

# 醤油麹菌 Dipeptidyl peptidase IV の 発見と 2 型糖尿病予防ペプチドの検索

館 博\*†

(令和元年 11 月 18 日受付/令和元年 12 月 6 日受理)

**要約:** 著者らは 1992 年に、麹菌が新規アミノペプチダーゼである Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) を生成していることを見出し、DPP IV が醤油の呈味形成における鍵酵素であることを明らかにした。麹菌 DPP IV の応用研究として、呈味性増強に用いる酵素剤の開発や、酵素法による機能性ペプチドの開発などを行った。麹菌 DPP IV を用いてヒト DPP IV 阻害ペプチドの検索を行い、納豆から DPP IV 阻害ペプチドを発見した。納豆から単離された 2 つのペプチドのアミノ酸配列は、LCMS/MS によって Lys-Leu および Leu-Arg として同定し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 41.40 ± 2.68 および 598.02 ± 18.35 μg/ml であった。納豆中の DPP IV 阻害ペプチドが、血糖値の上昇抑制に関与していると考えている。

**キーワード:** ジペプチジルペプチダーゼ IV, *Aspergillus oryzae*, 酵素合成, ジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質, 納豆, 糖尿病, 機能性ペプチド

## はじめに

醤油は日本の伝統的な発酵調味料で、強い旨味のほか酸味、甘味を持った塩辛い調味料である。醤油の旨味成分であるアミノ酸は、醤油麹に含まれる麹菌プロテアーゼによって原料である大豆と小麦のタンパク質分解により生成される。醤油麹菌のプロテアーゼについては、醤油の収量や呈味性に影響するために古くから多くの研究が行われてきた<sup>1-21)</sup>。著者らは 1992 年に、麹菌が新規アミノペプチダーゼである Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) を生成していることを見出し<sup>22)</sup>、本酵素が醤油醸造におけるアミノ酸生成に極めて重要な働きをしていることを明らかにした<sup>23)</sup>。従来、醤油熟成過程におけるアミノ酸生成は、醤油諸味中の原料タンパク質が麹菌のエンドペプチダーゼにより分解され、生成したポリペプチドにエキソペプチダーゼである Leucine aminopeptidase (LAP) および Acid carboxypeptidase (ACP) が作用することによりおこなわれるとされてきた<sup>24)</sup>。しかし、醤油熟成過程におけるアミノ酸生成が急速に進行する仕込み初期においては、ACP はその最適作用 pH<sup>17)</sup> からほとんど作用出来ないものと推定され、一方、LAP はポリペプチドのアミノ末端より作用するのだが、Xaa-Pro のペプチド結合は分解できない<sup>12-16)</sup>。DPP IV が LAP の分解できない X-Pro-peptide から Xaa-Pro のジペプチドを遊離することにより、再び LAP のアミノ酸生成が進行することを明らかにした<sup>23)</sup>。すなわち DPP IV は醤油の呈味形成における鍵酵素であった。

著者らは、麹菌 DPP IV の応用研究として、呈味性増強に用いる酵素剤の開発や、酵素法による機能性ペプチドの

開発などを行って来た。ヒト DPP IV と 2 型糖尿病との関連が明らかになった事により、醸造物における 2 型糖尿病予防ペプチドの検索に着手した。

糖尿病は 1 型、2 型、妊娠糖尿病、その他の糖尿病の 4 種に大別されるが、有病者の 90% が 2 型糖尿病と推定されている。2 型糖尿病は患者数が増加を続けている疾患であり、様々な対策についての研究が行われている。その治療薬の一つに DPP IV 阻害薬がある。DPP IV は、ヒト生体内ではインスリン分泌を促進するインクレチン (GIP: gastric inhibitory polypeptide と GLP-1: glucagon-like peptide 1) を分解することで血糖値の維持に関与することが知られている。肥満に伴い脂肪組織が肥大化し、炎症を発症することで DPP IV が多量に産生されるため、インクレチンが過剰に分解される。これによりインスリン分泌量が不足し、血糖値が上昇することが 2 型糖尿病の原因の一つである。DPP IV 阻害薬により、この反応を阻害することで血糖値の維持が可能となる (図 1)。経口血糖降下薬の一つである DPP IV 阻害薬は 2 型糖尿病に対する治療薬として広く処方されている。

