

## 内因性及び外因性ホルモンペプチドによる生体内での 血圧調節機構の解明に関する研究

松藤, 寛  
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3110936>

---

出版情報：九州大学, 1995, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

内因性及び外因性ホルモンペプチドによる生体内  
での血圧調節機構の解明に関する研究

松 藤 寛

1996

①

内因性及び外因性ホルモンペプチドによる生体内  
での血圧調節機構の解明に関する研究

松 藤 寛

1996

内因性及び外因性ホルモンペプチドによる生体内での  
血圧調節機構の解明に関する研究

## 第1章

## 緒論

1

## 第2章

## アンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害活性の新規測定法

## 第1節 緒言

7

## 第2節 材料及び方法

## 第1項 試薬

9

## 第2項 測定方法

10

## 第3節 結果及び考察

## 第1項 測定条件の最適化

12

## 第2項 実試料に対する適用性

20

## 第4節 小括

22

## 第3章

## 食品由来ペプチドの生理機能解明と機能性食品素材としての適用性（I）

## ～イワシ蛋白質由来の血圧上昇抑制ペプチド～

---

第1節 緒言	24
第2節 材料及び方法	
第1項 材料及び試薬	26
第2項 ACE阻害活性測定法	26
第3項 イワシ蛋白質加水分解物の調製	26
第4項 <i>in vivo</i> 試験	28
第5項 液体クロマトグラフィー	29
第6項 アミノ酸分析並びにアミノ酸配列測定	30
第3節 結果及び考察	
第1項 魚肉加水分解物の <i>in vitro</i> 生理作用	30
第2項 魚肉加水分解物の <i>in vivo</i> 生理効果	37
第3項 ACE阻害ペプチドの単離と構造決定	38
第4節 小括	50
第4章	
食品由来ペプチドの生理機能解明と機能性食品素材としての適用性 (II)	
～アルカリプロテアーゼによる機能性食品素材の創製～	
第1節 緒言	52
第2節 材料及び方法	
第1項 材料及び試薬	54
第2項 ACE阻害活性測定法	55
第3項 イワシ蛋白質加水分解物の調製	55

---

第4項	平均ペプチド鎖長の測定	57
第5項	各種消化系酵素による消化試験	57
第6項	モルモットを用いた抗原性試験	58
第7項	ラットを用いた血圧降下試験	60
第8項	液体クロマトグラフィー	60
第9項	アミノ酸分析並びにアミノ酸配列測定	61
第3節	結果及び考察	
第1項	機能性食品素材の調製	62
第2項	各種消化系酵素に対する消化耐性	74
第3項	モルモットに対する抗原性	76
第4項	ラットにおける血圧降下作用	80
第5項	ACE阻害ペプチドの単離と構造決定	82
第4節	小括	93
第5章		
内因性ホルモンペプチドによる生体内での血圧調節機構の解明		
～レニン・アンジオテンシン系を中心とした血圧調節～		
第1節	緒言	96
第2節	材料及び方法	
第1項	試薬	98
第2項	採血プロトコール	98
第3項	<i>in vivo</i> 試験	99

---

第4項	アンジオテンシン代謝過程の再現化	101
第5項	アンジオテンシナーゼ活性の測定	101
第6項	アンジオテンシン類の定量	102
第3節	結果及び考察	
第1項	アンジオテンシン代謝物の <i>in vitro</i> 生理作用	103
第2項	アンジオテンシン代謝物の <i>in vivo</i> 生理作用	108
第3項	ラット血漿中でのアンジオテンシン類の代謝挙動	111
第4項	ヒト血漿中でのアンジオテンシン類の代謝挙動	119
第5項	ヒト血漿中でのアンジオテンシン代謝過程の実際と その生理的意義	127
第4節	小括	141
第6章		
総括		144
後記		154
参考文献		155

## 第1章 緒 論

総務庁統計局の人口推計によると、わが国の全人口に占める65歳以上の高齢者の割合は1970年では7%であったのに対し、1995年8月1日現在では14%台に達しており、2000年には17%すなわち6人に1人が高齢者であると予測されている<sup>1)</sup>。このような加速度的な高齢化傾向と相まって、悪性腫瘍（ガン）、高血圧、動脈硬化、糖尿病などの成人病疾病率も増加の一途をたどっており、その対策と予防が喫緊の要務となっている<sup>2)</sup>。このような背景から、消費者の食生活形態も従来の大量消費傾向から健康性・安全性を重視した食志向へと大きく変わりつつある<sup>3)</sup>。

周知の通り、食品は生命維持の基本的要素であるが、食品を単なる化学成分の集合体としてではなく、摂取する側の人体に影響を及ぼす活性体-機能体として捉えると、その価値は栄養素及びエネルギー供給源としての一次機能、おいしさ、すなわち食生活に楽しみと豊かさを与える二次機能、そして生体の恒常性（ホメオスタシス）維持に関わる三次機能によって評価される。近年における食品機能に関する研究は、飽食時代、高齢化時代を迎えて二次機能と三次機能に集中しつつある。中でも、食品中の潜在的三次機能因子に関する関心は高く、その機能性物質の検索と生理作用の解明が精力的に行われている<sup>4,7)</sup>。

三次機能を明確化し、賦活化した食品（機能性食品）の設計・開発思想は1984年に始まった文部省の特定研究「食品機能の系統的解析と展開」により提唱<sup>5)</sup>され、1991年に厚生省により“特定保健用食品”との名の

もと新しい医食融合領域が確立された。すでに、低アレルギー化米をはじめとして易消化・吸収，カルシウム吸収促進，腸内環境改善，コレステロール低下などの機能を有した食品35種類が製品化され，血圧上昇抑制作用など他の機能を有した多数の食品が準備段階である<sup>8,9)</sup>。

食品由来の機能性物質の検索とその生理作用の特定化に関する研究も数多くなされ，食物繊維やオリゴ糖，多価不飽和脂肪酸などの11種の物質群について詳細な検討が行われている<sup>7)</sup>。中でも，蛋白質・ペプチドについてはその構造の多様性から，様々な生理学的作用を有しているものと考えられている<sup>10-12)</sup>。病後の回復期はもとより，生体の健全性・恒常性の維持，病原ウイルスやバクテリアに対する抵抗性の獲得には良質かつ十分量の蛋白質が必要であることは周知の事実である。食品として蛋白質を摂取した場合，その大部分は体内消化され，ペプチドやアミノ酸へと分解される。従来，ペプチドは腸管吸収されないと認識されていたため，単に栄養素であるアミノ酸の供給体として考えられていた。しかしながら，生体内に生理機能を有したペプチドが数多く存在すること，食品蛋白質のアミノ酸配列中に生体内の生理活性ペプチドと類似配列が存在すること，ペプチド（ジ及びトリ）でも腸管吸収されること<sup>13-16)</sup>，そして蛋白質・アミノ酸では説明しきれない疾病予防効果などの事例が蓄積されてきたことなどから，ペプチドの機能性が急速に注目されはじめた。すなわち，1979年に食品由来ペプチドの生理機能に関する研究<sup>17)</sup>が行われて以来数多くの研究<sup>4,5,11)</sup>がなされ，オピオイド（鎮痛）作用，カルシウム吸収促進作用，免疫増進作用，血小板凝集作用，アンジオテンシンI変換酵素阻害作用（後述）など数多くの生理活性を有するペプチ

ドが食品蛋白質中に潜在的に数多く存在することが明らかにされつつある。

一方、年々急増する悪性腫瘍（ガン）、高血圧、動脈硬化、糖尿病などの成人病の問題に関してはその発症機序が不明ながらも生活習慣に密接に関連しているため、医薬・医療による解決のみならず、生活環境の改善特に食生活に留意することが求められている。日本人の主要死因の年次別推移によると、1993年におけるこれら成人病の死因のトップはガンであるが、主要疾病受診率の絶対数から判断すると高血圧症が断然多い<sup>2)</sup>。このことは、30歳以上の約半数が高血圧症（WHOの基準によると、収縮期血圧160mmHg以上もしくは拡張期血圧95mmHg以上を高血圧、収縮期血圧159～140mmHgもしくは拡張期血圧94～90mmHgを境界域高血圧、収縮期血圧140mmHg未満かつ拡張期血圧90mmHg未満を正常血圧とする）とする厚生省の報告からも窺える。高血圧症はそれ自体が致命的となる疾患ではないが、脳出血、脳梗塞、動脈硬化、心筋梗塞など脳・心血管系疾患の主要な危険因子であり、その予防・治療法の開発が急務となっている。

高血圧症は神経系、体液系、血管系、腎系などの血圧調節因子の相互関係の破綻によってもたらされるものと認識されている<sup>18)</sup>。現在のところ、二次性高血圧症（病候性高血圧症）として発症原因が特定化されているものは10%程度に過ぎず、約90%は発症原因が不明な一次性高血圧症（本態性高血圧症）として留保されている。故に、その治療は極めて困難であるが、これまでの多くの臨床試験の結果、体液系の昇圧因子であるレニン・アンジオテンシン系の主要酵素であるアンジオテンシンI変

換酵素の阻害薬が有効であることが明らかにされてきた。この阻害薬は幼若年者から老年者を含めた広範な病態に対する降圧効果に加え、心保護作用（心肥大退縮，心不全改善効果，抗不整脈作用），腎保護作用（糖尿病性腎症改善，蛋白質尿減少効果），インスリン抵抗性改善効果を有し，さらに最も重要な“quality of life (QOL)”に大きな影響を与えない医薬品として注目されている<sup>19-21)</sup>。

レニン・アンジオテンシン (R-A) 系に関する研究<sup>22-24)</sup> は，1940年に Braun-Menendezのグループと Pageと Helmenのグループが独立に，レニンが血圧上昇作用を持つ活性ペプチド（前者はハイパーテンシンと，後者はアンジオトニンと命名した）を産生する酵素であることを報告したことにはじまる。その後，約20年の間にアンジオテンシンへの改名，2種類のアンジオテンシン (IとII) の発見<sup>25)</sup>，アンジオテンシンI変換酵素 (ACE) の発見<sup>26)</sup> などによりR-A系の全容がほぼ解明された。すなわち，腎の傍糸球体より分泌されたレニンが肝臓で生合成される分子量52～60kDの糖蛋白質アンジオテンシノーゲン（レニン基質）に作用し，アンジオテンシン (ANG) Iとなり，さらに主として肺に存在するACEによってC末端ジペプチド (His-Leu) が切断され，ANGIIを生成する。このようにして生成したANGIIは循環系によって運ばれ，血管（平滑筋）収縮並びにNa<sup>+</sup>貯留作用を有するアルドステロンの分泌促進を促し，血圧上昇をもたらす<sup>27,28)</sup>。ANGIIの示すこの2つの血圧上昇作用はいかなる生体物質よりも強力とされている。さらに，ANGIIはこの他にも多種の組織・器官で多様な生理作用を通じて血圧上昇をもたらすこと<sup>22,29)</sup> が知られている。また，R-A系の主要酵素であるACE（キニナーゼII）は

降圧系であるカリクレイン・キニン系にも作用して、血管拡張作用を有するブラジキニンを不活性化することによっても血圧を上昇させる。加えて最近、腎臓、心臓、脳（中枢）、血管壁などの種々の臓器自体にもR-A系（組織R-A系）が局在すること<sup>29-32)</sup>が明らかにされ、R-A系に対する関心が一層深まりつつある。

1977年にOndettiら<sup>33)</sup>によって初めて経口投与可能なACE阻害剤カプトプリルが合成されて以来、腎性高血圧や本態性高血圧などのモデル動物の作成成功<sup>34)</sup>と相まって、ACE阻害物質に関する研究<sup>35-38)</sup>は急速に発展した。その後、エナラプリル、リシノプリルなど様々な阻害薬が合成され、現在わが国では8種類のACE阻害薬が高血圧症に対する一次治療薬として用いられている<sup>19,39)</sup>。しかしながら、ACE阻害薬は永続的な投与を必要とするばかりでなく、他方では咳・湿疹・皮膚掻痒感などの副作用<sup>19,38)</sup>をも生ずる。そこで、ACEを阻害する物質を広く生物資源に求め、これを食品として日常的に摂取することで高血圧を抑制あるいは予防しようとする研究がなされはじめた。

