

〈原著〉

ゴマ酢に血圧降下作用のあるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドが存在するか

金森 きよ子¹⁾、内田 杏子¹⁾、佐山 遥¹⁾、芝 紀代子¹⁾、和田 竜哉²⁾

Analysis of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from a sesame vinegar

Kiyoko Kanamori¹⁾, Kyoko Uchida¹⁾, Haruka Sayama¹⁾,
Kiyoko Shiba¹⁾ and Tatsuya Wada²⁾

Summary It is reported that sesame contains peptides having angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities and can inhibit the rise in blood pressure. In this study, we have examined whether sesame vinegar contains peptides with ACE inhibitory activities, which are produced by acetic acid fermentation of sesame residue. The sesame residue is obtained during the process of production of sesame oil by explosion of sesame seeds. The peptides to which five amino acids were bound were follows: (1) Ala-Val-Tyr-Pro-Thr (AVYPT), (2) Ala-Glu-Tyr-Pro-Thr (AEYPT), (3) Val-Val-Tyr-Pro-Thr (VVYPT), and (4) Val-Glu-Tyr-Pro-Thr (VEYPT). The IC₅₀ of the peptides for inhibiting ACE activity were 611 μ mol/L, 2042 μ mol/L, 228 μ mol/L, and 239 μ mol/L, respectively. This revealed that sesame vinegar has blood pressure lowering effects.

Key words: sesame vinegar, angiotensin I converting enzyme, peptides, anti-hypertension

I. 緒言

生体内においてレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系は、体液系における昇圧調節の中心的役割を担っている^{1,3)}。その作用機序は、肝臓で産生されたアンジオテンシノーゲンが腎由来の酵素であるレニンにより血中でアミノ酸

残基が10個のアンジオテンシン I に分解され、次いで主として肺組織に存在するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE, EC 3.4.15.1) の作用によってアミノ酸残基が8個のアンジオテンシン II へと代謝される。アンジオテンシン II は生体内で最も強力な昇圧物質である。そのため、ACE を阻害する低分子ペプチドはアンジオテン

¹⁾ 文京学院大学保健医療技術学部臨床検査学科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1
03-3811-0471

E-mail : kanamori@bgu.ac.jp

²⁾ 日本薬品株式会社

〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町1丁目7番7号
MID日本橋堀留町ビル8F

¹⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University
4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

²⁾ Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.

受付日：2019年1月20日

採択日：2019年2月18日

シンIIの生成を減少させることにより血圧降下作用を持つ。越智ら⁴⁾は、ゴマ蛋白質をサモアーゼ[®]により分解したペプチドでACE阻害活性を有するペプチドはMet-Leu-Pro-Ala-Tyr、Val-Leu-Tyr-Arg-Asp-Gly、Ile-Val-Tyrの3種類が含まれていると報告した。和田らは酢にできる伝統的な食材を検討していたところ、ゴマ油を搾取した後の廃棄されているゴマ残渣に着目し、酢酸発酵させてゴマ酢を製造した。今回、このゴマ酢にACE阻害活性を有するペプチドが含まれているかについて検討した。

II. 材料と方法

1. ゴマ酢の作製法

ゴマ油搾取後のゴマ残渣に米麴を加えて、諸味発酵させ続いてアルコール発酵をしてゴマ諸味酢を作製し酢酸発酵してゴマ酢を作製した。このゴマ酢は日本薬品株式会社より供与された。

2. HPLC試料調製

ゴマ酢はUltracel-5K (Amicon Co.) を用いて遠心濾過し分子量5,000以下の濾液を得た。さらにその濾液を0.45 μmフィルター (Millex-HV FilterUnit) で濾過した。HPLC第1ステップには、ゴマ酢濾液を超純水で75%に希釈してサンプルとした。第1ステップ分画の溶媒を遠心エバポレーター (タイテック (株)) で蒸発乾固し、超純水100 μLで溶解してACE阻害活性値を測定した。阻害活性値70%以上の分画の溶媒を遠心エバポレーターで蒸発乾固し、HPLC第2ステップ移動相A液100 μLに溶解して第2ステップのサンプルとした。

