

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 山本 憲司
Name

学位論文題目： 新規機能性成分環状ジペプチドの一斉分析法の開発とその
Title of Dissertation 食品への応用

学位論文要約：
Dissertation Summary

2つのアミノ酸がペプチド結合で環化した化合物群は環状ジペプチド (DKP) とよばれ、タンパク質の構成単位である20種のアミノ酸の組み合わせでD体・L体を区別しない場合、210種が存在する(Fig. 1). DKPは食品加工の焙煎、発酵等の工程で生じ、コーヒー、ココア、ビール、日本酒等から検出されている¹⁻⁴⁾. これまでの食品分野における研究では、DKPは主に苦味成分として着目されてきたが、近年、チキンエキスに含まれるcyclo(-Phe-Phe)がセロトニン再取り込み阻害活性、およびマウスでの学習意欲改善効果を示すことが明らかとされた⁵⁾. また、直鎖ジペプチドのPhe-Pheには上記のような活性は認められず、環状化することで初めて生理活性を示すことも判明した. この報告により、DKPが食品中の新たな機能性成分として着目されるに至った. しかしながら、DKPの統一された分析法は確立されておらず、多くの食品のDKP含量、および組成は明らかではなかった. そこで本研究では、DKPを対象としたより汎用性の高い一斉分析法の確立を試みた. その後、開発した分析法を用い、機能性成分に関する情報が十分蓄積されていない微生物発酵茶と和食の根幹をなす食品素材であるかつお節等の各種節類を研究対象とし、DKP含量を調べた. さらに、食品加工工程とDKP生成の関連を考察することを試みた.

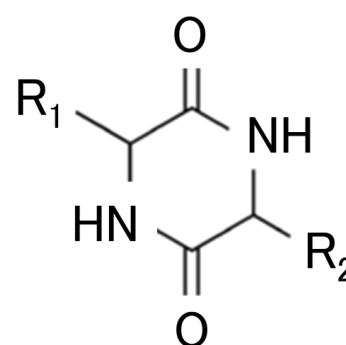


Fig. 1: DKP の構造

(R₁, R₂: アミノ酸残基)

微生物発酵茶に含まれるDKPの一斉分析法の開発

分析対象のDKPは市販品が入手可能であり、かつ機能性が期待される31種とした. 食品試料はプーアル茶抽出液とした. LC-MS/MSにおける各種パラメーターを最適化し(Table 1, Fig. 2), プーアル茶抽出液 (10 mg D.W.eq/.mL) を分析に供したところ、DKP31種の内、18種が検出され、その濃度は0.00080-0.11 ppmであった(Table 2, Fig. 3). また、31種のDKPについて添加回収試験を行った. その結果、回収率は48-181%となり、その際のRSD (n=3) は15%以下であった. このうち、21種のDKPについては、良好な精度と判断される70-120%の範囲内の回収率が認められた. 以上の結果より、本法を用いることで31種のDKPの定量が可能と判断した. 本結果は、DKPの一斉分析に関して、添加回収試験等による分析精度の確認にまで踏み込んだ初めての報告である.

Table 1: 本研究に用いたDKP種およびLC-MS/MS分析の最適化パラメーター

No.	DKP	Mw	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	コーン エネルギー (V)	コリジョン エネルギー (eV)
1	cyclo(-Gly-His)	194.19	195	82	30	30
2	cyclo(-Ala-His)	208.22	209	110	30	30
3	cyclo(-Ser-Ser)	174.16	175	60	28	22
4	cyclo(-Gly-Gly)	114.10	115	58	30	30
5	cyclo(-Asp-Asp)	230.17	231	195	22	16
6	cyclo(-Glu-Gly)	186.17	187	84	22	20
7	cyclo(-Ala-Gln)	199.21	200	84	30	30
8	cyclo(-His-Pro)	234.25	235	110	30	30
9	cyclo(-Ala-Ala)	142.16	143	44	30	14
10	cyclo(-Gly-Pro)	154.17	155	70	40	22
11	cyclo(-Pro-Thr)	198.22	199	70	30	30
12	cyclo(-Ser-Tyr)	250.25	251	136	30	30
13	cyclo(-D-Ala-Pro)	168.20	169	70	34	18
14	cyclo(-His-Phe)	284.31	285	110	30	30
15	cyclo(-Pro-Pro)	194.23	195	70	30	30
16	cyclo(-Gly-Leu)	170.21	171	86	30	14
17	cyclo(-Phe-Ser)	234.25	235	120	30	30
18	cyclo(-Pro-Tyr)	260.29	261	136	30	30
19	cyclo(-Val-Pro)	196.25	197	70	30	30
20	cyclo(-Gly-Phe)	204.23	205	120	30	30
21	cyclo(-Asp-Phe)	262.27	263	91	30	30
22	cyclo(-Gly-Trp)	243.26	244	130	30	30
23	cyclo(-Leu-Pro)	210.27	211	70	30	30
24	cyclo(-Met-Met)	262.39	263	167	30	30
25	cyclo(-Phe-Pro)	244.29	245	120	30	30
26	cyclo(-Trp-Tyr)	349.38	350	130	30	30
27	cyclo(-Leu-Trp)	299.37	300	130	30	30
28	cyclo(-Leu-Leu)	226.32	227	72	30	30
29	cyclo(-Leu-Phe)	260.33	261	120	30	30
30	cyclo(-Phe-Trp)	333.38	334	130	30	30
31	cyclo(-Phe-Phe)	294.35	295	120	30	30

