

日本酒原料米中の D- および L-アミノ酸含有量の地域差と局在性

郷 上 佳 孝, 保 井 美 保, 岡 田 かおり, 老 川 典 夫
(関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科*)

Regional difference and localization of D- and L-amino acids contents in brown rice for sake brewing

Yoshitaka GOGAMI, Miho YASUI, Kaori OKADA and Tadao OIKAWA
*Department of Life Science and Technology, Faculty of Chemistry, Material Bioengineering,
Kansai University, Suita Osaka 564-8680, Japan*

Summary

D-Amino acids are widely detected in various organisms and foods and expected to have physiological functions for human. We measured all of the D- and L-amino acids in 48 kinds of brown rice for sake brewing using HPLC. We found that the almost all brown rice contained the D-amino acid forms of Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ser, Val, Asp and Glu. D-Ala was detected only in brown rice produced in Hyogo, Hiroshima, Kochi, and Fukui Prefecture. The D-Ser concentration was relatively high in brown rice produced in Yamagata, and Tokushima Prefecture. D-Val was detected in brown rice produced in Hokkaido and Iwate Prefecture but not in Kochi and Kagawa Prefecture. D-Asp was detected only in brown rice but not in the 70%, 60%, and 50% polished rice. These results suggested that D-Asp existed around the center of the brown rice, and other D-amino acids existed near the surface of the brown rice. Accordingly, D-amino acid contents of brown rice for sake brewing are different significantly depend on the production area and the polishing ratio.

D-アミノ酸は自然界での存在や役割が不明のアミノ酸と考えられてきたが、近年分析技術の発達に伴いヒト等の哺乳動物の体内に遊離型 D-アミノ酸が存在することが明らかにされ、その由来や生理的機能が注目されている。D-セリンは哺乳類の脳内に存在し、神経伝達に参与する N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のグリシン結合部位のコアゴニストとして機能することが明らかとなっている¹⁾。また D-アラニン はラットの臍臓に存在し、血糖値の制御²⁾ に関与すると推定されている。さらに D-アスパラギン酸は、脳内のメラトニンの分泌抑制等に関与していると報告されている³⁾。

またわれわれは D-アミノ酸がさまざまな食品中にも存在することを明らかにした^{4, 5)}。たとえば、野菜ではトマト、たけのこ、キュウリ、かぼちゃやねぎなどに、また果物ではりんご、バナナ、キウイ、梨や柿などにさまざまな D-アミノ酸が含まれている。その他に、オレンジジュース⁶⁾ やミルク⁷⁾、ビール⁸⁾ やワイン⁸⁾、チョコレート⁹⁾ やココア⁹⁾、米¹⁰⁾ などにもその存在が報告されている。

先にわれわれは、日本酒中にさまざまな D-アミノ酸が含まれていることを明らかにした¹¹⁾。本研究では、日本

酒原料米中の D-アミノ酸含有量を高速液体クロマトグラフィーで定量し、その地域差と局在性を解明することを目的とする。

実験方法

1. 実験材料

玄米 46 種類および 70% 精米品 46 種類、60% 精米品 4 種類、50% 精米品 4 種類の計 100 種類の試料は独立行政法人酒類総合研究所（広島）及び酒米研究会から提供された。これらの試料の産地と品種名を Table 1 にまとめた。

2. 日本酒原料米の遊離 D- 及び L-アミノ酸の抽出

様々な品種および産地の玄米または白米（精米歩合 70%, 60%, 50%）10 g を上皿天秤で量りとり、ミルで 5 分間粉碎した後、その米粉を 250 μm のふるいにかけた。ふるいを通じた米粉 0.5 g を 15 ml 容のファルコンチューブに入れ、20 mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH 8.0）を 4.5 ml 加えて上下に激しく混合した後、25℃で 15 分間超音波処理した（超音波処理は合計 2 回行った）。超音波

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35（〒564-8680）

処理後, 13,000 rpm (15,000 x g), 15 分間遠心分離し, その上清を分析サンプルとした。

3. サンプルの除タンパク質

上記2で得られた上清にトリクロロ酢酸を添加し夾雑タンパク質を変性後, 水酸化ナトリウムを加えて中和し遠心分離後の上清のアミノ酸含有量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し定量した。

4. サンプル中のアミノ酸のキラル誘導化

OPA/NAC 法

試料溶液 60 μ l に 1% 四ホウ酸ナトリウム溶液 40 μ l を加えた後, 1% *N*-アセチル-L-システイン (NAC), 1.6% *o*-フタルアルデヒド (OPA) 溶液をそれぞれ 20 μ l ずつ加え試料中のアミノ酸をキラル誘導化した。その反応液 10 μ l を HPLC で分析した¹¹⁾。

FLEC/ADAM 法

試料溶液 10 μ l に 500 mM ホウ酸ナトリウム (pH 9.0) 10 μ l を加えた後, 1 mM ((+)-1-(9-フルオレニル)エチルクロロホルメート (FLEC) 溶液 20 μ l を添加し 40°C でインキュベートした。30 分後, 40 mM ADAM (1-アミノアダマンタン) 25 μ l を加え過剰の FLEC を除去した。15 分後, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 35 μ l を添加し誘導化反応を停止した。その反応液 5 μ l を HPLC で分析した¹²⁾。

結果および考察

1. 日本酒原料米の玄米中の D- および L-アミノ酸含有量

アミノ酸分析の結果, 46 品種の日本酒原料米の玄米中に含まれている D-アミノ酸の種類と各 D-アミノ酸を含んでいる玄米の品種の割合は, D-アスパラギン酸(100%), D-アラニン(26.1%), D-スレオニン(0%), D-グルタミン酸(87.0%), D-バリン(67.4%), D-フェニルアラニン(2.2%), D-イソロイシン(0%), D-チロシン(0%), D-ロイシン(0%), D-セリン(87.0%), D-メチオニン(0%), D-トリプトファン(0%), D-ヒスチジン(28.0%), D-アルギニン(40.0%), D-アスパラギン(27%), D-グルタミン(9%), D-プロリン(0%), D-リシン(0%) であった。一方, 46 種類の玄米中にはすべての L-アミノ酸が含まれていた。46 品種の日本酒原料米の玄米中に含まれている L-アミノ酸の種類と各 L-アミノ酸を含んでいる玄米の品種の割合は, L-アスパラギン酸(100%), L-スレオニン(91.3%), L-アラニン(100%), L-メチオニン(97.8%), L-セリン(95.7%), L-バリン(97.8%), L-フェニルアラニン(100%), L-イソロイシン(100%), L-ロイシン(100%), L-チロシン(97.8%), L-トリプトファン(43.5%), L-ヒスチジン(98%), L-アルギニン(100%), L-アスパラギン(100%), L-プロリン(100%), L-リシン(99%) であった。さらに, DL-システイン, グリシンの含有割合は, それぞれ 0%, 78.3% であった。

