

カキ (Oyster) のシリアチン高含有リンタンパク質の アンジオテンシン1変換酵素阻害活性について

玉 利 正 人

長崎大学教育学部食物学教室
(平成8年3月15日受理)

Angiotensin 1-Converting Enzyme Inhibiting Activity of Aminoethylphosphonic Acid-Containing Phosphoproteins of the Oyster, *Crassostrea gigas*

Masato TAMARI

Department of Food and Nutrition, Faculty of Education,
Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan
(Received March 15, 1996)

Abstract

Author describe a method of extraction and partial purification of phosphoproteins from *Oyster, Crassostrea gigas*. The extraction of the phosphoproteins was carried out with hot water and with 0.02M NaHCO₃ solution containing 5% NaCl.

The *Oyster, Crassostrea gigas* contained two kinds of phosphoproteins in the hot water extracts (P-1, P-2) and three kinds of phosphoproteins in the alkaline soluble extracts (P-3, P-4 and P-5).

The amino acid compositions of the phosphoproteins of the hot water extracts were characterized by relatively high percentage for glutamic acid and aspartic acid. The amino acid compositions of the each phosphoproteins of the alkaline soluble extracts were characterized by relatively high percentage for glutamic acid and threonine.

The phosphono-compounds was found in the all phosphoproteins. It has been demonstrated that the peak 1, 2, 3, 4 and 5 contained the phosphonoproteins and that about 78%, 50%, 82%, 72% and 51% as phosphonate-phosphorus of total phosphorus. The inhibition of angiotensin 1 converting enzyme (ACE) by the five phosphoproteins

was investigated in vitro. The IC_{50} values of these phosphoproteins (P-1~P-5) for ACE were 1.43, 0.27, 0.45, 0.33 and 0.17, respectively.

The peak 5 had the most inhibition activity and showed 0.17 (mg protein /ml) inhibition against ACE at IC_{50} value.

緒 言

アンジオテンシン変換酵素 (EC 3.4.15.1, ACE) は、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II に変換する酵素で、この酵素はレニン・アンジオテンシン系において、血圧と体内の水分量と電解質のバランスを調節する重要な働きをしている⁽¹⁻³⁾。

したがって、この ACE を阻害することによって、血圧上昇が抑制されることから、ACE 阻害剤の開発研究がタンパク質の加水分解物のペプチドを中心に活発に行われている⁽⁴⁻¹⁵⁾。しかしながら、リンタンパク質 (ホスホ型及びホスホノ型⁽¹⁶⁾) 及びリンペプチド (ホスホ型及びホスホノ型) について、ACE 阻害活性を調べた報告は、見あたらない。

前報⁽¹⁷⁾において著者らは、食用貝の「ウチワエビ」と「アサリ」のリンタンパク質を分離し、部分精製を行い、この物質が高い ACE 阻害活性を有することを明らかにした。本報告では、カキ (Oyster) から熱水及びアルカリ抽出によって 5 種類のリンタンパク質を抽出・分離し、これらの部分精製物について、アミノ酸組成、リン含量 (C-O-P 態と C-P 態) 及び ACE 阻害活性を調べたので、それらの実験結果について報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

試料は、カキ (Oyster, *Crassostrea gigas*) の可食部の凍結乾燥粉末を用いた。凍結乾燥は、品温 -30°C 、棚温 30°C 、トラップ温度 -30°C 、真空度 0.2 Torr の条件で約 12 時間で終了した。

2. リンタンパク質の熱水及びアルカリ抽出

(a) リンタンパク質の熱水抽出

カキの凍結乾燥物 (5 g) をビーカーに入れ 100ml の蒸留水を加え 10 分間、 80°C で加熱した。冷却後、3000r.p.m で 15 分間の遠心分離を行い、上清と沈澱を得た。次に、上清はセルロース膜 (visking 膜) を用い、温度 5°C の条件下において 2 l の蒸留水に対して 24 時間透析を行った。この透析内容物 (S-1 とした) と外容物について、それぞれ凍結真空乾燥を行い、この乾燥粉末をカラムクロマトグラフィーによるリンタンパク質の分離用試料とした。

