

HPLC法によるアンジオテンシン変換酵素阻害活性の 測定と各種スプラウトの阻害活性

志村亜希子*・及川佐枝子*・江崎秀男*

Measurement of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity
by HPLC and Inhibitory Activity of Various Sprouts

Akiko SHIMURA, Saeko OIKAWA and Hideo ESAKI

1. はじめに

高血圧はわが国では最も発症頻度の高い疾患であり、高血圧人口は約900万人と推定されている^{1), i)}。この高血圧の成因としてレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が重要な役割を果たしている²⁾。

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) は、アンジオテンシン I に作用し、昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II を生成する。アンジオテンシン II は強力な末梢血管収縮作用を示し、血圧の上昇をもたらす。更に副腎皮質ホルモンのアルドステロンの分泌を高め、Naの再吸収促進、水の貯留、循環血流量の増大をもたらし、血圧を上昇させる (図1)^{3), 4)}。すなわち、アンジオテンシン II の作用を抑制するには、ACEを阻害することが有効であると考えられる。

ACE阻害活性を知るための代表的な測定方法は、Lieberman⁵⁾の方法である。しかし、この方法は、酵素反応終了後、この反応液中の馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、この抽出物を蒸留水に転溶し馬尿酸量を228nmで測定するため、非常に手間を要する。また、試料中の夾雑物が測定時の吸光度に影響を及ぼすことも懸念される。そこで、本研究では、まずACE阻害活性を高速液体クロマトグラフィー (HPLC法) を用いて測定する方法を構築し、阻害活性が迅速かつ正確に評価できるか検討した。

多くの植物性食品については、ACE阻害活性が報告されており⁶⁾、その活性成分として、ニコチアナミンが報告されている⁷⁾。また、大豆たんぱく質が低分子化されたペプチド類がACEを阻害し、人への継続投与によっても血圧を穏やかに低下させる作用を示すことが報告されている⁸⁾。

近年、かいわれ大根をはじめ、豆苗やブロッコリースプラウトなどの多種多様なスプラウトが普及している。ブロッコリースプラウトはブロッコリーに比べ、高い抗がん作用を

* 生活科学部 管理栄養学科

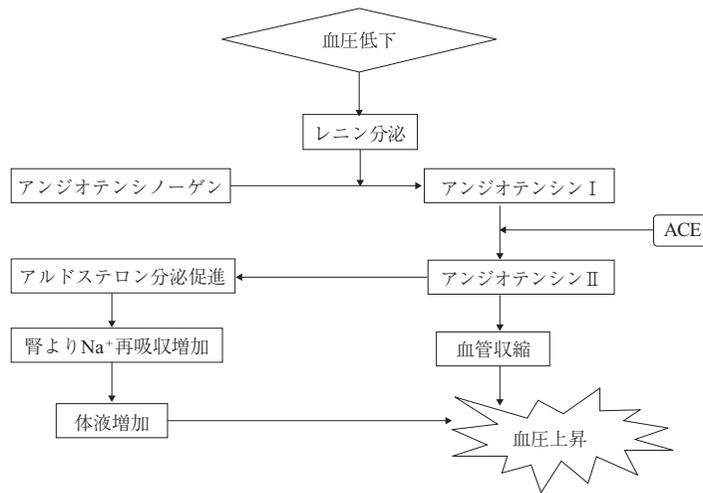


図1 レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系と血圧⁴⁾

示すことが報告されている⁹⁾。また、ソバスプラウトでは、発芽後、フラボノイド化合物が高含量含まれることが明らかになっている¹⁰⁾。このように、発芽にともなう種々の生理現象が、スプラウトの様々な機能性を向上させる例が報告されている。しかし、スプラウト類のACE阻害活性については報告例は少ない。

そこで、本研究では、HPLC法を用いたACE阻害活性測定法を検討するとともに、この方法を用いて、各種スプラウトのACE阻害活性を調べた。

2. 実験方法

2.1 実験試料および試薬

実験試料として、S社のスプラウト8種類（豆苗、たまねぎの新芽、かいわれ大根、赤ラディッシュの新芽、子大豆もやし、おくらの新芽、空芯菜の新芽およびブロッコリーの新芽）を使用した。ACEは(株)SIGMAのウサギ肺アセトンパウダー（Lung acetone powder from rabbit, L0756）を、基質は(株)ペプチド研究所のHHL（Bz-Gly-His-Leu・H₂O, 3064）を使用した。その他の試薬類は、入手可能な限り特級グレードを使用した。

