

チキンブイヨン酵素分解物中のアンジオテンシン I ：変換酵素阻害物質の単離・精製

翁, 韜

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

玉屋, 圭

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

松井, 利郎

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

末時, 崇行

九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

他

<https://doi.org/10.15017/23629>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 54 (1/2), pp.17-24, 1999-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

チキンブイヨン酵素分解物中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の単離・精製

翁 韜・玉屋 圭・松井 利郎
末時 崇行*・田川 智樹*・松本 清

九州大学大学院生物資源環境科学研究科
生物機能科学専攻食品バイオ工学講座

(1999年7月30日受付, 1999年8月24日受理)

Separation and Purification of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide in Peptic Hydrolyzate of Chicken Bouillon

Tao WENG, Kei TAMAYA, Toshiro MATSUI,
Takayuki SUETOKI*, Tomoki TAGAWA* and Kiyoshi MATSUMOTO

Laboratory of Food Analysis, Institute of Food Biotechnology,
Department of Bioscience and Biotechnology,
Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Graduate School Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒 言

「国民衛生の動向」によれば、わが国の死亡率の高い三大疾病は脳血管疾患、心疾患及び悪性ガンとなっており、前二者は高血圧疾患と極めて高い関係にある。しかも高血圧疾患の90%は本態性高血圧といわれており、血圧降下剤の投与によって完全に治癒できないのが現状である。最近、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害剤が本態性高血圧症に効果的であることが多くの研究及び臨床実験で明らかになってきた (萩原, 1994, Herman, 1992)。レニン・アンジオテンシン系とカリクレイン・キニン系の中で、ACE はレニン・アンジオテンシン系中のアンジオテンシン I に作用して、強力な昇圧作用を持つアンジオテンシン II を生成させながら、カリクレイン・キニン系中の降圧作用を有するブラジキニンを不活性化させる (萩原, 1994)。最近、日常摂食する食品から血圧降下作用を有する ACE 阻害ペプチドが次々と見出されている (受田ら, 1992, Mullally, *et al.*, 1997,

Matsufuji *et al.*, 1994)。ACE 阻害ペプチドはレニン・アンジオテンシン系と呼ばれる昇圧系に作用し、血圧上昇を抑制する効果が期待されるため、高血圧予防の観点から高い利用価値を有するものと考えられる (機能性食品連絡会, 1997)。従って、天然食品に何らかの加工を施し、呈味性を向上させた食品に、さらにこのような生体調節機能が加われば、食品としての付加価値はより高まるものと考えられる。

一方、天然調味料に対する需要の増大につれて、チキンエキス分の呈味性が注目され、その生産量は増大の一途をたどっている。このようなエキス類に対する需要は、今後益々大きくなるものと予想される。そこで、本研究では、高血圧症発症予防の観点から鶏肉加工時の廃棄物から抽出されたチキンブイヨンに着目し、これを酵素分解することにより、ACE を阻害する機能性物質の単離・精製を試みた。

材料および方法

1. 試料

廃鶏抽出残渣 (Brix 13.4%) をタンパク質重量に対し 5% のアルカラーゼ 0.6L で 4 時間分解したものを

* アリアケジャパン (株)

を廃鶏抽出残渣酵素分解エキス (Sample 1), 廃鶏抽出残渣 (Brix 14.0%) をタンパク質量に対し 3.3% のアルカラゼ 0.6L と 1.7% のフレーバザイムで 4 時間分解したものを廃鶏抽出残渣酵素分解エキス (Sample 2) とした。また, 廃鶏蒸煮エキス (Brix 3.0%) は廃鶏を $0.25\text{kg}/\text{cm}^2$ で 1 時間蒸煮した (Sample 3)。その他の試料: Brand's (Essence of chicken, Brix 10.0%, Sample 4), Brand's (Essence of chicken, 冬虫夏草入, Brix 10.0%, Sample 5), 統一鶏精 (Brix 11.0%, Sample 6), 陳氏鶏精 (Brix 2.5%, Sample 7) は台湾製のものをそのまま使用した。

2. ACE 阻害活性の測定

1) 試薬調製

ACE 溶液: 0.2U の Angiotensin converting enzyme (ACE, EC3.4.15.1, ウサギ肺由来, 和光純薬工業社製) を NaCl を含有しないホウ酸塩緩衝液 8 ml にて溶解した。

