

牛乳タンパク質からの AT1 受容体阻害活性を有する

新規血圧降下性ペプチドの単離とその利用

東北大学大学院農学研究科・教授 齋藤 忠夫

はじめに

我が国の高血圧患者は約 3,000 万人と推定され、日本人の 4 人に 1 人、さらに 50 歳以上では 2 人に 1 人が高血圧とされる。表 1 に示した様に、2003 年のアメリカ高血圧合同委員会の報告(JNC7)では、正常血圧を 120mmHg (収縮期血圧, SBP) / 80mmHg (拡張期血圧, DBP) 未満、高血圧前症が 120-139mmHgSBP / 80-89mmHgDBP と設定され、より早期の高血圧治療の重要性が指摘されている。一般的に、食事や運動療法でも高血圧症状が改善されない場合には、患者には薬物療法が開始される。医療の臨床現場で使用される降圧剤には、中枢性交感神経遮断薬 (β 受容体遮断薬)、抹消性交感神経遮断薬 (α 受容体遮断薬)、血管平滑筋拡張薬 (Ca 拮抗薬)、利尿薬およびレニン・アンジオテンシン系抑制薬 (ACE 阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) などが投与され治療に使用されている。

ほ乳動物の血圧の恒常性は、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) を中心として保たれており、昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系と降圧系であるキニン・カリクレイン系のバランスの上に成り立っており、その機構の概要を図 1 に示した。本研究の対象となるレニン・アンジオテンシン系抑制薬は、摂取後に肺などに局在するレニン・アンジオテンシン系の重要な酵素 (アンジオテンシン I 変換酵素: ACE、EC 3.4.15.1) を阻害するために、血管収縮作用により強い血圧上昇作用を示す「アンジオテンシン II」の生成が抑えられことで降圧作用を示す。現在広く市販され投薬されているアンジオテンシン II の産生を阻害する「ACE 阻害薬」は優れた降圧作用を発揮するが、キニン類が貯留して特有の「空咳」などの副作用が 1-33 % の患者で認められることが知られている。近年では、ACE 以外にもアンジオテンシン II を産生する副経路の存在が明らかになったため、アンジオテンシン II 受容体を直接的に阻害し、かつ副作用の少ない「アンジオテンシン II 受容体拮抗薬」(ARB) が開発され、広く患者に投与され始めている。しかし、今後副作用が発見される可能性も否定できない。

一方、食品科学分野では、食品の三次機能の研究の一環として、乳タンパク質のプロテアーゼ分解ペプチドの示す ACE 阻害活性や、近年では動物実験での確認を経て血圧降下作用 (降圧活性) が研究されている。これらのペプチドは機能性ペプチドまたは生理活性ペプチドと称されている。乳タンパク質であるカゼインやホエイタンパク質のタンパク質分解反応により生じる各種ペプチドでは、様々な血圧を調節する作用を示すペプチド類の存在が知られている。著者も、これまで乳タンパク質から多数の血圧降下性ペプチドを単離し、その構造や機能を報告しており

(Murakami et al., *J. Dairy Sci.*, 87, 1967-1974, 2004, Saito et al., *J. Dairy Sci.*, 83, 1434-14140, 2000, Abubakar et al., *J. Dairy Science*, 81, 3131-3138, 1998), 乳タンパク質が潜在的に多くの生理活性ペプチドを生成する機能性の高い機能性タンパク質であることを証明している。

本研究では、近年の医学分野で注目されているアンジオテンシンⅡが結合して昇圧作用に直接関与する受容体 (以下 AT1 受容体) に対する阻害活性の測定方法を食品分野に初めて導入確立し、とくに乳タンパク質より「アンジオテンシンⅡ受容体拮抗ペプチド」の存在仮説を証明し、新しい作用機作を示す機能性乳製品などの開発のための基礎研究を行うことを目的とするものである。

平成 20 年度実験研究の概要

「市販ペプチド素材からの血圧降下性ペプチド画分の調製と AT1 受容体

結合性ペプチドの存在推定」

これまでに、乳タンパク質のペプシン、トリプシンおよびキモトリプシン消化によって生じる「ACE 阻害活性ペプチド」についての報告は数多くあり、これらは乳タンパク質を摂取した際の体内における「生理活性ペプチド」の生成と作用を示唆している。また、乳の乳酸醗酵の過程で生じる ACE 阻害活性ペプチドや、非乳タンパク質の酵素分解により生じる同ペプチドについても数多くの報告がある。

