

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19235

研究課題名(和文) 醗酵食品に含まれるD-アミノ酸の精密プロファイリングと食品二次機能への関与の探索

研究課題名(英文) High resolution profiling of D-amino acid in fermented foods and their correlation with food secondary function.

研究代表者

福崎 英一郎 (Fukusaki, Eiichiro)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：40273594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：キラル固定相を用いたLC/MSを基盤としたD,L-アミノ酸高速キラルプロファイリング技術を醗酵食品中のD,Lアミノ酸分析に適用した。キムチを分析対象として分析システムの有用性を検証したのちに、日本酒を分析対象とした。特に、長期貯蔵日本酒および、生もと系日本酒を分析対象とした。D,Lアミノ酸キラル分析に加えて、従来のフードメタボロミクス分析を実施し、得られたメタボローム情報を統合し、説明変数として、日本酒の二次機能を応答変数として多変量分析を実施し、D,Lアミノ酸キラル分析情報を説明変数に加えることにより、醗酵食品の二次機能の解析精度が向上することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然に遊離体として存在するアミノ酸はL-アミノ酸であり、これまでD-アミノ酸の意義は不明だった。本研究により、日本酒においてD-アミノ酸が二次機能に貢献することが定量的に明らかになった。本研究により、醗酵食品の機能解析におけるD-アミノ酸分析の意義がさらに明確となった。また、本研究により確立されたD-アミノ酸入スルーブットプロファイル技術は堅牢な方法であり、今後、当該技術を用いた醗酵食品解析の進展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The LC/MS-based high-throughput chiral profiling technology for D,L-amino acids using a chiral stationary phase was applied to the analysis of D,L amino acids in fermented foods. After verifying the usefulness of the analytical system with Korean Kimchi as the analysis target, Japanese sake was analyzed. Especially, we analyzed long-term stored sake and Kimoto sake. In addition to D, L amino acid chiral analysis, conventional food metabolomics analysis was performed. The obtained metabolome information was integrated, and multivariate analysis was performed using the secondary function of Japanese sake as a response variable. It was proved that the analysis accuracy of secondary functions of fermented foods was improved by adding L amino acid chiral analysis information to the explanatory variables.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：D-アミノ酸 メタボロミクス フードメタボロミクス 醗酵食品 日本酒 キムチ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(福崎)は、食品メタボロミクス分野の先駆的技術開発実績があるとともに、アプリケーション研究の多くの実績を有し、当該分野で世界的に高く評価されている。(福崎)が開発した解析技術を用いることにより、食品中に含まれる水溶性低分子代謝物(糖、アミノ酸、有機酸、アルコール、アミン、その他)を網羅的に解析して得たメタボロームデータ行列を説明変数として、食品機能(おもに二次機能)を定量的に重回帰予測し、クラス分類や、官能評価値予測システムを提供することができる。これまで、応募者(福崎)は、種々の農産物、加工食品、醗酵食品、生薬等(緑茶、コーヒー、清酒、しょうゆ、チーズ、他)で食品機能(二次機能)の定量的解析に成功しており、当該技術の一般性と拡張性を証明してきた。従来のメタボローム情報だけでもかなり堅牢な機能解析が可能であるが、一部のフレーバーについては、「プラス」が必要であると感じてきた。近年、従来のメタボローム情報にジペプチドプロファイル情報を加えることにより、醗酵調味料である醤油のフレーバーの定量的理解が深まることを発見した。

上記状況に加えて、近年、一部の食品(醗酵食品、貝類等)には、D-アミノ酸が含まれることがわかってきた。例えば、しじみの旨味にはD-アラニンが大きく寄与していることが判明している。ただ、研究例はごくわずかであるとともに、D-アミノ酸以外の食品含有成分との相乗効果については、ほとんど報告が無い。D-アミノ酸プロファイル情報は、食品メタボローム解析における「プラス」情報として極めて重要と言われているが網羅的解析による検証結果は得られていない。研究代表(福崎)は、上記の問題を解決するために、スループットに優れ、偽陽性率の低い方法を開発に成功した。本手法の開発成功により、研究代表者(福崎)は、醗酵食品に含まれるD-アミノ酸プロファイルを精査し、食品二次機能との相関の有無を検証することを想起し、本研究着手にいった。さらに、D-アミノ酸プロファイルと従来のメタボロームプロファイルの統合情報を説明変数とすることにより、食品呈味予測モデルの性能が向上するという作業仮説を考えた。本研究開始当初、同様の研究は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、近年、生理活性が注目されているD-アミノ酸の食品機能に関わる。具体的には、いくつかの醗酵食品中のD-アミノ酸の種類と含有量を観測し、D-アミノ酸プロファイリングデータとしてカタログ化する。さらに、D-アミノ酸プロファイルと食品呈味機能(甘味、塩味、酸味、苦味、うま味等)との相関を解析し、D-アミノ酸の食品フレーバー性能への関与の有無を明らかにすることを目的とする。さらに、食品メタボロミクスの技術を運用し、D-アミノ酸プロファイルと食品含有他成分との相乗効果を確認する。

