

各種豆類のアンジオテンシン I
変換酵素阻害活性について

Angiotensin I - Converting Enzyme Inhibitory Activity
in Various Beans

吉 田 恵 子
Keiko YOSHIDA

四十九院 成子
Shigeko TSURUSHIIN
(東京家政学院短期大学)

I 緒言

近年食品について新しい概念が提言され注目されている。食品の質を決めるのは物質としての“特性”だけではなく、それを摂取する側の生体に対して及ぼす効果、すなわち“機能性”によって評価すべきであるという見方である。この立場から、“食品機能”という概念が形成され（昭和59年～61年度文部省科学研究費特別研究「食品機能の系統的解析とその展開」）食品の機能を三種に定義した。まず第一は身体構成素材及びエネルギー源としての栄養機能（一次機能）、第二は味覚や物性に関わる感覚機能（二次機能）に加えて、第三には食品の持つ生体調節機能（三次機能）が定義された¹⁾²⁾。

食品のうち、タンパク質の分解物であるペプチドについて、ジペプチドが示すアミノ酸より優れた腸管吸収能という一次機能や、オリゴペプチドの呈味性や食品物性などの二次機能と共に、生理活性ペプチドの三次機能が最近注目されてきた。食品に由来する生理活性ペプチドの存在形態としては以下の三つに大別される。①活性を有する形で食品素材中に含まれている顕在的な生理活性ペプチド、ミルクのホルモン類、豆類、穀類のプロテアーゼ阻害物質など。②加工、保蔵中や消化の過程で、活性を持たない食品タンパク質の部分加水分解物によって派生する潜在的な生理活性ペプチド。③加水分解以外の機構によって、食品加工、保蔵中に生成するペプチドなどである³⁾⁴⁾。特に②のペプチド類は新しく確立された概念であり、これらが様々な生理活性を持つことが明らかにされた。まずカゼインのプロテアーゼ加水分解物中に、様々な生理活性を持つペプチドの存在が明らかにされた。カルシウム吸収促進作用を有するペプチド、オピオイド活性を有するペプチド、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド、ファゴサイトーシス促進ペプチド、血小板凝集阻害ペプチド、尿素合成促進ペプチド、および線維芽細胞促進ペプチドなどが報告されている⁵⁾。カゼイン以外にも食品由来の生理活性物質とりわけアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドの発見が相次いで報告されている⁶⁾⁷⁾。高血圧症は現代成人病の最大疾患ともいわれ、その治療あるいは予防は緊急かつ重大な課題となっている。高血圧症のなかの大部分を占めるといわれている本態性高血圧の原因のなかで、レニン-アンジオテンシン系は重要な因子であると考えられている⁸⁾。このレニン-アンジオテンシン系でアンジオテンシン I 変換酵素 [EC3.4.15.1] (以下 ACE と略す) は腎臓での血圧調節機構の中心的役割を果たしている。この機構は以下のようである。肝臓で生成されるタンパク質であるアンジオテンシノーゲンが血液により運ばれ、腎臓内の酵素であるレニンの作用をうけて、アンジオテンシン I になる。これに ACE が作用すると、血管を収縮する作用のあるアンジオテンシン II になり、血圧を上昇させる。一方肝臓中に含まれるキニノーゲンは血液によって運ばれ、腎臓内の酵素であるカリクレインの作用を受け、血管を弛緩させて血圧を降下させる働きのあるブラジキニンに変化する。ACE はこのブラジキニンにも作用して、血管が弛緩するのを抑制するペプチドに変えるため、血圧上昇がおきる。従って、ACE の活性を阻害すれば昇圧性ペプチドであるアンジオテンシン II の生成を抑制し、降圧性

