

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～真菌基原の添加物の分析法の開発～

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨 2020年度に開発を行った SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS による分析を組み合わせた微生物由来酵素添加物の基原の解析法について、その適用範囲や問題点を明らかにするために真菌由来の9種の製品の解析を行った。5種の製品が Mascot サーチを用いた検索により、1種が NCBI のデータベースから取得したアミノ酸配列と MALDI-TOF-MS スペクトルを比較することにより同定できた。その他の3種については、基原の菌種のタンパク質情報がデータベースに含まれていないため同定できなかった。検討した解析法は、簡便に精度高く多様な添加物酵素の同定に対して適用可能であることが明らかになった。その一方で、同定の可否は検索に用いるデータベースの情報量に依存するという限界も明らかになった。今後は、菌種の同定マーカーの候補となったタンパク質アミノ酸配列の種内多型の有無を確認すること、及び細菌を基原とした酵素を含めてさらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、本解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続する。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 室長

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員

A. 研究目的

既存添加物酵素は、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。既存添加物酵素の基原は一つの微生物種に規定されておらず、異なる種に由来する製品であっても、酵素活性が同じであれば同一の品目とみなされる。微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ有害性を有する物質を産生するものがあることから、基原菌種の同定は重要である。その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基

原菌種の同定が難しい品目は多いことが知られている。そこで、微生物由来基原の品目の同定法の構築を目的とし、タンパク質アミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法に関する検討を行う。

本研究課題におけるこれまでの研究成果から、既存食品添加物酵素の LC-TOF-MS または MALDI-TOF-MS を用いた分析でアミノ酸配列を推定し Mascot サーチで基原菌種を検索すると、①確からしい検索結果が得られたが製品付帯情報による基原菌種と一致しなかった、②いずれの菌種もヒットせず同定できなかった、③SDS-PAGE でのバンドパターンが複雑となり Mascot サーチの結果の解釈が難しかった、といった結果となった添加物が存在したことを確認した。①については、昨年度、製品情報では *Aspergillus foetidus* 由来とされた α -アミラーゼについて、Mascot サーチによって *Aspergillus shirousami* と同定された。これらはシノニム同士であるため、本研究の分析方法によって正しく同定できたこと、及びシノニムであることが認識できなかった場合には正確に同定できな

かったものと認識される可能性があるが、*A. foetidus* の複数のシノニムを整理することによって同一であることが明確となり正しく同定できたことが示した。②については、データベースに登録された配列の不足と考へ、同定精度は使用するデータベースに大きく依存するため、データベースを整備し登録情報の学術的な正確性を向上させ、登録情報を厚くする必要があると考へた。そこで本年度は、Mascotサーチに搭載されているアミノ酸配列データベースである SwissProt 以外から収集した配列データを比較に使用することによって、同定が可能となるかを確認した。③については、分析した添加物に、分解や化学的変性や、製造工程に含まれる別タンパク質の添加、コンタミネーションなどにより複数種類のタンパク質が含まれた状態であったためと考へた。昨年度は、一昨年度に同定できなかった酵素添加物を用いて SDS-PAGE でタンパク質を分離し、個別のタンパク質を分析し同定する方法の構築を行った。SDS-PAGE で検出されたバンドを個別に酵素消化し、得られたペプチドを MALDI-TOF-MS で解析し、Mascot サーチで同定を行ったところ、*Aspergillus* 属真菌を基原とするアミラーゼやガラクトシダーゼの同定に成功した。そこで本年度は、引き続きこれまでに同定できなかった添加物を用いて、SDS-PAGE でのタンパク質単離及び MALDI-TOF-MS 分析を組み合わせた方法で、真菌基原のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びプロテアーゼの同定が可能かどうか検証を行った。

B. 研究方法

B-1) 分析機器

既存添加物の質量分析には、MALDI-TOF-MS (Spiral TOF-plus JMS-S3000 ; 日本電子株式会社) を使用した。

B-2) 試料

研究対象とした既存添加物試料には、過去の研究¹⁾において分析した添加物酵素 9 種 (セルラーゼ No.52<B576>, ヘミセルラーゼ 3 試料 No.101<B652>, 102<B653> 及び 103<B575

>, プロテアーゼ 5 試料 No.61<B675>, No.62<B676>, No.63<B677>, No.64<B678> 及び No.65<B679> を用いた。なお、< >内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

B-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、いずれも 20 mg/mL の濃度となるよう精製水に溶解した。それぞれ等量の 2×laemmli sample buffer (Bio-Rad 社) と混合後、SDS-PAGE に供した。ゲルからバンドを切り出し、約 1 mm 立方に細かく切り刻み、1.5 mL 容のマイクロチューブに入れた。チューブに脱色液 (50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 150 µL を加え、10 分間振盪 (1000 rpm) 後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 µL を加え、10 分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。還元用バッファー (10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 100 µL を加え、56°C で 45 分振盪 (1000 rpm) した。溶液を除去後、アルキル化用バッファー (55 mM ヨードアセトアミドを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 100 µL を加え、暗所下で 30 分間振盪 (1000 rpm) した。溶液を除去後、チューブに脱色液 (50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 150 µL を加え、10 分間振盪 (1000 rpm) 後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 µL を加え、10 分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。トリプシン (Trypsin Sequencing Grade, modified; Roche Diagnostics 社) 10 µg/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 20 µL を加え、37°C 一晩インキュベートした。0.1% TFA を 100 µL 加え、15 分間インキュベート後に上清を回収した。同様の操作を合計 3 回行い、全ての上清をまとめて、窒素気流で 20 µL 程度まで濃縮した。0.1% トリフロオロ酢酸を含む 50% アセトニトリル水溶液、続いて 0.1% トリフロオロ酢酸水溶液で平衡化した ZipTip 0.2 µL-C18 (ミリポア社製) にトリプシン消化産物を吸着させ、

0.1%トリフロオロ酢酸水溶液で洗浄後、0.1%トリフロオロ酢酸と 10 mg/mL のマトリクス (4-クロロ- α -シアノケイ皮酸; シグマアルドリッチ社) を含む 50% アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF-MS のサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF-MS を用いてスパイラルモードでマススペクトルを測定した。キャリブレーションには、トリプシン由来の 2 種の自己消化ペプチド (m/z 805.4163 及び 2163.0564) を用いた。

B-4) ペプチド質量を指標としたタンパク質の同定

マススペクトルから得られたペプチド質量を指標としたタンパク質の同定は、Matrix Science のウェブ上のプログラム Mascot Search Peptide Mass Fingerprint を用いて行った。主要なペプチドの質量を入力し、検索条件は以下のように設定した; Database : SwissProt, Taxonomy : Other Fungi, Enzyme : Trypsin, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tol \pm : 0.5Da, Mass values: MH⁺。これによって確からしい菌種とタンパク質が同定できなかった場合、National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) データベースの検索により該当する菌種のタンパク質のアミノ酸配列を得て、酵素消化後のペプチド配列の予測ソフトウェア expasy (https://web.expasy.org/peptide_mass/) によりトリプシン消化後のペプチドの質量を算出し、これと TOF-MS 分析によって得られたマススペクトルと目視により照合することによって、同定を行った。

C. 結果及び考察

C-1) MALDI-TOF-MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

Figure 1-3 に各試料の SDS-PAGE 像と泳動量、Figure 4-14 に、各試料由来のペプチドの MALDI-TOF-MS スペクトル(タンパク質が同定できたもののみ)、Table 1 に各試料の由来、SDS-PAGE 像から推定した分子量、及び MALDI-TOF-MS による同定結果 (タンパク質名、生物

