

# 7Sグロブリンからの血圧低下ペプチドSVYの高度生成と その生理機能評価

松井利郎\*

九州大学大学院農学研究院

## Production of Hypotensive Peptide, SVY, from 7S Globulin of Soybean Protein and Its Physiological Functions

Toshiro MATSUI

Faculty of Agriculture, Kyushu University Fukuoka 812-8581

### ABSTRACT

To clarify the latent hypotensive effect of soybean proteins, we measured production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors from 7S globulin, and characterized peptides responsible for an *in vivo* depressor effect. Soybean protein was hydrolyzed by pepsin, chymotrypsin, and trypsin, and the prepared hydrolysate (F-1) with a peptide length of 7.2 showed an ACE inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 0.286 mg/mL. The F-1 also contained 44.2% di- & tri-peptides ( $IC_{50}$ : 0.358 mg/mL), which could be absorbed intact through the intestinal tract. From the di-/tri- peptide fraction, Val-Tyr (VY), Ile-Val-Tyr (IVY), and Ser-Val-Tyr (SVY) ( $IC_{50}$ : 1.7 mM) were isolated and identified. A single oral administration rat study of the fraction revealed that it had an ability to lower blood pressure, in which a 0.3 g/kg dose in an 18 wk old spontaneously hypertensive rat resulted in a significant reduction of systolic blood pressure of 19.7 mmHg at 6 h. Useful information on the hypotensive effect of soybean proteins was obtained by an intestinal membrane transporting study using the Ussing system. Results from the rat small intestinal transport experiment indicate that F-1 and 18 di- and tri-peptides, including SVY and IVY with ACE inhibitory activity, were absorbed intact through the membrane. Phe-Ala (FA) was the most absorbable di-peptide with a permeation rate of 164.9 nmol/cm<sup>2</sup>/30 min/mL. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 73-77, 2003.

Key words : ACE inhibitory peptide, hypertension, soybean, gastrointestinal protease, absorption

\*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

我が国の高血圧疾患患者数は、予備軍も含めると3,500万人以上に上るとされ、心・脳疾患の危険因子としてその予防が強く望まれている。特に、その発症には生活習慣が深くかかわっているとされ、食生活からの見直しもまた時代の趨勢である。

申請者はこのような観点から、食事因子、特に機能性因子による高血圧疾患の予防を念頭に置いた研究を推進し、天然たん白質から各種降圧成分を調製・同定してきた<sup>1)</sup>。そこで、本研究では大豆たん白質に着目し、1) 大豆たん白質摂取後に想定される消化過程における降圧ペプチド産生挙動を把握するとともに、2) in vivo血圧降下作用の発現有無、3) 複次性高活性ペプチド ( $IC_{50}$ ; 0.48 mM, cf.  $IC_{50}$  captopril; 0.02~0.03 mM) であるIVY<sup>2)</sup>の類似ペプチドであるSVY (7Sグロブリン (300~302)) を含むアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドの腸管吸収性を明らかにすることを試みた。

## 方 法

### ACE阻害活性測定

山本らの変法に従って、Hip-His-Leu (ペプチド研究所製) を擬似基質として、ウサギ肺由来ACEによる馬尿酸生成阻害 (37℃, 60分間) からACE阻害活性を見積もった。

### 大豆たん白質酵素分解物の調製

大豆たん白質 (フジプロ) 3 gを30 mLの脱イオン水に溶解し、ボルテックスで攪拌後、20% HClを用いてpH1.2に調整した。対基質0.4 wt%となるようにペプシン12 mgを加え、37℃で4時間インキュベートした。その後、20% NaOHを用いて溶液をpH6.8に再調整した。次いで、対基質0.2 wt%となるようにキモトリプシンおよびトリプシンを添加し、37℃で4時間インキュベートした。98℃で15分間加熱処理し、10,000 rpmで15分間遠心分離した上清を凍結乾燥することにより大豆たん白質の人工消化物 (F-1) を得た。また、ハイニュートD3, R, SMPについても被験試料として使用した。

### 低分子ペプチド画分の調製

Superdex Peptide HR10/30 ( $\phi$ 1 cm×30 cm) (Bio-Rad社製) を用いたGPC-HPLC法 (島津製作所製 LC-6A, 溶離液: 30%  $CH_3CN$ /0.1% TFA, 0.3 mL/min, 35℃) により、ジ・トリペプチド画分 (52~69 min) を単離した。なお、各種ペプチド体は、市販あるいはFmoc固相合成法により得た。

