

紅藻 *Agardhiella subulata* の水抽出タンパク質サーモライシン加水分解物の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用

荻貴之、市村年昭*1、鎌田靖弘、照屋盛実、潮平憲二*2、瑞慶山良寧*2、稻福桂一郎*2、丸山進

紅藻 *Agardhiella subulata* から水抽出したフィコエリスリン（赤色の光合成タンパク質）を含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物がアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性 (IC₅₀ 値 69 μg/mL) を有することを見出した。本加水分解物が、高血圧自然発症ラットへの単回経口投与試験 (50 mg/kg 体重) で血圧降下作用を示すことを確認した。本加水分解物は LC/MS による測定で、ACE 阻害活性のある Ala-Tyr, Val-Tyr, Leu-Tyr を有することが確認でき、また、本加水分解物から以前に見出した INKC-フィコエリスロピリン (Ile-Asn-Lys-Cys 配列のペプチドが結合したフィコエリスロピリン) について、ACE 阻害活性を調べたところ 100 μM の濃度で ACE を 29% 阻害した。また、イソノハナ (*Halymenia floresia*) から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物から以前に見出した AAC-フィコエリスロピリン及び AC-フィコエリスロピリン (前者は Ala-Ala-Cys、後者は Ala-Cys 配列のペプチドが結合したフィコエリスロピリン) は、それぞれ 130 μM、101 μM の IC₅₀ 値で ACE を阻害した。

1 はじめに

アンジオテンシン I 変換酵素 (Angiotensin I-Converting Enzyme、以下 ACE) は不活性なアンジオテンシン I の C 末端 His-Leu を切断し、血管収縮、アルドステロン分泌促進などの強い血圧上昇活性を持つアンジオテンシン II に変換する働きをする昇圧系酵素である。ACE 阻害物質は高血圧を抑制する効果が期待でき、様々な食品タンパク質の酵素分解物から多くの ACE 阻害ペプチドが見出され、「血圧が高めの方の食品」(特定保健用食品) として数多く商品化されている¹⁾。筆者らは沖縄県産海産物及びその加工残渣の有効利用を目的に研究を行い、海藻などの酵素分解物から ACE 阻害作用のある Ile-Tyr, Val-Tyr, Phe-Tyr, Ile-Phe, Phe-Trp, Ala-Trp, Met-Trp, Val-Trp などのジペプチドを多数見出している²⁾。

紅藻、藍藻などの藻類中には、赤色の光合成タンパク質であるフィコエリスリンが含まれている。単細胞紅藻チノリモ (*Porphyridium cruentum*) の B-フィコエリスリンはそれぞれ、17,824 Da (164 アミノ酸残基) および 18,584 Da (177 アミノ酸残基) の α、β 2 種のサブユニット、30 kDa 程度の γ サブユニットからなるタンパク質とフィコエリスロピリン色素が共有結合したものであり、開環テトラピロールであるフィコエリスロピリンと上記タンパク質のシステイン残基がチオエーテル結合していることが報告されている (図 1)³⁻⁷⁾。フィコエリスリンの赤色はこのフィコエリスロピリンに由来する。筆者らはフィコエリスリンをサーモライシンで加水分解することで生じるフィコエリスロピリンペプチド (低分子のペ

プチドが結合したフィコエリスロピリン) を幾つか見出している⁸⁾。

今回、紅藻 *Agardhiella subulata* から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物が ACE 阻害活性を有することを見出した。さらに本加水分解物の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用を検討した。なお、*A. subulata* は食用や餌料としてタンク培養されており、県内で培養されているものは米国産の未同定紅藻とされていたが、*Agardhiella* 属 (ミリン科) であることが 2014 年に報告されている⁹⁾。

2 実験方法

2-1 実験材料

紅藻 *A. subulata*、イソノハナ (*Halymenia floresia*) は県内で養殖されたもので、それぞれ沖縄県栽培漁業センター、沖縄県海洋深層水研究所から恵与された。サーモライシン、フィコエリスリン α サブユニット

