

塩ストレス条件下で発芽させた大豆の血圧上昇抑制物質「ニコチアナミン」の合成酵素の特性解明と応用に関する研究

金内 誠

宮城大学大学院食産業学研究科

概要 大豆を発芽させることで、血圧上昇抑制効果を持つニコチアナミンを増加させ、食品へ応用することができると考えられる。ニコチアナミンは methionineadenosyl transferase (MAT) と nicotianamine synthase (NAS) によって生成される。まず、MAT によってメチオニンと ATP から S-アデノシルメチオニン (SAM) が生成される。ついで NAS によって SAM からニコチアナミンが生成される。そこで、塩水下の高ストレス条件下で発芽させた大豆の MAT 活性の消長について検討した。大豆は、次亜塩素酸ナトリウム溶液にて殺菌後、蒸留水及び 0.5~10.0% 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液への浸漬、水切り、再浸漬を繰り返し、発芽大豆とした。幼芽は、ノグスによって測定した。また、発芽大豆は、蒸留水と共にホモジナイザー処理した。その後、ろ過・遠心分離で、得られた上清をサンプル溶液・粗酵素液とした。SAM・ニコチアナミン・メチオニンの測定は、4000 Q TRAP LC/MS/MS システムを用い、測定した。MAT の測定は、粗酵素液を ATP-メチオニン溶液に添加し、37°C、10-120 分反応させた。反応停止後、残存した ATP 量を測定した。1U の MAT 活性は、1 分間に SAM 生成時に反応した ATP の mM とした。

大豆は、蒸留水にて、幼根がよく伸長した。しかし、NaCl 溶液では、幼芽が短くなった。10%以上では発芽しなかった。蒸留水発芽大豆中のニコチアナミン量は 5.9 (mg/100 g) で、5% NaCl 水溶液で発芽させたものでは 42.9 (mg/100 g) と高濃度で、NaCl ストレスによってニコチアナミンが生産されたと考えられた。粗酵素液を ATP と L-メチオニンを作用させたところ、ATP とメチオニンは消費され、SAM は生産され、遅れてニコチアナミンが生成された。発芽中の大豆において MAT 活性は、5% NaCl 水溶液で発芽させたものが高く、経過日数とともに減少した。また、MAT 活性が高い 5% NaCl 条件では、メチオニンは減少した。3% 塩化ナトリウム水溶液で 3 日間発芽させたものは、MAT 活性が低く、メチオニンは高い傾向があった。MAT 活性は、基質となるメチオニンと ATP、さらに生成物の SAM に関係するばかりではなく、SAM から生成するニコチアナミン量にも関与することが考えられた。

1. 研究目的

大豆は、豊富なタンパク質や脂質を含み栄養価が高いことが知られている¹⁾。さらに脂質代謝改善やイソフラボンのエストロゲン様活性効果などの健康機能改善効果も報告され、それら関連食品の開発も行われている²⁾。

これら大豆を含む植物種子は発芽過程において物質や酵素の合成や蓄積、分解機能が活性化され、生産される様々な酵素が物質変換を触媒する。特に大豆などの豆類は発芽時のストレス応答が顕著であり、ストレス応答として機能物質を生成することが知られている。片桐ら³⁾は大

豆を二酸化炭素下で発芽させることにより、GABA の蓄積量が二酸化炭素処理前の 6~14 倍に増加したと報告している。さらに、GABA 含量の多い大豆もやしを低温 (5°C) かつ、脱酸素空気中で保蔵することにより、その低下を防ぐことができることも報告している。また、伊藤ら⁴⁾は大豆種子に塩ストレスを与えたところ、植物中の機能性物質の生産が促進され、子葉中の GABA やプロリン、アラニンの含有量が増加したと報告した。

金内⁵⁾は、これまで塩化ナトリウムによる浸透圧ストレス条件下で発芽させることで、大豆種子内の遊離アミノ酸

量・遊離ペプチド(ホルモール窒素量)が増加することを報告した。また、ACE 阻害活性や遊離グルタミン酸から脱炭酸反応によって生成される γ アミノ酪酸(GABA)が増加し、タンパク質分解酵素関連物質が増加することも報告した。さらに、種子内の酵素は高活性化し、ニコチアナミンが発芽前より 17-34%以上増加することを明らかにした。このように食塩ストレスで、機能性物質を高生産することが可能であることが示唆された。