この DPP IV 阻害薬と同様の活性を持つペプチドが報告されており、安全性の高い分離源である食品からもさまざまな DPP IV 阻害物質が報告されている<sup>25)</sup>。これまでにゴダチーズや大豆麹、米タンパク質や小豆の酵素分解物から DPP IV 阻害物質が発見され<sup>26-28)</sup>、2 型糖尿病の予防効果も期待されている。著者らもタンパク質原料由来のペプチドを多く含む発酵食品に着目し、米味噌、醤油、納豆等から麹菌 DPP IV を用いてヒト DPP IV 阻害物質の探索を進め、特に納豆からは、比較的強い DPP IV 阻害活性を持つジペ

\* 東京農業大学名誉教授

† Corresponding author (E-mail: tachi@nodai.ac.jp)

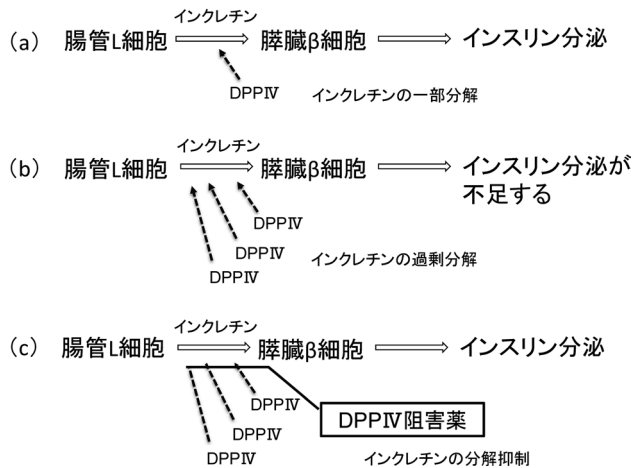


図 1 DPP IV阻害薬の作用機序

プチドを発見した<sup>29)</sup>。

### 麹菌 DPP IV の発見

醤油熟成過程におけるアミノ酸生成が急速に進行する仕込み初期には主に LAP がアミノ酸生成を行うと考えられるが、LAP はペプチド中にある Xaa-Pro のペプチド結合は分解できず、X-Pro-peptide の状態で作用が停止する。さらに醤油中のジペプチドとして、Gly-Pro をはじめとする Xaa-Pro のジペプチドが認められていることから、Xaa-Pro-peptide に作用して Xaa-Pro を遊離する DPP IV を麹菌が生成し、この酵素が醤油醸造におけるアミノ酸生成に極めて重要な働きをしているのではないかと考えた。

著者らは、基質として Gly-Pro-pNA を用いて醤油麹の抽出液から DPP IV の検索を行った。脱脂加工大豆 6 kg、小麦 6 kg を用い、種麹として「一紫」(ビオック社製) を使用して常法通り 30℃、48 時間製麹で醤油麹を調製した。醤油麹の製麹過程より経時的に麹を採り、10 倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を加え、4℃ で 3 時間抽出しろ紙 No. 2 でろ過して粗酵素液を調製した。醤油麹の製麹過程において、麹菌の増殖に伴って DPP IV 活性が増加したことから麹菌が製麹中に DPP IV を生成していると考えられた。

次に、醤油麹菌の DPP IV の精製を行った。醤油麹菌である *Aspergillus oryzae* RIB915 を用いて製麹したフスマ麹から粗酵素液を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、再ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動により DPP IV 精製酵素を得た (表 1)<sup>22)</sup>。精製酵素は、比活性が 0.120 kat/kg と粗酵素液の 1,000 倍に上昇し、回収率は 0.3% であった。シヨ糖密度勾配等電点電気泳動およびポリアクリルアミドディスク電気泳動において均一で、等電点は 4.2 であった。

醤油麹菌 DPP IV は、分子量 280 kD で 2 個のサブユニットからなる 2 量体であった。本酵素は Diisopropylphosphorofluoridate (DFP) により完全に阻害されたことから、活性中心にセリンを持つセリンプロテアーゼであると考えられた。最適 pH は pH7.0~7.5 で、Km 値は 0.55 mM で

表 1 醤油麹菌 DPP IV の精製

	総活性 (nkat)	総タンパク (mg)	比活性 (kat/kg)	精製倍率 (倍)	回収量 (%)
粗酵素	1,970	16,300	0.00012	1	100
Sephacryl S-300	1,060	165	0.006	50	54
Butyl-TOYOPEARL 650S	451	39	0.012	100	23
Sephacryl S-300	105	6	0.018	150	5
DEAE-TOYOPEARL 650M	20	1	0.020	167	1
等電点電気泳動	6	0.05	0.120	1,000	0.3

