

# 麴に含まれるタンパク質の網羅的解析

陶山明子、衛藤美加、藤原秀彦

## 【要 旨】

発酵食品は多くの機能性を持つ。酒類全般では抗酸化活性・免疫賦活作用など、味噌では血圧上昇抑制効果・がん細胞増殖抑制効果などである。我々は発酵食品に含まれるタンパク質の網羅的解析により、機能性に関わるタンパク質の特定をめざしている。今回2次元電気泳動を用いて麴と味噌のタンパク質を分離・検出した結果、白麴菌のみ、または黄麴菌のみを用いた味噌、黄麦麴を用いた味噌の各々に特異的なタンパク質を検出できた。

## 【キーワード】

麴菌、2次元電気泳動、味噌

## 【はじめに】

発酵・醸造食品は原料を微生物により発酵させることで原料にない物質を作り出し機能性を高めることができる。例えば酒類全般では抗酸化活性、免疫賦活作用、抗がん作用などの報告があり、独自の作用としては清酒の美肌効果、健忘症抑制効果、ビールの骨粗鬆症改善効果、ワインの心臓病改善効果などの報告がある<sup>1)</sup>。味噌では血圧上昇抑制効果、抗変異原性、がん細胞増殖抑制効果などの報告がある<sup>1)</sup>。これらの発酵・醸造食品の製造には酵母・麴菌・乳酸菌などの醸造微生物が関わっており、使用する醸造微生物の違いで発酵食品の味や色、香り、機能性物質の種類・量などが異なってくる。これらの違いは微生物の産生する酵素の量や働きの違いによるものが大きい。

近年、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が多く報告されている。プロテオーム解析は生体中の全タンパク質を分離してそれらのタンパク質のアミノ酸や分子量を測定した結果を、遺伝子配列の情報のデータベースと照合して同定する手法である。我々は、発酵食品の機能性に関わるタンパク質の特定や食品の品質管理への応用をめざして、醸造微生物のプロテオーム解析を試みている。プロテオーム解析の成功の鍵は、高収率に全タンパク質を抽出し、高い分離能で分離することである。本研究では、発酵食品の例として麴と味噌からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動（1次元目：等電点電気泳動、2次元目：SDS-PAGE）によるタンパク質の分離を行った結果を報告する。

## 【材料および方法】

### 1. 米麴

酒造用米麴（黄麴菌使用）と米麴（W-20：白麴菌使用）を使用した。

## 2. 味噌

*Aspergillus kawachii* と *Aspergillus oryzae* を用いて作成した白米麴、白麦麴、黄米麴、黄麦麴を用いて、a. 白米麴×白麦麴、b. 白米麴×黄麦麴、c. 黄米麴×黄麦麴、d. 黄米麴×白麦麴の組み合わせで味噌を作成した。

味噌の作成は、麴屋本店の味噌の作成方法に従った。以下に詳細を示す。味噌は、原料の比率を米麴：麦麴：大豆：食塩＝約1：4：3：1として作成した。大豆は市販の国産大豆を使用した。まず圧力鍋で大豆を40分間蒸煮した後、ざるに上げて常温まで放熱し、チャック付きの袋に入れて冷凍しておいた。冷凍大豆は100℃で10分湯煎して解凍し使用した。次に米麴22gと麦麴126g、大豆106g、食塩30gを十分に混ぜ合わせ、保存袋に詰めた。発酵の過程で二酸化炭素が発生するため随時空気抜きと天地返しを行い、常温で2か月静置して作成を終了した。

## 3. 麴からのタンパク質抽出

麴からのタンパク質抽出は、以下の2つの方法を試した。

(1) 麴は液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。粉碎した麴250mgに対して膨潤/サンプルバッファー (ReadyPrep™ 2次元スターターキット (バイオラッド製)) を125μlまたは1ml添加して麴を溶解した液を2次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶性タンパク質と水に不溶性タンパク質が可溶化したものが含まれている。膨潤/サンプルバッファーの組成は、8M尿素、50mMジチオスレイトール、2%CHAPS、0.2%キャリアンフォライト (pHレンジ3-10)、0.001%BPBである。

(2) 麴は液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。粉碎した麴250mgに対して滅菌水を1ml添加して懸濁し室温で2時間振盪した後、10000rpm、5分、4℃で遠心し、上清を回収した。上清170μlに対して10倍量の10%TCAを含むアセトン溶液を加え-20℃で3時間静置した。15000rpm、10分、4℃で遠心し、沈殿を回収して冷アセトンで2回洗浄した。沈殿を乾燥してアセトンを完全に除去し、膨潤/サンプルバッファー125μlに溶解し2次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶性タンパク質のみが含まれる。

