

原 著

## 青森県特産食材に含有されるアンジオテンシン変換酵素阻害物質の探索

板垣 史郎<sup>1)</sup> 内山 道子<sup>2)</sup> 金澤 佐知子<sup>1)</sup> 細井 一広<sup>1)</sup>  
照井 一史<sup>1)</sup> 下山 律子<sup>1)</sup> 土田 成紀<sup>3)</sup> 上野 伸哉<sup>4)</sup>  
早 狩 誠<sup>1,5)</sup>

**抄録** 本研究では、食事が多様な食品機能成分の摂取経路という一面を有し、疾病予防法を構築する上で有用な切り口であることを鑑み、アンジオテンシン I から強力な血圧上昇を有するアンジオテンシン II への変換を司るアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を標的として、青森県特産の農産物及び水産物に含まれる ACE 阻害物質の探索を行った。青森県特産食材より蒸留水で抽出した抽出液について、ACE 阻害活性の評価を行った。ACE 阻害活性を示した抽出液から各種カラム分画法にて ACE 阻害活性物質を単離・精製し、質量分析法により、ACE 阻害成分を同定した。その結果、カボチャ、ニンニク、大豆、大鰐モヤシの抽出液に特に強い ACE 阻害活性を見出した。その中から、カボチャを対象として ACE 阻害活性成分の特定を試み、分子量 303 のムギネ酸前駆物質、ニコチアナミンがその機能実体である可能性を強く示唆する結果を得た。

弘前医学 64 : 50—57, 2013

**キーワード**：アンジオテンシン変換酵素；高血圧症；カボチャ；特定保健用食品；ニコチアナミン。

### ORIGINAL ARTICLE

## IDENTIFICATION OF THE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORS IN THE LOCAL PRODUCT OF AOMORI PREFECTURE

Shirou Itagaki<sup>1)</sup>, Michiko Uchiyama<sup>2)</sup>, Sachiko Kanazawa<sup>1)</sup>, Kazuhiro Hosoi<sup>1)</sup>,  
Kazufumi Terui<sup>1)</sup>, Ritsuko Shimoyama<sup>1)</sup>, Shigeki Tsuchida<sup>3)</sup>, Shinya Ueno<sup>4)</sup>  
and Makoto Hayakari<sup>1,5)</sup>

**Abstract** A dietary approach to ingest food factors from diet is important to prevent lifestyle-related diseases, such as obesity, hypertension and dyslipidemia. Among these diseases, hypertension has been well established as a leading risk factor for both cardiovascular disease and mortality in general. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) plays a key role in the regulation of blood pressure by conversion of the inactive decapeptide angiotensin I to vasoactive octapeptide angiotensin II, as well as by inactivation of the vasodilator bradykinin. The aim of this study is to identify the ACE Inhibitors in the local products of Aomori prefecture. We identified an ACE inhibitor (nicotianamine) from pumpkin.

Hirosaki Med. J. 64 : 50—57, 2013

**Key words**: angiotensin-converting enzyme; hypertension; pumpkin; food for specified health use; nicotianamine.

<sup>1)</sup> 弘前大学医学部附属病院 薬剤部

<sup>2)</sup> 一般財団法人愛成会弘前愛成会病院薬剤部

<sup>3)</sup> 弘前大学大学院医学研究科ゲノム生化学講座

<sup>4)</sup> 弘前大学大学院医学研究科脳神経生理学講座

<sup>5)</sup> 弘前大学大学院医学研究科薬剤学講座

別刷請求先：早狩 誠

平成24年12月5日受付

平成24年12月20日受理

<sup>1)</sup> Department of Pharmacy, Hirosaki University School of Medicine & Hospital

<sup>2)</sup> Department of Pharmacy, Hirosaki Aiseikai Hospital

<sup>3)</sup> Department of Biochemistry and Genome Biology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

<sup>4)</sup> Department of Neurophysiology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

<sup>5)</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Correspondence: M. Hayakari

