報 文

マイタケ由来のプロテアーゼが米飯の物性 および米タンパク質に与える影響

大石恭子^{1*}, 足立里穂², 米田千恵³, 大田原美保⁴, 香西みどり²

¹ 和洋女子大学家政学部

² お茶の水女子大学生生活科学部

³ 千葉大学教育学部

⁴ 東京聖栄大学健康栄養学部

Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) Mushroom on the Physical Properties and Protein Profile of Cooked Rice

Kyoko Ohishi^{1*}, Riho Adachi², Chie Yoneda³, Miho Otahara⁴ and Midori Kasai²

¹ Faculty of Human Ecology, Wayo Women's University, 2-3-1 Kohnodai, Ichikawa-shi, Chiba 272-8533

² Faculty of Human Life and Environmental Sciences, Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610

³ Faculty of Education, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522

⁴ Faculty of Health and Nutrition, Tokyo Seiei College, 1-4-6 Nishishinkoiwa, Katsushika-ku, Tokyo 124-8530

The aim of this work was to study the effect of *Maitake* proteases on the textural properties of cooked rice. We also investigated alterations in the molecular weight distribution of proteins and levels of free amino acids in rice after soaking in *Maitake* extract at 50 °C. When rice was soaked and heated with *Maitake* extract, the texture of cooked rice was softer than rice cooked with water both immediately after cooking and post-refrigeration. Our results showed that when the rice grains were soaked in *Maitake* extract at 50 °C for 60 min, *Maitake* metalloproteases degraded rice glutelin, resulting in an increased level of hydrophobic amino acids such as phenylalanine, valine, and isoleucine. Moreover, we demonstrated that aspartic proteases from *Maitake* also degraded the rice proteins, without affecting their SDS-PAGE patterns. Finally, when the rice was cooked with *Maitake* extract, *Maitake* metalloproteases decomposed the glutelin and contributed to an apparent decrease in rice hardness.

(Received Mar. 16, 2020 ; Accepted May 27, 2020)

Keywords : rice, protein, Maitake, protease, texture

キーワード : 米, タンパク質, 酵素, マイタケ, 物性

マイタケ (*Grifola frondosa*) の子実体は高いプロテアーゼ活性をもち、牛肉の軟化効果¹⁾ や小麦のタンパク質分解によるパンの膨化阻害²⁾、卵液の凝固阻害^{3,4)} など、加熱をする調理過程においてもプロテアーゼの影響が見られることが報告されている。マイタケから数種のプロテアーゼの存在が確認されており、エンド型の金属プロテアーゼ (EC 3.4.24) は耐熱性が高く、pH 7 の条件で 90 °C で 40 分間の加熱でも 60 % の活性が維持される⁵⁾。そのほか酸性条件で活性化するアスパラギン酸プロテアーゼ (EC 3.4.23)⁴⁾ やエキソ型の金属プロテアーゼ (EC 3.4.17) の存在も報告されており⁶⁾、数種のプロテアーゼが相互に作用して影響を与える⁴⁾ と考えられている。

米のタンパク質はデンプンの吸水、膨潤、糊化を阻害し、米飯の物性低下に関与する^{7)~9)}。そのためプロテアーゼ処理により古米やインディカ種米のデンプン結合タンパク質を分解し、デンプン遊離量を増加させたり^{10,11)}、米デンプンの周囲に存在するタンパク質のジスルフィド結合 (以下、SS 結合と称する) を還元剤やプロテアーゼ添加で切断する方法が、米飯の軟化や粘りの増加に効果を示すことが知られている^{12,13)}。そしてマイタケ粉末を添加した水に古米を 15 時間浸漬させ、その後米を洗って水で炊飯をすると、軟らかく粘りのある飯になることが報告されている¹⁴⁾。大野らは³⁾、マイタケの酵素の中でプロテアーゼ活性は高いがキシラーゼおよびセルラーゼの活性はわずかであり、アミ

¹ 〒272-8533 千葉県市川市国府台 2-3-1, ² 〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1, ³ 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

⁴ 〒124-8530 東京都葛飾区西新小岩 1-4-6

*連絡先 (Corresponding author), k-ohishi@wayo.ac.jp

ラーゼは活性がないことを示し、寺下ら¹⁵⁾もマイタケ栽培後の廃培地に種々のプロテアーゼ活性が認められる中、アミラーゼの活性は極めて低いことを示していることから、米飯の物性変化はマイタケ由来のプロテアーゼが米のタンパク質に作用した結果と推察される。

そこで本研究ではマイタケ抽出液を炊飯液として用いて米飯を調製し、マイタケ内在性プロテアーゼが米のタンパク質の分解に与える影響を明らかにすることにより、米のタンパク質の分解と米飯の物性との関係を考察することを目的とした。

