

豆味噌の Dipeptidyl peptidase-IV 阻害作用および 活性因子の分離と同定

江崎秀男*・林 実咲*・志村亜希子*・長谷川淑己*・及川佐枝子*

Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Effect of Soybean Miso and
Separation and Identification of Active Factor.

Hideo ESAKI, Misaki HAYASHI, Akiko SHIMURA, Yoshiko HASEGAWA and
Saeko OIKAWA

1. はじめに

糖尿病は現代における最も一般的な慢性疾患のひとつであり、我が国の糖尿病有病者および糖尿病予備群は、いずれも約1000万人にも上ると報告されている¹⁾。我が国の糖尿病患者数は、生活習慣と社会環境の変化に伴って急速に増加している。糖尿病はひとたび発症すると治癒することはなく、放置すると網膜症・腎症・神経障害などの合併症を引き起こし、末期には失明したり、透析治療が必要となることがある。

糖尿病対策の一つとして、近年、新しい経口血糖降下薬として注目されているのが、インクレチン関連薬である dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 阻害薬である。2009年12月にわが国で臨床使用可能となった DPP-IV 阻害薬シタグリプチンは、単独使用でのインスリン投与と異なり低血糖を起こしにくい、体重増加をきたしにくいなどの特徴を持つとされている。

DPP-IVは、プロリルオリゴペプチダーゼに属し、インクレチンなどいくつかのホルモンのN末端から2番目のプロリンまたはアラニンの場所でアミド結合を切断し、2個のアミノ酸を切り出す酵素である。DPP-IVの標的となるペプチドとして glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や gastric inhibitory polypeptide (GIP) があるが、DPP-IVで分解されるとこれらのペプチドの生理活性は失われる。

DPP-IVはほぼ全身の臓器に発現しており、細胞膜に固定された状態で機能を発揮するものと、血中に存在して酵素活性を発揮するものがあることが知られている。

高橋直矢²⁾は、納豆は発酵中に大豆タンパク質が分解し、種々のペプチド類が生成することから、DPP-IV阻害物質が含まれている可能性を示唆した。ゲルろ過クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより、ペプチドなどの低分子性の DPP-IV 阻害物

* 生活科学部 管理栄養学科

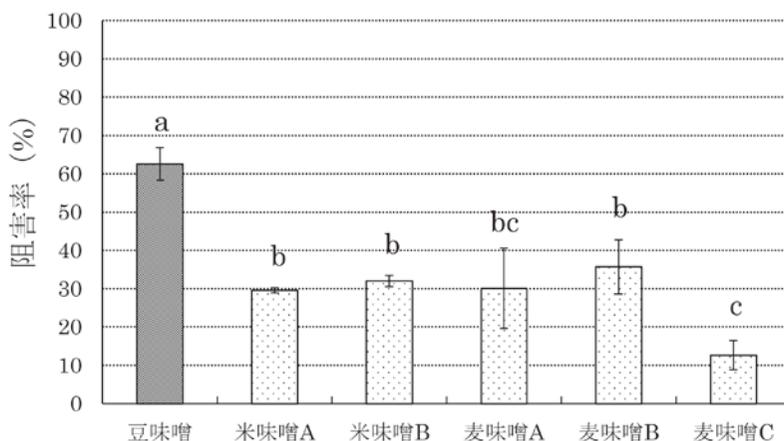


図1 6種類の味噌のDPP-IV阻害作用

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは、有意差 ($p < 0.05$, Tukey) があることを示す。

質の存在を明らかにした。安達夏帆³⁾は、納豆以外の大豆発酵食品にもDPP-IV阻害作用があるのではないかと考え、豆味噌、米味噌および麦味噌を用いて阻害活性を測定し、豆味噌が強い阻害作用を示すことを明らかにした(図1)。また、豆味噌の強いDPP-IV阻害活性は、製造元の異なる5種類の豆味噌においても、ほぼ同様の阻害率(%)を示した(データは省略)。