あった。本酵素の基質特異性は、アミノ末端から 2 番目のアミノ酸が Pro の場合に Xaa-Pro を遊離する性質を持っていた。

### 醤油醸造における DPP IV の役割

醤油醸造過程における原料タンパク質の分解に対する DPP IV の役割を明らかにする目的で濃口醤油の試醸を行い、DPP IV 活性、Xaa-Pro のジペプチドおよびフォルモール窒素の経時変化を調べた。脱脂加工大豆 6 kg、小麦 6 kg を用い、種麹として「一紫」(ビオック社製) を使用して常法通り 30℃、48 時間製麹で醤油麹を調製し、Bé19° の食塩水 21 L に仕込み 30℃ で温醸を行った。DPP IV 活性は、仕込後 40 日目までは 1 nkat/ml 以上の活性を維持していたが、50 日目では急激に活性が低下した。また、DPP IV の反応生成物である Xaa-Pro のジペプチドは熟成に伴って増加し、仕込後 50 日目には 1.63 mg/ml となり、以降は DPP IV 活性が低下したため一定になった。フォルモール窒素は Xaa-Pro の生成に伴って増加し、50 日目に 0.8% とアミノ化率が 80% に達し、Xaa-Pro と同様に 50 日目以降は一定量で推移した。以上の結果から、DPP IV は醤油原料中のタンパク質の分解において、麹菌の各種エンドペプチダーゼおよびエキソペプチダーゼが分解することにできない Xaa-Pro-peptide に特異的に作用し Xaa-Pro を遊離することにより、醤油熟成過程におけるアミノ酸生成を促進していると考えられた (図 2)<sup>30)</sup>。

### 麹菌 DPP IV の応用研究

醤油醸造において DPP IV が、原料タンパク質からのアミノ酸生成を促進していることから、DPP IV および LAP の力価を増強したプロテアーゼ製剤「ウマミザイム」を開発して天野エンザイムから市販した。ウマミザイムは、食品業界において広く利用されたと聞いている (表 2)。

機能性ペプチドにオピオイドペプチドというモルヒネ様作用を示すペプチドが知られているが、その配列に Xaa-Pro を含むものがあり、モルフィセプチンは Tyr-Pro-Phe-Pro-NH<sub>2</sub> の構造をしている (表 3)。オピオイドペプチドの機能性について動物実験を行う場合、高価なペプチドを何 kg も購入して餌を調製することはコストがかかりすぎる。そこで比較的安価なジペプチドを購入して、DPP IV の逆反応でオピオイドペプチドであるモルフィセプチンの酵素合成について検討した。加水分解ではなく合成が起こ

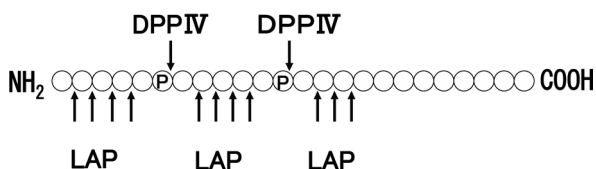


図 2 醤油の仕込み初期諸味におけるアミノ酸生成

表 2 市販プロテアーゼ製剤「ウマミザイム」

プロテイナーゼ	20,000 u/g 以上
LAP	55 u/g 以上
XPAP	4,000 mu/g 以上

(天野エンザイム 製)

表 3 食品由来のオピオイドペプチド

β-カソモルフィン (ウシ乳)	Tyr-Pro-Ser-Phe-NH <sub>2</sub>
モルフィセプチン (ウシ乳)	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH <sub>2</sub>
ヴァルミュセプチン (ヒト乳)	Tyr-Pro-Phe-Val-NH <sub>2</sub>
-----	
カソキシシン (ウシ乳)	Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Try-OCH <sub>3</sub>
ラクトフェロキシシン (ヒト乳)	Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr-OCH <sub>3</sub>

