高血圧自然発症ラットにおける酵素処理ローヤルゼリーの 血圧降下作用機序

徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 丸山広恵, 二村芳弘, 荒木陽子, 三島 敏[§]

アピ株式会社 総合研究所

Antihypertensive Mechanism of Royal Jelly Treated with Protease in Spontaneously Hypertensive Rats

Katsuhiko Tokunaga, Kazu-michi Suzuki, Chie Yoshida, Hiroe Maruyama, Yoshihiro Futamura,
Yoko Araki and Satoshi Mishima[§]

API Company Limited Research Institute 4-23, Shinhon-machi, Kanoh, Gifu 500-8463

It has been reported that Royal Jelly (RJ) treated with protease N (ProRJ) contained three ACE inhibitory peptides (IY, VY and IVY) and that three peptides have an antihypertensive effect on spontaneously hypertensive rats (SHR). We examined the mechanism by which ProRJ decreased blood pressure in SHR. In single oral administration of ProRJ at a dose of 2.0 g/kg in SHR, the systolic blood pressure was significantly decreased 6 hours after administration. And the angiotensin I converting enzyme (ACE) activities in the abdominal aorta and lungs of SHR administration of ProRJ were decreased compared to those of control at 6 hours after administration. IY, VY and IVY were detected in the abdominal aorta and lungs of SHR, and also in plasma by the HPLC method. The amount of aldosterone in plasma was significantly decreased from 1 hour to 4 hours after administration of ProRJ in SHR. According to these results, it was suggested that the antihypertensive effect of ProRJ in SHR is responsible for ACE inhibitory activity of IY, VY and IVY in ProRJ.
(Received Jul. 30, 2003 ; Accepted Oct. 20, 2003)

レニン-アンジオテンシン系 (RAS) ならびにアルドステロンは、カテコールアミンやバソプレッシンとともに生体内における血圧の調節や体内電解質の維持に重要な役割を果たしている。アンジオテンシノーゲンより生成するアンジオテンシン I (AngI) はアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) によりアンジオテンシ II (AngII) になる。AngII は、強い昇圧活性を有し、さらに副腎球状層からのアルドステロンの分泌を上昇させる。アルドステロンは、腎遠位尿細管からのナトリウム再吸収を増加させ、その結果、循環血漿量が増加し、血圧を上昇させる。また、現在ではカプトプリルやエナラプリルのような ACE 阻害剤やスピロノラクトン、トリウムテレンといった抗アルドステロン薬が高血圧治療薬の一つとして、臨床的に利用されている^{1)~3)}。このような医薬品には副作用があり、近年、副作用のない特定保健用食品のようなものが求められている。最近では様々な食品起源のタンパク質からも、ACE を特異的に阻害して血圧の上昇を抑制し高血圧を改善・予防しようとする目的で、ACE 活性阻害ペプチドが単離され、これ

らを機能性食品に応用する研究がなされている^{4)~7)}。

これまでに著者らは、機能性食品素材の一つとしてローヤルゼリー (RJ) に着目し、RJ に含まれるタンパク質をタンパク質分解酵素処理した RJ (ProRJ) の ACE 阻害活性が未処理 RJ に対して著しく増強されることを見出し⁸⁾、その関与する成分が Ile-Tyr (IY), Val-Tyr (VY) 及び Ile-Val-Tyr (IVY) 等のペプチド類であることを報告してきた⁹⁾。また、これらのペプチドは高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) に対して、経口投与により血圧降下作用を有することも確認している¹⁰⁾。

本報では、ProRJ の血圧降下作用機序を検討し、いくつかの知見を得たので、報告する。

実 験 方 法

1 ProRJ の調製

調製は鈴木らの方法⁸⁾に準じて行った。即ち、中国産生 RJ (固形分 32.7% (w/w)) 8 g に対して水 45 mL を加え、5 分間攪拌した。蛋白質分解酵素 (Protease N 「アマノ」 G, アマノエンザイム社製, ProN) を、至適 pH である

7.0 に調整後、25 mg 添加し、反応温度は 50℃ で、14 時間反応させた。反応後、98℃、5 分間の加熱により、酵素を失活させ、凍結乾燥処理して乾燥粉末 ProRJ を得た。

2 使用動物

本試験には、9 週令雄性 SHR を (株)星野実験動物飼育所より入手して使用した。動物は室温 23~25℃、相対湿度 40~70%、照明時間 12 時間/日 (7:00~19:00)、換気回数 15 回/時間の条件で、日本チャールズリバー社の固形飼料 CRF-1 を与えて飼育し、飲料水は水道水を自由に摂取させた。入荷後、2 週間予備飼育を行い、健康状態に異常を認めない動物を試験に用いた。

