

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 酸性プロテアーゼの新規測定方法の開発

大東 功承¹・山下 伸雄^{1*}・津田 修吾²・増田 駿²
山内 隆寛¹・窪寺 隆文¹・吉矢 拓²・明石 貴裕¹

¹白鶴酒造株式会社・²株式会社ペプチド研究所

(2018年11月14日受付 2019年2月6日受理)

Development of the new measurement method of koji mold, *Aspergillus oryzae* acid protease

Koushou Oohigashi¹, Nobuo Yamashita¹, Shugo Tsuda², Shun Masuda², Takahiro Yamauchi¹, Takafumi Kubodera¹, Taku Yoshiya², Takahiro Akashi¹ (*Hakutsuru Sake Brewing Corporation., Ltd., 4-5-5, Sumiyoshiminami-machi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo, 658-0041, Japan*¹, *Peptide Institute Inc, 7-2-9, Saito-asagi, Ibaraki Osaka, 567-0085, Japan*²) *Seibutsu-kogaku* **97**: 168–172, 2019.

We developed a novel measurement method for koji mold, *Aspergillus oryzae* acid protease (AP). To identify the amino acid sequence that *A. oryzae* AP preferentially cleaves, we employed the FRETs-25Xaa series (Peptide Institute Inc.) peptide library. LC-MS analysis of the fragments generated by the AP indicated that -Arg/Phe-Ile-Arg- is suitable sequence as a substrate for *A. oryzae* AP. Thus, we designed and synthesized a novel heptapeptidic probe (HAP-01). HAP-01 cannot be cleaved by exopeptidase because of D-Arg block at both the N- and C-terminal. Upon enzymatic digestion with AP, para-nitrophenol (pNP) is liberated from HAP-01 as a chromophore. We found that the increase in absorbance at 400 nm caused by the liberation of pNP in association with enzymatic cleavage of HAP-01 was proportional to the *A. oryzae* AP activity.

[**Key words**: Acid protease, *Aspergillus oryzae*, koji, Chromogenic substrate, Substrate specificity]

緒 論

酸性プロテアーゼは清酒醸造において米タンパク質の分解を通じて酒質を形成し、原料利用率の指標となる。たとえば、 α -アミラーゼの米タンパク質への無効吸着を防ぎ、デンプンの分解を促す¹⁾。また最近では、ビフィズス菌の増殖を促進し、ヒトの腸内菌叢を改善することが報告されている²⁾。清酒醸造において重要な米麹の糖化力（グルコアミラーゼ+ α -グルコシダーゼ）、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）の4つの評価項目については標準分析法³⁾が

定められているが、このうち糖化力、 α -アミラーゼ、ACPについては簡便な分析キットが開発され、これらが主に採用されている。一方、酸性プロテアーゼについては標準分析法による分析をするしかなかった。標準分析法は一晩透析を行う必要があり、ハマルステン氏グレードのカゼイン溶液を基質として調製した後、フォーリン・チオカルト法⁴⁾で発色定量する。これには時間を要するうえ、作業が煩雑であるという欠点がある。エンド型プロテアーゼの分析法としては、ペプチド結合の切断により蛍光を発する測定キットが販売されているが、通常の分光光度計では対応できない。筆者らはこれらの

*連絡先 E-mail: yamashita@hakutsuru.co.jp

問題を解決する簡便な分析法の開発を目指した検討を行った。その結果、麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来酸性プロテアーゼの好むアミノ酸配列を特定し、その知見に基づいて合成されたペプチドプローブ (HAP-01) を用いた方法での測定値と標準法での酸性プロテアーゼの活性値の間に良好な相関性があることを見だし、米麹において新規で簡便な活性測定法となりうる事が分かったので報告する。

