

氏名	長岡純子	
学位(専攻分野の名称)	博士(食品栄養学)	
学位記番号	甲第766号	
学位授与の日付	平成31年3月20日	
学位論文題目	伝統発酵食品「へしこ」の米糠の性状とアミラーゼ生産菌および生産酵素に関する研究	
論文審査委員	主査 教授・博士(農芸化学)	阿久澤 さゆり
	教授・博士(農学)	阿部 尚樹
	教授・博士(農芸化学)	田中 尚人
	准教授・博士(農学)	田村 倫子

論文内容の要旨

「発酵」は古くから食材の保存性の向上や、嗜好性にあう性状に変化させるために食品の加工・保蔵に利用されてきた。西洋の食文化における保存用食品はベーコン、ソーセージなどの肉製品とバターやチーズのような乳製品が多いが、畜産物の活用が少ない伝統的な日本の食生活においては、保存用食品の主な素材は野菜、海藻、魚である。野菜に塩を加えて貯蔵すると「漬物」となり、広義の漬物には魚介類を原料とした製品もある。魚を食材とした発酵食品に、福井県の郷土料理である「へしこ」がある。「へしこ」は、塩漬けにしたマサバを米糠に漬け込んで1年間の発酵熟成期間を経て製品となったもので、発酵後の米糠はペースト状に変化し、米糠を取り除くことなく魚体と共に食されている。通常、米糠は非可食部として扱われるが、「へしこ」の米糠が供される性状へ変化した要因には、米糠に糖質分解酵素が作用していることが考えられた。「へしこ」に関する報告は、発酵過程の微生物叢の変化、発酵熟成に伴う魚肉の遊離アミノ酸、有機酸、脂質などの一般成分の変化について多くの報告がみられるが、米糠の性状変化に関する報告はみられない。

そこで本研究では、伝統発酵食品の食品科学的研究として「へしこ」の米糠の性状と性状変化に関与するアミラーゼ生産菌および生産酵素について明らかにすることを目的とした。米糠の性状解析として、発酵熟成後の米糠の性状観察と、性状変化に寄与する要因としてアミラーゼ生産菌に着目し、発酵熟成期間後の米糠中のアミラーゼ生産菌の検索を行った。分離した菌株から糖質分解酵素を生産する5種の菌株の推定を行ったところ、*Oceanobacillus* 属細菌の1種である *Oceanobacillus picturae* と推定された菌株があり、この属の細菌は澱粉の資化性に関する報告がみられないため供試菌株とした。さらにドラフトゲノム解析およびアミラーゼ活性を持つ菌体外生産酵素の解析を行い、目的タンパク質を選択しそれをコードする遺伝子を導入した形質転換体を作成して組換えタンパク質の発現系を構築し、精製したりコンビナント酵素を得た。

本研究では、伝統発酵食品「へしこ」の米糠の性状解析とともに *O. picturae* に関する澱粉の資化性を示した最初の報告であり、さらに *O. picturae* のアミラーゼ活性を持つ菌体外生産酵素について、酵素科学的研究へ展開できる方法を確立した。以上の研究結果を報告する。

実験 1：「へしこ」米糠の性状解析およびアミラーゼ生産菌株の分離と菌種の推定

実験 1-1：発酵前および発酵熟成後の米糠の性状解析

へしこ（福井県福井市製造）製造に糠床として用いた米糠（コシヒカリ福井県産）と、発酵熟成期間後（へしこ）の魚体周辺の米糠を測定用試料とした。一般成分分析およびナトリウム含有量を測定した。さらに、米糠を脱脂したのち 60%エタノールに懸濁させ 200 μ m のメッシュでろ過し、①残査をグルコアミラーゼおよびプロナーゼ処理した区分（区分Ⅰ：非澱粉性多糖）、②メッシュを通過したろ液を遠心分離し、沈殿をプロナーゼ処理した区分（区分Ⅱ：澱粉性多糖および非澱粉性多糖の混在区分）、③上澄み区分（区分Ⅲ：水溶性低分子多糖）、の 3 区分に分画した。区分Ⅰと区分Ⅱは走査型電子顕微鏡（SEM）観察、示差走査熱量計（DSC）による熱分析およびアミロペクチンの鎖長分布測定、区分Ⅲは陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC-PAD）、 $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ （周波数 400MHz）により糖の分析を行った。

一般成分の変化は、水分、脂質、灰分、Na 含有量ともに増加し、炭水化物は著しく減少していた。分析により発酵熟成後の米糠で炭水化物含量が減少していることが示された。また SEM 観察により、発酵熟成後の米糠では、非澱粉性多糖の細胞壁の破損が顕著であり、かつ澱粉粒には穴や欠損部が観察された。