ペプチドであるブラジキニンの分解をも抑制して、血圧の降下が可能である。ACE 阻害剤は、ブラジキニン・ポテンシエーターとも呼ばれ、ブラジキニンが示すモルモットの回腸平滑筋収縮作用を増強させるペプチドとして、1970年頃蛇毒中から見いだされた。これらのペプチドがC末端に Pro-Pro または Ala-Pro の構造を有していることとなどから、Ondetti は、1977年カプトプリル (D-3-mercapto-2-methyl-propanoyl-L-proline) をデザインした¹⁰。その後この薬剤は経口可能かつ強力な降圧剤として実用化された。以来エナラプリルなど多数の化合物が開発され、さらに天然物からも ACE 阻害剤が多種みいだされるようになった。鈴木らは¹¹、日常摂取する食品の ACE 阻害能を測定し、食品中に種々の阻害物質が存在することを示唆した。現在までに報告されている食品中の阻害物質としては、米糠中のフィチン酸¹²、茶中のカテキン、テアフラビン¹³、醤油¹⁴、モロヘイヤ¹⁵中のニコチアミンなどがある。またタンパク質を各種プロテアーゼにより加水分解し、生じたペプチドの阻害活性についても数多く報告されている⁵⁾⁻⁸⁾。これらの中には *in vivo* における動物実験により、経口投与での血圧降下作用が実証されているものもある¹⁶⁾⁻²⁰⁾。それらのうち豆類については、河村ら²¹が大豆のペプシン加水分解物中のペプチドを単離し、末綱¹⁸は大豆のペプシン分解物を経口投与し、降圧作用があることを報告している。また緑豆 (*Vigna radiata*) のタンパク質をアルカリ性プロテアーゼなどで加水分解し、活性をもつペプチドを精製したとの報告もある²²⁾。著者らは、現在までもやしの原料豆であるブラックマッペのタンパク質および発芽過程でのその変化などについての研究を行ってきた。²³⁾⁻²⁶⁾。さらにブラックマッペのもつ機能性に注目し検討したところ、機能性の一つとしてのアンジオテンシン I 変換酵素の阻害活性が認められたことから、ブラックマッペは高血圧を予防する機能性を有することが明らかとなった²⁷⁾。さらにこの活性因子の検索を試みたところ、現在までに報告されている物質とは異質のものであることが示唆された。阻害因子の一つにはフィチン酸が関与していることは明らかとなった²⁸⁾が、これ以外にも阻害活性を有する因子が存在しているということが考えられた。

そこで、今回はブラックマッペ以外の各種豆類 (大豆, 黒大豆, 大福豆, 金時豆, えんどう豆, 小豆, マングビーン) についてもアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性を測定し、比較検討した。またこれらの阻害因子についても検討した。ブラックマッペにおいては、阻害因子の一つにフィチン酸が関与していることが明らかになった²⁸⁾ので各種豆類についてもフィチン酸の関与を検討した。

II 実験方法

1. 試料

豆として、大豆, 黒大豆, 大福豆, 金時豆, えんどう豆, 小豆, ブラックマッペ, マングビーンを用いた。

2. 試料の調製方法

各豆をミルで粉碎後、60メッシュのふるいをとらし、5倍量の超純水にて30分攪拌抽出した。その後10,000rpmで10分間遠心分離し、上澄液を試料液とした。

3. ACE 阻害活性測定法

Lieberman の測定法を改良した山本らの方法²⁹⁾に準じて行った。基質として50 μ Lの0.1Mホウ酸緩衝液 (pH8.4), 10 μ Lの4M塩化ナトリウム, 10 μ Lの50mM hippuril-L-histidil-L-leucine (HHL, ペプチド研究所), 10 μ Lの超純水をマイクロチューブに入れ、10 μ Lの試料液を入れた後、10 μ LのACE (和光純薬1.7munits) を加え、37°Cで45分間反応させ0.5N塩酸10 μ Lで反応を停止し、さらに酢酸エチル0.6mLを加えよく攪拌し、ACEにより遊離するヒプリル酸を抽出した。酢酸エチル層を0.4mLを分取し140°Cで10分間乾固後、1M塩化ナトリウム2.4mLを加えて溶解し228nmの吸光度を測定した。

阻害率は、試料液での吸光度をS、試料液の代わりに超純水を入れたときの吸光度をC、あらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光度をSB、CBとして阻害率を次式により求めた：阻害率 (%) = $\frac{\{(C-CB) - (S-SB)\}}{(C-CB)} \times 100$ 。各試料間の ACE 阻害活性の比較は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの反応液量を1 unitとして1gの豆中の総活性で比較した。

4. ゲルろ過クロマトグラフィー

SephadexG-100 のカラム (5.0 \times 57cm) に供し、高分子量域 (フラクション60~120) の画分と、低分子量域 (フラクション190~250) の画分に分けた。溶出液は0.01Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、流速60mL/hで溶し、1フラクション5.0mLずつ分取した。次に得られた活性画分 (フラクション190~240) を濃縮後、SephadexG-15 (Pharmacia) のカラム (1.8 \times 93cm) に供した。超純水を溶出液とし、流速20mL/hで溶出し、1フラクション4.0mLずつ分取した。