2.2 試料の調製

各種スプラウトは、-30℃で一晩凍結した。これらのスプラウト類は凍結乾燥（FDU-1100, EYELA）した後、コーヒーミル（Mini Blender, 大阪ケミカル(株)）で粉末化し、凍結乾燥粉末（Freeze Dried Powder: FDP）を得た。各種スプラウトのFDP0.1gを3検体ずつ精秤し、ここに10%エタノールを7.0mLずつ加え、室温で20時間振とう抽出した。その後、遠心分離（3500rpm, 20分間）を行い、各種スプラウト抽出液（n=3）を回収した。

2.3 HPLCを用いたACE阻害活の測定

2.3.1 反応時間

HHLを125mMホウ酸-塩酸緩衝液(pH8.3)に溶解し5.83mM HHL溶液を調製した。また、ウサギ肺アセトンパウダーに125mMホウ酸-塩酸緩衝液(pH8.3)を加え一晚抽出し、ACE溶液を調製した。

5.83mM HHL溶液1200 μ LにACE溶液を200 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間反応を行った。この反応液の10 μ Lを直ちにHPLC(ポンプ:655A-11, カラムオープン:655A-52)に注入し、生成した馬尿酸の分析を行った。その後、35, 50, 90および105分間後に、随時馬尿酸の分析を行った。

HPLCの分析条件は、カラム:Develosil ODS-UG-5(4.6mm i.d. \times 250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度:35 $^{\circ}$ C, 溶離液:メタノール:水:トリフルオロ酢酸(30:70:0.1, v/v), 流速:0.7mL/分, 注入量:10 μ L, 検出波長:228nmとした。

2.3.2 反応停止液

ACE阻害活性測定法は河村の方法⁴⁾を参考に行った。10%エタノール50 μ Lに5.83mM HHL溶液を150 μ L加え、予備加温を行った(37 $^{\circ}$ C, 5分間)。その後、ACE溶液を100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間の反応を行った。ここにエタノールを1000 μ L加えた後、更に、0, 10および30分間、37 $^{\circ}$ Cで加温を行った。これらの溶液をそれぞれ遠心分離(12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分間)し、上清中の各加温時間における馬尿酸量をHPLC(ポンプ:LC-10AD, カラムオープン:CTO-10AC)によって測定した。

HPLCの分析条件は、カラム:Develosil ODS-UG-5(4.6mm i.d. \times 250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度:35 $^{\circ}$ C, 溶離液:メタノール:水:トリフルオロ酢酸(20:80:0.1, v/v), 流速:0.7mL/分, 注入量:10 μ L, 検出波長:228nmとした。

2.4 各種スプラウトのACE阻害活性の測定

各種スプラウト抽出液50 μ Lに5.83mM HHL溶液を150 μ L加え、予備加温を行った(37 $^{\circ}$ C, 5分間)。その後、ACE溶液を100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間、加温を行った。ここにエタノールを700 μ L加え、酵素反応を停止させた後、遠心分離(12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分間)を行い、生成した馬尿酸量をHPLC(ポンプ:LC-10AD, カラムオープン:CTO-10AC)によって定量した(試料馬尿酸面積値)。本実験では、各試料溶液1種類につき3検体の抽出液($n=3$)を用いて酵素反応を行った。HPLCへの注入量は20 μ Lとした。

また、対照試験として、各試料溶液の代わりに抽出溶媒である10%エタノールを用いた3検体も同様に酵素反応を行った(対照馬尿酸面積値)。各試料溶液の阻害活性は次式を用いて算出し、阻害率(%)として表した。

$$\text{阻害率}(\%) = (1 - \text{試料馬尿酸面積値} / \text{対照馬尿酸面積値}) \times 100$$

2.5 豆苗および種子のHPLC分析

豆苗のFDP0.5g, また豆苗種子の粉末0.5gに、10%エタノールを3.5mLずつ加え、室温で20時間振とう抽出した。その後、遠心分離(3500rpm, 20分間)を行い、それぞれの上清を回収した。この上清(抽出液)中の成分分析を三次元HPLC法で行った。

これらの各抽出液の分析は、フォトダイオードアレイ検出器（Shimadzu SPD-M10A）を装備した三次元HPLC（ポンプ：LC-10AT，カラムオープン：CTO-10AC）で行った。

