

麹菌由来のフェルラ酸エステルゼについて

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	小関,卓也 堀,茜 見原,好治 河本,かずさ 伏信,進矢 小宮,大 鈴木,健太郎 祥雲,弘文 若木,高善 村山,哲也 塩野,義人
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	2巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 111-116
発行年月	2012年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



 総説
Ferulic Acid Esterase of *Aspergillus* Origin*

麹菌由来のフェルラ酸エステラーゼについて*

(2012年1月12日受付; 2012年2月29日受理)

小関卓也^{1,*}, 堀 茜¹, 見原好治¹, 河本かずさ¹伏信進矢², 小宮 大², 鈴木健太郎², 祥雲弘文²若木高善², 村山哲也¹, 塩野義人¹(こせき たくや, ほり あかね, みはら こうじ, かわもと かずさ
ふしのぶ しんや, こみや だい, すずき けんたろう, しょううん ひろふみ,
わかぎ たかよし, むらやま てつや, しおの よしひと)Takuya Koseki,^{1,*} Akane Hori,¹ Koji Mihara,¹ Kazusa Kawamoto¹Shinya Fushinobu,² Dai Komiya,² Kentaro Suzuki,² Hirofumi Shoun²Takayoshi Wakagi,² Tetsuya Murayama,¹ Yoshihito Shiono¹¹ 山形大学農学部

997-8555 鶴岡市若葉町 1-23

² 東京大学大学院農学生命科学研究科

113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

¹ Faculty of Agriculture, Yamagata University

1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka 997-8555, Japan

² Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo

1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

要旨: フェルラ酸は植物細胞壁に存在する最も豊富なヒドロキシ桂皮酸の1つで、ヘミセルロースのキシランにおいては側鎖のアラビノフラノースのO-5あるいはO-2の位置に、ペクチンにおいては側鎖のアラビノフラノースのO-2あるいはガラクトピラノースのO-6の位置でエステル結合している。また、フェルラ酸は5,5'-, 8,5'-, 8,8'-および8-O-4'-結合によるダイマーを形成し、キシラン、ペクチン、リグニンとの架橋を形作っている。麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 のゲノム配列情報を基に、ヘミセルロースの効率的分解に寄与するフェルラ酸エステラーゼと類似する遺伝子配列をいくつか見出し、それら遺伝子をクローン化し、*Pichia pastoris* で発現させた。それぞれのリコンビナント酵素のうち AoFaeB と AoFaeC はタンナーゼファミリーのフェルラ酸エステラーゼで、一次構造と一般的性質は似ていたが、いずれもタンナーゼ活性は検出されず、また、それぞれの酵素はシナピン酸エステルに対する特異性が異なっていた。AoPrbA は AoFaeB および AoFaeC と一次構造は類似しているものの、フェルラ酸エステラーゼ活性やタンナーゼ活性は検出されず、4-ヒドロキシ安息香酸エステル特異的なエステラーゼで、タンナーゼファミリーに分類されるエステラーゼは、その多様性が示唆された。

キーワード: 麹菌, フェルラ酸エステラーゼ, タンナーゼ***

1. はじめに

植物糖質素材はバイオ燃料、パルプ、食品そして飼料など、多くの工業分野に応用可能である。植物糖質のうち、イネ科植物の細胞壁の構成成分はヘミセルロースの割合が20~40%と比較的高く、バイオマスを酵素糖化する際にヘミセルロースを効率よく分解することが必要である。ヘミセルロースの1つであるキシランは1,4-β-キシロースのポリマーを主鎖として側鎖にアラビノフラノース、O-メチルグルクロン酸、フェルラ酸およびp-クマール酸を含み、また、一部のキシロースはアセチル化されている。ヘミセルロースを効率よく分解するには主鎖を加水分解する

