



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 182 回例会

講演要旨集

受賞講演
2018年度農芸化学技術賞，農芸化学企画賞
および
ミニシンポジウム
糖質に関わるタンパク質、酵素の構造と機能
—過去から未来へ—

平成 30 年 6 月 9 日（土）
三重大学大学院生物資源学研究科大講義室

主催：日本農芸化学会中部支部
共催：三重大学大学院 生物資源学研究科

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部

第 182 回例会

平成 30 年 6 月 9 日 (土)

三重大学大学院生物資源学研究科大講義室

主催：日本農芸化学会中部支部

共催：三重大学大学院 生物資源学研究科

13 : 00-13 : 10 開会挨拶

受賞講演 2018 年度農芸化学技術賞

13 : 10-13 : 40 「地域資源を活かした速醸魚醤類の開発と商品化」

宇多川 隆・白崎 裕嗣・森山 外志夫・片口 敏昭 (福井県
食品加工研究所・株式会社室次・有限会社もりやま・有限会社片
口屋)

受賞講演 2018 年度農芸化学研究企画賞

13 : 40-14 : 10 「筋分化を誘導する乳酸菌オリゴ DNA の生体内作用の実証」

高谷 智英 (信州大学農学部)

14:10-14:30 休憩

ミニシンポジウム 糖質に関わるタンパク質、酵素の構造と機能

-過去から未来へ-

14:30-15:00 「バイオマス分解に関わるモジュラー酵素とセルロソームの機能」

栗冠 和郎 (三重大学大学院生物資源学研究科)

15:00-15:30 「グルコアミラーゼのデンプン結合ドメインの構造と SS 結合の役割」

田中 晶善 (三重大学大学院生物資源学研究科)

15:30-16:00 「ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* と *Bacteroides plebeius* のキシ
ラナーゼの機能解析」

林 秀兼 (前橋工科大学工学部)

16:00-16:30 「微生物由来キチン分解モノオキシゲナーゼの構造安定性」

杉本 華幸 (新潟大学農学部)

17:00-19:00 懇親会 (三重大学生協 第 1 食堂)

地域資源を活かした速醸魚醤類の開発と商品化

宇多川 隆（福井県食品加工研究所特別研究員、福井県立大学名誉教授）

白崎 裕嗣（株式会社室次 代表取締役）

森山 外志夫（有限会社もりやま 代表取締役社長）

片口 敏昭（有限会社片口屋 専務取締役）

はじめに

魚の内臓は重量の約 20%を占め多くは廃棄されている。福井県の伝統的発酵食品として知られるサバの糠漬け「へしこ」の生産においても、最初の工程は内臓を除去することにある。我々は、副生する内臓が良好なタンパク質を含むことに着目し、発酵することによって魚醤を生産することを目的として研究を始め、効率的に生産する方法（速醸法）を開発するに至った。速醸法を利用し、北陸 3 県（福井、石川、富山）において特徴ある魚醤類の生産と商品化を実現した。

速醸発酵法の開発

サバの内臓を原料として、伝統的な魚醤発酵法（高濃度食塩・長時間発酵）で試作したが、塩辛く、臭もあって実用化できなかった。そこで、サバ幽門垂から抽出した蛋白質分解活性を有する粗酵素を用いて検討した結果、食塩濃度が高くなると急激に分解活性（魚醤生産活性）が低下することを認めた。一方、高温で発酵すると分解活性の向上とともに雑菌の増殖が制御された。この知見に基づき魚醤の実生産を検討したところ、55℃で雑菌増殖を制御し、食塩無添加で発酵すると、24 時間で長時間発酵して得られる魚醤とほぼ同じ濃度のアミノ酸の生成を認めた。発酵終了後、ろ過・加熱処理・油と未分解沈殿物の除去にて“無塩サバ魚醤”を調製した。食塩を添加後生成する澱を除去して魚醤を得るプロセスを「速醸魚醤発酵法(速醸法)」とした。速醸法は発酵速度が早く、設備生産性が高いこと（少投資）や、原料評価や条件検討結果が短期間で得られる利点を有している。

速醸法の特徴を活かした商品開発

- ① 原料多様化: サバ以外にもブリ、メギス、ニシン、マグロ、タイ、イワシなどは加工副生物をアユやアジ、アンチョビなどは魚全体を原料として、各々対応する魚醤を調製した。

サバ魚醤はサバ加工工場の副生物を原料にして、(株) 室次によって 24 時間の発酵で生産し「鯖しょうゆ」として販売している。おでんやラーメンなどの調味液として利用されている。

ブリ魚醤は富山湾で捕獲されるブリの内臓を原料とし、(有) 片口屋によって 72 時間の発酵で生産し「鰯醤」として販売している。味に深みがあり、2015 年のブランド 100 選に選ばれている。2017 年には“明日のとやまブランド”にも選ばれた。

メギス魚醤は石川県七尾のメギス加工工場が副生する内臓等を原料にして、(有) もりやまによって 24 時間の発酵で製造し、「めぎす魚醤こいくち」として販売している。メギスの場合、静置発酵では酪酸などの不快臭の生成を認めた。これらは嫌気状態で生成する化合物であり、攪拌発酵によって空気を巻き込む工夫をすることによって臭の問題を解決し販売に至った。

- ② 減塩: 食塩は最終工程で添加するので、濃度はニーズに応じて加減できる。食塩を含まない“無塩魚醤”の生産も可能である。(株) 室次では、無塩サバ魚醤に醤油をほぼ 1 : 1 でブレンドし塩分濃度を約 8.5%とした減塩魚醤油を生産し、「旨醤」として販売している。「旨醤」には、醤油と魚醤由来のアミノ酸が両者のほぼ平均濃度含まれているだけでなく、サバ由来のタウリンやペプチドも含み、健康志向の方に愛用されている。この「旨醤」を粉末化した「黄金ソルト」は旨みが強いだけでなく、持ち運び等の利便性に優れており好評である。「旨醤」に漬けた魚の「一夜干し」は、醤油漬けに比べ塩分が少なく東京ビジネスサミット大賞 2013 で準賞を受賞した。

