

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	中出浩二
題 目	畜産副生物の機能性に関する研究 (Studies on biologically active components in animal by-products)
<p>本研究では、畜産副生物の有効利用を目的に、それらの有する機能性について研究を行った。</p> <p>まず、新規の抗高血圧作用ペプチドを検索する目的で、鶏骨から抽出したエキスをペプシン、トリプシン、α-キモトリプシンにより加水分解したところ、ペプシン分解物に高いACE阻害活性を認めた。そこで、本活性ペプチドを同定するため、各種クロマトグラフィーによる分画を行った。ペプチドシーケンサーによる解析の結果、このペプチドは鶏骨免疫グロブリン重鎖の27位から30位にあたるアミノ酸配列「YYRA (Tyr-Tyr-Arg-Ala)」であることが明らかになった。本ペプチドのACE阻害活性(IC₅₀)は33.9 μg/mlであった。本配列にもとづく合成ペプチドを作成し、SHRラットに単回経口投与を行い、血圧降下作用を調べた。その結果、ペプチドを投与した試験区ではネガティブコントロールと比較して投与後3時間で血圧が有意に減少し、その効果は投与後6時間まで持続することが観察された。また、この効果は発酵乳由来の既知のACE阻害ペプチド「IPP (Ile-Pro-Pro)」とほぼ同等であった。以上の結果から本ペプチドは鶏骨免疫グロブリン重鎖由来の抗高血圧作用を有する新規なペプチドであることが判明した。</p> <p>次に、生理活性機能として豚肝臓加水分解物に存在が期待されるACE阻害活性、および多くの疾病の発症に関与している活性酸素の消去能(抗酸化活性)についてDPPHラジカル消去活性と安息香酸ヒドロキシル化法を用いたラジカル消去活性を測定した。その結果、豚肝臓加水分解物のACE阻害活性は既知のACE阻害物質であるカルノシンと比較して高い活性を有していることが明らかになった。また抗酸化活性についても既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンと比較して高い活性を有していることも明らかになった。</p> <p>さらに、牛心臓タンパク質加水分解物(HPH)のコレステロール(CHOL)低下作用について検討した。その結果、CHOLミセル溶解性はカゼインよりもHPHで有意に低下した。Caco-2細胞のCHOL吸収抑制はカゼインミセルよりもHPHミセルで有意に高かった。血清CHOLはカゼインよりもHPHで有意に低かった。放射性CHOLで測定したCHOL吸収はカゼインと比べてHPHで有意に減少し、HPHのCHOL低下作用は空腸のCHOL吸収阻害によるものであることが明らかになった。HPH由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物(HPHU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物)は、ラットにおいてHPHよりも強力なCHOL低下作用を示すことが明らかになった。</p> <p>以上の結果から、畜産副生物には多くの生理活性機能を有する成分が存在することが明らかになり、畜産副生物の利用に有効な知見を与えた。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Koji Nakade

題 目 Studies on biologically active components in animal by-products
(畜産副生物の機能性に関する研究)

These studies aimed to investigate the effective utilizations of active compounds and peptides exist in animal by-products *in vitro* and *in vivo*.

Fractionation by the chromatography variously was carried out in order to search the new antihypertensive peptide. The chicken bone extract was hydrolyzed by pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, pepsin degradation product showed the highest ACE inhibitory activity. The identified active peptide was defined as angiotensin I-converting enzyme inhibitor, following oral administration to spontaneously hypertensive rats (SHRs), the peptide showed a considerable antihypertensive activity. The results of this study suggest that peptide derived from extract of chicken bone, administered orally, have the ability to reduce the blood pressure of SHRs significantly over a short period of time (3h). Moreover, the blood pressure then remains low for 3 h. This peptide may therefore have great value as short-term remedy for chronic diseases such as blood pressure. The amino acid sequence of the peptide was YYRA (Tyr-Tyr-Arg-Ala), which was the origin of the Ig heavy chain V region (27-30 position). I suggest that the antihypertensive peptide derived from chicken bone extract may have potential applications as functional food, which could be utilized as nutraceutical compounds.

