

令和 6 年度（2024 年度）

神戸女子大学大学院家政学研究科

修士論文要旨

豆煮汁に含まれる γ -グルタミルペプチドの化学構造と機能性解析

博士前期課程（食物栄養学専攻）大谷彩佳

【背景・目的】

豆の種子には、様々な形態の γ -グルタミルペプチド (γ -GPs ; γ -グルタミル残基を含む低分子短鎖ペプチド) が存在することが報告されている¹⁾。本研究室の先行研究でも、インゲンマメ煮汁に最も多く存在するペプチドとして、 γ -Glu-S-methyl-Cys が分離・同定された²⁾。

近年、 γ -GPs は、CaSR アゴニストとして、食品へのコク味知覚の付与、様々な臓器の細胞表面 G タンパク質共役受容体の調節を介した炎症や心血管系の生理的機能の調節に関与することが明らかにされている¹⁾。また、 γ -GPs は、チーズやしょうゆなどの発酵食品、一部の食品（ニンニク、ダイズなど）に存在していることが報告¹⁾されているが、食品における分布、存在量、および機能性については不明な点が多い。

本研究では、豆煮汁を健康食品素材、あるいは試薬の供給源として利用する可能性を探るため、日本でよく食されている 4 種類の豆（アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ダイズ）煮汁中に存在する γ -GPs の化学構造を解析した。また、インゲンマメ煮汁中に最も多く存在する γ -Glu-S-methyl-Cys の機能性について検討した。

【方法】

4 種類の乾燥豆から豆煮汁を調製し、50%エタノール分画後、上清を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50×2) に供し、ペプチド画分を調製した。次に、逆相 HPLC (ODS) を用いて主要ピークを分離し、収量を測定した。ペプチド画分および主要ピークに含まれる成分の化学構造解析は、AccQ・Tag 誘導体化後、LC-MS/MS で行った。

インゲンマメ由来の 9 個の主要ピーク (T-I~T-IX) の ACE 阻害活性測定は、基質 (Hippuryl-His-Leu) から遊離される Hippuric acid を HPLC で定量して阻害率を算出した。

豆煮汁由来 γ -GPs がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響については、最も収量が多かったインゲンマメ由来の T-III (γ -Glu-S-methyl-Cys) を用い、ヒト糞便 (本学大学生・大学院生, n=4) に試料を添加し、24 時間嫌気培養後、DNA を抽出し、T-RFLP 法で腸内細菌叢の組成を評価した。

【結果・考察】

4 種類の豆煮汁から、ペプチドと推定される 9~13 個の主要ピークが得られた。これらのうち、存在量が最も多かったのはインゲンマメの T-III で、他のピークと比べて 10 倍以上含まれていた。また、アズキに 1 種類、インゲンマメに 4 種類、ダイズに 3 種類の γ -GPs が存在していることが確認された。インゲンマメとダイズには γ -GPs が含まれていることがすでに報告¹⁾されているが、今回確認した化学構造とは一致しなかった。これらのことから、豆類の品種や栽培条件により、存在する γ -GPs の化学構造

に差異が生じる可能性があると考えられる。

インゲンマメ由来ピークの ACE 阻害活性を測定した結果、T-I と T-II に高い活性が認められたが、GSH に比べると低かった。さらに、T-I と T-II を LC-MS/MS で詳細に分析したところ、T-I から 3 個、T-II から 4 個のピークが重なって検出されたことから、T-I と T-II は複数の成分により ACE 阻害活性が示されたと推察された。

T-RFLP 解析では、T-III が *Bifidobacterium* 属の増殖を有意に促進させたことから、*B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. faecale* / *B. adolescentis* のいずれかを強く増殖促進する可能性がある。また、T-III は、*Lactobacillales* 目を有意に増殖させたことから、*Streptococcus. gallolyticus*, *Streptococcus. mitis* / *oralis* / *infantis* の増殖促進効果を有することも示唆された。T-RFLP 法は、T-RF ピークが複数の種類の微生物に由来するため、増減した細菌種を同定することはできなかった。したがって今後は、得られた DNA サンプルを用い、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたメタ 16S 解析を行い、変動した細菌種を特定する必要がある。

