

# かび由来アスパルティックプロテアーゼを用いた色素タンパク質の脱色

研究期間：2012年～現在に至る

## 研究背景・目的

### 【研究背景】

日本の伝統食品であるかつお節には、大きく分けて荒節と枯節という2種類の製品が存在します。原料のかつおをおろし、熱水で煮たかつお肉を煙で燻した（焙乾）だけのものを荒節と呼び、荒節をアスペルギルス属のかつお節かびを使って発酵させたものを枯節と呼びます。かび付けの技法は、冷蔵や冷凍技術がなかった江戸時代に確立された保存法ですが、輸送技術が進歩した今でも続けられています。

それはかび付けの効用であり、①水分含量の低下（雑菌が生えにくい）、②脂質の分解（あぶら焼けの防止）、③旨味の向上、④まろやかな香味、⑤色相の変化などが挙げられます。

### 【目的】

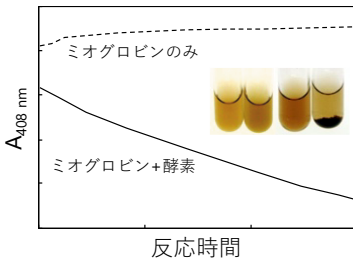
本研究では、色相の変化に関わるアスパルティックプロテアーゼの働きを調べるとともにこの酵素を他分野でも利用するためにその能力を評価しています。

### 鯉節（枯節）の製造工程



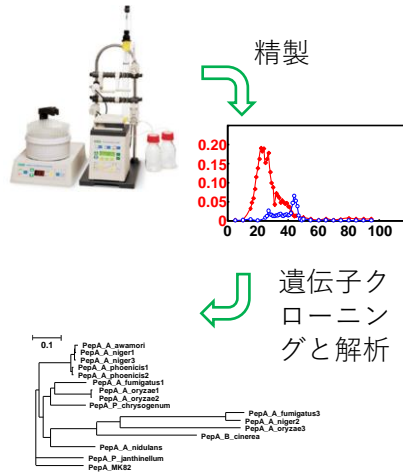
## 実験概要

### 【脱色因子の検索】

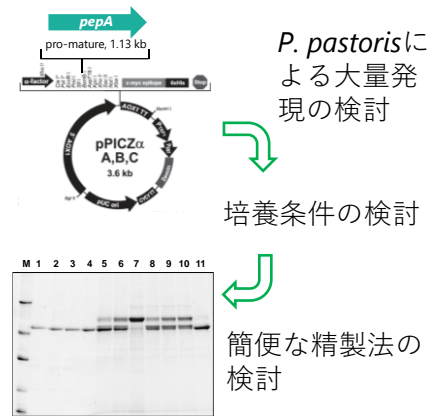


色素タンパク質の分解・脱色がアスパルティックプロテアーゼ (PepA) によるものであり、脱色活性を追いかけました。

### 【PepAの精製・特性解析】



### 【PepAの大量調製】



## 結果と考察

### 【PepAによる限定分解】

MGLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLRIRLFTGHP  
ETLEKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKGTVVLTALGGIL  
KKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAIHHVLS  
KHPGDFGADAQQAMTKALELFRNDIAAKYKELGFQG



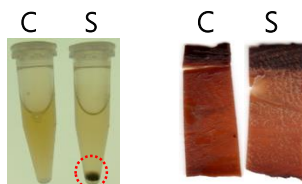
ヘムタンパク質は、PepAにより限定分解を受けて、ヘム（赤色）が遊離する。その後、酸化還元酵素系によって、ヘム⇒ビリベルジン⇒ビリルビン（黄色）へと代謝される。⇒脱色につながる。

### 【PepAの性質】

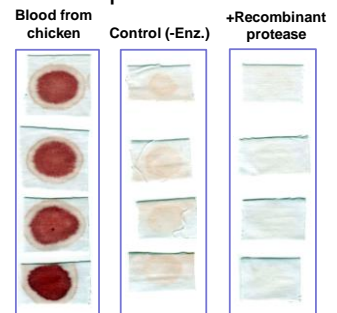
PepAは、中性領域まで安定で、室温でも約一か月活性を維持しました。また、界面活性剤や漂白剤に対しても安定でした。