本研究では、東海地方の特産品でもある豆味噌を用いて、DPP-IV阻害活性成分を分離・精製するとともにその同定を行った。

2. 実験方法

2.1 豆味噌10%エタノール(EtOH)抽出液の調製

本実験で使用した豆味噌は、愛知県清州市のN社より入手した。豆味噌に同量の蒸留水を加え、沸騰水浴中で10分間加熱処理を行った。その後、加熱により蒸発した水分量を補い、抽出時のEtOH濃度が10%になるように100% EtOHを加えた。更に抽出量を増やすため10% EtOHを加え、一晚室温で抽出を行った。No.101およびNo.2のろ紙でろ過し、得られたろ液を豆味噌の10% EtOH抽出液とした。

2.2 DPP-IV阻害活性の測定

96穴マイクロプレートの各wellに、試料溶液を60 μ Lずつ分注し、そこに反応液量を200 μ Lに調整するために精製水を10 μ L、200mMのリン酸緩衝液(pH8)を100 μ L、DPP-IV酵素液を10 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで2分間予備加温した。盲検として、酵素液の代わりに精製水を10 μ L加え、同様に予備加温した。その後、基質として3.5mM Glycyl-L-proline *p*-nitroanilide monotosylate (GPNT) 溶液を20 μ L入れ、37 $^{\circ}$ Cで60分間加温した後、405nmにおける吸光度を測定した。対照試験として、試料溶液の代わりに10% EtOHを用いて、同

様の操作を行った。DPP-IV 阻害率 (%) は以下の式を用いて算出した。

$$\text{DPP-IV 阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{試料溶液の DPP-IV 反応実験の吸光度} - \text{試料溶液の DPP-IV 無添加反応実験の吸光度}) / (\text{10\% EtOH の DPP-IV 反応実験の吸光度} - \text{10\% EtOH の DPP-IV 無添加反応実験の吸光度})\} \times 100$$

2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるニンヒドリン陽性物質の検出

試料溶液をシリカゲルプレート (Merck 社, Silica gel 60 F₂₅₄) に 1 μ L スポットした。展開溶媒 {展開液 A: *n*-BuOH/AcOH/H₂O = 4/1/1 (v/v/v), 展開液 B: 2-PrOH/H₂O = 7/3 (v/v), 展開液 C: *n*-BuOH/AcOH/H₂O = 4/1/0.5 (v/v/v)} を用いて展開した。その後, ニンヒドリン試薬を噴霧し, 100 $^{\circ}$ C で 60 分間加熱し, ニンヒドリン陽性物質の検出を行った。

2.4 Amberlite IR120 強酸性イオン交換クロマトグラフィー

2.1 で調製した豆味噌 10% EtOH 抽出液 (1.5L) を Amberlite IR120 強酸性陽イオン交換樹脂 (H 形) を詰めたカラム (5.4cm i.d. \times 72cm) で分画した。樹脂に吸着しなかったものを通過液 (1.5L) として回収し, また樹脂に吸着し, 2N アンモニア水で溶出したものを溶出液 (3L) とした。これらの通過液 150mL および溶出液 300mL, また分画前の 10% EtOH 抽出液 150mL を用いて, エバポレーターで溶媒を完全に留去した。得られた乾固物をそれぞれ 10% EtOH 150mL で溶解し, これらの溶液を用いて, DPP-IV 阻害活性の測定および TLC (展開液 A) によるニンヒドリン陽性物質の検出を行った。

2.5 TOYOPEARL HW-40F ゲルろ過クロマトグラフィー

強い DPP-IV 阻害活性を示した Amberlite IR120 カラム 溶出液を用いて TOYOPEARL HW-40F ゲルろ過カラム (2.2cm i.d. \times 40cm) による活性成分の分離を行った (溶離液: 10% EtOH, 流速: 0.5mL/分, 各フラクション: 5mL)。

得られた各フラクション (F) の 225nm における吸光度を測定し (島津紫外可視分光光度計 UV-1800), 溶出パターンを作成した。なお, 十分な実験試料を得るために, この操作は 9 回繰り返し行った。得られたゲルろ過各フラクションを用いて, DPP-IV 阻害活性の測定および TLC (展開液 B) によるニンヒドリン陽性物質の検出を行った。

