

氏 名 (本籍)	川 上 晃 (長野県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 3 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	ソバを用いた血圧降下作用を有する機能性食品 素材の創製
審 査 委 員	主査 信州大学 教授 茅 原 紘 副査 信州大学 助教授 只 左 弘 治 副査 静岡大学 教授 伊 奈 和 夫 副査 信州大学 教授 柴 田 久 夫 副査 岐阜大学 教授 長谷川 明

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究はソバ、とくに日本では食されていない苦ソバが機能性食品の素材となり得るかどうかを研究する目的で行われた。苦ソバは栄養学的には普通ソバとほとんど変わらないが、各種生理作用を有するルチンをより多く含んでいて、もしルチン含量を損なうことなく苦味を除去できれば、特に血圧降下作用を期待した機能性食品の素材となり得る。まづ苦ソバ粉中の苦味成分の除去方法および苦味を伴わない苦ソバの利用法を検討した結果；

- 1) 一番粉を利用する。
- 2) 苦味成分 (ケルセチン) はエタノール水溶液、アセトン水溶液〔特に 75% (V/V) エタノール水溶液〕による洗浄で苦味を除去できる。
- 3) 苦味物質ケルセチンはルチン加水分解酵素によってルチンから生じるので、加水分解を防ぐのに有効な 70℃ 以上に加熱処理すれば、新たな苦味成分を発生しない。

次に苦ソバが血圧降下作用の発現を期待できる機能性食品の素材となりえるかどうかの研究を行った。生体の血圧制御系において、血圧上昇に直接関与しているアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の活性を苦ソバタンパク質の酵素加水分解物 (PEH) が阻害するかどうかの実験として、まづ PEH 作製時に用いる酵素の ACE 阻害活性に及ぼす影響を調べた。モデルペプチドとして南極オキアミから単離された強い ACE 阻害能を有するトリペプチド、Leu-Lys-Tyr (LKY) のアナログを多数合成して、ACE 阻害活性を測定した結果、 $X_1-X_2-X_3$  で表されるトリペプチドでは、 $X_1$  = ロイシン、フ

フェニルアラニン>バリン>イソロイシン>アラニン； $X_2$ =アルギニン、リジン、アラニン>その他； $X_3$ =プロリン、トリプトファン>チロシン>フェニルアラニンの順で強いACE阻害活性が得られることが判明した。このことから、タンパク質を加水分解してACE阻害活性を有するPEHを作製するための使用酵素としては、C末端に芳香族や疎水性アミノ酸残基を生じるペプシン、キモトリプシン、サブチリシン、ポストプロリン分解酵素などやN末端にロイシン残基などを生じるサーモリシンもLKY型のACE阻害ペプチドの作製に有効であることを見出した。新規に合成したトリペプチドのうちで強いACE阻害能を有するペプチドはVal-Lys-Pro ( $IC_{50}=2.6\mu M/l$ )，Ile-Agr-Pro (4.5)，Leu-Lys-Phe (7.1)，Val-Lys-Tyr (7.2)，Ile-Lys-Tyr (9.7)であった。

次にPEH 作製用の原料としてのソバタンパク質を調製するため、等電点沈殿法によるソバタンパク質の抽出を検討した。その結果、1) 苦ソバと普通ソバのアルブミンとグロブリンの分子量分布には大きな差異は認められず、等電点などの物性にも差異が認められなかった。また、苦ソバの等電点沈殿物は苦味を呈さなかった。2) ソバのアレルゲンタンパク質およびトリプシン阻害タンパク質と同じ分子量を持つタンパク質は、ソバアルブミン中に存在し、ソバグロブリン中には存在しなかった。3) ソバアルブミンには等電点域が見られず、pHによって溶解度が大きく変化しなかった。一方、グロブリンはpH 3.8~5.0の間に等電点沈殿域を示し、このpH間では溶存グロブリンの70%以上が沈殿した。従って、等電点沈殿法でソバグロブリンのみを効率よく得ることが可能である。

等電点沈殿法によって調製したソバグロブリンを原料として、ソバタンパク質のPEHを作製した。その結果、ソバタンパク質が有するプロテアーゼ、特にトリプシンに対する分解阻害は認められず、実験に用いた7種の酵素で短鎖ペプチドに分解された。ACE阻害能の発現では、サーモリシンによる加水分解物に特に高い阻害能が認められ、ペプシン、サブチリシンによる分解物も強い阻害活性が観察された。また、これらのPEHは、ACEと類似の作用機作を持つコラゲナーゼを阻害しなかったことから、ACEに対する特異的阻害であり、目的とする血圧降下作用を志向した機能性食品の素材となりえることを実証した。

