

D-アミノ酸の高速一斉分析法の開発と食品分析への応用

中野 洋介^{1,2}, 谷口 百優^{1,2}, 福崎英一郎^{1*}

はじめに

アミノ酸の立体構造を考えたとき、それらには鏡像異性体が存在し、それぞれL-アミノ酸 (L-体) とD-アミノ酸 (D-体) に区別される (図1)。天然に存在するアミノ酸のほとんどがL-体であり、これまでD-体の機能についてはあまり注目されてこなかった。しかしながら、近年、一部の食品、特に微生物が関与する発酵食品において、D-アミノ酸が含まれていることが示唆され始め、その食品機能について注目が集まっている。そのような背景の中、筆者らはメタボロミクスで培った分析技術を応用して、新規D-アミノ酸分析法を開発した。本稿では、その手法を解説するとともに、発酵食品分析への応用例について述べたい。

食品研究におけるD-アミノ酸

D-アミノ酸に関する研究は、生理学的な観点でその機能の解明を目的としながら、医学分野で大いに発展した経緯があるが、近年では食品研究分野においても展開されている。野菜や果物といった農作物^{1,2)}や海産物³⁾、そして発酵食品中にD-アミノ酸が存在することが過去に報告されている。特に発酵食品に関しては、ワイン、ビール、日本酒、ヨーグルト、チーズ、酢、醤油、および味噌など対象は多岐にわたり、発酵に関わる微生物のはた

らきや熟成過程における生化学的変化が種々のD-アミノ酸生成の一因であると理解されている^{4,6)}。

食品の担う機能は、第一次機能としての栄養機能、第二次機能としての嗜好性機能、そして第三次機能としての健康性機能に大別されるが、食品含有成分としてのD-アミノ酸の機能は、そのうちの第二次機能、とりわけ個々が示す味質、すなわち呈味性に関連した性質がしばしば取り上げられる。L-glutamic acid monosodiumの旨味調味料としての使用に代表されるように、アミノ酸は食品の製造や調理過程における呈味改良剤として非常に大きな役割を果たす一方で、その呈味および閾値はL-アミノ酸とD-アミノ酸で異なる⁷⁾。これまで、アミノ酸溶液の官能評価や味覚受容体の解析を通じて、タンパク質構成アミノ酸のほとんどのL-体は苦味を呈するが、多くのD-体は甘味を示すことが明らかになっている^{8,9)}。我が国では、厚生労働省の食品添加物に関する規制¹⁰⁾によってalanine, threonine, methionine, tryptophanのみD-体の使用が許可されており、さらに各々はラセミ体としてのみ使用可能、すなわちD-体とL-体を等量で使用するのみでしか食品添加物として使用できないという制限があり、D-アミノ酸の特殊な呈味を応用した独創的な食品開発を活発には行えない現状がある。しかしながら、D-alanine, D-aspartic acid, D-glutamic acidが多く含まれている日本酒が官能評価において優れた評価を受け、さらにDL-alanineを日本酒に添加することにより、旨味が増強されることが報告されており¹¹⁾、食品中における呈味性成分としてのD-アミノ酸のもつユニークな味質には興味を持たれる。

D-アミノ酸の一斉高速分析法

筆者らの研究室では、液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) を用いて新規D-アミノ酸分析法を開発した¹²⁾。この手法の分離部においては、キラルセクターとしてパイナフチル骨格型クラウンエーテルを固定相に有するカラムを採用している。当該手法のD, L-アミノ酸のキラル分離の原理に関しては、未だ詳細な解明が待たれる段階であるが、以下のような分離メカニズムが推測される。ターゲットアミノ酸が有するアミノ基は、LCに使用される極低pHを有する移動相によって、プ

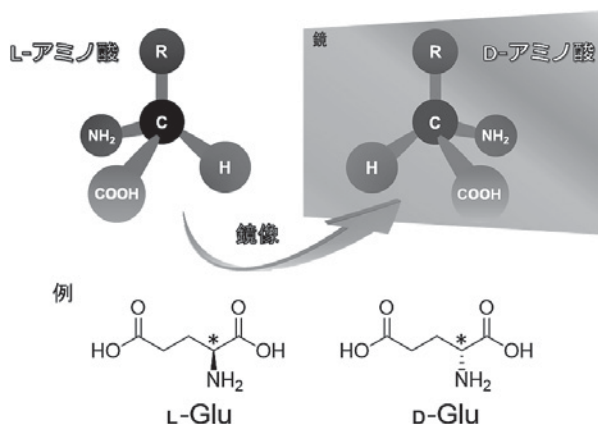


図1. アミノ酸の鏡像異性体。一例として glutamic acid のL-体とD-体の構造を示した。構造中のアスタリスクはキラル炭素を示す。

* 著者紹介 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

¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻、²日本学術振興会特別研究員 (DC1)

