

## わかめペプチドによる 高血圧自然発症ラットの血圧降下作用\*<sup>1</sup>

末綱邦男\*<sup>2</sup>・前川敬世\*<sup>3</sup>・陳 俊栄\*<sup>4</sup>

### Antihypertensive Effect of Wakame Peptide on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats\*<sup>1</sup>

Kunio Suetsuna\*<sup>2</sup>, Keisei Maekawa\*<sup>3</sup>, and Jiun-Rong Chen\*<sup>4</sup>

We examined an angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of the hot water extract of wakame *Undaria pinnatifida*. Ten dipeptides were isolated from the extract by several steps of chromatography, and their amino acid sequence were Tyr-His, Lys-Trp, Lys-Tyr, Lys-Phe, Phe-Tyr, Val-Trp, Val-Phe, Ile-Tyr, Ile-Trp and Val-Tyr. Both single oral administration and repeated oral administration of synthetic Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-His and Lys-Tyr decreased significantly the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) when compared with before administration.

#### 1 緒言

食品の持ついろいろな生体調節機能、いわゆる第3次機能が注目される近年、高血圧予防の観点からACE阻害ペプチドの血圧降下作用が注目を浴びている。高血圧症は、生活習慣病の中で最も頻度の高い疾患の一つであり、その治療あるいは予防は重大な課題となっている。高血圧症の中の大部分を占めるといわれている本態性高血圧症の原因の中で、レニン・アンジオテンシン系 (RA系) におけるアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) は重要なものである。すなわち、不活性なアンジオテンシン I はACEにより血管壁平滑筋収縮作用のあるアンジオテンシン II へと変換され血圧が上昇する。したがって、このACEを阻害すれば、昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II の生成を抑制し、血圧の降下が可能である。<sup>1)</sup>

一方、わかめは褐藻類の海藻でわが国では古くから食用に供されてきたが、近年、わかめに含まれるアルギン酸や食物繊維が高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた *in vivo* 実験で降圧効果のあることが確認されている。<sup>2)</sup> しかしながら、乾燥わかめ当たりタンパク質を15%含む<sup>3)</sup> といわれていることから、食物として摂取されて生じるACE阻害ペプチド成分に降圧効果をもっている可能性がある。これまで、我々はわかめの酵素分解物中に強いACE阻害活性を示す4種類のテトラペプチドを分離・同定してきた。<sup>4)</sup> 今回、わかめの熱水抽出物から10種類のACE阻害ジペプチドを分離し、この中でACE阻害活性の高かった4種類のジペプチドについて、高血圧自然発症ラット (SHR) に対する血圧降下作用を検討したのでここに報告する。

2002年11月8日受付. Received Nov. 8, 2002.

\* 1 魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究—VI

(Studies on Biologically Active Peptide Derived from Fish and Shellfish—VI)

\* 2 独立行政法人 水産大学校 食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

\* 3 高田製薬株式会社 研究開発部 (Department of Research and Development, Takata Seiyaku Co. Ltd.)

\* 4 台北医学大学保健栄養系 (School of Nutrition Health Science, Taipei Medical University ; E-mail : syunei@tmn. edu. tw)

## 2 実験方法

### 2.1 わかめ熱水抽出およびACE阻害ペプチドの単離・精製

徳島県鳴門市大毛島地区において、1998年1月から6月にかけて採集した天然産わかめを十分洗浄後、風乾して乾燥わかめとした。乾燥わかめを細かく刻み、バインダーにかけてメッシュ30前後のわかめ粉末とした。わかめ粉末66.2gに脱イオン水2lを加えて攪拌した後、熱水抽出(93°C, 20min)した。冷却後、ガーゼろ過して得たわかめ熱水抽出液740mlを透析チューブ(36inch, 分画分子量1万, 和光純薬工業社製)に詰め、脱イオン水6lに対して2日間透析した。透析外液を減圧濃縮して500mlとし、Dowex50W(H<sup>+</sup>)カラム(φ4.5×43cm)に負荷した。カラムを脱イオン水で十分洗浄後、2N NH<sub>4</sub>OH 500mlで溶出し、減圧濃縮でアンモニアを除去して濃縮液40mlを得た。濃縮液4mlを予め0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したSephadex G-25カラム(φ2.3×140cm)に負荷し、流速30ml/h, 各画分量8.6mlで分画した。Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーを繰り返して大量分取して得たペプチド画分を、再度Dowex50W(H<sup>+</sup>)カラムクロマトグラフィーして脱塩操作を行い凍結乾燥後、ペプチド粉末を得た。ペプチドの定量は、牛血清アルブミンを標準物質としてLowry法<sup>5)</sup>に準じて行った。