上記背景で述べたように記載したように、醗酵食品中のD-アミノ酸プロファイルは、D-アミノ酸の食品呈味への貢献の定量的理解のために、必須の研究である。ところが、D-アミノ酸プロファイル情報を得るために必要なハイスループット、高感度D-アミノ酸分析法が不在であるため、本研究の遂行は事実上不可能であった。後述の戦略により、(福崎)は極めて困難な本研究課題の遂行を可能にすることが出来る。従来から醗酵食品フレーバーへの関与が示唆されているものの詳細不明であるD-アミノ酸の関与の有無ならびに、関与様式(D-アミノ酸単独の相加的効果なのか、他メタボローム成分との相乗効果なのか等)に関わる重要な作業仮説を得ることが出来る。本研究はある意味では、醗酵食品におけるD-アミノ酸プロファイルマップを作る作業であり、もしかすると徒労に終わるかもしれないハイリスク・ハイリターン探索的「リソースづくり」である。従来技術(九大-資生堂法、1分析10万円の受注ビジネス、1分析500分要)を用いた場合、数千万円の研究費を費やして数年間かかる研究を、対象食品を限定することにより、(福崎)の新技術により、500万円で2年間で完成することが出来る。また、本成果は論文により全世界に公開する予定であるが、本研究成果により、世界中の醗酵食品呈味研究が大きく進むことが期待できる。

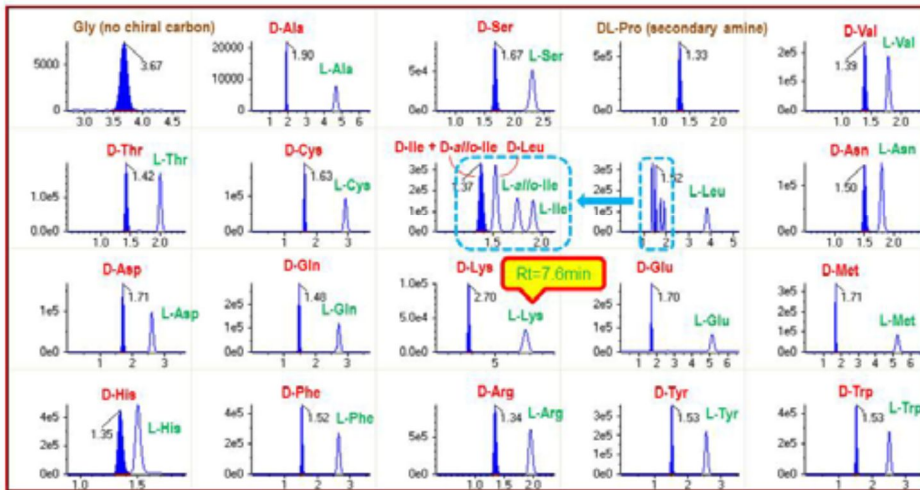
3. 研究の方法

研究代表者(福崎)が開発したLC-MS基盤のD,L-アミノ酸入スループットプロファイリング法(下表参照)を用いて、醗酵食品中に含まれるD,L-アミノ酸の分析を実施する。

