



Title	スルメイカ肝臓ならびに遡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
Author(s)	小野, 世吾; 細川, 雅史; 井上, 明 他
Citation	日本水産学会誌, 68(2), 192-196 https://doi.org/10.2331/suisan.68.192
Issue Date	2002-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42509
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	110003145466.pdf



スルメイカ肝膵臓ならびに遡上シロサケ筋肉の 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

小野 世 吾, 細 川 雅 史, 井 上 明, 山 田 大 介, 高橋是太郎*

(2001 年 2 月 16 日受付, 2001 年 8 月 27 日受理)

北海道大学大学院水産科学研究科

Proteolytic conversion of squid hepatopancreas and upstream chum salmon
muscle to angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides

SEIGO ONO, MASASHI HOSOKAWA, AKIRA INOUE,
DAISUKE YAMADDA AND KORETARO TAKAHASHI*

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

We tried to convert the upstream chum salmon muscle and squid hepatopancreas, which are major marine by-products in northern Japan, to angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. Hydrolysates prepared from defatted chum salmon muscle and squid liver with some protease showed the inhibitory activity against ACE. When defatted chum salmon muscle was hydrolyzed for 2 h at 37°C with 5% thermolysin, the inhibitory activity reached 73.0% at 78.9 µg/mL. The yield of the hydrolysate was 86.9%.

キーワード：スルメイカ, シロサケ, アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤, プロテアーゼ消化, ペプチド, 肝膵臓, 筋肉

水産業を基盤産業とする北海道では, スルメイカやホタテなど水産物が漁獲, 加工される一方で, 内臓などの非可食部が多量に排出され, その処理が問題になっている。また, 河川に遡上したシロサケはふ化事業のために漁獲されるが, 生殖巣を除くほとんどの部位が埋め立てられるか焼却処理されており, 漁業関係者の廃棄物処理に対する経済的負担は大きい。このような背景から, 水産廃棄物を有用資源に転換するための技術開発が強く望まれている。

これまでの研究において, 水産物のカツオ節,¹⁾ イワシ筋肉²⁻⁴⁾やヒジキ⁵⁾のプロテアーゼ分解物が, アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) に対して阻害活性を示し, *in vivo* で血圧を降下させることが報告されている。また, 太田ら⁶⁾は, 水産廃棄物のサケ頭部をプロテアーゼ (*Bacillus sub.* 由来) で加水分解することによる ACE 阻害ペプチドへの変換を報告している。ACE は血圧調節系に深く関与している酵素であり, アンジオテンシン I から昇圧物質であるアンジオテンシン II を生成すると

ともに, 降圧作用を示すブラジキニンを分解する作用を併せ持つ。高血圧症は先進諸国で最も罹患頻度が高く, 動脈硬化, 心筋梗塞や脳卒中を誘発するため, 水産廃棄物から ACE 阻害ペプチドへの変換が可能となれば, その有効利用が期待できる。

そこで本研究では, 北海道で排出量の多い水産廃棄物のスルメイカ肝膵臓 (ゴロ) と遡上シロサケ筋肉を試料として選び, 種々のプロテアーゼによる加水分解物の ACE 阻害活性を測定した。また, 水産廃棄物を効率的に利用するためには, ACE に対する阻害活性の発現に加え, 高い収率で加水分解物を得ることが重要になる。そのため, これまであまり詳細に調べられてこなかった, プロテアーゼの至適加水分解反応条件に関して検討を行った。

実験方法

試料 1997 年 7 月に函館市内の市場にて購入したスルメイカ *Todarous pacificus Steenstrup* から肝膵臓を取

* Tel : 81-138-40-5560. Fax : 81-138-40-5560. Email : kore@fish.hokudai.ac.jp

り出し、生理食塩水で洗浄した後、ホモジナイズしたものを用いた。シロサケ *Oncorhynchus keta* は、1998 年 6 月に函館市近郊の汐泊川に遡上したものを採取し、その筋肉を細切して用いた。