試験開始時の体重は、230~275 g であった。

本動物実験については、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府告示第 6 号) を遵守して実施した。

3 ProRJ 単回投与による各種臓器の ACE 活性及びペプチド定量

(1) SHR への投与及び解剖

9 週令の SHR を前記の環境で予備飼育した後、11 週令で収縮期血圧 (systolic blood pressure, SBP) が 185 mmHg 以上を示す動物を用いた。試験開始前の血圧及び体重を指標として、動物を 2 群 (対照群及び ProRJ 投与群、各 6 匹) に群分けした。血圧測定は、Softron BP system (Softron BP-98A Tokyo, Japan) を用い、動物を 37℃ で 10 分間保温して、非観血的に tail-cuff 法により行った。試験物質を精製水に溶解し、2 g/kg の投与量で単回経口投与した。対照群には同量の精製水を投与した。投与 6 時間後に開腹し、心臓より採血後、腹部大動脈、心臓、肺、肝臓、腎臓及び脳を摘出した。

(2) Triton X-100 可溶性画分の調製

各臓器より、Matsuda ら¹¹⁾ の方法に準じて Triton X-100 可溶性画分を得た。即ち、各臓器 1 g に対して 4 mL の BufferA (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.3 M NaCl) を加え、ホモジナイズした。ろ過後、33 000×g、90 分間遠心分離し、沈殿に 4 mL の BufferA を加えて懸濁し、33 000×g、90 分間遠心分離した。その後沈殿に 4 mL の BufferB (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.3 M NaCl, 0.5% Triton X-100) を加えて懸濁し、1 000×g、10 分間遠心分離した。さらに沈殿に上記所定量の BufferB を加え、2 時間抽出後、1 000×g、10 分間遠心分離した上清を Triton X-100 可溶性画分とした。

(3) ACE 活性の測定

各臓器の Triton X-100 可溶性画分の ACE 活性は、Matsuda ら¹¹⁾ の方法に準じて測定した。データは、1 ユニットを 1 分あたりの 1.0 mmol の hippuric acid 遊離に要する酵素量と定義し、タンパク定量はウシ血清アルブミン (BSA) をスタンダードとして Lowry 法にて測定した。データは比活性 (units/mg protein) で表した。尚、血漿

に関しては、units/L plasma で表した。

(4) 血漿及び各臓器中のペプチド定量

これまでに血圧降下ペプチドとして ProRJ より単離された IY, VY 及び IVY について、体内での挙動を調べるために血漿及び各臓器中のペプチド定量を行った。採取した血漿 5 mL を 5 分間煮沸し、その後 20% アセトニトリル (AcCN) 10 mL で抽出して、1 700×g、15 分間遠心分離を行い、上清を回収した。この操作を 3 度繰り返した。全ての上清を回収し、エバポレーターにより濃縮後、3% AcCN 1 mL に溶解した。この液を Sep-pakC18 (Waters 社製) で処理し、0.45 µm メンブレンフィルターでろ過後 HPLC により分析した。分析は CAPCELL PAK-AG ODS (資生堂製、4.6φ×250 mm) カラムを用い、0.1% TFA 含有水 (A 液) 及び 0.1% TFA 含有 AcCN (B 液) を用いたグラジェント (B 液 3%, 0→10 分, 3→11%, 10→90 分, 11→65%, 90→105 分, 65%, 105→110 分, 65→3% 110→125 分) で 1 分あたり 0.6 mL の流量でカラム温度 35℃、検出波長 220 nm にて行った。

4 ProRJ 単回投与による血圧及び血漿中のアルドステロン量への影響

9 週令の SHR を前記の環境で予備飼育した後、11 週令で SBP が 185 mmHg 以上を示す動物 (各 6 匹) を用いた。血圧測定は、上述の通り tail-cuff 法により行った。試験開始前の血圧及び体重を指標として 1 群 6 匹に群分けした。試験物質を精製水に溶解し、2 g/kg の投与量で単回経口投与した。投与前と投与後 1, 2, 4, 6 及び 8 時間後にそれぞれ SBP 値を測定後、開腹し血液を採取し、血漿を得た。得られた血漿のアルドステロン量を三菱化学 BCL にて、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法により分析した。

