

信州大学審査学位論文

ソバsprアウト乳酸発酵物に含まれる降圧成分の特徴付け

平成 25 年 9 月

小山 正浩

目次

序論	1
1. 血圧と高血圧	1
2. 食品による高血圧予防	2
3. ソバ	2
4. 発酵キョウバク	3
5. 本研究の目的	4
第一章 発酵キョウバクに含まれる既知降圧成分の定量	6
試薬および方法	6
1. 試薬	6
2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の調製	7
2-1. ソバスプラウト凍結乾燥物の調製	7
2-2. 発酵キョウバク凍結乾燥物の調製	7
3. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の SHR における単回経口投与試験	7
4. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物に含まれる フラボノイド類, GABA, チロシンの定量	8
4 - 1. フラボノイド類	8
4 - 1 - 1. HPLC 分析	8
4 - 1 - 2. LC-MS 分析	9
4 - 1 - 3. フラボノイド成分の定量	9
4 - 2. 総フェノール量	9

4-3. GABA	10
4-4. チロシン	10
5. 統計分析	11
結果	11
1. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の降圧作用の比較	11
2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物に含まれる	
既知降圧成分の定量	14
2-1. 含有フラボノイド成分の特定と定量	14
2-1-1. 含有フラボノイド成分の特定	14
2-1-2. 含有フラボノイド成分の定量	18
2-2. GABA およびチロシンの定量	20
考察	22
第二章 乳酸発酵により新たに生成する降圧成分の単離・同定	24
試薬および方法	24
1. 試薬	24
2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の調製	25
3. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の	
HPLC 分析による成分比較	25
4. 発酵キョウバクに含まれる降圧成分の分離と精製	25
5. LC-MS/MS 分析およびアミノ酸配列分析による	
降圧ピークに含まれる物質の同定	26
5-1. LC-MS/MS 分析	26

5. <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i> ACE 阻害活性間の相関分析	54
6. 統計分析	54
結果	54
1. 血管拡張作用	55
2. ACE 阻害活性	57
2 - 1. <i>in vitro</i> ACE 阻害活性	57
2 - 2. <i>in vivo</i> ACE 阻害活性	58
2 - 3. <i>ex vivo</i> ACE 阻害活性	63
考察	69
総括	80
謝辞	83
引用文献	84

序論

1. 血圧と高血圧

血圧とは、一般的に動脈内血液が血管壁に与える圧力（動脈血圧）を指し、心臓の一回の拍動により送り出される血液量（心拍出量）と末梢血管抵抗の積で表される。動脈血圧は、収縮期血圧と拡張期血圧（最高血圧、最低血圧とも言う）に分けられる。収縮期血圧とは、心臓が拍動して大動脈を含む全身の動脈に血液を送り出すときに血管にかかる圧力を示し、拡張期血圧とは、心臓が大動脈弁を閉じて拡張したとき、心臓から送り出された血液の一部が大動脈に蓄えられ、その蓄えられた血液が血管張力の反動で末梢側へ押し出されるときに血管にかかる圧力を示す。この収縮期血圧、拡張期血圧は、血管の収縮弛緩や心拍出量などにより調節されており、平常時にそれぞれ 130 mmHg 未満、85 mmHg 未満である状態がヒトの正常血圧と規定されている。しかし、血管収縮による血管抵抗の上昇、心拍出量増加による循環血液量の増加、動脈硬化による血管抵抗の上昇などの要因で長期にわたって血圧が上昇した状態が続くことが高血圧である。具体的には、正常血圧を超えると正常高値血圧（いわゆる高血圧症予備群）、さらに収縮期血圧が 140 mmHg 以上または拡張期血圧が 90 mmHg 以上となると高血圧症と診断される（高血圧治療ガイドライン 2009）。現在我が国の高血圧症患者は 4000 万人にのぼる（平成 23 年国民健康・栄養調査）。

高血圧は、心筋梗塞などの心疾患、脳卒中などの脳血管疾患そして慢性腎臓病の危険因子となる（島本和明, 1999 ; Lida, M. et al., 2003.）。その中でも、心疾患、脳血管疾患はそれぞれ日本人死亡要因の 2 位と 4 位である（平成 24 年（2012）人口動態統計の年間推計）。高血圧の予防は日本国民の死亡率低減につながり、国民の収縮期血圧 2 mmHg の低下で脳卒中死亡患者数は約 9000 人、虚血性心疾患死亡者数は約 4000 人も減少すると期待されている（健康日本 21 企画検討会, 2000）。さらに高血圧予防の効果は、国家医療費の削減にもつながる。超高齢化社会を迎えている日本では、国民医療費

は増加の一途をたどっている。現在、国民医療費 37.4 兆円のうち、20.8%の 5.6 兆円が循環器系の疾患の治療に使用されている（平成 22 年度国民医療費の概況結果）。高血圧の予防は、国民の健康増進および医療費低減のために重要な意味を持つのである。

2. 食品による高血圧予防

ヒトの高血圧症のおよそ 90%が本態性高血圧症であり、遺伝的な要因に加えて生活習慣がその発症に密接に関与している。この対策および予防として、栄養指導や生活指導に代表される生活習慣の改善が重要視されている。生活習慣の改善はすでに高血圧症を発症している人に対しても重要であり、初期の高血圧症に対しては効果が大きく表れ、正常血圧にまで改善されることもある（城西大学薬学部医療栄養学科，2007）。そこで注目されているのが、食品の生体調節を行う機能（三次機能）を高めた機能性食品である。機能性食品と言ってもさまざまであるが、代表的な例として消費者庁が科学的証拠に基づいて認可している機能性食品・特定保健用食品（トクホ）である。平成 25 年 6 月 4 日現在、1064 品目の食品がトクホとして認可され、そのうち 25 品目が「血圧が高めの方に適する」表示をした降圧食品である。降圧食品のトクホ市場規模は 245 億円に上り、市場に占める割合も年々増加している（2011 年特定保健用食品の市場規模調査）。医薬品は有効成分のみを含有しているため効果は高いが副作用がある。その一方で、食品にはさまざまな成分が含まれているため効果が穏やかであり、副作用もほとんどない。なにより、手軽に日常の食事に組み込んで血圧の調節ができる。機能性食品の市場は今後も増加していくと考えられる。

3. ソバ

ソバ (*Fagopyrum esculentum*) はタデ科ソバ属の一年草であり、世界中で食用にされている。ソバの機能性については古くから研究がなされており、血圧低下に関与する成分も複数報告されている。ソバ種実はその他の穀類と比較してアミノ酸やタンパク質を豊富に含有しており、ソバタンパク質から単離されたペプチドは昇圧物質の生成に関与

するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害作用 (Ma et al., 2006) を持つことが知られている。また、穀類で唯一、ルチンを含有している。ルチンとは、ケルセチンにルチノースが結合したフラボノイド配糖体の一種であり、降圧作用や抗酸化活性などの機能性が報告されている (Kreft et al., 2006)。ソバにはルチン以外にも降圧作用を持つ GABA (Kawasaki et al., 1995) や、優れた ACE 阻害活性を持つ 2' -ヒドロキシニコチアミン (Aoyagi, 2006) が豊富に含まれている。このように、ソバには高血圧予防に関連するさまざまな機能性成分が含まれている。これらの成分は、ソバ種実だけでなく発芽した茎葉 (以下、ソバスプラウト) にも含まれており、発芽により引き起こされるさまざまな生化学的反応によりその含量が増加することが報告されている (Aoyagi, 2006 ; Lin et al., 2008)。実際にルチン含量がソバ種子より 1.9 倍多い発芽種子が、ヒト本態性高血圧症モデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR ; Spontaneously Hypertensive Rat) において有意な降圧作用を示すという報告もある (Kim et al., 2009)。ソバは、種子、スプラウトともに機能性に富み、降圧食品素材として有望である。

4. 発酵キョウバク

筆者が所属する研究室では、機能性成分を豊富に含むソバスプラウトと伝統的な食品加工法であり、機能性食品の製造にも利用される乳酸発酵を組み合わせたソバスプラウト乳酸発酵食品である発酵キョウバク (Neo-fermented buckwheat sprout, Neo-FBS) を開発し、研究対象としている。

発酵キョウバクは高い降圧作用を有する。SHR へ 0.010 mg/kg 投与で収縮期血圧、拡張期血圧を有意に低下させる。また、降圧作用だけでなく、発酵キョウバク凍結乾燥物を 0.010% 混合させた飼料を SHR へ 42 日間連続摂取させたところ、通常餌を摂取させた SHR と比較して血圧上昇を有意に抑制する。

発酵キョウバクの降圧作用には、血管拡張作用と ACE 阻害作用の 2 種の降圧機序が関与する (Nakamura et al., 2013)。血管拡張作用は、収縮剤により収縮させた SHR 由来

胸部大動脈リング標本を用いて、血管等尺性張力試験により評価した。発酵キョウバク水溶液を収縮させたリング標本に添加したところ、添加濃度 0.5 µg/mL という低濃度から血管拡張を引き起こし、50 µg/mL で最大血管拡張 82.8±3.7%を確認した。50%効果濃度 (EC₅₀) は 8.3±1.4 µg/mL であった。この血管拡張作用は、内皮細胞除去標本、血管内皮細胞由来血管拡張因子として知られる一酸化窒素 (NO) の合成酵素阻害剤・L-NAME の共存下で抑制された。すなわち、発酵キョウバクの血管拡張は内皮依存性であり、NO 産生を介する経路に関与して血管を拡張させている。

発酵キョウバクのもう一つの降圧機序が ACE 阻害作用である。 *in vitro* 試験における発酵キョウバクの 50%ACE 阻害濃度 (IC₅₀ 値) は 0.24 mg/mL であり、食品としては中程度の活性を示した。さらに、発酵キョウバクを SHR に投与して生体組織における ACE 阻害活性を測定した。10 mg/kg BW の用量で発酵キョウバクを SHR に単回経口投与し、投与 6 時間後に摘出した生体組織の ACE 活性は、対照群 (純水投与) と比べて胸部大動脈、心臓、肺、肝臓および腎臓において有意な低下がみられた。生体内でも有効に ACE を阻害していた。

このように発酵キョウバクは、高血圧モデルに対して優れた降圧効果を持っており、高血圧治療または高血圧予防の観点から機能性食品、特定保健用食品、医薬品への応用が期待される。

5. 本研究の目的

発酵キョウバクは、上述したように優れた降圧作用を有している。降圧作用を持つ食品素材であるオキアミ加水分解物やイワシ加水分解物エタノール抽出物の SHR における最少有効用量はそれぞれ 1.0 mg/kg (Hatanaka et al., 2009), 10 mg/kg (Seki et al., 1999) であり、他の降圧食品素材と比較しても発酵キョウバクの降圧作用は強力であると言える。今後、この発酵キョウバクを食品分野、医薬品分野などで利活用していくためには、含まれている有効成分に関する科学的証拠を得ることが必須となるが有効成分については明らかとなっていなかった。そこで、本研究では乳酸発酵による成分変化と

いう面から発酵キョウバクに含まれる有効成分の探索を行い、単離成分についてその降圧機序の検討を行った。

第一章では、発酵キョウバクとソバスプラウトの SHR における降圧作用を比較し、乳酸発酵により増加する既知降圧成分の特定および定量を行う。第二章では、乳酸発酵により新たに生成される物質の単離を行い、候補物質を SHR に投与して降圧作用の確認を行った結果を述べる。第三章では、発酵キョウバクから単離された降圧物質の降圧機序を血管等尺性張力試験および ACE 阻害活性試験により検討した結果と新たに提案した ACE 阻害活性評価方法について述べる。最後に、総括として本研究により得られた成果をまとめ、その意義を考察する。

第一章 発酵キョウバクに含まれる既知降圧成分の定量

ソバスプラウト乳酸発酵物である発酵キョウバクは、SHRにおいて高い降圧作用を示した。過去に降圧作用を持つ発酵食品は複数報告されており、例えば、牛乳の乳酸発酵物や大豆の納豆菌による発酵物は、SHRの血圧を有意に低下させることが報告されている (Takano T, 1998 ; Ibe et al., 2009)。これらの食品は発酵により降圧作用が付与されており、発酵キョウバクの降圧作用も乳酸発酵により高まっていると考えられた。発酵キョウバクの原料であるソバスプラウトには、ソバ種子由来の機能性フラボノイド成分や遊離アミノ酸類が豊富に含まれている。これらの成分が乳酸発酵によりさらに増加して発酵キョウバクの降圧作用に関与している可能性がある。

そこで、本章では、まず発酵キョウバクと原料であるソバスプラウトの降圧作用の比較を行い、発酵により降圧作用が高まるかどうかを確認した。その後ソバスプラウトに含まれる機能性フラボノイド成分の同定を行い、それらの含量を発酵キョウバクと比較した。さらに降圧作用が報告されているアミノ酸類であるチロシン (Sved et al., 1979) と GABA (Suzuki et al., 2006) の定量も行い、発酵キョウバクが持つ降圧作用に対するこれらの成分の関与を検証した。

試薬および方法

1. 試薬

ギ酸, GABA, チロシン, フェノール試薬, 炭酸ナトリウム, HPLC グレードアセトニトリル, HPLC グレードメタノール, フェニルイソチオシアネート (PITC), トリエチルアミン (TEA) および次亜塩素酸ナトリウムは関東化学株式会社 (東京) から購入した。フェノール成分標品 (ルチン, イソオリエンチン, オリエンチン, イソビテキシン, ビテキシン) はフナコシ株式会社 (東京) より購入した。トリフルオロ酢酸 (TFA) は渡辺化学工業株式会社 (広島) から購入した。

2. 発酵キョウバクおよびソバспラウト凍結乾燥物の調製

2-1. ソバспラウト凍結乾燥物の調製

ソバспラウトはサラダコスモ株式会社（岐阜）から購入した。栽培床および種殻を取り除いたソバспラウト 25 g を 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム 100 mL に浸漬し、10 分間殺菌処理を行い、流水で洗浄した。その後、ジューサーにて破砕、搾汁し、搾汁液を 3,600 g、4°C で 30 分間遠心分離（Centrifuge 5810 R；エッペンドルフ株式会社、東京）した。上清を凍結乾燥（EYELA FDU-2000；東京理化機械株式会社、東京）し、ソバспラウト凍結乾燥物（0.27 g）として以降の実験に用いた。

2-2. 発酵キョウバク凍結乾燥物の調製

発酵キョウバク凍結乾燥物は、筆者の所属する研究室で開発した方法に従って調製した（Nakamura et al., 2013）。原料のソバспラウトはサラダコスモ株式会社から購入した。栽培床および種殻を取り除いたソバспラウト 10 kg を 100 ppm の次亜塩素酸ナトリウム 20 L に浸漬し、10 分間殺菌処理を行い、流水で洗浄した。殺菌したソバспラウトは、約 2.0 cm の長さに切断し、ジューサーで破砕・搾汁した。搾汁液と残渣は、合わせてミキサーでさらに細かく破砕し、密封容器に入れた。破砕物 1.0 kg あたり 25 mL の乳酸菌スターター（*Lactobacillus plantarum* KT, バイオテックジャパン, 新潟）を添加し、窒素置換後、室温で 15 日間静置発酵させた。発酵終了後、ろ過、遠心分離（3,600 g, 4°C, 30 min）によって得られた上清 6.8 kg を発酵キョウバクとした。得られた発酵キョウバクは、エバポレーターで減圧濃縮・凍結乾燥し、発酵キョウバク凍結乾燥物 137.4 g を以降の実験に用いた。

3. 発酵キョウバクおよびソバспラウトの SHR における単回経口投与試験

動物試験は、体重 300-350 g の雄性 13 週齢 SHR を用いて行った。SHR は、チャールスリバー株式会社（神奈川）より購入し、個別のケージで搬入から一週間馴化飼育した。明暗周期 12 時間、室温 22-23°C に制御された飼育室で飼育し、ラット用標準飼料（MF；

チャールスリバー株式会社) および水道水を自由摂取とした。馴化飼育後, 12 時間絶食させ, サンプルを単回経口投与した。発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物は純水に溶解させ, 1.0 mg/kg BW の用量でそれぞれ 6 匹の SHR に単回経口投与した。対照群には純水を投与した。収縮期血圧および拡張期血圧変化は非観血式血圧測定器 Softron BP-98A (ソフトロン株式会社, 東京) を用いてテイルカフ法により, 試料投与前および投与後 3, 6, 9, 24 時間後に測定した。本論文で行った動物実験は全て信州大学動物実験ガイドラインに従って行った。

4. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト中フラボノイド類, GABA, チロシンの定量

4-1. フラボノイド類

4-1-1. HPLC 分析

HPLC 分析はプロミネンス HPLC システム (株式会社島津製作所, 京都) を用いた。発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物それぞれ 3.0 mg を 1.0 mL の 50%メタノールに溶解させ, 振とう培養器 (SI-300C, アズワン株式会社, 大阪) で振とう (1600 rpm, 室温, 30 min) してフラボノイド成分の抽出を行った。抽出操作は 3 回行った。その後, 遠心分離 (1,500 g, 4°C, 15 min) を行い, 得られた上清の凍結乾燥物を HPLC 分析に用いた。HPLC 分析は, カラムに CHEMCOBOND 5-ODS-W (4.6×150 mm, 株式会社ケムコプラス, 大阪) を用い, 移動相 A に 0.10%ギ酸含有水, 移動相 B に 0.10%ギ酸含有アセトニトリルを用いた。移動相 B は 0→5% (0→2 min), 5→8% (2→12 min), 8→10% (12→16 min), 10→14% (16→18 min), 14→15% (18→20 min), 15% (20→50 min) の濃度でグラジエントを行い, 流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 40°C, 注入量は 10 μ L に設定した。含有されているフラボノイド成分の最大 UV 吸収を確認するため, フォトダイオードアレイ検出器を用いて 200-800 nm の範囲で吸収スペクトルを記録した。HPLC クロマトグラムは, 一般的にフラボノイド類の分析に用いられる検出波長の 280 nm で表した。この HPLC 分析条件は, LC-MS 分析にも用いた。

4-1-2. LC-MS 分析

LC-MS 分析は信州大学食品保健機能開発研究センター (CREFAS) にて行った。ソバスプラウトに含まれるフラボノイド成分は Waters 2695 (HPLC) に接続した Quattro micro API (MS) 分析システム (日本ウォーターズ株式会社, 東京) により分析した。LC 分析は「4-1-1. HPLC 分析」に示した条件で行った。MS 分析は, キャピラリー電圧が 3500 V, イオン化電圧が 30 V, 窒素ガス流量 (desolvation) が 350 L/hr, 窒素ガス流量 (cone) が 50 L/hr, 窒素ガス温度が 100°C, 脱溶媒用窒素ガス温度が 350°Cで行った。イオン化はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法により行い, 検出はポジティブモードで検出範囲は m/z 100-1000 とした。

4-1-3. フラボノイド成分の定量

定量は, HPLC を用いて「4-1-1. HPLC 分析」に示した条件で行った。検量線は, ソバに含まれる代表的なフラボノイド成分であるルチンの標準品を用いて作成し, 同定された各フラボノイド成分含量 (ルチン, オリエンチン, イソオリエンチン, ビテキシン, イソビテキシン) は, ルチン当量で表した (mg/g dry weight (DW))。ルチンは 50% メタノールに 0.125-1.0 mg/mL の濃度で溶解させて HPLC 分析し, 検量線を作製した。検量線の R^2 値は 0.9999 および回帰式は $y = 107x + 81639$ となった。全ての測定は 3 回行い, 結果は平均値±標準誤差で表した。

4-2. 総フェノール量

総フェノール量はフォリンチオカルト法により測定した (Julkunen-Tiitto, 1985)。発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物を 0.50 mg/mL の濃度で純水 1.0 mL に溶解させ, 分析試料とした。発酵キョウバクまたはソバスプラウト分析試料と 1.0 mL の 1.0 M フェノール試薬を混合し, 2 分間攪拌した。攪拌後, 10%炭酸ナトリウム溶液を 1.0 mL 加え, 再度攪拌し, 30 分間室温で静置した。30 分後, 溶液中の総フェノール量を吸光度計 (UV-2500PC, 株式会社島津製作所) を用いて測定波長 700 nm で測定した。検量線は 10-40 $\mu\text{g/mL}$ の没食子酸を用いて作成し, 総フェノール量は没食子酸当量

で表した (mg/g DW)。検量線の R^2 値は 0.9996 および回帰式は $y = 33.14x + 0.146$ となった。発酵キョウバクおよびソバスプラウトにはアスコルビン酸が含まれていなかったため、アスコルビン酸補正は行っていない。全ての測定は3回行い、結果は平均値±標準誤差で表した。

4-3. GABA

発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれている GABA は、フェニルチオカルバミル (PTC) -GABA に誘導体化させて定量した (Gunawan et al., 1990)。すなわち、発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物は純水で 100 mg/mL の濃度に調製し、遠心分離 (1,500 g, 4°C, 15 min) した後、上清を得た。上清 20 μ L を減圧乾燥させ、乾燥物に 10 μ L のエタノール：純水：TEA (2：2：1 v/v/v) を加えて溶解させた。混合液は再度減圧乾燥し、乾燥物に 20 μ L のエタノール：純水：TEA：PITC (7：1：1：1 v/v/v/v) を加え、20 分間室温で静置することで、発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれている GABA を PTC-GABA へ誘導体化した。その後、溶媒を減圧乾燥により除去し、PTC-GABA の HPLC 分析を行った (Xin-jin et al., 2010)。HPLC 分析は、カラムに Mightysil RP-18 GP aqua (4.6×250 mm, 関東化学) を用い、移動相 A にアセトニトリル：酢酸緩衝液 (pH 6.5) (25：975 v/v), 移動相 B にアセトニトリル：純水：メタノール (450：400：150 v/v/v) を用いた。移動相 B は 5→40% (0→50 min) の濃度でグラジエントを行い、流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 40°C, 検出波長は 254 nm, 注入量 10 μ L に設定した。検量線は 0.050-0.50 mM の GABA 標準溶液を上記の方法で誘導体化して HPLC 分析し、作成した。検量線の R^2 値は 0.9999 および回帰式は $y = 9.0 \times 10^8 x - 5582.8$ となった。全ての測定は3回行い、結果は平均値±標準誤差で表した。

