

研究論文

食肉の血圧上昇抑制効果の畜種別差異について

久保田 大樹・アブドラティフ アーメド・河原 聡・六車 三治男

宮崎大学農学部食品機能化学講座

(2011年12月22日 受理)

Comparative Study on Antihypertensive Activity of Meat Hydrolysates Sourced from Bovine, Porcine and Poultry

Daiki KUBOTA, Abdulatef AHMED, Satoshi KAWAHARA, Michio MUGURUMA

Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

Summary : This research aimed to study and compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates ; *in vitro* tests. In the current study, we evaluated the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of hydrolysate of *biceps femoris* muscles from beef and pork also we used leg muscles for chicken samples. All the muscles separately hydrolyzed with pepsin and trypsin and then subjected to size exclusion chromatography. ACE inhibitory activity of the hydrolysate was determined by Rabbit lung enzyme and Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC).

SDS-PAGE results suggest that beef has not been degraded on the same level as pork and chicken. HPLC patterns indicate that the second peak in chicken sample digested for 4h contain bioactive peptides (MW 1,560). The three species showed a very similar ACE inhibition percentage, although chicken showed lower protein concentration. Results suggest that the chicken possesses crucial peptide that are having a great ability in undermining ACE activity, which is in accord with the findings of HPLC. As a comparative study, IC_{50} of chicken showed the lowest values for the both treatments (Rabbit lung ACE and HUVEC ACE).

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on its remarkable ACE inhibitory activity, we suggest that the chicken hydrolysate may have potential applications as functional food, which could be used as nutraceutical compounds.

Key words : Meat hydrolysates, Antihypertensive effect, ACE inhibitor, Biological function

諸言

畜産食品の消費量は約半世紀の間に急増したが、これは我が国が長寿国となった理由の一つとも考えられている。一方、日本人のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病の患者が増加しており、国民の健康への関心は極めて高くなっている。特に高血圧症の患者は平成11年には719万人であつ

たのに対し、平成18年には5490万人に急増している（日本生活習慣病予防協会データ 2009）。高血圧症は我が国の死亡原因の2～3位を占める心疾患、脳血管疾患の原因と深く関わっている。

高血圧症は脳、心臓など各種臓器障害、血管性疾患の危険因子であり、主要死因の上位を占めている脳卒中や心不全あるいは腎臓病などの合併症

を引き起こす(田中他 1992; 尾前他 1992)ため、高血圧をいかに抑制するかが重要である。高血圧症は原因の明らかな二次性高血圧と、約90%以上を占めるといわれている本態性高血圧に分類される。本態性高血圧はこれまで原因が不明であったが、最近の研究により、生活習慣が大きな要因である事が分かってきた(日和田他 2001)。生体内で昇圧調節を中心的に担っているのはレニン-アンジオテンシン系であり、アンジオテンシンIがアンジオテンシン変換酵素(ACE)の作用によって、昇圧物質であるアンジオテンシンIIへと代謝される。このアンジオテンシンIIは生体内で最も強力な昇圧物質であり、血管平滑筋を収縮させる直接的昇圧作用を有しているだけではなく、副腎でのアルドステロン分泌を刺激し、ナトリウムや水の貯留量増大を引き起こし、間接的な血圧上昇にも関与する(松尾他 1994)。したがって、ACEの阻害薬は血圧上昇抑制に有効であるとされており、臨床的にも心臓系疾患の改善(Kostis 1995)や、他の降圧薬よりも副作用が少ない事が明らかになったこと(金子他 1982)や、ACE阻害剤単独で本態性高血圧患者の70%に効果を示していること(Irilli *et al.* 1992)などから、薬物療法において高血圧治療の第一選択薬の一つとして現在広く使用されている。

