納豆の粘質部位に見出される D-アミノ酸の種類と存在形態

真鍋 久

(会津大学短期大学部, 現在, 鳥取大学農学部)

D-Amino Acids in Viscous Parts of Natto

Hisashi Manabe

*Junior College of Aizu University, 1-1, Kadota, Yahata, Ikki-machi,
Aizuwakamatsu-shi, Fukushima, 965-8570*

(Present; *Fac. Agric., Tottori Univ., 4-101, Minami, Koyama-cho,
Tottori-shi, Tottori, 680-8553*)

(現住所, 〒680-8553 鳥取市湖山町南 4 丁目101番地)

It is well known that D-glutamic acid (D-Glu) is a major compound in poly- γ -glutamic acid (PGA) which is one of the major components in the viscous substances of Natto. However, no information has been obtained for the existence of D-amino acids except for D-Glu in Natto. Thus, D-amino acids were widely surveyed using the combination method of TLC and HPLC for the amino acid derivatives synthesized by reacting FDAA (fluoro-dinitrophenyl-L-Ala-NH₂) with amino acids in the water-soluble fraction of the viscous parts of Natto.

The results obtained in this study were as follows: (1) D-aspartic acid (D-Asp) and D-alanine (D-Ala) as well as D-Glu were detected in the viscous parts. (2) D-Glu was found not only in the conjugated form but also in the free form. However, D-Asp was only in the conjugated form and most of D-Ala was in the free form. (3) The content of the conjugated D-Glu was 3 mmole per 100g Natto or more, while those of the free D-Glu, conjugated D-Asp and free D-Ala were 0.5 mmole per 100g Natto or less.

はじめに

納豆は、蒸した大豆に納豆菌 (*Bacillus natto*) を繁殖させた、わが国の伝統的な発酵食品である¹⁾。納豆は糸引きの程度が高ければ良質といわれ²⁾、糸引き性は、納豆の粘質物の本体であるポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) の含有量の多少に基づくとされている。

PGA は、グルタミン酸の γ -カルボキシル基が別のグルタミン酸のアミノ基と結合しあった、グルタミン酸の重合体である。この重合体は、生体内に普遍的に存在す

る L-グルタミン酸と、L-グルタミン酸の鏡像異性体である D-グルタミン酸で構成されており、D-グルタミン酸が全グルタミン酸の70%を超えて存在するところに特徴がある³⁾。

ところで細菌は、細胞壁のペプチドグリカン部分に D-アラニンや D-グルタミン酸 (ときには D-グルタミン酸や 3-ヒドロキシ-D-グルタミン酸) などの D-アミノ酸を例外なく有している⁵⁾。これらの D-アミノ酸は、細菌が生成したラセマーゼ、エピメラーゼ、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼなどの作用により合成され

る⁶⁾。したがって納豆菌は、納豆の製造過程で、D-グルタミン酸のみならず各種D-アミノ酸を合成しているものと思われる。しかしながら、納豆のD-アミノ酸を包括的に調査した例はない。

納豆を食品として捉えた場合、D-アミノ酸の存在は注視すべきものとなる。たんぱく質を構成するアミノ酸はL型であり、また、体内におけるアミノ酸代謝もL-アミノ酸が担っているため、立体構造の酷似したD-アミノ酸が存在すると体内のアミノ酸代謝系に悪影響を及ぼしかねないからである¹¹⁾。一方、体内にはD-アミノ酸酸化酵素が存在するなどD-アミノ酸の分解系が備わっているため、食品由来のD-アミノ酸が体内に侵入しても問題ないとの見方がある。実際、納豆に含まれるD-グルタミン酸は、D-グルタミン酸サイクラーゼにより環化されて尿中に排泄されるという¹⁶⁾。しかしながら、D-アミノ酸の分解・代謝系が体内に備わっていないようにも、D-アミノ酸の種類や存在量、D-アミノ酸の存在形態などが異なると、D-アミノ酸やアミノ酸含有化合物が一樣に分解を受けたりはしない。

以上の点から、筆者は、納豆の有するD-アミノ酸がヒトの体内でどのような挙動を示すのかに興味を抱いた。そこでまずは、納豆に含まれるD-アミノ酸の種類・含量・存在形態などを調査することにして、今回は、納豆の「粘質部位」を分析した。その結果、この部位にはPGA由来のD-グルタミン酸以外にも、D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸、D-アラニンが遊離型あるいは結合型で存在することを明らかにしたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