試薬 ペプシン（ブタ胃粘膜由来）はディフコ・ラボラトリー社製、トリプシン（ウシ膵臓由来）は和光純薬工業製、キモトリプシン（ウシ膵臓由来）、サーモリシン（*Bacillus thermoproteolyticus* 由来）、プロテアーゼ Type I（ウシ膵臓由来）、プロテアーゼ Type IV（*Streptomyces caesptous* 由来）およびプロテアーゼ Type XXII（*Aspergillus oryzae* 由来）はシグマ社製、酸性プロテアーゼ（*Aspergillus niger* 由来）およびアルカリプロテアーゼ（*Bacillus subtilis* 由来）はナガセ生化学工業製、中性プロテアーゼ（*Streptomyces* sp. 由来）は協和醗酵工業製をそれぞれ購入した。ACE（EC3.4.15.1, ウサギ肺由来）はシグマ社より、Hip-puryl-L-histidyl-L-leucin（Hip-His-Leu）はペプチド研究所よりそれぞれ購入した。

脱脂処理 試料重量に対して 4 倍量の 99.5% エタノールを加え、4℃ の暗所で 4 日から 7 日間静置浸漬させて脱脂を行った。次いで、吸引濾過により得られた残渣から残存するエタノールを除去するために、蒸留水に懸濁し、3000 rpm で 10 分間の遠心分離により上清を除去した。得られた残渣に少量の蒸留水を加え、内在するプロテアーゼを失活させるために 90℃ で 15 分間加熱処理後、凍結乾燥して脱脂粉末を得た。

脱脂粉末の一般成分分析 水分定量は常圧加熱乾燥法により 110℃ で 6~7 時間加熱乾燥し定量した。粗タンパク質はケルダール法を用いてその窒素量を定量し算出した。粗脂肪は Folch 法⁷⁾によって抽出、定量した。灰分は直接灰化法により 550~600℃ で加熱乾燥後、定量した。

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、タンパク質を熱変性させるために 90℃ で 15 分間加熱した。これをそれぞれのプロテアーゼの至適 pH に調整した後、脱脂粉末（基質）に対して 0.1~5.0 % のプロテアーゼを加え、37℃ で反応を行った。一定時間反応後、90℃ 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、10000 rpm, 15 分間の遠心分離を行い、吸引濾過により可溶性成分を分離し、凍結乾燥することで加水分解物を得た。

ACE 阻害活性の測定 測定方法は Lieberman 測定法の変法⁸⁾に基づいて行った。すなわち、30 μ L の加水分解物溶液に、ホウ酸緩衝液（pH 8.3, 400 mM NaCl 含有）に溶解した 5 mM の Hip-His-Leu 基質溶液を 250 μ L 添加し、37℃ の恒温水槽中で 5 分間保温した。100 μ L の ACE 溶液（6 mU）を添加し、直ちに攪拌した後、37℃, 60 分間反応させた。1 N 塩酸 250 μ L を添加し、

攪拌することにより反応を停止させた。その後、1.5 mL 酢酸エチルを添加、十分に攪拌して馬尿酸を遊離した。3000 rpm, 10 分間の遠心分離後、上層の酢酸エチル層を 1.0 mL 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 228 nm における吸収度を測定した。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 1 N 塩酸を添加して反応させたときの吸光値を示す。

結果および考察

脱脂粉末の一般成分 スルメイカ肝膵臓は、4 倍量のエタノールを用いて脱脂処理を行ったにもかかわらず、その脱脂粉末中には脂質成分が、34.0 g/100 g 残存していた（Table 1）。そのため粗タンパク質の相対含量が低くなり、48.7 g/100 g にとどまった。一方、シロサケ筋肉はエタノールによる脱脂が十分なされ、脱脂粉末中の脂質含有量は 1.9 g/100 g まで低下した。また、これを反映して粗タンパク質の含有量は 86.0 g/100 g と非常に高い値を示した。水分、灰分についてはスルメイカ肝膵臓、シロサケ筋肉とも差が殆どなく、それぞれ 2~3 g/100 g, 1~2 g/100 g であった。スルメイカ肝膵臓、シロサケ筋肉の脱脂粉末の収率は、それぞれ 18.5%, 14.4% であったが、タンパク質の含有率を考え合わせると、シロサケ筋肉の方がよりタンパク質量の多い基質であるといえる。

