

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

～真菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集～

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 第三室長

研究要旨 食品添加物のうち微生物を基原とする酵素について、電気泳動法と MALDI-TOF MS によるペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)を組み合わせた基原同定法の開発を実施した。これまでに検討した構成成分の少ない添加物酵素製品については基原の情報を得ることができたが、一部の製品については製造者が公表している基原種と解析結果が一致せず、また、基原種の情報が全く得られなかった製品も存在した。その理由として、分析手法による問題のほか、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、及び微生物学名の変更に伴うシノニム情報の不足もあると考えられた。今年度は分析法の改良として、二次元電気泳動法を用いたタンパク質の分解能の改善による同定精度の向上を試みた。計 4 種の添加物酵素を二次元電気泳動法により解析した結果、*Niallia circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼについては、通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定された。また、等電点の情報も二次元電気泳動法による解析により得られることから、同定結果の正確性を向上させることができた。しかし、タンパク質同定のカバー率は通常の SDS-PAGE とほぼ同等で、Mascot サーチでヒットする生物種を限定するには至らなかった。以上の結果より、二次元電気泳動法による解析はタンパク質の同定率を向上させるために有用であることが明らかとなったが、基原同定の精度を高めるためには他の手法を組み合わせる必要があると考えられた。さらに、既存添加物酵素の基原としての使用頻度が高い真菌である *Trichoderma* 属菌を例として、データベースにおける微生物学名の情報量の不足や読み取りにおける問題を解消するためには、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集し、データベースや酵素製品の付帯情報での登録情報を継続して更新する必要があることを示した。

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
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

清水公徳 東京理科大学
先進工学部
伊藤紫野 東京理科大学
先進工学部

A. 研究目的

既存添加物酵素は、微生物を基原とするものが多く、基原として用いられる微生物種は細菌、真菌、放線菌など多分類にわたり、菌種も多様である。既存添加物酵素の定義には、基原が一つの微生物種に規定されていない。

微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危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が多いことが知られている。微生物由来基原の品目の同定法として、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の開発が望まれる。本研究では、これまで質量分析器を用いたペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法に着目し、基原種同定法を検討してきた。これまでにアミラーゼ、ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びプロテアーゼの複数製品を対象に、SDS-PAGEとPMFを組み合わせた方法によりそれぞれの基原種の同定を試み、構成成分の少ない添加物酵素成分については、基原の情報を得ることができ、一定の成果を上げた¹⁾。さらに、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチを実施した。その結果、オンラインで実施した場合には同定できなかったタンパク質を同定することに成功した。加えて複数種の消化酵素を用いる改良を分析法に加えたところ、1種の酵素(トリプシン)を用いた場合には同定できなかったタンパク質を同定することが可能となった。これらの2通りの改良法は、基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなったが、その効果は一部の添加物酵素に限られていた。

そこで、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、昨年度はデータベースの改良や消化酵素を伴う解析法の検討を実施した。今年度は、二次元電気泳動法を用いてタンパク質の分離能を上げることにより、タンパク質同定の精度が向上するかを検討した。なお、以降は分子量の違いのみで分離を行う通常の電気泳動法を SDS-PAGE と称する。

また、これまでの検討結果から、より良い分析手法によって基原微生物の同定指標における特徴を効果的に認識できたとしても、同定するにあたりその指標の特徴を照合するデータベースにおける菌種名の読み取りに問題

があった場合、正しく同定することができないことや、微生物の分類情報は新種の記載や再編が頻繁になされていることから、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集しておく必要があるという問題点を把握していた。そこで、今年度は、昨年度に引き続き、基原真菌種の最新の分類情報を把握することを目的として、既存添加物酵素の基原として使用される頻度の高い真菌種の分類学的情報を収集した。

B. 研究方法

B-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

B-1-1) 分析機器

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-1-2) 試料

既存添加物試料は、日本食品添加物協会から分与された製品を用いた。β-ガラクトシダーゼは DFA No. B572、ヘミセルラーゼは B651 及び B653、β-アミラーゼは B659 を用いた。

B-1-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、タンパク質含有量に応じて 5～100 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(1,000 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ g/mL を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 μ L を加え、37°C 一晩インキュベートした。0.1%トリフロオロ酢酸(TFA)を含む 50%アセトニトリル水溶液 100 μ L 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 μ L 程度まで濃縮した。0.1%TFA 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 μ L-C18(ミリポア社)に酵素消化産物を吸着させ、0.1%TFA 水溶液で洗浄後、0.1%TFA 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ペクトルを測定した。