実 験 方 法

1. 試料米

試料米として平成 29 年産茨城県産コシヒカリ BG 無洗米を用いた。入手後はポリエチレン製の密閉袋に入れ、4℃の冷暗所にて保存した。また官能評価および物性測定では比較のために業務用の米として平成 29 年産栃木県産あさひの夢も用いた。実験は平成 29 年から 30 年にかけて行った。

2. マイタケ試料

マイタケは乾燥粉末(舞茸粉末ナチュラルパウダー、(株)群馬まいたけセンター)を用いた。これは種菌(まいたけ 51 号、森産業(株))を秩父産のオガ屑で培養後、約 100 日間空調施設で栽培し、約 80℃で 36 時間乾燥させて粉末にしたものである。入手後、チャック付きのポリエチレン製の袋に入れて室温で保存した。

3. マイタケ抽出液の調製

マイタケ粉末 1.0 g に RO (Reverse Osmosis) 水 (以下「水」と略する) を加えて 200 g に調整し、室温で 1 時間振とうした。目開き 250 μ m, 125 μ m, 63 μ m のふるいに順に通し、吸引ろ過した後 225 g に加水調整した。

4. 飯の調製

米の浸漬から炊飯まで水を用いた飯、同操作をマイタケ抽出液を用いた飯、浸漬はマイタケ抽出液を用い、炊飯は水を用いた飯の 3 種を調製した。各々「基準飯」「マイタケ飯」「マイタケ浸漬飯」と称する。

基準飯およびマイタケ飯は、白米 150 g に対し、加水比が米重量の 1.5 になるよう、225 g の水またはマイタケ抽出液を加えて、20℃で 1 時間浸漬した。電圧調整器(ボルトスライダー V-130-5、山菱電機(株))を小型電気炊飯器(SR-03F、パナソニック(株))に接続し、100 V で 12 分間、続いて 60 V で 13 分間通電後スイッチを切り、15 分間蒸らしの操作を行った。マイタケ浸漬飯は、前述の方法でマイタケ抽出液に 20℃で 1 時間浸漬後、ザルを用いて浸漬液と米粒に分け、浸漬液の重量を測定し、同重量の水および浸漬した米を釜に戻して同様の方法で炊飯を行った。米を浸漬後の浸漬液の pH はいずれも 6~7 であった。

炊き上がり後、炊飯釜の蓋を外し、水で濡らしてかたく絞った 2 枚重ねのキッチンペーパーを釜に被せ、食品用

ラップフィルム(ポリ塩化ビニリデン製)で覆い、20℃で 1 時間放冷した。その後釜上部の厚さ 1 cm 分の飯をとり除き、釜中央部の飯を各種測定に用いた。

5. 冷蔵した飯の調製

放冷後の飯を直径 30 mm, 高さ 14 mm のガラス製シャーレに約 6 g ずつ入れて蓋をし、さらにラップフィルムでシャーレを覆った。4℃の低温室で 14 時間保存し、その後、20℃の恒温庫に 1 時間放置したものを飯の力学的物性測定用の試料とした。

6. 50℃の浸漬液の調製

バイアル瓶に生米 3 g および各溶液 4.5 g を入れ、50℃の恒温槽中で 1 時間浸漬した。溶液は水またはマイタケ抽出液を用い、酵素阻害剤添加の場合は、水またはマイタケ抽出液に、E-64 (N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl] agmatine)、ロイペプチン、ペプスタチン(いずれも(株)ペプチド研究所、終濃度 100 μ M)、または EDTA (Ethylenediamine tetraacetate、和光純薬(株)、終濃度 1 mM) を添加した。EDTA 添加の場合は水酸化ナトリウム(和光純薬(株))も添加し、pH を 7.0 に調整した。E-64 はシステインプロテアーゼ、ロイペプチンはシステインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼ、ペプスタチンはアスパラギン酸プロテアーゼ、EDTA は金属プロテアーゼの阻害剤である。浸漬後 5 分間水冷し、米粒と浸漬液に分け、浸漬液を遠心分離(12000 $\times$ g, 5℃, 15 分)し、得られた上清画分を測定用試料とした。マイタケ抽出液のみを 50℃で 1 時間浸漬した試料も調製した。これらの試料に対して、タンパク質量の測定、アミノ酸分析、SDS-PAGE 分析を行った。

7. 各種測定

(1) 炊飯時の温度測定

炊飯釜付属の蓋中央から銅コンスタンタン熱電対を挿入し、データコレクタ(AM-8000 K、安立計器(株))を用いて炊飯時の温度を測定した。測定箇所は釜中央の底から 1 cm 高い位置になるように調整した。