加水分解物の ACE 阻害活性 各種プロテアーゼを用いてスルメイカ肝膵臓の脱脂粉末を加水分解反応後、反応上清から得られた分解物の ACE 阻害活性を測定した（Table 2）。その結果、プロテアーゼ Type IV, プロテアーゼ Type XXII 以外のすべてのプロテアーゼによる加水分解物が、ACE 阻害活性を示した。特に、アルカ

Table 1. Proximate composition of defatted squid hepatopancreas and salmon muscle

	Defatted squid hepatopancreas	Defatted salmon muscle
	(g/100 g deatted powder)	
Moisture	2.4	3.1
Protein	48.7	86.0
Fat	34.0	1.9
Ash	2.2	1.2

Squid hepatopancreas and salmon muscle were defatted with four volumes of ethanol.

Table 2. ACE inhibitory activity and yield of hydrolysates obtained from various protease-mediated reactions of defatted squid hepatopancreas

Protease	Origin	Inhibition rate (%) ^{*1}	Yield (%) ^{*2}
Pepsin	Porcine gastric mucosa	13.4	23.0
Trypsin	Bovine pancreas	9.3	24.0
Chymotrypsin	Bovine pancreas	34.4	28.5
Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i> rokko	63.5	54.4
Basic protease	<i>Aspergillus niger</i>	28.8	26.0
Neutral protease	<i>Streptomyces</i> sp.	31.4	26.6
Alkaline protease	<i>Bacillus subtilis</i>	43.4	58.6
Protease Type I	Bovine pancreas	40.3	27.4
Protease Type IV	<i>Streptomyces caespitosus</i>	n.d.	6.4
Protease Type XXII	<i>Aspergillus oryzae</i>	n.d.	34.0

^{*1}: ACE inhibitory activity of hydrolysate was assayed at the final concentration of 78.9 µg/mL.

^{*2}: Yield (%) = (weight of hydrolysate/weight of substrate) × 100

n.d.: not detected

Table 3. ACE inhibitory activity and yield of defatted salmon muscle hydrolysates obtained from various protease-mediated reactions

Protease	Inhibition rate (%) ^{*1}	Yield (%) ^{*2}
Thermolysin	72.5	85.7
Alkaline protease	49.1	80.4
Pepsin	17.1	15.7

^{*1}: ACE inhibitory activity of hydrolysate was assayed at the final concentration of 78.9 µg/mL.

^{*2}: Yield (%) = (weight of hydrolysate/weight of substrate) × 100

リプロテアーゼとサーモリシンを用いた場合に高い阻害活性が認められ、終濃度 78.9 µg/mL あたりの ACE 阻害活性は、それぞれ 43.4% および 63.5% であった。また、加水分解物の収率も、アルカリプロテアーゼとサーモリシンを用いた場合にのみ 50% 以上であった。このようにアルカリプロテアーゼとサーモリシンがスルメイカ肝臓の脱脂粉末の加水分解反応において有用であったことから、シロサケ筋肉の脱脂粉末に対しても、それらのプロテアーゼを用いて同様に加水分解反応を行い、分解物の ACE 阻害活性ならびに収率の測定を行った。その際、イワシ筋肉やヒジキタンパク質から ACE 阻害ペプチドを生成することが報告されているペプシン^{2,5)}を比較対照プロテアーゼとして用いた。その結果、サーモリシンによる加水分解物の阻害活性が最も高く、終濃度 78.9 µg/mL における ACE 阻害活性は 72.5% であった。一方、アルカリプロテアーゼ分解物では 49.1% の阻害活性がみられたが、ペプシン分解物の ACE 阻害活性は 20% 以下と低い値であった (Table 3)。収率は、サーモリシン分解物およびアルカリプロテアーゼ分解物がともに 80% 以上であったのに対し、ペプシン分解物は 20% 以下であった。よって、スルメイカ肝臓とシ

ロサケ筋肉を試料とした加水分解反応において、サーモリシンが ACE 阻害活性および収率の両面から有用な酵素であることが明らかとなった。

この様にサーモリシン分解物に高い ACE 阻害活性が認められたが、阻害成分がサーモリシンによる基質脱脂粉末の分解物であることを確認するため、サーモリシンの自己消化物と脱脂粉末の非酵素的分解物を混合して、その ACE 阻害活性を測定した。その結果、混合物には ACE に対する阻害活性が全くみられなかったことから、阻害活性を示した成分は、サーモリシンが脱脂粉末を加水分解することにより生成したペプチドであると推察した。

