HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	未利用水産動植物資源の機能性成分に関する研究
Author(s)	太田, 智樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	乙第5728号
Issue Date	2000-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3178535
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51681
Type	doctoral thesis
File Information	000000395141.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

未利用水産動植物資源の機能性成分に関する研究

太田 智樹

平成12年

未利用水産動植物資源の機能性成分に関する研究

太田　智樹

平成　１２　年

目　次

頁

緒言 …… 6～13

第1章　水産加工副産物中のアンギオテンシンI変換酵素阻害
ペプチドの探索と高血圧抑制作用 …… 14～52

第1節　シロサケおよびホタテガイ加工副産物のプロテアーゼ
消化物のアンギオテンシンI変換酵素阻害活性 …… 14～24

実験方法

結果および考察

第2節　シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物の高血圧抑制
作用 …… 25～28

実験方法

結果および考察

第3節　シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物からアンギオ
テンシンI変換酵素阻害ペプチドの単離 …… 29～49

実験方法

結果および考察

第4節　シロサケ頭部由来ペプチド画分の保存におけるアンギオ
テンシンI変換酵素阻害ペプチドの安定性 …… 50～52

実験方法

結果および考察

第2章　シロサケ精巣組織の抗酸化活性とその特性 …… 53～81

第1節　シロサケ精巣の水抽出物の抗酸化活性 …… 53～61

実験方法

結果および考察

第2節　シロサケ精巣低分子画分の抗酸化特性 …… 62～68

実験方法

結果および考察

第3節　シロサケ精巣低分子画分の成分分析と抗酸化活性 …… 69～81

実験方法

結果および考察

第3章　未利用海藻からのα-グルコシダーゼ阻害成分の探索

と血糖上昇抑制作用 …… 82～121

第1節　未利用海藻抽出物のα-グルコシダーゼ阻害成分の探索 …… 82～89

実験方法

結果および考察

第2節　エゾイシゲ抽出物のラットα-グルコシダーゼに対する

阻害活性 …… 90～95

実験方法

結果および考察

第3節　ラット糖負荷試験によるα-グルコシダーゼ阻害成分の血

糖上昇抑制作用 …… 96～99

実験方法

結果および考察

第4節　エゾイシゲ由来α-グルコシダーゼ阻害成分の精製および

阻害活性 …… 100～117

実験方法

結果および考察

第5節　エゾイシゲ画分W-3のα-グルコシダーゼ阻害活性と血糖

上昇抑制作用 …… 118～121

実験方法

結果および考察

総合考察 …… 122～133

要約 …… 134～136

参考文献 …… 137～146

謝辞 …… 147

略語

本論文では次の略号を使用した。

ACE	angiotensin I-converting enzyme
ATP	adenosine 5’-triphosphate
ADP	adenosine 5’-diphosphate
AMP	adenosine 5’-monophosphate
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
AMVN	2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile)
BHA	3 (2)-*t*-butyl-4-hydroxyanisole
BHT	2,6-di-*t*-butylhydroxytoluene
DMBA	2,4-dimethoxybenzaldehyde
DHA	docosahexaenoic acid
EPA	eicosapentaenoic acid
HHL	hippuryl-L-histidyl-L-leucine

HPLC	high performance liquid chromatography
MW	molecular weight
NPG	*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
SHR	spontaneously hypertensive rat
TBA	thiobarbituric acid
TCA	trichloroacetic acid

緒言

近年、我が国の食品産業は高度に発展し、世界的に見ても多種多様な食品を提供してきている。とりわけ水産物は日本の食生活には欠かせぬ食品であり、重要な食品原料となっている。このため世界中の水産物が輸入され市場に供給されているが、国内においては北海道沿岸で漁獲される水産物が圧倒的な資源量を誇っている。特にシロサケやホタテガイなどの水産物は増養殖事業の成功によって年々漁獲量が増加し、年間60万トン近くにまで達している[1]。これらの水産物は安定的に供給できる数少ない国産の原料であり、国内の食品産業にとって重要な資源となっている。現在、これらの原料は様々な食品加工に利用されているが、加工処理する際に頭部や貝殻、内臓などが排出され、それらの加工副産物は膨大なものになってきている。例えば、シロサケでは北海道沿岸で毎年10万トンから19万トン程度漁獲されるが、加工処理する際、その頭部や内臓組織が20 %近く排出され、その量は毎年2万トンから3万8千トン近くにも達している。また、ホタテガイにおいても貝柱以外の内臓組織や貝殻などが30万トン以上も排出されている。しかし、これらの加工副産物は現在のところ、餌肥料や塩辛などの珍味の原料としてごくわずかの量が利用されるだけで、その大部分が廃棄されている。これらの廃棄物はその処理コストや廃棄場所が水産加工業の経営を圧迫し、また、最近では環境への影響なども懸念され社会的にも深刻な問題となってきている。さらに、北海道沿岸域には加工副産物以外にも有効利用されていない海藻資源が数多く分布しており、地域水産業の活性化と産業育成の観点からもこれら資源の高度利用技術の開発が求められている。

これらの未利用水産動植物資源には食品原料として利用価値の高いタンパク質や糖質、脂質などが豊富に含まれている。例えば、水産物に特に多く含まれ、機能性の高いタウリンやEPA、DHAなどの成分は未利用の加工副産物中にも豊富に含まれており、健康食品や医薬品の原料としての利用が模索されている[2-4]。さらに最近では、鮭皮からのコラーゲンの利用[5]やホタテガイ卵巣中の抗腫瘍成分[6]など多様な研究が活発に行われている。

一方、近年の食品開発では食品の健康性が重視されており、健康機能をアピールした製品開発が盛んに行われている。食品の生理機能に関する研究は従来の栄養学的なアプローチからさらに発展したものであり、最近の応用生化学の進歩によって特定の疾病に対する機能性評価が可能となってきている。これまでの精力的な研究によって、免疫系[7-9]、内分泌系[10, 11]、神経系[12, 13]、循環器系[14-18]および消化器系[19-23]などに対する特定疾患の予防に役立つ生理機能成分が多くの食品素材中に見出されてきている。しかし、この様な機能性成分を利用した食品を開発するためには、食品製造におけるコスト面から安価で安定的に供給可能な食品資源が必要である。したがって、未利用水産資源中に機能性成分が見出せれば、廃棄処理問題が解決されるだけでなく、低コストでの製造が可能となり機能性食品として付加価値の高い利用開発が期待できる。

以上の様な観点から本研究では、未利用水産動植物資源中に潜在する新規な機能性成分を見出し、優れた機能性素材として活用することを目的として検討を行った。

第1章では、シロサケやホタテガイなどの加工副産物中に含まれるタンパク質をターゲットとして、高血圧抑制に関与する機能性ペプチドに関して検討を

行った。

高血圧症は動脈硬化を引き起こすとともに国内の死亡要因の上位を占める心臓疾患や脳卒中の原因症と考えられている。高血圧症の90 %以上はいわゆる原因不明の本態性高血圧であり、ある種の遺伝的素因をもとに食塩の過剰摂取、ストレスや肥満などの種々の環境因子が作用することにより発症する多因子疾患であることが知られている。血圧調節には複数の系の作用が関与することが明らかにされているが、昇圧調節系としてレニンーアンギオテンシン系、エンドセリン系、バソプレッシン系などが知られている[24]。この中で、特にレニンーアンギオテンシン系が重要な血圧調節系であると考えられている。レニンーアンギオテンシン系のなかでもアンギオテンシンI 変換酵素（ACE : EC 3. 4. 15. 1）は、レニンが産生する不活性ペプチドであるアンギオテンシンIを強力な昇圧作用をもつアンギオテンシンII に変換するとともに血圧降下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ペプチターゼである。したがって、本酵素の阻害物質は血圧降下作用を示す。アンギオテンシンII が動脈硬化や心疾患の増悪に連なる血管平滑筋細胞の増殖を促進するのに対し、ブラジキニンはその増殖を阻害することから、ACEの阻害剤はこれらの疾患をも改善する効果を有することが知られている[25]。実際、医薬品として蛇毒中のACE阻害ペプチドをもとにデザインされたカプトプリルが開発され[26]、現在、臨床で降圧剤として用いられている。

最近、食品素材から高血圧抑制作用を有する機能性ペプチドに関する研究がACE阻害活性を指標として活発に行われ、カツオの内臓[27]、鰹節[28]、イワシ筋肉[29-32]、エビ[33]、マグロ筋肉[34, 35]、カゼイン[36-39]、トウモロコシ[40, 41]および酒粕[42-

[45]などから様々なアミノ酸配列のACE阻害ペプチドが単離されている。例えば、鰹節のサーモライシン消化物からIle-Lys-ProやIle-Tyr、また、酒粕のサーモアーゼ消化物からVal-TrpやVal-Tyrなどのペプチドが単離されている。これらのペプチドはいずれもSHRすなわち自然発症高血圧ラット に対して経口投与で穏やかな血圧降下作用を有することが報告されている[28, 44, 45]。これらのことから、ACE阻害ペプチドを含む食品を摂取することによって高血圧を抑制することが期待でき、予防医学の観点からも注目すべき機能性食品素材としてその活用が注目されている。

そこで本研究では、シロサケやホタテガイなどの頭部や内臓に含まれるタンパク質を微生物由来の食品用プロテアーゼにより消化し、それらの消化物についてACE阻害活性を指標として高血圧抑制ペプチドの探索を行った。また、機能性食品素材として活用するために経口投与での生理作用をSHRを用いた動物実験によって検討した。さらに高活性なプロテアーゼ消化物からACE阻害ペプチドを単離し、構造決定を行った。

第2章では、シロサケの加工副産物である精巣組織に注目し、その抗酸化活性と特性について検討を行った。抗酸化機能を有する成分は現在最も注目されている機能性成分の一つであり、その利用範囲は食品の品質劣化の一因である酸化的劣化の抑制剤としての利用だけでなく、それらを摂取することによって生体の酸化傷害により誘導される老化や疾病に対する予防効果をもつ機能性食品としても利用可能である。

食品成分の酸化は色、味覚、臭いや歯ごたえに悪影響を及ぼすだけでなく、その酸化物は人体の健康を害する可能性もある。食品成分の中でも脂質は最も

酸化を受けやすいため、脂質の酸化を防止することは食品製造において品質管理上、最も重要である。したがって、多くの食品は真空包装や不活性ガスによる充填、あるいは抗酸化物質の添加によって保存されている。抗酸化物質は、通常フェノール性の化学合成品や天然物由来のものが用いられているが、十分な効果を持つものはあまり多くない。また、BHAやBHTなどの抗酸化物質は食品に対して比較的強い抗酸化作用を有するが、発ガン性が問題となり現在ではほとんど用いられていない。これらのことから、安全で効果的な天然物由来の抗酸化物質が求められており、それらに関する研究が盛んに行われている。これまでにも食品素材や生物組織中に多くの抗酸化物質が見出され、脂溶性のトコフェロール、ユビキノンやカロチノイド、またスーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンパーオキシダーゼやカタラーゼなどの酸化還元酵素、さらにフェリチンやトランスフェリンなどの鉄結合性タンパク質やポリアミン、ヒスチジンを含んだジペプチド、グルタチオン、アスコルビン酸およびヌクレオチドなどの水溶性低分子化合物などが知られている[46-49]。これらの内在性の抗酸化物質は天然の食品添加物として優れた特性を有するものと考えられるが、入手性やコスト面、また色や溶解性などの物理的問題が有り、実用性があまり高くないものと思われる。

食品の酸化的劣化は内在するヘムタンパク質の活性化、遷移金属に依存して発生する活性酸素種、また一重項酸素の発生や脂質過酸化物の熱分解によって引き起こされるものと考えられている[48, 50]。これらの酸化に対し、脂溶性抗酸化物質が一般的に多くの食品で用いられるが、それらの効果は脂肪分の低い食品や脂溶性成分の導入が困難な畜肉加工製品では制限される。したがって、水

溶性抗酸化物質は脂溶性抗酸化物質よりも高い酸化抑制効果が期待される。さらに、水溶性抗酸化物質はミオグロビンの様な水溶性化合物[47]の酸化に対しても効果が期待できる。

高活性を示す天然の水溶性抗酸化物質が水産加工副産物中に含まれていれば新たな利用資源としての価値を見出すことができ、さらに経済的な観点からも利用が容易である。したがって、水産加工副産物は抗酸化物質の安価な供給資源として期待でき、とりわけシロサケの精巣組織は加工時に大量に廃棄され、その組織特性からも抗酸化物質の存在が期待できる。精巣組織はα-トコフェロール、ユビキノン、抗酸化酵素およびポリアミン類であるスペルミンやスペルミジンを特に多く含んでいる。Lovaas [50]はスペルミンがα-トコフェロール、BHA、BHTなどの抗酸化物質よりも魚油の酸化に対して抑制効果が高いことを報告している。このスペルミンの抗酸化メカニズムは鉄のキレート作用とラジカル捕捉能の両方の作用と推測されている[51-53]。魚の精巣組織中にも同様にポリアミン類が多く含まれており、優れた天然抗酸化物質の原料になりうるものと考えられる。

そこで本研究では、イワシのトリアシルグリセロールを脂質として用い、それに対する自動酸化および鉄から発生するラジカル、また水溶性および脂溶性のラジカル発生剤などを使用した脂質酸化モデルによりシロサケ精巣組織の水溶性画分について抗酸化活性を検討し、さらにその特性について解析を行った。

第3章では、未利用海藻資源からα-グルコシダーゼ阻害活性を指標として糖尿病予防に役立つ機能性成分について検討を行った。

近年、食生活は欧米化指向が顕著となり、欧米型の疾患であった肥満や糖尿病が我が国で急激に増加している。肥満や糖尿病は食生活に密接に関わって発症する疾病であり、脂肪や糖質の過剰な摂取が最も大きな要因の一つと考えられている。したがって、肥満や糖尿病予防に役立つ機能性成分を食生活の一部に取り入れることによりその発症の予防と疾病の改善が期待できる。肥満や糖尿病予防に役立つ機能性成分に関する研究は、主にアミラーゼやα-グルコシダーゼの阻害活性を指標として各種食品中からそれらの阻害成分が探索されている[54-57]。

α-グルコシダーゼ（EC 3. 2. 1. 20）は非還元末端に存在するα-D-グルコシド結合を加水分解するエキソグルコシダーゼであり、ヒトの小腸内で糖質の最終消化と吸収に重要な役割を果たしている。例えば、摂取後のデンプンの消化過程は唾液や膵臓中のアミラーゼによって二糖類であるマルトースとなり小腸に達し、小腸刷子縁膜上に存在するα-グルコシダーゼによってさらに加水分解されグルコースとなり腸管から吸収される。吸収されたグルコースによって血液中の糖濃度（血糖値）が上昇し、各組織に運搬されエネルギー源となる。しかしながら、血糖コントロールに異常が有る場合、食後高血糖の持続により様々な合併症を進展させることが知られている[58]。食後高血糖の是正は経口血糖降下剤やインスリンを用いても困難なことがあり、消化管における糖質の吸収を防ぐことにより改善されるものと考えられている。したがって、消化吸収過程におけるα-グルコシダーゼを阻害し、グルコースの生成・吸収を抑制することによって食後の急激な血糖値の上昇を抑制することが可能となる。実際、α-グルコシダーゼ阻害剤の開発が行われ、現在アカルボースやボグリボースといっ

た薬剤が臨床で用いられている。

一方、食品由来のα-グルコシダーゼ阻害成分に関しても最近活発に研究が行われ、水産食品においても魚タンパク加水分解物[54]やヒジキ[55]、また、茶[56]、香辛料[57]、などで阻害活性が見出されている。しかし、これらの研究はほとんどが試験管レベルでの実験結果であり、実際に経口摂取した際の効果は明らかにされていない。そこで本研究では、未利用海藻資源からα-グルコシダーゼ阻害活性を有する機能性成分を探索し、得られた活性成分について動物実験による食後高血糖抑制作用について検討を行った。さらにα-グルコシダーゼ阻害成分の精製単離を行い、その構造と生理作用についても論述した。

第1章　水産加工副産物中のアンギオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの探索と高血圧抑制作用

本章では、シロサケおよびホタテガイの加工副産物中のアンギオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの探索とシロサケ頭部からの同ペプチドの単離と構造決定を行った。

第1節　シロサケおよびホタテガイ加工副産物のプロテアーゼ消化物のアンギオテンシンI 変換酵素阻害活性

実験方法

1.1.1　試料および試薬

実験に用いたシロサケは北海道釧路沿岸で漁獲されたものを広洋水産 (株) から供与を受けた。すなわち、漁獲直後のシロサケを氷冷下で搬送して直ちに頭部、筋肉部および内臓組織に分け、-135℃で保存したものを用いた。ホタテガイは北海道常呂沿岸域で漁獲されたものを常呂漁業協同組合から供与を受け、氷冷下で搬送して中腸腺および生殖腺を採取し、-135℃で保存したものを用いた。実験に用いたプロテアーゼは食品加工に使用される微生物由来のXP-415（真菌由来）、ビオプラーゼSP-10（枯草菌由来）、パパイン（パパイヤ由来）、デナチーム2P（糸状菌由来）およびデナプシン2P（糸状菌由来）などのプロテアーゼ5種を長瀬生化学工業（株）より購入した。

ACEはウサギ肺由来ACEをシグマ社より、またACEの基質はHHLを（株）ペプチド研究所より購入した。その他の試薬、溶媒は特級、またはHPLC分析用の試薬を用いた。

1.1.2　シロサケおよびホタテガイの各種組織からプロテアーゼ消化物の調製

シロサケは頭部、筋肉、消化管および肝臓、また、ホタテガイは生殖腺および中腸腺などの組織を用いて実験を行った。各組織のプロテアーゼ消化物の調製はFig. 1に示した様に行った。なお、シロサケ頭部は120℃で40分間加熱処理し、さらにマスコロイダー（MKZA-10型、増幸産業（株））によりペースト状に処理したものを試料として使用した。

凍結した試料を室温で解凍後、ナイフで細切し、10 gを採取した。その試料に5倍量の蒸留水を加えてポリトロン・ホモジナイザー（Kinematica PT-6000型、Kinematica）を用いて9000回転で1分間ホモジナイズし、1M 水酸化ナトリウム溶液、または1 N 塩酸で各プロテアーゼの至適pHに調整した。そのホモジネートに一種類のプロテアーゼ50 mgを添加し、至適温度で16時間消化を行った。プロテアーゼ消化反応の停止は98℃で15分間加熱することにより行った。室温で冷却した後、10,000×gで10分間遠心分離を行い、上清を減圧下でろ紙（No.5A）によりろ過を行った。ろ液を150 mlにメスアップした後、ACE阻害活性測定に供した。なお、各種のプロテアーゼの至適pHおよび温度はTable 1に示す。

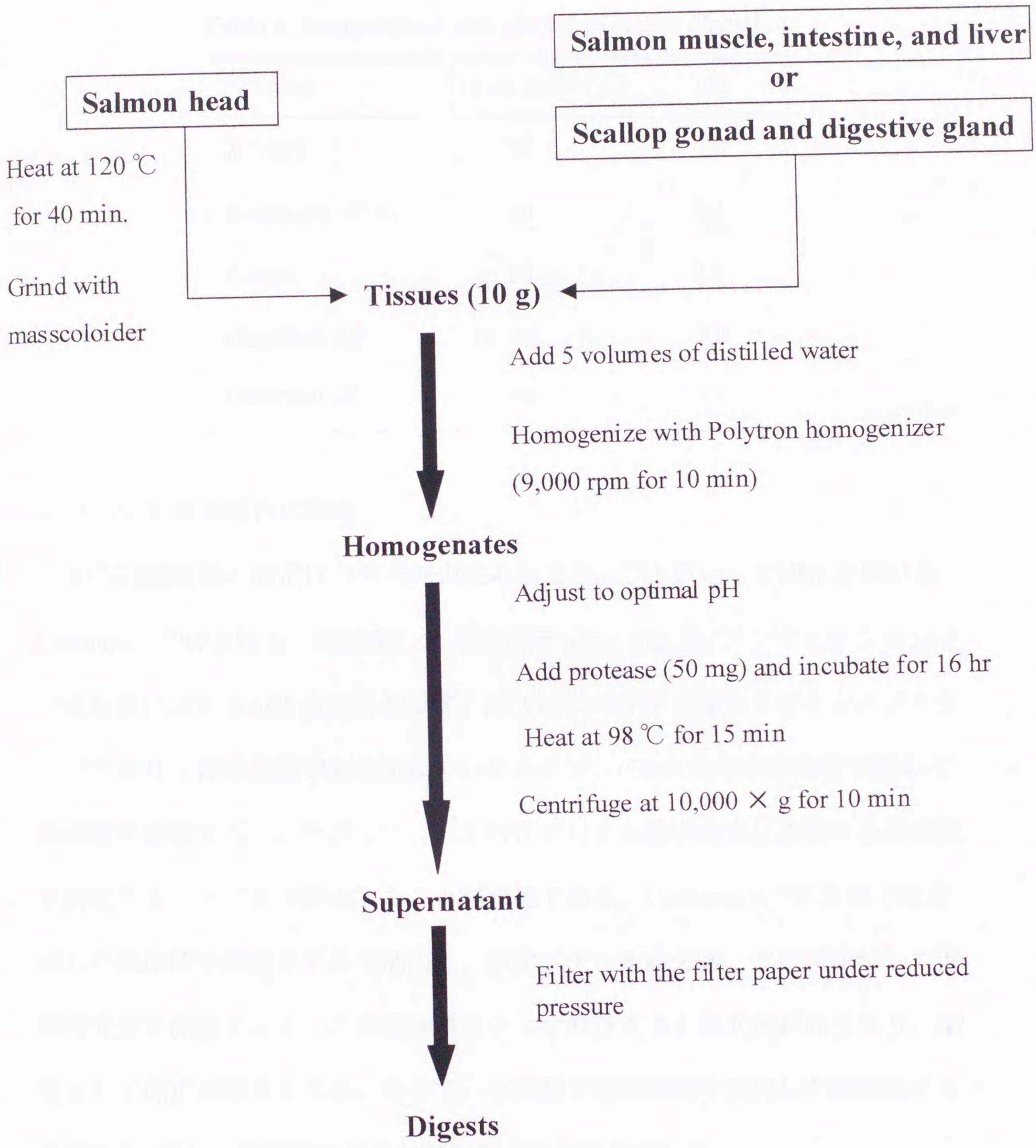


Fig. 1. Preparation procedure of various protease digests of underutilized marine by-products.

Table 1. Temperature and pH for protease digestion.

Protease	Temperature (℃)	pH
XP-415	30	3.0
Biopurase SP-10	30	7.0
Papain	55	7.0
Denazym AP	40	7.0
Denapsin 2P	40	3.0

1.1.3　ACE 阻害活性の測定

ACE阻害活性の測定はウサギ肺由来のACEおよび基質としてHHLを用いるCushmanら[59]の方法を一部改変した方法で行った。Fig. 2にアンギオテンシンIと合成基質に対するACEの反応を示す。ACEはジペプチジルカルボキシペプチターゼであり、合成基質であるHHLのL-ヒスチジンのN末端側の結合を切断して馬尿酸を遊離する。したがって、ACE活性に対する阻害活性は遊離する馬尿酸を測定することにより評価することが可能である。Cushmanら[59]の方法では遊離した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチルを除去後、水に再溶解して直接吸光度を測定するが、この際酢酸エチルが残存すると吸光度が高くなり、結果として測定誤差を生じる。そこで、本実験では馬尿酸を抽出した酢酸エチルをHPLCに供し、馬尿酸だけを分離定量する方法を用いた。

ACE阻害活性の測定は100 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.3）、300 mM 塩化ナトリウム溶液、100 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.3）で溶解した2.5 mM HHL、400 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.3）で溶解した10 mU/ml

(A)

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

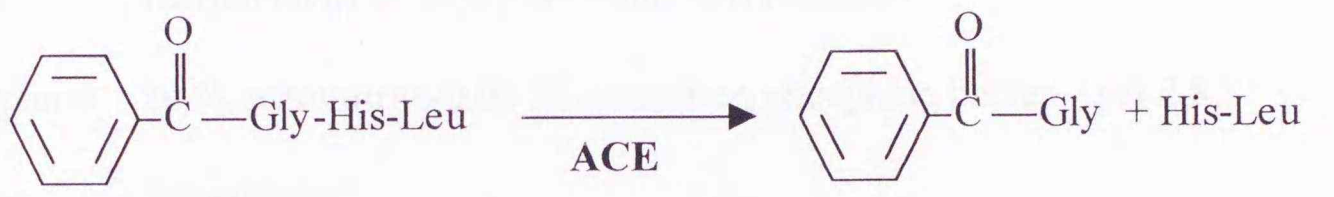
Angiotensin I

ACE

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe + His-Leu

Angiotensin II + dipeptide

(B)



Synthetic substrate **Hippuric acid + dipeptide**

Fig. 2. Degradation of angiotensin I and synthetic substrate by the angiotensin I-converting enzyme from rabbit lung.

(A) Conversion reaction of angiotensin I to angiotensin II and dipeptide.

(B) Conversion reaction of synthetic substrate to hippuric acid and dipeptide.

ACEおよび蒸留水に溶解した測定試料を各50μlずつ加えた反応混液（全量200μl）中で37℃、30分間行った。反応の停止は反応混液に1 N 塩酸を200μl加えて行った。反応停止した混液に100μlの酢酸エチルを加え、よく攪拌振とうして遊離した馬尿酸を抽出した。抽出液の10μlをHPLCに供し、馬尿酸の定量を行った。HPLCによる馬尿酸の分析条件はTable 2に示す。

Table 2. Conditions for HPLC of hippuric acid analysis.

Apparatus	: Hitachi L-6200 intelligent pump, L-4250 UV-VIS detector, and D-2000 integrator
Column	: Inertsil ODS-2（4.6×250 mm, GL Science）
Mobile phase	: 20 % acetonitrile-0.01 M potassium phosphate buffer（pH 2.8）
Flow rate	: 1.0 ml/min
Temperature	: 40℃
Detection	: 226 nm

また、HPLC分析における馬尿酸の標準曲線をFig. 3に示す。遊離した馬尿酸量から以下の式により阻害活性を算出した。

$$\text{ACE阻害活性（\%）} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

ただし、A：阻害試料を入れない時の遊離馬尿酸量、B：阻害試料を添加した時の遊離馬尿酸量 、C：ブランクの馬尿酸量

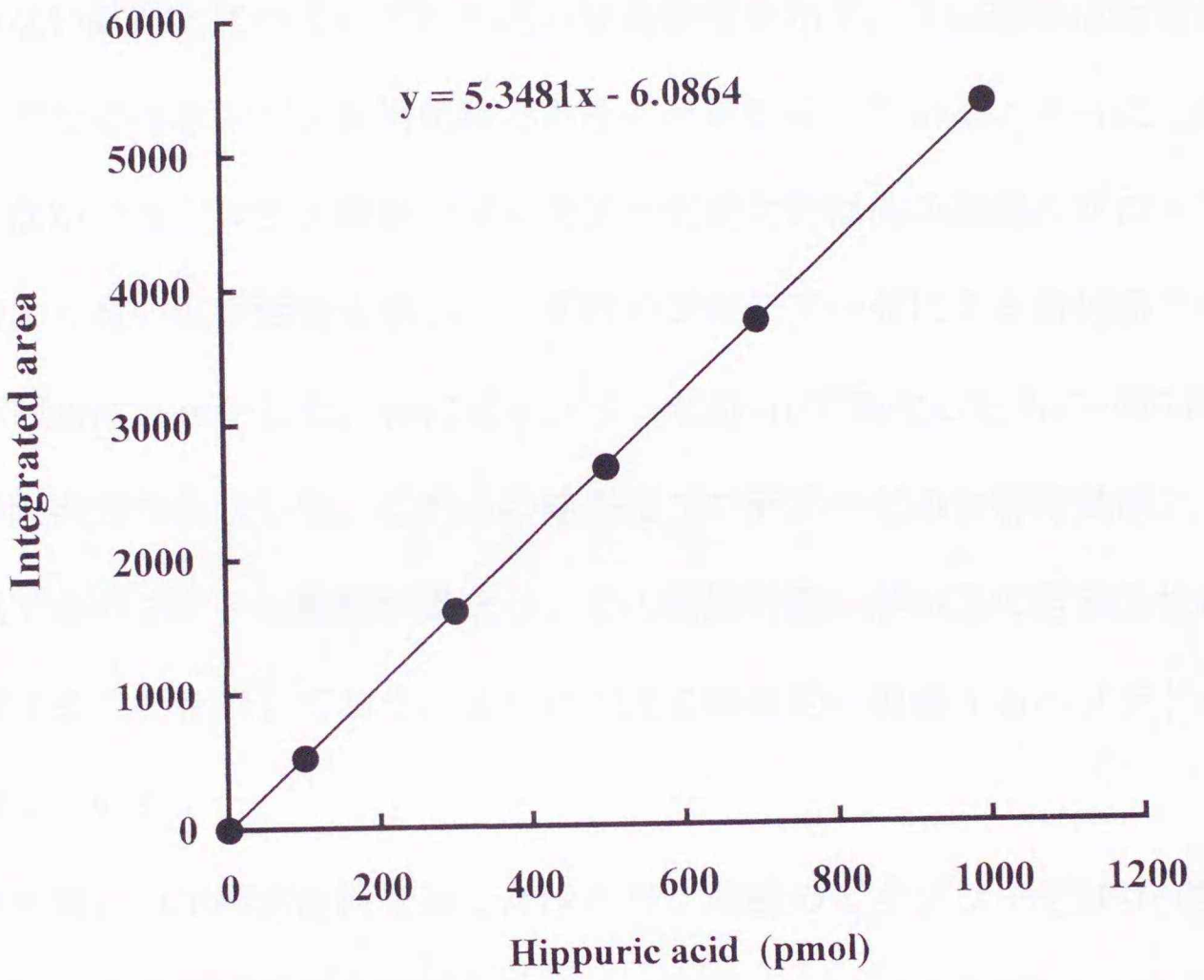


Fig. 3. Standard curve of hippuric acid and peak area for HPLC analysis.
Conditions for HPLC analysis were as follows : Mobile phase, 20 % acetonitrile in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 2.8); flow rate, 1 ml/min; column temperature, 40 ℃; detection, absorbance at 226 nm.

結果および考察

シロサケおよびホタテガイの加工副産物である頭部および内臓各組織のプロテアーゼ消化物のACE阻害活性をTable 3に示す。組織の濃度が70 mg/mlとなるように調整した試料の阻害活性を測定した結果、プロテアーゼ消化した試料は消化していない試料と比べていずれも高い阻害活性を示す。この結果は阻害成分がペプチドなどのタンパク質消化物であることを示唆している。さらに、用いた試料のなかでもシロサケ頭部のプロテアーゼ消化物は他の組織のプロテアーゼ消化物より高い阻害活性を示し、いずれのプロテアーゼによる消化物でも60 %以上の阻害活性を示した。特にビオプラーゼSP-10で消化したものが89.6 %と最も高い阻害活性を示した。これらの結果はプロテアーゼの分解特異性によって生成するペプチドの種類が異なり、その構造の違いがACEの阻害活性に大きく影響することを示しており、さらにACEを特異的に阻害するペプチドの存在も示唆している。

次に、最も強いACE阻害活性を示したシロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物について、その生成条件を検討した。その結果をTable 4およびFig. 4に示す。ただし、pHおよび温度に関する実験では組織の濃度が50 mg/mlとなるように調整し、1時間消化した試料について阻害活性を測定した。それらの結果を総合すると、pH 7.0、30℃で５時間消化した生成物が最も高い阻害活性を示した。これらの結果から、本節以降の実験ではシロサケ頭部をビオプラーゼSP-10を用いてpH 7.0および30℃で5時間消化した生成物について検討を進めた。

Table 3. ACE-inhibitory activity of protease digests from underutilized tissues of chum salmon and scallop.

Tissues \ Protease	Inhibition (%)					
	Non	Denapsin	Denazyme	Papain	Biopurase SP-10	XP-415
Chum salmon						
Head	60.1	77.5	82.9	89.4	89.6	85.0
Muscle	45.0	48.2	80.4	63.5	72.1	73.5
Intestine	30.5	32.1	58.6	40.1	56.7	43.1
Liver	ND	51.0	50.0	33.9	47.4	43.2
Spermary	ND	65.8	34.2	17.4	65.8	5.7
Scallop						
Gonad	45.3	53.9	65.8	50.7	68.2	50.1
Digestive gland	ND	49.5	16.1	24.5	44.8	43.2

Digestion was carried out for 16 hr under the condition of optimal pH and temperature as shown in Table 1.
The ACE-inhibitory activity of digests was assayed at a concentration of 70 mg equivalent of tissue per ml.
ND: not detected.

Table 4. Effect of pH and temperature on development of ACE-inhibitory activity of chum salmon head with Biopurase SP-10.

	Inhibition (%)		
Temperature (℃) \ pH	7	8	9
30	40.4	38.5	35.3
40	38.5	37.7	37.2
50	37.4	37.0	37.1

ACE-inhibitory activity was measured in the medium containing 50 mg equivalent of protease digests of crushed salmon head, 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3), 300 mM NaCl, 2.5 mM HHL,10 mU/ml ACE for 30 min at 37 ℃. Digestion of salmon head was carried out for 1 hr.

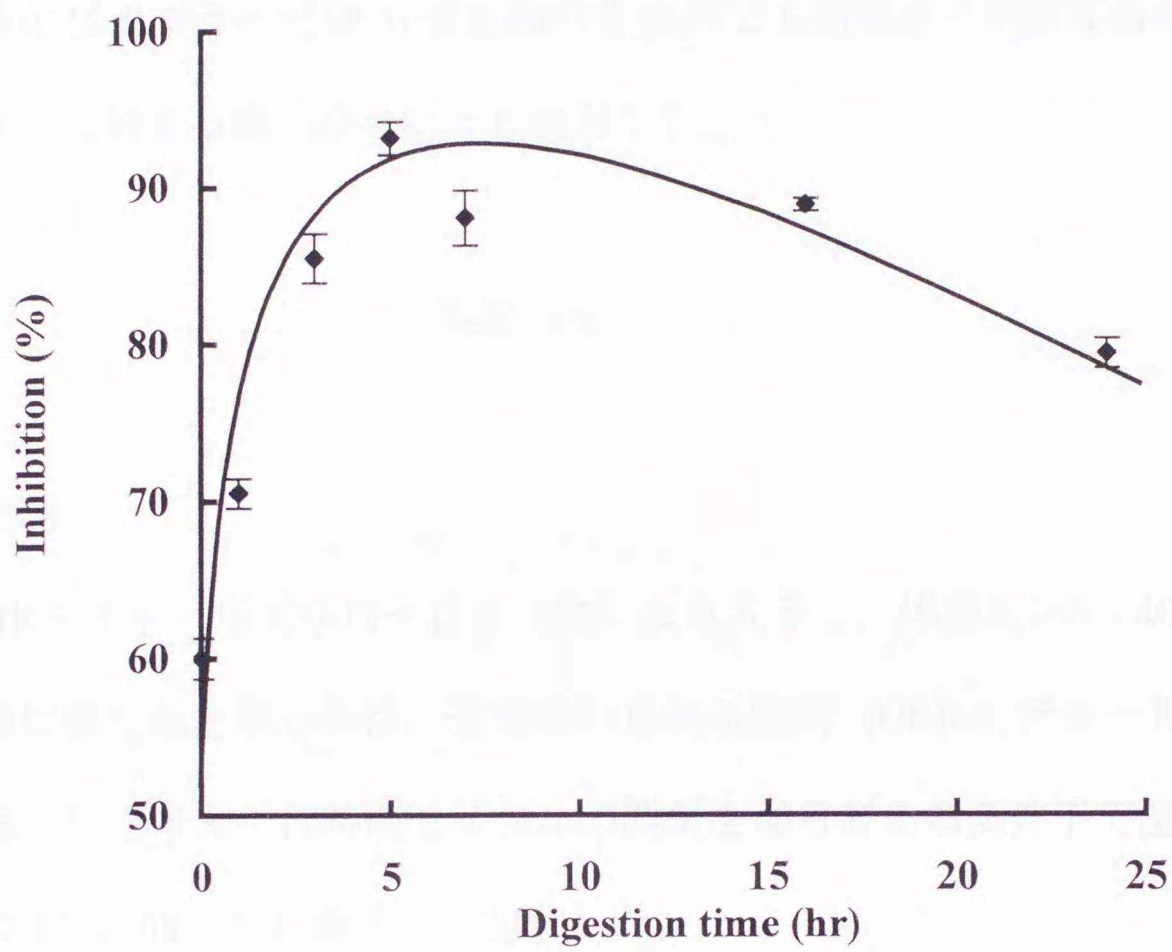


Fig. 4. Effect of digestion time with Biopurase SP-10 on ACE-inhibitory activity.