- ③ **減臭**:油分除去工程によって油酸化による不快臭の生成が殆どない。従って、他食材とブレンドすることにより様々な新しい加工食品の調製が可能である。福井県小浜の(有)タカノではサバ魚醬に米麴を添加し、再発酵することによって旨味を強化した「鯖こうじ」を生産販売している。また、「鰯醬」を使った「鰯醬油仕立て バイ貝入り炊き込みご飯の素」は地域に根ざした商品として成長しつつある。不快臭の無い「黄金ソルト」を使った焼菓子メレンゲは「ピュアロッシュ」として販売しており、香ばしい風味が感じられて好評である。
- ④ **ノンアルコール**:発酵が高温で短時間であるために酵母が生育できず、アルコールは全く生成されない。アルコールを口にすることが禁じられているイスラムの人々向けの調味液として適しており、ハラール認証を得た醤油風魚醬「福むらさき」を開発し、販売に至っている。
- ⑤ **低ヒスタミン**:高温短時間発酵ではヒスタミン生成菌の生育はなく、発酵中にヒスタミンの生成は認められない。我々は、タイ国カセサート大学の協力を得て、現地でアンチョビを調達し、速醸ナンプラーを試作した。4日間の発酵で得られた速醸ナンプラー中のヒスタミン濃度は市販品に比べて極めて低いことを確認している。
- ⑥ **無塩粗魚醬・魚醬粕**:食塩は魚醬生産工程の後半に添加するため、魚醬生産途中で生成する粗魚醬や魚醬粕には食塩はほとんど含まれていない。従って、塩分を嫌う肥料や飼料として利用することが出来る。無塩サバ粗魚醬を花壇に施肥すると花付きがよくなることを認めている。

おわりに

伝統的な手法（高濃度食塩添加・長時間発酵）で生産されてきた魚醬を、高温発酵によって雑菌を制御し、食塩無添加で活性を高めることによって極めて短時間で調製する方法（速醸法）を確立した。本法を利用し、地域の企業とともに、地域の魚加工工場副生物を原料として様々な速醸魚醬類を開発し商品化してきた。

一方で、伝統的な手法で作られている魚醬は特有の風味を呈し、地方の食文化を形成している。今回開発した速醸魚醬は伝統的な魚醬と拮抗するものではなく、地域の資源を活用した新しい調味液として利用されることを期待している。

速醸法の開発過程で、アミノ酸の遊離に関して幾つかの興味ある知見を得ている。例えば、カタクチイワシを原料とするナンプラーの生産では、発酵直後には著量生成しているアルギニンが経時的に急速に減少することを観察している。サバやブリではこのようなことは認められない、極めて興味ある現象である。このように古典発酵は新しい研究課題の宝庫でも考えている。

略歴

宇多川 隆（うたがわ たかし）：1974年京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了、味の素（株）取締役発酵技術研究所長、クノール食品（株）代表取締役社長、福井県立大学教授・副学長を経て現職。**白崎 裕嗣**（しらさき ひろつぐ）：1982年慶応義塾大学工学部機械工学科卒業後現職。**森山 外志夫**（もりやま としお）：1971年東洋大学経営学部経営学科卒業後、現職。**片口 敏昭**（かたぐち としあき）：1977年石川県立輪島高校普通科卒業後、現職。

筋分化を誘導する乳酸菌オリゴ DNA の生体内作用の実証

高谷 智英（信州大学農学部）

はじめに

超高齢社会を迎えた日本では、平均寿命（女性 87.1 歳、男性 81.0 歳）と健康寿命（女性 74.8 歳、男性 72.1 歳）の乖離が大きく、本人の QOL の低下や、介護や医療保険などの深刻な社会・経済問題の一因となっている。要介護状態となる最大の理由の一つとして、運動器の障害（ロコモティブ症候群）が挙げられる。中でも、加齢に伴う筋力・筋量の減少を加齢性筋萎縮（サルコペニア）といい、その予防法の確立が強く求められている。

骨格筋の恒常性は、骨格筋幹細胞が活性化した筋芽細胞（筋前駆細胞）の増殖と分化によって維持されるが、加齢とともに筋芽細胞の分化能は減弱することが報告されている。そこで我々は、ロコモティブ症候群を予防する食品素材の開発を目的に、筋芽細胞の分化を亢進する生物活性物質をスクリーニングを行った。その結果、ヒト腸内に存在し、ヨーグルトにも利用される乳酸菌のゲノム配列に由来するオリゴ DNA が、きわめて強力に筋分化を誘導することを発見した（国際特許出願中）。

本講演では、筋分化誘導型オリゴ DNA の作用と、その応用に向けた展望を紹介する。

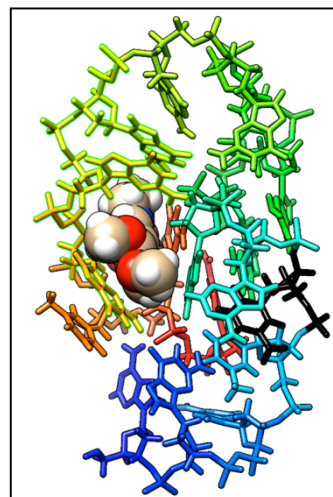
myoDN の同定と作用

乳酸菌などの腸内細菌のゲノムに由来するオリゴ DNA は、その配列に応じて多彩な免疫調節作用を発揮することが知られている。しかし、非免疫系の組織や細胞に作用するオリゴ DNA の報告はなかった。我々は、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来するオリゴ DNA ライブラリを用い、マウス筋芽細胞に対する作用をスクリーニングした結果、骨格筋分化の最終分化マーカーであるミオシン重鎖の発現を強力に誘導する一連の新規オリゴ DNA を見出し、**myoDN**（myogenic oligodeoxynucleotide）と命名した。

myoDN の筋分化促進作用は熱変性によって失われることから、その活性には立体構造が重要であることが考えられた。myoDN はテロメア配列を有するが、分子シミュレーションによる構造解析の結果、このテロメア配列の一部が myoDN の活性に重要であることが示唆された。