Received for publication, December 5, 2012

Accepted for publication, December 20, 2012

## 緒 言

超高齢化の進展する我が国では、2012年の時点で、年齢が65歳以上の人口は3083万人と、全人口の24.2%を占めている<sup>1)</sup>。このような急速な高齢化が進んでいる我が国では、高血圧症、糖尿病、認知症などの生活習慣病の克服が大きな課題となってきた。また、青森県においても年々生活習慣病が増加傾向を示し、この傾向は若年層にまで広がってきている<sup>2)</sup>。

疾病の治療には一般に薬物が用いられるが、薬物は「症状の速やかな治療・改善」を主たる目的とするものであり、疾病予防を目的として健常人に対して長期的に使用されることは稀である。一方、日常生活の一環である食事は多様な食品機能成分の摂取経路という一面を有し<sup>3)</sup>、疾病予防法を構築する上で有用な切り口である<sup>4-7)</sup>。これらの背景から、食生活の改善は生活習慣病の予防において重要な意味を有する。

高血圧症は、収縮期血圧が140 mmHg 以上もしくは拡張期血圧が90 mmHg 以上と定義される疾病であり、生活習慣病の中でも、高齢者医療費の3割強を占める、克服すべき大きな課題となっている。血圧調節において重要な役割を担っている生体因子として、アンジオテンシンⅠから強力な血圧上昇を有するアンジオテンシンⅡへの変換を司るアンジオテンシン変換酵素(ACE)が挙げられる<sup>8-10)</sup>。ACEは高血圧症の有効な治療標的であり、ACEを阻害する薬剤が、高血圧症治療薬として多数開発され、既に広く臨床応用されている<sup>11-13)</sup>。以上の背景を鑑みると、ACE阻害物質を含有する食品を多く摂る食生活は、生活習慣病の予防に効果を有効であることが期待される。

本研究では、青森県特産の農産物及び水産物に含まれる ACE 阻害物質の探索を行い、見出した食材の血圧降下作用について自然発症高血圧ラットを用いた動物実験により評価を行った。

## 方 法

### 1) 実験材料

青森県産農産物及び水産物は市販品を購入し使用した。Sprague-Dawley(SD)系雄性ラット(日

本クレア株式会社)は6週齢を用いた。自然発症高血圧ラット(spontaneously hypertensive rat/SHR, 雄10週齢)は日本チャールス・リバー株式会社より購入した。なお飼料はオリエンタル酵母株式会社 Certified Diet MF を用いた。

### 2) 食材抽出液の調製

食材(各5g)の細片に9倍量の蒸留水を加え、ポリトロンホモジナイザーで微細粒化後、4℃ 25,000 xg 30分間遠心して得た上清を用いて ACE 阻害活性を測定した。

### 3) ラット肺からの ACE の調製

SDラット肺(約50g)に5倍量の20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)を加えてホモジナイズし、20%ホモジネートを調製した。次に、ホモジネートを75,000 xg にて60分間遠心し、得られた沈査物を50 ml の1% Triton X-100を含む20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に再溶解後、4℃ にて3時間攪拌し、ACEを膜画分から抽出した。抽出液を75,000 xg にて60分間遠心し、上清(約50 ml)を得た。

上清を硫酸分画(30~60%)後遠心して得た沈殿物を、300 mM NaClを含む50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.3, 0.01% Triton X-100含有)で十分透析し脱塩を行った。次に医同緩衝液で平衡化したリシノプリル-Sephadex 6B アフィニティーカラム(2.5 x 15 cm)に付し、ACEを同カラムに吸着させた。同緩衝液にて十分に洗浄後、100 μM カプトプリル/5 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)溶液200 ml にてACEを溶出した。ACE活性のある画分をそれぞれ50 mM リン酸緩衝液(pH 8.3, 3L x 3回8.3, 0.01% Triton X-100および0.1% アジ化ナトリウム含有)で4℃ にて2日間透析し、カプトプリルおよびNaClを完全に除去したものを酵素標本として用いた<sup>14)</sup>。

### 4) ACE 活性測定法

ACE活性の測定には、我々が開発した方法を用いた<sup>15, 16)</sup>。すなわち、300 nM NaClを含む100 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液中で、人工基質5 mM hippuryl-histidyl-leucine と ACE(60~65 mU/ml溶液, 25 μl)とを30分間反応させた。2N

塩酸, 50  $\mu$ l で反応停止後, 反応生成物の馬尿酸を3%塩化シアヌール/ジオキサン溶液にて発色させ, 波長382 nmでの吸光度を酵素活性とした. なお, 1分間に産生される馬尿酸1  $\mu$ mol を酵素1単位(U)とした.

