

## 質量分析イメージングによる米麴中の リン脂質およびグルコースの可視化

Visualization of Phospholipids and Glucose in Rice *Koji*  
Using Microscopic Mass Spectrometry Imaging

新聞 秀一<sup>1,2\*</sup>、玉田 圭大<sup>3</sup>、Adinda Putri Wisam<sup>1</sup>、広畑 修二<sup>3</sup>、五味 勝也<sup>4</sup>、福崎英一郎<sup>1,2</sup>

キーワード：米麴、リン脂質、グルコース、質量分析イメージング、試料前処理、破精込み



1)大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

2)大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

3)白鶴酒造株式会社

4)東北大学大学院農学研究科生物産業創生科学専攻

### ■要旨

日本酒造りにおいて米麴は最も重要な要素の一つです。酒造りにおける米麴の役割は、主にデンプンとタンパク質の分解酵素の供給と考えられています。また、出来上がった米麴の成分は酒質（味や香り）に大きな影響を与えることもよく知られています。しかし、その品質の良し悪しの判断はこれまで杜氏の経験によるところが多く、科学的な知見が十分に得られている状況にはなく、開拓の余地が残された領域であると言えるでしょう。杜氏が米麴の品質を判断する際には、外観や触感という物理的な構造を指標の一つとしているようです。かつては、走査型電子顕微鏡を用いた米麴の内部構造に関する研究が行われていましたが、近年まで米麴の構造と成分の関連性を評価する研究はほとんど進められてきませんでした。本アプリケーションノートでは、構造と成分分布を同時に見ることが可能なiMScope™ を醗酵の分野に応用し、米麴中の構造と成分分布の可視化を試みました。

### 1. はじめに

本研究では、米麴における成分の空間分布可視化と品質特性評価に資する技術開発を行いました。「一麴、二もと、三造り」と言われるように、日本酒造りにおいて米麴は重要な要素です。酒造りにおける米麴の役割は、主にデンプンとタンパク質の分解酵素の供給と考えられていますが、米麴の成分が酒質（味や香り）に大きな影響を与えることもよく知られています。米麴の品質の良し悪しの判断はこれまで杜氏の経験によるところが多く、科学的な知見が十分に得られているとは言えない状況のようです。杜氏が米麴の品質を判断する際には、外観や触感という物理的な構造が指標の一つとなりそうです。かつては、走査型電子顕微鏡を用いた米麴の内部構造に関する研究が行われていましたが、近年まで米麴の構造と成分の関連性を評価する研究は進んでいないのが現状です。

米麴の構造と品質に関与する成分分布を見るためには、

図1に示すような質量分析イメージング法(MSI: mass spectrometry imaging) が最も適していると考えられます。これまで食品への応用として、アスパラガス中の「アスパラプチン」ならびに乾燥ターメリック中の「クルクミン」の分布を可視化し報告してきました<sup>1,2</sup>。本アプリケーションノートでは、食品科学の応用研究における新たな分野として、「醗酵」をテーマとし米麴中の構造と成分分布の可視化を試みました。MSIによる解析を行うにあたり、米麴は非常にもろく、そのままでは切片作製が困難です。したがって、切片作製手法を検討し、生米から蒸米および米麴の製造過程における代謝物の可視化を行いました。