【結論】

本研究では、アズキ、インゲンマメ、およびダイズ煮汁に含まれる γ -GPs の化学構造を推定し、新たな γ -GPs の機能性を確認できた。特に存在量が多いインゲンマメ由来 γ -GPs である γ -Glu-S-methy-Cys に ACE 阻害活性およびプレバイオティック活性が認められたことから、豆煮汁の新たな利用の可能性が広がったといえる。

- 1) Snigdha Guha, Kaustav Majumder, Comprehensive review of γ -glutamyl peptides(γ -GPs) and their effect on inflammation concerning cardiovascular health, *J. Agric. Food. Chem*, 70, 7851-7870 (2022)
- 2) 木村彩郁, 豆煮汁由来ペプチドの化学構造および機能性解析, 令和 4 年度神戸女子大学大学院家政学研究科修士論文 (2023)
- 3) Chisato Okajima, Naoki Imakawa, Kazuya Nagano, et al, Inhibitory activity and proposed binding model of γ -glutamyl cysteine, the precursor of glutathione, on angiotensin converting enzyme, *BPB Reports* 4, 116-119 (2021)
- 4) Singh RK, Chang HW, Yan D, et al, Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J. Transl. Med* , 15-73 (2017)

様々な可聴音波が出芽酵母の増殖およびエタノール産生へ及ぼす影響

博士前期課程（食物栄養学専攻）平野璃音

【背景・目的】

多くの発酵食品やパン作りに用いられる出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、音楽や可聴音域 (20 Hz~20 kHz) にある単一の音波の暴露下において増殖やエタノール産生が促進されることが報告されており、音波刺激が発酵食品の品質向上や生産コスト削減のための有効な方法の一つとなる可能性が示唆されている。一方で、音高 (周波数)、音圧 (音圧レベル)、音色 (波形) という音の 3 要素がもたらす出芽酵母の反応の違いについて検討した研究は、私たちの知る限り見当たらない。そこで、本研究では、周波数、音圧レベル、波形の 3 つのパラメーターが異なる様々な可聴音波の暴露下で出芽酵母の液体培養を行い、増殖を促進する音波の条件を探索することを目的とした。

【方法】

酵母には顆粒状のドライイースト (共立食品、東京) を用い、37°C の条件下で 12 時間振盪培養 (150 rpm) した。音波負荷なし条件では、スピーカーから音を鳴らさず、小型シェーカーの稼働音を含む環境音のみとした。音波負荷あり条件では、440 Hz・94 dBA・正弦波を標準とした音波を 12 時間継続して負荷した。周波数比較では 110、440、1,760 Hz、音圧レベル比較では 88、94、100 dBA、波形比較では正弦波、三角波、矩形波の音波をそれぞれ比較条件とした。増殖観察のため、1 時間おきにマイクロプレートリーダーを用いて 600 nm の吸光度を測定し、濁度によって、菌体量を推定した。また、エタノール濃度は、屈折糖度計によって得られた 12 時間培養後の Brix 糖度により半定量した。

【結果及び考察】

標準音波条件 (440 Hz・94 dBA・正弦波) は、音波負荷なし条件に比べ、増殖に有意な変化を与えなかった。周波数による比較では、音波負荷なしの場合に比べ、110 および 1,760 Hz の音波で増殖が有意に抑制された。音圧レベルによる比較では、88 および 100 dBA の音波は、音波負荷なしの場合に比べ、有意に増殖を抑制した。また、100 dBA の音波は、94 および 88 dBA と比べても、増殖を有意に抑制した。波形による比較では、音波負荷なしの場合に比べ、三角波および矩形波で有意な増殖の抑制が観察された。また、三角波および矩形波は、正弦波と比べても有意に増殖を抑制し、さらに、三角波は矩形波と比較して有意に増殖を抑制した。先行研究とは異なり、本研究で可聴音波が酵母の増殖を抑制した理由として、「負荷した音圧が、本実験全体を通して高く、酵母が可聴音波刺激に対してストレス適応反応を起こした」、「本研究で使用した周波数は、増殖を促進する効果を持たなかった」または「本研究で使用した酵母と、先行研究で使用された酵母では、可聴音波に対する感受性が異なっていた」可能性がそれぞれ考えられる。エタノール濃度については、音波負荷なし、440 Hz・94 dBA・正弦波、440 Hz・94 dBA・三角波の 3 条件で比較を行ったが、12 時間後の Brix 糖度において有意な差は見られず、音波が増殖を抑制した背景にアルコール発酵の促進があるとはいえなかった。

