

〈一般研究課題〉 愛知県産の発酵食品における新規生体保護成分の研究

助成研究者 中部大学 金政 真



愛知県産の発酵食品における新規生体保護成分の研究

金政 真
(中部大学)

Bioprotective ingredients in fermented foods from Aichi prefecture

Shin Kanamasa
(Chubu University)

Abstract :

Compatible solutes are components that protect cells from stress such as desiccation and high temperature. A kind of compatible solutes has been confirmed to be produced in bacteria. In this study, it was investigated by LC-MS/MS method whether traditional fermented foods of Aichi prefecture (natto, miso, soy sauce) contained the compatible solute. Since it was assumed that these samples contained a large amount of contaminants, a pretreatment method for the samples was developed prior to LC-MS/MS analysis. We have successfully detected the compatible solute from natto and miso. The compatible solute was detected in soybeans from Aichi prefecture, which are the plant raw materials of these fermented foods.

1. はじめに

生物は様々な環境ストレスから細胞を保護するために、ストレスの種類に応じた防御機構を有している。浸透圧ストレスは塩や糖などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動すると同時にナトリウムイオンなどホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。これを防ぐため、生物は様々な適合溶質 (compatible solute) を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。

適合溶質は、菌株ごとに異なり多岐にわたるだけでなく、細胞内で生合成して蓄積される主要な適合溶質の量と種類が、環境中の塩濃度に応じて変化することが知られている(1)。例として、高

度好塩菌の*Actinopolyspora halophilaide*では、15%以下の塩濃度では、トレハロースとベタインが適合溶質として蓄積されるが、24%の塩濃度ではベタインの生合成のみが誘導される(2)。また、同じく高度好塩菌である*Natronococcus occultus*では、トレハロース誘導体である2-スルホトレハロースが適合溶質として生合成される(3)。このように、多種多様に生合成される適合溶質であるが共通する特性として、細胞内に高濃度蓄積しても生理活性を阻害しない浸透圧調節物質として機能できる点や生体膜、生体分子の構造および活性を維持する保護機能に優れている点が挙げられる。また、適合溶質はタンパク質に直接作用するのではなく、溶質周囲の水分子の性質を変化させることで、その立体構造を保護すると考えられている(4)。

エクトイン(図1)は、好塩細菌*Ectothiorhodospira halochloris*等の細菌に存在する適合溶質の一種である(5)。エクトインは環状アミノ酸構造の双性イオンであり、水に対し強い親和性を有しエクトイン分子の周りの水分子は長期間安定することが知られている(6)。細胞外の塩濃度依存的に細胞内エクトイン濃度が調整されることで浸透圧耐性に貢献している。エクトインはタンパク質、核酸、細胞膜等の生体高分子を安定化することにより、様々なストレスから細胞を保護すると考えられている。エクトインはその特性を活かして、タンパク質安定剤、化粧品添加物などにも応用されている。エクトインは細胞成分を保護するヒートショックプロテインを誘導する機能や、経口投与により消化器の炎症を抑える作用も報告されており、これらの機能利用も期待される。エクトインの工業生産には好塩細菌*Halomonas elongata*が用いられているが、高塩濃度での培養による生産設備の劣化が課題となっている。

エクトインは、これまでバクテリアでのみ存在が知られてきたが、我々は独自に開発した高感度分析法(7)を用いることで、愛知県の特産である味噌や醤油などの発酵食品生産に不可欠な麹菌(コウジカビ)の一種もエクトインを生産することを初めて報告した(日本農芸化学会 2018 年度大会発表)。この発見により、本菌を用いて造る発酵食品にもエクトインが含まれると期待されるが、分析に基づいた知見は皆無である。これら発酵食品にエクトインの含有が判明すれば、新規機能性が期待されると同時に、新産業創生につながる。例えば新商品として、醸造法の工夫によりエクトイン成分を強化した味噌・醤油や、これらのエキスを添加した化粧品などが考えられる。我々の高感度分析法を駆使して発酵食品のエクトイン含有に関する知見を得て、愛知県産製品の普及につながると同時に人々の健康増進に貢献したいと考えた。

