

# 琉球大学学術リポジトリ

## [総説]食品系生物資源からの生理活性ペプチドの開発と商品化

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): アンジオテンシン変換酵素, 血圧降下, 血栓抑制, プロリルエンドペプチダーゼ, 特定保健用食品 キーワード (En): HIV-1 作成者: 丸山, 進, MARUYAMA, Susumu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016602">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016602</a>

# 食品系生物資源からの生理活性ペプチドの開発と商品化

丸山 進

\*独立行政法人 産業技術総合研究所

## Development and commercialization of biologically active peptides from foodstuffs

Susumu MARUYAMA

*Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan*

Keywords : アンジオテンシンI 変換酵素, 血圧降下, 血栓抑制, プロリルエンドペプチダーゼ, HIV-1, 特定保健用食品

### 1. はじめに

食品蛋白質のプロテアーゼ加水分解物から見出されたアンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチドを含有する食品が「血圧が高めの方に」の表示が許可された特定保健用食品として幾つも商品化されている。

食品蛋白質のプロテアーゼ加水分解により派生する生理活性ペプチドの研究の歴史は古く、1970年代には牛乳カゼイン分子に存在するカルシウム吸収促進ペプチド（カゼインホスホペプチド、CPP）が研究されていた。1979年になり牛乳カゼインのプロテアーゼ加水分解により派生するオピオイドペプチドがBrantlらにより発見され、次いで、1982年に同じく牛乳カゼインのトリプシン分解により派生するアンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチドが筆者により発見された<sup>1)</sup>。そして1980年代の半ば頃から、他のさまざまな食品蛋白質もプロテアーゼで限定分解すると、やはりいろいろな生理活性ペプチドを派生することが明らかになってきた。これまでに発見されたペプチドは主としてレセプターリガンド（オピオイドペプチド、平滑筋作動性ペプチドなど）、

酵素阻害ペプチド（アンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチド）、吸収調節ペプチド（カルシウム吸収促進ペプチド、コレステロール吸収抑制ペプチドなど）、抗菌ペプチド（ラクトフェリンなど）、抗酸化ペプチドなどに分類できる。同時に、食品由来ペプチドの腸管吸収メカニズムの研究も盛んに行われ、低分子量ペプチドの経口投与での有効性も確認されるようになった<sup>2-4)</sup>。そして、筆者の見出したカゼイン由来のアンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチドを添加した飲料はCPPと同時期の1995年に特定保健用食品として厚生省の許可を得ている。

本稿では、筆者らがこれまでに行ってきた食品由来のアンジオテンシンI 変換酵素阻害ペプチド、血栓抑制ペプチド、その他のプロテアーゼ阻害ペプチド、さらに木材のほか、キノコや小麦のフスマなどに大量に含まれているリグニンの酵素阻害活性、生理活性などについても述べる。

### 2. アンジオテンシンI 変換酵素（ACE）阻害ペプチド

ACEはアンジオテンシンI のC末端からHis-Leuを遊離させ、強い血圧上昇活性を持つアンジオテン

\*茨城県つくば市東1-1-1 中央第6

シンIIに変換するなどの働きをしている酵素（ジペプチジルカルボキシペプチダーゼの一種）で（図1）、血管内皮細胞膜などに存在する。ACEの阻害物質は高血圧を抑制する効果があり、1977年にOndettiらが発表したACE阻害剤カプトプリルは高血圧治療薬としてよく知られている。筆者は牛乳カゼインのトリプシン加水分解液がACEを強く阻害することに気づき、ACE阻害ペプチドFFVAPFPEVFGK（カゼインドデカペプチド）やTTMPLWなどを見出した（以下本文中では食品由来ペプチドのアミノ酸を一文字で標記）。当時、ACEの活性中心にはC末端2残基のアミノ酸配列がAla-Proであるペプチドがよく収まるといわれていたが、基質特異性はそれ程厳密ではない。このため、阻害ペプチドが発見されやすく、その後筆者らはトウモロコシ蛋白質や

