

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02338

研究課題名(和文) アミン酸化酵素とアルデヒド酸化酵素の共役反応によるヒスタミン中毒予防技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of histamine poisoning prevention technology by coupling reaction of amine oxidase and aldehyde oxidase

研究代表者

臼井 将勝 (Usui, Masakatsu)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・准教授

研究者番号：50399656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒の原因となるヒスタミンを消去する技術は存在せず、その対策は増やさない事に終始してきた。我々は麹カビのアミン酸化酵素と酢酸菌のアルデヒド酸化酵素複合体を用いてヒスタミンに対応するカルボン酸まで酸化できる共役反応系を見出し、ヒスタミン問題を直接的に解決する消去法を確立した。同法を用いて、干物や出汁中のヒスタミン消去例を示し、アミン類の消去による発酵食品等の風味改善を示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したFAOとALOXによる共役反応系は水産物や発酵食品の衛生管理技術発展に大きく寄与するものである。種々の毒性アミンの安全かつ安価な消去法を社会実装が可能なレベルで示したことは食品衛生分野の発展につながり、特にヒスタミン食中毒の予防対策を大きく前進させた。また種々のアルデヒドを、人工電子受容体を必要とせず、溶存酸素のみで対応するカルボン酸へ酸化するALOXは食品化学や創薬分野で活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：There is no technology to eliminate histamine, which causes food poisoning, and preventive measures have been limited to preventing its increase. We have discovered FAO/ALOX that a coupling reaction system using FAO, an amine oxidase from fungi, and ALOX, an aldehyde oxidase complex from acetic acid bacteria. FAO/ALOX oxidized amines to the corresponding carboxylic acids. We established a histamine elimination method Using this coupling reaction system. In addition, an example of eliminating histamine from dried fish and soup stock was also shown, and knowledge was obtained that suggests a method for improving the flavor of fermented foods by amines elimination.

研究分野：食品科学

キーワード：ヒスタミン アミン酸化酵素 アルデヒド酸化酵素複合体 共役反応 アミン消去 食中毒予防 アミン臭軽減

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1 . 研究開始当初の背景

アミノ酸脱炭酸酵素を持つ微生物 (*Morganella morganii* や *Photobacterium phosphoreum*) の汚染によって、魚や水産加工食品に発生するヒスタミン (HIST) や多くのアミン類は、食中毒の原因物質として知られている。食品衛生が発展した我が国でも HIST 食中毒の事例は絶えず、消費者庁の公表では 2013 ~ 2017 年の 5 年間で 50 件、患者数 1013 名となっていた。これに表面化しにくい食卓での発生が加わると予想された。HIST は集団食中毒となる傾向が強く、学校給食等大量調理での発生も懸念される。実際に本年度 6 月に宮崎県日南市、9 月に沖縄県浦添市でそれぞれ 50 名規模の魚 (シイラ) が原因となった HIST 食中毒が発生している。幼児や児童の食中毒は健康被害が深刻になり易く、同時に食中毒経験後の過剰な回避による食文化の衰退や消費の低迷につながる懸念された。

我が国では厚労省、農水省、食品安全委員会らが個別に HIST 管理指針を出し、各都道府県で食品衛生法に基づいて監視指導している。欧米では WHO と FDA が合同で CODEX 規格として、HIST 濃度に対する安全基準を厳密に定めている。多くの場合、HIST 濃度が 200 ppm を超えないように管理されているが、登田らの報告では 50 ~ 100 ppm でも発症する可能性が指摘されていた (*Bull.Natl.Inst.Health Sci.*, **127**, 31-38, 2009)。

他方で、食品加工業者の多くは低予算の中で苦しい対応を迫られ続けている。現在、食品中の HIST は比色定量法等で容易に知ることはでき、徹底した温度管理を行うことで中毒発生リスクを低下できる。対照的に、発生した HIST は加熱によって分解されることもなく、食品加工の範疇で HIST を除去する技術はなく、抜き取り検査と低温管理に依存した状態であった。一見すると科学的根拠に基づいた対策が可能のように見えるが、途上国や我が国の中小零細企業では常に不安と隣合せである。実際に市販されている食品の HIST 含有状況の報告例では、干物で約 6 品に 1 品、練り製品で約 15 品に 1 品の頻度で 50 ppm を超える HIST が検出され、それぞれの最高値は 3,400 ppm, 340 ppm であった。チーズでも 2,000 ppm を超える HIST が検出されるものが散見された (*日本調理科学会誌*, **47**, 341-347, 2014)。

