

[研究報告]

サケ及びサケを原料とした魚醬からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの分離

小 浜 恵 子*、高 橋 亨*、大 澤 純 也*

Preparation and Separation of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Salmon

KOHAMA Keiko*, TAKAHASHI Touru*, OHSAWA Junya*

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) is an exopeptidase related to the blood pressure control system. The enzyme converts in active decapeptide angiotensin I to potent vasoconstrictive octapeptide angiotensin II and also degrades vasodepressive nonapeptide bradykinin. It has become known specific ACE inhibitors reduce blood pressure. Salmon meat protein was hydrolyzed with protease, and the hydrolyzate tested for inhibitory activity against ACE. When pepsin, trypsin, chymotrypsin was used in hydrolyzation, The pepsin treated hydrolyzate showed the highest activity. Ethanol extracted fish-sauce (gyoshoyu) fermented from salmon processing residue was tested. It showed high activity, 50% inhibition against ACE at 0.24mg protein/ml. ACE inhibitory peptides from fish-sauce were separated by reverse-phase HPLC and gel chromatography.

Keyword : Angiotensin I Converting Enzyme, Peptide, Inhibitor, Salmon

1 緒 言

アンジオテンシン I 変換酵素 (EC3.4.15.1 : ACE) は、アンジオテンシン I を強力な昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II に変換するとともに降圧ペプチドであるブラジキニンを不活化する反応を触媒する。したがって、ACE を特異的に阻害する物質は血圧上昇を抑制する作用を有し、カプトプリルなどは経口投与可能な医薬品として実用化されている。

近年、さまざまな生物資源から ACE を阻害するペプチドが見いだされており、食品として摂取して高血圧予防に役立てようとする試みがなされている⁽¹⁻³⁾。

岩手県においては栽培漁業としてサケにも注力しており、その加工技術についても工夫が成されているが、加工残滓の利用や、いわゆるブナサケといわれる産卵期の肉質が軟化し加工が困難なものについては更に付加価値の高い利用法が望まれている。そこで本研究においてはサケ及びサケを原料とした魚醬より、ACE 阻害活性を有するペプチドを分離し、精製を試みたので報告する。

2 研究方法

2-1 試料及び調製方法

サケサンプルとして平成 7 年 1 月に釜石港に水揚げされた体長、体重ほぼ同一な雄サケ (銀毛サケ及びブ

ナサケ) を岩手県水産技術センターより分譲を受けた。サケの筋肉部分 25 g に対し、脱イオン水 250 ml を加えてホモジナイズした。pH を加水分解に用いるプロテアーゼの至適 pH に調整し、各プロテアーゼを 100 mg 添加あるいは無添加で 40℃、5 時間インキュベートした。使用したプロテアーゼはトリプシン (牛睪臓由来、ベーリンガーマンハイム製)、キモトリプシン (牛睪臓由来、ベーリンガーマンハイム製)、ペプシン (豚胃粘膜由来、ベーリンガーマンハイム製) の 3 種である。また無添加のものは pH 無調整 (pH 7) で反応した。反応後、pH を 7 に調整し、98℃ 10 分間加熱して酵素を失活させ、12,300 × g、10 分間遠心分離して分解液を得た。

サケ加工残滓から製造される魚醬及び発酵終了後に油分を分離して圧搾した残滓は、(株)海拓舎より分譲を受けた。これらのサンプルは 2 倍容のエタノールで抽出を行った後、沈澱物を 12,300 × g、10 分間遠心分離して除去し、上清を減圧乾固して脱イオン水に溶解した。

2-2 魚醬からの阻害活性画分の分離

調製した魚醬のエタノール抽出物を限外濾過膜を用いて (ミリポア、UFC4LGC25) 分画分子量 1 万以下のペプチドを得、HPLC により分画した。クロマトグラフ : ファルマシア SMART system、カラム : ファル

* 岩手県工業技術センター 応用生物部 岩手県盛岡市飯岡新田 3-35-2

マシアPC3.2/3、流速0.1ml/min、solvent system : (A) 0.1% TFA in water (B) 0.1% TFA in acetonitrile、A to B 0-40%/30minのリニアグラジエントで分離し、検出波長215nmで0.2mlずつ分取した。HPLC活性画分は減圧乾固して濃縮し、20mMリン酸バッファー (pH7.0) で平衡化したSuperdex peptideカラムに負荷し、流速0.25ml/minでゲル濾過した。更にゲル濾過したNo.1及びNo.2画分をHPLCにより精製した。カラム：ファルマシアPC3.2/3、流速0.25ml/min、solvent system : (A) 0.1% TFA in water (B) 0.1% TFA in 60% acetonitrile、A to B 0-100%/25minのリニアグラジエントで分離した。