### ラット血圧測定

18週齢雄性の高血圧自然発症ラット (SHR, 日本チャールズリバー社製) 7匹 ( $300.0 \pm 14.7$  g) を用いて単回経口投与試験を実施した。まず、16週齢のSHRを個別ケージにて2週間予備飼育を行った。このとき、市販固形飼料・脱イオン水共に自由摂取とし、室温は22℃, 明暗は8:00~20:00の12時間周期とした。投与12時間前より絶食を行い、カテーテルを用いて被験溶液を単回経口投与した。血圧測定は投与前および投与1, 3, 6, 9時間後に39.5℃で10分間の予備保温を行った後、tail-cuff法 (Softron BP98) により非観血的に行った。

### 腸管膜透過試験

18週齢SHRをエーテル屠殺後、直ちに空腸部位 (胃から15 cm) を摘出した。得られた腸管膜の漿膜側筋層を剥離後、Ussingシステムの透過セル (透過面積: 0.2826 cm<sup>2</sup>) にマウントした。37℃, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>下, 0.2 g/mL (Krebs-Hensleit Ringer Solution, pH7.4) のF-1 (7.5 mL) を粘膜側に負荷し、30分間の透過試験を行った。なお、膜抵抗電位の変化 ( $\Delta PD$ ) はAg/AgCl電極により測定した。

### ペプチド単離

F-1および腸管膜透過液からのペプチドの単離は、2段階の逆相HPLC法により行った (共に、カラムはナカライテスク社製COSMOSIL 5C18-ARII ( $\phi$ 0.46 cm × 25 cm), 日本分光製GULLIVERを使用した)。第1段階: 5~35%  $CH_3CN$ /0.1% TFA (30 min), 0.4 mL/min, 35℃, 第2段階: 5~35%  $CH_3CN$ /0.05% TFA+0.1% THF (30 min), 0.4 mL/min, 35℃)。アミノ酸組成はShimadzu SCL-10Aシステム (Column: AccQ・Tag (3.9 mm×150 mm), Waters, Milford, MA, USA) を用いて常法により行った。アミノ酸配列は、自動エドマン分解により、Shimadzu PPSQ-21 Protein Sequencerを用いて決定した。

## 結果と考察

### 大豆たん白質からのACE阻害ペプチドの生成

大豆たん白質 (フジプロ) の消化管プロテアーゼ処理により、平均ペプチド鎖長として7.24のオリゴペプチドF-1が派生することが確認された。また、GPC-HPLC測定の結果、本分解物中にはジおよびトリペプチド体 ( $IC_{50}$ : 0.358 mg/mL) が44.2%含まれていることが判明した (Fig. 1)。そこで、得られた各分解物のACE阻害活性を測定したところ (Table 1), F-1はハイニュートD3, R, SMPとほぼ同等の活性を示し、

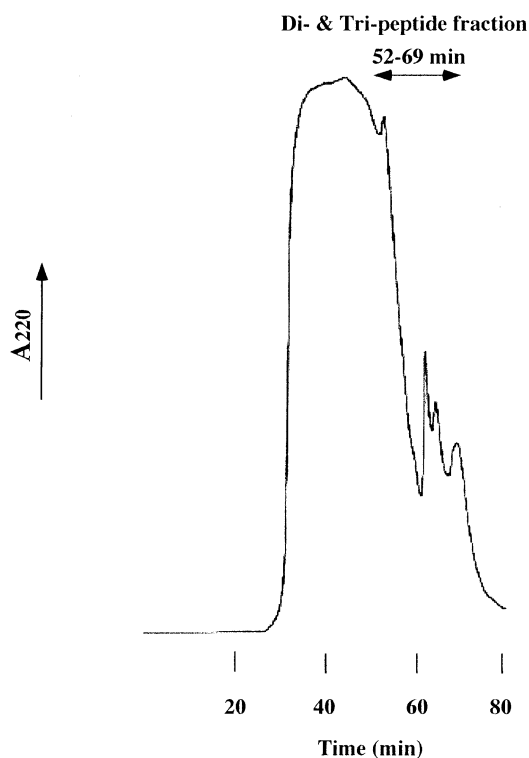


Fig. 1. Separation of di- and tri-peptide fraction from gastrointestinal protease hydrolysate of soybean proteins by GPC-HPLC. Column: Bio-Rad Superdex-Peptide HR10/30 ( $\phi$ 1 cm $\times$ 30 cm). Condition: 30% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA. Flow rate: 0.3 mL/min, 35°C.