上述を踏まえ、食卓や給食、魚食文化、発酵食品を守り発展させるためには、HIST 対策を低温管理のみに依存したままでは不十分な状態と考えられた。ゆえに「食品加工の範疇で HIST 等の有害アミン類を安全かつ安価に消去するためには如何にすればよいのか」および「HIST 消去技術をどのようにして中毒予防に応用すればよいのか」について答えを得て、解決策を創出すべきであった。

2 . 研究の目的

本研究の目的は HIST に代表される有害アミン類の消去法の確立である。加えて同法が食品に適用できること、すなわち安全で安価なことを条件とする。これを実現し、本研究の学術的独自性と創造性の核をなすものとして、以下の共役酸化反応による HIST 消去法の確立を目指した。

HIST 消去の第 1 酵素として麹カビのアミン酸化酵素 (Fungal Amine Oxidase, FAO) を用いた。FAO はアミンを酸化してアルデヒドを生じる。すなわち、FAO 単独では HIST 問題を解決できない。この事実は多くの研究者が FAO に期待し、断念したことから明白であった。この停滞した HIST 対策を再び前進させるために、研究分担者の足ららが報告した酢酸菌のアルデヒド酸化酵素複合体 (Aldehyde Oxidase, ALOX) を第 2 の酵素として用いた。ALOX は細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) と細胞膜の末端酸化酵素 (Quinol Oxidase) およびユビキノン (Q) による電子伝達 (キノンサイクル) からなり、細胞膜の外側に局在して種々のアルデヒド類を迅速に酸化する。特筆すべきは、細胞質に見られる NAD(P) 依存性 ALDH と明確に異なり、特別な電子受容体の添加を必要とせず、反応液中の溶存酸素を最終的な電子受容体としてアルデヒドを酸化し H₂O を生じることである (図 1)。これは食品用酵素にとってコスト面で大きな利点である。さらに、FAO は麹カビ、ALOX は酢酸菌と食経験豊富な微生物から得られることから、安全面での優位な特徴を併せ持っている。FAO と ALOX は酸化反応の最適 pH がともに中性域にあり、反応温度域も共通している。我々は共役反応系の構築に互いに好適と考え、FAO と ALOX によるアミン類 → (アルデヒド類) → カルボン酸という連続的な酸化反応を考案し、Benzylamine をモデルにして世界に先駆けてこれを証明した (図 2。発表論文 1)。

同法を HIST 消去に応用することで、長い間不可能とされてきた安全安価な HIST 消去を可能にし、食の安全における大きな breakthrough となることを目指した。

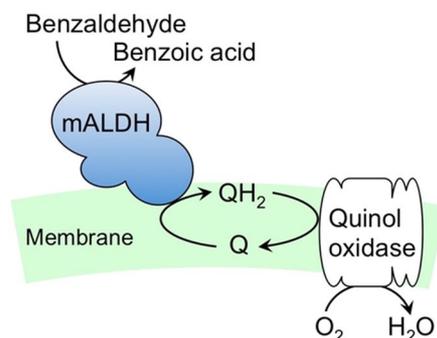


図 1 ALOX の構造とアルデヒド酸化反応機構モデル

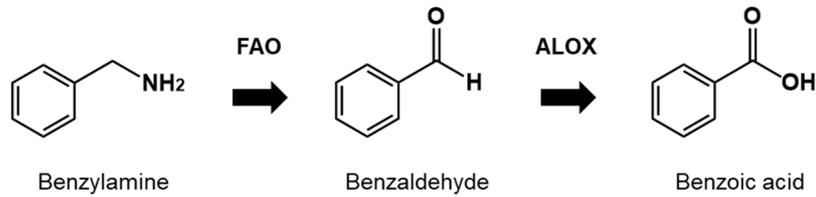


図2 FAO/ALOX によるアミン酸化反応モデル

3. 研究の方法

(1) 図2に示したFAOとALOXの共役反応系（FAO/ALOX）の応用によるHISTのImidazole-4-acetic Acid（I4AA）への酸化について証明を試みた。FAO/ALOXの主旨はアルデヒドを生成後直ちにカルボン酸へと酸化することにあるため、HISTの減少とI4AAの生成が反応の開始から終了まで化学量論的に一致することについて検証した。このための反応条件を見出し、証明するためにHPLCによる両物質の定量分析を行った。同法を用いて両化合物の増減量の一致から間接的ではあるが、アミンから生じたアルデヒドが他の分子と自由に反応することなくカルボン酸まで酸化されることの証明を目指した。

