

牛乳タンパク質からのAT1受容体阻害活性を有する新規血圧降下性ペプチドの単離とその利用

東北大学大学院農学研究科：齋藤 忠夫

要 約

市販の牛乳タンパク質のプロテアーゼ加水分解物（WE80BG）から、ヒトAT1受容体阻害活性を持つ複数のペプチド成分を見出した。これらのペプチドは、ACE阻害活性は余り高くないが、降圧活性は示した。その中の一つをHPLCにより単離して化学構造を解明した。構造知見に基づき合成したテトラペプチド（ATPM）を用いて、AT1受容体阻害活性を測定した。AngIIが受容体に結合するのを50%阻害するときの合成ペプチドの結合性は、 10^{-3} M程度と高値では無かったが、確かにAT1受容体阻害活性が確認された。牛乳ペプチド成分の中に弱いながらもAT1受容体阻害活性が見出されたことの意義は大きく、この活性が本テトラペプチドの降圧活性に大きく寄与していることが考えられた。さらに本ペプチドから消化過程で酵素誘導されるトリおよびジペプチドにも、AT1受容体阻害活性を検討して、そのエピトープ部分を確定することは今後の課題である。生理活性ペプチドが複数の機能を有するという「多機能性ペプチド」の存在はまだ不明の点が多く、牛乳タンパク質の潜在的に有する食品タンパク質としての三次機能性の解明の一端を担ったと考えられた。

はじめに

我が国における高血圧患者は約3,000万人と推定され、日本人の4人に1人、さらに50歳以上では2人に1人が高血圧とされる。2003年のアメリカ高血圧合同委員会の報告(JNC7)では、正常血圧を120mmHg（収縮期血圧，SBP）/ 80mmHg（拡張期血圧，DBP）未満，高血圧前症が120-139mmHgSBP / 80-89mmHgDBPと設定され、より早期の高血圧治療の重要性が指摘されている。

一般的に、食事や運動療法でも高血圧症状が改善されない場合には、患者には薬物療法が開始される場合が多い。医療の臨床現場で使用される降圧剤には、中枢性交感神経遮断薬（ β -受容体遮断薬），末梢性交感神経遮断薬（ α -受容体遮断薬），血管平滑筋拡張薬（Ca拮抗薬），利尿薬およびレニン・アンジオテンシン系抑制薬（ACE阻害薬，アンジオテンシンII受容体拮抗薬）などが投与され広く治療に使用されている。

ほ乳動物の血圧の恒常性は、アンジオテンシンI変換酵素(ACE)を中心として保たれており、昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系と降圧系であるキニン・カリクレイン系のバランスの上に成り立っており、その機構の概要を図1に示した。本研究の対象となるレニン・アンジオテンシン系抑制薬は、摂取後に肺などに局在するレニン・アンジオテンシン系の重要な酵素（アンジオテンシンI変換酵素：ACE、EC 3.4.15.1）を阻害するために、血管収縮作用により強い血圧上昇作用を示す「アンジオテンシンII」の生成が抑えられることで降圧作用を示すことが知られている。現在広く市販され投与されているアンジオテンシンIIの体内生産そのものを阻害する「ACE阻害薬」は、非常に優れた降圧作用を発揮するが、一方ではキニン類が貯留して特有の「空咳」などの副作用が1-33%の患者で認められることが知られている。

近年では、ACE以外にもアンジオテンシンIIを生産する副経路の存在が明らかになったため、ACEだけを阻害してもバイパス経路の働きで、アンジオテンシンIIは製造されてしまうことになる。そこで、アンジオテンシンII受容体を直接的に阻害し、かつ副作用の少ない「アンジオテンシンII受容体拮抗薬」(ARB)が開発され、広く患者に投与され始めている。しかしながら、今後副作用が発見される可能性も否定できない。

一方、食品科学分野では、食品の示す三次機能研究の一環として、乳タンパク質のプロテアーゼ分解ペプチドの示すACE阻害活性や、近年では動物実験での確認を経て血圧降下作用（降圧活性）が研究されている。これらのペプチドは機能性ペプチドまたは生理活性ペプチドと称されている。乳タンパク質であるカゼインやホエイタンパク質のタンパク質分解反応により生じる各種ペプチドでは、様々な血圧を調節する作用を示すペプチド類の存在が知られている。

著者も、これまで乳タンパク質から多数の血圧降下性ペプチドを単離し、その構造や機能を報告しており(Murakami et al., *J. Dairy Sci.*, 87, 1967-1974, 2004, Saito et al., *J. Dairy Sci.*, 83, 1434-14140, 2000, Abubakar et., *J. Dairy Science*, 81, 3131-3138, 1998), 乳タンパク質が潜在的に多くの生理活性ペプチドを生成する機能性の高い機能性タンパク質であることを証明している。最近著者らは、ACEに関する食品周辺の情報をまとめて書籍としてまとめている（Saito, T., in “Bioactive Components of Milk” (ed. by Dr. Z. Bosze), Springer, pp.295-317, 2008, 齋藤忠夫、機能性ペプチドの最新応用技術（有原圭三 監修）、シーエムシー出版、2009）。

本研究では、近年の医学分野で注目されているアンジオテンシンIIが結合して昇圧作用に直接関与する受容体(以下AT1受容体)に対する阻害活性の測定方法を食品分野に初めて導入確立し、とくに乳タンパク質より「アンジオテンシンII受容体拮抗ペプチド」の存在仮説を証明し、新しい作用機作を示す機能性乳製品などの開発のための基盤研究を行うことを目的とするものである。昨年度の研究では日本国内で市販されている食品タンパク質起源のペプチド素材から血圧降下性のペプチド画分の調製を試み、AT1受容体結合性ペプチドの存在の可能性が示唆されたので、本年度はさらにその成分科学的な探索研究を進めた。

平成21年度実験研究の概要

「血圧降下性ペプチドの化学構造解析と生理活性の確認（とくにAT1受容体阻害活性を有する空咳の心配の少ない新規降圧性ペプチドの探索）」

わが国では、トクホ（特定保健用食品）に代表される機能性食品の開発と提案には、その化学構造や安全性がはっきりと解明された機能性因子を含むことが必要である。昨年度の研究では、降圧効果が期待できるペプチド素材WE80BG中に含まれている降圧ペプチドの精製を各種クロマトグラフィーにより行い、最終的に1種類のペプチドを単離した。