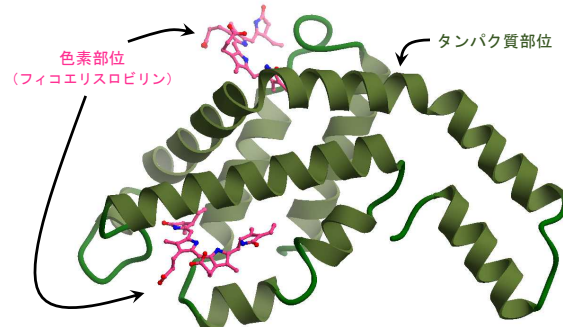


図 1 フィコエリスリンとフィコエリスロピリン

*1 国立研究開発法人産業技術総合研究所

*2 金秀バイオ株式会社

イシン (EC 3.4.24.27)、benzoylglycyl-L-histidyl-L-leucine (別名 hippuryl-L-histidyl-L-leucine) は株式会社ペプチド研究所から購入、サモアーゼ C-100 (食品・工業用グレードのサーモライシン) は天野エンザイム株式会社から購入、ACE (EC 3.4.15.1、ウサギ肺由来) はシグマアルドリッチ社から購入した。高血圧自然発症ラット (SHR/Izm、雄) は日本エスエルシー株式会社から購入した。

2-2 A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物の調製

A. subulata を海水で洗浄後、食品乾燥機 (M-60 型、木原製作所製) で温風乾燥し、高速遠心粉碎器 (ZM 100 型、Retsch 製) を用いて粉碎した。粉末 (3 g) を 100 mL の蒸留水に分散させ室温で 3 時間攪拌した。次いで、10,000×g で 10 分間の遠心分離を行い、フィコエリスリン等の水溶性タンパク質を含む上清を回収した。この上清を分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜 (限外ろ過ディスク PLGC ウルトラセル、再生セルロース、10 kDa、63.5 mm、メルク社) に通し、20 mL の蒸留水を 2 回通して洗浄し、限外ろ過膜上に残った高分子量物質を回収した。これを遠心エバポレーターで減圧下に乾固させ、110 mg の乾燥物を得た。この過程を 6 回繰り返すことで、576 mg の乾燥物を得た。この乾燥物を 29 mL の蒸留水に分散させ攪拌、さらに 2.9 mg のサーモライシンを添加、60℃の水浴中で 2 時間、加水分解を行った。反応停止は容器を沸騰水中に 10 分間保持することでを行い、次いで容器を流水中で室温まで冷却した。このサーモライシン処理液を分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜 (限外ろ過ディスク PLGC ウルトラセル、再生セルロース、10 kDa、63.5 mm) に通し、低分子側の溶液を回収、遠心エバポレーターで減圧下に乾固させることで 360 mg の乾燥物を得た。

2-3 A. subulata 水抽出タンパク質のサモアーゼ加水分解物の調製

冷凍保存した A. subulata (48.5 kg) を材料に水抽出した水溶性タンパク質の溶液 9 L にサモアーゼ C-100 (食品・工業用グレードのサーモライシン) 30 g を添加、60℃で 2 時間、加水分解を行った。その後 95℃で 60 分間処理することにより反応を停止させた。反応液を冷却後、分画分子量 6 kDa の限外ろ過膜に通して低分子側溶液を回収、スプレードライすることで 63 g の乾燥物を得た。

2-4 ACE 阻害活性の測定

前報と同じく Cushman らの方法¹⁰⁾により、終濃度 5 mM の hippuryl-L-histidyl-L-leucine を基質とし、終濃度 15 mU/mL のウサギ肺由来 ACE を用いて測定した。

2-5 高血圧自然発症ラットへの単回経口投与試験

本実験は国立研究開発法人産業技術総合研究所の「動物実験・実験動物取扱ガイドライン」に従って行った。実験動物として、高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) を 1 群 8 匹として用いた。ラットは通常飼育 (日本クレアより購入した固形飼料 CE-2 の自由摂食) を行い、17~20 週齢で収縮期血圧が 190 mmHg 程度に達した時点で実験を行った。A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物あるいはサモアーゼ加水分解物を投与容量が 5 mL/kg 体重となるように所定濃度に超純水で溶解し、セボフルラン吸入による軽麻酔下、胃ゾンデ (日本クレア製フレキブル経口ゾンデ (ラット用)) を用いて、単回経口投与した。投与直前及び投与 4、6 時間後の血圧を非観血式血圧計 MK-2000 (室町機械株式会社製) を用いて尾動脈圧の変化を尾カフ (Tail-Cuff) 法により測定した。対照群として SHR に同容量の超純水を投与し血圧を測定した。覚醒・安静時の収縮期血圧を各群とも 8 匹それぞれ測定し、平均値および標準誤差を算出、2 標本 t 検定による有意差検定を行った。

