

## 未利用水産動植物資源の機能性成分に関する研究

### 学位論文内容の要旨

未利用水産資源である水産加工副産物はそのほとんどが産業廃棄物として処理されており、漁業や水産加工業の経営を圧迫する一因となっている。また、沿岸部には利用されない雑海藻類が豊富に分布しており、その高度利用が求められている。一方、最近食品素材の生理機能に関する研究が注目を集め、疾病予防に役立つ新しい機能性成分が明らかにされつつある。このような機能性成分が未利用水産動植物資源中に見出されれば、それらの高度活用が可能となるばかりでなく、廃棄物処理問題や環境改善にも役立つものと考えられる。そこで、本研究は未利用水産動植物資源について高血圧抑制、抗酸化および血糖上昇抑制などに関与する機能性成分の探索を行い、新しい機能性成分の存在やその生理活性、さらにその構造についても明らかにすることを目的とした。以下に本研究で得られた結果を要約する。

1) シロサケ頭部およびシロサケとホタテガイの内臓の各組織をプロテアーゼで消化し、消化物のアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を検討し、高血圧抑制ペプチドの探索を行った。プロテアーゼとして市販の食品用プロテアーゼ 5 種 (XP-415、ピオプラーゼ SP-10、パパイン、デナチーム AP、デナプシン 2P) を用い、それぞれの組織を至適条件下で消化した。得られた消化物の ACE 阻害活性を測定した結果、活性の強さに違いがあるが、その全てが ACE 阻害活性を示した。中でもシロサケ頭部のピオプラーゼ SP-10 消化物が最も強い活性を示した。この消化物の溶液を限外ろ過により分子量 10,000 以下のペプチド画分 (HP-fraction と称す) を得た。この画分を自然発症高血圧ラットへ経口投与した結果、6 時間から 24 時間の間に約 23mmHg の血圧降下作用が認められ、生体内でも有効であることが示唆された。そこで次に、この ACE 阻害ペプチドの単離と構造決定を行うために、ACE 阻害ペプチドを ODS 樹脂による吸着分配法、ゲルろ過 HPLC および逆相 HPLC を用いて分離、精製した。その結果、2 種類のペプチドが単離され、それらのアミノ酸組成およびプロテインシーケンサーによる配列の解析を行った。その結果、ひとつは Asp-Trp であり阻害活性は  $IC_{50}=13\mu M$  と既知の食品由来のペ

プチドの中でも強い活性を持つものであったが、他は Gly-Ile-Gly であり阻害活性は  $IC_{50}=730 \mu M$  と比較的弱いものであることが明らかとなった。さらに同構造のペプチドを合成して阻害活性を比較したところ、単離したペプチドとほぼ同じ値を示した。次に、単離ペプチドの ACE 阻害の様式を検討した結果、Asp-Trp は非拮抗阻害、Gly-Ile-Gly は拮抗阻害を示した。以上の成果は、シロサケ頭部をプロテアーゼ消化することにより高血圧抑制機能を有する素材へ変換することが可能であることを示すものである。