Digestion was performed using Biopurase SP-10 at pH 7 and 30℃. The ACE-inhibitory activity of the digests was assayed at a concentration of 70 mg equivalent of tissue per ml. Bars represent standard error deviations.

第2節　シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物の高血圧抑制作用

シロサケ頭部のプロテアーゼ消化物を生理機能を有する食品素材として活用するためには経口摂取での生理効果を検証する必要がある。そこで本節では、シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物の生体内での効果を自然発症高血圧ラット（SHR）に対する経口投与により検討した。

実験方法

1.2.1　実験動物

9週齢のSHRをチャールズリバー日本（株）より入手し、体重約360～400 gのものを実験に供した。ラットは、通常用いられる餌料（CRF-1, チャールズリバー日本（株））を与え、12時間サイクルで照明を切り替える条件下で温度および湿度を22.1℃、60.5 %に調節して飼育した。

1.2.2　経口投与試料の調製

経口投与試験のためのシロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物はFig. 1と同様の方法で調製した。ただし、シロサケ頭部のペーストを100 g用い、ビオプラーゼSP-10を500 mg添加して30℃で5時間消化した。また、最後に得られたろ液はさらに限外ろ過（UK-10型、分画分子量10,000、アドバンテックTOYO（株））により精製し、凍結乾燥して経口投与試料とした。なお、本試料はシロサケ頭部由来のペプチド画分（HP-fraction）と称した。

1.2.3　経口投与と血圧の測定

動物実験はラットを数週間前からゾンデによる経口投与および尾静脈血圧測定に慣れさせた後、血圧が180 mmHg以上になってから実施した。経口投与は凍結乾燥試料を蒸留水に溶解し、ゾンデによりラット体重kg当たり2 gを投与した。血圧は38℃で15分間ラットを保定後、投与前、6、24および168時間後に尾静脈測定器（PS-100型、（株）理研開発）にて収縮期血圧を無麻酔下の間接（尾部カフ）法により測定した。対照区のラットには蒸留水を与え、同様に血圧を測定した。血圧の測定は10 mmHg以内に安定しているうちに連続的に5回行い、最高値と最低値を削除して3回の測定値の平均値を収縮期の血圧値とした。経口投与前後での収縮期血圧値の有意差はスチューデントt-検定[60]により判断した。

結果および考察

Table 5に示した様に、HP-fractionおよび対照試料投与6時間後のSHRの収縮時血圧はいずれもほとんど変化しなかった。その後、対照試料投与ラット群では168時間後においても血圧にほとんど変化はなかったが、HP-fraction投与ラット群では、6時間から24時間で約23 mmHg低下した。また、168時間後には、HP-fraction投与群においても元の血圧値に戻っていた。これらの結果から、HP-fractionは単回投与においても高血圧抑制作用を示すことが明らかとなり、この画分中に経口投与によって高血圧抑制作用を有するペプチドの存在が示唆された。これまで様々な食品タンパク質由来のACE阻害ペプチドが見出されている

Table 5. Change in systolic blood pressure of SHR by oral administration of HP-fraction.

Sample	Systolic blood pressure (mmHg) after administration			
	0	6	24	168 (hr)
Water	208.7±2.6	208.1±5.5	199.3±3.6	208.9±9.0
HP-fraction	200.6±5.0	204.8±9.4	177.2±9.9*	200.8±9.2

Systolic blood pressure is shown as mean±standard error measurement, n=5. Significant difference from systolic blood pressure on 0 hr : $0.05 < p\ ^{*} < 0.1$.

[27-45]が経口投与で生理作用を示すものは少ない。このことから、シロサケ頭部のプロテアーゼ消化物は生理機能を有する優れた食品素材であることが示唆された。一方、通常の薬剤の場合、経口摂取した際の薬理作用が消化吸収されてから数十分から1時間程度で効果を示すのに対して、HP-fractionの場合は高血圧抑制作用が現れるまでに6時間以上を要しており、薬剤による作用とは異なる結果を与えている。これまでのACE阻害ペプチドの生理作用の研究で、杉山ら[61]はイワシのタンパク質消化物についてSHRによる高血圧抑制作用を検討し、その降圧作用が4～6時間で最大になることを認めている。また、吉川らの報告[62]でも経口投与で降圧作用を有するACE阻害ペプチドは、いずれも2～8時間経過した後に生理効果を示すことを明らかにしている。これらの研究結果は本研究での結果とほぼ一致した生理作用であり、食品タンパク質由来のACE阻害ペプチドの生理作用は薬剤とは異なる作用機序によって発現するものと推察される。しかし、この点については未だに明らかにされておらず、この作用機構を解明するためには投与後の消化管内におけるペプチドの分解や吸収過程、また、血中での動態に関して詳細な検討が必要と考えられる。

第3節　シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物からACE阻害ペプチドの単離

前節で得られた結果からシロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物中には、高血圧抑制作用を有するペプチドの存在が示唆された。そこで本節では、消化物に含まれる高血圧抑制ペプチドを単離同定するためにACE阻害活性を指標として各種クロマトグラフィーを試みた。

実験方法

1.3.1　試料および試薬

シロサケ頭部から調製したACE阻害ペプチドは第1節と同じ製品である。分子量測定用マーカーはインシュリンB鎖（ブタ膵臓由来、MW 3,040）、ニューロテンシン（MW 1,673）、ブラジキニン（MW 1,060）、ロイペプチン（MW 494）およびグルタチオン（MW 307）を和光純薬（株）より購入した。合成ペプチドは（株）ペプチド研究所およびBachem社より購入した。その他の試薬および溶媒は特級もしくはHPLC分析用の試薬を用いた。

1.3.2　ACE阻害活性の測定

ACE阻害活性の測定は第1節と同様の方法で行った。なお、各試料のACE阻害活性は50%の阻害率を示す時の阻害物質の濃度（IC_{50}）で示した。

1.3.3　シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物の化学分析

水分および灰分は常法により分析した[63]。粗タンパク質量はケルダール法により測定した窒素量にタンパク質換算係数（6.25）を乗じて算出した。粗脂肪量はソックスレー法により分析した。

1.3.4　アミノ酸組成の分析

アミノ酸組成は試料を6 N 塩酸-0.1 %フェノールで110℃、24時間加水分解した後、生成したアミノ酸をフェニルチオカルバミル（PTC）化[64]した。PTC化したアミノ酸はHPLCにより分析した。HPLCの分析条件をTable 6および7に示す。なお、トリプトファンは試料を4 M メタンスルホン酸で加水分解した後PTC化して分析した。

Table 6. Conditions for HPLC of PTC-amino acid analysis.

Apparatus	: Tosoh high pressure HPLC system (CCPD pump, UV-8010, detector, CO-8010 column oven, and SC-8010 integrator)
Column	: WS-PTC column (4.0 mm×250 mm, Wako Chem.)
Mobile phase A	: 6 % acetonitrile-0.06 M sodium acetate buffer (pH 6.0)
Mobile phase B	: 60 % acetonitrile-0.06 M sodium acetate buffer (pH 6.0)
Gradient program	: Gradient program was shown in Table 7
Flow rate	: 1.0 ml/min
Temperature	: 40℃
Detection	: 254 nm

Table 7. Input program of gradient control.

Time (min)	Mobile phase	
	A (%)	B (%)
0	100	0
7	90	10
20	30	70
25	0	100
30	100	0

1.3.5　アミノ酸配列の分析

アミノ酸配列は、自動プロテインシーケンサー（Model-473A型、アプライドバイオシステム）により分析した。

1.3.6　ACE阻害ペプチドの精製

ACEを阻害するペプチドは第２節で用いたHP-fractionを各種クロマトグラフィーに供して精製した。すなわち、凍結乾燥したHP-fractionを蒸留水に溶解後、ゲルろ過HPLCに200 μlずつ繰り返して負荷し、精製を行った。カラムから溶出した画分はフラクションコレクターにより0.25 mlずつ分取した。また、HP-fractionに含まれるペプチドの分子量は標準ペプチドの溶出位置（保持時間、Fig. 5）と分子量の関係（Fig. 6）から推定した。ゲルろ過HPLCによる精製条件はTable 8に示す。

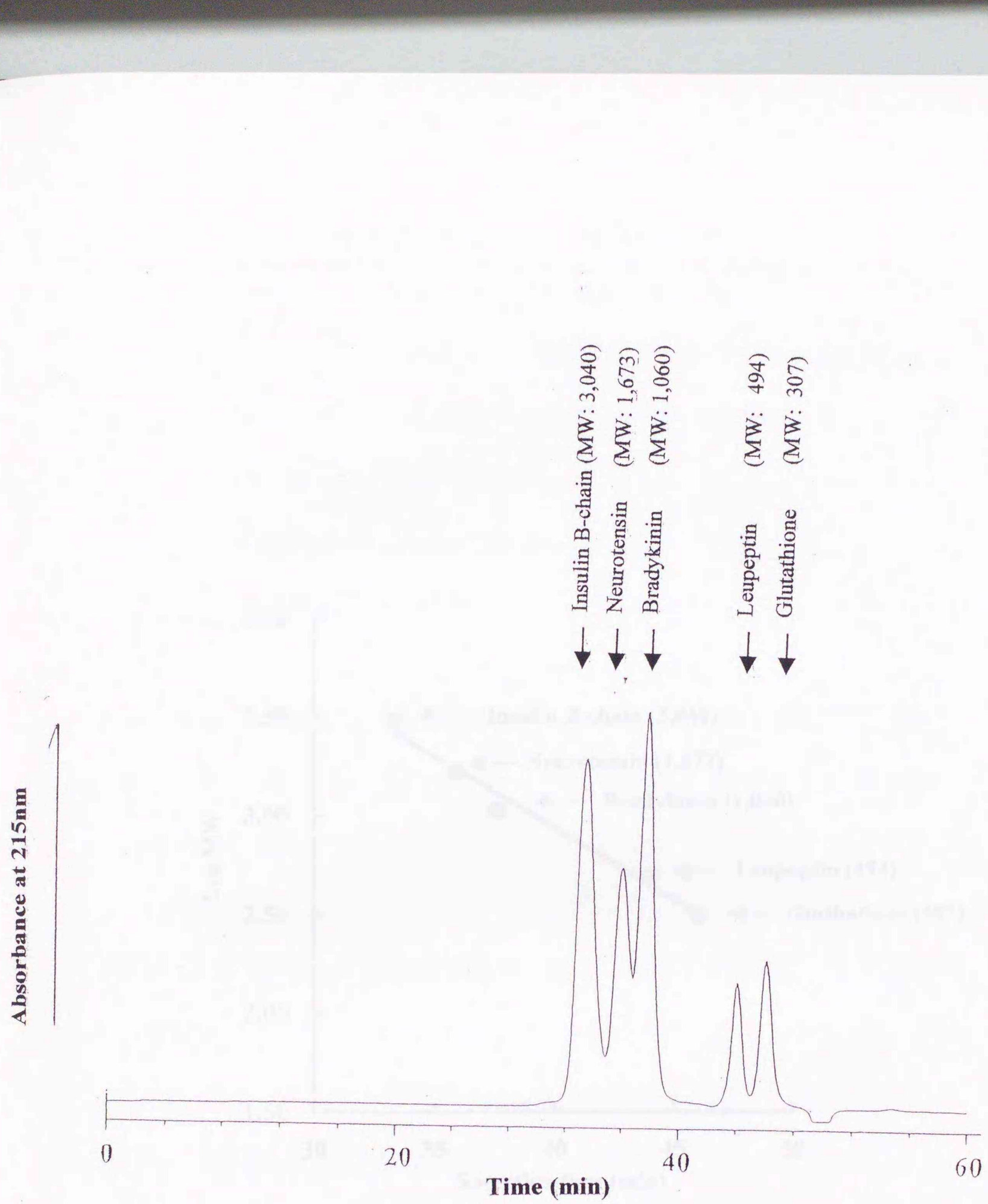


Fig. 5. Chromatogram of standard peptides on gel-filtration HPLC.
Gel-filtration HPLC was carried out using TSKgel G2500PWXL column (5×300mm) with 45 % acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.25 ml/min. Absorbance at 215 nm was monitored. Arrows indicate the elution positions of marker proteins.

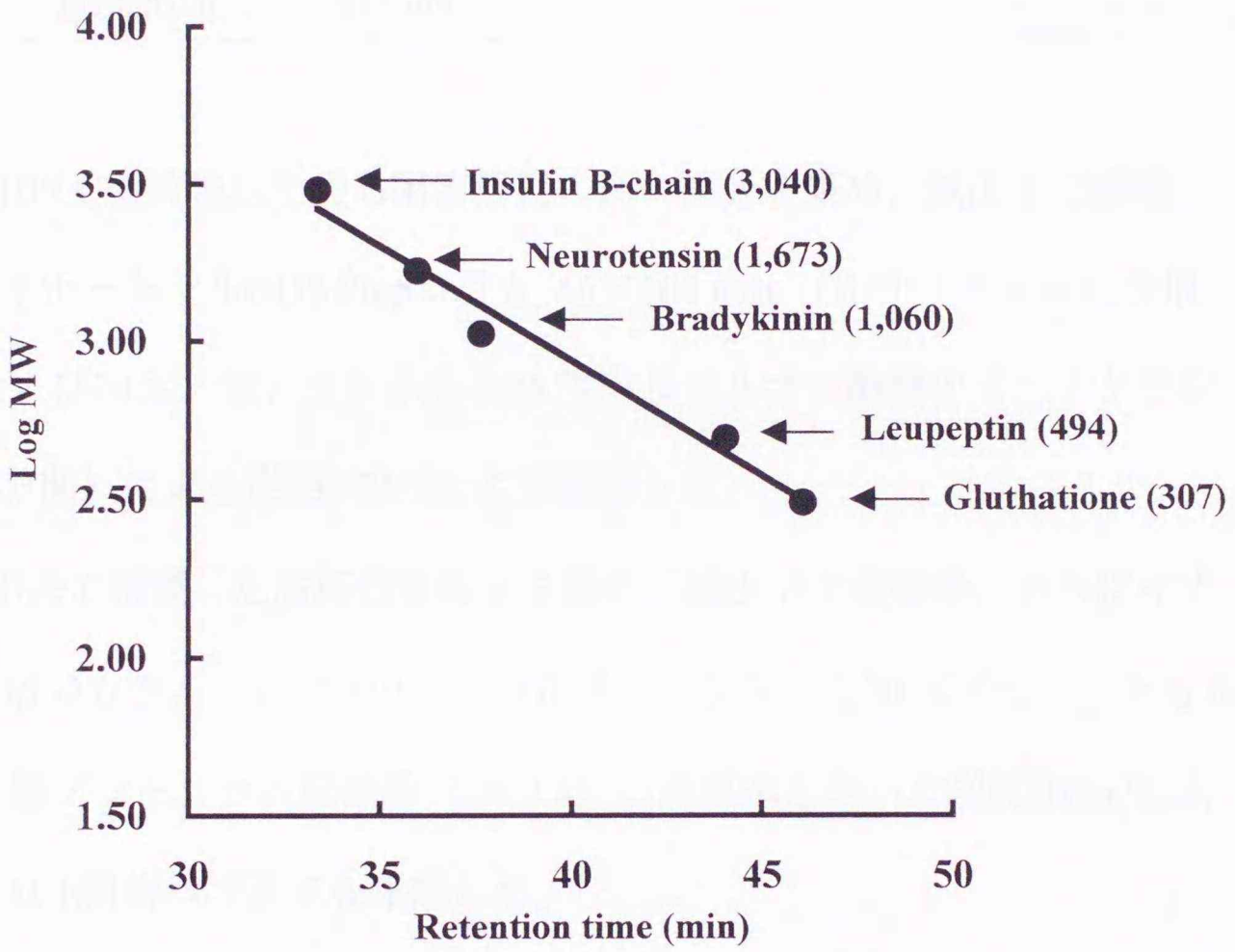


Fig. 6. Calibration plots of standard molecular weight makers on gel filtration HPLC.

Gel filtration HPLC was carried out using TSK-gel G2500PWXL column (5×300 mm) with 45 % acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.25 ml/min. Number in parentheses shows molecular weight.

Table 8. Conditions for gel-filtration HPLC.

Apparatus	: Same apparatus as shown in Table 2
Column	: TSK-gel G2500PWXL（5.0×300 mm, Tosoh）
Mobile phase	: 45 % acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid
Flow rate	: 0.25 ml/min
Temperature	: Room temperature
Detection	: 215 nm

ゲルろ過HPLCで精製した最も阻害活性の高い画分を集め、減圧下で濃縮後、さらにイナートシルODS Prepカラム（6×500 mm、GLサイエンス）を用い、10 %および70 %アセトニトリル-0.05 %トリフルオロ酢酸のリニアグラジエント（30分間）による逆相HPLCにより精製した。

逆相HPLC法で精製した高活性な画分を集め、減圧下で濃縮後、さらにイナートシルODS -2カラム（4.8×250 mm、GLサイエンス）と20 %アセトニトリル-10 mMリン酸アンモニウム緩衝液（pH 2.8）の溶媒系を用いた逆相HPLCにより精製し、ACE阻害ペプチドを単離した。

1.3.7　ACE阻害ペプチドの阻害型式

単離した2種のペプチドのACEに対する阻害型式は、ACE活性に対する種々濃度の基質（HHL）および阻害ペプチドの効果を検討し、Lineweaver-Burk プロットにより決定した。

結果および考察

シロサケ頭部からビオプラーゼSP-10消化によって得られたHP-fractionはシロサケ頭部試料100 gからの収量が6.25 g（収率: 6.3 %）であった。このHP-fractionを乾固した後に化学分析を行った結果、93.9 %がタンパク質（ペプチド、アミノ酸）成分であり、灰分が1.4 %含まれていた（Table 9）。さらにHP-fractionの全アミノ酸組成の分析により、グルタミン酸、グリシンおよびアスパラギン酸が主要なアミノ酸であることが示された（Table 10）。一方、HP-fractionのACE阻害活性はIC_{50}値で110 μg/mlを示した（Table 11）。さらにHP-fractionを精製し、ACE阻害ペプチドの単離を試みた。すなわち、5 gのHP-fractionを500 mlの蒸留水に溶解し、ODS樹脂（ODS-AQ120-S50、YMC化学）を加えて1時間攪拌した。次に、吸引ろ過して樹脂を回収した後、順次500 mlの蒸留水、10、30、50および99 %エタノール溶液により洗い、各洗浄液を吸引ろ過して吸着していた成分を溶出した。得られた各画分の溶媒を留去した後、凍結乾燥して乾燥重量を測定するとともにACE阻害活性を測定した（Table 11）。その結果、50 %エタノール画分 （D画分）が最も高い阻害活性を示し、そのIC_{50}値は78 μg/mlであり、収率はHP-fractionの1.3 %であった。

さらに同画分のゲルろ過HPLCを行ったところ、Fig. 7に示した様に2番目の小さい方のピークが高活性を示すことを認め、この画分を分取した。この画分は溶出位置から分子量が約300程度のペプチドと推定された（Fig. 6）。本画分をさらに逆相HPLCに供して阻害ペプチドを精製した。その結果、Fig. 8に示した様に、ブロードなピークが得られたが、最も阻害活性の高い画分はアセトニト

Table 9. Chemical composition of cooked salmon head and HP-fraction.

Sample	Moisture (%)	Proteins + peptides, + amino acids (%)	Fat (%)	Ash (%)
Cooked salmon head	72.1	12.5	10.6	3.7
HP-fraction*	4.6	93.9	ND	1.4

Cooked chum salmon head is the crushed by masscolloider after heated with autoclave at 120 ℃ for 40 min. * Freeze dried sample. ND: not detected.

Table 10. Amino acid content of HP-fraction.

Amino acid	Content (mg/g)
Aspartic acid	64.6
Glutamic acid	104.0
Serine	40.5
Glycine	91.6
Threonine	31.5
Alanine	62.3
Proline	44.4
Tyrosine	19.7
Valine	25.1
Methionine	25.5
Cystine	4.0
Isoleucine	19.3
Leucine	51.4
Phenylalanine	25.8
Histidine	15.6
Arginine	47.4
Lysine	54.6
Total	727.5

Amino acid contents were determined as described in " Materials and Methods". HP-fraction is used as in Table 9.

Table 11. Yields and ACE-inhibitory activity of fractions.

Fraction	Lyophilized powder weight (g)	Yield (%)	IC_{50} (μ g/ml)
HP-fraction	6.25	100.0	110
A-fraction	5.30	84.8	180
B-fraction	0.25	4.0	82
C-fraction	0.58	9.3	100
D-fraction	0.08	1.3	78
E-fraction	trace	-	-

A-, B-, C-, D- and E-fraction were obtained by elution with H_2O, 10, 30, 50 and 99 % ethanol, respectively, on batchwise ODS chromatography of HP-fraction.

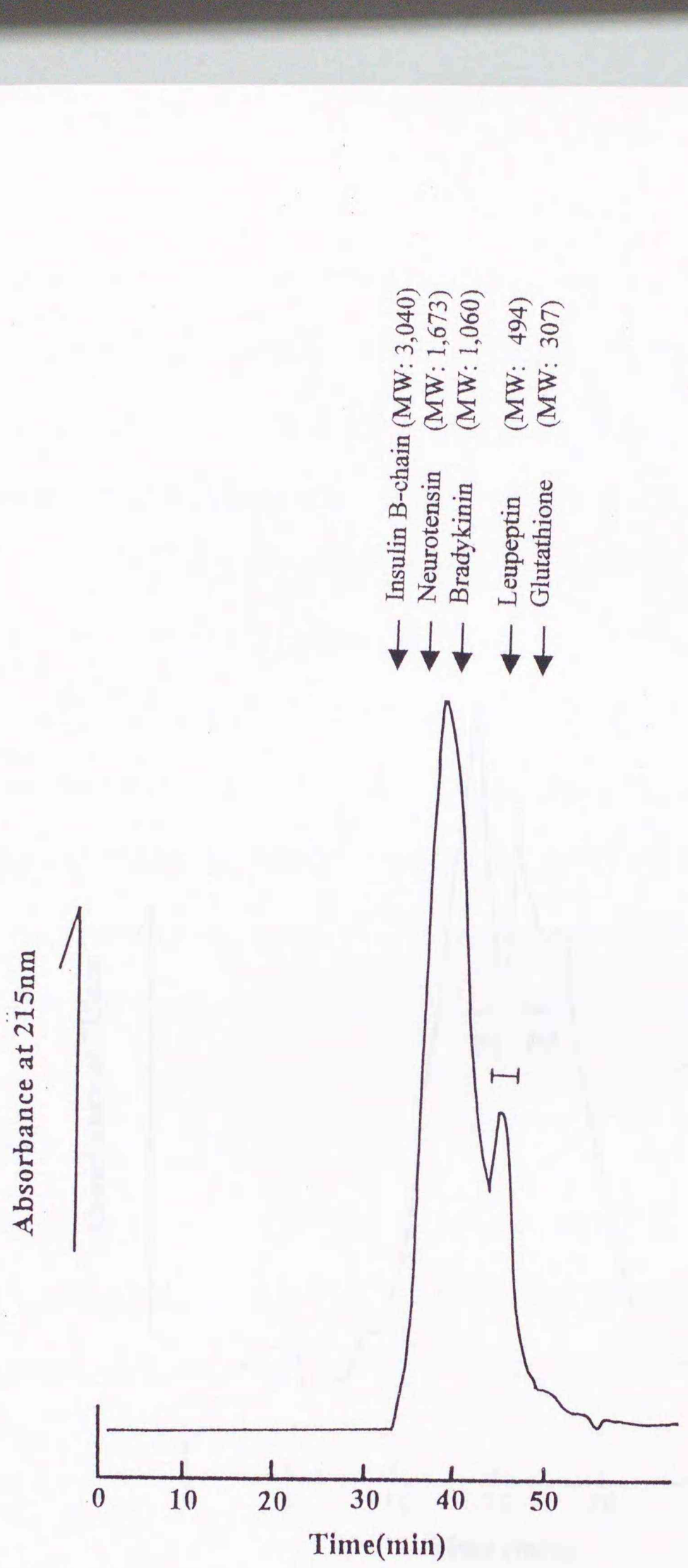


Fig. 7. Gel-filtration chromatography of Fraction D.
Fraction D was prepared as described in Table 11. A bar indicates the most active fraction. Eluting solution: 45 % acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid. Flow rate: 0.25 ml / min. Absorbance at 215 nm was monitored. Arrows indicate the elution positions of marker proteins.

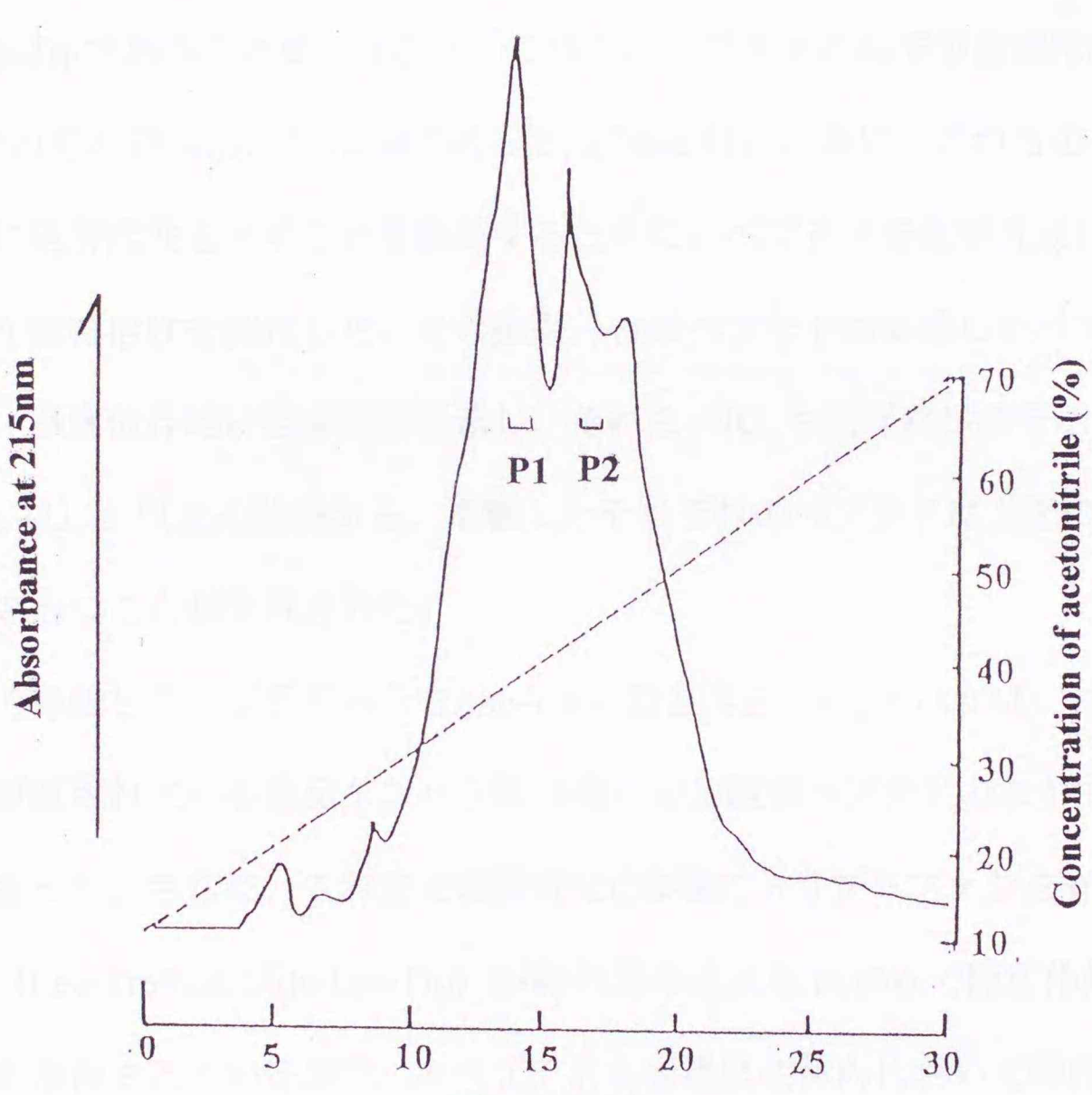


Fig. 8. Separation of ACE-inhibitory peptides from Fraction D by HPLC.
The fraction with the highest ACE-inhibitory activity indicated in Fig. 7 was purified on Inertsil ODS-prep by linear gradient of 10 – 70 % acetonitrile in 0.05 % trifluoroacetic acid. Flow rate was 2 ml/min. Bars indicate the fraction (P1 and P2) with high ACE-inhibitory activitity.

リル濃度で38-43 %の範囲に2画分（P1とP2）が得られた。これら2つの活性画分をさらに逆相HPLCで精製した結果、P1は3分、P2は5分でシャープなピークとして溶出し、それぞれ単離できた（Fig. 9）。それらのペプチドのアミノ酸組成を分析した結果（Table 12）、P1はグリシンとイソロイシンが2 : 1のモル組成比を示し、また、P2はアスパラギン酸とトリプトファンが1 : 1のモル組成比を示した。さらに、アミノ酸配列の解析から、これら2種のペプチドはGly-Ile-GlyおよびAsp-Trpであることが示された。これらのペプチドのACE阻害活性は、IC_{50}値でそれぞれ730および13 μMであった（Table 13）。次に、これらのペプチドが確かに阻害活性を示すことを確認するために、ペプチドを化学合成し、それらのACE阻害活性を測定した。その結果、合成ペプチドは単離したペプチドと同様に、濃度依存的に阻害活性を示し、それらのIC_{50}もほぼ同じ値を示した（Figs. 10, 11）。以上の結果から、単離したそれぞれのペプチドは上記のアミノ酸配列をもつことが支持された。

本研究で単離したペプチドのうちAsp-Trpの阻害活性（IC_{50} = 13 μM）は、これまでに単離されている食品タンパク質由来のACE阻害ペプチドのなかでも強いものであった。さらに、これまでの研究でC末端にトリプトファンを有するペプチド（Leu-TrpおよびIle-Lys-Trp）が経口投与により *in vivo* で降圧作用を有することが報告されているが[62]、本ペプチドも同様に生体内において降圧作用に直接関与しているものと考えられた。

次に、P1とP2の２つのペプチドの阻害形式について、合成ペプチドを用いて検討した。ACE活性に対するペプチドの影響をLineweaver-Burkプロットにより検討し、その結果をFig. 12およびFig. 13に示す。その結果はGly-Ile-Glyおよび

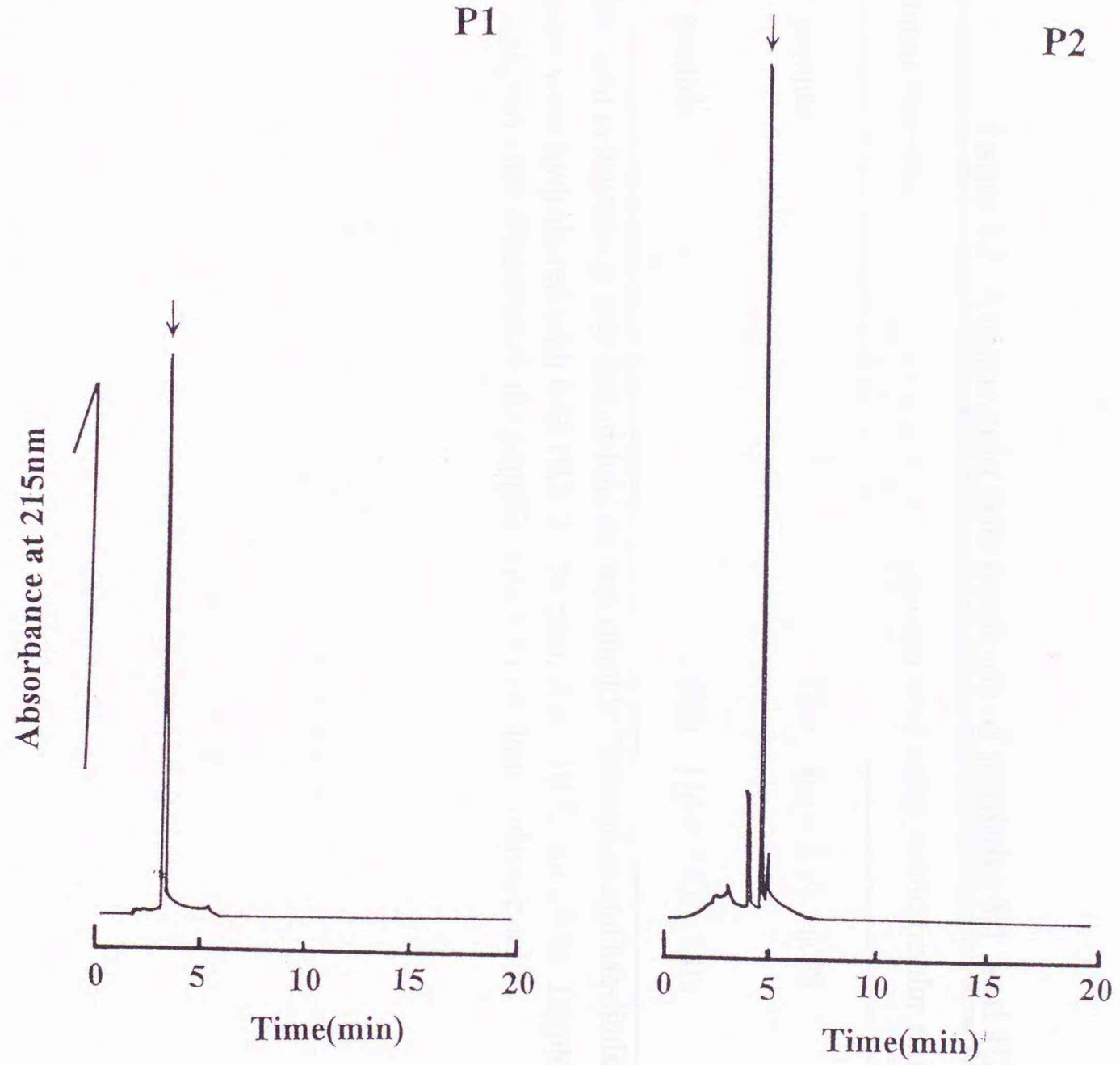


Fig. 9. Purification of P1 and P2 fractions by HPLC.
The P1 and P2 fractions indicated in Fig. 8 were subjected to HPLC on Inertsil ODS-2 using the isocratic elution system of 20 % acetonitrile in 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 2.8) at a flow rate of 1.0 ml/min. Arrows indicate the peptide peak.