2-6 A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物に含まれるジペプチドの LC/MS による定量

ジペプチドの定量には、超高速液体クロマトグラフ/タンデム四重極質量分析計 (LC/MS) を使用した。超高速液体クロマトグラフ (H-class, Waters Co., Ltd.) は、オクタデシルシリルカラム (ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 mm i.d. × 150 mm、粒子径 1.7 μm、Waters Co., Ltd.) を用い、カラム温度 50℃、溶離液流速 0.3 mL/min、直線濃度勾配 (0.1%ギ酸水溶液 → 0.1%ギ酸、30%アセトニトリル水溶液、13 分)、試料注入量 1 μL で行なった。タンデム四重極質量分析計 (Micromass Quattro micro API Tandem Quadrupole Mass Spectrometer, Waters Co., Ltd.) は、ESCI マルチモードイオンソースを装着したエレクトロスプレーイオン化法により、多重反応モニタリングモード (MRM)、ポジティブモード、キャピラリー電圧 3.5 kV、ソース温度 120℃、脱溶媒ガス 600 L/hr (350℃)、コーンガス 50 L/hr の条件で測定した。検量線は 0.5 ~ 16 μmol/L の範囲で調製したジペプチド標準溶液の MRM クロマトグラムピーク面積から作成し、絶対検量線法より被検液中のジペプチド量を算出した。

2-7 フィコエリスロピリンペプチドの調製

INKC-フィコエリスロピリンは A. subulata から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物から前報の方法⁸⁾によりセファデックス LH-20 ゲル濾過カラム (26 mm i.d. × 900 mm、GE へ

ルスケア・ジャパン株式会社)、次いで Develosil XG-C30M-3 カラム (C30 逆相カラム、4.6 mm i.d.×250 mm、野村化学株式会社) を用いて精製した。

AAC-フィコエリスロビン及び AC-フィコエリスロビンはイソノハナ (*H.floresia*) から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物から前報の方法⁸⁾により、Isolute C18 カラム (10 g/60 mL、バイオタージ・ジャパン株式会社)、次いで Develosil XG-C30M-5 カラム (20 mm i.d.×250 mm + 20 mm i.d.×50 mm、野村化学株式会社) を用いて精製した。

3 実験結果

3-1 *A. subulata* 水抽出タンパク質サーモライシン加水分解物及びサモアーゼ加水分解物の ACE 阻害活性

A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物は濃度依存的に ACE を阻害し、その IC₅₀ 値 (50% 阻害濃度) は 69 µg/mL であった (表 1)。一方、*A. subulata* 水抽出タンパク質をサモアーゼで処理した加水分解物の ACE 阻害 IC₅₀ 値は 270 µg/mL であった。

3-2 高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用

A. subulata 水抽出タンパク質サーモライシン加水分解物の高血圧自然発症ラットへの経口投与による収縮期血圧の経時変化を図 1 に示す。50 mg/kg 体重のサーモライシン加水分解物投与群は投与 4 時間後に血圧降下の傾向が見られ、投与 6 時間後には顕著な血圧降下作用が認められた。2 標本 t 検定の結果、6 時間後の値については対照群との間に有意差が認められた (図 2)。一方、*A.*

subulata 水抽出タンパク質のサモアーゼ加水分解物は、200 mg/kg 体重投与で 6 時間後に顕著な血圧降下作用を示し、2 標本 t 検定の結果、対照群との間に有意差が認められた (図 3)。

3-3 *A. subulata* 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物中のジペプチドの定量

加水分解物の ACE 阻害活性及び血圧降下作用との関連で、*A. subulata* 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物中のジペプチドを LC/MS で定量した。各ジペプチドのプリカーサーイオンとプロダクトイオンの質量電荷比 (*m/z*) およびコーン電圧、コリジョン電圧、濃度を表 2 に示す。これにより ACE 阻害活性のある Ala-Tyr、Val-Tyr、Leu-Tyr の存在が確認できた。それぞれの ACE 阻害活性を表 1 に示す。