現在、高血圧症の患者には治療薬が利用されているが、薬の種類により作用機構が異なると言われている。特にカプトプリルやエナラプリルのようなアンジオテンシンI変換酵素(以下ACE)阻害薬は、臨床的にも心臓系疾患の改善や高血圧症の治療に利用されている(金子他 1982)。しかしながら、このような薬には咳嗽などの副作用を発症させる可能性がある。従って、ACE阻害物質を含む食事の摂取による高血圧症予防は、副作用の心配も無く理想的だと考えられる。

食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり、近年、疾病予防作用などの保健的な機能性に関する研究が進められている。食肉には、ACEの阻害による高血圧症予防の期待があることが報告されている(斉藤他 2007)。食肉によるこれらの効果は主にペプチドに由来する。食肉タンパク質は酵素消化によりペプチドを生成し、その機能性を発揮する。現在、食肉由来血圧降下作用ペプチドに関してはいくつか検出されているが(Arihara *et al.*

2001; Katayama *et al.* 2003a, b, 2004, 2007, 2008; Muguruma *et al.* 2009; Ahhmed & Muguruma 2010)、各種食肉に含まれる生活習慣病予防効果のある機能性ペプチドに関する畜種別の詳細な比較検討はまだ行われていない。

そこで本研究では、生体内で血圧調節を中心的に担うレニン-アンジオテンシン系に着目し、各種食肉(牛肉・豚肉・鶏肉、いずれもモモ肉)をタンパク質分解酵素で消化したペプチド混合物を用いて、試験管内(ウサギ肺由来ACE)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC由来ACE)における血圧上昇抑制効果を畜種別に比較検討した。

材料および方法

1 実験材料

市販の宮崎県産の各種食肉(牛肉・豚肉・鶏肉いずれもモモ肉)を実験材料に用いた。

2 食肉由来ペプチドの調製

食肉由来ペプチドの調製は以下のとおりである。各種食肉のミンチ肉に2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサ(Panasonic MK-K48)を用いて30秒間、2回ホモジナイズした。70°Cで30分間インキュベート後、このホモジェネートを酵素未処理の加熱食肉タンパク質サンプル「Whole」とした。その後、このホモジェネートをHClでpH 1.8に調整し、胃粘膜由来ペプシン(1:10,000)(和光純薬工業株式会社)をタンパク質量(食肉重量当たり20%のタンパク質が含まれることを仮定した)に対して1/1,000倍量添加し、攪拌しながら37°Cで2時間インキュベートした。NaOHを用いてpH 6.8に調整し、10分間煮沸した後、溶液温度を40°Cまで低下させた。この溶液をペプシン消化サンプル「ペプシン(2h)」とした。さらにトリプシン(和光純薬工業株式会社)およびパンクレアチン(同会社)をそれぞれペプシンと同量添加し、再び攪拌しながら37°Cで2時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を食肉由来ペプチドとした。この溶液をペプシン・トリプシン処理サンプル「ペプシン/トリプシン(4h)」とした。

なお、加熱食肉タンパク質「Whole」および各反応段階で得られた酵素消化により生じたペプチド混合物を0.45 μ mセルロースアセテートメンブ

レンフィルタ（アドバンティック東洋株式会社）にてろ過した試料を実験に供した。

3 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

得られた試料の分子種やそれらの酵素反応による分解程度を調べるためにドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)をLaemmliの方法 (Laemmli 1970) で行った。アクリルアミド濃度7.5~17.5%のグラジエントゲルを用いてスラブ型の泳動槽で行った。ゲルバンドの染色はクーマシーブリリアントブルーR-250 (Bio-RAD Laboratories) により行い、脱色には10%酢酸を用いた。また、分子量マーカーとしてSDS-PAGE Molecular weight standards, Broad Range 161-031 7 (BIO-RAD社製) を使用した。

4 ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

溶離液には0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0, 0.4 M) を用いた。分析中は溶離液を脱気装置 (DGU-14A, 株式会社島津製作所) に通し、カラムはShodex PROTEIN KW-803 (8×300mm) (昭和電工株式会社)、送液ポンプはLC-10AD (株式会社島津製作所) を用い、流速0.5 ml/min、注入量20 μ lで行った。