乳タンパク質由来のペプチドの化学構造解析法としては、①質量分析のみを行い、既知の乳タンパク質の配列中から配列の同定を行う方法、②プロテインシーケンサーによりN-末端配列分析を行い配列を直接決定する方法あるいは③両者を組み合わせる方法などがある。これまでの著者らの研究では、構造解析の信頼性をより高めるために、上記の2種の分析にアミノ酸組成分析を加えてペプチドの化学構造解析を行ってきた。構造を決定したペプチドについては生理活性の確認を行うことになるが、HPLCではペプチドの大量調製が難しいことや生理活性の確認には純度の高

いペプチドを必要とすることから、化学合成したペプチド試料を実験に用いることにした。

また、生理活性の確認においては、新たな生理活性測定法の導入を試みることにした。レニン-アンジオテンシン系で産生される「アンジオテンシンⅡ」は強い昇圧作用を持つため、アンジオテンシンⅡの産生を阻害するACE阻害剤は優れた降圧作用を発揮する。しかし、ACE阻害によってキニン類が貯留し、「空咳」などの副作用が1～33%のヒトで見られるという報告がある。また、ACE以外にもアンジオテンシンⅡを産生する経路の存在することが明らかにされてきており、アンジオテンシンⅡの作用する受容体を確実に阻害し、かつ副作用の少ない「アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬」が近年では注目されている。そこで、新たな生理活性の評価系の一つとして、薬剤の分野で注目されているアンジオテンシンⅡの昇圧作用に関与する受容体(AT1受容体)に対する阻害活性の測定を導入することにした。

本研究では、RP-HPLCにより精製したペプチドの純度検定および化学構造解析を行い、構造を決定したペプチドについてその生理活性を確認することを目的とした。

実験材料と方法

1. 試薬

アミノ酸自動分析用H型標準アミノ酸混合溶液[No. 019-08393 ; アスパラギン(L-Asn, N), グルタミン(L-Gln, Q)およびトリプトファン(L-Trp, W)を除く17種類のL-アミノ酸および塩化アンモニウム(NH₄Cl)混合溶液(それぞれ2.5 μmol/ml of 0.1N HCl)], イソチオシアン酸フェニル(phenylisothiocyanate, No. 162-08473, アミノ酸組成分析用, 以下PITC)は、和光純薬工業㈱より購入した。定沸点6N塩酸(No. 24309, 加水分解用)はPIERCE (Rockford, IL, U.S.A.)より購入した。Hepes (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid)は同仁化学研究所(熊本)より購入した。アンジオテンシンⅡ(生化学用)は和光純薬工業㈱(大阪)製を用いた。[¹²⁵I]-アンジオテンシンⅡ((3-[¹²⁵I]iodotyrosyl⁴)AngiotensinⅡ(5-L-isoleucine), 以下[¹²⁵I]-AngⅡ)はAmersham Biosciences Limited (Buckinghamshire, England)より購入した。Micro BCA Protein Assay Reagent KitはPIERCE (Rockford, IL, U.S.A.)より購入した。また、本章に使用したその他の試薬は、とくに断りのない限り和光純薬工業㈱製の特級品を用いた。

2. 化学構造解析

2-1. キャピラリー電気泳動(CE)を用いたペプチドの純度検定

RP-HPLCで単離したペプチドを0.1Mリン酸緩衝液(pH2.5, Bio-Rad)を用いて100g/100 μlの濃度に調製し、BioFocus3000 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA, U.S.A.) システムによるキャピラリー電気泳動(CE)に供した。カラムにはコーテッドカラム(25 μm×17cm, カタログNo. 148-3030, Bio-Rad)を選択し、緩衝液には0.1Mリン酸緩衝液(pH2.5)を用い、10.0kVの定電圧にて15分間の泳動を行った。また、カラーセル温度は20℃に設定し、ペプチドの検出は紫外部(200nm)で行った。

2-2. フェニルチオカルバモイル法によるペプチドのアミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析は、Bidlingmeyerらの方法⁷³⁾を修正したフェニルチオカルバモイル法⁶⁵⁾⁻⁶⁸⁾を用いて行った。

1) 実験準備等

加水分解用試験管 (15×185mm, 特注品), 小ガラスチューブ (6×50mm) および試薬保存用バイアル等は, 30%(v/v) 硝酸中で一晩以上放置し, その後十分に蒸留水で洗浄し, 乾燥させたものを使用した。さらに, 一連の実験操作中はプラスチックグローブを着用し, 手指からのペプチドの汚染を防いだ。また, バイアルに移し替えたPITCは, 開封して使用する毎に窒素封入し, 長期保存の場合には窒素置換後, 冷凍保存した。

2) 試料の封管

2本の小ガラスチューブに, それぞれペプチド試料および標準溶液10 μ l (標準アミノ酸混合溶液5 μ l とトリプトファン (Trp) 溶液 (2.5 μ mol/ml) 5 μ l の混合溶液) を注入し, その2本を加水分解用試験管に入れ, 含硫アミノ酸の酸化防止のため真空ポンプで減圧乾固させた。試験管の管底に定沸点6N塩酸 (500 μ l) および10%(v/v) フェノール溶液25 μ l (易分解性Trpの保護剤) を, 小ガラスチューブ内に入れないよう注意しながら注入した。突沸を防ぐために試験管下部を氷冷しながら5分間真空ポンプで減圧し, 減圧状態のままバーナーにより加水分解用試験管を封管した。

3) 加水分解とその後の処理

封管した加水分解用試験管は, ヒーティングブロック : Dry Block Bath MG-2型 (Japan Torika Corp.) にて108℃で24時間正確に加熱した。加水分解終了後, 常温まで冷却し, 加水分解用試験管を開管して小ガラスチューブを取り出した。その管壁外側の塩酸をふき取り, 蒸留水で洗浄した。この小ガラスチューブを別の加水分解用試験管に入れ, 減圧下で乾燥させた。ついで, 小ガラスチューブ内にMilliQ水 (20 μ l) を注入して減圧乾固させ, この操作を2回繰り返し, 塩酸の除去を完全に行った。

4) フェニルチオカルバモイル (PTC) アミノ酸への誘導化処理

別の小ガラスチューブに標準溶液 (10 μ l) を注入し, 減圧乾固させた試料を「未加熱標準試料」とした。加えて, 上記の酸加水分解の終了した「加熱試料」および「加熱標準試料」の合計3本を1組として分析を進めた。

