

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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、質量分析を用いたアミノ酸解析法として、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)法を組み合わせることで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、基原種の情報全く得られなかった製品も存在した。その理由として、試験法における技術的な課題、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、微生物学名の変更に伴うシノニム情報の不足等の問題があると考えられた。これらの問題を解決するため分析法の改良を実施し、さらなる同定精度の向上を試みた。具体的には、複数種の消化酵素の使用、独自に構築した改良データベースの使用、二次元電気泳動法を用いたタンパク質の分解能の改善、マトリクスの変更や複数消化酵素の併用を実施し、同定精度の指標となる Coverage を上げることができるかの検討を行った。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 サーチを実施した結果、オンラインで検索した場合には同定できなかったβ-ガラクトシダーゼやプロテアーゼの基原菌種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を実施した結果、トリプシンを用いた場合には同定できなかったヘミセルラーゼやセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドの基原菌種を同定することができた。また計 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、一部の酵素については通常の 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同定結果の正確性を向上させることができた。マトリクスの変更や消化酵素の併用による検出ペプチド数の増加程度を確認したところ、これまで用いていたマトリクスの C1CCA では検出されなかったペプチドが複数種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出され、また消化酵素の併用により検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。さらに、複数のマトリクスとトリプシン/Lys-C 併用を組み合わせ Coverage 上昇程度を確認した結果、マトリクスに C1CCA 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。本研究で検討した分析手法を用いることで、従来の PMF 法と比較してより高精度の基原種の同定が可能となると期待される。基原種同定法の開発と並行して、データベースの有効的な改良を見据えた基原種に関する分類学的情報の収集を行った。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、*Trichoderma* 属菌およびアスペルギルス・ステレウス糖たん白質の基原である *Aspergillus terreus* について、それぞれの最新の分類体系に関する文献収集を実施した。その結果、伝統的な古い指標で同定された菌株は、再同定した際に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
食環境科学部

清水公德 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、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。既存添加物酵素の定義には、基原が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 法を

混合タンパク質試料に対して適用する際には、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 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、過去に複数の既存添加物酵素を対象に、SDS-PAGE と PMF 法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、構成成分の少ない添加物酵素成分については、大多数の製品で基原の情報が得られ、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、一定の成果を上げた¹⁾。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、試験法における技術的な課題、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、微生物菌名の変更に伴うシノニム情報の不足等の問題が考えられた。

また、過去の検討から、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、これらの問題を解決し同定精度を向上させることで、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、試験法の改良を行った。さらに、基原種同定法の開発と並行して、データベース有効的な改良を見据えた基原となる真菌種の分類学的情報の収集を行った。

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) 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-1-2) 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-1-3) 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.) で示す。1 年目の検討では、 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。2 年目の検討では、 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。3 年目の検討では、 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

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。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 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 または 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。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マスペクトルを測定した。

マトリクスには以下の化合物のいずれかを用いた。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-水和水物(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。

B-1-4) 等電点電気泳動

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 $\times$ 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 $\times$ 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 $\times$ 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-1-5) ペプチドの質量を指標としたタンパク質の同定

マス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設定した ; Database : SwissProt, Enzyme : トリプシン, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : 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 3 分類群, ①*Aspergillus* 属真菌の *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. kawachii* 及び *A. luchuensis* とこれらの近縁種, ②*Trichoderma* 属菌, ③アスペルギルスステレウス糖たん白質の基原 *A. terreus* 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。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) 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.

C-1-2) 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3). 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-1-3) 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 2A と 2B 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 4A). 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 4B). 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.

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 3A と 3B 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 5A). 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 5B). 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.

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 4A と 4B 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 6A). 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 6B).

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 5A と 5B 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 7A). 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 7B). 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. 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た.

C-1-4)マトリクスの種類変更と 2 種の消化酵素併用による Coverage への影響の解析

本研究での PMF 解析においては, マトリクスとして CICCA を用いることを基本としたが, 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 8). 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 9). 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 を上げることが明らかとなった.