サメの肉などのプロテアーゼ加水分解物から、あるいはイチジクの樹液やサメ内臓の抽出液からアミノ酸数2～6残基のACE阻害ペプチドを多数見出した（表1）。そして、その幾つかをWistar系ラットや高血圧自然発症ラットなどに静脈注射したところ実際に血圧の上昇を抑制することが確認できた（図2-a）<sup>5)</sup>。特にカゼインドデカペプチドはカネボウ（株）のグループの研究で高血圧自然発症ラットへの経口投与（図2-b）、さらにヒトへの経口投与でも有効であることが確認され<sup>6,7)</sup>、それを添加した飲料「カゼインDP」は「特定保健用食品」の表示が厚生省により許可され、1997年に商品化されている（図3）。これは血圧調節効果を示唆する表示が許可された特定保健用食品として初の商品である。

前述のようにACEは基質特異性が広いため阻害

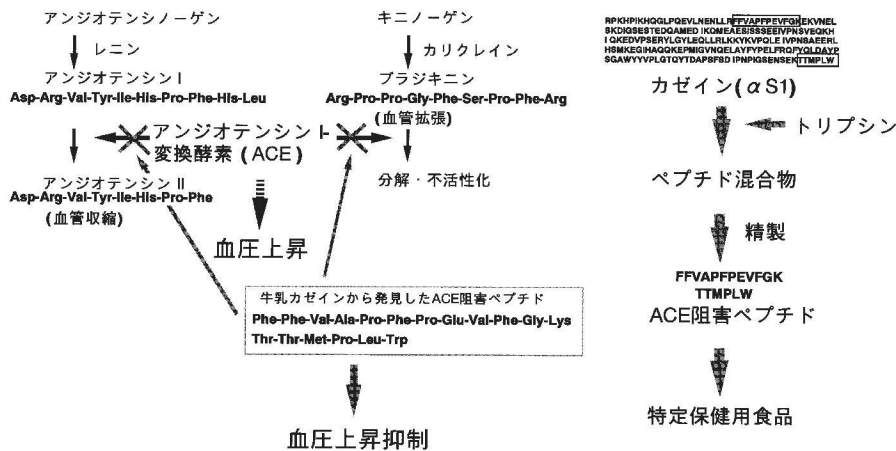


図1. アンジオテンシンI変換酵素とそれを阻害するカゼイン由来ペプチド

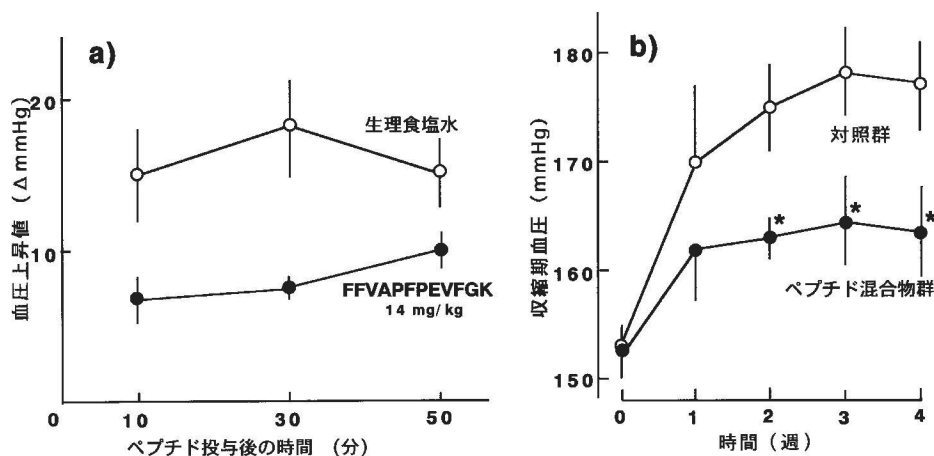


図2. アンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドによるラットの血圧上昇抑制作用

- a) ラットに静脈注射したアンジオテンシンIによる強制的血圧上昇を静脈注射したカゼイン由来ACE阻害ペプチドが抑制する。動脈内の血圧変化を直接測定した<sup>5)</sup>。
- b) ACE阻害ペプチドを含むカゼイン加水分解物を3%含有する飼料を高血圧自然発症ラットに自由摂食させた（カネボウのデータによる）<sup>6)</sup>。

