

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2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** 微生物由来基原の品目の同定精度の向上を目的としタンパク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った。過去の研究成果から、既存食品添加物酵素の MS スペクトルから予測したアミノ酸配列の Mascot search において、製品情報における基原として明確に菌種同定できなかった添加物が存在した。そこで、本年度は、その原因の解明を試みた。明確な同定結果が得られなかった場合の理由として、データベースに基原となった真菌種のアミノ酸配列の登録がなかった、データベースに登録されている真菌の種名において多様なシノニムが併用されていて解釈が難しかった、またはデータベース登録配列と比較してアミノ酸配列に変異が生じていたため相同なタンパクであることの判断が困難だった、以上が起こっていたことを確認した。これらを解消する措置として、添加物基原として使用される真菌種のシノニムを整理して照合しなおす、MALDI-TOF-MS で MS スペクトルを得る前に SDS-PAGE を行い、メジャーなバンドが複数現れた場合にはバンドを単離してから個々に分析を行うといった作業を行うことで、確度の高い同定結果が得られることを確認した。

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 主任研究員  
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 研究員  
大波純一 国立情報研究所  
オープンサイエンス基盤研究センター  
特任准教授  
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  
久保 文 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部 実験補助員

A. 研究目的

既存添加物製品において、既存添加物名簿収

載品目リストには、添加物の基原、製法、本質が記載されている。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。また、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。したがって、酵素の流通製品から基原を調査する体系を構築することは、既存添加物酵素の安全性を確保するうえで重要な検討項目であるが、その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基原の判断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。

過去の研究成果から<sup>1)</sup>、既存食品添加物酵素

の LC-TOF-MS 分析でアミノ酸配列を推定し Mascot サーチで基原の菌種を検索すると、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が発生した原因は、データベース登録菌種名の分類学上の混乱と考えた。製品情報から得られた基原菌種と、Mascot サーチによって得られた菌種名は実は一致していたにも関わらず、そのことが認識できなかった可能性がある。真菌は、生物学的に1菌種であっても、二重命名法（生物学的に同一の菌種が有性世代と無性世代で異なる菌名を持つ）や分類の過度な細分化によって、シノニムを複数持つ菌種が多数存在する。特に、多くの既存添加物の基原となっている *Aspergillus niger* および *Aspergillus oryzae* 等の *Aspergillus* 属菌では、この傾向が強いことが広く知られている。添加物基原真菌種について、シノニムを整理して同一であることが明確となるように、データベース登録情報を整理する必要がある。②が発生した原因は、データベースに登録された配列の不足と考えた。その添加物製品の基原菌種や、これと近縁でアミノ酸配列の相同性が高い菌種の配列がデータベースにまったく登録されておらず、いずれの配列ともある程度の相同性が得られず同定できなかった可能性がある。同定精度は使用するデータベースに大きく依存することから、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えられる。③が発生した原因は、分解や化学的変性や、製造工程に含まれる別タンパクの添加、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と考えた。今後、既存添加物の、精度の高い基原同定手法を開発するために、昨年度アミノ酸配列の解析による同定が困難だった添加物をモデルケースとしてその原因解明を行うことによって、有用な情報が得られると考えられる。

本年度は、アミノ酸配列データベースの改良点の抽出、および SDS-PAGE によって得た複数分子量のバンドについて MS スペクトルからの予測によって得たアミノ酸配列比較解析を行うことによって、同定が困難だった場合の原因解明、および結果の改善効果についての検証を行った。

## 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<sup>1)</sup>において分析した添加物酵素6種 ( $\alpha$ -ミラーゼ試料 No.1 < B613 > および No.2 < B614 > ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ No.14 < B654 > および No.16 < B656 > , グルコアミラーゼ No.18 < B573 > および No.19 < B662 > ) 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

各試料は精製水に以下の濃度となるよう溶解した。No.1 : 20 mg/mL, No.2 : 5 mg/mL, No.14 : 10 mg/mL, No.16 : 4 mg/mL, No.18 : 2 mg/mL, No.19 : 0.5 mg/mL, No.28 : 3 mg/mL。それぞれ等量の  $2 \times$  laemmli sample buffer (Bio-Rad 社) と混合後、20  $\mu$ L を SDS-PAGE に供した。CBB 染色像を Figure 1 に示した。SDS-PAGE 像において複数分子量のバンドが確認された場合、それらの MS スペクトルを個別に取得して解析をより詳細に行うため、CBB 染色後、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。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  $\mu$ L 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。トリプシン溶液（Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega 社）10  $\mu$ g/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液）20  $\mu$ L を加え、37°C 一晩インキュベートした。0.1% TFA を 100  $\mu$ 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L-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。試料 No.1, 2, 18, および 19 では  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（富士フィルム和光純薬社）を、試料 No.14 及び 16 では 4-クロロ- $\alpha$ -シアノケイ皮酸（シグマアルドリッチ社）をマトリクスとして用いた。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF MS（SpiralTOF-plus; 日本電社）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、ProteoMass Peptide MALDI-MS Calibration Kit（シグマアルドリッチ社）を用いた。

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 : Swiss-Prot, Taxonomy : Other Fungi, Enzyme : Trypsin, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : 0.5Da, Mass values: MH<sup>+</sup>。

#### B-4) アミノ酸配列データベースの改良に資するデータ収集

既存添加物の基原として広く用いられる真菌種のうち、分類が細分化傾向にあり分類体系に混乱がある群として、*A. niger*, *Aspergillus luchuensis* および *Trichoderma longibrachiatum* を選択し、分類体系の変遷を調査して、シノニム等についての情報を収集した。

### 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

製品の MALDI-TOF/MS スペクトルから予測したアミノ酸配列を指標として基原を検索した。Figure 1 に各試料の SDS-PAGE 像、Figure 2 ~10 に、各試料由来のペプチドの MALDI-TOF/MS スペクトル、Table 1 に各試料の由来、SDS-PAGE 像から推定した分子量、および 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 1**；本試料の基原は、製品の付帯情報によると *Aspergillus foetidus* の  $\alpha$ -アミラーゼである。SDS-PAGE 像において、異なる分子量を持つ 2 種のバンドが確認された（Figure 1）。それぞれの MS スペクトルを取得し Mascot Search したところ、低分子量のバンドは、トップヒットは *A. oryzae* および *Aspergillus shirousami*、続いて高い確度で *Aspergillus awamori* もヒットした（Table 1）。*A. foetidus* は焼酎やプーアル茶などの発酵食品を製造するための発酵菌としても広く用いられ、シノニムが多く存在する。近年、混乱した分類体系を分子系統分類学的知見から細分類する試みが複数の研究グループによってなされ、現在は *A. awamori*, *Aspergillus acidus*, *A. foetidus*, *Aspergillus kawachii*, *A. shirousami* など多数の菌名は *A. luchuensis* のシ