また, ACE 阻害活性は, 酵素反応液に, 各食材からの抽出液を添加し, 非添加時の ACE 阻害活性を100%としたときの比率(%)で表現した.

### 5) カボチャからの ACE 阻害物質の精製

カボチャを細断し, ひき肉作製機にてさらに細かくしたもの(500 g)に9倍量の蒸留水(4,500 ml)を加え, ポリトロンホモジナイザーで微細粒化後, 4℃25,000 xg にて30分間遠心して得た上清をアンモニウム溶液にてpH9.0に調整後, OH型に平衡化した陰イオン交換樹脂(AG 1-x8, 5 x 50 cm, Bio-Rad)カラムに付した. 蒸留水(5000 ml)にて洗浄後, 0.5 M HCl にて ACE 阻害物質を溶出した. 溶出液はエバポレーターにて濃縮した(分画 I, 約200 ml).

分画 I の 6 分の 1 (30 ml) を蒸留水で平衡化した Sephadex G-25 (7 x 17 cm) カラムに付し糖類の除去を行った. 溶出液について ACE 活性の測定を行い, ACE 阻害を示す分画を集め濃縮した. 分画 I の残り50 ml についても同様の操作を実施し, ACE 阻害を示す分画を集め濃縮した. 続いて, 濃縮液の 4 分の 1 を再び Sephadex G-25 (2.5 x 50 cm) カラムに付し, 溶出液について ACE 阻害活性を示す部分を集め濃縮した(分画 II, 約15 ml).

分画 II の 3 分の 1 (5 ml) を蒸留水で平衡化した Sephadex G-15 (2.5 x 50 cm) カラムにて分離した. 残りの分画 II についても同様の分離操作を行い, ACE 阻害活性部分を集め濃縮した(分画 III, 約5 ml).

分画 III を OH 型に平衡化した AG 1-x8 (2.5 x 30 cm) に再び付し, 0.2.0 M HCl リニアグラジエント法にて ACE 阻害物質を分離し, 阻害活性分画を集め濃縮後乾燥した(分画 IV, 約30 mg).

分画 IV を 0.1% トリフルオロ酢酸(TFA) 水溶液 2 ml に溶解後, 同溶液で平衡化した逆相系担体 C18(Wako Gel LP-60C18, 2x 10 cm, 和光純薬工業株式会社) カラムに付し, 未吸着画分を集め, 濃縮後凍結乾燥した(分画 V, 約 20 mg).

分画 V をアンモニア水溶液(pH 9.6) 2 ml に溶解後, 同溶液で平衡化した SAX カラム(陰イオン交換樹脂, 4.6 x 15 cm, 東ソー株式会社)を用いた HPLC 法にて分離精製した. なお, 試料の注入は50  $\mu$ l/回とした. HPLC の分離条件は, A 液にアンモニア水溶液(pH 9.6), B 液に200 mM ギ酸アンモニウム(pH 4.5)を用い, 2 分までを A 液100%, 2~60 分までを A 液85%, B 液15%とした. 流速は0.9 ml/分とした. 分離した ACE 阻害画分を分取後に集めて濃縮し, 凍結乾燥した(分画 VI, 約 4 mg).

分画 VI について, 質量分析を行った.