(2) 飯の官能評価

お茶の水女子大学の教員および学生(女性、20~60 代)計 15 名をパネルとし、官能評価を行った。評価の実施に先立ち、評価の趣旨および論文のデータとして使用することを口頭および書面で説明して同意を得た。また評価の途中であっても自由にやめることができ、それによる不利益が生じないことも説明した。基準飯およびマイタケ飯約 15 g ずつを試料とし、評価項目は「つや」、「硬さ」、「粘り」、「総合評価」とした。一方の飯を基準とし、もう一方の飯について、-2 点である「非常にない/非常にやわらかい/非常に悪い」から、+2 点である「非常にある/非常に硬い/非常に良い」までの 5 段階で評価させた。

(3) 飯の力学的物性測定

単軸圧縮・引張型レオメーター（テクスチャーアナライザー TA.XT plus, Stable Micro Systems Ltd.）を用いて岡留ら¹⁶⁾の報告に準じて、低・高圧縮2バイト法で飯の力学的物性（以下、「物性」と略する）を測定した。機器の試料台に飯粒を一粒置き、294 Nのロードセル、直径20 mmの円柱プローブを用い、飯粒を1.0 mm/秒で圧縮した。得られたテクスチャー曲線から、最大圧縮時の力を「硬さ」、引っ張り時の最大力を「粘り」と定義し、25%および95%圧縮時を、それぞれ粒表層および粒全体の力学特性とした。15粒分のデータを測定1回分とし、各条件において3回ずつ飯を調製して物性測定を行った。

(4) タンパク質量の測定

タンパク質の定量はLowry法¹⁷⁾を用い、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

(5) SDS-PAGE 分析

Laemmliの方法¹⁸⁾に従って電気泳動を行った。すなわち試料に等量のサンプルバッファーを加えて100℃で5分間加熱後、20 mAの定電流下で、3%ポリアクリルアミドの濃縮ゲルおよび15%アクリルアミドの分離ゲルを用いて分離させた。サンプル供試量は50 μLとした。泳動後、クマシーブリリアントブルーで染色し、各試料に含まれるタンパク質成分を検出した。また、11~245 kDaのプロテインマーカーを用いてタンパク質の分子量の同定を行った。

(6) 遊離アミノ酸の分析

試料を0.2 μmのフィルターに通し、0.02 N塩酸で適宜希釈し、L-8800A型高速アミノ酸分析計（日立ハイテクノロジーズ(株)）を用いて19種類（Asp, Thr, Ser, Asn, Glu, Gln, Gly, Ala, Val, Cys, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg, Pro）の遊離アミノ酸量を測定した。トリプトファンはピークが不明瞭であったため分析対象外とした。これらの19種類の遊離アミノ酸を合計したものを総アミノ酸量とした。

8. 統計解析

各測定は3回以上繰り返し、平均および標準偏差を求めた。統計処理は解析ソフトウェアSPSS ver. 24（日本IBM(株)）を用いてTukeyのHSD法による多重比較を行った。官能評価データは各試料のパネリストの平均点をGames-Howell法により多重比較検定を行った。いずれも有意水準は5%とした。

実験結果および考察

1. マイタケ抽出液のマイタケ濃度の検討および炊飯の温度履歴

炊飯液として用いるマイタケ抽出液を調製するにあたり、マイタケ濃度を0.25~2.50% (w/w)で検討した。その結果、1.25%以上では飯粒同士の付着性が強く見られ、通常食べる飯としては適さなかった。味や香りなども考慮し、マイタケ濃度を0.50%とした。

基準飯およびマイタケ飯の炊飯の温度履歴に違いは見られず、沸騰まで11.0±1.9分、沸騰継続時間は20.0±2.2分であった。

2. 飯の官能評価

コシヒカリおよびあさひの夢を試料としたマイタケ飯の官能評価結果をTable 1に示す。基準飯に比べると、コシ

Table 1 Sensory evaluation of cooked rice

	<i>Koshihikari</i>	<i>Asahinoyume</i>
Hardness	-0.32±1.03	-0.67±0.45*
Stickiness	0.71±0.56*	0.73±0.68*
Glossiness	0.24±0.43	0.75±0.60*
Overall acceptability	0.06±1.00	0.14±0.77

Values represent mean ± standard deviation. The score indicates the intensity of sensory characteristics of rice cooked with Maitake extract when the score of cooked rice with water is 0.00. * $p < 0.05$

Fig. 1 Textural properties of cooked *Koshihikari* rice grains immediately after cooking (0 h) and post refrigeration (14 h)

■ rice cooked with water; ▨ rice cooked with *Maitake* extract; ▤ rice soaked in *Maitake* extract and heated with water. The alphabets a, b, and c, indicate significant differences ($p < 0.05$) among the rice cooked with water, rice cooked with *Maitake* extract, and the rice soaked in *Maitake* extract and heated with water. X and Y indicate significant differences ($p < 0.05$) between the cooked rice with and without refrigeration.

