時に特異的に誘導される遺伝子 *Aohsp30*^{9),10)}等の単離がおこなわれており、新規有用遺

伝子の発見がなされている。

5. 麹菌のゲノム解読の経緯

麹菌の EST 解析に参加した研究機関が中心となり麹菌ゲノム解析コンソーシアム（代表：財団法人日本醸造協会）が設立され、（独）製品評価技術基盤機構（NITE）との共同研究によって、麹菌の全ゲノム配列解析プロジェクトが開始されたのは、2001年のことであった。供試菌株は *A. oryzae* RIB40として、ホールゲノムショットガン(WGS)法によって、ゲノム配列解析が行われた(図3)。1~2 kbの断片化された麹菌ゲノム DNA クローンの塩基配列をランダムに解読する方法である。NITEのDNAシーケンスセンターにおいてシーケンス解読作業が行われた。得られたデータはコンピューター上でアッセンブル(結合)され、次第にスーパーコンティグとして全貌を現していった。しかし、ゲノム上にはATリッチ繰り返し領域、セントロメア領域*が存在し、WGS法では完全に連結したデータを取得することができなかった。最終的にそれぞれが数百万塩基の長さを持つ約20個のスーパーコンティグが得られた。そこで、染色体とスーパーコンティグをつきあわせるために、物理マッピングを行う必要が生じた。麹菌ゲノム解析コンソーシアムの酒類総研、食総研、産総研が、染色体をパルスフィールド電気泳動によって分離し、スーパーコンティグの末端配列をプローブとしたサザンマッピングを行った。また、蛍光標識を用いたオプチカルマッピング技術を用いて染色体上への物理マッピングを完成させた。その結果を見ると、コンピューター上で結合されたコンティグ配列は完全に正確な染色体配列であり、ほとんど間違いがないくらいの精度であった。本研究では、良好なBACライブラリーが得られなかったこともあって、当初から完全なWGS法をもちいてゲノム解析が行われた。約37Mbという巨大なゲノムをWGS法でほぼ完全に解読したことは、ゲノム解析コンソーシアムの解析能力が示されたものと考えられる。

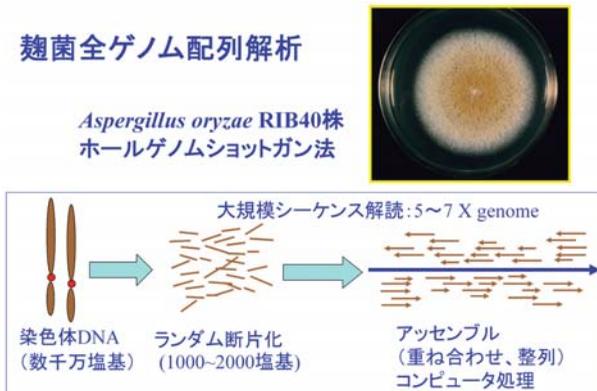


図3 麹菌ゲノム配列解析プロジェクト

麹菌全ゲノム配列解析

麹菌ゲノム解析コンソーシアム



製品評価技術基盤機構

Aspergillus oryzae RIB40

ホールゲノムショットガン法

シーケンス長 : 約10×ゲノム

ゲノムサイズ : 約37Mb

染色体数 : 8本

推定遺伝子数: 約12000

M.Machida et al., *Nature*, 22/29Dec. (2005)

(http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao)



図4 麹菌ゲノム解析の成果

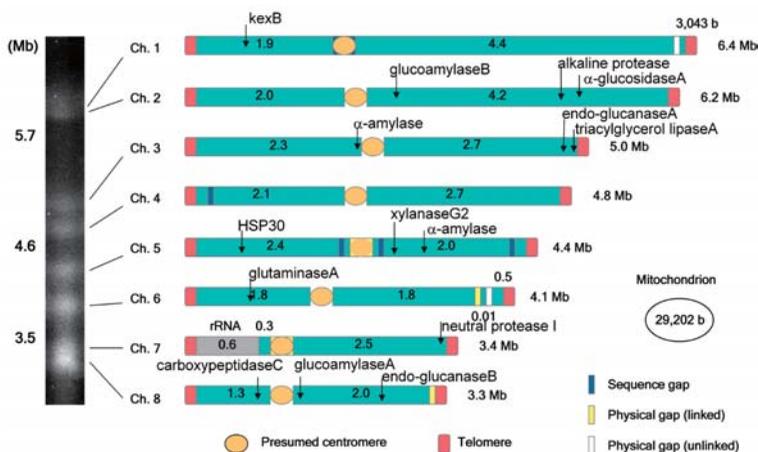


図5 麹菌染色体の概要と主要な酵素遺伝子の位置

さらに、DNA シーケンスデータ上に存在する遺伝子領域を産総研にて開発された GeneDecoder プログラムによって推定し、アノテーション付加作業を行っていた。この結果、全ゲノム配列は約37Mb (37,000,000塩基対)、推定遺伝子数12,000の値が得られた。推定遺伝子の機能アノテーション**は、コンソーシアムの研究者がすべて手動にて確認修正作業を行い、精度を高めた。この結果、染色体8本、ゲノムサイズ約37Mbの麹菌全ゲノム配列が明らかになった(図4、

図5)。

6. 麹菌ゲノムの特徴¹⁾

麹菌 *Aspergillus oryzae* (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao) のゲノム解析と時を同じくして、海外のアカデミックグループが *A. nidulans* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html), *A. fumigatus* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>) のゲノム解析を行った。同じ *Aspergillus* 属の糸状菌のゲノム解析をほぼ同時に行い、比較することができたのは幸運であったといえるだろう。ゲノムサイズを比較すると、*A. oryzae* : 37Mb, *A. nidulans* : 30Mb, *A. fumigatus* : 28Mb であった。また、推定された遺伝子数は、それぞれ12,000, 9,300, 9,000であり、ほぼゲノムサイズに比例していた。*A. nidulans* は、歴史的に糸状菌遺伝学の研究対象であって実験室の中で保存されてきたものである。*A. fumigatus* は、ヒトに日和見感染する病原性カビであり、人体という恒常的な環境で生育するものである。これにたいして、*A. oryzae* は、醸造、発酵に実用的に用いられ、麹として自然開放系にて穀物などに培養され、*A. fumigatus*, *A. nidulans* に比べて遙かに過酷な条件での生育を要求される。このため、生育環境に対応するための遺伝子を保有し、ゲノムサイズも大型化の方向に進化したものと考えられている(表1)。

また、これまでに、クローニングされ構造解析が行われた麹菌の代表的酵素遺伝子を染色体上にマッピングしてみると図5のようになる。酵素遺伝子の面から比較を行ってみると、醸造発酵において重要なプロテアーゼの推定遺伝子の数を比較すると、プロテアーゼ遺伝子総数は、それぞれ135, 90, 99であり、やはり麹菌のほうが、遺伝子数が50%ほど多い(表2)。これも、実用的な醸造発酵条件では麹菌に求められる形質の一つであり、実際の生育環境において、野生に近いプロテアーゼ数を持つことが必要であったためと考えられている。一方では *A.*

表1 麹菌と類縁菌のゲノムの比較

Table 1 Comparison of genome characteristics

Genome characteristic	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>General</i>			
Assembly size (bp)	30,068,514	27,980,910	37,047,050
G+C (%)	50	49	48
Protein coding genes	9,541	9,926	14,063
Protein coding genes (> 100 amino acids)	9,396	9,009	12,074
<i>Predicted protein coding sequences (> 100 amino acids)</i>			
Coding (%)	50	49	45
Gene density (1 gene every n bp)	3,151	2,938	2,613
Median gene length (mean)	1,547(1,868)	1,389(1,644)	1,152(1,414)
Average number of exons per gene	3.6	2.8	2.9

