

小麦粉タンパク質の酵素分解と生理活性を有するペプチドの探索

前田 良輔・清水 雄一*・畑中 千秋

Study of physiologically active peptides by enzymatic hydrolysis of flour protein

Ryosuke MAEDA, Yuichi SHIMIZU, and Chiaki HATANAKA

Abstract

Flour protein was hydrolyzed by protease, Alcalase 2.4L FG, and the hydrolyzate was investigated the physiological active properties. The protease was kinetically screened by Michaelis-Menten equation using z-Ala-Ala-Leu-pNA as a substrate. The hydrolyzate was analyzed by HPLC, and the effluent was divided into four fractions by elution time, then the total amount of peak area of each fraction was monitored. To study the physiological active property of each effluent which ACE inhibitory activity was focused in this study, modified Lieberman methods was applied. The maximum activity reached 82 % after reacted for four hours.

Key words: protease, flour protein enzymatic reaction, peptide, ACE

1. 緒言

食物から摂取したタンパク質は、タンパク質分解酵素であるペプシンなどによりアミノ酸やペプチドに分解され体内へ吸収される。しかし、このタンパク質の消化・吸収には3~4時間かかり、このことは生体にかかなりの負担を強いている。従って、直接ペプチドを摂取することにより早く吸収され、体への負担が小さくなる。またペプチドはアミノ酸やタンパク質にはない独自の活性を持っていることが知られている。特に、タンパク質をプロテアーゼによって部分的に加水分解したペプチドは、血圧降下作用や免疫亢進作用など様々な生理活性を有することが知られている。特にここで着目している高血圧症は代表的な生活習慣病のひとつであり、心臓病や脳卒中などの原因となりやすい。血圧上昇メカニズムにおいて肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲン(分子量 57000 のタンパク質)と腎臓から分泌されるレニンとが作用することで生成されるアンジオテンシン I (アミノ酸 10 残基) は、肺の上皮細胞や血管内皮に多く分布するアンジオテンシン変換酵素 (以下 ACE と略記) の作用によりアンジオテンシン II (アミノ酸 8 残基) へと変換される。アンジオテンシン I に生理活性は特に無いが、アンジオテンシン II は血管壁の受容体と結合することにより、血管の収縮が起こり血圧が上昇する。こうした血圧上昇をもたらす一連の流れであるレニン-アンジオテンシン系を阻害する方法として、アンジオテンシン I から II へと変換する ACE の活性をペプチド等により阻害する方法がある。そこで、このプロテアーゼによるタンパク質の分解物に生理活性を付与するためには、分解物の分布を制御することが重要であり、反応系を確立する上で速度論的な検討も重要である。現在、ACE 阻害剤は、高血圧症において軽症、重症に関係なく幅広く用いられ、高血圧症の治療中に投与され、多くの優れた効果が見いだされている。食品由来の ACE 阻害ペプチドは、一般的な医薬品に見られる副作用のように身体に負担をかけることなく高齢者でも安心して使用できる。これまで様々な食品やその加工物から ACE 阻害ペプチドが発見されており、カツオブシ、イワシ、サバ等の魚類由来のタンパク質や、大豆、豆豉(トウチ)、ゴマ等の種子類やその加工品の酵素分解物などから抽出されており、すでに市販されているものも少なくない¹⁾³⁾。

抽出されたペプチドは Arg-Phe や Phe-Val-Ile-Val-Ala などの比較的小きなペプチドであることが明らかとなっている。本研究では、分解対象としてタンパク質含有率が 8~12 % と比較的高い小麦粉(強力粉)を選択した。小麦粉には薄力粉、中力粉、強力粉などがあり、それぞれのタンパク質含有率は 8~8.8、9~9.7、11.7~12.4%であることが分かっている⁴⁾。また、タンパク質としてアルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリン、残渣タンパク質が 15、3、33、16、33%の割合で含まれており、15%のアルブミンのみ水に可溶性タンパク質となっている。そのため、残りの水に難溶であるタンパク質の抽出もこの研究の大きな課題の1つである。そして、小麦粉タンパク質からの高生理活性ペプチドの効率的生産を目的とし、プロテアーゼのスクリーニング、小麦粉タンパク質の抽出、分解反応の速度論的解析、分解物の HPLC による分析と Lieberman 変法を用い ACE 阻害活性について検討した。

