

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：34406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15279

研究課題名(和文)食品における結合態D-アミノ酸の分布と異性を促進させる要因の解析

研究課題名(英文) Occurrence of bound D-amino acids in food proteins, and analysis of the factors promoting isomerization of bound amino acids

研究代表者

大森 勇門(OHMORI, Taketo)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90570838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品における結合態D-アミノ酸の存在と異性を促進する要因について解析を行った。サプリメントとして販売されているコラーゲンペプチドには、結合態D-ValがD/D+L比20%程度の非常に高い割合で存在することを見出した。一方でダイズやホエイ由来ペプチドでは結合態D-Valは検出されなかった。またAspジペプチドをモデルとして異性を促進する加工処理を検討した。電子レンジでの加熱において、アルカリ条件では700 W、30秒で異性が進行することを見出した。既知の条件よりもかなり低い温度と短時間で進行することが明らかになり、マイクロウェーブが結合態アミノ酸の異性を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題ではコラーゲンペプチド中に著量の結合態D-Valが含まれることを明らかにした。結合態D-Valを含むタンパク質の報告はこれまでにほとんどなく、新たな結合態D-アミノ酸の例を示せたことは学術的に意義があるものと考えられる。またアミノ酸の異性は酸性、あるいはアルカリ性条件下での加熱により促進されることが知られていたが、本研究課題においてアルカリ条件下では電子レンジでの加熱が通常加熱以上に結合態アミノ酸の異性を促進することを明らかにした。このことは食品加工や調理において結合態D-アミノ酸が生成する可能性を示すもので学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：I analyzed about the occurrence of bound D-amino acids in food proteins and peptides, and the factors promoting isomerization of bound amino acids. UPLC and LC/MS analyses revealed that the bound D-Val occur in collagen peptides (D/D+L ratio: 10~20%), but not in peptides from soybean and whey. This is the first report of the occurrence of peptides containing many D-Val residues. Besides, I demonstrated that the isomerization of bound amino acids occurs by brief heating under alkaline condition with a microwave oven. This result suggests that the isomerization of bound amino acids promotes by microwave.

研究分野：酵素工学、タンパク質工学、微生物学

キーワード：結合態D-アミノ酸 タンパク質・ペプチド マイクロ波 異性化 食品ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物だけでなく、哺乳類の生体内からも遊離 D-アミノ酸が発見され、それらがもつ生理機能についても多くの報告がなされてきた。食品分野においても遊離 D-アミノ酸の分析が行われるとともに、その呈味性や生理機能を利用した食品開発が進み D-アミノ酸含有を売りにした食品やサプリメントが市販され始めていた。このように遊離 D-アミノ酸を対象とした研究が多くなされる一方で、ペプチドやタンパク質を構成する結合態 D-アミノ酸についてはその研究例は少なかった。しかしながら、 α -クリスタリンの特定の Asp 残基の D 化が白内障と関連していることが報告されたり、クモやカエルの毒ペプチド、それからウミウシなどの神経ペプチド中から結合態 D-アミノ酸が発見されたりなど、結合態 D-アミノ酸に関しても興味深い報告がなされていた。また食品由来のタンパク質としては、卵白アルブミン中の特定の Ser 残基が受精に伴って D 化し、この変化により熱安定型のアルブミンとなることが明らかになっていた。この変化は受精により卵内の pH がアルカリ化することで起こり、試験管内においても卵白アルブミンを pH 9.5、37°C にてインキュベーションすると 10 日間でその 90%以上が D 化する。pH と熱がアミノ酸の異性化に及ぼす影響は大きい。酸性、あるいはアルカリ性条件で、100°C 以上に加熱することで遊離アミノ酸が容易に異性化することは古くから知られていたが、酸加水分解の初期において結合態 D-アミノ酸の状態でも異性化が進行することが、重塩酸-重水中での酸加水分解と質量分析計を用いた解析により明らかになっていた。このように結合態アミノ酸の異性化が起こる条件が明らかになってきた中で、研究代表者は食品タンパク質中には多くの結合態 D-アミノ酸が存在しているのではないかと考えていた。食品はその加工過程において、熱、極端な pH、圧力、電磁波など様々な条件に晒されているためである。そしてこのような条件の中には、アルカリや酸処理以外にも、結合態 D-アミノ酸の異性化を促進するような工程が存在するのではないかと考え研究を開始した。

