

研究助成報告

平成31年度研究助成による研究報告

研究報告

味噌汁の摂取が酸化ストレスの低下・ 自律神経活動に与える効果

胡 愛玲¹, 奈良岡 佑南², 山口 琢児¹, 小林 弘幸^{1,2}

The effect of the miso soup gives for a decrease of the oxidative stress
and autonomic nerve activity

HU Ailing¹, NARAOKA Yuna², YAMAGUCHI Takuji¹, KOBAYASHI Hiroyuki^{1,2}

¹ Department of Personalized Kampo Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine

² Department of Hospital Administration, Juntendo University Graduate School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan.

【緒言】

味噌は日本を代表とする発酵食品である。原料の大豆は栄養が豊富な食材であるが、発酵することでさらに栄養価が増すことが知られている。例えば、ビタミンB1は5.5倍、ビタミンB6は2.5倍、鉄は3倍、葉酸は3倍、カルシウムは3倍、カリウムは1.2倍に増加する。これに加えて、発酵の過程で抗酸化物質であるメラノイジンや、興奮抑制性物質であるGABAが産生されるため、身体に様々な効果をもたらす可能性が高い。

自律神経を乱すひとつの要因はストレスであるが¹⁾、味噌にはストレスを緩和するγアミノ酪酸(GABA)が多く含まれているため、継続的に味噌を摂取することで、自律神経を整える可能性がある。

本研究において、味噌の摂取による自律神経バランスの調整、酸化ストレスに対する作用について検討し、疲労回復効果や、ストレスの緩和の改善効果を明らかにし、健康食品としての味噌の有用性を検証する。

【方法】

1. 対象者

本研究は30代から70代の健常正常女性17名(コントロール群6名:51.2±4.7歳, 味噌摂取群11名:55.8±3.5歳)を対象とした。対象者には本研究の目的と方法について十分な説明を文書にて行い、書面による同意を得た。本試験は、2019年10月~2020年1月に実施した。

2. 試料

市販の赤味噌と白味噌を1:1で合わせ1回約18gの味噌玉を作製した。1日2回、味噌汁として2週間摂取した。対照群は2週間味噌の摂取を中止した。

3. 自律神経活機能の測定法

対象者は実験室にて30分順化したのち、測定を行った。自律神経機能はパルスアナライザープラスビュー(TAS9VIEW:株式会社YKC)を用い、

安静座位にて測定した。総自律神経活動 (TP), 交感神経活動 (LF/HF), 副交感神経活動 (HF) を解析した。

4. 酸化ストレス値・抗酸化力値の測定法

抗酸化能は手指より採血し, フリーラジカル解析装置FREE Carrio DUO (株式会社ウイスマー) を用いて酸化ストレス値 (dROMs), 抗酸化力値 (BAP) を測定した。さらに, 酸化ストレス度 (OSI:酸化マーカー÷抗酸化マーカー×8.85) を解析した。

いずれの測定も摂取前, 摂取2週間後に実施した。

5. 統計処理

統計解析は, Student T-testを用い, 0.05以下を有意差ありとした。

【結果】

1. 自律神経機能に対する作用

味噌の2週間摂取後の自律神経機能に対する作用を図1に示した。味噌の摂取による総自律神経活動 (TP) に有意な変化はみられなかった (図1-A)。味噌の摂取による交感神経活動 (LF/HF), 副交感神経活動 (HF) の変化はみられなかったが, コントロール群に副交感神経活動 (HF) の低下がみられた。

味噌対象群について年齢における解析を行ったところ, 60歳以上で有意でないがTPの低下とHFの増加がみられた (図2)。

2. 酸化ストレス・抗酸化力値に対する作用

味噌の2週間摂取後の酸化ストレス・抗酸化力値に対する作用を図3に示した。味噌の摂取による酸化ストレス値 (dROMs) の減少がみられたが有意な変化ではなかった。コントロール群はわずかに増加した (図3-A)。抗酸化力値 (BAP) は味噌の摂取により有意な低下がみられたが, コントロール群に変化はみられなかった (図3-B)。いずれの群も酸化ストレス度 (OSI) の変化はみられなかった (図3-C)。

味噌対象群について年齢における解析を行ったところ, 60歳以下がdROM, BAPの低下が顕著であった。OSIの年齢による影響はみられなかった (図4)。

【考察】

味噌摂取による自律神経機能, 酸化ストレス値・抗酸化力値に対する作用を検討した。

コントロール群と比較して2週間の味噌摂取による自律神経機能に対する顕著な作用はみられなかった。年齢による影響について解析したところ, 60歳以上で有意でないが総自律神経活動 (TP) の低下と副交感神経活動 (HF) の増加がみられた, 加齢により自律神経のバランスに変化はみられないが, 交感神経

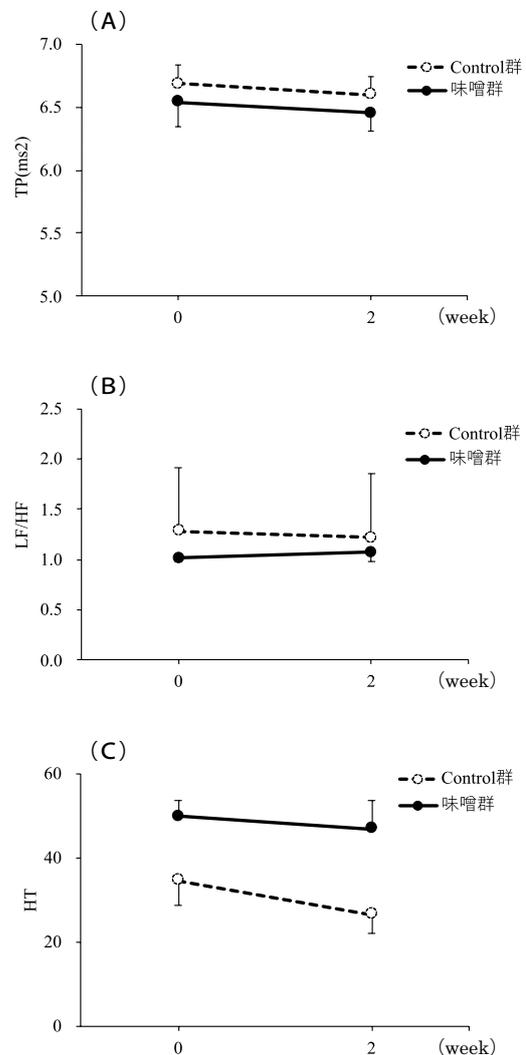


図1. 味噌摂取による自律神経機能に対する作用

A: 総自律神経活動 (TP), B: 交感神経活動 (LF/HF), C: 副交感神経活動 (HF)

(平均値±標準誤差, コントロール群: n = 6, 味噌摂取群: n = 11)

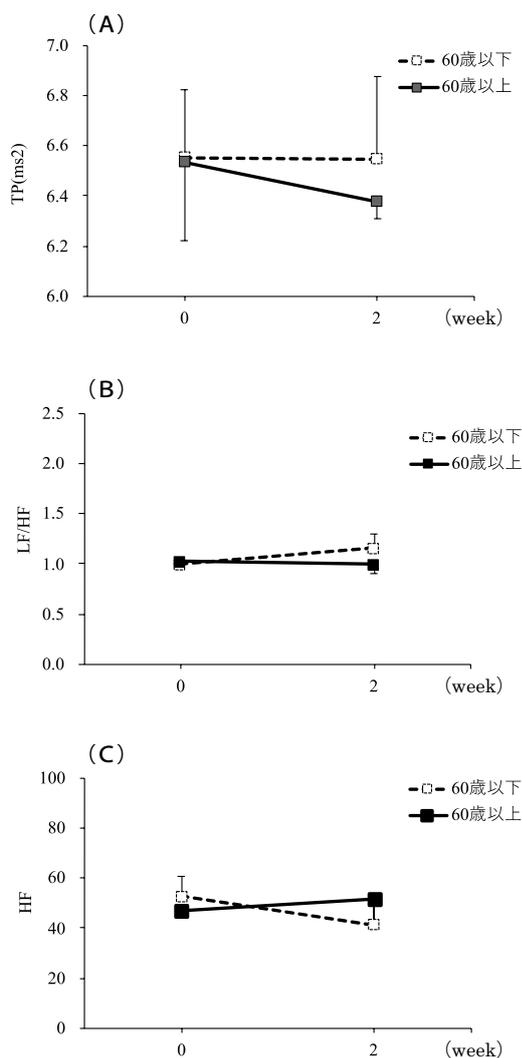


図2. 味噌摂取による自律神経機能に対する年齢の影響

A：総自律神経活動 (TP), B：交感神経活動 (LF/HF), C：副交感神経活動 (HF)
 平均値±標準誤差, 60歳以下 (45.6±4.0歳, n = 5), 60歳以上 (64.3±1.3歳, n = 6)

