

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04587

研究課題名(和文) 食肉タンパク質由来のロイシンオリゴペプチドの機能解明と利用法開発

研究課題名(英文) Functional properties of Leucine-peptides derived from meat proteins

研究代表者

有原 圭三 (ARIHARA, KEIZO)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00175994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ロイシンジペプチドに注目し、その機能性の解明と利用法の開発を目指した。ロイシンジペプチドの抗酸化活性を検討した結果、アラニン、アルギニン、リジンを含むもので活性が高いことが判明した。ロイシンジペプチド由来のメイラード反応生成物では、アルギニンとリジンを含むもので活性上昇が顕著であった。これらの高活性試料は、経口投与によっても酸化ストレス軽減をもたらした。さらに、ロイシンジペプチドの中には、加齢に伴う骨格筋の萎縮の予防に寄与するものもあることが示唆された。ロイシンジペプチドおよびそのメイラード反応生成物は、食肉において重要な役割を演じると共に、新たな食品素材開発に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Leucine-dipeptides were paid attention to study their functionalities and develop their industrial applications. Of 19 Leucine-dipeptides tested in this study, dipeptides containing Alanine, Arginine, or Lysine showed high antioxidative activities. In addition, Maillard reaction products generated from Leucine-dipeptides containing Arginine or Lysine increased their activities significantly. Orally administrated these materials with high activities decreased oxidative stress in animal bodies. Leucine-dipeptides, such as Leucine-Lysine and Lysine-Leucine would contribute to the prevention of atrophy of skeletal muscle associated with aging. From the results of this study along with previous observations, Leucine-dipeptides and their Maillard reaction products have important roles in meat and great possibility in the food industry.

研究分野：農学

キーワード：食肉 ペプチド ロイシン 抗酸化作用 メイラード反応 食品

1. 研究開始当初の背景

本研究者は、食肉タンパク質の分解により生成するペプチドの多様な機能を解明してきた。また、成果の産業的活用を目指し、食肉ペプチドを主成分とする機能性素材も完成させた。研究成果は、総説等の形でまとめるとともに、国際学会講演などの形で積極的な情報発信をしてきた。また、関係研究者の協力により、書籍『機能性ペプチドの最新応用技術 ~食品・化粧品・ペットフードへの展開~』(2009)と『ペプチドの機能と利用』(2015)を監修し、ペプチド関連の研究成果や技術の普及にも努めてきた。

これまでの一連の研究において、本研究者は食肉タンパク質分解物から保健的機能性を有する多くのペプチドを発見した。このようなペプチドの中には、Ser-Leu-Tyr-Ala や Glu-Leu-Tyr-Ala といった抗酸化ペプチド(抗ストレス・抗疲労作用)や Glu-Leu-Met といったプロバイオティックペプチドがあったが、これらの部分配列である Leu-Tyr や Leu-Met といったロイシンを含むジペプチドには、元のペプチドに勝る保健的機能があることを明らかにした。さらに Gly-Pro-Leu-Lys など数種のロイシンを含有する血圧降下ペプチドが食肉の熟成中に生成することも見出した。

ロイシンは食肉中の含量が多いため、ペプチドとしても食肉・食肉製品の特性に寄与しうる。また、ロイシンの呈味性は弱いですが、ロイシンを含むペプチドは多彩な呈味性を有する。Leu-Gly などのペプチドが糖類との加熱反応(メイラード反応)により、好ましい風味を生成することも報告されており、加熱食肉製品などにおけるロイシンペプチドの存在も重要と推定される。また、分岐鎖アミノ酸であるロイシンは、エネルギー源として利用されやすく、タンパク質の分解抑制や合成促進、免疫機能調節などの作用を有することも知られている。ロイシンを含むアミノ酸を摂取した場合、体内で分解されて生成するロイシンの機能をも期待することができる。

これまで多くの食品タンパク質の酵素分解物から血圧降下・抗酸化ペプチドが見出されてきたが、食肉・食肉製品の場合、熟成や発酵過程にもこの種のペプチドが生成し、嗜好性にも大きく関与しうる。本研究者は、食肉由来のペプチドの特性を解明し、食肉・食肉製品の嗜好性と保健的機能性の向上を目指してきた。たとえば、食肉に相応しい機能として抗ストレス作用や抗疲労効果に注目し、食肉・食肉製品の付加価値向上を考えた。

