

食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討について の研究 (Ⅲ)

Functional components sourced from bovine, porcine and poultry :
Comparative study on bioactive peptides. III

六車三治男・久保田大樹・河原 聡
(宮崎大学農学部)

Michio Muguruma, Daiki Kubota and Satoshi Kawahara
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This research aimed to compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates. The year before last, we examined the antihypertensive effects by determining the IC_{50} value of the three mentioned species. Last year, we evaluated the antioxidative activities of hydrolysates of biceps femoris muscles from beef, pork and chicken.

In the current study, the muscles hydrolyzed with pepsin, trypsin and pancreatin, and then determined their antioxidative efficiency. The antioxidative activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. Meat hydrolysates showed the high antioxidant activity by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. However, there are differences in the other factors for giving the antioxidative activity including amino acid sequence of those hydrolysates. For instance, Cys shows strong antioxidant activity that is considered to be specific for electron transfer reaction. On the other hand, though Trp also has been showing a strong activity, as it indicates only for transferring atom of hydrogen during its reactions. Beef and pork peptides may show antioxidant activity in specific manner that are influenced by His and Trp. Antioxidant activity of chicken peptides are small and far from other meat peptides especially when compared to beef and pork. In ORAC evaluation, Trp pattern similar to Trp in chicken one, in which we hypothesize that Trp may be very important amino acid. The results showed that the meat hydrolysate was composed with moderate amount of hydrophobic amino acids which might contribute to the high antioxidant activity. The fraction with molecular weight lower than 1 kDa exhibited the high antioxidative activity.

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on its remarkable ACE inhibitory activity and antioxidative activity, we suggest that the functional peptides from meat hydrolysates may have potential applications as functional food, which could be used as sources of nutraceutical compounds.

1. 目的

畜産食品の消費量は約半世紀の間に急増したが、これは我が国が長寿国になった要因の一つとも考えられる。一方、日本人のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病の患者が増加しており、国民の健康への関心は極めて高くなっている。食肉は良質なタンパク質を豊富に含み、近年、筆者らも含めて血圧降下作用などの保健的機能性についての研究が進められている¹⁻⁸⁾。しかし、各種食肉の生理活性を詳細に比較検討した研究はあまり報告されていない。

そこで、初年度は我が国の死亡原因の2~3位を占める心疾患、脳血管疾患の原因と深くかかわっている高血圧症の予防に及ぼす各種食肉を消化酵素により分解して生じたペプチド混合物のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害による高血圧予防効果について比較検討した⁹⁾。その結果、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

さらに昨年度は、日本人の死因第一位になり、その増加が続いているがん発症危険因子の中でも、特に活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) と呼ばれる悪性の酸素ROSを除去する能力を発現する抗酸化活性に及ぼす各種食肉酵素分解ペプチドの効果をDPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) 法とORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法により比較検討した¹⁰⁾。

DPPH法にて調査した結果、各種食肉間ではタンパク質濃度1.0mg/mlでおよそ40 μ Mトロロックス相当量の抗酸化活性を示した。また、食肉酵素分解物の添加濃度依存的に抗酸化活性は増加した。畜種間の活性に有意差は認められなかった。既知の抗酸化物質のカルノシンは痕跡程度の活性

しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できないほど強力な抗酸化活性を示した。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠であると考えられた。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、食肉に含有される様々なペプチドによる相乗効果であると推測された。

一方、ORAC法にて測定した結果、各種食肉共に非常に高い抗酸化活性を有することが確認された。各種食肉間でそれらの値に有意差は認められなかったが、同濃度のカルノシンと近似した値が得られた。このように単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかったが、食肉を構成するアミノ酸に注目し、ORAC法による抗酸化活性の経時変化を見ると、牛肉および豚肉と鶏肉では抗酸化活性の性質が異なることが明らかになった。特に重要なアミノ酸は高い電子供与活性を示すCys、高い水素供与活性を示すTrpであることが示唆された。

そこで本年度の研究では、食肉のペプチドを構成するアミノ酸やペプチドの極性に着目しながらラジカル消去活性の発現に重要なペプチドの条件を調査した。すなわちDPPH法およびORAC法を用い、アミノ酸を抗酸化活性機序に基づいて分類した。またその分類結果を基に、食肉タンパク質酵素分解物のようなペプチド混合物においても抗酸化活性機序の推定が可能であるのか調査した。さらに食肉を構成するアミノ酸を分析し、分析結果通りにアミノ酸を混合して食肉様アミノ酸混合物を調製した。これら食肉様アミノ酸混合物と食肉ペプチド混合物の抗酸化活性を比較することで、アミノ酸組成から抗酸化活性機序の推定が可能であるのか調査し、アミノ酸組成が抗酸化活性機序の決定にどれだけ影響を与えているのか検討した。これらアミノ酸組成だけでなくペプチドの極性もラジカル消去反応に関係があると考えられ