ノニムとして認識され、1 菌種にまとめるという分類体系が主流である<sup>2,3)</sup> (Table 2). 本試料の Mascot search による検索では、Swiss-Prot 上に”*A. foetidus*”由来のタンパク質の情報が収録されていなかったため、*A. foetidus* としてはヒットしなかったが、上述の通り本菌種と、今回トップヒットした *A. shirousami* は両者とも実際は *A. luchuensis* のシノニムであり生物学的には同一種であると解釈できるため、製品の付帯情報による基原と、本分析バンドの MS スペクトルからの予測アミノ酸配列から同定した菌種は一致していたことが示された。さらに、このことを確認するため、Mascot search から予測した本分析バンドのアミノ酸配列 (Swiss-Prot に登録された *A. shirousami* の配列由来) を NCBI の protein Blast search (blastp) で検索し、*A. luchuensis* の  $\alpha$ -アミラーゼの登録データがヒットするかを確認した。その結果、*A. luchuensis* の  $\alpha$ -アミラーゼと 100%match でヒットし、間違いなく本菌種であることが確認できた。

高分子量のバンドは、トップヒットが *A. kawachii* のグルコアミラーゼと検索された (Table 1)。上述の通り本菌種も *A. foetidus* 同様に *A. luchuensis* のシノニムであることから、菌種同定の結果としては製品付帯情報と一致した。SDS-PAGE 像から推定した分子量 (110kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) が大きく異なっていたが、これは、 $\alpha$ -アミラーゼにより生成した低分子の糖鎖をグルコース単位まで分解することを目的に、添加されたものと推察される。Mascot search から予測した本分析バンドのアミノ酸配列 (*A. kawachii* 由来グルコアミラーゼ) を用い blastp 検索を行った結果、70kDa 程度と SDS-PAGE 像から推定したアミノ酸分子量よりも短い、*Aspergillus* 属のグルコアミラーゼがトップヒットした。その他 130kDa 程度のタンパク質も比較的高い相同性でヒットした。このことから、添加されたグルコアミラーゼがこのような 100kDa を超えるタンパク質である可能性が考えられた。

**試料 2** ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* の  $\alpha$ -アミラーゼである。Mascot

Search の検索結果と製品の付帯情報からの菌種は一致した (Table 1) が、SDS-PAGE 像から推定した分子量 (70kDa) と Mascot Search でヒットしたタンパク質の分子量 (55kDa) が異なっていた。ヒットした *A. niger* の酸耐性  $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列を用い、blastp 検索を行った結果、相同性が 97% で質量が 69kDa の *A. niger* の  $\alpha$ -アミラーゼがヒットした。このことから、Mascot search でヒットした 55kDa の酸耐性  $\alpha$ -アミラーゼは、69kDa の  $\alpha$ -アミラーゼ由来の部分配列であり、試料に含まれているのは全長の 69kDa の  $\alpha$ -アミラーゼであったと考えられた。今後、本試料中から 55kDa の酸耐性  $\alpha$ -アミラーゼが欠損している部分配列由来のペプチドも検出されるかどうかの検証を行う必要がある。

**試料 14** ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. oryzae* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼであるが、SDS-PAGE 像において、2 種のバンドが確認され、両者とも Mascot search で *A. oryzae* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼがトップヒットした。SDS-PAGE 像で推定 110kDa のバンドについては、この分子量とヒットした  $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子量が一致していたことから、タンパク質全長と考えられる。分子量の小さい SDS-PAGE 像での推定 55kDa のバンドについては、MS で検出されたペプチドは、Mascot search の結果ヒットした *A. oryzae* 由来アミノ酸配列の N 末端側および C 末端側両方に亘っていたことから、特定の分解物ではないと考えられた (Figure 11)。そこで、二次元電気泳動法を用いて、より精密に分離を行ったところ、複数の等電点を持つ細かいスポットに分かれていることが確認された (Figure 12)。この結果より、この低分子量のバンドは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼが分解したタンパク質が複数種混合したものと考えられた。

**試料 16** ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. oryzae* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼである。SDS-PAGE 像において、2 種のバンドが確認され、両者とも Mascot Search の検索では *A. oryzae* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼがトップヒットしたことから、同定結果は正確に得られたことを確認できた。しかし試料 2 と同様に、SDS-PAGE

像から推定した分子量 (70kDa と 50kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (110kDa) が異なっていた。SDS-PAGE 像での推定 70kDa のバンドからは N 末端側由来のペプチドが、推定 50kDa のバンドからは C 末端側由来のペプチドが、それぞれ検出された (Figure 13)。この結果より、試料 16 は  $\beta$ -ガラクトシダーゼが分解した 2 種類のポリペプチドに分かれた状態にあると考えられた。

**試料 18** ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* のグルコアミラーゼであり、Mascot Search の検索では *A. niger* のグルコアミラーゼがトップヒットしたことから、同定結果は正確に得られたことを確認できた。しかし SDS-PAGE 像から推定した分子量 (100kDa) と Mascot Search でヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) が異なっていた。試料 18 の MALDI-TOF/MS スペクトルが No.1 と非常に似かよっていることから、これらの分子量が異なった理由は No.1 と同様と考えられた。

**試料 19** ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* のグルコアミラーゼであり、Mascot Search の検索では *A. niger* のグルコアミラーゼがトップヒットし、一致したことを確認できた。SDS-PAGE 像から推定した分子量 (70kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) も一致した。

本研究の検討結果から、基原として同一の菌種・同一の酵素種類と同定されていても、登録アミノ酸配列と SDS-PAGE 像の配列長が大きく異なるという現象が、複数の酵素製品で確認されていた<sup>1)</sup>。そのような場合でも、ひとまずアミノ酸配列断片を得て基原菌種の同定を達成することは可能であるが、配列長からも矛盾なく酵素種類を同定するためには、この配列長の矛盾の原因を解明する必要がある。今回、タンパク質に変異や分解が起こっている可能性があることが、複数試料において確認されたことから、今後、詳細な配列比較解析が必要であると考えられた。

## C-2)アミノ酸配列データベースの改良に資す

## るデータ収集

既存添加物酵素の基原として頻繁に使用される真菌種を抽出したところ、*A. awamori* を含む *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Monascus* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pycnoporus coccineus* であった。このうち、*A. luchuensis*, *A. niger* および *Trichoderma* spp. は特に分類の細分化が進み、分類体系が混乱したりシノニムが多く存在する。これらの分類群の分類体系のまとめを Table 2 に示した。文献調査や実験的に遺伝的距離を調査し近縁種を整理することによって、アミノ酸配列データベース上での菌名の整理が必要である。

