

## エビエキスの血圧上昇抑制ペプチド

作成者：徳島県立工業技術センター 主任研究員 新居 佳孝

### 1. エビエキスについて

#### 1. 1 概要

イズミエビ (*Plesionika izumiae* Omori, 1971) は、タラバエビ科ジンケンエビ属に属する食用のエビであり、徳島県南部沿岸一帯で大量に水揚げされるにもかかわらず、一部を干しエビとする以外はほとんどが飼料用原料とされている。イズミエビの有効利用を目的として市販食品工業用プロテアーゼを利用して調味料の調製を試みたところ、酵素分解液中にアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を認めた。そこで、イズミエビ酵素分解液 (以下、エビエキス) から ACE 阻害ペプチドの分離・精製を検討した。



#### 1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

エビの殻には主成分であるキチンとその脱アセチル化物であるキトサンが含まれており、抗菌性および免疫賦活などが報告されている。この他、殻にはアスタキサンチンおよびβ-カロチンなどの様々なカロテノイドが存在しており、抗酸化作用などの生理活性が知られている。しかし、エビエキスを含むエビ肉部における機能性の報告は見当たらず、エビに含まれる ACE 阻害物質に関する研究も少ない。

##### 1. 2. 1 血圧上昇抑制ペプチドを含む食品

特定保健用食品の分類の中に「血圧が高めの方の食品」があり、このなかで血圧上昇抑制ペプチドが関与する成分としてカゼインドデカペプチド、サーデン (いわし) ペプチド、かつお節オリゴペプチド、わかめペプチド、ゴマペプチドおよびラクトリペプ

チド（酸乳）などが認可されている。

## 2. 血圧上昇抑制ペプチドについての説明

ヒトの本態性高血圧の発症には、レニン－アンギオテンシン系や交感神経系、さらに体液性因子としてエンドセリン、血管内皮弛緩因子、心房性ナトリウム利尿ペプチドあるいは内因性ジギタリス様物質など多くの要因が複雑に関与している。近年、血圧調節系のひとつであるレニン－アンギオテンシン系に着目して、日常摂取している食品の中から、アンギオテンシン変換酵素（ACE）を阻害する物質を見出し、食品による高血圧予防に役立てようとする研究が数多く報告されている。

## 3. ペプチド分離の方法について

エビエキスから血圧上昇抑制ペプチド（ACE 阻害ペプチド）を高速液体クロマトグラフにより分離する方法を述べる。

### 3. 1 準備する器具など

1. 50ml 容のメスフラスコ（試料希釈用）
2. 試料濾過用フィルター（親水性テフロン膜を使用したもの、ポアサイズ 0.45  $\mu$ m、13mm 径）
3. 2 液グラジェントの出来る高速液体クロマトグラフシステム（紫外検出器がありピークの分取ができること）
4. C18 逆相カラム  
第 1 ステップ：TSK-GEL ODS-80TM、4.6x250mm、東ソー製  
第 2 ステップ：J' sphere ODS-H80、4.6x250mm、ワイエムシィ製
5. 遠心エバポレーター

[試薬]

1. アセトニトリル（試薬特級及び HPLC 用）
2. トリフルオロ酢酸（試薬特級）

### 3. 2 ペプチド分離用試料の前処理・調製方法

1. エビエキスのタンパク量をあらかじめ Lowry 法もしくは BCA 法等により分析しておき、HPLC による分析時に水により一定濃度に希釈しておくことが望ましい。
2. エビエキスは、移動相 A に希釈した後、限外ろ過（モルカット LCC；日本ミリポア社製）する。分画分子量は 5,000 とし、これより大きい分子量のタンパク質を除去する。

### 3. 3 HPLC によるペプチド分離方法

#### (1) 移動相の調製

移動相 A 及び移動相 B をアセトニトリル（HPLC 用）、超純水、トリフルオロ酢酸を用いて以下のように調製する。

(第1ステップ)

A液：水-0.05%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸(99.85+0.05+0.1、v/v/v)

B液：水-80%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸(19.9+80.0+0.1、v/v/v)

(第2ステップ)

A液：水-12%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸(87.9+12.0+0.1、v/v/v)

B液：水-24%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸(75.9+24.0+0.1、v/v/v)

## (2) 分析条件

①検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。

検出波長：210nm

恒温槽：40℃

流量：移動相 A、移動相 B の合計で毎分 1.0ml

②移動相溶媒の混合比(グラジエント)は以下のように調整する。

(第1ステップ)

40分の時点でB液の割合が100%になるように、B液の割合を直線に増加する。

(第2ステップ)

30分の時点でB液の割合が100%になるように、B液の割合を直線に増加する。

## (3) 試料の分取

①(第1ステップ)可能な限り分離されたピークごとに試料を分取する。分取したピークは1.5ml容のマイクロチューブに取り、遠心エバポレーターにより溶媒を除去する。

超純水に再溶解した後、ACE阻害活性を測定する。

②(第2ステップ)ACE阻害活性を測定し、おおむね阻害率が80%以上であったピークについて、再度HPLCによる分離を行う。分離されたピークごとに第1ステップと同様に分取し、得られたピークのACE阻害活性を測定する。