熱的性質では、区分Ⅰでは 79°C および 110°C に吸熱ピークが得られ、これは SEM 像より細胞壁成分由来と考えられた。区分Ⅱでは、67°C および 78°C 付近に吸熱ピークが得られ、67°C のピークは澱粉由来、78°C 付近は混在している他成分で、細胞壁成分由来であると推察された。さらにアミロペクチンの単位鎖長分布においても、DP6-12 の短鎖の減少がみられたことから、発酵熟成期間に澱粉性多糖は澱粉分解酵素の作用を受けていることが明らかとなった。一方、区分Ⅲにおける糖組成の分析では、発酵熟成後の米糠から澱粉や細胞壁の構成糖であるアラビノース、ガラクトース、グルコース、キシロースが同定され、以上の結果より、米糠中の澱粉および非澱粉性多糖は発酵熟成過程で分解されていることが明らかとなった。

実験 1-2：発酵熟成後の米糠中のアミラーゼ生産菌株の分離と菌種の推定

米糠中の澱粉や非澱粉性多糖の分解には微生物由来の糖質分解酵素の関与が示唆されたため、発酵熟成期間を経て製造されたへしこ魚体周辺の米糠からアミラーゼ生産菌株を分離

した。分離されたアミラーゼ生産菌株の中から 5 株を選択し、16S rDNA により菌種を推定した結果、*Bacillus amyloliquefaciens* (分類番号 A1 株)、*Paenibacillus amylolyticus* (分類番号 A3 株)、*Bacillus subtilis* (分類番号 B1 株)、*Bacillus licheniformis* (分類番号 B2 株)、*Oceanobacillus picturae* (分類番号 B3 株)であることが推定された。推定された 5 菌株のうち、*Bacillus* 属細菌および *Paenibacillus* 属細菌は近縁種からも澱粉を資化できる菌種が多いことが示されたが、*Oceanobacillus picturae* は、澱粉の資化性やアミラーゼに関する研究報告がみられず、かつ、近縁種からも澱粉を資化できる菌種がみられないことが示された。

実験 2 : *O. picturae* (分類番号 B3 株) のゲノム解析および、菌体外生産酵素の全長の予測

実験 2-1 : *O. picturae* (分類番号 B3 株) のゲノム解析

O. picturae (分類番号 B3 株) を供試菌株とした。可溶性澱粉を含む液体培地にて培養した供試菌株の菌体から DNA を抽出し、次世代シーケンサで塩基配列を解析した。この結果、92 コンティグ (約 3.9 Mbp) を決定し、3,889 の CDS を予測した。本菌を *Oceanobacillus picturae* Heshi-B3 と命名して、DDBJ へのゲノム配列登録を行った (BBXV01000001-BBXV01000092)。

実験 2-2 : *O. picturae* Heshi-B3 の菌体外生産酵素の精製、および目的タンパク質のアミノ酸配列分析と菌体外生産酵素の全長の予測

供試菌株を可溶性澱粉を含む液体培地に植菌し、30℃で 72 時間静置培養して遠心分離で菌体を除去した上清中の酵素を菌体外生産粗酵素溶液とした。その溶液中のアミラーゼ活性を持つタンパク質の精製を目的として、①限外ろ過法、②硫酸分画法、③疎水クロマトグラフィー (TOYOPEARL Butyl-650S)、および④陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose Fast Flow) を行い、⑤遠心濃縮 (VIVASPIN 遠心濃縮チューブ) により濃縮した。その精製工程⑤の溶液を二次元電気泳動で分離後、PVDF 膜に転写した各タンパク質スポットを切り出し、プロテインシーケンサを用いてエドマン分解法により N 末端のアミノ酸配列を決定した。一方、精製工程⑤の溶液を二次元電気泳動で分離後、選択したタンパク質スポットを切り出し、MALDI-TOF/MS によるペプチド断片の質量分析を行い、その質量分析データから Mascot 検索で相同性の高いタンパク質を抽出した。

その結果、複数のタンパク質スポットのうちの 1 つのスポットにおいて、N 末端から 7 残基までのアミノ酸配列を得ることができた。この情報について *O. picturae* Heshi-B3 と対応する CDS を検索したところ、N 末端から 25~31 残基目のアミノ酸配列が完全一致するアノテーション名 : cyclodextrin glucanotransferase precursor が得られた。この CDS がコードするアミノ酸配列のうち N 末端から 24 残基目まではシグナル配列と予測され、シグナル配列切断後のタンパク質の分子量は約 7.6 万、等電点は 4.38 と推定され、二次元電