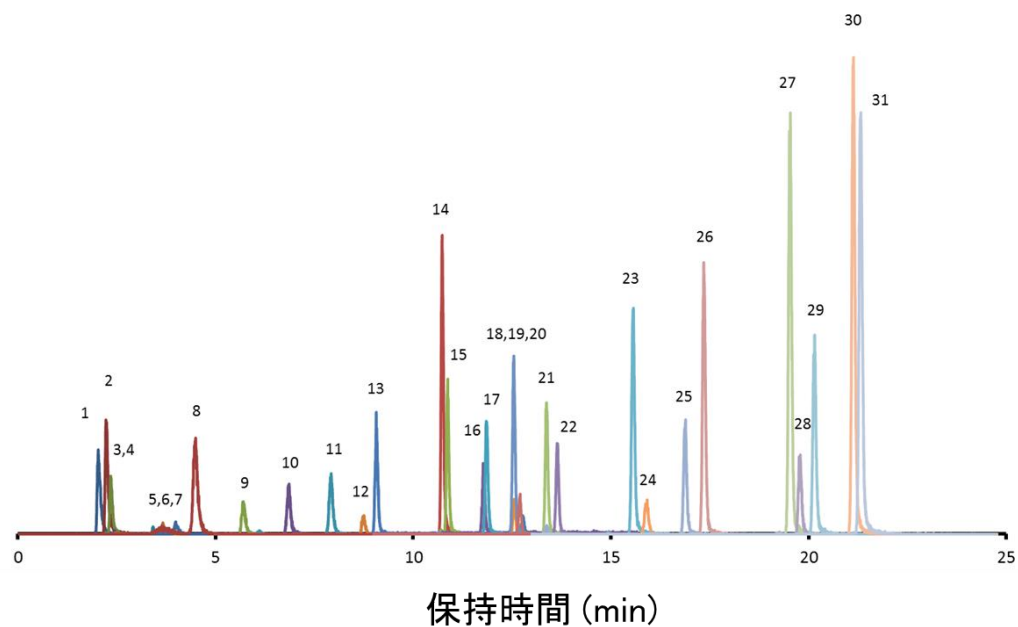
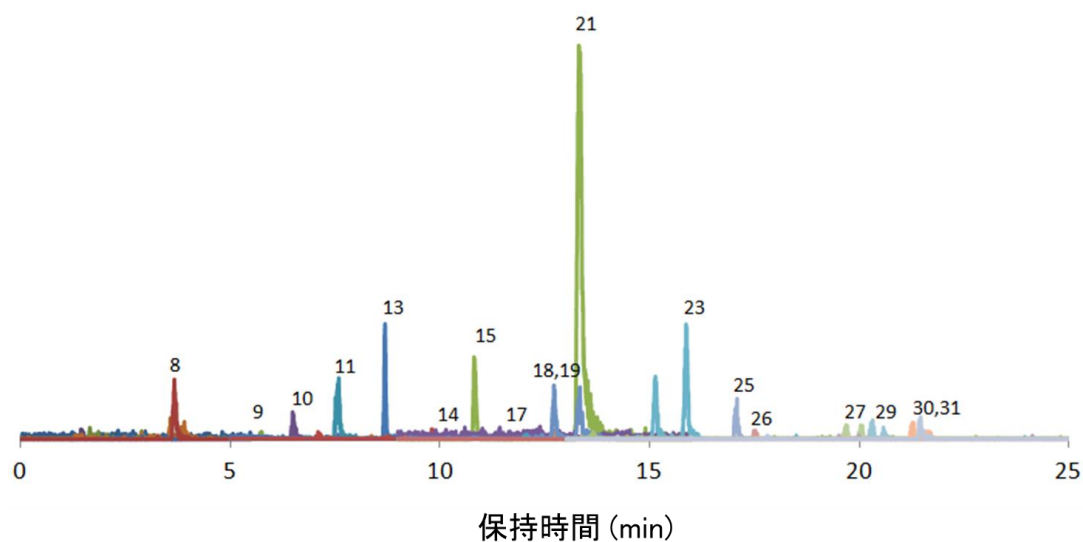
**Fig. 2:** DKP31種の標準品LC-MS/MSクロマトグラム

