

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7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 既存添加物酵素の微生物由来品目の同定法として、質量分析を用いたアミノ酸解析による基原菌種の同定法の開発を行ってきた。これまで、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)法を組み合わせることで基原同定法の検討を行った。その結果、独自データベースの作成や二次元電気泳動法を用いて、一部の酵素の基原同定が可能であることを示したが、さらなる同定精度の向上が望まれる。それらの課題を解決するため、これまでデータベースの改良や二次元電気泳動法を用いた検討、国際整合を考慮した最新の基原微生物種の分類情報の収集を行ってきた。今年度は、複数種のマトリクスの変更や消化酵素の併用により、同定精度の指標となる Coverage を上げることができかどうかを検討した。予備検討の結果、これまでにマトリクスとして用いていた 4-クロロ- α -シアノケイ皮酸(CICCA)に加え、9種のマトリクスを用いることにより検出ペプチド数が増えるかどうかを検討した。その結果、一部の製品の分析結果において、CICCA では検出されなかったペプチドが 5種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出された。また、これまで用いていた消化酵素であるトリプシンと Lys-C を併用することにより、検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、複数のマトリクスを用い、トリプシンと Lys-C を併用して PMF 法を行うことで、Coverage が上昇するかを調べたところ、3種の酵素製品の解析において、マトリクスに CICCA のみ、消化酵素にトリプシンのみを用いた過去の結果より Coverage が上昇した。本年度検討した手法を用いることで、より精度高く基原種の同定が可能となることが期待される。さらに、アスペルギルス・テレーウス糖たん白質の基原である *Aspergillus terreus* の最新の分類体系について文献調査を行った。その結果、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

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

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

西崎雄三 東洋大学

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、用いられる微生物種は細菌、真菌、放線菌など多分類群かつ他菌種にわたる。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、酵素の品質確保のため、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、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、タンパク質アミノ酸配列を指標とする質量分析法に基づくペプチドマスマインガープリンティング (PMF) 法に着目し、基原種同定法の検討を行ってきた。これまでに、複数の酵素製品を対象として SDS-PAGE と PMF を組み合わせた解析を実施し、構成成分の少ない添加物酵素については基原情報を取得できることを示した¹⁾。さらに、より正確な同定を目的として独自構築データベースによる Mascot サーチを行い、オンライン検索では同定困難であったタンパク質の同定に成功した。また、複数種の消化酵素を用いる手法を導入することで、トリプシン単独では同定できなかったタンパク質の同定も可能となった。これらの改良は基原同定精度の向上に有効であったが、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、2023 年度にはデータベースの改良や用いる消化酵素の検討を、2024 年度には二次元電気泳動法により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。本年度は、①マトリクスの検討、②2 種の消化酵素の同時使用の検討、③複数のマトリクスの使用と 2 種の消化酵素の同時使用の検討を実施した。精度の目安として、タンパク質全体のアミノ酸数に対する検出されたペプチドに含まれるアミノ酸の割合である Coverage を用いた。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微生物菌株の特徴を照合するデータベースにおける学名に問題があった場合、誤同定が発生したり、再同定した際に従来登録されていた基原種と異なる種とし

て同定されるケースがしばしばあることを把握していた。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継続的に収集する必要がある、文献調査を続けている。

今年度は、アスペルギルス・テレーウス糖たん白質に着目した調査を実施した。本酵素は、公定書の成分規格・保存基準各条で、アスペルギルス・テレーウス (*Aspergillus terreus*) の培養液から得ると定義されている。*A. terreus* は分子系統分類学的手法によって 2011 年以降に再分類が頻繁に行われたことから、本菌種から新種が独立的に定義され、真菌分類学分野では現在、12 菌種以上がここに内包されると認識されている。このことから、従来 “*A. terreus*” と扱われていた菌株を再同定した場合に、異なる種として同定される可能性が十分にある。そこで、従来の *A. terreus* (広義の *A. terreus*) に関する分類情報を整理することを目的とした調査を行った。

