

食品たん白質由来の血圧調節系に関与する酵素阻害ペプチド

RENIN AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS IN FOOD PROTEIN HYDROLYSATES

松富直利・加藤昭夫・小林邦彦（山口大学農学部）

Naotoshi MATSUDOMI, Akio KATO and Kunihiko KOBAYASHI
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753

ABSTRACT

Peptides that inhibit renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) were investigated in some food protein hydrolysates prepared with protease. Renin inhibitory peptides were included in hydrolysates of egg white proteins, whey proteins and soy proteins. The peptides in hydrolysates of bovine serum albumin and ovalbumin were found to have a powerful inhibitory activity against renin. The ACE inhibitory peptides were also contained in the hydrolysates of caseins, gluten and gliadin, except for the food protein hydrolysates having renin inhibitory peptides. The comparison of food protein hydrolysates with pepsin and trypsin was done on the inhibitory activities against renin and ACE. The renin inhibitory activities of the hydrolysates of gluten, α_s -casein and soy proteins were increased remarkably by the hydrolysis with pepsin, as compared to that with trypsin. On the other hand, the ACE inhibitory activities of the hydrolysates of ovalbumin and soyproteins with pepsin were similar to those of their hydrolysates with trypsin. From these results, it was suggested that the inhibitory peptides against renin may differ from those against ACE. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 12, 74-79, 1991.

食品たん白質は栄養源としての機能に加え、その消化分解物（ペプチド）が種々の生理機能を有することが報告されている¹⁾。その一つに血圧調節系に関与する生理機能ペプチドがある²⁻⁴⁾。

血圧はいくつかの系で調節されているが、その一つにレニン-アンジオテンシン系がある。肝臓で合成されて血液中に放出されたアンジオテンシノーゲンは、レニンおよびアンジオテンシン変換酵素（ACE）の作用を受けアンジオテンシンIIを生成する。このものは平滑筋収縮作用をもち血管を収縮させ血圧上昇をもたらす（Fig. 1）。従ってこの系に関わるレニン及びACEを阻害する食品たん白質由来のペプチドを検索することは血圧調節にとって意義あることと考えられる。

実験材料及び方法

材料

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu, ACE基質), ウサギ肺からの ACE, succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methylcoumaryl-7-amide (Suc-octapeptide-MCA, レニン基質), 豚の腎からのレニン, 豚の腎ミクロゾームからのロイシニアミノペプチダーゼ, Leu-Val-Tyr-MCA (ロイシニアミノペプチダーゼ基質), 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), 及びたん白質分解酵素（ペプシン, トリプシン）はシグマ社製を使用した。

食品たん白質の消化法

たん白質は1%になるように脱イオン水に溶解し、そ

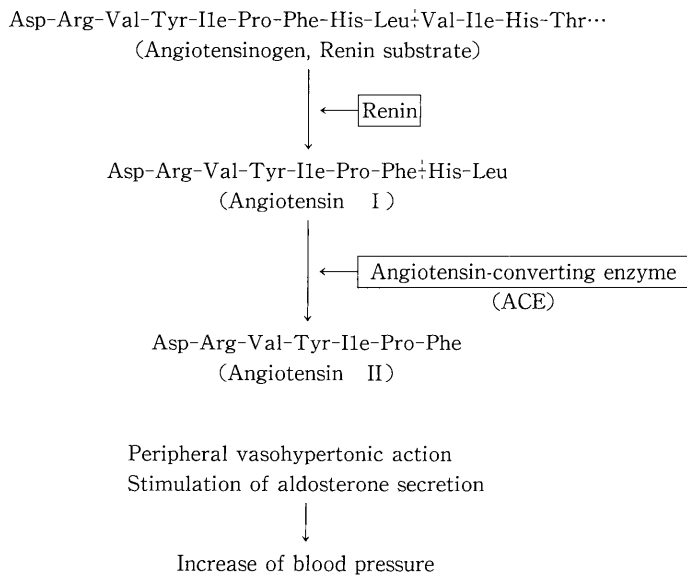


Fig. 1. Renin-angiotensin system.