実験方法および結果

【方法】

1. アミノ酸配列のスクリーニング アミノ酸配列の一次スクリーニングには FRET-25Xaa series ((株) ペプチド研究所) (Fig. 1) を用いた。Fig. 1 で示したように本製品中には 25 通り (5 × 5) のペプチドが混合されている。図中 Xaa のアミノ酸の違いにより 19 種の製品がある。したがって、19 種を試験すれば 475 (25 × 19) 通りの配列をスクリーニングしたことになる。 *A. oryzae* 由来米麹粗酵素抽出液は国税庁所定分析法⁵⁾により調製した。試薬を DMSO で溶解し、1 mM に調整した 19 種の FRET-25Xaa series をマッキルベイン緩衝液 (pH 3.0) で 100 μM に希釈し基質溶液とした。基質溶液 190 μL に粗酵素抽出液 10 μL を加え、40°C で基質の分解により生ずる蛍光をマイクロプレートリーダー (テカン社 infinite M200pro) によりトレースした。二次スクリーニングでは一次スクリーニングにより生じた加水分解物を LC-MS (アジレント社 G1956B LC/MSD detector, 1100 series HPLC system) にて解析し、酸性プロテアーゼによる切断により多く生じる断片のアミノ酸配列を特定した。

2. ペプチドプローブの合成 Fmoc 固相合成法にてリンクアミド樹脂上に保護ペプチドを構築した。保護ペプチド樹脂をトリフルオロ酢酸カクテルで処理して脱

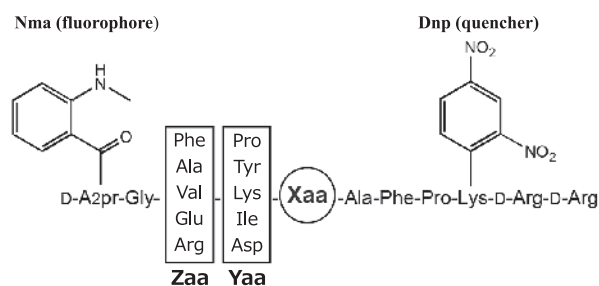


Fig. 1. Structure of FRET-25Xaa. For primary screening, fluorescence increments were assessed using a microplate-reader to determine whether the Xaa-containing peptide mixture [5 (Yaa) * 5 (Zaa) = 25] was efficiently cleaved.

樹脂・脱保護し、得られた粗ペプチドを逆相 HPLC にて精製・凍結乾燥して目的物を得た。

3. 活性測定条件の検討と標準法との相関性の確認

反応条件の検討はまず DMSO およびマッキルベイン緩衝液 (pH 3.0) で HAP-01 を 500 μM に調製し基質溶液とした。 *A. oryzae* 由来酸性プロテアーゼ酵素剤プロテアーゼ M アマノ「SD」(天野エンザイム (株)) を蒸留水に溶かして、標準分析法の測定値を基準に活性値を調整した。基質溶液 50 μL に対して、酵素液を 50 μL 加え、40°C で反応させた。0.4 M の炭酸ナトリウムを 200 μL 加え、pH 10 で失活させた。この後、55°C で 30 分間静置し、OD 400 nm の吸光度を測定した。より迅速な方法としては反応後に 0.4 M 炭酸ナトリウムを 15 μL 加えて、pH 7 にしてから 100°C で 5 分間処理することで失活させ、さらに 0.4 M の炭酸ナトリウムを 185 μL 加えて pH 10 にしてから、室温で OD 400 nm の吸光度を測定した。一旦中性にしたのは、アルカリで高温処理すると、非酵素的な pNP の遊離が起きる可能性があるからである。活性測定条件を設定した後、当社醸造蔵で製造した製麹条件が異なり、活性に差異がある米麹を複数測定して、標準分析法³⁾との相関性を調べた。

【結果】

1. 一次スクリーニング 当社醸造蔵で製造した米麹より抽出した粗酵素抽出液を用い、19 種の FRET-25Xaa series を 40°C で反応させ、初発 10 分間に増大した蛍光強度を比較した (Fig. 2)。この結果より、Xaa の位置のアミノ酸の違いにより、ペプチド鎖の切断に大きな差が生じており、Gly や Pro の場合はほとんど反応性がないと考えられた。分子量が小さいアミノ酸は、反応性が低い傾向にあるが、Trp など大きすぎても低くなる傾向がみられた。蛍光強度の高い順に FRET-25Met, -Ile, -Glu, -Arg の 4 つを選び、二次スクリーニングに進んだ。

