

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）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5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およ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。検討した添加物酵素の多くについて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、および微生物菌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。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、本年度の検討では、データベースの改良を伴う解析法の検討、およびデータベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行った。タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチの結果、オンラインで実施した場合には同定できなかった *Bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼや *Pycnoporus coccineus* 由来のプロテアーゼの基原を決定することができた。また、複数種の消化酵素を用いた解析では、トリプシンを用いた場合には同定できなかった *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼや *Trichoderma viride* 由来のセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドを同定することができた。さらに、添加物酵素の基原として広く用いられる *A. niger* とその近縁種に関する分類学的情報の収集することができた。以上の結果より、独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチおよび複数種の消化酵素を用いた解析は、基原同定の精度を高めるために有用であることが明らかとなった。さらに、データベースに登録する情報を精査すること、並び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。

研究協力者

衛生微生物部

吉成知也 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

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

衛生微生物部

伊藤紫野 東京理科大学

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部

先進工学部

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

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

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所

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おらず、すなわち、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酵素品目とみなされる。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。添加物酵素は、分子量の大きいタンパク質であることから、HPLC や質量分析器による解析に適していない。また、微生物の分泌物から製造されていることから、核酸情報を基にしたアプローチも難しい。この問題を解決できる手法として、質量分析器を用いたペプチドマスマスフィンガープリンティング (PMF) 法に着目した。本手法はタンパク質の構造解析法の一つとして頻繁に用いられている。PMF 法は、まずポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法 (SDS-PAGE) によってタンパク質を分離した後、バンドを切り出してトリプシンなどのタンパク質分解酵素による消化を行う。得られたペプチドをマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF MS) により網羅的に分析する。複数のペプチドの質量情報からデータベース検索 (Mascot サーチ) により、元のタンパク質を同定する。

我々は、これまでに 36 種 (アミラーゼ 10 種、ガラクトシダーゼ 3 種、セルラーゼ 5 種、ヘミセルラーゼ 5 種及びプロテアーゼ 13 種) の既存添加物酵素を対象に、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た。その結果、30 製品について基原の情報が得られ、そのうち 24 製品において、製品に付帯する基原情報と解析から得られた結果が一致した。残りの 6 製品については、製品付帯の基原情報と一致した結果のみならず、近縁種の基原情報も同時に得られた。これらの結果より、電気泳動法と MALDI-TOF MS を

組み合わせた解析法は、酵素の基原の特定に有効であり、製品の安全性の確保に貢献できると考えられたり。

しかし、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しなかった。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、上述の試験法の問題の他にも、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、及び微生物菌名の変更に伴うシノニム情報の不足、という問題もあると考えられた。

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、本年度の検討では、データベースの改良を伴う解析法の検討、及びデータベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行うこととした。

B. 研究方法

B-1) Mascot データベースの作成

タンパク質のアミノ酸配列データベース UniProt (<https://www.uniprot.org>) から、「*Bacillus*」, 「*Pycnoporus*」, 「*Sphingomonas*」, 又は「*Trichoderma*」の検索ワードにて抽出したアミノ酸配列を Mascot サーバーにアップロードし、データベースを構築した。過去の研究において取得した各酵素由来のバンドの MALDI-TOF MS スペクトルと構築したデータベースを照合し、タンパク質の同定を行った。

B-2) 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-2-1) 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-2-2) 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。各試料は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号 (DFA No.) で、 β -ガラクトシダーゼは B572、セルラーゼは B576 及び B674、ヘミセルラーゼは B651、B653 及び B577、プロテアーゼは

B591 及び B698 を用いた。

B-2-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、検体の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 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 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 µL, Arg-C (Sequence Grade; Roche Diagnostics 社) 5 µg/mL を含む 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ 水溶液 20 µL (10×Activation solution を 2 µL 含む), Asp-N (Sequence Grade;富士フィルム和光純薬 (株)) 2 µg/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 µL, キモトリプシン (CHTR, Sequence Grade; Roche Diagnostics 社) 10 µg/mL を含む 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ 水溶液 20 µL, 又は Lys-C (Sequence Grade;富士フィルム和光純薬 (株)) 10 µg/mL を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液を加え、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 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%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 µL-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スペクトルを測定した。