ることから、本年度の研究では疎水性の差を利用して低疎水性ペプチド混合物および高疎水性ペプチド混合物を調製し、ペプチドの極性と抗酸化活性との関係についても検討を加えた。

このように本研究の目的は、どのようなアミノ酸を含有したペプチドが、あるいはどのような立体構造のペプチドがROSの消去に有効なのかを明らかにすることにより、食肉タンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定を行い、ペプチドが抗酸化活性を発現するために必要な条件を解明し、食肉の価値の向上に貢献していくことである。

2. 方 法

2.1 実験材料

市販の宮崎県産の各種食肉（牛肉・豚肉・鶏肉いずれもモモ肉）を酵素分解用実験材料として用いた。

2.2 食肉タンパク質酵素分解物 (MPs: Meat Peptides) の調製

食肉由来タンパク質分解ペプチドの調製は以下のとおりである。

各種食肉のミンチ肉50 gに蒸留水100mlを添加してフードプロセッサ（Panasonic MK-K48）を用いて30秒間、2回ホモジナイズして均質化した。70℃で30分間インキュベート後、このホモジェネートをHClでpH1.8に調整し、胃粘膜由来ペプシン（1：10000）（和光純薬工業株式会社）を0.01 g添加して攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、試料の温度を40℃まで低下させた。さらにトリプシン（和光純薬工業株式会社）およびパンクレアチン（同会社）をそれぞれ0.01 g添加し、再び攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を食肉タンパク質酵素分解物 (MPs) とした。

2.3 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質の定量はBiuret法¹¹⁾により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液を島津UV-VIS Spectrophotometer 2450型分光光度計（吸光度：540nm）にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法¹²⁾を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

2.4 アミノ酸分析

(1) 標準アミノ酸溶液の調製

標準アミノ酸混合液AN II型（和光純薬工業株式会社）、標準アミノ酸混合液B型（和光純薬工業株式会社）、1.25mMアスパラギン溶液、25mMグルタミン溶液、25mMトリプトファン溶液それぞれ1 mlを混合し、0.2Mクエン酸緩衝液（pH2.2）で全量を25mlとした。

クエン酸緩衝液は0.2Mクエン酸一水和物（和光純薬工業株式会社）200mlに0.2Mクエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業株式会社）3 mlを加え、pH2.2とした。

(2) 遊離アミノ酸分析

各種MPs溶液に3%スルホサリチル酸（和光純薬工業株式会社）を加え、冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を沈殿させた。その後、3000rpmで15分間遠心分離を行った。上清を0.45 μmセルロースアセテートメンブレンフィルタ（アドバンティック東洋）でろ過し分析試料とした。これを全自動アミノ酸分析機（JIC-500, 日本電子株式会社）で分析した。

(3) 加水分解アミノ酸分析 (MPsの加水分解によって得られるアミノ酸の分析)

R.J. Simpsonらの方法¹³⁾に準じ、4 Mメタンス

ルホン酸加水分解を行った。80%エタノールで抽出されたMPsを遠心濃縮機 (CVE-200, 東京理科機器株式会社) で粉末化した。この粉末試料10mgを試験管に秤量し, 4 Mメタンスルホン酸 (和光純薬工業株式会社) 1 mlを加えた。またアスピレーター (WP-15, ヤマト科学株式会社) および超音波脱気装置 (MUS-10, 東京理科機器株式会社) を用い, 試験管内を真空状態にし, 封管した。ヒートブロック (DTU-1 C, タイテック株式会社) を用い, 110°Cで24時間加水分解を行い, 3.5M NaOH 1 mlを添加, 中和し, 0.2Mクエン酸緩衝液 (pH 2.2) 8 mlを加え, サンプルとした。0.45 μ mセルロースアセテートメンブレンフィルターにてろ過し, 分析試料とした。これを全自動アミノ酸分析機で分析した。

(4) トリプトファン (Trp) の定量

M.K. Gaitondeらの方法¹⁴⁾に従い, 各種食肉のTrp含有量を測定した。試験管にMPs (ペプチド濃度20mg/ml) (酵素処理後, 0.45 μ mセルロースアセテートメンブレンフィルターでろ過したもの) 0.5ml, 試薬A (ニンヒドリン250mgに (酢酸:0.6Mリン酸=3:2) 溶液10mlを加えたもの) または試薬B (ニンヒドリン250mgに (ギ酸:塩酸=3:2) 溶液10mlを加えたもの) 0.5mlを加え, 10分間煮沸し, さらに3 mlのエタノールを加え, 冷却した。分光光度計にて試薬Aを含む溶液は385nm, 試薬Bを含む溶液は390nmで吸光度を測定した。

