

しょうゆに含まれるジペプチドと呈味の相関

山本 慎也^{1,2}・福崎英一郎^{1*}

はじめに

食品は多成分から構成される多機能コモディティであり、含有成分と食品機能の相関は複雑な場合がほとんどである。必然的に、少数成分に注目した要素還元的アプローチでは食品機能の理解は困難である。特に嗜好、食感機能に関わる食品の二次機能の理解はきわめて難しい。近年、観測対象の代謝物を網羅的に解析して得た情報に基づくオーム科学であるメタボロミクスが注目されている^{1,2}。観測対象から定量的に観測したメタボローム情報を説明変数として観測対象の定量的表現型を推定する技術であるメタボリックフィンガープリンティングは、観測対象を食品に代えることにより食品機能の定量的解析戦略としてきわめて有用である³。筆者らはこれまで、メタボリックフィンガープリンティングの手法を食品二次機能の解析に適用し、緑茶⁴⁻¹²、チーズ¹³⁻¹⁵、しょうゆ¹⁶⁻¹⁸、日本酒¹⁹などの二次機能の定量的解析を行ってきた。食の二次機能レベルと相関を有する化合物は多岐にわたるが、そのなかでもアミノ酸の関与はよく知られている。たとえば、グルタミン酸は旨味を形成するもっとも重要な化合物であることは周知だが、共存する種々の化合物によってその旨味が増強されたり抑制されたりすることが最近わかりつつある。本稿では、2013年12月4日にユネスコ無形文化遺産として登録された「和食」を古くから支えるしょうゆを例にとり、アミノ酸が主体となって形成する二次機能、特に呈味の増強あるいは、抑制に関与する可能性があるジペプチドについて言及したい。

しょうゆでないもの（たとえば水）としょうゆの呈味の違いであればアミノ酸などのしょうゆの主要成分が呈味の差に大きく関わるのが容易に想像できる。しかし、水溶液中でのグルタミン酸ナトリウムの閾値が0.026% (w/v) であるのに対して、しょうゆ中でのグルタミン酸ナトリウムの閾値は1.9% (w/v) との報告がある一方で²⁰、閾値以下の濃度で含まれているピログルタミンジペプチドがしょうゆの呈味を増強させているとの報告がある²¹。しょうゆAとしょうゆBのように微妙な呈味の違いに着目する場合はアミノ酸のようなしょうゆの主要成分ではなく、ジペプチドのような微量成分に着目す

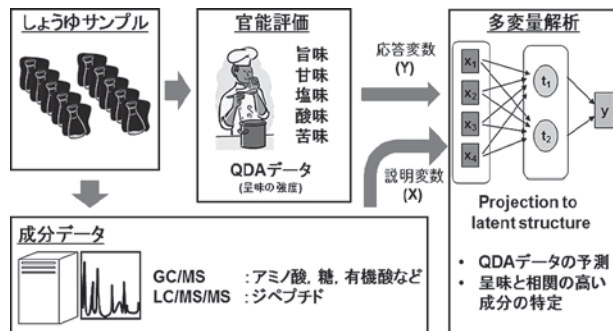


図1. 本研究のスキーム。(QDA; quantitative descriptive analysis)

る必要がある。しかし、しょうゆの呈味とジペプチドの相関は相関関係を含めて不明である。

そこで、ジペプチドについて解析するために、まず、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いてジペプチドの分析系を構築した。そして、しょうゆに適用することでしょうゆ中ジペプチドのデータを取得した。そして、メタボリックフィンガープリンティングの手法を用いてジペプチドデータと呈味強度との相関性を解析し、しょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドの特定を試みた。図1に本研究のスキームを示した。

LC/MS/MSによるジペプチドの分析手法の構築

ジペプチドの一斉分析は、ターゲットとなる種類が多いことから困難ではあるが、誘導体化法とLC/MS/MSを用いた一斉分析の手法が報告されている²²。しかし、実際にジペプチドの標準品を用いて検出を確認しているのはわずかであり、包括的な分析手法であることの確認がなされていない。より確実な分析系を構築するためには、ジペプチドの標準品をできる限り多く揃えて分析系の検証を行うべきである。