ニコチアナミンとはムギネ酸合成の中間物質の一つで植物に存在する物質である⁶⁾。また、食品において、高いキレート作用を示すことにより、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素の阻害活性を示す物質である⁷⁾。この生成には、nicotianamine synthase (NAS; EC.2.5.1.43) によって S-アデノシルメチオニン(SAM)を基質として生合成される⁸⁾。また、SAM は methionineadenosyl transferase (MAT; EC 2.5.1.6)によってメチオニンと ATP によって生合成される⁹⁾。よって、発芽大豆の2つの酵素活性をモニターすることで、ニコチアナミンを高含有する大豆発芽食品を得ることができると考えられる。

本研究では、加塩ストレス化で発芽工程を行うことで、高発現すると考えられるニコチアナミンの生成に関する酵素類について明らかにし、ニコチアナミン高生産法を開発することを目的とする。そのために、まず大豆を塩水下の高ストレス条件下で発芽させ、SAM とニコチアナミン量について検討した。さらに合成酵素類の一つである MAT の測定法や活性の消長について検討し、ニコチアナミン高含有食品開発を目指す。

2. 研究方法

2.1 供試試料

主要国産大豆品(平成29年度産)を用いた。

2.2 発芽方法

大豆種子の発芽は金内¹⁰⁾に従い、Fig. 1 に示す方法によった。すなわち、乾燥大豆(100 g)を25°Cで30分間、1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌した。その後、水洗し、水及び 0.5%~10.0%塩化ナトリウム水溶液(300 mL)に8時間浸漬した。その後、16時間水切りし、再度塩化ナトリウム溶液に24時間浸漬して得られたものを発芽大豆とした。殺菌後からの経過時間で示した(Fig. 1)。

2.3 幼芽の伸長の測定

発芽させた大豆を無作為に10粒選び出し、伸長した幼芽の長さをノギスによって測定した。

2.4 サンプル溶液・粗酵素試料の調製方法

発芽させた大豆種子 10 gを精秤し、蒸留水 30 mlを加えてホモジナイザー(SMT社)で5分間ホモジナイズした。その後、濾紙(ADVANTEC社)を用いて濾過を行い、蒸留水で100 mlに定容した。さらに、遠心分離(13,000×g, 10分間)し、得られた上清をサンプル溶液とした。

2.5 SAM およびメチオニン、ニコチアナミンの測定

SAM およびメチオニン、ニコチアナミンの測定は山口¹¹⁾を一部改変した。標品として SAM(Sigma-Aldrich)およびメチオニン(富士フィルム和光純薬)、ニコチアナミン(Toronto Research Chemicals Inc)を用いた。高速液体クロマトグラフは Aglient 1200series(アジレント・テクノロジー株式会社)、質量分析計は 4000 Q TRAP LC/MS/MS System(AB SCIEX社)を用いた。測定条件を Table 1 に示した。

2.6 Methionineadenosyl transferase (MAT) の測定

100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に、溶解させた 50 mM ATP- 20 mM methionine 溶液(300 μ L)に、200 μ L の粗酵素液を添加し、37°C、10-120分反応させた。反応後、100 μ L の 1M HClを添加し、30分間放置した。その後、100 μ L の 1M NaOHにて中和後、残存した ATP 量を測定した。ATP は ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(Catalog # K354-100, Bio Vision Inc.)によって測定した。1UのMAT活性は、1分間にS-アデノシルメチオニン(SAM)生成時に反応したATPのmMとした。

