

麹菌によるアグマチン高含有糖化液（甘酒）の開発

赤坂 直紀¹・藤原 伸介^{2*}

はじめに

ポリアミンは、1分子中に2つ以上のアミノ基を有する低分子塩基性物質の総称であり、バクテリアからヒトに至るまで、あらゆる生物種の生体内において普遍的に存在する¹⁾。一般的なポリアミンとしてプトレスシン、スペルミジン、およびスペルミンが広く知られている。これらは細胞内において核酸の構造安定化や翻訳調節など、さまざまな細胞機能を調節しており²⁾、生命活動を維持するうえで必要不可欠な物質であることが明らかにされている。近年、これらポリアミンが寿命延伸作用や抗炎症作用を有し、加齢に伴う運動機能や認知機能の低下を抑制・改善することが複数のモデル生物において実証されたことから、「生活の質」を向上させる素材として注目を集めている^{3,4)}。これら一般的なポリアミンに加え、アルギニンの脱炭酸により生じ、プトレスシンの前駆体となるアグマチン¹⁾も、多岐にわたる生理活性を有することが近年の研究で明らかにされている。本稿ではこのアグマチンに焦点をあて、はじめにその健康増進作用を概説する。続いて、日本の伝統的発酵食品の生産に必要な黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が、固体培養特異的にアグマチンを産生することを明らかにした、筆者らの直近の研究について紹介する。

アグマチンの健康増進作用

アグマチンの発見は1900年代初頭の、ニシン精液からの単離にまで遡る^{5,6)}。以降は、植物やバクテリア、アーキアなどのポリアミン生合成における中間代謝産物として広く認識されるようになったものの、哺乳類においてその存在が初めて確認されたのは、発見から約100年後の1990年代半ばである。Liらは、ウシの脳よりアグマチンを単離し、これが α_2 アドレナリン受容体およびイミダゾリン受容体に対する内在性リガンドとして機能しうることを明らかにした⁷⁾。この「再発見」以降、主に神経伝達物質・共存伝達物質としてのアグマチンの、中枢神経系における機能が集中的に研究されるようになった。これまでに、アグマチンがうつ病、神経痛、神経変性疾患、記憶・学習障害、薬物依存、および肥満・糖尿病など、さまざまな病態の治療・改善に有効であること

が、多数の前臨床研究で示されている^{5,6)}。特にうつ病および神経痛治療に関しては、アグマチンの効果がヒト臨床試験でも確認されている^{8,9)}。これらの背景から、アグマチンは、上記疾病に由来する諸症状を改善・緩和するうえで有望な治療薬、あるいは機能性食品素材として注目されており、欧米を中心に、アグマチン硫酸塩を主成分とするサプリメントが多数販売されている。

発酵食品に含まれるアグマチンとその由来

発酵食品は他の食材と比較して著量のポリアミンを含むことが知られており、それらは原料または発酵微生物の代謝に由来する^{10,11)}。アグマチンに富む醸造品としては清酒があげられるが、Okamotoらによれば、その原料となる米にはアグマチンは含まれていない¹⁰⁾。このことから、清酒に含まれるアグマチンは、その発酵に関与する微生物群(清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 黄麹菌、および乳酸菌)の代謝に由来すると推測されていた^{10,11)}。

一般にポリアミンは、アルギニンを基質とした2経路により合成される。主たる経路として、アルギニンの脱尿素により生じたオルニチンを脱炭酸することでプトレスシンを合成する経路が知られている¹⁾。他方、アルギニンの脱炭酸により生じたアグマチンを代謝し、プトレスシンを生成する経路も知られている¹⁾。アグマチンからプトレスシンへの転換は、脱尿素酵素による一段階反応、あるいはアグマチンデイミナーゼおよびN-カルバモイルプトレスシンアミドヒドロラーゼが関与する二段階反応が一般的である¹⁾。オルニチンおよびアルギニンの脱炭酸反応は、それぞれ ornithine decarboxylase (ODC) および arginine decarboxylase (ADC) により触媒される。先行知見によれば、赤ワインは微量のアグマチン (~0.2 mM 程度) を含み、これはワイン発酵に関与する酵母および乳酸菌の微弱なアグマチン生産能に起因すると報告されている^{12,13)}。しかしながら、清酒のアグマチン含量 [0.88 $\mu\text{mol/g}$ (約0.9 mM)] と比較すると乖離が大きく、清酒醸造に固有な微生物代謝の関与が示唆された。一般に真菌類はADCを保持しておらず、オルニチンの脱炭酸によりプトレスシンを合成する¹⁴⁾。比較ゲノム解析からも、協会7号酵母、および実験株として広く用いられる *A. oryzae* RIB40株ともにADC遺