そこで本研究では、味噌や醤油の原料である大豆(ダイズの種子)や、ダイズに共生する細菌である根粒菌に着目し、我々が改良した液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)分析法を用いてエクトインの検出を試みた。またカビのエクトイン生合成についての研究の第一歩としてゲノム解析も実施した。

2. 試料および実験方法

2.1 試料および使用した微生物

本研究で分析した試料である乾燥大豆、納豆、味噌、醤油は市場から調達した。微生物はダイズ

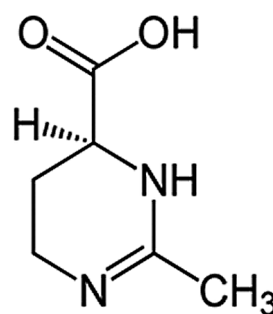


図1. エクトインの構造

根粒菌*Bradyrhizobium japonicum*およびコウジカビと同じアスペルギルス属で我々が主に有機酸の代謝解析を行ってきた糸状菌(カビ)の一種である*Aspergillus terreus* IF06365株を微生物保存機関から入手した。

2.2 LC-MS/MS分析試料の調製方法

乾燥大豆の分析試料は次のように調製した。ビニール袋に乾燥大豆を入れてペンチを用いて碎き、これと10 mm径のステンレスビーズ2個を破碎用チューブに入れ、2500 rpmにて30秒間ホモジナイザー(ビーズ破碎機 ビーズクラッシャー μ T-12、タイテック製)にて破碎した。15 mLチューブに破碎された大豆を0.1 g量り、次のようにBligh-Dyer法(8)の変法を用いて抽出した。メタノール、クロロホルム、超純水を10:4:4の比率で混合した混合液を作製し、15 mLチューブに破碎した菌体を0.1 g量り取り、これに混合液を2.28 mL加え、ボルテックスミキサーで3分間激しく攪拌した。その後、クロロホルムと超純水をそれぞれ680 μ L加え、ボルテックスミキサーで5分間激しく攪拌した。攪拌後、4°C、8000 rpmの条件で3分間遠心分離を行い、分離した水層をマイクロチューブに移して分析試料とした。納豆の分析試料は次のように調製した。50 mLチューブに納豆を入れ、一晩冷凍させてから凍結乾燥機を用いて24時間凍結乾燥し、これを乳鉢で粉末にした。15 mLチューブに試料を0.1 g量り取り、Bligh-Dyer法を用いて分離した水層をマイクロチューブに移して分析試料とした。味噌の分析試料は次のように調製した。凍結乾燥させた味噌を乳鉢にて粉末にした。0.1 g量り、Bligh-Dyer法により水層を分離した。さらに精製するために固相抽出を行い、分析試料とした。醤油の分析試料は次のように調製した。超音波ホモジナイザーにて均一に分散させた醤油を0.1g量り、Bligh-Dyer法を用いて分離した水層をマイクロチューブに移し、次いで前処理として固相抽出した抽出液を分析試料とした。

根粒菌の分析試料は次のように調製した。Bacto Yeast Extract 1 g、D(-)-マンニトール 5 g、リン酸水素二カリウム 0.7 g、リン酸二水素カリウム 0.1 g、硫酸マグネシウム七水和物 1 g (/L)からなる液体培地に植菌し、28°C、140 rpm/minにて振とう培養した。培養後、15 mLチューブに培養液を5 mL採取し、遠心分離機を用いて10000 rpm、3分間の条件で細胞を沈殿させた。この作業を繰り返して集菌した。これを-80°Cで凍結し、24時間凍結乾燥してから乳鉢にて破碎し、Bligh-Dyer法を用いて分離した水層をマイクロチューブに移して分析試料とした。いずれの試料も使用溶媒で10倍希釈し、フィルター濾過してからLC-MS/MSで分析を行なった。

