

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（第三報）

米倉政実*・市村妙子・西川実希

茨城大学農学部

Isolation and Application of Physiologically Active Peptides from Soybean Whey and Okara Proteins (Part Ⅲ)

Masami YONEKURA, Taeko ICHIMURA and Miki NISHIKAWA

School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-0393

ABSTRACT

In this study, angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides were isolated from protease S digests of soybean whey proteins by ethanol fractionation, gel filtration on Sephadex G-25, and repeated reverse phase HPLC. In addition the amino acid sequences of the peptides were determined. Antihypertensive effects of three tripeptides, VAP, VKP and VTP were investigated in spontaneously hypertensive rat (SHR). Single oral administration (100 mg/kg of body weight) of these peptides resulted in a significant reduction of systolic blood pressures in SHR. Moreover, antioxidative activities of 6 digests by thermolysin, papain, pepsin, trypsin and protease S and N were determined by inhibitory activities against the linoleic acid peroxidation and the oxidative stress-induced cell death of human monocytic leukemia U937 cell line. The trypsin, protease N and thermolysin digests showed potent antioxidative activities against lipid peroxidation, and protease N and thermolysin digests reduced the cell death induced by oxidative stress. These results suggest that the soybean whey peptide preparation containing VAP, VKP and VTP prepared by protease S digestion and the protease digests of soybean whey proteins may be promising materials for the development of a functional food with antihypertensive activity or antioxidative activity. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 97-102, 2005.

Key words: soybean, whey protein, angiotensin I-converting enzyme inhibitor, antioxidant, oxidative stress

*〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

大豆たん白質は高い栄養機能および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Ⅰ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、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、本研究では有効利用さ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阻害ペプチドや抗酸化性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阻害ペプチド (Leu-Ala-Pro) を同定し³⁾、ラットにおける血圧降下作用を報告した⁴⁾。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「ハイニュートDC5」からもACE阻害ペプチドを単離した⁵⁾。本報告では、ホエイたん白質のプロテアーゼS分解物からの新たなACE阻害ペプチドの単離・同定および血圧降下作用、さらにホエイたん白質のプロテアーゼ分解物の抗酸化作用について述べる。

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、ペプシンおよびトリプシンは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。また化学合成したVal-Lys-Pro (VKP)、Val-Ala-Pro (VAP) およびVal-Thr-Pro (VTP) は、スクラムから購入した。1,3-ジエチル-2-チオバルビツール酸 (DETBA)、リノール酸、*tert*-ブチルヒドロパーオキシド (*t*-BOOH) およびRPMI1640培地はSIGMAから、ウシ胎児血清はニチレイから、トリバンブルーと抗生物質はGIBCOからそれぞれ購入し、ヒト組織球性リンパ腫細胞 (U937細胞) は理化学研究所から分譲を受けた。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。高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) は日本エスエルシーから購入した。

ホエイたん白質の調製

脱脂大豆にその12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5.4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、これを約10倍量の水で2回洗浄した。これに同量の水を加えpHを8.0に調整後、オートクレーブ (120℃, 20分間) により加熱溶解したものを凍結乾燥し、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

ACE阻害ペプチドの単離においては、既報⁴⁾に従って、プロテアーゼSによりホエイたん白質をpH8.0, 70℃で4時間分解した。

またペプチドの抗酸化活性測定の実験では、3%ホエイたん白質溶液を純水に対して透析した後、pHを調整後1/50量のサーモライシン、ペプシン、パパイン、トリプシン、プロテアーゼSまたはプロテアーゼNをそれぞれ添加し、最適温度で2~16時間反応後、10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。なお分解条件は、サーモライシンとパパインではpH8.0で50℃、ペプシンではpH2.0で37℃、プロテアーゼSではpH8.0で70℃、プロテアーゼNではpH7.0で50℃、トリプシンではpH7.0で37℃とした。

逆相高速液体クロマトグラフィー

ペプチドの分離に用い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 およびCapcellpack C18AQ, 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。

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。

ACE阻害活性の測定

ACEの阻害活性測定はCushman and Cheung⁶⁾の原法に準じた河村⁶⁾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、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。

ラットにおけるACE阻害ペプチドの単回投与試験

高血圧自然発症ラット (SHR/Izm, 雄, 12週齢) 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℃, 点灯時間7:00~19:00で、5~7週間予備飼育を行った。その後1群5~6頭のラットに、ACE阻害ペプチドを体重1 kgあたり100 mg胃ゾンデで単回経口投与した。対照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8時間まで2時間おきに、非観血式自動血圧測定装置MK-2000 (室町機械) を用い、無加温でtail-cuff法により測定した。

