イソフラボン酒石酸誘導体 ショウユフラボン

—その発見と生理活性

イソフラボンを含むフラボノイド類は様々な生理活性を示すことが知られている。筆者らはイソフラボン酒石酸誘導体を醤油中から初めて発見し「ショウユフラボン」と命名し、ショウユフラボンの生理活性をヒスタミン脱炭酸酵素（HDC）に対する作用について調べた。今回はショウユフラボンの生成機構の解明や応用の可能性などの一連の研究結果について解説していただいた。

木下恵美子・相島鐵郎

はじめに

本醸造醤油はすべて大豆、小麦、食塩、水を主原料としてつくられるが、長期にわたる醸造期間中のさまざまな要因により、銘柄間に品質の差が生じる。つまり、原料処理法や火入れ条件、麹菌や酵母、乳酸菌などの影響により、原料中の高分子化合物から生成するアミノ酸や糖、有機酸などの組成、さらに多数の香り成分のバランスに違いが生じるのである。その結果、醤油の味、香り、色は多様性に富み、それぞれの銘柄は独自の風味を有するようになる。

この醤油の風味はアミノ酸、糖、有機酸などの主要な成分だけで簡単に説明のつくものではなく、当然、さまざまな微量成分も関わっている。この様な微量成分の分析手法として、味をもたらす水溶性成分には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、香りの原因となる揮発性成分にはガスクロマトグラフィーが有効である。これらの機器分析からは多数のピークからなる複雑な分析データが得られ、それらは醤油の品質はもとより原料や製法に関する情報も含んでいる。醤油成分の分析では従来、アミノ酸、有機酸、糖、アルコールなど個々の成分量にのみ注目してきたが、それらの定量値を単に比較するだけでは機器分析が生み出す複雑なデータから有用な情報を十分に抽出したとはいえない。つまり、多数成分の全体像をとらえることが可能な、パターン認識などのケモメトリックス手法¹⁾の

適用が不可欠となる。

ここでは、まず、ケモメトリックスのパターン認識手法による微量な化学成分にもとづく醤油の分類、識別を述べる。つぎに、識別に寄与するピーク成分を単離、精製、構造決定し、新規エーテル化合物群である「ショウユフラボン」、つまりイソフラボン酒石酸誘導体の発見に至る経緯を紹介する。さらに、それら新規化合物に対する生成機構の究明から全く新しい酵素反応の発見へ導いた一連の研究、およびショウユフラボンの生理活性についても言及する。

1. 銘柄の異なる醤油の分類と識別²⁾

(1) 醤油中水溶性成分の分析

約1年間にわたり市販の8銘柄濃口醤油と6銘柄淡口醤油を収集、それらを前処理なしで直接HPLCに注入し、水溶性微量成分を分析した。濃口醤油の典型的なクロマトグラムを第1図に示す。検出された多数のピーク中から相対的に大きな50ピークを選び、面積値を定量したところ、ほとんどのピークの変動係数は10%以下で良好な分析精度であった。

(2) パターン認識による醤油銘柄の分類と識別

クロマトグラム上で定量した50ピークを説明変数とし、パターン認識手法により醤油試料の分類と識別を試みた。まず、識別に明確な基準を設けない濃口醤油のクラスタ分析からは第2図のようなデンドログラムが得られ、全試料が銘柄ごとに明確なクラスタを形

Shoyuflavones, Tartaric Acid Isoflavone Derivatives; Elucidating Chemical Structures, Formation Mechanism and Histidine Decarboxylase Inhibitory Activity.

Emiko KINOSHITA and Tetuo AISHIMA (Research & Development Division, Kikkoman Corporation.)

第1図 市販濃口醬油の典型的な HPLC パターン

カラム：Wakosil-II 5 C 18 HG (4.6 mm I.D.×100 mm+4.6 mm I.D.×300 mm)，カラム温度：15°C，サンプル注入量：10 μ L，検出：280 nm.