表2 麹菌と類縁菌の蛋白質分解酵素遺伝子数の比較

Table 2 Redundancy of secretory proteolytic enzyme genes

		<i>A. oryzae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
Exopeptidase				
Aminopeptidase	EC 3.4.11. .	19	15	14
Dipeptidase	EC 3.4.13. .	3	1	2
Dipeptidyl or tripeptidyl peptidase	EC 3.4.14. .	9	6	6
Serine-type carboxypeptidase	EC 3.4.16. .	12	5	8
Metallo-carboxypeptidase	EC 3.4.17. .	12	7	7
unknown peptidase		14	10	11
Total		69	44	48
Endopeptidase				
Oryzin	EC 3.4.21.63	2	2	2
Aorsin	EC 3.4.21. .	2	1	1
Kexin	EC 3.4.21.61	1	1	1
ATP-dependent proteinase	EC 3.4.21.51	6	6	6
Cysteine proteinase	EC 3.4.22. .	4	3	4
Ubiquitin-specific proteinase	EC 3.4.22. .	7	7	7
PalB	EC 3.4.22. .	1	1	1
Aspartic proteinase	EC 3.4.23.18	11	7	7
Pepstatin insensitive proteinase	EC 3.4.23.19	3	2	2
Saccharolysin	EC 3.4.24.37	3	0	1
Metalloprotease	EC 4.2.24. .	12	5	8
Inulinase	EC 3.4.24. .	4	4	4
unknown	EC 3.4.99. .	10	7	7
Total		66	46	51
Exopeptidases + Endopeptidases		135	90	99

nidulans, *A. fumigatus* は生育環境を限定することによって、不要な遺伝子を放棄する方向に進化したものと考えられる。

このほか、ペクチナーゼ遺伝子、P450遺伝子など分解酵素系遺伝子は、やはり麹菌が多く保有する傾向があり、麹菌は野生型に近いゲノム構造を持ち続けながら、今日まで生き続けたものと考えられる。

7. 麹菌ゲノム解析に何が期待されるか。

麹菌は食品、発酵工業など産業上重要な微生物でありながら、有性世代が未発見である等の理由から、意外にも遺伝学的解析等の研究が進んでいるとは言えず、むしろ大幅に遅れていると言って良いであろう。農作物や家畜は交配によって、数々の品種が育成されてきた。酵母も交配によって品種改良ができ、交雑法によって各種の遺伝子の存在やゲノム上の遺伝子位置が解明されてきた。しかしながら、麹菌の有性世代は未発見であり、交雑することができないため遺伝的解析がほとんど行われていなかった。1970年代に開発された遺伝子工学技術によって、麹菌の酵素などの遺伝子が次々にクローニングされてきたが、酵素の宝庫とも言われている麹菌の酵素遺伝子を全体的に解明することは多大の時間と労力を要す

る事業である。

近年、ヒトゲノムに代表されるように生物のゲノム解析研究が次々と行われ、微生物においても出芽酵母や枯草菌のゲノム解析が完了し、遺伝子解析研究が急速に進んだ。麹菌においてもゲノム解析は、新規遺伝子の発見などの研究基盤として極めて重要な研究課題と考えられた。つまり、麹菌の生体構造、生体機能、酵素等の特徴は、酵素やタンパク質の機能によって決められているが、その情報を担っているのはゲノム DNA 配列に記録された遺伝子情報である。このため、ゲノム情報配列をすべて解読することによって、既知の酵素遺伝子、未知遺伝子をも含めて麹菌の遺伝的情報を入手することができる。特に実用麹菌の遺伝子情報は、産業的に価値の高い情報であるといえる。麹菌のゲノム情報に含まれている未知遺伝子の中には、これまでにない優れた活性をもつ酵素が存在することが大いに期待される。もし、この酵素が画期的な活性を有するものであり、先にこの遺伝子を手中に収められれば、産業的に有利な位置を占めることができる。このような状況で、1998年に米国のベンチャー企業によって麹菌の類縁菌 *A. nidulans* のゲノム解析が完了したことが報告された。また、酵素生産菌として有名な *A. niger* のゲノムも欧州の企業が解析したと言われているが、これらのデータは現在に至るまで一般に公開されていない。

麹菌は、醸造、発酵食品製造にて重要な糸状菌であり、数多くの酵素遺伝子とそのゲノム中に保有ことがわかっている。これまで、いくつもの遺伝子が研究されてきたが酵素等のタンパク質からの研究には限度があり、酒造で注目されるアミラーゼ、醤油醸造で重要視されるプロテアーゼ、ペプチダーゼ等、酵素タンパク全体から見れば一部の酵素が詳細に研究されているにすぎず、発現量が少ない酵素タンパクはほとんど研究がなされてこなかった。しかしながら、ゲノム解析の結果から、これまで存在すら知られていなかった数多くの酵素遺伝子がわかってきた。プロテアーゼ遺伝子と推定されるものだけでも135個もの遺伝子が存在する。このうち既知のものはごく一部であり、大部分は発現量がきわめて少ないか、通常環境では発現していないであろうと考えられる。この中には、全く新しい機能を有するものや特異的反応を触媒するものの存在が期待される。ゲノム情報が明らかになり、酵素タンパクの情報が発現子の方向から明らかになると、微量にしか得られなかった酵素タンパクでも、遺伝子をクローニングすれば大量に入手することが可能となり、性質や構造の解明を行うことができる。すなわち、食品産業のために有用な新規酵素を入手することが可能となり、新たな食品素材や食品製造工程の開発に応用できるかもしれない。

また、麹菌ゲノム上の遺伝子情報がすべて入手できるため、それぞれの遺伝子の発現状況をマイクロアレイ技術等によって網羅的に解析すること、いわゆるトランスクリプトーム解析が可能となる。これまで、発酵状況の解析は酵素生産量やタンパク質生産量などの定量により、分析結果から推定することが主流であっ

たが、網羅的な遺伝子発現解析によって遺伝子発現のステージから見て、発酵中にどのような遺伝子あるいは遺伝子群が発現するかを調べることができる。その遺伝子群の中で特徴あるものを指標として、逆に発酵中の麹菌の状態を推定することができ、発酵の工程管理などへの応用が考えられている。このように、単独の酵素、遺伝子の解析だけでは判然としなかった菌の生育状態を遺伝子発現の網羅的な解析によって把握する新しい測定技術が考えられている。ゲノム情報解析によってえられた膨大な情報は、これまでできなかった新しい測定法、発酵法の開発の基礎として、今後の応用が期待されている。

8. おわりに

近年、数々のゲノムシーケンスプロジェクトが行われ、莫大なデータが生産され蓄積されている。麹菌の約37Mbのゲノムに含まれる遺伝子数は約12,000であったが、既存のDNAデータベースの中の機能が明らかなものと一致するか、あるいは相同性から機能が推定されるものは、そのうち約半数でしかないことが改めて明らかになった。いずれのゲノム解析でも言えることであるが、ゲノム情報はあくまでも情報であり、配列情報と機能情報を関連づけることが、ゲノム情報を理解し産業的、学術的に応用可能にするためには必要である。麹菌ゲノム情報が明らかになった今、既にポストゲノムシーケンス研究が動き始めている。麹菌EST情報を応用したcDNAマイクロアレイ、ゲノム配列をもとにしたホールゲノムアレイを用いた発現遺伝子の解析（トランスクリプトーム解析）の研究が急速に進んでいる。また、ゲノム情報をもとにして、麹菌細胞のタンパク質を全て解析するプロテオーム解析研究も開始されている。ゲノム、遺伝子転写制御、タンパク質の各階層における研究が進むことによって、新しい遺伝子機能が明らかになり、醸造・発酵産業に役立つ新技術の開発が期待されている。

*セントロメア：真核細胞の有糸分裂により、染色体が配分されるときに必要なDNA配列をさす。出芽酵母では200bp以下の短い配列であるが、ヒトでは約170bpの配列が数百kbから数Mbにわたって繰り返し配列を形成している。

**アノテーション：遺伝子の塩基配列に対する注釈情報。ゲノムなどに見いだされた遺伝子に関する機能、他の遺伝子との関連などの情報を注釈として付加すること。

謝辞

麹菌ゲノム解析は、麹菌ゲノム解析コンソーシアムによる共同研究によって行

われたものである。麹菌 EST 解析はキッコーマン(株), ヒゲタ醤油(株), ヒガシマル醤油(株), 月桂冠(株), 大関(株), 天野エンザイム(株), 全国種麹組合, 全国味噌工業協同組合連合会からの研究助成, 委託研究によって行われたものであり, 本研究の一部は農林水産省パイオニア特別研究の一環として実施された。

