

- (1) 原料の大豆使用割合の増加
- (2) ペプチダーゼ活性抑制

図2. しょうゆ中のペプチド増加の方策

諸味中のペプチダーゼ活性の抑制方法

仕込温度が仕込初期諸味のペプチダーゼ活性とペプチド含量にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、さまざまな温度で仕込んだ諸味から粗酵素液を経時的に抽出し、残存ペプチダーゼ活性を測定した⁸⁾。測定するペプチダーゼは、諸味のタンパク質分解において寄与が高いことが知られているロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)-I, LAP-II, 酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP), およびX-プロリルジペプチルアミノペプチダーゼ (DPP)-IVとした⁹⁻¹¹⁾。

その結果、温度が高いほどLAP-IおよびLAP-II活性が大きく低下することが明らかとなった(図3AB)。このことから、初期仕込温度を高めることにより、諸味のペプチド分解に寄与が高いことが知られている¹²⁾ LAP活性を抑制し、残存ペプチド量を増加させられることができる可能性が示唆された。なお、LAP-I活性は15°Cでは徐々に上昇する現象が認められたが(図3A)、菌体内在型のアミノペプチダーゼが仕込後の溶菌に伴って徐々に溶出したためと推察された。

一方、ACPおよびDPP-IV活性は45°Cでも酵素活性は低下せず、6日間を通して活性が保たれていた(図3CD)。ACPはペプチドのC末端からアミノ酸を遊離する活性があるものの、その基質特異性からジペプチドは分解しにくいと考えられる¹²⁾。またDPP-IVは3残基以上のペプチドのN末端からジペプチドを遊離する酵素であるため⁹⁾、高温仕込においてこれらの活性が維持されていてもジペプチドは残存可能と考えられた。

これらの知見を基に、通常のしょうゆよりも多量のペプチドを含有するしょうゆ様調味料である、大豆発酵調味液を開発した¹³⁾。

大豆発酵調味液からのACE阻害ペプチドの単離同定

逆相クロマトグラフィー (C18カラム) を用いてUV検出によるピークプロファイルの分析を行った結果を図4に示す¹³⁾。濃口しょうゆ(キッコーマン社製、市販品)

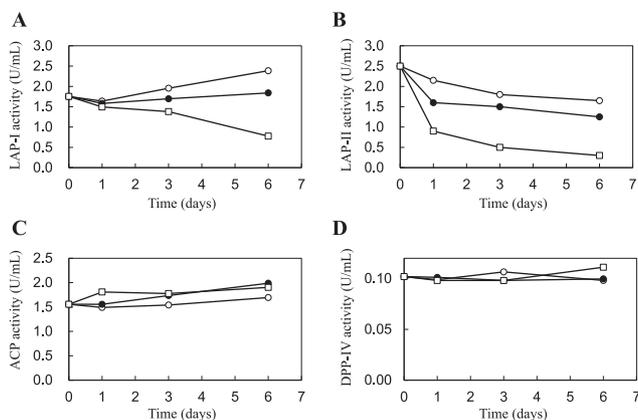


図3. 初期仕込温度が諸味中の各種ペプチダーゼ活性に及ぼす影響。(A) LAP-I活性, (B) LAP-II活性, (C) ACP活性, (D) DPP-IV活性。○15°C, ●30°C, □45°C, (n=2)。