2. 二次スクリーニング 一次スクリーニングで選

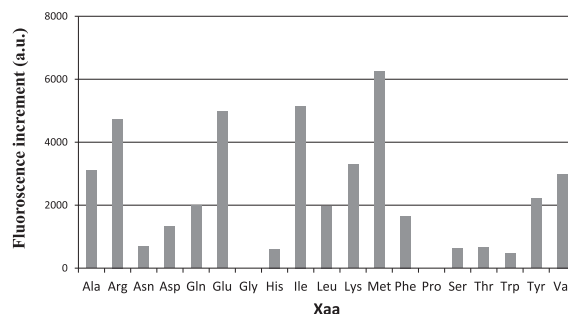


Fig. 2. Primary screening results

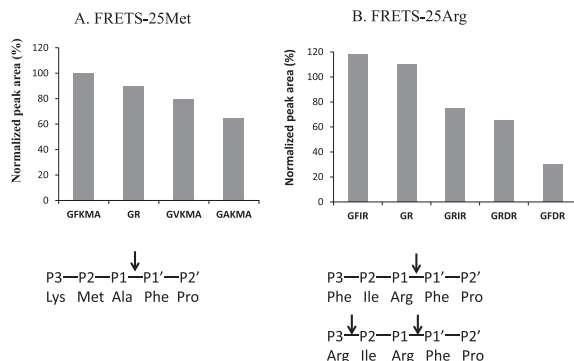


Fig. 3. Secondary screening results using FRET-25Xaa selected. A: Main fragments of digested FRET-25Met by acid protease. When Xaa was Met, most hydrolyzed fragments were D-A2pr (Nma)-GFKMA, D-A2pr (Nma)-GR, D-A2pr (Nma)-GVKMA, D-A2pr (Nma)-GAKMA. The results for Xaa=Ile/Glu were similar to those for Met. Arrow: cleavage site. B: Main fragments of digested FRET-25Arg by acid protease. When Xaa was Arg, the most hydrolyzed fragments were D-A2pr (Nma)-GFIR, D-A2pr (Nma)-GR, D-A2pr (Nma)-GRIR, D-A2pr (Nma)-GRDR, D-A2pr (Nma)-GFDR. Arrows: cleavage sites. *GR (D-A2pr (Nma)-GR) is present both A and B. All FRET-25 series contain this sequence as shown in Fig. 1.

んだ4種のFRET-25Xaaの加水分解物をLC-MSにアプライして、蛍光強度をモニターして得られたピークにより、生じた断片のアミノ酸配列の解析を行った。

まずFRET-25MetにおいてはAlaの直後で、よく切断されていた。Fig. 3AよりAlaの位置をP1とした場合、P2 (Xaa) はMet, P3 (Yaa) はLysが適していると考えられた。またFRET-25seriesの配列よりP1'はPhe, P2'はProでも反応は起きることが分かった。Fig. 3Aで示した生じた断片のピークパターンはFRET-25Ile, FRET-25Gluでも同様であった(Mの部分にIまたはEに置き換えられる)。FRET-25Argにおいて切断がよく起きているのはArgの直後であった。この場合、FRET-25ArgにおけるP2 (Yaa) のアミノ酸はIleで、P3 (Zaa) はPheもしくはArgであった(Fig. 3B)。またArgの直後はPhe-Proでも切断はよく起きることが分かった。なお、Fig. 3ABに共通してGR (-Gly-Arg-) があげられているが、この配列はすべてのFRET-25に含まれる。供試したFRET-25の配列のなかで、もっとも切断されて生じた断片のモル数が多かったアミノ酸配列は-Arg/Phe-Ile-Arg-であると分かった。

3. ペプチドプローブHAP-01の構造 以上のスクリーニング結果の知見よりペプチドプローブHAP-01を設計した(Fig. 4)。本プローブは7残基からなるアミノ酸で構成され、NおよびC末端はD-Argでブロックされ、さらにN末端はアセチル化、C末端はアミド化された構造を持つため、共存するエキソ型のペプチダーゼは作用できない。切断されるペプチド結合部位であるArg-人