(微生物利用研究領域 糸状菌ユニット 柏木 豊)

参考文献

- 1) Goffeau, A., Barrell, B.G., Bessey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galigert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Phillippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., Life with 6000 genes. *Science*, 274, 564-567 (1997)
- 2) Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R. et al., The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256 (1997)
- 3) 村上英也, 麹菌, 「麹学」, (日本醸造協会), pp. 57-58 (1986)
- 4) 水野克也, 大久保公策, EST データとその利用法, 蛋白質核酸酵素, 42, 2814-2821 (1997)
- 5) 大久保公策, 遺伝子発現データベース, ボディマップ, 蛋白質核酸酵素, 42, 2822-2829 (1997)
- 6) Sasaki T., Song J., Koga-Ban Y., Matsui E., Fuang F., Higo H., Nagasaki H., Mori M., Miya M., Murayama-Kayano E., Takiguchi T., Takasuga A., Niki T., Ishimaru K., Ikeda H., Yamamoto Y., Mukai Y., Ohta I., Miyadera N., Havukkaia, I. and Minobe, Y., Toward cataloguing all rice genes: large-scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library, *Plant J.*, 6, 615-624 (1994)
- 7) 町田雅之, 麹菌ゲノム科学とバイオテクノロジー. 日本農芸化学会2002年度大会講演要旨集, p. 394 (2002)
- 8) 坂本和俊, 有馬寿英, 山田修, 秋田修, 麹菌 (*A. oryzae*) の固体培養特異的に発現する転写制御因子様遺伝子 *atfB* の解析. 日本農芸化学会2004年度大会講演要旨集, p. 155 (2004)
- 9) 松下真由美, 鈴木聡, 楠本憲一, 柏木豊, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の AoHSP 30遺伝子とそのプロモーター解析. 日本農芸化学会2004年度大会講演要旨集, p. 155 (2004)
- 10) 松下真由美, 山口加奈子, 栗原洋子, 鈴木聡, 楠本憲一, 柏木豊, 黄麹菌における高温培養時に発現する遺伝子の探索. 日本農芸化学会2003年度大会講

演要旨集 , p . 180 (2003)

- 11) 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., Nieman, W.C., Yu, J., Archaer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleaveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotho, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarash, 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 sequence and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157 - 1161 (2005)

トマトの成熟変異遺伝子の利用による 日持ち性の改善と低アレルギー化について

1. はじめに

「日持ち性」と「低アレルギー化」、どちらも食品研究には重要なテーマであるが、この二つにはあまり関連性がないように思われるかもしれない。我々はトマトの成熟制御機構の解明といった研究の過程で、一つの変異遺伝子の作用がこの二つの性質に大きく影響していることを見出した¹⁻³⁾。図1Aに示す非常に日持ち性が優れたトマトを材料として、このトマトの日持ち性改善機構の解明に向けた研究を食品総合研究所とカゴメ総合研究所が共同で実施しているのだが、本稿ではこれまでに得られた高日持ち性に関わる研究成果について、それからこの研究の予想外の成果として得られたトマトの低アレルギー化の可能性について紹介したい。

2. *RIN/rin* 遺伝子型トマトの高日持ち性に関わる研究

(1) 高日持ち性トマトの必要性和研究動向

鮮度の良いおいしい食品を食べたいという消費者の要望は現在の我が国の豊かな食生活を反映してますます高まっている。またその反面、世界的な食糧問題の一つとして様々な要因で栄養状態が悪い地域が存在があるが、生鮮野菜を低コストで鮮度を保って輸送できれば、貴重な栄養素をそれらの地域に供給する可能性を開くことになり、栄養事情の改善に役立つ。このように、鮮度保持のための技術開発は様々な局面において必要性が高い、大変重要な食品研究課題であるといえよう。生鮮野菜類の鮮度保持には、貯蔵・流通過程での包装やガス、温度条件

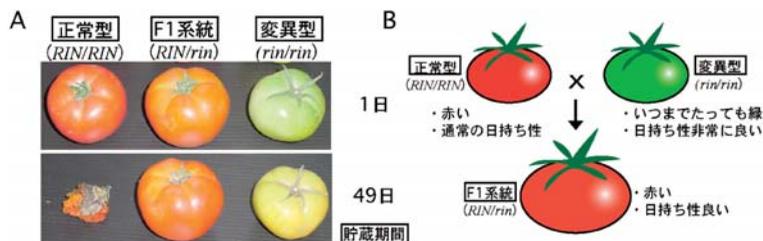


図1 “高日持ち性トマト”の育種と性状

A. 正常型、変異型親及びF₁系統に関して完熟期に収穫した果実を室温で49日間放置しておいたところ、正常型では完全に萎びてしまったが、変異型及びF₁果実はその姿を維持していた。B. 高日持ち性トマトは正常型トマトと *rin* 変異株の交配によるF₁系統として作出された。

等に様々な技術開発が行われているのと同時に、日持ちがよい品種の育成も重要な方法の一つである。食するのに最も良い状態（完熟）で収穫し、その品質を長く保持できる、ということであればそのメリットは非常に大きい。消費者としては、完熟の状態で収穫された物が食べられると言うだけでなく、家庭での保存がきくことは歓迎すべき点であろう。生産者にとっては、畑で収穫するのに適した状態が長く続くのであれば、毎日の収穫、出荷の作業が数日に一度で済み、作業効率の向上や栽培規模の拡大につながる。また流通・貯蔵過程で低温環境や大気組成の制御等の設備がなくても品質に問題がなく、さらに輸送中の傷みによるロスが減少できるような作物であれば、流通にかかるコスト削減が望める。近年ますます増加しつつある輸入野菜に対して、国産野菜はもともと品質面では競争力があるが、価格面ではやはり大きく水をあけられる。生産流通過程でのコスト削減により少しでも輸入野菜の価格へ近付ける事ができれば、さらに競争力が高まり、国内農業振興にも大いに寄与できるであろう。

このように日持ち性を改善することによるメリットが大きいことからその実現に様々な研究開発が行われているが、その中でも印象深いのが米国で始めて商業的に栽培された組換え作物である「フレーバーセーバー」トマトである。この組換えトマトはポリガラクチュロナーゼ（PG）という酵素の遺伝子発現をアンチセンス遺伝子の導入により抑制させたものである。PG という酵素はトマト果実の主要な細胞壁成分の一つのペクチンを分解する活性があることが知られている。PG のアンチセンス遺伝子を導入した組換えトマト（フレーバーセーバーと同一品種かどうかは記述がなく不明）に関する学術論文には、この組換えトマトは裂果や機械的損傷によるダメージを受けにくくカビも生えにくい、軟化に関しては通常の品種と変わらなかったとある^{4,5)}。PG が果実軟化の第一の鍵となる酵素であると当時強く信じられていたので、この組換えトマトが通常のトマトと同様の軟化を示したことは予想を大きく覆した結果となった。フレーバーセーバーに関しては、発売当初華々しくスーパーマーケットに並んだ報道が印象深いですが、その後商業的には成功を収められず、既に市場から撤退している。その後も細胞壁の代謝に関わる種々の遺伝子の発現を抑制したトマトの研究が行われており、軟化抑制に成功したものもあるが^{6,7)}、商業的に栽培されている例はない。現在、組換えダイズを始めいくつかの作物で組換え品種が商業的に栽培されており、将来的には遺伝子組換え作物の利用がさらに拡大することが予想されるが、現在の我が国の社会状況では組換え作物に抵抗感を持つ消費者の存在も無視できず、交配を使った従来育種による品種育成が当面のところは実用的であると考えられる。

ここでは突然変異体の利用と交配による従来育種法を用いて育成された非常に優れた日持ち性示すトマトを材料に、その高日持ち性に関わる要因について検討している我々の研究について紹介する。前述のように高日持ち性品種の開発は鮮