4-4. チロシン

発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物を 1.0 mg/mL の濃度で 0.10%TFA 含有水に溶解させ、HPLC 分析に用いた。HPLC 分析は、カラムに TSK-Gel Amide-80 (4.6

×250 mm, 東ソー株式会社, 東京) を用い, 移動相 A に 0.10%TFA 含有水, 移動相 B に アセトニトリルを用いた。移動相 B は 5% (0→15 min), 5→10% (15→25 min) の濃度 でグラジエントを行い, 流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 30°C, 検出波長は 215 nm, 注 入量は 20 μL に設定した。検量線は 4.31-17.3 μM のチロシン標準品溶液を用いて作成 した。検量線の R² 値は 0.9962 および回帰式は $y = 3.47 \times 10^4 x - 8001.2$ となった。 全ての測定は 3 回行い, 結果は平均値±標準誤差で表した。

5. 統計分析

全て結果は平均値±標準誤差で示した。各群間の比較はスチューデントの *t* 検定によ り統計処理を行い, 危険率 5%および 1%で有意差を示した (**p* < 0.05, ***p* < 0.01)。

結果

1. 発酵キョウバクとソバスプラウトの降圧作用の比較

発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物は純水に溶解させ, 1.0 mg/kg BW の用量で SHR に単回経口投与した (n = 6)。投与前, 投与後 3, 6, 9, 24 時間後に収縮 期血圧, 拡張期血圧を測定し, 投与前の血圧と比較した経時的な血圧変化をグラフに示 した (図 1)。また, 各時間での各投与群の血圧変化値と対照群の血圧変化値について スチューデントの *t* 検定を行った。

発酵キョウバク投与により 3 時間後から血圧低下の傾向が見られ始め, 6, 9 時間後 に有意な収縮期血圧低下を, 3-9 時間後に有意な拡張期血圧低下が確認された。最大収 縮期血圧低下は 39.9±1.1 mmHg, 最大拡張期血圧低下は 40.8±1.5 mmHg であった (い ずれも投与 6 時間後)。その一方で, ソバスプラウト投与による有意な収縮期, 拡張期 血圧低下は確認されなかった (図 1)。

ソバスプラウトは, 発酵キョウバクの最少有効用量 (0.010 mg/kg) の 100 倍用量で も有意な降圧作用を引き起こさなかったため, 有意な降圧作用を惹起させる十分な量の 降圧物質が含まれていないと考えられた。すなわち, これらの結果は, 発酵キョウバク

の降圧作用はソバスパウトの乳酸発酵により付与されることを示している。また、乳酸発酵により降圧成分の含量が高まっていると考えられた。

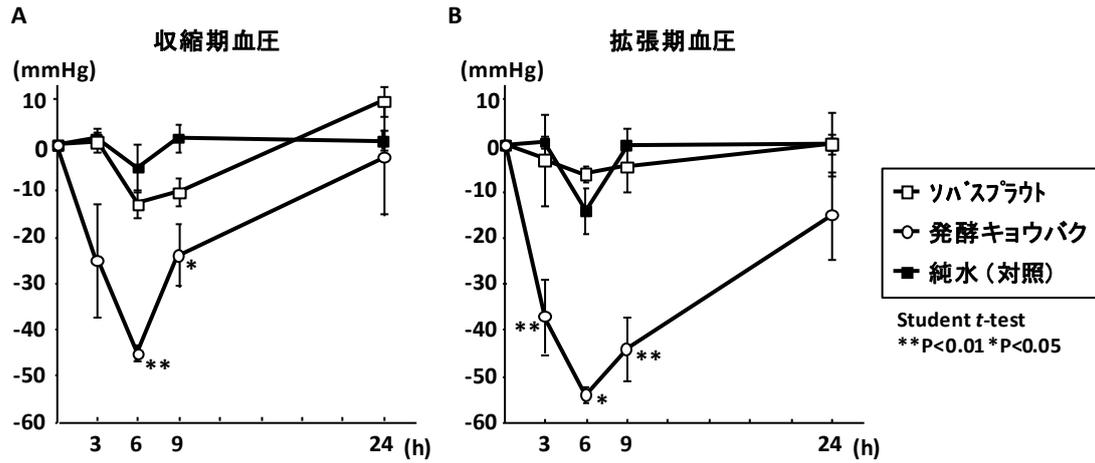


図1 発酵キョウバクおよびソバズプラウト凍結乾燥物単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) の収縮期血圧 (A) および拡張期血圧 (B) 変化.

試験動物は雄性 13 週齢 SHR, 投与量は 1.0 mg/kg BW. □, ソバズプラウト投与群 (n = 6); ○, 発酵キョウバク投与群 (n = 6); ■, 純水投与群 (対照) (n = 6) . * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれる既知降圧成分の定量

2-1. 含有フラボノイド成分の特定と定量

2-1-1. 含有フラボノイド成分の特定

ソバスプラウトに含まれるフラボノイド成分が乳酸発酵により増加し、発酵キョウバクの降圧作用に関与しているかどうかを確認するために、まず発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれているフラボノイド成分の特定を行った。発酵キョウバクおよびソバスプラウトメタノール抽出物について HPLC 分析を行ったところ、両者とも類似したクロマトグラムが得られ、5本の主要ピークが確認された (図 2A)。これらのピークは、フラボノイド類に特徴的な 250-280 nm および 330-350 nm に特徴的な UV 吸収を示した (Jurd, 1962) (図 2B)。そこで、各主要ピークに含まれるフラボノイド成分を特定するために LC-MS 分析を行った。

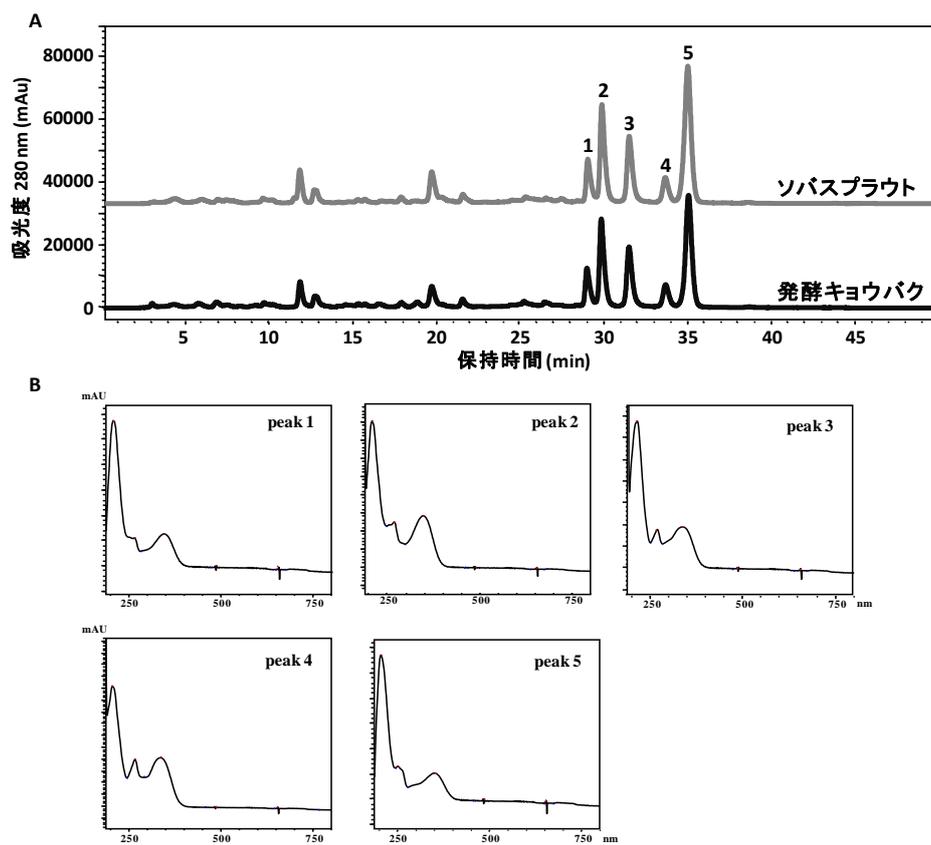


図 2 UV 280 nm における発酵キョウバクおよびソバsproutメタノール抽出物の HPLC クロマトグラム (A) と各ピークにおける UV スペクトラム (B, 200-800 nm).

分析は、カラムに CHEMCOBOND 5-ODS-W (4.6×150 mm, 株式会社ケムコプラス, 大阪) を用い、移動相 A に 0.10%ギ酸含有水, 移動相 B に 0.10%ギ酸含有アセトニトリルを用いた。流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 40℃, 注入量は 10 μL に設定した。

ソバスプラウトの各ピークについて LC-MS 分析を行った結果、イオンは全てプロトン付加体で検出された。MS スペクトルを図 3 に示す。ピーク 1 および 2 からは m/z 448.9 のイオンピークが強く観測され、理論値 $[M+H]^+$ m/z 449.38 のオリエンチンもしくはイソオリエンチンであると推定された。ピーク 3 および 5 からは m/z 432.9 のイオンピークが強く観測され、理論値 $[M+H]^+$ m/z 433.38 のビテキシンまたはイソビテキシンであると推定した。また、ピーク 4 については m/z 610.9 のイオンピークが強く観測され、理論値 $[M+H]^+$ m/z 611.53 のルチンであると推定された。各ピークに含まれている物質を決定するため、推定したフラボノイド標準品とソバスプラウト試料の混合溶液を HPLC 分析した結果、ピーク 1 に含まれる物質はオリエンチン、ピーク 2 に含まれる物質はイソオリエンチン、ピーク 3 に含まれる物質はビテキシン、ピーク 5 に含まれる物質はイソビテキシンであった。発酵キョウバクで検出された主要ピークについても LC-MS 分析を行った結果、同様の結果が得られた。

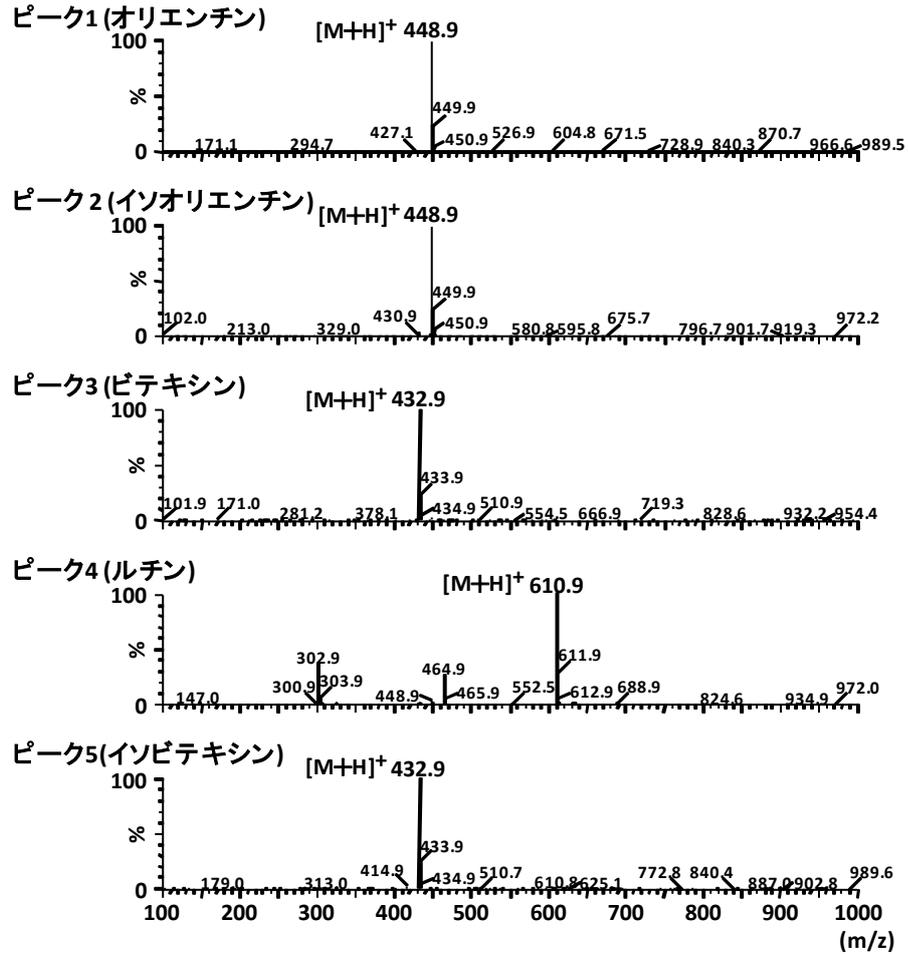


図3 各ピークに含まれる成分のMSスペクトル.

ピーク1; オリエンチン, ピーク2; イソオリエンチン, ピーク3; ビテキシン, ピーク4; ルチン, ピーク5; イソビテキシン.

2-1-2. 含有フラボノイド成分の定量

発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれる各フラボノイド成分の定量を行った。フラボノイド成分はHPLCにより定量し、ルチン当量で表した。定量結果は表1に示す。発酵キョウバクのオリエンチン、イソオリエンチン、ビテキシン、イソビテキシンおよびルチン含量は、それぞれルチン当量で 4.2 ± 0.5 mg/g DW, 12.9 ± 0.9 mg/g DW, 10.3 ± 0.3 mg/g DW, 1.7 ± 0.1 mg/g DW および 23.0 ± 1.2 mg/g DW であった ($n = 3$)。ソバスプラウトのオリエンチン、イソオリエンチン、ビテキシン、イソビテキシンおよびルチン含量は、それぞれルチン当量で 5.8 ± 0.5 mg/g DW, 16.6 ± 0.7 mg/g DW, 11.8 ± 0.7 mg/g DW, 2.5 ± 0.4 mg/g DW および 34.0 ± 3.1 mg/g DW であった ($n = 3$)。乳酸発酵によるフラボノイド成分含量の有意な増加は見られず、むしろ発酵キョウバクのイソオリエンチンおよびルチン含量は、ソバスプラウトと比較して有意に減少していた。これらのフラボノイド成分以外のフェノール成分が乳酸発酵により大幅に増加し、発酵キョウバクの降圧作用に関与している可能性も考えられたため、総フェノール量をフォリンチオカルト法により測定した。しかしながら、両者の総フェノール量に有意な変化は見られなかった(発酵キョウバク: 40.5 ± 0.3 mg/g DW, ソバスプラウト: 43.0 ± 1.2 mg/g DW)。

発酵キョウバクは 1.0 mg/kg 投与で強力な降圧作用を示すが、そのフラボノイド成分含量および総フェノール量は、同用量で有意な降圧作用を示さないソバスプラウトとほぼ同等または有意に少なかった。すなわち、これらの成分の発酵キョウバクの降圧作用への関与はほとんどないと考えられた。

表1 発酵キョウバクおよびソバスプラウトにおけるフラボノイド成分含量と総フェノール量 (mg/g DW, n = 3)

	ソバスプラウト	発酵キョウバク
オリエンチン ¹	5.8 ± 0.5	4.2 ± 0.5
イソオリエンチン ¹	16.6 ± 0.7	12.9 ± 0.9*
ビテキシン ¹	11.8 ± 0.7	10.3 ± 0.3
イソビテキシン ¹	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.1
ルチン	34.0 ± 3.1	23.0 ± 1.2*
総フェノール ²	40.5 ± 0.3	43.0 ± 1.2

¹ルチン当量. ²没食子酸当量. * $p < 0.05$ (ソバスプラウト vs 発酵キョウバク, スチューデント t -test)

2-2. GABA およびチロシンの定量

ソバにはフラボノイド成分以外に降圧作用を持つアミノ酸類であるチロシン (Sved et al., 1979) や GABA (Suzuki et al., 2006) が含まれている。そこで、発酵キョウバクおよびソバスプラウトにおけるこれらの成分の定量を行った (表 2)。発酵キョウバクとソバスプラウトの GABA 含量は、それぞれ 2.6 ± 0.2 mg/g DW および 1.4 ± 0.2 mg/g DW であった ($n = 3$)。発酵キョウバクの GABA 含量はソバスプラウトと比較して 1.86 倍有意に増加していた。また、発酵キョウバクとソバスプラウトのチロシン含量は、それぞれ 2.6 ± 0.1 mg/g DW, 0.54 ± 0.02 mg/g DW であり ($n = 3$)、4.89 倍有意に増加していた。これらの結果は、ソバスプラウトの乳酸発酵により GABA とチロシンが増加しており、これらの成分が発酵キョウバクの降圧作用の一部を担っている可能性を示している。

表2 発酵キョウバクおよびソバスプラウトにおけるGABA含量とチロシン含量(mg/g DW,

n = 3)

	ソバスプラウト	発酵キョウバク
GABA	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2**
チロシン	0.54 ± 0.02	2.6 ± 0.1**

** $p < 0.01$ (ソバスプラウト vs 発酵キョウバク, スチューデント t -test)

考察

本章では、ソバsprautを乳酸発酵させることで、発酵キョウバクが持つ優れた降圧作用が付与されることを明らかにした。さらに、乳酸発酵によりソバ由来既知降圧成分であるチロシンおよびGABAの含有量が増加していることを見出した。

発酵キョウバクは1.0 mg/kg投与でSHRの収縮期血圧および拡張期血圧を有意に低下させた。対照的に、ソバsprautは同用量の投与で有意な降圧作用を引き起こさなかった。ソバを原料とした降圧食品素材のSHRにおける降圧作用は、これまでに複数報告されている。Liらはソバの酵素消化物をSHRに100 mg/kgの用量で単回経口投与し、収縮期血圧が 29.9 ± 3.4 mmHg低下したと報告している (Li et al., 2002)。また、Kimらは発芽ソバ種子を600 mg/kg/dayの用量で5週間連続投与した結果、SHRの収縮期血圧が53 mmHg低下したと報告している (Kim et al., 2009)。発酵キョウバクの降圧作用は、これまでに報告されていたソバ由来降圧食品素材よりも大幅に高い。これらの知見は、ソバsprautの乳酸発酵が、降圧作用を飛躍的に高めていることを示している。そのため、含有される降圧成分も乳酸発酵により飛躍的に増加していると推測した。そこで、発酵キョウバクおよびソバsprautに含まれるソバ由来既知降圧成分の定量を行い、比較した。

ソバに含まれる既知降圧成分であるチロシンやGABAは、ソバsprautと比較して発酵キョウバクにおける含量が有意に高まっていた。遊離アミノ酸やGABAは、食品素材の乳酸発酵により増加することがこれまでに報告されている (Nomura et al., 1998; Tsai et al., 2006)。チロシンは200 mg/kgの用量で静脈内投与により、SHRの収縮期血圧を40 mmHg有意に低下させ (Sved et al., 1979)、GABAは0.50 mg/kg単回経口投与でSHRの収縮期血圧を15 mmHg有意に低下させる (Hayakawa et al., 2004)。実際に、チロシンやGABAを多く含んでいる発酵キョウバクはソバsprautより優れた降圧作用を示している。

アミノ酸類に加えてソバsprautには機能性を持つフラボノイド成分であるオリエンチン、イソオリエンチン、ピテキシン、イソピテキシン、ルチンが含まれているこ

とを HPLC 分析および LC-MS 分析により明らかにし、発酵キョウバクにもこれら 5 種のフラボノイド成分が含まれていた。特にルチン、オリエンチンおよびイソオリエンチンは降圧作用が報告されている (Fu et al., 2005; Fusi et al., 2003)。しかしながら、発酵キョウバクにおけるこれらの成分は、ソバスプラウトと比較して有意に減少または発酵による変化はなかった。総フェノール量についても両者間で有意な変化はなかった。アミノ酸類やフラボノイド類以外に、降圧作用に関与する可能性を持つソバ由来成分として強力な ACE 阻害物質である 2', 3'-ヒドロキシニコチアナミンが挙げられる (Aoyagi, 2006)。2', 3'-ヒドロキシニコチアナミンは、ソバスプラウトの乳酸発酵によりソバスプラウト搾汁液と比較して 3.32 倍増加することが明らかとなっており (Maejima et al., 2011)、発酵キョウバクにおいても原料のソバスプラウトより多く含まれていると考えられる。しかしながら、2', 3'-ヒドロキシニコチアナミンの生体における降圧作用は未だ明らかとなっておらず、発酵キョウバクの降圧作用への関与を判断することは難しい。

本章で、ソバ由来既知降圧成分の定量を行った結果、ソバスプラウトから同定したフラボノイド成分は乳酸発酵による有意な含量増加は確認されなかったが、チロシンおよび GABA は乳酸発酵により有意に増加しており、発酵キョウバクの降圧作用への関与が考えられた。しかし、チロシンおよび GABA の発酵キョウバク中の含有量や、それらの降圧作用から考察すると、これらの成分が発酵キョウバクの優れた降圧作用を引き起こすだけの能力を持っているとは考えにくい。すなわち、発酵キョウバクの降圧成分は、ソバ由来既知降圧成分の他に存在するということが強く示唆された。そこで、ソバスプラウトの乳酸発酵により新たに生成される降圧成分の探索を進めた。

第二章 乳酸発酵により新たに生成する降圧成分の単離・同定

第一章で、ソバスプラウトおよび発酵キョウバクに含まれる既知降圧成分の定量を行った。乳酸発酵により増加する成分もあったが、発酵キョウバクの降圧成分を説明するには、量的にも質的にも弱いという結論に至った。そのため、乳酸発酵によりソバスプラウト中の成分が代謝、化学修飾され、新たに生成した成分が降圧作用に関与している可能性が高いと考えた。

そこで、本章では、まず HPLC 分析により発酵キョウバクおよびソバスプラウトの成分比較を行い、発酵により増加、生成される物質を分析、単離した。単離された候補物質は単回経口投与し、*in vivo*での降圧作用を SHR への単回経口投与試験により検証した。