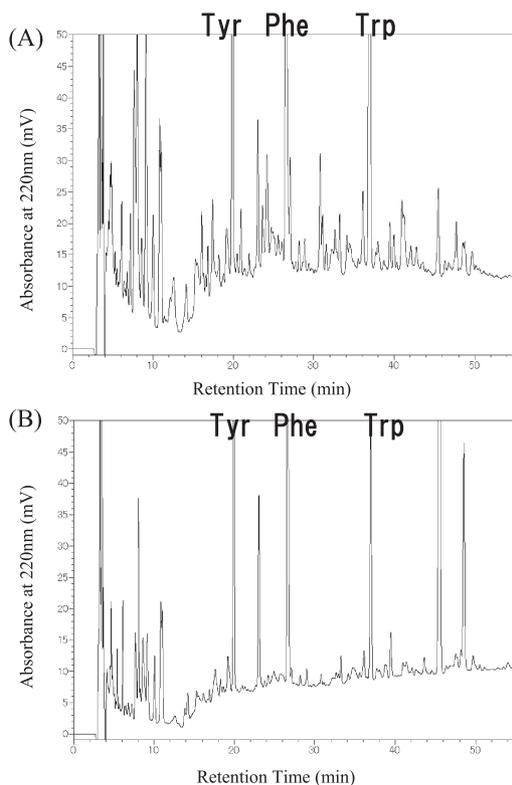


図4. 逆相クロマトグラフィーによるピークプロファイルの分析。(A) 大豆発酵調味液, (B) 濃口しょうゆ。

と大豆発酵調味液のクロマトグラムは大きく異なり、大豆発酵調味液の方がピークの種類が多く、それぞれのピークの高さも高かった。このことから、大豆発酵調味液の方が含まれるペプチドの種類が多く、含有量も全般的に高い可能性が示唆された(図4)。

大豆発酵調味液中にペプチドが多く含有されていると推定されたことから、ACE阻害活性を有するペプチドも多く含有されていることを期待し、大豆発酵調味液と

表1. 大豆発酵調味液および濃口しょうゆのACE阻害活性

検体	ACE阻害活性
	(IC ₅₀ , μg/mL)
大豆発酵調味液	454
濃口しょうゆ	1620

表2. 大豆発酵調味液から単離同定したACE阻害ペプチドと大豆発酵調味液および濃口しょうゆ中の含有量

ACE阻害ペプチド	ACE阻害活性(IC ₅₀ , μM)	含有量 (μg/mL)	
		大豆発酵調味液	濃口しょうゆ
Ala-Trp	10	9	1
Gly-Trp	30	25	1
Ala-Tyr	48	43	4
Ser-Tyr	67	100	3
Gly-Tyr	97	136	19
Ala-Phe	190	45	4

濃口しょうゆのACE阻害活性を測定した。その結果、期待通り、大豆発酵調味液のACE阻害活性(IC₅₀値)は濃口しょうゆと比較し、強い活性を持つことが示された(表1)¹³⁾。

次に、逆相分取クロマトグラフィー(C18およびC30カラム)を用いて大豆発酵調味液を分画し、得られたフラクションのACE阻害活性を指標として、ACE阻害成分の単離を行った。各種機器分析によって精製物の構造決定を行い、複数のペプチドを同定した。これらのペプチドの合成標品を用いて、ACE阻害活性の測定を行った結果、いずれも強いACE阻害活性を示した(表2)¹³⁾。さらに、大豆発酵調味液および濃口しょうゆに含まれるこれらのペプチドの含有量を定量したところ、大豆発酵調味液は濃口しょうゆと比較して顕著に高濃度のACE阻害ペプチドを含むことが明らかとなり、その量は濃口しょうゆと比較して7~33倍であった(表2)¹³⁾。

血圧が高めのヒトを対象とした連続摂取試験

血圧が高めのヒトに対する大豆発酵調味液を配合した減塩しょうゆの長期摂取時の有効性および安全性について評価するため、正常高値血圧者(男性36名,女性35名,計71名)および未治療のI度高血圧者(男性29名,女性32名,計61名)を対象に、減塩しょうゆを対照とした二重盲検法による12週間連続摂取試験を実施した。

試験食品は、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ(被験食品)および大豆発酵調味液を配合しない減塩しょうゆ

表3. 試験食品の栄養成分(8 mL中)

	被験食品	対照食品
熱量(kcal)	6.5	7.1
たんぱく質(g)	0.8	0.8
脂質(g)	0.0	0.0
炭水化物(g)	0.9	1.0
ナトリウム(mg)	260	251
Gly-Tyr(μg)	430	150
Ser-Tyr(μg)	250	40

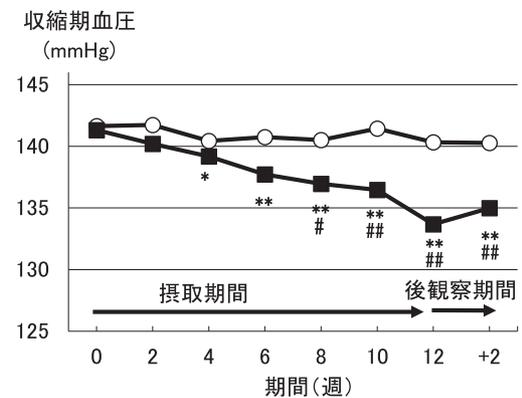


図5. 大豆発酵調味液配合減塩しょうゆの正常高値血圧者およびI度高血圧者に対する血圧低下作用。○:対照食品(減塩しょうゆ)摂取群, ■:大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ摂取群。対照食品=64名,被験食品=68名。*, **:0wと比較して有意差あり(それぞれ $p < 0.05, 0.01$)。#, ##:対照食品と比較して有意差あり(それぞれ $p < 0.05, 0.01$)。

