

シロサケ頭部、肝臓およびホタテガイ中腸線の プロテアーゼ分解物中のアンギオテンシン I 変換酵素阻害活性

太田智樹・佐々木茂文

Inhibition of Angiotensin I Converting Enzyme by Protease Hydrolysates Derived from Chum Salmon Head and Liver and from Scallop Digestive Gland

Tomoki OHTA and Shigefumi SASAKI

Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were investigated in the head and liver of chum salmon and the digestive gland of scallop.

After these tissues were hydrolyzed by commercial proteases for food, the ACE inhibitory activity of hydrolysates was measured. The hydrolysate of chum salmon head produced with BIOPUR-ASE showed the most potent inhibitory activity.

This hydrolysate was separated into fractions using ODS resin. Each fraction eluted with 10, 30, 50% ethanol showed inhibitory activity. The most active fraction was that eluted with 50% ethanol; it showed 50% inhibition for ACE at $78\mu\text{g}/\text{ml}$. The molecular weight of this fraction was estimated to be 500-3,000 from the results of high-performance gel chromatography analysis. Furthermore, amino acid analysis showed that these inhibitors contained large quantities of glycine, lysine, and leucine.

食品の持つ生体調節機能を解明し、健康増進に役立てようとする研究が盛んに行われている。最近、食品由来の機能性成分としてアンギオテンシン I 変換酵素 [EC 3.4.15.1] (ACE) 阻害ペプチドが注目を集め、各種食品中に広く存在することが認められている。ACE 阻害ペプチドは血圧調節に重要な役割を持つレニン-アンギオテンシン昇圧酵素系に作用し血圧上昇を抑制する効果が期待されている。水産物ではこれまでにマグロ¹⁾、イワシ²⁾⁻⁶⁾、カツオ⁷⁾等の筋肉およびそのプロテアーゼ分解物中に ACE 阻害ペプチドの存在が明らかにされている。

本研究では北海道内で漁獲される水産資源のうち未利用部位であるシロサケの頭部、肝臓、およびホタテガイ中腸腺などをより高度に食品に活用するために ACE 阻害ペプチドの検索を行った。

実験方法

1. 試料

ホタテガイ中腸腺、シロサケ肝臓は漁獲後 -135°C で凍

結保存したものを用いた。シロサケの頭部は鰓を除き 120°C で40分間加熱した後、マスコロイダー(増幸産業社製)でペーストにして -30°C で凍結保存したものを使用した。

2. 各種プロテアーゼによる加水分解物の調製

試料10gに10倍量の蒸留水を加え、Polytron PT 6000(Kinematica, Switzerland)で1分間ホモジナイズ後 98°C で20分間加熱した。室温まで放冷し、各酵素の至適pHに1NHClあるいは1NNaOHで調整し、市販プロテアーゼ5種を試料重量に対し0.5%量加えてホモジナイズし、至適温度で16時間攪拌しながら加水分解を行った。反応終了後 98°C で15分間プロテアーゼを加熱失活させ、放冷後、1NNaOHでpH7に調整して10,000Gで15分間遠心分離を行った。上清を濾過後、150mlのメスフラスコに定容し、ACE阻害活性測定試料とした。加水分解に使用した酵素と至適条件は次のとおりである。デナブシン2P(糸状菌由来、pH3.0、 40°C)、デナチームAP(糸状菌由来、pH7.0、 40°C)、パパイン

(パパイヤ由来, pH 7.0, 55°C), ビオプラーゼ SP-10 (枯草菌由来, pH 7.0, 30°C), XP 415 (真菌由来, pH 3.0, 30°C) ですべてナガセ生化学製である。

3. シロサケ頭部ビオプラーゼ分解物中の ACE 阻害ペプチドの精製

シロサケ頭部のペースト 100 g を 2. の方法に従いビオプラーゼを用いて 5 時間加水分解した。得られた加水分解物を限外濾過 (アドバンテック社製 MODEL UHP90) に供し, 分子量 10,000 以上のものを除去した。さらにこの分解物に ODS 樹脂 (YMC 製 ODS-AQ 120-S 50) 30 g を加え, 1 時間攪拌後, 吸引濾過した。ODS 樹脂を蒸留水 500 ml で洗浄した後, 10, 30, および 50% エタノールでそれぞれ 500 ml を用いて順次溶出した。それぞれの溶出液を減圧濃縮してエタノールを除去し, 凍結乾燥した。非吸着と蒸留水の洗浄液を合わせた画分を A, 10, 30, 50% エタノールで溶出した画分をそれぞれ B, C, D とした。

4. ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性は ACE (ウサギ肺由来, シグマ社製) 40 mU/ml および合成基質ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (シグマ社) 10 mM を用いて Cushman らの方法⁸⁾ に準じて測定した。すなわち生成した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し, 226 nm の吸光度を測定した。試料液の吸光度を a, 試料液の代わりに蒸留水を加えたときの値を b, あらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの値を c とし, 阻害率 (%) = $(b - a / b - c) \times 100$ で ACE 阻害率を算出した。各試料の ACE 阻害活性の比較は上式により得られる阻害率が 50% を示すときの反応液中に存在する試料濃度 (IC₅₀) で示した。なお, タンパク質とペプチドの濃度はマイクロケルダール法 (室素量に係数 6.25 を乗じた値) および重量法により決定した。