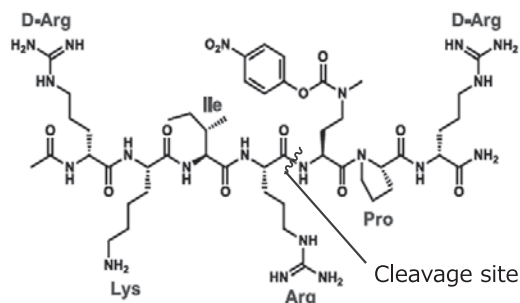


Fig. 4. Structure of HAP-01 (*A. oryzae* acid protease chromogenic substrate).

工アミノ酸間において、人工アミノ酸の側鎖にpNPを結合させた。実験結果よりFRET-25ArgのArg-Phe間のペプチド結合が切断されることが分かったため、側鎖にベンゼン誘導体であるpNPを持ち、Pheと性質が近いと考えられる人工アミノ酸を導入した。麹菌*A. oryzae*由来の酸性プロテアーゼが、所定部位を切断することにより、Fig. 5で示したようなメカニズムでpNPが遊離し、アルカリ下で発色する^{6,7)}。-Phe-Ile-Arg-もしくは-Arg-Ile-Arg-が最適と考えられたが、-Phe-Ile-Arg-においてPheは疎水性が高く、溶解性の悪化が予想されたので除いた。また-Arg-Ile-Arg-の場合、N末側のArgの直後でもよく切断されたので、この部位が切断されると、N末端が露出することによって、エキソ型であるアミノペプチダーゼが作用し、妨害発色が起こることが懸念されたためZaaのアミノ酸をLysにした。Lysにした理由は、1) Argと同様の塩基性アミノ酸ということ、2) FRET-25ArgにおいてYaaの位置にあるLysの直後で切断された断片は見つからなかったというデータに基づく。

4. 分析条件の検討 標準分析法で測定した活性を基準にし、酵素剤で酸性プロテアーゼ活性0-400 U/mLに調製した時、活性に相関して良好な直線性が得られた。この活性の範囲で酵素濃度を一定とした場合、0-60分間まで直線的に発色度が増加することが確認されたため反応時間を40°C、20分間とした。迅速に行うという点から、酵素反応液に対し0.15倍容量の0.4 M炭酸ナトリウムを加えてpH 7にしてから、95-100°Cで5分間処理した。室温にまで冷却してから、さらに1.85倍容量の0.4 M炭酸ナトリウムを加えた。次に室温でpH 10にて遊離したpNPに起因する発色をOD 400 nmの吸光度値で測定した。この結果HAP-01による発色は酸性プロテアーゼ活性に相関することが分かった(Fig. 6A)。

5. 標準法との相関性 3で設定した活性測定条件により、当社醸造蔵で製造した製麹条件が異なり、酸性プロテアーゼ活性値にも差異がある17種の米麹より、粗酵素抽出液を測定し、HAP-01による発色値と標準法