本研究での PMF 解析においては, 消化酵素

としてトリプシンを用いることを基本としたが、本消化酵素はリジンとアルギニンのC末端側の切断部位に切れ残りが生じることが知られている。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 10~13 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。

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¹⁾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 14~16)。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-2-1) *A. niger* とその近縁種に関する分類学的情報の収集

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る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 6 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ありうる。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。

C-2-2) *Trichoderma* 属菌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 7)。一例として、キシラナーゼ、キシナーゼ、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^{5,6)}。

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⁷⁾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有り、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。

C-2-3) *A. terreus* 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⁸⁾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⁹⁾および Visagie ら¹⁰⁾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* などを用いた 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に基づく、広義の *A. terreus* は 12 種に細分化される(表 17)。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、試験法の改良を行った。独自に構築したデータベースを用いた *Mascot* サーチ、複数種の消化酵素の併用、タンパク質の分解能を向上させるための SDS-PAGE から二次元電気泳動法への変更、検出されるペプチドの種類を増やすための 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、これらの改良を加えたことによって、解析するタンパク質によっては、検出されるペプチドの種類が増え、*Mascot* サーチの結果における Coverage の向上が認められ、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。これらの方法を組み合わせて用いることで、より精度高く酵素の基原種の同定が可能となると期待される。また、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．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) 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)
- 5) C. P. Kubicek et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. BMC Genomics. 20:485 (2019)
- 6) F. Cai, I. and S. Druzhinina. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Divers. 107:1–69 (2021).
- 7) G. J. Samuels. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195–206 (2006)
- 8) R.A. Samson, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga. New species in *Aspergillus* section Terrei. Studies in Mycology. 2011;69:39–55.
- 9) 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.
- 10) 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

- 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).
- 2) 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).

