

イカいしるに含まれるACE阻害活性ペプチドの単離とその血圧降下作用

笹木哲也* 河道真理** 道島俊英* 中村静夫**
油谷美幸*** 徳田耕二*** 小柳喬**** 榎本俊樹****

緒言

石川県奥能登地方では、「いしる、いしり、よしる、よしり」(以下、いしる)と呼ばれている魚醤油が古くから造られている。富山湾に面した能登内浦地区ではイカ、日本海に面した能登外浦地区ではイワシを主に原料として生産されている。地元ではいしり鍋や一夜干しなどの料理に使われてきたが、近年ではエスニック料理の調味料、大手食品メーカーの隠し味など用途が多様化している。我々は、いしるの成分や機能性について詳細な解析を行ってきた。その結果、いしるには種々のアミノ酸、ペプチド、タウリンなどの栄養成分が多く含まれ、優れた機能性(抗酸化性、血圧降下作用)を示すことを明らかにしてきた。

血圧降下作用は乳飲料、カツオブシなどの様々な発酵食品で確認されている。そのメカニズムは、発酵食品に含まれるペプチドが、血圧上昇の原因となるアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)の働きを阻害するためであることが明らかになっている。発酵食品から単離したACE阻害活性ペプチドは、サプリメントなどの機能性食品として活用されている。これら機能性食品と同様に、いしるは血圧降下作用を持つ機能性素材として活用可能である。

そこで、本研究では、イカいしるに含まれる新規のACE阻害活性ペプチドを単離、同定し、動物実験による血圧降下作用の効果を検証した。

ACE阻害活性ペプチドの単離

イカいしるをアセトニトリルで溶媒抽出し、エバポレーターで溶媒を留去した。残留物を超純水で溶解後、限外ろ過で2000 Da以下の成分を回収し、さらに電気透析処理により100-1000 Daの成分を回収した。得られた処理液を凍結乾燥し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。分離カラムはSephadex LH-20カラム(18 × 700 mm)を用い、流速10-20ml/hで4mlごとにフラクションを採取し、各フラクションの吸光度(216, 280 nm)およびACE阻害率を分析した。得られたクロマトグラフィーを図1に示す。フラクション48が最も高いACE阻害率を示した。このフラクションは216 nmの波長を吸収し、280 nmの波長を吸収しないことから、芳香族化合物を持たないペプチドであることが推察された。

ゲルろ過クロマトグラフィーのフラクション48を凍結乾燥後、液体クロマトグラフィーによる精製を行った。分離カラムはODSカラム(20 × 250 mm)を用い、溶離液は超純水-アセトニトリル混合液を用い、アセトニトリルの混合割合を0%から60分間で50%へ変化させた。流速5 ml/minにて1分ごとにフラクションを採取し、各フラクションの吸光度(216 nm)およびACE阻害率を分析した。

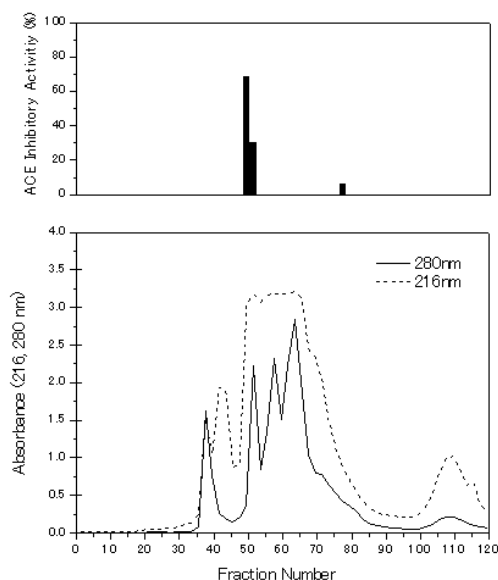


図1 ゲルろ過クロマトグラフィー

得られたクロマトグラフィーを図2に示す。溶出時間38分のフラクションがACE阻害活性を示した。そこで、38分のフラクションを分取し、エバポレーターでアセトニトリルを留去後、溶液の凍結乾燥を行った。

ペプチドの構造決定とACE阻害活性

精製試料の構造をペプチドシーケンサーにより分析した結果、その構造はロイシン-アラニン-アルギニン(LAR)であることが明らかとなった。このトリペプチドは、ACE阻害活性を示す新規のペプチドである。LARのアミノ酸配列を論文検索サイトで検索した結果、イカの眼球組織にLARの配列が存在することが判明した。イカいしるは眼球を含むイカの内臓を原料に使用しており、今回単離したLARもイカの眼球に由来するものと予想できる。