試薬および方法

1. 試薬

α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA), ジエチルエーテル, ギ酸, 塩酸, HPLC グレードアセトニトリル, HPLC グレードメタノール, 塩化ナトリウム, 水酸化ナトリウムおよび硫酸ナトリウムは関東化学株式会社から購入した。ジメチルホルムアミド (DMF), ピペリジン (PPD), トリフルオロ酢酸 (TFA), トリイソプロピルシラン (TIPS), H-Gln-O *t*Bu·HCl, Boc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OH·H₂O, Fmoc-Arg (Pbf) -OH·nIPE, Fmoc-Asp (O *t*Bu) -OH, Fmoc-Glu (O *t*Bu) -OH·H₂O, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His (Boc) -OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr (*t*Bu) -OH, Fmoc-Trp (Boc) -OH, Fmoc-Tyr (*t*Bu) -OH および Fmoc-Val-OH は渡辺化学工業株式会社から購入した。ジクロロメタン (DCM), ジイソプロピルエチルアミン (DIEA), 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリニウム クロライド (DMTMM), *o*-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート (HBTU), *N*-ヒドロキシベンゾトリアゾール

ル (HOBt) および *N*-メチルピロリドン (NMP) は国産化学株式会社 (東京) から購入した。Rink Amide AM resin はメルク株式会社 (東京) から購入した。

2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の調製

発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物は、第一章「2. 発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物の調製」に示す方法で調製した。

3. 発酵キョウバクおよびソバスプラウトの HPLC 分析による成分比較

発酵キョウバクおよびソバスプラウトの HPLC 分析は、一般的に食品成分分析に用いられる ODS カラムを用いて行った。発酵キョウバクおよびソバスプラウト凍結乾燥物を 0.10%TFA 含有水に 1.0 mg/mL の濃度で溶解し、分析試料とした。分析システムはプロミネンス HPLC システムを用いた。HPLC 分析は、カラムに CHEMCOBOND 5-ODS-W (4.6 × 150 mm) を用い、カラム温度は 30°C に設定した。溶出は 0.10%TFA 含有水のアイソクラティック溶出で行い、溶出速度は 0.8 mL/min, 検出波長は 215 nm, 注入量は 20 μL に設定した。

4. 発酵キョウバクに含まれる降圧成分の分離と精製

まず、発酵キョウバクを固相抽出により分画した。純水で 50 mg/mL に調製した発酵キョウバク試料 1.0 mL を Sep-Pak Vac C₁₈ 10 g Cartridge (日本ウォーターズ) に添加し、溶媒にメタノール : 0.1%TFA 含有水 (10 : 90 v/v) を用いて、画分 1-100 まで 1.0 mL ずつ計 100 mL 溶出させた。各画分は減圧濃縮し、発酵後増加ピークである ODS ピーク 1 および ODS ピーク 2 の存在を確認するために HPLC 分析を行った。HPLC 分析は「3. 発酵キョウバクおよびソバスプラウトの HPLC 分析による成分比較」に示す条件で行った。その結果、画分 37-78 に ODS ピーク 1 および ODS ピーク 2 が含まれていたため、これらの画分を減圧濃縮、凍結乾燥し、HPLC 分取に用いた。

凍結乾燥した画分は、0.10%TFA 含有水で 50 mg/mL に調製し、CHEMCOBOND 5-ODS-W セ

ミ分取カラム (20 × 250 mm) を用いて ODS ピーク 1 および ODS ピーク 2 の HPLC 分取を行った。分析システムはプロミネンス HPLC システムを用いた。溶出は 0.10%TFA 含有水のアイソクラティック溶出で行い、カラム温度は 30°C, 溶出速度は 10 mL/min, 検出波長は 215 nm, 注入量は 500 μL に設定した。分取した ODS ピーク 1 および ODS ピーク 2 は, 減圧濃縮, 凍結乾燥して動物試験と HPLC 分析に用いた。

高い降圧作用を示した ODS ピーク 2 に含まれている化合物をさらに精製するため, 異なる分離様式のカラムを用いて分離条件の検討を行った。検討には, ODS ピーク 2 の分取に使用した ODS カラムと比較して炭素含有率が異なる ODS カラム, ゲルろ過カラム, アミノカラム, アミドカラム, 親水性相互作用カラムを用いた。ODS ピーク 2 に含まれる化合物の最も良い分離はアミドカラムによって得られた。分析条件は以下の通りである。カラムは, TSK-Gel Amide-80 (4.6 × 250 mm) を用い, カラム温度は 30°C に設定した。溶出は 0.10%TFA 含有水 (溶媒 A) とアセトニトリル (溶媒 B) を用いて, 溶媒 A ; 5% (0→15 min), 5→10% (15→20 min), 10→25% (20→80 min) のグラジエント溶出で行った。溶出速度は 0.8 mL/min, 吸収波長は 215 nm, 注入量は 20 μL に設定した。この分析条件は LC-MS/MS 分析にも用いた。

5. LC-MS/MS 分析およびアミノ酸配列分析による降圧ピーク (ODS ピーク 2) に含まれる物質の同定

5-1. LC-MS/MS 分析

アミドカラム分析により検出されたピークの LC-MS/MS 分析は CREFAS にて行った。ODS ピーク 2 に含まれる化合物は Waters 2695 (HPLC) に接続した Quattro micro API (MS) 分析システムにより分析した。LC 分析条件は「4. 発酵キョウバクに含まれる降圧成分の分離と精製」に示したアミドカラム分析条件を用いた。MS 分析は, キャピラリー電圧が 3500 V, イオン化電圧が 20 V, 窒素ガス流量 (desolvation) が 350 L/hr, 窒素ガス流量 (cone) が 50 L/hr, 窒素ガス温度が 100°C, 脱溶媒用窒素ガス温度が 350°C で行った。イオン化は ESI 法により行い, 検出はポジティブモードで検出範囲は m/z

100-1000 とした。MS1 で得られた親イオン (m/z 270.1, 274.2, 294.2, 318.0, 582.5, 609.5, 609.6) は、コリジョンガスにアルゴンガスを用いた衝突誘起解離 (CID : Collision Induced Dissociation) 法により MS/MS 分析に供した。コリジョンガス流量は 9.0 mL/h, コリジョン電圧は 30 V である。また、特定の質量電荷比 (m/z) を持つイオンだけを選択的に検出できるシングルイオンモニタリング (SIM) モードを用いて、ソバスプラウトを試料として LC-MS 分析を行い、発酵キョウバクから同定された 7 種の候補ペプチドが含まれているかどうかの確認も行った。

5-2. アミノ酸配列分析

ODS ピーク 2 分取物由来のアミドカラムピークについてアミノ酸配列分析を行った。アミノ酸配列分析はニッピ株式会社 (東京) で気相式自動アミノ酸シーケンサー (Procise492HT ; Applied Biosystems, Inc., CA, USA) を用いたエドマン分解法により行った。各アミドピークに含まれるペプチドのアミノ酸配列は、LC-MS/MS 分析によって得られたフラグメントイオン情報とエドマン分解の結果により決定した。

6. 単離ペプチドの合成

LC-MS/MS 分析およびアミノ酸配列分析により同定されたペプチドは全て筆者の所属する研究室で合成し、動物試験に用いた。FQ は液相法, DVWY, FDART, GHG, VAE, VVG および WFR は固相法により化学合成した。

FQ は以下の手順に従って合成した。まず、MeOH (3.0 mL) に Boc-Phe-OH (3.0 mmol, 0.79 g) を溶解させ、その後 DMTMM (1.5 eq, 1.51 g) を加え室温で 10 分間攪拌した。攪拌後、H-Gln-*O*tBu (3.0 mmol, 0.72 g) を加えさらに 1 時間攪拌した。1 時間の反応後、酢酸エチル (50 mL) および純水 (30 mL) を加え攪拌し、水層は除去した。有機層は 1.0 M HCl (30 mL), 1.0 M NaOH (30 mL) および飽和食塩水で洗浄した。洗浄後、有機層は無水硫酸ナトリウムを入れたデシケーター内で減圧乾固させた。乾燥物は、溶媒に DCM : MeOH = 9 : 1 を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、Boc-Phe-Gln-*O*tBu を収率 84% で得た。Boc-Phe-Gln-*O*tBu (2.5 mmol, 1.12 g) は TIPS

(60 μ L) を混合させた DCM (3.0 mL) に溶解させた。さらに TFA (1.5 mL) を加え、10 時間攪拌した。攪拌終了後、ジエチルエーテル (50 mL) を加え、ろ過し、沈殿を得た。沈殿物は、ジエチルエーテル (30 mL) で洗浄した後、減圧乾固させ、粗ペプチド H-Phe-Gln-OH (FQ) を収率 70% で得た。

固相合成はペプチド固相合成器 (PetiSyzer ; ハイペップ研究所, 京都) を用いて行った。VAE の合成手順を以下に示す。Fmoc-Glu (OtBu) -OH (1.2 mmol, 0.53 g) に縮合剤混合液 (HBTU 1.2 mmol, 0.46 g ; HOBt 1.2 mmol, 0.16 g ; DMF 2.7 mL) を加えた後に、0.9 M DIEA (DIEA 0.42 mL ; NMP 2.3 mL) を加えて 10 分間攪拌した。混合液に Rink Amide AM resin (300 mg) を加えて 50°C で 8 時間攪拌した。樹脂を DCM : DMF = 1 : 1 (50 mL) で 3 回洗浄し、Fmoc-Glu (OtBu) -resin を得た。Fmoc-Glu (OtBu) -resin に Fmoc 脱保護混合液 (PPD 12 mmol ; DMF 5.4 mL) を加え、室温で 20 分間攪拌した。脱保護した樹脂を DMF (25 mL) で 3 回洗浄し、H-Glu (OtBu) -resin を得た。同様の方法で、Fmoc-Ala-OH (1.2 mmol, 0.40 g) および Fmoc-Val-OH (1.2 mmol, 0.41 g) を用いて H-Val-Ala-Glu (OtBu) -resin を合成した。氷上で H-Val-Ala-Glu (OtBu) -resin に脱樹脂・脱側鎖混合液 (TFA : H₂O : TIPS = 95 : 2.5 : 2.5, 10 mL) を加え、90 分間攪拌し、ろ液を回収した。さらに樹脂を TFA (15 mL) で洗浄し、ろ液を回収した。氷上でろ液に冷却したジエチルエーテル (40 mL) を滴下し、十分に攪拌して冷凍庫内で一晩沈殿させた。遠心分離 (4°C, 1,500 g, 30 min) を行い、上澄みを除去した。氷上で沈殿に冷却したジエチルエーテル (40 mL) を加えて十分に攪拌し、遠心分離 (4°C, 1,500 g, 30 min) を行い、上澄みを除去した。沈殿はさらに冷却したジエチルエーテル (40 mL) を加えて十分に攪拌し、遠心分離 (4°C, 1,500 g, 30 min) を行い、上澄みを除去した。その後、ドラフト内で 3 時間以上静置してジエチルエーテルを除去し、水酸化カリウムを入れたデシケーター内で一晩乾燥させて H-Val-Ala-Glu-OH の粗ペプチドを収率 66% で得た。GHG, VVG, DVWY, WFR および FDART も同様の方法で合成した。GHG は Fmoc-Gly-OH および Fmoc-His (Boc) -OH を用いて合成し、粗ペプチドを 82% の収率で得た。VVG は Fmoc-Gly-OH および Fmoc-Val-OH を用いて合成し、粗ペプチドを 92% の収率で得た。DVWY

は Fmoc-Asp (OtBu) -OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp (Boc) -OH および Fmoc-Tyr (OtBu) -OH を用いて合成し, 粗ペプチドを 36%の収率で得た。WTFR は Fmoc-Arg (Pbf) -OH·nIPE, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr (tBu) -OH および Fmoc-Trp (Boc) -OH を用いて合成し, 粗ペプチドを 57%の収率で得た。FDART は Fmoc-Thr (tBu) -OH, Fmoc-Arg (Pdf) -OH/0.5IPE, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp (OtBu) -OH および Fmoc-Phe-OH を用いて合成し, 粗ペプチドを 47%の収率で得た。

得られた粗ペプチドは TFA 含有水 (pH 2.0) で 10 mg/mL に調製し, HPLC 精製に用いた。カラムには CHEMCOBOND 5-ODS-W (20×250 mm) を用い, カラム温度は 30°C に設定した。溶出は 0.10%TFA 含有水 (溶媒 A) と 0.10%TFA 含有アセトニトリル (溶媒 B) を用いて, 溶媒 B;0→100% (0→30 min) のグラジエント溶出で行った。溶出速度は 10 mL/min, 吸収波長は 215 nm, 注入量は 500 μ L に設定した。分取物は減圧濃縮し, 純水を数回加えて TFA を完全に除去した。濃縮液は凍結乾燥した。凍結乾燥して得られたペプチドは, 「5-1. LC-MS/MS 分析」に示す条件で行った LC-MS/MS 分析により分子量およびフラグメントを確認してから以降の試験に用いた。また, HPLC で純度検定を行い, 総面積比 5%以上の不純物によるピークがないことを確認して試験に用いた。

7. SHR における単回経口投与試験方法

単回経口投与試験は, 雄性 11-13 週齢の SHR を用いて行った。試験動物は第一章方法「3. SHR における単回経口投与試験方法」に示す条件で飼育した。一週間馴化飼育を行った後, 12 時間絶食させ, サンプルを単回経口投与した。ODS ピーク 1 および 2 分取物は純水に溶解させ, 発酵キョウバクの最少有効用量と同じ 0.010 mg/kg BW の用量でそれぞれ 6 匹の SHR に単回経口投与した。両ピーク分取物に発酵キョウバク由来の降圧成分が含まれているかどうかを検討するためにこの濃度に設定した。単離ペプチド DVWY, FDART, FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR は純水に溶解させ, 十分な降圧作用を持つことを確認するために発酵キョウバクの最少有効用量よりも多い 0.10 mg/kg BW の用量でそれぞれ 5 匹の SHR に単回経口投与した。各サンプル投与試験において, 対照群には純水

を投与した。収縮期血圧および拡張期血圧変化はテイルカフ法により，試料投与前および投与後 3，6，9，24 時間後に測定した。

8. 統計分析

全て結果は平均値±標準誤差で示した。各群間の比較はスチューデントの t 検定により統計処理を行い，危険率 5%および 1%で有意差を示した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

結果

1. 乳酸発酵により生成する新規降圧成分の同定

1-1. 乳酸発酵により生成する新規降圧成分の探索

まず、発酵キョウバクおよびソバスプラウトの HPLC クロマトグラムの比較を行い、乳酸発酵により生成される物質の存在を確認した。図 4 に示すように、発酵キョウバクのクロマトグラムの 4.5, 11.5 および 21.0 分付近に増大するピークが検出された。4.5 分のピークに含まれる物質は乳酸発酵により生成された乳酸であった。11.5 分 (ODS ピーク 1) と 21.0 分 (ODS ピーク 2) に検出されるピークは、有機酸やフラボノイド類とは保持時間が異なっており、これらのピークに発酵により生成される物質が含まれていると考えた。そこで、含有されている物質の降圧作用を動物試験により評価するために両ピークを分取した。効率的にピーク分取物を得るために、発酵キョウバクの固相抽出により ODS ピーク 1 および 2 を含む画分を濃縮した後、各ピークの HPLC 分取を行った。得られた分取物をそれぞれ ODS ピーク 1 分取物、ODS ピーク 2 分取物として集めた後、各分取物は凍結乾燥し、動物試験に用いた。

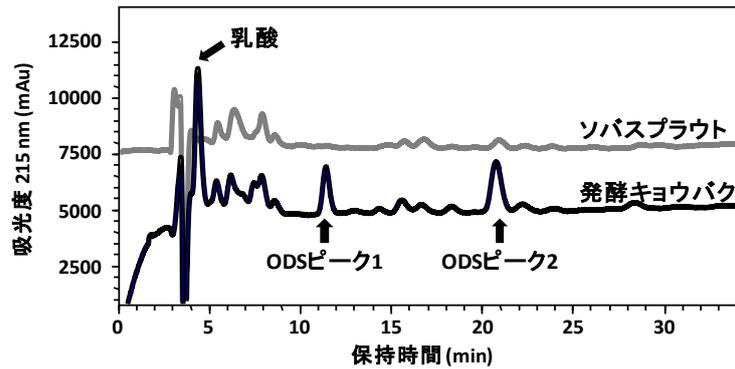


図4 UV 215 nmにおける発酵キョウバクおよびソバsproutのHPLCクロマトグラム。分析は、カラムに CHEMCOBOND 5-ODS-W (4.6 × 150 mm) を用い、移動相に 0.10%TFA 含有水を用いた。流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 30°C, 注入量は 20 μL に設定した。発酵キョウバクのクロマトグラムにおいて増大していた 11.5 分のピークを ODS ピーク 1, 21.0 分のピークを ODS ピーク 2 とした。4.5 分のピークは乳酸である。

各ピーク分取物は純水に溶解させ、0.010 mg/kg BW の用量で SHR に単回経口投与した。両ピーク分取物投与により SHR の血圧が有意に低下した（図 5, n = 6）。ODS ピーク 1 分取物投与により、収縮期血圧のみ投与 6 時間後に有意な低下が確認され、最大収縮期血圧低下は 31.2 ± 1.3 mmHg であった。ODS ピーク 2 分取物投与では、収縮期血圧および拡張期血圧の両方が投与 3-9 時間後にかけて有意に低下し、最大収縮期および拡張期血圧低下は投与 9 時間後にそれぞれ 39.2 ± 8.7 mmHg, 39.2 ± 1.2 mmHg であった。発酵キョウバクは、0.010 mg/kg BW で投与した 9 時間後に SHR の収縮期、拡張期血圧ともに有意に低下させる。ODS ピーク 1 分取物にも降圧成分は含まれていると考えられるが、収縮期、拡張期血圧ともに有意に低下させた ODS ピーク 2 分取物に発酵キョウバクの強力な降圧成分が含まれていると考えた。そこで、ODS ピーク 2 に含まれている降圧成分の単離、同定を進めた。

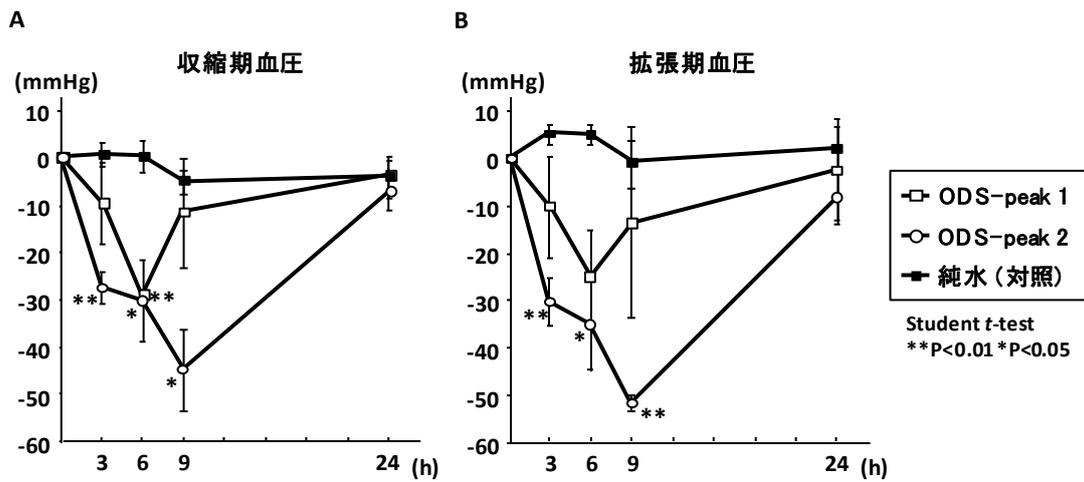


図5 ODS ピーク 1 および ODS ピーク 2 分取物単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) の収縮期血圧 (A) および拡張期血圧 (B) 変化.

試験動物は雄性 13 週齢 SHR, 投与量は 0.010 mg/kg BW. □, ODS ピーク 1 分取物投与群 (n = 6) ; ○, ODS ピーク 2 分取物投与群 (n = 6) ; ■, 純水投与群 (対照) (n = 6) . * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

1-2. ODS ピーク 2 に含まれる降圧成分の単離, 同定

ODS ピーク 2 分取物は、発酵キョウバクを固相抽出で分画後 ODS カラムを用いて分離しただけであり、含有されている降圧物質を単離するためにはさらなる精製が必要である。そこで、分取に用いた ODS カラムとは分離様式が異なる 10 種のカラムを用いて分離条件の検討を行った。まず逆相モードカラムを用いて ODS ピーク 2 分取物の分離条件検討を行った。固定基のエンドキャッピング率が異なる 2 種類の ODS カラムとイオン交換能を持つ ODS カラムについて分析を行ったが、ピークの分離が良好ではなかった。また、イオン排除カラムによる分析では、ほとんどピークが検出されなかった。ゲルろ過カラムでは、215 nm で強い吸収を示すピークを含むクロマトグラムが得られたが、ピークの分離は良好ではなかった。次に順相モードのカラムを用いて分離検討を行った。固定相として担体にアミノアルキル基またはアミノプロピル基が固定化された 2 種のアミノカラムによる分析を行った。アミノプロピル基が固定化されたアミノカラムは、アミノアルキル基が固定化されたカラムと比較して良好な分離が得られた。シリカにアミド基を固定化したアミドカラム、両性イオン型スルフォベタイン基を固定化した親水性相互作用カラムにおいて、さらに良好な分離が得られ、特にアミドカラムが優れていた。以上の検討により、逆相カラムよりも順相カラムにおいて優れた分離が得られることが分かり、ODS ピーク 2 の分析にはアミドカラムを用いた (図 6)。

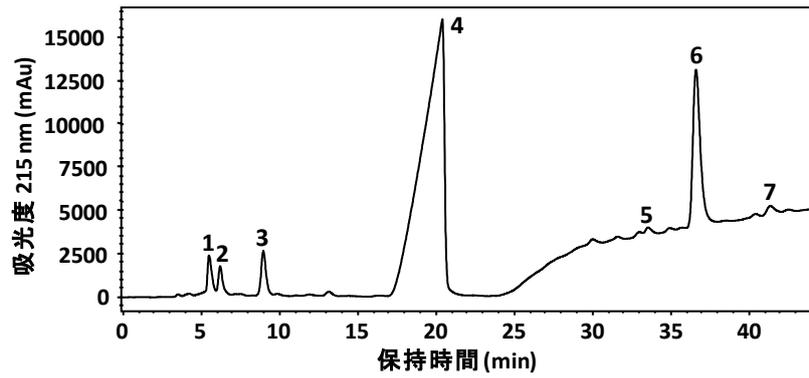


図6 ODS ピーク 2 のアミドカラムを用いた HPLC クロマトグラム.