2.3 LC-MS/MS分析

エクトインおよび関連化合物のLC-MS/MS分析はGL Sciences社製のLC800とAB SCIEX社製のAPI4000を接続したシステムで行った。カラムには高極性化合物の分離に定評のあるペンタフルオロフェニルプロピル基を有するInertSustain PFP (ϕ 2.1 x 150 mm, GL Sciences)を用い、展開溶媒には(A)0.10%ギ酸水溶液と(B)0.10%ギ酸アセトニトリル溶液を使用した。試料溶液を5.0 μ L注入し、カラム温度40°C、流速0.20 mL/minでグラジエント溶出(A液:100% (0-6 min) - 20% (11-16 min) - 100% (18-23 min))を行った。溶出物のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法で行い、陽イオンを検出した。イオン化におけるネブライザーガス、ヒーターガス、カーテンガス、衝突ガスの圧力はそれぞれ80 psi、80 psi、8.0 psi および20 psi、イオンスプレー電圧は5000 V、

ヒーターガス温度は700℃とした。測定は多重反応モニタリング(MRM)で行い、エクトイン、ヒドロキシエクトイン、2,4-ジアミノ酪酸に対する定量イオンとしてそれぞれm/zが142.9 > 68.0、159.0 > 83.1、119.1 > 56.1 のイオン(プレカーサーイオン > プロダクトイオン)を観測した。

2.4 カビのゲノム解析

A. terreus IF06365株をポテトデキストロース培地にて24時間培養して回収し、凍結した。次いで、凍結乾燥機を用いて乾燥させ、ジルコニアボールおよびジルコニアビーズを用いてホモジナイザーで破碎した。NucleoSpin Plant II(タカラバイオ製)を用いて、破碎した菌体からゲノムを抽出し、ゲノム解析に供した。次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析方法の詳細は参考文献9に記載した。

3. 実験結果

3.1 大豆のLC-MS/MS分析

納豆や味噌、醤油の原料である大豆に含まれるエクトインの測定を行った。エクトインのほか、細菌においてエクトイン生合成の前々駆体として知られる2,4-ジアミノ酪酸およびエクトインから合成される5-ヒドロキシエクトインについても測定を行った。その結果、3.75 µg/gのエクトインを検出することができた。エクトインのクロマトグラムを図2に示す。2,4-ジアミノ酪酸および5-ヒドロキシエクトインは検出されなかった(データは示さず)。

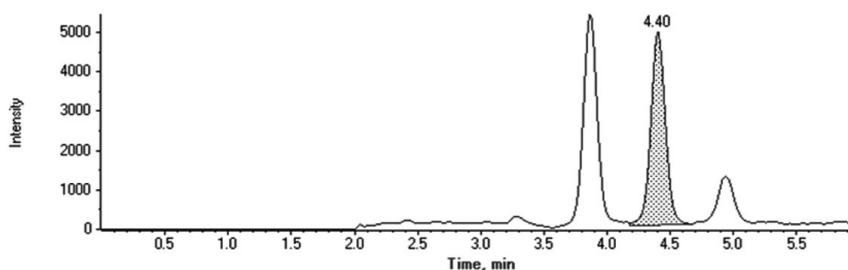


図2. LC-MS/MSで検出された大豆のエクトイン(保持時間4.4分)のクロマトグラム

3.2 納豆のLC-MS/MS分析

納豆に含まれるエクトイン、2,4-ジアミノ酪酸、5-ヒドロキシエクトインの測定を行った。その結果、原料である大豆よりも高濃度の43.8 µg/gのエクトインが検出された。エクトインのクロマトグラムを図3に示す。ほかにも55.5 µg/gの2,4-ジアミノ酪酸が検出されたが、5-ヒドロキシエクトインは検出されなかった(データは示さず)。