ヒカリのマイタケ飯は粘りが有意に強く、あさひの夢では有意に軟らかく、つやおよび粘りが強いと評価された。自由記述より、両試料で認められたマイタケ飯の粘りは、わずかに弾性も感じられる「もちもちした感じの粘り」であることが示された。

3. 飯の物性測定

コシヒカリを用いて基準飯、マイタケ飯、およびマイタケ浸漬飯を調製し、炊飯直後および冷蔵後の物性を測定した。結果を Fig. 1 に示す。

炊飯直後において、マイタケ飯は基準飯に比べて粒全体の硬さ、粒表層の硬さ、粒表層の粘りが有意に低下し、マイタケ浸漬飯との間に有意な差は見られなかった。予備実験において、浸漬を水で行い、その後炊飯液を新しい水に替えて炊飯を行った飯の物性値は、基準飯との間に違いが見られなかったことを確認している（データ未掲載）。したがってマイタケ浸漬飯の物性測定結果は、20℃ 1時間の浸漬中にマイタケ抽出成分が米に作用した影響を捉えていることになる。炊飯直後のマイタケ飯とマイタケ浸漬飯に違いがなかったことから、1時間の浸漬だけでも米飯の物性に対するマイタケの影響が認められ、マイタケ抽出成分が飯の軟化および表層の粘りの低下に関与することが示された。

冷蔵後は3種の飯のいずれも、炊飯直後に比べて粒全体および粒表層の硬さの増加が見られた。3種の飯間で比較すると、14時間冷蔵したマイタケ浸漬飯の粒全体および粒表層の硬さは基準飯と同程度であり、マイタケ浸漬の影響が示されなかった。

コシヒカリは良食味米であり家庭で用いられることが多い。そこで次に外食産業で用いられる業務用の米への影響を調べることを目的として、あさひの夢を試料米とし、基準飯およびマイタケ飯間の比較を行った。炊飯直後および冷蔵後の物性測定結果を Fig. 2 に示す。

炊飯直後では、マイタケ飯は基準飯に比べて粒全体の硬さは低下し、表層の硬さは低い傾向 ($p=0.058$) にあった。

粒表層の粘りもコシヒカリと同様に、マイタケ飯は基準飯に比べて低下した。冷蔵後においても、マイタケ飯の粒全体の硬さは基準飯に比べて有意に低く、コシヒカリと同様の傾向が認められた。

これらの結果より、2種の米のいずれにおいても、マイタケ抽出液で浸漬、炊飯を行うことにより飯の硬さが低下し、冷蔵後にもその効果が見られることが示された。またマイタケ抽出液での米の浸漬のみでも炊飯後の物性改善がコシヒカリにおいて認められた。粘りにおいては、粒全体の測定値はマイタケの影響が見られず、粒表層はマイタケ炊飯により低下する結果となった。官能評価 (Table 1) で認められた粘りの違いは本実験における物性測定値では示されなかったが、官能評価においてマイタケ飯で感じられた「もちもちした感じの粘り」は特徴的なものであり、物性測定の条件についてはさらに検討する必要がある。

Watanabe ら¹⁹⁾ は古米を試料とし、アクチナーゼに米を浸漬後水洗いして炊飯した飯は、硬さが低下し粘りが増加したことを報告している。そして Arai ら²⁰⁾ は、このアクチナーゼ処理によりデンプンを胚乳細胞内に固定しているタンパク質が分解され、遊離澱粉量が増加したことが、粘りの増加に寄与したと考察している。大能¹⁴⁾ は古米に対して乾燥マイタケを添加することにより、米飯を軟らかく粘りのある性状に変化させたことを報告しており、本実験においても、マイタケ抽出液で炊飯した飯は硬さを低下させ、浸漬のみでも効果があることを確認した。これらの変化にはマイタケ由来のプロテアーゼの関与が考えられた。

4. 50℃浸漬により溶出した米タンパク質の定量

マイタケ由来のプロテアーゼが炊飯過程で米のタンパク質を分解していれば、炊飯液に分解物が溶出することが考えられる。そこで、マイタケ抽出液に米を50℃で1時間浸漬し、米からの溶出タンパク質量を求めた。その際にそれぞれの浸漬液にプロテアーゼ阻害剤である E-64、ロイペチン、ペプスタチンを添加した試料を調製し、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プ

Fig. 2 Textural properties of cooked rice grains of *Asahinoyume* immediately after cooking (0h) and after refrigeration (14h)

The captions for this figure are the same as Fig. 1.