*Aspergillus flavus* および *A. luchuensis* のシノニム (Table 1 では *A. awamori*) が、製品の付帯情報による基原と異なる菌種としてヒットしている製品がいくつか確認された (Table 1 ; 酵素製品 No. 14, 16, 18, 19)。この現象は、*A. flavus* は *A. oryzae* と、*A. luchuensis* は *A. niger* と、それぞれ極近縁で遺伝的距離が非常に近いため、MS スペクトルから予測されたアミノ酸部分配列の相同部分が互いに 100% 一致していることが原因であった。近縁な菌種間ではしばしば同様の現象が見られると考えられるが、こういった場合はこのタンパク質アミノ酸配列を指標としては、完全に識別できないということを意味する。また逆に、同一の菌種の異なる菌株間で、相同なタンパク質アミノ酸配列が異なることもある。MS スペクトルから予測したアミノ酸配列が基原菌種の同定にどの程度有効かを幅広く評価するために、今後、同種の複数菌株から得た配列間の変異程度を確認する必要がある。

また、MS スペクトルを Mascot Search で検索した結果、まったく何の登録配列もヒットしない場合がある<sup>1)</sup>。これは Swiss-Prot に、基原となった菌種も、これと近縁な菌種の配列も、まったく登録が無い場合に発生する。*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属といった子囊菌類、および *Mucor* 属や *Rhizopus* 属といった接合菌類については分子生物学的研究が進行しているためデ

ータベース登録情報が厚いが、*Pycnoporus* 属など担子菌類は Swiss-Prot でも比較的登録情報が不足している状況にある。このような菌種の既存添加物酵素のアミノ酸配列を全てデータベースに登録することで、この問題は解消すると考えられる。今後、既存添加物の基原となる菌種のうち Swiss-Prot に登録が無い菌種を特定し、全ゲノム塩基配列シークエンスを行って ORF 推定を行い、全 ORF のアミノ酸配列を決定するか、または添加物酵素タンパクのアミノ酸配列のみを決定し、Swiss-Prot またはローカルで検索可能なデータベースに収録する必要がある。

#### D. 結論

真菌を基原とした添加物を TOF-MS で分析して得られた MS スペクトルからアミノ酸配列を予測し、その配列を指標としてアミノ酸配列データベース上で検索し、添加物基原菌種の同定を試みた。明確な同定結果が得られなかった場合の理由として、データベースに基原となった真菌種のアミノ酸配列の登録がなかった、データベースに登録されている真菌の種名において多様なシノニムが併用されていて解釈が難しかった、またはデータベース登録配列と比較してアミノ酸配列に変異が生じていたため相同なタンパクであることの判断が困難だった、以上が起こっていたことを確認した。これらを解消する措置として、添加物基原として使用される真菌種のシノニムを整理して照合しなおす、MALDI-TOF-MS で MS スペクトルを得る前に SDS-PAGE を行い、メジャーなバンドが複数現れた場合にはバンドを単離してから個々に分析を行うといった作業を行うことで、6 種類の添加物酵素全てにおいて製品の付帯情報と一致した同定結果が得られ、同定の確度は向上することが確認された。今後は、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行う、さらに MS スペクトルからアミノ酸配列を予測するためのデータベースでの登録配列を充実化させる、これらを行うことで、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。

#### 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) Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K: Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2018; 200: 241-246.
- 3) Hong SB, Yamada O, Samson RA.: Taxonomic re-evaluation of black koji molds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014; 98: 555-561.

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

- 1) 渡辺麻衣子, 青木渉, 渡辺雅樹, 寺島淳, 小西良子, 近藤一成, 工藤由紀子: CO1 遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).

##### 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

Table 1 Mascot Search による試料由来のタンパク質の同定結果

Product No.	Provided information from the product		Mass from SDS-PAGE (kDa)	Identification by Mascot search with SwissProt				
	Protein	Organism		Protein	Species	Mass (kDa)	pI	Coverage (%)
No.1	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus foetidus</i>	100	Glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68.8	4.33	16
				Glucoamylase	<i>A. shirousami</i>	68.7	4.3	13
				Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	12
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	12
			50	$\alpha$ -amylase A tyle-1/2	<i>A. oryzae</i>	55.3	4.48	27
				$\alpha$ -amylase A tyle-3	<i>A. oryzae</i>	55.3	4.52	27
				$\alpha$ -amylase	<i>A. shirousami</i>	55.3	4.48	27
				$\alpha$ -amylase A	<i>A. awamori</i>	55.4	4.52	23
$\alpha$ -amylase B	<i>A. awamori</i>	55.4	4.52	23				
No.2	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus niger</i>	70	acid a-amylase	<i>A. niger</i>	53.4	4.22	14
No.14	$\beta$ -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	110	$\beta$ -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	16
				$\beta$ -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	16
		<i>Aspergillus oryzae</i>	55	$\beta$ -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	14
				$\beta$ -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	14
No.16	$\beta$ -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	70	$\beta$ -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	12
				$\beta$ -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	12
		<i>Aspergillus oryzae</i>	50	$\beta$ -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	4
				$\beta$ -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	4
No.18	Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	100	Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	19
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	19
No.19	Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	70	Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	18
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	18

Table 2 既存添加物酵素基原として使用される代表的な真菌の分類体系

現在主流として用いられる菌種名	分類体系に関係した問題
<i>Aspergillus luchuensis</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus awamori</i> *
	<i>Aspergillus foetidus</i> *
	<i>Aspergillus inuii</i>
	<i>Aspergillus acidus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus aureus</i>
	<i>Aspergillus awamori</i> *
	<i>Aspergillus foetidus</i> *
	<i>Aspergillus usamii</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus phoenicis</i>
<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma koningii</i>	互いに極近縁なため酵素アミノ酸配列が100%一致する、またはMascot searchでのヒットテーブルで菌種名のヒット順に矛盾が生じる（入れ子上に菌種名が現れる）可能性がある。

\*学術発表後の再分類による菌種名変更、または配列登録時の誤同定のため、再分類の結果、*A. awamori* および *A. foetidus* 菌株群は *A. luchuensis* および *A. niger* 群それぞれに分かれた。