なおTrp含有量 (μ M) は次の式で算出した。

$$\text{Trp含有量} (\mu\text{M}) = (\text{Eb} - 1.6\text{Ea}) / 3.95 + \text{Ea}$$

Ea: 試薬Aを用いて測定した吸光度の値

Eb: 試薬Bを用いて測定した吸光度の値

2.5 食肉様アミノ酸混合物 (再構成MPs) の調製

MPsの遊離アミノ酸分析および加水分解アミノ酸分析により算出されたデータを基に食肉様ア

ミノ酸混合物 (再構成MPs) を調製した。

遊離アミノ酸分析データを基にした場合, 20種類のL-アミノ酸およびカルノシン (Car), アンセリン (Ans) の総量を100%として混合し, 溶媒には80%エタノールを用いた。また加水分解アミノ酸分析データを基にした場合, 20種類のL-アミノ酸量を100%として混合し, 溶媒には80%エタノールを用いた。

2.6 DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は, DPPH分光測定法に準じて行った¹⁵⁾。すなわち, 400 μ M DPPH, MES (2-morpholino-ethanesulphonic acid) buffer, 20%エタノールを同量ずつ加え, 混液を作製した。混液を0.9ml分注し, 80%エタノールを240 μ lとサンプルを60 μ l加え, 20分間反応させた。その後, サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また, サンプルの代わりに, 0.2mM Trolox (Sigma社) を使って標準として測定し, 検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し, NaOHでpH 6に調製したものを使用した。

2.7 ORAC法による抗酸化活性の測定

(独) 農研機構九州沖縄農業研究センターの報告をもとに改良して測定した^{16~19)}。すなわち96wellマイクロプレートに81.6nMフルオレセインを200 μ l, サンプル20 μ lを添加し, マイクロプレートリーダー (TECAN GENios Multifunction Fluorescence Virginia, USA) にて37°Cで励起波長485nm, 蛍光波長520nmにおける蛍光強度を測定した。10分後200mM AAPH75 μ lを添加し, 同条件にて2分間隔で45回測定した。またORAC値はNet AUC (Area Under Curve) = AUC sample - AUC blankを用いて算出した。検量線作成にはTrolox (125, 250, 500, 1000 μ M) を使用した。

2.8 ペプチド混合物の逆相カラムによる分画

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により 5 C₁₈-AR-II (4.6×250mm) (ナカライテクス株式会社) の逆相カラムを用いて、豚肉MPsを極性の違いに基づいて分画した。溶離液には0.1% TFA含有アセトニトリル溶液を用いた。分析中は溶離液を脱気装置 (DGU-14A, 島津社) に通し、LC-10AD送液ポンプを用い、流速0.5ml/min, 注入量100 μlで行った。ペプチドの検出には、コンピュータで制御された検出器 (SPD-10AVP, 島津社) を用い、検出波長は215nmで行った。

2.9 各フラクションのゲルろ過高速液体クロマトグラフィーによる分子量分布の分析

逆相カラムで分画した各フラクションの分子量分布をTSKgelG2000SWXL (7.8 mm I.D. x 30 cm) (東ソー株式会社) のゲルろ過カラムを用いて分画した。溶離液には0.1% TFA含有45%アセトニトリル溶液を用い、流速0.8ml/min, 注入量20 μlで行った。

3. 結果と考察

まず、MPsに含まれるアミノ酸が抗酸化活性機序の決定にどれだけ影響を与えているのか調査した。すなわちMPsのアミノ酸分析を行い、分析結果に基づいてアミノ酸を混合し、食肉様アミノ酸混合物 (再構成MPs) を調製した。さらにこれら再構成MPsの抗酸化活性を評価した。

前報において牛および豚肉MPsは主にHis, 鶏肉MPsは主にTrp由来の抗酸化活性を発現する可能性を認めた¹⁰⁾。そこで抗酸化活性の測定に用いたMPsの遊離アミノ酸およびMPsを加水分解して生じるアミノ酸 (mg/100 g) を分析した結果、食肉間で含有アミノ酸の違いが確認された。遊離アミノ酸分析において特に大きな違いはHisおよびHis含有ペプチドであるカルノシン, アンセリン含有量であった。His, カルノシン, アンセリンの合計量は牛肉, 豚肉, 鶏肉MPsの順にそれぞれ

Table 1 The amounts of antioxidant amino acids in hydrolysates of beef, pork and chicken.

Antioxidant amino acids	Unit (mg/100g)		
	Beef	Pork	Chicken
Cys	0.72	0.29	0.36
Met	7.43	4.63	5.33
Tyr	9.13	5.40	5.82
His	17.16	12.86	6.92
Trp	1.84	1.30	2.04

260.31, 277.42, 172.34mg/100 gであり、これまでの報告²⁰⁾ のとおり牛および豚肉にはカルノシンが豊富に含まれ、鶏肉にはアンセリンが豊富に含まれていた。さらにTrpはわずかに鶏肉MPsが牛および豚肉MPsよりも多く含まれていた。また加水分解によって生じたアミノ酸を分析した結果でも鶏肉MPsは他の食肉と比較してHis含量が低く、Trpを多く含む傾向があった (Table 1)。M.K. Gaitondeらの方法で食肉中のTrp含量を調査した際にも有意な差は見られなかったが、これまでの報告と一致して鶏肉は他の食肉と比較してTrpを多く含有している傾向があることを確認した²¹⁾。

