

ブタ肝臓由来のアンジオテンシン変換酵素阻害物質

苔庵泰志*, 山崎栄次*, 栗田 修*, 中林 徹*, 坪内一夫*, 井上哲志*

Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme from Porcin Liver

by Yasushi KOKEAN, Eiji YAMAZAKI, Osamu KURITA,
Toru NAKABAYASHI, Kazuo TSUBOUCHI and Tetsuji INOUE

〔要旨〕

三重県内で肥育した食肉用豚を屠殺後、食用として利用率の低い内臓等からタンパク質を抽出し、血圧上昇抑制作用のあるアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害ペプチドを見いだすことを目的とした。その結果、いくつかのプロテアーゼでブタ肝臓を処理すると、ペプチド混合液中に、ACE活性阻害作用を見いだした。また、肝臓由来ペプチドと、ロース由来ペプチドを比較すると、肝臓由来ペプチドのほうがロース由来ペプチドよりも、プロテアーゼ処理後のACE阻害作用の増強効果が大きくなる傾向を示した。

1. はじめに

水畜産物の加工工程でできる未利用物から有用成分を分離・抽出することは、資源の有効利用につながる。また、近年日本においても欧米型の食生活にシフトするにつれ、心臓病、高血圧、糖尿病等の生活習慣病が増加している。その中で生体内での血圧上昇に関与しているアンジオテンシン変換酵素(Angiotensin Converting Enzyme:ACE)の阻害ペプチドが、様々な食品素材から、近年分離抽出されている。^{1)~3)}本研究では、ブタ内臓からACE阻害ペプチドを分離することを目的とした。

食用ブタは、生後約半年で屠殺すると、体重は約115kg~120kgで、そのうち血液が、約5~6%、四肢端が1%以下、内臓が13~14%、そして可食部の約65%が枝肉となる。内臓については、廃棄される肺、脾臓以外の臓器は、その30%くらいが異常や疾病のため廃棄、残りが可食部分となっている。これらは、関東地方を中心にホルモンとして食されているが、三重県を始め、関西地方ではあまり食されていない。また、内臓の部位別では、心臓や、大腸、小腸に比べて、肝臓については、ホルモン業者に売却後、ペットフード等に利用されている傾向があり、いずれにしても高付加価値のある商品と

はなっていない。

そこで今回は肝臓、そして比較としてロースを用いてペプチドを調製することとした。

2. 実験方法

2. 1 タンパク質の抽出及び、市販各種プロテアーゼによるペプチドの調製

サンプル10gを水100mlに加え、ポリトロンホモジナイザーで、1分間ホモジナイズした後、沸騰湯浴中で20分間内因性のプロテアーゼを失活させ、冷却後、再びホモジナイズ、それぞれの酵素の至適pHに合わせ、サンプル重量に対して、0.5%(w/w)になるように酵素を加えた。16時間攪拌下処理後、15分間沸騰湯浴中で反応を止め、pHを中和した後、ろ過助剤としてセライトを加えて7,500×gで30分間遠心分離し、得られた濾液をPTFE膜(ミリポア社、φ0.2μm)でろ過した。この溶液を200mlにメスアップし、ケルダール法による窒素分析、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性測定用のサンプルとした。また、ペプチド調製用に用いた6種類の酵素の概要は表1に示した。

2. 2 アンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定⁴⁾

1.2M NaCl 50μlに脱イオン水(ブランク)50μlまたは、試料液50μl(阻害剤または化合物)を加えた。次に、10mUのACEを含んだ50mM

* 生物食品グループ

ホウ酸緩衝液(pH8.3) 50 µlを加え, 3分間, 37度でインキュベートした後, 10mM hippuryl-

表1 プロテアーゼの種類

酵素の名称	pH	反応温度	起源
デナチーム AP	7.0	50	Aspergillus oryzae
ビオブラーゼ SP- 15FG	8.0	55	Bacillus subtilis
ビオブラーゼ SP- 4FG	8.0	55	Bacillus subtilis
パバイン	7.0	55	Carica papaya L.
デナブシン 10P	3.0	40	Aspergillus niger
XP- 415	3.0	40	Rhizopus delemar

酵素は全てナガセ生化学(株)製食品添加物用プロテアーゼを用いた。

His-Leuを含んだ350mMホウ酸緩衝液(pH8.3) 50 µlを加えて, 30分間反応させた。1N HCl 200 µlを加えて反応停止し, 5分後, 酢酸エチル 1mlで遊離した馬尿酸を抽出した。抽出液を, 遠心エバポレーターで蒸発乾固し, 蒸留水1mlに溶解して226nmでの吸光度を測定した。

2. 3 肝臓ペプチドの精製

部分精製では, 同時に活性測定を行った。カラムは, ODS, C18系のカラム(カラムサイズ: 10.0 x 250mm)を用い, サンプルはタンパク濃度で1回に約600 µg添加した。溶媒は0.1% TFA, アセトニトリルと超純水を用い, 流速2.5ml/min, アセトニトリル0~60%のリニアグラジエントで溶出させた。この分離操作を3回繰り返してフラクションを集め, 減圧エバポレーターで濃縮乾燥し, 300 µlの超純水に溶解した後, そのうち50 µlを2連でアッセイに用いた。肝臓ペプチドは, 活性の高い部分について, アセトニトリル60~100%までの条件で再クロマトを行い, さらに精製を行った。