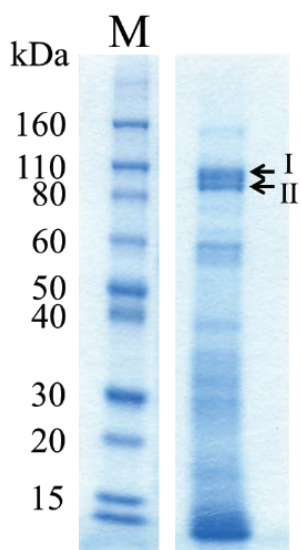
F-1-2) シンポジウム等

無し

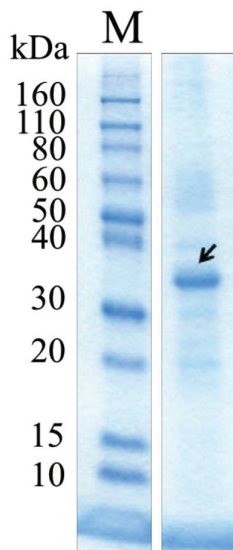
F-2) 論文発表

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

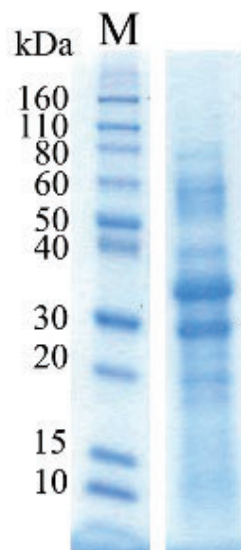
a) B572



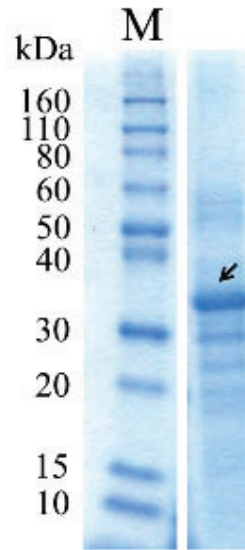
b) B576



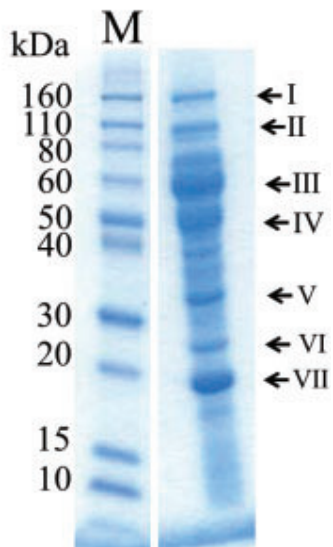
c) B577



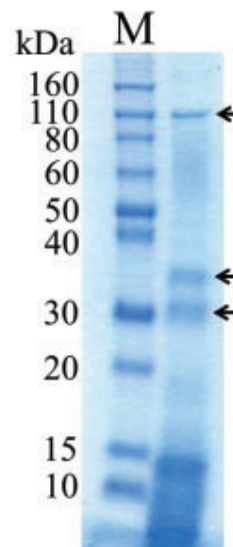
d) B591



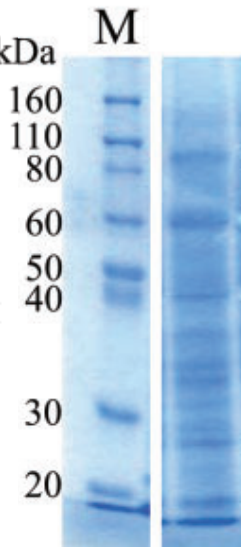
e) B653



f) B698



g) B651



h) B674

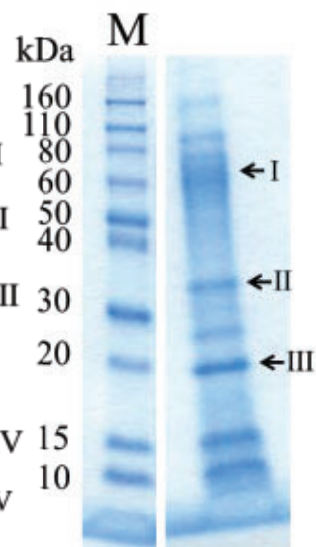
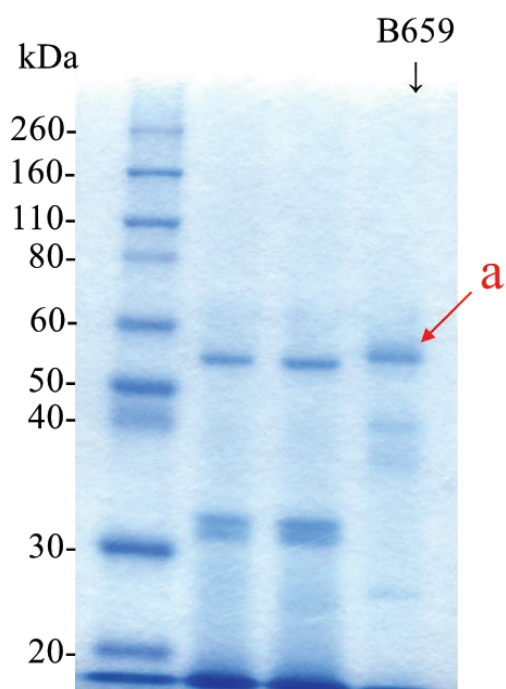


図 1. 解析を行った添加物酵素の SDS-PAGE 像

(A)



(B)