前報において、アミノ酸の抗酸化持続能をORAC法にて解析すると、抗酸化力には電子供与 (ET) 型と水素供与 (HAT) 型に大きく分類されることを示した¹⁰⁾。ET型とはここではCys, グルタチオン, トロロックスのようにDPPHラジカル消去活性が高く、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に活性が低下するパターンを持つ物質のことを言う。HAT型とはHis, Met, Tyr, Trp, カルノシンなどを指し、経時的にフルオレセインが分解されていくパターンを持つ物質のことである。

昨年度の研究で報告したように、TrpはHAT活性に最も重要なアミノ酸であり、微量でも大きな活性を示すことが示唆された¹⁰⁾。MPsの両アミ

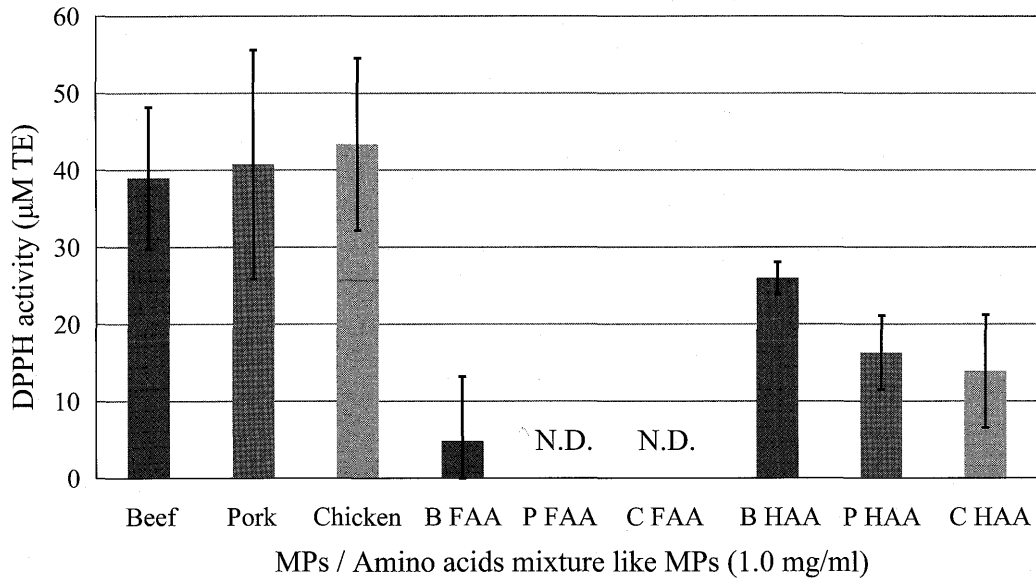


Fig.1 DPPH radical scavenging activity of beef, pork, chicken and amino acids mixtures reconstituted according to the analyzed data. B:Beef, P: Pork, C:Chicken, FAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on free amino acids, HAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on total amino acids. TE: Trolox Equivalent.

ノ酸分析結果ともにHis含量が少なく、Trp含量が多いことが示されたことから、鶏肉MPsはTrpの影響を大きく受けた抗酸化活性を示した可能性が考えられた。

このようにMPsのようなペプチド混合物の抗酸化活性機序の決定には各種ペプチドのアミノ酸組成が重要である可能性がある。そこで各種MPsの遊離アミノ酸および加水分解アミノ酸を分析し、さらにその結果に基づいて各種アミノ酸を混合し、MPsを再構成した。次に、これら各種再構成MPsがET活性およびHAT活性いずれの抗酸化活性機序を示すのか調査した。

DPPH法を用いた場合、再構成MPs遊離アミノ酸混合物(以下“FAA”と略す(BFAA, PFAA, CFAAはそれぞれ牛・豚・鶏肉様アミノ酸混合物))はBFAAが痕跡程度の活性を示した以外、全て活性は検出されなかった (Fig. 1)。また再構成MPs加水分解アミノ酸混合物(以下“HAA”と略す(BHAA, PHAA, CHAAはそれぞれ牛・

豚・鶏肉様アミノ酸混合物))は10~25 μM TEの活性を示したが、これはもとのMPsよりも低い活性であった。“FAA”がET活性を示さなかった理由としては“FAA”は“HAA”と比較して強力なET活性を示すCysの含量が少なかったこと(“FAA”にはおよそ0.05%、“HAA”にはおよそ0.2%のCysが含まれていた)が考えられた。またMPsの方が“HAA”よりも高いET活性を発現した理由はペプチド特有の立体構造に起因する活性、またペプチド同士による相乗効果が働いた可能性が考えられた。

さらに“HAA”のET活性がCysだけに由来するものだったのか調査するためにCys溶液、すなわちBHAA, PHAA, CHAAの平均Cys濃度(0.0215mg/ml)を調製し、ET活性を評価した。データには示していないが、この溶液は“HAA”よりも高いET活性(およそ80 μM TE)を示した。従って“HAA”のET活性がCys溶液より低い値を示した理由はアミノ酸の混合操作ミスや