リノール酸の過酸化反応に対する抗酸化活性の測定

ペプチドの抗酸化活性は、リノール酸の過酸化反応を抑制する作用 (脂質過酸化抑制率) で表し、DETBA法⁷⁾に従って測定した。また50%の過酸化抑制率を示す被検試料濃度をIC₅₀とした。

培養動物細胞における抗酸化ストレス活性の測定

培養細胞株としてU937細胞を用い、10%ウシ胎児血清、ペニシリン (100 ユニット/mL) およびストレプトマイシン (100 ng/mL) を添加したRPMI1640培地で、37℃, 5% CO₂, 95%空気の条件下で培養した。U937細胞に対する酸化ストレス誘導は、t-BOOHを用いたNardiniら⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち96穴マイクロプレートに2×10⁵個/mLの細胞懸濁液100 μLを播種し、ホエイたん白質分解物を添加した後、37℃で24時間培養した。次にt-BOOHを500 μMとなるように加え、2時間培養した後、トリパンブルーを用いる色素排除法により血球計算盤を用いて生細胞数を計測した。t-BOOHおよび試料を添加しない場合の生細胞数を100%として、各処理における細胞の生存率 (%) を求め、試料添加による細胞生存率の増加量で抗酸化ストレス活性を表した。

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

Amino acid sequence	Molecular weight	IC ₅₀ (μM)	Soybean protein containing the peptide
VAP	286.3	1.6	Basic 7S globulin
VKP	343.4	3.1	Soyacystatin
VTP	316.3	16.0	Basic 7S globulin
FEK	422.5	—	Chalcone isomerase
VVSKNKP	771.9	—	Kunitz trypsin inhibitor

結果と考察

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

ホエイたん白質のプロテアーゼS分解物からのACE阻害ペプチドの分離は、既報⁴⁾で述べたように、まず60%エタノール処理により沈殿物を除去した後、Sephadex G-25によるゲル濾過、さらに逆相HPLCにより行った。本実験では逆相HPLCにより得られたACE阻害活性の高いⅡ-4画分⁴⁾を用いて、さらに逆相HPLCによるペプチドの分離と活性測定を繰り返し、ACE阻害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、5種のペプチドが同定された。3種のトリペプチド、VAP, VKPおよびVTPについては、合成ペプチドを使用しACE阻害活性 (IC₅₀) を求めた結果、それぞれ1.6, 3.1および16 μMとなり、比較的高い活性であることがわかった。またC末端ジペプチド部分のAP, KPおよびTPは、今まで報告されているACE阻害ペプチド^{9~11)}に認められる配列であり、ACE阻害作用に深く関与しているものと考えられる。FEKとVVSKNKPのIC₅₀については今後の検討課題である。

これら5種のペプチドのうちVAP¹¹⁾以外はACE阻害ペプチドとして報告はなく、新規なものであり、またVAPとVTPは塩基性7Sグロブリンに、VKPはソヤシスタチンに、FEKはカルコンイソメラーゼに、VVSKNKPはKunitzトリプシンインヒビターにそれぞれ該当配列が存在する¹²⁾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。

ACE阻害ペプチドの血圧降下作用

ACE阻害活性が高かったVAP, VKPおよびVTPについて合成ペプチドを用いて高血圧自然発症ラット (SHR) に体重1 kgあたり100 mgを単回経口投与した結果、Fig. 1~3に示すように収縮期血圧は低下傾向を示し、VAPでは投与4~6時間後に、VKPでは4と8時間後に、VTPでは8時間後に、それぞれ対照区に比べ有意 ($P<0.05$) に低下することが分かった。

以上のように、VAP, VKPおよびVTPはSHRにおいて単回経口投与により血圧降下作用があることが明らかになった。これらのペプチドの経口投与による動物実験は本研究が初めてであり、既報⁴⁾の大豆レクチン由来トリペプチドLAPと同様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可能性があるが、そのためには臨床試験を含め更なる研究が必要である。

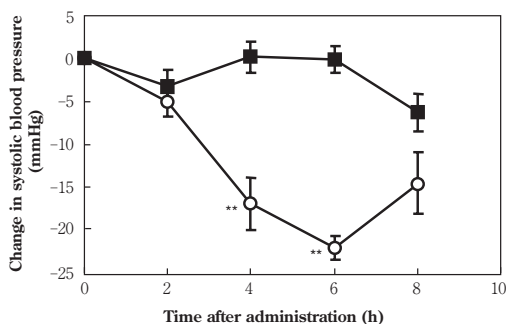


Fig. 1. Antihypertensive activity of VAP after oral administration in 18 weeks old spontaneously hypertensive rats. VAP was administered at a dose of 100 mg/kg of body weight. ■, Control (n=4); ○, VAP (n=6). Values are mean $\pm$ SD. **, Significantly different from control, $P < 0.01$.