ペプチドの検出には、コンピューターで制御された検出器 (SPD-10AVP, 株式会社島津製作所) を用い、検出波長は280 nmで行った。さらに分子量マーカーとしてリボフラビン、シトクロームC、アプロチニン、BSAを用いた。

5 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質「Whole」の定量はBiuret法 (Gornall *et al.* 1949) により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液をSHIMADZU製UV-VIS Spectrophotometer 1245型分光光度計 (吸光度: 540 nm) にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法 (Murphy & Kies 1960) を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215 nmの吸光度から225 nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ

分光光度計を使用した。

6 アンギオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害活性の測定

Cushmanの方法 (Cushman & Cheung 1971) に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンギオテンシンI変換酵素 (ACE, Peptidyl dipeptidase, EC 3.4.11.5.1, シグマ社) を用い、0.25 Mホウ酸緩衝液で60 unit/mlに調整し、測定時には0.25 Mホウ酸緩衝液で1 unit/mlに希釈し使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-Lヒスチジル-Lロイシン (HHL, ナカライテスク株式会社) を使用した。HHLは塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)、0.25 Mホウ酸緩衝液をそれぞれ0.608 M, 0.1 MになるようにMilliQ水を用いて調整した溶液で溶解した。

試料6 μ lに60 unit/mlのACE溶液20 μ lおよび7.6 mM HHL溶液50 μ lを添加し37°Cで30分間反応させた。反応は0.1 N HCl (和光純薬工業株式会社) 554 μ lを加えて停止させた。反応後には酢酸エチル (ナカライテスク株式会社) 1.5 ml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、2,500 rpm (1000×g)、15分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1 ml分取し、100°C、10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために1 MのNaCl溶液を1 ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸吸光度を228 nmで測定した。

阻害率は吸光度をS、食肉の代わりにMilliQ waterを加えた時の吸光度をC、あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして次式より求めた。

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

7 ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるACE活性抑制試験

本実験は財団法人日本食品分析センター彩都研究所機能科学研究チームの協力の下で行った。Balyasnikovaの方法 (Balyasnikova 2001) に従い、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験を行った。すなわち96 well Micro PlateにHUVECを分注し、培地希釈した各種食肉由来ペプチド50 μ lと基質液50 μ lを添加し37°Cで3時間反応させ、上清50 μ lを分取後、His-LeuをOPA (o-Phthalaldehyde)

蛍光測定した。

ACEタンパク質の活性上昇を誘導するPMA (Phorbol-12-myristate 13-acetate) を使用し、陽性対照区にはカプトプリル2.5 nMを添加した。

結果および考察

1 SDS-PAGEおよびゲルろ過HPLCによる分子量分布の分析

これまでの食品素材からのACE阻害活性の研究は、タンパク質派生ペプチドの検索が中心である

ことや、Stamlerらの報告 (Stamler *et al.* 1996) からタンパク質摂取量の増加は血圧降下に有効であるとされることなどから、本実験においても食肉を複数の酵素によりによって処理したペプチドを調製し、ACE阻害活性を測定した。

まず、SDS-PAGEによるサンプル全体のタンパク質の分子量分布およびゲルろ過HPLCによる消化による食肉タンパク質の経時的变化の観察と分子量分布の測定を行った (Fig. 1, 2)。SDS-PAGEによって、酵素処理時間に伴い、各食肉タンバ

