

肝臓酵素分解物の新規生理活性機能の検索

Search of Novel Biologically Active Components in Liver Hydrolysates

六車 三治男・西 俊郎・奥野 真代・山下 真由子・河原 聡

(宮崎大学農学部)

Michio Muguruma, Toshio Nishi, Mayo Okuno,

Mayuko Yamashita and Satoshi Kawahara

(Faculty of Agriculture, Miyazaki University)

Liver hydrolyzed powder (Liver-Hi) contains the various functional materials, which has bioregulation. Therefore, it is considered that the functional materials are existed in the liver-Hi. The purpose of this study was to search their functional materials, especially angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides and antioxidant activity.

First of all, inhibitory activities against ACE of liver-Hi and their enzymatic hydrolysates were investigated. Liver-Hi was digested by pepsin, trypsin and α -chymotrypsin. After digestion, hydrolysates showed ACE inhibitory activities, and the tryptic hydrolysates showed the strongest activity. The liver-Hi ethanol extract was applied to reverse-phase high performance liquid chromatography to separate an active peptide. In the case of A-18 fraction, the molar concentration of liver-Hi peptides required to inhibit 50% of the activity increased markedly ($0.268\mu\text{g/ml}$). Secondary, the effects of liver-Hi and their enzymatic hydrolysates on antioxidant activities were studied. The DPPH radical scavenging method and the hydroxyl radical scavenging method were used for detecting. The liver-Hi had strong antioxidant activity. The molar concentration of liver-Hi peptides required to inhibit 50% of the activity of DPPH radical scavenging and hydroxyl radical scavenging were $157\mu\text{g/ml}$ and $135\mu\text{g/ml}$, respectively.

These results suggested that the porcine liver-Hi was able to show ACE inhibitory activity and antioxidant activity, and that might be a useful source of physiologically functional factors.

1. 目 的

肝臓はさまざまな有効成分の宝庫であり、古くから人々はこれを食することで種々の疾患の治癒や回復に役立ててきた。肝臓を酵素により分解して得られる肝臓加水分解物には各種アミノ酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド、低分子のペプチド、ビタミン、ミネラル等が豊富に含まれており、機能障害を起こした肝臓ではこれらの成分が減少す

ることから、積極的に補充することで治療効果が期待できることが報告されて以来、多くの臨床研究がなされている^{1,2)}。また、酵素分解物は低分子ペプチドを主成分とするために、消化性および吸収性に優れ、消化能力の衰えた老人や病人、タンパク質の摂取を必要とする乳幼児からスポーツ選手の食生活にまで貢献することが期待され、すでに伊藤ハム(株)より豚肝臓酵素分解物(レバーHi)として製品化されている³⁾。この製品には、肝代

謝改善作用、肝再生促進作用、肝解毒機能改善作用、抗ウイルス作用、アルコール性肝障害治療効果¹⁾等の効果が示唆されている。

この豚肝臓酵素分解物にはその他、肝臓酵素分解物中に血圧調節に関与しているACE（アンギオテンシンⅠ変換酵素）阻害作用、肥満抑制作用、コレステロール低下作用等が存在する可能性も示唆されており、それらを含む新しい生理活性機能の研究が求められている。近年、いろいろな材料からのACE阻害ペプチドに関する研究が行われている⁵⁻¹⁰⁾。また、われわれも動物骨成分^{11,12)}や豚肉由来のACE阻害ペプチドの同定^{13,14)}を行ってきた。

そこで今回は、肝臓加水分解物中に存在が期待されるACE阻害作用を示すペプチドの同定と抗酸化作用についても検索を行ったので、得られた結果を報告する。

2. 実験材用および方法

2.1 実験材料

伊藤ハム株式会社製レバー Hiを使用した。なお、このレバー Hiは、豚肝臓を酵素分解し、特異な臭気を除去した水溶性のペプチド粉末である。

2.2 アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性の測定

Cushmanらの方法¹⁵⁾に準じて、和光純薬工業株式会社製ウサギ肺由来ACEとナカライテスク社製合成基質HHL（Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine）を用いて測定した。