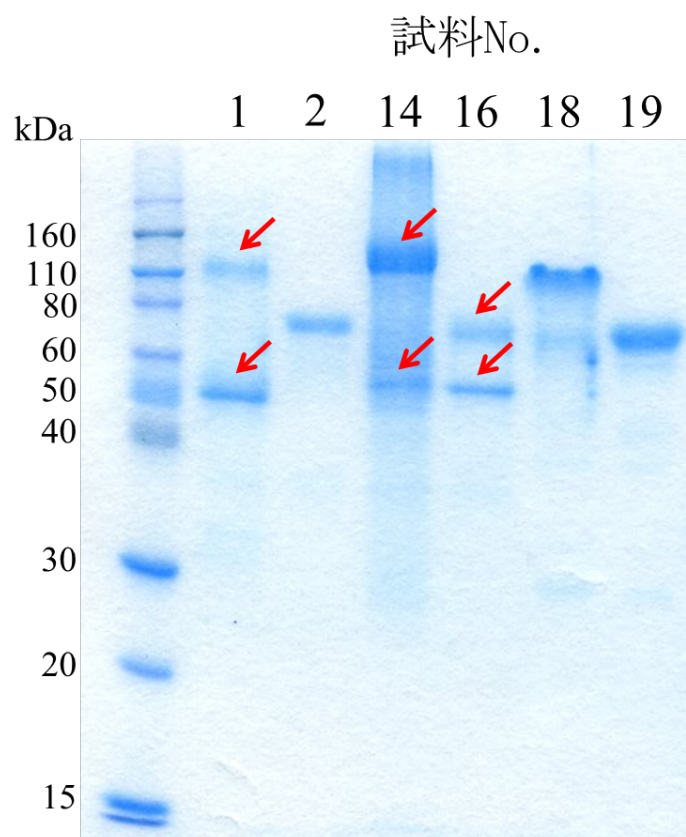


Figure 1. 試料の SDS-PAGE 像

No.1, 14, 16 については、それぞれ 2 種のバンドを解析した (赤色の矢印).