基質溶液: Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) 合成疑似基質 (シグマ社製) 6.25mg に対して, 1M NaCl を含有したホウ酸塩緩衝液 1 ml にて溶解した。

緩衝液: ホウ酸塩緩衝液 ($1/20\text{M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 1/5\text{M H}_3\text{BO}_3$, pH 8.3) を調製し, 1M NaCl を含有したものとしないもの 2 種を使い分けた。なお, 試薬調製にはすべて超純水を用いた。

2) 測定方法

ACE 阻害活性の測定は 25mU ACE 溶液, 12.5mM HHL 合成疑似基質を用い, Lieberman の測定法を改良した山本らの方法に準じて測定した (山本ら, 1980)。すなわち, 試料 50 μl に ACE 溶液 100 μl を加え, HHL 基質 100 μl を添加することにより酵素反応を開始し, 37°C にて 1 時間インキュベート後, 0.5M HCl 250 μl を添加することにより酵素反応を停止させた。反応液中に生成した馬尿酸を酢酸エチル 1.5ml にて抽出し, 2000rpm で 10 分間遠心分離後, その上澄液 500 μl を別の試験管に移し, 減圧乾燥を行った後, 1M NaCl 3ml に溶解した。228nm の吸光度を測定することにより ACE 阻害活性を求めた。被検液での吸光度を A_s , 被検液のかわりに水を加えたときの値 (Control) を A_c , 予め反応停止液を加えて反応させた時の値 (Blank) を A_b として, 以下の式により試料の ACE 阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{|(A_c - A_s)|}{(A_c - A_b)} \times 100$$

また, 試料間の ACE 阻害活性の比較は上式により得られる阻害率が 50% を示す反応液中の試料の重量濃度

又はモル濃度として IC_{50} で示した。

3. ODS 充填カラムによる ACE 阻害ペプチドの精製

廃鶏抽出残渣酵素分解エキス 1 (Sample 1) を凍結乾燥し, その凍結乾燥したサンプルを脱イオン水 100ml に溶解した後, 前処理用フィルター (0.8 μm) でろ過し, そのろ過液を ODS 樹脂 (YMC 製 ODS-AQ120-S50, $3.5 \times 13\text{cm}$) 充填カラムに負荷した。溶出はエタノール濃度のステップワイズで行った。すなわち, 脱イオン水 500ml で溶出後, 10, 25, 50, 100% 濃度のエタノール溶液各 300ml を用いて順次溶出し, E1~E5 を得た。各画分を減圧濃縮後, 凍結乾燥したものを ODS 充填カラムによる一次精製物として, 前述の ACE 測定法を用いて, その阻害性を評価した。

4. イオン交換クロマトグラフィーによる ACE 阻害ペプチドの精製

ODS 溶出画分のうち, 最も ACE 阻害活性の高かった E2 を 150mg/ml に調製し, 0.45 μm のフィルターを通過させた後, SP-Sephadex C-25 (H^+ 型) カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー (IEC) による溶出を行った。イワシ (受田ら, 1992) 及びオイスター (松本ら, 1994) 酵素分解物の例から, 水溶出画分には ACE 阻害活性は認められなかったため, 本実験では, 水 160ml を流してから, 0.1M ギ酸アンモニウム及び 0.5M ギ酸アンモニウムのステップワイズグラジエントにて 6ml ずつ試験管に分取した。さらにこれらの溶出画分の ACE 阻害活性も測定した。

5. 逆相 HPLC による ACE 阻害ペプチドの分離, 精製

SP-Sephadex C-25 溶出画分 E2A を 2ml まで濃縮し, 凍結乾燥後 ODS-120T カラムを用いた逆相 HPLC による分離を行った。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル 10~60% (0~5分: 10%, 5~30分: 10~60%, 30~40分: 60%) のリニヤグラジエントで行い, 280nm の吸光度の増大が認められたピークのクロマトグラムを参照しながら分取した。一般に, イオン交換クロマトグラフィー後の画分においては脱塩操作を必要とするが, ここではペプチド収率低下を避けるため直接 ODS 系カラムに 50 μl ずつ導入した。続いて, ナカライテスク社製 COSMOSIL 5C18-AR II ($4.6 \times 250\text{mm}$) を用い, 20% アセトニトリルを含む 10mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 2.8) (Ohta *et al.*, 1997) で分離を行った。さらに, 旭化成社製 HIKARISIL C-18 ($4.6 \times 250\text{mm}$) を使用し, 0.1% トリフルオロ酢酸を含む