### 【鯉肉の脱色】

PepAを用いてミオグロビン溶液と鯉節片が脱色されるか調べると、確かに脱色が見られた。



### 【PepAの活用】



血液を滴下した布（左）は、洗濯洗剤のみではシミが残ってしまうが（中央）、PepAと組み合わせると洗いがよくなります（右）。

## 発表論文

1. Lim L, Senba H, Kimura Y, Yokota S, Doi M, Yoshida K, and Takenaka S. Influences of N-linked glycosylation on the biochemical properties of aspartic protease from *Aspergillus glaucus* MA0196. *Process Biochem.* 79:74-80 (2019). doi: 10.1016/j.procbio.2018.12.017
2. Takenaka S, Lim L, Fukami T, Yokota S, Doi M. Isolation and characterization of an aspartic protease able to hydrolyze and decolorize heme proteins from *Aspergillus glaucus*. *J Sci Food Agric.* 2018 Sep 6. doi: 10.1002/jsfa.9339.
3. Takenaka S, Umeda M, Senba H, Koyama D, Tanaka K, Yoshida KI, Doi M. Heterologous expression and characterisation of the *Aspergillus* aspartic protease involved in the hydrolysis and decolorisation of red-pigmented proteins. *J Sci Food Agric.* 97(1):95-101 (2017). doi: 10.1002/jsfa.7688.
4. Aoki K, Matsubara S, Umeda M, Tachibanac S, Doi M, Takenaka S. Aspartic protease from *Aspergillus (Eurotium) repens* strain MK82 is involved in the hydrolysis and decolourisation of dried bonito (Katsuoobushi). *J Sci Food Agric.* 93(6):1349-1355 (2013). doi: 10.1002/jsfa.5896.

## 学会発表

1. ○林理希、土居幹治、竹中慎治ら。 *Aspergillus glaucus* MA0196由来ハイマンノース型アスパルティックプロテアーゼの分泌生産と酵素特性の解析 （生命科学系学会合同年次大会、2017年12月）
2. ○林理希、竹中慎治、横田仁子、土居幹治ら。 *Aspergillus glaucus* MA0196におけるアスパルティックプロテアーゼの生産特性と酵素の性質 （日本生化学会 近畿支部例会、2017年）
3. ○竹中慎治、土居幹治ら。 かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus* 属糸状菌由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析 （日本生物工学会本大会、2015年）
4. ○仙波弘雅、小山大、土居幹治、吉田健一、竹中慎治。 ハイマンノース型糖鎖を有する *Aspergillus glaucus* MA0196由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析 （日本生物工学会、2014年9月、北海道）
5. ○中川 知里、吉田 健一、小山 大、土居 幹治、青木 健次、竹中 慎治。 かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus glaucus* MA0196由来アスパルティックプロテアーゼの精製と特性解析 （2011年3月、京都）
6. ○梅田 麻代、吉田 健一、小山 大、土居 幹治、青木 健次、竹中 慎治。 かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus repens* MK82由来アスパルティックプロテアーゼの精製と特性解析 （2011年3月、京都）

## 特許

1. ピキア酵母を用いた遺伝子組換えによるアスパルティックプロテアーゼの製造方法（特開2017-60421）
2. 脱色用プロテアーゼおよびその用途（特開2009-219483）

## 共同研究先

1. マルトモ株式会社

# 微生物酵素を用いた卵殻膜の加水分解と可溶性ペプチド・タンパク質の抽出

研究期間：2008～現在に至る

## 研究背景・目的

### 【研究背景】

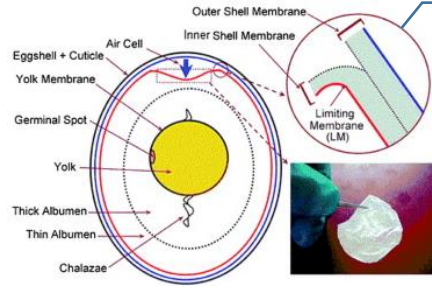
鶏卵は、栄養価の高い機能性食品で、年間約260万トン消費されています。よって、加工工程で生じる非可食部である卵殻部の有効活用も求められています。卵殻部の構成成分である卵殻膜は、古来より生理活性があることはわかっていましたが、いまだに焼却廃棄されています。食品・化粧品・サプリメントなどの分野での活用を考えれば前処理（可溶化）が必要となりますが、化学的処理よりも温和な条件で行うことが環境にも優しいと言えます。