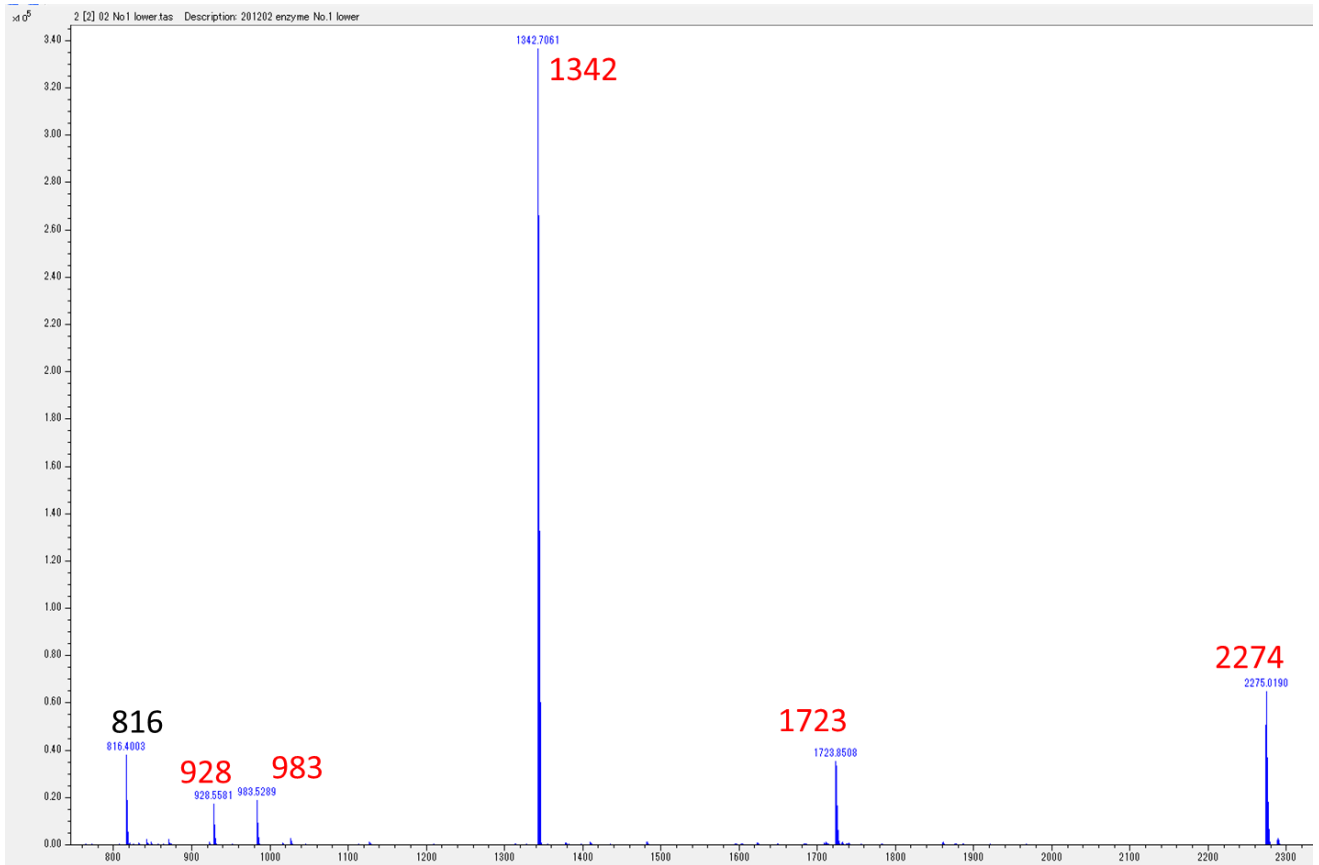


Figure 2. 試料 No.1 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

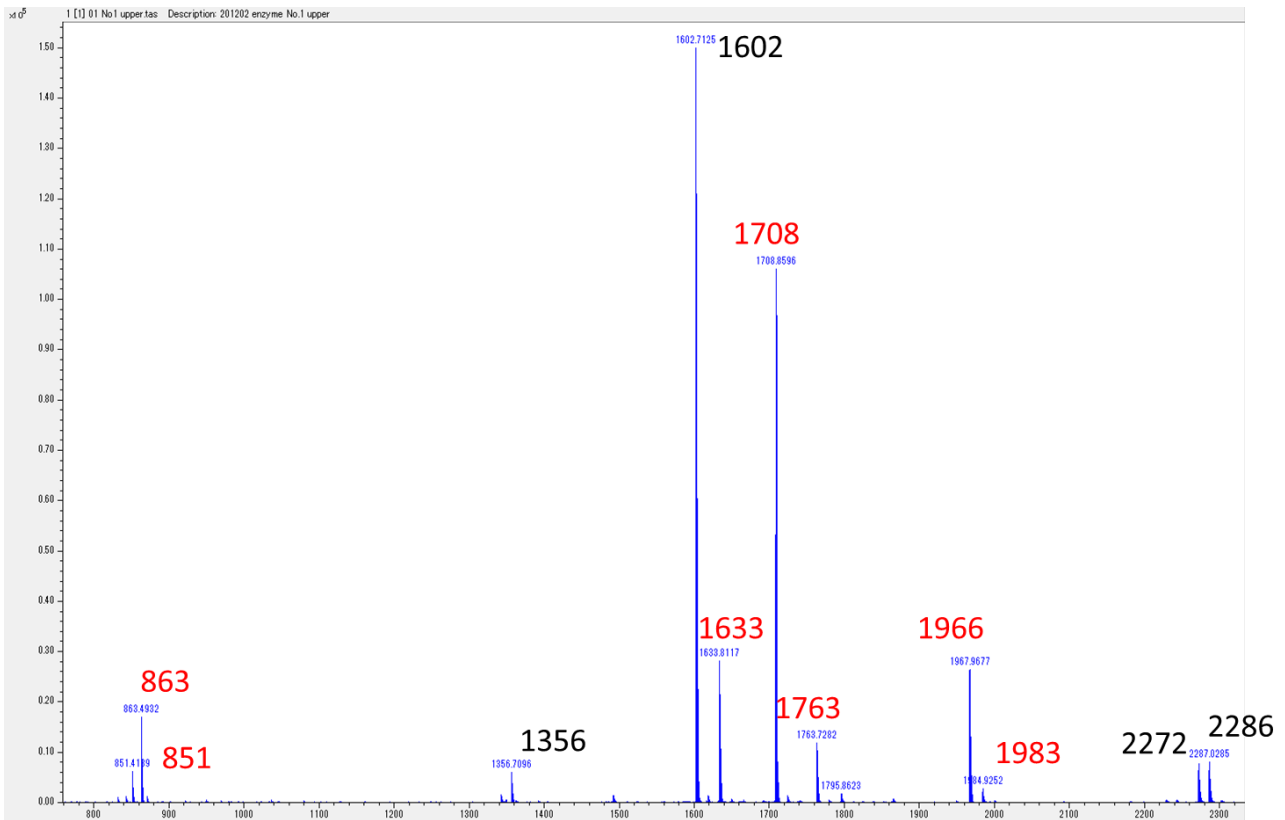


Figure 3. 試料 No.1 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

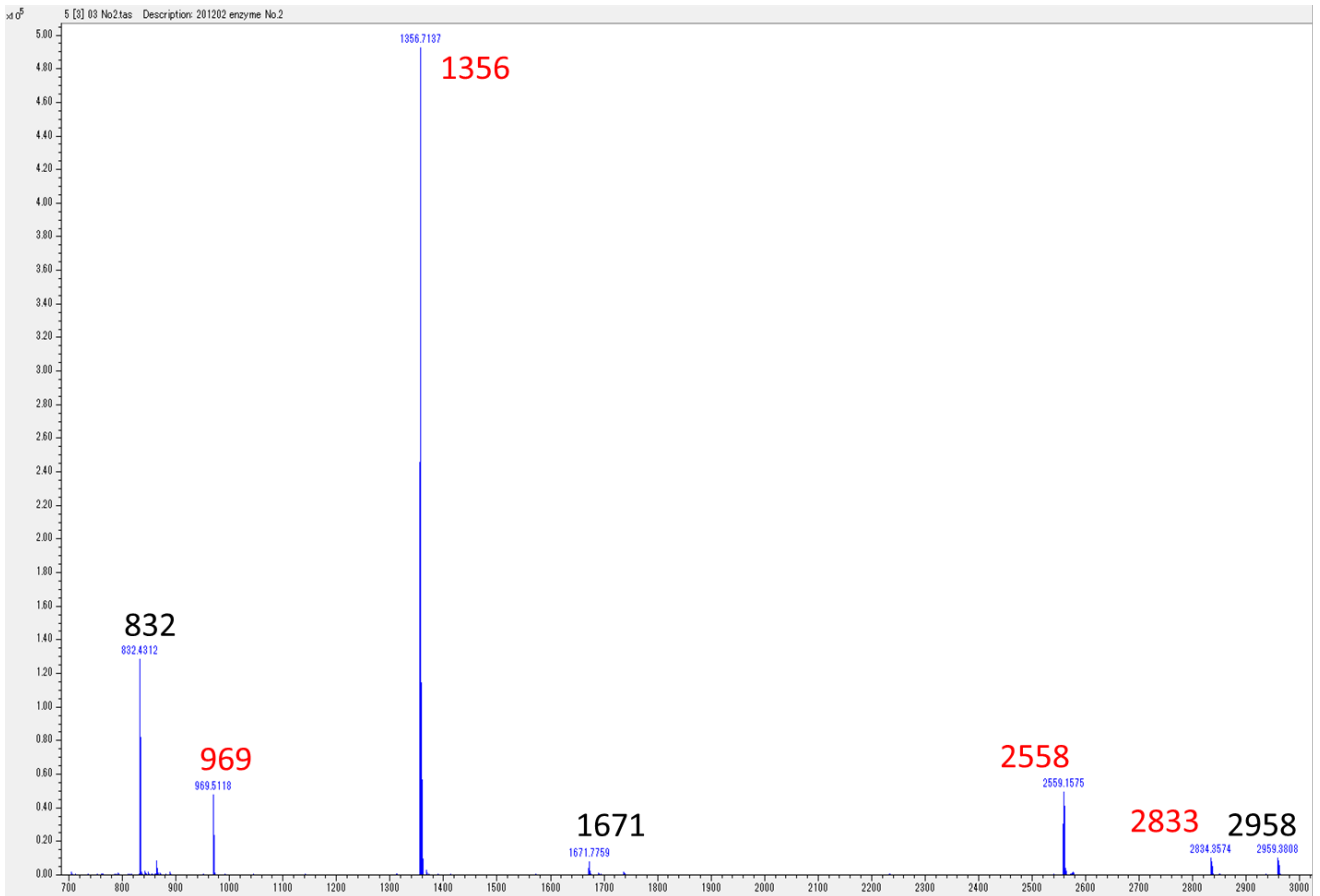