B-2-4) ペプチドの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 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: 各消化酵素, Allow up to: 1, Fixed modification: Carbamylmethyl(C), Peptide tolerance: 15 ppm, Mass values: MH⁺。

B-3) 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広く用いられ、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 *Aspergillus* 属真菌の *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. kawachii* 及び *A. luchuensis* とこれらの近縁種に関する分類学的情報を文献から収集した。

C. 結果及び考察

C-1) 構築した Mascot データベースを用いた PMF

Bacillus circulans 由来 β -ガラクトシダーゼ (B572, 図 1a) については、SwissProt のデー

データベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで、UniProt において「*Bacillus*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った (表 1)。その結果、2 種のバンドについていずれも *B. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼが最も高いスコアで同定された。

Pycnoporus coccineus 由来のセルラーゼ (B576, 図 1b), ヘミセルラーゼ (B577, 図 1c) 及びプロテアーゼ (B591, 図 1d) については、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで UniProt において「*Pycnoporus*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った (表 1)。その結果、B576 の主要バンドは *P. coccineus* 由来の酸性プロテアーゼと同定された。B577 のバンド I は同定できなかったが、バンド II は *P. coccineus* の酸性プロテアーゼと同定された。B591 の主要バンドは、*P. coccineus* の酸性プロテアーゼと同定された。

Trichoderma longibrachiatum 由来のヘミセルラーゼ (B653, 図 1e) は、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは *Trichoderma reesei* 又は *Trichoderma koningii* 由来のセルラーゼ様タンパク質がヒットし、*T. longibrachiatum* のタンパク質はヒットしなかった。そこで UniProt において「*Trichoderma*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った結果、バンド II は *T. reesei* 及び *Trichoderma parareesei* 由来のキシログルカナーゼが、バンド III は *Trichoderma viride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* 及び *Trichoderma orientale* のグルカナーゼが、バンド IV は *Trichoderma ghanense*, *T. reesei*, *Trichoderma parareesei*, *T. viride* 及び *T. jecorina* 由来のグルカナーゼが、バンド V は *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. jecorina*, *T. orientale* 及び *T. longibrachiatum* のキシラナーゼが、バンド VII は *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. pseudokoningii* 及び *T. orientale* のキシラナーゼが高スコアでヒットした (表 1)。

Sphingomonas paucimobillis 由来のプロテアー

ゼ (B698, 図 1f) は、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで UniProt において「*Sphingomonas*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行ったが、3 種のバンドいずれも同定することができなかった (表 1)。

4 種の微生物由来の添加物酵素について、データベースを構築して Mascot サーチを行った結果、*B. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼについては付帯情報と同一の微生物の β -ガラクトシダーゼが高スコアでヒットした。*P. coccineus* 由来の酵素については、付帯情報と同一の微生物由来のタンパク質が高スコアでヒットしたが、セルラーゼとヘミセルラーゼについては他のタンパク質であった。UniProt からアミノ酸配列情報を取得し、構築したデータベースを用いることにより、オンラインの SwissProt を用いる Mascot サーチよりも検索対象を広げることができ、基原の特定に有用であることが明らかとなった。しかし、*T. longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼについては、一部のバンドで付帯情報と同一の微生物由来のヘミセルラーゼ様タンパク質が高スコアでヒットしたが、他の種由来のタンパク質も多くヒットした。また、*S. paucimobillis* 由来のプロテアーゼについては、構築したデータベースを用いてもいずれのバンドも同定することができなかった。UniProt には、*S. paucimobillis* 由来のプロテアーゼのアミノ酸配列が 100 種以上登録されていることから、データベースの情報量は十分と考えられる。今後、まだ解析していないバンドの同定を試みる。

