

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 佐藤健司

副査 牛田一成

副査 渡部邦彦

1 氏 名

清野珠美

2 学位の種類

博士 (学術)

3 学位授与の要件

学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目

Study on pyroglutamyl peptides in Japanese rice wine, Sake.

(日本酒中のピログルタミルペプチドに関する研究)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文では発酵食品の一つである日本酒中に含まれるアミノ末端がピログルタミン酸となったピログルタミルペプチドの構造を解明し、その生成機構を明らかにしている。さらに日本酒中のピログルタミルペプチドの生理機能を大腸炎動物モデルで評価し、新規の大腸炎抑制ピログルタミルペプチドを同定している。さらに上記の結果に基づき、蒸米、麴、水から大腸炎抑制作用を動物モデルで示す、アルコールを含まない発酵産物を試作している。

第1章で研究の背景として、アミノ末端がピログルタミン酸となったピログルタミルペプチドの食品タンパク質酵素分解物中での存在と生理機能を概説し、これら

のピログルタミルペプチドが発酵食品にも含まれている可能性を指摘している。さらに日本酒の製造法を概説し、本研究で日本酒を研究対象とした理由を説明している。

第2章では、市販されている日本酒から、19種類の短鎖ピログルタミルペプチドを分離、同定し、pyroGlu-Leu (pEL) と pyroGlu-Gln (pEQ) が主要ペプチドであることを明らかにしている (日本酒ピログルタミルペプチド中、約 36.2% および 21.3%)。pEL は、すでに動物モデルにおいて肝炎および大腸炎を抑制することが明らかにされている。市販されている製造元の異なる5種の日本酒には 40–60 μM (10–15 mg/L) の濃度の pEL が含まれることを見出している。麴に用いる *Aspergillus oryzae* のプロテアーゼを蒸米に処理すると pEL は生成するが、熱失活させた麴抽出液中で清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を培養しても pEL 濃度は増加しないことを明らかにしている。さらに酒母発酵中に ^{13}C -Leu を過剰に添加しても、pyroGlu- ^{13}C -Leu の割合は増加しないことを明らかにし、日本酒中の pEL が、*A. oryzae* 由来プロテアーゼによる米タンパク質分解により生成され、pEL 生成に対して酵母の存在は必須ではないと結論している。

第3章では日本酒中に動物モデルにおいて大腸炎を抑制する pEL の存在が明らかとなったため、他のピログルタミルペプチドの大腸炎抑制作用を動物モデルで評価している。市販日本酒中の成分を等電点および疎水性の差に基づき、分画したところ、特定の画分の摂取で大腸炎の緩和作用が認められた。活性画分中に含まれるピログルタミルペプチドを分離し、pyroGlu-Tyr (pEY), pyroGlu-Asn-Ile (pENI), pyroGlu-Asn-Ile-Asp-Asn-Pro (pENIDNP) を同定している。これらのペプチドを化学合成し、単独での DSS 誘発性大腸炎に対する抑制効果を検証した結果、pENI および pEY が、1.0 mg/kg 経口投与で有意な大腸炎抑制効果を示した。この pENI は、大腸炎で変化した *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門の比を正常化した。pEY にはそのような作用はなく、両者の作用メカニズムが異なることを示唆している。

日本酒の中に複数の比較的低濃度で動物モデルにおいて大腸炎を抑制するピログルタミルペプチドを見出し、これらのペプチドの製造に清酒酵母が必須で無いことを明らかにしている。そこで、第4章では酵母を添加せず、麴のみを用いた大腸炎抑制作用を持つ米発酵飲料の作成を試みた。麴米 (精米歩合 90%)、蒸米、水を混合し、高温 (55°C) で 4 時間糖化を保持した米高温発酵物を試作したところ、pEL (約 20 μM) と pEY (約 4 μM) を含むが、pENI や pENIDNP 含まないことを見出した。一方、麴米 (精米歩合 90%)、水、乳酸を混合し、10°C または 20°C で 2 週間発酵させた米低温発酵物では、pEL を 100 μM 程度含有し、他の3ピログルタミルペプチドも、市販の日本酒中濃度に近い濃度を持っていた。米高温及び低温発酵物を、3.0 mg 総ペプチド/kg 体重で大腸炎モデルマウスに投与した結果、高温発酵物投与群では改善効果が見られなかったのに対し、低温発酵物投与群では、コントロール群と比較して、

有意な大腸炎改善効果を見出している。

第5章では、各章で得られた結果をまとめて総括としている。

本論文では、菌体外にペプチダーゼを分泌する *A. oryzae* を用いる発酵食品である日本酒中に多くの短鎖ピログルタミンペプチドが存在することを初めて報告し、その中の pEL, pEY, pENI が動物モデルで大腸炎を改善することを見出している。またこれらのペプチドを含む、大腸炎改善効果を示す非アルコール発酵物の試作に成功している。低温発酵物は、体重あたりでヒトに換算して 20 mL 以下の実用的な用量で効果がある事を見出している。また発酵物中の pEL, pEY, pENI 含量は単独で効果を示す用量よりかなり小さく、これらの成分、または他の成分と共同して効果を示す事が示唆されている。本研究で単独で効果のある成分が同定されているので、このような組み合わせによる作用が検討可能となっている。複雑な組成を持つ発酵食品の機能解明の面で優れた学術性と高い実用性を持つと考える。

6 最終試験の結果の要旨

平成 26 年 2 月 24 日午後 2 時より、図書館視聴覚教室において博士論文発表会を公開で開催し、口頭発表後に質疑応答を行った。質問内容は、pEL, pEY, pENI の大腸炎抑制作用メカニズム、生体利用能、日本酒・米低温発酵物中のペプチドの含量とその生成メカニズムの多岐に及んだが、それぞれの質問に適切に回答していた。以上より、最終試験の結果については、審査委員全員一致で合格と判断した。