

研究助成報告

平成28年度研究助成による研究報告

研究報告

胃がんリスクファクターである活性酸素種と ピロリ菌に対する味噌抽出成分の効果

荒木 智之¹, 瀬尾 誠²

Effects of Miso extraction components on reactive oxygen species and *H. pylori*,
a strategic risk factor for gastric cancer

Tomoyuki ARAKI¹, Makoto SEO²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Saitama Medical University,
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama, 350-0495, Japan.

²Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University,
1 Sanzo, Gakuen-cho, Fukuyama, Hiroshima, 729-0292, Japan.

【緒言】

申請者は平成27年度の本研究グラントによる助成によって、味噌成分が胃癌のリスクファクターである活性酸素種を減少させるかについて研究を進めた。同時に味噌成分が持つ胃癌細胞の増殖抑制効果についての検証を行った。その結果、ある種の味噌抽出液が胃癌細胞の増殖を抑制し、細胞死に向かわせることを示唆するデータを得た。平成28年度の研究では、ピロリ菌と味噌との関係を明らかにすることにより、味噌による胃癌抑制効果について検証をおこなうことを目的とした。

これまでの癌に係る知見では、癌の発生に繋がる原因は活性酸素種によるDNA障害であるとされているが、特に日本人においては胃癌の重要なリスクファクターとして、ピロリ菌（ヘリコバクター・ピロリ）による胃壁の障害（胃潰瘍）とそれに伴う胃上皮細胞の再生の過程でおこるDNAの複製エラーが挙げられている。また、ピロリ菌から胃上皮細胞内に打ち込まれるCagAタンパク質が胃細胞の増殖を引き起こすことが明らかとなっている¹⁾。また、それら以外にもピ

ロリ菌による様々な胃癌誘発機構が明らかになってきており、胃癌の予防にはピロリ菌の除染が極めて重要であるとされている^{2),3),4)}。今年度の研究助成においては、味噌成分がもつピロリ菌に対する感染予防効果（除染効果）、増殖抑制効果、遺伝子タンパク質作用について検証することによって、味噌がもつ胃癌の発症抑制効果について研究を行ったのでその結果を報告する。

【材料と方法】

1) 味噌試料

実験動物に投与する味噌汁は、中央味噌研究所より供与いただいた、米みそ9種、豆みそ1種、麦みそ2種を各々10g秤量し、90℃の蒸留水100mlで溶いたものを味噌試料液とした。微生物検定の実験では、味噌10gを下記ピロリ菌増殖培地100mlに懸濁し0.45μmのフィルターで濾過したものを用いた。味噌の濃度は先行研究⁵⁾に従った。味噌試料は少量づつ小分けし、-30℃で保存した。

2) ピロリ菌

ピロリ菌は麻布大学獣医学部微生物学第一研究室の内山淳平先生から分与いただいた *Helicobacter pylori* strain 26695 を用いた。ピロリ菌の培養は、10%馬血清（ハイクローン社製）と10 μ g/mlバンコマイシン（ナカライテスク社製）を含むブルセラブロス（ベクトン・ディッキンソン社製）培地（ピロリ菌増殖培地）上でおこなった。培養にはアネロパック（スギヤマゲン社製）を用い、酸素濃度6~12%、二酸化炭素濃度5~8%の微好気環境、37 $^{\circ}$ Cでおこなった。

3) 実験動物

実験動物は4週齢のオスのスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) を用いた。通常の飼育環境で3個体ずつの集団飼育をおこない、味噌汁の投与は自由飲水によりおこなった。

4) タンパク質の抽出とウェスタンブロッティング

対数増殖期にあるピロリ菌の培養液と味噌懸濁液を1:1で混合し、6時間経過後の培養液をタンパク質抽出の材料とした。ピロリ菌はプロテアーゼインヒビターカクテル（シグマ社製）を含むNP40リンスバッファー【150 mM NaCl, 1% NP40, 50 mM Tris-HCl (pH8.0)】で溶解した。タンパク質濃度はBCA reagent kit（サーモフィッシュサイエンティフィック社製）で行った。抽出したタンパク質50 μ g分を8%のポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によって分離し、PVDF膜（ミリポア社製）に転写した。転写膜は0.3%のスキムミルクでブロッキング後、抗CagA抗体（オーストラルバイオロジカルズ社製）、HRPを付加したヤギ抗ラビットIgG抗体で反応させた。シグナルの検出はChemi-doc（バイオラッド社製）でおこなった。

5) スナネズミ胃中のピロリ菌数の測定

スナネズミをエーテルによって麻酔後、胃を切除し、胃内容物の除去をおこなった。次に滅菌済みのPBSとともにダウンスホモジナイザーで胃組織を破碎し、試料液とした。この試料液を10倍~1000倍に希釈したものをピロリ菌選択培地（日水薬品社製）に塗布し、3日後にコロニー数をカウントすることによっておこなった。

【結果と考察】

1) 食塩と味噌による増殖期のピロリ菌への影響

多目的コホート研究の結果より、高塩分食と胃癌との関係が示唆されている⁶⁾。味噌汁は通常で約1%程度の食塩を含む食品であり、このコホート研究の結果を勘案すると味噌は胃癌のリスクファクターとなる。この可能性を検証するため、ピロリ菌増殖の食塩による影響を解析した。対数増殖期にあるピロリ菌を0~2%のNaClを含むピロリ菌増殖培地にO.D.₆₀₀=0.06になるように懸濁し、37 $^{\circ}$ C、微好気環境下で振盪培養をおこなった。図1Aに示すとおり、5時間毎の測定では0~1.5%の間で増殖速度に大きな差は見られなかった。また、2%の濃度では~25時間の間で増殖が強く抑制されたが、30時間まで培養したところ、最終的な濁度は他の濃度のもので変わりなかった。この結果より、通常の味噌汁の摂取によって期待される塩分濃度ではピロリ菌の増殖に影響がないことが示唆された。また、短時間の高濃度塩分の暴露はむしろピロリ菌の増殖を抑制する（即ちがんに対し抑制的に働く）可能性が示唆された。

微生物は増殖期にある時と停止期にある時で細胞活動を大きく変化させることが一般的であるため、味噌によるピロリ菌への影響も増殖期と停止期とで個別に検証する必要がある。そのため、まずは増殖期にあるピロリ菌の味噌による影響を調べた。【材料と方法1】で記した味噌-ブルセラ培地混合液にO.D.₆₀₀=0.1相当のピロリ菌を懸濁し~12時間、37 $^{\circ}$ C、微好気環境下で培養した後、一部をピロリ菌選択培地に塗布しコロニー数をカウントすることによりピロリ菌数を比較した。結果図1Bに示すとおり、増殖期にあるピロリ菌は味噌の存在下で最大25%程度の細胞数の低

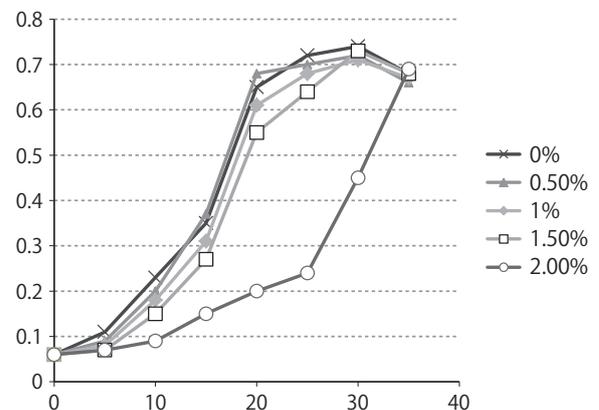


図1A. ピロリ菌増殖の食塩による影響

下を引き起こした（培養12時間後の時点において）。しかし、短時間（1時間未満）の暴露によっては影響

が殆どないか、あるいはいくつかの味噌においては幾分増殖率が上昇した。

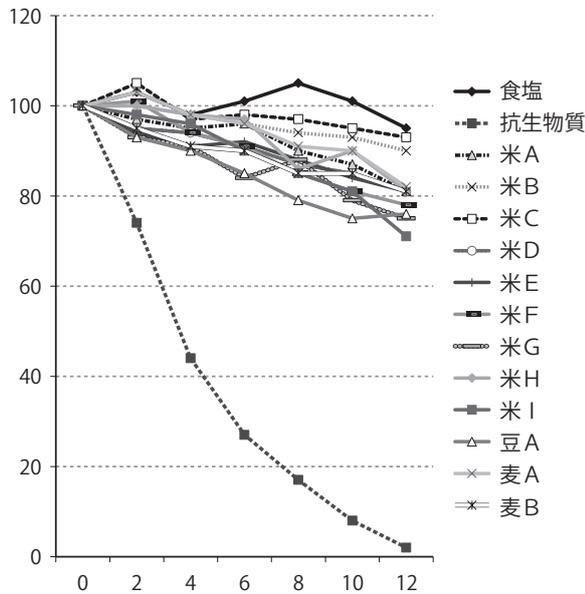


図1 B. 増殖期にあるピロリ菌に対する味噌試料液の影響

縦軸は対照区（ブルセラ培地に他のサンプルと同量の水を添加したもの）の細胞数を100とした時の相対値

2) 味噌が停止期のピロリ菌の生存率に与える影響

次に、細胞周期を停止している（停止期にある）ピロリ菌に対する味噌の影響を調べるため、培養後20時間後のピロリ菌培養液を味噌試料液に懸濁し、2時間後のピロリ菌生存率をコロニーカウント法によって測定した。結果2に示すとおり、対象区（水）に対し、1% NaCl（食塩水）では～5%程度の生存率の減少を認めた。また、味噌試料液に浸したものでは、最大で12%程度の減少を認めるものがあったが、その一方で4%程度上昇するものがあった。全体としては対象区に対して低下傾向にはあるものの、大きな差は認められなかった。

3) 味噌がピロリ菌CagAタンパク質の発現に与える影響

上記の結果より、長時間の味噌試料液の暴露によりピロリ菌は生存率を低下させる傾向にあることが明らかとなった。しかし、他方でNaClはピロリ菌の胃癌（細胞分裂）を誘導するタンパク質CagAの発現を上昇させることが知られている（図3A⁷⁾。図3Aに示すとおり、CagAタンパク質の発現量はNaCl濃度依存的に上昇する（NaCl 1%では0%の約20倍程

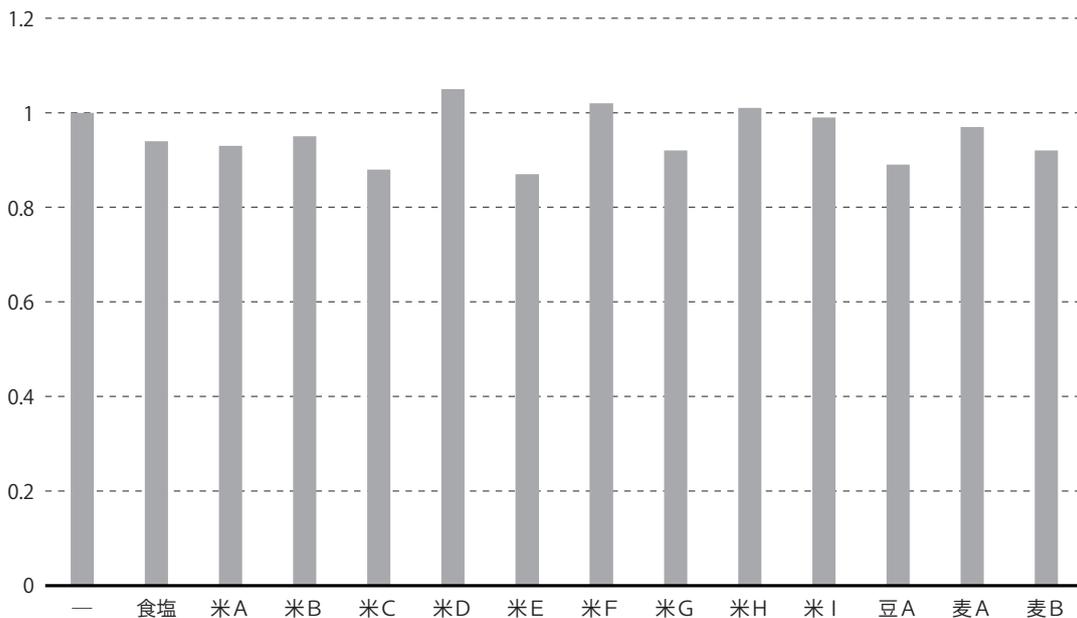


図2. 停止期にあるピロリ菌に対する味噌試料液の影響

縦軸は対照区（水）との相対値

度)。この結果に関連して、味噌によるCagAタンパク質の発現量の変化を測定したところ、1% NaClに晒したピロリ菌のCagA発現量に対して多くの味噌品種でCagA量の低下を認めた (<15%)。これによって、同量の塩分 (NaCl) を摂取する場合においても、味噌汁として摂取することによってCagAの発現をある程度抑える効果が期待されることが示唆された。

4) 味噌汁によるピロリ菌感染数の変化

モデル生物として頻繁に使用されるげっ歯類はピロリ菌に対して耐性があり、多くのものはピロリ菌感染試験に用いるのに適当ではない。しかし、スナネズミはヒトと同じくピロリ菌に感受性があり、感染試験に用いられるモデル生物である。本実験において、ピロリ菌をスナネズミに適合させるため、スナネズミの胃中で2世代に渡り継代したものを感染実験に用いた。

スナネズミを各区3匹づつに継代済みピロリ菌を摂取し、感染が確認された後、自由飲水による味噌試料液 (味噌汁) の投与を2週間続けた。その後、胃中のピロリ菌数をカウントしたのが図4Bである。結果が示すとおり、各味噌試料液の投与による有意なピロリ菌数の変化は認められなかった。

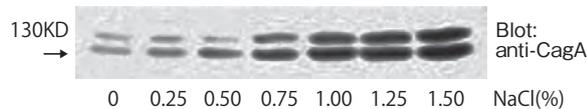


図3 A. NaCl添加によるCagA発現量の変化

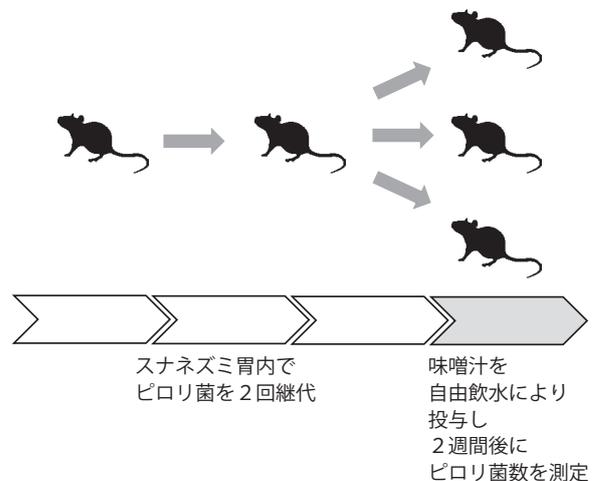


図4 A. ピロリ菌の定着と実験のスキーム

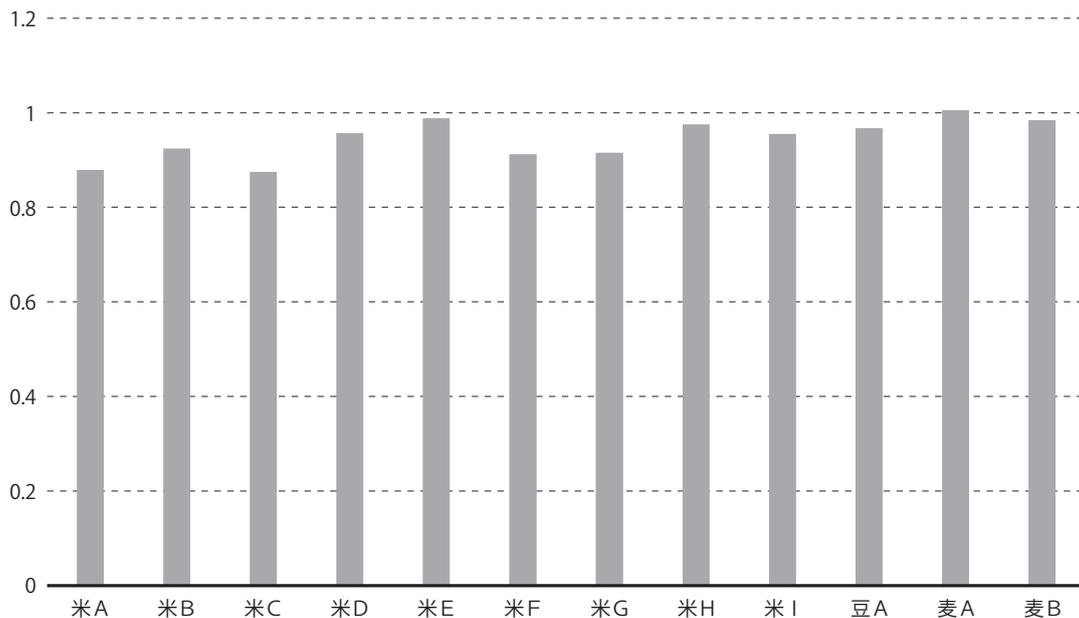


図3 B. 味噌添加によるCagA発現量の変化
縦軸はピロリ菌を1% NaClに晒した時のCagA量の相対値

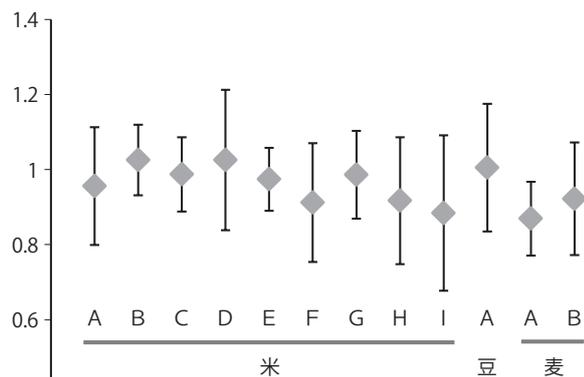


図4 B. 2週間後のピロリ菌数
縦軸は味噌試料液の代わりに水を飲水させた時のピロリ菌量との相対値

【総括と今後の展望】

今回の研究結果より、i) 多くの味噌抽出液の存在下で増殖期・停止期両方のピロリ菌が生存率を低下させることが明らかとなり、また、ii) 同等の塩分を含む液体に浸した時に比べ、味噌試料液に浸した場合にはピロリ菌の毒性タンパク質であるCagA量の発現が抑えられることが明らかとなった。しかし、i) に関しては、この効果は長時間の味噌試料液の暴露によって観察されることであり、(食事のような)味噌汁の短時間の暴露での効果は認められなかった。また、ii) の効果に関しては、同等の塩分摂取と比較した場合にはCagA量の低下が認められた。このことから、同等の塩分を摂取する場合には味噌汁として摂取することが胃癌の抑制につながる可能性が示唆される。今回、スナネズミを使った *in vivo* 試験では有意な差は得られなかったが、長期間・幅広い味噌サンプルで試験することにより、より具体的な味噌とピロリ菌、更に胃癌との関係を明らかにできると考えている。

【引用文献】

- 1) Science 2002;295:683-686
- 2) Nature Med 2007;13:470-476
- 3) Cancer Res 2010;70:1430-1440
- 4) PNAS 2011;108:14944-14949
- 5) 瀬尾誠, 荒木智之, 村越隆之, 慢性拘束ストレスによる脳機能低下を改善する味噌中の生理活性ペプチドの探索, 中央味噌研究所研究報告, 第36号
- 6) Am J Clin Nutr 2010;91:456-464
- 7) Cancer Res 2007;67:4709-4715

研究報告

味噌による DNA 損傷抑制効果

石田 万里¹, 坂井 千恵美¹, 田代 聡², 粟井 和夫³, 石田 隆史⁴

The effect of Miso on radiation-induced DNA damage

Mari ISHIDA¹, Chiemi SAKAI¹, Satoshi TASHIRO², Kazuo AWAI³, Takafumi ISHIDA⁴¹Department of Cardiovascular Physiology and Medicine,²Research Institute for Radiation Biology and Medicine,³Department of Diagnostic Radiology, Hiroshima University,

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan.

⁴Department of Cardiovascular Medicine, Fukushima Medical University,

1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-1295, Japan.

【背景と目的】

2004年のLancet誌に、医療先進国15カ国の年間のエックス線検査件数は、単位人口あたりで日本が世界一多く、日本ではがんの3.2%が医療被曝、特に画像診断における放射線被曝に起因すると推測される、との報告がされた¹⁾。しかし、その一方で放射線被曝の少ない国よりも平均余命は長く、各種画像診断によって疾病が早期に発見されるなどメリットがデメリットを上回っているとも考えられる。したがって放射線検査をむやみに控えるよりも、検査を行う際に受ける被曝の影響を低減させる新たな方法を見つけることが、より重要な課題と言える。

放射線の影響とは、細胞内でラジカルが生じることによって化学結合が切断されたり分子の酸化が生じ、DNAの切断が起こることである。したがって抗酸化作用をもつ成分が放射線の影響を減弱させる可能性がある²⁾。本研究の目的は、放射線被曝による障害を薬品などではなく、抗酸化作用をもち古来十分に安全性が認められている味噌という食品によって防御できるか否かを明らかにすることにある。

【方法】

(1) 味噌の抽出

味噌は中央味噌研究所より供与された米味噌3種(米味噌, 米味噌(白), 米味噌(麴入り)), 麦味噌2種, 豆味噌1種を使用した。味噌の成分の抽出方法として、①リン酸緩衝液で溶解し抽出 ②リン酸緩衝液で溶解後トリクロロ酢酸を用いた蛋白沈殿を行う方法 ③メタノールを用いた抽出を試みたが、手順の煩雑さ、抽出液中の塩分濃度、浸透圧等を鑑み、メタノールを用いた抽出法を選定した。これまでの報告を参考に³⁾、各味噌10gを20mLのメタノールに溶解し、濾紙で濾過後、0.20μmセルロースアセテートフィルター(DISMIC®-28CP, ADVANTEC, 東洋濾紙)を通して滅菌した。

(2) 細胞

培養細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用した。細胞はhEGF(組換えヒト上皮細胞成長因子)、ヒドロコルチゾン、ウシ胎児血清、VEGF(血管内皮細胞成長因子)、hFGF-B(組換えヒト繊維芽細胞成長因子、塩基性)、ヘパリン、R3-IGF-1(イ

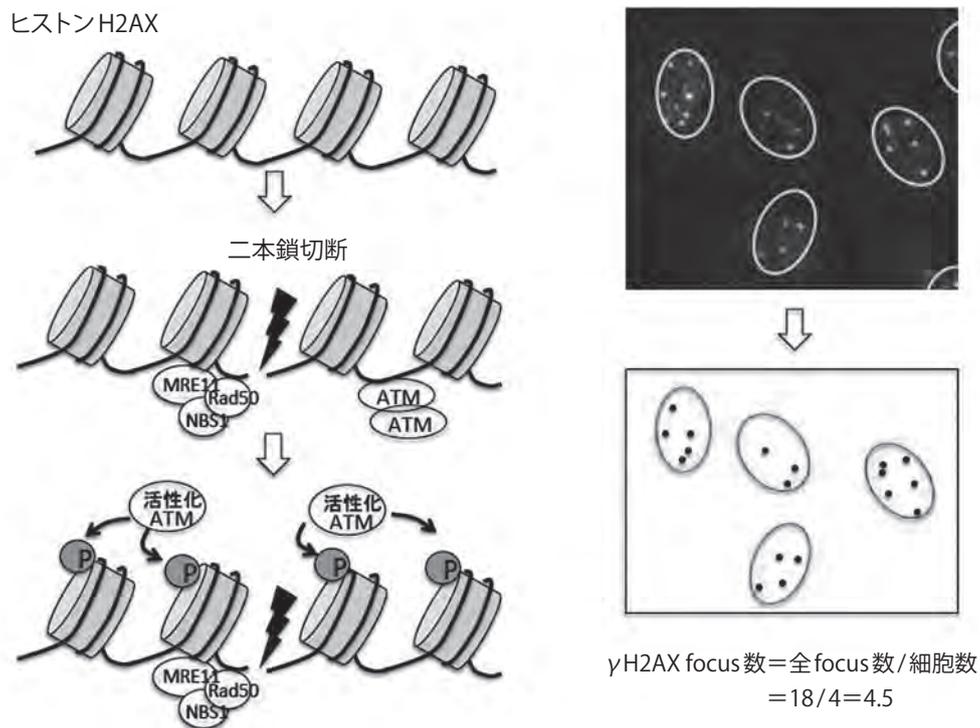


Figure.1 γ H2AX focus のできる機序と γ H2AX focus 数の算出法

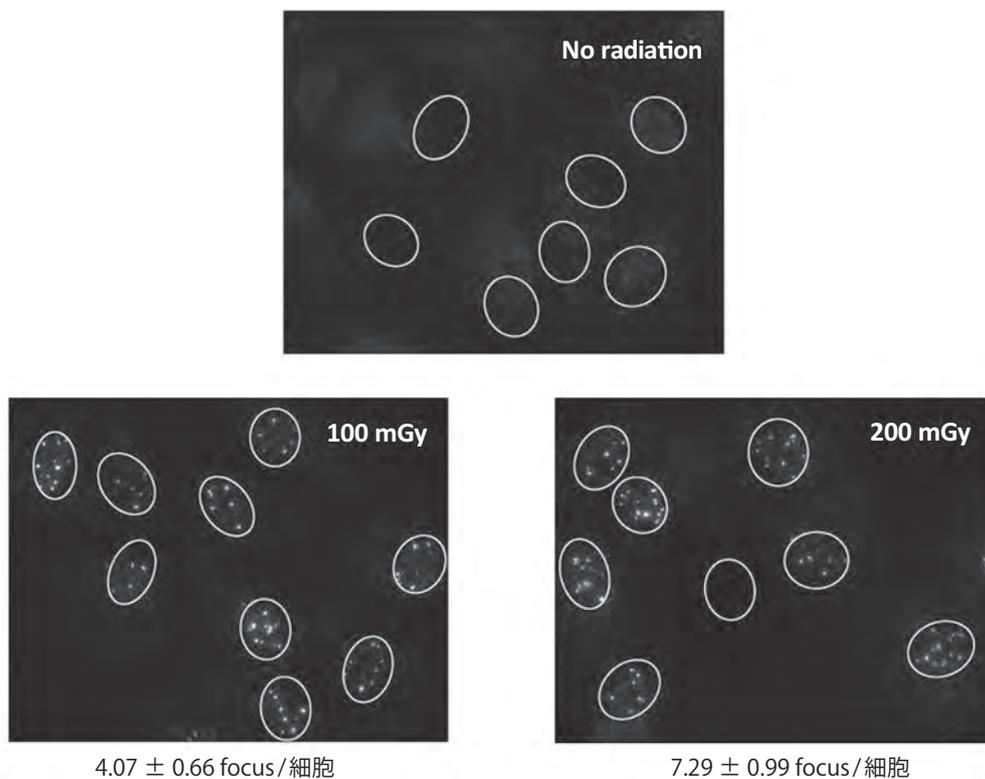


Figure.2 放射線照射量と γ H2AX focus 数

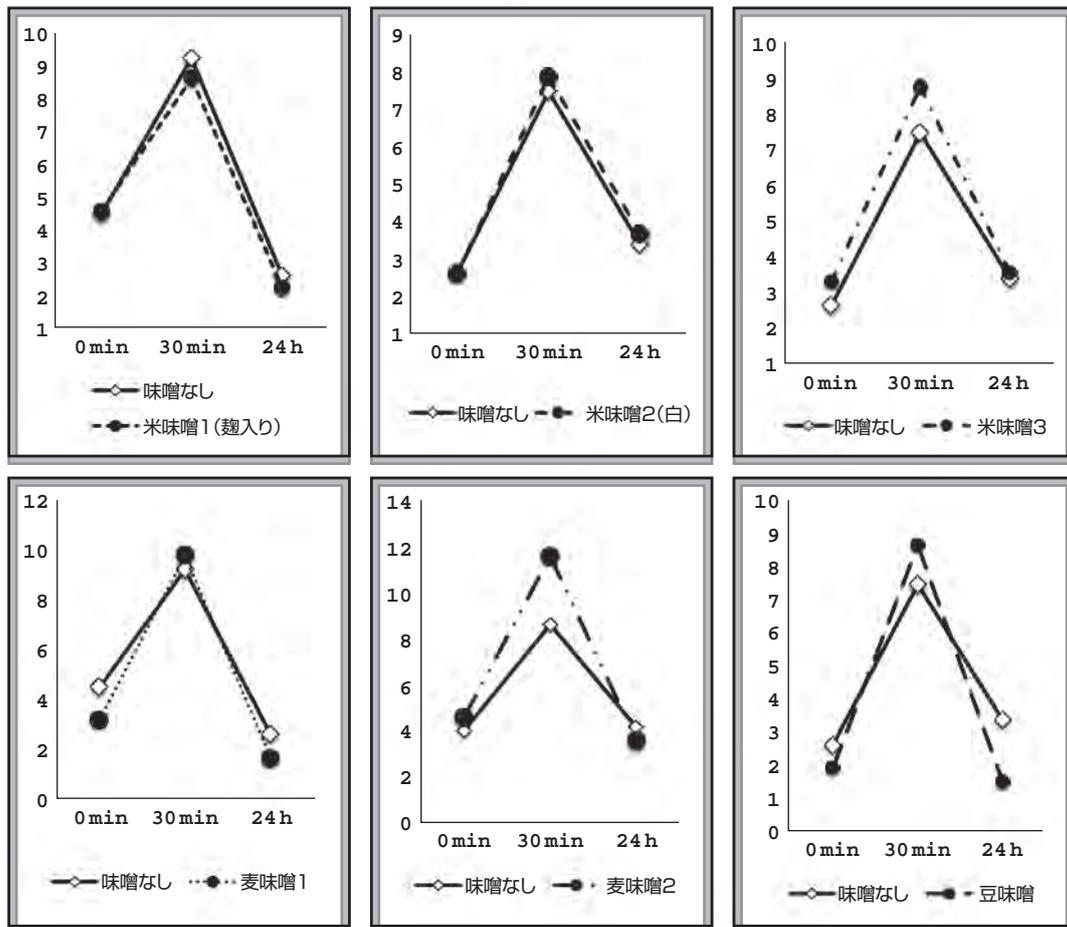


Figure.3 放射線照射後のγH2AX focus 数の変化および各味噌の効果 (一例)