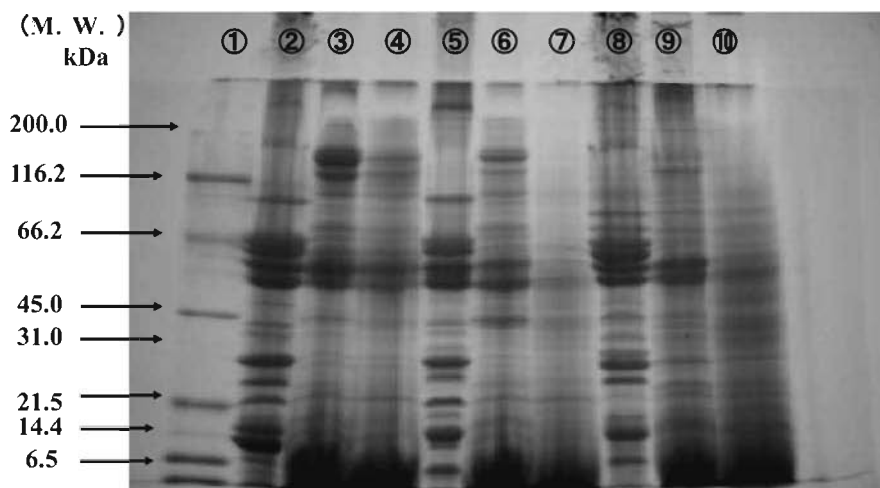


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of time course hydrolyzation of beef, pork and chicken digested muscles. 1 (molecular-weight marker); 2~4 (0, 2 and 4h digestion time of beef samples); 5~7 (0, 2, and 4h digestion time of pork samples); 8~10 (0~2~4h digestion time of chicken samples).

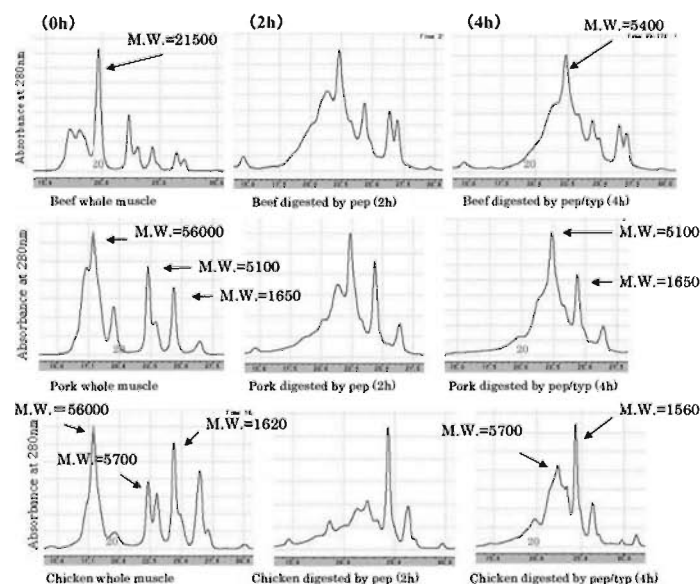


Fig. 2. HPLC pattern of time course hydrolyzation of beef, pork and chicken digested muscles. First row indicates patterns of beef proteins; second row patterns of pork proteins; third row patterns of chicken proteins. The time course of samples digestion is associated above the patterns. Pep = pepsin; typ = trypsin.

ク質の分解が進行したことが認められ、牛肉よりも豚肉および鶏肉で酵素処理による筋肉タンパク質の分解が進行する傾向も認められた。またHPLCの結果より分子量20,000 Da以上の食肉タンパク質は6,000 Da以下に分解されることが明らかになり、各種プロテアーゼとの反応による高分子タンパク質の低分子化が確認された。食肉の種類により消化による影響の受け易さに若干の違いが生じ、分解過程のHPLCパターンは異なったが、それらのパターンから鶏肉、豚肉、牛肉の順に分解されやすい傾向にあった。ペプシンとトリプシンで4時間酵素消化した食肉由来ペプチドのピークを畜種間で比較すると、どれも分子量1,000~6,000 Daの間にピークを有していることが確認された。特に、鶏肉で分子量1,560付近の低分子量のピークの増加が認められ、機能性ペプチド発現の増加が期待された。