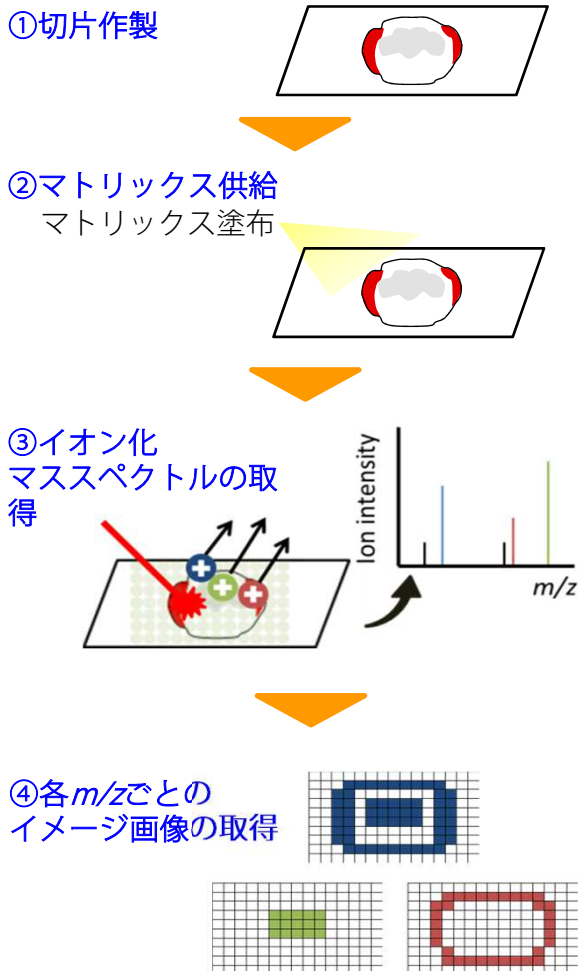


図1. 質量分析イメージング法のワークフロー

## 2. 実験

### 2-1 試薬

包埋剤のカルボキシメチルセルロースは富士フィルム和光純薬より購入し、4%の濃度となるよう水を加え、一晚恒温槽 (70°C) に入れて完全溶解させました。マトリックスの $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA)

および*N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDC) はメルクより購入しました。溶媒として使用したアセトニトリル、イソプロパノール、およびメタノールは富士フィルム和光純薬より購入しました。超純水はサーモフィッシャーサイエンティフィックのGenPure™ UV-TOC xCAD PLUSで製造したものを使用しました。

### 2-2 切片試料作製

白鶴酒造から提供を受けた精米歩合70%の山田錦の蒸米と米麴を用いました。なお、生米は市販米を用いて可視化を試みました。これらの試料は、既に述べた通り非常にもろいことからクライオミクロトームで切片を作製し、得られた切片を粘着性クライオフィルム (cryo-lab) にて回収しました。切片作製において、それぞれの米粒は4%カルボキシメチルセルロースを用いて包埋した後、-80°Cで凍結させました。切片の厚みは20  $\mu\text{m}$  とし、得られたフィルムは松浪ガラス製ITOコートガラス (MASコート無し、表面抵抗100  $\Omega/\text{m}^2$ ) に3Mより購入した導電性両面テープを用いて固定しました (図2)。

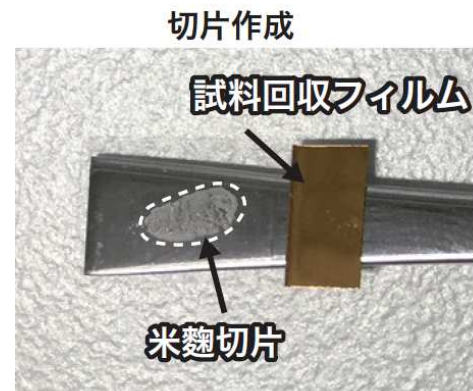


図2. 米麴の切片作成

### 2-3 マトリックス供給

米切片および米麴切片中のリン脂質を検出するにあたり、図3のマトリックス蒸着装置iMLayer™を用いてCHCAを試料表面に蒸着した後、CHCA溶液のスプレー噴霧を行いました<sup>3</sup>。蒸着したマトリックスの膜厚は0.5 μmとし、CHCA溶液は溶媒としてアセトニトリル:イソプロパノール:超純水を3:1:6の混合溶媒に0.1%ギ酸を添加し、濃度が10 mg/mLになるように調製しました。また、グルコースのイオン化を効率よく行えることで知られているNEDCは、蒸着温度を220°C、蒸着時間を10分間に設定し、iMLayerを用いて蒸着を行いました。蒸着後、5%メタノールを用いた蒸着後再結晶化を行いました。



図3. マトリックス蒸着装置 iMLayer™

### 2-4 質量分析イメージング

MSIの測定はiMScope を用いて実施しました。レーザー照射回数は1スポット当たり100回とし、リン脂質については空間分解能を25 μmとしたポジティブイオンモード、グルコースについては空間分解能を50 μmとしたネガティブイオンモードで測定を行いました。測定  $m/z$  範囲は、ポジティブイオンモードで  $m/z$  400-800、ネガティブイオンモードで  $m/z$  180-230 としました。全ての測定において、レーザー強度は45とし、検出器電圧は2.1 kVに設定しました。

### 2-5 MSイメージング画像作成

データ解析およびMSイメージング画像作成には、質量分析イメージング解析ソフトウェアのImaging MS Solution™ およびIMAGEREVEAL™ MS を用いました。本稿では取り上げませんが、IMAGEREVEAL MSは統計学的手法を用いたノンターゲット解析も行うことが可能なソフトウェアであり、また、得られる画像に対する補正機能（画像フィルタおよびピクセル補間）も優れており、類似画像抽出機能も搭載されています。本稿の後半で示す、グルコース分布はIMAGEREVEAL MSを用いて画像作成を行いました。