2-3 ACE阻害活性測定法

ACE 5 mU (ウサギ肺由来、和光純薬製)、Hippuryl-L-histidyl-L-leucine 5 mM (シグマ製) を用い、Liebermanの測定法を改良した山本ら⁽⁴⁾の方法に準じて測定した。生成した馬尿酸を酢酸エチルにて抽出し、228nmの吸光度を測定した。被験液での吸光度をEs、被験液の代わりに水を加えたときの値をEc、あらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの値をEbとして、

$$\text{阻害率 (\%)} = (Ec - Es) / (Ec - Eb) \times 100$$

で表した。IC₅₀の値は、上式によって得られる阻害率が50%を示す反応液中の試料の蛋白質濃度としてもとめた。また、蛋白質量はケルダール法により得られた窒素量に6.25を乗じて算出した。

3 結果及び考察

3-1 サケの酵素分解液中のACE阻害ペプチド

Table I に各種酵素により得られた分解液の活性を示した。銀毛サケ、ブナサケ共にペプシン分解物が最も高い値を示した。ペプシン酵素自体に阻害活性が見られたが (data not shown)、それを考慮しても最も

Table I . ACE Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolyzate

| Sample | pH | IC ₅₀ (mg protein/ml) |
|--------------------------|----|-------------------------------------|
| Pre-spawning chum salmon | | |
| Trypsin | 8 | 1.26 |
| Chymotrypsin | 8 | 0.74 |
| Pepsin | 3 | 0.56 |
| None | 7 | 1.58 |
| Spawning chum salmon | | |
| Trypsin | 8 | 0.92 |
| Chymotrypsin | 8 | 0.84 |
| Pepsin | 3 | 0.60 |
| None | 7 | 0.98 |

高い活性を示した。産卵期のいわゆるブナ化が進んだサケは非常に高いプロテアーゼ活性を有していることが報告されており、加工上問題となる場合もある。筋肉の軟化現象は、産卵期の生理的変化に伴う筋肉内在性プロテアーゼの増大、筋細胞間に分布するマクロファージ様食細胞の増加に伴うカテプシンLの増大によることが報告されている⁽⁵⁾。

Table I に示したように、酵素無添加の場合ブナサケは銀毛サケよりも高い阻害活性を示しており、プロテアーゼ活性の増大により、自己消化を起こしているものと思われる。加工食品として利用価値の低いブナサケを材料としても、生理機能を有するペプチド剤として使用できる可能性があり、呈味性を考慮して食品素材として活用できるとと思われる。

3-2 魚醬中のACE阻害ペプチドの分離

サケ加工残滓から製造されている魚醬は *Aspergillus soiya* を用いた魚麹を利用して発酵させ製造されている。頭部、内臓、骨等の部分も材料としており、魚醬中にはさまざまな生理機能を有する物質が含まれると期待される。魚醬及び魚醬の圧搾残滓よりエタノール抽出した画分のIC₅₀値はそれぞれ0.24mg protein/ml、1.68mg protein/mlであった。圧搾残滓を上記のプロテアーゼにより分解を試みたが、IC₅₀値に変化はなかった。

Table II Separation of ACE Inhibitors from Ethanol Extracted Fish-sauce

| Fraction No. | ACE Inhibition (%) |
|--------------|--------------------|
| 1 | 0.0 |
| 2 | 73.6 |
| 3 | 4.7 |
| 4 | 14.3 |
| 5 | 13.5 |
| 6 | 4.1 |
| 7 | 7.0 |
| 8 | 0.0 |
| 9 | 0.0 |
| 10 | 0.0 |

また魚醬のエタノール抽出物を限外濾過したところ、活性の8割が分子量1万以下の低分子画分に存在していた (data not shown)。この低分子画分について逆層クロマトグラフィーにより分画した結果をTable II に示した。最も活性の高かったFraction 2をゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果を Fig. 1 に示し

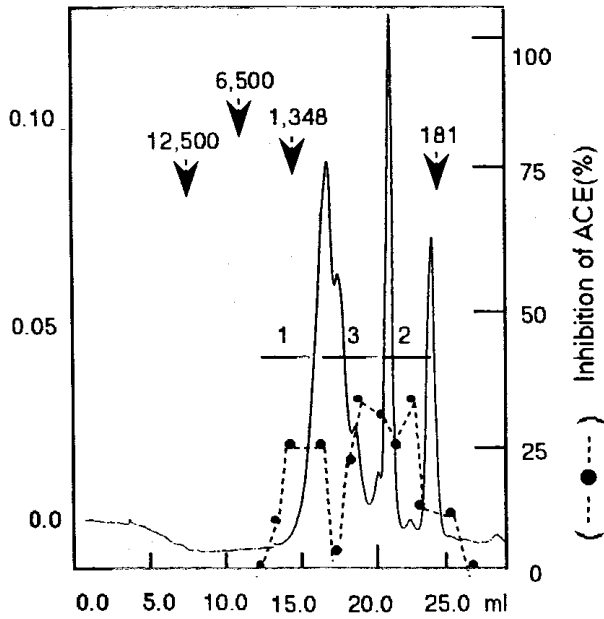


Fig. 1 Gel Chromatography on a Superdex Peptide 10/30 of Fraction 2.