1979年にOshimaら<sup>40)</sup>によってゼラチンからACE阻害活性ペプチドが単離されて以来、ACE阻害ペプチドの検索<sup>41-43)</sup>が精力的に行われ、現在では30種以上の食品群から150以上のACE阻害ペプチドが見出されている。一方、ACEが亜鉛を含む金属酵素であることに着目し茶中のカテキン類及びテアフラビン類<sup>44)</sup>、米糠中のフィチン<sup>45)</sup>などのキレート作用を有する天然物についても検討が行われている。しかしながら、これらの研究はいずれも単に天然由来のACE阻害物質の検索のみに終始しており、血圧調節作用を有する食品の登場には至っていない。

本研究は、このような背景に鑑み、高血圧抑制作用を有する機能性食品を分子レベル及び動物実験を通じて設計し、生体内での作用機作に至る基礎的かつ応用的研究を行ったものである。すなわち、1) まず従来行われているACE阻害活性測定法の欠点である煩雑さ、低再現性、低定量性、時間的不経済性を改善し、簡便かつ迅速に、そして正確に測定し得る新規阻害活性測定法を設定した。2) 食品由来の蛋白質に着目し、多獲性であるが故に利用効率の低いイワシを対象として、その潜在的生理機能(ACE阻害能)を明確化した。続いて、ACE活性部位構造の知見に基づいたACE阻害活性ペプチドの新規調製法の設定並びにその一次精製物の*in vivo*での作用確認を行うとともに、3種の新規ACE阻害ペプチドを明らかにした。3) 三次機能のみならず食品としての必須条件である二次機能をも兼備した機能性食品素材を創製した。本素材が官能特性、消化耐性、血圧降下作用、抗原性ともに優れた高品質な機能性食品素材であることを確認した。続いて、本素材中のACE阻害ペプチド13種を同定し、その11種が新規ペプチドであることを明示した。4) ANG類の配列中にACE阻害活性を有するペプチド配列が存在することを明らかにし、従来不活性代謝物であるとされてきたANG代謝物の潜在的生理機能の解明並びにR-A系での自己血圧調節機能を究明した。

これら一連の研究は、血圧上昇抑制作用を有する機能性食品創製の設計並びに生体内での血圧調節機構についての理論的根拠・深化を与えるものと考えられる。

## 第2章

# アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性の新規測定法

### 第1節 緒言

生理活性を検証し、評価するには、公定法的な測定法の存在が必須であり、翻ってその設定の有無が研究の遂行に大きな影響を及ぼす。1956年にSkeggsら<sup>26)</sup>によって見出されたアンジオテンシンI変換酵素(ACE)についても、その血中酵素活性を正確に求め得るならばサルコイドーシス、ゴーシェ病などの肉芽腫性疾患の補助診断及び病勢判断<sup>19,46,47)</sup>が可能となる。このため、ACE活性測定法に関して数多くの提案がなされてきた。現在では、用いる基質(アンジオテンシンIもしくは疑似基質)によって大きく2つの測定法が採用されている。基質にアンジオテンシンIを用いる場合、ACE活性は生成するアンジオテンシンIIの血管収縮作用<sup>48)</sup>により、また標識したアンジオテンシンI([U-<sup>14</sup>C-Leu<sup>10</sup>]-アンジオテンシンI)より生成するHis-[U-<sup>14</sup>C]-Leuの放射活性を測定すること<sup>49)</sup>により評価される。一方、アンジオテンシンIの疑似合成基質であるhippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu)を用いたACE活性の測定では、His-Leuもしくは馬尿酸(hippuric acid)の生成量の検出が基本となる。His-Leuの検出に関しては、*o*-フタルアルデヒド、フルオレスカミンなどの蛍光試薬で

誘導体化し、蛍光検出器で測定する方法<sup>50,51)</sup>があり、馬尿酸に関しては溶媒抽出後、紫外分光検出器 (228nm) で測定する方法<sup>52,53)</sup>がある。

医薬及び食品科学分野においては、高血圧予防とその治療の観点から、ACEを特異的に阻害し得る合成<sup>33,35-37)</sup>及び天然<sup>54,55)</sup>由来物質の検索が数多く行われている。しかしながら、ACE活性測定を基本とした物質の阻害性評価法は未だ統一されておらず、前述のACE活性測定法に準拠して阻害活性測定法が設定されているのが現状である。ACE活性測定法を阻害活性測定法に転用する場合、数々の克服すべき難点が生じる。特に、食品成分のACE阻害活性を測定する場合、食品が血清・血漿よりも多成分混合系であることから、夾雑物質の影響を常に考慮に入れておく必要がある。アンジオテンシンIを基質とする場合、その反応は生体内での反応を反映していることから、得られたACE阻害性は最も信頼性のおけるものであるが、デカペプチドからなるアンジオテンシンIを合成することは困難であること、また市販品も高価であることから、*in vitro*におけるルーチン評価法としては自ずと制限がある。また、疑似基質を用いてHis-Leuを測定する蛍光法は、酵素反応停止後の操作が極めて簡便でありかつ高感度な測定法であるが、高感度故に検体溶液中のアミノ基含有夾雑物質の影響を受けやすく正確性に劣ること、酵素濃度及び基質濃度を制限しなければならないこと、また装置の汎用性に欠けるなどの問題を有している。一方、馬尿酸を測定する方法は、反応により生じた馬尿酸のみを酢酸エチルで抽出するため、His-Leuを測定するよりも特異的であり、また特別な装置を必要としないことから、現在最も広く用いられており、

その変法<sup>53,56,57)</sup>も数多く報告されている。しかしながら、本法は酵素反応停止後遠心分離、抽出、乾固などの操作上の煩雑さ、並びに馬尿酸の酢酸エチル相への移行率の低さから再現性及び定量性に劣るという欠点を有している。それ故、簡便かつ迅速な、そして定量性に優れたACE阻害活性測定法の確立が求められている。

このような背景に鑑み、本章においてHis-Leuを測定対象物として、トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いた新規ACE阻害活性測定法の設定を試みた。

## 第2節 材料及び方法

### 第1項 試薬

2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)及びウサギ肺由来ACEはSigma社より、合成擬似基質であるHip-His-Leu及びHis-Leuはペプチド研究所より購入した。また、ACE阻害活性測定用試料としては、合成ACE阻害薬であるカプトプリル(Sigma社製)及び天然由来のACE阻害物質であるイワシ筋肉のペプシン分解物(第3章, 第2節, 第3項参照)を用いた。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま用いた。本実験で使用した溶液組成は以下の通りである。

ACE溶液; ACE/borate buffer (0.05M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-0.2M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.3)

基質溶液; Hip-His-Leu/borate buffer-1M NaCl

Kolthoff buffer ; 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1.0M NaOH

TNBS溶液 ; TNBS / 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

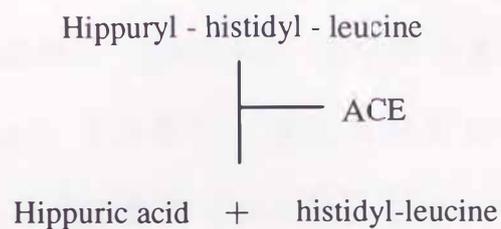
亜硫酸溶液 ; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> / 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## 第2項 測定方法

TNBS発色に基づく ACE 阻害活性測定法の概要をFig.2-1に示した。すなわち、検体溶液 (25 $\mu$ l) に対して25mU/ml ACE溶液, 12.5mM基質溶液 (各々50 $\mu$ lずつ) を添加し, 37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。0.5M HCl (125 $\mu$ l) による反応停止後, Kolthoff buffer (250 $\mu$ l) を添加し, 反応液のpHを目的とするpHに調整した。続いて, TNBS溶液 (25 $\mu$ l), 亜硫酸溶液 (4500 $\mu$ l) を順次添加し, 呈色反応を完結させた。ACE阻害活性の評価は, 被検溶液の416nmでの吸光度変化により行った (分光光度計: 島津製作所製, UV-1200)。すなわち, 検体溶液の吸光度を $A_s$ , 検体溶液の代わりに水を加えたときの吸光度を $A_c$ , 水及び検体溶液にあらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光度をそれぞれ $AB_1$ ,  $AB_2$ としてACE阻害率を算出した:

$$\text{阻害率 (\%)} = \{ (A_c - AB_1) - (A_s - AB_2) \} / (A_c - AB_1) \times 100 \text{ ---- (1)}$$

なお, 阻害率が50%を示したときの検体濃度をIC<sub>50</sub>値として定義し, これをACE阻害活性の尺度とした。

Lieberman' s method

The stopped solution  
 |  
 --- Ethyl acetate  
 |  
 Mixed for 15sec  
 |  
 Centrifuged for 10min  
 |  
 Fractionated from ethyl acetate layer  
 |  
 Evaporated under reduced pressure  
 for 20min  
 |  
 Redissolved in 1.0M NaCl  
 |  
 Mixed for 15sec  
 |  
 Measured at 228nm

Present method

The stopped solution  
 |  
 Adjusted to pH 9.1 by Kolthoff buffer  
 (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1.0M NaOH)  
 |  
 --- 0.1M TNBS in 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 |  
 Incubated for 20min at 37°C  
 |  
 --- 4mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 |  
 Measured at 416nm

**Fig.2-1 Comparison of present method with conventional one for determining ACE inhibitory activity**

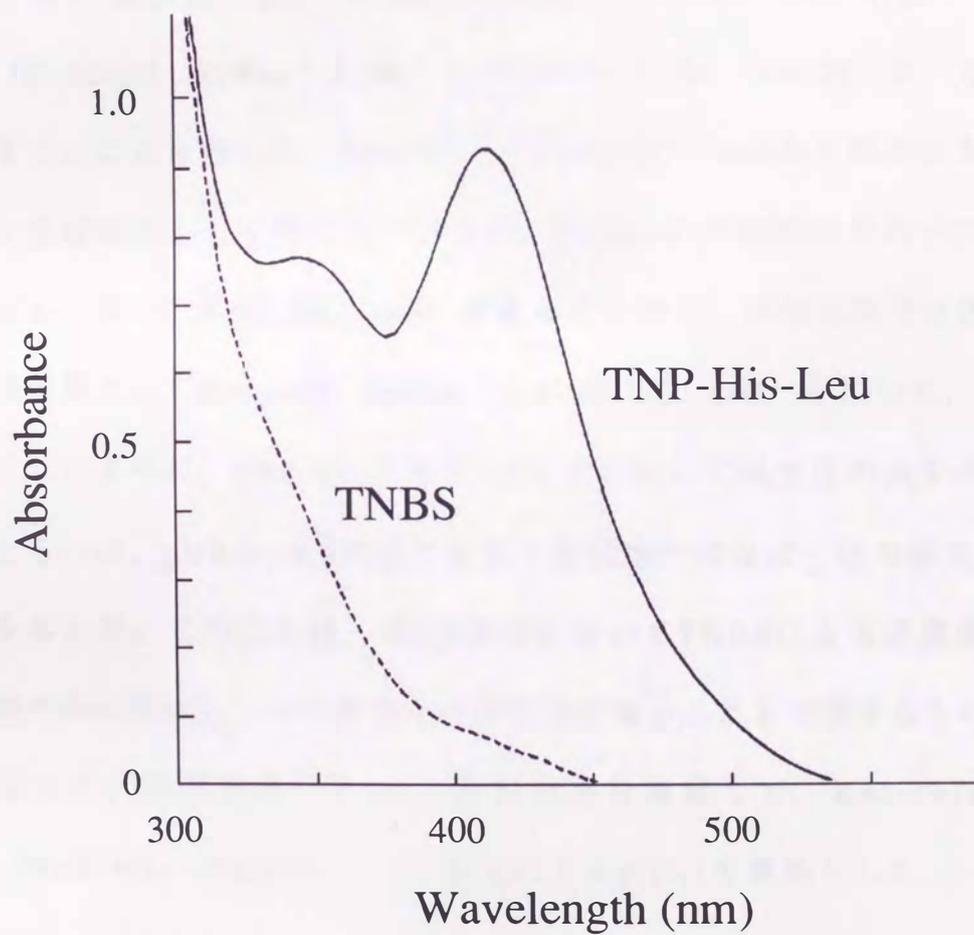
一方、馬尿酸抽出法はLiebermanの変法<sup>56)</sup>に準じて測定した。すなわち、上記と同様に酵素反応を停止後(但し必要量は上記の2倍;検体溶液50 $\mu$ l, ACE溶液100 $\mu$ l, 基質溶液100 $\mu$ l, HCl 250 $\mu$ l), 酢酸エチル(1500 $\mu$ l)を添加し, 2000rpm, 10分間の遠心分離を行った。次に酢酸エチル(500 $\mu$ l)を分取し, 遠心エバポレーター(EYELA, CVE-100D)によって減圧乾固(20分間)を行った。室温で5分間放置後, 1M NaCl(3000 $\mu$ l)に再溶解させ, 15秒間攪拌ののち, 228nmでの吸光度変化によりACE阻害活性を評価した。