度保持に重要な技術開発の一つであり、高日持ち性のメカニズムについて詳細に解析することで、多くの種類の果実や野菜に広く適応できる知見が得られるため、現在、その解析を進めている。

(2) 果実の成熟に関わる要因

植物は開花後、果実が着生すると徐々に肥大した後、その肥大が止まり、果実の成熟が始まる。成熟の開始に伴う果実の生理的变化は劇的であり、また高度に同調している。成熟に伴う変化としては、例えばトマトではリコピンを含むカロテノイドの生産、軟化の開始、呼吸量の上昇、エチレンの生産上昇、風味の変化等が挙げられ、これらの変化はほぼ同時にはじまる。また未熟のトマトに比べ、熟したトマトはアレルギー性が高いことが知られており⁸⁾、これも成熟に伴う変化の一つであろう。トマトは成熟時に呼吸量およびエチレン生産が上昇する「クライマクテリック型」の成熟をみせるが、この種類の果実類としてはリンゴやバナナ、モモなどがある。これに対して呼吸量の増大やエチレン生産が見られないで成熟が進む「ノンクライマクテリック型」の果実には、イチゴ、ブドウ、ミカン等がある。エチレンはよく知られているとおり、果実の成熟を早める作用がある植物ホルモンである。エチレンの生産を抑制するとトマトは成熟することができない^{9,10)}。

果実の成熟機構を研究する上で、種々の成熟に関わる変異体が重要な材料となってきた。これらは実際の育種にも使われているものもある。例えば果実色に関して、黄色やオレンジを呈する変異体もあるが、最も利用価値の高いものとして“*high pigment*”と名付けられる変異体 (*hp-1*, *hp-2*) は、リコピンや β -カロテンの蓄積量が顕著に向上するため、その育種的利用価値は高い。成熟全般に関わる変異体も多く、有名なものが *non-ripening* (*nor*), *ripening inhibitor* (*rin*), さらに *Never-ripe* (*Nr*) の各変異である。これらの変異体はいずれも成熟の進行全体が妨げられ、果実が軟化したり赤色を呈したりすることがない。その特異な性質から、これらの変異体は成熟に関わる様々な要因の解析に用いられている。*Never-ripe* は果実の成熟期にその発現量が増大するエチレンレセプター遺伝子の変異であることが報告されている¹¹⁾。*nor* と *rin* はエチレンよりもさらに上位で成熟制御を行っている転写因子であると言われており、恐らく成熟開始のごく初期のステップをコントロールしていると考えられる。

(3) *rin* 変異遺伝子について

今回解析しているトマトが高日持ち性を示す、その鍵となるのは *rin* と呼ばれる変異遺伝子である。この突然変異トマトは1960年代に米国で発見されたものであるが、トマトの成熟全般に大きな影響を与えることが知られている。この *rin* 突然変異トマトは果実の肥大までは普通のトマトと全く同じように進行するのだ

が、いつまでたっても赤くもならず、柔らかくもならず、何ヶ月もその姿を保つという不思議な性質を示す。また成熟の進行に重要なエチレンを生産せず、エチレンを外からかけてやってもやはり成熟は進まず、この遺伝子はエチレンによる制御よりもさらに上位で成熟を制御していると考えられてきた。最近になりこの遺伝子 *LeMADS-RIN* が Vrebarov ら (2002) によってクローニングされ¹²⁾、果実成熟開始期にのみ発現する転写制御因子であることが明らかとなった。この転写制御因子は MADS ボックスファミリーに属するが、このファミリーは植物では特に花器官の分化において重要な機能を果たしていることがよく研究されている¹³⁾。また *rin* 変異の正体は、ゲノム上で *LeMADS-RIN* 遺伝子の後半の一部が欠失したことにあり、その影響で mRNA の合成に異常が生じ、ゲノム上のすぐ隣に位置する遺伝子と融合した本来とは異なる長い転写産物が作られるということが示された¹²⁾。この変異により本来成熟時に誘導される様々な遺伝子、例えばエチレン生成やリコペン合成系、果実軟化などに関わる数多くの遺伝子の転写が抑制されるために、果実成熟の全体が進まなくなるのである。

この変異の一つの特徴として、正常型遺伝子が *rin* 変異に対して不完全優性を示すことにある。遺伝子型が *rin/rin* の変異体は成熟が完全にストップするのに対し、正常型植物と変異体を交配して得られたヘテロ型 (*RIN/rin*) は両親の間接型の性質を示す (図 1B)。*RIN/rin* ヘテロ型の果実は正常型品種に比べ、エチレン生産量やリコペン生産量の低下が見られるが、変異型果実のように全く生産がストップするというわけではない。当然この変異を高日持ち性トマトの育種に利用しようという考えは突然変異体が発見された当時からあり、通常の栽培種(正常型)トマト (*RIN/RIN*) と変異体 (*rin/rin*) とを掛け合わせた F₁ 雑種 (*RIN/rin*) の利用が提案されている¹⁴⁾。しかしながら実用的には今のところ世界的にも主要な品種は見あたらないようである。また、果実成熟の研究材料として、*rin* 変異体と正常型の比較に関する数多くの研究が為されているが、意外なことに *RIN/rin* ヘテロ型の F₁ 雑種に関する遺伝学的研究は皆無であった。図 1 に示すとおり、*RIN/rin* 型の F₁ 雑種系統は非常に優れた日持ち性を示す。この品種の特性を明らかにする事で、トマトだけでなくすべての果実類の日持ち性改善に役立つ知見が得られると考えられる。食品総合研究所ではカゴメ総合研究所と共同で、この高日持ち性トマトの日持ち性改善機構について研究を開始した。

(4) *RIN/rin* 遺伝子型を持つ高日持ち性トマトの育成

カゴメ(株)総合研究所では高日持ち性トマトを作出することを目的として、異なる正常型系統、*rin* 変異系統による様々な交配で 8 系統の *RIN/rin* 遺伝子型の F₁ 系統を育成した (表 1)。これらの系統に関して日持ち性及び果実色の評価を行ったところ、日持ち性に関しては、通常良いとされる桃太郎が 5.3 ± 1.6 日に対して、いずれの系統も大幅に向上していた。しかしながら F₁ 系統間でのばらつき

第 1 表 正常型及び *rin* 変異体の交配から得られた F₁ 系統果実の日持ち性と着色性の比較

F ₁ 系統	親系統		日持ち性 (日数) ¹⁾	赤み (a*値) ²⁾
	種子親	花粉親		
Kc01-5	PK353 ³⁾	TK5970	25.8±5.1	17.4±0.3
Kc01-6	PK331	PK353 ³⁾	29.0±4.5	17.5±0.6
Kc01-7	PK355 ³⁾	PK331	28.4±4.4	17.1±0.6
Kc01-10	PK356 ³⁾	PK347	30.4±3.0	19.2±0.5
Kc01-11	PK356 ³⁾	PK331	23.0±9.3	14.8±0.6
Kc01-24	01F345	PK353 ³⁾	31.0±3.2	16.6±0.3
Kc01-28	PK329	PK356 ³⁾	15.4±7.1	21.3±0.7
Kc01-31	PK330	PK355 ³⁾	19.6±3.4	14.9±0.9

注 1) 日持ち性は果実表面に水浸状のスポットが出るまでの期間とした。

2) CIE カラーモデルのインデックスによる。

3) *rin* 変異体親

は大きく、最も長いもので31±3.2日、短いもので15.4±7.1日であった。次に、着色に関しては赤みを表す a* 値について桃太郎が19.13±0.03に対し、F₁ 系統は14.8±0.6から21.3±0.7とこちらもばらつきがあった。興味深いことに、日持ち性と着色性との間には明確な相関が見られなかった。当初、*LeMADS-RIN* 遺伝子は着色および日持ち性を含む成熟全般を強く支配していることから、強い着色を示す系統は日持ちする期間が短く、着色が弱い系統ほど日持ちが良い、という傾向があるだろうと予測していた。しかしながら実際には、日持ちが良くしかも着色性がよい系統 (Kc01-10) や、日持ちがそれほど良くなく着色性も良くない系統 (Kc01-31) も現れた (第 1 表)。このことは日持ち性及び着色性について、*LeMADS-RIN* 遺伝子が強く支配していることは間違いないが、それ以外のいくつかの遺伝的要因もそれぞれの形質に対して少なからず影響を与えていることを示唆する。さらに、適切な交配親を選ぶことにより、日持ちがよい上に着色性もよい優れた F₁ 系統を育成することが可能であるだろう。