2.6 Develosil ODS-HG-5 カラムによる分取 HPLC

ゲルろ過クロマトグラフィーにより得た DPP-IV 阻害活性を示す溶出液 F22 については, TLC (展開液 C) によるニンヒドリン陽性物質の検出を行った。その後, この F22 を用いて Develosil ODS-HG-5 カラム (20mm i.d. \times 250mm) による活性成分の単離を行った。HPLC の分析条件は, カラム: Develosil ODS-HG-5 カラム (20mm i.d. \times 250mm), カラム温度: 22 $^{\circ}$ C, 溶離液: 水, 流速: 6.0mL/分, 注入量: 1mL, 検出波長: 230nm, 各フラクション: 5mL とした。また, 十分な実験試料を得るために, この操作は 4 回繰り返し行った。

2.7 誘導体化アミノ酸分析

ODS-HG-5 カラムを用いた分取 HPLC によって単離した HPLC24 および HPLC25 の DPP-

IV阻害活性を測定した。またこれらの精製物を用いて、超高速液体クロマトグラフ Nexera X2（島津製作所）による誘導体化アミノ酸分析を行った。HPLC24およびHPLC25の凍結乾燥物（FDP）をそれぞれ1.0mgずつ採取し、10mL容メスフラスコへ入れ、0.1mol/L塩酸でメスアップした。この溶液を10倍希釈した後、フィルター処理したものを試料溶液とした。オートサンプラー SIL-30ACによる自動誘導体化での試薬を添加した後、分析を行った。自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析条件は、カラム：Inertsil ODS-4（3.0mm i.d.×100mm）、カラム温度：35℃、溶離液A：20mmol/Lリン酸（カリウム）緩衝液（pH6.5）、溶離液B：CH₃CN/MeOH/H₂O=45/40/15（v/v/v）、流速：0.8mL/min、注入量：1μL、初期検出波長：Ex：350nm、Em：450nmとした。

また、豆味噌10% EtOH抽出液についても同様の全処理を行った後、アミノ酸分析を行った。

2.8 アミノ態窒素量および全窒素量の測定

豆味噌10% EtOH抽出液より調製したFDPを0.5g採取し、50mL容メスフラスコに入れ、精製水でメスアップした。この液を25mLとり、スターラーで攪拌しながら、0.1N NaOH溶液（factor：1.000）をpH8.5になるまで加えた。その後、ホルムアルデヒド溶液を20mL加え、再び0.1N NaOH溶液でpH8.5になるまで滴定を行った（ホルモール滴定法）。このとき消費した0.1N NaOH溶液の滴定量（t）から、次式によりFDP100g中のホルモール窒素量を算出した。

$$\text{ホルモール窒素 (g/100g)} = t \times 0.0014 \times 1.000 \times 50/25 \times 100/\text{採取量 (g)}$$

またケルダール法により全窒素量を測定するため、豆味噌10% EtOH抽出液より調製したFDP 0.1gを採取し、ケルダール分解管に入れた。硫酸を6mL加え、さらに過酸化水素を1.5mL入れ、加熱分解を行った。反応が進むとともに、過酸化水素を1.5mL程度随時（2～3回）加えた。反応液が透明になったところで分解を終了した。この反応液に混合指示薬を数滴加えた後、蒸留装置にセットし、15%水酸化ナトリウムを、溶液が薄緑色になるまで加えた。蒸気受け側に4%ホウ酸溶液20mLおよび混合指示薬数滴の入った200mL容三角フラスコをセットし、蒸留装置のスタートボタンを押した。赤色を呈していた酸性液体は、アルカリ性となり灰色を経て緑色に変化した。10分間の蒸留後、0.1N硫酸（factor：1.002）で滴定を行い、溶液の色が緑色から透明、透明から赤色と変わったところを終点とした。このとき消費した0.1N硫酸の滴定量（t₂）から、次式によりFDP100g中の全窒素量を算出した。

$$\text{全窒素量 (g/100g)} = (t_2 \times 1.002 \times 1.4) / (\text{採取量 (g)} \times 1000) \times 100$$

$$\text{たんぱく質} = \text{全窒素量} \times \text{窒素} \cdot \text{たんぱく質換算係数 (大豆, 大豆製品: 5.71)}$$

