

乾燥米麹を用いた正常ヒト成人皮膚線維芽細胞に対する影響とメタボローム解析による麹菌生成物の比較

神戸女学院大学大学院 人間科学研究科
博士前期課程 1 年 加藤 愛望

1. はじめに

麹菌はアスペルギルス属に属する微生物であり、2006年に日本醸造会に「国菌」として認定された発酵食品製造に用いられる糸状菌の総称である。麹菌は多種存在するが、わが国では黄麹菌、白麹菌、黒麹菌の3種類が主に用いられている。近年、麹菌による発酵食品の機能性に注目が高まっており、麹菌を利用した食品や麹菌そのものの薬理作用について盛んに研究されている。麹菌を利用した食品の研究として、米麹発酵改良による抗酸化性の向上^[1]、高脂肪飼料誘導マウスの抗肥満効果^[2]、米麹甘酒の摂取による食後の血糖値およびインスリン値の上昇抑制^[3]などの報告があり、多くの機能性が見出されている。しかし、機能性成分と皮膚への影響の相関を解析した例は少ない。本研究では、菌株の異なる米麹で機能性成分を一斉分析することで成分の微細な違いを検出し、皮膚細胞に対する影響との相関を解析することで、麹菌が皮膚に与える影響を明らかにすることを目的とし、乾燥米麹を用いて正常ヒト成人皮膚線維芽細胞に対する影響とメタボローム解析を実施した。

2. 材料および方法

まず、清酒、味噌、醤油などの製造に用いられ、黄麹菌（学名：*Aspergillus oryzae*）4種、及び泡盛の製造に用いられ、クエン酸を作り出す特徴を持つ黒麹菌（学名：*Aspergillus luchuensis*）3種を、酒米（五百万石）にて製麹した。作製した米麹を凍結乾燥させ、試料とした。

3. メタボローム解析による麹菌生成物の比較

3.1 サンプル調整

試料をステンレスビーズ（φ 5 mm/バイオメディカルサイエンス製）でビーズ式破碎装置（ShakeMaster® SHAKE MASTER, ver. 1.2/バイオメディカルサイエンス製/BMS-12）にて20分間破碎し、15mLファルコンチューブに集めた。集めた粉末をボルテックスミキサーで攪拌し、2 mLエッペンドルフチューブに100mgずつ秤量した。そこに内部標準（d-カンファール-10-スルホン酸）を加え、ボルテックスで攪拌した。その後、酢酸アンモニウム溶液（pH 7）200 μL、メタノール400 μL、クロロホルム400 μL、Milli-Q 300 μLの順で溶液を加えていき、溶液を加えるたびにボルテックスで攪拌した。その後、遠心分離機で遠心処理（15000rpm, 1分, 4℃）を行った。そこから上澄み800 μL程度とり、遠心をかけ、濃縮したものをサンプルとした。

3.2 メタボローム解析

イオン性成分の分離・検出に優れるキャピラリー電気泳動—質量分析装置（CE/MS法）を用いて、機能性成分を一斉分析し、菌株の異なる米麹でイオン性代謝物をターゲットとした分析を実施した。得られた結果は統計解析を実施した。

4. 乾燥米麹を用いた正常ヒト成人皮膚線維芽細胞に対する影響

4.1 サンプル調整

黄麹と黒麹それぞれ蒸留水を用いて10mg/mL、1 mg/mL、0.1mg/mL、0.01mg/mLに希釈したものをサンプルとした。そのサンプルをコントロール（蒸留水のみ）と比較したものを結果とした。

4.2 細胞培養法

以下の操作はすべてクリーンベンチ内で行っ

た。正常ヒト成人皮膚線維芽細胞は、10% FBSを含むRPMI-1640を用いて100mLディッシュ(3020-100/IWAKI 社)に細胞を全量播種し、37℃ - 5 %CO₂ 下で3日間インキュベートした。その後、培養した細胞を96well プレートに100 μ Lずつ播種し、3時間インキュベートした。3時間後、培地を取り除き、2 % FBSを含むRPMI-1640 100 μ Lに対してサンプルを10 μ L加えた培地に交換し、3日間インキュベートした。96well プレートに播種してから3日後、培地を吸引し、10% FBSを含むRPMI-1640で2回洗浄後、WST-1を10 μ L加えた培地を100 μ L加え、2時間インキュベートし、1時間後と2時間後に、吸光度計(Multiskan FC/Thermo Scientific社) 450nmで測定を行い、測定した吸光度から細胞の増殖率を求めた。

5. 結果及び考察

メタボローム解析においては、黄麹においてはGABA、リジン、チロシン、コウジ酸で増加が見られ、黒麹菌においてはリジン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸などで増加が見られた。このことから、黄麹と黒麹において、発酵によって多く生成された機能性アミノ酸成分に違いが見られ、元となるタンパク質や糖質から麹菌の代謝により米の成分が変化した可能性が示唆された。

正常ヒト成人皮膚線維芽細胞において、コントロールと比較して、黄麹と黒麹ともに1 mg/mL、0.1mg/mLで有意差のある増殖が見られた。(図1) また、黄麹と黒麹を比較して、黒麹の方が増殖率が高かった。この結果から、どちらにも線維芽細胞を増殖させる機能が見られ、黄麹に比べ黒麹の方が線維芽細胞への細胞増殖効果が高いことが示唆された。

6. 引用文献

Gow-Chin Yen, Yung-Ch Chang, Sheu-Wen Su, (2003) "Antioxidant activity and active

compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*" Food Chemistry, Vol83, 49-54

小島正明, 落俊行, 明尾一美, 田内遊, 大谷元, (2009) "米麹による食塩無添加大豆発酵粉末の高脂肪飼料誘導肥満マウスに対する抗肥満効果", 日本栄養・食糧学会誌, Vol.62, No.4, pp.171-178

倉橋敦, 中村彩奈, 小黒芳史, 渡辺賢一, 尾崎信紘, 後藤博, 平山匡男 (2020): 麹甘酒は健常者の食後血糖およびインスリンの上昇を抑制する有用成分を含有する, 日本醸造協会誌, Vol. 115, No. 1, pp.43-53