

酒類のジペプチド分析方法開発について

成分解析研究部門 高橋 圭

1. はじめに

清酒等の醸造酒や、しょうゆ及び味噌等の発酵食品は、ジペプチドを中心に様々な低分子オリゴペプチドを含んでおり、それら自体が即効性のある栄養成分である上に、呈味性や生理調節機能があると考えられています。ジペプチドとは、2つのアミノ酸のそれぞれカルボキシル基とアミノ基がアミド結合（ペプチド結合）した化合物であり、醸造酒の場合には、その多くはタンパク質等のポリペプチドの加水分解によって生成されると考えられています。α-アミノ酸は20種類あるので、それらのみから成るジペプチドを計算しただけでも400種類のジペプチドが存在することになります。

ところが、ジペプチドの構造・分子量の類似性等により、近年に至るまで醸造酒に含まれるジペプチドの一定の網羅性を有する解析法が確立することはありませんでした。そこで私たちは、ジペプチドの定性（プロファイリング）・定量・構造推定方法を開発し、醸造酒のジペプチドの情報を収集すること等を目的として、研究を進めております。本講演では、2013年までに開発したジペプチド分析方法¹⁾を中心にご紹介したいと思います。

2. 分析方法の要点と結果

(1) 誘導体化

ジペプチドを分析するにあたり、ジペプチドを含んだ液体をそのまま分析するよりも、誘導体化という前処理を行うことで疎水性や選択性を高め、逆相カラムを用いた液体クロマトグラフィーで分離しやすくしました。具体的には、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)という

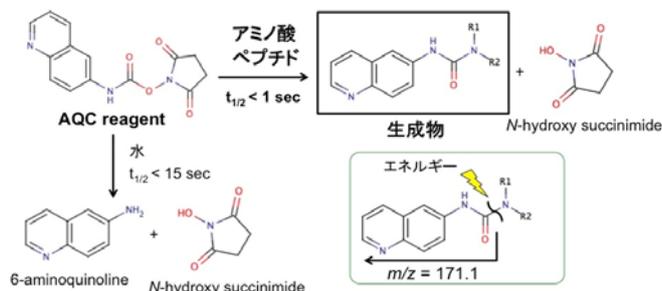


図1 ジペプチドの誘導体化概要

試薬を用いて、誘導体化を行ないました(図1)。AQCは、アミノ酸やペプチドのアミノ基・イミノ基と速やかに反応して、疎水性が高い生成物を生じさせます。さらに、誘導体化化合物に質量分析装置内において一定のエネルギーを与えると、誘導体化試薬に由来する正にチャージした一価の分子イオンを特異的に生成するという特徴を持っています²⁾。

(2) 成分分離

超高速液体クロマトグラフィーという装置に分離部の心臓と言える「カラム」を繋げ、高圧（背圧）を掛けて誘導体化ジペプチドを分離させます。クロマトグラフィーには分離度の指標となる理論段数という概念があり、一般的にはカラム内に充填されている粒子の粒子径が小さいほど、高い背圧が必要となるものの理論段数が高く、成分が分離しやすくなります。誘導体化により逆相カラムによる分離が可能となりましたが、粒子径が2マイクロメートル以下の比較的長いカラムでも誘導体化ジペプチドは高度に分離できず、またカラム内の細かい粒子を外に漏れないようにするためのフリットの隙間も当然小さいために、圧力の変動が起きやすく保持時間がずれやすい等の苦労が続きました。

そこで、単位背圧当たりの理論段数を高くするという考えに基づいて2.7マイクロメートルのコアシェル型粒子（表面多孔性粒子）が充填されたカラムを検討し、さらに、粒子径が2マイクロメートル以下のカラムと比較して背圧が低いことから、技術が必要になりますがコアシェル型粒子カラムを2本連結させることにしました。以上の方法によれば、ジペプチドが高度に分離されることが分かっ

た他、醸造酒に多く含まれるグルコースやマルトース等の糖類が、誘導体化ジペプチドよりも極めて早い時間に溶出されるので、定量性の面において信頼性の高いデータが得られると期待できました。