すなわち、試料6 μ lに、60mU/ml ACE溶液20 μ lおよび7.6mM HHL 50 μ lを添加し、37℃で30分間反応させた。ACEは、ホウ酸緩衝液（pH8.3）で溶解し、HHLは、塩化ナトリウム（和光純薬工業製、特級）、0.25Mホウ酸緩衝液を、それぞれ最終濃度0.608M、0.1Mになるように超純水を用いて調製した溶液で溶解した。その後、0.1N塩酸

0.554mlを加えて反応を停止した。ついで、酢酸エチル1.5mlを加えてACEの作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し、3,000rpmで10分間遠心分離を行った後、酢酸エチル層1mlを分取して蒸発乾固（100℃、10分間）した。乾固した馬尿酸は1M塩化ナトリウム溶液1mlで溶解し、波長228nmにおける吸光度を測定した。

阻害率は、試料の吸光度をS、試料の代わりに超純水を加えて同様に反応させたときの値をC、あらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの値をBとして次式により求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(C-S)/(C-B)\} \times 100$$

阻害活性（IC₅₀）は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの阻害物質濃度で示した。対照実験として、既知のACE阻害物質であるカルノシンのACE阻害活性を測定した。

2.3 エタノールによるレバー Hiの分画

エタノールによるレバー Hiの分画はレバー Hiを90%エタノールに溶解させ、遠心分離（10,000×g 10分間）した。遠心分離後、上清と沈殿物に分け、遠心エバポレーターでエタノールを除去し、それぞれレバー Hi上清（Livei-Hi s.u.p.）とレバー Hi沈殿（Liver Hi p.p.t.）に分画した。

2.4 高速液体クロマトグラフィーによる分析

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析は、TSKgel G2000SW_{XL}カラム（7.8mm I.D.×30cm）を島津製LC-10AD型のHPLC装置に接続して行った。溶出液は20mMリン酸緩衝液（pH7.0）を用いた。

2.5 レバー Hiの消化耐性試験

レバー Hiを生体内の消化酵素で分解し、ACE阻害活性を測定した。すなわち、レバー Hiと各種消化酵素（ペプシン、トリプシンおよび α -キモトリプシンをタンパク質：酵素比で100：1となるように添加し、ペプシンとトリプシンは37℃で6時間、 α -キモトリプシンは25℃で6時間反応させ

た。反応後、加熱により酵素失活を行い、遠心分離（10,000×g 10分間）し、上清のACE阻害活性を測定した。

2.6 ACE阻害活性化因子の精製

最もACE阻害活性が高かったレバー Hi上清のACE阻害活性化因子を逆相HPLCにて精製した。HPLC装置はGL-science Inertsil ODS-2（6.0mm ID×150mm）カラムを接続した島津製LC-10AD型を用いた。

2.7 DPPHラジカル消去活性の測定

抗酸化消去活性の測定はDPPH分光測定法¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）、MES緩衝液（pH6.0）、エタノールの混合溶液に試料を加えて、室温、暗所で40分間反応させ、反応後、島津 Bio Spec 1600分光光度計により波長517nmにおける吸光度を測定した。DPPHラジカル消去率は、試料の吸光度をS、試料の代わりに超純水を加えて同様に反応させたときの値をCとして次式より求めた。

$$\text{DPPHラジカル消去率(\%)} = \frac{(C-S)}{C} \times 100$$

ラジカル消去活性（IC₅₀）は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの阻害物質濃度で示した。対照実験として、既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンの消去活性を測定した。

2.8 安息香酸ヒドロキシル化法

安息香酸ヒドロキシル化法はChungらの方法¹⁷⁾に準じて行った。すなわち、100mMリン酸緩衝液（pH 7.4）を1.0ml、試料を0.4ml、10mM FeSO₄・H₂Oと10mM EDTA-4Naの混合溶液を0.2mlおよび安息香酸ナトリウムを0.2mlを混合・攪拌したのちに10mM 過酸化水素水を0.2ml加えて、37℃、2時間反応させた。反応後、直ちに島津RF-1500蛍光分光光度計により、Emission 407nm、Excitation 305nmを測定した。

ラジカル消去率は、試料の吸光度をS、試料の

代わりに超純水を加えて同様に反応させた時の値をCとして次式より求めた。

$$\text{消去率(\%)} = (C-S)/C \times 100$$

阻害活性（IC₅₀）は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの阻害物質濃度で示した。対照実験として、既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンの消去活性を測定した。

