

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	宮内 聡
論文題目	Structure, absorption, and bioactivities of pyroglutamyl peptides in food protein hydrolysates (食品タンパク質酵素分解物中のピログルタミルペプチドの構造、吸収および機能)		
(論文内容の要旨)			
<p>グルタミンは水溶液中で非酵素的に環状構造を持つピログルタミン酸へ変化することが知られている。この反応はアミノ末端にグルタミンを持つペプチドにおいても進行し、ピログルタミル (pyroGlu) ペプチドが生じる。このpyroGluペプチドはマサバ可食部、植物貯蔵タンパク質等の食品タンパク質酵素分解物や味噌、醤油、日本酒といった発酵食品に広く含まれている。また、pyroGluペプチドは経口摂取により様々な生理活性を示すことが報告されている。pyroGlu-Leuは、D-ガラクトサミン誘発肝炎モデルにおいて血清AST値を改善する肝保護作用を持つペプチドとして同定された。さらに、pyroGlu-Leuは 0.1 mg/kg 体重の投与により、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルにおいて、体重の減少、大腸炎症状、腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) を有意に改善した。近年、pyroGlu-Leuは回腸において宿主の抗菌ペプチド産生を増加させることで、高脂肪食摂取によるdysbiosisを有意に改善することが報告されている。pyroGlu-Leuは食品タンパク質酵素分解物をはじめ、味噌、日本酒といった発酵食品に広く含まれており、発酵食品などから日常的に摂取することで腸内細菌叢の改善を通して健康に有益な作用を発揮することが期待されている。しかし、これらの発酵食品は塩分やエタノールを含むため、ヒト試験を行うことが困難である。そこで、これら発酵食品の共通の原料である米を用いて調製した米タンパク質酵素分解物 (RPH) は、塩分やエタノールを含まない pyroGluペプチド源として利用できると申請者は考え研究をおこなった。研究内容は以下のように要約される。</p>			
<p>1. pyroGluペプチドは in vitroエンドプロテイナーゼおよびエキソペプチダーゼ消化に対し抵抗性を有することが報告されている。しかしながら、酵素分解物の経口摂取後、血中で増加するものはごく一部であり、pyroGluペプチドの消化管における消化および吸収に関してはいまだ不明な点が多かった。そこで、RPHおよびそのエキソペプチダーゼ消化物中のペプチドをLC-MS/MSを用いて網羅的に同定した。RPH中のアミノ基を持つ通常のペプチドはエキソペプチダーゼ分解で消失したが、pyroGluペプチドの大部分は残存した。さらにRPHをラットへ経口投与 (250 mg/kg 体重) 後、RPHおよびそのエキソペプチダーゼ分解物中に同定されたペプチドの小腸管腔内、小腸組織内、血中での濃度を測定した。RPH中のエキソペプチダーゼにより分解されたアミノ基を持つ通常のペプチドはいずれの組織においても増加しなかった。一方、耐性を持つpyroGluペプチドはRPH投与後のラット小腸管腔内および回腸組織において有意に増加したが、血中ではpyroGlu-Leu, pyroGlu-Lysなどのごく一部が有意に増加するのみであった。血中で増加がみられなかった pyroGlu-Gln, pyroGlu-GluなどのpyroGluペプチドもラット小腸抽出物および血漿ペプチダーゼ消化には抵抗性を示したため、小腸上皮細胞に吸収された後再び腸管に排出された可能性が示唆された。</p>			
<p>2. これまでにpyroGlu-LeuおよびpyroGlu-Asn-Ileといった合成pyroGluペプチドが腸内細菌叢を改善することが報告されているが、食品中のpyroGluペプチド混合物が</p>			

