

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	山本 憲司
審査委員	主査 受田 浩之 副査 菅原 卓也 副査 合谷 祥一 副査 島村 智子 副査 柏木 丈弘

論文名 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食品への応用

審査結果の要旨

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) と呼ばれ、タンパク質を構成する 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 種類が存在する。DKP は食品加工の焙煎や発酵の工程で生じ、コーヒー、ココア、ビール、日本酒などからの検出例が報告されている。過去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。しかし近年、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、及びマウスにおいて学習意欲改善効果を示すことが明らかとなり、さらにこれらの生理活性が環状化することではじめて生じることが判明したことから、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、汎用性の高い DKP の一斉分析法は確立されておらず、食品中における DKP 含量、及び組成は不明であった。本論文は、上記の背景のもと、DKP の一斉分析法の開発を行うとともに、開発した分析法を用いて機能性成分に関する情報が十分に蓄積されていない微生物発酵茶、ならびに和食の根幹をなす食品素材であるかつお節をはじめとする各種節類に含まれる DKP の定量を行った。また、食品加工工程と DKP 生成の関連について考察したものである。以下にその内容を記す。

DKP 一斉分析法の開発: 機能性が期待でき、かつ市販品を入手可能な 31 種類の DKP を分析対象とした LC-MS/MS による一斉分析法の開発を試みた。LC-MS/MS における各種パラメーターを最適化した後、食品試料として用いたプーアル茶抽出液を分析に供したところ、分析対象とした 31 種類のうち、18 種類の DKP が検出された。また、その含量は 0.0017~0.11 ppm であった。31 種類の DKP について添加回収試験を行ったところ、その回収率は 48~181% であり、RSD (n = 3) は 15% 以下であった。このうち、21 種類の 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、本法を用いることにより 31 種類の DKP の定量が可能と判断した。

微生物発酵茶中の DKP: 本研究において開発した一斉分析法を用い、日本国内で生産されている 4 種類の微生物発酵茶に含まれる DKP の定量を行った。その結果、好氣的発酵茶のバタバタ茶、嫌氣的発酵茶の阿波番茶抽出液に含まれる DKP 含量はそれぞれ 0.0047 ppm, 0.0069 ppm であり、非常に低いものであった。一方、二段階発酵茶の石鎚黒茶、及び碁石茶抽出液の DKP 含量はそれぞれ 0.33 ppm, 1.2

ppm であり、単段階の発酵茶と比較して 4.8~255 倍の値を示した。このことから、好氣的発酵と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、製造工程や製造に関与する微生物が DKP の生成に量的、及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、好氣的発酵、ならびに嫌氣的発酵の製造工程の両方で DKP 含量と DKP の種類が共に増加することが判明した。嫌氣的発酵段階における DKP 含量の増加が顕著であったことから、嫌氣的発酵に関与する微生物の単離・同定を試みた。その結果、嫌氣的発酵に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 DKP の生成に対する乳酸菌の関与を示唆する報告も認められることから、今回単離した微生物が碁石茶中の DKP の生成に関与している可能性があるものと推察された。

各種節類中の DKP: 本研究において開発した一斉分析法を用い、かつお節、ならびにその他の節類抽出液に含まれる DKP の定量を行った。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 含量の推移を調べたところ、DKP 含量は煮熟、焙乾、カビ付けの工程に従って徐々に増加し、特定の製造工程で顕著に増加することはなかった。一方で、カビ付け工程において新たに生成した cyclo(-Asp-Phe) と cyclo(-Leu-Trp) に対してはカビ付けに用いられた *Eurotium repens* の関与があるものと推察された。また、cyclo(-Val-Pro) や cyclo(-Phe-Pro) といった抗菌作用が報告されている 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、これらの DKP がかつお節製造期間、及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。

以上、本論文は、近年新たな機能性成分として着目されつつある DKP の一斉分析法の開発を行い、各種微生物発酵茶、及び節類中の DKP 含量を明らかにしたものである。また同時に、DKP 生成と食品製造工程との関連についても考察を行っており、食品化学、及び食品機能学の発展に寄与するものと高く評価される。

本学位論文の公開審査会は 2017 年 8 月 5 日に高知大学農林海洋科学部で開催され、口頭発表と質疑応答が行われた。続いて学位論文審査委員会を開催し、本論文の内容を審査した。その結果、審査委員全員一致して本論文が博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。