Table 1 Growing place and species of brown rice for analysis

No.	Growing place	Species of brown rice	No.	Growing place	Species of brown rice
1	Hokkaido	Ginpu	26	Hiroshima	Hattan-nisiki No. 1
2	Hokkaido	Daichinohoshi	27	Hiroshima	Senbon-nishiki
3	Hokkaido	Suisei	28	Hiroshima	Koshihikari
4	Hokkaido	Undisclosed *	29	Hiroshima	Nakateshinsenbon
5	Hokkaido	Undisclosed *	30	Hiroshima	Yamada-nishiki (sparse planting)
6	Hokkaido	Ginpu	31	Hiroshima	Yamada-nishiki
7	Hokkaido	Suisei	32	Hiroshima	Yamada-nishiki
8	Iwate	Hitomebore	33	Hiroshima	Nihonbare
9	Iwate	Ginginga	34	Tokushima	Nihonbare
10	Yamagata	Dehasansan	35	Tokushima	Yamada-nishiki
11	Yamagata	Dehanosato	36	Kochi	Akituho
12	Fukushima	Gohyakumangoku	37	Kochi	Ginoyume
13	Fukushima	Gohyakumangoku	38	Kochi	Kazenaruko
14	Fukushima	Yumenoka	39	Kochi	Kazenaruko
15	Ishikawa	Gohyakumangoku	40	Kagawa	Ooseto
16	Fukui	Gohyakumangoku	41	Kagawa	Ooseto
17	Fukui	Okuhomare	42	Chiba	Fusanomai
18	Fukui	Gohyakumangoku	43	Chiba	Koshihikari
19	Fukui	Koshinoshizuku	44	Chiba	Fusakogane
20	Tochigi	Gohyakumangoku	45	Chiba	Yumekanae
21	Hyogo	Undisclosed *	46	Niigata	Gohyakumangoku
22	Hyogo	Hyougo-kitanishiki			
23	Hyogo	Gohyakumangoku			
24	Hyogo	Tozinoyume			
25	Shiga	Nihonbare			

* Under test cultivation

2. 日本酒原料米の玄米中の D- および L-アミノ酸濃度と産地との関係

得られたアミノ酸分析の結果にもとづき日本酒原料米の玄米中の D-アミノ酸濃度と日本酒原料米の産地との関係を検討した結果、D-アスパラギン酸はすべての産地の玄米に含まれていることが明らかとなった (Fig. 1)。特に福島県産の五百万石 (No. 13) や夢の香 (No. 14) に高濃度で含まれていた。また北海道産の玄米 (No. 1-No. 7) にはいずれも D-アスパラギン酸がほぼ同濃度含まれていた。D-アラニンは福井県産 (五百万石 (No. 16), おくほまれ (No. 17)), 兵庫県産 (試験栽培中につき品種非公開 (No. 21), 兵庫北錦 (No. 22), 五百万石 (No. 23), 杜氏の夢 (No. 24)), 広島県産 (コヒシカリ (No. 28), 東広島産 (山田錦 (No. 32), 日本晴 (No. 33)), 高知県産 (風鳴子 (No. 38)), 新潟県産 (五百万石 (No. 46)) の 11 種類の玄米に含まれていた (Fig. 2)。D-セリンは特に山形県産 (出羽の里 (No. 11)), 徳島県産 (山田錦 (No. 35)) の玄米に多く含まれている傾向が見られた (Fig. 3)。D-バリンは北海道産 (彗星 (No. 3), 試験栽培中につき品種非公開 (No. 5), 福井県産 (五百万石 (No. 18), おくほまれ (No. 17), 越の雫 (No. 19)), 東広島産 (山田錦 (No. 32)) の玄米に多く含まれていたが、高知県産 (No. 36-No. 39) や香川県産 (No. 40, No. 41) の玄米には全く含まれていなかった (Fig. 4)。D-グルタミン酸はほとんどの玄米中に含まれていたが、特に福井県産 (五百万石 (No. 18)), 兵庫県産 (兵庫北錦 (No. 22)) に多く含まれていた (Fig. 5)。D-ヒスチジンは北海道産の彗星 (No. 1) に多く含まれており、広島県産の玄米 (No. 26-No. 31) にも広く含まれていた。D-アルギニンは北海道産 (吟風 (No. 1), 大地の風 (No. 2), 彗星 (No. 3), 試験栽培中につき品種非公開 (No. 5), 福井県産 (五百万石 (No. 18), 越の雫 (No. 19)), 広島県産 (八反錦 1 号 (No. 26), 千本錦 (No. 27), こしひかり (No. 28)), 徳島県産 (日本晴 (No. 34), 山田錦 (No. 35)), 高知県産 (吟の夢 (No. 37), 風鳴子 (No. 38, 39)), 香川県産 (オオセト (No. 40, 41)) の玄米に多く含まれていた (Fig. 6)。D-アスパラギンは北海道産 (吟風 (No. 1), 大地の風 (No. 2), 試験栽培中につき非公開品種 (No. 4), 福井県産 (五百万石 (No. 16), 越の雫 (No. 19)), 兵庫県産 (試験栽培中につき品種非公開 (No. 21), 兵庫北錦 (No. 22), 五百万石 (No. 23)) の玄米に多く含まれていた (Fig. 7)。D-グルタミンは北海道産 (試験栽培中につき品種非公開 (No. 5), 彗星 (No. 7), 岩手県産 (ひとめばれ (No. 8)), 福島県産 (五百万石 (No. 13)), 東広島産 (山田錦 (No. 32)) の玄米に多く含まれていた (Fig. 8)。それぞれの D-アミノ酸の分析した玄米中での平均濃度は D-アスパラギン酸 (0.21 μM), D-アラニン (0.06 μM), D-セリン (0.33 μM), D-バリン (0.09 μM), D-グルタミン酸 (0.07 μM), D-ヒスチジン (0.16 μM), D-アルギニン (0.79 μM), D-アスパラギン (0.24 μM), D-グルタミン (0.02 μM) であった。これらの結果から日本酒原料米の玄米中の D-アミノ酸濃度は玄米の産地によって大きく異なる