酵素に加えて側鎖の基質を分解するアクセサリー酵素と呼ばれるα-L-アラビノフラノシダーゼ、α-グルクロニダーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、アセチルキシランエステラーゼの存在が不可欠である¹⁾。実際に、キシランナーゼとアクセサリー酵素とを混合するとヘミセルロースの分解が加速されることが知られている²⁾。

一方、食品機能の面でもフェルラ酸エステラーゼは重要な役割をもっている。たとえば乳酸菌などの細菌が腸内にフェルラ酸エステラーゼを分泌することで食物繊維が分解されてフェルラ酸が遊離する。フェルラ酸は血圧降下、コレステロール低下、血糖値低下などの作用を有し³⁾、ヒトの腸管から吸収されたフェルラ酸は生活習慣病の予防・改

*本原稿は、日本応用糖質科学会平成23年度大会糖質関連酵素化学シンポジウムで一部発表された。

**連絡先 (Tel. 0235-28-2949, Fax. 0235-28-2820, E-mail: tkoseki@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp)

***Key words: koji mold, ferulic acid esterase, tannase

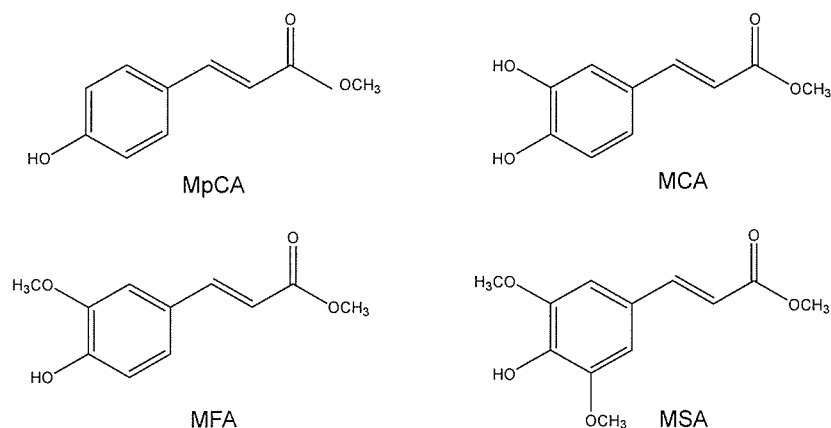


Fig. 1. Substrate for feruloyl esterase activity.

Table 1. Classification of feruloyl esterases based on primary amino acid sequence similarity and specificity for hydroxycinnamic acid methyl esters.

Parameter	Type A	Type B	Type C	Type D
Hydrolysis of methyl esters	MpCA MFA MSA	MpCA MCA MFA	MpCA MCA MFA MSA	MpCA MCA MFA MSA
ESTHER Database	Lipase_3	Esterase_PHB	Tannase	$\alpha\beta$ _hydrolase
Release of diferulic acid	Yes (5-5')	No	No	Yes (5-5')
Publication	AnFaeA AwFaeA etc.	PfFae-1 AwAxeA etc.	AnFaeB TsFaeC etc.	NcFaeD PfFaeA etc.

善が期待される⁴⁾。このようにフェルラ酸エステラーゼはバイオ燃料生産に重要であるばかりでなく、生理活性物質として有用なフェルラ酸を生産するため、産業上興味深い酵素の1つと考えられる。本稿では *Aspergillus oryzae* で見つかったフェルラ酸エステラーゼの多様性を中心に紹介する。

