

## 健康D-アミノ酸を多く含む食品を見つけ出せ！

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 大嶽 結夢乃

1年 池田 ころろ

1年 兼井 愛

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

助教 牟田口 祐太

### 【背景・目的】

タンパク質を構成する 20 種類の  $\alpha$ -アミノ酸のうち、グリシンを除く 19 種類には鏡像異性体である L 体と D 体が存在する。全生物において、タンパク質を構成するのは L 体のアミノ酸のみであり、生体内や環境から検出されるアミノ酸も圧倒的に L 体が多いことから、古くからのアミノ酸研究は L-アミノ酸を対象として行われてきた。しかし近年、D-アミノ酸を高精度・高感度に検出できる技術が発展してくると、ヒトを含む殆ど全ての生物に D-アミノ酸が存在し、重要な生理機能をもつことが明らかとなってきた。

このような D-アミノ酸研究の発展の中で、多くの食品にも D-アミノ酸が含まれていることが明らかとなり、その食品機能が注目されている。例えば、D-アスパラギン酸(D-Asp)や D-グルタミン酸(D-Glu) はヒトの肌の保湿性を維持する美容効果があることが知られている<sup>1),2)</sup>。また、トリプトファン(D-Trp)にはアレルギー性気道疾患の進行を防ぐ効果があることや<sup>3)</sup>、D-セリン(D-Ser)と D-アラニン(D-Ala)には急性腎障害から腎臓を保護する機能があることが報告されている<sup>4),5)</sup>。さらに、D-Ala はインフルエンザウイルスや COVID-19 による感染症の重症度を軽減することが報告され注目されている<sup>6)</sup>。このように、「健康に良い D-アミノ酸」が明らかになりつつあるが、それらの D-アミノ酸がどのような食品に多く含まれるかについての体系的な研究は未だ無い。

一方、過去の食品を対象とした D-アミノ酸研究から、発酵食品には豊富な D-アミノ酸が含まれていることが知られている。そこで、上記の 5 種類の D-アミノ酸を「健康 D-アミノ酸」と位置づけ、これらをより多く含む発酵食品を明らかにすることができれば、その食品に新たな付加価値を提案し、食品産業の活性化に貢献できると考えた。

以上より、本研究では産地、原料などが異なる発酵食品を対象として、「健康 D-アミノ酸」の含量を分析・比較し、健康 D-アミノ酸を多く含む食品を明らかにすることを目的とした。

### 【材料】

発酵食品中の D-アミノ酸生産には乳酸菌が大きく寄与していることが報告されており<sup>7)</sup>、実際にヨーグルトやチーズといった代表的な乳酸発酵食品は、より豊富な D-アミノ酸を含むことが知られている。そこで、乳酸発酵がその製造に関与する発酵食品のうち、日本特有のものや過去に D-アミノ酸分析の報告例がないもの(計 7 種、表 1) を分析の対象とした。

表 1. 分析対象とした食品

固形の食品	液状の食品
生ハム	生酏づくり日本酒（秋田県産）
メンマ	十年熟成しょつつる（秋田県産）
なれずし・魚身部分（和歌山県産）	シュールストレミング（スウェーデン産）※
なれずし・米部分（和歌山県産）	
くずもち（東京都産）	

※本来は固形の食品であるが、開封時に液状になっていた。容器内で発酵が進行したと考えられる。

## 【方法】

### 1. 固形の食品からのアミノ酸の抽出

食品 10 g に対して 50 mL の 75%エタノールを加え、食品をホモジナイザーで粉碎した。転倒混和 1 時間で抽出を行い、遠心分離後の上清を回収した。残渣に 50 mL の 75%エタノールを加えて再度抽出を行い、その上清を先の上清と 1:1 の比率で混合した。混合した上清 1 mL を遠心エバポレーターで蒸発乾固し、得られた乾固物を 0.5 mL の超純水で溶解したものをアミノ酸抽出液とした。尚、なれずしは魚身部分と米部分で分けてアミノ酸を抽出し、後述の前処理、分析を行なった。

### 2. 試料の前処理

後述する超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) に用いるカラムの根詰まり防止と夾雑ピークの軽減を目的として、液状の食品及び固形食品のアミノ酸抽出液中のタンパク質を除去した。遠心限外ろ過フィルター（分子量 3,000 カット）に供し、スルー画分を分析用試料として回収した。

### 3. UHPLC を用いた D-及び L-アミノ酸の分析

D-アミノ酸の分析は D-アミノ酸研究で広く用いられるジアステレオマー法により行なった。試料中の D, L-アミノ酸を *o*-phthalaldehyde と *N*-isobutyryl-L-cysteine によってジアステレオマー蛍光誘導体化した後、ODS カラムを用いた UHPLC で分離・分析した。