ここで育成された F₁ 系統のうち、日持ち性、着色性に加え、食味、生産性なども勘案して選抜された系統 (表中 Kc01-6) が、“KGM011” として2005年にカゴメから品種登録された。この系統は図 1 A に示すとおり、生食用に十分な赤みを示しながら、非常に優れた日持ち性を示した。そこで、この KGM011 系統を供試して *RIN/rin* 遺伝子型が果実成熟に与える影響に関して検討を行うことにした。以後本稿で述べる F₁ 系統とは、特に断らない限り、この KGM011 を指すこととする。果実成熟における重要な生理学的変化として、リコピンの合成、果実の軟化、そしてエチレン合成が挙げられるが、それらに係る遺伝子の発現は *LeMADS-RIN* によって強く制御されていることが知られており、*rin* 変異によりその発現が大きく影響される。そこで次に、KGM011 系統における *RIN/rin* 遺

伝子型が、果実の生理学的変化とそれに関わる遺伝子発現に関してどのような効果をもたらしているのかを検討することにした。

(5) リコピン合成

トマトの特徴的な赤い色素の正体は、よく知られているようにカロテノイドの一種であるリコピンである。リコピンの蓄積開始による果実色の赤色への変化が成熟開始の一つの指標であり、果実の肥大期には全く検出されないが、成熟期には急激に蓄積が見られる。図2 A に示す通り、 F_1 系統におけるリコペン量は正常型親の約半分量であった。リコピンはゲラニルゲラニルピロリン酸を材料として図2 B に示すような生合成経路を経て生産される。そこでリコピン合成に関わる反応を触媒する酵素の遺伝子発現に関して正常型、変異型、および F_1 系統を材料に検討を行った。正常型および F_1 系統に関しては、果実の肥大生長が終わった頃の緑熟期 (Mature Green; G) 赤色が果実表面に見え始める催色期 (Breaker; B), 全体に薄く赤色が回る桃熟期 (Pink; P), 赤色が全体に回る完熟期 (Red ripe; R) の4つのステージの果実を樹上から収穫し、また *rin* 変異体に関しては赤い色への変化が見られないため、果皮の黄色い着色がはじまってから約5日後、約9日後をそれぞれPステージ、Rステージに相当する果実として収穫し、解析を行った。リコピン合成に関わる3つの酵素、*Psy*, *Zds*, *Pds* の遺伝子発現量を比較したところ、*Zds*, *Pds* 遺伝子に関しては *rin* 変異の影響が少なかったのに対し、*Psy* 遺伝子では *rin* 変異の影響により明確に発現量の変化が見られた(図2 B)。正常型では成熟開始期から急激に発現が始まり成熟期間中その発現は維持されるが、変異体では対応する期間にほとんど発現が見られない。ところが F_1 系統では確かに発現が見られるものの正常型親よりも明らかにその量は少なく、両親の中間型の発現量を示していた。従って、 F_1 系統のリコペン合成量の減少は *Psy* 遺伝子の転写レベルの変化が影響していることが示唆された。

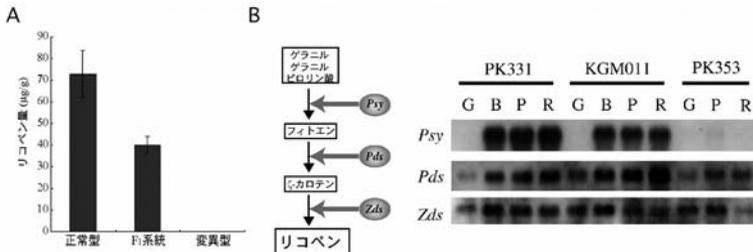


図2 F_1 系統のリコピン合成と遺伝子発現

A. 正常型、変異型親及び F_1 系統の完熟果実におけるリコペン量の比較。B. リコピン合成経路とその過程に関わる酵素遺伝子の発現解析。正常型、変異型及び F_1 系統のトマトを緑熟期 (G), 催色期 (B), 桃熟期 (P), 完熟期 (R) の各成熟ステージで収穫し、各酵素遺伝子の発現量をノーザンブロットング法により解析した。

(6) 果実の軟化

細胞壁の構造変化にともなう果実の軟化も成熟の特徴的な形質の一つであり、日持ち性に直接関わる要因であろう。果実の軟化には多くの要因が影響していることが知られている。成熟中の細胞壁成分の最も大きな変化はペクチン質が低分子化・可溶化することであるが、これにはポリガラクトクロナーゼとペクチンメチルエステラーゼが関わっている。 β -ガラクトシダーゼも細胞壁構造の変化に関与しており、アンチセンス遺伝子の導入により、果実の軟化が抑制された⁶⁾。またエクспанシンと呼ばれる蛋白質は細胞壁成分の多糖類の構造をゆるめ分解酵素類の働きを助ける役割を果たしていると言われているが、トマトの果実の成熟中に特異的に発現するエクспанシンがあり、やはりアンチセンス遺伝子の導入により果実の軟化が抑制されることが示された⁷⁾。

F₁系統の果実について貯蔵中の軟化の程度を検討したところ、“桃太郎”と比較して明らかにその進行が抑制されており、特に低温貯蔵時(13℃)に軟化の抑制が顕著に見られた(図3A)。そこで細胞壁構造の変化に関わる因子のうち、ポリガラクトクロナーゼ(PG)、 β ガラクトシダーゼ(TBG4)、エクспанシン(LeEXP1)遺伝子に関してF₁系統の果実成熟中の発現変化を見たところ、これらの遺伝子の発現はいずれも正常型に比べ低下していた(図3B)。つまりF₁系統の果実においては、今回供試した遺伝子を含め果実の成熟中に発現が増加する細胞壁の代謝に関わる数多くの遺伝子の発現が部分的に抑制されていることが示唆される。細胞壁の構造を変化させる様々な酵素等の活性低下が複合的に起こり、その結果として果実の軟化が抑制されるのではないかと考えている。

(7) エチレン合成

植物ホルモンの一種であるエチレンは、植物の種子の発芽、花器の形成、組織の老化、果実の成熟など様々な過程をコントロールしている。エチレンはS-ア

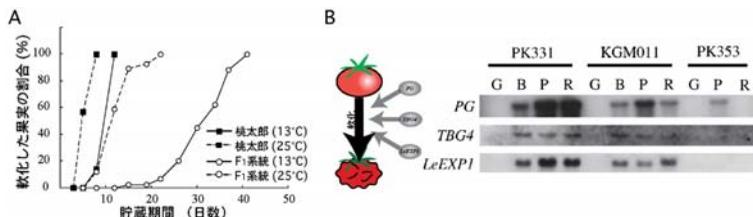


図3 F₁系統の果実軟化抑制効果と関連遺伝子の発現量の変化

A. 果実の軟化の進行を桃太郎とF₁系統で比較した。約20個の果実を催色期に収穫し、13℃及び25℃に置き、軟化が進行した果実(果実を30mmプランジャーで5mm圧縮するのに必要な力が1.5kgf以下のもの)の割合を示した。B. 細胞壁分解に関わる因子の遺伝子発現量をノーザンブロッティング法により解析した。果実を収穫した時期は図2Bと同様である。