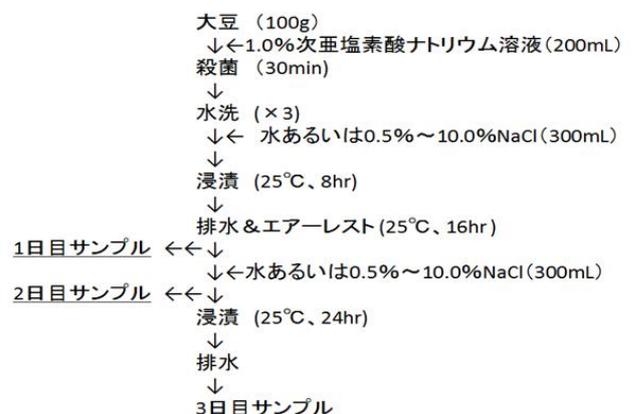


Fig. 1 大豆の発芽法

Table 1 LC-MS/MS測定条件

Column	Sun Fire C18 3.5 μ m (4.6 \times 150mm)
Mobile phase	A: 0.01% (v/v) Acetic acid B: 150mM Ammonium acetate - D.W./Acetonitrile (30:70)
Gradient	0-25 min B: 0-100% 25-40 min B: 100% 40-45 min B: 0%
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	30 $^{\circ}$ C
Injection volume	5 μ L
Ionization mode	ESI (+)
Acquisition mode	MRM (MS/MS)
Curtain Gas (CUR)	20
Collision Gas (CAD)	8
IonSpray Voltage (IS)	5500
Temperature (TEM)	500
Ion Source Gas1 (GS1)	80
Ion Source Gas2 (GS2)	40

3. 研究結果

3.1 発芽時の幼芽の伸長

大豆の発芽を行い幼芽の長さを測定した (Fig. 2)。その結果、発芽によって幼芽は長かったものは、0%塩化ナトリウム(蒸留水)に浸漬させたもので、1日目では1.3 cm、2日目では2.1 cm、3日目では2.22 cmであった。ついで、1%塩化ナトリウムに浸漬させたものは、1日目では0.8 cm、2日目では1.2 cm、3日目では1.4 cmであった。また、3%塩化ナトリウムに浸漬させたものは、1日目では0.5 cm、2~3日目では0.7 cmであった。5%塩化ナトリウムに浸漬させたものでは1日目では0.5 cm、2~3日目では0.6 cmであった。10%では、3日目で、0.4 cmであった。また、10%以上の塩化ナトリウム濃度では、発芽による幼芽の伸長が認められなかった。よって、10%以下の塩水で、発芽3日目で、酵素生産すると考えられた。

これは、金内ら¹⁰⁾が3日目(72時間)でプロテアーゼ生産が最大になるとの報告と一致した。プロテアーゼの分解により、生育に必要な栄養が供給され、伸長が促進したと考えられた。また、ニコチアナミンの最大となる日数は、発芽後3日となったので、塩化ナトリウム濃度の異なる溶液を用い、3日間発芽させた大豆サンプルを用いてニコチアナミン生成量について検討した。ニコチアナミンの生成量は、Fig. 3に示した。