### 第3節 結果及び考察

#### 第1項 測定条件の最適化

(1) 検出波長の検討 TNBSは第一アミノ基を有する化合物と結合してTNP誘導体となり, 亜硫酸イオンと錯体を形成することにより発色<sup>58,59)</sup>する。そこでまず, 本法における発色対象物であるHis-Leuの誘導体化を行い, 本誘導体(TNP-His-Leu)の吸収波長並びに共存化合物の当該波長領域での吸収性を検討した。Fig.2-2に示したように, TNP-His-Leu誘導体はHazraら<sup>60)</sup>の報告したTNP-amino acid並びにNeelら<sup>61)</sup>のTNP-Gly-Glyと同様416nmに最大の吸収を与えた。本波長域でのTNBS自身の吸収はほとんど認められなかった。また, 本測定系における共存化合物, すなわちACE(20mU/ml), Hip-His-Leu(3mM), hippuric

acid (3 mM) (以上全て終濃度以上) の416nmでの吸光度はそれぞれ0.020, 0.003, 0.004であり, His-Leuのみの選択的検出が可能であることが示された。



**Fig. 2-2 Absorbance spectra of TNBS and TNP-His-Leu read against borate buffer**

(2) pHの影響      TNBSの結合速度並びに生成したTNP誘導体の安定性はその反応系のpHに著しく依存し、pHが高いほどその速度は大きくなるが、強アルカリ性溶液ではTNBSさらにはその誘導体の分解を生じ、顕著な吸光度の低下を招くことが報告<sup>58)</sup>されている。そこで、TNP-His-Leuの最適発色pHの検討を行った。なお、pHの調整はHClによる反応停止液が強酸性(pH 0.66)であることから、強アルカリ性緩衝液(Kolthoff buffer; 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1.0M NaOH)を一定量添加することにより行った。Neelら<sup>61)</sup>はNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOHの混合液を強アルカリ性緩衝液として使用しているが、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>の溶解性が低いこと並びにばらつき(C.V.=2.2%, n=3)があることから、本測定系では強アルカリ緩衝液としてKolthoff buffer (C.V.=0.1%, n=3)を用いた。Fig.2-3で示したように、pH8.0以下及び9.5以上において吸光度の減少が認められたものの、pH8.0~9.5の弱アルカリ性領域ではほぼ一定の吸光度(0.9)を与えた。このことは、本pH領域においてTNBSによる誘導体化反応が速やかに進行し、かつ誘導体の安定性が高いことを示唆するものである。従って、本測定系でのpHは調整誤差を考慮して、Kolthoff buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH=1:2)添加によるpH9.1を最適とした。

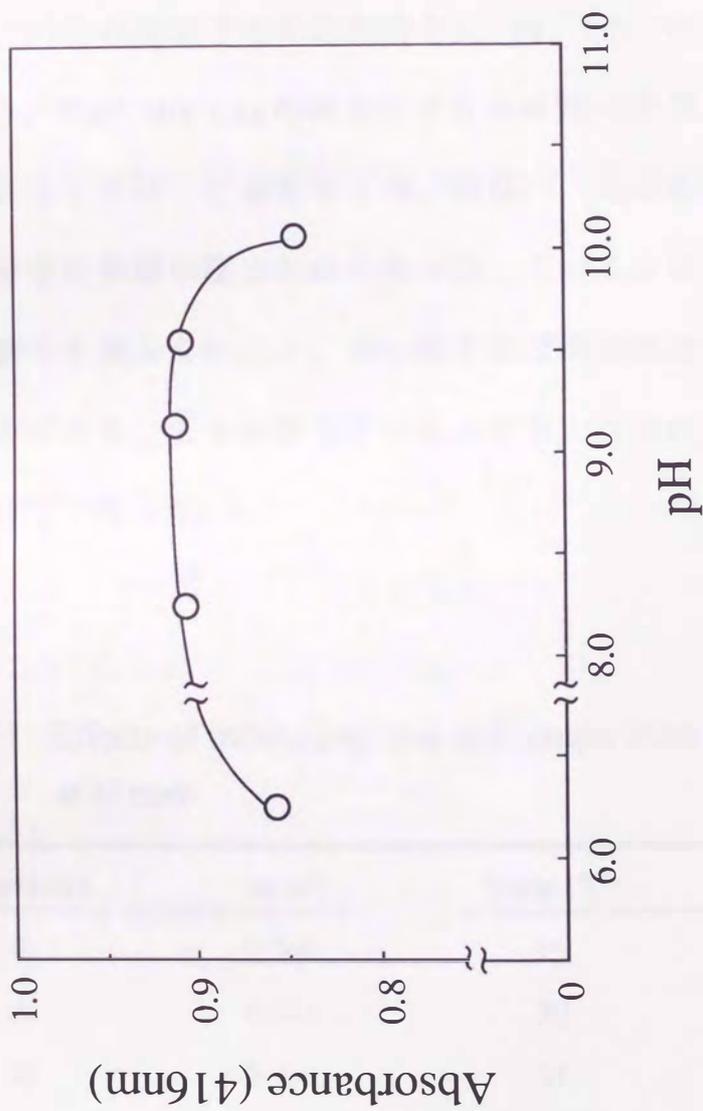


Fig.2-3 Effect of pH on the coloration of 1.0mM His-Leu

(3) TNP誘導体化時間及び温度の影響 TNP-His-Leu誘導体形成に及ぼす反応時間及び反応温度について検討を加えた。Table 2-1 は各種反応時間及び反応温度での1.0mM His-Leuの発色量を示したものである。まず、37℃の定温下で反応時間を0, 10, 20, 30, 60分として検討したところ、TNP-His-Leuの吸光度は反応時間10分後、反応時間に影響されることなくほぼ一定値を与えた。同様に、反応温度についても発色に対して有意な影響は認められなかった。このことは、本法が測定条件設定の厳密さを問わないこと、言い換えれば操作誤差の少ない再現性に優れたものであることを示唆している。なお、以後の検討は反応時間20分、温度37℃で行った。

**Table 2-1** Effects of incubation time and temperature on the coloration at 416nm

Time(min)	A416 <sup>1)</sup>	Temp.(°C)	A416 <sup>2)</sup>
0	0.760	25	0.908
10	0.915	30	0.905
20	0.918	37	0.918
30	0.919	50	0.908
60	0.920		

1) The measurement was performed at 37°C.

2) The measurement was performed for 20min.

(4) TNBS濃度並びに亜硫酸濃度の影響      TNBSは第一アミノ基によるスルホン酸基との求核置換によりTNP誘導体となり、放出された亜硫酸が発色団として作用し、発色する。しかしながら、その発色はTNBS一分子から放出される亜硫酸一分子では不完全であり、さらに亜硫酸の添加が必要であることが報告<sup>59)</sup>されている。そこで、TNP-His-Leuの完全な発色を目的としてTNBS濃度並びに亜硫酸濃度の検討を行った。TNBS濃度を0.005, 0.01, 0.05, 0.1Mとし1.0mM His-Leuの発色の程度を比較したところ (Fig.2-4), 0.05M以上の濃度で吸光度はほぼ一定となったことから、0.1M TNBSを最適濃度とした。また、亜硫酸濃度については、無添加時すなわちTNBSより放出される亜硫酸のみによる発色が0.4であったのに対して、さらに亜硫酸を加えることによりその発色は2mM以上の添加濃度で約2倍となった。なお、過剰濃度の添加はブランク値の上昇を惹くことが報告<sup>60)</sup>されているが、検討した濃度範囲内ではその現象は認められなかった。3~5mMの範囲でほぼ一定の最大発色を与えたことから、本測定系での亜硫酸濃度は4mMとした。

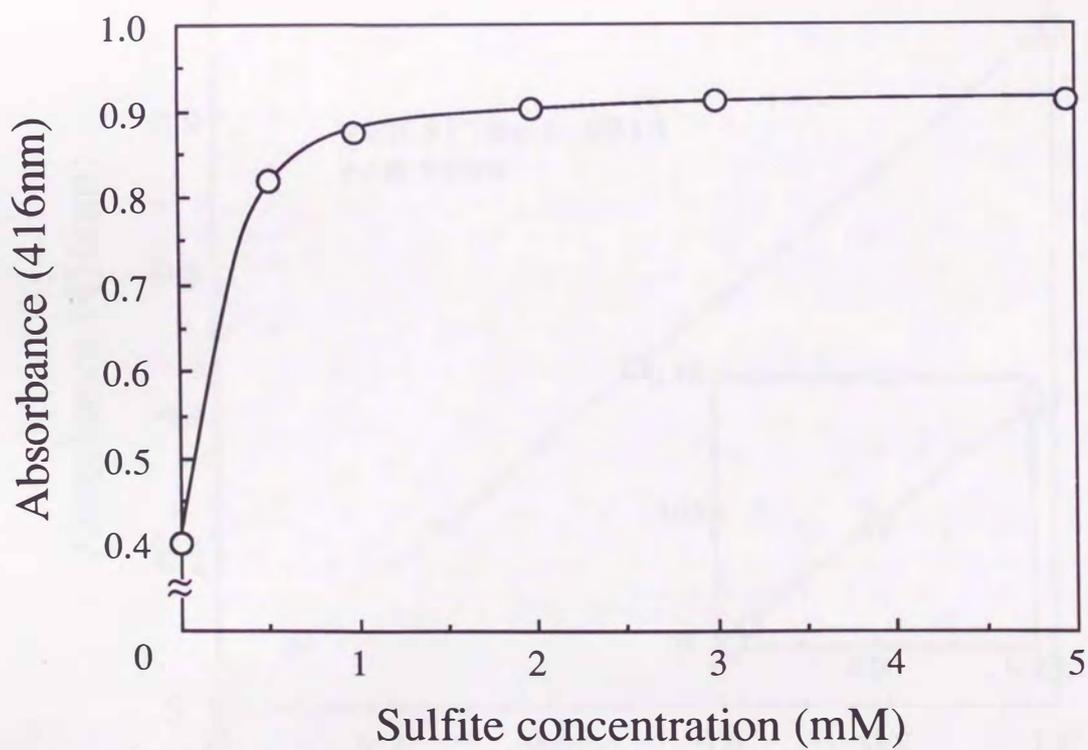
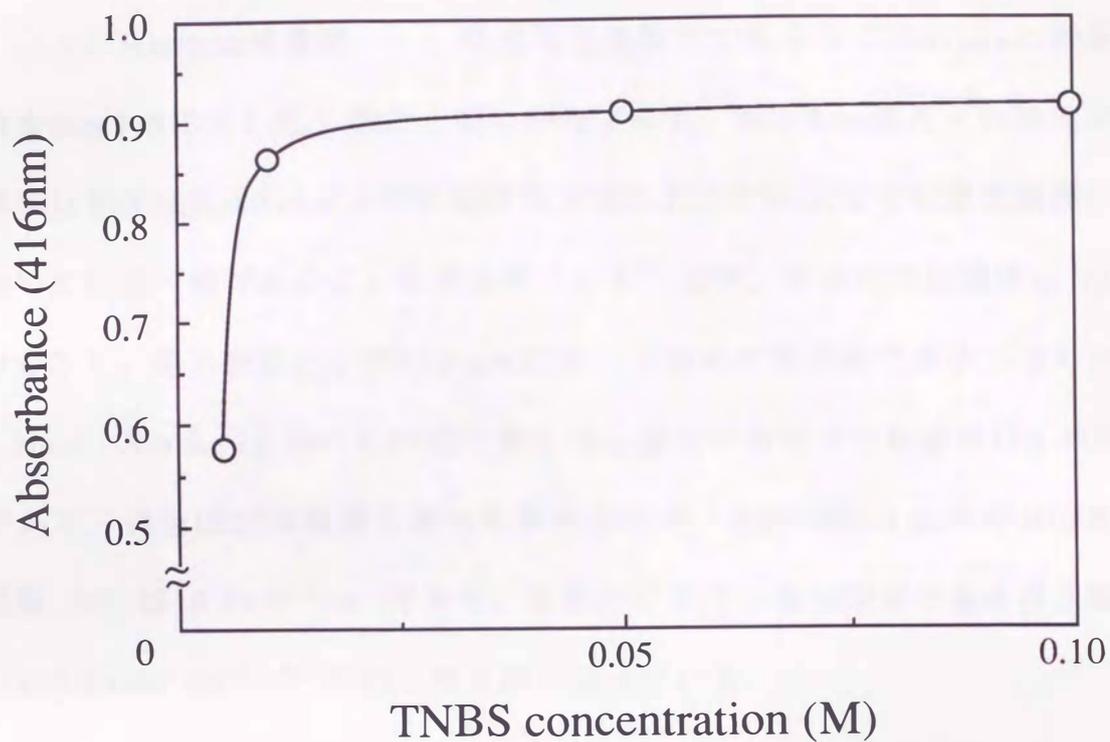