しかし、ACE 阻害活性ペプチドの多くには、*in vivo* (動物実験) での活性の確認されていないものの多いことに問題がある。ヒトへの応用を考えた場合、実験動物による検討は不可欠であり、当研究室では高血圧のモデル動物である「高血圧自然発症ラット (SHR)」を用いた *in vivo* での血圧評価系をとり入れている。また、ACE 阻害活性ペプチドの実用化が難しいことの要因の一つとして、機能性成分を食品から大量に調製し安定供給することの難しい点が挙げられる。そこで本研究では、安定的に出発材料を確保できるように、世界的なペプチドメーカーであるオランダの DMV 社製の市販ペプチド素材から血圧降下性ペプチドを探索し、AT1 受容体に結合し、阻害性を示す可能性の高いペプチドを探索することにした。

機能性食品の開発には構造が解明された機能性因子を含んでいることが必要である。通常、タンパク質の加水分解物から生理活性ペプチドの単離精製を行う際には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることが多いが、単一ステップでは目的とするペプチドを分取することが難しく、数段階の条件の異なる HPLC を組み合わせる必要性が生じる。そこで本研究では、降圧効果の期待できるペプチド素材をあらかじめ疎水クロマトグラフィーおよびゲルろ過に供して、疎水性で降圧活性の高い画分の絞込みを初めに行う調製方法を導入した。

本研究では、市販ペプチド素材 12 種類について、ACE 阻害活性と SHR による降圧活性を測定し、降圧効果の十分に期待できるペプチド素材を選抜し、さらに各種クロマトグラフィーによりペプチド素材中に含まれる AT1 受容体結合性の高い「降圧活性ペプチド」の単離・精製を行うことを目的とした。

実験材料と方法

1. 試薬および材料

アンジオテンシン変換酵素 (angiotensin I -converting enzyme, EC 3.4.15.1, ウシ肺製, 以下 ACE) は和光純薬工業(株) (大阪) 製を用いた。馬尿酸-ヒスチジルロイシン [Hippuryl-histidyl-leucine (Hip-His-Leu), ACE の活性測定基質, 以下 HHL], ゲルろ過分子量マーカーとして使用したウシ血清アルブミン (BSA), ジペプチド AP (Mw=186.2) およびグリシン (Mw=75.0) は Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, U. S. A.) より購入した。市販ペプチド素材 12 種類は, DMV ジャパン(株) (当時は大阪、平成 20 年よりこの販売部門は日本新薬 (株) に異動した) より購入した。その種類, 起源および特性について表 2 に示した。また, 本章に使用したその他の試薬は, とくに断りのない限り和光純薬工業(株)製の特級品を用いた。

2. 高血圧自然発症ラット (SHR)

高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rats, 以下 SHR) は, 雄の 10 ~ 12 週齢, 体重 265 ~ 285g の条件を満たすものを, (株)船橋農場 (千葉) より購入した。SHR は 10 時間照明, 14 時間暗室の明暗条件, ケージ内温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, および湿度 $60 \pm 3\%$ の環境下で飼育し, 標準飼料 (Labo MR Breeder, 日本農産工業(株), 神奈川) と蒸留水は自由摂取させた。なお, 飼育実験棟の環境に慣れさせるために, 購入後少なくとも 1 週間は予備飼育を行い, その後実験に供するようにした。実験に用いた SHR の週齢および体重は, それぞれ 12 ~ 21 週齢, 280 ~ 400g の範囲であった。

3. アンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定 (*in vitro* 実験)

Yamamoto らの方法を基本として考案された Abubakar らの方法 (*J. Dairy Sci.*, 81, 3131-3138, 1998) により, アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を測定した。表 3 (スキーム) には, 本実験における測定手順を示した。

測定の概要は, 試料溶液 (0.5mg/ml の各ペプチド溶液 150 μ l), Blank および Control (それぞれ 150 μ l の蒸留水) に ACE 溶液 (0.5mU/ μ l of 50% (v/v) グリセロール) 10 μ l, 基質溶液 [12.5mM HHL および 1.0M NaCl を含む 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH8.3)] 100 μ l を加えた。Blank には直ちに 0.5N HCl (125 μ l) を加えて反応を停止した。Control および試料については, 37°C で, 60 分間インキュベートし, 0.5N HCl (250 μ l) を加えて反応を停止させた。ついで, 酢酸エチル (1.5ml) を添加し, 15 秒間振とう抽出後, 試験管遠心分離機を用いて 1,000 \times g, 5 分間遠心分離を行った。2 層に分離した上層部 (正確に 1ml) を小試験管に移し取り, ヒーティングブロックにて 80°C で 5 分間, 窒素噴霧により酢酸エチルを蒸発させた。さらに, 加熱乾固の条件を一定にするため, 最後に全試料を 80°C で 10 分間加熱した。常温にまで冷却後, 0.9% (w/v) NaCl 溶液 (3.0ml) を加えて 15 秒間攪拌溶解し, 直ちに分光光度計 Model UV-1200 (島津製作所, 東京) を用いて馬尿酸の 228nm での紫外部吸光度を測定した。Control の阻害活性を 0% として, 次の計算式により試料の ACE 阻害活性 (%) を求めた。

$$\text{ACE 阻害活性 (\%)} = (\text{Ac-As}) / (\text{Ac-Ab}) \times 100$$

ここで Ab, Ac および As はそれぞれ Blank, Control および試料 (Sample) の 228nm での各吸光度を示す。

なお、各試料について ACE 阻害活性測定を 2 回ずつ行い、その平均値を「%値」で示した。

4. 高血圧自然発症ラットを用いた血圧測定試験 (*in vivo* 実験)