ことが明らかとなった。

一方、日本酒原料米の玄米中の L-アミノ酸と日本酒原料米の産地との関係を検討した結果、L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-アラニン, L-ロイシン, L-イソロイシン, L-フェニルアラニンはすべての産地の玄米に含まれており, L-アラニンは兵庫県産 (No. 22-No. 24), 千葉県産 (No. 44, 45) に多く含まれ, L-セリンは高知県産 (No. 36, 37) にあまり含まれていないことが明らかとなった (Fig. 3-Fig. 16)。

3. 日本酒原料米の玄米中の D- および L-アミノ酸の局在性

日本酒原料米の玄米中の D-アミノ酸の局在性を明らかにするために、山田錦 (東広島産 (No. 32)), 日本晴 (東広島産 (No. 33)), コヒシカリ (広島県産 (No. 28)), 五百万石 (新潟県産 (No. 46)) の精米歩合 70, 60, 50% の玄米中の D-アミノ酸含量を定量した結果、D-アスパラギン酸はすべての玄米および精米歩合が 70%, 60%, 50% の玄米中に含まれていることが明らかとなった (Fig. 10)。また、D-セリン, D-アルギニン, D-ヒスチジン, D-バリンはいくつかの精米歩合が 70% の玄米中に含まれていたが、その他の D-アミノ酸は玄米以外には含まれていなかった。これらの結果から、D-アスパラギン酸は米の内部に、その他の D-アミノ酸は米の表面付近に局在していることが明らかとなった。

一方、含有 L-アミノ酸と日本酒原料米の精米歩合との関係を検討した結果、L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-スレオニン, L-バリン, L-アラニン, L-ロイシン, L-イソロイシン, L-フェニルアラニンは玄米及び精米歩合が 70%, 60%, 50% の日本酒原料米中に含まれていることが明らかとなった。また L-セリンは玄米と精米歩合が 70% の日本酒原料米にしか含まれていないことが明らかとなった。また精米歩合が 70% のすべての日本酒原料米中の D-アミノ酸及び L-アミノ酸の濃度の平均値は、それぞれ玄米の約 10%, 13% であった。以上の結果から、D-アミノ酸及び L-アミノ酸は、いずれも米の外側、すなわち表層部に多く含まれていることが明らかとなった。

まとめ

日本酒原料米の玄米中には D-アラニン, D-アルギニン, D-アスパラギン, D-アスパラギン酸, D-グルタミン酸, D-グルタミン, D-ヒスチジン, D-セリン, D-バリンが含まれていることが明らかとなった。D-アスパラギン酸は、すべての産地の日本酒原料米中に検出され、D-アラニンは、兵庫県産, 東広島産, 広島県産, 高知県産, 福井県産に検出され、D-セリンは、山形県産, 徳島県産に多く含まれ、D-バリンは、北海道産, 岩手県産, 福島県産, 福井県産, 東広島産, 徳島県産に多く含まれ、D-グルタミン酸は、ほとんどすべての産地の日本酒原料米中に検出され、特に、北海道産, 岩手県産の日本酒原料米中に多く含

まれていることが明らかとなった。さらに、精米歩合が 50, 60, 70%の日本酒原料米の玄米中には、D-アスパラギン酸のみが含まれており、D-アスパラギン酸は米の中心部分に存在していることが明らかとなった。一方、D-アラニン、D-セリン、D-バリン、D-グルタミン酸、D-ヒスチジン、D-グルタミン、D-アスパラギン、D-アルギニンは、米の表層部に含まれていることが明らかとなった。以上の結果から、日本酒原料米中のD-アミノ酸の種類や濃

度は、日本酒原料米の産地や精米歩合によって大きく異なることが明らかとなった。一般に日本酒原料米には精米歩合が70%以下の玄米が用いられることを考慮すると、日本酒中のD-グルタミン酸、D-セリン、D-バリン、D-アラニンは、日本酒原料米にほとんど由来していないが、日本酒中のD-アスパラギン酸の一部は日本酒原料米に由来することが明らかとなった。

