

テンペ中のプロリルエンドペプチダーゼ阻害因子について

江崎 秀 男*・中 村 好 志*

Studies on Prolyl Endopeptidase Inhibitors in Tempeh

Hideo ESAKI and Yoshiyuki NAKAMURA

1. はじめに

高齢化社会の到来とともに、我が国においても認知症は増加し、社会の重大な関心事となっている。この認知症にはその原因により脳血管性認知症とアルツハイマー病がある。

近年、特に問題視されているアルツハイマー病では、その原因物質として β アミロイド蛋白質が注目されている¹⁾⁻²⁾が、一方ではアミロイド A₄ペプチドの蓄積に関与するともいわれているプロリルエンドペプチダーゼ (PEP) の活性が、脳内 (海馬) において亢進されている³⁾。この酵素は、サブスタンス P やニューロテンシンと呼ばれる神経伝達物質や、学習や記憶に関与するバソプレシンという物質 (神経ホルモン) を分解または不活性化作用をもつ。PEP はこれらの物質を正常なレベルに維持するために重要であるが、一方ではこの酵素の過剰発現は様々な問題をひき起こす。すなわち、この酵素活性を抑制することが、アルツハイマー病の予防や治療につながる可能性もあり、最近では種々の天然物より PEP 阻害物質を探索する試みがなされている⁴⁾⁻⁶⁾。

著者らは、これまで種々の大豆発酵食品についてその機能性、特に抗酸化性について研究を行ってきた⁷⁾⁻¹⁰⁾。インドネシアの代表的な大豆発酵食品であるテンペについては、テンペ菌 (*Rhizopus* 属) の発酵によって新たに生成する新規抗酸化物質を単離し、その構造を決定するとともに、この物質がテンペの酸化的劣化の抑制に大いに寄与することを報告した¹¹⁾。また、この抗酸化物質は、ラットを用いた生体内でも抗酸化性を発揮することを明らかにした¹²⁾。本研究では、このテンペのもつ新たな機能性の探索として、PEP 阻害作用を調べるとともに、阻害因子を分離・精製し、その化学構造を明らかにした。

2. 実験方法

2.1 実験試料および凍結乾燥粉末の調製

最初の実験に使用した A 社、B 社、C 社のテンペは、市販のものを利用した。その後の実

* 生活科学部 管理栄養学科

験においては、C社よりテンペ原料である蒸煮大豆、またこの蒸煮大豆を用いて製造された加熱殺菌前のテンペおよび加熱殺菌後のテンペ（市販用のテンペ）を入手した。これらのテンペは凍結乾燥後、コーヒーマイルにて粉末化し、凍結乾燥粉末（FDP: Freeze Dried Powder）を調製した。得られた各FDPは、使用時まで -30°C で保存した。

2.2 各抽出液の PEP 阻害活性の測定

2.1で調製した各試料のFDP 700mg ずつを精秤し、ここに70%エタノール7.0mLを加え、振とう抽出（ 20°C 、18時間）を行った。遠心分離（3500rpm、20分間）によって得られた上清を、70%エタノールで順次希釈した。これらの希釈液を試料溶液として、植松らの方法⁶⁾を一部改変し、マイクロプレートリーダーを用いてPEP阻害活性の測定を行った。すなわち、試料溶液 $5\mu\text{L}$ に0.0014単位のPEPを含む0.1Mりん酸緩衝液（pH7.0） $90\mu\text{L}$ を加え、 37°C で5分間プレインキュベートした。ここに、基質としてZ-グリシン-プロリン-p-ニトロアニリン（Z-Gly-Pro-p-NA） $5\mu\text{L}$ を添加して 37°C で10分間インキュベートを行った。その後、1.0M酢酸緩衝液（pH4.0） $100\mu\text{L}$ を加えて酵素反応を停止させ、405nmにおける吸光度（ A_{405} 値）を測定することにより、生成したp-ニトロアニリン（p-NA）量を測定した。なおこの実験においては、試料溶液の代わりに70%エタノールを加えた対照試験、また酵素溶液の代わりに緩衝液を加えた盲検も同時に行い、下記の計算式にてPEP阻害率（%）を求めた。

