

アミノ酸ハイブリッド型食塩が発酵食品成分組成・生物活性プロファイル に与える影響に関する研究

中尾 洋一¹，町田 光史¹，神平 梨絵²，中村 文彬¹

¹ 早稲田大学理工学術院，² 早稲田大学先進理工学部

概要

潜在患者を含めると約 4000 万人の高血圧患者がいるとも推計されるわが国において、塩分の取りすぎは健康リスクに直結する健康上の大きな不安要素となっている。『日本人は塩分を取りすぎなので減塩すべき』という認識が広く社会一般に浸透するにつれ、健康を気にする多くの家庭では塩分濃度が高い発酵食品が食卓から避けられる傾向も生じており、発酵食品業界全体の将来にかかわる大きな問題ともなっている。

一方、減塩は味の薄さにもつながることから、行き過ぎた減塩は食事の楽しみである美味しさと矛盾することにもつながる。このような背景下、われわれは海底湧海水を使って、おいしく 25% NaCl をカットできるアミノ酸ハイブリッド型食塩を開発した。われわれはおいしく減塩が可能な本アミノ酸ハイブリッド型食塩を、様々な発酵食品の材料として適用することで、塩分摂取量が気になる人も安心して摂取することができる発酵食品開発に役立てたいと考えている。そこで本研究では、アミノ酸ハイブリッド型食塩が発酵食品におよぼす影響を、代謝物・生物活性プロファイル評価によって明らかにし、塩分を気にしないで摂取可能な発酵食品開発につながる知見を得ることを目的とした。

本研究では、精製塩、本塩、精製塩＋本塩を用いて味噌の製造を行い、得られた各味噌に含まれる代謝物のメタボローム解析結果を比較して、先行研究で得られた知見である、用いる塩によって味噌の代謝物プロファイルが大きく異なる（精製塩＋本塩では中間のプロファイルになる）こと確認した。また、これまでの研究で見出している、味噌に含まれる抗ストレス成分およびアンジオテンシン変換酵素(ACE:高血圧の原因酵素)阻害活性成分についても、メタボローム解析を行ってそれらの含有量変化について検討した。

一方、上記のように製造した味噌について、その機能性に関する知見を得るべく、それぞれの抽出物の分画し、各画分に対して遺伝子スイッチとしても知られるヒストン修飾(最大 24 種類)についても同時並行的に変化のプロファイルを調べて、特徴的な変化が認められるかどうかについて検討を行った。

以上の結果から、用いる食塩を変えることで味噌に含まれる成分プロファイルや活性プロファイルに変化が生じることが示唆された。今後はこれらの変化を引き起こす成分の精製・同定を進め、味噌の新たな機能性について解明を試みたいと考えている。

1. 研究目的

潜在患者を含めると約 4000 万人の高血圧患者がいるとも推計されるわが国において、塩分の取りすぎは健康リスクに直結する健康上の大きな不安要素となっている。そのため、塩分濃度が高い発酵食品が食卓から避けられる

傾向も生じており、発酵食品業界全体の将来にかかわる大きな問題ともなっている。

このような背景下、われわれは海底湧海水を使って、おいしく 25% NaCl をカットできるアミノ酸ハイブリッド型食塩を開発した。この本アミノ酸ハイブリッド型食塩を、様々な

発酵食品の材料として適用することで、塩分摂取量が気になる人も安心して摂取することができる発酵食品開発に役立てたいと考えて研究を行っている。

本研究では、アミノ酸ハイブリッド型食塩の使用が発酵食品の成分・機能性におよぼす影響を、代謝物・生物活性プロファイルを評価することによって明らかにし、塩分を気にしないで摂取可能な機能性発酵食品開発につながる知見を得ることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 味噌サンプルの調製

以前の研究では米味噌を用いて成分分析を行ったので、本研究では麦味噌サンプルを用いて同様の研究を行うこととした。麦味噌の製造にあたっては、山口県萩市の岡田味噌醤油有限会社の協力を得た。ここで用いた味噌サンプルは共通の麦麴と大豆を使用した上で、異なる2種類の塩(精製塩、アミノ酸ハイブリッド型食塩、およびそのミックス)を使用して作製した(表1)。精製塩のみを用いたものをMS22001、精製塩とアミノ酸ハイブリッド型食塩を1:1で混合したものを用いて製造したものをMS22002、アミノ酸ハイブリッド型食塩のみを用いたものをMS22003とした。