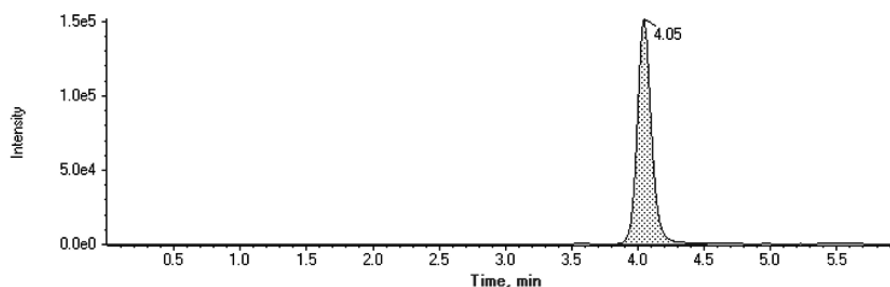


図3. LC-MS/MSで検出された納豆のエクトイン(保持時間4.05分)のクロマトグラム

3.3 味噌のLC-MS/MS分析

味噌に含まれるエクトインの測定を行った。味噌は夾雑物と塩分が多く含まれるため高感度分析が困難なことが予想されたためカラムによる簡易精製を前処理に加えた。その結果、原料である大豆よりも高濃度の33.0 $\mu\text{g/g}$ のエクトインが検出された。エクトインのクロマトグラムを図4に示す。

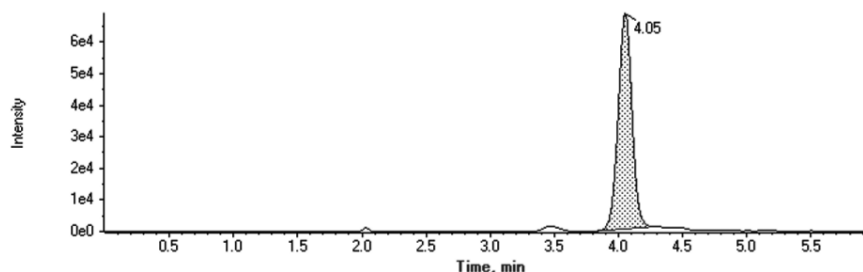


図4. LC-MS/MSで検出された味噌のエクトイン(保持時間4.05分)のクロマトグラム

3.4 醤油のLC-MS/MS分析

醤油に含まれるエクトインの測定を行った。醤油は油分などの夾雑物と塩分が多く含まれるため高感度分析が困難なことが予想されたためカラムによる簡易精製を前処理に加えた。LC-MS/MS分析の結果、明確なピークを検出することが出来なかった(データは示さず)。前処理法により改善するものか、あるいは醤油にエクトインがほとんど含まれないのかは現時点では判断できず、今後の課題である。

3.5 根粒菌のLC-MS/MS分析

本研究により、大豆からエクトインが検出された。しかし、大豆のゲノムには、細菌において知られているエクトイン合成遺伝子と類似の遺伝子配列は存在しない。そこで、ダイズの根の根粒に共生する細菌である根粒菌が関与している可能性を調べるために、根粒菌細胞内の代謝物をLC-MS/MS分析した。本研究では根粒菌に含まれるエクトイン、2,4-ジアミノ酪酸、5-ヒドロキシエクトインの測定を行った。その結果、エクトインは714.9 ng/g の存在を確認できた。エクトインのクロマトグラムを図5に示す。ほかにも、2,4-ジアミノ酪酸は20.0 $\mu\text{g/g}$ 、5-ヒドロキシエクトインは90.6 ng/g 含まれていた(データは示さず)。このことから、根粒に存在する根粒菌がダイズにエクトインを供給している可能性が考えられた。

