

大豆ホエイおよびオカラたん白質からの生理機能性ペプチドの単離と応用

米倉政実*・田中絢子

茨城大学農学部

Isolation and Application of Physiologically Active Peptides from Soybean Whey and Okara Proteins

Masami YONEKURA and Ayako TANAKA

School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

Peptides with inhibitory effects on angiotensin I-converting enzyme (ACE) were isolated from thermolysin digests of soybean whey proteins; basic 7S globulin; and the "Hinute DC5" soybean peptide preparation. The amino acid sequence of the inhibitory factor from the whey protein digest was Leu-Ala-Pro and the IC_{50} value of the peptide for ACE from rabbit lung was $0.13 \mu M$. Isolation of the inhibitory peptide from the basic 7S globulin digest was attempted, however the sequence of the peptides has not been clarified. Thirteen kinds of ACE inhibitory peptides from "Hinute DC5" were isolated. Among these peptides, dipeptides such as Lys-Tyr and Ala-Phe showed comparatively high inhibitory activity for ACE. and their IC_{50} values were $25 \mu M$ and $97 \mu M$, respectively. Our results suggest that the thermolysin digests of soybean whey proteins, basic 7S globulin and "Hinute DC5" may be suitable materials for the development of a functional food with antihypertensive activity. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 88-93, 2003.

Key words: soybean, peptide, angiotensin I-converting enzyme inhibitor, whey protein, basic 7S globulin

大豆たん白質は高い栄養機能をもつだけでなく、ゲル形成性や乳化性などの物性面での特性、さらにコレステロール低下作用などの三次機能を有するので、分離大豆たん白質などとして多くの食品に利用されている¹⁾。また、大豆たん白質由来の機能性ペプチドにつ

いては、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害ペプチド、抗酸化性ペプチド、ファゴサイトーシス促進ペプチドなどの報告がある²⁾が、これらは大豆の主要たん白質であるグリシニンや β -コングリシニン由来のものであり、ホエイたん白質やオカラに含まれているたん白質由来の機能性ペプチドについての研究はほとんど行われていない。

*〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

そこで、本研究ではあまり有効利用が図られていないホエイおよびオカラたん白質に注目し、これらをプロテアーゼにより分解し、血圧降下作用をもつACE阻害ペプチドを単離し、機能性食品等の素材として活用することを目的とした。

方 法

実験材料および試薬

ACE (ウサギ肺由来)、サーモライシン、ズブチリシン、パパインおよびペプシンはSIGMA社から、ACEの基質であるBz-Gly-His-Leuはペプチド研究所からそれぞれ購入した。これら以外の試薬は特級またはHPLC用(和光純薬工業)を使用した。実験材料として不二製油から恵与された脱脂大豆および大豆ペプチド「ハイニユートDC5」を使用した。

ホエイたん白質および塩基性7Sグロブリンの調製

脱脂大豆にその10倍量の水を加え、pHを7.0に調整しながら室温で30分間攪拌した後、遠心分離(1,000 g, 10分間)により上清を得た。この上清のpHを4.5に調整し、遠心分離(同上)により沈殿を除去した。得られた上清にCa(OH)₂を加え、pHを5.3に調整した後、95℃で15分間加熱し、生じた沈殿を遠心分離(同上)により回収し、これをホエイたん白質として使用した。

また脱脂大豆にその10倍量の水を加え、pHを4.0に調整しながら室温で15分間攪拌した後、遠心分離(同上)により上清を得た。この上清にCaCl₂を加え、pHを6.5に調整した後、生じた沈殿を遠心分離(同上)により回収し、これを塩基性7Sグロブリン標品として使用した。

プロテアーゼによる分解

pH8.0に調整した5%ホエイたん白質に1/100量のサーモライシンを添加し、50℃で4時間反応後、20分間煮沸して酵素反応を止め、遠心分離(10,000 g, 10分間)により上清を得、これをホエイたん白質分解物とした。

またpH7.0に調整した2%塩基性7Sグロブリン溶液に1/100量のサーモライシンを添加し、37℃で3時間反応後、5分間煮沸して酵素反応を止め、遠心分離(10,000 g, 10分間)により上清を得、これを分解物とした。ズブチリシン、パパインおよびペプシンによる分解も同様に行ったが、ペプシンの場合のみ酵素反応はpH2.0にて行った。