また、生薬由来のアルカロイドである**ベルベリン**は、テロメア配列に結合して DNA の構造を変化させることが報告されている。実験の結果、ベルベリンは myoDN と結合し、その筋分化促進活性を顕著に増強することがわかった。現在、myoDN-ベルベリン複合体（図）の構造活性相関、標的タンパク質、作用機序の詳細を解析中である。

myoDN-ベルベリン複合体の構造計算結果
（信州大学・梅澤公二先生による）



myoDN の応用展開

骨格筋分化を強力に誘導する myoDN は、ロコモティブ症候群に対する予防効果を示す機能性食品素材としての活用が期待される。その他にも、食肉の増産に資する家畜飼料や、横紋筋肉腫に対する核酸医薬品としての応用可能性も検討しているので、以下に紹介する。

myoDN によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導

世界人口の増加に伴い、食肉の生産量・消費量は年々増加している。ブロイラーなどの肉用鶏は鶏肉生産に特化した品種で、その筋芽細胞は活発な増殖・分化能力を示すが、鶏肉の増産のために、さらなる飼料要求率の改善が求められている。我々の実験では、マウス筋芽細胞に対する作用と同様に、myoDN はニワトリ筋芽細胞の分化を誘導することが明らかになった。一般的に、複数の動物種で活性を示すオリゴ DNA は少数だが、myoDN は哺乳類と鳥類という大きく離れた動物種で同様の作用を示した。myoDN は、家畜用飼料配合物として、ニワトリ、ウシ、ブタなどの食肉増産への貢献が期待される。

myoDN によるヒト横紋筋肉腫の増殖抑制

横紋筋肉腫は小児で最も頻度の高い軟部悪性腫瘍であり、治療法も確立されていない。横紋筋肉腫の一部は筋芽細胞が起源であることから、筋分化を誘導することで細胞周期を停止させることにより、肉腫の増殖・転移が抑制できると考えられている。複数のヒト横紋筋肉腫の培養細胞株に myoDN を投与した結果、いずれの株においても細胞増殖が抑制されることを認めた。また、myoDN 投与群では骨格筋マーカー遺伝子の発現量が上昇した。myoDN には、横紋筋肉腫に対する新規核酸医薬としての可能性が期待される。

謝辞

本研究に多大なご協力を下さいました、信州大学菌類・微生物ダイナミズム創発研究センターの下里剛士先生、信州大学バイオメディカル研究所の梅澤公二先生、信州大学農学部 鏡味裕先生・小野珠乙先生、そして研究室の学生諸氏に心より感謝申し上げます。

略歴

高谷 智英（たかや ともひで）

2005 年 岡山大学大学院 自然科学研究科 修了

2005 年 国立病院機構 京都医療センター 研究員

2011 年 京都大学大学院 医学研究科 修了 博士（医学）

2011 年 国立循環器病研究センター研究所 研究員

2013 年 ミネソタ大学 医学部 幹細胞研究所 博士研究員

2015 年 信州大学 農学部 助教（現職）

Mail: ttakaya@shinshu-u.ac.jp

URL: <http://t-takaya.net/>

バイオマス分解に関わるモジュラー酵素とセルロソームの機能

栗冠 和郎（三重大大学 大学院生物資源学研究科）

温室効果ガスの排出量抑制のため、様々な再生可能エネルギーの利用の促進が課題であり、バイオマスエネルギーの利用もその一つである。ここでは、植物性バイオマスの分解過程に関わる酵素の中で、複数の機能モジュールからなるモジュラー酵素とセルラーゼ・ヘミセルラーゼ複合体（セルロソーム）の機能解析の結果について紹介する。

1. モジュラー酵素の機能解析

セルラーゼなどの糖質分解酵素の多くは、複数のモジュール（部品）からなるモジュラー酵素である。*Tricoderma reesei*などの糸状菌由来のセルラーゼは触媒活性を担う糖質加水分解酵素（GH）モジュールとファミリー1の糖質結合モジュール（CBM1）から構成されるのが普

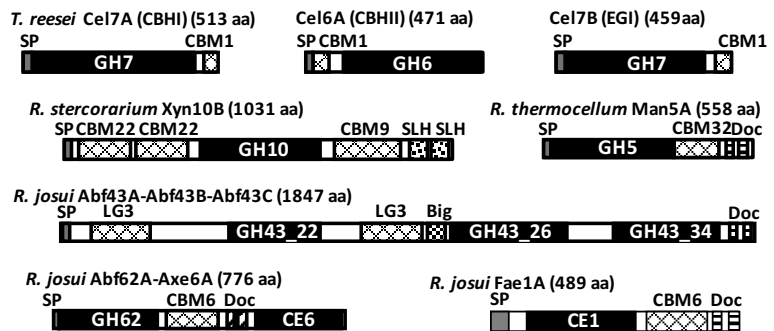


図 1. 幾つかのモジュラー酵素の模式図

通であり、比較的単純なモジュラー構造を持つ（図 1）。CBM の重要性については、CBM を除去することにより、酵素の結晶性セルロースや不溶性基質に対する活性が大きく低下することにより示されている。一方、細菌由来の糖質分解酵素には、GH と CBM の他、複数のモジュールにより構成される酵素が多数存在する（図 1）。

