

沖縄県産海産物及びその加工残渣より得られる アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドとイミダゾールジペプチド

丸山進、荻貴之、照屋盛実、市村年昭*¹、鎌田靖弘

アナアオサ、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリ、オキナワモズク加工残渣、グルクン筋肉、トンボマグロ中骨部位などの酵素(サーモライシン)加水分解物からアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)阻害作用のある Ile-Tyr、Val-Tyr、Phe-Tyr、Ile-Phe、Phe-Trp、Ala-Trp、Met-Trp、Val-Trp などのジペプチドを多数見出した。また、トンボマグロ中骨部位の熱水抽出物中のイミダゾールジペプチドを定量したところ、乾燥重量 1 mg あたりアンセリン 0.14 mg、カルノシン 0.005 mg を含有していた。さらに、トンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物は Val-Tyr などの複数の ACE 阻害ペプチドと乾燥重量 1 mg あたり 0.04 mg のアンセリンを含んでいた。

1 はじめに

アンジオテンシン I 変換酵素 (Angiotensin I-Converting Enzyme、以下 ACE) は不活性なアンジオテンシン I の C 末端 His-Leu を切断し、血管収縮、アルドステロン分泌促進等の強い血圧上昇活性を持つアンジオテンシン II に変換する働きをしている昇圧系酵素で、血管内皮細胞膜などに存在する。ACE はまた、血管拡張作用を有するブラジキニンを分解し、不活性化させる働きもしている。したがって、ACE 阻害物質は高血圧を抑制する効果が期待できる。ACE 阻害効果のある医薬品としては 1977 年に Ondetti らが発表したカプトプリルが有名である。また、様々な食品タンパク質の酵素分解物から多種の ACE 阻害ペプチドが見いだされ、「血圧が高めの方の食品」(特定保健用食品)として多数が商品化されている¹⁾。

アンセリン(別名 β-alanyl-L-methyl-L-histidine)、カルノシン(別名 β-alanyl-L-histidine)などのイミダゾールジペプチド(図 1)は、動物の骨格筋に高濃度に存在し、特に鶏肉やカツオ等の回遊魚ではアンセリンの比率が高い。イミダゾールジペプチドは抗酸化作用、ラジカル補足作用、緩衝作用による運動能力向上、抗疲労効果などの機能を有するとされている²⁻⁵⁾。

筆者らは、沖縄県産海産物及びその加工残渣の有効利

用を目的として、これらの材料を酵素処理することで ACE 阻害活性を有するペプチドを生成させる試みを行った。同時に、魚類に含まれるイミダゾールジペプチドの利用可能性を検討した。

2 実験方法

2-1 実験材料

アナアオサ (*Ulva pertusa*)、ヒトエグサ (*Monostroma nitidum*)、キリンサイ (*Eucheuma denticulatum*)、イバラノリ (*Hypnea charoides*)、グルクン(タカサゴ、*Pterocoesia digramma*) は沖縄県内で入手した。クビレオゴノリ (*Gracilaria blodgettii*) は、海洋深層水研究所にて培養したものをを用いた。オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) 加工残渣はフコイダン抽出後の試料を食品工場から入手した。トンボマグロ(ビンナガ、*Thunnus alalunga*) 中骨部位および頭部は糸満漁港で入手した。

サーモライシン (EC 3.4.24.27)、Benzoylglycyl-L-histidyl-L-leucine (別名 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine) は株式会社ペプチド研究所から、ACE (EC 3.4.15.1、ウサギ肺由来)はシグマアルドリッチ社からそれぞれ購入した。L-アンセリン硝酸塩、L-カルノシンは和光純薬工業株式会社から購入した。

2-2 ACE 阻害活性の測定

Cushman らの方法⁶⁾と山本らの方法⁷⁾に基づいて行った。ウサギ肺由来 ACE を、ホウ酸緩衝液(50 mM Na₂B₄O₇、200 mM H₃BO₃で作成、pH 8.3)に溶解し、60 mU/ml の酵素溶液とした。また、Hippuryl-L-histidyl-L-leucine 及び塩化ナトリウムを前記ホウ酸緩衝液に溶解し、それぞれの濃度が 7.7 mM 及び 615 mM (反応液中での終濃度は、それぞれ 5 mM 及び 400 mM) である基質溶液を調製し

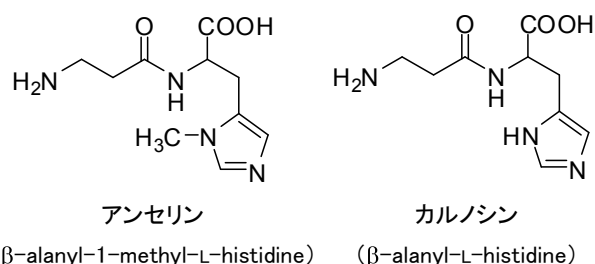


図 1 イミダゾールジペプチド

*1. 国立研究開発法人産業技術総合研究所

た。1.5 ml 容量のチューブに、試料溶液（または対照として超純水）20 μ l と前記酵素溶液 50 μ l を入れ、37°C で 5 分間保温した後、前記基質溶液 130 μ l を加えて混合、37°C で 30 分間の反応を行った。10% トリフルオロ酢酸 30 μ l を添加することにより、反応を停止させ、酵素反応により遊離した馬尿酸を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量した。カラムとして Symmetry C18 3.5 μ m 4.6 \times 100 mm（ウォーターズ社）を用い、0.1% トリフルオロ酢酸を含む 0~70%(v/v) のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配、流速 1 ml/min で溶出、228 nm の紫外外部吸収をモニターした。