C-2) 複数種の酵素消化を用いた解析

トリプシンを用いた PMF の結果、複数種の菌種のタンパク質がヒットした添加物酵素について、トリプシン以外の酵素を用いた解析を実施し、菌種を限定することが可能か検討した。*Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ (B651, 図 1g) については、トリプシンを用いた場合はバンド I, III 及び V を同定できた。Arg-C を用いた場合にはバンド I のみが、Asp-

N を用いた場合はバンド I, II 及び III が, CHTR を用いた場合はバンド I, IV 及び V が, Lys-C を用いた場合はバンド I, III 及び IV が同定できた (表 2). トリプシン以外の消化酵素を用いることにより, トリプシンでは同定できなかったバンドが同定できた. 特にキモトリプシンを用いた場合, トリプシンよりもヒットタンパク質の由来菌種が少なく, 基原を限定することができた. *T. viride* 由来のセルラーゼ (B674, 図 1h) については, トリプシンを用いた場合は 3 種の主要バンドはいずれも同定できた (表 2). Arg-C を用いた場合はいずれのバンドも同定できず, Asp-N を用いた場合はバンド II のみが, CHTR と Lys-C を用いた場合は 3 種いずれのバンドも同定できた. バンド I と III の同定結果については, トリプシンを用いた場合が最も coverage が高く, 他の酵素を用いる利点は見出せなかった. バンド II については, トリプシンを用いた際はバンド I と同じタンパク質が同定されたが, Asp-N と CHTR を用いた場合は異なるタンパク質が同定された. バンド I と II は非常に近接していることから, SDS-PAGE のゲルから切り出す際に, バンド II に I が混入した可能性が考えられた.

C-3) 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広く用いられる *A. niger* とその近縁種は, *Aspergillus* 属 Nigri 節と総称され, 黒褐色の胞子を形成する胞子や分生子頭等の形態が非常に酷似した麹菌のグループである. それらの分類法をめぐり多くの研究と改名が繰り返され, 菌種の定義や名前が混乱していたが^{2,3)}, 近年では遺伝子を用いた再分類が進んだが^{3,4)}, シノニムが多く, 現在でも, 古い分類体系が一掃され完全に整理されたとは言い難い. 分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史として, *A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 系統の変遷を図 2 に示した. 真菌の分類学分野では 3 菌種にまとめる分類体系をとることが主流であるが, 現在でも, これら 3 菌種以外に, 添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として現在使用され続けている菌種は多く, *A.*

awamori, *A. kawachii*, *A. foetidus* などがしばしば見られる. つまり, 公的データベースであっても登録種名が最新でない可能性があり, ヒット配列の由来または製品の付帯情報が「*A. awamori*」であっても, 生物としては *A. luchuensis* または *A. niger* のどちらの可能性も有りうる. この問題を解決する方法の 1 つとして, 登録する情報を精査し, 独自に構築したカスタムデータベースを使用する 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, 改良を行った. 独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチの結果, 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ができた. 複数種の消化酵素を用いた解析では, 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できた. これらの 2 種の方法は, 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. 今後, より同定の精度を高めるために, 電気泳動法の工夫を行う. さらに, 手法の開発だけに留まらず, データベース構築に使用する真菌データの分類情報や, 酵素製品の付帯情報を, 真菌分類学的情報を元に整理して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) 伴さやか. “微生物あれこれ (25) 泡盛麹菌

Aspergillus luchuensis の学名の変遷” . NBRC ニュース. 2014. No.28.

- 3) Koji Yamada. “Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene” . FEMS Microbiology Letters. 2001, p241-246.
- 4) H. Seung-Beom et al. Taxonomic re-evaluation of black koji molds. Appl Microbiol Biotechnol. 98:555–561 (2014)

peptide mass fingerprinting. Food addit. contam. A, 2023; 40(6): 711-722.

F. 研究業績

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 伊藤紫野, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 後藤慶一, 水谷治, 山田修, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会 (2023.10).

