ブラックマツペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索 (第2報)*

吉田 恵子^{**1}, 四十九院 成子², 福場 博保³
島村 理美子⁴, 田所 忠弘⁴, 前川 昭男⁴

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances in Black Matpe*

Keiko Yoshida,^{**1} Shigeko Tsurushiin,² Hiroyasu Fukuba,³
Rimiko Shimamura,⁴ Tadahiro Tadokoro,⁴ and Akio Maekawa⁴

J Jpn Soc Nutr Food Sci **52**:153-156 (1999)

ACE inhibitory substances in black matpe constituted a hydrophilic group with a molecular weight of about 400-800, estimated by gel filtration on a Sephadex G-15 column. These inhibitory substances could not be separated using reverse-phase HPLC, gel filtration or ion exchange columns. The ACE inhibitory substances contained phytic acid, which when extracted had 40% of the total activity. When the ACE inhibitory substances were analyzed by TLC, some ninhydrin-positive spots were observed, whereas the phytic acid fraction contained no ninhydrin-positive spots. These results suggest that the substances are a mixture of phytic acid and ninhydrin-positive material.

Key Words black matpe, angiotensin I-converting enzyme, inhibitor, phytic acid

(Received August 24, 1998; Accepted February 15, 1999)

著者らは前報¹⁾において、もやしの原料豆として利用されているブラックマツペ (*Vigna mungo*) に、血圧上昇に関与するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE, [EC3.4.15.1]) の活性を阻害する因子が存在することを報告した。この因子の主成分は、逆相カラムに吸着されず水溶性の溶媒で溶出することから、現在までに数多く報告されている疎水性のペプチド類²⁻⁵⁾ではなく、親水性の物質であることが示唆された。またゲル濾過法により分子量は 400 から 800 であると推察された。

この阻害因子の検索をさらにすすめ、2, 3 の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

ブラックマツペは、前報¹⁾⁶⁻⁹⁾ 同様タイ国産のものを用いた。

2. 試料の調製法

ブラックマツペを粉碎後、60 メッシュのふるいを通し

*ブラックマツペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索¹⁾ を第1報とする。

**連絡・別刷請求先 (Corresponding author)

¹⁾ つくば国際短期大学生生活科学科 (300-0051 土浦市真鍋 6-7-10)

Department of Living Sciences, Tsukuba International Junior College, 6-7-10 Manabe, Tsuchiura 300-0051, Japan

²⁾ 東京家政学院短期大学生生活科学科 (102-0075 東京都千代田区三番町 22)

Department of Science of Life Management, Tokyo Kasei Gakuin Junior College, 22 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

³⁾ 昭和女子大学生生活機構研究科 (154-0004 東京都世田谷区太子堂 1-7-57)

Graduate School of Practical Sciences, Shouwa Women's University, 1-7-57 Taisido, Setagaya-ku, Tokyo 154-0004, Japan

⁴⁾ 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科 (156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1)

Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

た粉末試料に、5倍量の0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、室温で1時間攪拌抽出後、 $14,000\times g$ で15分間冷却遠心分離を行い上澄液を得た。この抽出液を凍結乾燥後、抽出粉末試料とした。

3. ACE 阻害活性の測定法

前報¹⁾と同様、山本らの方法¹⁰⁾で行った。

4. ACE 阻害因子の部分精製品の調製

前報¹⁾で行ったように、ブラックマッペ抽出粉末を Sephadex G-100, SP-Sephadex C-25 を用いたイオン交換および Sephadex G-15 のカラムに供して精製を行い活性画分を得た。以下これを部分精製品とした。

5. ACE 活性阻害因子の検索

5.1 HPLC での分析 日立製作所製 HPLC L-6200 による高圧グラディエントシステムを用いた。検出器は日立製作所製可視紫外検出器 L-4250 を用いた。

5.1.1 TSK ゲル ODS-80Ts (逆相) TSK ゲル ODS-80Ts (東ソー製、 4.5×150 mm) を用い、溶出は0.1% トリフルオロ酢酸中で、アセトニトリル濃度0-60%のリニアグラディエント (5-20分) によった。流速は1.2 mL/min, 検出は215 nmで行った。

5.1.2 DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (ダイソー株式会社、 6×150 mm) を用い、溶出は超純水で行い、流速0.5 mL/min, 検出は215 nmで行った。

5.1.3 日立 3013-N (イオン交換) 日立 3013-N (4×150 mm) を用い、溶出は1/15 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で食塩濃度0から1 M に上昇させるリニアグラディエント法 (0-30分) で行った。流速は1.0 mL/min, 検出は215 nmで行った。

