

清酒副産物の機能性ペプチドに関する研究



月桂冠株式会社 堤 浩子

はじめに

「酒は百薬の長」といわれるよう、アルコール飲料としてだけでなく、さまざまな薬理・薬効を持つものとして受け継がれている。なかでも日本酒は、米を原料とし主に清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と麹菌 *Aspergillus oryzae* の2つの微生物の複雑な代謝を経て得られる発酵産物であることから、「百薬の長」となる成分が多く含まれていると考えられる。発酵期間を終えたもろみは、上槽（しほり工程）をへて日本酒と酒粕に分離される。酒粕には酵母や麹菌、発酵代謝物も多く含むことから栄養価富む素材と考えられる。清酒の中に、血圧上昇抑制ペプチド¹⁾の機能性成分も含まれ、さらに酒粕にも同じ機能性ペプチドや様々なたんぱく質や栄養成分が多く含まれていることも注目されている。近年の甘酒ブームも加わり、発酵食品は機能性食品として定着しつつある。清酒副産物である酒粕から、機能性ペプチドを製造し、さらなる機能付与すること目的に研究開発を行った。

1. 酒粕分解ペプチドの製造

酒粕をプロテアーゼ分解することで、機能性を強化した酒粕ペプチド製造を目的に製造方法を検討した。製造の概略は図1に示し、最初にアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害の活性を指標として、酒粕ペプチドの製造を検討した。酒粕ペプチド中には、ジペプチドから長鎖ペプチドを含んだ混合物とであった。酒粕ペプチド中には、多様な機能性ペプチドが含まれると予測し、多方面から機能性を探索し、血圧上昇抑制ペプチド、抗酸化ペプチド、肝機能保護効果ペプチドの精製と同定を行い、機能性食品への展開を検証した。

2. アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチドの同定と定量

生体内の肺や血管内皮細胞などに存在するアンギオテンシン変換酵素（ACE）は、レニン・アンгиотенシン系やブラジキニン系において血圧上昇を制御する主要な酵素であることが知られている。ACEの酵素活性を阻害すれば血圧上昇が抑制できるため、様々な食品からACE阻害物質の単離が試みられている。酒粕ペプチドの機能の探索ターゲットとして、最初にACE阻害ペプチドの精製・同定を行った。高血圧自然発症ラット（SHR）による試験とヒト試験により血圧上昇抑制効果を確認している²⁾。斎藤ら³⁾によりACE阻害活性ペプチドは数種類（Arg-Tyr, Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr）が報告されていたが、

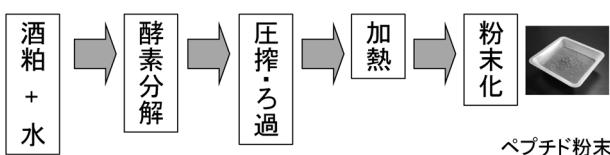


図1. 酒粕ペプチドの製造

他にも活性の寄与ペプチドが存在するものと予測した。そこで、酒粕ペプチドを分画・精製し、ACE阻害ペプチドを探索した結果、新たに5種類のペプチド（Phe-Trp, Arg-Trp, Ser-Trp, Gln-Trp, Ile-Gln-Pro）を同定し⁴⁾、そのうちIle-Gln-ProはACE阻害活性を有する新規なペプチドとして同定した⁵⁾。それぞれのペプチドの由来を調べた結果、酒粕に多く含まれるタンパク質（プロラミン、グロブリン）が分解され生成したものと推察した。各機能性ペプチドは酒粕を人工消化試験により生成され、ヒトが酒粕を摂取したときの血圧上昇抑制効果の寄与している物質と結論づけた。

3. 酒粕ペプチドの非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に対する効果

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は、慢性肝疾患の主要な原因の1つとして世界中で増加している。高脂肪食（HFD）摂食マウスを使用し、酒粕ペプチドのNAFLD抑制効果を調べた。その結果、肝臓の脂質蓄積、肝臓におけるペルオキシドーム増殖因子活性化受容体γ（PPAR γ ）、PPAR α 、CD36、およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ1のmRNAおよびタンパク質レベルの有意な減少を示した。HF抽出マウスのインスリン抵抗性および肝臓炎症は、酒粕ペプチド投与により改善した⁶⁾。加えて、HepG2細胞では、酒粕ペプチド添加では脂肪酸誘導細胞内脂質蓄積を抑制した⁷⁾。よって、酒粕ペプチドにはNAFLD発症のリスクを低下させることができた。

4. 抗酸化ペプチドおよび肝機能保護ペプチドの同定と定量

酒粕ペプチドの抗酸化活性を3種類の方法（リノール酸自動酸化抑制、SOD様、DPPH消去能）で測定した結果、2種類の活性測定（リノール酸自動酸化抑制、SOD様活性）では、ポジティブコントロールのグルタチオンとほぼ同等の活性を有していた（表1）。酒粕ペプチドに抗酸化活性が有することを確認し、寄与ペプチドの同定を行った。ペプチドの同定には、酒粕ペプチドのLC分画とLC-MS/MSによる分析および抗酸化活性とを組み合わせながら精製することで、寄与ペプチドを同定した。酒粕ペプチド中に含まれる各種ペプチドを定量し多数の抗酸化ペプチドが含まれていることを確認した。新規ペプチド