ロテアーゼの関与について調べた。なお、金属プロテアーゼの阻害剤である EDTA については金属キレート剤であることから、溶出したタンパク質量を Lowry 法で測定することが不可能であった。結果を Fig. 3 に示す。米をマイタケ抽出液に浸漬した試料のタンパク質量については、マイタケ抽出液のみを 50℃ で 1 時間浸漬させて測定したときの液中のタンパク質量をブランクとして差し引いて求めた。

水浸漬ではプロテアーゼ阻害剤無添加とロイペプチン、ペプスタチン添加のタンパク質溶出量に違いはなく、E-64 はこれらに比べて有意に低かった。マイタケ抽出液での浸漬では、無添加、E-64 添加、ロイペプチン添加は水浸漬の約 2 倍の溶出量であり、ペプスタチンは水浸漬との間に有意な差が見られなかった。マイタケ抽出液の阻害剤添加試料間で比較すると、無添加およびロイペプチン添加に比べてペプスタチン添加は有意に低い値であった。

一般にエンドペプチダーゼは触媒機能によってシステインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼの 4 種に分類される。水浸漬では、システインプロテアーゼ阻害剤の E-64 添加は無添加よりもタンパク質量が減少したが同じくシステインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンでは減少が見られなかった。米内在性システインプロテイナーゼの活性は主として発芽期に認められている²¹⁾²²⁾ことから、水浸漬における米のシステインプロテアーゼの活性は考えられにくく、E-64 添加による溶出量の減少について、その理由は現時点では不明である。マイタケ抽出液での浸漬では、ペプスタチン以外では水浸漬よりもタンパク質の溶出量が多く、マイタケ中のプロテアーゼによるタンパク質の分解および溶

出促進が考えられた。これに対してペプスタチン添加により溶出量が水浸漬と同程度まで減少し、これはペプスタチン添加による影響、すなわちアスパラギン酸プロテアーゼによる分解が阻害されたことを示した。これらの結果より、米をマイタケ抽出液で浸漬すると、米のタンパク質がアスパラギン酸プロテアーゼにより低分子化されることが示された。マイタケには分子量 44 kDa、至適温度 65℃、至適 pH は 3.0 で、pH 2.5~6 でも安定性が見られるアスパラギン酸プロテアーゼが存在するため⁴⁾、この酵素が米のタンパク質を分解したことが考えられた。

5. 浸漬液溶出タンパク質の分子量分布

前述したように EDTA を用いた金属プロテアーゼによるタンパク質分解の確認は、溶出タンパク質の定量ではできなかった。そこで SDS-PAGE 分析による浸漬液中の溶出タンパク質の分子量分布から、金属プロテアーゼも含めたエンドペプチダーゼの関与について定性的に調べた。測定には EDTA ならびに Fig. 3 で有意差が示された E-64 およびペプスタチンを浸漬液に添加した試料を用いた。Fig. 4 に示すように、水に米を浸漬した試料では無添加 (RW) および EDTA 添加 (RW+ED) 間で違いが見られず、11~14 kDa、22~25 kDa、32 kDa 付近に鮮明なバンドが確認された。マイタケ抽出液のみを 50℃ で 1 時間インキュベートした試料 (M) には 46 kDa 付近に極めて鮮明なバンドが見られ、17 kDa 付近にもタンパク質が検出された。これらのタンパク質はマイタケ由来と考えられる。マイタケ抽出液に米を浸漬した試料 (RM) では、阻害剤添加の有無に関わらず、17 kDa、46 kDa 付近のタンパク質は同じように検

Fig. 3 Amount of rice protein in soaking solution with and without inhibitor

Soaking solution: □ water; ▨ Maitake extract.

Different letters, a, b and X, Y indicate significant differences ($p < 0.05$) among the soaking solution of water or Maitake extract.

Fig. 4 SDS-PAGE pattern of extracted proteins in the soaking solution

Lane (RW), soaked rice in water without inhibitor; lane (RW+ED), soaked rice in water with EDTA; lane (M), Maitake extract; lane (RM), soaked rice in Maitake extract; lane (RM+E), soaked rice in Maitake extract with E-64; lane (RM+P), soaked rice in Maitake extract with pepstatin; lane (RM+ED), soaked rice in Maitake extract with EDTA. The apply volume was 50 μ l into each lane.

