

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：

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

前章において、イワシ蛋白質中に血圧上昇抑制作用を有するアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドが潜在的に存在し、それがペプシン加水分解によって顕在化すること、そしてそのODS一次精製物が *in vivo* においても効果があることを明らかにした。しかしながら、ACE活性部位との構造的親和性にに基づき阻害ペプチドを計画的に検索したため、ペプシン分解物及びその一次精製物は疎水性アミノ酸に富み、かなりの苦みを有していた。それ故に、食品として直接適用するには風味の点で若干の難点があり、その改善が機能性食品創製のための検討課題として提起された。すでに、これまで種々の蛋白質のプロテアーゼ分解物からACE阻害ペプチドが見出されてきた⁸⁰⁻⁸³⁾が、これらの研究はいずれもペプチド検索のみに終始しており、食品品質を左右する風味をも考慮に入れた複合機能性物質の検索に関する研究は皆無である。

ペプチドの苦みに関する研究は古くからなされており、大豆のペプシン分解物⁸⁴⁻⁸⁷⁾やカゼインのアルカリプロテアーゼ (*Bacillus subtilis*由来) 分解物⁸⁸⁾など種々の蛋白質加水分解物中^{89,90)}から、これまでに

1000種類近くの苦みペプチドが単離・合成されている⁹¹⁾。単離された苦みペプチドは、疎水性アミノ酸（ロイシン・イソロイシン・フェニルアラニン・チロシン）、アルギニン、プロリンを数多く含んでおり、これらアミノ酸残基が苦みに寄与していることが明らかとなっている^{91,92)}。個々のペプチドの苦みの有無についてはNey⁹³⁾の報告したQ則により、またその強弱についてはペプチドのアミノ酸配列及びペプチド中の疎水性アミノ酸含量^{87,94-96)}により評価・予測することが可能である。しかしながら、蛋白質加水分解物中には数多くのペプチド・アミノ酸が存在し、それらが複雑に呈味発現に寄与しているため、分解物全体としての苦み評価は不可能であり、その評価は経験的・統計的予測に委ねられているのが現状である。

Fig.4-1にMatobaとHata⁹⁷⁾より引用した蛋白質加水分解物中における苦みペプチドの生成に関する概念図を示した。

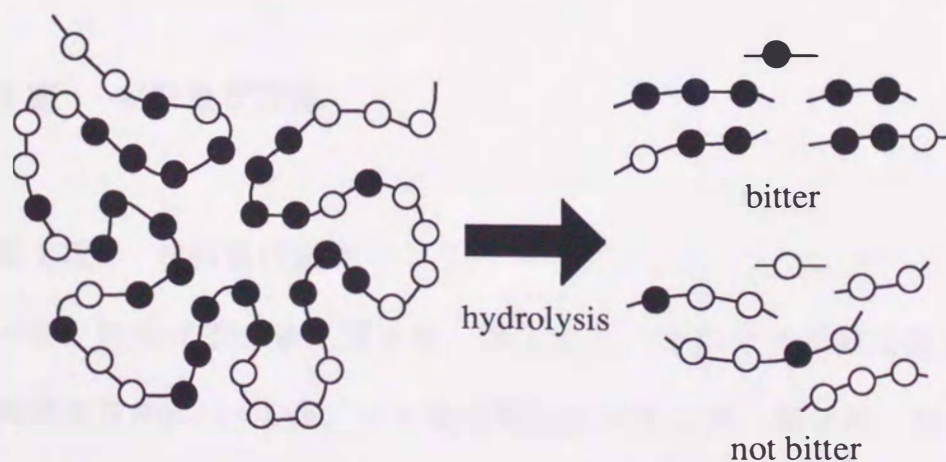


Fig.4-1 Appearance of bitterness resulting in enzymatic hydrolysis of protein (quoted from Matoba and Hata (1972))

● : hydrophobic amino acid, ○ : hydrophilic amino acid

分解物中には苦みペプチドが常在するため、分解物の苦みを低減化するには該当ペプチドの苦み強度を低下させる必要がある。それ故に、用いる加水分解酵素としてはペプチド配列中における疎水性アミノ酸残基数を低下させる酵素、すなわち種々の疎水性アミノ酸部位で切断する酵素を選出する必要がある⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾。翻って、ACE阻害活性を念頭においた場合には得られるペプチドは一定の疎水性が必要であることから、機能性食品を構築するにはこれら相反する事項を解消し得る酵素の選択が不可欠となる。

そこで、本章では基質特異性が広くかつ疎水性アミノ酸残基を切断するサブチリシンAを主要酵素とするアルカリプロテアーゼ (*Bacillus licheniformis*由来) に着目し、二次 (風味) ・三次 (ACE阻害性) 機能を兼備したイワシ筋肉からの機能性食品素材の調製を試みた。

第2節 材料及び方法

第1項 材料及び試薬

イワシ筋肉は第3章、第2節、第1項と、またウサギ肺由来ACE、合成擬似基質Hip-His-Leu、ホウ酸塩緩衝液は第2章、第2節、第1項と同様である。アルカリプロテアーゼ (*Bacillus licheniformis*由来, 2.4L, タイプFG) はNovo社より、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社より購入した。ブタ小腸液は、ブタ小腸凍結乾燥品（日本化薬社製，1バイアル）を10mlの水に溶解後，遠心分離することにより得た。免疫補助剤としてのフロイント完全アジュバンドはYatlon社より，色素斑用色素としてのエバンスブルーはMerck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IC₅₀値として活性の尺度とした。また，試料中の蛋白質量は窒素量に係数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は第3章，第2節，第3項に準じて行った（Fig.4-2）。すなわち，イワシ筋肉50gに対して50ml（魚肉の等倍量）の脱イオン水を加え，ポリトロン（Kinematica mbH, Switzerland：出力8）で4分間ホモジナイズした。pHを9に調整後，アルカリプロテアーゼを添加し，再度1分間ホモジナイズした。50℃で酵素反応を行った後，pHを6に調整し，98℃で15分間加熱することにより酵素を失活させた。その後3000rpm，10分間遠心分離を行い，上清をろ過して酵素分解物を得た。なお，酵素添加濃度並びに反応時間については結果及び考察の項に記した。

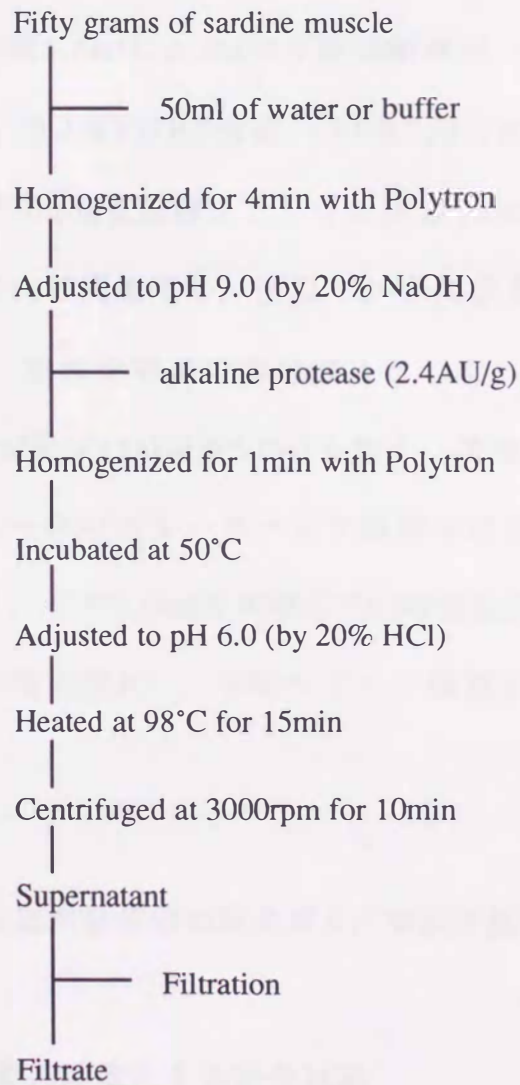


Fig.4-2 Preparation of sardine muscle hydrolyzate by alkaline protease

第4項 平均ペプチド鎖長の測定

分解物中のペプチド平均鎖長の測定は中村ら¹⁰¹⁾の報告に従って行った。すなわち、試料溶液1.0mlに0.1Mホウ酸塩緩衝液(pH9.2)6.0mlを加え、50℃に加温後、0.1%TNBS溶液(TNBS/0.1Mホウ酸塩緩衝液(pH9.2))2.0ml及び30mM亜硫酸ナトリウム溶液1.0mlを添加し、25分間静置した。氷水中で10秒間急冷し、室温で20分間静置した後、425nmでの吸光度を測定し、加水分解前の吸光度Aとした。一方、同一試料1.0mlに脱イオン水4.0ml及び12M塩酸5.0mlを加え、酸加水分解(110℃, 24時間)し、ロータリーエバポレーターにて塩酸を除去した。さらに、脱イオン水10mlを加え、その1.0mlを同様にTNBS発色させ、吸光度を測定した(加水分解後の吸光度B)。平均ペプチド鎖長は以下の式より求めた。

$$\text{平均ペプチド鎖長} = \text{加水分解後の吸光度B} / \text{加水分解前の吸光度A}$$

第5項 各種消化管系酵素による消化試験

最適条件で得られたアルカリプロテアーゼ分解物の各種消化管系酵素による消化試験は、Furuyaら¹⁰²⁾による方法に準拠して行った。すなわち、ペプシン処理区では分解物250mgをペプシン溶液(20mg/0.075M HCl 10ml, pH2.0)に添加し、37℃で4時間インキュベートした。その後、98℃で5分間加熱することにより酵素を失活させ、2000rpm, 10分間遠心分離を行い、上清をろ過して消化物を得た。また、ペプシン処

理後の小腸環境を想定した酵素処理は、4時間のインキュベート後、0.2M NaOHを用いてpHを調整し、各酵素液10mlを添加した（トリプシン；pH 7，4時間，37℃，キモトリプシン；pH 7，4時間，37℃，トリプシン+キモトリプシン；pH 7，4時間，37℃，ブタ小腸液；pH 8，4時間，37℃）。最終的に5分間の加熱により酵素を失活させ、遠心分離後、上清をろ過して各々の消化物を得た。

第6項 モルモットを用いた抗原性試験

実験動物としては、Harreley系モルモット（日本エスエルシー社）を用い、能動性全身性アナフィラキシー（ASA）反応試験においては5週齢（雄性，体重；312～389g）のモルモットを，同種受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応試験においては7週齢（雄性，体重；470～506g）のモルモットを，1群6匹として用いた。なお，モルモットは予備飼育期間（1～2週間）及び試験期間を通じて恒温恒湿（24±2℃，55±10%）の条件下で飼育し，飼育用飼料（RC4，オリエンタル酵母工業社製）及び次亜塩素酸ナトリウム－紫外線照射により殺菌した自家揚飲料水を自由摂取させた。

（1）能動性全身性アナフィラキシー反応 皮下投与試験群においては，アルカリプロテアーゼ分解物（A-1）及び対照物質である牛血清アルブミン（BSA）各々1mgを生理食塩水0.25mlに懸濁後，フロイント完全アジュバンド（FCA）0.25mlを加え，背部皮下に注射した。15日

後に二次感作を行い、その16日後に生理食塩水、BSA (40mg/ml)、A-1 (40mg/ml) を対応する感作動物の背中足静脈に1匹当たり0.25mlを注射した。また、経口投与試験群においては、A-1の投与量を10mg/kg及び100mg/kgとして、週5日間連続で3週間経口投与し、感作を行った。最終感作12日後にA-1 (40mg/ml及び400mg/ml) を皮下投与試験と同様に0.25ml注射した。皮下投与試験及び経口投与試験は、江田式¹⁰³⁾の判定基準に従い2時間アナフィラキシー反応を観察した。

判定基準

- | | | |
|---------|---------|--------|
| 1) 搔鼻 | 5) くしゃみ | 9) 虚脱 |
| 2) 立毛 | 6) 嘔気 | 10) 排便 |
| 3) 衰弱 | 7) 喘鳴 | 11) 排尿 |
| 4) 呼吸困難 | 8) 痙攣 | 12) 死亡 |

全般的評価

- : いずれの症状も示さないもの
- + : 上記の症状が1～3個のもの
- ++ : 上記の症状が4～7個のもの
- +++ : 上記の症状が8個以上または死亡したもの

(2) 同種受身皮膚アナフィラキシー反応 皮下投与試験群においては、前述のASA反応試験と同様に一次及び二次感作を行った。また、経口投与試験群においても同様に週5日間連続で3週間経口投与し、感作を行った。皮下投与群においては最終感作14日後に、経口投与群にお

