

論文内容の要旨

氏名	岩本和子			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	農第185号			
学位授与の日付	平成25年3月22日			
学位授与の要件	学位規程第5条該当			
学位論文題目	Studies on the enzymes related to γ -amino butyric acid (GABA) formation in edible mushrooms (食用きのこの γ -アミノ酪酸(GABA)生成に関与する酵素に関する研究)			
論文審査委員	(主査)	教授	田中裕美	
	(副主査)	教授	岸本憲明	
	(副主査)	准教授	白坂憲章	

きのこに含まれる呈味成分は、きのこのおいしさに関わる化学的要因として、また、きのこの食品栄養学的な有用性を知るためにも重要であると考えられている。きのこに含まれるうま味成分としてはグアニル酸(5'-GMP)がよく知られているが、本成分と相乗的に作用し、うま味が増強されるグルタミン酸も比較的多く含まれており、その他にも呈味性のアミノ酸であるアラニン等も含まれている。また近年、生理活性を有する機能性アミノ酸として注目されるようになったオルニチンや γ -アミノ酪酸(GABA)といった非タンパク質性アミノ酸も多く含有していることが報告されている。しかし、食用きのこにおけるこれらの成分の含量については詳細に検証された例は少なく、日本栄養・食糧学会が公表しているアミノ酸組成データベースにおいてもきのこ類として情報の公開がされてはいるものの、文献ごとに含量の表記が統一されておらず、また、機能性アミノ酸の含量についても他の食品と比較し、その位置付けにあるかについては明らかでない部分も多い。

GABAは自然界に広く分布しており、中枢神経では抑制性神経伝達物質として作用し、血圧上昇抑制、利尿作用、ストレスの緩和、糖尿病の予防といった様々な効果が期待される機能性食品素材の一種である。GABAは、生体内においてグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)によりグルタミン酸の α -カルボキシル基が脱炭酸され生成することが確認されている。これまでに哺乳動物、高等植物、細菌などの様々な生物種由来のGADが精製され、その性質について報告されている。きのこにおいてもGABA蓄積とGAD活性の関連性を調べることで、GABA含量とGAD活性を制御し、商業的にきのこの価値を向上させることができる可能性があるが、食用きのこを含む担子菌由来のGADについての報告はいまだない。

そこで本研究では、食用きのこ中に含まれる機能性アミノ酸の一種であるGABAに着目し、食用きのこ中のGABA含量を明らかにすると共にGABA生合成に関与する酵素としてGADを精製し、その性質を明らかにした。

食用きのこの機能性アミノ酸含量

市販の食用きのこ9種類（エノキタケ、エリンギ、シイタケ、タモギタケ、ツクリタケ、ナメコ、ブナシメジ、ホワイトブナシメジ、マイタケ）を用いて、GABA含量と近年注目されるようになったアンモニア解毒作用、成長ホルモンの分泌促進、コラーゲン合成促進、免疫力の向上といった様々な活性を有するオルニチンの含量を明らかにした。その結果、各きのこのアミノ酸含量を乾燥重量100g当たりに換算し比較したところ、エノキタケがきのこ類の中で最も高いGABA含量を示し、9種類全てのきのこが一般的にGABAを多く含むと言われているトマトなどの食品と比較して同等もしくは高い値を示した。オルニチンにおいても、ブナシメジ(白)がきのこ類の中で最も高い含量を示し、ほとんどのきのこがオルニチンを多く含む代表的な食材と言われているシジミと比較して同等もしくは高い値を示すことを明らかにした。

食用きのこ由来グルタミン酸デカルボキシラーゼの特性

きのこに含まれるGADの特性を明らかにするため、GAD酵素を精製し、その性質について調べた。9種類の食用きのこを用いて、きのこ中のGAD活性と局在性について調べた結果、マイタケのGADで調製した破碎液の上清のみ安定して活性が確認できた。検討したきのこの中で最もGABA蓄積量の高いエノキタケにおいて最も高いGABA生成が確認されたが、GAD精製のために調製した破碎液の上清に活性が認められず、沈殿で強い活性が確認できた。これらの結果より、それぞれ酵素の局在性が異なるエノキタケとマイタケを用いてGADの精製を試み、その特性について検討した。

1. マイタケ由来グルタミン酸デカルボキシラーゼの精製と性質

市販マイタケ (*Grifola frondosa*) 子実体を50mM 酢酸バッファー (pH4.0) と共に破碎後、遠心分離により得られた上清を硫酸塩析、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を用いて精製し、収率1.24%、精製倍率11.9倍で、電気泳動的に単一の酵素を得た。精製酵素の分子量はSDS-PAGEより約42 000、HPLC-GPCより約97 000であったことから、本酵素は二量体であることが示唆された。最大活性はpH 3.5で37℃

のときに観察され、pH 2.5-5.5でGAD活性は安定であった。*G. frondosa*より精製したGADは、L-グルタミン酸でのみ特異性を示した。酵素の K_m は7.5 mMで、 V_{max} は450 $\mu\text{mol min}^{-1}$ であった。酵素活性は Hg^+ と Ag^+ より著しく阻害された (0%、32%)。GADのN-末端アミノ酸配列を解析した結果、既知のタンパク質に高い相同性のあるものは認められなかった。