Table 2: プーアル茶抽出液分析時の検出限界, 定量限界, DKP濃度および添加回収試験結果

No.	検出限界 (ppm)	定量限界 (ppm)	DKP濃度 (ppm)	検出限界 (ppm)	回収率 (%)	RSD (%) (n=3)
1	0.02	0.06	n.d.	0.02	48 *	6.0
2	0.0003	0.001	n.d.	0.0003	54	14
3	0.009	0.03	n.d.	0.009	77 *	8.8
4	0.006	0.02	n.d.	0.006	54 *	5.4
5	0.002	0.004	n.d.	0.002	55	5.7
6	0.02	0.05	n.d.	0.02	141 *	8.5
7	0.0007	0.003	n.d.	0.0007	121	6.5
8	0.00007	0.0003	0.055	0.00007	126	4.8
9	0.0002	0.0006	0.0044	0.0002	113	15
10	0.0002	0.0007	0.025	0.0002	117	0.93
11	0.006	0.02	0.083	0.006	120 *	6.8
12	0.0005	0.002	n.d.	0.0005	125	15
13	0.004	0.02	0.11	0.004	108	6.8
14	0.00003	0.0001	0.0048	0.00003	181	3.8
15	0.003	0.008	0.050	0.003	120	4.9
16	0.05	0.2	n.d.	0.05	106 *	14
17	0.0002	0.0004	0.00080	0.0002	84	9.8
18	0.0003	0.001	0.011	0.0003	93	9.5
19	0.003	0.01	0.026	0.003	104	5.7
20	0.0004	0.002	n.d.	0.0004	76	15
21	0.0002	0.0005	0.0017	0.0002	80	6.1
22	0.0002	0.0005	n.d.	0.0002	90	15
23	0.003	0.01	0.061	0.003	104	3.5
24	0.0005	0.002	n.d.	0.0005	106	1.0
25	0.0002	0.0005	0.028	0.0002	110	1.8
26	0.00005	0.0002	0.0025	0.00005	93	5.6
27	0.00004	0.0002	0.0074	0.00004	100	2.4
28	0.0003	0.0008	n.d.	0.0003	127	7.3
29	0.00007	0.0003	0.0053	0.00007	96	1.7
30	0.00004	0.0002	0.0063	0.00004	102	8.1
31	0.00003	0.0001	0.0035	0.00003	88	2.0

*: Recovery data spiked 0.1 ppm of DKP standard
n.d.: not detected

**Fig. 3:** プーアル茶抽出液のLC-MS/MSクロマトグラム

各種微生物発酵茶に含まれるDKPの定量および関与する微生物

開発した一斉分析法を用いて、国内に存在する4種の微生物発酵茶に含まれるDKPの定量を行った(**Table 3**)。好氣的発酵茶のバタバタ茶、嫌氣的発酵の阿波番茶抽出液に含まれるDKP含量の合計値は、それぞれ0.0047 ppm, 0.0069 ppm と非常に低濃度であった。対照的に、二段階発酵茶である石鎚黒茶および碁石茶の抽出液のDKP含量は、それぞれ0.33 ppm, 1.2 ppmと単段階の発酵茶と比較して4.8~255倍の値を示した。したがって、好氣的発酵、嫌氣的発酵の両方がDKPの生成に関与していることが示唆された。構成DKPの割合は茶種によって異なっていたことから、製造工程や関与する微生物がDKP生成に量的、および質的に影響するものと推察された。続いて、碁石茶製造工程とDKP生成の関連について調べたところ(**Table 4**)、好気発酵3-4日目では2.0倍にDKP含量が増加し、新たに7種のDKPが生成した。嫌気発酵前後では、2.3倍にDKP含量が増加し、cyclo(-Asp-Phe)が新たに生成した。続いて、最も顕著にDKPが増加した嫌気発酵工程に関与する微生物の単離同定を試みたところ、主に関与している微生物は乳酸菌であり、*Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*が同定された。過去にも乳酸菌がDKPの生成に関与していることを示唆する報告もあり、今回単離した微生物がDKPの生成に関与している可能性があるかと推察された。碁石茶由来乳酸菌とDKP生成の関連については、今後追究を行う予定である。