上記のように製造した味噌サンプル各5.0gずつを、30mLのMeOH中で2分間振盪させながら抽出した。抽出液をろ過して残渣を除去し、得られたろ液を濃縮してMeOH抽出物とした。MeOH抽出物をさら、逆相のODSフラッシュカラムクロマトグラフィー[Φ1.6×2cm; H₂O, MeOH (20%, 50%, 70%, 100%), CHCl₃/MeOH/H₂O (6:4:1)]によって分け、得られた6画分(図1)を各分析・活性試験に供した。

表1. 各麦味噌サンプル製造に使用した塩

| サンプル | 使用した塩 | 使用量 | 種水 |
|---------|--------------------------------|---------|--------|
| MS22001 | 精製塩 | 0.7 kg | 1.6 L |
| MS22002 | アミノ酸ハイブリッド型食塩 +精製塩 (1:1 混合) | 0.86 kg | 1.95 L |
| MS22003 | アミノ酸ハイブリッド型食塩 | 0.7 kg | 1.6 L |

いずれも麦麴3.4kg, 大豆2.76kgを原料とする

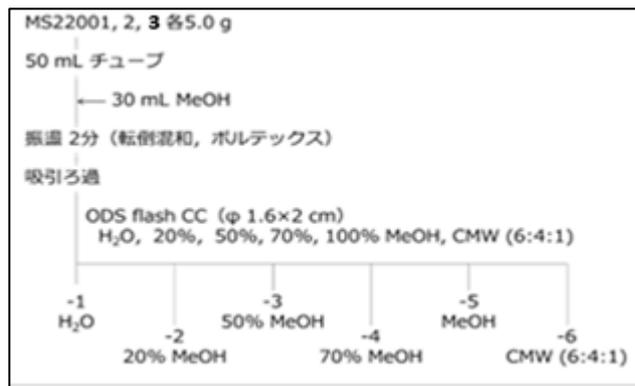


図1. サンプルの抽出・分画スキーム

2.2 LC-MS 分析による味噌成分のメタボローム解析

味噌成分の網羅的なメタボローム解析には、分離導入部としてSHIMADZU UFL(島津製作所)、分析部としてAB SCIEX QTRAP 4500(エービー・サイエックス)からなるLC-MSシステムを使用した。

味噌サンプル抽出物から調製した分画物のうち、20%(MS22001-2, 2-2, 3-2), 50%(MS22001-3, 2-3, 3-3), 70%(MS22001-4, 2-4, 3-4) MeOH 溶出画分を250 μg/mLのMeOH溶液として調製し、LC-MS分析[カラム; COSMOSIL 5C18-AR-II(ナカライテスク), 移動相; liner gradient 95/5 to 0/100 of 0.1% HCOOH H₂O/0.1% HCOOH MeCN, MS; positive mode]に供した。取得した質量分析データは多変量解析ソフトウェア Signpost MSTM(ライフィクス)を用いて解析した。

2.3 アンジオテンシン変換酵素阻害活性試験

アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性試験は以下の手順に従って行った。すなわち、96ウェルプレートの各ウェルにHEPES緩衝液(0.1M HEPES, 0.3M NaCl, pH 8.3)40 μL, サンプル溶液10 μL, 10 mU/mLのACE溶液100 μLを加え、酵素反応開始前の蛍光強度(励起光:360 nm, 蛍光:460 nm)を測定した。プレインキュベーション(37°C, 10分間)後、25 mMのACE基質(HHL:Hippuryl-His-Leu)溶液を25 μL加えて酵素反応を開始させ、37°Cで40分間酵素反応を行った。NaOH溶液(1N)を50 μL加えて反応を停止させ、0.2%の蛍光試薬o-フタルアルデヒド溶液を10 μL添加して、室温で15分間振盪させた。ここに3.6Mリン酸溶液15 μLを加えて溶液を中和し、蛍光強度(励起光:360 nm, 蛍光:460 nm)を測定することでACE阻害活性を算出した。

2. 4 ヒストン修飾調節活性試験 (顕微鏡) (図 2)

ヒストン修飾調節活性試験は不死化血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞および大腸がん由来 CACO-2 細胞株を用いて行った。

EA.hy926 細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^3 cells/well となるように播種し、DMSO に溶解させたサンプルを添加した培地(DMSO 終濃度 0.1%)で 5% CO₂ 下、37°Cにて 20 時間培養した。培地を除去し 4%パラホルムアルデヒド(PFA, 富士フィルム和光純薬工業)溶液を加えて 10 分間静置、固定処理を行った。その後、1% Triton X-100(Alfa Aesar)を用いた透過処理と Blocking One-P(ナカライテスク)を用いたブロッキング処理をそれぞれ 20 分間ずつ行った。ここで、蛍光標識したヒストン修飾特異的なモノクローナル抗体(モノクローナル抗体研究所)を 2 時間反応させた。染色した細胞を蛍光顕微鏡で撮影し、各画像の蛍光強度を画像処理ソフト NIS-Elements(Nikon)を用いて解析することで、それぞれのヒストン修飾レベルを算出した。これをコントロールと比較することで活性を評価した。

