

ヒジキタンパク質ペプシン消化物のアンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチドの分離と同定

末 綱 邦 男

(1997年9月2日受付)

Separation and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme
Inhibitory Peptides from Peptic Digest of *Hizikia fusiformis* Protein

Kunio Suetsuna*

A peptidic fraction (SP-I) having inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme (ACE) was separated from the peptic digest of protein prepared from the brown alga *Hizikia fusiformis* by ion-exchange chromatographies and gel filtration. Oral administration of SP-I into spontaneously hypotensive rats at 200 mg/kg resulted in a marked hypotensive effect. Further separation of SP-I by ODS HPLC afforded three active peptides, Gly-Lys-Tyr (IC_{50} : 3.92 μ M), Ser-Val-Tyr (8.12 μ M), and Ser-Lys-Thr-Tyr (11.07 μ M).

キーワード：ヒジキ，タンパク質，酵素分解，ペプチド，酵素阻害，アンジオテンシンI変換酵素，
血圧降下

タンパク質は栄養源としての機能に加え，その消化物であるペプチドが種々の生理活性機能を有することが示されている。その一つに血圧調節系に関与するアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害ペプチドがある。ACEは，動脈収縮，昇圧物質であるアンジオテンシンIIの生成と，動脈弛緩，降圧物質であるブラジキニンの分解を触媒するジペプチジルカルボキシラーゼであり，この酵素の阻害物質は降圧効果を示す。¹⁾このため，各種食品タンパク質の酵素による加水分解物，あるいは食品成分のACE阻害活性について多くの研究が行われている。

著者らは，血圧降下作用を持つ魚介類タンパク質由来ACE阻害ペプチドに関して報告してきたが，²⁻⁴⁾今回，海藻類タンパク質由来の降圧ペプチド検索過程中，ヒジキタンパク質の酵素分解物からのACE阻害ペプチド画分(SP画分)に血圧降下作用を認めたので，さらに，ACE阻害ペプチドの単離精製，アミノ酸配列決定を行ない，その構造活性相関を検討した。

実験方法

試料 ヒジキ *Hizikia fusiformis* は，長崎県対馬佐須

奈湾から採取した(1995年2月)。採取後，十分に水洗した後，凍結乾燥し，細切後，粉碎機にかけて粉末とした。

酵素分解物の調製 ヒジキ粉末25.2gに脱イオン水1lを加え攪拌してヒジキ懸濁液を得た。透析チューブ(36 inch, 和光純薬工業社製)に詰め，流水に対して3日間透析を行ない透析内液を得た。透析内液のpHを2.0に調整し，豚胃のペプシン(EC 3.4.23.1, メルク社製)750mgを添加し，37°Cで20時間攪拌しながら酵素分解を行なった。

ペプチド粉末の精製 分解終了後，直ちに反応液を透析チューブに詰め，再度脱イオン水5lに対して2日間透析を行ない透析外液を得た。透析外液をDowex 50W×4カラム(H⁺ form, 50~100 mesh, ϕ 4.5×20 cm)に加え，カラムを脱イオン水で十分洗浄した後，2N NH₄OH 500 mlで溶出した。減圧濃縮によりアンモニアを除去し，濃縮液40 mlを得た。濃縮液4 mlを予め0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で緩衝化したSephadex G-25カラム(medium, ϕ 2.3×140 cm)に負荷し，流速30 ml/h, 各分画量8.6 mlでゲルろ過した。Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーを繰り返して大量

* 水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, Nagata-Honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

分取して得たペプチド画分（分画分子量 300~5,000）を、再度 Dowex 50W (H⁺) カラムクロマトグラフィーに付して脱塩操作を行ない凍結乾燥後、粗ペプチド粉末を得た。この粗ペプチド粉末 1.5 g を脱イオン水 20 ml に溶解後、SP-Sephadex C-25 カラム (H⁺form, φ1.5×47.2 cm) に負荷した。脱イオン水 500 ml から 1.5% NaCl 溶液 500 ml での濃度勾配法により、流速 90 ml/h, 各分画量 10 ml で溶出し、各画分 (SP-I, SP-II, SP-III 画分) を再度 Dowex 50W (H⁺) カラムクロマトグラフィーに付して脱塩操作を行ない凍結乾燥後、精製ペプチド粉末 (SP 画分) とした。ペプチドの定量は、牛血清アルブミンを標準として、Lowry 法⁵⁾ に準じて行なった。