2 ACE阻害活性の測定比較検討

牛肉、豚肉および鶏肉ともに消化酵素による処理で、食肉タンパク質のほとんどが6,000 Da以下に分解されていることが確認された。そこで酵素処理によるACE阻害活性の比較検討を行った。

Fig. 3に、食肉の加熱処理と酵素処理により0.45 μ mセルロースアセテートメンブレンフィルタを透過するタンパク質量と、それらのACE活性阻害率を示した。酵素処理前の加熱処理により各種食肉から遊離する低分子量のタンパク質に有意な差異は認められなかった。各種食肉はペプシン消化およびその後のトリプシン酵素消化によりタ

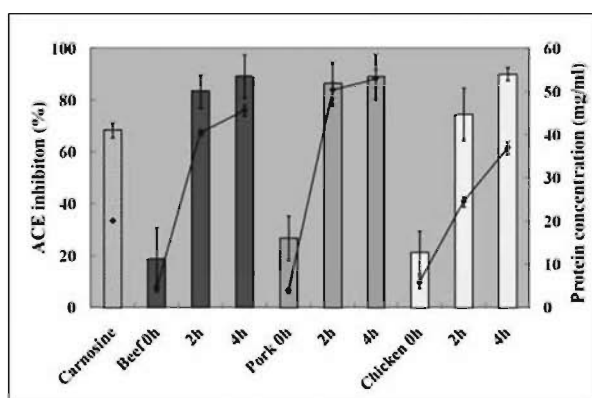


Fig. 3. Associated graph shows the values of ACE inhibition percentage (data in bars) and protein concentration (mg/ml; data in line) of beef, pork and chicken muscles.

ンパク質濃度が増加する傾向が認められ、ACE阻害活性も上昇していくことが確認された。また、ペプシンによる2時間の酵素処理で、既知のACE阻害剤であるカルノシンの阻害活性と同等かそれ以上のACE阻害活性が発現することが認められた。なお、ペプシンによる2時間の消化(2h)と、さらにその後2時間のトリプシンによる処理(4h)との間に優位差は認められなかった。これらの結果から、ACEの阻害に必要なペプチドの生成はペプシンによる影響が強く、消化の初期段階で多量に生成し、約2時間の消化時間でACE阻害を高く発現するペプチドの生成終了に近づいていく可能性が示唆された。また各種食肉由来ペプチドのIC₅₀値(mg/ml)を算出したところ牛肉(9.02)、豚肉(4.19)、鶏肉(3.55)と算出された。

以上の結果から、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

3 ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるACE活性抑制試験による比較検討

血圧低下ペプチドの生体内での作用機構についてはまだ不明な点が多い。血圧調節に関与しているレニン-アンギオテンシン系は循環器系だけでなくあらゆる臓器に存在することが知られている。循環器系の関連組織では、腎臓、心臓、大動脈血管(内皮および平滑筋)、さらには副腎にもレニン-アンギオテンシン系が存在する(Ehler *et al.* 1990)。高血圧自然発症ラット(SHR)の場合、大動脈ACE活性が血圧の亢進とともに増加することが人の場合と同様に認められている。さらに、持続性ACE阻害剤であるスピラプリルを用いたSHRに対する投与試験によって、長期間の高圧持続性の発現は、大動脈血管に存在するACE活性の抑制が1つの要因である(Okunishi 1991; 松井 2009)ことが判明している。従って、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験を実施することは重要と考えられる。

