ブラジキニンおよびアンジオテンシン I の 分解における Val-Tyr の影響

関 英治*・箆島克裕*・松藤 寛**
松井利郎**・箆島 豊**

Effect of Val-Tyr on Degradation of Bradykinin and Angiotensin I

Eiji SEKI*, Katsuhiko OSAJIMA*, Hiroshi MATSUFUJI**,
Toshiro MATSUI** and Yutaka OSAJIMA**

* Research Laboratories, Senmi Ekisu Co., 779-2
Noda, Hirano-cho, Ozu-shi 795

** Department of Food Science and Technology, Faculty
of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki,
Higashi-ku, Fukuoka-shi 812

Bradykinin was converted rapidly into the fragment 1-8 by kininase I when incubated with human plasma. Kininase II inactivated bradykinin by splitting the Pro⁷-Phe⁸ and the Phe⁵-Ser⁶ bonds in it. ACE inhibitory peptide Val-Tyr and captopril did not inhibit the conversion of bradykinin in human plasma into the fragments 1-8, 1-7 and 1-5. Bradykinin was converted into the fragments 1-7 and 1-5 by dipeptidyl peptidase activity of ACE. Captopril inhibited degradation of bradykinin by dipeptidyl peptidase activity of ACE, but Val-Tyr did not inhibit. (Received Jul. 1, 1996)

本態性高血圧症における腎カリクレイン・キニン系の抑制には、プロカリクレイン量および比活性の低下、キナーゼ活性亢進が考えられる。本系の抑制は低レニン群でより顕著であるが、病態との関係は明らかでない。本系の生物学的活性物質であるブラジキニンは、血管平滑筋に働き、血管拡張作用を示し、腎においては、水・Naの排泄作用を示すペプチドホルモンである。ブラジキニンは、主にキナーゼ I、II¹⁾によって分解され、不活性化する。KOMORIら²⁾は、アンジオテンシン I 変換酵素 (EC 3.4.15.1: ACE) の作用およびブラジキニンの分解を阻害する、蛇毒由来ブラジキニン増強ペプチ

ドを単離した。NATOFFら³⁾は ACE 阻害剤について、ラットを用いて、そのアンジオテンシン I による昇圧の抑制とブラジキニンによる降圧増強作用を認めている。ヒト血漿でのブラジキニンの分解経路については、ブラジキニンは、フラグメント 1-8 に分解後、さらに、フラグメント 1-5 に分解されること⁴⁾が報告されている。今回、著者らは、ヒト血漿ならびに精製 ACE によるブラジキニンおよびアンジオテンシン I の分解における ACE 阻害ペプチドである Val-Tyr の影響を調べた。

実験方法

健常者から採血後、クエン酸ナトリウムを 1.5% 添加し、4℃、3,000 回転で、15 分間遠心分離し、ヒト血漿を得た。使用するまで -40℃ で保存した。血漿によるブラジキニンとそのフラグメントの分解を行った。40 nmol のブラジキニン、フラグメント 1-8、あるいはフラグメント 1-7 (Sigma 社製) を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.4) - 0.1 mM CoCl₂ 300 μl に溶解し、最終反応液濃度として、10 μM カプトプリル (ACE 阻害剤、D-3-Mercapto-2-methylpropionyl-L-Proline: Sigma 社製) あるいは 1 mM Val-Tyr⁵⁾ (ACE 阻害ペプチド: 国産化学社製) のインヒビターを添加後、ヒト血漿あるいは 10 mU 精製 ACE (ウサギ肺由来、Sigma 社製) を 100 μl 加え、37℃ で、30 分間反応させた。6% スルホサリチル酸 2.0 ml を加え、酵素を失活させ、3,000 回転で 10 分間遠心分離後、メンブランフィルター 0.45 μm でろ過し、分析に供した。生成したフラグメントの HPLC による分離を行った。各フラグメントのアミノ酸量は、常法により塩酸加水分解後、オルトフタルアルデヒド蛍光検出を用いた島津製作所製 LC-6 A アミノ酸分析システムに供し定量した。

結果および考察

40 nmol のブラジキニンは、ヒト血漿との反応 30 分後、フラグメント 1-8 に 25.1 nmol 変換された。フラグメント 1-7、1-5 の生成は、それぞれ、1.2 nmol、1.1 nmol と少なかった。ACE 阻害剤であるカプトプリル (10 μM) を添加した場合、フラグメント 1-8、1-7、1-5 はそれぞれ 25.2 nmol、0.5 nmol、0.2 nmol 生成された。Val-Tyr (1 mM) を添加した場合、26.2 nmol、0.8 nmol、0.8 nmol 生成された。よって Val-Tyr (1 mM) は、ACE 阻害剤であるカプトプリル (10 μM) と同様、ヒト血漿でのブラジキニン分解を阻害しなかった。

次に、精製 ACE によるブラジキニンおよびアンジオ

* 仙味エキス株式会社開発部 (〒795 愛媛県大洲市平野町野田 779 番地 2)