3. 結果および考察

国内の主要な疾患のうち、高血圧は比較的主要な疾患である。高血圧症は、脳・心臓など各種臓器障害や欠陥性疾患の危険因子であり、高齢化社会の進展とともに早急な予防対策を講じる必要がある。近年、食品中に存在し、血圧上昇に関与するACEを阻害して、高血圧防止に役立てようとする研究が、数多く報告されている^{5~11)}。本研究でも肝臓の酵素分解物中にACEを阻害して血圧上昇を抑制するペプチドの検索を行うために以下の実験を試みた。

3.1 高速液体クロマトグラフィーによる分析

酵素処理により低分子量化したレバー Hi構成成分を、さらに低分子量化成分を主に含む画分と比較的高分子量成分を含む画分に分離するためにエタノール沈殿を行った。分離後のレバー Hi上清とレバー Hi沈殿の分子量分布をゲルろ過HPLCにより分析した（Fig. 1）。いずれの試料も低分子域に主要なピークが存在していた。レバー Hi上清は元のレバー Hiよりも低分子域のピークが増加し、一方、レバー Hi沈殿はそのピークが減少し、元のレバー Hiよりもわずかであるが高分子成分に富むことが明らかになった。

3.2 レバー Hiおよびそのエタノール分画物のACE阻害活性

レバー Hiおよびそのエタノール分画物のACE阻害活性を測定したところ、阻害率はいずれの試料もタンパク質濃度依存的に上昇した。この結果

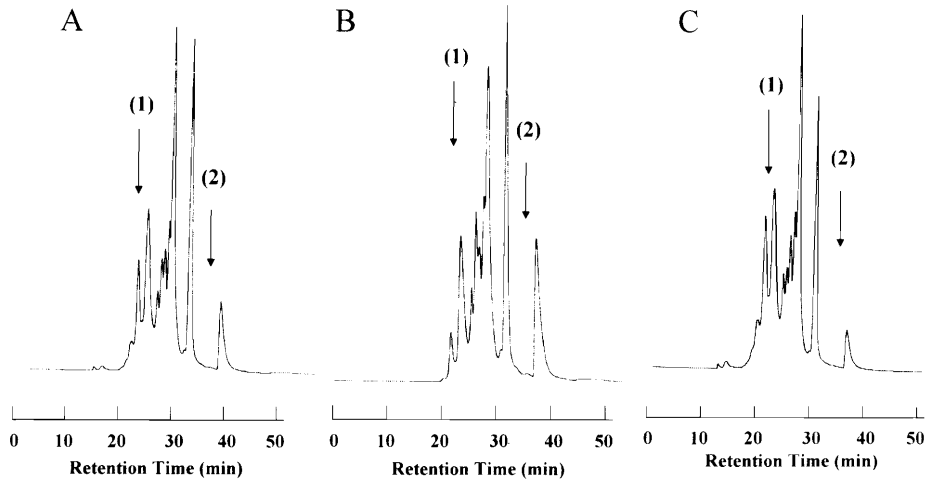


Fig.1 HPLC profiles of liver-Hi and their fractionates.

A; Liver-Hi, B; Liver-Hi s.u.p., C; Liver-Hi p.p.t.

HPLC condition; Column: TSK gel G2000SW_{XL} (7.8mm I.D. × 30cm)

Eluent: 20mM phosphate buffer (pH 7.0)

Flow rate: 0.2 ml/min

Detection: OD at 215 nm

Molecular weight marker; (1) Aprotinin (6,500 Da), (2) Rivoflavin (376 Da)

から得られた IC_{50} 値を**Fig. 2**に示した。レバー Hi 自体の IC_{50} 値は0.24mg/mlとなり、既知のACE阻害物質であるカルノシンの IC_{50} 値よりも高い値を示した。次に、エタノールでの分画の結果、レバー Hi上清の IC_{50} 値は0.10、レバー Hi沈殿は0.34mg/mlであった。このこととゲルろ過HPLCの結果から、レバー Hi由来のACE阻害ペプチド