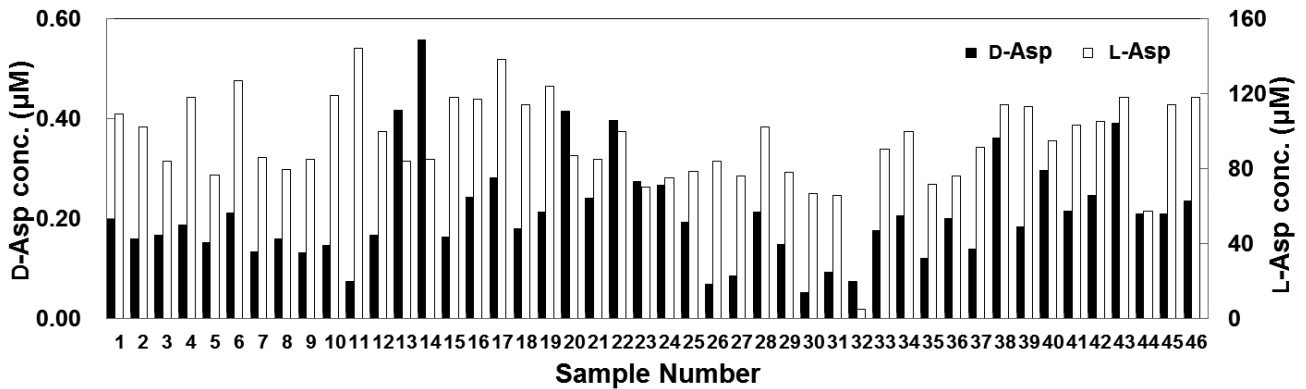


Fig. 1 Comparison of D- and L-Asp concentration in brown rice

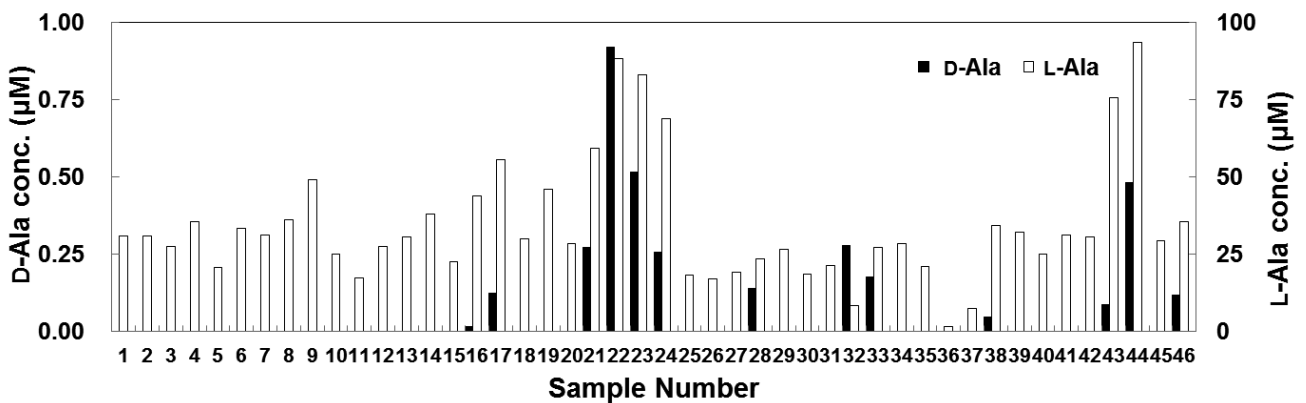


Fig. 2 Comparison of D- and L-Ala concentration in brown rice

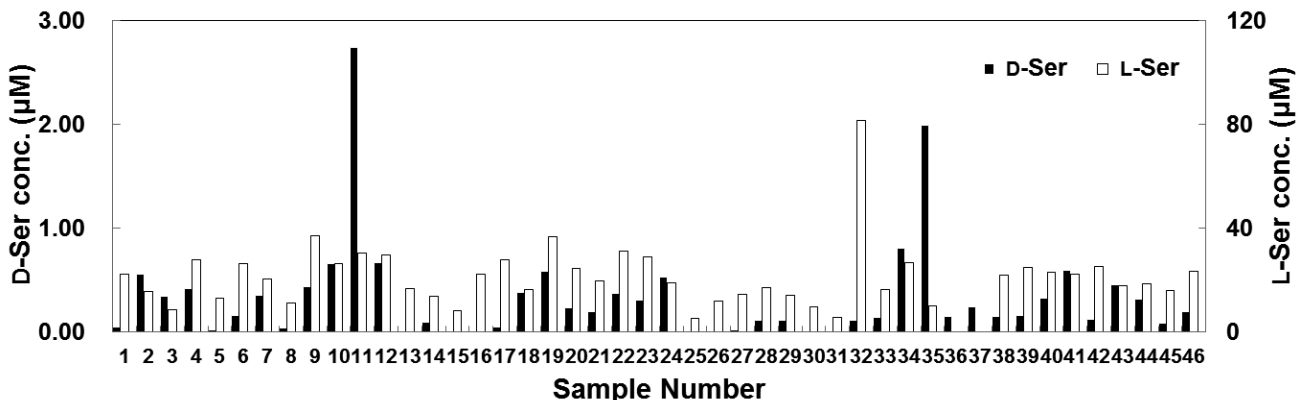


Fig. 3 Comparison of D- and L-Ser concentration in brown rice

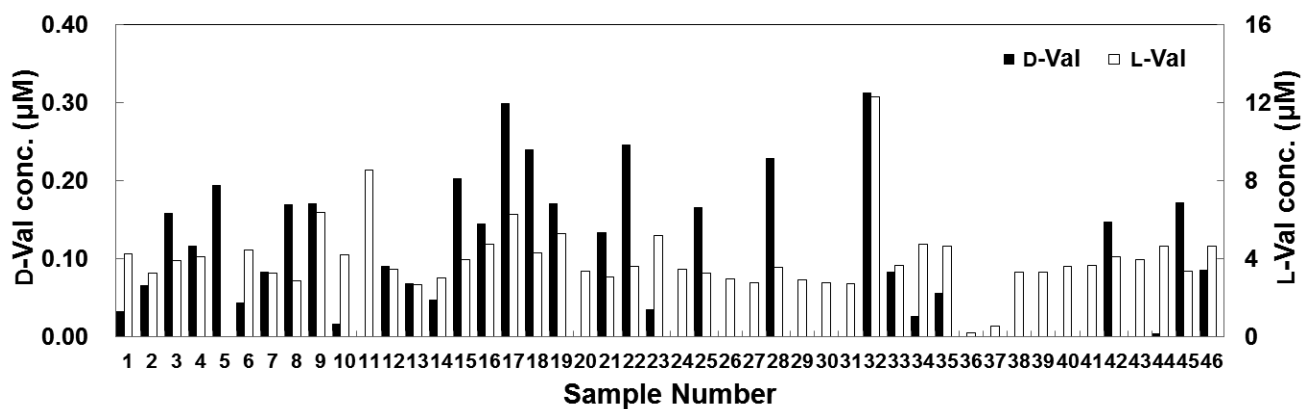


Fig. 4 Comparison of D- and L-Val concentration in brown rice

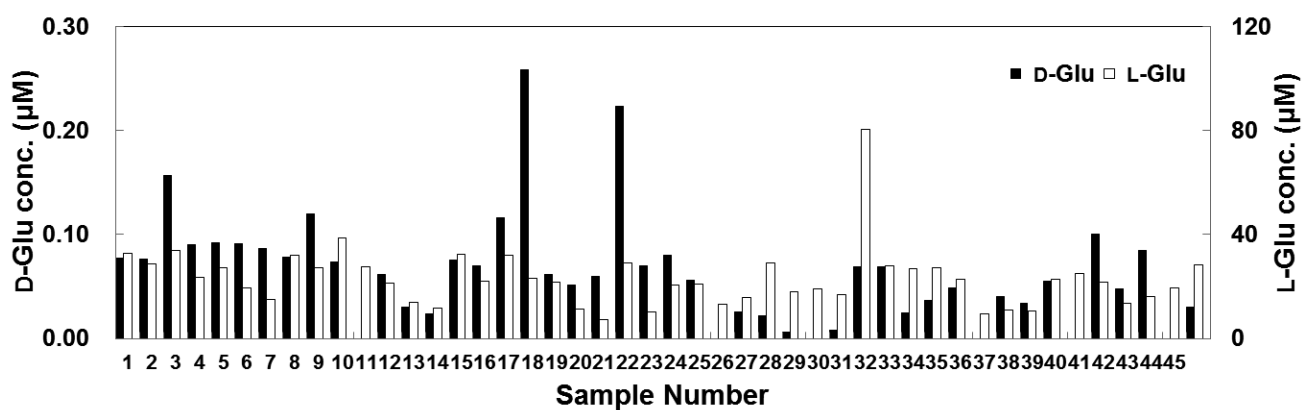


Fig. 5 Comparison of D- and L-Glu concentration in brown rice

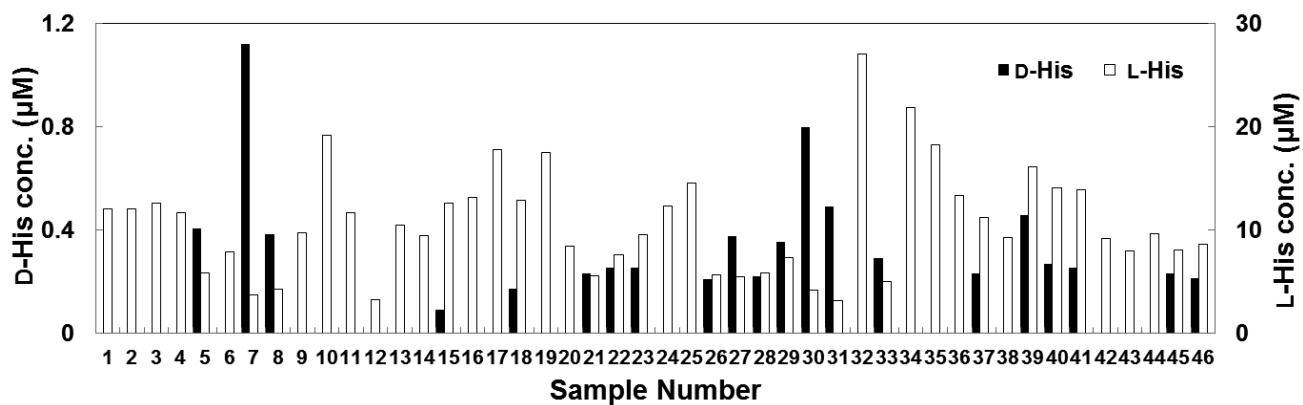


Fig. 6 Comparison of D- and L-His concentration in brown rice

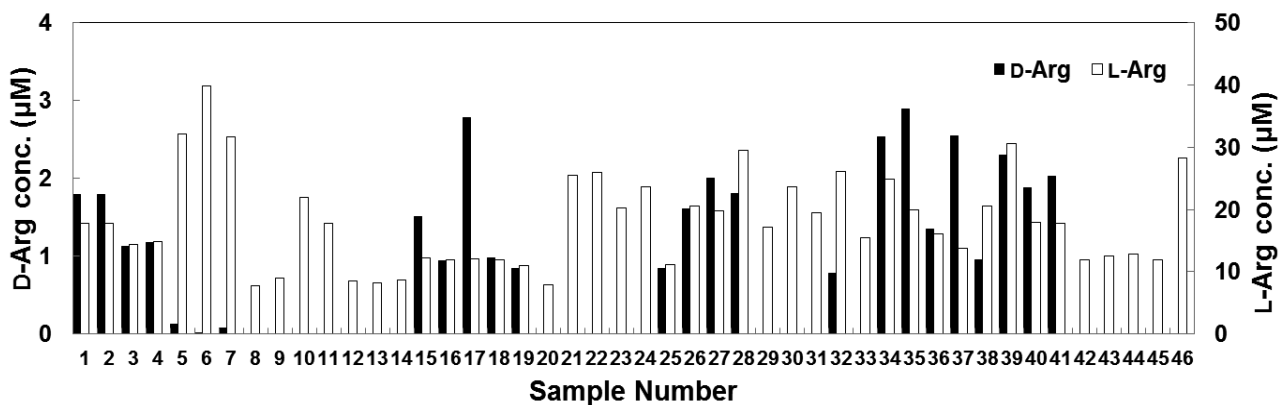


Fig. 7 Comparison of D- and L-Arg concentration in brown rice