3. 結果・考察

3.1 Amberlite IR120 カラム分画液のDPP-IV阻害作用

Amberlite IR120 カラムで調製した分画液（通過液および溶出液），および分画前の10% EtOH抽出液の阻害活性を図2に示した。溶出液で54%となり，通過液（26%）より強い阻害活性を示した。これらの分画液中のペプチド類などをTLCで調べたところ（展開液A），溶出液に多くのニンヒドリン陽性スポット（Rf値0.04, 0.26, 0.40, 0.51）が検出された（図3）。これらの結果から，豆味噌10% EtOH抽出液のDPP-IV阻害作用には，中酸性のペプチド類が関与していると考えられる。高橋直矢ら²⁾は，DPP-IV阻害作用を示す低分子性のペプチド類を納豆から見出している。以後，このAmberlite IR120カラム溶出液を用いて，活性成分の分離を行うこととした。

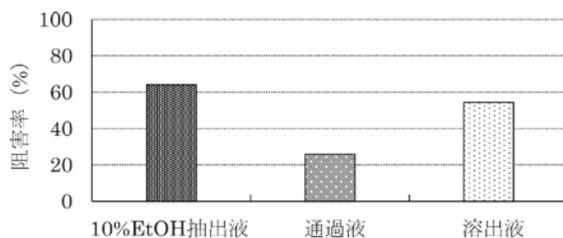


図2 Amberlite IR120カラム分画液のDPP-IV阻害作用

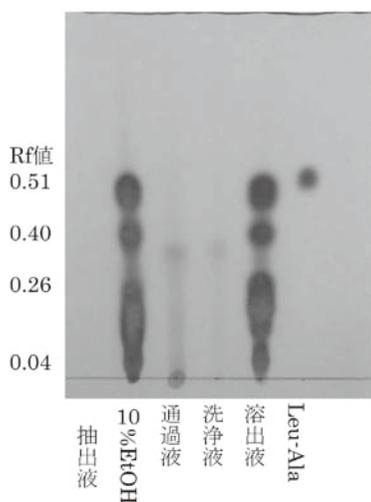


図3 Amberlite IR120カラム分画液中のニンヒドリン陽性物質
各試料溶液をSilica gel 60 F₂₅₄にスポットした後，*n*-ブタノール：酢酸：水（4：1：1 v/v/v）で展開した。0.2%ニンヒドリン/95%ブタノールを噴霧後，加熱した。

3.2 ゲルろ過溶出液のDPP-IV阻害作用

Amberlite IR120カラム溶出液中のペプチド類を分離するために、TOYOPEARL HW-40Fを用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った。225nmにおける溶出パターンを図4に示した。F12～23, F28～31で、225nmにおいて主要なピークが見られた。

ペプチド類などの比較的分子量が高い物質が溶出したと考えられるゲルろ過フラクションF12～22を用いて、TLC（展開液B）によるニンヒドリン陽性物質の検出を行ったところ、F22においてRf値0.57および0.67に最も濃厚なニンヒドリン陽性スポットが検出された（図5）。これらのスポット物質は、Amberlite IR120カラム溶出液（カラム前）中の主要な活性成分であると推察される。このF22のDPP-IV阻害活性を調べたところ、3.0mg/mLの濃度において約50%の阻害率を示した。