Table 12. Amino acid composition of peptides P1 and P2.

Isolated fraction	Amino acid composition (molar ratio)
P1-peptide	Gly : Ile = 2.01 : 0.98
P2-peptide	Asp : Trp = 1.02 : 1.05

Amino acid composition was determined as described in "Materials and Methods". Peptides were hydrolyzed with 6 M HCl-0.1 % phenol at 110 ℃ for 24 hr. Tryptophan was analyzed after digestion of the peptide with 4 M methane sulfonic acid.

Table 13. Amino acid sequence and ACE-inhibitory activity of P1-peptide and P2-peptide.

Peptide	Amino acid sequence	IC_{50} (μM)
P1	Gly-Ile-Gly	730
P2	Asp-Trp	13

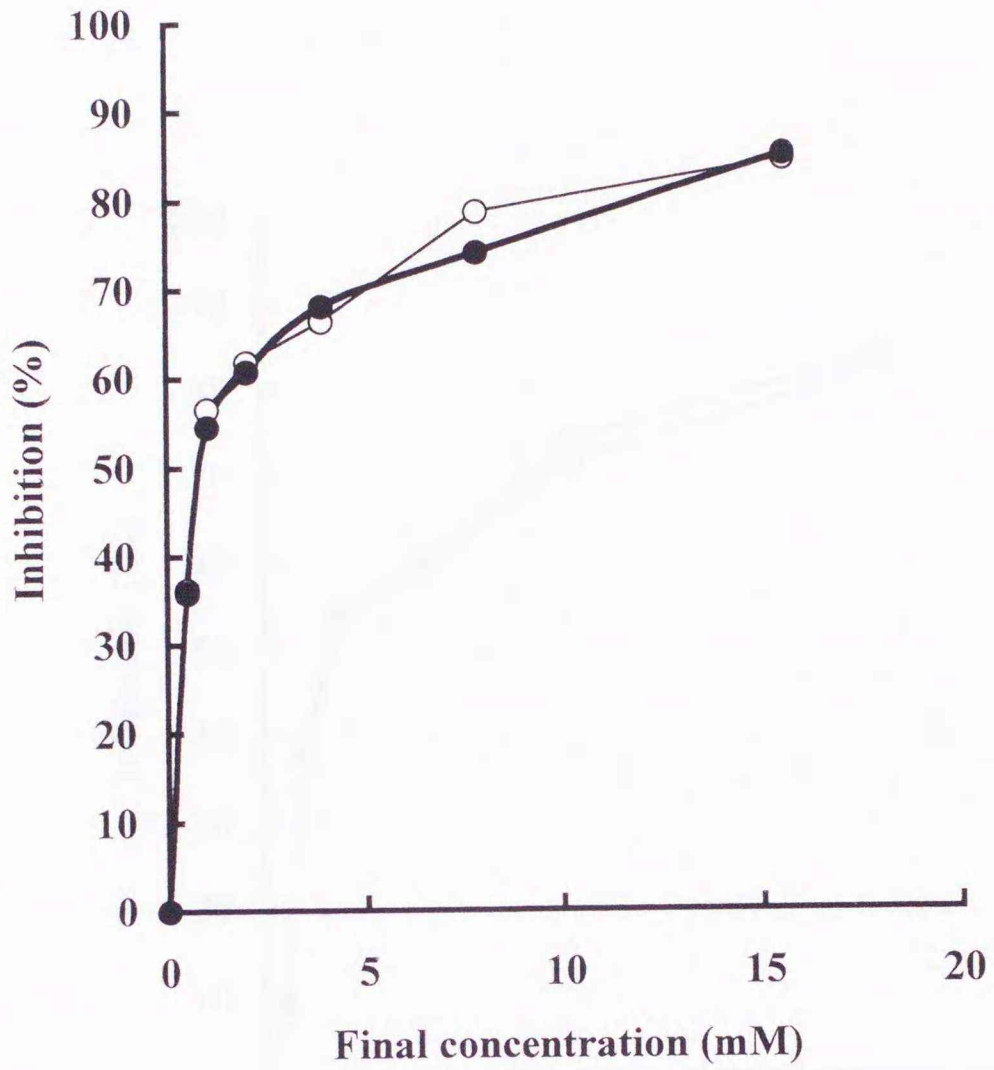


Fig. 10. Dose-response curve of P1-peptide on ACE-inhibitory activity.

ACE- inhibitory activity was measured at 37 ℃ in a mixture containing 100 mM borate buffer (pH 8.3), 300 mM NaCl, 2.5 mM HHL, 10 mU/ml ACE and various concentrations of P1-peptide or synthesized Gly-Ile-Gly in a total volume of 200 μl.

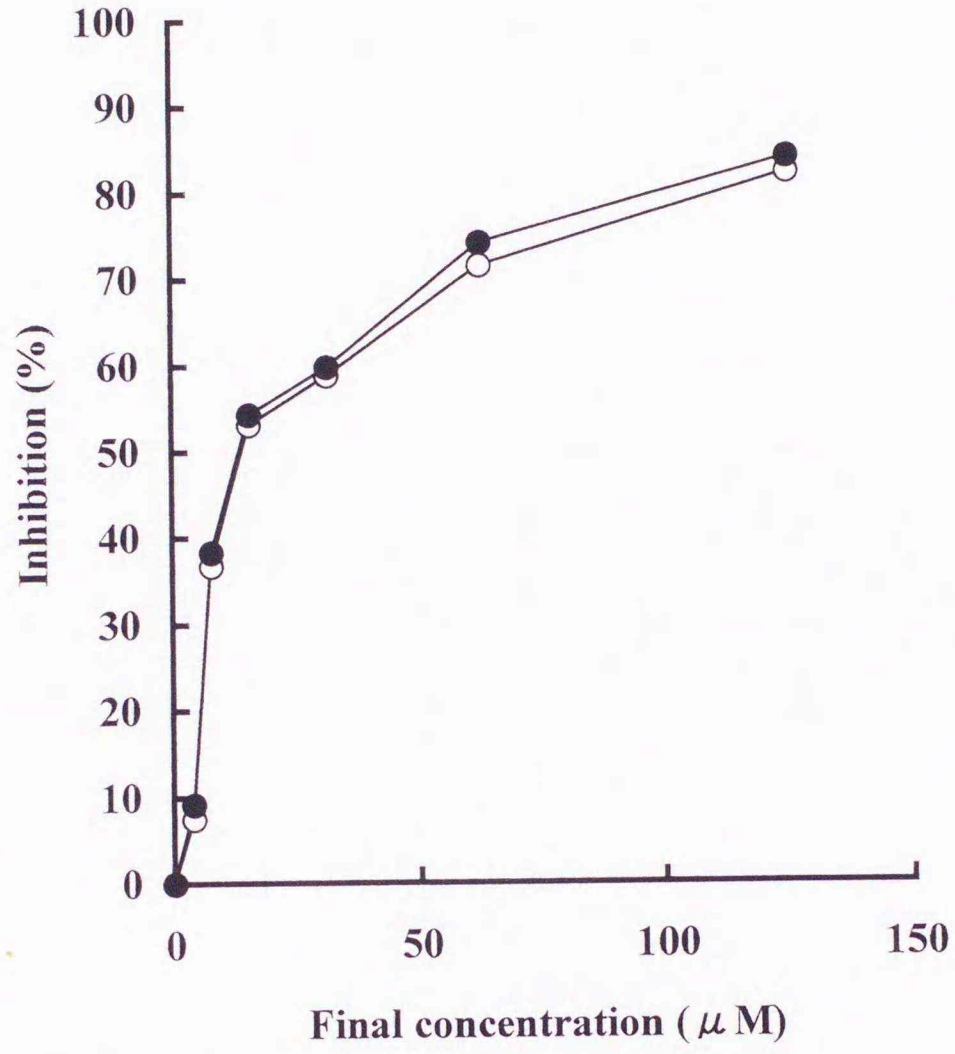


Fig. 11. Dose-response curve of P2-peptide on ACE-inhibitory activity.

ACE-inhibitory activity was measured as in Fig. 10.

Asp-Trpの阻害形式がそれぞれ拮抗阻害および非拮抗阻害であることを示した。

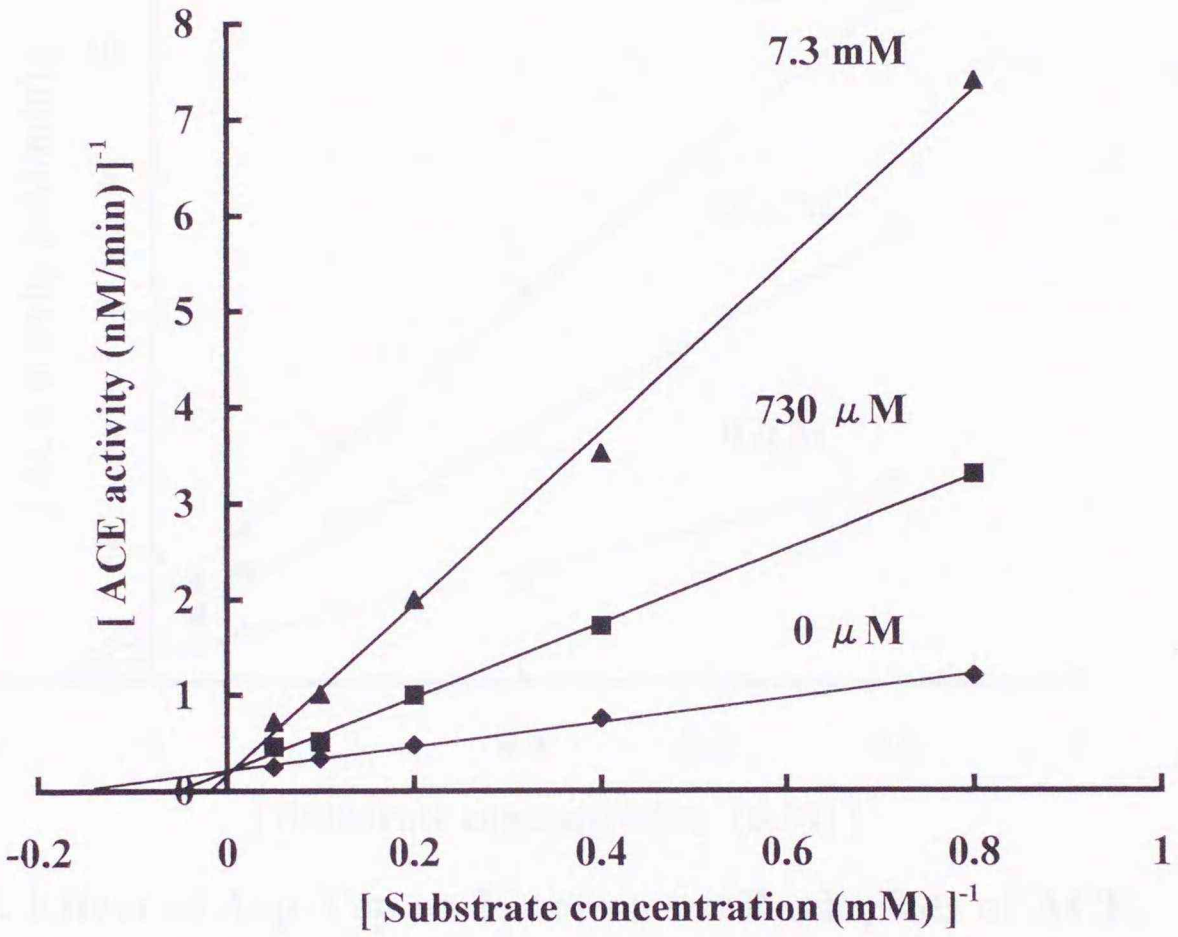


Fig. 12. Effect of Gly-Ile-Gly on Lineweaver-Burk plots of ACE.

ACE activity was measured under the same conditions in Figs.10 and 11. Synthesized peptide, Gly-Ile-Gly, was used for the assay.

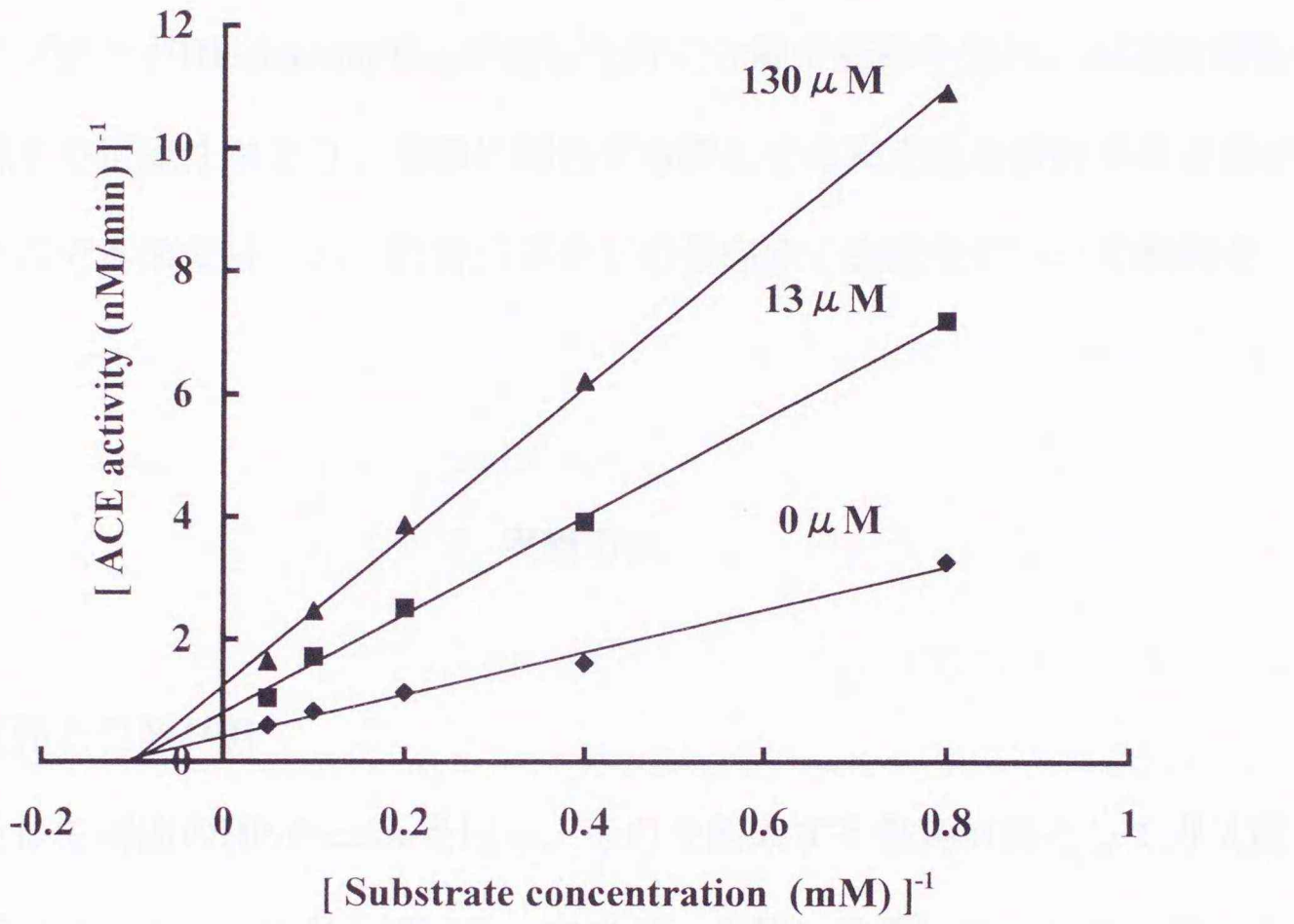


Fig. 13. Effect of Asp-Trp on Lineweaver-Burk plots of ACE.
ACE activity was measured as in Fig. 12 . Synthesized peptide, Asp-Trp, was used for the assay.

第4節　シロサケ頭部由来ペプチド画分の保存におけるアンギオテンシンI変換酵素阻害ペプチドの安定性

シロサケ頭部ビオプラーゼ消化物中には、経口投与で高血圧を抑制するACE阻害ペプチド、Asp-TrpおよびGly-Ile-Glyが存在することが明らかとなった。これらのペプチドがHP-fraction中に存在した時に分解や修飾を受け、ACE阻害活性に影響する可能性があり、実際に利用する際にその安定性を検討する必要がある。そこで本節では、ACE阻害ペプチドの保存中の安定性について検討を行った。

実験方法

1.4.1　試料と包装材料

試料として前述のHP-fractionを用い、それを封入する包装材料としてガス遮断性の高いフィルム（EVAL EF-XL、カウパック社）を用いた。なお、フィルムのガス遮断性は20℃、1気圧、相対湿度65 %の条件下で24時間当たり酸素が1 ml/m^2 透過するものである。

1.4.2　保存方法

包装材に凍結乾燥したHP-fractionを1 gずつ入れ、ガス置換包装機により空気および窒素封入して包装した。包装した試料を20℃で3ヶ月間保存し、１ヶ月ごとにACE阻害活性を測定した。なお、阻害活性の測定は第1節に記述した。

結果および考察

空気および窒素を封入してHP-fractionを保存している間のACE阻害活性の変化をTable 14に示す。それによると、窒素封入したHP-fractionは少なくとも3ヶ月間はほとんど阻害活性が変化しなかったが、空気封入したHP-fractionでは明らかにACE阻害活性が低下する傾向が認められた。このことから、HP-fraction中のACE阻害ペプチドは、少なくとも上記の条件においては酸化に対する安定性が低いものと考えられた。これはHP-fractionに含まれる高活性な阻害ペプチド（Asp-Trp）が空気中の酸素と反応して酸化修飾や分解などの構造変化を受け、阻害作用が低下したものと推察される。したがって、ACE阻害ペプチドの活性を維持するためには酸化を防止する必要があると考えられる。

以上の結果から本ペプチドのACE阻害活性を保持し、機能性食品素材として用いるためには酸素透過性の低いハイバリヤー性フィルムでの窒素充填包装、あるいは脱酸素剤との併用による包装方法により酸素との接触を遮断し、さらに遮光等によって酸化反応が出来るだけ進行しない保存技術を適用する必要があると考えられる。

Table 14. Change in ACE-inhibitory activity of HP-fraction during storage.

Storage time (month)	IC_{50} (mg/ml)	
	Air-packed	N_2-packed
0	0.23	
1	0.23	0.23
2	0.27	0.26
3	0.35	0.26

HP-fraction was stored at 20 ℃ in the dark.

第2章　シロサケ精巣組織の抗酸化活性とその特性

本章ではシロサケ精巣組織から抗酸化成分の探索とその成分の同定を行った。

第1節　シロサケ精巣の水抽出物の抗酸化活性

本節では、まずシロサケ精巣からの水抽出物およびその分画試料について抗酸化活性を測定した。抗酸化活性はイワシ油トリアシルグリセロールの乳化物を基質とし、自動酸化および鉄イオンにより発生するラジカルを用いた酸化系により測定した。

実験方法

2.1.1　試料および試薬

シロサケ精巣は北海道浦河沿岸で漁獲されたシロサケを約４時間氷冷しながら実験室へ搬入し、直ちに精巣を取り出して血液を水洗除去した。次いで精巣を真空包装し、使用するまで-20℃で保存した。精製したイワシ油は日本化学飼料（株）より購入した。アスコルビン酸、塩化第一鉄およびTBAは和光純薬（株）より購入した。Tween 20は関東化学（株）より購入した。その他の試薬については、特級もしくはHPLC分析用の試薬を用いた。

2.1.2　シロサケ精巣の水抽出物の調製と分画

シロサケ精巣からの水抽出物の調製と分画方法についてFig. 14に示す。すなわち、凍結したシロサケ精巣を短刀で削り取って採取し、採取した組織の3倍量の50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）を加えてポリトロン・ホモジナイザーにより8,500回転で3分間ホモジナイズした。ホモジネートは10,000×gで15分間遠心分離し、得られた上清を4層のチーズクロスでろ過し、水抽出画分または全画分と称した。さらに全画分を低分子画分および高分子画分に分画した。すなわち、全画分を限外ろ過（UK-10型、分画分子量10,000、アドバンテックTOYO（株））したろ液を低分子画分とし、また、水抽出液を分画分子量が12,000～14,000の透析チューブを用いて50 mMリン酸緩衝液（pH 7.4）に対して透析した内液を高分子画分とした。なお、透析は32時間行ったが、他の試料はすべて8時間以内に実験に供した。また、すべての実験操作は氷冷下あるいは4℃以下で行った。

2.1.3　精製イワシ油からトリアシルグリセロールの分離

抗酸化活性の測定に用いたイワシ油トリアシルグリセロールは、以下のように分離した。すなわち、遊離脂肪酸、カロチノイド、コレステロールおよびα-トコフェロールを除去するために、イワシ油 6 gを50 gのケイ酸/セライト（4/1, w/w）[65]を充填したガラス製カラム（25 mm×450 mm）に負荷し、250 mlのヘキサンで洗浄後、トリアシルグリセロールを500 mlのヘキサン/ジエチルエーテル（19/1, v/v）で溶出した。なお、得られたトリアシルグリセロールはヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸（80/30/1, v/v）の溶媒系による薄層クロマトグラフ

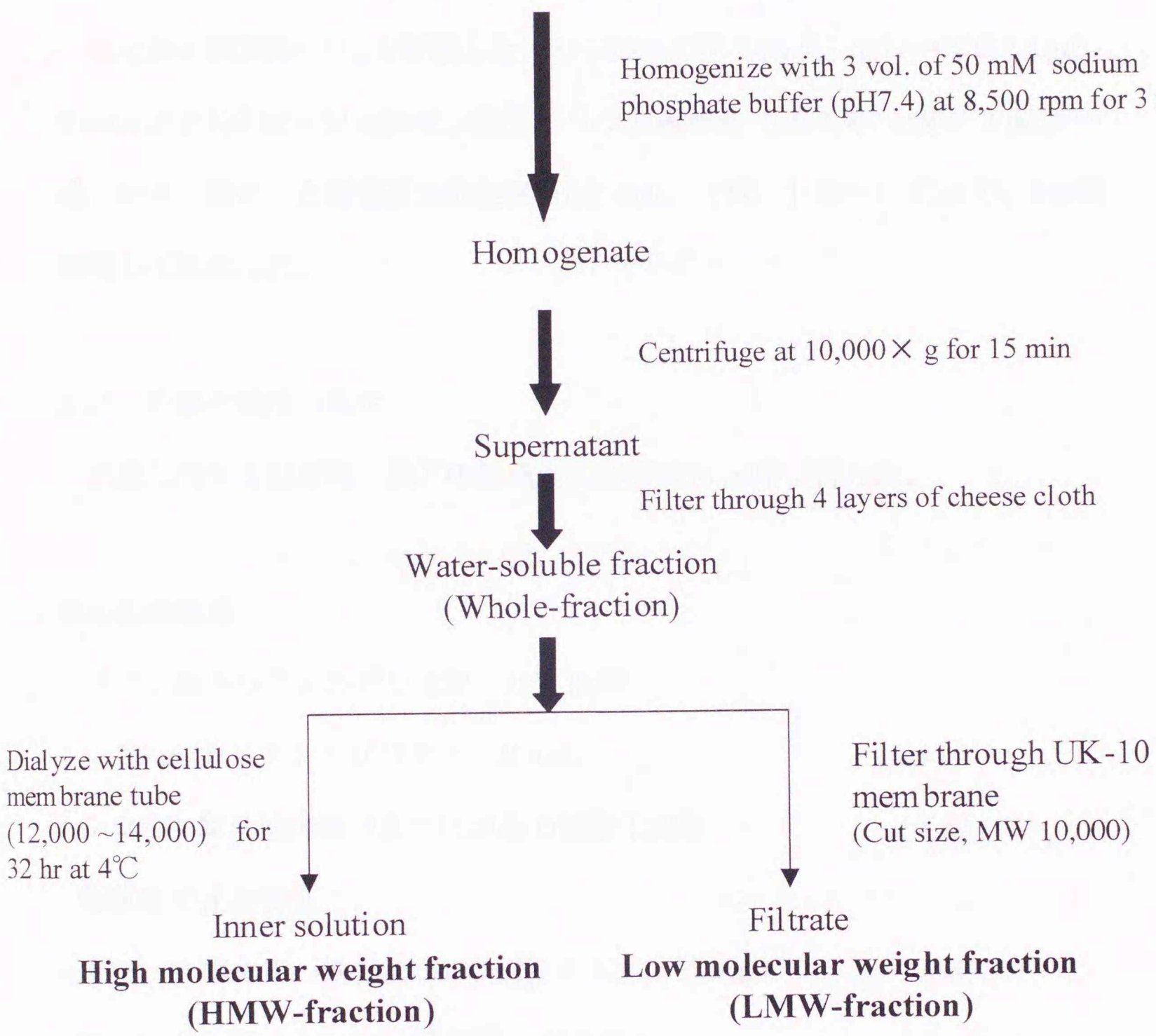


Fig. 14. Preparation of LMW- and HMW-fractions from chum salmon spermary tissue.

All procedures were carried out below 4℃.

ィー（Whatmann K5）で単一スポットを示すことを確認した。

2.1.4　トリアシルグリセロール乳化物の調製

乳化物の調製は0.25 gの精製したイワシ油トリアシルグリセロールに2.5 gのTween 20と100 mlの50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）を加えて混合後、80Wに設定した超音波分散装置（UD-200、（株）トミー）により、3分間処理して乳化した。

2.1.5　抗酸化活性の測定

抗酸化活性の測定は、以下の組成の反応混液10 ml中で行った。

反応混液組成

イワシ油トリアシルグリセロール乳化物	
（2.5 mgトリアシルグリセロール/ml）	: 4 ml
シロサケ精巣抽出画分または純品の抗酸化成分	: 1 ml
脂質酸化促進物質	
（15 μM 塩化第一鉄および100 μM アスコルビン酸）	: 1 ml
50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）	: 4 ml

なお、対照試料はシロサケ精巣抽出画分、または抗酸化成分の代わりに蒸留水を加えた上記反応混液で測定した。酸化は自動酸化（暗所で37℃、7日間静置）、または酸化触媒（15 μM 塩化第一鉄および100 μM アスコルビン酸[66]）

を用いる方法でそれぞれ測定した。酸化反応は37℃で90および120分間行い、酸化した脂質の測定はMcDonaldとHultinのTBA法[67]、または稲谷らのチオシアン酸脂質過酸化法[68]により行った。すなわち、TBA法ではTCAおよびTBAをそれぞれ15 %、0.375 %になるように0.25 Mの塩酸に加え、おだやかに加熱撹拌して溶解した後、この溶液100 mlに対して2 %のBHT溶液を2 ml添加した溶液を反応液とした。この溶液3 mlを試験管に入れ、一定の時間ごとに試料液1 mlを入れて直ちに撹拌混合した。次いで試料を沸騰水浴中で15分間加熱し、室温で冷却した後、1,600×gで10分間遠心分離した。得られた上清を取り、その上清を532 nmで測定した。一方、チオシアン酸脂質過酸化法では試料0.1 mlに75 %エタノール9.7 mlと30 %チオシアン酸アンモニウム0.1 mlを添加した後、さらに3.5 %塩酸に溶解した0.02 M 塩化第一鉄を0.1 ml添加し、正確に3分間発色させた後、500 nmで測定した。

結果および考察

シロサケ精巣から上記のようにして調製した水抽出画分（Whole-fraction）、低分子画分（LMW-fraction）および高分子画分（HMW-fraction）をそれぞれ10 %ずつ反応溶液に添加し、自動酸化による酸化反応を行った。これにより生成した過酸化物およびTBA値の経時変化をFig. 15およびFig. 16に示す。その結果、対照試料では3日目まで時間の経過とともに過酸化物およびTBA値が高まり、その後は低下した。一方、水抽出画分および高分子画分では、1日後で過酸化物およびTBA値が高まり酸化促進が認められた。2日目以降は水抽出画分

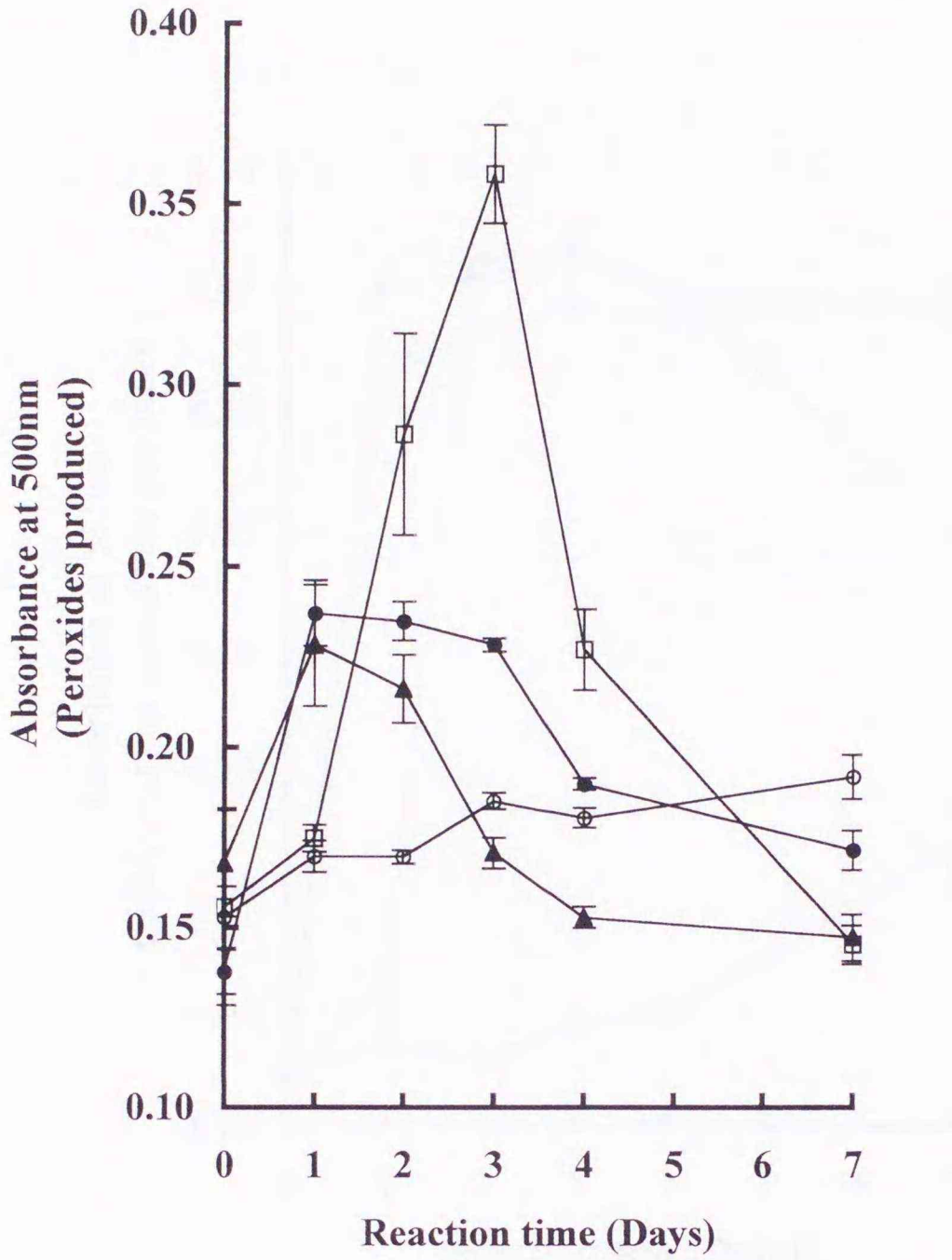


Fig. 15. Effects of water-soluble fractions on lipid peroxide production.

Peroxide produced by autooxidation was measured at pH 7.4 and 37℃ in a medium of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol in the presence of 10% of either water-soluble fraction (Whole fraction), LMW-fraction or HMW-fraction. Measurement of peroxide were performed as described in " Materials and Method ". Autooxidation of the emulsion was performed in the dark at room temperature. Bars represent standard error deviations.

—□— Control **—▲— Whole-fraction**

—○— LMW-fraction **—●— HMW-fraction**

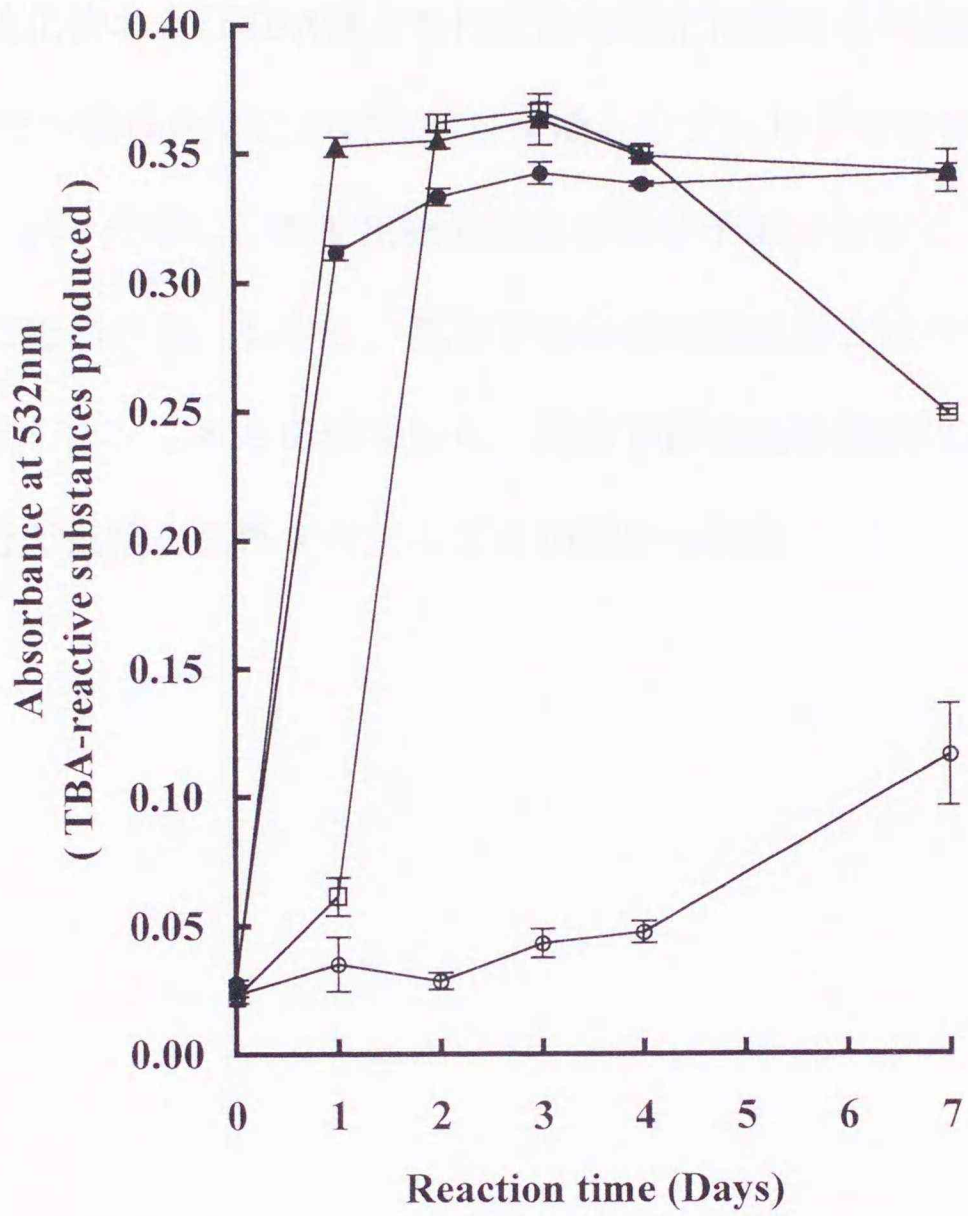


Fig. 16. Effects of water-soluble fractions on the production of TBA-reactive substances.