以上を総括すると、1) 苦ソバ粉の食品としての利用上、問題となっていた苦味について、除去する方法を確立したことで、苦ソバ中の血圧降下作用を有する有するルチンを利用できるようになった。このことにより、血圧降下作用が期待できる機能性食品素材として、“高ルチン含有ソバ”を提供することが可能となった。2) 酵素分解性に優れたソバタンパク質の調製法として、等電点沈殿法を確立した。これによって得たタンパク質を用いて、酵素処理して得たタンパク質酵素加水分解物はACEの活性を強く阻害することで、血圧降下作用の期待できる機能性食品素材の作製法を確立した。

以上の成果は、原価の安い苦ソバを用いた血圧降下作用を有する機能性食品素材の創製に関して、素材および製法の重要な知見を提供するものである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

平成7年1月20日(金)に信州大学農学部11番教室において、審査員を含む関連教官、学生多数の出席のもと、川上論文の公開發表会がおこなわれた。その後、最終試験を兼ねた質疑応答が行われ、直ちに審査委員会を開いて合否案の検討がなされた。学位論文および公開發表も良くまとまっているとの高い評価を受け、審査委員全員一致で合格と判定した。

川上論文は基礎となる下記の学術論文3報を中心にまとめられている。

第一報〔日本栄養・食糧学会誌、46(5)、425~428(1993)、トリペプチド(Leu-Lys-Tyr)誘導体の合成とアンジオテンシンI変換酵素との相互作用〕

食品由来のタンパク質を種々の酵素で部分加水分解し、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害能を有する短鎖ペプチドを得る際の酵素の選択の指標を確立する目的で、南極オキアミから単離されたACE阻害能を有するトリペプチド、Leu-Lys-Tyrおよび関連トリペプチドを多数合成して、構造とACE阻害活性相関を調べた。 $H \cdot X_1 - X_2 - X_3 - OH$  :  $X_1 = \text{ロイシン} \rangle \text{イソロイシン} \rangle \text{バリン} \rangle \text{フェニルアラニン} \rangle \text{アラニン} \rangle$  ;  $X_2 = \text{リジン} \rangle \text{アルギニン} \rangle \text{アラニン} \rangle \text{オルニチン} \rangle \text{スレオニン} \rangle \text{その他}$  ;  $X_3 = \text{プロリン} \rangle \text{トリプトファン} \rangle \text{チロシン} \rangle \text{フェニルアラニン}$ で示されるアナログに強いACE阻害能が観察された。ソバのタンパク質を酵素により部分加水分解して機能性食品の素材とする研究を進める上で、本実験の結果から分解酵素としてキモトリプシンやサブチリシン、プロリン特異性プロテアーゼなどが有効であり、さらに、アミノ末端がロイシンなどであるから、サーモライシン処理も有効であることがわかった。反面、塩基性アミノ酸を認識しやすいトリプシンやカテプシンは不向きであり、パパインも不向きと判断した。

第二報〔日本食品工業学会誌、41(7)、481~484(1994)、等電点沈殿による苦そばタンパク質の抽出と呈味改善〕

日本ではあまり食されていない苦ソバは栄養学的にみると、普通ソバとほとんど同じであり、リジン含有量も多く必須アミノ酸バランスに富んでいるが、普通ソバよりもルチン含有量が高く、機能性食品素材として有望である。川上は苦ソバの呈味改善法を各種試み、等電点沈殿法による苦ソバタンパク質を抽出精製する方法を確立した。そして、以下の結果を得た。(1) 苦ソバと普通ソバのアルブミンおよびグロブミンの分子量分布や等電点などの物性に差違が認められず、苦ソバの等電点沈殿物は独特の苦味を呈さなかった。(2) アレルゲンタンパク質、トリプシン阻害タンパク質はアルブミン中に存在し、グロブリン中には存在せず、グロブリンはpH3.9-5.0の間に等電点沈殿域を示し、

溶存グロブリンの70%以上が沈殿した。従って、等電点沈殿によりグロブリンのみを効率よく得ることが可能である。

第三報 [Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59(4), 印刷中、Taste evaluations of Leu-Lys-Tyr analogues]

第一報の内容を発展させて、甘味および苦味発現と構造との相関関係を詳細に検討して甘味の発現、苦味の低減化における指標を提出した。さらに、砂糖の約10倍の甘味発現と同時にアンジオテンシン変換酵素の活性を強く阻害するトリペプチドを数種類合成した。

川上論文を要約すると、血圧降下作用の発現を期待した機能性食品素材として、苦ソバタンパク質の酵素加水分解物 (PEH) が優れた素材であることを各種実験で裏づけるとともに、機能性食品素材の簡易創製法を確立した。なお、関連論文7報、特許2件も含め、総合判断して農学博士の学位を与えることを決定した。