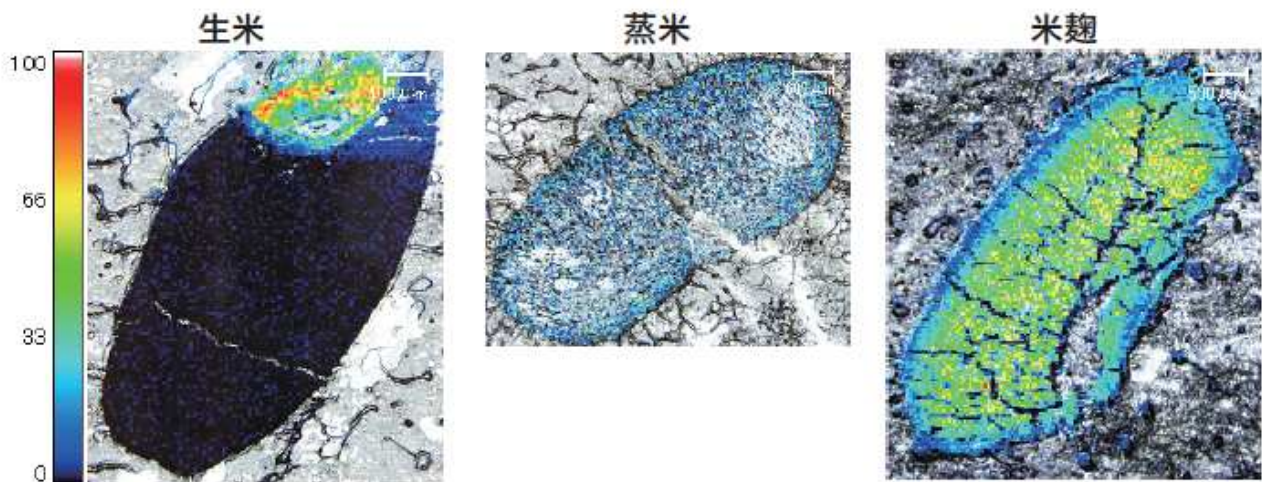


図4.生米・蒸米・米麴内におけるコリンの分布



### 3. 結果

#### 3-1 生米・蒸米・米麴におけるリン脂質の分布

図4は、生米、蒸米、米麴それぞれの切片におけるコリンの分布であり、製麴過程で分布および量が大きく変化する成分の一例です。生米は精米を行う前の結果であり、胚芽部分に蓄積しています。精米後、蒸米ではコリン由来ピークの強度は大きく減少し、米麴では内部において非常に高いピーク強度を示しました。これより米麴の発酵過程（製麴過程）でコリンを生成していることが示唆されます。このように、製麴過程において量および空間分布がMSIを用いることによりダイナミックに変化することが観察できるようになりました。

また米麴内部では様々なリン脂質（リゾリン脂質を含む）が蓄積する様子を可視化することができました（図5）。特にその傾向が認められた $m/z$  496.34および520.34はそれぞれリゾフォスファチジルコリンLPC(16:0)およびLPC(18:2)です<sup>4</sup>。また $m/z$  748.35および786.30は、リン脂質に由来するMSイメージですが、米麴の内部に不均一に分布する様子が示唆されました。このような不均一性は、米麴中における麴菌の入り込み具合、すなわち「破精込み（はぜこみ）」に由来すると考えられます。次項では、破精込みの可視化手法の開発とMSIを組み合わせた結果について紹介します。

#### 3-2 破精込みの可視化とMSIの融合<sup>5,6</sup>

破精とは蒸米の表面に広がる麴菌の菌糸体を表す白い斑点であり、杜氏による目視検査などにおいて、米麴の出来を判断する指標として使われているそうです。破精の可視化はこれまで走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた吉井らの報告が先駆的であり、麴菌の繁殖過程を直接可視化することにより、米麴中の*Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*)の成長特性に関する考察が得られ、製麴の改善に貢献すると述べられています<sup>7</sup>。

SEMでの破精込みの可視化ではミクロな領域を観察することが可能という点で優れています。その一方、米麴全体の破精込みを可視化するためのアプローチと、成分分布情報を得られる手法が有用であると考えました。我々は、この課題解決に向けて破精込みを可視化するために $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）を使用したレポー

ターシステムを導入しました。すなわち、GUS発現*A. oryzae*株を構築し、それを使用した米麴（以下、GUS米麴）を製造し、製麴中の麴菌成長を明確に観察できる系を確立しました。GUS米麴を用いることで、麴菌の存在位置を呈色反応より可視化することが可能となり、MSIを融合することで、成分分布情報を得ることが可能となります。これら2つの技術を融合することで、米麴全体の破精込みの可視化と成分分布の可視化の両方が達成されます。