種、質量、Coverage) を示した。

試料 52; 本試料の基原菌種は、製品の付帯情報によるとヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*) の α -アミラーゼである。SDS-PAGE 像において、35kDa 付近のメインのバンドの他、複数のバンドが検出された。3 本のバンドを切り出して解析した結果、いずれも Mascot サーチにおいてタンパク質が同定されなかった。そこで NCBI のデータベースから *P. coccineus* のシノニムである *Trametes coccinea* のセルラーゼ様タンパク質のアミノ酸配列 172 種を得て、全てのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。その結果と MALDI-TOF-MS 解析で得られたスペクトルを比較した結果、バンド 52-1 がセルラーゼの 1 種である glycoside hydrolase family 79 protein [*Trametes coccinea* BRFM310] OSD01894.1 由来のタンパク質と同定された。Mascot サーチで同定できなかった原因は、SwissProt のデータベースにヒイロタケのタンパク質が登録されていないためと推定された。NCBI のデータベースには *T. coccinea* のタンパク質の情報があるため、今後 SwissProt にも登録されれば、Mascot サーチで同定可能になると考えられた。

試料 101-103; 101 と 102 の基原菌種は、*Trichoderma longibrachiatum*、103 の基原菌種は、*Trichoderma viride* である。いずれの酵素も SDS-PAGE 像において複数のバンドが検出されたため、それぞれを切り出して解析を行った。101 については、5 種のバンドを解析した結果、2 種が Mascot サーチによって同定され、それぞれ *Trichoderma harzianum* 及び *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei* の有性世代) のヘミセルラーゼであった。酵素種は製品の付帯情報と一致したが、菌種が一致しなかったため、同定されたタンパク質の *T. longibrachiatum* における相同タンパク質のアミノ酸配列を NCBI からアミノ酸配列 1 種を得て、これらの全てのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。これらと MALDI-TOF-MS スペクトルを比較した結果、*T. longibrachiatum* の相同タンパク質からは生成されず、*T. harzianum* のヘミセルラーゼからのみ生

成されるペプチドがバンド 2 から、*H. jecorina* のヘミセルラーゼからのみ生成されるペプチドがバンド 4 から検出されていた。この結果から、試料 101 の基原の菌種は少なくとも現在得られているデータからは *T. longibrachiatum* とは同定できず、*T. harzianum* または *H. jecorina* の可能性もあると考えられた。

102 については、7 種のバンドを解析した結果、5 種が Mascot サーチによって同定され、いずれも *H. jecorina* 由来のヘミセルラーゼであった。101 の解析結果と同様に、酵素種は製品の付帯情報と一致したが、菌種が一致しなかった。そこで、同定されたタンパク質の *T. longibrachiatum* における相同タンパク質のアミノ酸配列を NCBI からアミノ酸配列 1 種を得て、これらのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。その情報と MALDI-TOF-MS スペクトルを比較した結果、*T. longibrachiatum* の相同タンパク質からは生成されず、*T. harzianum* のヘミセルラーゼからのみ生成されるペプチドがバンド 2 とバンド 4 から検出されていた。この結果から、試料 102 の基原の菌種は少なくとも現在得られているデータからは *T. longibrachiatum* とは同定できず、*T. harzianum* の可能性もあると考えられた。

101 及び 102 で確認された現象は、製品の付帯情報による菌種と、実際の製品で使用された菌種が異なっていた可能性の他に、*T. longibrachiatum*、*T. harzianum* 及び *T. reesei* が極近縁である²⁾ことと関連してヘミセルラーゼのアミノ酸配列に種内多型が生じている可能性も考えられる。様々な生物種で、近縁な菌種間では、同一の菌種の異なる菌株間で相同なタンパク質のアミノ酸配列が異なると同時に、異なる菌種間でそのタンパク質のアミノ酸配列が一致している、つまり一部のアミノ酸配列が菌種内で固定されていない種内多型が生じていることが報告されている³⁾。その場合、ヘミセルラーゼのアミノ酸配列が菌種特異的でない可能性がある。添加物酵素の分析から得たアミノ酸配列が、基原菌種の同定にどの程度有効かを評価するためには、今後、タンパク質の種類

ごとに、同種の複数菌株から得た配列間の一致率を複数の近縁種にまたがって確認し、菌種特異的であるかを評価する必要があることも確認された。この作業を行うことによって、そのタンパク質のアミノ酸配列を菌種同定のマーカーとすることが可能となる。

103 については、5 種のバンドを解析した結果、いずれも Mascot サーチにより同定することができなかった。101 と 102 の解析結果から、SwissProt のデータベースには 103 の基原の菌種である *T. viride* のプロテアーゼタンパク質の情報は登録されていると考えられる。しかし 103 だけで 5 種のバンドが同定されなかった原因は、この製品の基原菌種は *T. viride* ではなく、真の基原菌種の情報が SwissProt のデータベースに登録されていない、または今回単離できたバンドのタンパク質は製造過程で培地などから混入した夾雑物であり、そのアミノ酸配列がデータベースに含まれていない、といった理由により同定できないことなどが考えられた。2019 年度に LC-TOF-MS を用いて行われた解析結果においては、小麦由来の 15kDa 前後のアミラーゼインヒビターが同定されていた¹⁾。しかし今回の MALDI-TOF-MS を用いた解析では小麦由来のタンパク質は検出されなかった。

試料 61-65 ; 61 と 62 の基原菌種は *Aspergillus melleus*、63-65 の基原菌種は *Aspergillus niger* である。SDS-PAGE による解析の結果、いずれも主要なバンドが 1 種ずつ検出されたため、それらを解析した。その結果、61 と 62 のバンドはいずれも Mascot search で同定できなかった。SwissProt のデータベース中に *A. melleus* の情報が含まれていないためと考えられた。63、64 及び 65 のバンドについては、*A. niger* のプロテアーゼと同定され、これは製品付帯情報の基原菌種と一致したことから、正確に同定できたことが確認された。

今後は、これまでの検討において同定が不可能であったような菌種で示されたように、真菌を含む多くの添加物の基原となっている微生物種のタンパク質アミノ酸配列を決定し、SwissProt またはローカルで検索可能なデータベースに収録する作業を進めることが必要で

あることが確認された。また、分析対象とする酵素について、菌種の同定マーカーの候補となったタンパク質のアミノ酸配列において種内多型の有無を確認し、菌種特異的であるかを評価する必要があることも示された。加えて、細菌を基原とした酵素を含めて、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、添加物の基原菌種やタンパク質の種類と同定が困難なケースの原因についての情報を蓄積していく必要があると考えられた。これらを行うことで、今後、TOF-MS分析で得られたスペクトルパターンから、多くの既存添加物酵素基原を正確に同定することが可能となると考えられた。基原菌種の解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続していく。

D. 結論

昨年度に開発した SDS-PAGE によって添加物に含まれる個々のタンパク質を単離した後に、それぞれのタンパク質について MALDI-TOF-MS による分析を行う手法を用い、真菌を基原としたセルラーゼ及びプロテアーゼ製品の基原菌種の特定を行った。その結果、いくつかの酵素製品について基原菌種の特定に成功した。また、付帯する基原菌種と解析結果が異なる可能性のある製品が認められた。*A. melleus* 及び *P. coccineus* では、昨年度構築した SDS-PAGE でのタンパク質単離及び MALDI-TOF-MS での分析を組み合わせた手法でも、Mascot search で用いる SwissProt のデータベースに情報が一切含まれていないため、登録情報がまったくヒットせず基原菌種もタンパク質の種類と同定も不可能であった。しかしその場合には、さらに NCBI データベースから収集したアミノ酸配列との照合を行うことによって、正確に菌種を同定することが可能となった。SDS-PAGE で分離したシングルバンド由来のペプチドを MALDI-TOF-MS で解析する基原菌種の解析法は、簡便に精度高く多様な添加物酵素に対して適用可能であることが明らかになった。その一方で、検索に用いるデータベースの情報量に依存するという限界も明らかになった。今後は、菌種