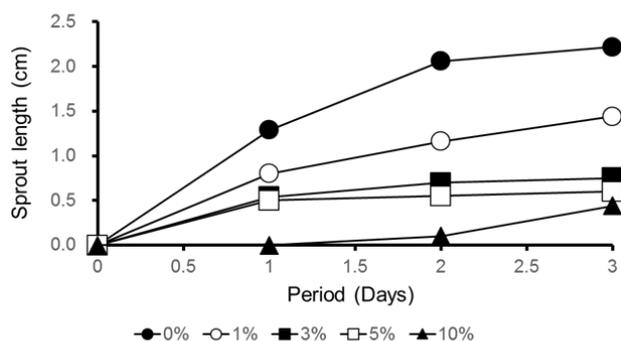


Fig. 2 発芽時の幼芽の長さ測定

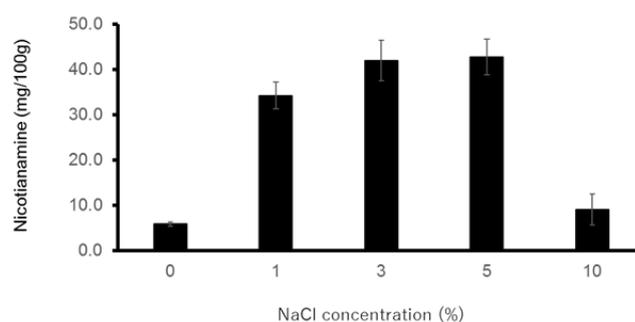


Fig. 3 発芽大豆中のニコチアナミン量

蒸留水で生育・幼芽の伸長は良いものであったが、ニコチアナミン量は 5.9 (mg/100 g)であった。また 1%では 34.3 (mg/100 g)、3%では 42.1 (mg/100 g)、3%では 42.9 (mg/100 g)であった。また、10%では 9.1 (mg/100 g)であり、10%以下の塩化ナトリウム水での発芽によってニコチアナミンが生産されたと考えられた。これはニコチアナミン生産にかかわる酵素 MAT と NAS の両酵素が生産されたことが考えられた。さらに、プロテアーゼの生産によって貯蔵タンパク質基質からメチオニンが遊離し、代謝によりニコチアナミンが生産されたと考えられた。

3.2 Methionineadenosyl transferase (MAT) の測定

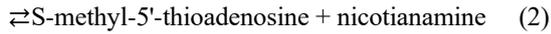
メチオニンからニコチアナミンの生成には2つの酵素が存在する。一つは methionineadenosyl transferase (MAT) の作用であり、

① ATP + L-methionine



また、もう一つは, nicotianamine synthase (NAS) で, S-アデノシルメチオニンを基質とする作用である。

② S-adenosyl-L-methionine



粗酵素液と ATP, ニコチアナミンを作用させた。この時に反応した ATP の減少量を Fig. 4 に示した。

反応 5 分では 3.1 mM, 反応 10 分では 3.6 mM, 20 分では 3.8 mM であり, 10 分まで急激に反応し, その後反応速度は減少した。さらに反応 60 分では 4.49 mM, 反応 120 分では 4.8 mM となった。よって, 反応速度が速い 10 分以下で測定することが適していると考えられた。

つぎに, 粗酵素によるメチオニン, S-アデノシルメチオニン, ニコチアナミンの反応について検討した。結果を Fig. 5 に示した。

反応液中のメチオニンの最終濃度は 4 mM であり, 理論値と一致した。反応が進むとメチオニンが酵素反応で減少した。メチオニンは, (1) 式により, S-アデノシルメチオニンに変換される。S-アデノシルメチオニンは, 10 分で, 最大となり 4 mM であった。それ以降は, 検出限界以下であった。よって, メチオニンを基質とし, S-アデノシルメチオニンへと変換されたと考えられた。さらに, ニコチアナミンは 10 分以降に増加し, 10 分では 1.0 mM, 60 分では 3.3 mM, 180 分では, 4.0 mM となった。これにより 2 種の酵素メチオニンと ATP から S-アデノシルメチオニンを算出する MAT が反応性に富み, 速い速度で反応すると考えられた。一方, NAS の酵素反応時間は, MAT と比べると 6~18 倍の時間を要することが明らかとなった。NAS は, 酵素反応が弱いと考えられた。

このようなことから, 基質として S-アデノシルメチオニン量によって, ニコチアナミンの生産が進むのではないかと考えられた。そこで, 発芽時の MAT 活性について検討した¹²⁾。

一般的に, ニコチンアナミンは, ムギネ酸の中間代謝物質と報告され, イネ科の植物の根から分泌されるファイトシドロフォア (植物性親鉄剤) であり, 鉄 (III) イオンとキレートを形成することによって, 土壌からの鉄の吸収や移動に関与しているとされることが知られる¹³⁾。そのため, これらの酵素の局在として, 発芽時に伸長される幼根に蓄積するといわれる。しかし, 本研究で検討した大豆においては, 胚乳中にも存在し, 酵素の胚乳部に存在した。よって, 植物種による違いなども考えられる。今後はさらに検討する必要が考えられた。