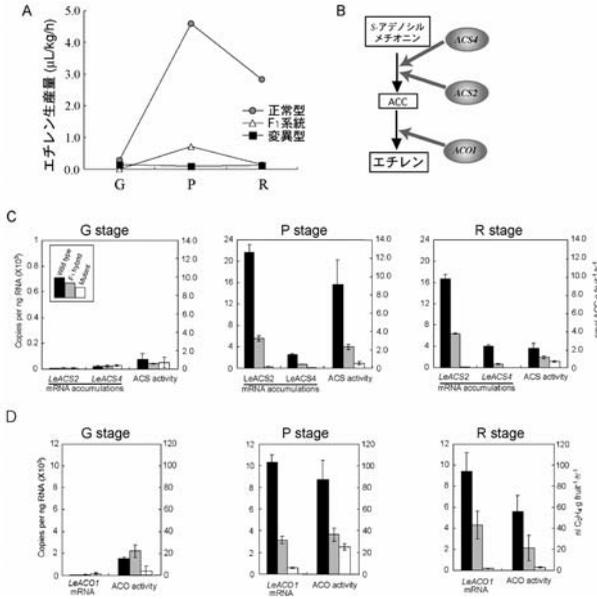


図4 F₁系統のエチレン合成

A. 正常型、変異型親及びF₁系統のエチレン生成量。緑熟期(G)、桃熟期(P)、完熟期(R)の果実について測定した。B. エチレン生成経路に関わる酵素。C. 果実成熟期間中のACS遺伝子の発現量と酵素活性。D. 果実成熟期間中のACO遺伝子の発現量と酵素活性。C, Dの遺伝子発現量はリアルタイムPCR法により定量した。

デノシルメチオニンを材料として1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)シンターゼ, ACCオキシダーゼの働きにより合成される(図4B)。ACCシンターゼ(ACS), ACCオキシダーゼ(ACO)をコードする遺伝子はトマトゲノム内にそれぞれ複数個存在しており, このうち果実の成熟時には*LeACS2*及び*LeACS4*, *LeACO1*が重要な機能を果たしていることが知られている¹⁵⁾。トマトにおけるエチレン合成はエチレンを発生して成熟が進む一般的な果実類と同様であり, 成熟が開始する前である緑熟期にはごくわずかに検出されるのみであるが, 着色が始まる時期に急激に増加しはじめ, 桃熟期頃にピークを迎え, その後ゆっくりと減少していく。これに対し *rin* 変異型では緑熟期以降, いつまでたっても全くエチレンの増加が見られない。F₁系統におけるエチレン生産量を測定したところ, 桃熟期で生成量の増加が見られるものの, 正常型のような急激な生成量の上昇は見られず, 以後また基底レベルに戻った(図4A)。この結果から, F₁系統の高日持ち性はエチレンレベルが正常型ほどには上昇しないことが大きく影響していることが示唆された。次に, エチレン生成量の減少を制御している要因を明らかにするために, ACCシンターゼおよびACCオキシダーゼの酵素活性,

さらに *LeACS2*, *LeACS4*, および *LeACO1* 遺伝子の mRNA の蓄積量について F_1 系統と正常型および変異型で比較を行った。その結果, エチレンを豊富に生成する正常型の桃熟期果実では *LeACS2*, *LeACS4*, および *LeACO1* 遺伝子の mRNA が高レベルで蓄積しており, それに伴い ACS および ACO の酵素活性の上昇が見られたが, 変異型では mRNA 蓄積および酵素活性ともほとんど上昇しなかった (図 4 C)。 F_1 系統ではこれらの mRNA 蓄積量は正常型と比べ明らかに低く, 両酵素活性も低下していた (図 4 C)。これらの結果より, F_1 系統の果実におけるエチレン生成量の低下は ACS と ACO をコードする遺伝子の転写量の低下によりのものであり, その原因は *LeMADS-RIN* 遺伝子座における *RIN/rin* のヘテロ遺伝子型による効果であると考えられる。エチレンは成熟進行に重要な因子であることから, ヘテロ型の効果による ACS および ACO 遺伝子の転写制御は F_1 系統果実の成熟過程を制御するキー要因の一つであると言える。

(8) *rin* 変異遺伝子を利用した高日持ち性品種育成の課題と展望

RIN/rin 遺伝子型を持つトマトの成熟過程における様々な生理的变化とそれを司る遺伝子発現について以上のような解析を行ってきたが, 予想外の結果も得られ, *rin* による日持ち性改善機構の全体を理解するにはまだほど遠い。表 1 のように, 得られた F_1 系統間では果実の日持ち性と着色性に必ずしも相関があるわけではなく, 日持ちがよくて赤みが強い系統を育種できる可能性が示された。しかしながら, 親系統の性質から F_1 系統のこれら両形質について予測はできないのが現状であり, 交配して種を播いて実を付けてからでないとその性質は評価できない。両形質に関係する何らかの遺伝要因が *RIN/rin* 遺伝子型によって影響を受けていると考えられるが, 詳細は今後の検討課題である。 F_1 系統間の遺伝子発現の違いや今後明らかになっていくことが期待される種々の成熟進行過程の詳細な情報からこれらの形質に影響を与える因子を見出し, 効率の良い高日持ち性品種育成法を検討していく必要がある。

また, トマト以外の各種果実類・果菜類の高日持ち性品種育成への応用も今後の課題である。*RIN* 遺伝子はほとんどの果実類に相同性遺伝子があることが予想されている。おもしろいことに, トマトとは異なる, エチレン非生成で成熟が進む果実の代表であるイチゴにも相同性遺伝子が存在することから¹²⁾, クライマクテリック型, ノンクライマクテリック型を問わず *RIN* 遺伝子が果実成熟を制御していると考えられ, その機能調節によりあらゆる果実類で成熟制御が行える可能性がある。しかし, トマトの場合は都合よく本遺伝子に変異を持つ系統が見つかったために, この変異体を用いた交配育種が可能であったが, 他の作物では *RIN* に相当する遺伝子に関する変異体と思われるものは報告がなく, トマトと同じようなアプローチは取れない。今後組換え体が受け入れられる社会的情勢が整えば, 遺伝子組換え技術を使って各種果実類の *RIN* 相同性遺伝子を標的とした発現調

節を行うことにより、日持ちのよいモモやイチゴなどが食卓に登場するかもしれない。

3. トマトアレルゲンの蓄積に対する *rin* 遺伝子の影響

(1) トマトのアレルギーについて

アレルギーを引き起こす食品としては卵、米穀、豆類、魚、果実類等多岐にわたるものが知られているが、トマトもアレルギーの原因となる食品の一つであることはあまり知られていないことかもしれない。トマトアレルギー患者においてもっとも多い症状は、成熟した生のトマトを食べたときに唇や口の中、のどにかゆみや腫れを引き起こすような口腔アレルギー症候群（Oral allergy syndrome: OAS）と呼ばれるものであり、ごく稀に呼吸困難などの重篤な症状を示す場合もある。卵や牛乳などの場合と違いトマトアレルギーがあまり問題にならないのは、上記の通り症状があまり重篤でない場合が多く、また加熱すればほとんどの場合アレルゲン性が失われることもあり、それほど注意を払う必要性がないからかもしれない。しかし、韓国では加工食品に含まれるアレルギー食品として表示義務がある原材料の一つにトマトが挙げられており、またトマトアレルギーとスギ花粉症との関連性が示唆されていることなどから、今後大きな問題となってくる可能性がある。アレルギー患者にとってアレルゲンを含まない（または非常に少なくなった）食品が開発される事は切望される場所であり、実際に低アレルゲン化されたコメやダイズが開発されている。「アレルゲン」と「日持ち性」とは一見、何の関係もないような研究テーマであるように思われるかもしれない。我々にとっても意外だったのだが、今回の研究対象である高日持ち性トマトが実はアレルゲンの蓄積量が少ないことを見出すことができたので、次にその研究内容を紹介したい。