ACE の阻害率は、下記の式により算出した。また、阻害率が 50% になるペプチド濃度を IC₅₀ 値とした。

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

（A は対照における馬尿酸のピーク面積、B は試料溶液添加における馬尿酸のピーク面積）

2-3 イミダゾールジペプチドの定量

本実験で調製した試料中のイミダゾールジペプチドは HPLC により定量した。使用したカラムおよび溶出条件は、森山らの「食品中の機能性成分分析法マニュアル集」に記載された方法による⁵⁾。検量線は試薬の L-アンセリン硝酸塩、L-カルノシンを、それぞれ 2 mM、4 mM、6 mM、8 mM の濃度でカラムに導入して作成した。測定用試料は乾燥物を 10 mg/ml~80 mg/ml の濃度で超純水に溶解しカラムに導入した。

カラム：ウォーターズ社 Atlantis HILIC Silica HPLC column 186002031、3 μ m 4.6 \times 150 mm

移動相 A 液：0.65 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル (25:75、v/v)

移動相 B 液：4.55 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル (70:30、v/v)

A 液/B 液 (100:0) から A 液/B 液 (0:100) を 13 分で行う。流速：1.4 ml/min、検出波長：220 nm、試料導入量：10 μ l

2-4 アナアオサ、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリのサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製

アナアオサ、ヒトエグサはそれぞれ乾燥重量 4 g を 200 ml の蒸留水中に分散させ、ホモジェナイザー（ポリトロン、キネマチカ社）による処理を 15 分間行うことにより、粉砕した。キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリは粉砕器を用いて微粉末化したものについて乾燥重量 4 g

を 200 ml の蒸留水中に分散させた。

上記で調製したそれぞれの海藻の溶液 200 ml にサーモライシンを 20 mg 添加、60°C の水浴中で 3 時間攪拌した。反応停止は 10 分間の煮沸により行った。酵素処理液は冷却後、分画分子量 30,000 の限外ろ過膜（限外ろ過ディスク YM30、30 kDa、76 mm、ミリポア社）に通し、低分子側の溶液を回収、遠心エバポレーターで減圧下に乾固させた。

上記で得たアナアオサのサーモライシン加水分解物のうち 460 mg を 12 ml の蒸留水に溶解したものを、セファデックス LH-20 ゲル濾過カラム (26 \times 900 mm、GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) に負荷し、流速 0.52 ml/min の 30% メタノール水溶液で溶出した。10.4 ml/フラクションで分画し、各フラクション 20 μ l について、ACE 阻害活性を測定した。強い ACE 阻害活性を有する低分子フラクションを回収し、遠心エバポレーターで減圧下に 0.8 ml に濃縮した。この濃縮フラクションを Develosil C30-UG-5 カラム (C30 逆相カラム、4.6 \times 250 mm、野村化学株式会社) を用いた HPLC でさらに分画した。即ち、その 40 μ l をカラムに導入し、0.1% トリフルオロ酢酸を含む 0~70%(v/v) のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配 (流速 1 ml/min、0~70% の濃度勾配を 40 分間で行う) により溶出し、溶出液の 210 nm の吸光度をモニターしつつ各ピークを分取した。分取した各ピークについて、遠心エバポレーターで減圧下に溶媒を除去し、ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性が確認できたピークと同一のピークを再度分取し、プロテインシークエンサー 491 型（アプライドバイオシステムズ社）によりペプチドのアミノ酸配列を解析した。なお、精製純度の悪いペプチドについては Symmetry C18 カラム (4.6 \times 250 mm、ウォーターズ社) を用いてさらに精製して解析した。ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリそれぞれのサーモライシン加水分解物についてもほぼ同様の方法で ACE 阻害ペプチドを精製、解析した。また、ここで解析した各ペプチドの構造は同一配列の化学合成品と HPLC で比較することにより確認した。

2-5 オキナワモズク加工残渣のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製

フコイダン抽出後のオキナワモズク加工残渣乾燥物 4 g を乳鉢で摩砕、全量を 200 ml の蒸留水中に分散させ、NaOH により pH 8.3 に調製した。これにサーモライシンを 20 mg 添加、60°C の水浴中で時々攪拌しつつ 3.5 時間反応させた。反応停止は 10 分間の煮沸により行った。酵素処理液は冷却後、9,100xg で 10 分間の遠心分離を行い、上清をさらに、分画分子量 10,000 の限外ろ過膜（限外ろ

過ディスク PLGC ウルトラセル、再生セルロース、10 kDa、63.5 mm、ミリポア社)に通し、低分子側の溶液を遠心エバポレーターで減圧下に乾固させた。

上記で得た乾固物のうち 150 mg を 6 ml の蒸留水に溶解し、セファデックス LH-20 カラム (26×900 mm、GEヘルスケア・ジャパン株式会社)に負荷、流速 0.47 ml/min の 30%メタノール水溶液で溶出した。7 ml/フラクションで分画し、各フラクション 20 µl について、ACE 阻害活性を測定した。強い ACE 阻害活性を有する低分子フラクションを回収し、遠心エバポレーターで減圧下に 0.3 ml に濃縮した。この濃縮フラクションを Develosil XG-C30M-3 カラム (4.6×250 mm、野村化学株式会社)を用いた HPLC でさらに分画した。即ち、その 30 µl をカラムに導入し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む 0~70% (v/v)のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配 (流速 1 ml/min、0~70%の濃度勾配を 40 分間で行う)により溶出し、溶出液の 220 nm の吸光度をモニターしつつ各ピークを分取した。分取した各ピークについて、遠心エバポレーターで減圧下に溶媒を除去し、ACE 阻害活性を測定した。次に、ACE 阻害活性が確認できたピークと同一のピークを再度分取し、ペプチドのアミノ酸配列分析を四重極型 LC/MS (QuattroMicro API LC/MS system、ウォーターズ社)で行った。衝突誘起解離 (CID) による分子量関連イオンの解析、化学合成標品との保持時間の比較によりアミノ酸配列を推定した。