ンシュリン様成長因子), アスコルビン酸, GA-1000 (ゲンタマイシン, アンホテリシン-B)を加えた内皮細胞基本培地-2 (EBM®-2)を用いて, 37°C, 5% (v/v) CO₂の条件下で培養した。

(3) DNA 損傷刺激

HUVECを22 x 24 mm カバーガラスに播種し, 接着後メタノール抽出した味噌を添加し24時間後に, X線照射装置CP-160を用いてX線を照射した。

(4) DNA 損傷の程度の評価

DNA 損傷とくに二本鎖切断が生じると傷周辺のヒストンH2AXは直ちにリン酸化される (Figure.1)。これを利用し, DNA 損傷の程度はリン酸化H2AX (γH2AX)の抗体を用いた蛍光免疫染色により評価した⁴⁾。X線照射後30分 (最大DNA 損傷時), 24時間 (DNA 修復後)に細胞を4%パラフォルムアルデ

ヒドにより固定し, γH2AX抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。Zeiss社 Metapherを用いて画像を撮影し, 細胞核内のDNA damage focusの数をカウントした。細胞100個分の平均値を算出し, 溶媒 (メタノール)のみを添加したコントロールと比較した。

【結果と考察】

(1) 放射線照射量の決定

最近の医療被曝とくにCTは低線量放射線により画像を得る技術が進歩している。その照射量によるものと同等のDNA 損傷量を得るため, 100 mGy, 200 mGyの放射線照射を行い, DNA 損傷の程度を比較した。最近の低線量肺CTによってできるDNA 損傷 (γH2AX focus数)は3.30 ± 2.4個/細胞, 今回の実験のX線照射装置による照射100 mGyで4.07

± 0.66個/細胞, 200 mGyで7.29 ± 0.99個/細胞 (Figure.2) であることから, 本実験では100 mGyを照射量として選択した。

(2) 味噌によるDNA損傷抑制効果

ヒト内皮細胞に放射線100 mGyを照射すると, 味噌の有無にかかわらずγH2AX focus数は30分後に増加し, 24時間後にはほぼ前値に戻った (Figure.3)。各味噌を投与した際のγH2AX focus数の変化の一例をFigure.3に示す。

放射線照射前 (0 Gy), 100 mGy照射後30分, 100 mGy照射後24時間において, 味噌を投与していない細胞のDNA損傷量を100とした場合のみそ投与群のDNA損傷の程度をFigure.4に示す。

放射線照射後30分においては米味噌 (麴入り) のみがDNA損傷を有意に抑制していた。照射後24時間では, 麦味噌1と豆味噌においてDNA損傷が有意に抑制されていた。

以上より, 麴入り米味噌は放射線照射直後のDNA損傷の生成を抑制し, 麦味噌1および豆味噌は生じたDNA損傷の修復を促進すると考えられた。

放射線照射は酸化ストレスを生じることによりDNA損傷を引き起こすので, 麴入り米味噌は抗酸化作用によってDNA損傷の生成を抑制した可能性がある。DNA損傷が生じると, ataxia-telangiectasia mutated (ATM) などのキナーゼが活性化され, DNA損傷修復にいたるDNA損傷応答の活性化が引

き起こされる。今後, このDNA損傷の生成抑制やDNA損傷修復の促進にいたる分子メカニズムを明らかにしていきたい。また, 培養細胞において味噌がDNA損傷抑制効果を有することが明らかとなったので, 動物やヒトの生体内における放射線の影響が味噌によって抑制されるか否かを検討したい。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり, 味噌サンプルのご提供ならびに平成28年度研究助成を頂きました一般社団法人中央味噌研究所をはじめ各関係者の方々に深謝申し上げます。また本研究の実施に協力して下さった, 広島大学医学部医学科学生平川稔明君に感謝致します。

【文献】

- 1) Berrington de Gonzalez A and Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet (London, England)*. 2004;363:345-51.
- 2) Xiao R, Su Y, Simmen RC and Simmen FA. Dietary soy protein inhibits DNA damage and cell survival of colon epithelial cells through attenuated expression of fatty acid synthase. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;294:G868-76.
- 3) Teranaka T, Ezawa, M., Matsuyama, J., Ebine, H., and Kiyosawa, I. Inhibitory effects of extracts from rice-koji miso, barley-koji miso, and soybean-koji miso on the activity of angiotensin I converting enzyme. *Nippon Nogeikagaku Kaishi (in Japanese)*. 1995;69:1163-1169.
- 4) Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y and Yoshizumi M. Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PloS one*. 2014;9:e103993.

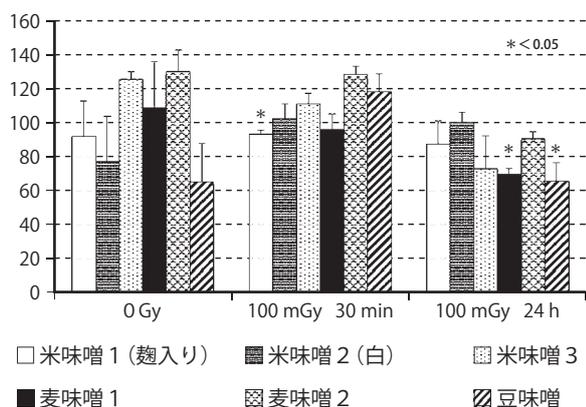


Figure.4 放射線照射後のγH2AX focus数における味噌の効果

研究報告

味噌降圧機能性物質発現機構の解明と
味噌製造への応用に関する研究

上原 誉志夫

Expression process of potent antihypertensive substance(s) in Miso and
manufacturing application to strengthen the benefits

Yoshio UEHARA

*Division of Clinical Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University,
2-2-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-8437, Japan.*

はじめに

味噌には食塩感受性を抵抗性に変換する新規抗高血圧物質（降圧機能性物質）が存在することをみだしてきた。味噌に含まれる降圧物質は複数存在するが、このうち分子量3k～5kDa分画中にある降圧物質を同定しその特性を明らかにするとともに、本分画中の降圧物質に注目し、HPLC上で物理化学的に定量化する方策について検討した。また、全国各地で製造される味噌中に存在する本降圧物質の含有量を定量測定する可能性を検討した。さらに、製造工程と降圧物質発現との関連性を検討した。

1. 味噌による高血圧抑制効果（表1）

長期味噌摂取が血圧に及ぼす影響については、これまでの動物実験での研究を通して、含有される食塩による昇圧反応性が減弱されること、それには味噌に含まれる腎Na利尿促進物質と循環血液経由の血管弛緩性物質が関係することを報告してきた¹⁾⁻⁴⁾。

昇圧反応性についてみると、味噌には摂取された食塩の30～50%の減塩効果があること、味噌の降圧作用は食塩感受性高血圧のみならず自然発症高血圧の抑制

作用もあることをみだしている。このように、動物実験からは味噌中に降圧物質の存在にすることが明らかであり、味噌摂取が高血圧発症に影響しないと結論された。

一方、ヒトでの血圧への影響については、5年間の横断的観察研究からは、一日1～3杯のみそ汁摂取は正常血圧者及び正常高値血圧者の血圧に影響しないことを報告した⁵⁾。さらに、最近、ヒトでの二重盲検平行比較介入試験を実施し、3ヶ月間の一日2杯の味噌汁摂取は、正常血圧者及びステージⅠの高血圧症患者での血圧値に影響を与えないことを初めて報告した（図1）⁶⁾。

このように、味噌摂取による血圧への影響はないことが、動物実験に引き続きヒトでも明確に実証された。これらのことは、味噌中の降圧物質がヒトでも有効であることを強く示唆している。したがって、降圧物質の同定とそれを強化した味噌製造の重要性が示唆される。これらを背景に、複数あると考えられる味噌中降圧物質の一つに焦点を合わせ、その抽出と定量法、その意義について検討した。

表 1. 味噌と血圧に関する研究成果

研究系	主な成績	文献	
動物実験	Dahl食塩感受性高血圧	味噌汁摂取による高血圧抑制効果。 30%減塩効果	Yoshinaga M et al: Nutrition 2012;28(9):924-931. 文献(1)
	Dahl食塩感受性高血圧	腎Na利尿による食塩感受性抑制効果	Du D et al: Clin Exp Hypertens 2014;36(5):359-366. 文献(2)
	Dahl食塩感受性高血圧	腹腔内及び皮下投与による血圧抑制因子	Shimizu N et al: Food and Nutrition Sciences 2015;6(8):693-702. 文献(3)
	SHRsp/Izm	自然発症高血圧における ACE 阻害活性強化味噌による降圧強化	内川実紗等：ACE 阻害活性強化短期熟成試験味噌の自然発症高血圧における有効性. 第63回日本栄養改善学会学術総会/青森 文献(4)
臨床研究	5年間横断的観察研究	味噌汁摂取回数は正常血圧～正常高値血圧に影響しない	作山裕恵等：習慣的味噌汁摂取が血圧に及ぼす影響～5年間の観察研究. 日本食品機能性学会誌 文献(5)
	短期介入試験	味噌汁摂取回数は正常血圧に影響しない	
	長期介入試験	通常味噌と ACE 阻害強化味噌は正常～ステージ I 高血圧に影響しない	北川学等：長期味噌摂取が血圧および代謝に与える影響—二重盲検ヒト比較介入試験— 薬理と臨床 2016;44(11):1601-1612. 文献(6)

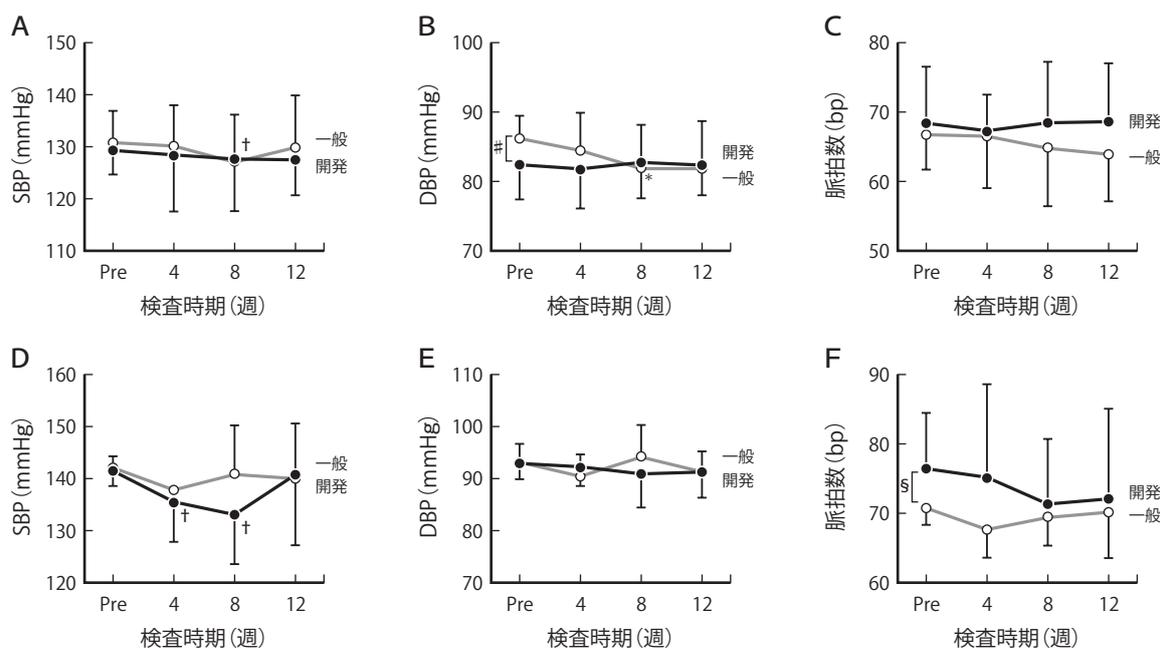


図 1. 12週間のヒト介入試験の結果

上段は正常血圧者, 下段は正常高値からステージ I 本態性高血圧者。A, Dは収縮期血圧, B, Eは拡張期血圧, C, Fは脈拍数を示す。†p<0.05 vs pre (開発), *p<0.05 vs pre (一般), #, §p<0.05 開発 vs 一般

2. 味噌中の降圧物質

味噌に含有される降圧物質については、経口摂取での降圧機能性と腹腔内・皮下投与による降圧機能性物質に分けて考えられる。経口摂取下には腎Na利尿を伴う。一方腹腔内・皮下投与では50 mg/日という微量でも降圧機能性を発揮するが、Na利尿は伴わず、さらに分子量で分けて調べると<3kDaと3kDa<のいずれにも降圧機能性が存在することが分かっている³⁾。<3kDaにはACE阻害活性が存在するが、他にも多くの物質が存在することが予想され、降圧物質の探査には向いていない^{4),7)}。したがって、予備的には3kDa<中の降圧活性物質に注目するのが適切と考えた。

味噌粗上清と3k~5kDaのC₁₈逆相HPLCの分離パターンを示す(図2)。ピーク高からも分かるように3k~5kDaには上清に比較して0.1~1%の物質しか含まれていない。しかし、3k~5kDaのHPLC解析では約70種類の物質が分離され、この中に降圧活性を示すものが存在する。日本全国での地域味噌からACE阻害活性の異なる7種類を選択し、これらの味噌3k~5kDa上清を作成し、ラット腹腔内に投与して2時間と4時間後の血圧降下を測定した。さらに、この分画をC₁₈逆相HPLCにより分離しRtごとのピーク高を計測して、降圧活性とピーク高との関係性をPearsonの単相関法により解析した。その結果ピーク高と有意な逆相関関係を示す2分画が抽出され、そのうち腹腔内投与後4時間まで強い降圧活性を示すRt17.5 minの分画に注目した。

3. 日本全国の味噌における降圧物質

3k~5kDa中のRt17.5の物質について、各種味噌での含有量を測定した。はじめに、各種30種類の味噌の粗分画と3k~5kDa分画についてC₁₈逆相HPLCで分析した。Rt17.5のピーク高(p)、面積(a)の一覧を表2に示した。Rt17.5でのピーク高または面積について粗分画と3k~5kDa分画との間には一定の関係が見られず、粗分画は3k~5kDaの量を反映しないと結論された。Rt17.5近辺の多くは分子量<3kDaにあり、分子量3kDa<でカットすることでRt17.5の降圧物質を定量することが可能となる。なお、ニコチアミンのRtは2.67、イソフラボンであるダイゼンは14.39、グリシチンは14.91、ゲニスチンは15.99であり、Rt17.5の物質はこれらの機能性物質とは異なるものと考えられる(図3)。

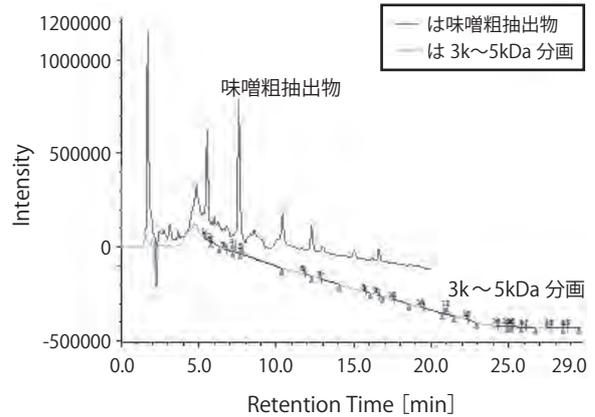


図2. 味噌抽出物のHPLC溶出分画

表2. Rt17.5のピーク高(p)とピーク面積(a)

tR①@3kDa-		tR②@3kDa-		tR③@3kDa-	
p	a	p	a	p	a
0	0	1114	113	0	0
0	0	699	67	0	0
0	0	753	71	0	0
0	0	3358	279	0	0
409	37	0	0	0	0
724	70	0	0	130	15
0	0	991	99	0	0
0	0	765	76	0	0
0	0	963	91	0	0
1164	113	0	0	0	0
2681	223	0	0	0	0
0	0	1119	116	0	0
0	0	977	94	0	0
1111	106	0	0	0	0
0	0	1432	110	0	0
659	67	0	0	0	0
4112	305	0	0	2243	213
0	0	0	0	1709	161
0	0	0	0	2208	199
0	0	0	0	1927	186
0	0	0	0	1345	118
0	0	0	0	3436	282
0	0	876	82	0	0
0	0	1092	95	0	0
0	0	1523	135	0	0
0	0	1443	128	0	0
0	0	569	53	0	0
0	0	3716	303	0	0
0	0	914	87	0	0
0	0	585	48	0	0
0	0	691	70	0	0

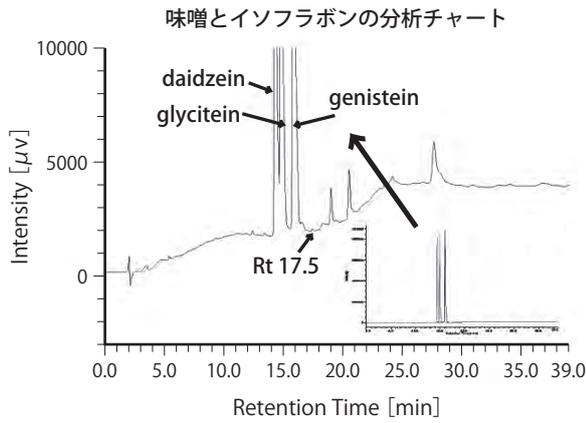


図3. 味噌の降圧成分とイソフラボン

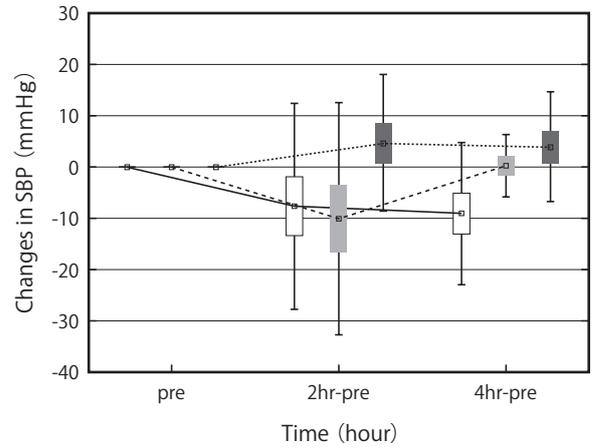


図4. Rt17.5 分画の降圧効果

■ は 0, ■ は 1443, □ は 3358 μV の味噌を表す。

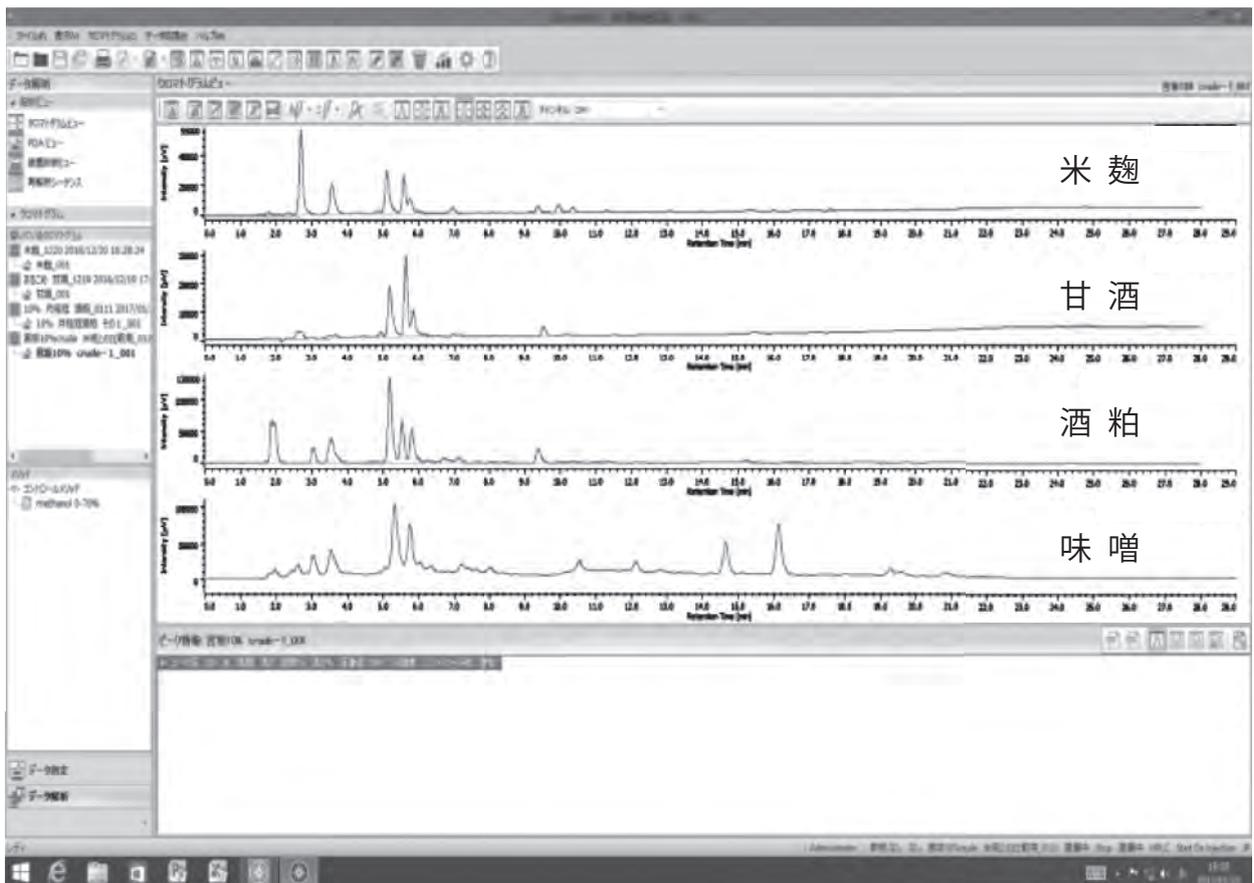


図5. 米麴関連食品のクロマトグラム

上段から米麴, 酒麴, 甘酒, 味噌のクロマトグラムを示す。

3k～5kDaのRt17.5ピーク高についてみると、0から最大37160 μ Vまで分布していた。Rt17.5のピーク高を測定することで味噌の降圧活性が評価できるか、0、1443及び3358 μ Vを示す3種類の味噌について3k～5kDa分画を作成し、その降圧活性を測定した(図4)。Rt17.5が0 μ Vの味噌では2時間、4時間共に血圧は低下せず、Rt17.5が1443 μ Vの味噌では2時間値が、3358 μ Vでは2と4時間値が共に低下し、降圧活性が強いことが示された。

したがって、3k～5kDaの抽出分画のC₁₈逆相HPLCでのRt17.5のピークを測定することで、味噌の降圧活性の一部を評価することが可能といえる。

4. 降圧機能性物質の構造決定

味噌に含まれる降圧機能性物質の一つが同定されたことから、3k～5kDaでのRt17.5ピーク高が最大の味噌を用いてこの分画を分取し、単離したものを用いてMSによる構造決定を実施する予定となっている。分子量が3kDa以上であることから、ペプチドや糖鎖の結合体が考えられるため、慎重な解析が必要とされる。

5. 味噌とNa利尿因子

ところで、味噌水の経口投与により腎Na利尿作用と食塩感受性高血圧の抑制がみられるが、味噌の原料である米麴を原料とする酒粕水や甘酒においても腎Na利尿効果と自然発症高血圧の抑制効果がある⁸⁾。図5には、比較のためにこれらのクロマトグラムを示す。これからも明らかなように、極性が高い部位の溶出パターンは、味噌も酒粕、甘酒も同様のクロマトグラムを示す。味噌にみられる溶出が遅れる部位には、酒粕と甘酒には溶出がみられない。

このことは、味噌でみられるRt17.5の降圧成分は大豆の発酵に由来する可能性が高いと考えられた。一方、味噌にみられる腎Na利尿物質は、米麴菌に由来することが強く示唆された。

終わりに

味噌には、腎Na利尿活性、食塩感受性高血圧抑制活性、自然発症高血圧抑制活性などが存在し、これらの総合的な効果でヒトにおいても食塩感受性を抑制して血圧に影響を与えないことが明らかになった。味噌

の降圧機能性は、大豆のみならず米麴菌での発酵にも依存するものであり、機能性物質も複数存在する。今回その中で、大豆に由来すると考えられる分子量3k～5kDaにある降圧機能性物質について単離に成功した。本因子の構造決定は今後待つ必要があるが、物理化学的な定量が可能となったことから、味噌の降圧機能性の一部について簡便に評価することができ、味噌製造への応用へ繋げることができるものと考えられる。

文 献

- 1) Yoshinaga M, Toda N, Tamura Y, Terakado S, Ueno M, Otsuka K, Numabe A, Kawabata Y, Uehara Y: Japanese Traditional Miso Soup Attenuates Salt-induced Hypertension and its Organ Damage in Dahl Salt-sensitive Rats. *Nutrition* 2012;28(9):924-931.(doi:10.1016/j.nut.2011.09.010.)
- 2) Du D, Yoshinaga M, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y: Blood Pressure Reduction by Japanese Traditional Miso is Associated with Increased Diuresis and Natriuresis through Dopamine System in Dahl Salt-sensitive Rats. *Clinical Experimental Hypertension Clin Exp Hypertens.* 2014;36(5):359-366. <http://dx.doi.org/10.3109/10641963.2013.827702>. Epub 2013 Sep 18.
- 3) Shimizu N, Du D, Sakuyama H, Ito Y, Sonoda M, Kawakubo K, Uehara Y: Continuous Subcutaneous Administration of Miso Extracts Attenuates Salt-Induced Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Food and Nutrition Sciences* 2015;6(8):693-702. doi: 10.4236/fns.2015.68072.
- 4) 内川実紗, 佐々木玲子, 山川称子, 上原誉志夫, 小池祥悟, 北川学, 山本哲郎: ACE阻害活性強化短期熟成試験味噌の自然発症高血圧における有効性. 第63回日本栄養改善学会学術総会.一般演題(口頭) 2016年9月9日, 15:00~16:12, B会場(小会議室(4) [3階]) リンクステーションホール青森
- 5) 作山裕恵, 立崎成葉, 南茂彩, 山田薫, 上原誉志夫: 習慣的味噌汁摂取が血圧に及ぼす影響~5年間の観察研究~The influence of intake off daily Miso soup on blood pressure in humans-The results of 5-year observational study- *日本食品機能性学会誌* 2017;10(6):361-368.
- 6) 北川学, 伊藤公美恵, 山田南実, 小池祥吾, 山本哲郎, 上原誉志夫: 長期味噌摂取が血圧および代

謝に与える影響—二重盲検ヒト比較介入試験—薬理と臨床 2016;44(11):1601-1612.

