

学位論文要旨	
氏名	ポランバ リヤナゲー ニランタ ラクシュマン
題目	<i>Monascus</i> 属菌の产生する酸性プロティナーゼに関する研究 (Studies on Acid Proteinases from Genus <i>Monascus</i> )
<p><i>Monascus</i> 属菌はアジアの発酵産業において重要な微生物のひとつである。カビの产生する酸性プロティナーゼは、食品やペプチド産業において広く利用されている。しかしながら、本菌の产生するプロティナーゼについては、若干の酵素の性質と豆腐よう熟成における酵素の役割について限定的な報告しかない。本研究では、<i>Monascus</i> 属菌の产生する酸性プロティナーゼの学術的評価と産業利用を行うため、酵素の精製、酵素の諸性質、乳清タンパク質の抗原性低減化および固定化酵素の安定性について検討した。</p> <p>プロティナーゼ活性の高生産株である <i>Monascus pilosus</i> と <i>Monascus purpureus</i> を蒸煮米に固体培養し、それぞれ麹を調製した。麹より粗酵素液を抽出し、各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせて <i>M. pilosus</i> より MpiAP1 と MpiAP2, <i>M. purpureus</i> より MpuAP の 3 種類の酵素を電気泳動的に均一に精製した。精製酵素の分子量は、それぞれ 43 kDa (MpiAP1), 58 kDa (MpiAP2) および 40 kDa (MpuAP) と推定された。このうち、MpiAP2 は糖含量 27% の糖タンパク質であった。これらの精製酵素はいずれも至適温度 55°C, 至適 pH 2.5~3.2 付近で最大活性を有し、ペプスタチン A によって阻害される典型的なアスパラギン酸プロティナーゼであった。酸化インシュリン B鎖に対する切断様式では、カビ由来酸性プロティナーゼと共に切断点が認められたが、個々の酵素で特徴的な切断点も認められた。いずれの酵素も動物性タンパク質、特にミルクカゼインに対して高い基質特異性を有していたが、カゼイン基質に対する個々のキネティック値は異なっていた。本研究で精製された <i>Monascus</i> 属菌の酸性プロティナーゼは、基本的な生化学的性質を共有する一方で酸化インシュリン切断様式の違いが認められた。</p> <p>牛ミルクの加水分解ペプチドを成分とする調整乳は新生児の栄養源として重要であるが、ミルクタンパク質を原因とするアレルギーが問題となっている。<i>Monascus</i> 属菌の酸性プロティナーゼの産業利用のひとつとして、牛ミルク乳清タンパク質 (Whey Protein Concentrates; WPC) の酵素加水分解法による抗原性低減化について検討した。MpiAP1, MpiAP2, MpuAP, ペプシンおよびトリプシンの単独または組合せによって WPC 加水分解物をそれぞれ調製し、ウサギ抗血清に対する競合 ELISA 法を用いて加水分解物中の残存抗原性について評価した。また、酵素加水分解による WPC 構成タンパク質消化の様子を電気泳動法によって確認したところ、カゼインは全ての酵素の単独反応によって早期に分解され低分子化することが観察された。一方で、<math>\alpha</math> ラクトアルブミンは <i>Monascus</i> 酵素によって腸管消化酵素 (ペプシン、トリプシン) よりも効果的に分解されるが、<math>\beta</math> ラクトグロブリンの効果的な分解はトリプシンの存在によってのみ観察された。WPC 構成タンパク質の完全分解は、<i>Monascus</i> 酸性プロティナーゼ (MpiAP1, MpiAP2 および MpuAP) の WPC 加水分解に続くトリプシン加水分解反応の段階反応によって達成された。加水分解物の最も低い残存抗原性は、MpiAP1 または MpiAP2 とトリプシンの組合せにおいて観察された。これらの結果は、<i>Monascus</i> 酸性プロティナーゼによる低抗原性牛ミルク加水分解ペプチドの調製に有効であることを強く示唆した。</p> <p><i>Monascus</i> 属菌酸性プロティナーゼの産業利用における操作性と安定性の向上のために、固定化酵素を作成し、酵素の安定性試験を行った。精製された酵素の中で最も温度安定性の高い MpiAP2 を定法に従って化学的に架橋したキトサンビーズに固定化し、温度、pH および NaCl 濃度に対する安定性を遊離型酵素と比較した。その結果、酵素の固定化によってこれらの安定性の増大が確認され、産業利用における操作性の向上も期待された。総括として、本研究は <i>Monascus</i> 酸性プロティナーゼの産業利用に対する非常に多くの可能性と学術的重要性を提供する。</p>	

