

マイタケのタンパク質分解酵素の熱耐性と部位による活性の違いについて

1. テーマ設定の理由

- (1) 令和2年度数理科学科探究学習活動記録集に「マイタケに含まれるタンパク質分解酵素の抽出と活性の確認」という先行研究があった。しかし、この研究ではマイタケプロテアーゼを抽出してから活性の確認をするまで約二か月が経過していた。この間活性が十分に保たれていなかった可能性があるため、抽出から活性の確認の期間をなるべく詰めて再検証する必要があると考えた。
- (2) マイタケの上部(カサ側)と下部(石づき側)では形態的な違いがあり、部位によりプロテアーゼの量にも違いがあるのかどうか実験により確認しようと考えた。

2. 実験内容とその結果について

＜事前研究＞

プロテアーゼとはどのような酵素か、どのくらいの温度で失活するか。また、酵素の活性を評価するための方法（ニンヒドリン反応）などについてインターネットや書籍を読み、調べた。

＜実験＞

日本工業大学において2回（計4日間）に分けて以下の実験を行った。酵素抽出から活性の確認までの時間を詰めるために、どちらの実験も2日連続して行った。

[実験1] 酵素の熱耐性とその活性について

1日目（8月24日）

- ・マイタケ（130g）をミンチ機で粉碎し、蒸留水 150mL と 5mmol/L のリン酸緩衝液 5μL を加えて2時間抽出した後、フィルターを通して固形物を取り除き、抽出液を採取した（以後これを酵素液とする）。
- ・得られた酵素液を半分に分け、一方をそのまま保存し（非加熱処理）、他方を 70℃で2時間加熱した（70℃加熱処理）。

2日目（翌8月25日）

- ・非加熱処理の酵素液と 70℃加熱処理の酵素液に基質（ミオシン）を加え、それぞれ 25℃と 50℃で5分間酵素反応を行わせた。
- ・反応液をニンヒドリン反応させ、吸光度を測定することによって活性の違いを比較した。

[結果1]

- ・70℃加熱処理の有無に関わらず、25℃で酵素反応させたよりも 50℃で反応させた方が活性が高かった。反応温度 50℃では、非加熱処理、70℃加熱処理ともに活性に違いは見られなかった。一方、反応温度 25℃では非加熱処理の方が 70℃加熱処理より活性が高かった（図1）。

[実験2]

（11月18日および19日）

- ・マイタケを上部（98.2g）と下部（94.5g）に分けてそれぞれをミンチ機で粉碎し、試料 1g 当たり 1mL の蒸留水と 5mmol/L のリン酸緩衝液 5μL を加えて2時間抽出した後、ゴース生地を通して固形物を取り除き、抽出液を採取した。
- ・得られた上部酵素液と下部酵素液をそれぞれ半分に分け、一方をそのまま保存し（非加熱処理）、他方を 70℃で2時間加熱（70℃加熱処理）した後、[実験1]と同じ方法で活性を比較した。

[結果2]

- ・マイタケには70℃2時間処理をしても失活しない高温耐性プロテアーゼが存在し、50℃、25℃のどちらの酵素反応でも、非加熱処理のものと同様の活性を示した。
- ・マイタケ上部の方がマイタケ下部よりも重量当たりのプロテアーゼ活性が高かった。
- ・[実験1]の結果とは反対に50℃で酵素反応させたよりも25℃で酵素反応させた方が活性が高かった。
- ・また、[実験1]の結果と反対に、70℃加熱処理酵素液の方が非加熱処理のものより活性が高い傾向が見られた。(図2)