加水分解反応条件の検討 種々のプロテアーゼを用いて加水分解反応を行った場合、分解物の収率が高いものほど ACE 阻害活性が高かった。よって、より一層加水分解が進む反応条件の検討が必要であると考えた。そこで、ACE 阻害活性の強かったサーモリシンとアルカリプロテアーゼについて、反応条件の検討を行った。

始めにプロテアーゼ添加量の影響について検討を行った (Fig. 1)。サーモリシンを 0.1% 添加し 5 時間の反応後に得られた分解物は、終濃度 78.9 µg/mL における ACE 阻害活性が 54.3% であったのに対し、5.0% 添加では 72.5% に達し、プロテアーゼ添加量が増加するにつれて分解物の ACE 阻害活性が上昇した。アルカリプロテアーゼを用いた場合においても同様の傾向が認められたが、いずれの添加濃度においてもその阻害活性は、サーモリシン分解物より低い値であった。一方、加水分解物の収率は、二つのプロテアーゼの間に大きな差が認められず、5.0% のサーモリシンおよびアルカリプロテアーゼ添加において、それぞれ 85.7% および 82.0% であった。

サーモリシンは、Leu, Ile, Val, Met, Phe などの疎水

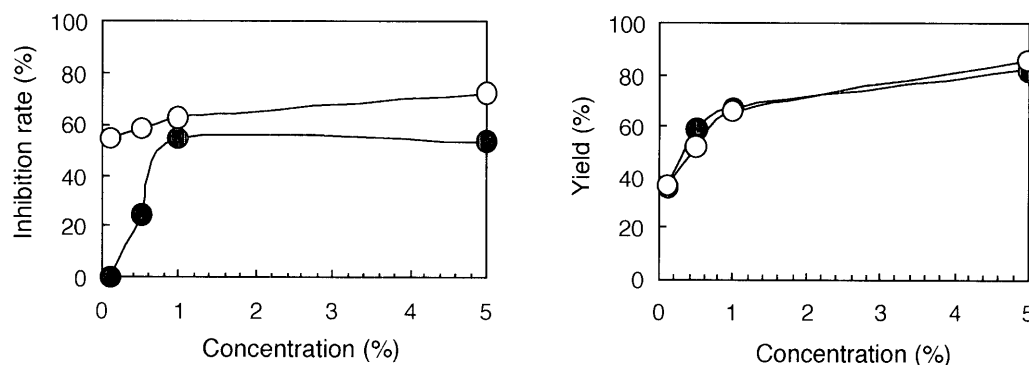


Fig. 1. Effect of protease concentration on ACE inhibitory activity and yield of hydrolysates derived from defatted squid hepatopancreas or salmon muscle. Defatted squid hepatopancreas and salmon muscle were hydrolyzed with thermolysin (pH 7.5) or alkaline protease (pH 8.0) at 37°C. ○: Thermolysin, ●: Alkaline protease

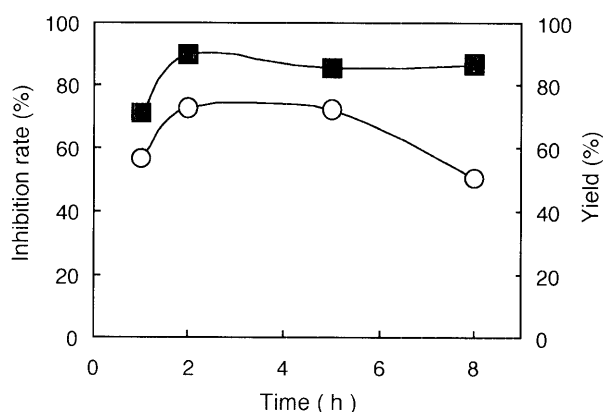


Fig. 2. Time course of alkaline protease-mediated hydrolysis. Defatted salmon muscle was hydrolyzed with alkaline protease at 37°C, pH 8.0. ○: Inhibition rate, ■: Yield