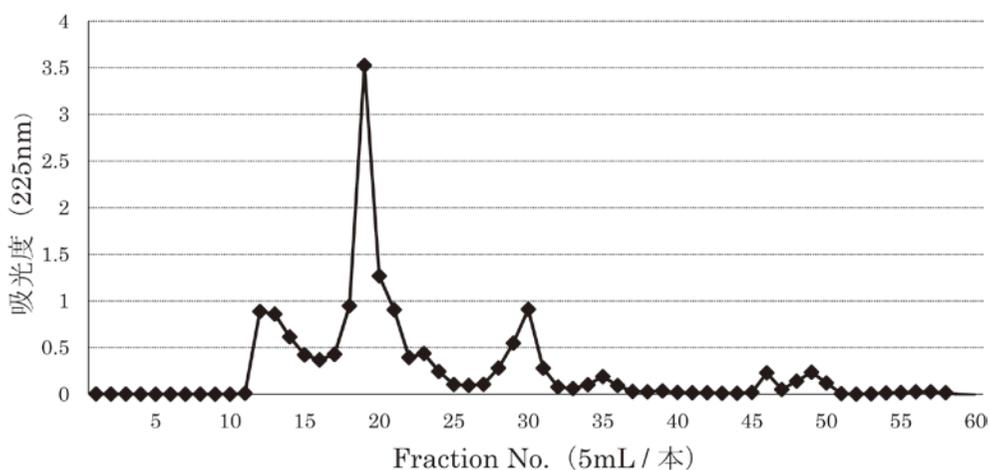


図4 TOYOPEARL HW-40Fゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターン

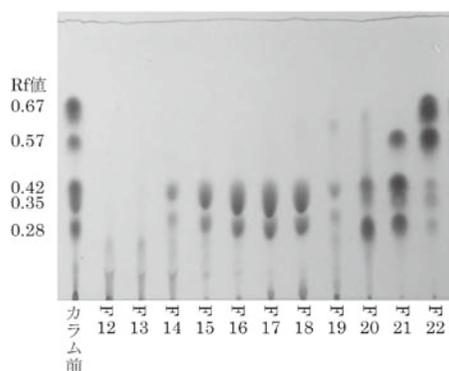


図5 ゲルろ過各フラクション中のニンヒドリン陽性物質

各フラクションをSilica gel 60 F₂₅₄にスポットした後、2-プロパノール：水（7：3 v/v）で展開した。0.2%ニンヒドリン/95%ブタノールを噴霧後、加熱した。

カラム前：Amberlite IR120カラム溶出液

3.3 分取HPLC溶出液のDPP-IV阻害作用

阻害活性の認められたF22中のニンヒドリン陽性物質を分離するために、ODS-HG-5カラムを用いた分取HPLCを行った。230nmにおける溶出パターンを図6に示した。溶出時間10分から17分に複数のシャープなピークが検出されたが、これらのフラクション(HPLC10~HPLC17)には、阻害活性は見られなかった。そこで、溶出時間19分以降のなだらかなピーク(HPLC19~HPLC25)に着目し、各フラクションの阻害活性を調べたところ(図7)、HPLC25で56%、HPLC24で54%、HPLC23で49%、HPLC22で38%、HPLC21で24%、HPLC20で20%、HPLC19で30%の阻害率を示した。なかでもHPLC23、HPLC24およびHPLC25の阻害率は、HPLC19~HPLC22より有意に($p<0.05$)高かった。

HPLC25およびHPLC24においては、ともにRf値0.69に単一のニンヒドリン陽性スポットが検出された。これらの結果より、HPLC25およびHPLC24は、豆味噌10% EtOH抽出液中のDPP-IV阻害作用を示す活性成分であると考察される。

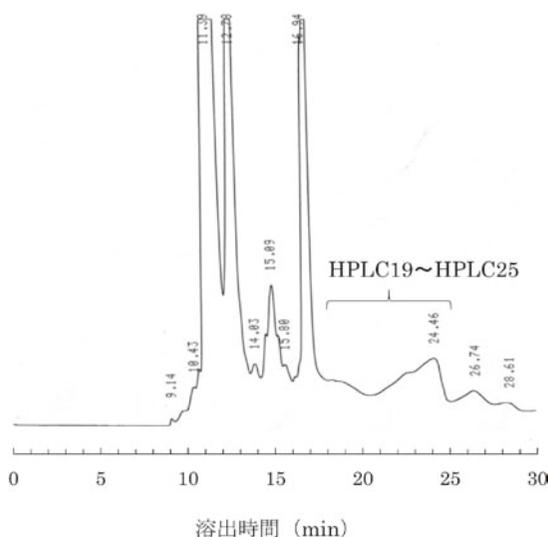


図6 ODS-HG-5カラムを用いた分取HPLCの溶出パターン

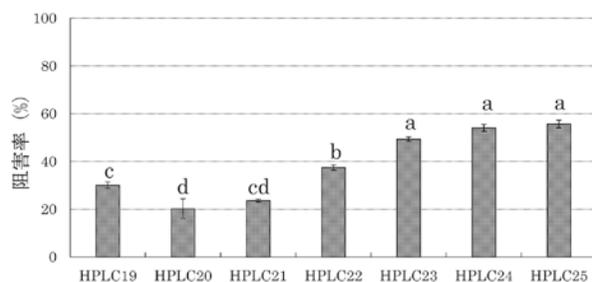


図7 分取HPLC各フラクションのDPP-IV阻害作用

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは、有意差 ($p<0.05$, Tukey) があることを示す。

