

# 学位論文全文に代わる要約

## Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 大塚 祐季  
Name

学位論文題目： 機能性成分環状ジペプチドの生成機構に関する研究  
Title of Dissertation

学位論文要約：  
Dissertation Summary

2分子のアミノ酸が脱水縮合したジケトピペラジン構造を基本骨格とする環状ジペプチド (DKP、図1) は、タンパク質の構成アミノ酸20種類の組合せでD・L体を区別しない場合、210種類が存在する。従来、DKPはビール等の苦味寄与成分として知られてきたが、近年では、抗ガン作用、抗菌作用、学習意欲改善効果など、直鎖ペプチドにはない生理活性を示すことが報告され、注目を集めるようになった。これまでの研究において、DKPは焙焼食品や発酵食品中に検出されており、その中でも、Pro含有DKP (cyclo(-X-Pro)) が豊富に含まれることが明らかとなっている。しかし、Pro含有DKP全20種類の一斉測定法は存在せず、食品中でのPro含有DKPの定性定量的な情報は皆無である。また、DKPは加熱や発酵に伴い生成するとされてきたが、生成機構の詳細については明らかでない。そこで本研究では、直鎖ペプチドからのDKPの生成に対する各種反応条件の影響を調べ、生成機構の解明を行った。また、Pro含有DKPのLC-MS/MSによる一斉測定法を開発し、食品へ適用するとともに、実際の食品中でのDKP生成機構に関する考察を行った。

直鎖ペプチドからのDKP生成機構: ジペプチド2種類 (Pro-Leu、Leu-Pro)、トリペプチド10種類 (Gly-Pro-Leu、Leu-Pro-Gly、Leu-Gly-Pro、Gly-Leu-Pro、Pro-Gly-Leu、Pro-Leu-Gly、Gly-Pro-Gly、Leu-Pro-Leu、Phe-Pro-Gly、Leu-Pro-Phe)、テトラペプチド1種類 (Gly-Gly-Pro-Leu) を用い、反応温度、反応時間、反応pHがDKP生成率に及ぼす影響を調べた。その結果、直鎖ペプチドからのDKP生成率は、温度と時間に依存して増加した。ジペプチド、トリペプチドからのDKP生成率はpH 5.0~7.0で最大となり、検出されたDKPは全て直鎖ペプチドのN末端から2分子のアミノ酸が環化したDKPであった。その生成機構としては、N末端のアミノ基窒素と、N末端から2残基目のアミノ酸のカルボニル炭素とが結合することで、環化反応が生じ、DKPが生成していると推察された (図2)。一方、テトラペプチドではpH 6.0で最大となり、N末端のGlyが脱離してトリペプチドが生成し、その後、N末端からの2分子が環化したDKPが検出された。結果として、N末端の2残基目にProが位置する直鎖ペプチドにおいて、高いDKP生成率が認められた。原子間距離の算出の結果、N末端の2残基目にProが位置した場合、DKP生成に関わるアミノ基窒素とカルボニル炭素が求核反応に適した配置となり、環化反応が生じ易くなることが判明した。このことが、食品中にPro含有DKPが豊富に存在する理由であると考えられた。

Pro含有DKPの一斉測定法の開発: Pro含有DKP20種類を測定対象としてLC-MS/MS条件の最適化を行った後、各種DKP標品の検量線を作成した。その結果、今回分析対象としたPro含有DKP20種類は

保持時間18分以内に検出された (図3)。検量線の相関係数は0.995以上 (n=7)、DKP濃度0.05 mg/Lにおける変動係数は6%以下 (n=3) となり、高い直線性と再現性が認められた。二段階発酵茶の碁石茶中のDKPの定量を試みたところ、各種DKPの検出限界は0.03 mg/L 以下、定量限界は0.06 mg/L 以下 (cyclo(-Cys-Pro) を除く) であった。DKP標品 (0.05 mg/L) の添加回収試験の回収率は93~117%となり、定量性の面でも問題がないことを確認した。以上のことから、本法は食品のDKP定量法として実用可能であると判断した。さらに、碁石茶中には17種類のPro含有DKPが検出され、その総量は3.7 mg/Lであった。