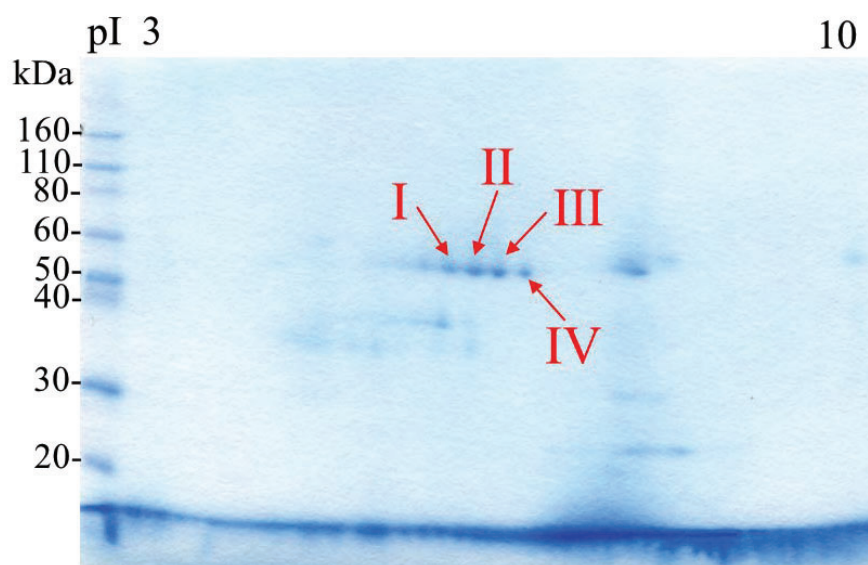
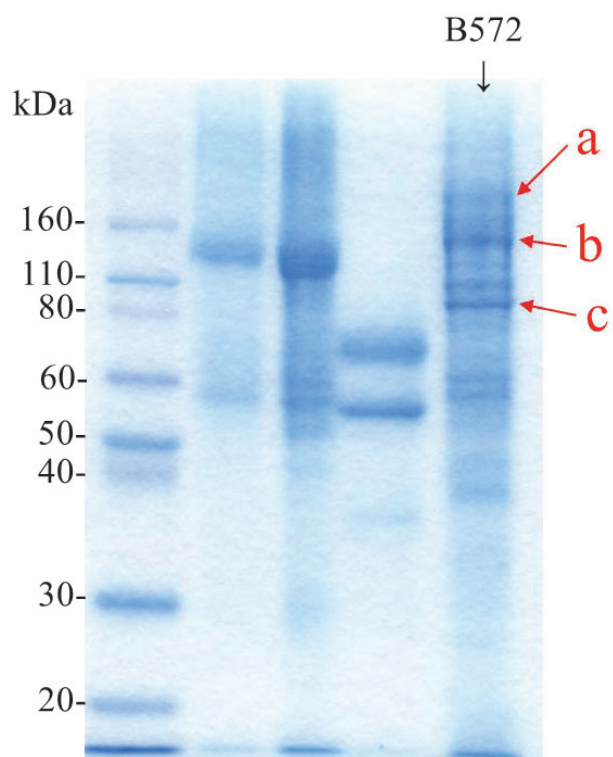


図 2. *Triticum aestivum* 由来の β -アミラーゼ(B659)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

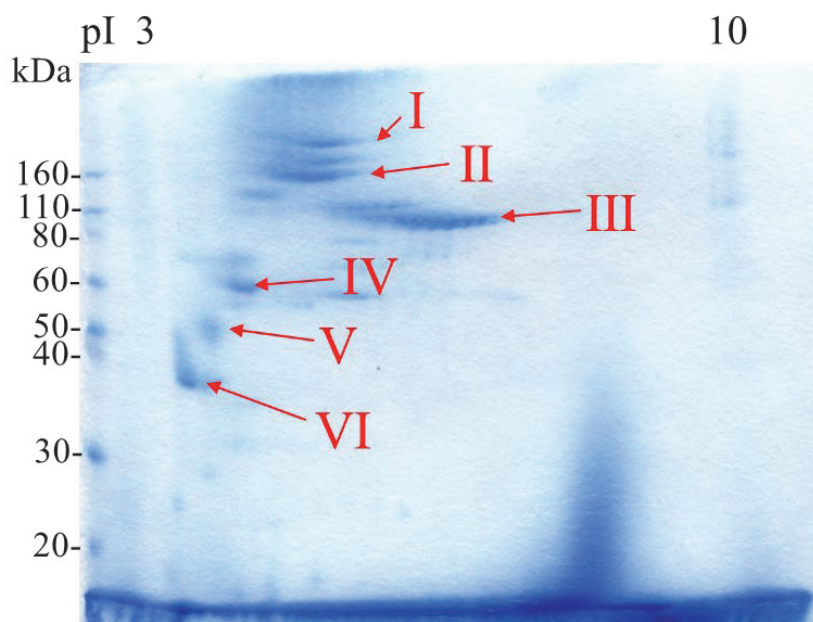
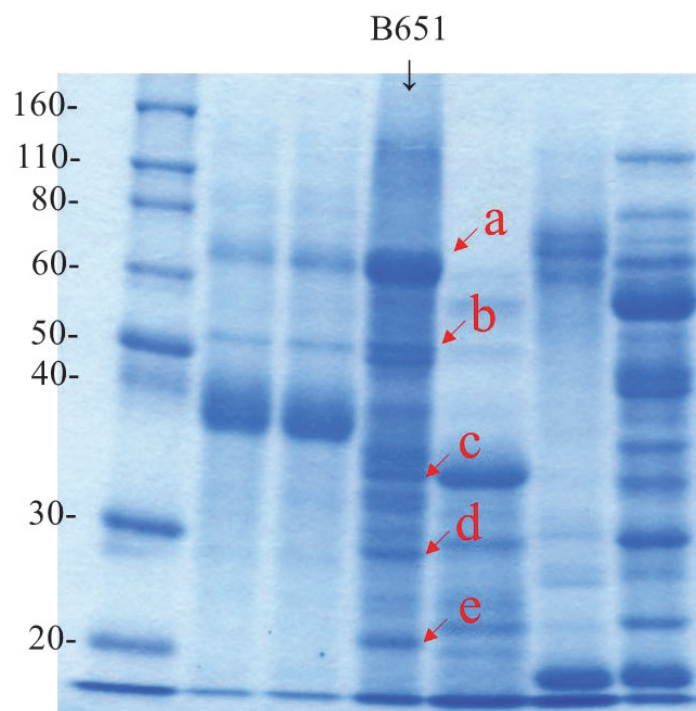


