



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サモアーゼ®による溯上シロサケ筋肉のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害ペプチドへの変換反応の設定
Author(s)	小野, 世吾; ONO, Seigo; 細川, 雅史 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 54(1-2), 1-5
Issue Date	2003-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21976
Type	departmental bulletin paper
File Information	54(1_2)_P1-5.pdf



サモアーゼ[®]による遡上シロサケ筋肉のアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドへの変換反応の設定

小野 世吾¹⁾・細川 雅史¹⁾・宮下 和夫¹⁾・高橋是太郎²⁾

Proteolytic conversion of late run chum salmon muscle to angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides with Thermoase[®]

Seigo ONO¹⁾, Masashi HOSOKAWA¹⁾, Kazuo MIYASHITA¹⁾
and Koretaro TAKAHASHI²⁾

Abstract

It has been reported that hydrolysate of upstream chum salmon muscle with thermolysin exerts angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats (SHR). To apply the hydrolysate of chum salmon muscle as a nutraceutical material for ACE inhibitors, we employed Thermoase[®], known as a proteolytic enzyme for food industry. When defatted chum salmon muscle was hydrolyzed for 24 h at 65°C with 5% Thermoase[®], inhibitory concentration₅₀ (IC₅₀) value of the hydrolysate for ACE activity was 26.4 µg/mL. This IC₅₀ value was comparable to the hydrolysate obtained by the reaction for 5 h at 37°C with 5% purified thermolysin. The yield was 72.5% for Thermoase[®] hydrolysate.

Key words: Proteolysis, Upstream migration salmon, Angiotensin I-converting enzyme, thermolysin, Thermoase[®]

緒 言

世界の先進諸国では高血圧症が最も罹患率の高い疾病であり、日本においてもその患者数は年々増加傾向にある。高血圧症は死因疾患である脳血管疾患や心疾患を誘発することが知られている。したがって、生活習慣病である高血圧を予防することは致死性疾患の予防につながるといえる。

高等動物の血圧の調節に普遍的に関わっている酵素として、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) が知られている (Dzau et al., 1988)。通常、ACE は定常状態にある不活性ペプチドのアンジオテンシン I に作用し、血圧上昇作用をもったアンジオテンシン II (AII) を生成する。この AII はアルドステロンの分泌を促進、腎臓での Na⁺ の再吸収を亢進するなどの作用により血圧を上昇させる。更に血圧降下作用をもつブラジキニンを分解し、不活性化させるキナーゼ活性も有する。このように血圧上昇に大きく関わっている ACE を阻害することで血圧上昇の抑制効果が期待される。実際に ACE 阻害剤であるカプトプリルは高血圧症患者に対して有効な降圧剤として用いられており、現在では第一選択薬になっている (上月・阿部, 1994; 橋本, 1984)。

血圧降下作用を示す天然物としてペプチド (Miyoshi et al. 1991; Hata et al., 1996; Suetsuna and Nakao, 2000)、遊離脂肪酸 (Bellenger et al., 2002)、配糖体化合物 (出山, 1990) などが知られているが、中でもペプチドについては多くの研究がなされている。これまでに植物、海産物を中心に多くの天然物から ACE 阻害ペプチドが分離、同定されている。特に近年、カツオ節 (藤田ら, 1997) やイワシ筋肉 (関ら, 1999) の酵素分解物中に ACE 阻害ペプチドが見い出され、これらを含む食品が特定保健用食品に認可されている。

我々もこれまでの研究において、遡上シロサケ筋肉のプロテアーゼ加水分解物が強い ACE 阻害活性を有することを見出した (小野ら 2002)。検討したプロテアーゼの中でサーモリシンによる加水分解物が最も強い ACE 阻害活性を示し、6つの ACE 阻害ペプチドを同定した。更に、この加水分解物は高血圧自然発症ラットに対して 500 mg/kg 体重投与においても血圧降下作用を示した (Ono et al., 2003)。

先の研究では生化学用試薬の加水分解酵素を用いた反応であったことから、実用化に向けての課題が残されていた。そこで本研究ではサーモリシンを含む食品添加物 (サモアーゼ[®]) を用いて遡上シロサケ筋肉タンパク質を加水

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座
(Laboratory of Marine Bioresources and Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科応用生物科学講座
(Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

分解することを試み、その至適条件について検討した。

方 法

試薬

サモアーゼ® (*Bacillus thermoproteolyticus* 由来) は大和化成工業社製, サーモリシン (*Bacillus thermoproteolyticus* 由来) 及び ACE (EC3.4.15.1 ウサギ肺由来) はシグマ社より, Hippuryl-L-histidyl-L-leusin (Hip-His-Leu) はペプチド研究所よりそれぞれ購入した。