Fig.2-4 Effects of TNBS and sulfite concentrations on the coloration of 1.0mM His-Leu

(5) His-Leu検量線 最適発色条件下で得られたHis-Leuの検量線をFig.2-5に示した。図から明らかなように、His-Leu濃度と吸光度の間には相関係数0.999以上の直線関係が得られ、1.0mMまでの濃度範囲において定量可能であることが示されている。また、本法の検出限界は5  $\mu$ Mであり、馬尿酸抽出法での30  $\mu$ Mに比べて極めて高感度である。さらに1.0mM His-Leuを用いた10回の繰り返し測定における変動係数は0.34%であり、退色は24時間後も認められなかった。TNP-His-Leuのモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) は18.1  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり、従来法における被検物質である馬尿酸 ( $\epsilon=9.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )<sup>52)</sup> の約2倍と高くなっている。

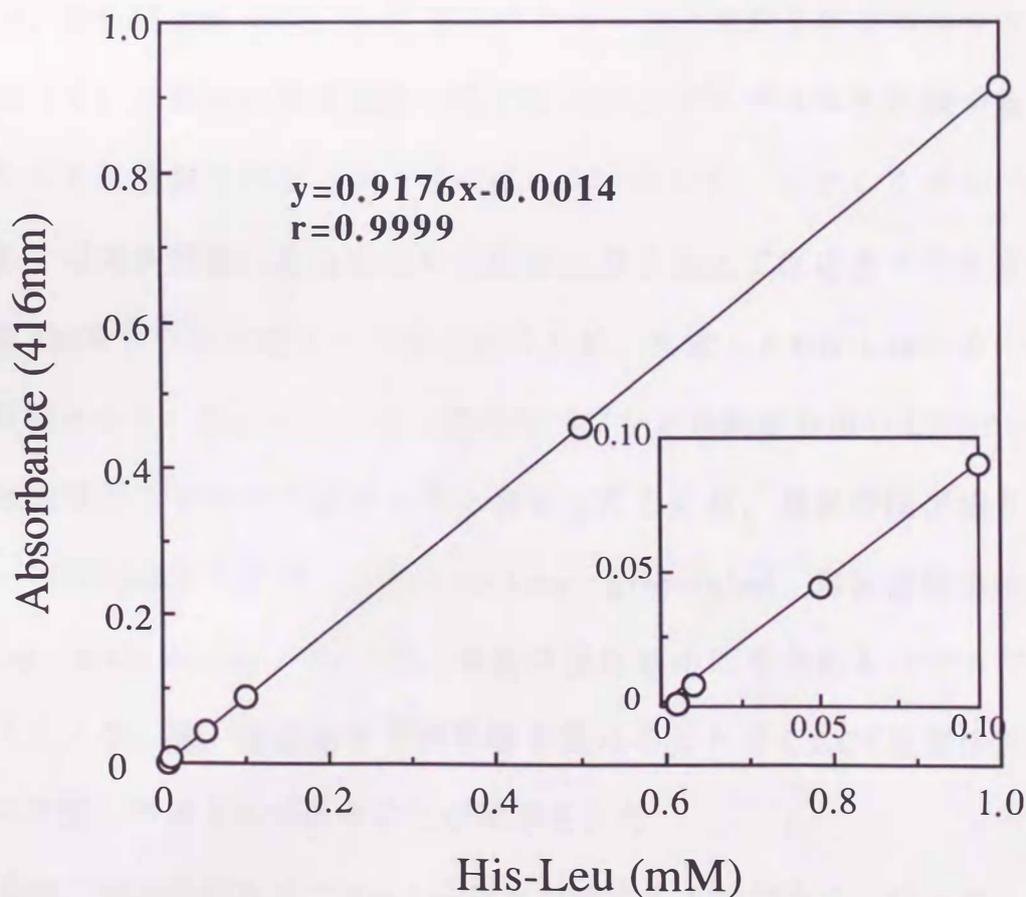


Fig.2-5 Calibration curve for His-Leu with TNBS at 416nm

## 第2項 実試料に対する適用性

本測定法を用いて、ACE阻害薬であるカプトプリル並びにイワシ筋肉のペプシン分解物のACE阻害活性(IC<sub>50</sub>値)を測定した。Table 2-2 に示したように、本法並びに従来法により得られたカプトプリルのIC<sub>50</sub>値は、それぞれ5.25ng/ml, 5.24ng/mlと良好な一致が認められた。一方、IC<sub>50</sub>値算出直線の相関係数を比較したところ、本法は0.999と従来法(0.979)以上であった。また各々の3回の繰り返し測定における変動係数は、それぞれ2.06%, 4.57%であり、本法が繰り返し精度の点で極めて優れていることが明らかとなった。粗精製物質のACE阻害活性測定においては、発色対象物(His-Leu)以外のアミノ基含有化合物が存在するため、式(1)における検体溶液の吸光度 $A_s$ はカプトプリルと比較するとかなり大きく検知された(データは示していない)。しかしながら、本測定系では検体溶液にあらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光度 $A_{B2}$ をブランク値として差し引くため、生成したHis-Leuのみの検出が可能となる。そこで、イワシ筋肉のペプシン分解物を用いてTNBS発色性物質存在下でのACE阻害活性を検討したところ、馬尿酸抽出法とはほぼ同一のIC<sub>50</sub>値を示した(本法; 0.61mg protein/ml, 馬尿酸抽出法; 0.62mg protein/ml)。従って、本法は反応液中に含まれるペプチド、遊離アミノ酸、糖、有機酸などの影響を受けることなくACE阻害活性を正確に評価し得る方法であることが明示された。

本法は、蛍光法に準じてHis-Leu量を測定するものである。従って、その操作は反応停止液を目的pHに調整し、蛍光試薬を加える蛍光法と同様、

TNBSを加えるだけと極めて簡便であり、反応停止後約30分で阻害率の算出が可能であった（馬尿酸抽出法；1～1.5時間）。また、蛍光法で問題となる検体溶液の夾雑物質の影響も酵素反応系での必要量を1/2に縮小することにより解決可能となった。各種食品蛋白質中には数多くのACE阻害ペプチドが顕在もしくは潜在的に存在していることが多数の研究者により明らかにされつつある<sup>42,43,62</sup>。しかしながら、ACE阻害活性測定のための基準及び公定法が設定されておらず、研究者の選択に委ねられているのが現状である。従って、対象物質が同じであっても、測定法により阻害活性が異なることも見受けられ、このことが*in vitro*での活性評価に対して大きな障害となっている。それに対して、本法は定量性、再現性（C.V.=0.34%，*n*=10）に優れ、迅速かつ簡便にACE阻害活性を評価し得る方法であることから、今後食品工業分野をはじめとして多くの利用が期待される。

**Table 2-2** The IC<sub>50</sub> values of Captopril and peptic hydrolyzate from sardine muscle measured by the new and conventional methods

	IC <sub>50</sub> value	
	Captopril (ng/ml)	Peptic hydrolyzate (mg protein/ml)
New method	5.25 ( <i>r</i> =0.999)	0.61
Conventional method	5.24 ( <i>r</i> =0.979)	0.62

#### 第4節 小括

ACE阻害性を有する機能性食品の創製もしくはそのドラッグデザインには、公定法的な阻害活性測定法の存在が不可欠である。現在、ACE阻害活性測定法として馬尿酸抽出法が最も一般的に適用されているが、操作性、再現性及び定量性に劣るという欠点を有している。そこで、従来法に代わるACE阻害活性の新規測定法の設定を試み、以下の結果を得た。

1) 疑似基質であるHip-His-Leuより生成するHis-Leuを被検物質とし、TNBSとの発色に基づくACE阻害活性測定法を新たに確立した。TNP-His-Leu発色の最適化を図り、以下の条件で最大発色が得られた。

pH ; 9.1, 誘導体化時間 ; 20分, 反応温度 ; 37℃,

TNBS濃度 ; 0.1M, 亜硫酸濃度 ; 4 mM

上記条件で得られたHis-Leuの検量線は、1.0mMまでの濃度範囲において相関係数0.999以上の直線であり、5 μMまで検出可能であった（従来法 ; 30μM）。また、1.0mM His-Leuを用いた10回の繰り返し測定における変動係数は0.34%であった。

2) 従来法と比べて、酵素反応停止後の操作が極めて簡便であり、約30分で阻害率の算出が可能であった（従来法 ; 1~1.5時間）。

3) カプトプリルのIC<sub>50</sub>値算出直線の相関係数を従来法と比較したところ、本法は0.999と従来法（0.979）以上であり、より正確にACE阻害活性を評価し得ることが判明した。また各々の3回の繰り返し測定における変動係数は2.06%と（従来法 ; 4.57%）極めて再現性に優れているこ

とが明らかとなった。

4) 本法は反応液中に含まれるペプチド, 遊離アミノ酸などのアミノ基含有化合物及び糖, 有機酸などの夾雑物質の影響を受けることなく ACE 阻害活性を正確に評価し得る方法であることが判明した。

## 第3章

# 食品由来ペプチドの生理機能解明と機能性食品素材としての適用性 (I)

## ～イワシ蛋白質由来の血圧上昇抑制ペプチド～

### 第1節 緒言

医食同源という言葉が示すとおり、従来より食品は健康の維持、増進に密接に関わり合っているとされてきた。近年ではこの生理作用を食品の三次機能として分類化し、食品中に存在する生理活性物質、特に経口摂取後腸管内での消化分解過程で新たに生成する機能性因子を明確化—有効利用することにより、健全性維持に役立てようとする研究が活発に行われている<sup>4,5,11)</sup>。

食品蛋白質由来の機能性物質（ペプチド）についての研究は、1979年にBrantlら<sup>17)</sup>によって初めてなされ、カゼインの酵素分解物（カゼインペプトン）中にオピオイド（鎮痛）作用を有するペプチド（Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly及びTyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile）が存在することが初めて明らかにされた。その後、食品蛋白質中にはカルシウム吸収促進、免疫増進、血小板凝集阻害、アンジオテンシンI変換酵素（ACE）阻害などの生理活性を有するペプチドが潜在的に多数存在することが明らかにされてきた<sup>10-12)</sup>。