(b) リンタンパク質のアルカリ抽出

カキの凍結乾燥物 (5 g) をビーカーに入れ、5% 塩化ナトリウムを含む 0.02M 炭酸水素ナトリウム溶液 200ml を加え 10 分間攪拌後、3000r.p.m で 15 分間遠心分離を行い、上清と沈澱を得た。沈澱物は再度同じ溶液 200ml に懸濁し、同じ操作を行い上清と沈澱を得た。

この 2 回の処理によって得られた上清をセルロース膜 (visking 膜) を用い、温度 5°C の

条件下において2ℓの蒸留水に対して24時間透析を行った。この透析内容物(S-2とした)と外容物について、それぞれ凍結真空乾燥を行い、この乾燥粉末をカラムクロマトグラフィーによるリンタンパク質の分離用試料とした。

3. S-1及びS-2からリンタンパク質の分離

熱水抽出及びアルカリ抽出で得られたそれぞれの抽出物(S-1, S-2)を、0.02M炭酸水素ナトリウムの少量に溶かし、これをSephadexG-50カラム(2.5cm×40cm)に注入し、0.02M炭酸水素ナトリウム溶液の375mlで、1本の試験管に7mlずつフラクションコレクターを用いて分画した。これらの50本の各画分は、タンパク質、T-P及びC-Pを測定した。次に、得られた5つの主要画分(P-1~P-5)についてC-P/T-P、アミノ酸及びACE阻害活性を測定した。

4. 全リン(T-P)及びC-P態リン(C-P)の定量

T-Pの定量は、リンとして3~6 µgを含む試料について、Chenらの方法⁽¹⁸⁾を改良した玉利らの方法⁽¹⁹⁾によって行った。C-Pはリンとして3~6 µgを含む試料について、玉利らの方法⁽¹⁹⁾を用いて定量した。

5. 窒素及びタンパク質の測定

窒素は、マイクロケルダール法、タンパク質は280nmの吸光度によって測定した。

6. アミノ酸分析

アミノ酸分析は、窒素として0.1~0.5mgを含む試料を常法により塩酸加水分解後、この加水分解物について日本電子製JLC300型アミノ酸自動分析計を用いて行った。アミノ酸は、窒素1mgに含まれるアミノ酸量として表わした。

7. ACEの阻害活性の測定

シグマ社製ACE(EC3.4.15.1:ウサギ肺由来)2.5mU、ペプチド研究所製合成基質Hippuryl-L-histidyl-L-leucine 2.5mMを用いて、Liebermanの測定法を改良した山本ら⁽²⁰⁾の方法に準じて前報⁽¹⁷⁾のように測定した。

実験結果

Fig. 1は、カキの凍結乾燥粉末から熱水抽出によって得られた抽出物を透析し、その透析内容物(S-1)のSephadexG-50におけるゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出曲線を示す。

その結果、タンパク質の吸収である280nmの吸収度は、溶出画分9~14と22~31に、2つのピークが認められた。次に、各溶出画分について定量を行った結果、C-P及びT-Pの2つの形態のリンのピークもそれぞれ2つ認められた。しかも、C-P及びT-Pの各2つのピークは、280nmの吸収のピークと一致した。これらの結果から、この2つのピークのタンパク質は、リンの結合形態から考えて、エステル型及びC-P型の2つのリント