出された。阻害剤無添加 (RM)、E-64 添加 (RM+E)、ペプスタチン添加 (RM+P) のマイタケ浸漬では、11 kDa 付近が濃くなり、無添加の米 (RW) で認められた 32 kDa 付近のタンパク質は 30-32 kDa に薄い複数のバンドで検出され、ゲルの下端にはタンパク質分解物である低分子のタンパク質が検出された。これらの 30-32 kDa の複数のバンドは EDTA 添加 (RM+ED) では 32 kDa の単一バンドとして濃くなり、一方、ゲル下端のタンパク質分解物を示す低分子のバンドが薄くなった。

著者らの既報²³⁾より水浸漬で見られた 11-14 kDa のタンパク質はアルブミン、グロブリンの混合、22-25 kDa 付近はグルテリン塩基性サブユニットならびにグロブリンの混合、30-32 kDa 付近のバンドはグルテリン酸性サブユニットであると考えられる。グルテリン酸性サブユニットのバンドが複数に見えるのは microheterogeneity によるもので、グルテリンがわずかにアミノ酸配列の一部が異なるポリペプチドの集合であることを示す²⁴⁾²⁵⁾。

水浸漬では EDTA 添加によるタンパク質の分子量分布の違いは見られず、米内在性の金属プロテアーゼの影響は考慮しなくていいことが示された。一方で、マイタケ抽出液浸漬の無添加、E-64 添加、ペプスタチン添加では、水浸漬に比べて 32 kDa のグルテリン酸性サブユニットのバンドが複数に分かれて薄くなり、ゲルの最下端にバンドが濃く表れた。それに対し、金属プロテアーゼの阻害剤である EDTA を添加したマイタケ抽出液浸漬ではこれらの変化が見られなかった。すなわち、32 kDa の米のグルテリン酸性サブユニットの一部がマイタケ由来の金属プロテアーゼにより分解され、低分子成分が生成されたことが示唆された。米のタンパク質は米粒外層に偏在しており²⁶⁾、主要タンパク質であるグルテリンは胚乳細胞内のデンプン粒の隙間に顆粒状で存在する。グルテリンは酸性サブユニットと塩基性サブユニットが SS 結合によりヘテロ二量体を形成しているが、ヘテロ二量体がさらに分子間の SS 結合を介して重合高分子化している²⁷⁾。顆粒状のグルテリンがデンプンの吸水、膨潤、糊化を物理的に妨げる²⁸⁾と考えられており、トリプシンによるグルテリンの分解、または還元剤によるジスルフィド結合の切断は、米粉の膨潤力の増加や米飯の硬さの減少、粘りの増加に寄与することが報告されている¹²⁾¹³⁾。したがって、Fig. 1 ならびに Fig. 2 で認められたマイタケ飯の軟化は、マイタケの金属プロテアーゼにより米のグルテリンが分解され、デンプンの膨潤、糊化が促されたことに因ると考えられた。

一方、グルテリン塩基性サブユニットを含む 22-25 kDa 付近のタンパク質においては、水浸漬では見られたバンドがマイタケ浸漬ではいずれの条件でも見られず、この理由については現時点では不明である。また Fig. 3 で示されたアスパラギン酸プロテアーゼによるタンパク質の分解への関与は、Fig. 4 の分子量分布には反映されなかった。岡田

ら²⁹⁾は SDS-PAGE 分析において、豚もも肉の筋原線維タンパク質、主としてミオシン重鎖がマイタケから調製した粗酵素液で分解されるが、分解物がバンドとして見られなかったことを報告し、マイタケのプロテアーゼによりミオシンが高度に加水分解された可能性を示唆している。マイタケには金属エキソペプチダーゼも存在し、エンドペプチダーゼならびにエキソペプチダーゼが連動してタンパク質をアミノ酸まで分解すると考えられている⁶⁾。Fig. 4 のゲル下端に低分子のタンパク質が見られたことから、マイタケの米タンパク質への影響はアミノ酸でも確認する必要があると考えられた。

6. 酵素阻害剤添加が溶出アミノ酸に与える影響

最後に米タンパク質に対するマイタケ由来のエキソペプチダーゼの関与を調べるために、浸漬液中の遊離アミノ酸量の測定を行った。Fig. 5 に示すように、水浸漬で米から溶出したアミノ酸濃度 (RW) に対してマイタケ抽出液中の濃度 (M) は約 4 倍であり、米をマイタケ抽出液に浸漬して溶出したアミノ酸濃度 (RM) はさらに高い値を示したが、EDTA 添加 (RM+ED) によりマイタケ抽出液中の濃度と同程度になった。すなわち、米タンパク質の分解によるアミノ酸の増加にはマイタケ由来の金属プロテアーゼの影響が大きいことが示され、Fig. 4 で示されたように、グルテリン酸性サブユニットが金属エンドペプチダーゼにより分解され、金属エキソペプチダーゼも作用して遊離アミノ酸が増加したと考えられた。

金属プロテアーゼにより増加した遊離アミノ酸の特徴を知るために、EDTA 添加マイタケ抽出液において米から溶出した遊離アミノ酸量から、EDTA 無添加の同条件で溶出したアミノ酸量を差し引き、これをマイタケの金属プロテアーゼにより増加した米由来の遊離アミノ酸とし、疎

Fig. 5 Concentration of free amino acid of rice in soaking solution

(RW), soaked rice in water without inhibitor; (M), *Maitake* extract; (RM), soaked rice in *Maitake* extract; (RM+ED), soak rice in *Maitake* extract with EDTA.

