

# 魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究—Ⅲ 海苔由来テトラペプチド Ala-Val-Gly-Pro の 分離精製とアンジオテンシン I 変換酵素との相互作用

末綱邦男\*

Studies on Biological Active Peptide Derived from Fish and Shellfish - III  
Separation and Purification of Ala-Val-Gly-Pro Derived from *Porphyra*  
*yezoensis* and Its Interaction with Angiotensin I-Converting Enzyme

Kunio Suetsuna\*

A peptide having the potent angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity was separated from *Porphyra yezoensis* protein hydrolysate by chromatographic analyses such as ion-exchange, gel-filtration and HPLC. The most active fraction (SP-I) obtained by SP-Sephadex C-25 chromatography provided 50% inhibition against ACE activity at 72  $\mu\text{g}/\text{ml}$  reaction mixture concentration. Oral administration of the SP-I fraction (200mg/kg of body weight) spontaneously hypertensive rat showed a hypotensive effect. The SP-I fraction was further separated into the peptides using ODS HPLC. Among these peptides, an active peptide was obtained, and its primary structure was Ala-Val-Gly-Pro ( $\text{IC}_{50}$ ; 3.12  $\mu\text{M}$ ). Using these active peptide analogs, Val-Gly-Pro ( $\text{IC}_{50}$ ; 26.5  $\mu\text{M}$ ) and Ala-Gly-Pro ( $\text{IC}_{50}$ ; 89.3  $\mu\text{M}$ ), which were newly synthesized, the interaction between ACE inhibitory peptides and the active site of ACE was presumed.

## 1 緒言

タンパク質は栄養源としての機能に加え、その消化物であるペプチドが種々の生理活性機能を有することが示され、その一つに血圧調節系に関与するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドがある。高血圧は、病的に

血圧上昇の原因が明らかな二次性高血圧 (病候性高血圧) と、本態不明な一次性高血圧 (本態性高血圧症) に大別される。前者は、原因となる疾患を治癒させることにより高血圧を治癒することが可能である。一方、本態性高血圧には原因と考えられる因子がいろいろあり、原因に対する直接的な治療法は困難である。レニン・アンジオテンシン系

水産大学校研究業績 第1584号, 1997年8月22日受付.

Contribution from National Fisheries University, No.1584. Received Aug. 22, 1997.

\* 水産大学校食品化学科資源理化学講座 (Laboratory of Resources Science, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University).

(R・A系)は、本態性高血圧の重要な要因の一つであると考えられている。ここ10年来、R・A系で中心的な役割を果たしているACEの活性を抑制することでR・A系をコントロールし、それによって本態性高血圧をコントロールしようという試みが行なわれてきた<sup>1)</sup>。

著者らは、血圧降下作用を持つ魚介類タンパク質由来のACE阻害ペプチドに関して報告してきたが<sup>2), 3)</sup>、今回、海藻類タンパク質由来の降圧ペプチド検索過程に、海苔タンパク質の酵素分解物からのACE阻害ペプチド粉末(SP画分)に *in vivo*での血圧降下作用を認めたので、さらに、ACE阻害ペプチドの単離精製、アミノ酸配列決定を行ない、その構造活性相関を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

海苔 *Porphyra yezoensis* は、1995年2月から3月にかけて、愛媛県丸亀市海苔養殖場にて採取後、十分に水洗した後、凍結乾燥し、細切後、粉砕機にかけて粉末とした。

### 2.2 酵素分解物の調製

海苔粉末23.7gに脱イオン水1ℓを加え、海苔懸濁液を得た。透析チューブ(36 inch, 和光純薬工業社製)に詰め、流水に対して3日間透析を行ない透析内液を得た。透析内液のpHを2.0に調整し、豚胃のペプシン(EC 3.4.23.1, メルク社製)750mgを添加し、37°Cで20時間攪拌しながら酵素分解を行なった。