TBA-reactive substances produced by non-catalytic autooxidation were measured in the same medium as in Fig. 15, except for the wavelenth of the absorbance (see " Materials and Methods"). Bars represent standard error deviations. Symbols are as in Fig. 15.

および高分子画分ともに過酸化物の生成が抑制されているように思われたが、TBA値を見ると対照試料と比較して低下していなかった。これに対して、低分子画分は過酸化物およびTBA値ともに大きな変化は認められなかった。また、鉄-アスコルビン酸存在下におけるイワシ油トリアシルグリセロールの酸化の結果はFig. 17に示した様に、水抽出画分および高分子画分ともに、酸化反応を促進するように思われた。しかし、低分子画分は対照試料と比べて54～80 %もその酸化を抑制した。これらの結果から、低分子画分は自動酸化および酸化触媒存在下の両方で抗酸化活性を有することが認められた。

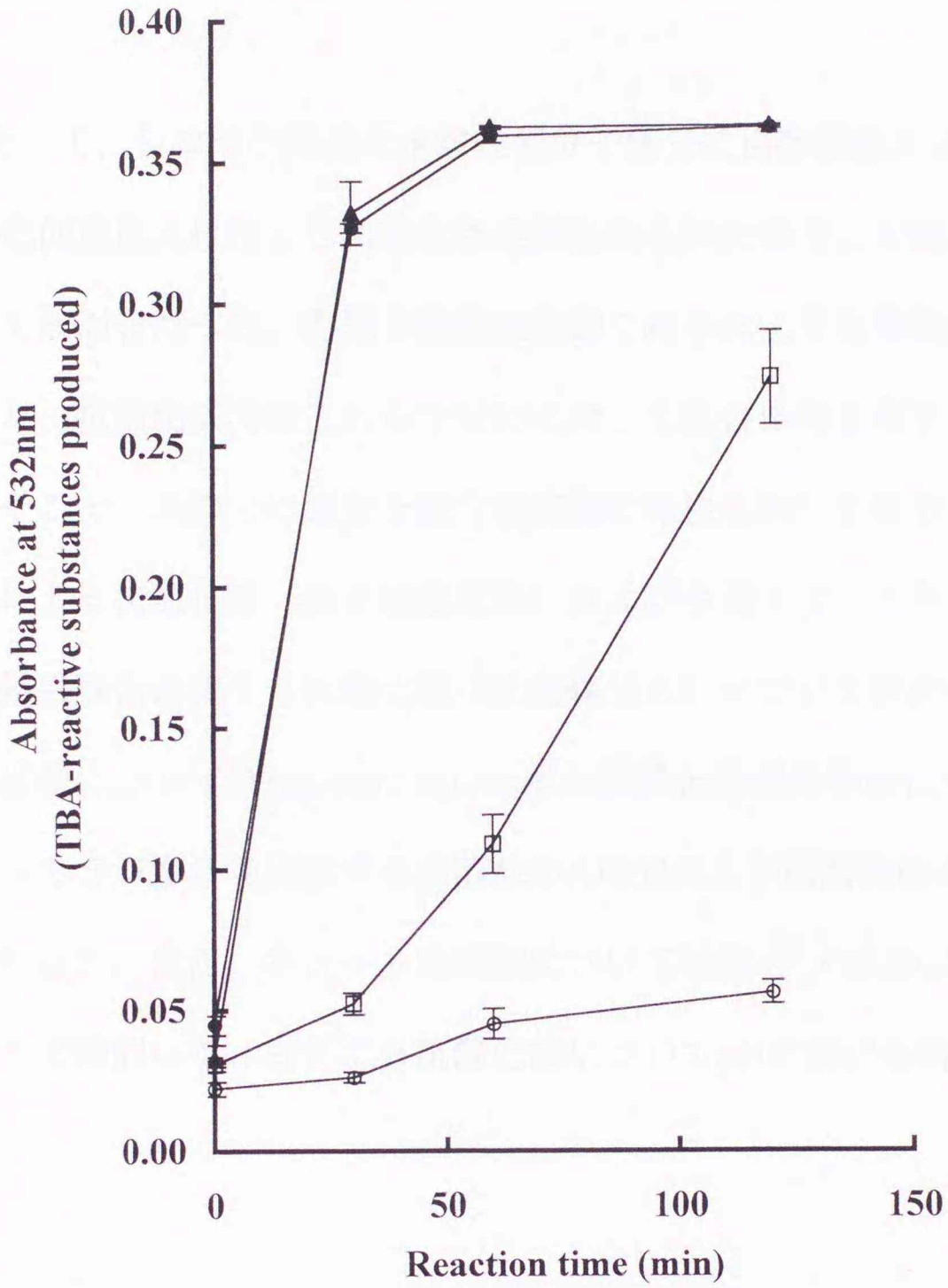


Fig. 17. Effects of water-soluble fractions on the catalytic production of TBA-reactive substances.

TBA-reactive substances produced by catalytic oxidation was performed as in Fig. 16, except for the presence of 15 μM ferric chloride and 100 μM ascorbic acid.

Bars represent standard error deviations. Symbols are the same as in Fig. 15.

第2節　シロサケ精巣低分子画分の抗酸化特性

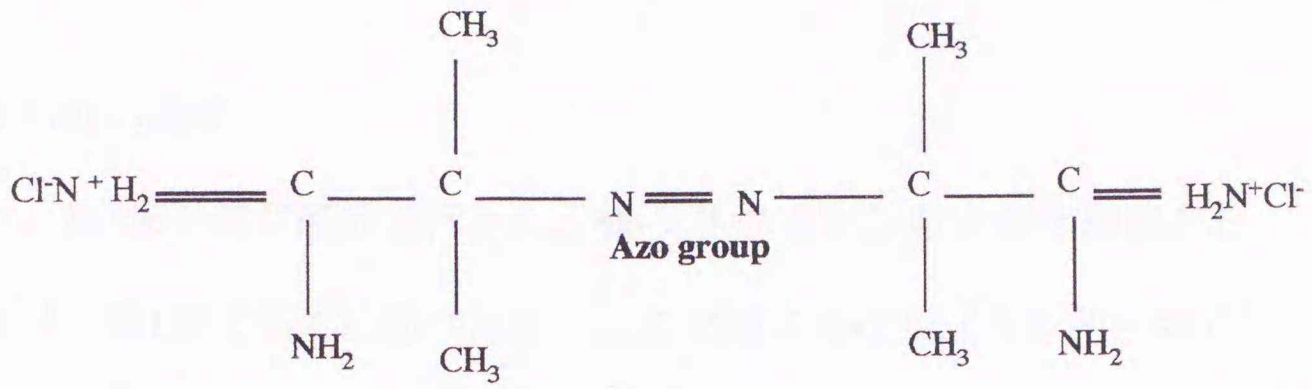
第1節において、シロサケ精巣の水溶性低分子画分に自動酸化および鉄を触媒とする酸化促進反応に対して抗酸化活性が認められたのでこの画分の抗酸化特性について検討を行った。脂質の酸化は前節で述べたような非触媒反応と触媒反応があり、抗酸化成分はこれらの反応に対して阻害作用を有するものと考えられる。そこで、本節では低分子画分の抗酸化特性を明らかにするためにラジカル捕捉による抗酸化能（抗非触媒反応）および金属イオンとキレートを形成し、その結果酸化抑制する抗酸化能（抗触媒反応）について検討を行った。ラジカル捕捉能についてはFig. 18に示した様な抗酸化活性の解析に多用され[69]、加熱によってラジカルを発生する水溶性のAAPHおよび脂溶性のAMVNを用いて検討を行った。また、キレート形成能については鉄-アスコルビン酸を用いた酸化モデルで検討した。さらに各抗酸化能についてpHにおける活性変化も検討した。

実験方法

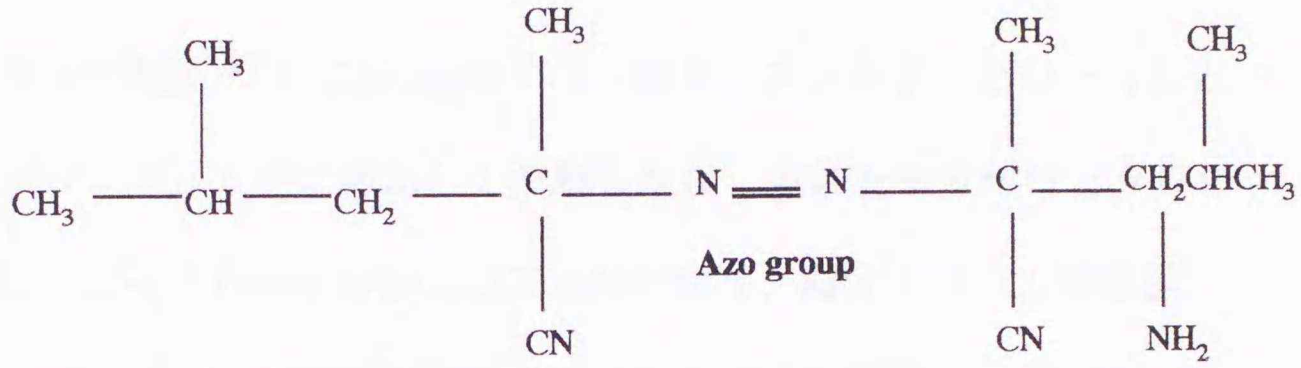
2.2.1　試料および試薬

試料は第1節で用いたものと同様のものを用いた。試薬は第1節で用いたものと同様のものを用いた。AAPHおよびAMVNは、和光純薬（株）より購入した。イワシ油トリアシルグリセロール乳化物は第1節と同じものを使用した。

(A)



AAPH



AMVN

(B)

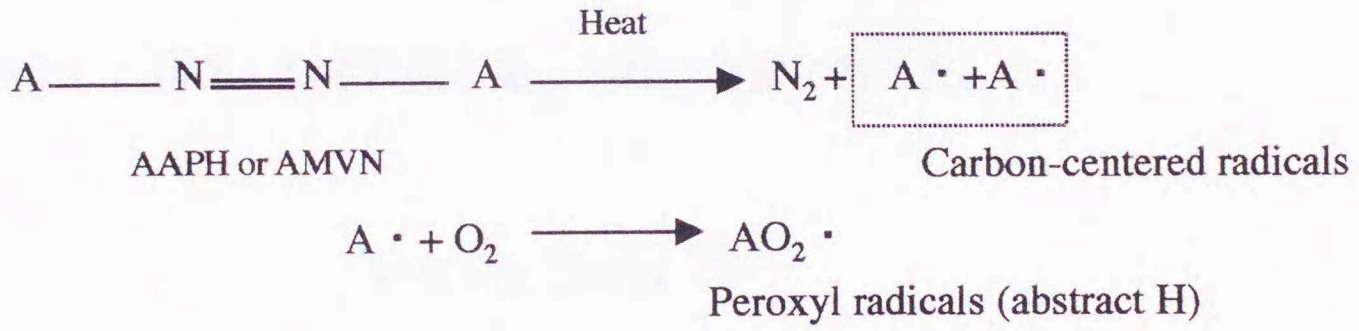


Fig. 18. Radical generation model from AAPH and AMVN as a source of water- or lipid-soluble peroxyl radicals.

(A) Chemical structure of AAPH and AMVN

(B) Radical generation model

AAPH is a water-soluble radical generator. On heating, it forms carbon-centered radicals that can react swiftly with O_2^- to yield peroxyl radicals capable of abstracting hydrogen from membrane lipids. AMVN is a lipid-soluble azo initiators, containing more highly hydrophobic groups. These Azo initiators have been much used in studies of antioxidants.

2.2.2　抗酸化活性の測定

反応混液は、第1節と同じ組成で行った。鉄-アスコルビン酸を酸化触媒として用いる方法は、第1節ですでに述べたが、ここではさらにラジカル発生剤であるAAPHおよびAMVNを用いる方法でも抗酸化活性を測定した。AAPHは50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）で2 mMになるように溶解し、使用した[69]。AMVNを用いた実験では、250 mgのイワシ油トリアシルグリセロールとともにAMVNをクロロホルム中に添加して溶解した後、窒素を吹き付けてクロロホルムを除去し、2.5 gのTween 20および50 mMの冷リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）100 mlを加えてAMVN濃度が2 mMになるように調整し、第1節と同様の方法で乳化して用いた。なお、抗酸化活性のpHの影響に関する実験では、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液でpHを調整した。酸化反応は37℃で90および120分間行った。酸化した脂質の測定は第 1 節と同様の方法で行った。

結果および考察

Fig. 19に示した様に低分子画分はAMVN存在下におけるトリアシルグリセロールの酸化反応に対し、いずれの濃度においても抗酸化活性を示さなかったが、AAPHでは1 %の濃度で24 %の酸化阻害作用を示した。一方、鉄-アスコルビン酸存在下における酸化反応に対して低分子画分は1 %の濃度で80 %以上も酸化抑制が認められた。次に低分子画分の抗酸化活性に及ぼすpHの影響を調べ、その結果をFig. 20およびFig. 21に示す。この実験では低分子画分を0.25 %添加し、鉄-アスコルビン酸による酸化モデルにより検討を行った。その結果、

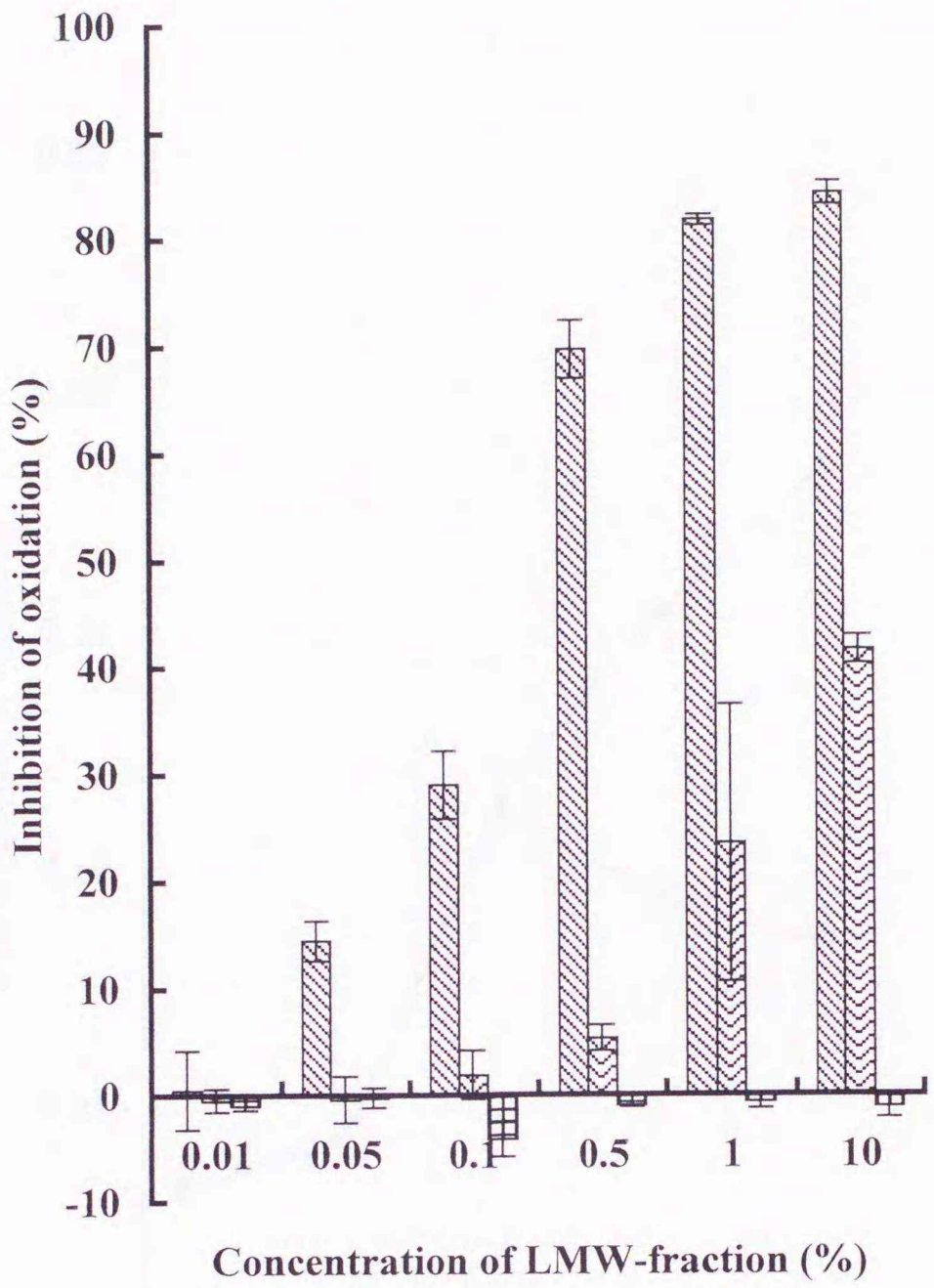


Fig. 19. Inhibition of catalytic oxidation of triacylglycerol by LMW-fraction.

Catalytic oxidation was performed at 37℃ for 90 min using 15 μM ferric chloride-100 μM ascorbic acid, 2 mM AAPH or 2 mM AMVN as a catalysis in an assay medium consisting of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol. Bars represent standard error deviations.

Catalysis : ▧ ferric chloride plus ascorbate
▨ AAPH
⊞ AMVN

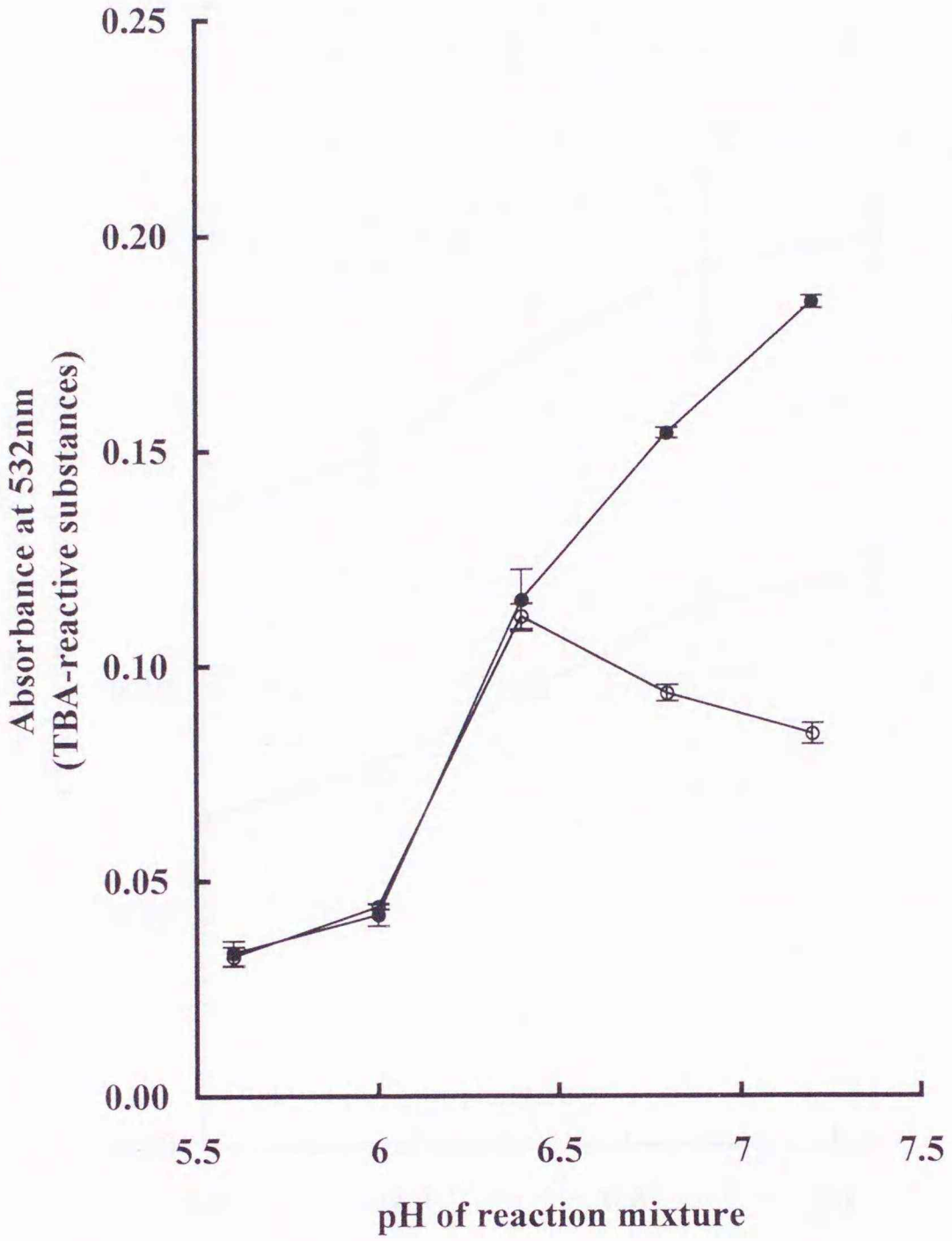


Fig. 20. Effects of the LMW-fraction on iron-catalyzed oxidation of triacylglycerol as a function of pH.

Catalytic oxidation was performed using 15 μM ferric chloride-100 μM ascorbic acid in an assay medium consisting of 50 mM sodium phosphate buffer, 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol and 0.25 % LMW-fraction. Oxidation was performed at 37 ℃ for 120 min. Bars represent standard error deviations.

—●— **Control** —○— **LMW-fraction**

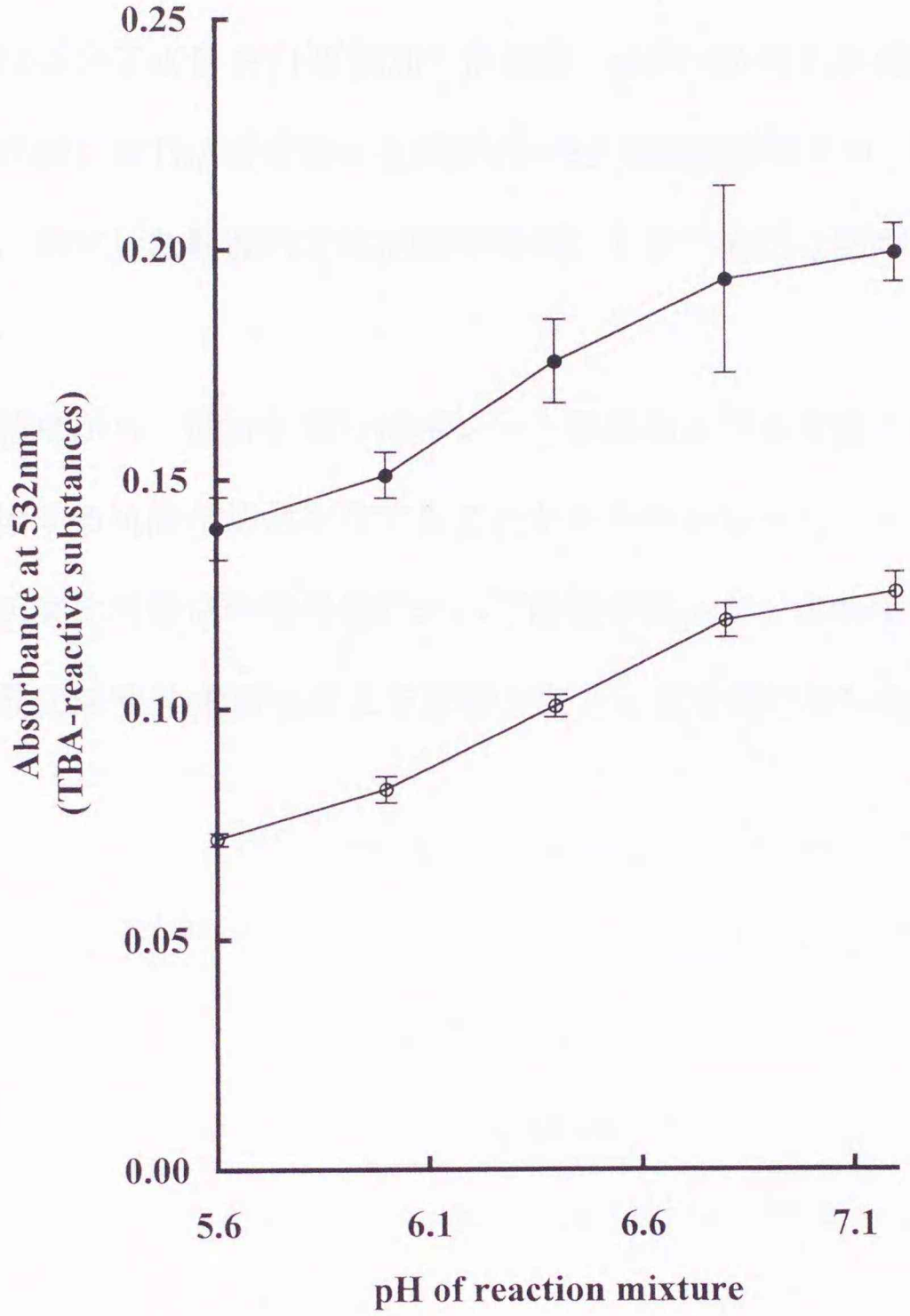


Fig. 21. Effect of the LMW-fraction on AAPH-catalyzed oxidation of triacylglycerol as a function of pH.

Catalytic oxidation was performed at 37 ℃ for 120 min in an assay medium consisting of 50 mM sodium phosphate buffer, 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol and 10 % LMW-fraction in the presence of 2.0 mM AAPH . Symbols are as in Fig. 20. Bars represent standard error deviations.

低分子画分は鉄-アスコルビン酸存在下における酸化反応をpH 6.4から7.2で抑制したが、pH 6.0以下では抑制しなかった（Fig. 20）。一方、AAPH存在下における酸化では低分子画分を10 %添加した場合、pH 5.6から7.2の領域においては対照実験と比較してTBA反応物の生成が42～55 %程度抑制され、抗酸化性が認められたが、測定した範囲内では抗酸化効果に大きな違いは認められなかった（Fig. 21）。

以上の結果から、低分子画分はキレート作用および水溶性ラジカル捕捉能の両方に起因する抗酸化活性を有することが明らかとなった。また、キレート作用による抗酸化活性は中性付近において活性が高いが、水溶性ラジカル捕捉能による抗酸化活性はpH変化による影響をほとんどを受けないものと考えられた。

第3節　シロサケ精巣低分子画分の成分分析と抗酸化活性

前述したように、シロサケ精巣から調製した低分子画分には強い抗酸化性を示す成分の存在が示唆された。しかし、本画分中には既知の抗酸化成分であるグルタチオン、ポリアミン、ヌクレオチド、ペプチドおよび遊離アミノ酸などを含有しているものと推定されたので、それらの標準化合物と低分子画分について抗酸化活性の比較検討を行った。

実験方法

2.3.1　試料および試薬

試料は第1節で用いたものと同様のものを用いた。スペルミン、スペルミジン、プトレッシン、ヒポキサンチン、キサンチン、ATP、ADP、AMP、尿酸、グルタチオン、オルトフタルアルデヒド、イソシアン酸フェニルおよびアミノ酸標準試薬タイプHおよびBキットは和光純薬（株）より購入した。その他の試薬については第1節と同等のもの、あるいはHPLC分析用試薬を用いた。

2.3.2　成分の化学分析

低分子画分は第1節と同様の方法で調製し、固形分と灰分の分析を行った。固形物量は低分子画分10 mlを凍結乾燥し、測定した。灰分量は低分子画分50 mlを90℃で5時間、110℃で10時間乾燥した後、550℃で24時間灰化して測定した。還元型グルタチオンは低分子画分から5 %TCAおよび20 mM EDTAにより

抽出したものをTietzeらによる酵素法[70]によって求めた。スペルミン、スペルミジン、プトレッシンなどのポリアミンおよびATP、ADP、AMP、ヒポキサンチン、キサンチンなどのヌクレオチドおよび塩基は、ODSカラムを用いるHPLCによって測定した[71]。なお、ポリアミンの分析はYenとHsiehの方法[72]に準じて行い、イソシアン酸フェニルにより誘導体化[64]し、分析に供した。カルノシンおよびアンセリンの分析は、Chanらによるオルトフタルアルデヒドによる蛍光誘導体化法[73]に準じ、HPLCにより行った。分析条件はTable 15から18に示す。

Table 15. Conditions for HPLC of polyamine analysis.

Apparatus	: Hitachi L-6200 intelligent pump, L-4250 UV-VIS detector, and D-2000 integrator
Column	: ODS-2 column （4.6×250 mm, GL Science）
Mobile phase	: A, 55 % methanol; B, 88 % methanol
Elution condition	: Linear gradient of mobile phase A and B （20 min）
Flow rate	: 1.1 ml/min
Temperature	: Room temperature
Detection	: 258 nm

Table 16. Conditions for HPLC of nucleotide and its related compounds analyses.

Apparatus and column	: Same apparatus and column as shown in Table 15
Mobile phase	: 50mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)
Flow rate	: 1.0 ml/min
Temperature	: Room temperature
Detection	: 254 nm

Table 17. Conditions for HPLC of carnosine and anserine analyses.

Apparatus and column	: Same apparatus and column as shown in Table 15
Mobile phase	: A, 10 % methanol/ 300 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) ; B, 80 % methanol/300 mM sodium acetate buffer (pH5.5)
Gradient program	: Gradient program was shown in Table 18
Flow rate	: 1.5 ml/min
Temperature	: 35℃
Detection	: excitation at 310 nm, emission at 375 nm

Table 18. Input program of gradient control.

Time (min)	Mobile phase	
	A (%)	B (%)
0	90	10
5	80	20
25	70	30

なお、HPLC分析を行う際は試料の低分子画分に終濃度で5 %になるように20 % TCA溶液を添加して除タンパクした後、10,000×gで10分間遠心分離して得られた上清をpH 7.0に調整し、0.45 μmのフィルターに通したものを用いた。また、上記のHPLC分析による定量は、標準品による検量線を用いて行った。

2.3.3　遊離アミノ酸の分析

分析は以下の様にして行った。低分子画分1 mlに対して、4倍量の無水エタノールを添加した後、充分撹拌してから10,000×gで10分間遠心分離を行い、得られた上清を減圧下で乾固した。得られた粉末を0.02 N 塩酸で溶解し、第1章第3節に示した様にイソシアン酸フェニルにより誘導体化[64]した後、HPLC分析に供した。

2.3.4　低分子画分の酸加水分解物の抗酸化活性の測定

低分子画分の酸加水分解物は低分子画分を第1章第3節で行った方法と同様に6 N 塩酸-0.1％フェノールにより分解した。分解物は加熱乾固して塩酸を除去した後、緩衝液に溶解し抗酸化活性を測定した。また、イワシ油トリアシルグリセロール乳化物は第1節と同様に調製し、これを用いた抗酸化活性の測定は鉄-アスコルビン酸およびAAPHによる酸化モデルを用いて第2節と同様に行った。

結果および考察

シロサケ精巣から調製した低分子画分について化学成分の分析を行った結果をTable 19に示した。それによると、固形物量および灰分の含量はそれぞれ5.6および1.7 mg/mlであった。また、各種成分を分離定量した結果、ポリアミン系成分としてスペルミンおよびプトレッシンがそれぞれ353および13.7 μg/mlの濃度で含まれていたが、スペルミジンは検出されなかった。山中ら[74]はコイおよびマス精巣のポリアミン分析を行っているが、その値は本論文の分析結果と同様な値であり、スペルミンの含量と比較してスペルミジンおよびプトレッシンの値が明らかに低いものであった。また、還元型グルタチオンは10.2 μg/mlの濃度で含まれていた。一方、ヌクレオチド関連成分の分析では、ヒポキサンチンおよびキサンチンがそれぞれ49.5および20.3 μg/mlであった。

次に、分析した各成分および各成分を低分子画分と同じように再構成した混合物について抗酸化活性を検討した結果をFig. 22に示す。なお、低分子画分を0.25 %添加した試験を対照とし、0.25 %の低分子画分中に含まれる量の各成分を水溶液として添加して試験を行った。その結果、鉄-アスコルビン酸存在下における酸化に対して、スペルミンおよびプトレッシンはTBA反応物の生成を阻害したことから抗酸化活性を有することが認められたが、塩基およびグルタチオンでは逆に酸化が促進され、さらにこれらすべてを混合した場合にも酸化は促進した。これらのことから、各成分を再構成した混合物では酸化促進性および抗酸化性を有する成分が混在するため活性が相殺されるために阻害が認められないものと推測した。次に、低分子画分中の遊離アミノ酸の抗酸化活性を同

Table 19. Content of various components in the LMW-fraction of chum salmon spermary tissue.

Content	mg / ml LMW-fraction
Solid	5.6±0.3
Ash	1.7±0.1
	μg / ml LMW-fraction
Spermine	353.0±33.3
Putrescine	13.7± 2.9
Spermidine	ND
Reduced Glutathione	10.2± 0.3
Hypoxanthine	49.5±10.1
Xanthine	20.3± 4.8
Uric acid	ND
ATP	ND
ADP	ND
AMP	ND
Anserine	ND
Carnosine	ND

ND: not detected.