アセトニトリル20~40% (0~5分:20%, 5~25分:20~40%, 25~30分:40%) のリニヤーグラジエントによる分離を行った。高速液体クロマトグラフは島津製作所製 LC-10AD, 検出器は東ソー社製紫外可視検出器 UV-8000を使用し, 波長220nm でモニターした。また, データ処理装置, カラムオープン は東ソー社製 CP-8000及び CO-8000を使用した。

6. アミノ酸分析及びアミノ酸配列の決定

アミノ酸組成分析は単離物を1.0%フェノールを含む6M塩酸によって加水分解(気相法, 150℃, 1.5時間)後, N-hydroxysuccinimidyl-6-aminoquinolinylnyl carbonate (AQC) を用いて誘導体化し, HPLC に供することにより行った (AccQ・Tag 法, Waters 社)。また, アミノ酸配列は島津製作所製 PPSQ-21プロテインシーケンサーを用いて, 常法により決定した。

実験結果

1. 各種チキンブイオンの ACE 阻害性

試料の項で述べた7種類のサンプルを前処理用フィルター (DISMIC, 1.0 μ m) でろ過後, そのろ過液の一定量を凍結乾燥後, ACE 阻害活性を測定し

Table 1 の結果を得た。3種の廃鶏抽出残渣エキス (Sample 1~3) では1と2に顕著な活性が認められた。なかでも Sample 1 (ALC-1) の IC₅₀ 値は 0.05mg/ml であり極めて高い阻害性を示した。これは以前行ったチキン抽出液における ACE 阻害活性測定において, アルカラゼを作用させたブイオン, 鶏ガラ抽出液の活性が処理前より10倍以上増大したことと同様に, アルカラゼが活性の増大に寄与していると考えられた。また, フレーバーザイムの添加により, 活性の低下が認められたことから判断すると, 本酵素による分解ペプチドの活性発現の寄与は低いものと考えられた。Sample 4, 7に関しては, サンプル中に非極性物質が存在し, 酢酸エチル相に移行するために, 正確な値を求めることが不可能であった。そこで, 通常の Blank, Control に加えて, サンプルに対する Blank を設定して, 阻害活性を算出した。また Sample 4, 5 は, 活性に寄与する因子は不明であるが, 5の活性が高いことは明らかであった。しかし Sample 1 の廃鶏抽出残渣酵素分解エキスと比較すると, 約10分の1程度であった。そこで, 廃鶏抽出残渣酵素分解エキス1 (Sample 1) を最も高い阻害活性を持つものとして次の精製ステップに用いた。

Table 1. Characteristics of Samples Used and Their ACE Inhibitory Activities

Sample No	W/V Concentration (mg/ml)	Brix (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
Sample 1	202.27	13.4	0.05
Sample 2	109.56	14.0	0.67
Sample 3	30.41	3.0	17.21
Sample 4	86.31	10.0	7.09
Sample 5	100.10	10.0	0.77
Sample 6	101.55	11.0	4.58
Sample 7	24.38	2.5	15.27

Table 2. Separation of ACE Inhibitory Fraction from Chicken Extract Hydrolyzates (ALC-1) with ODS Resin

Fr. No	Elution condition	Weight (g)	Yield (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
ALC-1	-----	8.51	100	0.05
E1	Water	2.02	23.8	0.23
E2	10% EtOH	1.73	20.3	0.0024
E3	25% EtOH	1.45	16.9	0.206
E4	50% EtOH	0.82	9.6	0.066
E5	100% EtOH	0.21	2.5	1.502