### 2.3 ペプチド粉末の精製

分解終了後、直ちに反応液を透析チューブに詰め、再度脱イオン水5ℓに対して2日間透析を行ない透析外液を得た。透析外液をDowex 50W×4カラム(H<sup>+</sup>form, 50~100mesh, φ4.5×20cm)に加え、カラムを脱イオン水で十分洗浄した後、2NNH<sub>4</sub>OH 500mlで溶出した。減圧濃縮によりアンモニアを除去し、濃縮液40mlを得た。濃縮液4mlを予め0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したSephadex G-25カラム(medium, φ2.3×140cm)に負荷し、流速30ml/h, 各分画量8.6mlでゲルろ過した。Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーを繰り返して大量分取して得たペプチド画分(分画分子量300~5,000)を、再度Dowex 50W(H<sup>+</sup>)カラムクロマトグラフィーして脱塩操作を行ない凍結乾燥後、粗ペプチド粉末を得た。こ

の粗ペプチド粉末1.5gを脱イオン水20mlに溶解後、SP-Sephadex C-25カラム(H<sup>+</sup>form, φ1.5×47.2cm)に負荷した。脱イオン水500mlから1.5%NaCl溶液500mlでの濃度勾配法により、流速90ml/h, 各分画量10mlで溶出し、各溶出画分(SP-I, SP-II, SP-III画分)を再度Dowex 50W(H<sup>+</sup>)カラムクロマトグラフィーして脱塩操作を行ない凍結乾燥後、精製ペプチド粉末(SP画分)とした。ペプチドの定量は、牛血清アルブミンを標準として、Lowry法<sup>4)</sup>に準じて行なった。

### 2.4 ACE阻害活性の測定

Liebermanの測定法を改良した山本らの方法<sup>5)</sup>に準じて行なった。すなわち、サンプル液50μlに2.5mU ACE(EC 3.4.15.1, ウサギ肺由来, シグマ社製)酵素溶液100μlを加え、37°C, 3分間保持後、100mMホウ酸緩衝液(500mM食塩含有, pH8.3)に溶解した12.5mM Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine(ペプチド研究所製)基質溶液100μlを加え、37°C, 60分間反応させた後、0.5N塩酸250μlを加え反応を停止した。さらに、酢酸エチル1.5mlを加えよく攪拌し、遠心分離(3,000rpm, 10min)した後、酢酸エチル層1.0mlを分取し、蒸発乾固後、1M食塩溶液1.0mlを加えて溶解し、ACEにより遊離するヒプリル酸量を228nmの吸光度で測定した。サンプル液での吸光度をE<sub>S</sub>、サンプル液の代わりに緩衝液を加えたときの値をE<sub>C</sub>、予め反応停止液を加えて反応させたときの値をE<sub>B</sub>として、阻害率(%) = (E<sub>C</sub> - E<sub>S</sub> / E<sub>C</sub> - E<sub>B</sub>) × 100で求めた。阻害活性(IC<sub>50</sub>値)は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの反応液中での阻害物質濃度(反応液ml当たりのμg数、またはモル濃度)で示した。

### 2.5 SHRに対する精製ペプチド粉末の血圧降下作用

実験動物は、日本チャールズ・リバー社より雄性高血圧自然発症ラット(SHR)を購入し、1週間の予備飼育後、収縮期血圧が160mmHg以上で体重280~330gの動物5匹1群として用いた。上記ペプチド粉末の精製で調製した精製ペプチド粉末(SP-I画分, 200mg/SHR体重kg)を0.9%生理食塩水3mlに溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与後、1, 2, 4および5時間時の血圧を、非観血式小動物用尾動脈血圧測定装置(UR-5000型, ウェダ製作所製)で測定した。各測定時間5回繰り返して行ない、得られた測定値の最高最低値を棄却し、3回の平

