

研究報文

麹菌DPPIVを用いた発酵食品からの DPPIV阻害ペプチドの精製と解析

辻聡^{1*}, 佐藤公亮², 館博³

(¹ 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科, ² 東京農業大学大学院
農学研究科醸造学専攻, ³ 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科)

Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibitory activity from fermented food using DPPIV from *Aspergillus oryzae*

Akira Tsuji^{1*}, Kousuke Sato², Hiroshi Tachi³

¹ Department of International Agriculture Development, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

² Department of Fermentation Science and Technology, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

³ Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

*Corresponding author. Akira Tsuji

Department of International Agriculture Development, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan. Tel. : +81- 3 -5477-2394. FAX : +81- 3 -5477-2659. E-mail : at202493@nodai.ac.jp

麹菌由来DPPIVがヒト由来DPPIVの代替としてDPPIV阻害活性測定に利用可能であることを示した。濃口醤油と米味噌にDPPIV阻害物質が含まれることを示唆した。納豆の主要なDPPIV阻害物質としてLys-LeuとLeu-Argを同定した。

緒 言

糖尿病は世界的に問題とされる生活習慣病である。世界の成人の4億2200万人が糖尿病を患っており、成人の11人に1人が疾患していることになる。糖尿病はインスリンの投与が必要な1型と、インスリンを効果的に活用することが困難になる2型に分類され、多くの糖尿病患者は2型に属する。2006年、2型糖尿病の治療薬のひとつとして、Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 阻害薬であるシタグリブチンが開発され、DPPIV阻害薬はひとつの治療薬として確立された。以降、現在までに11種類のDPPIV阻害薬が開発されており、DPPIVの基質を模したペプチド

型と非ペプチド型が存在する^{1,2)}。

DPPIV (EC 3.4.14.5) はN末端から2番目にプロリンあるいはアラニンを含むペプチドを分解し、Xaa-ProおよびXaa-Alaを生成するセリンプロテアーゼである³⁾。DPPIV阻害物質の作用機序としては、小腸内L細胞から分泌される消化管ホルモンであるGlucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分解を阻害することにある。GLP-1が膵臓β細胞に到達することで、グルコース誘発性インスリンの増強およびグルカゴン分泌が抑制され、グルコース恒常性に有益な効果をもたらす。しかし、その多くがDPPIVにより数分以内に分解されるため、実際に作用するGLP-1は

全体の10%程度に留まる¹⁾。以上より、DPPIV阻害物質はDPPIVによるGLP-1の分解を阻害し、活性型GLP-1を膵臓β細胞に到達させることが可能となる。更に、他の経口糖尿病治療薬とほぼ同様にHbA1c値を減少させる効果を持つ一方で、他の治療薬に見られる低血糖、体重増加、胃腸部への影響などの典型的な副作用がないことも明らかになっている¹⁾。

これらDPPIV阻害物質に関する研究が行われてから約20年間が経過している¹⁾。しかしながら、DPPIV阻害物質に関する研究を行う上で、ヒト由来のDPPIVは依然として高価である⁴⁻⁶⁾。そのような背景の中、真菌類や細菌がDPPIVを有することが報告された。しかし、原核生物由来のDPPIVの一部分は、ヒトの代謝において不適切な翻訳後修飾が行われているため使用できない。これに対し、ヒト同様の真核生物に属する*Aspergillus*属由来のDPPIVは、ヒトDPPIVと同一性があり、同様の働きを示すことが明らかになっている。しかし、ヒトDPPIV阻害物質の探索における*Aspergillus*属由来DPPIVの有用性については検討されていなかった。以上より、本研究では*Aspergillus oryzae* KBN616由来のDPPIVをヒト由来DPPIVの代替として用いたDPPIV阻害活性測定法の有用性を明らかにした。

また、先に述べたDPPIV阻害薬が販売される以前より、*Bacillus cereus*の培地濾過液からペプチド性DPPIV阻害物質であるジプロチンA (Ile-Pro-Ile) およびB (Val-Pro-Leu)が報告されている⁷⁾。また、ゴータイプチーズのカゼイン由来であるLeu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leuや、米糠タンパク質の麹菌酵素加水分解物であるIle-ProおよびLeu-Pro、タイセイヨウサケゼラチンの*Bacillus*由来酵素加水分解物であるGly-Pro-Ala-GluおよびGly-Pro-Gly-AlaなどについてもDPPIV阻害活性を有することが報告された⁸⁻¹⁰⁾。これらのDPPIV阻害物質は原料タンパク質が微生物由来の酵素により分解され、生成されていることも明らかになっている。以上の背景から、タンパク質の豊富な大豆を原料としている発酵食品として濃口醤油と米味噌、納豆に着目した。