HPLCの分析条件は、カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6mm i.d.×250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.），カラム温度：35℃，溶離液：A；メタノール：水：トリフルオロ酢酸（60：40：0.1, v/v），B；メタノール：水：トリフルオロ酢酸（20：80：0.1, v/v）【A：B=0：100（0分→10分），A：B=（0：100→100：0）（10分→70分），A：B=100：0（70分→100分），A：B=0：100（100分→120分）】，流速：0.7mL/分，注入量：20μL，測定波長：200nm-380nm，検出波長：320nmとした。

2.6 統計処理

各スプラウトのACE阻害活性の測定値は、平均値±標準偏差で示した。統計解析には、IBM SPSS Statistics Ver.20を使用した。平均値の有意差検定は、分散分析（ANOVA）により有意差（ $p < 0.05$ ）が認められたものについて、Tukeyの多重比較法を用いて行った。

3. 実験結果および考察

3.1 HPLC法を用いたACE阻害活性試験法の検討

2.3.1. 反応時間の検討

アンジオテンシン I にACEが作用すると、酵素反応が起こり、アンジオテンシン II と His-Leu (Histidyl-L-Leucine) に分解される。合成基質であるHHLにACEが作用すると、アンジオテンシンと類似した酵素反応が進行し、HHLは馬尿酸とHis-Leuに分解される¹¹⁾。本実験では、HHLが分解して生じた馬尿酸量をHPLCによって測定し、ACE阻害活性を評価した。まず、馬尿酸のHPLC分析条件を検討し、17.7分付近にシャープなピークとして検出することができた（図2）。また、このピークは228nm付近に吸収極大を持つUVスペクトルを示した（図3）。

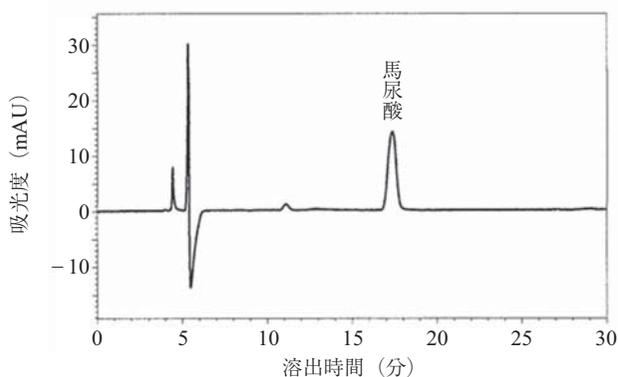


図2 馬尿酸のHPLCクロマトグラム（228nm）

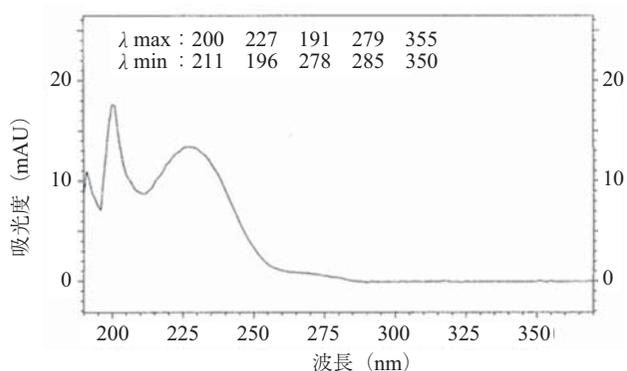


図3 馬尿酸のUVスペクトル

各試料溶液のACE阻害活性を評価する場合、その反応時間は、酵素反応が直線的に進行する時間内で行う必要がある。本実験では、まず20、35、50、90および105分間の各反応時間における馬尿酸生成量をHPLCによって測定した。各反応時間における馬尿酸の面積値の変化を図4に示した。この図から明らかなように、反応時間20～105分の間において酵素反応は直線的に進行し、また各反応時間と馬尿酸面積値との間には、高い正の相関($r=0.99$, $n=5$, $p<0.01$)が認められた。この結果より、ACE阻害活性試験の反応時間を60分間とした。