【結論】

本研究において、酵母の増殖を促進する音波条件は見つけられず、むしろ音波は増殖を抑制した。この増殖抑制効果は、音波条件により、その程度が異なることが観察された。また、エタノール産生への影響は見られず、酵母の増殖が抑制された機序について明らかにすることはできなかった。

回復期リハビリテーション病棟における調理活動が食事摂取にもたらす影響

博士前期課程（食物栄養学専攻）南 由子

【背景】

リハビリテーション（以下，“リハ”と言う）病院・施設入院患者では40～50%に低栄養が認められ、リハアウトカムに悪影響を及ぼす。リハ対象者は様々な状況から低栄養の要因に曝露しやすく、回復期リハビリテーション病棟（以下，“回リハ病棟”と言う）では、9割以上が経口摂取単独での栄養管理であるため食事摂取率を良好に保つ必要があると考えられる。

大阪府のI病院の回リハ病棟では、食欲不振患者に対して集団で調理活動を実施してきた。先行研究では、認知症のケアと予防への効果を明らかにすることを目的に料理療法が行われており、ADLの改善やコミュニケーションの活性化からQOLの向上に有効であるということが分かっている。

【目的】

調理活動は、「前頭連合野の活性化による効果」より認知症周辺症状の緩和から食事摂取改善につながる効果や、五感を刺激することにより食欲増進効果があることから調理作業が食事摂取を増加させるという仮説のもと、本研究は、回復期リハビリテーション病棟における調理作業を含む調理活動が食事摂取に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】

研究対象者は、65歳以上の回リハ病棟入院患者とした。回リハ対象疾患の主病名により3群（廃用群、運動器疾患群、脳血管疾患群）に分類した。各群で調理観察群（調理風景を観察・月1回）と調理実施群（簡単な調理を実施・月2回）を比較した。評価項目は、食事摂取率、必要エネルギー量充足率、BMI (kg/m²)、MMSE (Mini-Mental State Examination) 等とした。

【結果及び考察】

食事摂取に関する項目として、食事摂取率、必要エネルギー量充足率、摂取エネルギー量 (kcal, kcal/kg BW) は、各疾病群ごとに調理作業の有無に関わらず、介入期間または回数が有意な影響を与えた。先行研究では、調理による認知症のケアと予防の効果が検証されていたが、本研究では疾病群分けをしない実施群において、MMSE得点で有意な改善がみられた。観察群でも同程度の改善がみられているため、調理作業による有意な改善とは言えない。

先行研究の料理療法では、献立立案から取り組んでおり、調理実施群で行った嗜好に合わせて調味をすることや皿に盛りつけることだけでなく、それ以外の献立立案、食材を切る、炒めるなど加熱操作をする等、他の手順で認知機能に効果的にはたらく可能性があることが考えられる。

また、調理実施群において前頭前野の活性化が起こった可能性はあるが、低栄養の改善に結びつくほど調理作業の期間や頻度が十分でなかった可能性が考えられる。

調理活動における調理作業で食事摂取を増加させたが、調理観察以上の食事摂取改善は見られなかった。

【結論】

回リハ病棟における調理活動は、食事摂取に関する項目として、食事摂取率、必要エネルギー量充足率、摂取エネルギー量 (kcal, kcal/kg BW) において、介入期間または回数で有意な差がみられた。しかし、調理観察群と調理実施群の間では差はなかった。