等電点電気泳動は、以下の様に実施した。各試料をタンパク質含有量が 1.5 mg/mL の濃度となるよう標準細胞溶解バッファーに溶解した。

標準細胞溶解バッファーの組成

Tris(1 M 溶液)	3.0 mL
チオウレア	15.2 g
ウレア	42 g
CHAPS	4.0 g

以上の試薬を精製水に溶解し、希塩酸によって pH を 8.5 に調製後、100 mL にメスアップした。

タンパク質溶液 62.5 μ L (7 cm の DryStrip 使用時)又は 125 μ L (13 cm の DryStrip 使用時)に等量の 2×サンプルバッファーを加え、氷上で 10 分間インキュベートした。ストリップホルダー

に添加後、Immobiline DryStrip pH 3-10 NL (Cytiva 社) を上から置き、カバー液を添加した後、Ettan IPGphor II を用いて 1 次元目の等電点電気泳動を行った。

2×サンプルバッファーの組成

ウレア	10.5 g
チオウレア	3.8 g
CHAPS	1 g

以上の試薬を精製水で 25 mL にメスアップした。2×サンプルバッファーは使用直前に DTT を 2 mg/ml, Pharmalyte broad range pH 3-10 (Cytiva)を 1%となるよう添加した。

一次元電気泳動後の Immobiline Drystrip を SDS 平衡化バッファーA 2 mL に浸し、室温で穏やかに 15 分間振盪した。バッファーを捨て、SDS 平衡化バッファーB 2 mL に浸し、再び 15 分間振盪した。平衡化終了後の Drystrip を電気泳動バッファーでリンスした後、10% アクリルアミドゲルの上部に乗せ、0.5% アガロース溶液で封入した。SDS-PAGE は上述の方法で実施した。

SDS 平衡化バッファーA/B

Tris(1.5 M pH 8.8)	20 mL
ウレア	72 g
グリセロール	69 mL
SDS	4 g

以上の試薬を精製水で 200 mL にメスアップした。使用直前にバッファーA は DTT を 5 mg/mL, バッファーB はヨードアセトアミドを 45 mg/mL となるよう加えた。

B-1-4) ペプチドの質量を指標としたタンパク質の同定

マスペクトルから得られたペプチドの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 Peptide Mass Fingerprint search, または昨年度構築した Mascot データベースを用いて行った。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,

Enzyme : トリプシン, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamydomethyl(C), Peptide tolerance : $\pm$ 15 ppm, Mass values: MH⁺.

B-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

添加物酵素の基原としての使用頻度が高く、かつ分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史が複雑でありシノニムが多数存在することが知られる *Trichoderma* 属菌について、PubMed から分類体系に関する論文を検索し、入手した²⁻⁴⁾。

C. 結果及び考察

C-1) 二次元電気泳動法を用いた添加物酵素の基原の解析

Triticum aestivum(パンコムギ)由来のβ-アミラーゼ(B659)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 1A と 1B に示す。SDS-PAGE 像においては、55 kDa 付近に単一のバンド a が認められ、PMF 法による解析の結果、*Hordeum vulgare*(大麦)のβ-アミラーゼと同定された(表 1A)。二次元電気泳動像においては、55 kDa・pI 6 付近に 4 つのスポット I, II, III 及び IV が認められ、PMF 法による解析の結果、いずれも *H. vulgare* のβ-アミラーゼと同定された(表 1B)。

Niallia circulans 由来のβ-ガラクトシダーゼ(B572)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 2A と 2B に示す。SDS-PAGE 像においては、180, 140 及び 80 kDa 付近に 3 つのバンド a, b 及び c が認められ、PMF 法による解析の結果、いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された(表 2A)。二次元電気泳動像においては、多数のブロードなスポットが認められた。180 kDa・pI 5 付近のスポット I, 140 kDa・pI 5 付近のスポット II 及び 80 kDa・pI 6 付近のスポット III は、いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された。50 kDa・pI 4 付近のスポット V は、グルタミン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと同定された。スポット IV と VI は同定されなかった(表 2B)。

Aspergillus niger 由来のヘミセルラーゼ(B651)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 3A と