- 7) Kitagawa M, Tada K, Yamada M, Haruno R, Higashi T, Koike S: Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor from short-term fermented Miso. The 68th Annual Meeting of the Society of

Biotechnology of Japan. Toyama/Japan.

- 8) 上原誉志夫, 山川称子, 樋口千恵, 植松玲名, 平山あい, 横田真歩: 日本の伝統的発酵食品である酒粕による自然発症高血圧への抑止効果とその機序. 一般口演, 発表形式: 一般口演, 2016年10月1日(土) 17:10 ~ 18:10 会場: 第7会場(仙台国際センター 会議室4)

研究報告

ヒト大腸フローラモデルを用いた 味噌と腸内フローラに関する基盤研究

稲垣 瑞穂¹, 水谷 綾乃¹, 大澤 朗²

The effect of miso on gut microbiota using a human colonic microbiota simulation system

Mizuho INAGAKI¹, Ayano MIZUTANI¹, Ro OSAWA²

¹Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,
1-1 Yanagido, Gifu, Gifu, 501-1193, Japan.

²Department of Bioresource Science, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo, 657-8501, Japan.

【緒言】

ヒトの体内では、小腸での消化吸收を免れて大腸にたどり着いた食事成分は、ヒト腸内細菌叢（フローラ）の餌となり菌叢構成に大きな影響を与えている。しかしながら現在の食品機能性評価では、細胞やモデル動物を用いた試験に基づいた食事成分とヒトの健康の関わりが主流となっており、ヒト腸内フローラに対する議論に及んでいない。腸内フローラが人々の健康に大きく関与していることが明らかになりつつある今、食事成分が腸内フローラに与える影響を評価する試験系の確立が強く望まれている。

我々はこれまでに腸内細菌叢環境の培養槽レベルでの再現（ヒト大腸フローラモデル、Kobe University Human Intestinal Microbiota Model；KUHIMM，**図1**）に取り組み、このモデルを用いて機能性食品素材が腸内フローラに与える影響を評価する試験系の構築に関わってきた¹⁾。本研究では、味噌の主原料である大豆に含まれる特異的なオリゴ糖・スタキオース(stachyose)に着目した。スタキオースとは、天然に存在する非還元性の四糖のオリゴ糖である。これまでにスタキオースのビフィズス菌増殖作用は報告されて

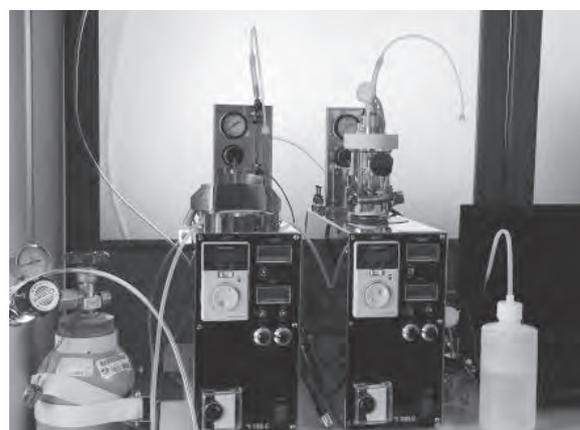


図1. ヒト大腸フローラモデル培養槽

(エイブル株式会社/BME-25NC)

100 mL 培地中にヒト糞便を加えてフローラ構成を再現する

いるが²⁾、スタキオースがヒト腸内細菌叢構成に与える影響については報告がない。本研究では本モデルを用いてスタキオースのヒト腸内細菌叢構成に与える影響を検証した。

【方法】

1) ヒト大腸フローラモデル培養

ヒト糞便(検体)から綿棒を用いて腸内フローラを回収し、実験使用時まで嫌氣的に保管し、5時間以内に試験を開始した。検体を生理食塩水に溶かしこんだものをスターターとして、このスターターを培地に播種した。24時間、嫌気条件下で攪拌しながら培養を行った(ヒト大腸フローラモデル試験、図1)。培養開始時に、スタキオースを加えて培養を開始した群(スタキオース群)と未添加群(コントロール群)を用意し、スタキオース添加以外は同一条件で実験を行った。培養開始時から経時的にpHのモニタリングを実施した。また培養24時間後にサンプリングした培養液からDNAを抽出し、定量PCR法に供した。全菌数を基準に正規化し $\Delta\Delta$ CT法により解析した。Student's t-testにより有意差検定を行った。本試験はヒト糞便を使用するため、岐阜大学医学部倫理審査

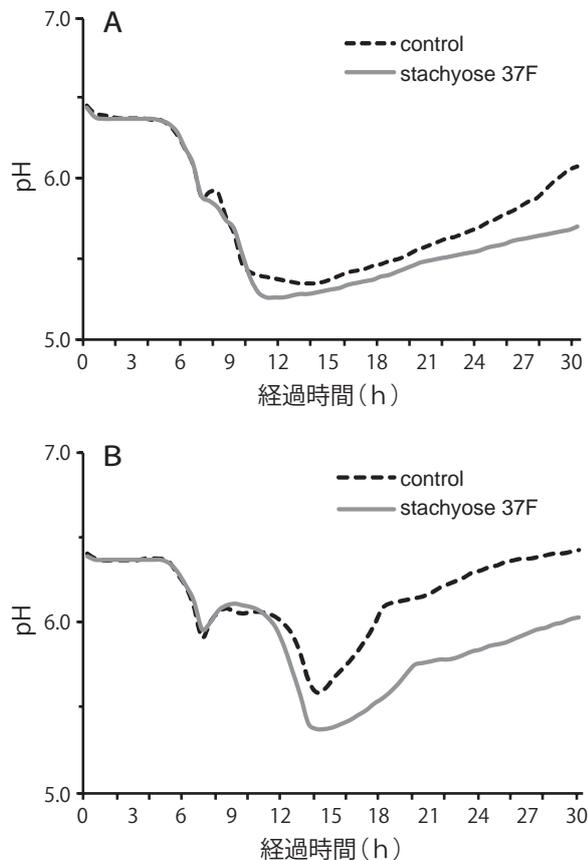


図2. スタキオース73 mg 添加時の培養液 pH の経時変化
(A) 37歳女性, (B) 43歳女性

の承認を得て実施した。

2) 味噌中のスタキオースの定量

味噌を熱水に溶かした溶液に含まれるスタキオースの量について、アセトニトリルにより抽出し、以下の条件でHPLC解析を行った。スタキオース標品を用いて検量線を作成し、味噌1gに含まれるスタキオースの定量を試みた。

HPLC: DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Scientific), Column: AsahiPak NH2P-50 4E, Flow rate: 1.0 mL/min, Injection volume: 20 μ L, Gradient program: 0.5 % CH₃COOH: Acetonitrile = 25 % : 75 % (13 min) \rightarrow 7 min gradient \rightarrow 40% : 60% (5 min).

【結果および考察】

1) 味噌汁1杯の大豆原料に含まれるスタキオース量がヒト腸内フローラに与える影響

味噌汁1杯に相当する大豆タンパク量から算出したスタキオース73 mg(和光純薬工業)をヒト大腸フローラモデルに供した。一例として2名の被験者データを示す。培養液内のpHの経時変化では、培養10

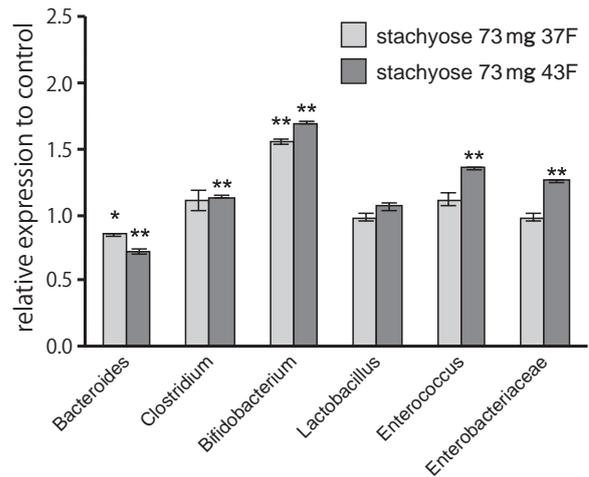


図3. スタキオース73 mg 添加がヒト腸内細菌叢に与える影響

ヒト大腸フローラモデルにてスタキオース73 mg 添加・未添加を同一条件で培養した。24時間後に回収した培養液から細菌DNAを抽出し、定量PCR解析を行った。スタキオース未添加のコントロールを1.0としたときのスタキオース73 mg 添加時の菌叢変化を示す。
n = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01

時間ごろまではコントロールとスタキオース群では類似した挙動を示した。10 時間後から培養終了時までには、コントロールと比較して、スタキオース添加群では pH が低く維持された (図 2)。コントロールを比較してみてもわかるように、培養液の pH 変動は個人のフローラに依存した個人差がある。43 歳女性の被験者についてはスタキオース添加により腸内の pH が低く保たれていた (図 2 B)。

24 時間後の培養液に含まれる菌叢について定量 PCR 解析を行った。コントロール培養液に含まれる各属の菌量を 1.0 とした時の変化を示している (図 3)。2 名の被験者いずれも善玉菌として知られるビフィドバクテリウム属を増加させ、一方で、バクテロイデス属は減少する傾向が共通して見られた。その他にも 43 歳女性被験者については、クロストリジウム属、エンテロコッカス属、エンテロバクター科の増加が観察された。

大豆オリゴ糖であるスタキオースは、腸内のビフィドバクテリウム属を有意に増加させる効果が見られた。ビフィドバクテリウム属の増加に伴い、代謝産物である乳酸、酢酸などの有機酸の産生量が増加し、結果として培養液 pH が低下したと推測される。味噌汁 1 杯の大豆原料中に含まれるスタキオースには、腸内フローラ改善作用が期待できると考えられた。

2) 味噌に含まれるスタキオース量の定量

味噌汁 1 杯の大豆原料に含まれるスタキオースの量で十分な腸内環境改善効果が期待されたことから、味噌 6 種に含まれるスタキオース量の定量を試みた。HPLC 分析より、味噌 1 g 中に 0.6 mg ~ 2.8 mg のスタキオースが含まれていた (表 1)。大豆原料に含まれているスタキオース量と比較すると、加工・成熟により約 60-90% のスタキオースが減少していた。過去に、味噌の熟成期間において遊離するオリゴ糖の組成が異なることが報告されている³⁾。今回の試験に用いた味噌は熟成期間が統一されていなかったため、各味噌に含まれるスタキオース量を一概に比較することはできないが、加工・成熟によりスタキオースが減少することが明らかとなった。

3) 味噌汁 1 杯スタキオース量がヒト腸内フローラに与える影響

HPLC の結果から、実際の味噌汁 1 杯 (味噌 10 g) に含まれるスタキオース量を想定し、大腸フローラモデル 100 mL 培養液中に 8 mg を添加して試験を行った。未添加の場合と比較して、スタキオース 8 mg 添加により pH は上昇傾向にあった (図 4)。菌叢解析を行ったところ、いずれの試験群においても全菌数

表 1. 各味噌に含まれていたスタキオースの量

スタキオース濃度 (mg/味噌 1g)	
豆味噌	0.8
米味噌 A	0.6
米味噌 B	2.8
米味噌 C	2.0
朴葉味噌	0.6
麦味噌	1.0

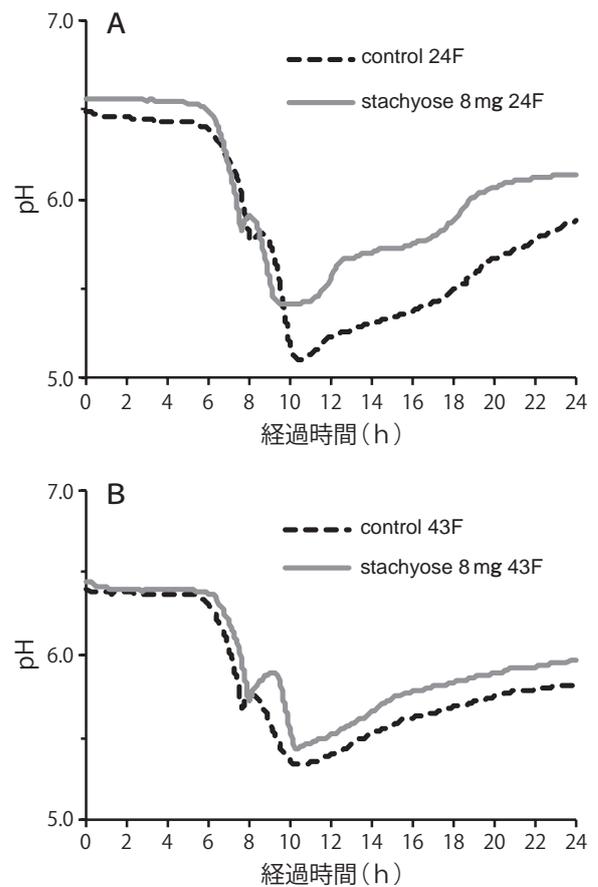


図 4. スタキオース 8 mg 添加時の培養液 pH の経時変化

(A) 24 歳女性, (B) 43 歳女性

は 10^{11} に到達した。しかしながら、24 歳女性 (24F) / スタキオース 8 mg 群では、バクテロイデス属の急激な増加が見られ、一方でビフィドバクテリウム属の減少が観察された。43 歳女性 (43F) / スタキオース 8 mg 群では様々な属において全体的に菌数の減少傾向が見られた。今回の検証だけでは結論にはできないけれども、少量のスタキオースの単回投与では腸内

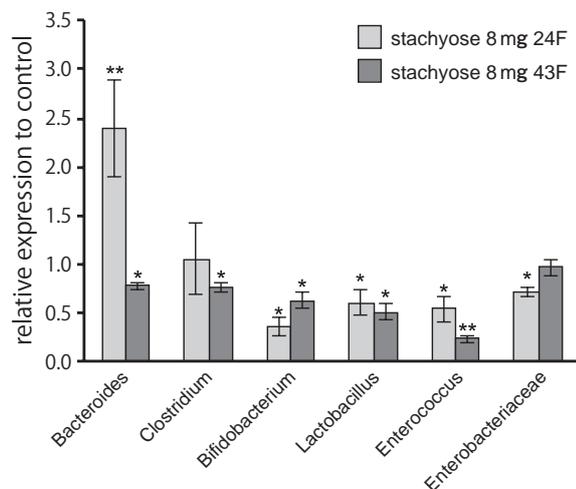


図5. スタキオース8 mg 添加が腸内細菌叢に与える影響

ヒト大腸フローラルモデルにてスタキオース8 mg 添加・未添加を同一条件で培養した。24時間後に回収した培養液から細菌 DNA を抽出し、定量 PCR 解析を行った。スタキオース未添加のコントロールを1.0としたときのスタキオース8 mg 添加時の菌叢変化を示す。
n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

細菌叢に対して良い効果を得るのは難しいと考えられた。

【総括】

味噌汁1杯相当の大豆(原料)に含まれるスタキオース量に対してビフィズス菌増殖効果が認められた。また味噌に含まれるスタキオースの定量結果より、加工・熟成の工程により60から90%ほど減少すると推測された。加工・熟成の工程において、味噌に含まれる微生物がスタキオースを資化するため、実際の味噌汁(1杯の摂取量)には腸内細菌叢に好影響を与えるほどのスタキオースが残っていないと推測された。味噌加工・成熟においてスタキオース含量を高める工夫を

することで、腸内細菌叢を改善する食品・プロバイオティクスとしての利用性が考えられる。

スタキオースは大豆特有のオリゴ糖であることから、被験者の日常的な大豆摂取量が本試験結果に大きく関与している可能性が考えられる。例えば一般的な見解として、日常的に大豆摂取している被験者はスタキオース資化性の高い腸内細菌が定着している可能性が高い。また加齢による腸内フローラの変遷も生じることから、スタキオース・味噌摂取の有効性をさらに検証するためには、被験者を区分して試験を行う必要がある。また今回の8 mg 試験は味噌汁1杯による影響を検証しているが、今後は味噌汁を継続して摂取した場合の影響なども検証していく必要がある。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、味噌サンプルのご提供ならびに本研究のご支援・ご協力いただきました一般社団法人中央味噌研究所をはじめ各関係者の方々に深謝いたします。またスタキオースの定量では、岐阜大学大学院連合農学研究科 中野浩平先生にご協力いただきました。感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Takagi et al., A single-batch fermentation system to simulate human colonic microbiota for high-throughput evaluation of prebiotics, PLoS ONE (2016)
- 2) Inoguchi et al., Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on fecal microbiota and fecal metabolites in humans, International Journal of Food Sciences and Nutrition (2012)
- 3) 本藤智・望月務 みその遊離糖について 日本食品工業学会誌 (1979)

研究報告

高 HEMF 産生味噌酵母の育種と
味噌酵母接合育種の可能性の検討

尾形 智夫

Consideration of a possibility of breeding miso yeast that produce high HEMF by mating

Tomoo OGATA

Department of Biotechnology, Maebashi Institute of Technology,
460-1 Kamisadori, Maebashi, Gunma 371-0816, Japan.

1. 序論

接合は、酵母の自然現象である。酵母の接合性 a を示す細胞と接合性 α を示す細胞間で接合し、接合性を示さない 2 倍体 a/α 細胞となる現象である。接合育種とは、この現象を利用した育種法である (図 1)。育種された酵母菌株は、遺伝子組み換え体には該当しないので、有望な酵母育種法であるといえよう。酵母の接合性は、接合遺伝子座 MAT に Y^a 配列が挿入されていると、その細胞の接合性は a になり、 Y^α 配列が挿入されていると、その細胞の接合性は α となる。

昨年度、我々は、接合性が a であると報告されている味噌酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 と、接合性 α であると報告されている味噌酵母 *Z. rouxii* NBRC0740 との間に、接合株を得たことを報告している¹⁾。しかし、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の接合性を決定する遺伝子座 MAT の構造、この領域の DNA 塩基配列の詳細が不明で、接合が生じたかを正確に証明することができていなかった。そこで、本年は、次世代シーケンサーを用いて、*Zygosaccharomyces* 属酵母株のゲノム配列を決定し、接合が生じたことをゲノムデータから証明することを試みた。

また、味噌酵母が産生する香気物質 HEMF (2-(or 5-)-ethyl-5 (or 2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)

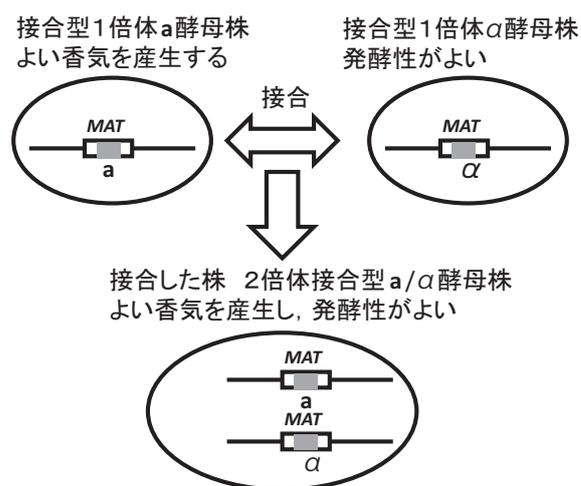


図 1. 酵母の接合

-furanone) は、味噌の品質を高める香気物質であるとともに、強い抗酸化性より、抗ガン性等の生理活性も注目されている物質である。昨年度の我々の研究では、味噌酵母による HEMF の産生には、五炭糖であるリボースが必須であることを見出した¹⁾。本年は、菌体内リボース含量を増加させる変異株を用いることで、HEMF 産生量に変化があるかを検討した。

2. 実験材料と実験方法

(1) 実験材料と培地

味噌酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) のバイオテクノロジーセンター (NBRC) より入手した。タイプストレインである NBRC1130, NBRC の菌株リストに接合性 α と記載されている NBRC0740, 1877 と、接合性 a と記載されている NBRC1876 を使用した。培地は、YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) 使用した。HEMF の産生培地としては、Sugawara らの報告²⁾ にあった培地 (2.5% ribose, 1% glycine, 7.5% glucose, 1% KH_2PO_4 , 0.5% MgSO_4 , 0.5% yeast extract) を使用した。

(2) 味噌酵母 *Z. rouxii* の接合実験

NBRC の菌株リストに、接合性 α と記載されている NBRC0740 に、シクロヘキシミド耐性の選択マーカーを付与した。シクロヘキシミド耐性の付与は、NBRC0740 を、EMS (エチルメタンサルホン酸) で変異処理し、YPD 寒天培地に、シクロヘキシミド 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコロニーを形成する菌株を分離することでおこなった。分離されたシクロヘキシミド耐性酵母株を、NBRC0740-CYR1 と命名した。接合は、この NBRC0740-CYR1 と、NBRC の菌株リストに、接合性 a と記載されている NBRC1876 を、1 細胞ずつ、マイクロマニピュレーターで釣菌し、YPD 寒天培地上に接触させ、コロニーを形成させ、接合株 Y130 を得た。

(3) 次世代シーケンサーによるゲノム配列解読

味噌酵母 *Z. rouxii* NBRC1130 (type strain),

Z. rouxii NBRC0740, *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 のゲノム配列解読は、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いておこなった。アセンブリソフトウェア Platanus を用いて配列アセンブリをおこない、scaffold を作成した³⁾。

(4) 各 *Zygosaccharomyces* 酵母株の MTL (Mating type like) loci の PCR による増幅

各 *Zygosaccharomyces* 酵母株の MTL (Mating type like) loci の PCR による増幅は、*Zygosaccharomyces* ゲノムデータあるいは、次世代シーケンスデータを基に作成したプライマーを用いておこなった。各プライマーの配列は、表 1 に示す。

(5) プリン塩基生合成変異株の HEMF 産生への影響

プリン塩基生合成に関わる遺伝子 *ADE1* が遺伝子破壊された *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 $\Delta ade1$ 株を用いて、HEMF 産生量を測定した。

3. 実験結果および考察

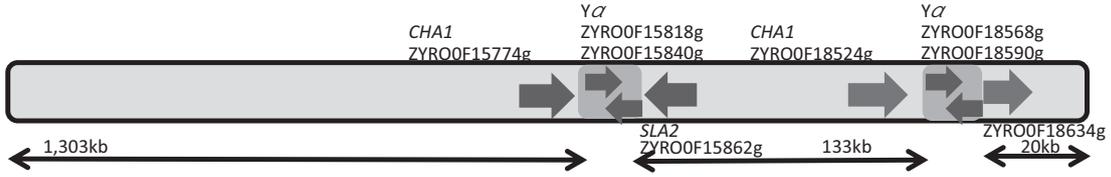
(1) 次世代シーケンサーを用いたゲノム解読とそのゲノムデータを用いた接合の確認

味噌酵母 *Z. rouxii* NBRC1130 (type strain), *Z. rouxii* NBRC0740, *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 のゲノム配列は、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて決定し、アセンブリソフトウェア Platanus を用いて配列アセンブリをおこない、scaffold を作成した。各接合遺伝子座に相当する推定の染色体構造と scaffold は、図 2 - 4 に示した。この推定された染色体構造に基づき、各

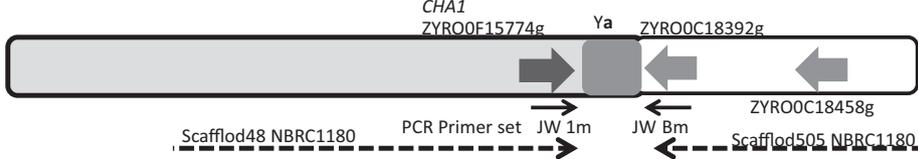
表 1. PCR プライマーの配列

プライマー名	配列 (5' - 3')
JW 2m	TGCGCGCAGCGCATGATATGAAACGAAGATGCAAC
JW Am	CTATAACCAACCAGTTAGTGTGTTATCGATAAGTC
JW 1m	AAGACGAAATGCTACTCCCTCATTAGAACATGAAA
JW Bm	CCTACAATACTCTATTTTCGTCGGTTTATCGTTGGT
JW 3m	TTCTATACTTACTGGATGAATCTTCTGTGA
JW Cm	TCAGTACCAGAAGTGGTCTTTGAAACGATTGCCGC
Ya rev	AAATCTGTGATACAATTCCTGGAATACTGCATCCT
Ya rev	GAGATATGTTTTGGGGCTTCTATGATGTATTACCT
Ya	ATATAGGATGCGAGTATTCCAGGAATTGTATCACAG
Ya	ATTGCAAGAAAAGGTAATACATCATAGAAGCCCCA
Scaf1957_1876_128R	ATCAACCGGTAAGTGTCTTTCAATAAGTC