上記ペプチド粉末について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるペプチドの分離・精製を行った。ペプチド粉末7mgを0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液25μlに溶解しHPLCに負荷した。カラムとしてDevelosil ODS-5(φ4.6×250mm, 野村化学社製)を用い、溶離液として0.05%TFA溶液から、0.05%TFAを含む25%アセトニトリル(AcCN)溶液への濃度勾配法(流速; 1.0ml/min, 検出波長; 220nm)で行った。このHPLCにより出現した100個前後のピークフラグメントを分取、凍結乾燥してACE阻害活性を測定後、活性の高いピークについて再度HPLCした。カラムとしてAsahipack CG-320HQ(φ7.6×300mm, 昭和電工社製)を、溶離液には5%AcCNを含む50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.8)を用いて、流速1.5ml/min, 検出波長215nmでACE阻害ペプチドの分離を行った。

### 2.2 ACE阻害ペプチドのアミノ酸配列決定とペプチド合成

HPLCで分離精製したACE阻害ペプチドのアミノ酸分

析は、常法により塩酸加水分解後、PICO-TAG<sup>TM</sup>アミノ酸分析計(Waters社製)を用いて行った。ACE阻害ペプチドのアミノ酸配列は、自動エドマン分解により477A型プロテインシーケンサー(Applied Biosystem社製)を用いて決定した。

ACE阻害ペプチドの合成は以下のように行った。すなわち、原料としてのアミノ酸、合成試薬はすべてApplied Biosystem社製を用い、ペプチド自動合成装置430A型(Applied Biosystem社製)を使用して固相法によるペプチド合成を行った。固相担体としてはスチレンジビニルベンゼン重合体(ポリスチレン樹脂)をクロロメチル化した樹脂を用いた。C末端側のアミノ酸からクロロメチル樹脂に反応させてペプチド結合樹脂を得た。この場合、C末端アミノ酸はt-ブトキシカルボニル基(t-Boc基)で保護されたt-Bocアミノ酸を用いた。次に、このペプチド結合樹脂をエタンジチオールとチオアニソールからなる混合液に懸濁し、攪拌(室温, 30min)後、氷冷下でTFAを加え、さらに攪拌(10min)した。この混合液にトリフルオロメタンスルホン酸を滴下し、攪拌(室温, 30min)した後、無水エーテルを加えて生成物を沈殿させて分離し、その沈殿物を無水エーテルで数回洗浄した後、減圧下で乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ペプチドは蒸留水またはメタノールに溶解した後、逆相カラムCAPCELL PAK SG-120(φ10×250mm, 資生堂社製)を用いたHPLCにより精製した。溶離液として0.05%TFA溶液から、0.05%TFAを含む25%AcCN溶液への濃度勾配法によって、流速4.0ml/min, 波長220nmで検出した。最大吸収を示した溶出画分を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

### 2.3 ACE阻害活性の測定

Liebermanの方法を改良した山本らの方法<sup>6)</sup>に準じて行った。すなわち、サンプル液50μlに2.5μ ACE(ウサギ肺由来, Sigma社製)溶液100μlを加え、37°C, 3分間保持後、0.4M NaClを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.3)に溶解した12.5mM Hippuryl-His-Leu(ペプチド研究所製)基質溶液100μlを加え、37°C, 60分間反応させた後、0.5N HCl 250μlを加え反応を停止した。さらに、酢酸エチル1.5mlを加えよく攪拌、遠心分離(2,000rpm, 10min)した後、酢酸エチル層1.0mlを分取、蒸発乾燥後、1M NaCl 1.0mlを加えて溶解し、ACEにより遊離する馬尿酸量を228nmの吸光度で測定した。サンプル液での吸光度をEs, サンプル液の代わりに緩衝液を加えた時の値を