同様に CACO-2(ヒト大腸がん由来細胞株)を、96 ウェルプレートに 5.0×10^3 cells/well の密度で播種し、DMSO に溶解させたサンプルを添加した。このときの DMSO の濃度は 0.1%であり、サンプルの終濃度は 30 μ g/mL とした。20 時間培養後、細胞を 4% PFA 溶液によって固定した。さらに、1% TritonX-100 溶液を用いて透過処理、Blocking One-P 溶液によるブロッキング処理を行った。その後、各ヒストン修飾に特異的な蛍光標識されたモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、上記と同様に蛍光画像を撮影し、画像処理ソフト NIS-Elements によって解析を行い、各サンプルのヒストン修飾調節活性を評価した。

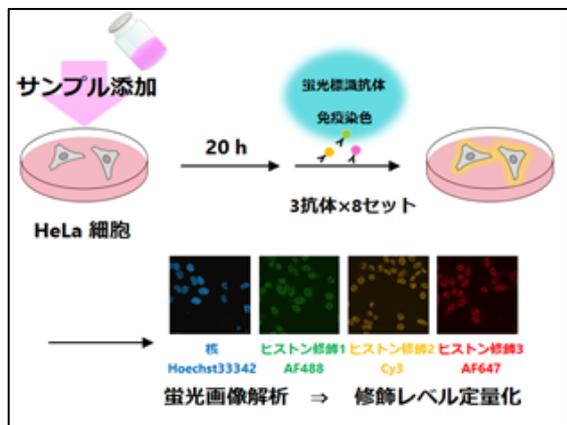


図 2. ヒストン修飾調節活性試験

2. 5 セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験 (図 3)

2. 5. 1 蛍光色素と抗体の組み合わせの検討

セルアナライザーによってヒストン修飾レベルを検出するための、蛍光色素の選定とヒストン修飾抗体-色素の組み合わせの最適化を行った。本研究で用いるスペクトル型セルアナライザーでは、色素ごとの蛍光スペクトルを記録することで、同一のレーザーで励起される蛍光色素であっても識別が可能となるため、一度の多くの蛍光色素を使用した同時染色が可能となる。

そこでまず、405/488/637 nm それぞれの波長のレーザーで励起される市販の蛍光色素 26 種類をそれぞれキャプチャービーズに結合させたのち、二色識別試験を行った。ここでは同一のレーザーによって励起される色素について、それぞれの色素の蛍光スペクトルの測定を行って、本活性試験に用いる 8 色の蛍光色素を絞り込んだ(図 4)。

次に、絞り込んだ 8 色の蛍光色素の輝度を比較するために、色素の輝度を正規化した値である Stain Index の算出を試みた。蛍光色素で標識した抗体を結合させた positive beads, コントロールの negative beads をそれぞれセルアナライザー (SONY, ID7000) で分析して、平均蛍光強度 MFInega・標準偏差 SDnega および Positive Beads の平均蛍光強度 MFIposi を測定した。この値を用いて Stain Index を算出した。

細胞を蛍光免疫染色する際、傾向の強さは

$$\text{各蛍光の強さ} = \text{抗原量} \times \text{色素輝度}$$

で示される。活性試験では 24 種類のヒストン修飾抗体を用いるため、各抗体で染色した細胞の蛍光強度を測定し、その値から各 24 種類の相対抗原量を算出した。続いて、同一励起波長をもつ色素の輝度と算出した抗原量をもとに、それぞれ「抗原量×色素輝度」の値が出来るだけ等しくなるよう抗体と色素の組み合わせを検討した。

2. 5. 2 セルアナライザーによるヒストン修飾調節活性試験

以上で検討した蛍光色素と抗体の組み合わせを用いて、既知のヒストン脱アセチル化阻害剤 trichostatin A (TSA) を HeLa 細胞に投与した際のヒストン修飾変化を、セルアナライザーを用いて評価し、その結果を従来の共焦点顕微鏡(Nikon, Digital Sight 10)によるヒストン修飾調節活性試験結果と照らし合わせて、セルアナライザーによるヒストン修飾調節活性試験の有効性を検証した。