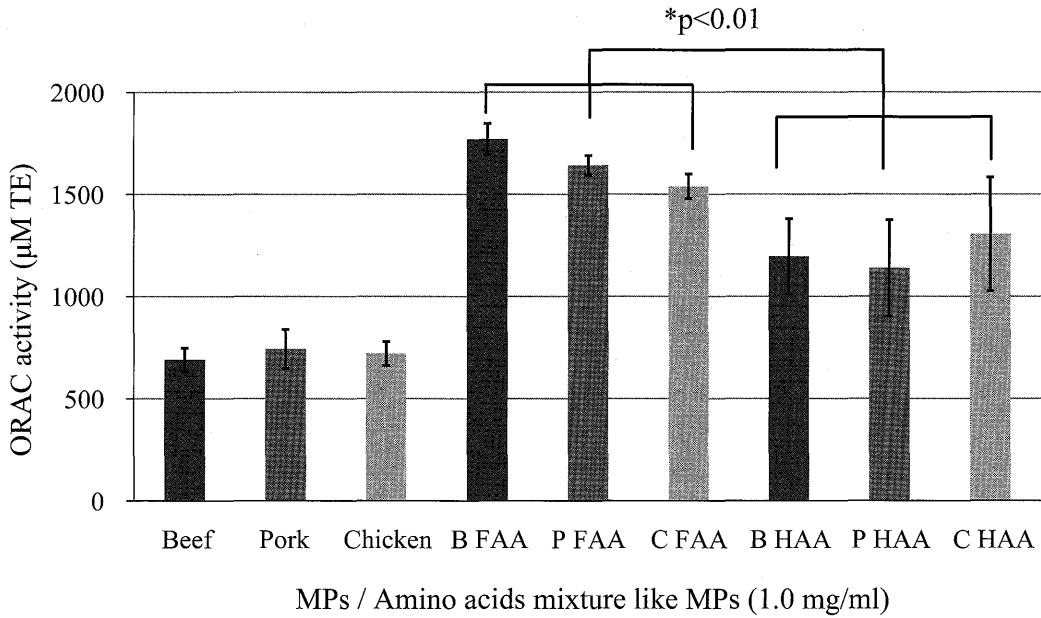


Fig. 2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of beef, pork, chicken and amino acids mixtures reconstituted according to the analyzed data. B:Beef; P: Pork; C:Chicken, FAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on free amino acids, HAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on total amino acids. TE: Trolox Equivalent.

種々のアミノ酸間での活性相殺効果などに由来する可能性も考えられた。つまり“HAA”が示したET活性の大部分はCys由来であると示唆された。

またORAC法を用いた場合 (Fig. 2), “FAA”および“HAA”はMPsよりも有意に高い活性を示し、活性値の高い順に“FAA”, “HAA”, MPsとなった。さらに抗酸化活性の経時的変化を調査すると“FAA”および“HAA”は主にHis系統の抗酸化活性を示した可能性が高いと推測された。これは含有抗酸化アミノ酸のうち、Hisが最も多く含まれていたことに起因すると考えられる。再構成MPsはもとのMPsと類似したHis由来の活性、つまり高いHAT活性を示した。しかしながら単にアミノ酸を混合しただけでは本来のMPsと同じ活性を示すことはなかった。また特に“HAA”は“FAA”の結果と比較すると、よりMPsに近い抗酸化活性を示した。

さらにMPsと再構成MPsの抗酸化活性を比較するとDPPHラジカルにはペプチドの状態、AAPH由来ペルオキシラジカルの場合にはアミノ酸の状態がラジカルの消去に有利な傾向にあることが示唆された。DPPHラジカルには1種類、AAPH由来のペルオキシラジカルには5種類のアミノ酸がラジカル消去に関与するが、この数の違いが再構成MPsの各種実験系における抗酸化活性の差である可能性が高いと考えられた。

以上の結果からペプチド混合物のアミノ酸組成は抗酸化活性機序の決定に大きな影響を与えていることが確認できた。また加水分解アミノ酸分析はタンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定に利用できる分析法であると考えられた。しかしながらアミノ酸組成だけがペプチドの抗酸化活性機序を決定する要因ではない。もしアミノ酸組成だけが抗酸化活性機序の決定に関与するのなら、Cysを多く含まない限りET活性を発現しないと

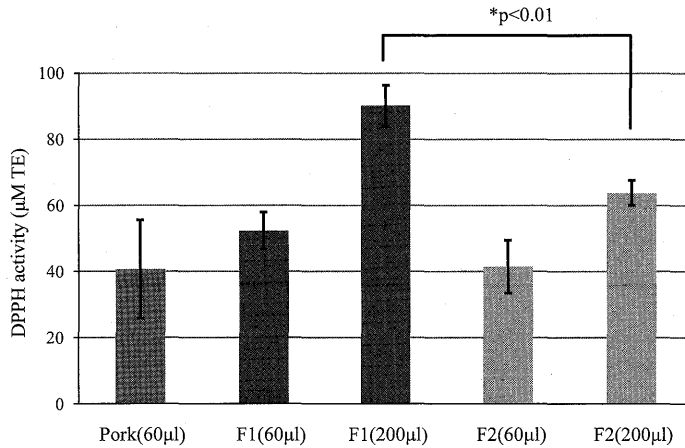


Fig. 3 DPPH radical scavenging activity of pork, fraction 1 and fraction 2. F1: fraction 1; F2: fraction 2, TE: Trolox Equivalent.