いては最終感作10日後に感作動物の心臓より採血を行い、血清を得た。血清を生理食塩水にて5, 15, 45, 135, 405, 1215, 3645及び10935倍に希釈し、無処置モルモットの背部左右の皮内に0.1mlずつ投与して受身感作を行った。2%エバンスブルーを含む生理食塩水にて調製した40mg/ml及び400mg/mlのA-1並びに40mg/mlのBSAを受身感作24時間後に、動物1匹当たり0.25mlを背中足静脈より注射してPCA反応を惹起した。30分後に皮膚の反応局所内面に生じた色素斑の直径及び短径を測定し、2径の平均が5mm以上の色素斑を示したものを陽性とし、その最大希釈倍数を抗体価とした。

第7項 ラットを用いた血圧降下試験

実験動物として、15週齢、雄性の高血圧自然発症ラット (SHR, 日本チャールスリバー社) を1週間予備飼育した後、試験に供した。エーテル麻酔下で、血圧測定のためヘパリン含有生理食塩水 (250U/ml) を満たしたカニューレを左大腿動脈に、検体物質投与のため生理食塩水を満たしたカニューレを右大腿静脈に挿入し、覚醒後、大腿静脈より各種濃度のアルカリプロテアーゼ分解物 (A-1) を投与 (1 ml/kg) した。血圧測定は圧トランスデューサー (日本光電製; TP-400T), 歪圧力用アンブ (日本光電製; AT-601G) を介して観血的に直接測定した。

第8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 第3章, 第2節, 第5項と同

様に行った。すなわち、アルカリプロテアーゼ分解液 (A-1) 500mlを ODS樹脂を充填したカラムに通し、脱イオン水500mlで洗浄した (Y-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Y-2~Y-5画分)。高活性画分を濃縮 (10ml) 後、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-9A, カラム: 旭化成工業社製Asahipak GS-320 (7.6mm×500mm) 及び東ソー製TSK gel ODS-120T (7.8mm×300mm), 検出器: 島津紫外可視検出器SPD-10AV, 溶出: 20%アセトニトリル/50mM 酢酸アンモニウム (pH6.7) 及び10-50%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (80分)。

第9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0.1%フェノールを含む6M塩酸で加水分解 (110℃, 20時間) 後、島津LC-6Aアミノ酸分析計を用いて行った。なお、トリプトファンはグリオキシル酸法 (ホプキンス・コール反応) により分析した。また、アミノ酸配列は島津PSQ-1プロテインシーケンサーを用いて決定した。単離したペプチドの収量はアミノ酸分析をもとに算出した。ACE阻害ペプチドの合成は、国産化学社製固相ペプチド合成装置を用いて行い、Waters社製 μ -Bondasphere 5C18-100Aカラム (3.9mm×

150mm, 10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸) により純度決定を行った。

第3節 結果及び考察

第1項 機能性食品素材の調製

(1) 加水分解条件の最適化 広い基質特異性を有し, 食品加工用酵素製剤として認可されている *Bacillus licheniformis* 由来のアルカリプロテアーゼを用いてイワシ筋肉の加水分解物を調製し, 機能性食品素材としての有効性を風味とACE阻害活性の両面から詳細に評価した。前章で明らかにしたように, 生成するペプチド構造によってACE阻害性は大きく異なる。そこでまず, ACE阻害活性発現に及ぼすアルカリプロテアーゼの添加濃度及び加水分解時間について検討を行った (Fig.4-3)。ACE阻害率はいずれの酵素添加量においても反応時間の増大とともに増加したが, 1.0wt%及び2.0wt%添加区では反応時間1時間, 0.3wt%では6時間, 0.1wt%, 0.5wt%添加区では24時間でほぼ最大の阻害率を与えた。一方, TNBS法⁵⁹⁾により得られた加水分解物中のペプチド生成量は1.0wt%添加区では1時間, 0.3wt%添加区では17時間の反応で最大値を示した (Fig.4-4)。

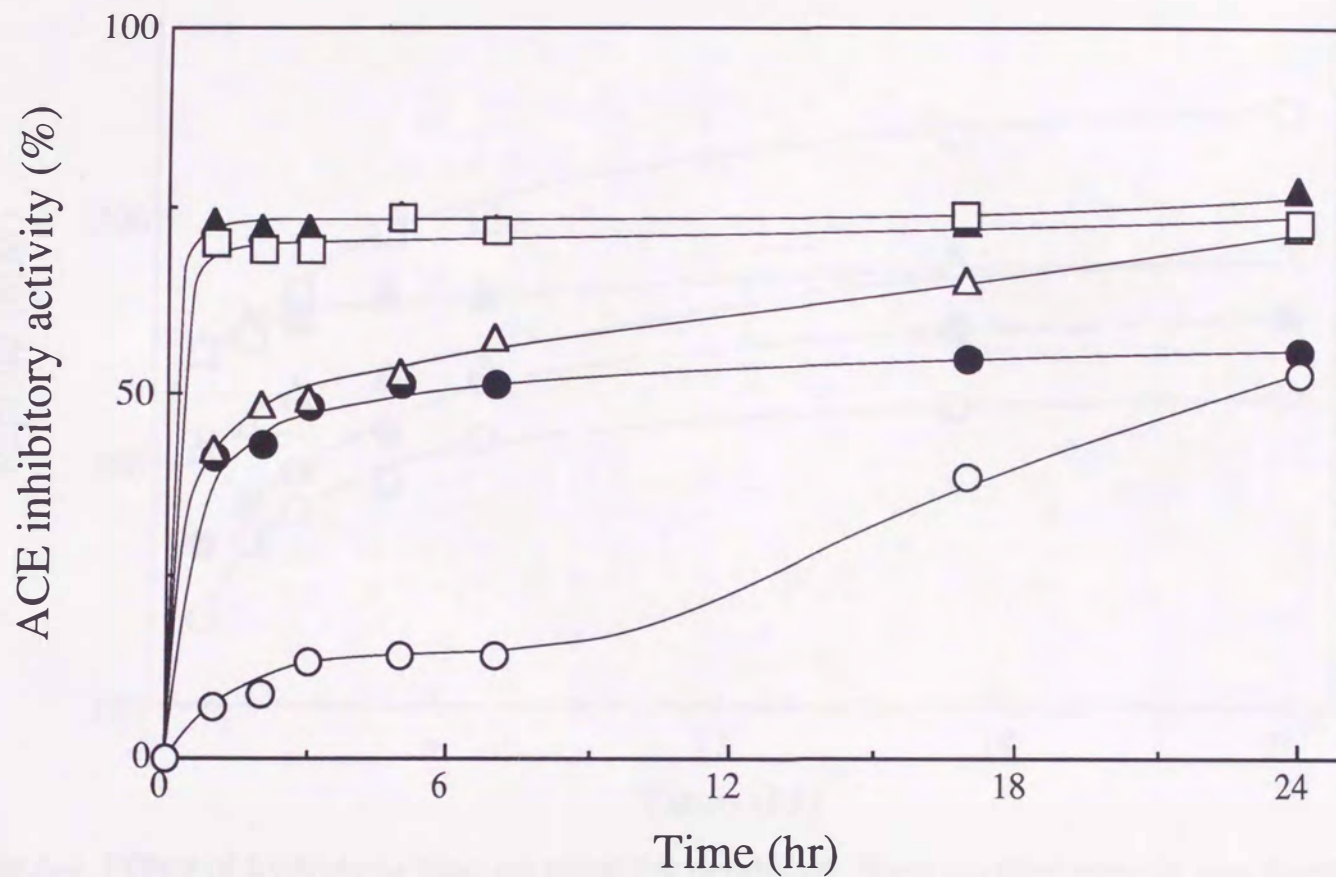


Fig.4-3 Effect of hydrolysis time on ACE inhibitory activity as a function of enzyme concentration

Sardine muscle was hydrolyzed by alkaline protease at 50°C, pH9.0.

□ : 2.0wt%, ▲ : 1.0wt%, △ : 0.5wt%, ● : 0.3wt%, ○ : 0.1wt%

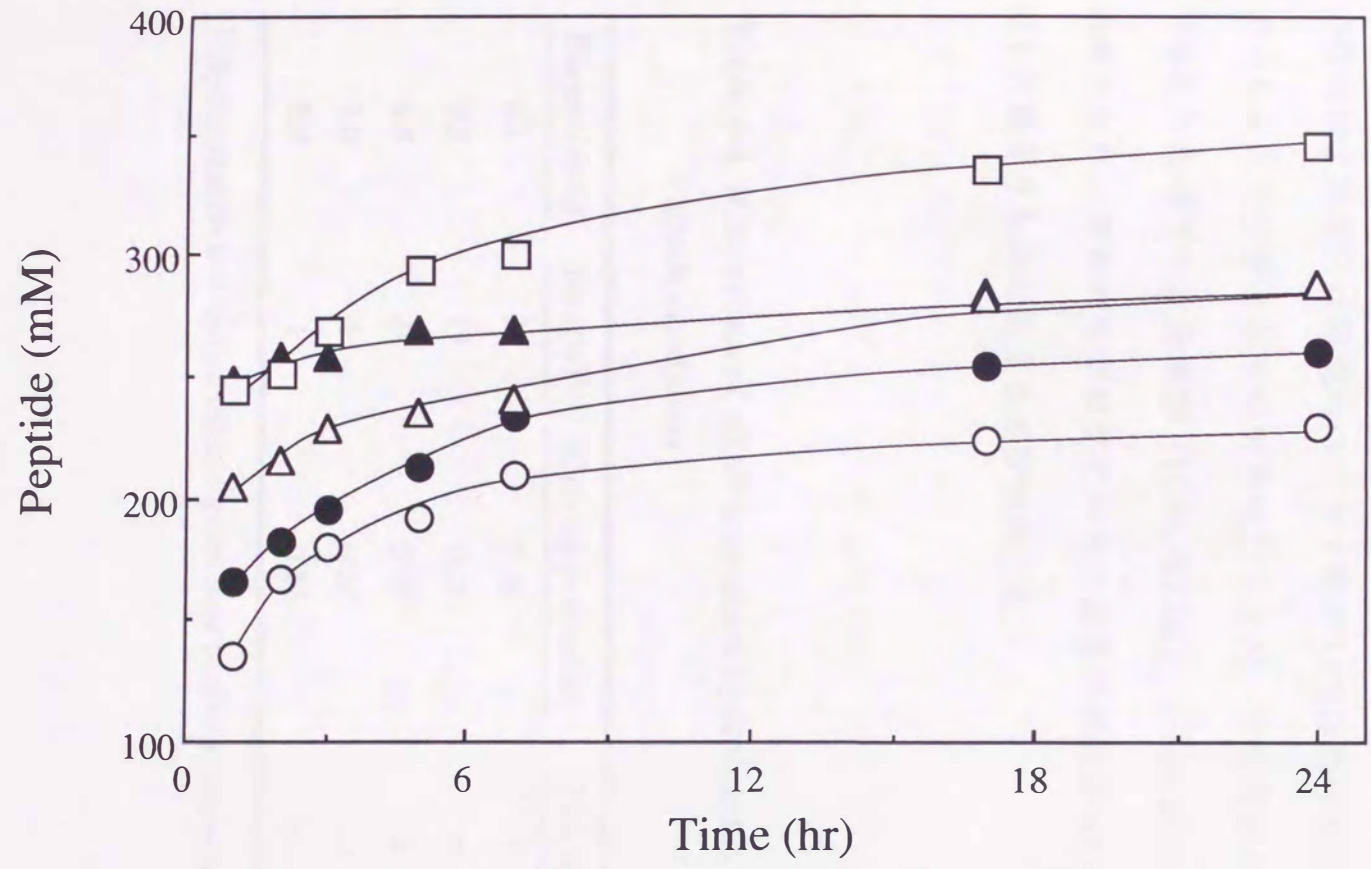


Fig.4-4 Effect of hydrolysis time on peptides produced from sardine muscle as a function of enzyme concentration

Sardine muscle was hydrolyzed by alkaline protease at 50°C, pH9.0.
Peptides (amounts of amino group) produced were measured with TNBS method proposed by Fields (1972).
□ : 2.0wt%, ▲ : 1.0wt%, △ : 0.5wt%, ● : 0.3wt%, ○ : 0.1wt%

また, Table 4-1で示したように, 最大の阻害率を与えた各々の分解物のACE阻害活性 (IC₅₀値) はいずれも0.25mg protein/ml前後であり, 分解物間で有意差は認められなかった. このことは, アルカリプロテアーゼの作用により生じた特定のペプチド群がACE阻害活性発現に深く関与していることを示唆するものであった. なお, 本分解物の阻害活性は前章で得られたペプシン分解物 (IC₅₀=0.62mg protein/ml) と比べて約2.4倍高くなり, アルカリプロテアーゼの基質特異性がACE阻害物質の生成に十分見合うものであることが判明した.

Table 4-1 IC₅₀ values of alkaline protease hydrolyzates prepared under various conditions

Enzyme(wt%)	Time(hr) ¹⁾	IC ₅₀ (mg protein/ml)	Fish odor	Bitterness
0.1	24	0.26	+	-
0.3	17	0.26	±	±
0.5	24	0.25	+	++
1.0	1	0.24	++	+++
2.0	1	0.24	+++	++++

¹⁾Hydrolyzation was carried out at a given time to give a maximum inhibitory activity.