活動, 副交感神経活動が低下することが知られている²⁾。現在, 味噌の需要は減少し, 昭和35年と比較すると平成26年では60%減少したとも言われている。今回, 60歳以上で副交感神経活動の増加がみられたことで, 味噌の摂取量を増やすことで自律神経活動の低下を抑制することが期待できる。また, ストレスにより自律神経の変調をきたすことが知られている¹⁾。味噌の摂取により自律神経バランスを整えることで, ストレスに対する予防としての効果も期待できる。

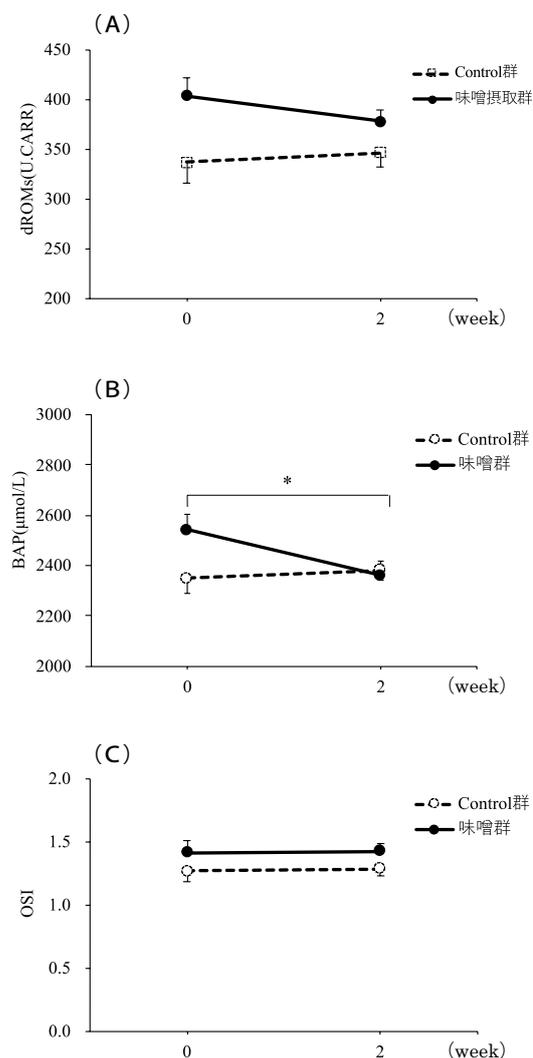


図3. 味噌摂取による酸化ストレス、抗酸化力値に対する作用

A：酸化ストレス値 (dROM), B：抗酸化力値 (BAP), C：酸化ストレス度 (OSI)
 (平均値±標準誤差, コントロール群: n = 6, 味噌摂取群: n = 11) *: p < 0.05 vs. 0

酸化ストレスは, 活性酸素種の増加, 抗酸化能力の低下により生体が酸化した状態である。酸化ストレスの亢進は細胞, 組織を障害することで老化促進, 生活習慣病, ガンなどの疾患形成に関与している。また, 精神的, 肉体的疲労状態を評価できる可能性が示唆されている^{3,4)}。

酸化ストレスに対して2週間の味噌の摂取によりコントロール群と比較して酸化ストレス値 (dROMs) および抗酸化力値 (BAP) の低下がみられた。年齢による影響については, 60歳以下でdROMsが著しく

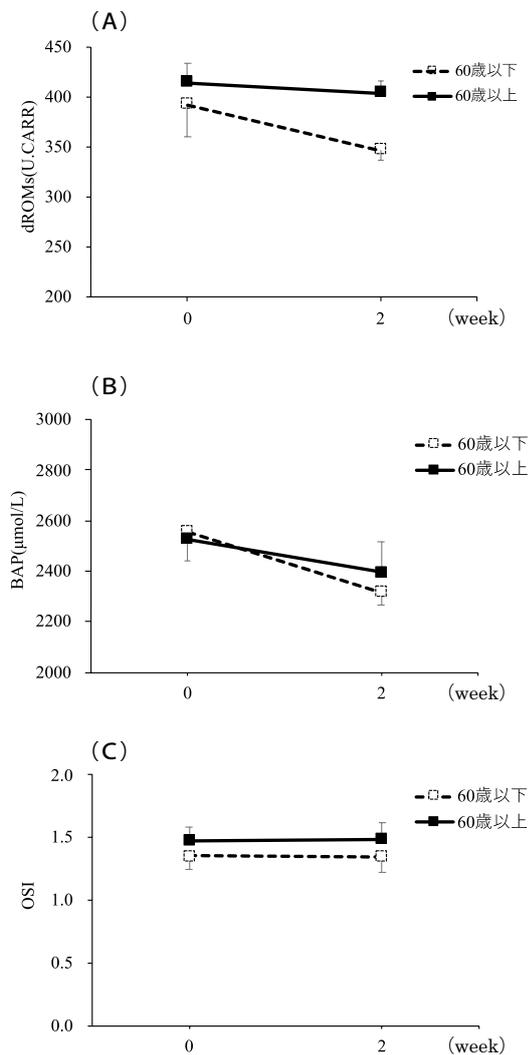


図4. 味噌摂取による酸化ストレス、抗酸化力値に年齢の影響

A: 酸化ストレス値 (dROM), B: 抗酸化力値 (BAP), C: 酸化ストレス度 (OSI)
 平均値±標準誤差, 60歳以下 (45.6±4.0歳, n = 5), 60歳以上 (64.3±1.3歳, n = 6)

低下した。若年齢では普段味噌の摂取が少ないために2週間であるが味噌を摂取したことによる結果であると考えられる。BAPは酸化ストレスの制御に関与しているが、今回の結果からdROMsの低下とともにBAPも低下した。この結果は味噌の摂取がBAPに作用することでdROMsを低下したと考えられるが、味噌の作用機序に関してさらなる研究が必要である。酸化ストレス度 (OSI) は疲労状態と相関することが示唆されているが、味噌摂取によるOSIに対する影響はみられなかった。

今回の結果から、味噌の摂取は自律神経活動のバランスを整え、酸化ストレスを軽減することが示唆された。

【謝辞】

本研究を助成していただいた一般社団法人味噌中央研究所に感謝します。

【引用文献】

- 1) 雪下岳彦, 大谷 悟, 小林弘幸. メンタルストレスと自律神経 ～心拍変動解析を用いた客観的なストレス評価～, アンチ・エイジング医学 Vol. 11, 42-47 (2015)
- 2) 倉恒弘彦. ストレス・疲労の科学と健康イノベーション, 産業ストレス研究, 22, 307-313 (2015)
- 3) 野島順三. 種々の疲労状態における酸化ストレス値/抗酸化力値の評価, 厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業)(精神の障害/神経・筋疾患分野) (分担) 研究年度終了報告書 (2010)
- 4) 野島 順三. 疲労病態における酸化ストレス, 抗酸化力の評価, 厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業) (精神の障害/神経・筋疾患分野) (分担) 研究年度終了報告書 (2009)

研究報告

子宮内膜症に対する味噌の有効性の検討

垂水 洋輔, 高岡 宰, 森 泰輔, 北脇 城

京都府立医科大学大学院医学研究科 女性生涯医科学

Effect of Miso on stromal cells derived from ovarian endometrioma

Yosuke TARUMI, Osamu TAKAOKA, Taisuke MORI, Jo KITAWAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine,

Graduate School of Medical Science

Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan.