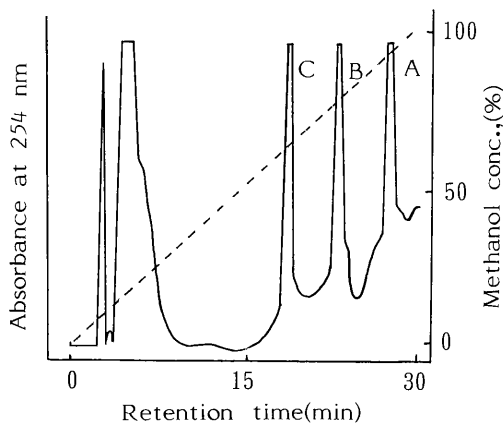


Fig. 2. HPLC pattern of suc-octapeptide-MCA (A), Leu-Val-Tyr-MCA (B), and AMC (C). Column; Wakopak silica gel M-ODS (4×30 cm). Solvent system; a : 0.1 M acetate buffer (pH 4.6), b : methanol. Flow rate; 1.0 mL/min.

れにたん白分解酵素（ペプシン, pH 2; トリプシン, pH 8.8）をたん白質量に対して1%になるように添加し, それぞれの酵素の至適 pH で, 50℃, 30分間消化を行った。消化後, 100℃で5分間加熱して酵素反応を停止

した。消化率は反応液に10% TCA 溶液を等量加えたのち, 濾紙 (Toyo, No. 5B) で濾別し, TCA 可溶成分のたん白量から算出した。

ACE 阻害活性

ACE 阻害活性は Cushman と Cheung の方法⁵⁾に従って測定した。Hip-His-Leu (5 mM) と ACE 阻害剤 (たん白質の消化ペプチド, 20 μL あるいは50 μL) を 0.3 M 食塩を含む0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3) に溶解し, ACE (5 mU) を加え, 37℃で60分間インキュベートした。阻害能は阻害剤を加えない場合の ACE 活性に対する割合から測定した。

レニン阻害活性

レニン阻害活性は村上らの方法⁶⁾を適用した。レニン基質 (20 μM) とレニン阻害剤 (たん白質の消化ペプチド, 100 μL) を0.1 mM 酢酸亜鉛を含む50 mM ピロリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し, レニン (10 mU) を加え, 37℃で60分間インキュベートした。反応後100℃で5分間加熱処理し, 冷却後ロイシンアミノペプチダーゼ (50 mU) を加え, さらに37℃で90分間インキュベートした。反応終了後, 遊離した AMC を380 nm で励起し, 440 nm での蛍光を測定した。阻害能は阻害剤を加えない場合のレニン活性に対する割合から算出した。使用したたん白質の消化ペプチドはロイシンアミノペプチダーゼに対して阻害能を示さないことを確認した。

逆相 HPLC 及び TLC 分析

逆相 HPLC は Wakopak silica gel M-ODS カラム (0.4×30 cm) を使用した。溶出溶媒は0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) を含む。メタノールの直線

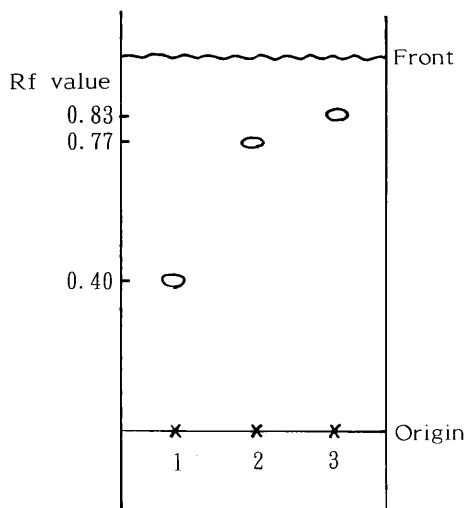


Fig. 3. TLC of suc-octapeptide-MCA (lane 1), Leu-Val-Tyr-MCA (product by renin, lane 2) and AMC (product by leucine aminopeptidase, lane 3). Solvent system; n-butanol/acetic acid/water (4/1/1, v/v).