### 【目的】

本研究では、卵殻膜を効率よく分解できる微生物由来エステラーゼを検索し、卵殻膜分解条件の最適

化を図りながら、可溶性ペプチドやタンパク質の生理活性とその構造の解明に取り組んでいます。

### 卵殻膜部分

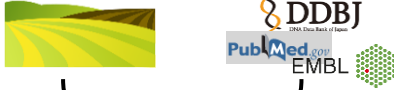


卵殻膜はタマゴの殻の内側にある薄い生体膜であり、その主成分はタンパク質で、二層の網目状構造をしています。微生物が卵内部への侵入・汚染を防ぐ役割を果たしているため難分解性です。

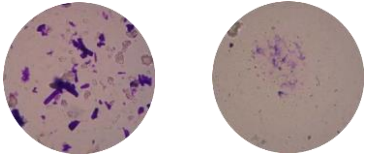
M. Baláž, Acta Biomaterialia, 10: 3827-3843 (2014)より

## 実験概要

### 【卵殻膜分解微生物の検索】

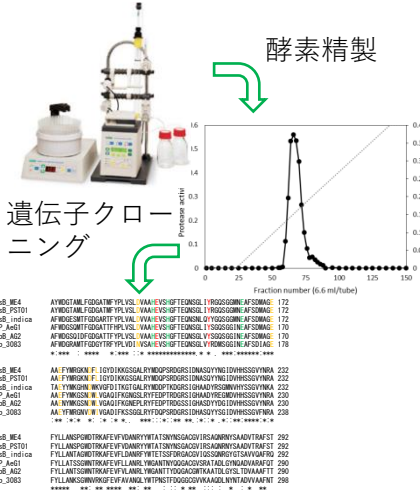


自然界またはデータベースから検索

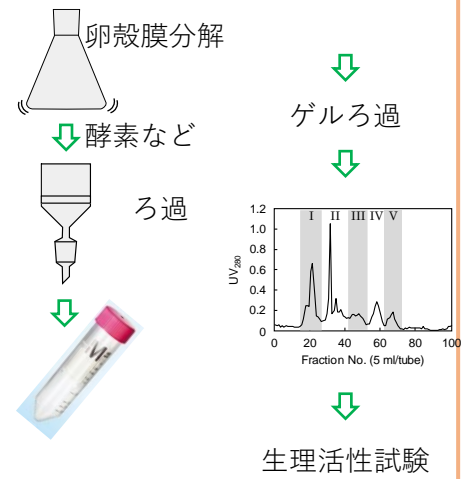


分解活性評価

### 【卵殻膜分解酵素の特性解析】

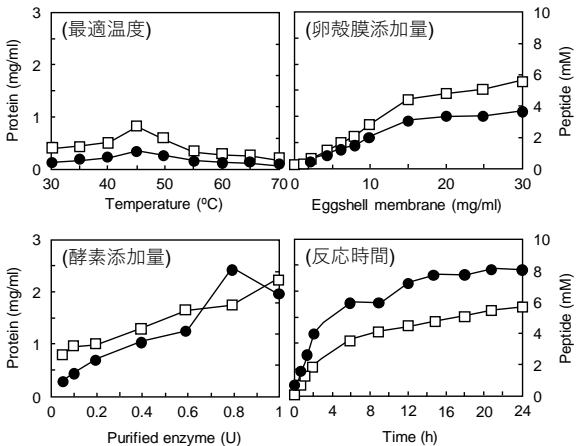


### 【卵殻膜の分解と分画】

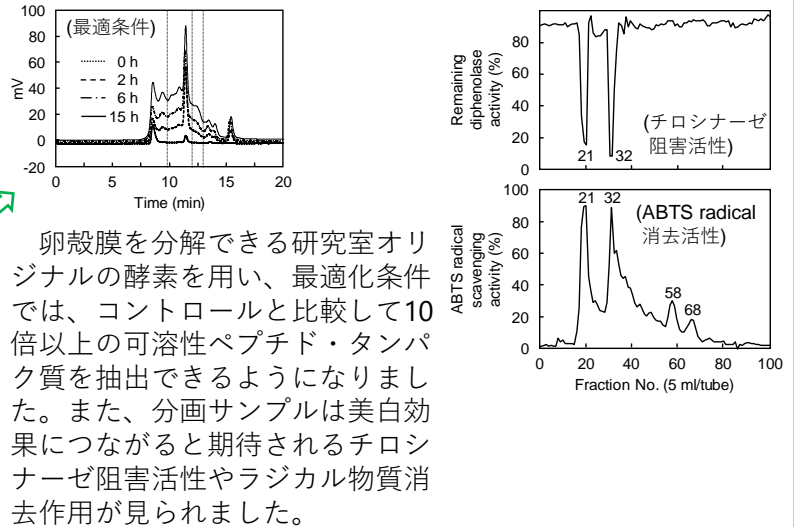


## 結果と考察

### 【卵殻膜分解の最適化】



### 【分画した生理活性ペプチドの生理活性試験】



## 発表論文

1. Takenaka S, Yokoyama M, Kimura Y, Yamashita Y, and Ashida H. Characterization of an organic-solvent-stable elastase from *Pseudomonas indica* and its potential use in eggshell membrane hydrolysis. *Process Biochem.* 85:156-163 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.021>
2. Takenaka S, Hano S, Cheng M, Yoshida K, Aoki K. Organic solvent-tolerant elastase efficiently hydrolyzes insoluble, cross-linked, protein fiber of eggshell membranes. *Biotechnol Lett.* 34(5):949-55 (2012). doi: 10.1007/s10529-012-0861-3.