高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧測定は、以下のように行った。まず、SHR を保温箱で 42°C、10 分間保持した後、小動物非観血式自動血圧計 UR-5000 型 (株)ウエダ製作所、東京) を用いて、尾部血圧測定法により心収縮期血圧 (Systolic Blood Pressure, 以下 SBP, 単位 mmHg) を測定した。各試料溶液を、ラット用ゾンデを用いて直接胃内に投与し、6 時間後に同様の方法で SBP を測定した。今回の試料は、ラット 1 匹当たりペプチド 2mg/2ml 蒸留水を投与した。結果は、試料投与前後での SBP の変化量 (血圧降下度) として表示した。また、SHR (n=3) に蒸留水 (2ml) を投与した場合の血圧降下度をコントロール値とした。対照区 (n=3) と試験区との差違は Student' s t-test により評価し、P<0.05 の場合には「有意」と判定した。

5. 逆相担体による疎水性ペプチドの調製

分取クロマトグラム用逆相担体の Wakogel LP-40C18 樹脂 (particle size 20 ~ 40µm, 和光) を 100g (乾燥重量) 採り、90% (v/v) エタノールついで蒸留水で十分に洗浄してから使用した。ペプチド試料 (1g) を蒸留水 (200ml) に溶解後、同樹脂と激しく攪拌し、「疎水性ペプチド」を樹脂に吸着させた。ブフナーロートで吸引ろ過して水分を除いた。樹脂に、新たに 90% (v/v) エタノール (200ml) を混合後、10 分間攪拌し、10 分間放置することで吸着した疎水性ペプチド画分 (混合物) を溶出させた。溶出液中のエタノールは、ロータリーエバポレーターによる 40°C 以下の減圧濃縮により除去した後、ペプチド残液を凍結乾燥した。

6. ゲルろ過による低分子量ペプチド画分の調製

1) 分子量マーカーによる低分子量ペプチド画分溶出位置の推定

ウシ血清アルブミン、ジペプチド AP (Mw=186.2) およびグリシン (Mw=75.0) を以下の条件でゲルろ過に供し、各マーカーの溶出位置を検討した。

—ゲルろ過条件—

カラム: Sephadex G-15 カラム (2.6φ×93.5cm, Vt=494ml, Vo=145ml, Amersham pharmacia biotech, Co., Ltd.)

移動相: 0.05% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む MilliQ 水

流速: 0.5ml/min

分取: 5ml

検出: OD₂₁₄ (ペプチド結合の 214nm の吸収を測定)

2) 疎水性ペプチドのゲルろ過

方法 5. で調製した疎水性ペプチド試料について、上記の 6. -1) のクロマト条件によりゲルろ過

を行った。分画面分の中で一定分子量範囲のフラクションを回収し、ロータリーエバポレーターにより 40℃以下での濃縮・乾固を繰り返し行い、TFA を完全に除去した後、凍結乾燥した。

7. 逆相モードでの高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

方法 6. で調製したペプチド画分について、逆相 (Reversed-Phase, 以下 RP) モードでの高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography, 以下 HPLC) に供し、目的ピークを分取した。実験には、インテリジェントポンプ L-6200 型 (㈱日立製作所, 東京), カラムオーブ L-7300 型 (㈱日立製作所), UV-VIS 検出器 L-7420 型 (UV and visible light detector, ㈱日立製作所) およびクロマトデータステーション D-7000 型 (㈱日立製作所) を用いた。

— RP-HPLC 条件 —

カラム : Wakosil-II 5C18 カラム (4.6φ×250mm ; 和光純薬)

溶 媒 : 移動相 A

[0.05% (v/v) TFA を含む 10% (v/v) アセトニトリル (CH₃CN) 溶液]

移動相 B [0.05% (v/v) TFA を含む 60% (v/v) CH₃CN 溶液]

溶 出 : 20 分間で移動相 A 100% から移動相 B 100% に直線的に上昇させた。

流 速 : 0.5ml/min

温 度 : 40℃

検 出 : OD₂₁₄ (ペプチド結合)