濃口醤油は原料のタンパク質分解率が高く、窒素分に対する遊離アミノ酸が多くペプチド含有量は低い

ものの多様なペプチドが検出されている¹¹⁾。米味噌の原料タンパク質分解率は25%程度であり、多量のペプチドを含有している¹²⁾。納豆の原料タンパク質分解率は他の発酵食品と比較して低くさまざまなペプチドを含有している¹³⁾。これらの各発酵食品が含むペプチドの機能性として血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素阻害活性が報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。また、リン脂質結合大豆タンパク質分解ペプチドの血清コレステロール低下作用や生物系界面活性剤の中でも非常に優れた作用を有するリポペプチドのサーファリンなど様々な知見も報告されている^{17, 18)}。しかし、DPPIV阻害物質についての知見は明らかにされていない。また、過去に報告されたDPPIV阻害物質の含有が示された食品は一般的に流通していない形態が多い。これに対し、市販の発酵食品からDPPIV阻害物質が検出されれば、日本の伝統的な発酵食品の新たな可能性を示せると考えられる。

また、納豆食は大豆食と比較して血糖値の上昇抑制効果があることが報告されている¹⁹⁾。この作用は納豆の水溶性食物繊維の影響が示唆されているが、詳細な機構は不明であった。納豆からDPPIV阻害物質が検出されればその機構の一端が明らかに出来ると考えられる。

以上より、本研究では各種市販発酵食品中のDPPIV阻害活性を調査した。また、納豆については既知のDPPIV阻害物質と比較を行う目的で半阻害濃度(IC₅₀)を算出し、主要なDPPIV阻害物質の構造特定を試みた。その後、特定したDPPIV阻害物質の消化管酵素耐性も明らかにした。

実験方法

1. 供試発酵食品を用いた試料溶液の調製

市販の濃口醤油を25倍希釈し、Amicon Ultra-15(分画分子量3,000, Millipore製)を用いて遠心分離(5,000×g, 90min)し、分子量3,000以下の画分を濃口醤油試料溶液とした。

市販米味噌10gを量り取り、100 mL程度の超純水に溶解・加熱し、1分間弱く沸騰させた。これを定数濾紙No.2を用いて吸引濾過し、濾液を250 mLにメスアップし、米味噌浸出液とした。米味噌浸出液は

Amicon Ultra-15 (Millipore 製) を用いて分子量3000以下の画分を回収し, 米味噌試料溶液とした。

濃口醤油試料溶液と米味噌試料溶液はTOYOPEARL HW-40S (1.5cm×150.0cm, 東ソー製) を用いて, 超純水を溶媒とし流速0.5 mL/min, 室温下でゲル濾過クロマトグラフィーを行った

市販納豆に10倍量の超純水を加え60℃で35分間の加熱処理を行い, γ -ポリグルタミン酸 (PGA) を抽出し超純水と共に除去した。PGA除去納豆を乳鉢で磨砕し 5 倍量の沸騰水を加えて室温にて 1 時間抽出後, 定性濾紙No.2を用いてろ過し, ろ液をAmicon Ultra-15 (Millipore 製) を用いて分子量3,000以下の画分を納豆試料溶液とした。

2. *A. oryzae* KBN616由来DPPIVを用いたDPPIV阻害活性の測定

酵素抽出液の調製とDPPIVの分離精製は, 館らの方法に準拠して実施した⁵⁾。分離精製後, 最終酵素活性が0.8 nkat/mLとなるよう50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) で希釈し, DPPIV阻害活性の測定に用いた。DPPIV阻害物質として, 既存のDPPIV阻害剤であるP32/98 (Focus Biomolecules 製) を超純水で1.0 μ Mに調製して用いた。P32/98溶液20 μ Lに50mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 50 μ Lおよび0.03mM Gly-Pro-MCA 100 μ Lを混合し, *A. oryzae* KBN 616およびヒト組換え体由来のDPPIV (コスモバイオ社製) を30 μ L加え37℃に予熱した蛍光プレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader FLx800TBI, Bio-Tec Instrument Inc. 製) を用いて, 励起波長360 nm, 蛍光波長460 nm で蛍光強度を50秒間隔で20分間測定した^{20, 21)}。