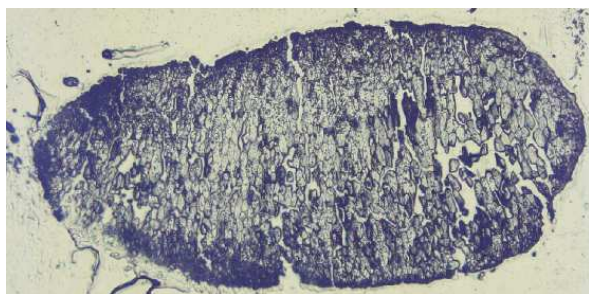
ここでGUSレポーターシステムを米麴に応用するにあたり考案した工夫について述べたいと思います。GUSレポーターシステムは、報告当初、植物組織内部の菌糸可視化のために開発された手法です。植物組織の場合、呈色を行うために発色基質溶液である5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニド（X-Gluc）に浸漬することが一般的です。非常に頑丈な細胞壁を持つ植物組織では、X-Glucに長時間浸漬したとしても観察を行う上で、問題のない形態を保つことが可能です。

一方、米麴は既に述べたとおり非常に脆く、植物組織とは全く異なる性状であると言えます。したがって、既存の発色プロトコルをそのまま用いることは困難を極めます。実際に米麴をX-Gluc溶液に発色が確認できる程度の時間浸漬させると、米麴が吸水し形態が大きく変わることを確認しました。この問題を解決するためには、X-Gluc溶液の供給方法を変更しなければなりません。我々は、解決方法としてGUS米麴切片へX-Gluc溶液をスプレー噴霧することにより破精込みを可視化する手法を考案しました。

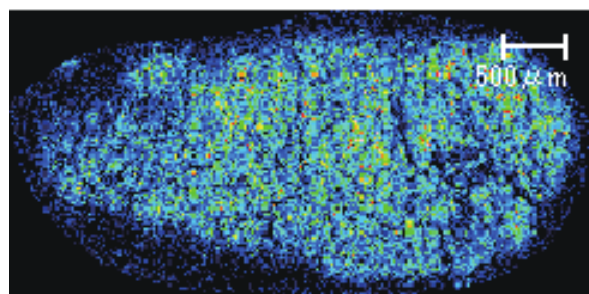
得られた結果を図6に示します。ここでは、精米歩合70%の白鶴錦の精白米を用いて製麴を行い、製麴開始から24時間後、31時間後および43時間後にサンプリングを行いました。製麴が進むにつれ藍色が米麴表面から内部に浸透している様子が観察されました。特に、製麴が完了する43時間後では米麴表面で強い藍色が検出されるだけでなく、内部まで藍色が検出されていることから、麴菌が米の内部に到達している様子が分かります。

米麴の主な役割の一つは、醸造段階で酵母の栄養素を生成するための様々な酵素を供給することです。主に観察される酵素は、酵母成長のための栄養素としてグルコースを生成する $\alpha$ -アミラーゼまたはグルコアミラーゼです。さらに、 $\alpha$ -アミラーゼは米麴の菌糸侵入に影響を与える最も重要な酵素である可能性が報告されています。