この中で、1979年にOshimaら<sup>40)</sup>によって食品（ゼラチンのコラゲナーゼ分解物）中にACEを阻害する物質（ペプチド）が存在することが明らかにされて以来、高血圧予防並びに治療の観点から、ACE阻害ペプチドを各種生物資源の蛋白質に求め、これを機能性食品として有効利用しようとする基礎的研究が精力的に行われている。すでに、カゼイン<sup>41)</sup>、大豆<sup>11,63)</sup>、トウモロコシ<sup>64)</sup>、イワシ<sup>42,65)</sup>、ツナ<sup>43)</sup>、オキアミ<sup>11)</sup>など種々の食品蛋白質のプロテアーゼ分解物中に様々なACE阻害ペプチドが存在することが明らかにされてきた。現在では、30種以上の食品群から150以上のACE阻害ペプチドが見出されている。しかしながら、これらの研究はいずれも単にACE阻害ペプチドの検索のみに終始し、機能性食品の設計・構築を目的とした研究は皆無に等しい。

一方、物質検索と同時に阻害機構についての分子化学的研究<sup>66-68)</sup>も行われ、ACE阻害にはC末端でのトリプトファン、チロシン、プロリン、フェニルアラニンの存在、及びN末端でのバリン、イソロイシンの存在が重要であることが明らかにされている。このことは、活性発現に対して芳香族及び疎水性アミノ酸残基の寄与が極めて大きいことを示唆するものである。

そこで、本章では機能性食品の分子設計と構築を目的として、古くから食卓に馴染みが深いにもかかわらず利用効率が20%台と極端に低いイワシを原料として、芳香族及び疎水性アミノ酸残基に富む高活性ACE阻害ペプチドの調製法の設定と機能性食品素材としての適用性を検討した。

## 第2節 材料及び方法

### 第1項 材料及び試薬

イワシは新鮮なマイワシ (*Sardinops melanosticta*) を用いた (仙味エキス (株) より供試)。ウサギ肺由来ACE, 合成擬似基質Hip-His-Leuは第2章, 第2節, 第1項と同様である。ペプシン (豚粘膜由来), キモトリプシン (牛膵臓由来), トリプシン (牛膵臓由来) はBoehringer Mannheim社より, デナチームAP (*Aspergillus oryzae* 由来) はナガセ生化学工業より購入した。カラム用充填剤であるODS/YMC gel ODS AQ120-S50はワイエムシー社より, SP-Sephadex C-25はPharmacia社より, トヨパールHW-40は東ソー社より購入した。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま用いた。

### 第2項 ACE阻害活性測定法

ACE阻害活性の測定は第2章, 第2節, 第2項と同様に行い, ACEを50%阻害するときの検体の濃度をIC<sub>50</sub>値として活性の尺度とした。また, 試料中の蛋白質量はケルダール法により得られた窒素量に係数6.25を乗じて求めた。

### 第3項 イワシ蛋白質加水分解物の調製

イワシ蛋白質加水分解物の調製法をFig.3-1にまとめて示した。すなわ

ち、イワシ筋肉50gに対して500ml（魚肉の10倍量）の脱イオン水を加え、

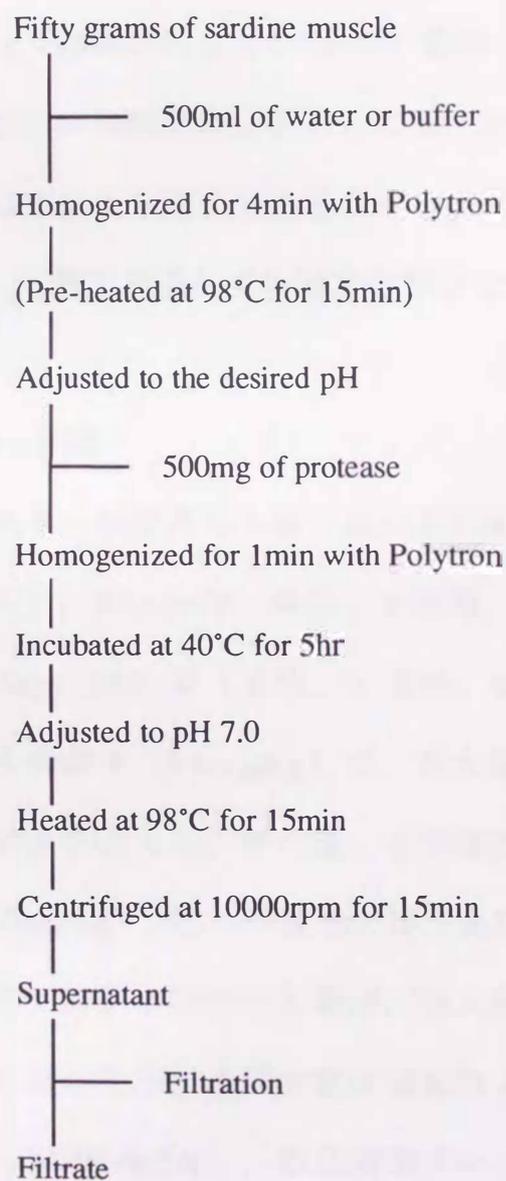


Fig. 3-1 Preparation of enzymatic hydrolyzate of sardine muscle

ポリトロン (Kinematica mbH, Switzerland: 出力 8) で 4 分間ホモジナイズした。予備加熱処理を施す場合は、次の pH 調整を行う前にこのホモジネートを 98°C で 15 分間インキュベートした。pH 調整 (ペプシン; pH 3, キモトリプシン及びトリプシン; pH 8, デナチーム AP; pH 7) 後、各酵素を 500mg (魚肉に対して 1.0wt%) 添加し、再度 1 分間ホモジナイズした。40°C で 5 時間酵素反応を行った後、pH を 7 に調整し、98°C で 15 分間加熱することにより酵素を失活させた。その後 10000rpm, 15 分間遠心分離を行い、上清をろ過して各酵素分解物を得た。

#### 第 4 項 *in vivo* 試験

Engelら<sup>70)</sup>の方法を一部改変して *in vivo* での ACE 阻害活性を測定した。実験動物としては、Wistar 系 (雄性, 6 週齢, 体重 182g) ラット並びに Sprague Dawley (SD) 系 (雄性, 11 週齢, 体重 416g) ラットを用いた。ネンブタール麻酔下 (60mg/kg) で、左大腿静脈より生理食塩水に溶解させた検体溶液を注入し、その後、右大腿静脈より注入したアンジオテンシン I (300ng/kg) の II への変換に伴う血圧上昇に対する検体の抑制効果を検討した。検体溶液の注入量は、注入後の洗浄に用いた生理食塩水とあわせて 0.45ml とし、血圧測定は頸動脈より圧トランスデューサー (日本光電製; MPU-0.5A), 歪圧力用アンプ (日本光電製; AP-621-G) を介して観血的に直接測定した。

## 第5項 液体クロマトグラフィー

(1) カラムクロマトグラフィー 酵素分解液500mlをODS樹脂(YMC gel ODS-AQ120-S50)を充填したカラム(3.5cm×14cm)に通し, 脱イオン水500mlで洗浄した(F-1画分とする. 以下同様). 次に, 10, 25, 50, 99.5%のエタノール各500mlのステップワイズグラジエントにより溶出した(各々F-2~F-5画分). 高活性画分を濃縮(10ml)後, SP-Sephadex C-25(H<sup>+</sup>型)カラム(1.5cm×33cm)に通し, ギ酸アンモニウムのステップワイズグラジエント(脱イオン水; 250ml, 0.1Mギ酸アンモニウム(pH 7.0); 300ml, 0.5Mギ酸アンモニウム(pH 7.0); 330ml)により溶出し, 主要な活性画分を集め, 1mlまで濃縮した. 次に, 各々を30%メタノールを溶離液としたトヨパールHW-40カラム(1.5cm×100cm)により脱塩し, 活性画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した.

(2) 高速液体クロマトグラフィー 高速液体クロマトグラフ: 島津LC-6A, カラム: 東ソー製TSK gel ODS-120T(0.78cm×30cm)及び東ソー製TSK gel G2500PWXL(0.78cm×30cm), 検出器: 島津紫外可視検出器SPD-6AV, 溶出: 14-24%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(55分)及び45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸.

#### 第6項 アミノ酸分析並びにアミノ酸配列測定

アミノ酸分析は常法により6M塩酸で加水分解(110℃, 24時間)後, 日立社製L8500型アミノ酸分析計を用いて行った。また, アミノ酸配列はABI (Applied Biosystems Inc.) 社製477A型プロテインシーケンサーを用いて決定した。単離した各ペプチドの収量はアミノ酸分析の結果をもとに算出した。ACE阻害ペプチドの合成は, American Peptide Company社製固相ペプチド合成装置を用いて行い, Vydac C18 5 μカラム(10-40%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(20分))により純度検定を行った。

### 第3節 結果及び考察

#### 第1項 魚肉加水分解物の *in vitro* 生理作用

(1) 魚肉加水分解物 イワシ蛋白質の血圧上昇抑制作用を検証し, 機能性食品素材としての適用性を詳細に検討した。まず, 機能性成分の顕在化を図るため, 各種酵素剤を用いてイワシ筋肉の加水分解を試みた。Table 3-1に酵素処理により得られた分解物のACE阻害活性並びに活性発現に及ぼす予備加熱処理の効果について検討した結果を示した。分解物のACE阻害活性は使用した酵素の種類により大きく異なり, 検討した4種の酵素の中では, ペプチド収率は若干低いながらもペプシンが

最も高い活性を与えた ( $IC_{50}=0.86\text{mg protein/ml}$ )。なお、酵素の基質特異性によってACE阻害活性が異なったことは、ACE阻害に関与する成分がイワシ蛋白質由来のペプチドであることを強く示唆しており、生成するペプチド構造の違いがACEの阻害性に大きく影響を及ぼしているものと判断された。また、ペプシンをはじめとする一連のプロテアーゼ処理によってACE阻害性が発現したことは、イワシそのものの摂取が生体の恒常性維持に有効であること、また機能性食品素材としてさらに効率的な利用が図れることを示唆するものであった。なお、ペプシン分解物が最も高い活性を示したことは、本酵素のチロシン、フェニルアラニンのN及びC末端側を優先して切断する基質特異性に基づく疎水性ペプチド群の生成によるものであると考えられた。

疎水性ペプチドの効率的な産生を目的とした予備加熱の効果について検討を行ったところ、Table 3-1 に示したように、すべての酵素分解物においてACE阻害活性の増大が認められ、中でもキモトリプシンにおいて約2倍の活性増大となった。これは、加熱処理によって魚肉蛋白質の立体構造が崩壊し、蛋白質内部の切断可能な疎水性領域が露出したためであると考えられた。しかしながら、加熱処理は熱変性による蛋白質の凝固、沈殿をも引き起こし、酵素作用を受ける基質の見かけの濃度低下を招くため、結果的に蛋白質としての回収率は未処理のものと比較して大きく減少した(データは示していない)。そこで、予備加熱処理後に再びホモジナイズを行い、凝固蛋白質を微細化したところ、Table 3-1 に示

したように回収率は未処理のものにほぼ匹敵するまでに上昇した。これまで種々の生物資源由来のACE阻害ペプチドの調製法についていくつか報告<sup>42,70)</sup>がなされているが、加熱処理を施した変性蛋白質にプロテアーゼを作用させた報告例は見当たらない。従って、本章で行った予備加熱処理操作は高いACE阻害活性を有するペプチドの簡便な調製方法として今後多くの応用が期待される。

**Table 3-1** ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolyzate from sardine muscle

Enzyme	pH	Pre-heated	Yield(g)	IC50(mg protein/ml)
Pepsin	3	○	1.45	0.62
		×	1.46	0.86
Chymotrypsin	8	○	1.95	1.28
		×	1.95	2.41
Trypsin	8	○	1.79	2.03
		×	2.04	3.24
Denazyme AP	7	○	1.23	1.26
		×	1.38	1.59

次に、予備加熱処理を施したペプシン分解物を用いて、機能性食品素材としての有効利用を図る上での詳細について検討を加えた。Fig.3-2は、活性発現に及ぼす加水分解時間の影響について検討を行ったものである。分解物のペプチド収率は加水分解時間の増大とともに徐々に増加したのに対して、ACE阻害活性は反応初期での増大は認められたものの、3時間以降はほぼ一定値を示した。食品素材としてのペプチド製造の見地からは加水分解時間を可能な限り延長することが望ましいが、長時間の反応は活性ペプチドの相対濃度の低減を招くことになる。そこで、ペプチドの収量及び活性の両面を考慮し、加水分解時間5時間を最適とした。