3. 各種発酵食品のDPPIV阻害物質の検索

各試料溶液20 μ Lに50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 50 μ Lおよび0.03mM Gly-Pro-MCA 100 μ Lを混合し, *A. oryzae* KBN 616由来DPPIV を30 μ L加え, 37℃に予熱した蛍光プレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader FLx800TBI, Bio-Tec Instrument Inc. 製) を用いて, 励起波長360nm, 蛍光波長460nmで蛍光強度を50秒間隔で20分間測定し

た。対照区には超純水を用いた。試料区と対照区の活性を比較し, 各試料のDPPIV阻害率を算出した。

4. 納豆からのDPPIV阻害物質の精製

高い活性を示した納豆試料溶液 6 mLに対して, TOYOPEARL HW-40S (1.5 cm×150.0cm, 東ソー製) を用いて超純水を溶媒とし流速0.5 mL/min, 室温下で24時間のゲル濾過クロマトグラフィーを行った。分画した各試料のDPPIV阻害活性と吸光度計 (UV-1700, 島津製作所製) を用いて吸光度280 nmを測定し, 高いDPPIV阻害活性を示すフラクションを回収した。次に取得したフラクションをSuperdex Peptide 10/300 GL (1.0cm×30cm, GEヘルスケア製) を用いて50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を溶媒として流速0.7mL/min, 室温下で50分間のゲル濾過クロマトグラフィーを行った。分画した各試料のDPPIV阻害活性と吸光度280 nmを測定し, 高いDPPIV阻害活性を示すフラクションを回収した。

取得したフラクションに対してTSKgel ODS-80Ts (4.6 mm×250.0 mm, 東ソー製) を用いて流速1.0 mL/min, 40℃下で0.1%トリフルオロ酢酸溶液から60分間かけて35%アセトニトリル溶液になるようリニアグラジエントによる溶出を行った。分画後に遠心濃縮機 (VP-15S, タイテック社製) を用いてフラクションの水分を完全に揮発後, 1%ジメチルスルホキシド溶液で再懸濁しDPPIV阻害活性と吸光度220nmの測定を行った。

5. 納豆からのDPPIV阻害物質の同定

LCMS/MSのLC部はUPLC Acquity (Waters社製) を, MS部は Xevo QToF MS (Waters社製) を用いた。分析カラムはWaters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, i.d., 1.7 μ m) を用い, カラム温度40℃とした。移動相はA液に0.1%ギ酸溶液, B液に0.1%ギ酸添加アセトニトリル溶液を用いた。グラジエント条件は0-8分 (B: 5%-100%), 8-10分 (B: 100%) とし, 流速は0.4 mL/minとした。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のポジティブモードとし, キャピラリー電圧2.0 kV, コーン電圧30 Vで行った。取得したスペクトルはMETLINスペクトルデー

データベース (<https://metlin.scripps.edu/>) を用いて同定した。同定した配列のペプチド標準品を用いて、納豆試料溶液中のペプチド含有量を測定した。

取得したペプチドを含むフラクションのアミノ酸を酸加水分解法により解析した。6 M HCl により24時間の酸加水分解した試料溶液を、Shim-pack Amino-Na (6 mm×100mm, 島津製作所製) を用い、クエン酸三ナトリウム溶液を移動相、*o*-フタルアルデヒドを反応試薬として、励起波長348nm, 蛍光波長450nmにより分析を行った。同定したペプチドの検索はExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) の大豆タンパク質のアミノ酸配列情報を用いて行った。

6. 納豆から特定されたDPPIV阻害活性ペプチドの活性比較

同定したDPPIV阻害活性ペプチドとDiprotin A, Ile-ProのDPPIV阻害活性を測定し比較した。Diprotin Aは最も高いDPPIV阻害活性を示すトリペプチドである。Ile-Proは米糠タンパク質加水分解物から精製されたDPPIV阻害物質として報告されている²³⁾。そして、これは食品タンパク質から生成されるDPPIV阻害物質として非常に高いDPPIV阻害活性を示すことが報告されている²³⁾。

7. 納豆からの特定されたDPPIV阻害活性ペプチドの消化耐性

判明したDPPIV阻害活性を示すペプチドに対し消化酵素を用いて消化耐性試験を行った²⁴⁾。ペプシンを含む人工胃液にDPPIV阻害活性を有するペプチドを加え、攪拌条件下、37℃にて2時間消化し、0.1 M NaOHと0.1 M NaHCO₃でpH7.0からpH 8.0に調整した。その後、パンクレアチンを試料に対して1:25の割合で加え、攪拌条件下、37℃にて2時間の消化処理後、10分間の湯煎により酵素反応を停止した。対照群は消化酵素を添加せず同様の処理を行うことで調製した。調製後、消化酵素処理群と対照群のDPPIV阻害活性を測定し比較した。

