イワシ筋肉アルカリプロテアーゼ加水分解物の スーパーオキシドアニオン消去活性

森山洋憲, 片山泰幸*, 受田浩之*[§], 沢村正義*, 箴島克裕**, 松井利郎***, 松本 清***

高知県工業技術センター

* 高知大学農学部

** 仙味エキス株式会社開発部

*** 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

Superoxide Anion-Scavenging Activity of Alkaline Protease Hydrolysate from Sardine Meat

Hironori Moriyama, Yasuyuki Katayama*, Hiroyuki Ukeda*[§], Masayoshi Sawamura*,
Katsuhiro Osajima**, Toshiro Matsui*** and Kiyoshi Matsumoto***

Kochi Prefectural Industrial Technology Center, 3992-3, Nunoshida, Kochi 781-5101

* Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe B-200, Nankoku 783-8502

** Research Laboratories, Senmi Ekisu Co., Hirano, Ozu 795-0021

*** Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School Kyushu University,
6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

Superoxide anion-scavenging activity (SOSA) of alkaline protease hydrolysate from sardine meat (A-1) was measured by colorimetry using water-soluble tetrazolium salt (WST-1). A-1 showed low activity with IC₅₀ value of 9.21 mg powder/ml. The hydrolysate was separated into F-1-F-6 on an ODS column. The most active fraction (F-4) was fractionated by ion exchange chromatography on SP-Sephadex C-25 into three active fractions (1/SP-3/SP). The first fraction, 1/SP, showed the most potent activity (IC₅₀=4.11 mg powder/ml). By elution with a stepwise gradient of acetonitrile containing 0.1% TFA on Sep-pak plus C18 cartridge, A/SE (IC₅₀=2.12 mg powder/ml) and B/SE (IC₅₀=7.14 mg powder/ml) were obtained from 1/SP. A/SE was extracted with water or 20% acetonitrile. A/SE W, the water extract, showed high SOSA with an IC₅₀ value of 0.51 mg powder/ml. The amino acid analysis of each active fraction indicated that five amino acid residues (Leu, Phe, Pro, Met, Tyr) played important roles in the activity. Moreover, it was suggested that the potent scavenger contained few histidine residue.

(Received Feb. 3, 2003 ; Accepted Jun. 3, 2003)

タンパク質加水分解物の有する様々な生体調節機能が明らかにされている。Yoshikawa らは、卵白アルブミンのペプシン消化物に由来する動脈拡張ペプチド ovokinin およびその誘導体が、高血圧ラットに対して血圧降下作用を示すことを報告している^{1)~3)}。血小板の凝集阻害を示す物質がブタ皮膚コラーゲンの加水分解物から得られている⁴⁾。また Tomita らは、乳タンパク質の一つであるラクトフェリンのペプシン消化物から抗菌性ペプチドを見いだした⁵⁾。一方、大豆からは肥満抑制作用⁶⁾あるいはコレステロール代謝改善機能を示すペプチド⁷⁾が分離されており、

後者の機能を応用した食品開発も行われている⁸⁾。さらに牛乳カゼインのトリプシン分解物⁹⁾、トウモロコシ由来α-ゼインの分解物¹⁰⁾、ウシ皮膚ゼラチンの分解物¹¹⁾、そしてカツオブシのサーモリシン分解物¹²⁾からアンジオテンシンⅠ変換酵素(ACE)を阻害するペプチドが分離された。イワシ筋肉の加水分解物からもACE阻害ペプチド^{13)~18)}が見いだされているが、関らはそのペプチドの活性に寄与する成分がVal-Tyr¹⁹⁾であることを確認した。Matsui らは同様にイワシ魚肉加水分解物からα-グルコシダーゼ阻害を示す物質の検索も試みている²⁰⁾。

タンパク質加水分解物の中には抗酸化能を有しているものもある。その例として大豆タンパク質^{21)~23)}、卵アルブミン²⁴⁾、あるいは発酵乳²⁵⁾に由来するペプチドなどが挙げられる。また Aruoma らは、動物の骨格筋に広く分布するカ

