

## 平成 25 年度 研究経過報告書

### 研究者名

白坂 憲章

### 研究課題名

食用きのこにおける  $\gamma$ -アミノ酪酸代謝に関する検討

### 研究目的・内容

本研究では、食用きのこの GABA 含量をコントロールすることを目的とし、きのこの栽培・流通・保存等の条件が GABA 含量に及ぼす影響を酵素学的、遺伝子工学的手法を用いて明らかにすることを旨として GABA の生成や代謝に関与する酵素を食用きのこから単離精製し、性質を明らかにするとともに、酵素遺伝子のクローニングを行う。また、酵素遺伝子の発現時期・発現量を定量 RT-PCR もしくは Real-Time PCR により明らかにし、GABA 含量との関係を明らかにする。

### 研究の経過

本研究を進めるにあたり、先ずグルタミン酸の脱炭酸による GABA の生成と GABA のコハク酸セミアルデヒドへの代謝を明らかにするため、GABA の生成を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の性質解明と遺伝子クローニングを試みた。

本研究の申請時にマイタケ (*Grifola frondosa*) からすでに精製 GAD が得られていたため、本酵素の N 末端アミノ酸配列情報をもとに設計したプライマーを用いて PCR クローニングを試みた。しかし、増幅断片を得ることができず、クローニングを進めることは困難であった。そこで、本研究室で部分精製が進んでいるシイタケ (*Lentinula edodes*) 由来の GAD の精製を進めた。シイタケは食用きのこ類で唯一全塩基配列の情報が公開されており、アミノ酸配列情報が一部でも明らかになればコードする遺伝子の情報が得られるといった利点がある。現在、電気泳動的にほぼ単一にまで精製が進んでおり、現在酵素の性質の確認を進めるとともに N 末端および内部アミノ酸配列の改正を行うための準備を進めている。これらの成果は 2014 年度に国内外の学会において発表するとともに論文としても発表する予定である。

一方、GABA の前駆体となるグルタミン酸は GABA だけでなく、きのこに豊富に含まれることが報告されている機能性アミノ酸であるオルニチンの前駆体でもある。このことは食用きのこ中のグルタミン酸やオルニチンの含量は GABA の含量とも関連することが示唆される。そこで、食用きのこに含まれるこれらのアミノ酸および GABA の代謝によって生じるアラニンの含量について市販のきのこについて検討するとともに、これまでにオルニチン含量の高いことが報告されているブナシメジを用いて収穫直後からのオルニチンおよび GABA 含量の推移について検討した。その結果、市販の食用きのこにおいては、これまでの知見と同じく GABA はエノキタケでオルニチンはブナシメジで高い含量を示したが、同種のきのこであっても生産者によって含量にばらつきがあることが明らかとなった。

また、ブナシメジにおいて収穫直後から 3 日目あたりまではオルニチンの含量は減少傾向

が認められたが、その後含量は上昇し 1 週間目あたりで収穫直後と同程度まで回復することが確認され、出荷された後もきのこの中でアミノ酸の代謝が行われていることが示唆された。

#### **本研究と関連した今後の研究計画**

現在までに、シイタケ、マイタケより GAD が生成されており、さらに部分精製されているエノキタケの酵素の完全精製を目指すとともに、これらの GAD のクローニングを行い比較をする。また、得られた遺伝子の配列より定量 PCR のプライマーを作成し、培養・栽培条件と遺伝子発現の関係についての検討を進めていく予定である。さらに、これらのきのこにおける GABA 代謝系の酵素についての検討も進めていくとともに、オルニチンなどグルタミン酸を前駆体として生合成されるアミノ酸との生合成のバランスがどのように制御されているかについての検討を進めていく予定である。

(平成 26 年 3 月 31 日現在)