

食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド

[I] イワシ筋肉由来の抗血圧上昇性 (ACE-阻害) ペプチドの単離と構造決定

河村 幸雄¹⁾・杉本 敏男¹⁾・高根 俊一²⁾・佐竹 幹雄²⁾

(¹⁾農水省食品総合研究所*, (²⁾日本水産株式会社中央研究所**)

Biologically Active Peptides Derived from Food Proteins

(I) Angiotensin-converting-enzyme inhibiting peptides

from water soluble protein of sardine muscle

Yukio KAWAMURA¹⁾, Toshio SUGIMOTO¹⁾, Hideji NAKAJIMA²⁾, Mikio SATAKE²⁾

¹⁾*Protein Science Laboratory, National Food Research Institute*

²⁾*Central Research Institute, Nippon Suisan Co.*

A peptide which inhibits angiotensin converting enzyme was isolated from peptic hydrolyzates of water soluble protein of sardine muscle. The preparation procedure contains SP-Sephadex C-25 and Sephadex G-25 chromatography followed by twice high performance liquid chromatography. The purified peptide, a hexapeptide had the sequence of HQAAGW with the half maximum inhibition (IC_{50}) of $60 \mu M$. A peptide sequence with 66% homology to the purified peptide was found in some proteins such as enolase I, ferredoxin II, VB₁₂ receptor precursor, apo-lipoprotein C-III precursor, β -amylase, and reverse transcriptase.

近年、栄養源としての食品という従来からの基本的機能を越えた食品の重要性が認識されている。すなわち、食品と生体の健全性、成人病（高血圧、心臓循環器系疾患など）、免疫不全や過敏（アレルギー）、老化（骨粗しょう症など）との間に深い関係のあることが指摘されている。

cDNA の塩基配列解析およびタンパク質の一次構造解析手法の進歩により、その一次構造の明かとなったタンパク質が増加するにつれ、そのアミノ酸配列中に、生理活性を示すペプチドと同じ配列の存在することが示されている^{1,2)}。生体内で、数種のペプチドホルモンが不活性な前駆体として合成された後、プロテアーゼによりプロセッシングを受け活性な形になる事実は、食品タンパク質の消化過程で、

*所在地：茨城県つくば市観音台2-1-2 (〒305)

**所在地：東京都八王子市北野町559-6 (〒192)

生理作用を有するペプチドが遊離される可能性を示唆する。事実、そのような生理機能を示すペプチド配列が食品タンパク質中に存在することが示されている³⁾。

イワシ (Sardine) は、世界で最も漁獲量が多く、安価な魚であるが十分には利用されていない。しかし、摂取されたとき、高血圧、高脂血症、心筋梗塞など循環器系疾患に良いことが知られている。これは、一つには畜肉と比べて、コレステロールの少ないことや不飽和脂肪酸含量の高いことによると考えられるが、特異的な作用として、消化分解ペプチドによるレニン-アンギオテンシン系におけるアンギオテンシン II の生成に関与するアンギオテンシン変換酵素活性の制御が考えられる。そこでイワシ肉の可溶性タンパク質由来のアンギオテンシン変換酵素阻害作用を示すペプチドを検索、単離し、その構造決定を行った。

実験方法

アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性は、ウサギ肺のアセトンパウダー (Sigma) を用いて、測定した。ACE 活性は、Hipp-His-Leu を基質とし遊離してくる Hipp-基の吸収を測定する Cheung らの方法^{4,5)} に依った。高速液体クロマトグラフィーは、日立高圧グラジエントシステム HPLC により行った。ペプチドのアミノ酸分析は日立-L8500型アミノ酸分析機により、また、ペプチドのアミノ酸配列分析は、ABI 社気相シーケンサー477/120A で決定した。

結果と考察

イワシの頭、内臓、皮などをとり除いた自身の筋肉部分の、水抽出を行い、水溶性タンパク質を調製した。水不溶性 (高塩濃度溶液可溶性) の筋肉タンパク質は、他の目的に使用した。水可溶性タンパク質からの ACE 阻害ペプチドの調製方法を Fig 1. に示す。可溶性画分から低分子成分や低分子ペプチド

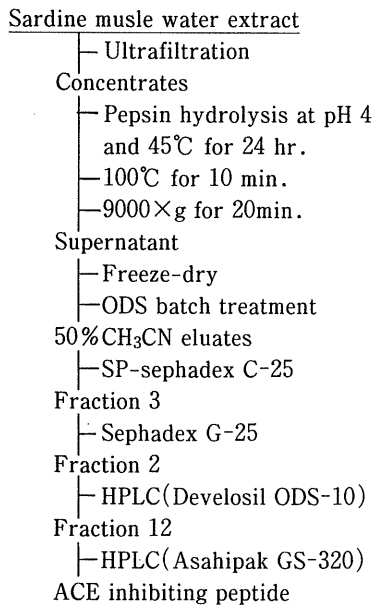


Fig. 1. Isolation procedure of ACE inhibiting peptides from peptic hydrolyzates of sardine muscle extracts.

