

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	大塚 祐季
審査委員	主査 島村 智子
	副査 柏木 丈広
	副査 菅原 卓也
	副査 渡邊 彰
	副査 村松 久司

論文名

機能性成分環状ジペプチドの生成機構に関する研究

審査結果の要旨

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)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てきている。過去の研究において、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った。また、DKPは加熱や発酵に伴い生成するとされてきたが、食品中における生成機構の詳細については明らかとなっていない。本論文は、上記のような背景のもと、モデル直鎖ペプチドを用いたDKP生成機構の解明、Pro含有DKP全20種類の一斉測定法の開発、実際の食品中でのDKP生成機構に関する考察を行ったものである。以下にその内容を記す。

直鎖ペプチドからのDKP生成機構: ジペプチド2種類、トリペプチド10種類、テトラペプチド1種類を用い、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pH5.0から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。一方、テトラペプチドではpH6.0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、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判断した。

Pro 含有 DKP の一斉測定法の開発: Pro 含有 DKP 全 20 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、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。また、碁石茶では 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。以上の結果より、本法は食品中の DKP の定量法として実用可能であると判断した。

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 DKP 20 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-Diphosphate Carboxylase が DKP 生成源の 1 つであることを明らかとした。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。

以上、本論文は、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ものである。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ものであり、本研究の成果は食品化学、食品機能学の発展に寄与するものであると高く評価される。

本論文に関する公開審査会は、令和 3 年 2 月 2 日にリモートシステムを利用して開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。