3本それぞれの小ガラスチューブに誘導化準備試薬 [エタノール : MilliQ水 : トリエチルアミン (TEA) =2 : 2 : 1 (v/v) の混合溶液] 20 μ l を加え, 室温で20分間保持し, ペプチドの酸加水分解により得られた各アミノ酸を, フェニルチオカルバモイル (phenylthiocarbonyl, 以下PTC) 誘導体に変換した。30分間減圧後, 試料溶解液 [アセトニトリル : MilliQ水=2 : 7 (v/v)] 100 μ l を加え, 十分に混合し, 無色透明な上清部分を次のHPLC分析に供した。なお, 以上の操作は同時に実行せず, 一本ずつ誘導化およびHPLC分析を行った。

5) HPLC分析

インテリジェントポンプL-6200型 (株式会社日立製作所, 東京), クロマトデータステーションL-7000型 (株式会社日立製作所), カラムオープンL-7300型 (株式会社日立製作所) およびUV-VIS検出器L-7420型 (UV and visible light detector, 株式会社日立製作所) を用い, 上記で得られた上清部分の約10 μ l を, 以下の条件によりRP-HPLC分析に供した。

—RP-HPLC条件—

カラム：Wakosil-II 5C18カラム (4.6φ×250mm；和光純薬)

溶 媒：移動相A [140mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.4)]

移動相B [60%(v/v) CH₃CN溶液]

溶 出：20分間で移動相Bを0から 100%に直線的に上昇させ、その後
移動相B100%で10分間保持した。

流 速：1.0ml/min

温 度：40℃

検 出：OD₂₅₄

6) 計算

「未加熱標準試料」および「加熱標準試料」のクロマトグラムにおける各アミノ酸ピーク面積から、個々のアミノ酸の分解率を求めた。さらに各ピーク面積の誤差を減らすため、ある1ピークを基準に、その他の各ピーク面積を相対比で表した。次いで、「加熱試料」の個々のピーク面積をその分解率および相対比で除し、試料のアミノ酸組成を未加熱状態となるように補正した (0時間に補正)。

2-3. プロテインシーケンサーによるN-末端アミノ酸配列分析

ペプチド試料 (約30 μg) は、ポリビニリデンジフルオリド膜 (polyvinylidene difluoride membrane filter, 以下PVDF膜, Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.) に疎水的に結合させた。分離カラムには、PTH-C18カラム (2.1×220mm; Perkin Elmer Co., Ltd., Applied Biosystem Division, Foster City, CA, U.S.A.) を用い、Protein Sequencer Model 490 Procise (Perkin Elmer) によりアミノ酸配列分析を行った。また、溶媒A3 [3.5%テトラヒドロフラン水溶液] および溶媒B [アセトニトリルおよびイソプロパノール混合液] などの140Cマイクログラジエント送液システム (140C microgradient delivery system) に必要な関連試薬は、PE Biosystems Japan Ltd. (東京) 製を使用した。

2-4. 高速原子衝撃質量分析法による質量分析

測定溶媒にはMilliQ水、また測定マトリックスにはグリセロールを選択した。各ペプチド試料について、POSITIVEモードおよび低分解能の各種条件により、高速原子衝撃質量分析法 (Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry, 以下FAB-MS) に基づいた高性能二重収束質量分析計JMS-700型 (日本電子㈱, 東京) を用いて質量分析を行った。

3. 化学合成ペプチドの精製

3-1. 化学合成ペプチドの精製 (TFA除去)

構造決定したペプチドの化学合成をキアゲンに依頼した。化学合成ペプチドを10%(v/v) CH₃CNに溶解し、RP-HPLC分取を行うことによりTFAを除去し、以降の生理活性試験に用いた。

—RP-HPLC条件—

カラム：Wakosil-II 5C18カラム (4.6φ×150mm；和光純薬)

溶 媒：移動相A [10% (v/v) CH₃CN溶液]

移動相B [60% (v/v) CH₃CN溶液]

溶 出：30分間で移動相Bを0から 100%に直線的に上昇させ、
その後移動相B100%で10分間保持した。

流 速：0.5ml/min

温 度：40℃

検 出：OD₂₁₄

3-2. 合成ペプチドALPMの純度検定

精製した合成ペプチド：ALPMをキャピラリー電気泳動（CE）に供し，純度検定を行った。

3-3. FAB-MSによる合成ペプチドALPMの分子量測定

精製した合成ペプチド：ALPMの質量分析を行った。

4. 合成ペプチドALPMの生理活性の確認

4-1. アンジオテンシン変換酵素50%阻害濃度の測定

合成ペプチドのIC₅₀値（ACEを50%阻害する試料濃度，単位はμM）の測定を行った。最初に，ペプチド濃度を広範囲に測定し，およそその50%阻害濃度の検討を行った後，ペプチド濃度の設定を細分化し同様の測定を行い，IC₅₀値を求めた。

4-2. 降圧活性測定

合成テトラペプチド：ALPMのSHRにおける降圧活性を測定した。投与後2，4，6，8，10および24時間において血圧測定した。

5. 合成ペプチドALPMのAT1受容体阻害活性試験

Soldnerらの方法を用いて，AT1受容体阻害活性試験を行った。

1) ラット肺膜画分の調製

Wistarラット（n=3）の肺を摘出し，生理食塩水中で洗浄した。これ以降の操作は4℃下で行った。組織を細切後，組織重量の5倍量のTris緩衝液（50mM Tris，150mM NaCl，5mM Na₂EDTA；pH7.2）を添加し，ポリトロンハンドヘルドホモジナイザーPT1200型（ジェネレーター径12mm，ジェネレーター長100mm；KINEMATICA AG，Switzerland）を用いてホモジナイズした。1,000×g，10分間遠心分離後，上清を回収し，20,200×g，20分間遠心分離した。得られたペレットにTris緩衝液（pH7.2）5mlを添加し洗浄後，20,200×g，20分間遠心分離した。洗浄後のペレットはHepes緩衝液（20mM Hepes，1mM Na₂EDTA，10mM MgCl₂・5H₂O；pH7.4）にホモジナイズによって懸濁させ，Micro BCA Protein Assay Reagent Kitによりタンパク含量を測定し，-80℃で保存した。

