

微生物由来リパーゼ活性のスクリーニング ～食用キノコを中心とした担子菌類由来リパーゼの探索～

石原浩二* 熊澤希実* 中島伸佳**

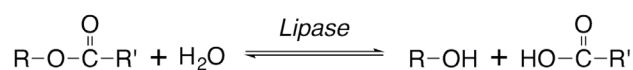
要旨 キノコに代表される担子菌類は、食用や漢方など、古くから食品や医薬品として利用されてきた。しかしながら、その他の利用、特に、有用物質生産を目的とした「生体触媒」としての有用性については、ほとんど知られていなかった。そこで、本研究では、食用キノコを中心とした担子菌類の、生体触媒としての可能性を探るため、担子菌由来の細胞外分泌型リパーゼの探索を目的として研究を行った。

キーワード：食用キノコ、担子菌、生体触媒、リパーゼ、スクリーニング

1. はじめに

リパーゼ (lipase) とは、中性脂肪の化学構造中に含まれるエステル結合を加水分解する酵素の一群である。一般には、グリセロールの脂肪酸エステル (トリグリセリド) を加水分解して、脂肪酸を遊離する反応を触媒するトリアシルグリセリドハイドロラーゼ (EC 3.1.1.3) とよばれ、「消化酵素」の一つとして知られている。リパーゼは、水中では基質であるトリグリセリドに存在する3つのエステル結合のうち、いずれかを位置選択的に加水分解するタイプが多い。一方で、微水系 (有機溶媒系) では、逆反応であるエステル化 (アシル化) 反応も触媒できることから (図1)、化成品や医薬品合成にも利用されており、有機合成においても、重要な酵素の一つである¹⁻⁴⁾。

図1



右方向：加水分解反応，左方向：エステル（アシル）化反応

これまでに、生理活性物質などの有用物質生産の触媒として利用されてきたリパーゼは、主に微生物、特に、酵母や細菌由来が多い。入手が容易、か

つ、高い立体特異性を有し、その利用に関する研究が多数報告されているものは、*Candida antarctica* 由来のリパーゼ (商品名：CAL TypeB もしくは CHIRAZYME[®] L-2) と、*Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) 由来のリパーゼ (商品名：Lipase-PS Amano) である。これらのリパーゼは、液晶材料や生理活性物質製造のためのキラルビルディングブロック合成の手段として汎用されているだけでなく、医薬品の工業生産にも多用されており、その有用性は非常に高いと言える。また、その他の微生物由来リパーゼも、何種類か発見されているが、実用化レベルの利用にまで至ったケースは少ない。

そこで本研究では、微生物由来の新規リパーゼの探索研究の一環として、また、食用キノコの新しい利用法の探索研究として、食用キノコを中心とした担子菌類の培養液中から細胞外分泌型 (菌体外) リパーゼを探索することを主目的として研究を行い、新たな知見を得たので報告したい。

2. 実験材料と方法

Phiolita nameko NBRC30372 (和名：ナメコ)、*Grifola frondosa* NBRC30522、NBRC30661、NBRC32987 (和名：マイタケ)、*Lentinula edodes* NBRC30719、NBRC30720、NBRC30723、NBRC30724 (和名：シイタケ)、*Agaricus bisporus*

* 岡山理科大学理学部臨床生命科学科

** 岡山県立大学大学院保健福祉学研究科

〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1

〒719-1197 岡山県総社市窪木111

NBRC30774、NBRC30782（和名：アガリクス）、*Lyophyllum ulmarium* NBRC30775（和名：ブナシメジ）、*Flammulina velutipes* NBRC31862（和名：エノキタケ）、*Ganoderma lucidum* NBRC31863（和名：マンネンタケ）、*Hericium erinaceus* NBRC100328（和名：ヤマブシタケ）株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）より購入した。*Lepista sordida*（和名：コムラサキシメジ）、*Pleurotus salmoneostramineus*（和名：トキイロヒラタケ）は（株）フジワラテクノアートより提供していただいた株を用いた。

