

食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド (II) オキアミタンパク質由来の抗血圧上昇性ペプチド

河村幸雄¹⁾・杉本敏男¹⁾・高根俊一²⁾・佐竹幹雄²⁾
(¹⁾農林水産省食品総合研究所, ²⁾日本水産株式会社中央研究所)

Physiologically Active Peptides Derived from Food Proteins (II) Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme from the Antarctic krill muscle protein

Yukio KAWAMURA¹⁾, Toshio SUGIMOTO¹⁾, Toshikazu TAKENE²⁾, and Mikio SATAKE²⁾

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

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

A Peptide fraction which inhibits angiotensin-converting enzyme was separated from the sequential hydrolyzates of the defatted Antarctic krill muscle by pepsin and trypsin. The preparation procedure contains SP-Sephadex C-25, gel filtration, and RP-high performance. The peptide fraction with ACE inhibiting activity were nearly pure and the main component was a peptide with the amino acid sequence of Lys-Leu-Lys-Phe-Val showing the half maximum inhibition (IC₅₀) of 30 micro molar.

A peptide sequence with 66% homology to the present peptide was found in some proteins such as Prostaglandin DII reductase, thrombospondin precursor, epidermal growth factor precursor.

生体において、血圧は種々の系で制御され、それらの制御系に対応した血圧調節作用を有する薬が開発されている。現在、抗高血圧薬としては、それらの作用点の違いから、(1)利尿剤、(2)交換神経遮断剤、(3)血管拡張剤、(4)アンギオテンシン変換酵素阻害剤、(5)5-HT₂受容体遮断剤に分類される。

アンギオテンシン変換酵素 (ACE) は、腎臓から放出されたレニンが、血流中の分子量約 57,000 の糖タンパク質であるレニン基質に作用して生成するデカペプチド (DRVYIHPFHL) のアンギオテンシン I に作用し、アンギオテンシン II (DRVFIHPF) を生成する酵素である。

アンギオテンシン II は、直接作用として、末梢毛細血管を収縮させ、交換神経や副腎を刺激し、カテ

*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)

コールアミンの放出を促進させるため血圧を上昇させる。さらに副腎皮質ホルモンのアルドステロンの分泌を高め、 Na^+ の再吸収促進、水の貯留、循環血流量の増大をもたらし、血圧を上昇させる。またACEは血管拡張作用を示すブラジキニンを分解する（キニナーゼ）ので、相乗的な血圧上昇作用を示すこととなる。このようにレニン-アンジオテンシン系は、循環血液動態の定常性の維持に中心的な役割を果たしている。このような点から、近年、ACEの阻害剤の開発が計られている。

最近、Ikeda, Yamoriらは¹⁾、オキアミ脱脂肉で飼育した脳卒中易発性高血圧ラット（SHRSP）の血圧上昇が、豚肉飼育群と比べて有意に抑制されることを見出した。アミノ酸組成を同じにした飼料では、この効果が認められないことから、著者らは、この作用が、消化過程で生じてくるペプチドにあると考え、オキアミ筋肉タンパク質を消化管プロテアーゼで消化分解し、その中から、ACE阻害作用を指標として、生理活性をもつペプチドを分離した。

実験方法

アンジ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製）から部分精製した標品を使い、Hipp-His-Leuを基質として用い、反応後生成してくるHipp基を定量するCheungらの方法^{2,3)}、または、His-Leuのアミノ基をTNBS法^{4,5)}により測定した。クロマトグラフィーは、通常のオープンカラムの他、中速液体クロマトグラフィー（FPLC）や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により行った。分離ペプチドのアミノ酸分析は、日立L-8500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

南極産オキアミの頭胸部と皮をとり除いた後、筋肉部分をとり、5倍量の0.4MKClを含む、pH7.5の水を加え、ホモゲナイザーで、続いて、ポリトロンで破碎、抽出を行った。抽出物（オキアミ筋肉懸濁液）のpHを3.5に合わせ、500分の1量のペプシンを添加し、4時間37℃で加水分解を行った。続いて、pHを7.8に上昇させた後、0.01mMになるように CaCl_2 を加え、ペプシンと同じく500分の1量のトリプシンを添加、12時間、4℃で加水分解を行った。100℃の沸騰水上15分間放置、放冷後、遠心分離操作により、上清を得た。上清は、直ちに、凍結乾燥を行った。以下、本凍結乾燥加水分解物からのACE阻害ペプチドの調整方法の極略を、Fig. 1に示す。

乾燥粉末をODSカラムのバッチ処理で、15%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。活性画分は、大きく三つのピークとして溶出されたが、Fig. 2に示したように画分Ⅲ（Fr. Ⅲ）の部分を集め、濃縮の目的で凍結乾燥した後、Superose12（FPLC）を用いるゲルろ過を行った。（Fig. 3）