2) 次にシロサケ精巢組織から水溶性成分を抽出し、その抗酸化活性と特性について研究した。まず、水溶性成分をリン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて抽出し (水抽出画分と称す)、抽出物を分画分子量 10,000 のメンブランによる限外ろ過で得られたろ液 (低分子画分) および分画分子量 12,000~14,000 のセルロース膜を用いた透析により得られた内液 (高分子画分) に分け、それぞれについて自動酸化および鉄-アスコルビン酸触媒存在下における抗酸化活性を測定した。その結果、水抽出画分および高分子画分では両酸化反応に対する抗酸化活性が認められなかったが、低分子画分は抗酸化活性を示した。また、この低分子画分は水溶性ラジカル発生剤である AAPH 存在下の酸化に対しても抗酸化活性を示した。これらの結果から、低分子画分には触媒および非触媒存在下の酸化反応に対して抗酸化活性を示す成分の存在が示唆された。このため、低分子画分中に存在する抗酸化成分の同定を試みた。低分子画分中には従来から抗酸化成分として知られているスペルミン、プトレッシンなどのポリアミンが含まれていたが、これらの成分は単独では鉄-アスコルビン酸存在下の酸化反応に対して抗酸化活性を示したが、測定された含量の各成分を混合したもの (再構成した混合物) では抗酸化活性が認められなかったため、他の抗酸化成分の存在が示唆された。そこで、低分子画分中に含まれるペプチドおよび遊離アミノ酸について抗酸化活性を検討した。まず、低分子画分を塩酸加水分解する前後でその活性が低下しないことから、ペプチドは関与していないものと考えられた。一方、遊離アミノ酸に関しては、測定したアミノ酸はすべて鉄-アスコルビン酸存在下の酸化に対して抗酸化活性を示し、さらにチロシン、ヒスチジンおよびアルギニンの場合は、AAPH 存在下の酸化に対しても抗酸化活性を示した。以上の結果から、シロサケ精巢中の水溶性低分子画分の抗酸化活性は、スペルミンやプトレッシンなどの関与も考えられるが、主としてチロシンなどの遊離アミノ酸の作用に依存するものと考えられた。以上の成果により、シロサケ精巢組織から限外ろ過のような簡単な処理によって水溶性抗酸化成分が調製できることから、同組織は有用かつ優れた機能性原料と考えられた。

3) 未利用海藻から  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を指標として血糖上昇抑制作用を有する機能性成分を探索し、活性成分の同定を行った。まず、エゾイシゲ、アラメ、ホンダワラ、スジメ、イソムラサキ、エゾツノマタの6種の海藻をそれぞれ50%メタノールで抽出し、それらの抽出物について酵母由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼに対する阻害活性を測定した。その結果、エゾイシゲおよびアラメの抽出物に阻害活性が見られ、特にエゾイシゲ抽出物に強い阻害活性を認めた。次にエゾイシゲ抽出物について、ラット小腸由来  $\alpha$ -グルコシダーゼのマルトースおよびスクロース分解活性に対する阻害活性を測定したところ、両分解活性に対していずれも阻害活性が認められ、その  $IC_{50}$  値はそれぞれ2.8 mg/ml および2.2 mg/ml であった。そこで、この抽出物の生体内での有効性を調べるために、ラットの糖負荷試験による血糖上昇抑制作用の検討を行った。その結果、スクロースにエゾイシゲ抽出物を混合した試料を経口投与したラット群では、投与後15~30分間の最高血糖値を約30mg/100ml程度有意に抑制し、本抽出物の生体内での有効性が明らかとなった。そこで、この抽出物から生理的に有効な  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害成分を液液分配法や各種クロマトグラフィーを用いて単離し、活性成分の構造解析を行った。単離した活性成分は核磁気共鳴分析法、ゲル浸透HPLC および元素分析などで解析した結果、分子量14,000のフロロタンニンと同定された。フロロタンニンの  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用は本研究によってはじめて明らかにされたものである。以上の結果から、未利用海藻であるエゾイシゲは上記活性成分を含み、その抽出物は粗製物でも生理効果を有することから糖尿病や肥満予防に有用な機能性食品素材であることが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	西田清義
副査	教授	関伸夫
副査	教授	林賢治
副査	助教授	尾島孝男
副査	助教授	栗原秀幸

## 学位論文題名

### 未利用水産動植物資源の機能性成分に関する研究

近年、各種の食品素材のもつ生理機能が注目され、疾病予防に有効な新しい機能性成分の探索と単離、構造について盛んに研究されている。この様な機能性成分が未利用水産動植物資源中に見出すことができれば、それら資源の高度活用が可能となるばかりでなく、廃棄物処理問題や環境保全にも貢献するものと考えられる。本研究は未利用水産動植物資源として水産加工副産物や沿岸部に繁茂する雑海藻類などを対象にし、高血圧抑制、抗酸化および血糖上昇抑制などに関与する新しい機能性成分の存在や生理活性、化学構造などについて明らかにすることを目的としたもので、審査員一同が評価した点を以下に要約する。