PDB（ポテト・デキストロース・ブロス）、PDA（ポテト・デキストロース・アガー）、Difco™ Yeast Extract（酵母エキス）、Difco™ Malt Extract（麦芽エキス）、Difco™ Agar Technical（寒天・テクニカルグレード）はベクトン・ディッキンソン株式会社より購入した。アラビアゴムとTween®80はシグマアルドリッチ株式会社から購入した。ポリペプトン、リンゴ由来ペクチン、オリーブ油、結晶性セルロースは和光純薬株式会社から購入した。リパーゼキットSはSBバイオサイエンス株式会社より購入した。遠心式限外濾過フィルターユニットはメルク-ミリポア社のアミコンウルトラ-15（NMWL: 10 kDa）を用いた。その他の試薬は、全て特級品を購入して用いた。各菌株はPDAシャーレ培地上にて、暗所、25℃で培養し、月に一度の間隔で新しい培地へ植継いで保存株とした。

液体培地（150 mL培地／500-mL容バツフル付き三角フラスコ）で担子菌類を培養後、ワットマン定性ろ紙（No. 4）で吸引ろ過を行い、ろ紙上に残った湿潤菌体については、その重量を量った。ろ過液（培養後培地）については、ポリプロピレン製チューブ中、-20℃で凍結保存し、後日、流水中で解凍後、リパーゼキットSを用いて菌体外リパーゼ活性を測定した。なお、培地のみを試料とした場合をブランクとし、リパーゼ活性については、30℃において、1分間に1 μmol/Lの遊離SH基を生じる酵素量を1 IU（国際単位）/Lと定義した。

3. 結果と考察

1) PDB 液体培地を用いた有用株の選択

研究に用いた全16株の担子菌類について、PDB液体培地を用いて、暗所、25℃で好氣的に12日間培養した後の湿潤菌体を計量した結果、1.0 g以上得

られた菌株は、*P. nameko* NBRC30372、*L. ulmarium* NBRC30775、*F. velutipes* NBRC31862、*G. lucidum* NBRC31863、*L. sordida*、*P. salmoneostramineus*であった（表1）。菌株が十分に生育しなければ、菌体外へ分泌されるリパーゼも少ないと考えられるので、湿潤菌体量が多く得られた、これら6株を有用株と判断し、以後の実験に用いることとした。

表1 ポテトデキストロース液体培地中で培養して得られた担子菌類の湿潤菌体量

NBRC No.	学 術 名	和 名	湿潤菌体(g)
30372	<i>Phiolita nameko</i>	ナメコ	3.2
30552	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	0.2
30661	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	0.2
32987	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	0.2
30719	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	0.1
30720	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	0.3
30723	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	0.2
30724	<i>Lentinula edodes</i>	シイタケ	0.3
30774	<i>Agaricus bisporus</i>	アガリクス	0.1
30782	<i>Agaricus bisporus</i>	アガリクス	0.1
30775	<i>Lyophyllum ulmarium</i>	ブナシメジ	1.7
31862	<i>Flammilia velutipes</i>	エノキタケ	6.4
31863	<i>Ganoderma lucidum</i>	マンネンタケ	8.9
100328	<i>Hericium erinaceum</i>	ヤマブシタケ	0.2
	<i>Lepista sordida</i>	コムラサキシメジ	1.0
	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	トキイロヒラタケ	11.2

500-mL容バツフル付き三角フラスコ中、PDB150 mL、暗所、25℃、好氣的に12日間培養を行った。

これら6株の培養後培地に含まれる菌体外リパーゼ活性を測定した結果、全て5.00 x 10² IU/L以下であり、明確なリパーゼ活性は検出されなかった（培養後培地のろ過後の液量は、いずれの菌株でも140～145 mLであり、大きな差はなかったため、酵素活性値に液量を乗じた総活性ではなく、IU/Lで比較した）。この結果は、一般的には菌株に細胞外へリパーゼを分泌する能力が欠損しているためと考えられる。しかしながら、培養条件がリパーゼ生産や分泌に適していない可能性も十分に考えられたので、培養条件の中でも、特に、培地組成について検討し、菌体外リパーゼ誘導用の新たな液体培地を調製することにした。

2) 新規な培地を用いた有用株の液体培養と菌体外リパーゼ活性

これまでに、*Pseudomonas* や *Bacillus* 属細菌の培養液に使用済みの天ぷら油を添加することで、細胞外分泌型リパーゼの生産性が上昇したという研究報

告⁵⁾とアラビアゴムがカビ由来のリパーゼを安定化に有効であるという特許が報告されている⁶⁾。そこで、菌体外リパーゼの生産性と安定性を高めることを目標に、グルコースと酵母エキスを基本とした培地へ、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油などを添加した、PG(ペクチン・アラビアゴム添加)培地、O(オリーブ油添加)培地、PGO(ペクチン・アラ