2. *Aspergillus* 属由来のフェルラ酸エステラーゼ

Aspergillus oryzae のフェルラ酸エステラーゼの最初の報告は1991年で⁵⁾、その後 *Aspergillus niger* において報告され^{6,7)}、また、遺伝子クローニングに関する最初の報告は1997年である⁸⁾。フェルラ酸エステラーゼは合成基質のフェルラ酸メチル (MFA)、*p*-クマール酸メチル (MpCA)、カフェ酸メチル (MCA) およびシナピン酸メチル (MSA) に対する特異性 (Fig. 1) とアミノ酸配列の相同性に基づいてタイプ A-D の4つの分類が報告された (Table 1)⁹⁾。また、エステル加水分解酵素を分類している ESTHER データベース (<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER>) においてはタンナーゼファミリーに、炭水化物エステラーゼを分類している CAZy データベース (<http://www.cazy.org>) においてはファミリー 1 (CE1) に分類される。しかしながら、CE1 には代表的なフェルラ酸エステラーゼの多くが含まれていない。さらに、カビのゲノム情報に基づいた分子系統解析からフェルラ酸エステラーゼはサブファミリー (SF)1 から 7 に分類され、その多様性が示唆されている¹⁰⁾。その中で麹菌のフェルラ酸エステラーゼは泡盛や麦焼酎な

ど、穀類の原料由来の香り物質の生成に大きく関わっていることが見出されたことから、泡盛麹菌 *A. awamori* 由来のタイプ A のフェルラ酸エステラーゼ (AwFaeA) の特性を明らかにした¹¹⁾。

3. 麹菌 *A. oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼの基質特異性と多様性

フェルラ酸エステラーゼは、2004年の時点で、Table 1に示すようにアミノ酸配列の相同性と4つの合成基質に対する特異性で分類されている⁹⁾。タイプ A 酵素はアミノ酸配列がリパーゼと類似し、基質特異性は MCA は分解せず、MSA に対し高い活性を示すこと、タイプ B 酵素はアミノ酸配列がアセチルキシランエステラーゼと類似し、基質特異性は MSA は分解せず、MpCA および MCA に対し高い活性を示すこと、タイプ C 酵素はアミノ酸配列がタンナーゼと類似し、タイプ D 酵素とともに広い特異性を示すことで分類されている。また、タイプ A およびタイプ D 酵素はヘミセルロース架橋を形成している二量体フェルラ酸の遊離能がある。しかしながら、その後、アミノ酸配列はタイプ C に類似しているものの、MSA を分解できない酵素がいくつか報告された¹³⁻¹⁵⁾。

清酒麹菌 *A. oryzae* のゲノム配列情報を基に前記の SF1 には複数のフェルラ酸エステラーゼ遺伝子が存在するとされており¹²⁾、そのうち2つのフェルラ酸エステラーゼ遺伝子をクローン化し、*Pichia pastoris* を用いて発現させた¹¹⁾。SF1 はタイプ C のフェルラ酸エステラーゼでタンナーゼとも類似性がある。それぞれのリコンビナント酵素の特徴

付けを行ったところ、一方の酵素の基質特異性はタイプ B 酵素のように MSA を分解できなかった (Table 2)。また、両酵素は *A. oryzae* のタンナーゼと類似しているが、タンナーゼ活性はなく、しかしながら、既知のクロロゲン酸エステラーゼとの類似性はなかったものの¹⁶⁾、クロロゲン酸 (カフェオイルキナ酸) に対する分解性を示した (Table 2)。

Table 2. Substrate specificity of the AoFAEB and AoFAEC for the hydrolysis of methyl cinnamates, chlorogenic acid (CGA) and α -naphthyl esters (C 2~C 8).

Substrate	Specific activity (U/mg-protein)	
	AoFAEB	AoFAEC
MFA	0.57 $\pm$ 0.003	1.5 $\pm$ 0.20
MCA	3.2 $\pm$ 0.06	34.9 $\pm$ 1.03
MpCA	30.6 $\pm$ 2.1	14.3 $\pm$ 0.28
MSA	ND	0.072 $\pm$ 0.002
CGA	1.3 $\pm$ 0.06	6.0 $\pm$ 1.2
C 2	0.042 $\pm$ 0.003	0.071 $\pm$ 0.003
C 4	1.2 $\pm$ 0.01	1.5 $\pm$ 0.56
C 6	3.7 $\pm$ 0.13	2.1 $\pm$ 0.037
C 8	1.4 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.008

Values are given as means $\pm$ standard deviations. ND, not detected.

