

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*・山本亜弥子

茨城大学農学部

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

Masami YONEKURA and Ayako YAMAMOTO

School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

In this study, the antihypertensive effect of a peptide, Leu-Ala-Pro (LAP), which has angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and was isolated from thermolysin digests of soybean whey proteins, was investigated in spontaneously hypertensive rat (SHR). Oral administration of soybean whey peptide preparation containing 0.1% LAP at a dose of 1 g/kg of body weight/day resulted in a significant reduction of systolic and diastolic blood pressures in SHR. Single oral administration of synthesized LAP at a dose of 10 mg/kg had ability to lower blood pressure in 21-week-old SHR. The ACE inhibitory peptides from whey protein digested with protease S were also isolated by 60% ethanol fractionation, gel filtration on Sephadex G-25, and reverse phase HPLC, and their amino acid sequences were determined. Seven kinds of the ACE inhibitory peptides were identified as LN, LHP, LKP, VTY, LYQA, YEAP, and YQAP. These results suggest that the soybean whey peptide preparations containing LAP prepared by thermolysin digestion and the protease S digests of soybean whey proteins may be promising materials for the development of a functional food with antihypertensive activity. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 79-84, 2004.

Key words: soybean, peptide, angiotensin I-converting enzyme inhibitor, whey protein

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的な機能、さらにコレス

テロール低下作用などの三次機能を有しており、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

* 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

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、大豆ホエイ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。

そこで、本研究において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阻害ペプチドの単離を行い、機能性食品等の素材として活用することを目的とした。すでに我々は、ホエイたん白質のサーモライシン分解物からACE阻害活性の高いペプチド (Leu-Ala-Pro) を同定し、報告した³⁾。またオカラから調製した塩基性7Sグロブリンのサーモライシン分解物および大豆ペプチド「ハイニューDC5」からもACE阻害ペプチドを単離した³⁾。本報告では、ラットにおけるLeu-Ala-Proの血圧降下作用およびホエイたん白質のプロテアーゼSによる分解物からの新たなACE阻害ペプチドの単離・同定について述べる。

方 法

実験材料および試薬

ACE (ウサギ肺由来)、サーモライシンおよびペプシンはSigmaから、パパイン、プロテアーゼSおよびプロテアーゼNは天野エンザイムから、また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。またLeu-Ala-Pro (LAP) とVal-Tyr (VY) は、それぞれ渡辺化学工業およびSigmaから購入した。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を使用した。

ラットの血圧測定試験

高血圧自然発症ラット (SHR/NCrj, 雄, 4週齢, 体重 56.8 ± 5.6 g, 日本チャールズ・リバー) 11頭を用いて、0.1% LAPを含むホエイたん白質分解ペプチドを反復経口投与し、ラットの血圧に対する影響を調べた。まず4週齢ラットを個別ケージにて、飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) と水は自由摂取とし、室温約23°C, 点灯時間7:00~19:00で、2週間予備飼育を行った。その後12週齢まで毎日9:00に6頭のラットに上記ペプチドを体重1 kgあたり1 g胃ゾンデで経口投与した。対照として5頭のラットには滅菌水を同様に投与した。血圧測定は、投与前と投与後1週間毎に、非観血式自動血圧測定装置BP-98A (ソフトロン) を用い

tail-cuff法により測定した。

また単回投与試験では同様に飼育した21週齢雄性ラット (体重 354.7 ± 9.9 g) 4頭ずつを用い、LAPまたはVYを体重1 kgあたり10 mg経口投与し、投与後8時間まで2時間おきに血圧を測定した。

ホエイたん白質の調製

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°C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。

プロテアーゼによる分解

pH 8.0に調整した5%ホエイたん白質溶液をオートクレーブ (120°C, 10分間) した後1/100量のサーモライシンを添加し、50°C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。この分解物中のLAP量を既報³⁾の方法に基づいて逆相HPLCにより分析した結果、その含量は0.1%であった。

またpH 8.3 (ペプシンの場合pH 2.0) に調整した10%ホエイたん白質溶液に1/100量のサーモライシン、ペプシン、パパイン、プロテアーゼSまたはプロテアーゼNを添加し、最適温度で2~16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、これを各プロテアーゼ分解物とした。なお本実験における最終的な分解条件は、サーモライシンでは50°C・4時間、ペプシンでは37°C・16時間、パパインでは50°C・4時間、プロテアーゼSでは70°C・4時間、プロテアーゼNでは50°C・2時間とした。

