ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 66, No. 11, pp. 1645~1647, 1992]

ブタ小腸液によるイワシ筋肉由来の
アンジオテンシン I 変換酵素阻害
ペプチドの分解

松田秀喜, 石崎俊行, 森田日出男

長岡俊徳*, 箆島克裕**, 箆島 豊***

(宝酒造食品研究所, *広島大学生物生産学部
仙味エキス株式会社, *九州大学農学部)

平成 4 年 5 月 20 日 受理

Digestion of Peptides from Sardine
Muscle That Inhibit Angiotensin I
Converting Enzyme by Intestinal
Enzymes of Pigs

Hideki MATSUDA, Toshiyuki ISHIZAKI, Hideo
MORITA, Toshinori NAGAOKA*, Katsuhiko
OSAJIMA**, and Yutaka OSAJIMA***
*Food Research Laboratories, Takara Shuzo
Co., Ltd., Otsu 520-21,*

**Department of Bioproduction, Hiroshima
University, Higashihiroshima,
Hiroshima 724, Japan*

***Senmi Ekisu Co., Ltd., Ohzu, Ehime 795,
and ***Department of Food Science and
Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan*

Three peptides (I: Leu-Lys-Leu, II: Val-Lys-Ala-Gly-Phe, and III: Lys-Val-Leu-Ala-Gly-Met) from a hydrolyzate of sardine muscle and that inhibited angiotensin I converting enzyme were digested with the intestinal fluid of pigs. The IC_{50} values of II and III were decreased to 56% and 66% of the original value, respectively, after digestion. Peptide I was not digested. Five peptide fragments were isolated from the peptide digests by high-pressure liquid chromatography. By the Edman procedure, peptide II digest was found to contain the fragments Val-Lys-Ala-Gly and Gly-Phe, and peptide III digest was found to contain the fragments Ala-Gly-Met, Lys-Val-Leu-Ala-Gly, and Lys-Val-Leu. (Received May 20, 1992)

食品工業界においては、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を有するペプチドを各種生物資源の蛋白質に求め、これを食品として摂取することで高血圧予防に役立てようとする研究が注目され⁽¹⁾、生体内における分解を想定した検討も行われている^(2,3)。また腸管において、ジペプチドあるいはトリペプチドの吸収の優位性の報告^(4,5)などペプチドの吸収に関する研究などが進められている。

前報^(6,7)において著者らは、多獲性で利用効率の低いイワシを対象として、そのすり身を加熱処理後ペプシンで加水分解し、ODS 充填カラムで疎水性差により分離することで高い ACE 阻害活性を有するペプチド群を分離しうることを報告した。また、そのペプチドがラットを用いた *in vivo* のアッセイにおいても血圧上昇抑制効果を発現すること、そしてそれに含まれる 3 種の ACE 阻害ペプチドの構造を明らかにした。

今回、著者らは、前報⁽⁷⁾において単離した 3 種のペプシン加水分解で得られる ACE 阻害ペプチド (LKL, VKAGF, KVLGM) をブタ小腸液を用いた消化実験に供し、ACE 阻害活性の変化や分解生成した数種のペプチドフラグメントの構造およびその ACE 阻害活性を明らかにしたので報告する。

消化試験に供するペプチド (LKL, VKAGF, KVLGM) は、アメリカン・ペプチド社製固相ペプチド合成装置により合成したものを用いた。消化試験は、Furuya ら⁽⁸⁾の方法に準じて行った。すなわち、ブタ小腸液凍結乾燥品 (日本化薬製) 1 バイアルに 10 ml の水を加えて溶解 (pH 6.0) し、遠心分離して得られた上清に各合成ペプチド 20 mg を溶解させ、37°C で 4 時間、pH 6.8 で反応させた。反応後沸騰水中で 5 分間加熱し、消化酵素を失活させた。また、対照は、各ペプチドを小腸液に溶解後直ちに沸騰水中で同様に加熱した。得られた反応液はメンブラン・フィルターで濾過し、清澄な液を試料とした。

ACE 阻害活性は、前報同様⁽⁷⁾、Lieberman の測定法を改良した山本ら⁽⁹⁾の方法に準じて測定した。試料間の ACE 阻害活性の比較は、阻害率が 50% を示す試料のタンパク質濃度 (全窒素濃度 $\times 6.25$) として IC_{50} で表した。

消化されたペプチドフラグメントを分離するため、試料を ODS 逆相 HPLC に供した。分離条件は以下のとおりである。高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製

Table I. ACE Inhibitory Activity of the Digested Peptides in the Intestinal Fluid of Pig

Peptides	IC ₅₀ (mg/ml)	
	After digestion	Before digestion
LKL	0.062	0.062
VKAGF	0.045	0.025
KVLAGM	0.032	0.021

LC-6A, カラム: 東ソー製 TSKgel ODS-120 T (4.6 mm×15 cm), 溶出液: 0.05% トリフルオロ酢酸存在下で, 5% (10 分)~45% (50 分) アセトニトリルのリニアグラジエント, 流速: 1.0 ml/min, 検出器: 島津製作

所製紫外検出器 SPD-6A, 検出波長: 220 nm. 消化前後のクロマトグラムを相互に比較することにより新たに分解あるいは生成したペプチドフラグメントを確認し, 単離した. なお, アミノ酸の配列決定は, 常法により塩酸加水分解後, 日立製 L 8500 型アミノ酸分析計を用いて行った. アミノ酸配列は自動エドマン分解により ABI (Applied Biosystems Inc.) 製 477A 型プロテインシーケンサーを用いて決定した.