2. 研究の目的

まず食品タンパク質やペプチド中における結合態 D-アミノ酸の分布を調べることを目的とした。肉類を加工前と熱処理後で解析を行い、結合態 D-アミノ酸の有無を解析する。また予備検討においてサプリメントとして利用されているコラーゲンペプチド中に著量の結合態 D-Val が存在することを見出していたが、その詳細について解析を行うとともに、このペプチドの原料それから製造工程ごとのサンプルを解析することで異性化を促進する工程を明らかにすることを目的とした。さらに Asp ジペプチドをモデルペプチドとして使用し、異性化を促進させる処理について検討することにした。これにより、食品における結合態 D-アミノ酸の存在、促進させる処理方法を明らかにして、食品への D-アミノ酸利用の新たな展開を図る。

3. 研究の方法

(1) 肉類に含まれる結合態 D-アミノ酸の解析

市販されているウシ、ブタ、トリ肉を生の状態、フライパンでの加熱(140°C 設定のプレートで 3 min)、熱湯中での加熱(沸騰水で 3 min)の状態に処理し、ピーズショッカーで粉末状にして超純水で懸濁することでタンパク質溶液を調製した。タンパク質溶液は Pico-Tag にて酸加水分解(110°C、6 h)を行い、*N*-アセチル-L-システイン(Nac)と *o*-フタルジアルデヒド(OPA)により誘導体化した後で超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)により解析を行った。また酸加水分解サンプルはブタ由来 D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)で処理後に解析を行うことで D-アミノ酸の確認を行った。

(2) コラーゲンペプチド中の結合態 D-Val の解析

コラーゲンペプチドは全て 10 mg/mL となるように調製し、上記と同様に酸加水分解、Nac と OPA による誘導体化、UPLC による解析を行った。また液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いた方法では、NBD-F を用いて誘導体化を行い、その後エレクトロスプレーイオン化法を備えた MS に供し、Negative ion モードで検出を行った。

(3) 結合態アミノ酸の異性化を促進する処理法の検討

L 体のみからなる Asp ジペプチドに対して、様々な処理を行いその光学活性がどのように変化するのか確かめた。行った処理は以下のとおりである。オートクレーブ処理(105, 121°C で 10, 15, 30 min)、電子レンジ処理(700 W で 20, 40, 60, 120 sec)、ヒートブロックインキュベーターでの処理(電子レンジ処理での時間、温度上昇と同じ条件になるよう調整)、UV 照射。処理後の解析は全て、サンプルを NBD-F にて誘導体化し、UPLC に供することで行った。

4. 研究成果

(1) 肉類に含まれる結合態 D-アミノ酸の解析

ウシ、ブタ、トリ肉について生の状態、フライパンで加熱あるいは沸騰水中で湯煎することで調製した各サンプルからタンパク質を抽出し、酸加水分解を行い結合態 D-アミノ酸の割合が変化するか検討した。それぞれのサンプルから抽出した遊離アミノ酸については、どの条件においても D-アミノ酸は検出限界以下であった。結合態 D-アミノ酸については、全てのサンプルで Asp, Ala, Met, Val の D 体に由来するピークが検出されたが、その D/D+L 比は 2%以下であ

った。生のものと比較すると、加熱により D/D+L 比が増加しており、その割合はフライパンで加熱した方が増加する傾向にあったものの有意な差を見出すことはできなかった。