(2) *RIN/rin* 遺伝子型トマトの低アレルギー化の可能性について

この研究の発端となったのは、*RIN/rin* 遺伝子型トマトが高日持ち性を示すその鍵を探ることを目的として行ったマイクロアレイ解析である。F₁系統と正常型トマトの果実の比較、*rin* 変異型と正常型の比較を行い、発現が変化している遺伝子をスクリーニングするという試みであった。この解析では米国 Cornell 大学 Boyce Thompson 研究所で作られた cDNA アレイを用いた。桃熟期の果実における発現の比較を行った結果が図 5 のとおりであり、正常型と *rin* 変異型とを比較した場合よりも、正常型果実と F₁ 系統果実との比較した場合の方が遺伝子発現パターンは近いものになったが、2 倍以上のシグナル強度の差を示したスポットも多数見られた（図 5）。これらのスポットに対応する遺伝子名を眺めると、「minor allergen beta-fructofuranosidase precursor」という説明のある遺伝子、つまりアレルゲンとして同定されている β -フルクトフラノシダーゼをコー

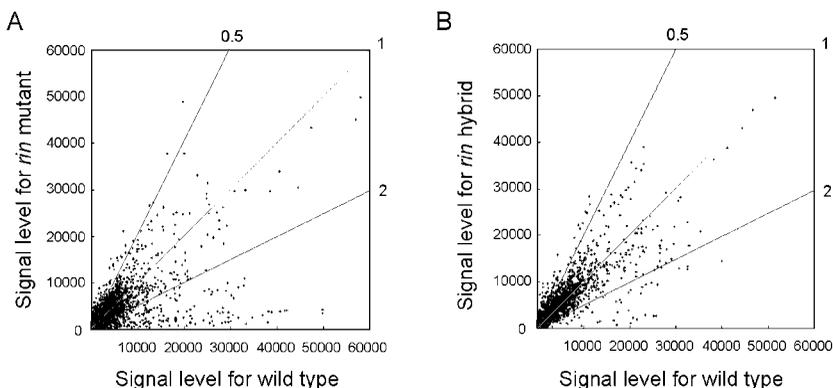


図5 正常型トマトに対する変異型および F_1 系統の遺伝子発現の違い

マイクロアレイ解析により桃熟期果実における遺伝子発現の比較を行い、各系統のシグナル強度をプロットした。Aは正常型と rin 変異体の比較、Bは正常型と F_1 系統の比較。グラフ上の補助線はシグナル強度比がそれぞれ0.5倍、1倍、2倍となる位置を示す。例えばAにおいて正常型が2倍以上のシグナル強度を示す時には2の補助線より下に位置し、1/2以下のシグナル強度を示す時には0.5の補助線より左に位置する。

ドする遺伝子の発現が F_1 系統では低下しているということを見つけた。この時点ではトマトのアレルギーに関しては全く予備知識がなく全く予想外のことであり、また、本来の研究目的からは横道にそれることにはなるが、「低アレルゲントマト」として F_1 果実の用途に新たな可能性が開けると考え、もう少し突っ込んで検討してみることにした。そこで過去にトマトアレルゲンとして同定されているタンパク質について調べたところ、この他に、ポリガラクトシドナーゼ(PG)、ペクチンエステラーゼ、プロフィリン等が同定されていた¹⁶⁾。このうちPGは既に図3Bの通り、 F_1 系統において遺伝子発現の低下が確認されていたので、今回は β -フルクトフラノシダーゼとPGに焦点を絞り、研究を進めた。 β -フルクトフラノシダーゼは別名インベルターゼとも呼ばれ、スクロースを加水分解してフルクトースを遊離する酵素である。糖鎖が付加したタンパク質であり、この糖鎖部分がアレルゲンとして認識されるのに必須であることが知られている¹⁷⁾。

次に β -フルクトフラノシダーゼとPGに関して、果実の成熟各ステージにおける遺伝子の転写量を正確に比較するためにリアルタイムPCR法により定量を行った。正常型果実では β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の発現は成熟に伴って増加が見られたのに対し、 rin 変異型果実ではほとんど発現が見られなかった(図6A)。 F_1 系統の果実では、果実の成熟に伴い発現量が増加したものの、正常型に比べて明らかに発現量は低下していた。PGの発現に関しても同様の傾向にあり、 F_1 系統の果実では正常型に比べて明らかに発現量は低下していた(図6A)。さらに、タンパク質量の比較を行うために、各系統の果実からの抽出物を

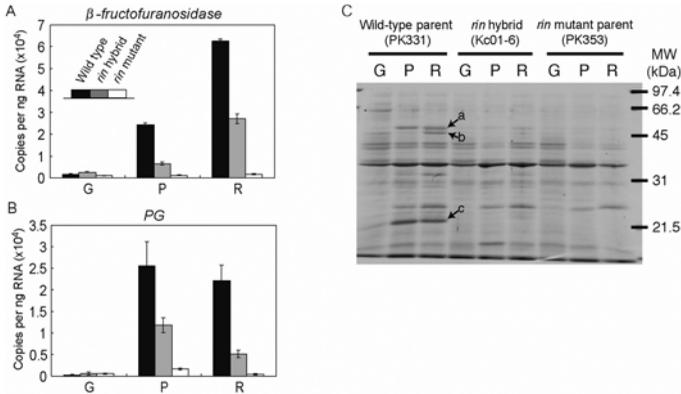


図6 トマト果実成熟期における β -フルクトフラノシダーゼおよびPGの発現

A. 果実成熟期間中の β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の mRNA 蓄積量。B. 果実成熟期間中のPG 遺伝子の mRNA 蓄積量。A, BともリアルタイムPCR法により定量した。C トマト果実成熟期の粗抽出タンパク質のSDS-PAGE解析。a, cは β -フルクトフラノシダーゼ, bはPGのバンドを示す。

SDS-PAGE 解析に供し、得られたタンパク質のバンドパターンを比較した。図6Bに示す正常型の50kDaのバンド(a)および22kDaのバンド(c)が β -フルクトフラノシダーゼであり、46kDaのバンド(b)がPGである。図に示すとおり、これらのバンドは F_1 系統の果実では成熟ステージ全般にごくわずかに検出されるに過ぎなかった。この結果から、トマトのアレルゲンとして同定されているこの二つのタンパク質に関しては蓄積量が減少しており、アレルゲンが減少している可能性が高まった。

最後に、この F_1 果実から抽出したタンパク質がトマトアレルギー患者の血清にどのように反応を示すかを検討した。 F_1 系統およびコントロールとして日本の市場で最もポピュラーな品種である“桃太郎”を対象に、完熟果から抽出したタンパク質に対して、トマトアレルギー患者あるいはアレルギーを持たない正常人との血清を用いてウェスタンブロットング解析を行い、IgE反応性を調べた(図7)。その結果、この患者血清では“桃太郎”で検出される約50kDaのバンドが F_1 系統果実では検出されなかった。その他にも“桃太郎”で検出される多数のバンドに関して F_1 系統果実では検出されないか、あるいはシグナルが弱くなっているものがあった。以上の実験結果より、アレルゲンとなるタンパク質の蓄積量が低下しており、また抽出物の患者血清との反応性が明確に低下したことから、*RIN/rin*ヘテロ型の遺伝子型をもつこの F_1 系統の果実はアレルゲン性が低下している可能性が示唆された。

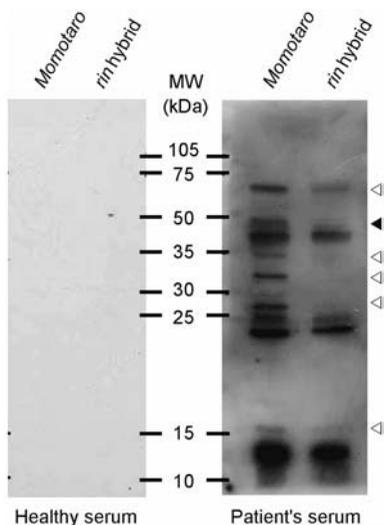


図7 トマトアレルギー患者血清を用いた
完熟果実のイムノプロットング

桃太郎で検出されたがF₁系統で検出されなかった50kDaのバンドは で、その他シグナル強度に変化があったバンドは でそれぞれ示した。

(3) *rin* 変異遺伝子の低アレルギー化に関する研究の課題と展望

このようにF₁系統の果実は低アレルギー化している可能性が示された。しかしアレルギータンパク質が完全になくなっているわけではないため、実際にトマトアレルギー患者さんに対して低アレルゲントマトとして適用することには慎重になるべきであり、医学的な見地から十分な検証が必要だと思われる。しかしながら、*rin* という一つの遺伝子の作用で複数のアレルゲンの蓄積量が低下する現象の発見は、低アレルギー作物の育種という面で新たなアプローチになる可能性がある。これまで作物のアレルゲンを低下させる試みとしては、アレルゲンを作る遺伝子に関する変異体を選抜する方法や遺伝子組換えによる発現の抑制といった方法がある¹⁸⁻²⁰⁾。これらの方法は標的とするタンパク質の除去には非常に有用であるが、複数のアレルゲンを標的とするときには多段階の育種が必要となる。それに比べ、一つの遺伝子の影響で複数のアレルゲンを減少させる *rin* 遺伝子の効果は非常にユニークと言え、トマトの低アレルギー化を考える場合に一つの選択肢と考えることができるかもしれない。