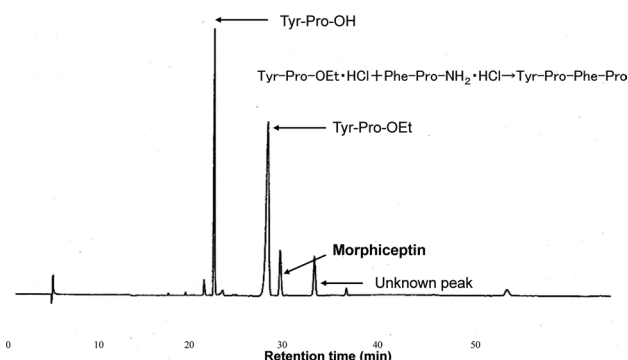


図 3 DPP IV によるモルフィセプチンの合成

りやすい様に、反応系から水を排除するために有機溶媒中で合成反応を行った。その結果、Pro を含むオリゴペプチドの酵素合成としては初めて、モルフィセプチンの酵素合成に成功した (図 3)<sup>31)</sup>。

### 麹菌 DPP IV とヒト DPP IV の比較

DPP IV 阻害物質の探索には、本来、ヒト由来の DPP IV を用いて試験すべきであるが、ヒト由来の DPP IV は高価であり容易に試験が行なえない。そこで安価な麹菌由来の DPP IV が利用可能であるかについて検討を行った。Aspergillus oryzae RIB616 を用いて製麹したフスマ麹から粗酵素液を調製し、限外ろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画、ポリエチレングリコール濃縮を行った<sup>22)</sup>。酵素活性が 0.8 nkat/ml となるように Tris-HCl (pH7.5) で希釈し、麹菌 DPP IV として用いた。市販のヒト DPP IV (フナコシ株式会社 製) も同様に 0.8 nkat/ml に希釈して用いた。ヒト DPP IV 阻害剤として 1.0 μM P32/98 (FOCUS BIOMOLECULES 製) を用いた。

超純水 20 μl に 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 50 μl および 0.03 mM Gly-Pro-MCA 100 μl を混合し、麹菌 DPP IV およびヒト DPP IV を 30 μl 加え 37°C に予熱した蛍光プレートリーダーを用いて、励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm で蛍光強度を経時的に 20 分間測定した。P32/98 に対する麹菌 DPP IV とヒト DPP IV の阻害活性を比較した結果、阻害率は各々 83.6 ± 0.4 %, 81.4 ± 1.3 % となり t 検定において、統計的有意差を示さなかった (P > 0.1)。これにより、麹菌 DPP IV が、ヒト DPP IV 阻害物質に阻害されることを確認し、ヒト DPP IV 阻害物質の探索においても利用可能であると判断した<sup>29)</sup>。

### 納豆からの DPP IV 阻害ペプチドの検索

ペプチドを多く含む発酵食品である米味噌、醤油について、麹菌 DPP IV を用いて DPP IV 阻害ペプチドの検索を行った。米味噌および醤油とも食塩を含むことから、食塩による DPP IV 活性の阻害が起こり、正確な DPP IV 阻害活性を測定する事が出来なかった。そこで、タンパク質の豊富な大豆を原料とする発酵食品である納豆に着目した。納豆の原料タンパク質分解率は醤油や味噌などの発酵食品と比較して低く、さまざまなペプチドを含有している。これまでの研究により、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチドや生物系界面活性剤の中でも優れた作用を有するリポペプチドのサーファリンなどが報告されている<sup>32,33)</sup>。しかし、納豆の DPP IV 阻害ペプチドについては明らかにされていない。そこで、麹菌 DPP IV を用いて納豆の DPP IV 阻害ペプチドの探索を試みた<sup>29)</sup>。

市販納豆に 10 倍量の超純水を加え 60°C で 35 分間の加熱処理を行い、γ-ポリグルタミン酸 (PGA) を除去した。PGA 除去納豆を乳鉢で磨砕し 5 倍量の沸騰水を加えて室温にて 1 時間抽出後、定性ろ紙 No. 2 を用いてろ過し、ろ液を Amicon Ultra-15 (Millipore 製) を用いて分子量 3,000 以下の画分を納豆試料溶液とした。納豆試料溶液 20 μl に 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 50 μl および 0.03 mM Gly-Pro-MCA 100 μl を混合し、麹菌 DPP IV を 30 μl 加え、37°C に予熱した蛍光プレートリーダー (Multi Detection Microplate Reader FLx800TBI, Bio-Tec Instrument Inc. 製) を用いて、励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm で蛍光強度を 50 秒間隔で 20 分間測定した。対照区には超純水を用いた。試料区と対照区の活性を比較し、各試料の DPP IV 阻害率を算出した。