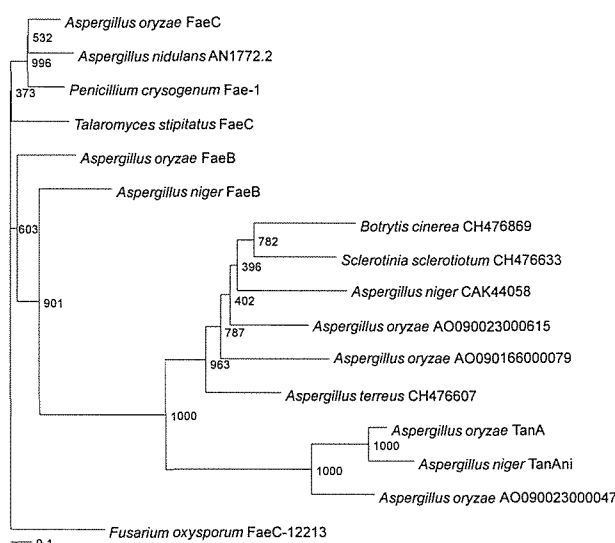


Fig. 2. Phylogenetic relationship among paraben esterase and its related hypothetical proteins, feruloyl esterases and tannases in fungi.

Phylogenetic relationships were calculated using the ClustalW software program. The phylogenetic tree was constructed based on the neighbor-joining method and visualized using the TreeView ver. 1.6.6 software program. The bar indicates 0.1 substitutions per site. The numbers given in the Figure are bootstrap values. Bootstrap values are an indication of splitting the enzymes into different branches; a value 1,000 means that the split is certain; the lower the value, the higher the probability that the enzyme actually belongs in one branch.

Table 3. Specific activity and kinetic parameters of AoPrbA for ethyl 4-hydroxybenzoic acid, propyl 4-hydroxybenzoic acid and butyl 4-hydroxybenzoic acid.

Substrate	Specific activity (U mg ⁻¹)	K _m (mM)	V _{max} (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V _{max} /K _m
Ethyl 4-hydroxybenzoic acid	0.094 $\pm$ 0.004	0.12 $\pm$ 0.03	0.037 $\pm$ 0.004	0.30
Propyl 4-hydroxybenzoic acid	0.280 $\pm$ 0.029	0.17 $\pm$ 0.03	0.074 $\pm$ 0.001	0.43
Butyl 4-hydroxybenzoic acid	0.420 $\pm$ 0.015	0.18 $\pm$ 0.04	0.107 $\pm$ 0.009	0.60

Values are given as means $\pm$ standard deviations.

したがって、フェルラ酸エステラーゼの基質特異性による分類は、必ずしもアミノ酸配列の相同性による分類とは対応しないことが分かる。

4. *A. oryzae* 由来の新規エステラーゼ

筆者らはフェルラ酸エステラーゼやタンナーゼの活性中心セリン残基近傍のアミノ酸配列が保存されているものの、それらとは異なるクラスターに分類される酵素遺伝子が存在することが分かり、*A. oryzae* 由来の遺伝子をゲノム情報を利用して探索し、機能未知な AO 090023000615 (BAE 59141) および AO 090166000079 (BAE 61730) を見いだした (Fig. 2)。AO 090023000615 発現産物の最適 pH は 7.0, pH 5~9 において安定で、最適温度は 45°C, 50°C まで安定であった。特に、基質特異性はフェルラ酸エステラーゼ基質の MFA, MpCA, MCA, MSA, タンナーゼ基質の没食子酸メチル (3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸メチル) およびエピカテキンガラートならびにエピガロカテキンガラート、さらには 3,4-ジヒドロキシ安息香酸メチルには活性を示さず、興味深いことに、4-ヒドロキシ安息香酸エチル (EHBA), 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル (PHBA), 4-ヒドロキシ安息香酸ブチル (BHBA) に対して活性を示した (Table 3)。これら 4-ヒドロキシ安息香酸エステル類はパラベンと称され、抗菌剤として食品、日用品、化粧品等に配合されている。糸状菌由来のパラベンエステラーゼは初めて見出され、本酵素を AoPrbA と名付けた¹⁷⁾。本酵素はパラベンを加水分解するが、フェルラ酸エステラーゼ活性やタンナーゼ活性は示さず、基質特異性の狭いエステラーゼであり、パラベンの 1 つであるブチル 4-ヒドロキシ安息香酸エステルのカビに対する抗菌性は本酵素の作用により消失した (Fig. 3)。パラベンの微生物に対する作用機序の研究は細菌を指標に報告されているが、カビに対する報告は見あたらない。本酵素の生物学的意義を明らかにすることは、パラベンの抗微生物活性の分子機構の解明につながると期待される。