ロトン化される。このプロトン化アミノ基と固定相中のクラウンエーテルとの間に静電引力がはたらき、アミノ酸の保持が発生する。また、同時にこのクラウンエーテルに結合した非常に嵩高い構造のバイナフチルによって疎水保持が達成されるとともに、D, L-アミノ酸で異なる立体障害が生じる。さらに、プロトン化したアミノ酸のアミノ基と固定相の充填剤粒子の細孔部における静電反発も分離に影響を及ぼしていると考えられる。これらキラルセクターと固定相の寄与によって、D, L-アミノ酸の分離が可能になり、その選択性は逆相分配、親水性相互作用、静電排除の混合モードにより得られていると予想される¹³⁾。

当該手法の特徴は、従来のD, L-アミノ酸分析で定石であった誘導体化処理を排したところにある。アミノ酸のD-体とL-体はほぼ等しい物理化学的性質を示すため、誘導体化反応を行うことによって、化学的性質を大きく変化させ、分離を可能にしている。当該手法ではその必要がないため、誘導体化処理によって生じる試料中の夾雑物の副反応の影響を考慮する必要がない。さらに、第二級アミンである proline を除くすべてのタンパク質構成アミノ酸を10分以内に分離分析することが可能であり、スループットの点では大きな強みがある。検出部には飛行時間型質量分析計 (TOFMS) あるいは三連四重極型質量分析計 (QqQMS) を使用している^{12,14)}。TOFMSは定性能力が高く、glutamineやlysineといった分子量が近い化合物を高い質量分解能によってそれらの精密質量で区別することが可能である。またQqQMS

は、定量能力が高く、広いダイナミックレンジかつ高感度に分析することができ、自然界に微量しか存在しないD-アミノ酸を対象としている場合には好適であると言える。いずれの方法を選択するにせよ、試料中に含まれる複数のD-アミノ酸を網羅的にプロファイルすることができるのは質量分析計が有する共通の利点である。

筆者らはこれらの構築した手法を用いて、発酵食品に含まれるD-アミノ酸を分析および解析し報告してきた。本稿では、そのいくつかをピックアップし紹介する。

発酵食品に含まれるD-アミノ酸の定量

これまで多くの発酵食品でそのD-アミノ酸含量が調査されており、特に発酵過程に乳酸菌が関与する食品中で高濃度のD-アミノ酸が検出されている⁵⁾。たとえば日本酒においては、速醸酛よりも生酛を用いて造られた製品の方がより多量のD-アミノ酸を含むことが明らかとなっており¹⁵⁾、醸造蔵から単離された*Leuconostoc mesenteroides*¹⁶⁾や*Lactobacillus sakei*¹⁷⁾の全ゲノム解析によってD-アミノ酸ラセマーゼをコードする遺伝子が推定されている。このような背景から、筆者らは構築した分析手法を用いてキムチ中のD-アミノ酸の定量分析を行った。キムチは野菜を乳酸菌で発酵させた食品であり、その製品は生菌を含んだままである。そのため、キムチの保存期間において、乳酸菌の代謝が関与してD-アミノ酸プロファイル (D-アミノ酸の種類とその濃度) が変動する可能性が考えられた。そこで市販キムチを冷蔵庫 (4°C) 又は室温 (25°C) で保存し、保存期間中に