3-4 フィコエリスロビンペプチドの ACE 阻害活性

A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物中には INKC-フィコエリスロビン (図 4)⁸⁾ が含まれていることからその ACE 阻害活性を測定したところ、100 µM の濃度で ACE の活性を 29% 阻害した (表 1)。関連して、イソノハナ (*H.floresia*) から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン分解物から以前に見出したフィコエリスロビンペプチドである AAC-フィコエリスロビン及び AC-フィコエリスロビン (図 4) について⁸⁾、ACE 阻害活性を測定したところ、それぞれ 130 µM、101 µM の IC₅₀ 値で

表 1 加水分解物及び関連物質の ACE 阻害活性

試料	ACE 阻害活性
<i>A. subulata</i> 水抽出タンパク質 サーモライシン加水分解物	IC ₅₀ 値 69 µg/mL
<i>A. subulata</i> 水抽出タンパク質 サモアーゼ加水分解物	IC ₅₀ 値 270 µg/mL
INKC-フィコエリスロビン	12.5 µM で 5% 阻害 25 µM で 14% 阻害 50 µM で 23% 阻害 100 µM で 29% 阻害
AAC-フィコエリスロビン	IC ₅₀ 値 130 µM
AC-フィコエリスロビン	IC ₅₀ 値 101 µM
<i>A. subulata</i> 水抽出タンパク質 のサーモライシン加水分解物 中に含有されるジペプチド	
Ala-Tyr	IC ₅₀ 値 78 µM
Val-Tyr	IC ₅₀ 値 7.4 µM
Leu-Tyr	IC ₅₀ 値 52 µM

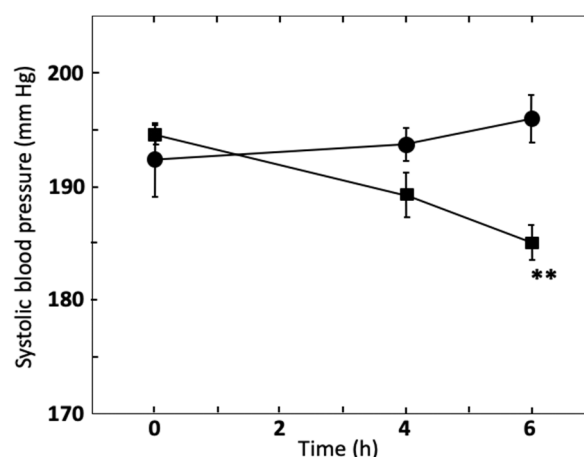


図 2 *A. subulata* 水抽出タンパク質サーモライシン加水分解物の高血圧自然発症ラットへの経口投与試験

● : 対照群 (n=8)、■ : 50 mg/kg 体重 (n=8)。投与前及び投与後 4、6 時間後の収縮期血圧を測定した。平均値 ± 標準誤差で表示。**, p<0.01

ACE を阻害した (表 1)。

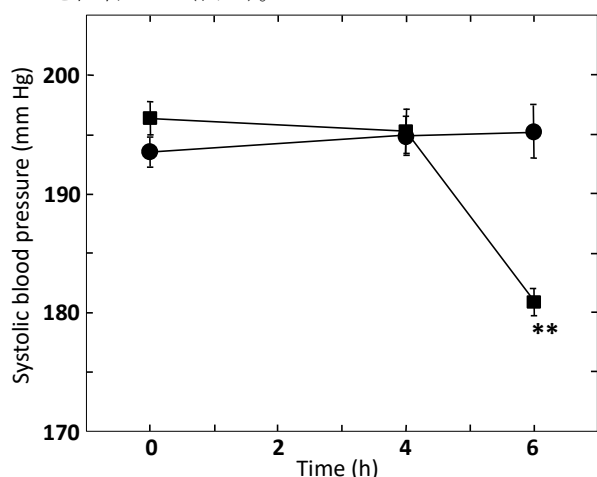


図 3 *A. subulata* 水抽出タンパク質サーモライゼ加水分解物の高血圧自然発症ラットへの経口投与試験

● : 対照群 (n=8)、■ : 200 mg/kg 体重 (n=8)。投与前及び投与後 4、6 時間後の収縮期血圧を測定した。平均値±標準誤差で表示。**, p<0.01

4 考察

A. subulata 水抽出タンパク質のサーモライゼ加水分解物は高血圧自然発症ラットへの単回経口投与試験において 50 mg/kg 体重の投与量で血圧降下作用を示すことが確認できた。一方、サーモライゼ処理の加水分解物は 200 mg/kg 体重投与で有意差が認められた。両者の ACE 阻害