3. HPLC測定法

Niiらの方法³⁾ に準じて2ステップ法で行った。第1ステップは、逆相カラムMightysil RP-18 GP250-4.6 (関東化学 (株)) を用い、サンプル量50 μL、検出波長210 nm、カラム恒温槽温度40℃、流量は移動相A液 (アセトニトリル0.05% - TFA 0.1%) と移動相B液 (アセトニトリル80% - TFA 0.1%) の合計で毎分1.0 mL、40分の時点でB液が100%になるようリニアグラジェントにて測定した。第2ステップは、逆相カラムJ'sphere ODS-H80 250-4.6 (YMC Co.) を用い、サンプル量50 μL、検出波長210 nm、カ

ラム恒温槽温度40℃、流量は移動相A液 (アセトニトリル12% - TFA 0.1%) と移動相B液 (アセトニトリル24% - TFA 0.1%) の合計で毎分1.0 mL、30分の時点でB液が100%になるようリニアグラジェントにて測定した。

4. ACE阻害活性値測定

ACE Kit-WST (DOJINDO Laboratories) を用いて使用説明書に従って測定した。すなわちACEが合成基質 (3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly) を分解し、切り出されてきた3-Hydroxybutyric acidを酵素法で検出する方法である。96穴マイクロプレートに試料 (s) もしくは純水 (b1、b2) を20 μLずつ入れ、各ウェルに合成基質を20 μLずつ加えた。次にb2のウェルには純水を20 μL加え、他の試料溶液を入れたウェルとb1のウェルに酵素使用液を20 μLずつ加えた。37℃で60分間インキュベートして、全てのウェルに発色溶液を200 μLずつ加えた。室温で10分間インキュベートし、その後プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定して、ACE阻害活性値 (阻害率%) を下記の計算式により求めた。

$$\text{ACE阻害活性値 (阻害率 \%)} = \left[\frac{(A_{b1} - A_s)}{(A_{b1} - A_{b2})} \right] \times 100$$

5. ACE阻害活性IC₅₀算出法

濃度既知試料を超純水で1/5、1/5²、1/5³、1/5⁴、1/5⁵、1/5⁶と5倍希釈ずつして、それぞれのACE阻害活性値を求めた。濃度に対してのACE阻害活性値をプロットし阻害曲線を描き、阻害率50%に相当する試料濃度を求めた。ACE阻害活性値反応時の試料終濃度は、調整時の試料濃度の1/3であるため求めた試料濃度の1/3をACE阻害活性IC₅₀とした。

6. N末端アミノ酸配列解析

アミノ酸配列解析は (株) 島津テクノリサーチに委託した。すなわち島津プロテインシーケンサー (PPSQ-33A) を用い、エドマン分解法によりN末端からのアミノ酸配列解析をした。

7. ペプチド合成

ペプチド合成はGenScript (ジェンスクリプトジャパン (株)) に委託した。

III. 結果

1. ゴマ酢溶液のACE阻害活性IC₅₀

ゴマ酢原液を100 %として、ACE阻害活性 IC_{50} 算出法に基づき操作したところ、ACE阻害活性 IC_{50} は0.10 %であった。市販(ミツカン(株))の黒酢、純米酢、穀物酢それぞれの原液を100 %として同時に測定したところ、 IC_{50} はそれぞれ0.09 %、0.32 %、0.60 %であった。

2. HPLC分画

HPLC第1ステップは図1に示すように、流出時間 (Rt) 11.907分から18.897分までに36分画が得られた。各分画のACE阻害活性値を測定したところ、Rt: 14.540 分の分画No.13が71.3 %と

高値であった。そこで、この分画をHPLC第2ステップにかけたところ、Rt: 19.154 分の分画No.1がACE阻害率74.0 %と高値であった(図2)。HPLC第2ステップで分離した分画No.1のN末端アミノ酸シーケンス解析を行ったところ、1サイクル目にAla、Valが検出され、2サイクル目にVal、Gluが検出され、3サイクル目にTyr、4サイクル目にPro、5サイクル目にThrが検出された。