【背景と目的】

子宮内膜症は子宮内膜様の組織が卵巣や腹膜などで異所性に増殖することによって疼痛や不妊を生じる疾患である。罹患率は性成熟期女性の10%であり、近年、晩婚、少子、少産化の影響もあり日本での患者数は増加傾向にある^{1,2)}。子宮内膜症による慢性骨盤痛や不妊症は女性の quality of life を著しく低下させるため、多大な社会的損失をもたらす。子宮内膜症はエストロゲン依存性に増殖、退縮をする疾患であり、手術療法とならんで内分泌療法が効果的である。しかし、内分泌製剤は高い治療効果を発揮する反面、排卵を抑制することから妊娠を希望する女性に対しては同時には使用できない欠点がある。妊娠希望者でも使用可能な緩徐な作用を持つ治療薬が望まれている。

子宮内膜症と食習慣の関連を調査した疫学研究が行われているが、一致した結論は得られていない。味噌は大豆由来の発酵製品であり、その健康増進効果についてはしばしば指摘されているが、具体的な疾患との関連については未だ不明である。大豆には植物性エス

トロゲンであるイソフラボンが多く含まれている。イソフラボンには弱いエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用があることが知られているが、子宮内膜症に対するイソフラボンの作用は不明であった。近年われわれはイソフラボン的一种であるダイゼインを豊富に含む成分が子宮内膜症に対して細胞増殖を抑制し、抗炎症作用を持つことを報告している³⁾。

そこで、本研究では味噌が子宮内膜症細胞に及ぼす効果を *in vitro* で検討した。

【方法】

1. 味噌の抽出

味噌は中央味噌研究所から供与された味噌9種類を使用した(米味噌7種、麦味噌1種、豆味噌1種)。各味噌の特徴を表1に示す。これまでの報告をもとにメタノール抽出法を選択した⁴⁾。各味噌10gを20mLのメタノールに溶解・攪拌し、濾過後にセルロースアセテートフィルターに通して滅菌した(図1)。

表 1. 各味噌の特徴:

番号	麴による分類	生産地	特 徴
1	米味噌	宮城県	・発酵が進んでおり、色が濃い
2	米味噌	宮城県	・発酵が進んでおり、色が濃い ・低麴（大豆：米 = 10：5.5）
3	米味噌	山形県	・発酵が進んでおり、色が濃い ・天然醸造
4	豆味噌	愛知県	・発酵が進んでおり、色が濃い
5	米味噌	長野県	・米味噌の一般流通品
6	米味噌	富山県	・米味噌の一般流通品
7	麦味噌	大分県	・麦味噌の一般流通品
8	米味噌	東京都	・熟成期間が短く、色が濃い
9	米味噌	京都府	・研究者地元の味噌

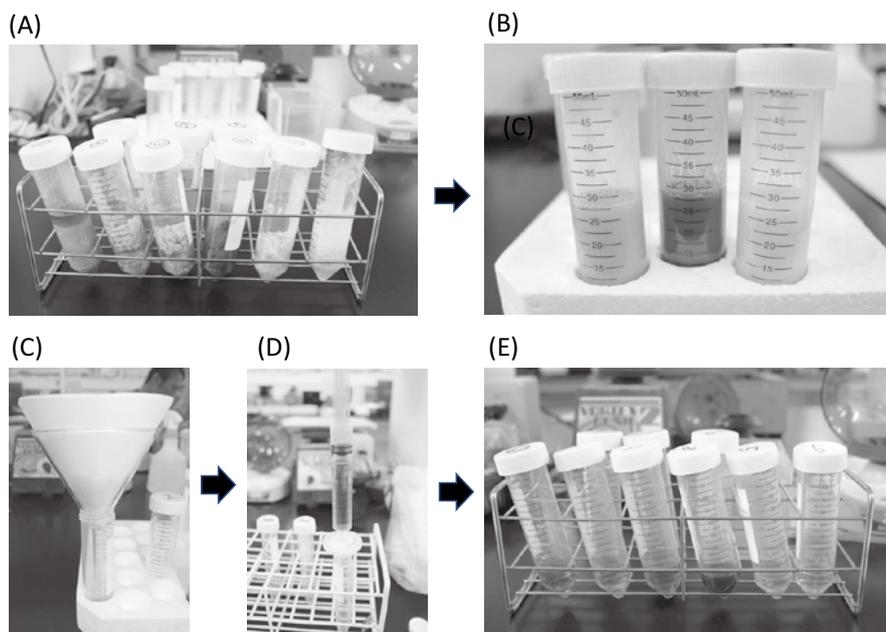


図 1. メタノールを用いた味噌成分の抽出

供与された各味噌をメタノールに溶解・攪拌し（A-B）、濾紙で濾過後（C）、セルロースアセテートフィルターを通して滅菌した（D, E）。

2. 子宮内膜症間質細胞、正常子宮内膜間質細胞の分離培養

腹腔鏡手術施行時に子宮内膜症患者の卵巣子宮内膜症病巣から子宮内膜症間質細胞（stromal cells derived from ovarian endometrioma, OESC）を、また非子宮内膜症患者の正常子宮内膜から正常子宮内膜間質細胞（stromal cells derived from normal endometrium, NESc）をそれぞれ分離培養した⁵⁾。

対象患者は20～45歳で、周期的な月経があり、手術前3か月以内にホルモン療法を施行されていない患者とした。摘出組織を細切し、0.25% type I collagenase と15 IU/mL deoxyribonuclease 含有DMEMにより消化し、メッシュで濾過することにより単離した細胞を得た。遠心により赤血球を除去した後、10%ウシ胎仔血清含有DMEMで培養した。

3. 味噌の投与方法

味噌抽出液を10%ウシ胎仔血清含有DMEMで希釈し、各濃度の味噌抽出液を含むDMEMでOESCとNESCの培養液を交換した。

4. 細胞増殖測定およびRT-PCR解析

OESCを96-well plateに播種し、24時間後に味噌抽出液を含む培地に交換、24~96時間後にWST-8 assayを用いて評価した。

培養細胞から抽出したmRNAからcDNAを作成し、real-time PCRを行った³⁾。

5. 統計解析

one-way repeated measures ANOVAで解析後、post-hoc testにはDunnett法を用いた。統計学的有意水準は5%とした。

【結果】

1. 味噌2番はOESCの細胞増殖を抑制する

各味噌によるOESCの細胞増殖の変化を評価した。味噌2, 3, 5, 7, 8番は投与後96時間において、0.01, 0.1, 1%のいずれの濃度でも細胞増殖を抑制する傾向を示した(図2)。その中で、味噌2番は投与後24, 48, 72, 96時間のいずれの時間でも細胞増殖を抑制する傾向を示したため、味噌2番の作用をさらに検討した。