3. Cheng M, Takenaka S, Aoki S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *J Biosci Bioeng.* 107(4):373-378 (2009). doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.010.

## 学会発表

1. 横山 萌、○竹中 慎治、吉岡 泰淳、山下 陽子、芦田 均. 卵殻膜分解活性を示す微生物由来エラスターゼの検索と特性解析 (日本農芸化学会本大会、2018年3月、名古屋)
2. ○横山 萌、吉岡 康淳、山下 陽子、芦田 均、竹中 慎治. 微生物由来エラスターゼを用いた卵殻膜の可溶化と生理活性ペプチドの調製 (2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸)
3. ○竹中 慎治、大坂 宇津実、山下 陽子、芦田 均. 卵殻膜分解酵素の異種発現と同酵素を用いた卵殻膜からの生理活性ペプチドの取得 (日本農芸化学会本大会、2016年3月、北海道)
4. ○芦田 均、田中 裕基、山下 陽子、竹中 慎治. 卵殻膜由来ペプチドによるグルコース取り込み促進効果について (日本食品科学工学会、2015)

## 共同研究先

1. 当学部 生物機能開発化学 (山下先生) / 動物資源利用化学 (白井・福田先生)
2. 旗影会 特別研究助成等により研究を実施中

# 環境・発酵食品中の微生物菌叢解析

研究期間：2010～現在に至る

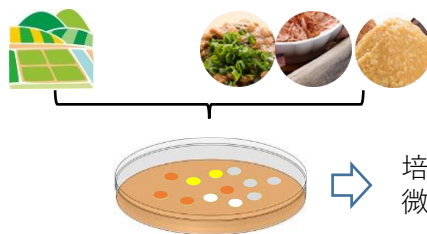
## 研究背景・目的

### 【研究背景】

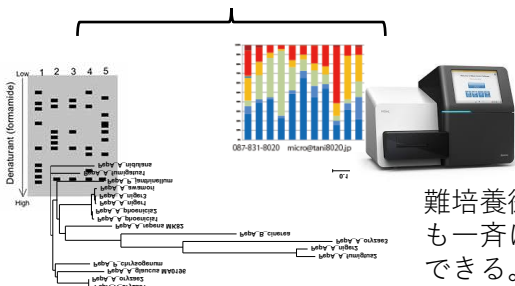
環境や発酵食品中の微生物菌叢の変遷について理解するためには、単離培養できる微生物とできないものすべてを含めて解析する必要があります。近年の遺伝子解析技術の進歩によりrRNA遺伝子やITS領域をターゲットとして「RFLP法、SSCP法、DGGE法」や「全ゲノム解析」による菌叢解析が行われています。

### 【目的】

農産物を分解する微生物群集および伝統発酵食品の発酵熟成に関わる糸状菌の変遷について明らかにすることを目的としました。



培養できない微生物が多い！

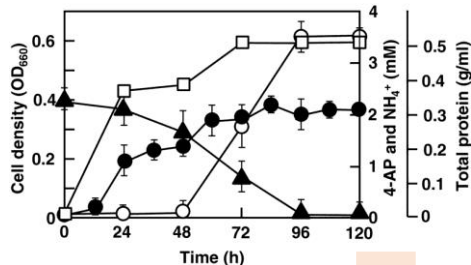


難培養微生物でも一斉に解析ができる。

## 実験概要

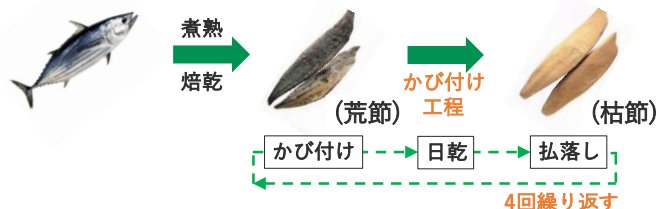
### 【研究例1】

4-アミノピリジンは鳥類に対する忌避剤として利用されています。環境中における微生物分解は複数の微生物が関わって無機化されていることがわかりましたが、keyとなる微生物は単離培養できませんでした。⇒菌叢解析で明らかにすることにしました。