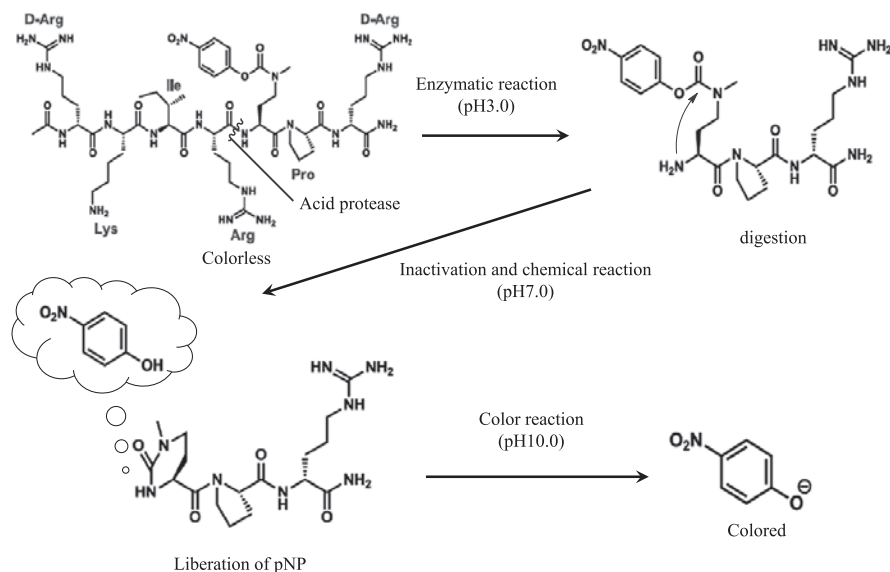


Fig. 5. Reaction mechanisms. [HAP-01: Ac-D-Arg-Lys-Ile-Arg-A2bu (Me, CO-pNP)-Pro-D-Arg-NH₂]

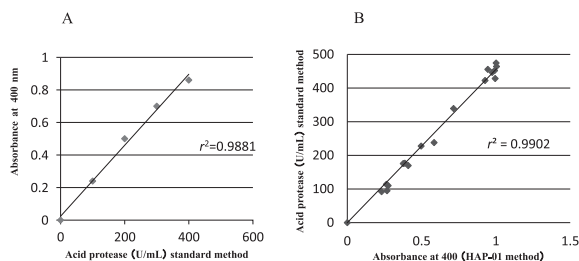


Fig. 6. Comparison of HAP-01 protease assay method with the standard method. A: Acid protease from *A. oryzae* can be quantified using HAP-01 by absorption at 400 nm. B: Correlation between the proposed HAP-01 method and the standard method. Note: 17 types of koji produced in the factory were used for the each assay to evaluate acid protease activity.

による活性値の相関性を調べた。粗酵素抽出液はほとんどの場合、希釈なしで測定範囲に入るが、標準法で高かったものは蒸留水で2倍希釈した。決定係数 $r^2 = 0.9902$ で良好な相関性が見られた (Fig. 6B)。

6. 中性プロテアーゼ, 焼酎麹菌の酸性プロテアーゼに対する反応性 HAP-01を用いて *A. oryzae* 由来の中性プロテアーゼを測定した。マッキルベイン緩衝液を用い、pH 6またはpH 7にして反応を行ったが、pH 3の時より発色値が低く、この傾向はpHが6から7に上がるに連れて顕著であった。通常標準分析法においてプロテアーゼ活性の相対比はpH 3 < pH 6である。このことから、*A. oryzae*の中性プロテアーゼはHAP-01が持つアミノ酸配列を酸性プロテアーゼほど好んで切断しないと考えられた。また焼酎麹菌である *A. kawachii*の酸性プロテアーゼも反応性が低く、標準法との相関性は認められなかった。

考 察

筆者らはエンド型のプロテアーゼである酸性プロテアーゼの簡便な測定法の開発を目指し、まずプローブとなるペプチド基質を構成するアミノ酸配列をスクリーニングした。麹菌 *A. oryzae*の酸性プロテアーゼはアルカリ性プロテアーゼに比べ、基質特異性が広いという報告⁸⁾があるが、その中でも詳細には把握されていない差異があると考えられ、酸性プロテアーゼにより切断しやすいアミノ酸配列を特定することにした。一次スクリーニング、二次スクリーニングを通して、酸性プロテアーゼにより優先的に切断されやすいアミノ酸配列があることが分かり、特定することができた。この中で -Phe/Arg-Ile-Arg-のArgの直後がもっとも切断されやすいアミノ酸配列の一つということが分かった。これは今まで明らかになっていない知見である。

基質となるペプチドプローブの設計において、配列中のPheは難水溶性であることから除外した。またArg-Ile-ArgについてはN末端側のArgの直後においても切断が起こり、N末端が露出してアミノペプチダーゼによる発色が懸念されたことからN末端側のArgの代わりにLysを導入した。Lysにした理由は、1) Argと同様の塩基性アミノ酸ということ、2) FRETs-25ArgにおいてYaaの位置にあるLysの直後で切断された断片は見つからなかったというデータに基づく。布川らは *A. oryzae*の酸性プロテアーゼはタンパク質からLysをもっとも遊離しやすいと報告しているが⁸⁾、FRETs-25Arg、-Glu、-Ile、-Metにおいては、Lys直後のペプチド結合でよく切断される現象は見られなかった。これらの配列情報を