Fig. 6 Composition of free amino acid in the soaking solution of rice

The amino acids listed in order of hydrophobicity. Panel A indicates the amount of free amino acid released from the rice soaked in water. Panel B indicates the amount of free amino acids after subtracting the 'RM + ED' values from the 'RM' value. 'RM' represents the condition of soaking rice in Maitake extract, while 'RM + ED' represents the condition of soaking rice in Maitake extract with EDTA.

水性の強さ (Hydropathy index³⁰⁾) の順に並べたのが Fig. 6 である。米を水に浸漬させた条件で溶出した遊離アミノ酸の結果も併記する。水浸漬の結果 (Fig. 6A) は著者らの既報²³⁾ と一致し、アスパラギン酸およびアスパラギンの合計量、グルタミン酸およびグルタミンの合計量が著しく多く、アラニン、セリンが次いで多かった。一方、マイタケの金属プロテアーゼによる分解で増加した遊離アミノ酸 (Fig. 6B) は、疎水性度が低いアルギニン、リジン、グルタミンも多かったが、これら以外は疎水性度の増加と共に遊離アミノ酸量も増加する傾向が見られた。アミノ酸配列が既知のウマ心臓シトクロム C⁵⁾ やウシ酸化インシュリン B 鎖⁶⁾ を用いてマイタケ酵素による基質特異性を調べた報告では、エンド型の金属プロテアーゼはリジン結合部位を、エキソ型のアミノペプチダーゼはバリン、フェニルアラニン、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸を遊離させることが示されている。本研究の結果より、米タンパク質に対してもマイタケ由来の金属プロテアーゼによる加水分解の特徴が見られ、特に金属エキソペプチダーゼによる疎水性アミノ酸の遊離が明瞭に認められたことから、エンド型の金属プ

ロテアーゼと連動して炊飯過程の米のタンパク質分解および溶出を促進することが示唆された。

以上の結果より、マイタケ飯およびマイタケ浸漬飯で示された硬さの低下には、マイタケのエンド型、エキソ型の金属プロテアーゼによる米のグルテリン酸性サブユニットの分解が関与していると推察された。米タンパク質に対するアスパラギン酸プロテアーゼの関与も認められたが、この酵素が関与する明瞭な低分子化は分子量分布に認められなかった。

要 約

1. コシヒカリおよびあさひの夢を試料とし、マイタケ抽出液を用いて飯を調製した。官能評価では、水で炊飯した飯に比べてコシヒカリのマイタケ飯は粘りが強く、あさひの夢では軟らかく、つやおよび粘りが強いと評価された。物性測定ではいずれの品種においても粒全体の硬さが低下した。コシヒカリを試料とし、浸漬のみのマイタケ抽出液の利用でも飯の物性向上が見られ、浸漬および加熱の両方でマイタケ抽出液を用いることで冷蔵後の物性も改善した。
2. 米をマイタケ抽出液に 50℃ で 1 時間浸漬すると、米からの溶出タンパク質量が増加し、プロテアーゼ阻害剤のペプスタチン添加により溶出が抑えられた。浸漬液の SDS-PAGE 分析では、マイタケの金属プロテアーゼによるグルテリン酸性サブユニットの部分分解が認められた。さらに遊離アミノ酸の分析において疎水性アミノ酸が多く遊離していたことから、エンド型、エキソ型両方の金属プロテアーゼが炊飯時の米のタンパク質を分解し、飯の物性変化に関与していることが示唆された。

本研究を行うにあたり、マイタケ乾燥粉末試料をご提供頂きました (株)群馬マイタケセンターに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Yamazaki, T., Ito, N., Oshima, I., Iwamori, H., Hotta, Y., and Murayama, A. (2008). Tenderizing of meat by using *Maitake* (*Grifola frondosa*) extract with low temperature steam cooking. *Journal of Cookery Science of Japan (Nihon Chourikagaku Kaishi)*, **41**, 176–183.
- 2) Seguchi, M., Morimoto, N., Abe, M., and Yoshino, Y. (2001). Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) mushroom powder on bread properties. *J. Food Sci.*, **66**, 261–264.
- 3) 大野信子, 仁平佳奈, 小平了二 (1995). マイタケ (*Grifola frondosa* (Fr.) S.F.Gray) 子実体から溶出する加水分解酵素. 和洋女子大学紀要 家政系編, **35**, 11–19.
- 4) 木元幸一, 林あつみ, 草間正夫, 菅原龍幸, 青柳康夫 (1994). 卵白の加熱凝固に対するマイタケ中のプロテアーゼの影響. 日本栄養・食糧学会誌, **47**, 43–48.
- 5) Nonaka, T., Ishikawa, H., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., and