2. 実験方法

2.1 プロテアーゼのスクリーニング

Table 1 には本研究において検討した 11 種類のプロテアーゼを示した。スクリーニングは後に示すように疑似基質による反応の経時変化によって行ったが、それに先立ち各プロテアーゼ中のタンパク質濃度はコマジープリリアントブルー (CBB) を用いて決定した。このタンパク質濃度を基準に各プロテアーゼがタンパク質濃度で一定になるように条件を調整し、以下に示す疑似基質を用いた酵素反応によって各酵素の活性を比較した。各酵素の活性は、基質として Z-Ala-Ala-Leu-pNA を DMSO に溶解させ、測定する際に濃度が 20 μ M となる基質溶液を調製した。Table 1 に示した酵素をタンパク質含有率を基に系内の酵素タンパク質濃度が一樣になるように酵素を添加し、酵素の至適 pH の緩衝液中での最終濃度が 0.2 μ M となる酵素溶液を調製した。試験管に緩衝液を 5 mL 入れ、それに基質溶液を 100 μ L 加えた。それをよく攪拌し 30 $^{\circ}$ C の水浴中にて整温した。30 分後セルに移し酵素溶液を 20 μ L 加え、30 $^{\circ}$ C における吸光度の経時変化を測定した。モル吸光係数 ($\epsilon = 9920$ [L/(mol \cdot cm)]) を用い吸光度を pNA 濃度に換算した。続いて、特に高活性であった Alcalase 2.5L と Alcalase 2.4L FG について Michaelis-Menten 式による酵素反応速度パラメータの算出を行った。

*竹本油脂株式会社

2.2 小麦タンパク質の分解とHPLC分析

小麦粉 100 g に対し 0.01 mol/dm³-HCl 1.5 dm³ 加え、30 °C で 24 時間攪拌した。攪拌後、603 g⁷⁾、20min で遠心分離 (KOKUSAN 社製 H-19F) を行い、上澄み液を回収した。これを小麦タンパク質抽出液とした。この小麦タンパク質抽出液 100 μL と CBB 溶液 5mL を反応させ、波長 594 nm における吸光度を測定し、小麦タンパク質抽出液中に溶存するタンパク質量を算出した。このようにして得られた小麦タンパク質抽出液を Tris 緩衝液 (pH7.1) に加えると白濁するため、小麦タンパク質抽出液 5 mL と Alcalase 2.4L FG を Tris 緩衝液 (pH7.1) 中、30 °C で反応させ、その時の濁度の減少に伴う吸光度の経時変化を波長 500 nm で測定した。上と同じ条件の下で所定の反応時間後に沸騰水浴中で反応を停止させ、反応液は 0.2 μm のシリンジフィルターを用いてろ過し、HPLC 分析用の試料とした。HPLC の分析条件は以下の通りである。

- ・カラム: ウォーターズ製 Symmetry300™ C-18 5 μm, 3.9×150 mm
- ・溶出: 0.1% TFA 含有アセトニトリルおよび 0.05% TFA 水溶液のグラジエント法
- ・流速: 1 ml/min
- ・カラム温度: 35°C
- ・検出: 紫外可視検出器 (波長 214 nm)
- ・試料量: 20 μl