学位論文要旨	
氏名	Poramba Liyanage Nilantha Lakshman
題目	Studies on Acid Proteinases from Genus <i>Monascus</i> ( <i>Monascus</i> 属菌の产生する酸性プロテイナーゼに関する研究)
<p>Genus <i>Monascus</i> is one of the most important microorganisms in the fermentation industry in Asia. Acid proteinases produced by fungi are extensively used in food and peptide industries. However, only a little attention has been paid to the proteinases produced by this fungus and their role in fermentation process of tofuyo which is the traditional fermented soybean protein food in Okinawa. In this study, the author discusses the purification, characterization, application and immobilization of acid proteinases from the genus <i>Monascus</i>.</p>	
<p><i>Monascus pilosus</i> and <i>Monascus purpureus</i>, high proteinase activity producer, were cultured as solid state fermentation on steamed rice and used as the enzyme sources. Three acid proteinases were homogeneously purified from the individual crude extracts; <i>M. pilosus</i> (MpiAP1 and MpiAP2) and <i>M. purpureus</i> (MpuAP) by column chromatography techniques. The molecular masses of the purified enzymes, MpiAP1, MpiAP2 and MpuAP, were estimated to be around 43 kDa, 58 kDa, and 40 kDa respectively. Only the MpiAP2 was glycoprotein with 27% carbohydrate content. The purified enzymes showed optimal proteolytic activity around at 55°C and at pH 2.5-3.2 and were typical aspartic proteinase inhibited by pepstatin A. In the cleavage analysis on the oxidized insulin B-chain, individual enzymes had characteristic cleavage sites. <i>Monascus</i> acid proteinases, in each case, preferentially hydrolyzed casein, although they had distinct kinetic values for it.</p>	
<p>One of the prospective applications of <i>Monascus</i> enzymes, we investigated the ability for reducing antigenicity of cow's milk whey protein concentrate (WPC). The antigenicity of hydrolyzed WPC prepared enzymatically using MpiAP1, MpiAP2, pepsin and trypsin, both singly, and combination was evaluated by using competitive ELISA against rabbit antiserum. In the proteolytic hydrolysis of WPC, it was electrophoretically confirmed that the casein, one of the main component of WPC, was most easily degraded by all enzymes. On the other hand, the <math>\alpha</math>-lactalbumin was far effectively degraded by <i>Monascus</i> acid proteinases rather than that of pepsin and trypsin but the effective digestion of <math>\beta</math>-lactoglobulin was confirmed by trypsin only. The complete digestion of all WPC components was accomplished with the addition of trypsin to the partially hydrolyzed WPC by MpiAP1, MpiAP2, or MpuAP. Furthermore, the lowest antigenicity was observed in the hydrolysates treated with MpiAP1/MpiAP2 and trypsin. The results suggest that <i>Monascus</i> acid proteinases can be effectively used to make hypoallergenic bovine milk whey protein hydrolysates.</p>	
<p>To improve handleability and stability of the enzyme for industrial usage, we fabricated the immobilized enzyme and performed the stability test of it. Among the purified enzymes from <i>Monascus</i> species, the most stable MpiAP2 was successfully immobilized on to chemically cross-linked chitosan beads. As a result, we succeeded in increasing pH stability, temperature-stable performance, and salt tolerance compared with its free form. Overall, this study provides enormous potential for industrial applications and academic importance of <i>Monascus</i> acid proteinases.</p>	