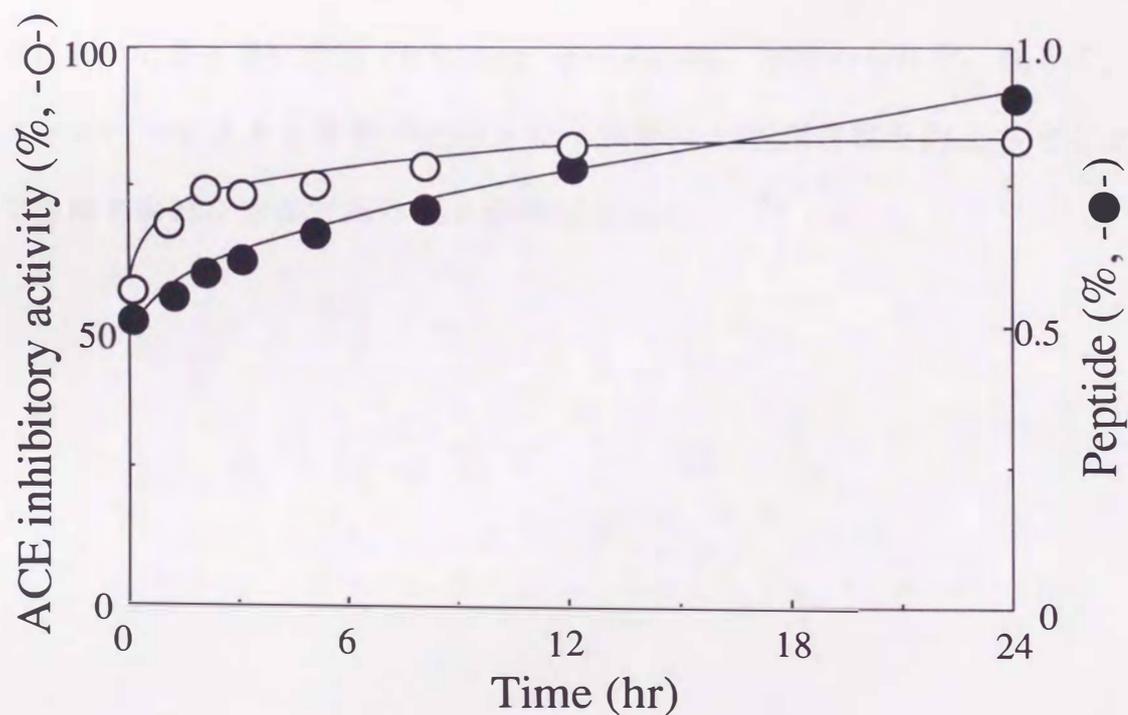
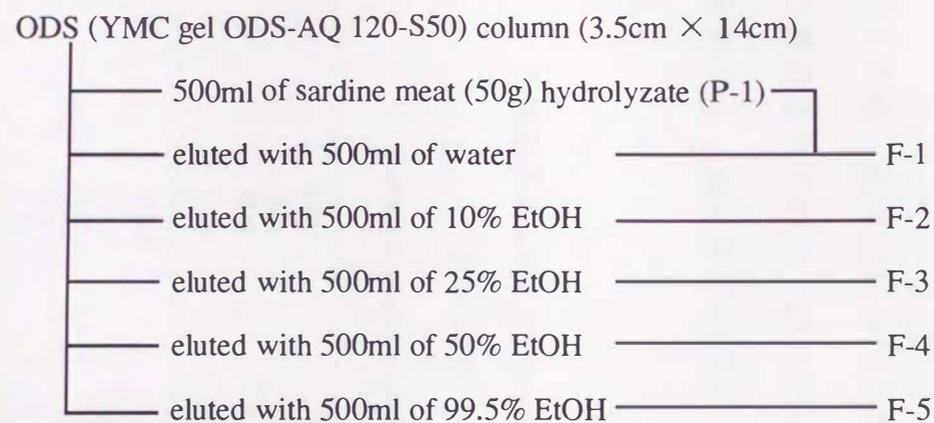


Fig.3-2 Effect of hydrolysis time on peptide concentration and ACE inhibitory activity

(2) ODSカラムによる一次精製 最適反応条件で調製したペプシン分解物 (P-1) のさらなる機能増強を図るため, ACE活性部位での疎水性及び芳香族アミノ酸残基の重要性に着目し, 疎水度に基づく一次精製を試みた. すなわち, 精製後の分解液の食品素材としての適用を考慮して, エタノールを溶離液とするODS分離を試みた. Table 3-2に示したように, 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阻害ペプチドの分画を行ったところ, ACE阻害活性 (IC<sub>50</sub>値) は各画分で大きく異なり, 25%エタノール溶出画分 (F-3) においてP-1よりも約10倍高い活性 (0.064 mg protein/ml) が認められた. さらにF-3を細かく分取したところ, F-3-8すなわち25%エタノールでの350~400mlの溶出画分において最も高い活性 (0.030 mg powder/ml) が認められた. 従って, エタノールによる分解物の逆相分離・精製はACE阻害性を向上させる上で極めて有効な方法であることが明示された.

**Table 3-2** Separation of ACE inhibitors from peptic hydrolyzate with ODS resin



Fraction No.	Protein-g (Yield)	IC50 (mg protein/ml)
P-1	5.15 (100)	0.62
F-1	2.40 (47)	N.D. <sup>1)</sup>
F-2	0.91 (18)	0.83
F-3	0.81 (16)	0.064
F-4	0.39 (8)	0.23
F-5	0 (0)	—



Fraction No.	IC50 (mg powder/ml)
F-3-2	0.13
F-3-4	0.12
F-3-6	0.11
F-3-7	0.11
F-3-8	0.030
F-3-9	0.085
F-3-10	0.060

<sup>1)</sup> not detected

また、Table 3-3 に示したようにF-3画分は、末綱と箴島<sup>42)</sup>によって報告された塩基性ペプチド（イワシ筋肉のデナチームAP分解物、IC<sub>50</sub>=0.40mg/ml）と比較して、リジン含量が少なく、チロシン、ロイシン、フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸含量が多いことが明らかとなった。ACEはアンジオテンシンIのC末端側のPhe-His-LeuからHis-Leuを切断することから、拮抗的にACEを阻害するためには一定の疎水性が必要であると推定されている。従って、F-3及びF-3-8画分の高いACE阻害能は、疎水性アミノ酸に富むペプチドが数多く存在しているためであると考えられた。

**Table 3-3** Comparison of amino acid compositions of F-3 and basic peptide

	F-3	Basic peptide <sup>1)</sup>
Gly	5.23	2.39
Ala	6.33	3.96
Val	5.85	5.85
Leu	8.86	1.70
Ile	4.92	2.22
Phe	4.64	0.38
Pro	0.00	1.14
Ser	3.56	3.55
Thr	4.11	2.79
Cys	0.79	—
Met	2.64	0.01
Trp	—	0.14
Tyr	2.80	0.02
Asp	10.83	4.60
Glu	10.32	4.91
Lys	10.53	47.68
Arg	6.15	6.85
His	3.84	3.54

<sup>1)</sup> Suetsuna and Osajima (1986).

第2項 魚肉加水分解物の *in vivo* 生理効果

得られた分解物を機能性食品として適用するためには, *in vivo* における活性発現の有無が重要となる. そこでまず, *in vitro* において最も高いACE阻害活性を示したF-3-8を用いて, ラットに対する静注試験での血圧上昇抑制効果を検討した (Table 3-4). アンジオテンシンIのIIへの変換に伴う血圧上昇に対する最大の抑制効果は被検液注入後, Wistar系ラットでは3分に, SD系ラットでは3~5分に認められ, 本一次精製物が血中においてもACEを阻害していることが明らかとなった.

**Table 3-4** Inhibitory effect of peptic hydrolyzate against rat blood pressure increment after administration of angiotensin I

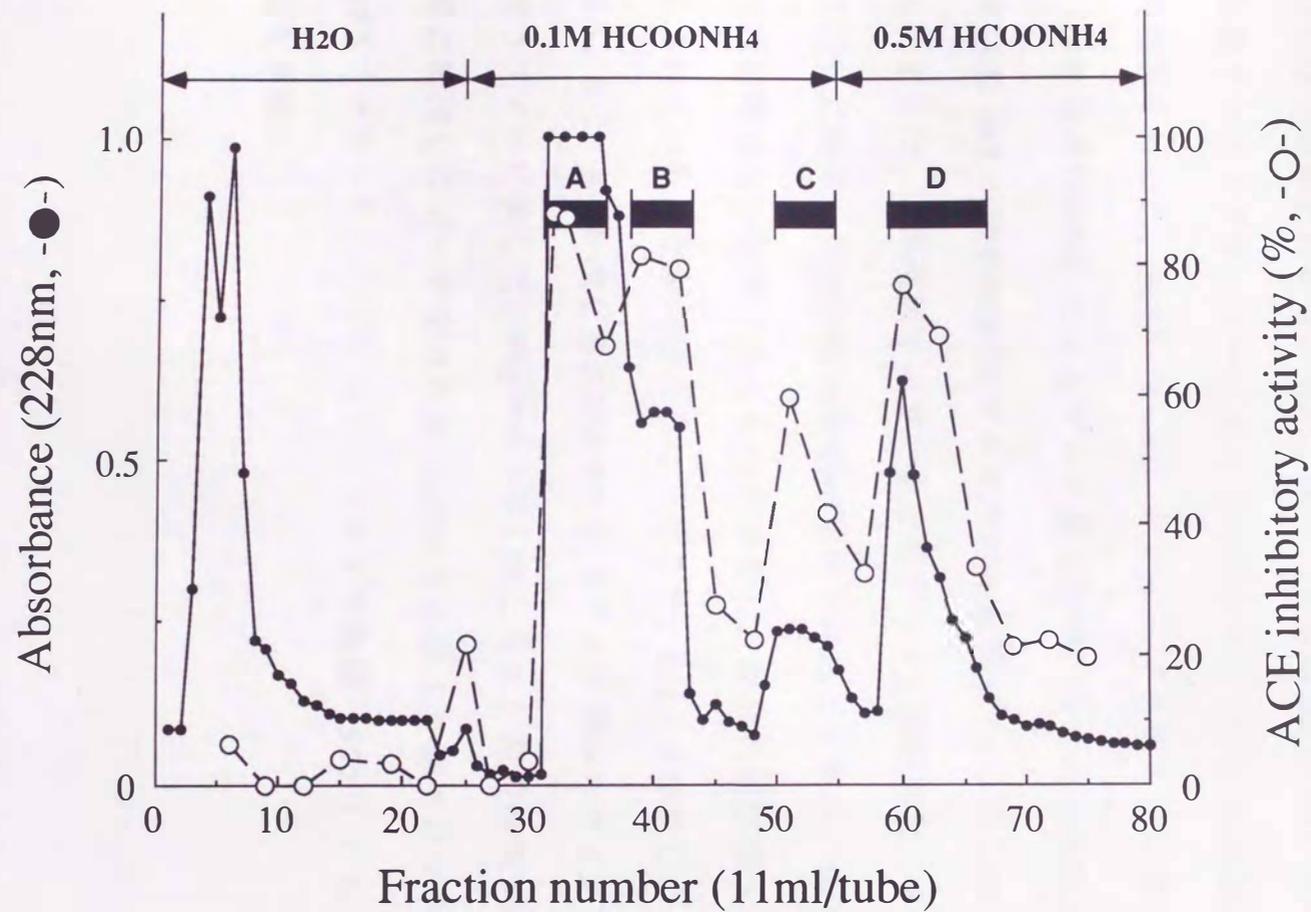
	Test compound	Dose (mg/kg, <i>i.v.</i> )	Time after administration (min)	Inhibition <sup>1)</sup> (%)
Crj: Wistar (bw. 182g)	F-3-8	2.5	3	3
		12.5	3	20
Crj: SD (bw. 416g)	F-3-8	5.0	5	6
		10.0	3	29
	captopril	10.0 $\mu$ g/kg	3	32

<sup>1)</sup> Mean blood pressure increments after administration of angiotensin I (300ng/kg) were 24 mmHg for 6 male Wistar rats and 31 mmHg for 11 male SD rats, respectively.