3. 3 発芽中の MAT 活性

発芽中の MAT の酵素活性について検討した (Fig. 6)。

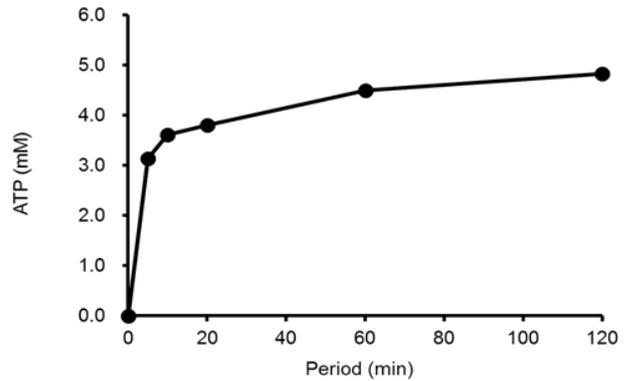


Fig. 4 ATP測定によるmethionineadenosyl transferase活性

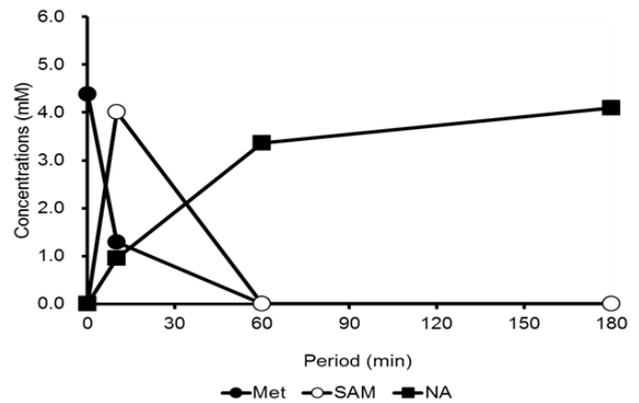


Fig. 5 粗酵素液によるメチオニン、S-アデノシルメチオニン、ニコチアナミン生成量の測定

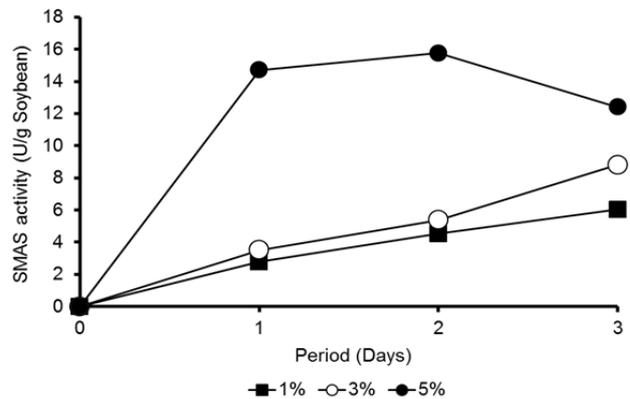


Fig. 6 発芽中のmethionineadenosyl transferase活性

発芽時に浸漬させた塩化ナトリウム水溶液の濃度は、1～5%とした。1%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものの MAT は、1 日目では 2.7 U/g であった。また、2 日目では 4.5 U/g、3 日目では 6.0 U/g であった。次に、3%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものの MAT は、1 日目では 3.5 U/g であった。また、2 日目では 5.4 U/g、3 日目では 6.0 U/g であった。このように 1～3%塩化ナトリウム水溶液中では発芽の経過によって MAT 活性が高まった。また、5%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたものの MAT は、1 日目では 14.7 U/g であった。また、2 日目では 15.7 U/g、3 日目では 12.4 U/g であった。発芽後、1～2 日目で MAT 活性が最大であった。一方、3 日目では活性が減少した。この減少の要因として基質の減少が考えられた。大豆の MAT は、基質と結合し、Fig. 5 に示すように反応速度が速い。そこで、大豆中でも同様に酵素反応が進むと考えられ、基質が少なくなるまで、進行すると考えられる。そこで、これらの基質となる遊離のメチオニン量を測定した。結果を Fig. 7 に示した。

その結果、遊離のメチオニン量は 123 mg/100 g であった。1%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたもののメチオニン量は、1 日目では 21.3 (mg/100 g) であった。2 日目では 70 (mg/100 g)、3 日目では 111.5 (mg/100 g) であった。また、3%塩化ナトリウム水溶液で発芽させたもののメチオニン量は、1 日目では 70.6 (mg/100 g) であった。2 日目では 47.1 (mg/100 g)、3 日目では 322.1 (mg/100 g) であった。3%塩化ナトリウム水溶液で、3 日間発芽させたもののメチオニンは、高い傾向があった。