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Poramba Liyanage Nilantha Lakshman (ポーランバ リヤナゲ - ニランタ ラシュクマン)		
審査委員	主査	琉球大学 教授	外山博英
	副査	琉球大学 准教授	平良東紀
	副査	鹿児島大学 教授	菅沼俊彦
	副査	佐賀大学 教授	渡邊啓一
	副査	琉球大学 准教授	橘信二郎
審査協力者	琉球大学	名誉教授	安田正昭
題目	<i>Monascus</i> 属菌の產生する酸性プロティナーゼに関する研究 (Studies on Acid Proteinases from Genus <i>Monascus</i> )		

紅麹菌である *Monascus* 属菌は、アジアの発酵産業において重要な微生物のひとつである。カビの產生する酸性プロティナーゼは、食品やペプチド産業において広く利用されている。しかしながら、本菌の產生する酸性プロティナーゼについては、酵素の若干の性質や豆腐よう熟成における酵素の役割について限定的な報告しかない。本研究では、*Monascus* 属菌の產生する酸性プロティナーゼの学術的知見と産業利用を行うため、酵素の精製、酵素の諸性質、乳清タンパク質の抗原性低減化および固定化酵素の安定性について検討した。

プロティナーゼ活性の高生産株である *Monascus pilosus* と *Monascus purpureus* を蒸煮米に固体培養し、それぞれ麹を調製した。麹より粗酵素液を抽出し、各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせて *M. pilosus* より MpiAP1 と MpiAP2, *M. purpureus* より MpuAP の 3 種類の酵素を電気泳動的に均一に精製した。精製酵素の分子量は、それぞれ 43 kDa (MpiAP1), 58 kDa (MpiAP2) および 40 kDa (MpuAP) と推定された。このうち、MpiAP2 は糖含量 27% の糖タンパク質であった。これらの精製酵素はいずれも、至適温度

55°C, 至適 pH 2.5~3.2 付近で最大活性を有し, ペプスタチン A によって阻害される典型的なアスパラギン酸プロティナーゼであった。酸化インシュリン B 鎮に対する切断様式では, カビ由来酸性プロティナーゼと共に切断点が認められたが, 個々の酵素で特徴的な切断点も認められた。いずれの酵素も動物性タンパク質, 特にミルクカゼインに対して高い基質特異性を有していたが, カゼイン基質に対する個々の速度定数は異なっていた。本研究で精製された *Monascus* 属菌の酸性プロティナーゼは, 基本的な生化学的性質を共有する一方で酸化インシュリン切断様式の違いが認められた。

牛ミルクの加水分解ペプチドを成分とする調整乳は新生児の栄養源として重要であるが, ミルクタンパク質を原因とするアレルギーが問題となっている。*Monascus* 属菌の酸性プロティナーゼの産業利用のひとつとして, 牛ミルク乳清タンパク質 (Whey Protein Concentrates; WPC) の酵素加水分解法による抗原性低減化について検討した。MpiAP1, MpiAP2, MpuAP, ペプシンおよびトリプシンの単独または組合せによって WPC 加水分解物をそれぞれ調製し, ウサギ抗血清に対する競合 ELISA 法を用いて加水分解物中の残存抗原性について評価した。また, 酵素加水分解による WPC 構成タンパク質消化の様子を電気泳動法によって確認したところ, カゼインは全ての酵素の単独反応によって早期に分解され低分子化することが観察された。一方で,  $\alpha$  ラクトアルブミンは *Monascus* 酵素によって腸管消化酵素 (ペプシン, トリプシン) よりも効果的に分解されるが,  $\beta$  ラクトグロブリンの効果的な分解はトリプシンの存在によってのみ観察された。WPC 構成タンパク質の完全分解は, *Monascus* 酸性プロティナーゼ (MpiAP1, MpiAP2 および MpuAP) の WPC 加水分解に続くトリプシン加水分解反応の段階反応によって達成された。加水分解物の最も低い残存抗原性は, MpiAP1 または MpiAP2 とトリプシンの組合せにおいて観察された。これらの結果は, *Monascus* 酸性プロティナーゼによる低抗原性牛ミルク加水分解ペプチドの調製に有効であることを強く示唆した。