1) シロサケ頭部および内臓、ホタテガイの内臓の各組織を5種の市販プロテアーゼ(XP-415、ピオプラーゼSP-10、パパイン、デナチームAP、デナプシン2P)で消化し、消化物についてアンギオテンシンI変換酵素(ACE)の阻害活性を検討し、高血圧抑制ペプチドの探索を行った。その結果、活性の強さに違いはあるものの、全てがACE阻害活性を示した。その中でも、シロサケ頭部のピオプラーゼSP-10消化物が最も強い活性を示したので、この消化物を限外ろ過して分子量10,000以下のペプチド画分を分離した。この画分は自然発症高血圧ラットへの経口投与により、6時間から24時間の間に約23mmHgの血圧降下作用を示し、生体内でも有効であることを確認した。そこで、ACE阻害ペプチド画分を吸着分配法、ゲルろ過法および逆相HPLCにより分離、精製した結果、2種類のペプチドを得た。それらのアミノ酸組成および配列の解析結果から、ひとつはAsp-Trpであり、他はGly-Ile-Glyであった。阻害活性(IC<sub>50</sub>)は前者が13μMと既知の食品由来のペプチドの中でも強い活性をもつものであったが、後者は730μMと比較的弱いものであり、このことはペプチドを合成して確認した。以上の成果は、シロサケ頭部がプロテアーゼ消化されることにより高血圧抑制機能を有する素材へと変換されうることを示すものである。

2) シロサケの精巣組織から水溶性画分を抽出した後、分子量10,000以下の低分子画分と12,000~14,000以上の高分子画分に分画し、それらの抗酸化活性を自動酸化および鉄-アスコルビン酸接触酸化反応下で測定した。その結果、低分子画分は両酸化反応に対して抗酸化活性を示したが、高分子画分は示さなかった。また、低分子画分は水溶性ラジカル発生剤である2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)ジヒドロクロリド(AAPH)存在下の酸化反応に対しても抗酸化活性を示した。この画分には抗酸化成分として従来から知られているスペルミンやプトレッシンなどのポリアミンが含まれていたが、それらを混合した場合は抗酸化活性を示さないことが分かった。さらに、ペプチドおよび遊離アミノ酸の抗酸化活性を検討した結果、ペプチドが抗酸化活性に寄与しているとは認められなかった。一方、遊離アミノ酸はすべて鉄-アスコルビン酸存在下の酸化に対して抗酸化活性を示し、中でもチロシン、ヒスチジンおよびアルギニンは、AAPH存在下の酸化に対しても抗酸化活性を示した。以上の結果から、シロサケ精巣中の水溶性低分子画分に見出された抗酸化活性は、主としてチロシンなどの遊離アミノ酸によるものと判断された。以上の成果はシロサケ精巣が水溶性抗酸化成分を含む有用な機能性原料であることを示した。

3) エゾイシゲ、アラメ、ホンダワラ、スジメ、イソムラサキ、ツノマタの6種の海藻中に血糖上昇抑制作用を有する成分を探索した。すなわち、それらの50%メタノール抽出物を調製し、酵母およびラット小腸由来の $\alpha$ -グルコシダーゼに対する阻害活性を検討し、エゾイシゲ抽出物に強い阻害活性を認めた。次いで、この抽出物の生体内での有効性を調べるために、ラットの糖負荷試験による血糖上昇抑制作用を検討した結果、スクロースにエゾイシゲ抽出物を混合した試料を経口投与したラット群では、投与後15~30分間の最高血糖値を約30mg/100ml程度低下させ、その有効性が確認された。そこで、抽出物から阻害活性成分を液液分配法や各種クロマトグラフィーを用いて単離し、核磁気共鳴分析法、ゲル浸透HPLCおよび元素分析法などにより構造解析を行った結果、活性成分は分子量14,000のフロロタンニンと同定された。フロロタンニンが $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有することは新知見である。以上のように、エゾイシゲは血糖上昇抑制成分としてフロロタンニンを含み、その抽出物は粗製でも生理効果を有することから、糖尿病や肥満予防に有用な機能性食品素材であることを示した。

上記の成果は、現在その廃棄、処理が問題となっている各種の未利用水産動物資源から機能性物質を分離し、その機能と構造を明らかにし、利用の可能性を示した点で高く評価され、審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与されるに適格であると判定した。