ただし、分取の際は感度を下げるために、230nm で検出した。各フラクションを回収し、ロータリーエバポレーターにより 40℃以下での濃縮・乾固を繰り返し行い、TFA を完全に除去した後、凍結乾燥した。

実験結果

1. 市販ペプチド素材の示す ACE 阻害活性 (*in vitro*)

表 2 に示した 12 種類の市販ペプチド素材について、ACE 阻害活性および SHR による降圧活性を測定した (表 4)。その結果、各種のペプチドの起源によらず、ACE 阻害活性は 38 ~ 78% の間の値を示した。すなわち、ACE 阻害活性を示さない試料は存在せず、全ての試料において一定の阻害性を示した。とくに、ホエータンパク質由来の WE80M および卵白のオボアルブミン由来の EE90FX では、共に 78.2% と最も高い ACE 阻害活性値を示した。ついで、カゼイン由来の CE90STL で 64.9%、および小麦グルテン由来の WGE80GPA で 62.7% と高値を示した。一方、カゼイン由来の CE90F では 34.1%、小麦グルテン由来の WGE80GPU では 36.0% と、低い ACE 阻害活性値を示した。ACE 阻害活性の低かった CE90F および WGE80GPU の両ペプチド素材に含まれるオリゴペプチドの平均分子量は、それぞれ 18,500 および 6,700 と高い値であった (表 2 参照)。

2. 市販ペプチド素材の示す SHR による降圧活性 (*in vivo*)

SHR を用いての降圧活性試験の結果 (表 4 参照)、乳タンパク質由来のペプチド素材でとくに

高い降圧活性を示す傾向にあった。すなわち、ホエータンパク質由来の WE80BG および WE80M では、それぞれ-21.2mmHg および-18.8mmHg であった。またカゼイン由来の CE90STL および CE90GMM では、それぞれ-20.7mmHg および-18.0mmHg という降圧活性値を示した。高い ACE 阻害活性を示したホエータンパク質由来の WE80M では、降圧活性も同様に高かった。一方、高い ACE 阻害活性を示した EE90FX では、対照的に-0.5mmHg とほとんど降圧活性を示さなかった。

以上の ACE 阻害活性および SHR での降圧活性試験の結果から、AT1 受容体阻害活性を示す成分が含まれる可能性の高い、「降圧活性が最も高くてかつ ACE 阻害活性も中程度の強さ」のペプチド素材「WE80BG」を選抜して、「降圧ペプチド」の単離精製を行うことにした。

3. 疎水クロマトグラフィーおよびゲルろ過によるペプチドの分画

方法 5. により調製した疎水性ペプチドを、Sephadex G-15 カラムを用いたゲルろ過により分画した。はじめに、ウシ血清アルブミンを用いて排除限界点（ボイド容積）を求め、ジペプチド AP (Mw=186.2) およびグリシン (Mw=75.0) によりオリゴペプチドと遊離アミノ酸の溶出範囲を検討した。

WE80BG より調製した疎水性ペプチドをゲルろ過に供した結果は、図 2 に示した。各ペプチドは明確なピーク群として分離溶出はしなかったが、矢印に示した f. 1 (分画本数 29-35 本), f. 2 (同 36-45 本), f. 3 (同 46-52 本), f. 4 (同 53-60 本) および f. 5 (同 61-68 本) の 5 画分に分取した。

4. ゲルろ過により調製した各画分の ACE 阻害活性

WE80BG の疎水性画分をゲルろ過により分画して得られた 5 画分における各画分について、ACE 阻害活性を測定した (図 3)。ACE 阻害活性値は、0 ~ 42.5% の範囲であり、WE80BG (whole) の値 (53.6%, 表 4) よりもやや低値を示した。5 つの画分の中では、「f. 4 画分」が 42.5% と最も高い ACE 阻害活性を示した。

5. ゲルろ過により調製した各画分の降圧活性

ゲルろ過により調製した 5 画分について、SHR (n=3) への投与 6 時間後の降圧活性を検討した (図 4)。その結果、f. 4 画分で-18.8mmHg と最も高い降圧活性値を示した。f. 2 画分では-7.2mmHg と弱い降圧活性値を示したが、その他の画分ではほとんど降圧活性が認められなかった。また、同じラット群を用いての WE80BG および WE80BG から調製した疎水性ペプチドの降圧活性は、それぞれ-8.0mmHg および-11.0mmHg であった。以上の結果から、「f. 4 画分」中には、AT1 受容体活性を阻害する可能性があると考えられ、この画分に含まれる降圧ペプチドの単離精製を行うことにした。

6. 逆相-高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による降圧ペプチドの単離と精製

ゲルろ過により得られた「f. 4 画分」を、RP-HPLC に供した。得られた HPLC クロマトグラムは、図 5 に示した。図の矢印に示したように、a (溶出時間 3-6 分), b (同 6-9 分), c (同 9-12 分), d (同 12-15 分) および e (同 15-18 分) の 5 つの画分に分画した。