5.2 フィチン酸の抽出と定量

5.2.1 フィチン酸の抽出 部分精製品を減圧乾固後、一定量の超純水に溶解し0.6 N 塩酸を加えホモジナイズ後、0.6 N 塩酸で50 mL とし室温で2時間振とう抽出した。 $30,000\times g$ で20分間遠心分離して得られた上澄み10 mL を0.1 N 水酸化ナトリウム溶液でpH 7-8 になるまで中和し、これを陰イオン交換樹脂 (AG1-X4, Bio-Rad 社) カラムに供し、1 mL/min の流速でフィチン酸を吸着させ、0.2 M 塩化ナトリウム、水各20 mL で洗浄後、40 mL の2N 塩酸でフィチン酸を溶出させた。これを減圧乾固し1 mL の超純水で溶解した。

5.2.2 フィチン酸の定量¹¹⁾ フィチン酸抽出液3 mL にWade 試薬 (超純水に0.03% 塩化鉄と0.3% スルホサリチル酸を溶解) 1 mL を加え、5秒間混合した後、遠心分離し500 nm で測定した。

5.3 薄層クロマトグラフィー プレートはSilicagel 70 F₂₅₄ Plate-wako を用い、エタノール:25%アンモニア溶液=77:23 で展開させ、発色は0.2%ニンヒドリン溶液で行った。

5.4 総活性の算出方法 前報同様 ACE の阻害率が50%を示すときの試料量を1 unit とし、一定量の試料

中での総活性を算出した。

5.5 阻害様式の検討 40倍および80倍希釈した部分精製品を阻害剤として、基質濃度を変化させ阻害活性を測定し、阻害様式を検討した。

実験結果

1. 阻害因子の検索

1.1 TSK ゲル ODS-80Ts (逆相) 部分精製品を TSK ゲル ODS-80Ts の逆相カラムに供し溶出したところ、Figure 1 に示すような溶出パターンを示した。1.5分と2.4分に溶出したピークに強い阻害活性が認められた。また吸着画分については、この画分を5回くりかえし集めたものにわずかであるが活性が認められた。このことより阻害活性因子の主要なものは、逆相カラムで吸着しないことから、親水性の物質であると示唆された。

1.2 各種カラムでの分離 前述したように、逆相カラムで吸着されなかった活性画分について、以下のカラムを用いて分離を試みた。

1.2.1 DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP 逆相カラムであるが親水性化合物の保持ができるという、DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP を用い精製を試みた。Figure 2 に示したように、215 nm では五つのピークに分離されたが、活性はいずれのピークにも認められた。

1.2.2 日立 3013-N (イオン交換) 活性画分を乾固後、イオン交換カラムに供した。Figure 3 に示したよう

Figure 1 Chromatogram on a TSKgel ODS-80Ts column of active fraction from Sephadex G-15.

Column, TSK gel ODS-80Ts (4.5×150 mm); eluent, 0-60% CH₃CN (15 min) in 0.1% trifluoroacetic acid; flow rate, 1.2 mL/min.

Figure 2 Chromatogram on a DAISOPACK SP-120-5-ODS-BP column of active fraction from TSK gel ODS-80Ts.

Column, DAISOPACK SP-120-5-ODS-BP (6×150 mm); eluent, deionized water, flow rate: 0.5 mL/min.

Figure 3 Chromatogram on a 3013-N column of active fraction from TSK gel ODS-80Ts.

Column, HITACHI 3013-N (4×150 mm); eluent, 0-1 M NaCl (30 min) in 1/15 M Sodium phosphate buffer; flow rate: 1.0 mL/min.

に五つのピークがみられたが、活性は最初の二つのピークに認められた。

1.3 フィチン酸の定量と阻害活性 部分精製品からフィチン酸を抽出したところ、約2%のフィチン酸が含まれていた。抽出したフィチン酸について阻害活性を測定したところ、フィチン酸が示す阻害活性は1,694 units

Figure 4 Lineweaver-Burk plots of inhibition of ACE by partial purified inhibitor.

▲, control; □, 40 times dilution; ●, 80 times dilution.

であり、部分精製品の総活性の4,304 unitsの約40%を占めていた。また部分精製品、フィチン酸の標品および部分精製品から抽出したフィチン酸を薄層クロマトグラフィーに供し比較したところ、フィチン酸、抽出フィチン酸はニンヒドリンで発色するスポットがみられなかったが、部分精製品ではニンヒドリンで発色するスポットがいくつか認められた。

1.4 阻害様式の検討 部分精製品について阻害様式を検討したところ、Figure 4に示すように部分精製品は混合型阻害であった。

考 察

ブラックマップに存在するACE阻害因子の検索を行ったところ、この物質は逆相カラムに吸着しないことから、現在までに報告されている疎水性のペプチド類とは異なるものであると推察された。そこで本物質を同定するために、HPLCを用い各種カラムでの分離を試みた。まず逆相であるが親水性の物質に有効であるというDAISOPAKカラムで試みたところ、215 nmではピークにわかれるものの、阻害活性はいずれのピークにも認められた。また本物質のイオン性に注目し、イオン交換カラムでの分離を試みたところ陰イオン交換カラムには吸着せず、素通りの画分に阻害活性が認められた。また陽イオン交換カラムにおいても吸着されなかった(未掲載)。これらのことから本阻害物質はイオン性をもたないものと推察された。また前報¹⁾で報告したようにゲル濾過のカラムでも分離は不可能であった。