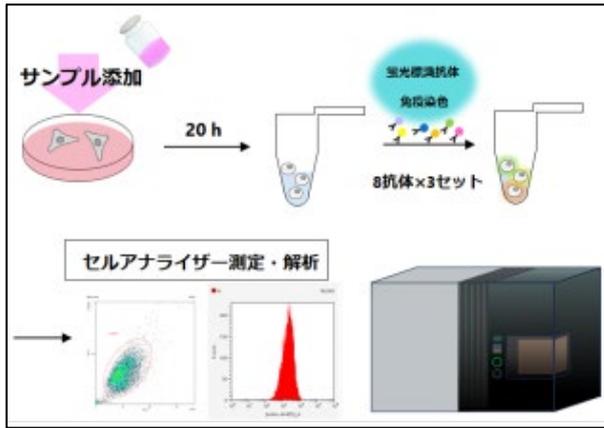


図 3. セルアナライザーによるヒストン修飾調節活性試験

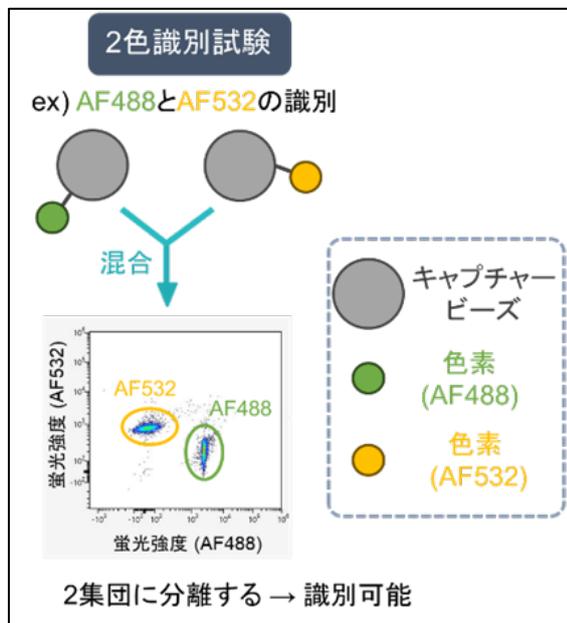


図 4. 二色識別試験の概要

3. 研究結果

3.1 メタボローム解析結果

各味噌サンプルの ODS 20% MeOH 溶出画分 (MS22001-2, 2-2, 3-2), 50% MeOH 溶出画分 (MS22001-3, 2-3, 3-3), 70% MeOH 溶出画分 (MS22001-4, 2-4, 3-4), の主成分分析結果を 図 5 に示す。破線で囲った各サンプルの溶出画分が近い主成分組成であることがわかる。これにより、味噌サンプルは違っても同じ溶出画分間では類似の主成分組成となることが分かった。

また、20% MeOH 溶出画分と 50% MeOH 溶出画分はサンプル間でも成分組成が高い類似度を示しているのに対し、よ

り低極性の成分を含む 70% MeOH 溶出画分では味噌サンプル間における成分組成のばらつきが大きいことも示された。

次に、イオンピークの階層的クラスタリング解析を行った結果を 図 6 に示す。主成分分析結果と同様にそれぞれの味噌サンプルは溶出画分ごとに成分組成が近いことを示すものの、同じ溶出画分であっても味噌サンプル間で特徴的な成分はプロファイルが異なることが示されている。この傾向は以前行った塩を変えて製造した米味噌間の主成分分析結果とも一致していた。

なお、以前の米味噌を使った研究で見出し、血圧降下活性を有する成分 (特許出願前であるため成分 X とする)、および抗ストレス成分としてわれわれが初めて同定した味噌に特有の成分であるフェルラ酸エチルエステル (FAEE) についても、LC-MS 測定データをもとに定量したところ、今回対象とした麦味噌では、成分 X についてはいずれのサンプルでも検出限界以下となった。また、FAEE については米味噌よりも含量が高いものの、アミノ酸ハイブリッド型食塩を用いて製造したサンプルよりも、精製塩を用いて製造したサンプルで高含量となった (図 7)。以上より、残念ながらこれらの機能性成分の増強にアミノ酸ハイブリッド型食塩は寄与しないことが明らかとなった。