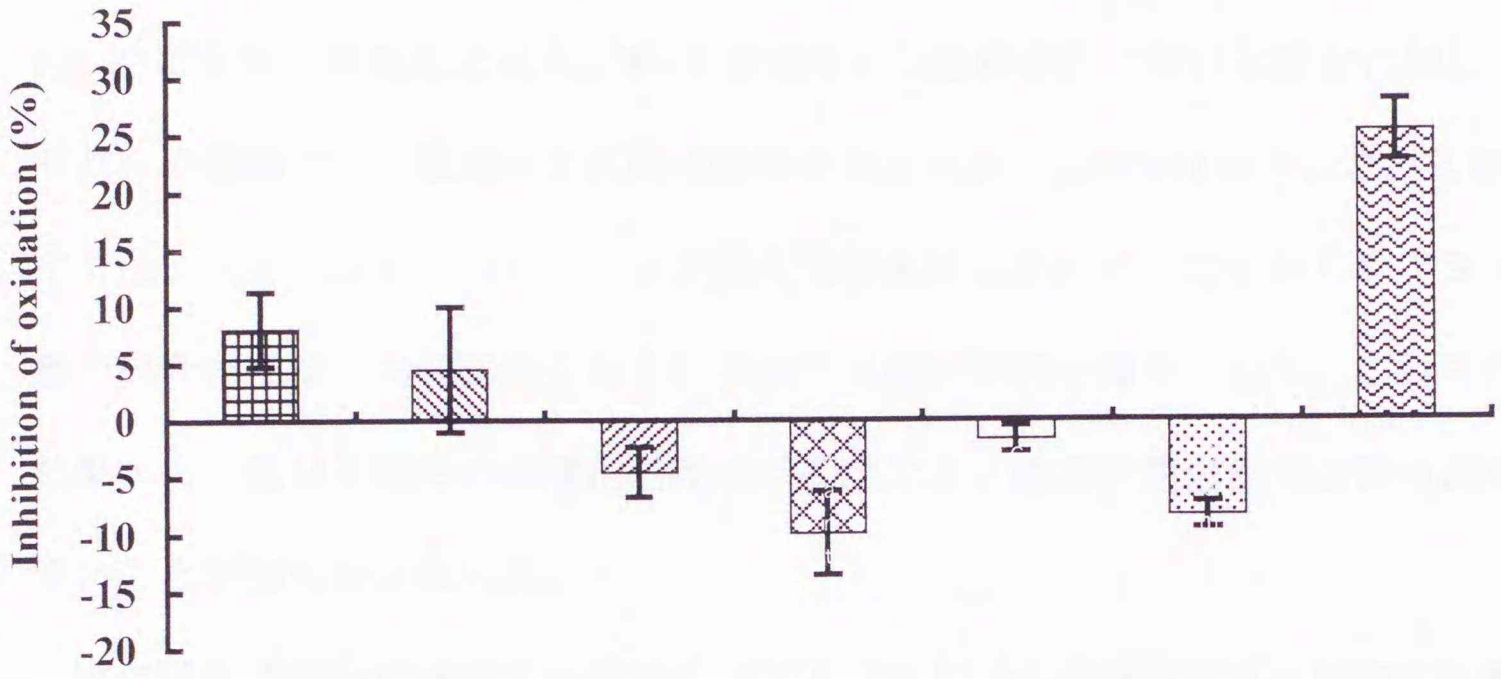


Fig. 22. Inhibitory activity of various chemical components in LMW-fraction on catalytic oxidation of triacylglycerol.

Catalytic oxidation was performed at 37℃ for 90 min using 15 μM ferric chloride and 100 μM ascorbic acid in an assay medium consisting of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol. Each chemical component was used at the concentration equivalent to that found in 0.25 % LMW-fraction as follows.
Spermine: 0.88 μg/ml, Putrescine: 0.034 μg/ml, Hypoxanthine: 0.12 μg/ml, Xanthine: 0.051 μg/ml, reduced glutathione: 0.025 μg/ml. Bars represent standard error deviations.

⊞ Spermine
▨ Putrescine
▨ Hypoxanthine
⊠ Xanthine
□ Glutathione
⁙ Combination
⊠ 0.25 % LMW-fraction

様に測定した。Table 20に示した様に、低分子画分中にはアルギニンが最も多く含まれ、また、一般的に抗酸化性を有すると考えられているヒスチジンやチロシン、さらに抗酸化性がほとんど無いグルタミン酸、グリシン、トレオニン、バリンなども比較的多く含まれていた。そこで、それらのアミノ酸およびもとの組成に再構成した混合物について抗酸化活性を測定した。その結果をFig. 23に示す。それによると、鉄-アスコルビン酸存在下における酸化に対し、それらの遊離アミノ酸は全て抗酸化活性を示したが、AAPH存在下における酸化ではヒスチジンとチロシンのみが酸化抑制を示した。さらにそれらのアミノ酸の混合物では、両触媒酸化反応において抗酸化活性が認められた。これらの結果から、低分子画分の抗酸化活性には遊離アミノ酸の抗酸化作用の寄与が大きいことが明らかとなった。

次に低分子画分に存在する低分子ペプチドおよびその塩酸加水分解物の抗酸化性を検討した。低分子画分およびそれを塩酸加水分解した後のアミノ酸組成および抗酸化活性をTable 21およびFig. 24に示す。低分子画分は塩酸加水分解した後も鉄-アスコルビン酸およびAAPH存在下の酸化反応において、抗酸化活性の低下が認められなかったことから、低分子画分中にペプチドが存在していたとしてもそれらにはほとんど抗酸化活性が無いものと考えられた。また、AAPH存在下における酸化反応においては、塩酸加水分解によって抗酸化性が若干上昇したが、これは加水分解によって生成した遊離チロシンなどの水溶性ラジカル捕捉能を有するアミノ酸が増加した結果によるものであると考えられた。以上の結果から、低分子画分の示した抗酸化活性には、ポリアミンや遊離アミノ酸の抗酸化作用が大きく寄与しているものと考えられた。精巣組織はポ

Table 20. Free amino acid composition of the LMW-fraction of chum salmon spermary tissue.

Amino acid	Weight*(mg/100 ml LMW-fraction)
Aspartic acid	1.0
Glutamic acid	6.7
Serine	3.8
Glycine	43.8
Threonine	11.5
Alanine	5.9
Proline	3.8
Tyrosine	12.9
Valine	4.6
Methionine	2.4
Cystine	0.5
Isoleucine	2.2
Leucine	2.7
Phenylalanine	1.3
Histidine	13.7
Arginine	126.6
Lysine	1.3
Total	244.7

Amino acid composition was determined as described in "Materials and Methods".

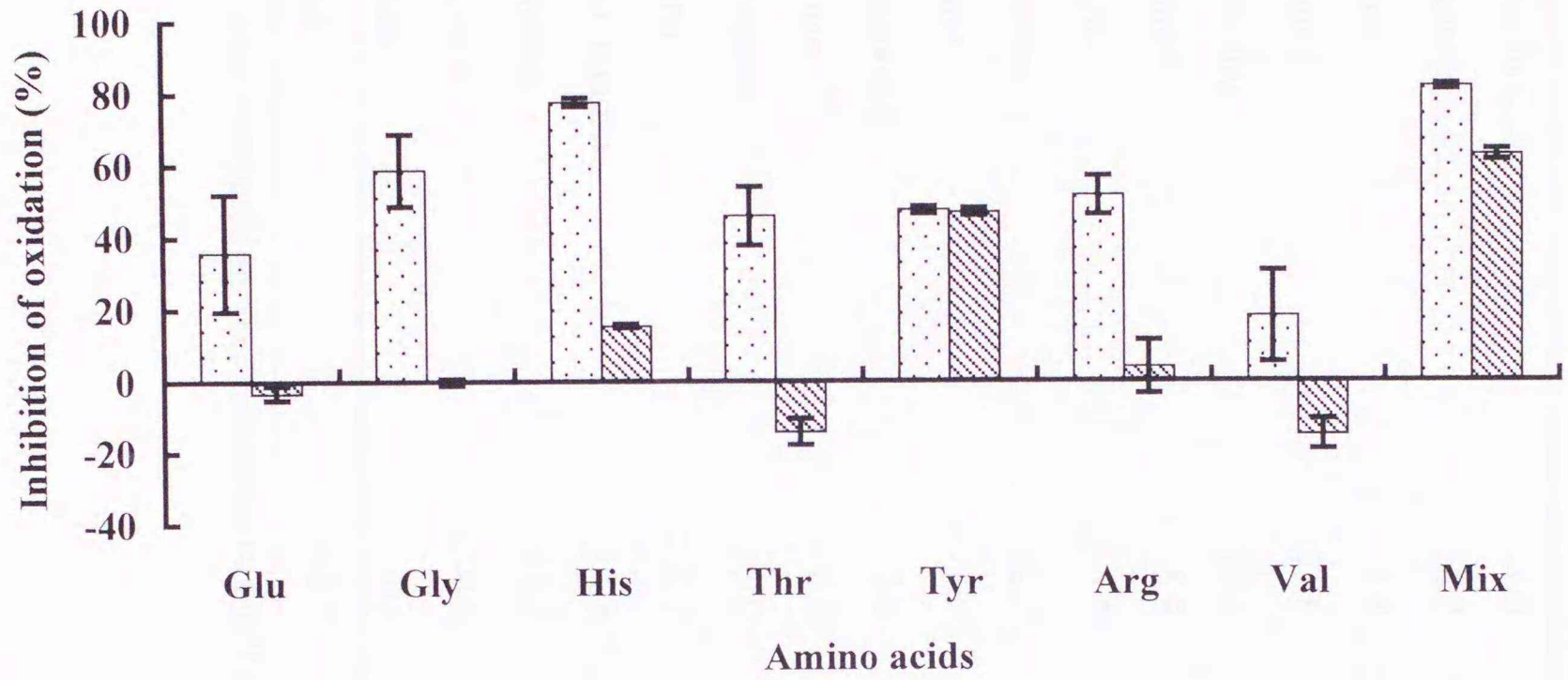


Fig. 23. Inhibition of catalytic oxidation of triacylglycerol by free amino acids.

Catalytic oxidation was performed at 37 ℃ for 90 min using 15 μM ferric chloride and 100 μM ascorbic acid or 2.0 mM AAPH as a catalyst in an assay medium consisting of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol. Amino acid concentrations in the assay media were adjusted to those found in 0.25 % LMW-fraction. Mix means mixture of free amino acids used in this experiment. Bars represent standard error deviations.

Catalysis : ⊡ Ferric chloride plus ascorbic acid

⊠ AAPH

Table 21. Changes in amino acid composition in the LMW-fraction by HCl-hydrolysis.

Amino acid	Weight (mg/100 ml LMW-fraction)	
	Before hydrolysis	After hydrolysis
Aspartic acid	1.0	2.6
Glutamic acid	6.7	25.3
Serine	3.8	8.6
Glycine	43.8	85.9
Threonine	11.5	13.6
Alanine	5.9	7.2
Proline	3.8	3.3
Tyrosine	12.9	18.6
Valine	4.6	3.3
Methionine	2.4	1.8
Cystine	0.5	1.0
Isoleucine	2.2	2.1
Leucine	2.7	2.8
Phenylalanine	1.3	1.1
Histidine	13.7	17.9
Arginine	126.6	177.7
Lysine	1.3	3.3
Total	244.7	376.1

Amino acid composition was determined as in Table 20.

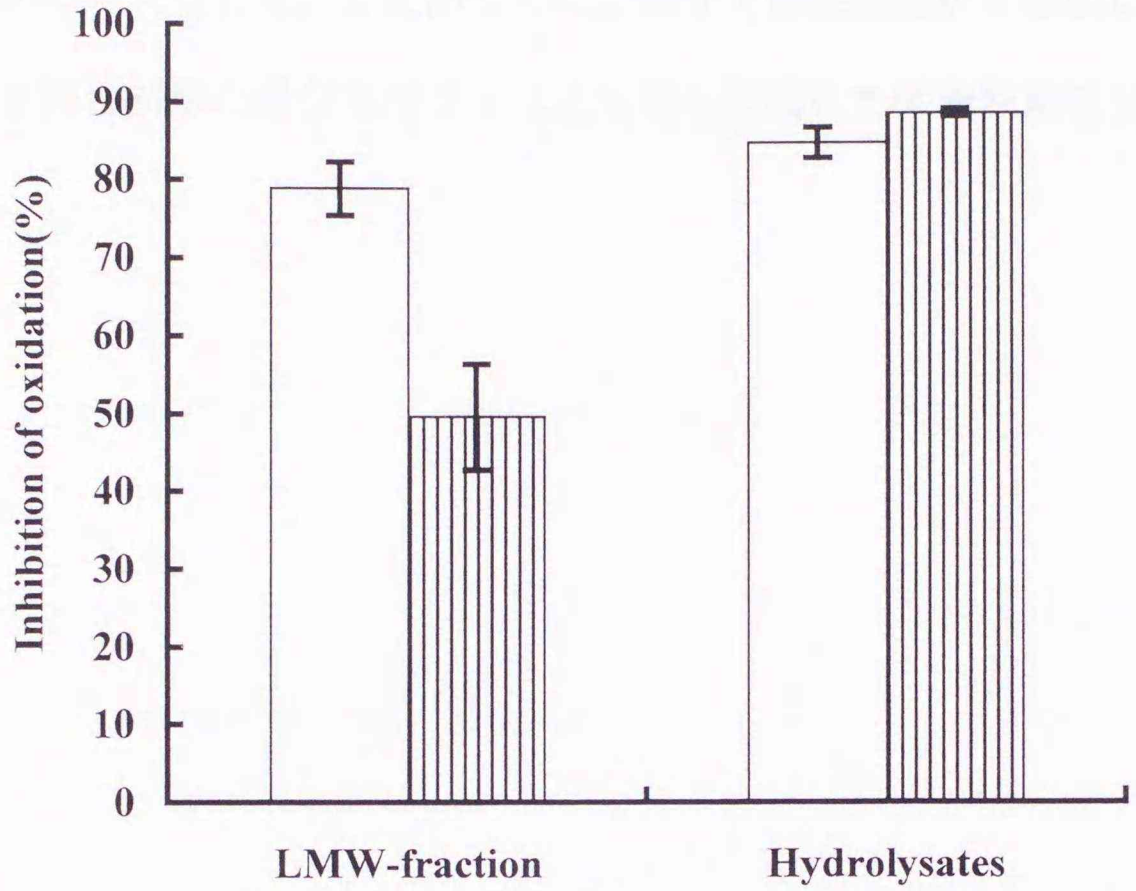


Fig. 24. Inhibitory activity of LMW-fraction before and after HCl hydrolysis against oxidation of triacylglycerol.

Acid-hydrolysis was performed with 6 M HCl-0.1 % phenol for 24 hr at 110℃. Catalytic oxidation was performed at 37 ℃ for 90 min using 15 μ M ferric chloride plus 100 μ M ascorbic acid or 2.0 mM AAPH in an assay medium consisting of 0.25 % LMW-fraction, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 2.5 mg/ml emulsified sardine triacylglycerol . Bars represent standard error deviations.

Catalysis : □ Ferric chloride plus ascorbic acid

▥ AAPH

リアミンなどの塩基性化合物を特異的に含む組織であり、さらにチロシンなどの抗酸化性を有する芳香族アミノ酸が存在することによって、より抗酸化活性が高まるものと考えられる。したがって、シロサケ精巣組織から抽出した低分子画分は、水溶性抗酸化成分をバランスよく含んだ優れた機能性素材であると考えられる。

第3章　未利用海藻からのα-グルコシダーゼ阻害成分の探索と血糖上昇抑制作用

本章では未利用海藻からα-グルコシダーゼ阻害成分を探索し、その活性成分の同定を行った。

第1節　未利用海藻抽出物のα-グルコシダーゼ阻害成分の探索

本節では、まず初めに北海道沿岸で採取される未利用海藻から酵母由来のα-グルコシダーゼの活性を阻害する成分を探索した。

実験方法

3.1.1　試料および試薬

未利用海藻として、北海道三石町沿岸で採取された褐藻類であるエゾイシゲ（*Pelvetia babingtonii* de Toni）、アラメ（*Eisenia bicyclis*）、ホンダワラ（*Sargassum fulvellum*）、スジメ（*Costaria costata*）、紅藻類であるイソムラサキ（*Symphyocladia latiuscula* Yamada）、エゾツノマタ（*Chondrus yendoi* Yamada et Mikami）の6種を用いた。海藻は採取後直ちに低温下（5℃）で搬入し、水洗した後に-80℃で凍結した。

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）由来α-グルコシダーゼおよび基質として用いたNPGは、シグマ社より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

3.1.2　阻害成分試料の調製

凍結した海藻を室温で半解凍状態にした後、細切し、5倍量の50 %メタノール水溶液を加えてポリトロン・ホモジナイザーにより8,000回転で1分間破砕した。次に、10,000×gで10分間遠心分離を行い、得られた上清をろ紙（No. 5B）でろ過した。ろ液は減圧下で濃縮乾固した。乾固した試料を50 %メタノール水溶液に再溶解して実験に供した。

3.1.3　酵母由来α-グルコシダーゼの阻害活性の測定

酵母由来α-グルコシダーゼの阻害活性の測定は、Watanabeらの方法[56]に準じて行った。すなわち、酵母由来α-グルコシダーゼ（70 Units/mg）は、10μg/ml（0.7 Units/ml）になるように50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.3）に溶解した。基質のNPGは5 mMになるように50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.3）に溶解した。阻害活性の測定は96穴マイクロプレートにα-グルコシダーゼ溶液10μlおよび測定試料の50 %メタノール水溶液、または対照試料としての50 %メタノール水溶液を50μlを入れた後、NPG溶液を10μl入れ、プレートミキサーで攪拌した後、37℃で5分間反応を行った。反応後、直ちにマイクロプレートリーダー（MP-100型、コロナ電気）により415 nmでの吸光度を測定し、以下の式により阻害率を算出した。また、阻害活性の比較はα-グルコシダーゼを50 %阻害するときの濃度（IC_{50}）で行い、濃度は阻害成分試料の乾燥重量から求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : 50%メタノール水溶液を入れた時の吸光度、B : 阻害成分試料を入れた時の吸光度

結果および考察

6種の海藻から得た50 %メタノール抽出物について酵母由来α-グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、褐藻類のアラメおよびエゾイシゲの抽出物に濃度依存的な阻害活性が認められた（Fig. 25）。特にエゾイシゲの50 %メタノール抽出物は極めて強い阻害活性を有し、そのIC$_{50}$値は、6.4 μg/mlであった（Table 22）。この阻害活性は既報の食品素材由来のα-グルコシダーゼ阻害成分[54]と比較しても極めて強いものであり、新規な阻害成分の存在が期待された。また、水および水-メタノール系抽出溶媒による抽出成分の阻害活性を比較検討した結果、Fig. 26とFig. 27 に示した様にいずれの抽出物も全て濃度依存的な阻害活性を示した。特にTable 23に示した様に、70 %メタノール抽出物は最も強い阻害活性（IC$_{50}$ = 5.3 μg/ml）を示した。この結果から以後の実験では、70 %メタノール水溶液を抽出溶媒として用いた。

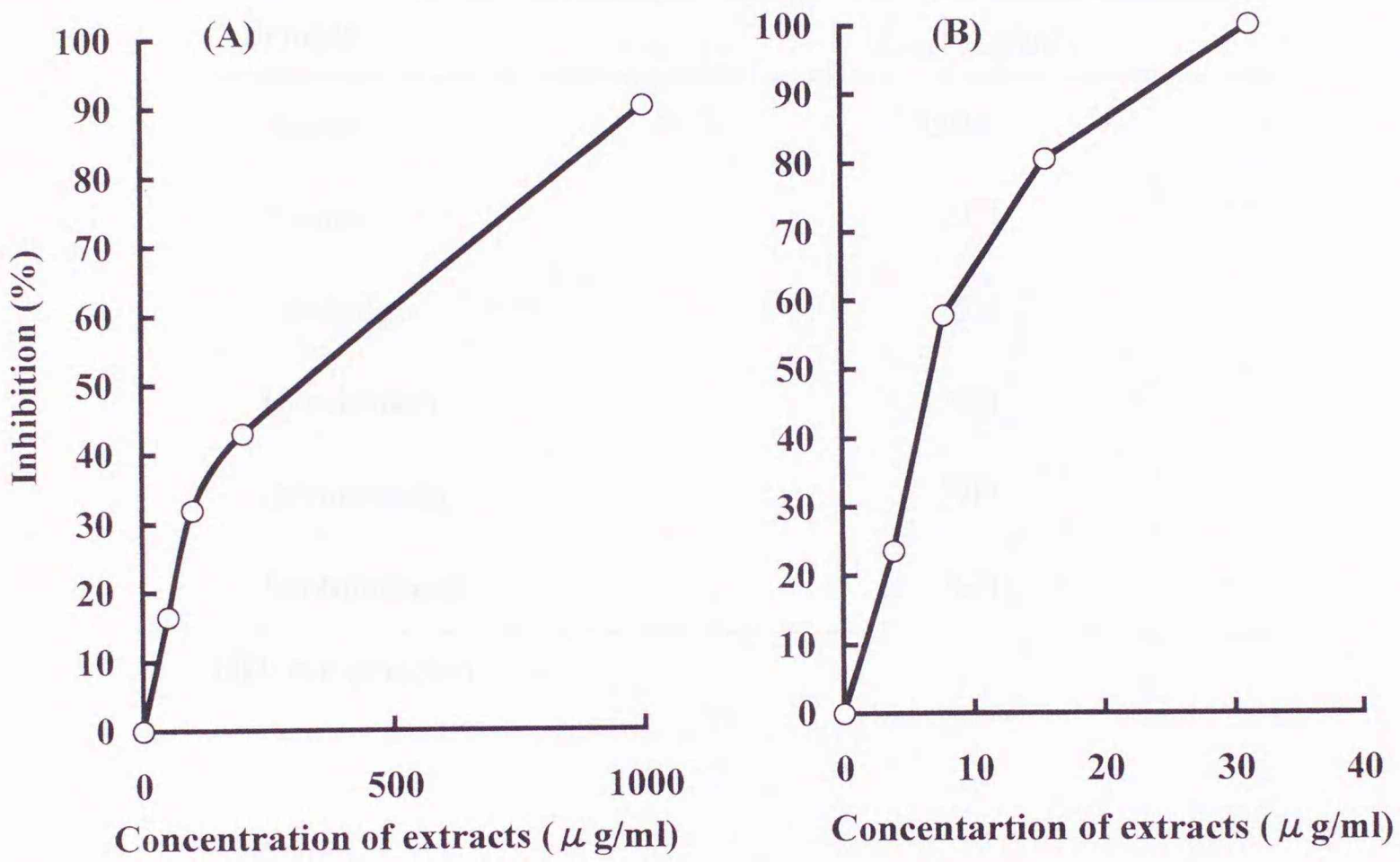


Fig. 25. Dose-response curves of inhibitory activity of 50 % aqueous methanol-extracts from Alame (A) and Ezoishige (B) against yeast α -glucosidase.

Table 22. Inhibitory activity of 50 % aqueous methanol-extracts against yeast α -glucosidase.

Sample	IC_{50} (μg/ml)
Alame	250.0
Sujime	ND
Ezoishige	6.4
Hondawara	ND
Isomurasaki	ND
Ezotunomata	ND

ND: not detected.

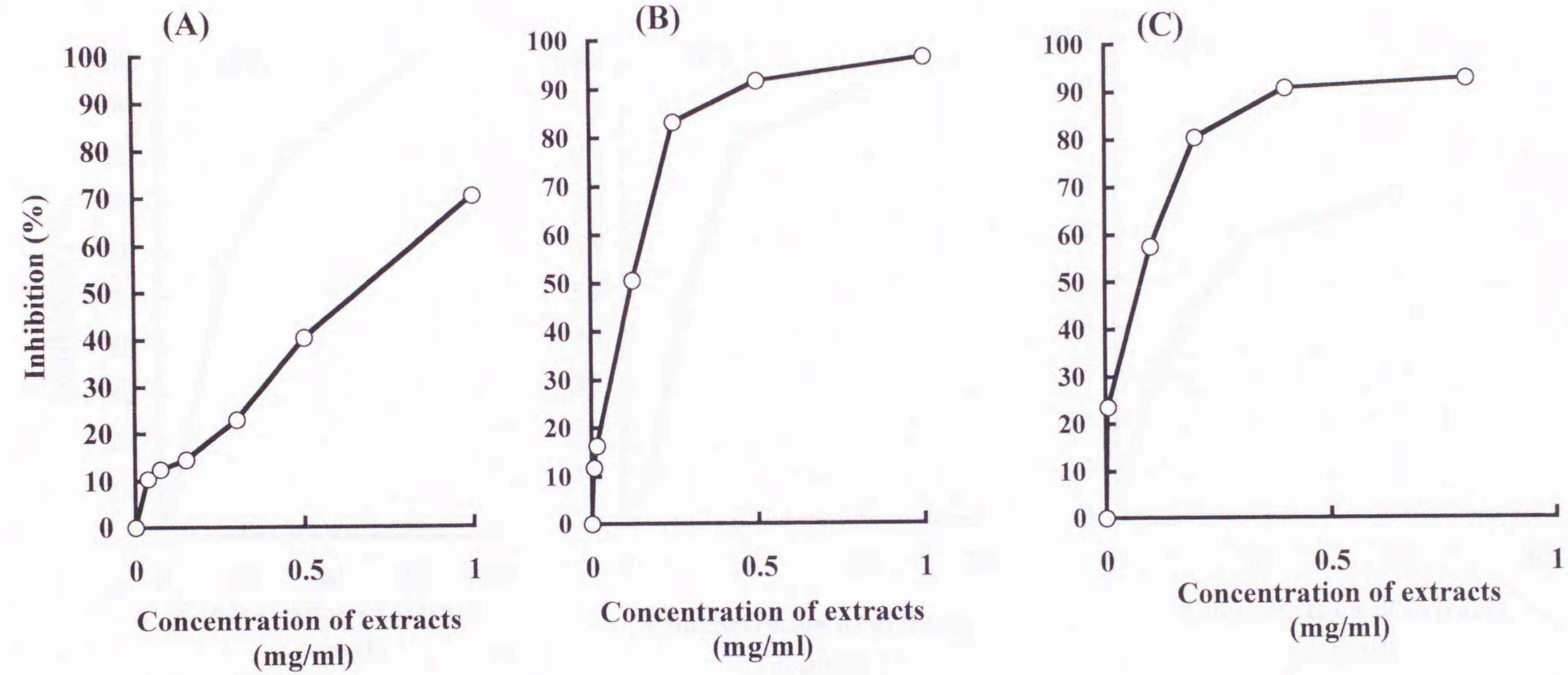


Fig. 26. Dose-response curves of inhibitory activity of water- and aqueous methanol-extracts from Ezoishige against yeast α -glucosidase.

(A) Water extracts (B) 10 % aqueous methanol extracts (C) 30 % aqueous methanol extracts

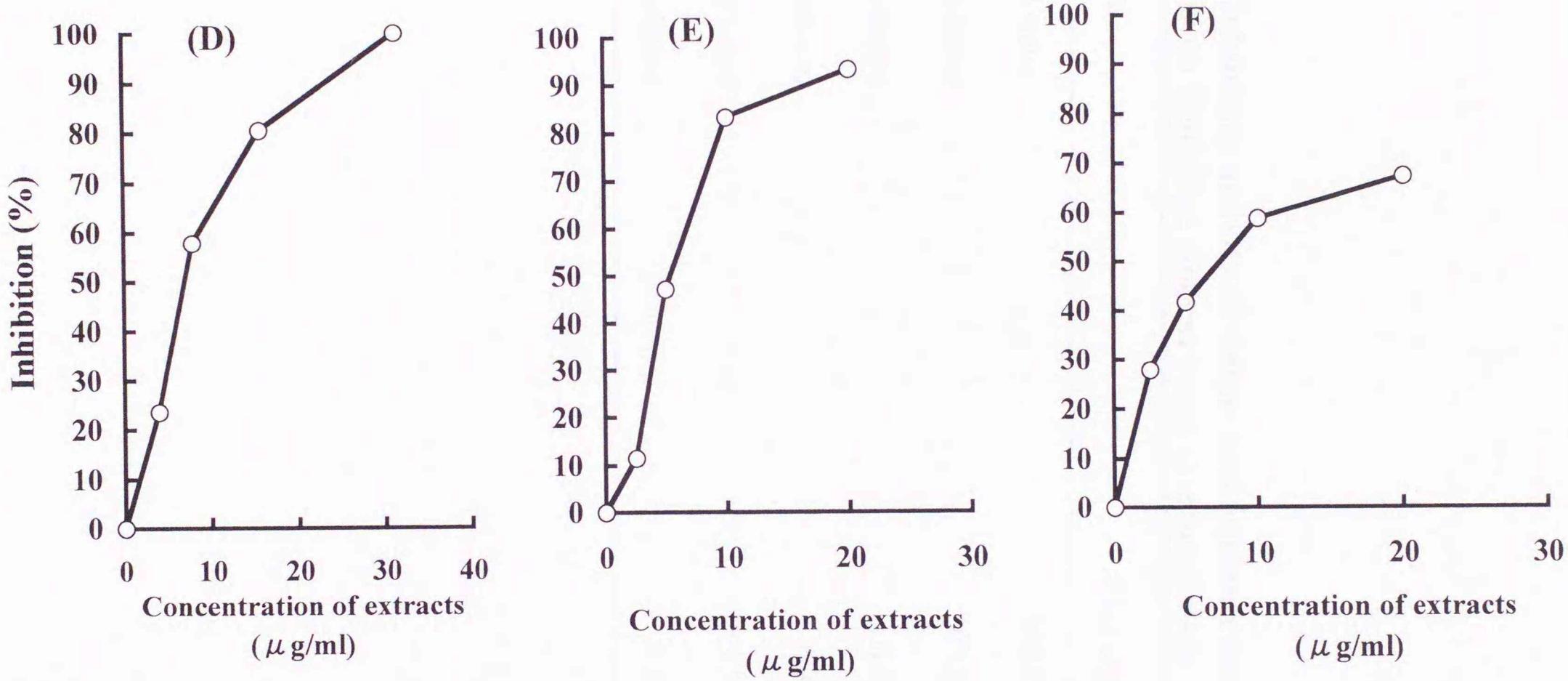


Fig. 27. Dose-response curves of inhibitory activity of aqueous methanol-extracts from Ezoshige against yeast α -glucosidase.

(D) 50 % aqueous methanol extracts (E) 70 % aqueous methanol extracts (F) 99 % methanol extracts

Table 23. Inhibitory activity of water- and aqueous methanol-extracts from Ezoishige against yeast α -glucosidase .

Solvents	IC_{50} (μ g/ml)
Distilled water	598.8
10 % methanol	107.2
30 % methanol	6.5
50 % methanol	6.4
70 % methanol	5.3
99 % methanol	9.5

第2節　エゾイシゲ抽出物のラットα-グルコシダーゼに対する阻害活性

本節では、酵母のα-グルコシダーゼに対して強い阻害活性を示したエゾイシゲの70 %メタノール抽出物についてラット小腸のα-グルコシダーゼに対する阻害活性を検討した。ラット小腸のα-グルコシダーゼはマルトースおよびスクロースをそれぞれ基質とするマルターゼ活性およびスクラーゼ活性を測定したが、これらの活性に対するエゾイシゲ抽出物の阻害活性について検討した。

実験方法

3.2.1　試料および試薬

阻害成分試料は第1節と同様にエゾイシゲから70 %メタノール水溶液を用いて行った。ラット小腸のアセトンパウダーはシグマ社より購入し、10倍量の0.1 Mマレイン酸緩衝液（pH 6.0）を加え、1分間の超音波処理を3回繰り返した後、3,000回転で30分間遠心分離して得られた上清を粗酵素液として用いた。粗酵素液はスクラーゼ活性には原液、マルターゼ活性には4倍希釈したものを用いた。基質として用いたスクロースおよびマルトースは、それぞれ0.1M マレイン酸緩衝液（pH 6.0）で500 mMになるように溶解して用いた。グルコース測定キット（グルコースCII-テストワコー）は和光純薬（株）より購入した。その他の試薬は第1節と同様のものを用いた。

3.2.2　ラット小腸のα-グルコシダーゼ活性の測定

ラット小腸のα-グルコシダーゼ活性およびエゾイシゲ抽出物の阻害活性の測定は、浅野らの方法[75]に準じて行った。すなわち、阻害活性の測定は阻害成分100μl、基質溶液100μlおよび0.1Mマレイン酸緩衝液（pH 6.0）700μlを試験管に入れ混合した後、α-グルコシダーゼ粗酵素液100μlを加えて37℃で60分間反応を行った。反応後、2Mトリス-マレイン酸-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 7.4）を1 ml加えて酵素反応を停止させた。反応液から20μlを分取し、遊離したグルコースをグルコース測定キットにより発色し、505 nmでの吸光度を測定した。得られた吸光度から以下の式により阻害活性を算出した。なお、すべての試験は一定容量および一定時間で行っていることから、吸光度の変化量はそのまま酵素反応速度に比例すると考え、吸光度から直接計算した。また、酵素反応で生成したグルコースを定量する試薬にはグルコースオキシダーゼおよびペルオキシダーゼが含まれており、これらの酵素が測定試料によって阻害される可能性を考慮し、BおよびB'に示す吸光度で補正して計算した。

阻害活性の比較はα-グルコシダーゼを50%阻害するときの濃度（IC_{50}）で行い、濃度は試料の乾燥重量から求めた。

$$\text{阻害活性（\%）} = \frac{\{A - A' \times B / (B - B')\}}{A} \times 100$$

A：測定試料を加えずにα-グルコシダーゼ反応を行った後の吸光度

A'：測定試料を加えてα-グルコシダーゼ反応を行った後の吸光度

B：α-グルコシダーゼ反応は行わず、阻害成分試料を加えずに一定量のグル

コースを添加し、グルコース測定を行った時の吸光度

B': α-グルコシダーゼ反応は行わず、阻害成分試料と一定量のグルコースを添加し、グルコース測定を行った時の吸光度

結果および考察

エゾイシゲ70％メタノール抽出物のスクラーゼ、マルターゼの両α-グルコシダーゼの阻害活性を測定した結果、いずれの酵素に対しても濃度依存的に阻害活性を示し（Figs. 28, 29）、各IC_{50}値はそれぞれ2.84および2.24 mg/mlであった（Table 24）。この結果から、エゾイシゲ由来 70 ％メタノール抽出物中に存在するα-グルコシダーゼ阻害成分は酵母由来のα-グルコシダーゼを阻害するだけではなく、ラット小腸由来のα-グルコシダーゼをも阻害することが明らかとなった。食品素材由来のα-グルコシダーゼの阻害成分に関する報告は、酵母由来のα-グルコシダーゼに対する阻害活性を検討したものが多く[54-57]、小腸由来のα-グルコシダーゼに対する効果はほとんど検討されていない。本研究においてエゾイシゲ由来の70 ％メタノール抽出物は酵母由来のα-グルコシダーゼだけでなく、ラット小腸由来のα-グルコシダーゼに対しても阻害活性を有することから、ヒトの体内でのグルコース吸収阻害作用による血糖上昇抑制効果が期待できるものと考えられた。

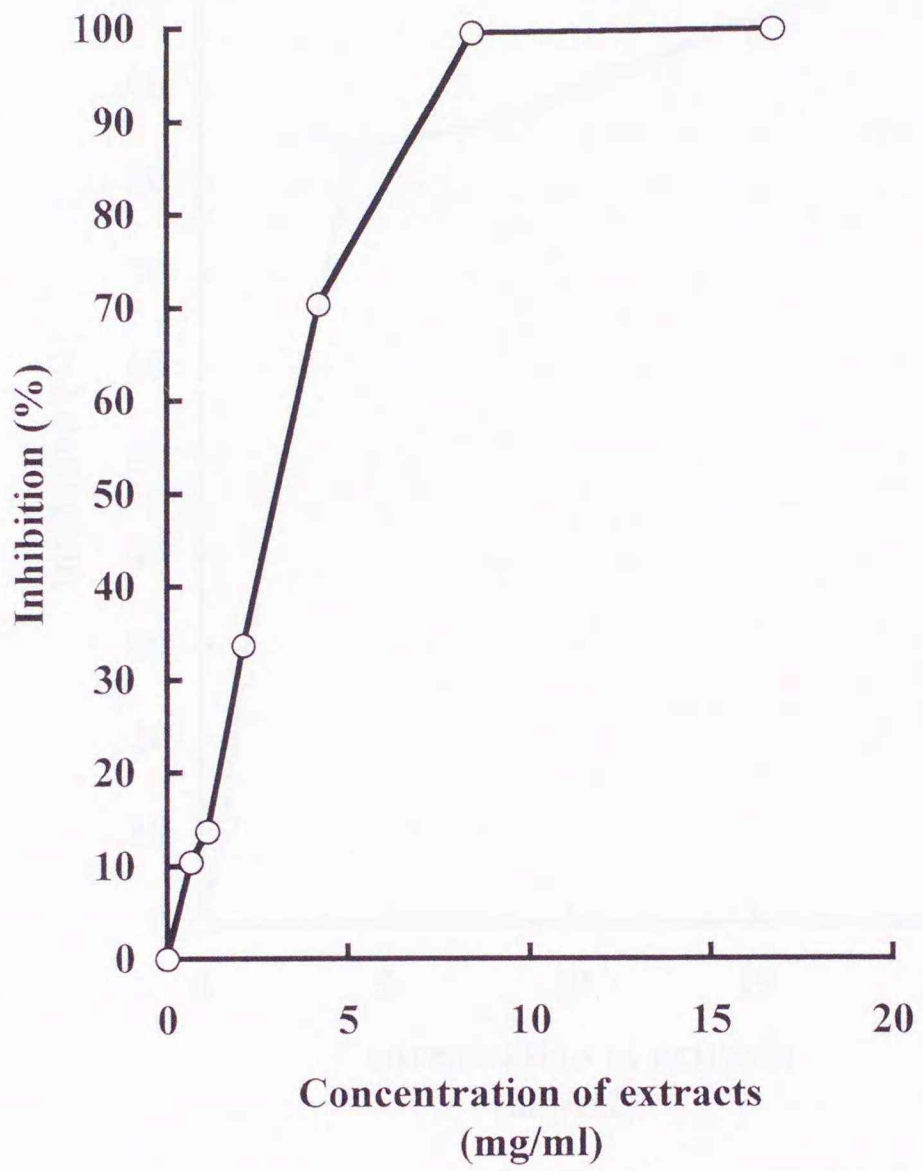


Fig. 28. Dose-response curve of inhibitory activity of 70 % aqueous methanol-extracts from Ezoishige against sucrase activity of rat small intestine.