近年、発酵法などによるペプチドの工業的製法が飛躍的に進歩し、2残基のアミノ酸からなるジペプチドであれば、大量かつ安価に製造することが可能になった。このため、食

肉タンパク質由来のロイシンジペプチドにおいても、ジペプチドにターゲットを絞って保健的機能性や嗜好性を解明し、実用化を目指す意義が浮上している。

2. 研究の目的

本研究では、食肉タンパク質の分解により生成するロイシンオリゴペプチドに注目し、食肉・食肉製品における役割解明や積極的利用、そして新規ペプチド食品素材の開発を目指した。これまでに本研究者は、食肉タンパク質分解物から、Asp-Leu-Tyr-Ala や Glu-Leu-Met などの機能性ペプチドを見出してきた。さらに、これらの部分配列である Leu-Tyr や Leu-Met といったロイシンを含むジペプチドにも、顕著な機能(抗酸化活性に伴う抗ストレス・抗疲労作用など)があることを示した。食肉に多く含まれるロイシンは、おペプチドの形でも品質に関与していると考えられる。そこで、本研究では、ロイシンジペプチドの保健的機能性や嗜好性を解明するとともに、これらの効果的利用法の開発に寄与する知見を得ることを目的とした。また本研究では、食品は加熱過程を経て最終製品となることが多いことを鑑み、ペプチドが加熱処理を受けた際に生成するメイラード反応生成物にも注目した。

3. 研究の方法

(1) in vitro 活性

in vitro における生理活性指標として、抗酸化活性(スーパーオキシドイオン消去能および ACE 阻害活性等)を測定した。

(2) in vivo 活性

in vivo における生理活性試験は、マウスに試料を経口投与することにより行った。本研究では、とくに血清酸化ストレスマーカー(ヒドロペルオキシド)値の変動に注目した。

(3) タンパク質分解抑制効果

活性酸素(水酸化ラジカル、次亜塩素酸ラジカル)によるタンパク質の酸化障害に対する有効性を、標的タンパク質として牛血清アルブミンを用い、SDS-PAGE により検討した。

(4) 骨格筋肥大経路に及ぼす影響

マウス由来 C2C12 筋芽細胞を無血清培地で培養した後、Lys-Leu あるいは Leu-Lys を添加し、0~60 分後に細胞を回収した。また、C57BL/6J マウスに Lys-Leu あるいは Leu-Lys を経口投与し、投与 1 時間後に筋組織を摘出した。P-Akt、Akt、p-p70S6K、p70S6K の発現は Western Blotting 法により検出した。

(5) メイラード反応生成香気の解析

ロイシンジペプチドと還元糖を加熱した際に生成するメイラード反応生成香気の解析は、捕集香気を GC/MS および GC-0 に供して行った。

4. 研究成果

(1) ロイシンジペプチドおよびメイラード反応生成物の in vitro 活性

すでに行った予備的な検討から、9種のアミノ酸 (Ala, Arg, Gly, His, Ile, Lys, Pro, Ser, Thr) を選出し、これらのアミノ酸ロイシンとの組み合わせにより、19種のロイシンジペプチドを調製した。すなわち、Ala-Leu, Arg-Leu, Gly-Leu, His-Leu, Ile-Leu, Leu-Leu, Lys-Leu, Pro-Leu, Ser-Leu, Thr-Leu (以上、C末端がLeu)、Leu-Ala, Leu-Arg, Leu-Gly, Leu-His, Leu-Ile, Leu-Lys, Leu-Pro, Leu-Ser, Leu-Thr (以上、N末端がLeu) である。

19種類のロイシンジペプチド溶液およびその加熱処理 (メイラード反応) 後の溶液の抗酸化活性を測定した結果 (図1)、Ala, Arg, Lys を含むペプチドで活性が高いことが判明した。また、Arg や Lys を含むペプチドは、メイラード反応により顕著に活性が上昇した。一方、血圧降下作用の指標としてよく用いられる ACE 阻害作用を測定した結果 (図2) においても、メイラード反応を経ることによる活性上昇が多く、多くのペプチドで認められた。

