

# しめサバ酵素消化物中の ACE 阻害ペプチド

若 生 豊\*

## ACE inhibitory peptide in enzyme hydrolyzate of marinade mackerel

Yutaka WAKO\*

### Abstract

It is known that the many peptides have significant inhibitory activity toward the Angiotensin I Converting Enzyme (ACE), prepared from various kind of daily foods. These proteinaceous inhibitors of this enzyme show antihypertensive effect. The hydrolyzate of “shimesaba” (marinade process mackerel) showed the significant inhibitory activity as well as them found in intact raw mackerel. There was no difference in the intensity of activity between them. One of ACE inhibitory peptides of shimesaba hydrolysate was isolated, and its amino acid sequence was Ala-Gln-Pro-Ala-Pro-Thr-Gly-Ala-Gly.

**Keywords:** marinade mackerel, peptide, ACE inhibitory activity, thermolysin

### 1. 緒言

サバはタンパク質含有量が高く、脂肪含有量も高く心血管系疾患予防に有効な n3 系脂質の豊富な供給源となっている。さらに、ビタミンの含有量や炭水化物含有量も高く栄養成分の充実している食材として理解され、食に供されて来た。サバは脂質含有量が高いことや、鮮度劣化が早いことから、酢を用いた調理や加工が古くよりなされ、しめサバも惣菜、嗜好品として広く親しまれている。

さて、タンパク質は分解され吸収されるが、分解の過程で生じるペプチドには様々な機能が見出されてきた。消化吸収過程で派生するペプチドが生理的機能を果たすか否かについては不明の部分も多いが、本研究においては、しめサバの消化性と派生ペプチドの生理機能について検討を行い、しめサバの健全性を考察することを目的とした。アンジオテンシン変換酵素は血圧上昇を調節しており、血管収縮作用を持つペプチドであるアンジオテンシンを活性化する。活性化は前駆ペプチドの末端を加水分解することによりなされるが、末端ペプチドと類似構造を持つアンタゴニストである阻害ペプチドが存在する場合、この反応は阻害され結果的に血圧上昇が抑制される<sup>1)</sup>。様々なタンパク質から阻害ペプチドは派生しており、これを原理とする血圧降下剤や健康食品が開発利用されている。研究室ではバイオリアクター装置によりすり身廃液から強力な阻害ペプチドを生成できることを確認してきた<sup>2)</sup>。本研究ではしめサバの加工原理である食酢による酸変性処理に着目し、酸変性処理が酵素消化反応や分解物中の ACE 阻害活性にどのような影響を及ぼすか

について検討を行った。

### 2. 実験材料および方法

#### 1) 試料調製と加水分解反応

青森県ふるさと食品研究センターより提供された、しめサバおよびその対照となるサバフィレーを試験試料とした。各試料を冷アセトンにてホモジナイズした後に、ブフナー漏斗上で溶媒を吸引ろ過し、脱脂および脱水を行い、アセトンパウダーを作成し実験に供した。本研究では、しめサバより調製したアセトンパウダーは“酢酸処理試料”、対照となるサバフィレーから調製したものは“対照試料”と表示した。

加水分解反応は以下の条件により行った。各タンパク質のアセトンパウダーを濃度 80mg/ml, pH7 に調整し、タンパク質分解酵素であるサーモリシン(和光純薬工業株式会社)を 0.2mg/ml の濃度となるように加え、恒温槽で 45℃, 8 時間、加温振盪した。加水分解物試料は 0, 30, 60, 120, 240, 480min に各反応液の一部を採取し、その遠心上清を実験試料とし、凍結保存した。

#### 2) タンパク質の定量

タンパク質濃度の測定はビシンコニン酸法により行なった。試薬は市販のキット BCA Protein Assay Reagent を用い、アルブミンを標準物質として定量した。反応は、マイクロプレート内で行い、60℃, 30 分間インキュベートの後、562nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 3) アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性

ACE 阻害活性は、Cushman と Cheung らの方法<sup>3)</sup> に

\* バイオ環境工学科・教授

準じ測定した。反応液 (250  $\mu$ l) は 100mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.3), 400mM NaCl, 2.5mU アンギオテンシン変換酵素, 12.5 mM 基質 (Hippuryl-Histidyl Leucine) および試料溶液, 対照区は試料溶液の代わりに水から成り, 37  $^{\circ}$ C で 60 min 振盪付置した。250  $\mu$ l の 0.5M HCl を加え反応停止した後, 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。阻害率は被験液での吸光度を Es, 被験液の代わりに水を加えた対照区の値を Ec, あらかじめ反応停止液を加えておいたブランクの値を EB としたとき, 下記の式から計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{EC} - \text{ES}) / (\text{EC} - \text{EB}) \times 100$$