PEP 阻害率（%）＝

$$\{1 - (\text{試料 } A_{405} \text{ 値} - \text{試料盲検 } A_{405} \text{ 値} / \text{対照 } A_{405} \text{ 値} - \text{対照盲検 } A_{405} \text{ 値})\} \times 100$$

2.3 各種溶媒を用いた PEP 阻害物質の抽出

C社のテンペ（水分含量：56.4%）より調製した500gのFDPに、1.5Lのヘキサンを加えて一晚抽出を行った後、遠心分離（9500rpm、10分間）により上清を回収した。ヘキサン抽出後の残渣については、同様にヘキサン抽出を2回繰り返した。3回分のヘキサン抽出液は混合した後、エバポレーターにて減圧濃縮し、シラップとしてその重量を測定した。

ヘキサン抽出を終えた残渣は、さらに酢酸エチルによる抽出を3回、またエタノールによる抽出を3回、ヘキサン抽出の場合と同様に行い、各抽出物の収量を測定した。また、各抽出物の一定量を用いてPEP阻害活性を測定した。

2.4 酢酸エチル抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー

2.3で得られた酢酸エチル抽出物（8.71g）を、シリカゲルカラム（Wakogel C-200, 4.0i.d.×37cm）に吸着させた後、1.8Lのヘキサン：酢酸エチル（95:5, v/v）混液を流し、溶出液を回収した。その後、ヘキサン：酢酸エチル（90:10, v/v）混液、ヘキサン：酢酸エチル（85:15, v/v）混液、ヘキサン：酢酸エチル（80:20, v/v）混液、ヘキサン：酢酸エチル（75:25, v/v）混液および酢酸エチルを1.8Lずつ順次流し、それぞれの溶出液を回収した。得られた各溶出画分は減圧濃縮し、シラップとしてその重量を測定した。また、各溶出画分の一定量を用いてPEP阻害活性を測定した。

2.5 シリカゲルカラム溶出画分の薄層クロマトグラフィー

2.4で得られたヘキサン：酢酸エチル（95:5, v/v）溶出画分およびヘキサン：酢酸エチル（90:10, v/v）溶出画分の一部を、シリカゲル薄層板（Silica gel 60 F₂₅₄）にスポットした後、ヘキサン：酢酸エチル（8:2, v/v）を用いて展開した。その後、薄層板をヨウ素ガスで充満させた器の中に入れ、展開されたスポット物質の検出を行った。以後の薄層クロマトグラフィー（TLC）による実験においても、同様の条件で操作を行った。

2.6 シリカゲルカラム溶出画分のみ分取 HPLC

2.4で得られたヘキサン：酢酸エチル（90:10, v/v）溶出画分0.95gを、少量の溶媒に溶解し、分取用高速液体クロマトグラフ（分取 HPLC）に注入した。分離用のカラムには Develosil 60-10/20（50i.d.×450mm）を、溶離液にはヘキサン：酢酸エチル（8:2, v/v）混液を使用した。溶離液の流速は36.4mL/minとして、検出波長は210nmで行った。分取 HPLC において、得られた各ピーク部分を回収し、1～10の10フラクションを得た。各フラクションは減圧濃縮し、シラップとしてその重量を測定した。また、各フラクションの一定量を用いて PEP 阻害活性を測定した。

2.7 HPLC/APCI-MS 分析による4フラクションの分析

2.6で得られた4フラクションに含まれる PEP 阻害物質の分析を、HPLC/APCI-MS を用いて行った。HPLC 用のカラムには TSK-GEL ODS 80TS（2.0i.d.×150mm）を、溶離液には0.1% HCOOH/MeOHを使用した。溶離液の流速は0.2mL/minとして、検出波長は210nmで行った。マス分析には、APCI-MS（N₂; 2.5L/min, Probe; 4.5kV at 400°C, CDL; -35V at 250°C, DEF; +50V）を使用した。