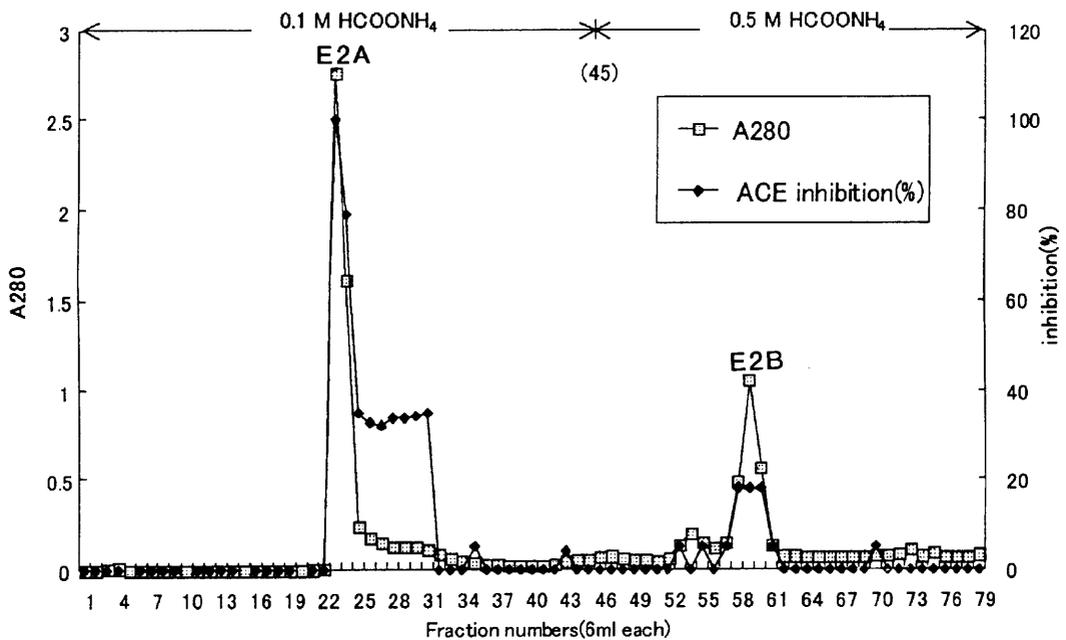


Fig. 1. Chromatogram on SP-Sephadex C-25 column of active fraction (E2) eluted with 10% ethanol from ODS column. Stepwise gradient elution: 160ml of H₂O, 270ml of 0.1M ammonium formate (pH 7.0), 210ml of 0.5M ammonium formate (pH 7.0)

2. ODS カラム溶出物の ACE 阻害性

Sample 1 を ODS 樹脂充填カラムに通し、エタノール濃度のステップワイズグラジエントにより ACE 阻害活性を有するペプチドの分画を行った。Table 2 に示したように、エタノールによる溶出を行うことにより、Sample 1 原液から 73.1% の回収率でエタノール溶出画分が得られた。各画分の ACE 阻害活性の強さは、画分間で大きく異なり、E2 (10% エタノール溶出画分, $IC_{50}=0.0024\text{mg/ml}$) においては Sample 1 (ALC-1, $IC_{50}=0.05\text{mg/ml}$) と比べて約 20 倍以上の活性増大となった。また E2 は 20.3% の高収率の回収が可能であった。従って、E2 中に存在する活性画分のさらなる分離を試みた。

3. IEC による ACE 阻害ペプチドの精製

E2 の SP-Sephadex C-25 (H⁺型) カラムを用いた IEC の溶出曲線を Fig. 1 に示した。0.1M 及び 0.5 M ギ酸アンモニウムの溶出画分に、2 つの阻害活性のピークが認められ、それぞれのピークはタンパク質の 280nm の吸収ピークと一致した。このうち最も活性が高く、タンパク質量も多い画分 E2A のみを次の分離ステップに供した。

4. 逆相 HPLC による単離・精製

SP-Sephadex C-25 溶出画分 E2A を ODS-120T カラムにより分離した。Fig. 2 に示したように、この段階ではまだ多くのピークが観察され、E2A-4 で最も高い阻害率 (75.1%) を与えた。そこで、本画分を次の分離ステップに供した。まず、COSMOSIL 5C18-AR II カラムを用いた逆相 HPLC による分離を行った。その結果、Fig. 3 に示したように、3 つの活性画分が観察され、最も高い阻害率を示した画分 2 をさらに HIKARISIL C-18 カラムに通した (Fig. 4)。ピーク 3 を同様の HPLC に供し活性画分 2 を得た (Fig. 5)。活性画分 2 の阻害率 (20.6%) は活性画分 1 (3.7%) より 5 倍も高いことが認められた。そこで活性画分 2 を最終分離に供し、最終精製物としてアミノ酸分析に供した。

5. ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列と活性

アミノ酸分析並びにアミノ酸シーケンスを行った結果、本画分は Gly-Ala-Pro-Gly (Gly : Ala : Pro = 2.17 : 1 : 1.18) であると同定された。また、本ペプチドの IC_{50} 値は $408\mu\text{M}$ であった。