著者紹介 ¹ 関西学院大学理工学部 (研究員)

² 関西学院大学理工学部生命科学科 (教授) E-mail: fujiwara-s@kwansai.ac.jp
生物学 第97巻 第4号 (2019)

伝子を保持しないと推測されているが^{15,16)}、筆者らは、清酒醸造の主たる発酵微生物である *S. cerevisiae*, *A. oryzae* のいずれか、あるいは両方が未同定のアグマチン生合成経路を保持すると仮定し、以下の培養実験を行うことでアグマチン生産菌の特定を試みた。

供試菌株および培養方法

黄麹菌 *A. oryzae* および清酒酵母 *S. cerevisiae* に関しては、清酒醸造で広く用いられている市販の株を供試した。なお本研究では、前者を *A. oryzae* RW (Rice Wine) 株とした¹⁷⁾。本研究で行った培養に関して、その概要を図1に示した。すなわち、*A. oryzae* RW 株の分生子を蒸米に接種し、固相環境下で培養することで米麹を作製する工程(製麹)を「固体培養」とした(図1A)。続いて、得られた米麹、蒸米、および水の混合物中で清酒酵母を培養することで、蒸米の糖化およびアルコール発酵を同時に行った(「並行複発酵」)(図1A)。また、蒸米を α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼで処理することで得られた糖化液に清酒酵母のみを接種し、アルコール発酵を行う工程を「単発酵」、米麹を用いて蒸米を糖化する工程を「米麹による糖化」とした(図1A)。並行複発酵および米麹による糖化では、仕込み直後から約1時間の間に蒸米が吸水する。したがって、基質の流動性が失わ

れる培養初期の環境は固相条件に近い。その後発酵が進むにつれ、培養環境は徐々に液相へと変遷していく(図1B)。また、固体培養の対照実験として、蒸米を仕込み水中で十分にすり潰して液状にしたもの(以降「おかゆ培地」とする)を作製し、これにRW株の分生子を接種して振とう培養を行なった(「液体培養」)(図1A)。なお、断りのない限り、仕込み水には0.05%のL-乳酸を添加し、初発pHを5.3とした。

アグマチン生産菌の同定

一般に、清酒の発酵は好気成分の揮発を防ぐために低温(〜20°C)で行われる¹⁸⁾。これに倣い、並行複発酵および米麹による糖化を20°Cで7日間行い、得られた酒および糖化液上清に含まれるアグマチンを、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により定量した。対照実験として、清酒酵母のみによる単発酵も行った。その結果、単発酵により得られた酒のアグマチン含量は極微量(<0.01 mM)であったのに対し、並行複発酵で得られた酒(3.5 mM)および糖化液(3.1 mM)からは、ほぼ等量のアグマチンが検出された(図2)。これらの結果から、*A. oryzae* RW 株がアグマチン生産菌であることが示された。