### 6) カボチャによるラットでの血圧降下作用

SHR ラット用飼料のカボチャ含有量はそれぞれ10%および40%とした. まずカボチャを蒸留水と共にペーストを作製し, ラット用粉餌(Certified Diet MF)と混合後, 適当なサイズに裁断し乾燥させて作製した. なお, 対象群には粉餌と同成分の固形飼料を用い, 30日間自由に摂食させた. その間非観血式血圧測定装置(MK1030型, 室町機械株式会社)を用い, ラット尾動脈圧での収縮期および拡張期血圧の変動を観察した(各群 n=5). 動物実験の内容については, 弘前大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した.

### 7) 数値処理

統計的評価を要する実験結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した. 多群間の比較には, 一元配置分散分析を行い, 有意差が認められた場合, Dunnett の多重比較検定を行った. 統計学的解析は, IBM SPSS21 Statistics Base (日本アイ・ビー・エム株式会社)を用いた.

## 結果・考察

### 1) ACE 阻害活性を発揮する青森県特産食材

各種の青森県特産食材の抽出液について ACE 阻害活性を測定した. その結果, カボチャ, ニンニク, 大豆, 大鰐モヤシの抽出液に90%以上の ACE 阻害活性を見出した(図1). これらの食材は, 食生活を基盤とした高血圧予防法の構築において, 有用な食材となる可能性が示唆された.



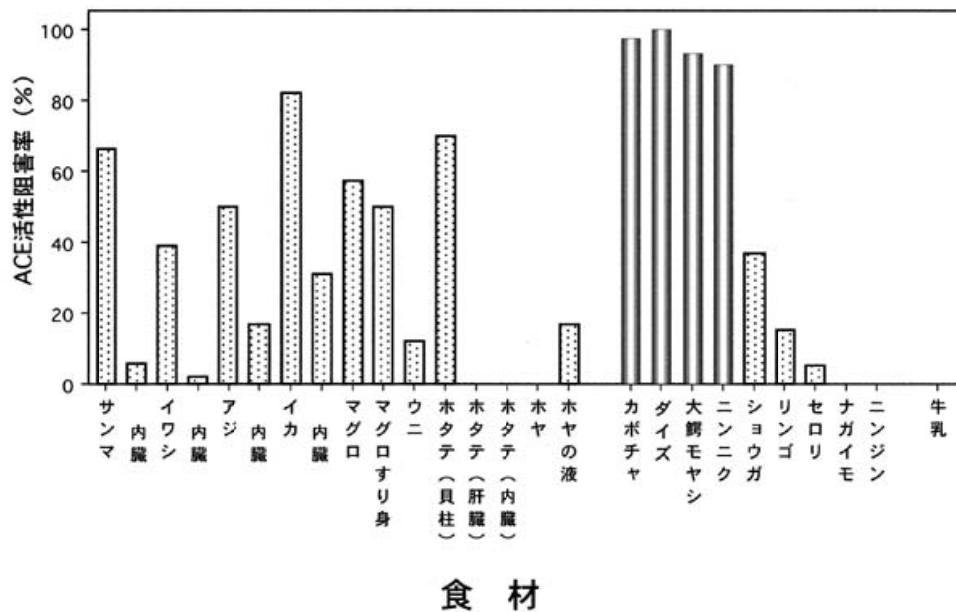


図1 青森県特産食材抽出液中 ACE 阻害活性.

## 2) カボチャの ACE 阻害活性を司る機能成分の特定

前項で、抽出液が特に強い ACE 阻害活性を示した食材の中から、カボチャを対象として ACE 阻害活性成分の特定を試みた。なお、ニンニクにキレート能を有するアリインおよびその類縁物質が、そして大豆には各種ペプチド性物質の存在が報告され、それらはいずれも ACE 阻害活性を有することが報告されていることから<sup>17, 18)</sup>、新規 ACE 阻害物質の存在が期待されるカボチャから ACE 阻害物質の分離を検討した。

カボチャ抽出液は添加量の増加に伴い、濃度依存的に ACE 阻害効果が増強し、カボチャ抽出液に ACE 阻害剤が存在していることが明らかとなった。また、カボチャ抽出液の ACE 活性阻害効果は抽出液の加熱処理による影響を受けなかった(図2)。