上記を鑑みて筆者らは、ジペプチドのデータを取得するために、352種類のジペプチドを用いてLC/MS/MSによるジペプチドの一斉分析法を構築した。LCではペンタフルオロフェニルプロピル (PFPP) 基を導入したカラムを、質量分析計のMS/MSでは三連四重極型質量分析計による multiple reaction monitoring (MRM) を

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (教授) E-mail: fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp
²アジレント・テクノロジー (株)

用いた。標準品が得られなかったジペプチドのQ3の m/z とコリジョンエネルギーはMETLIN²³⁾ および他のジペプチドの値を基に予測した。このように、N末端がAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val およびpGluの20種類、C末端がAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr およびValの19種類、計380種類のジペプチドの一斉分析手法を構築した。

LC/MS/MSによるしょうゆ中ジペプチドの分析

構築した分析系をしょうゆに適用し、しょうゆ中のジペプチドデータを取得した。19種類のしょうゆサンプルを3回ずつ分析した結果、これまでのしょうゆの報告の中でもっとも多い237種類のジペプチドを検出した。Ala, Asp, Gly, Glu, Ile, Leu, Pro, Serを含むジペプチドは多くの種類が検出された。また、Asp, Gln, Met, Trpを含むジペプチドの検出数は少なかった。たとえば、Gluを含むジペプチドは31種類が検出されたが、Trpを含むジペプチドはPro-Trpのみであった。検出数の多いジペプチドを構成するアミノ酸は、しょうゆの原料である大豆タンパクや小麦タンパクにも多く含まれている。一方、検出数の少なかったTrpやMetは大豆ペプチドと小麦タンパク共に含有量が少ない^{24,25)}。このように、検出したジペプチドの種類数はしょうゆの原材料中に含まれるアミノ酸組成を反映していた。

一方で、グルタミンは大豆タンパクに多く含まれているにも関わらず、Gln-X (X = アミノ酸) の検出種類は少なかった。グルタミンの一部は麹菌のグルタミナーゼによってグルタミン酸に変換され²⁶⁾、残りは非酵素的反応でピログルタミン酸になるため、しょうゆ中のグルタミン濃度は低くなっている²⁷⁾。同様の理由でGln-Xはピログルタミン酸化してしまうために検出数が少なくなったのだと考えられた。一方、pGlu-Xは検出を試みた19種類のうちの15種類のジペプチドが検出されていた。

続いて、サンプル間における有意差を評価するために、検出した237種類のジペプチドのデータについて一元配置分散分析を行った ($p < 0.05$)。その結果、228種類の成分についてサンプル間での有意差が認められたので、以降の解析にこれら228種類のジペプチドデータを用いて解析することとした。

OPLSによる呈味の予測モデルの構築

ジペプチドデータと呈味性との相関性を解析するために、OPLS (orthogonal projection to latent structure) 回

帰分析を用いた。まず、成分データを説明変数、呈味強度を応答変数として呈味の予測モデルを構築した。説明変数には228種類のジペプチドの成分データに加えて、しょうゆのメタボリックプロファイリング研究にかかる前報¹⁶⁾と同様にGC/MS (gas chromatography mass spectrometry) によって取得した糖、アミノ酸、有機酸などのジペプチド以外の親水性低分子化合物138種類のデータも比較のために使用した。合計366種類の成分データを説明変数として使用した。一方、応答変数は、しょうゆのメタボリックプロファイリング研究にかかる前報¹⁶⁾で官能評価によって取得した基本五味である旨味、甘味、塩味、酸味、および苦味の呈味強度データを使用した。OPLSにおける応答変数を予測するための変数は1、応答変数に直行する変数は2とした。図2に例として、構築した旨味、甘味、塩味の予測モデルを示し

