

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	県産キノコ類（椎茸・舞茸）で発現する有用酵素群の性質決定を容易化するクローン化・発現プラットフォームの構築				
研究組織	代表者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	河原崎 泰昌
	研究分担者	所属・職名	東京農工大・准教授	氏名	田中 瑞己
		所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	伊藤 圭祐
		所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	三好 規之
		所属・職名	静岡県東部農林事務所農山村整備部・主査	氏名	大石 英史
		所属・職名	静岡県東部農林事務所森林整備課・主任（きのこ総合センター）	氏名	山本 正晃
	発表者	所属・職名	食品栄養科学部・准教授	氏名	河原崎 泰昌

講演題目	キノコ類有用酵素群の性質決定を容易化するクローン化・発現プラットフォームの構築
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>キノコ類は多様な酵素のはたらきにより生態系の物質循環の要を担うだけでなく、他の生物に作用する生理機能物質を作り出す。キノコ類のうち、シイタケ（原木栽培品出荷量は静岡県が全国1位）やエノキダケ、マイタケ（生産量は静岡県が全国2位）のように食用可能でかつ容易に栽培できるものであっても、遺伝子重複によるゲノムの複雑性により、可食部子実体で発現する酵素種を同定し、性質決定を行い、さらなる産業利用に展開を計ることは容易ではない。</p> <p>我々はシイタケのラッカーゼ (Kawarasaki et al., Method Mol Biol, 2022 等)、麴菌のβガラクトシダーゼ (Kamiya et al., J. Biotechnol., 2010)、プロテアーゼ（未発表）の組換え発現を試みる過程で、同じ菌類であるパン酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 実験室出芽酵母株) が多くの菌類の分泌酵素を活性型で発現できることを報告した。これを利用し、シイタケ可食部で発現するラッカーゼ群や分泌性ヌクレアーゼ群（グアニル酸生成に関わる）、マイタケ可食部のプロテアーゼ・ペプチダーゼ群の単離・性質決定のプロセスを劇的に容易化する酵素発現プラットフォームを構築することを本研究の主目的とする。この過程で性質決定された酵素の知見をもとに、上記可食性キノコのさらなる高次利用を目指した。</p> <p>令和5年度は、マイタケ可食部より全 polyA-RNA を調製し、既に報告されているゲノム情報を元に明確な分泌シグナル配列をもつ予測プロテアーゼ（13種のアスパラギン酸プロテアーゼ、2種のズブチリシン様プロテアーゼ、2種の金属プロテアーゼ）の蛋白質コード領域の増幅を試みた。この結果、3種のアスパラギン酸プロテアーゼ、1種のズブチリシン様プロテアーゼのクローニングに成功した。またアスパラギン酸プロテアーゼ2種類は、組換え出芽酵母を用いて活性型組換え酵素として菌体外生産することができた。生産されたアスパラギン酸プロテアーゼの性質決定を行ったところ、1) 低 pH 領域において高活性、2) 高温（50℃以上）で安定、3) 高 pH 領域で安定、4) 厳密な配列特異性（基質特異性）はない、5) 各種界面活性剤と併用可、等の性質が明らかになった。これらの成果を令和5年度日本生物工学会大会（名古屋大学東山キャンパス、9月）で発表した。</p>