Figure 4. 試料 No.2 のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

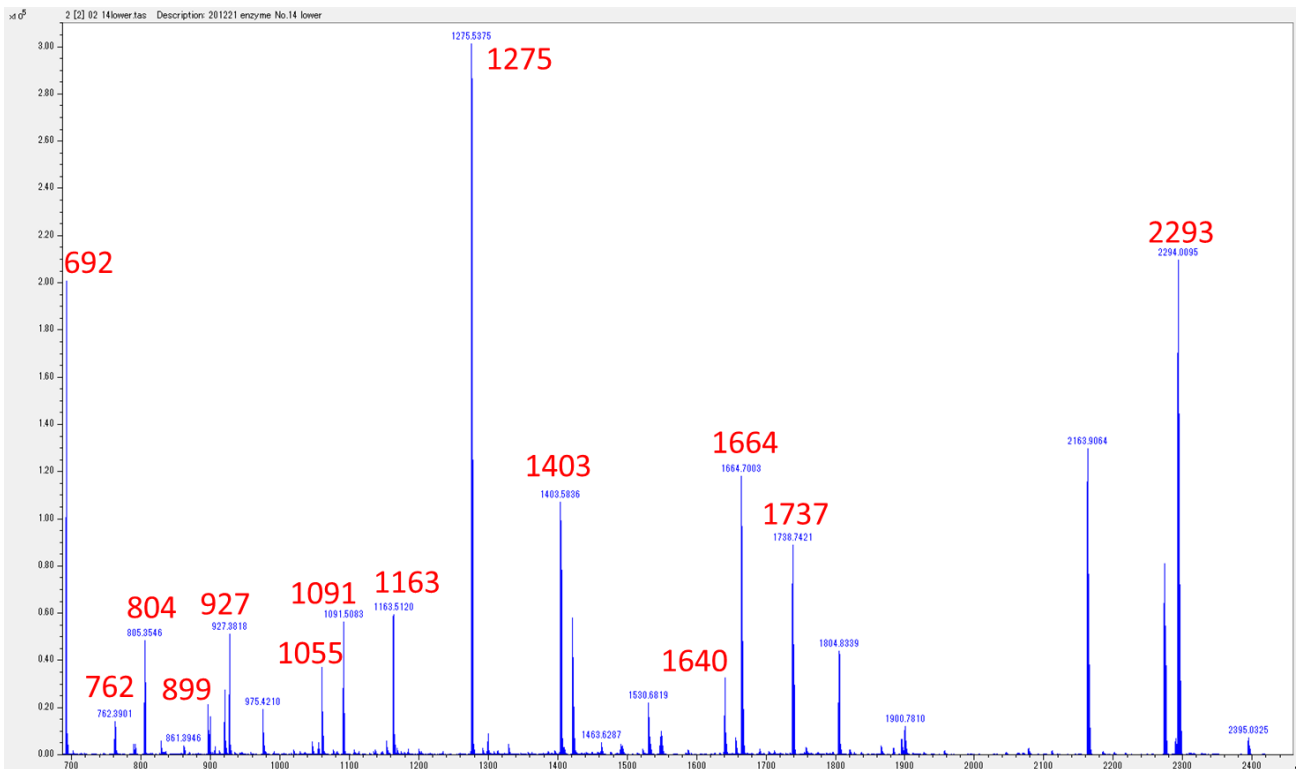


Figure 5. 試料 No.14 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

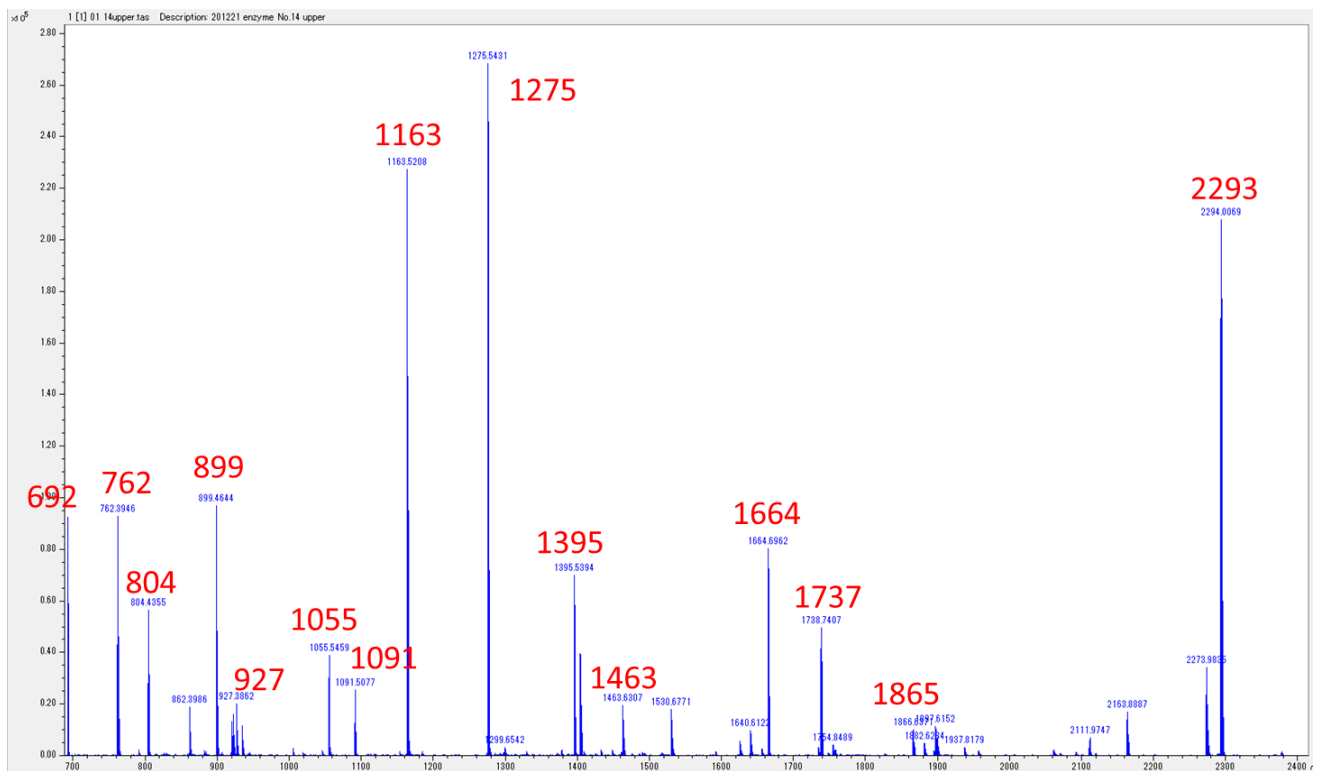


Figure 6. 試料 No.14 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

