

固形培地上で誘導される麹菌酸性プロテアーゼの精製

応用生物科学専攻 食資源科学講座 応用食品科学 前田 菖花

1. 緒論

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くから、日本の伝統食品である酒や味噌、醤油の製造に利用されてきた。本菌は、ゲノム解析の結果から、約 130 種ものプロテアーゼ遺伝子を有していることが推定されている。この多様なプロテアーゼ産生能を持つ麹菌を他の食品にも応用しようと、当研究室では、麹菌を培養し、その培養物をチーズに添加し熟成させることで、チーズの風味や成分組成に与える影響について研究を行ってきた。乳タンパク質を窒素源とした最少培地上で麹菌を培養すると、もっぱら、アルカリセリンプロテアーゼである Oryzin が産生されるが、乳タンパク質を主成分とする固形培地(ホエイ培地)上で、培地の pH 環境を変えたり、培地へグルコースを添加したりすることにより、異なるアイソザイムが産生される。本研究では、Oryzin 以外に誘導されたプロテアーゼの同定を行った。

2. 方法

A. oryzae AHU 7139 を、pH 4.0 に調整した 0 または 5%グルコース添加ホエイ培地 (①または②)、及び pH 6.5 に調整した 5%グルコース添加ホエイ培地 (③) で培養した。上記 3 条件の培養終了後、純水を加えて抽出したものを粗酵素液として回収し、ここに含まれるタンパク質を 65%冷アセトンで沈殿させ、酢酸緩衝液に溶解したものをを用いてプロテアーゼ活性を比較したところ、②において、ペプスタチン A によって阻害されるアスパラギン酸プロテアーゼが高い比率で存在しているのに対し、①及び③においては、②よりも高い比率で、PMSF によって阻害されるセリンプロテアーゼの存在が確認された。②の粗酵素液の 30~65%冷アセトン沈殿画分を回収し、酢酸緩衝液で透析後、陰イオン交換クロマトグラフィー、ブチルトヨパールを用いた疎水クロマトグラフィーに供した。得られた活性画分を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜へ転写したサンプルから N 末端アミノ酸配列を解析した。

3. 結果と考察

各培養条件での培養終了時の培地 pH を比較すると、①では、初発 pH 4.0 から 5.3 に上昇した一方で、グルコースを添加した②では培地 pH はあまり上がらず、4.2 に留まった。③では初発 pH から下がり、最終的に pH 6.0 となった。このような培地 pH の変遷により、①と③ではアスパラギン酸プロテアーゼの他にもアルカリ側で活性が高いセリンプロテアーゼが誘導された一方、②では培地 pH がより酸性側に留まり、その誘導がかからなかったものと考えられる。アスパラギン酸プロテアーゼの存在比が高い②を用いた培養から得られたプロテアーゼの一部を SDS-PAGE に供した結果、分子量 40 kDa 付近にプロテアーゼ活性のピークと対応するバンドが確認できた。N 末端アミノ酸配列解析の結果、本酵素はアスパラギン酸プロテアーゼである Pep0 であることが示唆された。

4. まとめ

A. oryzae AHU 7139 は、5%グルコースを含有する pH 4.0 のホエイ培地上において主にアスパラギン酸プロテアーゼを産生することが示された。陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーにより精製を行い、N 末端アミノ酸配列を解析した結果、産生されるプロテアーゼ中には Pep0 が含まれていることが明らかとなった。