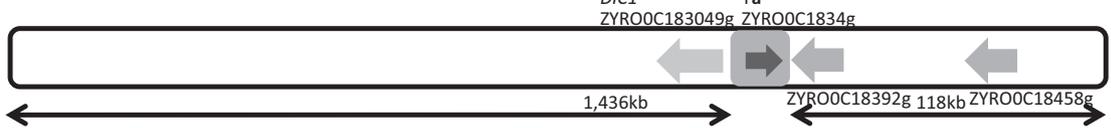
(a) Chromosome F (accession no: CU928178) in CBS732



(b) Chromosome F on which Watanabe *et al.* insist (2013) in NBRC1130



(c) Chromosome C (accession no: CU928175) in CBS732



(d) Chromosome C on which Watanabe *et al.* insist (2013) in NBRC1130

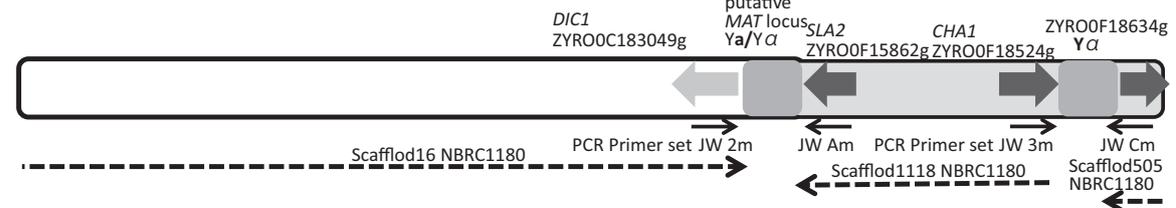
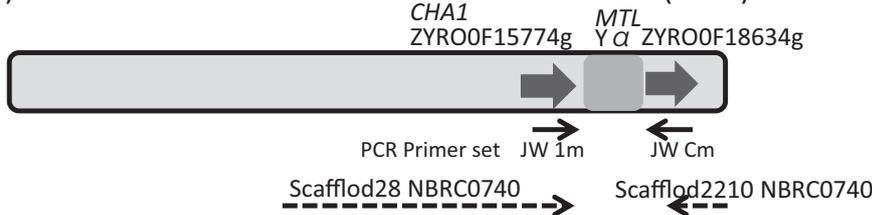


図 2. *Zygosaccharomyces rouxii* CBS732 or NBRC1130 の染色体 C および B の推定構造

(a) Chromosome F on which Watanabe *et al.* insist (2013) in NBRC0740



(b) Chromosome C on which Watanabe *et al.* insist (2013) in NBRC0740

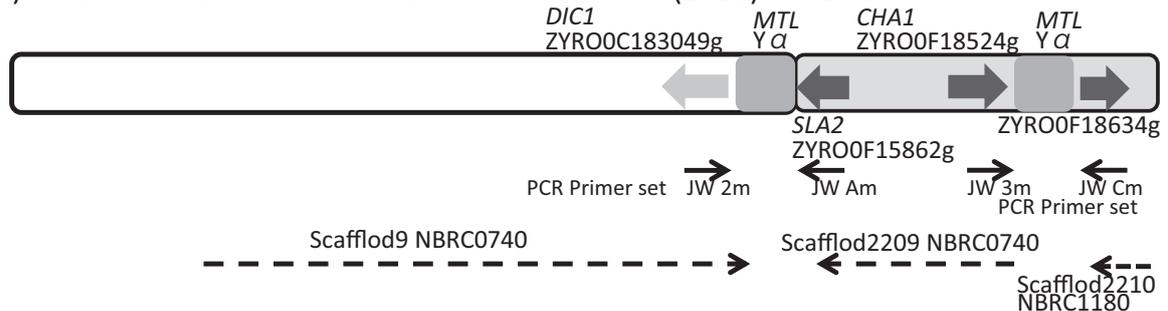
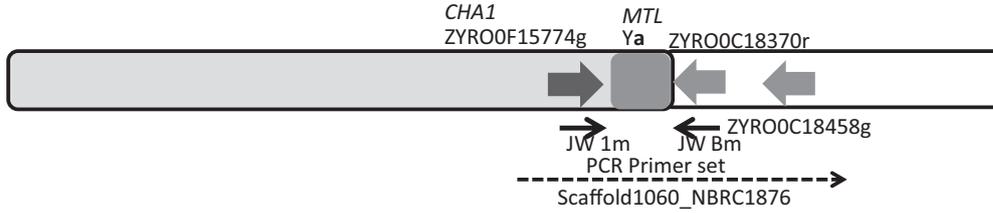


図 3. *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC0740 の染色体 C および B の推定構造

(a) Chromosome F on which is deduced from this sequencing in NBRC1876



(b) Chromosome C which is deduced from this sequencing in NBRC1876

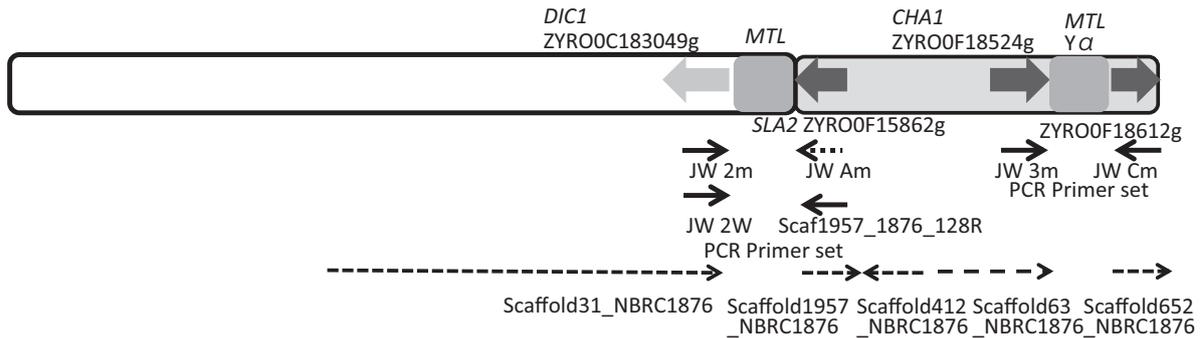
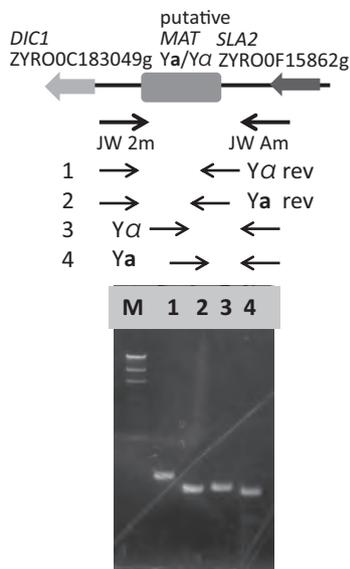
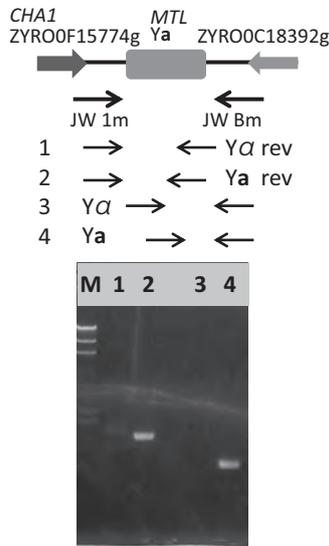


図4. *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の染色体 C および B の推定構造

(a) Chromosome C



(b) Chromosome C right arm end



(c) Chromosome F

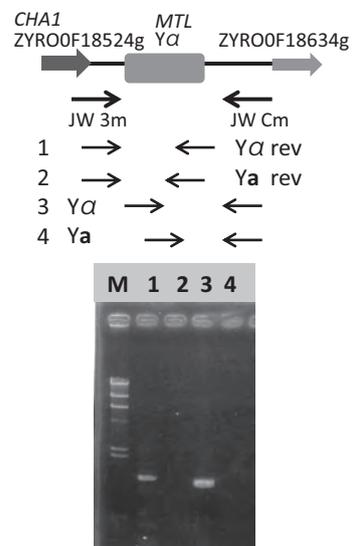


図5. *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC1130 の *MTL* 遺伝子座

MTL (Mating Type Like) locus を PCR によって増幅させた (図5-7)。 *Z. rouxii* NBRC1130 および *Z. rouxii* NBRC0740 では、各 *MTL* loci で

Watanabe らが報告していたように、各 *MTL* locus に、Ya あるいは Yα 配列が挿入されていることが確認された (図5, 6)⁴⁾。一方、接合実験で用いた

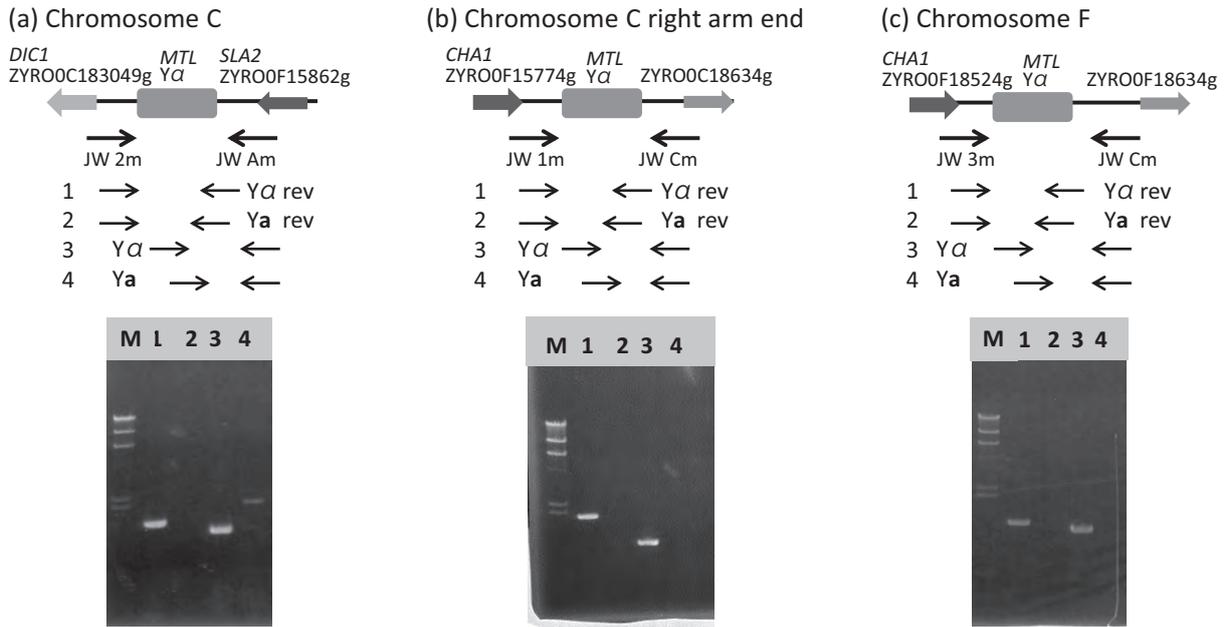


図 6. *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC0740 の MTL 遺伝子座

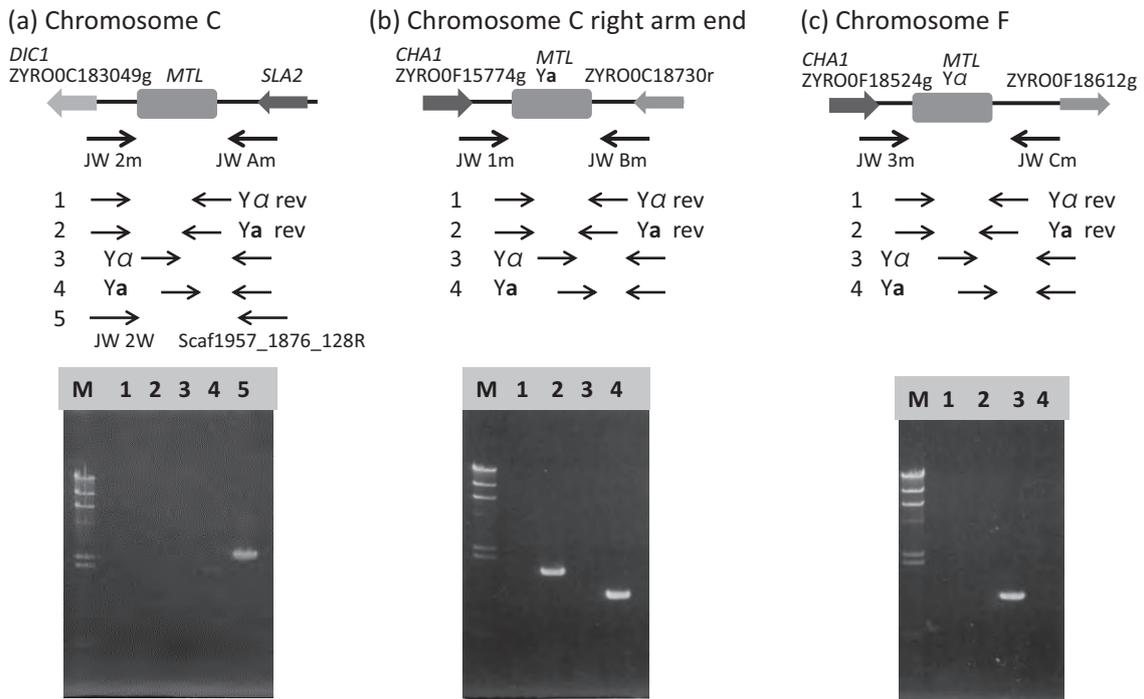


図 7. *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の MTL 遺伝子座

酵母菌株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 では、Chromosome C にある *MTL* locus が、PCR で増幅されず (図 7 (a) lanes 1-4)、この領域の DNA 塩基配

列が、データベースのものと異なっていることが予想された。*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の次世代シーケンサーのゲノム解析後の Scaffold1957_

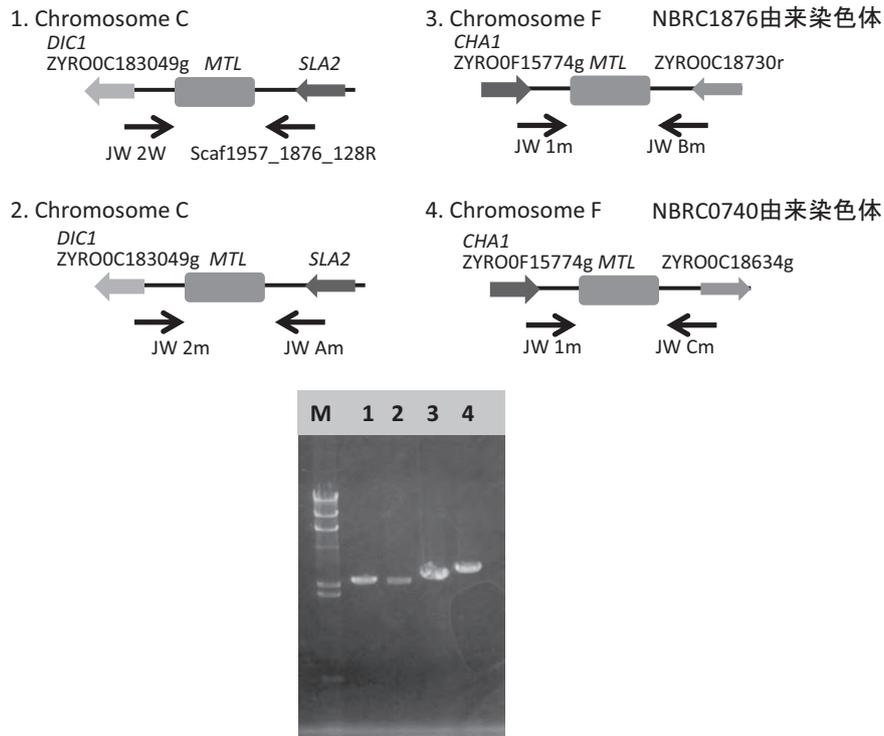


図8. 接合株 Y130 の MTL 遺伝子座

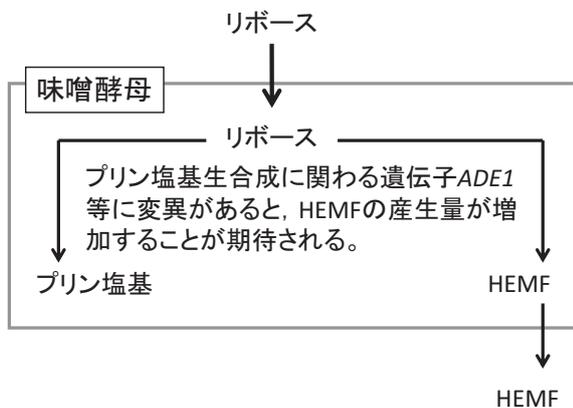


図9. HEMF 産生量増加のために考えられる酵母育種

NBRC1876 の DNA 塩基配列は、このゲノム領域にある遺伝子 *SLA2* (ZYRO0F15862g) と、81% の一致率であったが、プライマー JW_Am の相当領域では一致していなかった。そこで、Scaffold1957_NBRC1876 の DNA 塩基配列を基に新たにプライマー Scaf1957_1876_128R を作成し、PCR をおこなったところ、増幅産物を得た (図7 (a) lane 5)。以上の

結果より、接合実験で用いた *Z. rouxii* NBRC0740 と、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 とでは、Chromosome C の *MTL* locus と、Chromosome F 右腕末端の *MTL* locus で、染色体構造及び DNA 塩基配列に差異があることがわかった。この差異を利用して、接合が生じていた場合、*Z. rouxii* NBRC0740 由来の *MTL* locus と、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 由来の *MTL* locus が、接合株に共に存在することを、PCR によって証明可能となることが予想された。そこで、PCR をおこなったところ、接合株 Y130 から、増幅産物を得た (図8)。従って、次世代シーケンサーを用いたゲノムデータを利用して、味噌酵母 *Zygosaccharomyces* 酵母で接合株を分離できたことを証明することができた。

(2) 高 HEMF 産生味噌酵母の育種の可能性の検討

昨年度の我々の研究では、味噌酵母による HEMF の産生には、五炭糖であるリボースが必須であることを見出した (図9)¹⁾。そこで、本年、菌体内リボース含量を増加させることが予想される $\Delta ade1$ 変異株を用いることで、HEMF 産生量に変化があるかを検討した。HEMF 産生実験の結果は、表2に示す。 $\Delta ade1$ 変異によって、HEMF 産生量が増加したことが

表 2. HEMF 産生への $\Delta ade1$ 変異の影響

	HEMF 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	1 週間培養	2 週間培養
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	14.2 \pm 1.6	17.1 \pm 3.2
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 $\Delta ade1$	30.3 \pm 2.7*	31.7 \pm 3.1*

値は、平均値 \pm 標準偏差 で示した。

* 危険率 1% で有意差あり

確認された。この結果は、Uehara らの結果と一致するものであった⁵⁾。

4. 総括

- (1) 次世代シーケンサーを用いて得た味噌酵母のゲノムデータを利用して、接合実験に用いた味噌酵母菌株間の染色体構造及び *MTL* loci 周辺の DNA 塩基配列の差異を見出し、これを利用して、接合株であることを PCR 実験によって証明することができた。
- (2) 味噌の品質を高める香気物質である HEMF は、前駆物質であるリボース量に産生量が影響されると予想され、酵母菌体内リボース量を増加させる $\Delta ade1$ 変異によって、HEMF 産生量が増加したことが確認された。

謝 辞

本研究は、一般財団法人中央味噌研究所の平成 28 年度研究助成を受けて実施したものです。関係各位に深く感謝します。本研究の実施にあたっては、前橋工科大学工学部生物工学科卒業研究生、伊藤功起さん、黒木克明さんと共同でおこないました。次世代シーケンサーを用いた味噌酵母のゲノム解読は、前橋工科大学工学部生命情報学科教授 中村建介先生との共同研究です。

参考文献

- 1) 尾形智夫：高 HEMF 産生味噌酵母の接合による育種 中央味噌研究所研究報告 第 38 号, p101-107 (2017).
- 2) E. Sugawara, M. Ohata, T. Kanazawa, K. Kubota, Y. Sakurai: Effects of the amino-carbonyl reaction of ribose and glycine on the formation of the 2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone aroma component specific to miso by halo-tolerant yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* Vol.71, p1761-1763 (2007).
- 3) Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, et al.: Efficient de novo assembly of highly heterogenous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Research* Vol.24, p1384-1395 (2014).
- 4) J. Watanabe, K. Uehara, Y. Mogi: Diversity of mating-type chromosome structures in the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* caused by ectopic exchanges between *MAT*-like loci. *PLoS ONE* Vol.8, e62121 (2013).
- 5) K. Uehara, J. Watanabe, T. Akao, D. Watanabe, Y. Mogi, H. Shimoi: Screening of high-level 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3(2H)-furanone-producing strains from a collection of gene deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* Vol.81, p453-460 (2015).

研究報告

各種味噌が食中毒菌に汚染された際の 微生物学的安全性に関する網羅的解析

島村 裕子, 増田 修一

Analysis on microbiological safety of various Miso contaminated
with food poisoning bacteria

Yuko SHIMAMURA, Shuichi MASUDA

*School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka,
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.*

はじめに

味噌は、食品の品質や保存性を高めることが以前から知られており、食塩だけでなく、水分活性およびpHの低下、また含有するアルコール¹⁾、メラノイジン²⁾および乳酸菌由来のバクテリオシン³⁾などの作用により食中毒菌の生育を抑制できることが知られている。このように、味噌は微生物に関する安全性が高いことが報告されているが、最近の市販されている味噌における微生物の挙動および病原性因子の発現に関する情報・知見は少ない。

味噌は、加熱変性処理した米または麦に、麴菌を生育させた「麴」と加熱変性処理した大豆と食塩を混合して仕込まれる。仕込みの過程で、切返しという天地返し工程を含む醸造発酵中において、麴菌の生産する加水分解酵素群により大豆のタンパク質や米、麦のデンプンが分解され、分解物を *Zygosaccharomyces rouxii* 等の酵母や *Tetragenococcus halophilus* 等の乳酸菌が資化する。半年間程度、酵母発酵と乳酸発酵が行われた後、漉し味噌は、漉し機を通してすり味噌に整えられ、粒味噌はそのまま製品化される。また、再発酵を防ぐために、必要に応じて酒精（アルコール）を添加、または加熱殺菌してから包装された後、製品として販売される⁴⁾。味噌中には、麴菌、酵母、

乳酸菌をはじめとする様々な微生物が存在していることが知られており、味噌製造に関する微生物は、身近に存在する微生物であるにも関わらず、味噌中に含まれる微生物の挙動に関する知見は少ない。一方、新たな機能を有する微生物の分離源として味噌等の発酵食品が注目されていることから、現在、発酵食品中にどのような微生物が存在するのか、その菌叢構造を明らかにする研究が世界中で活発に行われている⁵⁾。従来分子生物学的な菌叢解析では、発酵食品中の細菌叢の解析は困難であったが、近年、次世代シーケンサーを用いた細菌叢を正確かつ網羅的に把握する手段（メタゲノム解析）が報告されており、韓国の味噌であるテンジャン⁶⁾や meju⁷⁾において、その細菌叢が報告されている。しかし、近年、日本で市販されている味噌に食中毒菌を接種した際の味噌中の細菌叢のメタゲノム解析や食中毒菌の病原性因子の発現について網羅的に解析した報告はない。

そこで、本研究では、各種味噌が食中毒菌に汚染された際の細菌の挙動に影響を及ぼす因子について調べた。まず、近年市販されている味噌における微生物学的安全性について検討し、次に、次世代シーケンサーを用いた細菌叢のメタゲノム解析により、食中毒菌を接種した際の細菌叢の変動や挙動について、明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. 試料

各種味噌は、一般社団法人 中央味噌研究所が選定した味噌を用いた。保存温度 4℃における味噌中の食中毒菌数の変動については、市販味噌 20 検体（米味噌 15 検体、麦味噌 2 検体、豆味噌 1 検体および調合味噌 2 検体）を実験に用いた（Table. 1）。保存温度 30℃における味噌中の食中毒菌数の変動、各種味噌中の細菌叢の変動および各種味噌の理化学検査については、保存温度 4℃における結果をもとに選抜した 6 種（米味噌 3 種；米甘みそ A、米甘みそ B、米辛みそ H、豆味噌 1 種；豆みそ A、麦味噌 1 種；麦みそ B、および調合味噌 1 種；調合みそ B）を試料とした。

2. 供試菌株

Staphylococcus aureus C-29（黄色ブドウ球菌）、*Salmonella* Enteritidis NBRC3313（サルモネラ）および *Escherichia coli* JCM2449（大腸菌）を試験に供した。

3. 保存温度 4℃および 30℃における味噌中の食中毒菌数の変動

各味噌 5 g を 50 mL 遠沈管に入れ、2,000 × g で 20 秒間遠心し、味噌の表面を平らにしたものを味噌試料とした。これを味噌 1 種につき 3 菌株 × 試験日数（4℃；0, 1, 4, 7, 14, 28 日、30℃；0, 2, 5, 7 日）分の試料を作製した。一晚培養した各供試菌株の培養液 30 μL を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地（3 mL）に接種し、37℃で 24 時間振盪培養（本培養）した。マイクロチューブに各菌体の培養液 1 mL を分注し、4000 × g で 5 分間遠心分離した後、phosphate buffered saline (PBS) 1 mL を加え、菌懸濁液とした。菌懸濁液 50 μL を味噌表面に接種（10⁷ ~ 10⁸ CFU/g）し、4℃（28 日間）または 30℃（7 日間）で保存した。各試験日に、味噌試料の入った遠沈管に最終容量が 50 mL となるように PBS を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、PBS で適宜希釈し、希釈液 100 μL を選択培地に塗布した。黄色ブドウ球菌選択培地としてマンニット食塩寒天培地を、サルモネラ選択培地として XLD 寒天培地を、大腸菌選択培地として XM-G 寒天培地を用いた。

4. 各種味噌中の細菌叢の変動

次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を実施するにあたり、各種味噌からの DNA 抽出法の検討を行った。

Table. 1：試験に供した味噌試料

米甘みそ A	米辛みそ F	米辛みそ M
米甘みそ B	米辛みそ G	豆みそ A
米辛みそ A	米辛みそ H	麦みそ A
米辛みそ B	米辛みそ I	麦みそ B
米辛みそ C	米辛みそ J	調合みそ A
米辛みそ D	米辛みそ K	調合みそ B
米辛みそ E	米辛みそ L	

方法 1；サンプル 200 mg を採取し、ガラスビーズを用いて均質化し、NucleoSpin Food（タカラバイオ株式会社）を用いて味噌中に存在する微生物の DNA を抽出・精製した。