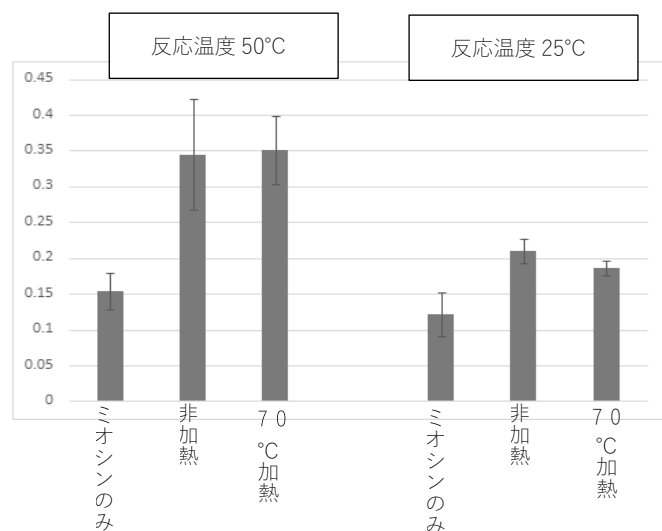


図1 70℃加熱処理の有無と反応温度による活性の違い

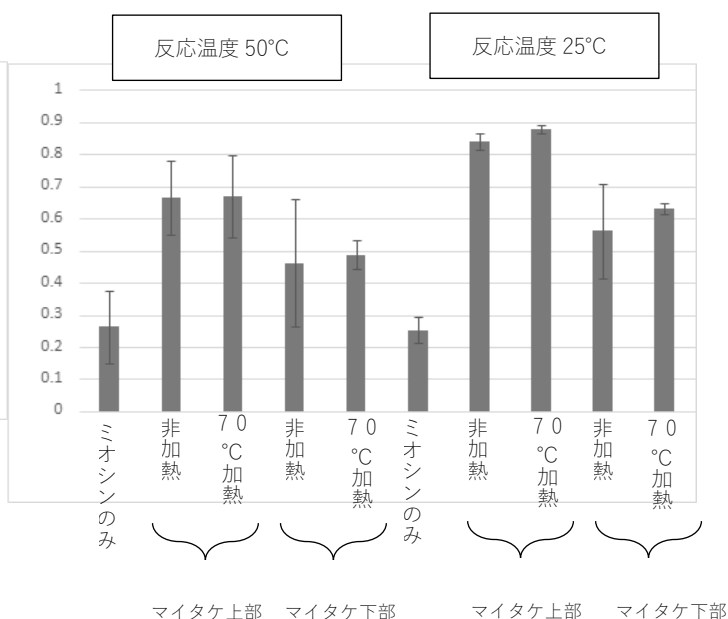


図2 マイタケ上部と下部における活性の違い

3. 考察

[実験1]では反応温度 25℃では非加熱処理の酵素液の方が活性が高くなっていた。その理由は 70℃加熱処理によって、25℃で活性の高い酵素が失活してしまったためである。また、70℃加熱処理によって失活しない耐熱性のある酵素は低温（25℃）でははたらきにくいと考えた。

[実験1]と[実験2]ともに、マイタケには70℃加熱処理によって失活しない高温耐性プロテアーゼが含まれていることがわかった。一方、[結果]で述べた通り[実験1]と[実験2]で反対の結果も得られ、その理由について以下の通り考察した。

[実験1]と[実験2]では用いたマイタケの製造者が異なるため、品種や培養方法が異なっていると考えられる。各製造者のホームページによると、それぞれ独自に品種改良をしていることが分かった。それにより遺伝的な違いがあり、酵素の種類や量が異なるため結果に違いが現れたと考えた。また、[実験1]と[実験2]ではマイタケの流通経路、保存状態、鮮度などの条件が異なるため、その影響が現れたことも考えられる。例えば、それらの条件によってプロテアーゼの分子構造に違いが生じることが考えられる。また、プロテアーゼには阻害剤のほか Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの陽イオンなど、活性を制御する他の因子が存在することが知られており、これらの状態や量などに差が出たとも考えられる。

ところで、[実験2]ではマイタケの上部と下部で重量当たりのプロテアーゼ活性が高いことが示されたが、グラフの標準偏差から再現性を確認すべきである。

4. 今後の課題

- ・様々な製造者の異なる品種どうしを比較する。
- ・同じ製造社の同じ商品について保存状態（温度、湿度、光などの条件）を変え、酵素の活性の違いを比較する。
- ・以上をマイタケの上部と下部に分けて行う。

5. 参考文献

- ・「マイタケに含まれるタンパク質分解酵素の抽出と活性の確認」町田真渉 数理科学科研究収録 2020 年
- ・「マイタケプロテアーゼの動物性タンパク質と植物性タンパク質への作用の違い」畝くるみ 四方帆奈美 原田ありさ 渡邊柚月 石川県立七尾高等学校 SSH 課題研究論文 R02 2021 年
- ・「マイタケ由来タンパク質分解酵素の食品加工利用」西脇俊和 日本醸造協会誌 2013 年 108 巻 8 号
- ・「マイタケで茶碗蒸しはなぜ固まらないのか：他の食用きのこ類プロテアーゼの比較」森本美里 有泉文賀 志田万里子 山梨学院短期大学研究紀要 2010 年
- ・『品種開発 ホクト株式会社』<https://www.hokto-kinoko.co.jp/corporate/kenkyu/dokujigijyutsu/shinsyukaihatsu/> 1 月 17 日
- ・『ホクトのきのこはオリジナル!』<https://www.hokto-kinoko.co.jp/kinokolabo/kenkyu/58666/> 1 月 17 日
- ・『品種登録迅速化総合電子化システム』<http://www.hinshu2.maff.go.jp/vips/cmm/apCMM110.aspx?MOSS=1> 1 月 17 日
- ・『雪国まいたけ 雪国まいたけ開発ストーリー』https://www.maitake.co.jp/kiwami/story_kiwami/ 1 月 17 日

謝辞

日本工業大学基幹工学部応用化学科教授佐野健一先生にはこの度の研究で大変お世話になりました。誠にありがとうございました。