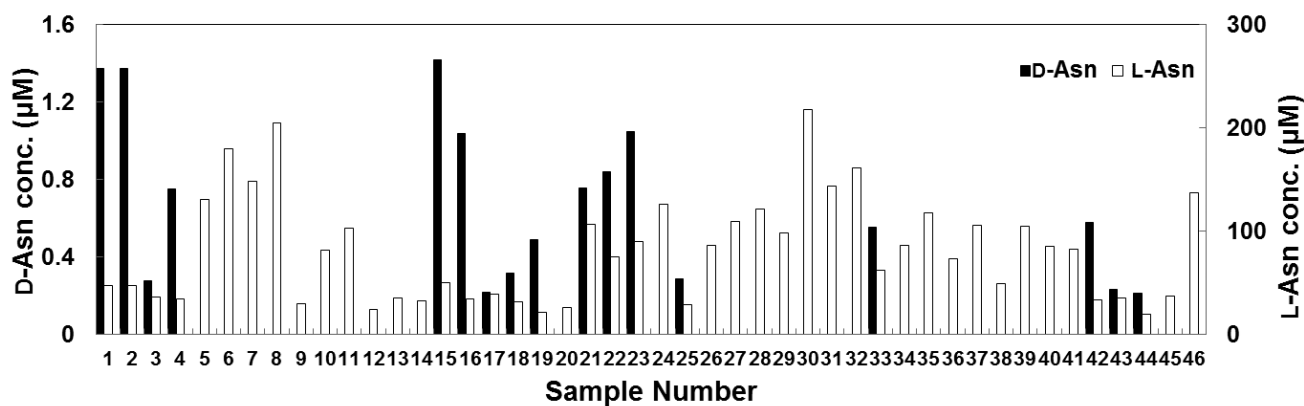


Fig. 8 Comparison of D- and L-Asn concentration in brown rice

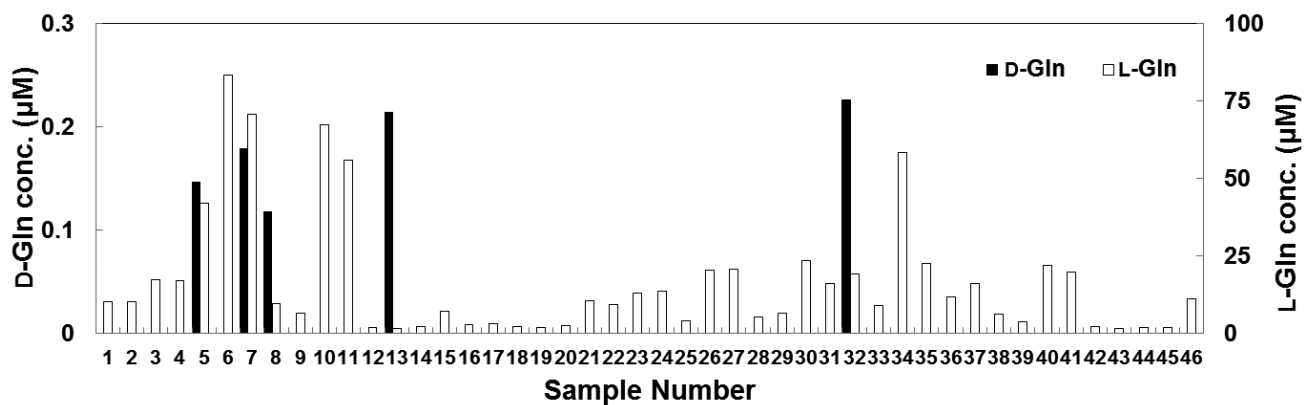


Fig. 9 Comparison of D- and L-Gln concentration in brown rice

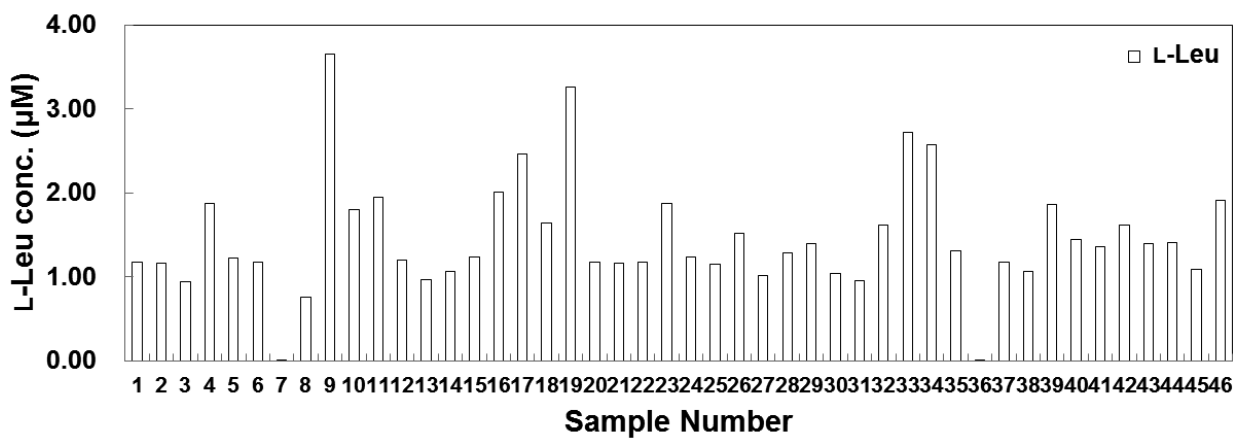


Fig. 10 Comparison of L-Leu concentration in brown rice

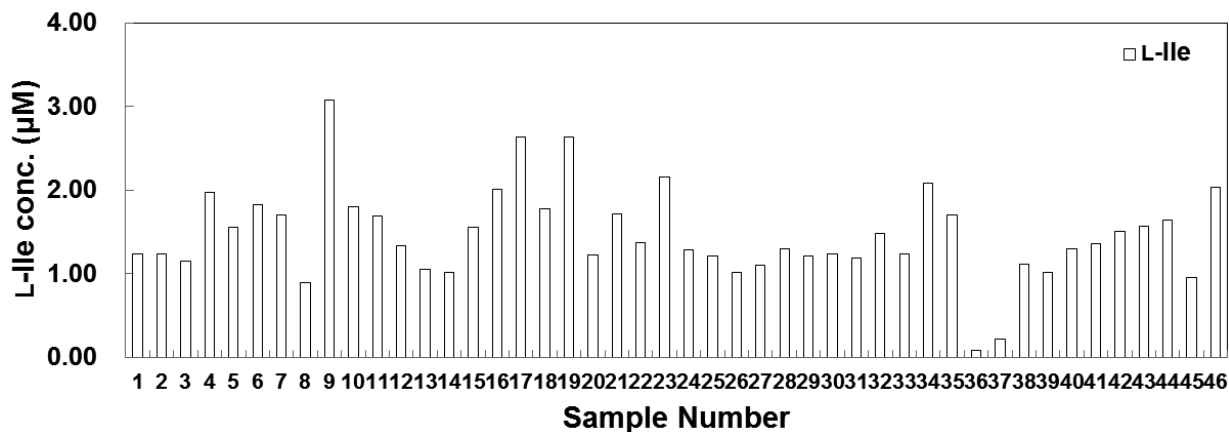


Fig. 11 Comparison of L-Ile concentration in brown rice

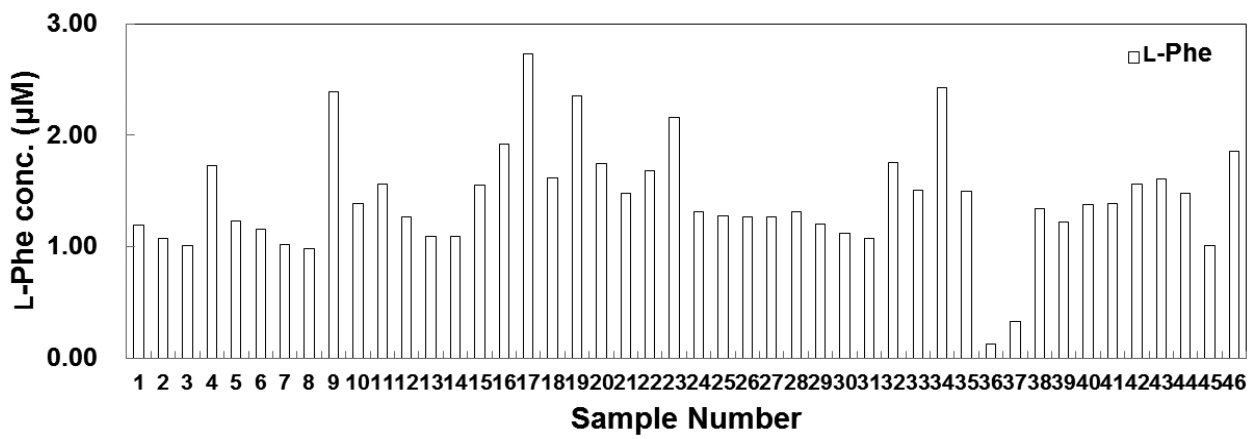


Fig. 12 Comparison of L-Phe concentration in brown rice

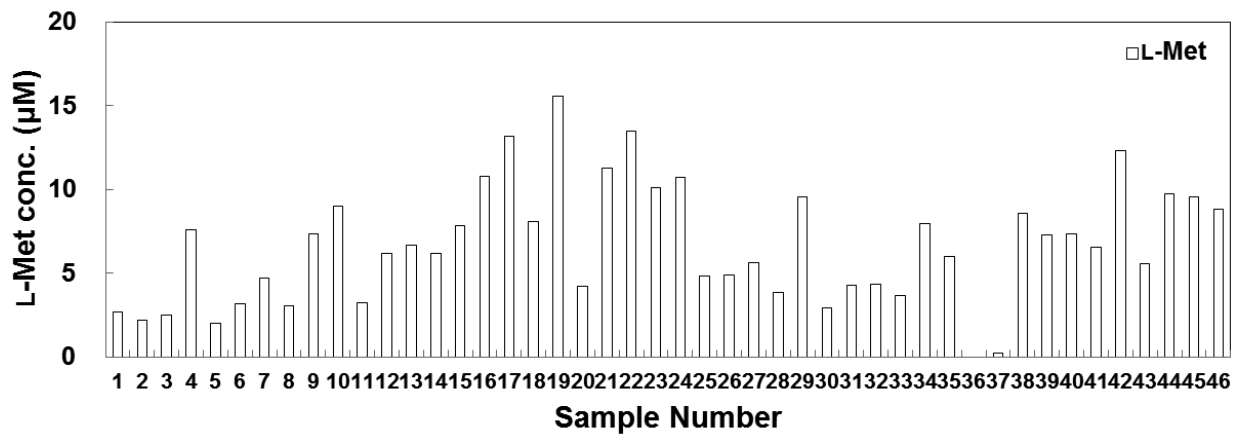


Fig. 13 Comparison of L-Met concentration in brown rice

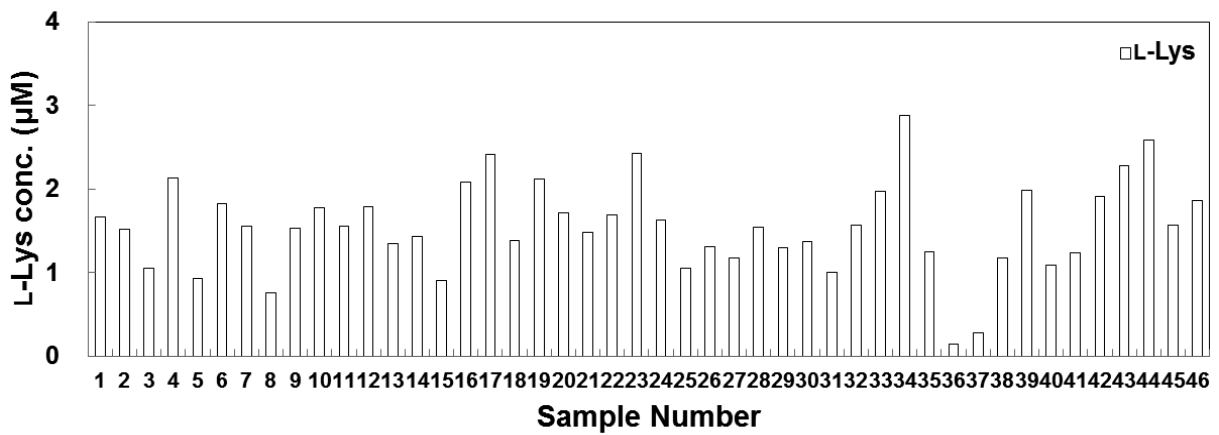


Fig. 14 Comparison of L-Lys concentration in brown rice