これまで、金内ら¹⁰⁾は、発芽によってプロテアーゼが生産され、胚乳中の貯蔵タンパク質は分解され、遊離アミノ酸が増加すると報告した。また、発芽時のプロテアーゼについて検討したところ、蒸留水で発芽させるより、食塩(塩化ナトリウム)溶液で発芽させたものが高くなり、可溶性窒素や遊離アミノ酸が増加すると報告した。

しかし、本検討において、遊離メチオニンは減少する条件と増加しない条件が見られた。3%塩化ナトリウム溶液で発芽させたものでは、MAT の活性が低いために、胚乳へ蓄積したと考えられた。5%塩化ナトリウム溶液水溶液中で発芽させたものは、MAT 活性が高いためにメチオニンが消費され、発芽経過日数に伴いメチオニンが減少したと考えられた。また、発芽時の ACE 阻害活性を検討したとこ

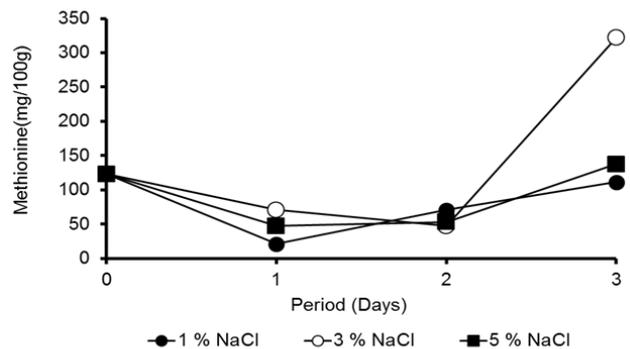


Fig. 7 発芽中のメチオニン量の測定

ろ 2～3 日目では上昇する傾向が見られた(データ未提示)。これらは、金内⁵⁾の報告と同傾向があり、ニコチアナミン生成によって ACE 阻害活性が上昇したと考えられた。

以上のように、発芽時の酵素により機能性物質であるニコチアナミンが上昇することが明らかとなった。特に酵素反応では基質の遊離のメチオニンと酵素である MAT が重要であり、NAMS の基質である S-アデノシルメチオニン生成がニコチアナミン量に関係すると考えられた。

4. 考 察

ニコチアナミンは、血圧上昇抑制に関わる物質であることが知られている。これは、ニコチアナミンが血圧上昇に関わる酵素アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を示すといわれるためである。

食品の ACE 阻害活性について、鈴木ら¹⁴⁾は大豆食品や茶類、貝類、果実類、および蕎麦において ACE 阻害が確認されたと報告した。また、伊澤ら¹⁵⁾は、豆類抽出物の ACE に対する IC₅₀ 値はニコチアナミンと相関があることを示し、その時の抽出物中ニコチアナミンの存在量は、ニコチアナミン標品の IC₅₀ 値と一致していたと報告した。さらに、豆類 41 品種類のニコチアナミン含量が多く、ACE 阻害活性を示したと報告した。未熟豆と完熟した豆類を比較すると、未熟豆の方がニコチアナミンを多く含有している傾向があり、これはニコチアナミンが水溶性であり、冷凍枝豆やそら豆等の茹で加工品においては、ニコチアナミン含量が大きく減少すると報告した²³⁾。しかし、本検討は、発芽後に、ACE 阻害活性は高くなり、ニコチアナミンが増加し、特に 3～5%塩化ナトリウム溶液で発芽させたものが、ニコチアナミンが最大となった。これは、発芽に伴って各

種酵素が、ニコチアナミンを生産したと考察した。

板垣¹⁶⁾は、大豆から単離精製した ACE 阻害物質はムギネ酸の前駆体物質であるニコチアナミンであると報告した。ニコチアナミンの生産だけでなく、ニコチアナミンからムギネ酸へ変換される酵素についての検討も必要と考察された。

ニコチアナミン生産は、メチオニンから S-アデノシルメチオニンを経て、生成される。これまで、金内⁹⁾は発芽に伴いプロテアーゼ活性が増加し、これに伴い遊離ペプチド及びアミノ酸が増え、ホルモール窒素量が増加すると報告した。そこで、メチオニン量と酵素活性を検討すると、酵素活性が高いものはメチオニン量が低下し、酵素によって変換消費されると考えられ、ニコチアナミンの生成には、代謝上流の遊離メチオニンを増加される必要があると考察された。