*Monascus* 属菌酸性プロティナーゼの産業利用における操作性と安定性の向上のために, 固定化酵素を作成し, 酵素の安定性試験を行った。精製された酵素の中で最も温度安定性の高い MpiAP2 を定法に従って化学的に架橋したキトサンビーズに固定化し, 温度, pH および NaCl 濃度に対する安定性を遊離型酵素と比較した。その結果, 酵素の固定化によってこれらの安定性の増大が確認され, 産業利用における操作性の向上も期待された。

以上のように、本研究で得られた研究成果は、紅麹菌 *Monascus* 由来の酸性プロティナーゼを産業的に利用するのに、非常に多くの可能性と学術的重要性を提供するものであり、学位論文として十分に価値があるものと判定した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	Poramba Liyanage Nilantha Lakshman (ポーランバ リヤナゲー ニランタ ラシュクマン)		
審査委員	主査 琉球 大学 教授 外 山 博 英		
	副査 琉球 大学 准教授 平 良 東 紀		
	副査 鹿児島 大学 教授 菅 沼 俊 彦		
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邇 啓 一		
	副査 琉球 大学 准教授 橋 信 二 郎		
審査協力者	琉球 大学 名誉教授 安 田 正 昭		
実施年月日	平成 23年 1月 11日		

試験方法（該当のものを○で囲むこと。）

 口答・筆答

主査および副査4名は審査協力者1名とともに、平成23年1月11日（火）の公開審査会において、学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙の様な質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者 Poramba Liyanage Nilantha Lakshman が、博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力および識見を有すると認めた。

学位申請者 氏 名	Poramba Liyanage Nilantha Lakshman (ポーランバ リヤナゲー ニランタ ラシュクマン)
--------------	---

【質問 1】抗原性試験でトリプシンが  $\beta$ -ラクトグロブリンを分解することを明らかにしています。 $\beta$ -ラクトグロブリンを加水分解するために大きな影響を与える要因についてどのように考えますか？

【回答 1】私の知る限りでは、 $\beta$ -ラクトグロブリン分子の立体配座は、pH 8.0 のようなアルカリ側の領域では分子構造が開いた状態となります。そして、pH 3.0 のような酸性領域では  $\beta$ -ラクトグロブリンの分子構造は強固になり、このような状況ではほとんどのプロテイナーゼが  $\beta$ -ラクトグロブリンを加水分解することができないと考えられています。したがって、最適反応 pH が今回のように pH 8.0 付近にあるプロテイナーゼは、 $\beta$ -ラクトグロブリンを加水分解する能力を有するかも知れません。これに関して、本研究ではトリプシンしか試していないので正確には言及できません。

【質問 2】キモトリプシンを用いて同様の実験をすれば確認できたと思います。

【回答 2】確かにその通りだと思います。他の同様の論文でもペプシンとトリプシンが使われていたので、当時、キモトリプシンを用いるというアイディアを持っていませんでした。今回の質問で、キモトリプシンを用いて実験すれば先ほどの私の回答について検証できることを理解しました。

【質問 3】固定化酵素は pH および温度に対して高い安定性を示しています。しかし、固定化酵素の再利用において、50%以上の活性を保持した状態で繰り返し反応に利用できた回数は、わずかに 3 回です。この状況についてどのように説明しますか？

【回答 3】安定性試験の結果は、固定化酵素が遊離型の酵素に比べて pH や温度の変化と同様に NaCl 濃度に対しても安定性が向上したことを示しています。発表の中で説明したとおり、キトサンビーズに酵素を固定化するための可能性を探る目的で、この実験を行いました。キトサンビーズに固定化できる酵素量を含めた固定化条件の最適化が必要であると考えます。NaCl 濃度に関しては、NaCl が固定化酵素のタンパク質浸出効果の原因となり得るかどうかについて調べました。その結果は、反応液中の NaCl 濃度が 10% のときでさえ、固定化分子からの酵素タンパク質の浸出兆候がないことを示しました。しかしながら、今回の実験では固定化酵素の再利用回数が低い原因について見いだすことができませんでした。次のステップとして、主に固定化酵素の再利用性向上のための条件の最適化が必要だと思います。