7. RP-HPLCにより分画した各画分のACE阻害活性

RP-HPLCにより分画して得られた5つの画分(a～e)について、ACE阻害活性を測定した結果を、図6に示した。d画分では、55.2%と最も高いACE阻害活性値を示した。しかしながら、c画分では6.3%、他のaおよびb画分ではACE阻害活性が認められなかった。これらの結果から、「d画分」に含まれるペプチド成分が出発試料(WE80BG)の示した降圧活性に強く関与しているものと推定し、次のステップである純度検定および化学構造解析を行うことにした。

考 察

本研究で用いたペプチド素材12種類は、食品グレードの酵素を用いた食品タンパク質の加水分解物であり、様々な食品に添加する目的でオランダのDMV社から販売されている市販品である。これらの製品の中には、タンパク質を加水分解することにより、例えばホエータンパク質由来の素材の場合は、低アレルギー性を獲得しつつ腸管からの吸収性が向上しており、栄養補助剤や飲料など様々な製品に応用されている。また、小麦グルテン由来の素材の場合、グルタミン含量が高いことから、グルタミン補給によって免疫促進や疲労回復促進などの効果があり、スポーツドリンクや機能性飲料に応用されている。このように、実際に利用性の高いペプチド素材が血圧を下げる機能も合わせて有しているならば、将来的に機能性食品などへの応用性はより促進されるだろうと考えられる。

本研究では、12種類の市販ペプチド素材についてACE阻害活性試験(*in vitro*)およびSHRを用いた降圧活性試験(*in vivo*)を行い、この2つの活性を指標としてAT1受容体阻害による降圧効果の期待できるペプチド素材の選抜および降圧ペプチドの単離精製を行った。ACE阻害活性では、ホエータンパク質由来のWE80Mおよび卵白のオボアルブミン由来のEE90FXで最も高い値を示した。一方、カゼイン由来のCE90Fおよび小麦グルテン由来のWGE80GPUでは、高いACE阻害活性を示さなかった。このCE90FおよびWGE80GPUの2つのペプチド素材は、平均分子量が18,500および6,700と大きく、加水分解の程度の高くないことがACE阻害活性の低さに関係しているものと推定された。これまでにも、低分子量のペプチドがACE阻害活性に主として寄与しているという報告があることも、この推定を支持している。

また、乳タンパク質由来のペプチド素材、すなわちホエータンパク質由来のWE80BGおよびWE80M、カゼイン由来のCE90STLおよびCE90GMMの4種の素材では、-18.0mmHg以上の高いSHRを用いて降圧活性が認められた。しかし、同じく乳タンパク質由来のペプチド素材であるLE80GFでは、全く降圧活性が認められなかった。乳タンパク質には血圧を下げるのに有効なペプチドの配列が多く含まれるが、その調製法やペプチドの大きさによって生理活性に大きな差異が生じることが予想される。乳タンパク質以外では、小麦グルテン由来のWGE80GPNで、-17.2mmHgと高い降圧活性が認められた。小麦グルテンは不溶性のタンパク質であり、グルテン中にはほ乳動物乳カゼインに似た構造の「グルテンカゼイン」と呼ばれる構造の存在することが知られてお

り、この構造により乳タンパク質と同様の降圧ペプチドを生じることが考えられる。

LE80GF では、ACE 阻害活性は高いが、SHR での降圧活性は認められなかった。これは、消化過程において試料中に含まれるペプチドがペプシン、トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼあるいはアミノペプチダーゼなどの消化管起源の各種分解酵素によってさらに低分子化され、ジペプチドあるいはトリペプチドとして吸収されることにより、高分子では示した生理機能を消失したためと考えられる。実際の利用性を検討する場合、単離ペプチドには *in vivo* で降圧活性を示すことが最も重要な因子であるため、当研究室では ACE 阻害活性は生理機能を検討するための参考値として捉え、SHR での降圧活性の結果を最重視してペプチドの生理活性を検討している。しかし、特定保健用食品での評価は、*in vitro* の ACE 阻害活性のみで検討されている。これは、動物実験の実験費用がかさむことや時間がかかり動物飼育施設や特別な技量が必要とされるために、多検体試料の検証にはあまり向いていないのも事実である。