実験に供した納豆は、市販されている標準形態の各社製品の中から、2種類を任意に選択したものである。製品名は、「おかめ納豆・極小粒」（製造後2日目のもの；タカノフーズ株式会社製）ならびに「有機納豆」（製造後1日目のもの；あづま食品株式会社製）である。これらの納豆は、以降、「おかめ」ならびに「有機」と略称する。

2. 水溶出液の調製

納豆を「水溶出」すると、「粘質部位」の可溶性成分が丸ごと分取できる。そこで、「おかめ」と「有機」を5.0g（新鮮重）ずつ分取し500mLビーカーに移した。このビーカーに蒸留水300mLを注入し、穏やかに攪拌して1時間放置した。これをガーゼで濾し、得られた液を「水溶出液」として分析に供した。

3. 「全アミノ酸画分」の調製

「水溶出液」を6.0mL分取し、塩酸を加えて6M塩酸溶液とした。この液をガラス管に封入後、110℃のもと20時間かけて加水分解を行った。得られた塩酸加水分解物をろ過した後、ろ液を60℃以下で濃縮乾固した。ここに蒸留水を加えて濃縮乾固を繰り返し、塩酸を除去した。最後に蒸留水を3.0mL加えて加水分解物を溶解させ、「全アミノ酸画分」とした。

4. 「遊離アミノ酸画分」の調製

「水抽出液」を100mL分取し蒸留水で200mLにした。この液にトリクロロ酢酸（TCA）を10g加えてたんぱく質を変性させた後、遠心分離により除たんぱくした。

得られた上澄み液を陽イオン交換樹脂Dowex50WX8（H⁺タイプ、50-100mesh）（湿容量10mL、17meq相当）に流し込みアミノ酸を吸着させた。このカラムを蒸留水200mLで洗浄後、1Mアンモニウム溶液100mLでアミノ酸を溶出した。得られたアミノ酸溶出液を50℃以下で濃縮乾固した後、蒸留水を5.0mL加えてアミノ酸を溶解させ、「遊離アミノ酸画分」とした。

5. アミノ酸の分析

「全アミノ酸画分」と「遊離アミノ酸画分」はpHを1.5～2に調整後、0.4μmフィルターでろ過した。このろ液を高速アミノ酸自動分析計（HITACHI L-8500A）にかけて各アミノ酸を定量分析した。

6. D-およびL-アミノ酸誘導体の作成

「全アミノ酸画分」ならびに「遊離アミノ酸画分」を1-フルオロ-2, 4-ジニトロフェニル-5-L-アラニンアミド（FDAA）（マーフィー試薬）と反応させて、各アミノ酸の誘導体（D-およびL-アミノ酸-ジニトロフェニル-L-アラニンアミド）を合成した⁷⁾。すなわち、0.6mL容チューブに「全アミノ酸画分」または「遊離アミノ酸画分」を60μL（濃度はおよそ0.5～1μmol）分取した。ここにFDAAの1%アセトン溶液40μL（1.5μmol相当）と1M炭酸水素ナトリウム8μLを順次加えてチューブの栓を閉じた後、40℃で60分間反応させた。チューブ内の温度を室温に戻した後、1M塩酸4μLを添加して反応を停止させ、減圧乾固した。このチューブに200μLのメタノールを添加して、アミノ酸誘導体を溶解させた。

7. TLCによる各種アミノ酸誘導体の分離

前項で調製したアミノ酸誘導体の混合液から20～100μLを分取し、シリカゲルプレート（Whatman社、K6 Silica Gell 60, 20cm×20cm）に塗布した。この薄層プレートを、室温のもと一次元溶媒（フェノール：水＝3：

1) と二次元溶媒 (n-ブタノール: 酢酸: 水=10: 1: 1) を用いて二次元展開することにより, 個々のアミノ酸誘導体を分離した. 本法は, 長田らの方法⁸⁾を一部改変したものである.