均値から、収縮期血圧 (SBP)、平均血圧 (MBP)、拡張期血圧 (DBP) を算出し、5 群の平均値±標準誤差で示した。統計処理として、投与前 (0 時間) 血圧値に対して、各時間ごとの有意差は *t* 検定を行ない、 $p < 0.01\%$ 、 $p < 0.05\%$  で判定した。

## 2.6 逆相HPLCによるACE阻害ペプチドの単離精製

精製ペプチド粉末 (SP-I 画分) 7 mg / 25  $\mu$ l を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるペプチドフラグメントの分離を行なった。カラムとして Develosil ODS-5 ( $\phi$ 0.46  $\times$  25 cm, 野村化学製) を用い、溶離液として 0.05% トリフルオロ酢酸溶液 (TFA) から、0.05% TFA を含む 16.7% アセトニトリル溶液への 2 時間での濃度勾配法、流速; 1.0 ml / min, 検出波長; 220 nm で行なった。

## 2.7 ペプチドのアミノ酸配列決定

HPLC で得られた ACE 阻害ペプチドフラグメントのアミノ酸分析は、常法により塩酸加水分解後、PICO-TAG<sup>TM</sup> アミノ酸分析計 (ウォーターズ社製) を用いて行なった。ペプチドのアミノ酸配列は自動エドマン分解により 477A 型プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いて決定した。ペプチドの分子量は、DX-300 型質量分析計 (日本電子製) を用い FAB-MS 法で測定した。

## 2.8 ペプチドの合成

分離精製した ACE 阻害ペプチドの誘導体合成は、433 A 型プロテイン合成装置 (アプライドバイオシステム社製) により *t*-Boc 固相法により行なった。

# 3 結果

## 3.1 精製ペプチド粉末の精製

海苔タンパク質部分をペプシン分解して得られた分解物を、透析、Dowex 50W 吸着・脱着後、Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーすることにより、分画分子量として大きいものは、5,000 程度、小さいものは 300 程度の粗ペプチド粉末 3.44 g を得た (Fig. 1)。これは、海苔乾燥粉末 23.7 g から回収率 14.5% であった。さらに、SP-Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィーすることにより

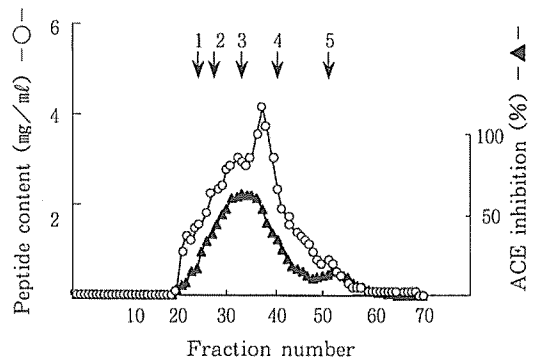


Fig. 1. Chromatogram on Sephadex G-25 column of *Porphyra yezoensis* protein hydrolysate. Elution; 0.1M phosphate buffer (pH7.0). Flow rate; 30ml/h. Each fraction; 8.6ml. Monitoring absorbance; 750 nm.<sup>4)</sup> 1; insulin (MW=6,000). 2; insulin B chain (MW=3,500). 3; insulin A chain (MW=2,550). 4; bradykinin (MW=1,052). 5; glycine (MW=75).

SP-I 画分 (分画番号 13~29)、SP-II 画分 (分画番号 30~39) および SP-III 画分 (分画番号 40~63) に分画し、精製ペプチド粉末 0.44 g (回収率 1.9%)、0.79 g (回収率 3.3%) および 1.98 g (回収率 8.4%) を得た (Fig. 2)。

ACE 阻害活性をみたところ、粗ペプチド粉末  $IC_{50}$  値; 910  $\mu$ g / ml に対し、精製ペプチド粉末では、SP-I 画分  $IC_{50}$  値; 55  $\mu$ g / ml, SP-II 画分  $IC_{50}$  値; 150  $\mu$ g / ml および SP-III 画分  $IC_{50}$  値; 1,015  $\mu$ g / ml であった。