ゲルろ過分析で活性は、大きく2つの画分に回収された。後のピーク部分（Fr. Ⅱ）を集め、脱塩後、凍結乾燥し、Develosil ODS-5を用いる高速液体クロマトグラフィーによりさらに分離を行った。そのクロマトグラムを示したのがFig. 4である。多数のペプチドの存在が認められるが、ACE阻害活性は、4つの画分に回収された。一番後に溶出してくる活性画分（Fr. Ⅴ）を集め、溶媒を窒素気流下で蒸発

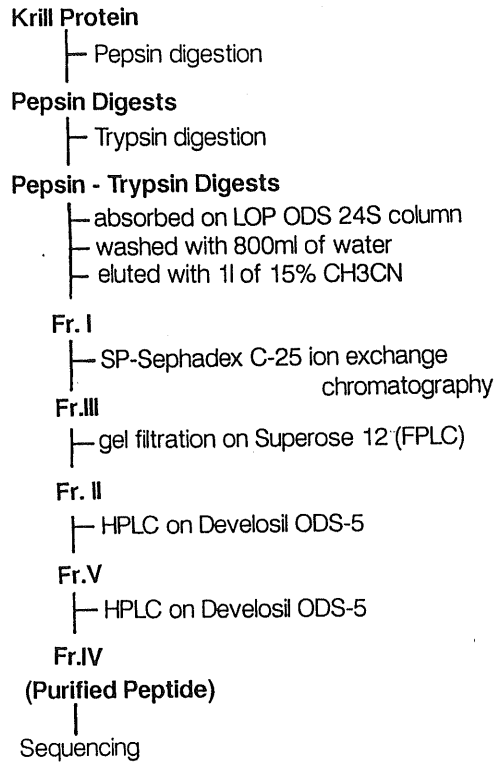


Fig. 1. Isolation procedure of ACE inhibiting peptides from peptic and tryptic hydrolyzates of Antarctic krill muscle.

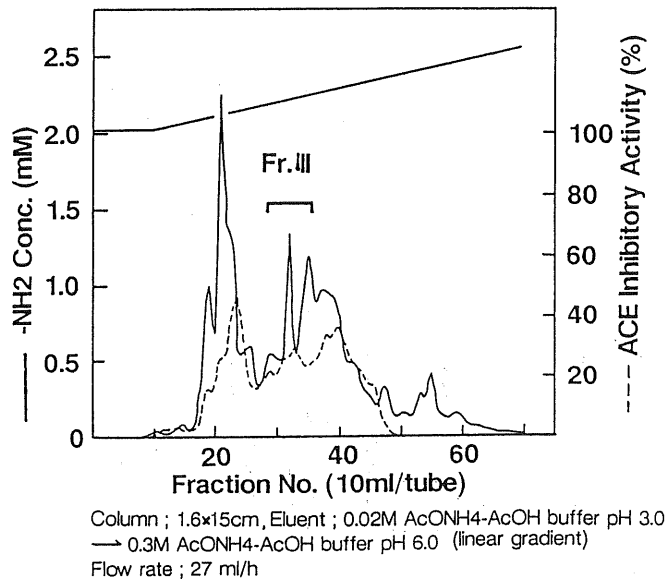


Fig. 2. SP-Sephadex C-25 chromatography of 15% CH₃CN eluate fraction.

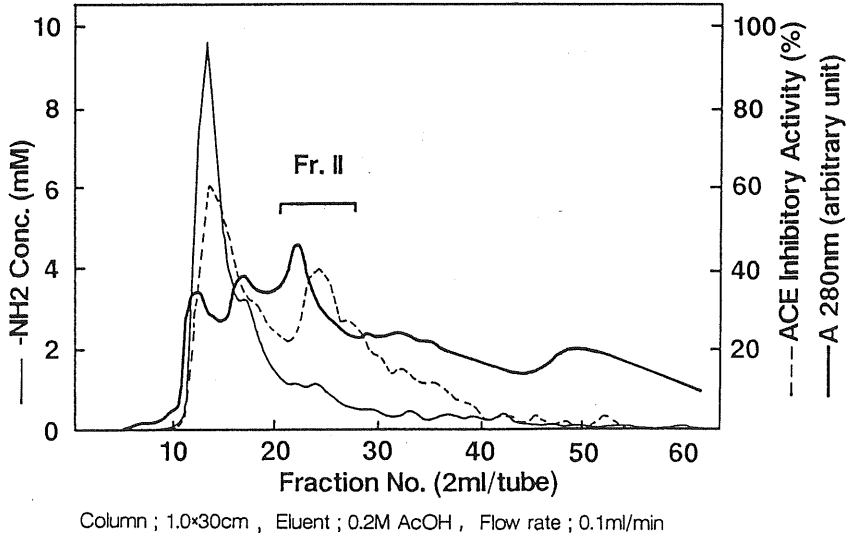


Fig. 3. Gel filtration chromatography of the active fraction from SP-Sephadex chromatography on Superose 12.