Ec, 予め反応停止液を加えて反応させた時の値をEbとして, 阻害率 (%) =  $\{(Ec - Es) / (Ec - Eb)\} \times 100$  で求めた。サンプル液のACE阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値) は, サンプル液の濃度を変化させて阻害率 (%) を測定し, 阻害率50%を示す反応液中の阻害物質濃度で示した。

## 2.4 血圧降下作用実験

実験動物は, 埼玉実験動物供給所より雄性高血圧自然発症ラット (SHR) を購入し, 1週間の予備飼育後, 収縮期血圧 (SBP) が160mmHg以上で, 体重280~330gのラット3匹を1群として用いた。上記2.2で合成したジペプチドLys-Tyr, Tyr-His, Ile-TyrおよびPhe-Tyrを0.9%生理食塩水3mlに溶解し, 金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。単回経口投与 (50mg/SHR体重kg) による経時的降圧試験として, 投与前, 投与後3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24および27時間の収縮期血圧 (SBP), 平均血圧 (MBP) および拡張期血圧 (DBP) を, 非観血式小動物用尾動脈血圧測定装置 (UR-5000型, ウェダ製作所製) で測定した。さらに, 連続経口投与 (10mg/SHR体重kg, 1週間) による経時的降圧試験として, 投与前, 連続投与後1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8および9週目の血圧値 (SBP, MBP, DBP) を測定した。各測定毎5回繰り返して行い, 得られた測定値の最高最低値を棄却し, 3回の平均値から血圧値 (SBP, MBP, DBP) を算出し, 3群の平均値士標準誤差で示した。統計処理として, 投与前 (0時間または0週) 血圧値に対して, 各時間または各週ごとの有意差はt検定を行い,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  で判定した。

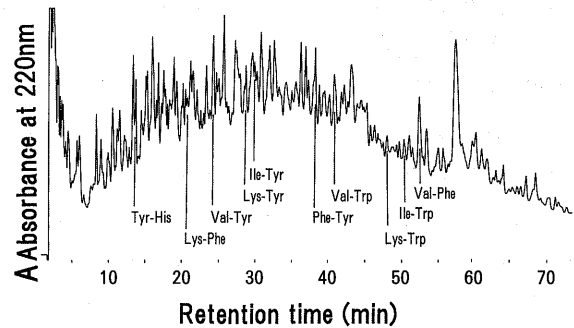


Fig. 1. Reverse-phase HPLC of wakame peptide powder. Column; Develosil ODS-5 (0.46 × 25cm). Solvent system; (a) 0.05% trifluoroacetic acid, (b) 25% acetonitrile in 0.05% TFA. Linear gradient from (a) to (b) for 3 h.

## 3 結果

### 3.1 わかめ熱水抽出液からのACE阻害ペプチドの分離・同定

供試わかめ粉末66.2gを用いて, 熱水抽出 (93°C, 20min) し, 透析, Dowex50W(H<sup>+</sup>)吸着・脱着を行うことによりわかめペプチド粉末7.2g (粉末当たり回収率10.9%) を得た。さらに, 逆相HPLCによりACE阻害ペプチドの分離・精製を行ったところ, Fig. 1ならびにTable 1に示す10種類のACE阻害ジペプチドを同定した。このうちACE阻害活性の高かったIle-Tyr (IC<sub>50</sub> 値: 2.65 μM), Phe-Tyr (3.74 μM), Tyr-His (5.1 μM) およびLys-Tyr (7.74 μM) についてSHRを用いた降圧試験を行った。

Table 1. Analytical data and ACE inhibitory activity of the isolated dipeptides by HPLC

Retention time (min) <sup>1)</sup>	Dipeptide	Amino acid ratio <sup>2)</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>3)</sup>
13.8	Tyr-His	Tyr 1.03, His 0.81	5.1
21.3	Lys-Phe	Lys 0.85, Phe 1.12	28.3
24.3	Val-Tyr	Val 1.27, Tyr 1.14	11.3
28.8	Lys-Tyr	Lys 0.79, Tyr 1.08	7.74
30.0	Ile-Tyr	Ile 1.26, Tyr 0.97	2.65
38.3	Phe-Tyr	Phe 1.08, Tyr 1.16	3.74
40.9	Val-Trp	Val 1.04, Trp 0.92	10.8
48.1	Lys-Trp	Lys 0.87, Trp 0.99	0.8
50.3	Ile-Trp	Ile 1.33, Trp 0.94	12.4
52.4	Val-Phe	Val 1.02, Phe 1.04	43.7

All amino acids were of L-configuration.