の同定マーカーの候補となったタンパク質のアミノ酸配列の種内多型の有無を確認すること、及び細菌を基原とした酵素を含めて、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、基原菌種の解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続する。

E. 参考文献

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 西崎雄三: 既存添加物の基原同定手法に関する研究〜ペプチドを指標とした既存添加物酵素の基原同定法の検討〜. 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業 H29-食品-一般-007), 既存添加物の品質向上に資する研究 平成 29〜31 年度総合分担報告, 2020.
- 2) Asis A, Shahriar S, Naher L, et al. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports*. 48:3285–3301, 2021.
- 3) Hadami K, Ameziane E, Hassani R, et al. Association between GPX1 Pro189Leu polymorphism and the occurrence of bladder cancer in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2(14):38-43, 2016.

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

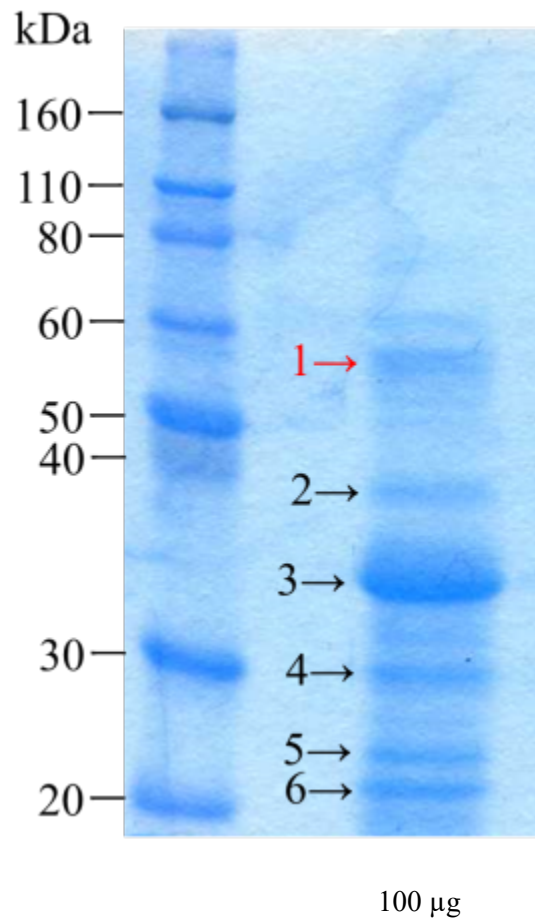


Figure 1. 試料 52 の SDS-PAGE 像
同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

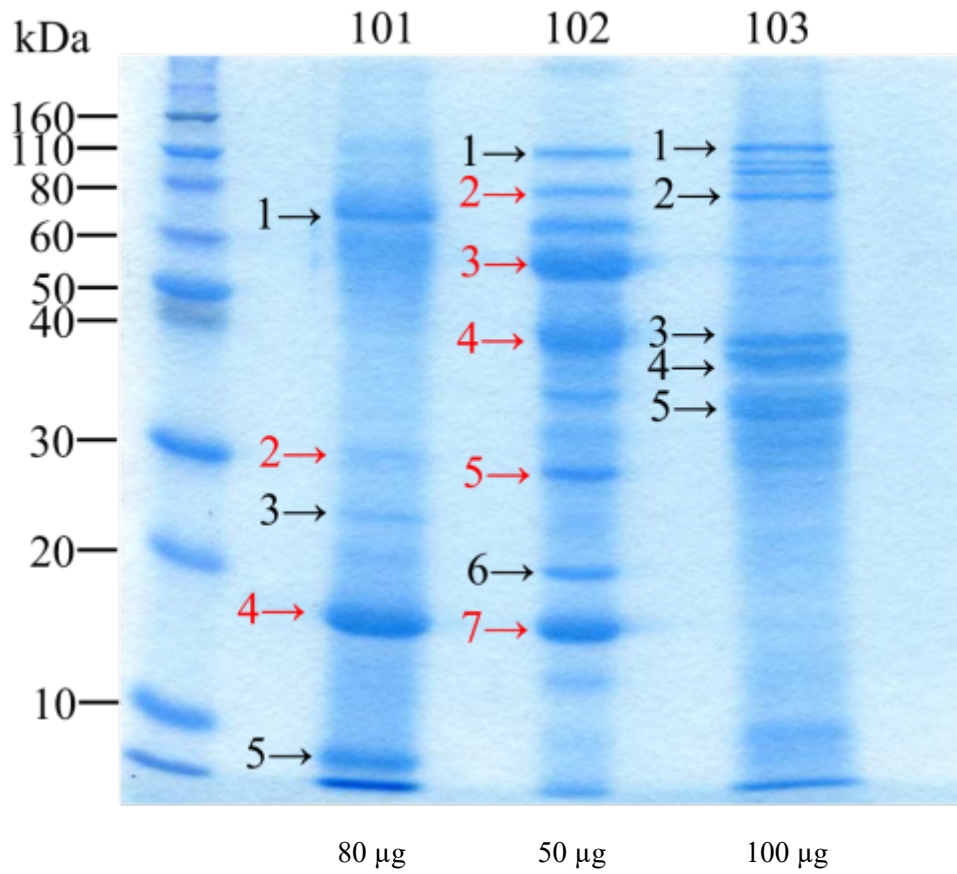


Figure 2. 試料 101,102 及び 103 の SDS-PAGE 像
同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

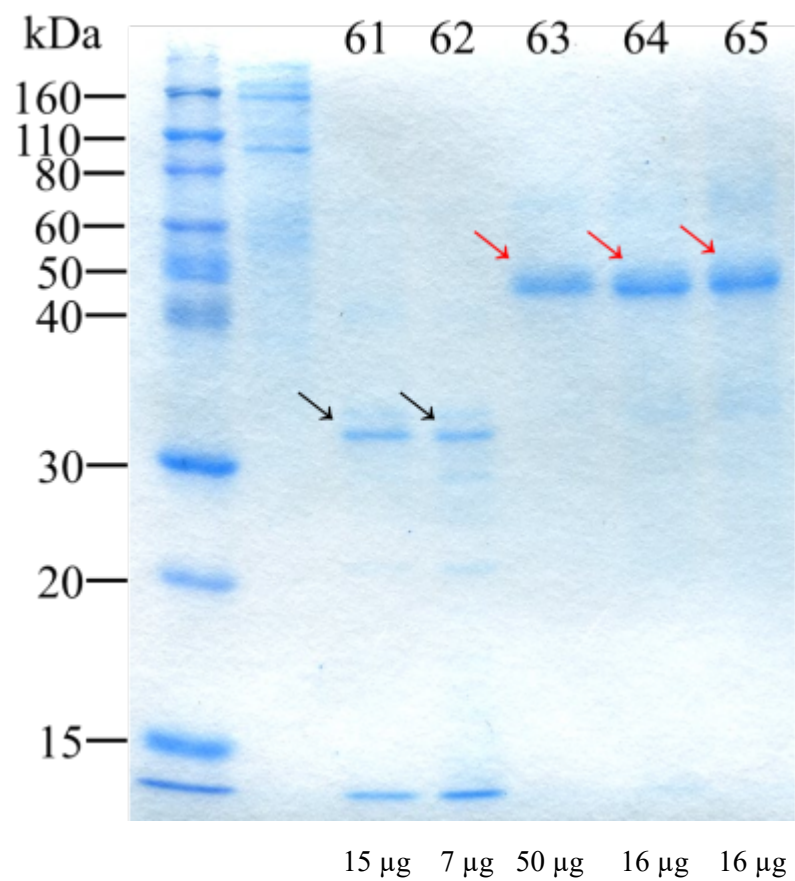


Figure 3. 試料 No.61-65 の SDS-PAGE 像
 同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