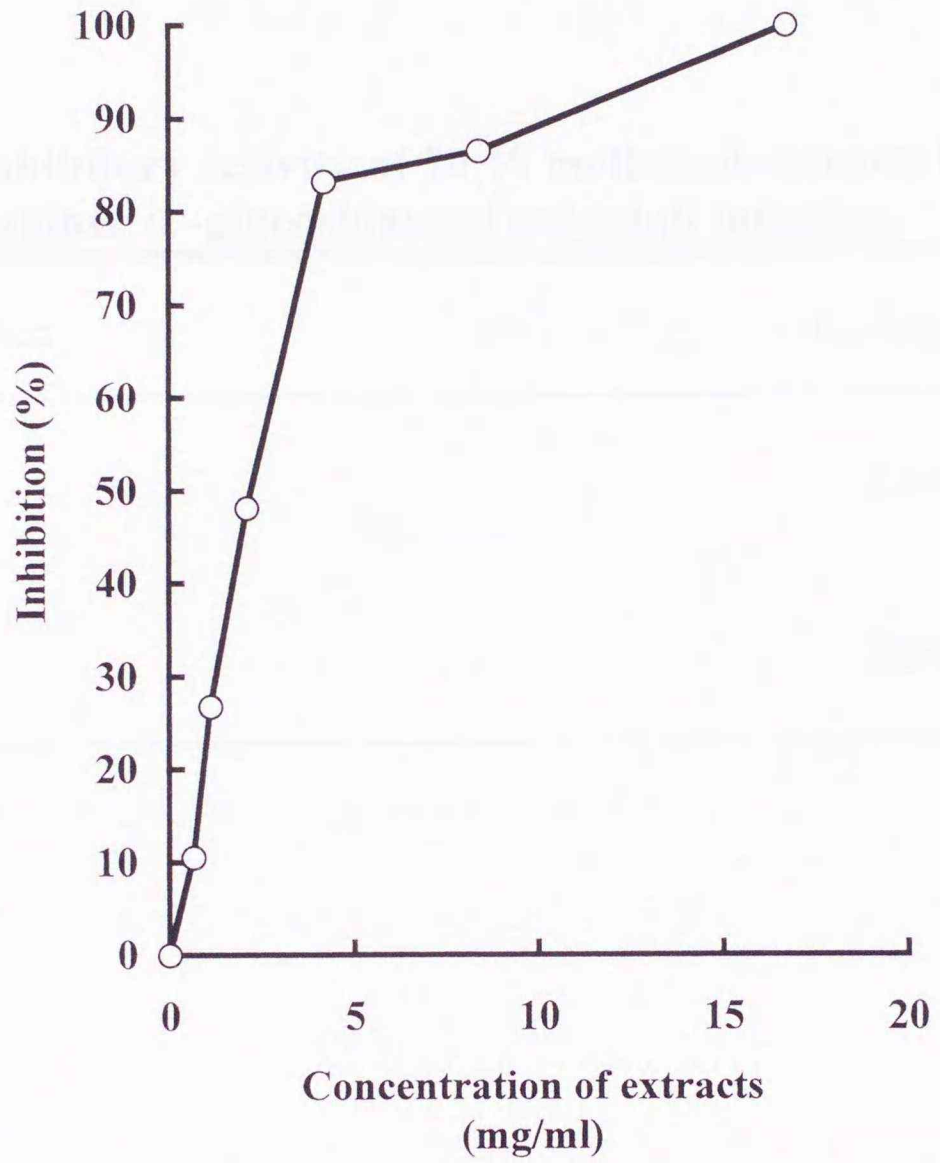


Fig. 29. Dose-response curve of inhibitory activity of 70 % aqueous methanol-extracts from Ezoishige against maltase activity of rat small intestine.

Table 24. Inhibitory activity of 70 % methanol-extracts from Ezoishige against α -glucosidase of rat small intestine.

α -glucosidase	IC_{50} (mg/ml)
Maltase	2.84
Sucrase	2.24

第3節　ラット糖負荷試験によるα-グルコシダーゼ阻害成分の血糖上昇抑制作用

一般的な糖尿病の診断のためには糖負荷による食後高血糖の持続性検査が行われている。したがって、食後高血糖の上昇抑制作用を検討する動物実験では、ラットに対する経口糖負荷試験が通常用いられる。そこで、本節ではラット小腸由来α-グルコシダーゼ阻害活性を有するエゾイシゲの70％メタノール抽出物についてラットの糖負荷試験による血糖上昇抑制作用の検討を行った。

実験方法

3.3.1　試料および試薬

試料および試薬は第1節と同様のものを用いた。なお、α-グルコシダーゼ阻害成分は乾固したものを1,000 mg/mlになるように蒸留水に分散して用いた。

3.3.2　動物および飼育条件

7週齢のWistar系雄ラットは日本エスエルシー（株）より購入し、予備飼育して、一般状態に異常が見られなかったものを選択して使用した。実験開始時のラットの体重は163～191 gであり、固形飼料（ラボMRストック、日本農産工業）と水は自由に与えた。飼育環境は予備飼育および実験期間を通じ、温度 22±3℃、湿度 50±20％、照明 12時間、換気回数13~17回/時間の環境下でステンレス製可動ラック（1,790 W×470 D×1,650 H mm）に装着したステレス製金網2連ケージに個別収容した。

3.3.3　ラットへの経口投与

一夜絶食したラットを用い、エーテル軽麻酔下で頸静脈よりヘパリン採血管に約0.5 ml採血を行い、血漿を分画し、血糖値を測定した。血糖値が119～147 mg/100mlの範囲のラット24匹を選別し、層別連続無作為化法により、対照および試験群の2群に分けた。対照群ではラット1匹当たりにスクロース500 mg/kgを、試験群ではスクロース500 mg/kgとα-グルコシダーゼ阻害成分を混合した溶液をゾンデにより経口投与した。なお、α-グルコシダーゼ阻害成分の投与量は1,000 mg/体重kgとした。経口投与から15、30、60および120分後に頸静脈より約0.5 ml採血した。

3.3.4　血糖値の測定

採取した血液から血漿を分画し、その血糖値をグルコース測定キットを用いて測定した。得られた数値から各群での平均値および標準誤差を算出した。対照群と試験群間の有意差は、F検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合は、Studentのt検定[60]により、不等分散の場合は、Aspin-Welchのt検定[60]を行った。有意水準は、危険率1 %および0.1 %とした。

結果および考察

対照群ラットには糖としてスクロースを、また試験群ラットにはスクロースとエゾイシゲ抽出物を経口投与し、経時的に血糖値を測定した。その結果、Fig. 30に示した様に対照群では投与15分後には急激に血糖値が上昇したが、30

分以降には穏やかに血糖値が低下した。一方、試験群では対照群と比較して血糖値の上昇は穏やかで、スクロース投与後15～30分間の最高血糖値を約30 mg/100ml程度有意に抑制した。さらに30分以降も血糖値の上昇は認められなかったが、60分以降は対照群と同様に推移した。この結果から、エゾイシゲ抽出物には経口投与においても血糖上昇抑制作用有する生理的に有効なα-グルコシダーゼ阻害成分が存在していることが示唆された。また、実験に用いたラットの状態は投与後24時間後においても全く変化が観察されないことから、この成分は少なくとも急性毒性を有するものではないと考えられ、食品素材として活用が期待できた。

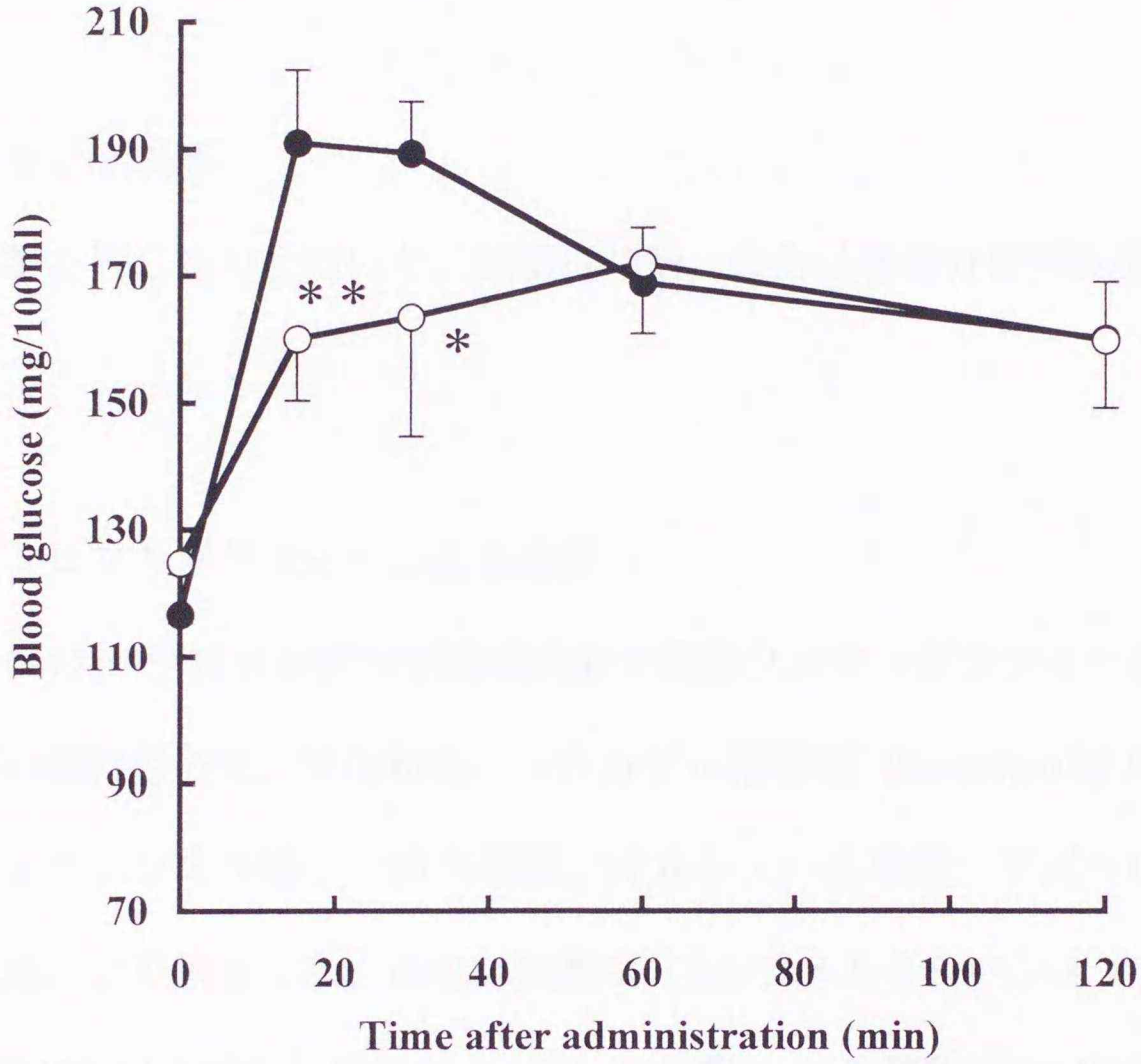


Fig. 30. Effect of 70 % aqueous methanol-extracts from Ezoishige on blood glucose levels after administration to rats.

Rats were administered 500 mg sucrose and 1,000 mg extracts per kg of body weight. Significant difference from glucose levels on the corresponding control : $*P < 0.01$,$**P < 0.001$. Bars represent standard error deviations.

第4節　エゾイシゲ由来α-グルコシダーゼ阻害成分の精製および阻害活性

本節では、エゾイシゲ70 %メタノール抽出物からα-グルコシダーゼ阻害成分の単離・精製を行い、活性成分の構造解析を試みた。

実験方法

3.4.1　試料および試薬

試料は前節と同じものを用いた。試薬は特級、または機器分析用試薬を用いた。

3.4.2　薄層クロマトグラフィーによる分析

エゾイシゲのα-グルコシダーゼ阻害成分の薄層クロマトグラフィーによる分析は、以下の様に行った。すなわち、シリカゲル薄層板（Kieselgel 60 F254、メルク社）により成分を分離し、50 %硫酸、オルシノール硫酸、アズールAおよびDMBA試薬により検出した。DMBA試薬は、2,4-ジメトキシベンズアルデヒド 2 gを酢酸100 mlに溶かしたもの（A液）と塩酸16 mlを酢酸100 mlに溶かしたもの（B液）を1 : 1（v/v）の割合で混合して調製した[76]。

3.4.3　成分の構造解析

単離した成分の構造は、核磁気共鳴分光装置（NMR Spectrometer JEOL JNM-FX90Q、日本電子（株））により解析した。測定溶媒には重メタノールを、内

部標準にはテトラメチルシラン（TMS）を用いた。

3.4.4　分子量の測定

分子量の測定は単離した成分をアセチル化した後、ゲル浸透HPLC法により行った。すなわち、単離した成分100 mgにピリジン1 mlと無水酢酸2 mlを加え、攪拌しながら60℃で6時間反応させた。その後、反応混合物を減圧濃縮して有機溶媒を除去し、アセチル化物を得た。これを0.2 mg/mlになるようにテトラヒドロフランに溶解し、その20 μlをゲル浸透HPLCに供した。ゲル浸透HPLCによる分析条件をTable 25に示す。なお、分子量の標準品としてポリスチレンを用い、その検量線をFig. 31に示す。

Table 25. Conditions for gel-permeation HPLC.

Column	: TSK-gel G5000H6 (7.5 mm×300 mm, Tosoh)
Mobile phase	: Tetrahydrofuran
Flow rate	: 1.0 ml/min
Detection	: 254 nm
Temperature	: Room temperature

3.4.5　元素分析

炭素と水素の分析はCHNコーダー（MT-3型、柳本）を使用し、試料を空気気流中で燃焼させて二酸化炭素および水とし、吸着剤に吸収させてその重量増加から求める方法で行った（Pregl法）[77]。また、硫黄の分析は試料を酸化分解し、硫酸イオンの状態にしてDIONEXイオンクロマトグラフシステム（MT-5

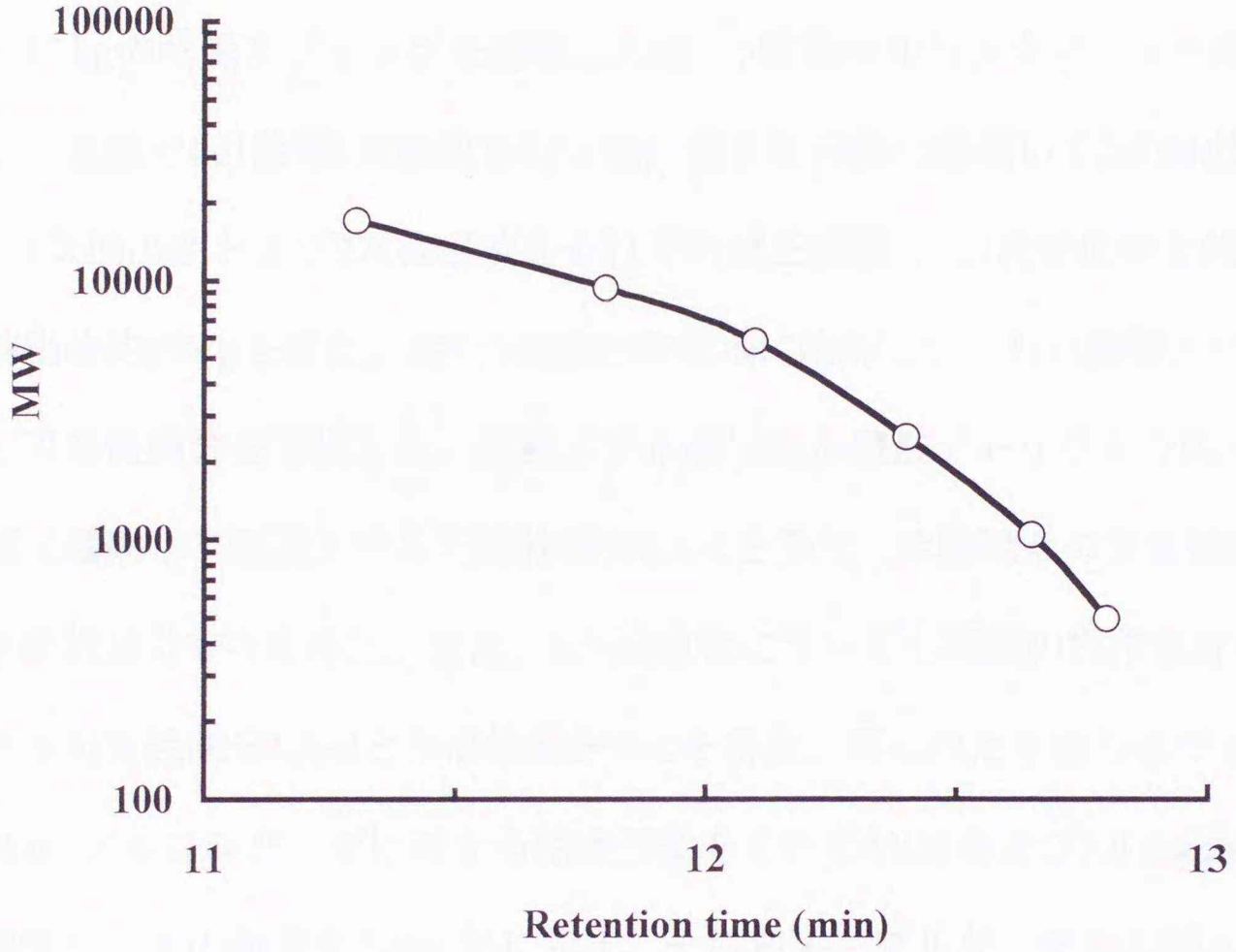


Fig. 31. Relationship between molecular weight of TSK standard polystyrene and retention time on TSK-gel G5000 HPLC.

型、柳本）により定量した。

結果および考察

エゾイシゲのα-グルコシダーゼ阻害成分の精製はFig. 32に従って行った。すなわち、13 kgの乾燥エゾイシゲを細切した後、5倍量の70％メタノール水溶液に浸漬し、室温で約1週間1次抽出を行った。残さを同様に処理して2次抽出を行った。1次抽出液および2次抽出液をそれぞれ減圧濃縮して1次抽出物を約338 gと2次抽出物約298 gを得た。次に1次抽出物を水に溶解し、これに酢酸エチルを加えて可溶性画分を抽出した。酢酸エチル層は無水硫酸ナトリウムで脱水した後に減圧濃縮して酢酸エチル可溶性画分EA-1を得た。水層はそのまま減圧濃縮して水溶性画分W-1を得た。また、2次抽出物についても同様の操作を行い、酢酸エチル可溶性画分EA-2と水溶性画分W-2を得た。得られた各画分のラット小腸由来α-グルコシダーゼに対する阻害活性をそれぞれ2.5および5.0 mg/mlの濃度で測定し、その結果をTable 26に示す。その結果、マルターゼおよびスクラーゼに対する阻害活性は画分W-1およびW-2より画分EA-1とEA-2にいずれも強い阻害が見られた。画分EA-1およびEA-2では両酵素に対する阻害活性にいずれもほとんど差が認められなかったが収量はEA-2の方が多かった。そこで画分EA-2についてさらに精製を行った。

EA-2画分 23.62 gをクロロホルムに対する可溶性の違いにより分画を行い、クロロホルム可溶性画分 3.47 gとクロロホルム不溶性画分 20.1 gを得た。両画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで分析を行った結果をFig. 33に示す。

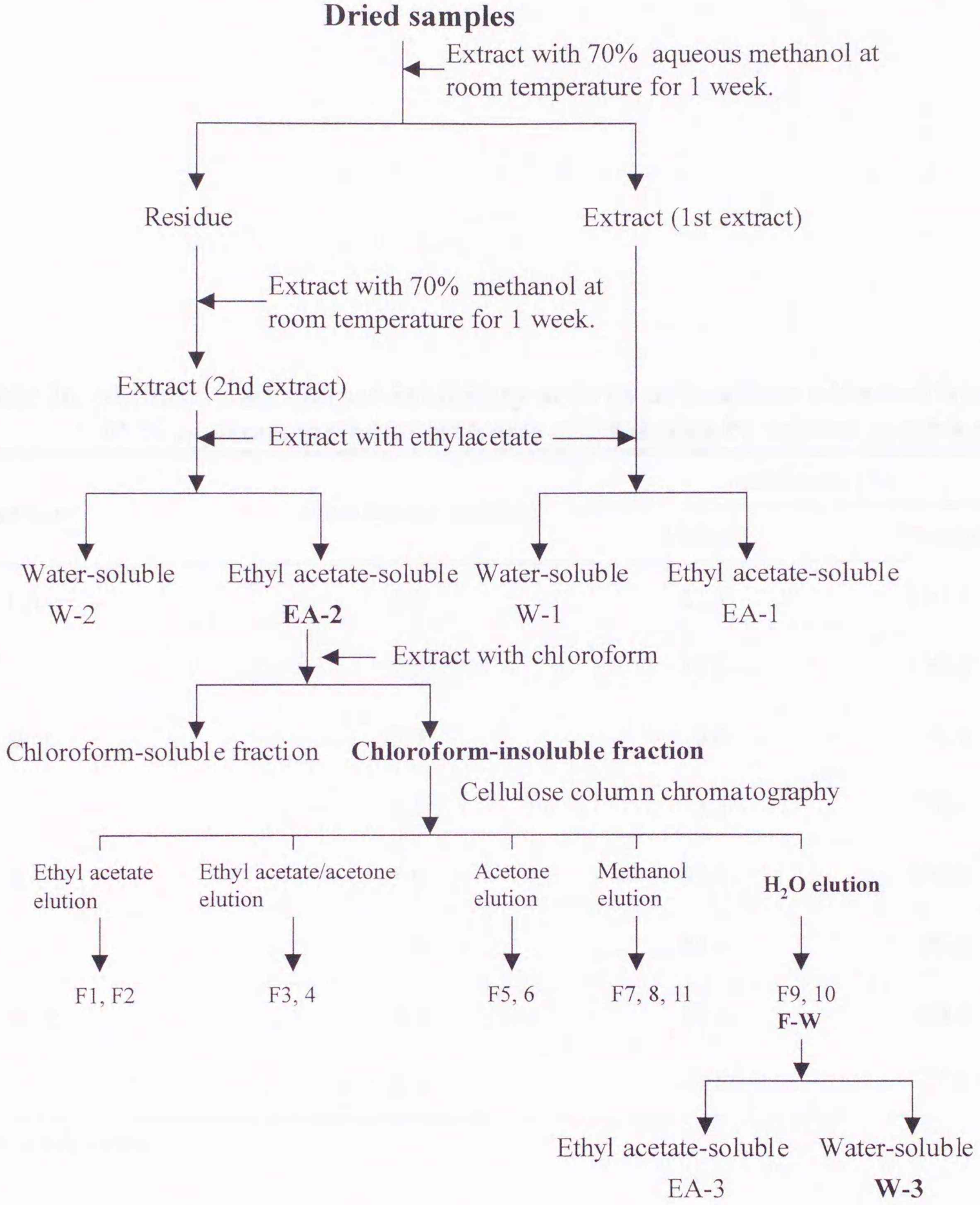


Fig. 32. Purification procedures for α-glucosidase inhibitor from Ezoishige.

Bold letters represents the fractions showing the highest inhibitory activity against rat small intestinal α-glucosidase.

Table 26. Maltase- and sucrase-inhibitory activity of fractions obtained from 70 % aqueous methanol-extracts of Ezoishige by solvent partitioning.

Fraction	Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)	
		Maltase	Sucrase
EA-1	5.0	83.3	100.0
	2.5	43.7	100.0
W-1	5.0	0.6	7.4
	2.5	3.2	ND
EA-2	5.0	93.6	100.0
	2.5	84.4	95.2
W-2	5.0	15.3	68.0
	2.5	4.7	25.0

ND: not detected.

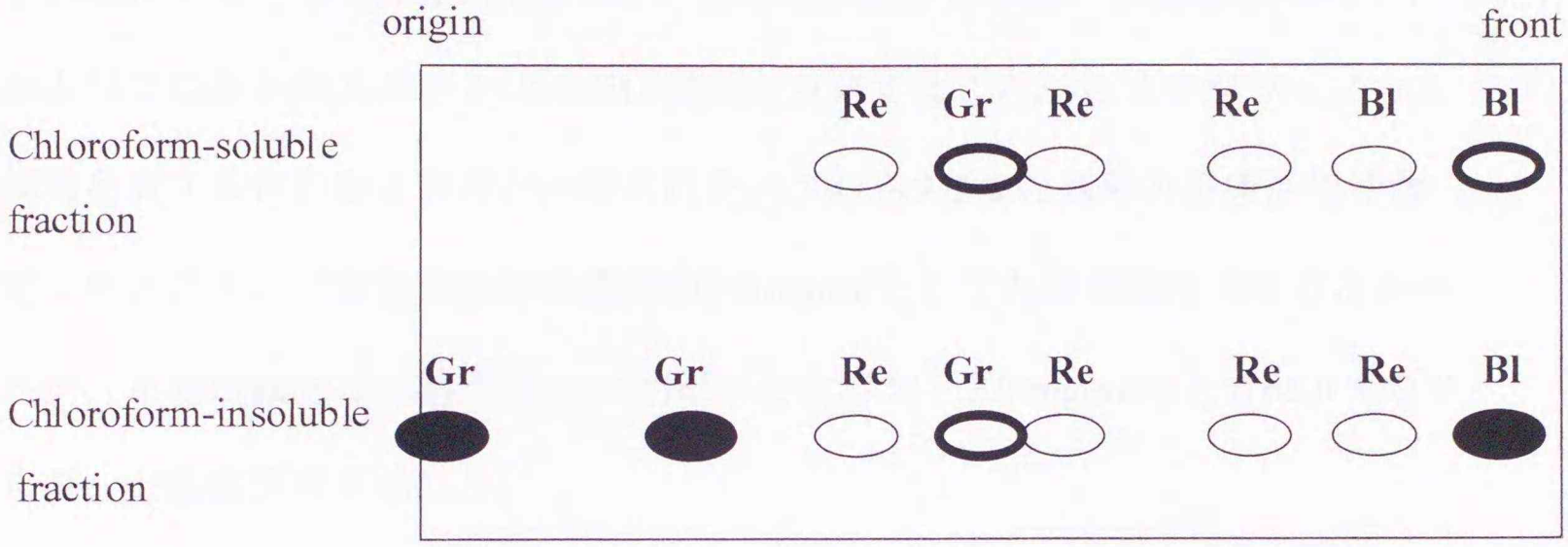


Fig. 33. Thin layer chromatogram of the chloroform-soluble and insoluble fractions.

Thin-layer chromatography was carried out using a developing solvent of *n*-buthanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 2 (v/v/v)

: Spot visualized with 50 % sulfuric acid reagent.

Spot colors : **Bl** , blue ; **Re**, red; and **Gr**, green.

: Spot visualized with Azure A reagent.

: Spot visualized with DMBA reagent.

それによると、クロロホルム可溶性画分では硫酸試薬で6つのスポットが検出され、その中の2つはアズールA試薬にも反応を示した。これらのことからクロロホルム可溶性画分では硫酸基を含む糖類および有機化合物一般の性質を持つ化合物の混合物であることが推定された。一方、クロロホルム不溶性画分では8つのスポットが検出され、その中の2つのスポットはクロロホルム可溶性画分と同様にアズールA試薬と反応した。さらに本画分の原点、２番目のスポットおよびフロントのスポットはDMBA試薬と反応することからメタジフェノール構造を有する化合物の存在が示唆された。これらの2つの画分の阻害活性を測定したところ、可溶性画分は終濃度が2.0 mg/mlとしても阻害活性は示さなかったが、不溶性画分は終濃度が1.0 mg/mlのとき25 %、2.0 mg/mlのとき68.0 %のマルターゼ阻害活性を示した。

そこで、このクロロホルム不溶性画分をさらにセルロースに対する吸着分配によって分離・精製した。すなわち、セルロースをガラス製カラム（6.0×35 cm）に充填し、クロロホルム不溶性画分にセライトを混合した試料を重層した後、酢酸エチル、酢酸エチル/アセトン（1/1, v/v）、アセトン、メタノールおよび蒸留水などの溶媒で順次展開した。各溶媒で溶出した画分（F-1～F-11）を分取し、それぞれの画分について収量およびマルターゼ阻害活性を測定し、その結果をTable 27に示す。また、各画分のTLC分析の結果をFig. 34に示す。その結果、F-9, 10および11画分に阻害活性が認められた。TLC分析の結果では、阻害活性を示したF-9, 10および11画分は、比較的低極性のスポットが認められたため、溶媒分画による精製を進めた。なお、精製は活性の高いF-9およびF-10画分を合一して用い、FW画分と称した。

Table 27. Maltase-inhibitory activity of fractions obtained from the chloroform-insoluble fraction by cellulose column chromatography.

Fraction	Developing solution (v/v)	Solution volume (ml)	Weight (mg)	Inhibitory activity (%)
F-1	Ethyl acetate	1000	47.4	ND
F-2	Ethyl acetate	1000	5.4	ND
F-3	Ethyl acetate / acetone = 1 / 1	1000	1.0	NT
F-4	Ethyl acetate / acetone = 1 / 1	1000	4.7	ND
F-5	Acetone	1000	12.1	ND
F-6	Acetone	1000	32.8	ND
F-7	Methanol	1000	70.7	ND
F-8	Methanol	1000	622.7	ND
F-9	Water	1000	878.3	70.4
F-10	Water	1000	493.0	73.5
F-11	Methanol	500	86.3	28.6

Sample weight: 2.6232 g. Sample concentration of the assay was performed at 1.0 mg/ml. ND: not detected. NT: not tested.

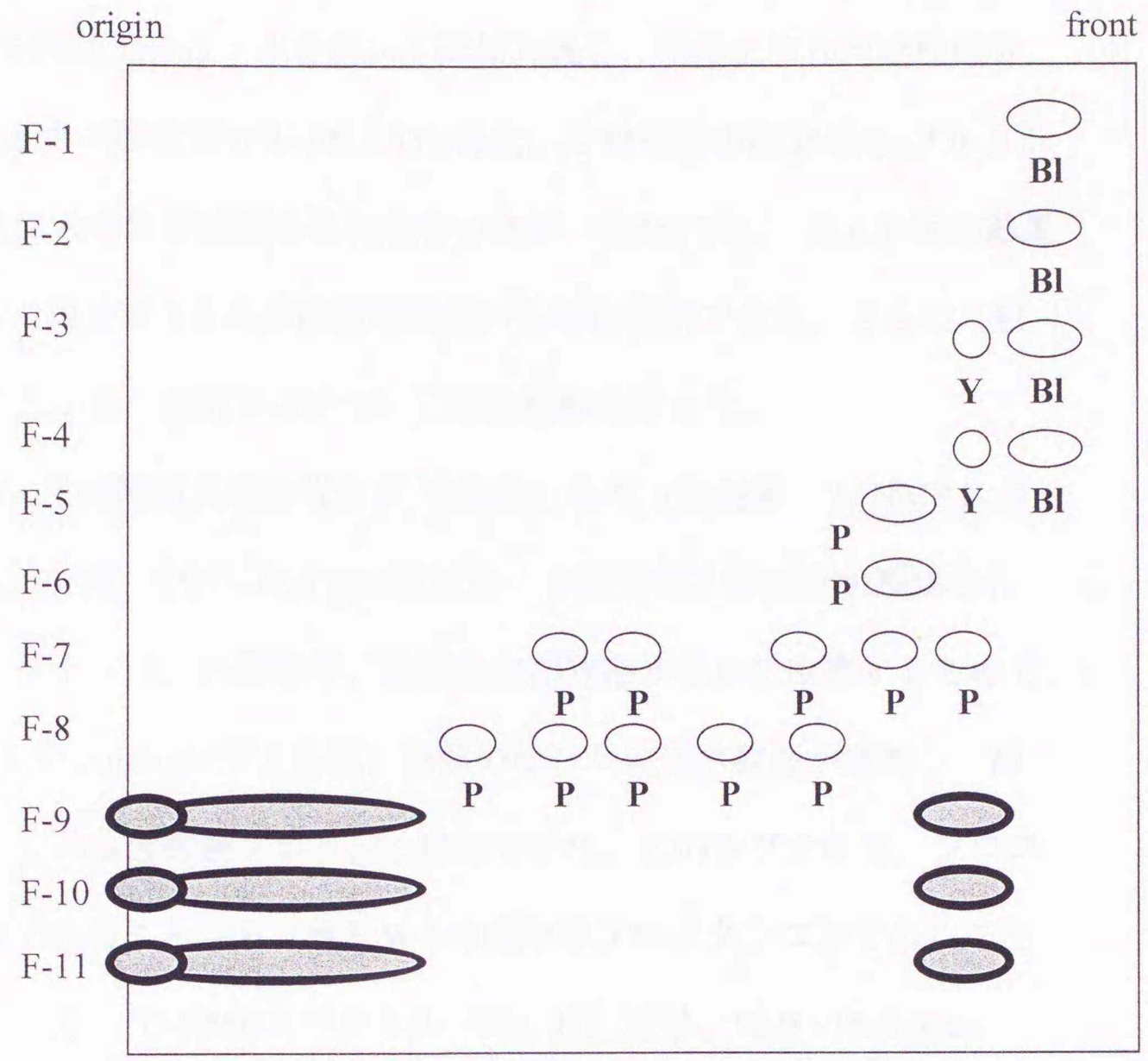


Fig. 34. Thin layer chromatogram of the fractions obtained from the chloroform-insoluble fraction by cellulose column chromatography.