2.3 ACE 阻害活性の測定

馬尿酸を用いた Lieberman 変法を用い ACE 阻害活性の測定を行った。Lieberman 変法とは、疑似基質として Hip-His-Leu (以下 HHL と略称) を用いることによって ACE 阻害活性測定を行う方法である。ACE によって Hip-His-Leu から遊離した馬尿酸 (Hippuric Acid) を酢酸エチルで抽出し、228 nm での吸光度変化から阻害活性を評価した。この方法で用いる ACE は 0.1U の ACE を 4mL の Borate buffer に溶解させ、25 mU-ACE 溶液とした。スクリーン管に Sample 50 μL と ACE 100μL を加えたものを S (Sample) とし、Sample 50 μL と ACE 100 μL と 0.5 N-HCl 250 μL を加えたものを S_B (Sample Blank) とした。また、水 50 μL と ACE 100 μL を加えたものを C (Control) とし、水 50 μL と ACE 100 μL と 0.5 N-HCl 250 μL を加えたものを B (Blank) とする。これらを 37 °C で 5 分間予熱し、全てに HHL 溶液を 100μL を加えて 37 °C で 1 時間反応を進行させた。1 時間後 S と C に 0.5 N-HCl 250 μL 加え反応を止めた。そして全てに 1.5 mL-酢酸エチルを加え、15 秒間攪拌し遠心分離器 (KUBOTA 社製 2410) にて 313 g で 10 分間遠心分離を行った。分離後、上層 500 μL をマイクロチューブに採り、遠心エバポレーター (EYELA 社製 CVE-3100) により真空乾燥した。乾燥後、マイクロチューブに残った白色固体を 1M-NaCl に溶解させ、紫外可視分光光度計 (ULTROSPEC 社製 3100pro) を用い 228 nm で吸光度を測定した。ACE 阻害率は次式によって算出した。

$$\text{阻害率}[\%] = \frac{(C - B) - (S - S_B)}{(C - B)} \times 100$$

3. 実験結果および考察

3.1 プロテアーゼのスクリーニング

Table 1 に示した 11 種類のプロテアーゼのうち、明確な活性を示した 6 種類について、その経時変化を Fig. 1 に示す。いずれの酵素も時間の経過と共に生成物濃度は上昇し、基質が分解されている様子が明らかになったが、Alcalase 2.5L お

Table 1 Proteases studied in this study.

酵素	製造元
サモアーゼ PC10F	大和化成(株)
プロチン AC10F	大和化成(株)
プロテアーゼ M アマノ G	天野エンザイム(株)
プロテアーゼ P アマノ 3G	天野エンザイム(株)
アロアーゼ XA-10	ヤクルト薬品工業(株)
パンチダーゼ MP	ヤクルト薬品工業(株)
Protamex	ノボザイムズジャパン(株)
Flavourzyme 1000L	ノボザイムズジャパン(株)
Neutrase 0.8L	ノボザイムズジャパン(株)
Alcalase 2.5L	ノボザイムズジャパン(株)
Alcalase 2.4L FG	ノボザイムズジャパン(株)

および Alcalase 2.4L FG は著しい初期のバーストによって急激に分解生成物に起因する吸光度の上昇がみられ、その後基質の完全な消費のためプラトーに達している。このように他のプロテアーゼに比べて非常に大きな活性を示した原因は、酵素製剤としての比活性が Alcalase 2.5 L や Alcalase 2.4L FG が他の酵素に比べて高かったことが考えられ、またこの 2 種類の酵素は、基質に用いた Z-Ala-Ala-Lue-pNA に対する基質特異性が高いことが考えられる。ここで、2 種類の Alcalase については、さらに以下に示す Michaelis-Menten 式による酵素反応速度パラメータの算出を行った。ここで、 v は酵素反応速度、 $[S]$ は基質濃度、 V_{max} は最大速度、 K_m は Michaelis 定数

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

を示している。Fig. 2 に酵素反応の初速度と基質濃度の関係を示した。Alcalase 2.5L と Alcalase 2.4L FG のいずれも Michaelis-Menten 式による計算結果に対して良好な相関があり、この計算結果より Table 2 に示す速度パラメータを得た。ここで見かけ上の速度定数 k_{cat} の大きさより、小麦タンパク質の分解には Alcalase 2.4L FG を用いることとした

3.2 プロテアーゼによる分解時間と分解生成物量

酵素反応時間を 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 時間として沸騰水浴中で反応を停止した試料を準備し、それぞれについて HPLC 分析を行った。その結果を Fig. 3 のように保持時間 7~17 分、17~28 分、28~38 分、38~49 分の 4 つの画分に分割し、それぞれのフラクションにおける分解生成物のピークの面積比を解析し、酵素分解時間と各フラクションにおけるピーク面積比を比較した結果を Fig. 4 に示した。その結果、フラクション①、②は短時間の酵素反応では大きなピーク面積はほと