〒781-5101 高知県高知市布師田 3992-3

* 〒783-8502 高知県南国市市部乙 200

** 〒795-0021 愛媛県大洲市平野町野田 779-2

*** 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), hukeda@cc.kochi-u.ac.jp

ルノシン関連物質が有する抗酸化能を明らかにした^{26)~28)}。一方、末綱らはマイワシ筋肉ペプシン消化物²⁹⁾、ミルクカゼイン分解物³⁰⁾の有する抗酸化活性を報告している。以上のような天然の抗酸化物質は、ブチルヒドロキシアニソール³¹⁾などの合成酸化防止剤の代替品として期待される。他方で末綱らによって報告された物質²⁹⁾³⁰⁾は、生体防御酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と同様に、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を消去する活性を有していることも注目される³²⁾³³⁾。

イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ加水分解物から得られた親水性ペプチド画分は強い ACE 阻害を示し、特定保健用食品としても応用されている。しかし、現段階ではその有効利用画分はほんの僅かであり、活性画分以外の大部分は未だ利用されていないのが現状である¹⁸⁾。このような未利用画分について新たな生体調節機能を解明できれば、新機能を応用した食品の開発を通じて魚肉加水分解物の高度有効利用が可能となる。そこで本研究では、イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ加水分解物を分離し、高い O_2^- 消去活性 (Superoxide anion-scavenging activity; 以下 SOSA と略記) を示す画分を検索し、その画分の精製を試みた。SOSA の測定には、受田らの開発した水溶性テトラゾリウム塩 WST-1 を用いる方法 (WST-1 法)³⁴⁾、および電子スピン共鳴 (ESR) 法を利用した。

実験方法

1. 試料および試薬

WST マイクロプレートキットは、同仁化学研究所製 SOD Assay-Kit WST を用いた。5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) はラボテック製を、シトクロム *c* と牛赤血球由来 SOD (4 000 units/mg protein) は Sigma 製を用いた。SOD 標品の活性は標準シトクロム *c* 法³⁵⁾ で得られた unit で表示した。その他の試薬は全て市販の特級試薬を用いた。また全ての実験において蒸留水を Auto Pure WQ 501 (Millipore 製) に通して処理した超純水を用いた。

2. 加水分解物からの SOSA 画分の精製

(1) A-1 の調製

イワシすり身加水分解物 A-1 の調製は、ACE 阻害ペプチドの調製に対して最適化された条件¹⁷⁾¹⁸⁾を用いて、次のように行った。1 kg のイワシすり身に等量の水を加え、98℃で10分間加熱処理した。その後、20% アンモニア水で pH を 9.0 に調整し、*Bacillus licheniformis* 由来のアルカリプロテアーゼ (Novo 製, 2.4 L, Type FG) を 3 g (魚肉に対して 0.3% 重量) 添加後、50℃で17時間加水分解した。

(2) ODS カラムによる精製

8.65 l の A-1 に超純水 18.35 l を加え、9 l の ODS 樹脂 (YMC 製; ODS-AQ 120-S50) を充填したカラム (15.0 cm

×50.0 cm) に供した。この際溶出された非吸着画分と 27 l の超純水で溶出した画分を合わせ、F-1 とした。次に 20%, 40%, 60%, 80%, 99.5% エタノールをそれぞれ 27 l 用いて順次溶出し、F-2~F-6 の画分を得た。F-2~F-6 の溶出画分についてはエバポレーター (タイテック製 VC-36N) でエタノールを除去した後、全ての画分を凍結乾燥して粉末試料を得た。この粉末を SOSA 測定用試料として用いた。

(3) SP-Sephadex C-25 (H^+) による精製

F-1~F-6 のうち、最も高い SOSA を示した F-4 粉末 40 g を超純水 4 l に溶解し、SP-Sephadex C-25 (H^+) (Pharmacia Biotech 製) を充填したカラム (2.5 cm × 34.5 cm) に供した。一度の供試量を 200 ml とし、20 回精製を繰り返した。超純水、0.1 M ギ酸アンモニウム、0.5 M ギ酸アンモニウムを用いてステップワイズグラジエント、流速 1.0 ml/min、検出波長 280 nm の条件で溶出した。溶出液を 11 ml ずつフラクションコレクター (Pharmacia LKB 製 Radil Frac) で分取し、各溶液の中で高い SOSA を示した 3 つの画分を 1/SP~3/SP とした。それらの画分を凍結乾燥して粉末を得た。この粉末を SOSA 測定用試料として用いた。