次いで、食品品質における風味の重要性から、得られたアルカリプロテアーゼ分解物を官能検査に供し、食品素材としての適合性を検討した。当研究室員10名による官能検査の結果、0.1wt%添加区では魚臭を、1.0wt%添加区以上ではかなりの苦みを呈したのに対して、0.3wt%添加区では魚臭、苦みともにほとんど認められず、食品素材として最適であると判断された (Table 4-1)。また、Table 4-2 に示したように、0.3wt%-17時間加水分解物と1.0wt%-1時間加水分解物のアミノ酸組成を比較したところ、0.3wt%-17時間加水分解物はバリン、ロイシン、トリプトファンなどの疎水性アミノ酸が少なく、逆にアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸に富むことが判明した。酸性アミノ酸はうまみを呈し、同時に苦みに対してマスキング作用を有していることが知られている⁹¹⁾。従って、これらの結果は官能検査の結果を裏付けるとともに、本加水分解物がACE阻害活性及び風味の点で十分に目的にかなう素材であることを明示するものであった。(以後、0.3wt%-17時間加水分解物をアルカリプロテアーゼ分解物とし、A-1と略記する)。

Table 4-2 Amino acid compositions of sardine muscle hydrolyzates by alkaline protease

	Amino acid composition (%)	
	0.3wt% -17hr hydrolysis	1.0wt% -1hr hydrolysis
Gly	4.40	4.51
Ala	5.82	5.20
Val	5.67	6.70
Leu	8.09	8.76
Ile	4.40	4.51
Phe	3.69	2.74
Pro	3.40	3.28
Ser	3.55	3.97
Thr	4.11	4.10
Cys	2.27	0.96
Met	3.25	5.20
Trp	1.56	2.46
Tyr	2.84	3.42
Asp	11.91	9.30
Glu	16.31	14.78
Lys	8.23	9.03
Arg	4.40	5.06
His	6.10	6.02
Total	100.0	100.0

A-1中に存在するペプチドサイズを把握するため、Asahipak GS-320カラム(4.0mm×50mm)を用いたGPC分析(高速液体クロマトグラフ:島津LC-6A, 溶出:45%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸, 流量:0.5ml/min)に供した。Fig.4-5に示したように、A-1はその約93%が分子量250~1000のペプチド(平均ペプチド鎖長2.90, アミノ酸残基数2~4)に集約され、本加水分解条件での低分子ペプチドの生成効率が極めて高いことが明らかとなった。

なお、杉山ら^{70,104)}は脱脂しさらに酸類などの水溶性成分を除去したイワシ粉をアルカリプロテアーゼで分解することにより、本分解物よりも1.4倍高いACE阻害活性(IC₅₀=0.18mg protein/ml)を有する分解物(FPH)を得ている。しかしながら、FPHは分子量1000~2000と本分解物(A-1)の分子量250~1000と比較してペプチドサイズが大きいこと、また後述する消化試験において40%という大幅な活性低下すなわちペプチドの分解が認められていることなどから、FPHは機能性食品素材源としては不十分かつ不適であると考えられる。

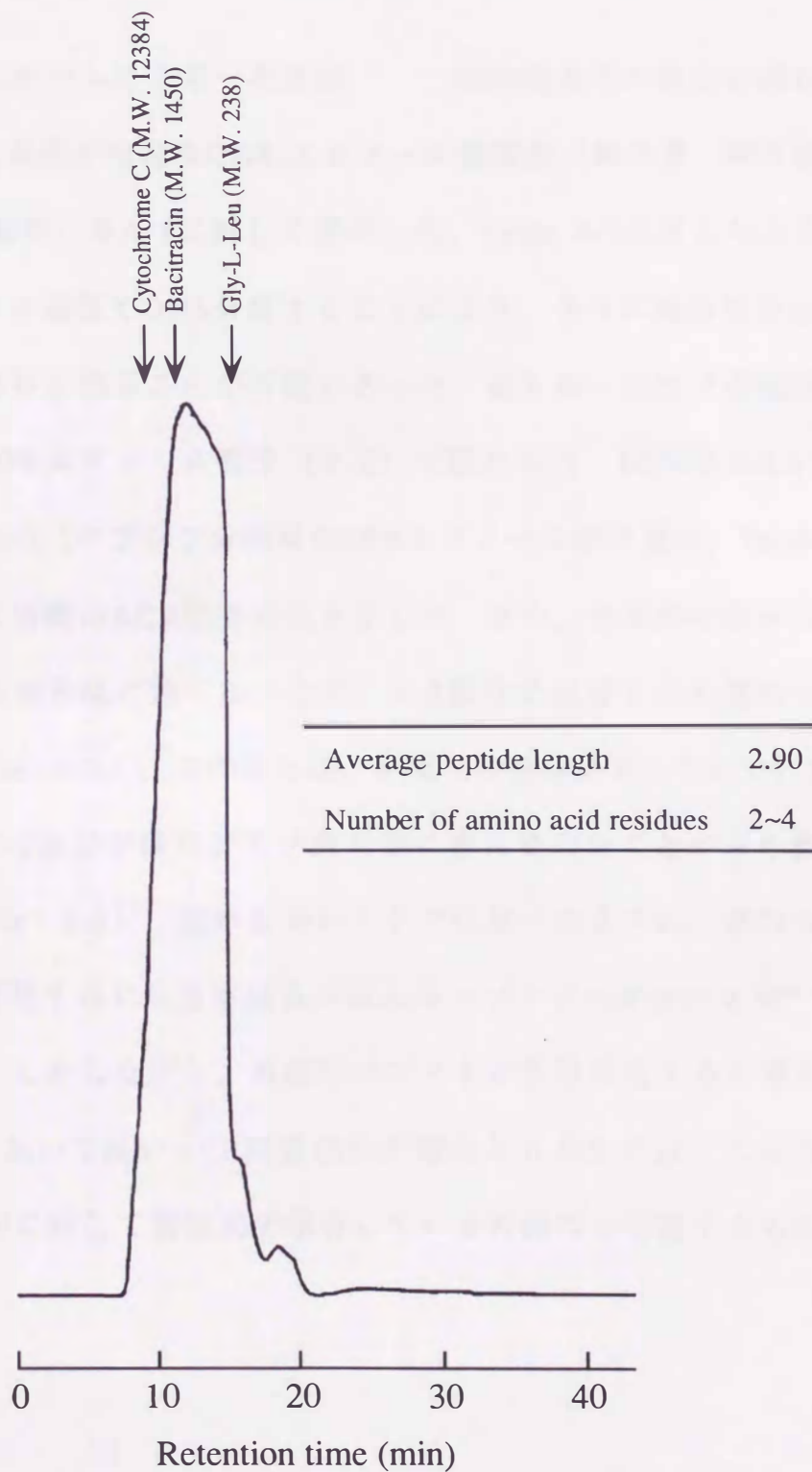


Fig.4-5 Asahipak GS-320 gel permeation chromatography of A-1 preparation

Column: Asahipak GS-320 (4.0mm × 50mm); Eluent: 45% CH₃CN in 0.1% TFA; Flow rate: 0.5 ml/min; Monitoring absorbance: 220 nm.

(2) ODSカラムによる一次精製 ACE阻害性の向上が図れ、食品素材として展開が可能なODS-エタノール精製法(第3章. 第3節, 第1項, (2) 参照)をA-1に対して適用した。Table 4-3に示したように、各種エタノール濃度でODS分離することにより、さらに高活性なACE阻害ペプチド画分を得ることが可能であった。最も高い活性は高極性溶出画分である10%エタノール画分(Y-2)で認められ、IC₅₀値は0.015mg protein/mlとF-3(ペプシン分解液の25%エタノール溶出画分, Table 3-2 参照)の約4倍高いACE阻害活性を示した。また、各画分の苦みは高エタノール溶出画分ほど強くなったが、Y-2画分ではほとんど認められなかった(Table 4-3)。このことは、かなりの苦みを有していたF-3画分と比較してY-2画分が酸性アミノ酸含量に富んでいたことから裏付けられる(Table 4-4)。前章においてすでに述べたように、強力なACE阻害作用を発現するには芳香族及び疎水性ペプチドの存在が必須⁶⁶⁻⁶⁸⁾とされている。しかしながら、高極性ペプチドが多数存在すると考えられるY-2画分において高いACE阻害活性が認められたことは、これらペプチド群がACEに対して別様式で阻害している可能性を示唆するものである。

Table 4-3 Separation of ACE inhibitors from alkaline protease hydrolyzate with ODS resin

Fraction No.	Protein-g(Yield)	IC50(mg protein/ml)	Bitterness	IC50(Pepsin treatment)
A-1 ¹⁾	13.6 (100)	0.26	±	0.62 (P-1)
Y-1(0% ethanol)	6.1 (45.6)	1.222	—	ND ²⁾ (F-1)
Y-2(10%)	3.9 (29.8)	0.015	±	0.83 (F-2)
Y-3(25%)	2.3 (17.6)	0.078	++	0.064 (F-3)
Y-4(50%)	0.3 (2.3)	0.041	+++	0.23 (F-4)
Y-5(99.5%)	0.1 (0.8)	—	±	— (F-5)

1) A-1 was obtained at 0.3wt% alkaline protease addition for 17hr - hydrolysis.

2) not detected.

Table 4-4 Comparison of amino acid composition of Y-2 with that of F-3

	Y-2 ¹⁾	F-3 ²⁾
Gly	5.23	5.23
Ala	4.20	6.33
Val	6.54	5.85
Leu	7.89	8.86
Ile	5.83	4.92
Phe	4.81	4.64
Pro	6.54	0.00
Ser	3.17	3.56
Thr	4.29	4.11
Cys	0.84	0.79
Met	4.01	2.64
Trp	1.40	
Tyr	3.73	2.80
Asp	12.42	10.83
Glu	12.51	10.32
Lys	7.94	10.53
Arg	5.62	6.15
His	3.03	3.84

1) Y-2 ; alkaline protease treatment (10% ethanol eluted fraction with ODS)

2) F-3 ; pepsin treatment (25% ethanol eluted fraction with ODS)

(3) 官能検査 Y-2画分の機能性食品素材としての有効性を判断するため、F-3画分との官能比較を行った。Table 4-5 に当研究室員10名によるY-2及びF-3画分の官能検査の結果を示した。なお、評価はうまみ、苦み、魚臭の3項目について、全く認められない0から非常に強い5の6点評点法により行い、評価項目の有意差の有無は二元配置分散分析(F検定)により判定した。その結果、Y-2画分はF-3画分と比較していずれの項目に対しても有意に ($p < 0.05$) 低いスコアを与えた。Y-2画分は酸性アミノ酸含量が多いにもかかわらず (Table 4-4)、苦みだけでなくうまみにおいても低いスコアを示したことは、酸性アミノ酸のペプチド内での結合位置に起因したためであると考えられる。

Table 4-5 Mean sensory scores for Y-2 and F-3 fractions

	Y-2 ¹⁾	F-3 ²⁾	F value ³⁾
Umami	0.30	1.64	19.29
Bitterness	1.58	2.83	6.40
Fish odor	0.70	3.25	73.05

1) Y-2 ; alkaline protease treatment (10% ethanol eluted fraction with ODS)

2) F-3 ; pepsin treatment (25% ethanol eluted fraction with ODS)

3) $F_{9}^{1}(0.05)=5.12$

A score of 0 indicates "None" and 5 "Very strong".