(対照食品)の2種類を用い、摂取量は8 mL/日とした。大豆発酵調味液を配合した被験食品8 mL中には、大豆発酵調味液由来大豆ペプチドであるGly-Tyrが430 μg, Ser-Tyrが250 μg含有されていた。試験食品は、いずれも8 mLずつ無色透明の袋に充填され、風味、香りなどの官能面やパッケージなどにより対照食品と区別がつかないことを確認した。試験食品および対照食品の栄養成分値を表3に示す。

試験を実施した結果、摂取前値との比較では、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ摂取群で摂取4週間後以降に収縮期血圧が有意な低下を示した。また、減塩しょうゆ摂取群との比較では、収縮期血圧が、摂取8週間以降に有意に低下した。大豆発酵調味液配合減塩しょうゆは正常高値血圧者およびI度高血圧者に対して適度な降圧作用を示した(図5)。また、血液検査、理学的検査、医師診察所見ならびに自覚症状から、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ摂取に起因すると考えられる有害事象の出現は認められなかった¹⁴⁾。

安全性試験

正常血圧者および未治療のI度高血圧者の成人男女40名を対象に、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆまたは減塩しょうゆ(対照) 24 mL (1日摂取目安量の3倍)を、4週間連続摂取させた試験を実施した。その結果、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ摂取に起因すると考えられる有害事象の出現は認められなかった¹⁵⁾。同様に、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆと高血圧治療薬との併用についての影響を確認するため、高血圧治療薬(ACE阻害薬, ARB, Ca拮抗薬)を服用している成人男女86名を対象に大豆発酵調味液配合減塩しょうゆまたは減塩しょうゆを1日8 mL, 10週間連続摂取させた試験を実施した。その結果、大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ摂取に起因すると考えられる有害事象の出現は認められなかった¹⁵⁾。

おわりに

和食は糖尿病や高脂血症の予防に理想的な食事である。実際に食生活の欧米化が進むとともに心血管疾患が増加傾向にある現状において、和食を推進することは健康の維持・増進につながると期待できる。しょうゆは和食に欠かせない基本調味料であり、本試験で用いた「大豆発酵調味液配合減塩しょうゆ」は、和食を生活習慣病予防の点でより理想的なものに近づけるための一助になるものと期待される。また、本食品は2013年に特定保健用食品として許可され、「まめちから大豆ペプチドしょうゆ」として商品化された(図6)。この「まめちから大豆ペプチドしょうゆ」は、普段使用しているしょうゆの代替品として使用できることから、消費者の方から、おいしさの面からだけでなく続けやすさの面からも評価を頂いている。さらに、しょうゆという食品の特性上、過剰に使用すると調理した食品の味のバランスが損なわれるため、過剰量摂取のリスクも少ない安全な食品であると考えられる。和食を中心とした食事や減塩の心がけ



図6. 特定保健用食品「まめちから大豆ペプチドしょうゆ」

に加え、本食品で期待される降圧効果により、健康増進に大いに貢献することが期待される。

文 献

- 1) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会編：高血圧治療ガイドライン2009，ライフサイエンス出版(2009)。
- 2) 厚生労働省：平成18年国民健康・栄養調査報告(2009)。
- 3) 独立行政法人 国立健康・栄養研究所：<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail2557.html> (2017/05/18)
- 4) Laragh, J. H. *et al.*: *Am. J. Med.*, **52**, 633 (1972)。
- 5) 独立行政法人 国立健康・栄養研究所：https://hfnet.nih.go.jp/contents/sp_health_listA008.html (2017/05/18)
- 6) Oka, S. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1185 (1974)。
- 7) Oka, S. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1195 (1974)。
- 8) Nakahara, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 355 (2012)。
- 9) 舘 博：日本醸造協会誌，**93**, 307 (1998)。
- 10) Nakadai, T. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 261 (1972)。
- 11) Nakadai, T. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1239 (1972)。
- 12) 中台忠信：醬研，**11**, 67 (1985)。
- 13) Nakahara T. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 821 (2010). Erratum in: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5858 (2010)。
- 14) 内田理一郎ら：薬理と治療，**36**, 837 (2008)。訂正：薬理と治療，**39**, 1063 (2011)。
- 15) 食品安全委員会，食品安全総合システム：<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20100215002> (2017/05/18)