

水産廃棄タンパク質加水分解物の高度利用に関する研究

—アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの生成と特性—

学位論文内容の要旨

農水産加工業を中心とする北海道では一次、二次産業から排出される廃棄物の処理が大きな問題となっており、その解決策が模索されている。特に水産加工業では、内臓などの非可食部の排出割合が高く、埋め立てや焼却処理に過大なコストがかかるため、それらを有効利用する用途開発が急務とされている。そこで、本研究では未利用水産物であるスルメイカ肝臓や遡上シロサケから、その特性を生かした高度利用法を開発するための基礎的な研究として、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性ペプチドの生成を試み、得られたペプチドの特性について調べた。

はじめに、スルメイカ肝臓や遡上シロサケ筋肉のタンパク質から ACE 阻害ペプチドの生成過程である加水分解反応条件を詳細に検討した。その結果、12 種のプロテアーゼの中から遡上シロサケ筋肉のサーモリシン分解物が ACE 阻害率及び収率において最も高い値を示し、それぞれ 72.5%、85.7% であった。また、同加水分解反応において、反応時間の設定も重要であることが明らかとなった。すなわち、加水分解反応初期段階においては反応時間に伴いペプチドの生成量が増加し ACE 阻害活性も高まったが、反応 5 時間をピークにその後は減少した。その際、収率は変わらなかったことから、生成した ACE 阻害ペプチドがさらに加水分解を受けて、みかけの ACE 阻害活性が低下したと考えられた。これらの条件を最適化することで、ACE 阻害活性を有するサーモリシン分解物 (IC_{50} : 27.9 $\mu\text{g/mL}$) を得ることができた。また、サーモリシンを含む食品添加物であるサモアーゼ®を用いて ACE 阻害ペプチドの生成過程である加水分解反応の条件を検討した結果、サーモリシン分解物の IC_{50} 値と同程度である 26.4 $\mu\text{g/mL}$ の ACE 阻害活性が得られ、食品添加物でも同程度の阻害活性をもった加水分解物を生成できることがわかった。

サーモリシン分解物を高血圧自然発症ラットに対して体重あたり 500 及び 2000 mg/kg で単回経口投与し、*in vivo* における血圧降下作用を調べた。サーモリシン分解物はコントロール群に対し有意に血圧の降下作用を示し、500、2000 mg/kg

種のペプチドの透過速度の合計の方が高くなることを見い出した。そこで、これらの中で効率よく透過するペプチドの組み合わせについてさらに検討を加えた。その結果、N末端グループ(Trp-Ala、Trp-Val、Trp-Met、Trp-Leu)が逆配列であるC末端グループ(Ala-Trp、Val-Trp、Met-Trp、Leu-Trp)より透過速度が速いことが分かった。このようにジペプチドを混合することでそれぞれのジペプチドを単独で添加する場合に比べて透過性が増大することが初めて示された。ペプチドの腸管における吸収はペプチドトランスポーター(PEPT)を介することが知られており、本研究におけるジペプチドもGly-Proと競合することから、PEPTを介した透過であることが示唆された。その際に、混合ペプチドはPEPTの発現量に影響を及ぼしていなかったが、PEPTに対するKm値が大きく低下していた。したがって、混合することでPEPTに対する親和性が高まり、透過量が増加したと考えられた。このようにペプチドを混合することでその透過量の総和が個々のペプチドの単独添加より増加することから、サーモリシン分解物はペプチドを効果的に吸収させて、血圧降下作用を示していたことが推察された。

以上のように、本研究では、遡上シロサケの新たな利用用途として血圧降下作用ペプチドの生成とその特性に関する重要な知見を得ることができ、有用資源として位置づけるに至った。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋 是太郎
副査	教授	宮下 和夫
副査	助教授	栗原 秀幸
副査	助教授	細川 雅史

学位論文題名

水産廃棄タンパク質加水分解物の高度利用に関する研究

—アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの生成と特性—

本研究は廃棄処分負担が問題になっている遡上シロサケ筋肉及びイカゴロに含まれるタンパク質をプロテアーゼの特異性を活用して加水分解し、アンジオテンシン I 変換酵素(ACE)阻害活性を示す高付加価値機能性ペプチドへの変換を試みたものである。