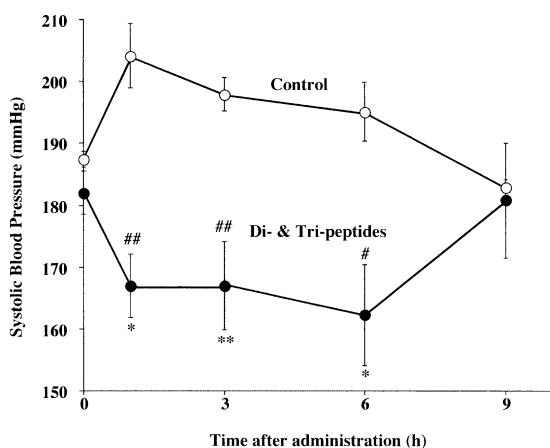


Fig. 2. Change in blood pressure after single oral administration of di- and tri-peptides (0.3 g/kg dose) of soybean hydrolysate in 18 wk-SHR. \*\* $P$ <0.01, \* $P$ <0.05 vs. 0 h; # $P$ <0.01, # $P$ <0.05, vs. control ( $n$ =5, Dunnett's  $t$ -test).

Table 1. ACE inhibitory activity of soybean products

|                                  | IC <sub>50</sub> (mg/mL)    |
|----------------------------------|-----------------------------|
| F-1 <sup>a)</sup>                | 0.286 (0.209 mg-protein/mL) |
| Di- & Tri-peptides <sup>b)</sup> | 0.358                       |
| 「Hinute」 SMP                     | 0.259                       |
| R                                | 0.247                       |
| D3                               | 0.260                       |

a) F-1; Gastrointestinal protease hydrolysate of soybean proteins. The soybean protein (Fujipuro) was subjected to a peptic hydrolyses for 4 h, and the subsequent chymotryptic and tryptic hydrolyses for 4 h.

b) The fraction was obtained by applying F-1 on a Bio-Rad Superdex-Peptide HR 10/30 column.

Table 2. Isolation and identification of ACE inhibitory peptides from F-1 hydrolysate<sup>a)</sup>

|             | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | Content (mg/g) |                    |
|-------------|-----------------------------|----------------|--------------------|
|             |                             | F-1            | Di- & Tri-peptides |
| Val-Tyr     | 26                          | 1.69           | 3.83               |
| Ile-Val-Tyr | 0.48                        | 2.83           | 6.44               |
| Ser-Val-Tyr | $1.68 \times 10^3$          | 3.89           | 8.85               |

a) F-1 hydrolysate: Gastrointestinal protease hydrolysate of soybean proteins.

IC<sub>50</sub>値は0.286 mg/mL (0.209 mg-protein/mL)であった。本活性値はヒトでの降圧効果が認められているイワシ由来ペプチド体のIC<sub>50</sub>値 (0.018 mg-protein/mL)<sup>3)</sup>の約1/10程度と低活性であったが、大豆たん白質摂取により新たに腸管内でACE阻害性物質が生成することが明らかとなった。

逆相HPLC分析によりF-1およびジ・トリペプチド画分に含まれるACE阻害ペプチドの単離を行い、VY, IVY, ならびにSVYを同定した (Table 2)。その結果、SVYはF-1中に0.389%含まれていたものの、IC<sub>50</sub>は1.68 mMであり、ACE阻害性はほとんどないと判断された。

#### 大豆たん白質分解物の血圧降下作用

18週齢SHRに対してF-1のジ・トリペプチド画分を単回経口投与 (0.3 g/kg) した結果 (Fig. 2), 6時間までの有意な血圧低下作用 (SBP<sub>0h</sub>: 182.0 $\pm$ 7.9 mmHg, SBP<sub>6h</sub>: 162.3 $\pm$ 14.2 mmHg) が認められた。この知見は、大豆たん白質摂取が血圧調節を図る上で有効なこと、またその発現にはペプチドが大いに関わっていることを示唆するものであった。

#### 大豆たん白質由来ペプチドの腸管吸収性

生体での降圧作用を評価する上で重要となる腸管吸収性について検討を行った。SHR空腸を用いたF-1の

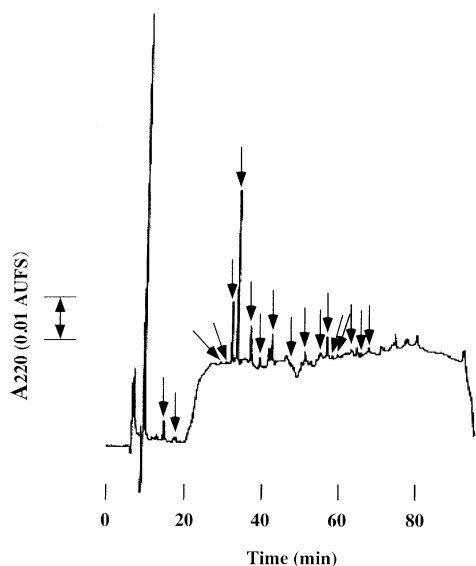


Fig. 3. HPLC elution profile of peptides in F-1 permeable through 18 wk-SHR intestinal membrane. Permeating peptides in the 7.5 mL of Krebs-Hensleit Ringer solution (pH7.4) was extracted with C18 Sep-pak cartridge, and applied on HPLC. Arrow indicates the identified peptides. Column: Cosmosil 5C18-ARII ( $\phi$ 0.46 cm $\times$ 25 cm). Condition: 5-35% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA (30 min), 0.4 mL/min, 35°C.