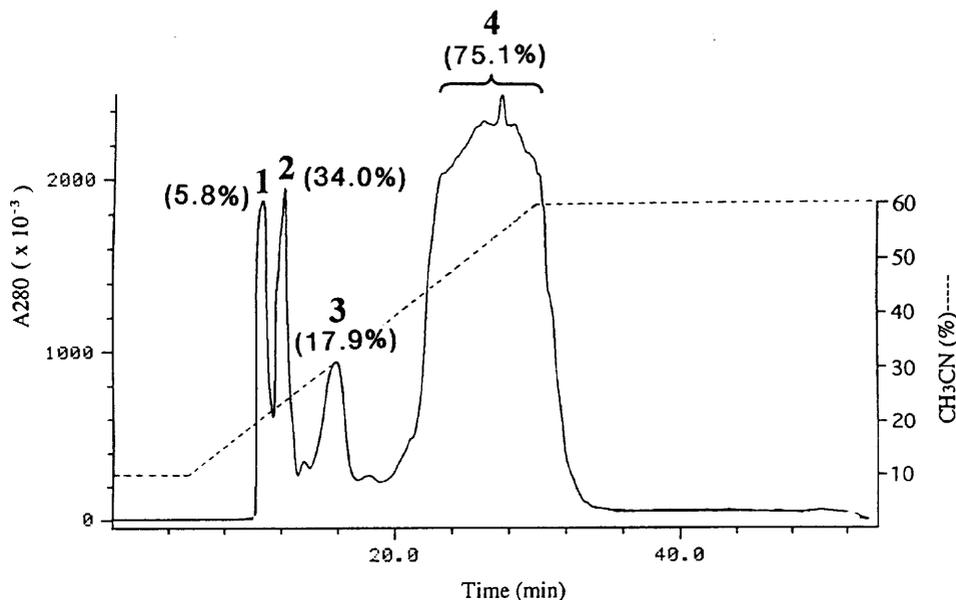


Fig. 2. Reverse-phase HPLC on TSK gel ODS-120T column of active fraction (E2A) from SP-Sephadex C-25 column.

Column: TSK gel ODS-120T (7.8×300mm), Solvent system: 10% to 60% CH₃CN (from 5 to 30min) in 0.1% trifluoroacetic acid, Flow rate: 1.0ml/min, Injection volume: 50 μ l

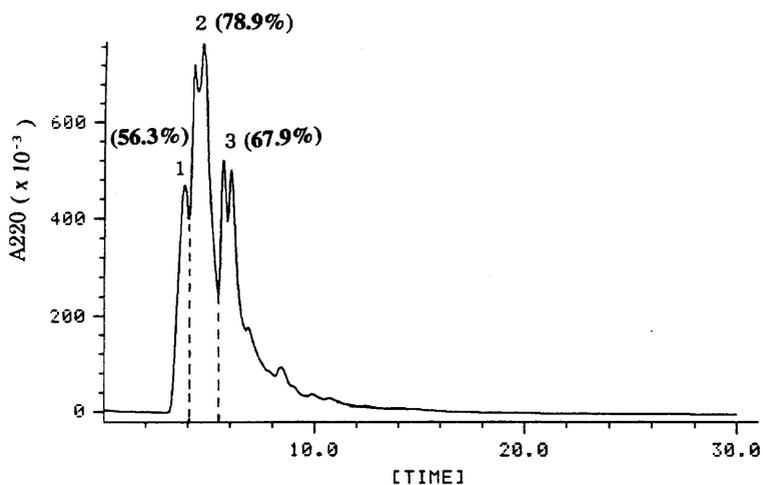


Fig. 3. Reverse-phase HPLC on COSMOSIL 5C18-AR II column of active fraction (4) from TSK gel ODS-120T column.

Column: COSMOSIL 5C18-AR II (4.6×250mm), Solvent system: 10mM ammonium phosphate buffer (pH 2.8) in 20% CH₃CN, flow rate: 0.6ml/min, Injection volume: 20 μ l