## 4. 分析例

### 4.1 HPLC装置による血圧上昇抑制ペプチドの分離例

以下にエビエキスから血圧上昇抑制ペプチドを分離した際のクロマトグラフを図4.1-1-3に示す。

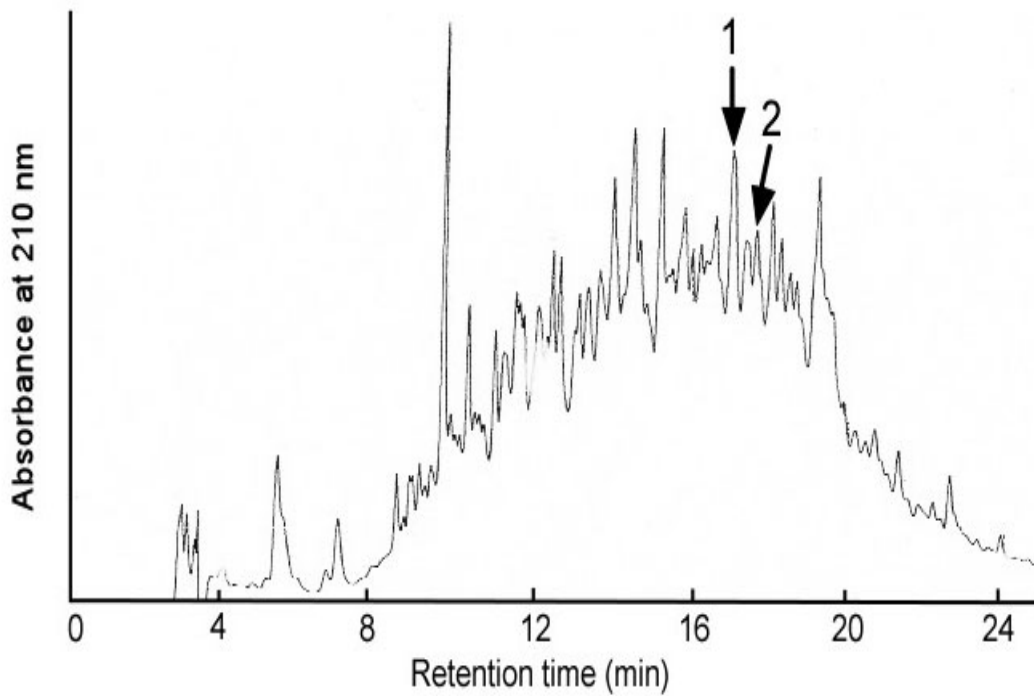


図4. 1- 1 エビエキスにおけるペプチド分離のクロマトグラム（第1ステップ）

ピーク1および2（矢印）を分取し、再クロマトした。

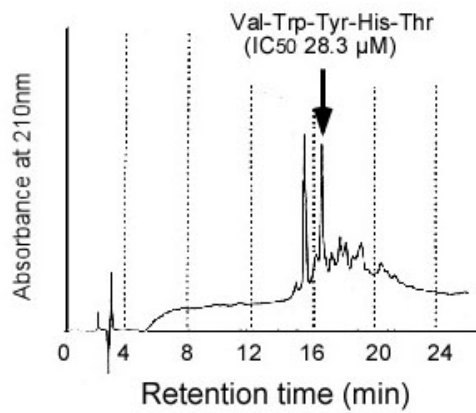


図4. 1- 2 ピーク1の再クロマトグラム（第2ステップ）

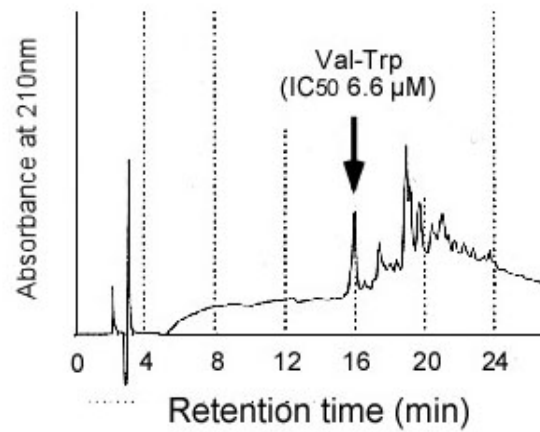


図4. 1- 3 ピーク2の再クロマトグラム（第2ステップ）

## 5. 食品の分析結果例

エビエキスをピークごとに分取した結果、ピーク 1 と 2 にそれぞれ 80%以上の強い ACE 阻害活性が認められた (図 1)。次に、これら 2 つの活性画分をそれぞれ分取して遠心エバポレーターを用いて濃縮した後、再クロマトを行った (第 2 ステップ)。単離したペプチドのアミノ酸配列の分析は、プロテインシーケンサー (LF-3000, Beckman 社製) を用いて行った。その結果、図 2、3 に示したとおり、ピーク 1 が、Val-Trp-Tyr-His-Thr ( $IC_{50}$  値  $28.3 \mu M$ )、ピーク 2 が、Val-Trp ( $IC_{50}$  値  $6.6 \mu M$ ) として同定された。

## 6. 分析上の留意、注意点

移動相はトリフルオロ酢酸を加えて強酸性にすること。

## 7. その他

得られたペプチドは、そのアミノ酸配列を基に合成ペプチドを作成し、実験動物等を用いて血圧上昇抑制効果を確認する必要がある。

エビエキスについては、合成ペプチドを脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP) に経口投与し、投与 1 時間後の有意な血圧上昇抑制効果を確認している。

## 8. 定量法に関する引用・参考文献

1. Nii, Y., Fukuta, K., Yoshimoto, R., Sakai, K. and Ogawa, T.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 861-864(2008)

—以上—

[トップページに戻る](#)