食品分析用に最適化
した移動相で分析

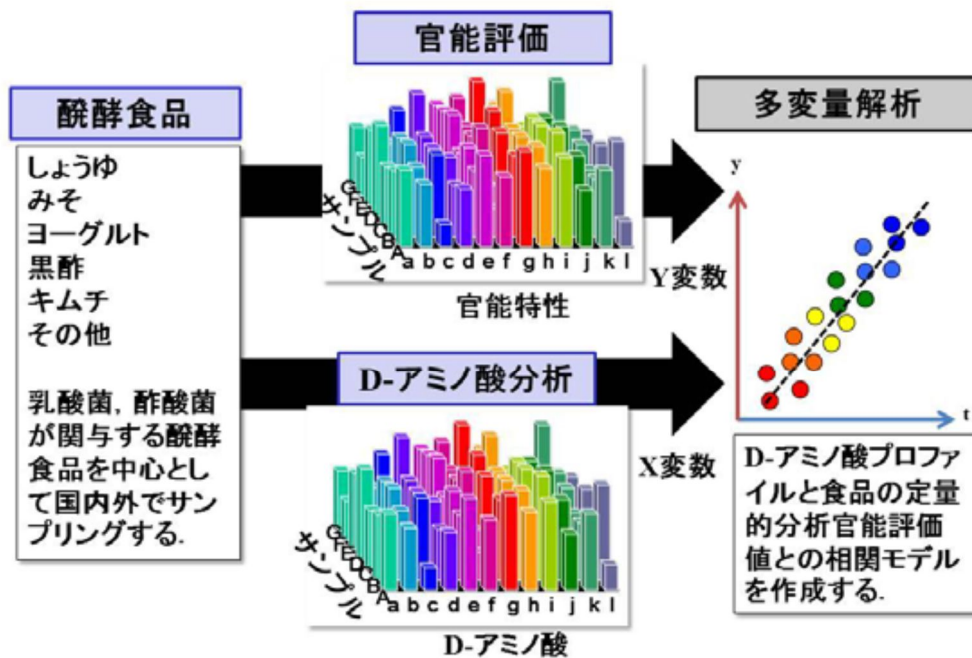
ACN/EtOH/Water/TFA
= 80 / 15 / 5 / 0.5

検量線 1000 nmol/mL



福崎法によるキラルアミノ酸分析結果(すべてベースライン分離)

醱酵食品は、D,L-アミノ酸以外の代謝物も研究代表者（福崎）がこれまでに確立した GC/MS および LC/MS を用いたシステムにより、メタボローム解析を実施する。得られた従来メタボローム情報と D-アミノ酸情報を統合したキラルメタボローム情報を説明変数として醱酵食品の二次機能を応答変数とした多変量解析を実施し、D-アミノ酸の貢献を査定する。



D-アミノ酸プロファイリングの概念

醱酵食品として主として日本酒を用いた。日本酒の中でも、D-アミノ酸を多く含む二種の日本酒カテゴリー（貴醸酒、および生もと清酒）をサンプルとした。官能評価は、共同研究先（一ノ蔵酒造株式会社、および、菊正宗酒造株式会社）との共同研究を実施した。

4. 研究成果

(平成 29 年度研究成果)

平成 29 年度は、まず、D-アミノ酸分析(福崎法)のメソッドバリデーションを実施した。分析システムとして D,L アミノ酸光学分割のためにクラウンエーテルに光学活性 BINAP 化合物が連結したキラルセクターカラムを使用した。アセトニトリル/TFA/エタノールの均一溶離液系によりクロマトグラフィー分離を行い、飛行時間型質量分析で定性定量検出を試みたところ、プロリンを除く 18 種類のすべてのアミノ酸の D,L 体を完全に分離する条件を確認した。分析時間は 10 分を切り、現時点で世界最高のスループット性能を示した。続いて、実際の醗酵食品を対象として分析系を検証した。サンプルとしてキムチを用いた。前処理法を検討した結果、十分な回収率ですべてのアミノ酸の分析を行うシステムを確立した。当該確立方法を用いて異なる醗酵経過時間のキムチサンプルを分析したところ、経過時間に依存してアミノ酸プロファイル、特に D-アミノ酸の特異的なプロファイル変動を観察することに成功した。上記に加えて、生もと系で仕込んだ清酒サンプルならびに、味噌サンプルについての検討に着手した。生もと系清酒ならびに味噌については、GC-MS による親水性低分子代謝物を標的としたメタボローム解析の予備検討を実施した。上記に加えて、D-アミノ酸プロファイルと食品二次機能(官能性能)との相関の有無を検討するために、分析型定量官能試験のシステム構築に着手した。フレーバーの定量的判別分析(QDA 法)のパネル構築に着手するとともに、非熟練者にも比較的可能な半定量的フレーバー分析法の検討も行った。

(平成 30 年度研究成果)