腸内細菌叢へどのような影響を与えるかは不明であった。1. に示すように、RPH投与によりエキソペプチダーゼ抵抗性pyroGluペプチドが小腸で増加し、一部は血液でも増加することが明らかになったため、RPH経口摂取がラットの腸内細菌叢へ与える影響を明らかにすることを目的とした。5週間のRPH投与 (100 mg/kg 体重/日) により、高脂肪食摂取ラットの糞便中*Proteobacteria*門の増加を有意に抑制し、種レベルにおいても12種の占有率を変化させた。2-ニトロフェニルヒドラジド誘導化とLC-MS/MSにより有機酸分析をおこなったところ、ラット盲腸内容物中において高脂肪食摂取により腸内細菌代謝物である酢酸、プロピオン酸、酪酸といった短鎖脂肪酸が減少したが、RPHの投与では有意な変化は認められなかった。同法によりN-アセチルイソロイシン、N-アセチルロイシン、N-アセチルフェニルアラニンといったN-アセチルアミノ酸をラット盲腸内に新たに見出した。これらのN-アセチルアミノ酸も高脂肪食により減少しており、RPHの投与により一部のN-アセチルアミノ酸量が有意に増加した。この変化は盲腸内*Clostridiaceae*の変化と相関していることを見出した。これらの結果は、N-アセチルアミノ酸は通常の有機酸と比べ早期に変動する腸内細菌の代謝物の新たなマーカーになりうる可能性を示唆した。

3. 2.でみられたRPH摂取の効果を異なる動物モデルで検証するため、高脂肪食摂取マウスに対するRPH投与の、体重、肝機能、腸内細菌叢、回腸の宿主抗菌ペプチドへの影響を調べた。12週間のRPH投与 (500 mg/kg 体重/日) により、高脂肪食摂取マウス回腸において、マウス抗菌ペプチドであるcryptdinの前駆体ペプチドが増加する傾向がみられた。さらに、高脂肪食摂取による肝重量および血中ALTの増加が改善した。RPH投与が盲腸内腸内細菌叢において *Lactobacillus reuteri* および *L. taiwanensis* の高脂肪食摂取による増加を有意に抑制した。これらの腸内細菌の占有率と肝重量および血中ALT活性との間に有意な正の相関がみられた。先行研究において*L. taiwanensis*の腸内細菌叢での増加が肝臓への脂肪蓄積に関与するとの報告もあり、これらの結果から、RPH投与により宿主抗菌ペプチドが増加することでdysbiosisを改善し、高脂肪食による肝機能の低下を改善したと示唆した。

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)

食品タンパク質の酵素分解物中にピログルタミル(pyroGlu) ペプチドが存在することが知られており、エンドプロテイナーゼおよびエキソペプチダーゼに抵抗性を示すことも知られていたが、経口摂取後の体内での分解は調べられていなかった。本研究ではpyroGluペプチドを含む米タンパク質分解物(RPH)を摂取した動物の腸管内、血中へのペプチドの移行を調べ、さらにRPHの摂取による腸内細菌叢、腸内細菌代謝物、ホストの抗菌ペプチドの分泌への影響を検討したものである。本研究の評価できる点は以下の通りである。

1. RPH中のアミノ基を持つ通常のオリゴペプチドはin vitroのエキソペプチダーゼによっても分解され、経口摂取後も腸管内で増加しない。一方、pyroGluペプチドはin vitro消化にも抵抗性があり、また経口摂取後も腸管内で有意に増加することを見出した。
2. 腸管内に認められたpyroGluペプチドはpyroGlu-Leu, pyroGlu-Lys 等を除き血中では有意な増加はみられないが、回腸抽出物、血漿ペプチダーゼ消化に対しては安定であり、血中へ移行する輸送担体が存在しないことを指摘した。
3. RPHの投与により高脂肪食摂取によるラットおよびマウスの腸内細菌叢の変化を一部の門、種レベルにおいて抑制し、この変化が新たに見出した腸内細菌の代謝産物であると考えられるN-アセチルアミノ酸含量と相関することを提示した。
4. RPHの投与によりマウスの高脂肪食摂取により減少した回腸の抗菌ペプチド cryptdin レベルを回復させることを提示した。

以上のように、本論文は経口摂取されたpyroGluペプチドの消化管内での存在とホストの抗菌ペプチドの分泌および腸内細菌叢への影響に関する新たな知見を提供するものであり、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5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)