

氏名	林 実咲
学位の種類	修士 (生活科学)
学位記番号	生修第227号
学位授与年月日	平成31年3月15日
学位授与の要件	学位規準第15条第1項
学位論文題目	論文題目 豆味噌の Dipeptidyl peptidase-IV 阻害作用および活性因子の分離と同定
審査委員	主査 江崎 秀男 教授 副査 本山 昇 教授 副査 及川 佐枝子 講師

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

糖尿病は現代における最も一般的な慢性疾患のひとつであり、我が国の糖尿病人口は約 950 万人、また、予備群は約 1000 万人にも上ると報告されている。糖尿病はひとたび発症すると治癒することはなく、放置すると網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、末期には失明することや透析治療が必要となることがある。糖尿病の病型は、(1) 1型糖尿病、(2) 2型糖尿病、(3) その他、(4) 妊娠糖尿病に大別できる。糖尿病の発症要因としては、遺伝的要因と環境要因が重要であるが、特に2型では生活習慣が環境因子として重要である。我が国の糖尿病の大部分をしめるものは2型糖尿病であり、この疾患の対策としては、発症の予防・早期発見・合併症の予防が重要である。

新しい経口血糖降下薬として注目されている Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 阻害薬は、単独使用で低血糖を起こしにくい、体重増加をきたしにくい等の特徴を持つとされている。

過去の卒業研究において、食品の機能性から、糖尿病予防に寄与できる大豆発酵食品を検討したところ、豆味噌に強い DPP-IV 阻害作用を示すことが明らかとなった。そこで、この豆味噌を用いて活性成分の分離・精製、および成分の同定を行うこととした。

### 【方法】

#### 1. 試料溶液の調製

豆味噌 10%エタノール (EtOH) 抽出液の調製：豆味噌 (N 社、愛知県) に同量の蒸留水を加え、沸騰浴中で 10 分間加熱処理を行った。その後、抽出時の EtOH 濃度が 10%になるように 100%EtOH を加えた。更に抽出液量を増やすため 10%EtOH を加え、一晚室温で抽出を行った。No.101 および No.2 の濾紙でろ過し、このろ液を豆味噌の 10%EtOH 抽出液とした。

#### 2. DPP-IV 阻害試験

96 穴マイクロプレートの各 well に、試料溶液を 60 $\mu$ L ずつ分注し、そこに反応液量を 200 $\mu$ L に調整するために精製水を 10 $\mu$ L、200mM のリン酸緩衝液 (pH.8) を 100 $\mu$ L、DPP-IV 酵素液を 10 $\mu$ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 分間予備加温した。

盲検として、酵素液の代わりに精製水を 10 $\mu$ L 加え、同様に予備加温した。その後、基質として 3.5mM Glycine-Proline-*p*-nitroaniline-Tosyl (GPNT) 溶液を 20 $\mu$ L 入れ、37 $^{\circ}$ C で 60 分間加温し、405nm における吸光度を測定した。対照試験としては、試料溶液の代わりに 10%EtOH を用いて、同様の操作を行った。DPP-IV 阻害率 (%) は以下の式を用いて算出した。

$$\text{DPP-IV 阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{試料溶液の DPP-IV 反応実験の吸光度} - \text{試料溶液の DPP-IV 無添加反応実験の吸光度}) / (\text{10\%EtOH の DPP-IV 反応実験の吸光度} - \text{10\%EtOH の DPP-IV 無添加反応実験の吸光度})\} \times 100$$

#### 3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるニンヒドリン陽性成分の検出

試料溶液をシリカゲルプレート (Merck 社、Silica gel 60 F<sub>254</sub>) に 1 $\mu$ L スポットした。展開溶媒 (展開液 A : *n*-ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 1、展開液 B : 2-プロパノール : 水 = 7 : 3、展開液 C : *n*-ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 0.5) を用いて展開した。その後、ニンヒドリン試薬を噴霧し、100 $^{\circ}$ C で 60 分間加熱し、ニンヒドリン陽性成分の検出を行った。

#### 4. 強酸性陽イオン交換クロマトグラフィー

豆味噌 10%EtOH 抽出液を用いて強酸性陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR120) を詰めたカラム (5.4i.d. $\times$ 72cm) で分画し、樹脂に吸着しなかったものを通過液、樹脂に吸着し、2N アンモニア水で溶出したものを溶出液とした。

#### 5. HW-40F ゲルろ過クロマトグラフィー

強い DPP-IV 阻害作用を示したイオン交換カラム溶出液は、TSK gel TOYOPEARL HW-40F ゲルろ過カラム (2.2i.d. $\times$ 40cm) を用いて、活性成分の分離を行った。

得られた各フラクション (F) の 225nm および 254nm における吸光度を測定し (島津紫外可視分光光度計 UV-1800)、溶出パターンを作成した。なお、十分な実験試料を得るために、この操作は 9 回繰り返し行った。得られたゲルろ過溶出液を用いて、DPP-IV 阻害試験を行った。