## 3.2 精製ペプチド粉末の血圧降下作用

*in vitro* での活性の高かった精製ペプチド粉末 (SP-I 画分, 200 mg / SHR 体重 kg) を用いて血圧降下作用をみたところ、Fig. 3 に示すような結果を得た。すなわち、投与後 2 時間で平均血圧 (MBP) の最低値を示し、投与前に比べ血圧差 30 mmHg の低下をみた。その後 4 時間までに血圧は徐々に正常値に近づき 5 時間を経てもなお血圧降下作用は持続していた。これらの結果から、海苔由来のペプチドは *in vivo* において明らかな血圧低下作用を示すことを確認した。

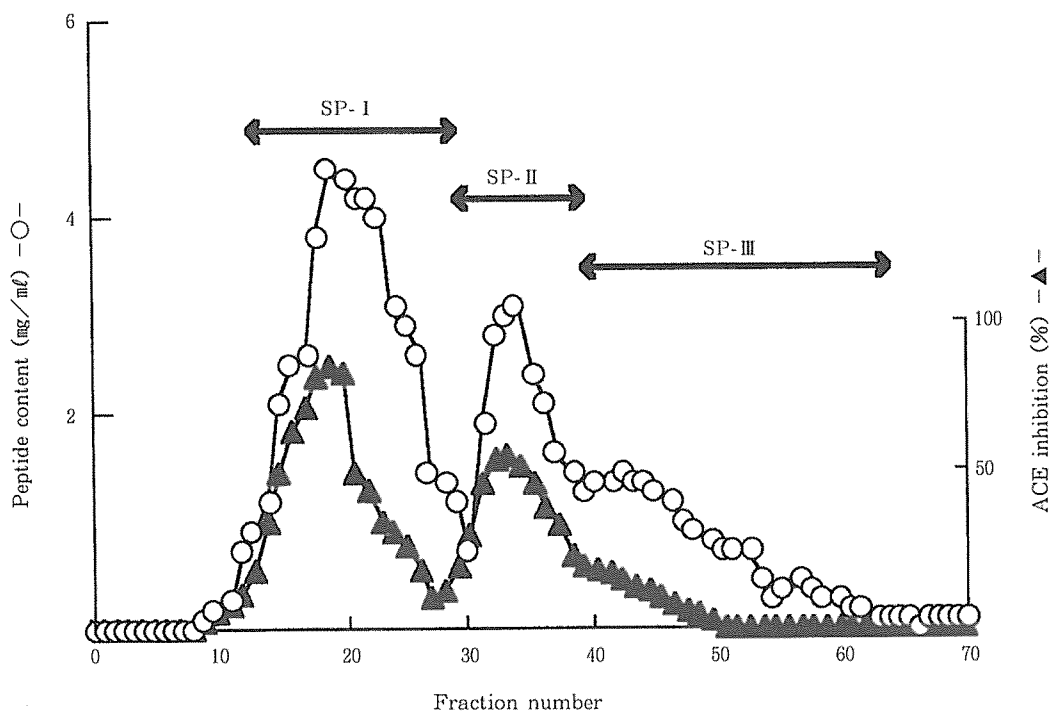


Fig. 2. Chromatogram on SP-Sephadex C-25 column of active fraction 21-46 eluted from Sephadex G-25. Solvent system; (a) 500ml of H<sub>2</sub>O, (b) 500ml of 1.5% NaCl. Linear gradient from (a) to (b). Flow rate; 90ml/h. Each fraction; 10ml. Monitoring absorbance; 750 nm.<sup>4)</sup>