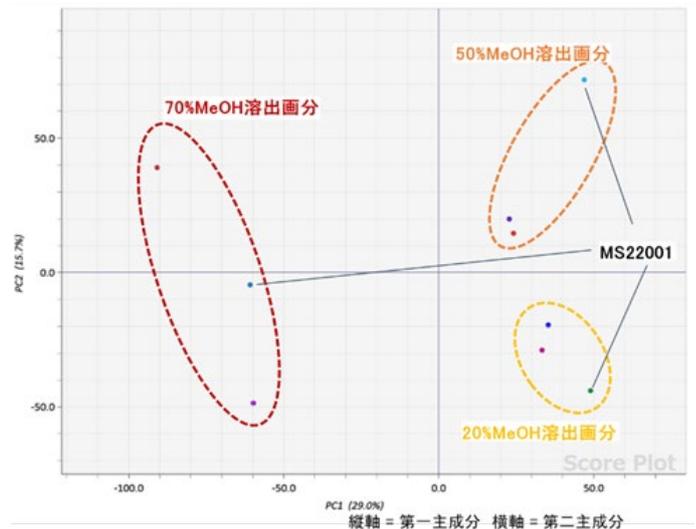


図 5. 味噌サンプルの主成分分析結果

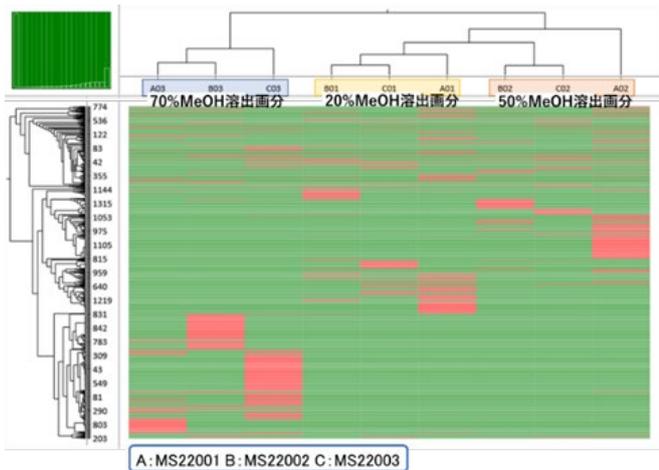


図 6. 味噌サンプルのクラスタリング解析結果

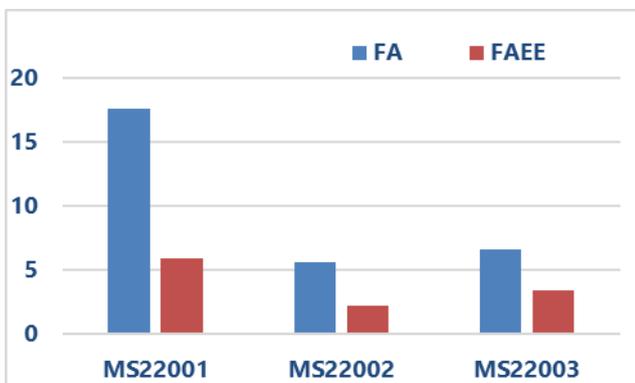


図 7. FA および FAEE の含有量 [µg] (味噌 1 g 中)

3. 2 アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性試験

以前行った米味噌に含まれる ACE 阻害成分と同じ試験方法により、麦味噌サンプルから調製した各画分について ACE 阻害活性を調べたところ、いずれの画分も低濃度では阻害活性を示さず、精製塩を使用して製造した味噌サンプルの 20% 溶出画分 (MS22001-2) のみに弱い活性 (IC_{50} 0.5 mg/mL) が認められるにとどまった。このことは今回製造した味噌サンプル中に、ACE 阻害活性本体である成分 X が検出限界以下となり、検出されなかった結果とも矛盾しない。

3. 3 ヒストン修飾調節活性試験結果

血管内皮細胞株 EA.hy926 に対する、各味噌サンプル画分のヒストン修飾調節活性試験結果を図 8 に示す。結果はすべてコントロール比として算出され、凡例に示した色分けによりヒートマップを作成し示している。

このヒートマップから、3 番目のヒストンにおける 4 番目のリジン残基に対するモノメチル化修飾 (H3K4me) レベルは、どのサンプルでも抑制されていることや、H3 の 9 番目のリジンのアセチル化修飾 (3K9ac) レベルはサンプル添加によりほとんど変化しないことなどが読み取ることが出来る。対して、H3 の K27 のトリメチル化 (3K27me3) は MS22004 を添加した場合に修飾レベルの比較的強い抑制傾向が確認できる。また H3 の 36 番目リジンのトリメチル化 (3K36me3) は MS22002 の 50% (S22002-3), 70% MeOH 溶出画分 (MS22002-4) において他のサンプルでは見られない修飾レベルの亢進傾向が確認できた。以上のように、弱いながらもヒストン修飾プロファイルの変化が観察された。

しかしながら、ヒストン修飾レベルの変化は 0.9~1.1 倍の範囲にとどまっており、FAEE が HeLa ヒト子宮がん由来細胞株に対して示した H4K5ac レベルの低下のような明瞭な変化は認められなかった。