ACE 阻害活性の測定 Lieberman の測定法を改良した山本らの方法⁶⁾ に準じて行なった。すなわち、サンプル液 50 μl に 2.5 mU ACE (EC 3.4.15.1, ウサギ肺由来, シグマ社製) 酵素溶液 100 μl を加え、37°C, 3 分間保持後、100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3, 500 mM 食塩含有) に溶解した 12.5 mM HHL (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, ペプチド研究所製) 基質溶液 100 μl を加え、37°C, 60 分間反応させた後、0.5 N 塩酸を 250 μl 加え反応を停止した。さらに、酢酸エチル 1.5 ml を加えよく攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) した後、酢酸エチル層 1.0 ml を分取し蒸発乾固した。1 M 食塩溶液 1.0 ml を加えて溶解し、ACE により遊離するヒプリル酸量を 228 nm の吸光度で測定した。サンプル液での吸光度を E_s, サンプル液の代わりに緩衝液を加えたときの値を E_c, 予め反応停止液を加えて反応させたときの値を E_B として、阻害率 (%) = $(E_c - E_s / E_c - E_B) \times 100$ で求めた。阻害活性 (IC₅₀ 値) は、上式により求められる阻害率が 50% を示すときの反応液中での阻害物質濃度 (反応液 ml 当たりの μg 数, またはモル濃度) で示した。

SHR に対する精製ペプチド粉末の血圧降下作用 実験動物は、日本チャールズ・リバー社より雄性高血圧自然発症ラット (SHR) を購入し、1 週間の予備飼育後、収縮期血圧 (SBP) が 160 mmHg 以上で体重 280~330 g の動物 5 匹を 1 群として用いた。上記精製法で調製した精製ペプチド粉末 (SP-I 画分, 200 mg/SHR 体重 kg) を 0.9% 生理食塩水 3 ml に溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与後、1, 2, 3, 4 および 5 時間の血圧を、非観血式小動物用尾動脈血圧測定装置 (UR-5000 型, ウエダ製作所製) で測定した。各測定時間に 5 回繰り返して行ない、得られた測定値の最高最低値を棄却し、3 回の平均値から、収縮期血圧、平均血圧 (MBP), 拡張期血圧 (DBP) を算出、5 匹の平均値 ± 標準誤差で示した。

逆相 HPLC による ACE 阻害ペプチドの単離精製 精製ペプチド粉末 (SP-I 画分) 7 mg/25 μl を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるペプチドフラグメントの分離を行なった。カラムとして Develosil ODS-5 (φ4.6×250 mm, 野村化学社製) を用い、溶離液として 0.05% トリフルオロ酢酸溶液 (TFA) から、0.05% TFA を含む 16.7% アセトニトリル溶液への 2 時間での濃度勾配法、流速; 1.0 ml/min, 検出波長; 220 nm で行なった。

ペプチドのアミノ酸配列決定 HPLC で得られた ACE 阻害ペプチドフラグメントのアミノ酸分析は、常法により塩酸加水分解後、PICO-TAGTM アミノ酸分析計 (ウォーターズ社製) を用いて行なった。ペプチドのアミノ酸配列は、自動エドマン分解により 477A 型プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いて決定した。ペプチドの分子量は、DX-300 型質量分析計 (日本電子社製) を用い FAB-MS 法で測定した。

ペプチドの合成 ACE 阻害ペプチドの合成は、4-ヒドロキシフェノキシメチルチロシン樹脂 154 mg (チロシン含量 0.65 mmol/g, スチレン 1% ジビニルベンゼン共重合体) を出発原料とし、433A 型プロテイン合成装置 (アプライドバイオシステム社製) により Fmoc 固相法により行なった。脱保護は、ペプチド結合樹脂に対して 95% トリフルオロ酢酸を加え 1.5 時間攪拌した。反応後、冷ジエチルエーテルを加え生成物を沈澱させて合成ペプチドを分離した。