(4) Sep-Pak Plus C18 Cartridges による精製

最も高い活性を示した 1/SP 粉末 1.39 g に超純水 230 ml を加え、60℃まで加熱して溶解させた。その後、メンブレンフィルター (pore size 0.45 μ m; 富士フィルム製) でろ過し、Sep-Pak Plus C18 Cartridges (360 mg/cartridge; Waters 製) に供した。溶出には 0.1% の TFA を含む 10% のアセトニトリル (A 液) と 0.1% の TFA を含む 50% のアセトニトリル (B 液) を使用した。そして各液で溶出した画分を A/SE および B/SE とした。各画分のアセトニトリルをエバポレーターで除去した後、凍結乾燥して粉末を得た。以上の操作で得た 347 mg の A/SE 粉末を SOSA 測定用試料として用いた。

(5) A/SE からの SOSA 画分の精製

A/SE 粉末を次の手順で分離した。すなわち 70 mg の A/SE に対して超純水 4 ml を加えて溶解させ、3000 × g、4℃で10分間遠心分離を行った。この上清を水抽出物 (A/SE W) とし、さらに沈殿物を 20% アセトニトリル 3 ml で溶解したものを 20% アセトニトリル抽出物 (A/SE 20 AN) とした。SOSA 測定には得られた両画分の一部を分取し、遠心エバポレーターで乾固させた粉末を用いた。

(6) アミノ酸分析

アミノ酸組成の分析は常法により試料を塩酸加水分解後、Shimadzu 製 SCL-10A アミノ酸分析計を用いて行った。

(7) SOSA の測定方法

ESR 法による A-1 の SOSA 測定は既報³⁴⁾に従って行った。測定結果は、コントロールに対して 50% の阻害を示す試料濃度 (IC₅₀) で示した。

WST-1 法による A-1 からの各分画物の SOSA 測定は、既報³⁴⁾に従って行った。測定結果は IC₅₀ で表示した。ただし F-4 画分から SP-Sephadex C-25 (H⁺) カラムにより分取した試料については、直接その試料を測定に供した際の阻害率で表した。この阻害率は、試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化を Ac, 試料添加での吸光度変化を As として、次式により計算した。

$$\text{阻害率(\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

両方法による測定結果は測定 2 回の平均値で示した。

実験結果及び考察

1. 加水分解物 A-1 の SOSA

イワシすり身をアルカリプロテアーゼで加水分解した溶液、すなわち A-1 原液の SOSA を WST-1 法で測定した。その結果、A-1 原液を 11.1 倍に希釈した試料が 50% の阻害率を示した。A-1 の IC₅₀ を求めたところ、9.21 mg powder/ml であった。ESR 法も用いて測定した結果、A-1 原液の 1.33 倍希釈液が 50% 阻害率を示した。IC₅₀ を求めたところ 76.8 mg powder/ml であった。さらにこの値を SOD 等価活性に換算すると 5.71 units/ml であった。受田らの報告³⁴⁾によると WST-1 法は ESR 法より高い検出能を有することが示されている。本実験でも、IC₅₀ を示すペプチド溶液 A-1 の希釈倍率は ESR 法で 1.33 倍、WST-1 法で 11.1 倍であり、WST-1 法は ESR 法と比べ 10 倍近い検出能を有することが判明した。他方で、ESR 法で測定した A-1 原液の SOSA (5.71 units/ml) は、ワイン (755~866 units/ml) あるいはお茶 (67 100~113 000 units/ml) の活性³⁴⁾に比べて低いことも判った。

2. SOSA を有するペプチドの精製

(1) 加水分解物 A-1 の精製

A-1 原液の有する SOSA は嗜好飲料に比べて低いことから、分画を進め、高活性画分を得ることを試みた。A-1 の ACE 阻害活性は、ODS カラムを用いた一度の精製により 17 倍以上に増大している¹⁸⁾。そこで本研究でも ODS カラムを用いた精製を行った。まず、8.65 l (ペプチド粉末; 562 g) の A-1 を ODS カラムに供し、エタノールのステッ