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。 α -アミラーゼは B583, B641 及び B643, ヘミセルラーゼは B653, プロテアーゼは B590 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。今回用いた試料の電気泳動像を図 1 に示す。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 μ L 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 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。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 μ 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 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 又はリシルエンドペプチダーゼ(質量分析グレード, Lys-C)10 μ g/mL を併用し、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。

マトリクスは以下の化合物を用いた。4-クロロ- α -シアノケイ皮酸(CICCA : シグマアルドリッチ), 6-アザ-2-チオチミン(ATT : サーモフィッシャーサイエンティフィック), カフェイン酸(CA : 東京化成工業), α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA : 富士フイルム和光純薬), 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHBA : 東京化成工

業), *trans*-フェルラ酸(FA : 東京化成工業), 2-ヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸(MSA, 東京化成工業), nor-harman(東京化成工業), シナピン酸(SA : 富士フイルム和光純薬), 2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン-水和物(THAP : 東京化成工業)をそれぞれ終濃度 10 mg/mL となるよう 0.1%TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液に溶解して用いた。各マトリクスの化学構造を図 2 に示す。

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 2024 年度に構築した 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 : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : 15~50 ppm, Mass values: MH⁺。

B-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

アスペルギルス・テレーウス糖たん白質の基原として使用されており、かつ頻繁に分類体系の再構築に伴う菌名の変更が繰り返され学名の細分化が進むことが知られる *A. terreus* について、広義の *A. terreus* に内包する複数の近縁種に関する文献を PubMed および Google Scholar を用いて検索し、主に遺伝子塩基配列の解析手法を取り入れた分類体系に関する論文を入手した²⁻⁴⁾。これらの文献の内容を調査し、整理した。

C. 結果及び考察

C-1-1) マトリクスによる Coverage への影響の解析

これまでに実施した PMF 解析においては、マトリクスとして CICCA を用いた。CICCA 以外のマトリクスを用いることにより、検出可能なペプチドが増える可能性が考えられたため、9 種のマトリクスを入手し、 α -アミラーゼ

(DFA B643)とヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドの PMF 解析に用いた。B643 の結果では、CICCA を用いた際に最も多くペプチド(14 種)が検出された。ATT, CA, FA, MSA 及び THAP を用いた際に CICCA では検出されなかったペプチドが計 3 種検出された。それらをまとめて Mascot データベースサーチを行った結果、Coverage が CICCA のみの 29%から 31%に向上した(表 1)。一方で B653 の結果では、CICCA を用いた際に 9 種のペプチドが検出され、他のマトリクスを用いても新たなペプチドは検出されなかった(表 2)。以上の結果より、解析するタンパク質によってはマトリクスを複数種用いることにより検出されるペプチドの種類が増え、Coverage を上げることも明らかとなった。

C-1-2) 2 種の消化酵素の同時使用による Coverage への影響の解析

これまでに実施した PMF 解析においては、消化酵素としてトリプシンを用いた。トリプシンはリジンとアルギニンの C 末端側を切断するが、切れ残りが生じることが知られている。そこでリジンの C 末端側を切断する LysC を併用することで切れ残りが減り、Coverage の向上が期待された。 α -アミラーゼ 2 種(DFA B583 と B643)、 β -アミラーゼ(DFA B659)及びヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドを PMF 解析に用いた。それぞれトリプシンのみ又はトリプシンと LysC を併用して得られた結果を表 3~6 に示した。B583, B643 及び B659 においては、LysC を併用することにより検出されるペプチドのパターンが変化し、Coverage がそれぞれ 2%, 8%及び 1%上昇した。B653 については、検出されるペプチドのパターンに変化はなかった。以上の結果より、解析するタンパク質によっては LysC をトリプシンと併用することにより、Coverage が上がることも明らかとなった。