<sup>1)</sup> Expressed from the results of HPLC (Fig.1).

<sup>2)</sup> Hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 24h.

<sup>3)</sup> The concentration inhibiting half activity of the ACE.

### 3.2 わかめペプチドのSHRを用いた血圧降下作用実験

(1)単回投与試験；合成した各ACE阻害ジペプチド（50 mg/SHR体重kg）を単回経口強制投与した後、投与後27時間までの血圧値（SBP, MBP, DBP）の変化を見た（Fig. 2）。Ile-Tyr投与では、投与後3時間でSBPが最高34mmHgまで下がり、その後12～15時間で徐々に回復した。Phe-Tyr投与では、投与後3時間で最高46mmHg下がり、その後27時間までその降圧効果は持続した。Tyr-His投与では、投与後3時間で最高50mmHg下がり、その後6～12時間で回復した。Lys-Tyr投与では、投与後6時

間で最高45mmHg下がり、その後12～21時間で徐々に回復した。これらの結果、Tyr-His投与は、3時間で血圧が下がった後、やや早い時間で血圧値が回復したのに対し、Ile-Tyr投与ならびにPhe-Tyr投与では、3時間で血圧が下がった後、その後の血圧値の回復が緩やかであった。一方、Lys-Tyr投与では他の3種類のジペプチドに比べ、血圧の下がりが遅く6時間で下がった後、徐々に回復したが、その回復も遅れる傾向にあった。

(2)連続投与試験；合成した各ACE阻害ジペプチド（10 mg/SHR体重kg）を1週間、連続経口強制投与した後、9週までの血圧値（SBP, MBP, DBP）の変化を見た