分析は、カラムに TSK-GEL amide-80 (4.6 × 250 mm, 東ソー株式会社) を用い, 移動相 A に 0.10%TFA 含有水, 移動相 B にアセトニトリルを用いた. 流速は 0.8 mL/min, 分離温度は 30°C, 注入量は 20 μ L に設定した.

図 6 に示すように、ODS ピーク 2 分取物は、アミドカラム分析により 7 つの主要ピークに分離することができた。また、その面積値から、ピーク 4 および 6 に含まれている化合物が比較的豊富に ODS ピーク 2 に含まれていると考えられた。これらのピーク 1-7 に含まれている物質を同定するため、LC-MS/MS 分析を行った。1 次 MS 分析により得られた親イオンとその親イオンの 2 次 MS 分析によって得られたフラグメントイオン情報から、 m/z 200-700 の 7 種のオリゴペプチド (DVWY, FDART, FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR) とアミノ酸 (チロシン) を推定した。図 7 は各ペプチドの LC-MS/MS スペクトルを、表 3 には推定ペプチドのフラグメントイオン情報を示している。ペプチドは全てプロトン付加体である $[M+H]^+$ イオンで検出され、MS/MS 分析によりペプチドで観測されやすい a-, b-, y-, z-系列のフラグメントイオン (Nakata, 2002) が強く観測された。推定したペプチドのアミノ酸配列を決定するため、アミドカラム分析で得られたピーク 1-7 を分取し、エドマン分解法によるアミノ酸配列分析を行った。その結果、LC-MS/MS 分析の結果を裏付けるデータが得られたため、アミノ酸配列は DVWY, FDART, FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR に決定した。

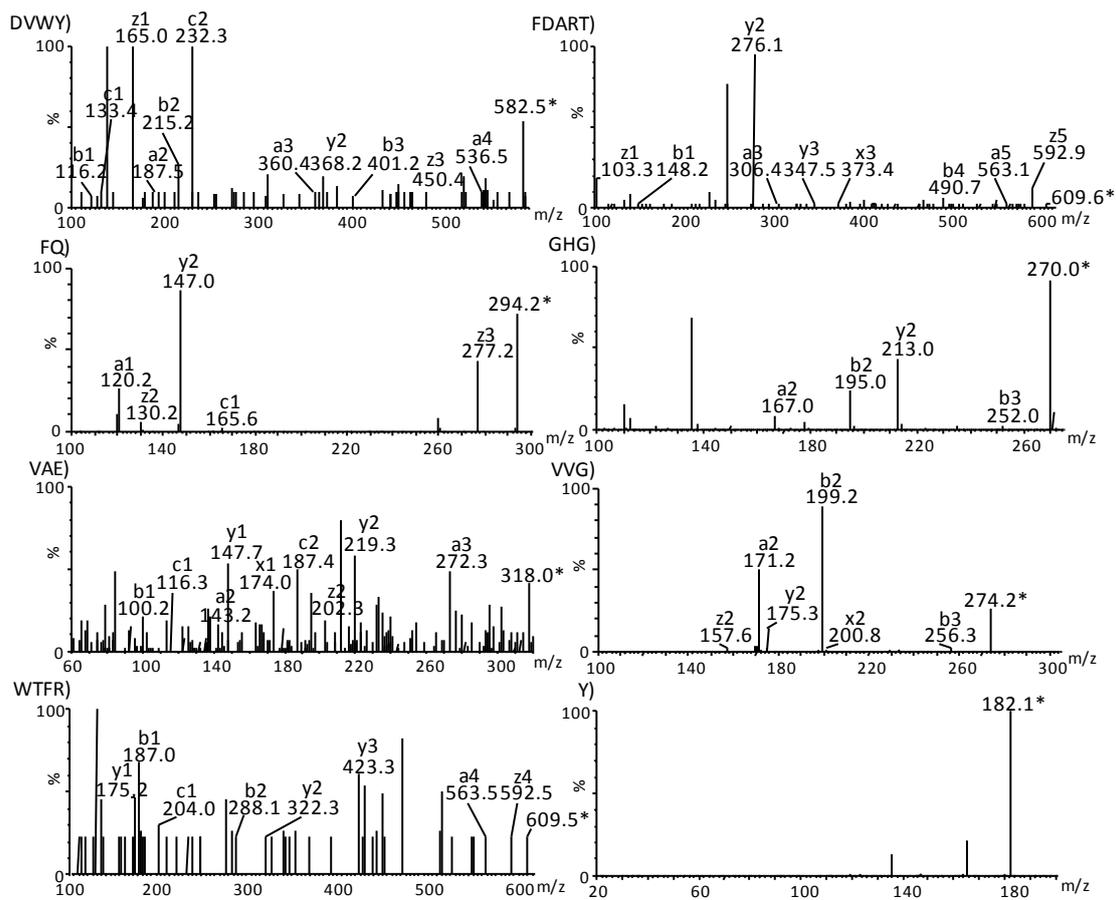


図7 アミドピーク 1 (WFR), ピーク 2 (FDART), ピーク 3 (DVWY), ピーク 4 (チロシン), ピーク 5 (VAE), ピーク 6 (FQ, VVG), ピーク 7 (GHG) の MS/MS スペクトル。親イオン (アスタリスクを付した値) に加えて, 各ペプチド由来の a-, b-, c-, x-, y-および z-フラグメントイオンを図中に示している。

表 3 MS/MS 分析によって得られた各ピークに含まれるペプチドのフラグメントイオン
データ

ピーク 番号	アミノ酸配列	観測値 [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	理論値 [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	観測されたフラグメントイオン (<i>m/z</i>)
1	Trp-Thr-Phe-Arg (WTFR)	609.5	609.3	592.5 (z4), 563.5 (a4), 423.3 (y3), 322.3 (y2), 288.1 (b2), 204.0 (c1), 187.0 (b1), 175.2 (y1)
2	Phe-Asp-Ala-Arg-Thr (FDART)	609.6	609.3	592.9 (z5), 563.1 (a5), 490.7 (b4), 373.4 (x3), 347.5 (y3), 306.4 (a3), 276.1 (y2), 148.2 (b1), 103.3 (z1)
3	Asp-Val-Trp-Tyr (DVWY)	582.5	582.3	536.5 (a4), 450.4 (z3), 401.2 (b3), 368.2 (y2), 360.4 (a3), 232.3 (c2), 215.2 (b2), 187.5 (a2), 165.0 (z1), 133.4 (c1), 116.2 (b1)
4	Y	182.1	182.1	-
5	Val-Ala-Glu (VAE)	318.0	318.2	272.3 (a3), 219.3 (y2), 202.3 (z2), 187.4 (c2), 174.0 (x1), 147.7 (y1), 143.2 (a2), 116.3 (c1), 100.2 (b1)
6	Phe-Gln (FQ)	294.2	294.1	277.2 (z3), 165.6 (c1), 147.0 (y2), 130.2 (z2), 120.2 (a1)
6	Val-Val-Gly (VVG)	274.2	274.2	256.3 (b3), 200.8 (x2), 199.2 (b2), 175.3 (y2), 171.2 (a2), 157.6 (z2)
7	Gly-His-Gly (GHG)	270.0	270.1	167.0 (a2), 195.0 (b2), 213.0 (y2), 252.0 (b3)

2. 単離ペプチドの SHR における降圧作用

ソバスプラウトの乳酸発酵により増加するピークから、DVWY, FDART, FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR が同定された。実際に、降圧作用を持つかどうかを確認するため、SHR へ合成したペプチドを投与し、血圧変化を測定した。ペプチド合成は全て筆者が所属する研究室にて行った。合成したペプチドは純水に溶解させ、0.10 mg/kg BW の用量で SHR へ単回経口投与した (n = 5)。投与前および投与後 3, 6, 9, 24 時間後にテイルカフ法にて収縮期血圧, 拡張期血圧を測定し、投与前の血圧と比較した経時的な血圧変化の値をグラフに示した (図 8, 9)。また、各時間での各ペプチド投与群の血圧変化値と対照群の血圧変化値を比較してスチューデントの *t* 検定を行った。

各単離ペプチドの投与により、SHR の血圧が有意に低下した。DVWY は投与 3, 6 時間後に有意な収縮期血圧低下, 投与 9 時間後に有意な拡張期血圧低下が確認され、最大血圧低下はそれぞれ 54.9 ± 1.3 mmHg, 27.8 ± 4.3 mmHg であった。FDART は、9 時間後に有意な拡張期血圧低下が確認され、最大血圧低下は 26.4 ± 3.7 mmHg, VAE は 3 時間後に有意な拡張期血圧低下が確認され、最大血圧低下は 17.7 ± 2.0 mmHg であった。FDART と VAE において、有意な収縮期血圧低下は確認されなかった。FQ は、投与 9-24 時間後に有意な収縮期血圧低下を、3 および 9 時間後に有意な拡張期血圧低下を示した。最大血圧低下は、それぞれ 33.6 ± 3.4 mmHg, 41.4 ± 3.5 mmHg であった。VVG は、投与 6-9 時間後に有意な収縮期血圧低下を、拡張期血圧は 3-24 時間後と長時間にわたって有意に低下した。最大血圧低下は、 28.3 ± 1.5 mmHg (収縮期血圧), 37.1 ± 3.9 mmHg (拡張期血圧) であった。WTFR は 3-6 時間後に有意な収縮期血圧低下を示し、最大血圧低下は 29.5 ± 4.1 mmHg であった。WTFR 投与による有意な拡張期血圧低下は確認されなかった。GHG は 0.10 mg/kg 投与では収縮期血圧および拡張期血圧において有意な降圧作用は確認されなかったが、1.0 mg/kg 投与において投与 6 時間後に有意な収縮期血圧および拡張期血圧低下が確認された。最大収縮期血圧低下は 22.1 ± 3.1 mmHg, 最大拡張期血圧低下は 12.6 ± 3.9 mmHg であった。7 種の単離ペプチドの中で特に、DVWY, FQ および VVG が高い降圧作用を有していた。LC-MS 分析により、これらのペプチドは全て、ソバスプ

ラウトには含まれていなかった。すなわち、ソバスプラウトの乳酸発酵により新たに降圧ペプチドが生成されたことを示している。

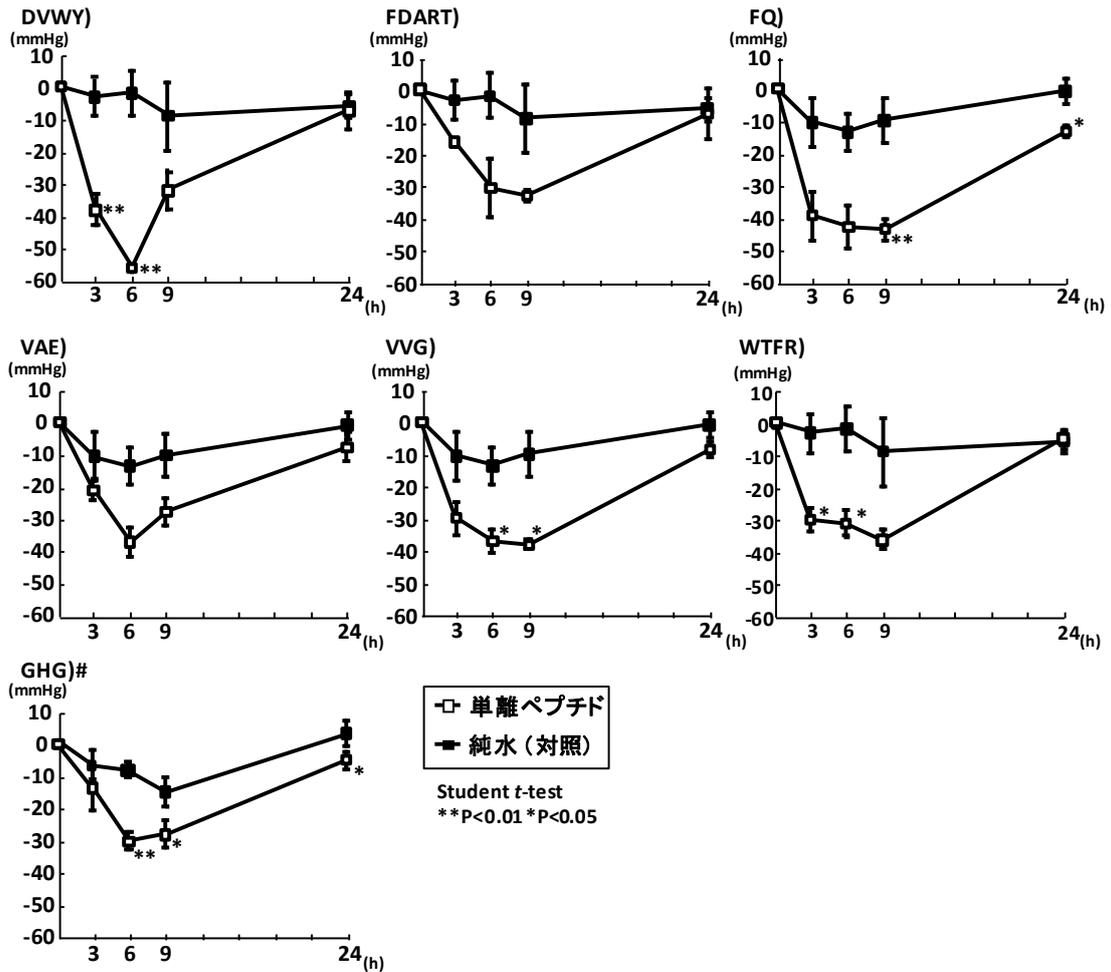


図 8 単離ペプチド単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) の収縮期血圧変化.

試験動物は雄性 13 週齢 SHR, GHG を除く FBP の投与量は 0.10 mg/kg BW. # : GHG のみ 1.0 mg/kg 投与. □, 単離ペプチド投与群 (n = 5); ■, 純水投与群 (対照) (n = 5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

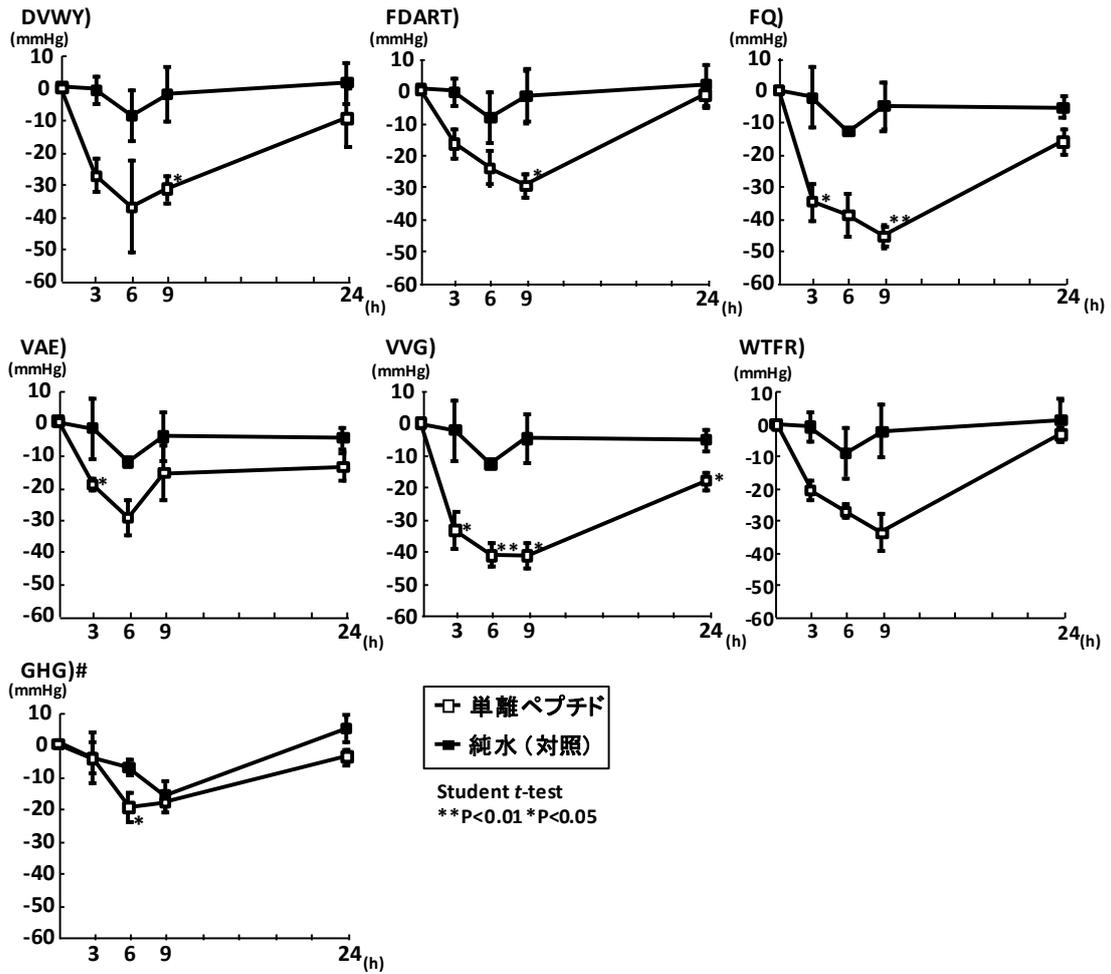


図 9 単離ペプチド単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) の拡張期血圧変化.

試験動物は雄性 13 週齢 SHR, GHG を除く FBP の投与量は 0.10 mg/kg BW. # : GHG のみ 1.0 mg/kg 投与. □, 単離ペプチド投与群 (n = 5); ■, 純水投与群 (対照) (n = 5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

考察

本章では、ソバスプラウトの乳酸発酵により新たに生成する降圧成分の単離を行った。まず ODS カラムを用いた HPLC 分析により、発酵キョウバクとソバスプラウトの成分比較を行った。その結果、乳酸発酵により増大する降圧ピーク ODS ピーク 1 および 2 が確認され、特に高い降圧作用を示した ODS ピーク 2 に含まれている物質の単離を行った。LC-MS/MS 分析、アミノ酸配列分析により 7 種のペプチド (DVWY, FDART, FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR) とチロシンが候補物質として単離された。本研究で単離した全てのペプチドについてサイファインダーデータベース (<https://scifinder.cas.org/>)、タンパク質奨励会データベース (<http://www.prf.or.jp/seqdb-e.html>) を用いてアミノ酸配列の検索を行った。DVWY, VAE および WTFR はデータベースに収録されておらず、新規ペプチドであると考えられた。また、UniProtKB/Swiss-Prot データベース (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>) を用いて、ソバ種子タンパク質のアミノ酸配列と、単離ペプチドのアミノ酸配列を比較した。FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR のアミノ酸配列は、それぞれ、リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (ルビスコ) タンパク質の 148-149 番目のアミノ酸残基、葉緑素タンパク質の 315-317 番目のアミノ酸残基、ATP 合成酵素 CF1 の 437-439 番目のアミノ酸残基、葉緑体タンパク質 RF1 の 19-21 番目のアミノ酸残基、そしてヌクレオカプシドタンパク質の 91-94 番目のアミノ酸残基と一致した。これらのタンパク質は植物に含まれており、種子だけでなく茎葉にも豊富に含まれている (Yang et al., 2003; Song et al., 2009; Sang et al., 2012; Yang et al., 1998)。また、ホウレンソウのルビスコタンパク質や葉緑体タンパク質から降圧ペプチドが単離された例もある (Yang et al., 2003; Zhao et al., 2008)。これらのデータは、FQ, GHG, VAE, VVG および WTFR がソバスプラウトタンパク質中から乳酸発酵により生成されたことを裏付けている。一方で、DVWY または FDART のアミノ酸配列は、タンパク質データベース内で一致しなかった。これらのペプチドはソバスプラウトに特有のタンパク質または、乳酸菌の代謝物から生成したと推測した。これら 7 種のペプチドは、全て SHR において有意な降圧作用を有しており、合成したペプチド

の投与により 20-60 mmHg 程度の有意な血圧低下が確認され、特に、DVWY, FQ および VVG が優れた降圧作用を示した。これらのペプチドの降圧作用については、本研究以外に報告が無い。これらの結果から、乳酸発酵により生成したペプチドは、SHR に対して十分な降圧作用を示しており、発酵キョウバクの優れた降圧作用の一部を担っていると考えられた。

第3章 発酵キョウバク由来降圧ペプチドの降圧機序の検討と、正確な ACE 阻害活性評価への新たな取り組み

現在, 降圧ペプチドは, 機能性食品の有効成分として数多く報告されている (Nakamura et al., 1995a, b; Matsui et al., 2000; Fujita et al., 1999)。発酵乳から単離された降圧ペプチド IPP, VPP は, それぞれ 0.4 mg/kg, 1.0 mg/kg の単回経口投与により SHR の収縮期血圧を有意に低下させる (Nakamura et al., 1995b)。イワシタンパク質加水分解物から単離されたジペプチド VY は, 1.0 mg/kg 単回経口投与で SHR の収縮期血圧を有意に単離させた (Seki et al., 1999)。Fujita らはカツオ節加水分解物からペプタペプチド LKPNM を単離し, 8.0 mg/kg 単回経口投与により SHR の収縮期血圧を有意に低下させた (Fujita et al., 1999)。これらのペプチドの降圧作用は, ACE 阻害により引き起こされることが分かっており, ACE 阻害は降圧剤の主な降圧機序の一つである。