試料調製

シロサケ (*Oncorhynchus keta*) は2000年に汐泊川(北海道函館市)に遡上したものを採取した。その筋肉を細切して4倍量のエタノールで7日間浸漬し、脱脂した。その後、凍結乾燥することで脱脂粉末を得た。

加水分解反応

脱脂粉末重量に対して50倍量の蒸留水を加え、これをサモアーゼ® 及びサーモリシンの至適 pH の7.5に調整後、脱脂粉末(基質)に対して0.1~10%のプロテアーゼを加え、37°Cもしくは65°Cで反応を行った。一定時間反応後、90°Cで15分間加熱してプロテアーゼを失活させ、反応を停止した。次いで、20,000×g、15分間の遠心分離を行い、上清を吸引濾過することで可溶性成分を分離し、凍結乾燥することにより加水分解物を得た。

サーモリシンの活性測定

基質溶液は2gのカゼインを90mLのTris-HCl(0.1M)に溶解し、0.2Nの酢酸でpHを8.0に調整後、蒸留水で100mLに定容した溶液を用いた。この基質溶液1mLを35°Cで5分間プレインキュベート後、0.01M Tris-HCl(pH 8.0)に溶解した酵素溶液を添加した。インキュベート時間は15分間とし、1.2Mトリクロロ酢酸を2mL添加することで反応を停止した。反応液を250×g、15分間の遠心分離後、上清の280nmにおける吸光値を測定した。

ACE阻害活性の測定

測定方法はLieberman測定法の変法(山本ら, 1980)に基づいて行った。すなわち、30μLの加水分解物溶液に、ホウ酸緩衝液(pH 8.3, 400mM NaCl含有)に溶解した5mMのHip-His-Leu基質溶液を250μL添加し、37°Cの恒温水槽中で5分間保温した。100μLのACE溶液(6mU)を添加し、直ちに攪拌した後、37°C、60分間反応させた。1N塩酸250μLを添加し、攪拌することにより反応を停止させた。その後、1.5mL酢酸エチルを添加、十分に攪拌して馬尿酸を遊離した。1,000×g、10分間の遠心分離後、上層の酢酸エチル層を1.0mL回収し、エバポレーターで乾固した。さらに減圧デシケーター内で60分間乾燥後、蒸留水3

mLを添加し、その溶液の228nmにおける吸光度を測定した。なお、阻害活性は、以下の式により算出した阻害率(%)であらわした。

$$\text{阻害率 (\%)} = (E_c - E_s / E_c - E_b) \times 100$$

E_s は試料溶液を添加したときの吸光値、 E_c は試料溶液の代わりに蒸留水を添加したときの吸光値、 E_b はあらかじめ1N塩酸を添加して反応させたときの吸光値を示す。

結 果

食品添加物であるサモアーゼ® を用いて遡上シロサケ筋肉を加水分解する際、酵素含有量が低いためにサーモリシンの加水分解条件をそのまま応用することは適当ではない(Table 1)。そのために、酵素添加量を増やすことが必要になるが、13%以上の添加になると酵素安定化剤としてサモアーゼ® に含まれているCa量が食品衛生法に定められている基準(食品に対して1%以下)を超過することになる。そこで先ず酵素添加量を変えずに反応温度を上昇させ、生成する分解物のACE阻害活性に及ぼす影響を検討した。先のサーモリシンを用いた反応系(小野ら2002)では37°Cで加水分解反応を行っていたが、本研究ではサーモリシン及びサモアーゼ® の耐熱性を生かし、反応温度を65°Cに設定した。サーモリシンは65°Cに最大活性を示すことが知られていることから(Matsubara et al., 1966)、それを含むサモアーゼ® も同温度で最大活性を示すと考えたからである。事実、Fig. 1に示すように、サモアーゼは65°Cで37°Cの約3倍の加水分解活性を示した。そこで前報(小野ら2002)のサーモリシンのときと同様のサモアーゼ5%の添加量で反応温度37°Cから、65°Cに上昇させて反応させた結果、加水分解物のACE阻害率は63.6%になった。これはサーモリシンの37°CにおけるACE阻害率よりも約10%低い値ではあったが、37°Cの反応でサモアーゼ® を用いた場合のACE阻害率8.5%に比べ、著しく上昇した(Table 2)。一方、サーモリシンの65°CにおけるACE阻害率は60.1%にとどまった。これは生成したACE阻害ペプチドがさらに酵素分解を受けることで、見かけの阻害活性が低下したためと推察した。このようにサモアーゼ® を用いた場合、反応温度を65°Cに上げることで分解物の収率とACE阻害活性が大きく上昇したことから、次にこれらの経時変化について検討した。65°Cにおける酵素の熱安定性(Fig. 2)について調べた結果、一時的に相対酵素活性は