分析プログラム：0.05% TFA 溶液 (A) 100% を 20 分間保持後，0.05% TFA 含有 90% アセトニトリル溶液 (B) 0 から 25% のリニアグラジエントを 270 分間，その後，B 溶液 25-50% のリニアグラジエントを 50 分間行なった。

第2図 HPLC 分析に基づく濃口醬油のクラスタ分析

A-H：銘柄

成した。なお，縦軸は試料どうしの類似度を表わす距離である。また，淡口醬油の試料でも同じような銘柄

分類を示すクラスタが形成された。

つぎに，銘柄を分類基準として，識別に寄与するピ

第3図 HPLC分析データのLDAから選出された3ピーク面積値に基づく濃口醤油の試料分布
A-H：銘柄

ークを選出する段階的判別分析(LDA)により、濃口醤油のHPLCデータを解析した。選出されたピーク27, 32, 42の面積値にもとづく試料の3次元プロットを第3図に示す。8銘柄の試料がそれぞれ明確なグループを形成し、この3ピークにより明確に銘柄ごとの識別をできることが分かった。淡口醤油についても、遺伝的アルゴリズムを利用して判別に最適なピーク群を探し出すLDA (GALDA) により選んだピーク8, 27, 40により、はっきりと銘柄ごとに試料を識別できた。さて、ケモメトリックス分野で広く利用されているパターン認識手法、Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) 法からは、各ピークの識別力やグループ間距離などの統計量が得られる。そこで淡口醤油のHPLCデータをSIMCA法により解析、銘柄に対する識別力が大きかったピークを第1表に示す。とりわけピーク37, 40, 42は識別力の平均値と標準偏差が大きく、6銘柄の分類に最も効果的であることが分かる。

第1表 SIMCAにより算出した淡口醤油のHPLC分析ピークの識別力

ピーク No.	平均	標準偏差
9	13.0	6.61
28	11.0	7.08
31	10.7	8.88
37	23.2	13.30
40	13.1	7.32
42	17.9	11.10

2. 銘柄識別に寄与する成分の単離・精製と構造決定

パターン認識から識別に高い寄与を示すことが明らかとなったピーク成分は、銘柄どうしの品質差について多くの情報をもたらすことが期待できる。そこで、最も高い重要度を示したピーク37, 40, 42成分の単離、精製および同定をめざして研究を進めた。第4図に示す手順でピーク成分を単離、精製、ピーク37, 42, 40成分として、それぞれ凍結乾燥標品A, B, Cを得た。各化合物の理化学的性質を第2表にまとめた。

各種機器分析から、A, B, Cはイソフラボン化合

第4図 重要ピーク成分の単離，精製

第2表 重要ピーク成分の理化学的性質

	ショウユフラボン A	ショウユフラボン B	ショウユフラボン C
性状	白色粉末	淡黄色粉末	淡黄色粉末
融点	212-218°C(分解)	138-144°C(分解)	209-212°C(分解)
UV _{max} (log ε _{max})	248 nm (4.50), 302 nm (4.15)	260 nm (4.63)	266 nm (4.50)
負イオン FAB-MS(<i>m/s</i>)	385[M-H] ⁻ , 253[daidzein-H] ⁻	401[M-H] ⁻ , 269[genistein-H] ⁻	417[M-H] ⁻ , 285[hydroxygenistein-H] ⁻
HRFAB-MS(<i>m/s</i>)	387.0722[M+H] ⁺	403.7061[M+H] ⁺	419.0639[M+H] ⁺
分子式	C ₁₉ H ₁₄ O ₉	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₀	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₁

物であり，それぞれダイゼイン，ゲニステイン，8-ヒドロキシゲニステインの誘導体であることが示唆された。さらに，NMR や質量分析などから得た各種スペクトルの詳細な解析により，A，B，C はいずれもイソフラボンと酒石酸がエーテル結合したイソフラボン酒石酸誘導体で，第5図に化学構造を示す新規化合物であることが明らかとなった。

