

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：85403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850092

研究課題名(和文) 清酒に含まれるオリゴペプチドの解析と発生機構の解明

研究課題名(英文) Oligopeptide analysis in Japanese sake and elucidation of its generating mechanisms during sake brewing process

研究代表者

高橋 圭 (Takahashi, Kei)

独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・主任研究員

研究者番号：60565399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、醸造酒のジペプチドを中心とする低分子オリゴペプチドの分析方法を超高速液体クロマトグラフィー-質量分析装置(UHPLC-MS)を用いて開発した。清酒のオリゴペプチドの発生源の多くは米タンパク質と考えられることから、米の主要なタンパク質であるグルテリンについて、そのサブタイプごとに、イムノブロット法と免疫蛍光染色法を用いて米粒内局在を明らかにした。グルテリンが醸造工程中に分解される様子を確認した。2次元ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置やキャピラリー電気泳動装置を用いたメタボロミクスにより吟醸酒の低分子オリゴペプチド関連化合物が吟醸酒の品質と正に相関することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method for analyzing low-molecular oligopeptide containing dipeptide in fermented alcoholic beverages by UHPLC-MS. Because primary sources of oligopeptide in Japanese sake are considered as rice proteins, we examined the localization analysis for each subtype of glutelin in rice grains by immunoblotting and immunofluorescent staining methods, resulting in the fact that glutelin subtype-dependent localization pattern in rice grain. Furthermore, we confirmed that glutelin in polished rice was digested during the sake brewing process. Metabolomic approach using GCxGC-TOFMS and CE-TOFMS unraveled that low-molecular oligopeptide related compounds in ginjo sake are positively correlated with the quality of ginjo sake.

研究分野：農学

キーワード：酒類 清酒 日本酒 オリゴペプチド ジペプチド グルテリン 米タンパク質 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

清酒等の発酵食品に含まれる成分の解析は、呈味性・生理機能など食品科学への応用基盤となるだけでなく、醸造学や発酵生理学に関する根本的理解につながることから、これらに関する学術的知見を得るための重要なステップの一つと位置づけることができる。清酒等の醸造酒は、しょうゆ及び味噌等の発酵食品と同様に、ジペプチドを中心に様々な低分子オリゴペプチドを含んでおり、それら自体が即効性のある栄養成分である上に、呈味性や生理調節機能があると考えられている。しかし、研究開始当初において、清酒成分の中でも特にジペプチドを中心としたオリゴペプチド類については、ジペプチド等低分子オリゴペプチドをターゲットにした分析方法を一定のレベルで確立し、研究代表者らが報分として発表していた(引用文献1)ものの、なお情報に乏しく、清酒品質との関連性は不明であった。

一方、清酒の低分子オリゴペプチドの解析にあたっては、米タンパク質特定が重要である他、清酒醸造には高度に精米した高精白米を原料とすることから、米タンパク質の米粒内局在や量比に関する知見が極めて有益な基盤的情報となることが考えられた。米タンパク質の中でも、特にグルテリンタンパク質は、米タンパク質の約半分を占め、さらに醸造工程において易溶性であることから、清酒の低分子オリゴペプチドを解析する上で重要なターゲットである。米グルテリンは複数の遺伝子から成り、いくつかのグルテリン遺伝子について、それらのプロモーターを用いた β -glucuronidase (GUS) レポーター発現解析から、米粒内の発現部位が異なる可能性が報告されていたが、タンパク質レベルでの報告が無かったことに加え、より解像度の高いアプローチによる解析が求められているという現状があった。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題において、研究代表者らは、

- (1) 米粒内におけるタンパク質の蓄積パターンを解析すること。
- (2) 醸造工程におけるタンパク質分解機構を解明すること。
- (3) 清酒等の醸造酒のオリゴペプチドの分析方法を改良し、清酒のペプチドがどれだけ含まれるかを明らかにすること。
- (4) 清酒のペプチド成分が呈味や機能性に与える影響の可能性を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 【米分画法及びタンパク質抽出】 平成21~23年産の日本晴(広島県)、コシヒカリ(千葉県)、山田錦(広島県)、五百万石(福島

県)、夢の香(福島県)、出羽燦々(山形県)、出羽の里(山形県)と醸造用超小型試験精米機(チヨダエンジニアリング)を用いて、飯米程度の精米歩合(90%)から米の中心部にかけて4つに米の画分を調製した。このうち、代表的な酒造好適米である山田錦については、心白有と無で選別した精米画分も作成した。