また、F-3画分の高血圧自然発症ラット (SHR) に対する経口投与試験によっても *in vivo*での有効性が支持されている (5 g/kgの経口投与で、5時間後に4例中の3例が10~13mmHgの有意な血圧低下 (4例の平均では9 mmHg) を示し、またそのうちの1例は6時間後も血圧低下作用 (12mmHg, 4例の平均では7 mmHg) が持続していた)<sup>71)</sup>。従って、ODS一次精製画分は *in vitro*のみならず、*in vivo*においても血圧上昇抑制効果があることが明らかとなった。また、*in vivo*での力価はカプトプリルの1/100~1/1000程度であると見積もられた。高血圧疾病予防を目的とした機能性食品の摂取を前提とすると、この程度の低力価は妥当であると判断される。

### 第3項 ACE阻害ペプチドの単離と構造決定

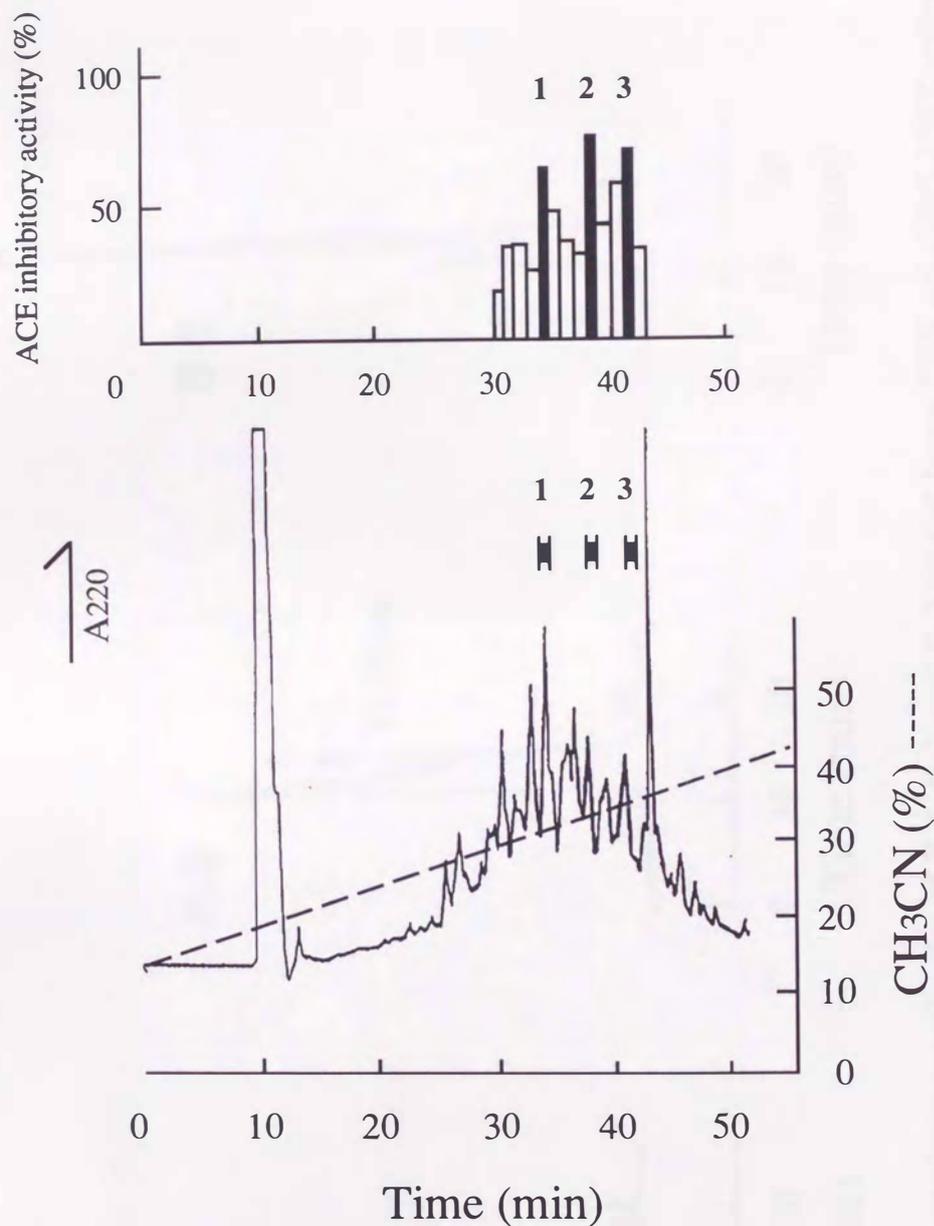
(1) ACE阻害ペプチドの単離・精製 ODS充填カラムを用いて分離したF-3画分中に存在するACE阻害物質の単離・精製を目的として、F-3のさらなる分離を試みた。まず、F-3をSP-Sephadexを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供した (Fig.3-3)。水で溶出した非吸着画分ではACE阻害活性は全く認められなかったが、0.1M及び0.5Mギ酸アンモニウムでの溶出画分中に4つの顕著なACE阻害活性領域が認められ、各々は蛋白質の吸収である280nmの吸光度のピークの位置と一致した。(これらの活性画分を以後A/SP, B/SP, C/SP, D/SPとする)。



**Fig.3-3 Chromatography on a SP-Sephadex C-25 column of active fraction (F-3) eluted with 25% ethanol from ODS column**

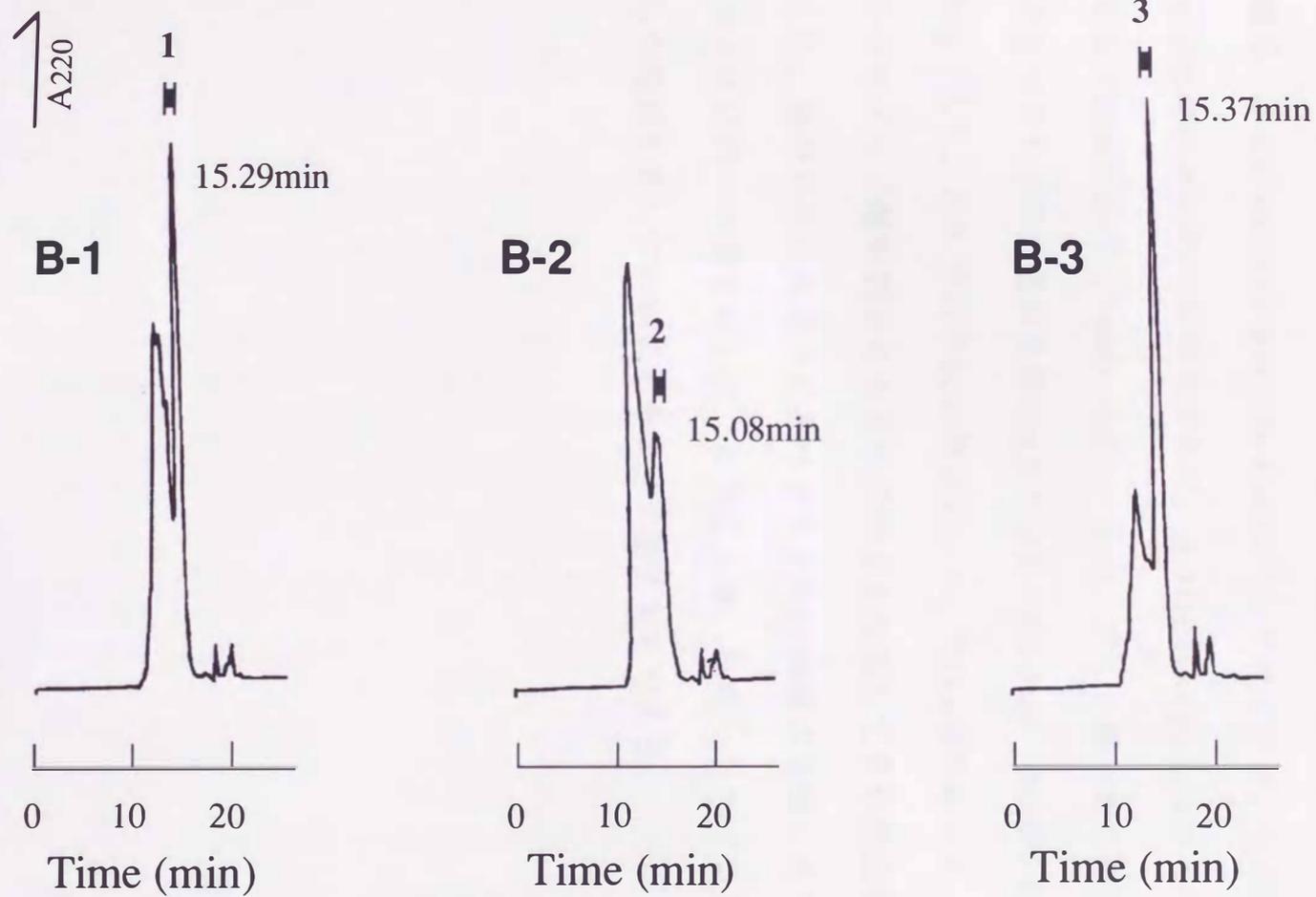
A stepwise gradient elution (condition): 240ml of H<sub>2</sub>O, 365ml of 0.1M ammonium formate (pH 7.0), 330ml of 0.5M ammonium formate (pH 7.0).

なお、A/SPは他の画分と比較して高い280nmの吸光度を示したが、これは魚肉中の褐変物質がここに多く溶出したためであり、本画分については以後の精製を行わなかった。次に、最も塩基性の低いB/SPを選定し、各種クロマトグラフィーによりその画分中に含まれるACE阻害ペプチドの精製を行った。B/SP (44ml) を1mlまで濃縮し、トヨパールHW-40 (排除限界10000) によるゲルろ過を行い、得られた活性画分 (B/TP) をTSK gel ODS-120Tカラムを用いた逆相HPLCに供した。Fig.3-4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、またそれらピーク全体にわたってACE阻害活性が認められたことから、B/TPのACE阻害活性発現は単一物質によるものではなく、複数の阻害物質により引き起こされていることが明示された。そこで、Fig.3-4で示した各高活性画分B-1, B-2, B-3を次なるG2500PWXLカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーに供した。Fig.3-5に示したように、阻害活性が認められた後半に溶出したピークをさらにODSカラムにより再クロマト (溶出: 14-42%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (55分)) し、ACE阻害物質を単離した。



**Fig.3-4 Reverse-phase HPLC of peak B/TP from Toyopearl HW-40 column**

Column: TSK gel ODS-120T (0.78cm × 30cm); Solvent system: 14% to 42% CH<sub>3</sub>CN (55 min) in 0.1% TFA; Flow rate: 1.0ml/min; Monitoring absorbance: 220nm.



**Fig.3-5** Size exclusion chromatography of B-1, B-2 and B-3 eluted from TSK gel ODS-120T column

Column: TSK gel ODS-120T (0.78cm×30cm); Eluent: 45% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA;  
Flow rate: 1.0ml/min; Monitoring absorbance: 220nm.