2-6 オキナワモズク加工残渣のアルカリ抽出物のサーモライシン加水分解

フコイダン抽出後のオキナワモズク加工残渣乾燥物 2 g を乳鉢で摩砕、全量を 100 ml の 0.1 N NaOH 溶液中に分散させ、室温で 5 時間攪拌した。この溶液を 9,100xg で 10 分間遠心分離し、上清を 1 N HCl で中和後、分画分子量 10,000 の限外濾過膜 (限外ろ過ディスク PLGC ウルトラセル、再生セルロース、10 kDa、63.5 mm、ミリポア社)に通し、高分子側を回収、遠心エバポレーターで乾燥させた。全量 540 mg に蒸留水 10 ml、サーモライシン 3 mg を添加、60℃の水浴中で時々攪拌しつつ 3 時間反応させた。反応停止は 10 分間の煮沸により行った。酵素処理液は冷却後、9,100xg で 10 分間の遠心分離を行い、上清をさらに分画分子量 10,000 の限外濾過膜に通し、低分子側の溶液を回収、遠心エバポレーターで減圧下に乾固させた。

2-7 グルコン筋肉のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製

細断したグルコン筋肉 50 g (湿重量) に蒸留水 180 ml

を加え、ホモジェナイザーで粉碎した。これにサーモライシンを 38 mg 添加、60℃の水浴中で時々攪拌しつつ 3.5 時間反応させた。反応停止は 10 分間の煮沸により行った。酵素処理液は冷却後、9,100xg で 10 分間の遠心分離を行い、上清をさらに分画分子量 30,000 の限外濾過膜 (限外ろ過ディスク PLTK ウルトラセル、再生セルロース、30 kDa、63.5 mm、ミリポア社)に通し、低分子側の溶液を回収、遠心エバポレーターで減圧下に乾固させた。

上記で得た乾固物のうち 200 mg を 2 ml の蒸留水に溶解し、セファデックス LH-20 カラム (26×900 mm、GEヘルスケア・ジャパン株式会社)に負荷、流速 0.47 ml/min の 30%メタノール水溶液で溶出した。7 ml/フラクションで分画し、各フラクション 20 µl について、ACE 阻害活性を測定した。強い ACE 阻害活性を有する低分子フラクションを回収し、遠心エバポレーターで減圧下に 0.4 ml に濃縮した。この濃縮フラクション 30 µl を Develosil XG-C30M-3 カラム (4.6×250 mm、野村化学株式会社)に導入し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む 0~70% (v/v)のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配溶出 (流速 1 ml/min、0~70%の濃度勾配を 40 分間で行う)により溶出し、溶出液の 220 nm の吸光度をモニターしつつ各ピークを分取した。分取した各ピークについて、遠心エバポレーターで減圧下に溶媒を除去し、ACE 阻害活性を測定した。次に、ACE 阻害活性が確認できたピークと同一のピークを再度分取し、飛行時間型 LC/MS (6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system、Agilent 社)に導入し、衝突誘起解離 (CID) による分子量関連イオンの解析、化学合成標品との保持時間の比較によりペプチドのアミノ酸配列を推定した。

2-8 トンボマグロ中骨部位および頭部からのイミダゾールジペプチドの熱水抽出

トンボマグロの中骨部位、頭部をそれぞれミンチにし、それぞれ 40 g (湿重量) を 65 ml のイオン交換水に分散させ、熱水浴で 12 分間煮沸した。直ちに冷却後、それぞれ 1 ml を回収、残りをサーモライシン加水分解用の試料とした。回収した 1 ml について、遠心型限外濾過膜 (分画分子量 10,000、ミリポア社)に通し、遠心エバポレーターで乾燥させ、これを熱水抽出物とした。

2-9 トンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製

上記 2-8 のトンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解用試料について、これに 20 mg のサーモライシンを添加、60℃の水浴中で時々攪拌しつつ 4 時間反応させた。反応停止は 10 分間の煮沸により行った。酵素処理液

は冷却後、9,100xgで10分間の遠心分離を行い、上清を回収した。この上清をさらに分画分子量30,000の限外濾過膜（限外ろ過ディスク PLTK ウルトラセル、再生セルロース、30 kDa、63.5 mm、ミリポア社）に通し、低分子側の溶液を回収、遠心エバポレーターで減圧下に乾固させた。

上記で得た乾固物のうち200 mgを2 mlの蒸留水で溶解し、セファデックス LH-20 ゲル濾過カラム（26×900 mm、GEヘルスケア・ジャパン株式会社）に負荷、流速0.5 ml/minの30%メタノール水溶液で溶出した。7.5 ml/フラクションで分画し、各フラクション20 µlについて、ACE阻害活性を測定した。強いACE阻害活性を有する低分子フラクションを回収し、遠心エバポレーターで減圧下に1.3 mlに濃縮した。この濃縮フラクション100 µlをDevelosil XG-C30M-3カラム（4.6×250 mm、野村化学株式会社）に導入し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0～70%（v/v）のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配溶出（流速1 ml/min、0～70%の濃度勾配を40分間で行う）により溶出し、溶出液の220 nmの吸光度をモニターし

つつ各ピークを分取した。分取した各ピークについて、遠心エバポレーターで減圧下に溶媒を除去し、ACE阻害活性を測定した。次に、ACE阻害活性が確認できたピークと同一のピークを再度分取し、飛行時間型LC/MS（6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system、Agilent社）に導入し、衝突誘起解離（CID）による分子量関連イオンの解析、化学合成標品との保持時間の比較によりペプチドのアミノ酸配列を推定した。

3 実験結果

3-1 アナアオサ、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリのサーモライシン加水分解物由来のACE阻害ペプチド

アナアオサのサーモライシン加水分解物はIC₅₀値190 µg/mlでACEを阻害した。アナアオサのサーモライシン加水分解物のうち460 mgを用いて、ACE阻害ペプチドの精製を行った。セファデックス LH-20 カラムによる溶出パターンを図2-aに示す。ACE阻害活性の強いピークのうち、低分子側のピーク（フラクション35、図中の矢