2) バインディングアッセイ

冷凍した膜画分を解凍し，20,200×g，20分間遠心分離し，ペレットに最終濃度が10mg/mlになるように0.1% BSAを含むHepes緩衝液を加え，懸濁した。96wellマイクロプレートに，ラット肺膜

画分100 μ lおよび試料溶液 ($10^{-11} \sim 10^{-3}$ Mの非標識アンジオテンシン II (以下Ang II) もしくはペプチド試料) 100 μ lを加えた。0.18 nMの 125 I-Ang II 100 μ lを加え攪拌後、25℃で60分間インキュベートした。セルハーベスター (フタバメディカル㈱, 東京) を用いて吸引ろ過し、ガラス繊維濾紙GF/B (Whatman) 上に膜画分を回収した。生理食塩水200 μ lで3回洗浄後、濾紙をプラスチックチューブに回収し、膜画分に結合した放射性同位体の放射活性を γ -counter Cobra (Packard Instrument Co., Meriden, CT, U.S.A.) で測定した。 10^{-3} M (過剰量) の非標識Ang IIを加えた場合の 125 I-Ang IIの結合量 (cpm) を非特異的結合とし、各濃度での特異的結合量を求めた。試料溶液を添加しないときの 125 I-Ang IIの特異的結合量を100%として標準曲線を描いた。

実験結果

1. 化学構造解析

1-1. キャピラリー電気泳動 (CE) を用いたペプチドの純度検定

昨年度の研究で得られたRP-HPLC-d画分をキャピラリー電気泳動に供し、純度検定を行った (図2)。クロマトグラムにおいて、3.4分に溶出した単一ピーク以外には大きな夾雑ピークは全く認められず、本ペプチド試料の純度が極めて高いことを確認した。したがって、本ペプチド試料を以降の化学構造解析に供することにした。

1-2. アミノ酸組成分析

RP-HPLC-d画分について、フェニルチオカルバモイル法によるアミノ酸組成分析を行った。その結果、得られたクロマトグラム上には、Ala, Pro, MetおよびLeuの4つのピークが確認できた (図3)。未加熱標準試料および加熱標準試料のピーク面積比より、加熱試料のピーク面積を未加熱状態へ補正計算を行った結果、「Ala : Pro : Met : Leu = 1.5 : 1.9 : 1.0 : 2.7」となった。

1-3. プロテインシーケンサーを用いたペプチドのN-末端配列分析

RP-HPLC-d画分について、プロテインシーケンサーによりN-末端配列分析を行った (図4)。分析サイクルにおいて、残基数が進むにつれて検出されるピークがじょじょに小さくなっていったが、3残基目までは比較的明確なピークが得られた。その結果、本ペプチドのN-末端はAla, 第2残基目はLeu, 第3残基目はProと決定された。

1-4. FAB-MSを用いた質量分析

FAB-MSによる本ペプチド試料の分子量測定の結果 (図5), RP-HPLC-d画分の分子量は431 Da (M^+H) であった。

以上の3種の分析結果を総合し、RP-HPLC-d画分のアミノ酸一次構造はAla-Leu-Pro-Met ($M_w=430.6$ Da) であると決定することが出来た。

2. 合成ペプチドALPMの精製

化学合成ペプチドをRP-HPLCに供し、TFAの除去を行った。クロマトグラム上の18分に溶出するALPMのメインピークのみを分取し、CEおよびFAB-MSに供した。これにより十分に純度が高いことを確認した。また、この2つの分析により、CE溶出時間がともに4.1分前後であること、および分

子量が431Daであったことから、合成ペプチドALPMが確かにRP-HPLC-d画分と一致することを確認した。精製した合成ペプチドALPMを用いて、ACE阻害活性試験および降圧活性試験を行った。

3. 合成ペプチドALPMの生理活性の確認

3-1. 合成ペプチドのIC₅₀値

合成ペプチドALPMについて、ACE50%阻害濃度（IC₅₀値， μ M）を測定した結果、ALPMのIC₅₀値は928 μ Mと高い値であった。

3-2. 合成ペプチドの降圧活性

合成ペプチドALPMについて、SHRでの降圧活性を経時的に測定した（図6）。その結果、水を投与した場合は血圧の低下が見られなかったのに対し、合成ペプチドALPMを投与した場合、投与2時間後から徐々に血圧が低下し始め、投与4時間後では -16.6 ± 4.4 mmHg、6時間後では -19.0 ± 8.6 mmHgおよび8時間後では -21.4 ± 7.8 mmHgの降圧活性を示した。投与6時間および8時間後にはコントロールに対して有意な差異が見られた（ $P < 0.05$ ）。

4. 合成ペプチドのAT1受容体阻害活性

合成ペプチドALPMのAT1受容体阻害活性を測定した（図7）。[¹²⁵I]-Ang IIが受容体に結合するのを50%阻害するときのアンジオテンシンIIの濃度は 10^{-7} M程度であるが、合成ペプチドALPMの場合は 10^{-3} M程度であり、ALPMは弱いながらもAT1受容体阻害活性が見られた。また、もとの素材WE80BGについても平均分子量からモル濃度を設定し、AT1受容体阻害活性を測定したが、阻害は認められなかった。

考 察

純度検定に用いたキャピラリー電気泳動(CE)は高分離能を有し、微量試料であっても短時間での純度検定が可能である。これらの長所から、近年では各種タンパク質や核酸の分離・分析などに広く用いられており、乳タンパク質の分析にも利用されている。本研究においても、構造解析にあたって、RP-HPLC分取画分の純度を確認するために不可欠なステップとなっている。CEの結果、ベースラインに多少の乱れが見られたが、ピークは単一であり、構造解析に供するのに十分な純度であると判断した。

アミノ酸組成分析の結果、RP-HPLC-d画分の組成がAla, Pro, MetおよびLeuであることがわかったが、正確な存在比は得られなかった。この原因として、アミノ酸組成分析のRP-HPLCクロマトグラムでのベースラインの乱れが面積比に影響したと考えられ、正確な定量には試料の純度をもっと高めることが要求されると考えられる。プロテインシーケンサーによるN-末端配列分析の結果とFAB-MSによる分子量測定の結果から、RP-HPLC-d画分は β -Lgのf 142-145を起源とするAla-Leu-Pro-Met(Mw=430.6Da)であると決定した。ALPMおよびこれまでに著者らの報告も含めて、学会誌に報告のある β -Lg由来のACE阻害ペプチドの位置関係を図8に示した。