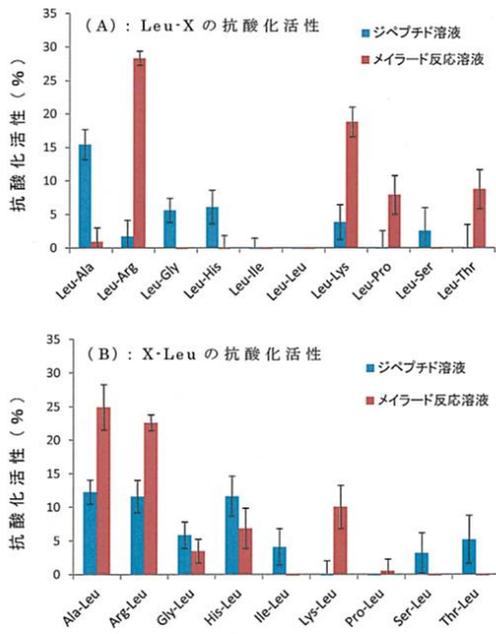


図1 ロイシンジペプチドとそのメイラード反応生成物の抗酸化活性

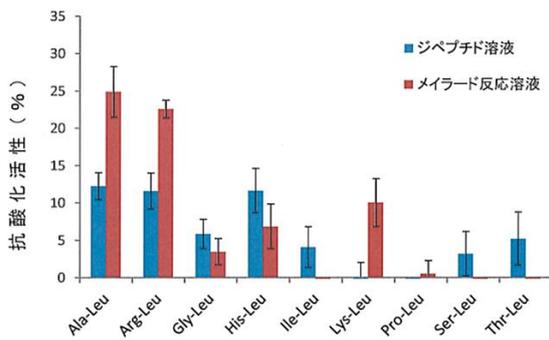


図2 ロイシンジペプチドとそのメイラード反応生成物のACE阻害活性

(2) ロイシンジペプチドおよびメイラード反応生成物の in vivo 活性

前述の in vitro における検討から、高い抗酸化活性と ACE 阻害活性を示した6種のロイシンジペプチド (Leu-Ala, Ala-Leu, Leu-Arg, Arg-Leu, Leu-Lys, Lys-Leu) を選択し、これらのペプチドとそれぞれのメイラード反応生成物をマウスに経口投与し、血中酸化ストレス値 (ヒドロペルオキシド) の変化を調べた (図3に結果の一部)。

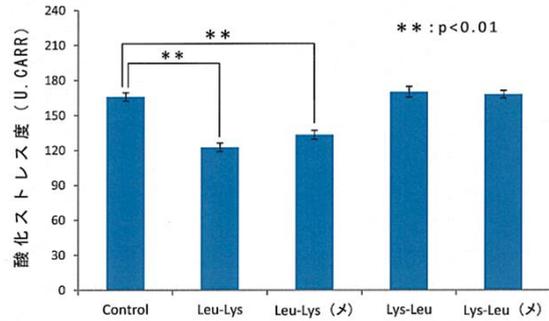


図3 ロイシンジペプチドとそのメイラード反応生成物の経口投与による血中酸化ストレス値の変化

Ala-Leu のメイラード反応生成物や、Leu-Lys およびそのメイラード反応生成物で顕著な酸化ストレス値の低下が見られ、経口投与による効果が確認された。

(3) ロイシンジペプチドおよびメイラード反応生成物のタンパク質分解抑制効果

ロイシンジペプチドおよびそのメイラード反応生成物が、タンパク質 (牛血清アルブミン) の酸化障害に対して有効であるかを検討した (図4に結果の一部)。

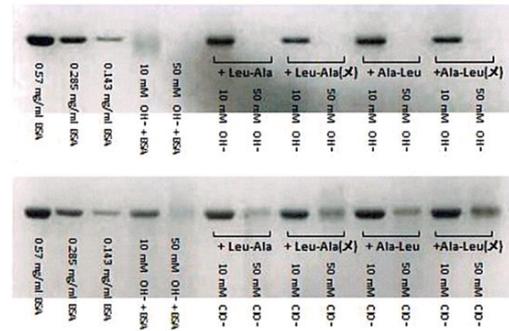


図4 活性酸素によるタンパク質分解に対するロイシンジペプチドとそのメイラード反応生成物の抑制効果

すべての試料でタンパク質の分解抑制が認められたが、とくに Leu-Lys のメイラード反応生成物の抑制率は 94% と高い値であった。また、Ala を含むペプチドのメイラード反応生成物の抑制率も高く、Leu-Ala で 62%、Ala-Leu で 47% であった。この結果から、ロイシンジペプチドおよびそのメイラード反応生成物の有する抗酸化作用は、タンパク質の酸化障害に対して有効であることが示された。