発芽大豆のアミノ酸は、アスパラギン酸が減少し、グルタミン酸の増加が顕著であると報告されている¹⁷⁾。また、ナトリウムストレスを与え、大豆の発芽させたところ、プロリン、アラニンの含量が増加すると報告している⁴⁾。瀧川ら¹⁸⁾はグルタミン酸量 100 g/L までは、GABA の生成量は添加したグルタミン酸量と比例して増加すると報告した。しかし、メチオニンなどについては報告がなく、今後は検討の必要も考えられた。さらに、大豆の発芽時のナトリウムストレスでは、酵素生産の報告もあり、特に GABA 生成に関する酵素活性が増進することより、含量が増加した⁵⁾。本検討でも、ナトリウムストレスによってニコチアナミンやその生成酵素である MAT が上昇し、ナトリウムストレスによる高発現が考えられた。

一般的に植物は、ストレスにより細胞内の Ca^{2+} イオン濃度が高まり、GAD アミノ酸配列の C-末端部分のカルモジュリン結合部位 (CaMBD) にカルシウム/カルモジュリンが結合することで GABA 生成が誘導される¹⁹⁾と報告される。ニコチアナミン濃度上昇は、GABA と同様に、キレート作用により、金属イオンの影響を抑制する効果があると考察された。カルシウムなどのミネラル類は、骨粗しょう症や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病予防のために重要な栄養成分の 1 つである。一般的に大豆に含まれるキレート物質であるニコチアナミンやフィチン酸、その他のキレート力の強い物質は、多くの金属イオンと強く結合してミネラルの体内吸収率を低下させる²⁰⁾。よって、発芽大豆中の

キレート作用をコントロールすることで、カルシウム取り込みを増加し、骨粗しょう症のような疾病リスクを軽減できると考えられた。

ニコチアナミンは鉄イオンに対してキレート作用を示す。一方、NAS の酵素反応の基質である S-アデノシルメチオニンは、キレート作用を持たないことから鉄イオンのキレート作用を利用したニコチアナミンの酵素活性を検討できると考えられ、今後検討する予定である。

5. 今後の課題

本研究では、2 つの酵素、MAT と NAS の酵素学的性質まで明らかにすることができなかった。しかし、大豆の発芽時の 2 つの酵素の反応や物質の変換の基礎データを得ることができた。特に、MAT の反応様式を明らかにすることができた。一方、NAS の酵素活性を明らかにできなかった。そこで、今後ニコチアナミンのキレート力を利用した鉄イオン-アスコルビン酸の反応による酵素活性測定を明らかにし、酵素精製やその酵素学的特性を明らかにする予定である。さらに、これらの酵素や大豆発芽物を利用し、バイオリクターによるニコチアナミン生産法を検討していく予定である。

6. 文献

- 1) 菅野道広, 尚弘子:大豆たんぱく質の加工特性と生理機能, 建帛社, 東京都 (1999)
- 2) 西山美樹, 江崎秀男, 森久美子, 山本晃司, 加藤丈雄, 中村好志:豆乳を用いたチーズ様食品の調整とその抗酸化性および特性, 日本食品科学工学会誌, Vol.60 No.9 p480-489 (2013)
- 3) 片桐充昭, 清水純夫:もやし(大豆, グリーングラム, ブラックグラム)の二酸化炭素ガス処理による γ -アミノ酪酸含量変化, 日本食品工業学会誌, Vol.36, No.11, p916-919 (1989)
- 4) 伊藤直子, 中山宣洋, 瀧石幸子, 実岡寛文:発芽時におけるダイズ子葉中の塩ストレス下での溶質濃度の変動, 日本作物学会中国支部研究集録(46), p34-35 (2005)
- 5) 金内誠:ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集 2 医学 食品科学編, 2017: 291-300 (2017)
- 6) Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H,

- Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK. (2003). "Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development". *The Plant Cell* 15 (6): 1263–80.
- 7) Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. (1993). "Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (7): 1107-1110
- 8) Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.-K., Chino, M., Mori, S. Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley root. *Plant Soil* 165: 173-179 (1994).
- 9) Cantoni GL, Durell J. Activation of methionine for transmethylation. II. The methionine-activating enzyme; studies on the mechanism of the reaction. *J Biol Chem* 225:1033-48 (1957)
- 10) 金内誠, 畑中咲子, 下山田真, 落合孝次, 高橋義洋, 津志田藤二郎: 発芽大豆中のプロテアーゼの特徴と豆乳タンパク質への作用について, *日本食品保蔵学会誌*, 40(5), 233-240 (2014)
- 11) 山口仁美: LC-MS/MS を用いた醤油および植物性食品中のニコチアナミンの定量分析: *醸協*: 108: 716-723 (2013)。
- 12) Higuchi K, Kanazawa K, Nishizawa NK, Chino M, Mori S (1994). "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley root". *Plant Soil*. 165(2): 173–179.
- 13) Matsuura, F.; Hamada, Y.; Shioiri, T.: Total synthesis of mugineic acid. Efficient use of the phenyl group as the carboxyl syntho. *Tetrahedron* 49: 8211–8222 (1993).
- 14) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙: 食品中のアンジオテンシンI変換酵素阻害能について, *日本農芸化学会誌*, Vol.57, No.11, p1143-1146 (1983)
- 15) 伊澤華子, 吉田望, 白貝紀江, 青柳康夫: 豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシンI変換酵素阻害活性, *日本食品科学工学会誌*, Vol.55, No.5, p253-257 (2008)
- 16) 板垣史郎: アンジオテンシン変換酵素を標的とした大豆由来内臓脂肪型肥満症改善物質の探索, *大豆たん白質研究*, Vol.16, p144-149 (2013)
- 17) 水野時子, 島田信二, 丹治克男, 山田幸二: 大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動, *日本家政学会誌*, Vol.53, No.12, p1197~1202 (2002)
- 18) 瀧川重信, 大笹稿, 鈴木達郎, 遠藤千絵, 橋本直人, 齋藤勝一, 山内宏昭, 野田高弘: 小麦を用いた γ -アミノ酪酸の効率亭製造法, *日本食品科学工学会誌*, Vol.56, No.2, p114-117 (2009)
- 19) 阿部利徳, 竹屋佳奈子: エダマメ中の γ -アミノ酪酸(GABA)含量の差異, *日本食品科学工学会誌*, Vol.52, No.11, p545-549 (2005)
- 20) 早川利朗, 伊賀上郁夫: フィチン酸の構造と機能, *日本食品工業学会誌* Vol.7, No.7, p647-655 (1992)

Characteristics of Synthesizing Enzymes of Nicotianamine as Anti-Hypertensive Substance, in Germination of Soybean and Its Application for Food

Makoto Kanauchi

Miyagi University

Summary

Nicotianamine, an anti-hypertensive substance that decreases in soybeans during germination, can be developed from soybean seedlings for new healthy functional foods for people with high-blood pressure. Nicotianamine is produced by two enzymes as methionineadenosyl transferase (MAT) and nicotianamine synthase (NAS). First, S-adenosyl methionine (SAM) is produced from methionine and ATP by MAT. Subsequently, NAS produces nicotianamine from SAM. This study was conducted to examine nicotianamine and enzyme characteristics for production of new healthy functional foods containing nicotianamine. Soybeans were seedlings using deionized water or sodium chloride solutions. SAM, nicotianamine, and methionine were assayed using an LC/MS/MS system. Decreasing amounts of ATP were assayed for MAT activity at 37°C. Long sprouts were grown from soybeans that had been germinated using deionized water. However, sprouts grown from soybeans germinated using high concentrations of sodium chloride solution were short. Soybeans were not grown using 10% sodium chloride solution. Nicotianamine was present in large quantities in soybeans germinated in 5% sodium chloride solution. Results suggest that the soybeans produced nicotianamine under salt stress conditions. Crude enzyme extraction was done from germinated soybeans reacted in ATP and methionine solution. The enzyme produced SAM quickly. Nicotianamine was produced slowly by the enzyme extract. MAT germinated in 5% sodium chloride solution was the highest among germinating bean conditions. Furthermore, it contained low levels of methionine. Methionine in beans germinated in 5% sodium chloride solution was apparently converted by MAT. Results suggest that MAT is an important enzyme for high-level nicotianamine production.