は低分子域に存在する可能性が示唆された。

3.3 レバー Hi由来ACE阻害ペプチド群の消化耐性

レバー Hiを体内の消化酵素であるペプシン、トリプシンおよび α -キモトリプシンで消化し、その消化物のACE阻害活性を測定した(**Fig. 3**)。その結果、未分解のレバー Hiの IC_{50} 値が0.24mg/ml

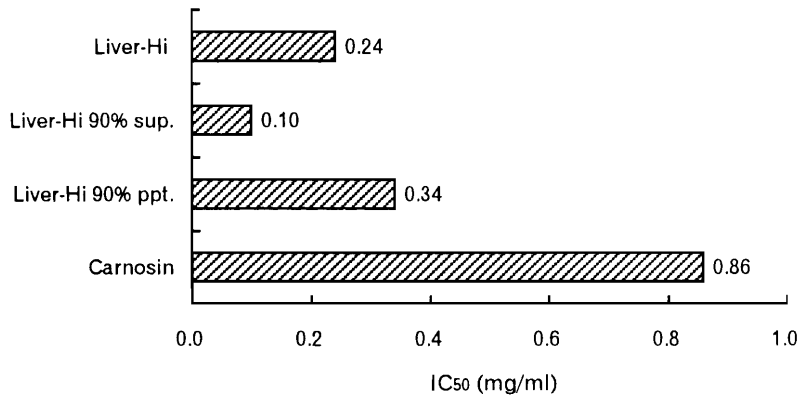


Fig.2 ACE inhibitory activities of liver Hi and their fractionates.

IC_{50} : concentration of protein reduced to inhibit 50% of the ACE activity.

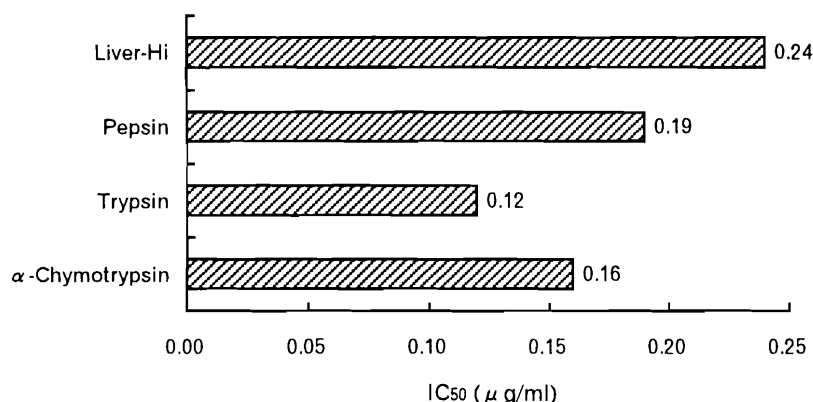


Fig.3 ACE inhibitory activities of liver Hi and their hydrolysates.

IC₅₀: concentration of protein reduced to inhibit 50% of the ACE activity.

であるのに対し、ペプシン消化物が0.19、トリプシン消化物が0.11、 α -キモトリプシン消化物が0.16mg/mlであり、すべての消化物で活性が上昇した。以上の結果より、レバー Hi由来のACE阻害ペプチド群は生体内での酵素に耐性を有し、しかもそれら消化物のACE阻害活性はレバー Hi自体よりも高くなったことから、体内での消化酵素による消化で新たなACE阻害ペプチドが生成する可能性が示唆された。また、生体内酵素による消化耐性はこれらのペプチドが消化管部位まで分解されずに移行する可能性を示唆している。

3.4 レバー Hi由来ACE阻害ペプチドの精製

レバー Hi由来ACE阻害ペプチドの精製を目的に、エタノール分画で最もACE阻害活性が強かったエタノール90%上清画分を逆相HPLCにより分画した (Fig. 4-A)。その結果、いくつかの画分でACE阻害活性を有する画分が存在し、その中で非常に強い活性を有している画分は溶出時間23分から25分に溶出していた画分Aと26分から27分に溶出している画分Bであった。そのIC₅₀値は前者が28.7μg/ml、後者が22.6μg/mlであった。次にこれらの画分を同カラムにてリクロマトした結果、画分Aで溶出時間27~28分の画分と画分Bの溶出時間28~29分の画分に強いACE阻害活性を有して