納豆試料溶液は 83.6 ± 0.4% の DPP IV 阻害活性を示し、IC<sub>50</sub> 値は 5.35 ± 0.27 mg/ml であった<sup>29)</sup>。この結果から、納豆は DPP IV 阻害物質を含有することが示唆された。一方、DPP IV 阻害活性に関する食品の IC<sub>50</sub> についての報告と、納豆の IC<sub>50</sub> を比較すると酒粕の加水分解物よりも低い値だが米糠タンパク質加水分解物よりも高い値を示していた (表 4)。しかしながら、酒粕の加水分解物や米糠タンパク質加水分解物は酵素処理によりタンパク質を加水分解させており市販食品ではない。納豆は市販食品であることから DPP IV 阻害活性を有する食品として食生活に導入しやす

く、喫食による2型糖尿病の予防効果につながるのではないかと考えられた。

そこで、納豆に含まれるDPP IV阻害ペプチドの特定を試みた。納豆試料溶液をTOYOPEARL HW-40S (1.5cm×150cm, 東ソー製) でゲルろ過クロマトグラフィーにより分画し、高い阻害活性を示す6画分を取得した(図4)。次にSuperdex Peptide 10/300 GL (1.0cm×30cm, GEヘルスケア製) によるゲルろ過クロマトグラフィーを行い、No. 51およびNo. 61から高い阻害活性を示す画分を取得した(図5)。各画分に対してTSKgel ODS-80Ts (4.6mm×250mm, 東ソー製) による逆相クロマトグラフィーを行い、高い阻害活性を示した画分に対して1%ジメチルスルホキシド溶液への溶媒置換を行った(図6)。この物質に対し、LCMS/MSによる構造解析およびアミノ酸分析を行い、構造を決定した。納豆中から取得した画分No. 51よりLys-Leu, No. 61よりLeu-ArgのジペプチドがDPP IV阻害活性を示すことを明らかにした<sup>29)</sup>。また、大豆の主要なタンパク質であるグリシニンやコングリシニン中にこれらの配列が含まれていることも確認した(表5)。

Lys-LeuおよびLeu-Argのペプチド標準品を用いて、IC<sub>50</sub>値および消化耐性を測定した。これらのペプチドのDPP IV阻害活性を測定した結果、Lys-LeuおよびLeu-ArgのIC<sub>50</sub>は各々41.40±2.68 μMと598.02±18.35 μMであった。また、Leu-ArgのDPP IV阻害活性はLys-Leuの14分の1であった。活性が低いにもかかわらず主要な阻害活性物質として取得したのは、大豆タンパク質の主要なタンパク質には多くのLeu-Arg配列が含有されていることに

表4 納豆試料溶液と食品由来DPP IV阻害活性の比較

試料	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	参考文献
納豆試料溶液	5.35 ± 0.27	Sato, K. et al. 2018
米タンパク質加水分解物	1.45 ± 0.13	Hatanaka T. et al. 2012
酒粕加水分解物	27.55 ± 5.76	Hatanaka T. et al. 2015