この合成ペプチドを用いて生理活性の確認を行った。IC₅₀値は928 μ Mと高い値であり、ALPMのACE阻害活性は強いとはいえない。これまでにACE阻害ペプチドはカゼイン由来のものが多く報告されており、 β -Lg由来のACE阻害ペプチドの報告は近年増えてきているところである。 β -Lgの中でも

ALPMのf 142-145付近の配列からはACE阻害ペプチドの報告がとくに多く、配列と活性の関係が興味深い。 β -Lg由来のACE阻害ペプチドのうち、ALPMに配列が類似するものも知られている。Mullallyらは乳清タンパク質のトリプシン分解物に含まれるALPMHIR (β -Lg f142-148) の IC_{50} 値が $42.6 \mu M$ と強いACE阻害活性をもつことを示し、「lactokinin」と命名した。また、Pihlanto-LeppäläらはALPMH (β -Lg f142-146) の IC_{50} 値が $521 \mu M$ 、HIRの IC_{50} 値が $953 \mu M$ と報告した。ALPMとHIRは、それぞれ単独の配列では弱い活性しか示さないが、両配列をもつALPMHIRでは強い活性を示すことから、ACE阻害活性には構成アミノ酸の種類だけではなく、配列や立体構造が重要であると考えられる。

これまでのACE阻害ペプチドの知見として、疎水性ペプチドの重要性が示唆されてきた。CheungらはペプチドのC-末端のアミノ酸3残基に芳香族アミノ酸 (Trp, TyrおよびPhe)、分枝鎖アミノ酸 (Val, Leu, Ile) およびイミノ酸 (Pro) が位置する場合、ACE阻害活性が高くなることを示した。OndettiとCushmanはこれらC-末端の3残基のアミノ酸がACEの3か所のsubsiteと相互作用することを示した。また、MeiselはArgのグアニジン残基のような正電荷がACE阻害に重要であることを示した。トリペプチドHIRは疎水性アミノ酸のIleと正電荷のArgをもち、またALPMは疎水性アミノ酸のLeuおよびProをもつがACE阻害活性は強くなく、両配列をもつALPMHIRで強いACE阻害活性を示すことから、ACE阻害には、C-末端の3残基のアミノ酸以外も関係していると考えられる。

合成ペプチドALPMの降圧活性を測定した結果、投与8時間後に $-21.4 \pm 7.8 \text{ mmHg}$ と最も高い降圧活性が確認された。本研究では降圧ペプチドの精製の際に実際の利用性を考え、ACE阻害活性よりもSHRでの降圧活性を重視してきた。このため、WE80BG素材中の降圧活性ペプチドの単離精製には成功したといえる。しかし、その降圧機構の一つであるACE阻害活性が高くないため、ALPMの降圧活性には他の要因が関与していると考えられる。

一つ目の要因としては、消化の過程でALPMからさらにACE阻害活性および降圧活性が強いペプチドが生じることが考えられる。膵液に含まれるエラスターゼはLeuやAlaの配列を認識し、ペプチド結合を切断する。これによりジペプチドのAla-LeuとPro-Metや、トリペプチドのLeu-Pro-Metが生じる。また、小腸刷子縁膜に存在するペプチダーゼはN-末端から2残基目に存在するProを認識しN-末端のジペプチドを切断するため、トリペプチドのLeu-Pro-MetからジペプチドLeu-Proが生じる可能性もある。

ジペプチドおよびトリペプチドは、小腸刷子縁膜のペプチド輸送システムにより小腸細胞内に取り込まれることが知られている。ジ-およびトリペプチドからのアミノ酸吸収速度は同一のアミノ酸混合物からの吸収速度より速いことが腸管灌流法により示され、オリゴペプチドに特異的な輸送機構の存在することが示唆された。またヒト小腸刷子縁膜標品においても、ペプチド輸送機構の存在することが明らかにされた。ペプチド輸送担体 (トランスポーター) はウサギおよびヒトでクローニングされ、「PepT1」と命名された。PepT1はペプチド輸送の駆動力に H^+ 濃度勾配を利用する。ペプチドは H^+ の細胞内の流入に共役し、濃度勾配に逆らって輸送される。また、刷子縁膜には Na^+/H^+ 逆交換体 (アンチポーター) が存在し、細胞側から管腔側に H^+ を放出し、 H^+ 勾配が形成される。上皮細胞内に取り込まれたペプチドは、側底膜に存在するペプチド輸送担体により血中へ移行するか、あるいはペプチダーゼによりアミノ酸に加水分解されアミノ酸輸送担体により血中へ移行する。PepT1は特異的な選択性がなく、ペプチドの構成アミノ酸が疎水性であっても親水性であっても同様に吸収する。

前述したALPMから酵素消化によって生じる可能性のあるジペプチドおよびトリペプチドが *in vitro* でACE阻害活性を有していれば、*in vivo* においてそのまま吸収され、肺などの組織のACEを阻害することによって降圧活性を生じているとすることができる。

ALPMの降圧活性に関与している二つ目の要因としては、ALPMがACE阻害だけではなく、他の経路にも関与していることが考えられる。例えば「一酸化窒素」(NO) を介した血管弛緩作用の他、レニン-アンジオテンシン系においてレニン阻害やブラジキニンの産生促進あるいはアンジオテンシンⅡの受容体に対する拮抗阻害作用などが挙げられる。アンジオテンシンⅡの強い昇圧作用は受容体に結合することによって生じる。アンジオテンシンⅡの受容体にはいくつかのサブタイプが存在し、発見された順からAT1, AT2, … Atnと命名されている。このうち機能性が明らかにされているのが「AT1受容体」と「AT2受容体」である。アンジオテンシンⅡの結合により、AT1は昇圧作用、AT2は降圧作用を生じ、両者は拮抗した働きをする。近年、降圧薬市場においてはACE阻害薬市場が徐々に縮小し、代わりにアンジオテンシンⅡ拮抗薬市場が拡大している。ACE阻害薬は安全性の高い降圧薬だが、副作用として痰を伴わない「空咳」を発症することが知られている。発症率は多い場合には33%とされており、高齢者や呼吸器疾患の喘息患者には問題となる。それに対してAngⅡ拮抗薬は大きな副作用の報告はない。これまでに開発されているAngⅡ拮抗薬は、経口投与後も高い活性を持つ非ペプチド性のものである。もともとAngⅡのアミノ酸の一部を置換したペプチド性のAngⅡ拮抗薬が開発されたが、経口投与後に活性を失ってしまうことなどから、薬剤としては実用的ではなかった。しかし、低分子量ペプチドであれば消化による分解を受けにくく、活性の低下も起こりにくいかもしれない。そこで本研究では新たな生理活性試験の一つとして、AT1受容体拮抗阻害活性の有無を測定することにした。AT1受容体は、心臓、肺、血管内皮細胞などに分布しており、今回の実験ではAT1受容体のみを発現しているマウス肺から膜画分の調製を行った。