的濃度勾配 (0–100%) を用い, 1.0 mL/min の流速で溶出した。吸収は254 nm で測定した。一方, TLC 分析は, Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck 製) を用い, 展開溶媒は n-ブタノール/酢酸/水 (4/1/1) を使用した。スポットは紫外線照射あるいは fluorescamine (Roche 製) を噴霧することにより検出した。

消化ペプチドの分離・分画

ペプシン及びトリプシンで消化した食品たん白質は残渣を除去したのち, 限外濾過 (Toyo, UK-10) を行った。得られた濾液 (分子サイズ 1 万以下) は Sephadex G-25 カラム (2×85 cm) にかかけられ, イオン交換水で 3 mL ずつ分画した。それぞれの画分は280 nm (たん白成分) 及び228 nm (ペプチド成分) で吸光度を測定し, それらのクロマトグラムパターンから 3～4 本の画分を集め濃縮し, レニン及び ACE 阻害活性を測定した。

結果と考察

レニン反応系における反応生成物の確認

レニンは合成基質である Suc-octapeptide-MCA の Leu-Leu 結合を切断し, Leu-Val-Tyr-MCA を生成する。また, レニンにより生成した Leu-Val-Tyr-MCA はロイシンアミノペプチダーゼによって, 順次アミノ末端から切断され, AMC を遊離する。これらの一連の反応系が標準分析法下で進行していることを確認するために, HPLC 及び TLC によって反応産物の分析

Table 1. Inhibitory activity of food protein hydrolysates against renin and ACE

Hydrolysates of food proteins	Digestibility (%)	Inhibitory activity (%)	
		Renin	ACE
SPI	18.5	46.2	89.7
Fuji Pro R	18.1	31.5	77.3
Egg white	40.9	81.8	94.5
Ovalbumin	37.2	78.6	97.1
Whey protein	25.9	58.1	88.6
BSA	38.4	71.8	69.5
β -LG	32.2	19.6	ND
α_s -Casein	34.2	10.0	96.7
β -Casein	30.8	15.8	87.2
Gluten	24.2	20.0	89.0
Gladiadin	ND	17.4	68.5

The hydrolysates were prepared with pepsin and trypsin. After digestion, 50 μ L of hydrolysates were used for the inhibitory assay against ACE. The details of assay are described in Materials and Methods. Abbreviations: SPI, soy protein isolate; BSA, bovine serum albumin; β -LG, β -lactoglobulin; ND, not determined.

を行った。Fig. 2 に示したように逆相 HPLC 分析の結果、レニン基質である Suc-octapeptide-MCA (A) は27.8分、レニンによる反応生成物である Leu-Val-Tyr-MCA (B) は22.5分、ロイシンアミノペプチダーゼによる反応生成物 AMC (C) は18.3分の保持時間を持ち、完全に分離、分別できることが確認できた。さらに、TLC 分析の結果 (Fig. 3) からこれらの反応生成物を分離確認できることがわかった。

食品たん白質消化物のレニン及び ACE 阻害活性

Table 1 は食品たん白質をペプシンに、ついでトリプシンで消化した場合のレニン及び ACE 阻害活性と消化率を示す。用いたたん白質のうち、卵白、乳清たん白、分離大豆たん白 (SPI) 中に比較的強いレニン阻害ペプチドが存在することがわかった。さらに卵白中ではオボアルブミン、乳清たん白中では血清アルブミン (BSA) に強力なレニン阻害ペプチドが存在することが示唆された。ACE に対する阻害ペプチドは、用いられた食品たん白質の全てに認められ、レニン阻害能

Table 2. Effect of protease digestion on inhibitory activity of food proteins against renin

Protease treatment	Hydrolysates of proteins	Digestibility (%)	Inhibitory activity (%)
Pepsin	SPI	12.6	71.1
	Fuji Pro R	21.3	57.6
	Ovalbumin	32.4	61.5
	α_s -Casein	19.7	60.5
	Gluten	25.2	11.2
Trypsin	SPI	17.2	38.2
	Fuji Pro R	17.1	0
	Ovalbumin	19.6	68.0
	α_s -Casein	15.1	32.0
	Gluten	9.5	0
Pepsin + Trypsin	SPI	18.5	46.2
	Fuji Pro R	18.1	31.5
	Ovalbumin	37.2	78.6
	α_s -Casein	34.2	10.0
	Gluten	24.2	20.0

The details of assay are described in Materials and Methods. Abbreviation: SPI, soy protein isolate.