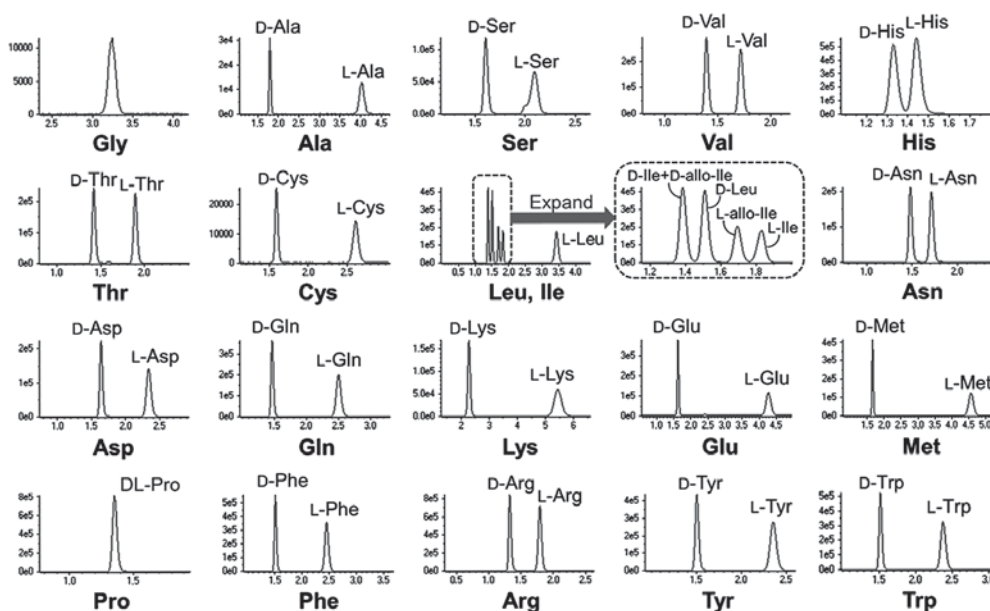


図2. タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体のクロマトグラム

採取したキムチサンプル中のD-アミノ酸濃度をLC-TOFMSを用いて測定した¹⁸⁾。prolineとglycineを除くタンパク質構成アミノ酸18種の鏡像体を対象として分析を実施したところ、25°Cで保存したキムチから17種のL-アミノ酸(L-alanine, L-serine, L-valine, L-threonine, L-isoleucine, L-leucine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamine, L-lysine, L-glutamic acid, L-methionine, L-histidine, L-phenylalanine, L-arginine, L-tyrosine, L-tryptophan)と12種のD-アミノ酸(D-alanine, D-serine, D-*allo*-isoleucine, D-leuc, D-asparagine, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-methionine, D-histidine, D-phenylalanine, D-arginine, D-tyrosine)が検出された。さらに主成分分析を用いてこれらのアミノ酸の保存期間におけるプロファイル変動を調査したところ、キムチ中のD, L-アミノ酸プロファイルは4°Cで保存した場合ではほとんど変動がなかったが、25°Cで保存した場合は大きく変動し、特にいくつかのD-アミノ酸(D-alanine, D-serine, D-*allo*-isoleucine, D-leucine, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-methionine, D-tyrosine)が増加したことが示された(図3A, B)。つまり、保存時の温度条件がD-アミノ酸プロファイルの変化に影響していたと考えられる。この結果は4°Cよりも25°Cの方が乳酸菌の生育環境として適しており、その増殖や代謝が活発になったためであると推測される。さらに、保存期間におけるD-アミノ酸プロファイルの変動を詳細に追跡する

ために定量値を算出した。いくつかのD-アミノ酸は定量下限以下だったために定量値を算出できなかったが、定量できたD-アミノ酸については図3(C)に結果を示した。鏡像体のD-体存在比 $D/(D+L) \times 100(\%)$ をピーク面積値から算出したところ、25°Cで28日間保存したキムチ中のalanine, glutamic acid, arginineのD-体存在比はそれぞれ22.2%, 23.4%, 4.3%ときわめて高い値を示した。特にD-alanineおよびD-glutamic acidに関してはそれぞれの濃度が1293.5 nmol/mLおよび746.3 nmol/mLにまで達しており、食品中のアミノ酸の精密プロファイリングを行うためには分析手法の鏡像体選択性が重要であると示される結果になった。

現在筆者らは、より広範なキラルメタボローム解析を可能にする分析法を開発するべく分析対象化合物の拡張を行っている。先に述べた本分析法の推定分離メカニズムを考慮すると、タンパク質構成アミノ酸に限らず分子内にアミノ基を保有する化合物であれば、同様に適用可能であると予想し、GABAやornithineといった非構成タンパク質やadenineやadenosineなどの核酸代謝物にまで対象を広げることを試みた。結果としてLC-TOFMSあるいはLC-QqQMSを用いて100種類以上のキラル、アキラルアミンの一斉分析法を構築することに成功した^{19,20)}。LC-QqQMSを用いて、熟成期間の異なるチーズの分析に供したところ、タンパク質構成アミノ酸の他、一部のヌクレオシドや核酸塩基などの代謝物が検出さ