プワイズグラジェントで溶出した。得られた画分の SOSA を ESR 法により測定した (Table 1)。各画分の活性は大きく異なっていた。このうち、60% エタノールで溶出した画分 F-4 に最も高い活性 (IC₅₀=17.0 mg powder/ml) が認められた。この画分は、A-1 (IC₅₀=76.8 mg powder/ml) よりも顕著に活性が増大していた。一方、0~20% のエタノールで溶出された F-1 および F-2 の活性は弱く、それぞれの IC₅₀ は 271 mg powder/ml と 207 mg powder/ml であった。なお、高い ACE 阻害能を示すペプチドはこの F-1~F-2 の画分に存在する¹⁸⁾。本実験により、高い SOSA を示す画分は ACE 阻害ペプチドが得られる画分とは異なることが明らかとなった。そこで最も高い活性を示した F-4 に注目し、この画分を精製することとした。なお、8.65 l のペプチド A-1 から F-4 は 36.5 g 得られた。

(2) F-4 の精製

40 g の F-4 を SP-Sephadex C-25 (H⁺) カラムに供し、ギ酸アンモニウムのステップワイズグラジェントで溶出した。このときのクロマトグラムおよび WST-1 法で測定した阻害率を Fig. 1 に示す。活性が認められた分画番号 9~36, 107~125, 206~218 の 3 ケ所をそれぞれ 1/SP, 2/SP, 3/SP とした。各画分の SOSA を WST-1 法で測定した (Fig. 1)。1/SP と 2/SP の IC₅₀ 値は 4.11 mg powder/ml と 10.8 mg powder/ml であった。15 mg powder/ml の 3/SP を測定に供しても IC₅₀ は得られなかった。最も高い活性を示した 1/SP の SOSA を ESR 法により確認した。その結果、1/SP は IC₅₀=14.1 mg powder/ml を示した。この SOSA は精製前の F-4 のものより高い。そこで高活性画分 1/SP に注目し、この画分の精製を進めることとした。なお、40 g の F-4 から 1.39 g の 1/SP が得られた。

(3) 1/SP の精製

1.39 g の 1/SP を Sep-Pak Plus C18 Cartridges に供し、0.1% TFA を含むアセトニトリルのステップワイズグラジェントで溶出した。この操作で得られた A/SE と B/SE の SOSA を測定した (Table 2)。WST-1 法で得られた A/SE の活性は B/SE よりも高かった。同様に ESR 法においても B/SE より A/SE の方が高い活性を示した。A/SE の活性 (IC₅₀=2.12 mg powder/ml: WST-1 法) は 1/SP の活性 (IC₅₀=4.11 mg powder/ml: WST-1 法) よりも強かった。両方法ともに A/SE が高い活性を示したことから、この画分の精製を進めることとした。なお、1.39 g の 1/SP から 347 mg の A/SE および 845 mg の B/SE を得た。

(4) A/SE の精製

347 mg の A/SE を超純水および 20% アセトニトリルで抽出し、それぞれの抽出画分を A/SE W, A/SE 20AN とした。これら画分の SOSA を WST-1 法および ESR 法を用いて測定した (Table 3)。A/SE W と A/SE 20AN の両画分は共に高い活性 (IC₅₀=0.51 mg powder/ml, 0.50 mg powder/ml) を示した。これらの活性は A/SE よりも高

Table 1 SOSA of F-1~F-6 separated by ODS column

Fraction	IC ₅₀ (mg powder/ml) ¹⁾	Yield (g)
A-1 ²⁾	76.8	
F-1 (0% ethanol)	271	268
F-2 (20%)	207	192
F-3 (40%)	51.6	111
F-4 (60%)	17.0	36.5
F-5 (80%)	21.6	11.3
F-6 (99.5%)	35.1	4.46

¹⁾ Measured by ESR method.

²⁾ Hydrolysate with protease.

Fig. 1 Ion exchange chromatography of F-4 on Sephadex C-25 (H^+) column

Column : SP-Sephadex C-25 (H^+) (2.5 cm $\times$ 34.5 cm). Stepwise gradient elution : (a) H_2O , (b) 0.1 M $HCOONH_4$, (c) 0.5 M $HCOONH_4$. Flow rate : 1 ml/min. Monitoring absorbance : 280 nm.