以上より、12 種の市販ペプチド素材中から降圧活性の最も高かった「WE80BG」を選抜できたので、本試料中に含まれている「降圧ペプチド」の単離精製を行った。降圧ペプチドの精製の第一段階として、逆相担体：Wakogel LP40C18 樹脂を用いて WE80BG 中に含まれる「疎水性ペプチド」の調製をまず行った。これまでの報告では、ACE 阻害活性の強いペプチドの条件として、疎水性のアミノ酸を配列中に含むことが挙げられている。そこで当研究室では、降圧効果の期待できる「疎水性ペプチド」のみをあらかじめ調製し、親水性ペプチドや遊離アミノ酸を事前に除去してから、大量調製の難しい HPLC による精製に供する独自の調製方法を用いている (Abubakar *et al.*, *J. Dairy Sci.*, 81, 3131-3138, 1998)。この疎水性ペプチドを試料よりまず初めに調製後、次いでゲルろ過による分子量の差違に基づく分画を行った。Sephadex G-15 担体は 1,500Da 以下の分子量化合物を相互分離し、またマトリックスは化学的に安定で吸着の少ないという特性がある。WE80BG 素材は平均分子量が 570Da であったため、低分子量の物質の分離に有効な Sephadex G-15 担体を用いてゲルろ過を行うことにした。アミノ酸およびペプチドの溶出位置の目安として、グリシンおよびジペプチド (AP) を用い、図 2 のクロマトグラムで矢印に相当する画分をそれぞれ f. 1 から f. 5 画分として回収した。グリシンおよびジペプチドの溶出位置から、f. 4 画分に遊離アミノ酸や低分子量のオリゴペプチドが含まれていると考えられた。

各画分の ACE 阻害活性は、f. 4 画分で 42.5% と最も高い値を示した (図 3)。分画した中では最も高分子量である f. 1 画分の ACE 阻害活性は低く、f. 2, f. 3 と分子量の小さな画分になるにつれ、ACE 阻害活性が高くなる傾向にあった。これにより、前述したように低分子量のペプチドと ACE 阻害活性の高さには負の相関関係が見られた。しかし、アミノ酸のマーカーとして用いたグリシンの溶出後に得られた f. 5 画分でも ACE 阻害活性が見られた。これは分取モードのゲルろ過によるペプチドの大量調製を行ったため、ロード量が多かったためのペプチドの溶出位置の遅れが原因の一つと考えられた。

f. 4 画分の降圧活性は -18.8mmHg と最も高かったが (図 4)、出発試料のペプチド素材 WE80BG

の降圧活性-21.2mmHg よりもやや低値であった。しかし、今回の実験で用いたラット群で再び降圧活性を測定したところ、WE80BG および WE80BG から調製した疎水性ペプチドでの降圧活性はそれぞれ-8.0mmHg および-11.0mmHg であったため、降圧活性画分は確かに精製されていると考えられた。このように SHR での降圧活性は個体差が大きく、n=3 での測定でも信頼に足る活性指標にはなり得るが、より正確な数値を求める際には、実験に用いる SHR の個体数をさらに増やす必要性が示唆された。

以上より、ACE 阻害活性と降圧活性がともに最も高い値を示した「f. 4 画分」中に含まれる降圧ペプチドの単離精製を行った。RP-HPLC による分析の結果、溶出時間 3～6 分付近に複数のピークが見られ、これは溶出初期であることから親水性ペプチドが溶出したものだと考えられる。また、溶出時間 9～12 分においても 2 つのピークが近接して溶出しており、単一ピークとして分取していくことが難しかったため、溶出時間 3 分から 18 分までのピークを 3 分毎に分取することにした。

a～e の分取画分について ACE 阻害活性を測定したところ、「d 画分」で 55.2% という最も高い ACE 阻害活性が見られた (図 6)。溶出位置から、d 画分はかなり疎水性の高い画分であると考えられる。本クロマト条件では、分取用カラムではないため、一度にサンプルをインジェクトできる量が限られており、分取画分について SHR での降圧活性を測定できるほどの収量が得られなかった。このため、ACE 阻害活性を示した d 画分のペプチドについて、今後アミノ酸組成分析と配列順序を明らかにする構造解析を行ってアミノ酸配列を決定し、その配列に基づいて合成ペプチドを合成し、AT1 受容体阻害活性の有無を検討することにした。本年度は、AT1 受容体阻害活性の推定されるペプチドの単離精製まで完了することができ、今後の検討に期待が持たれた。

表 1 国際的取り決めによるヒト血圧疾患における血圧レベルの

分類	収縮期血圧 (mmHg)		拡張期血圧 (mmHg)
至適血圧	<120	かつ	<80
正常血圧	<130	かつ	<85
正常高値血圧	130-139	かつ	85-89
グレード 1 高血圧(軽症)	140-159	または	90-99
グレード 2 高血圧(中等症)	160-179	または	100-109
グレード 3 高血圧(重症)	≥180	または	≥110
収縮期高血圧	≥140	かつ	<90