Table 3: 国内微生物発酵茶抽出液中のDKP濃度 (ppm)

No.	バタバタ茶	阿波晩茶	碁石茶	石鎚黒茶
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	0.021	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	0.0030	0.0069	0.097	0.059
9	n.d.	n.d.	0.0085	n.d.
10	n.d.	n.d.	0.093	0.022
11	n.d.	n.d.	0.30	0.11
12	n.d.	n.d.	0.027	n.d.
13	n.d.	n.d.	0.14	0.041
14	n.d.	n.d.	0.0049	n.d.
15	0.0017	n.d.	0.052	0.013
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	n.d.	n.d.	0.011	n.d.
18	n.d.	n.d.	0.043	n.d.
19	n.d.	n.d.	0.069	0.0030
20	n.d.	n.d.	0.0075	n.d.
21	n.d.	n.d.	0.019	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	n.d.	n.d.	0.17	0.048
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	0.084	0.028
26	n.d.	n.d.	0.013	n.d.
27	n.d.	n.d.	0.013	0.0050
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	0.0090	0.0010
30	n.d.	n.d.	0.013	0.0040
31	n.d.	n.d.	0.0057	0.0010
Total	0.0047	0.0069	1.2	0.33

Table 4: 各製造工程における基石茶抽出液のDKP含有量 (ppm)

No.	蒸	好気発酵 1日目	好気発酵 2日目	好気発酵 3日目	好気発酵 4日目	好気発酵 5日目	好気発酵 6日目	好気発酵 7日目	嫌気発酵後	乾燥後
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0087	0.012	0.015	0.012	0.062	0.021
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	0.0048	0.0046	0.0020	0.015	0.026	0.024	0.024	0.041	0.089	0.097
9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0019	0.0018	0.0053	0.0085
10	n.d.	n.d.	0.0024	0.012	0.028	0.030	0.029	0.042	0.085	0.093
11	0.016	0.016	0.023	0.065	0.095	0.098	0.091	0.097	0.21	0.30
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.022	0.017	0.019	0.025	0.031	0.027
13	0.0011	0.0012	0.0047	0.020	0.035	0.033	0.029	0.046	0.11	0.14
14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0021	0.0020	0.0022	0.0023	0.0041	0.0049
15	0.0013	0.0011	0.0013	0.0015	0.0039	0.0032	0.0028	0.0057	0.027	0.052
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0078	0.0069	0.0038	0.0042	0.010	0.011
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0028	0.00049	0.030	0.043
19	n.d.	n.d.	n.d.	0.0024	0.0064	0.0073	0.0087	0.015	0.046	0.069
20	n.d.	n.d.	n.d.	0.0071	0.0094	0.0075	0.0075	0.0070	0.0088	0.0075
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.015	0.019
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	0.0017	0.0014	0.0050	0.025	0.045	0.049	0.045	0.062	0.12	0.17
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	0.0039	0.0038	0.0054	0.014	0.024	0.025	0.022	0.031	0.066	0.084
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0084	0.012	0.013
27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0093	0.0093	0.0094	0.0095	0.011	0.013
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00070	0.00068	0.00069	0.00037	0.0040	0.0090
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0093	0.0095	0.0094	0.0095	0.012	0.013
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00074	0.00079	0.00079	0.0012	0.0033	0.0057
Total	0.029	0.028	0.044	0.162	0.33	0.33	0.32	0.42	0.96	1.2

かつお節等の各種節類中に存在するDKPの定量

開発した一斉分析法をかつお節，ならびにその他の節類抽出液(40 mg D.W.eq/.mL)に適用し，DKPを定量した(**Table 5**)。その結果，本枯節が最も高いDKP含量 (12 ppm)を示し，次いで，荒節 (9.0 ppm)，そうだがつお節 (8.7 ppm)，さけ節 (7.3 ppm)，あご節 (5.0 ppm)，まぐろ節 (1.2 ppm) となった。いわし節ではすべてのDKPが定量限界以下となった。続いて，かつお節製造工程におけるDKP含量の推移を確認したところ(**Table 6**)，煮熟，焙乾，カビ付けの全製造工程において生成することが判明した。一方で，カビ付け工程中に新たに生成したcyclo(-Asp-Phe) とcyclo(-Leu-Trp) はカビ付けに用いられた*Eurotium repens*の関与が推察された。また，cyclo(-Val-Pro)，cyclo(-Phe-Pro) 等の抗菌作用を持つと報告⁶⁾されているDKPがかつお節独特の製造工程である二次焙乾で生成したことから，これらがかつお節の製造期間およびその後の保管期間において，危害菌等の制御に関わっている可能性があるものと推察された。