Fig. 4 a-cに、人血管内皮細胞におけるACE活性抑制試験による比較検討を行い、得られた結果を示した。

図に記載されたPMA (Phorbol myristate acetate) はACEの活性を発現させる物質である。またカブ

トプリルは一般的に用いられているACE阻害薬であり、本実験では標準物質として用いた。Fig. 4 aは牛肉由来ペプチド、Fig. 4 bは豚肉由来ペプチド、Fig. 4 cは鶏肉由来ペプチドを添加した時のACEの活性を測定したものである。PMA未処理区ではほとんどACEの活性は見られず、PMAの添加によりACE活性が発現した。また、各種食肉由来ペプチドは濃度依存的にACEの活性を抑制し、牛肉ではおよそ0.5~1 mg/ml、豚肉・鶏肉では0.25~0.5 mg/mlにおいてカプトプリル2.5 nMと同等のACE阻害活性を示した。本試験においても、ウサギ肺由来ACE試験同様に IC_{50} (mg/ml) を求めた。その結果、牛肉 (0.668)、豚肉 (0.260)、鶏

肉 (0.249) と算出された。

食肉由来ペプチドによる、ウサギ肺由来ACEとHUVEC細胞由来ACEの阻害活性試験によって算出された IC_{50} (mg/ml) をTable. 1 に示した。ウサギ肺由来ACEの IC_{50} のデータはHUVEC細胞由来ACE測定時の反応液 (76 μ l) に換算した値である。比較の結果、どちらの試験結果も活性の強い順に、鶏肉、豚肉、牛肉となり、ほぼ同様の値が得られた。従って、ヒト血管内皮由来のACEでも食肉由来ペプチドによる阻害活性をその作用強度とともに確認することができた。

以上の結果から、牛肉および豚肉も高いACE阻害活性を示したが、鶏肉はそれらの食肉よりもさらに高いACE阻害活性を持つことが明らかになった。今後、ACE阻害活性を発現している食肉由来ペプチドを単離・精製し、同定を行うことにより高い活性を示した要因一つを明らかにする必要がある。今回の研究では、血圧上昇抑制ペプチドに焦点を当て研究を行った。食肉には他の生活習慣病予防効果を示すペプチドの存在も報告されている (Arihara *et al.* 2001)。従って本研究は引き続き

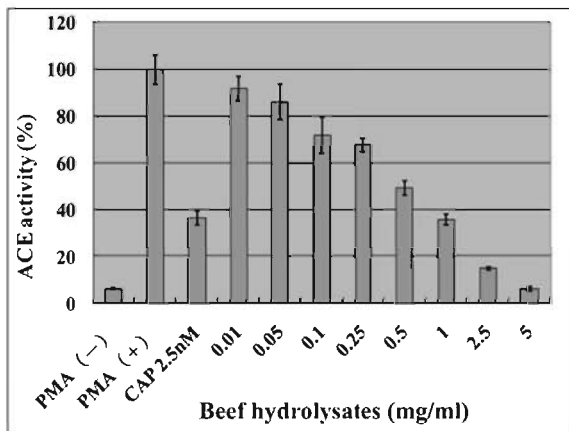


Fig. 4-a. Changes in ACE activity of beef hydrolysates measured using HUVEC. Axis numbers are changes in beef hydrolysates concentration. PMA (Phorbol myristate acetate); CAP (Captopril).

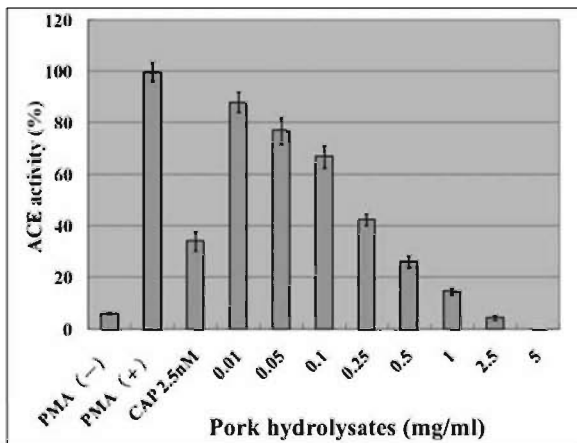


Fig. 4-b. Changes in ACE activity of pork hydrolysates measured using HUVEC. Axis numbers are changes in pork hydrolysates concentration. PMA (Phorbol myristate acetate); CAP (Captopril).