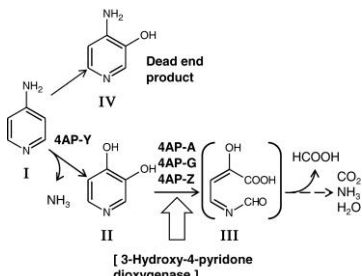
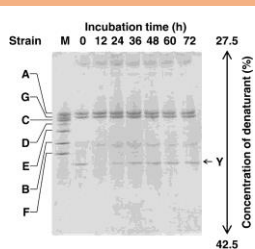
### 【研究例2】

だしの素のひとつであるかつお節は「かび付け」と呼ばれる発酵・熟成工程を経て製造される。

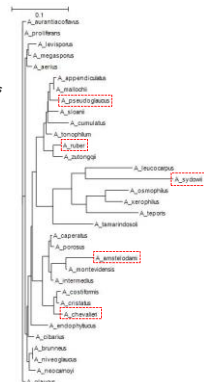
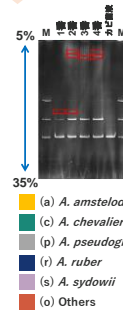
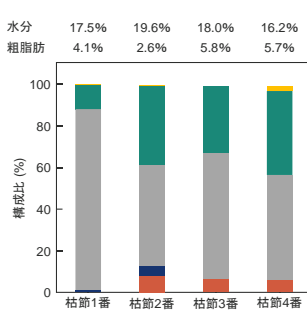


複数の近縁種の鰹節かびが、リパーゼ、プロテアーゼ、O-メチル化酵素などを生産することでうま味や香味の付与に寄与していると言われていたが、どのようなかびかはあまりわかりませんでした。⇒鰹節かびの変遷を明らかにする。

## 結果と考察



菌叢解析から単離培養できなかった *Hypomicrobium* 属細菌を検出できました。この菌は、4-アミノピリジンが存在すると徐々に存在比が増大し、代謝分解の初発ステップで働いていることがわかりました。



鰹節の発酵には、かび付けを繰り返す毎に、好乾性の *Aspergillus* 属糸状菌 (5種) が構成比を変えながら働いていることがわかりました。

## 発表論文

1. Takenaka S, Ogawa C, Uemura M, Umeki T, Kimura Y, Yokota S, Doi M. Identification and characterization of extracellular enzymes secreted by *Aspergillus* spp. involved in lipolysis and lipid-antioxidation during katsuobushi fermentation and ripening. *Int J Food Microbiol.* 353:109299 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109299>
2. Takenaka S, Nomura R, Minegishi A, Yoshida K, Enrichment and characterization of a bacterial culture that can degrade 4-aminopyridine. *BMC Microbiol.* 13:62 (2013).

## 学会発表

1. ○竹中 慎治、中林麗奈、小川千晶、横田仁子、土居幹治. 鰹節（枯節）製造のかび付け発酵工程における好乾性糸状菌の菌叢解析（日本農芸化学会本大会、2019年3月、東京）

## 特許

1. 鰹節カビの種の検出方法（特開2020-110091）

## 共同研究先

1. マルトモ株式会社

# 微生物酵素の耐塩性機構の解明

研究期間：2003～現在に至る

## 研究背景・目的

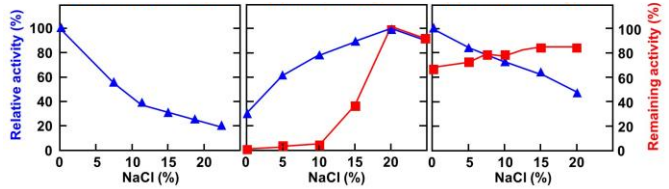
### 【研究背景】

タンパク質や糖質を多く含む食品の加工において、もとめる風味やうま味を付与することや、腐敗や食物汚染を防ぐために、塩を加えることがあります。しかし、加工に関わる既存の酵素の中には塩に対して不安定なものもあり、幅広い塩濃度で安定で高活性な耐塩性タイプの酵素の取得が求められています。また、近年取り組まれているバイオマスの分解にも耐塩性タイプの加水分解酵素は、コストの面で有利です。

