

紅麴菌が生産する赤色色素の成分分析

三宅剛史、張明永*、産本弘之

Tsuyoshi MIYAKE, Mingyong ZHANG, Hiroyuki SAMMOTO

キーワード 紅麴菌 / 赤色色素 / LC-MS

KEY WORDS *Monascus* / Red pigments / LC-MS

1 はじめに

紅麴菌はその名の通り、赤色の色素を生産し、古くから東南アジアを中心に様々な発酵食品の原料や天然色素として利用されてきた。さらに近年の研究により、この赤色色素が、抗菌、抗ガンなどの生理活性を示すことが明らかになってきたことで、その特定成分の同定と寄与を明らかにしていくことが重要になってきている。この赤色色素は、アザフィロン系色素(赤色、黄色、紫色)の混合物であり、現在までに少なくとも11種類の特定成分の構造式が明らかにされている(表1)。しかしながら、実際には、これらの各成分がアミノ酸や糖などの付加体として存在することが多く知られており、こうした種類や誘導体の多様性から、各成分に対する有効な分析手段はほとんど確立されていない。そこで、本研究では液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた赤色色素成分の分析を試みた。

表1 紅麴菌が生産する色素成分

成分	分子式	分子量	生理活性
赤色系			
Rubropunctatin (rR)	(C21H22O5)	354.40	
Monascorubrin (rM)	(C23H26O5)	382.46	発ガンプロモーター抑制
紫色系			
Rubropunctamine (pR)	(C21H23NO4)	353.42	発ガンプロモーター抑制
Monascorubramine (pM)	(C23H27NO4)	381.47	
黄色系			
Monascin (yM)	(C21H26O5)	358.43	発ガンイニシエーション抑制
Ankaflavin (yA)	(C23H30O5)	386.49	
Xanthomonascin A (yXa)	(C20H22O7)	374.39	
Xanthomonascin B (yXb)	(C22H26O7)	402.44	
Monascopyridine A (yMa)	(C21H25NO4)	355.43	
Monascopyridine B (yMb)	(C23H29NO4)	383.49	
Yellow II (yY2)	(C23H28O5)	384.47	

2 方法

2.1 菌株と培養方法

Monascus pilosus IF04520 株、*Monascus purpureus* IF04478 株、*Monascus purpureus* SM050

株をそれぞれPDA培地で30℃、10日間培養後、0.9% NaClと0.2% Tween 80を含む溶液で孢子懸濁液を調製し、 $\sim 10^7$ 個の孢子を含む懸濁液0.2mlを75mlのPD培地、GSP培地(7% glycerol, 3% glucose, 3% soybean meal, 0.8% peptone, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% $NaNO_3$)、MSG培地(2% glucose, 0.5% monosodium glutamate(MSG), 0.24% K_2HPO_4 , 0.24% KH_2PO_4 , 0.05% KCl, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0003% $MnSO_4 \cdot H_2O$)に接種し、25℃、14日間、120rpmで振とう培養を行った。

2.2 試料の調製

培養後、菌体と培養液をNo. 5Cのろ紙(アドバンテック東洋(株))で分離し、菌体の湿重量を測定した。得られた菌体1g(湿重量)に20mlの60%エタノールを加え、25℃で24時間保温し、菌体抽出液とした。培養液と菌体抽出液は、フィルター(0.45 μ m)ろ過後分析に供した。なお、市販のベニコウジ色素(関東化学(株))もエタノールに溶解して分析に供した。

2.3 赤色色素の分析

赤色色素の生産は、490nm(赤色系)と380nm(黄色系)における吸光度(U)で評価した。赤色色素の成分分析は、LC-MSを用いて次の条件で行った。液体クロマトグラフ(LC)は、Agilent 1100 systemを用い、カラム: COSMOSIL 5C18-MS (4.6 \times 150 mm)、移動相: 60%アセトニトリル(0.1%ギ酸)から100%(20分)のリニアグラジエント、流速: 0.5 ml/分、カラム温度: 40℃、注入量: 10 μ lの各条件で、質量分析(MS)はJEOL社製のJMS-T100LCを用い、イオン化モード: ESI+、ニードル電圧: 2000V、オリフィス1電圧: 70V、オリフィス2電圧: 5V、リングレンズ電圧: 10V、脱溶媒温度: 250℃、分析時間: 20分の各条件で行った。

3 結果と考察

3.1 赤色色素成分の同定とその局在性

* 独立行政法人日本学術振興会(JSPS)