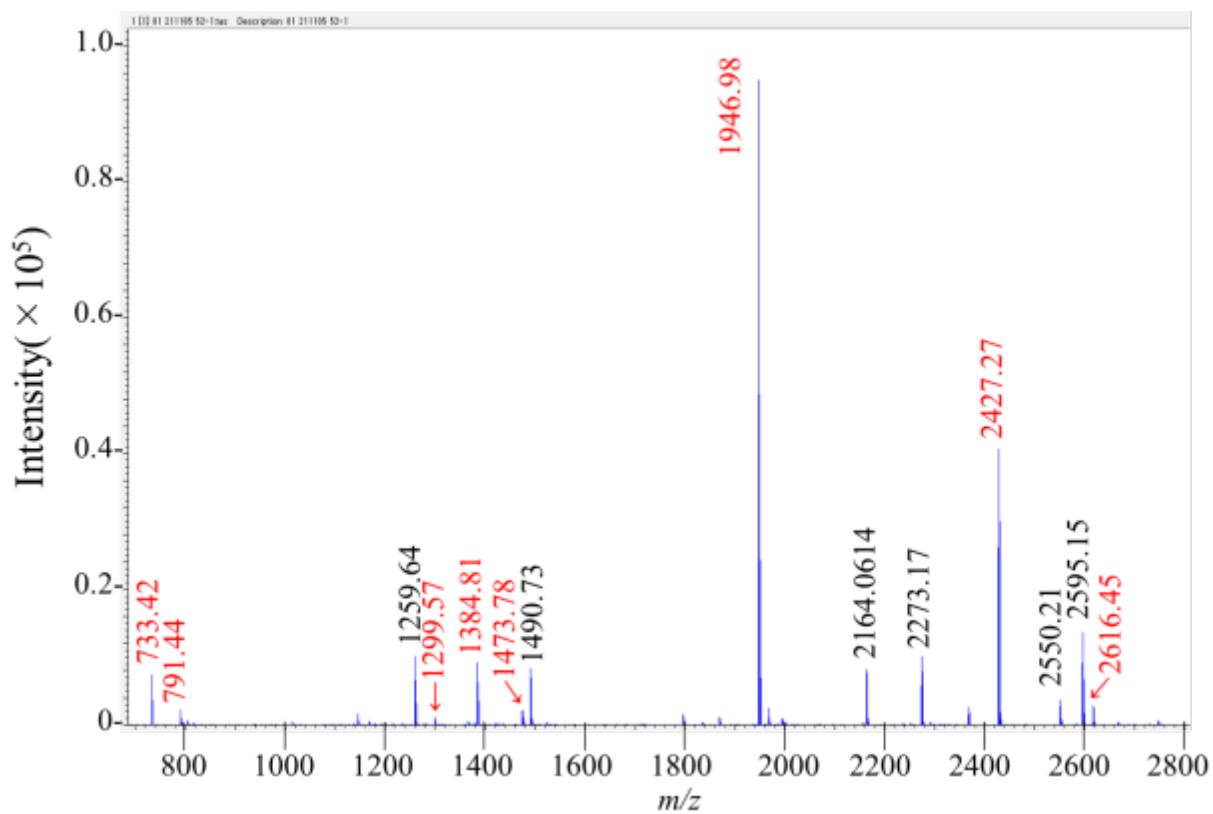


Figure 4. 試料 52 バンド 1 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

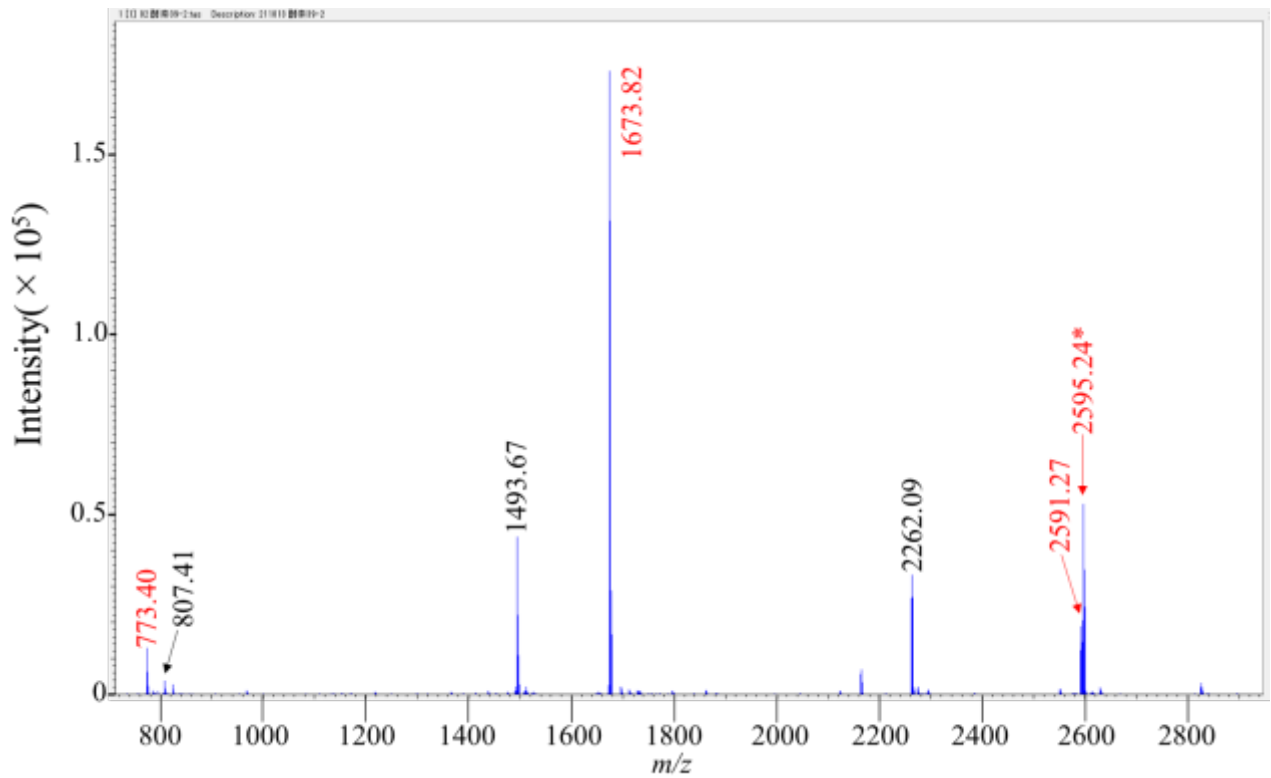


Figure 5. 試料 No.101 のバンド 2 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し, *は *T. lognbranchiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