活性に 4 倍程の違いがあり、それを反映しているものと考えられる。サーモライゼによる加水分解は工業レベルでの製造を意図して行っており、製造工程を改良することで活性を高めることは可能と思われる。*A. subulata* 水抽出タンパク質サーモライゼ加水分解物の血圧降下作用に関わる物質については、Ala-Tyr、Val-Tyr、Leu-Tyr などが考えられるが、含有量が微量であり、他の未同定の ACE 阻害ペプチドも寄与している可能性がある。また、INKC-フィコエリスロピリンの経口投与での有効性については、今後、単独投与による確認が必要である。B-フィコエリスリン及び R-フィコエリスリンの極大吸収波長は 540~570 nm 付近、極大蛍光波長は 575 nm 付近にある^{7,11)}。このため、フィコエリスリンは天然由来の食品用着色料(「一般飲食物添加物リスト」において、ノリ色素の主色素として記載されている)として、あるいは抗体などを標識する蛍光色素として利用されている。フィコエリスリンのプロテアーゼ加水分解物も赤色を有しており、且つ紫外線励起により蛍光を発することから、本研究の加水分解物は機能性と同時に食品用赤色素、蛍光色素としての用途も考えられる。

5 まとめ

紅藻 *A. subulata* から水抽出したフィコエリスリンを含む水溶性タンパク質のサーモライゼ加水分解物が ACE 阻害活性 (IC₅₀ 値 69 µg/mL) を有することを見出した。一方、スケールアップ生産を目的として *A. subulata*

表 2 *A. subulata* 水抽出タンパク質サーモライゼ加水分解物中のジペプチドの定量

ジペプチド	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	保持時間 (min)	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)	濃度 (µmol/g)
Ala-Tyr	253	136	3.88	20	20	2.84
Val-Tyr	281	165	5.36	20	20	0.40
Tyr-Val	281	121	5.65	20	20	n.d.*
Met-Tyr	313	182	6.37	20	20	< 0.14
Tyr-Met	313	136	6.40	20	20	< 0.14
Ile-Tyr	295	182	6.79	20	20	n.d.*
Trp-Ala	276	159	6.99	20	20	n.d.*
Leu-Tyr	295	182	7.21	20	20	3.57
Tyr-Ile	295	136	7.63	20	20	n.d.*
Ala-Trp	276	188	8.08	20	20	< 0.14
Phe-Tyr	329	182	8.28	20	20	< 0.14
Tyr-Leu	295	136	8.34	20	20	< 0.14
Trp-Val	304	159	9.16	20	20	n.d.*
Val-Trp	304	205	9.21	20	20	< 0.14
Met-Trp	336	205	10.01	20	20	n.d.*
Ile-Phe	279	166	10.07	20	20	< 0.14
Leu-Trp	318	205	10.79	20	20	n.d.*

* n.d. = not detected

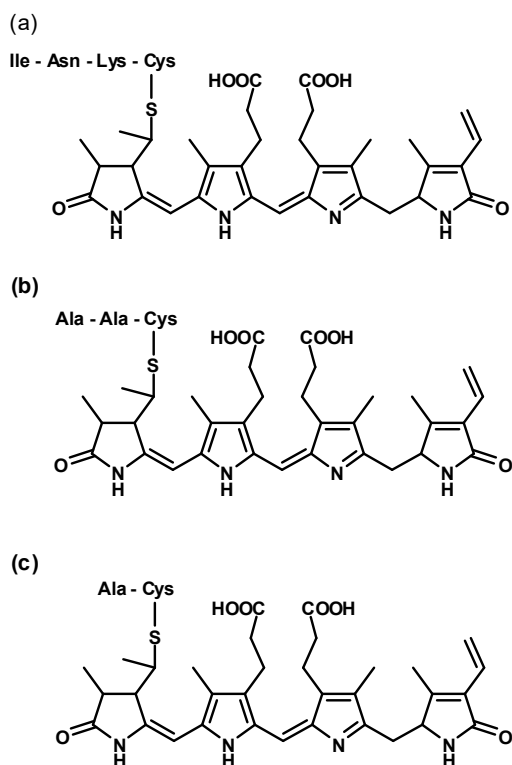


図4 フィコエリスロビルンペプチド
 (a) INKC-フィコエリスロビルン (*A. subulata* 由来)。
 (b) AAC-フィコエリスロビルン (*H. floresia* 由来)。
 (c) AC-フィコエリスロビルン (*H. floresia* 由来)。