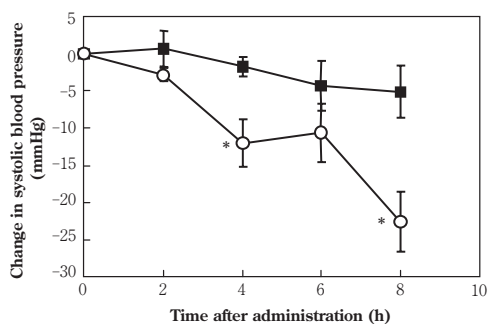


Fig. 2. Antihypertensive activity of VKP after oral administration in 19 weeks old spontaneously hypertensive rats. VKP was administered at a dose of 100 mg/kg of body weight. ■, Control (n=5); ○, VKP (n=5). Values are mean $\pm$ SD. *, Significantly different from control, $P < 0.05$.

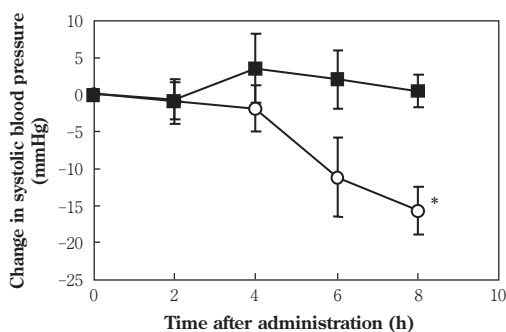


Fig. 3. Antihypertensive activity of VTP after oral administration in 18 weeks old spontaneously hypertensive rats. VTP was administered at a dose of 100 mg/kg of body weight. ■, Control (n=4); ○, VTP (n=5). Values are mean $\pm$ SD. *, Significantly different from control, $P < 0.05$.

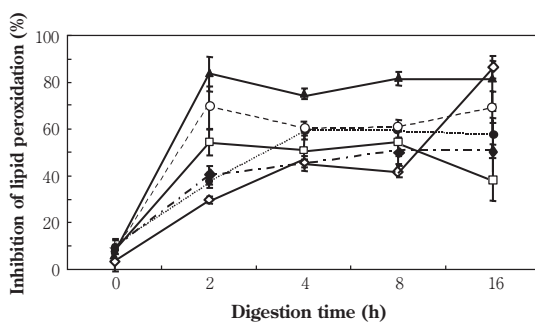


Fig. 4. Effect of digestion time on the antioxidative activity of soybean whey protein hydrolysates. ◆, Thermolysin; □, papain; ●, pepsin; ◇, trypsin; ○, protease S; ▲, Protease N. Values are mean $\pm$ SD.

ホエイたん白質のプロテアーゼ分解物の抗酸化活性

ホエイたん白質のプロテアーゼ分解をサーモライシン、パパイニン、ペプシン、トリプシン、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、各分解物のリノール酸過酸化反応に対する抗酸化活性はFig. 4に示すように、いずれの分解物でもおおむね分解反応16時間で最大となった。またIC₅₀はサーモライシン分解物では18.0 μ g/mL、パパイニン分解物では28.9 μ g/mL、ペプシン分解物では36.4 μ g/mL、トリプシン分解物では17.6 μ g/mL、プロテアーゼS分解物では31.4 μ g/mL、プロテアーゼN分解物では18.0 μ g/mLであることが分かった。従って、トリプシン、サーモライシンおよびプロテアーゼNによる分解物が比較的高い抗酸化活性をもつことが明らかになった。大豆たん白質由来の抗酸化性ペプチドについては、Chenらの報告¹³⁾があるが、それらは大豆の主要たん白質であるグリシニンや β -コングリニニン由来のもので、ホエイ由来の抗酸化性ペプチドについては報告がない。

培養細胞におけるホエイたん白質のプロテアーゼ分解物の抗酸化ストレス作用

リノール酸の過酸化抑制率が高かったトリプシン、サーモライシンおよびプロテアーゼNによるホエイたん白質分解物を用いて、ヒト培養細胞株U937細胞における抗酸化ストレス活性を調べた結果、Fig. 5～7に示すようにプロテアーゼNおよびサーモライシン分解物では、*t*-BOOHによる細胞死が抑制され、抗酸化ストレス作用が認められたが、他方トリプシン分解物では細胞死の抑制作用はみられなかった。従って、リノール酸の過酸化抑制率と細胞における抗酸化ストレス作用は必ずしも一致しなかったが、これは両作用メカニズムに差異があることによると考えられる。また、