2. 味噌2番は濃度依存的にOESCの細胞増殖を抑制するが、NESCの細胞増殖は抑制しない

子宮内膜症病巣のみならず、正所性子宮内膜に対する味噌の効果を検討するため、OESCとNESCの細胞増殖の変化を評価した。味噌2番は投与後72時間

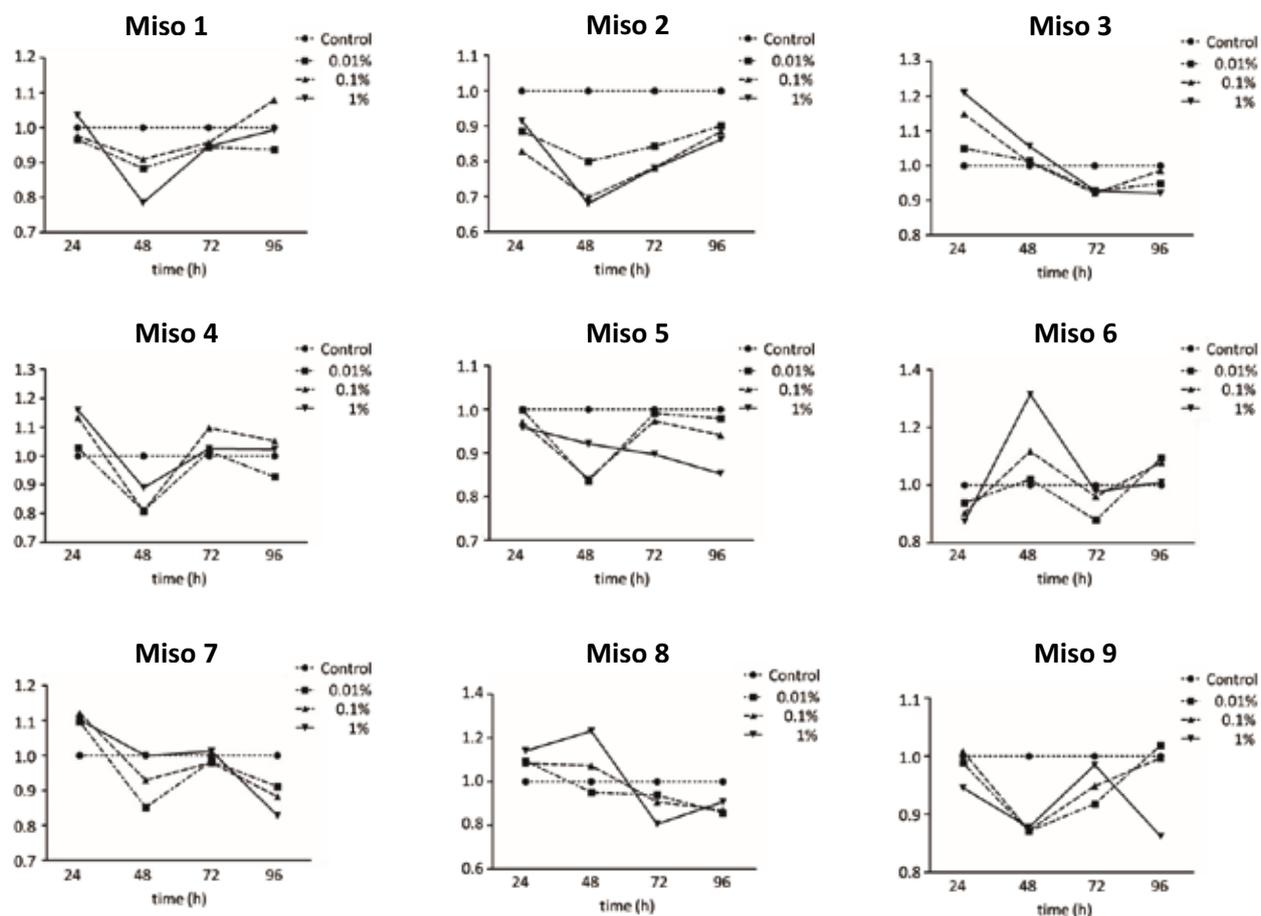


図2. 各味噌によるOESCの細胞増殖の変化

味噌2, 3, 5, 7, 8番は投与後96時間において細胞増殖を抑制する傾向であった。味噌2, 3, 5, 7, 8番の内、味噌2番は24~96時間、0.01~1%の濃度のいずれにおいても細胞増殖を抑制する傾向であった (n = 3)。

において濃度依存的にOESCの細胞増殖を抑制したが、NESCの細胞増殖は抑制しなかった (図3 A)。0.1%の濃度の味噌2番は投与後24~96時間においてはOESCの細胞増殖を抑制する傾向であったが、統計学的有意差を認めなかった。NESCでは24~96時間のいずれにおいても細胞増殖を抑制しなかった (図3 B)。

3. 味噌2番はOESCのVEGFの発現を抑制する
次に、OESCに対する味噌2番の作用機序を調べる

ため、子宮内膜症の増悪因子として報告されるVEGFの発現を測定した。投与後72時間において味噌2番は0.01, 0.1, 1%の濃度のいずれの濃度でもOESCにおけるVEGFの発現を抑制した (図4)。

【考察】

本研究では供与された味噌9種類のうち、味噌2番は卵巣の子宮内膜症病巣から分離したOESCの細胞増

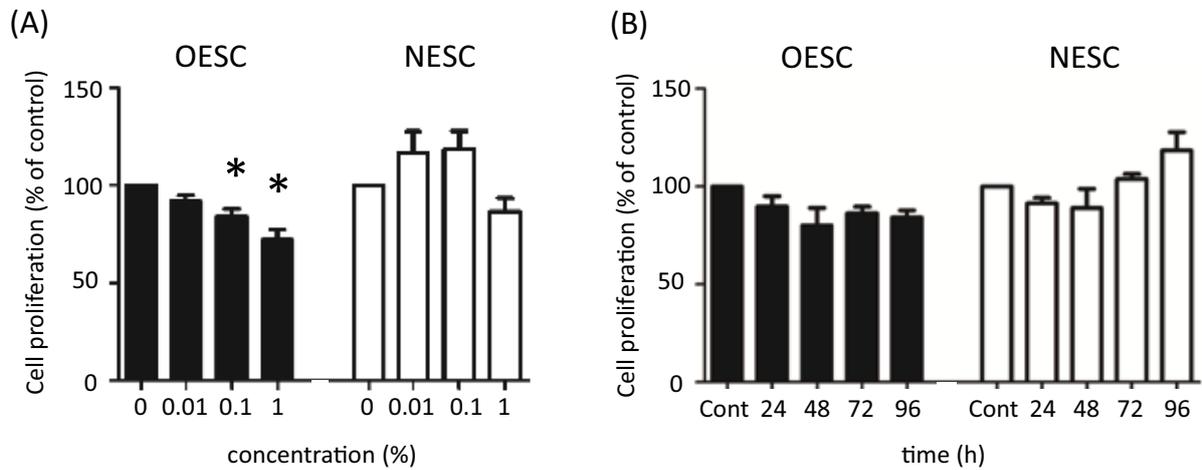


図3. 味噌2番によるOESCとNESCの細胞増殖の変化

味噌2番は投与後72時間において0.1%, 1%の濃度でOESCの細胞増殖を抑制したが、NESCの細胞増殖は抑制しなかった (A)。0.1%の濃度の味噌2番はOESCの細胞増殖を抑制する傾向であったが、NESCの細胞増殖は抑制しなかった (B)。mean ± SEM (n=4), * P < 0.05 vs control

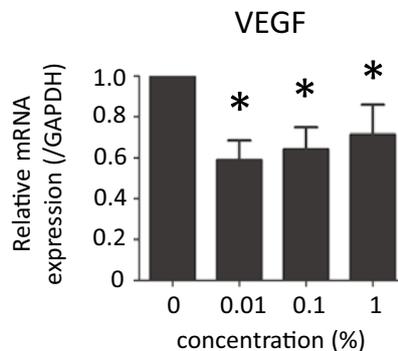


図4. 味噌2番によるOESCの遺伝子発現の変化

0.01, 0.1, 1%の濃度の味噌2番はOESCにおけるVEGFの発現を抑制した。mean ± SEM (n = 4), * P < 0.05 vs control

殖を濃度依存的に抑制したが、非子宮内膜症患者の子宮内膜から分離したNESCの細胞増殖は抑制しなかった。このことは、味噌2番が子宮内膜に影響を及ぼさずに子宮内膜症病巣に対してのみ増殖抑制効果を持つことを示唆している。味噌の特異的な増殖抑制作用は、著者らが知る限り最初の報告である。

さらに、味噌2番はOESCにおいてVEGFの発現を抑制することがわかった。VEGFは質量30~46 kDaの血管新生に関与する糖タンパクであり、さまざまな悪性腫瘍の増殖を担う増殖因子である。McLaren et al. は子宮内膜症患者の腹水では正常患者と比較してVEGFの濃度が上昇しており、子宮内膜症病巣が腹腔内で生存するためには血管新生が重要であることを報告している^{6,7)}。

子宮内膜症と大豆摂取の関連を調査した疫学研究はごく限られている。Tsuchiya et al. は、尿中のイソフラボン濃度が高いことが重症子宮内膜症のリスクを減少させるとしているが、逆にUpson et al. は幼児期に大豆成分を常時与えられた女性は子宮内膜症リスクが2倍以上になるとしている^{8,9)}。