まず、カボチャ抽出液について、酸性、中性、およびアルカリ性の各条件下、各種有機溶剤(酢酸エチルエステル、エーテル、クロロホルム、ベンゼン)による ACE 阻害物質の抽出を試みたが、いずれの溶剤にも ACE 阻害物質は抽出されなかった(結果未掲載)。

次に各種イオン交換樹脂による抽出を試みた結

果、AG1-x8 樹脂(陰イオン交換樹脂)に吸着することが判明したため、以下 AG1-x8 樹脂カラムによる ACE 阻害物質の抽出を行った。カボチャ水抽出液同カラムに吸着させ、0.5N 塩酸にて溶出を行った。溶出液は200 ml までしか濃縮できなかったため(分画Ⅰ)、カボチャに含有される酸性および中性多糖類が抽出されてきた可能性を考え、分取用 Sephadex-G25 カラム(8 x 15 cm)クロマトグラフィー法によるそれらの除去を行い、阻害活性部分を濃縮後、再度分離用 Sephadex-G25 カラム(2.5 x 50 cm)による精製を行った。その結果、ACE 阻害活性を示す物質は分子量1355を示すシアノコバラミン(V. B12)より遅い画分に溶出された(図3)。

溶出された画分を集め濃縮後(分画Ⅱ)、Sephadex-G15 カラム(2.5 x 50cm)による分離後阻害分画を濃縮した(分画Ⅲ、図4)。

分画Ⅲを再度 AG1-x8 樹脂カラム(2.5 x 30 cm)に付し、0~2.0 M HCl のグラジエント法による溶出を行った結果、ACE 阻害活性を示す分画は、220 nm での吸光度の溶出パターンと一致した。これらの ACE 阻害画分を濃縮後凍結乾燥し、分画Ⅳを得た。

得た試料を逆相系樹脂(ODS-C18)に付し、分画中に含まれる共存物質の除去を行い、その未吸着

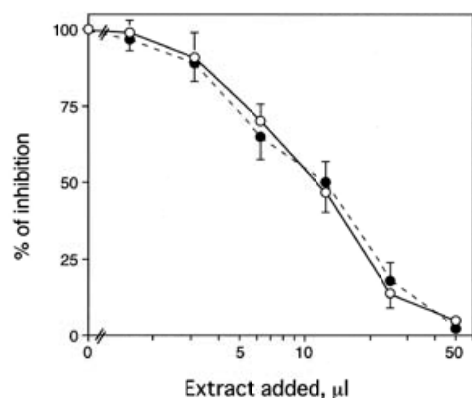


図2 カボチャ抽出液の ACE 阻害活性に対する加熱の影響. ○; 非加熱, ●; 加熱, N=3.

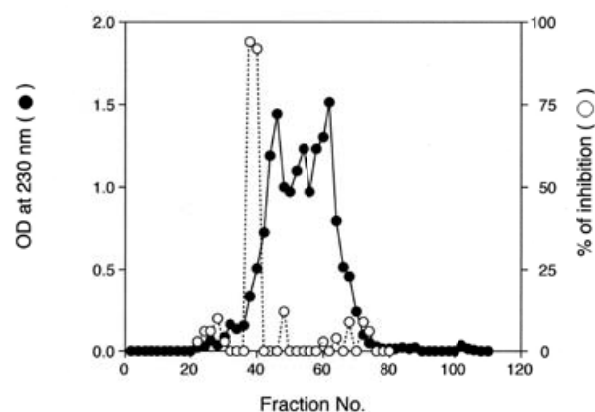


図4 Sephadex G-15によるカボチャ含有 ACE 阻害物質の単離.

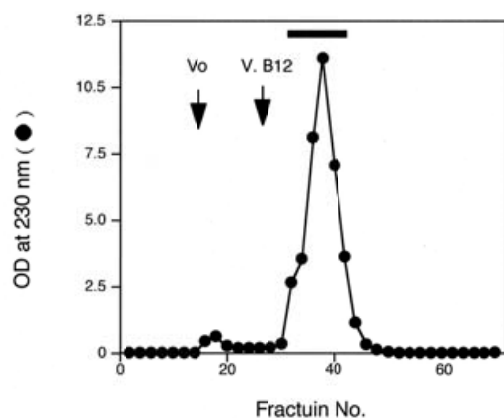


図3 Sephadex G-25によるカボチャ含有 ACE 阻害物質の分離.