(3) 検出

まずは、どれくらいジペプチドを含んでいるのか全体像を見るために、三連四重極型質量分析装置を用いて、ジペプチドに狙いを定めたプレカーサーイオンスキャンを行います。誘導体化ジペプチドに相当する m/z 値を持つ化合物（プレカーサーイオン）にエネルギーを与えると生成する特異的な分子イオン（プロダクトイオン： $m/z=171.1$ ）が検出されたときのプレカーサーイオンを検出しました。その結果、ビールやワインと比べて清酒が豊富なジペプチドを含んでいることが明らかとなりました（図2）。

次に、誘導体化した 32 種類のジペプチド標準品の m/z 値や保持時間を調べ、三連四重極型質量分析装置において多重反応モニタリング法のプログラムを作成しました。クロマトグラフィーによる誘導体化ジペプチドの高度な分離が行われていることから、 $m/z=171.1$ のピークを測定することで、定量解析しました。実際に、ジペプチド標準品や清酒を用い、分析化学分野で行われる添加回収試験における回収率や再現性といった評価項目が良好な値を示すことを確認しました。定量解析の結果、ある清酒には約 1~100 μM の範囲でジペプチドが含まれており、ジペプチドの種類によって、または清酒製品によって大きく濃度が変わることが分かりました。

さらには、精密質量を測定することができる飛行時間型質量分析装置を用いて、ジペプチドの標準品が無い場合であってもジペプチドを中心とした低分子オリゴペプチドがノンターゲットに検出できる系を確立しました。誘導体化ジペプチドに弱いエネルギーを与えると、誘導体化物の $m/z=171.1$ のピークが検出されますが、少ないながらもアミノ酸とアミノ酸の間のペプチド結合で切断された分子イオンが検出されます。プレカーサーイオンとプロダクトイオンの精密質量の差等を調べると、ジペプチドやトリペプチドを同定することができます。このようにして 35 種類以上のジペプチドを同定し、定量解析結果と併せて合計 60 種類以上のジペプチドを清酒から検出することができました。

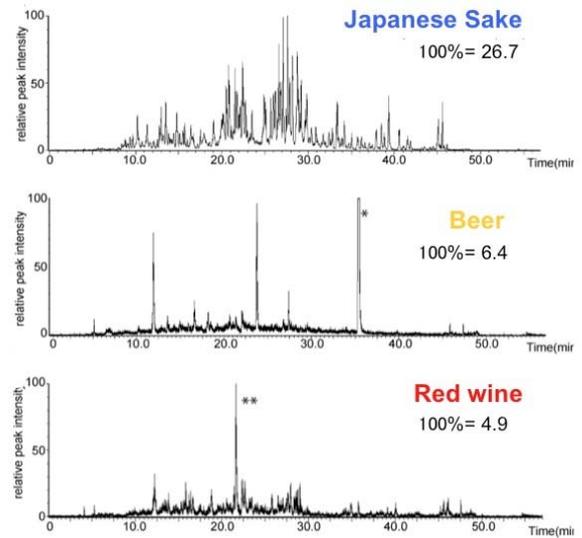


図2 醸造酒に含まれるジペプチド等⁽¹⁾

3. おわりに

米及び米こうじを原料とし、並行複発酵の様式をとる清酒は、ジペプチドを主とする低分子オリゴペプチドを豊富に含んでおり、これが清酒成分の大きな特徴の一つと考えています。最近の研究から、吟醸酒の品質とジペプチド類が相関関係にあることも分かってきています^{3,4)}。今後、分析を続けることにより、思いもよらなかった清酒の真実に近づけるのではないかと期待しています。

4. 参考文献

- 1) Takahashi, K., and Tokuoka, M., et al., *J. Chromatogr. A*, 1218, 7850-7856 (2012)
- 2) 宮野ら, 特願 2003-568398
- 3) Takahashi, K., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 3, 274-280 (2016)
- 4) Takahashi, K. and Kohno, H., *PLoS ONE*, 11(3): e0150524 (2016)