

アルカリプロテアーゼのポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動によるAspergillus flavusおよびA. parasiticusの簡易な同定法

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者	齊藤, 道彦 楠本, 憲一 川澄, 俊之
巻/号	55号
掲載ページ	p. 49-51
発行年月	1991年3月

アルカリプロテアーゼのポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動による *Aspergillus flavus* および *A. parasiticus* の簡易な同定法

斉藤道彦・楠本憲一・川澄俊之

A simple method for identification of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by slab polyacrylamide gel electrophoresis of alkaline proteinases

Michihiro SAITO, Ken-ichi KUSUMOTO, and Toshiyuki KAWASUMI

A simple method for identification of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by slab polyacrylamide gel electrophoresis of their alkaline proteinases are proposed. The proteinase bands separated by electrophoresis were visualized by incubating the slab gel in contact with a thick agar film containing gelatin and then soaking the agar film in a saturated ammonium sulfate solution to precipitate gelatin. (Received Oct. 2, 1989)

Aspergillus flavus および *A. parasiticus* は、*A. flavus* group¹⁾に属する近縁種であるが、両菌種とも強力な発癌性マイコトキシンであるアフラトキシンを産生する。また、酒、醤油、味噌などの醸造に用いられる麴菌の *A. oryzae* および *A. sojae* は、それぞれ *A. flavus* および *A. parasiticus* にきわめて近縁な種と考えられている。このように、これらは分類学的あるいは食品衛生学的にも問題のある菌群であるため、これまで種々の分類学的研究が行なわれ、同定のための検索表^{1,2,3)}が発表されているものの、形態学的には同定の困難な糸状菌である。

Nasuno^{4,5,6)}は、*A. oryzae* と *A. sojae* (すなわち *A. flavus* と *A. parasiticus* も同様) が、アルカリプロテアーゼのポリアクリルアミド-ディスク電気泳動によって明確に分けることができると報告している。しかしながら、その方法は泳動後のゲルディスクをドライアイス凍結下に2mmに切断し、各切片より酵素を抽出し、それぞれの活性を測定するという煩雑な方法であり、多数の菌株を比較するなどの目的には用いがたい方法である。

また、DNAの相同性⁷⁾、DNAの制限酵素による切断パターン⁸⁾を比較する方法なども試みられているが、簡易さに欠ける。

著者らも、これまでいくつかの酵素について *A. flavus* と *A. oryzae*、また *A. parasiticus* と *A. sojae* の電気泳動パターンの比較による同定法を検討してきたが、まだそれぞれの菌種間で明確な差異を示す酵素を見い出すに至っていない。

ここでは、アルカリプロテアーゼのポリアクリルアミド-スラブゲル電気泳動による方法で *A. flavus* と *A. parasiticus* を識別できることを再確認し、これらの菌種の簡易な同定法として有用と思われる結果を得たので報告する。

実験方法

1) 供試菌株

A. flavus は、主としてタイ国の土壌から分離した20株、*A. oryzae* は財団法人醸酵研究所(大阪市)および食品総合研究所保存株20株、*A. parasiticus* は醸酵研究所保存株3株およびNRRL株2株、*A. sojae* は醸酵研究所保存株4株を供試した。

2) 供試菌の培養および酵素の抽出

Nasuno⁴⁾の方法に準じて、5gのフスマに4mlの水を混ぜたものを基質として、容量100mlの三角フラスコ内で、30°C、2日間培養した。培養終了後、50mlの蒸留水を加え、よく攪拌して、室温に30分間

放置し、冷蔵庫に1夜保った後、炉過した。炉液に2倍量の -20°C で冷却したエタノールを加え、 4°C 、 $4,000\times g$ で5分間遠心した。得られた沈澱物を 0.5ml の水に溶かし、再び $4,000\times g$ で5分間遠心して得られた上澄みを酵素液とした。

3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Davis⁹⁾の方法に準じ、アトー社製のスラブ・ディスク電気泳動装置(SJ-1060型)で作製した 2mm 厚の 7.5% 分離ゲル(pH8.9)および 3.75% 濃縮ゲル(pH6.7)およびトリス-グリシン緩衝液(pH8.0)を用いて行なった。ゲルあたり 36mA の電流を通じ、先端が 6cm に達した時点で通電を止めた。