4. ペプチド合成

N末端アミノ酸シーケンス解析の結果より

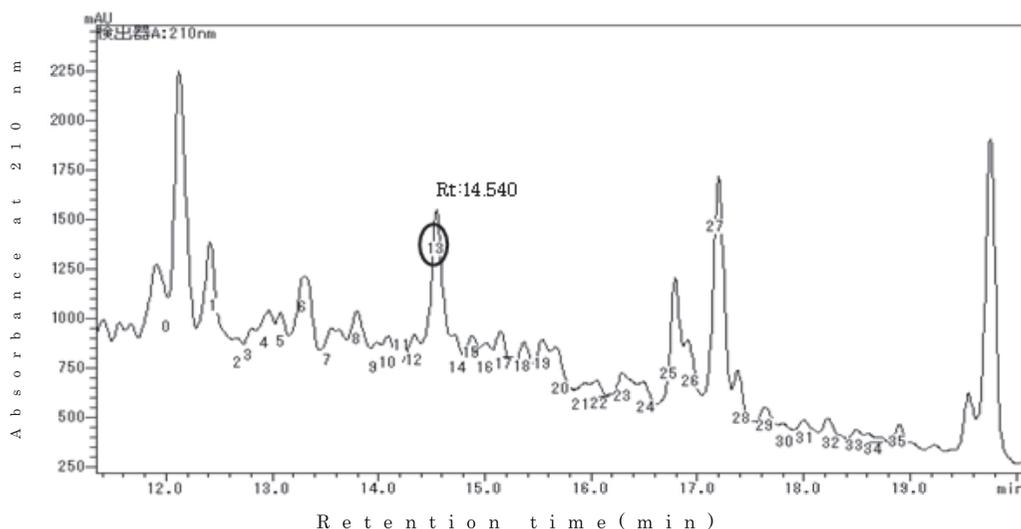


Fig. 1 First HPLC Step for the sesame vinegar in a Mightysil RP-18 GP250-4.6 Column.

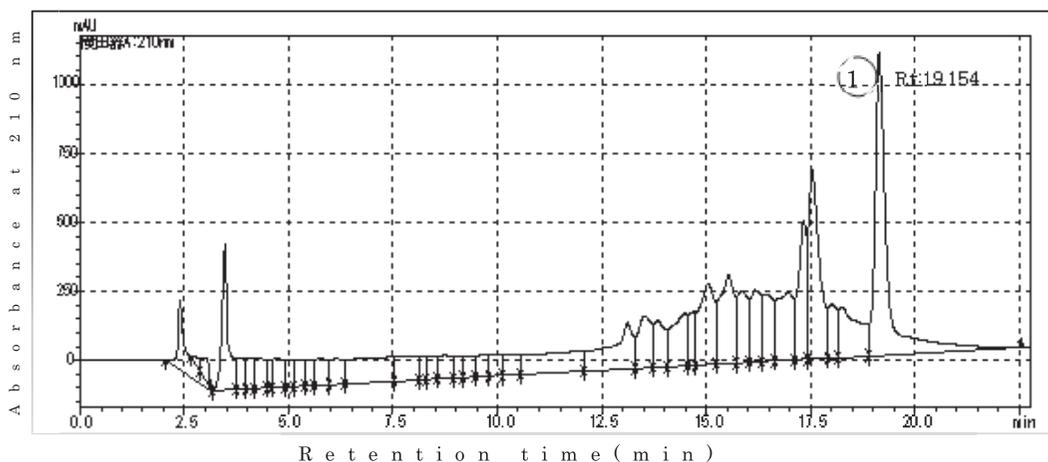


Fig. 2 Second HPLC Step for the sesame vinegar in J'sphere ODS-H80 250-4.6 Column.

AVYPT、AEYPT、VVYPT、VEYPTの4種類のペプチドが含有されていると考えられたため、4種類のペプチドを合成した。

5. ペプチド溶液のACE阻害活性 IC_{50}

合成ペプチドを超純水で溶解して、ACE阻害活性 IC_{50} を測定した。それぞれのACE阻害活性 IC_{50} はAVYPTで $611 \mu\text{mol/L}$ 、AEYPTで $2042 \mu\text{mol/L}$ 、VVYPTで $228 \mu\text{mol/L}$ 、VEYPTで $239 \mu\text{mol/L}$ であった。

Ⅳ. 考 察

ゴマ由来のACE阻害活性を持つペプチドは多く報告されている。越智らは、ゴマのタンパク質をサモアーゼ[®]により分解したペプチドの中から、ACE阻害ペプチドとしてMLPAY、VLYRDG、IVYの3種類のペプチドを得て、それぞれのACE阻害活性 IC_{50} は $5.8 \mu\text{mol/L}$ 、 $19.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $8.7 \mu\text{mol/L}$ であると報告している。またNakanoら⁶⁾は、ゴマ粉末からLVY、LQP、LKYがACE阻害ペプチドとして、それぞれのACE阻害活性 IC_{50} は $0.92 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.50 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.48 \mu\text{mol/L}$ であると報告している。さらに、脱脂ゴマにはLVY、LSA、LQP、LKY、MLPAYが含まれていると報告されている⁷⁾。