図 3. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

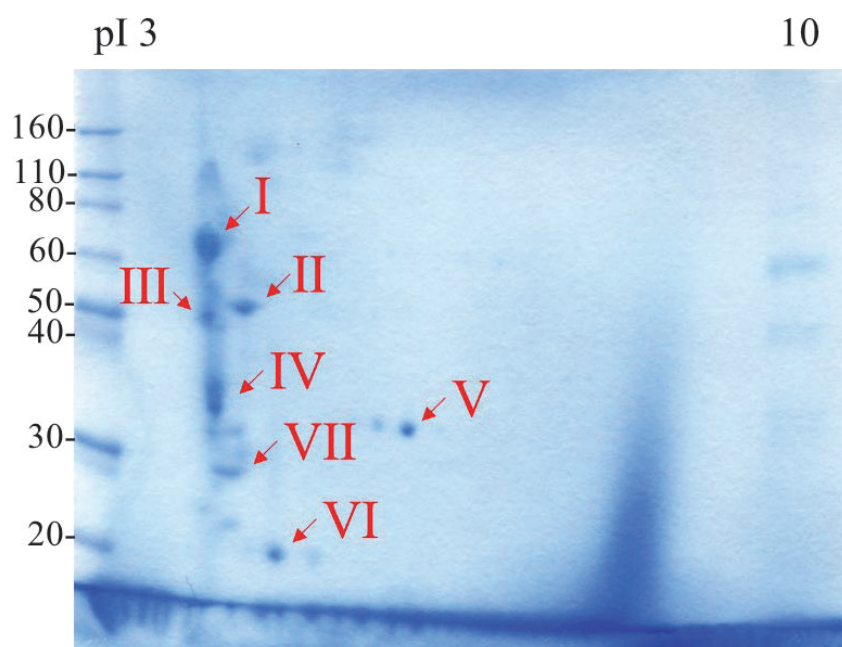
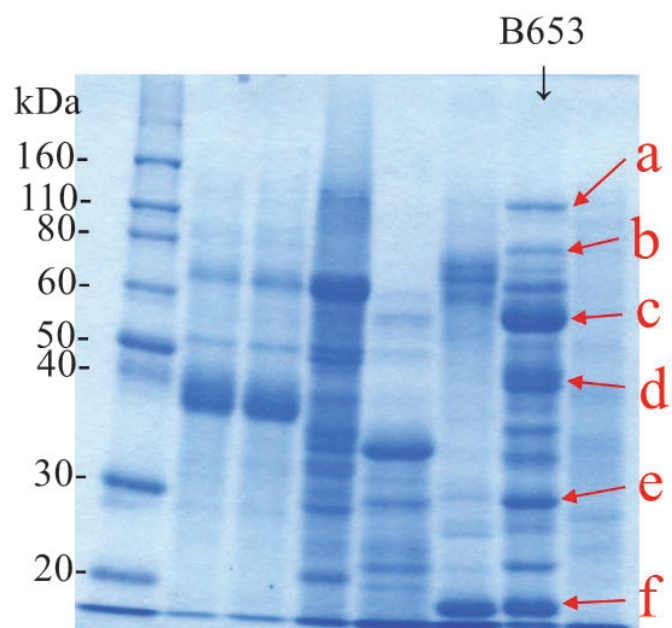