### 【目的】

本研究では、酵素タンパク質の配列データを収集しながら、配列比較により耐塩性に関わるアミノ酸残基を推定し、酵素の機能変化（耐塩性化）を目指

します。また、オリジナルの酵素と変異酵素との耐塩性を比較することで普遍的なメカニズムの考察を目的としています。



塩に対して不安定な酵素

好塩性酵素

耐塩性酵素



機能変化して能力アップを図る

塩依存型であり、塩がないと不安定

## 実験概要

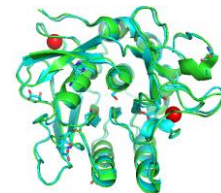
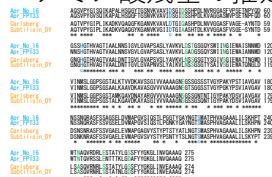
酵素精製  
耐塩性評価

配列比較  
耐塩性に関わる  
アミノ酸残基の推定

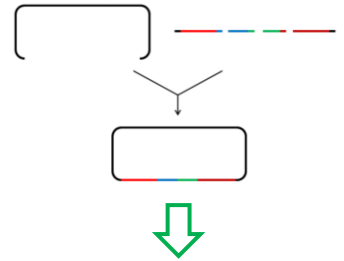
アミノ酸置換による  
多重変異酵素の作製



塩蔵発酵食品からの検索



推定高次構造モデルでの機能推定



- ・変異酵素発現株の取得
- ・酵素の機能（耐塩性）の評価

DDBJ

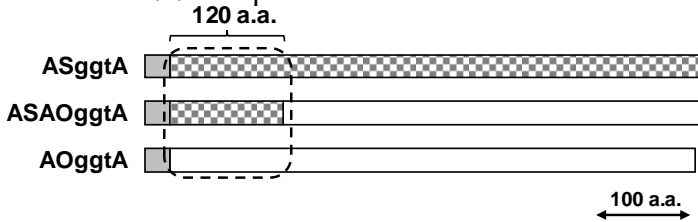
EMBL

PubMed.gov

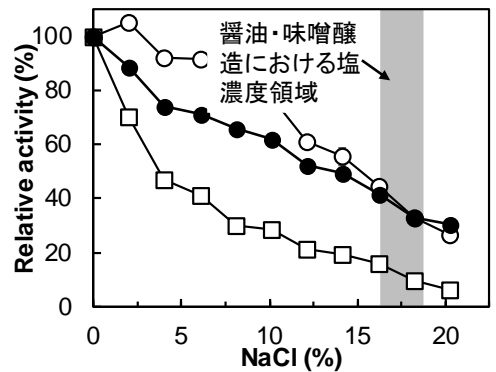
データベースからの検索

## 結果と考察

実験例: 麹菌由来 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼの耐塩性化



醤油・味噌醸造では、麹菌由来の加水分解酵素群が大豆タンパク質に作用し、遊離アミノ酸がこれら調味食品のうま味やこくを高める。グルタミナーゼは、グルタミンを加水分解してうま味を呈するグルタミン酸へと変換することから、同醸造における鍵酵素であるが、高塩濃度下では活性が極端に低下する。本研究では、我々オリジナルの糸状菌由来グルタミナーゼと配列比較し、作製したキメラ酵素が、耐塩性に優れることを明らかにした。



麹菌由来酵素 (□)、オリジナル糸状菌由来酵素 (○)、キメラ酵素 (●)