斉藤らは米糠に存在するACEを阻害する物質はフィチン酸であると報告している¹²⁾。そこで本報においても、

豆類に含まれるフィチン酸が ACE の阻害に関与している可能性について検討した。ブラックマッペの部分精製品からフィチン酸を抽出し、この画分の阻害活性を測定したところ、部分精製品の総活性の約 40% をフィチン酸が占めていた。また部分精製品と、これから抽出したフィチン酸の薄層クロマトグラフィーでのスポットを比較すると部分精製品にはニンヒドリンで発色するスポットが認められたが、抽出したフィチン酸画分にはニンヒドリンでのスポットは認められなかった。

阻害様式の検討を行ったところ、部分精製品は混合型阻害であった。

以上のことより、本阻害因子は複数の物質からなり、その一つはフィチン酸であることが推察された。フィチン酸はそのキレート作用やタンパク質結合力によって酵素活性を阻害することが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。また部分精製品にはニンヒドリンに反応する物質が多数存在しており、総活性を比較するとフィチン酸の示す活性よりも部分精製品の方が強い活性を有することから、フィチン酸以外にもニンヒドリンに反応する物質を含めた他の阻害物質の存在が推察される。また阻害様式を検討したところ混合型阻害であったことから、ブラックマッペの ACE への阻害作用はフィチン酸のキレート作用やタンパク質結合作用とともに、その他の因子の阻害作用も複合されて行われているものと推察された。

要 約

ブラックマッペに存在するアンジオテンシン阻害因子の検索を試みたところ、以下のことが明らかとなった。

1) 本阻害物質は、HPLC での逆相カラムに吸着せず、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーで分離されなかった。

2) 豆類に含まれるフィチン酸に注目し検討したところ、部分精製品中の総阻害活性の約 40% はフィチン酸で占められていた。

3) 阻害物質の一つはフィチン酸であると示唆されたが、フィチン酸以外にも阻害物質は存在し、これらが複合されて強い阻害活性を示すことが推察された。

文 献

- 1) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1998) ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索. 日本栄養・食糧学会誌 **51**, 195-200.
- 2) 丸山 進 (1989) 食品タンパク質からの血圧降下ペ

プチドの生成. バイオサイエンスとインダストリー **47**, 1182-6.

- 3) 河村幸雄 (1990) 食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド. 食品工業 **30**(2), 20-9.
- 4) 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 **30**(4), 20-5.
- 5) 村元 学, 河村幸雄 (1991) 米タンパク質と米タンパク質由来の抗血圧上昇性 (アンジオテンシン変換酵素阻害) ペプチド. 食品工業 **34**(22), 18-26.
- 6) 吉田恵子 (1996) ブラックマッペタンパク質の分画とそれらの性状について. 土浦短期大学紀要 **24**, 60-8.
- 7) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保 (1986) 黒緑豆タンパク質画分とその発芽過程における変化について. 日本栄養・食糧学会誌 **39**, 415-21.
- 8) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペグロブリンの性質. 日本栄養・食糧学会誌 **50**, 73-6.
- 9) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペ発芽体の各部位におけるタンパク質および酵素活性の変動について. 日本栄養・食糧学会誌 **50**, 153-9.
- 10) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎 (1980) 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討. 日本胸部疾患学会雑誌 **18**, 297-303.
- 11) Latta M, Ahderinne R (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem* **28** : 1313-5.
- 12) 斉藤義幸, 中村桂子, 川戸章嗣, 今安 聡 (1992) 清酒, および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質. 日本農芸学会誌 **66**, 1081-7.
- 13) Hayakawa T, Okada F, Tsutsui M, Sato N, Igaue I (1991) Effect of phytate on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate with phosphatase from various sources. *Agric Biol Chem* **55** : 651-7.
- 14) Deshpande SS, Cheryan M (1984) Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on α -amylase activity. *J Food Sci* **49** : 516-9.
- 15) Singh M, Krikorian AD (1982) Inhibition of trypsin activity *in vitro* by phytate. *J Agric Food Chem* **30** : 799-800.
- 16) Inagawa J, Kiosawa I, Nagasawa T (1987) Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with β -galactosidase. *Agric Biol Chem* **51** : 3027-32.
- 17) Knuckles BL (1988) Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity. *J Food Sci* **50** : 250-2.

(1998 年 8 月 24 日受付, 1999 年 2 月 15 日受理)