5. ACE 阻害ペプチドの分子量の測定

ACE 阻害ペプチドの分子量の測定は高速液体クロマトグラフ (HPLC) により行った。標準ペプチドとしてインスリン B 鎖 (分子量 3,040), ニューロテンシン (分子量 1,673), プラジキニン (分子量 1,060), ロイペプチン (分子量 494), グルタチオン (分子量 307) を用いた。測定条件を以下に示した。

装置: 東ソー(株)製 HPLC システム, カラム: TSKGEL-2500 PWXL (内径 7.8 mm × 300 mm), 溶離液: 45% アセトニトリル-0.1% トリフルオロ酢酸, 流速: 0.2 ml/min, 検出波長: 215 nm

6. アミノ酸分析

ACE 阻害ペプチドのアミノ酸分析は 6 N 塩酸で加水

分解後, イソチアノ酸フェニル (PITC) によるプレカラム誘導体化法⁹⁾ により行った。

実験結果及び考察

1. プロテアーゼ分解物の ACE 阻害活性

各プロテアーゼ分解物の ACE 阻害率を Table 1 に示した。プロテアーゼ分解物はいずれの試料も ACE 阻害活性が認められ, シロサケ頭部のプロテアーゼ分解物は他の試料よりも高い阻害活性を示した。また, シロサケ頭部の各酵素分解物ではパパイン, ビオプラーゼを作用させた分解物が特に阻害活性が高く, 約 90% の阻害率を示した。そこで最も高い阻害率を示したシロサケ頭部を用いてビオプラーゼによる分解時間の検討を行った。Fig. 1 にビオプラーゼ分解物による ACE 阻害率およびタンパク質量の経時変化を示す。分解物のタンパク質量は反応時間とともに穏やかに増加したが, 阻害率は反応初期に大きく増加し, 反応 5 時間で最高に達して, その後緩やかに減少した。このことからシロサケ頭部ペース

Table 1 Inhibitory activity for ACE of hydrolysates by various proteases*

	Inhibition(%)**				
	DENAPSIN	DENAZYME	PAPAIN	BIOPURASE	XP-415
Chum Salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>)					
Head	77.5	82.9	89.4	89.6	85.0
Liver	51.0	50.0	33.9	47.4	43.2
Scallop (<i>Patinopecten yessoensis</i>)					
Digestive gland	49.5	16.1	24.5	44.8	43.2

* Commercial proteases used here (See materials and methods)

** The ACE inhibitory activity of hydrolysates by various proteases was assayed at a concentration of 0.07g equivalent of tissue per ml.

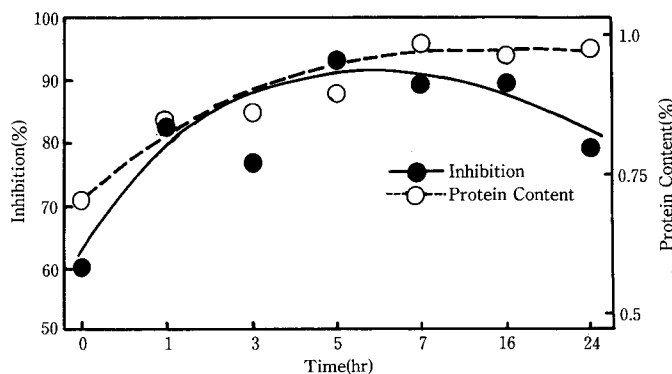


Fig. 1 Effect of hydrolyzation time on ACE inhibitory activity and protein content

トのビオプラゼによる分解時間は5時間が最適であると考えられた。

2. シロサケ頭部のビオプラゼ分解物中に存在する ACE 阻害ペプチドの精製

最も強い ACE 阻害活性を示したシロサケ頭部のビオプラゼ分解物に存在する ACE 阻害ペプチドを ODS 樹脂により精製した。各画分の収量および IC₅₀ を Table 2 に示した。各画分の ACE 阻害活性を比較すると画分 D が最も高い阻害活性を示し、IC₅₀ は 78 μg/ml であった。また、画分 D はシロサケ頭部ペースト 100 g のビオプラゼ分解物から 77.5 mg 得られた。

3. 画分 D 中の ACE 阻害ペプチドの分子量およびアミノ酸組成

画分 D の分子量を推定するためにゲル濾過を用いた HPLC 分析を行った。HPLC 分析の溶出パターン (Fig. 2) から画分 D は少なくとも 2 つ以上の異なるペプチドから成り、その分子量範囲は 500 から 3,000 と推定された。次に画分 D のアミノ酸組成について検討を行った。塩酸加水分解によって得られたアミノ酸組成を Table 2 に示した。画分 D のアミノ酸組成はグリシン、リシン、ロイシンを多く含み、特にロイシンが多く 339.7 mg/g で

Table 2 Separation of ACE inhibitors from hydrolysate of chum salmon head by BIOPURASE with ODS resin

Fraction	Yield(g powder)	IC ₅₀ (μg/ml)
A	5.30	180
B	0.25	82
C	0.58	100
D	0.08	78

Table 3 Amino acid composition of fraction D

Amino acid*	fraction D
Gly	76.9
Ala	27.7
Val	25.9
Leu	339.7
Phe	22.4
Pro	37.5
Ser	23.8
Thr	27.7
Cys	20.2
Asp	21.4
Glu	54.0
Lys	104.0
Arg	46.3

* Expressed as mg/g.