LARのACE阻害活性を評価した結果、 IC_{50} は2.5 μ Mであった。これまでの報告で、魚醤油から単離されたペプチドのACE阻害活性は1.8 - 147 μ Mであり、LARは従来のペプチドの中でも高い活性を示すことが明らかとなった。

動物実験による血圧降下作用

単離されたトリペプチドLARの血圧降下作用を検証するため、高血圧自然発症性ラット(SHR)による動物実験を行った。LAR合成品、生理食塩水、およびジペプチドのバリン-チロシン(VY)を、各グループ6匹からなるSHRにそれぞれ経口投与した。VYは、イワシより単離された既に血圧効果作用が確認されているペプチドであり、本実験でポジティブコントロールとして用いた。また、ペプチドの投与量は10 mg/kgとした。ペプチド投与後のSHRの血圧変化を図3に示す。LAR投与グループにおいて、投与後4-12時間のSHRの血圧は優位に降下した。LARは低分子であるため、腸で容易に吸収され、強い血圧効果作用を示したものと考えられる。一方、VY投与グループにおいて、SHRの血圧は4時間のみ降下した。LARの血圧効果作用は、VYよりも強い作用を示すことが明らかとなった。この結果は、イカいしるより単離したLARが、血圧降下の機能性食品として活用できる可能性があることを示唆している。

結言

- (1) イカ魚醤油(いしる)より新規のアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)阻害ペプチドLeu-Ala-Arg (LAR)を単離した。
- (2) LARのACE阻害活性 IC_{50} は2.5 μ Mであり、これまでに報告されている魚醤油中のACE阻害活性ペプチドの中でも高い阻害活性を示した。LARを高血圧自然発症ラットに経口摂取した結果、血圧降下作用を示した。

論文投稿

Japanese Journal of Complementary and Alternatibe Medicine 2013, vol. 10, no. 1, p.45-49.

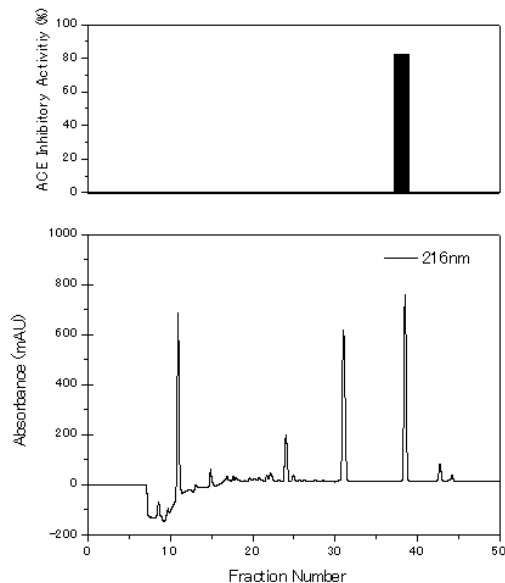


図2 液体クロマトグラフィー

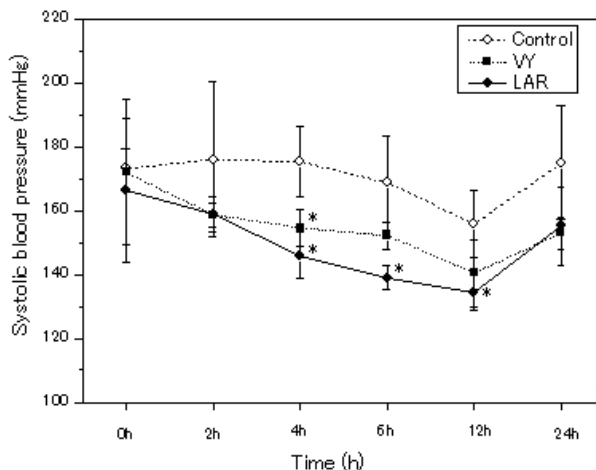


図3 ペプチド投与後のSHRの血圧変化

*印を有する場合は、コントロールグループと優位差あり(P<0.05)。

この結果は、イカいしるより単離したLARが、血圧降下の機能性食品として活用できる可能性があることを示唆している。