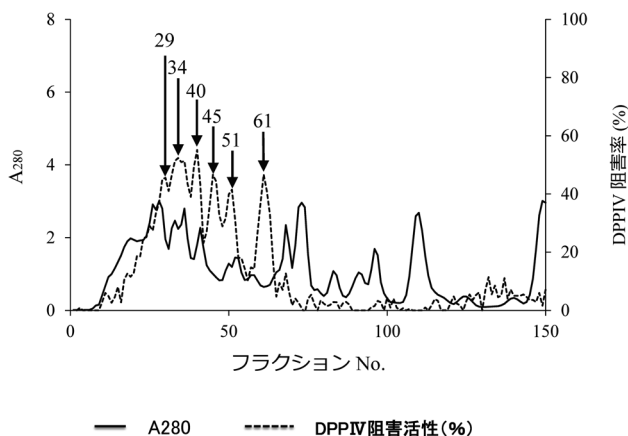


図4 納豆試料溶液のTOYOPEARL HW-40Sによるゲル濾過クロマトグラフィー

ある。

また、Lys-LeuのDPP IV阻害活性を、高いDPP IV阻害活性を示すペプチドとして報告のあるDiprotin A (Ile-Pro-Ile) およびIle-Proと比較した。Diprotin AはDPP IV阻害活性を有するペプチドの中でも最も高いDPP IV阻害活性を示すトリペプチドとして知られており、Ile-Proはジペプチドの中では最も高いDPP IV阻害活性を示すとの報告もされている<sup>25)</sup>。それぞれのIC<sub>50</sub>値は、Diprotin Aが6.83±0.53 μM, Ile-Proが167.79±4.96 μMを示している。この結果により、Lys-LeuはIle-Proの約8倍のDPP IV阻害活性を示しており、ジペプチドとして非常に優れたDPP IV阻害活性を有していた。

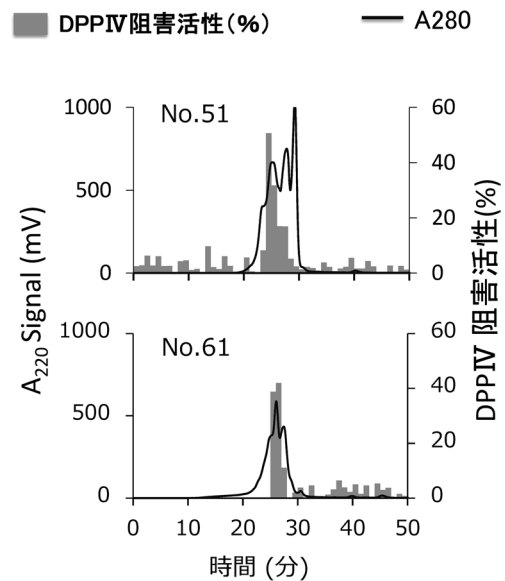


図5 納豆試料溶液のSuperdex Peptide 10/300 GLによるゲルろ過クロマトグラフィー

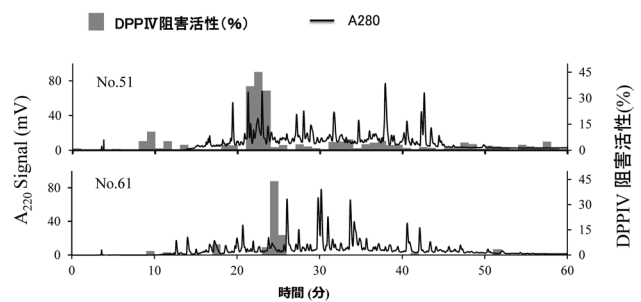


図6 納豆試料溶液のTSKgel ODS-80Tsによる逆相クロマトグラフィー

表5 大豆主要タンパク質中のDPP IV阻害活性配列

タンパク質名	Lys-Leu配列	Leu-Arg配列
グリシニン	250-251, 354-355	386-387, 439-440
β-コングリシニン α鎖	418-419, 568-569	187-188, 230-231, 285-286, 304-305, 408-409, 433-434, 601-602
β-コングリシニン β鎖	147-148	69-70, 242-243, 267-268