を除くため、分子量5,000以下のものを通過させる UF 膜を用いて、抽出液を濃縮した。濃縮後の pH を下げた後、ペプシンを添加し加水分解を行った。沸騰水中で10分加熱して酵素作用を停止した後、遠心し、その上清をとり、凍結乾燥を行った。乾燥粉末を ODS カラムのバッチ処理で、50%アセトニトリル溶出画分を集め、SP-セファデックス C-25イオン交換クロマトグラフィーを行った。つづいて活性画分の、セファデックス G-25ゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。(Fig 2.) ACE 阻害活性は、

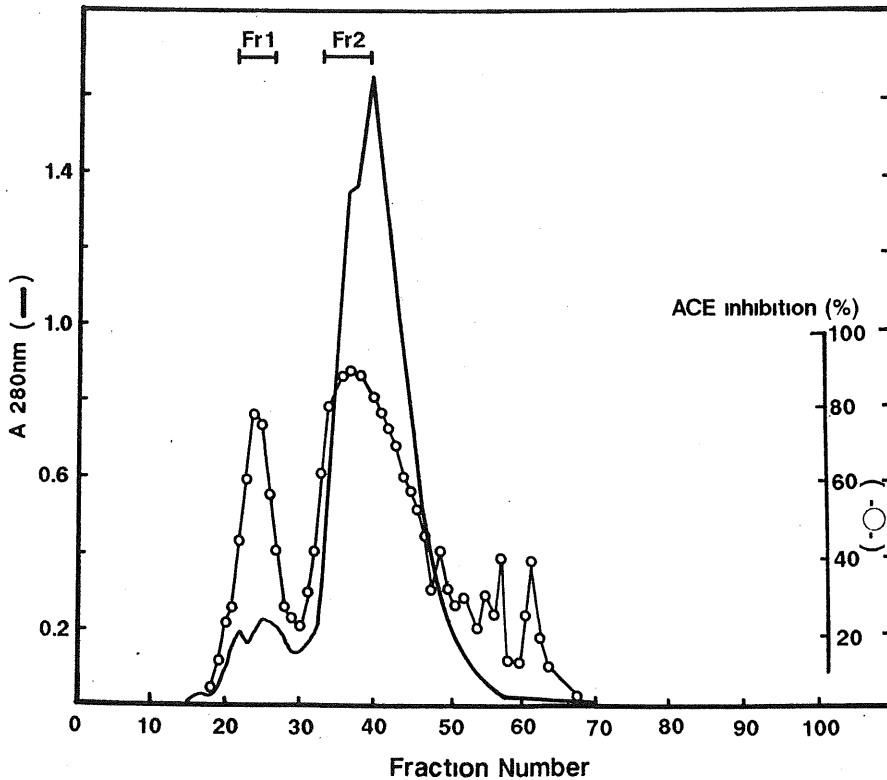


Fig. 2. Sephadex G-25 gel filtration chromatography of the active fraction from SP-sephadex chromatography.

二つの活性ピークとして溶出された。後の大きなピークを集め、脱塩後、凍結乾燥し、Develosil ODS-10を用いる高速液体クロマトグラフィーにかけた。その分析パターンとACE 阻害活性を、Fig 3. に示す。この中で存在量の多い、溶出時間58.37分の画分を集め、溶媒を蒸発させた後、Asahipak GS-320 (0.76×50cm) を用いる HPLC にて、分離した結果、Fig 4. に示すように、1 ピークとして溶出された。この画分につき、アミノ酸分析およびアミノ酸配列解析を行った。決定された、ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列を Table 1 に示した。

単離されたこのペプチドに ACE 阻害活性のあることを確かめるために、同一シーケンスのペプチドを固相法により化学合成し、活性を検証した。その IC₅₀ 値は、分離ペプチドのものと同じく 60 μM であった。