8. アミノ酸誘導体の HPLC 分析

薄層プレートから特定のアミノ酸誘導体を掻き取り, メタノール200 μ L を加えて攪拌後, 遠心分離して上澄み液を得た. 上澄み液1 ~ 10 μ L を逆相カラム (GL サイエンス社, Unicil QC18 粒径5 μ m, 6 ϕ × 150mm)

に注入し, カラム温度40℃のもと, 流速1 ml/min で溶媒 A [50mM トリエチルアミン-リン酸緩衝液 (pH 3.0)] と溶媒 B [アセトニトリル] の混液を展開させた. なお混合溶液は, 展開開始時に A: B = 8: 2 としたものを45分間のリニアージラジエントで A: B = 6: 4 に置き換えた. アミノ酸誘導体の測定は340nm の吸光度によった.

9. D-アミノ酸酸化酵素法による D-アミノ酸の確認

酵素反応は既報⁹⁾にしたがってなされた. すなわち,

Fig. 1 Elution pattern of Glu (a), Asp (b) and Ala (c) derivatives by HPLC

Amino acids in the total amino acid fraction of viscous parts from 'Okame' were derivatized with FDAA. A mixture of the amino acid derivatives were applied to TLC in order to separate each derivative. The Glu, Asp and Ala derivatives were then extracted from the TLC plate and analyzed by HPLC.

Fig. 2 Elution pattern of Ala derivative by HPLC before (left) and after (right) treatment of D-amino acid oxidase to amino acids in the total amino acid fraction of the viscous parts from 'Okame'. The derivatization of the amino acids and isolation of Ala derivative were conducted according to the method shown in Fig. 1.

試験管に「全アミノ酸画分」あるいは「遊離アミノ酸画分」を0.3mL分取し、0.1M ピロリン酸緩衝液 (pH8.3) 3.0mLを加えて30℃とした。この試験管にD-アミノ酸酸化酵素 (豚腎臓由来の粗標品, 2.25U) 20mgを添加して酸化反応を行わせた。60分後に20% TCA 溶液を0.5mL加えて反応を停止させ、遠心分離して上澄み液を得た。一方、酵素反応の前に TCA 溶液を添加したものをコントロールとした。

これらの液を、前項4に準じてDowex50WX8 (H⁺タイプ) カラムにかけてアミノ酸を吸着させた後、アンモニア水でアミノ酸を溶出した。溶出液を濃縮乾固し、蒸留水で200 μ Lとした。

この液にFDAAを反応させてアミノ酸を誘導体にした後、TLCにより個々のアミノ酸誘導体を薄層プレート上で分離した。このプレートからそれぞれの誘導体を抽出してHPLC分析を行った。そして、コントロールと酵素反応後のクロマトグラムを比較し、後者でD型に相当するピークが消失しているか否かを検討した。一連の実験操作は前項6～8に準じてなされた。

結果および考察

1. 「全アミノ酸画分」から検出されるD-アミノ酸

Fig. 1 (a) は、「おかめ」におけるグルタミン酸のクロマトグラムである。L-グルタミン酸とともにD-グルタミン酸を示すピークが検出された。グルタミン酸以外のアミノ酸については、アスパラギン酸 (b) とアラニン (c) がD型を示すピークを明瞭に出現させた。したがって「全アミノ酸画分」には、これら3種類のD-アミノ酸が存在するといえる。D-アミノ酸の存在は、既報⁹⁾に準じてD-アミノ酸酸化酵素を作用させることによりD型を示すピークが減少したことからも再確認できた。なお、Fig. 2にはアラニンの結果のみを示した。

クロマトグラム上のD型ならびにL型を示すピークの強度から、各アミノ酸ごとにD型の割合 (D%すなわち $[D/(D+L)] \times 100$) を求めると、グルタミン酸は40%弱、アスパラギン酸とアラニンは10%弱となった。ペプチドを塩酸加水分解する過程ではラセミ化がおきる。たんぱく質を110℃のもと6M塩酸で3～22時間加水分解した際のラセミ化の進行状態¹⁰⁾から、たんぱく質を20時間加水分解した際のラセミ化率はアスパラギン酸4%、グルタミン酸2%、アラニン1%程度と推定できる。実際、ラセミ化は、アスパラギン酸>グルタミン酸>アラニンの順序で生じやすい¹¹⁾。ここに示したラセミ化率を基にして、各アミノ酸におけるD型の割合を算