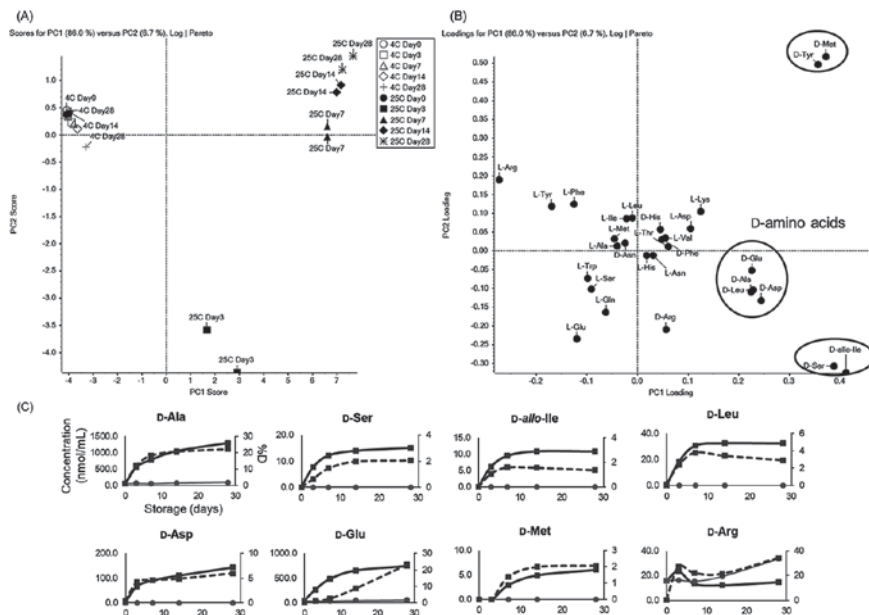


図3. 室温(25°C)または冷蔵庫(4°C)で28日間保存したキムチにおけるD, L-アミノ酸プロファイルの経時的変動。各サンプルのピーク面積値を主成分分析に供して得られた(A)スコアプロットと(B)ローディングプロット(データ変換:Logarithm, スケール:Pareto)および(C)D-アミノ酸の定量値(実線, ■:25°C保存, ●:4°C保存)および存在比(点線, 25°C保存)

れ、従来のメタボローム解析手法では取得し得なかった包括的なキラルメタボローム情報が得られた。熟成を経ることによってD-アミノ酸の増加が見られる一方で、一部のL-アミノ酸が減少し、そしてそのプロファイルはアミノ酸の種類によって大きく異なっていた²⁰⁾。D-アミノ酸がチーズの有する複雑な呈味形成に貢献しているかどうか、そしてD-アミノ酸生成の由来は何であるかなど、未だ不明な点は多く、当該分野の今後の更なる発展に期待が持たれる。

おわりに

本稿では、筆者らが開発したアミノ酸のキラル分析技術と発酵食品への分析応用例について紹介した。新規分析技術の強みはその分析時間の短さであり、スループット性である。食品中のD-アミノ酸生成は微生物由来の酵素や生化学的な反応に依るところが大きいと考えられるが、その解明にはさまざまな検討事項が要求される。発酵食品であれば、微生物の種類、生育条件、発酵期間、発酵温度など枚挙に暇がない。それら諸条件を検討しながら解明していくにあたり、短時間で多サンプルを処理できる当該分析手法は大きな強みを発揮すると言える。そして最終的に得られた知見は、食品の品質設計や製造

理論に応用するといった形でD-アミノ酸の産業利用への貢献が期待できる。

文 献

- 1) Brückner, H. and Westhauser, T.: *Chromatographia*, **39**, 419 (1994).
- 2) Gandolfi, I. et al.: *J. Food Sci.*, **59**, 152 (1994).
- 3) Abe, H. et al.: *S. Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1571 (2005).
- 4) Friedman, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3457 (1999).
- 5) Mutaguchi, Y. et al.: *Springerplus*, **2**, 691 (2013).
- 6) Inoue, Y. et al.: *Food Sci. Technol. Res.*, **22**, 679 (2016).
- 7) Schiffman, S. S. et al.: *Physiol. Behav.*, **27**, 51 (1981).
- 8) Kawai, M. et al.: *Amino Acids*, **43**, 2349 (2012).
- 9) Bassoli, A. et al.: *Food Chem.*, **150**, 27 (2014).
- 10) 厚生労働省：指定添加物リスト（規則別表第1）。
- 11) 老川典夫：日本醸造協会誌，**110**，189 (2015)。
- 12) Konya, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 349 (2016).
- 13) Konya, Y. et al.: *J. Chromatogr. A*, **1578**, 35 (2018).
- 14) Nakano, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 134 (2017).
- 15) Gogami, Y. et al.: *J. Chromatogr. B*, **879**, 3259 (2011).
- 16) Kato, S. and Oikawa, T.: *Genome Announc.*, **5**, e00661 (2017).
- 17) Kato, S. and Oikawa, T.: *Genome Announc.*, **5**, e00656 (2017).
- 18) Taniguchi, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 414 (2017).
- 19) Konya, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 126 (2017).
- 20) Nakano, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 520 (2019).