C-1-3) 複数のマトリクスの使用と 2 種の酵素を用いた同時消化による Coverage への影響の解析

上述の解析結果より、CICCA 以外のマトリクスも使用すること、又はトリプシンと LysC を併用することにより、Coverage が上昇することが明らかとなった。そこでその両手法を併用することにより、さらに Coverage が上がるかを検討した。 α -アミラーゼ(DFA B641)、プロテアーゼ(DFA B590)とヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドを切り出し、トリプシンと LysC で同時消化後、CICCA, ATT, FA 及び THAP それぞれをマトリクスとして用い、ペプチドを検出した。得られたペプチドの質量数を統合して Mascot データベースサーチを行い、Coverage を求めた。過去の文献⁹⁾を参照し、トリプシンと CICCA を用いて解析を行った結果と比較したところ、Coverage が B641 では 28%から 33%に、B590 では 27%から 32%に、B653 では 17%から 19%に向上した(表 7~9)。以上の結果より、トリプシンと LysC を併用し、マトリクスを複数用いる方法は PMF 解析の結果の精度を向上させることに有効であると示された。

C-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

広義の *A. terreus* の分類について、Samson ら (2011) は、 β -tubulin (β -*tub*) およびカルモジュリン (*CaM*) 遺伝子などを指標とした multilocus の分子系統解析と形態学的特徴、二次代謝産物プロファイルを統合することによって再評価を行い、広義の *A. terreus* には複数の明確な系統群が内包されることを明らかにした。各系統群は新種として記載または既存種として再定義された。これが起こった主な理由は、広義の *A. terreus* 内部にはゲノムレベルでは明確に独立した系統群が存在するが、これらの群間の形態学的差異は軽微であったため、従来の形態観察中心の同定では識別困難であったことによるものである。それらの系統が隠ぺい種として認識された。その後、Houbraken ら (2020) および Visagie ら (2024) は、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* 属菌などの分類においては、従来多用されてきた rDNA-ITS 領域単独での系統解析では分解能が不十分であることを強調し、 β -*tub*, *CaM*,

RPB2などを組み合わせた multilocus の分子系統解析による分類を推奨した。また、近年再定義された *A. terreus* (狭義の *A. terreus*) とそれと近縁な隠ぺい種を含むグループ「*Aspergillus* section Terrei における series Terrei」内の種境界を一層厳密に定義した。さらに近年でも、series Terrei の種多様性は継続的に評価されており、今後さらに学術的に許容された菌種は増加すると考えられた。

以上の現行の分類体系 (Houbraken et al. 2020 ; Visagie et al. 2024) に基づくと、広義の *A. terreus* は、狭義の *A. terreus*, *Aspergillus pseudoterreus*, *Aspergillus aureoterreus*, *Aspergillus floccosus*, *Aspergillus neoaffricanus*, *A. alabamensis*, *Aspergillus citrinoterreus*, *Aspergillus heldtiae*, *Aspergillus jilinensis*, *Aspergillus montoensis*, *Aspergillus neoterreus* および *Aspergillus pseudoalabamensis* の 12 種に細分化される (表 10)。したがって、2011 年以前に「*A. terreus*」と同定された添加物酵素の基原菌株は、series Terrei 内の別種として再同定される可能性あり、狭義の *A. terreus* とその近縁種を網羅した参照配列と比較したうえでの multilocus の分子系統解析に基づく再同定が必要である。

A. terreus の例と同様に、基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

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、一昨年、昨年に引き続き改良を行った。検出されるペプチドの種類を増やすために、2 種の酵素による消化法と複数種のマトリクスを用いた検出法を組み合わせたことにより、Mascot サーチの結果における Coverage の向上が認められた。この方法を用いることで、よ

り精度高く基原種の同定が可能となることが期待される。また、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

E. 参考文献

- 1) T. Yoshinari, A. Sekine, N. Kobayashi, et al. 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) R.A. Samson, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga. New species in *Aspergillus* section Terrei. Studies in Mycology. 2011;69:39-55.
- 3) J. Houbraken, S. Kocsubé, C.M. Visagie, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies in Mycology. 2020;95:1-169.
- 4) C.M. Visagie, N. Yilmaz, S. Kocsube, et al. A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. Studies in Mycology. 2024; 107: 1-66.