3B に示す。SDS-PAGE 像においては、20~70 kDa の間に多数のバンドが認められた。そのうち、切り出しが可能であった 5 種を PMF 法で解析した結果、28 kDa 付近のバンド d は複数の *Aspergillus* 属由来のエンドグルカナーゼ、22 kDa 付近のバンド e は複数の *Aspergillus* 属由来のキシラナーゼと同定された。バンド a, b 及び c は同定されなかった(表 3A)。二次元電気泳動像においては、7 種の主要なスポットが認められた。50 kDa・pI 4 付近のスポット II は、5 種の *Aspergillus* 属由来のα-アミラーゼ、34 kDa・pI 6 付近のスポット V は、6 種の *Aspergillus* 属由来のβ-キシラナーゼ、20 kDa・pI 5 付近のスポット VI は、3 種の *Aspergillus* 属のキシラナーゼ、30 kDa・pI 4 付近のスポット VII は、2 種の *Aspergillus* 属の多糖分解酵素と同定された。スポット I, III と IV は同定されなかった(表 3B)。

Trichoderma longibrachiatum 由来のヘミセルラーゼ(B653)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 4A と 4B に示す。SDS-PAGE 像においては、20~120 kDa の間に多数のバンドが認められた。そのうち、切り出しが可能であった 6 種を PMF 法で解析した結果、120 kDa 付近のバンド a は 4 種の *Trichoderma* 属由来のキシラン 1,4-β-キシロシダーゼ、80 kDa 付近のバンド c は 2 種の *Trichoderma* 属由来のエキシソグルカナーゼ、30 kDa 付近のバンド e は 2 種の *Trichoderma* 属由来のβ-キシラナーゼ、20 kDa 付近のバンド f は 5 種の *Trichoderma* 属由来のβ-キシラナーゼと同定された。バンド b と d は同定されなかった(表 4A)。二次元電気泳動像においては、20~80 kDa の間に多数のスポットが認められた。そのうち、9 種の主要なスポットを PMF 法で解析した結果、80 kDa・pI 5 付近のスポット I は複数の *Trichoderma* 属由来のキシログルカナーゼ、60 kDa・pI 4 付近のスポット II は 3 種の *Trichoderma* 属由来のエキシソグルカナーゼ、30 kDa・pI 8 付近のスポット VIII は 2 種の *Trichoderma* 由来のβ-キシラナーゼと同定された。スポット III~VII は同定されなかった(表 4B)。

本年度は、計 4 種の添加物酵素を対象に二次

元電気泳動法による解析を実施した。B659 は、SDS-PAGE 像ではシングルバンドとして検出されたが、二次元電気泳動像では複数のスポットとして検出された。ただ、いずれも同じタンパク質であったことから、何らかの修飾の有無の違いによるものと考えられる。それぞれのスポットを分離して解析を行ったが、検索時のペプチドの決定アミノ酸配列のデータベース登録配列に対するカバー率は SDS-PAGE でバンドを切り出して解析した結果とほぼ同様であった。このようなタンパク質数の少ない酵素では、二次元電気泳動法の長所は活かせないと考えられる。B572 は、二次元電気泳動像において横に伸びたスポットとなった。B659 と同様に何らかの修飾による影響と考えられる。スポットの同定結果は SDS-PAGE のバンドを切り出した時と同様であったが、検索時の配列カバー率はわずかに低下した。ただ、SDS-PAGE による解析ではバンドとして切り出しが困難であったタンパク質 1 種が、二次元電気泳動法による解析では同定できた。B651 と B653 においては、SDS-PAGE 像では多数のバンドが認められ、切り出しが困難であったが、二次元電気泳動像ではスポットに分離され、解析が容易となった。その結果、B651 においては同定できたタンパク質数が増加した。ただ、B653 においては同定できたタンパク質数は 1 種減少した。二次元電気泳動法は、SDS-PAGE に比べてアプライ可能なタンパク質量が少ない。そのため、解析に十分なシグナルが質量分析による解析で得られなかったことが原因と推定される。

以上の結果より、二次元電気泳動法で添加物試料を解析することにより、タンパク質数の多い試料において SDS-PAGE では同定不可能であったタンパク質が同定可能となること、pI(等電点)の情報も得られることから同定の精度が上がる利点があることが明らかとなった。しかし、データベースサーチ時の配列カバー率は SDS-PAGE による解析時とほとんど変わらず、複数の菌種由来のタンパク質がデータベースサーチの結果ヒットするという問題点の解決には至らなかった。今後はデータベース

サーチ時の決定配列カバー率を上げるために、イオン化に用いるマトリクスの種類や組成を検討し、検出可能なペプチド種を増やす試みを行う。二次元電気泳動法は操作が複雑で泳動像が得られるまでに時間がかかる、多検体を同時に処理できない等といった欠点もあることから、SDS-PAGE では十分な解析結果が得られない試料のみに用いることが適切と考えられる。