胚芽及び果皮・種皮、アリューロン層の画分については、酒類総合研究所(広島県)の水田から収穫した、山田錦及び日本晴の玄米から、家庭用精米機を用いて調製した。

タンパク質抽出については、米粉末試料にタンパク質抽出バッファーを加え、23ゲージ針付きシリンジを用いて通液した。その後、バイオシェーカーで1時間、室温でインキュベートした。胚芽、果皮及び種皮からタンパク質を抽出する場合は、タンパク質抽出バッファー添加後、バイオマッシャーにより破砕してから行った。

(2) 【イムノブロット(IB)法による解析】

タンパク質抽出サンプルを遠心分離後、この上清に5×Ling's solubilizing bufferを加え、インキュベートした。さらに、2×Urea bufferを加え混合した。

変性処理したタンパク質サンプルを、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動(SDS-PAGE)し、十分に分離後、CBB染色した。

イムノブロット解析については、SDS-PAGE後、0.22 μ m PVDF膜に転写した。その後、ブロッキングバッファーに浸し、1次抗体と反応させた。グルテリンファミリーのうち、GluA-2, GluB-1, GluC-1, GluD-1, GluB-4/5の酸性サブユニットに対する5種類のポリクローナル抗体及びアミロプラスト構成タンパク質に対する市販抗体(Agrisera)、とともに1次抗体として用いた。麴菌由来のPepA, Amylase, GlaBについては、アミノ酸配列からエピトープとなるペプチドを選択し、ポリクローナル抗体を作成し、 β -actin等の市販抗体とともに1次抗体として使用した。

その後、HRP結合2次抗体と反応させ、ChemiDoc MP イメージングシステム(Bio-Rad)を用いた化学発光法により検出した。

(3) 【免疫蛍光染色法による解析】

酒類総合研究所の水田から山田錦及び日本晴、五百万石の登熟中米(開花後17日後)を1次枝梗側生穎花より採取し、使用日まで -80°C で保存した。

パラフィン包埋後、連続式マイクロトームを用いて米長軸方向及び米短軸方向のパラフィン切片を得、キシレンとエタノールを用いて脱パラフィンし、固定化等の処理を行なった。

1次抗体として抗グルテリン抗体等を100倍希釈濃度で処理し、50倍希釈したAlexa fluor 594 donkey anti-rat IgG及び、Alexa

fluor 488 donkey anti-rat IgG 又は Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG を 2 次抗体として用いた。DAPI を含む SlowFade Gold Antifade reagent (Molecular Probe) で処理し、正立顕微鏡により蛍光を観察した。

(4) 【酒類のジペプチド分析】

醸造酒については、除タンパク質のため限外ろ過に供した。限外ろ過通液画分を、誘導体化試薬 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC; Waters) を用いて誘導体化した。誘導体化ジペプチドを ODS 系カラムを用い、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) により分離した。ジペプチド定量解析は三連四重極質量分析計 (Waters Premier XE) の多重反応モニタリング法 (MRM 法) を用いて行なった。ジペプチドの構造推定には四重極を連結した飛行時間型質量分析装置 Q-TOFMS (Waters Xevo Q-TOFMS) を用いた。

(5) 【清酒のメタボローム解析】

品質の指標が予め分かっている吟醸酒について、揮発性成分を HLB (Waters) による固相抽出後、2 次元ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置 GCxGC-TOFMS (LECO, Pegasus 4D) により分析した。極性代謝物成分については、希釈後、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置 CE-TOFMS (Agilent) により分析した。

4. 研究成果

(1) 作成した 5 種類のグルテリン (GluA-2, GluB-1, GluB-4/5, GluC-1, GluD) の酸性サブユニット可変領域に対する抗体の抗体特異性を、大腸菌に強制発現させたグルテリン酸性サブユニットを IB 法により確認した。5 つの抗体の、グルテリンサブタイプ間のクロス反応は通常の検出を行なっている限りは無く、高い特異性を有する抗体が作成できていることを確認した。

平成 21 年～平成 23 年産の 7 品種の米試料を用い、米粒の外側から内側まで 4 つに分画した米粉末からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 後、抗グルテリン抗体を用いた IB 法により発現を解析した。まず、この解析により、グルテリンサブタイプによって米胚乳内の分布が異なることが分かった。

さらに、登熟中のイネにおいて、いつグルテリンタンパク質が発現するのかをサブタイプごとに確認し、タンパク質蓄積量が最大レベルとなる開花後 17 日目の登熟中のイネの未成熟米について、免疫蛍光染色法によりグルテリンの米粒内局在を解析した。その結果、グルテリンの米粒内発現部位が、米粒内においてかなり偏っていることが分かり、またグルテリンサブタイプによって米粒内局在が異なることが明らかとなった。