ACE は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞上に発現する膜貫通型亜鉛メタロプロテアーゼであり, アンジオテンシン I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) の C 末端より His-Leu を切断して強力な血管収縮ペプチドであるアンジオテンシン II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) に変換する (Soubrier et al., 1988)。アンジオテンシン II は, 血管内皮細胞や血管平滑筋細胞上に存在する AT1 受容体に結合し, 血管収縮, 炎症などの作用を引き起こす (Heeneman et al., 2007)。ACE の発現は正常血圧状態では血管内皮細胞にのみ確認されるが (Falkenhahn et al., 1995), 高血圧やアテローム性動脈硬化を発症すると内皮細胞, 内皮下新生内膜細胞, および血管平滑筋細胞にも ACE が発現する (Fukuhara et al., 2000; Diet et al., 1996)。ヒト高血圧症モデル動物である SHR においても ACE は血管内皮細胞および平滑筋細胞に発現している (Hu et al., 2002; Fukuda et al., 1999)。ACE 阻害剤は, ACE が発現している全ての細胞においてアンジオテンシン II の生成を抑制することで血圧を低下させる。

一般的に食品由来 ACE 阻害物質の活性は, *in vitro* ACE 阻害活性試験および *in vivo*

ACE阻害活性試験により評価されてきた(Yang et al, 2004; Nakano et al., 2006; Miguel et al., 2007)。*in vitro* ACE阻害活性試験はACE阻害物質のACEに対する結合能力を評価する試験であり, *in vivo* ACE阻害活性試験は投与されたACE阻害物質の生体組織におけるACE阻害を評価する試験である。この両試験の結果が, 阻害物質のACE阻害能を評価するために重要となる。しかし, これらの試験は, 血圧低下に関与したACE阻害活性を評価するためには十分でない可能性がある。*in vitro* ACE阻害活性試験は, 阻害物質, ACEおよび基質の三者が緩衝液中に均一に分散している環境で測定を行う。しかし, 実際の生体内では, これら3つの因子が均一に存在しているとは考えられない。一方で *in vivo* ACE阻害活性試験は, 生体に吸収されたACE阻害物質と組織ACEを用いて測定するため, 生体条件に近い環境での測定を可能にしている。しかし, 基質は活性測定の際に新しく加えている。そのため, 組織ACEと基質は生体内とは異なった反応性を示す可能性がある。加えて, ホモジナイズした生体組織を組織ACEとして用いるため, 組織ホモジネートに含まれるACE以外のプロテアーゼが測定結果に影響を与える可能性もある。そこで, 本研究ではより生体条件に近い環境でACE活性を評価できる新しい定量的な *ex vivo* ACE阻害活性試験を提案した。従来の *ex vivo* ACE阻害活性試験は, アンジオテンシンIIにより引き起こされる血管張力変化を指標として間接的にACE阻害活性を評価している(Gohlke et al., 1993; Hayashi et al., 2010; Feher et al., 2013)。対照的にOlszaneckiらは正常血圧ラット由来胸部大動脈標本を用いてアンジオテンシンII生成量の変化により活性を測定した(Olszanecki et al., 2008)。本研究では, 高血圧モデル動物におけるアンジオテンシンII生成阻害活性とアンジオテンシンII由来血管収縮の抑制作用からACE阻害を評価した。

前章で単離したFBPは, 発酵キョウバクと同様の降圧機序, すなわちACE阻害活性と血管拡張作用に関与していると考えられる。そのため, 本章ではFBPの *in vitro*, *in vivo* ACE阻害活性試験および血管等尺性張力試験により, FBPの降圧機序の検討を行った。さらに, 生体により近い条件で血圧低下に関与するACE阻害活性を評価する手段として, 新たに *ex vivo* ACE阻害活性試験を提案した。最後に, FBPの *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*

ACE 阻害活性間の相関分析を行い、ACE 阻害活性の評価方法について考察した。

試薬および方法

1. 試薬

アセチルコリン、アンジオテンシン I (純度 97%以上)、アンジオテンシン II (純度 97%以上)、カプトプリル、ノニデット P-40 そしてフェニレフリン塩酸塩は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。ウサギ肺由来 ACE (EC 3.4.15.1) はシグマアルドリッチジャパン (東京) から購入した。ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (Hip-His-Leu) はペプチド研究所 (大阪) から購入した。塩酸、ホウ酸、酢酸エチル、スクロース、塩化カリウム、塩化ナトリウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、ギ酸アンモニウム、ジエチルエーテル、リン酸二水素カリウム、炭酸水素ナトリウム、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンおよび HPLC グレードアセトニトリルは関東化学株式会社から購入した。TFA は渡辺化学工業株式会社より購入した。

2. FBP の合成

本章で使用した FBP は、第二章方法「6. 単離ペプチドの合成」に示した方法で合成した。

3. FBP の血管拡張作用の測定

FBP の SHR 由来胸部大動脈における血管拡張作用は、筆者の所属する研究室で標準化した方法に従って行った (Nakamura et al., 2013)。試験に用いた胸部大動脈は雄性 10-13 週齢 SHR から摘出し、結合組織を除去後、長さ 2-3 mm に切断してリング標本作製した。リング標本のいくつかは、内皮細胞をピンセットで擦ることで除去し、血管内皮除去リング標本として試験に用いた。作製したリング標本は、95%O₂-5%CO₂ 混合ガスを通気した 37°C のクレブス溶液 (119 mM NaCl/4.7 mM KCl/1.1 mM KH₂PO₄/1.2 mM MgSO₄/25 mM NaHCO₃, pH 7.4) を満たしたオーガンバスに取り付け、1.5 g の静止張力

を負荷した (UFER UC-05A; いわしや岸本医科産業, 京都)。血管張力は, UFER UM-203 トランスデューサー (いわしや岸本医科産業) により計測した。取り付けから 60 分間のインキュベーション後, リング標本は収縮剤であるフェニレフリン (終濃度 0.30 μM) を用いて収縮させた。収縮させたリング標本には内皮依存性血管拡張剤であるアセチルコリン (終濃度 100 μM) を添加し, 血管拡張作用の有無により血管内皮の有無を判断した。その後, 薬剤を除去するためクレブス液でリング標本を洗浄し, 10 分間静止張力でインキュベートした後, 再び 0.30 μM フェニレフリンにより収縮させた。この操作を 2 回繰り返した後, 0.30 μM フェニレフリンを再度添加し, 収縮が最大に達したことを確認して, クレブス溶液に溶解させた各 FBP を終濃度 0.50, 1.0, 5.0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように累積添加した。この累積添加濃度は, 筆者の所属する研究室で以前行った発酵キョウバクの試験濃度と同じである (Nakamura et al., 2013)。血管拡張作用 (拡張率, %) は, フェニレフリンにより収縮した際の血管張力を基準として, FBP 添加時の血管張力と比較することで表した。全ての測定は 3 回行い, 結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。

4. FBP の ACE 阻害活性

4-1. *in vitro* ACE 阻害活性

in vitro ACE 阻害活性試験は, Horiuchi らの変法に従って行った (Horiuchi et al., 1982)。FBP はそれぞれ予備試験で決定した 3 濃度に純水を用いて調製して試験に用いた。DVWY は 0.17, 0.86 および 4.3 mM, FDART は 0.66, 3.3 および 16 mM, FQ は 6.8, 14 および 27 mM, VAE は 63, 126 および 252 mM, VVG は 3.7, 7.3 および 15 mM そして WFR は 1.6, 8.2 および 41 mM に調製した。7.6 mM Hip-His-Leu 含有ホウ酸バッファー (7.6 mM Hip-His-Leu, 0.10 M ホウ酸および 0.60 M NaCl, pH 8.3) 250 μL に, 各 FBP 溶液 30 μL を加え, 37°C で 7 分間インキュベートした。その後, 6.0 mU ウサギ肺由来 ACE 100 μL を加え, 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後, 酵素反応を停止させるために 1.0 M HCl 250 μL を加え, ACE を失活させた。ACE により遊離した

ヒプリル酸 (Hip) を抽出するため、反応液に酢酸エチル 1.0 mL 加えて攪拌後、13,000 g で 5 分間遠心分離 (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) した。水層は除去し、有機層を遠心エバポレーターにより減圧濃縮した。濃縮物を Hip 抽出サンプルとして HPLC 分析に用いた。HPLC 分析は、筆者の所属する研究室で決定した条件に従って行った (Nakamura et al., 2013)。カラムは、TSK-GEL ODS-120A (4.6×150 mm) を用い、カラム温度は 40°C に設定した。溶出は pH 3.2 TFA 含有水 (溶媒 A) と 0.010% TFA 含有アセトニトリル (溶媒 B) を用いて、溶媒 B ; 10→25% (0→15 min) のグラジエント溶出で行った。溶出速度は 1.0 mL/min, 吸収波長は 228 nm, 注入量は 30 µL に設定した。検量線は 5.0–50 µg/mL の Hip を用いて作成した。検量線の R² 値は 0.9995 および回帰式は $y = 27319x + 200598$ となった。FBP 溶液を用いたサンプルは S, FBP 溶液を添加する前に 1.0 M HCl を添加したサンプルコントロールは Sc, FBP 溶液の代わりに純水を添加したブランクは B, ブランクの純水添加前に 1.0 M HCl を添加したブランクコントロールを Bc として、遊離 Hip 量を算出式 $[(B-Bc) - (S-Sc)] / (B-Bc)] \times 100$ に当てはめて ACE 阻害活性 (%) を計算した。FBP の *in vitro* ACE 阻害活性は ACE 活性 50% 阻害濃度 IC₅₀ で表わしている。全ての測定は 3 回行い、結果は平均値 ± 標準誤差で表した。

4-2. *in vivo* ACE 阻害活性

in vivo ACE 阻害活性試験は、雄性 12-13 週齢の SHR を用いて行った。試験動物は第一章方法「3. SHR における単回経口投与試験方法」に記載している条件で飼育した。試験動物搬入から一週間馴化飼育を行った後、各 FBP 投与群と対照群の 8 群に 6 匹ずつ分けた。12 時間の絶食後、テイルカフ法にて収縮期血圧および拡張期血圧の測定を行い、測定が終了した試験動物から、純水に溶解させた各 FBP 試料を 10 mg/kg BW となるように単回経口投与した。対照群には純水を単回経口投与した。投与 6 時間後に再度試験動物の血圧を測定し、測定終了と同時にジエチルエーテル雰囲気下で麻酔した。十分麻酔がかかっていることを確認し、開腹、腹部後大静脈より採血した。血液は血液凝固防止剤が入った試験管に採取し、直ちに 3,200 g, 4°C で 20 分間遠心分離を行い、血漿

を得た。全血採血して放血死させ、各臓器（胸部大動脈、心臓、肝臓、腎臓および肺）を摘出した。血漿および臓器は試験に用いるまで-80℃で冷凍保存した。臓器は解凍後、細かく刻み、50 mM Tris-HCl バッファー（3.0 mM KCl/0.5 mM Mg (CH₃COO)₂/25 mM スクロース/5.0 mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン/0.5%ノニデット P-40, pH 7.8）を加えて、胸部大動脈以外の臓器は5分間、胸部大動脈は10分間氷上でホモジナイズした。組織ホモジネートは、12,000 g, 4℃で20分間遠心分離し、その上清を ACE 活性測定に用いた。組織および血漿 ACE 活性の測定は、「4-1. *in vitro* ACE 阻害活性」に示す方法で行った。ACE 活性は血漿においては mU/mL, 臓器については mU/mg-protein で表した。また, *in vivo* ACE 阻害活性は, 対照群と FBP 投与群の各組織 ACE 活性を比較し, FBP 投与により低下した ACE 活性の割合を阻害率 (%) として表した。組織タンパク質濃度は, BCA タンパク質測定キット (Thermo Fisher Scientific K. K., 神奈川) により測定した。結果は平均値±標準誤差で表した。

4-3. *ex vivo* ACE 阻害活性

ex vivo ACE 阻害活性試験は, SHR の胸部大動脈に存在する組織 ACE に対する作用を評価するため, *in vivo* ACE 阻害活性試験で有意に胸部大動脈 ACE を阻害した DVWY, FDART, FQ および WTFR を試験試料として用いた。これら 4 種の FBP は予備試験により決定した終濃度 0.10, 1.0 および 10 μM にクレブス溶液を用いて調製し, 試験に用いた。FBP の活性は ACE 阻害剤であるカプトプリルと比較した。

これまでに胸部大動脈を用いた非ペプチド性 ACE 阻害物質の *ex vivo* 試験が報告されている (Gohlke et al., 1993; Hayashi et al., 2010; Feher et al., 2013; Olszanecki et al., 2008)。その中でも, Olszanecki らのみが血管組織中のアンジオテンシン II 量を LC-ESI-MS により定量し, アンジオテンシン II 生成量の減少から直接的に試料の ACE 阻害活性を評価している。Gohlke らと Hayashi らはアンジオテンシン II による血管収縮の抑制率から間接的に ACE 阻害活性を評価している。試験に用いる血管標本には, Olszanecki らと Hayashi らは正常血圧ラットである WKY ラット由来の内皮保存または

内皮除去胸部大動脈を用い、Gohlke らは SHR 由来の内皮保存胸部大動脈を用いた。内皮由来血管拡張因子、例えばプロスタノイド類や NO は、強力な血管収縮抑制作用も持つことが知られている (Burgaud et al., 1994)。そのため、FBP のように内皮依存性血管拡張作用を持つ ACE 阻害物質の *ex vivo* 活性を正しく評価する場合、血管内皮保存標本を用いることは難しい。また、高血圧状態において、ACE は血管内皮だけでなく中皮にも発現しており (Ehlers et al., 1986)、実際に Hayashi らは WKY ラットではあるが内皮除去標本を用いて試験を行っている。本研究における *ex vivo* ACE 阻害活性試験を行う目的は、生体にできるだけ近い条件で FBP の ACE 阻害活性を確認することと、高血圧モデルで血圧低下に関与する ACE 阻害活性を評価することである。そのため、本研究では SHR 由来の内皮除去胸部大動脈を試験に用いた。

4-3-1. アンジオテンシン II 生成量の測定

本研究では、SHR 由来内皮除去胸部大動脈に存在する組織 ACE により生成したアンジオテンシン II を定量し、ACE 活性を評価する新しい定量的な *ex vivo* 試験を提案した。*ex vivo* 試験に用いた胸部大動脈の摘出、内皮除去胸部大動脈リング標本の作製、リング標本の平衡化およびフェニレフリンによる血管張力の安定化は、「3. FBP の血管拡張作用の測定」に示す方法に従って行った。フェニレフリンによる血管張力の安定化が終了した後、アンジオテンシン I 添加のためにオーガンバスからクレブス溶液を 2.0 mL 除去し、終濃度が 0.10, 1.0 および 10 μM となるように調製した DVWY, FDART, FQ および WTFR をそれぞれのオーガンバスに 1.0 mL 添加した。また、陽性対照として終濃度が 0.10, 0.50 および 1.0 μM となるように調製した ACE 阻害剤であるカプトプリルを添加した。陰性対照には、FBP の代わりにクレブス溶液を添加した。試料添加後 30 分間インキュベートし、全てのリング標本に 0.20 μM のアンジオテンシン I を 1.0 mL 添加した。組織 ACE により生成したアンジオテンシン II による収縮が最大に達した直後に (アンジオテンシン I 添加から約 30 分間)、オーガンバス内のクレブス溶液を全量試験管に移した。回収したクレブス溶液は、酵素反応を停止させるために内温 90°C で 5 分間熱処理を行い、その後減圧濃縮した。濃縮試料は、500 μL の 4.0 mM ギ酸含有 4.0 mM ギ

酸アンモニウム:アセトニトリル (95:5) 緩衝液に溶解させ、UPLC-MS 分析に用いた。MS 分析は、CREFAS にて行った。分析システムには、ACQUITY UPLC システムに接続した Quattro micro API MS システム (Waters) を用いた。UPLC 分析は、カラムに CHEMCOBOND 5-ODS-W (4.6×150 mm) を用い、移動相 A に 4.0 mM ギ酸含有 4.0 mM ギ酸アンモニウム:アセトニトリル (95:5) 緩衝液、移動相 B に 4.0 mM ギ酸含有 4.0 mM ギ酸アンモニウム:アセトニトリル (10:90) 緩衝液を用いた。移動相 B は 0% (0→2 min), 0→40% (2→10 min), 40% (10→15 min), 40→90% (15→20 min) の濃度でグラジエントを行い、流速が 0.8 mL/min, 分離温度が 35°C, 検出波長が 215 nm, 注入量が 20 µL に設定した。MS 分析は、キャピラリー電圧が 3500 V, イオン化電圧が 20 V, 窒素ガス流量 (desolvation) が 350 L/hr, 窒素ガス流量 (cone) が 50 L/hr, 窒素ガス温度が 100°C, 脱溶媒用窒素ガス温度が 350°C で行った。イオン化は ESI 法により行い、検出はポジティブモードを使用した。アンジオテンシン II の定量が目的のため、SIM モードにより m/z 523.8 $[M+2H]^{2+}$ を指定して分析を行った。アンジオテンシン II の分子量は 1045.53 であるが、イオン化に ESI 法を用いた MS 分析ではアンジオテンシン II の 2 価イオンが検出されるため、 m/z 523.8 を指定した (Bujak-Gizycka et al., 2007)。検量線は 0.0010-1.0 µM のアンジオテンシン II を用いて作成した。検量線の R^2 値は 0.9993 および回帰式は $y = 69455x + 423.12$ となった。アンジオテンシン II 濃度は pmol/mg-protein で表した (Bujak-Gizycka et al., 2007)。試験に用いたリング標本のタンパク質量は BCA タンパク質測定キット (Thermo Fisher Scientific K.K.) により測定した。アンジオテンシン II 生成 50% 阻害濃度 IC_{50} は、試料濃度とアンジオテンシン II 生成阻害率の関係から算出した。全ての測定は 3 回行い、結果は平均値±標準誤差で表した。

4-3-2. 血管収縮抑制作用の測定

本研究における定量的な *ex vivo* 試験では、血圧低下に関与する ACE 阻害を評価するために、アンジオテンシン II 由来血管収縮の抑制作用も測定した。試験は、「4-3-1. アンジオテンシン II 生成量の測定」に示す方法で行った。終濃度が 0.10, 1.0 お

よび 10 μM となるように調製した FBP と陽性対照として、0.10, 0.50 および 1.0 μM に調製したカプトプリルをリング標本に添加後 30 分間インキュベートし、全てのリング標本に 0.20 μM のアンジオテンシン I を添加した。組織 ACE により生成したアンジオテンシン II による収縮が最大に達した際の張力を、最大収縮力として記録した。血管収縮抑制作用はアンジオテンシン I 添加により引き起こされた陰性対照 (クレブス溶液添加) 群の最大収縮力と試料添加群の最大収縮力を比較し、抑制率 (%) として表わした。血管収縮抑制 50% 効果濃度 EC_{50} は、試料濃度と血管収縮抑制率の関係から算出した。全ての測定は 3 回行い、結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。

5. *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* ACE 阻害活性間の相関分析

相関分析は、酵素阻害活性の相関分析に一般的に用いられているスピアマンの相関分析法を用いた。相関係数 (r) が 0.7 より大きいかつ P 値 (両側検定) が 0.05 より小さい場合に統計的に有意な相関があると判断した。

6. 統計分析

全て結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。各群間の比較はスチューデントの t 検定により統計処理を行い、危険率 5% および 1% で有意差を示した ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。

結果

発酵キョウバクの降圧作用は ACE 阻害と血管拡張により引き起こされる (Nakamura et al., 2013)。FBP の降圧作用もまた、発酵キョウバクと同様の降圧メカニズムに関与していると示唆される。そのため、血管拡張作用、*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* ACE 阻害活性を測定することにより FBP の降圧機序の解明に取り組んだ。

1. 血管拡張作用

まず、FBP の降圧作用に対する血管拡張作用の関与と血管拡張作用の内皮への依存性を調査した。FBP の血管拡張作用は、フェニレフリンにより収縮させた SHR 由来胸部大動脈リング標本を用いて測定した (n = 3)。DVWY, FDART および VVG は 0.50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積添加で有意な血管拡張作用を示したが、FQ, GHG, VAE および WTFR は有意な効果を示さなかった (図 10)。FDART および VVG は 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加から、DVWY は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加から有意に血管を拡張させ、FDART, DVWY および VVG の最大血管拡張率は FBP 添加前の血管張力と比較してそれぞれ $14.9 \pm 0.38\%$ (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $11.7 \pm 6.5\%$ (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および $8.20 \pm 4.8\%$ (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。WTFR は血管を拡張させる傾向は確認されたが、有意な作用ではなかった。また、FBP の血管拡張作用は血管内皮除去により消失した。DVWY, FDART および VVG の血管拡張作用は、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では減弱し、DVWY および VVG については 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加で、FDART については 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加でサンプル添加前とほぼ同等の血管張力となり、それ以上の濃度では血管が収縮した。これらの結果は、発酵キョウバクに含まれる複数の成分がフェニレフリンにより収縮させた SHR 由来胸部大動脈において内皮依存性の血管拡張作用を持つことを示している。

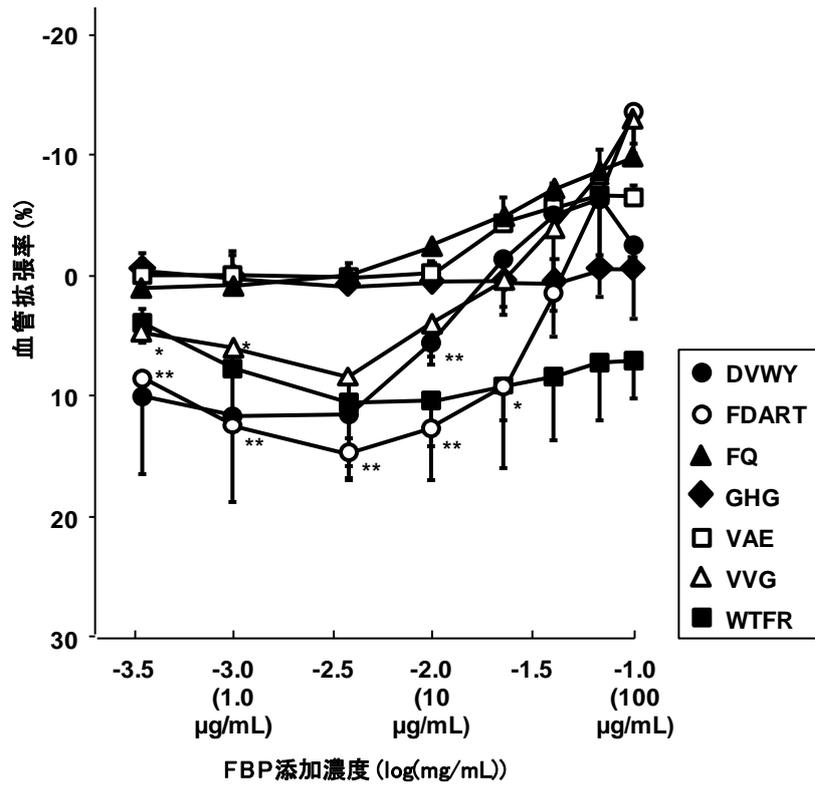


図 10 フェニレフリンにより収縮させた SHR 由来胸部大動脈リング標本に対する FBP の血管へ与える影響 (n = 3).