申請者は初めにスルメイカ肝臓や遡上シロサケ筋肉のタンパク質から ACE 阻害ペプチドの生成過程である加水分解反応条件を詳細に検討し、遡上シロサケ筋肉のサーモリシン分解物が ACE 阻害率及び収率において最も高い値を示すことを明らかにした。また、加水分解反応初期段階においては反応時間に伴いペプチドの生成量が増加し ACE 阻害活性も高まるが、反応時間が 5 時間をピークにその後は減少することから、反応時間の設定が重要であることも明らかにした。事業化を念頭において、申請者はさらにサーモリシンを含む食品添加物であるサモアーゼ®を用いた反応系についても検討し、同程度の阻害活性をもった加水分解物を十分に生成できることを明らかにした。

次いで申請者はサーモリシン分解物を高血圧自然発症ラットに対して体重あたり 500 及び 2000 mg/kg 単回経口投与し、コントロール群に対し有意に血圧を下げることを証明した。

申請者はサーモリシン分解物に含まれる ACE 阻害ペプチドの分離、同定にも成功し、Trp-Ala、Val-Trp、Trp-Met、Met-Trp、Leu-Trp、Ile-Trp の存在を明らかにするとともに、これらの中で強い阻害活性を示すジペプチドの IC₅₀ 値は Val-Trp 2.5 mM、Met-Trp 9.9 mM、Ile-Trp 4.7 mM と何れも 10 mM 以下であることを明らかにした。また、同定した ACE 阻害ペプ

チドの特徴として、何れも Trp を含むジペプチドであり、ペプチドの配列の比較から Trp が C 末端側に配した場合の方が N 末端に配したときよりも ACE 阻害活性が高いことを明らかにした。このペプチドの配列と阻害様式の関係についても調べ、高い ACE 阻害活性を示す Trp を C 末端側に配したペプチドのうち、Val-Trp を除いて 5 種のうち 4 種が非拮抗阻害であることを明らかにした。これに対して、Trp を N 末端に配したジペプチドでは Trp-Ala、Trp-Val 及び Trp-Met が拮抗阻害、Trp-Leu が非拮抗阻害様式であることを明らかにした。

in vitro において ACE 阻害活性を示すペプチドの中には生体中で血圧降下作用を示さないものも知られており、それらはペプチドの消化性や吸収性に起因すると考えられている。そこで申請者はペプチドの生体内への吸収性について腸管上皮モデル細胞を用いて調べた。同定した 6 種のペプチドのほかに Ala-Trp、Trp-Val、Trp-Leu も含めてそれらの消化性や吸収性について詳細に検討した結果、何れのジペプチドも腸管上皮モデル細胞の単層膜を透過し、中でも Ala、Val を含む親水性のジペプチドが高い透過速度を示すことを明らかにした。また、Trp を N 末端側に配したペプチドの方が C 末端に配したものより透過速度が速いことも明らかにした。通常ペプチドは混合した状態にあることから、上記のジペプチドを混合した状態における透過性についても検討を加え、8 種のジペプチドを等量ずつ混合した状態で腸管上皮モデル細胞に添加した場合は、それらの中で最も透過速度の高かった Trp-Ala 単独の添加よりも、混合した 8 種のペプチドの透過速度の合計の方が高くなることが初めて見いだされた。そこで申請者はこれらの中で効率よく透過するペプチドの組み合わせについてさらに検討を加え、N 末端グループが同一アミノ酸の混合形態 (Trp-Ala、Trp-Val、Trp-Met、Trp-Leu) の方が逆配列である C 末端グループが同一の混合形態 (Ala-Trp、Val-Trp、Met-Trp、Leu-Trp) よりも透過速度が速いことを明らかにした。ペプチドの腸管における吸収はペプチドトランスポーター (PEPT) を介することが既に知られており、本研究におけるジペプチドも Gly-Pro と競合することから、PEPT を介した透過であることが示唆された。その際に、混合ペプチドは PEPT の発現量に影響を及ぼしてはいないが、PEPT に対する K_m 値を大きく低下させることが判明した。したがって、申請者はペプチドを混合することにより PEPT に対する親和性が高まり、透過量が増加したものと考えに至った。サーモリシン分解物がペプチドの混合形態をとることから、結果として ACE 阻害ペプチドを効果的に吸収させ、血圧降下作用を発揮するものと申請者は結論した。

以上のように、申請者の研究成果は水産廃棄物タンパク質の高度利用に新たな方向を切り

開くものであり、審査員一同は本研究の申請者が博士(水産科学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。