すなわち、酸性アミノ酸がペプチドのN末端に位置するときは“うまみ”を呈するが、それ以外の位置では“sour taste”を呈することが報告⁹²⁾されている。従って、Y-2画分の無味は酸性アミノ酸の配列位置が関与しているものと推察された。機能性食品素材としては食品本来の風味を損なわない無味無臭が最良とされる。従って、本研究で得られたY-2画分はうまみ、魚臭ともにほとんど認められず、苦みも非常に弱いと判定されたことから、広範な適用の可能な優れた機能性食品素材であると判断される。

第2項 各種消化管系酵素に対する消化耐性

*in vitro*において高いACE阻害活性を示し、風味に優れたアルカリプロテアーゼ分解物を機能性食品素材として適用するためには、消化管内での安定性、腸管吸収性、生体に対する抗原性、*in vivo*活性発現など数多くの問題をクリアしなければならない。そこで、まず各消化管における分解過程を想定して生体内酵素を選択し、それら酵素に対する消化耐性について検討を行った。Table 4-6はA-1をペプシン処理(pH 2, 37℃, 4時間)、続いてのpH 8, 4時間のトリプシン、キモトリプシン及びトリプシン・キモトリプシンの同時処理、さらにはブタ小腸液処理を行ったときの活性変動をまとめたものである。表から明らかなように、いずれの処理においてもACE阻害活性の低下は全く認められなかった。

Table 4-6 Resistance of alkaline protease hydrolyzate to digestion by gastrointestinal proteases

Digesting protease	Remaining ACE inhibitory activity (%)
None	100
Pepsin (pH2, 4hr)	114
Pepsin → Trypsin (pH8, 4hr)	104
Pepsin → Chymotrypsin (pH8, 4hr)	101
Pepsin → Trypsin + Chymotrypsin (pH8, 4hr)	105
Pepsin → Intestinal fluid (pH7, 4hr)	108

このことは、A-1の平均ペプチド鎖長が2.90、アミノ酸残基数が2～4の低分子ペプチド群であったこと (Fig.4-5) 及び低分子ペプチドが腸管内で安定であるとの報告¹³⁻¹⁶⁾ によく一致するものである。従って、A-1は消化酵素に対する耐性に優れたジもしくはトリペプチドを主要ACE阻害ペプチドとして含有する分解物であると考えられる。

第3項 モルモットに対する抗原性

次に、アルカリプロテアーゼ分解物の食品素材としての適用性を免疫学的に検討した。通常、高分子量10000前後以上の物質に抗原性は認められるが、プロテアーゼ処理を行うことによりその免疫原性は低下・消失することが知られている¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。そこで、A-1の無免疫原性を検証するため、モルモットを用いて能動性全身性アナフィラキシー (ASA) 及び同種受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を観察した。

Table 4-7にASA反応の結果を示した。対照として用いたBSAを皮下に感作した群は惹起抗原投与後、掻鼻、虚脱、嘔気、衰弱、喘鳴、呼吸困難、痙攣などの典型的なアナフィラキシー・ショック症状が認められ、30分以内に全例が死亡したのに対して、A-1を皮下に感作した群並びに経口で感作した群は惹起抗原投与後、アナフィラキシー反応は全く認められず、死亡例もなかった。ジ及びトリペプチドはほとんど免疫原性を有さないと考えられていることから、この結果は妥当であると考えられた。また、Table 4-8にPCA反応の結果を示した。BSAを皮下に感作した群では、5/12例がアナフィラキシー反応を呈して死亡し、7/12例にお

いて抗血清に依存した色素斑が認められたのに対して、A-1を経口で感作した群は全く色素斑が認められなかった。しかしながら、皮下で感作した群においてはその抗体価はBSAの1215~10935以上と比較すると15~135と小さいながらも3/6例で色素斑が認められた。これは、免疫強化作用及びIgG抗体産生誘導能力を有するFCAをアジュバントとして用いたこと、また感作時間が24時間であることから、IgG抗体の産生によるものと考えられる。また、ウシ、ヒトカゼインのトリペプチドに貪食細胞を活性化する作用¹⁰⁸⁾が認められていることから、マイトジェインとしてIgG抗体の産生を促進していることも推察される。しかしながら、ASA反応においては全例が陰性であったことから判断すると、産生されたIgG抗体はアナフィラキシー反応を誘発するものではない、もしくはIgA抗体などの防御機構により誘発しないことを示唆するものであり、A-1の食品としての適用性が示された。

Table 4-7 Active systemic anaphylaxis (ASA) in guinea pigs immunized with alkaline protease hydrolyzate

Immunization Antigen (dose, time, routes)	Challenge		Number of animals	Anaphylactic signs Number of observed				Mortality Number of died
	Antigen	Dose (<i>i.v.</i>) mg/animal		—	+	++	+++	
Saline + FCA ¹⁾ (0.25 ml/animal, 2times, <i>s.c.</i> ²⁾)	Saline	(0.25 ml)	6	6	0	0	0	0
BSA + FCA (1 mg/animal, 2 times, <i>s.c.</i>)	BSA	10	5	0	0	0	5	5
A-1 + FCA (1 mg/animal, 2 times, <i>s.c.</i>)	A-1	10	6	6	0	0	0	0
A-1 (10 mg/animal, 15 times, <i>p.o.</i> ³⁾)	A-1	10	6	6	0	0	0	0
A-1 (100 mg/animal, 15 times, <i>p.o.</i>)	A-1	100	6	6	0	0	0	0

1) Sample solutions were diluted with an equal of FCA.

2) *sub cutaneoue*

3) *per os*

Table 4-8 Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs induced by alkaline protease hydrolyzate

Immunization Antigen (dose, time, routes)	Challenge		Number of animals	Diameter (>5.0mm) 1/dilution of anti-sera							Mortality Number of died	
	Antigen	Dose (<i>i.v.</i>) mg/animal		×5	×15	×45	×135	×405	×1215	×3645		×10935
Saline + FCA ¹⁾ (0.25 ml/animal, 2times, <i>s.c.</i> ²⁾)	Saline	(0.25 ml)	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	- ⁴⁾	-	-	0
BSA + FCA (1 mg/animal, 2 times, <i>s.c.</i>)	BSA	10	5				6/6	6/6	6/6	4/6	4/6	0
A-1 + FCA (1 mg/animal, 2 times, <i>s.c.</i>)	A-1	10	6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6				5
A-1 (10 mg/animal, 15 times, <i>p.o.</i> ³⁾)	A-1	10	6	3/6	3/6	2/6	2/6	0/6	-	-	-	0
A-1 (100 mg/animal, 15 times, <i>p.o.</i>)	A-1	100	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-	0

1) Sample solutions were diluted with an equal of FCA.

2) *sub cutaneoue*

3) *per os*

4) not examined

第4項 ラットにおける血圧降下作用

アルカリプロテアーゼ分解物 (A-1) の機能性食品としての適用を図るため、高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた動物実験によって血圧降下作用を検討した。Fig.4-6に示したように、A-1の投与後2～3分に血圧の低下が認められ、3～5分に最大の効果が示された。また、A-1の投与量 (20, 40, 80, 200mg/kg) に依存してその血圧低下効果が増大したことから、本分解物が *in vivo* においても血圧降下作用を有していることが明らかとなった。周知のように、疾病に対する治療薬の合成並びにその疾病の解明の経緯には、モデル動物の開発が大きな比重を占めている。SHRは、正常血圧であるWistar系ラットの中で高血圧を自然発症したラットの数回の交配によって生成され、生後2～3ヶ月 (8～12週齢) で確実に高血圧 (ラットの場合、雄性180mmHg以上、雌性170mmHg以上) となる³⁴⁾。SHRの高血圧発生機序としては複数の遺伝子の作用によって、また神経系、内分泌系、末梢抵抗動脈などの種々の臓器の機能異常によって血圧上昇をきたすことが明らかにされているが、その原因は不明である³⁴⁾。それ故に、SHRはヒトの本態性高血圧症の良いモデルラットであると賞用されている。従って、SHRにおける血圧降下作用を考慮すると、A-1は本態性高血圧症発症予防に対して優れた機能性食品素材であると判断される。

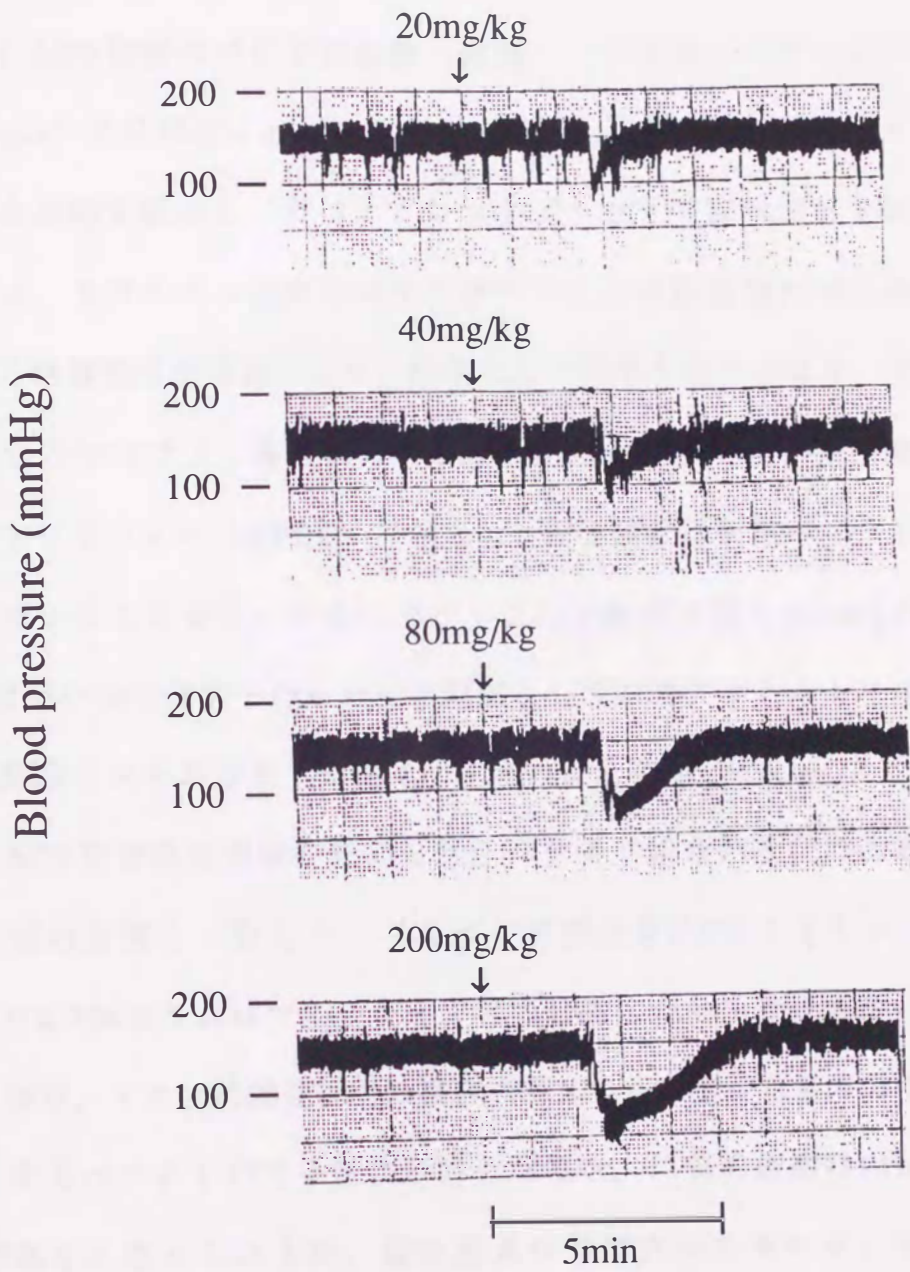


Fig.4-6 Effect of alkaline protease hydrolyzate on blood pressure of SHR

第5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 アルカリプロテアーゼ分解物 (A-1) 中に存在するACE阻害ペプチドの単離・精製を目的として、さらなる分離を試みた。カラムクロマトグラフィーはペプチドの収率を低下させ、またイオン交換クロマトグラフィーは脱塩操作が必要であることから精製操作が煩雑になり、結果として収率を低下させた。そこで、本研究ではODSにより得られたY-2画分を10mlに濃縮後、直接高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供した。Y-2画分は極性ペプチドを数多く含んでいることから、マルチモードでの分離が可能なAsahipak GS-320を用いたGPC分析を行った。移動相として20%アセトニトリルを含む50mM酢酸アンモニウム (pH6.7) を用いたところ (Fig.4-7), 4つの顕著なACE阻害活性領域が認められ、ペプチド結合の吸収である220nmの吸光度の位置と一致した。(これらの画分をFIIG-1,2,3,4と略記する)。GS-320カラムはマルチモードでの分離すなわち分子ふるい、疎水性相互作用、イオンの相互作用の複合作用による分離が可能であるため、対象とするペプチドの分子量に着目した場合、以後の精製はFIIG-3,4が妥当であると考えられるが、疎水度及び等電点pIを含めると本溶解液 (pH6.7) における低分子ペプチドの溶出は広い範囲にわたっているものと推察される。従って、以後の精製は全ての活性画分について行うものとした。