ACE阻害活性の測定

ACEの阻害活性測定はCushman and Cheung⁴⁾の原法に準じた河村⁵⁾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 G-25カラム (2.6×96 cm, 移動相: 純水, 流速: 30 mL/h) を用い、ペプチドの検出は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 (Wakosil-II 5C18 AR, 4.6×250 mm, 流速: 1 mL/min) 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216 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12.5%濃度ゲルを用い, Laemmli[®]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 (モデル494, Applied Biosystems) を用いて解析した。またペプチドの分子量は四重極型質量分析装置 (モデルAPI300, Applied Biosystems) により測定した。この両結果からペプチドのアミノ酸配列を決定した。

結果と考察

ホエイたん白質のサーモライシン分解物から得られたACE阻害ペプチドの血圧降下作用

既報³⁾で述べたように, ホエイたん白質のサーモライシン分解物からACE阻害ペプチドを単離したところ, 大豆レクチン由来のLAPであることが分かり, そのIC₅₀は0.13 μMであった。そこで, 既報³⁾と同様にしてLAPを0.1%含むホエイたん白質分解ペプチドを調製し, 高血圧自然発症ラット (SHR) に, 体重1 kgあたり1 g/日を6週間経口投与した結果, Fig. 1に示すように収縮期血圧は投与2週間後から非投与区に比べ有意 ($P<0.05$) に低下することが分かった。また拡張期血圧も低下傾向が認められ, 投与6週間後では有意 ($P<0.05$) な低下が見られた。

さらに合成ペプチドを使用し, LAPまたはVYを体

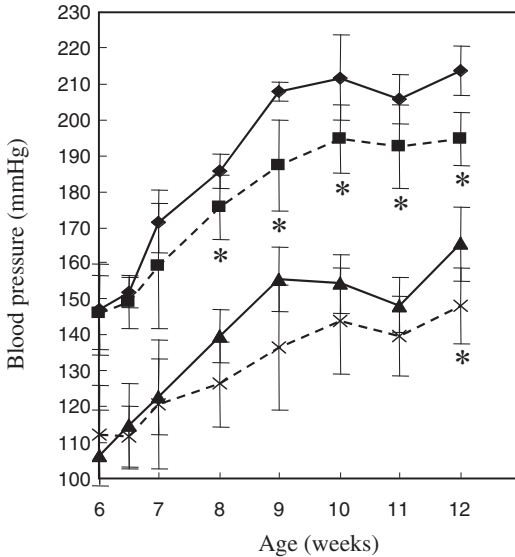


Fig.1. Changes in systolic (◆, control; ■, whey peptide) and diastolic (▲, control; ×, whey peptide) blood pressure in spontaneously hypertensive rats administered the soybean whey protein digest containing 0.1% LAP (whey peptide) at a dose of 1 g/kg of body weight/day for 6 weeks. Values are mean ± SD for 5-6 rats. * $P<0.05$. Significantly different from control.

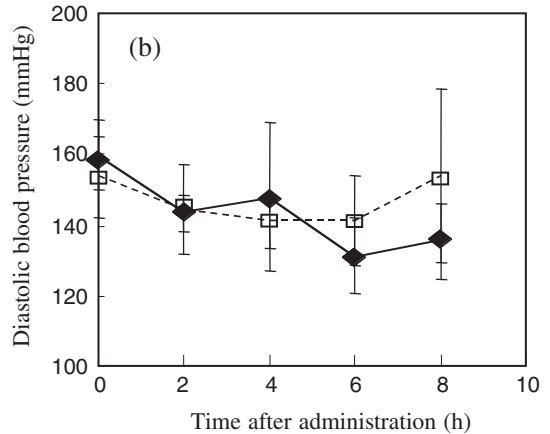
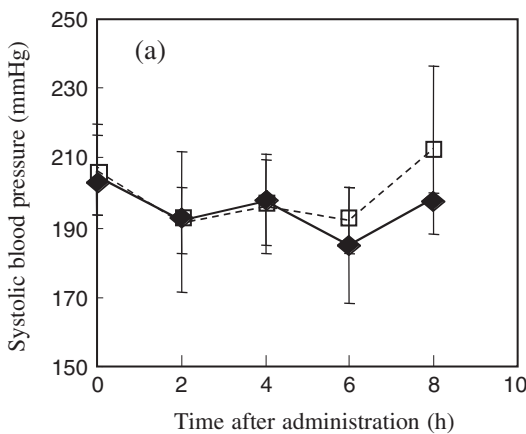


Fig. 2. Changes in systolic (a) and diastolic (b) blood pressure after single oral administration of LAP (□) and VY (◆) at a dose of 10 mg/kg of body weight in 21 weeks old SHR. Values are mean ± SD for 4 rats.