結果および考察

1. ヒト由来DPPIVと*A. oryzae* KBN616由来DPPIVの阻害活性比較

ヒトおよび*A. oryzae* KBN616由来のDPPIV阻害活性についてDPPIV阻害薬P32/98を用いて測定した。その結果、阻害率は各々83.6±0.4%, 81.4±1.3%となり、これらの値はt検定において、統計的有意差を示さなかった(P>0.1)。

これまでに、微生物によるDPPIVの生産は最も経済的な方法であるといった報告がなされている^{26, 27)}。その中でも真核生物に属する*Aspergillus*属由来のDPPIVは、ヒトに向けた市販酵素としての有用性が示唆されていた²⁸⁾。本研究により、*A. oryzae* KBN616由来のDPPIVが、ヒトDPPIV阻害物質に阻害されることを確認し、DPPIV阻害物質の探索においても利用可能であることを明らかにした。そこで、*A. oryzae* KBN616由来のDPPIVをDPPIV阻害活性の測定に利用可能だと判断し、我々は各試料溶液のDPPIV阻害活性測定に用いた。

2. 各種発酵食品のDPPIV阻害活性の測定

濃口醤油と米味噌に含有する食塩がDPPIV阻害活性測定に影響してしまう。そこで、各試料溶液をTOYOPEARL HW-40Sを用いて分画した。濃口醤油を分画した結果を図1に示した。食塩とペプチドが分画できたフラクションでは最大で10.1±1.0%のDPPIV阻害活性を示した。濃口醤油は70%から90%

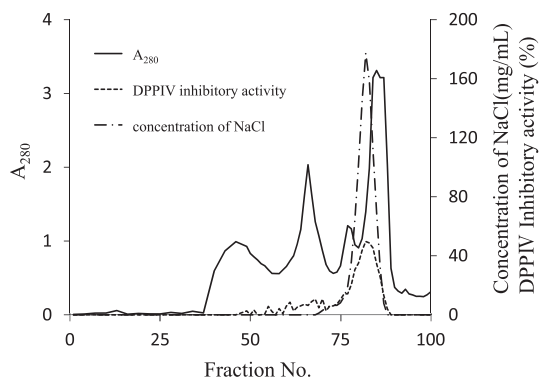


図1. HW-40Sカラムを用いた濃口醤油試料溶液中の阻害活性ペプチドの分画

程度の高い原料タンパク質分解率を示し、原料がアミノ酸まで分解されている割合が高いことからDPPIV阻害活性は低い値を示したと考えられる。

米味噌を分画した結果を図2に示した。食塩とペプチドが分画できたフラクションでは最大で22.9±1.5%の阻害活性を示した。濃口醤油に比べて米味噌が高いDPPIV阻害活性を示す原因として、米味噌の原料タンパク質分解率が濃口醤油と比較して低い値を示すことが挙げられる。原料タンパク質分解率が低く、ジペプチド含有量が高い試料が高いDPPIV阻害活性を示す可能性を示唆した。

納豆のDPPIV阻害活性を測定した結果、83.6±0.4%のDPPIV阻害活性を示し、IC₅₀値は5.35±0.27 mg/mLであった。DPPIV阻害に関して食品由来のペプチドまたは食品自体のIC₅₀についていくつかの報告が存在している⁸⁻¹⁰⁾。これらと比較して酒粕の加水分解よりも低い値だが納豆のIC₅₀は米糠タンパク質加水分解物よりも高い値を示している(表1)。しかしなが

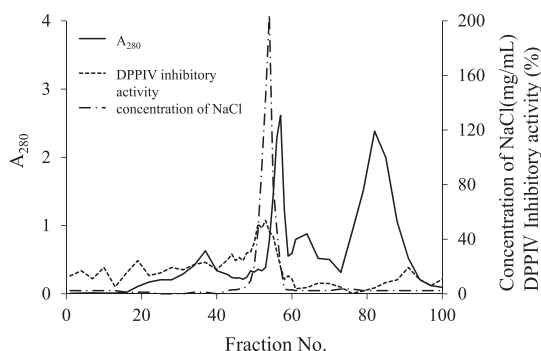


図2. HW-40Sカラムを用いた米味噌試料溶液中の阻害活性ペプチドの分画

表1. DPPIV阻害活性とIC₅₀

Sample	IC ₅₀ (mg/mL)	References
Natto sample solution	5.35 ± 0.27	This study
Sake lees hydrolysate*	27.55 ± 5.76	Hatanaka <i>et al.</i> (2015)
Rice bran protein hydrolysate**	1.28 ± 0.18	Hatanaka <i>et al.</i> (2012)