表1. 食品等から見出したアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチド

ペプチド	IC <sub>50</sub> (μM)
牛乳カゼインの加水分解物	
Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys	77
Val-Ala-Pro	2.0
Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	15
Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	16
トウモロコシ蛋白質ツェインの加水分解物	
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	200
Leu-Pro-Pro	9.6
Leu-Arg-Pro	0.27
イチジク樹液熱水抽出物	
Ala-Val-Asn-Pro-Ile-Arg	13
Leu-Tyr-Pro-Val-Lys	4.5
Leu-Val-Arg	14
サメ筋肉の加水分解物	
Met-Trp	3.8
Leu-Trp-Ala	13
Val-Ser-Trp	23
Phe-Arg-Val-Pro-Thr-Pro-Asn	9.6
Val-Trp	1.7
サメ内臓熱水抽出物	
Ile-Lys-Trp	0.54
魚醤油	
Lys-Pro	22
Arg-Pro	21

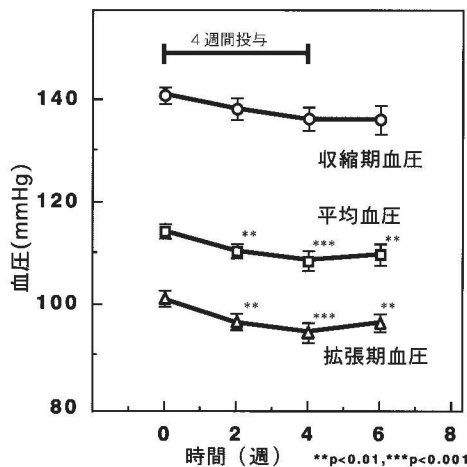
筆者と共同研究者が見出した主なペプチド。  
Val-Trpは別グループにより報告されたものと同じ。  
IC<sub>50</sub>, ACEの活性を50%阻害する濃度

ペプチドが発見されやすいことと阻害ペプチドの実用性が高いことなどから、筆者以外のグループからも、さまざまな食品に由来するACE阻害ペプチドの報告が相次いでおり、今では報告あるいは特許出願されたACE阻害ペプチドの全てを把握するのは困難な状況である。現在、他社が開発した酪酪乳由来のACE阻害ペプチド (VPP、IPP)、鯉節由来のACE阻害ペプチド (LKPNM)、イワシ由来のACE阻害ペプチド (VY) を添加した食品など数種が「特定保健用食品」として許可、商品化されており、一部は一般消費者にもよく知られたヒット商品となっている。なお、カゼインドデカペプチドについては、2002年2月から新商品「ペプティオドリンク」として全国販売が行われている。

関連して、筆者らはトウモロコシ由来ACE阻害ペプチドLPPと同一のペプチドを逆反応により合成可能なプロリン特異的ジペプチジルカルボキシペプチダーゼを微生物から見出している (図4)<sup>8)</sup>。

### 3. 血栓形成抑制ペプチド

フィブリンのN末端トリペプチドに相当するGPRはフィブリンポリマーの形成を阻害することが知られている。コラーゲンα1鎖にはGPRの配列が8箇所ほど存在することから、筆者らはコラーゲンの高度利用を目的に、ブタ皮膚コラーゲンを微生物コラーゲナーゼで加水分解し、GPRを単離した<sup>9)</sup>。そして、GPRやコラーゲン加水分解物はフィブリンポリマーの形成を阻害するのみでなく、in vitroの系でヒト血小板凝集を阻害することも明らかにした。



1995年 カゼインドデカペプチド 特定保健用食品許可



1997年5月「カゼインDP」発売



2002年2月 「カゼインDPペプティオドリンク」発売

図3. カゼインドデカペプチド配合飲料によるヒトの血圧降下と実用化された特定保健用食品 軽症高血圧症ボランティアに1日1本の「カゼインDP」を4週間連続投与した (カネボウのデータによる)。