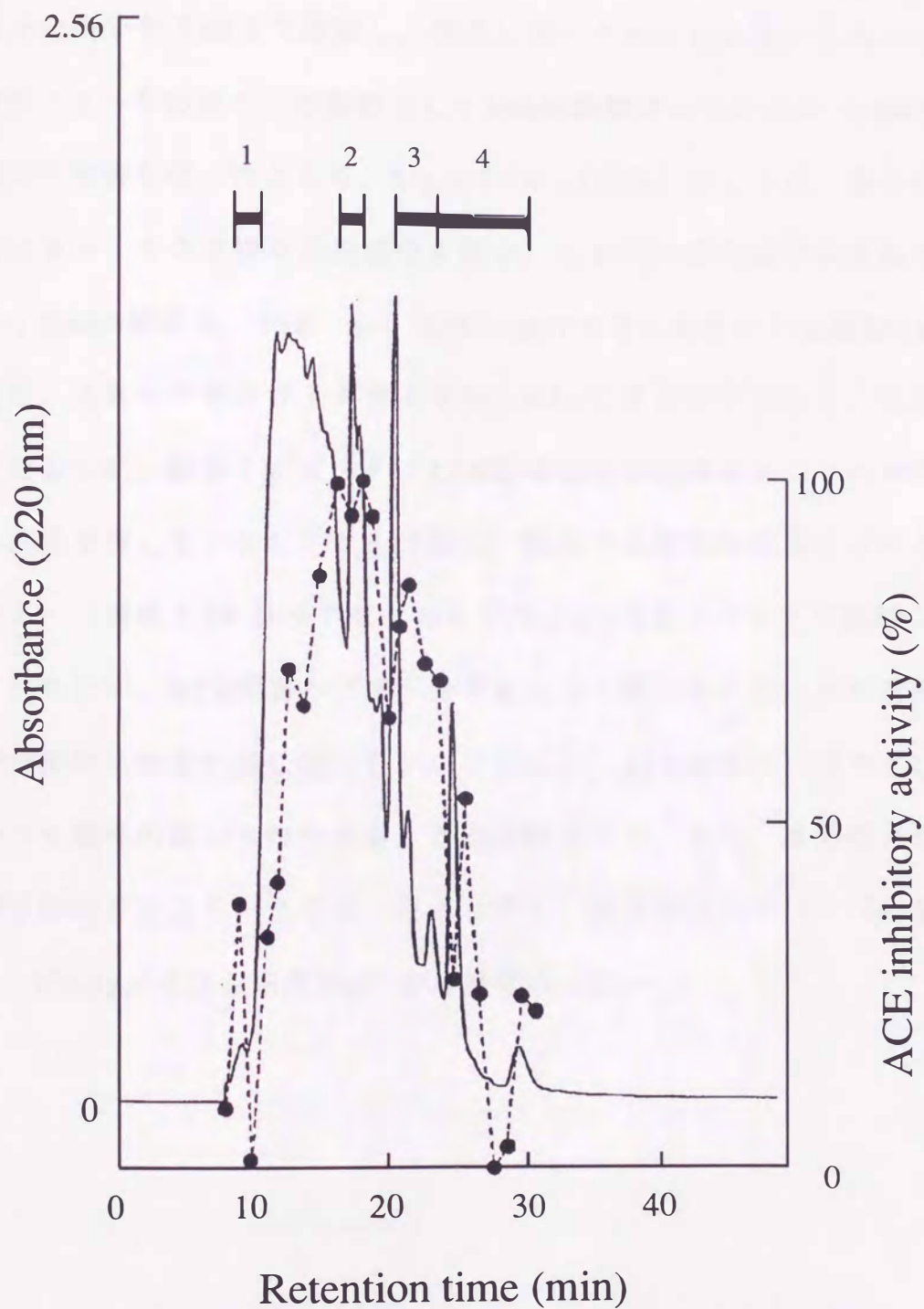


Fig.4-7 Chromatography on an Asahipak GS-320 column of active fraction (Y-2)

Column: Asahipak GS-320 (7.6mm × 500mm); Eluent: 20% CH₃CN/50mM ammonium acetate (pH 6.7); Flow rate: 1.0 ml/min.

各々の画分を5 mlまで濃縮し、前述と同一のカラムを用いて再クロマトグラフィーを行った。移動相として20mM酢酸アンモニウム (pH4.0) を用いて分析を行ったところ、Fig.4-8~4-11に示したように、各々の画分から2~4つの主要な活性画分を得た。これらの活性画分を分取し、0.5~1.0mlに濃縮後、TSK gel ODS-120Tカラムを用いた逆相HPLCに供した。それらのクロマトグラムをFig.4-12にまとめて示した。矢印で示したように、数多くのピークにACE阻害活性が認められ、その中から高い活性を有していたピークを分取し、同カラムを用いて再クロマトグラフィー (溶出: 10-30%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (40分)) を行い、ACE阻害ペプチドを単離した。得られたピークの溶出位置が全般的に高極性側に偏っていたことから、ACE阻害ペプチドとしてはかなり極性の高いものであることが示唆された。また、本分離ステップが2回のカラムワークであったことから、高収率でのペプチドの単離 (1~250 μ g/イワシ筋肉50g) が可能であった。

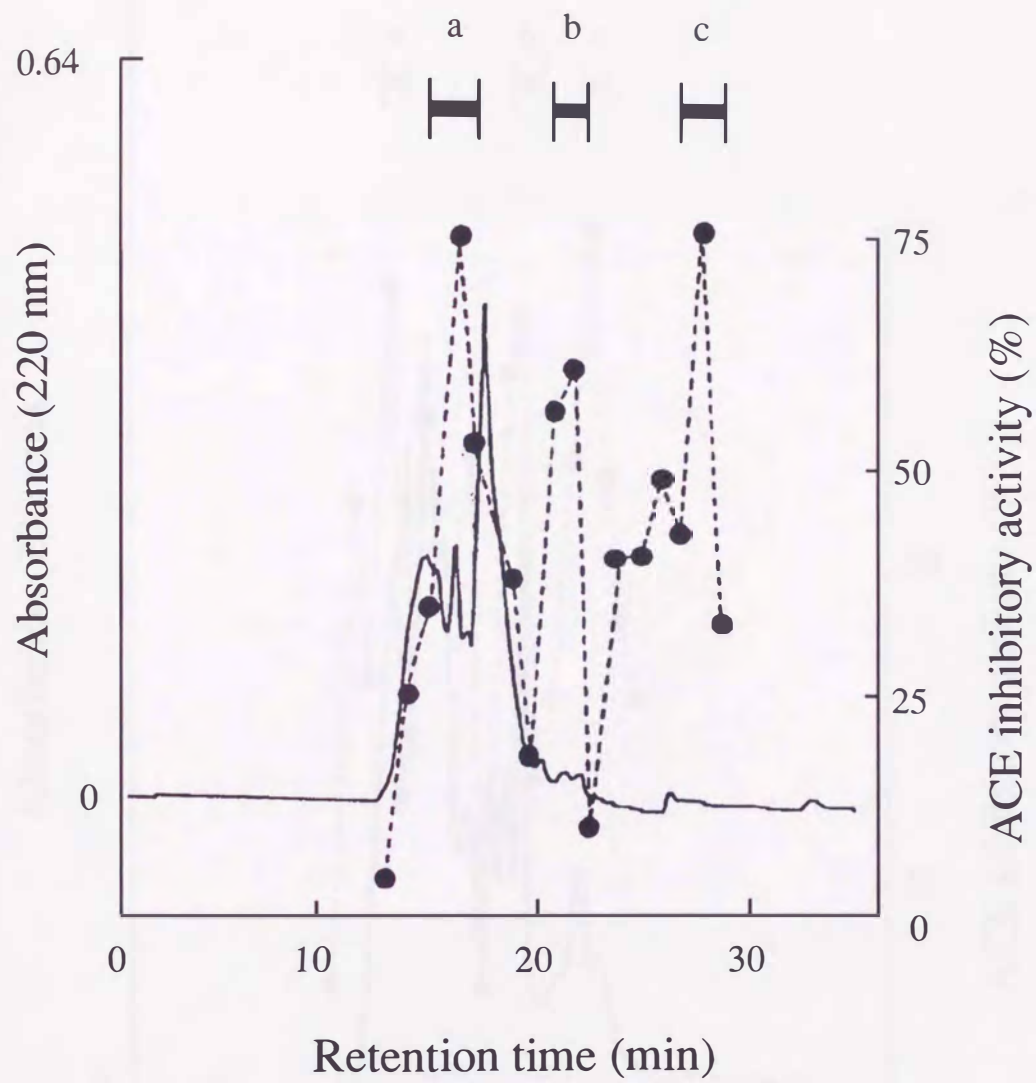


Fig.4-8 Rechromatography of FIIG-1 from Asahipak GS-320

Column: Asahipak GS-320 (7.6mm × 500mm); Eluent: 20mM ammonium acetate (pH 4.0); Flow rate: 1.0 ml/min.

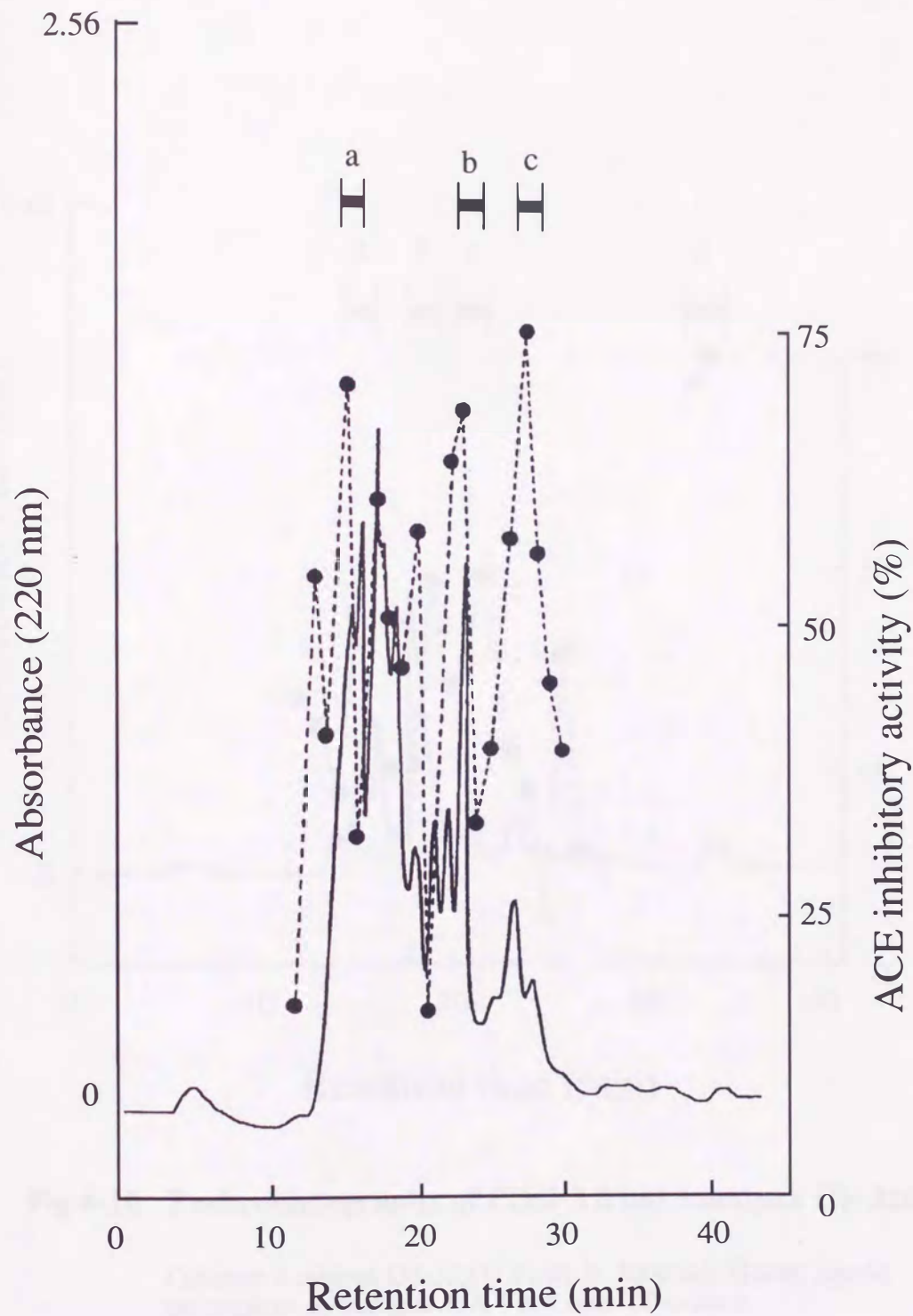


Fig.4-9 Rechromatography of FIIG-2 from Asahipak GS-320

Column: Asahipak GS-320 (7.6mm × 500mm); Eluent: 20mM ammonium acetate (pH 4.0); Flow rate: 1.0 ml/min.