ACE阻害活性の測定

ACEの阻害活性測定はCushman and Cheung³⁾の原法

に準じた河村⁴⁾の方法に従って行った。すなわち、Bz-Gly-His-Leuを基質とし、ACEにより生成された馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、水に再溶解した後、228 nmにおける吸光度を測定した。ACE阻害率(%)は、被検試料添加によりもたらされた吸光度の低下割合で表した。また、ACE活性を50%阻害する被検試料量をIC₅₀として阻害活性を表した。

ゲル濾過および逆相高速液体クロマトグラフィー

ゲル濾過にはSephadex LH-20カラムを用い、ペプチドの検出は215 nmまたは280 nmにおける紫外吸収により行った。逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にはC18カラムを使用し、アセトニトリルの濃度勾配によりペプチドの溶出を行った。ペプチドの検出は220 nmにおける紫外吸収により行った。

ゲル電気泳動分析

たん白質のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は10~20%濃度勾配ゲルを用い、Laemmli⁵⁾の方法に従って行い、たん白質バンドの染色にはクマシーブリリアントブルーR-250を用いた。

アミノ酸配列分析

単離したペプチドのアミノ酸配列は、プロテインシーケンサー(モデル494, Applied Biosystems)を用いて解析した。

結 果

ホエイたん白質由来のACE阻害ペプチドの単離と構造決定

本実験で使用したホエイたん白質をSDS-PAGEにより分析した結果、Fig. 1(a)に示すようにレクチン(分子量30kDa)とKunitz型トリプシンインヒビター(21kDa)が主成分であることが分かった。このサーモライシン分解物をゲル濾過に供した結果、Fig. 2(a)に示すⅢ画分に最も強いACE阻害活性(阻害率56%)が認められたので、再ゲル濾過(Fig. 2(b))を行い、活性の高いⅢ-3画分(阻害率73%)を得た。次に逆相HPLCによりペプチドの分離を行ったところ、Fig. 3(a)に示すように保持時間10~15分の画分に高いACE阻害活性(阻害率68%)が認められたので、各ペプチドピークを分取した結果、Fig. 3(b)のD画分前半のピークに高い阻害活性(阻害率61%)が認められた。そこで本ペプチドのアミノ酸配列を解析した結果、Leu-Ala-Pro(LAP)であることが明らかになった。またLAPのIC₅₀は0.13 μMで、強いACE阻害活性を有することが分かった。

塩基性7Sグロブリン由来のACE阻害ペプチドの分離

塩基性7Sグロブリン標品のSDS-PAGEパターンをFig. 1(b)に示すが、非還元状態で1本のたん白質バンド(分子量42 kDa)が、還元状態でH鎖(26 kDa)とL鎖(16 kDa)の2本のバンドがそれぞれ確認された。またHとL鎖のバンドのN末端アミノ酸配列を10残基分析した結果、それぞれ既知配列⁶⁾と完全に一致した。

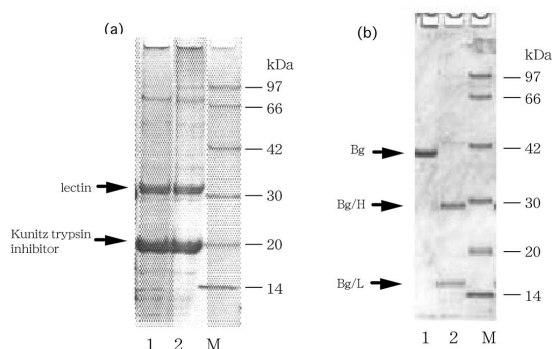


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of whey proteins (a) and basic 7S globulin (b). SDS-PAGE of the sample was done with a 10-20% polyacrylamide gel according to Laemmli method and protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (a) lane 1 and 2, whey proteins; lane M, molecular weight marker proteins. (b) lane 1, basic 7S globulin without β -mercaptoethanol; lane 2, basic 7S globulin with β -mercaptoethanol; lane M, molecular weight marker proteins.