3. 結果

3. 1 食品添加物用プロテアーゼによるタンパクの抽出及びペプチドの調製

表2 ブタ肝臓のプロテアーゼ分解物によるACE活性阻害作用

	タンパク質濃度(mg/ml)	可溶化率(%)	IC ₅₀ (µg/ml)
デナチーム AP	8.0	69.7	1100
ビオブラーゼ SP- 15FG	9.8	86.0	410
ビオブラーゼ SP- 4FG	8.1	70.6	425
パバイン	3.8	33.3	310
デナブシン 10P	6.9	60.5	220
XP- 415	8.3	72.8	170
酵素処理無し	1.5	-	-

ACE阻害活性は, 糸状菌由来(Rhizopus delemar: 商品名XP-415)のプロテアーゼによる分解物がIC₅₀で170 µg/mlとなり, 最も強い値を示した(表2)。ローズの酵素分解物と比較すると, ローズでは酵素処理によるACE阻害活性の増強が観測されなかったのに対して, 肝臓では, 酵素処理によるACE阻害活性が強くなっていることが確認された(表3)。このため, 以後の部分精製にはXP-415分解物を用いた。

表3 ブタローズのプロテアーゼ分解物によるACE活性阻害作用

	タンパク質濃度(mg/ml)	可溶化率(%)	IC ₅₀ (µg/ml)
デナチーム AP	8.8	70.3	530
ビオブラーゼ SP- 15FG	10.7	85.9	330
ビオブラーゼ SP- 4FG	10.4	83.5	540
パバイン	6.0	48.2	555
デナブシン 10P	9.7	77.9	270
XP- 415	10.5	84.3	245
酵素処理無し	1.4	-	152

3. 2 ペプチドの部分精製

図1に示したように, 肝臓プロテアーゼ分解物(XP-415処理)については, 10のフラクションに分けて分取した。得られたフラクションのACE阻害活性は図2のようになった。その結果, FR-8が最も阻害活性が高く, 100%近くACE活性を阻害した。この他では, FR-7, FR-6, FR-9の順で阻害活性は高かった。このように, 阻害活性は一つのフラクションではなく, 各フラクションに分布して現れた。

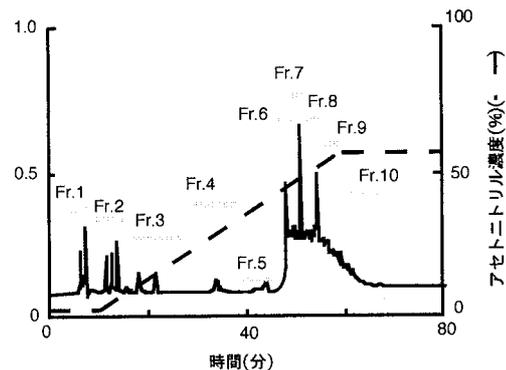


図1 ブタ肝臓プロテアーゼ分解物の逆相クロマト

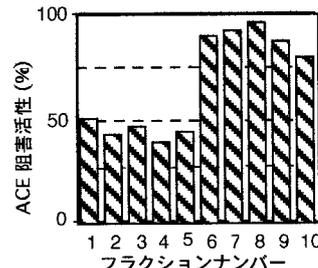


図2 ブタ肝臓プロテアーゼ分解物の逆相クロマトフラクションによるACE阻害活性

4. 考察

従来、ブタの血漿由来のACE阻害物質が知られている。⁵⁾しかしながら、内臓等に関する研究報告はほとんどなされていない。内臓については、酵素分解の結果ACE阻害活性が上昇し、一方でロースではあまり変化が認められないのは、ペプチドの分析を待たなければわからないが、アミノ酸残基の特異性の違いによる可能性もある。生体中でアンジオテンシン変換酵素の基質としてのアンジオテンシンI は10個のアミノ酸からなるデカペプチドで、このC末端からHis-Leuを遊離する酵素がACEであるが、ロースペプチドの方が、肝臓由来のものよりも、アンジオテンシンI のアナログとして作用するペプチド断片が、多く生成されていることも考えられる。

5. まとめ

ブタ肝臓に対する、食品添加物用プロテアーゼ処理によるアンジオテンシン変換酵素阻害物の調製を試みた。その結果、調製したプロテアーゼ分解物中に、アンジオテンシン変換阻害(ACE)作用を確認できた。そこで、アンジオテンシン阻害物質の逆相クロマトグラフィーに

よる部分精製及び、濃縮による活性化画分の確認を行った。以上のことにより、ブタ内臓を機能性素材、食品素材として付加価値を高めることができた。

謝辞

ブタ臓器、ロースを提供して頂いた、三重県科学技術振興センター農業技術センター畜産部、和田健一主幹研究員、安芸博主幹研究員、市川隆久主任研究員に感謝いたします。

参考文献

- 1) 藤田裕之ら：薬理と治療,25(8),153,(1997)
- 2) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T. : J.Dairy Sci., 78(4),777,(1995)
- 3) Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N and Suzuki, H. : Agric.Biol. Chem.,51(9),2557,(1987)
- 4) Cushmann, D.W. and Cheung, H.S. : Biochem. Pharmacol., 20, 1637,(1971)
- 5) 特開平3-182069号公報 : Agric.Biol. Chem., 51(9),2557,(1987)