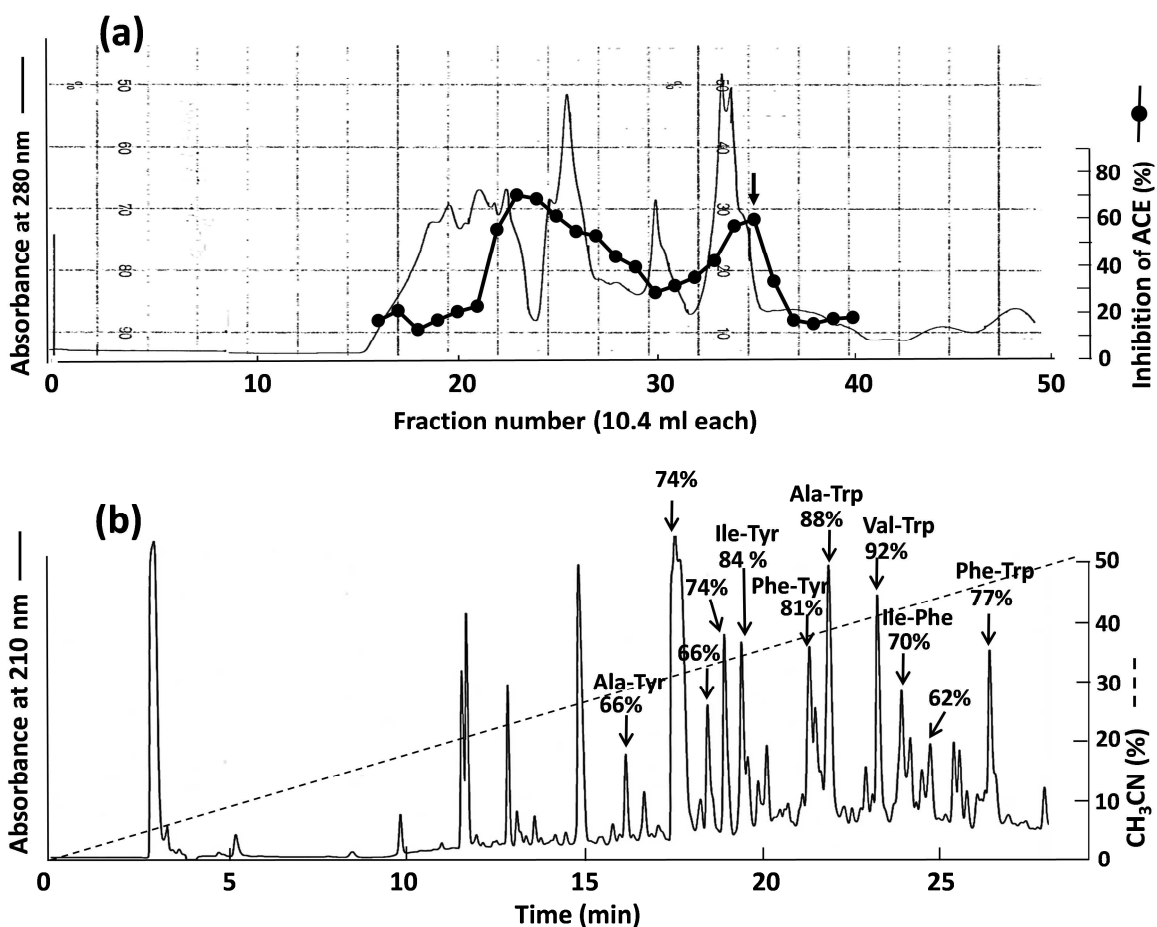


図2 アナアオサのサーモライシン加水分解物からのACE阻害ペプチドの精製

(a) セファデックス LH-20 カラムによる分画。(b) LH-20 フラクション35のDevelosil C30-UG-5カラムによる分画。分取したピークのACE阻害活性をそれぞれのピーク位置に示す。

印) を濃縮し、濃縮液の一部を Develosil C30-UG-5 カラムでさらに分画した。その溶出パターンならびに分取したそれぞれのピークの ACE 阻害活性を図 2-b に示した。このうちプロテインシークエンサーで構造の解析できたペプチド (Ala-Tyr, Ile-Tyr, Phe-Tyr, Ile-Phe, Ala-Trp, Val-Trp, Phe-Trp) をそれぞれのピーク位置に示した。また、各ペプチドの ACE 阻害 IC₅₀ 値を表 1 にまとめて記載した。

同様に、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリのサーモライシン加水分解物について、それぞれの ACE 阻害 IC₅₀ 値を表 1 にまとめた。また、それぞれから精製した ACE 阻害ペプチドを表 1 にまとめた。

3-2 オキナワモズク加工残渣サーモライシン加水分解物由来の ACE 阻害ペプチド

オキナワモズク加工残渣のサーモライシン加水分解物は IC₅₀ 値 870 µg/ml で ACE を阻害した。オキナワモズク加工残渣のサーモライシン加水分解物のうち 150 mg を用いて、ACE 阻害ペプチドの精製を行った。セファデックス LH-20 カラムによる溶出パターンを図 3-a に示す。ACE 阻害活性の強い二つのピークのうち、低分子側のピーク (フラクション 47、図中の矢印) を濃縮し、濃縮液の一部を Develosil XG-C30M-3 カラムでさらに分画した。その溶出パターンならびに分取したそれぞれのピークの ACE 阻害活性を図 3-b に示した。このうち四重極型 LC/MS で解析できたペプチド (Val-Tyr, Ile-Tyr, Ala-Trp) をそれぞれのピーク位置に示した。また、各ペプチドの ACE 阻害 IC₅₀ 値を表 1 にまとめて記載した。