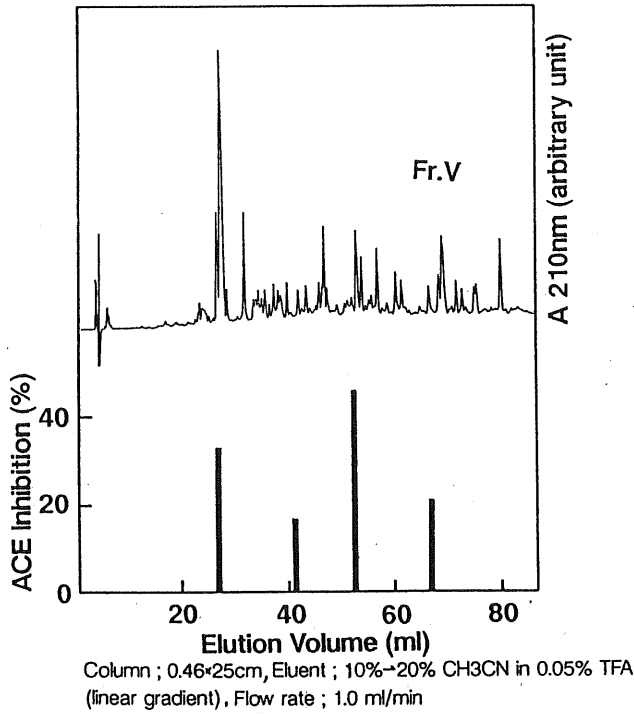


Fig. 4. High performance liquid chromatography of the active fraction from the active fraction on Develosil ODS-5.

させた後、再度、HPLCによるグラジエント溶出、続いてイソクラテイク溶出により、ACE阻害活性を有する単一ピークを得た。この画分につき、アミノ酸分析およびアミノ酸配列の解析を行った。

アミノ酸分析の結果をTable 1に示した。

リジン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンが、約2:1:1:1の割合で存在することが示された他、セリン(0.5)、イソロイシン(0.3)、グリシン(0.1)、アラニン(0.1)が検出された。

気相ペプチドシーケンサーによるN末端側からの推定配列は、Lys-Leu-Lys-Phe-Valであり、アミノ酸分析の結果と一致した。得られたペプチド画分は、まだ単一のペプチドではなく、セリン、イソロイシン、アラニン、グリシンなどからなるペプチドの少量の混在が認められた。本画分のIC₅₀値は約30 μMであった。現在、この画分のもう一段の純化と、ペプチド合成による、Lys-Leu-Lys-Phe-Valの活性検証の実験が進行中である。

尚、本ペプチドの一次構造と66%以上の相同性をもつ蛋白質として、以下のようなものが探索された。Prostaglandin D₂ 11 Reductase, Lipamide Acyltransferase, Pyruvate Dehydrogenase, Sucrose Synthetase, Cytochrom c oxidase, Protein Kinase C, Plasma Kallikrein, Serine Protease, T cell Receptor α-chain Precursor, Tropomyosin α-chain. これらは、一部であるが、オキアミ筋肉部分からの抽出、単離ペプチドであることを考えると、トロポミオシン由来の可能性がある。

最近アンギオテンシン変換酵素の阻害剤の生理的意味づけと関連のある結果が報告された。⁶⁾それは、血管内皮細胞の局所アンギオテンシン系が血管壁の修復時の細胞増殖や分化に関与しているというもので、ACE阻害物質の存在下では、血管壁の修復に伴う肥厚が少くなることを示している。ACE阻害ペプチドと動脈硬化との関連にも興味もたれる。

文 献

1. IKEDA, K., Y. NARA., Y. YAMORI. (1988) Jpn. Heart J. 29(4): 583
2. CHEUNG H. S., F. L. WAMG, M. A. ONDDTI, E. F SABO and D. W. CUSHMAN (1980) J. Biol. Chem. 255: 401
3. CUSHMAN, D. W. and H. S. CHEUNG (1981) Biochemical Pharmacol. 20: 1637
4. SATAKE, K., T. OKUYAMA., M. OHASHI and T. SHIMODA (1960) J. Biochem. 47: 654
5. HABEEB A. F. S. A. (1960) Anal. Biochem.
6. POWELL, J. S., J. P. CLOZEL, R. K. MÜLLER, H. KUHN, F. HEFTI, M. HOSANG and BAUMGARTNER (1989) Science, 245: 186