アグマチン生産における最適培養条件の決定

黄麹菌の生育至適温度は一般に30–35°C付近であり¹⁸⁾、培養温度を最適化することで、細胞活性の上昇に伴うア

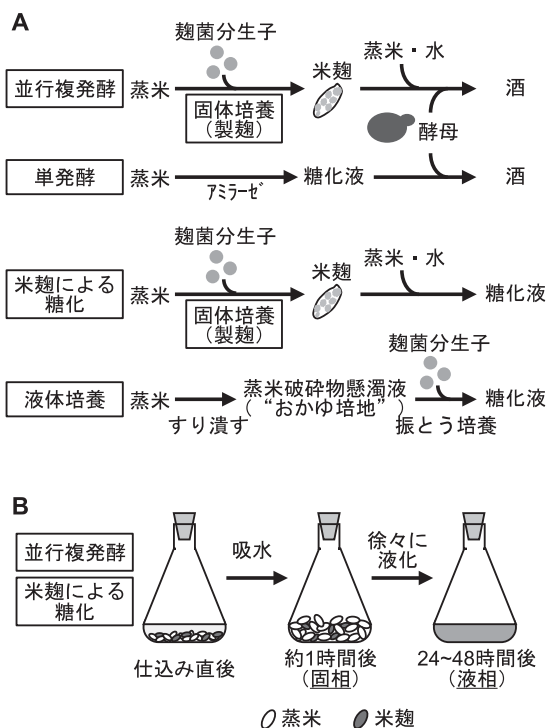


図1. 蒸米を基質とした *A. oryzae* RW 株および清酒酵母 *S. cerevisiae* の培養。(A) 本研究で行った培養の概要。(B) 並行複発酵および米麹による糖化の際の培養環境の変遷。

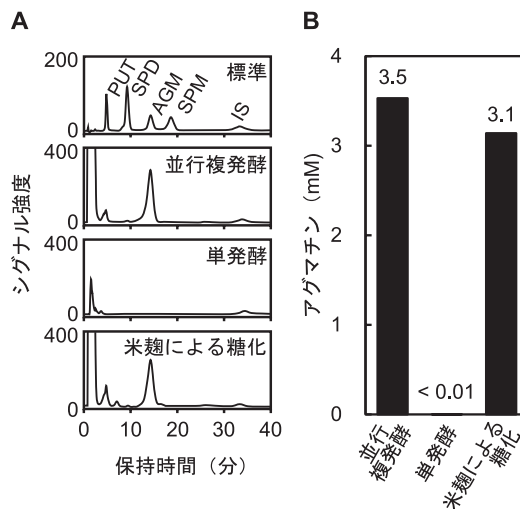


図2. アグマチン生産菌の同定。図1に示した各種培養を行い、得られた酒あるいは糖化液上清に含まれるアグマチンをHPLCにより定量した。(A) HPLCクロマトグラム。PUT, プトレスシン; SPD, スペルミジン; AGM, アグマチン; SPM, スペルミン; IS, カルドペンタミン(内部標準)。(B) 培養上清に含まれるアグマチン(mM)。数値はAに対応する。

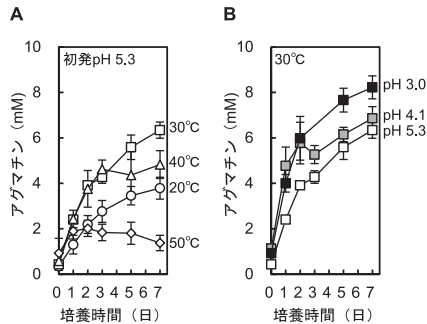


図3. *A. oryzae* RW株アグマチン生産の温度およびpH依存性. *A. oryzae* RW株米麴を用いた糖化を、種々の温度およびpH条件下で行い、糖化液上清に含まれるアグマチンを経時的に定量した。(A) 温度依存性. L-乳酸添加により初発pHを5.3に調整した。(B) pH依存性. 培養は30°Cで行った. エラーバーは標準偏差を示す (N=3).