今回の研究では、脱脂ゴマ残渣を酢酸発酵したゴマ酢中のACE阻害活性を有するペプチドを検討した。ゴマ酢原液を100%としてACE阻害活性を比較するために、ACE阻害活性 IC_{50} を算出したところ0.10%であり、黒酢とほぼ同等、純米酢の約3倍、穀物酢の約6倍のACE阻害活性があった。また逆相カラムを用いたHPLC測定でゴマ酢を分画して、ACE阻害活性の高い分画から含有ペプチドを分析した。その結果、AVYPT、AEYPT、VVYPT、VEYPTの4種類のペプチドが確認された。それぞれのACE阻害活性 IC_{50} は $611 \mu\text{mol/L}$ 、 $2042 \mu\text{mol/L}$ 、 $228 \mu\text{mol/L}$ 、 $239 \mu\text{mol/L}$ であった。VVYPTとVEYPTは低いACE阻害活性 IC_{50} 値が得られたために、ゴマ酢由来の主要なACE阻害活性を有するペプチドであると確認できた。ゴマ酢由来のACE阻害活性ペプチドは、ゴマ由来のACE阻害活性ペプチドと比較するとアミノ酸配列が異なり、グルタミン酸とトレオニンがゴマ由来にはないゴマ酢由来に特徴的なアミノ酸であった。ACEに対する

阻害性はペプチドを構成するアミノ酸残基の種類、配列および鎖長によって大きく異なる。また、ゴマ酢は製造過程で脱脂ゴマを諸味発酵、アルコール発酵、酢酸発酵をしているため、プロテアーゼで処理したゴマ由来のペプチドとは異なったアミノ酸配列が得られたと考えられる。そこでゴマ由来のACE阻害活性 IC_{50} 値と比較するとゴマ酢のACE阻害活性 IC_{50} 値はかなり高値になり阻害が弱いペプチドであった。しかし、九州大学食品分析学研究室（松井利郎教授）のホームページのこれまでに報告された主なACE阻害ペプチド一覧⁸⁾をみると、ACE阻害活性 IC_{50} が $0.27 \sim 2500 \mu\text{mol/L}$ と幅広く分布した383個のペプチドが報告されている。これらのことから、AVYPT、AEYPT、VVYPT、VEYPTはゴマ酢由来のACE阻害活性を有するペプチドであると確認できた。

本研究の特徴は、ゴマ油搾取後の廃棄してしまうゴマ残渣を有効的に活用していることにあり、またそれを飲みやすいゴマ酢にしたところに特徴がある。

Ⅴ. 結 語

本研究の結果より、ゴマ酢はACE阻害ペプチドを含んでおり、血圧降下作用が期待できる機能性食品であるといえる。

IOC報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者（ら）の利益相反：なし

文 献

- 1) Yang HYT, Erdos EG, Levin Y: A Dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta*, 214:374-376, 1970.
- 2) Erdos EG, Skidgel RA: The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest*, 56:345-348, 1987.
- 3) Erdos EG: Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lawis K.Dahl memorial lecture. *Hypertension*, 16:363-370, 1990.
- 4) 越智修二, 森貴芳, 堀河満, 三上浩, 佐藤学: ゴマ蛋白由来、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド. 日本農芸化学大会講演要旨, pp142, 1995.
- 5) Nii Y, Fukuta K, Yoshimoto R, Sakai K, Ogawa T: Assay of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting

- activity based on the detection of 3-hydroxybutyrate with water-soluble tetrazolium salt. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 861-864, 2008.
- 6) Nakano D, Ogura K, Miyakoshi M, Ishii F, Kawanishi H, Kurumazuka D, Kwak C, Ikemura K, Takaoka M, Moriguchi S, Iino T, Kusumoto A, Asami S, Shibata H, Kiso Y, Matsumoto Y: Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70: 1118-1126, 2006.
- 7) 宮腰正純, 山本正次: ペプチドの定量方法. 特許第 4563764号. 2010-10-13.
- 8) 九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 食料化学工学講座 食品分析学分野. 『ACE阻害ペプチド』. http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/foodanalysis/reseach_4.html (参照: 2019-01-15)