#### 6. ODS-HG-5 カラムによる分取 HPLC

ゲルろ過クロマトグラフィーにより得た DPP-IV 阻害

活性を示す溶出液 F22 については、TLC 分析 (展開液 C) によりニンヒドリン陽性スポットの検出を行った。その後、この F22 を用いて ODS-HG-5 カラム (20i.d.×250nm) による活性成分の単離を行った。また、十分な実験試料を得るために、この操作は 4 回繰り返した。

#### 7. 単離した活性成分の分析

ODS-HG-5 カラム分取 HPLC によって単離した分画液⑥および⑦中の DPP-IV 阻害活性を測定した。これらの分画液を用いて、超高速液体クロマトグラフ Nexera X2 (島津製作所) による誘導体化アミノ酸分析を行った。

#### 8. 豆味噌 10%EtOH 抽出液のアミノ酸分析

豆味噌 10%EtOH 抽出液を用いて、同様にアミノ酸分析を行った。また、この抽出液の凍結乾燥物の一定量を用いて、ホルモール滴定法でアミノ態窒素量 (遊離アミノ酸) を、ケルダール法で全窒素量を測定した。

#### 【結果・考察】

イオン交換カラムで得た分画液では、溶出液 (中酸性窒素画分) が通過液より強い DPP-IV 阻害作用を示した。この溶出液の TLC 分析 (展開液 A) により、Rf 値 0.04、0.26、0.40、0.51 にニンヒドリン陽性スポットが検出された。これらのスポット成分が DPP-IV 阻害作用に関与していると考えられる。

この溶出液を用いてゲルろ過カラムで分離し、225nm の波長で大きいピークが見られた F12~F22 の溶出液を用いて TLC 分析 (展開液 B) を行ったところ、Rf 値 0.26、0.34、0.41、0.57、0.67 にニンヒドリン陽性スポットが検出された。特にゲルろ過溶出液 F22 において、Rf 値 0.57、0.67 に色の濃いニンヒドリン陽性スポットが検出された。また、ゲルろ過溶出液 F22 を用いて DPP-IV 阻害試験 (0.6mg/200μL) を行ったところ、約 50% の阻害率を示した。

このゲルろ過溶出液 F22 を用いて ODS-HG-5 カラム分取 HPLC により活性成分を単離したところ、分画物⑥および⑦が強い DPP-IV 阻害活性 (阻害率 54%、56%) を示した。TLC 分析 (展開液 C) においては、Rf 値 0.69 に単一のニンヒドリン陽性スポットが検出された。

ODS-HG-5 カラムで単離した分画物⑥および⑦を用いて超高速液体クロマトグラフ Nexera X2 による誘導体化アミノ酸分析を行ったところ、分画物⑥および⑦はともにロイシンと同定された。

分画物⑥および⑦と同濃度のロイシン標準液

(10mg/mL) を用いて DPP-IV 阻害試験を行ったところ、分画物⑥および⑦ (0.6mg/200μL) で阻害率 54%、56% を示したのに対し、ロイシン (0.6mg/200μL) では阻害率 62% を示し、両者の間に大きな差は見られなかった。この結果から、分画物⑥および⑦のロイシンが、DPP-

IV 阻害作用に関与していると考察された。

そこで、実際にこのロイシンが DPP-IV 阻害作用に寄与しているかを調べるために、豆味噌 10%EtOH 抽出液のアミノ酸分析を行った。その結果、18 種類のアミノ酸が検出されたが、この抽出液中のロイシン濃度は高く、その値は 44μmol/L であった。これまでの結果から、豆味噌に含まれるロイシンが DPP-IV 阻害作用を示す一成分であると考察される。

豆味噌 10%EtOH 抽出液を用いたホルモール滴定法の結果では、遊離アミノ酸量が 1.85g/100g であり、ケルダール法の結果では、全窒素量が 4.77g/100g であることが分かった。この結果は、豆味噌には、発酵熟成によりアミノ酸まで分解されていないペプチド類が存在することを示唆している。今後、これらの DPP-IV 阻害作用に寄与するペプチド類を分離・精製し、その化学構造を解明していく必要がある。

#### 【まとめ】

豆味噌 10%EtOH 抽出液を用いて、イオン交換カラムクロマトグラフィー、HW-40F ゲルろ過クロマトグラフィー、ODS-HG-5 カラムにより DPP-IV 阻害活性成分の分離を行った。

単離した ODS-HG-5 カラム分画物⑥および⑦を超高速液体クロマトグラフ Nexera X2 による誘導体化アミノ酸分析を行ったところ、ロイシンと同定された。この分画物⑥および⑦の阻害活性は、同濃度で行ったロイシン標準液と近似した阻害率を示した。この結果から、分画物⑥および⑦のロイシンが豆味噌の DPP-IV 阻害作用に関与していると考えられる。

豆味噌 10%EtOH 抽出液を用いてアミノ酸分析を行ったところ、ロイシンが多く含まれており、このことから、豆味噌に含まれるロイシンが DPP-IV 阻害作用を示す一成分であると考察される。

ホルモール滴定法およびケルダール法の結果から、豆味噌 10%EtOH 抽出液には、アミノ酸まで分解されていないペプチド類が存在することが明らかとなり、これらも DPP-IV 阻害作用に寄与していると考えられる。