グマチン生産性の向上が期待された. 米麴による糖化を20, 30, 40, あるいは50°Cで7日間行い、糖化液上清に含まれるアグマチンを経時的に定量した. 20°Cで培養を行った場合、糖化液上清のアグマチン含量は比較的緩やかに上昇し、7日目における濃度は3.8 mMであった(図3A). 対照的に、30°Cあるいは40°Cでは、培養前期に急激なアグマチンの蓄積が見られ、培養3日目におけるアグマチン濃度は約4 mMに到達した(図3A). 30°Cではその後もアグマチン濃度は上昇し、最終的に、20°Cで培養した時と比較して、約2倍(6.3 mM)のアグマチンが蓄積した(図3A). 一方40°Cでは、3日目以降アグマチン含量に変化は認められなかった(図3A). 50°Cでは生産性は著しく低下し、アグマチン含量は培養を通じて2 mM未満であった(図3A). 菌体量の指標として、培養液に含まれるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc, 細胞壁多糖であるキチンの構成単位)¹⁹⁾を併せて定量したところ、20°Cおよび30°CではGlcNAc量の増加が観察されたのに対し、40°Cおよび50°Cでは、その量は培養期間を通して変化せず一定であった¹⁷⁾. これらの結果から、40°C以上では供試株は生育せず、細胞活性や生合成に関与する酵素(群)の活性低下により、アグマチン生産量が減少すると考えられた. これらを踏まえ、以降の実験は30°Cで行った.

ところで、清酒醸造は雑菌汚染を抑止するため、乳酸酸性下で行われる²⁰⁾. これに加え、清酒酵母もリンゴ酸やクエン酸などの有機酸を産生する²¹⁾. したがって、(環境のエタノールが致死的な濃度に到達するまで)黄麹菌がこのような酸性環境下で生存するためには、何らかの耐酸性機構が必要であると考えられた. バクテリアに目を向けると、アミノ酸の脱炭酸を介した耐酸性機構がよく知られている²²⁾. たとえば大腸菌は、グルタミン酸や

アルギニンの脱炭酸の際にプロトンを消費し、細胞内pHの恒常性を維持している²²⁾. 脱炭酸反応により生じた γ -アミノ酪酸やアグマチンなどのアミンは、基質となるアミノ酸との対向輸送で細胞外へ排出される²²⁾. これらの知見を踏まえ、酸性ストレスが黄麹菌のアグマチン生産を促進すると仮定し、種々の濃度のL-乳酸存在下で米麴による糖化を行い、乳酸(pH)がアグマチン生産に与える影響を解析した. 仕込み水に0.05, 0.2, あるいは1.0%のL-乳酸を添加することで、初発pHをそれぞれ5.3, 4.1, あるいは3.0とし、*A. oryzae* RW株米麴を用いた糖化を30°Cで行い、培養上清に含まれるアグマチンを定量した(図3B). その結果、低pH依存的なアグマチン生成量の増加が観察され、初発pH 3.0の場合、培養7日目におけるアグマチンの最終濃度は8.2 mMに到達した(図3B). 同様の低pH依存的なアグマチン生産性の向上は、仕込み水にクエン酸やコハク酸を添加した際にも観察されたことから¹⁷⁾, 黄麹菌によるアグマチン生産は低pHにより促進されることが示された.

固体培養特異的なアグマチン生産

黄麹菌による菌体外分泌酵素や二次代謝産物の生産は培養環境(固体あるいは液体培養)によって大きく影響を受けることが広く知られている²³⁾. たとえば, GlaB(グルコアミラーゼ)は固体培養特異的に産生される菌体外加水分解酵素として有名である²⁴⁾. 近年の*A. oryzae*におけるトランスクリプトーム解析でも、固相あるいは液相環境特異的に発現する遺伝子が網羅的に同定されている²⁵⁾. 一般に、固相培養環境における上記酵素タンパク質や二次代謝産物の生産性は、液体培養と比較して顕著に高い²³⁾. これらを踏まえ、黄麹菌のアグマチン生産が特定の培養環境に依存した現象であるかどうかを明らかにするため、*A. oryzae* RW株米麴を用いた糖化、および液体培養を行った. 特に液体培養では、培地成分の差異が黄麹菌のアグマチン生産に与える影響を排除するため、上述のおかゆ培地を用いた(図1). 両条件ともにL-乳酸を仕込み水に添加して初発pHを3.0とし、培養は30°Cで行った. 培養条件を問わず、培養液中のGlcNAc量は時間経過とともに上昇したことから、*A. oryzae* RW株の生育が確認された(図4A). 対照的に、培養上清に含まれるアグマチン量に関しては両者で明瞭な差異が観察された. 米麴による糖化では5日間の培養で9.9 mMのアグマチンが蓄積したのに対し、液体培養では、乳酸酸性下にもかかわらず、その濃度は培養期間を通じて0.02 mM未満であった(図4B). 前述の通り、米麴による糖化では、培養初期(24~48時間)は固相培