5. フェルラ酸エステラーゼと CBM42 とのキメラ酵素

糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 54 に分類される α -L-アラビノフラノシダーゼの構造は N 末端側の触媒ドメインと C 末端側のアラビノース結合ドメインとからなる

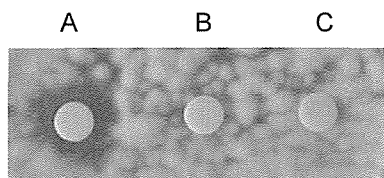


Fig. 3. Effect of AoPrbA on antimicrobial activity of BHBA against *A. oryzae*.

An antifungal paper disk was loaded with 1.0 μM of BHBA (A), 1.0 μM of BHBA supplemented with 5.0 μg of AoPrbA (B) and 1.0 μM of BHBA supplemented with 10.0 μg of AoPrbA (C) on a PD agar plate inoculated with *A. oryzae* and was incubated at 30°C for 4 days. The antifungal activity was estimated on the basis of the diameter of the inhibition zone formed on the agar.

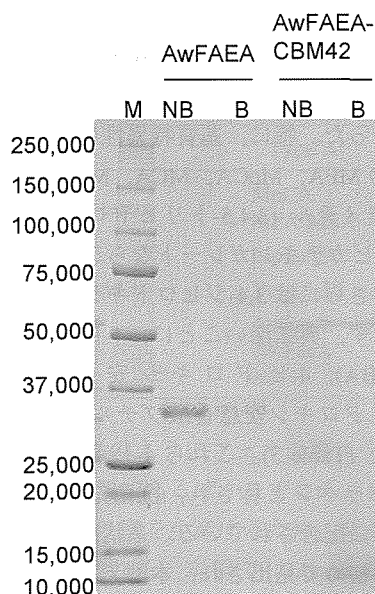


Fig. 4. Binding of native and chimeric enzymes to insoluble wheat arabinoxylan.

The supernatant (non-bound) protein fractions (NB) and the precipitated and solubilized (bound) protein fractions (B) were subjected to SDS-PAGE. Lane M, standard proteins.

ことが麹菌 *Aspergillus kawachii* NBRC 4308 株由来の酵素タンパク質 (AkAbf54) の X 線結晶構造解析により明らかにされた¹⁸⁾。また、アラビノース結合ドメイン (AkCBM42) はヘミセルロース側鎖のアラビノフラノースに特異的に結合し、アラビノフラノースの加水分解に寄与する炭水化物結合モジュール (CBM42) として分類された¹⁹⁾。AkCBM42 を *Aspergillus awamori* NBRC4033 株由来のフェルラ酸エステラーゼ (AwFaeA) に連結したキメラ酵素 (AwFaeA-CBM42) を造成し、その特性を検討した。遺伝子導入した *P. pastoris* 培養上清中のキメラ酵素のエステラーゼ活性は野生型 AwFaeA と同程度のエステラーゼ活性を示し、培養上清から陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGE より AwFaeA-CBM42 の分子量は 53,000 で、AwFaeA の 35,000 より大きく、また、抗 AwFaeA 抗体および抗 AkAbf54 抗体を用いたウェスタン解析によりキメラ酵素タンパク質であると確認された。SDS-PAGE を利用した解析から AwFaeA はほとんどがアラビノキシラン非結合画分から顕著なタンパク質バンドが確認されたが、AwFaeA-CBM42 はアラビノキシラン