2.8 メチル化誘導体の調製および HPLC 分析

2.6で得られた各フラクションの一定量（5.0mL）を、真空ポンプを用いて完全に溶媒を除去した。この乾燥物に、少量の三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液を加え、常温で30分間放置してメチル化誘導体とした。また、市販の脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸）を用いて、同様にメチル化誘導体を調製した。各フラクションのメチル化誘導体は、HPLC 分析（カラム；Develosil ODS-UG-5 4.6i.d.×150mm, 溶離液；MeOH, 流速；0.7mL/min, 波長；210nm）を行った。各フラクションより得られたそれぞれの HPLC ピークの面積値より、あらかじめ作成した各種脂肪酸メチルの検量線を用いて、これらフラクション中の脂肪酸メチル誘導体の含量を求め、さらには脂肪酸の含量（5.0mL 中）を算出した。

3. 結果および考察

3.1 各種市販テンペの PEP 阻害作用

A 社, B 社, C 社のテンペの抽出液の PEP 阻害率（%）を図1に示した。ここでは各抽出液の添加量を変えて実験を行ったが、横軸に、その量を酵素反応液100 μ L中に添加した各試料の FDP 相当量（7.8 μ g, 15.6 μ g, 31.3 μ g, 62.5 μ g）として示した。この図から明らか

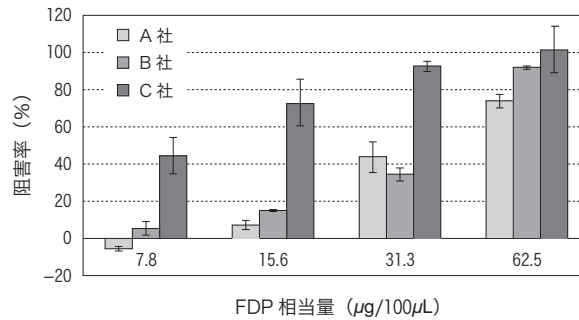


図1 各種市販テンペの PEP 阻害作用

値は平均値±標準偏差 (n=4) を示す。

なように、A社、B社、C社のいずれのテンペにおいても、添加量を増すと PEP 阻害率は濃度依存的に上昇した。また、3社のテンペのなかでは、C社の抽出液が最も強い PEP 阻害作用を示した。

3.2 発酵にともなう PEP 阻害活性の変化

強い PEP 阻害作用を示したテンペの製造元であるC社より、原料である蒸煮大豆、またこの大豆より製造された加熱殺菌前のテンペ、さらには市場に出回る加熱殺菌後のテンペを入手し、これらの FDP 抽出液の PEP 阻害活性を調べ、その結果を図2に示した。発酵前の蒸煮大豆は PEP 阻害作用を示さなかったが、テンペ発酵にともない強い阻害活性が認められた。発酵後のテンペは発酵前に比べ、PEP 阻害作用は有意に上昇した ($p<0.01$)。また加熱殺菌後のテンペにおいても、その阻害率は多少低下したが、強い PEP 阻害活性は保持された。

これらの結果より、市販テンペ中には、蒸煮大豆のテンペ菌による発酵によって新たに生成された PEP 阻害物質が含有されており、また、この活性物質は熱に対して比較的安定であることが分かった。

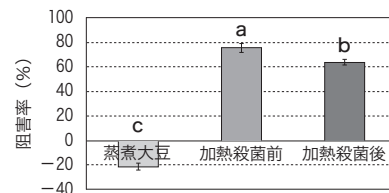


図2 テンペ製造過程における PEP 阻害活性の変動

値は平均値±標準偏差 (n=4) を示す。異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$, Tukey 検定)。