●; DVWY, ○; FDART, ▲; FQ, ◆; GHG, □; VAE, △; VVG, ■; WTFR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 有意差は試料添加前の張力と比較することで算出した.

2. ACE 阻害活性

2-1. *in vitro* ACE 阻害活性

まず基質に Hip-His-Leu を用いた *in vitro* 試験を行った。全ての FBP が *in vitro* で ACE を阻害し、DVWY, FDART, WTFR, FQ, GHG, VVG および VAE の IC_{50} 値はそれぞれ 0.694 ± 0.051 mM, 1.93 ± 0.13 mM, 6.69 ± 0.65 mM, 7.38 ± 0.79 mM, 8.30 ± 0.36 mM, 39.6 ± 7.0 mM および 55.9 ± 2.4 mM であった (図 11, n = 3)。

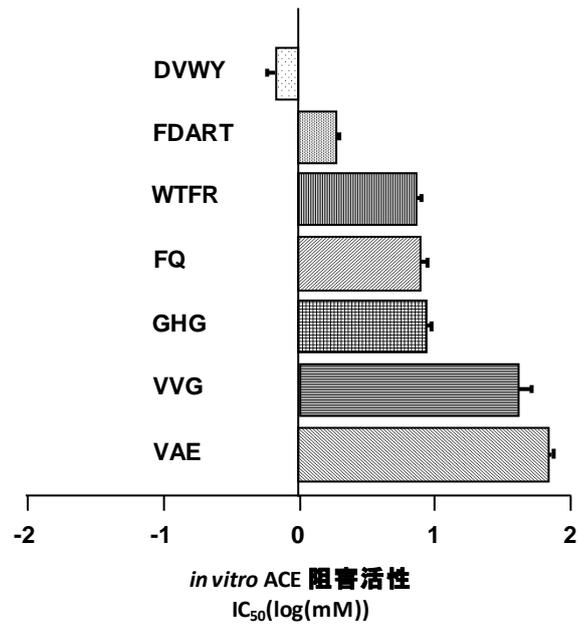


図 11 FBP の *in vitro* ACE 阻害活性 (IC₅₀ 値, n = 3)

2-2. *in vivo* ACE 阻害活性

次に、生体組織における ACE 阻害活性を評価するため、FBP を 10 mg/kg BW の用量で SHR へ投与し、6 時間後に摘出した組織の ACE 活性を測定した (n = 6)。 *in vivo* ACE 阻害活性の評価は、純水を投与した対照群の各組織 ACE 活性と、FBP 投与群の各組織 ACE 活性を比較することで行った。

図 12 に胸部大動脈、心臓、肝臓、腎臓、肺、血漿における各 FBP 投与群および対照群の組織 ACE 活性を、図 13 に各 FBP の対照群に対する ACE 阻害率を示している。胸部大動脈では、WTFR が ACE 阻害率 61% と最も強い活性を示し、次いで FDART (52%)、DVWY (28%)、FQ (21%) であった。心臓では、FQ が ACE 阻害率 91% と最も強い活性を示し、次いで VAE (86%)、VVG (77%)、WTFR (75%)、FDART (47%)、DVWY (17%) であった。肝臓では、WTFR が ACE 阻害率 64% と最も強い活性を示し、次いで FQ (59%)、VVG (54%)、DVWY、FDART および VAE (53%) であった。腎臓では、FDART が ACE 阻害率 63% と最も強い活性を示し、次いで WTFR (53%)、DVWY および VVG (25%) であった。肺では、FQ と GHG が有意に ACE 阻害し、阻害率はそれぞれ 19% および 16% であった。血漿では、GHG と FDART が有意に ACE 阻害し、阻害率はそれぞれ 62% および 36% であった。

本研究における *in vivo* ACE 阻害活性試験では、試料投与前および解剖前に SHR の血圧を測定した。全ての FBP が対照群と比較して有意に血圧を低下させ、特に収縮期血圧が FBP 投与により強く低下した (表 4)。これらの結果から、全ての FBP が血圧低下に関わる効果的な ACE 阻害作用を持つと考えられた。

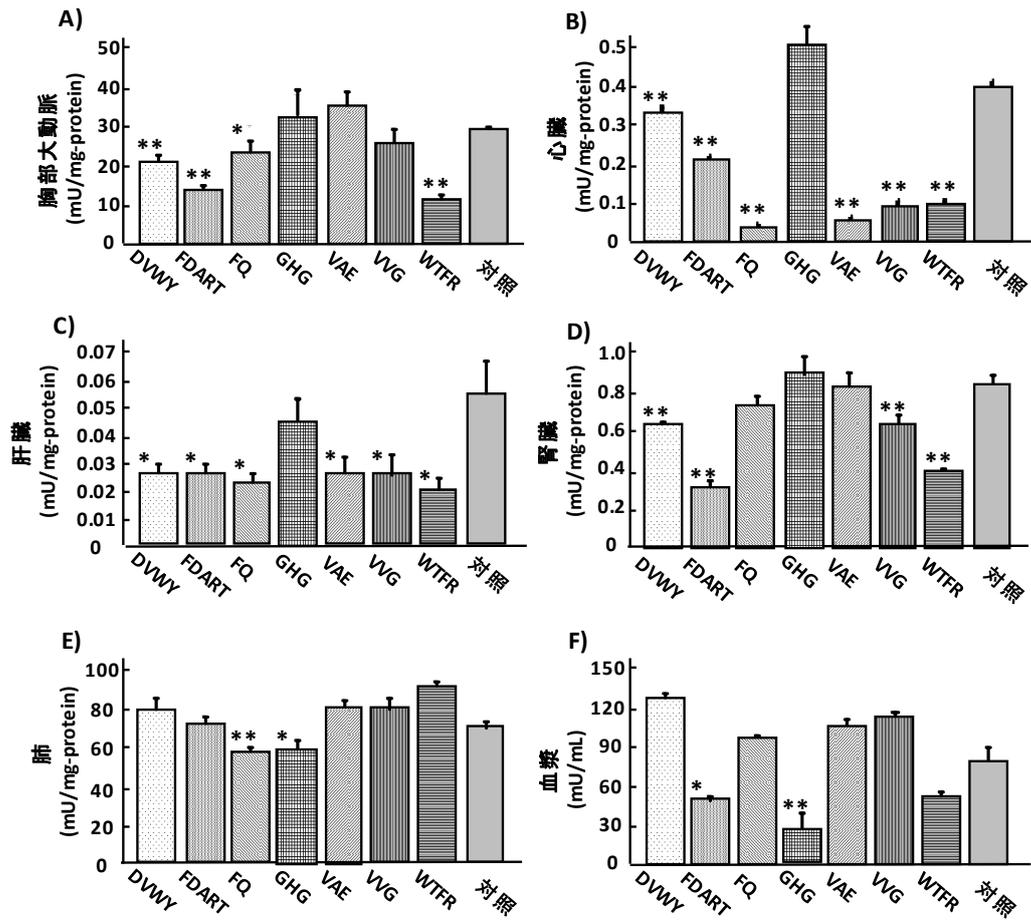


図 12 FBP (10 mg/kg BW) および純水 (対照) 投与 6 時間後の SHR の (A) 胸部大動脈, (B) 心臓, (C) 肝臓, (D) 腎臓, (E) 肺および (F) 血漿 ACE 活性 (n = 6).

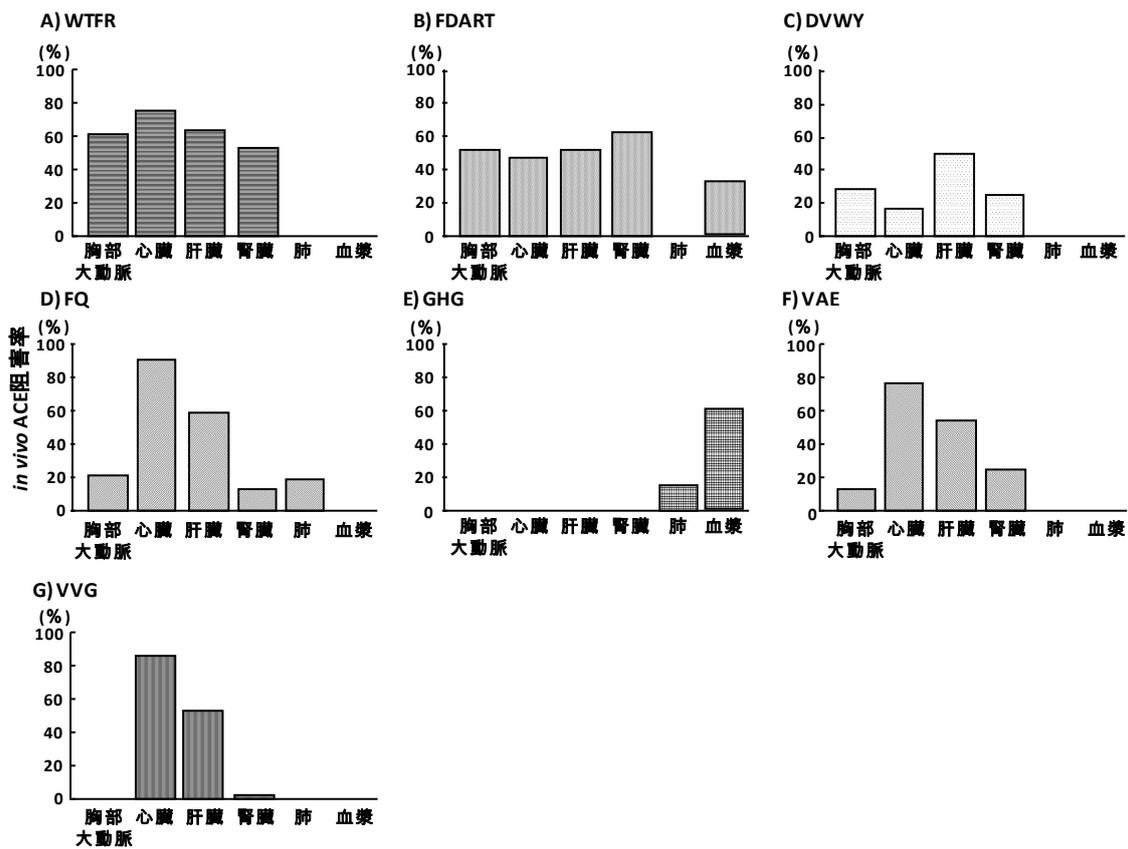


図 13 各組織における FBP 投与 6 時間後の対照群に対する組織 ACE 阻害率.

(A) WTRF, (B) FDART, (C) DVWY, (D) FQ, (E) GHG, (F) VAE および (G) VVG.

表 4 SHR (10 mg/kg BW) における投与 6 時間後の最大収縮期血圧低下および最大拡張期血圧低下 (n = 6)

	DVWY	FDART	FQ	GHG	VAE	VVG	WTFR
収縮期 (mmHg)	-28.3 ±5.0**	-24.7 ±3.4**	-27.3 ±8.3*	-9.86 ±2.1*	-15.8 ±4.7*	-20.1 ±5.5**	-21.1 ±7.1*
拡張期 (mmHg)	-19.2 ±5.2*	-16.9 ±7.6	-18.6 ±8.5*	-4.42 ±4.4	-15.8 ±3.8*	-17.0 ±5.8*	-16.6 ±7.5

最大血圧低下値は、対照群(純水投与)と各 FBP 投与群の最大降圧値との差から算出.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (対照群 vs FBP 投与群, スチューデント t -test)

2-3. *ex vivo* ACE 阻害活性

これまで多くの食品由来降圧ペプチドの ACE 阻害活性が *in vitro* および *in vivo* 試験により評価されてきた (Yang et al., 2004; Nakano et al., 2006; Miguel et al., 2007)。しかしながら, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 試験におけるそれぞれの結果が活性の正確な評価に重要であると考えた。実際に, 医薬品研究では *in vitro* 試験により活性の有無を調査し, *ex vivo* 試験により生体組織における活性を評価し, *in vivo* 試験で最終試験を行っている。本研究では, 基質にアンジオテンシン I を, 生体組織に SHR 由来内皮除去胸部大動脈標本を用いて *ex vivo* 試験を行った。試料には *in vitro* 試験で ACE 阻害活性を有し, *in vivo* 試験で有意な胸部大動脈 ACE 阻害活性を示した DVWY, FDART, FQ および WTFR を用いた。これまでに行われてきた *ex vivo* 試験は, アンジオテンシン II 由来血管収縮の抑制作用により間接的に ACE 阻害活性を評価していたが, 本研究で提案する新しい定量的な *ex vivo* 試験では添加したアンジオテンシン I から組織 ACE により生成するアンジオテンシン II を定量するため, 正しく阻害物質の ACE 阻害活性を評価することができる。

図 14 はアンジオテンシン II の定量結果を示す。クレブス溶液中で各濃度の DVWY, FDART, FQ, WTFR またはカプトプリル共存下で血管リング標本を 30 分間インキュベートし, アンジオテンシン I を添加した ($n = 3$)。添加アンジオテンシン I から血管組織 ACE により生成したアンジオテンシン II を定量した。含量は, pmol/mg-protein tissue で表した。クレブス溶液のみを添加した陰性対照群と比較して, DVWY, FDART および WTFR は 1.0 μM 添加から有意にアンジオテンシン II 生成を抑制し, FQ は 10 μM で有意に生成を抑制した。DVWY は, 陰性対照群と比較して 1.0 μM で 18%, 10 μM で 34% アンジオテンシン II 生成を有意に阻害した。FDART は, 1.0 μM で 19%, 10 μM で 37% 有意に阻害した。FQ は 10 μM で 25% 有意に阻害した。WTFR は, 1.0 μM で 26%, 10 μM で 59% 有意に阻害した。陽性対照のカプトプリルは 0.10 μM で 46%, 0.50 μM で 61%, 1.0 μM で 73% 有意に阻害した。各試料の IC_{50} 値は, 0.15 μM (カプトプリル), 5.64 μM (WTFR), 41.7 μM (FDART), 70.5 μM (DVWY) および 90.9 μM (FQ) であった。これらの結果は, FBP の

in vitro ACE 阻害活性試験結果よりも、より低濃度で胸部大動脈に存在する組織 ACE を効果的に阻害していることを示している。さらに、この *ex vivo* 試験では内皮除去血管標本を用いている。そのため、SHR の血管内皮以外にも ACE が発現しているという過去の知見を裏付ける結果となった。

本研究における定量的な *ex vivo* 試験では、血管張力変化も測定した。図 15 は、各濃度の FBP およびカプトプリル共存下で 30 分間インキュベート後のアンジオテンシン I 添加によるリング標本の最大収縮力を示している (n = 3)。DVWY は、陰性対照群と比較して 1.0 μM で 31%, 10 μM で 41%血管収縮を有意に抑制した。FDART は 0.10 μM で 27%, 1.0 μM で 32%, 10 μM で 44%有意に抑制した。FQ は 10 μM で 30%有意に抑制した。WTFR は 0.10 μM で 31%, 1.0 μM で 37%, 10 μM で 46%有意に抑制した。カプトプリルは 0.10 μM で 19%, 0.50 μM で 32%, 1.0 μM で 63%有意に抑制した。各試料の EC_{50} 値は、0.75 μM (カプトプリル), 36.8 μM (WTFR), 53.6 μM (FDART) 68.2 μM (DVWY) および 85.1 μM (FQ) であった。これらの結果は、FBP の組織 ACE 阻害に伴ったアンジオテンシン II 量の減少が、血管収縮抑制作用を引き起こしたことを示している。すなわち、*ex vivo* 試験結果は、FBP が低濃度で胸部大動脈に存在する組織 ACE を効果的に阻害し、血圧低下に関わる血管収縮抑制作用を惹起したことを示している。

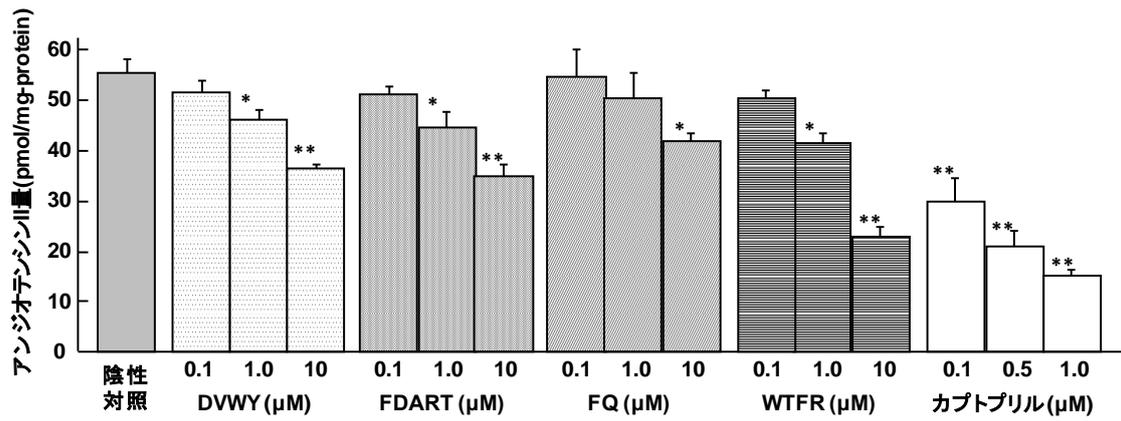


図 14 FBP, カプトプリル (陽性対照), クレブス溶液 (陰性対照) 共存下でのアンジオテンシン I 添加による SHR 胸部大動脈リング標本由来アンジオテンシン II 量の変化 (n = 3) .

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

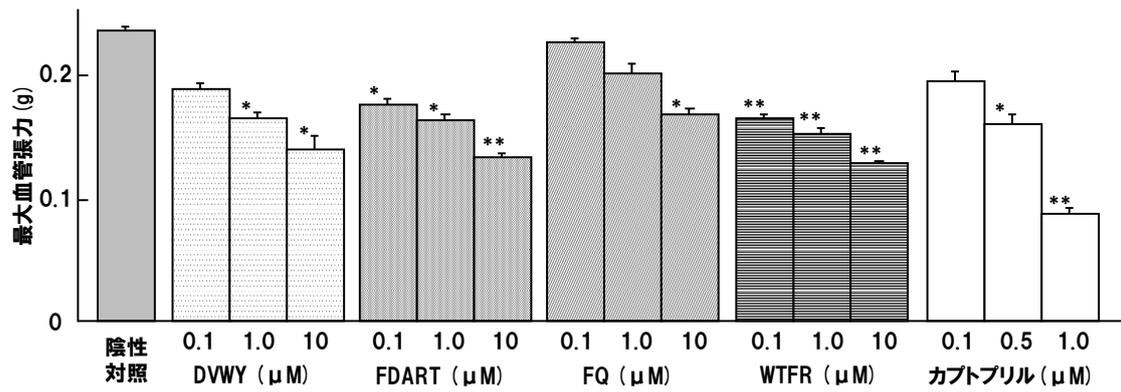


図 15 FBP, カプトプリル (陽性対照), クレブス溶液 (陰性対照) 共存下でのアンジオテンシン I 添加による SHR 胸部大動脈リング標本の血管張力の変化 (n = 3) .