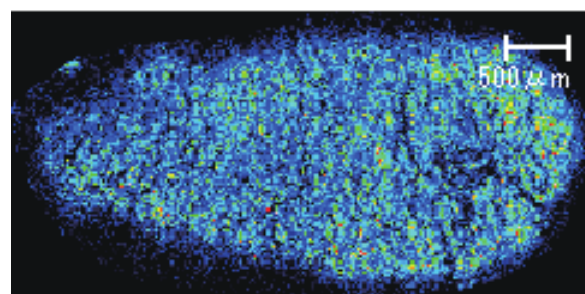
Optical view



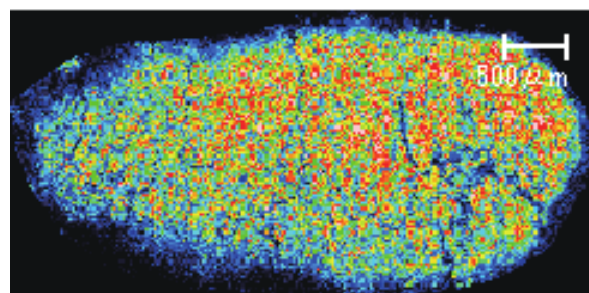
452.24



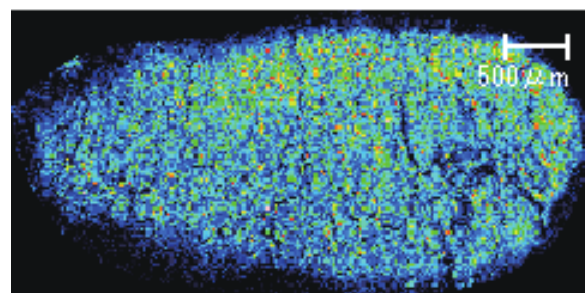
468.31



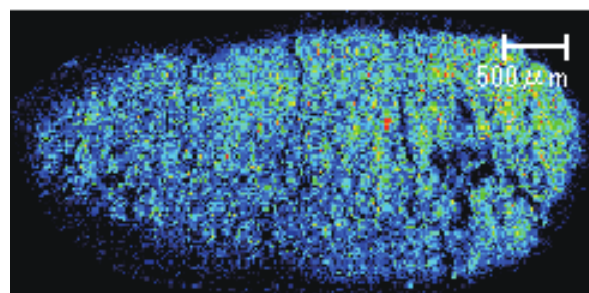
496.34



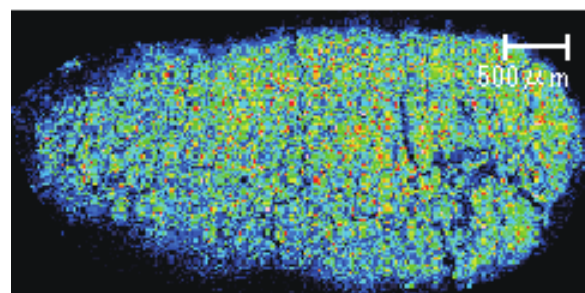
520.34



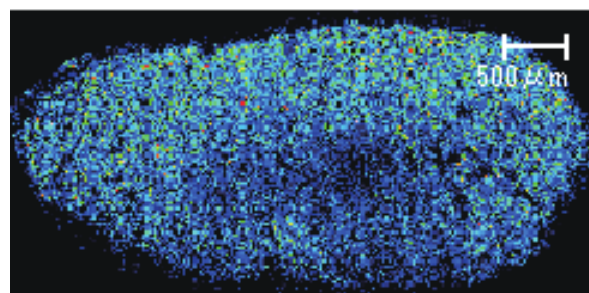
534.30



632.36



748.35



786.30

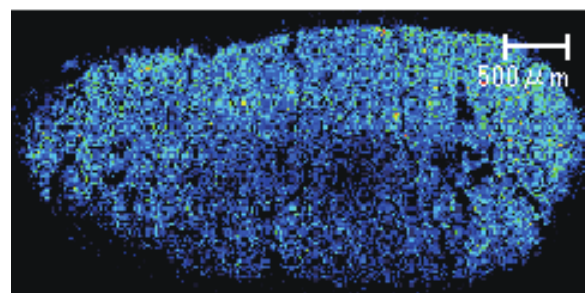


図5.米麩中（山田錦、精米歩合70%）のリゾリン脂質およびリン脂質の分布



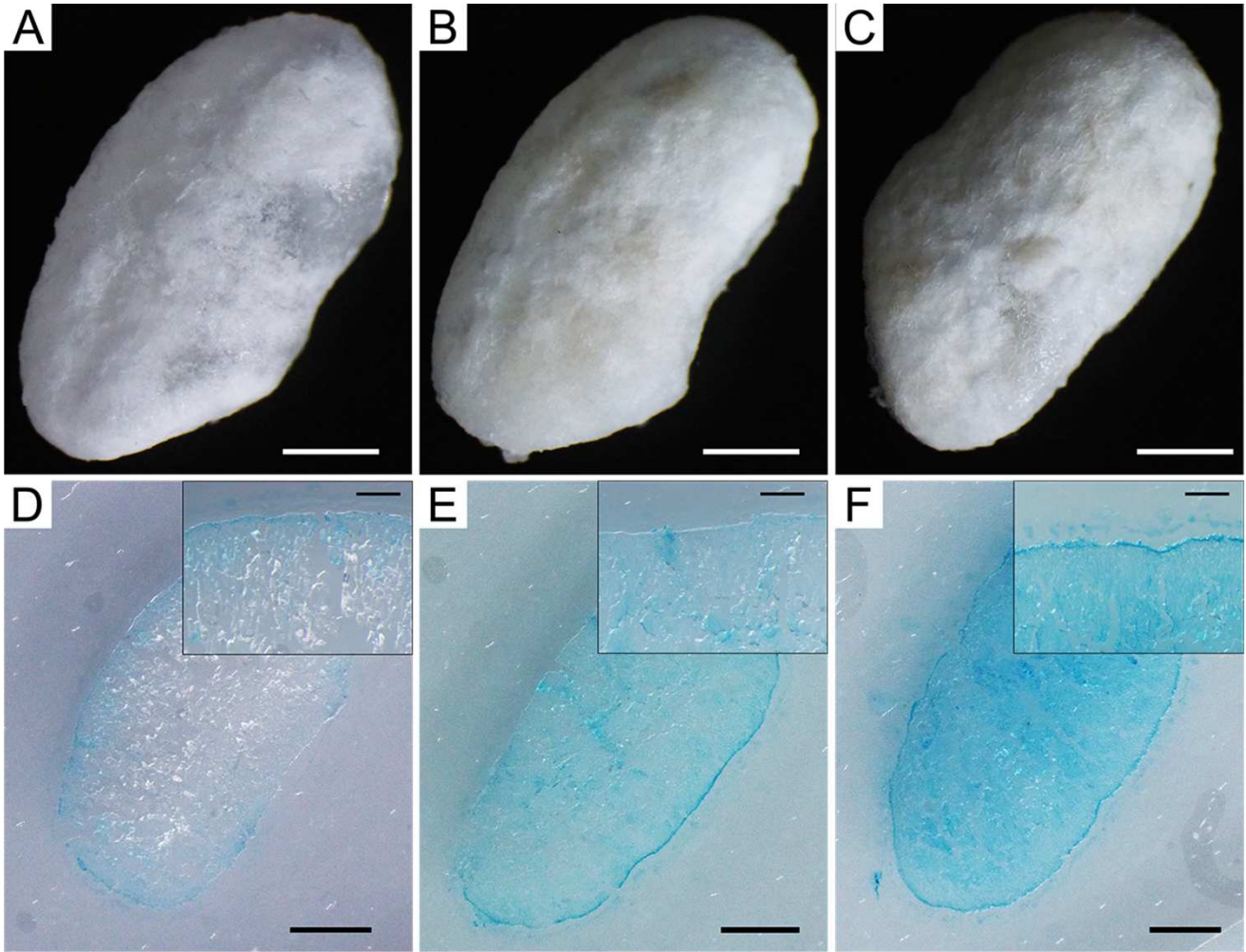


図6. GUS米麩における破精込みの可視化。スケールバー：200 μm（挿入図）、1 mm

これまでの研究では製麩後のグルコースの増加は報告されていますが、破精込みとグルコース分布との関係はまだ確認されていません。実際に製麩過程のそれぞれの時間でサンプリングした米麩におけるマススペクトルにおいて、グルコースのピーク強度が上昇する様子が確認されました（図7）。なお、グルコースのMSIにはマトリックスとしてNEDCを用い、負イオンで $[M+Cl]^- = 215.02$ として検出しました。NEDCを用いた理由は、NEDCにより癌組織におけるグルコースの検出感度が向上することがすでに報告されていたからです<sup>8</sup>。

MSIによるグルコース分布とGUS米麩での破精込みの関連性を調べるために、GUS染色した切片とその隣接切片を用いてMSIを行いました。すなわち、GUS染色画像と得られたグルコースイオン強度分布を比較しました。得られた結果を図8に示します。

グルコース分布とGUS染色像との重ね合わせを見ると、製麩初期から後期にかけてグルコースは外側から内側に向けて増加している様子が分かります。すなわち、破精込みとグルコース分布には相関があることが示されました。その一方、黒矢印で示すようにX-Glucによる青色が濃く、グルコース強度が高いところもあれば、黒丸印で示す領域のように、破精込みが見られるわりにグルコース強度が低い部位も今回の実験で見られました。この結果から破精込みによって産生されるグルコース量は部位による多様性が示唆されました。今後、様々な代謝物（アミノ酸、糖、糖アルコールなど）と併せて議論することにより、破精込みという現象をより化学的に理解することが可能になると考えられます。