ビアゴム・オリーブ油添加)培地、CPGO(セルロース・ペクチン・アラビアゴム・オリーブ油添加)培地を新たに調製した(表2~5)。

新規に調製した4種の液体培地を用いて、25℃、暗所、好氣的に12日間培養を行い、湿潤菌体量と培養後培地に含まれるリパーゼ活性を測定し、表6にまとめた。

表2 PG培地の組成 (pH 5.5)

組成	質量 (g)
グルコース	20.0
ポリペプトン	4.0
Yeast Extract	1.0
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0
ペクチン	2.0
アラビアゴム	2.0
精製水 1L	

表3 O培地の組成 (pH 5.5)

組成	質量 (g)
グルコース	20.0
ポリペプトン	4.0
Yeast Extract	1.0
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0
オリーブ油	10.0
精製水 1L	

表4 PGO培地の組成 (pH 5.5)

組成	質量 (g)
グルコース	20.0
ポリペプトン	4.0
Yeast Extract	1.0
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0
オリーブ油	10.0
ペクチン	2.0
アラビアゴム	2.0
精製水 1L	

表5 CPGO培地の組成 (pH 5.5)

組成	質量 (g)
グルコース	20.0
ポリペプトン	4.0
Yeast Extract	1.0
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0
オリーブ油	10.0
セルロース	10.0
ペクチン	2.0
アラビアゴム	2.0
精製水 1L	

表6 担子菌類5株を各液体培地中で培養した時の湿潤菌体量と培養後培地中のリパーゼ活性

NBRC No.	和名	PG培地		O培地		PGO培地		CPGO培地	
		湿潤菌体 (g)	リパーゼ活性(IU/L)	湿潤菌体 (g)	リパーゼ活性(IU/L)	湿潤菌体 (g)	リパーゼ活性(IU/L)	湿潤菌体 (g)	リパーゼ活性(IU/L)
30372	ナメコ	4.8	N.A.	0.6	N.A.	10.6	N.A.	23.9	N.A.
30775	ブナシメジ	2.7	N.A.	3.5	N.A.	2.2	N.A.	29.6	N.A.
31862	エノキタケ	7.1	1.81	2.4	N.A.	8.3	N.A.	5.2	N.A.
31863	マンネンタケ	12.9	N.A.	1.7	4.90	19.3	1.72 x 10	32.5	1.08 x 10
	コムラサキシメジ	2.1	N.A.	3.3	N.A.	13.9	4.07 x 10	11.0	N.A.
	トキイロヒラタケ	17.5	N.A.	14.4	N.A.	17.9	3.78	56.2	N.A.

500-mL容バツフル付き三角フラスコ中、各液体培地150 mL、暗所、25℃、好氣的に12日間培養を行った。

N.A.: 5.00 x 10⁻² IU/L以下の活性値であったので、活性なし (No Activity) とした。

PG 液体培地で培養した時、PDB 液体培地による培養時と比較して、6 株全てにおいて湿潤菌体量が増加し、さらに、エノキタケ NBRC31862 株の培養液にわずかではあるが、菌体外リパーゼ活性を検出できた。O 培地では、マンネンタケ NBRC31863 株に明確な菌体外リパーゼ活性 (4.90 IU/L) を検出できた。さらに、PGO 液体培地では、3 株にリパーゼ活性が検出され、特に、マンネンタケ NBRC31863 株とコムラサキシメジに、15 IU/L を越える高い活性を見いだした。また、高いリパーゼ活性を示した 2 つの菌株では、湿潤菌体は 10 g 以上得られたので、内在性リパーゼが溶菌によって培地へ放出された結果としてのリパーゼ活性ではなく、細胞外へ分泌されたリパーゼ活性であると判断した。さらに、PGO 培地にセルロースを添加した CPGO 液体培地では、マンネンタケで 30 g 以上、トキイロヒラタケでは 50 g 以上の湿潤菌体が得られ、PGO 培地での培養時よりも大幅に増加したものの、菌体外リパーゼ活性は低い値を示した。セルロースの添加は、菌体外リパーゼの生産には効果的ではないが、菌株の培養には応用できることがわかり、食用キノコの液体培養には有用なインフォメーションと言える。