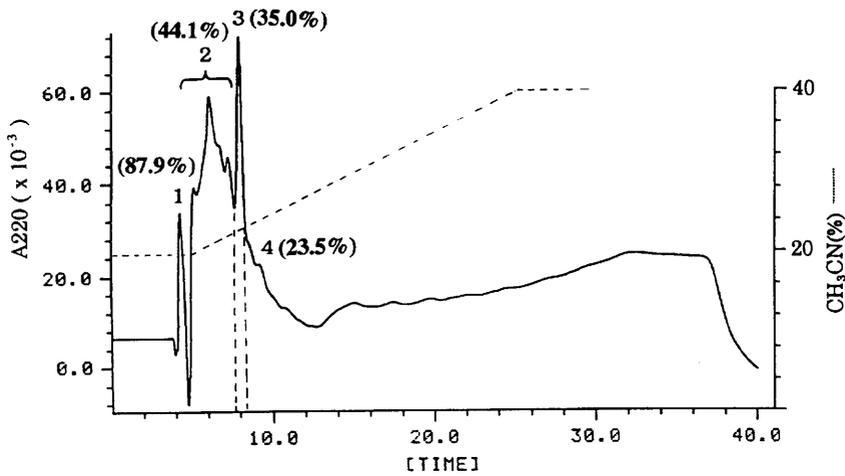


Fig. 4. Reverse-phase HPLC on HIKARISIL C-18 column of active fraction (2) from COSMOSIL 5C18-AR II column. Column: HIKARISIL C-18 (4.6×250mm), Solvent system: 20% to 40% CH₃CN (from 5 to 25min) in 0.1% trifluoroacetic acid, Flow rate: 1.0ml/min, Injection volume: 10 μ l

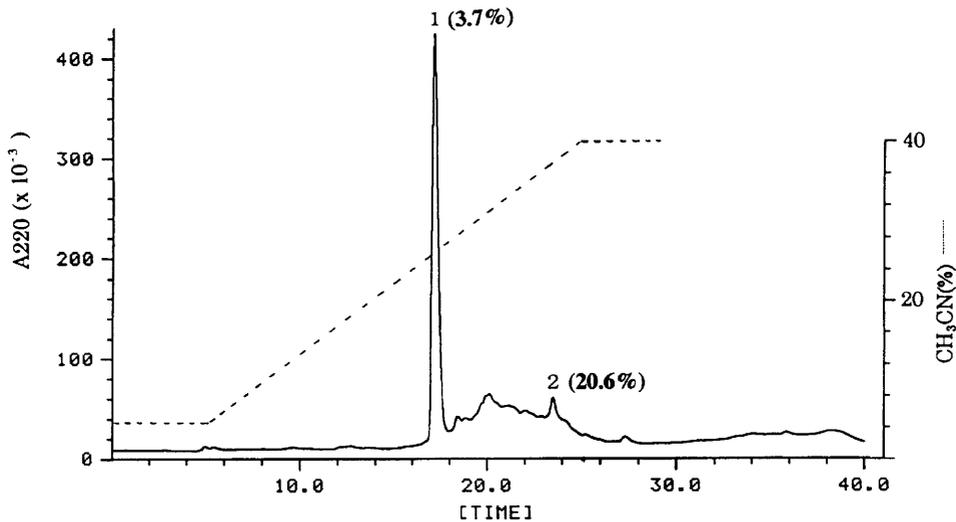


Fig. 5. Reverse-phase HPLC on HIKARISIL C-18 column of active fraction (3) from HIKARISIL C-18 column. Column: HIKARISIL C-18 (4.6×250mm), Solvent system: 5% to 40% CH₃CN (from 5 to 25min), Flow rate: 0.6ml/min, Injection volume: 10 μ l

考 察

本研究において、廃鶏抽出残渣をアルカラーゼで加水分解することによって得られたエキス (ALC-1)

中の ACE 阻害性を評価した。なお、ACE 阻害ペプチドを単離する過程において、E2A 画分には ACE 阻害活性を示すペプチドが多数存在していると考えられた。特に E2 の IC₅₀ 値が 0.0024mg/ml であること

から考えると、E2 中には今回単離したペプチドよりも高い活性を有するペプチドが存在しているものと推察される。

ACE 阻害活性とペプチド配列との相関に関しては、Cheung ら (Cheung *et al.*, 1980) がジペプチドについて詳細に調べており、Ala-Pro の IC₅₀ 値は 230 μM と報告している。ジペプチドでは、C 末端に芳香族酸 (Trp, Tyr, Phe) やイミノ酸 (Pro) を、N 末端に分岐脂肪族アミノ酸 (Val, Ile) を有するペプチドが高活性であると言われている。本研究で得られた Gly-Ala-Pro-Gly は新規ペプチドであるが Ala-Pro の N, C 末端にそれぞれ親水性の Gly が結合しているため若干阻害活性が低下したものと考えられた。