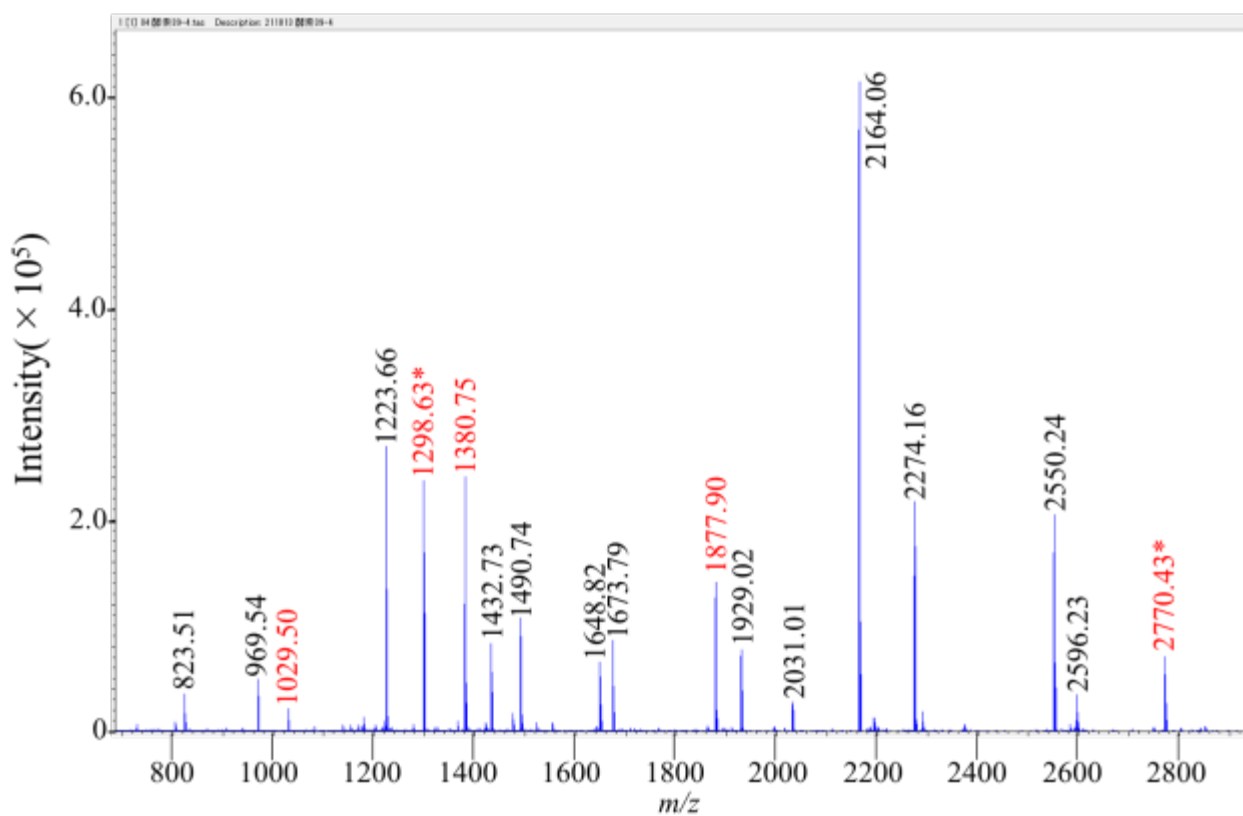


Figure 6. 試料 No.101 のバンド 4 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し, *は *T. lognbranchiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

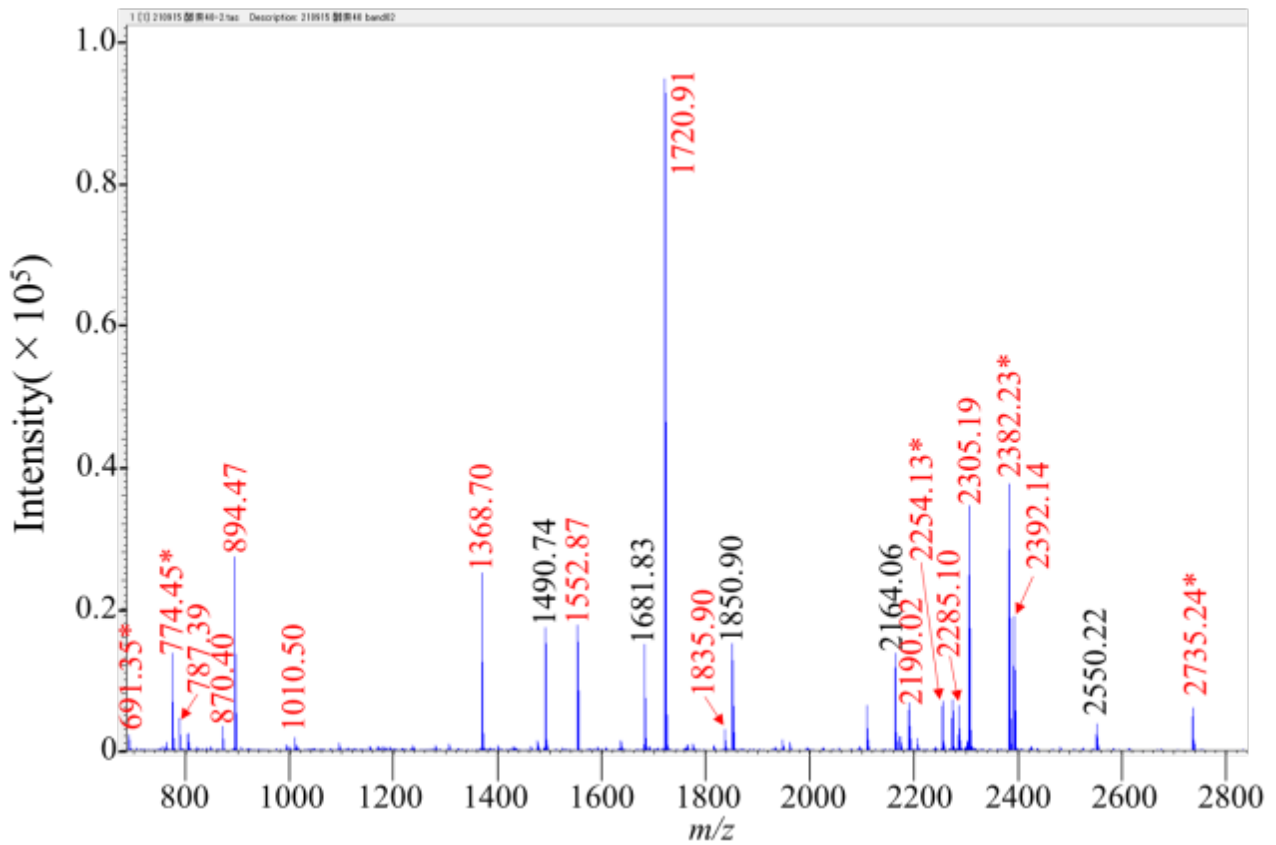


Figure 7. 試料 No.102 のバンド 2 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し、*は *T. lognibrachiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