(2) 種々の食品成分の共存下でもFAO/ALOXが成立するか否かについて検討した。一般的に高塩濃度条件下では酵素活性が低下することが懸念されるため、干物や出汁をモデルにFAOとALOXの実用例を示した。HIST生成が起こった魚肉を模したHIST添加アジフィーレーや市販顆粒出汁において、FAO/ALOXによるHIST消去とI4AAの生成について確認した。

(3) FAOおよびALOX生産の効率化に取り組んだ。超音波処理による両酵素抽出効率、麴カビ培養時のFAO発現物質（*n*-ブチルアミン）の代替物質、酢酸菌培養期間とALOX収率との関係について検討した。

(4) FAO/ALOXによるアミン類の消去が食品のにおいに対する影響について検討した。臭気性アミンとして知られるプトレシンの腐肉臭、カダベリンの死体臭、スペルミジンの精液臭、トリプタミンの糞便臭などを念頭に、FAO/ALOXによるこれらアミン臭の消去を試みた。酵素処理した食品中のアミン分析に加えて、揮発成分の変化について官能評価および電子嗅覚装置による差別化を行った。

4. 研究成果

(1) さらにFAO/ALOXによるHIST消去において、FAOによるHISTの消去速度とALOXによるI4AA生成の実態について精査した。250 nmolのHIST溶液に0.04 unitのFAOと0.16 unitのALOXを加えて20°Cにて酵素反応させた。FAOおよびALOXの酵素活性は、それぞれベンジルアミンおよびベンズアルデヒドを基質として求めた値を用いた。各酵素反応時間でのHISTおよびI4AA濃度をHPLC法にて定量した。当初の酵素活性から求めた理論値ではHISTは約6.25分で消去され、4倍量のALOXにより速やかにI4AAへと酸化されると予想された。しかし、実測値では大半のHISTを酸化するために30分を要しており、ベンジルアミンに対する酸化活性に対して遅延することが確認された。ALOXはさらに遅延し、250 nmolのI4AAを生成するために60分以上120分未満の反応時間を要した。この結果より、FAO、ALOXともにベンズアルデヒドとHIST、ベンジルアミンとI4AAとで酵素活性が異なることが明らかとなった。他方、反応の遅延は生じても添加したHISTと等量のI4AAが回収できておりHISTを初発基質とした場合でもFAO/ALOXによる化学量論的なカルボン酸生成、すなわち消去は成立することが確認された（図3）。