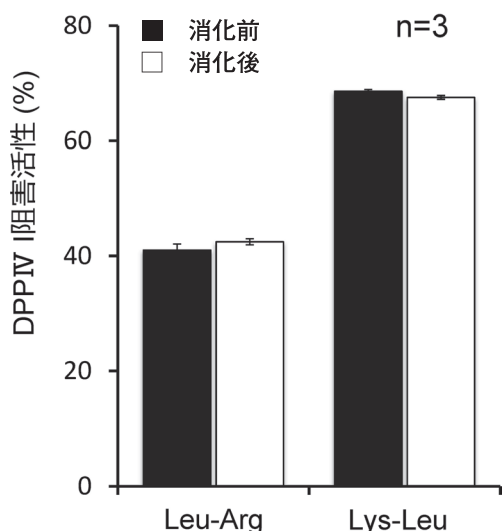


図 7 納豆中に含まれる DPP IV 阻害物質の消化耐性

しかしながら、GLP-1 を膵臓β細胞へ到達させるためには DPP IV 阻害活性を有するペプチドが血漿中の DPP IV を阻害する必要がある。血漿にこれらのペプチドが到達するためには消化管酵素に対する消化耐性を有し、構造を維持した状態で小腸を通過する必要がある。そこで、Lys-Leu および Leu-Arg の消化耐性試験を実施した (図 7)。加水分解処理群と未処理の対照群の DPP IV 活性を比較した結果、両者に統計的有意差は得られなかった ( $P>0.1$ )。そのため Lys-Leu および Leu-Arg は消化管酵素に対する消化耐性を有すると判断した。一方、ヒトに対する試験結果として納豆食は大豆食と比較して血糖値の上昇抑制効果があることが報告されている<sup>34)</sup>。この作用は納豆中の水溶性食物繊維の影響が示唆されているが詳細な作用機序は不明であった。著者らの研究によりその存在が明らかになった納豆中の DPP IV 阻害ペプチドが、血糖値の上昇抑制に関与しているものと考えている。

### おわりに

麹菌 DPP IV の発見により、醤油醸造の仕込み初期におけるアミノ酸生成が LAP と DPP IV との共同作用により進行することが明らかになり、麹菌 DPP IV の醤油の呈味形成における鍵酵素としての位置づけを明らかになったと自負している。一方、麹菌 DPP IV を活用した食品中のヒト DPP IV 阻害物質の検索は、安価で有用な手法であると考えている。醤油や味噌などの醸造物を始め、様々なペプチドを含む食品が存在することから、今後、麹菌 DPP IV を活用した検索方法を用いて新たな DPP IV 阻害ペプチドが見いだされ、食品の 2 型糖尿病予防ペプチドの研究が進むことを期待している。

醤油は、麹菌、乳酸菌および酵母などの微生物の発酵作用により醸造されることから、多くの物質を含む複雑な調味料である。今回の研究では、納豆から 2 型糖尿病予防のペプチドが発見されたが、醤油については麹菌 DPP IV 阻害ペプチドの発見には至らなかったが、近い将来、醤油由来の糖尿病予防ペプチドについて発見できると確信してい

る。

近年、醤油は海外でも優れた調味料として知られるようになり、その使用量は増加しているが、日本国内においては、食生活の変化と輸出用醤油の海外生産により、年々生産量は減少している。醤油は日本人にとって無くてはならない調味料であるが、あって当たり前の空気のような存在で、もっと醤油の素晴らしさを再認識して欲しいと思っている。

醤油には多くの機能性成分も含有されているが、醤油は調味料であるのでその美味しさを評価して欲しいと思っている。この醤油の美味しさこそが、人の脳に対する刺激となり健康効果を生み出しているのではないかと考えている。日本人にとって醤油を使う和食が、健康に良いとも考えている。

麹菌 DPP IV の研究については、恩師である故小原哲二郎先生から学位取得に向けてご紹介頂いた、麹菌プロテアーゼの第一人者である一島英治先生 (当時は東京農工大学教授) から頂いた研究テーマです。醤油醸造の製造研究を主体に行って来た者にとっては、酵素精製は全く新しい研究領域で大いに戸惑いましたが、何とか麹菌プロテアーゼにおける新酵素を発見することが出来ました。この研究成果は、一島英治先生の御指導の賜物と深く感謝しております。

麹菌 DPP IV の応用研究を遂行するにあたり、共同研究者として多大な御協力を頂いた盛岡大学の太田徹先生に深く感謝いたします。また、納豆からの DPP IV 阻害ペプチドの検索については、共同研究者として非常にお力添えを頂いた高崎健康福祉大学の辻聡先生 (元 東京農業大学短期大学部醸造学科調味食品学研究室 助教) に深く感謝いたします。さらに卒業論文として本研究に参加して頂いた、調味食品学研究室の多くの院生、学部学生、短大生の皆さんに心から感謝します。

### 参考文献

- 1) HAYASI K, TERADA M (1972) *Agr. Biol. Chem.* **36** : 1755.
- 2) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37** : 2685.
- 3) MORIHARA K, OKA T, TSUZUKI H (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **165** : 72.
- 4) MORIHARA K, TSUZUKI H (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **146** : 291.
- 5) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37** : 2695.
- 6) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37** : 2703.
- 7) SEKINE H (1976) *Agr. Biol. Chem.* **40** : 703.
- 8) KOVALEVA G.G, SHIMANAKAYA M.P, STEPANOV U.M (1972) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **49** : 1075.
- 9) IIO K, YAMASAKI M (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **429** : 912.
- 10) CHANG W.J, HORIUCHI S, TAKAHASHI K, YAMASAKI M, YAMADA Y (1976) *J. Biochem.* **80** : 975.
- 11) MAJIMA E, ODA K, MURAO S, ICHISHIMAE (1988) *Agr. Biol. Chem.* **52** : 787.
- 12) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37** :