This part of the research, aimed to search for bioactive functions in swine liver hydrolysates as expected to have an ACE inhibitory activity and antioxidative activity. By the use of DPPH radical scavengers and radical scavengers of benzoic acid hydroxylation methods, antioxidative activity in swine liver hydrolysates was measured. As a result, ACE inhibitory activity of the swine liver hydrolysate had higher activity when compared to the carnosine, which was known as ACE inhibitor. The swine liver hydrolysate had higher antioxidative activity when compared to the reduced state of glutathione, which was known as antioxidant.

This study was conducted to clarify the mechanisms of the hypocholesterolemic action of the cattle heart protein hydrolysate (HPH). We investigated the effects of casein or HPH on the solubility of cholesterol *in vitro* and cholesterol absorption in Caco-2 cells. The micellar solubility of cholesterol *in vitro* was significantly lower in the presence of HPH than in the presence of casein. The suppression of cholesterol uptake into Caco-2 cells was significantly higher in the cholesterol micelles containing HPH than in the cholesterol micelles containing casein. Serum cholesterol concentrations and atherogenic index were significantly lower in the rats fed HPH than in those fed casein. The fecal excretion of total steroids was significantly higher in the rats fed HPH than in those fed casein. The cholesterol absorption measured by [3 H]-cholesterol was significantly decreased by HPH *in vivo*. Thus, the hypocholesterolemic action of HPH involves the inhibition of jejunal cholesterol absorption. The cattle heart protein hydrolysate ultra-filtrate (HPHU, MW < ca. 1,000 Da peptides fraction) derived from HPH imparts a stronger hypocholesterolemic activity than HPH in rats.

From the above results, components with many bioactive functions exist in animal by-products were detected, and the functional utilizations of these components were also clarified.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	中出 浩二
審査委員	主査 宮 崎 大学 教授 六車 三治男
	副査 宮 崎 大学 教授 太田 一良
	副査 鹿児島 大学 教授 青木 孝良
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 佐 賀 大学 教授 柳田 晃良
審査協力者	
題 目	畜産副生物の機能性に関する研究 (Studies on biologically active components in animal by-products)
<p>本研究では、畜産副生物の有効利用を目的に、それらの有する機能性について研究を行った。</p> <p>まず、新規の抗高血圧作用ペプチドを検索する目的で、鶏骨から抽出したエキスをペプシン、トリプシン、α-キモトリプシンにより加水分解したところ、ペプシン分解物に高い ACE 阻害活性を認めた。そこで、本活性ペプチドを同定するため、各種クロマトグラフィーによる分画を行った。ペプチドシーケンサーによる解析の結果、このペプチドは鶏骨免疫グロブリン重鎖の 27 位から 30 位にあたるアミノ酸配列「YYRA (Tyr-Tyr-Arg-Ala)」であることが明らかになった。本ペプチドの ACE 阻害活性(IC₅₀)は 33.9 μg/ml であった。本配列にもとづく合成ペプチドを作成し、SHR ラットに単回経口投与を行い、血圧降下作用を調べた。その結果、ペプチドを投与した試験区ではネガティブコントロールと比較して投与後 3 時間で血圧が有意に減少し、その効果は投与後 6 時間まで持続することが観察された。また、この効果は発酵乳由来の既知の ACE 阻害ペプチド「IPP(Ile-Pro-Pro)」</p>	

とほぼ同等であった。以上の結果から本ペプチドは鶏骨免疫グロブリン重鎖由来の抗高血圧作用を有する新規なペプチドであることが判明した。

次に、生理活性機能として豚肝臓加水分解物に存在が期待される ACE 阻害活性、および多くの疾病の発症に関与している活性酸素の消去能（抗酸化活性）について DPPH ラジカル消去活性と安息香酸ヒドロキシル化法を用いたラジカル消去活性を測定した。その結果、豚肝臓加水分解物の ACE 阻害活性は既知の ACE 阻害物質であるカルノシンと比較して高い活性を有していることが明らかになった。また抗酸化活性についても既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンと比較して高い活性を有していることも明らかになった。