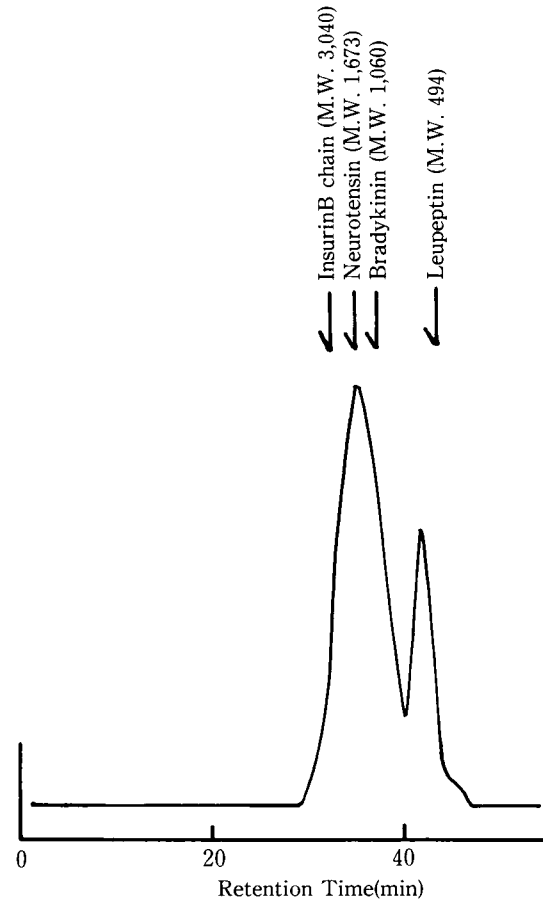


Fig. 2 Gel chromatogram of fraction D obtained from BIOPURASE hydrolysate of chum salmon head.

Column: TSKGEL 2500PWXL(7.8mm i. d. X 300mm), Mobile phase: 45% acetonitrile / 0.1% trifluoroacetic acid, Flow rate: 0.2ml/min, Detector: ultraviolet 215nm

あった。末綱ら²⁾がイワシ筋肉のプロテアーゼ(デナチム AP) 分解物から得た塩基性ペプチドあるいは Matsui ら⁵⁾がアルカリプロテアーゼから得たペプチド混合物のアミノ酸組成とは大きく異っており、画分 D に含まれる ACE 阻害ペプチドはこれらのペプチドとは違った構造を有するものと推定された。

要 約

シロサケの頭部、肝臓およびホタテガイ中腸線を各種食品用プロテアーゼで分解し、その ACE 阻害活性を測定した。また、強い阻害作用が認められたシロサケ頭部のビオプラゼ分解物中の ACE 阻害ペプチドを部分精製し、分子量、アミノ酸組成について検討を行い、以下の知見を得た。

1) シロサケ頭部、肝臓およびホタテガイ中腸腺のプロテアーゼ分解物はいずれも ACE 阻害活性が認められ、なかでもシロサケ頭部のピオプラーゼ分解物は最も高い阻害活性を示した。

2) シロサケ頭部のピオプラーゼによる分解時間は ACE 阻害活性およびタンパク質収量の結果から 5 時間が最適であると考えられた。

3) シロサケ頭部のピオプラーゼ分解物を ODS 樹脂で部分精製したところ 50%エタノールで溶出する画分に最も強い阻害活性が認められ、その IC 50 は 78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。

4) 50%エタノール画分は 500 から 3,000 の分子量範囲を示し、構成アミノ酸はグリシン、リシン、ロイシンを多く含み、特にロイシンは 339.7 mg/g であった。

文 献

1) Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Ter-

amoto, T., Okabe, M. and Mimura, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 332(1988).

2) 末綱邦男・箴島克裕：日水誌, **52**, 1981(1986).

3) 受田浩之・松田秀喜・黒田浩之・松藤寛・箴島 豊：農化, **65**, 1223(1991).

4) 受田浩之・松田秀喜・箴島克裕・黒田浩之・松藤寛・松井利朗・箴島 豊：農化, **66**, 25(1991).

5) Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 922(1993).

6) 杉山圭吉・高田康二・江川 真・山本郁雄・恩塚博・大場健吉：農化, **65**, 35(1991).

7) Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541(1992).

8) Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637(1971).

9) 桑野和民・酒巻千波・三田村敏男：農化, **61**, 53(1987).