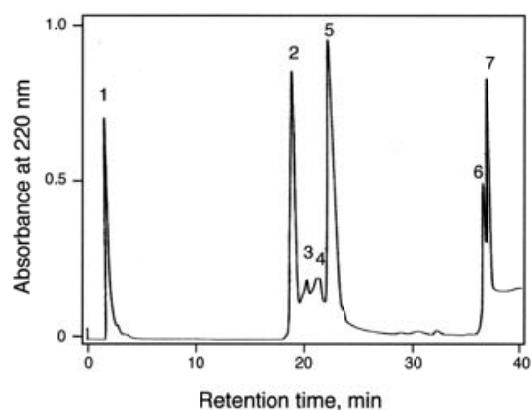


図5 SAX-HPLCによるカボチャ含有 ACE 阻害物質の精製.

画分を濃縮後凍結乾燥し、分画Vを得た。

分画Vを試料として陰イオン交換カラム (SAX カラム, 4.6 x 150 mm) を用いたHPLCにより、カボチャに含有される ACE 阻害物質の精製を行った。その結果、いくつかのピークが得られ、うち、ピーク 5, 7, 8 に ACE 阻害活性が認められた (図 5)。これら各ピークを集め、濃縮乾燥した ACE 阻害物質を質量分析用試料とした (分画 VI)。

HPLC にて精製した ACE 阻害物質について、質量分析を行った結果、ポジティブチャージ条件下で  $[M+H]^+304$ 、ネガティブチャージ条件下で  $[M-H]^-302$  に相当するピークが確認され、単離した ACE 阻害物質は分子量 303 と決定した。その後弘前大学農学生命科学部橋元勝教授らの研究

で、この物質はムギネ酸前駆物質、ニコチアナミンであることが判明した (図 6)。

### 3) カボチャの血圧降下作用に関する評価

ACE 阻害成分を豊富に含有することが明らかとなったカボチャについて、その血圧降下作用を生体レベルで評価することを目的として、SHR を用いた検討を行った。SHR の血圧は生後 4 週目ごろから徐々に上昇し、徐々に高血圧の症状を呈す。対象群用飼料ならびに 10% および 40% カボチャ含有飼料で 4 週間飼育し、収縮期血圧ならびに拡張期血圧に与える影響を評価した。飼育後 3 日目からカボチャ飼料 10% 群、カボチャ飼料 40% 群において、対象群に比較して収縮期血圧、拡張期血圧のいずれも、血圧の低下が確認された