いた。それらのIC₅₀値は前者が0.268μg/ml、後者が5.87μg/mlであった (Fig. 4-B, Fig. 4-C)。今後さらに高い阻害活性を示すペプチドを単離し、それらの構造を明らかにする必要がある。

3.5 抗酸化機能の測定

活性酸素やフリーラジカルは、生体内では種々の生体分子を攻撃し、生体膜の損傷や遺伝子の障害を生じる。これらは各種疾患、発ガン、老化の要因とされており、生体に吸収されて抗酸化ストレスに働く効果的な抗酸化剤の開発が望まれている。トコフェロールやポリフェノールが代表的な抗酸化剤であるが、タンパク質を加水分解することにより不飽和脂肪酸の自動酸化を抑制するペプチドが生成することが認められている。そこで、本研究でも肝臓の酵素分解ペプチドの抗酸化活性の有無について検討した。

食品の抗酸化機能を評価する方法としては種々の方法が提案されており、これらには一長一短がある。また評価法によっては結果が一致しない場合もあり、可能ならば原理の異なる2つ以上の方法で評価することが望ましい。本研究では、DPPH分光測定法¹⁶⁾と安息香酸ヒドロキシル化法¹⁷⁾による分析を行った。

(1) DPPHラジカル消去活性

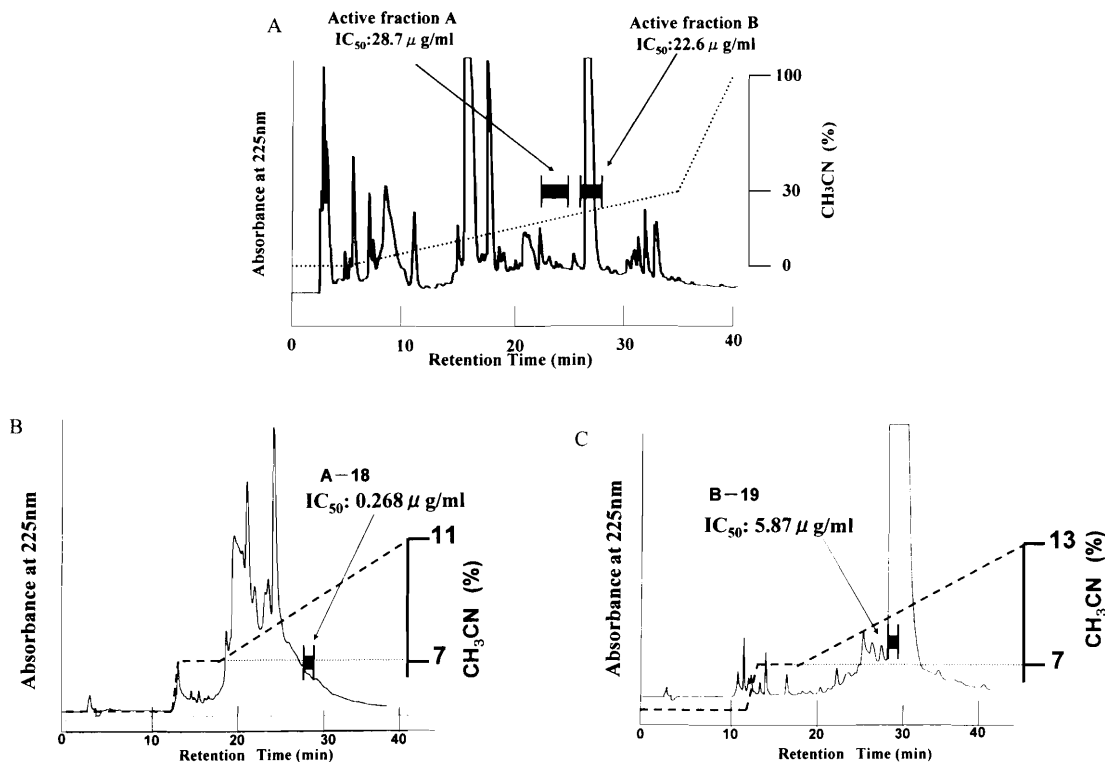


Fig.4 Reverse-phase HPLC profiles of the active fraction.