Table I に, 各ペプチドのブタ小腸液による消化前後の ACE 阻害活性を示した. ペプチド LKL は, 消化前後とも IC₅₀ が 0.062 mg/ml で活性を維持していた. ペプチド VKAGF は, 消化前が 0.025 mg/ml, 消化後

Fig.1. Comparisons of the Peptide Composition before and after Digestion. One μ l of the each reaction mixture was analysed by reversed phase HPLC. Analytical conditions, see in the text. a, The intestinal fluid only; b, LKL in the intestinal fluid; c, VKAGF in the intestinal fluid; d, KVLAGM in the intestinal fluid; (1), before digestion; (2), after digestion. Peptide fragments, c-1 (retention time, 3.9 min), and c-2 (24.8), were generated from the peptide, VKAGF (27.0), and peptide fragments, d-1 (9.4), d-2 (21.3), and d-3 (24.0), were generated from the peptide, KVLAGM (29.0). The retention time for LKL was 30.1 min. The peak b-1 was not identified because it was not reproducible. The peak at 11.8min in c (2) was an amino acid, F. There was no remarkable difference between the chromatograms a (1) and a (2).

Table II. Analytical Data for Peptide Fragments from Peptides Digested with Intestinal Fluid of Pig

Original peptides	Amount (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	Digested peptides	Amount (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
LKL	1.3	0.076	LKL	0.9	0.076*
VKAGF	1.4	0.033	VKAGF	0.6	0.033*
			VKAG	0.4	>0.93
			GF	0.02	>0.05
KVLAGM	1.7	0.017	KVLAGM	1.0	0.017*
			AGM	0.1	>0.19
			KVLAG	0.1	0.044
			KVL	0.05	>0.27

* Remaining original peptides.

が 0.045 mg/ml で、ペプチド KVLAGM は、消化前が 0.021 mg/ml、消化後が 0.032 mg/ml であり、両者とも活性が低下したが、まだかなり高い活性を維持していた。このことにより、ブタ小腸液中の消化酵素によって LKL は分解されず、VKAGF と KVLAGM は部分分解されたことが推測される。なおブタ小腸液そのものの ACE 阻害活性 (IC₅₀) は 140 mg/ml と力価的に無視できるものであり、また消化試験前後でほとんど変化しなかった。

そこで、ODS 逆相 HPLC により各ペプチドの消化前後のクロマトグラムを比較し新たに分解あるいは生成したペプチドフラグメントを確認した (Fig. 1)。ペプチド LKL は、消化前後でクロマトグラムにほとんど認められず、また、LKL のピークもほとんど減少していなかった。ペプチド VKAGF は、消化後新たに c-1、c-2 の 2 ピークが現れた。ペプチド KVLAGM も、消化後新たに d-1、d-2、および d-3 の 3 ピークが現れた。それに伴い、VKAGF、KVLAGM のそれぞれのピークは減少した。

消化後新たに生じた各ピークを、ODS 逆相 HPLC により分取し、アミノ酸分析、およびペプチドシーケンサーにより分析した結果、それぞれ c-1 は VKAG、c-2 は GF、d-1 は AGM、d-2 は KVLAG、d-3 は KVL であることが強く示唆された (Table II)。さらに、これら消化後新たに生じたペプチドフラグメントを分取し、その ACE 阻害活性を求めたところ、d-2 KVLAG は 0.044 mg/ml であったが、その他のペプチドフラグメント c-1、c-2、d-1、および d-3 は、それぞれのペプチドの濃度範囲において強い活性は測定されなかった。

以上の検討の結果、イワシ筋肉由来の ACE I 阻害ペプチン分解ペプチドのブタ小腸液による消化によってト

リペプチド LKL は分解を受けにくく、ペンタペプチド VKAGF およびヘキサペプチド KVLAGM は消化後の ACE 阻害活性が減少したが、十分な残存活性を有していた。またクロマトグラム上明らかな新たに計 5 個のペプチドフラグメントの生成を確認した。いずれも消化前の各ペプチド内にその配列を有していることから、それらが分解されて生成されたことは明らかである。今後ペプチドの消化前後およびこれらのペプチドフラグメントの回収率や ACE 阻害活性との相関、あるいは未確認のフラグメントの解析などペプチドの生体内酵素による分解に関してはさらに検討が必要である。

ACE 阻害ペプチドを食品として経口摂取し、生体内においてその活性を発現させるためには、生体内酵素による分解と腸管吸収という 2 つの関門を通過しなければならない。今後、生理機能を有するペプチドの食品としての利用を考えるにあたって、両者一体とした実験モデルが必要であり検討中である。

- (1) 千葉英雄, 吉川正明: 化学と生物, **25**, 396—405 (1977).
- (2) 中島秀司, 佐竹幹雄, 河村幸雄: 日本農芸化学会誌 1990 年度大会講演要旨集, 1990, p. 556.
- (3) 杉山圭吉, 高田康二, 江川 真, 山本郁雄, 恩塚 博, 大場健吉: 農化, **65**, 35—43 (1991).
- (4) 真島吉也: 千葉医学, **61**, 389—396 (1985).
- (5) 萩平 博, 中坊幸弘: 代謝, **27**, 993—1000 (1990).
- (6) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 松藤 寛, 箴島 豊: 農化, **65**, 1223—1228 (1991).
- (7) 受田浩之, 松田秀喜, 松藤 寛, 松井利郎, 箴島 豊: 農化, **66**, 25—29 (1992).
- (8) S. Furuya, K. Sakamoto, and S. Takahashi: *Br. J. Nutr.*, **41**, 511—520 (1979).
- (9) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎: 日胸疾会誌 **18**, 297—302 (1980).