3-3 グルコン筋肉サーモライシン加水分解物由来の ACE 阻害ペプチド

グルコン筋肉のサーモライシン加水分解物は IC₅₀ 値 33 µg/ml で ACE を阻害した。グルコン筋肉サーモライシン加水分解物のうち 200 mg を用いて、ACE 阻害ペプチドの精製を行った。セファデックス LH-20 カラムによる溶出パターンを図 4-a に示す。ACE 阻害活性は幅広く分布したため、アミノ酸 2 残基程度のペプチドが溶出されると思われるフラクション 48~53 を濃縮し、濃縮液の一部を Develosil XG-C30M-3 カラムでさらに分画した。フラクション 48 および 53 の溶出パターンならびに分取したそれぞれのピークの ACE 阻害活性を図 4-b, c に示した。このうち飛行時間型 LC/MS で解析できたペプチド (Ala-Trp, Met-Trp, Val-Trp) をそれぞれのピーク位置に示した。また、各ペプチドの ACE 阻害 IC₅₀ 値を表 1 にまとめて記載した。

表 1 各種海産物のサーモライシン加水分解物から精製した ACE 阻害ペプチド

	ACE阻害IC ₅₀
アナアオササーモライシン加水分解物	190 µg/ml
アナアオサ由来ペプチド	
Ala-Tyr	78 µM
Ile-Tyr	3.5 µM
Phe-Tyr	26 µM
Ile-Phe	16 µM
Ala-Trp	7.0 µM
Val-Trp	1.0 µM
Phe-Trp	6.1 µM
ヒトエグササーモライシン加水分解物	210 µg/ml
ヒトエグサ由来ペプチド	
Phe-Tyr	26 µM
Ile-Phe	16 µM
Leu-Trp	50 µM
Val-Trp	1.0 µM
キリンサイサーモライシン加水分解物	240 µg/ml
キリンサイ由来ペプチド	
Ala-Tyr	78 µM
Val-Tyr	7.4 µM
Ile-Phe	16 µM
Leu-Trp	50 µM
Phe-Trp	6.1 µM
Ile-Trp-Ala	19 µM
Leu-Arg-Ala	6.2 µM
Leu-Arg-Ser	4.2 µM
イバラノリサーモライシン加水分解物	190 µg/ml
イバラノリ由来ペプチド	
Phe-Tyr	26 µM
クビレオゴノリサーモライシン加水分解物	560 µg/ml
クビレオゴノリ由来ペプチド	
Ala-Tyr	78 µM
Ile-Tyr	3.5 µM
Phe-Tyr	26 µM
Val-Tyr	7.4 µM
Ile-Phe	16 µM
Val-Phe	62 µM
モズク加工残渣サーモライシン加水分解物	870 µg/ml
モズク加工残渣アルカリ抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物	240 µg/ml
モズク加工残渣由来ペプチド	
Val-Tyr	7.4 µM
Ile-Tyr	3.5 µM
Ala-Trp	7.0 µM
グルコン筋肉サーモライシン加水分解物	33 µg/ml
グルコン筋肉由来ペプチド	
Ala-Trp	7.0 µM
Met-Trp	3.8 µM
Val-Trp	1.0 µM
マグロ中骨部位サーモライシン加水分解物	71 µg/ml
マグロ中骨部位由来ペプチド	
Val-Tyr	7.4 µM
Met-Tyr	38 µM
Leu-Tyr	52 µM
Met-Trp	3.8 µM
Val-Trp	1.0 µM

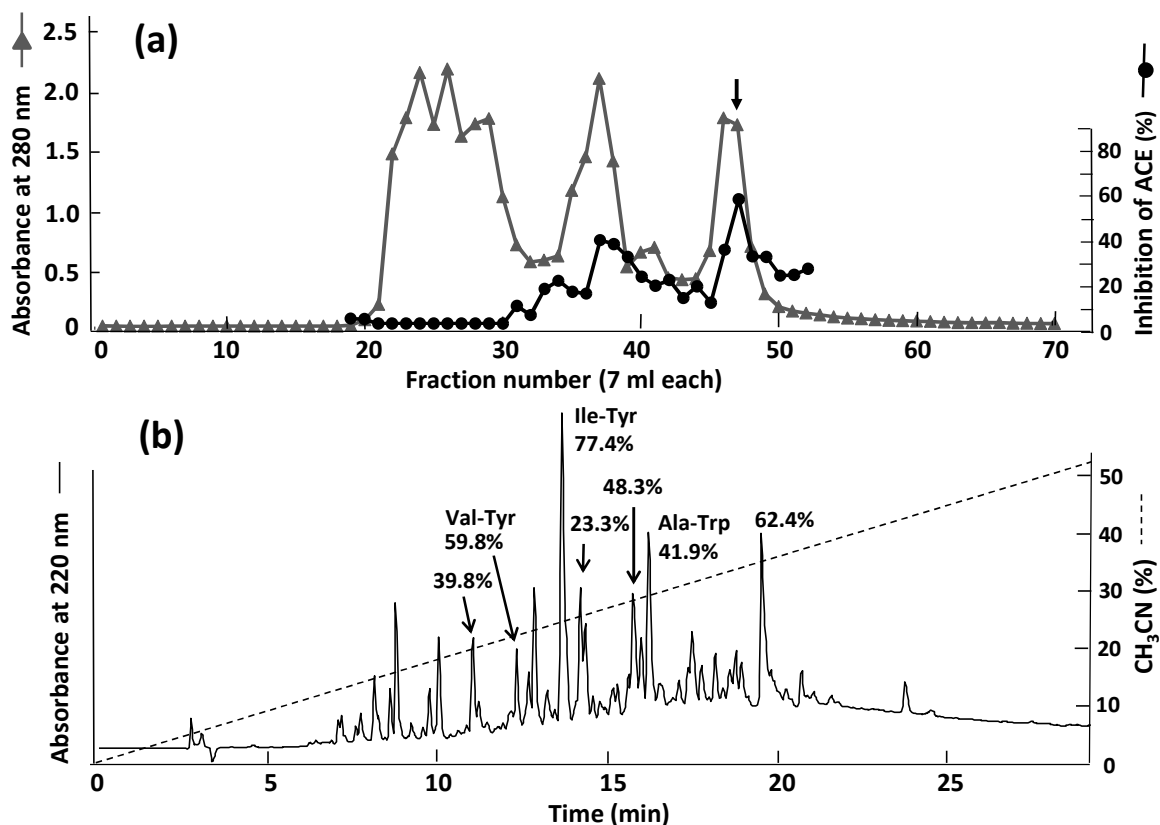


図3 オキナワモズク加工残渣のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製
 (a) セファデックス LH-20 カラムによる分画。(b) LH-20 フラクション 47 の Develosil XG-C30M-3 カラムによる分画。
 分取したピークの ACE 阻害活性をそれぞれのピーク位置に示す。