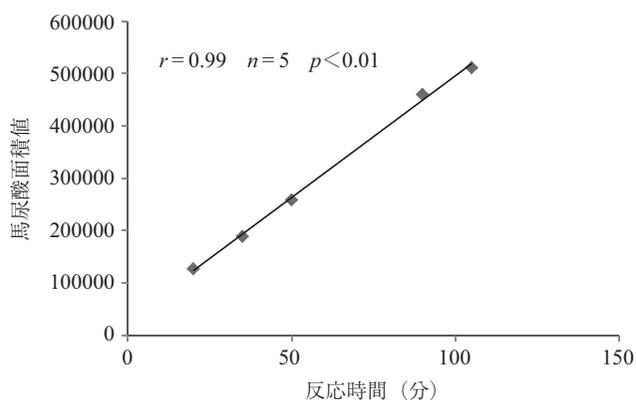


図4 反応時間に伴う馬尿酸面積値の変化

2.3.2 反応停止液の検討

ACE酵素反応の停止液にエタノールを使用し、その溶液を直接HPLCに注入し、生成した馬尿酸量を測定することができれば、ACE阻害活性を迅速かつ正確に求めることができる。そこで、60分間酵素反応を行った反応液にエタノールを加えた後、更に0、10および30分間加温したものをHPLC分析することで、エタノールによって酵素反応が完全に停止したかを調べた(図5)。その結果、加温0、10および30分間における馬尿酸面積値

の差異はほとんど認められなかった（馬尿酸面積値：0分間，244953；10分間，244744；30分間，247701）。以上の結果より，エタノールはACE酵素反応を完全に停止することができ，反応停止液として適していると考えられた。

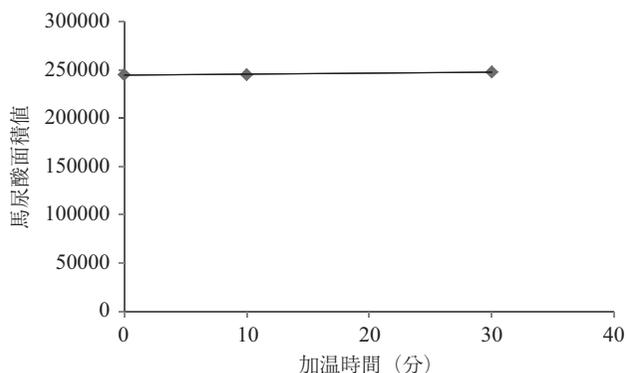


図5 エタノール添加後の加温時間に伴う馬尿酸面積値の変化

3.2 各種スプラウトのACE阻害作用

各種スプラウトの水分含量を表1に示した。いずれのスプラウトも90%以上の水分含量を示した。

表1 各種スプラウトの水分含量

	凍結乾燥前の重量 (g)	凍結乾燥後重量 (g)	水分含量 (%)
豆苗	87.5	6.0	93.2
たまねぎ	39.2	2.2	94.4
かいわれ	75.4	4.6	93.9
赤ラディッシュ	104.6	3.9	96.2
子大豆もやし	115.0	9.0	92.2
おくら	66.3	4.8	92.8
空芯菜	88.4	4.5	94.9
ブロッコリー	70.1	3.6	94.8

各種スプラウトのACE阻害活性試験は豆苗，たまねぎ，かいわれ，赤ラディッシュおよび子大豆もやしの5種類と，おくら，空芯菜およびブロッコリーの3種類の2回に分けて評価を行った。なお，2回目の試験において，比較試料として，1回目に阻害活性を測定したたまねぎを同時に用いた。

各種スプラウトのACE阻害活性を図6に示した。かいわれ，赤ラディッシュ，子大豆もやし，おくら，空芯菜およびブロッコリーのACE阻害活性は40%以下であった。それに対し，豆苗およびたまねぎは70~90%の阻害率を示し，有意に ($p < 0.05$) 他のスプラウトより高いACE阻害活性を示した。