- Dohmae, N. (1995). Characterization of a thermostable lysine-specific metalloendopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete. *Grifola frondosa*. *J Biochem.*, **118**, 1014–1020.
- 6) Nishiwaki, T., Asano, S., and Ohyama, T. (2009). Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 605–609.
- 7) 竹生新治郎, 渡辺正浩, 杉本貞三, 酒井藤敏, 谷口嘉廣 (1983). 米の食味と理化学的性質の関連. 澱粉科学, **30**, 333–341.
- 8) 竹生新治郎, 渡辺正浩, 杉本貞三, 真部尚武, 酒井藤敏, 谷口嘉廣 (1985). 多重回帰分析による米の食味の判定式の設定. 澱粉科学, **32**, 51–60.
- 9) 柳瀬 肇, 大坪研一, 橋本勝彦, 佐藤裕保, 寺西敏子 (1984). 米タンパク質含量と米飯テクスチャーならびに炊飯特性. 食総研報, **45**, 118–12.
- 10) Arai, E., Aoyama, K., and Watanabe, M. (1993). Enzymatic improvement of the cooking quality of aged rice: A main mode of protease action. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 911–914.
- 11) 新井映子, 渡辺道子 (1994). 高圧処理および酵素処理によるインディカ種米飯のテクスチャー改変. 日本食品工業学会誌, **41**, 619–626.
- 12) Ohno, T., Tomatsu, M., Toeda, K., and Ohisa, N. (2007). Texture of cooked rice prepared from aged rice and its improvement by reducing agents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2912–2920.
- 13) Derycke, V., Veraverbeke, W.S., Vandepuutte, G.E., De Man, W., Hoseney, C., and Delcour, J.A. (2005). Impact of proteins on pasting and cooking properties of nonperboiled and perboiled rice. *Cereal Chem.*, **82**, 468–474.
- 14) 大能俊久 (2010). マイタケ (*Grifola frondosa*) による米飯テクスチャーの改良. 秋田県総合食品研究センター報告, **12**, 24–28.
- 15) 寺下隆夫, 山田陽子, 吉川賢太郎, 獅山慈孝 (1997). マイタケ菌床栽培後の廃培地における加水分解酵素類の活性. 近畿大学農学部紀要, **30**, 33–40.
- 16) 岡留博司, 豊島英親, 須藤 充, 安東郁男, 坂口憲治, 堀末登, 大坪研一 (1998). 米飯1粒の多面的物性測定に基づく米の食味評価. 日本食品科学工学会誌, **45**, 398–407.
- 17) Lowry, O.H., Rosenbrough, G.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- 18) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- 19) Watanabe, M., Arai, E., Honma, K., and Fuke, S. (1991). Improving the cooking properties of aged rice grains by pressurization and enzymatic treatment. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2725–2731.
- 20) Arai, E., Aoyama, K., and Watanabe, M. (1993). Enzymatic improvement of the cooking quality of aged rice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 911–914.
- 21) Abe, K., Kondo, H., and Arai, S. (1987). Purification and properties of a cysteine proteinase from germinating rice seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1509–1514.
- 22) Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H., and Arai, S. (1991). Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J. Biol. Chem.*, **266**, 16897–16902.
- 23) Ohishi, K., Kasai, M., Shimada, A., and Hatae, K. (2003). Effect of acetic acid added to cooking water on the dissolution of proteins and activation of protease in rice. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4054–4059.
- 24) Sugimoto, T., Tanaka, K., and Kasai, Z. (1991). Heterogeneity in subunit composition of glutelin in rice protein bodies. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 273–274.
- 25) Wen, T.N. and Luthe, D.S. (1985). Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiol.*, **78**, 172–177.
- 26) 堀野俊郎, 森 隆, 孫 鐘録, 田島 真 (1992). モチ種およびウルチ種米粒の層別成分特性. 日本作物学会紀事, **61** (別2), 53–54.
- 27) Sugimoto, T., Tanaka, K., and Kasai, Z. (1986). Molecular species in the protein body II (PB-II) of developing rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3031–3035.
- 28) 森高真太郎, 安松克治 (1972). 精白米のSH基と貯蔵中の品質劣化との関係: 穀類に関する研究 (第10報). 栄養と食糧, **25**, 59–62.
- 29) 岡田昌己, 西山一朗 (2015). プナシメジに含まれるプロテアーゼの筋原線維タンパク質分解作用. 日本家政学会, **66**, 19–24.
- 30) Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132.

(令和2年3月16日受付, 令和2年5月27日受理)