Table 1 D% of Glu, Asp and Ala in the total amino acid fraction of viscous parts from 'Okame' and 'Yuki' after taking into account of amino acid racemization during hydrolysis

Amino acid	Okame	Yuki
Glu	37.5%	35.4%
Asp	8.8%	15.4%
Ala	9.0%	8.5%

出したものがTable 1である。

「おかめ」の「全アミノ酸画分」については、グルタミン酸の37.5%、アスパラギン酸の8.8%、アラニンの9.0%がD型であった。「有機」では、グルタミン酸の35.4%、アスパラギン酸の15.4%、アラニンの8.5%がD型であり、「おかめ」とほぼ類似のパターンで各D-アミノ酸が検出された。

2. 遊離D-アミノ酸の存在

「全アミノ酸画分」には、加水分解操作により「結合型アミノ酸」から遊離した「アミノ酸」(①)と、本来の「遊離アミノ酸」(②)とが混在している。そこで、②におけるD-アミノ酸の存在割合を知るために、前項に示した「全アミノ酸画分」の解析方法に準じて「遊離アミノ酸画分」を分析した (Table 2)。

Table 2 D% of Glu, Asp and Ala in the amino acid fraction of viscous parts from 'Okame' and 'Yuki'

Amino acid	Okame	Yuki
Glu	28.3%	22.7%
Asp	tr.	tr.
Ala	50.0%	52.6%

「おかめ」では、グルタミン酸の28.3%がD型であり、アスパラギン酸からD型は検出されず、アラニンの50.0%がD型という結果が得られた。「有機」も同様な傾向にあり、グルタミン酸の22.7%ならびにアラニンの52.0%がD型であり、アスパラギン酸からD型は検出されなかった。

3. 遊離D-アミノ酸ならびに結合型D-アミノ酸の存在量

「全アミノ酸画分」ならびに「遊離アミノ酸画分」に見出されるD-アミノ酸の割合を絶対量で示すために、これらの画分をアミノ酸自動分析計にかけてグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンの含量を求め、これらの含量に各アミノ酸のD% (前者の場合はTable 1, 後者の場合はTable 2に示された値) を乗じた。

さらに、「全アミノ酸画分」における各D-アミノ酸

の含量から「遊離アミノ酸画分」における該当D-アミノ酸の含量を差し引くことにより、各々の「結合型D-アミノ酸」の含量を算出した。以上をまとめたものがTable 3である。

最も多量に検出されるD-アミノ酸はグルタミン酸であり、その含量は納豆100gあたり「おかめ」が3.96mmol、「有機」が3.25mmolであった。これらはそれぞれ、全D-アミノ酸含量の89%ならびに84%に相当する。さらに、D-グルタミン酸の大部分（「おかめ」92%、「有機」96%）は「結合型」であった。粘質物の本体はPGAなので、多量の「結合型D-グルタミン酸」は、PGA中のD-グルタミン酸を反映したものと考えられる。

D-グルタミン酸が「遊離型」で存在する割合は数%（「おかめ」8%、「有機」4%）とわずかであるが、含量で示すと納豆100gあたり「おかめ」が0.32mmol、「有機」が0.10mmolであり全D-アラニン含量（次の段落）に匹敵する状態にあった。

D-アスパラギン酸はほとんど全てが「結合型」で存在しており、それらの含量は納豆100gあたり「おかめ」が0.31mmol、「有機」が0.50mmolであった。一方、D-アラニンの含量は納豆100gあたり「おかめ」が0.16mmol、「有機」が0.14mmolであり、これらのほとんどが「遊離型」（「おかめ」100%、「有機」71%）で検出された。

以上、「粘質部位」には、PGAに由来するであろう多量の「結合型D-グルタミン酸」の存在が確認されたほか、「遊離D-グルタミン酸」、「結合型D-アスパラギン酸」、「遊離D-アラニン」がかなり分布することが判明した。

4. D-アミノ酸含量とL-アミノ酸含量の比較

「粘質部位」より見出される各D-アミノ酸の含量を、対応するL-アミノ酸の含量と対応させながら図示するとFig.3のようになる。なおL-アミノ酸の含量は、アミノ酸自動分析で測定した各アミノ酸の総量から、対応するD-アミノ酸の含量（Table 3）を差し引いて求めた。