(4) ロイシンジペプチドが骨格筋肥大経路に及ぼす影響

加齢に伴う骨格筋の萎縮が問題となっており、酸化ストレスの関与が示唆されている。そこで、抗酸化作用を有するロイシンジペプチド (Leu-Lys および Lys-Leu) の骨格筋肥大経路に及ぼす影響を検討した (図5)。

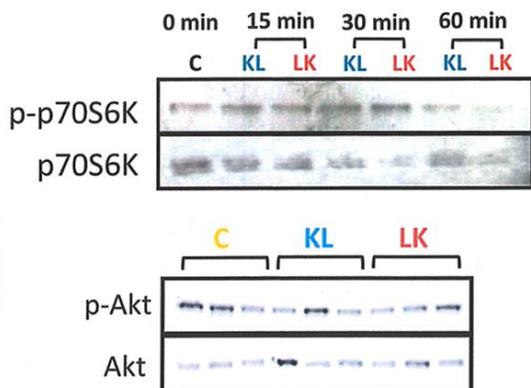


図5 P-AktとAkt(上)およびp-p70S6Kとp70S6K(下)の発現量のWestern Blotting法による検討

筋芽細胞において、Lys-Leu の添加は P-Akt の発現を増加させ、生体における Leu-Lys の投与は P-p70S6K の発現を増加させた。この結果は、Leu-Lys が酸化ストレスによる骨格筋肥大阻害の抑制に関与することを示唆するものである。現在、それぞれのメイラード反応生成物の作用についても検討を進めている。

(5) ロイシンジペプチドからメイラード反応により生成する香り成分の機能

ロイシンジペプチドをグルコースなどの還元糖とともに加熱すると、様々な揮発性香り成分が生成する。その中で、とくに本研究者は、DMHF (図6) に注目している。DMHF は、好ましい香りを呈することに加えて、リラックス作用などの生理的な機能を示すことをこれまでに明らかにした。

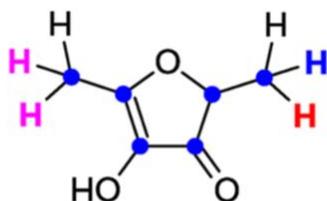


図6 DMHF (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone)

DMHF は食肉の調理や食肉製品の加工時にも生成することから、嗜好性と機能性の両面から重要な成分としてとらえ、検討を進めている。食肉・食肉製品が、美味しくて体によい食品であることは疑う余地がないが、この一端に DMHF の存在が関与していることが考えられる。

(6) ロイシンジペプチドおよびメイラード反応生成物の利用

ロイシンジペプチドとそのメイラード反応生成物の産業的利用を視野に入れた検討を行ってきた。その中に、食品とペットフードのための、嗜好性と保健的機能性に優れた素材開発がある。匂いに敏感な動物であるネコを用いた実験結果をあげておく (図7)。

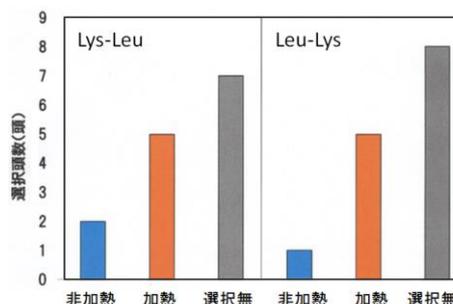


図7 ロイシンジペプチドおよびメイラード反応生成物のネコにおける嗜好性試験(2点比較法による実施)

Lys-Leu と Leu-Lys はほぼ無臭であるが、加熱処理により、好ましいメイラード反応香気が生成する。これによりネコの選択性が高まることが判明した。この知見は、療法食など嗜好性の低いペットフードへの利用等に生かす方向で検討が進められている。

(7) まとめと展望

本報告書では紙面の制約もあり、主に化学合成により調製したロイシンジペプチドを用いた検討結果を紹介した。これらのペプチドの多くは、食肉タンパク質中に存在する配列であり、一部については食肉の熟成中や食肉製品の製造過程で生成することを確認している。また、食肉タンパク質を摂取した際に消化管内酵素によりこれらのペプチドが生成することも予想される。合成ペプチドの調製によらず、食肉タンパク質の酵素分解物をロイシンジペプチドの供給源とする検討も、あわせて進めてきた。今後は、ロイシンジペプチドおよびそのメイラード反応生成物の諸性質の解明を進めると共に、効果的な利用方法の開発を行いたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件)