さらに、発酵食品の機能として腸内環境に与える影響を調べるため、ヒト結腸がん由来細胞株である CACO-2 に対して、同じ味噌サンプル画分を投与してヒストン修飾変化を評価したところ、EA.hy926 細胞株の時よりもより明瞭なヒストン修飾レベルの変化が認められた (ヒストン修飾レベルの変化は 0.6~1.4 倍, 図 9)。

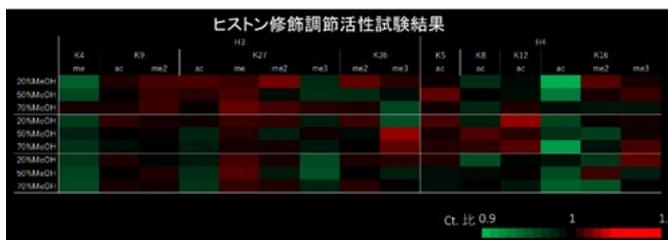


図 8. 味噌サンプルのヒストン修飾調節活性試験結果

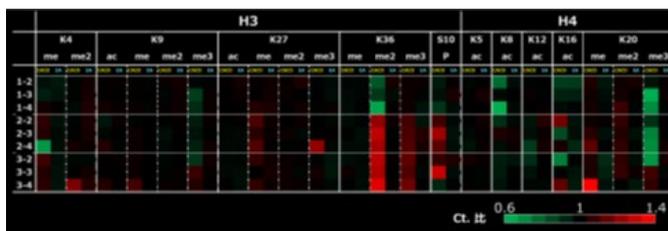


図 9. ヒストン修飾調節活性試験結果の比較 (左: CACO-2, 右: EA.hy926)

強い変化が見られた H3K10 のリン酸化や、H3K36、H4K20のメチル化について、複数回の追試を行ったところ再現性がうまく取れなかった。これらの修飾は細胞周期や、伝子の転写・修復にかかわることが知られており、特にがん細胞では細胞周期や外部刺激の影響を受けやすい修飾であるため大きな変化が生じた可能性も考えられた。

3. 4 蛍光色素と抗体の組み合わせの検討

活性試験で用いる 24 種類のヒストン修飾抗体と蛍光色素の組み合わせを検討した結果、現時点ではセルアナライザーでは同時に 8 色の色素を区別するのが、最も効率的であると判断し、下の表 2 に示すような抗体と色素の組み合わせを決定した。

3. 5 セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験の検証結果

セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験を行い、TSA による HeLa 細胞のヒストン修飾レベルの評価を行った結果を図 10(上段-FCM)に、蛍光顕微鏡を用いたヒストン修飾調節活性試験を行った結果を図 10(下段-顕微鏡)に示す。蛍光顕微鏡での評価では H3K18ac や H4K12ac, H4K16ac などのアセチル化レベルを亢進する活性が認められた。顕微鏡下でも同様にそれらのアセチル化レベルを亢進する傾向が示されている。一方、H3K4me や H3S10P などのヒストン修飾に関しては両者で異なる評価結果となった。

また、抗体-抗原反応の確認のため共焦点顕微鏡を用いて蛍光標識した各抗体の細胞内局在の確認を行った結果、24 種類の抗体のうち 17 種類の抗体で核のみの染色が確認できた。残りの 7 種類の抗体については細胞質でも染色が見られ、結合させる色素の種類によっては抗体-色素反応時に特異性が低下することが示唆された。

表 2 マルチカラー染色パネル

| Set1 | | Set2 | | Set3 | |
|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| 抗体 | 色素 | 抗体 | 色素 | 抗体 | 色素 |
| H3K27ac | AF405 | H4K16ac | AF405 | H3S10P | AF405 |
| H3K27me3 | AF700 | H4K5ac | PacO | H4K12ac | AF532 |
| H3K27me2 | AF633 | H3K36me3 | AF700 | H3K18ac | PacO |
| H3K9me3 | AF660 | H3K4me | AF633 | H4K8ac | AF633 |
| H3K27me | AF532 | H3K36me2 | AF660 | H4K20me2 | AF700 |
| H3K9me2 | PacO | H3K4me3 | AF532 | H4K20me | AF660 |
| H3K9me3 | AF660 | H3K4me | AF633 | H4K8ac | AF633 |
| H3K9ac | AF488 | H3K4me2 | AF488 | H4K20me3 | AF488 |
| H3K27me | AF532 | H3K36me2 | AF660 | H4K20me2 | AF700 |
| H3K9me | AF647 | H3K36me | AF647 | H4K20ac | AF647 |