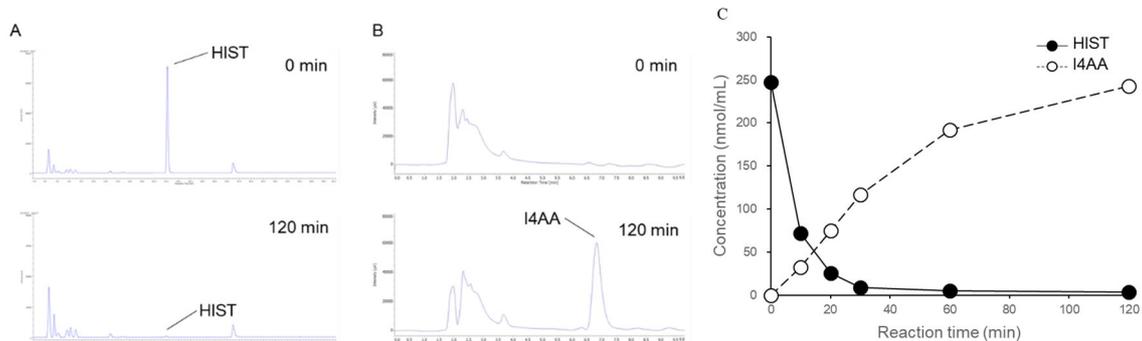


図3 FAO/ALOX によるHISTの消去とI4AA生成

さらに遅延が顕著な ALOX について原因を検討した。酢酸菌から得た ALOX の活性はベンズアルデヒドを使用して算出しているが、イミダゾール-4-アセトアルデヒドを基質とした場合には活性が異なることが予想された。ALOX のイミダゾール-4-アセトアルデヒドに対する酸化活性をより正確に把握するために、イミダゾール-4-アセトアルデヒド標準品が必要であるが、市販されていない。そこで FAO を使用して HIST を完全酸化することで既知濃度のイミダゾール-4-アセトアルデヒド標準品を得た。これを使用して、ALOX 活性を比較した結果、イミダゾール-4-アセトアルデヒドを基質とした場合では、ベンズアルデヒドを基質とした場合の約 1/8 ~ 1/16 に低下することが明らかになった。ただし、同検討では FAO/ALOX の共役反応系とは異なり、酵素反応時間を延長しても I4AA を理論値通り 100%回収することができなかった。これは、FAO と ALOX の逐次反応によって HIST から生成したイミダゾール-4-アセトアルデヒドが ALOX 添加以前に酵素反応系中のアミノ化合物などと相互作用してしまったことが原因であると予想された。すなわち、FAO と ALOX によるアミン消去（カルボン酸生成）では逐次反応は不適であり、両酵素の共役反応が必須であることが再確認された。

(2) FAO/ALOX の水産加工食品への応用に先駆けて、高塩濃度条件下での FAO/ALOX による HIST 消去活性について検討した。その結果、5% NaCl 存在下では NaCl 非存在下と比較して HIST 消去活性に変化は見られなかった。他方、10% NaCl 存在下では活性が半減し、15% 以上では 1/3 以下に低下した。また、低温条件下での FAO/ALOX 共役反応系による HIST 消去についても検討し、10°C または 4°C でも HIST を I4AA へと変換することが可能であることを確認した。

一般的な水産加工品における FAO/ALOX による HIST 消去例を示すために、HIST 含有アジ一夜干しを作製した。アジの頭部、内臓、鱗を除去し、フィレーの状態に 5% 食塩および 300ppm の HIST を含む溶液に 3 時間漬けた。その後、4°C で 24 時間乾燥させたものを試料とした。HPLC 法で分析した結果、同試料の HIST 濃度は 71 ± 3 ppm であった。FAO/ALOX を添加して、HIST 消去効果を確認した結果、同一条件の 3 検体において酵素添加後 3 時間の時点で HIST 濃度は 33 ± 9 ppm であり、酵素添加後 9 時間の時点で HIST 濃度は 5 ± 2 ppm であった（図 4）。I4AA の回収については、HPLC 法で分析した結果、酵素添加後 3 時間の時点で回収率 $35 \pm 14\%$ 、酵素添加後 9 時間の時点で $30 \pm 3\%$ であった。さらに、時間を延長して検討した結果、I4AA 回収率は $101 \pm 4\%$ に達するまでに 120 時間を要した（図 4）。

以上の結果より、HIST 含有アジ一夜干しに導入した HIST を FAO と ALOX によって効率よく消去できることが確認され、FAO/ALOX が塩干魚介類における HIST 食中毒予防策として有効であることが示唆された。他方で、I4AA の生成においては HIST 消去の約 13 倍の時間を要しており、FAO/ALOX の回転速度に対する低温と塩濃度の負の影響が改善すべき項目として浮き彫りとなった。

さらに FAO/ALOX による HIST 消去の応用例を示すために、出汁顆粒中の HIST の消去を試みた。こんぶ、いりこ、あご、かつお出汁として市販されている風味調味料各 1 種を用いて、各商品記載の方法で出汁溶液を調製した。各出汁溶液に 250 nmol/mL となる様に HIST を添加してヒスタミンが高濃度に発生した出汁溶液を模した。同溶液に FAO および ALOX をそれぞれ 0.025 unit/mL となる様に加え、20°C にて酵素処理した。HPLC 分析にて HIST 消去および I4AA 生成量を測定した結果、各出汁中の HIST は、酵素処理 10 分後に 1/2 ~ 2/3 が消去され、24 時間後までに大半が消失した。しかし、FAO 活性は想定約 1/2 に留まっていた（表 1）。I4AA 生成量は、こんぶ出汁といりこ出汁で 24 時間後までに添加した HIST のほぼ同モル濃度の I4AA が生成された。他方、あご出汁とかつお出汁ではそれぞれ 4/5、3/4 に留まった（表 2）。以上の結果より、適切な FAO および ALOX の添加によって出汁中の HIST を消去できることが示唆された。