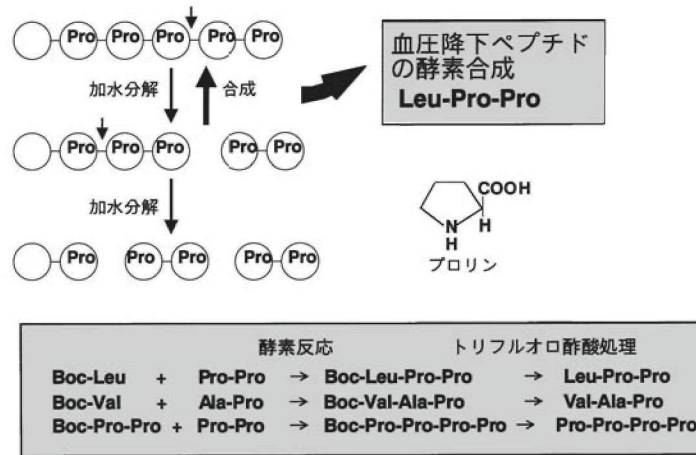


図4. 新規プロリン特異的ペプチダーゼによる血圧降下ペプチドの合成

本酵素は*Streptomyces* sp.由来の70 kDa のジペプチジルカルボキシペプチダーゼで、オリゴプロリンのC末端からプロリンを2残基ずつ遊離させる。反応条件の設定によっては、逆にプロリンを結合させる反応が進行する。

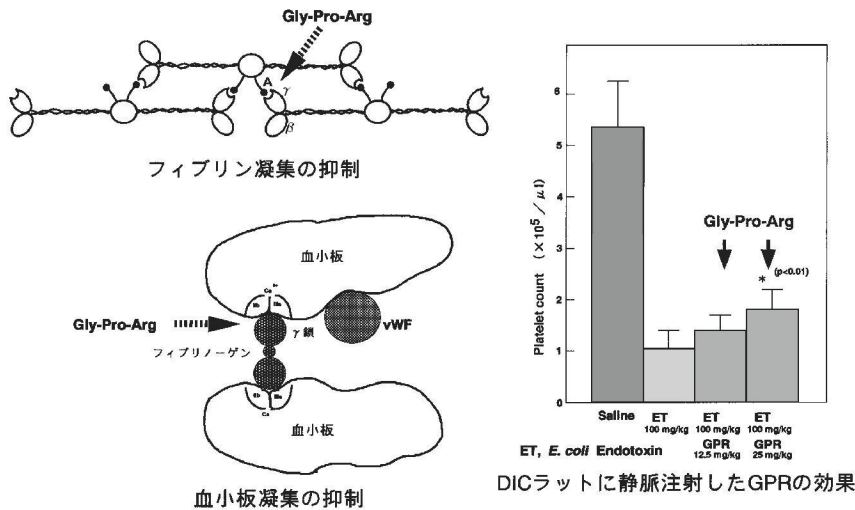


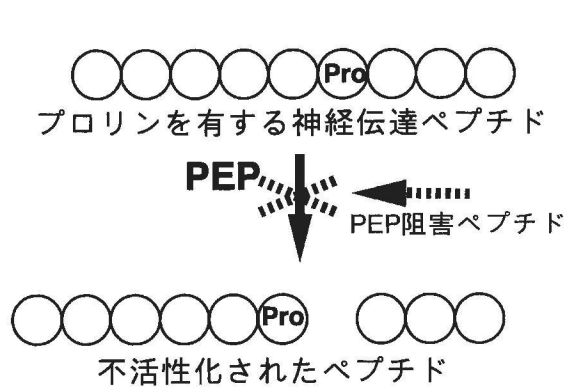
図5. コラーゲン加水分解物由来のGly-Pro-Argの血栓形成抑制作用

血小板の糖蛋白質GPIIb/GPIIIaにフィブリノーゲンが結合するのをGPRPが抑制するとの報告があり、GPRも同じ機序で血小板凝集を阻害したためと推定される。さらに、大腸菌エンドトキシンを投与することによって実験的に播種性血管内凝固 (DIC) を誘発したラットに静脈注射あるいは経口投与したGPRやコラーゲン加水分解物は血液中の血小板数の減少を抑制することも確認した (図5)<sup>10)</sup>。コラーゲンは血小板凝集の惹起物質の一つであるが、酵素消化で遊離したペプチドにはこのように別の機能があることが分かった。

#### 4. プロリルエンドペプチダーゼ (PEP) 阻害ペプチド

PEPはプロリンのカルボキシル基側のペプチド

結合を切断する酵素で、サブスタンスPなどの代謝に関係すると考えられている。PEPは脳の海馬領域に高い活性が認められ、記憶過程とPEPとの関係については不明なところが多いが、Benzylloxycarbonyl-Pro-prolinalなどのPEP阻害剤がラットの受動的回避学習実験においてスコポラミン誘発性の記憶障害を回復することが報告されている。また、PEPの内在性阻害物質としてブタ膵臓、ラット脳などから約7 kDaのポリペプチドが報告されたが、構造は不明であった。筆者らは食品工場廃棄物などから有用生理活性物質を抽出する研究を行う過程で、ウシ脳 (食品という位置付けではないが) の熱水抽出液にPEP阻害活性のあることに気づき、PEP阻害ペプチドMPPPLPARVDFSLAGALNを精製した。ホモロジー検索の結果、本ペプチドはアストロ