3. 大豆醗酵食品中のイソフラボン化合物

今日，ダイゼイン，ゲニステインやグリシテインのイソフラボンアグリコンおよびその配糖体が，大豆や大豆食品中に存在することは広く知られている³⁾。通常，イソフラボン是大豆中では配糖体として存在しているが，醸造期間中に糖と離れてイソフラボンアグリコンとなるため，醤油中に配糖体は検出されない。疎水性の高いイソフラボンアグリコンは水に難溶であり，醤油中の含有量は痕跡程度⁴⁾に過ぎないことから，大部分が醤油粕として除かれていると考えられる。一方，アスペルギルス・ニガーの培養液や味噌から8-ヒ

ドロキゲニステイン^{5),6)}，インドネシアの大豆醗酵食品テンペから6，7，4'-トリヒドロキシイソフラボンの単離⁷⁾など，イソフラボンの微生物による変換についていくつかの報告はなされていた。しかし，イソフラボンと酒石酸がエーテル結合した化合物についての報告は全くなかった。

つまり，イソフラボン酒石酸誘導体は醤油中から初

第5図 ショウユフラボンの構造式

169

第4表 各種糸状菌のショウユフラボン生成能

菌株		ショウユフラボン生成能(%)*	
		無添加**	添加***
<i>A. oryzae</i>	IFO4206	10	100
<i>A. oryzae</i>	NISL1764	67	209
<i>A. oryzae</i>	NISL1769	3	157
<i>A. oryzae</i>	NISL2192	16	197
<i>A. oryzae</i>	NISL2195	18	151
<i>A. oryzae</i>	NISL3012	0	79
<i>A. sojae</i>	ATCC11906	0	24
<i>A. sojae</i>	ATCC20245	14	35
<i>A. sojae</i>	ATCC20387	22	268
<i>A. tamarii</i>	IAM13907	8	193
<i>A. tamarii</i>	IAM2138	15	124
<i>A. tamarii</i>	IAM14471	26	235
<i>A. niger</i>	NISL1786	3	3
<i>A. niger</i>	NISL1787	4	2
<i>A. awamori</i>	NISL1730	0	0
<i>A. usami mut. shirousamii</i>	NISL1810	8	4
<i>Mucor praini</i>	NISL0103	0	0
<i>Rhizopus oligosporus</i>	NISL9066	0	0
<i>Monascus anka</i>	NISL9081	0	0

*, 0.25 mM ゲニステイン存在下, 200 mM (±)-*trans*-エポキシコハク酸添加時の *A. oryzae* IFO4206 培養抽出物の醤油フラボン B 生成能を 100% とした。

, *, それぞれ, (±)-*trans*-エポキシコハク酸無添加, 添加。

NISL, (財)野田産業科学研究所で保有している菌株番号。

第7図 ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 系

研究課題である。

5. 各種糸状菌のショウユフラボン生成能

各種糸状菌のショウユフラボン生成能を比較して第4表に示す。醤油醸造で使用する麹菌アスペルギルス・オリゼ, アスペルギルス・ソーヤおよびアスペルギルス・タマリは菌株により生成能に差はあるものの,

いずれもショウユフラボン生成能を有していた。アスペルギルス・オリゼは味噌醸造でも広く使用されているが, まだ味噌からショウユフラボンは単離されていない。これは製造方法や使用麹菌の (±)-*trans*-エポキシコハク酸生成能の違いなどによると考えられる。醤油中のショウユフラボンの量は醸造工程における各種条件の違いによって異なる¹³⁾ ので, ショウユフラ

第8図 マウスーマストサイトーマ P-815 細胞由来 (a) および *Clostridium perfringens* 由来 (b) HDC 活性に対するショウユフラボンの阻害作用