合成ペプチドALPMについて、AT1受容体阻害活性を測定した。その結果、弱いながらも阻害活性が見られ、AT1受容体阻害活性がALPMの降圧活性に寄与している可能性が示唆された。しかし、ALPMのACE阻害活性およびAT1受容体阻害活性はともに強い活性であるとは言えず、このほかの降圧機構も関与している可能性がある。また、ALPMから消化の過程で生じるジペプチドおよびトリペプチドについてもAT1受容体阻害活性を確認することで、降圧機構がより明確になるだろう。

近年、多機能を有する生理活性ペプチドの報告がある。例えば、 α -lactorphin (YGLF ; α -lactalbumin f50-53) および β -lactorphin (YLLF ; β -lactoalbumin f102-105) はオピオイド活性をもつが、ACE阻害活性も有し、 IC_{50} 値はそれぞれ733および172 μ Mである。また、これらのオピオイドペプチドがSHRの血管標本を用いた *in vitro* の実験において弛緩力を改善したという報告もある。生理活性ペプチドが一度に複数の機能をもつことは非常に興味深い。

長岡らの報告によると、ALPMより1残基長いALPMH (β -Lg f142-146) はCaco-2細胞を用いた *in vitro* の実験でコレステロール吸収を阻害した。これはALPMHの強い疎水性によって生じる生理機能であると考察されており、1残基少ないALPMもコレステロール吸収阻害のような生理機能を有する多機能ペプチドの可能性もある。今後、ALPMの生理機能を明らかにすることで、機能性素材としてのWE80BGの利用性を高め、新たな機能性食品の開発に貢献できると考えられる。

要 約

市販の牛乳タンパク質のプロテアーゼ加水分解物（WE80BG）から、ヒトAT1受容体阻害活性を持つ複数のペプチド成分を見出した。これらのペプチドは、ACE阻害活性は余り高くないが、降圧活性は示した。その中の一つをHPLCにより単離して化学構造を解明した。構造知見に基づき合成したテトラペプチド（ATPM）を用いて、AT1受容体阻害活性を測定した。AngIIが受容体に結合するのを50%阻害するときの合成ペプチドの結合性は、 10^{-3}M 程度と高値では無かったが、確かにAT1受容体阻害活性が確認された。牛乳ペプチド成分の中に弱いながらもAT1受容体阻害活性が見出されたことの意義は大きく、この活性が本テトラペプチドの降圧活性に大きく寄与していることが考えられた。さらに本ペプチドから消化過程で酵素誘導されるトリおよびジペプチドにも、AT1受容体阻害活性を検討して、そのエピトープ部分を確定することは今後の課題である。生理活性ペプチドが複数の機能を有するという「多機能性ペプチド」の存在はまだ不明の点が多く、牛乳タンパク質の潜在的に有する食品タンパク質としての三次機能性の解明の一端を担ったと考えられた。