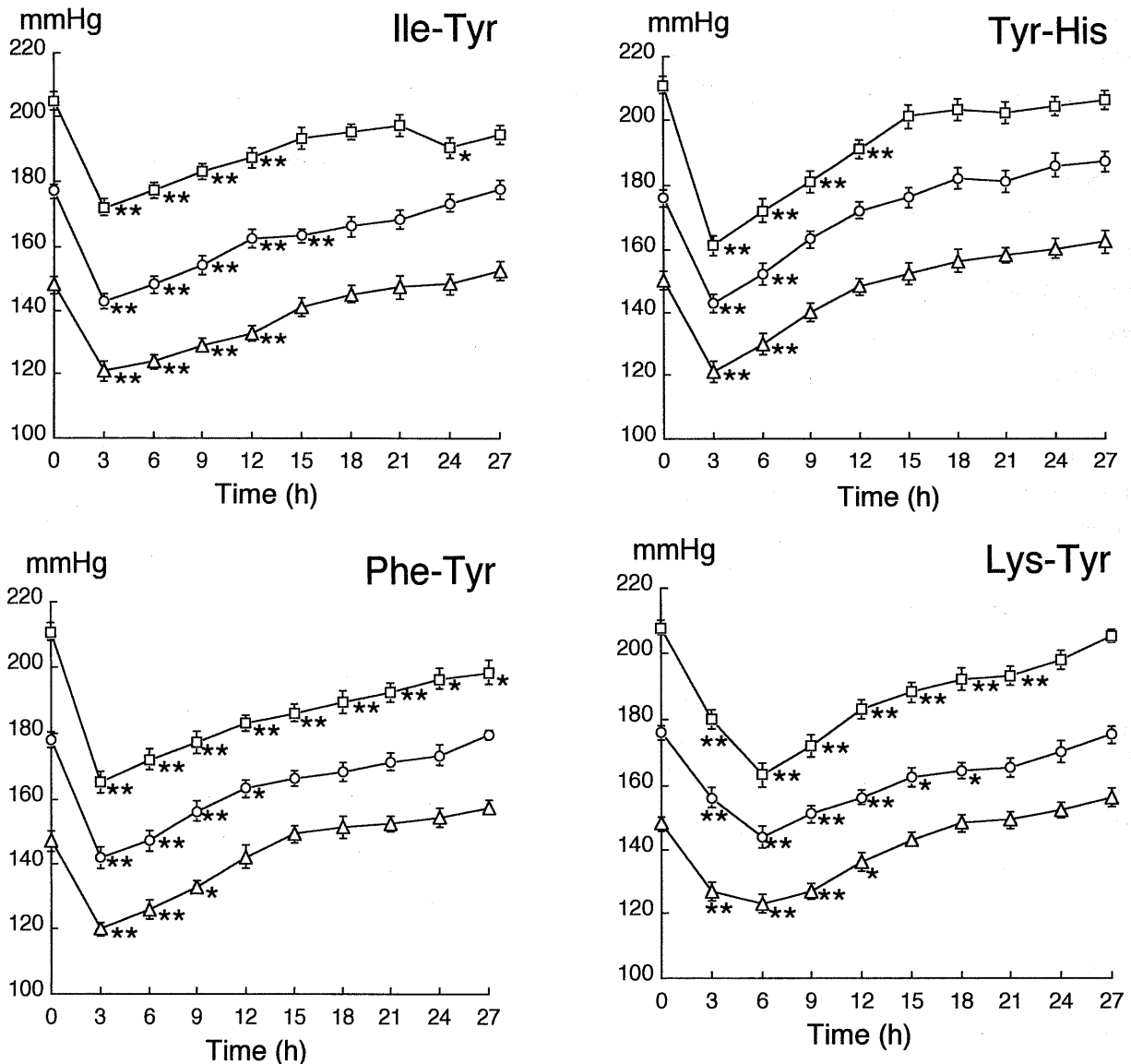


Fig. 2. Effect of single oral administration of the synthetic peptides, Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-His and Lys-Tyr, on the blood pressure of SHR. Vertical bars represent the mean  $\pm$  S.E. (n=3 per group). Significantly different from the blood pressure before administration (\*p<0.05, \*\*p<0.01). -□- SBP (systolic blood pressure). -○- MBP (mean blood pressure). -△- DBP (diastolic blood pressure).