PEP阻害活性

Peptide	$K_i$ ( $\mu$ M)
MPPPLPARVDFSLAGALN (Bovine)	8.6
MPPPLPTRVDFSLAGALN (Human)	4.6
MTPPLPARVDFSLAGALN (Mouse)	8.3
MPPPLPA	73
MPPPLP	8.8
MPPPL	NI
PLPAR	NI
PPPLP	670
MPPLP	NI
MPLP	NI
MLP	NI

Enzyme, PEP purified from bovine brain;  
Substrate, Z-Gly-Pro-pNA; NI, no inhibition.

図6. プロリルエンドペプチダーゼ阻害ペプチド

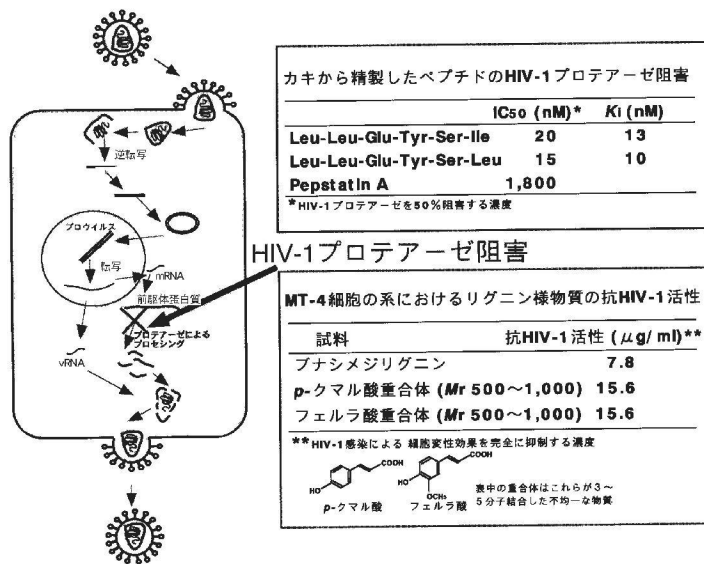


図7. HIV-1のライフサイクルとHIV-1プロテアーゼ阻害物質

グリアに特異的に存在するグリア細胞繊維性酸性タンパク質のN末端38-55のアミノ酸配列に一致し、 $K_i$ 値はラット脳由来のポリペプチドに近い値の8.6  $\mu$ Mであった。本ペプチドのPEP阻害活性にはMP PPLP部分が重要で (図6)、この5残基のペプチドはもとのペプチドと同じ活性を有しているが、経口投与でPEPの存在する脳内に達する可能性は低く、用途については困難がある<sup>11, 12)</sup>。

### 5. エイズウイルスプロテアーゼ阻害物質

HIV-1 (ヒト免疫不全ウイルス1型) プロテアーゼはHIV-1の前駆体蛋白質を切断し、ウイルス自体の酵素と構造蛋白質を生成する。本酵素の阻害物質はHIV-1の増殖を抑制するため、基質の遷移状態を模倣した阻害物質がこれまでに種々開発されている。

筆者らはカキ (牡蛎、*Crassostrea gigas*) の蛋白質のサーモリシン加水分解液からHIV-1プロテアーゼの活性を強く阻害する2種のペプチドLLEYSIおよびLLEYSLを見出した (図7)。カキから見出したペプチドは各々13nM、10nMの $K_i$ 値でHIV-1プロテアーゼを選択的且つ拮抗的に強く阻害し、HIV-1プロテアーゼによって加水分解されることはなく安定に存在した。本ペプチドはアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンAより100倍も強いHIV-1プロテアーゼ阻害活性を有しており、アミノ酸を置き換えた様々なペプチドを化学合成したが、これより活性の強いものは得られなかった<sup>13)</sup>。