収縮期血圧と拡張期血圧の分類が異なる場合には、高い方の分類を採用する。

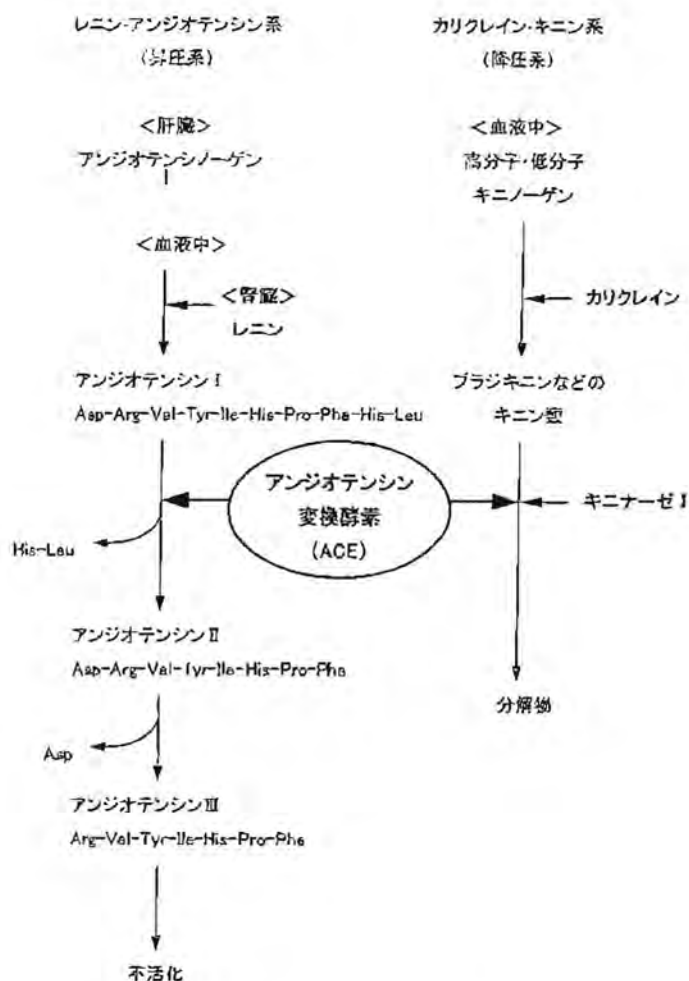


図1 ほ乳動物における血圧恒常性維持のメカニズム

表2 本研究で出発試料として用いた12種類の市販ペプチド素材

試料名	起源	平均分子量 (Da)	タンパク質含量 (%)	溶解度 (g/L)
WE80BG	whey protein	570	81.5	700
WE80M	whey protein	3,000	79.4	350
WE90FS	whey protein	8,500	90.0	-
LE80GF	whey protein	4,600	77.2	150
CE90STL	casein	400	86.7	300
CE90GMM	casein	640	89.9	250
CE90F	casein	18,500	91.2	200
EE90FX	ovalbumin	2,000	86.8	150
WGE80GPA	wheat gluten	660	77.6	200
WGE80GPN	wheat gluten	670	79.0	400
WGE80GPU	wheat gluten	6,700	77.5	200
SE50BT	soybean protein	320	53.2	300

ペプチド素材は、全て DMV JAPAN (大阪)より入手した。また、これらの情報は、同社の製品カタログに公表されている数値である。

表3 アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の測定方法

試薬	Sample	Control	Blank
試料溶液 (0.5mg/ml)	150	-	-
蒸留水	-	150	150
基質溶液 (HHL 溶液) ¹⁾	100	100	100
ACE 溶液 ²⁾	10	10	10
反応停止液 (0.5N HCL)	-	-	-
	↓	↓	
	反応 (37°C, 80 分)		-
反応停止液 (0.5N HCL)	250	250	-
全量	510	510	510

(単位: μ l)

1) 12.5 mM HHL および 1.0 M NaCl を含むホウ酸緩衝液 (pH8.0)

2) ACE 0.5 mL / μ l of 50% (v/v) グリセロール

Abubakar, A. et al. J. Dairy Sci. 81: 3131-3138 (1998) より

表4 12種類の市販ペプチド素材の示した ACE 阻害活性

Peptides	ACE inhibitory activity ¹⁾ (%)	Antihypertensive activity ²⁾ (mmHg)
WE80BG	53.6	-21.2 \pm 16.9
WE80M	78.2	-18.6 \pm 9.4
WE90FS	45.1	-8.5 \pm 19.1
LE80GF	41.9	+0.6 \pm 13.5
GE80STL	64.9	-20.7 \pm 10.3
CE90GMM	51.3	-18.0 \pm 19.3
CE90F	34.1	-12.0 \pm 11.4
EE90FX	78.2	-0.5 \pm 3.3
WGE80GPA	62.7	-5.2 \pm 6.4
WGE80GPN	59.7	-17.2 \pm 9.1
WGE80GPU	38.0	-10.0 \pm 2.5
SE50BT	37.3	-4.5 \pm 6.7