* The hydrolysate using Denazyme AP (50,000 PUN/g powder) from *A. oryzae*

** The protein from defatted rice bran hydrolyzed by Umamizyme G (70 u/g) derived from *A.*

ら、米糠タンパク質加水分解物は工業的な酵素による処理により、タンパク質を加水分解させたものであり、市販食品ではない。我々の研究では、市販の食品である納豆がDPPIV阻害活性を有することを明らかにした。これらの結果から、納豆はDPPIV阻害物質を含有することが示唆された。従って我々は、DPPIV阻害物質の構造を明らかにする目的で、納豆からの分離精製を実施した。

3. 納豆由来のDPPIV阻害物質の分離精製

図3に納豆から調製した試料溶液のTOYOPEARL HW-40Sを用いたゲル濾過クロマトグラムを示した。6つの主要なピーク(フラクションNo.29, 34, 40, 45, 51, 61)が、40%以上のDPPIV阻害活性を示していた。これらのフラクションは280nmの吸光もみられた。特にフラクションNo.40は55.1%の最も高いDPPIV阻害活性を示していた。また、フラクションNo.61は独立したピークとして溶出されており、46.7%の高いDPPIV阻害活性を示していた。以上の結果より、これらのフラクションはDPPIV阻害活性を有するペプチドを含むと推定した。従って、我々は40%以上のDPPIV阻害活性を有する6つのピークを回収し、更なる分離精製に供した。

6つのフラクションに対してSuperdex Peptide 10/300GLを用いた分離精製結果を図4に示す。No.29およびNo.40においては、DPPIV阻害活性が複数のフラクションにみられた。しかし、前工程におけるNo.29およびNo.40のDPPIV阻害活性は高い値を示していたにも関わらず、本工程におけるフラクション

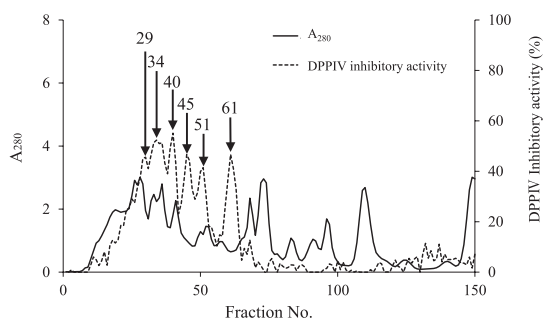


図3. HW-40Sカラムを用いた納豆試料溶液中の阻害活性ペプチドの分画

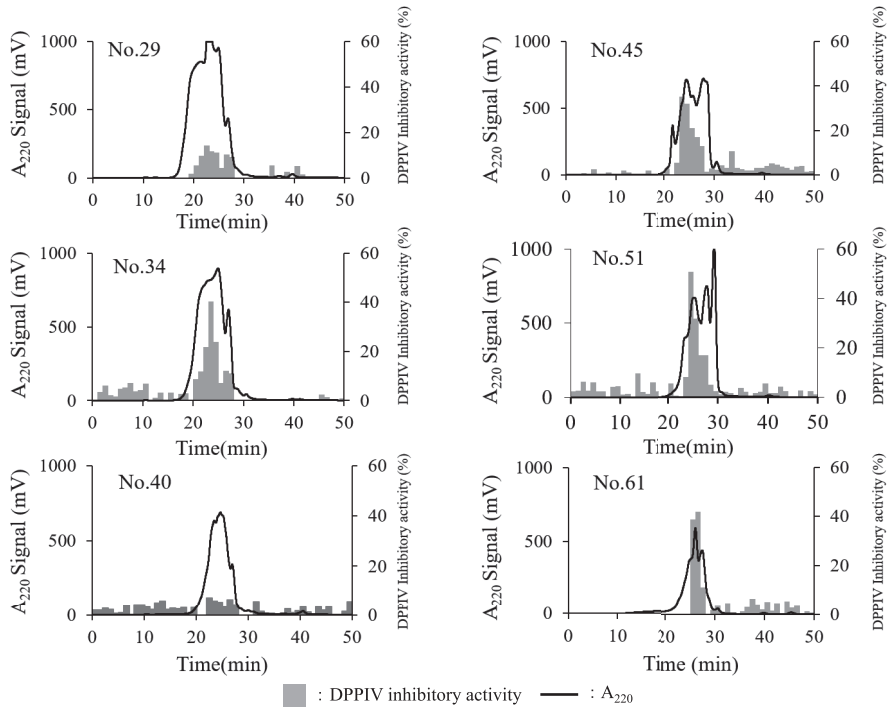


図4. Superdex peptide GL 10/300を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