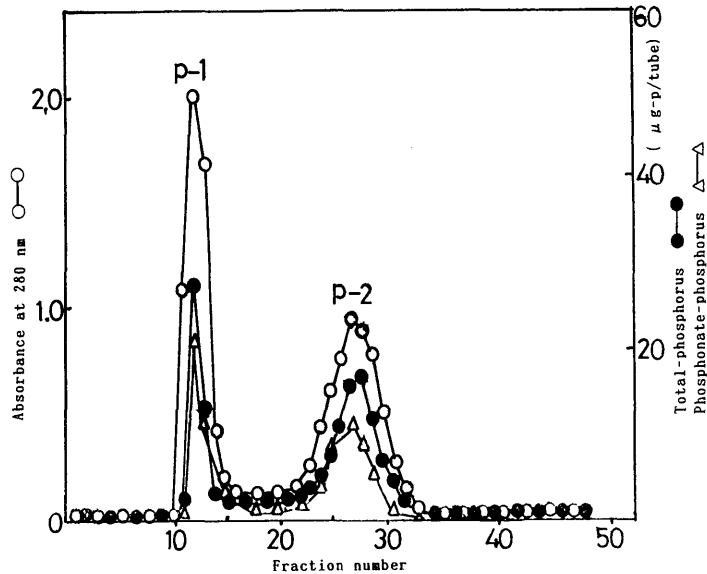


Fig. 1 Chromatographic Profile of Phosphoproteins in the Hot Water Extracts from Oyster, *Crassostrea gigas*.

The experimental details are described in the text.

The freeze-dried material (5g) was heated for 10 min. in hot water (80°C), and centrifuged for 15 min. at 3000 rpm. The supernatant was dialyzed to water for 24 hrs at 5°C. The dialysate (inner material) was applied to a sephadexG-50 column (2.5×40cm), and eluted of 7ml per tube with 0.02M NaHCO₃ solution.

○—○ indicates proteins at 280nm, ●—● indicates total-phosphorus and △—△ indicates phosphonate-phosphorus in the collected fractions. Peak 1 and peak 2 represent combined fractions 9~14 and fractions 22~31 respectively.

ンパク質を含有していることが示唆された。そこで、溶出画分 9~14 をリンタンパク質 1 (P-1), 22~31 をリンタンパク質 2 (P-2) とし、各リンタンパク質ごとに溶出液をまとめて、濃縮後、一定容にして C-P/T-P, アミノ酸及び ACE 阻害活性を測定した。

Fig. 2 は、カキの凍結乾燥粉末からアルカリ抽出によって得られた抽出物を透析し、その透析内容物 (S-2) の SephadexG-50 におけるゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出曲線を示す。280nm の吸収度から、溶出画分 10~20, 21~27 及び 28~39 に 3 つのピークが認められた。次に、各溶出画分について定量を行った結果、C-P 及び T-P の 2 つの形態のリンのピークもそれぞれ 3 つ認められた。しかも、C-P 及び T-P の各 3 つのピークは、280nm のピークと一致した。これらの結果から、この 3 つのピークのタンパク質は、リンの結合形態から考えて、エステル型及び C-P 型の 2 つのリンタンパク質を含有していることが示唆された。そこで、溶出画分 10~20 をリンタンパク質 3 (P-3), 21~27 をリンタンパク質 4 (P-4), 28~39 をリンタンパク質 5 (P-5) とし、各ピークごと