(8 抗体×3 セット)

4. 考察

4. 1 味噌の生物活性ならびに含有成分の変化

LC-MS 分析データの主成分解析の結果より、20% MeOH 溶出画分と 50% MeOH 溶出画分では精製塩+ハイブリッド型食塩混合サンプルとハイブリッド型食塩サンプルの含有成分の高い類似度が示された。一方、機能成分が多く含まれると期待される 70% MeOH 溶出画分では、サンプル間で特有の成分にばらつきが認められた。このことは原材料として用いる塩の種類によっては、味噌の機能性が変化する可能性があることを示唆している。

階層クラスタリング解析の結果においては、混合塩サンプルにはハイブリッド型食塩サンプルとの共通成分が認められるが、混合塩サンプル特有の成分も確認することが出来る。これは味噌を仕込む際に使用した塩の量や塩中に含まれるアミノ酸等の成分の変化により発酵過程の微生物の働きに影響が出たことによるものであると考えられる。

また、ヒストン修飾調節活性試験の結果から、精製塩とアミノ酸ハイブリッド型食塩を用いて作製した味噌サンプルの、EA.hy926 血管内皮細胞株へ与えるエピジェネティックな影響の違いを弱いながらも確認することが出来た。特に、H3K36me3 や H3K27ac などはサンプルによって修飾レベルの変化が異なっており、これは LC-MS の分析結果と併せて味噌サンプル中の機能性成分の含有量の違いによるものと推察できるため、今後活性本体の同定を行いたいと考えている。

H3K27ac は転写活性化ヒストンマークとして知られている。これまでには、血管新生を促進させる働きのある酵素 NOX4

| Set1 | | | | | | | | | |
|-------------|-----|---------|---------|--------|---------|----------|--------|---------|----------|
| 抗体-色素 | 抗体 | H3K27ac | H3K9me2 | H3K9ac | H3K27me | H3K27me2 | H3K9me | H3K9me3 | H3K27me3 |
| Ct 比 | FCM | AF405 | PacO | AF488 | AF532 | AF633 | AF647 | AF660 | AF700 |
| (100nM TSA) | 顕微鏡 | | | | | | | | |

| Set2 | | | | | | | | | |
|-------------|-----|---------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|----------|
| 抗体-色素 | 抗体 | H4K16ac | H4K5ac | H3K4me2 | H3K4me3 | H3K4me | H3K36me | H3K36me2 | H3K36me3 |
| Ct 比 | FCM | AF405 | PacO | AF488 | AF532 | AF633 | AF647 | AF660 | AF700 |
| (100nM TSA) | 顕微鏡 | | | | | | | | |

| Set3 | | | | | | | | | |
|-------------|-----|--------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|----------|
| 抗体-色素 | 抗体 | H3S10P | H3K18ac | H4K20me3 | H4K12ac | H4K8ac | H4K20ac | H4K20me | H4K20me2 |
| Ct 比 | FCM | AF405 | PacO | AF488 | AF532 | AF633 | AF647 | AF660 | AF700 |
| (100nM TSA) | 顕微鏡 | | | | | | | | |

図 10. セルアナライザーと顕微鏡によるヒストン修飾調節活性試験結果の比較

の血管内皮細胞中での転写制御に H3K27ac が関与していることが報告されている¹⁾。このことから、アミノ酸ハイブリッド型食塩を用いて作製した味噌は血管内皮細胞の機能を調節する生物活性化合物を含有している可能性が考えられる。

CACO-2 細胞におけるヒストン修飾変化は EA.hy926 細胞における変化よりもより明確な変化が認められた。しかしながら再現性の問題があった。おそらく細胞分裂が盛んながん細胞では、細胞周期に伴うエピゲノミックな変化の影響を強く受けるため、ヒストン修飾変化にばらつきが生じている可能性が考えられた。そこで、セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験において、各細胞の周期ごとにゲートをかけて、同じ周期にある細胞間でヒストン修飾の変化を観察できれば、味噌成分によるヒストン修飾への影響を再現性良く検出できると考えて、その実験準備を行っている。

4.2 多種類ヒストン修飾レベル同時検出アッセイの構築

セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験結果は、顕微鏡による活性試験結果との比較において一部異なる結果となった。これに関しては2つの要因が考えられる。

① 多重免疫染色による抗体の競合

蛍光顕微鏡を用いたヒストン修飾調節活性試験では3種類の蛍光標識抗体を用いて染色するのに対し、多種類ヒストン修飾レベル同時検出アッセイでは8種類の蛍光標識抗体を同時に使用して免疫染色を行っている。抗原が近傍の修飾であった場合、ヒストン修飾抗体の反応性に影響を与えるという報告があることから²⁾、多重免疫染色を行った場合ヒストン修飾抗体同士での干渉が起き、その干渉が活性評価の結果に影響を及ぼした可能性が考えられる。