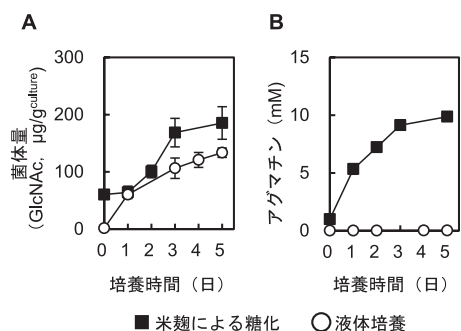


図4. *A. oryzae* RW株による固体培養特異的なアグマチン生産。*A. oryzae* RW株米麹を用いた糖化,あるいはおかゆ培地を用いた液体培養を行い,培養上清に含まれるアグマチンを経時的に定量した。いずれの条件においても, L-乳酸を添加することで初発pHを3.0に調整した。(A)菌体量 (GlcNAc, µg/g^{culture})。 (B)培養上清に含まれるアグマチン (mM)。エラーバーは標準偏差を示す (N=3)。

養環境に近い。これらから,黄麹菌のアグマチン生産は固体培養特異的な現象であると推測された。また同時に,低pHストレスは黄麹菌によるアグマチン生産を誘導するうえで必須ではなく,固相培養環境が決定因子であることが示唆された。上記の傾向はRIB40株でも認められた¹⁷⁾。

細胞破砕物のアグマチン合成活性

最後に,前項での仮説を検証するため,*A. oryzae* RW株の固体培養(図1)により得られた米麹,および液体培養により得られた菌糸凝集塊の破砕物を供試し,それらのアグマチン合成活性を評価した。米麹および菌糸凝集塊を凍結破砕し,これらを種々のpHおよび温度条件下でアルギニンとともに保温し,反応液中のアルギニンおよびアグマチンをHPLCにより定量した。アグマチン合成活性は,供試した破砕物に含まれるGlcNAc量(細胞数)を用いて標準化した[pmol^{アグマチン}・min⁻¹・(µg^{GlcNAc})⁻¹]。その結果,米麹破砕物はpH 3.0, 30~40°Cで最大活性[約70 pmol^{アグマチン}・min⁻¹・(µg^{GlcNAc})⁻¹]を示したのに対し,液体培地由来の菌糸塊凝集塊破砕物は,いかなる反応条件下においてもアグマチン合成活性を示さなかった(図5)。これらは図3および図4で示した結果ともよく一致する結果である。また,逆相HPLC解析から,アグマチンの生成はアルギニンの減少と並行して起こることも明らかとなった。これらの結果から,黄麹菌のアグマチン生産は固体培養特異的に起こり,さらにその基質はアルギニンであることが示された。黄麹菌*A. oryzae* RW株は,30~40°CおよびpH 3.0付近に反応至適を持つ未同定のADCを保持しており,その発現は固相培養環境下で特異的に誘導されると推測された。