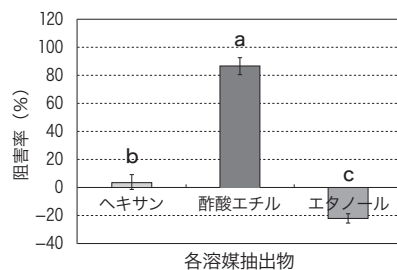


図3 各溶媒抽出物の PEP 阻害活性

値は平均値±標準偏差 (n=4) を示す。異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$, Tukey 検定)。

3.3 溶媒抽出法による PEP 阻害物質の分画

C社テンペの FDP を用いて、溶媒抽出法による PEP 阻害物質の分画を行った。FDP500g より得られたヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、エタノール抽出物の収量は、それぞれ106g、8.8g、11.3gであった。これらの抽出物の2.5µgを酵素反応液100µLに添加した場合の各抽出物の PEP

阻害活性を、図3に示した。酢酸エチル抽出物において、有意に ($p<0.01$) 強い阻害活性が認められた。一方、ヘキサン抽出物およびエタノール抽出物では、阻害活性はほとんど認められなかったことより、このテンペ中の PEP 阻害物質は酢酸エチルで効率よく抽出されることが分かった。

3.4 シリカゲルカラムによる PEP 阻害物質の分離

強い阻害活性の認められた酢酸エチル抽出物 (8.7g) を試料として、シリカゲルカラムを用いて PEP 阻害物質の分離を行った。各ヘキサン：酢酸エチル混液 (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, v/v) および酢酸エチルによって溶出した各溶出画分の収量は、それぞれ 3.89g, 2.36g, 0.51g, 0.40g, 0.32g, 0.37g であった。この総量は 7.85g となり、試料として用いた酢酸エチル抽出物の 90% が回収されたことになる。各溶出画分の $2.5\mu\text{g}$ を酵素反応液 $100\mu\text{L}$ に添加した場合の PEP 阻害活性を、図4に示した。ヘキサン：酢酸エチル=95:5 およびヘキサン：酢酸エチル=90:10 溶出画分は、特に強い PEP 阻害活性を示した。これらの両画分の阻害率は、他の溶出画分より有意に ($p<0.01$) 高い値を示した。

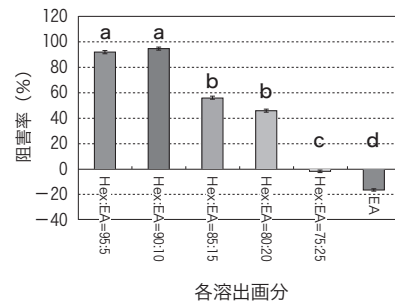


図4 シリカゲルカラム溶出画分の PEP 阻害活性

(Hex; ヘキサン, EA; 酢酸エチル)
値は平均値±標準偏差 ($n=4$) を示す。異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$, Tukey 検定)。

3.5 TLC による PEP 阻害物質の探索

強い PEP 阻害活性を示したヘキサン：酢酸エチル=95:5 およびヘキサン：酢酸エチル=90:10 溶出画分の TLC の結果を図5に示した。ヘキサン：酢酸エチル=95:5 溶出画分では、Rf 値が 0.58 および 0.34 を示す A と B の 2 つのスポットが検出された。一方、ヘキサン：酢酸エチル=90:10 溶出画分では、Rf 値が 0.34 を示す B スポットのみが検出された。

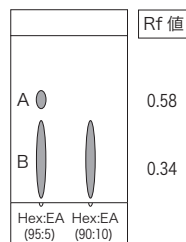


図5 シリカゲルカラム溶出画分の TLC

(Hex; ヘキサン, EA; 酢酸エチル)