ではそれぞれが低い値を示していた。そのため、前工程において高いDPPiV阻害活性を示したNo.29とNo.40は、低いDPPiV阻害活性を示す複数のDPPiV阻害物質によるものであることが示唆された。一方で、No.34, 45, 51, 61は、特定のフラクションに高いDPPiV阻害活性を示し、これらのフラクションには220 nmの吸光も見られた。以上よりこれら4つのフラクションには、高いDPPiV阻害活性を有する特定のペプチドを含有していると考えられた。そのため、30%以上のDPPiV阻害活性を有するそれぞれのフラクションを回収し、TSKgel ODS-80Tsによる分画試験に供した。

次いで、取得したフラクションをTSKgel ODS-80Tsを用いて逆相クロマトグラフィーに供した(図5)。その結果より、No.51およびNo.61は依然として特定のフラクションに高いDPPiV阻害活性を示していた。更に、これらのフラクションには、220nmの吸光も見られた。従って、No.61からはフラクションNo.25を回収した。しかし、No.51については、高

いDPPiV阻害活性を有するフラクションの吸光度から、幾つかのペプチドが同じフラクションに溶出されていることが見受けられた。従って、高いDPPiV阻害活性を示した3つのフラクションを回収し、リクロマトに供した。その結果、単一のペプチドを含むと考えられ、高い阻害活性を示すフラクションが分画された(データ非表示)。これらの工程で得られたフラクションを構造解析に供した。

4. 納豆から取得したDPPiV阻害物質の同定

我々は、LC-MS/MSおよび、<https://metlin.scripps.edu/>で利用可能なMETLINスペクトルデータベースにより特定された分子式を基に、精製したフラクションの構造を決定した。No.51の特定の結果、Lys-LeuまたはLys-Ileであることが示唆された。続いてアミノ酸分析により、含有アミノ酸を特定し、LysおよびLeuが含有することが明らかになった(データ非表示)。以上より、No.51はLys-Leuと同定した。No.51の特定の後、No.61についても同様の