考えられるからである。

現在、DPPH法を用いて様々なET活性を有する抗酸化ペプチドが単離・精製されている。例えばカゼイン由来のLeu-Val-Tyr-Pro, Pro-Ile-His, Pro-Val-Leu, Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu²²⁾, マグロ煮汁由来のPro-Ser-His-Asp-Ala-His-Pro-Glu, Pro-Lys-Ala-Val-His-Glu, Pro-Ala-Gly-Tyr, Val-Asp-Tyr-Pro²³⁾, などが報告されている。このようにET活性発現に重要なアミノ酸であると考えられるCys含有のペプチドはあまり報告されていない。これら抗酸化ペプチドのアミノ酸配列の特徴はN末端にVal, Leu, Proなどの疎水性アミノ酸を有し, C末端にPro, Gluを有しているものが多い²⁴⁾。つまりペプチドがET活性を示すさらなる要因の一つとしてペプチドの極性が関与している可能性がある。特にDPPHラジカルは疎水性のラジカルであり, 極性はペプチドとDPPHラジカルとの親和性に寄与しているかもしれない²⁵⁾。

一方ORAC法で精製された抗酸化ペプチドはあまり報告されていないが, N末端がTrp-Tyrで始まるペプチドが数種発見されており, 本研究で示したとおりORAC法で高い活性を示すTrpやTyrを含むペプチドが高いHAT活性を示す可能性が

高い。例えば牛乳ホエータンパク質由来のTrp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile, Trp-Tyr-Ser, Trp-Tyr-Ser-Leu, Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala^{26, 27)} などが報告されている。

次に, ペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な要素であると考えられるペプチドの極性とラジカル消去反応との関係について調査した。極性はペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な要素であることが示唆された。そこでペプチドとラジカルとの相互作用に関与する極性に着目し, ペプチドの極性と抗酸化活性との関係について調査した。抗酸化物質とラジカルとの反応には極性が関与している可能性が高い。しかしながらペプチドの極性と抗酸化活性との関係を研究した例はほとんどない。そこで, HPLCを用いて疎水性の低いフラクション1および疎水性の高いフラクション2のペプチド混合物を調製して各フラクションの抗酸化活性を測定した。

DPPH法を用いた場合 (Fig. 3), サンプルを60 µl添加した時は両フラクション間に活性の有意差は見られなかったが, 200 µl添加するとフラクション1は2と比較して有意に高い活性を示した。また豚肉MPsに占めるフラクション1および

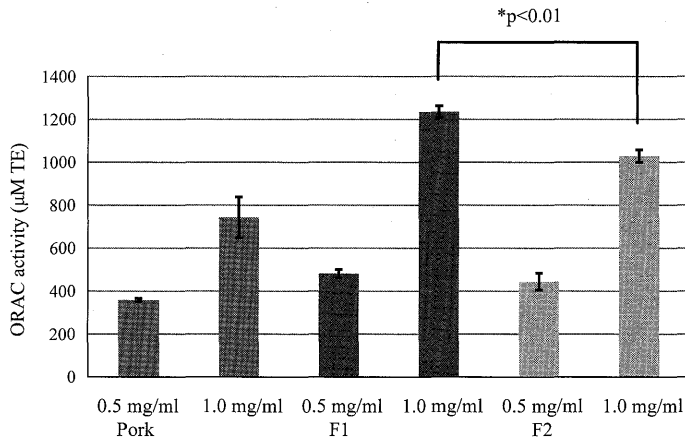


Fig. 4 ORAC activity of pork, fraction 1 and fraction 2. F1: fraction 1; F2: fraction 2, TE: Trolox Equivalent.

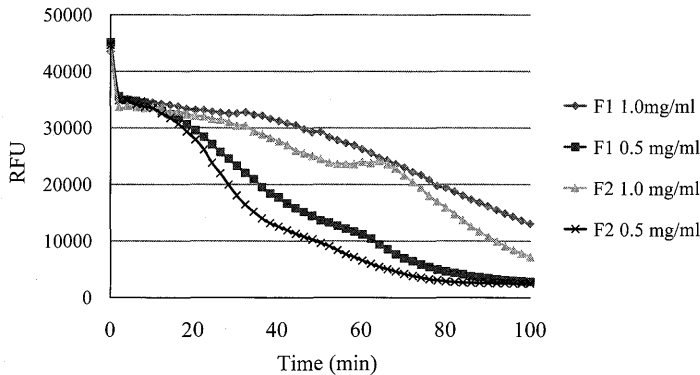


Fig. 5 Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of Fraction 1 and fraction 2. RFU: relative fluorescence unit; AAPH : 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. F1: fraction 1; F2: fraction 2.