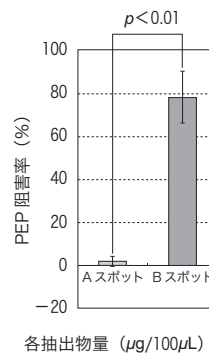


図6 TLC 分画物の PEP 阻害活性

値は平均値±標準偏差 ($n=4$) を示す。A スポットと B スポットとの有意差 ($p<0.01$) は、t 検定による。

そこで、AとBの2つのスポットが検出されたヘキサン：酢酸エチル＝95:5溶出画分をTLCプレート上に帯状に塗布し、展開後、Rf値が0.58および0.34を示すバンド部分を掻きとり、酢酸エチルで抽出を行った。得られたTLC分画物（AスポットとBスポット部分の抽出物）の2.5 μ gを酵素反応液100 μ Lに添加した場合のPEP阻害活性を、図6に示した。この図から明らかなように、図5におけるRf値が0.34を示すBスポットがPEP阻害活性を示すことが分かった。一方、Rf値が0.58を示すAスポットは阻害活性を示さなかった。これらの結果より、Bスポットがシリカゲルカラム溶出画分中の主要なPEP阻害成分であることが分かった。そこで、このBスポット成分を高濃度に含むヘキサン：酢酸エチル＝90:10溶出画分を用いて、さらにPEP阻害物質の分離・精製を行うことにした。

3.6 分取HPLCによるPEP阻害物質の分離・精製

ヘキサン：酢酸エチル＝90:10溶出画分の分取HPLCを行い、1から10の10フラクションを得た。これらのフラクションの濃縮物の1.25 μ gを酵素反応液100 μ Lに添加した場合のPEP阻害活性を、図7に示した。4、5、6、7フラクションにおいて、PEP阻害活性が認められ、特に4フラクションが有意に ($p<0.01$) 高い阻害率を示した。

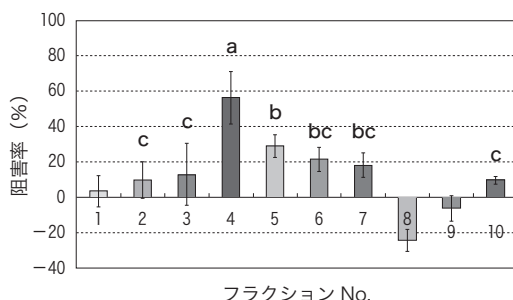


図7 分取HPLC各フラクションのPEP阻害活性
値は平均値±標準偏差 ($n=4$) を示す。異なるアルファベットは有意差を示す ($p<0.01$, Tukey 検定)。

3.7 4フラクション中のPEP阻害物質の同定

4フラクションのHPLC/APCI-MS分析を行った結果、溶出時間3.17分に主要なピークを検出し、そのマススペクトル（図8のA）よりこのピーク物質がリノール酸である可能性が示唆された ($[M+H]^+=281.20$, $[M-OH]^+=263.35$)。そこで、標品であるリノール酸を用いて同様の条件で分析を行ったところ、溶出時間3.17分に単一のピークを検出し、そのマススペクトル（図8のB）も4フラクションの主要なピークのスペクトルとよく一致した。これらの結果より、4フラクションのもつPEP阻害活性にはリノール酸が関与していることが明らかとなった。