### 3.3 ACE阻害ペプチドの単離精製とアミノ酸配列

*in vitro*でACE阻害活性が高く、*in vivo*で血圧降下作用を有する精製ペプチド粉末ペプチド (SP-I画分) を、さらに、逆相HPLCで分離、分取した100前後のペプチドフラグメントの中で、ACE阻害率50%以上を示すペプチドフラグメントを検索した。その際、ペプチドの単一ピークのアミノ酸分析を行ない、ペプチド含量を測定しペプチド重量当りのACE阻害比活性を求めた。Fig. 4に示すように溶出時間48.192分にACE阻害比活性の強いペプチドフラグメントを見出した。Table 1に示すように、このペプチドフラグメントのアミノ酸分析、アミノ酸配列決定、およびFAB-MS法による分子量決定 (MH<sup>+</sup>) を行なったところ、海苔由来のACE阻害ペプチドとしてAla-Val-Gly-Proを構造決定した。さらに、ACEとの構造活性相関を

検討するために、テトラペプチドとアナログとしての2種類のトリペプチドを合成した。Table 1に合成したテトラペプチドAla-Val-Gly-Pro (IC<sub>50</sub>; 3.12 μM) と2種類のトリペプチド Val-Gly-Pro (IC<sub>50</sub>; 26.5 μM) および Ala-Gly-Pro (IC<sub>50</sub>; 89.3 μM) の分析値を示したが、合成テトラペプチドと分離してきたテトラペプチドの分析値 (アミノ酸分析, MH<sup>+</sup>=343) は非常によく一致した。

これらの結果、C末端をプロリンに固定、第2アミノ酸をグリシンに固定したACE阻害トリペプチドの場合、N末端はアラニンよりもバリンの方が活性が高かった。さらに、今回単離されたACE阻害テトラペプチドは、N末端にアラニン、第2アミノ酸にバリンを位置しているが、この場合は先の合成トリペプチドよりさらに活性が高いという結果を得た (Ala-Val-Gly-Pro > Val-Gly-Pro > Ala-Gly-Pro)。

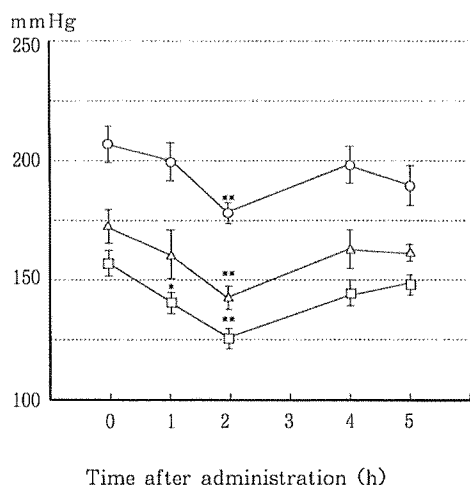


Fig. 3. Effect of oral administration of the SP-I fraction on the blood pressure of SHR. Vertical bars represent the mean  $\pm$  S.E. (n=5 per group). Significant difference from the blood pressure before administration (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01). -○- SBP (systolic blood pressure). -△- MBP (mean blood pressure). -□- DBP (diastolic blood pressure).

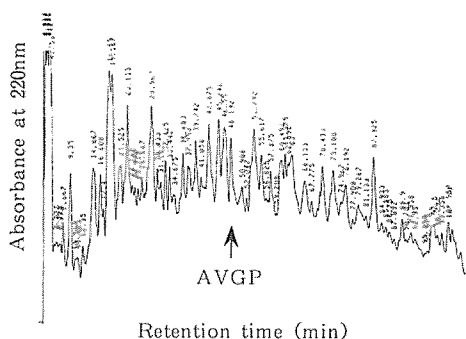


Fig. 4. Reverse-phase HPLC of the SP-I fraction eluted from SP-Sephadex C-25. Column; Develosil ODS-5 (0.46  $\times$  25cm). Solvent system; (a) 0.05% trifluoroacetic acid, (b) 16.7% acetonitrile in 0.05% TFA. Linear gradient from (a) to (b) for 2h. Flow rate; 1 ml/min. Monitoring absorbance; 220 nm.