結合型D-グルタミン酸が多量に検出されるのは前述のとおりであるが、結合型L-グルタミン酸はそれを上回って存在しており、納豆100gあたり「おかめ」が5.79mmol、「有機」が5.59mmolであった。この含量は、結合型D-グルタミン酸含量の1.6倍（「おかめ」）あるいは1.8倍（「有機」）に相当する。遊離グルタミン酸については、L-グルタミン酸が納豆100gあたり「おかめ」0.81mmol、「有機」0.34mmolであり、D-グルタミン酸の2.5倍（「おかめ」）あるいは3.4倍（「有機」）であっ

た。よって、D-グルタミン酸が多量に分布する「粘質部位」には、それを上回ってL-グルタミン酸が存在していることがわかる。納豆のPGAを構成するグルタミン酸は70%以上がD型というが³⁾、「粘質部位」の結合型グルタミン酸は40%弱（「おかめ」39%、「有機」36%）しかD型を持ち合わせていないことになる。よって「粘質部位」には、PGAのみならず、L-グルタミン酸などL-アミノ酸だけで構成される通常の各種ペプチド類も相当量存在していると考えられる。実際、大豆たんぱく質にはL-グルタミン酸が多量に存在しており（全たんぱく質中の20%強）¹²⁾、納豆の製造過程では納豆菌がエンド型ペプチダーゼをはじめとする各種プロテアーゼを作用させてこの大豆たんぱく質を加水分解することが知られている¹³⁾ほか、各種高分子ペプチドが粘質物質中に見出されている⁴⁾。加えて、納豆菌は主として「粘質部位」に分布するので、菌体内のたんぱく質やペプチド類も無視できない。

なお、大豆グロブリンの塩酸加水分解により遊離する酸性アミノ酸（L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸）は50~60%がアミド（L-アスパラギンおよびL-グルタミン）なので¹²⁾、「結合型アミノ酸画分」に見出されるL-アスパラギン酸やL-グルタミン酸の一部は、もともとL-アスパラギンやL-グルタミンであった可能性がある。

D-アスパラギン酸はほとんどが「結合型」で見出されているが（前項）、結合型L-アスパラギン酸は、その9.8倍（「おかめ」）あるいは5.4倍（「有機」）存在していた。

D型の大部分が「遊離型」で検出されたアラニン（前項）については、ほぼ同量の遊離L-アラニンが存在していた。ちなみにその含量は、納豆100gあたり「おかめ」が0.16mmol、「有機」が0.09mmolである。ペプチドグリカンが合成される際には、D-アラニル-D-アラニン残基を末端に含むペプチド鎖から1分子のD-アラニンが外され、この部位に別のペプチド鎖が結合することにより「架橋」が形成されるので、D-アラニンが遊離する¹⁴⁾。また、D-アラニル-D-アラニン残基は、アラニンラセマーゼの作用によりL-アラニンから合成された遊離D-アラニンが結合しあったジペプチドである¹⁵⁾。よって、「粘質部位」より検出される遊離型のD-アラニンは、これらの遊離D-アラニンを示したものである可能性が高い。

以上のように、今回は、納豆の「粘質部位」を分析す

Table 3 Contents of D-Glu, D-Asp and D-Ala in the total amino acid fraction (Total), in the free amino acid fraction (Free) and in the conjugated amino acid fraction (Conjugated) of viscous parts from 'Okame' and 'Yuki'

mmol/100g Natto

D-Amino acid	Okame			Yuki		
	Total	Free	Conjugated*	Total	Free	Conjugated*
Glu	3.96(100%)	0.32(8 %)	3.64(92%)	3.25(100%)	0.10(4 %)	3.15(96%)
Asp	0.31(100%)	tr.(0 %)	0.31(100%)	0.50(100%)	tr.(0 %)	0.50(100%)
Ala	0.16(100%)	0.16(100%)	tr.(0 %)	0.14(100%)	0.10(71%)	0.04(29%)

Total amount of D-amino acids was 4.43mmol/100g Natto in 'Okame', and 3.89mmol/100g Natto in 'Yuki', respectively. *Conjugated = Total - Free