Table 1 Calcium and sodium content of thermolysin and Thermoase®

	Thermolysin	Thermoase®
Enzyme protein	60%	3%
Ca salt	20%	25%
Na salt	10%	72%

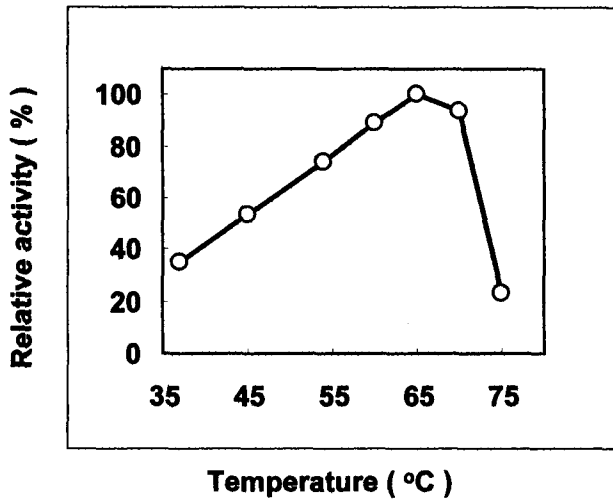


Fig. 1. Relative activity of Thermoase® under various temperatures.

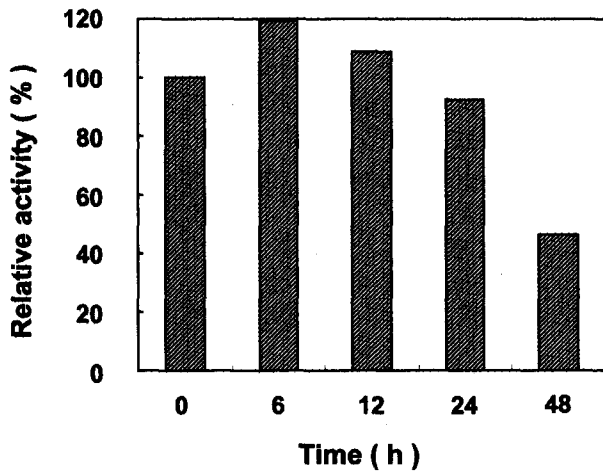


Fig. 2. Thermostability of Thermoase® at 65°C.

上昇したが、24時間後にはやや減少し、48時間後には約半分に活性が低下した。しかし、少なくとも24時間目までは安定であったことから、反応は24時間まで行うこととした。酵素添加量を5%と一定にし、37°C及び65°Cで反応を行った結果 (Fig. 3)、65°Cの反応において反応時間の延長に伴い、阻害率の上昇が認められた。阻害率は反応2時間後でも50%以上を示し、24時間反応後では阻害率が72.0%に達した。このときの阻害率は同量のサーモリシンを用い

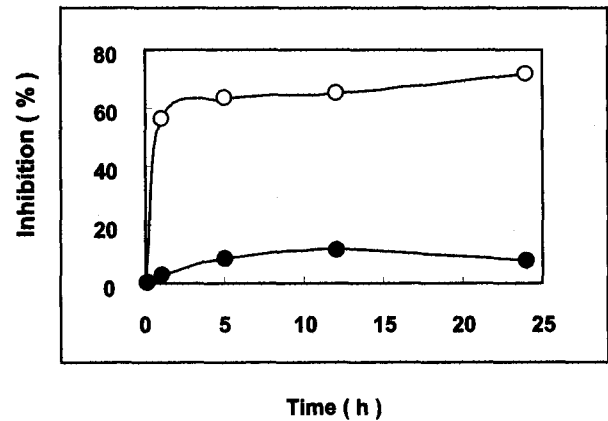


Fig. 3. Effect of proteolytic reaction temperature to obtain hydrolysates on ACE inhibition. Defatted late chum salmon muscle was hydrolyzed with Thermoase® at 37°C (●) or 65°C (○). ACE inhibitory activity of the hydrolysate was assayed at a final concentration of 78.9 $\mu\text{g/mL}$.