Developing solvent is as shown in Fig. 33.

: Spot visualized with 50 % sulfuric acid reagent.

Abbreviations of spot colors are designated as follows : **Bl** , blue ; **Re**, red ; **P**, purple, and **Y**, yellow.

: Spot visualized with Azure A reagent.

: Spot visualized with DMBA reagent.

次にFW画分を酢酸エチルと水を用いて溶媒分画し、酢酸エチル可溶性画分EA-3を0.1742 gと水可溶性画分W-3を2.55 g得た。それぞれの画分はα-グルコシダーゼ阻害活性に大きな差は認められなかったが（Table 28）、TLC分析の結果（Fig. 35）から、画分W-3の方が精製度が高いものと判断できた。さらに、収量が多かったことから、画分W-3について構造解析を行った。

画分W-3について核磁気共鳴分光分析（NMR）を行った結果、^{1}H-NMRスペクトル（Fig. 36）では、5.91 ~ 6.31 ppmにブロードなシグナルのみが観察された。その他のシグナルは、内部標準、溶媒および残存する水に由来するものであった。5.91 ~ 6.31 ppmのシグナルは、両側のオルト位に水酸基が置換し、高磁場にシフトしている芳香族プロトンと帰属できた。このシグナルは、フロロタンニンに特有であることから、画分W-3の成分はフロロタンニンであることが示唆された。一方、^{13}C-NMRスペクトル（Fig. 37）では、95.9 ~ 96.8 ppm、126.1 ~ 126.2 ppmおよび152.2 ~ 158.2 ppmにそれぞれいくつかのシグナルが重なって観察された。これらもやはりフロロタンニンに特有の芳香族カーボンのシグナルであることから、画分W-3の成分はフロロタンニンであることが支持された。フロロタンニンはフロログルシノールを基本骨格とするオリゴマーおよびポリマーの総称で（Fig. 38）、褐藻類に多く含まれていることが知られている[78]。そこで、今回得られたフロロタンニンと推定される成分の分子量の測定および元素分析を行った。

まず、画分W-3をアセチル化処理した後、ゲル浸透HPLCで分析した結果をFig. 39に示す。この画分の主成分の分子量はピークの保持時間とFig. 31に示した標準曲線から、約14,000と推定された。また、元素分析の結果から、画分W-

Table 28. Maltase-inhibitory activity of EA-3 and W-3 obtained from FW-fraction by partitioning between ethyl acetate and water.

Fraction	Concentration (mg/ml)	Inhibitory activity (%)
EA-3	1.0	87.6
	0.5	70.5
	0.3	22.4
	0.1	ND
W-3	1.0	90.0
	0.5	53.6
	0.3	19.5
	0.1	ND

FW means the fraction pooled of F-9 and F-10 shown in Table 27. ND: not detected

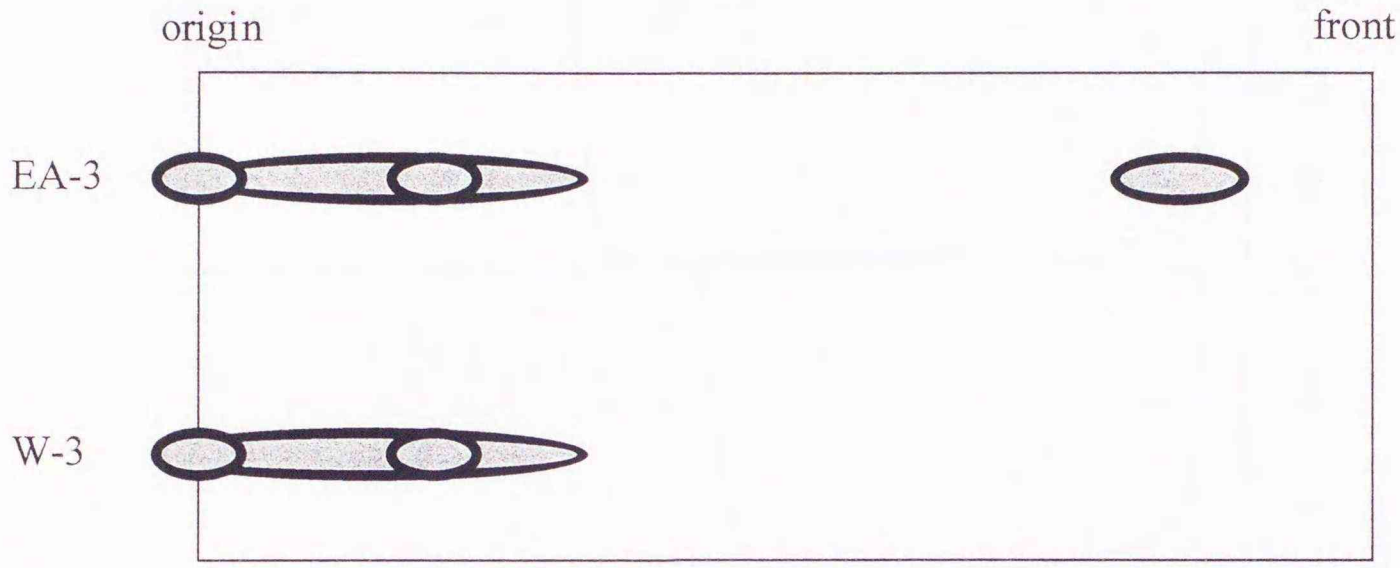


Fig. 35. Thin layer chromatogram of Fraction EA-3 and Fraction W-3.
Developing solvent is as shown in Fig. 33.

: Spot visualized with Azure A reagent.

: Spot visualized with DMBA reagent.

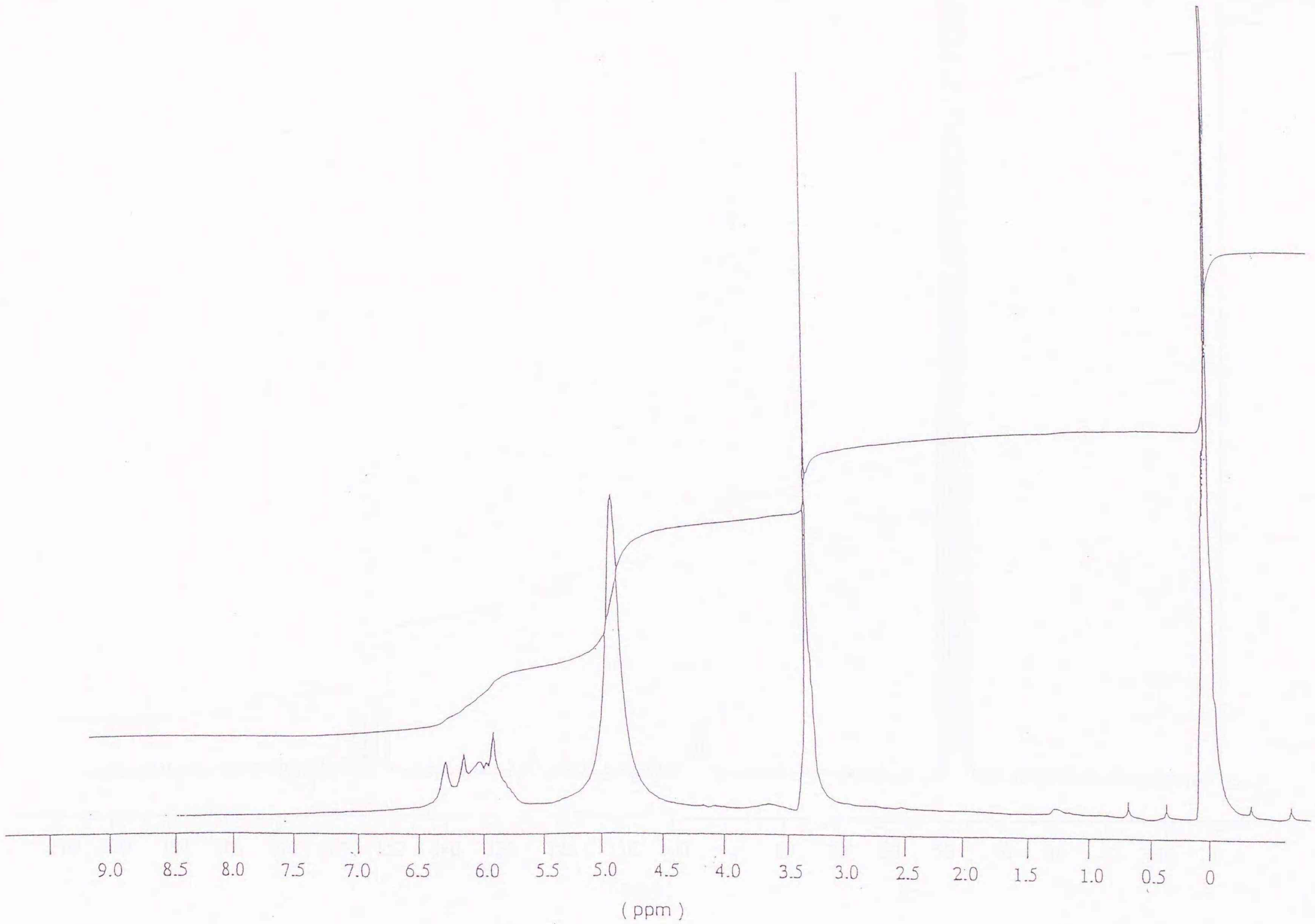


Fig. 36. ^{1}H-NMR spectrum of Fraction W-3.

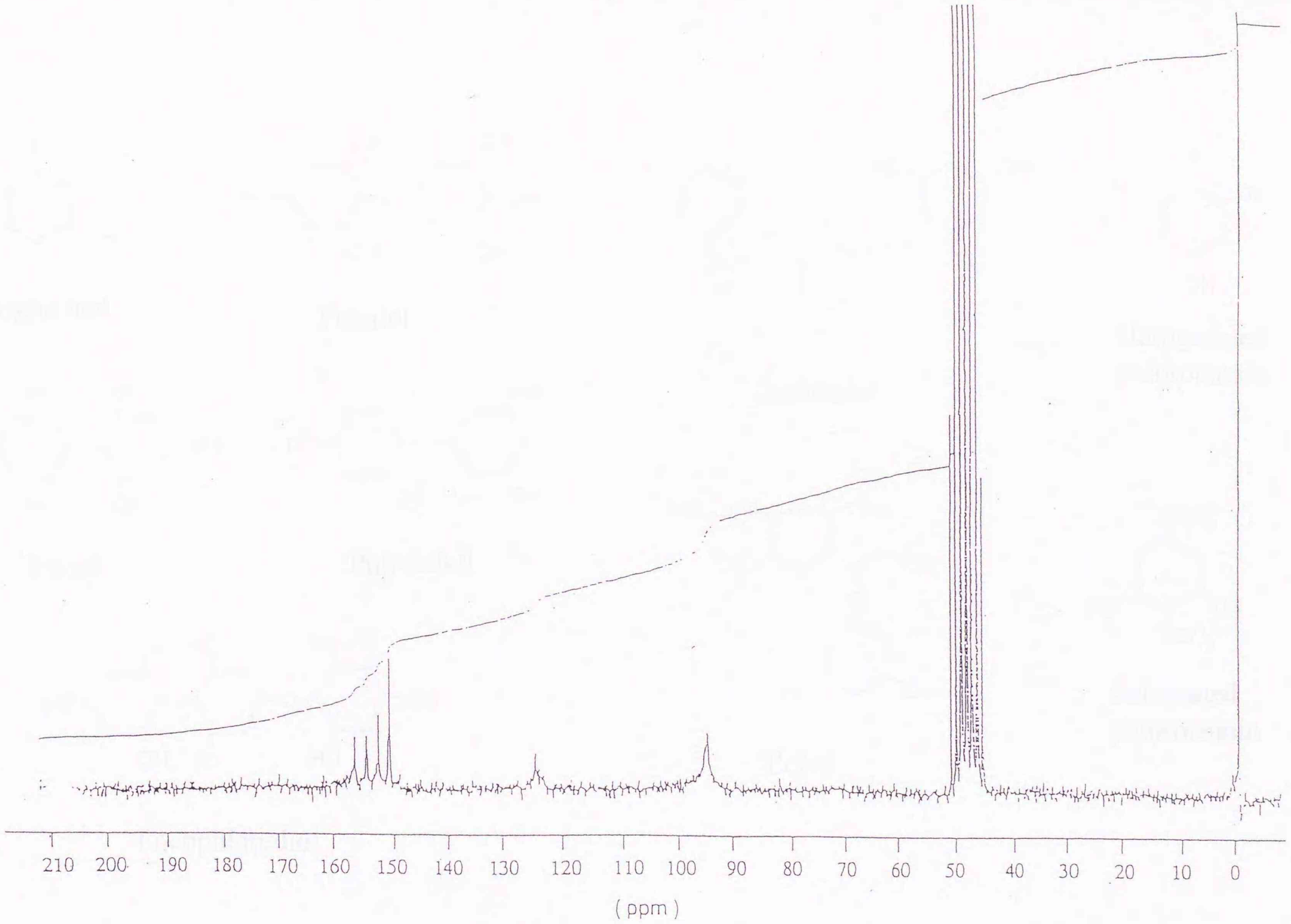
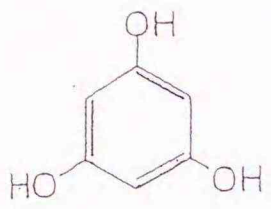
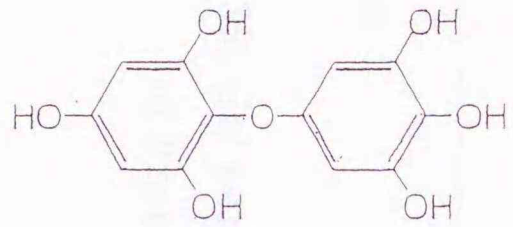


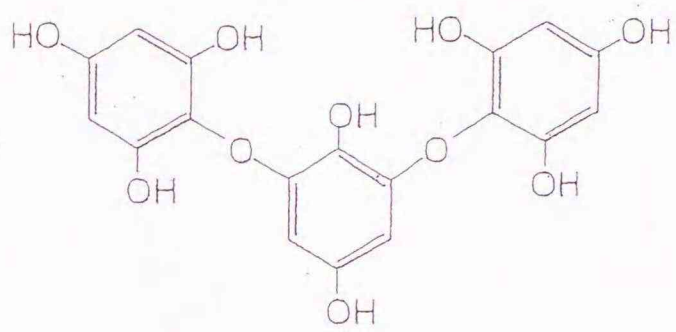
Fig. 37. ^{13}C-NMR spectrum of Fraction W-3.



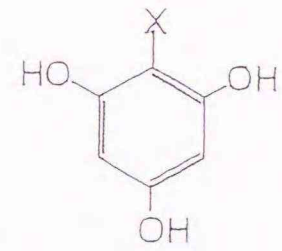
Phloroglucinol



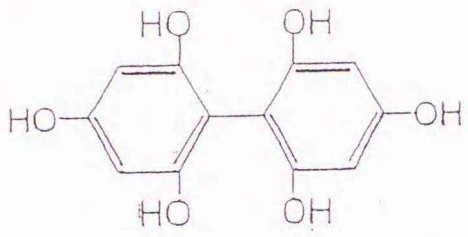
Fuhalol



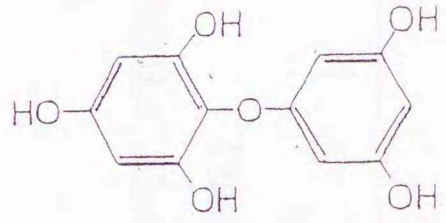
Isofuhalol



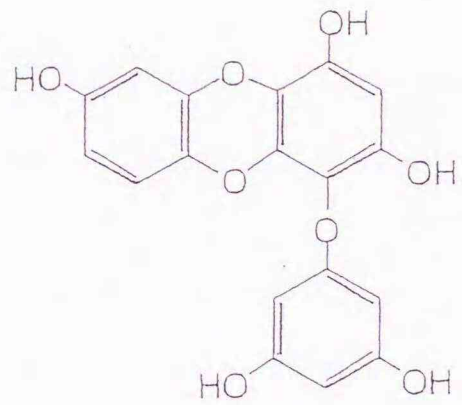
Halogenated phlorotannin



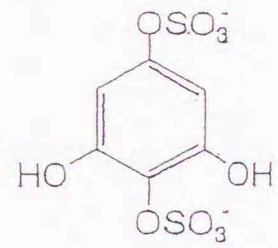
Fucol



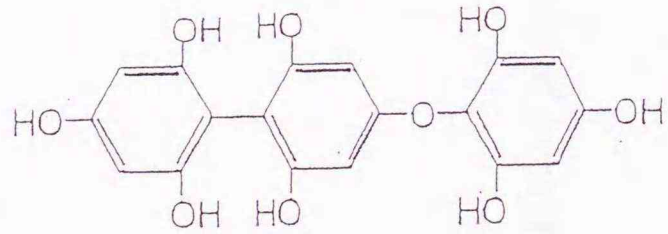
Phlorethol



Eckol



Sulfonated phlorotannin



Fucophlorethol

Fig. 38. Structures of typical phlorotannin .

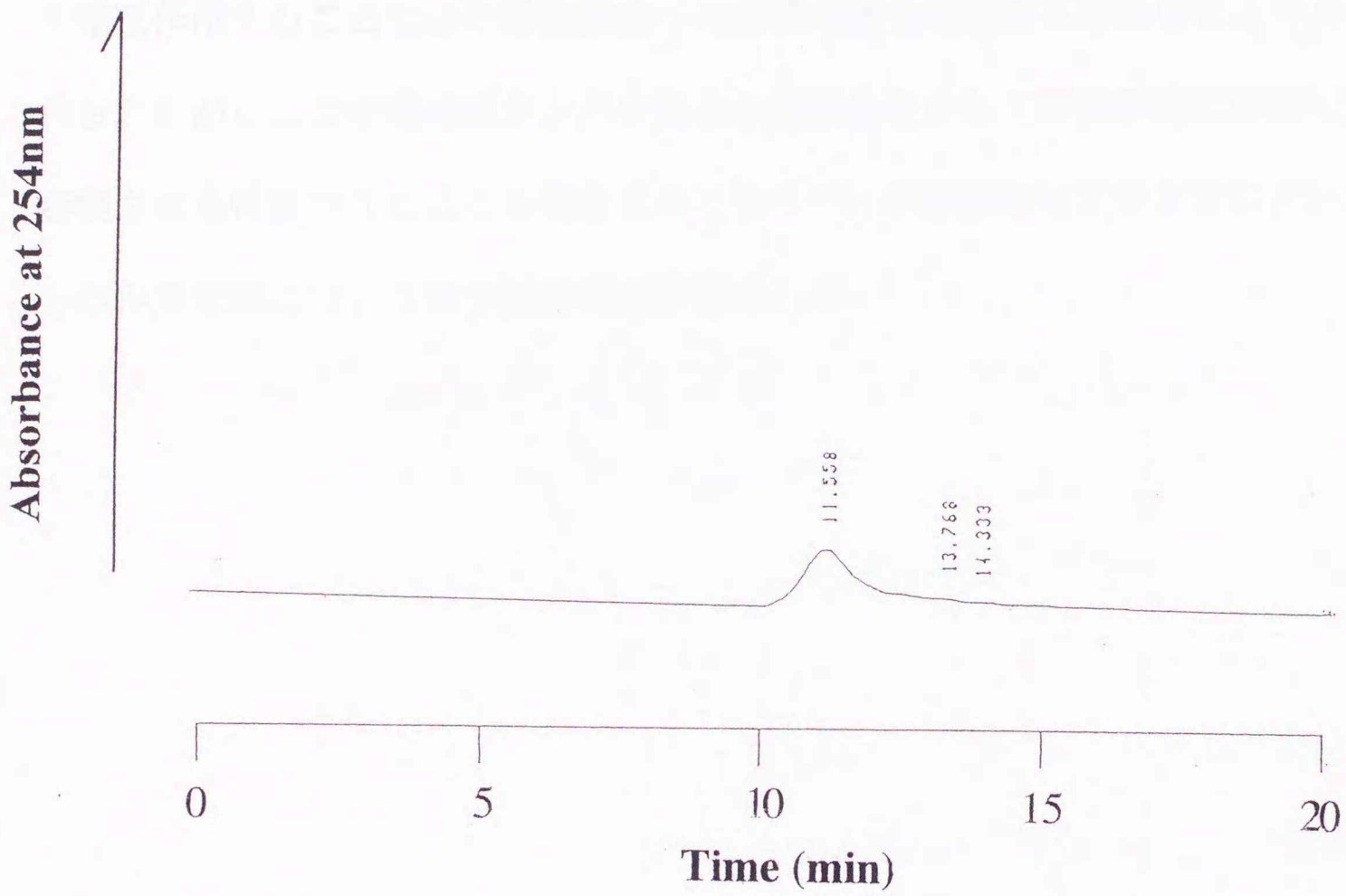


Fig. 39. Gel permeation HPLC chromatogram of acetylated component of Fraction W-3.

3の主成分は炭素53.74 %、水素4.25 %、硫黄0.30 %未満であることから、硫酸化されていないことが明らかとなった。以上の結果から、エゾイシゲに存在するα-グルコシダーゼ阻害成分のうち画分W-3に含まれる成分は分子量約14,000を示すフロロタンニンであることが明らかとなった。フロロタンニンはポリフェノールの1種であり、本成分の阻害作用はα-グルコシダーゼと水酸基を介して相互作用することにより活性部位への基質の結合が阻害されるものと考えられる。しかし、この成分はタンパク質と水素結合を介して非共有的に結合して凝集させる性質があることも報告されており[79]、本酵素に対するフロロタンニンの作用機構については今後の研究が望まれる。

第5節　エゾイシゲ画分W-3のα-グルコシダーゼ阻害活性と血糖上昇抑制作用

本節では、エゾイシゲから精製した画分W-3（フロロタンニン）のα-グルコシダーゼ阻害活性とラット糖負荷試験による血糖上昇抑制作用を検討した。エゾイシゲから精製した画分W-3とフロロタンニンの基本骨格構造体であるフロログルシノールのマルターゼおよびスクラーゼ阻害活性（IC_{50}）を測定した結果、画分W-3はマルターゼ活性に対して0.48 mg/ml、スクラーゼ活性に対して1.65 mg/mlであり、一方、フロログルシノールはマルターゼ活性に対して1.95 mg/ml、スクラーゼ活性に対しては0.30 mg/mlであった。また、その効果はいずれも濃度依存的であった（Fig. 40）。これらの結果から阻害活性にフェノール構造が重要な役割を果たしていると推定された。

次に、画分W-3の経口投与によるラットの血糖値の変化について測定した結果をFig. 41に示す。スクロースを単独で投与した対照群では、投与後血糖値は急激に上昇したが、画分W-3を混合した投与群では、10分後の血糖値は対照群のそれと比較して抑制された。しかし、30分以後では、血糖値の上昇抑制作用は認められなかった。このことから、画分W-3は短時間でのみ有意に血糖上昇抑制作用を示すことが明らかとなった。第3節で行った実験では未精製物を経口投与した際、30分以上も血糖値の上昇抑制作用が認められたが、精製した画分W-3を投与した場合では同様の効果が認められなかった。これは未精製物では阻害物質である画分W-3が、共存する他の成分に保護されながら消化過程を経て小腸に達するため、活性に持続性を示すものと考えられたが、精製したものでは小腸に達する前に生体内の他のタンパク質と相互作用してしまい、小腸

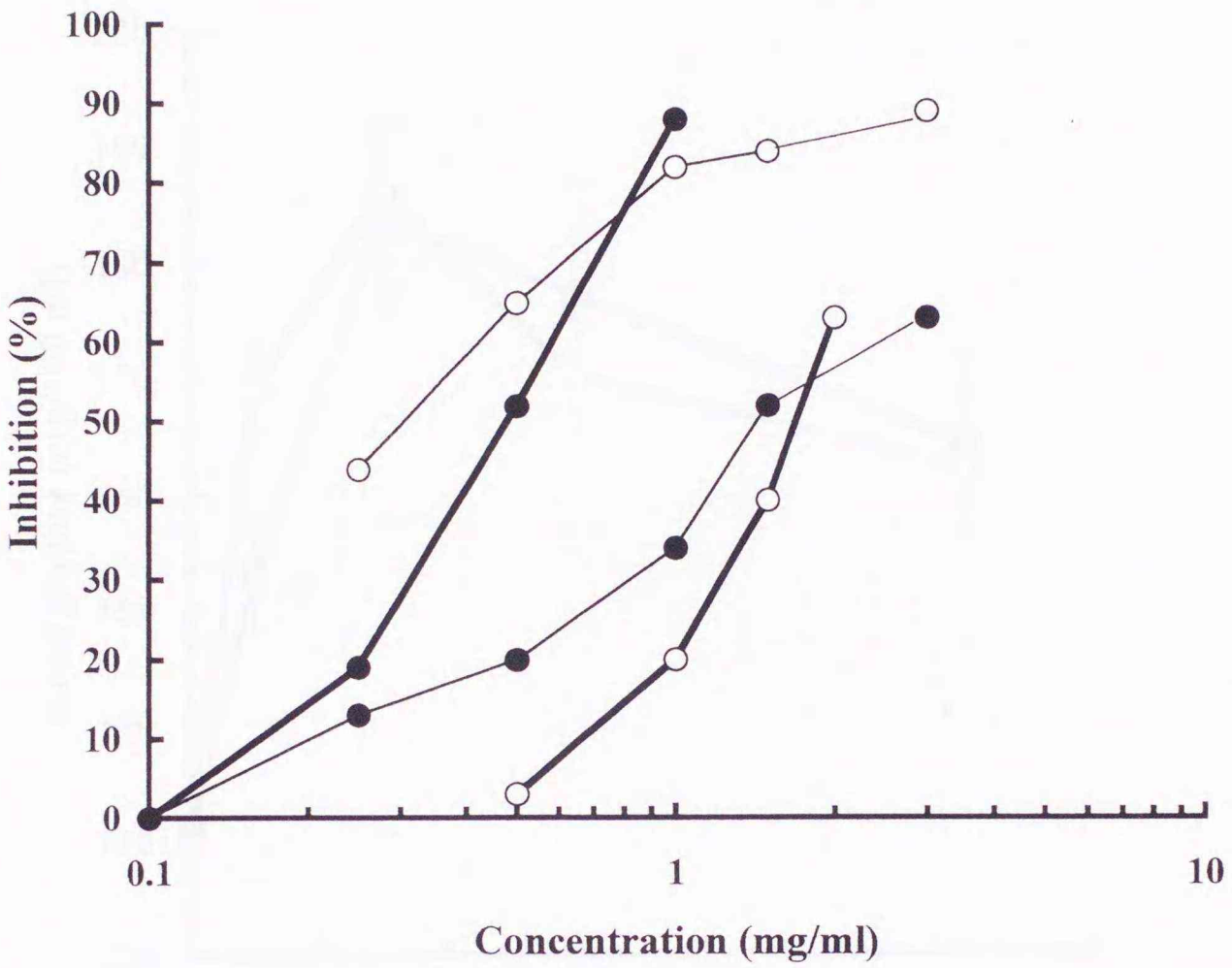


Fig. 40. Inhibitory activity of Fraction W-3 and authentic phloroglucinol against rat intestinal α -glucosidase activity.

—●— Fraction W-3 against maltase-activity

—○— Fraction W-3 against sucrase-activity

—●— Phloroglucinol against maltase-activity

—○— Phloroglucinol against sucrase-activity

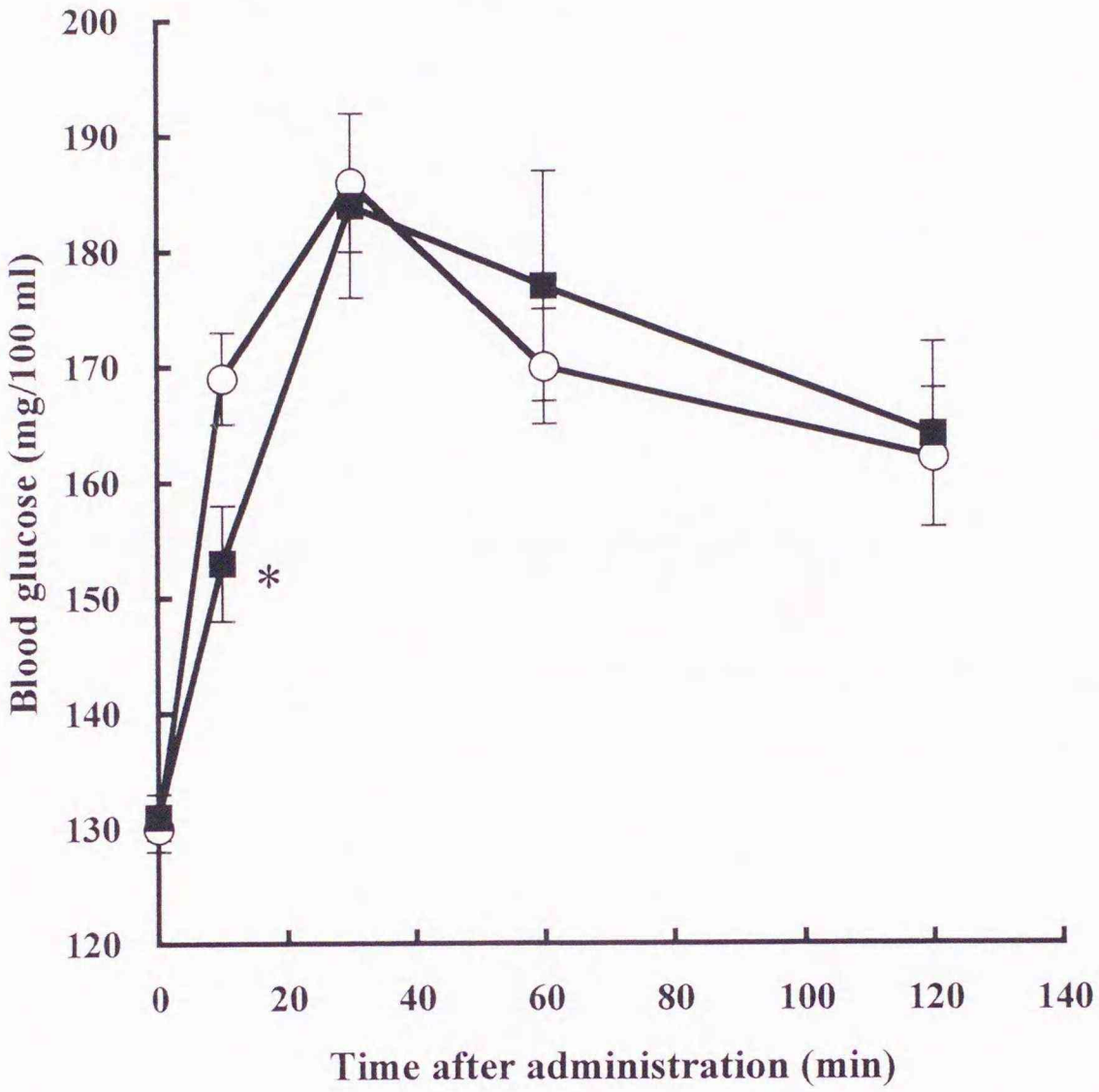


Fig. 41. Effect of Fraction W-3 on blood glucose levels after administration to rats.

Rats were administered 500 mg sucrose and 300 mg Fraction W-3 per kg of body weight. Significant difference from glucose levels on the corresponding control, $*p < 0.05$. Bars represent standard deviations.