結 果

ペプチド粉末の精製 ヒジキタンパク質部分をペプチン分解し得られた分解物を、透析、Dowex 50W 吸着・脱着、Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーをすることにより、分子量 5,000~300 程度の粗ペプチド粉末 1.9 g を得た。これは、ヒジキ乾燥粉末 25.2 g から回収率 7.5% であった。さらに、SP-Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィー (Fig. 1) を行なうことにより、SP-I 画分 (分画番号 9~25), SP-II 画分 (分画番号 26~41) および SP-III 画分 (分画番号 42~60) に分画し、精製ペプチド粉末 0.34 g (回収率 1.4%), 0.59 g (回収率 2.3%) および 0.85 g (回収率 3.4%) を得た。

ACE 阻害活性をみたところ、粗ペプチド粉末 IC₅₀ 値; 895 μg/ml に対し、精製ペプチド粉末では、SP-I 画分 IC₅₀ 値; 72 μg/ml, SP-II 画分 IC₅₀ 値; 270 μg/ml および SP-III 画分 IC₅₀ 値; 785 μg/ml であった。

精製ペプチド粉末の血圧降下作用 *in vitro* で活性の高かった精製ペプチド粉末 (SP-I 画分, 200 mg/SHR 体重 kg) を用いて血圧降下作用をみたところ、

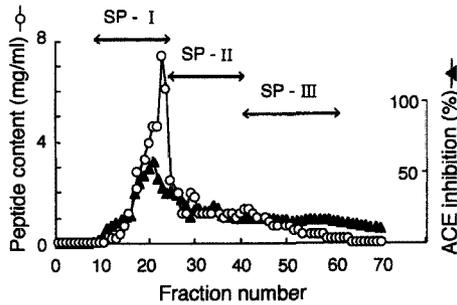


Fig. 1. Chromatogram of *H. fusiformis* protein hydrolysate on SP-Sephadex C-25 column. Solvent system; (a) 500 ml of H₂O, (b) 500 ml of 1.5% NaCl. Linear gradient from (a) to (b). Flow rate; 90 ml/h. Each fraction; 10 ml. Monitoring absorbance; 750 nm by the Lowry method.

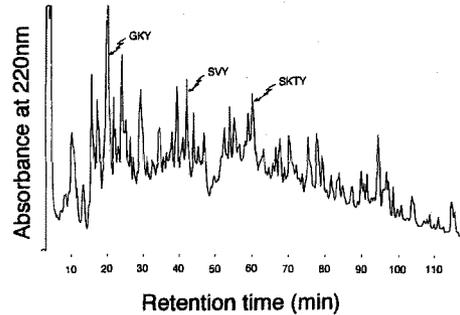


Fig. 3. Reverse-phase HPLC separation of SP-I. Column; Develosil ODS-65 (4.6 × 250 mm). Solvent system; (a) 0.05% trifluoroacetic acid, (b) 16.7% acetonitrile in 0.05% TFA. Linear gradient from (a) to (b) for 2 hours. Flow rate; 1.0 ml/min. Monitoring absorbance; 220 nm.

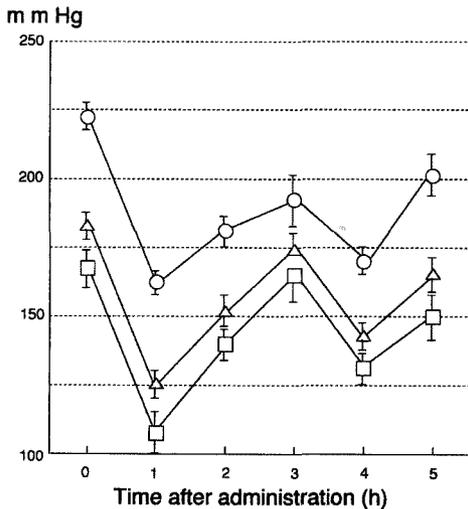


Fig. 2. Effect of oral administration of SP-I on the blood pressure of spontaneously hypertensive rat. Vertical bars represent the mean ± S.E. (n=5 per group). -○-SBP (systolic blood pressure). -△-MBP (mean blood pressure). -□-DBP (diastolic blood pressure).