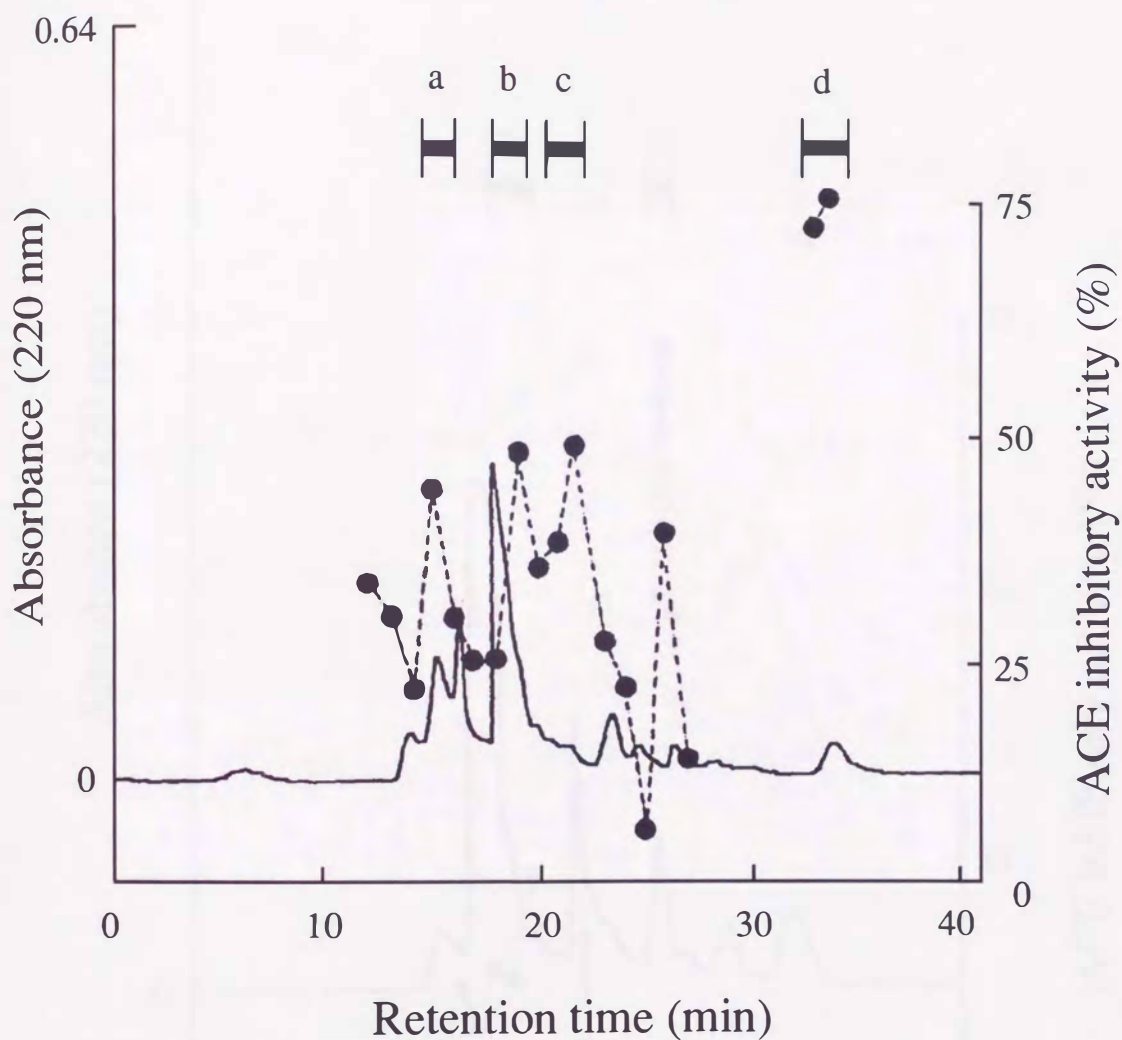


Fig.4-10 Rechromatography of FIIG-3 from Asahipak GS-320

Column: Asahipak GS-320 (7.6mm × 500mm); Eluent: 20mM ammonium acetate (pH 4.0); Flow rate: 1.0 ml/min.

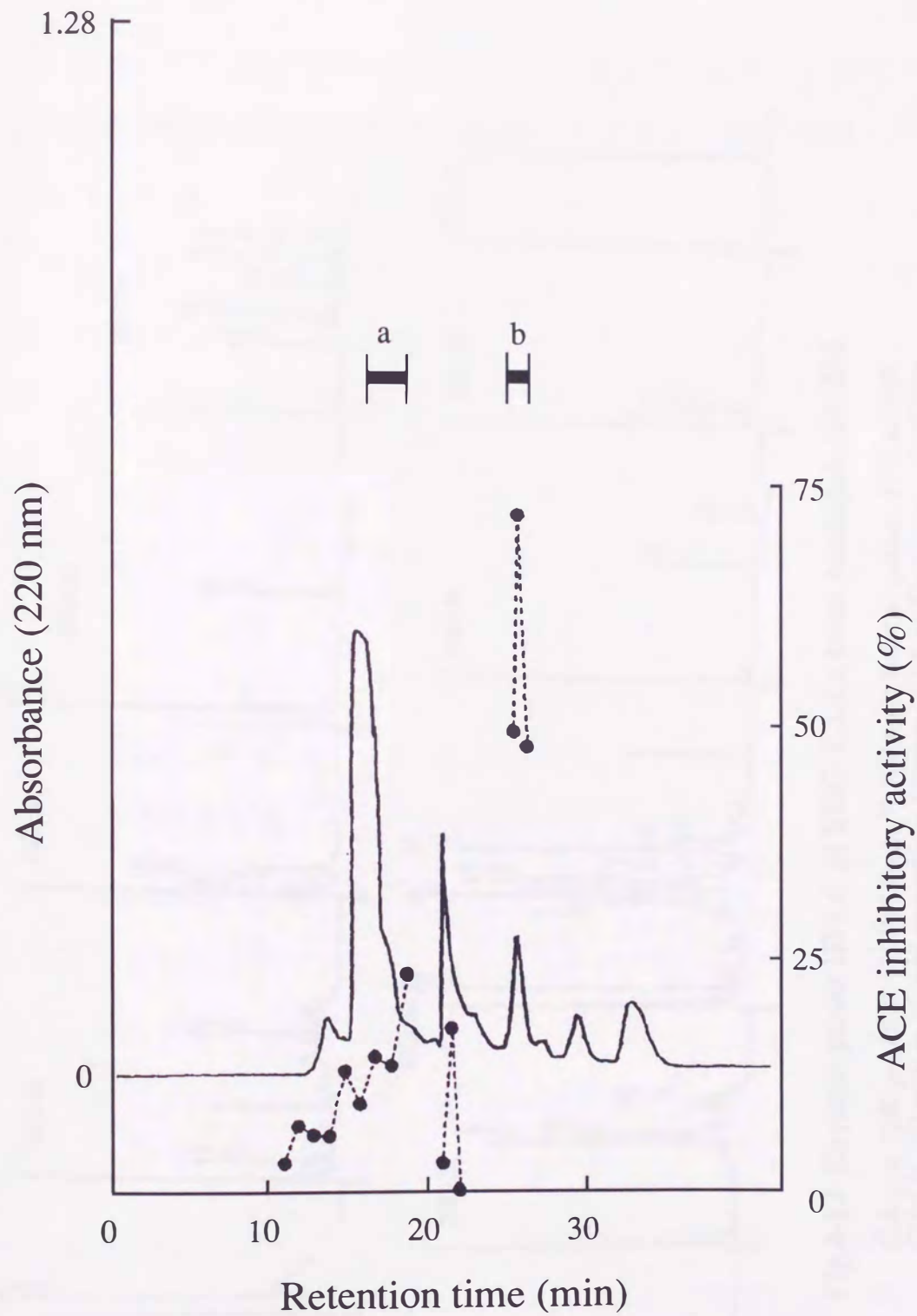


Fig.4-11 Rechromatography of FIIG-4 from Asahipak GS-320

Column: Asahipak GS-320 (7.6mm × 500mm); Eluent: 20mM ammonium acetate (pH 4.0); Flow rate: 1.0 ml/min.

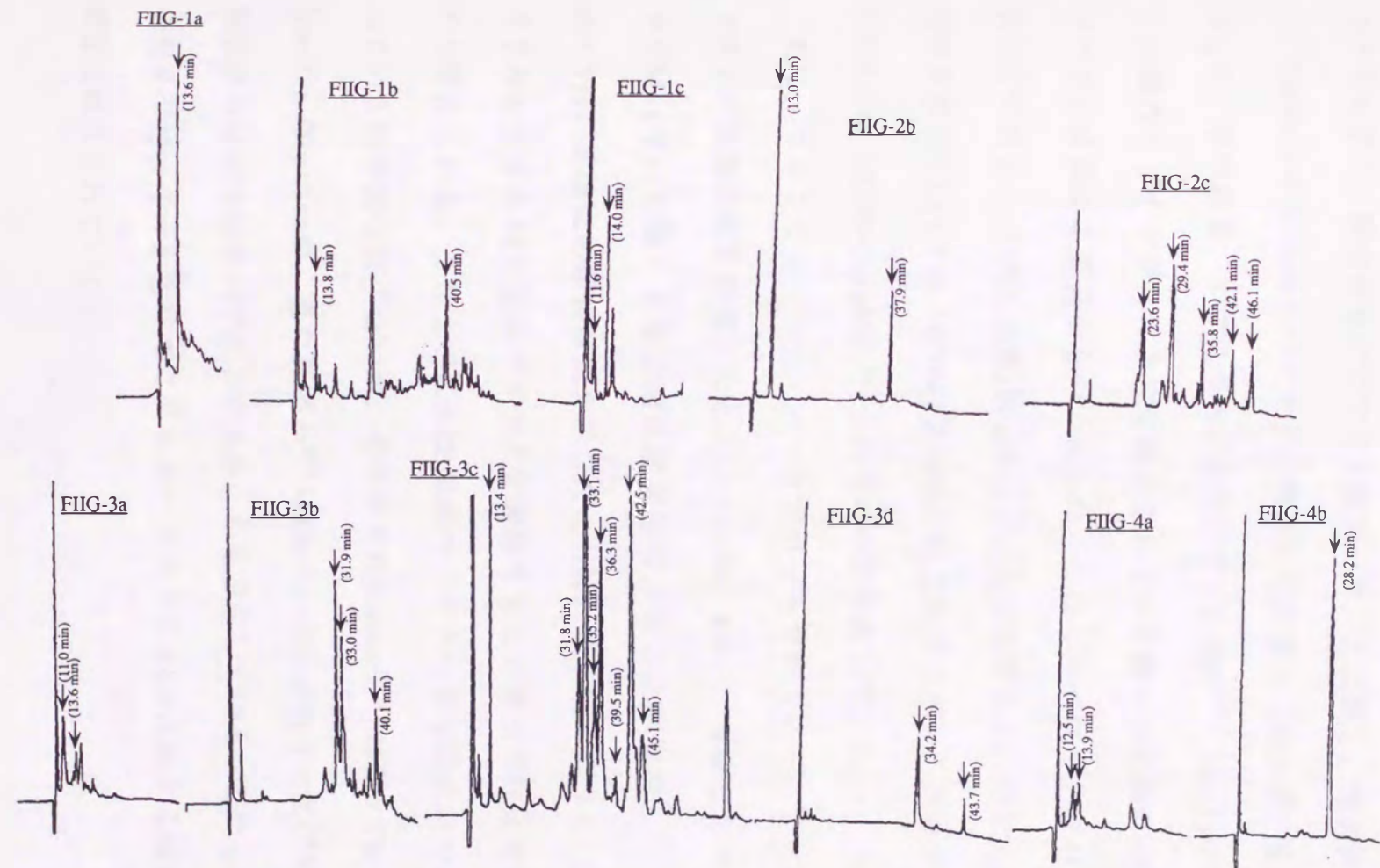


Fig.4-12 Reverse-phase HPLC of FIIG-1,2,3,4 from Asahipak GS-320

Column: TSK gel ODS-120T (7.8mm × 300mm); Solvent system: 10% to 50% CH₃CN (80 min) in 10 mM ammonium formate (pH 6.3); Flow rate: 1.0 ml/min.

(2) ACE阻害ペプチドの構造決定

単離した13種のACE阻害ペ

プチド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。Table 4-9 に各々のペプチドの構造とその活性 (IC₅₀値) をまとめて示した。その結果、すでに報告されているVal-Phe⁶⁶⁾、Ile-Tyr^{66,109)}を除く11種のペプチドが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。これらのペプチドのACE阻害活性はそのほとんどがIC₅₀値100μM以下と高活性であり、中でも最も高い活性を示したLys-Trp (IC₅₀=1.63μM) は既知のジペプチドの中で最も高いVal-Trp (IC₅₀=1.6μM)⁶⁶⁾ と同等の活性を有していた。

次に、ラインウェーバー・バークプロットを行うことにより各々のペプチドの阻害様式を評価したところ (Table 4-9)、単離したペプチドの中でMet-Tyrを除く8種が拮抗的阻害によることが判明した。ここでMet-Tyrが非拮抗的阻害様式を示したことは、疎水性に基づくことなく、うまみを有するACE阻害ペプチドを調製する上で有用な知見を与えるものと考えられる。これまでにACE阻害ペプチドの阻害様式について検討している報告例は数少ないが、その中でKohamaら⁷⁴⁾ はPro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Aspが、また斉藤ら⁴⁵⁾ はIle-Tyr-Pro-Arg-Tyr及びVal-Tyrが非拮抗的なACE阻害ペプチドであることを報告している。しかしながら、現在までMet-Tyrを含めてこれらのペプチドのACEに対する阻害部位の特定化はなされていない。

Table 4-9 ACE inhibitors derived from alkaline protease hydrolyzate

Amino acid sequence	Amino acid ratio in acid hydrolyzate	IC50 (μM)	Inhibition mode
Met-Phe	Met 1.00, Phe 1.21	44.7	competitive
Arg-Tyr		51	competitive
Met-Tyr		193	non-competitive
Leu-Tyr	Leu 1.19, Tyr 1.00	38.5	competitive
Tyr-Leu		82	competitive
Ile-Tyr ¹⁾	Ile 1.00, Tyr 0.64	10.5	competitive
Val-Phe ¹⁾	Val 1.00, Phe 1.16	43.7	competitive
Lys-Trp	Lys 1.00, Trp —	1.63	competitive
Gly-Arg-Pro		20.0	
Arg-Phe-His		330	
Ala-Lys-Lys	Ala 1.00, Lys 1.63	3.13	
Arg-Val-Tyr	Arg 1.00, Val 1.00, Tyr 0.91	205.6	competitive
Gly-Trp-Ala-Pro		3.86	

¹⁾ These peptides have been already reported by Cheung (1980).