### 4. D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 処理による D-アミノ酸ピークの確認

上記の蛍光誘導体化法では、分析対象のアミノ酸以外のアミノ化合物も誘導体化される。そのため食品等の試料を分析した時、夾雑ピークが検出される場合が多い。夾雑ピークの溶出時間が D-アミノ酸のものと近い場合、その夾雑ピークを D-アミノ酸ピークとして誤認する恐れがある。そこで、D-アミノ酸特異的な酸化的脱アミノ反応を触媒する DAO で分析試料を処理し、ピークの消失をもって、検出された D-アミノ酸ピークが夾雑物質ではなく D-アミノ酸に由来することを確認した。本研究で使用したブタ腎臓由来 DAO は D-Asp、D-Glu への反応性が低いことから、D-Trp、D-Ser、D-Ala のピークを本処理により確認した。

## 【結果】

生ハム、メンマ、なれずし、日本酒、シュールストレミング、しょっつるには、健康D-アミノ酸が検出されたが、くずもちからはいずれの健康D-アミノ酸も検出されなかった。また、D-Trp は分析対象とした全ての食品において検出されなかった。以上を踏まえて、各食品中の健康D-アミノ酸4種（D-Asp、D-Glu、D-Ser、D-Ala）の分析結果を図1に示す。

D-Asp はシュールストレミング以外の食品で検出され、なれずしに最も多く含まれていた（魚身部分：186 nmol/g、米部分：195 nmol/g）。

D-Glu は全ての食品で検出され、しょっつるに最も多く含まれていた（1,000 nmol/g）。

D-Ser はシュールストレミング以外の食品で検出され、しょっつるに最も多く含まれていた（242 nmol/g）。

D-Ala は生ハム以外の食品で検出され、メンマに最も多く含まれていた（2,500 nmol/g）。

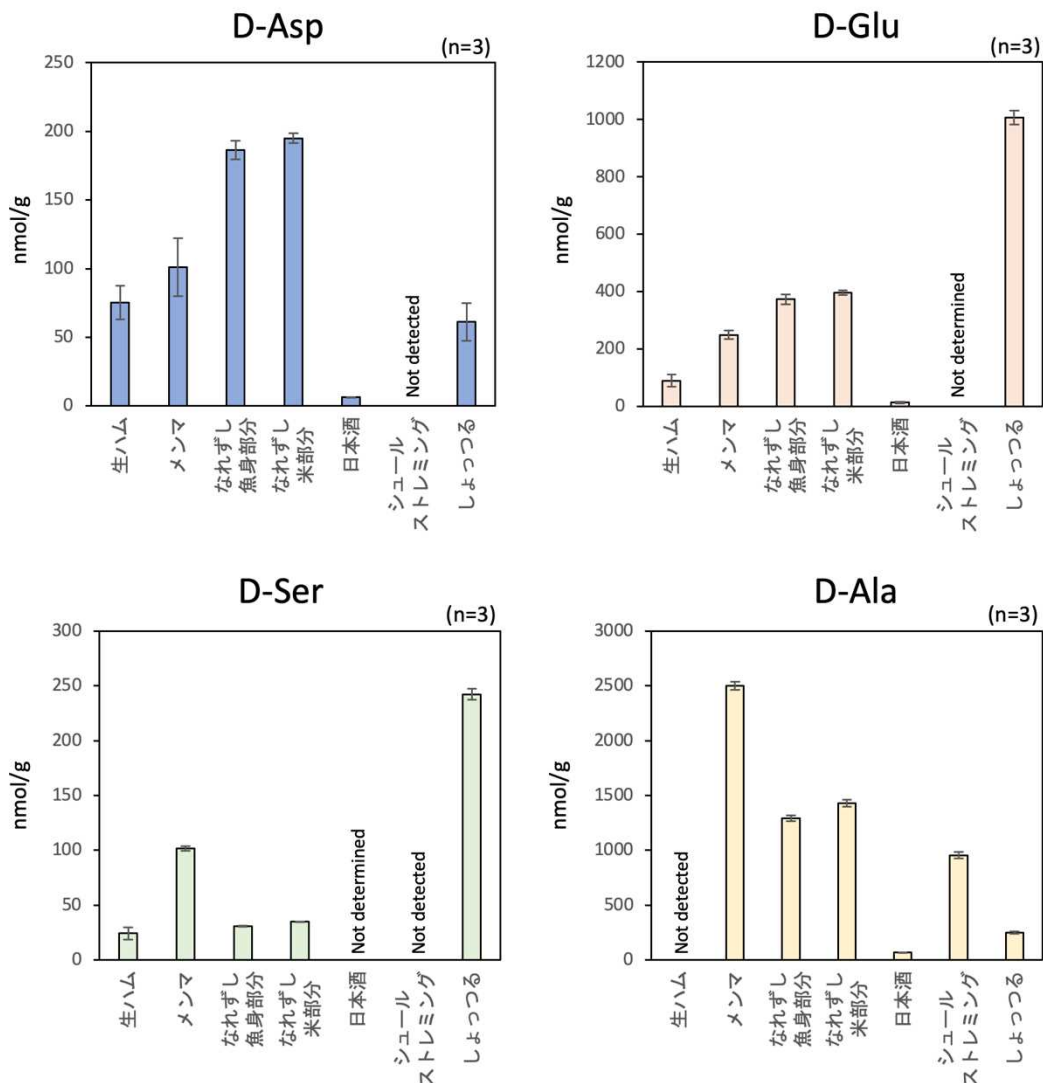


図1. 健康D-アミノ酸(D-Asp、D-Glu、D-Ser、D-Ala)の分析結果

Not detected: D-アミノ酸のピークが検出されなかったことを示す。

Not determined: D-アミノ酸ピークは検出されたが、定量限界未満の量だったことを示す。

## 【考察】

本研究では5種類の健康D-アミノ酸をより多く含む食品を見出すことを目的とし、多様なD-アミノ酸が豊富に含まれるとされる乳酸発酵食品に着目した。さらに、乳酸発酵食品の中でも、これまでにD-アミノ酸分析の報告例が殆どない生ハム、メンマ、なれずし、くずもち、シュールストレミングを対象に分析を実施した。また、なれずし、くずもちに加え、日本独自の発酵食品という視点から、生酛づくりの日本酒やしょつつるも対象として分析を実施した。生酛づくりは乳酸発酵が関与する伝統的な日本酒の製造法であり、健康D-アミノ酸が含まれていることを期待した。一方、しょつつるについては、平成26年度の学生自主研究「D-アスパラギン酸を多く含む秋田の発酵食品の探索とその生成機構の解明」において、D-Aspが検出された例が報告されていたので、他の健康D-アミノ酸も含まれていることを期待した。