図 4. *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ(B651)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

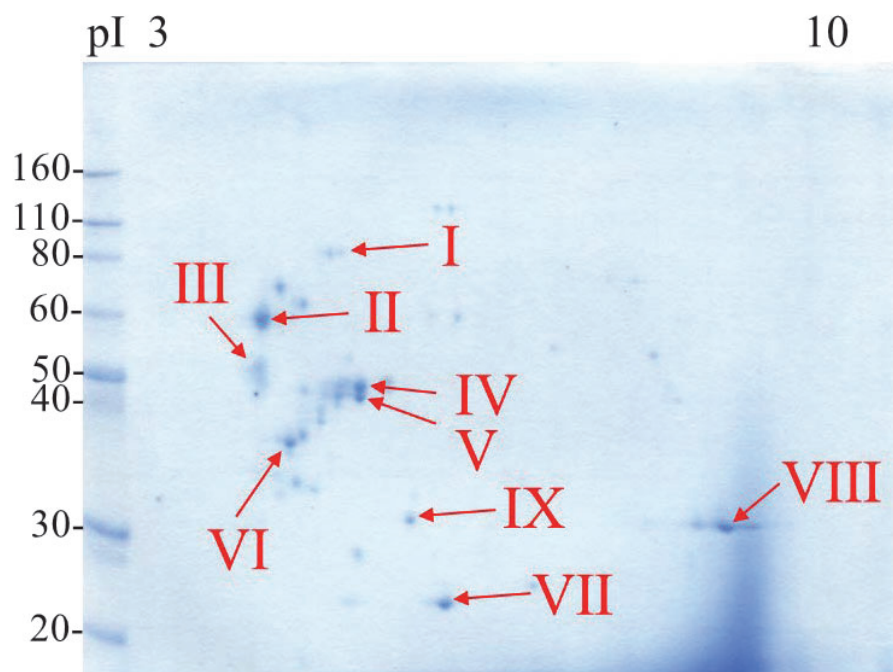


図 5. *Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ(B653)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