Ruminiclostridium stercoarium Xyn10B は、キシラナーゼ活性を担う GH10 のほか、2つの CBM22、CBM9 及び2つの SLH モジュールからなるモジュラー酵素である（図 1）[1]。2つの CBM22 と GH10 を含む酵素（CBM22-GH10）と GH10 のみからなる酵素を発現させ、それらの酵素特性を比較すると、両者のキシランに対する K_m 、 V_{max} 値には大きな差はなかった。しかし、大麦 β -グルカン（ β -1,3-1,4 グルカン）に対する分解能を比較すると、GH10 のみでは全く活性がないのに対して、CBM22-GH10 は高い活性を示し、大麦 β -グルカンに対する V_{max}/K_m 値はキシランに対する V_{max}/K_m 値の約 8 倍であった。これは、CBM が不溶性基質への結合だけでなく、酵素の基質特異性に大きな影響を及ぼすことを示す例である [2]。また、CBM22 を除去することにより、Xyn10B の至適温度及び熱安定性が低下した。DSC 分析の結果は、CBM22 と GH10 のモジュール間の相互作用が Xyn10B の熱安定性に寄与することを示唆した。さらに、Xyn10B が分子中の SLH モジュールを介して *R. stercoarium* の細胞表層に結合すると同時に、同分子中の CBM がセルロースへ結合することにより、*R. stercoarium* 細胞はセルロースへ結合することが実験的に示された（図 2）。

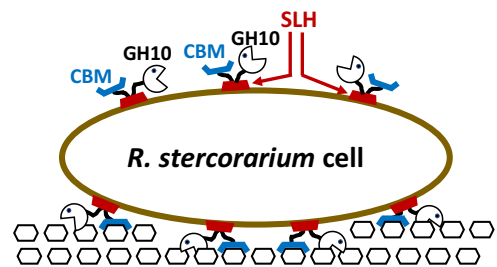


図 2. Xyn10B のセルロース結合タンパク質としての働き

Ruminiclostridium thermocellum Man5A は GH5、CBM32 及びドックリンから構成される。

Man5A と CBM3 を除去した酵素の比較から、CBM32 はマンナンに対する結合能を持ち、不溶性マンナンに対する活性を高めることが示された。さらに、CBM32 は GH5 と共に基質結合部位を形成し、触媒作用に直接関与することが示唆された [5, 6]。

これらの結果は、モジュラー酵素において各モジュールは必ずしも独立して働くのではなく、モジュール間の相互作用により新たな性質を発揮することを示唆する。

2. セルロソームの機能解析

セルロソームは、嫌気性細菌が作るセルラーゼ複合体であり、触媒活性を持たない骨格タンパク質のコヘシンモジュールに触媒サブユニットのドックリンモジュールが特異的に結合することにより形成される。コヘシンとドックリンの結合は極めて特異性が高く、その解離定数は 10^{-10} のレベルである [7]。セルロソームの機能解析には、骨格タンパク質の大腸菌による発現が難しいことから、主としてミニ骨格タンパク質を用いる方法が用いられてきた。また、無細胞タンパク質合成系を用いる方法によっても成果が得られている



図3. *R. thermocellum* セルロソームの模式図

[8]。我々は、*Ruminiclostridium josui* の骨格タンパク質の大腸菌による発現に成功し、このタンパク質と数種類の触媒サブユニットとの複合体形成実験によりセルロソームの機能解析を行った。その結果、天然基質を用いたとき、セルロース分解に関しては骨格タンパク質の CBM3 が重要であるが、キシラン分解には CBM が阻害的に働くこと、同じ酵素を骨格タンパク質上に複数並べたときに活性促進効果（近接効果）は見られなかった。近接効果の有無は、酵素の種類に依存すると思われる [9, 10]。

- [1] MK Ali *et al*, *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 41 (2001). [2] R Araki *et al*, *FEBS Lett*, 561, 155 (2004). [3] MK Ali *et al*, *FEMS Microbil Lett*, 198, 79 (2001). [4] G Zhao *et al*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 70, 464 (2006). [5] K Mizutani *et al*, *Appl Environ Microbiol*, 78, 4781 (2012). [6] K Mizutani *et al*, *FEBS Lett*, 588, 1726 (2014). [7] S Jindou *et al*, *J Biol Chem*, 279, 9867 (2004). [8] H Hirano *et al*, *Sci Rep*, 6, 35709 (2016). [9] T Orita *et al*, *Enz Microb Technol*, 97, 63 (2016). [10] T Orita *et al*, *Enz Microb Technol*, 104, 37 (2017).

略歴

栗冠 和郎（さっか かずお）

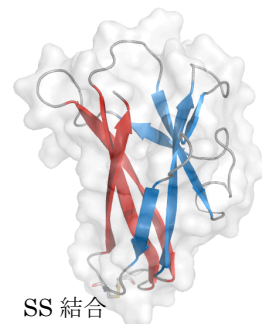
1977	東北大学	農学部農芸化学科	卒業
1979	東北大学	大学院農学系研究科農芸化学専攻博士前期課程	修了
1982	東北大学	大学院農学系研究科農芸化学専攻博士後期課程	修了
1982	三重大学	農学部	助手
1985~1986	米国	Uniformed Services University of the Health Sciences	博士研究員
1987	三重大学	農学部	講師
1989	三重大学	生物資源学部	助教授
1995	仏国	パスツール研究所	文部科学省在外研究員
2004	三重大学	生物資源学部	教授
2018	三重大学	生物資源学研究科	特任教授

グルコアミラーゼのデンプン結合ドメインの構造と SS 結合の役割

田中晶善（三重大学大学院生物資源学研究科）

はじめに *A. niger* グルコアミラーゼの C 末端には、糖質結合モジュールのファミリー20 に属するデンプン結合ドメイン (SBD) があり、110 残基の球状タンパク質 (図 1) として単離できる。単離した SBD 分子のほぼ両端を結ぶようにジスルフィド結合 (SS 結合、C3-C98) がある。本講演ではこの SS 結合が構造安定性や構造形成に与える効果について述べる。対象としたタンパク質は、野生型の SBD (**WT** と略記) と、その Cys3 と Cys98 を Gly や Ser で置換した C3G/C98G (**GG**)、および C3S/C98S (**SS**) である。