方法 2；サンプル 200 mg に DNA すいすい-F または DNA すいすい-E（株式会社リーゾ）のバッファー溶液を混合し、乳鉢を用いて均質化した。65℃で 1 時間インキュベートした後、フェノール・クロロホルム処理にてタンパク質を除去し、上清をイソプロパノール沈殿で回収した。NucleoSpin Food を用いて味噌中に存在する微生物の DNA を精製した。

5. 各種味噌中の理化学検査

5-1. pH の変化

各味噌試料を 30℃で 7 日間保存し、継時的に pH を測定した。各味噌試料 5 g を 50 mL 遠沈管に入れ、MilliQ 水を最終容量が 50 mL となるように分注し、ボルテックスミキサーで攪拌し、懸濁液を作製した。pH メーター F-21（株式会社 堀場製作所）を用いて、pH を測定した。

5-2. 酸度の変化

各味噌試料を 30℃で 7 日間保存し、継時的に酸度（酸の質量パーセント濃度）を測定した。各味噌試料 5 g に MilliQ 水を最終容量が 70 mL となるように分注し、ボルテックスミキサーで攪拌し、懸濁液を作製した。懸濁液を 100℃で 20 分加熱した後、ろ過した。ろ液は、MilliQ 水を加えて最終容量を 100 mL とし、そのうち 10 mL を試験に供した。指示薬として 1% フェノールフタレイン溶液を 2, 3 滴加え、0.1 N 水酸化カリウム (KOH) 溶液で滴定し、次式を用いて酸度を算出した。

$$\text{酸度 (\%)} = 0.009 \times a \times F \times 100 / w$$

a : 滴定に要した KOH 溶液 (mL)

F : 0.1 M KOH 溶液のファクター

w : サンプルの採取量

5-3. 遊離アミノ酸組成の変化

各味噌試料を 30℃で 7 日間保存し、遊離アミノ酸含有量を測定した。遊離アミノ酸組成分析は、北海道大学創成研究機構 共用機器管理センター委託分析部門に委託した。各味噌試料 5 g に 2%スルホサリチル酸 20 mL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌し、懸濁液を調製した。この懸濁液を 3000 × g で 10 分間遠心分離し、変性タンパク質や脂肪を含まない中間層をさらに 10,000 × g で遠心分離した後、得られた透明層を Amino Acid Analyzer L-8900 (日立ハイテクノロジーズ) を用いて測定した。分析は、カラム (# 2622SC-PF (高分離用) (Φ4.6 mm x 80 mm; 日立ハイテクノロジーズ)、フィルターカラム (# 2650L (高分離用) (Φ4.6 mm x 80 mm; 日立ハイテクノロジーズ)、溶離液 (生体液分析法用緩衝液 PF セット (関東化学)) および反応液 (日立用ニンヒドリン発色溶液キット (和光純薬工業)) を用い、検出波長 570, 440 nm で検出した。

6. 加熱処理後の味噌における食中毒菌数の変動

我々は、これまでに、80℃で 30 分加熱した塩麴溶液においても、食中毒菌の増殖抑制効果が認められることを明らかにしている (データ未発表)。そこで、加熱処理した味噌においても食中毒菌の増殖抑制効果が認められるか検討した。各味噌は、オートクレーブを用いて、121℃で 15 分間加熱して試験に供した。オートクレーブで加熱した各味噌試料 5 g を 50 mL 遠沈管に入れ、2,000 × g で 20 秒間遠心し、味噌の表面を平らにしたものをオートクレーブ加熱処理味噌試料とした。これを味噌 1 種につき 3 菌株 × 試験日数 (0, 2, 5, 7 日) 分作製した。一晚培養した各供試菌株の培養液 30 μL を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (3 mL) に接種し、37℃で 24 時間振盪培養 (本培養) した。マイクロチューブに各菌株の培養液 1 mL を分注し、4000 × g で 5 分間遠心分離した後、PBS 1 mL を加え、菌懸濁液とした。菌懸濁液 50 μL を味噌表面に接種 (10⁷ ~ 10⁸ CFU/g) し、30℃ (7 日間) で保存した。各試験日に、味噌試料の入っ

た遠沈管に最終容量が 50 mL となるように PBS を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、PBS で適宜希釈し、希釈液 100 μL を選択培地に塗布した。黄色ブドウ球菌選択培地としてマンニット食塩寒天培地を、サルモネラ選択培地として XLD 寒天培地を、大腸菌選択培地として XM-G 寒天培地を用いた。

7. 評価方法

データは、平均値および標準偏差を算出し、Tukey-Kramer の多重比較検定法を用いて有意差の検定を実施した。試料 100 g あたりの成分の比較については、各試料群の平均値および標準偏差を算出し、両群間で等分散性の検定 (F 検定) を行い、Student の *t* 検定により統計学的有意差検定を行った。なお、いずれの場合も有意水準は 5% とし、両側検定で実施した。

結果および考察

1. 保存温度 4℃における味噌中の食中毒菌数の変動

保存温度 4℃における味噌中の食中毒菌数の変動を Fig. S1 に示した。全試料中 19 検体で、4℃, 28 日間の保存期間中における減少は、他の食中毒菌に比べて、サルモネラが最も速かった。特に、28 日目にサルモネラが検出限界以下 (≤ 10² CFU/g) となった試料は、米味噌 2 検体 (米甘みそ B および米辛口みそ J)、豆味噌 1 検体 (豆みそ A) および麦味噌 1 検体 (麦みそ A) であった。これらのうち 3 検体は、味噌 100 g あたりの食塩含有量が約 10 g であったが、1 検体 (米甘みそ B) は 5.5 g であった (Fig. 1)。また、28 日目に黄色ブドウ球菌が検出限界以下となった試料は、豆味噌 (豆みそ A, 食塩含有量 9.7 g/100 g) であった (Fig. 1)。しかし、いずれの試料においても、大腸菌は検出限界以下にならなかった。一方、米味噌 3 検体 (米甘みそ A, 米辛口みそ I および米辛口みそ G) および調合味噌 (調合みそ A) 1 検体において、28 日目においても 10⁴ CFU/g 以上の菌が生存していた。これらのうち 3 検体では、味噌 100 g あたりの食塩含有量が 10 g 以上であったが、1 検体 (米甘みそ A) は 4.9 g (Fig. 2) であった。これらの結果より、食中毒菌の死滅速度には、味噌の主原料や食塩含有量以外の因子が関与していることが推察された。

食中毒菌の死滅速度が速かった 4 試料 (Fig. 1) および遅かった 4 試料 (Fig. 2) について、試料 100 g あたりのタンパク質、脂質、炭水化物および食塩含有量 (g) の平均値を Fig. 3 に示した。試料 100 g あたりのタンパク質、炭水化物および食塩含有量において、食中毒菌の死滅速度が速かった試料と遅かった試料の

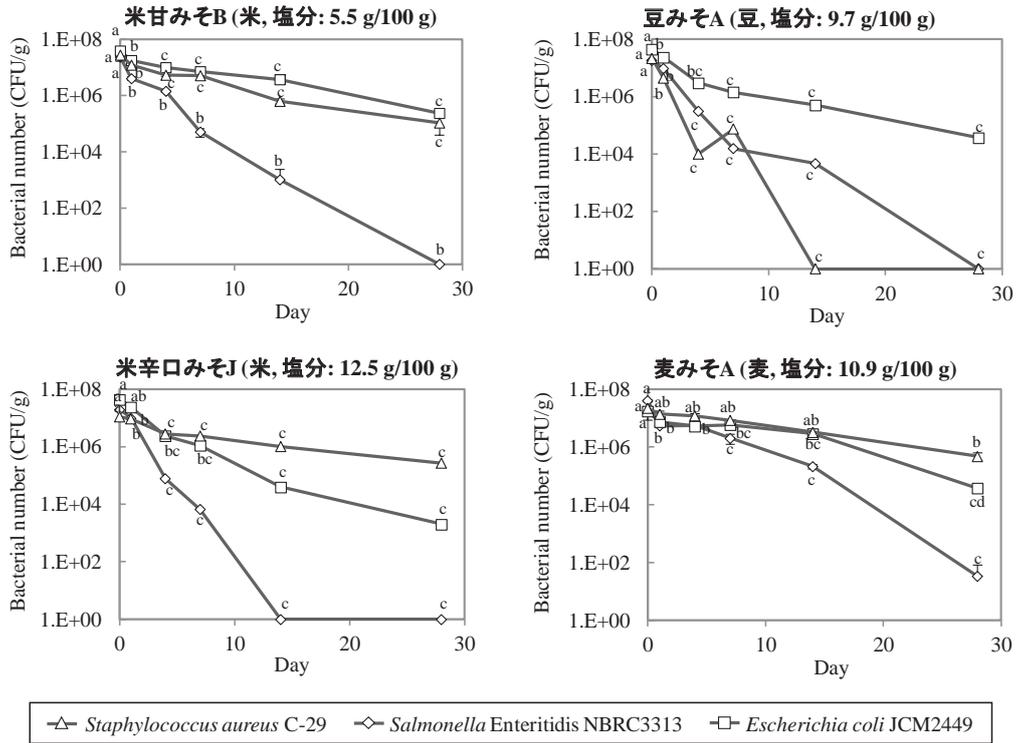


Fig. 1 : 味噌中の食中毒菌の死滅速度が速かった試料 (保存温度 4 °C)

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$

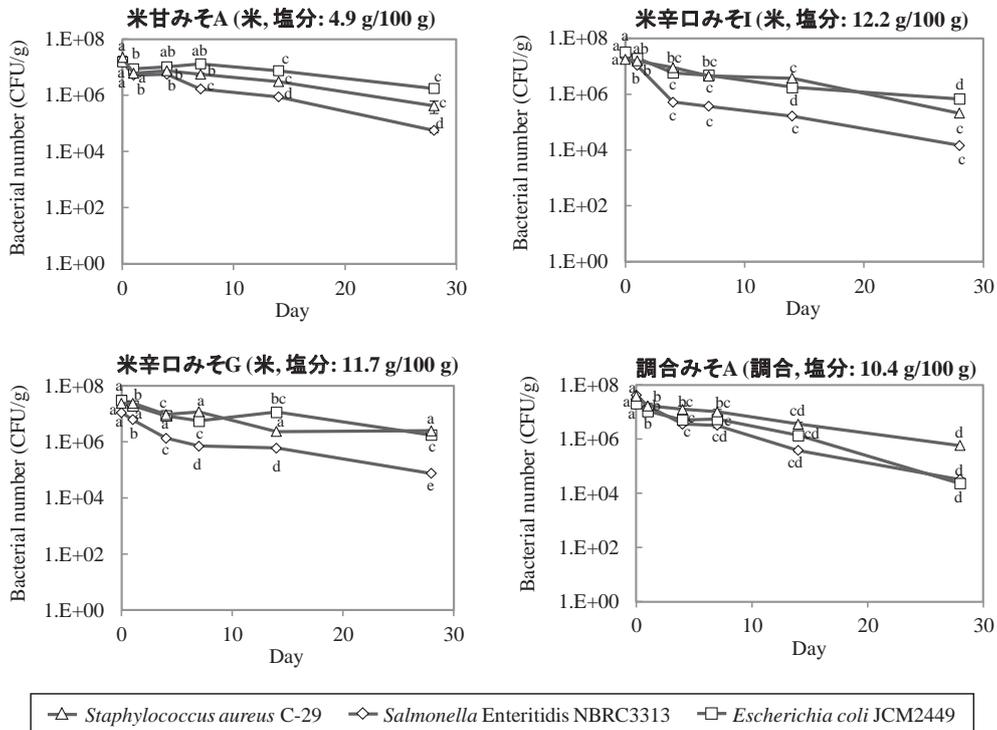


Fig. 2 : 味噌中の食中毒菌の死滅速度が遅かった試料 (保存温度 4 °C)

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$

間に有意差は認められなかった。一方、脂質含有量は、食中毒菌の死滅速度が速かった試料の方が遅かった試料に比べて有意に少なかった。これらの結果より、

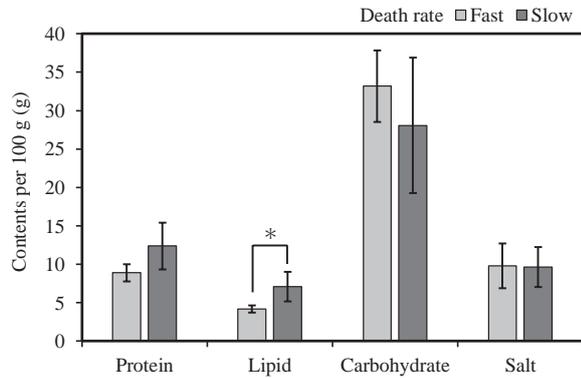


Fig. 3: 食中毒菌の死滅速度と味噌中成分の関係

Fast; 味噌中の食中毒菌の死滅速度が速かった4試料の平均値,
Slow; 味噌中の食中毒菌の死滅速度が遅かった4試料の平均値. * $p < 0.05$

食中毒菌の死滅速度には、味噌の脂質含有量が関与している可能性が推察された。しかし、今回は、比較した試料数が少ない(4試料 vs. 4試料)ことから、今後試料数を増やして検討する必要がある。

2. 保存温度 30℃における味噌中の食中毒菌数の変動

保存温度 4℃における味噌中の食中毒菌数の変動の結果より、食中毒菌の菌数減少が速い(米甘みそBおよび豆みそA)、または遅い味噌(米甘みそA)および試料を米(米辛口みそH)、麦(麦みそA)、調合味噌(調合みそB)から各1種類の6種を選抜し、保存温度 30℃における食中毒菌の生菌数の変動を調べた(Fig. 4)。その結果、サルモネラおよび大腸菌を接種した全ての試料において7日目までに検出限界以下となった(Fig. 4 (A)(B))。黄色ブドウ球菌を接種した米甘みそAのみが7日目までに検出限界以下に至らなかった(Fig. 4 (C))が、4℃で保存した際の生菌数の推移と比較するとその減少速度が大きくなった。味噌に接種した食中毒菌は、低温条件下(4℃)よりも高温条件下(30℃)で生育が抑制されたことから、

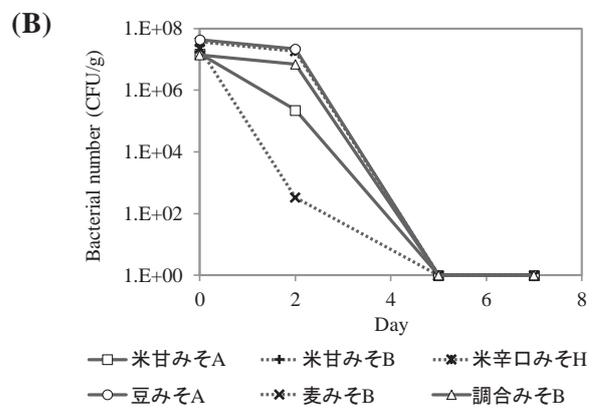
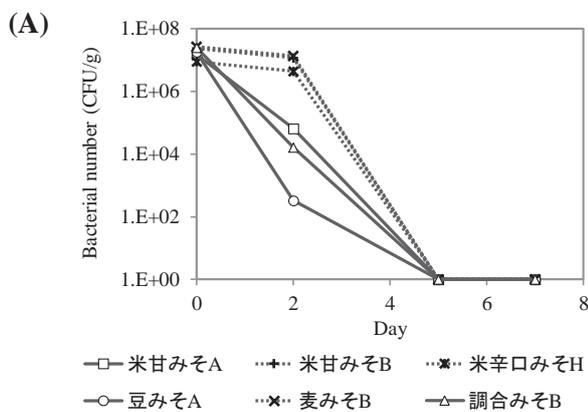
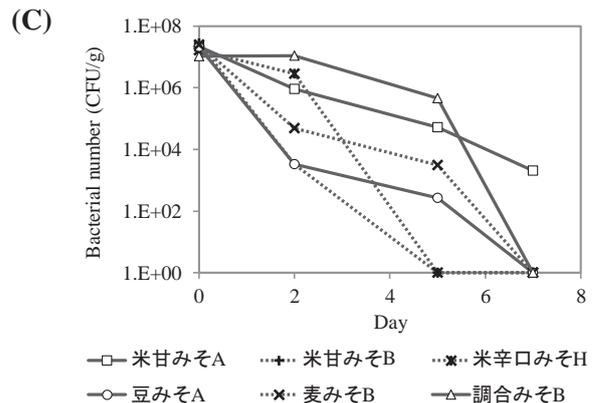


Fig. 4: 保存温度30℃における味噌中の食中毒菌数の変化

(A) *Salmonella* Enteritidis NBRC3313,
(B) *Escherichia coli* JCM2449,
(C) *Staphylococcus aureus* C-29.



味噌中に、30℃で保存した際に、新たに生成もしくは活性化する成分が存在する可能性が示唆された。過去の報告によると、味噌中に混入した大腸菌の生菌数は、特定の保存条件下では寒天平板法の検出限界以下まで減少することが報告されており⁸⁾、本研究の結果も既報の結果を支持する結果となった。

3. 各種味噌中の細菌叢の変動

味噌中のDNAを抽出する方法について検討したが、いずれの方法においても味噌中微生物由来のDNAは、次世代シーケンシング解析に必要な量を得るまでに至らなかった。今後は、ジルコニアビーズによる破碎方法を使用し、DNAの抽出効率の向上を図る予定である。

4. 各種味噌中の理化学検査

選抜した6種（米味噌3種、豆味噌1種、麦味噌1種および調合味噌1種）を検体としてpHの測定を行った（Fig. 5 (A)）。その結果、最も高い試料で平均pH5.6（米甘みそA）、最も低い試料で平均pH4.9（豆みそA）となり、味噌試料間でのpHの差が確認された。しかし、30℃で7日の保存した味噌試料において1日目と7日目でpHの増減は確認されなかったことから、味噌中における食中毒菌の抑制因子は、pHによるものではないことが示唆された。

酸度については、最も高い試料で平均0.44%（豆みそA）、最も低い試料で平均0.1%（米甘みそA）となり、味噌試料間での酸度の差が確認された（Fig. 5 (B)）。しかし、30℃で7日の保存した味噌試料において1日目と7日目で酸度の増減は確認されなかったことから、味噌中における食中毒菌の抑制因子は、酸によるものではないことが示唆された。

アミノ酸含有量については、4℃および30℃で7日の保存した試料におけるアスパラギン酸（Asp）、トレオニン（Thr）、セリン（Ser）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、システイン（Cys）、バリン（Val）、メチオニン（Met）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、チロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、リシン（Lys）、ヒスチジン（His）、アルギニンおよびNH₃の含有量の変化を調べた。30℃で7日の保存した試料における抗菌作用を示すGlyおよびAlaの含有量の変化については、米甘みそAのGly、豆みそA、麦みそBおよび調合みそBのAlaの含有量が約5%上昇したが、その他の試料では、アミノ酸含有量の変化は±5%以内に留まった（Fig. 6 (A)）。また、30℃で7日の保存した試料における味噌の熟成度を示す指標となる成分として報告されているLys、Glu、Phe、ArgおよびAsp⁹⁾の含有量の変

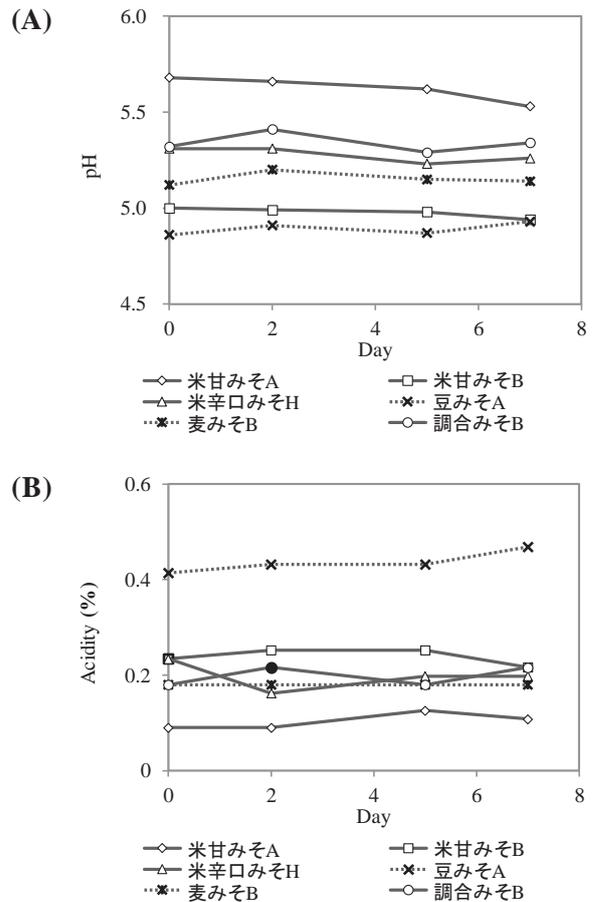


Fig. 5 : 保存温度30℃における味噌中の (A) pH および (B) 酸度の推移

化については、Lys、Glu、PheおよびAspの含有量が約5%上昇したが、Argの含有量に変化は認められなかった（Fig. 6 (B)）。上記以外のアミノ酸含有量についても、4℃および30℃で7日保存した試料間で差は認められなかった。これらの結果より、味噌中における食中毒菌の抑制因子は、アミノ酸によるものではないことが示唆された。

5. 加熱処理後の味噌における食中毒菌数の変動

オートクレーブで加熱した味噌試料に各種食中毒菌を接種して30℃で7日保存し、継時的に食中毒菌数の変動を調べた。その結果、オートクレーブ加熱後の味噌においても、オートクレーブ加熱していない味噌試料と同様に食中毒菌数が有意に減少した。これらの結果より、味噌中に生存している微生物により、食中毒菌の増殖抑制効果が得られている可能性は低いことが推察された。また、食中毒菌の増殖抑制効果を有する物質は、耐熱性であることが示唆された。今後は、

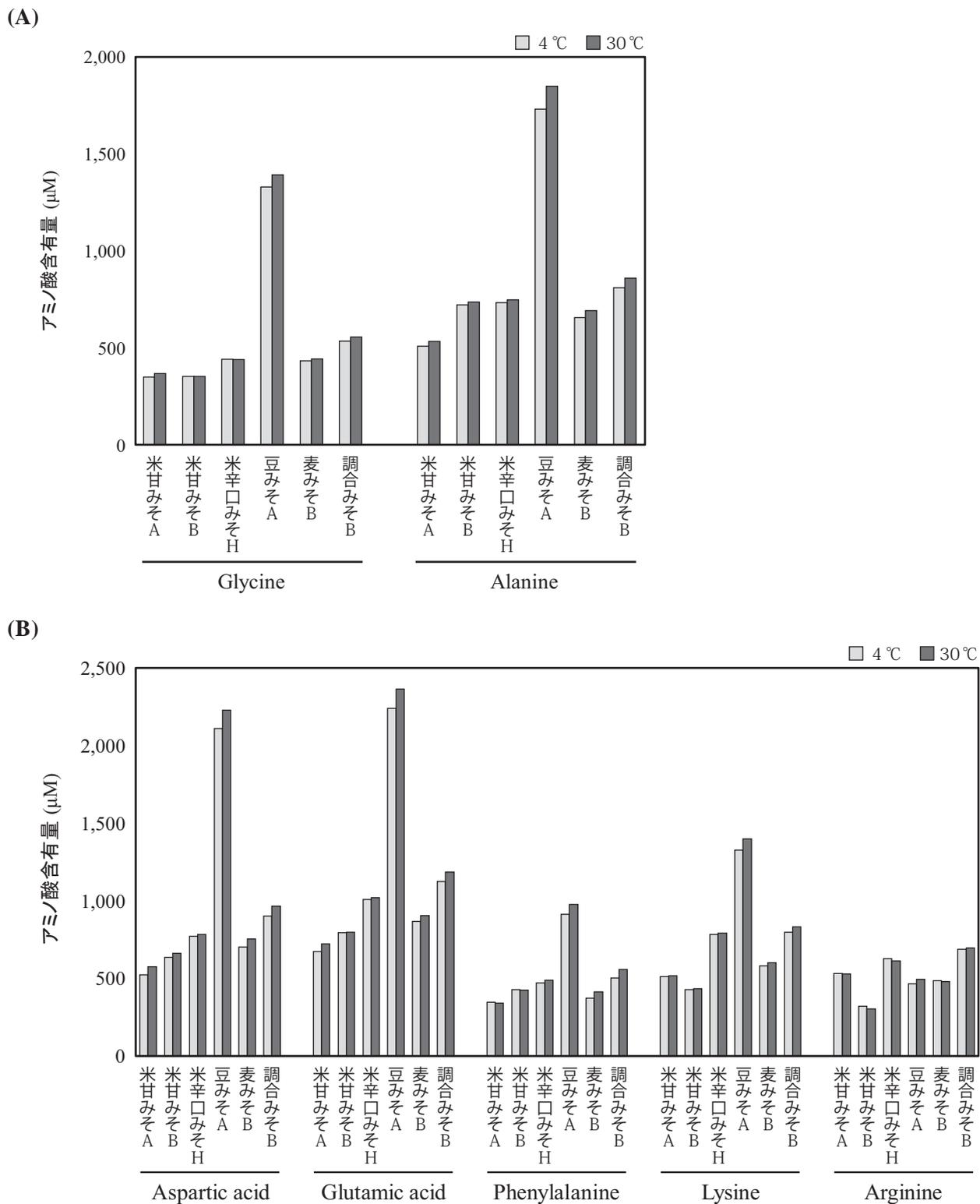


Fig. 6 : 保存温度の違いが味噌中のアミノ酸含有量に及ぼす影響 (n=2)

(A) 抗菌作用のあるアミノ酸, (B) 味噌の熟成度を反映するアミノ酸.