1) ACE 阻害活性の測定は2連で行い、結果は平均値で表した。

2) 投与量はペプチド 2mg/蒸留水 2ml とした。高血圧自然発症ラット (SHR; n=3) への投与 6 時間後の収縮期血圧 (SBP) の変化を測定した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (SE) で表した。

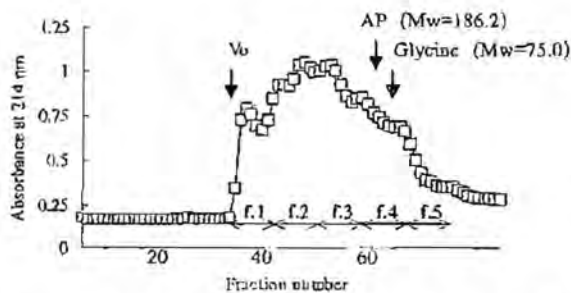


図2 市販ペプチド試料 WE80BG から調製した疎水性ペプチドのゲルろ過溶出曲線

-ゲルろ過条件-

カラム: Sephadex G-15 カラム (2.6X93.5cm, Vt=494ml, Vo=145ml, Amersham 製)

移動相: 0.05% (v/v) のトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む MilliQ 水

流速: 0.5ml/min. 分取: 5ml

検出: OD₂₁₄ (ペプチド結合)

クロマトグラム中の略号: Vo ボイド容積 (ml)

AP: Ala-Pro グペプチド

Mw 分子量 (Da)

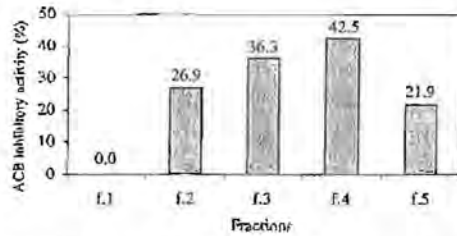


図3 WE80BG 試料からの疎水性ペプチドのゲルろ過調製5画分の示す ACE 阻害活性 (%)
f. 1 ~ f. 5 画分は、図2のゲルろ過で分画された画分を示す。

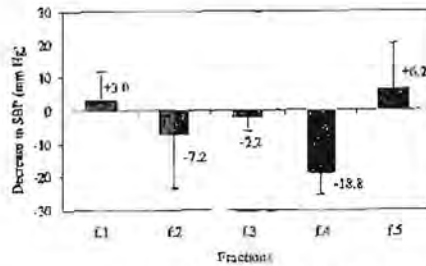


図4 WE80BG 試料からの疎水性ペプチドのゲルろ過調製5画分の示す SHR による血圧降下活性
f. 1 ~ f. 5 画分は、図2のゲルろ過で分画された画分を示す。
SHR は n=3 で実験を行い、測定は3回の平均値で示した。

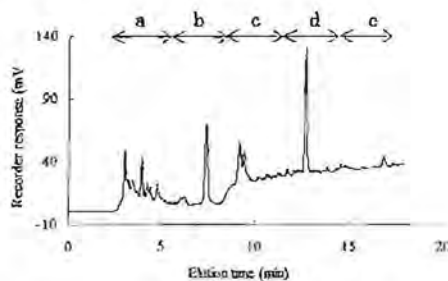


図5 WE80BG 試料からの疎水性ペプチドのゲルろ過調製 f. 4 画分の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

-逆相 HPLC の条件-

カラム: Wakosil-II5C18 カラム (4.6×150mm, 和光純薬 (株) 製)

溶媒: 移動相 A [0.05% (v/v) TFA を含む 10% (v/v) eH₂CN 溶液]

移動相 B [0.05% (v/v) TFA を含む 60% (v/v) eH₂CN 溶液]

溶出: 20 分間で移動相 A100%から移動相 B100%に直線的に上昇。

流速: 0.5ml/min.

温度: 40℃

検出: OD₂₁₄ (ペプチド結合)

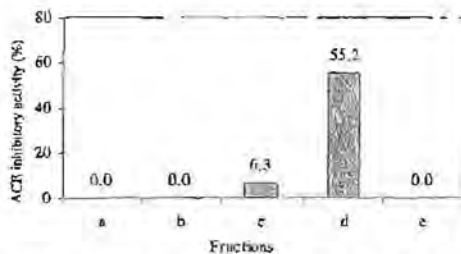


図6 逆相 HPLC により調製した f. 4 画分に分画5区分の示す ACE 阻害活性 (%)
a-e 画分は、図5における RP-HPLC で分画した各区分を示した。