結果として、くずもち以外の分析対象から健康D-アミノ酸が検出された。しかしながら、D-Trpはいずれの食品からも検出されなかった。D-Trpを除く4種類の健康D-アミノ酸が全て検出されたのは、メンマ、なれずし、しょつつるであり、いずれもこれらのD-アミノ酸に着目したD-アミノ酸分析の報告例がなく、初めての知見となる。特に、メンマとなれずしでは1,000 nmol/g以上のD-Alaが検出されており、報告例のあるD-Ala高含有発酵食品と同レベルのD-Alaが含まれていることがわかった。メンマ、なれずしのD-Alaはそれらの発酵に関与する乳酸菌に由来する可能性が高い。そこで、これらの食品からD-Ala生成の主体となる乳酸菌を同定することができれば、新たなD-Ala強化食品開発への応用が期待できる。また、しょつつるからは特に高濃度のD-GluとD-Serが検出された。しょつつるはハタハタを飽和濃度の食塩に漬け込み、プロテアーゼによるタンパク質分解によって発酵を進行させて製造されており、乳酸菌を含む微生物はその発酵に関与しないとされている。しょつつるに多種のD-アミノ酸が高濃度で含まれていることを示す本結果は、発酵食品における未知のD-アミノ酸生成メカニズムが存在することを示唆しており、学術的にも大変興味深い。

本研究の結果から、様々な発酵食品に健康D-アミノ酸が含まれることがわかった。特に、本研究で使用したメンマは全国的に販売されている一般的な商品であり、容易に入手できる。そのメンマに、腎臓の保護作用や新型コロナウイルス感染症の症状緩和が期待できるD-Alaが特に高濃度に含まれていたことは予想外だった。メンマの健康成分として、食物繊維やカリウムが知られているが、いわゆる”健康食品”という印象は薄い。他のメンマ製品のD-アミノ酸含量やその生成メカニズムも今後の研究課題として興味深い。

## 【引用文献・サイト】

- 1) 資生堂ホームページ「世界初、D-アスパラギン酸にコラーゲン線維束形成を促進する効果を発見」  
[https://corp.shiseido.com/jp/newsimg/archive/0000000001859/1859\\_v9p85\\_jp.pdf](https://corp.shiseido.com/jp/newsimg/archive/0000000001859/1859_v9p85_jp.pdf)
- 2) 資生堂ホームページ「D-グルタミン酸が肌のバリア機能の回復を促進」  
<https://corp.shiseido.com/jp/news/detail.html?n=0000000002085>
- 3) Kepert I. *et al.*, 2017, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 139: 1525.
- 4) Nakade Y. *et al.*, 2018, *JCI Insight.*, 3: e97957.
- 5) Iwata Y. *et al.*, 2022, *Am. Physiol. Rend. Physiol.*, 322: F667.
- 6) Kimira-Ohba S. *et al.*, 2023, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, 1869: 166584.
- 7) 牟田口祐太, 大森勇門, 大島敏久, 2015, *化学と生物*, 53(1): 18.