塩基性7Sグロブリンのサーモライシン分解物のACE阻害率は74.5%で、ズブチリシン分解物の阻害率47.6%、パパイン分解物の同45.5%、ペプシン分解物の同68.4%に比べ、高い活性を示すことが分かった。また、その IC_{50} は46 μ g/mLであった。そこで、本サーモライシン分解物からACE阻害ペプチドを分離するため、まず50%エタノールで沈殿する画分を除去し、上清をゲル濾過に供したところFig. 4に示すように、3つ(I~III)の活性ピークが認められた。次にI~III画分について逆相HPLCによりペプチドの分離を行ったところ、Fig. 5に示す各画分にACE阻害活性(阻害率53~88%)が認められた。これらの活性画分からのACE阻害ペプチドの単離と構造決定は現在試みているところである。

大豆ペプチドハイニユートDC5由来のACE阻害ペプチドの単離と構造決定

ハイニユートの IC_{50} は75 μ g/mLであり、比較的強いACE阻害活性を示したので、逆相HPLCにより活性ペプチドの単離とそのアミノ酸配列の解析を行った結果、Fig. 6に示す13種のペプチドが同定された。このうち比較的強い活性が再確認されたペプチドは、Lys-Tyr ($IC_{50}=25 \mu$ M)とAla-Phe (同97 μ M)の2つのジペプチドであったが、他のペプチドについても化学合成の後ACE阻害活性(IC_{50})を確認しているところである。

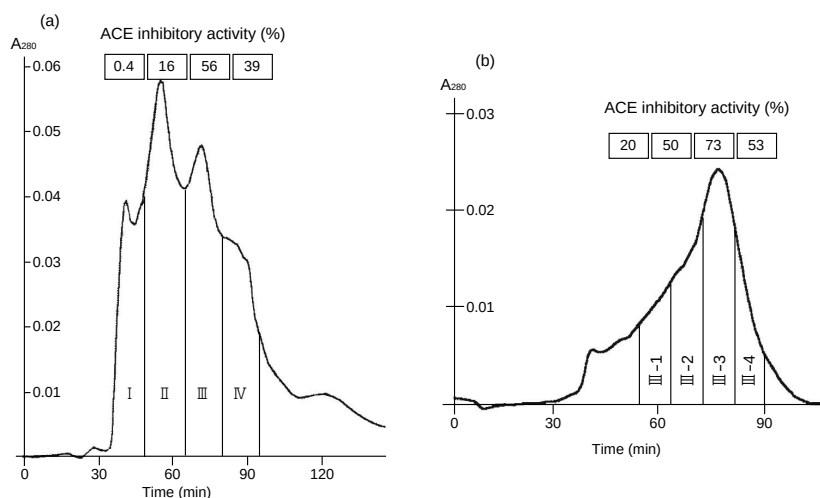


Fig. 2. Gel filtration patterns of the thermolysin digest of whey proteins (a) and the active fraction III (b) through Sephadex LH-20 column. The sample was put on a column (2.2 $\times$ 75 cm) equilibrated with 10 mM phosphate buffer containing 50% ethanol, pH6.8 and eluted at a flow rate of 2 mL/min.

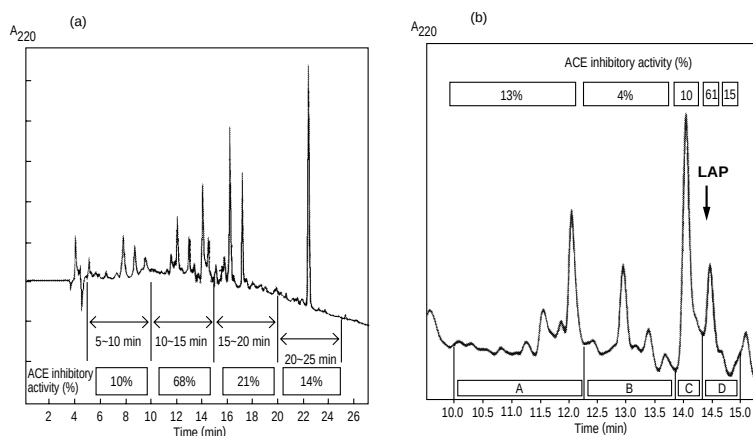


Fig. 3. Reverse phase HPLC chromatograms of whey proteins-derived active fraction III-3 (a) and 10~15 min fraction (b) on a TSKgel ODS-80TM column (4.6×250 mm). The column was eluted with a two solvent system: (A) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and (B) 0.1% TFA in acetonitrile, with 5-90% acetonitrile gradient for 45min at a flow rate of 0.8 mL/min.