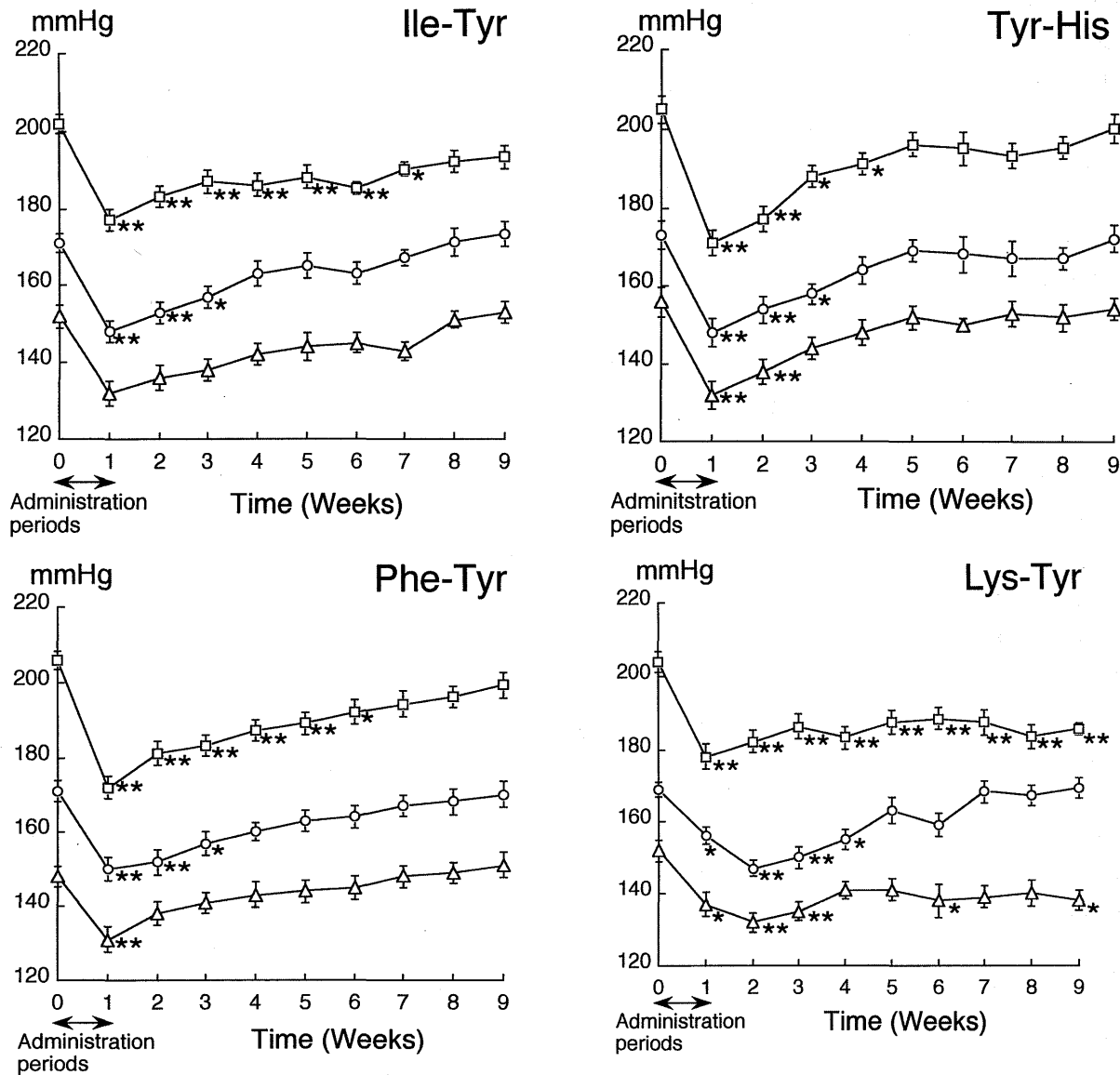


Fig. 3. Effect of repeated oral administration of the synthetic peptides, Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-His and Lys-Tyr, on the blood pressure of SHR. Vertical bars represent the mean  $\pm$  S.E. (n=3 per group). Significantly different from the blood pressure before administration (\*p<0.05, \*\*p<0.01). -□- SBP (systolic blood pressure). -○- MBP (mean blood pressure). -△- DBP (diastolic blood pressure).

(Fig. 3)。Ile-Tyr投与では、1週間連続投与後、SBPが最高25mmHg下がり、その後その降圧効果は7週間続いた。Phe-Tyr投与では、1週間連続投与後、最高34mmHg下がり、その降圧効果は6週間まで続いた。Tyr-His投与では、1週間連続投与後、最高34mmHg下がったが、4週間でその血圧値は回復した。Lys-Tyr投与では、1週間連続投与後、SBPが最高26mmHg下がり、その後9週間たっても血圧値は回復せず、降圧効果は持続した。但し、Lys-Tyr投与のMBPならびにDBPに関しては、1週間連続投与後、2週間で最高22mmHgならびに最高20mmHg下がり、SBPと同様の挙動を示さなかった。

#### 4 考 察

これまでのわかめペプチドに関する一連の研究において、著者らは、わかめをペプシン分解して得られるエキス成分をSP-SephadexC-25( $H^+$ )カラムクロマトグラフィーして得られるSP-I画分から、Ala-Ile-Tyr-Lys ( $IC_{50}$  値;  $213\mu M$ ), Tyr-Lys-Tyr-Tyr ( $64.2\mu M$ ), Lys-Phe-Tyr-Gly ( $90.5\mu M$ ), Tyr-Asn-Lys-Leu ( $21\mu M$ ), Ala-Val-Tyr-Gly ( $4.7\mu M$ ), Tyr-Tyr-His ( $0.96\mu M$ ), Tyr-Tyr-Phe ( $4.4\mu M$ ) を、また、SP-II画分から Asp-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro ( $5.6\mu M$ ), Ile-Gly-Phe-Pro-Leu ( $7.3\mu M$ ),