SBD 分子では 8 本の β ストランドが二枚の β シートを形成している。**WT** と変異型 SBD の高次構造はほぼ同一であるが、**WT** の SS 結合周辺の構造は天然状態 (フォールド状態) でも大きく揺らいでいる。また SBD には基質結合部位が二か所あり、基質アナログである β -シクロデキストリン (β CD) がそれ



ぞれの部位に結合する。 β CD の結合の熱力学量は 3 種の SBD ではほぼ同じで、**GG** と **SS** の間でも差がない (置換アミノ酸の側鎖の性質の違いが影響しない) ことも考え併せると、SS 結合の有無は天然状態の SBD の構造や機能に有意の影響をもたないと考えられる。

図 1 野生型 SBD の立体構造
主に、左側の β シートは分子内部、右側は分子表面にある。

平衡論的効果 図 2 (A、C、E) は、3 種の SBD の熱変性に伴う比熱の変化を DSC で測定した結果である。変性はいずれも可逆的であった。変異型 SBD は **WT** に比べて変性温度が約 10°C 低下した。**GG** と **SS** の間で有意の差はなかった。変性の熱力学量を **WT** の変性温度 (53°C) で比較すると、エンタルピー変化は SS 結合の欠損によりむしろ増大 (変異型の安定化に寄与) するが、これを上回るエントロピー変化の増大 (不安定化に寄与) があり、その結果、変異型では変性のギブズエネルギー変化 ΔG^0 として約 10 kJmol⁻¹ の不安定化が起きていた。また天然状態と変性 (アンフォールド) 状態の比熱の差 ΔC_p は、変異型では **WT** の概ね 2 倍であった。

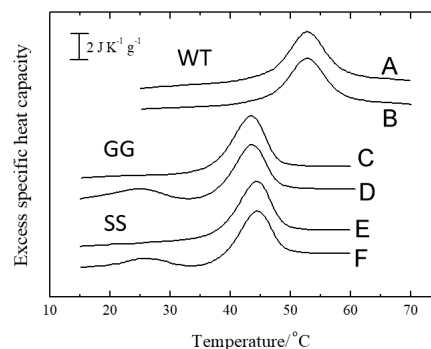


図 2 SBD 熱変性の DSC 曲線
B、D、F は、それぞれ A、C、E の走査後急冷し再走査して得られた結果。pH7。昇温速度 1Kmin⁻¹。

塩酸グアニジンによる変性では、変性の中間濃度が **WT** で 3.8M であったのに対して **GG** では 1.8M であった (pH7、25°C)。変性剤濃度ゼロへ補外した時の変性の ΔG^0 の値は DSC から得られた値と概ね一致した。変性剤濃度に対する ΔG^0 の傾き m の値は、**GG** が **WT** の 1.4 倍大きく、熱変性の場合と同様、変性に際して溶媒に露出する面積が **GG** では **WT** より大きいことが示唆された。6.6M 塩酸グアニジン共存下での X 線小角散乱からは、変性状態での **WT** 分子の慣性半径の値として約 26 Å が得られた。この値は 110 アミノ酸残基のタンパク質がランダムコイルをとるとしたときに期待される値 32 Å より小さく、分子のほぼ両端にかかる SS 結合が変性状態での分子の広がりを制限していると考えられた。

以上の結果より、SS 結合の欠損は天然状態の構造やエネルギー準位には影響せず、変性状態のエントロピーを大きくすることによって変性状態を安定化させ、相対的に天然状態を不安定化する (変性の ΔG^0 を小さくする) ものと考えられる。

速度論的効果 DSC 測定（図 2）において、昇温走査後急冷し、ただちに再走査すると、**WT** では初回と同じ結果が得られたが（B）、変異型の場合は 25℃付近に新たな小さいピークが観測された（D、F）。この小ピークは、高温からゆっくり冷却したり、急冷後 1 日置いたりしてから再走査すると消失した。急冷した **GG** 溶液の ^1H -NMR および円二色性（CD）を 5℃で測定したところ、わずかながら天然状態とは明確に異なるスペクトルが得られた。さらにこの急冷溶液を一旦 31℃にしてから再度 5℃で測定すると天然状態と全く同じ結果が得られた。これらのことから、変異型タンパク質では高温から急冷すると、天然状態と構造が類似であるが異なり、エネルギー的に準安定な状態（中間体 I）にトラップされることがわかった。中間体 I には天然状態と概ね同等の熱力学量で β CD が結合することから、I はモルテングロビュールとも異なることが示唆された。

図 3 は、高温から急冷した **GG** の Ala17 の主鎖 NH について得られた ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルで、時間経過に伴って中間体 I に由来するシグナルが消失し、天然状態 N に由来するシグナルが出現する様子が見られた。I から N への転移の半減期は、I 由来シグナルの消失速度、N 由来シグナル出現速度のいずれによって評価しても、5℃でおよそ 11 時間

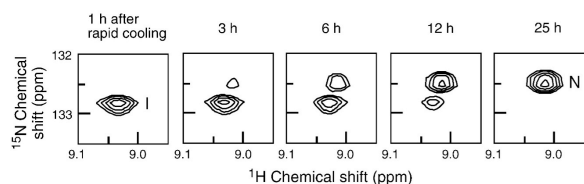


図 3 高温から急冷した **GG** の Ala17 主鎖 NH について得られた ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの経時変化。I は中間状態、N は天然状態由来。

であり、活性化ギブズエネルギー $\Delta G^\ddagger$ としてはおよそ 100kJmol^{-1} という大きな値であった。これらの値は 21 か所の主鎖 NH およびトリプトファン残基側鎖 NH について共通であり、転移が分子の広範囲にわたる協同的コンフォメーション変化を伴うものであることが示された。この中間体では、分子内部疎水性コアのパッキングは天然状態と同じであるが、分子表面に存在する疎水性クラスター（図 2 では右上の部分）のパッキングが異なっていることが判明した。[本パラグラフの結果は文献 5 から引用。]