食品中のDKPの定量と生成機構: ナチュラルチーズ、碁石茶、鰹節を対象として、Pro含有DKP20種類を含む全42種類のDKPの定量を行うとともに、DKP生成機構に関する考察を行った。その結果、チーズでは、熟成チーズが未熟成チーズと比べて、DKP含量、種類ともに高い値を示した。また、カゼインのプロテアーゼ (トリプシン、キモトリプシン) 消化物から25種類のDKPが検出され、そのうち21種類が実際のチーズで検出されたDKPと一致した。チーズ、及びカゼインの酵素消化物で検出されたDKPは、カゼインの一次構造と良好な一致を示した。以上のことから、チーズ中のDKPの大部分はカゼインに由来し、DKP生成の主要因はプロテアーゼによるタンパク質分解であることが判明した。また、碁石茶では、発酵前に13種類のDKPが検出されたのに対し、好気発酵後に15種類、嫌気発酵後に2種類のDKPが新たに検出された。両発酵段階においてタンパク質分解の進行とpHの低下が認められ、これらの変化がDKPの生成と関連していると考えられた。一次構造との比較からRibulose 1,5-Di phosphate Carboxylase (RuBiSCO) がDKP生成源の1つであることが判明した。鰹節においても、製造工程中にDKP含量、種類ともに増加し、カビ付後の本枯節に最も高い値が認められた (20.9 mg/L、27種類)。鰹節製造工程中には、タンパク質分解の進行は認められず、焙乾工程の高温加熱とカビ付け工程の保温による継続的な加熱がDKP生成の主要因であると推察された。以上の結果より、食品中に含まれるDKPは、発酵に伴うタンパク質分解、あるいは加熱により直鎖ペプチドが生成し、その直鎖ペプチドのN末端から2分子が環化して生成していることが明らかとなった。同時に、食品中のDKPは大部分が主要タンパク質由来であることも明らかとなった。

本研究では、食品中の主要DKPであるPro含有DKPの一斉測定法を開発して実際の食品分析に適用するとともに、Pro含有DKPの生成機構の解明を行った。DKPは呈味や生理活性に寄与する物質として注目を集めている物質であり、本研究の成果は今後の研究の発展に資するものと期待される。

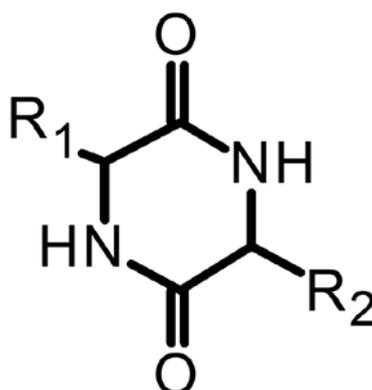
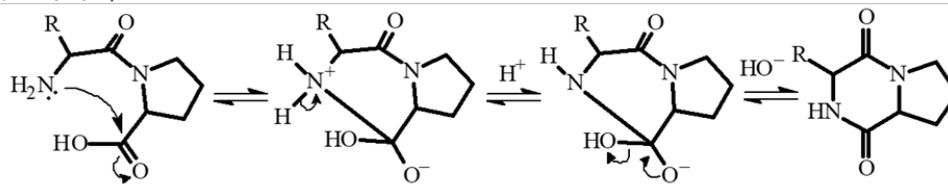