Ile-His-Val-Pro-Pro (16.4  $\mu$ M), Ile-Thr-Pro-Pro-Pro (5.8  $\mu$ M), Ile-His-Val-Pro-Asn (16.2  $\mu$ M), Ala-Ile-Leu-Pro-Pro (5.3  $\mu$ M), Val-Gly-Tyr-Pro-Pro (14.7  $\mu$ M), Lys-Ala-Val-Pro-Gly (31.3  $\mu$ M), Leu-Pro-Pro-Ile-Ala (8.7  $\mu$ M), Leu-Pro-Ile-Ala (13.6  $\mu$ M), Leu-Pro-Val-Pro-Pro (3.9  $\mu$ M) 等を分離・同定してきた。<sup>7)</sup> しかしながら、これらACE阻害ペプチドが体内で血圧降下作用を発揮するためには消化管プロテアーゼに耐性があり、そのまま吸収されなければならない。一方、これらプロテアーゼ分解物から得られるACE阻害ペプチドの回収率は極めて低く、血圧降下食品に適用するにはACE阻害ペプチドの大量取得法を検討する必要がある。そこで今回、わかめ熱水抽出物からのACE阻害ペプチドの分離・精製を検討したところ、プロテアーゼ分解法より回収率に優れ、かつ短鎖ペプチドとしてのACE阻害ジペプチドを多く含むわかめペプチドを得た。多糖体を多く含む海藻類からタンパク質およびペプチド成分を得るには熱水抽出や溶媒抽出が利用されるが、特に短鎖ペプチドを得る目的には有効な取得法と言える。

Cheung et al.<sup>8)</sup> は、カルボキシル基末端にTrp, Phe, Tyrなどの芳香族アミノ酸とProを、また、アミノ基末端にValやIleなどの疎水性アミノ酸を有するジペプチドにACE阻害活性が高いことを報告しているが、今回、わかめ熱水抽出物より分離・同定した10種類のACE阻害ジペプチドもこのことを裏付けている。

一方、高血圧症は、現在我が国の人口の約20%にあたる2,000万人以上が罹患していると推定され、そのうちヒト高血圧の90%以上は、いわゆる本態性高血圧であるといわれている。本態性高血圧は、遺伝的素因をもとに、ストレスや肥満などの種々の環境因子が作用することによって発症する多因子疾患である。今回、本態性高血圧のモデル実験動物であるSHRを用いて、比較的ACE阻害活性の高かったIle-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-HisおよびLys-Tyrの血圧降下作用をみた。Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-Hisの単回投与実験では、投与後3時間で血圧値(SBP, MBP, DBP)は最低を示し、その後、徐々に回復傾向にあったが、Lys-Tyr投与では、投与後6時間で血圧の最低値を示し、その後、徐々に回復した。この傾向は、連続投与実験においても同様の結果を示した。すなわち、Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-Hisの連続投与実験では、連続投与後1週間で血圧値

(SBP, MBP, DBP)は最低を示し、その後、徐々に回復傾向にあったが、Lys-Tyr投与では、投与2週間で血圧値(MBP, DBP)は最低を示し、その後9週間たっても投与前の血圧値(SBP)に回復しなかった。Lys-Tyrが他のACE阻害ジペプチド(Ile-Tyr, Phe-Tyr, Tyr-His)に比べてACE阻害活性が低いにもかかわらず、*in vivo*における活性が高かったこと、すなわち血圧降下作用が大きかったということは、Lys-Tyrが他の3種類のACE阻害ジペプチドに比べて、消化管プロテアーゼ耐性が強いといえる。

これまで特定保健用食品の中で「血圧が高めの方の食品」として、酵素分解カゼイン、発酵酸乳、カツオ節酵素分解物、イワシ酵素分解物が認定されており、固有のアミノ酸配列をもつACE阻害ペプチドを含むとされている。<sup>9)</sup> 今後、これらACE阻害ペプチドとの比較において、わかめペプチドのACE阻害活性および降圧効果を検討する予定である。

## 文 献

- 1) 鈴木紘一：プロテアーゼと生態機能—分子から病態まで—, 現代化学増刊22, 東京化学同人, 東京, 1993年, pp.238-244.
- 2) Y.Yamori, Y.Nara, T.Tsubouchi, Y.Sogawa, K.Ikeda and R.Horie: *J. Hypertension*, **4**, 449-451 (1986).
- 3) 科学技術庁資源調査会：食品分析表, 第9版, 第一出版, 東京, 1990, p.181.
- 4) K.Suetsuna, and T.Nakano: *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 450-454 (2000).
- 5) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall: *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 6) 山本節子・戸井田一郎・岩井和郎：日胸疾会誌, **18**, 297-303 (1980).
- 7) 末綱邦男・陳 俊栄・前川敬世：日本食品科学工学会第49回大会講演集, p.50, 名古屋, 2002.
- 8) H.S. Cheung, F.L. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo, and D.W. Cushman: *J. Biol. Chem.*, **255**, 401-407 (1980).
- 9) 針生 仁：日水誌, **68**, 710-713 (2002).