更に、筆者らはブナシメジなどのキノコから熱水抽出した水溶性リグニン様物質がHIV-1プロテアーゼを強く阻害することに気付いた。筆者らの研究以

前に、水溶性リグニン様物質やフェルラ酸等を脱水素重合させた高分子量の合成リグニンが抗HIV-1活性を有することが報告されている。これは、HIV-1の細胞への結合をリグニン様物質が阻害するためとされている<sup>14)</sup>。筆者らの実験では、リグニンの構成単位分子であるフェニルプロパノイドや他のポリフェノール類にはHIV-1プロテアーゼ阻害活性はなかったが、*p*-クマル酸あるいはフェルラ酸を脱水素重合させた低分子量 ( $M_r$  500~1,000) のリグニン様物質などもHIV-1プロテアーゼを強く阻害した。そして、ブナシメジ由来のリグニン様物質や低分子量の合成リグニン様物質はMT-4細胞の系において抗HIV-1活性を有することが確認できた (図7)<sup>15)</sup>。本実験ではHIV-1が細胞へ結合するのを阻害する効果を区別できないため、上記の抗HIV-1活性が実際にHIV-1プロテアーゼ阻害によるものかは不明であるが、筆者らの研究で初めて $M_r$  1,000以下の低分子量のリグニン様物質に抗HIV-1活性が確認された。

## 6. おわりに

特許出願時期の関係でここでは省略させて頂くが、筆者らは他にも培養血管内皮細胞、膵臓 $\beta$ 細胞などを用いて、食品系生物資源由来の様々な生理活性物質を探索している。今後は、特に沖縄産の植物を材料に、高血圧抑制、血糖値上昇抑制、骨形成促進などの機能を有する物質を広く探索し、沖縄産の新しい特定保健用食品を実現したいと願っている。

## 要約

牛乳カゼインのトリプシン加水分解物からアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドを見出し、他の食品からも多数の阻害ペプチドを見出した。カゼイン由来ペプチドはヒトへの経口投与試験を経て、「血圧が高めの方に」の表示が許可された初の特定保健用食品として実用化されている。

ブタ皮膚コラーゲンの酵素加水分解物から得たペプチドGPRは播種性血管内凝固を誘発したラットに経口投与すると血液中の血小板数の減少を抑制することを明らかにした。他に、HIV-1プロテアーゼを強く阻害するペプチドや脳プロリルエンドペプチダーゼを阻害するペプチドなども見出した。

## Abstract

We previously found an angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibiting peptide in the tryptic hydrolysate of casein by chance. Antihypertensive effect of the casein-derived ACE-inhibiting peptide in mildly hypertensive volunteers was confirmed, and then a beverage containing the peptide has been officially recognized as a food for specified health use. Next, we isolated a tripeptide GPR from bacterial collagenase hydrolysate of collagen. Oral administration of the peptide suppressed the decrease in platelet count for endotoxin-induced DIC in rats. We also isolated very potent HIV-1 protease-inhibiting peptides from an enzymatic hydrolysate of oyster proteins.

## 参考文献

- 1) Maruyama, S. *et al. Agric. Biol. Chem.*, 46, 1393~1394 (1982)
- 2) 吉川正明: バイオサイエンスとインダストリー, 52, 289~292 (1994)
- 3) Meisel, H. *Biopolymers*, 43, 119~128 (1997)
- 4) 丸山進: バイオサイエンスとインダストリー, 59, 30~33 (2001)
- 5) Maruyama, S., *et al. Agric. Biol. Chem.*, 51, 1581~1586 (1987)
- 6) Karaki, H. *et al. Comp. Biochem. Physiol.*, 96C, 367~371 (1990)
- 7) 関谷宗一郎ほか: 日本栄養・食糧学会誌, 45, 513~517 (1992)
- 8) Maruyama, S., *et al., Biochim. Biophys. Acta*, 1162, 72-76 (1993).
- 9) Maruyama, S. *et al.: Biochim. Biophys. Acta*, 1164, 215~218 (1993)
- 10) Nonaka, I. *et al.: Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 772~775 (1997)
- 11) Ohmori, T. *et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202, 809~815 (1994)
- 12) 丸山進: 蛋白質核酸酵素, 42, 857~864 (1997)
- 13) Lee, T. G. *et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253, 604~608 (1998)
- 14) 坂上宏ほか: 日本臨床, 51, 127~131 (1993)
- 15) Ichimura, T. *et al.: Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 2202~2204 (1999).