—○— **Sucrose** —■— **Sucrose + Fraction W-3**

におけるα-グルコシダーゼを持続的に阻害する必要量が到達しなかったものと考えられた。しかしながら、本研究の結果から画分W-3が生体内においてもα-グルコシダーゼを阻害し、血糖上昇抑制効果を有することが示唆され、本成分を含むエゾイシゲは糖尿病予防に役立つ食品素材の一つとして有効であると考えられる。

総合考察

本論文では、未利用水産動植物資源の高度利用を目的として機能性成分の探索を行い、活性成分の生理作用や化学的特性を解明するとともにそれらの化学構造や活性相関について論述した。

第1章では、未利用水産加工副産物に含まれるタンパク質に着目し、ACE阻害活性を指標として高血圧抑制ペプチドの検索を行った。また、高血圧のモデル動物である自然発症高血圧ラット（SHR）を用い、その生理効果についても研究を行った。さらに、高血圧抑制に関与するACE阻害ペプチドを単離し、構造決定を行った。

食品由来のペプチドに関しては、これまでにも多くの生理機能が見いだされており、カルシウム吸収促進、高血圧抑制および血中コレステロール低下などの作用が報告されている[78]。特に高血圧抑制ペプチドは、水産物の筋肉や内臓などのタンパク質中に潜在することが報告されており[28-35]、未利用水産タンパク質資源中にもこの様なペプチドが存在すれば機能性素材の原料として高度利用が期待できる。そこで本研究では、北海道における重要な水産資源であるシ

ロサケやホタテガイなどの未利用加工副産物のタンパク質からACE阻害ペプチドを探索するとともに、その一次構造や生体内での機能性を検討した。その結果、シロサケ頭部のプロテアーゼ消化物中に高いACE阻害活性を有する成分の存在を見出した。消化に用いたプロテアーゼの中では、特にビオプラーゼSP-10がACE阻害成分の産生に有効であった。一方、試験管内でACE阻害活性を示す成分が、必ずしも生体内で同等な活性を有するとは限らないことがこれまでの多くの例で示されている。従って、本研究で得たプロテアーゼ消化物をACE阻害活性を示す機能性食品として活用するためには、経口投与での生理活性の有効性を検討する必要がある[63]。なお、これまでに報告されている食品由来のACE阻害ペプチドは、臨床で用いられる医薬品のACE阻害剤と比較して活性は高くないが、SHRを用いた経口投与実験で、実際に降圧効果を示すペプチドが報告されている[63]。そこで、強いACE阻害活性を示したシロサケ頭部のプロテアーゼ消化物について、SHRに対する経口投与によって降圧作用の評価を行った。その結果、１回の経口投与によって少なくとも24時間以内で約23 mmHgの血圧降下作用が認められた。このことから、シロサケ頭部に含まれるタンパク

質中には高血圧抑制機能を持つペプチド相当領域が含まれ、プロテアーゼを作用させることによりそのペプチドを遊離できること、またその供給資源としてシロサケ頭部が有用であることが示された。さらに、シロサケ頭部プロテアーゼ分解物から各種クロマトグラフィーにより比較的高いACE阻害活性を有する２種類のペプチドを単離することが出来た。そのアミノ酸配列はGly-Ile-GlyとAsp-Trpであり、それらのペプチドのACE阻害能の強さを示すIC_{50}値は、それぞれ730μMおよび13μMであった。これらのペプチドについてデータベースによる検索を行った結果、Gly-Ile-Glyは新規ペプチドであることが明らかとなった。一方、Asp-Trpは新規ペプチドでは無かったが、ACE阻害活性を有することを見出した報告としては初めてのものである。Gly-Ile-GlyのACE阻害活性はこれまでに単離されているペプチドの阻害活性と比較して強いものでは無かったが、Asp-Trpのそれは強いものと言えた。ACE阻害ペプチドの構造と活性の相関については、Cheungら[81]が詳細に検討している。それによると、阻害ペプチドのC末端のアミノ酸残基がACEの活性部位への結合に重要であり、それがTrpである場合、最も高い結合性を示すとされている。したがって、本研究で単離し

たAsp-Trpが強い阻害活性をもつことは、Cheungらの結果[81]とほぼ一致するものである。ACE阻害活性を有するペプチドが、C末端がTrpであることは他にいくつかの報告がある。例えば、吉川らは卵白アルブミンおよび鶏肉のプロテアーゼ消化物から単離したACE阻害ペプチドが、Leu-TrpおよびIle-Lys-Trpの構造をもつことを明らかにし、それらはいずれも経口投与で血圧降下作用を有することを報告している[62]。

一般にペプチドは、生体内ではアミノ酸までに完全に分解されて吸収されるものと考えられているが、ジペプチドおよびトリペプチドには消化酵素に対する耐性があり、しかも容易に小腸内に吸収されると報告されている[82, 83]。また、吉川ら[84]は単離したACE阻害ペプチドのうち、経口摂取により生体内で血圧抑制作用を示すペプチドのほとんどがジペプチドおよびトリペプチドであることを報告している。本研究で単離した2種類のACE阻害ペプチドもジペプチドおよびトリペプチドであった。従って、これらのペプチドは消化されずに直接腸管内に吸収されて血圧抑制作用を示したと考えられた。

以上の様に、本研究の第1章においてシロサケ頭部をプロテアーゼで分解す

ることにより高血圧抑制機能を有する素材へ変換することが可能であることを明らかにした。この知見は、未利用水産タンパク質資源の新しい高度利用方法として活用が期待されている[85]。

第2章においては、シロサケ精巣組織の水抽出物中の抗酸化成分について抗酸化活性と反応特性について検討した。通常、生体組織中には水溶性の酸化促進物質と抗酸化物質の両方が含まれているが、本研究で検討したシロサケ精巣由来の水抽出物およびその高分子画分は、イワシのトリアシルグリセロール乳化物の自動酸化および鉄-アスコルビン酸触媒存在下における酸化反応に対し、酸化抑制効果を示さなかった。この理由として、水抽出物や高分子画分中には鉄を含むタンパク質[86]やリポキシゲナーゼ[87]などの酵素が含まれており、これらが原因となって脂質酸化が促進されたためと考えられた。なお、本研究中で示された過酸化物の減少については、脂質過酸化物の分解を触媒する鉄やヘムタンパク質の活性によるものか、あるいは高分子画分に存在するスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼといった抗酸化酵素の働きに依存するものと考えられる。

一方、低分子画分は自動酸化におけるTBA反応性の生成物および過酸化物の両方の生成を阻害したことから、抗酸化活性を有することが明らかとなった。低分子画分は鉄-アスコルビン酸やAAPHという酸化触媒の存在下での酸化反応に対しても抗酸化活性を示した。また、低分子画分にAMVNに対する抗酸化作用がほとんど認められないのは、この画分が水溶性成分であり、脂溶性のラジカルに対する親和性が低いものと考えられることから判断して当然のことと思われる。低分子画分は鉄-アスコルビン酸だけでなくAAPHの様な酸化促進剤の存在下でも抗酸化性を示すことから、その抗酸化作用が単純な金属イオンのキレート作用によるものではないことを示唆している。さらに、鉄-アスコルビン酸存在下における酸化において、低分子画分の抗酸化活性はpHによって変動したが、これは抗酸化成分が鉄あるいはアスコルビン酸と相互作用することにより抗酸化活性を変動させたためではないかと考えられる。

次に、低分子画分中に存在する抗酸化成分の同定を試みた。この画分の化学分析を行った結果、灰分は固形物重量の約30 %であり、有機物の濃度は約3.9 mg/mlであった。また、生体組織中には通常、カルノシン、アンセリン、ポリ

アミン、ヌクレオチド、アスコルビン酸や還元型グルタチオンなどの水溶性の抗酸化成分が存在するため[47, 49, 72, 73]、低分子画分中のこれらの成分の含量を分析した。その結果、低分子画分中には抗酸化成分であるスペルミン、プトレッシン、ヒポキサンチン、キサンチンおよび還元型グルタチオンが全有機物のおおよそ11％含まれていた。これらの化合物を単独で、または各成分をもとの組成に再構成した混合物としてその抗酸化活性を測定した結果、いずれの場合においてももとの低分子画分より低い活性を示した。従って、低分子画分には上記成分以外の抗酸化成分の存在が示唆された。そこで、さらにこの画分に存在する遊離アミノ酸に関して抗酸化活性を測定したところ、鉄-アスコルビン酸およびAAPH存在下の酸化モデルにおいて、抗酸化活性が認められた。また、ペプチドに関しては低分子画分を塩酸加水分解しても抗酸化性が低下しないことから、抗酸化性にペプチドは関与していないものと考えられた。一方、アミノ酸の抗酸化性については、従来から金属イオンとのキレート形成による酸化抑制作用が知られている[88]。特にチロシンはヒドロキシルラジカルスカベンジャーより強力な抗酸化作用を有することが報告されている[89]。これらのことから低

分子画分の抗酸化作用は、スペルミン、プトレッシン、ヒポキサンチン、キサンチンおよび還元型グルタチオンなどの抗酸化成分と抗酸化能を有する多種の遊離アミノ酸の相乗作用によって示されるものと考えられた。

以上の様に本研究では、シロサケ精巣組織から得られる水溶性抽出物の抗酸化活性と反応特性について解析した。水溶性抽出物中、特に低分子画分は食品製造で通常用いられるpH領域で酸化反応を抑制し、また水溶性であることから利用範囲が広く、効果的な抗酸化剤としての活用が可能である。さらに、シロサケ精巣組織から、限外ろ過のような簡単な処理で水溶性抗酸化成分を抽出精製することが可能なため、製造コストや効率性の点においても優れた機能性原料と考えられる[90]。

第3章では、北海道沿岸に分布する未利用の海藻からα-グルコシダーゼ阻害能をもつ糖尿病予防食品素材の探索を行った。これまでにもα-グルコシダーゼ阻害活性をもつ食品素材について報告されているが[54-57]、そのほとんどが酵母由来のα-グルコシダーゼに対する阻害活性により評価されている。しかし、実際の生体内での生理作用が期待できる機能性素材を探索するには、*in vitro*の実

験系においても*in vivo*の生理機能を考慮した実験を行う必要がある。そこで本研究では、1次スクリーニングとして従来通り酵母由来のα-グルコシダーゼを用いたが、得られた活性成分についてはさらにラット小腸由来α-グルコシダーゼを用いて再評価を行った。その結果、エゾイシゲの70％メタノール抽出物中に酵母由来のα-グルコシダーゼおよびラット小腸由来のα-グルコシダーゼのいずれに対しても強い阻害活性を示す成分の存在を明らかにした。そこで次に、実際の生体内での生理機能を検証するためにラットに対する経口投与により糖負荷試験を行った。その結果、エゾイシゲ抽出物は経口投与後30分以上にわたって血糖の上昇を有意に抑制することが明らかとなった。このことから、エゾイシゲ抽出物は小腸内でα-グルコシダーゼ活性を阻害することによって食後高血糖の上昇を抑制したものと推定された。一般的に糖尿病においては、食後高血糖が長時間持続することが合併症の発症の原因となることから、その是正が重要と考えられている。したがって、食後高血糖の抑制作用をもつエゾイシゲ抽出物は糖尿病予防や糖尿病の症状改善に有効と考えられ、またエネルギー過剰摂取による肥満防止にも役立つ機能性食品素材になりうると考えられ

た。さらに、本研究ではエゾイシゲのα-グルコシダーゼ阻害成分の精製と構造解析についても検討を行った。すなわち、エゾイシゲ抽出物を各種クロマトグラフィーにより精製分離した結果、分子量14,000の主活性成分を得ることができた。さらにNMR分析により、この成分が高分子フロロタンニンであることを明らかにできた。フロロタンニンおよびその誘導体は海藻の生体防御物質の一つとして知られており[91]、これまでに80種類以上が同定されている。フロロタンニンの生理活性として、これまでに抗菌作用、抗酸化作用およびプロテアーゼ阻害作用などが報告されている[76]が、本研究で示した様なα-グルコシダーゼ阻害活性に関しては、報告例がない。フロロタンニンの作用機構には、タンパク質と水素結合を介して非共有的に結合することが報告されており[79]、α-グルコシダーゼに対する作用もフロロタンニンの結合による活性部位の遮蔽作用や会合体形成による酵素の立体構造変化が原因となり、活性部位への基質の結合が阻害されるものと考えられる。また、フロロタンニンとα-グルコシドのポリオールとしての類似性により基質結合性が影響を受けた可能性も推察される。一方、褐藻類のフロロタンニンには構成単位成分であるフロログルシノー

ルの重合度の違いによって分子量が約1万から約65万のものまで幅広い分子種が存在することが報告されている[92]が、α-グルコシダーゼに対する阻害活性の強さとフロロタンニンの分子量との関連はさらに検討が必要であろう。また、フロロタンニンの経口投与による血糖上昇抑制作用は投与10分後までは有意に認められたが、その後抑制効果は消失した。これはフロロタンニンが消化器官内の他のタンパク質とも相互作用したため、小腸上皮上のα-グルコシダーゼを阻害するための必要量が不足したとも考えられるが現在のところ不明である。

本研究の結果から、未利用海藻であるエゾイシゲに糖尿病や肥満予防に役立つと考えられるα-グルコシダーゼ阻害成分が存在し、それがフロロタンニンの１種であることが明らかになった。また、その抽出物は粗製物でも有意に生理機能を発現することから、実用上も優れた機能性食品素材であると考えられた。

以上、本論文は北海道における未利用水産動植物資源から新しい機能性成分の存在を見出し、それらの生理活性や機能特性、さらに活性成分の構造について明らかにしたものである。本論文で示した研究成果は水産加工副産物や未利

用海藻資源に関する新しい基礎的知見であり、食品産業における廃棄物処理問題や資源の有効利用の観点からも重要な情報を与えるものと考えられる。さらに、未利用水産動植物資源中に含まれる機能性成分は機能性食品としての利用だけでなく、医薬品へのリード物質としても役立つものと考えられ、より精密で高度な産業への展開も期待できると考えている。

要約

本論文では、未利用動植物水産資源の高度利用を目的として高血圧抑制、抗酸化および血糖上昇抑制に関与する成分に着目してそれらの機能性を検討し、さらに機能性成分の単離精製を行い、構造決定や活性相関について研究を行った。以下に本研究の成果を要約した。

A. 未利用水産加工副産物からのACE阻害ペプチドの探索と高血圧抑制作用

（1）シロサケおよびホタテガイの頭部や内臓組織のプロテアーゼ消化物はACE阻害活性を示したが、中でもシロサケ頭部のビオプラーゼSP-10の消化物が最も強い活性を示した。

（2）シロサケ頭部のビオプラーゼSP-10消化物のうち、分子量1万以下のペプチド画分（HP-fraction）は自然発症高血圧ラットへの経口投与により、約23 mmHgの血圧降下作用が認められた。

（3）HP-fractionから IC_{50} 値が730 μ Mと13 μ Mの2種のACE阻害ペプチド、すなわちGly-Ile-GlyとAsp-Trpを単離した。Asp-Trpは既知の食品由来のペプチドの

中でも強い活性を有するペプチドであった。

（4）単離したペプチドの阻害様式は、Gly-Ile-Glyは拮抗阻害、Asp-Trpは非拮抗阻害であった。

B.　シロサケ精巣組織の抗酸化活性とその特性

（1）シロサケ精巣の水抽出物中の低分子画分は自動酸化、鉄-アスコルビン酸およびAAPH存在下の酸化に対して抗酸化活性を示した。

（2）低分子画分の抗酸化活性は、スペルミン、プトレッシンなどのポリアミン、ヒポキサンチンやキサンチンなどの塩基、グルタチオンなどの抗酸化成分や抗酸化性のアミノ酸に依存していた。

（3）低分子画分中のアミノ酸は鉄-アスコルビン酸存在下の酸化に対して、またチロシン、ヒスチジンおよびアルギニンは、AAPH存在下の酸化に対して抗酸化活性を示した。

C.　未利用海藻からのα-グルコシダーゼ阻害成分の探索と血糖上昇抑制作用

（1）未利用海藻6種のうち、エゾイシゲおよびアラメの抽出物から酵母由来のα-グルコシダーゼの阻害活性を見出した。特にエゾイシゲ抽出物の70%メタノール抽出物は、強い阻害活性を示した。

（2）このエゾイシゲ抽出物は、ラット小腸由来α-グルコシダーゼのマルターゼ活性およびスクラーゼ活性に対してIC_{50}値がそれぞれ2.8mg/mlおよび2.2mg/mlの阻害活性を示した。

（3）この抽出物はラットへの経口投与により、投与後30分まで血糖上昇抑制作用が認められた。

（4）この抽出物から単離したラット小腸由来のα-グルコシダーゼ阻害成分は、分子量14,000のフロロタンニンと同定された。

（5）フロロタンニンを投与したラット群では、投与後10分まで有意に血糖上昇が抑制されたが、その後は抑制作用が消失した。これは、フロロタンニンが小腸に達する前に他の生体内のタンパク質と相互作用し、α-グルコシダーゼを阻害する必要濃度に達しなかったためと考えられた。

参考文献

(1) 北海道水産林務部企画調整課編 : 北海道水産業のすがた, 北海道水産林務部, 札幌, 1998, pp. 357-365.

(2) 矢沢一良・影山治夫 : 油化学, 40, 974-976 (1991).

(3) 矢沢一良 : ニューフードインダストリー, 34, 37-39 (1992).

(4) 佐々木茂文・太田智樹 : 北海道立食品加工研究センター研究報告, 1, 5-8 (1994).

(5) 高井光男 : 日本農芸化学会誌, 72, 21-23 (1998).

(6) 太田智樹 : 日本農芸化学会誌, 72, 18-20 (1998).

(7) 上野川修一 : 化学と工業, 41, 1110-1111 (1988).

(8) M.Yamazaki and T. Nishimura : *Biosci. Biotech. Biochem*., 56, 150-154 (1992).

(9) 鈴木史郎 : 日本農芸化学会誌 , 62, 59-61 (1988).

(10) M. Mizuno : *Biotherapy*, 5, 611-613 (1991).

(11) 栄田努・日高弘 : ジャパンフードサイエンス, 12, 56-63 (1988).

(12) 千葉英雄・吉川正明 : 食品起源の潜在的機能性ペプチド, 食品の生体調節

機能, 初版, 千葉英雄編, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 5-14.

(13) 水柿道直・菱沼隆則・石橋正兀 : エイコサペンタエン酸誘導体の構造と生物活性との相関 -栄養学的意義の再検討- , 食品の生体調節機能, 初版, 千葉英雄編, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 102-111.

(14) G. Oshima, H. Shimabukuro, and K. Nagasawa : *Biochim. Biophys. Acta*, 566, 128-137 (1979).

(15) 丸山進 : *Bioscience and Industry*, 47, 1182-1186 (1989).

(16) K. Suetsuna, C. Jiun-Rong, and F. Shimizu : *Clin. Rev*., 25, 4349-4355 (1991).

(17) 末綱邦男 : 基礎と臨床, 25, 2245-2261 (1991).

(18) A. Yashiro, S. Oda, and M. Sugano : *J. Nutr*., 115, 1325-1336 (1985).

(19) B. D. Korant, J. Brzin, and V. Turk : *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 127, 1072-1075 (1985).

(20) R. L. Soffer : *Annu. Rev. Biochem*., 45, 73-94 (1976).

(21) 大澤俊彦 : シリーズ＜食品の科学＞ ゴマの科学, 初版, 並木満・小林貞作編, 朝倉書店, 東京, 1981, pp. 168-179.

(22) C. S. Foote : *Free radical in Biology*, vol 1-II, ed. by W. A. Pryor, Academic press, New York, 1976, pp. 117-120.

(23) Y. S. Lee, T. Noguchi, and H. Naito : *Br. J. Nutr*., 49, 67-76 (1983).

(24) 村上和雄 : 高血圧の分子生物学と発症機構, 高血圧 -分子メカニズムから病態・診断・治療まで- , 初版, 藤田敏郎編, 羊土社, 東京, 1995, pp. 12-13.

(25) T. W. Kurtz : *Nature*, 359, 588-589 (1992).

(26) M. A. Ondetti, R. Rubin, and D. W. Cushman : *Science*, 196, 441-443 (1977).

(27) M. Fujii, N. Matsuura, K. Mito, T. Shimizu, M. Kuwahara, S. Sugino, and H. Karaki : *Biosci. Biotech. Biochem*., 57, 2186-2188 (1993).

(28) K. Yokoyama, H. Chiba, and M. Yoshikawa : *Biosci. Biotech. Biochem*., 56, 1541-1545 (1992).

(29) 末綱邦男・筴島克裕 : 日本水産学会誌, 52, 1981-1984 (1986).

(30) 河村幸雄・ 杉本敏男・ 高根俊一・佐竹幹雄 : 微量栄養素研究, 6, 117-121 (1989).

(31) T. Matsui, H. Matsufuji, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, and K. Osajima :

Biosci. Biotech. Biochem., 57, 922-925 (1993).

(32) 杉山圭吉・高田康二・江川真・山本郁雄・恩塚博・大場健吉 : 日本農芸化学会誌, 65, 35-43 (1991).

(33) Y. Kawamura, T. Takane, M. Satake, and T. Sugimoto : *J. Agric. Res. Quat.*, 26, 211-214 (1992).

(34) Y. Kohama, S. Matsumoto, H. Oka, T. Teramoto, M. Okabe, and T. Mimura : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332-337 (1988).

(35) Y. Kohama, H. Oka, Y. Kayamori, K. Tsujioka, T. Mimura, Y. Nagase, and M. Satake : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2169-2170 (1991).

(36) M. Maruyama and H. Suzuki : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1393- 1394 (1982).

(37) S. Maruyama, K. Nakagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki : *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405-1409 (1985).

(38) S. Maruyama, H. Mitachi, J. Awaya, M. Kurono, N. Tomizuka, and H. Suzuki : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2557-2561 (1987).

(39) S. Maruyama, S. Miyoshi, T. Kaneko, and H. Tanaka : *Agric. Biol. Chem.*, 53,

1077-1081 (1989).

(40) S. Miyoshi, H. Ishikawa, T. Kaneko, F. Fukui, H. Tanaka, and S. Maruyama : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1407- 1408 (1991).

(41) E. Kinoshita, J. Yamakoshi, and M. Ikuchi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1107-1110 (1990).

(42) 斉藤義幸・中村圭子・川戸章嗣・今安聰 : 日本農芸化学会誌, 66, 1081-1087 (1992).

(43) 芦田優子・斉藤義幸・川戸章嗣・今安聰 : 日本農芸化学会誌, 66, 1233-1240 (1992).

(44) Y. Saito, K. Wanezaki (Nakamura), A. Kawamoto, and S. Imayasu : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 812-816 (1994).

(45) Y. Saito, K. Wanezaki (Nakamura), A. Kawamoto, and S. Imayasu : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1767-1771 (1994).

(46) F. Lucesoli and C. G. Fraga : *Arch. Biochem. Biophys.*, 316, 567- 571 (1995).

(47) S. Matsushita, F. Ibuki, and A. Aoki : *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 446-451

(1963).

(48) E. A. Decker and A. D. Crum : *J. Food Sci.*, 56, 1179- 1181 (1991).

(49) J. Kanner, J. B. German, and J. E. Kinsella : *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 25, 317-364 (1987).

(50) E. Lovaas : *JAOCS.*, 68, 353-358 (1991).

(51) W. W. Nawar : *Food Chemistry*, 2nd ed., ed by O. Fennema, Marcel Decker, New York, 1985, pp. 202-220.

(52) G. Droplet, E. B. Dumbroff, R. L. Legge, and J. E. Thompson : *Phytochemistry*, 25, 367-371 (1986).

(53) B. Tadolini : *Biochem. J.*, 249, 33-36 (1988).

(54) T. Matsui, C. Yoshimoto, K. Osajima, T. Oki, and Y. Osajima : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 2019-2022 (1996).

(55) 栗原秀幸・斉木智子・ 羽田野六男 : 日本水産学会誌, 63, 634-635 (1997).

(56) J. Watanabe, J. Kawabata, H. Kurihara, and R. Niki : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 177-178 (1997).

(57) 三浦理代・五代紀春 : 日本食品科学工学会誌, 43, 157-163 (1996).

(58) 望月健太郎 : α-グルコシダーゼ阻害剤, 糖尿病 -分子メカニズムから病態・診断・治療まで-, 初版, 門脇 孝・河盛隆造・渥美義仁編, 羊土社, 東京, 1995, pp. 112-113.

(59) D. W. Cushman and H. S. Cheung : *Biochem. Pharm.*, 20, 1637-1648 (1971).

(60) 石川馨・久米均・藤森利美 : 化学者および化学技術者のための統計的方法第 2 版, 東京化学同人, 東京, 1990, pp. 15-45.

(61) 杉山圭吉・高田康二・江川　真・山本郁雄・恩塚　博・大場健吉 : 日本農芸化学会誌, 65, 1, 35-43 (1991).

(62) 吉川正明 : 化学と生物, 31, 342-346 (1993).

(63) 日本食品科学工学会・新食品分析法編集委員会編 : 新食品分析法, 初版, 光琳, 東京, 1992, pp. 6-9.

(64) 桑野和民・酒巻千波・三田村敏男 : 日本農芸化学会誌, 61, 53-55 (1987).

(65) E.A. Decker and H. Faraji : *JAOCS.*, 67, 650-652 (1990).

(66) T. Takagi, T. Ishizawa, and T. Iida : *J. Japan. Oil Chem. Soc.*, 28, 548-551 (1979).

(67) R. E. McDonald and H. O. Hultin : *J. Food Sci.*, 52, 15-21,27 (1987).

(68) R. Inatani, N. Nakatani, and H. Fuwa : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 521-528 (1987).

(69) E. Niki : Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxylradicals, *Methods in Enzymology*, vol. 186, ed. by L. Packer and A. N. Glazer, Academic press, New York, 1990, pp. 100-108, .

(70) F. Tietze : *Anal. Biochem.*, 27, 502-522 (1969).

(71) M. Tsuchimoto, T. Misima, T. Utsugi, S. Kitajima, S. Yada, and M. Yasuda : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 1363-1369 (1985).

(72) G. C. Yen and C. L. Hsieh : *J. Food Sci.*, 56, 158-160 (1991).

(73) W. K. M. Chan, E. A. Decker, C. K. Chow, and G. Boissonneault : *Lipids*, 29, 461-466 (1994).

(74) H. Yamanaka, K. Shimakura, K. Shiomi, T. Kikuchi, H. Iida, and K. Nakamura : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 2041-2044 (1987).

(75) 浅野敏彦・吉村康美・櫟田清彦 : 日本栄養・食糧学会誌, 3, 157-162 (1996).

(76) J. L. Stern, A. E. Hagerman, P.D. Steinberg, F. C. Winter, and J.A. Estes : *J. Chem. Ecol.*, 22, 1273-1293 (1996).

(77) 泉美治・小川雅弥・加藤俊二・塩川二郎・芝哲夫 : 機器分析のてびき2, 増補改訂版, 化学同人, 京都, 1991, pp. 13-18.

(78) 伊藤啓二・宮沢啓輔 : ＜新水産学全集＞ 水産利用化学, 初版, 鴻巣章二・橋本周久編, 恒星社厚生閣, 東京, 1992, pp. 386-388.

(79) J. L. Stern, A. E. Hagerman, P.D. Steinberg, and P. K. Mason : *J. Chem. Ecol.*, 22, 1877-1899 (1996).

(80) 千葉英雄・荒井健一 : 化学と生物, 26, 34-39 (1988).

(81) H. S. Cheung, F. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, and D. W. Cushman : *J. Biol. Chem.*, 255, 401-407 (1980).

(82) I. L. Craft, D. Geddes, C. W. Hyde, I. J. Wise, and D. M. Matthews : *Gut.*, 9, 425-428 (1968).

(83) S. A. Adibi and E. Phillips : *Clin. Res.*, 17, 376-379 (1969).

(84) 吉川正明 : 食品タンパク質から派生する生理活性ペプチド -その多様性と機

能性食品素材としての可能性-, 機能性食品の研究, 荒井綜一編, 初版, 学会出版センター, 東京, 1995, pp. 99-104.

(85) T. Ohta, A. Iwashita, S. Sasaki, and Y. Kawamura : *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.*, 3, 339-343 (1997).

(86) E. A. Decker and H. O. Hultin : *Lipid Oxidation in Muscle Foods via Redox Iron*, ACS Symposium Series 500, ed. by A. J. Angelo, American Chemical Society, Washington DC, 1992, pp. 294-298.

(87) J. B. German and J. E. Kinsella : *J. Agric. Food Chem.*, 33, 680-683 (1985).

(88) M. Y. Jung, S. K. Kim, and S.Y. Kim : *Food Chemistry*, 53, 397-403 (1995).

(89) D. U. Ahn, F. H. Wolfe, and J. S. Sim : *Poultry Science*, 72, 1972-1980 (1993).

(90) S. Sasaki, T. Ohta, and E. A. Decker : *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1682-1686 (1996).

(91) 谷口和也・蔵田一哉・鈴木稔 : 化学と生物, 32, 434 - 442 (1994).

(92) M. A. Ragan : *Can. J. Chem.*, 63, 294 - 303 (1985).

謝辞

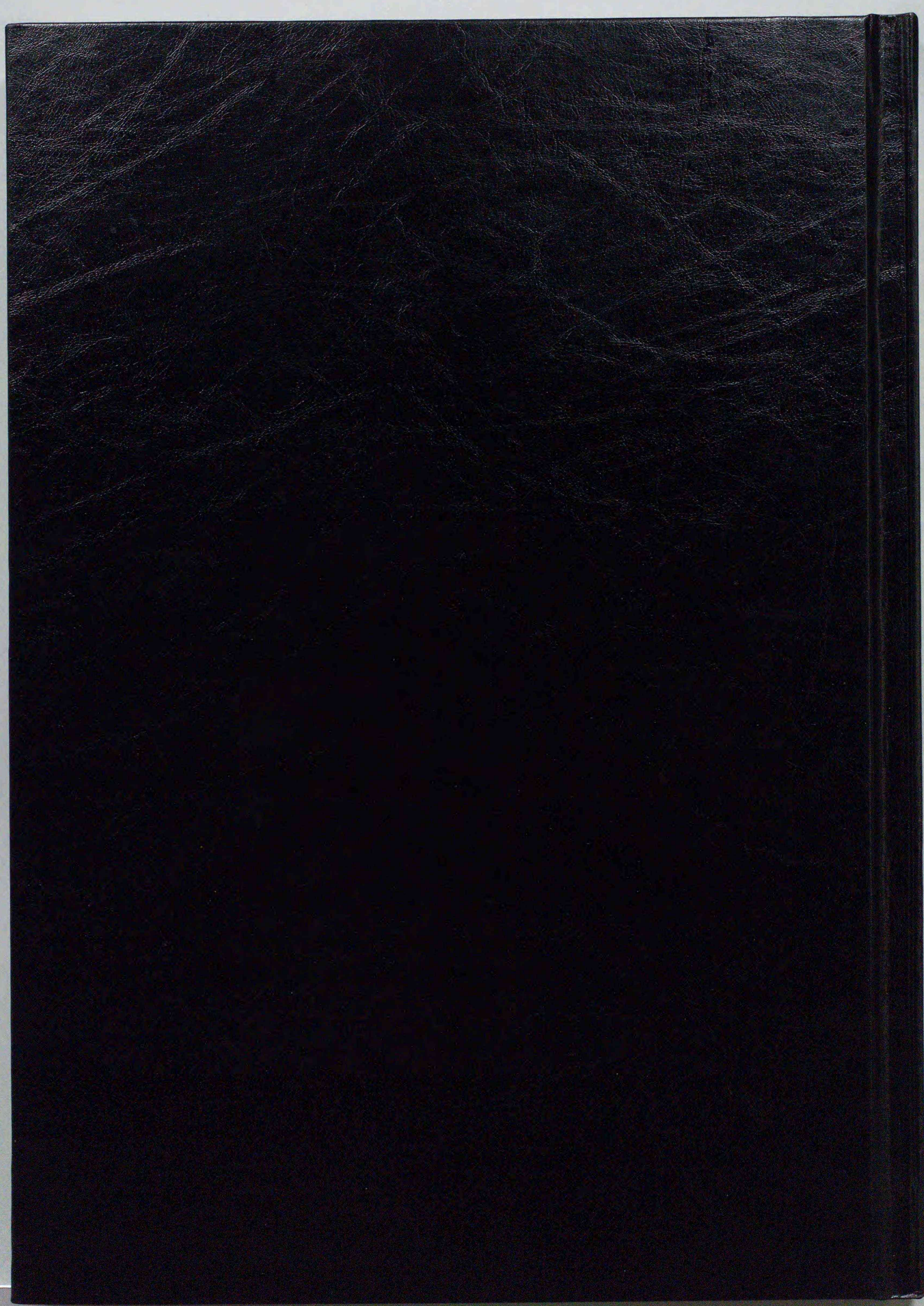
北海道大学大学院水産科学研究科教授　西田清義先生には、本論文に関し、御懇篤な御指導、御高配を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

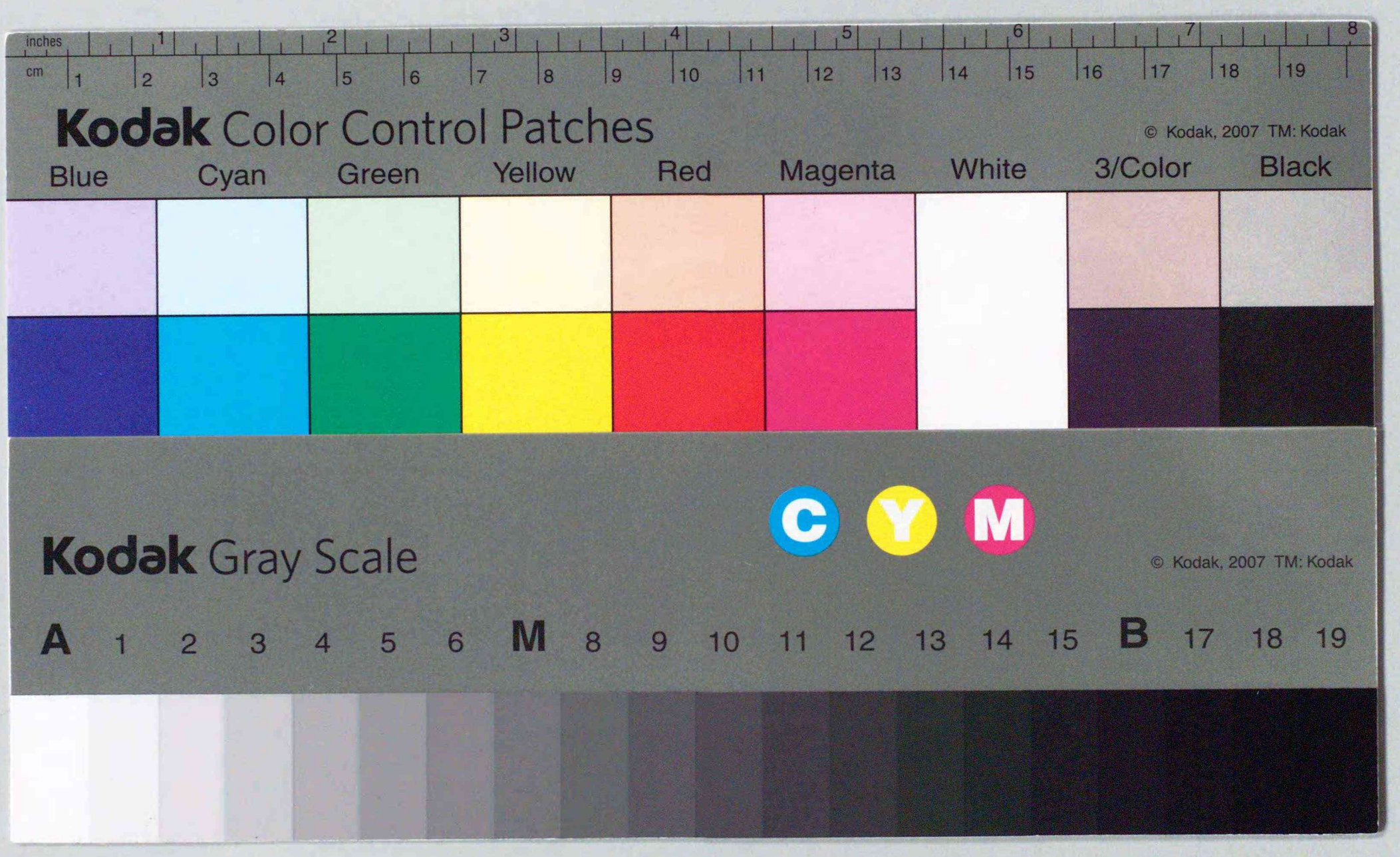
また、本論文を作成するにあたり貴重な御助言と御校閲を賜りました北海道大学大学院水産科学研究科教授　関伸夫先生、同教授　林賢治先生、同助教授　尾島孝男先生、同助教授　栗原秀幸先生に感謝申し上げます。

本研究の機会を与えられた北海道立食品加工研究センター前所長　中井和夫氏、適切な御指導と御鞭撻を賜った同副所長　清水條資氏に深謝申し上げます。

また、本研究の推進にあたり御指導、御助言を戴きました北海道立食品加工研究センター加工食品部　前部長　浅野行蔵博士、同部前主任研究員　西田孟氏ならびに同部主任研究員　大堀忠志氏に深謝申し上げます。

実験に御協力と御指導戴きました北海道大学大学院水産科学研究科助教授　栗原秀幸先生、マサチューセッツ州立大学準教授　Eric A. Decker 先生ならびに北海道立食品加工研究センター研究員　佐々木茂文博士に深く感謝申し上げます。また、動物実験を行うにあたり、御協力を戴いた農林水産省食品総合研究所蛋白質研究室長　河村幸雄先生、北海道立食品加工研究センター研究員　岩下敦子氏ならびに株式会社新薬開発研究所　山崎則之氏に深く感謝申し上げます。




inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A
M
B