Fig. 2 に示すような結果を得た。すなわち、投与後 1 時間で平均血圧 (MBP) の最低値を示し、投与前に比べ血圧差 61 mmHg の低下をみた。その後 3 時間までに

血圧は徐々に正常値に近づき、4 時間では一旦低下するが 5 時間を経てもなお血圧降下作用は持続していた。これらの結果から、ヒジキ由来のペプチドは *in vivo* において明らかな血圧低下作用を示すことを確認した。

ACE 阻害ペプチドの単離精製とアミノ酸配列 *in vitro* で ACE 阻害活性の高く、*in vivo* で血圧降下作用を有する精製ペプチド粉末 (SP-I 画分) を、さらに、逆相 HPLC で単離精製を行なったところ、Fig. 3 に示すように溶出時間 20.2 分、42.2 分および 62.9 分に ACE 阻害活性の強いペプチドフラグメントを見出した。これらペプチドフラグメントのアミノ酸分析、アミノ酸配列決定および FAB-MS 法による分子量決定 (m/z) を行い、3 種類の ACE 阻害ペプチドの構造解析を行なった。Table 1 に示すように、ヒジキ由来の ACE 阻害ペプチドは、Gly-Lys-Tyr (IC₅₀ 値; 3.92 μM) Ser-Val-Tyr (IC₅₀ 値; 8.12 μM) および Ser-Lys-Thr-Tyr (IC₅₀ 値; 11.07 μM) であった。

考 察

近年、食品タンパク質の消化過程で派生する生理活性ペプチドを特定保健用食品に利用しようとする研究が進められているが、その中でも ACE 阻害 (血圧降下) ペプチドは、quality of life に対する悪影響が最も少ないといわれている。一般的に、食品タンパク質を酵素分解して得られた ACE 阻害ペプチド類のすべてが、*in vivo* で血圧降下作用を示すとは限らず、経口投与が前提となる食品においては、特定のタンパク質を特定の酵素で消化した場合に生成する ACE 阻害ペプチドが血圧降下ペプチドとなり得る可能性がある。^{7,8)} 今回の実験では、多

Table 1. Analytical data and ACE inhibitory activity of synthetic peptides

| Peptide | Amino acid ratio in acid hydrolyzate | FAB-MS (<i>m/z</i>) | IC ₅₀ (μM) |
|-----------------|-----------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Gly-Lys-Tyr | Gly, 1.03 Lys, 0.98 Tyr, 1.08 | 367 | 3.92 |
| Ser-Val-Tyr | Ser, 0.98 Val, 1.10 Tyr, 1.02 | 368 | 8.12 |
| Ser-Lys-Thr-Tyr | Ser, 0.91 Lys, 0.99 Thr, 1.07 Tyr, 1.11 | 498 | 11.07 |

Each peptide was hydrolyzed with 6 N HCl at 110°C for 24 hours.

IC₅₀: concentration of ACE inhibitory peptide required to inhibit 50% of the ACE activity.

糖体を多く含む海藻類の中で、比較的タンパク質含量が高いといわれるヒジキを酵素分解して得た ACE 阻害画分 (SP 画分) を用いて、*in vivo* で血圧降下作用を確認した後に、ACE 阻害ペプチドの単離精製を行ない、そのアミノ酸配列を決定した。

高血圧は、病的に血圧上昇の原因が明らかな二次性高血圧 (病候性高血圧) と、本態不明な一次性高血圧 (本態性高血圧症) に大別される。前者は、原因となる疾患を治癒させることにより高血圧を治癒することが可能である。一方、本態性高血圧には原因と考えられる因子がいろいろあり、原因に対する直接的な治療法は困難である。レニン・アンジオテンシン系 (R・A 系) は、本態性高血圧の重要な要因の一つであると考えられている。ここ 20 年来、R・A 系で中心的な役割を果たしている ACE の活性を抑制することで R・A 系をコントロールし、それによって本態性高血圧をコントロールしようという試みが行なわれてきた。Cheung らは、⁹⁾ ACE とジペプチドとの構造活性相関を検討し、カルボキシル基末端 (C 末端) にプロリンあるいは芳香族アミノ酸を、またアミノ基末端 (N 末端) に分岐鎖アミノ酸 (バリン、イソロイシン) をもつジペプチドが ACE 阻害活性が高いと報告した。さらに、今回単離・精製してきた 3 種類の ACE 阻害ペプチドの C 末端はすべてチロシンであったことは、ACE 阻害ペプチドの C 末端が芳香族アミノ酸であると阻害活性が高まるという結果を支持するものであった。一方、N 末端のアミノ酸はグリシンまたはセリンであったが、これは、これまでの報告で N 末端が分岐鎖アミノ酸である場合に比べ、それ程高い阻害活性を示すものではなかった。