** 九州大学農学部食糧化学工学科 (〒812 福岡県福岡市東区箱崎 6 丁目 10 番 1 号)

Table 1 Effect of inhibitors on degradation of bradykinin and angiotensin I by angiotensin I converting enzyme

Substrates	Inhibitors	Products ^a			
		BK ^b	Des-8, 9-BK ^c	ANG I	ANG II
Bradykinin	None	19.9	12.2		
Bradykinin	10 μ M Captopril	33.9	4.9		
Bradykinin	1 mM Val-Tyr	20.6	13.6		
Angiotensin I	None			17.9	22.0
Angiotensin I	10 μ M Captopril			39.9	— ^d
Angiotensin I	1 mM Val-Tyr			32.3	7.8

^a Numbers represent nmoles of products derived from 40 nmoles of each substrate after 30 min of incubation.

^b Bradykinin

^c Des-Phe⁸, Arg⁹-bradykinin

^d — represents less than 0.01 nmole of product formed after 30 min of incubation.

テンシン I の分解量ならびにインヒビター添加の結果を Table 1 に表した。40 nmol のブラジキニンと ACE を上記の分解条件で反応させると、フラグメント 1-7, 1-5 にそれぞれ 12.2 nmol, 7.9 nmol 変換された。カプトプリル (10 μ M) を添加した場合、フラグメント 1-7, 1-5 はそれぞれ 4.9 nmol, 1.0 nmol 生成された。Val-Tyr (1 mM) を添加した場合、13.6 nmol, 5.8 nmol 生成された。その分解は、それぞれ、ACE が持つジペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性によるものと推定された。ACE のジペプチジルカルボキシペプチダーゼによるブラジキニンの分解をカプトプリル (10 μ M) は阻害したが、Val-Tyr (1 mM) は阻害しなかった。また、40 nmol のアンジオテンシン I (ANG I) と ACE を上記の分解条件で反応させると、ANG I, ANG II 量がそれぞれ、17.9 nmol, 22.0 nmol 得られ、カプトプリル (10 μ M) を添加した場合、ANG I 量は、39.9 nmol, ANG II は検出せず、Val-Tyr (1 mM) 添加の場合、ANG I 量は 32.3 nmol, ANG II 量は 7.8 nmol であった。

本結果では、ACE による ACE によるブラジキニンの分解を、カプトプリルは阻害し、Val-Tyr は阻害しなかったことは、カプトプリルと Val-Tyr の ACE 活性部位での作用の違いによるものと考えられる。PERICH ら⁶⁾ は、ACE 活性部位での ACE 阻害剤の親和性の差異が、薬理学的作用に影響することを報告している。ブラジキニンは様々なエキソおよびエンドペプチダーゼで分解されることが明らかにされており、これらのキナーゼとしての特異的な酵素の重要性は細胞下の局在に依存すること⁷⁾ である。AHMAD ら⁸⁾ は、ブラジキニンの分解が、

ACE, カルボキシペプチダーゼ N, アミノペプチダーゼ P の 3 つの阻害剤を同時に加えた場合、最も阻害されることを報告している。最近、動脈等組織中で局所的に生じたブラジキニンの局所 ACE による分解に対する ACE 阻害物質の作用が重要視されてきている。上記の結果のみから推論するのは危険ではあるが、ACE 阻害ペプチドである Val-Tyr は、ヒト血漿ならびに精製 ACE による活性ブラジキニンの分解を阻害しないと見積もられたことから、レニン・アンジオテンシン系には作用し、カリクレイン・キニン系には作用しないのではないかと考えられる。

文 献

- 1) TAYLOR, J.E., DEFEUDIS, F.V. and MOREAU, J.P.: *Drug Devel. Res.*, **16**, 1 (1989).
- 2) KOMORI, Y. and SUGIHARA, H.: *Int. J. Biochem.*, **22**, 767 (1990).
- 3) NATOFF, I.L., NIXON, J.S., FRANCIS, R.J., KLEVANS, L.R., BREWSTER, M., BUDD, J., PATEL, A.T., WENGER, J. and WORTH, E.: *J. Cardiovasc. Pharmac.*, **7**, 569 (1985).
- 4) SHIMA, C., MAJIMA, M. and KATORI, M.: *Jap. J. Pharmac.*, **60**, 111 (1992).
- 5) 関 英治・箴島克裕・松藤 寛・松井利郎・箴島 豊: *農化*, **69**, 1013 (1995).
- 6) PERICH, R.B., JACKSON, B. and JOHNSTON, C.I.: *Clin. Exp. Pharmac. Physiol.*, **19**, 353 (1992).
- 7) SKIDGEL, R.A.: *J. Cardiovasc. Pharmac.*, **20**, S 4 (1992).
- 8) AHMAD, S. and WARD, P.E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **200**, 115 (1992).

(平成 8 年 7 月 1 日受理)