C-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

既存添加物名簿収載品目リストから *Trichoderma* 属を基原にもつ既存添加物 10 品目とその基原菌種を抽出したところ、7 菌種が記載されていた。これらのゲノムにおける特定の遺伝子アミノ酸配列における異種間での配列一致率を確認したところ、近縁菌種間では最高で 99.5% が一致することが判明した(図 5)。一例として、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、 β -グルコシダーゼ及びセルラーゼの基原として記載される *T. reesei* では、その近縁菌種 *T. parareesei* と平均で 99.5% 一致した^{2,3)}。このことから、アミノ酸配列を指標として、基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5% 程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。加えて *Trichoderma* 属はその有性世代は *Hypocrea* 属である⁴⁾ことから、塩基配列やアミノ酸配列を決定し公共データベースで検索した際には *Hypocrea* spp. としてヒットする場合があり、このことに注意が必要である。この問題を解決する方法の 1 つとして、登録配列の菌種に関するアノテーションを精査し、独自に構築したカスタムデータベースを使用しての Mascot サーチを行うことが有効であると考えられた。さらに、データベースの整備とともに、酵素製品の付帯情報についても、最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると言える。

D. 結論

電気泳動法と MALDI-TOF MS を組み合わせた添加物酵素の基原の解析法について、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、

昨年度に引き続き改良を行った。タンパク質の分解能を向上させるために、二次元電気泳動法を用いて添加物酵素を解析した結果、一部の試料において SDS-PAGE による解析結果と比較して同定可能なタンパク質数が増え、本手法はタンパク質の同定率を向上させるために有用であることが明らかとなった。今後、基原同定の精度をさらに高めるためには、手法の更なる改良や他の手法との組み合わせが必要であると考えられた。さらに、手法の開発だけに留まらず、同定の際の検索に用いるデータベース登録情報の菌種に関するアノテーションや、酵素製品の付帯情報について、真菌分類学的情報を元に、継続して整理し使用する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) T. Yoshinari, A. Sekine, N. Kobayashi, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, Y. Hara-Kudo, M. Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Addit. Contam. A. 2023;40(6):711-722.
- 2) C. P. Kubicek et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. BMC Genomics. 20:485 (2019)
- 3) F. Cai, I. and S. Druzhinina. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Divers. 107:1–69 (2021).
- 4) G. J. Samuels. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195–206 (2006)

F. 研究業績

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 伊藤紫野，渡辺麻衣子，西原秀典，橋本一浩，川上裕司，小林直樹，後藤慶一，水谷治，清水公德，伴さやか，矢口貴志，工藤由起子，大西貴弘：発酵食品由来の黒麹菌

Aspergillus luchuensis の遺伝子指標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).

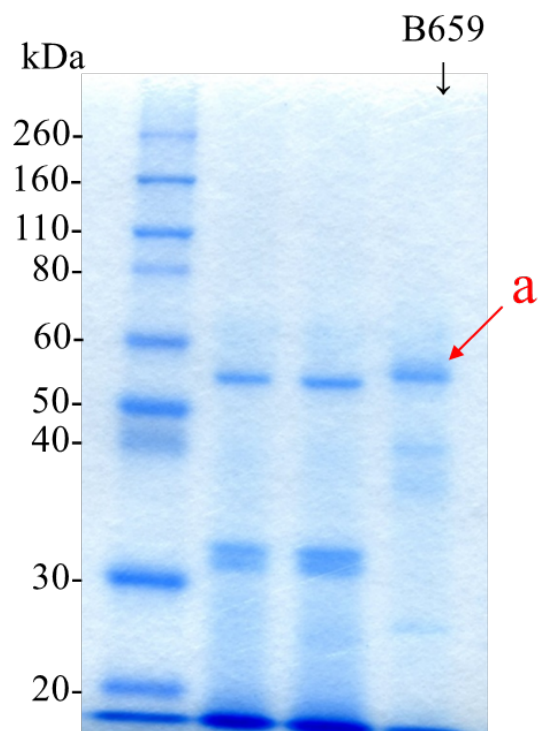
F-1-2) シンポジウム等

無し

F-2) 論文発表

無し

(A)



(B)

