

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation その食品への応用

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

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。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。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。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。

DKP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、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0.0017-0.11 ppmであった。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。

微生物発酵茶中のDKP：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。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、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、今後追跡を行う予定である。

各種節類中のDKP: 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に適用し、DKPを定量した。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、DKPが顕著に増加する工程は存在せず、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与している可能性があるものと推察された。

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、今後追跡すべき課題である。