2の構成比はそれぞれ21.2%および78.8%でありMPsは比較的疎水性の高いペプチドを多く含んでいたことが判明した。DPPH法にて、MPsとフラクション2(添加量60µl)の活性を比較するとほぼ等しいことから、MPsは主にフラクション2由来の抗酸化活性を発現している可能性が示唆された。

一方、ORAC法を用いて抗酸化活性を測定したところ(Fig. 4)、0.5mg/mlでの比較では各フラクション間で大きな差は見られなかったが、1.0mg/ml

mlの比較ではDPPH法を用いた時と同様にフラクション1の方がより高い活性を示した。さらに抗酸化活性の経時の変化を調査すると(Fig. 5)、若干だがフラクション1(1.0mg/ml)はET型に近いパターンを発現している可能性が示唆された。これはフラクション1が比較的高いET活性を示したことが原因だと推測された。またフラクション2(1.0mg/ml)は牛および豚肉MPs同様にHis由来のHAT型抗酸化活性機序を有している可能性が示唆された。

各フラクションに存在するペプチドの分子サイズも抗酸化活性に影響を与えた可能性がある。そこで各フラクションの分子量分布を分析すると、フラクション1 (1,000Da~100Da) はフラクション2 (分子量7,500Da~700Da) よりも分子サイズの小さなペプチドが多く存在した。従って極性の差だけでなく、ペプチドの分子サイズもラジカルとの相互作用に影響を及ぼした可能性がある。最近、エビ製品の加工工程の副産物として生成される加水分解物のアミノ酸組成と分子量分布について検討し、分子量1,000以下の成分で40.4%の疎水性アミノ酸を含む画分に高い抗酸化活性を認め、100℃以上の加熱でも安定であると報告されている²⁸⁾。本研究で得られた結果も分子的には一致していた。

様々な溶媒を用いて焼き栗から抽出してきた成分の抗酸化活性 (DPPH法) を測定するとメタノール抽出液の活性が最も高く、次いで水、そして最も低い活性を示したのがアセトンなどの疎水性の高い溶媒であるという報告²⁹⁾もあり、さらに他の食品においても低疎水性溶媒で抽出した画分の抗酸化活性が高い傾向にあるという研究結果が多数報告されている。以上の結果からペプチドと各種ラジカルとの反応には疎水性に起因する親和性が関与し、疎水性の比較的低いペプチドがラジカルの消去に有効である可能性が高いと考えられた。

一連の本研究で得られた成果から、牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシン、トリプシンやパンクレアチンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。また、抗酸化活性も、有意差は認められないものの各食肉加水分解物は高い抗酸化活性を示した。また、我々は豚肉の消化酵素分解物を自然発症高血圧ラットおよび自然発症糖尿病ラットを用いた持続投与実験を行った

結果、連続的に酵素処理肉を投与した自然発症高血圧ラットおよび自然発症糖尿病ラットにおいて血圧降下作用を示すと共に、血糖値を低下する傾向を認めた^{30, 31)}。

これらの結果を総合的に判断すると、生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できるのではないかと考えられ、食肉全体の価値を高めることにつながる結果であり、食肉消費の拡大に貢献していくことが期待される。

4. 要 約

本研究はアミノ酸および食肉タンパク質酵素分解物 (MPs) に関してMPsの抗酸化活性機序を推定するとともに、ペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な条件を調査した。

DPPH法およびORAC法のデータからアミノ酸を抗酸化活性機序に基づいて分類すると、ET型はCys, HAT型はHis, Met, Tyr, Trpとなった。特にCysおよびTrpは微量でも高い抗酸化活性を示すことから、ペプチドの抗酸化活性発現に重要なアミノ酸だと考えられた。次に食肉タンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定を試みた結果、MPsの抗酸化活性機序は主にHAT型であり、牛および豚肉MPsはカルノシンやアンセリンなどHis由来の活性、また鶏肉MPsはTrp由来の抗酸化活性を発現している可能性が示唆された。

そこで含有アミノ酸と抗酸化活性機序との関係を詳細に調査するために、MPsを再構成した。加水分解アミノ酸分析の結果を反映した再構成MPsはよりもとのMPsに近い活性を示し、His由来の抗酸化活性を発現した可能性が示唆された。DPPH法を用いた場合、再構成MPsはもとのMPsより低い活性を示し、ORAC法を用いた場合、再構成MPsはもとのMPsより高い活性を示した。各種ラジカルを消去できる抗酸化アミノ酸の種類が異なることを考慮すると、特にDPPHラジカルの

消去にはペプチド特有の立体構造も重要な要素になると考えられた。

さらにペプチドとラジカルとの相互作用に関わる要素, 特に極性に着目し, 豚肉MPs由来の低疎水性ペプチド混合物および高疎水性ペプチド混合物の抗酸化活性を測定した。各種ラジカルの消去には低疎水性のペプチドが有効である可能性が考えられ, ペプチドと各種ラジカルとの反応には疎水性度に起因する親和性が関与することが示唆された。