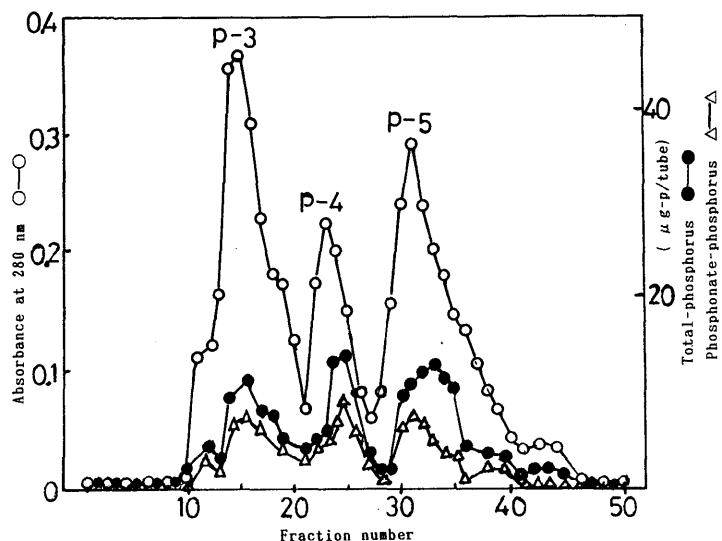


Fig. 2 Chromatographic Profile of Phosphoproteins in the Alkaline Extracts from Oyster, *Crassostrea gigas*.

The experimental details are described in the text.

The freeze-dried material (5g) was stirred for 10 min. at room temperature in 5% NaCl-containing 0.02M NaHCO₃ solution, and centrifuged for 15 min. at 3000 rpm. The supernatant was dialyzed to water for 24 hrs at 5°C. The dialysate (inner material) was applied to a sephadexG-50 column (2.5×40cm), and eluted of 7ml per tube with 0.02M NaCO₃ solution.

○—○ indicates proteins at 280nm, ●—● indicates total-phosphorus and △—△ indicates phosphonate-phosphorus in the collected fractions. Peak 3, peak 4 and peak 5 represent combined fractions 10~20, fractions 21~27 and fractions 28~39 respectively.

Table 1 Contents of Total-phosphorus (T-P) and Phosphonatephosphorus (C-P) of the Peak 1~5 Eluted by Column Chromatography of the Extracts by Hot Water and Alkaline of Oyster, *Crassostrea gigas*.

Sample	T-P (μg)	C-P (μg)	C-P/T-P (%)
P - 1	53.56	42.11	78.62
P - 2	135.11	68.48	50.69
P - 3	38.30	31.47	82.17
P - 4	33.44	24.34	72.78
P - 5	75.45	38.87	51.52

Table 2 Amino acid Composition in the Acid Hydrolysates of Phosphoproteins (peak 1~5) Eluted by Sephadex G-50 Column Chromatography of the Extracts Obtained by Extraction of Hot Water and Alkaline of Oyster, *Crassostrea gigas*. ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{N}$)

	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5
Asp	529.09	268.66	151.02	203.66	291.80
Thr	272.97	136.08	891.84	1524.03	1537.70
Ser	229.47	145.74	477.55	940.50	819.67
Glu	665.58	352.06	783.67	1796.34	1386.89
Gly	399.13	201.05	653.06	1011.44	1180.33
Ala	219.68	182.62	683.67	1066.36	1262.30
Cys	8.16	5.27	18.37	681.92	—
Val	225.67	129.06	555.10	1098.40	947.54
Met	22.84	4.39	14.29	414.19	91.80
Ileu	188.15	102.72	428.57	924.49	773.77
Leu	278.96	170.32	700.00	1281.46	1288.52
Tyr	210.44	109.75	295.92	947.37	849.18
Phe	212.62	126.43	512.24	1171.62	1118.03
His	115.82	223.00	436.73	1057.21	1059.02
Lys	283.85	167.69	614.29	1302.06	996.72
Arg	247.96	166.81	591.84	1199.08	845.90
Pro	307.78	88.67	216.33	331.81	311.48
Ammonia	665.04	1048.29	3646.94	3947.37	3403.28

Table 3 Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity of the Phosphoproteins of Oyster, *Crassostrea gigas*.