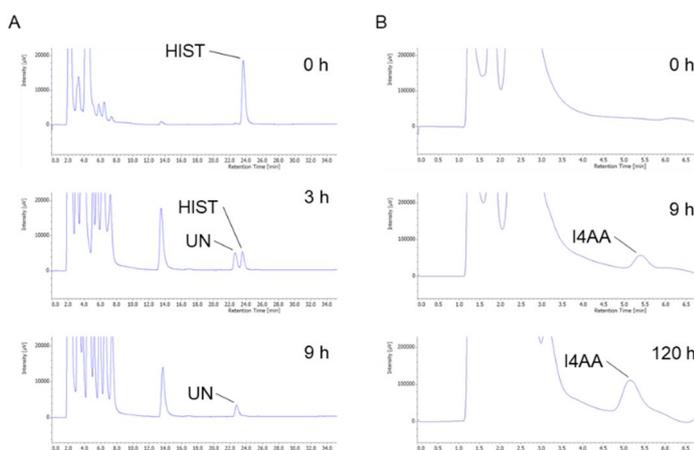


図 4 FAO/ALOX によるアジ一夜干し中 HIST の消去

表 1 各出汁溶液における HIST 消去率

	10min	20min	30min	24h
こんぶ	57.02%	78.97%	91.83%	99.10%
いりこ	43.84%	65.47%	81.78%	98.26%
あご	45.56%	68.13%	81.99%	98.01%
かつお	53.80%	64.01%	86.91%	94.66%

表 2 各出汁溶液におけるヒスタミン消去率

	10min	20min	30min	24h
こんぶ	0.46%	2.11%	4.06%	82.10%
いりこ	1.21%	3.05%	5.01%	82.47%
あご	0.35%	1.71%	2.90%	83.53%
かつお	0.55%	3.39%	5.20%	59.57%

(3) FAO および ALOX を一般的な研究設備にて容易に製造できる体制構築に取り組んだ。FAO は、プレ培養した麹カビ *Aspergillus luchuensis* AKU 3302 株を 0.25% n-ブチルアミン添加培地に移して同菌糸体上に FAO を誘導した。菌糸体を超音波処理して得た破碎上清に FAO を含む画分を得ることができた。FAO の抽出効率超音波処理の強度(振幅幅)に比例して向上した。本研究最終段階での FAO 収量は、麹カビ菌糸体湿重量 1 g あたり 0.75 ± 0.11 unit となった。さらに FAO 産生の誘導物質である n-ブチルアミンが消防法において危険物第 4 類引火性液体に指定されていることから、他のアミンへ代替することの可能性についても検討した。その結果、FAO 産生誘導においてアミン添加は必須であり、カダベリンで代替可能であることが明らかとなった。ただし、カダベリン誘導時の酵素産生量は n-ブチルアミン誘導時の 1/2 に低下した。

ALOX は、酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3258 株の超音波破碎液に 40% 飽和硫酸を加えて塩析し、脱塩後に ALOX 活性を含む画分を得ることができた。超音波処理と一般的な遠心分離によって粗精製が可能となり、従来の超遠心分離依存が解消できた。さらに酢酸菌培養液の pH 変動と菌体収量および ALOX 収量との関係について検討した。その結果、培養開始後 24 時間までは対数増殖期様に濁度が上昇し、72 時間までは濁度上昇が鈍化した。その後 96 時間にかけて上昇速度がやや早まった。培地の pH は 24 時間までは濁度の上昇に伴って急速に低下し、pH 4.42 となった。その後、48~120 時間で再上昇に転じ 120 時間で pH 8.11 となった(図 5)。