味噌は麴の種類、生産地、麴比率、味(辛口・甘口)などによって分類される。味噌2番の麴は米麴、生産地は東北で、醗酵期間が長く、麴比率が低いことが特徴である。詳細な味噌の成分は不明であるが、長い醗酵期間と低い麴比率によって、子宮内膜症増殖抑制効果を示す特徴的なイソフラボン類の含有比率となった可能性が考えられる。味噌の成分分析とともに、逆に子宮内膜症増殖抑制効果を示す製品の開発が期待される。

本検討により子宮内膜症に対する味噌の増殖抑制効果が*in vitro*で示された。今後、味噌の子宮内膜症への作用機序を解明するための基礎的検討、およびマウスを用いた*in vivo*の実験を予定している。

【文献】

- 1) Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Vigano P. Endometriosis. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):9.
- 2) 厚生労働省. 「平成29年 患者調査(疾病分類編)」。 <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syobyu/dl/h29syobyu.pdf> (2020年4月10日). 2017.
- 3) Takaoka O, Mori T, Ito F, Kitawaki J, et al. Daidzein-rich isoflavone aglycones inhibit cell growth and inflammation in endometriosis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2018;181:125-32.
- 4) 石田万里, 坂井千恵美, 田代聡, 粟井和夫, 吉栖正生, 石田隆史. 味噌によるDNA損傷抑制効果 II. 中央味噌研究所研究報告. 2019;No.40:50-3.
- 5) Mori T, Kitawaki J, et al. Estrogen-related receptor alpha expression and function are associated with vascular endothelial growth factor in human cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(4):609-15.
- 6) McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum Reprod Update. 2000;6(1):45-55.
- 7) McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. Hum Reprod. 1996;11(1):220-3.
- 8) Tsuchiya M, Miura T, Hanaoka T, Iwasaki M, Sasaki H, et al. Effect of soy isoflavones on endometriosis: interaction with estrogen receptor 2 gene polymorphism. Epidemiology. 2007;18(3):402-8.
- 9) Upson K, Sathyanarayana S, Scholes D, Holt VL. Early-life factors and endometriosis risk. Fertil Steril. 2015;104(4):964-71 e5.

研究報告

麹菌ゲノム情報と質量分析装置を活用した 味噌の糖類に関する基盤研究

徳岡 昌文, 柏木 豊, 矢野 碧子, 崔 淋鈞, 本田 千尋, 小林 泉美
金本 湧太, 小島 祐輔

Studies on the saccharides in Miso based on genome information of
Aspergillus oryzae and mass spectrometry

Masafumi TOKUOKA, Yutaka KASHIWAGI, Aoko YANO, Linkin SAI, Chihiro HONDA,
Izumi KOBAYASHI, Yuta KANEMOTO, Yusuke KOJIMA

*Department of Fermentation Science and Technology Graduate School of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502, Japan.*

【背景】

味噌の糖類は、麹由来のデンプン分解物、原料大豆由来の糖類、細胞壁分解物など複雑多岐な成分を含んでいるが、分析の難しさから研究例が少ないため、その構造や熟成中の推移、生成メカニズムについての報告は限られている¹⁾。我々はこれまでに、多数の市販味噌の網羅的分析から、味噌中のオリゴ糖が味噌のタイプにより異なることを明らかにし、未知糖を含む多様な非発酵性糖が味噌中に含まれることを見出した²⁾。麹菌の糖転移酵素はマルトースから非発酵性糖を生成することは昔から知られていることから³⁾、麹菌の α -グルコシダーゼが味噌中のオリゴ糖生成に重要であることは間違いなく、すでに高 α -グルコシダーゼ活性の麹を用いた味噌製造が報告されている⁴⁾。

本研究では、大量精製が困難な味噌中のオリゴ糖について、未知糖の構造解析に資する、誘導化を介した微量試料からの構造推定法の検討を行なったほか、麹

菌のゲノム情報から推定された α -グルコシダーゼについて、遺伝子破壊株と高発現株を作製し、その麹菌を用いて醸造した味噌のオリゴ糖を分析することで、 α -グルコシダーゼと味噌中のオリゴ糖の関連を調べた。さらに、味噌麹から、活性に基づき、 α -グルコシダーゼを精製することで、味噌中のオリゴ糖生成に関与する新規酵素の酵素化学的性質、タンパク質科学的性質を解明することを目指した。

【実験1】誘導化試薬による微量試料からの オリゴ糖の構造推定法の検討

(方法)

1. 試薬

標準品に用いたオリゴ糖は富士フィルム和光純薬株式会社、又は Carbosynth Product 社のものを用いた。

2. 誘導化方法

重合度 2, 3 の標準品 (maltose, kojibiose, sakebiose, isomaltose, maltotriose, panose, isopanose, isomaltotriose) 各0.01mg及びABEE 16.5mg, borane-2-methylpyridine 21.2mgをmethanol 360 μ Lに溶解し, 酢酸 40 μ Lを添加後, 60 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートすることで誘導体化した。その後, 吹き付け濃縮によって乾固し, Milli-Q水及びchloroform 200 μ Lを添加, 攪拌後, 遠心分離し, 水層をHPLC試料とした。

3. HPLC分析

カラムにはPoroshell 120 EC-C18 (4.6 x 100 mm, 2.7 μ m; アジレント・テクノロジー株式会社)を用い, 試料導入量 5 μ L, 流速 0.5mL / minとした。移動相の液はMilli-Q水, B液はアセトニトリルを用い, グラジエント溶出はA / B = 100 : 0 (0 min), 40 : 60 (20 min), 0 : 100 (21-25 min) で行った。検出器はSPD-20A (株式会社島津製作所)を用い, 検出波長は254 nmとした。

(結果・考察)

前報告²⁾において, 味噌中より新たにみいだされた未知糖の構造に興味を持たれたものの, 多様な糖を含む試料から微量に含まれる特定のオリゴ糖を精製し構造決定することは困難であった。そこで, オリゴ糖が加水分解によりグリコシド結合で切断される特徴を生かし, 誘導化と加水分解を組み合わせることで, 構造の推定を行う方法を検討した。

様々な糖修飾試薬の中で, 糖鎖分析に用いられる, 4-アミノ安息香酸エチルエステル (4-aminobenzoic acid ethyl ester) は蛍光及びUV検出が可能であること

から⁵⁾, 検出感度が優れていた。さらに, 誘導化されたオリゴ糖を加水分解した際に, 誘導化部位は分解されない特徴を生かし, 誘導化後に加水分解し, 誘導化糖のHPLC分析を行うことで, 還元末端の糖残基を決めることができると考えた。特に, 試料のオリゴ糖の重合度が小さい場合は, 加水分解により生じた, 還元末端以外の糖について, 再度誘導化をすることで, 還元末端以外の部分についても構造推定が可能な場合があり, 分析結果を統合することで, 元試料のオリゴ糖の構造を決定できると考えた。

標準品として, 種々のマルトース, マルトトリオースの異性体を誘導化して分析したところ, 異なる溶出時間で明瞭なピークを検出することができた (図 1)。さらに重合度 6 の標準品について加水分解を行ったところ, 1 N塩酸で80 $^{\circ}$ Cの条件で1時間反応させることで, 重合度 2, 3 のオリゴ糖が最も多く生成することが分かった。

今後は, 味噌試料から精製した微量なオリゴ糖に対して, 本法による分析を行い, 構造の解明を目指す。

【実験2】 α -glucosidase遺伝子破壊株及び高発現株を用いた味噌製造

(方法)

1. 味噌の仕込み及びサンプリング

市販味噌仕込みキット (株式会社伊勢惣) を使用した。説明書に従い, キット付属蒸煮加塩大豆110 g, 米麴40 g, 水11.2 mlを混合し, 容器は270 ml容のタッパーを使用し, 仕込み後は30 $^{\circ}$ Cでインキュベート