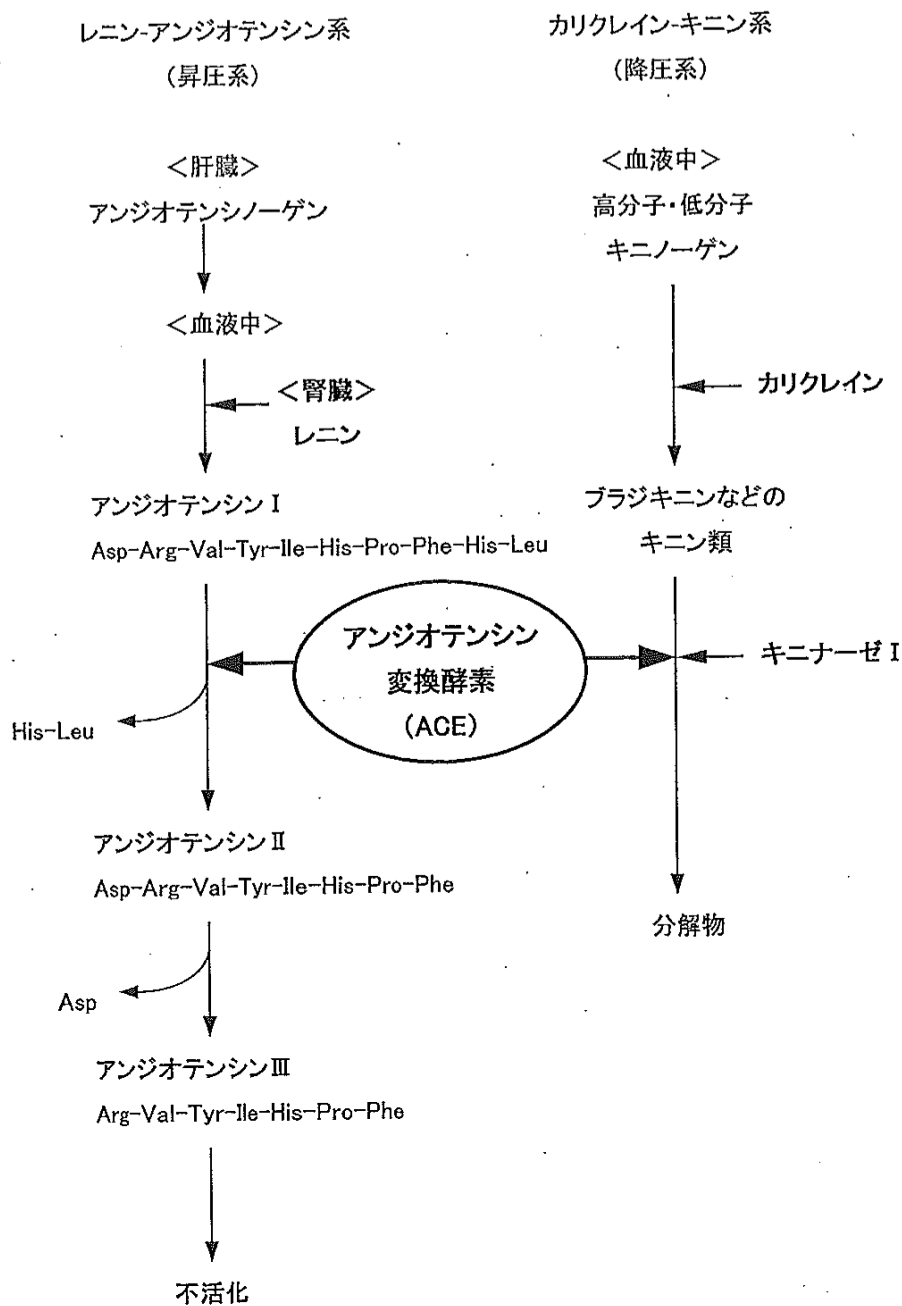


図1 ほ乳動物における血圧の定常性システム

レニン-アンジオテンシン系（昇圧系）およびカリクレイン-キニン系（降圧系）におけるキーエンザイムとしてのアンジオテンシン変換酵素（ACE）

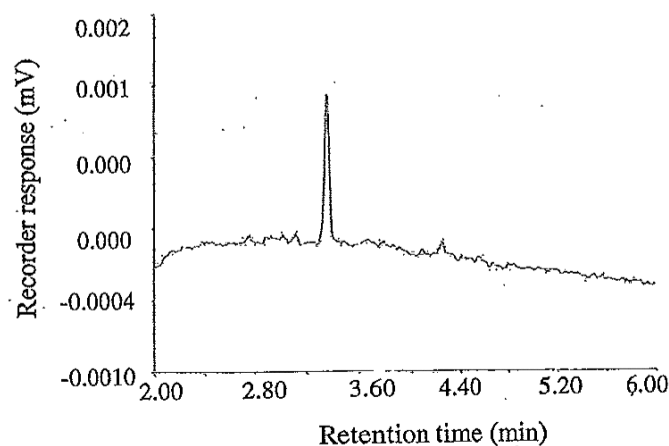


図2 逆相高速液体クロマトグラフィー分析で得られたd画分のキャピラリー電気泳動法(CE)による純度検定

-CE 条件-

カラム：コーテッドカラム(25 μ m X 24 cm, Bio-Rad 社)

泳動用緩衝液：0.1M リン酸緩衝液(pH 2.5, Bio-Rad 社)

電圧：10.00 kV

カローセル温度：20 °C

検出：200 nm

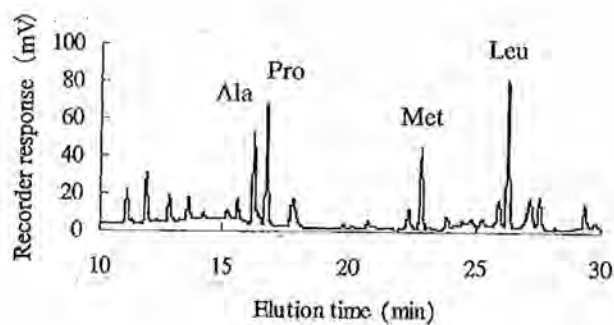


図3 逆相高速液体クロマトグラフィー分析で得られたd画分のアミノ酸組成分析

-分析条件-

カラム：Wakosil-II5C18 カラム (4.6 X 250 mm、和光純薬)

溶媒：移動相 A(140mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.4)

移動相 B 100%で10分間保持した。

流速：1.0ml/min

温度：40°C

検出：OD₂₅₄

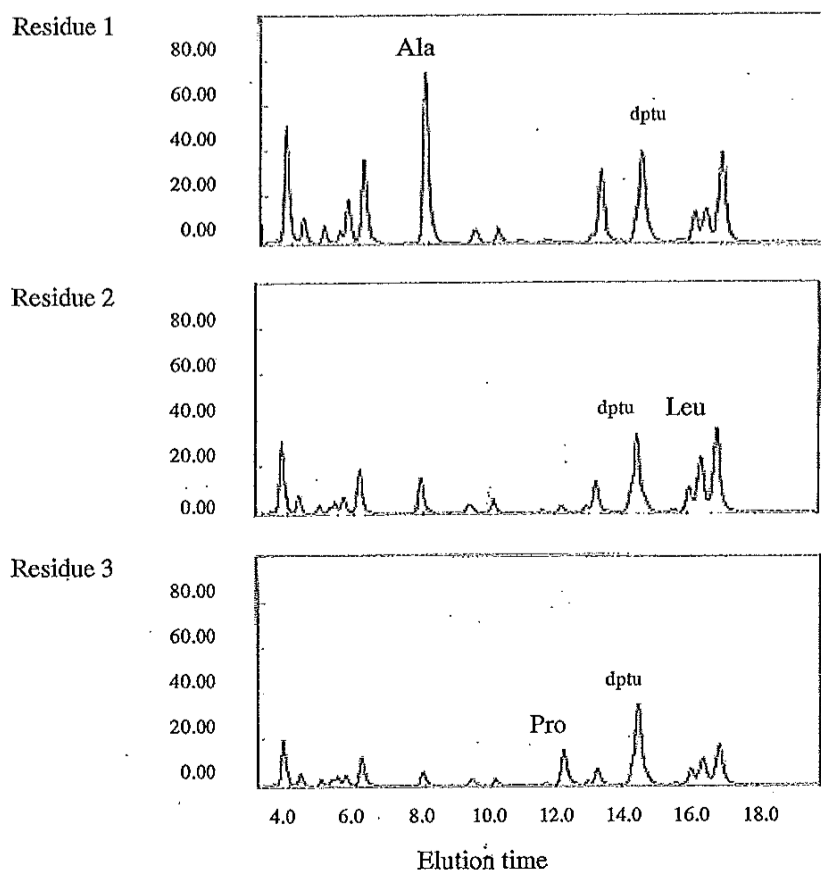


図4 逆相高速液体クロマトグラフィー分析で得られたd画分のプロテインシーケンサーによるN-末端アミノ酸配列分析

dptu: $\text{H}_2\text{O}+\text{PITC}$ (試薬) の溶出ピークを示す (解釈から除外)