ここではグルコースに焦点を絞り、破精込みとグルコース分布の変化について説明しましたが、生成された

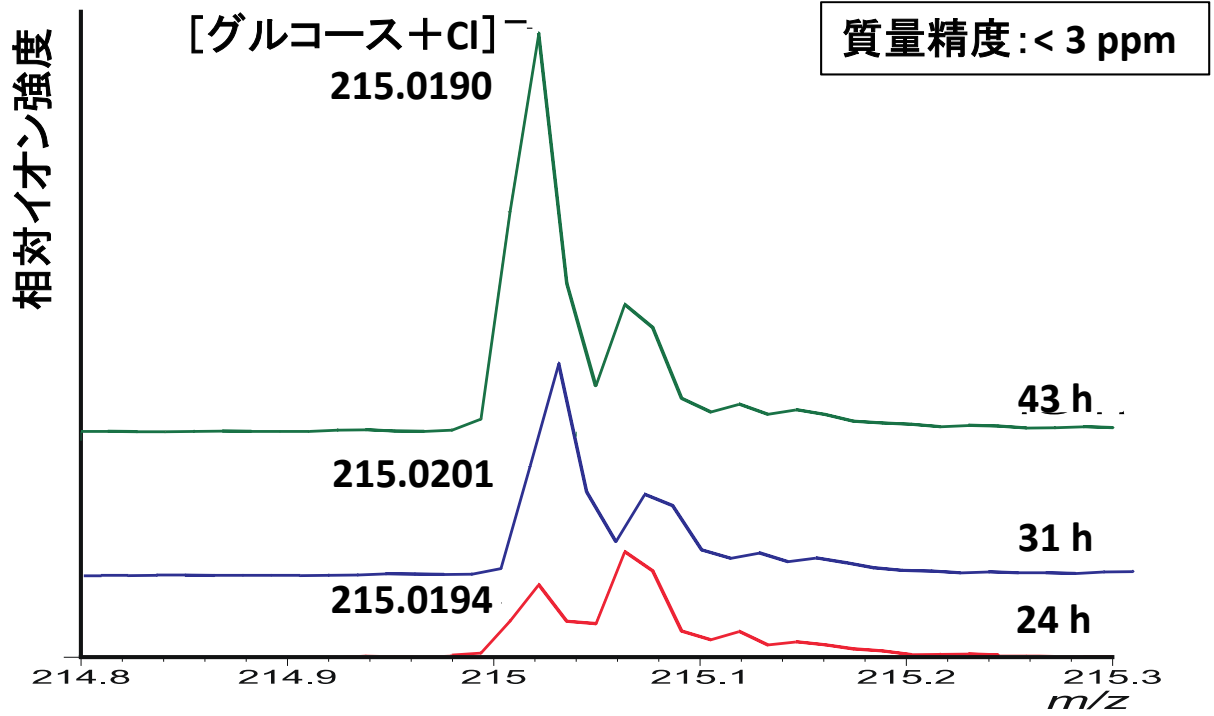


図7. NEDC をマトリックスとして得られたグルコースピークの経時変化

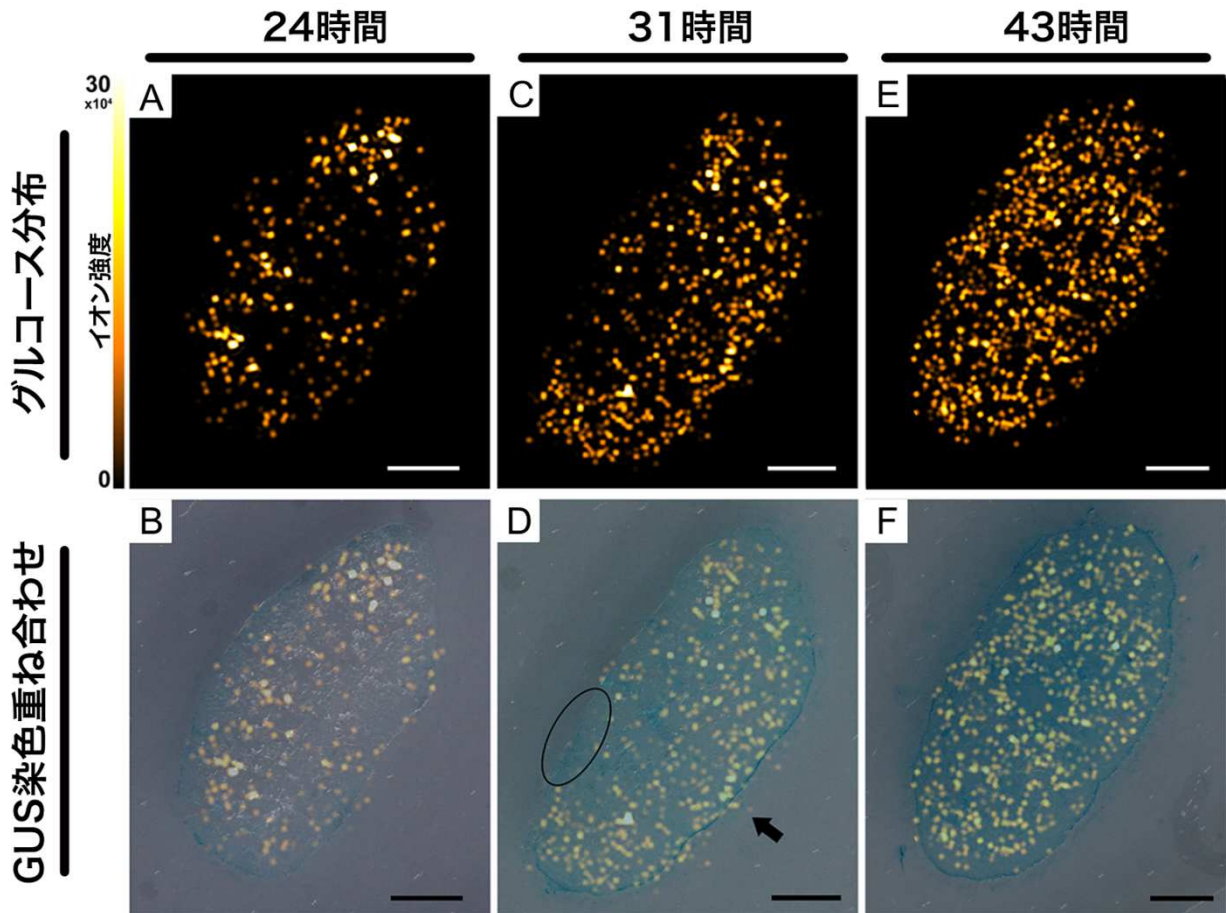


図8. GUS米麩におけるグルコース ([M+Cl]<sup>-</sup>) 可視化。スケールバー: 1 mm

酵素の拡散範囲と活性は、米粒の性質などの他の要因によって影響を受けると考えられます。これら新たな可視化技術（GUS米麴とMSIの融合）は、米麴およびその他の麴由来製品の製麴方法の改善につながると期待できます。



図9. iMScope™ QT

## 5. 参考文献

1. 三好航平、榎本陽介、福崎英一郎、新聞秀一  
島津アプリケーションノート (No. 57)
2. 新聞秀一、佐川岳人  
島津アプリケーションノート (No. 63)
3. S. Shimma, Y. Takashima, J. Hashimoto, K. Yonemori, K. Tamura, and A. Hamada  
J. Mass Spectrom., 2013, 48, 1285.
4. N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, M. Setou,  
Rapid Commun. Mass Spectrom., 2010, 24, 2723.
5. A. P. Wisman, Y. Tamada, S. Hirohata, K. Gomi, E. Fukusaki, S. Shimma  
J. Biosci. Bioeng., 2020, 129, 296.
6. A. P. Wisman, 玉田佳大, 広畑修二, 五味勝也, 福崎英一郎, 新聞秀一,  
日本醸造協会誌 (in press)
7. 吉井 美華, 荒巻 功,  
日本醸造協会誌, 2001, 96, 806.
8. J. Wang et al.,  
Anal. Chem., 2015, 87, 422.