Table 2 SOSA of A/SE and B/SE separated by Sep-Pak

Fraction	WST-1 IC ₅₀ (mg powder/ml)	ESR IC ₅₀ (mg powder/ml)	Yield (mg)
A/SE	2.12	13.4	347
B/SE	7.14	19.9	845

Table 3 SOSA of A/SE W and A/SE 20AN

Fraction	WST-1 IC ₅₀ (mg powder/ml)	ESR IC ₅₀ (mg powder/ml)	Yield (mg)
A/SE W	0.51	7.90	311
A/SE 20AN	0.50	7.36	35.7

かった。凍結乾燥品として 311 mg の A/SE W 粉末を得た。なお、A/SE W の収量 311 mg は 40 g の F-4 から得られたものであり、これは原液 A-1 の 9.5 l に相当する。すなわち、A-1 加水分解物 1 l 中に A/SE W 画分は 32.7 mg 存在することになる。

3. SOSA を有する画分のアミノ酸組成

以上の操作で分離された各画分の化学的特徴の解明を試みた。1/SP から各精製段階で得られた画分のアミノ酸組成を Table 4 に示す。各画分に含まれるアミノ酸含量は、全体を 100 としたときの重量パーセントで表している。組成比の順位が上位 1~4 番目のアミノ酸に下線を表示した。参照として、A-1 のアミノ酸組成¹⁸⁾を左端に示している。本実験で得られた画分の特徴は、Leu, Phe, Pro などの疎水性アミノ酸、および Asp, Glu などの酸性アミノ酸の組成比が高いことである。但し Leu, Asp, Glu は A-1 中の

組成比も高い。Lys と His などの塩基性アミノ酸の組成比は A-1 中で高いが、活性画分では低かった。1/SP は SP-Sephadex C-25 (H^+) (陽イオン交換樹脂) に非吸着の画分であることから、酸性アミノ酸を多く含むと考えられる。ODS 樹脂を用いて 60% エタノールにより A-1 から溶出された 1/SP は、比較的強い疎水性を示すことも予測される。このような性質を有する 1/SP から活性画分を検索した結果、活性画分のアミノ酸組成に上述の特徴が現れたと考える。

1/SP ($IC_{50}=4.11$ mg powder/ml) から A/SE ($IC_{50}=2.12$ mg powder/ml) を分画し、A/SE から A/SE W ($IC_{50}=0.51$ mg powder/ml) を分離した。このように活性成分を分画するに従って各画分のアミノ酸組成比は変化した。この変化を調べることで、活性に寄与するアミノ酸残基を推定した。Fig. 2 は次の方法で作成した図である。A-1 のアミノ酸組成を基準値すなわち 0 とし、各画分のアミノ酸含量がその基準値より上回っていればその上回った数値 (%) をプラス側に表し、下回っていればマイナス側に表した。その図を見ると、基準値を上回っている多くのアミノ酸は疎水性アミノ酸であることが明らかとなった。疎水性アミノ酸以外では Met と Tyr が基準値を越えていた。Phe, Met, Tyr は、1/SP から精製が進む、すなわち活性が増加するに伴いその含量が増えていた。したがって、それらのアミノ酸残基が SOSA に大きく寄与していることが示唆された。一方、Asp あるいは Glu の含量は活性と逆の相関を示している。このことからそれらは SOSA に寄与しないアミノ酸残基と推察された。また各活性画分中の Ala, Lys, His の組成比は常に低かった。Chen らはリノール酸の過酸化に対する抗酸化能において、His と Pro がペプチドの抗酸化能に重要な役割を果た

すことを示している²³⁾。同時に、そのペプチドが O_2^- に対する消去能を持たないことも報告している。本研究では、イワシ筋肉加水分解物から高い SOSA を示す画分を得ることができたが、その画分は His をほとんど含んでいなかった。

本研究の結果、ACE 阻害ペプチドの製造で未利用の画分が高い SOSA を示すことが明らかとなった。また高活性の画分には Leu, Phe, Pro, Met, Tyr のアミノ酸を持つ物質が存在すると推定された。しかもその物質は His を

持たない構造を有することも示唆された。最終的に原液 A-1 の 18 倍の活性を示す A/SE W を得ることができた。生体内での O_2^- による障害の多くは、Fenton 型 Haber-Weiss 反応などにより、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) をはじめとする反応性の高い分子種への変換 ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$) によると考えられている³⁶⁾。今回得られたような SOSA を有する食品成分は、反応性の高い活性酸素種の生成を抑制することにより、老化や生活習慣病の予防に資することが期待される。今後、A/SE W の分離と精製を進めることにより、活性に関与する成分を特定していくことで、魚肉加水分解物を高度に有効利用する技術の確立を目指す。同様に、収量の点で A/SE W に劣っていたものの、A/SE 20 AN も高活性素材であったことから、この画分も実用化を図る。その一方で、本研究で得られた活性画分の特徴を参考にして、様々なタンパク質原からの SOSA 物質検索にも注目していきたい。