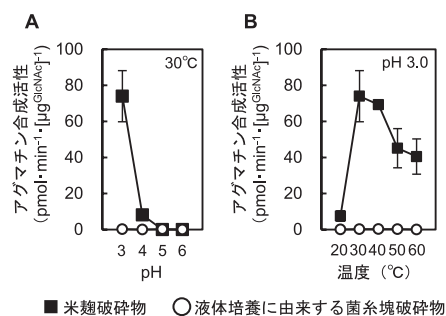


図5. *A. oryzae* RW株細胞破砕物のアグマチン合成活性。*A. oryzae* RW株米麹,あるいは同株の液体培養により得られた菌糸塊の破砕物を供試し,アルギニンを基質とした試験管での酵素活性評価を種々のpHおよび温度条件下で行った。生成したアグマチン量を細胞数(GlcNAc量)で除することで,破砕物のアグマチン合成活性を標準化した(pmol^{アグマチン}・min⁻¹・[µg^{GlcNAc}]⁻¹)。(A)pH依存性。反応は30°Cで行った。(B)温度依存性。反応はpH 3.0で行った。エラーバーは標準偏差を示す (N=3)。

黄麹菌におけるアグマチン生産の意義

本研究で黄麹菌*A. oryzae*が(主たる)アグマチン生産菌であることが示された。さらに,清酒醸造(並行複発酵)が乳酸酸性下で行われること,およびバクテリアにおけるアミノ酸脱炭酸を介した耐酸性機構との類似性を手がかりに,黄麹菌によるアグマチン生産が酸性ストレスにより促進されることも明らかにした。実際に,乳酸存在下で米麹およびアルギニンを保温すると,アグマチンの生成に伴い反応液のpHは徐々に上昇するため,アルギニンの脱炭酸によりプロトンが消費されていると推測される。このことから,本研究で観察された現象は黄麹菌における耐酸性機構の一つであると示唆される。しかし一方で,低pHストレス非存在下で調製(固体培養)された米麹がすでにアグマチン合成活性を有していること,および液体培養由来の細胞は酸性ストレスの有無に関わらず活性を示さないこと(図4および図5)から,黄麹菌のアグマチン合成活性誘導には,固相環境下での培養が必要不可欠であるようだ。さらに,本稿で示したような十分なアグマチン合成活性は,蒸米や小麦ふすまといった天然固形基質上で培養した細胞でのみ確認されており,実験用寒天培地上で生育させた細胞の活性は著しく低い。固相環境条件を細胞へ伝達する環境因子として,菌糸伸長を阻害する物理障壁,空気との直接的な接触,および低水分活性などが知られている²⁶⁾。これら環境因子と,天然基質に由来する何らかの成分が,アグマチン生産の誘導に必須である可能性も考えられ,今後の同定が期待される。また,RIB40株を含めた用途の異なる菌株(醤油や味噌製造用*A. oryzae*)のアグマチン生産能を評価したところ,いずれの株も固相培養時特異

的にアグマチンを産生し、かつその生産量は低pHストレスを付与することで増加したが、これら株の最大アグマチン生産量はRW株の～50%程度であり、依然としてRW株がもっとも高いアグマチン生産能を示した。したがってこの高いアグマチン生産能は、同株が清酒醸造環境に適応するうえで獲得した特異な形質であると推測されるが、その意義に関しては依然不明な点が多い。より効率的なアグマチン生産を達成するには、上記環境因子や活性本体同定を含めた、アグマチン生産機序の解明が必須である。

美味しい黄麹「甘酒」

本稿で記載した、「米麹による糖化」で得られる糖化液は蒸米を米麹で溶解させたものであり、いわゆる「麹甘酒」に近いものである。今回、低pH下で固相培養を行うことで、黄麹菌によるアグマチン生産量を向上させることができることを紹介したが、低いpHを実現できるのであれば天然果汁を添加してもよい。筆者らは試験的に、ゆずやグレープフルーツなど柑橘系果実の果汁を添加してRW株を培養してみたが、いずれにおいてもアグマチンを高含有する糖化液（甘酒）が得られた（図6）。さらに、研究室にて試食した限りでは、甘みに柑橘由来の酸味が加わり、美味しいと好評であった。

おわりに

和食は2013年にユネスコ無形文化遺産にも登録され、健康に資する食事として、世界でも注目を集めている。その和食の中でも、多様な発酵食品は欠くことのできない食材であり、その製造の多くで麹菌が用いられている。近年の集中的な研究で、黄麹菌に由来する代謝産物や細胞構成成分が、さまざまな生理活性を有することが明らかにされており^{27,28)}、これらが日本人の健康長寿に寄与していることは確かであろう。メタボローム解析を含めた近年の網羅的解析により、麹甘酒の機能性・健康増進