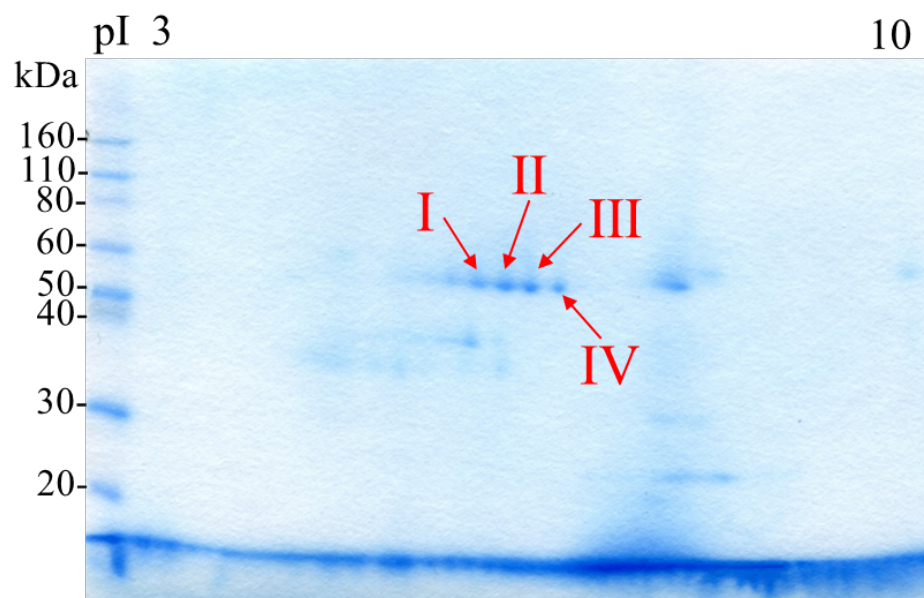
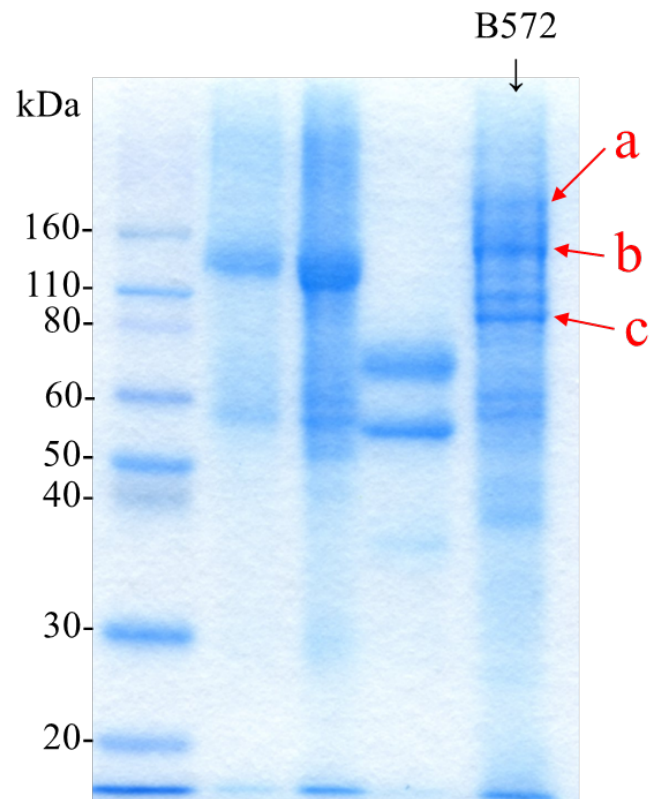


図 1. *Triticum aestivum* 由来の β -アミラーゼ(B659)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