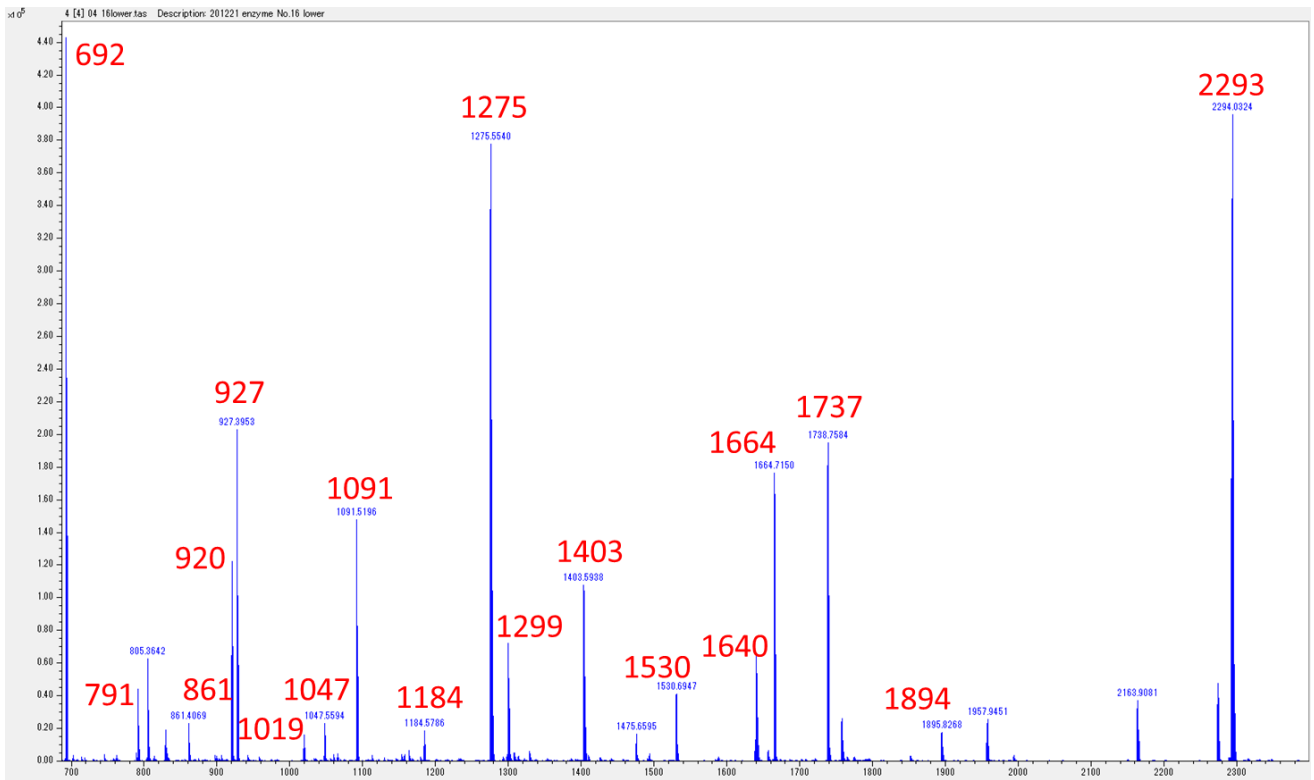


Figure 7. 試料 No.16 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

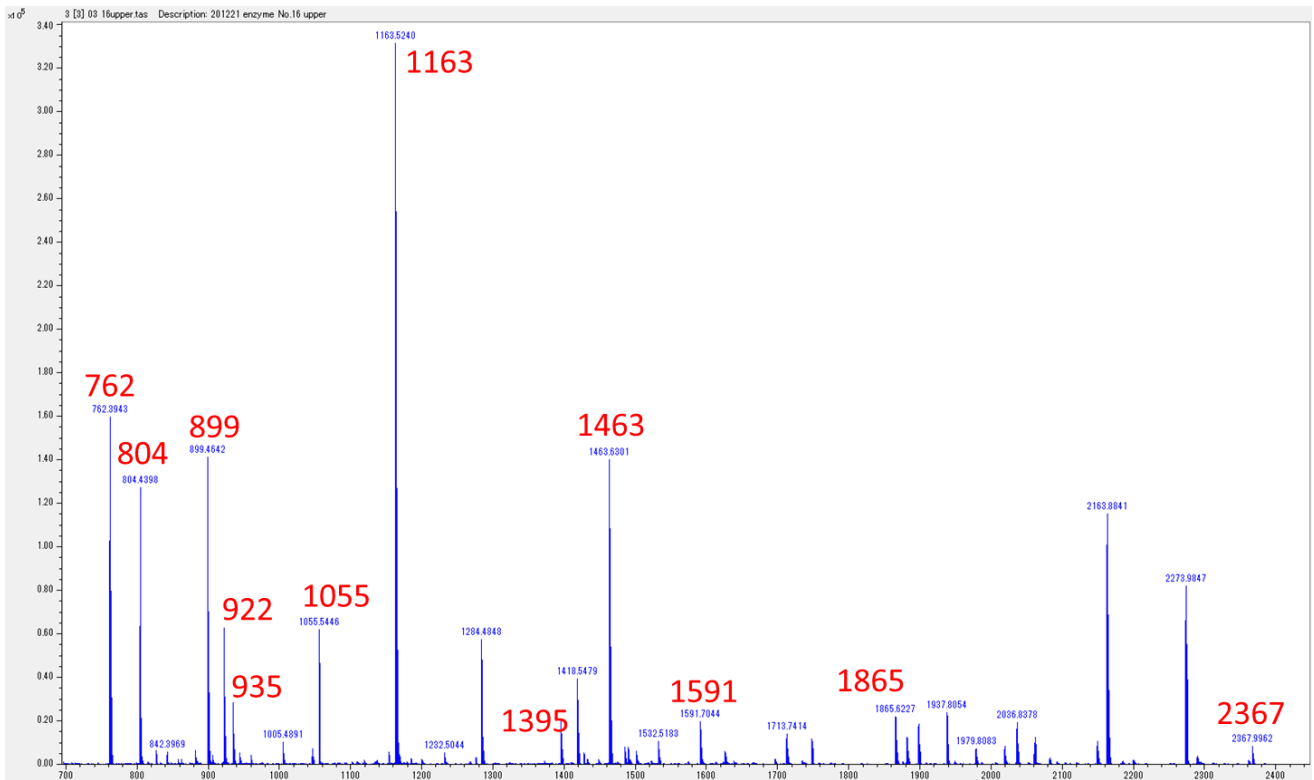


Figure 8. 試料 No.16 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)