○：ショウユフラボン A, ●：ショウユフラボン B, △：ショウユフラボン C, ▲：ダイゼイン
□：ゲニステイン, ■：(+)-カテキン
×：HIS-PHE

ボンを含む醤油以外の大豆発酵食品の製造も可能であろう。

6. ショウユフラボンのヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 阻害活性¹⁴⁾

(1) フラボノイド類の HDC 阻害活性

イソフラボンを含むフラボノイド類は、さまざまな生理活性を有する¹⁵⁾ことから、現在最も注目されている健康食品素材の1つである。たとえば、イソフラボン化合物はエストロゲン様作用を示すことから、骨粗しょう症の予防などにも関わると考えられている。また、フラボノイド化合物の抗酸化作用についての報

告も多数あり、老化予防などに注目されている。ショウユフラボンは、全く新しい酒石酸エーテルのイソフラボンであり、イソフラボンと同様に多様な生理活性を有する可能性も期待できる。

そこで、ショウユフラボンの生理活性をヒスタミン脱炭酸酵素 (HDC) に対する作用について調べた。ヒスタミンは近年、古くから知られている気道分泌促進や胃酸分泌促進のほか、免疫反応調節作用、各種細胞の増殖、分化の促進、血小板凝集作用、神経伝達物質としての脳機能調節作用など、さまざまな生理活性を呈する物質として注目されている。ヒスタミンは動物細胞や細菌類に広く分布する酵素により、1段階の脱炭酸反応で L-ヒスチジンから生合成される (第7図)。しかし、過剰に分泌されたヒスタミンは疾病の原因物質となる。たとえば、気管支平滑筋の攣縮や気道分泌を促進しすぎて気管支喘息を誘引したり、胃酸分泌の促進作用により胃潰瘍を悪化させたりすると言われている。それゆえ、HDC 阻害剤には抗潰瘍剤などヒスタミンが関与する疾病の予防、あるいは治療薬としての効果が期待できる。

今までに、naringenin, taxifolin, (+)-3-methoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone, など、数種フラボノイド化合物の HDC 阻害作用は知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。その中でも、特にフラボノイド類縁化合物の (+)-カテキンは毒性も低く、ヒスタミンメチルトランスフェラーゼやジアミンオキシダーゼなどのヒスタミンを不活性化する酵素に作用することなく、特異的に HDC 活性を阻害する¹⁹⁾。また、(+)-カテキンでは、ストレスで誘因された実験動物の胃潰瘍に対する予防効果²⁰⁾も報告されている。しかしながら、(+)-カテキンは H₁ や H₂ 遮断薬に比べて *in vivo* における効果が弱い。また、強力な HDC 阻害剤として知られている brocresine²²⁾ は副作用をもち、HDC 活性に特異的に作用するわけではないこと²³⁾ から、臨床的な使用には適さない。そのため、ヒスタミンを原因物質とする疾病に対し、HDC 阻害剤の臨床での適用例は未だにない。つまり、(+)-カテキンの様に好ましい性質を有し、かつ強い HDC 阻害剤活性を示す化合物の発見が待たれているわけである。

ここでは、誘導体化したヒスタミンの簡便で経済的な HPLC による定量法を HDC 阻害活性の測定系に応用¹⁴⁾、ショウユフラボンの HDC 阻害作用について

調べた。

(2) ショウユフラボンの HDC 阻害活性

HDC は、その由来により構造や性質が大きく異なる。そこで、増殖性で粘膜型肥満細胞の諸性質をもつ癌化肥満細胞株であるマウス-マストサイトーマ P-815 細胞由来とグラム陽性桿菌である *Clostridium perfringens* 由来の、2 種類の HDC に対するショウユフラボンの阻害活性を調べた。マウス-マストサイトーマ P-815 細胞由来の HDC は 2 量体タンパク質で、酵素活性はピリドキサル 5'-リン酸依存性である²⁵⁾。一方、*C. perfringens* 由来の HDC は 6 量体タンパク質で、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として必要としない代わりに、活性中心としてピルボイル基を分子内に持つ²⁶⁾。この由来の異なる 2 種類の HDC に対して、ショウユフラボンの阻害剤活性を調べた結果を第 8 図に示す。