食中毒菌の増殖抑制効果を有する物質が30℃の保存期間中に生成するものか、もしくは30℃で活性化する物質であるかについて明らかにする予定である。現在、30℃で10日間保存した味噌に食中毒菌を接種した後、4℃で保存した場合の食中毒菌数の変動について検討している。

総括

本研究では、近年市販されている各種味噌が食中毒菌に汚染された際の細菌の挙動に影響を及ぼす因子について検討し、以下のことを明らかにした。

- (1) 各種市販味噌に食中毒菌を接種し、4℃で保存したところ、食中毒菌の死滅速度が速い味噌と遅い味噌が存在した。その因子については、味噌の主原料や食塩含有量以外の因子が関与していることが示唆された。
- (2) 4℃で保存した際に食中毒菌の死滅速度が速い、または遅い味噌を6試料選抜し、食中毒菌を接種した後、30℃で保存したところ、サルモネラおよび大腸菌を接種した全ての試料において7日目までに検出限界以下となった。これらの結果より、味噌中に、30℃で保存した際に新たに生成もしくは活性化する成分が存在する可能性が示唆された。
- (3) 保存温度が味噌の成分に及ぼす影響について明らかにするために、30℃における味噌のpHおよび酸度の変化と、4℃および30℃で保存した味噌のアミノ酸含有量の比較を行った。その結果、30℃、7日間の保存期間中において、味噌のpHおよび酸度に変化は認められず、4℃で保存した味噌と30℃で保存した味噌のアミノ酸含有量についても大きな差は認められなかった。
- (4) オートクレーブ加熱した味噌試料に各種食中毒菌を接種して30℃で7日間保存し、継時的に食中毒菌数の変動を調べた。その結果、オートクレーブで加熱後の味噌においても、加熱していない味噌試料と同様に食中毒菌数が有意に減少した。これらの結果より、味噌中に生存している微生物により、食中毒菌の増殖抑制効果が得られている可能性は低いことが推察された。また、食中毒菌の増殖抑制効果を有する物質は、耐熱性であることが示唆された。

本研究の結果より、30℃で新たに生成もしくは活性化する味噌中の物質により、食中毒菌の増殖が抑制されていることを明らかにした。また、オートクレー

ブで加熱後の味噌においても食中毒菌数が有意に減少したことから、食中毒菌の増殖抑制効果を有する物質は耐熱性であり、味噌中に生存している微生物により食中毒菌の増殖抑制効果が得られている可能性は低いことが推察された。本研究の成果および今後の更なる研究により、味噌の微生物学的な安全性や品質向上に寄与する新たな成分や因子を見出し、病原性因子の発現抑制メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、一般社団法人中央味噌研究所の研究助成と試験試料の提供により実施したものです。本研究の遂行に、多大なるご支援を賜りました一般社団法人中央味噌研究所 常任理事 中野京子氏をはじめ、関係者の方々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 窪田 譲, 伊藤公雄, 望月 務.: 味噌と病原細菌. *日本醸造協会雑誌*, **76(12)**: 821-826 (1981).
- 2) Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., Kagaya, I.: Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, Suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*, **9(5)**: 429-435 (2004).
- 3) Onda, T., Yanagida, F., Uchimura, T., Tsuji, M., Ogino, S., Shinohara, T., Yokotsuka, K.: Widespread distribution of the bacteriocin-producing lactic acid cocci in Miso-paste products. *Journal of applied microbiology*, **92(4)**: 695-705 (2002).
- 4) みその製造法, みそ技術ハンドブック, 全国味噌技術会編集発行, 14-32 (1995).
- 5) Nam, Y. D., Yi, S. H., Lim, S. I.: Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control*, **28(1)**: 135-142 (2012).
- 6) Nam, Y. D., Lee, S. Y., Lim, S. I.: Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, **155(1)**: 36-42 (2012).
- 7) Kim, Y. S., Kim, M. C., Kwon, S. W., Kim, S. J., Park, I. C., Ka, J. O., Weon, H. Y.: Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional

fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *The Journal of Microbiology*, **49**(3): 340-348 (2011).

8) 伊藤公雄, 今井 学, 石神 実, 武田 茂, 安平 仁美. : 味噌熟成過程における添加大腸菌の消長, *味噌の科学と技術*, **34**9: 102-106 (1983).

9) Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T., & Miyano, H.: Advantage of LC-MS metabolomics methodology targeting hydrophilic compounds in the studies of fermented food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(4): 1119-1126 (2009).

補足資料

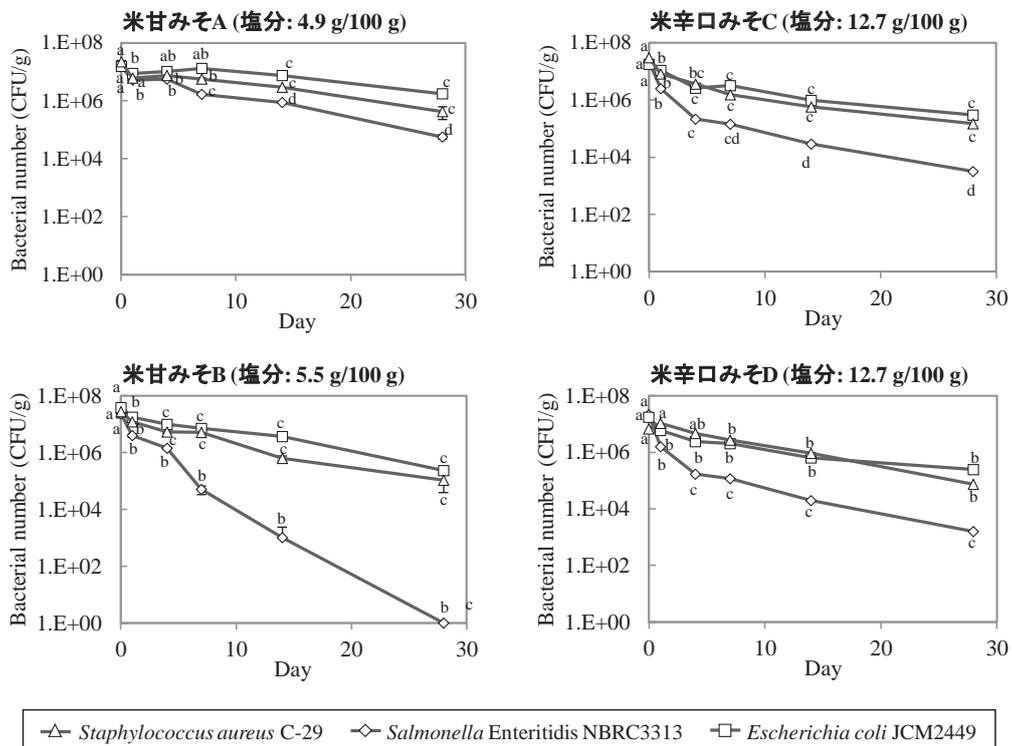


Fig. S1 : 保存温度 4 °Cにおける味噌中の食中毒菌数の変化

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$

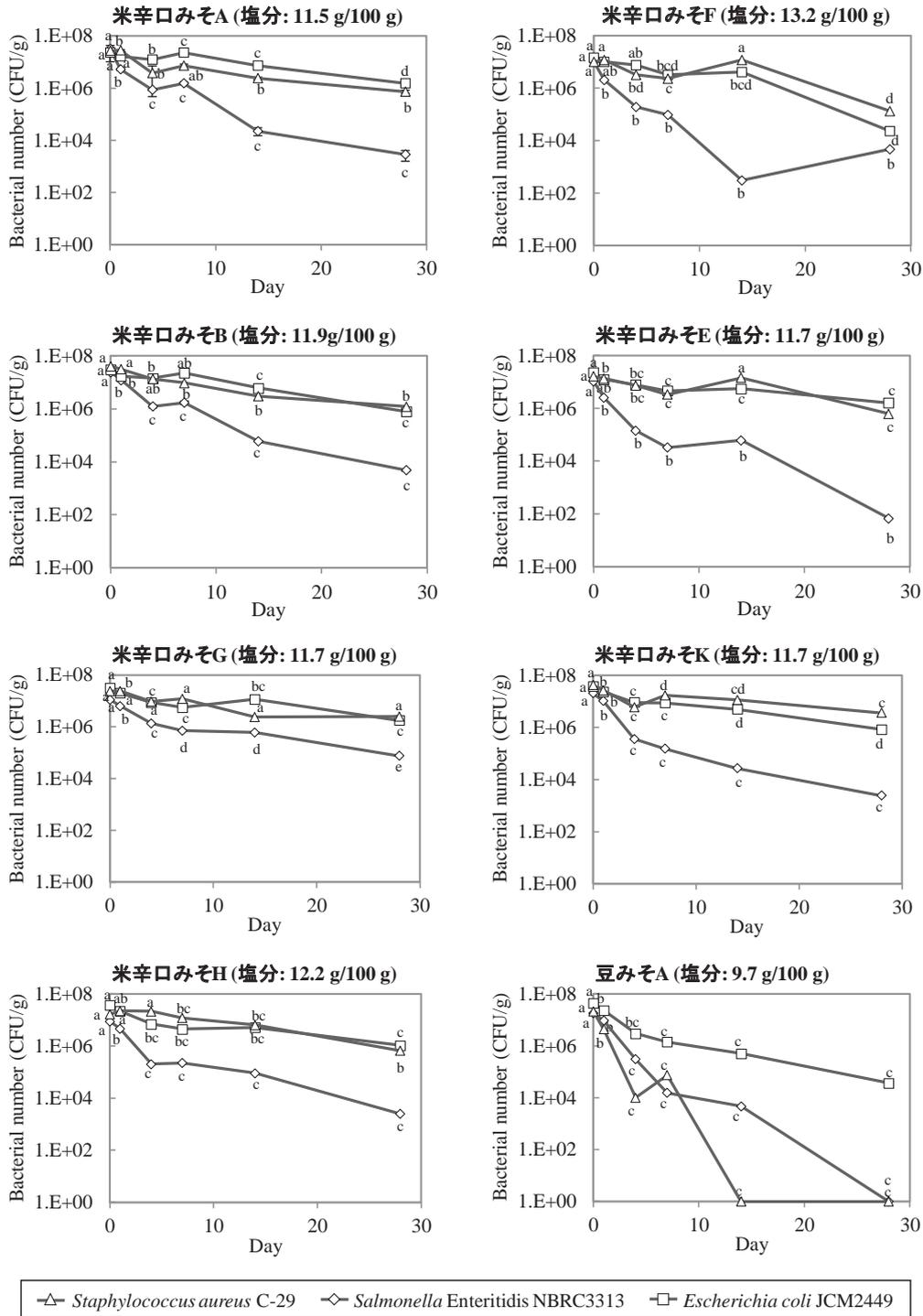


Fig. S1 (続き) : 保存温度 4 °C における味噌中の食中毒菌数の変化

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$

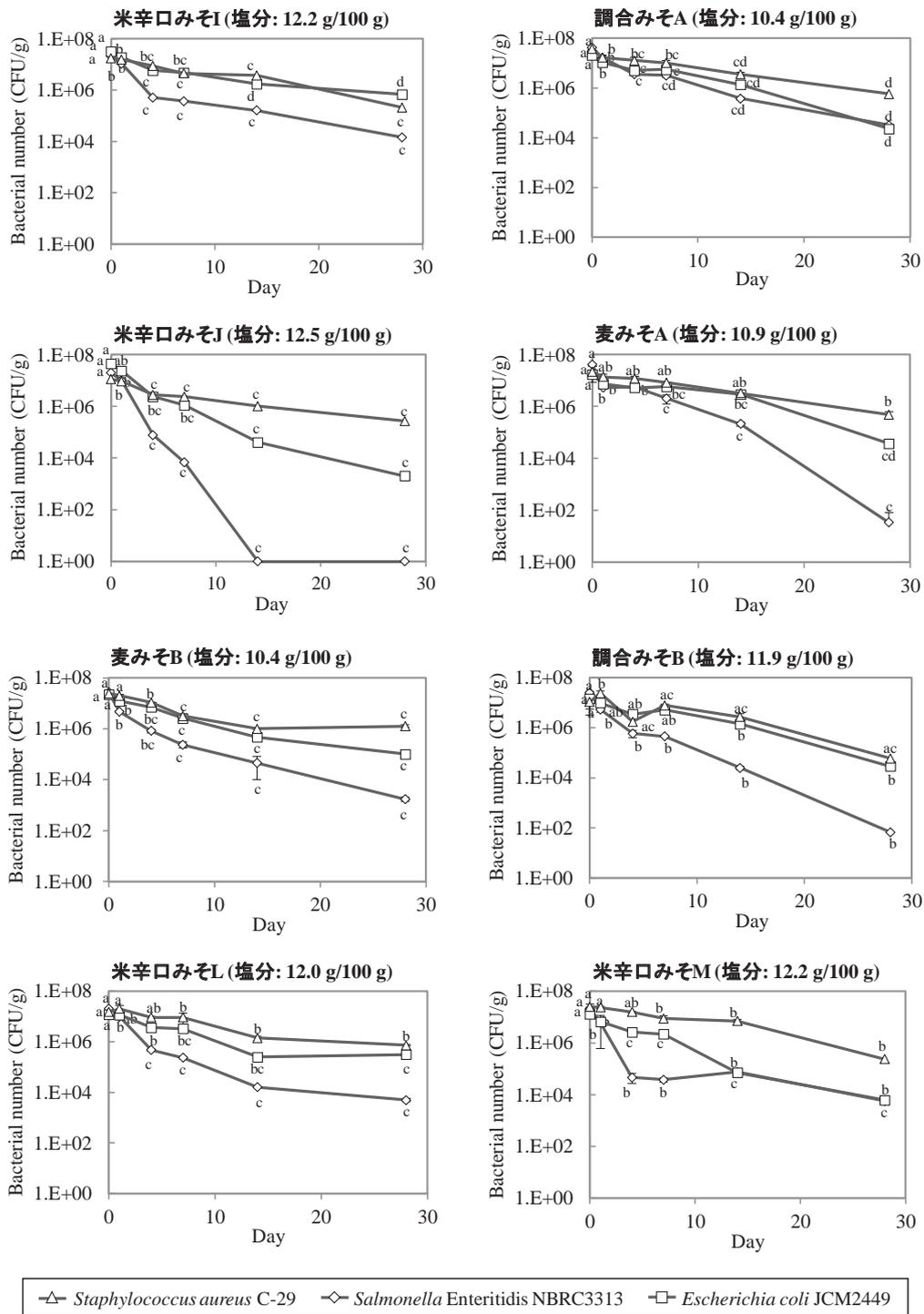


Fig. S1 (続き) : 保存温度 4 °C における味噌中の食中毒菌数の変化

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$

Table.S1-1：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（米甘みそA）

	4℃	30℃
Asp	523.9	575.6
Thr	627.2	634.0
Ser	489.3	511.1
Glu	673.5	723.3
Gly	349.4	367.2
Ala	508.6	533.0
Cys	140.4	145.3
Val	469.3	453.2
Met	114.4	112.2
Ile	294.7	303.2
Leu	585.3	581.8
Tyr	269.0	296.9
Phe	346.0	341.4
Lys	510.9	518.1
His	108.2	105.8
NH ₃	890.2	1002.0
Arg	531.7	529.9

(単位：μM)

Table.S1-2：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（米甘みそB）

	4℃	30℃
Asp	635.2	660.7
Thr	477.5	501.1
Ser	468.4	467.7
Glu	794.9	798.2
Gly	353.5	353.6
Ala	722.3	737.3
Cys	142.2	157.8
Val	483.2	480.1
Met	100.3	82.9
Ile	339.4	342.5
Leu	639.1	610.4
Tyr	336.7	349.9
Phe	427.3	424.7
Lys	428.8	432.7
His	45.7	41.1
NH ₃	1705.7	1777.5
Arg	320.6	303.7

(単位：μM)

Table.S1-3：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（米辛口みそH）

	4℃	30℃
Asp	770.5	781.6
Thr	500.5	489.5
Ser	597.4	596.6
Glu	1008.5	1018.9
Gly	441.2	439.9
Ala	733.1	747.4
Cys	191.1	182.1
Val	633.6	633.9
Met	142.2	109.5
Ile	444.1	443.0
Leu	833.0	870.5
Tyr	353.8	368.0
Phe	470.3	486.8
Lys	784.0	791.3
His	93.8	101.3
NH ₃	1804.6	1889.3
Arg	627.1	612.5

(単位：μM)

Table.S1-4：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（豆みそA）

	4℃	30℃
Asp	2109.8	2227.5
Thr	1229.5	1291.6
Ser	1821.1	1919.8
Glu	2240.7	2363.9
Gly	1329.5	1392.2
Ala	1731.4	1848.4
Cys	272.8	270.3
Val	1503.7	1618.3
Met	196.9	205.5
Ile	1018.3	1232.6
Leu	1335.5	1709.2
Tyr	221.8	252.0
Phe	913.8	978.1
Lys	1325.4	1397.3
His	358.6	368.3
NH ₃	5082.4	5374.4
Arg	465.1	493.7

(単位：μM)

Table.S1-5：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（麦みそB）

	4℃	30℃
Asp	700.7	754.9
Thr	513.1	516.9
Ser	566.7	589.4
Glu	866.3	905.6
Gly	432.9	443.5
Ala	656.3	691.5
Cys	133.1	126.4
Val	540.7	554.5
Met	108.0	95.1
Ile	384.0	394.7
Leu	681.5	721.5
Tyr	313.4	295.4
Phe	372.1	412.7
Lys	580.7	601.1
His	81.3	82.7
NH ₃	1686.8	1833.7
Arg	485.9	480.5

(単位：μM)

Table.S1-6：4℃で保存した試料と30℃で7日の保存した試料におけるアミノ酸含有量の比較（調合みそB）

	4℃	30℃
Asp	900.5	965.4
Thr	571.3	599.9
Ser	702.3	742.2
Glu	1122.8	1184.6
Gly	535.0	555.8
Ala	809.9	858.6
Cys	201.9	197.6
Val	719.2	748.9
Met	146.3	126.6
Ile	509.3	531.4
Leu	911.4	982.0
Tyr	379.2	398.8
Phe	502.7	558.0
Lys	796.8	831.7
His	104.4	113.9
NH ₃	1981.9	2143.7
Arg	688.0	695.3

(単位：μM)

研究報告

味噌による免疫系の活性化を介したがん予防

永尾 雅哉

Cancer prevention through activation of innate immunity
by compounds in Miso

Masaya NAGAO

*Division of Integrated Life Science,
Graduate School of Biostudies, Kyoto University,
Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan.*

【要旨】

味噌の原料の大豆に含まれるイソフラボン類が、樹状細胞からのナチュラルキラー（NK）細胞活性化因子であるインターロイキン-12（IL-12）産生を促進することで、間接的に自然免疫系を活性化する可能性を考えて、その確認を試みた。単球系の細胞株であるTHP-1細胞をホルボール 12-ミリステート 13-アセテート（PMA）とインターロイキン-4（IL-4）で樹状細胞様の細胞に分化させた細胞系を用いて、イソフラボン類のIL-12産生誘導能を観察した。その結果、ゲニステインにはIL-12産生誘導能はなかったが、ダイゼインはIL-12の産生を用量依存的に促進することが明らかになった。その他のイソフラボン類についても検討したところ、バイオカニンAにはIL-12産生誘導能はなかったが、フォルモノネチンには観察された。IL-12はNK細胞活性化因子であり、大豆イソフラボンのダイゼインをはじめ、ある種のイソフラボン類は、IL-12の産生誘導を介して、自然免疫系を活性化して、がん予防につながる可能性が示唆された。

【目的】

大豆イソフラボンが、樹状細胞からのNK細胞活性化因子であるIL-12の産生を促進することで、間接的にNK細胞が活性化され、がん予防につながる可能性について検討することを目的とした。

【方法】

IL-12測定：96穴プレートに20 ng/ml PMA, 20 ng/ml ヒト組換え型IL-4, 10 % ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地に 1.1×10^5 cells/mlで分散させたTHP-1細胞を100 μ l播種し、5 % CO₂存在下、37℃で96時間培養して樹状細胞様に分化誘導させ、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回洗浄後、1 mg/mlのオボアルブミンと被験サンプルを含み、PMA, IL-4を含まない上記培地を100 μ l加えて、72時間培養した。培養後、プレートを1,000 rpm, 4℃で、5分間遠心し、上清70 μ lを回収した。培養上清中のIL-12量は、ヒトIL-12測定キット（Cisbio）を用いて測定した。なお、ポジティブコントロールとしては、リンゴプロシアンジン（アサヒビールより入手）を用いた。

NK 活性測定： 2.5×10^5 cells / well (1.25 ml / 12 well plate) のNK細胞株 KHYG-1を100 IU/mlのIL-2 (WAKO) と10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で、被験物質を添加して24時間前処理を行った。ポジティブコントロールとしては、フラボノイドの一種であるノビレチン (東京化成工業) を30 μ Mになるように添加した。一方、標的となる白血病細胞株 K562 はPBSで洗浄後、10 μ g/ml の calcein-AM を含む血清を含まないRPMI1640培地で、30分間遮光して室温で緩やかに混和し、PBSで洗浄後、1%のウシ血清アルブミンを含み、フェノールレッドを含まないRPMI1640培地 (アッセイ培地) を加えて、96 well plate に100 μ l ずつ、 1×10^4 cells / well になるように播種した。前述の被験物質で処理したKHYG-1細胞を96 well plate に100 μ l ずつ、 1×10^4 cells / well になるように、先ほど播種したK562細胞の上に添加した (K562 : KHYG-1 = 1 : 1)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で4h培養後、上清の calcein の量をプレートリーダー PowerScan 4 (DS Pharma Biomedical) で測定した (excitation / emission = 485 nm / 538 nm)。

【結果】

PMA とIL-4により樹状細胞様に分化したTHP-1細胞に、大豆に含まれるイソフラボンであるダイゼイン、ゲニス테인、グリシテインと、ひよこ豆などに多く含まれるイソフラボンのフォルモノネチン、バイオカニンAを添加して培養したところ、ダイゼインとフォルモノネチンでは用量依存的なIL-12の産生促進が見られるのに対して、ゲニス테인、グリシテイン、バイオカニンAでは産生促進効果は見られなかった (図1)。

なお、前年度にゲニス테인は直接NK細胞を活性化しないことを、NK細胞株のKHYG-1の白血病細胞株K562への細胞傷害性を見る系で示したが、ダイゼイン、グリシテイン、フォルモノネチンも同様にNK細胞を活性化しないことを、同じ系で確認した (図2)。

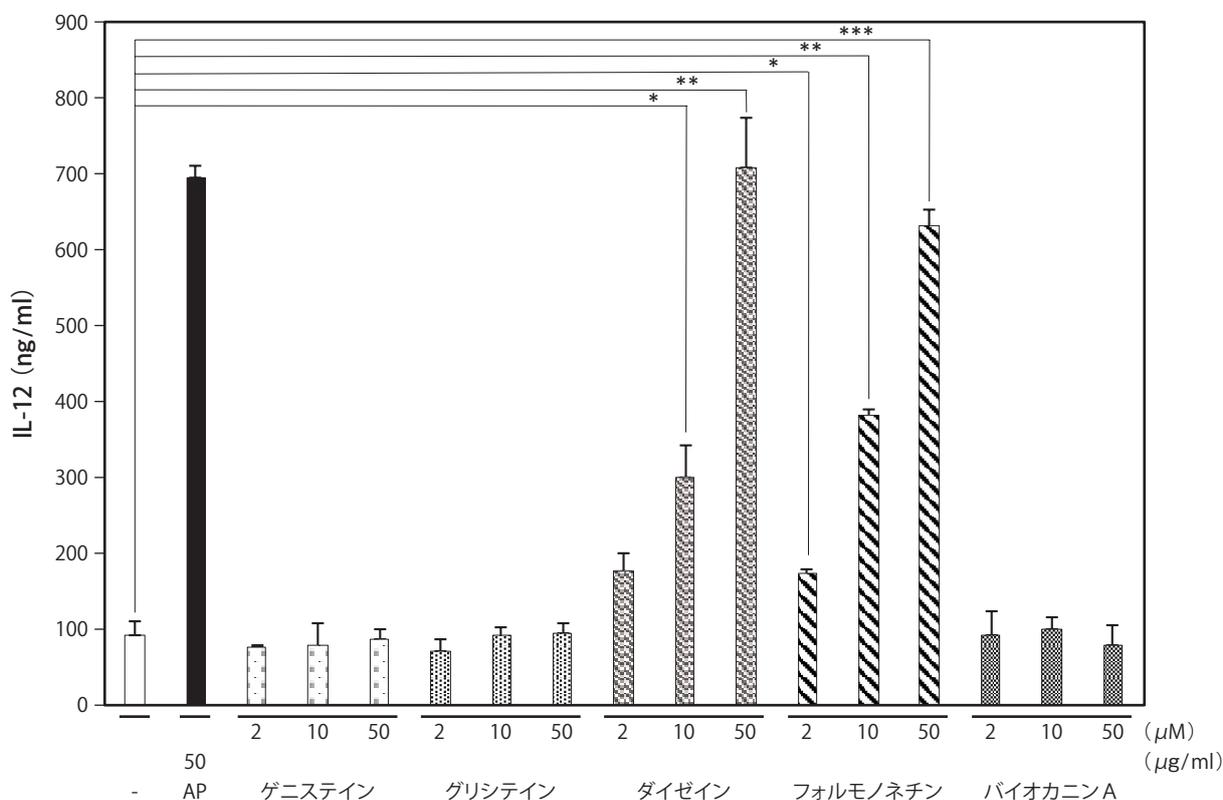


図1. 各種イソフラボン類による樹状細胞様に分化させたTHP-1細胞からのIL-12産生 (n = 3, mean \pm SD, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

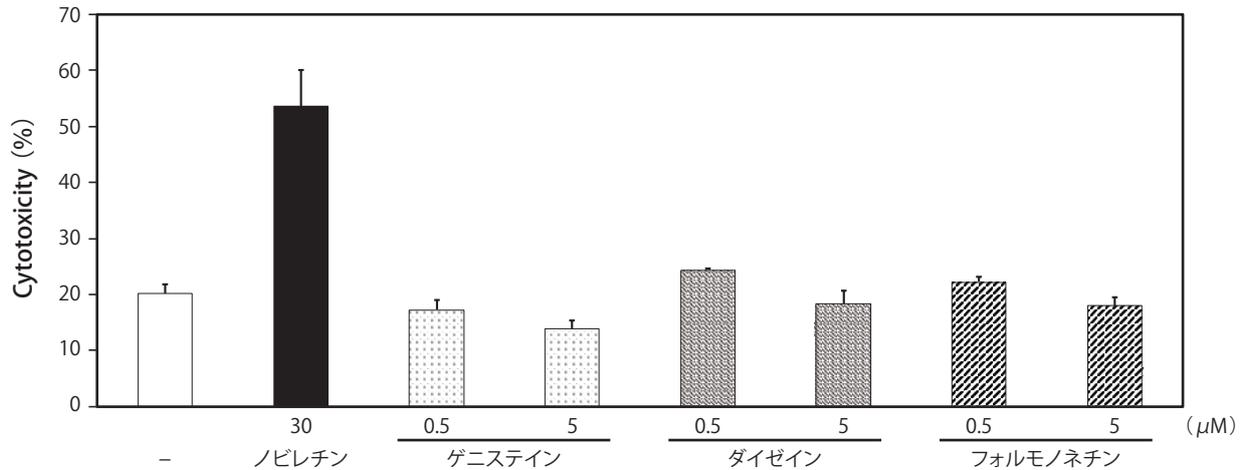


図2. NK活性に対するイソフラボン類の効果

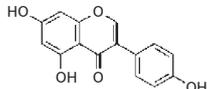
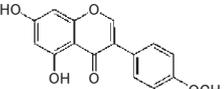
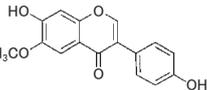
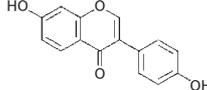
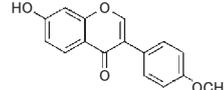
ノビレチンはポジティブコントロール。イソフラボン類（ゲニステイン、ダイゼイン、フォルモノネチン）にはNK活性促進能はない。(n=3)