IB 法及び免疫蛍光染色法という、異なる 2 つアプローチによる解析結果が概ね一致していたことから、グルテリンサブタイプによってグルテリンタンパク質の米粒内の蓄積場所が異なることが高い信頼性を持って示されるに至った。現在は、論文投稿準備を進めている。また、今後はグルテリンタンパク質の定量化解析により、例えば米品種ごとのグルテリン量の比較等への応用展開が期待できる。

(2) 米タンパク質の分解機構を調べるためには、一定のレベルに精製した米タンパク質が必要となる。そこで、精米歩合 70% に精米した酒造好適米の山田錦を粉末状に調製した試料から、「グルテリンを多く含む粗精製標品」、「グルテリンとプロラミンを多く含む米貯蔵タンパク質精製標品」、「米タンパク質の抽出標品」の 3 種類のタンパク質抽出・精製方法を確立した。グルテリン粗精製標品を用いてトリプシンや麹菌由来プロテアーゼ等タンパク質分解酵素液による消化試験を行い (*in vitro* グルテリン分解試験)、グルテリンが分解される様子を観察した。

清酒醸造において、原料米の約 80% は掛米 (かけまい) として蒸した米が用いられるが、その一方で、約 20% は蒸し米に麹菌を生やした米麹 (こめこうじ) として用いられる。米タンパク質は、麹菌から分泌されるプロテアーゼ、ペプチダーゼの働きによって分解され、アミノ酸やペプチドとなる。そこで、米麹を製造する際の代表的なプロテアーゼ (酸性プロテアーゼ: PepA) の発現をタンパク質レベルで解析し、その発現・存在様式が、麹菌の他の代表的な酵素であるアミラーゼやグルコアミラーゼ (GlaB) とは異なっていること等が分かった。さらに、清酒醸造工程の製麹・もろみ期間 (固形物を含むもろみ全体及びもろみ液部) においてグルテリンの消長及びグルテリンが分解される様子を確認した。

(3) 低分子オリゴペプチドについては、これまでに、UHPLC-MS/MS (Triple quadrupole mass spectrometer) および UHPLC-Q-TOFMS を用いた酒類の低分子オリゴペプチド分析方法を一定のレベルで開発している (引用文献 1)。

研究代表者らは、さらに、分析の 3 要素 (前処理、分離、検出) のそれぞれについて、分析方法を改良した。ジペプチド標品を購入し、UHPLC-MS/MS を用いた多重反応モニタリング法 (MRM 法) により、ジペプチドを定量分析し、主に市販酒製品間の比較をした。その結果、醸造酒 (清酒、ビール、ワイン) の種類毎にジペプチドの含有パターンが似ており、それぞれの醸造酒特有のジペプチド含有パターンがあることが確認できたことから、過去に行なったプレカーサーイオンスキュン法による醸造酒ジペプチドのプロファイル解析結果 (引用文献 1) が裏付けられた。さらに、

清酒やワインは製品ごとにジペプチド含有量が大きく変動することが分かってきた。

今後は、改良した分析方法により、より多くのジペプチドを対象とした定量解析を、より多くの酒類サンプルについて進める必要がある。

(4) 吟醸酒に含まれる低分子オリゴペプチド(ジペプチド、トリペプチド、環状ジペプチド)と吟醸酒の官能評価特性との関連性が、2次元ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置(GC×GC-TOFMS)やキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)を用いたメタボロミクスにより、偶然に明らかになった。

まず、GC×GC-TOFMS分析の結果、不揮発性のジペプチドは検出されないはずであるが、環状ジペプチドと推定される成分が複数検出され、特に「香り品質」や「カプロン酸エチル」の官能評価項目と高い正の相関があることが分かった。

CE-TOFMS分析の結果、過去の研究で知られているとおり、吟醸酒品質とほとんどのアミノ酸は負の相関があり、正の相関があるアミノ酸は皆無であった。その一方で、ジペプチドについては、吟醸酒品質と複数のジペプチドが正の相関があることが分かった。尤も、吟醸酒品質と負の相関があるジペプチドもあることから、特定のジペプチドが吟醸酒品質と正の相関の関係にある可能性が示された。