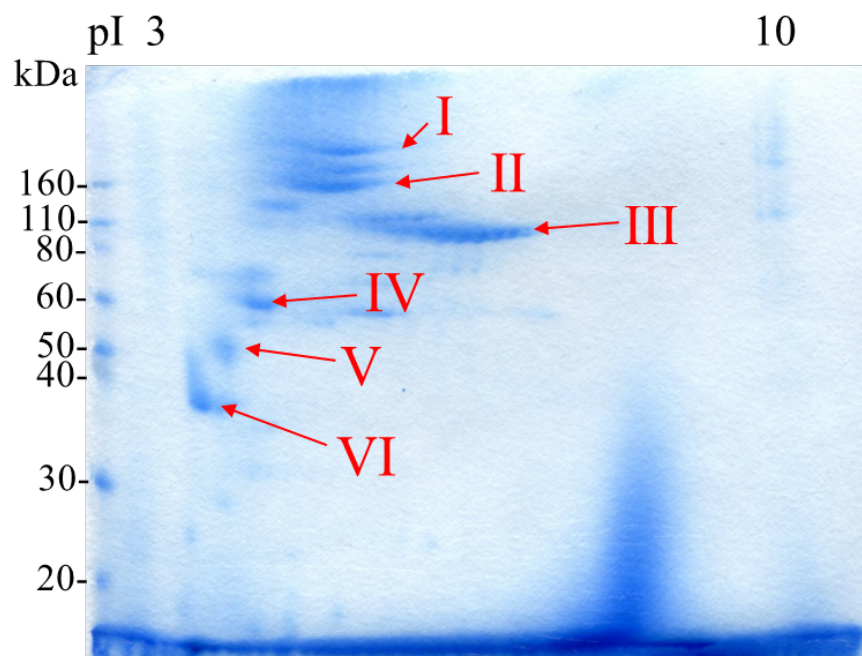
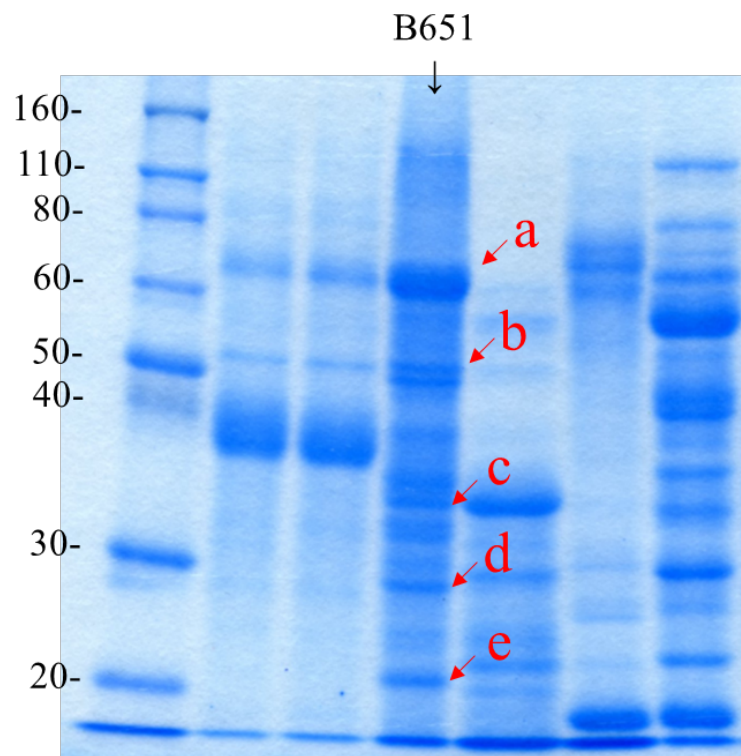


図 2. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

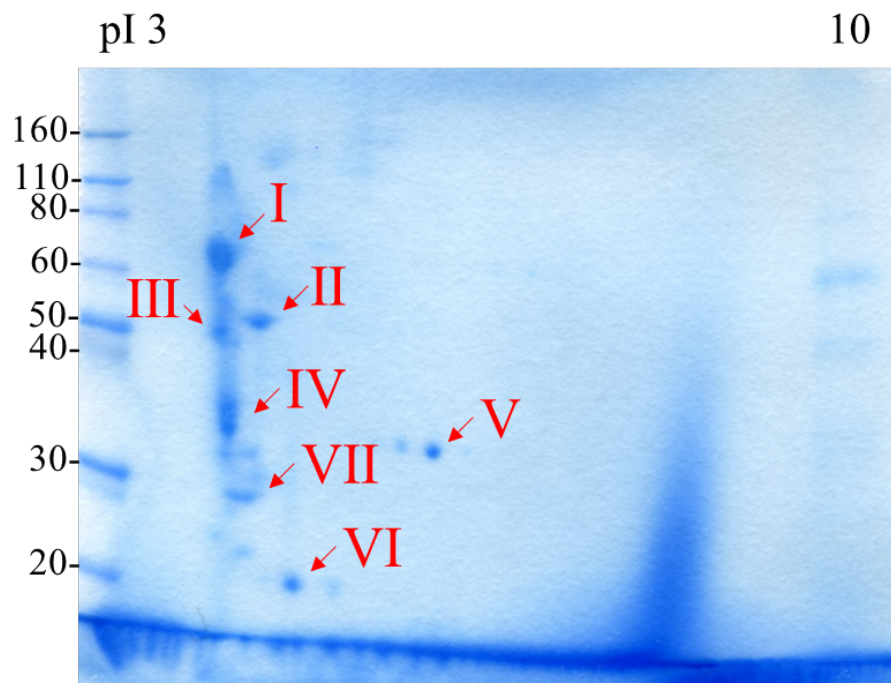
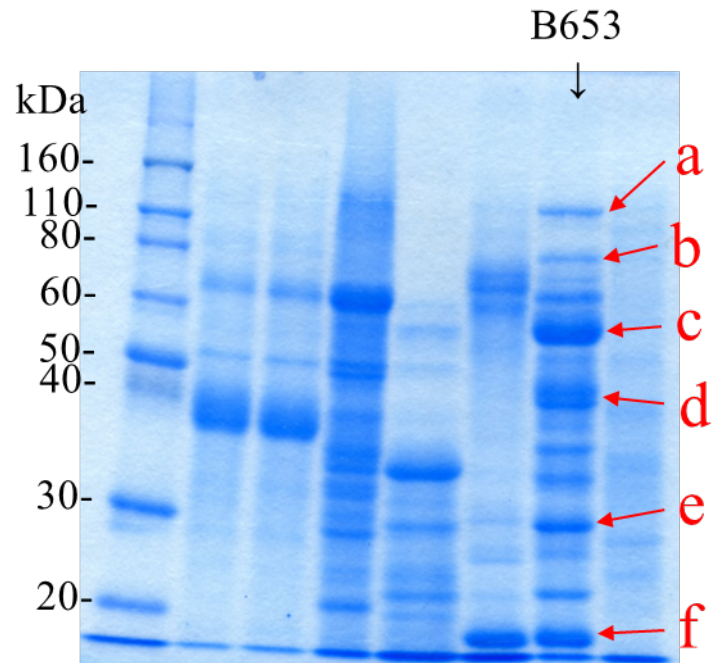