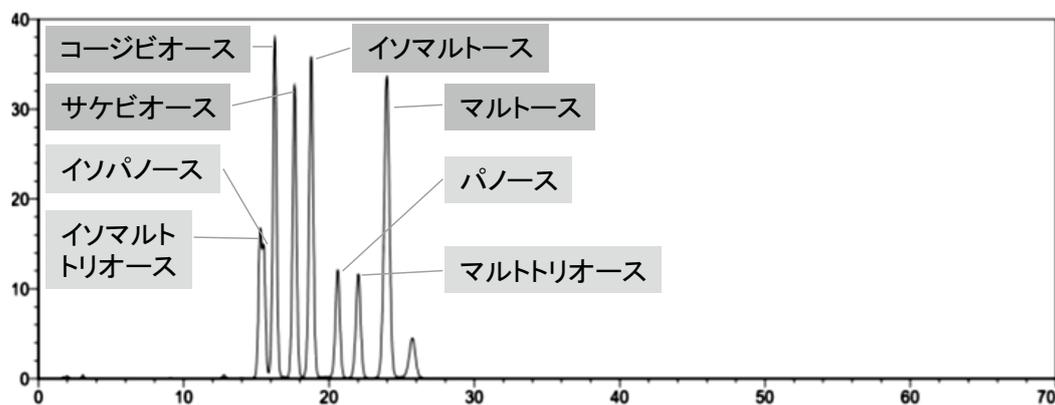


図 1. ABEE誘導化したオリゴ糖のHPLC分析

した。サンプリングは、条件Aでは、試料を離れた3カ所から0.2 gをサンプリングし、条件Bでは、試料を離れた4カ所から1.0 gをサンプリングした。サンプリング後、Milli-Q水で希釈し、濾紙（アドバンテック東洋No. 2）でろ過をした後、分析まで-80°Cで保存した。

2. 麹菌遺伝子破壊株及び高発現株の作製

*Aspergillus oryzae*のゲノムデータベース（CAoGD (<https://nribf21.nrib.go.jp/CAoGD/>))より抽出した α -グルコシダーゼ遺伝子について²⁾、遺伝子破壊と遺伝子高発現株を作製した。遺伝子破壊及び高発現株作製は既報⁶⁾に従った。

3. 糖の分析

重合度（DP）2～5のオリゴ糖定量には、親水性相互作用クロマトグラフィー・飛行時間型質量分析計（HILIC-TOF/MS）を既報と同様に用いた⁷⁾。全糖はフェノール硫酸法⁸⁾で、グルコースはグルコースアナライザーGLU-12（東亜ディーケーケー株式会社）を用いて測定した。

（結果・考察）

1. 味噌からの糖分析試料のサンプリング法の検討

味噌醸造を実施する上で、本研究では遺伝子組換え体を用いた検討を行うため、設備上、小さいスケールでの仕込みが必須となる。そこで初めに、安定した分析値を得るためのサンプリング方法を検討した。試料3カ所から0.2 g（A法）及び4カ所から1.0 g（B法）のサンプリングを行い、サンプルについて、グルコースと全糖の測定値のバラツキを、相対標準偏差（RSD）から比較した（表1）。サンプリング法Aは試料が少ないものの、RSDが大きく、B法はサンプリングによるバラツキを抑えることができていたことから、B法を本実験における分析試料のサンプリング方法とした。

2. α -glucosidase A遺伝子破壊株及び

高発現株を用いた味噌の製造及びオリゴ糖分析

α -glucosidase A（AgdA）は麹菌 *A. oryzae* において、最も遺伝子発現が強く、またデンプン分解に関わる重要な転写因子AmyRと α -アミラーゼを含む遺伝子クラスターである *amyR-agdA-amyA* 遺伝子クラスターを構成することからも⁹⁾、主要な α -グルコシダーゼと考えられている。これまでにAgdAの遺伝子破壊株及び高発現株を遺伝子組換えにより作製していることから⁶⁾、これらの麹菌株を用いて味噌醸造を行うことにより、AgdAのオリゴ糖生成への関わりを調

表1. 味噌試料からのサンプリング法A, Bにおける糖グルコース及び全糖の相対標準偏差

抽出法	RSD(%)	
	Glc	全糖
A	22.7	16.7
B	2.4	5.6

べた。10日目以降、約10日ごとに70日目までサンプリングを行なったところ、対照株2株と比較し、重合度（DP）2のオリゴ糖量が10日目の時点から遺伝子破壊株で多く、遺伝子高発現株で少ない傾向が観察された。変動があったオリゴ糖の分子種の解明は今後の課題であるが、AgdA遺伝子破壊株でオリゴ糖が増加することは、同株を用いた清酒醸造でも確認されていることから⁶⁾、高発現の影響と併せ、AgdAは味噌醸造においても重合度2のオリゴ糖の分解に寄与していることが分かった。また、若干の増加傾向が見られるものの、各株の重合度2, 3のオリゴ糖は10日目と70日目で大きな差は無いことから、味噌中のこれらオリゴ糖は米麹に由来する、もしくは仕込み後10日目までの間に生成すると考えられる。重合度4, 5については漸減する傾向から仕込みの期間に分解が進んでいると考えられる。

3. 新規 α -グルコシダーゼの遺伝子破壊株及び

高発現株を用いた味噌の製造及びオリゴ糖分析

麹菌のゲノム情報からは、 α -グルコシダーゼをコードすると考えられる14遺伝子が見出されているものの²⁾、機能が確認されているものは、AgdAとBのみである^{10,11)}。しかし、データベースからは、その他の α -グルコシダーゼ遺伝子の中にも米麹で発現しているものもあることから、これら遺伝子について破壊株と高発現株の作製を進めた。取得できた、AgdE（AO090102000559）の遺伝子破壊株と高発現株、AgdB（AO090038000471）及びAgdG（AO090020000176）の高発現株について米麹を作製し、味噌醸造を行い、20, 30, 40日目におけるオリゴ糖（DP2～5）を定量した（図3）。興味深いことに、データベース上ではAgdEの遺伝子発現が比較的高いにもかかわらず、破壊株と高発現株に差がほとんど無かった。一方、データベース上で発現が比較的低いAgdGの高発現により重合度2～5すべてのオリゴ糖が増加する傾向が観察された。*agdG*は *A. nidulans* において *agdG* とされている遺伝子（AN4843.3）のホモログである¹²⁾、米麹（仲仕事）での遺伝子発現

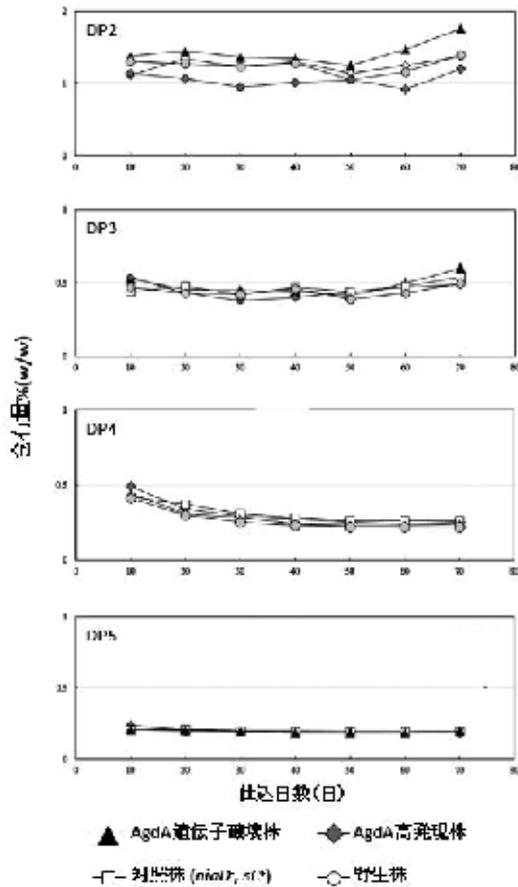


図2. AgdA破壊株及び高発現株を用いて製造した味噌のオリゴ糖 (DP2-5) の推移

は*agdA*の17分の1程であり、さらに細胞内タンパク質と予想されている²⁾。実際の味噌醸造での役割については破壊株の結果が得られるまでは結論付けられないものの、強制発現をさせることでオリゴ糖が増えることは興味深く、育種のターゲットとしても期待できる。なお、*AgdG*の遺伝子高発現の影響についても、*AgdA*での結果(図2)と同様に、10日目の時点で差が生じているため、観察された生成オリゴ糖量の差は、米麴中もしくは10日目までに生じた差であると考えられる。