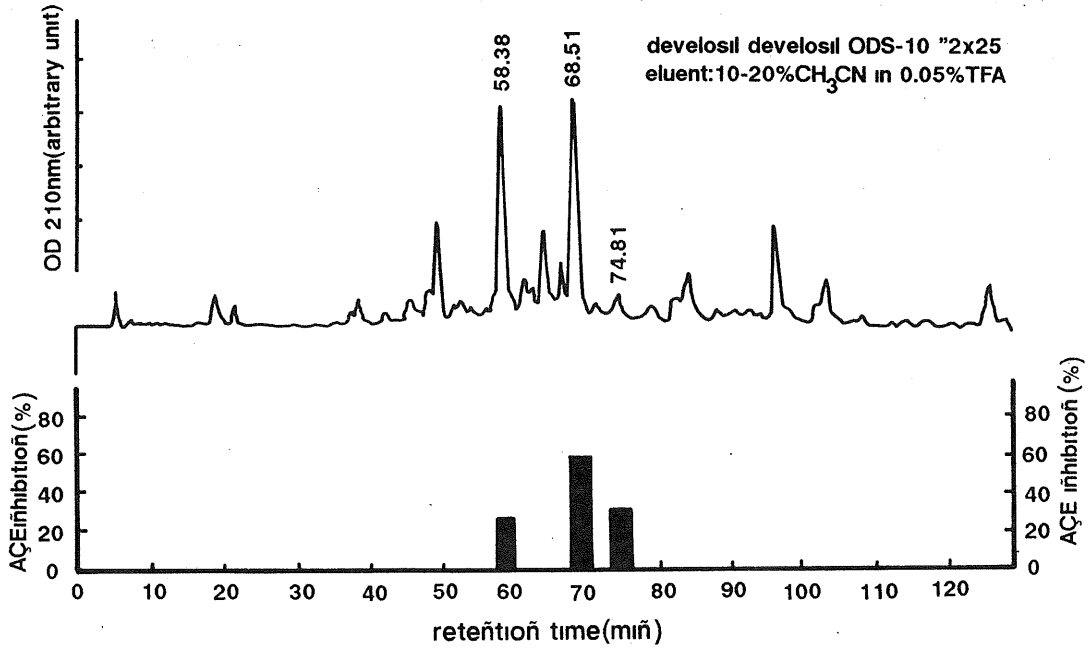


Fig. 3. High performance liquid chromatography on ODS-10 column of a active fraction from sephadex G-25 chromatography.

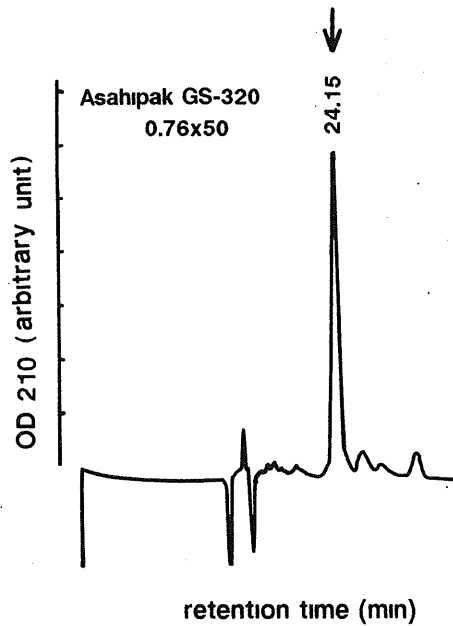


Fig. 4. High performance liquid chromatography on Asahipak GS-320 column of a active fraction from the first HPLC chromatography.

Table 1. Some proteins with the sequence homologous to ACE inhibiting peptide of sardine muscle extracts

Proteins with the homologous sequence	Sequence
ACE inhibiting peptide from sardine muscle	H Q A A G W
Enolase I	S F A A G W
β -amylase	Y P A A G W
Reverse Transcriptase	P V A A G W
Group Specific Protease	C W A A G W
Streptomycin-6-phospho-transferase	G R A A G W
Ferredoxin II	Q L A A G W
VB ₁₂ Receptor Precursor	Q T S A G W
Apolipoprotein IV C-III precursor	Q Q A R G W
Endonuclease BSURT	S Q K H G W
β -crystallin	L Q A M G W

従って、この配列を有するペプチドに ACE 阻害活性のあることが確認された。

HQAAGW と相同配列をもつタンパク質をコンピューター検索したところ、AAGW の配列をもつ数種のタンパク質が見つかった。そのタンパク質とその配列を Table 1 に示した。この AAGW に ACE 阻害活性が認められるか否かは、検討すべく、現在合成中であり、その結果に興味もたれる。又、この配列に何らかの意味があるか否かは不明であるが、この種の生理機能性ペプチドの発見される例が増加すれば、その意義づけが可能になるかもしれない。

文 献

1. DOOLITTLE R. F. (1989) Trends. in Biochemical Science 14 : 244
2. NAKAYAMA, K., H. OHKUBO, T. HIROSE, S. INAYAMA and S. NAKANISHI, (1984) Nature 310 : 699
3. 千葉英雄, 吉川正明(1987) 化学と生物 25 : 396
4. CUSHMAN D. W. and H. S. CHEUNG (1981) Biochemical Pharmacol. 20 : 1637
5. CHEUNG H. S. F.-L. WANG, M. A. ONDDITI, E. F. SABO and D. W. CUSHMAN, (1980) J. Biol. Chem. 255 : 401