	Fraction No	Protein mg	(yield)	IC ₅₀ (mg protein/ml)
Hot water- extract	P-1	48.3	(100)	1.43
	P-2	46.2	(96)	0.27
Alkaline- extract	P-3	19.7	(41)	0.45
	P-4	13.0	(27)	0.33
	P-5	18.6	(39)	0.17

に溶出液をまとめて、濃縮後、一定容にしてC-P/T-P、アミノ酸及びACE阻害活性を測定した。

以上のことから、カキには分子量の異なるリントタンパク質が熱水抽出物及びアルカリ抽出物に2個及び3個それぞれ存在することが明らかとなった。次に、5つのリントタンパク質について、C-P、T-P及びC-P/T-P(%)を調べた結果をTable 1に示した。C-P/T-P(%)が最も高い値を示したのは、アルカリ抽出物のP-3の82%とで、以下、P-1、P-4、P-5及びP-2の順となり、それぞれ78%、72%、51%及び50%であった。すなわち、この値はリントタンパク質の中で、エステル型に対するC-P型の占

める割合を示しており、P-3はC-P型のホスホノタンパク質の割合が最も高いことを示している。

次に、P-1, P-2, P-3, P-4, P-5のリンタンパク質について、常法により塩酸分解した後、アミノ酸自動分析計を用いてアミノ酸組成を調べた結果をTable 2に示した。

P-1及びP-2ではGlu, Gly, Aspが高い値を示し、P-3ではThr, Glu, Leu, Gly, Ala, Lys, Argが高い値を示した。P-4及びP-5ではP-3に含まれるアミノ酸以外に、Val, Phe, Hisも多く含まれていた。

次に、P-1～P-5のリンタンパク質による、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)の阻害活性の測定を行ない、その結果をTable 3に示した。

この表から、ACE阻害活性は、P-5が最高の値を示し、 IC_{50} 値で0.17となり、以下、P-2, P-4, P-3, P-1の順で高く、それぞれ0.27, 0.33, 0.45, 1.43であった。

考 察

これまで、ACEを阻害する物質として、主に魚のタンパク質を酵素分解し生成した低分子のオリゴペプチド以下のペプチドについて報告がされている⁽⁴⁻¹⁵⁾。しかし、リンタンパク質やリンペプチドのACE阻害に関する報告はみられない。

高分子リン化合物の中で、特に、ホスホノタンパク質及びホスホノペプチドの機能性を明らかにするために、前報では、ウチワエビ及びアサリのリンタンパク質(ホスホ型とホスホ型の混合物)についてACE阻害活性の結果を報告した⁽¹⁷⁾。

この研究では、カキの凍結乾燥物から熱水及びアルカリ抽出によって得られた抽出物のリンタンパク質を透析及びゲルろ過によって部分精製し、分離したリンタンパク質についてACE阻害活性、リン含量及びアミノ酸組成を調べた。Fig.1, 2において、280nmのタンパク質の吸収のピーク(○—○)と全リンのピーク(●—●)が重なり、さらにC-P態リンのピーク(△—△)が重なることから、これらのピークのタンパク質のリンは、エステル結合(C-O-P)したホスホプロテインと共有結合(C-P)したホスホプロテインの2つの結合型で存在する混合物であった。

しかし、得られた5つのピーク中のこの2つのリンタンパク質の存在割合には違いが認められた(Table 1)。次に、カキからカラムクロマトグラフィーによって得られた5種のリンタンパク質について、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性を測定した結果(Table 3)は、前報⁽¹⁷⁾のアサリ及びウチワエビの熱水及びアルカリ抽出物の透析内容物からカラムクロマトグラフィーによって得られたリンタンパク質のACE阻害活性に比較して高い値を示した。アサリ、ウチワエビ及び食用タニシ⁽²⁰⁾では熱水及びアルカリ抽出物の透析外内容物が透析内容物よりもACE阻害活性が高い傾向にあり、従って、透析外内容物に存在する比較的low分子のリンタンパク質が阻害活性の高いことを示している。以上のことから、食品に存在するACE阻害物質は、低分子のリンペプチド又はリンタンパク質がより阻害活性が高いと考えられるので、今後は食品中のリンペプチドあるいはリンタンパク質の酵素分解物中のペプチドについて、さらに研究を進める計画である。