赤色色素が生産された紅麴菌培養液を用いて、構造式が明らかになっている 11 種類の成分について、その生成が推定される水素付加イオンの同定を行ったところ、図 1a に示すとおり、それぞれの成分を同定することができた。しかしながら、これまでに報告のあるようなアミノ酸や糖などの付加体由来すると思われる生成イオンの同定は、チャートと検出イオンの複雑さから困難であった。そして興味深いことに、当初は、各成分の MS 測定による同定は、吸光測定 (490nm もしくは 380nm) による検出ピークとよく一致するものと予想していたが、実際には、大きく異なっており、むしろ吸光測定における微小ピークの多くが、各成分として同定された (図 1bc)。なお、吸光測定において、メジャーなピークとして検出された多くの成分 (ないしは構造体) は、今回の分析では赤色色素の各成分として同定できなかったものの、その吸光スペクトルから赤色の色調に寄与していることが示唆された。従って今後は、これらの成分の同定を行っていく必要があると考えている。また、この傾向は菌体抽出液およびベニコウジ色素でも同様であった。

さらに、培養液と菌体抽出液に含まれている各成分含量の比較を行ったところ、菌種や培養基質によらず、成分の構造特性 (疎水および親水性) に由来すると考えられる、若干の局在 (細胞内外) 選択性が見られた (図 1a にその概要を付記する)。

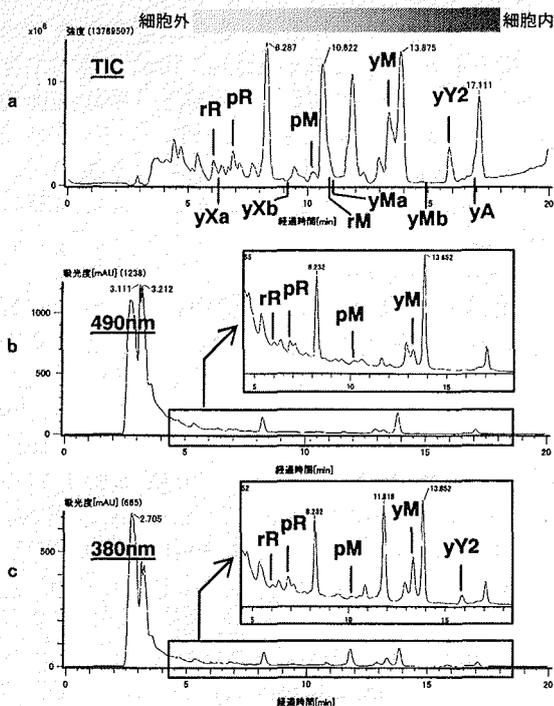


図1 赤色色素成分のMSおよび吸光分析

3.2 菌種や培養基質による赤色色素成分の生産性の違い

3種類の紅麴菌のPD培地培養液を用いて、上記

で同定された 11 種類の赤色色素成分の生産性を比較したところ、菌種により、これらの各成分の生産性が大きく異なることが判った (図 2)。また、培養基質による各成分の生産性を調べたところ、一つに窒素源の違いによる選択性が見られ、比較的、赤色系の成分 (特に rR) の生産が、ペプトン (複数のアミノ酸を含む) によるのに対し、黄色系の成分の生産がグルタミン酸ナトリウム (特定アミノ酸) によることなどが判った (図 3)。

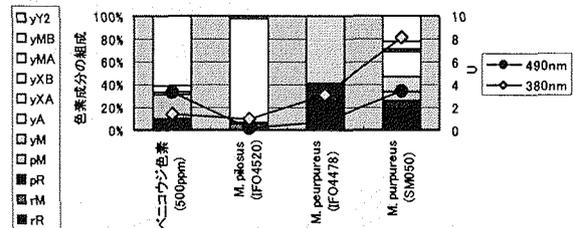


図2 菌種による赤色色素成分の生産性の違い

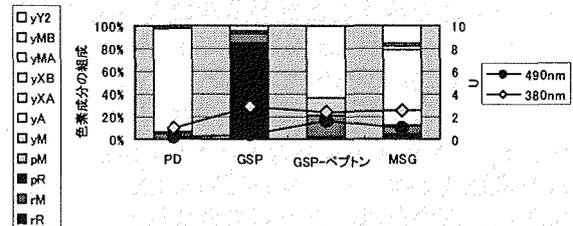


図3 培養基質による赤色色素成分の生産性の違い

4 まとめ

LC-MS を用いた成分分析により、紅麴菌培養液中に、これまで報告のある 11 種類の赤色色素成分の水素付加イオンの同定を行うことができた。しかしながら同時に、赤色の色調に寄与していると思われる成分 (構造体) が、この 11 種類以外にも多く存在していることも示唆されたため、今後の成分分析と同定が重要になると考えられる。また、赤色色素各成分の生産および含有組成は、紅麴菌種、培養基質、調製法などにより大きく異なることも明らかになった。紅麴菌赤色色素の持つ、抗菌や抗ガンなどの興味深い生理活性がこうした各成分によっていると考えられることから、今後、赤色色素の各成分それぞれに対する生産制御が重要になってくると考えられる。