5 統計解析

ACE 活性測定試験において、対照群と投与群間における測定値の統計学的な差の検定は Student's t-test 法で行った。また、ProRJ 投与による血圧への影響及び血漿中の Ang、及びアルドステロン量測定試験においては、投与前と投与後の間で、Dunnett の多重比較検定を行った。得られた値は平均値±標準偏差 (mean±SD) で表記した。検定での有意水準は 5% 未満とした。

実験結果

1 ProRJ 単回投与による各種臓器の ACE 活性及びペプチド定量

(1) ACE 活性の測定

各種臓器のうち、腹部大動脈および肺において、ProRJ 投与群の ACE 活性が対照群よりも有意に低下した (Fig. 1-B)。血漿、心臓、肝臓、腎臓及び脳においては ACE 活性の低下は認められなかった (Fig. 1-A, B)。

(2) 血漿及び各臓器中のペプチド定量

ACE 活性の低下がみられた腹部大動脈及び肺について

各臓器中のペプチド定量を行った。その結果、ProRJ 投与群の腹部大動脈および肺において、IY、VY 及び IVY の 3 種 ACE 阻害ペプチドが検出された (Table 1)。また、ProRJ 投与群の血漿中においても 3 種のペプチドが検出された。VY に関しては、対照群においても腹部大動脈、肺及び血漿で検出された。また、ACE 活性の低下がみられなかった臓器に関してペプチド定量を行った結果、どのペプチドも検出されなかった。

2 ProRJ 単回投与による血圧及び血漿中のアルドステロン量への影響

ProRJ 投与後 1 時間に一過性的な血圧の降下がみられ、2 時間後にやや回復するものの、その後 8 時間まで血圧低下状態が持続した (Fig. 2)。血漿アルドステロン量は、投与後 1 時間から、初期値に対して有意に減少し、4 時間後まで、その状態が持続したが、その後回復し始め、8 時間後には、ほぼ初期状態に戻った (Fig. 3)。

考 察

腹部大動脈及び肺において ACE 活性は低下していた。この結果は SHR に酸乳を投与した場合の報告¹¹⁾と一致している。今回、腹部大動脈及び肺において ACE 活性が低下していたことは、ACE が細胞膜結合酵素であり、特に肺血管内皮細胞膜等に多く含まれていること¹²⁾、即ち、肺及

び大動脈付近において、ACE の作用が多く発現していることとも関連している可能性が考えられた。また、ACE 活性の低下がみられた臓器においてペプチド定量を行った結果、ProRJ 投与群の腹部大動脈及び肺において、IY、VY 及び IVY の 3 種 ACE 阻害ペプチドが検出された。また同様に血漿においても検出された。特定臓器の ACE 活性が低下し、ペプチドが検出されたことは、ProRJ 中のペプチドが消化管から吸収され、血中に移行し、特定臓器において ACE を阻害することで血圧降下作用を発現する可能性が示唆された。また、関ら¹³⁾によると、ジペプチドの小腸粘膜ペプチダーゼへの耐性に関しては N 末が重要であり、ACE 阻害活性には C 末が重要であると報告している。即ち、N 末に Val を有するジペプチドは小腸粘膜ペプチダーゼに対して耐性をもち、また、N 末に Ile を有するジペプチドにおいては、IY や Ile-Trp (IW) が小腸粘膜ペプチダーゼに対して耐性を有すると報告している。この報告により、筆者らの検討したペプチド (IY、VY) は経口摂取された後、分解されないで吸収されると推察される。

また、アルドステロンは腎遠位尿細管からのナトリウム再吸収を増加させ、血圧を上昇させる作用があることは知られている¹⁾。今回、ProRJ 投与後 1 時間に一過性の血圧の低下がみられたことは、アルドステロン量が、投与後 1 時間から有意に減少し、4 時間程度まで持続していたこと

Fig. 1 The ACE activity in plasma and organs from SHR after six hours administration of ProRJ
Significant differences from the control were evaluated by Student's *t*-test: *p < 0.05.

Table 1 The amounts of peptides in plasma and organs SHR after six hours administered ProRJ

	Aorta ($\mu\text{g/g}$ Aorta)		Lung ($\mu\text{g/g}$ Lung)		Plasma ($\mu\text{g/mL}$ plasma)	
	Cont.	ProRJ	Cont.	ProRJ	Cont.	ProRJ
VY	2.78 ± 0.53	3.17 ± 1.20	0.12 ± 0.04	0.37 ± 0.16	1.21 ± 0.09	2.08 ± 0.29
IY	N.D.	0.27 ± 0.14	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.44 ± 0.09	1.60 ± 1.37
IVY	N.D.	0.25 ± 0.13	N.D.	N.D.	0.25 ± 0.09	0.68 ± 0.22

N.D.; not detected

ProRJ: Protease treated Royal jelly

Data are expressed the mean $\pm$ SD.