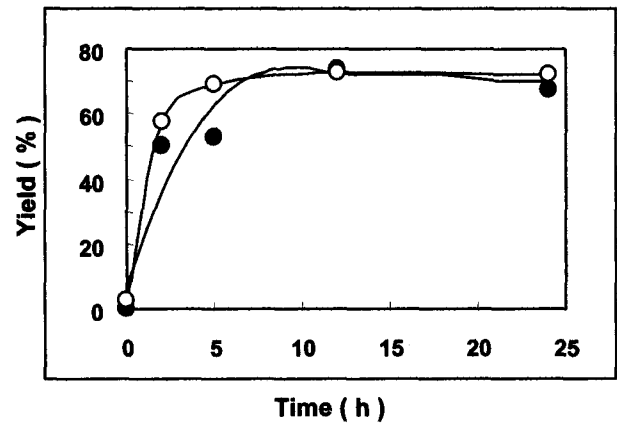


Fig. 4. Effect of proteolytic reaction temperature on the yield of hydrolysate. Defatted salmon muscle was hydrolyzed with Thermoase® at 37°C (●) or 65°C (○).

たときと同程度の阻害率となり、 IC_{50} 値も 26.4 $\mu\text{g/mL}$ と高い阻害活性となった。一方、37°Cでは24時間内の反応において、阻害率に大きな変化はなく、24時間反応後においても10%以下の低い阻害率にとどまった。温度による収率への影響は見られず、両温度において12時間までは増加し、それ以降は変化が見られなかった (Fig. 4)。その際の収率は70%以上にはなったが、サーモリシンの加水分解物に

Table 2 ACE inhibitory activity and yield of hydrolysates derived from defatted chum salmon muscle after thermolysin or Thermoase® mediated hydrolysis

	Inhibition (%)		Yield (%)	
	37°C	65°C	37°C	65°C
Thermolysin	72.5%	60.1%	85.7%	75.0%
Thermoase®	8.5%	63.6%	69.0%	72.0%

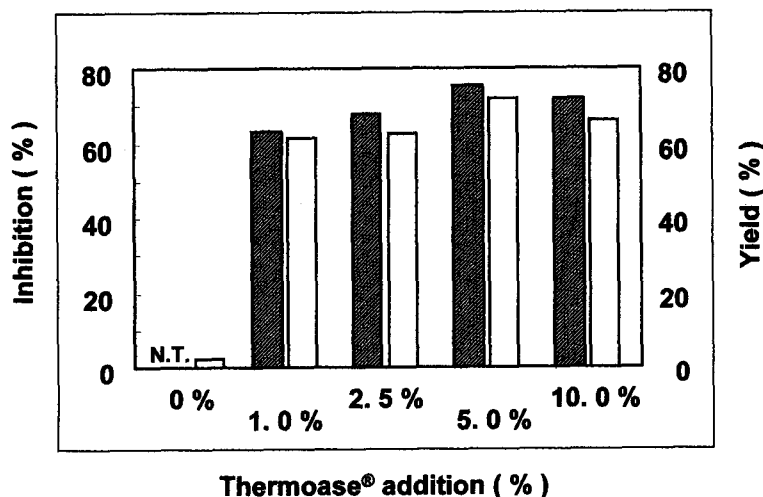


Fig. 5. Effect of Thermoase amount on ACE inhibitory activity and on the yield of the hydrolysate. Defatted salmon muscle was hydrolyzed with Thermoase® at 65°C for 24 h. ACE inhibitory activity of hydrolysate was assayed at a final concentration of 78.9 µg/mL. Hydrolysis was done at 65°C for 24 h. ■ □: inhibition □: yield.

は及ばなかった。反応時間の延長により阻害率はサーモリシンを用いたときと同程度にまで上昇させることができたが、収率を十分に高めることはできなかった。そこで、収率を高めることを目的とし、酵素添加量を10%まで変化させたときの影響について検討した (Fig. 5)。その結果、65°C、24時間反応において0~5%の範囲では酵素量の増加に伴って、阻害率、収率ともに増加する傾向がみられた。しかし、酵素添加量が5%以上になると、5%と10%では阻害率、収率ともほぼ同じ値を示したことから5%以上の添加では酵素添加量を増やしても影響がないことがわかった。一方、酵素無添加系では、65°Cの反応においても非常に低い収率であったことから、非酵素的分解はほとんど起こっていないと考えられた。以上の結果から、サモアーゼ®を用いる場合の至適条件は添加量5%、加水分解反応温度65°C、反応時間12~24時間と考えられた。その加水分解物のACE阻害活性を示すIC₅₀値は26.4 µg/mLであり、サーモリシンを用いたときとほぼ同じ値を示すことが明らかになった。