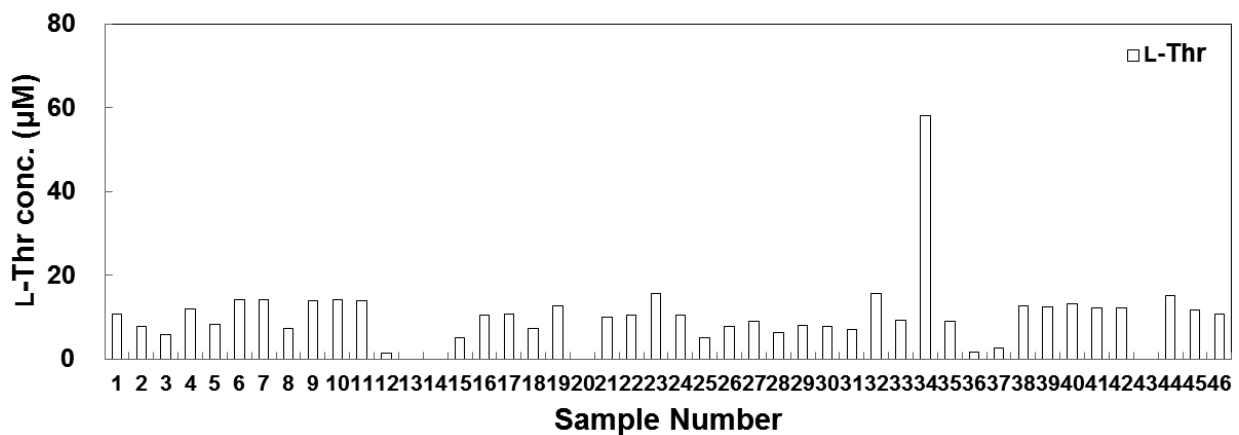


Fig. 15 Comparison of L-Thr concentration in brown rice

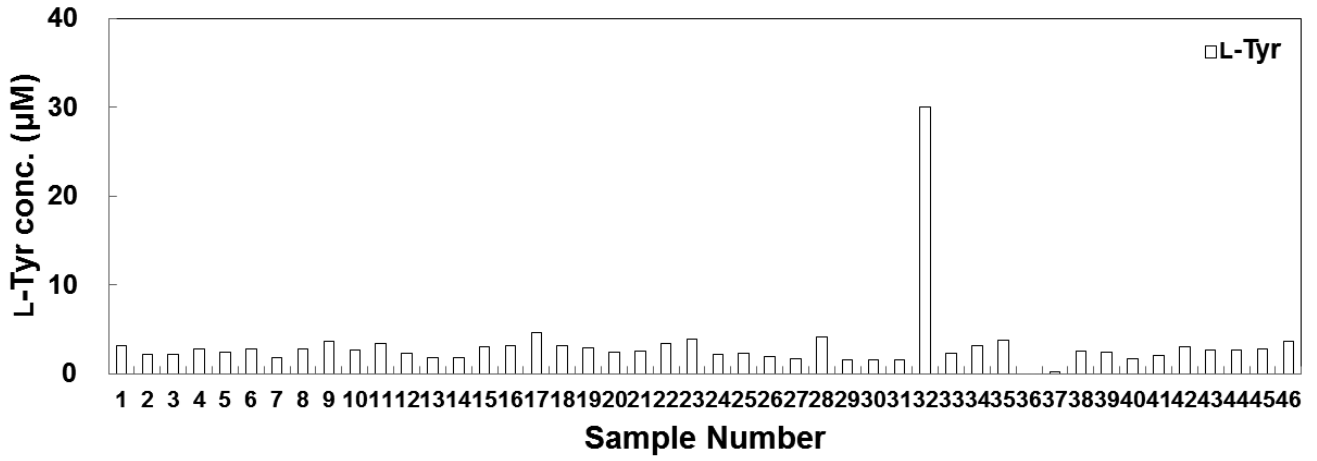


Fig. 16 Comparison of L-Tyr concentration in brown rice

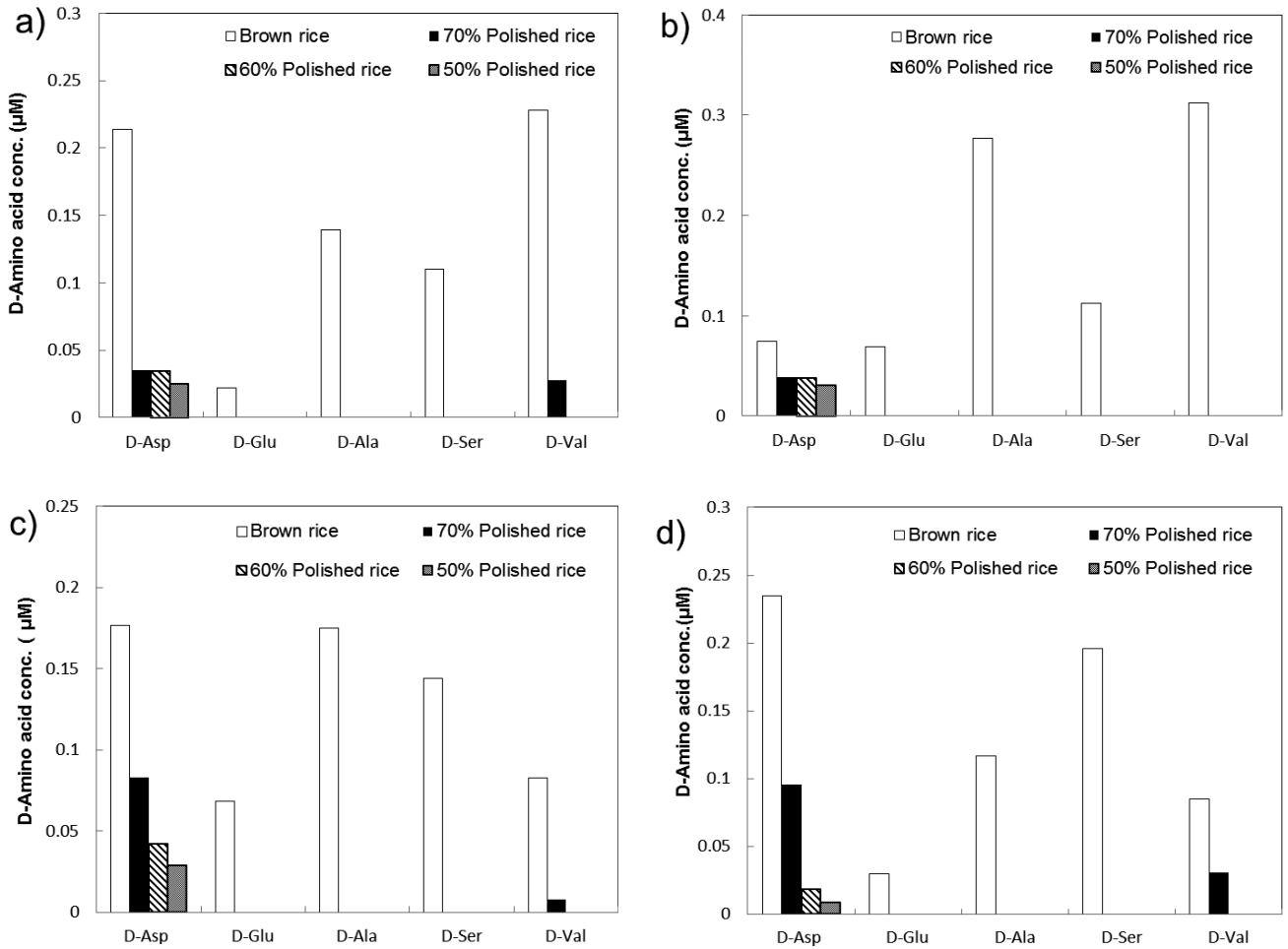


Fig. 16 Relationship between polished ratio and D-amino acid concentration

a) No. 27 b) No. 31 c) No. 32 d) No. 45

謝 辞

日本酒原料米を提供頂いた独立行政法人酒類総合研究所の橋詰克己様（現：秋田県立大学）、伊豆英恵様および酒米研究会の皆様にご礼申し上げます。

なお、本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業により実施したものである。

参考文献

- 1) De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. Proc Natl Acad Sci USA 99: 14542-14547.