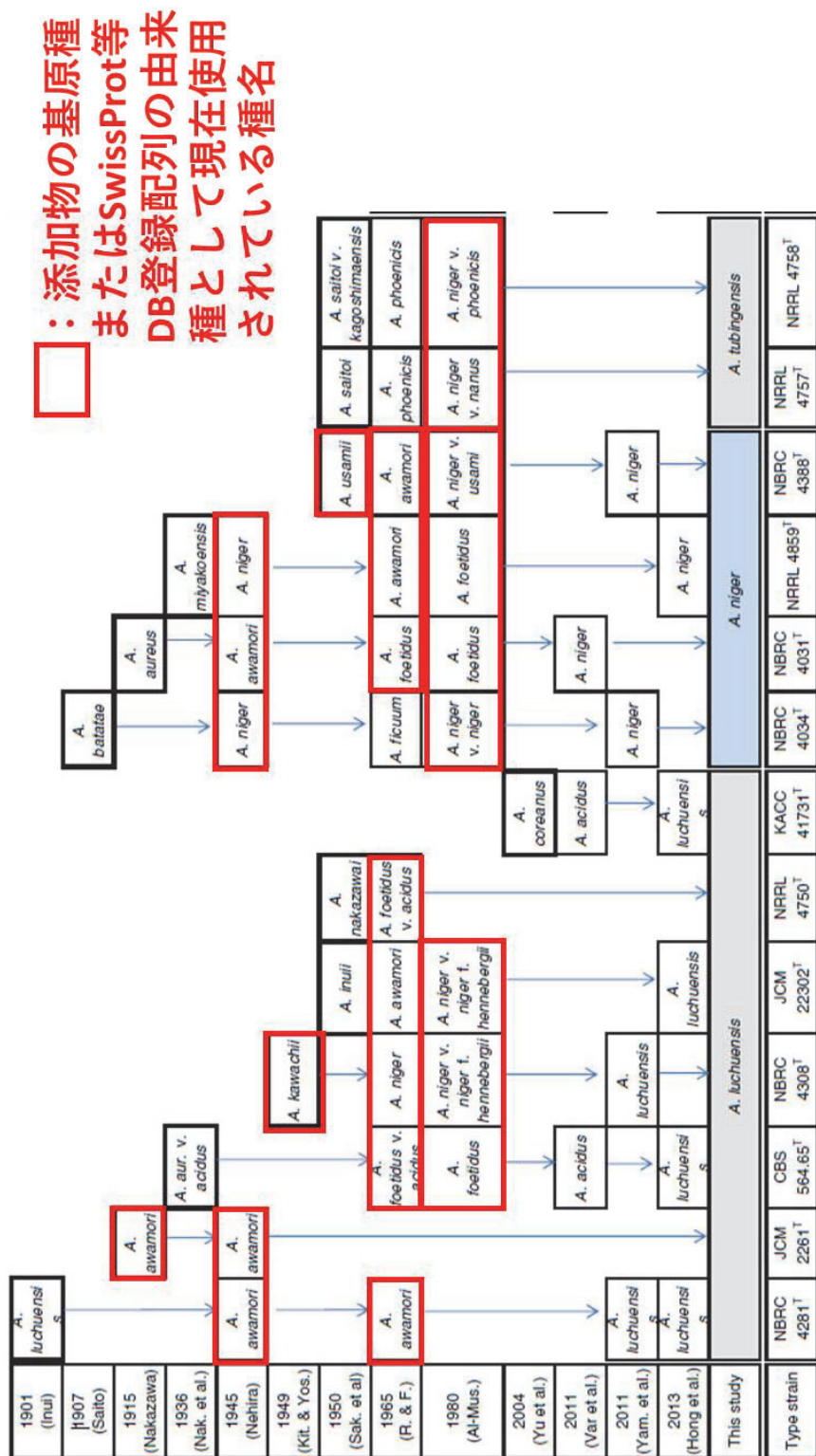


図6. *Aspergillus niger* およびその近縁菌の分類体系の変遷とシノニムの整理

<i>Trichoderma</i> 属の節		Long branchiatum				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. harzianum</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. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果

製造者による付帯情報			バンド No.	ゲル上の 分子量 (kDa)		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		
酵素名	由来	分子量 (kDa)		タンパク質名	生物種	分子量 (kDa)	一致した ペプチド数	
B572	β-galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	I	105	β-galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	27
			II	98	β-galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	28
B576	cellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	33	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
B577	hemicellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	I	34	unidentified			
			II	28	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	164	unidentified			
			II	104	xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87.3	18
					xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87.3	18
			III	59	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
			IV	48	glucanase	<i>Trichoderma ghanense</i>	50.1	6
					exo glucanase	<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 分子量 (kDa)		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>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	38.3	7
						β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	38.3	7
						unidentified			
B591	protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	VI	25		endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	20.8	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	21.5	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	22.4	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	24.1	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	24.1	6
						acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	5
B698	protease	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	I	110		unidentified			
						unidentified			
						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	-

表4. *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 5. *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6. *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7. *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				

表8. 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	ClCCA	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
	1561	1561				1561			1561	1607	1607
		1519				1519				1561	1561
	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9. ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリブ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	CICA	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
	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10. 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11. 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12. 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13. 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14. 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15. 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16. 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17. 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. floccosus</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. neoafrikanus</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. hekkiae</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. pseudoalabamensis</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