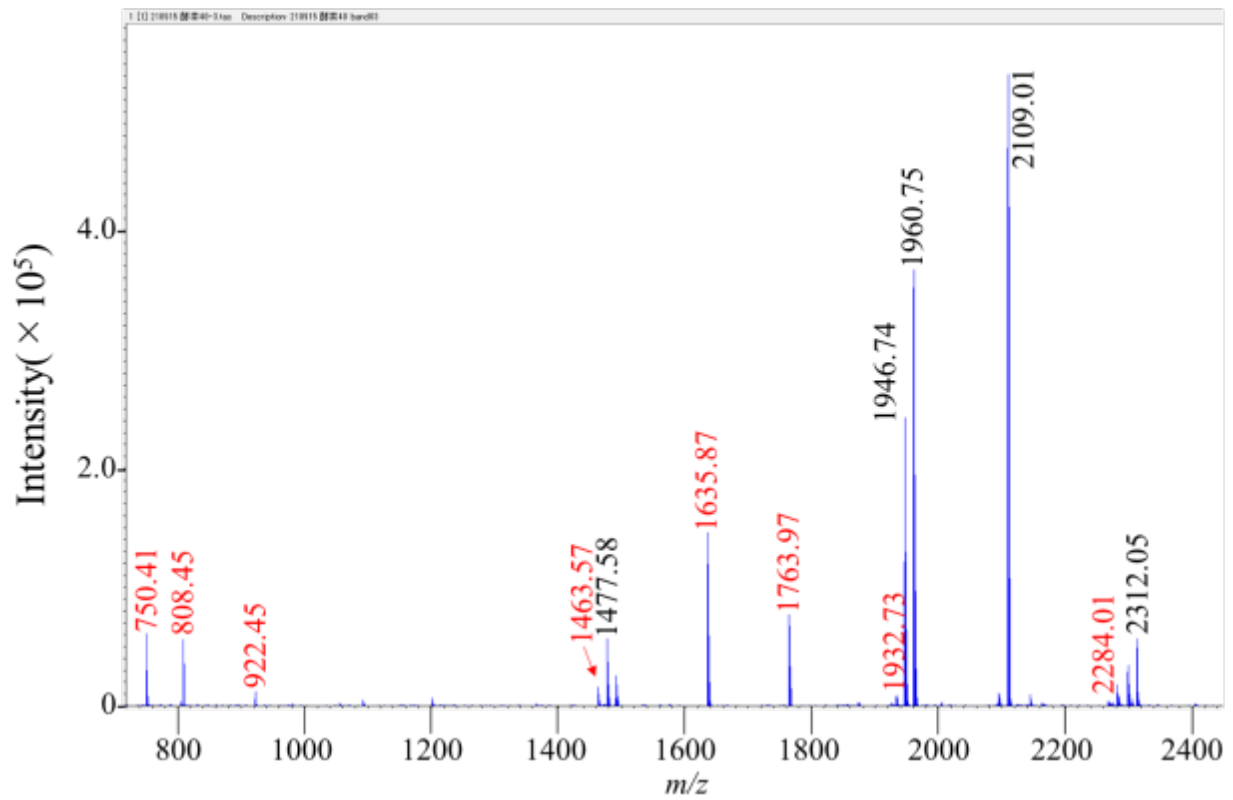


Figure 8. 試料 No.102 のバンド 3 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

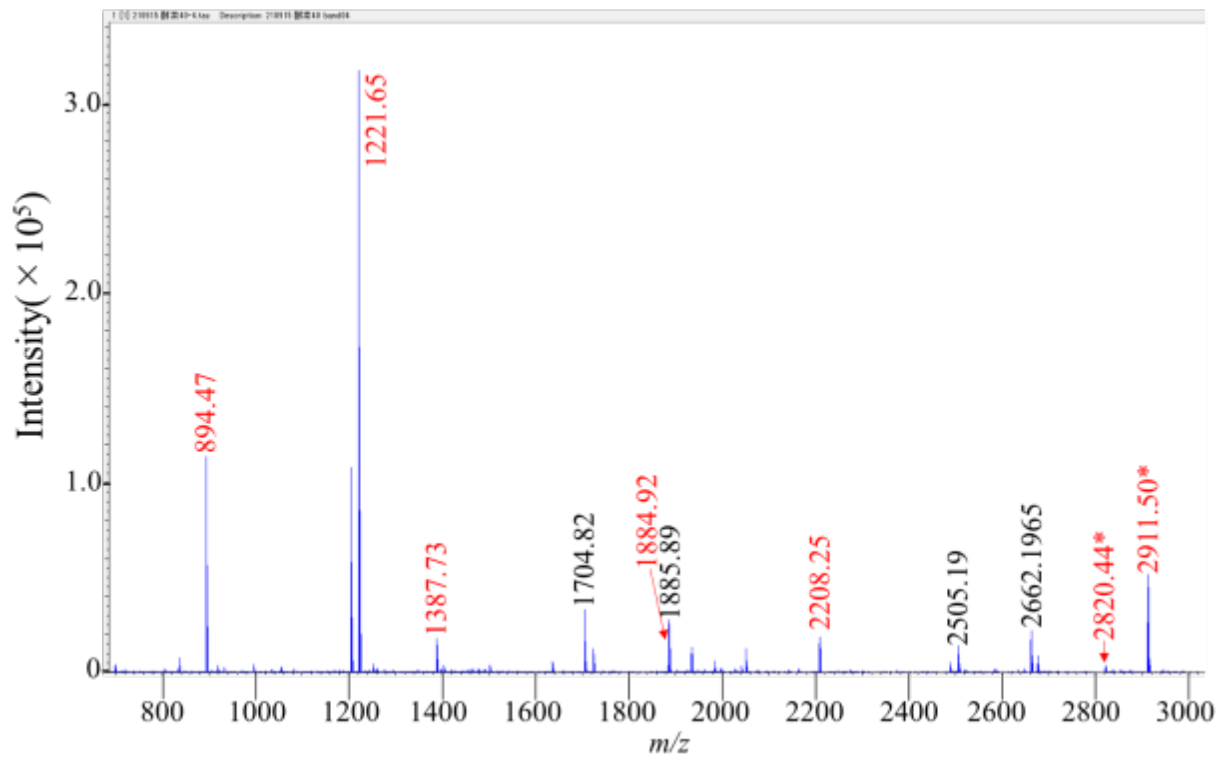


Figure 9. 試料 No.102 のバンド 4 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し、*は *T. lognibrachiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