もとに7アミノ酸残基からなるペプチドプローブ (HAP-01) を合成した。HAP-01 の両端はブロックされていて、エキソ型ペプチダーゼの分解を受けない。また人工的に *p*-ニトロフェノール (pNP) を結合させており、Arg-人工アミノ酸間でのペプチド結合の切断により遊離し、アルカリ条件下で発色した (chromogenic substrate)。データを示さないが、実際に HAP-01 は *A. oryzae* の酸性プロテアーゼにより特異的に Arg の直後のペプチド結合で切断されることを LC-MS により確認している。実際に HAP-01 の酸性プロテアーゼによる切断、発色は標準法において粗酵素液が 0–400 U/mL にある場合、標準法との良好な相関性が見られた。この濃度は所定分析法で米麴から粗酵素を抽出した場合に通常、抽出液の 1/2–1 倍希釈くらいに相当する。当社醸造蔵で製造した 17 種の米麴からの抽出液を測定した結果、HAP-01 を用いた方法と標準法の間で $r^2 = 0.9902$ という良好な相関性を示した。この結果より、新規に開発した酸性プロテアーゼの測定法は実用化の可能性が高いと考えられる。

この HAP-01 は *A. oryzae* の中性プロテアーゼには反応性が悪かった。また焼酎麹菌 *A. kawachii* 由来の酸性プロテアーゼにも今一步反応性が悪かった。特に後者の場合は意外であるが、種による酵素の基質特異性の差が示唆されて興味深い。以上より、HAP-01 を用いて麹菌 *A. oryzae* で調製した米麴の酸性プロテアーゼを簡便に測定できることを確認した。この方法の実用化に向けてさらに検討を行っている。

要 約

清酒醸造において重要な米麴の酸性プロテアーゼ活性を簡便に測定できる方法を開発した。まず酸性プロテ

アーゼが好んで切断するアミノ酸配列をスクリーニングした。一次スクリーニングとして、FRETS-25Xaa series ((株) ペプチド研究所) を用い、二次スクリーニングでは LC-MS により、加水分解物の断片のアミノ酸配列を特定した。この結果より -Phe/Arg-Ile-Arg- が最適と解析した。スクリーニングで得られた知見より、新規なペプチドプローブ (HAP-01) を合成した。HAP-01 は 7 残基のアミノ酸からなり、N、C-末端はブロックされているため、エキソ型のペプチダーゼは作用しない。加えて、*p*-ニトロフェノール (pNP) が側鎖に結合した人工アミノ酸を持つ。Arg 残基と人工アミノ酸の間のペプチド結合が切断されると pNP が遊離して発色する。筆者らは HAP-01 を用いた米麴の酸性プロテアーゼ測定条件を設定し、pNP のアルカリ性下での OD 400 nm の吸光度が標準分析法による酸性プロテアーゼ活性と高い相関性を持つことを示した。

文 献

- 1) 岩野君夫, 布川弥太郎: 日本醸造協会誌, **71**, 943–947 (1976).
- 2) Yang, Y. *et al.*: *Nutr. Res.*, **44**, 50–55 (2017).
- 3) 酒類総合研究所「酒類総合研究所標準分析法」について: <https://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.htm> (2019/1/31).
- 4) FoLin, O. and Ciocalteu, V.: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627–650 (1927).
- 5) 国税庁所定分析法 (訓令): <https://www.nta.go.jp/law/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/01.htm> (2019/1/31).
- 6) Yoshiya, T. *et al.*: *ChemBioChem*, **14**, 2110–2113 (2013).
- 7) Yoshiya, T. *et al.*: *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 3182–3185 (2015).
- 8) 布川弥太郎: 日本農芸化学会誌, **36**, 884–890 (1962).