また、この4フラクション中には小さな別のピーク（溶出時間3.56分）も検出され、そのマススペクトルよりこのピーク物質をオレイン酸と同定した。

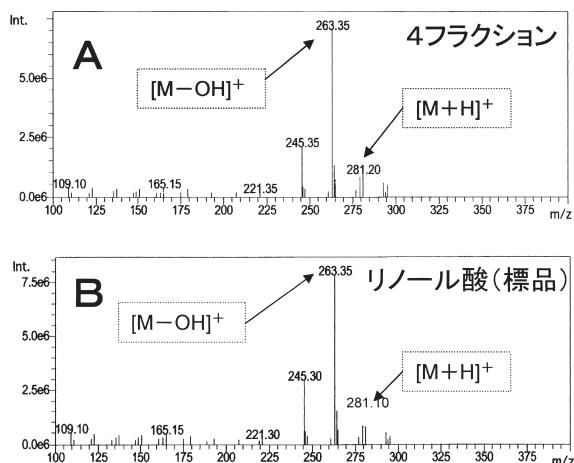


図8 分取 HPLC 4 フラクションのマススペクトル

3.8 4, 5, 6, 7フラクション中の脂肪酸含量

4, 5, 6, 7フラクションのメチル化誘導体の HPLC 分析により, これらの各フラクション 5mL 中の脂肪酸含量を算出し, その結果を図 9 に示した。4 フラクションにはリノール酸, それに次いでオレイン酸が多く含まれていた。また 5 フラクションには, リノール酸とオレイン酸の他に α -リノレン酸も含まれていた。6 フラクションおよび 7 フラクションにも同様に 3 種類の脂肪酸が含まれていたが, 各フラクションの総量は 4, 5 フラクションに比べ, 順次減少していた。

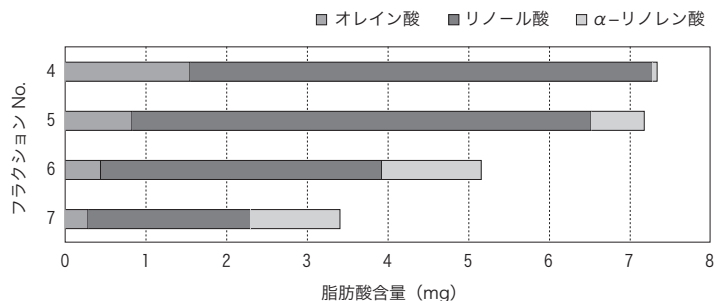


図9 分取 HPLC 各フラクション中の脂肪酸含量

3.9 各種脂肪酸の PEP 阻害活性

市販の炭素数 18 の脂肪酸, すなわちステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, α -リノレン酸の 4 種類を用いて, 各モル濃度における PEP 阻害率を求め, これらの結果より各脂肪酸の IC₅₀ 値を算出した。その結果を表 1 に示したが, オレイン酸 (C_{18:1}) の阻害活性は最も強く, その IC₅₀ 値は 39.0 μ M であった。また, オレイン酸より二重結合が一つ多いリノール酸 (C_{18:2}) の IC₅₀ 値は 56.2 μ M であった。さらに二重結合が増した α -リノレン酸では阻害活性は顕著に低下し, その IC₅₀ 値は 121 μ M となった。

表1 各種脂肪酸の PEP 阻害活性 (IC₅₀ 値)

脂肪酸名	IC ₅₀	構造式
ステアリン酸	46.9	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
オレイン酸	39.0	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH
リノール酸	56.2	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH
α -リノレン酸	121.0	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH

表中の値は μ M を示す。

ここで得られた各脂肪酸の示す PEP 阻害活性と、図 9 に示された分取 HPLC 各フラクション 5 mL 中に含まれる脂肪酸組成およびその総量の結果より、これらの各フラクションの PEP 阻害活性を算出すると、その値は、図 7 に示された各フラクションのもつ PEP 阻害活性を十分に説明することができる。これらの結果より、テンペ中の PEP 阻害作用を示す物質は、発酵中に生成したオレイン酸およびリノール酸によるところが大きいと考察される。

3.10 テンペ発酵にともなう PEP 阻害物質の生成

3.2 で使用した蒸煮大豆、加熱殺菌前のテンペおよび加熱殺菌後のテンペの TLC の結果を、図 10 に示した。加熱殺菌前および加熱殺菌後（市販）のテンペ中には、オレイン酸 (Rf 値 0.36) およびリノール酸 (Rf 値 0.28) が高濃度で、また α -リノレン酸 (Rf 値 0.14) も少量含まれていた。一方、蒸煮大豆中に含有されるこれらの脂肪酸の量は極めて微少であった。また、蒸煮大豆の Rf 値 0.81 のスポット（大豆油中のトリグリセリド）のヨウ素呈色は、加熱殺菌前のテンペや加熱殺菌後のテンペより濃かった。これらの結果より、テンペ中に生成した PEP 阻害物質は、蒸煮大豆中に存在するトリグリセリドがテンペ菌の産生するリパーゼの作用により生成したものと考察される。