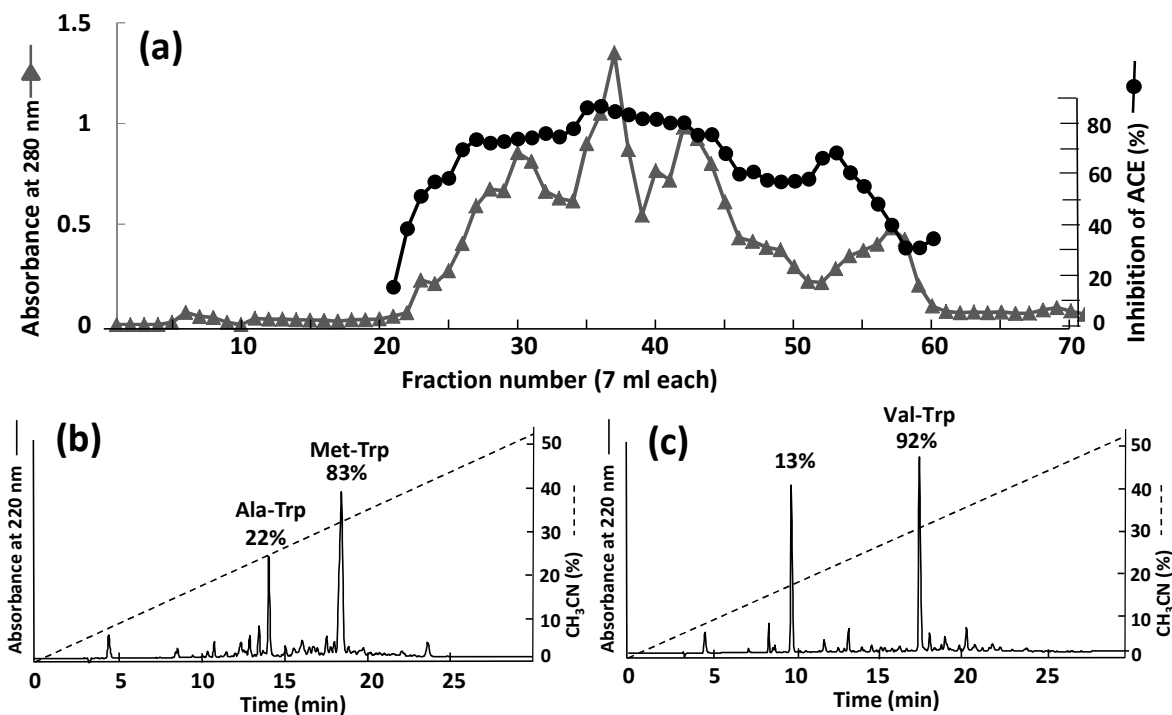


図4 グルコン筋肉のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製
 (a) セファデックス LH-20 カラムによる分画。(b) LH-20 フラクション 48 の Develosil XG-C30M-3 カラムによる分画。
 (c) LH-20 フラクション 53 の Develosil XG-C30M-3 カラムによる分画。分取したピークの ACE 阻害活性をそれぞれの
 ピーク位置に示す。

3-4 トンボマグロ中骨部位サーモライシン加水分解物由来の ACE 阻害ペプチド

トンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物は IC₅₀ 値 71 µg/ml で ACE を阻害した。トンボマグロ中骨部位サーモライシン加水分解物のうち 200 mg を用いて、ACE 阻害ペプチドの精製を行った。セファデックス LH-20 カラムによる溶出パターンを図 5-a に示す。ACE 阻害活性は幅広く分布し、低分子側のフラクション 42、44、46 を濃縮し、濃縮液の一部を Develosil XG-C30M-3 カラムでさらに分画した。このうちフラクション 42、46 の溶出パターンならびに分取したそれぞれのピークの ACE 阻害活性を図 5-b, c に示した。このうち飛行時間型 LC/MS で解析できたペプチド (Val-Tyr, Met-Tyr, Leu-Tyr, Val-Trp) をそれぞれのピーク位置に示した。また、Met-Tyr がフラクション 44 から検出された各ペプチドの ACE 阻害 IC₅₀ 値を表 1 にまとめて記載した。

3-5 トンボマグロ中骨部位および頭部の熱水抽出物に含まれるイミダゾールジペプチド

トンボマグロ筋肉の熱水抽出物 (乾燥重量 0.8 mg) を Atlantis HILIC Silica HPLC column で分析したクロマトグラムを図 6-a に示す。L-アンセリン、L-カルノシンの検量線から算出したトンボマグロ筋肉熱水抽出物中のイミダゾールジペプチドは乾燥重量 1 mg あたり、アンセリン 0.28 mg、カルノシン 0.024 mg であった。

トンボマグロの中骨部位ミンチの熱水抽出物 (乾燥重量 0.8 mg) を同様に分析したクロマトグラムを図 6-b に示す。トンボマグロ中骨部位熱水抽出物は乾燥重量 1 mg あたり、アンセリン 0.14 mg、カルノシン 0.005 mg を含有していた。また、ACE 阻害ペプチドを含むトンボマグロ中骨部位サーモライシン加水分解物は、乾燥重量 1 mg あたりアンセリン 0.04 mg を含有することが確認できた (図 6-c)。

さらに、トンボマグロの頭部ミンチの熱水抽出物 (乾燥重量 0.8 mg) を分析したクロマトグラムを図 6-d に示す。トンボマグロ頭部熱水抽出物は乾燥重量 1 mg あたりアンセリン 0.07 mg を含有していた。