これらから、特に、吟醸香が良好な吟醸酒において、いくつかの特定のジペプチドが正に相関する等、興味深い関係性があることが分かってきた。

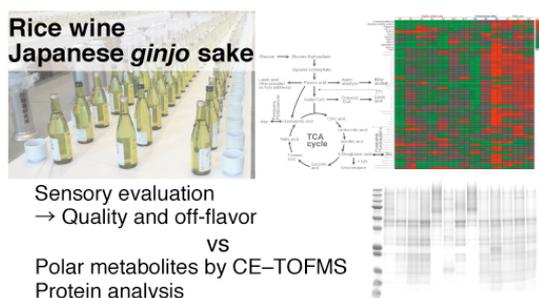


図1 CE-TOFMSによる吟醸酒のメタボローム解析イメージ

※研究代表者が所属する研究機関の人事異動により、平成27年7月～平成29年7月までの間、専ら研究を担当する部門ではなくなったため、研究成果(2)及び(3)、(4)については、研究計画を変更し実施した成果であることに留意する(参考:平成27年度実施状況報告書、平成28年度実施状況報告書)。

<引用文献>

1 Takahashi, K., and Tokuoka, M., et al. Comprehensive analysis of dipeptides in

alcoholic beverages by tag-based separation and determination using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 7850-7856 (2012)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

① Okuda, M., Joyo, M., Tamamoto, Y., Sasaki, M., Takahashi, K., Goto-Yamamoto, N., Ikegami, M., and Hashizume, K., Analysis of protein composition in rice cultivar used for sake brewing, and their effects on nitrogen compounds in sake, *Cereal Chem.*, 査読有, 95, 320-329 (2018)
doi: 10.1002/cche.10036.

② Takahashi, K. and Kohno, H., Different Polar Metabolites and Protein Profiles between High- and Low-quality Japanese Ginjo Sake, *PLOS ONE*, 査読有, 11(3): e0150524 (2016)
doi: 10.1371/journal.pone.0150524.

③ Okuda, M., Miyamoto, M., Joyo, M., Takahashi, K., Goto-Yamamoto, N., Iida, S., and Ishii, T. The relationship between rice protein composition and nitrogen compounds in sake, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 122, 1, 70-78 (2016)
doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.11.009.

④ Takahashi, K., Kabashima, F. and Tsuchiya, F. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry reveals the correlation between chemical compounds in Japanese sake and its organoleptic properties, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 121, 3, 274-280 (2016)
doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.016.

[学会発表](計10件)

高橋圭 メタボローム解析による吟醸酒成分と品質との相関解析 第70回日本生物工学会大会 ランチョンセミナー 2018年9月5日～7日(発表確定) 大阪府吹田市(招待講演)

高橋圭 酒類のジペプチド分析方法開発について 第54回独立行政法人酒類総合研究

所講演会 2018年5月29日 広島県東広島市

高橋圭、河野弘美、奥田将生 米グルテリンファミリーの米粒内局在に関する研究 2018年度日本農芸化学会大会 2018年3月15日～18日 愛知県名古屋市

高橋圭 日本酒のメタボローム解析による成分と品質との相関関係 第77回分析化学討論会 2017年5月27日～28日 京都府京都市 (招待講演)

高橋圭、河野弘美 吟醸酒品質優劣により極性代謝物及びタンパク質は異なる 第10回メタボロームシンポジウム 2016年10月19日～21日 山形県鶴岡市

高橋圭、河野弘美、奥田将生 清酒オリゴペプチドに関与する米グルテリンタンパク質の米粒内局在解析 第68回日本生物工学会大会 2016年9月28日～30日 富山県富山市

高橋圭 吟醸酒の中鎖脂肪酸及びメタボローム解析による清酒成分と品質との相関解析 北海道醸造研究会 2016年9月9日 北海道札幌市 (招待講演)

高橋圭、河野弘美 吟醸酒の極性代謝物メタボローム解析による清酒成分と品質との相関解析 第2回関西醸造研究セミナー 2016年7月21日 兵庫県神戸市 (招待講演)

高橋圭、河野弘美 吟醸酒品質優劣と極性代謝物及びタンパク質プロファイルはどう関係するか? 2016年度日本農芸化学会大会 2016年3月27日～30日 北海道札幌市

高橋圭、河野弘美 吟醸酒の極性代謝物メタボローム解析による清酒成分と品質との相関解析 第67回日本生物工学会大会 2015年10月26日～28日 鹿児島県鹿児島市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

・独立行政法人酒類総合研究所研究成果概要
<https://www.nrib.go.jp/data/seika/NewSeika.htm>

・第54回独立行政法人酒類総合研究所講演会「酒類のジペプチド分析方法開発について」

<https://www.nrib.go.jp/kou/pdf/54kou04.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 圭 (TAKAHASHI, Kei)

独立行政法人酒類総合研究所・研究部門・主任研究員

研究者番号：60565399

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

河野弘美 (KOHNO, Hiromi)