腸管膜透過試験によって、Fig. 3で示したように30ピークの腸管膜透過性物質が確認された。これらピークをアミノ酸分析ならびにアミノ酸配列分析に供した結果、18種類の大豆たん白質由来ジおよびトリペプチドが腸管吸収されることが初めて明らかとなった (Table 3)。これらペプチドの膜透過速度 (P) を算出したところ、ペプチドの種類によって膜透過速度は大いに異なり、FA (P : 164.9 nmol/cm<sup>2</sup>/30 min/mL), FG (P : 19.1),

Table 3. Identification of peptides from F-1 that can be absorbed through rat intestinal membrane<sup>a)</sup>

|             | RT <sup>b)</sup><br>(min) | Permeation Rate<br>(nmol/cm <sup>2</sup> /30 min/mL) |
|-------------|---------------------------|------------------------------------------------------|
| Leu-Ala     | 15.8                      | 0.11                                                 |
| Leu-Val     | 17.8                      | 0.02                                                 |
| Ile-Tyr     | 29.2                      | 0.01                                                 |
| Val-Tyr     | 31.1                      | 0.38                                                 |
| Phe-Gly     | 32.0                      | 19.1                                                 |
| Phe-Ala     | 33.0                      | 164.9                                                |
| Ser-Val-Tyr | 37.2                      | 4.24                                                 |
| Lys-Phe     | 38.8                      | 2.82                                                 |
| Glu-Ser-Phe | 41.9                      | 0.08                                                 |
| Val-Phe-Lys | 48.3                      | 0.17                                                 |
| Val-Ile-Tyr | 51.4                      | 0.65                                                 |
| Ile-Gln-Thr | 54.6                      | 0.18                                                 |
| Phe-Thr-Leu | 56.5                      | 1.00                                                 |
| Val-Leu-Phe | 57.8                      | 0.03                                                 |
| Ile-Val-Tyr | 59.2                      | 0.35                                                 |
| Trp-Leu     | 63.3                      | 0.05                                                 |
| Leu-Ser-Typ | 65.4                      | 0.01                                                 |
| Pro-Ala-Leu | 67.5                      | 0.03                                                 |

<sup>a)</sup> Rat intestinal membrane permeation experiment of F-1 (1.5 g) was performed with Ussing Chamber system (cell area: 0.286 cm<sup>2</sup>, 37°C, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>).

<sup>b)</sup> Retention time.

SVY (P : 4.24) が高い膜透過性 (腸管吸収性) を示した。このことは、PepT<sub>1</sub> トランスポーターに対する結合親和性 (K<sub>m</sub>) がペプチド構造によって大いに異なることを示すものであった。なお、SVYは比較的高い透過速度を示したことから、腸管吸収後、ACE阻害ペプチドVYの産生<sup>4)</sup>に伴う降圧効果発現の可能性が示唆された。

## 要 約

F-1 (平均ペプチド鎖長7.2) はIC<sub>50</sub>値として0.286 mg/mLのACE阻害活性を示した。また、F-1中にはジおよびトリペプチドが44.2% (IC<sub>50</sub> : 0.358 mg/mL) 含まれており、この画分からACE阻害ペプチドとしてVY, IVYおよびSVY (IC<sub>50</sub> : 1.7 mM) を単離・同定した。SHRに対するジ・トリペプチド画分を単回経口投与 (0.3 g/kg) した結果、6時間までの有意な血圧低下 ( $\Delta$ SBP : 19.7 mmHg) が認められ、本画分の血圧低下作用が明らかとなった。F-1の腸管膜透過試験を実施した結果、SVY, IVYを含む18種類のジ・トリペプチドのラット腸管膜透過を確認し、特にFAが最も高い腸管吸収性を示すジペプチドであることを明らかにした (P : 164.9 nmol/cm<sup>2</sup>/30 min/mL)。

## 文 献

- 1) 松井利郎 (2002) : 食品成分による高血圧疾患予防とその作用メカニズム. バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 665-670.
- 2) Matsui T et al (1999): Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J Peptide Sci*, **5**, 289-297.
- 3) Kawasaki T et al (2000): Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Human Hypertens*, **14**, 519-523.
- 4) Matsui T et al (2000): Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biol Pharm Bull*, **23**, 427-431.