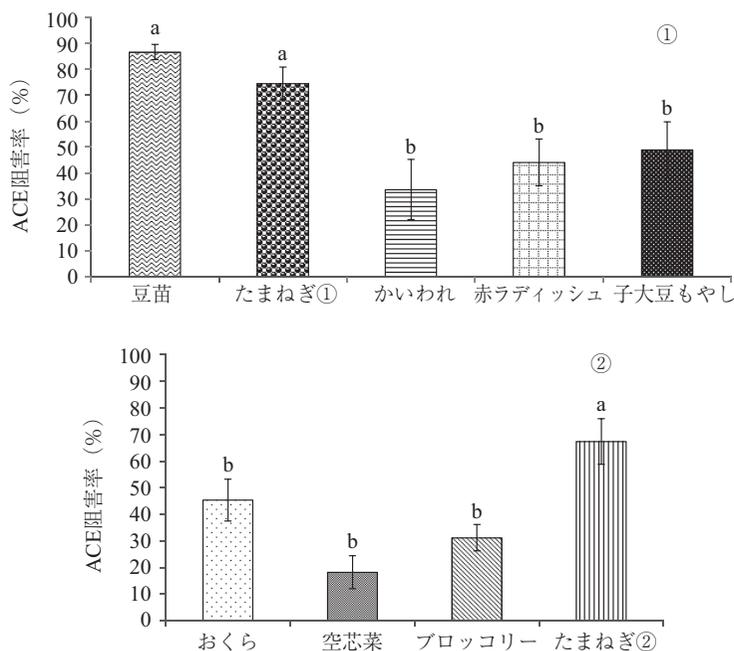


図6 各種スプラウトのACE阻害活性
それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.05$, Tukey検定) があることを示す。

3.3 豆苗および種子のHPLC分析

図6より、最も高いACE阻害活性を示したのは豆苗であった。そこで、豆苗のACE阻害活性に関与している成分を調べるために、豆苗および豆苗種子の10%エタノール抽出液の三次元HPLC分析を行った。

その結果、豆苗種子は主要なピークは検出されなかったが、豆苗ではa, b, cおよびdの4つのピークが出現した(図7)。これらのUVスペクトルを図8に示した。aおよびbは270nmおよび350nm付近に吸収を持つため、フラボノイド類である可能性が示唆される。また、cおよびdは、320nm付近に吸収極大を持つことから、フェノールカルボン酸類であると推察される。今後、これらの発芽によって新たに生成したピーク成分を分離・精製し、その化学構造を明らかにするとともに、この成分のACE阻害活性への関連性を明らかにしていきたい。

4. まとめ

本研究では、従来の方法に比べ、迅速および正確にACE阻害活性を測定する方法を検討するとともに、この方法を用いて、各種スプラウトのACE阻害作用を調べた。

HPLCを用いてACE阻害活性測定法を検討した所、エタノールはACE酵素反応を完全に停止することができ、反応停止液として適していると考えられた。この方法は馬尿酸を

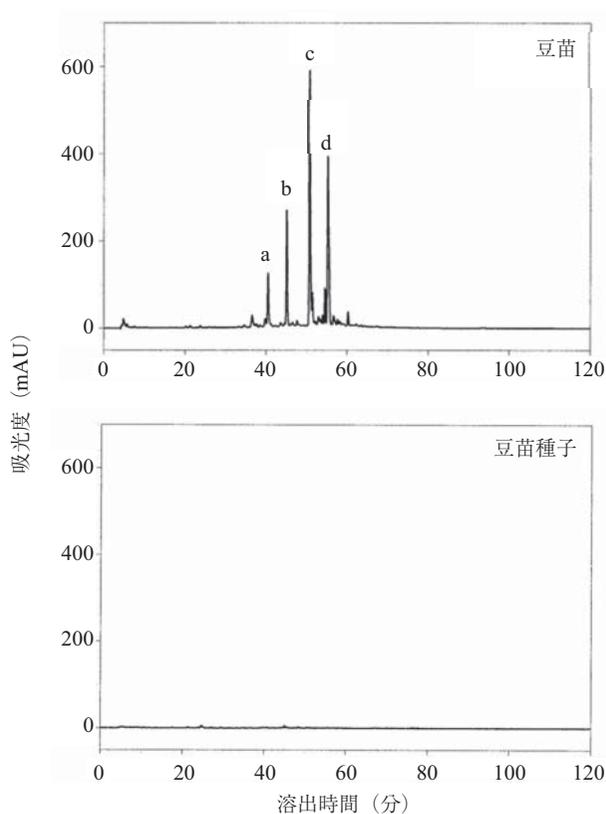


図7 豆苗および豆苗種子10%エタノール抽出液のHPLCクロマトグラム (320nm)

酢酸エチルで抽出することなく、馬尿酸量を測定することができ、迅速および正確であると考えられる。

この方法を用いて、各種スプラウトのACE阻害活性を測定した所、豆苗およびたまねぎは70~90%の阻害率を示し、有意に ($p < 0.05$) 他のスプラウトより高いACE阻害活性を示した。そこで、最も高い活性を示した、豆苗およびその種子の10%エタノール抽出液をHPLCによって分析し、豆苗のACE阻害活性に関与している成分を調べた。その結果、豆苗では種子に認められないa, b, cおよびdの4つのピークが出現した。今後、これらの発芽によって新たに生成したピーク成分の化学構造を明らかにするとともに、ACE阻害活性を調べる必要がある。