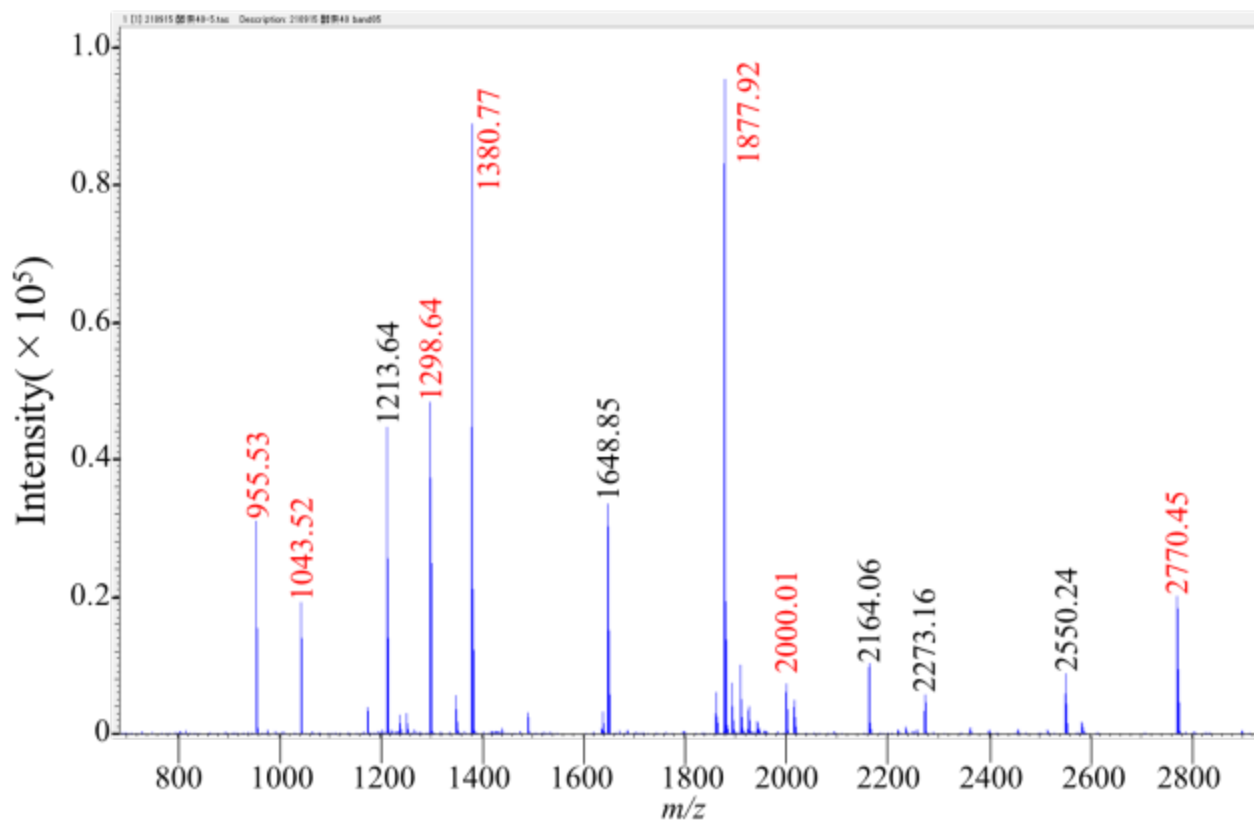


Figure 10. 試料 No.102 のバンド 5 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