阻害率が 50% を示す反応液中の試料のタンパク質濃度を IC<sub>50</sub> として表した。

#### 4) ペプチドの分析と分離精製

酵素分解によりしめサバタンパク質より派生したペプチドの分析と分離精製は, 逆相樹脂を用いたクロマトグラフィーにより行なった。分析には島津製 LC-10 型の HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を用いた。カラムは ODS 樹脂の TSK gel 120-T (4.6  $\times$  250mm, TOSO) を用い, 流速は 0.7ml/min とした。溶出は 0.1%TFA を含む水 (A 液) およびアセトニトリル (B 液) の 2 液により, B 液濃度を 50 分で 14% から 30% まで上昇させ濃度勾配溶出によって行なった。分離精製の最初のステップには逆相樹脂 (LP-60 C18, Wako) を充填したオープンカラム (2.5cm  $\times$  8cm) を用いた。カラムを 0.5% のメタノールで平衡化した後, 加水分解試料をチャージし 0.5% のメタノールで洗浄の後, 40% メタノールで溶出を行い, 溶離液を 20ml ずつフラクションコレクターで分取した。各画分は 40 $^{\circ}$ C で減圧濃縮しメタノールを除去した後, 次の分離精製に付した。ペプチド分析と同条件の HPLC クロマトグラフィーを行い, 溶出液をフラクションコレクターに 30 秒ずつ繰り返し分取し, ペプチドを単離精製した。

#### 5) アミノ酸一次配列解析

アミノ酸の一次配列解析は自動アミノ酸一次配列解析装置 (気相プロテシケーター: 島津 PSQ-21) により行った。標準アミノ酸を用い装置をキャリブレーションした後, 試料をガラスフィルターへロードし, 装置リアクター内へ装着し分析に付した。分析のサイクル数は 15 回とした。各サイクルの配列アミノ酸の決定は, 専用解析ソフト PPSQ10 による自動解析結果によった。

### 3. 実験結果と考察

#### 1) 酢酸変性処理がタンパク質加水分解および ACE 阻害活性発現におよぼす影響

食品の消化吸収性および機能性成分の生成に及ぼす, 酢酸変性処理の影響を検討する目的で, 酢酸処理試料および対照試料をタンパク質分解酵素により加水分解し比較した。反応液を経時的に採取し, 遠心分離した上清のタンパク質濃度, および ACE 阻害活性を測定し, それぞれの結果を Fig. 1 A, および B へ示した。タンパク質濃度は時間経過と共に可溶化が進み上清の濃度は増加するが, さらに反応がペプチド・アミノ酸まで進行する結果, 減少に転じた。酢酸処理試料の可溶性タンパク質は 120min まで上昇し, 対照試料のそれと比べ約 2 倍の値を示しその後減少した。このことは, 酢酸処理群では, タンパク質の可溶化とペプチド・アミノ酸への移行が早く, 加水分解を受け易い状態になっていることが示唆された。

一方, ACE 阻害活性は 120min までに急激に上昇し, その後ほぼ一定の値に収束した。しかし, 両群の間に差は認められなかった。その理由としては反応液の試料濃度が高く, いずれの群も早期に ACE 阻害を示すペプチドが多量に生成されたためと思われる。