【実験3】味噌用米麴からの α -グルコシダーゼの精製と性質

(方法)

1. 実用麹菌株の味噌麴からの酵素画分の精製

実用種麴を用いて製麴した味噌麴から0.5 % NaCl溶液により抽出を行い粗酵素液を取得した後、硫酸

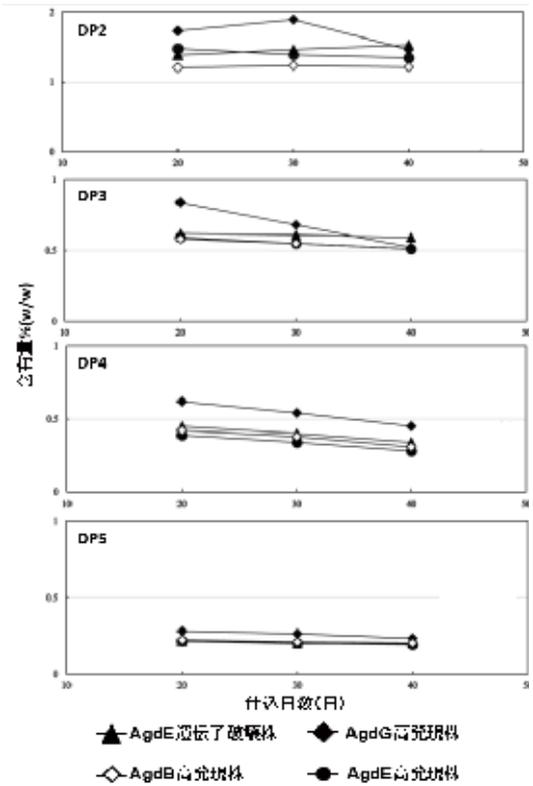


図3. 麹菌 α -グルコシダーゼ遺伝子破壊株及び高発現株を用いて製造した味噌のオリゴ糖 (DP2-5) の推移

沈殿、TSKgel DEAE-5PW陰イオン交換カラム及びTSKgel UP-SW3000GPCカラムによるクロマトグラフィーによって、 α -グルコシダーゼ活性画分を精製した。

2. α -グルコシダーゼ活性画分の酵素化学的性質

活性画分の酵素活性は、各pH及び温度において基質

-nitrophenyl- α -glucopyranoside (*p*NP-Gluc)から遊離する

-nitrophenol (*p*NP)をOD₄₀₀の測定により定量し、酵素活性を算出した。酵素活性の1Uは1分間に1 μ molの

NPを遊離する酵素量とした。SDS-PAGEによって酵素標品の均一性と分子量を推定した。酵素によるマルトースからの反応生成物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分析した。展開溶媒 2-propanol / 1-butanol / DW (12 : 3 : 4)により上昇法にて展開し、20% H₂SO₄ / methanol スプレー加熱法によって糖のスポットを検出した。LC/MS²⁾によって、酵素反応生成物の構造を解析した。

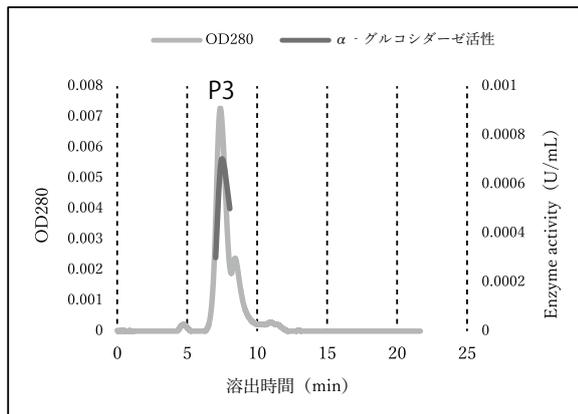


図4. TSKgel-UP-SW3000ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出パターン

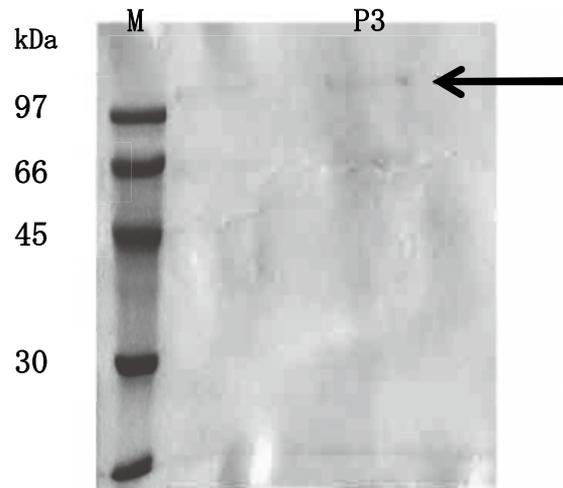


図5. 活性ピークのSDS-PAGE

M, 分子量マーカー；P3, ゲル濾過クロマト活性ピーク画分 (←)

(結果・考察)

1. 味噌麹からの α -グルコシダーゼ活性画分の精製

市販精米(飯米用)を用いて常温にて一夜吸水し水切後、100℃、60分蒸煮し、放冷した後、市販粉末種麴(味噌用、醤油用、いずれも*A. oryzae*)を散布してよく混合し、ガラスシャーレに盛り込み、恒温恒湿器にて30℃、相対湿度90%にて72時間培養した。出麹重量の10倍量の0.5%NaClを加え、室温にて2時間振とうして抽出液を得た。抽出液の α -グルコシダーゼ活性は、味噌用及び醤油用種麴においてそれぞれ7.1 mU/mL及び11.2 mU/mLであった。このため以後の精製操作には醤油用種麴由来の米麹を用いた。麹抽出液に対して90%飽和硫酸沈殿、TSKgel DEAE-5PWカラム、TSKgel UP-SW3000カラムによるクロマトグラフィーにより α -グルコシダーゼ画分を精製し、SDS-PAGEにより単一の活性画分を取得した。

図4に示したように、ゲル濾過クロマトグラフィーによって鋭いタンパク質ピークP3が得られ、活性ピークが一致した。本ピーク画分をSDS-PAGEによって分析したところ、単一のタンパク質染色バンドが得られた(図5)。

2. 精製活性画分の酵素化学的性質

SDS-PAGEによって、本酵素の分子量は約99 kDaと推定された。本酵素は、至適pH 6.0、至適温度50℃であり、pH 4 - 8、40℃以下で安定であった(図6)。合成基質に対してはpNP- α -Glucのみを分解し、pNP- β -Gluc、pNP- α -L-Fuc、pNP- α -Man及びpNP- α -Galには全く作用しない。

味噌醸造は食塩存在下で発酵熟成が進行することから、高濃度食塩の酵素活性への影響が注目される事項である。そこで0 - 10% NaClを添加した際の酵素活性を検討した。本酵素は10% NaCl存在下において、NaCl無添加に比べて約56%の活性を保持した(図7)。

食塩添加による活性低下は緩やかであり、赤色辛口味噌等の発酵熟成が長期間にわたることを考えると、本酵素は食塩存在下でも活性を保持し、穏やかに酵素反応を進行していることが予想された。

本酵素を100mg/mLマルトースに作用させた場合の反応生成物をTLCによって解析した。図8に示したように、反応初期から分解産物であるグルコースはほとんど検出されずマルトースより重合度の高い糖が検出され、マルトースの加水分解と同時に糖転移反応が起こっていることがわかった。さらに22時間の長時間反応においては、重合度4~6と考えられるオリゴ糖が生成することがわかった。従って、本酵素はマルトースに対して分解反応と同時に糖転移反応を行う典型的な α -グルコシダーゼであった。

さらに22時間反応における反応生成物をLC/MSによって構造解析したところ、糖転移による生成糖として、パノース、イソマルトース、イソマルトトリオース、コージビオース、マルトトリオース及びイソマルトテトラオースが検出された。さらに、4糖と考えられる未同定のオリゴ糖も検出された(図9)。また、10% NaCl存在下でも、反応生成物は変化しなかった。