- ① Abdallah, R., Moustafa, R. Y., Kirrella, G. A. K., Al-Hawary, I., Komiya, Y., & Arihara, K. Effect of NaCl reduction and substitution with KCl on behavior and functional characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120 in fermented beef sausage. *Journal of Animal and Plant Science* 28 (in press): 2018. (査読有)
- ② Ohata, M., Yokoyama, I., & Arihara, K. Functionality and capability of

- odorants generated by the Maillard reaction in foods. International Maillard Reaction Society Highlights 13: 9-16, 2018. (査読無)
- ③ Ghassem, M., Arihara, K., Mohammadi, S., Sani, N. A., & Babji, A. S. Identification of two novel antioxidant peptides from edible bird's nest protein hydrolysates. Food and Function 8: 2046-2052, 2017. (査読有)
- ④ Zhou, L., Ohata, M., Owashii, C., Nagai, T., Yokoyama, I., & Arihara, K. Odors generated from the Maillard reaction affect autonomic nervous activity and decrease blood pressure through the olfactory system. Journal of Science of Food and Agriculture 97: 923-927, 2017. (査読有)
- ⑤ Arihara, K., Zhou, L., & Ohata, M. Bioactive properties of Maillard reaction products generated from food protein-derived peptides. Advances in Food and Nutrition Research 81: 161-185, 2017. (査読有)
- ⑥ Ohata, M., Zhou, L., Higuchi, K., Nagai, T., Kasamatsu, H., & Arihara, K. Investigation of volatile components and identification of the most potent odor-active component in fermented meat sauce. Flavour and Fragrance Journal 32: 171 - 177, 2017. (査読有)
- ⑦ 有原圭三, 小宮佑介. 食品・ペットフード・化粧品における機能性ペプチドの利用. 月刊ファインケミカル 45 (9): 5-14, 2016. (査読無)
- ⑧ 有原圭三, 小宮佑介. 機能性食品素材としての乳・肉・卵の可能性. 月刊 FOOD Style 21 20 (11): 46-49, 2016. (査読無)
- ⑨ Zhou, L., Ohata, M., & Arihara, K. Effects of odor generated from the glycine/glucose Maillard reaction on human mood and brainwaves, Food and Function, 7: 2574-2581, 2016. (査読有)
- ⑩ Mirdhayati, I., Hermanianto, J, Wijaya, C. H., Sajuthi, D, & Arihara, K. Angiotensin converting enzyme inhibitory and antihypertensive activities of protein hydrolysate from meat of Kacang goat. Journal of Science of Food and Agriculture 96: 3536-3542, 2016. (査読有)
- ⑪ Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., and Arihara, K. Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. Food Chemistry 194: 1034-1039, 2016. (査読有)
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 横山壺成, 大畑素子, 小宮佑介, 有原圭三. 食肉の加熱調理によるメイラード反応生成香気の保健的作用. 日本食肉研究会第 59 回大会 (東京) 2018 年 3 月 30 日.
- ② 柴宮大輔, 小宮佑介, 有原圭三. リジン由来メイラード反応生成物の抗酸化作用および抗健忘作用. 日本畜産学会第 124 回大会 (東京) 2018 年 3 月 29 日.
- ③ 横山壺成, 中井雄二, 鈴木喜博, 大畑素子, 小宮佑介, 有原圭三. メイラード反応により生成する DMHF 香気は食欲を増進させる. 日本畜産学会第 124 回大会 (東京) 2018 年 3 月 28 日.
- ④ 横山壺成, 中井雄二, 鈴木喜博, 大畑素子, 小宮佑介, 有原圭三. メイラード反応生成香気曝露が脳内遺伝子発現に及ぼす影響. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋) 2018 年 3 月 16 日.
- ⑤ 柴宮大輔, 横山譲, 小宮佑介, 有原圭三. アルギニンおよびリジン由来のメイラード反応生成物の抗健忘作用. 東北畜産学会第 67 回大会 (青森) 2017 年 8 月 19 日.
- ⑥ 横山壺成, 小宮佑介, 有原圭三. アルギニンと還元糖の加熱により生成する香気の高血圧降下作用. 東北畜産学会第 67 回大会 (青森) 2017 年 8 月 19 日.
- ⑦ 服部美咲, 小宮佑介, 有原圭三. 鶏肉タンパク質由来のペプチドやそのメイラード反応生成物によるペット用療法食の嗜好性向上. 東北畜産学会第 67 回大会 (青森) 2017 年 8 月 19 日.
- ⑧ 有原圭三. メイラード反応を利用した保健的機能性と嗜好性向上作用を備えた食品素材. BIO tech 2017 アカデミック・フォーラム (東京) 2017 年 6 月 30 日.
- ⑨ Arihara, K. Probiotics and bioactive peptides for developing functional foods. Scientific Symposium of Orel State Agrican University (Orel, Russia) 2017 年 6 月 6 日.