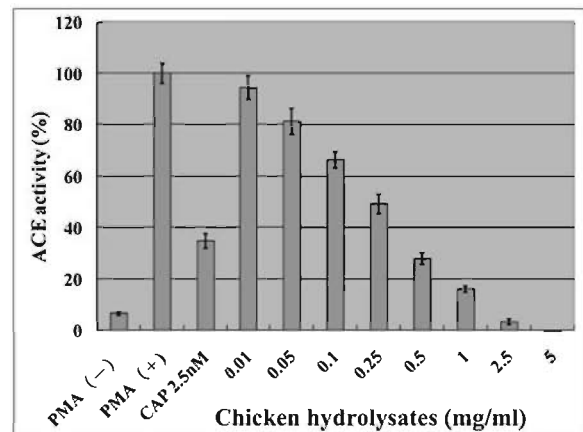


Fig. 4-c. Changes in ACE activity of chicken hydrolysates measured using HUVEC. Axis numbers are changes in chicken hydrolysates concentration. PMA (Phorbol myristate acetate); CAP (Captopril).

Table 1. IC_{50} values of beef, pork and chicken hydrolysates measured using Rabbit-lung ACE and HUVEC-ACE.

Sample	Rabbit lung ACE	HUVEC-ACE
Beef	0.714	0.668
Pork	0.343	0.260
Chicken	0.287	0.249

き、生活習慣病の中でも罹患率の高い、癌や糖尿病と深く関わっている抗酸化効果や血糖値上昇抑制効果を示す機能性ペプチドについて、畜種別の比較を行っていく必要がある。

要 約

本研究では、生体内で血圧調節を中心的に担うレニン-アンジオテンシン系に着目し、各種食肉をタンパク質分解酵素で消化したペプチド混合物を用いてウサギ肺ACE阻害活性と人血管内皮細胞 (HUVEC) における血圧上昇抑制効果を畜種別に比較検討した。

食肉タンパク質はSDS-PAGEとゲルろ過HPLCによって経時的に分解・消化されたことが確認された。食肉の種類により消化による影響の受け易さに若干の違いが生じ、HPLCのパターンから鶏肉、豚肉、牛肉の順に分解されやすい傾向にあった。特に、鶏肉で分子量1,560付近の低分子量のピークの増加が認められた。ACE阻害に必要なペプチドの生成はペプシンによる影響が強く、約2時間の消化時間で阻害ペプチド生成終了に近づいていく可能性が示唆された。また各種食肉由来ペプチドの IC_{50} (mg/ml) を算出したところ牛肉 (9.02)、豚肉 (4.19)、鶏肉 (3.55) と算出された。また、HUVECによる試験結果においても IC_{50} : 牛肉 (0.668)、豚肉 (0.260)、鶏肉 (0.249) を算出し、ACE阻害活性の結果と同様の阻害傾向を示したことが確認された。