A ; Chromatogram of active fraction after GL-science Inertsil ODS-2 column.
HPLC condition ; Column : Inertsil ODS-2 (6.0 mm I.D.×150 mm)
Solvent system : 0% to 30% CH₃CN (5–35min) in 0.1% TFA
Flow rate : 1 ml/min
Detection : OD at 225 nm

B ; Rechromatography of active fraction A
HPLC condition ; Column : Inertsil ODS-2 (6.0 mm I.D.×150 mm)
Solvent system : 7% to 11% CH₃CN (15–35min) in 0.1% TFA
Flow rate : 1 ml/min
Detection : OD at 225 nm

C ; Rechromatography of active fraction B
HPLC condition ; Column : Inertsil ODS-2 (6.0 mm I.D.×150 mm)
Solvent system : 7% to 13% CH₃CN (15–45min) in 0.1% TFA
Flow rate : 1 ml/min
Detection : OD at 225 nm

抗酸化機能としてDPPHラジカル消去活性を測定した結果、濃度依存的に阻害活性が上昇し、レバー HiのIC₅₀値は157μg/mlを示した (Fig. 5-A)。既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンのIC₅₀値は15μg/mlであり、それよりも低いものの、

レバー Hi自体粗精製品であることから、その抗酸化機能は高いと考えられる。このレバー Hiを生体内の消化酵素で分解した結果、ペプシン消化物のIC₅₀値は227, トリプシン消化物は259, α-キモトリプシン消化物は170μg/mlであり、いずれの

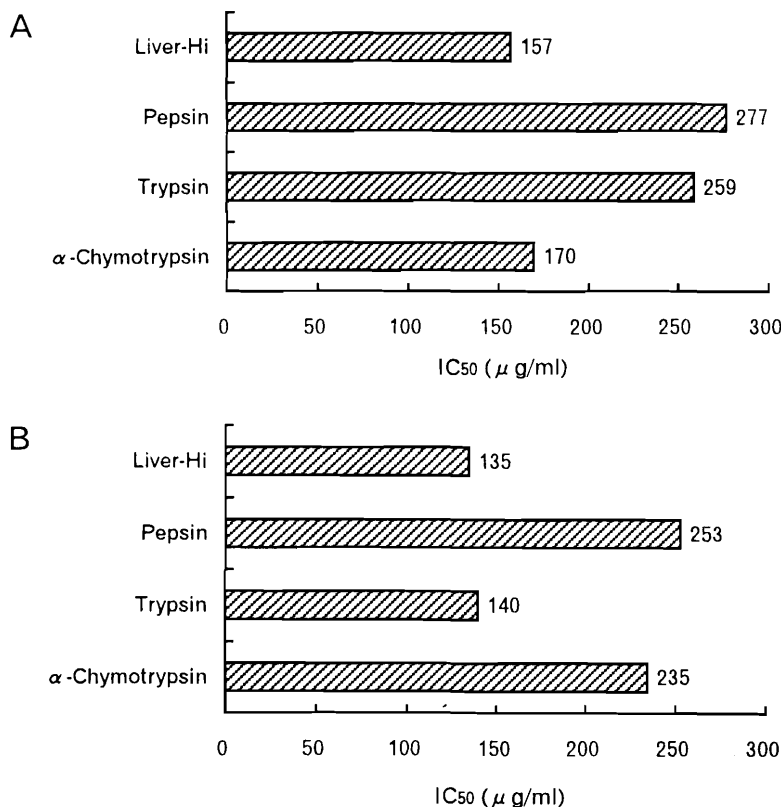


Fig.5 Antioxidative activity of liver-Hi and their hydrolysates

A: Activity in DPPH radical scavenging system

B: Activity in hydroxyl radical scavenging system

消化物もレバー Hi自体よりも活性が若干低下した。

(2) 安息香酸ヒドロキシル化法によるラジカル消去活性

安息香酸ヒドロキシル化法を用いて、試料のOHラジカル消去能を測定した。DPPHラジカル消去能と同様に濃度依存的に阻害活性が上昇し、IC₅₀値が135μg/mlであった (**Fig. 5-B**)。その結果、既知の抗酸化物質である還元型グルタチオンのIC₅₀値は358μg/mlとなり、レバー Hiと比較するとその活性はレバー Hiの方が高くなっていることが明らかになった。また、消化酵素でレバー Hiを消化した結果、ペプシン消化物のIC₅₀値は253、トリプシン消化物は140、α-キモトリプシンは