4) アルカリプロテアーゼの検出

あらかじめ約 15cm 角の透明なプラスチック容器に、トリス-塩酸緩衝液(pH8.8) 30ml にゼラチン 0.15g を含む 1.5% 溶解寒天を流し込み、約 2mm 厚の薄層を作っておき、その上に泳動の終了したゲルを重ね、30分間インキュベートした。ゲルを取り除いた後、寒天薄層上に飽和アンモニウム液を流し込み、活性部位を検出した¹⁰⁾。

結果および考察

アルカリプロテアーゼ活性は、白濁したバックグラウンドに透明なバンドとして得られた。第1図に供試した *A. flavus* 20株のうち12株の泳動パターンを示したが、明らかに全株が同一のパターンを示している。なお、この他の株もすべてこれと同一のパターンを示した。また、*A. oryzae* についても *A. flavus* のパターンとまったく同一であった。

第2図は、*A. oryzae* 3株(図の左側3株)、*A. parasiticus* 5株(同じく中央部5株)および *A. sojae* 4株(同じく右側4株)の泳動パターンであるが、*A. oryzae* と *A. parasiticus* ならびに *A. sojae* とのパターンは明らかに異なっていた。すなわち、*A. parasiticus* および *A. sojae* は *A. oryzae* (*A. flavus* も同様) よりも早い泳動度を示している。この結果は Nasuno⁴⁾の報告に示された結果と同じであった。

A. flavus と *A. parasiticus* を分ける特徴的な形態上のちがいで、分子形成構造体の差異があげられる。すなわち、*A. flavus* では vesicle (頂囊) 上に phialide (フィアライド) のみを持つものと、vesicle と phialide の間に metulae (メトレ) を持つものが混在するのに対し、後者では metulae が形成されることはないという点にあるが¹⁾、2菌種間の

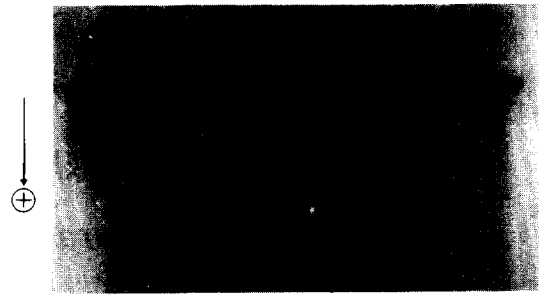


Fig.1. The electrophoretic patterns of alkaline proteinases of 12 strains of *Aspergillus flavus*.



Fig.2. The electrophoretic patterns of alkaline proteinases of 3 strains of *Aspergillus oryzae* (left), 5 strains of *A. parasiticus* (middle) and 4 strains of *A. sojae* (right).

同定は、これらの菌種の同定に経験が浅い者にとっては必ずしも容易ではないと思われる。本報告で示した方法は培養を含め2、3日を要するのみで、比較的簡易で容易な方法である。

引用文献

- 1) RAPER, K. B., FENNELL, D. I.: The Genus *Aspergillus* (The Williams & Wilkins Company, Baltimore) p 360 (1965).
- 2) CHRISTENSEN, M.: *Mycologia*, **73**, 1056 (1981).
- 3) MURAKAMI, H., HAYASHI, K., USHIJIMA, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 55 (1982).
- 4) NASUNO, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1147 (1971).
- 5) NASUNO, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 29 (1972).

- 6) NASUNO, S. : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 684 (1972).
- 7) KURTZMAN, C. P., SMILEY, M. J., ROBNETT, C. J.,
WICKLOW, D. T. : *Mycologia*, **78**, 955 (1986).
- 8) KOZŁOWSKI, M., STEPIEN, P. P. : *J. Gen. Microbiol.*,
128, 471 (1982).
- 9) DAVIS, B. J. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**,
404 (1964).
- 10) EVERY, D. : *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 809 (1982).