Fig. 3 Contents of D- and L-enantiomers of Glu, Asp and Ala in the free amino acid fraction (Free) and in the conjugated amino acid fraction (Conjugated) of the viscous parts from 'Okame' and 'Yuki'

ることにより、D-グルタミン酸を筆頭にD-アスパラギン酸やD-アラニンが、「結合型」あるいは「遊離型」で存在することを明らかにできた。引き続いて「粘質成分」(「粘質部位」のうち菌体を含まない部分)や「非粘質部位」(水溶出した後の残渣)についても同様の分析をおこなうことにより、納豆全体におけるD-アミノ酸の分布状態の特徴を把握したいと考えている。なお、今回分析した「おかめ」と「有機」では、粘質部位におけるD-アミノ酸の存在パターンがほぼ同じ状態にあったが、両者は、通常の方法で製造された、製造後、日の浅い納豆である。したがって、製造方法や貯蔵期間に大きな差がない場合は、どのような納豆でも、粘質部位のD-アミノ酸の分布状態は類似しているものと予測される。

要 約

納豆粘質物の主要成分であるPGAには多量のD-グルタミン酸が含まれている。なお、納豆をD-アミノ酸含有食品として捉える場合には、PGAを含めた納豆全体に、如何なるD-アミノ酸がどの程度存在するのかを把握しておく必要がある。しかしながら、そのような報告はなされていない。そこで著者は関連の調査をおこなうことにし、今回は、納豆の「粘質部位」を分析して以下の結果を得た。

(1) 納豆の粘質部位から、D-グルタミン酸のみならず、D-アスパラギン酸やD-アラニンが検出された。

(2) それらのD-アミノ酸は、D-グルタミン酸が結合型ならびに遊離型、D-アスパラギン酸のほとんどが結合型、D-アラニンの大部分が遊離型で見出された。

(3) D-アミノ酸の含量については、結合型D-グル

タミン酸が納豆100gあたり3 mmol以上という大変高い状態にあったほかは、いずれの遊離型ならびに結合型D-アミノ酸も納豆100gあたり0.5mmol以下であった。

アミノ酸の分析にご協力いただいた女子栄養大学菅原龍幸教授(現・聖徳大学教授)ならびに根岸由紀子助教授、関連文献を提供された会津大学短期大学部宮下朋子助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 真鍋 久: *New Food Industry*, **39** (No. 4), 50 (1997)
- 2) 村松芳多子・永井利郎・佐藤志津子・落合祐子・石村典子・伊藤義文・木内 幹: *日食工誌*, **44**, 812 (1997)
- 3) 山内文夫: *大豆の科学* (山内文夫・大久保一良編), 朝倉書店, 東京, p. 122 (1993)
- 4) 大西礼子・阿部桂子・本間清一・相田 浩: *家政誌*, **38**, 871 (1987)
- 5) Metzler, D. E.: *メツラー生化学(上)* (今堀・上代・西塚・山川訳), 東京化学同人, 東京, p. 292 (1979)
- 6) 吉村 徹・左右田健次: *現代化学*, 12月号, 14 (1996)
- 7) Marfey, P.: *Carlsberg Res. Commun.*, **49**, 591 (1984)
- 8) 長田洋子・山本和彦: *生化学*, **64**, 1451 (1992)
- 9) 真鍋 久・大平幸次: *土肥誌*, **51**, 239 (1980)
- 10) 藤井紀子・原田 馨: *Jasco Report*, **32**, 9 (1990)
- 11) Friedman, M.: *Nutritional and toxicological consequences of food processing*, Plenum Press, New York and London, p. 447 (1991)
- 12) 鎌田慶朗: *大豆の科学* (山内文夫・大久保一良編), 朝倉書店, 東京, p. 36 (1993)
- 13) 大西礼子・阿部桂子・本間清一・相田 浩: *家政誌*, **39**, 13 (1988)
- 14) 今堀和友・山川民夫監修: *生化学辞典第3版*, 東京化学同人, 東京, p. 1263 (1998)
- 15) 今堀和友・山川民夫監修: *生化学辞典第3版*, 東京化学同人, 東京, p. 82 (1998)
- 16) 真鍋 久: *New Food Industry*, **39** (No. 7), 40 (1997)