Table 3. Effect of protease digestion on inhibitory activity of food proteins against ACE

Protease treatment	Hydrolysates of proteins	Digestibility (%)	Inhibitory activity (%)
Pepsin	SPI	12.6	36.8
	Fuji Pro R	21.3	26.8
	Ovalbumin	32.4	58.4
Trypsin	SPI	17.2	30.1
	Fuji Pro R	17.1	20.1
	Ovalbumin	19.6	43.9
Pepsin + Trypsin	SPI	18.5	73.6
	Fuji Pro R	18.1	49.8
	Ovalbumin	37.2	69.5

After protease digestion, 20 μ L of hydrolysates were used for the inhibitory assay. The details of assay are described in Materials and Methods. Abbreviation: SPI, soy protein isolate.

を有する食品たん白質消化物以外に乳カゼイン及び小麦グルテン、グリアジンにも存在することがわかった。レニン及び ACE 阻害活性に及ぼすたん白分解酵素の影響

食品たん白質由来の ACE 阻害ペプチドは、塩基性アミノ酸を含み、その C 端にプロリンや芳香族アミノ酸をもつものが強力な阻害活性を有すると報告⁷⁾されている。そこで、数種の食品たん白質を用いて、ペプシン処理、トリプシン処理、及びペプシン処理後さらにトリプシン処理したたん白質消化物中のレニン及び ACE に対する阻害活性を調べた。Table 2 はレニン阻害活性を示す。オボアルブミンやグルテンでは、ペプシン+トリプシン消化物でレニン阻害活性が最も高く、 α_s -カゼイン、分離大豆たん白 (SPI), 及びフジプロ R (不二製油製) では、ペプシン消化物で高いレニン阻害活性を示した。トリプシン消化物はいずれのたん白質においても弱く、とくにグルテン、フジプロ R ではレニン阻害能を示さなかった。Table 3 には ACE 阻害活性を示す。ACE 阻害活性はいずれのたん白質においてもペプシン及びトリプシンで消化したものに高い活性がみられた。ACE 阻害活性ではトリプシン消化物にも比較的高い阻害活性が認められ、とくにレニン阻害がみられなかったフジプロ R においてもペプシン消化物と同等の阻害能がみられた。これらの結果から、たん白質分解酵素によって食品たん白質由来のレニン、

ACE に対するペプチドの阻害能は異なることがわかった。食品たん白質中に潜在しているこれらの酵素阻害ペプチドの顕在化には、たん白分解酵素の基質選択性を考慮する必要があることが示唆された。

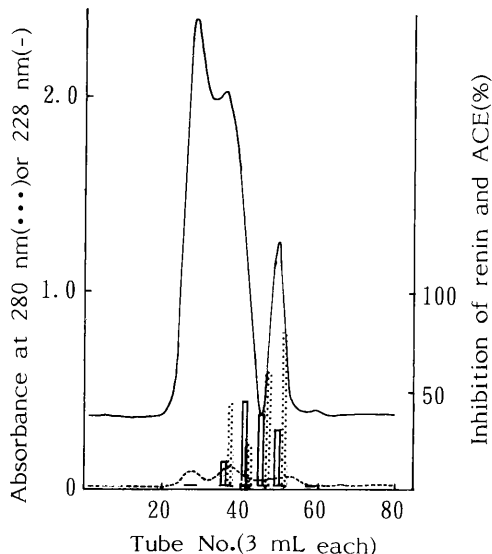


Fig. 5. Sephadex G-25 column chromatography of ovalbumin hydrolysate.
□, Renin; ▨, ACE.