図1: DKPの構造

◇ 直鎖ジペプチド



◇ 直鎖トリペプチド

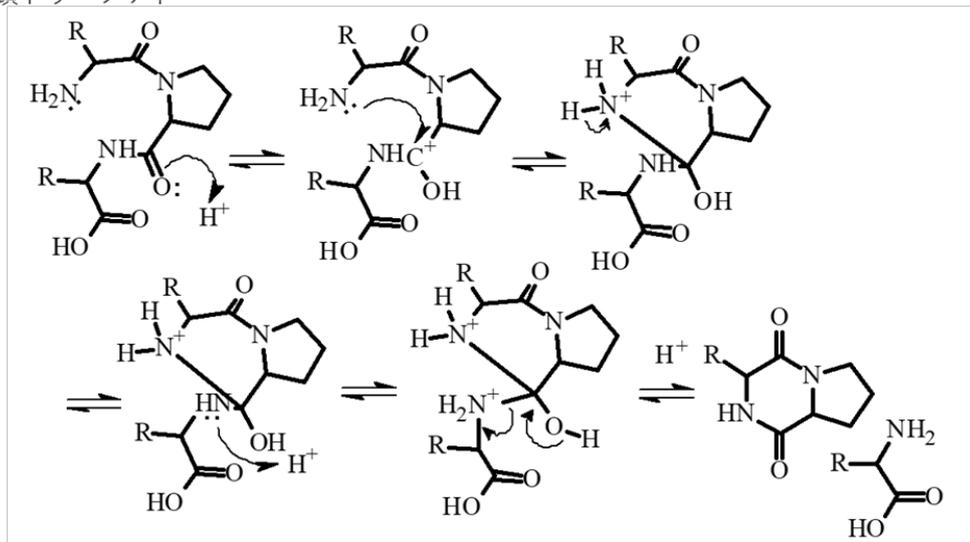


図2: 直鎖ペプチドからのDKP生成機構

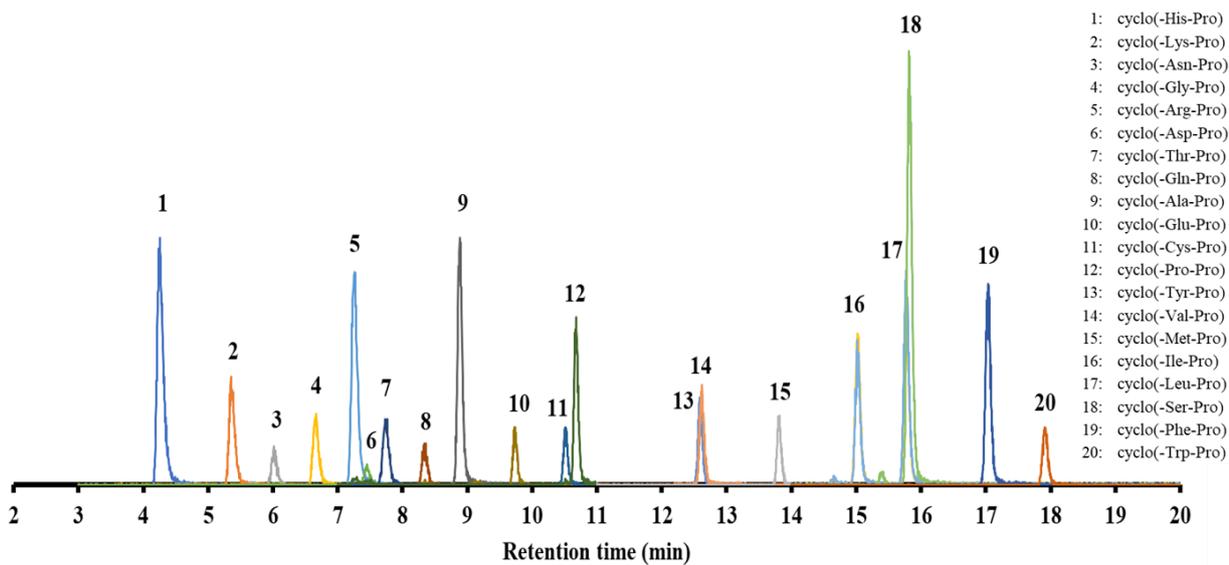


図3: Pro含有DKP20種類のMRMクロマトグラム