- 757.
- 13) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol, Chem.* **37** : 767.
- 14) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1973) *Agr. Biol, Chem.* **37** : 775.
- 15) OZAWA Y, SUZUKI K, MIZUNIUMA T, MOGI K (1973) *Agr. Biol, Chem.* **37** : 1285.
- 16) NAKADAI T, NASUNO S (1977) *Agr. Biol, Chem.* **41** : 1657.
- 17) ICHISHIMA E (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* **258** : 274.
- 18) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1972) *Agr. Biol, Chem.* **36** : 1343.
- 19) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1972) *Agr. Biol, Chem.* **36** : 1473.
- 20) NAKADAI T, NASUNO S, IGUCHI N (1972) *Agr. Biol, Chem.* **36** : 1481.
- 21) bARAI T, ICHISHIMA E (1974) *J. Biochem.* **76** : 765.
- 22) TACHI H, ITO H, ICHISHIMA E (1992) *Phytochem.* **31** : 3707.
- 23) 館 博 (1998) 醸協 **93** : 307.
- 24) 栃倉辰六郎編(1988) 醤油の科学と技術. (財)日本醸造協会, 東京, pp. 174-176.
- 25) RUI L, JIANMING C, HAO W (2019) *Int. J. Mol. Sci.* **20** : 463.
- 26) HATANAKA T, INOUE Y, ARIMA J, KUMAGAI Y, USUKI H, KAWAKAMI K, MUKAIHARA T (2012) *Food Chem.* **134** : 797.
- 27) UENISHI H, KABUKI T, SETO Y, SERIZAWA A, NAKAJIMA H (2012) *Inter. Dairy J.* **22** : 24.
- 28) HATANAKA T, URAJI M, FIGITA A, KAWAKAMI K (2015) *Inter. J. Peptide Res. Thera.* **21** : 479.
- 29) SATO K, MIYASAKA S, TSUJI A, TACHI H (2018) *Food Chem.* **261** : 51.
- 30) 館 博 (1996) 醸協 **91** : 138.
- 31) OTA T, ITOH A, TACHI H, KUDOH K, WATANABE T, YAMAMOTO Y, MAEKAWA A (2005) *J. Agr. Food Chem.* **53** : 6112.
- 32) OKAMOTO A, HANAGATA H, KAWAMURA Y, YANAGIDA F (1995) *Plant Foods Human Nut.* **47** : 39.
- 33) OKA K, HIRANO T, ISHII H, MURAKAMI K, MOGAMI S, ITOKAWA H (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41** : 1000.
- 34) 石川篤志, 岸 幹也, 山上圭吾 (2009) 生活衛生 **53** : 257.

# Discovery of Dipeptidyl Peptidase IV and Search for Type 2 Diabetes Prevention Peptide

By

Hiroshi TACHI\*†

(Received November 18, 2019/Accepted December 6, 2019)

**Summary** : In 1992, the authors found that *Aspergillus oryzae* produced a new aminopeptidase, Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), and revealed that the enzyme is a key enzyme in the formation of the taste of soy sauce. As an applied study of DPP IV by *A. oryzae*, we developed enzyme agents used to enhance taste and bioactive peptides by the enzyme method. This study determined the *in vitro* DPP IV inhibitory activity of isolated peptides from natto. Amino acid sequences of two peptides isolated from natto were identified by LCMS/MS as Lys-Leu and Leu-Arg. These isolated peptides inhibited DPP IV in a dose-dependent manner, with  $IC_{50}$  values of  $41.40 \pm 2.68$  and  $598.02 \pm 18.35 \mu\text{g/ml}$ , respectively. These results indicate the potential mechanism of blood glucose control by natto and novel roles of Lys-Leu and Leu-Arg as DPP IV inhibitors.

**Key words** : Dipeptidyl peptidase IV, *Aspergillus oryzae*, Enzymatic synthesis, Dipeptidyl peptidase IV inhibitor, Natto, Diabetes, Bioactive peptides

---

\* Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture

† Corresponding author (E-mail : tachi@nodai.ac.jp)