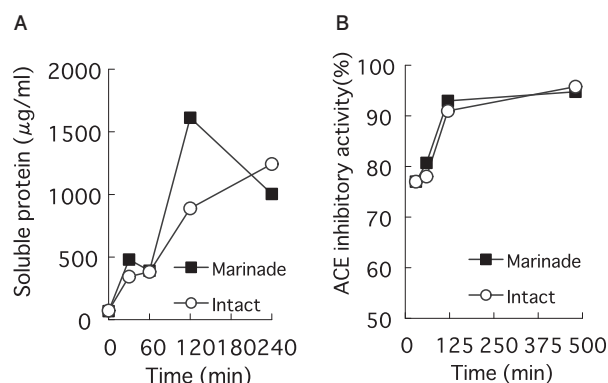
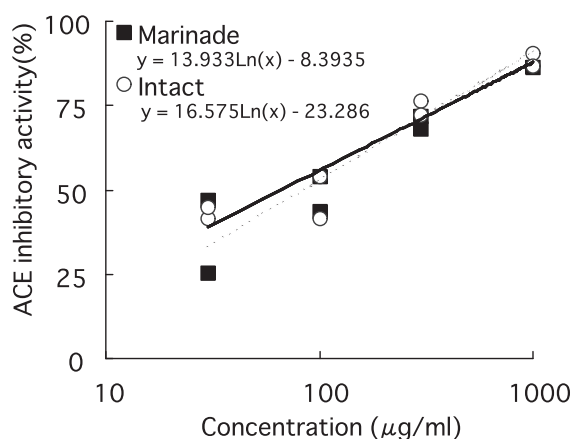


Fig.1 Time course analysis of soluble protein (A) and ACE inhibitory activity (B) in hydrolyzate. Hydrolyzates of marinade (■) and intact (○) mackerel was collected at time intervals. Hydrolysis condition was described in the experimental method.

#### 2) 酸変性処理および対照試料酵素加水分解物の ACE 阻害活性比較

両群の試料から生成される阻害ペプチドの活性の強さに違いがあるかを検討した。阻害の強さは酵素反応を 50% 阻害するのに必要とされる試料濃度の IC<sub>50</sub> 値で評価した。値が低いほど阻害強度は高いことを意味する。8 時間酵素消化した両群の試料を段階的に濃度を変え ACE 阻害活性強度を測定した。酢酸変性処理および対照試料, それぞれの ACE 阻害活性と試料濃度との相関の回帰式を求め, 式より計算で IC<sub>50</sub> 値を得た。IC<sub>50</sub> 値を算出した散布図と回帰曲線を Fig.2 に示す。その結果, 対照の IC<sub>50</sub> 値は約 66.3  $\mu$ g/ml, 酢酸処理群のそれは約

59.2  $\mu\text{g/ml}$  と計算され、両者に差は認められなかった (Table)。従って、しめサバへの加工処理は、生ずる ACE 阻害活性の強度には影響を与えないことが示唆された。さらに、今回調製した加水分解物の活性強度を評価する参考として、阻害ペプチドの配合されている市販の健康食品について  $\text{IC}_{50}$  を測定し比較したところ、その商品の  $\text{IC}_{50}$  値は 8500  $\mu\text{g/ml}$  であり、しめサバより調製した試料は十分強い阻害強度を示していることが分かった。



**Fig.2** Correlation curve between ACE inhibitory activity and concentration of hydrolyzates. ACE inhibitory activity was determined with varying concentration of hydrolyzate of marinade (■) and intact (○) mackerel.

Table Comparison of the ACE inhibitory activity of hydrolysate between marinade mackerel and intact course mackerel.

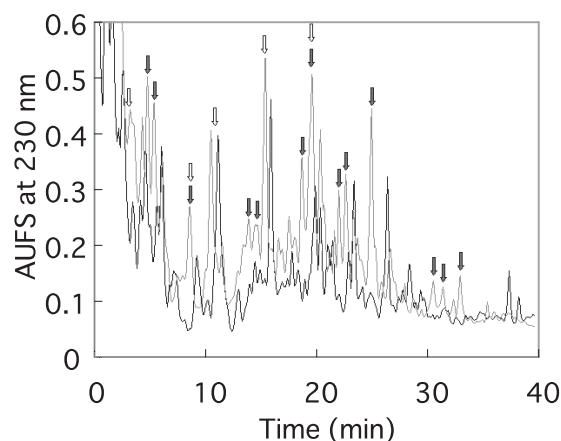
| Sample        | Sample conc.<br>dry weight mg/ml | ACE inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ ) |                                       |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|
|               |                                  | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )        | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{l/ml}$ ) |
| Marinade      | 10.0                             | 66.3                                         | 6.6                                   |
| Intact        | 10.0                             | 59.2                                         | 5.9                                   |
| Healthy drink | 52.6                             | 8500.0                                       | 161.6                                 |

Each value is an average of two data.