F. 研究業績

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

無し

F-1-2) シンポジウム等

無し

F-2) 論文発表

無し

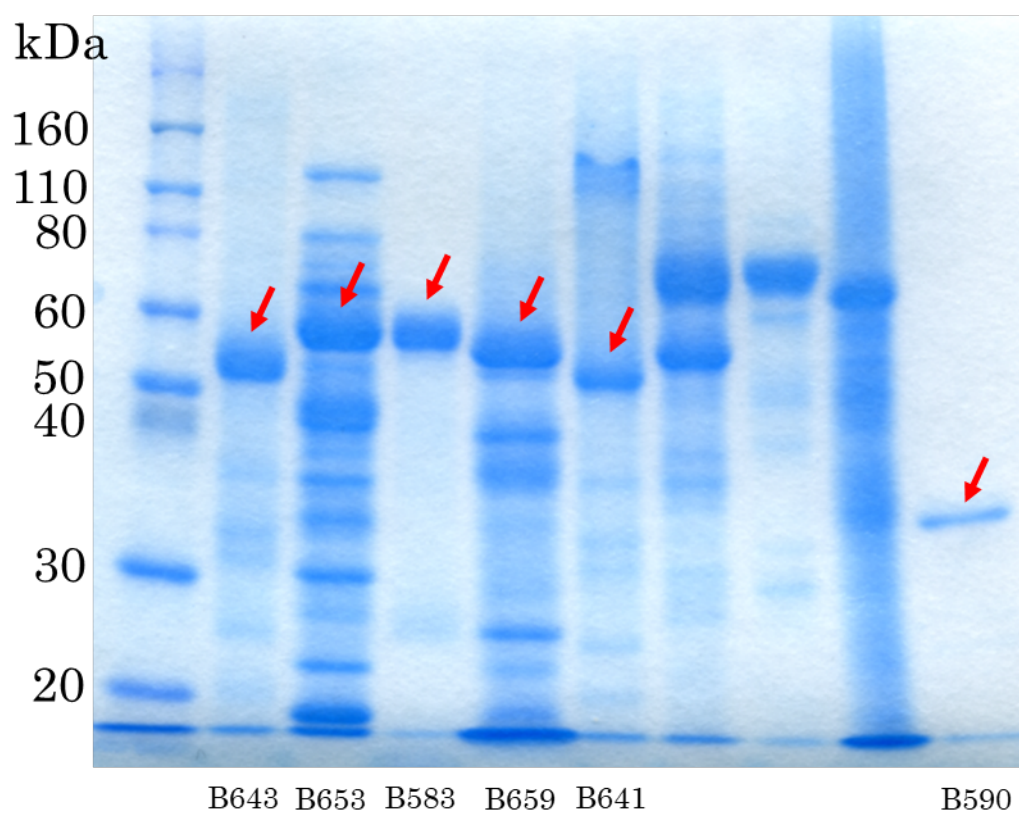


図1 PMF解析に用いた添加物酵素のSDS-PAGE像
赤色の矢印のバンドを切り出して解析に用いた.