第 8 図(a) は、マウス-マストサイトーマ P-815 細胞由来の HDC に対する阻害作用である。ショウユフラボン C は既知の HDC 阻害剤である (+)-カテキンよりも阻害作用が強かった。第 8 図(b) は、*C. perfringens* 由来の HDC に対する阻害作用を示す。ショウユフラボンは、いずれも既知の HDC 阻害剤である HIS-PHE と同程度の阻害作用であった。一方、大豆由来のイソフラボンであるダイゼインとゲニステインの阻害作用は、どちらの HDC に対しても用量依存性ではなかった。また、(+)-カテキンはマウス-マストサイトーマ P-815 細胞由来の HDC 活性は阻害したが、*C. perfringens* 由来の HDC に対しては阻害活性を示さなかった。

7. ショウユフラボン応用の可能性

実験結果は、ショウユフラボンが由来の異なる HDC に対して広い阻害活性を示すことを十分に期待させるものであった。さらに、マウス-マストサイトーマ P-815 細胞に対する毒性もなく、またマウスへの強制経口投与によっても急性毒性を示さないことから安全性も高いと考えられ、HDC 阻害剤としても非常に有望である。

現在、イソフラボンが数々の生理作用を有することから、これらを豊富に含む大豆食品が注目をあびている。しかし、糖から切り離されたイソフラボンアグリコンは水に難溶で醤油中の量も 5 mg/L 程度に過ぎな

い。一方、分子中に酒石酸を有するショウユフラボンは水溶性が高く、醤油中には 60 mg/L 前後も含まれる。このような性質から、醤油中のイソフラボンの多くは、ショウユフラボンとして存在していると考えられる。もちろん、この濃度では日常摂取可能な醤油の量から考えて、醤油そのものに HDC 阻害剤としての効果を期待するのは無理である。しかしながら、ショウユフラボンはイソフラボンアグリコンよりも水溶性と HDC 阻害活性が高く、(+)-カテキンと同様にヒスタミンが関与する疾病に対する治療薬、あるいは予防薬としての高い可能性を有している。さらに HDC 阻害活性のみならず、エストロゲン様作用などのイソフラボンが有する生理活性などについても、同様の可能性が期待できる。摂取しやすさなども考慮して、イソフラボンの誘導体化を考えると、酒石酸エーテル誘導体は 1 つの有力な選択肢となり得る可能性が高い。

おわりに

通常、醤油の品質は、総窒素やアルコールなど規格化された成分やアミノ酸、糖、有機酸など、主要な成分量にもとづき評価、格付けされている。ここで紹介したような、多数の水溶性微量成分も考慮した総体的な評価手法の適用例はほとんどない。しかし、本稿では、多数微量成分の分析データにパターン認識手法を適用することで、醤油の分類・識別が可能であることを示した。さて、今までにも醤油中の微量成分として、抗腫瘍物質や血圧降下物質などが単離されてはいる²⁵⁾が、これらの成分は生理活性面からのアプローチによる発見であった。しかし近年、分析機器とコンピュータの発達、ケモメトリックス手法による複雑な機器分析データのルーティン解析を可能とし、品質に関する重要情報の効率的な抽出を容易にした。このような新たな手法の導入により、今まで醤油の品質を考えるうえでは注目されなかったショウユフラボンのような新規化合物群や、その生成を触媒する新規酵素のように、天然物化学的にさらに有用で興味を引く化合物を発見する機会も増えつつある。このように簡便で有用な手法が醤油にとどまらず今後、広く他の醸造食品の研究にも利用され成果を生み出すことを期待したい。