(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検索したところ、Arg-Val-Tyr (IC₅₀=205.6μM) は一連のアンジオテンシン類 (アンジオテンシンI, II, III, des Asp[1]-アンジオテンシンI) のN末端側配列と完全に一致していた (Table 4-10)。血圧上昇に関与するアンジオテンシン類の配列中に本来の顕在機能とは逆の血圧上昇抑制作用を有するフラグメントが存在していたことは、一方的な血圧上昇系と位置づけられているレニン・アンジオテンシン系が血圧上昇を抑制する機能をも備えた自己血圧調節系であることを示唆するものである。この点については次章にて詳細な検討を加えた。

Table 4-10 Sequence homology of sardine ACE inhibitor and angiotensins

Sardine ACE inhibitor	Arg-Val-Tyr
Angiotensin I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
Des Asp[1]-angiotensin I	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
Angiotensin II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
Angiotensin III	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

第4節 小括

イワシ蛋白質中に潜在的に存在するACE阻害ペプチドを顕在化・高濃度化し、しかも機能性食品素材として広範な実用性を有する標品の創製を目的として、従来行われていた三次機能についての検討のみならず、二次機能をも考慮に入れた複合機能性物質の検索を行い、以下の結果を得た。

1) *Bacillus licheniformis*由来のアルカリプロテアーゼをイワシ筋肉に対して0.3wt%添加し、加水分解を17時間行うことにより、高いACE阻害活性 ($IC_{50}=0.26\text{mg protein/ml}$) を有し、かつ苦み及び魚臭を示さない優れた分解物 (A-1) の調製を可能とした。

2) A-1のペプチドサイズをGPC分析及び平均ペプチド鎖長測定により求め、本分解物はその93%が分子量250~1000、平均ペプチド鎖長2.90であり、アミノ酸残基数2~4の低分子ペプチド群からなることを明らかにした。

3) A-1をODS充填カラムに通した結果、高極性溶出 (10%エタノール溶出) 位置において、極めて高いACE阻害活性 ($0.015\text{mg protein/ml}$) が認められ、その画分が酸性アミノ酸に富むことを明らかにした。

4) ODSカラムによる一段階精製で得られた画分を官能評価した結果、うまみ、魚臭ともにほとんど認められず、苦みも非常に弱いと判定され、本画分が適用範囲の広い優れた機能性食品素材であることが示された。

5) 生体内酵素及びブタ小腸液を用いてA-1の消化試験を行った結果、

A-1は消化後においても活性の低下は認められず、消化耐性に優れていることが明示された。

6) A-1の抗原性の有無をモルモットを用いて検討した結果、経口投与において能動性全身性アナフィラキシー反応、同種受身皮膚アナフィラキシー反応ともに認められず、食品としての適用性が示された。また、皮下投与においてわずかに同種受身皮膚アナフィラキシー反応が観察されたが、産生されたIgG抗体はアナフィラキシー反応を誘発しないことを明らかにした。

7) 本態性高血圧症のモデル動物であるSHRを用いてA-1の血圧降下作用を検討したところ、被検液注入後3～5分に最大の効果が発現すること並びに投与量に依存してその効果が増大することを実証した。

8) ODS処理後、GPC及び逆相HPLCによる2回のカラムワークでA-1中に含まれるACE阻害ペプチドを高収率(1～250 μ g/イワシ筋肉50g)で単離した。

9) 単離した13種類のACE阻害ペプチドの構造決定を行ったところ、Val-Phe, Ile-Tyrを除く11種のペプチドが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。また、これらのペプチドのほとんどはIC₅₀値100 μ M以下と高活性であり、ジ及びトリペプチドであった。最大の活性を示したLys-Trp(IC₅₀=1.63 μ M)は既知のジペプチドの中で最も高いVal-Trp(IC₅₀=1.6 μ M)と同等の活性を有していた。

10) 単離したペプチドの中で、Arg-Val-Tyrは一連のアングiotenシ

ン類 (アンジオテンシンI, II, III, des Asp[1]-アンジオテンシンI) のN末端側配列と完全に一致することを明らかにした。

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

血圧調節は生命維持の基本であり，神経系，体液系，血管系，腎系など多くの因子の相互作用によって制御されている．高血圧症はこれら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^{18,19)}が，未だその発症の90%が原因不明な本態性高血圧症として留保されている．現在のところ，血管収縮作用及びアルドステロン分泌促進作用を有するアンジオテンシン (ANG) IIの生成阻害，すなわちアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害薬の薬理効果^{19,110)}から，体液系因子の一つであるレニン・アンジオテンシン (R-A) 系が本態性高血圧症の発症と密接に関わっていると考えられている．また，R-A系は循環系のみならず，脳，心臓，腎，血管壁などの各組織にも存在し，各組織で異なる生理作用をなしていることが報告^{29-32,111)}され，R-A系の持つ生理効果に対する関心が一層深まりつつある．

一方，1954年にSkeggsら²⁵⁾によってANGIIが見出されて以来，分子レベルでの研究が精力的になされ，ANGIIの活性維持には少なくとも第3位 (バリン) から第8位 (フェニルアラニン) までのヘキサペプチドが

必要であることが明らかとなっている¹¹²⁾。すでに、ANG (2-8) である ANGI^{113,114)} と ANG (3-8) である ANGI^{18,112)} は ANGI 様作用を有していることが報告されている。また、種々の臓器における ANG 類の代謝に関する研究¹¹⁵⁻¹¹⁹⁾ も数多くなされ、中でも Ferrario ら^{120,121)} はイヌの脳を用いて ANGI 由来の ANG (1-7) を見出し、このペプチドが ANGI と同様の神経系の活性化及びバソプレシン (抗利尿ホルモン) の分泌促進作用を有することを報告している。一方、最近 Harding の研究グループ¹²²⁻¹²⁵⁾ は ANGI が特異的に結合する受容体を細胞表面に見出し、これが ANGI と結合した場合内皮細胞に依存した血管拡張作用が生じることを、また Ferrario ら¹²⁶⁾ は ANG(1-7) が血管拡張作用を有するプロスタグランジン I₂ を放出する作用をも有していることを報告しており、R-A 系の新しい機能が見出されつつある。

前章において、イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ分解物中より Arg-Val-Tyr の配列を持つ ACE 阻害ペプチドを見出し、これが一連の ANG 類の配列中に存在すること、すなわち血圧上昇に関与する ANG 類の配列中に本来の顕在的機能とは逆の血圧上昇抑制作用を有するフラグメントが存在することを明らかにした。ANG 類の高血圧発症因子に関する生理学的研究は内外において数多くみられるが、ANGI すなわち 6 つ以下のペプチド代謝物は不活性であるとの認識が強く、ANG 代謝分解機構及びその血圧上昇抑制への直接的関与に関する研究例は皆無である。

そこで、本章では ANG 代謝物の潜在的生理機能を明らかにすると同時に、一方的な昇圧系であるとされている R-A 系による自己血圧調節機構

の解明を試みた。

第2節 材料及び方法

第1項 試薬

種々のアンジオテンシン (ANG) 類はSigma社もしくは国産化学社より購入した。入手不可能なANGフラグメントは国産化学社製固相合成装置を用いて合成した。内標準として用いたD-Leu-D-LeuはSigma社より、蛍光誘導体化試薬であるナフタレン-2,3-ジアルデヒド (NDA) はFluka社より、シアン化ナトリウムは片山化学工業社より購入した。ヘパリン含有真空採血管 (Heparin採血管) 及びEDTA-2Na含有真空採血管 (EDTA採血管) はテルモ社より購入した。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 採血プロトコール

(1) ラット血漿 *in vivo* 試験 (次項) に供した高血圧自然発症ラット (SHR, 日本チャールスリバー社) (雄性, 12週齢, 20匹) を試験終了後, 屠殺し, 全血を一つにまとめてSHR血液とした。その血液を4℃, 3000回転で15分間遠心分離 (佐久間製作所社製RSL-08A) して血漿 (SHR血漿) を得た。また, 対照として正常血圧であるWistar系ラット (雄性, 12週齢, 20匹, 生物技術研究所より供試) の血液を用い, 上

記と同様に遠心分離して血漿（Wistar血漿）を得た。

（2）ヒト血漿 採血は正常血圧男子7名（収縮期血圧：112±18，拡張期血圧：61±11，平均年齢：23.5±1.1歳）で行い，前日の夜食と当日の朝食を抜き，排尿して30分間の安静仰臥位状態後，静脈よりあらかじめ氷水で冷却したHeparin採血管及びEDTA採血管を用いて採血した。その後，60分間の立位歩行を行い，再度採血した。得られた血液は上記同様4℃，3000回転，15分間遠心分離し，各々の血漿を得た。血漿中のレニン活性はチバ・ガイギー社製レニン活性測定用キットを用いて測定した。なお，いずれの血漿も使用直前まで-40℃で保存した。

第3項 *in vivo* 試験

実験動物としては，11週齢，雄性のSHRを1週間予備飼育し，尾動脈圧が180mmHg以上を示す20匹（体重；300～330g）を試験に供した。試験群は，Val-Tyr（20mg/kg，50mg/kg），ANGIII（20mg/kg），カプトプリル（30μg/kg）を静脈投与した4群に区分し，1群を5匹とした。Photo.5-1に示したように，血圧はネンブタール（50mg/kg）麻酔下で，左大腿静脈より生理食塩水に溶解させた試料（1.0ml/kg）を注入後，頸動脈より血圧トランスデューサー（日本光電製：DX-360），歪圧力用アンプ（日本光電製：AP-601G）を介して観血的に直接測定した。

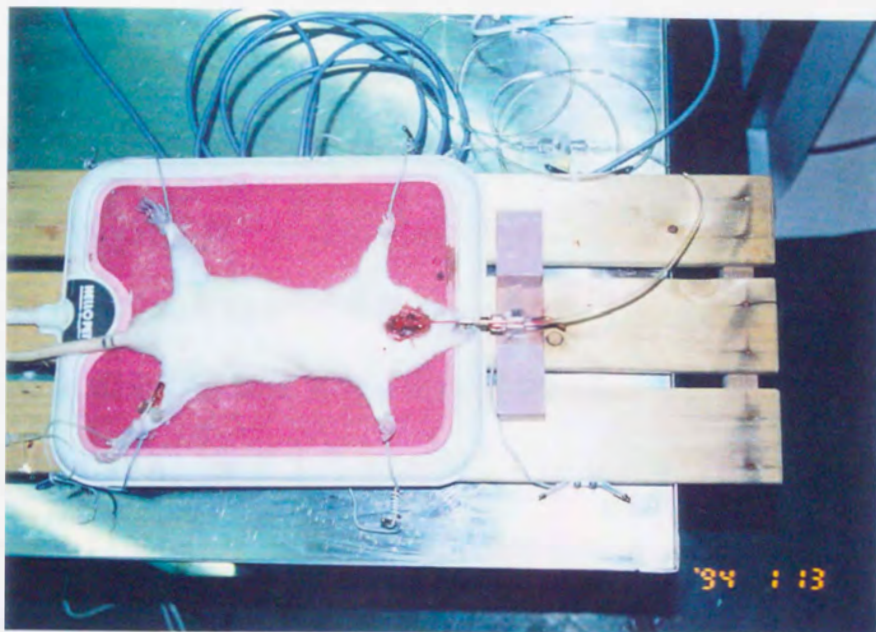


Photo.5-1 Direct measurement of arterial pressure of SHR

A rat was anesthetized with Nembutal (50 mg/kg). The carotid artery and femoral vein were cannulated with a polyethylene tube. Blood pressure was monitored from the artery with a Nihon Koden DX-360 blood pressure transducer connected to an amplifier (Nihon Koden AP-601G).