【考察】

信州大学の菅元教授（現・名誉教授）らのグループにより、無塩味噌粉末（正確には塩を含まないものは味噌と呼ばない）をC3H/HeNマウスに投与すると、脾臓中の免疫関連細胞であるIL-12⁺CD11b⁺細胞、CD49b⁺細胞が増えることが示されていた¹⁾。CD49⁺細胞は主に自然免疫系のNK細胞と考えられ、大豆に含まれる成分が直接NK細胞の活性化に関わっている可能性が考えられた。そこで、前年度に味噌の原料である大豆に含まれる成分として、イソフラボン類の一種のゲニステインに着目し、NK細胞株KHYG-1の白血病細胞株K562に対する傷害性で評価する系²⁾で検討したが、残念ながらNK細胞の直接的な活性化は見られなかった。また本年は、大豆の主要なもう一つのイソフラボンであるダイゼインについても同様の実験を行ったが、ゲニステインと同様に活性化は見られなかった（図2）。そこで、無塩味噌粉末でIL-12⁺CD11b⁺細胞が増加することに着目し、CD11b⁺細胞に分類されるマクロファージや樹状細胞からの、NK活性化因子であるIL-12の分泌を促進することで、大豆イソフラボンが間接的にNK細胞を活性化する可能性について検討することにした。今回は、信州大学の中村宗一郎教授らが開発した、単球系の細胞株であるTHP-1細胞をPMAとIL-4で樹状細胞様に分化させた細胞系で、オボアルブミン刺激下でのIL-12産生に及ぼすイソフラボン類の効果を検討した。なお、ポジティブコントロールとしては、この論文でIL-12産生誘導能が示されていたリン

ゴプロシアニジンを用いた³⁾。その結果、ダイゼインによって、樹状細胞様に分化したTHP-1細胞からのIL-12産生が促進されたが、ゲニステインにはその活性がなかった（図1）。そこで、その他の大豆イソフラボンであるグリシテイン、ならびに、ひよこ豆に多く含まれるイソフラボンであるフォルモノネチン、バイオカニンAについてもIL-12産生誘導能を観察したところ、フォルモノネチンにのみ活性が認められた（図1）。イソフラボン類の構造と樹状細胞様の細胞からのIL-12産生能との構造活性相関から、A環の5位に水酸基がないダイゼインやフォルモノネチンにはIL-12産生促進能があるが、この位置に水酸基があるゲニステイン、バイオカニンAでは活性がなくなることが分かった。また、ダイゼインのA環の6位にメトキシ基が加わったグリシテインでは、ダイゼインで見られた活性が消失することが明らかになった（表1）。ダイゼインやフォルモノネチンは何に作用してIL-12の産生を促進するかについては今後の検討課題である。A環の5位に水酸基があるゲニステインも、この位置に水酸基がないダイゼイン（表1）も、例えばエストロゲン受容体（ER）（特にERβ）を介して、エストロゲン様の活性を示すことが知られており⁴⁾、この樹状細胞様の細胞からのIL-12産生誘導では、ダイゼインはIL-12産生誘導活性があるものの、ゲニステインには活性が見られないのとは全く対照的であり、IL-12産生誘導に関わるダイゼインの標的はエストロゲン受容体とは異なるのではないかと予想される。

表1. イソフラボン類と IL-12 産生誘導能

IL-12産生誘導活性	化合物	
-	 ゲニステイン	 バイオカニンA
	 グリシテイン	
+	 ダイゼイン	 フォルモノネチン

IL-12 はNK 細胞活性化因子として知られているため⁵⁾、本研究では大豆イソフラボンのダイゼインが、樹状細胞などからの IL-12 の産生を誘導することで、自然免疫系の NK 細胞を活性化して、がん予防につながる可能性が示唆された。IL-12 は Th1 細胞を増やす形で、腸管の Th1/Th2 バランスを制御することで、アレルギーの制御に関わっている可能性が示唆されており⁶⁾、ダイゼインによる、IL-12 の産生制御は、腸管免疫系の制御にも重要なのかも知れない。

【謝辞】

本研究は、平成28年度一般社団法人中央味噌研究所研究助成のご支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Karasawa K, Sugiura Y, Kojima M, Uzuhashi Y, and Otani H. (2013): Fermented soybean powder with rice mold in the absence of salt stimulates the cellular immune system and suppresses the humoral immune response in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 59, 564-569.
- 2) Nagahama K, Eto N, Shimojo T, Kondoh T, Nakahara K, Sakakibara Y, Fukui K, and Suiko M. (2015): Effect of kumquat (*Fortunella crassifolia*) pericarp on natural killer cell activity in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 1327-1336.
- 3) Katayama S, Kukita T, Ishikawa E, Nakashima S, Masuda S, Kanda T, Akiyama H, Teshima R, and Nakamura S. (2013): Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells. *Food Chem* 138, 757-761.
- 4) An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N. and Leitman DC. (2001): Estrogen receptor β -selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogen. *J Biol Chem* 276, 17808-17814.
- 5) Trinchieri G. *Immunobiology of Interleukin-12*. (1998): *Immunol Res* 17, 269-278.
- 6) Sergio R. (2004): Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 1113, 395-400.

研究報告

味噌のフィターゼ特性を活用した
フィチン酸低減化技術の開発

中川 良二

Technical development for reduction of the phytic acid by phytase from Miso

Ryoji NAKAGAWA

*Hokkaido Research Organization, Food Processing Research Center,
589-4 Bunkiyodai Midori-Machi, Ebetsu, Hokkaido, 069-0836, Japan.*

I 緒言

亜鉛はヒトの健康や栄養バランスの維持に重要な必須微量元素であり、欠乏すると味覚異常、免疫機能低下および創傷治癒力低下等を招くなど人体に重篤な影響を与える¹⁾。最近の試算では、世界人口の実に25%が亜鉛欠乏傾向にあるとの報告^{2),3)}があり、亜鉛欠乏を予防することは、健康社会の実現のため重要な要素の一つとなっている。このことから、平成14年に厚生労働省が栄養機能食品成分として亜鉛を追加し、また、平成16年には文部科学省により給食中亜鉛含量の目標値を設定するなど、国による対策も講じられている。

我が国の食事摂取基準においては、一日あたり成人男性は10 mg、女性は8 mg（妊婦や授乳婦は数 mgの付加）の亜鉛を摂取することが推奨されている⁴⁾が、現状では充足されていない。また、通常の食事に含まれる亜鉛の消化管での吸収効率は30%前後と低い⁵⁾。したがって、必要量の亜鉛を充足させるには食事での亜鉛量を高めることや、消化管での亜鉛吸収効率を高めることが要求される。

亜鉛を多量に含む代表的な食材は、牡蠣、ホヤなど魚介類や豚レバーなどの動物性食品があげられるが、これらは日本人の食生活習慣から日常的に摂取することが難しい。また、植物性食品では豆類や種実類に比

較的多く、特に大豆は乾燥重量100 gあたり3.2 mg含まれ、牛や鶏のレバーに匹敵することから、亜鉛供給素材として期待される。

しかし、植物性食品である大豆には、亜鉛をはじめ、カルシウム、鉄、銅などの必須ミネラルの吸収を阻害するフィチン酸が多く含まれていること⁶⁾が知られており、吸収率を高めるためには、フィチン酸を十分に取り除くことが不可欠である。実際に、塩酸抽出等によりフィチン酸が除去された分離大豆タンパク質では、亜鉛の吸収効率が改善されることが報告されている⁷⁾。

大豆発酵食品では、フィチン酸は発酵過程に微生物が持つフィチン酸分解酵素（フィターゼ）により分解されることが報告⁸⁾されており、優れた亜鉛供給食品として期待される。味噌では、主に麴由来のフィターゼが大豆中のフィチン酸に作用し、これを分解することが示唆されている⁹⁾が、フィチン酸の分解に関与するフィターゼの種類が特定されていない。そこで、本研究では味噌および原料中のフィターゼを精製し、幾つかの化学的性質を明らかにするとともに、味噌の試作をおして効果的なフィチン酸低減化技術に繋がる基礎データの取得を目指した。

II 味噌および味噌原料のフィターゼ活性

1. 目的

味噌のフィチン酸含有量が他の大豆製品と比較して少ないことは幾つかの報告^{9),10)}があり、フィターゼの関与が示唆されている。麴のフィターゼについては Fujita らの報告があり、麴の液体培養物からフィターゼを見出し、特性を調べている¹¹⁾。一方、味噌は麴のほか、大豆も原料としており、大豆からもフィターゼが分離されている¹²⁾。また、麴の原料である米由来フィターゼに関する報告も出されている¹³⁾。味噌の原料である大豆や米は蒸煮処理を行うことから、酵素はほぼ失活していると考えられるが、味噌におけるフィターゼの由来は明らかにされていない。

そこで、本実験では味噌とその原料である大豆、米、麴のフィターゼ活性を調べるとともに、味噌の原料である米および大豆については蒸煮前後のフィターゼ活性についても調べた。

2. 実験方法

1) 粗酵素液の調製

大豆（道産大豆「ユキホマレ」）および米（市販の食用米）は一晩、2.5倍量の水に浸漬した。蒸煮はオートクレーブで95℃、30分間で行った。余分な水分を除き、氷冷した抽出バッファー（20 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 100 mM 酢酸緩衝液, pH 5.5）を加え、ホモジナイザーで破碎した。米麴（市販の味噌用）および味噌（試験試作したもの）は同抽出バッファーを加え、同様に破碎した。全てのサンプルは遠心分離（10,000 rpm, 20分, 4℃）し、上清を回収した。得

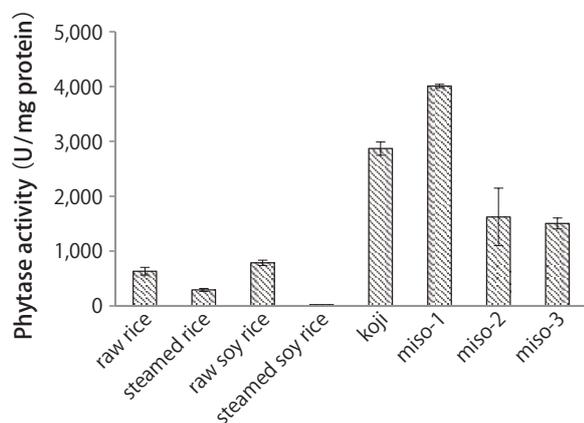


図1. 味噌原材料および味噌のフィターゼ活性

られた上清は50mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.2）で透析し、これを粗酵素液とした。

2) タンパク質量の測定

粗酵素液のタンパク質は Bradford 試薬（TaKaRa Bradford Protein Assay Kit, タカラバイオ）を用い、試薬に添付された説明書に準じて測定した。BSA 標準溶液の検量線から濃度を求めた。

3) フィターゼ活性の測定

2 mM フィチン酸を含む 20 mM 酢酸緩衝液（pH 5.2）に同量の粗酵素液を加え、40℃、60分間インキュベーションした。生成した無機リン酸をホスファテストワコー（和光純薬工業）にて、試薬に添付された説明書に準じて定量した。フィターゼ活性は1分間に1μMのリン酸の生成する酵素量を1Uと定義した。

3. 結果および考察

米、大豆、麴および味噌（3点）は全てフィターゼ活性を有していた（図1）。しかし、米は蒸煮することで活性が減少し、大豆はほぼ活性を失った。麴は高い活性を有していた。3点の味噌については、活性に約3倍の差が見られた。

これらの結果から、味噌のフィターゼ活性は主に麴由来であろうと推察されるが、米由来フィターゼが残存している可能性も考えられる。

III 味噌および味噌原料のフィターゼ精製

1. 目的

味噌のフィターゼ活性は、主に麴由来であろうと推察されたが、米由来フィターゼが残存している可能性も考えられた。したがって、味噌の含まれるフィターゼの由来を明らかにするには、味噌のフィターゼを精製するとともに、大豆や麴等の原料由来フィターゼを精製し、その性質を比較する必要がある。そこで、本実験では味噌および大豆、米、麴からフィターゼの精製を試みた。

2. 実験方法

1) サンプル

大豆（道産大豆「ユキホマレ」）、米はタンパク質の多い玄米（道産米「ゆきびりか」）、麴は生麴（北海道味噌株式会社）を用いた。味噌は蒸煮後の大豆に米麴（10割）と食塩（終濃度12%）を加え、8日間、30℃で発酵させた発酵初期段階のものを用いた。これは、味噌では発酵経過とともにタンパク質が分解され、低

分子化することが示されている¹⁴⁾ことから、当初のフィターゼに近い構造を維持しているものを調べるため比較的短期間発酵した味噌を用いることとした。

2) フィターゼの精製

II 2.1) に記した手順で粗酵素液を調製し、これに硫酸アンモニウムを80%飽和として加え、沈殿を20 mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) に溶解し、同緩衝液に対して24時間透析した。透析後、Toyoperl DEAE-650M イオン交換クロマトグラフィー (東ソー), Toyoperl SP-650M イオン交換クロマトグラフィー

(東ソー), Toyoperl HW55S ゲル濾過クロマトグラフィー (東ソー), ConA アフィニティークロマトグラフィー (アガロース固定化ゲル, J-オイルミルズ) の手順で精製した。各フラクションについて、280 nm の吸光度およびフィターゼ活性を測定した。

クロマトグラフィー後のフィターゼ活性画分は必要に応じてアミコンウルトラ (10K, Merck Millipore) を用いて濃縮した。

3) タンパク質量およびフィターゼ活性の測定

II 2.2) および3) を参照のこと。

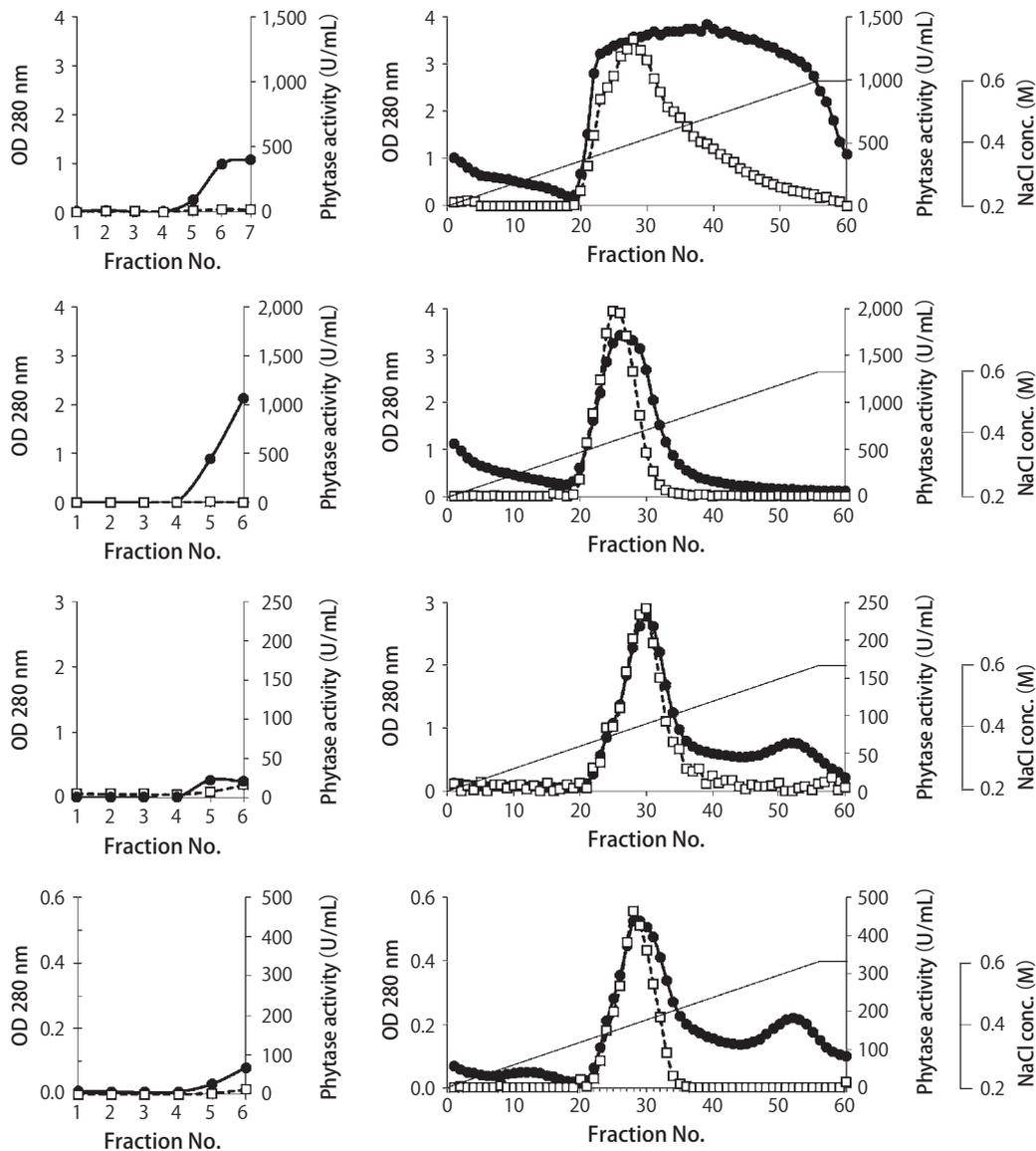


図2. DEAE-650M イオン交換クロマトグラフィーによるフィターゼの精製

上から大豆, 玄米, 麴および味噌由来フィターゼのクロマトグラム, ●; 280 nm 吸光度, □; フィターゼ活性

4) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

電気泳動はコンパクト PAGE・ツイン-R (アトー) を使い、泳動ゲルはc-パジェル (ゲル濃度: 5-20%, アトー), タンパク質染色はクマシーブリリアントブルー (イージーステインアクア, アトー) を用いて行った。分子量マーカーはSDS-PAGE用イージースタンダード (アトー) を用いた。

3. 結果および考察

1) DEAE-650M イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-650M イオン交換クロマトグラフィー (5.0 × 12.5 cm, 250 mL) は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化し、非吸着画分は同緩衝液で溶出 (50 mL/画分) した。吸着画分は 0.2 ~ 0.6 M NaCl の直線濃度勾配 (500 mL) で溶出 (1分/画分) した (図 2)。玄米のフィターゼ活性は吸着画分のフラクション No.25-26 にピークがあった。大豆, 麴および味噌の各フィターゼ活性はほぼ同様に吸着画分のフラク

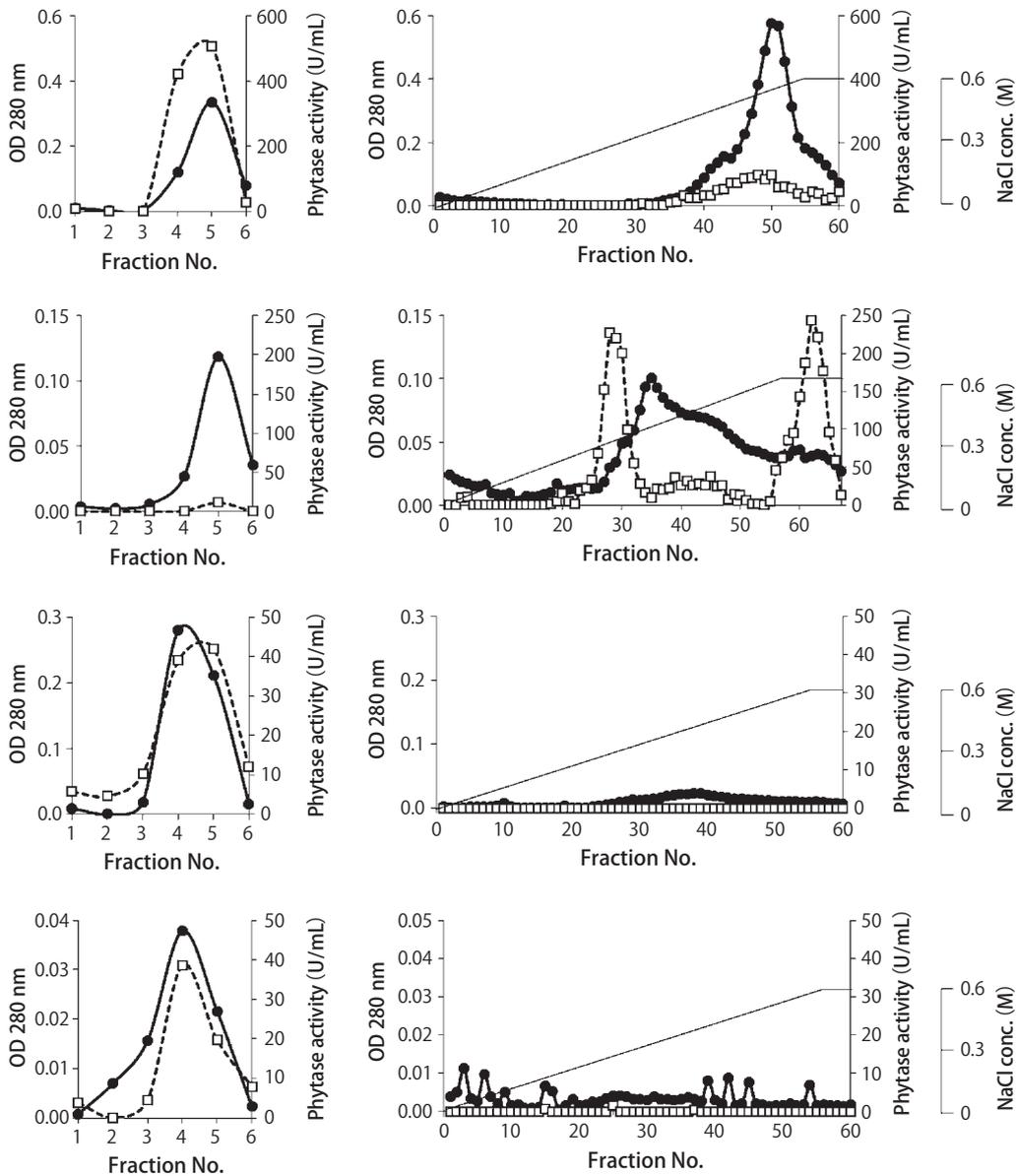


図 3. SP-650M イオン交換クロマトグラフィーによるフィターゼの精製

上から大豆, 玄米, 麴および味噌由来フィターゼのクロマトグラム, ●; 280 nm 吸光度, □; フィターゼ活性

ション No.28-30 にピークがあった。それぞれの最大活性フラクションを集め、次のクロマトグラフィーに供した。

2) SP-650M イオン交換クロマトグラフィー

SP-650M イオン交換クロマトグラフィー (5.0 × 12.5 cm, 250 mL) は 20 mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化し、非吸着画分は同緩衝液で溶出 (50 mL/画分) した。吸着画分は 0 ~ 0.6M NaCl の直線濃度勾配 (500 mL) で溶出 (1分/画分) した (図3)。玄米由来フィターゼは吸着画分の No.28-29 と No.62-63 にピークがあった(それぞれ玄米-1, 玄米-2 とする)。一方、大豆、麴および味噌の各フィターゼ活性は非吸着画分にピークがあった。それぞれの最大活性フラクションを集め、次のクロマトグラフィーに供した。

3) HW55S ゲル濾過クロマトグラフィー

HW55S ゲル濾過クロマトグラフィー (2.5 × 102 cm, 500 mL) は 0.5M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化し、供試試料は同緩衝液で溶出 (20分/画分) した (図4)。玄米-1, 大豆, 麴および味噌由来フィターゼ活性はフラクション No.50 付近にピークがあった。玄米-2 のフィターゼ活性はフラクション No.53-54 にピークがあった。それぞれの最大活性フラクションを集め、次のクロマトグラフィーに供した。

4) ConA アフィニティークロマトグラフィー

ConA アフィニティークロマトグラフィー (充填量; 1 mL) は TBS (トリス緩衝生理食塩水, pH7.4) で平衡化し、非吸着画分は同溶液で溶出 (5 mL,