図 3. *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ(B651)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

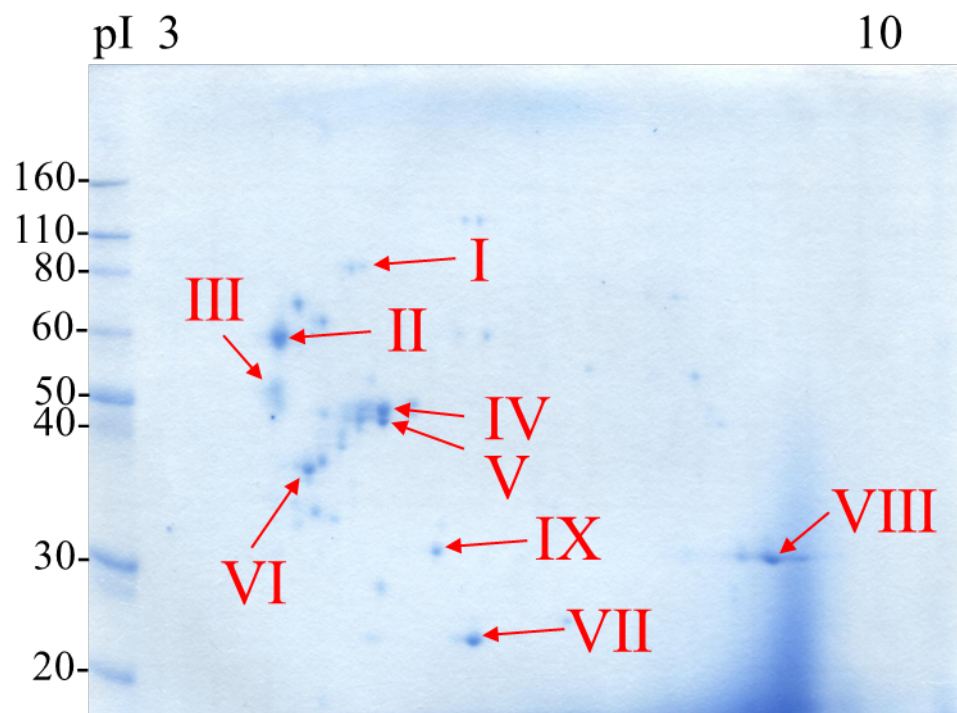


図 4. *Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ(B653)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

<i>Trichoderma</i> 属の節		Longibranchiatum				Harzianum /Virens			
Species		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>T. reesei</i> ●	1		0.021	0.027	0.005	0.071	0.071	0.072	0.068
<i>T. longibranchiatum</i> ●	2			0.03	0.021	0.074	0.075	0.075	0.072
<i>T. citrinoviride</i>	3				0.027	0.071	0.071	0.071	0.068
<i>T. parareesei</i>	4					0.071	0.071	0.072	0.068
<i>T. horzianum</i> ●	5						0.007	0.009	0.033
<i>T. guizhouense</i>	6							0.009	0.034
<i>T. afroharzianum</i>	7								0.034
<i>T. virens</i>	8								