アミノ酸組成は抗酸化ペプチドに重要な要素である。しかしアミノ酸配列もまた抗酸化活性発現に重要な要素である。アミノ酸残基が適正に配列されて初めて抗酸化活性が増強される。ペプチドの抗酸化活性の発現について, 様々な機構が提案されているが未知の部分が多い。従って今後はアミノ酸配列の抗酸化活性への影響および, 抗酸化ペプチドの作用機構についてより詳細に研究していく必要がある。

本研究で得られた成果から, 各種食肉を加熱後, 消化酵素のペプシン, トリプシンやパンクレアチンで処理すると鶏肉, 豚肉, 牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。また, 抗酸化活性も, 有意差は認められないものの各食肉加水分解物は高い抗酸化活性を示した。これらの結果から, いずれの食肉を摂取しても生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できることが示唆された。

文 献

- 1) 在原圭三: 最新畜産物利用学, 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田幹編集, 朝倉書店, 122~124, 2007.
- 2) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, **16**, 417~424, 2003.
- 3) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, **74**, 53~58, 2003.
- 4) Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 771~775, 2004.
- 5) Katayama, K., Jamhari, M., Mori, T., Kawahara, S., Miasaka, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Maruyama, M., Muguruma, M.: *J. Food Sci.*, **72**, S702~S706, 2007.
- 6) Katayama, K., Anggraeni, H.E., Mori, T., Ahmmed, A.M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 355~360, 2008.
- 7) Muguruma, M., Ahmmed, A.M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.: *Food Chem.*, **114**, 516~522, 2009.
- 8) Ahmmed, A. M., Muguruma, M.: *Meat Sci.*, **86**, 110~118, 2010.
- 9) 久保田大樹, アブドラティフアーメド, 河原聡, 六車三治男: 平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, **28**, 1~9, 2010.
- 10) 久保田大樹, 河原聡, 六車三治男: 平成22年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, **29**, 29~39, 2010.
- 11) 奥村宣明: タンパク質実験ノート抽出と分離精製, 岡田雅人・宮崎香編集, 羊土社, 27~31, 1996.
- 12) Murphy J.B., Kies, M.W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 13) Simpson R.J., Neuberger M.R., Liu, T.Y.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936~1940, 1976.
- 14) Gaitonde, M.K., Dovey, T.: *Biochem. J.*, **117**, 907~911, 1970.
- 15) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一: 食品機能研究法, 株式会社光琳, 218~220, 2000.
- 16) 沖智之, 竹林純, 山崎光司: 食品機能マニュアル集第Ⅱ集, (社)日本食品科学工学会, 79~86, 2008.
- 17) Huang, D., Ou, B., Hmpsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437~4444, 2002.
- 18) Garcia-Macias, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., Wagstaffe, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10168~10172, 2007.
- 19) Bao, L., Yao, X-S., Tsi, D., Yau, C-C., Chia, C-S., Nagai, H., Kurihara, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 420~425, 2008.
- 20) 近藤君夫, 戸井田仁一, 蟻川幸彦, 小原忠彦: 長野県産の食肉の遊離アミノ酸, 長野県工業技術総合センター食品技術部門研究報告, **3**, 36~44, 2010.
- 21) 五訂増補日本食品標準成分表, 文部科学省報告書, 2005.
- 22) 大前允人: *Lactococcus lactis* と *Streptococcus thermophilus* で製造した新規発酵乳の機能特性に関する研究, **74**, 2008.

- 23) Jao, C.L., Ko, W.C. : *Fish. Sci.*, **68**, 430, 2002.
- 24) Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K. : *J. Nutri. Biochem.*, **16**, 562~569, 2005.
- 25) Serpen, A., Gokmen, V., Fogliano, V. : *Meat Sci.*, **90**, 60~65, 2012.
- 26) Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L. : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 588 ~ 593, 2005.
- 27) Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolome, B. : *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3392~3397, 2007.
- 28) Zhao, J., Huang, G.R., Zhang, M.N., Cjen, W.W. Jiang, J.X. : *Am. J. Food Tech.*, **6**, 904~913, 2011.
- 29) 沖智之, 佐藤麻紀, 白土英樹, 工藤康文, 須田郁夫 : 焼き栗の殻に含まれる抗酸化成分, 九州農業研究発表会専門部会発表要旨集, **72**, 45, 2009.
- 30) 六車三治男, 難波靖, 丸山真杉, 中村豊郎 : 平成19年度食肉に関する成分等の調査研究事業委託研究報告書, (財)日本食肉消費総合センター, 15~35, 2008.
- 31) 六車三治男, 難波靖, 丸山真杉, 中村豊郎 : 平成20年度食肉に関する成分等の調査研究事業委託研究報告書, (財)日本食肉消費総合センター, 35~52, 2009.