要 約

カキの凍結乾燥物の熱水抽出物 (S-1) 及びアルカリ抽出物 (S-2) から得られたリントタンパク質について ACE 阻害活性, リン含量及びアミノ酸組成を調べ, 以下の結果を得た。

- (1) S-1 及び S-2 を SephadexG-50 充填カラムに通し, 0.02M 炭酸水素ナトリウムで溶出すると, S-1 から分子量の異なる 2 種の水溶性リントタンパク質 (P-1, P-2) が, S-2 から 3 種のアルカリ可溶性リントタンパク質 (P-3, P-4, P-5) が分離された。それらのリントタンパク質中には, 全リンに対して C-P 態リンが 50~82% 含まれ, ホスホプロテインの存在することが明らかとなった。
- (2) アミノ酸含量は, P-1 及び P-2 では Glu, Gly, Asp が多く, P-3 では Thr, Glu, Leu, Gly, Ala, Lys, Arg が多く, P-4 及び P-5 では P-3 に含まれるアミノ酸以外に, Val, Phe, His が多く含まれていた。
- (3) P-1~P-5 のリントタンパク質はすべて ACE 阻害活性を有するが, 最も活性の高いのは P-5 であり, IC_{50} 値が 0.17 を示し, 以下 P-2, P-4, P-3, P-1 の順であった。

文 献

- (1) L. T. Skeggs, Jr. T. R. Kahn, and N. P. Shumway: J. Exp. Med., 103, 295-299 (1956)
- (2) E. Kinoshita, J. Yamazaki, and M. Kikuchi: Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1107-1110 (1993)
- (3) J. H. Laragh, L. Baer, H. R. Brunner, E. R. Buhler, J. E. Sealy, and E. D. Vaughan Jr.: Amer. J. Med., 52, 633-652, (1972)
- (4) D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, and M. A. Ondetti: Biochemistry, 16, 5484-5491 (1977)
- (5) 千葉英雄, 吉川正明: 化学と生物, 25, 396-405 (1987)
- (6) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箆島克裕, 松藤寛, 箆島豊: 農化, 65, 1223-1228 (1991)
- (7) 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木健夫: 農化, 61, 803-808 (1987)
- (8) 受田浩之, 松田秀喜, 箆島克裕, 松藤寛, 松井利郎, 箆島豊: 農化, 66, 25-29 (1992)
- (9) 川上 晃, 茅原 紘: 栄食誌, 46, 425-428 (1993)
- (10) T. Matsui, H. Matsufuji, K. Osajima, M. Nakasima, and Y. Osajima: Biosci. biotech. Biochem., 57, 922-925 (1993)
- (11) 鈴木健夫, 石川宣子, 目黒照: 農化, 57, 1143-1146 (1983)
- (12) S. Maruyama, K. Nakagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki: Agric. Biol. Chem., 49, 1405-1409 (1985)
- (13) Y. Kohama, S. Matsumoto, H. Oka, T. Teramoto, M. Okabe, and T. Mimura: Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 332-337 (1988)
- (14) 末綱邦男, 箆島克裕: 栄食誌, 42, 47-54 (1989)
- (15) S. Maruyama, S. Miyoshi, T. Kaneko, and H. Tanaka: Agric. Biol. Chem., 53, 1077-1081 (1989)
- (16) D. S. Kirkpatrick, S. H. Bishop: Biochemistry, 12, 2829-2840 (1973)
- (17) 玉利正人, 久富貴子, 池田朱子: 長崎大学教育自然研報, 50号, 59-69 (1994)
- (18) P. S. Chen., T. Y. Toribara, and H. Warner: Anal. Chem., 28, 1756-1758 (1956)
- (19) 玉利正人, 堀口雅昭, 神立誠: 農化, 45, 433-446, (1971)

- (20) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎: 日胸疾会誌, 18, 297-303 (1980)
- (21) 玉利正人: 未発表 (投稿中)