

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	白子 紗希
論文題目	Structure and biological activities of hydrophobic short chain pyroglutamyl peptides in fermented foods and food protein hydrolysates (発酵食品及び食品タンパク質加水分解物中に存在する疎水性短鎖ピログルタミルペプチドの構造とその生理機能)		
(論文内容の要旨)			
<p>疫学調査等から日本食は健康的な食事であると示されているが、日本食に特徴的に含まれる有益な成分に関する研究はすくない。これまでにマサバ肉タンパク質および小麦グルテンの酵素分解物等からアミノ末端のグルタミン残基が環状のピロリドン形成した、ピログルタミルペプチドが見出されている。ピログルタミルペプチドは抗炎症作用、肝炎動物モデルでの肝保護作用等の有益な作用が報告されている。日本食に用いられる味噌、醤油、日本酒の製造に用いられる麹菌 (<i>Aspergillus oryzae</i>) はプロテアーゼ活性が強く麹菌により製造される味噌などの発酵食品にもピログルタミルペプチドが含まれると考えられるが、日本酒に含まれるピログルタミルペプチドが知られているのみである。そこで本研究では、日本食の重要な要素である味噌に注目し、味噌中のピログルタミルペプチドの構造と生理機能の解明、及びその吸収・代謝を明らかにすることを試みたものであり、以下のように要約される。</p>			
<p>1. 味噌の水抽出物中のピログルタミルペプチドを LC-MS/MS を用いて、ピログルタミン酸のインモニウムイオンをターゲットとしたプレカーサーイオンキャンデ特異的に検出し、13種類のピログルタミルペプチドを同定した。豆味噌の水抽出物をラット (Wistar) に摂取 (味噌0.6 g由来/体重 kg) させることで高脂肪食誘発体重増加を抑制し、摂取カロリーの減少を見出した。水抽出物中の成分を親水性と疎水性画分に分画し、投与したところ疎水性画分に同じ活性が見られた。この疎水性画分には、ピログルタミルプロリン (pEP)、ピログルタミルロイシン (pEL)、ピログルタミルバリン (pEV)、ピログルタミルイソロイシン (pEI) の4種類のピログルタミルペプチドが含まれていた。これら4種類のピログルタミルペプチドの投与によっても同様の作用が認められたため、これらの疎水性ピログルタミルペプチドが、関与成分であることが示唆される。作用メカニズムを解明するため、脂肪組織での脂肪分解抑制に関わるG Protein-coupled Receptorの1つである GPR109A と GPR81 へのリガンド活性を評価した。その結果、pELはGPR81を強発現した細胞中のErk のリン酸化を10 <math>\mu</math>Mから有意に増加させた。さらに pEL、pEV、pEI は、数 <math>\mu</math>M~mM の間で用量依存的に GPR109A に結合し、リガンドになりうることを明らかにした。</p>			
<p>2. pEL を 1 mg/kg 経口投与することで、ラットにおいて高脂肪食により誘発された腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) を改善することを見出した。このようなごく微量の食品由来成分の投与が dysbiosis を改善した例はほとんどなく、腸内細菌に直接作用するとは考えにくい。そこで pEL がホストの自然免疫系に作用してdysbiosis を改善すると考え、回腸から分泌される抗菌ペプチドに着目した。LC-MSを用いて分離したタンパク質から生じる多価イオンをもとにタンパク質の分子量を推定した結果、分子量 520~17748 Da の計44種類のタンパク質を回腸の酸抽出物中から検出することに成功した。この手法を用いることで pEL の投与により抗菌ペプチド</p>			

の一種である  $\alpha$ -defensin (rattusin)のプロペプチドが回腸で増加することを見出した。さらに、管腔内においてその活性型フラグメントの増加を確認した。この結果から、pEL がホストの抗菌ペプチドの分泌増加を介して腸内細菌叢の乱れを改善することを明らかにした。

3. ラットを用いた疎水性ピログルタミルペプチド単回投与試験において、ピログルタミルペプチドは回腸特異的に吸収されるが、血中やその他の組織への移行はほとんどないことを見出した。そこで回腸に吸収されたピログルタミルペプチドが別の物質に変換・代謝されている可能性を検討した。LC-MS/MS を用いて、ロイシンのインモニウムイオンをターゲットとしたプレカーサーイオンキャンにより投与前後の回腸中のロイシン関連成分を網羅的に解析したところ、pEL, pEI, pEV の混合物の投与によってプロピオン酸とロイシンのペプチド結合からなる propionyl-Leu という新規ロイシン誘導体が生成されることを明らかにした。propionyl-Leu は管腔内、十二指腸、空腸、および大腸では存在せず、回腸特異的に生成することを見出した。

本研究では麹菌を用いた日本の伝統的な発酵食品中である味噌に含まれるピログルタミルペプチドの構造を明らかにした。これらの味噌中の疎水性のピログルタミルペプチド (pEL, pEI, pEV) が日常的な食事の摂取で得られる用量でラットにおいて高脂肪食により誘発される体重増加を抑制し、さらに pEL がホストの抗菌ペプチドを介した腸内細菌叢の改善や新規ロイシン誘導体の生成に関わっていることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

疫学調査等から日本食は健康的な食事であると示されているが、日本食中の特徴的に含まれる有益な成分に関する研究はすくない。本研究では日本食で用いられる味噌に注目し、味噌中のペプチド、特にアミノ末端のグルタミン残基が環化してピロリドン環を形成したピログルタミルペプチドの構造と機能の解明を検討したものである。成果として評価できる点は以下の通りである。

1. 非常に複雑なマトリックスである味噌の抽出物からピログルタミン酸のインモニウムイオンをターゲットとしたプレカーサーキャンを用いた LC-MS/MS により、ピログルタミルペプチドを特異的に検出し、13種類のピログルタミルペプチドを同定した。さらに疎水性の pEL, pEI, pEV が摂取可能な味噌中に含まれる用量で高脂肪誘発体重増加を抑制することをラットで見出した。
2. 味噌中に含まれる pEL が 1 mg/kg 体重の低用量で高脂肪食誘発腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) をラットで抑制することを見出した。さらに pEL がホストの抗菌ペプチドである  $\alpha$ -defensin の分泌を促進することで dysbiosis を改善することを明らかにした。
3. 疎水性ピログルタミルペプチドである pEL, pEI, pEV が GPR109A, GPR81 に対してリガンドとなりうる可能性を示した。さらに *in vivo* でこれらのペプチドの投与により回腸特異的に新規化合物 propionyl-Leu を生成されることを明らかにした。

以上のように、本研究は海洋生物機能学、食品科学、食品機能学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)