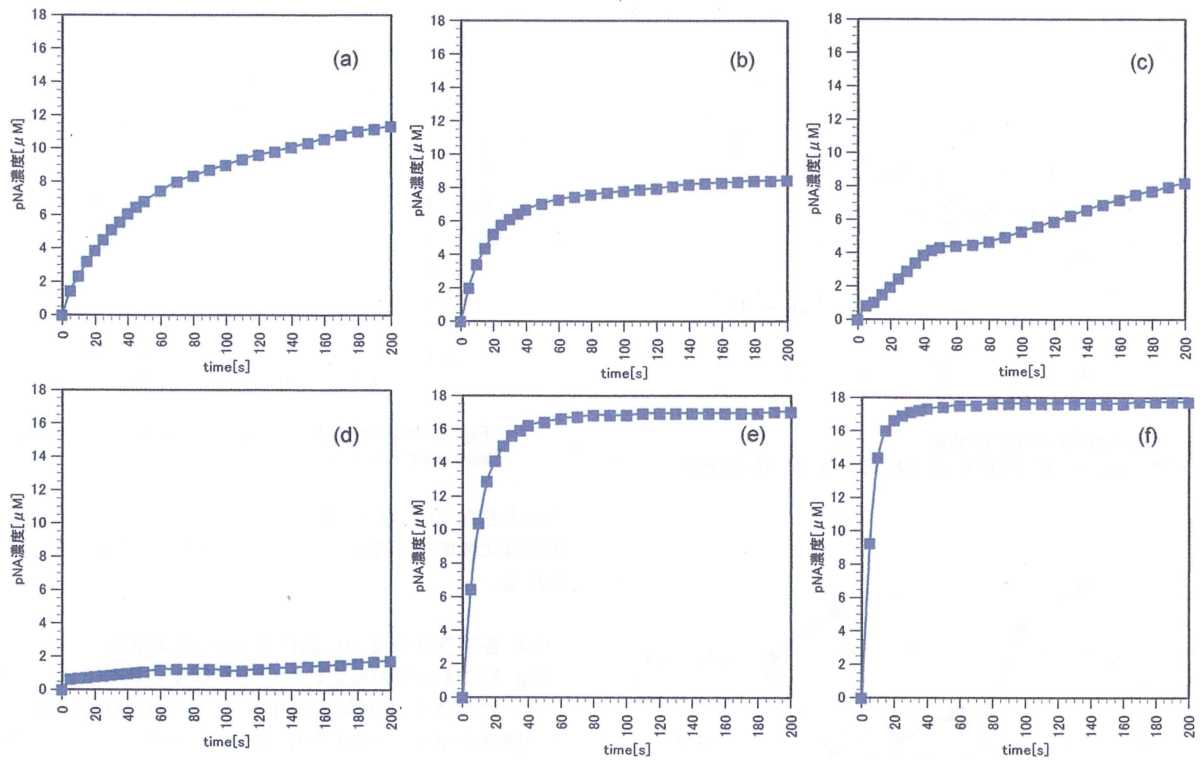


Fig. 1 Timecourses of enzymatic reaction of various proteases.
Panel: (a) Protease P Amano 3G, (b) Protamex, (c) Pancidase MP, (d) Flavourzyme, (e) Alcalase 2.5L, (f) Alcalase 2.4L FG