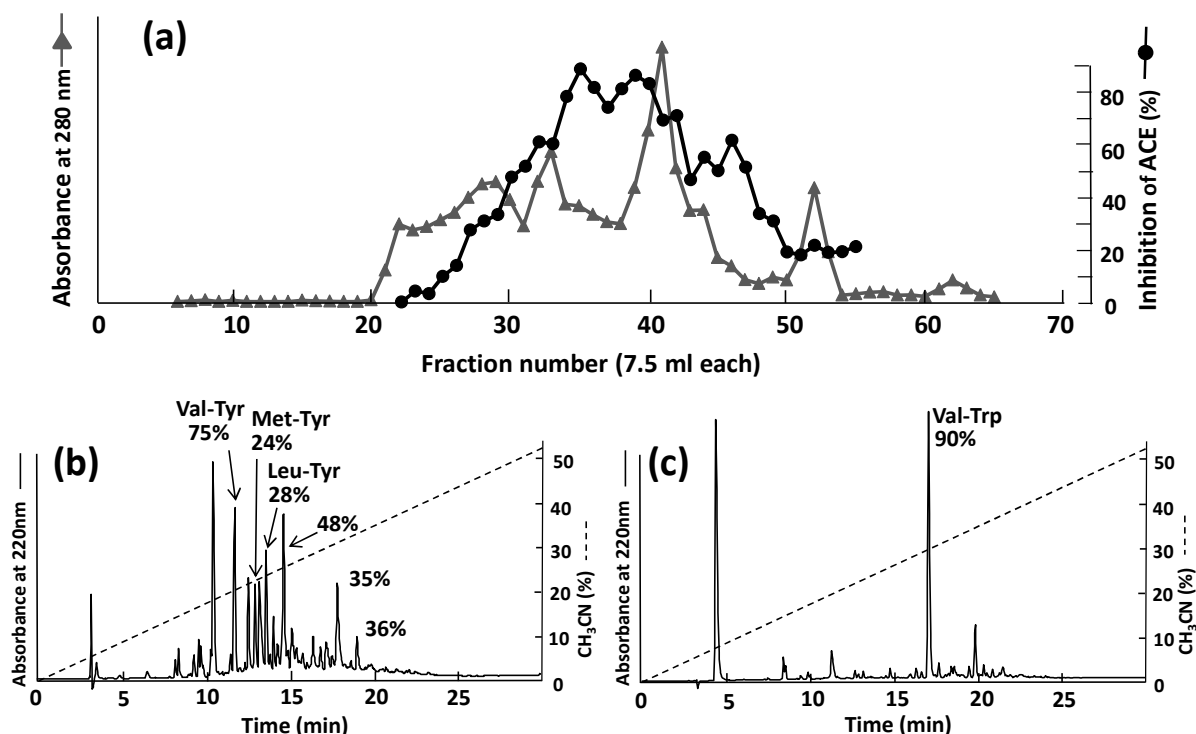


図5 トンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの精製

(a) セファデックス LH-20 カラムによる分画。(b) LH-20 フラクション 42 の Develosil XG-C30M-3 カラムによる分画。(c) LH-20 ラクシオン 46 の Develosil XG-C30M-3 カラムによる分画。分取したピークの ACE 阻害活性をそれぞれのピーク位置に示す。

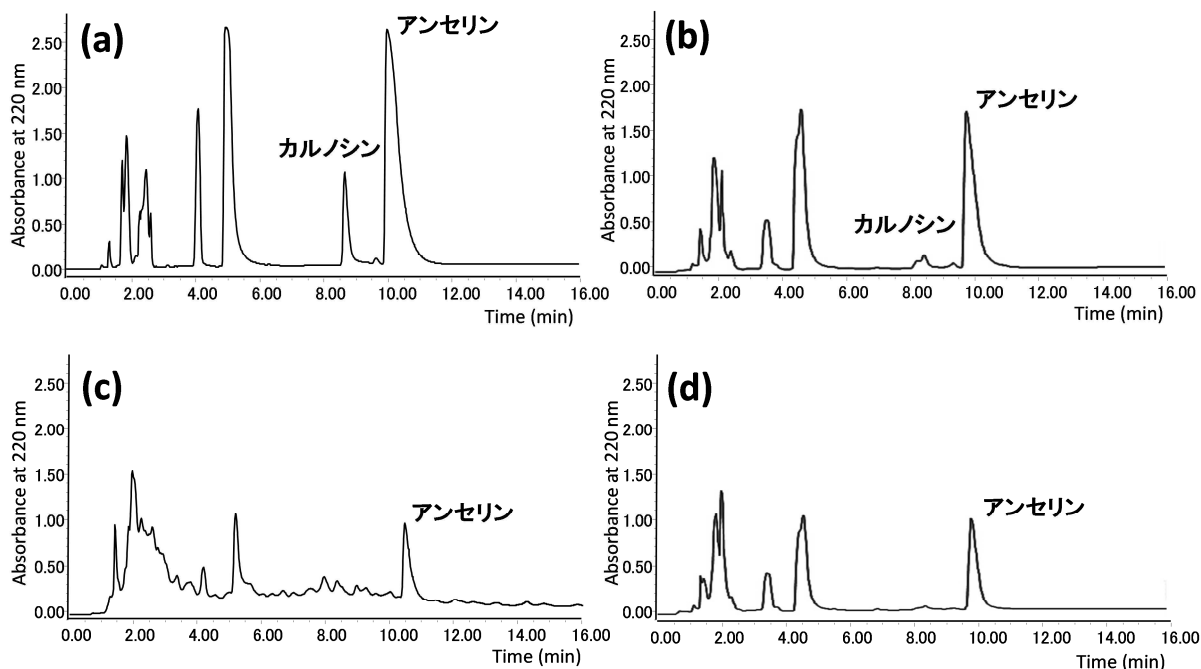


図6 トンボマグロのイミダゾールジペプチドの定量

(a) トンボマグロ筋肉熱水抽出物中のイミダゾールジペプチド。(b) トンボマグロ中骨部位ミンチ熱水抽出物中のイミダゾールジペプチド。(c) トンボマグロ中骨部位ミンチのサーモライシン加水分解物中のイミダゾールジペプチド。(d) トンボマグロ頭部位ミンチの熱水抽出物中のイミダゾールジペプチド。それぞれ乾燥重量 0.8 mg の試料を水溶液として Atlantis HILIC Silica HPLC column に導入した。