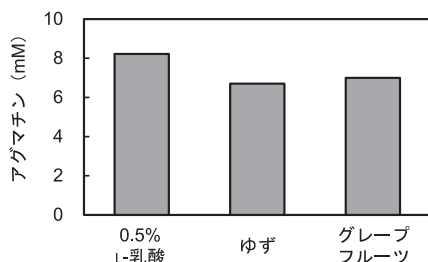


図6. 天然果汁添加によるアグマチン生産性の向上。ゆず、あるいはグレープフルーツ果汁存在下で、*A. oryzae* RW株米麹を用いた糖化を行い(30°C, 7日間)、糖化液上清に含まれるアグマチンを定量した。

作用が解明されつつある²⁹⁾。本研究で、麹甘酒を含め黄麹菌*A. oryzae*を用いて製造される発酵食品の潜在的な機能的側面を提示できた。

謝 辞

本研究遂行にあたり、関西学院大学理工学部・福田青郎先生、ならびに秀瀬涼太先生（現神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）よりご指導賜りました。また、加藤彩織氏、加藤紗也氏含む、関西学院大学理工学部・藤原伸介教授研究室の学生の皆様にご協力いただきました。さらに、佐古田久雄博士より、研究に関するご助言に加え、日本の醸造文化についてご教示賜りました。この場をお借りして心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kusano, T. and Suzuki, H. (Eds.): *Polyamines: A Universal Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism*, Springer (2015).
- 2) 栗原 新: 生物工学, **89**, 555 (2011).
- 3) Soda, K. *et al.*: *Exp. Gerontol.*, **44**, 727 (2009).
- 4) Eisenberg, T. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1305 (2009).
- 5) Piletz, J. E. *et al.*: *Drug Discov. Today*, **18**, 880 (2013).
- 6) Laube, G. and Bernstein, H. G.: *Biochem. J.*, **474**, 2619 (2017).
- 7) Li, G. *et al.*: *Science*, **263**, 966 (1994).
- 8) Shopsin, B.: *Acta Neuropsychiatr.*, **25**, 113 (2013).
- 9) Keynan, O. *et al.*: *Pain Med.*, **11**, 356 (2010).
- 10) Okamoto, A. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1582 (1997).
- 11) Galgano, F. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **3**, 199 (2012).
- 12) Caruso, M. *et al.*: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 159 (2002).
- 13) Arena, M. E. and Manca de Nadra, M. C.: *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 158 (2001).
- 14) Valdés-Santiago, L. and Ruiz-Herrera, J.: *Front. Chem.*, **1**, 42 (2014).
- 15) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 16) Akao, T. *et al.*: *DNA Res.*, **18**, 423 (2011).
- 17) Akasaka, N. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, DOI: 10.1128/AEM.00722-18 (2018).
- 18) 日本醸造協会編: 増補改訂 清酒製造技術, 日本醸造協会 (1978).
- 19) Takagi, H. and Kitagaki, H. (Eds.): *Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation*, Springer (2015).
- 20) Bokulich, N. A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 5522 (2014).
- 21) 浅野忠男: 生物工学, **85**, 63 (2007).
- 22) Foster, J. W.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 898 (2004).
- 23) Machida, M. *et al.*: *DNA Res.*, **15**, 173 (2008).
- 24) Hata, Y. *et al.*: *Gene*, **207**, 127 (1998).
- 25) Wang, B. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5075 (2010).
- 26) Barrios-González, J.: *Process Biochem.*, **47**, 175 (2012).
- 27) Hamajima, H. *et al.*: *Springerplus*, **5**, 1321 (2016).
- 28) Yang, Y. *et al.*: *Nutr. Res.*, **44**, 60 (2017).
- 29) Oguro, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 178 (2017).