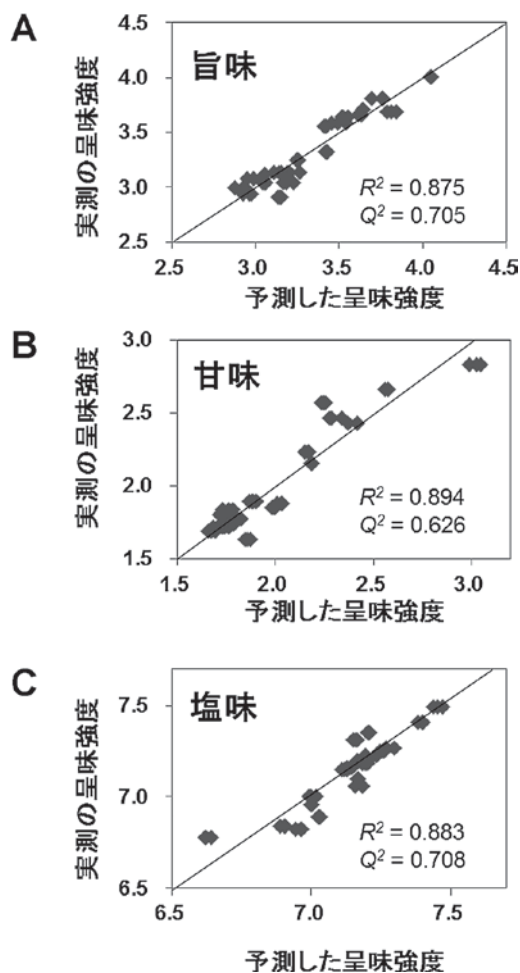


図2. 旨味 (A), 甘味 (B), 塩味 (C) のOPLS予測モデル。各マーカーが各サンプルを示し、縦軸は官能評価によって得られた実測の呈味強度を示し、横軸はOPLS回帰分析により成分データから予測した呈味強度をそれぞれ示す。直線は実測値と予測値が完全に一致している部分を示す。

た。図中の直線は実測値と予測値が等しい部分を示しており、各プロットがこの直線に近いほど予測精度が高いことを意味している。モデルの直線性の指標となる R^2 値と予測力の指標となる Q^2 値を用いてモデルの性能評価を行ったところ、良好な予測モデルの指標である $R^2 > 0.65$ と $Q^2 > 0.5$ がすべての呈味で満たされていた。これより、精度の高い予測モデルを構築することができ、しょうゆ中にしょうゆの呈味と相関の高い成分が含まれていることが示唆された。

OPLSによる呈味と相関の高いジペプチドの特定

OPLS回帰分析は応答変数の予測モデルを作成するだけでなく、variable importance in the projection (VIP) 値を用いることにより各説明変数の予測モデルの予測性能への貢献度を知ることが可能である。VIP値は各説明変数について計算され、値が大きいほど、特に1以上であれば予測モデルの予測性能に対する寄与が大きい。

しょうゆの呈味性の違いと高い相関を示すジペプチドを特定するためにVIP値を用いた。表1に例として旨味、甘味、塩味について、VIP値を指標に特定した呈味と相関の高いジペプチドを示した。当該論文での本手法は応答変数として各しょうゆの呈味強度を使用しているため、特定されたジペプチドはしょうゆ間の微妙な呈味の「差」との高い相関を示す。

表1より、VIP値の高いジペプチドが多く存在したことから、さまざまなジペプチドが呈味に関与する可能性が示唆された。また、全体的にPhe, Tyr, Arg, Leu, Ile, Val, Met, Hisなどの単独の水溶液では苦味を呈するアミノ酸残基を含むジペプチドが高いVIP値を示した。特に、塩味と酸味で正に相関していたジペプチドはトップ5のうちすべてが苦味を呈すると考えられるジペプチドであった。単独水溶液で苦味を呈するPheやTyrなどのアミノ酸はグルタミン酸ナトリウムの旨味を増強することが報告されているが^{28,29)}、これらの苦味アミノ酸と同様に、苦味ジペプチドによるさまざまな味への関与が期待される。