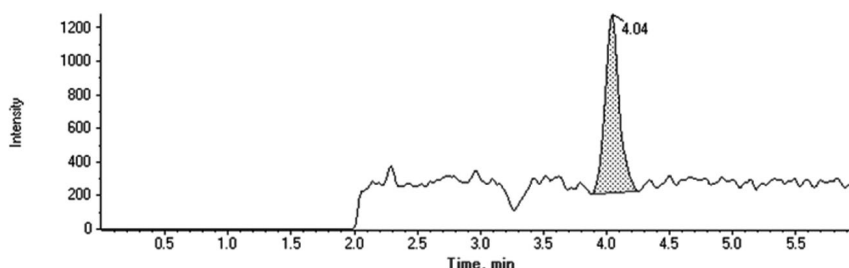


図5. LC-MS/MSで検出された根粒菌のエクトイン(保持時間4.04分)のクロマトグラム

3.6 カビのゲノム解析

エクトイン生産生物のゲノム情報は醸造時に発酵食品に供給されるエクトインについての知見を得るための基本データとなる。そこで、我々がエクトインを生産することを発見したコウジカビの近縁種である *A. terreus* IFO6365株のゲノム解析を実施した。本菌のドラフトゲノム配列を決定し、

データベース (GenBank/ENA/DDBJ) に accession number BLJY00000000 (contig accession numbers BLJY01000001 ~ BLJY01000023)、SRA/DRA/ERA accession number は DRA009452として登録した。詳細は本研究期間中に専門誌にて発表した(9)。

4. まとめ

本研究では市販の納豆や味噌、醤油、またそれらの原料である大豆に含まれるエクトインおよび関連化合物の分析を行った。また、ダイズ根粒菌についても分析した。その結果、大豆および納豆、味噌、根粒菌からそれぞれエクトインが検出された。特に大豆を原料とする製品である納豆や味噌にエクトインが高濃度で含まれることが判明した。また、根粒菌がダイズにエクトインを供給している可能性が考えられる結果を初めて得ることができた。本研究により、我が国の伝統的な醸造食品の新規機能性の開発につながると期待される成果を得ることができた。

謝辞

本研究は、筆者と中部大学応用生物学部応用生物化学科 堤内要先生、金沢大学医薬保健研究域薬学系高橋広夫先生、各研究室に関係するメンバーによる共同研究である。

参考文献

- (1) 仲山英樹(2012) 創立90周年記念企画 特集 好塩菌の塩ストレス適応機構とその応用, 日本生物工学会誌 11, P.667-669.
- (2) Nyysölä A, Leisola M. (2001) *Actinopolyspora halophila* has two separate pathways for betaine synthesis. Arch Microbiol. 176, 294-300.
- (3) Desmarais D, Jablonski PE, Fedarko NS, Roberts MF. (1997) 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. J Bacteriol. 179, 3146-3153.
- (4) Street TO, Bolen DW, Rose GD. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. Proc Natl Acad Sci USA. 103, 13997-14002.
- (5) Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper HP. (1985) 1, 4, 5, 6-Tetrahydro- 2-methyl- 4-pyrimidinecarboxylic acid. Eur J Biochem. 149, 135-139.
- (6) Yu I, Jindo Y, Nagaoka M. (2007) Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: direct interaction and hydration alteration. J Phys Chem B. 111, 10231-10238.
- (7) 堤内 要, 佐々木雅史, 三浦章寛, 早川優希, 金政 真. (2018) エクトインの重水素化による安定同位元素標識化合物の調製, 中部大学生物機能開発研究所紀要 19, 87-93.
- (8) Bligh EG, Dyer WJ. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37, 911-917.
- (9) Takahashi H, Minami T, Okabe M, Park EY, Fujimoto T, Takahashi A, Murase M, Fukuyoshi S, Satou K, Kanamasa S. (2020) Draft genome sequence of the *Aspergillus terreus* high-itaconic-acid-productivity strain IFO6365. Microbiol Resour Announc. Doi: 10.1128/MRA.00080-20.