## 発表論文

1. Senba H, Nishikawa A, Kimura Y, Tanaka S, Matsumoto J, Doi M, Takenaka S. Improvement in salt-tolerance of *Aspergillus oryzae*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase via protein chimerization with *Aspergillus sydowii* homolog. *Enzym Microb Technol.* 167:110240 (2023).  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110240>
2. Nishikawa A, Senba H, Kimura Y, Yokota S, Doi M, Takenaka S. Isolation and characterization of a salt-tolerant  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from xerophilic *Aspergillus sydowii*. *3 Biotech.* 12:253 (2022).  
<https://doi.org/10.1007/s13205-022-03259-3>
3. Takenaka S, Takada A, Kimura Y, Watanabe M, Kuntiya A. Improvement of the halotolerance of a *Bacillus serine* protease by protein surface engineering. *J. Basic Microbiol.* 62:174-184 (2022).
4. Takenaka S, Yoshinami J, Kuntiya A, Techapun C, Leksawasdi N, Seesuriyachan P, Chaiyaso T, Watanabe M, Tanaka K, Yoshida KI. Characterization and mutation analysis of a halotolerant serine protease from a new isolate of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett.* 40(1):189-196 (2018).
5. Takenaka S, Miyatake A, Tanaka K, Kuntiya A, Techapun C, Leksawasdi N, Seesuriyachan P, Chaiyaso T, Watanabe M, Yoshida K. Characterization of the native form and the carboxy-terminally truncated halotolerant form of  $\alpha$ -amylases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *J Basic Microbiol.* 55(6):780-789 (2015).
6. Takenaka S, Yoshida N, Yoshida K, Murakami S, Aoki K. Molecular cloning and sequence analysis of two distinct halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* FP-133. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75(1):148-151 (2011).
7. Setyorini E, Kim YJ, Takenaka S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *J Basic Microbiol.* 46(4):294-304 (2006).
8. Setyorini E, Takenaka S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(2):433-440 (2006).

## 学会発表

1. S. Takenaka, A. Takada et al., Characterization and mutation analysis of a halotolerant serine protease from *Bacillus subtilis* isolated from Thai traditional fermented shrimp paste. The final joint seminar of core to core program advanced research networks. (2018. Dec., Yamaguchi)
2. 竹中慎治, 吉浪淳, 高田愛莉ら タイの塩蔵発酵食品から分離した*Bacillus*属細菌の生産する耐塩性プロテアーゼの遺伝子クローニングと特性解析 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大阪大会 (2017年9月、大阪)
3. 竹中慎治, 吉浪淳ら タイの塩蔵発酵食品から分離した *Bacillus* 属細菌の生産する耐塩性プロテアーゼの特性解析 日本生物工学会大会 (2017年9月、東京)
4. S. Takenaka. Bacterial Enzymes with special characteristics for biotechnological applications. IC-STAR 2015 (The 1st International Conference on Science, Technology and Interdisciplinary Research ) (2015年9月、インドネシア・ジャワ)
5. S. Takenaka. Characterization of the native form and the carboxy-terminally truncated halotolerant form of alpha-amylases from *Bacillus subtilis* FP-133. The 6th international conference on fermentation technology for value added agricultural products (2015年7月、タイ・コンケン)

## 共同研究先

1. マルトモ株式会社
2. チェンマイ大学アグロインダストリー学部 (タイ国)

# 好乾性糸状菌による鰹節だしがらの発酵

研究期間：2021～現在に至る

## 研究背景・目的

### 【研究背景】

2013年に「和食とその文化」がユネスコの無形文化遺産に登録され、和食の基本である“だし”も世界的に知られるようになった。これに伴い、鰹節等調整品は、国内消費・輸出量も増加傾向にある(農林水産省 輸出・国際関連情報より)。鰹節からだしをとった後に生じる食品残渣“だしがら”のリサイクルとして、堆肥や家畜飼料への転換が挙げられるが、競合する食品廃棄物が多い。よって、SDGsの達成に寄与できる新たな高度利用法の開発も望まれている。

### 【目的】

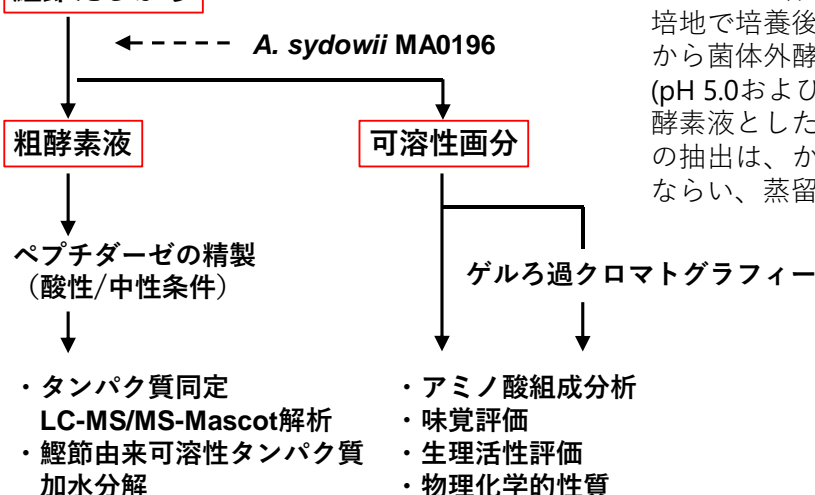
“だしがら”は、タンパク質を主成分とする残渣であることから、本研究ではプロテアーゼ高生産な好乾性糸状菌 *Aspergillus sydowii* MA0196を用いた