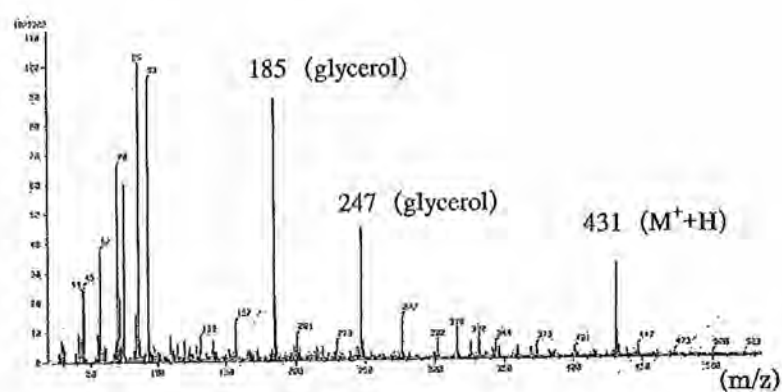


図5 逆相高速液体クロマトグラフィー分析で得られたd画分のFAB-MSによる質量分析

M^+ は分子イオンピークを示す

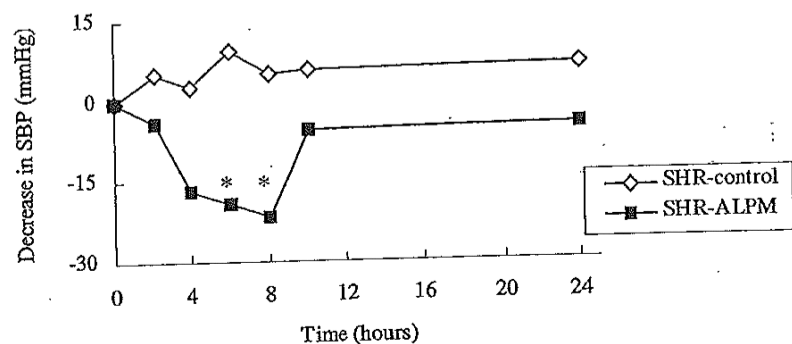


図6 化学合成したペプチド ALPM を投与後の SHR での血圧降下度の経時的変化

* : コントロールとの有意差、 $P < 0.05$

SHR : 高血圧自然発症ラット, $n=5$

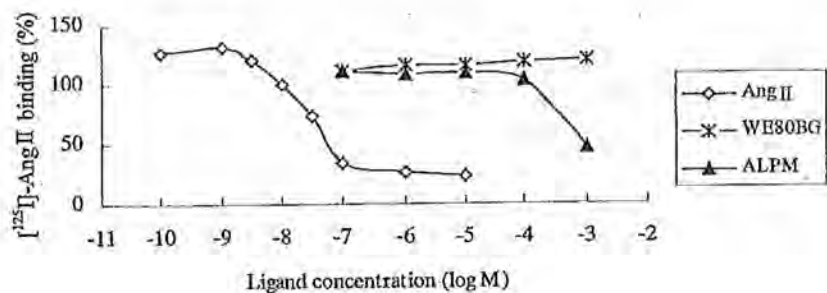


図7 AT1 受容体バインディングアッセイを用いてのペプチド試料による
[¹²⁵I]-Ang II の AT1 受容体への結合阻害性の検討

Ang II : アンジオテンシン II

WE80BG : ホエイタンパク質起源の市販ペプチド

ALPM : 化学合成したペプチド

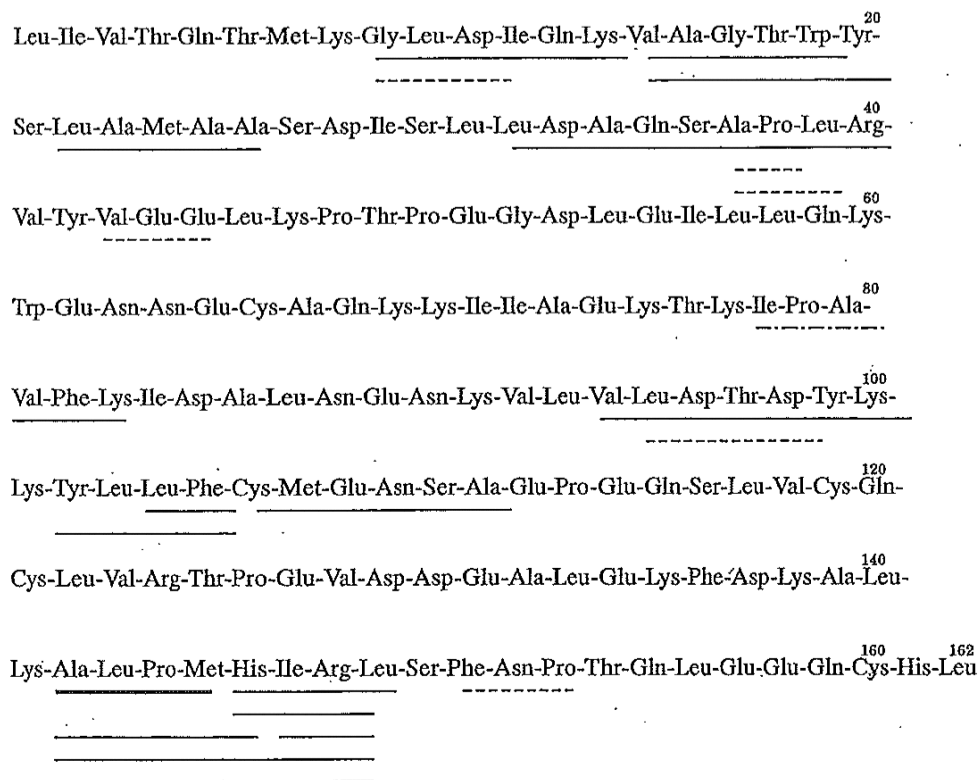


図 8 生理活性ペプチド ALPM の起源は β -ラクトグロブリン

実線は今回構造決定したテトラペプチド ALPM を示し、その他の線はこれまでに報告のある ACE 阻害活性ペプチドの位置づけを示す