## 4. 味噌からの水溶性タンパク質抽出

味噌400mgに滅菌水1mlを添加して懸濁し室温で1時間振盪した後、ろ過した。ろ液に100%(w/v)TCAを2ml添加し-20℃で一夜静置した。9000rpm、15分、4℃で遠心し、沈殿を回収して冷アセトンで2回洗浄した。沈殿を乾燥してアセトンを完全に除去し、膨潤/サンプルバッファー125μlに溶解し2次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶性タンパク質のみが含まれる。

## 5. 2次元電気泳動

2次元電気泳動に使用する試薬および装置はすべてバイオラッド社のものを使用し、バイオラッド社の2次元電気泳動ガイドに従って操作した。

1次元目の等電点電気泳動はIPGストリップ (pHレンジ4-7、7cm) を使用し、等電点電気泳動の条件は、膨潤：12時間、Step1：250V Rapid 15min、Step2：4000V Linear 1h、Step3：4000V Rapid 10000Vhourである。等電点電気泳動装置はプロティアンIEFセルを使用した。電気泳動の終了後、IEFストリップはReadyPrep™ 2次元スターターキット付属の平衡化バッファーIおよびバッファーIIで平衡化した。

2次元目のSDS-PAGEは10%ミニプロティアンTGX™プレキャストゲルを用い、200V、

35分で電気泳動した。タンパク質は EzStain AQua (アトー社) による染色で検出した。2次元電気泳動では、タンパク質はスポット状に検出される。

## 【結果および考察】

### 1. 米麴の2次元電気泳動

1次元目の等電点電気泳動に供することのできる最大サンプル量は 125  $\mu$ l である。粉碎した麴 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 125  $\mu$ l 添加したところ、溶液の粘性が高くなりゲル状となったため1次元目の等電点電気泳動に供することができなかった。そこで粉碎した麴 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 1 ml 添加して溶解させ2次元電気泳動を行った。しかし、スメア状の濃いスポットと、5つ前後の薄いスポットしか検出できなかった。スメア状の濃いスポットは高含量のタンパク質の存在を示しており、米の主要な貯蔵タンパク質であるグルテリン (オリザニン) ではないかと推測した。それ以外のタンパク質量は少なかったため5つ前後の薄いスポットしか検出できなかったと考察した。

プロテオーム解析を行うためには、なるべく多くのタンパク質を2次元電気泳動で分離することが必要である。そのためには、高含量のタンパク質を除去し、低含量のタンパク質を濃縮する必要がある。グルテリンは水に不溶のため、麴を水で抽出すると不溶性タンパク質として除去できる。そこで、水に可溶性タンパク質と不溶性タンパク質に分けて2次元電気泳動を行うこととし、今回は可溶性タンパク質の2次元電気泳動を行った。粉碎した麴 250 mg の水溶性タンパク質を TCA/アセトン沈殿した全量を膨潤/サンプルバッファー 125  $\mu$ l で溶解し2次元電気泳動に供した。図 1a に白麴菌を用いた米麴の、図 1b に黄麴菌を用いた米麴の2次元電気泳動結果を示す。両者とも 50 個以上の良く分離されたスポットが検出できた。それぞれのスポット位置はほぼ同一であったが、白麴菌を用いた米麴に特異的なタンパク質のスポットが1つ検出できた (図 1a)。

### 2. 味噌の2次元電気泳動

味噌の製造には黄麴菌 (*A. oryzae*) を用いた黄米麴と黄麦麴が用いられる。焼酎製造に用いられる麴菌 (白麴菌 *A. kawachii*、黒麴菌 *A. awamori* など) はクエン酸を高生産することが特徴であり、産生した多量のクエン酸により 焼酎麴の pH は低く (pH 約 3) になっている<sup>2)</sup>。また 焼酎麴菌は黄麴菌よりも多量に植物細胞壁溶解酵素を産生する特徴がある<sup>2)</sup>。今回、黄米麴、黄麦麴をそれぞれ白米麴、白麦麴に置き換えてどのような違いが現れるかを、水溶性タンパク質の2次元電気泳動により検討した。

味噌は a. 白米麴×白麦麴、b. 白米麴×黄麦麴、c. 黄米麴×黄麦麴、d. 黄米麴×白麦麴の組み合わせで作成した。味噌 400 mg の水溶性タンパク質を TCA/アセトン沈殿した全量を膨潤/サンプルバッファー 125  $\mu$ l で溶解し2次元電気泳動に供した。図 2 には、特異的なタンパク質のスポットが検出された pH5 から 6 までの範囲の2次元電気泳動結果を示す。a. 白米麴×白麦麴と c. 黄米麴×黄麦麴の組み合わせでは、低分子量 (20 kDa 以下) の特異的なタンパク質スポットが検出された。したがって白麴菌のみを用いた味噌と黄麴菌のみを用いた味噌の違いを2次元電気泳動で検出することができた。一方、b. 白米麴×黄麦麴および d. 黄米麴×白麦麴のように白麴菌と黄麴菌を用いた組み合わせでは、良く分離されたタンパク質スポットは検出できなかったが、黒い点線で囲んだ中～高分子量のタンパク質が共に検出された。このタンパク質は a. 白米麴×白麦麴と d. 黄米麴×白麦麴では検出されなかったため、黄麦麴由来であると考えられる。また、味噌の2次元電気泳動結果 (図 2) では麴の結果 (図 1) と比べると高分子量のタンパク質ス