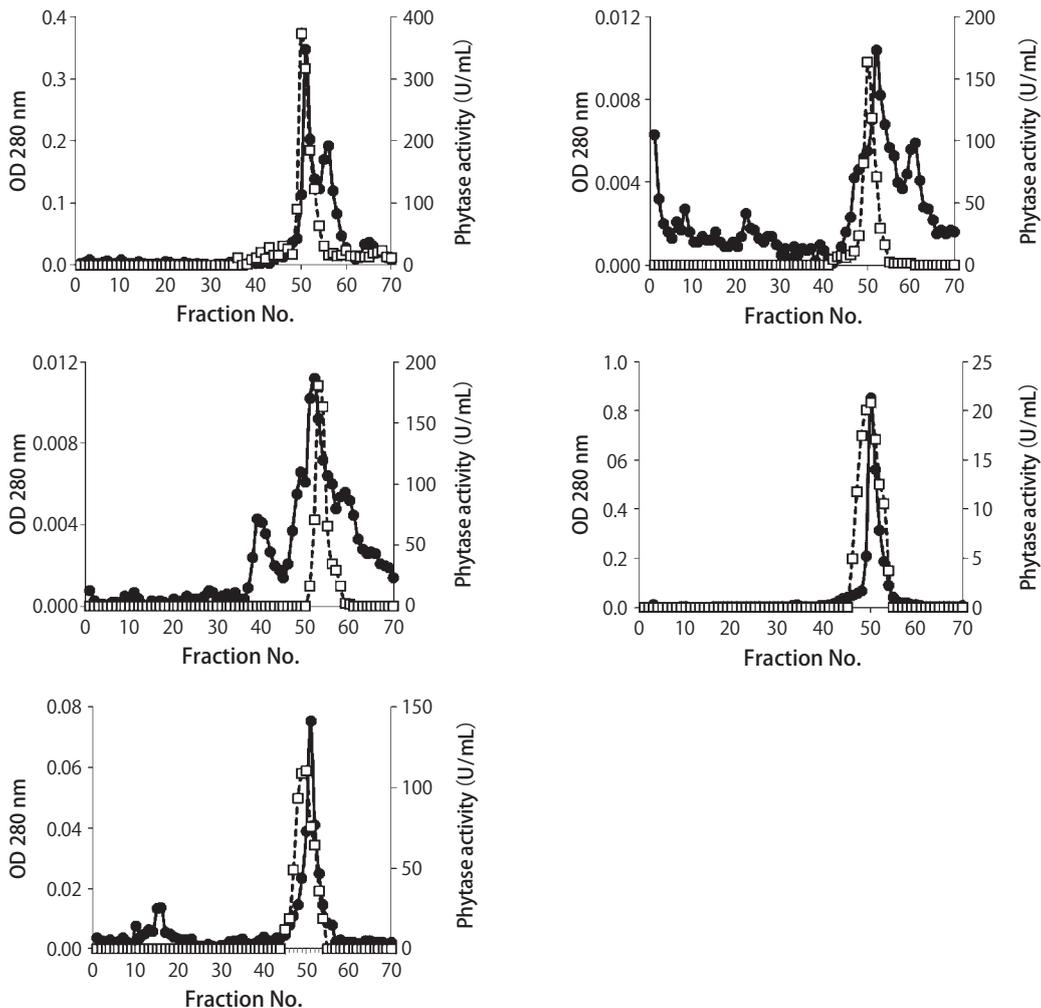


図4. HW55S ゲル濾過クロマトグラフィーによるフィターゼの精製

上左から大豆, 玄米-1, 玄米-2, 麴および味噌由来フィターゼのクロマトグラム, ●; 280 nm 吸光度, □; フィターゼ活性

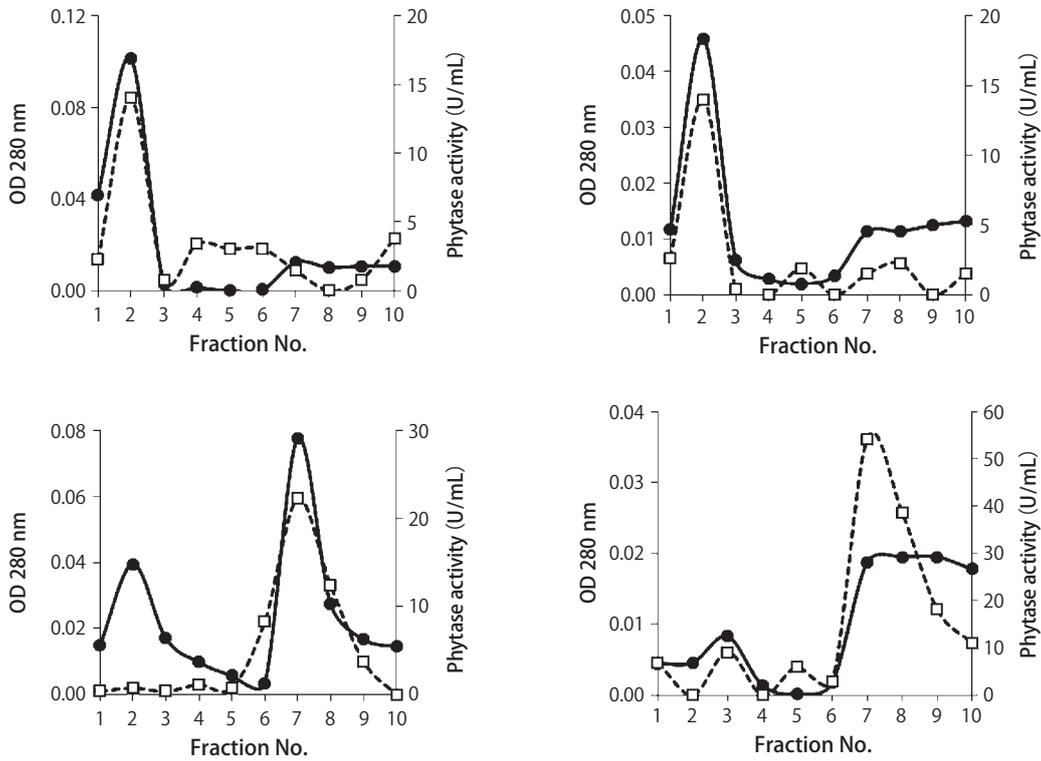


図5. ConA アフィニティークロマトグラフィーによるフィターゼの精製

上左から大豆, 玄米-1, 麴および味噌由来フィターゼのクロマトグラム, ●; 280 nm 吸光度, □; フィターゼ活性

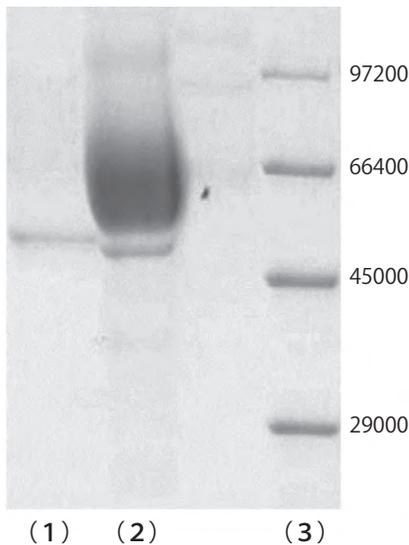


図6. 味噌由来フィターゼの SDS-PAGE

- (1) アフィニティークロマトグラフィー後,
- (2) DEAE イオン交換クロマトグラフィー後,
- (3) 標準タンパク質

1 mL/画分)した。吸着画分は TBS に溶解した 0.2M Methyl- α -D-glucoside で溶出 (5 mL, 1 mL/画分)した。大豆および玄米 (本実験では玄米-1 を用いた) 由来フィターゼ活性は非吸着画分にあったが, 麴および味噌由来フィターゼ活性は吸着画分にあった (図 5)。

味噌由来フィターゼの活性画分を集め, 精製度を調べるために SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。アフィニティークロマトグラフィー後の精製酵素は, ほぼ単一のバンドであり, 分子量は約 53,000 と推定された (図 6)。

IV 味噌および味噌原料由来フィターゼの性質

1. 目的

精製された味噌および味噌原料由来フィターゼの性質として, 分子量, pH 及び温度特異性を調べた。また, 味噌発酵過程での活性を想定して, 味噌由来フィターゼの食塩およびアルコール耐性を調べた。

2. 実験方法

1) ゲル濾過による分子量測定

Ⅲ 3. 3) のゲル濾過クロマトグラフィーで得られたフィターゼ活性画分の溶出時間および標準タンパク質の溶出時間から算出した。標準タンパク質はOvalbumin (44,000), Conalbumin (75,000), Aldolase (158,000), Ferritin (440,000), Thyroglobulin (669,000) とした。

2) pH 特異性

フィターゼ活性の測定方法(Ⅱ 2. 3)を参照に従ったが、緩衝液はクエン酸-クエン酸ナトリウム (pH3.19-5.78), トリス-塩酸 (pH7.49) を用いた。

3) 温度特異性

フィターゼ活性の測定方法に従ったが、インキュベーション温度は30~60℃の10℃刻みとした。

4) 食塩およびアルコール耐性

フィターゼ活性の測定方法に従ったが、酵素反応液に食塩(終濃度0, 2, 5, 10, 15%)またはエタノール(終濃度0, 2, 5, 10, 15%)を添加した。

3. 結果および考察

1) ゲル濾過による分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出時間から玄米-1, 大豆, 麴および味噌由来フィターゼの分子量はほぼ同じであり, 標準タンパク質の溶出時間との比較から約55,000と推定された。また, 同様に米-2は約25,000と推定された(図7)。

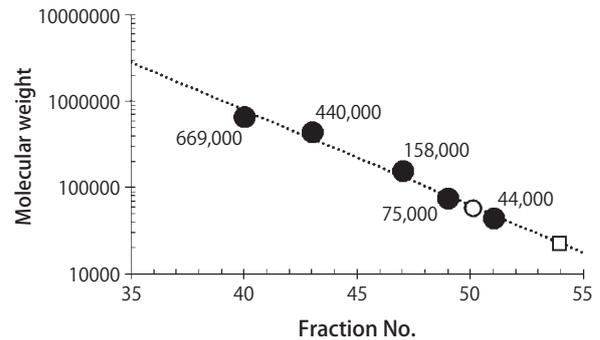


図7. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量の測定

○; 玄米-1, 大豆, 麴および味噌由来フィターゼ, □; 玄米-2

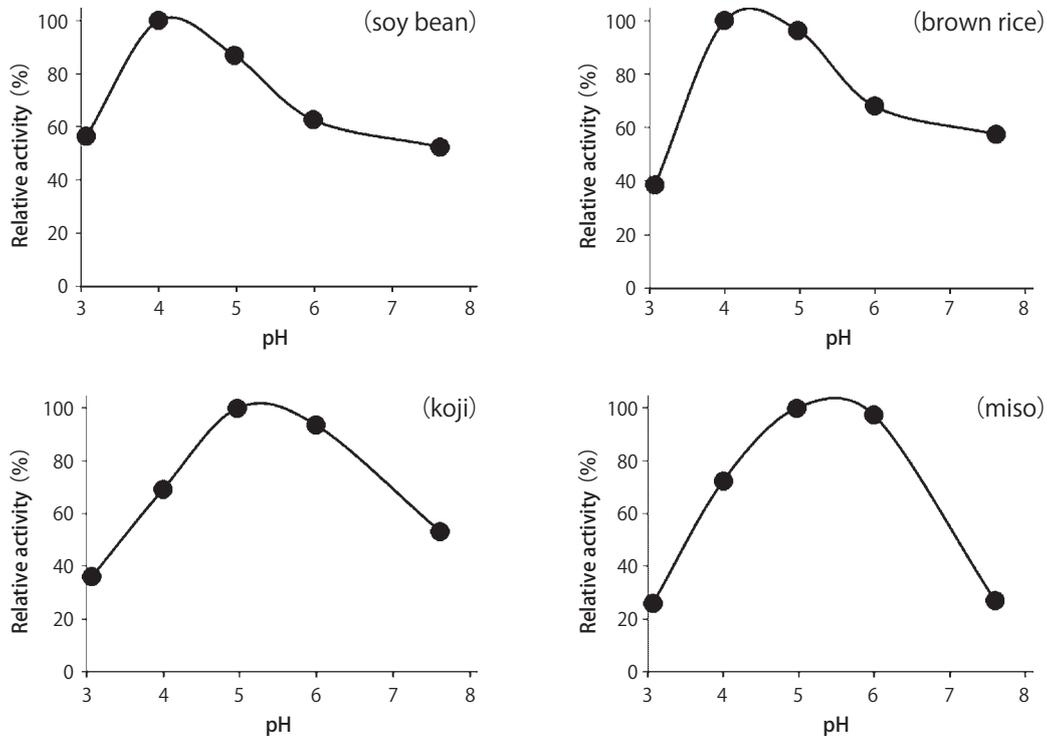


図8. 味噌原料および味噌由来フィターゼのpH特異性

DEAE イオン交換クロマトグラフィー後の部分精製フィターゼを用い, 活性は相対活性値で示した。

2) pH および温度特異性

DEAE イオン交換クロマトグラフィー後の部分精製フィターゼを用いて pH および温度特異性を調べた。大豆および玄米由来フィターゼの至適 pH は約 4.5, 麴および味噌由来フィターゼの至適 pH は約 5.5 であった (図 8)。味噌の pH は 5.5 前後である¹⁵⁾こ

とから、麴由来フィターゼは効果的に作用すると考えられる。

同様に各フィターゼの温度特異性を調べた。至適温度は全由来フィターゼで 50℃前後であった (図 9)。味噌は一般的に 30℃前後で発酵させる¹⁶⁾ので、この温度で麴由来フィターゼは高い活性を維持しており、

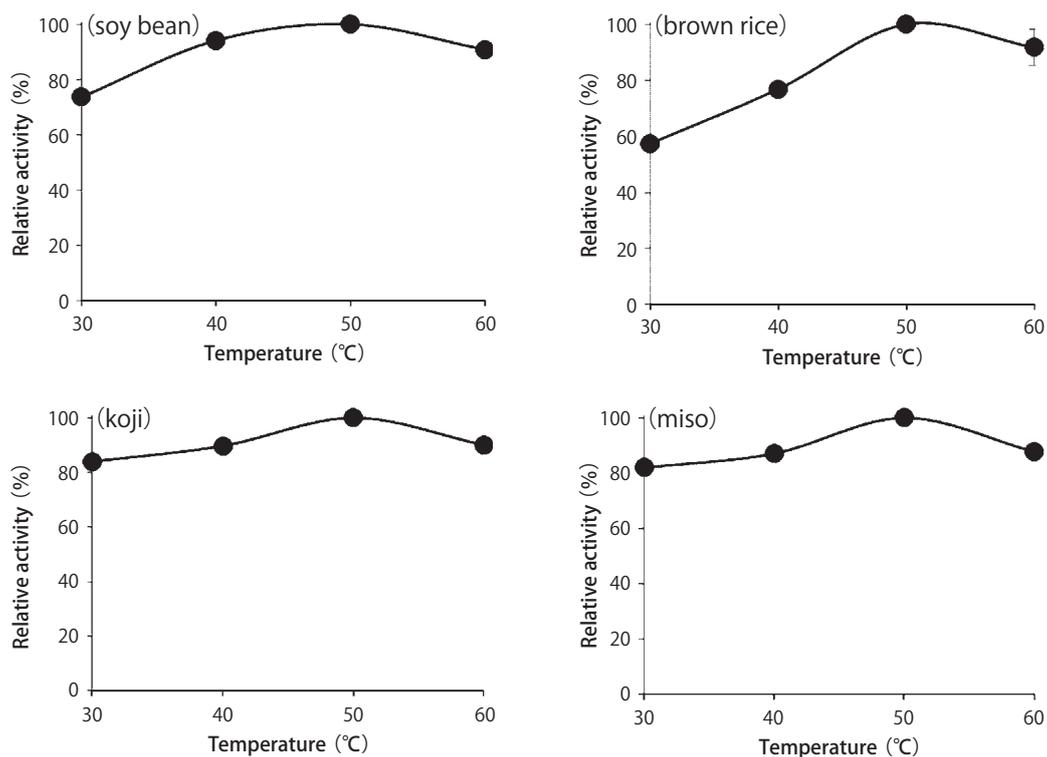


図 9. 味噌原料および味噌由来フィターゼの温度特異性

DEAE イオン交換クロマトグラフィー後の部分精製フィターゼを用い、活性は相対活性値で示した。

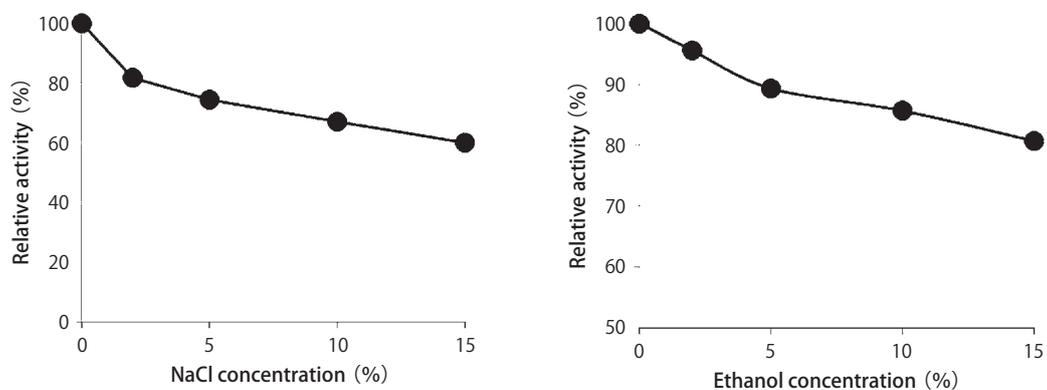


図10. 味噌由来フィターゼ活性に及ぼす食塩およびエタノールの影響

アフィニティークロマトグラフィー後の精製フィターゼを用い、活性は相対活性値で示した。

十分に作用すると考えられる。

以上のクロマトグラフィー精製、分子量、pH および温度特異性などの結果は、先行文献¹¹⁾⁻¹³⁾で報告された各フィターゼとほぼ同様の特性を示した。味噌由来フィターゼは麴由来フィターゼと特性が類似したことから、麴に由来することが示された。

3) 味噌由来フィターゼの食塩およびアルコール耐性

味噌由来フィターゼは食塩およびアルコールの含有量の増加とともに活性が低下したが、食塩濃度15%で約60%、アルコール濃度15%で約80%の活性を有した(図10)。したがって、味噌の発酵過程において十分に活性を保持し、フィチン酸の分解に効果のあることが示唆された。

V 味噌試作とフィチン酸の低減化

1. 目的

味噌製造において、フィターゼ活性に基づいたフィチン酸の低減には発酵過程でのpH、温度、食塩濃度などフィターゼ活性の至適条件で発酵させるのが効果的であろうと考えられる。しかしながら、味噌は伝統的に地域や各メーカーで製法が決められており、これらの条件を変更するのは非常に難しいのが現状である。

そこで、本実験ではフィターゼ添加による米味噌の試作をとおして、味噌発酵過程におけるフィチン酸量の変化を調べ、フィターゼ添加の有効性を検討した。

2. 実験方法

1) 味噌の試作

蒸煮後の大豆(道産大豆「ユキホマレ」)に米麴(10割)と食塩(終濃度12%)、さらに味噌由来フィターゼ(約10 U/g)または市販の小麦由来フィターゼ試薬(約120 U/g, Sigma)を加え30℃、28日間の発酵により試作した。コントロールはフィターゼ無添加区とした。

2) フィチン酸

フィチン酸量は試料を3%トリクロロ酢酸で抽出し、Wade試薬を用いる比色法にて測定した¹⁷⁾。

3) 麴由来酵素液による小麦由来フィターゼの分解反応

麴由来酵素液は、III 2. 2) に記した手順で硫酸塩析し、20 mM 酢酸緩衝液(pH5.2)に溶解し、同緩衝液に対して透析したものをを用いた。この麴由来酵素液(たんぱく質量:1.5 mg/mL)に同量の20 mM 酢酸緩衝液(pH5.2)に溶解した小麦由来フィターゼ試薬(1 mg/mL)を混和し、30℃で24時間インキュベーションした。

4) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

III 2. 4) を参照のこと。

3. 実験結果および考察

フィチン酸量は、フィターゼ無添加のコントロール区を含めて発酵7日までに有意に減少した(図11)。また、発酵7日では、小麦由来フィターゼ添加区がコントロール区よりも減少傾向にあった。味噌由来フィターゼ添加区では、フィターゼの添加量が少なかった

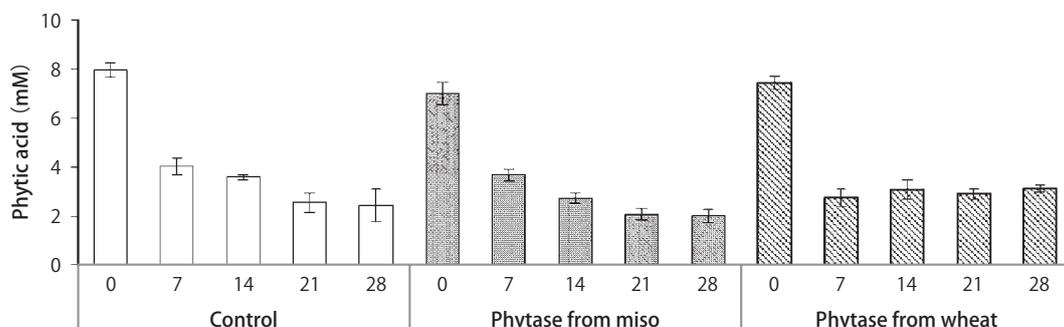


図11. 味噌試作におけるフィターゼ添加の影響

蒸煮大豆、麴(麴歩合10割)、食塩(塩分濃度12%)に味噌由来フィターゼ(約10 U/g)または小麦由来フィターゼ試薬(約120 U/g)を加え混和後、30℃で28日間の発酵を行った。コントロールはフィターゼ未添加のもの。

(手持ちが無かったため) ことから、コントロール区との有意差はなかった。コントロール区および味噌由来フィターゼ添加区では、21日間までフィチン酸量の緩やかな減少傾向が見られ、小麦由来フィターゼ添加区とほぼ同量となった。このことから、味噌発酵過程

において迅速なフィチン酸の低減にはフィターゼ添加が有効であろうと考えられる。しかし、発酵7日以降では小麦由来フィターゼの効果が認められなかった。

コントロール区と小麦由来フィターゼ添加区について、**図12**に発酵過程における可溶性タンパク質の

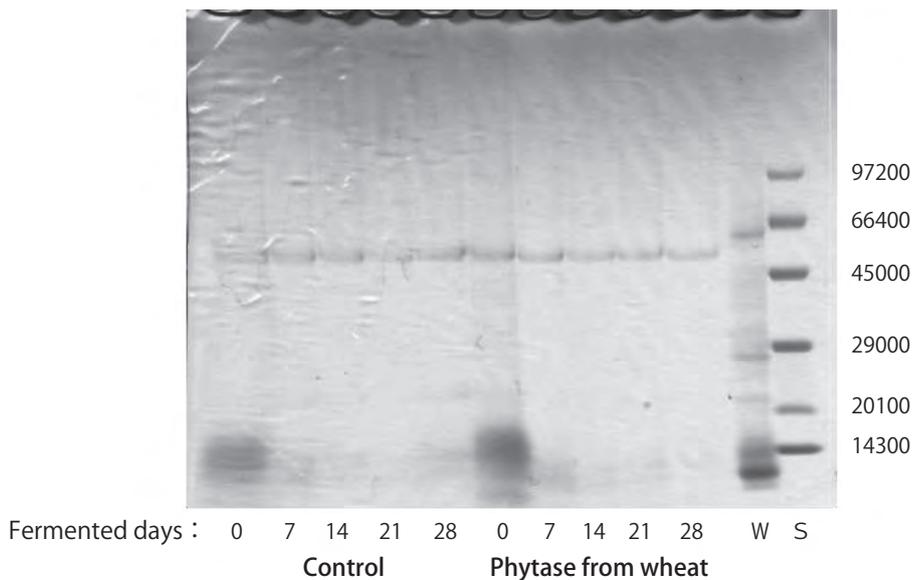


図12. 味噌発酵過程における粗抽出液の SDS ゲル電気泳動パターン
 W：小麦由来フィターゼ試薬，S：標準タンパク質

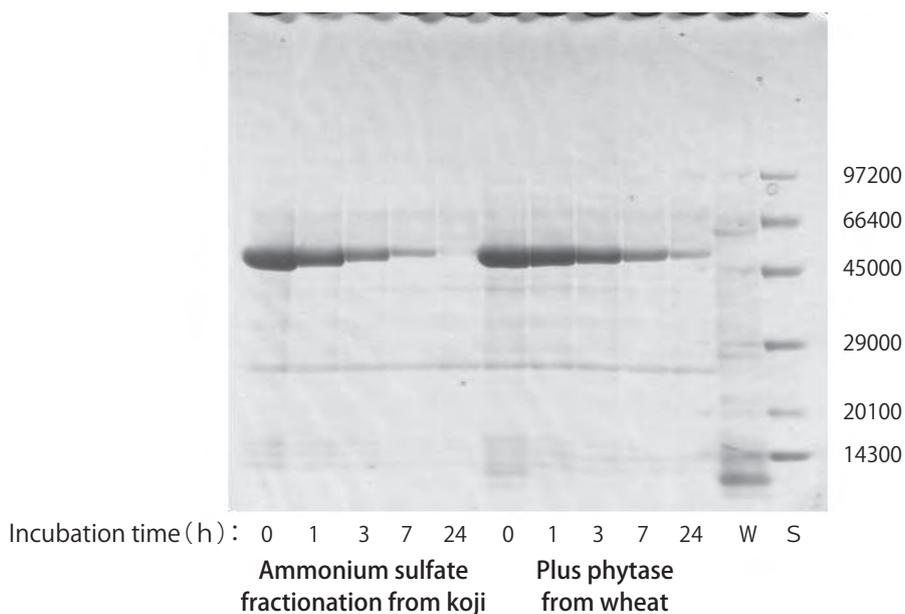


図13. 麹粗酵素液による小麦由来フィターゼの分解反応
 W：小麦由来フィターゼ試薬 (1 mg/mL)，S：標準タンパク質

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示した。発酵前には約15,000および約55,000にバンドが見られた。発酵7日で、約15,000のバンドはほぼ消失したが、約55,000のバンドは発酵28日まで検出された。小麦由来フィターゼ試薬の複数バンドは、発酵7日までに全て検出限界以下に分解された。

図13に麴由来酵素液による小麦由来フィターゼ試薬の分解反応の結果を示した。インキュベーション直後(0時間の位置)には、薄いながらも小麦由来フィターゼ試薬の複数バンドが見られたが、数時間のインキュベーション後には全てのバンドが検出限界以下まで分解された。一方、麴由来の約55,000付近に見られる主バンドは、時間経過とともに分解されたが、幾つかのバンドは24時間経過後も検出された。

麴は高いプロテアーゼ活性を有し、60日間の味噌発酵過程でも大きく活性が低下しないことが示されている¹⁸⁾。したがって、小麦由来フィターゼは麴のプロテアーゼにより迅速に分解され、活性を消失したものと考えられる。一方、麴由来フィターゼはConAアフィニティークロマトグラフィーに親和性を示したことから糖タンパク質であることが示唆された。一般的に、糖タンパク質は安定性に優れ、分解されにくいことが知られている。本研究において、小麦由来フィターゼ試薬は糖鎖染色法であるシッフ染色に反応しなかった(データは示していない)ことから、糖鎖をもたないタンパク質であろうと考えられる。これらのことから、麴由来フィターゼは小麦由来フィターゼよりも長期間にわたって活性を維持したと考えられるが、仮説の域をでない。今後、麴由来フィターゼのプロテアーゼ抵抗性や味噌発酵過程での挙動などに関する研究を進める必要がある。

以上から、味噌製造において市販の小麦由来フィターゼ試薬の添加は発酵初期では有効であるが、ある程度の発酵期間で作用させるには麴由来フィターゼの優位性が示唆され、今後の研究の進展に期待するところである。特に、味噌発酵過程でのフィチン酸低減化には、高フィターゼ活性を有する新たな種麴菌株の開発が望まれる。

VI まとめ

味噌およびその原料である大豆、米、麴のフィターゼを各種クロマトグラフィーにより精製し、幾つかの性質を調べた。味噌から精製されたフィターゼは、分子量55,000、至適pH5.5、至適温度50℃であり、同様に精製した麴のフィターゼと類似した特性を有して

いたことから、麴由来であることが示された。また、味噌製造におけるフィチン酸の低減化にはフィターゼ活性を高めることが有効であり、特に、麴由来フィターゼが効果的であると推察された。

VII 参考文献

- 1) Hambidge, M., *J. Nutr.*, 130, 1344S-1349S (2000).
- 2) Wuehler, SE., Peerson, JM. and Brown, KH., *Public Health Nutr.*, 8, 812-819 (2005).
- 3) Maret, W., and Sandstead, H H., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 20, 3-18 (2006).
- 4) 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2015年版).
- 5) Gallaher, DD., Johnson, PE., Hunt, JR., Lykken, GI. and Marchello, MJ., *Am. J. Clin. Nutr.*, 48, 350-354 (1988).
- 6) Anderson, RL. and Wolf, WJ., *J. Nutr.* 125, 581S-588S (1995).
- 7) Lonnerdal, B., Bell, JG., Hendrickx, AG., Burns, RA. and Keen, CL., *Am. J. Clin. Nutr.*, 48, 1301-1306 (1988).
- 8) 大槻耕三, 佐藤健司, 中村考志, 大豆たん白研究, 4, 33-38 (2001).
- 9) 海老根英雄, 味噌の科学と技術, 31, 248-253 (1983).
- 10) 加藤熙, 鬼頭幸男, 清水裕幸, 愛知県食品工業技術センター年報, 35, 6-13 (1995).
- 11) Fujita J., Shigeta S., Yamane Y., Fukuda H., Kizaki Y., Wakabayashi A. and Ono K., *J Biosci. Bioeng.*, 95, 460-465 (2003).
- 12) Sutardi, BK., *J. Food Biochem.*, 10, 197-216 (1986)
- 13) Hayakawa, T., Toma, Y. and Igaue, I., *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1475-1483 (1989).
- 14) Nikkuni, S., Itoh, H., Tanaka, M. and Ohta, T., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 8, 502-510 (1984).
- 15) 全国味噌技術会, 味噌の科学と技術, 53, 145-161 (2004).
- 16) 全国味噌技術会, 味噌の科学と技術, 52, 255-268 (2004).
- 17) American Association of Cereal Chemists, *Approved Methods of the AACC 10th edition*, 76-13(2000).
- 18) 和久豊, 醸協, 88, 433-438 (1993).