表1. 酒粕ペプチドの抗酸化活性

| サンプル | リノール酸自動酸化抑制 | | | SOD様* DPPH消去能* |
|--------|-------------|---------|------|----------------|
| | 5 ppm | 0.5 ppm | % | |
| 酒粕ペプチド | 64 | 44 | 48 | 52 |
| グルタチオン | 58 | 35 | <0.1 | 78 |
| フェルラ酸 | 26 | 9 | 43 | >99 |
| コントロール | 0 | 0 | 0 | 0 |

*1000 ppm サンプル添加

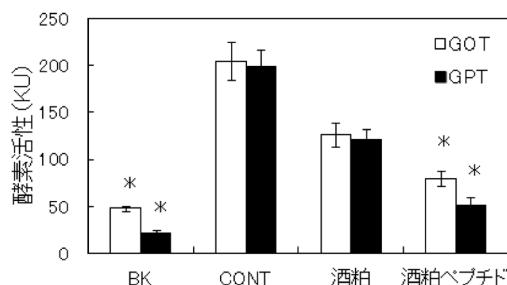


図2. 酒粕および酒粕ペプチド摂取6週間のGOT値, GPT値

Ile-Gln-Proは、ACE阻害活性および抗酸化活性を有する機能性ペプチドとして同定した⁵⁾。

ヒト肝臓細胞HepG2を用いて肝障害モデルを作製するためイソアミルアルコール添加による細胞死を誘導し、同定した各種ペプチドが細胞死を抑制するかどうかを検証した。その結果、酒粕ペプチドと同等、それ以上に肝細胞HepG2の死滅率を低減するペプチドを多数同定した⁴⁾。これらの肝細胞生存率の回復には、ペプチドの抗酸化活性が関与していると考えられる。

5. マウス試験による酒粕ペプチドの肝臓保護効果

酒粕ペプチドの肝臓保護効果をマウス試験により検証した。Balb/cマウス雄8周齢を1週間予備飼育し、餌に普通食、酒粕ペプチドを含む、酒粕を含む3種類を用いてガラクトサミンによる肝障害誘導した。肝機能評価については、血清分析しGOT値、GPT値を指標とした。その結果、摂取4週間、6週間では酒粕ペプチドを摂取した群では顕著にGOT、GPT値が低減した(図2)。よって、酒粕ペプチドにはガラクトサミン誘導した肝機能障害を保護し、酒粕そのものにも肝機能保護効果があることを初めて見出した⁷⁾。

おわりに

日本酒中に含まれる成分は700種類以上とも言われ、醸造微生物である麹菌と酵母の代謝により、多くの物質が醸造により生成されている結果であろう。醸造食品の機能性の最大の利点は、長い食経験に裏付けられた「安全性」であり、酒粕も長い食経験を有する醸造副産物である。酒粕にさらなる機能性を見出すため、ペプチドからの探索を行った。ペプチドだけでなく、酒粕中にはまだまだ、新たな機能の可能性を有するものと考えている。酒粕(醸造食品)は「安心」「安全」「健康」がそろった食品であり、長い歴史の間に上り上げられた醸造微生物

の賜物である。今後、発酵の利点を生かした技術開発により、豊かな食生活や健康に寄与していきたい。

(引用文献)

- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S., Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(10), 1767–1771 (1994)
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S., Antihypertensive effects of peptide in Sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(5), 812–816 (1994)
- 齊藤義幸, 中村圭子, 川戸章嗣, 今安聰, 清酒, および副産物中のアンギオテンシン変換酵素阻害物質. 日本農芸化学会誌, **66**(7), 1081–1087 (1992)
- 堤 浩子, 大浦 新, 秦 洋二, 安部泰久, 酒粕ペプチドに含まれる抗酸化ペプチドの同定. 日本農芸化学会2010年度大会講演要旨集, 134 (2010)
- 堤 浩子, 水本真紀子, 大浦 新, アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド. 特許第512893号.
- Kubo, H., Hoshi M., Matsumoto T., Irie M., Oura S., Tsutsumi H., Hata Y., Yamamoto Y., Saito K., Sake lees extract improves hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed mice. *Lipids Health Dis.*, **16**, 106. doi: 10.1186/s12944-017-0501-y. (2017)
- 堤 浩子, 水本真紀子, 大浦 新, 抗酸化剤及び肝機能障害抑制剤. 特許第5474369号.

謝 辞 本研究は、月桂冠株式会社 総合研究所において多くの方々に支えていただきながら行われたものです。月桂冠株式会社総合研究所 所長 秦洋二博士に深く感謝いたします。また、多大なるご助言とご指導を賜りました、入江元子氏、大浦新氏、福田克治氏、小高(水本)真紀子氏、村上直之氏に深くお礼を申し上げます。また、共に同じ部署にて支えていただきました石田博樹博士、松村憲吾博士、ならびに月桂冠株式会社の皆様に深謝します。非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)に対する効果に関する研究は、藤田保健衛生大学院保健研究科との共同研究にて行われたものです。齊藤邦明博士(京都大学名誉教授)、山本康子博士、久保紗子氏に心よりお礼を申し上げます。ここに記載できなかった多くの方々にも支えていただき、その支えなくしてはこの賞をいただくことはできませんでした。深く感謝申し上げます。