235μg/mlであり、DPPH消去活性を測定したときと同様に活性が低下した。しかし、これらの消化物の活性は還元型グルタチオンよりも高かった。

以上の結果より、レバー Hiは比較的高い抗酸化機能を有することが明らかになった。それらの全活性は生体内の酵素処理により若干低下するものの依然として比較的高い抗酸化機能を保持しており、生体で機能する可能性が示唆された。

4. 要 約

今回、生理活性機能として肝臓加水分解物中に存在が期待される血圧上昇を抑制するACE阻害活性と多くの疾病に関連しているラジカルに対する消去活性を測定した。

その結果、レバー Hi の ACE 阻害活性は他の ACE 阻害ペプチドの粗精製品よりも比較的高い活性を有していることが明らかになった。また、さらにレバー Hi をエタノール分画した結果、レバー Hi 中の ACE 阻害活性は低分子量域に存在するペプチドにより高い活性が発揮されることも認められた。今後、それらの高い活性を有するペプチドの単離・精製を進めて、レバー Hi 中の ACE 阻害ペプチドの構造解析を行う必要がある。

一方、肝臓の酵素分解ペプチドの抗酸化活性の有無について検討する目的で、DPPH 分光測定法と安息香酸ヒドロキシル化法による分析を行った。

その結果、レバー Hi 標品は抗酸化活性を有していることも明らかになった。レバー Hi は高い肝機能改善効果を有することから、それらの機能性成分の検索をさらに追及する予定である。

いずれにしても、レバー Hi は酵素分解された低分子ペプチドからなるために、消化性および吸収性に優れ、高齢者や乳幼児のための健康食品として、あるいは病人のみならず健常人やスポーツ選手の体力増強食品素材として高度で幅広い利用が期待できる。

文 献

- 1) 小泉岳夫, 末松俊彦: 臨床と研究, 49, 261-262 (1989)
- 2) 平山千里: 診断と治療, 69, 66-68 (1981)
- 3) 本田和久: 食品の包装, 26, 46-50 (1995)
- 4) 奥山啓二, 丸山勝也, 横山 顕, 高橋久雄, 許斐健二: 新薬と臨床, 46, 152-160 (1997)
- 5) 鈴木建夫, 石川宣子, 日黒 照: 日本農芸化学会誌, 57, 1143-1146 (1983)
- 6) Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H.: Agric. Biol., Chem., 53, 2763-2797 (1989)
- 7) Yokoyama, K., Chiba, H. and Yoshikawa, M.: Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1541-1545 (1992)
- 8) Wako, Y., Abe, Y., Handa, T. and Ishikawa, S.: Food Sci. Technol. Res., 5, 378-380 (1999)
- 9) 松井利郎, 川崎晃二: 日本栄養・食糧学会誌, 53, 77-85 (2000)
- 10) 末綱邦夫: 日本水産学会誌, 64, 862-866 (1998)
- 11) 六車三治男, 土島良介, 河原 聡: 伊藤記念財団平成11年度食肉に関する助成研究調査報告書, 18, 338-345 (2000)
- 12) 六車三治男, 土島良介, 河原 聡: 伊藤記念財団平成12年度食肉に関する助成研究調査報告書, 19, 262-269 (2001)
- 13) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. and Muguruma, M.: Asian-Aust. J. Anim. Sci., 16, 417-424 (2003)
- 14) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. and Muguruma, M.: Anim. Sci. J., 74, 53-58 (2003)
- 15) Cushuman, D.W.: Biochemical Pharmacology, 20, 1637-1647 (1996)
- 16) 須田邦夫, 分光学的抗酸化機能評価, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一 編著, 218-223, 光琳, 東京 (2001)
- 17) Chung, S., Osawa, T. and Kawakishi, S.: Biosci. Biotech. Biochem., 61, 118-123 (1997)

- 1) 小泉岳夫, 末松俊彦: 臨床と研究, 49, 261-262