ヒジキ由来の 3 種類の ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列と阻害活性との相関を検討するには IC₅₀ 値の差が小さいが、C 末端がチロシンの場合、N 末端のアミノ酸 (グリシン、セリン) の影響よりもむしろ、トリペプチド (Gly-Lys-Tyr, Ser-Val-Tyr) の第 2 アミノ酸 (リシン、バリン) およびテトラペプチド (Ser-Lys-Thr-Tyr) の第 2, 第 3 アミノ酸 (リシン、トレオニン) が、ACE 阻害活性に影響を及ぼしたと推測した。すなわち、

第 2, 第 3 アミノ酸の側鎖のかさばり (bulkiness) 度合いの差異 (Lys-Thr > Val > Lys) とスパーサーの役割度合いの差異 (Lys-Thr > Val, Lys) が、ACE 活性部位、特に亜鉛イオン部位に対する親和性に影響を及ぼし、ACE 阻害活性に差異をもたらしたと推測した。^{10,11)}

一方、このような高い生理活性を有するペプチドの作製のみならず、呈味性をも付与する機能性ペプチドの作製も重要である。¹²⁾ 我々も、種々のプロテアーゼおよびペプチダーゼを用いて、ヒジキタンパク質部分を酵素分解したところ、ACE 阻害活性に関してペプシン分解物が最も強かったが (データは示していない)、酵素分解物の呈味性に関しては今後の検討課題となった。このように、種々の生物資源由来のタンパク質を用いて、酵素部分加水分解して得られたペプチドに、従来の栄養性、嗜好性に加え、生体調節機能としての血圧降下作用を有するならば、将来有望な高血圧予防食品としての道が開かれるであろう。

文 献

- 1) M. A. Ondetti, R. Rubin, and D. W. Cushman: Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441-444 (1977).
- 2) 末綱邦男: イワシ筋肉由来ペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素阻害能に関する研究. 学位論文, 東北大学農学部, 1992, pp. 1-8.
- 3) 末綱邦男, 笹島克裕: イワシおよびタチウオ筋肉由来塩基性ペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. *日本誌*, **52**, 1981-1984 (1986).
- 4) K. Suetsuna, M. Yamagami, and K. Kuwata: Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1853 (1988).
- 5) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 6) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎: 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 (1980).
- 7) 末綱邦男, 笹島克裕: イワシ筋肉由来ペプチドの *in vivo* における血圧降下作用ならびに血管拡張作用について. *栄養誌*, **42**, 47-54 (1989).
- 8) 吉川正明: 食品の生体調節機能と *in vitro* バイオアッセイ. *化学と生物*, **31**, 342-346 (1993).

- 9) H. S. Cheung, F. L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, and D. W. Cushman: Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme; Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, **255**, 401-407 (1980).
- 10) H. Kayahara, I. Tomida, and S. Kurosawa: Synthesis of Z- and Tfa-X-Phe-Ala-Pro-OH and their ACE inhibitory tests. *Peptide Chemistry*, **1983**, 125-128 (1984).
- 11) H. Kayahara, I. Tomida, and S. Kurosawa: Synthesis of Z- and Tfa-pentapeptides and their ACE inhibitory tests. *Peptide Chemistry*, **1984**, 49-52 (1985).
- 12) A. Kawakami, H. Kayahara, and K. Tadasa: Taste evaluation of angiotensin I converting enzyme inhibitors, Leu-Lys-Tyr analogues. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 709-710 (1995).