(様式5) (Style5)

Table 5: 各種節抽出液中のDKP含有量 (ppm)

No.	カツオ (本枯節)	カツオ (荒節)	ソウダガツオ	サケ	アゴ	キハダマグロ	カタクチイワシ
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	0.41	n.d.	n.d.	0.20	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	1.1	1.0	1.1	0.38	0.13	0.16	n.d.
9	0.27	0.29	0.21	0.24	n.d.	n.d.	n.d.
10	1.8	1.2	0.76	0.95	3.0	0.17	n.d.
11	1.2	0.95	0.68	0.35	n.d.	n.d.	n.d.
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	3.4	2.1	3.2	2.1	1.2	0.48	n.d.
14	0.32	0.20	0.27	0.059	0.048	0.065	n.d.
15	2.2	1.4	0.31	1.4	0.40	0.34	n.d.
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	0.26	0.34	0.34	0.30	n.d.	n.d.	n.d.
19	0.33	0.35	0.38	0.31	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	0.11	n.d.	0.065	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	0.57	0.58	0.61	0.71	0.17	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	0.31	0.37	0.68	0.30	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27	0.041	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	0.090	0.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31	0.054	0.10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	12	9.0	8.7	7.3	5.0	1.2	0.0

Table 6: 本枯節の製造工程サンプルを用いた抽出物のDKP含有量 (ppm)

No.	籠立て時	煮熟後	一次 焙乾後	二次 焙乾後	荒節	裸節	一次カビ 付け後	二次カビ 付け後	本枯節
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	0.21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.38	0.42	0.41
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	n.d.	0.32	0.47	0.52	1.0	0.77	0.78	0.80	1.1
9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.29	0.11	0.14	0.19	0.27
10	n.d.	n.d.	n.d.	0.48	1.2	1.0	1.2	1.2	1.8
11	n.d.	n.d.	n.d.	0.53	0.95	0.89	0.88	0.9	1.2
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	0.38	0.65	1.2	2.1	2.1	2.4	2.4	3.4
14	n.d.	0.054	0.059	0.090	0.20	0.019	0.12	0.14	0.32
15	n.d.	0.28	0.40	0.90	1.4	1.7	1.7	1.7	2.2
16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.34	0.18	0.20	0.19	0.26
19	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	0.35	0.24	0.28	0.29	0.33
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.072	0.10	0.11
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	n.d.	0.13	0.20	0.26	0.58	0.44	0.50	0.52	0.57
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	0.37	0.25	0.30	0.26	0.31
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.041
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
29	n.d.	n.d.	n.d.	0.055	0.11	0.056	0.072	0.090	0.090
30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31	n.d.	n.d.	n.d.	0.085	0.10	0.080	0.086	0.10	0.054
Total	0.0	1.4	1.8	4.5	9.0	7.9	9.1	9.3	12

以上のように、本研究では、近年新たな機能性成分として着目されつつあるDKPを対象とした一斉分析法を開発し、微生物発酵茶、およびかつお節等の各種節類の分析に応用した。微生物発酵茶、および各種節類からDKPを検出し、食品加工工程とDKP生成の関連を考察した報告は今回が初めてであった。本法を用いて、今後さらに多くの食品からDKPが検出され、食品加工でDKPが生成する詳細なメカニズム、意義が明らかになることが期待される。また、本研究で確認されたDKPのヒトにおける各種生理活性との関連については、今後追究すべき課題である。

引用文献

- 1) Michael G., Ulrich H.E., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3528 (2000)
- 2) Pickenhagen W., Dietrich P., Keil B., Polonsky J., Nouaille F., *Helv. Chim. Acta.*, **58**, 1078 (1975)
- 3) Gautschi M., Schmid J.P., Peppard T.L., Ryan T.P., Tuorto R.M., Yang X., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3183 (1997)
- 4) Takahashi K., Tadenuma M., Kitamoto K., Sato S., *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 927 (1974)
- 5) Tsuruoka N., Beppu Y., Koda H., Doe N., Watanabe H., Abe K., *PLoS One*, **7**, e50824 (2012)
- 6) Kwak. M., Liu R., Kim M., Moon D., Kim A.H., Song S., Kang S. *Journal of Microbiology*, **52**, 64 (2012)