正に相関しているジペプチドと、負に相関しているジペプチドについてVIP値を比較すると、甘味と酸味は正負に相関するジペプチド間においてVIP値の大きさに違いはなかった。一方、旨味、塩味、苦味においては負に相関しているジペプチドのほうが、生に相関しているジペプチドよりも高いVIP値を示した。これより、旨味、塩味、苦味においては負に相関しているジペプチドによる塩味、旨味、苦味への抑制が特に期待された。

続いて、旨味、甘味および塩味について、過去に呈味

表1. VIP値を指標に特定した呈味と相関の高いジペプチド

呈味	相関	VIP ランキング ^a	成分	VIP 値	
旨味	正	23	Glu ^c	1.65	
		52	Ala-His	1.37	
		101	Gly-Pro	1.13	
		112	Ala-Glu	1.09	
		113	Ile-Gln	1.09	
		115	Pro-Thr	1.09	
	負	9	Arg-Pro	1.83	
		19	Asp-Asp	1.7	
		21	Arg-Asp	1.68	
		25	Asp-Ala	1.65	
		27	Arg-Thr (+Thr-Arg)	1.64	
		甘味	正	4	Ile-Gln
	8			Pro-Lys	2.01
	10			Ile-Glu	1.91
	14			Thr-Phe	1.74
15	Leu-Gln ^b			1.74	
26	Fructose ^c			1.55	
負	44		Glucose ^c	1.43	
	66		Sucrose ^c	1.31	
	7		His-Leu	2.09	
	12		Asp-Ala	1.77	
	16		pGlu-Gly	1.72	
塩味	正	15	His-Leu	1.84	
		35	Leu-Arg ^b	1.61	
		52	Phe-His	1.51	
		58	Phe-Ile	1.48	
		82	His-Val	1.33	
	負	4	Ala-Leu	2.23	
		5	Ile-Glu	2.22	
		8	Ala-Gln	2.06	
		10	Arg-Gly	2.02	
		11	Pro-Lys	2.00	

^a GC/MSで取得した成分も含めたVIP値のランキング。

^b 標準品を用いずに構造を推定したジペプチド。

^c 比較対象として記載。

性が報告されているジペプチドの、しょうゆの呈味の差との相関について述べる。過去に旨味に関与するとの報告があるpGlu-Gln (VIP値 = 0.0287), pGlu-Gly²¹⁾ (0.831), Val-Pro (0.683), Asp-Glu (0.131), Gly-Phe (0.948), Ala-Pro³⁰⁾ (1.01), Glu-Glu (0.810), Thr-Glu³¹⁾ (0.101) はAla-Proを除いてVIP値が1以下であったが、いずれも正の相関を示した。甘味に関与すると報告のあるAsp-Glu³⁰⁾ (0.754) のVIP値は1以下であったが、正の相関を示していた。塩味を増強するジペプチドとして報告のあるジペプチドであるArg-Ala

(0.223), Glu-Ala (0.34), Glu-Ser³²⁾ (0.234), Arg-Ser (0.410), Arg-Val³³⁾ (0.184) のVIP値は1以下であったが、正の相関を示していた。このように、過去に呈味性の報告のあるジペプチドのVIP値はほとんど1以下であった。しかし、報告のある呈味性に対しては正に相関しており、過去の知見と一致する結果が得られた。これらのジペプチドはしょうゆ中で呈味成分として働いているものの、しょうゆの呈味の差への関与の割合は低いと思われる。

最後に、旨味や甘味の主要呈味成分とされるGluや糖類のVIP値と、ジペプチドのVIP値を比較した。旨味と負に相関するジペプチドであるArg-Pro, Asp-Asp, Arg-AspについてはGlu (1.65) よりも高いVIP値を示した。また、甘味においては表1に示したジペプチド (正に相関したIle-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Glnと、負に相関したHis-Leu, Asp-Ala, pGlu-Gly, His-Gly, Ser-Ala) はいずれもfructose (1.55), glucose (1.43), sucrose (1.31), よりも高いVIP値を示した。これらのジペプチドは、しょうゆの呈味の差に関与する成分として特に期待される。