考 察

これまでの研究 (小野ら, 2002, Ono et al. 2003) で遼上シロサケ筋肉をサーモリシンで加水分解した反応物が強いACE阻害活性を示すことを報告した。しかし、食品への応用を考えた場合、生化学用試薬のサーモリシンを直接用いることはできない。よって、工業的に利用されている食品添加物のサモアーゼ®を用いた際の反応条件の検討は事業化へ向けて重要となる。サモアーゼ®中に含まれる酵素タンパク質量は3%であり、生化学用試薬のサーモリシン(60%)と比べて20分の1に過ぎない。そこで本研究では、遼上シロサケ筋肉の加水分解反応温度をこれまでの37°C

から65°Cに高めることで反応効率を高めることを考えた。その結果、65°Cで24時間の加水分解反応を行うことにより72.5%の加水分解物収率が得られ、そのACEに対するIC₅₀は26.4 µg/mLとサーモリシン分解物とほぼ同程度を示すことを見出した。サーモリシンを用いたときと比べると収率は10%程度低くなったが、このことは産業的には大きな意味を持つ。37°Cと65°Cでは収率に大きな差が見られないにもかかわらず、ACE阻害率に大きな違いが認められたのは反応温度を65°Cにして酵素活性を高めることでより小さいペプチドにまで分解が進み、分解物のACE阻害活性が高くなったものと考えられた。因みにこれまでの研究でACEに対して強い阻害活性を示すペプチドとしてジペプチドやトリペプチドが報告されている (Yokoyama et al., 1992; Fujita et al., 2000; Nakamura et al., 1995)。本研究では未利用の水産資源である遼上シロサケの筋肉タンパク質を高血圧予防のための食品素材に応用するため、サーモリシンを含んだ食品添加物のサモアーゼ®を用いてACE阻害活性を有するペプチドが生成することが明らかとなった。これらは水産資源の付加価値の向上といった観点からも重要な知見になると思われる。

文 献

- Bellenger-Germain S., Poisson J.P., Narce M. (2002). Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats. *Lipids*, **37**, 561-567.
- 出山 武 (1990). 杜仲茶の成分に関する研究. 学位論文 (名古屋市立大学).
- Dzau V.J., Safer M.E. (1988). Large conduit arteries in hypertension: role of the vascular renin-angiotensin system. *Circulation*, **77**, 947-954.

- 藤田裕之・安本良一・長谷川昌康・大嶋一徳 (1997). かつお節オリゴペプチドによるヒトボランティアに対する血圧降下作用. *薬理と治療 (II)*, **25**, 2161-2165.
- Fujita H., Yokoyama K., Yoshikawa M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.*, **65**, 564-569.
- 橋本虎六 (1984). レニン・アンジオテンシン系抑制の基礎と臨床 (荒川・蔵本・国府編), ライフサイエンス, 東京.
- Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y. (1996). A placebo-controlled study of the effect sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767-771.
- Matsubara H., Sasaki R., Singer A., Jukes T.H. (1966). Specific nature of hydrolysis of insulin and tobacco mosaic virus protein by thermolysin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 324-331.
- Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Tanaka H., Fukui F., Maruyama S. (1991). Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1407-1408.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sasaki K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk. *J. Dairy. Sci.*, **78**, 777-783.
- 小野世吾・細川雅史・井上 明・山田大介・高橋是太郎 (2002). スルメイカ肝臓ならびに廻上シロサケ筋肉のプロテアーゼ加水分解によるアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドへの変換. *日本水産学会誌*, **68**, 192-196.
- Ono S., Hosokawa M., Miyashita K., Takahashi K. Anti-hypertensive effect of hydrolysate derived from upstream chum salmon and isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *J. Food Sci.* (in press)
- 関 英治・川崎晃一・吉田真弓・笈島克裕・玉屋 圭・松井利郎・笈島 豊 (1999). イワシタンパク質由来ペプチドならびに Valyl-Tyrosin の降圧作用. *日本栄養・食糧学会誌*, **52**, 271-277.
- Suestuna K., Nakano T. (2000). Identification of an anti-hypertensive peptide from peptic digest of wakame. *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 450-454.
- 上月正博・阿部圭志. (1994) 第一選択の降圧薬. *循環科学*, **14**, 250-257.
- 山本節子・戸井田一郎・岩井和郎 (1980). 血清アンギオテンシン変換酵素活性測定法の検討. *日本胸部疾患会誌*, **18**, 297-302.
- Yokoyama K., Chiba H., Yoshikawa M. (1992). Peptides inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541-1545.