以上より、SBD の SS 結合は天然状態の構造やエネルギー準位には影響しないが、立体構造形成時に分子表面の疎水性残基が適切な配向をとることに寄与しているものと考えられた。

なお、変性剤変性では、その速度論的な解析（シェブロンプロット）から、**GG** だけでなく **WT** でも中間体が存在し、SS 結合はその中間体を不安定化させる（“溜まり”にくくする）ことが示唆されている。

関連文献

(1) A. Tanaka *et al*, *J Biochem*, **117**, 1024-1028, 1995. (2) A. Tanaka *et al*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 2127-2132, 1998. (3) H. Sugimoto *et al*, *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 1535-1541, 2007. (4) H. Sugimoto *et al*, *Protein Science*, **18**, 1715-1723, 2009. (5) H. Sugimoto *et al*, *J Mol Biol*, **412**, 304-15, 2011. (6) Ohta *et al*, *Biochim Biophys Acta*, **1864**, 1464-1472, 2016. (7) Y. Suyama *et al*, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, **73** (Pt 10), 550-554, 2017. (8) Y. Masuda *et al*, *Netsu Sokutei (Calorimetry and Thermal Analysis)*, **44**, 135-138, 2017

略歴

田中 晶善（たなか あきよし）

学歴 1977 年 京都大学農学部食品工学科卒業／1982 年 京都大学大学院農学研究科修了（酵素化学）

職歴 1982 年 三重大学教育学部／1997 年 同 生物資源学部 現在に至る

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* と *Bacteroides plebeius* のキシラナーゼの機能解析

林 秀謙（前橋工科大学 工学部 生物工学科）

はじめに

食物繊維は消化、吸収を受けることなく大腸に達し、腸内細菌のセルラーゼ、キシラナーゼなどの糖質加水分解酵素の分解を受け、酪酸、酢酸などの短鎖脂肪酸に変換される。短鎖脂肪酸は宿主に吸収されエネルギー源として利用される。特に酪酸は発ガン、炎症性腸疾患の抑制、腸管上皮細胞の発達と代謝に重要な役割を果たしている。また、酢酸は肥満を防ぐ機能を有することも明らかとなってきた。しかしながら、ヒト腸内における食物繊維分解に関与する糖質加水分解酵素の研究されているのは *Bacteroides intestinalis*、*Bacteroides ovatus*、*Bacteroides xylanisolvens*、*Ruminococcus champanellensis* などの数菌種のみである。さらにヒト腸内細菌における食物繊維分解に関わる糖質加水分解酵素の機能と酵素特性を明らかにする必要がある。ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* と日本人の腸内に特有に生息する *Bacteroides plebeius* のキシラナーゼについて解説する。

1. *P. copri* CB7^T のキシラナーゼについて

P. copri CB7^T (=JCM 13464^T) は日本人の成人男性より分離を行い、2007 年に新種提唱をした菌種である。キシランを炭素源として培養を行い、活性染色を行ったところ、約 40 kDa と約 80 kDa の 2 つの主要なキシラナーゼを検出した。ゲノム DNA 配列を検索したところ、2 つのキシラナーゼ遺伝子の存在が明らかとなった。一つはファミリー10 の触媒ドメイン単独なる分子量 37 kDa のキシラナーゼ (PcXyn10A)、もう一方はファミリー10 の触媒ドメインが 2 つの糖質結合モジュール (CBM) で分断された分子量 82 kDa のキシラナーゼ (PcXyn10B) であった (図 1)。PcXyn10A 遺伝子上流にはキシローストランスポーター (*xynT*) が、下流にはキシロシダーゼ遺伝子 (PcXyl43A) が存在し、オペロンを形成していた (図 1)。PcXyn10A および PcXyn10B の発現を活性染色および RT-PCR で行ったところ、キシラン、セロビオース培養時に高い発現を示したが、キシロース、グルコース培養時は発現が抑制されていた。さらに PcXyn10B の 2 つの CBM について解析を行った。前半の CBM (CBM-1) はキシランに対する吸着は非常に弱いものであったが、後半の CBM (CBM-2) はオートスペルトキシランへの K_a は $32.8 \mu\text{M}^{-1}$ 、最大結合量([PX_{max}]) は $55.2 \mu\text{mol/g}$ であった。これらの値は、既に報告され

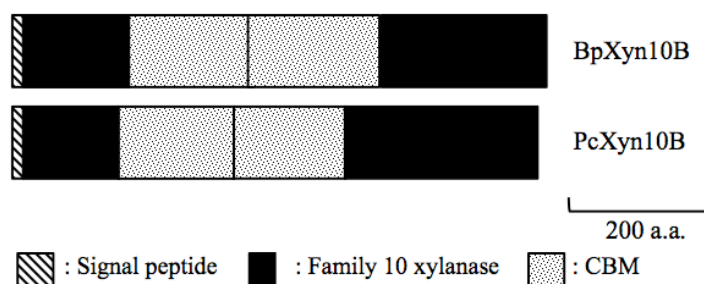


図1. *P. copri* のPcXyn10Bと*B. plebeius*のBpXyn10Bのモジュール構造

ている CBM と同程度であった。さらに PcXyn10B の CBM を欠失した変異型 PcXyn10B を構築したところ、Km 値が増加し、基質との親和性が低下していたので、PcXyn10B の CBM は基質との結合に関与していると推定される。また、変異型 PcXyn10B は加熱後、冷却を行うことでキシラナーゼ活性が回復することが明らかとなった。