おわりに

メタボリックフィンガープリンティングの技術によりしょうゆの呈味性の違いと相関の高いジペプチドを特定することを目的として、LC/MS/MSによるメタボリックフィンガープリンティングを実施し、OPLS回帰分析により呈味との相関性を解析した。

まず、しょうゆ中のジペプチドをできる限り網羅的に分析するために、LC/MS/MSによる分析方法を新規構築した。本分析法は既存の分析法に比べて、用いた標準品の数をもっとも多く、分析対象とした380種類のジペプチドのうち352種類について標準品により検出できることを確認した。さらに、構築した分析方法によって、これまでのしょうゆの報告の中でもっとも多い237種類のジペプチドの分析情報を取得した。

続いて、LC/MS/MSで取得したジペプチドデータとGC/MSによって得たその他の親水性低分子の合計366種類の成分データを説明変数、基本五味の呈味強度を応答変数としてOPLS回帰分析により予測モデルを構築した。その結果、すべての味において良好な予測モデルを構築することができたことより、しょうゆ中にしょうゆの呈味と相関の高い成分が含まれていることが示唆された。さらに、個々のジペプチドのプロファイルに着目して、VIP値を元にしょうゆの呈味性と相関の高いジペプチドを特定した。特に、グルタミン酸よりもしょうゆの

旨味の差に相関の高いジペプチドとして旨味と負に相関するArg-Pro, Asp-Asp, Arg-Aspを特定した。また、糖類よりもしょうゆの甘味に相関の高いジペプチドは多く、特に正に相関したジペプチドとしてIle-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Glnを特定した。

このように、メタボリックフィンガープリンティングの技術をしょうゆ中ジペプチドに応用することによってしょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドを特定した。

文 献

- Putri, S. P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 9 (2013).
- Putri, S. P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 579 (2013).
- 津川裕司ら: *化学と生物*, **49**, 683 (2011).
- Pongsuwan, W. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231 (2007).
- Tarachiwin, L. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9330 (2007).
- Ikeda, T. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9908 (2007).
- Pongsuwan, W. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 744 (2008).
- Ikeda, T. *et al.*: *J. Comput. Aided Chem.*, **9**, 37 (2008).
- Pongsuwan, W. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10705 (2008).
- Jumtee, K. *et al.*: *J. Sep. Sci.*, **32**, 2296 (2009).
- Jumtee, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 252 (2011).
- Miyauchi, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.008).
- Ochi, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751 (2012).
- Ochi, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 506 (2012).
- Ochi, H. *et al.*: *J. Dairy Sci.*, **96**, 7427 (2012).
- Yamamoto, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 170 (2012).
- Yamamoto, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 56 (2014).
- Shiga, K. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 7317 (2014).
- Mimura, N. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.04.006).
- 今村美穂ら: *日本食品科学工学会誌*, **56**, 384 (2009).
- Kaneko, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1275 (2011).
- Takahashi, K. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **242**, 17 (2012).
- METLIN Metabolite Database: <http://metlin.scripps.edu/>
- Kovalenko, I. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3485 (2006).
- Rombouts, I. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 5557 (2009).
- Yano, T. *et al.*: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 137 (1988).
- Sugiyama, S.: *Food Microbiol.*, **1**, 339 (1984).
- Lioe, H., N. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5950 (2004).
- Lioe, H., N. *et al.*: *Food Chem.*, **100**, 1669 (2007).
- Park, J.-N. *et al.*: *Fisheries. Sci.*, **68**, 921-928 (2002).
- Noguchi, M. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 49 (1975).
- Shimono, M. *et al.*: Patent WO2009-119503 (2009).
- Schindler, A. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 12578 (2011).