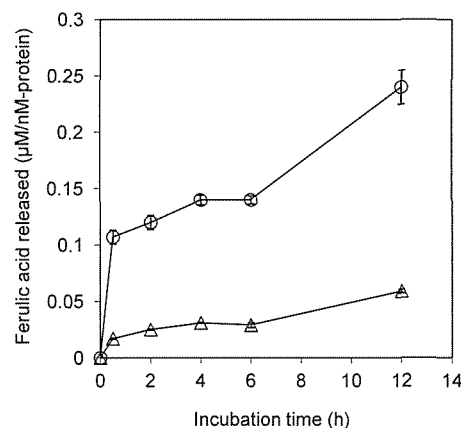


Fig. 5. The time course of the release of ferulic acid from insoluble wheat arabinoxylan by native (open triangle) and chimeric (open circle) enzymes.

結合画分に見出され、アラビノキシランへの結合性が増大した (Fig. 4)。CBM42 がアラビノキシラン側鎖のアラビノースに結合し、結合性が増大したと考えられ、キメラタンパク質でも CBM42 が機能していると示唆された。AwFaeA-CBM42 は反応開始とともに高いフェルラ酸遊離活性を示し、12 時間後には野生型に対して比活性で約 3 倍高いフェルラ酸遊離活性を示した (Fig. 5)。CBM42 によるキシランのアラビノース側鎖への結合により AwFaeA の触媒効率が高まったこと、また、CBM42 の結合定数はこれまで報告されている CBM と比べ低く、基質から解離し易いことも要因の 1 つと考えられる。

6. フェルラ酸エステラーゼの構造

フェルラ酸エステラーゼの触媒残基はセリン、アスパラギン酸、ヒスチジンの catalytic triad で構成され、リパーゼおよびセリンプロテアーゼと同様の触媒機構である。その構造は α/β ヒドロラーゼフォールドを有し²⁰⁾、*A. niger* 由来タイプ A フェルラ酸エステラーゼの立体構造が 2 つのグループから 1995 年に報告された^{21,22)}。本酵素の構造は *Rhizomucor miehei* など糸状菌由来のリパーゼに類似しているが、本酵素はリパーゼ活性を有しないことからフェルラ酸を認識するアミノ酸残基が解析され、フェルラ酸の水酸基やカルボキシル基と水素結合を形成することが可能な触媒残基近傍のチロシン残基などが関わっていることが示された²³⁾。また、lid と呼ばれるドメインがリパーゼやフェルラ酸エステラーゼには存在し、リパーゼでは lid が開閉することで水油界面における活性発現に重要な役割を演じている。一方、フェルラ酸エステラーゼではリパーゼのような機能は lid ドメインにはない。ところが、フェルラ酸エステラーゼには lid ドメイン中に N 糖鎖修飾部位があり、N 糖鎖修飾により lid が常に開いた状態にあると考えられている。また、N 糖鎖修飾ができないアミノ酸置換変異酵素では酵素活性や熱安定性が低下した^{24,25)}。

ごく最近、*A. oryzae* のフェルラ酸エステラーゼ (AoFaeB) の X 線結晶構造解析による立体構造が明らかにされ、こ

れまで報告のない大きな lid ドメインが存在するとともに、触媒残基のセリン、ヒスチジン残基の隣のシステイン残基同士がジスルフィド結合を形成するユニークなモチーフをもつことがわかり、CS-D-HC モチーフと名付けられた²⁶⁾。Table 1 に示すタイプ B フェルラ酸エステラーゼの構造解析に関する報告はまだないが、類似性のある *A. awamori* 由来のアセチルキシランエステラーゼは X 線結晶構造が解明され²⁷⁾、今後、麴菌ゲノム情報を基にした酵素の構造解析が一段と進むものと考えられる。