要 約

イワシすり身のアルカリプロテアーゼ分解物 (A-1) を分離および精製することにより、高い SOSA を有する画分の分離を行った。WST-1 法により A-1 の SOSA を測定した結果、その IC_{50} は 9.21 mg powder/ml であった。A-1 を ODS オープンカラムによるエタノールのステップワイズグラジエントで溶出し、F1~F6 に分離した。高活性画分 F-4 を SP-Sephadex C-25 (H^+) によるギ酸アンモニウムのステップワイズグラジエントで溶出し、1~3/SP を得た。1/SP を Sep-Pak Plus C18 Cartridges により極性画分 (A/SE) と非極性画分 (B/SE) に分画した。B/SE ($IC_{50} = 7.14$ mg powder/ml; WST-1 法) よりも高い活性を示した A/SE ($IC_{50} = 2.12$ mg powder/ml; WST-1 法) を水抽出物 (A/SE W) と 20% アセトニトリル抽出物 (A/SE

Table 4 Amino acid composition of each fraction

Fraction IC ₅₀ ¹⁾ (mg powder/ml)	Amino acid composition (w/w%)					
	A-1 ²⁾	1/SP	A/SE	B/SE	A/SE W	A/SE 20AN
	9.21	4.11	2.12	7.14	0.51	0.50
Gly	4.5	4.2	3.6	4.4	5.9	4.7
Ala	5.9	2.8	2.4	3.1	2.4	2.9
Val	5.8	6.0	5.8	6.2	6.7	6.0
Leu	8.4	14.1	16.4	12.6	14.0	17.8
Ile	4.5	9.1	8.3	9.1	9.6	8.9
Phe	3.7	5.5	6.8	5.0	8.7	8.4
Pro	3.4	11.2	15.5	8.8	11.2	15.1
Ser	3.6	1.9	2.0	2.2	1.7	0.5
Thr	4.2	2.6	2.2	2.7	3.6	3.1
Cys	2.3	0.7	0.9	—	0.4	—
Met	3.3	5.1	7.6	3.4	11.8	8.2
Tyr	2.8	3.9	4.5	3.1	9.8	4.7
Asp	12.1	11.7	9.2	11.8	3.8	3.6
Glu	16.5	11.5	11.6	11.8	6.9	9.5
Lys	8.3	0.6	0.5	0.5	0.2	—
Arg	4.5	8.8	2.4	15.1	3.2	3.5
His	6.2	0.3	0.3	0.3	—	3.2

¹⁾ Measured by WST-1 method.

²⁾ Ref. 18.

Fig. 2 Comparison of amino acid composition (%) between A-1 and each fraction

20AN) に分け, SOSA を測定した. A/SE W は 0.51 mg powder/ml の活性を示し, A-1 溶液 1 l から 32.7 mg の収率で得られた.

以上の操作で得た各画分のアミノ酸分析を行った. 活性画分中の Lys と His の組成比は特に低かった. 各画分の活性が増大するに従い, Phe, Met, Tyr の組成比が増大する傾向が確認された.