iMScope、iMScope TRIO、iMLayer、Imaging MS Solutionおよび IMAGEREVEALは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。GenPureは、Thermo Fisher Scientificの商標です。その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中にはTM、®マークを明記していない場合があります。

# 株式会社 島津製作所

分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

## 4. まとめ

本研究は、山田錦を用いてリン脂質の分布を可視化し、また白鶴酒造独自の酒米である白鶴錦を用いて破精込みとグルコース分布を可視化しました。その結果、製麴過程でリン脂質の変化が生じることが可視化されました。また、白鶴錦からGUS発現米麴を製造し、破精込みとグルコース分布に相関があることを示しました。これら新たな可視化技術は、米麴およびその他の麴由来製品の製麴過程の理解や製麴方法の改善につながると期待できます。また、ミクロな部位での光学顕微鏡観察と顕微鏡下で質量分析を行うことが可能なイメージング質量顕微鏡 iMScopeを今後様々な麴の分析に適用することで、醗酵分野に新たな科学的知見をもたらすと考えられます。

iMScope TRIO™の後継機であるiMScope QT(図9)が2020年6月にリリースされました。iMScope TRIOの特長である顕微鏡観察機能や空間分解能を引き継いでいる上、質量分解能、検出感度、分析速度が向上しており、より容易に分析が可能です。また質量分析範囲も広がっているため、MSIのさらなる応用の可能性に期待が高まります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2020年9月  
© Shimadzu Corporation, 2020



[> アンケート](#)

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



[> iMScope™ QT](#)



[> iMLayer](#)  
マトリックス蒸着装置

**関連分野**

[> 食品・飲料](#)

[> 価格お問い合わせ](#)

[> 製品お問い合わせ](#)

[> 技術お問い合わせ](#)

[> その他お問い合わせ](#)