重1 kgあたり10 mgの投与量で21週齢SHRに単回経口投与した結果、Fig. 2に示すように両ペプチドとも投与2～6時間後、収縮期および拡張期血圧ともに低下傾向が認められた。

以上のように、LAPはSHRにおいて反復投与および単回投与により、血圧降下作用があることが明らかになった。LAPはすでに鶏肉のサーモライシン分解物から同定されているが、その血圧降下作用についてはラットに静注した場合に認められており⁷⁾、経口投与による実験は本研究が初めてである。また反復投与実験では、LAPとして1 mg/日の少ない投与量で効果があったこと、単回投与実験においては、血圧降下作用が実証され特定保健用食品の素材として利用されているイワシ由来のVY[®]と同様の作用であることから、LAPも血圧降下作用を目的とした特定保健用食品に利用できると考えられるが、そのためには臨床実験を含め更なる研究が必要である。

ホエイたん白質のプロテアーゼ分解物のACE阻害活性

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. 3に示すようにレクチン、塩基性7Sグロブリン、Kunitz型トリプシンインヒビター、Bowman-Birk型プロテアーゼインヒビターが主成分であり、 β -コングリシニンも少量含まれていることが分かった。

そこでホエイたん白質のプロテアーゼ分解をサーモライシン、ペプシン、パパイン、プロテアーゼSおよびNを用いて2～16時間行ったところ、各分解物のACE阻害活性はFig. 4に示すように、ペプシンを除いて分解反応2～4時間で最大となり、サーモライシン分解物が最も高かった。またIC₅₀はサーモライシン(4時間分解物)では0.082 mg/mL、プロテアーゼS(4時間分解物)では0.124 mg/mL、ペプシン(16時間分解物)では0.183 mg/mL、パパイン(4時間分解物)では0.234 mg/mLおよびプロテアーゼN(2時間分解物)では0.320 mg/mLであることが分かった。なお、サーモライシン分解物は前述のようにACE阻害ペプチドとしてLAPがすでに見出されているので、今回はプロテアーゼS分解物から新たなACE阻害ペプチドの単離を行うこととした。

ホエイたん白質のプロテアーゼS分解物からのACE阻害ペプチドの単離と構造決定

まず本ホエイたん白質分解物の60%エタノール処理を行い、沈殿物を遠心分離により除去した上清を得たところ、ほとんどのACE阻害活性はこの上清に含まれていた。そこでこの上清画分をSephadex G-25によるゲル濾過に供した結果、Fig. 5に示すI～IV画分に

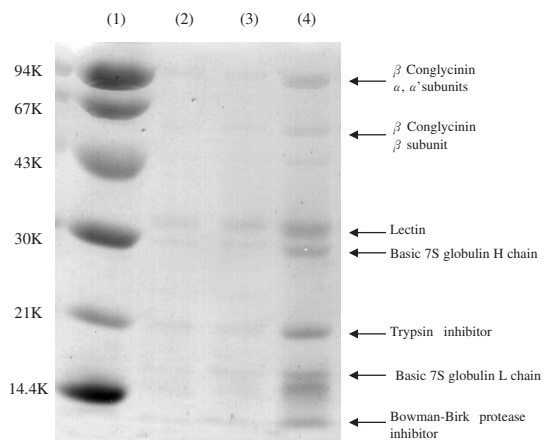


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of soybean whey protein preparation under reducing condition. Gel concentration is 12.5%. Lane 1, molecular weight marker proteins; lane 2-4, soybean whey protein preparation.

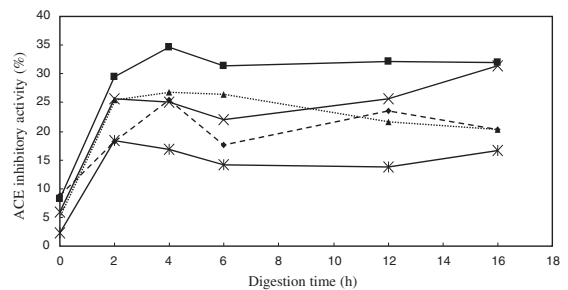


Fig. 4. Effect of digestion time on the ACE inhibitory activity of soybean whey protein hydrolysates. ■, thermolysin; ×, pepsin; ▲, papain; ◆, protease S; *, protease N.