## 4 考 察

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、動脈収縮、血圧上昇物質であるアンジオテンシンIIの生成と、動脈弛緩、血圧降下物質であるブラジキニンの分解を触媒するジペプチジルカルボキシルラーゼであり、この酵素の阻害物質は血圧降下作用を示す。アンジオテンシンIIが動脈硬化や心疾患の増悪に連なる血管平滑筋細胞の増殖を阻害することから、ACEはこれら疾患をも改善する効果を有することが知られている。<sup>6)</sup>

Cheungら<sup>7)</sup>は、種々のジペプチドを合成し、ACE阻害活性に及ぼすC末端およびN末端アミノ酸残基の影響について検討を行ない、C末端アミノ酸として、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン、チロシンをまたN末端アミノ酸としてバリン、イソロイシンを有するジペプチドが、高いACE阻害活性を有すると報告している。今回単離されたテトラペプチドは、C末端にプロリンを有していることから、高いACE阻害活性を発現したことを裏付けられるものと考えられる。また、川上ら<sup>8)</sup>は、トリペプチドアナログについての構造活性相関の検討で、C末端をプロリンにした場合、第2アミノ酸をアルギニン、グルタミン酸、リジンにすると高い阻害活性が得られると報告している。今回単離されたテトラペプチドの第3アミノ酸、およびその誘導体トリペプチドの第2アミノ酸がグリシンであることから、川上らの報告にあるトリペプチド (Leu-Arg-ProIC<sub>50</sub>; 0.26  $\mu$ M, Leu-Gln-Pro IC<sub>50</sub>; 1.9  $\mu$ M, Leu-Lys-Pro IC<sub>50</sub>; 1.6  $\mu$ M) に比べ高い阻害活性を示さなかった。

ACEの活性部位は、亜鉛イオンを含む部位、水素結合をする部位、正電荷を持つ部位、の3ヶ所であると考えられている (Fig. 5)。今回単離されたテトラペプチドのC末端がプロリン、第3アミノ酸がグリシンであり、およびその誘導体トリペプチドの、C末端がプロリン、第2アミノ酸がグリシンであることは、ACEの正電荷を持つ部位にはC末端プロリンのカルボキシル基が包接部位として、また、水素結合する部位には、グリシルプロリンのペプチド結合のカルボニル基が包接部位として働いている。亜鉛イオンを含む部位には、開裂されるアミド結合のカルボニル基を分極させてペプチド結合の切断を受けやすくする部位が考えられ、今回単離されたテトラペプチドのN末端アミノ酸-第2アミノ酸 (Ala-Val) の側鎖、およびその誘導体トリペプチドの第2アミノ酸 (Val, Ala) の側鎖のかさばり度合い (bulkiness) とスペーサーの役割の程度

Table 1. Analytical data and ACE inhibitory activity of synthetic peptides.

Peptide	Amino acid ratio in acid hydrolyzate	FAB-MS ( <i>m/z</i> )	IC <sub>50</sub> (μM)
Ala-Val-Gly-Pro	Ala ; 1.20 Val ; 1.12 Gly ; 0.92 Pro ; 0.83	343	3.12
Val-Gly-Pro	Val ; 1.08 Gly ; 0.93 Pro ; 0.87	272	26.5
Ala-Gly-Pro	Ala ; 1.18 Gly ; 0.88 Pro ; 0.81	244	89.3
Ala-Val-Gly-Pro*	Ala ; 1.03 Val ; 1.06 Gly ; 1.12 Pro ; 0.95	343	0.95

All amino acid are of the L-configuration.

Each peptide was hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 24h.

IC<sub>50</sub>: concentration of ACE inhibitory peptide required to inhibit 50% of the ACE activity.

Ala-Val-Gly-Pro\* is the corresponding isolated peptide.