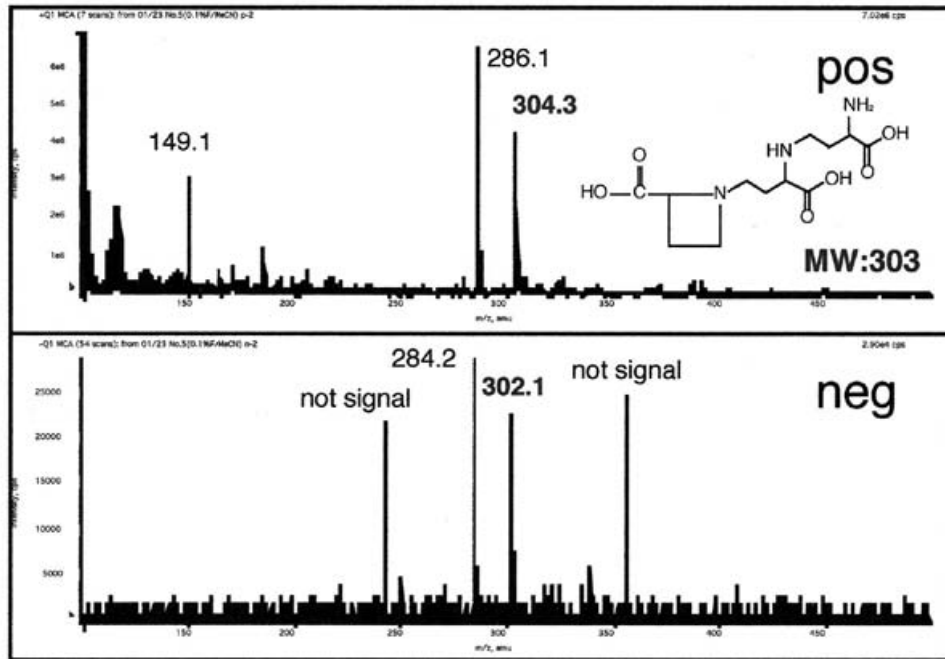


図6 単離精製したカボチャ含有 ACE 阻害物質の MS スペクトル.

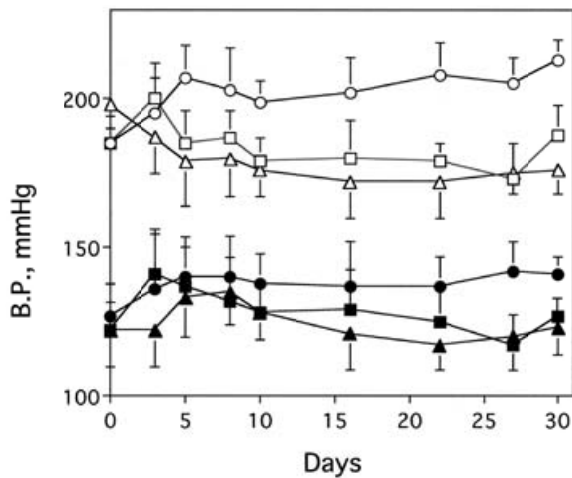


図7 カボチャ摂取が SHR の血圧に与える影響.

○; 対象群の収縮期血圧, ●; 対象群の拡張期血圧,  
□; 10%カボチャ飼料群の収縮期血圧, ■; 10%カ  
ボチャ飼料群の拡張期血圧, △; 40%カボチャ飼料  
群の収縮期血圧, ▲; 40%カボチャ飼料群の拡張期  
血圧, N=5.

(図7). この血圧降下作用は, 投与期間終了まで  
持続した.

この結果から, ニコチアナミンをはじめとする  
カボチャに含有される ACE 阻害成分が生体にお  
いて血圧降下作用を発揮することが示されたた  
め, 血圧降下に必要な1日のカボチャ摂取量の

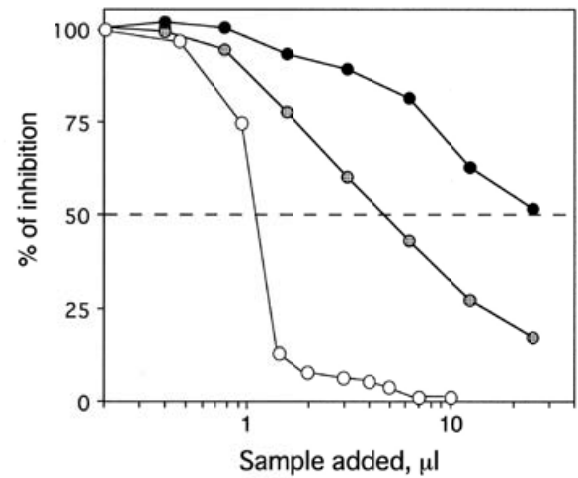


図8 特定保健用食品およびカボチャ抽出液の ACE 阻害  
活性.

○; カボチャ抽出液, ●; 市販飲料A, ◐; 市販飲料B,  
N=3.