### 3) 酸変性処理および対照試料酵素加水分解物の HPLC パターンの比較

加水分解液中に含まれる多数のペプチドが ACE 阻害作用を示す。しかし、有効にペプチドが機能する条件としては、消化過程で加水分解の影響を受け活性が失われないこと、十分に消化管吸収が起こる分子サイズであること、ペプチド残基の Val, Trp などの分枝アミノ酸が際立ち苦味を呈さないこと<sup>4)</sup>などが求められる。これらの点を検討するには構成ペプチド分子を分取し、構造と化学的特性を明らかにする必要がある。ここでは予備的検討として両試料を液体クロマトグラフィーで分析し、試料に含まれるペプチドの分離パターンを比較した (Fig.3)。対照試料の HPLC のクロマトグラムを下部へ、酢酸処理試料のそれを上部へ示した。両試料のクロマトグラムには差異が認められた。ピークの保持時間を比較

したところ、白矢印のピークでは対照と比べ酢酸処理試料ではその保持時間が早まっていた。ピーク面積比の比較では、灰色矢印のピークでは対照では小さなピークであるものが、酢酸処理試料ではそのエリア面積が増大し、大きなピークとして観察されていた。これらの結果から、酢酸処理によって派生するペプチドの内容に変化の起こることが示唆された。この差異が示す意味合いは明らかではないが、上記のペプチドの性状も異なっている可能性も考えられ今後さらに検討が必要と思われた。

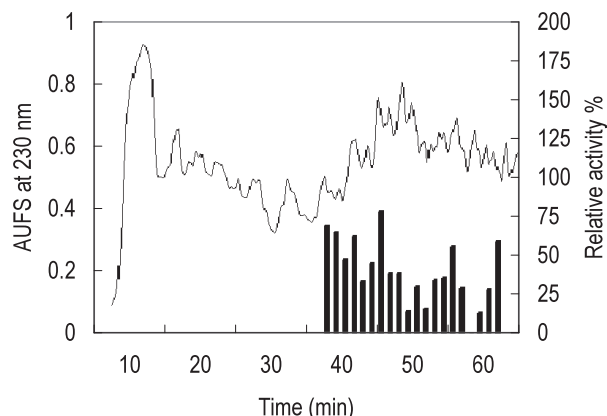


**Fig.3** Comparing HPLC profiles of hydrolyzate of marinade (upper chromatogram) and intact mackerel (lower chromatogram) with TSK gel 120-T. Open arrows indicated the peaks which retention time changes between them. Hatched arrows indicated the peaks which area changes.

### 4) 酸変性処理試料より派生する ACE 阻害ペプチド分離精製の検討

有効に機能するペプチドが含まれているかを明らかにするためには、ペプチドの分離精製と構造解析が求められる。本研究では一部のペプチドを分離精製し、予備的検討を行った結果を報告する。加水分解液のセミ分取カラムを用いた液体クロマトグラフィーによる分離結果を Fig.4 に示す。黒のヒストグラムは回収した各フラクションの ACE 阻害活性強度を示す。多数のピークが密集して溶出されており無数の阻害活性ペプチドの生じていることが示された。しかし、ここから派生ペプチドを分取することは効率的ではなく、最初の段階でオープンカラムを用いた粗分画を行う方法を取ることとした。オープンカラムを 0.5% のメタノールで平衡化した後、加水分解試料をチャージし 0.5% のメタノールで洗浄の後、40% メタノールで溶出を行い、溶離液を 20ml ずつフラクションコレクターで分取した。主要な吸着成分はフラクション 2~6 に溶出された。各画分は 40°C で減圧濃縮しメタノールを除去した後、次の分離精製に付した。ペプチド分析と同条件の HPLC クロマトグラフィーを行い、溶出液をフラクションコレクターに 30 秒ずつ繰り返して分取し、ペプチドを単離精製した。Fig.4 (A) へ粗分画 4 を HPLC で精製した際のクロマトグラムを

示した。溶出時間 12.5 分, 21.9 分, 28.2 分のピークを分離することとし, 各ピークが分取される溶出位置にある数本の試験管の溶離液を再度, 同条件の HPLC で分析し目的のピークが最も良く回収されているフラクションを決定した (Fig.4 (B))。



**Fig.4** Reverse phase HPLC profiles of hydrolyzate of marinade mackerel with Mitosil RP-18 (10mm × 25cm). The eluate of each fraction was obtained and assayed for ACE inhibitory activity. The vertical bar represent relative inhibitory activity.