(2) ACE阻害ペプチドの構造決定 単離したB-1, B-2, B-3をアミノ酸分析並びにアミノ酸シーケンスに供し, 構造決定を行った。その結果, B-1はVal-Lys-Ala-Gly-Pheのペンタペプチド, B-2はLys-Val-Leu-Ala-Gly-Metのヘキサペプチド, B-3はLeu-Lys-Leuのトリペプチドであると決定された (Table 3-5)。また, アミノ酸分析の結果から算出した各ペプチドの収量は魚肉50g当たりB-1が3.3 $\mu$ g, B-2が0.7 $\mu$ g, B-3が1.2 $\mu$ gであり, それぞれのIC<sub>50</sub>値は83, 30, 188 $\mu$ Mであった。各該当ペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドを合成してその活性を測定したところ, 表中に示したように各ペプチドのIC<sub>50</sub>値は単離したペプチドのそれとほぼ同一の値を示した。このことは, 単離したペプチドが表中に示した配列を有していることを十分に証すものである。

**Table 3-5** Analytical data for ACE inhibitors from sardine muscle hydrolyzate and their synthetic peptides

Amino acid sequence	Inhibitor	Amino acid ratio in acid hydrolyzate	IC50(μM)
Val-Lys-Ala-Gly-Phe	B-1	Val 1.00, Lys 1.03, Ala 1.27 Gly 1.14, Phe 0.80	83
	SP <sup>1)</sup>	Val 1.00, Lys 1.01, Ala 1.00 Gly 1.02, Phe 0.98	68
Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met	B-2	Lys 1.00, Val 1.13, Leu 1.48 Ala 1.01, Gly 1.12, Met 0.53	30
	SP	Lys 1.00, Val 1.00, Leu 1.04 Ala 1.03, Gly 1.02, Met 0.96	29
Leu-Lys-Leu	B-3	Leu 1.99, Lys 1.00	188
	SP	Leu 2.08, Lys 1.00	182

1) SP : the corresponding synthetic peptide

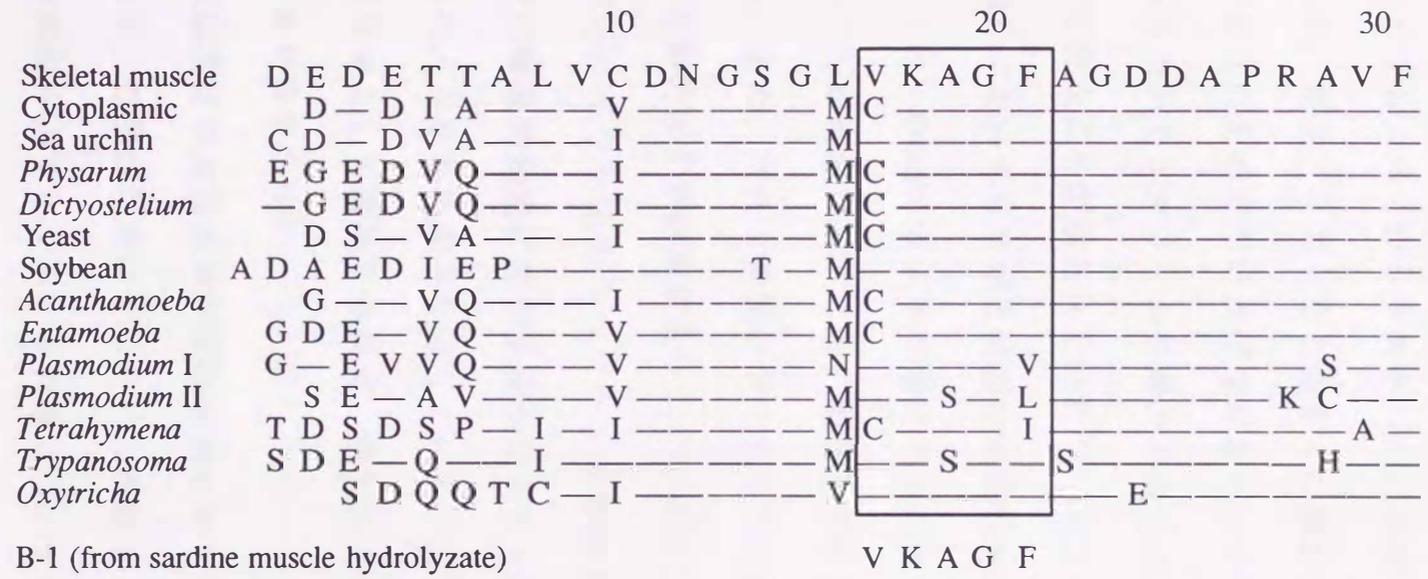
これまでにイワシ蛋白質からはHis-Gln-Ala-Ala-Gly-Trp<sup>65)</sup>なる配列を有するACE阻害ペプチド(IC<sub>50</sub>=60μM)が報告されている。本研究で得られたACE阻害ペプチドはこのペプチドとは異なった配列を有しており、イワシから初めて見出されたACE阻害ペプチドであるとともに、これまでに報告されている種々の起源のACE阻害ペプチドとも異なる新規なものであった。ACE阻害活性はB-2が最も高い値(IC<sub>50</sub>=30μM)であったが、これまでにIC<sub>50</sub>値10μM以下の高活性を有する天然資源由来のペプチドがすでにくつか報告(Phe-Phe-Val-Ala-Pro(カゼイン由来, IC<sub>50</sub>=6.0μM)<sup>72)</sup>, Leu-Tyr-Pro-Val-Lys(イチジク, 4.5μM)<sup>73)</sup>, Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp(ツナ, 0.9μM)<sup>74)</sup>)されており、ACE阻害活性の点では本ペプチドは新規性の高いものではなかった。構造的には、B-1及びB-2はそれぞれC末端にGly-Phe及びGly-Metの配列を有していたが、これらのジペプチドについてはCheungら<sup>66)</sup>によりIC<sub>50</sub>値が各々630μM, 1400μMであることが報告されている。これらの値と比較するとB-1及びB-2はともに1~2オーダーほど高い活性を有しており、これはグリシンのN末端側に結合しているアミノ酸配列に起因しているものと推察された。さらに、Leu-Lys-Leuの配列を有するB-3はHazatoら<sup>75)</sup>がブタ血漿より単離したトリペプチドLeu-Val-Leuと類似していた。そのLeu-Val-Leuは1.7μMのIC<sub>50</sub>値を有しており、この値と比較するとB-3の活性は1/110と低く、トリペプチドの中間位に存在するアミノ酸の種類によってもその活性が大きく変動することが示された。これらの結果は、

Cheungら<sup>66)</sup>の報告しているジペプチド以外のペプチドにおいても、阻害性に対してN末端側及びC末端側のアミノ酸の影響が大きいことを示している。

単離したペプチドを機能性食品として摂取し、生体内において活性発現させるには、生体内酵素による分解と腸管吸収という2つの関門を通過しなければならない。共同研究グループの松田ら<sup>76)</sup>は、B-1, B-2, B-3のブタ小腸液による分解性を検討し、B-3のトリペプチドは分解を受けなかったが、B-1のペンタペプチド及びB-2のヘキサペプチドはそれぞれ44%, 36%の分解 (B-1; Val-Lys-Ala-Gly, Gly-Pheの生成, B-2; Ala-Gly-Met, Lys-Val-Leu-Ala-Gly, Lys-Val-Leuの生成) が認められ、結果として消化後のACE阻害活性が減少したことを報告している。また、ペプチドの吸収性<sup>13-16)</sup>については、ジペプチドはアミノ酸よりも優れた腸管吸収能を有していること、さらにトリペプチドでも吸収されることが明らかとなっている。故に、生体調節機能を有するペプチドを食品素材として利用するには、消化耐性と腸管吸収性を考慮してジ及びトリペプチドを対象とすべきであると判断され、F-3画分から単離したB-3 (Leu-Lys-Leu) の有用性が示唆された。

(3) ホモロジー検索 単離したペプチドのアミノ酸配列とこれまでに報告されている蛋白質一次構造とのホモロジーをデータベースGENASを用いて検索したところ、B-1に関しては種々の生物、植物起源

の14種類のアクチンの配列中に完全に一致する配列が認められた (Fig.3-6)。イワシのアクチン構造に関する報告は見当たらないが、アクチンの一次配列における保守性を考慮すると、この配列 (Val-Lys-Ala-Gly-Phe) がイワシアクチンに含まれている可能性は高いものと推察される。B-1と同じ配列はヒト、ウサギ、ラット、マウスなどの骨格筋のアクチンの17番目から21番目の配列<sup>77,78)</sup>と完全に一致しており、この部分は種を越えての相同性が高いことから、本来アクチンの機能にとって重要な役割を担っている部分と考えられる。このような配列部分にACE阻害能というアクチン本来の機能とは全く異なる活性が認められたことは、アクチンの機能性の点で非常に興味深いものであった。さらに、これまでいくつかのACE阻害ペプチドの配列が酵素配列中に見出されている<sup>65,74)</sup>のに対して、本ペプチドが生体の大量成分であるアクチンを前駆体とすることは消化系での生成頻度の高さを裏付けるものであり、機能性食品素材としての見地からも有用な知見と考える。



**Fig.3-6 Sequence homology between sardine ACE inhibitor and actins**

Amino acid sequence of actins were quoted from Hirono and Watanabe (1989).

(4) 機能性食品への適用性      ペプシン分解物もしくはその一次精製物を機能性食品素材として展開するためには、その工業化についての検討が必要となる。パイロットスケールへの拡大化に関しては使用原材料、生産工程、用途、コストなど数多くの検討が必要であるとともにその生産品が良質のものでなければならない。すでに、本章で明らかにしたODS樹脂を用いたエタノール分画の手法を適用した工業化が達成され、実用化が可能なが示されている<sup>79)</sup>。すなわち、拡大化（イワシ筋肉20kg処理）においてもラボと同様の高活性ACE阻害ペプチドの調製が可能であること、ODSカラムを2連にすることにより効率よくペプチドを生産することが可能であること、脱臭及び脱色が可能であることを報告している。また、コスト試算においてもその精製操作が一段階であることにより工業的に十分採算が合うことを報告している。

しかしながら、イワシ筋肉のペプシン分解物及びその一次精製物はACE活性部位の構造的知見に基づき疎水性アミノ酸残基に富むペプチド画分であるため、かなりの苦みを有している。従って、本ペプチド画分を機能性食品素材として適用する場合、残念ながらその添加割合に自ら限界を生じざるを得なかった。

一般に、食品素材は食品本来の風味を損なわない”無味”が最良とされることから、阻害活性だけではなく、風味をも考慮に入れたACE阻害ペプチドの調製が必要となる。この点については次章にて詳細な検討を加えた。

#### 第4節 小括

ACE阻害活性ペプチド産生原料として、多獲性で利用効率の低いイワシを選択し、以下の結果を得た。

1) イワシ蛋白質をペプシンにより加水分解したところ、その分解物に高いACE阻害活性が認められ、イワシ蛋白質が潜在的な生理機能を有していることが明らかとなった。

2) イワシ蛋白質を加熱処理することにより、対未処理で26~88%高いACE阻害活性分解物を得ることが可能となった。

3) 予備加熱処理を施したイワシ蛋白質のペプシン分解物 ( $IC_{50}=0.62\text{mg protein/ml}$ ) をODS充填カラムに通し、25%エタノールで溶出することにより、高いACE阻害活性 ( $IC_{50}=0.064\text{mg protein/ml}$ ) を有する画分を一段階の精製操作で得ることが可能となった。

4) ODSカラムによる一段階精製で得られたペプチド画分はラットへの静脈内投与により、アンジオテンシンIのIIへの変換に伴う血圧上昇を明らかに抑制することを実証した。

5) ODSカラムによる一段階精製で得られた画分をさらにSP-Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィー、逆相HPLCで分離した結果、粗精製画分の活性は単一のACE阻害物質によるものではなく、多くの活性物質により発現したものであることを明らかにした。

6) 各種HPLC操作によって、3つの主要なACE阻害ペプチド (B-

1, B-2, B-3) を単離し, 以下のアミノ酸配列とIC<sub>50</sub>値を有することを明らかにした. また, これらのペプチドはこれまでに報告されている種々の起源のACE阻害ペプチドとは異なる新規なものであった.

B-1 ; Val-Lys-Ala-Gly-Phe (IC<sub>50</sub>=83 $\mu$ M)

B-2 ; Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met (IC<sub>50</sub>=30 $\mu$ M)

B-3 ; Leu-Lys-Leu (IC<sub>50</sub>=188 $\mu$ M)

7) 単離したペプチドのホモロジーを検索した結果, B-1は種々の起源のアクチンにおける17から21番目のアミノ酸配列と完全に一致することを明らかにした.