3.4 超高速液体クロマトグラフNexeraX2を用いた誘導体化アミノ酸分析によるHPLC25の同定

分取HPLCにより単離したHPLC25を試料として、NexeraX2による誘導体化アミノ酸分析を行ったところ、溶出時間10.648分に左右対称のシャープなメインピークが検出され(図8)、このピーク物質はロイシンと同定された。このピーク面積値より、HPLCに注入した試料溶液中のロイシンのモル濃度は68.0 $\mu\text{mol/L}$ と算出された。このHPLC25には、ロイシン以外にも小さなイソロイシンのピーク(溶出時間:9.933分)が検出されたが、このピーク物質のモル濃度は、4.76 $\mu\text{mol/L}$ であり、ロイシンのモル濃度より極めて小さな値であった。このことから、HPLC25のロイシンがDPP-IV阻害活性に関与していると考えられる。

HPLC25の溶液(3.0mg/mL)と同濃度のロイシン標準液を用いてDPP-IV阻害活性を調べたところ、HPLC25の阻害率は56%となり、ロイシン標準液の阻害率62%と近似した値を示した。この結果からも、HPLC25の阻害活性はロイシンに起因すると考察される。

また、ロイシンがDPP-IV阻害作用に寄与しているかを調べるために、豆味噌10% EtOH抽出液のアミノ酸分析を行った。その結果、18種類のアミノ酸が検出され、ロイシン濃度はグルタミン酸(56.1 $\mu\text{mol/L}$)、アスパラギン酸(44.1 $\mu\text{mol/L}$)に次いで高く、その値は44.0 $\mu\text{mol/L}$ であった。この結果からも、豆味噌に含まれるロイシンがDPP-IV阻害作用を示す一成分であると考察される。

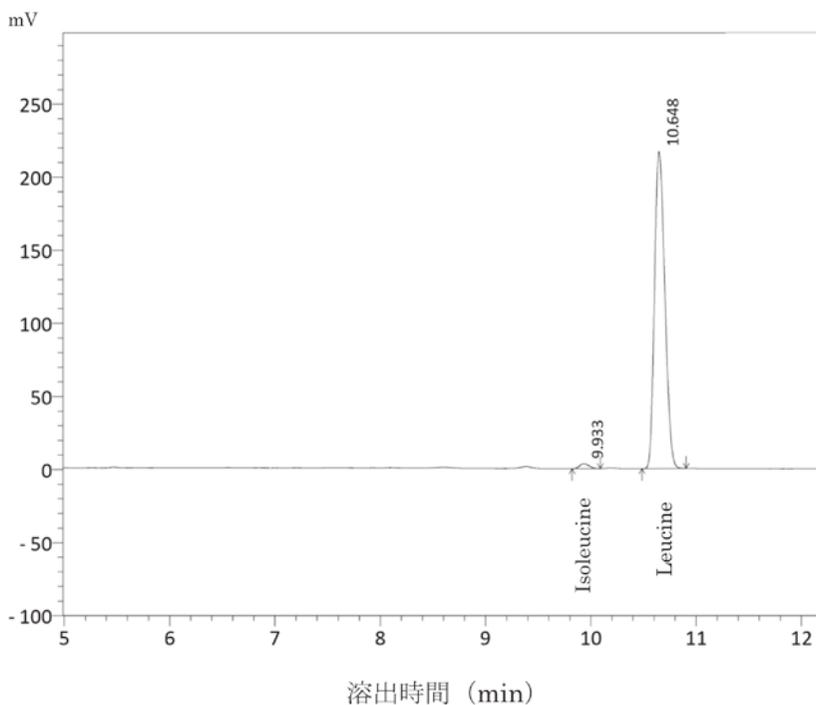


図8 HPLC25のNexeraX2による誘導体化アミノ酸分析

3.5 豆味噌10% EtOH抽出物の全窒素量およびアミノ態窒素量

豆味噌10% EtOH抽出液のFDP100g中の全窒素量をケルダール法により調べたところ、4.98gであった。一方、ホルモール滴定法によって得られたFDP100g中のアミノ態窒素量は、1.85gと算出された。この豆味噌10% EtOH抽出物中には、豆味噌の原料である大豆中のたんぱく質が味噌の発酵・熟成中に分解されて生成した遊離アミノ酸やペプチド類、また残存たんぱく質などが含まれていると考えられるが、これらの窒素化合物がケルダール法により全窒素量として求められる。従って、全窒素量(4.98g)からホルモール態窒素量(1.85g)を差し引いた3.13g中には、ロイシンをはじめとする遊離アミノ酸以外のペプチド類などが含まれていると考えられる。この値(3.13g)は全窒素量の63%に相当することから、この豆味噌10% EtOH抽出物中には様々なペプチド類がかなりの量で含有されていると考察される。今後、これらのペプチド類に焦点を当てて、DPP-IV阻害作用を示す豆味噌特有のペプチド類を探索する必要がある。