Fig. 2 Effect of single oral administration of ProRJ on SBP in SHR

Each point with a vertical bar represents the mean $\pm$ SD. Significant differences from the administration 0 time were evaluated by Dunett test : ** $p < 0.01$.

Fig. 3 Changes of Aldosterone in plasma from SHR administration of ProRJ

Significant differences from the administration 0 time were evaluated by Dunett test : ** $p < 0.01$.

と関連している可能性が示唆され、持続的な血圧低下の一因でもあると推察された。アルドステロン量の変動に関しては、今後さらに検討を進める予定である。これらの結果より、ProRJ もしくはペプチド類は RAS- アルドステロン系に影響を及ぼし、血圧降下を誘導している可能性が示唆された。

要 約

SHR における蛋白質分解酵素処理 RJ の血圧降下作用機序を検討した。

1) SHR に対し、ProRJ (2g/kg) を経口投与したところ、投与 6 時間後の腹部大動脈及び肺において、顕著な ACE 活性の低下がみられた。

2) ACE 活性の低下がみられた腹部大動脈及び肺において、ACE 阻害ペプチドである IY, VY 及び IVY が検出された。また、血漿中にも ACE 阻害ペプチドが検出された。

3) ProRJ 投与により、投与後 1 時間から血漿中のアルドステロン量の顕著な減少がみられた。

ProRJ を投与した SHR の特定臓器において、ACE 活性の低下がみられ、また消化管より ACE 阻害ペプチドが検出されたことは、ProRJ 中に含まれるこれらのペプチドは、分解されずに吸収され、標的臓器に移行し、ACE 活性を低下させるという機構が推測された。その結果、ProRJ は RAS- アルドステロン系に影響を及ぼし、血圧降下が起こることが考えられた。

文 献

- 1) 片山茂裕, 板橋 明, 高血圧とレニン, *Biomedica*, **4**, 47-51 (1989).
- 2) 尾前照雄, 高血圧の治療・最近の進歩と考え方, *治療*, **71**, 1101-1104 (1989).
- 3) 松井利郎, 食品成分による高血圧疾患予防とその作用メカニズム, *バイオサイエンスとインダストリー*, **60**, 665-670 (2002).
- 4) Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A. and Nakano, T., Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Their Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats., *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 6245-6252 (2002).
- 5) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T., Purification and characterization of Angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk., *J. Dairy Sci.*, **78**, 777-783 (1995).
- 6) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箆島克裕, 松藤 寛, 箆島豊, イワシタンパク質加水分解物からの ANGI 変換酵素阻害ペプチドの調製とその分離, *農化*, **65**, 1223-1228 (1991).
- 7) Matsui, T., Chun-Hui, Li and Osajima, Y. Preparation and Characterization of Novel Bioactive Peptides Responsible for Angiotensin I-converting Enzyme Inhibition from Wheat Germ., *J. Peptide Sci.*, **5**, 289-297 (1999).
- 8) 鈴木和道, 吉田千絵, 徳永勝彦, 丸山広恵, 二村芳弘, 荒木陽子, 三島 敏, プロテアーゼによるローヤルゼリー分解物のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, *食科工*, **50**, 286-288 (2003).
- 9) 丸山広恵, 徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 荒木陽子, 二村芳弘, 三島敏, プロテアーゼ処理ローヤルゼリー中に含まれるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの単離同定, *食科工*, **50**, 310-315 (2003).
- 10) 徳永勝彦, 鈴木和道, 吉田千絵, 丸山広恵, 荒木陽子, 二村芳弘, 三島 敏, 高血圧自然発症ラットに対する蛋白質分解酵素処理ローヤルゼリーの血圧調節作用, *食科工*, **50**, 457-462 (2003).
- 11) Matsuda, O., Nakamura, Y. and Takano, T., Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats., *J. Nutr.*, **126**, 3063-3068 (1996).
- 12) Nakamura, Y., Matsuda, O. and Toshiaki, T., Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 488-489 (1996).
- 13) 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シ由来の ACE 阻害ペプチドである, *農化*, **69**, 1013-1020, (1995).

(平成 15 年 7 月 30 日受付, 平成 15 年 10 月 20 日受理)