算出を試みた. 厚生労働省より「血圧が高めの方」  
向けに特定保健用食品に指定されている2種の  
飲料の ACE 阻害活性とカボチャ抽出液の ACE  
阻害活性を比較した. 阻害率50%(IC<sub>50</sub>)を示した  
カボチャ抽出液添加量は12 μlであった. 同一の  
実験系で阻害率50%を示した飲料Aの添加量は25  
μl, 飲料Bの添加量は5 μlであった(図8). 飲料

Aの1日摂取量は200 ml, 飲料Bの1日摂取量は100 mlであり, 各飲料1日摂取量に相当するカボチャの量はそれぞれ40 gおよび80 gと算出された。これらの量は, 1日の食事で無理なく摂取できる量と考えられた。また, カボチャのACE阻害活性は加熱による影響を受けなかったことから(図2), 多様な調理法が可能であり, この点もまた, 高血圧症の予防を念頭においた食生活の提案において, カボチャが有用な食材であることを示している。

高血圧症は, 総患者数約800万人, 推定患者数は実に4000万とされる, 我が国の生活習慣病の中でも最も多い疾病である。高血圧症は心血管系疾患の重要な危険因子であり, その予防・改善は社会的課題の一つであるといえる<sup>19, 20)</sup>。本研究で得られた結果は, カボチャを活用した食生活が, 高血圧症の改善に有用な方法である可能性を示唆するものであった。

## 謝 辞

本研究の一部は, 青森県産学官共同研究推進事業(シーズ熟成事業)ならびに浦上食品・食文化振興財団によるご支援を受けました。ここに記し, 深く感謝の意を述べます。

## 引用文献

- 1) 国立社会保障・人口問題研究所. 日本の将来推計人口. 2012.
- 2) 青森県. 平成22年青森県保健統計年報. 2011.
- 3) 中谷延二. 食品の機能食と健康. 1版. 東京:放送大学教育振興会;2006, p.11-21.
- 4) 藤本新平, 庄司俊彦, 稲垣暢也. 肥満・メタボリックシンドローム. *Functional Food* 2011;5:8-11.
- 5) 岩部美紀, 山内敏正, 門脇 孝. 糖尿病. *Functional Food* 2011;5:12-6.
- 6) Sato Y, Suzuki R, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Noda T, Mizuno S, et al. Involvement of cholesterol membrane transporter Niemann-Pick C1-like 1 in the intestinal absorption of lutein. *J Pharm Pharm Sci* 2012;15:256-64.
- 7) Itagaki S, Oikawa S, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. Protective effects of rutin on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Food Chemistry* 2010;118:426-9.
- 8) Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. A Dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1970;214:374-6.
- 9) Erdös EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987;56:345-8.
- 10) Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* 1990;16:363-70.
- 11) Suzuki H. Therapeutic efficacy of renin-angiotensin blockade in patients receiving dialysis. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009;3:397-405.
- 12) Hermida RC, Ayala DE, Fernández JR, Portaluppi F, Fabbian F, Smolensky MH. Circadian rhythms in blood pressure regulation and optimization of hypertension treatment with ACE inhibitor and ARB medications. *Am J Hypertens* 2011;24:383-91.
- 13) Godsel LM, Leon JS, Engman DM. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in experimental myocarditis. *Curr Pharm Des* 2003;9:723-35.
- 14) Hayakari M, Satoh K, Izumi H, Kudoh T, Asano J, Yamazaki T, Tsuchida S. Kinetic-controlled hydrolysis of Leu-Val-Val- hemorphan-7 catalyzed by angiotensin- converting enzyme from rat brain. *Peptides* 2003;24:1075-82.
- 15) Hayakari M, Kondo Y, Izumi H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal Biochem* 1978;84:361-9.
- 16) Hayakari M, Seito R, Furugori A, Hashimoto Y, Murakami S. An improved colorimetric assay of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clin Chim Acta* 1984;144:71-5.
- 17) Oron-Herman M, Rosenthal T, Mirelman D, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Sela BA. The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2005;183:238-43.

- 18) Mallikarjun Gouda KG, Gowda LR, Rao AG, Prakash V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *J Agric Food Chem* 2006;54:4568-73.
- 19) 厚生労働省. 平成20年(2008)患者調査の概況. 2009.
- 20) 日本高血圧学会. 高血圧治療ガイドライン2009. 2009.