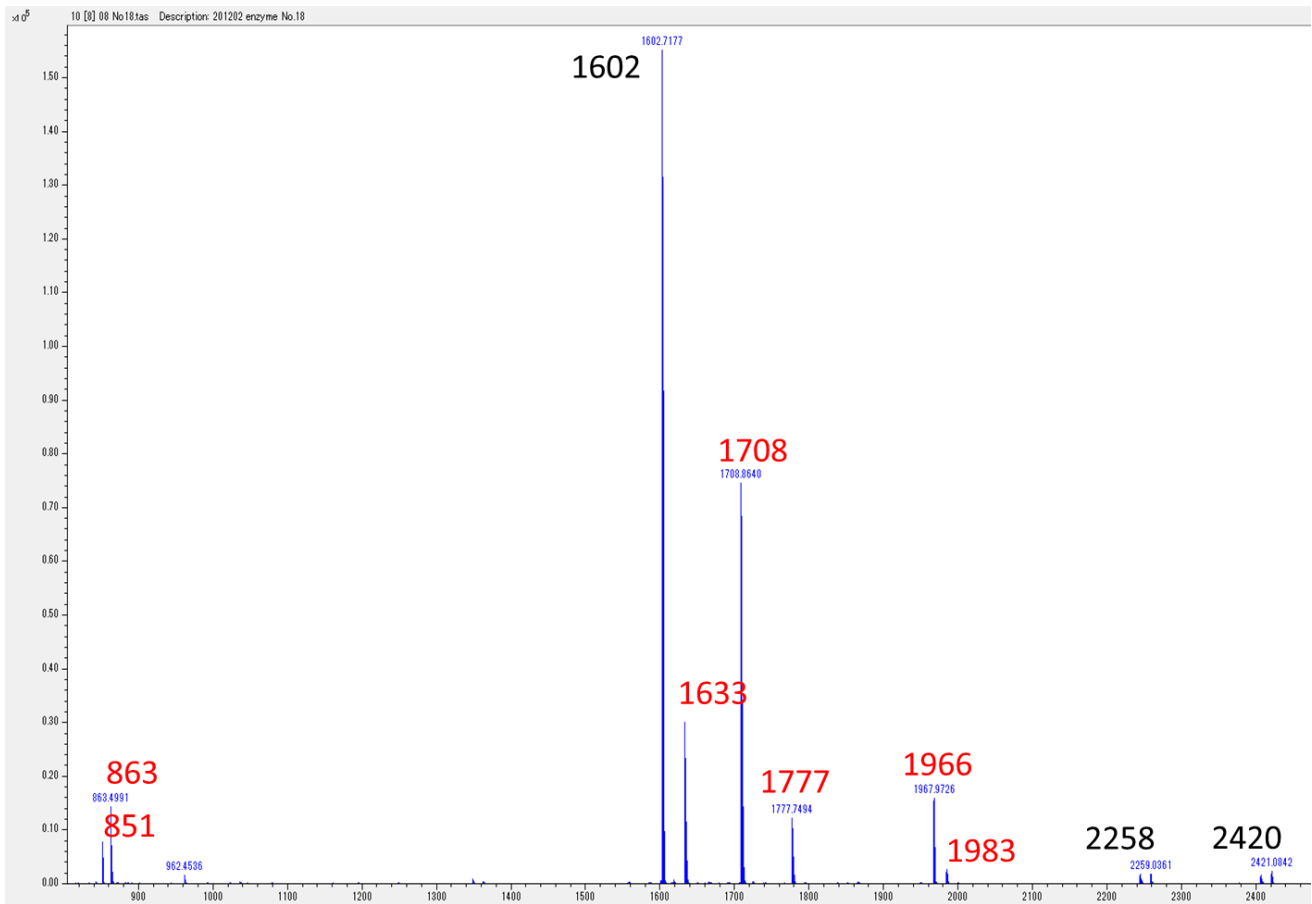


Figure 9. 試料 No.18 のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム  
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)



(A)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFPF
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTGVTYTD TSDLAVTPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKLPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KTTASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATTPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLDWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLSYSS YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDLDD
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

(B)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFPF
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTGVTYTD TSDLAVTPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKLPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KTTASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATTPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLDWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLSYSS YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDLDD
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

Figure 11. 試料 No.14 の同定されたタンパク質のアミノ酸配列  
(A)SDS-PAGE 像で推定 110kDa のバンド, (B) SDS-PAGE 像で推定 55kDa のバンド  
赤字は, 検出されたペプチド

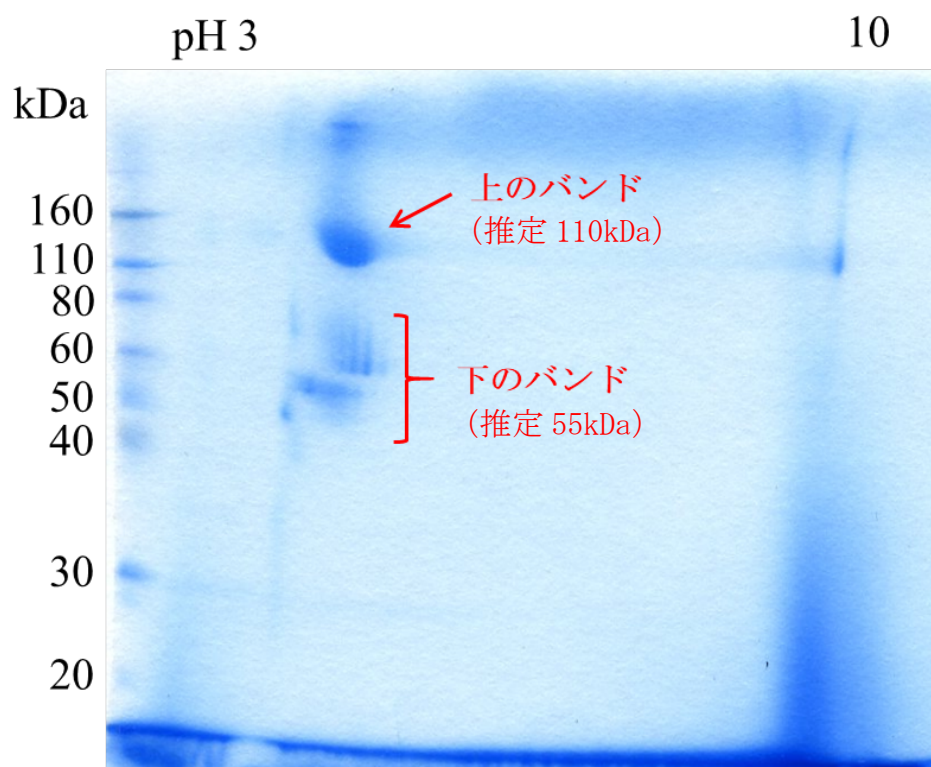


Figure 12. 試料 14 の二次元電気泳動像

(A)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTIGVYTD TSDLAVIPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KITASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLYSSD YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDL DL
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

(B)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTIGVYTD TSDLAVIPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KITASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLYSSD YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDL DL
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

Figure 13. 試料 No.16 の同定されたタンパク質のアミノ酸配列  
(A)上のバンド, (B)下のバンド  
赤文字は, 検出されたペプチド