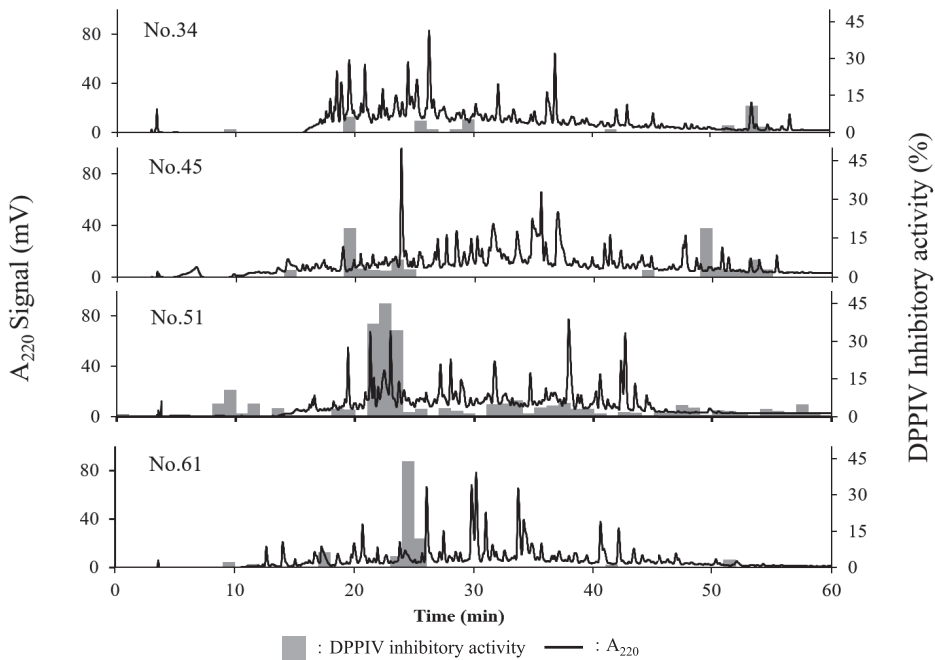


図5. ODS-80Tsを用いた逆相クロマトグラフィーによる精製

手法で構造特定を実施した。LC-MS/MS, METLIN スペクトルデータベース, そしてアミノ酸分析を用いた結果, No.61はLeu-Argであることが明らかになった。更に<http://expasy.org/>で利用可能な ExPASy Proteomics Serverにより, これらのジペプチドは大豆の主要なタンパク質に含有することを確認した。No.51はglycinin (250-251, 354-355), β -conglycinin α -chain (418-419, 568-569) および β -chain (147-148) に含有し, No.61はglycinin (386-387), β -conglycinin α -chain (187-188, 230-231) そして β -chain (69-70, 242-243) などに含有していた。加えて, これらのペプチドのDPPIV阻害活性を測定した結果, Lys-LeuおよびLeu-Argの IC_{50} は各々 $41.40 \pm 2.68 \mu M$ と $598.02 \pm 18.35 \mu M$ であることが明らかになった。本報告により, Lys-LeuおよびLeu-ArgがDPPIV阻害活性を有することを明らかにし, IC_{50} 値を特定した。これらのペプチドのDPPIV阻害活性の強さについては, Leu-ArgのDPPIV阻害活性はLys-Leuの14分の1であった。しかし, 大豆タンパク質には多量のLeu-Argの配列が含有されてい

るため, Leu-Argは納豆の主要なDPPIV阻害物質として特定されたと推測した。続いて, 他のDPPIV阻害活性を有するペプチドとDPPIV阻害能を比較する目的で, Diprotin A (Ile-Pro-Ile)とIle-ProのDPPIV阻害活性も測定することとした。Diprotin AはDPPIV阻害活性を有するペプチドの中でも最も高いDPPIV阻害活性を示すトリペプチドとして認知されている。Ile-Proは脱脂米糠から精製され, 食品中から精製されたジペプチドとして非常に高いDPPIV阻害活性を示すとの報告もされている³²⁾。測定の結果, Diprotin Aは $6.83 \pm 0.53 \mu M$, Ile-Proは $167.79 \pm 4.96 \mu M$ の IC_{50} 値を示した。以上より, Lys-Leuは他のジペプチドと比較して, 非常に優れたDPPIV阻害活性を有することが明らかになった (表2)。続いて, 特定したDPPIV阻害物質の納豆中における含有量を特定した (表2)。Lys-Leuは $50 \mu g/g$ natto, Leu-Argは $85 \mu g/g$ natto 含有することが明らかになり, ExPASy Proteomics Serverによる大豆主要タンパク質のアミノ酸配列検索の結果でも高頻度で検出された, Leu-Argが比較的高い含有量を示していた。

表 2. 納豆試料溶液から特定したDPPIV阻害物質のDPPIV阻害活性と性質, 含有量の比較

DPPIV inhibitory substances	DPPIV inhibitory activity (IC ₅₀ µg/mL)	Content (µg/g natto)
Diprotin A	6.83±0.53	-
Ile-Pro	167.79±4.96	-
Lys-Leu	41.40±2.68	50
Leu-Arg	598.02±18.35	85

5. 納豆から取得したDPPIV阻害物質の消化耐性試験

特定したDPPIV阻害活性を有するペプチドが構造を維持した状態で小腸に到達するかを明らかにするために, 各ペプチドの消化耐性試験を実施した(図6)。加水分解処理群と未処理の対照群のDPPIV活性を比較した結果, 両者に統計的有意差は得られなかった($P>0.1$)。このことより, Lys-LeuおよびLeu-Argは, 消化管酵素による消化に対し, 耐性を有することが明らかになった。GLP-1を膵臓β細胞へ到達させるためにはDPPIV阻害活性を有するペプチドが, 血漿中のDPPIVを阻害することが重要である。しかしながら, 血漿に到達するためには, これらのペプチドが消

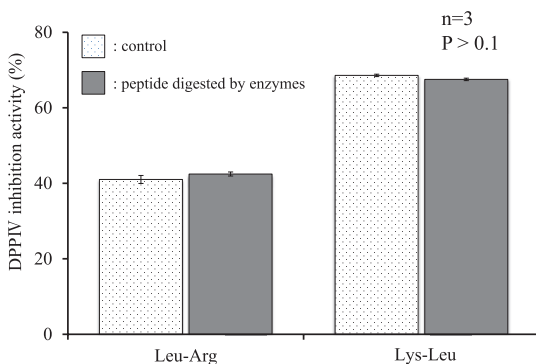


図 6. 納豆試料溶液から特定したDPPIV阻害物質の消化耐性

化管酵素による消化耐性を有する必要があり, 構造を維持した状態で小腸を通過する必要がある²⁹⁾。Lys-LeuならびにLeu-Argにおける消化耐性については, 既に本研究にて実証した。