2. エノキタケ由来グルタミン酸デカルボキシラーゼの精製と性質

市販エノキタケ (*Flammulina velutipes*) 子実体を用い、GAD活性の破碎上清への溶出方法を4種類の可溶化剤を用いて検討したところ、非イオン界面活性剤であるポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル (Igepal CA-630) でのみ沈殿に残留していたGADが上清に溶出することが確認できた。このことから、子実体破碎後、遠心分離より得られた沈殿をIgepal CA-630を含む破碎液で10回洗浄して得られた上清を集め、限外濃縮により調製した酵素液でSDS-PAGEを行ったところ、27 kDa付近にGADとみられるバンドが確認できた。また、残渣を酵素試料として本酵素の性質を検討したところ、最大活性はpH 6で28℃のときに観察され、pH 2-5でGAD活性は安定であった。*F. velutipes*より部分精製したGADは、L-グルタミン酸でのみ特異性を示した。酵素の K_m は4.85 mMで、 V_{max} は0.86 $\mu\text{g min}^{-1}$ であった。酵素活性は Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ より著しく阻害された (20%、25%、0%)。

論文審査結果の要旨

本申請者は本学位論文において、食用きのこ中に含まれる機能性アミノ酸の一種であるGABAに着目し、食用きのこ中のGABA含量を明らかにすると共にGABA生成に関与する酵素としてGADを精製し、その性質を明らかにしている。

申請者はまず、食用きのこの機能性アミノ酸含量を明らかにし、その他の食品と比較するため、市販の食用きのこ9種類（エノキタケ、エリンギ、シイタケ、タモギタケ、ツクリタケ、ナメコ、ブナシメジ、ホワイトブナシメジ、マイタケ）を用いて、GABA含量と近年注目されるようになったアンモニア解毒作用、成長ホルモンの分泌促進、コラーゲン合成促進、免疫力の向上といった様々な活性を有するオルニチンの含量を明らかにした。その結果、エノキタケがきのこ類の中で最も高いGABA含量を示すとともに、測定した全てのきのこが一般的にGABAを多く含むと言われているトマトなどの食品と比較して同等もしくは高い値を示すことを明らかにした。またオルニチンにおいても、ブナシメジ(白)がきのこ類の中で最も高い含量を示し、ほとんどのきのこがオルニチンを多く含む代表的な食材と言われているシジミと比較して同等もしくは高い値を示すことを明らかにした。

上記の結果を受け、申請者はきのこに含まれるGADの特性を明らかにするため、破碎液の上清で安定して活性が確認できるマイタケ (*Grifola frondosa*) のGADと検討した中で最もGABA蓄積量の高くGAD活性も高いが破碎沈殿で強い活性が確認できエノキタケ (*Flammulina velutipes*) の酵素の局在性が異なるきのこを用いてGADの精製を試み、その特性について検討した。

マイタケ子実体を50mM 酢酸バッファー (pH4.0) と共に破碎後、遠心分離により得られた上清を硫酸塩析および各種クロマトグラフィーを用いて収率1.24%、精製倍率11.9倍で、電気泳動的に単一のGAD酵素を得た。精製酵素の分子量はSDS-PAGEより約42 000、HPLC-GPCより約97 000であったことから、本酵素は二量体であることが示唆された。最大活性はpH 3.5で37℃のときに観察され、pH 2.5-5.5でGAD活性は安定であった。また、精製した酵素は、L-グルタミン酸のみを基質とするGADであること、L-グルタミン酸に対す

ぬは7.5 mMで、 V_{max} は450 $\mu\text{mol min}^{-1}$ であること、 Hg^+ と Ag^+ より著しく阻害されること (0%、32%)を明らかにした。酵素のN-末端アミノ酸配列についても解析を行ったが、既知のタンパク質に高い相同性のあるものは認められなかったとしている。

エノキタケについては、破碎後の上清に活性が見られないため可溶化剤を用いて沈殿からの活性の回収を検討したところ、非イオン界面活性剤であるポリオキシエチレン (9) オクチルフェニルエーテル (Igepal CA-630) によりGADの一部が上清に溶出することが確認できた。このことから、子実体破碎後、遠心分離より得られた沈殿をIgepal CA-630を含む破碎液で処理し得られた上清を集め、限外濃縮により調製した酵素液でSDS-PAGEを行ったところ、27 kDa付近にGADとみられるバンドが確認している。また、破碎沈殿を酵素試料として酵素の性質を検討したところ、最大活性はpH 6で28℃のときに観察され、pH 2-5でGAD活性は安定であることを明らかにしている。*F. velutipes*より部分精製した酵素もL-グルタミン酸のみを基質とし酵素の K_m は4.85 mMで、 V_{max} は0.86 $\mu\text{g min}^{-1}$ であり、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ より著しく阻害される (20%、25%、0%)ことを明らかにした。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成25年2月8日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。