F-1-2) シンポジウム等

無し

F-2) 論文発表

- 1) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y. Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test for food additives in EC groth. Food Hyg. Saf. Sci. 2023; 64: 69-77.
- 2) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparations using SDS-PAGE and

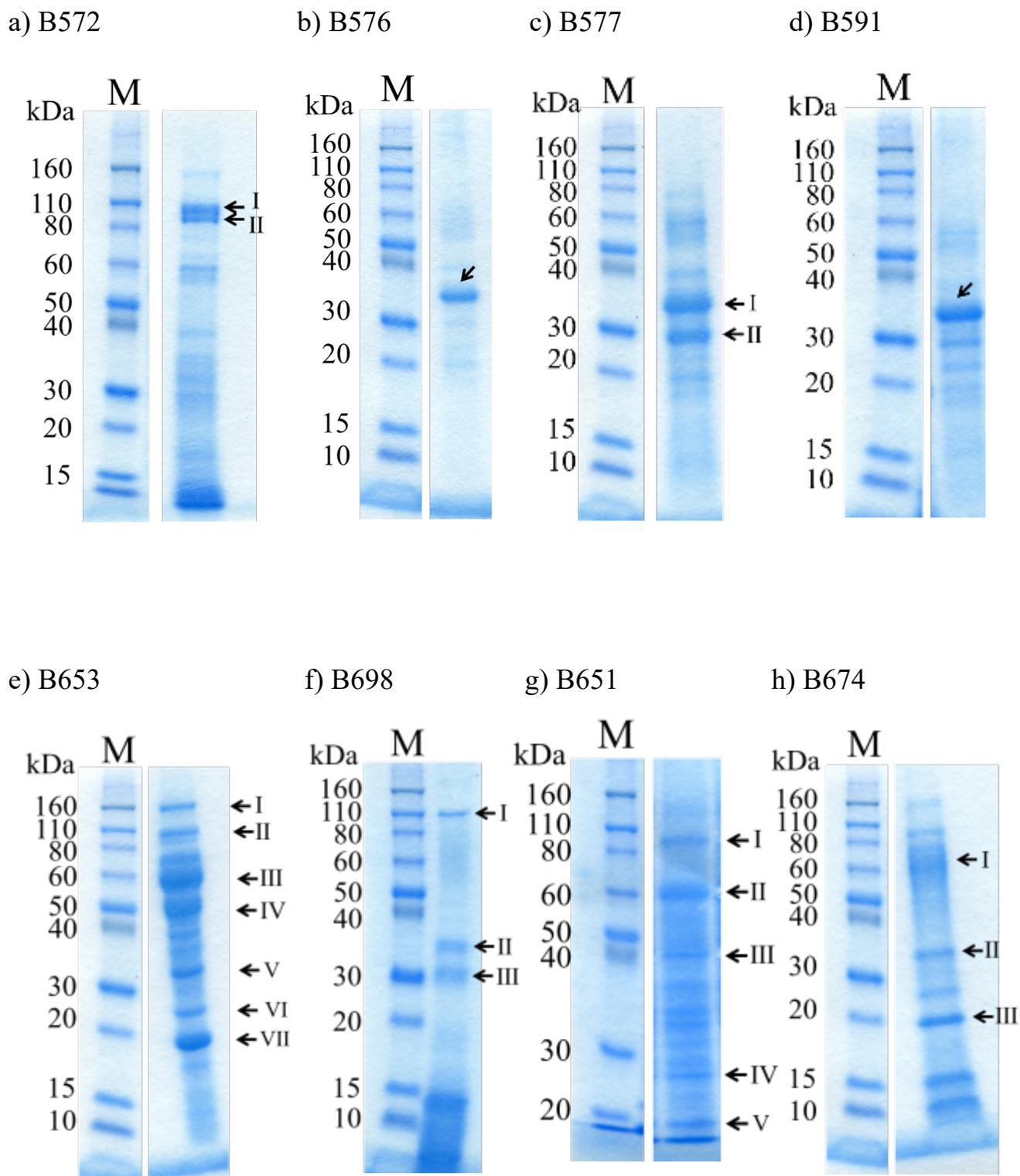


図 1. 解析を行った添加物酵素の SDS-PAGE 像

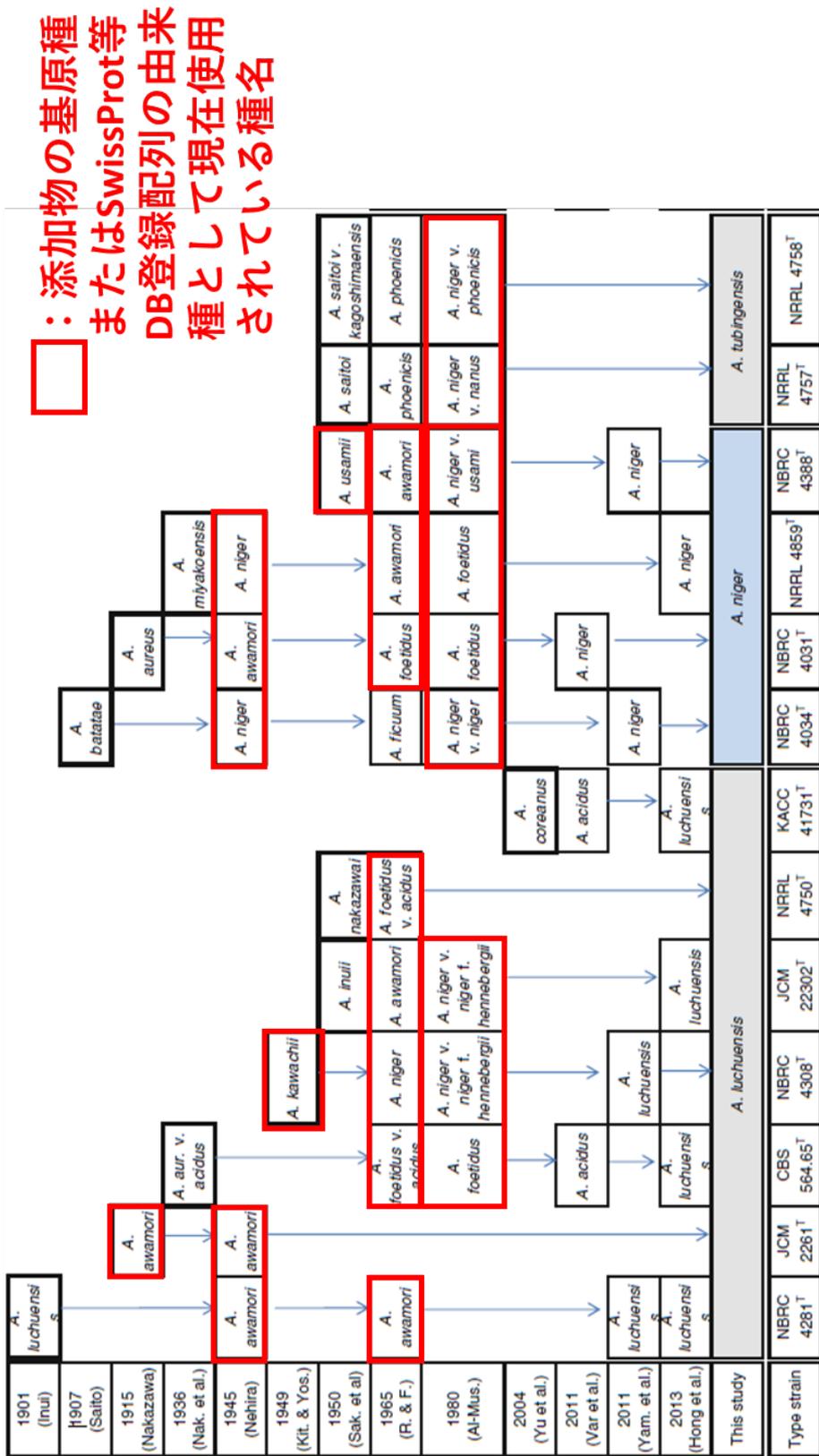


図 2. *Aspergillus niger* およびその近縁菌の分類体系の変遷とシノニムの整理

H. Seung-Beom et al. Appl Microbiol Biotechnol. 98:555–561 (2014) からの引用。

表 1. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果

DFA No.	製造者による付帯情報		バンド No.	ゲル上の構築したデータベースを用いた Mascot サーチによりヒットしたタンパク質		分子量 (kDa)	一致したペプチド数	
	酵素名	由来		タンパク質名	生物種			
B572	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	I	105	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	27
B576	cellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	33	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	28
B577	hemicellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	I	34	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	164	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
			II	104	xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87.3	18
			III	59	xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87.3	18
			IV	48	glucanase	<i>Trichoderma viride</i>	53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma koningii</i>	53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	55.5	8
					glucanase	<i>Trichoderma orientale</i>	55.6	8
					glucanase	<i>Trichoderma ghanense</i>	50.1	6
					exoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	50.4	6
					glucanase	<i>Trichoderma viride</i>	50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	50.3	6

次ページへ

表 1. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果 (続き)

DFA No.	製造者による付帯情報		バンド No.	ゲル上の構築したデータベースを用いた Mascot サーチによりヒットしたタンパク質		分子量 (kDa)	一致したペプチド数
	酵素名	由来		タンパク質名	生物種		
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V	33	endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	8
					β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	8
					β -xylanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	8
					β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	7
					β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7
			VI	25	unidentified		
			VII	20	endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6
					endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	6
					endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	6
					endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	6
					endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	6
B591	protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	34	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	5
B698	protease	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	I	110	unidentified		
			II	36	unidentified		
			III	30	unidentified		

表 2. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果 (B651)

バンド I							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68,743	20	11	9	10	9
	<i>A. usamii</i>	68,659	18	11	7	10	7
	<i>A. awamori</i>	68,837	14	11	9	-	9
	<i>A. niger</i>	68,837	14	11	9	-	9
バンド II							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68,743	-	-	13	-	-
	<i>A. usamii</i>	68,659	-	-	13	-	-
	<i>A. awamori</i>	68,837	-	-	8	-	-
	<i>A. niger</i>	68,837	-	-	8	-	-
バンド III							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
aspergillopepsin-1	<i>A. niger</i>	41,319	24	-	27	-	20
	<i>A. phoenicis</i>	41,387	24	-	27	-	20
	<i>A. awamori</i>	41,266	18	-	20	-	20
バンド IV							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
endoglucanase A	<i>A. kawachii</i>	25,911	-	-	-	20	32
バンド V							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
1,4- β -xylanase B	<i>A. kawachii</i>	24,225	27	-	-	26	-
	<i>A. niger</i>	24,099	15	-	-	-	-

表 3. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果 (B674)

バンド I							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
exoglucanase 1	<i>T. viride</i>	55,336	21	-	-	19	7
	<i>T. reesei</i>	55,407	19	-	-	13	6
	<i>T. koningii</i>	55,407	19	-	-	13	6
	<i>T. reesei</i>	55,445	19	-	-	13	6
バンド II							
タイプ	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
exoglucanase 1	<i>T. viride</i>	55,336	21	-	-	-	4
	<i>T. reesei</i>	55,407	19	-	-	-	3
	<i>T. koningii</i>	55,407	19	-	-	-	-
	<i>T. reesei</i>	55,445	19	-	-	-	-
exoglucanase 2	<i>T. reesei</i>	50,306	-	-	19	19	-
バンド III							
タイプ	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
1,4- β -xylanase	<i>T. harzianum</i>	20,691	23	-	-	20	3
1,4- β -xylanase II	<i>T. harzianum</i>	23,809	20	-	-	17	-
	<i>T. reesei</i>	24,055	20	-	-	21	-