5. フィチン酸の抽出方法と定量

(1) フィチン酸の抽出

各豆を粉碎後一定量の超純水に溶解し、0.6N塩酸を加え、ホモジナイザーで十分粉碎混合した後、0.6N塩酸で50mLとし、室温で2時間振とう後、30,000 \times gで20分遠心分離して上澄液を得た。このうち10mLを0.1N水酸化ナトリウム溶液でpH7~8になるまで中和した。これを陰イオン交換脂 (AG1-X4, Bio-Rad 社) カラムに供し1 mL/minの流速でフィチン酸を吸着させ、0.2M塩化ナトリウム、水それぞれ20mLで洗浄後、40mLの2N塩酸でフィチン酸を溶出させた。これを減圧乾固し1 mLの超純水に溶解した。

(2) フィチン酸の定量³⁰⁾

フィチン酸抽出液3 mLに Wade 試薬 (0.03%塩化鉄と0.3%スルホサリチル酸) 1 mLを加え、5秒間混合した後、遠心分離し500nmで測定した。それぞれについて総活性とフィチン酸が占める活性を比較した。

Ⅲ 実験結果および考察

1. 各豆の粗抽出液での阻害活性の比較

図-1に各豆の総阻害活性を示した。えんどう豆が一番強く、小豆類である小豆、ブラックマッペ、マングビーンは同様の値を示し阻害活性は弱めであった。

2. 各豆の SephadexG-100, G-15での溶出曲線

図-2に SephadexG-100での、図-3に SephadexG-15での溶出曲線を示した。

SephadexG-100はゲル濾過の担体でタンパク質に対する分画分子量は150,000から4,000であり、高分子量のタンパク質と、低分子量の物質との分画が可能である。いずれの豆においても、フラクション100本目に大きなピークが観察された。これは分子量160,000位に位置し、これらは豆の主要タンパク質と推察された。阻害活性を有する画分はいずれの豆でも200本目から300本目に溶出した。分子量が既知であるリボヌクレアーゼ（分子量13,700）の溶出位置はフラクション200本目であったことから、この阻害因子は低分子量のものであると示唆された。

そこでさらに分画分子量1,500以下である SephadexG-15のを用い分画した。その溶出曲線を図-3に示した。フラクション20本目が分子量830のフラビン アデニン ジヌクレオチドの溶出位置であり、40本目が分子量430の hippuril-L-histidil-L-leucine であった。各豆とも、20本目と40本目のあいだに活性画分が溶出していることから、すべての豆とも阻害活性因子は分子量400から800のものであると推察された。またすべて同位置に溶出していることより、同じ活性因子であると思われた。著者らはブラックマッペについてこの因子の検索を行い、HPLC で種々のカ