- 2) Morikawa A, Hamase K, Ohgusu T, Etoh S, Tanaka H, Koshiishi I, Shoyama Y, Zaitsu K (2007) Immunohistochemical localization of D-alanine to beta-cells in rat pancreas. Biochem Biophys Res Commun 355: 872-876.
- 3) Takigawa Y, Homma H, Lee JA, Fukushima T, Santa T, Iwatsubo T, Imai K (1998) D-Aspartate uptake into cultured rat pinealocytes and the concomitant effect on L-aspartate levels and melatonin secretion. Biochem Biophys Res Commun 248: 641-647.
- 4) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫 (2006) 野菜および果物中の D-アミノ酸の定量と植物における D-アミノ酸の生合成機構. 微量栄養素研究 23 : 1-4
- 5) 老川典夫 (2008) 高等植物及び食品中の D-アミノ酸とその代謝関連酵素. 生化学 第 80 卷 第 4 号 : pp. 300-307
- 6) Brückner H, Lüpke M (1991) Determination of amino acid enantiomers in orange juices by chiral phase capillary gas chromatography Chromatographia 31: 123-128.
- 7) 老川典夫 (2009) 食品中の D-アミノ酸 —おいしさとの関連と食品産業への応用—. バイオインダストリー Vol.27 No.1 : 44-48
- 8) 老川典夫, 山田高史, 杉原裕貴, 宮田智子, 吉田宗弘, 左右田健次 (2003) 食品中の D-アミノ酸：定量的解析と微量栄養素としての可能性. 微量栄養素研究 20 : 121-124
- 9) Pätzold R, Brückner H (2006) Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. Amino Acids 31: 63-72.
- 10) Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T (2009) Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. Phytochemistry 70(3): 380-387.
- 11) Aswad DW (1984) Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of *o*-phthalaldehyde Anal Biochem 137(2): 405-409.
- 12) Einarsson S, Josefsson B, Möller P, Sanchez D (1987) Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography Anal Chem 59(8): 1191-1195.