文 献

- 1) Brereton, R. G. : Chemometrics. Applications of mathematics and statistics to laboratory systems. Ellis Horwood : New York, 1990.
- 2) Kinoshita, E., Ozawa, Y., Aishima, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3753 (1997).
- 3) 工藤重光, 打田悌治, 大久保良一 : 醸協, **87**, 29 (1992).
- 4) Wang, H.-J., Murphy, P. A. : *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1666 (1994).
- 5) Umezawa, H., Tobe, H., Shibamoto, N., Nakamura, F., Nakamatu, K., Matsuzaki, M., Takeuchi, T. : *J. Antibiotics*, **28**, 947 (1975).
- 6) Esaka, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y., Osawa, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1637 (1999).
- 7) György, P., Murata, K., Ikehara, H. : *Nature*, **203**, 870 (1964).
- 8) Kinoshita, E., Murakami, S., Aishima, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2149 (2000).
- 9) White, G. F., Russell, N. J., Tidward, E. C. : *Microbiol. Rev.*, **60**, 216 (1996).
- 10) Yaginuma, S., Asahi, A., Morishita, A., Hayashi, M., Tsujino, M., Takada, M. : *J. Antibio.*, **42**, 1362 (1989).
- 11) Sato, N., Yoshioka, T., Hamano, M., Sekine, H., Chiba, S., Yamamoto, H., Yoshioka, T., Kimura, I., Satake, M., Ida, Y. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1747 (1996).
- 12) Yamada, T., Hiratake, J., Akikawa, K., Oda, J. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 907 (1998).
- 13) Kinoshita, E., Sugimoto, T., Ozawa, Y., Aishima, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 877 (1998).
- 14) Kinoshita, E., Saito, M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1488 (1998).
- 15) 下位香代子, 木苗直秀 : 食品と開発, **35**, 8 (2000).
- 16) Albinus, M., Frisch, G., Hennings, G. : *Agents and Actions*, **13**, 249 (1983).
- 17) Parmar, N. S., Hennings, G., Gulati, O. P. : *Agents and Actions*, **15**, 494 (1984).
- 18) Konturek, S. J., Kitler, M. E., Brzozowski, T. : *Dig. Dis. Sci.*, **31**, 847 (1986).
- 19) Lorenz, W., Kusche, J., Barth, H., Mathias, C. : Histamin. Mašliški, C., Ed. ; Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. : Stroudsburg, PA, p. 256 (1973).
- 20) Reimann, H.-J., Lorenz, W., Fischer, M., Frölich, R., Meyer, H. -J. : *Agents and Actions*, **7**, 69 (1977).
- 21) Levine, R. J., Senay, E. C. : *Am. J. Physiol.*, **214**, 892 (1968).
- 22) Sewing, K.-F., Binder, B. : Histamin. Mašliniški, C., Ed. ; Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. : Stroudsburg, PA, p. 306 (1973).
- 23) Yatsunami, K., Ohgo, M., Yamamoto, J., Nakagawa, S., Ichikawa, A. : *Advances in the Biosciences*, **89**, 157 (1993).
- 24) Van Poelje, P. D., Snell, E. E. : *Biochemistry*, **29**, 132 (1992).
- 25) 大下克典 : 食生活, **94-3**, 74 (2000).

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

木下恵美子 <Emiko KINOSHITA>

<勤務先とその所在地> キッコーマン株式会社研究本部, 〒278-0037 千葉県野田市野田399 <略歴> 平成元年静岡薬科大学薬学部製薬学科卒, 同年キッコーマン(株)入社, 現在に至る。平成10年博士(農学)。<抱負> 醤油のおいしさを微量成分面から解明したい。<趣味> コーラス (アカペラが好き)。

相島鐵郎 <Tetsuo AISHIMA>

昭和21年11月2日生れ <勤務先とその所在地> キッコーマン(株)研究本部, 〒278-0037 千葉県野田市野田399 <略歴> 昭和46年北海道大学大学院農学研究科修士課程修了, 同年キッコーマン(株)入社。昭和52年(財)野田産業科学研究所, 昭和54年農学博士, 昭和59~61年 British Columbia 大学 research associate, 平成2年キッコーマン(株)研究本部, 現在に至る。<抱負> 食品 R&D に対するケモメトリックス手法と官能評価の利用。<趣味> 読書, 野原の散歩。