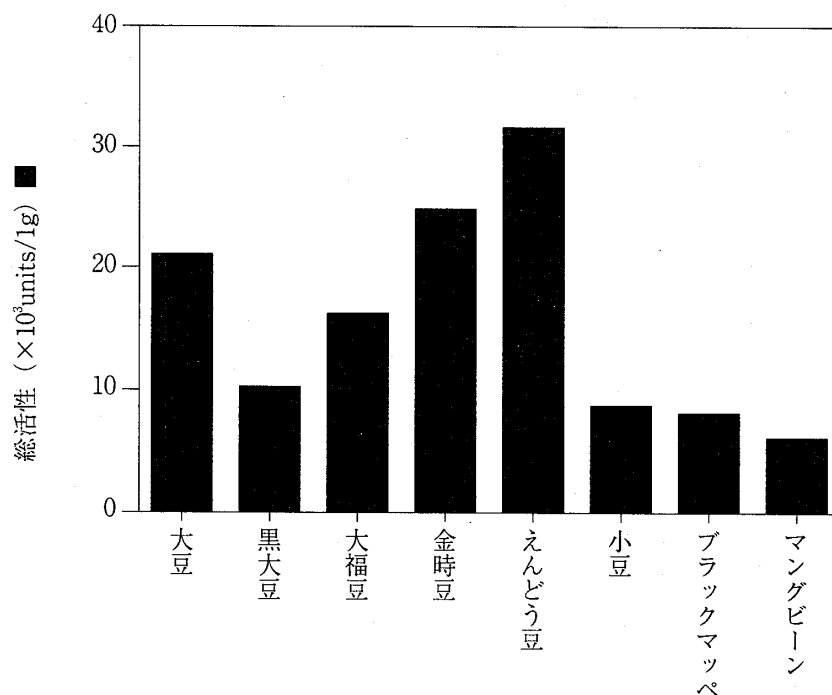


図-1 各種豆類のACE阻害活性

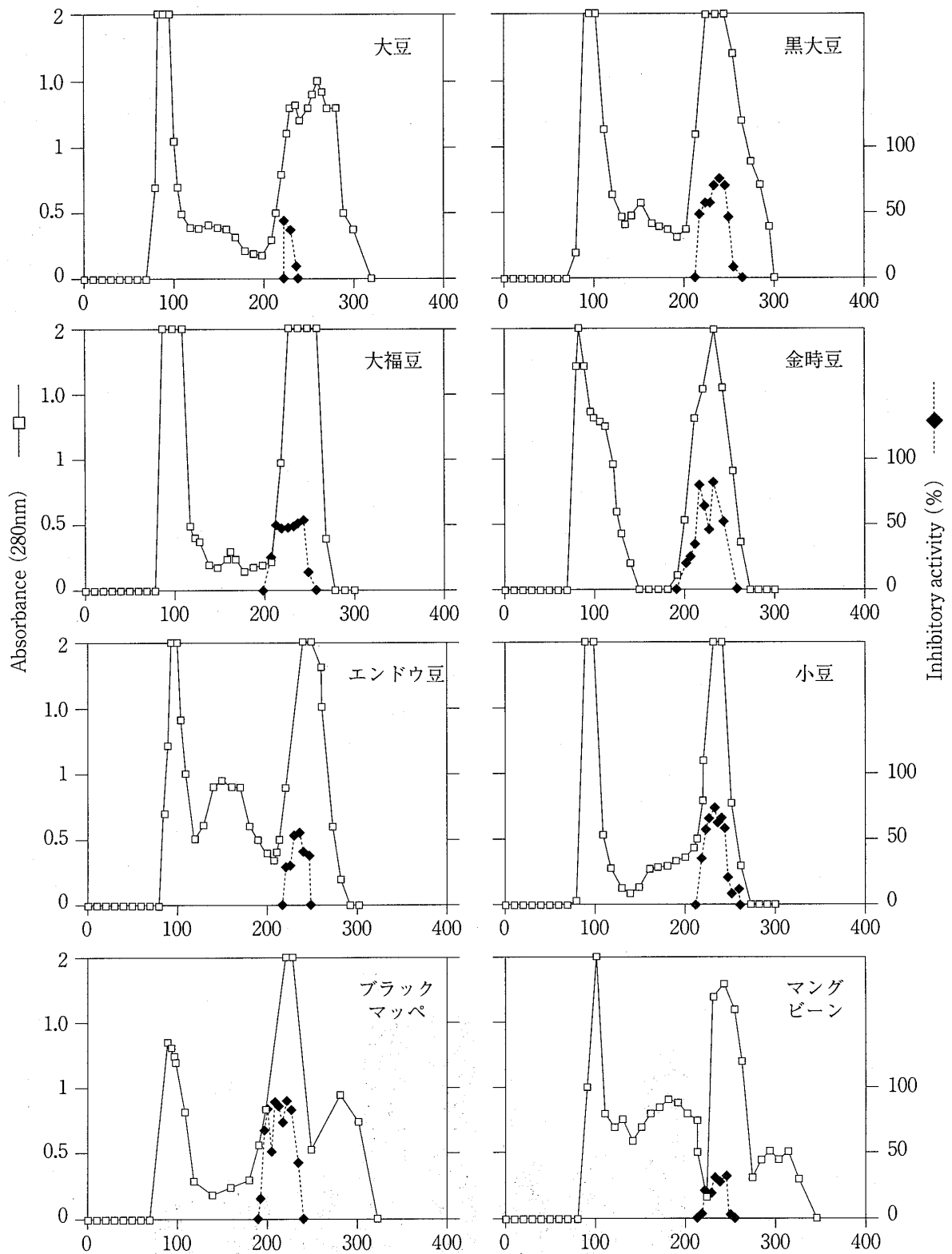


図-2 各種豆類の Sephadex G-100での溶出曲線

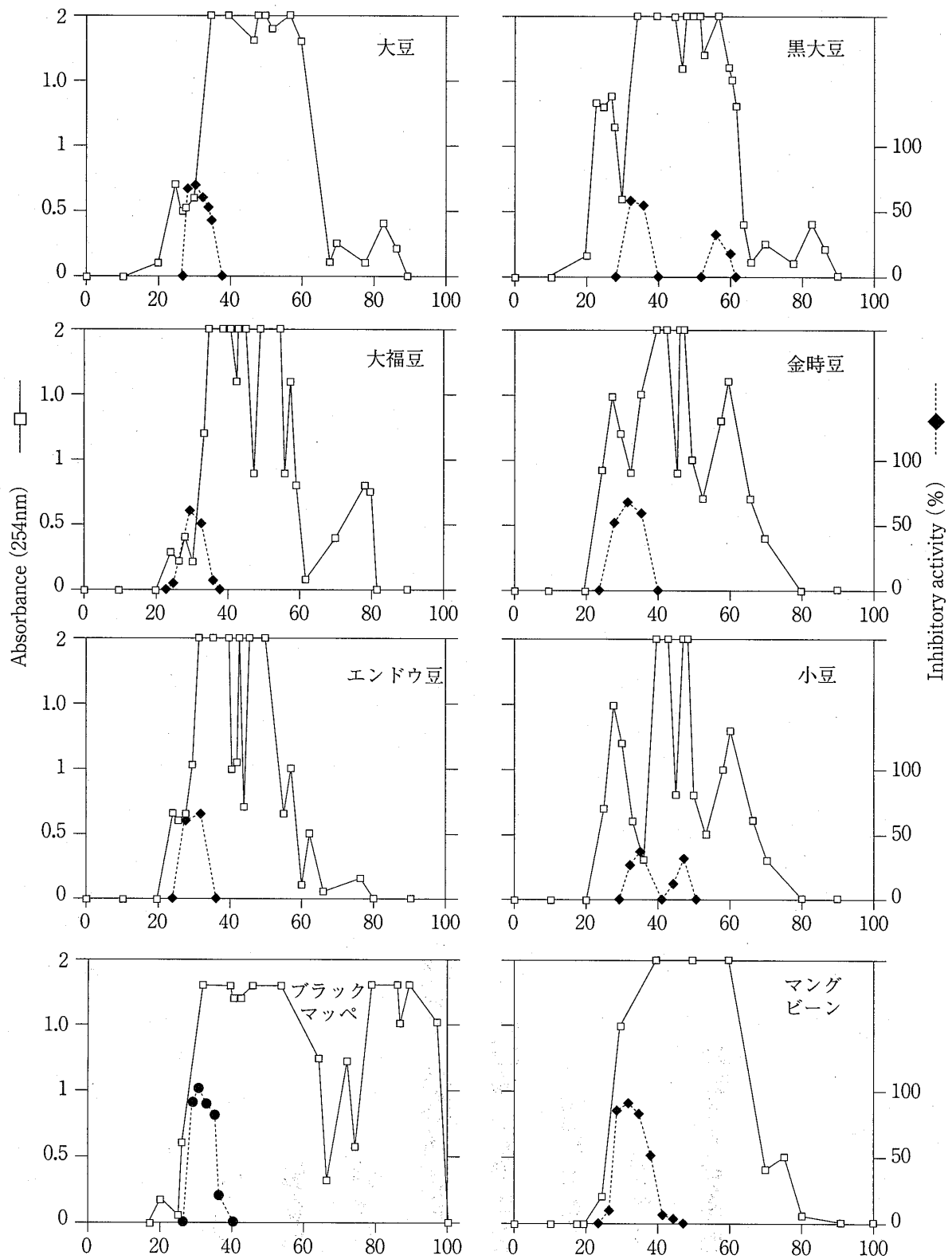


図-3 各種豆類の Sephadex G-15での溶出曲線

ラムを用い精製を試みたが、精製はされなかった。そこで分子量から、またそのキレート作用から ACE を阻害すると思われるフィチン酸に注目したところ、フィチン酸が阻害活性因子の一つであることがわかった²⁸⁾。そこで各豆よりフィチン酸を抽出し定量して、阻害活性との関連を調べた。