さらに、牛心臓タンパク質加水分解物（HPH）のコレステロール（CHOL）低下作用について検討した。その結果、CHOL ミセル溶解性はカゼインよりも HPH で有意に低下した。Caco-2 細胞の CHOL 吸収抑制はカゼインミセルよりも HPH ミセルで有意に高かった。血清 CHOL はカゼインよりも HPH で有意に低かった。放射性 CHOL で測定した CHOL 吸収はカゼインと比べて HPH で有意に減少し、HPH の CHOL 低下作用は空腸の CHOL 吸収阻害によるものであることが明らかになった。HPH 由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（HPHU、分子量約 1000 ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいて HPH よりも強力な CHOL 低下作用を示すことが明らかになった。

以上のように、本論文で得られた成果は畜産副生物の新たな利用法を提案するものであり、畜産副生物の機能性食品素材としての有効利用に大きく貢献するものと高く評価できる。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	中出 浩二
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 六車 三治男
	副査 宮崎 大学 教授 太田 一良
	副査 鹿兒島 大学 教授 青木 孝良
	副査 鹿兒島 大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月7日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月7日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

中出 浩二

【質問 1】本研究で得られた鶏骨抽出物由来の ACE 阻害ペプチドは既知の ACE 阻害ペプチドと相同性が少ないように思いますがいかがでしょうか？

【回答 1】たしかに今までにない配列の新規のペプチドと思います。

【質問 2】鶏骨抽出物のトリプシン分解物がペプシン分解より ACE 阻害活性が高い様に思われますがなぜペプシン分解物を ACE 阻害ペプチドの精製のために使用しましたか？

【回答 2】確かにトリプシン分解物が少し高い活性を示していますが、食品に応用しやすいことからペプシン分解物を利用しました。

【質問 3】同定されたペプチドは IgG 由来ですが、血液から取った方が効率よく取れる可能性はありますか？

【回答 3】ご指摘頂きましたように、効率ということを考えれば本研究で得られた ACE 阻害ペプチドを血液中から取ることも一つの選択肢と考えます。今回は、鶏骨の有効利用をまず念頭において検討を行ってきた結果として、IgG 由来のペプチドを得ました。

【質問 4】このペプチドが鶏骨にどれくらい含有されているかは非常に重要と思いますがいかがですか？

【回答 4】明確な含量は分かりませんが、ご指摘の通り非常に重要と思います。

【質問 5】このペプチドは水に溶解しにくい構造をしているようですがどうでしょうか？

【回答 5】確かに構造からは水に溶解しにくい可能性がありましたが、同定されたペプチドを合成した標品は水に溶解しました。

【質問 6】鶏抽出物を 121℃、30 分間加圧加熱し、さらに加水後 100℃、4 時間加熱したのはなぜですか？

【回答 6】1 段階だけの加熱による抽出と比較はしていませんが、骨から抽出することを考えると、より沢山の成分を抽出するためには 2 段階加熱が良いと考えました。

【質問 7】抽出した後に残渣が出るとは思いますがその利用はいかがですか？

【回答 7】確かに残渣がでることから、今後その有効利用も検討する必要があると思います。

【質問 8】鶏骨抽出物の食品への応用を考えているのなら、ACE 阻害以外の機能性についても検討する必要があるように思いますがいかがですか？

【回答 8】ご指摘の通り、血圧上昇抑制効果だけではなく、さらにその他の機能性の探索も行う必要があると考えています。

【質問 9】牛心臓タンパク質加水分解物のコレステロール吸収抑制効果は明らかにされていますが、合成系への影響は検討されましたか？

【回答 9】合成に及ぼす影響についてはまだ検討しておらず、今後検討する必要があると考えています。

【質問 10】コレステロールの吸収抑制に係る評価系で、ミセルの大きさは測定していますか？

【回答 10】ミセルの形成の程度を測定しましたが、大きさについては観察していません。

【質問 11】牛心臓タンパク質加水分解物のコレステロール吸収抑制効果については評価系の定義を明確にして実験を実施すると、有意義な結果が得られると思いますが、いかがでしょうか？

【回答 11】ご指摘どうもありがとうございました。今後の課題として評価系の定義を明確にし、検討する所存です。