謝辞

スプラウト類を提供して頂いた(株)サラダコスモの中田様に感謝の意を申し上げます。共同研究者である平成26年度の鈴木彩加さんに感謝致します。

HPLC法によるアンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定と各種スプラウトの阻害活性

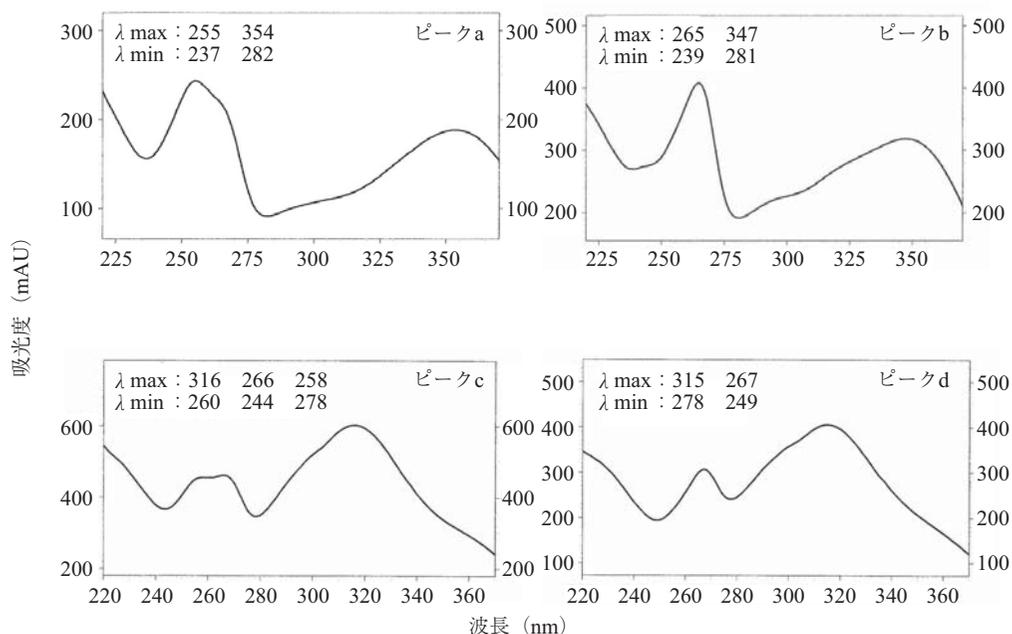


図8 豆苗10%エタノール抽出液のピークのUVスペクトル

参考文献

- 1) 松岡博昭, 高血圧, 日本内科学会雑誌, **98**, 167-172 (2009).
- 2) 山里正演, 瀧下修一, 高血圧の病態と病因, 臨牀と研究, **85**, 1-5 (2008).
- 3) 後藤昌義, 瀧下修一, B. 高血圧, 「新しい臨床栄養学」, 5版 (南江堂, 東京) pp. 119-127 (2008).
- 4) 河村幸雄, 3-3-5 循環系調節機能, 「食品機能研究法」, 初版, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, (光琳, 東京) pp. 109-112 (2002).
- 5) Lieberman, J., Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis, *Am. J. Med.*, **59**, 365-372 (1975).
- 6) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙, 食品中のアンジオテンシン変換酵素阻害能について, 日本農芸化学会誌, **57**, 1143-1146 (1983).
- 7) 伊澤華子, 青柳康夫, 植物性食品のニコチアナミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, 日本食品科学工学会誌, **59**, 348-353 (2012).
- 8) 及川和志, 田中真美, 渡辺毅, 工藤重光, 打田悌治, 金澤武道, 大豆蛋白質由来ペプチドの長期継続投与による血圧低下作用, 日本未病システム学会雑誌, **8**, 196-199 (2002).
- 9) Jed, W.F., Yuesheng, Z. and Paul, T., Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 10367-10372 (1997).
- 10) 渡辺満, 伊藤美雪, ソバ地上生育ステージによる抗酸化能とフラボノイド組成の変動, 日本食品科学工学会誌, **49**, 119-125 (2002).
- 11) Cushman, D. W. and Cheung, H. S., Spectrometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971).

志村亜希子・及川佐枝子・江崎秀男

引用 URL

i) <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/11/dl/04.pdf> (2014.9.16).