② 色素同士のスペクトルの近接や蛍光強度の違い

本アッセイのデザインにおいては「抗原量×色素輝度」がなるべく近くなるよう抗体に色素を割り当てているが、「抗原量×色素輝度」にはどうしても差が出ており、一部の抗体間では2倍以上の差が生じている。この値の差により評価結果に影響が出ているのではないかと考えられる。

これら2つの可能性を検証するため、セルアナライザーを用いて単一蛍光標識抗体で免疫染色した場合と複数抗体を用いて免疫染色した場合をそれぞれ評価し、その結果の違いが生じるかどうかで確認できると考える。どちらの要因も使用する抗体と色素の組み合わせに起因するものであるため、それらをデザインしなおす必要性も考えられる。

5. 今後の課題

味噌サンプルに関しては LC-MS 分析によるメタボローム解析とヒストン修飾活性試験を行いプロファイリングの変化に関して解析した。現状では実際に変化した化合物の情報を得ることが出来ていない。そこで、より高精度な LC-MSMS (Thermo Fisher Scientific, orbitrap 2023 年度末に共通機器として導入済)でのデータ取得と解析を行いたいと考える。

セルアナライザーを用いたヒストン修飾調節活性試験に関しては現在8種類のヒストン修飾の同時検出までが可能になっている。今後は抗体と色素の調整を行うことでさらに多色での同時解析を目指していきたい。本試験では各ヒストン修飾に対するモノクローナル抗体を用いているため、ChIP シーケンス解析を行えば、注目するヒストン修飾の制御下にある遺伝子発現を明らかにすることも可能であり、発酵食品の機能性をより深く理解することができると期待される。

本試験法での多種類ヒストン修飾レベル同時解析により、ヒストン修飾間の関連性を俯瞰的に解析可能となるアッセイ系の構築し、発酵食品を含めた様々なサンプルの機能性を探っていきたい。

6. 文献

1. Siuda, D.; Zechner, U.; El Hajj, N. et al. Transcriptional regulation of Nox4 by histone deacetylases in human endothelial cells. *Basic Res. Cardiol.* 2012, 107, 283.
2. Hayashi-Takanaka, Y.; Yamagata, K.; Nozaki, N.; Kimura, H. Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J. Cell Biol.* 2009, 187, 781-790.

Effect of Amino Acid Hybrid Type Salt on Composition and Biological Activity Profile of Fermented Foods

Yoichi Nakao¹, Koshi Machida¹, Rie Kamidaira², Fumiaki Nakamura¹

¹ School of Science and Engineering, Waseda University,

² School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

Summary

In Japan, where an estimated 40 million people suffer from hypertension including latent patients, excessive salt intake is a major health concern directly related to health risk. As the awareness that "Japanese people should reduce salt intake because they consume too much salt" has spread widely throughout society, many health-conscious households have begun to avoid high-sodium fermented foods, which has become a major issue for the future of the fermented food.

On the other hand, too much salt reduction is inconsistent with the enjoyment of food, as it leads to less flavor. Against this backdrop, we have developed an amino acid hybrid type salt that can reduce NaCl by 25% without compromising on taste, using seabed spring water. We intend to apply this amino acid hybrid type salt, which is tasty and low in NaCl, as an ingredient in various fermented foods to help develop fermented foods that can be enjoyed by people who are concerned about NaCl intake. Therefore, the objective of this study was to clarify the effects of amino acid hybrid type salt on fermented foods by evaluating metabolite and biological activity profiles, and to obtain information that will lead to the development of fermented foods that can be consumed without concern for salt content.

In this study, miso was produced using purified salt, amino acid hybrid type salt, and purified salt + amino acid hybrid type salt, and the metabolite profiles of the metabolites in each miso obtained were compared, confirming the findings of previous studies that the metabolite profiles of miso differ greatly depending on the salt used. In addition, we conducted metabolome analysis to examine changes in the content of anti-stress components and angiotensin-converting enzyme (ACE: enzyme responsible for hypertension) inhibitory active components contained in miso, which we have discovered in our previous research.

Furthermore, to gain insight into the functionality of the miso produced as described above, we fractionated each miso extract and examined the profile of changes in histone modifications.

These results suggest that changing the salt used causes changes in the profiles of components and activities in miso. In the future, we will continue to purify and identify the components that cause these changes and attempt to elucidate the new functionality of miso.