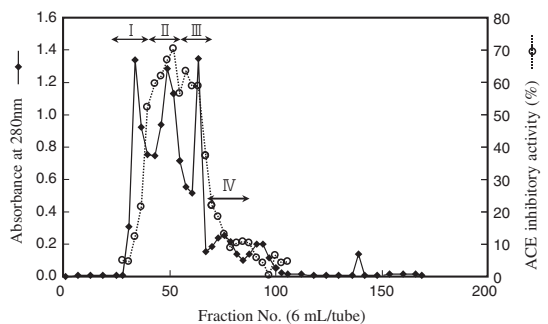


Fig. 5. Gel filtration pattern of the protease S digest of soybean whey protein through a Sephadex G-25 column. The sample was put on a column (2.6×96 cm) equilibrated with purified water and eluted at a flow rate of 30 mL/h.

ACE阻害活性が認められたので、次にこれら4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. 6(a)~(d)に示す分離パターンが得られた。そこでこれらのペプチドピークのACE阻害活性を測定した結果、Fig.7に示すように、IIおよびIII画分に高い阻害活性が見られた。そこでまずII-5画分について、ペプチドの単離を行い、プロテインシーケンサによるアミノ酸配列分析と質量分析装置による分子量測定を行い、両者の結果からペプチドの同定を行った。その結果をTable 1に示すが、2~4残基のペプチド7種が同定された。なお、その他の活性画分からのACE阻害ペプチドの単離と構造決定は現在進行中である。

これら7種のペプチドのうち、LKPは鶏肉のサーモライシン分解物からすでに発見されているが⁷⁾、他のペプチドは新規なものであり、LNは大豆レクチン、塩基性7SグロブリンH鎖、Bowman-Birk型インヒビターおよび β -コングリシニンに、LHPは β -コングリシニンに、YQAPは塩基性7SグロブリンH鎖にそれぞれ該当配列が存在する⁹⁾ので、これらのホエイたん白質から派生したものと考えられる。他方VTY, LYQAおよびYEAPでは一次構造既知の大豆たん白質には該当する配列が認められず、未同定のたん白質に由来するものと推察される。なお、これらペプチドのACE阻害

活性の強さや血圧降下作用については今後の検討課題である。

以上の結果から、LAPを含む大豆ホエイたん白質のサーモライシン分解ペプチドは経口投与によりSHRにおいて血圧降下作用があることが明らかになった。またホエイたん白質のプロテアーゼS分解物からACE阻害活性を有する7種のペプチドが同定され、血圧降下作用を有する機能性食品などへのこれら大豆ホエイたん白質の有効利用が期待できるものと考えられる。

Table 1. ACE inhibitory peptides isolated from the protease S digest of soybean whey protein

Amino acid sequence	Calculated molecular weight	Molecular weight determined by MS	Soybean protein containing the ACE inhibitory peptide
LN	246.3	247.0	lectin, basic 7S globulin, Bowman-Birk inhibitor, β conglycinin
LHP	366.4	366.0	β conglycinin
LKP	357.5	357.0	—
VTY	382.4	382.0	—
LYQA	494.6	495.0	—
YEAP	479.5	479.0	—
YQAP	478.5	478.0	basic 7S globulin