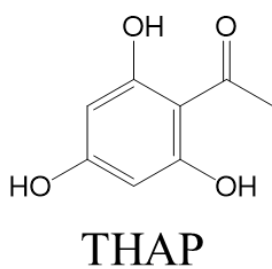
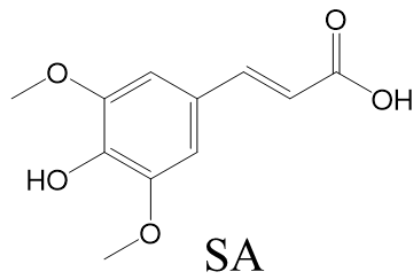
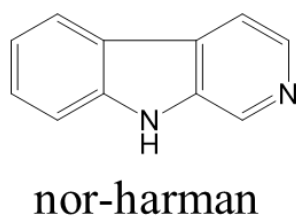
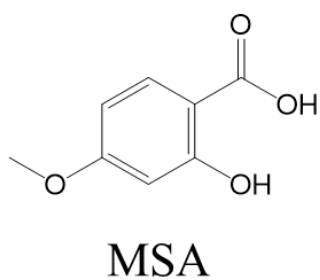
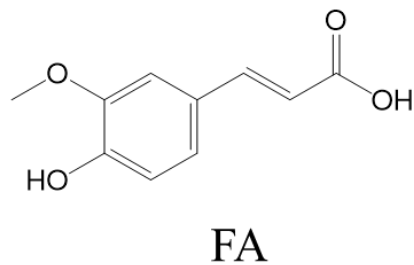
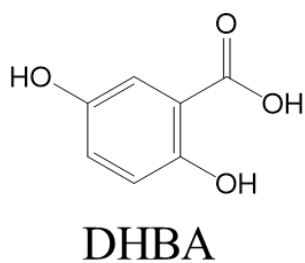
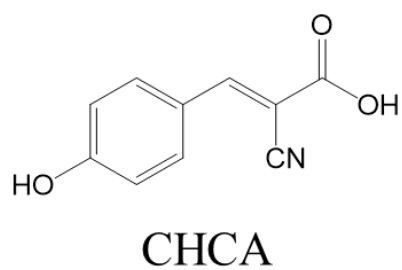
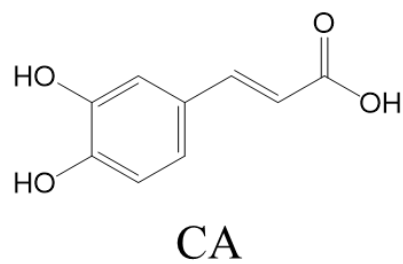
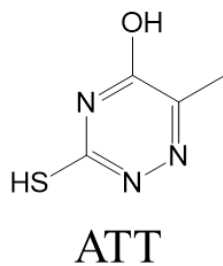
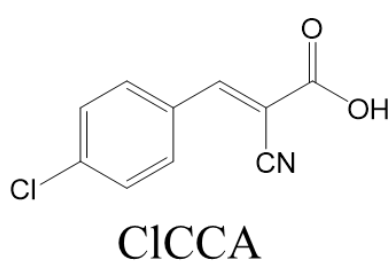


図2 本研究で使用したマトリクスの化学構造

表1 α -アミラーゼ(DFA B643)のトリプシン消化物を各マトリクスを用いてMALDI-TOF MSにより検出した際の
ペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

マトリクス	CICCA	ATT	CA	CHCA	DHBA	FA	MSA	nor-harman	SA	THAP	合算*
検出ペプチド数	14	11	8	7	9	14	11	6	11	10	17
Coverage (%)	29	27	13	16	21	30	22	13	27	22	31
m/z	2274	2274		2274	2274	2274	2274	2274	2274	2274	2274
	1876	1876				1876			1876		1876
	1860	1860			1860	1860	1860		1860		1860
	1724	1724	1724	1724	1724	1724	1724		1724	1724	1724
										1607	1607
	1561	1561				1561			1561	1561	1561
		1519				1519					1519
	1433	1433				1433				1433	1433
	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343
	1314	1314		1314	1314	1314	1314		1314	1314	1314
	1026		1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026
	984	984	984	984	984	984	984	984	984	984	984
	930		930	930	930	930	930	930			930
	929	929	929	929	929	929	929	929	929	929	929
	922										922
	849		849			849	849		849		849
			820				820				820

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表2 ヘミセラーゼ(DFA B653)のトリプシン消化物を各マトリクスを用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

マトリクス	CICCA	ATT	CA	CHCA	DHBA	FA	MSA	nor-harman	SA	THAP	合算*
検出ペプチド数	9	6	7	6	8	6	6	7	6	7	9
Coverage (%)	21	14	11	14	17	11	11	13	11	13	21
m/z	2284	2284		2284	2284						2284
	2078										2078
	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933
	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764
	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636
	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464
	922		922	922	922	922	922	922	922	922	922
	879		879		878			879		879	879
	808	809	808	808	808	808	808	808	808	808	808