平成 30 年度は、まず、平成 29 年度の研究実績を踏まえて、さらに D,L アミノ酸キラルプロファイルリング法の性能向上を志向したメソッド開発を実施した。昨年度同様にクラウンエーテルに光学活性 BINAP 化合物が連結したキラルセクターを固定相として有する工学分割カラムを用いて HILIC 系(アセトニトリル/トリフルオロ酢酸/エタノール)の均一溶媒系によるクロマトグラフィーにタンデム四重極質量分析系を連結したシステムを基本とした。今年度は、(+)型カラムと(-)型カラムの 2 本のカラムを用いることにより共溶出するアミノ酸類についても擬陽性の危険を排除することに成功した。開発した分析システムを用いて、平成 29 年度に予備検討を行った種々のサンプルについて分析を実施した。まず清酒については、長期貯蔵の貴醸酒を中心として種々の清酒サンプルについて分析を実施した。サンプルをメタノール-クロロフォルム抽出系により徐タンパク、脱脂し、D-Alanine(d4)を内部標準物質としたサンプルの分析を実施した。LC-MS 分析に加えて GC-MS 分析も実施した。異なるサンプル間の差異は種々の代謝物プロファイルで説明することに成功したが、熟成期間の差異は完全にとらえることはできなかった。一方、官能特性を説明変数とした回帰分析を実施したところ、種々の D-アミノ酸の関与が示唆されたが、食品添加物グレードの D-アミノ酸が無い場合、容量依存性を確認するには至っていない。味噌ならびに、醤油サンプルについても同様に分析を実施した。アミノ酸プロファイルを説明変数として種々の味噌サンプルの違いを表現することが可能であることを見出した。続いて、インドネシアの代表的な大豆醗酵食品であるテンペについても同様の分析を実施し、種々のテンペの再をアミノ酸プロファイルを説明変数としてあらわすことに成功した。

(令和元年度研究成果)

平成 31 年度(令和元年度)は、まず、平成 30 年度の実績を踏まえて、さらに D,L アミノ酸キラルプロファイリング法の性能向上を志向したメソッド開発を実施した。昨年度同様にクラウンエーテルに光学活性 BINAP 化合物が連結したキラルセクターを固定相として有する工学分割カラムを用いて HILIC 系(アセトニトリル/トリフルオロ酢酸/エタノール)の均一溶媒系によるクロマトグラフィーにタンデム四重極質量分析系を連結したシステムを基本とした。今年度は、(+)型カラムと(-)型カラムの2本のカラムを用いるとともに、バルブスイッチングシステムを適用することにより、(+)型、(-)型の2本のカラムの分析を連続的に行うシステムを構築した。本方式により、分析のバッチ差に基づく系統誤差が減じられ、よりバラつきの少ない高精度分析系を構築できた。

実サンプル分析については、昨年度の長期貯蔵貴醸酒中の D-アミノ酸分析結果を踏まえて、同じく D-アミノ酸を多く含有すると言われている生もと仕込みの清酒をサンプルとして D-アミノ酸プロファイルを実施した。生もと仕込みは乳酸菌を関与させる伝統的な清酒醸造方法であり、乳酸菌の産生すると思われる D-アミノ酸が含まれ、それらのプロファイルが生もと仕込み清酒の独特の呈味に關与する可能性が示唆されてきた。生もと系清酒の特徴を理解するために、対象試験サンプルとして酵母仕込み清酒も同じ分析に供した。サンプルをメタノール-クロロフォルム抽出系により徐タンパク、脱脂し、D-Alanine(d4)を内部標準物質としたサンプルの分析を実施した。LC-MS 分析に加えて GC-MS 分析も実施した。得られたデータ行列を多変量解析に供した結果、生もと仕込み清酒と酵母仕込み清酒の差異を捉えることに成功した。また、官能試験の結果と合わせて考察したところ、複数の D-アミノ酸が生もと仕込み清酒の呈味の強さに相関を有することを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Y, Taniguchi M, Fukusaki E.	4. 巻 127
2. 論文標題 High-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 520-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi M, Konya Y, Nakano Y, Fukusaki E.	4. 巻 124
2. 論文標題 Investigation of storage time-dependent alterations of enantioselective amino acid profiles in kimchi using liquid chromatography-time of flight mass spectrometry.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng.	6. 最初と最後の頁 414-418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2017.04.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口百優, 霜鳥朝子, 福崎英一郎
2. 発表標題 濃醇甘口日本酒のD-アミノ酸に注目した呈味成分の網羅的解析
3. 学会等名 第12回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Nakano, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki
2. 発表標題 Wide-targeted LC-MS/MS-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites
3. 学会等名 Metabolomics Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 百優, 紺屋 豊, 中野 洋介, 福崎 英一郎
2. 発表標題 キムチ中 D-アミノ酸の保存期間における経時的プロファイル変動の調査
3. 学会等名 第11回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎
2. 発表標題 ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発
3. 学会等名 第11回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考