過去の報告により, 納豆食は大豆食にはない血糖値の上昇抑制効果を有することが, ヒトの臨床試験により明らかになっている¹⁹⁾。この効果は, 納豆中の水溶性食物繊維と高い粘性によるものと推測しているが, その作用機序等は明確にされていない。本研究では, 血糖値の上昇抑制効果を示すひとつの要因としてDPPIV阻害活性を有するペプチドが関与している可能性を示した。本研究が醤油, 味噌, 納豆の新たな機能性付与の一助となり, 日本の伝統的な食事風景でもある, ご飯に醤油を垂らした納豆と味噌汁の組み合わせが, 糖尿病予防に向けても役立つ可能性を示した。今後のさらなる研究の発展により, 日本の伝統的な発酵食品の新たな可能性発見に繋がることが期待される。

本報は2018年6月8日に開催された日本醤油技術センター第86回醤油研究発表会(東京大会)において報告した内容に一部加筆したものである。なお, 本研究は本誌に先立ちFood Chemistry誌に掲載されている。本文と図表の大部分は文献25より改変・転載しており, 本論文を引用する際には文献25を引用する必要がある。

参考文献

- 1) Deacon, C. F. et al. : Diabetes, Obesity and Metabolism, **18**, 33 (2016).
- 2) Holst, J. J. et al. : Diabetes, **47**, 1663 (1998).
- 3) Bjelke, J. R. et al. : Biochemical Journal, **396**, 391 (2006)
- 4) Lloyd, R. J. et al. : Journal of General Microbiology, **137**, 49 (1991).
- 5) Tachi, H. et al. : Phytochemistry, **31**, 3707 (1992).
- 6) Zevaco, C. et al. : Journal of Applied Microbiology, **68**, 357 (1990).
- 7) Umezawa, H. et al. : The Journal of Antibiotics, **37**, 422 (1984).
- 8) Hatanaka, T. et al. : Food Chemistry, **134**, 797 (2012).
- 9) Li-Chan, E. C. Y. et al. : Journal of

- Agricultural and Food Chemistry, **60**, 973 (2012).
- 10) Uenishi, H. et al. : International Dairy Journal, **22**, 24 (2012).
- 11) Yamamoto, S. et al. : Journal of Bioscience and Bioengineering. **118**, 56 (2014).
- 12) Harayama, F. et al. : J. Brew. Soc. Japan. **87**, 829 (1992).
- 13) Onishi, R. et al. : Journal of Home Economics of Japan, **38**, 871 (1987).
- 14) Kinoshita, E. et al. : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. **57**, 1107 (1993).
- 15) Teranaka, T. et al. : Nippon Nogeikagaku kaishi. **69**, 1163 (1995).
- 16) Okamoto, A. et al. : Plant Foods for Human Nutrition, **47**, 39 (1995).
- 17) Hori, G. et al. : yakuri to chiryo, **31**, 155 (2003)
- 18) Oka, K. et al. : Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **41**, 1000 (1993).
- 19) Ishikawa, A. et al. : Seikatsu Eisei, **53**, 257 (2009).
- 20) Takai, S. et al. : Journal of Pharmacological Society, **125**, 386 (2014).
- 21) Lan, V. T. et al. : Peptides, **54**, 166 (2014).
- 22) Hatanaka, T. et al. : International Journal of Peptide Research and Therapeutics, **21**, 479 (2015).
- 23) Lacroix, I. M. E. et al. : Journal of Functional Foods, **4**, 403 (2012).
- 24) Yan, Q. J. et al. : Food Chemistry, **179**, 290 (2015).
- 25) Sato, K. et al. : Food Chemistry, **261**, 51 (2018).
- 26) Ota, T. et al. : Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53**, 6112 (2005).
- 27) Üstün, Ö. et al. : Bioprocess and Biosystems Engineering, **35**, 1417 (2012).
- 28) Öngen, G. et al. : Turkish Journal of Biology, **36**, 665 (2012).
- 29) Vermeirssen, V. et al. : British Journal of Nutrition, **92**, 357 (2004).