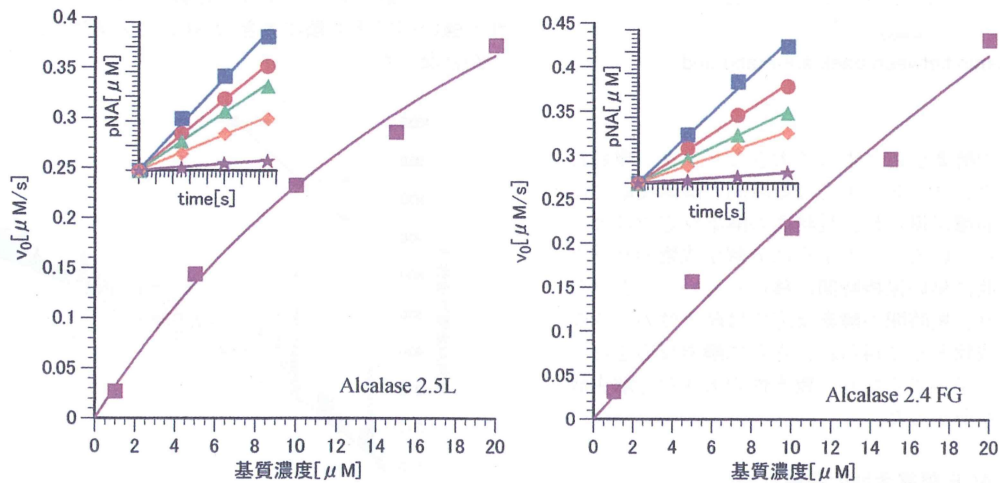


Fig. 2 Relationship between initial velocity and concentration of substrate.
The solid lines show calculated results by Michaelis-Menten equation.
The inserted figures show initial region of timecourses for various concentration of substrate. ★: 1 μM, ◆: 5 μM, ▲: 10 μM, ●: 15 μM, ■: 20 μM.

Table 2 Kinetic parameters calculated from Michaelis-Menten equation.

Enzyme	Substrate	V_{max} [$\mu\text{M}/\text{s}$]	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]
Alcalase 2.5L	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0.835	26.1	4.18	0.160
Alcalase 2.4L FG	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	2.07	80.2	10.4	0.129

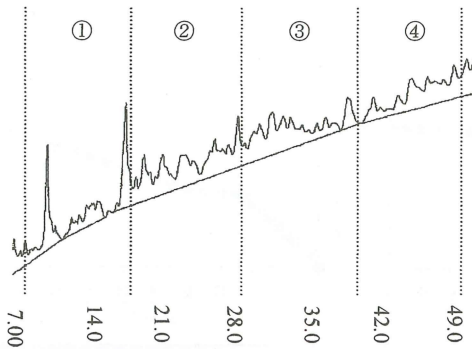


Fig. 3 Division of HPLC profile.
①: 7-17 min, ②: 17-28 min, ③: 28-38 min, ④: 38-49 min.

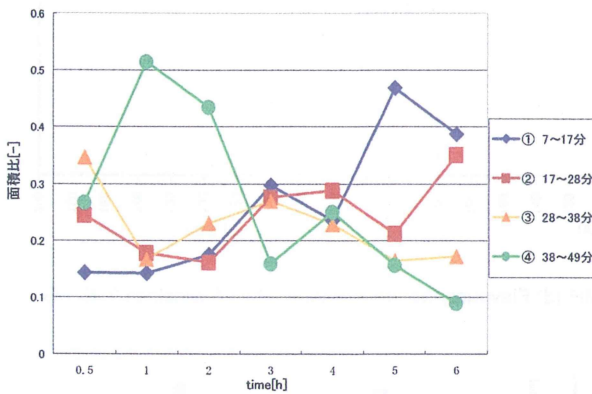


Fig. 4 Relationship between peak area ratio and reaction time.

んどなく、長時間の酵素反応によって大きなピークが現われている。一方フラクション③、④では短時間の酵素反応で比較的大きなピーク面積が得られ、長時間の酵素反応ではピーク面積は小さくなっている。このように分解生成物のピークは酵素反応時間と共に早い保持時間に移行していることが分かる。このことより、短時間の酵素反応では疎水性の大きなペプチドが分解生成物として得られ、さらに酵素反応を行うことによりペプチドが小さくなり、親水性の大きな分解生成物が得られることが分かった。

3.3 分解時間と ACE 阻害活性の関係

Fig. 5 には分解時間とその時の分解生成物の ACE 阻害活性の関係を示した。分解反応時間 0 時間の分解生成物における阻害活性において平均 38% という値が得られたが、これは小麦粉からのタンパク質抽出の際に 0.01 mol/dm³-HCl を用いることにより、わずかにタンパク質から分解されたペプチドが作用した為と思われる。Lieberman 変法は誤差の大きな測定方法であり再現性の確認は 3 回行っている。分解反応時間 4 時間までで阻害活性は急激に上昇しピークをむかえ、それ以後の反応時間の分解生成物の阻害活性はほぼ一定となった。HPLC 分析の結果と比較すると、疎水性の分解生成物が多く現れた分解反応時間 0~1 時間の ACE 阻害活性は比較的小さく、親水性の分子量の小さな分解生成物が現れた 4~24 時間