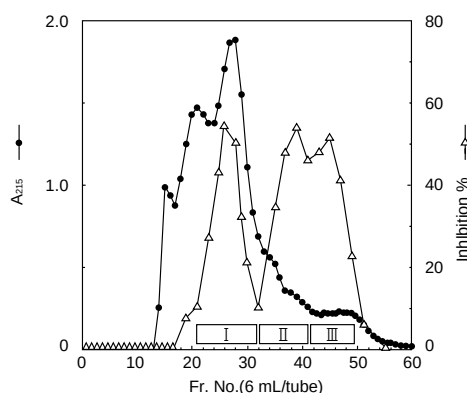


Fig. 4. Gel filtration of the thermolysin digest of basic 7S globulin through Sephadex LH-20 column. The sample was put on a column (2.2×75 cm) equilibrated with 10 mM phosphate buffer containing 50% ethanol, pH6.8 and eluted at a flow rate of 2 mL/min.

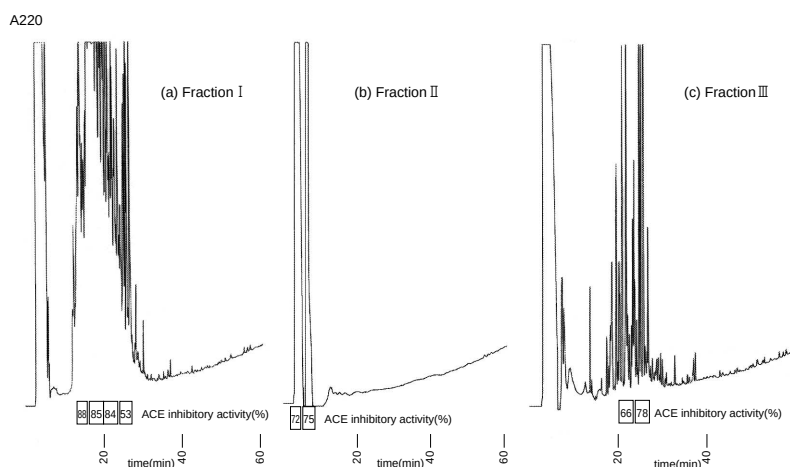


Fig. 5. Reverse phase HPLC chromatograms of basic 7S globulin-derived active fraction I, II, and III on a CAPCELL PAK C18 AQ column (4.6×250 mm). The column was eluted with a two solvent system: (A) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and (B) 0.1% TFA in acetonitrile, with 0-60% acetonitrile gradient for 40 min at a flow rate of 1.0 mL/min.

Lys-Tyr, Ala-Phe, Ile-Tyr, Val-Phe

Gly-Val-Ala, Ile-Phe-Leu, Gly-Glu-Leu
Ala-Ile-Leu, Gly-Val-Pro, Arg-Val-Pro

Ile-Val-Pro-Gln, Ser-Lys-Arg-Ala

Ser-Gly-Asp-Ala-Leu

Fig. 6. Amino acid sequences of ACE inhibitory peptides isolated from Hinute.

考 察

ホエイたん白質のサーモライシン分解物から単離されたACE阻害活性を有するトリペプチドLAPは大豆レクチン⁶⁾の94残基～96残基目に相当する配列であった。94残基目がLeuで97残基目がIleであるので、疎水性アミノ酸残基のN末端側ペプチド結合を切断するサーモライシンの特異性に合致している。一方LAPはニトリ筋肉のサーモライシン分解物由来のACE阻害ペプチドの1つとしてすでに報告されており、そのIC₅₀は3.5 μ Mであり、本実験の値よりも大きい。自然発症高血圧ラットに静注した場合血圧降下作用が認められている⁷⁾。なお、経口投与による血圧降下作用は報告されていないので、確認する必要がある。

塩基性7Sグロブリンを4種のプロテアーゼで分解した結果、サーモライシン分解物が最もACE阻害活性が高く、ホエイたん白質の場合と同様に、N末端に疎水性アミノ酸残基をもつペプチドを生成するプロテアーゼを用いる方法がACE阻害ペプチドの調製には有利であると推察される。また塩基性7Sグロブリン⁶⁾にはLAPという配列は存在しないので、本実験で認められ

```
1 VEKEEECEGEIPRPRPQHPEREPQQPGEKEEDEQPRPIPFPRPQPR
51 QEEHEQREEQEWPRKEEKRGKEGSEEEDEDEEQDERQFPFPRPPHQK
101 EERNEEEDEEEQQRESESESELRHKNKNPFLFGSNRFETLFKNQYG
151 RIRVLQRFNQSPQLQNLDRYILEFNSKPNTLLLPNHADADYLIVILNG
201 T AIL SLVNDDRDYSYRLQ SGDAL RVP SGTYYVVPNDNNENLRLITLAIP
251 VNKPGRFESFFLSSTEAQQSYLQGFSRNILEASYDTKFEEINKVLFREE
301 GQQQGEQRLQESVIVEISKEQIRAL SKRA KSSSRKTISSDEKPFNLRSRD
351 P TY SNKLGKFFEITPEKNPQLRDLDFLSIVDMNEGALLPHFNKAIVI
401 LVINEGDANIELVLGKEQQEQEQEQPLEVR KY RAELSEQDIFVIPAGY
451 PVVFNATSNLNFAGINAEENNQRNFLAGSDQNVISQIPSVQVEL AE PGS
501 AQAWEKLLNQRESYFVDAQPKKKEEGNKGRKGLPSILR AEY (543)
```