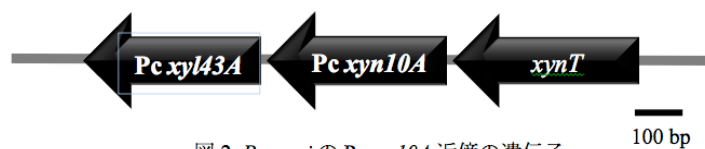


図 2. *P. copri* の *PcXyn10A* 近傍の遺伝子

2. *B. plebeius* JCM 12973^T のキシラナーゼについて

B. plebeius JCM 12973^T は海藻由来多糖分解に関連する遺伝子を多数保有している。これは日本人が古代から海藻を生食していたため、ヒト腸内で海藻に付着した海洋細菌の海藻由来多糖分解酵素遺伝子が腸内細菌に水平伝播したのではないかと考えられている。*B. plebeius* はキシラナーゼ遺伝子も保有している。活性染色の解析により約 40 kDa、と約 80 kDa の 2 つの主要なキシラナーゼが検出された。ゲノム DNA 配列を検索したところ、2 つのキシラナーゼと推定される遺伝子が存在していた。約 40 kDa (BpXyn10A) のキシラナーゼはファミリー 10 に属する単独の触媒ドメインから構成されていた。一方、約 80 kDa (BpXyn10B) のキシラナーゼはファミリー 10 に属する触媒ドメインが 2 つの CBM で分断されていた (図 1)。*B. plebeius* は系統的に *P. copri* と近い関係にあることから、構造が類似したキシラナーゼを保有していると思われる。活性染色から BpXyn10A と BpXyn10B はキシラン、キシロース、グルコース培養時に発現していた。BpXyn10A については大腸菌で発現させ、その性質を解析したところ、*P. copri* の PcXyn10A の性質と類似していた。今後、両菌種のキシラナーゼについてさらなる解析が必要である。

略歴

林 秀謙 (はやし ひでのり)

1999 年 三重大学大学院 生物資源学研究科 生物機能応用科学専攻 博士後期課程修了

1999 年 博士 (学術) (三重大学、大宮邦雄教授)

1999 年 農林水産省 食品総合研究所 開放的融合研究 研究員

1999 年 農林水産省 食品総合研究所 生研機構 研究員

2000 年 理化学研究所 生物基盤研究部 微生物分類室 協力研究員

2001 年 理化学研究所 生物基盤研究部 微生物分類室 基礎科学特別研究員

2004 年 理化学研究所 微生物機能解析室 協力研究員

2004 年 理化学研究所 理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室 協力研究員

2006 年 前橋工科大学 工学部付 講師

2007 年 前橋工科大学 工学部 生物工学科 講師

2010 年 前橋工科大学 工学部 生物工学科 准教授

受賞歴

2004 年 日本ビフィズス菌センター研究奨励賞

微生物由来キチン分解モノオキシゲナーゼの構造安定性

杉本 華幸（新潟大学農学部）

はじめに

多糖モノオキシゲナーゼ（lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO）は、2010年に機能が明らかになった新しい酵素で [Vaaje-Kolstad *et al. Science* **330**, 219-222 (2010)], セルロースやキチンなどの結晶性多糖のグリコシド結合を酸化分解する。LPMOの作用により、基質の結晶表面上に新たに還元（非還元）末端が生じる。これらの末端にセルラーゼやキシナーゼなどの糖質加水分解酵素が作用することで、結晶性多糖の分解が効率的に進むことから、LPMOは結晶性多糖バイオマス分解のブースター（促進）酵素として注目されている。

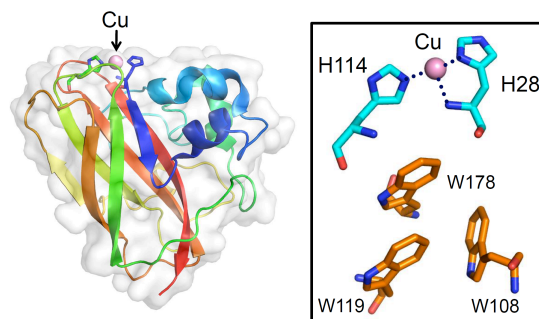


図1 CBP21の立体構造（左）と銅イオン結合部位（右）

キチン分解能の高い細菌 *Serratia marcescens* が分泌する CBP21 は、結晶性キチンに作用する LPMO であり、糖質関連酵素データベース (CAZy) による分類では Auxiliary Activities family 10 [AA10 (formerly CBM33)] に属する。CBP21 は 170 アミノ酸残基からなる小型球状タンパク質で、触媒部位に銅イオンが配位している (図 1)。本講演では、CBP21 の変性機構および銅イオンが本酵素の構造安定性におよぼす影響について述べる。

アポ型 CBP21 と銅イオンの結合

図 2 は、トリプトファン残基の蛍光を指標として、アポ型 CBP21 と銅イオン (Cu^{2+}) の結合を調べた結果である (pH 5.0, 25°C)。[apoCBP21] : [Cu^{2+}] が 1:1 になったところで蛍光強度の変化が収束し、両者の結合は非常に強い結合（解離定数は 10 nM より小さい）であった。また、アポ型およびホロ型 CBP21 の CD スペクトル (25°C) に顕著な差はなく、銅イオンが結合しても CBP21 の天然状態の構造に大きな変化はないと考えられた。

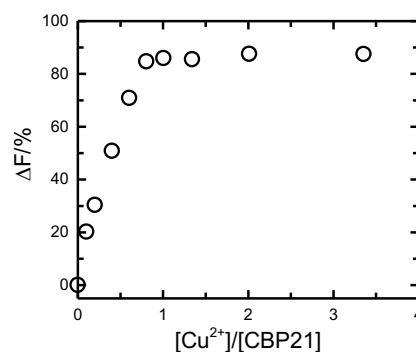


図2 Cu^{2+} によるCBP21の蛍光滴定
pH 5.0, 25°C, タンパク質濃度 1 μM

アポ型およびホロ型 CBP21 の変性

熱変性反応を断熱型示差走査熱量測定 (DSC) により調べたところ、アポ型 CBP21 の変性温度は 65.3°C (pH 5.0) であった (図 3)。また、変性温度のタンパク質濃度依存性は観測されず、アポ型 CBP21 の変性は二状態転移 ($\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$, N は天然状態, U は変性状態を表す) であった。他方、ホロ型 CBP21 の変性温度は 74.5°C で (図 3)、アポ型に比べて 9°C 増大し、銅イオンが CBP21 の構造安定化に寄与していることがわかった。タンパク質濃度に対して過剰の銅イオンを共存させた場合でも、CBP21 の変性温度はおよそ 75°C で、変性温度は共存する銅イオン濃度に依存しなかった。