以上の結果から、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

キーワード：食肉酵素分解物、血圧上昇抑制効果、ACE 阻害、生理機能

謝 辞

本研究の一部は、平成21年度財団法人伊藤記念財団研究助成を受けて実施したものである。記して深甚なる謝意を表します。

引用文献

- Ahmed, A.M., M. Muguruma (2010) A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Sci.* **86**, 110-118.
- Arihara, K., Y. Nakashima, T. Mukai, T. Ishikawa, M. Itou (2001) Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* **57**, 319-324.
- Balyasnikova, I.V., S.M. Dnilov, V.R. Muzykantov, A.B. Fisher (2001) Modulation of angiotensin-converting enzyme in cultured human vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **34**, 545-554.
- Cushman, D.W., H.S. Cheung (1971) Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648.
- Ehler, M.R.W., J.F. Riordan (1990) Pathophysiology, diagnosis, and management. *Hypertension* (Eds. J.H. Laragh & B.M. Brenner), Raven Press, New York, pp. 1217-1231
- Gornall, A.G., C.J. Baradawill, M.M. David (1949) Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- 日和田邦夫・阿部陽一 (2001) 高血圧の予防と管理。学会センター関西学会出版センター, pp. 12, 9-27
- Irairi, Z.H., W.D. Hall (1992) Cough and angio-neurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* **117**, 234-242
- 金子好宏・山田和生・池田正男・尾前照男・武田忠直・塩之入洋・増山義明・熊原雄一・国府達郎・荒川規矩男 (1982) 医学のあゆみ。医歯薬出版株式会社, pp. 122, 62-85
- Katayama, K., H. Fuchu, A. Sakata, S. Kawahara, K. Yamauchi, Y. Kawamura, M. Muguruma (2003a) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**, 417-424.
- Katayama, K., M. Tomatsu, H. Fuchu, M. Sugiyama, S. Kawahara, K. Yamauchi, K. Y. Kawamura, M. Muguruma, (2003b) Purification and characterization of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Anim. Sci. J.* **74**, 53-58.
- Katayama, K., M. Tomatsu, S. Kawahara, K. Yamauchi, H. Fuchu, M. Sugiyama, Y. Kawamura, M. Muguruma (2004) Inhibitory profile of

- nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 771-775.
- Katayama, K., Jamhari, T. Mori, S. Kawahara, K. Miake, K. Y. Kodama, M. Sugiyama, Y. Kawamura, M. Nakayama, M. Mayuyama, M. Muguruma (2007) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine skeletal muscle myosin and its antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.* **72**, 702-706
- Katayama, K., H. E. Anggraeni, T. Mori, A. M. Ahhmed, S. Kawahara, M. Sugiyama, T. Nakashima, M. Mayuyama, M. Muguruma (2008) Porcine skeletal muscle troponin is a good source of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 355-360
- 河野雄平 (1992) 日本臨床 (増刊) 高血圧. 日本臨牀社, pp. 623-630
- Kostis, J.B (1995) The effect of enalapril on mortal and morbidevents in patients with hypertension and left ventricular dysfunction. *Am. J. Hypertens.* **8**, 909-914.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 松井利郎 (2009) ペプチドと高血圧. *New Food Industry* **51**, 1-7.
- 松尾寿之・香取信・大石幸子・加藤久雄・三宅可浩 (1994) キニンとアンギオテンシン生体調節の分子機構. 講談社サイエンティフィック, pp. 2, 4-7, 23-24
- Muguruma, M., A.M. Ahhmed, K. Katayama, S. Kawahara, M. Maruyama, T. Nakamura (2009) Identification of pro-drug type ACE inhibitory peptide sourced from porcine myosin B: Evaluation of its antihypertensive effects *in vivo*. *Food Chem.* **114**, 516-522.
- Murphy J. B., M.W. Kies (1960) Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 382-384.
- 日本生活習慣病予防協会データ (2009)
- Okunishi, H., T. Kawamoto, Y. Kurobe, Y. Oka, K. Ishii, T. Tanaka, M. Miyazaki (1991) Pathogenetic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **18**, 649-659.
- 尾前照雄・河野雄平 (1992) 日本臨床 (増刊) 高血圧. 日本臨牀社, pp. 623-630
- 斉藤忠夫・西村敏英・松田 幹 (2007) 最新畜産物利用学. 朝倉書店, pp. 123-124
- Stamler, J., P. Elliott, H. Kesteloot, R. Nichols, G. Claeys, A.R. Dyer, R. Stamler (1996) Inverse relation of dietary protein markers with blood pressure: Finding for 10020 men and women in the INTERSALT study. *Circulation* **94**, 1629-1634.
- 田中繁道・飯村 政 (1992) 日本臨床 (増刊) 高血圧 (下巻). 日本臨牀社, pp. 623-629.