Fig. 7. Amino acid sequence of β -conglycinin α -subunit and location of ACE inhibitory peptides which were identified in this study on the sequence of the protein.

たACE阻害活性は別種のペプチドによると考えられるが、その同定は今後の課題である。

分離大豆たん白質から調製された大豆ペプチドハイニユートDC5から、本実験で13種のACE阻害ペプチドが同定された。そのうち7種のペプチドについて、 β -コングリシニン α サブユニット⁶⁾における存在箇所をFig. 7に示すが、その他の β -コングリシニン β サブユニットやグリシニン⁶⁾などにもこれらのペプチド配列は複数存在する。また本実験で確認されたACE阻害ペプチドのうち、Lys-Tyrはイワシ由来のACE阻害ペプチドVal-Tyr⁸⁾のIC₅₀ (8.2 μ M) に近い値を示すことが分かり、その有用性が期待できる。ハイニユートには、栄養生理機能や物性改良機能が報告されている⁹⁾が、本実験結果から血圧降下機能を持つことが示唆され、新たな利用面が十分に期待できる。

以上の結果から、大豆ホエイたん白質やオカラに含まれている塩基性7Sグロブリンのサーモライシン分解物ならびに大豆ペプチドハイニユートにACE阻害活性を有するペプチドが含まれていること、さらにその構造が一部明らかになり、血圧降下作用を有する機能性食品などへのこれら大豆たん白質の有効利用が期待できることが分かった。

要 約

本研究では大豆ホエイおよびオカラたん白質分解物からのアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害ペプチドの単離・同定を試みた。ホエイたん白質をサーモライシンで分解し、ゲル濾過さらに逆相HPLCにかけ、ACE阻害ペプチドとして大豆レクチン由来のLeu-Ala-Proを単離した。そのIC₅₀は0.13 μ Mであり、強いACE阻害活性を示した。次に塩基性7Sグロブリンのサーモライシン分解物をエタノール分画、ゲル濾過さらに逆相HPLCにかけ、活性ペプチドの分離を試みた。さらに大豆ペプチドハイニユートDC5から逆相HPLCによりACE阻害ペプチドを13種単離し、そのアミノ酸配列を調べた。比較的強い活性が確認されたのは、Lys-TyrとAla-Pheであり、前者はイワシ由来ペプチドVal-Tyrに近い阻害活性を示した。以上の結果から、大豆ホエイたん白質や塩基性7Sグロブリンのサーモライシン分解物ならびに大豆ペプチドハイニユートにACE阻害ペプチドの存在が明らかになり、機能性食品などへの有効利用が可能であることが分かった。

文 献

- 1) 菅野道廣, 尚 弘子編 (1999): 大豆タンパク質の加工特性と生理機能. 建帛社, 東京.
- 2) 河村幸雄, 大久保一良編 (1998): ダイズのヘルシーテクノロジー. 光琳, 東京.
- 3) Cushman DW and Cheung HS (1971): Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, **20**, 1637-1648.
- 4) 河村幸雄 (2000): アンギオテンシン変換酵素阻害. 食品機能研究法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, 光琳, 東京, pp.109-112.
- 5) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 6) 森田雄平 (2000): 大豆蛋白質. 光琳, 東京, pp.13-64.
- 7) Fujita H, Yokoyama K and Yoshikawa M (2000): Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci*, **65**, 564-569.
- 8) 関 英治, 箴島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箴島豊 (1995): Val-Tyrは消化管プロテアーゼ耐性なイワシ由来のACE阻害ペプチドである. 日本農芸化学会誌, **69**, 1013-1020.
- 9) 中坊幸弘 (1999): 大豆ペプチドの機能性. 大豆タンパク質の加工特性と生理機能, 菅野道廣, 尚弘子編, 建帛社, 東京, pp.133-154.