単離したペプチドの相同性を検討したところ、本配列は鶏のコラーゲンタンパク質の 1 次構造中に認められ (Yamada *et al.*, 1984, Fuller and Boedtker, 1981), 廃鶏抽出物の加水分解によりコラーゲン部分から派生したものと考えられた。コラーゲンタンパク質を対象とした ACE 阻害性研究は未だ報告されておらず、今後の研究展開が期待される。

要 約

1. 7 種類の廃鶏抽出残渣エキスでは Sample 1 と 2 に顕著な活性が認められた。中でも廃鶏抽出残渣 (Brix 13.4%) をタンパク質重量に対して 5% のアルカラーゼ 0.6L で 4 時間分解したエキス (Sample 1, ALC-1) は IC₅₀ 値が 0.05mg/ml と極めて高い値を示した。これはアルカラーゼが活性の増大に寄与していると考えられた。また、フレーバーザイムの添加により、活性の低下が認められたことから判断すると、本酵素による分解ペプチドの活性発現の寄与は低いものと考えられた。

2. ODS 充填カラム、イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC などを用いて、Sample 1 中の ACE 阻害ペプチドの分離を行った。その結果、ACE 阻害ペプチドとして、Gly-Ala-Pro-Gly (IC₅₀ 408 μM) が単離された。

3. 廃鶏抽出残渣を適切に酵素処理することにより、呈味性の向上と共に生体調節機能が加えられ、食品としての付加価値がより向上し得るものと考えられた。

文 献

Cheung, H-S., F-L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo and D. W. Cushman 1980

Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme. *J. Biol. Chem.*, **255**: 401-407

Fuller, F. and H. Boedtker 1981 Sequence determination and analysis of the 3' region of chicken pro-α1 (I) and pro-α2 (I) collagen messenger ribonucleic acids including the carboxy-terminal pro-peptide sequences. *Biochem.* **20**: 996-1006

機能性食品連絡会 1997 機能性素材の開発の現状。食品と開発, **26**: 14-40

萩原俊男・猿田享男・日和田邦男編 1994 ACE 阻害薬のすべて。先端医学社, 東京

Herman, A. G. 1992 Differences in structure of angiotensin-converting enzyme inhibitors might predict differences in action. *Am. J. Cardiology*, **70**: 102C-108C

Matsufuji, H., T. Matsui, E. Seki, K. Osajima and Y. Osajima 1997 Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptides in an Alkaline Protease Hydrolyzate Derived from Sardine Muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 2244-2245

松本 清・萩久保温子・吉野貴唯・松井利郎・箴島豊 1994 オイスター蛋白質加水分解エキス中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの分離・精製。日食工誌, **41**: 589-594

Mullally, M. M., H. Meisel and R. J. FitzGerald 1997 Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β-lactoglobulin. *FEBS Letters*, **402**: 99-101

Ohta, T., A. Iwashita, S. Sasaki and Y. Kawamura 1997 Antihypertensive action of the orally administered protease hydrolysate of chum salmon head and their angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Sci. Technol., Int. Tokyo*, **3**: 339-343

受田浩之・松田秀喜・箴島克裕・松藤 寛・松井利郎・箴島 豊 1992 加熱イワシ筋肉のペプシン加水分解物中に存在するアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチド。農化誌, **66**: 25-29

Yamada, Y., G. Liau, M. Mudryj, S. Obici and B. de Crombrughe 1984 Conservation of the sizes for one but not another class of exons in two chick collagen genes. *Nature*, **310**: 333-337

山本節子・戸井田一郎・岩井和郎 1980 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討。日胸疾会誌, **18**: 297-303

Summary

Chicken extract was hydrolyzed with proteases for food industry. The hydrolyzed chicken extracts and other chicken bouillons were tested for inhibitory activity against angiotensin I converting enzyme (ACE). The hydrolyzate (ALC-1) treated with alcalase for 15h at 40°C has the highest inhibitory activity against ACE. The IC_{50} -value of ACL-1 was 0.05mg-powder/ml. The ACL-1 was applied on a column packed with ODS resin and washed with water in order to remove salts and the water-soluble fraction. The most active fraction (E2) was eluted with 10% ethanol and showed the IC_{50} -value of 0.0024mg-powder/ml. A peptide that inhibited ACE was isolated from E2 by use of different modes of chromatography involving SP-Sephadex C-25 and reversed-phase HPLC. The amino acid sequence and the IC_{50} -value of the isolated peptide were Gly-Ala-Pro-Gly and 408 μ M, respectively.