図 5. 添加物酵素の基原として使用される頻度高い *Trichoderma* spp.における全ゲノムの遺伝子アミノ酸配列の異種間での配列一致率

C. P. Kubicek et al. (2019)²⁾を改変。●：既存添加物名簿収載品目リストに掲載された添加物に基原として使用される *Trichoderma* 属菌。各菌株のゲノムにおける相同遺伝子のアミノ酸配列の配列一致率を、異種間で算出した。

表1. *Triticum aestivum*由来の β -アミラーゼ(B659)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	32	5.58

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	30	5.58
II	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	26	5.58
III	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	35	5.58
IV	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	26	5.58

表 2. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定された タンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	25	5.51
b	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	30	5.51
c	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	29	5.51

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定された タンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	19	5.51
II	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	13	5.51
III	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	15	5.51
IV	同定不可				
V	L-glutamate γ -semialdehyde dehydrogenase	<i>Niallia circulans</i>	57,445	14	5.35
VI	同定不可				

表3. *Aspergillus niger*由来のヘミセルラーゼ(B651)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	同定不可				
b	同定不可				
c	同定不可				
d	Endoglucanase A	<i>Aspergillus kawachii</i>	25,911	24	4.63
	Glycoside hydrolase family 12 protein	<i>Aspergillus luchuensis</i>	25,911	24	4.63
	Endoglucanase A	<i>Aspergillus eucalypticola</i>	25,834	24	4.57
	Endoglucanase A	<i>Aspergillus piperis</i>	25,888	24	4.63
e	Endo-1,4- β -xylanase B	<i>Aspergillus kawachii</i>	24,225	27	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus luchuensis</i>	24,225	27	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus piperis</i>	24,225	27	5.74

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	同定不可				
II	α -Amylase	<i>Aspergillus niger</i>	55,157	25	4.48
	α -Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	55,152	25	4.52
	α -Amylase	<i>Aspergillus sojae</i>	55,141	25	4.54
	α -Amylase	<i>Aspergillus kawachii</i>	55,157	25	4.48
	α -Amylase	<i>Aspergillus parasiticus</i>	55,171	25	4.5
III	同定不可				
IV	同定不可				
V	β -Xylanase	<i>Aspergillus tubingensis</i>	34,197	34	5.89
	β -Xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	34,240	34	6.08
	β -Xylanase	<i>Aspergillus neoniger</i>	34,197	34	5.89
	β -Xylanase	<i>Aspergillus vadensis</i>	34,207	34	5.66
	β -Xylanase	<i>Aspergillus phoenicis</i>	34,240	34	6.08
	β -Xylanase	<i>Aspergillus awamori</i>	34,240	34	6.08
VI	Endo-1,4- β -xylanase B	<i>Aspergillus kawachii</i>	24,225	26	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus luchuensis</i>	24,225	26	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus piperis</i>	24,225	26	5.74
VII	Endoglucanase A	<i>Aspergillus kawachii</i>	25,911	32	4.63
	Glycoside hydrolase family 12 protein	<i>Aspergillus luchuensis</i>	25,911	32	4.63

表4. *Trichoderma longibrachiatum*由来のヘミセルラーゼ(B653)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	87,479	14	5.52
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87,477	14	5.52
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	87,590	14	5.54
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma orientale</i>	87,610	14	5.49
b	同定不可				
c	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma reesei</i>	55,407	17	4.65
	Glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	55,445	17	4.6
d	同定不可				
e	Endo-1,4- β -xylanase 3	<i>Trichoderma reesei</i>	38,224	20	6.97
	β -Xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38,224	20	6.97
f	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	20,931	45	8.15
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	21,512	44	9.01
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	22,447	42	9.00
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	24,112	38	7.88
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	24,112	38	7.88

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	Xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87,307	10	5.42
	Xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87,322	10	5.42
II	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma reesei</i>	55,407	21	4.65
	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma koningii</i>	55,407	21	4.65
	Glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	55,445	21	4.60
III	同定不可				
IV	同定不可				
V	同定不可				
VI	同定不可				
VII	同定不可				
VIII	Endo-1,4- β -xylanase 3	<i>Trichoderma reesei</i>	38,224	20	6.97
	β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38,224	20	6.97
IX	同定不可				