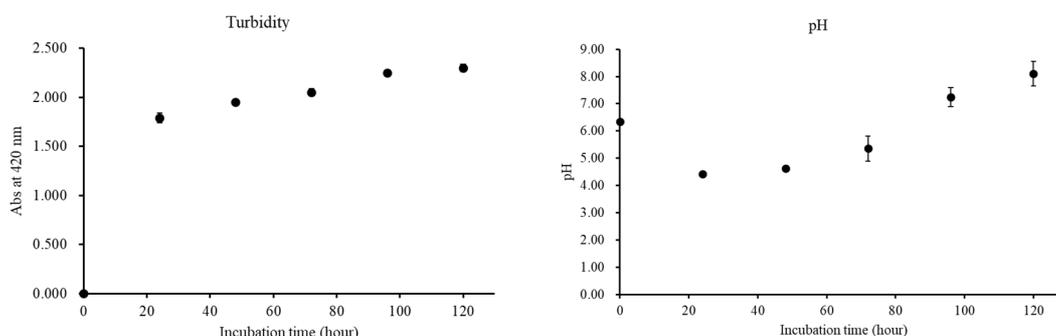


図 5 酢酸菌培養液における濁度と pH の経時変化

各時間で再度培養した酢酸菌を超音波処理し、得られた沈殿物を膜画分として ALOX 活性を測定した。その結果、膜画分 1.0 g あたりの ALOX 活性は最大が 24 時間の 58.27 ± 12.50 unit/g、最小が 120 時間の 41.23 ± 6.48 unit/g となり培養時間の延長または pH の上昇と共に ALOX 活性が低下する傾向がみられ ALOX 発現量の減少が示唆された。各時間培養液の得られた菌体総重量をもとに、得られた ALOX 総収量を算出した場合では、最大が 96 時間の 54.5 ± 16.6 unit/300 mL、最小が 24 時間の 26.9 ± 5.46 unit/300 mL であった。菌体総重量が少なく最小収量となった 24 時間培養においても、最大収量であった 96 時間の約 1/2 量の ALOX を得られたことから、培養液と培養時間に係るコスト状況に応じて最適な培養時間を選択することが必要と考えられた。

以上の結果より、両酵素ともに実用化に向けたさらなる収率向上が課題として残ったが、生産体制の大規模化に向けた基礎的技術が確立できた。

表 3 各培養時間の ALOX 活性と収量

培養時間 (hour)	膜画分 1.0 g あたりの ALOX 活性 (unit/g)	培養液中の総 ALOX 活性 (unit/300 mL)
24	58.27 ± 12.50	26.90 ± 5.46
48	48.97 ± 4.33	30.19 ± 6.25
72	49.42 ± 11.85	36.03 ± 2.19
96	50.41 ± 14.54	54.54 ± 16.57
120	41.23 ± 6.48	51.72 ± 16.44

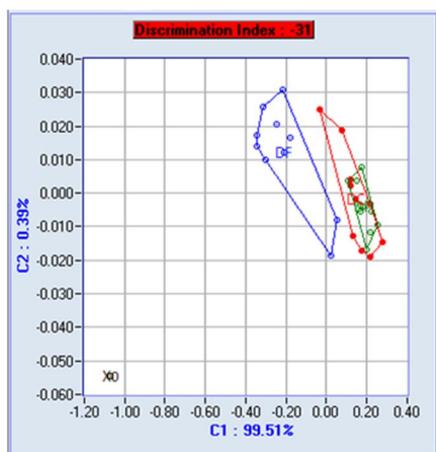


図 6 SAS によるにおい成分の主成分分析結果

第 1 主成分と第 2 主成分の結果を示した。左下の黒色 (X) は空気。赤色サークル (DC) は未処理の大根漬け汁、緑色 (DP) は pH 調整後の大根漬け汁。青色 (DF) は FAO/ALOX 処理した大根漬け汁。DF のみが他よりも空気に近く、区別されていた。

(4) FAO/ALOX のアミン臭軽減または改善効果について、市販大根塩漬の漬け汁を例として検討し、官能評価および電子嗅覚装置 (SAS) による分析を行った。FAO/ALOX 処理は、3 mL の漬け汁を使用して pH を中性付近調整した後に両酵素を 1 unit 加えて 10°C で 1 晩静置して行った。その結果、パネル 8 名による官能評価では FAO/ALOX 処理により漬け汁の悪臭が半分以下に軽減された。SAS 分析においても臭気の主成分が未処理の漬け汁と明確に差別化され、FAO/ALOX 処理により空気スコアに近づくことが確認された(図 6)。これらの結果より、FAO/ALOX を添加することで食品の臭いを改善できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Usui Masakatsu, Kubota Hikari, Ishihara Mizuki, Matsuki Haruka, Kawabe Shinya, Sugiura Yoshimasa, Kataoka Naoya, Matsushita Kazunobu, Ano Yoshitaka, Akakabe Yoshihiko, Hours Roque A, Yakushi Toshiharu, Adachi Osao	4. 巻 86
2. 論文標題 Histamine elimination by a coupling reaction of fungal amine oxidase and bacterial aldehyde oxidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1438 ~ 1447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac121	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原 瑞希、河邊 真也、足立 収生、白井 将勝
2. 発表標題 アミン酸化酵素とアルデヒド酸化酵素の共役反応による出汁中ヒスタミンの消去
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	足立 収生 (Adachi Osao) (20027189)	山口大学・その他部局等 ・名誉教授 (15501)	
研究分担者	河邊 真也 (Kawabe Kawabe Shinya) (60579415)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------