微生物発酵による加水分解処理を検討し、加水分解に関わるペプチダーゼの同定と発酵物の生理活性評価を行うこととした。



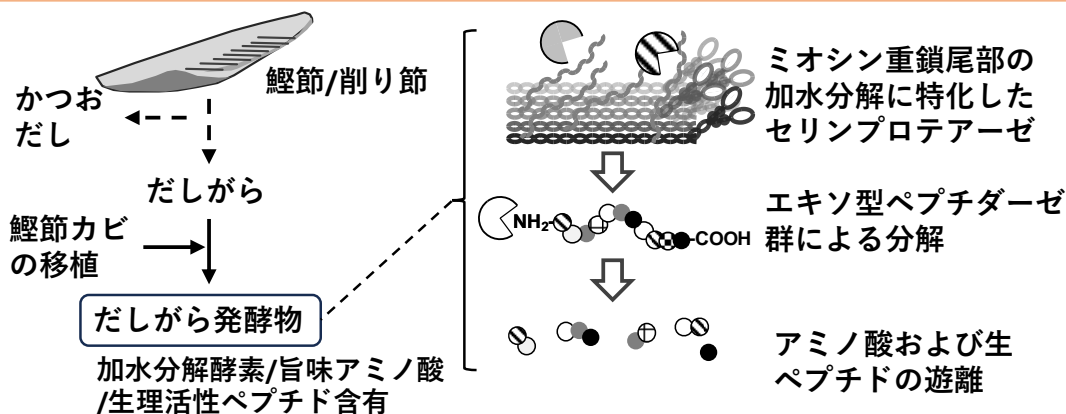
## 実験概要

### 鰹節だしがら



MA0196株を鰹節だしがら固体培地で培養後、緩衝液にて培養物から菌体外酵素を抽出後、緩衝液(pH 5.0および7.5)にて透析し、粗酵素液とした。また、可溶性画分の抽出は、かつおだしの調製法にない、蒸留水にて熱水抽出した。

## 結果と考察



だしがらに含まれるミオシンタンパク質に対し、エンド型およびエキソ型ペプチダーゼが協働して作用し、発酵物には遊離アミノ酸およびペプチドが含まれていた。発酵物の可溶性画分に呈味性の向上を確認するとともに、フリーラジカル消去活性、抗酸化活性、アンジオテンシン変換酵素阻害活性だけでなく、乳酸菌の増殖促進効果を見出した。発酵物は、醸造調味料や健康食品用タンパク質素材としての展開が期待できます。

## 発表論文

1. Takenaka S, Kato M, Oribe Y, Kimura Y, Tanaka S, Matsumoto J, Doi M. Exploring the potential of katsuobushi grounds as a source of bioactive peptides through fermentation with *Aspergillus sydowii*. Proc Biochem. 130:534-544 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.017>
2. Senba H, Nishikawa A, Kimura Y, Tanaka S, Matsumoto J, Doi M, Takenaka S. Improvement in salt-tolerance of *Aspergillus oryzae*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase via protein chimerization with *Aspergillus sydowii* homolog. Enzym Microb Technol. 167:110240 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2023.110240>
3. Takenaka S, Ogawa C, Uemura M, Umeki T, Kimura Y, Yokota S, Doi M. Identification and characterization of extracellular enzymes secreted by *Aspergillus* spp. involved in lipolysis and lipid-antioxidation during katsuobushi fermentation and ripening. Int J Food Microbiol. 353:109299 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109299>
4. Takenaka S, Nakabayashi R, Ogawa C, Kimura Y, Yokota S, Doi M. Characterization of surface *Aspergillus* community involved in traditional fermentation and ripening of katsuobushi. Int Food Microbiol. 327:108654 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108654>

## 学会発表

1. 竹中慎治, 加藤将城, 織部恭宏、木村行宏、田中伸一、松本淳一、土居幹治. *Aspergillus sydowii* による鰹節だしがらの発酵と可溶性画分の特性解析. 日本生物工学会 (2023年9月、名古屋) <大会トピックスとして選出>

## 共同研究先

1. マルトモ株式会社

## 特許 (本研究に関連する特許)

1. 発酵食品組成物の製造方法 (仮題) として出願準備中