ポットは少なかった。味噌作成にかかった2ヶ月間で、高分子量のタンパク質が分解されて低分子量のタンパク質やペプチドになったためであると考えられる。低分子量のタンパク質検出に適したゲルを使用することでそれらのスポットの検出が期待できる。

今回の結果ではタンパク質スポットの数は非常に少なかったが、白麹菌のみを用いた味噌、黄麹菌のみを用いた味噌、黄麦麴を用いた味噌のそれぞれに特異的なタンパク質スポットを検出することができた。今後、サンプル調製および2次元電気泳動の条件を最適化することでより多くの特異的なタンパク質スポットを得て、発酵食品の機能性に関わるタンパク質の特定を行いたい。

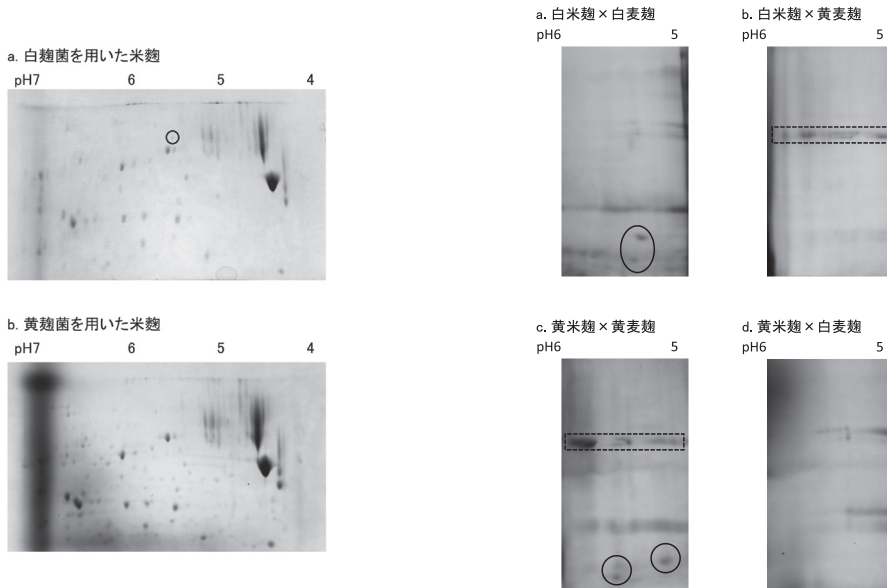


図1 米麴の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

a. 白麹菌を用いた米麴、b. 黄麹菌を用いた米麴。  
電気泳動写真の上の数字は等電点電気泳動におけるpHを示す。  
黒丸は特異的なタンパク質を示す。

図2 味噌の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

a. 白米麴と白麦麴を用いた味噌、b. 白米麴と黄麦麴を用いた味噌、  
c. 黄米麴と黄麦麴を用いた味噌、d. 黄米麴と白麦麴を用いた味噌。  
電気泳動写真の上の数字は等電点電気泳動におけるpHを示す。  
黒丸はその味噌に特異的なタンパク質を示す。黒い点線で囲んだ部分は共通と思われるタンパク質を示す。

## 【終わりに】

2次元電気泳動で麴と味噌を分析した結果、使用した麹菌に特異的なタンパク質が検出できた。サンプル調製および2次元電気泳動の条件を最適化し、発酵食品の機能性に関わるタンパク質の特定を行っていきたい。また、食品分析への応用も以下のように行っていきたい。まず製造過程ごとに食品サンプルの2次元電気泳動を行い、正常に製造できているときの泳動パターンを作成しておく。次に腐敗・色の変化など品質が低下した食品サンプルの2次元電気泳動を行って正常時の泳動パターンと比較することで、品質低下の原因となったタンパク質を特定する。そのタンパク質をプロテインシーケンサーで同定することで、品質低下の原因（微生物汚染、製造過程の不備など）が特定でき、製造過程の改善に役立てられることが期待される。

## 【謝辞】

本研究は、文部科学省平成 27 年度～平成 29 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」の助成金により実施しました。

## 【参考文献】

- 1) 北本 勝ひこ編著、醸造物の機能性、日本生物工学会スローフード微生物工学研究部会（財）日本醸造協会（2007）
- 2) 伊藤 清、焼酎麹菌の酵素生産の特徴、醸協：100(12)、838-848(2005)