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

FBP はアンジオテンシン II 生成抑制作用と血圧低下に関与する血管収縮抑制作用を引き起こした。この2つの結果が、FBP の降圧機序を解明するために必須となる。血管拡張作用の測定において、FBP は内皮除去により拡張作用を示さなかったため、フェニレフリンにより収縮させた内皮除去血管標本には影響を与えないことを確認した。しかし、アンジオテンシン系を再現した *ex vivo* 試験で、FBP が血管中皮に影響を与えないかどうかは考慮されていない。例えば、アンジオテンシン II 由来血管収縮を抑制する AT1 受容体阻害 (ARB) 活性が、*ex vivo* 試験結果に影響を与える可能性がある。そのため、FBP の血管収縮抑制作用が ACE 阻害によるアンジオテンシン II の減少により引き起こされていると結論付けることはできない。

ACE 阻害が FBP の血管収縮抑制作用を引き起こす主な因子であることを確認するために、FBP のアンジオテンシン II 生成阻害活性 (IC_{50} 値) を変数 x として血管収縮抑制作用 (EC_{50}) を変数 y として、スピアマンの相関分析を行った。図 16 に示すように、FBP の IC_{50} 値と EC_{50} 値は、有意に正の相関を示した ($r = 0.992$; $P = 0.008$)。この高い相関性は、ARB の様な ACE 阻害以外の妨害因子の影響は限定的であることと、FBP の ACE 阻害を伴ったアンジオテンシン II の減少が直接血管収縮抑制作用を引き起こしていることを意味する。すなわち、本研究で用いた新しい *ex vivo* ACE 阻害活性試験により、SHR における FBP の血圧低下に関与する ACE 阻害活性を正しく評価することができた。加えて、高い相関は、血圧低下に関与する *ex vivo* ACE 阻害活性を、アンジオテンシン I 添加後の血管収縮抑制作用の測定だけで評価することが可能であることを表わしている。ペプチド性 ACE 阻害物質によるアンジオテンシン II 生成抑制と血管収縮抑制の関係性については、本研究が初めて報告となる。

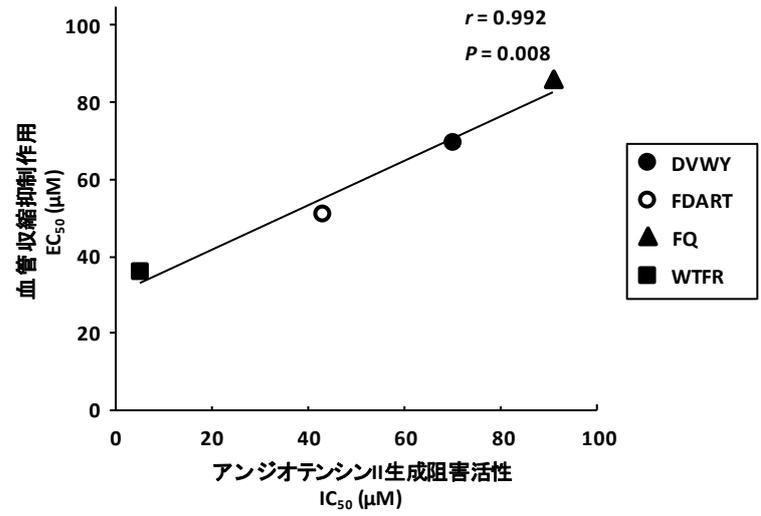


図 16 FBP のアンジオテンシン II 生成抑制と血管収縮抑制作用の相関分析.

●; DVWY, ○; FDART, ▲; FQ, ■; WTFR.

考察

発酵キョウバクから単離された降圧ペプチドである FBP の特徴づけを行うために、本研究では血管等尺性張力試験，従来の *in vitro*，*in vivo* および新しい *ex vivo* ACE 阻害活性試験を行った。

FDART と VVG は 0.50 µg/mL 添加から，DVWY は 10 µg/mL 添加から有意な血管拡張を引き起こした。しかしながら VVG と DVWY は 25 µg/mL，FDART は 50 µg/mL 以上では血管収縮作用を示した。このような作用はこれまでも報告があり (Sunano et al., 1999; 2001)，神経伝達物質であるアセチルコリンは，低濃度では血管内皮に存在する M₃ レセプターに結合し，NO 産生を促進して血管を拡張させる。しかし，濃度が高まるにつれて血管中皮に存在する M₃ レセプターにも作用し，血管平滑筋細胞のカルシウムイオン濃度を上昇させて血管を収縮させる。DVWY，FDART および VVG も複数のレセプターに作用することで低濃度では血管拡張作用，高濃度では血管収縮作用を引き起こしたと考えられた。発酵キョウバクは，SHR 由来胸部大動脈において 0.5 µg/mL 添加から内皮依存性の血管拡張作用を示し，EC₅₀ 値は 8.3 ± 1.4 µg/mL と食品としては強力な作用を持つ (Nakamura et al., 2013)。DVWY，FDART および VVG も低濃度から内皮依存性血管拡張作用を示したが，その作用は発酵キョウバクと比較して弱い。そのため，血管拡張作用は，FBP の降圧作用の一部には関与しているがその寄与度は低いと推測した。そこで，発酵キョウバクのもう一つの降圧機序である ACE 阻害作用を測定した。

全ての FBP が *in vitro* ACE 阻害活性を示し，特に DVWY が IC₅₀ 値 690 µM と最も強力であった。血圧の調節を目的とした特定保健用食品 (<https://hfnet.nih.go.jp/>) の有効成分である降圧ペプチド IPP，VPP，VY，LKPNM の IC₅₀ 値はそれぞれ 5.17 µM，8.89 µM，26.0 µM および 2.40 µM である (Fujita et al., 1999; Nakamura et al., 1995a; Matsui et al., 2000)。すなわち，FBP は *in vitro* で ACE 阻害能を有しているが，他の食品由来 ACE 阻害ペプチドと比較してその活性は非常に弱いということが分かった。

in vivo ACE 阻害活性試験は，FBP の単回経口投与後に摘出した組織を用いて行った。FBP は，肝臓および主要循環器系である胸部大動脈，心臓の ACE 活性を強く低下させた。

胸部大動脈 ACE 活性低下は血管収縮の抑制, 心臓 ACE 活性の低下は冠動脈かん流圧の低下により, 降圧作用に深く関与する (Kouno et al., 2005; Rosendorff et al., 2009)。肝臓 ACE 活性の低下は, 肝臓線維化予防に関与することが報告されている (Yoshiji and Fukui, 2004)。発酵キョウバクも FBP と同用量 (10 mg/kg) の単回経口投与で SHR の組織 ACE 活性を有意に低下させ, 阻害率は 36% (胸部大動脈), 62% (心臓), 22% (肺), 61% (肝臓) および 16% (腎臓) であった (Nakamura et al., 2013)。FBP は, 発酵キョウバクと同等かそれ以上の組織 ACE 阻害活性を有していた。すなわち, FBP は SHR において降圧作用を引き起こす十分な組織 ACE 阻害能を持っていると考えられた。臓器摘出前に血圧を測定したところ, FBP は SHR の血圧を有意に低下させ, 拡張期血圧よりも収縮期血圧を強く低下させた。Kouno らは, ACE 阻害はアンジオテンシン II による血管収縮を抑制するため, 主に収縮期血圧を低下させると報告している (Kouno et al., 2005)。この報告から, FBP が ACE 阻害により効果的に収縮期血圧を低下させたと推測される。血管拡張は, 血管抵抗を低減させるため拡張期血圧も強く低下させる (Takai et al., 2005)。しかし, FBP の血管拡張作用は弱く, 拡張期血圧の低下も収縮期血圧の低下と比べて弱かったため, FBP の降圧作用への血管拡張作用の関与は低いと考えられた。

血管等尺性張力試験, *in vitro*, *in vivo* ACE 阻害活性試験の結果, 組織 ACE 阻害が FBP の主な降圧機序であると結論付けた。しかし, FBP の *in vivo* ACE 阻害活性は高いにもかかわらず *in vitro* 活性は弱く, 両活性間には大きな差が見られた。そのため, *in vitro* および *in vivo* 試験だけでは血圧低下に関与する ACE 阻害活性を評価するために十分ではない可能性がある。通常, 組織 ACE は血管収縮により血圧を上昇させるために, 血管内皮または中皮細胞膜や腎臓の近位尿細管細胞の刷子縁膜に局在している (Ehlers et al., 1986; Carey, 2004)。そのため, 組織 ACE は阻害物質と均一な状態で相互作用することはない。加えて, 経口投与した ACE 阻害物質は小腸から吸収され, 血流に乗って各生体組織に移行すると考えられる。阻害物質は, 生体内で効果的な ACE 阻害を惹起するために十分な吸収効率と生体組織との親和性を持つことが重要である。*in vitro* 試験における測定環境では, 生体内での阻害物質, 基質, ACE の相互作用を再

現することはできない。*in vivo* 試験は生体組織由来の ACE を用いることができる。さらに、生体内に吸収されて組織に吸着した阻害物質と相互作用した組織 ACE との活性を評価することができる。そのため、*in vivo* 試験により血圧低下に関与した ACE 阻害を評価することができる。ただし、*in vivo* 試験では、人工的に化学合成した基質である Hip-His-Leu が、組織ホモジネート中に存在する ACE と相互作用した結果遊離する Hip を定量して ACE 阻害活性を評価するため、この方法では、合成基質が組織ホモジネート中に存在する他のプロテアーゼの影響を受ける可能性がある。Hip-His-Leu は ACE 本来の基質であるアンジオテンシン I の代わりに用いている。これは、生体組織中に存在する多くの生理活性ペプチドの中から特定のペプチドを選択的に定量することが難しい (Tamvakopoulos, 2007; Boonen et al., 2009) ためである。すなわち、基質として添加したアンジオテンシン I から生成されたオクタペプチドであるアンジオテンシン II を選択的に定量することも難しいと考えられる。さらに、遊離した Hip は他の生体由来物質と区別して定量しやすい。Hip はもともと生体に存在するが、*in vivo* 試験結果には影響しないと考えられる。なぜなら、さまざまなフェノール化合物から合成される Hip は、すぐに組織中から血漿を通じて腎臓から尿中に排出されるためである (Deguchi et al., 2005)。しかし、アンジオテンシン I には影響を与えないキニナーゼ I (EC 3.4.17.3) のような他のペプチダーゼが Hip-His-Leu から Hip を遊離させる可能性がある (Skidgel, 1988; Zhao et al., 2003)。

この *in vivo* 試験における問題を解決し、*in vitro* および *in vivo* 試験結果の差を考察するために、本研究では新たに *ex vivo* ACE 阻害活性試験を行った。*ex vivo* 試験は、組織 ACE としてホモジナイズしていない胸部大動脈と、ACE 本来の基質であるアンジオテンシン I を用いており、*in vivo* 試験の問題を解決することができる。また、ACE 阻害物質は組織 ACE と自然な状態で相互作用できるため、*in vitro* 試験の問題も解決することができる。そこで、*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* 試験結果を用いた相関分析を行い、ACE と阻害物質の不自然な相互作用や ACE 以外の妨害酵素が、血圧低下に関与する ACE 阻害活性評価に影響を与えているかどうかを検証した。

相関分析には、FBP の *in vitro*, *in vivo* および *ex vivo* ACE 阻害活性を用い、それぞれ IC_{50} 値 (mM), 胸部大動脈 ACE 阻害率 (%), アンジオテンシン II 定量から算出した IC_{50} 値 (μ M) で表した。まず初めに、*ex vivo* ACE 阻害活性 IC_{50} 値 (μ M) を変数 x , 胸部大動脈における *in vivo* ACE 阻害率 (%) を変数 y として両者間の相関分析を行った。図 17A に示すように、相関係数は -0.971 ($P = 0.030$) となり、FBP の *ex vivo* 活性と *in vivo* 活性間に有意な負の相関があった。ACE 本来の基質であるアンジオテンシン I とホモジナイズしない組織を用いた *ex vivo* 試験結果が、*in vivo* 試験結果と高い相関性が確認されたことは、*in vivo* 試験において ACE 以外の妨害酵素の影響はない、または限定的であることを示している。そのため、*in vivo* 試験において合成基質 Hip-His-Leu を使用することは問題ないと考えられた。加えて、*ex vivo* 試験との高い相関性は、血圧低下に関与する ACE 阻害活性を *in vivo* 試験によっても適切に評価できることを意味している。*in vivo* 試験は、ACE 阻害物質が投与後に受ける消化、吸収および代謝の影響を反映したうえで ACE 阻害活性を評価することができる。本研究で新たに提案した *ex vivo* 試験は、ACE 阻害剤の血圧低下に関与する ACE 阻害活性を従来の試験方法より簡便に評価することができる。

次に、*in vitro* ACE 阻害活性 IC_{50} 値 (mM) を変数 x , *ex vivo* ACE 阻害活性 IC_{50} 値 (μ M) を変数 y として両者間の相関分析を行った。図 17B に示すように、相関係数は 0.089 ($P = 0.911$) であり、両者間の相関は非常に弱いことが分かった。すなわち FBP の *in vitro* 活性は血圧低下を反映した ACE 阻害活性とかけ離れていることを意味する。*ex vivo* 活性と *in vivo* 活性または *in vitro* 活性間の相関分析結果から、*in vitro* および *in vivo* 活性間の相関も低いと考えられた。図 18 に、*in vitro* ACE 阻害活性 IC_{50} 値 (mM) を変数 x , 各組織における *in vivo* ACE 阻害率 (%) を変数 y として両者間の相関分析を行った結果を示す。変数 y には組織 ACE 阻害活性を示した FBP の結果のみを用いた。また、肺および血漿 ACE 阻害活性においては、相関分析を行うために十分なデータ数 (標本数が 3 点以上) に達しなかったため行っていない。相関係数は、胸部大動脈において -0.597 ($P = 0.288$), 心臓において 0.544 ($P = 0.265$), 肝臓において -0.322 ($P = 0.534$),

腎臓において -0.625 ($P = 0.185$) であった (図 18)。いずれの組織においても *in vivo* および *in vitro* 活性間に高い相関は見られなかった。すなわち, FBP に限れば, *in vitro* ACE 阻害活性の強さは *in vivo* に反映されない。本研究における各 ACE 阻害活性試験結果間での相関分析は, *in vitro* 試験で血圧低下に関与した ACE 阻害活性の評価は難しいことを示している。そのため, *in vitro* ACE 阻害活性試験は定性的に ACE 阻害能を評価することに適した試験であると考えた。

これまでは, *in vitro* および *in vivo* 試験が食品由来 ACE 阻害ペプチドの活性を評価するために用いられてきた。しかしながら, *in vitro* 試験では定性的な判断に適しており, 血圧低下に関与した ACE 阻害活性を評価するためには *ex vivo* または *in vivo* 試験を実施することが重要であることが明らかとなった。

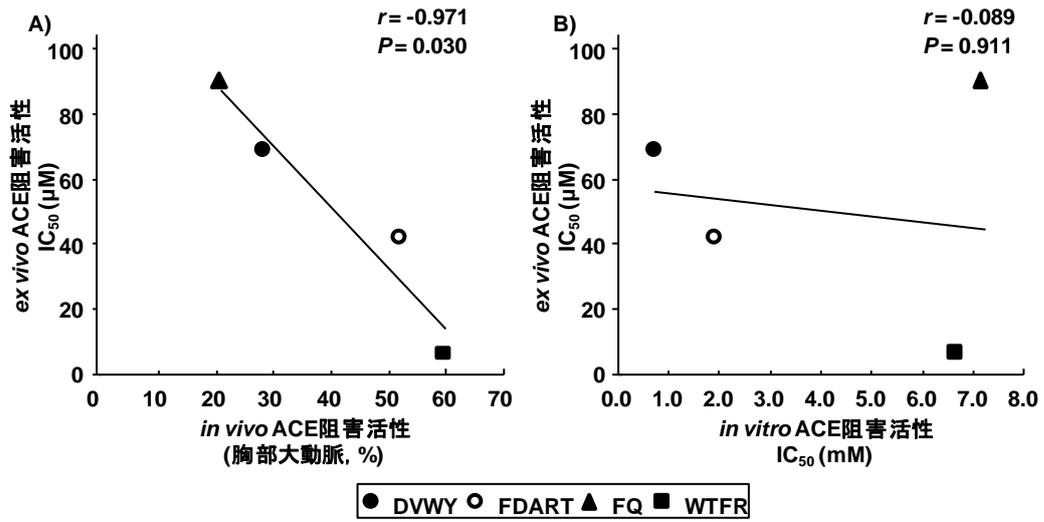


図 17 FBP の *ex vivo* ACE 阻害活性と (A) *in vivo* および (B) *in vitro* ACE 阻害活性間の相関分析.

●; DVWY, ○; FDART, ▲; FQ, ■; WTFR.

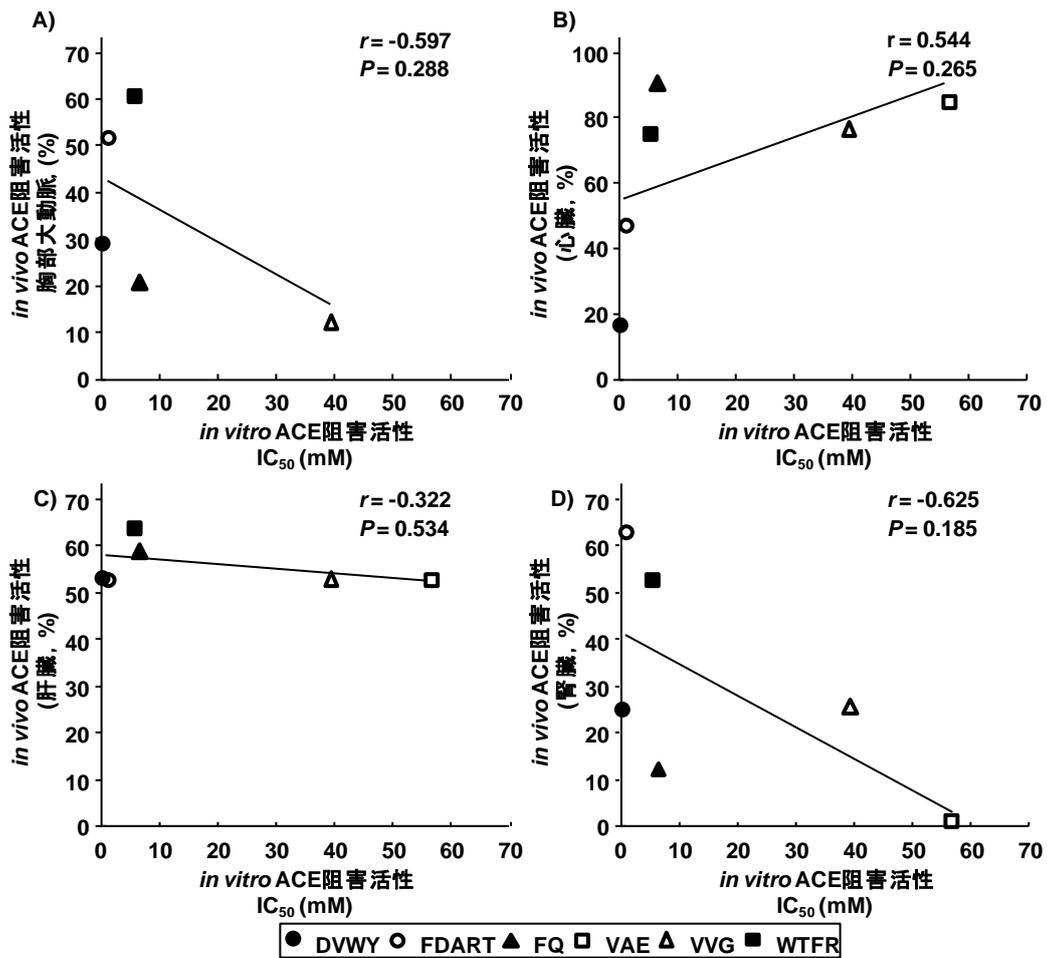


図 18 FBP の *in vitro* ACE 阻害活性と (A) 胸部大動脈, (B) 心臓, (C) 肝臓および (D) 腎臓 *in vitro* ACE 阻害活性間の相関分析.

●; DVWY, ○; FDART, ▲; FQ, □; VAE, △; VVG, ■; WTFR.

相関分析では, FBP の *in vitro* ACE 阻害活性は弱いが, 生体内では低濃度で効果的な ACE 阻害活性を持つことを検証した。表 5 には FBP と ACE 阻害剤であるカプトプリルの各 ACE 阻害活性試験結果を示している。カプトプリルの *in vitro* ACE 阻害活性 IC_{50} 値 (0.092 μM) は FBP と比較して非常に強力であり, FBP の活性よりも 10,000 倍以上高い活性を示した。カプトプリルの *ex vivo* ACE 阻害活性 IC_{50} 値は, FBP よりも 37.6 倍 (WTFR), 278 倍 (FDART), 470 倍 (DVWY) および 606 倍 (FQ) 高かった。同様の試験方法で測定したカプトプリルの *in vivo* 活性は, FBP の *in vivo* ACE 阻害活性と同等であった。

表5 FBP およびカプトプリルの *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* ACE 阻害活性

	カプトプリル	WTFR	FDART	DVWY	FQ	GHG	VAE	VVG
<i>in vitro</i>								
IC ₅₀ 値 (mM)	9.2 × 10 ⁻⁵ ^b	6.69	1.93	0.694	7.38	8.30	55.9	39.6
<i>ex vivo</i>								
IC ₅₀ 値 (μM)	0.15	5.64	41.7	70.5	90.9	-	-	-
<i>in vivo</i> ^a								
(%)	18.7 ^b	60.7	52.4	28.3	20.6	-	-	-

^a 胸部大動脈における *in vivo* ACE 阻害活性, ^b Nakamura et al., 2013.

in vitro ACE 阻害活性試験で確認された FBP とカプトプリルの ACE 阻害活性の大きな差は、*ex vivo* 試験では縮小し、*in vivo* 試験ではその差はなくなった。*in vitro* 試験の結果は、カプトプリルが FBP よりも極低濃度で ACE の活性部位に結合し、阻害能を発揮することを示している。次に *in vitro* および *ex vivo* ACE 阻害活性の IC₅₀ 値を比較したところ、カプトプリルの *in vitro* および *ex vivo* 活性の IC₅₀ 値はほぼ同値であった。一方で、FBP の *ex vivo* 活性 IC₅₀ 値は、*in vitro* 活性 IC₅₀ 値と比較して非常に低く、組織中で効果が高まっていると考えられた。阻害物質は、生体組織中で有効濃度に達して初めて組織 ACE を阻害することができる。そのため、FBP は有効濃度を超えて生体組織に徐々に蓄積することで、高い組織 ACE 阻害作用を引き起したと推測した。本研究で行った *ex vivo* ACE 阻害活性試験において、30 分間行っているペプチド添加後のインキュベーション時間を 1/3 の 10 分間に設定したところ、十分な ACE 阻害活性がみられなかったことも、徐々にペプチドが組織中に蓄積するという推測を裏付けている（データは示していない）。すなわち、高い組織親和性を持つ FBP は、効果的に生体組織に蓄積し、カプトプリルの ACE 阻害活性に近付いたと考えられた。*in vivo* ACE 阻害活性は、組織親和性に加えて生体への吸収も考慮されている。アミノ酸残基が 10 個以下のオリゴペプチドは効率的に生体内に吸収されるという報告がある (Grimble et al., 1986; Shimizu et al., 1997; Takaori et al., 1986)。このことから、*in vivo* 試験でカプトプリルと同等の活性を示した FBP は、カプトプリルよりも吸収効率が高い可能性がある。すなわち、生体への吸収、組織への親和性および蓄積の 3 つの要因を考慮すると、生体内における FBP とカプトプリルの ACE 阻害効果は同等であると推測された。