3. 各豆のフィチン酸量と総活性との比較

図-4 に各豆類のフィチン酸量と、総阻害活性を示した。総活性の強い豆においてはフィチン酸量も多い傾向を示した。

各種豆類に ACE を阻害する活性が認められ、その活性の強さは豆により異なっていたが、ゲル濾過による溶出位置から、阻害因子は同じ物質であろうと推察された。この因子のひとつにフィチン酸を推定し検討したところ、阻害活性の弱い豆類はフィチン酸量も少なく、阻害活性の強い豆類のフィチン酸量は多いという傾向を示したが、顕著な相関は認められなかった。総阻害活性の値と、フィチン酸が占める活性の値を比較すると、その割合はかなり少ないことから、阻害因子の一つはフィチン酸であるとも考えられるが他の因子の存在が示唆された。今後豆類に含まれる ACE 阻害因子の解明を試みたいと考えている。

IV 要約

日常食する各種豆類（大豆、黒大豆、大福豆、金時豆、えんどう豆、小豆、ブラックマッペ、マングビーン）について、ACE 阻害活性を測定し、その活性因子の検索を行ったところ以下のこ

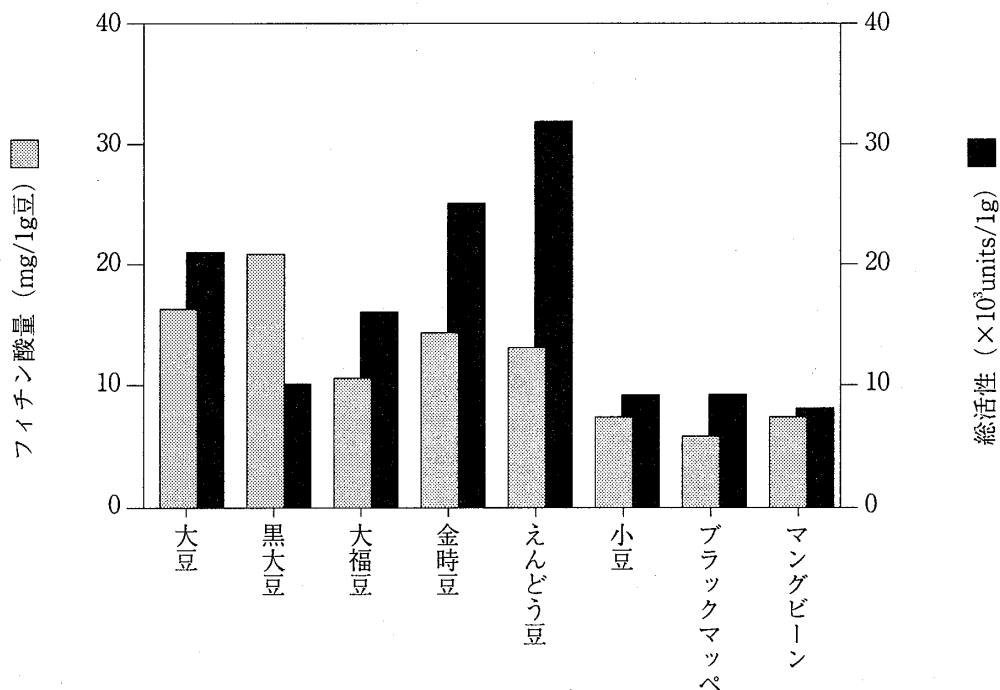


図-4 各種豆類のフィチン酸量とACE阻害活性

とが明らかとなった。

1. えんどう豆, 大豆類, いんげん豆類において, 強い阻害活性が認められ, 小豆類である小豆, ブラックマッペ, マングビーンは弱い傾向を示した。
2. ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて活性画分の分子量を推定したところ, すべての豆とも, 分子量400~800前後であった。
3. 各豆のフィチン酸量を測定し, 阻害活性との相関を検討したところ, フィチン酸量の多い豆は阻害活性が強く, 少ない豆は弱い傾向を示したが, 総阻害活性のなかで, フィチン酸の占める割合は少ないことより, 他の阻害因子の存在が示唆された。