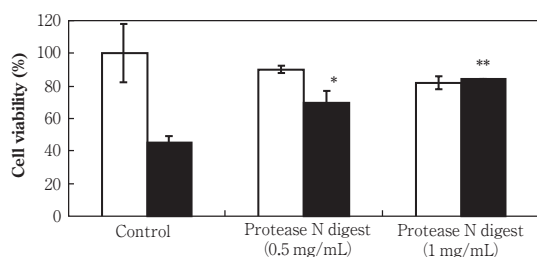


Fig. 5. Effect of protease N digest of soybean whey protein on the cell viability of U937 cells treated with *t*-BOOH. ■, With *t*-BOOH; □, without *t*-BOOH. Values are mean $\pm$ SD. *, **, Significantly different from control treated with *t*-BOOH at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

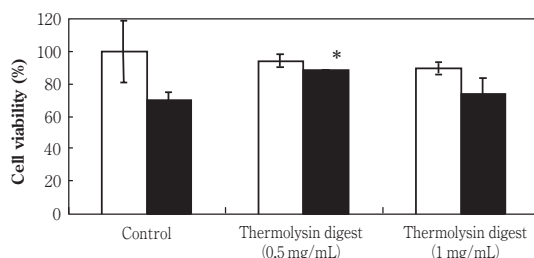


Fig. 6. Effect of thermolysin digest of soybean whey protein on the cell viability of U937 cells treated with *t*-BOOH. ■, With *t*-BOOH; □, without *t*-BOOH. Values are mean $\pm$ SD. *, Significantly different from control treated with *t*-BOOH at $P < 0.05$.

抗酸化活性および細胞における抗酸化ストレス作用を有するペプチドの単離と同定は今後の検討課題である。

以上の結果から、VAP、VKPおよびVTPを含む大豆ホエイたん白質のプロテアーゼS分解物は血圧降下作用を有する機能性食品などへの有効利用が期待できるものと考えられる。また、ホエイたん白質のプロテアーゼNおよびサーモライシン分解物は、抗酸化物質として、また生体内で抗酸化ストレス作用を発揮する物質として、活性酸素が原因となる種々の病気の予防や改善などを目的とした機能性食品に応用できる可能性が示唆された。

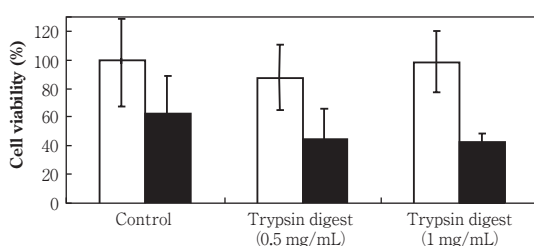


Fig. 7. Effect of trypsin digest of soybean whey protein on the cell viability of U937 cells treated with *t*-BOOH. ■, With *t*-BOOH; □, without *t*-BOOH. Values are mean $\pm$ SD.

要 約

本研究では大豆ホエイたん白質のプロテアーゼS分解物から単離・同定されたアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドVAP、VKPおよびVTPのラットにおける血圧降下作用を調べた。その結果これら3種のトリペプチドは、高血圧自然発症ラットにおいて単回経口投与により血圧降下作用があることが明らかになった。一方、ホエイたん白質のトリプシン、プロテアーゼNおよびサーモライシン分解物は、リノール酸の過酸化抑制率が高く、またプロテアーゼNおよびサーモライシン分解物はヒト培養細胞、U937細胞において抗酸化ストレス作用があることがわかった。よって、血圧降下作用および抗酸化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.
- 米倉政実, 山本亜弥子 (2004): 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, **7**, 79-84.
- Cushman DW and Cheung HS (1971): Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, **20**, 1637-1648.

- 6) 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.
- 7) Suda I, Furuta S and Nishiba Y (1994): Fluorometric determination of a 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malondialdehyde adduct as an index of lipid peroxidation in plant materials. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 14-17.
- 8) Nardini M, Pisu P, Gentili V, Natella F, Felice MD, Piccolella E and Scaccini C (1998): Effect of caffeic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med*, **25**, 1098-1105.
- 9) 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.
- 10) Yang Y, Marczak E, Yokoo M, Usui H and Yoshikawa M (2003): Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *J Agric Food Chem*, **51**, 4897-4902.
- 11) Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, Tomizuka N and Suzuki H (1987): Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric Biol Chem*, **51**, 1581-1586.
- 12) 森田雄平 (2000): 大豆蛋白質. 光琳, 東京, pp.13-64.
- 13) Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F and Nokihara K (1996): Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, **44**, 2619-2623.