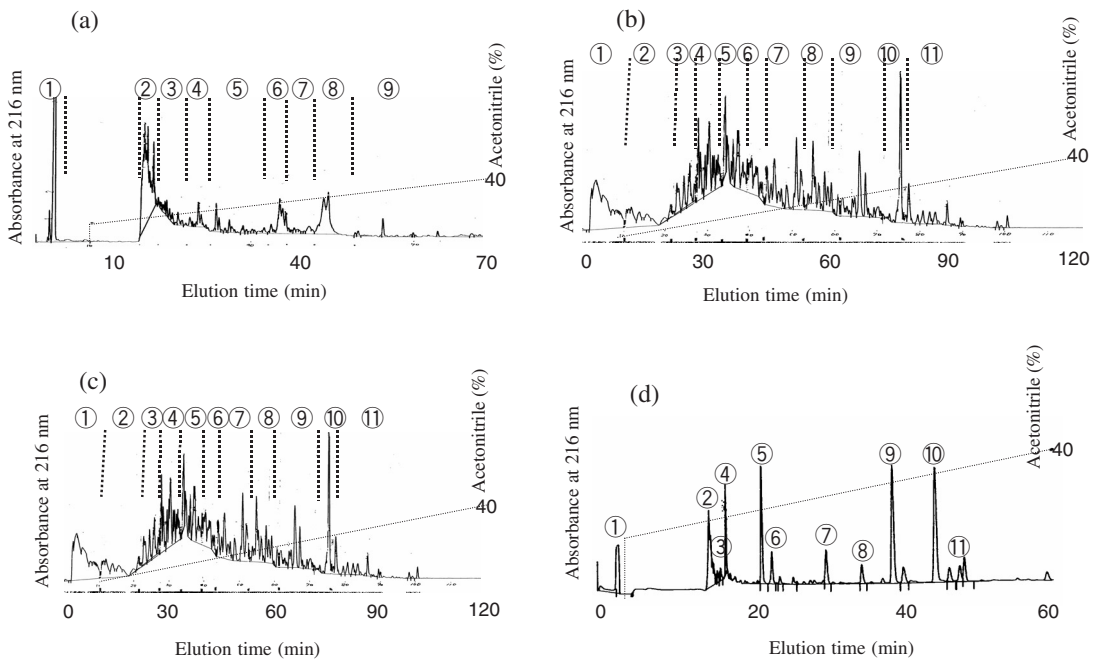


Fig. 6. Reverse phase-HPLC patterns of the gel filtration fractions, (a) I, (b) II, (c) III, and (d) IV of the protease S digest of soybean whey protein on a Wakosil-II 5C18 AR column (4.6×250 mm). The column was eluted with a two solvent system: (A) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and (B) 0.1% TFA in acetonitrile, with 0-40% acetonitrile gradient at a flow rate of 1 mL/min.

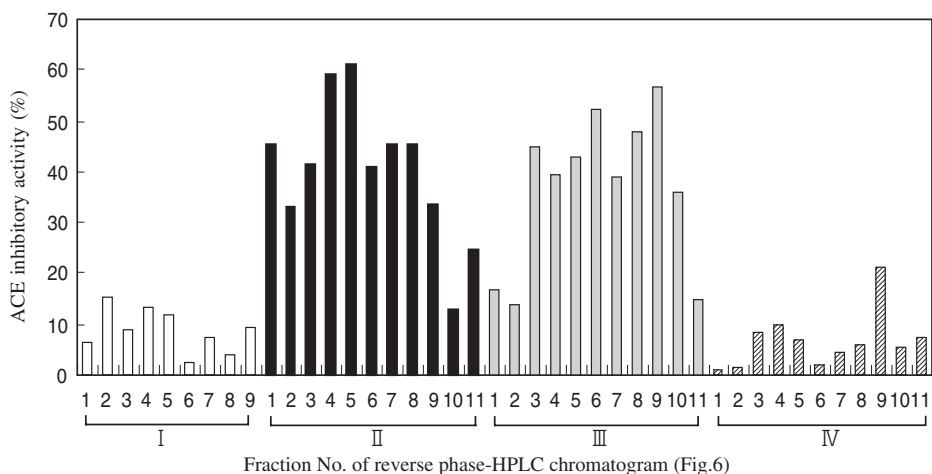


Fig. 7. ACE inhibitory activities of the reverse phase-HPLC fractions (Fig.6) separated from the gel filtration fractions (I-IV) of the soybean whey protein digest with protease S.

要 約

本研究では大豆ホエイたん白質のサーモライシン分解物から単離・同定されたアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドLAPのラットにおける血圧降下作用を調べた。その結果LAPを含む大豆ホエイたん白質のサーモライシン分解ペプチドには反復経口投与により高血圧自然発症ラット (SHR) において血圧降下作用があることが明らかになった。一方、ホエイたん白質をプロテアーゼSで分解し、エタノール分画、ゲル濾過さらに逆相HPLCにかけ、ACE阻害ペプチドとして7種 (LN, LHP, LKP, VTY, LYQA, YEAP, YQAP) のペプチドを単離・同定した。以上の結果から、LAPを含む大豆ホエイたん白質分解ペプチドはSHRにおいて血圧降下作用があることが明らかになった。またホエイたん白質のプロテアーゼS分解物からACE阻害活性を有する7種のペプチドが同定され、血圧降下作用を有する機能性食品などへの大豆ホエイたん白質の有効利用が十分期待できるものと考えられる。

文 献

- 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.
- 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.
- 米倉政実, 田中絢子 (2003): 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. 大豆たん白質研究, **6**, 88-93.
- Cushman DW and Cheung HS (1971): Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, **20**, 1637-1648.
- 河村幸雄 (2000): アンジ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.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 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.
- 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.
- 森田雄平 (2000): 大豆蛋白質. 光琳, 東京, pp. 13-64.