第4項 アンジオテンシン代謝過程の再現化

37°Cで5分間プレインキュベートしたラット血漿 (900 μ l) に対して内標準としてのD-Leu-D-Leu (終濃度0.4mM) 並びに十分量のANGIIもしくはANGIII (終濃度12.5wt%) を添加し, 37°Cで0.5~30分間インキュベートした. 10%トリクロロ酢酸溶液 (TCA, 終濃度1.0%) 添加により血中内酵素を失活させた後, 限外ろ過 (日本ミリポア社製: Molucut L, 排除限界5000) を行い, 分析試料とした. なお, ヒト血漿 (Heparin採血管) においては上述の1/2のスケールで行った. 生成物 (ANG代謝物) 及びその生成量の測定は試料を直接逆相HPLC (高速液体クロマトグラフ: 島津LC-9A, カラム: ナカライテスク社製Cosmosil 5C18-AR (4.6mm \times 250mm), 検出器: 島津紫外可視検出器SPD-10AV, 溶出: 10-25%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (150分), 検出波長: 220nm, 流量: 0.5ml/min, カラム温度: 30°C) に供することにより行った. ANG代謝物の同定は生成ピークを分取し, アミノ酸分析に供することにより行い, またその生成量は内標準を用いて規格化することにより定量した.

第5項 アンジオテンシナーゼ活性の測定

ヒト血漿中におけるアンジオテンシナーゼ活性の測定は, 基質としてANGIIを構成するジペプチド (Asp-Arg, Arg-Val, Val-Tyr, Tyr-Ile, Ile-His, His-Pro, Pro-Phe) を用いることにより行った. 内標準としてのD-Leu-D-Leu (終濃度0.5mM) を含むジペプチド溶液 (終濃度

1.0mM/0.1M Tris-Maleate buffer (pH7.4) -1.0mM CaCl₂) (500 μl) にヒト血漿 (Heparin採血管) (20 μl) を添加し, 37°Cで30分間インキュベートした. EDTA-2Na溶液 (0.1M/0.1M Tris-Maleate buffer (pH7.4)) (25 μl) 添加により, 血中内酵素を失活させた後, 直接逆相HPLCに供した (カラム: ナカライテスク社製Cosmosil 5C18 (4.6mm×250mm), 溶出: 5-15% (15分), 15-25% (37.5分) アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸, 流量: 0.4ml/min, カラム温度: 30°C). 反応による各ジペプチドの減少量を内標準で規格化することにより定量化し, 血漿 1 ml当たり 1 分間に 1 μmolの基質を消費するときの酵素量を 1 Uとして定義した.

第6項 アンジオテンシン類の定量

(1) ヒト血漿中におけるアンジオテンシン代謝物の精製 ヒト血漿 (EDTA採血管) (10ml) をMolucut L (排除限界; 5000) を用いて限外ろ過し, 濃縮 (0.5ml) 後, 逆相HPLCに供することによりANG代謝物 (ANGI, II, III, (3-8), (4-8), (5-8), Val-Tyr) を一次精製した (HPLCの条件は本節, 第4項と同様). 各画分 (90 μl) を同カラムを用いて再クロマトグラフィー (ANGI, II, III及び(3-8); 20-25%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (100分), ANG (4-8) 及び(5-8); 15-25% (100分), Val-Tyr; 5-15% (100分)) し, 次なる蛍光HPLC分析法に供した.

(2) 蛍光誘導体化条件 ナフタレン-2,3-ジアルデヒド (NDA)

による蛍光誘導体化はMontignyらの変法¹²⁷⁾を一部改変して行い、誘導体化試料をHPLCへ注入(90 μ l)した。すなわち、20mMホウ酸塩緩衝液(pH9.5)に溶解した検体(50 μ l)に10mMシアン化ナトリウム/20mMホウ酸塩緩衝液(pH9.5)(10 μ l)、NDA/メタノール(50 μ l)を添加し、室温で反応させることにより誘導体化を行い、蛍光HPLC分析に供した。なお、NDA濃度及び反応時間は結果及び考察の第5項に記した。

高速液体クロマトグラフ：島津LC-9A、カラム：ナカライテスク社製Cosmosil 5C18-AR(4.6mm \times 250mm)、蛍光検出器：島津分光蛍光検出器RF-10A、溶出：アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(ANGI, II, III; 25-40%(100分)、ANG(3-8)及びVal-Tyr; 45-55%(100分)、ANG(4-8)及び(5-8); 30-45%(100分))、検出：励起波長(Ex)=420nm、蛍光波長(Em)=490nm、流量：0.5ml/min、カラム温度：25 $^{\circ}$ C。また、NDA-ANGIをはじめとする誘導体化試料のピーク同定は、島津紫外可視検出器SPD-10AVを蛍光検出器の直前に直列配置し、UV検出(220nm)との保持時間の一致により行った。

第3節 結果及び考察

第1項 アンジオテンシン代謝物の*in vitro*生理作用

まず、アンジオテンシン(ANG)II配列を基本骨格として、これまで

に報告されているANGフラグメント並びに代謝生成が予測されるフラグメントを合成し、これらフラグメントの*in vitro*でのACE阻害性を検討した。なお、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IC₅₀値として示した。ここでは、ANGIIのIC₅₀値が585.4μMであったことから、この値より小さいIC₅₀値を示すペプチドをACE阻害活性を有するペプチドと判定した。

Table 5-1に示したように、9種のフラグメントペプチドが阻害活性を示し、中でも5つのフラグメント、ANGIII (IC₅₀=27.9μM)、ANG (1-7) (21.1μM)、ANG (3-8) (6.55μM)、ANG (5-8) (11.6μM)、ANG (3-4) (26.0μM)が顕著なACE阻害活性を呈した。従来、ANG類のACE阻害作用についてANGII、III自体^{128,129)}及びANGIからII変換時に切り出されるHis-Leu⁶⁶⁾に関する報告はなされているが、その他の代謝物に対しては不活性であるとの認識が強く、研究も皆無であった。しかしながら、ANGII由来のフラグメント中にACE阻害作用を有するペプチド配列が存在したことは、生体に対してANG代謝物が何らかの生理的機序を担っていることを強く示唆するものであった。さらに、これら5種の活性フラグメントは全てVal-Tyr配列を共通構造として有していたことから、この配列は活性発現にとって重要な要素であると考えられた。

Table 5-1 ACE inhibitory activity of angiotensin II fragments

Fragments								Abbreviation	IC50(μM)
1	2	3	4	5	6	7	8	ANG II	585.4
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe								ANG III	27.9
Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe								ANG(1-7)	21.1
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro								ANG(3-8)	6.55
Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe								ANG(4-8)	457.5
Tyr - Ile - His - Pro - Phe								ANG(5-8)	11.6
Ile - His - Pro - Phe								ANG(2-4)	205.6
Arg - Val - Tyr								ANG(3-5)	141.5
Val - Tyr - Ile								ANG(2-3)	N.D. ¹⁾
Arg - Val								ANG(3-4)	26.0
Val - Tyr								ANG(4-5)	N.D.
Tyr - Ile								ANG(5-6)	386.0
Ile - His								ANG(6-7)	—
His - Pro								ANG(7-8)	N.D.
Pro - Phe									

1) N.D. ; not detected

次に、ヒト血漿を用いてこれらペプチドの生成確認を行った。ヒト血漿に十分量のANGIIを加え、37℃で4時間インキュベートし、逆相HPLCに供したところ、4時間のインキュベートによって、ANGIIの分解に由来する複数のピーク成分が新たに出現した (Fig.5-1)。そこで、これらピーク成分のACE阻害性を測定したところ、図中に黒塗りで示した3つのピークに顕著なACE阻害活性が認められた。これらピークはアミノ酸分析により各々Val-Tyr, ANG (5-8), ANG (4-8) であると同定された。以上のことから、ACEを阻害し得るANGII由来の代謝物が血中内で確実に生成されることが初めて明らかとなった。

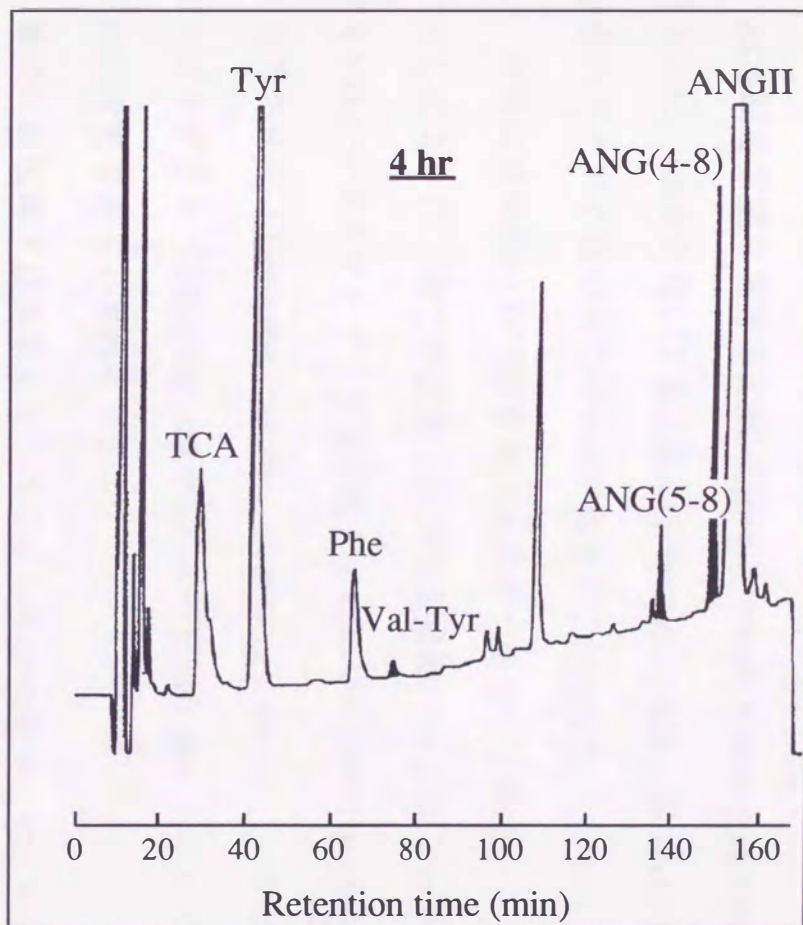
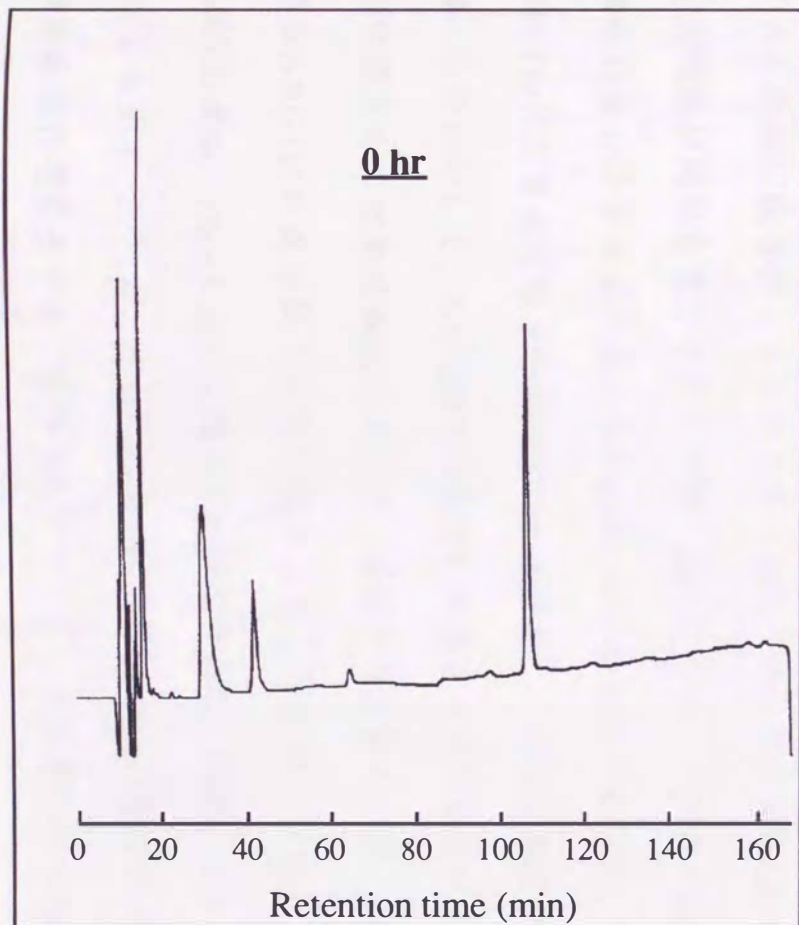


Fig.5-1 HPLC elution profiles from *in vitro* degradation of ANG II in human plasma

Column: TSK gel ODS-120T; Solvent system: 5% to 11% CH₃CN (60min) and 11% to 30% (63min) in 0.1% TFA; Flow rate: 1.0ml/min; Monitoring absorbance: 220nm; Column oven: 30°C