スギ花粉症は国民病とも言われるほど我が国ではその患者が多いことはよく知られているが、スギ花粉に対するアレルギーとトマトアレルギーには強い関連性があることが知られている²¹⁾。またスギ花粉の主要なアレルゲンの一つであるCryj2はトマトのPG-2Aとアミノ酸レベルで40%の相同性が見られ、また部分的に相同性が非常に高い領域もある²²⁾。スギ花粉症患者が増加し、また症状が悪化する人の割合が高まれば、トマトアレルギーを起こす人が増えてくる可能性がある。前述の通りトマトのアレルギーは生で食べたときにのみ症状を示すことが多く加工品は問題なく食べられる場合が多いため、問題にされることは少ない

のかもしれないが、食べた時の不快感からトマトを敬遠する人が増えてくる可能性がある。「トマトは好きだけど、食べた後かゆくなるからな...。」というような人への選択肢の一つとして *rin* 変異を用いて育種された低アレルギー化トマトが活用されることを期待したい。

4．おわりに

成熟に関わるユニークな変異遺伝子 *rin* を用いることにより、高日持ち性や低アレルギー性を示すトマトが育成できる可能性、それからその機構に関して現在行っている研究を紹介したが、現在のところ日持ち性にしてもアレルギー性にしても、自由にコントロールできるという段階にはほど遠い。果実が行っている成熟制御に対する根本的な理解がさらなる良形質を持つ品種の育成に必要であろう。果実の成熟制御機構の解明のための研究の歴史は長く、様々な成熟変異体の表現型の解析、あるいはエチレングスによる果実の反応の解析等の地道な研究が数多く為され多くの知見が蓄積されてきたが、この制御機構は非常に巧妙かつ複雑であり、その全容解明にはほど遠かった。しかし、近年 *rin* 遺伝子を含む様々な成熟変異遺伝子が次々に単離されてきており、またトマトのゲノムプロジェクトも進行中であることから、これまでの蓄積と新たに得られた遺伝子情報が結びつくことにより、近いうちに成熟機構の全体像が明らかになってくるのではないかと期待している。*RIN/rin* 遺伝子型の F₁ 系統はこれまで成熟研究の材料としてあまり扱われてこなかったが、本稿で示したとおり、日持ちの面での実用性の高さもさることながら、そのユニークな成熟進行の性状は研究面でも注目に値する。さらに本研究から *rin* 変異遺伝子の利用によるトマトアレルギー低蓄積への可能性も見出すことができた。我々が進めている *RIN/rin* 遺伝子型トマトの解析に最新の成熟研究の進歩を取り込みながら、成熟制御機構に関する研究に独自の視点で切り込んでいき、最終的には成熟を自由にコントロールできるような手法の開発に挑みたい。成熟の制御機構は多くの果実類・果菜類で共通であるので、その応用範囲は非常に広い。成熟のコントロールによって、おいしさが長持ちする果実、機能性成分が高蓄積する果実、あるいはアレルギーを持つ人も安心して食べられる果実の開発等につながる研究を展開していければ、と考えている。

(食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能制御ユニット 伊藤 康博)

参考文献

- 1) Kitagawa, M., Moriyama, T., Ito, H., Ozasa, S., Adachi, A., Yasuda, J., Ookura, T., Inakuma, T., Kasumi, T., Ishiguro, Y. and Y., I., Reduction of allergic proteins by the effect of the ripening inhibitor (*rin*) mutant gene in F₁ hybrid of the *rin* mutant tomato. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1227-1233 (2006).

- 2) Kitagawa, M., Ito, H., Shiina, T., Nakamura, N., Inakuma, T., Kasumi, T., Ishiguro, Y., Yabe, K. and Ito, Y., Characterization of tomato fruit ripening and analysis of gene expression in F₁ hybrids of the *ripening inhibitor (rin)* mutant. *Physiol Plant*, 123, 331-338 (2005).
- 3) Kitagawa, M., Nakamura, N., Usuda, U., Shiina, T., Ito, H., Yasuda, J., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Kasumi, T. and Y., I., Ethylene biosynthesis regulation in tomato fruit of F₁ hybrid of the ripening inhibitor (*rin*) mutant. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1769-1772 (2006).
- 4) Smith, C. J. S., Watson, C. F. S., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W. and Grierson, D., Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334, 724-726 (1988).
- 5) Schuch, W., Kanczler, J., Robertson, D., Hobson, G., Tucker, G., Grierson, D., Bright, S. and Bird, C., Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience*, 26, 1517-1520 (1991).
- 6) Smith, D. L., Abbott, J. A. and Gross, K. C., Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol*, 129, 1755-1762 (2002).
- 7) Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B. and Dunsmuir, P., Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11, 2203-2216 (1999).
- 8) Bleumink, E., Berrens, L. and Young, E., Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. II. Further chemical characterization of the purified allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 31, 25-37 (1967).
- 9) Hamilton, A. J., Lycett, G. W. and Grierson, D., Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346, 284-287 (1990).
- 10) Oeller, P. W., Lu, M. W., Taylor, L. P., Pike, D. A. and Theologis, A., Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254, 437-439 (1991).
- 11) Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J. and Klee, H. J., An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science*, 270, 1807-1809 (1995).
- 12) Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. and Giovannoni, J., A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *ripening-inhibitor (rin)* locus. *Science*, 296,

343-346 (2002).

- 13) 伊藤寿朗, 花の形づくりを制御する遺伝子ネットワーク, 蛋白質核酸酵素, 50, 228-238
- 14) Tigchelaar, E. C., McGlasson, W. B. and Buescher, R. W., Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience*, 13, 508-513 (1978).
- 15) Barry, C. S., Llop-Tous, M. I. and Grierson, D., The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol*, 123, 979-986 (2000).
- 16) Kondo, Y., Urisu, A. and Tokuda, R., Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*, 126, 294-299 (2001).
- 17) Westphal, S., Kolarich, D., Foetisch, K., Lauer, I., Altmann, F., Conti, A., Crespo, J. F., Rodriguez, J., Enrique, E., Vieths, S. and Scheurer, S., Molecular characterization and allergenic activity of Lyce 2 (beta-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *Eur J Biochem*, 270, 1327-1337 (2003).
- 18) Takahashi, K., Banba, H., Kikuchi, A., Ito, M. and Nakamura, S., An induced mutant line lacking the a-subunit of b-conglycinin in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Breeding Science*, 44, 65-66 (1994).
- 19) Tada, Y., Nakase, M., Adachi, T., Nakamura, R., Shimada, H., Takahashi, M., Fujimura, T. and Matsuda, T., Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett*, 391, 341-345 (1996).
- 20) Dodo, H., Konan, K. and Viquez, O., A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*, 5, 67-73 (2005).
- 21) 近藤康人, 徳田玲子, 宇理須厚雄, スギ花粉症とトマトの oral allergy syndrome. アレルギー・免疫, 8, 866-872 (2001)
- 22) Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Hino, K., Taniguchi, Y., Fukuda, S., Usui, M. and Kurimoto, M., Molecular cloning of the second major allergen, Cry j II, from Japanese cedar pollen. *FEBS Lett*, 353, 124-128 (1994).