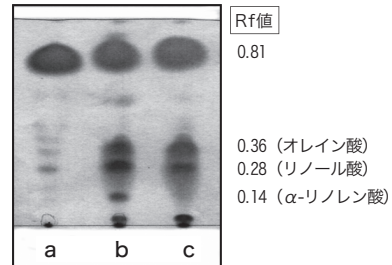


図10 テンペ発酵にともなう成分変化

(a; 蒸煮大豆, b; 加熱殺菌前のテンペ,
c; 加熱殺菌後（市販）のテンペ)

4. ま と め

本研究では、インドネシアの伝統的な大豆発酵食品であるテンペを用いて、アルツハイマー病の予防や治療に役立つ可能性をもつプロリルエンドペプチダーゼ (PEP) 阻害作用について検討した。市販のテンペにはかなり強い PEP 阻害作用が認められ、またこの阻害活性は原料蒸煮大豆をテンペ菌で発酵させるプロセスで新たに発現することを明らかにした。阻害活性の強い市販テンペより、活性成分を各種溶媒で抽出した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、さらには分取 HPLC などを行うことにより、活性成分を分離・精製し、テンペ中の PEP 阻害因子として、リノール酸、オレイン酸、 α -リノレン酸を同定した。また TLC 分析により、発酵によって生成したこれらの PEP 阻害因子は、蒸煮大豆中に存在するトリグリセリドがテンペ菌の産生するリパーゼ作用により生成したものと

考察された。

謝辞

本研究において、HPLC/APCI-MS 分析にご協力をいただきました岐阜大学応用生物科学部の山内亮教授に感謝の意を表します。また、本研究の一部は本学学園研究費助成金(C)を受けて行われたものであり、記して感謝申し上げます。

文 献

- 1) 川原正博, 黒田洋一郎, アルツハイマー・ β アミロイド蛋白質の神経毒性と膜脂質との関連, 蛋白質・核酸・酵素, **44**, 1982-1987 (1999).
- 2) 岩坪威, アルツハイマー病 β アミロイドと γ セクレターゼを中心に, 蛋白質・核酸・酵素, **49**, 1086-1090 (2004).
- 3) 青柳高明, 村岡靖彦, PEP 阻害物質, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 1971-1986 (1993).
- 4) Saito, Y., Ohura, S., Kawato, A. and Suginami, K., Prolyl Endopeptidase Inhibitors in Sake and Its Byproducts. *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 720-724 (1997).
- 5) Yanai, T., Suzuki, Y. and Sato, M., Prolyl Endopeptidase Inhibitor Peptides in Wine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 380-382 (2003).
- 6) 植松敦史, 中村浩蔵, 宮入なつき, 茅原紘, ヒジキ中のプロリルエンドペプチダーゼ阻害物質, 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 67 (2004).
- 7) Esaki, H., Onozaki, H. and Osawa, T., "Antioxidative Activity of Fermented Soybean Products." in *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*, ed. by Huang, M.-T., Osawa, T., Ho, C.-T. and Rosen, R.-T., American Chemical Society, Washington, pp. 353-360 (1994).
- 8) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T., New Potent Antioxidative *o*-Dihydroxyisoflavones in Fermented Japanese Soybean Products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1637-1639 (1999).
- 9) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昂, 大澤俊彦, 味噌中のオルトジヒドロキシイソフラボンとその抗酸化性, 食科工, **48**, 51-57 (2001).
- 10) Esaki, H., Shirasaki, T., Yamashita, K., Nakamura, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T., Absorption and Excretion of the 8-Hydroxydaidzein in Rats after Oral Administration and Its Antioxidant Effect. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 80-86 (2005).
- 11) Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S., and Osawa, T., New Antioxidant Isolated from Tempeh. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 696-700 (1996).
- 12) 江崎秀男, 山下かなへ, 川岸舜朗, 大澤俊彦, テンペ抗酸化物質の生体内抗酸化効果, 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 62 (2000).