水抽出タンパク質をサモアーゼで処理した加水分解物の ACE 阻害 IC₅₀ 値は 270 μg/mL であった。*A. subulata* 水抽出タンパク質のサーモライシン加水分解物は 50 mg/kg の投与で 6 時間後に顕著な血圧降下作用を、*A. subulata* 水抽出タンパク質のサモアーゼ加水分解物は 200 mg/kg 投与で 6 時間後に顕著な血圧降下作用を示し、それぞれ対照群との間に有意差が認められた。サーモライシン加水分解物は LC/MS による測定で、ACE 阻害活性のある Ala-Tyr、Val-Tyr、Leu-Tyr を有することが確認できたが、微量であった。また、本加水分解物から以前に見出した INKC-フィコエリスロビルンについて、ACE 阻害活性を調べたところ 100 μM の濃度で ACE を 29% 阻害した。また、イソノハナ (*H. floresia*) から水抽出したフィコエリスロビルンを含む水溶性タンパク質のサーモライシン加水分解物から以前に見出した AAC-フィコエリスロビルン及び AC-フィコエリスロビルンはそれぞれ 130 μM、101 μM の IC₅₀ 値で ACE を阻害した。このようなフィコエリスロビルンペプチドが実際に動物試験で血圧降下作用に関わっているかについては今後の検討課題である。

本研究は「沖縄海洋生物資源を用いた機能性ペプチド

生産に関する研究 (2014 技 002/H26-27)」の一環として行ったものである。

謝辞

海藻試料をご恵与いただいた沖縄県栽培漁業センター、沖縄県海洋深層水研究所の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 松井利郎, レニン-アンジオテンシン系と血圧調節, 化学と生物, **53**, 228-235 (2015)
- 2) 丸山進, 荻貴之, 照屋盛実, 市村年昭, 鎌田靖弘, 沖縄県産海産物及びその加工残渣より得られるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドとイミダゾールジペプチド, 平成 27 年度沖縄県工業技術センター研究報告, 第 18 号, 21-29 (2016)
- 3) A. N. Glazer, C. S. Hixson, Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. *Porphyridium cruentum* B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* **252**, 32-42 (1977)
- 4) D. J. Lundell, A. N. Glazer, R. J. DeLange, D. M. Brown, Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Amino acid sequence studies. *J. Biol. Chem.* **259**, 5472-5480 (1984)
- 5) R. W. Schoenleber, D. J. Lundell, A. N. Glazer, H. Rapoport, Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on the singly linked phycoerythrobilins. *J. Biol. Chem.* **259**, 5485-5489 (1984)
- 6) A. V. Klotz, A. N. Glazer, J. E. Bishop, J. O. Nagy, H. Rapoport, Phycobiliprotein-bilin linkage diversity. II. Structural studies on A- and D-ring-linked phycoerythrobilins. *J. Biol. Chem.* **261**, 6797-6805 (1986)
- 7) PDB ID: 3V57, A. Camara-Artigas, J. Bacarizo, M. Andujar-Sanchez, E. Ortiz-Salmeron, C. Mesa-Valle, C. Cuadri, J. M. Martin-Garcia, S. Martinez-Rodriguez, T. Mazzuca-Sobczuk, M. J. Ibañez, J. P. Allen, pH-dependent structural conformations of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*, *FEBS J.*, 279, 3680-3691 (2012)
- 8) 丸山進, 荻貴之, 照屋盛実, 瑞慶山良寧, 稻福桂一郎, 鎌田靖弘, 紅藻のプロテアーゼ加水分解により生成するフィコエリスロビルンオリゴペプチドとその性質, 平成 27 年度 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部 日本食品科学工学会西日本支部合同大会 講演番号 Bpm9
- 9) T. D. Vo, G. N. Nishihara, S. Shimada, Y. Watanabe, M. Fujimoto, S. Kawaguchi, R. Terada, Taxonomic identity and the effect of temperature and irradiance on the photosynthesis of an indoor tank-cultured red alga *Agardhiella subulata* from

Japan. *Fish. Sci.* **80**, 281-291 (2014)

10) D. W. Cushman, H. S. Cheung, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971)

11) R. R. Sonani, R. P. Rastogi, D. Madamwar, Antioxidant potential of phycobiliproteins: Role in anti-aging research. *Biochem. Anal. Biochem.* **4**, 172 (2015)