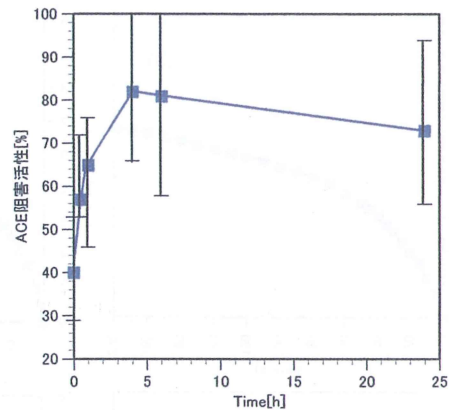


Fig. 5 Relationship between ACE inhibitory activity and reaction time.

では大きな ACE 阻害活性を示した。このことより ACE 阻害活性は比較的小さい分子量の小さな親水性のペプチドにあると考えられる。

3.4 各フラクションにおける ACE 阻害活性

Fig. 6 に 4 時間の反応における分解生成物の 4 つのフラクションにおける ACE 阻害活性とその HPLC 分析におけるピークの関係を示す。一番大きな ACE 阻害活性を示したフラクション②を 100% としてそれぞれのフラクションの阻害活性を相対的に表した。フラクション①、②、③に大きな阻害活性があり、フラクション④に阻害活性がほとんど無いことが分かった。これらのことより、比較的分解が進んだ段階の親水性の強いペプチド類に大きな ACE 阻害活性があることが明らかとなった。

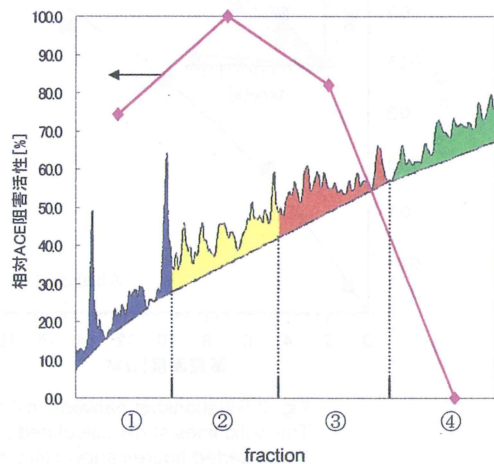


Fig. 6 Relation between relative ACE inhibitory activity and fraction of HPLC effluent.

4. 結言

小麦粉由来のタンパク質を抽出し、それをプロテアーゼで分解することにより生理活性を有するペプチド類の生成について検討した。はじめに、使用するプロテアーゼを決定するために 11 種類の市販のプロテアーゼから、最も高活性であつ

た Alcalase 2.5L および Alcalase 2.4L FG の2種類を選び、さらにこの2種類の酵素については Michaelis-Menten 式に基づく速度パラメータを算出した。この結果、小麦粉タンパク質の分解には Alcalase 2.4L FG を用いることとした。分解反応時間に対する分解生成物量の関係から、反応時間の経過と共に親水性の大きなペプチドが溶出した。さらに反応時間4時間における分解物が、ACE 阻害率82%に達した。また、HPLC の保持時間と ACE 阻害活性の関係では比較的早い保持時間において ACE 阻害率が高く、保持時間の大きな画分には全く ACE 阻害活性が見られないことが明らかとなった。

5. 引用文献

- 1) 亀和田光男, 機能性食品の開発, CMC (1988)
- 2) 中谷延二, 食品化学, 朝倉書店 (1987)
- 3) D.T.ELMORE, ペプチドとタンパク質, 東京化学同人 (1970)
- 4) 林督元, 血圧には安心の一粒を, トレランス出版 (2004)
- 5) Jian-Hua Zhang, Eizo Tatsumi, Chang-He Ding, Li-Te Li, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product, Food Chemistry 98 551-557 (2006)
- 6) 香川綾, 四訂 食品成分表 1995, 女子栄養大学出版部 (1995)
- 7) 日本生化学会編, 基礎生化学実験法 第3巻, 東京化学同人 (2001)

(2009年10月9日 受理)