7. おわりに

麴菌のキシラン分解酵素の中でキシラナーゼやキシロナーゼは解析例が多い。*A. kawachii* のキシラナーゼは好酸性、耐酸性を有する酵素として特徴付けられ、その構造解析から²⁸⁾、好酸性・耐酸性機構が提唱されている^{29,30)}。本稿ではこれまで注目されなかったアクセサリー酵素の構造と機能について紹介してきたが、これらの酵素はバイオマスの効率的分解に寄与するとともに、食品素材の開発の面からも重要であることが分かってきた。麴菌のゲノム情報を活用し、酵素の構造と機能解明が一段と進むことにより、今後の応用展開が期待される。

謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金 (20580071) および第 10 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞 (天野エンザイム株式会社) の助成により実施しました。

文献

- 1) G. Williamson, P.A. Kroon and C.B. Faulds: Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology*, **144**, 2100–2023 (1998).
- 2) R.P. de Vries, H.C.M. Kester, C.H. Poulsen, J.A.E. Benen and J. Visser: Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **327**, 401–410 (2000).
- 3) Ardiansyah, H. Shirakawa, T. Koseki and M. Komai: Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2825–2830 (2008).
- 4) L. Poquet, M.N. Clifford and G. Williamson: Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metabol. Dispos.*, **36**, 190–197 (2008).
- 5) M. Tenkanen, J. Schuseil, J. Puls and K. Poutanen: Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocelluloses. *J. Biotechnol.*, **18**, 69–84 (1991).
- 6) C.B. Faulds and G. Williamson: Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **17**, 349–359 (1993).
- 7) C.B. Faulds and G. Williamson: Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*, **140**, 779–787 (1994).
- 8) R.P. de Vries, B. Michelsen, C.H. Poulsen, P.A. Kroon, R.H. van den Heuvel, C.B. Faulds, G. Williamson, J.P. van den Hombergh and J. Visser: The *faeA* genes from *Aspergillus ni-*

ger and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4638–4644 (1997).

- 9) V.F. Crepin, C.B. Faulds and I.F. Connerton: Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 647–652 (2004).
- 10) I. Benoit, E.G.J. Danchin, R.J. Bleichrodt and R.P. de Vries: Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 387–396 (2008).
- 11) T. Koseki, K. Takahashi, S. Fushinobu, H. Iefuji, K. Iwano, K. Hashizume and H. Matsuzawa: Mutational analysis of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* involved in substrate discrimination and pH dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, **1722**, 200–208 (2005).
- 12) T. Koseki, A. Hori, S. Seki, T. Murayama and Y. Shiono: Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 689–696 (2009).
- 13) R.P. de Vries, P.A. van Kuyk, H.C.M. Kester and J. Visser: The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.*, **363**, 377–386 (2002).
- 14) T. Sakamoto, S. Nishimura, T. Kato, Y. Sugawara, M. Tsuchiyama and H. Kawasaki: Efficient extraction of ferulic acid from sugar beet pulp using the culture supernatant of *Penicillium chrysogenum*. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 115–120 (2005).
- 15) H.D. Shin and R.R. Chen: A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1323–1330 (2007).
- 16) I. Benoit, M. Asther, Y. Bourne, D. Navarro, S. Canaan, L. Lesage-Meesen, M. Herweijer, P.M. Coutinho, M. Asther and E. Record: Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5624–5632 (2007).
- 17) T. Koseki, K. Mihara, T. Murayama and Y. Shiono: A novel *Aspergillus oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters. *FEBS Lett.*, **584**, 4032–4036 (2010).
- 18) A. Miyanaga, T. Koseki, H. Matsuzawa, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu: Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44907–44914 (2004).
- 19) A. Miyanaga, T. Koseki, Y. Miwa, Y. Mese, S. Nakamura, A. Kuno, J. Hirabayashi, H. Matsuzawa, T. Wakagi, H. Shoun and S. Fushinobu: The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 α -L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicelluloses. *Biochem. J.*, **399**, 503–511 (2006).
- 20) M. Nardini and B.W. Dijkstra: α/β Hydrolase fold enzyme: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 732–737 (1999).
- 21) J.A. Hermoso, J. Sanz-Aparicio, R. Molina, N. Juge, R. Gonzalez and C.B. Faulds: The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *J. Mol. Biol.*, **338**, 494–506 (2004).
- 22) K. McAuley, A. Svendsen, S.A. Patkar and K.S. Wilson: Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 878–887 (2004).
- 23) C.B. Faulds, R. Molina, F. Husband, N. Juge, J. Sanz-Aparicio and J.A. Hermoso: Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. *FEBS J.*, **272**, 4362–4371 (2005).
- 24) I. Benoit, M. Asther, G. Sulzenbacher, E. Record, L. Marmuse, G. Parsiegla, I. Gimbert, M. Asther and C. Bignon: Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett.*, **580**, 5815–5821 (2006).
- 25) T. Koseki, K. Takahashi, T. Handa, Y. Yamane, S. Fushinobu and K. Hashizume: N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and

- catalysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2476–2480 (2006).
- 26) 鈴木健太郎, 小関卓也, 小宮 大, 伏信進矢, 祥雲弘文, 若木高善: 麹菌由来フェルラ酸エステラーゼのX線結晶構造解析. 日本農芸化学会平成22年度大会講演要旨集, p. 25 (2010).
- 27) 小宮 大, 伏信進矢, 小関卓也, 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 若木高善, 祥雲弘文: *Aspergillus awamori* 由来アセチルキシランエステラーゼの結晶構造解析. 日本応用糖質科学会平成20年度大会講演要旨集, p. 56 (2008).
- 28) S. Fushinobu, K. Ito, M. Konno, T. Wakagi and H. Matsuzawa: Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp 37 for catalysis at low pH. *Protein Eng.*, **11**, 1121–1128 (1998).
- 29) J. Kongsted, U. Ryde, J. Wydra and J. H. Jensen: Prediction and rationalization of the pH dependence of the activity and stability of family 11 xylanase. *Biochemistry*, **46**, 13581–13592 (2007).
- 30) S. Fushinobu, T. Uno, M. Kitaoka, K. Hayashi, H. Matsuzawa and T. Wakagi: Mutational analysis of fungal family 11 xylanases on pH optimum determination. *J. Appl. Glycosci.*, **58**, 107–114 (2011).

質疑応答

[質問]

キッコーマン 小熊

フェルラ酸エステラーゼの活性チェックにクロロゲン酸を用いているが、すでにクロロゲン酸エステラーゼは報告されている。これらは同じ酵素に属すると考えているのか。

[回答]

Aspergillus oryzae フェルラ酸エステラーゼ B はアミノ酸配列がタンナーゼと類似し、タンナーゼファミリーに分類され、フェルラ酸エステルに加えて、カフェ酸エステルおよび *p*-クマール酸エステルも加水分解します。一方, *A. niger* クロロゲン酸エステラーゼはアミノ酸配列から ESTEHR データベースではカルボキシエステラーゼ B ファミリーに分類され、フェルラ酸のエステルは加水分解しないと報告されておりますので、同じ酵素に属するものではないと考えております。

[質問]

大阪市工研 中野

タンナーゼの Lid の機能が分かっているならば教えてください。

[回答]

糸状菌リパーゼで分かっている Lid の機能 (開閉することによる水油界面での活性制御) は、フェルラ酸エステラーゼを含めてタンナーゼファミリーの酵素では報告がありません。構造がリパーゼと類似しているタイプ A のフェルラ酸エステラーゼも Lid を備えていますが、常に開いた状態にあると報告されております。ご指摘のように、タンナーゼファミリーのフェルラ酸エステラーゼの Lid について機能は分かっておりませんので、明らかにしていきたいと考えております。