- ⑩ 大畑麻奈, 小宮佑介, 有原圭三. ロイシンジペプチドおよびそのメイラード反応生成物の抗酸化作用. 日本畜産学会第122回大会(神戸) 2017年3月29日.
- ⑪ 横山壺成, 周蘭西, 大畑素子, 有原圭三. アルギニンおよびリジンに由来するメイラード反応生成物の香気への影響. 日本畜産学会第122回大会(神戸) 2017年3月29日.
- ⑫ 大畑素子, 周蘭西, 矢田幸博, 有原圭三. 食品のメイラード反応により生成する香気がヒトに及ぼす生理作用. 第23回日本行動医学会総会(沖縄県恩納村) 2017年3月17日.
- ⑬ 飯田雅, 大畑素子, 有原圭三. 鶏肉タンパク質分解物の嗜好性に対する影響. 日本畜産学会第121回大会(東京) 2016年3月29日.
- ⑭ 有原圭三. ペプチドの特性を生かした美味しく体に良い食品の開発. 弘前大学農学生命科学部地域資源活用センターシンポジウム(弘前) 2016年3月4日.
- ⑮ Arihara, K. Bioactive peptides and probiotics for functional meat products. Conference for 85th Anniversary of the All-Russian Meat Research Institute (Moscow, Russia) 2015年12月9日.
- ⑯ Arihara, K. Functional properties of peptides in foods and development of peptide-based food ingredients. Symposium on Chemistry and Biochemistry of Functional Foods and Renewable Natural Resources (Ulaanbaatar, Mongolia) 2015年7月10日.

〔図書〕(計4件)

- ① Arihara, K. & Komiya, Y. Bioactive properties of peptides generated from meat proteins. In *Advanced Technologies for Meat Processing, Second Edition* (Toldra, F. & Nollet L. M. L. eds.). CRC Press (Boca Raton) p. 371-402. 2018.
- ② Arihara, K. & Ohata, M. Production of bioactives from meat and animal by-products. In *Advances in Meat Processing Technology* (Bekhit, A. E. -D. A. ed.). CRC Press (Boca Raton) p. 505-520. 2017.
- ③ 有原圭三. メイラード反応と特許. メイ

ラード反応の機構・制御・利用(宮澤陽夫監修). シーエムシー出版(東京) p. 78-85. 2016.

- ④ 有原圭三(監修). 機能性ペプチドの開発最前線. シーエムシー出版(東京) 2015. (240ページ)

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

- ① 名称: DMHFを含むリラックス剤
発明者: 大畑素子, 横山壺成, 有原圭三
権利者: 学校法人北里研究所
種類: 特許
番号: 2017-142580
出願年月日: 2015年7月24日
国内外の別: 国内
- ② 名称: メイラード反応を利用して機能性を強化した素材およびこれを用いた食品・ペットフード
発明者: 有原圭三, 大畑素子
権利者: 学校法人北里研究所
種類: 特許
番号: 2016-233792
出願年月日: 2016年12月1日
国内外の別: 国内
- ③ 名称: アミノ酸を原料とする嗜好性と保健的機能性に優れた素材およびこれを利用した食品・ペットフード
発明者: 有原圭三, 大畑素子
権利者: 学校法人北里研究所
種類: 特許
番号: 2015-123311
出願年月日: 2015年6月18日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

- ① 株式会社フード・ペプタイドホームページ(トピックスページ)
<http://topics.foodpeptide.com/>
- ② 北里大学獣医学部食品機能安全学研究室ホームページ
<http://food-kitasato.jp/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
有原 圭三 (ARIHARA KEIZO)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号: 00175994

- (2) 研究協力者
大畑 素子 (OHATA MOTOKO)
日本大学・生物資源科学部・講師
小宮 佑介 (KOMIYA YUSUKE)
北里大学・獣医学部・助教