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascot サーチを行った結果

表3 α -アミラーゼ(DFA B583)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	14	17
Coverage (%)	35	37
m/z	2660	
	2594	2594
		2532
		2027
	2007	2007
	1900	1900
	1842	1842
		1524
	1500	
	1497	1497
	1485	1485
		1451
	1413	1413
	1344	1344
		1116
	960	960
		942
	931	931
	873	873
	795	

表4 α -アミラーゼ(DFA B643)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	11	13
Coverage (%)	20	28
m/z	2274	2274
	1860	1860
	1724	
	1561	
	1433	1433
		1398
	1343	1343
		1314
	1051	
		1026
	984	984
	930	930
	929	929
	922	922
		849
		820

表5 β -アミラーゼ(DFA B659)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	11	12
Coverage (%)	23	24
m/z	2086	2086
	1753	1753
	1739	1739
	1670	1670
	1371	1371
	1327	1327
	1017	1017
	1003	1003
	993	
		884
	838	838
		832
	802	802

表6 ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	6	6
Coverage (%)	11	11
m/z	1933	1933
	1764	1764
	1636	1636
	1464	1464
	922	922
	808	808

表7 α -アミラーゼ(DFA B641)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	16	11	16	7	17
Coverage (%)	32	25	31	17	33
m/z	2274	2274	2274	2274	2274
	1876	1876	1876		1876
	1860	1860	1860	1860	1860
	1561	1561	1561		1561
			1519		1519
	1433	1433	1433		1433
	1398	1398			1398
	1343	1343	1343	1343	1343
	1314	1314	1314	1314	1314
	1026	1026	1026		1026
	984		984	984	984
	930		930		930
	929		929	929	929
	922	922	922	922	922
	849		849		849
	820	820	820		820
	695		695		695

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表8 プロテアーゼ(DFA B590)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	10	11	11	13	13
Coverage (%)	27	28	28	32	32
m/z	2348	2348	2348	2348	2348
	2320	2320	2320	2320	2320
	2183	2183	2183	2183	2183
	2144	2144	2144	2144	2144
	2130	2130	2130	2130	2130
	2105	2105	2105	2105	2105
	1840	1840	1840	1840	1840
				1403	1403
	1194	1194	1194	1194	1194
		1086	1086	1086	1086
	1081	1081	1081	1081	1081
	934	934	934	934	934
				831	831

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表9 ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	8	3	7	5	8
Coverage (%)	19	5	15	8	19
m/z	2284		2284		2284
	2078				2078
	1933		1933		1933
	1764	1764	1764	1764	1764
	1636	1636	1636	1636	1636
	1464	1464	1464	1464	1464
	922		922	922	922
	808		808	808	808

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表10 最新の分類体系において*Aspergillus* section Terrei series Terreiに含まれる菌種の一覧

学名	新種記載 された年	新種記載時の分類指標	主に分子系統解析での 再定義時の分類体系
<i>A. terreus</i>	1918	形態学（コロニー形態、分生子頭、分生子形状）	Sam son et al 2011
<i>A. alabamensis</i>	2009	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；温度成長；抗真菌薬感受性試験	Sam son et al 2011
<i>A. pseudoterreus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. aureoterreus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. fibricosus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. neoafRICanus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. citrinoterreus</i>	2015	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性	Houbraken et al 2020
<i>A. hildiae</i>	2020	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標；二次代謝プロファイル	Houbraken et al 2020
<i>A. jilnensis</i>	2020	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標	Houbraken et al 2020
<i>A. montensis</i>	2021	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性	Houbraken et al 2020
<i>A. neoterreus</i>	2022	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標	Houbraken et al 2020
<i>A. pseudalabamensis</i>	2023	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標；抗真菌薬感受性試験	Houbraken et al 2020