尿素による変性剤変性においては、転移中点での変性剤濃度が、アポ型よりもホロ型の方が 2 M 程

高かった。また、過剰に銅イオンが共存していても、転移中点での変性剤濃度は共存する銅イオン濃度に依存しなかった。変性剤変性においても、熱変性の場合と同様の現象が観測された。

これらの結果から、ホロ型 CBP21 の変性機構は $N \cdot Cu^{2+} \rightleftharpoons U \cdot Cu^{2+}$ (N は天然状態, U は変性状態を表す) と表され、変性しても銅イオンはタンパク質分子から解離しないと考えられた。

また、銅イオンを共存させた後に変性状態の CBP21 の蛍光スペクトルを測定すると、銅イオン非共存系の場合よりも蛍光強度が低かった。このことから、変性状態であっても銅イオンが結合していることで結合部位近傍のトリプトファン残基の蛍光が消光されたと考えられた。

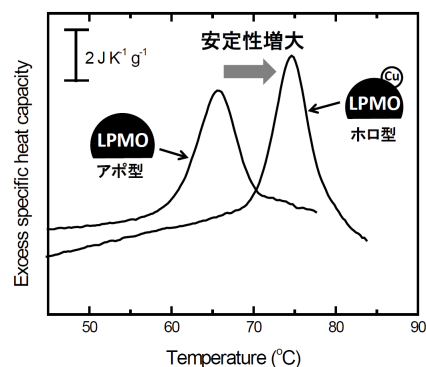


図3 CBP21 の DSC 曲線
pH 5.0, 走査速度: 1 K/min,
タンパク質濃度 4 μ M

おわりに

リガンド結合はタンパク質の安定性に影響をおよぼす因子の 1 つである。リガンド分子の結合によるタンパク質の安定化は、変性に伴うタンパク質-リガンド間の解離平衡の移動による見かけ上の現象であることが多い。すなわち、変性機構は $N \cdot L \rightleftharpoons U + L$ (L はリガンド) と表され、反応系にリガンド分子が共存していると、平衡が N 側へシフトして見かけ上の安定化が起こる。しかし、CBP21 の場合、変性にはリガンド分子である銅イオンの解離を伴わないことがわかり、上記とは安定化機構が異なっていた。銅イオンの結合による天然状態の構造への大きな影響はなかったことから、アポ型とホロ型の変性状態の構造の差異が安定化に寄与していることが示唆された。

略歴

杉本 華幸 (すぎもと はゆき)

学歴 2003 年 三重大学生物資源学部 卒業 / 2008 年 三重大学大学院生物資源学研究科 博士後期課程 修了

職歴 2008 年 関西学院大学大学院理工学研究科 (生体分子システムの物理科学研究センター) 博士研究員 / 2011 年 新潟大学自然科学系 (農学部) 現在に至る

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）



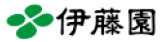
天野エンザイム(株) 岐阜研究所

<http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/>



イチビキ(株) 研究開発部

<http://www.ichibiki.co.jp/>



(株)伊藤園 生産本部

<http://www.itoen.co.jp/>

 伊那食品工業株式会社 伊那食品工業(株)

<http://www.kantenpp.co.jp/>



加藤化学(株) 技術部

<http://www.katokagaku.co.jp/>



(株)岐阜セラック製造所 品質保証部

<http://www.gifushellac.co.jp/>



キリンビール(株) 名古屋工場

<http://www.kirin.co.jp/>



敷島製パン(株) 研究部

<http://www.pasconet.co.jp/>



(株)真誠

<http://www.shinsei-ip.ne.jp/>

新日本化学工業(株) 研究部



太陽化学(株) ニュートリション事業部

<http://www.taiyokagaku.com/>



辻製油(株)

<http://www.tsuji-seiyu.co.jp/>



東海物産(株) 食品研究所

<http://www.tokaibsn.co.jp/>



中日本氷糖(株)

<http://www.nakahyo.co.jp/>



(株)ニッポンジーン

<http://www.nippongene.com/>



フジ日本精糖(株) 研究開発室

<http://www.fnsugar.co.jp/>



物産フードサイエンス(株)
研究開発センター

<http://www.bfsci.co.jp/>



ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株)
中央研究所

<http://www.pokkasapporo-fb.jp/>



(株)Mizkan-Holdings 中央研究所

<http://www.mizkan.co.jp/company/>



ヤマモリ(株) 桑名工場

<http://www.yamamori.co.jp/>



養命酒製造(株) 商品開発センター

<http://www.yomeishu.co.jp/>

協力企業（五十音順）

アサヒビール(株) 名古屋工場	サンエイ糖化(株)	(株)東洋発酵
旭松食品(株) 食品研究所	サンジルス醸造(株) 生産本部	東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所
アステラス製薬(株) CSR 部	敷島スターチ(株) 技術開発室	名古屋製酪(株) 中央研究所
伊藤忠製糖(株) 品筆保証室	大和製罐(株) 総合研究所	日本食品化工(株) 研究所
科研製薬(株) 生産技術研究所	竹本油脂(株) 情報調査室	三井農林(株) 食品総合研究所
カネハツ食品(株) 技術部	デザイナーフーズ(株)	名糖産業(株) 食品開発部
金印(株) 研究開発部	東海漬物(株) 漬物機能研究所	盛田(株) 小鈴谷工場

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
日本農芸化学会中部支部第 182 回例会
講演要旨集

平成 30 年 6 月 9 日 発行

編集発行人: 日本農芸化学会中部支部 支部長 吉村 徹

名古屋市千種区不老町 名古屋大学 東山キャンパス内