Number in the figure indicates molecular weight of standard marker.

た。活性画分は分散しており、図中に示した分子量マーカーによれば分子量約1,300~200の間に存在している。Fig. 1のように3画分に分け、更にHPLCによる精製を試みた。比較的パターンが単純であったNo. 1及びNo. 2についてのクロマトグラフィーのパターンをFig. 2に、阻害活性について、Table IIIに示した。それぞれのピークについてアミノ酸組成と配列の決定を現在実施している。

ACEの阻害ペプチドはさまざまな生物資源から分離されている。魚類ではイワシ加熱筋肉から分離され、その1つがアクチン由来のペプチドであることが報告されている^{(6),(7)}。in vivoの結果でも高血圧ラットに対し、静脈注入⁽⁸⁾、腹腔内投与、あるいは経口でも降圧効果があったとの報告もある。

Table III ACE Inhibitory Activity of No.1 and No.2

| Peak No. | ACE Inhibition (%) |
|----------|--------------------|
| No.1 | |
| P1, P2 | 34.0 |
| P3 | 0.0 |
| P4 | 25.0 |
| No.2 | |
| P1 | 31.0 |
| P2 | 23.4 |

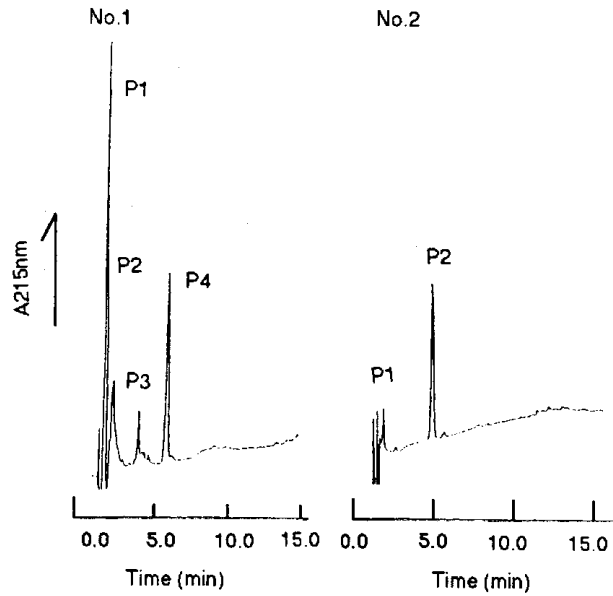


Fig. 2 Reverse -Phase HPLC of No.1 and No.2 Eluted Gel Chromatography.

ACE阻害活性とペプチド配列との相関に関しては、いくつかの報告が見られるが、Cheungら⁽⁹⁾はジペプチドについて、C末端及びN末端アミノ酸と阻害活性との関係を詳細に調べており、C末端アミノ酸としてはトリプトファン、チロシン、プロリン、フェニルアラニンを、またN末端としてはバリン、イソロイシンを有するジペプチドが高い活性を有することを明らかにしている。

今後、単離したペプチドの配列を明らかにし、既報の知見と比較していく予定である。また in vivoでの効果も明らかにするのが今後の課題である。

4 要 約

サケ（銀毛サケ、ブナサケ）をプロテアーゼで分解することにより、ACEを阻害するペプチドを取得した。使用したプロテアーゼ中ではペプシン分解物が最も活性が高かった。また、サケ加工残渣を利用して製造される魚醬のエタノール抽出物は IC₅₀が0.24mg/proteinと高い活性を有しており、抽出物からHPLCにより更に分画を進めている。

キーワード：アンジオテンシン変換酵素
ペプチド阻害剤 サケ

本研究を実施するにあたり、試料を提供していただきました岩手県水産技術センター、並びに(株)海拓舎に深く感謝いたします。

参考文献

- (1) 千葉英雄, 吉川正明: 化学と生物, **25**, 396 (1987)
- (2) 丸山 進: バイオサイエンスとインダストリー, **47**, 1182 (1989)
- (3) 末綱邦男: 発酵と工業, **46**, 179 (1988)
- (4) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎: 日胸疾会誌, **18**, 297 (1980)
- (5) 山下倫明: 日本水産学会誌, **60**, 439 (1994)
- (6) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箴島克裕, 松藤 寛, 箴島 豊: 日本農芸化学会誌, **65**, 1223 (1991)
- (7) 受田浩之, 松田秀喜, 箴島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箴島 豊: 日本農芸化学会誌, **66**, 25 (1992)
- (8) 末綱邦男, 箴島克裕: 日本栄養・食糧学会誌, **42**, 47 (1989)
- (9) H.S.Cheung, F.I.Wang, M.A.Ondetti, E.F.Sabo and D.W.Cushman: *J.Biol.Chem*, **255**, 401 (1980)