4 考察

本実験では、ACE 阻害ペプチドの精製にあたり、特定保健用食品などで利用されている Val-Tyr、Ile-Tyr など血圧降下作用が明らかになっているジペプチドが溶出されてくると思われるフラクションを中心に精製を試みた。実際に Val-Tyr、Ile-Tyr が検出され、類似のペプチドも多数精製されたことから、表1に記載の加水分解物は実用性の高いものと思われる。なお、予備実験で、高血圧自然発症ラット (SHR/NCrlCrj、雄性、日本チャールス・リバー社より購入) にアナアオサのサーモライシン加水分解物を投与量が 50 mg/kg 体重となるよう胃ゾンデを用いて強制経口投与した。その結果、投与5時間後に、投与群 (n=6) はコントロール群 (n=6) との比較で血圧が 12 mmHg ほど低い値を示し、 $p < 0.05$ で有意差が認められた。今後、詳細な試験が必要とされる。

オキナワモズク加工残渣のサーモライシン加水分解物は ACE 阻害 IC_{50} 値 870 $\mu\text{g/ml}$ という弱い活性であった。これは、モズクのタンパク質含量が他の海藻に比べて少ないためと思われる。そこで、2-6 に記載の方法で、予めオキナワモズク加工残渣に含有されるタンパク質をアルカリ抽出し、それをサーモライシンで加水分解した。その結果、加水分解物の ACE 阻害 IC_{50} 値は 240 $\mu\text{g/ml}$ となり、大幅に改善した (表1)。フコイダン抽出後のオキ

ナワモズク加工残渣も機能性食品原料として利用できるものと思われる。

本実験により、トンボマグロ中骨部位熱水抽出物は乾燥重量 1 mg あたり 0.14 mg という高濃度のアンセリンを含んでいることが明らかになった。回遊魚ではアンセリンの比率が高いという報告と一致する⁵⁾。一方、トンボマグロ中骨部位サーモライシン加水分解物のアンセリン含有量は、乾燥重量 1 mg あたり 0.04 mg で、サーモライシン未処理の 1/3 程度という値となっている。これは、サーモライシン処理で多数のペプチドが遊離したことにより、熱水抽出物の重量が増加したため、重量当たりのアンセリン含有量が相対的に減少したものと考えられる。また、本実験の結果はマグロ加工残渣からアンセリンと ACE 阻害ペプチドを同時に含む機能性食品開発の可能性を示している。

5 まとめ

アナアオサ、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリ、オキナワモズク加工残渣、グルクン筋肉、トンボマグロ中骨部位などのサーモライシン加水分解物から ACE 阻害作用 (血圧降下作用の可能性) のある Ile-Tyr、Val-Tyr、Phe-Tyr、Ile-Phe、Phe-Trp、Ala-Trp、Met-Trp、Val-Trp などのジペプチドを多数見出した。

Ile-Tyr、Val-Tyr は「血圧が高めの方の食品」(トクホ)の成分でもある。海藻や魚類の酵素加水分解物が「血圧が高めの方の食品」として実用化されている例が多数あり、今後、実用化のためにはヒトへの投与試験が必要であるが、これらは有望な素材と考えられる。

また、トンボマグロ中骨部位の熱水抽出物は乾燥重量1 mgあたり、アンセリン0.14 mg、カルノシン0.005 mgを含有し、マグロ加工残渣から、このようなイミダゾールジペプチドを高濃度に含むサプリメントが開発できる可能性がある。イミダゾールジペプチドは抗酸化作用、緩衝作用による運動能力向上、抗疲労効果などの機能を有するとされている^{2~5)}。さらに、トンボマグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物は Val-Tyr など複数のACE阻害ペプチドと1 mgあたり0.04 mgのアンセリンを含んでおり、ACE阻害ペプチドとイミダゾールジペプチドの効果を併せ持った機能性食品として開発できる可能性もある。

本研究は「沖縄海洋生物資源を用いた機能性ペプチド生産に関する研究(2014 技 002/H26-27)」の一環として行ったものである。また、本研究の一部は地域イノベーション創出研究開発事業「沖縄県産機能性素材を用いた発酵健康飲料の開発」(2011 技 006/H22-23)の過程で行った。

謝辞

海藻試料をご恵与いただいた沖縄県海洋深層水研究所、沖縄県水産海洋技術センター、トンボマグロ中骨部位および頭部をご恵与いただいた一般財団法人沖縄県水産公社、オキナワモズク加工残渣をご恵与いただいた金秀バイオ株式会社の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 松井利郎, レニン-アンジオテンシン系と血圧調節, 化学と生物, **53**, 228-235 (2015)
- 2) R. Kohen, Y. Yamamoto, K. C. Cundy, B. R. Ames, Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175-3179 (1988)
- 3) 阿部宏喜, 魚類におけるヒスチジン関連化合物の代謝, 化学と生物, **23**, 809-815 (2009)
- 4) 森山洋憲, カツオのアンセリン、カルノシン 2010.5.20, 食品中の機能性成分分析法マニュアル集 (https://unit.aist.go.jp/shikoku/food_forum/katudou/katudou-noseika-ma.html)
- 5) 森山ほか, メカジキ魚肉粉末のアンセリン標準分析法マニュアル 2012.10.10, 食品中の機能性成分分析法

マニュアル集 (https://unit.aist.go.jp/shikoku/food_forum/katudou/katudou-noseika-ma.html)

- 6) D. W. Cushman, H. S. Cheung, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971)
- 7) 山本ら, 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討, 日胸疾会誌, **18**, 297-303 (1980)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。