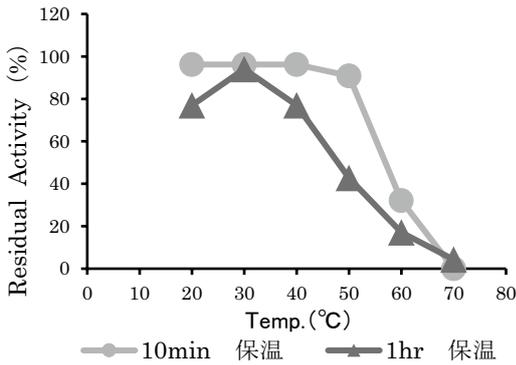
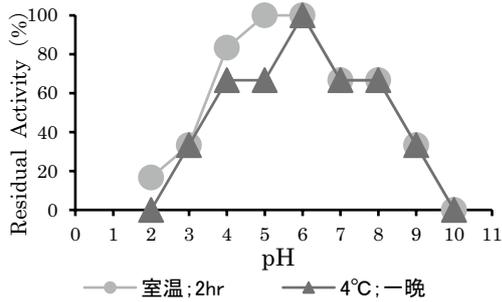
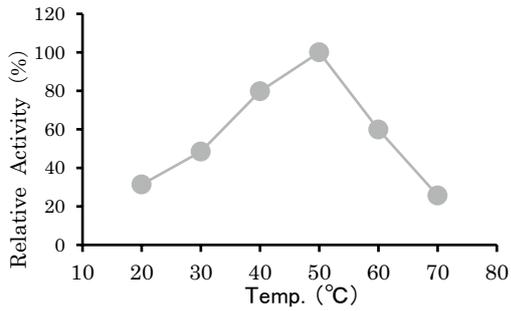
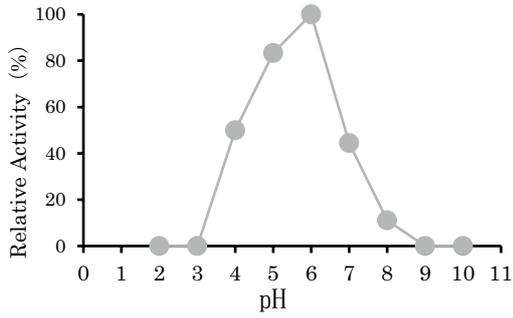


図6. 精製酵素の至適pH, 至適温度, pH安定性及び温度安定性

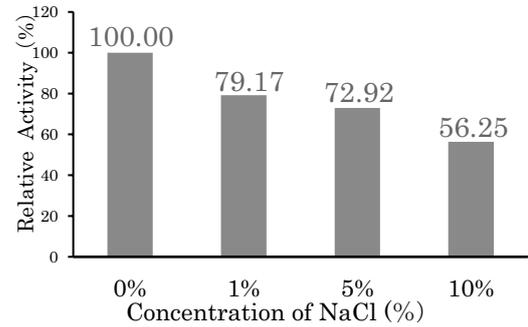


図7. 食塩存在下の加水分解反応の比較

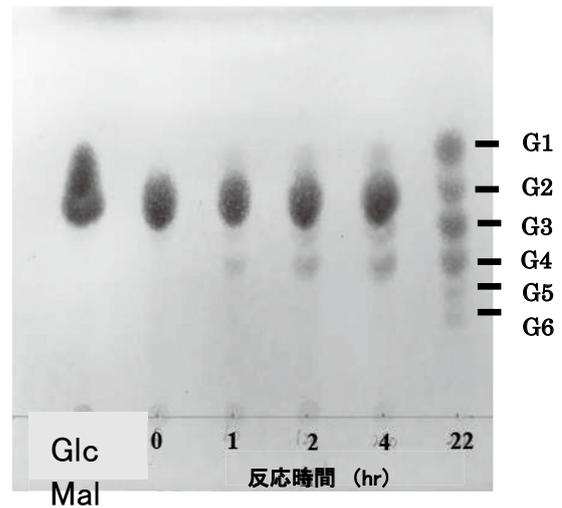


図8. 精製酵素によるマルトースからの反応生成物のTLC分析

従って、味噌醸造に用いられる米麴に含まれる α -グルコシダーゼは、 α -アミラーゼ等によってデンプンから生成するオリゴ糖を加水分解すると同時に糖転移反応によって α -1,2-, α -1,3-, α -1,6-グリコシド結合を含むオリゴ糖を生成し、味噌熟成中において分岐オリゴ糖の一部を生成する役割を持つことが強く示唆された。

【総括と展望】

本実験では、麴菌のゲノム情報から推定された α -グルコシダーゼと、味噌麴から精製した α -グルコシ

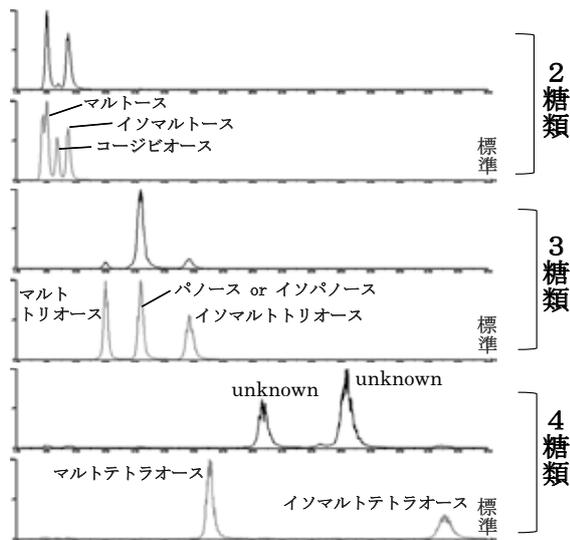


図9. マルトースからの反応生成物のLC/MSによる解析

ダーゼについて、それぞれ遺伝学的手法及び酵素化学的手法で、味噌醸造におけるオリゴ糖生成の観点から、それぞれ特徴付けを行った。ゲノム情報からは、主要な α -グルコシダーゼであるAgdAが味噌中のオリゴ糖を減少させる方向に寄与することが明らかになった一方で、味噌麹から見出された酵素は活発な糖転移作用を示したことから、味噌中のオリゴ糖の生成への寄与が強く示唆された。また、ゲノム情報では発現が相対的に弱いAgdGを強制発現することで、味噌中のオリゴ糖が増加することが分かった。これらは、味噌中のオリゴ糖量と酵素との関連性を具体的に示す興味深い結果である。味噌中のオリゴ糖は、味噌の味や物性、テリなどに影響すると考えられているが、その詳細は明らかではない。将来的に、本結果を踏まえて育種された麹菌を用いることにより、味噌中のオリゴ糖量をコントロールした醸造が可能になると期待できる。今後は、造成できていない α -グルコシダーゼ遺伝子の破壊株や高発現株を用いた解析を継続すると

もに、未知糖の構造解析法を構築し、味噌中のオリゴ糖の詳細及び生成メカニズムについて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料提供により実施したものです。研究遂行に多大なご支援を賜りました一般社団法人中央味噌研究所をはじめ、関係者の方々に心より感謝申し上げます。

【文献】

- 1) 本藤 智・他；日本食品工業学会誌, **26**, 469-474 (1979)
- 2) 徳岡昌文・他；中央味噌研究所研究報告, **41**, 36-42 (2020)
- 3) Pazur H., *et al.* ; Journal of Biological Chemistry, **196**, 265-272(1952)
- 4) 渡辺隆幸・他；日本醸造協会誌, **107**, 191-196 (2012)
- 5) Kwon H., *et al.* ; Journal of Liquid Chromatography, **18**, 1437-1449 (1995)
- 6) Kojima Y., *et al.* ; Journal of Agricultural and Food Chemistry, **68**, 1419-1426 (2020)
- 7) Tokuoka M., *et al.* ; Journal of Bioscience and Bioengineering, **124**, 171-177 (2017)
- 8) Dubois M., *et al.* ; Nature **168**, 167 (1951)
- 9) Gomi K.; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **83**, 1385-1401 (2019)
- 10) Minetoki T., *et al.* ; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **59**, 1516-1521 (1995)
- 11) Nagayoshi E., *et al.* ; Journal of Biological Macromolecule, **15**, 13-27 (2015)
- 12) Nakamura T., *et al.* ; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **70**, 2363-2370 (2006)