### 5) ACE 阻害ペプチドのアミノ酸一次配列

粗分画 4 より分離された精製ペプチド (4-26) の配列を検討した結果, Ala-Gln-Pro-Ala-Pro-Thr-Gly-Ala-Gly の一次配列を有するアミノ酸 9 残基のペプチドであることが判明した。サンプル量は十分でなかったため, ACE 阻害活性は測定できず IC<sub>50</sub> は不明である。また, このペプチドを生じさせた基となるタンパク質を検討する目的から, アミノ酸配列の相同性を調べる検索サイト (BLAST) を用い検討したが, 一致するペプチドを検索

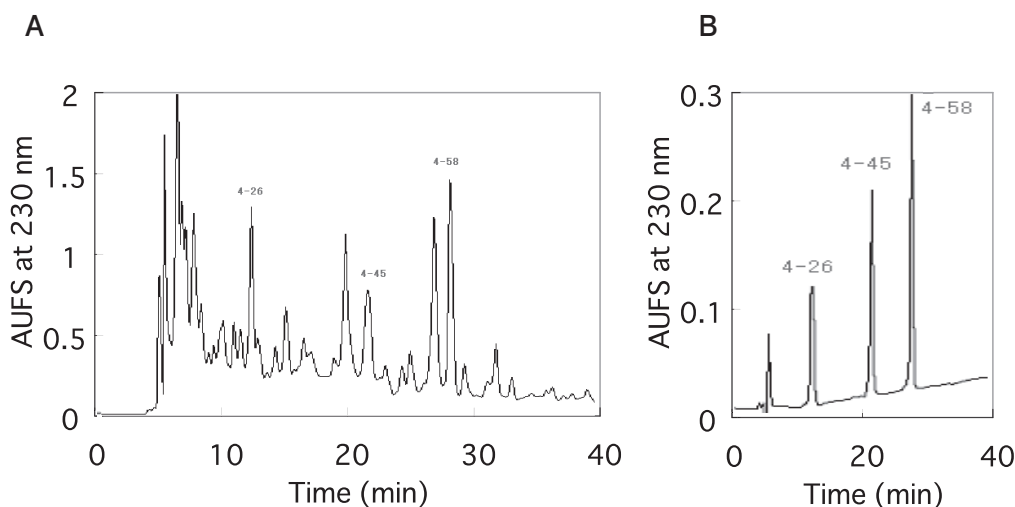
することはできず, ペプチドの由来を推定することは出来なかった。今後, 複数のペプチドの一次配列を調べ, ペプチドの機能を明らかにする必要がある。

### 6) 結論

- ・しめサバから調製したタンパク質の酵素消化性は, 対照の未加工サバと比較し高く酢酸処理により酵素消化が受けやすくなっていることが示唆された。
- ・サーモリシン加水分解により強い ACE 阻害活性が出現し, IC<sub>50</sub> 値は約 50~70 μg/ml であった。
- ・しめサバにおける酢酸処理は, タンパク分解により発現する ACE 阻害活性の生成スピードや加水分解液の比活性である IC<sub>50</sub> 値に影響は及ぼさなかった。
- ・酢酸処理は, しめサバタンパク質より派生するペプチドの種類あるいは組成比に影響を及ぼすことが示され, 加水分解物の呈味や安定性などの性質に変化を与える可能性が考えられた。
- ・一つの派生ペプチドを分離精製し, そのアミノ酸配列を分析した結果, Ala-Gln-Pro- Ala-Pro-Thr-Gly-Ala-Gly であることが判明した。

### 参考文献

- 1) Ondetti, M.A., Rubin, B. Cushman, D.W., *Science*, 196, 441 (1977)
- 2) Wako, Y., Abe, U. et al., *Food Sci. Technol. Res.*, 54, 378 (1990)
- 3) Cushman, D.W., Cheng, H.S., *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637 (1971)
- 4) Cheng, H.S., Wang, F.L. et al., *J. Biol. Chem.*, 225, 401 (1980)



**Fig.5** Purification of ACE inhibitory peptides from hydrolyzate of marinade mackerel. (A) Reverse phase HPLC in TSKgel 120T (4.6mm × 25cm) of clued peptide fraction 4 eluted from LP-60C. (B) Chromatography pattern of each fractions (4-26, 4-45, 4-58) eluted from Reverse phase HPLC showed in (A).