菌体外リパーゼ活性が上昇する詳細なメカニズムは不明であるが、オリーブ油はリパーゼの細胞外への分泌を促進させ、アラビアゴム、ペクチンは菌体外リパーゼの安定化に寄与していると思われる。本研究では、最初から培地に含んだ状態で使用したが、添加量や添加時期などを考慮することで、さらなる高リパーゼ活性が期待できる。

3) 菌体外リパーゼ活性の酵素化学的特徴の調査

見いだしたリパーゼ活性が酵素タンパク質に由来するものかを調べるために、活性画分の分子質量の確認を行った。PGO 培地で培養したマンネンタケ NBRC31863 株の培養液を、遠心式限外ろ過フィルターユニットでろ過を行い、上清と濾液画分について、それぞれリパーゼ活性を調査した結果、濾液画分には、リパーゼ活性は検出されず、ユニットに残った上清にだけ活性が検出された。この結果は、リパーゼ活性を示す物質の分子質量が 10k Da 以上であることを意味しており、酵素タンパク質分子であると考えられる (表 7)。

表 7 限外濾過フィルターによるリパーゼ活性の確認

画分	容量 (mL)	リパーゼ活性 (IU/L)	回収率 (%)
上清液	1.0	1.36×10^{-1}	91
濾過液	7.4	N.D.	<1

*PGO 液体培地で培養したマンネンタケ NBRC31863 株の培養後培地の 8.72 mL (1.50×10^{-1} IU) を遠心濾過 (5,000 x g) 後に活性測定した。
**N.D.: Not detected (未検出)

表 8. 熱安定性の調査

処理温度 (°C)	リパーゼ活性回収率 (%)
40	97
60	92
80	88
95	52

*各温度で 60 分間加熱処理後に活性を測定

また、粗酵素溶液状態ではあるが、リパーゼ活性の熱に対する安定性を調べた結果、80°C までは安定で、耐熱性が高く、安定性が高い酵素である可能性が示唆された (表 8)。

リパーゼキット S で用いられている基質は、炭素数が 4 という短鎖脂肪酸トリグリセリド誘導体であるので、プロテアーゼ活性を捕らえている可能性も考えられるので、長鎖脂肪酸基質を用いた活性測定を行い、基質特異性や立体選択性を明らかにすることで、新規なリパーゼとしての有用性を明らかにしていきたい。また、その他微生物についても、同様に調査することで、新規なリパーゼ探索研究を拡張していきたい。

参考文献

- 1) K. Faber, In "Biotransformations in Organic Chemistry A Textbook, 5th Ed.", 2.1.3.2 Lipases, pp. 94-123, (2004) Springer-Verlag, Berlin.
- 2) K. Buchholz, V. Kasche, U.T. Bornscheuer, In "Biocatalysts and Enzyme Technology", 3.2.2.1 Lipases (EC 3.1.1.3), pp. 127-134, (2005) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- 3) S. Servi Ed. In “Microbial Reagents in Organic Synthesis”, C.J. Sih and R.-L. Gu, Organic synthesis via Biocatalytic Methods – A Chemoenzymatic Approach to the Synthesis of FK506, pp. 79-92 (2005) Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 4) S. Servi Ed. In “Microbial Reagents in Organic Synthesis”, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, M.D. Amici, C.D. Micheli, Resolution of Racemates with Lipases and Effect of Reaction Conditions on Enantioselectivity, pp. 225-238 (2005) Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 5) E. Haba, O. Bresco, C. Ferrer, A. Marques, M. Busquets, A. Manresa, Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 40-44 (2000).
- 6) アスペルギルス・ニガー由来リパーゼの安定化蘇生物および安定化法, 特許第 4175696 号, 平成 20 年 8 月.

Screening for novel lipase from microorganisms: Search for lipase activity in basidiomycetes mainly on edible mushrooms

KOJI ISHIHARA*, NOZOMI KUMAZAWA*, NOBUYOSHI NAKAJIMA**

**Department of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

***Graduate School of Health and Welfare Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama 719-1197, Japan*

Abstract Basidiomycetes containing edible mushrooms have been used for foods and traditional Chinese medicines since ancient times. However, the possibility of its application in other fields of the mushrooms is not well known. Therefore, in this study, in order to explore the possibility of edible mushrooms as biocatalysts, we investigated the screening for extracellular lipases derived from basidiomycetes containing edible mushroom.

Keywords : edible mushroom, basidiomycete, biocatalyst, lipase, screening