【質問 4】紅麹は研究室で調製したものですか？5~6 日の培養では紅麹色素は得られないのではないですか？

【回答 4】試料の紅麹は研究室で調製しました。紅麹菌が蒸煮米に生育している間の酵素活性についてのみ確認しています。もちろん、その間も培養時間の経過とともに麹の赤みは増しています。製麹中、6 時間毎に麹のサンプリングを行い、酵素活性を測定しました。その結果、麹の赤みがそれほど強くない培養 5 日目に最大酵素活性が得られました。この結果をもとに、酵素活性が最適レベルに達した時点で培養を停止して麹を回収しました。

【質問 5】酸化インスリン B 鎮の切断点分析において、QH、GF および FF のペプチド結合は *Monascus* 酸性プロテイナーゼに特異的な切断点であると主張されていますが、ス

ライドの結果からはそれらの切断点は *Monascus* 酵素に特異的ではないように見えます。なぜこれらの切断点が *Monascus* 酸性プロテイナーゼに特異的であると主張されたのですか？

【回答 5】ご指摘のとおり、いくつかの切断点はスライドに示した全てのカビ酸性プロテイナーゼにおいて確認されています。例えば、酸化インスリン B鎖の FF ペプチド結合は、スライドに示した全てのカビ由来の酸性プロテイナーゼに共通しています。したがって、このような状況下では「特異的」という語彙が適切ではないことを理解します。

【質問 6】酸化インスリン B鎖の切断点分析スライド中の 8 番目の酵素に対するペプチド結合切断点が博士論文に記載されている図中の切断点と違っています。なぜですか？

【回答 6】おそらくパワーポイントで配列を編集する際に間違えたのだと思います。博士論文で引用した参考文献をもとに修正します。

【質問 7】MpiAP1 と MpiAP2 はいくつかの生化学的性質が類似していますが、これについてどのように考えますか？

【回答 7】両酵素の N 末端アミノ酸配列の相同性が 95% 以上であることから、MpiAP2 は MpiAP1 の翻訳後の産物だと考えています。しかしながら、N 末端アミノ酸配列の 1 番目のアミノ酸残基は明確に異なっており、この仮説は明確ではありません。

【質問 8】糖鎖除去したあと、MpiAP2 の活性はチェックしましたか？

【回答 8】MpiAP2 の種々の安定性は糖鎖付加に起因すると推測していたので、MpiAP2 の糖鎖除去後の活性について確認の必要性を感じていました。同様の質問が Food Chemistry の審査員の一人からも寄せられました。しかし、MpiAP2 の脱グリコシル化の際、本酵素は脱グリコシル化酵素 (PNGase) に作用してしまうため、脱グリコシル化が不十分でした。この現象を排除するため、MpiAP2 の阻害剤であるペプスタチン A を反応液に添加しましたが、脱グリコシル化は不十分なままでした。MpiAP2 の脱グリコシル化に成功した唯一の方法は、反応前に MpiAP2 を加熱変性させることでした。したがって、糖鎖を除去したとの MpiAP2 は不活性型酵素として得られ、脱グリコシル化後の活性確認に至りませんでした。

【質問 9】結局、MpiAP1 と MpiAP2 ではどちらが最も安定でしたか？

【回答 9】今回のプレゼンテーションでは紹介しませんでしたが、MpiAP2 の方が MpiAP1 よりも長い活性の半減期を示しました。したがって、MpiAP2 の方が安定であると考えます。その安定性は MpiAP2 の糖タンパク質としての形態に起因していると推測します。

【質問 10】報告されている他のカビ由来酸性プロテイナーゼと比べて *Monascus* の酸性プロテイナーゼの違いは何ですか？ペプチド結合の切断点以外について説明してください。

【回答 10】他のカビ由来酸性プロテイナーゼと比較すると、最適温度、温度安定性、最適 pH および pH 安定性は *Monascus* 酸性プロテイナーゼとほぼ共通しています。しかしながら、熱安定性において我々の酵素は他のカビ由来の酵素に比べて 50°C 以下でよく安定していました。さらに、*Monascus* 酸性プロテイナーゼは、反応液中のある程度の NaCl 濃度に対して耐性をもっていました。この点において、他のカビ由来酸性プロテイナーゼとは異なっていました。