次に FBP の構造と活性について考察した。FBP のうち配列に正電荷性アミノ酸であるアルギニンを持つ WTFR, FDART が胸部大動脈組織において高い *ex vivo* および *in vivo* 活性を示した (表 5)。これまでに、正電荷性アミノ酸をカルボキシル末端 (C 末端) に持つペプチドは優れた ACE 阻害活性を持つという報告がある (Pripp et al., 2004; Meisel et al., 1993)。しかしながら、WTFR は C 末端にアルギニンを持つにもかかわらず、他の食品由来 ACE 阻害ペプチドに比べて *in vitro* 活性は弱い。さらに FDART は

C末端にアルギニンを持たない。そこで、FR, TFR, FDAR, DAR, ARなどのアルギニンをC末端に持つペプチドフラグメントが生体組織内で生成し、組織に蓄積することで優れた組織ACE阻害活性を示したのではないかと推測した。*in vivo*試験だけでなく吸収は考慮されない*ex vivo*試験においても高い阻害活性を示したことから、血管内皮細胞および平滑筋細胞上に発現する複数のペプチダーゼ (Mentlein et al., 1996)により分解されたペプチドフラグメントが関与する可能性がある。WTFRやFDARTに限らずその他のFBPにおいても同様の代謝を受けると予測される。FBP自身の吸収効率の高さ、組織との親和性、蓄積に加えて、代謝を受けたFBPフラグメントの関与も本研究により示唆された。

本章では、血管等尺性張力試験、*in vitro*、*in vivo*および新しく提案した定量的な*ex vivo* ACE阻害活性試験によりFBPの降圧機序を検討し、FBPの主な降圧機序は生体組織におけるACE阻害であることを明らかにした。*ex vivo* ACE阻害活性試験は、血圧低下を引き起こすACE阻害を簡便に評価することを可能にし、アンジオテンシンIIの生成抑制と血管収縮抑制の関係について初めて報告した。最後に、FBPの*in vitro* ACE阻害活性はカプトプリルと比較して非常に弱かったが、*ex vivo*試験ではカプトプリルの活性に近付き、*in vivo*試験ではほぼ同レベルであった。この結果から、生体内でのFBPのACE阻害活性は、FBPまたはFBPのフラグメントの高い生体内利用度により大幅に高まっているのではないかという仮説を立てた。今後、ペプチド性ACE阻害物質の詳細な組織ACE阻害機序を解明するためにもこの仮説が証明されることを期待したい。

総括

近年、超高齢化社会への突入、高血圧を含む生活習慣病の増加によりセルフメディケーションへの関心が高まっている。それに伴い、機能的食品への関心が高まっており、エビデンスの有無にかかわらず疾病の予防・改善をうたった食品素材が数多く販売されている。これらの食品と発酵キョウバクを区別して、効果のある食品として実用化していくためには、適切な評価方法に基づいて科学的証拠を得ることが必須である。

研究対象である発酵キョウバクは、高血圧症モデル動物でありその試験結果はヒトに適用することができる SHR (Russell & Proctor, 2006) において優れた降圧作用を示し、その降圧機序も明らかとなっている。しかし、有効成分については明らかとなっていなかった。そこで、本論文では、発酵キョウバクの網羅的な解析を進めるために、発酵キョウバクの降圧成分の探索と特徴付けを行った。さらに試験を行う中で、活性評価に用いる評価方法の妥当性についても考察した。

本論文の第一章では、発酵キョウバクの降圧作用は、ソバスプラウトの乳酸発酵により付与されることが明らかとなった。この降圧作用を引き起こす物質を特定するために、発酵キョウバクおよびソバスプラウトに含まれているフラボノイド類の同定および定量を行ったが、乳酸発酵による有意な増加は確認されなかった。一方で、既知降圧成分であるチロシンと GABA が乳酸発酵により有意に増加していた。しかし、これらの成分の降圧作用は発酵キョウバクよりも非常に弱く、その含量からも、発酵キョウバクの降圧作用を引き起こすとは考えられなかった。

そこで、本論文の第二章では、乳酸発酵により新たに生成する降圧成分の探索を行い、ソバスプラウトには含まれない7種のペプチドが単離された。つまり、ソバスプラウトの乳酸発酵により新たに生成するペプチドであり、DVWY, VAE および WTFR は配列も新規であった。これらのペプチドはすべて SHR において比較的低用量で降圧作用を示した。そのため、単離ペプチドは、発酵キョウバクの降圧作用に関与する主要成分の一つであると考えられた。

第三章では、発酵キョウバクより単離した降圧ペプチド (FBP) の降圧機序の検討を行った。FBP は弱い血管拡張作用と *in vitro* ACE 阻害活性を示した。しかし、全ての FBP が優れた組織 ACE 阻害活性を有していることが *in vivo* および *ex vivo* ACE 阻害活性試験により明らかとなった。そのため、FBP の降圧作用は、主に組織 ACE 阻害により引き起こされると結論付けた。組織 ACE 阻害は、降圧作用だけでなく肝臓、心血管および腎保護作用などにも効果を表すことが報告されている (Maki et al., 1995; Lonn et al., 1994)。FBP は ACE 阻害剤に匹敵する優れた組織 ACE 阻害作用を持っているため、ペプチド性 ACE 阻害剤として降圧作用だけでなく心筋梗塞や肝臓線維化、腎不全などの予防や治療に応用していくことも可能である。

また、従来用いられてきた *in vitro* および *in vivo* ACE 阻害活性試験の測定条件には、それぞれ生体内の環境とは異なる点があり、血圧低下に関与している ACE 阻害活性を正確に評価できていない可能性があった。本研究ではその問題点に着目し、正確な ACE 阻害活性を測定するために、従来の試験よりも生体に近い条件で活性測定ができる *ex vivo* ACE 阻害活性試験を提案した。この試験により、血圧低下に関与した ACE 阻害活性を評価することが可能になったと同時に、*in vitro* および *in vivo* 試験を用いた ACE 阻害活性評価の妥当性についても言及することができた。*in vitro* 試験は、生体における ACE 阻害物質の活性を評価することは難しいが、定性的な評価は行うことができる簡便な試験として広く用いることができる。*in vivo* 試験は、阻害剤の生体吸収や生体組織への作用も考慮できるため、血圧低下に関わる ACE 阻害活性を正しく評価できる試験であるが、直接 ACE 阻害により引き起こされる生体反応を測定することはできない。*ex vivo* 試験は *in vivo* 試験よりも生体組織と阻害物質の作用を考慮したうえで、定量的に ACE 活性と ACE 阻害により引き起こされる生体反応を評価できるため、*in vitro* 試験で行うべき阻害剤のスクリーニングと *in vivo* 試験で行うべき生体内での活性評価を *ex vivo* 試験により同時にかつ簡易に行うことも可能である。

本研究により、発酵キョウバクの降圧作用は乳酸発酵により付与され、主に生体組織の ACE を阻害することにより発酵キョウバクの降圧作用に寄与している物質として FBP

を単離することができた。本研究の結果は、発酵キョウバクの実用化に向けての網羅的な解析の一助になったと同時に、FBPは優れたACE阻害作用を持つ機能性素材としての利用が期待できると考えられた。

謝辞

本研究を遂行し博士論文をまとめるにあたり、貴重なご指導とご助言を頂きました主指導教官である信州大学農学部教授 廣田満先生に深く感謝の念を申し上げます。また、副指導教官として貴重なご助言とご協力頂きました信州大学農学部教授 大谷元先生、信州大学農学部教授 藤井博先生に深く感謝いたします。本研究の論文審査において、信州大学大学院農学研究科教授 藤田智之先生、信州大学大学院農学研究科教授 真壁秀文先生、山形大学農学部教授 佐藤英世先生にはご親切なるご教示およびご助言を賜りました。謹んで謝意を表します。

また、信州大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、農学部応用生命科学科 食品分子工学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、日頃から多大なるご協力を戴き、研究および論文執筆について終始ご懇切なご指導を賜りました信州大学農学部准教授 中村浩蔵先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 2011年特定保健用食品の市場規模調査, 公益財団法人日本健康・栄養食品協会.
- Aoyagi, Y. An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour. *Phytochem.*, 67, 618-621, 2006.
- Boonen, K., Creemers, J.W., & Schoofs, L. Bioactive peptides, networks and systems biology. *Bioessays*, 31(3), 300-314, 2009.
- Bujak-Gizycka, B., Madej, J., Wołkow, P.P., Olszanecki, R., Drabik, L., Rutowski, J., & Korbut, R. Measurement of angiotensin metabolites in organ bath and cell culture experiments by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *J. Physiol. Pharmacol.*, 58(3), 529-40, 2007.
- Burgaud, J.L., & Oudart, N. N^G-nitro-L-arginine methyl ester inhibits the effect of an H3-histaminergic receptor agonist on NANC contraction in guinea-pig perfused bronchioles. *J Pharm Pharmacol.*, 46(2), 153-155, 1994.
- Carey, R.M. Angiotensin type-1 receptor blockade increases ACE 2 expression in the heart. *Hypertens.*, 43(5), 943-944, 2004.
- Deguchi, T., Takemoto, M., Uehara, N., Lindup, W.E., Suenaga, A., & Otagiri, M. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314(2), 932-938, 2005.
- Diet, F., Pratt, R.E., Berry, G.J., Momose, N., Gibbons, G.H., & Dzau, V.J. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circ.*, 94, 2756-2767, 1996.
- Ehlers, M.R., Maeder, D.L., & Kirsch, R.E. Rapid affinity chromatographic purification of human lung and kidney angiotensin-converting enzyme with the novel N-carboxyalkyl dipeptide inhibitor N-[1(S)-carboxy-5-aminopentyl]glycylglycine.

Biochim. Biophys. Acta., 883(2), 361-372, 1986.

Falkenhahn, M., Franke, F., Bohle, R.M., Zhu, Y.C., Stauss, H.M., Bachmann, S., Danilov, S., & Unger, T. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertens.*, 25, 219-226, 1995.

Feher, A., Cassuto, J., Szabo, A., Patel, V., Vinayak Kamath, M., & Bagi, Z. Increased tissue angiotensin-converting enzyme activity impairs bradykinin-induced dilation of coronary arterioles in obesity. *Circ. J.*, 77(7), 1867-1876, 2013.

Fu, X.C., Wang, M.W., Li, S.P., Zhang, Y., & Wang, H.L. Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(1), 37-41, 2005.

Fujita, H., & Yoshikawa, M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44(1-2), 123-127, 1999.

Fukuda, N., Hu, W.Y., Satoh, C., Nakayama, M., Kishioka, H., Kubo, A., & Kanmatsuse, K. Contribution of synthetic phenotype on the enhanced angiotensin II-generating system in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 17, 1099-1107, 1999.

Fukuhara, M., Geary, R.L., Diz, D.I., Gallagher, P.E., Wilson, J.A., Glazier, S.S, Dean, R.H., & Ferrario, C.M. Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertens.*, 35, 353-359, 2000.

Fusi, F., Saponara, S., Pessina, F., Gorelli, B., & Sgaragli, G. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations. a comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur. J. Nutr.*, 42(1), 10-17, 2003.

Gohlke, P., Lamberty, V., Kuwer, I., Bartenbach, S., Schnell, A., Linz, W., Schölkens, B.A., Wiemer, G., & Unger, T. Long-term low-dose angiotensin converting enzyme inhibitor treatment increases vascular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertens.*, 22(5), 682-687, 1993.

Grimble, G.K., Keohane, P.P., Higgins, B.E., Kaminski, M.V. Jr., & Silk, D.B. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, 71(1), 65-69, 1986.

Gunawan, S., Walton, N.Y., & Treiman, D.M. High-performance liquid chromatographic determination of selected amino acids in rat brain by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *J. Chromatogr.*, 503, 177-187, 1990.

Hatanaka, A., Miyahara, H., Suzuki, K., & Sato, S. Isolation and identification of antihypertensive peptides from antarctic krill tail meat hydrolysate. *J. Food Sci.*, 74, 116-120, 2009.

Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.*, 92, 411-417, 2004.

Hayashi, A., & Kimoto, K. Studies on the mechanism of antihypertensive action by nicotianamine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56(4), 242-246, 2010.

Heeneman, S., Sluimer, J.C., & Daemen, M.J., Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ. Res.*, 101, 441-454, 2007.

Hu, W.Y., Fukuda, N., & Kanmatsuse, K., Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 20, 1323-1333, 2002.

平成 22 年度国民医療費の概況結果, 厚生労働省.

平成 23 年国民健康・栄養調査, 厚生労働省.

平成 24 年人口動態統計の年間推計, 厚生労働省.

Ibe, S., Yoshida, K., Kumada, K., Tsurushin, S., Furusho, T., & Otobe, K.

Antihypertensive effects of natto, a traditional Japanese fermented food, in spontaneously hypertensive rats. *Food Sci. Technol. Res.*, 15(2), 199-202, 2009.

Izzo, J.L. Jr, & Weir, M.R., Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Clin. Hypertens.*, 13, 667-675, 2011.

Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 213-217, 1985.

Jurd, L. Spectral properties of flavonoid compounds. Geissman TA (ed) In the chemistry of flavonoid compounds, The Macmillan Co., NY, 107-155, 1962.

城西大学薬学部医療栄養学科 (編著): 最新版「トクホ」のことがよくわかる保健機能食品・サプリメント基礎と活用. 株式会社カザン, 2007.

Kawasaki, T., Itoh, K., Ogaki, T., & Yoshimizu, Y. A study on the genesis of hypertension in mountain people habitually taking Tibetan tea and buckwheat in Nepal. *J. Health Sci.*, 17, 121-130, 1995.

健康日本 21 企画検討会: 計画策定検討会報告書. 健康日本 21 (21 世紀における国民健康づくり運動について). 健康・体力づくり事業団, 2000.

Kim, D.W., Hwang, I.K., Lim S.S., Yoo, K.Y., Li, H., Kim, Y.S., Kwon, D.Y., Moon, W.K., Kim, D.W., & Won, M.H. Germinated buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.*, 23, 993-998, 2009.

高血圧治療ガイドライン 2009. 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会 (編), ライフサイエンス出版, 2009.

Kouno, K., Hirano, S., Kuboki, H., Kasai, M., & Hatae, K. Effects of dried bonito (katsuobushi) and captopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, on rat isolated aorta: a possible mechanism of antihypertensive action. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(5), 911-915, 2005.

Koyama, M., Hashiguchi, Y., & Nakamura, K. Antihypertensive Actions of the Gly-His-Gly Isolated from Fermented Buckwheat Sprout. *Pept. Sci.* 2011, 115-118, 2012.

Koyama, M., Nakamura, C., & Nakamura, K. Changes in phenols contents from buckwheat sprouts during growth stage. *J. Food Sci. Technol.*, 50, 86-93, 2013.

Kreft, I., Fabjan, N., Yasumoto, K. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem.*, 98, 508-512, 2006.

Li, C.H., Matsui, T., Matsumoto, K., Yamasaki, R., & Kawasaki, T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J. Pept. Sci.*, 8, 267-274, 2002.

Lida, M., Ueda, K., Okayama, A., Kodama, K., Sawai, K., Shibata, S., Tanaka, S., Keijnkai, T., Horibe, H., Minowa, M., Yanagawa, H., Hashimoto, T.; Nippon Data 80 Research Group. Impact of elevated blood pressure on mortality from all causes, cardiovascular diseases, heart disease and stroke among Japanese: 14 year follow-up of randomly selected population from Japanese -- Nippon data 80. *J. Hum. Hypertens.*, 17, 851-857, 2003.

Lin, L.Y., Peng, C.C., Yang, Y.L., & Peng, R.Y. Optimization of bioactive compounds in buckwheat sprouts and their effect on blood cholesterol in hamsters. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1216-1223, 2008.

Lonn, E.M., Yusuf, S., Jha, P., Montague, T.J., Teo, K.K., Benedict, C.R., & Pitt, B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*, 90(4), 2056-2069, 1994.

Ma, M.S., Bae, I.Y., Lee, H.G., & Yang, C.B. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.*, 96, 36-42, 2006.

Maejima, Y., Nakatsugawa, H., Ichida, D., Maejima, M., Aoyagi, Y., Maoka, T.,

& Etoh, H. Functional compounds in fermented buckwheat sprouts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1708-1712, 2011.

Maki, D.D., Ma, J.Z., Louis, T.A., & Kasiske, B.L. Long-term effects of antihypertensive agents on proteinuria and renal function. *Arch. Intern. Med.*, 155(10), 1073-1080, 1995.

Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., & Osajima, Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57(6), 922-925, 1993.

Meisel, H. Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein. In: Schwenke, K.D., Mothes, R. editor. *Food Proteins-Structure Functional.* Weinheim, New York: VCH, 67-75, 1993.

Mentlein, R., & Roos, T. Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells. *Peptides*, 17(4), 709-720, 1996.

Miguel, M., Manso, M.A., Martín-Alvarez, P.J., Aleixandre, A., & López-Fandiño, R. Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51(5), 555-563, 2007.

Nakamura, K., Naramoto, K., & Fujita, M. Blood-pressure-lowering effect of fermented buckwheat sprout and the peptides contained therein. *Pept. Sci.* 2008, 13-16, 2009.

Nakamura, K., Naramoto, K., & Koyama, M. Blood-pressure-lowering effect of fermented buckwheat sprout in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods*, 5, 406-415, 2013.

a) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano,

T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 777-783, 1995. b) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., & Takano, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, 78, 1253-1257, 1995.

Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Kwak, C.J., Ikemura, K., Takaoka, M., Moriguchi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., & Matsumura, Y. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(5), 1118-1126, 2006.

Nakata, H. A rule to account for mass shifts in fragmentations of even-electron organic ions in mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 50, 173-188, 2002.

Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., & Suzuki, I. Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 81, 1486-1491, 1998.

Olszanecki, R., Bujak-Gizycka, B., Madej, J., Suski, M., Wołkow, P.P., Jawień, J., & Korbut, R. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme. *J. Physiol. Pharmacol.*, 59(2), 387-392, 2008.

Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepaniak, L., & Sørhaug, T. Quantitative structure-activity relationship modeling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 579-583, 2004.

Rosendorff, C., & Black, H.R. Evidence for a lower target blood pressure for people with heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.*, 24(4), 318-324, 2009.

Russell, J.C., & Proctor, S.D. Small animal models of cardiovascular disease: Tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and

atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.*, 15, 318-330, 2006.

Sang, Y.L., Xu, M., Ma, F.F., Chen, H., Xu, X.H., Gao, X.Q., & Zhang, X.S. Comparative proteomic analysis reveals similar and distinct features of proteins in dry and wet stigmas. *Proteom.*, 12, 1983-1998, 2012.

Seki, E., Kawasaki, T., Yoshida, M., Osajima, K., Tamaya, K., Matsui, T., & Osajima, Y. Antihypertensive effect of sardine peptide and valyl-tyrosine in spontaneously hypertensive rats. *J Japan Soc. Nutr. Food Sci.*, 52, 271-277, 1999.

島本和明. 高血圧管理・治療の新しい動向 (JNC-VIと我が国の現状). 日本内科学会雑誌, 88 : 401-405, 1999.

Shimizu, M., Tsunogai, M., & Arai, S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides*, 18(5), 681-687, 1997.

Skidgel, R.A. Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 9(8), 299-304, 1988.

Song, X., Ni, Z., Yao, Y., Zhang, Y., & Sun, Q. Identification of differentially expressed proteins between hybrid and parents in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling leaves. *Theor. Appl. Genet.*, 118, 213-225, 2009.

Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., & Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(24), 9386-9390, 1988.

Sunano, S., Nakahira, T., Kawata, K., & Sekiguchi, F. Factors involved in the time course of response to acetylcholine in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 423(1), 47-55, 2001.

Sunano, S., Watanabe, H., Tanaka, S., Sekiguchi, F., & Shimamura, K. Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of

mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, 126, 709-716, 1999.

Sved, A.F., Fernstrom, J.D., & Wurtman, R.J. Tyrosine administration reduces blood pressure and enhances brain norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 3511-3514, 1979.

Takaori, K., Burton, J., & Donowitz, M. The transport of an intact oligopeptide across adult mammalian jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 137(2), 682-687, 1986.

Tamvakopoulos, C. Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spectrom. Rev.*, 26(3), 389-402, 2007.

Tsai, J.S., Lin, Y.S., Pan, B.S., & Chen, T.J. Antihypertensive peptides and gamma-aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochem.*, 41, 1282-1288, 2006.

Takai, S., Kirimura, K., Jin, D., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., Mino, Y., & Miyazaki, M. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling. *Hypertens Res.*, 28(7), 593-600, 2005.

Takano, T. Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.*, 8, 375-381, 1998.

Xin-jin, Z., Wen-cai, L., Ya-ning, F., & Lin, H. High gamma-aminobutyric acid content, a novel component associated with resistance to abamectin in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *J. Insect Physiol.*, 56, 1895-1900, 2010.

Yang, H., Singsit, C., Wang, A., Gonsalves, D., & Ozias-Akins, P. Transgenic peanut plants containing a nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus show divergent levels of gene expression. *Plant Cell Reports*, 17, 693-699, 1998.

Yang, H.Y., Yang, S.C., Chen, J.R., Tzeng, Y.H., & Han, B.C. Soyabean protein

hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.*, 92(3), 507-512, 2004.

Yang, Y., Marczak, E.D., Yokoo, M., Usui, H., & Yoshikawa, M. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4897-4902, 2003.

Yoshiji, H., & Fukui, H. Vascular endothelial growth factor. *J. Nara Med. Assoc.*, 55(2), 63-72, 2004.

Zhao, H., Usui, H., Ohinata, K., & Yoshikawa, M. Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D(2)-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, 29, 345-349, 2008.

Zhao, L., Buckman, B., Seto, M., Morser, J., & Nagashima, M. Mutations in the substrate binding site of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) alter its substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 278(34), 32359-32366, 2003.