文 献

- 1) Fujita, H., Sasaki, R. and Yoshikawa, M., Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2344-2345 (1995).
- 2) Matoba, N., Yamada, Y., Usui, H., Nakagiri, R. and Yoshikawa, M., Designing potent derivatives of ovokinin(2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 736-739 (2001).
- 3) Yamada, Y., Matoba, N., Usui, H., Onishi, K. and Yoshikawa, M., Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin(2-7), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 1213-1217 (2002).
- 4) Nonaka, I., Katsuda, S., Ohmori, T., Shigehisa, T., Nakagami, T. and Maruyama, S., *In vitro* and *in vivo* anti-platelet effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related peptides, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 772-775 (1997).
- 5) Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K., Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion, *J. Dairy. Sci.*, **74**, 4137-4142 (1991).
- 6) 新甫勇次郎, 山崎 律, 細野 剛, 中島嘉次郎, 石崎正和, 蔵重達雄, 大豆由来の低分子ペプチドの研究—疲労・肥満並びに糖代謝に及ぼす影響, *薬誌*, **113**, 334-342 (1993).
- 7) Hori, G., Wang, M., Chan, Y., Komatsu, T., Wong, Y., Chen, T., Yamamoto, K., Nagaoka, S. and Yamamoto, S., Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 72-78 (2001).
- 8) 長岡 利, リン脂質結合大豆ペプチドのコレステロール代謝改善機能, *食品と開発*, **36**, 49-51 (2001).
- 9) Maruyama, S., Nakagami, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H., Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405-1409 (1985).
- 10) Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S., Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318 (1991).
- 11) Kim, S., Byun, H., Park, P. and Fereidoon, S., Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2992-2997 (2001).
- 12) Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M., Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541-1545 (1992).
- 13) 末綱邦男, 箆島克裕, イワン筋肉由来ペプチドの *in vivo* における血圧降下作用ならびに血管拡張作用について, *栄食誌*, **42**, 47-54 (1989).
- 14) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箆島克裕, 松藤 寛, 箆島豊, イワン蛋白質加水分解物からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの調製とその分離, *農化*, **65**, 1223-1228 (1991).
- 15) 受田浩之, 松田秀喜, 箆島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箆島豊, 加熱イワン筋肉のペプシン加水分解物中に存在するアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチド, *農化*, **66**, 25-29 (1992).
- 16) 関 英治, 箆島克裕, 松井利郎, 箆島 豊, イワン筋肉由来アルカリプロテアーゼ分解物からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの分離精製, *日食工誌*, **40**, 783-791 (1993).
- 17) Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2244-2245 (1994).
- 18) Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y., Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 922-925 (1993).
- 19) 関 英治, 箆島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箆島 豊, Val-Tyr は消化管プロテアーゼ耐性なイワン由来の ACE 阻害ペプチドである, *農化*, **69**, 1013-1020 (1995).
- 20) Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T. and Osajima, Y., *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 2019-2022 (1996).
- 21) Chen, H-M., Muramoto, K. and Yamauchi, F., Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 574-578 (1995).
- 22) Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K., Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2619-2623 (1996).
- 23) Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K., Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 49-53 (1998).
- 24) 柘植信昭, 永川由美, 野村幸弘, 山本正典, 杉澤 公, 卵アルブミンの酵素分解によって得られるペプチドの抗酸化性について, *農化*, **65**, 1635-1641 (1991).
- 25) 工藤康文, 松田茂樹, 井越敬司, 沖 智之, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* IFO13953 で発酵させた発酵乳から分離された抗酸化ペプチド, *食科工*, **48**, 44-50 (2001).
- 26) Aruoma, O.I., Loughton, M.J. and Halliwell, B., Carnosine, homocarnosine and anserine : could they act as antioxidants *in vivo*?, *Biochem. J.*, **264**, 863-869 (1989).
- 27) Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C. and Ames, B.N., Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175-3179 (1988).
- 28) Chan, W.K.M., Decker, E.A., Lee, J.B. and Butterfield, D. A., EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical

- scavenging activity of carnosine and related dipeptides, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1407-1410 (1994).
- 29) 末綱邦男, 受田浩之, マイワシ筋肉ペプシン消化物からの活性酸素消去能を有するオクタペプチドの分離同定およびその活性, *日水誌*, **65**, 1096-1099 (1999).
- 30) Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H., Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein, *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 128-131 (2000).
- 31) Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata M. and Ogiso, T., Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343-352 (1983).
- 32) 吉川敏一, 谷川 徹, 活性酸素・フリーラジカルと疾患, *化学と生物*, **37**, 475-481 (1999).
- 33) 大澤俊彦, 老化抑制食品のデザイン・抗酸化成分による老化抑制食品の設計, *食品と開発*, **36**, 8 (2001).
- 34) 受田浩之, 森山洋憲, 川名大介, 片山泰幸, 中林錦一, 沢村正義, スーパーオキシドアニオン消去活性新規測定法の食品への応用, *食科工*, **49**, 25-31 (2002).
- 35) Beauchamp, C. and Fridovich, I., Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287 (1971).
- 36) Halliwell, B., Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydrofumaric acid by peroxidase, *Biochem. J.*, **163**, 441-448 (1977).
- (平成 15 年 2 月 3 日受付, 平成 15 年 6 月 3 日受理)
-