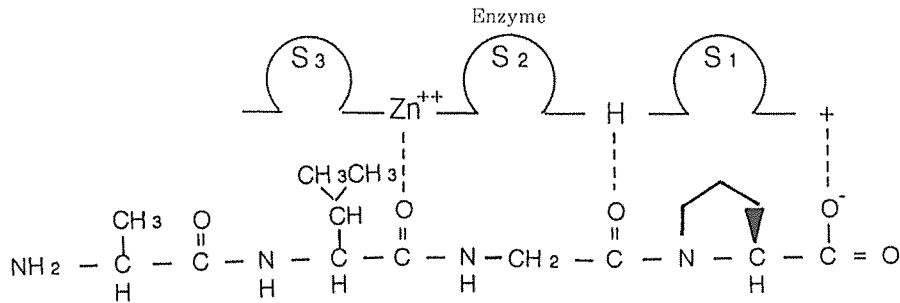


Fig. 5. Possible interaction of Ala-Val-Gly-Pro with the active site of ACE.  
S1, S2, S3; the subsites of enzyme.

が、ACEに対する相互作用に影響を及ぼし、ACE阻害活性に差異 (AVGP>VGP>AGP) をもたらしたと考えた。

近年、食品加工、保藏中や消化の過程で、活性を持たない食品タンパク質の部分加水分解によって派生する潜在的な生理活性ペプチドを特定保健用食品に利用しようとする傾向が高まっている。その中でも、ACE阻害（血圧降下）ペプチドは、quality of lifeに対する悪影響が最も少ないといわれているが、経口投与が前提となる食品においては、ACEそのものに対する安定性が問題となる。すなわち、すべての蛋白質の酵素消化物には、程度の差こそあれ見かけ上のACE阻害を示すが、経口投与時に血圧降下作用を示す真のACE阻害ペプチドは、特定のタンパク質を特定の酵素によって消化した場合に多く生成する<sup>10)</sup>。今回の実験では、多糖体を多く含む海藻類の中で、比較的少量のタンパク質を含む海藻試料を用い、酵素分解して得た

ACE阻害画分を用いて、*in vivo*で血圧降下作用を確認した後に、ACE阻害ペプチドの単離精製を行ないそのアミノ酸配列を決定した。今後、今回の実験で単離されたACE阻害テトラペプチドの*in vivo*における有効性を確認する必要はあるが、*in vitro*のスクリーニング系で検出されたACE阻害活性は、ただ単に*in vitro*での有効性の可能性を示唆するにすぎず、研究のはい段階で*in vivo*での有効性を確認した上で、研究を進めていくことが望ましいといえる。

## 謝 辞

本研究で使用した海藻試料の採取にご協力頂きました故大貝政治博士に深く感謝申し上げますとともに、ご冥福をお祈りいたします。

## 文 献

- 1) 末綱邦男：イワシ筋肉由来ペプチドのアンジオテンシンI変換酵素阻害能に関する研究。学位論文，東北大学農学部，1992，pp.1-8.
- 2) 末綱邦男・箆島克裕：日水誌，52，1981-1984 (1986).
- 3) K.Suetsuna, M.Yamagami, and K.Kuwata : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1853 (1988).
- 4) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, and R.J.Randall : *J.Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 5) 山本節子・戸井田一郎・岩井和郎・日胸疾会誌，18, 297-303 (1980).
- 6) M.A.Ondetti, R.Rubin, and D.W.Cushman : *Science*, 196, 441-444 (1977).
- 7) H.S.Cheung, F.L.Wang, M.A.Ondetti, E.F.Sabo, and D.W.Cushman : *J.Biol.Chem*, 255, 401-407 (1980).
- 8) A.Kawakami, H.Kayahara, and K.Tadasa : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59,709-710 (1995).
- 9) 川上 晃・茅原 紘：栄食誌，46, 425-428 (1993).
- 10) 吉川正明：化学と生物，31, 342-346 (1993).