4. まとめ

大豆を原料として製造される味噌、醤油、納豆などは、大豆を十分に蒸煮した後、さらにカビ、細菌、酵母などの微生物のもつ酵素反応を利用して組織を軟化させ、消化性を高めた大豆発酵食品である。これらは我が国の食生活に欠かせない伝統的な食品である。この発酵食品は、発酵・熟成という過程のなかで様々な微生物の働きにより、原料大豆には認められない新たな機能性(生理機能)が発現することが知られている。

納豆の生理機能として、血栓溶解作用⁴⁾、発癌プロモーション抑制作用⁵⁾などが報告されており、また味噌では、アンギオテンシンI変換酵素抑制効果⁶⁾、メラニン生成抑制作用⁷⁾などが知られている。近年、味噌の生理機能として、佐藤ら⁸⁾は米味噌および麦みそを用いてゲルろ過クロマトグラフィーにて分画を行い、これらの味噌がDPP-IV阻害物質を含有することを明らかにするとともに、原料の配合割合や熟成期間の違いからその含有量も異なることを報告している。

本研究では、当研究室の先行試験によって米味噌や麦味噌より有意に強いDPP-IV阻害作用を示す豆味噌を試料として、各種クロマトグラフィーを行うことにより、活性物質を単離することができた。またNexeraX2による誘導体化アミノ酸分析により、この物質はロイシンであることを明らかにした。

今後、本研究において構築した手法を用いて、豆味噌中のDPP-IV阻害成分であるペプチド類などを探索し、豆味噌の糖尿病予防という観点からの新規機能性を明らかにすることが求められる。

謝辞

本研究において、DPP-IV酵素をご提供いただきました静岡県立大学 食品栄養科学部食品生命科学科 食品化学研究室 伊藤圭祐准教授に、豆味噌を提供いただきましたナカモ(株)に感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり、誘導体化アミノ酸分析にご協力頂きましたあいち産業科学技術総合センター 食品工業技術センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省, 平成28年度「国民健康・栄養調査」, <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h28-houkoku.pdf>
- 2) 高橋直矢, 矢辻聡, 河盛治彦, 太田徹, 館博: 納豆のDPP4阻害物質に関する研究, 第23回日本健康医学会総会抄録集, **22**(3), pp.194-195, 2013
- 3) 安達夏帆: 大豆発酵食品の糖尿病予防に寄与するDPP-IV阻害作用を示す大豆発酵食品および活性成分の探索, 椛山女学園大学, 平成27年度卒業論文
- 4) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., Muraki, H.: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia*, **43**(10), pp. 1110-1111, 1987
- 5) Takahashi, C., Kikuchi, N., Katou, N., Miki, T., Yanagida, F., Umeda, M.: Possible anti-tumor-promoting activity of components in Japanese soybean fermented food, Natto: effect on gap junctional intercellular communication, *Carcinogenesis*, **16**(3), pp. 471-476, 1995
- 6) 寺中毅頼, 江澤真, 松山惇, 海老根英雄, 清澤功: 米味噌, 麦味噌および豆味噌抽出液のアンジオテンシンI変換酵素抑制効果, 日本農芸化学会誌, **69**(9), pp.1163-1169, 1995
- 7) 實山安英, 新本洋士, 小堀真珠子, 津志田藤二郎, 篠原和毅: 味噌熱水抽出非透析物によるマウスメラノーマのメラニン生成抑制作用, 日本食品科学工学会誌, **43**(6), pp. 712-715, 1996
- 8) 佐藤公亮, 原直幸, 辻聡, 館博: 味噌のDipeptidyl-peptidase 4阻害物質の検索に関する研究, 第25回日本健康医学会総会抄録集, **24**(3), pp. 270-271, 2015