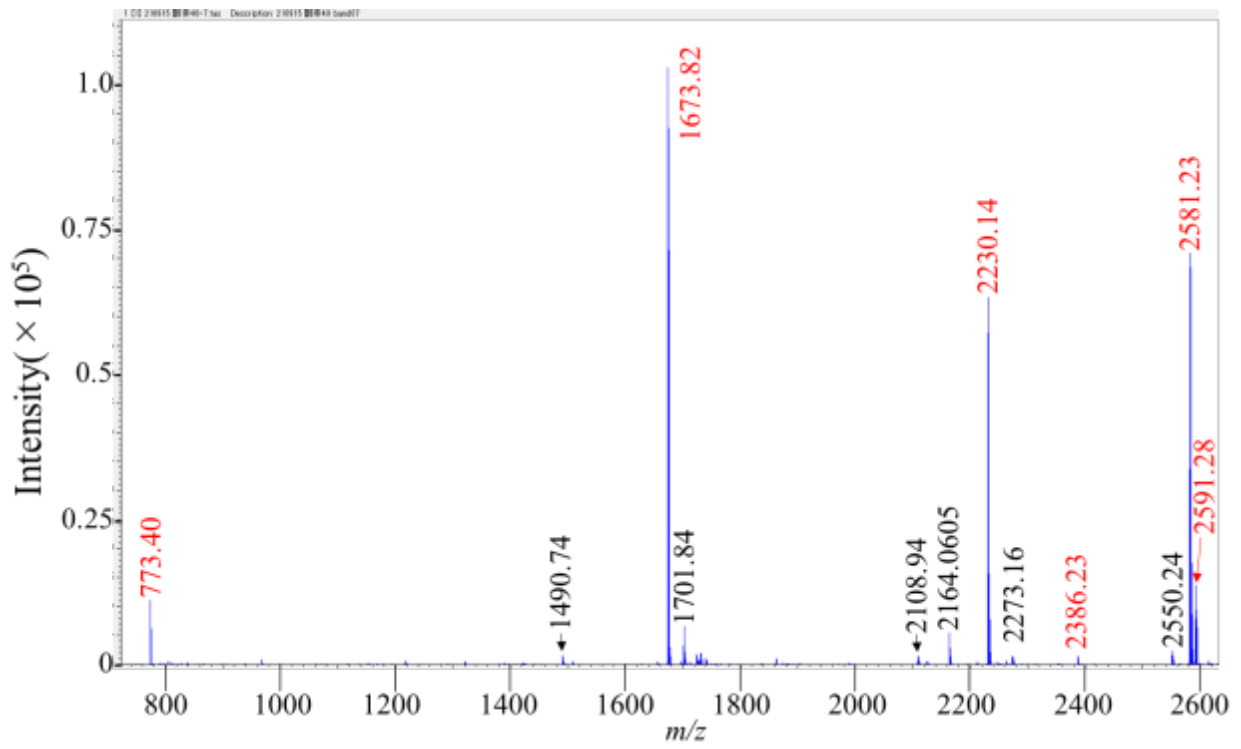


Figure 11. 試料 No.102 のバンド7の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

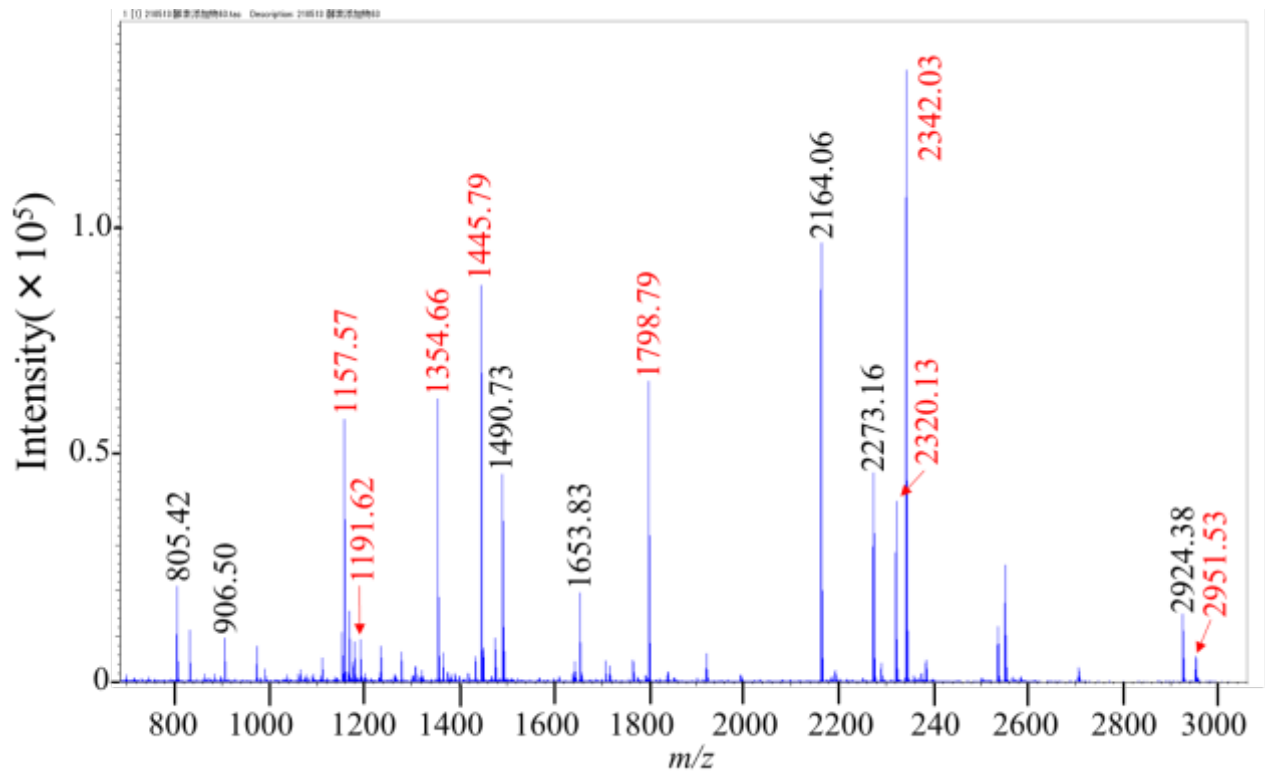


Figure 12. 試料 No.63 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

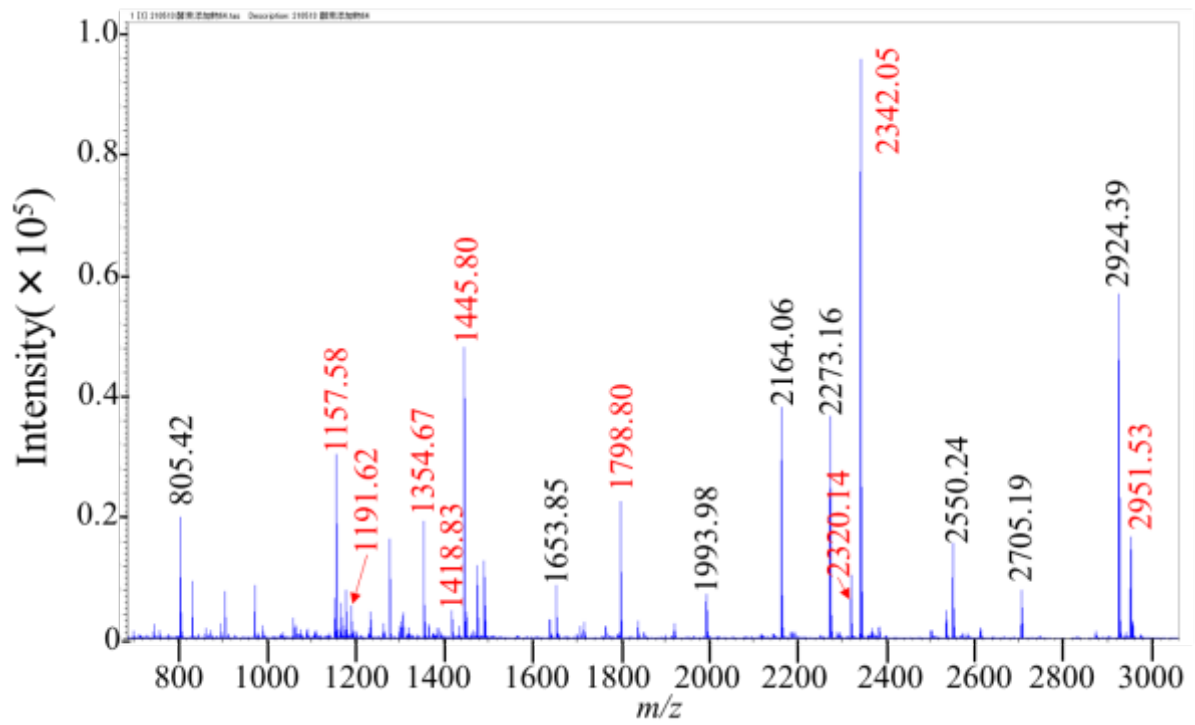


Figure 13. 試料 No.64 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

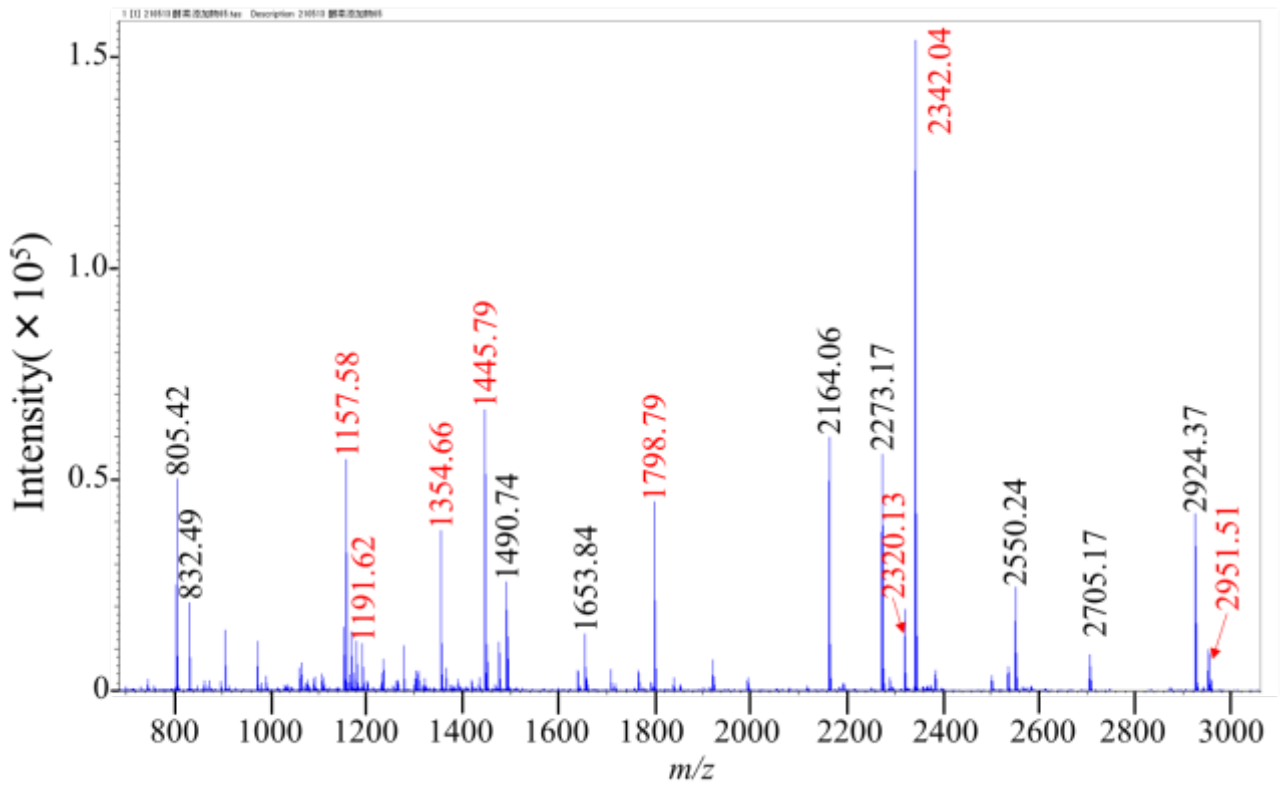


Figure 14. 試料 No.65 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

Table 1 Mascot サーチによる試料由来のタンパク質の同定結果

製品 No.	バンド No.	基原情報		SDS-PAGE上の 推定分子量 (kDa)	酵素名	生物名	酵素名	生物名	分子量 (kDa)	Coverage (%)
		酵素名	生物名							
	1			55	Glycoside hydrolase	<i>Trametes coccinea</i>			57	-
	2			38		同定不可				
52	3	セルラーゼ	<i>Pycnoporus coccineus</i>	35		同定不可				
	4			30		同定不可				
	5			24		同定不可				
	6			21		同定不可				
61		プロテアーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>	32		同定不可				
62		プロテアーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>	32		同定不可				
63		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Aspergillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	34
64		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Aspergillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	37
65		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Aspergillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	34
	1			70		同定不可				
	2			30	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Trichoderma harzianum</i>			20.7	35
101	3	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	25		同定不可				
	4			18	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			38.2	25
	5			5		同定不可				
	1			130		同定不可				
	2			80	Xyloglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			87.3	27
	3			58	Exoglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			55.4	17
102	4	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	40	Exoglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			50.3	22
	5			30	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			38.2	33
	6			20		同定不可				
	7			18	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			24.1	39
	1			130		同定不可				
	2			80		同定不可				
103	3	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma viride</i>	40		同定不可				
	4			38		同定不可				
	5			35		同定不可				