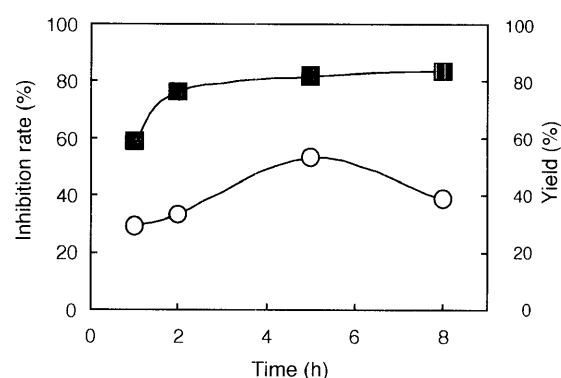


Fig. 3. Time course of thermolysin-mediated hydrolysis. Defatted salmon muscle was hydrolyzed with thermolysin 37°C, pH 7.5. ○: Inhibition rate, ■: Yield

性アミノ酸を特異的に認識するエンドペプチダーゼであり、カツオ節のサーモリシン分解物からは ACE に対して高い阻害活性を示す Leu-Lys-Pro-Asn-Met が分離され、*in vivo*での血圧降下作用も明らかにされている^{1,9)}。また、サーモリシンは ACE¹⁰⁾と同様に活性中心部位に Zn^{2+} をもつメタロペプチダーゼでもある。この様に、ACE との類似性が、高い阻害活性をもつ分解物を得るうえで重要なかもしれない。

次いで、それぞれのプロテアーゼを 5.0% 添加して得られる分解物の ACE 阻害活性および収率について経時の変化を調べた (Fig. 2, 3)。サーモリシン添加では 2 時間の反応において、既に 73.0% と高い阻害活性を示し、収率も 89.6% に達した。しかし、8 時間まで反応を延長すると、ACE 阻害活性の低下が見られた。アルカリプロテアーゼを用いた場合においても、5 時間反応で高い ACE 阻害活性が認められた後、8 時間の反応では低下した。一方、収率は両酵素とも 5 時間以上の反応においても大きな変化が見られなかったことから、生

成した ACE 阻害ペプチドが長時間の反応によりさらに分解され、その分解液全体の阻害活性が低下したものと考察された。よって、高い ACE 阻害活性をもつ分解物を得るためには、至適反応時間の設定が重要であると考えられる。

以上、本研究では、水産廃棄物であるスルメイカ肝臓および遡上シロサケ筋肉の脱脂粉末にプロテアーゼを作用させることにより、ACE 阻害ペプチドへの変換が可能であることを明らかにした。特に、遡上シロサケ筋肉の脱脂粉末に対し、サーモリシンを 5% 添加し 2~5 時間反応することにより、ACE に対し高い阻害活性を有する分解物が高収率で得られることが明らかとなった。今後、これらの加水分解物の *in vivo*での血圧降下作用を検討することが必要である。

謝 辞

本研究の一部は笹川科学研究助成によった。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for Angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; **56**: 1541-1545.
- 2) 末綱邦男, 箴島克裕. 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. 栄食誌 1989; **42**: 47-54.
- 3) Matsufuji S, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Yoshikawa M. Inhibition of Angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1993; **57**: 922-925.
- 4) 松井利郎, 川崎晃一. 食品タンパク質由来機能性ペプチドによる血圧降下作用. 栄食誌 2000; **53**: 77-85.
- 5) 末綱邦男. 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. 日水誌 1998; **64**: 862-866.
- 6) Ohta T, Iwashita A, Sasaki S, Kawamura Y. Antihypertensive action of the orally administered protease hydrolysates of chum salmon head and their angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Sci. Technol. Int.* 1997; **3**: 339-343.
- 7) Folch J, Lees M, Stanley GHS. A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; **226**: 497-509.
- 8) 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 1980; **18**: 297-303.
- 9) 藤田裕之, 安本良一, 長谷川昌康, 大島一徳. 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 (I). 薬理と治療 1997; **25**: 2155-2159.
- 10) 大島敏久, 左右田健次. 補欠分子族の同定と定量. 「新生物化学実験講座 1 タンパク質 V」(崎山文夫, 鈴木紘一, 太田隆久編) 東京化学同人, 東京. 1991; 201-218.