(2) コラーゲンペプチド中の結合態 D-Val の解析

新田ゼラチン株式会社から提供いただいたコラーゲンペプチドを酸加水分解し解析を行ったところ、D-Val が検出されその D/D+L 比は 15~20%という非常に高い値を示した。本サンプルに含まれる遊離アミノ酸を解析した場合は、D-Val は検出されなかったことから結合態として存在していることが示唆された。ブタ、あるいはサカナ由来のコラーゲンペプチドをそれぞれ解析したが、由来に関係なく結合態 D-Val が検出され、その存在比はブタ由来が 15~17%であるのに対してサカナ由来は 20~25%であり、サカナ由来コラーゲンの方がわずかに高い D/D+L 比を示した。一方で大豆やホエー由来のペプチドについて同様に解析した結果では、結合態 D-Val は全く検出されなかった。このことからコラーゲンペプチドには結合態 D-Val が特異的に存在している可能性が示された。また UPLC 以外に LC/MS を用いて解析した結果、NBD-D-Val の溶出時間において検出されたピークが NBD-Val の m/z 279.1 に一致したことから、やはりコラーゲンペプチドの酸加水分解サンプルに D-Val が存在することが明らかになった。しかしながら、酸加水分解サンプルを DAO 処理した場合において、D-Val に由来するピークの減少はほとんど見られなかった。ただし、今回使用した DAO の最も良い基質である D-Ala も、本酸加水分解サンプルにおいては一部しか分解されなかったことから、DAO 処理については更なる検討が必要であると考えられる。続いて、製造工程ごとのコラーゲンペプチドについて解析を行ったが、あるプロテアーゼでの処理以降で、結合態 D-Val の存在比が上昇したことからこのプロテアーゼ、あるいは本工程の条件に異性を促進する要因があるものと思われたが、現在のところその特定には至っておらず引き続き解析を進めている。

(3) 結合態アミノ酸の異性を促進する処理法の検討

結合態アミノ酸の異性を促進する要因について、Asp ジペプチドをモデルペプチドとして使用して解析を行った。NBD-F で誘導体化することで、同じ光学異性をもつジペプチド(LL と DD)と異なる光学異性を示すジペプチド(DL と LD)を UPLC で分割できることを見出し、LL ジペプチドに様々な処理を施した後、酸加水分解することなく UPLC で解析することで異性が生じているか確認した。まずはオートクレーブにて 105℃あるいは 121℃で 10~30 min 加熱することで異性が生じるか解析した。LL ジペプチドを 1 M HCl、1 M NaOH、超純水のそれぞれで溶解し加熱したところ、アルカリ性の条件でのみ異性が起きたジペプチド(DL or LD)が検出された。高温かつ長時間であるほど、異性が良く進行していた。次に同じ条件で調製した LL ジペプチドを 700 W の電子レンジにて加熱した。電子レンジで処理した場合でもアルカリ条件においてのみ、異性が確認できたが、その処理時間は 40~120 sec と非常に短時間で進行していた。またその時のサンプルの温度を測定してみると、50℃ 付近を境に異性が起こっていることが明らかになった。さらに NaOH ではなく、KOH にて調製したサンプルの方がより顕著に異性が進行していた。一方でヒートブロックインキュベーターを用いて、電子レンジ処理した場合と同じ時間でサンプルの温度が同程度上昇するように処理してみたが、どの条件においても異性は確認できなかった。以上の結果から、マイクロウェーブが結合態アミノ酸の異性に大きく寄与することが示唆された。過去に L. Fay ら(1991)によって電子レンジでの加熱ではミルク中の結合態アミノ酸の異性は促進されないことが報告されているが、本研究においても中性条件では異性が確認されなかったことから矛盾する結果ではなく、異性化にはアルカリ条件が重要であると考えられる。また K⁺イオンの存在がマイクロウェーブ照射下での異性化をより促進させる可能性がある。他の条件として、上記したヒートブロックインキュベーターでの加熱時に紫外線(254, 302, 365 nm)を照射してみたが異性は確認できなかった。今後はさらに異なる波長の電磁波を照射し結合態アミノ酸の異性を促進する波長がないか検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶山敬至、大森勇門、大島敏久
2. 発表標題 食品ペプチド中の結合態D-アミノ酸の分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------