本研究は平成10年度私学研修福祉会の国内研修, および(財)飯島記念食品科学振興財団平成14年度学術研究助成により行われた。

V 文献

- 1) 千葉英雄, 吉川正明 (1987) 化学と生物 5, 396.
- 2) 千葉英雄, 荒井綜一 (1988) 化学と生物 26, 34~40.
- 3) 吉川正明 (1988) 食品と開発 23, 39
- 4) 吉川正明, 千葉英雄 (1988) 臨床栄養 72 (5), 467~474
- 5) 丸山進 (1989) 食品タンパク質からの血圧降下ペプチドの生成. バイオサイエンスとインダストリー 47, 1182~6.
- 6) 河村幸雄 (1990) 食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド. 食品工業 30 (2), 20~9.
- 7) 吉川正明, 千葉英雄 (1990) 食品由来の生理活性ペプチド. 食品工業 30 (4), 20~5.
- 8) 村元学, 河村幸雄 (1991) 米タンパク質と米タンパク質由来の抗血圧上昇性 (アンギオテンシン変換酵素阻害) ペプチド. 食品工業 34 (22), 18~26.
- 9) 金勝慶, 山本研二郎, 深水昭吉, 宮崎均, 石堂正美 (1992) *Cell Science* 8, 146~167.
- 10) Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active anti hypertensive agents. *Science*, 196, 441~4.
- 11) 鈴木健夫, 石川宣子, 目黒熙 (1983) 食品中のアンジオンシン I 変換酵素阻害能について. 日本農芸化学会誌 57, 1143~6.
- 12) 斉藤義幸, 中村桂子, 川戸章嗣, 今安聡 (1992) 清酒, および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質. 日本農芸化学会誌 66, 1081~7.
- 13) 原征彦, 松崎妙子, 鈴木健夫 (1987) 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. 日本農芸化学会誌 61, 803~8.

- 14) Kinoshita E, Yanakoshi J, Kikuti M (1993) Purification and identification of an angiotensin I - converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biotech. Biochem* **57**, 1107~10.
- 15) Kimoto K, Kuroda Y, Yamamoto J, Murakami T, Aoyagi Y (1998) Purification and identification angiotensin I - converting enzyme inhibitor from moroheiya. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo* **4**, 223~6
- 16) 末綱邦男, 箴島克裕 (1989) イワシ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. *日本栄養・食糧学雑誌* **42**, 47~54.
- 17) Miyoshi S, Kaneko T, Yoshizawa Y, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S (1991) Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1407~8.
- 18) 末綱邦男 (1991) イワシ筋肉, 大豆, 豚プラズマ由来トリペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤としての SHR に対する降圧効果. *基礎と臨床* **25** (7), 249~65.
- 19) Astwan M, Wahyuni M, Yasuhara T, Yamada K, Tadokoro T, Maekawa A (1995) Effects of angiotensin I - Converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 425~9.
- 20) 長谷川昌康 (1992) かつお節由来の血圧降下ペプチド. *食品と開発* **27**, 43~45.
- 21) 河村幸雄, 杉本俊男 (1991) アンジオテンシン変換酵素阻害物質. *公開特許公報平* 3-167198
- 22) 洪水宏之, 大亦志朗, 鈴木浩之, 津坂伸幸 (1995) 緑豆蛋白質加水分解物より得られたアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害ペプチド. *日本農芸化学会誌* **69**, 140.
- 23) 吉田恵子 (1996) ブラックマッペタンパク質の分画とそれらの性状について. *土浦短期大学紀要* **24**, 60~8.
- 24) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保 (1986) 黒緑豆タンパク質画分とその発芽過程における変化について. *日本栄養・食糧学雑誌* **39**, 415~21.
- 25) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペグロブリンの性質. *日本栄養・食糧学会誌* **50**, 73~6.
- 26) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペ発芽体の各部位におけるタンパク質および酵素活性の変動について. *日本栄養食糧学会誌* **50**, 153~9.
- 27) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1998) ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索. *日本栄養・食糧学会誌* **51**, 195~200.
- 28) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 島村理美子, 田所忠弘, 前川昭男 (1999) ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索 (第2報). *日本栄養・食糧学会誌* **52**, 153~56
- 29) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎 (1980) 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討.

日胸疾会誌 18, 297~303

- 30) Latta, M. and Ahderinne, R. (1980) A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food. Chem.* **28**, 1313~5.