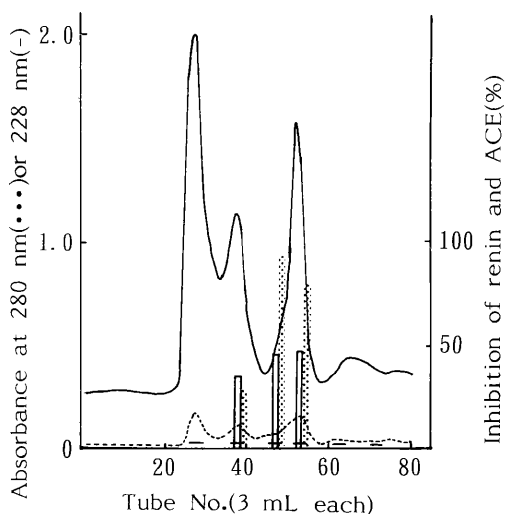


Fig. 4. Sephadex G-25 column chromatography of bovine serum albumin hydrolysate.
□, Renin; ▨, ACE.

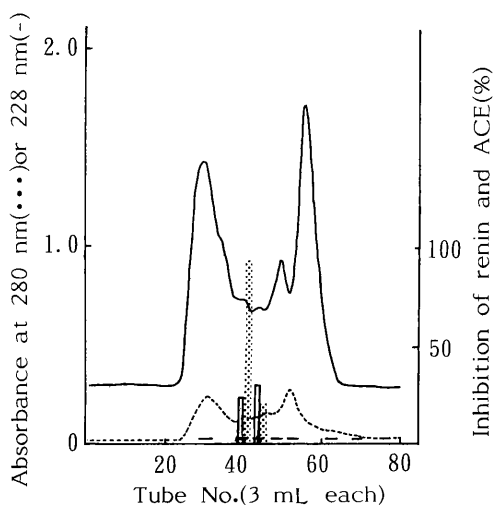


Fig. 6. Sephadex G-25 column chromatography of soy protein (Acid precipitated protein) hydrolysate.
□, Renin; ▨, ACE.

レニン及び ACE 阻害ペプチドの分離

Figs. 4~6 はペプシン及びトリプシン消化後の食品たん白質のゲル濾過パターンを示す。それぞれの各画分を濃縮し、レニン及び ACE 阻害活性を測定した。牛血清アルブミン (BSA) の場合 (Fig. 4), レニン阻害活性は、フラクション No. 37~39, 45~47, 及び 51~53 の画分に溶出された。ACE 阻害活性では、フラクション No. 45~47, 及び 51~53 の画分に強い阻害能がみられた。オボアルブミンの場合 (Fig. 5), レニン阻害活性はフラクション No. 40~42, 45~47, 及び 51~53 の画分に溶出された。ACE 阻害活性は、フラクション No. 35~37, 45~47, 及び 51~53 にみられた。とくにフラクション No. 51~53 の画分が強力な阻害能をもつことがわかった。分離大豆たん白質 (SPI, Fig. 6) では、レニン及び ACE 阻害ペプチドは比較的狭い分子サイズの画分に濃縮され (フラクション No. 43~45 及び 48~50), フラクション No. 43~45 の画分に非常に強い ACE 阻害能がみられた。

これらの結果から、3 種の食品たん白質 (BSA, オボアルブミン, SPI) のペプシン、及びトリプシン消化物は比較的類似した分子サイズのペプチド成分がレニン及び ACE 阻害能をもつことがわかった。しかし、レニン及び ACE に対する阻害能は必ずしもパラレルな関係にはなく、今後、これらの阻害ペプチドを分離・精製して、構造と阻害活性との関係、さらには構造と阻害活性サイトとの関係について明らかにする必要がある。

文 献

- 1) 藤巻正生監修 (1988): 食品機能, 学会出版センター
- 2) 末綱邦男, 箆島克裕 (1989): イワン筋肉由来ペプチドの in vivo における血圧降下作用ならびに血管拡張作用について. 日本栄養・食糧学会誌, **42**, 47-54.
- 3) 吉川正明, 千葉英雄 (1990): 食品由来の生理活性ペプチド. 食品工業, **2**・28, 20-25.
- 4) Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. (1991): Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysates., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318.
- 5) Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971): Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648.
- 6) Murakami, K., Ohsawa, T., Hirose, S., Takada, K. and Sakakibara, S. (1981): New fluorogenic substrates for renin. *Anal. Biochem.*, **110**, 232-239.
- 7) Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. (1980): Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **255**, 401-407.