気泳動の結果と概ね一致した。

また、MALDI-TOF/MS で解析されたペプチド断片の質量分析結果に対して Mascot 検索による相同性の高いタンパク質は、*O. picturae* S1 の alpha-amylase と、*O. picturae* Heshi-B3 の CDS がコードする cyclodextrin glucanotransferase precursor であり、この 2 つのタンパク質のアミノ酸配列は完全に一致していた。さらに、この CDS がコードするタンパク質の機能を探るために、NCBI サイトでの BLAST による相同性検索を行った。その結果、*Bacillus sp.* 8SB 株由来の cyclodextrin glucanotransferase precursor と 72 %、*Bacillus tryoxylicola* 由来の α -amylase と 70 % の相同性が認められた。従って、この CDS がコードするタンパク質は糖質加水分解酵素または糖転移酵素の機能を持つことが示唆されたため、この CDS をアミラーゼ遺伝子 *HeshiAMY1* と命名した。

実験 3 : アミラーゼ遺伝子 *HeshiAMY1* の発現系の構築

アミラーゼ遺伝子 *HeshiAMY1* の塩基配列をもとに、シグナル配列を除いた *HeshiAMY1* をベクター (pBIC 3) に導入し、*Brevibacillus choshinensis* を宿主として、N 末端に His タグを融合させたリコンビナント *HeshiAMY1* を菌体外に分泌させる発現系を構築した。構築した発現系の培養上清のアフィニティークロマトグラフィー (Ni Sepharose 6 Fast Flow) でリコンビナント *HeshiAMY1* を精製し、SDS-PAGE で単一バンドであることが確認された。また、得られたリコンビナント *HeshiAMY1* 溶液を可溶性澱粉を基質として作用したところ、還元糖が生成したことから糖質加水分解酵素または糖転移酵素であることが確認された。

まとめ

本研究では、「へしこ」の米糠の性状変化を解析し、その性状変化には分離菌株の生産する菌体外生産酵素が寄与していることを示した。その分離菌株の 1 つは *Oceanobacillus picturae* と推定され、さらに本菌を *Oceanobacillus picturae* Heshi-B3 と命名して、DDBJ へのゲノム配列登録を行った。また、供試菌株のゲノム解析結果と菌体外生産酵素のアミノ酸配列から、菌体外に生産するアミラーゼのゲノム配列を予測してその発現系を構築し、*Brevibacillus choshinensis* を宿主として、発現・精製したリコンビナント酵素 (*HeshiAMY1*) を得た。これらの成果は、伝統発酵食品の食品科学的研究として資する成果でありさらに微生物学分野においても *O. picturae* Heshi-B3 に関する最初の澱粉の資化性を示し、菌体外生産酵素についてコンビナント *HeshiAMY1* の発現系を構築して酵素科学的研究へ展開できる方法を確立し意義のある成果と考える。

審査報告概要

本研究では、「へしこ」の米糠の性状変化を解析し、魚体周辺の米糠からアミラーゼ生産菌株を分離し、16S rDNAにより *Bacillus amyloliquefaciens* (A1株), *Paenibacillus amylolyticus* (A3株), *Bacillus subtilis* (B1株), *Bacillus licheniformis* (B2株), *Oceanobacillus picturae* (B3株)であることが推定され、そのうち *Oceanobacillus* 属の細菌は澱粉の資化性に関する報告がなく、澱粉の資化性を示した最初の報告である。さらに本菌を *Oceanobacillus picturae* Heshi-B3 と命名して、DDBJ へのゲノム配列登録を行い供試菌株とした。また、供試菌株の菌体外生産酵素を精製し、ゲノム解析結果と菌体外生産酵素のアミノ酸配列から、菌体外に生産するアミラーゼのゲノム配列を予測してその発現系を構築し、*Brevibacillus choshinensis* を宿主として、発現・精製したリコンビナント酵素 (HeshiAMY1) を得た。これらの成果は、伝統発酵食品の食品科学的研究として資する成果でありさらに微生物学分野においても *O. picturae* Heshi-B3 に関する最初の澱粉の資化性を示し、菌体外生産酵素についてコンビナント HeshiAMY1 の発現系を構築して酵素科学的研究へ展開できる方法を確立した観点からも高く評価される。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査員一同は博士 (食品栄養学) の学位を授与する価値があると判断した。