

論文の内容の要旨

論文題目 *Lactobacillus helveticus* 発酵乳の血圧降下ペプチドに関する研究

氏名 中村 康則

食品蛋白に由来する機能性ペプチドが多く知られているが、中でも乳蛋白を原料とした報告は多く、機能性ペプチドの潜在性が高い素材と言える。乳蛋白の酵素分解物より見出された、生理機能の異なる、いくつものペプチドが報告されている。しかし、食品中から見出した例は少ない。乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* で発酵して出来る発酵乳を、自然発症高血圧ラット (SHR) へ経口投与すると、血圧を降下させることが報告されている。また、*L. helveticus* は、他の乳酸菌にくらべ蛋白分解活性が強く、多くのペプチド、アミノ酸を乳中に産生する。*L. helveticus* で調整した発酵乳には、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性が認められることから、ACE 阻害ペプチドの存在が推察された。しかし、これまでに、発酵乳から ACE 阻害ペプチドを見出し、さらに *in vivo* の効果、作用機序を検討し、発酵乳そのものがヒトにおいて実用性があるかどうかを評価した報告はない。

そこで、本研究では、まず第一に、*L. helveticus* 発酵乳中の ACE 阻害ペプチドの精製と同定を行った。さらに、特定したペプチドが血圧降下作用を発揮するか検討し、ペプチドがどのような機序により発酵中に生成されるのか検討した。第二に、*L. helveticus* 発酵乳の血圧降下作用を理論的に説明するために、発酵乳を摂取

した SHR ラットの組織 ACE 活性の変化を調べ、さらに、その変化が ACE 阻害ペプチドによるものか検討した。第三に、実用化できるものであるか否かを明らかにするため *L. helveticus* 発酵乳がヒトで効果を発揮するかどうか検討した。

ACE は、10 個のアミノ酸より成るアンジオテンシン I の C 末端 His-Leu を除去し、血圧上昇ペプチドであるアンジオテンシン II の生成を触媒するカルボキシジペプチダーゼである。生体の血圧調節において、昇圧に働くレニン・アンジオテンシン系に位置する酵素である。*L. helveticus* で乳を発酵する過程で、ACE 阻害活性は、対数増殖期後期から安定期にかけて顕著に上昇した。ACE 阻害活性を指標に、逆相系およびゲル濾過カラムを用いた 4 ステップの HPLC 操作により 2 種のピークを単離した。発酵乳中の ACE 阻害活性の大半が両ピークに起因し、2 つのピークから全体の 74.4% に相当する活性を回収した。ピーク I のアミノ酸組成は、Val が 1 に対し Pro2.03 であり、さらに配列分析の結果から、Val-Pro-Pro であることが判明した。同様に、ピーク II は、Ile-Pro-Pro と同定された。

SHR ラットに対して *L. helveticus* 発酵乳、VPP および IPP ペプチドを、それぞれ ACE 阻害活性で等しい量(ラット体重 1kg あたり発酵乳 5ml、VPP0.6mg、IPP0.3mg) を経口投与し血圧をモニターした結果、同程度に投与後数時間にわたり血圧降下を観察した (図 1)。

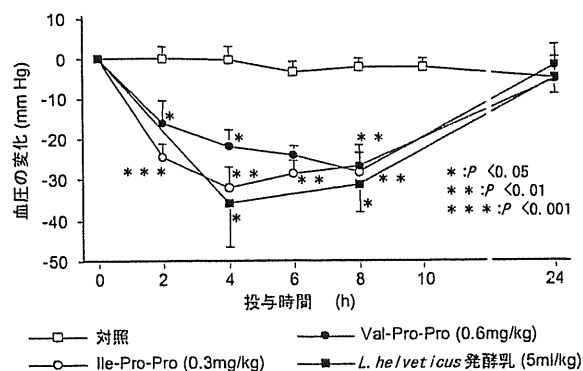


図 1. SHRラットへペプチドを経口投与した時の血圧変化

また、両ペプチドをラット体重 1kg あたり 5mg まで投与した時の血圧降下作用は、用量依存的であった。これらの結果から、VPP および IPP が、*L. helveticus* 発酵乳の血圧降下作用において重要な役割を担っていると考えられた。一方、体重あたり 10mg の VPP と IPP の混合物を、正常血圧を示す Wistar-Kyoto ラット (WKY ラット) に投与したが、血圧には影響を与えなかった。よって、VPP および IPP の血圧降下作用は、高血圧の状態に対して特異的に作用すると考えられた。

β カゼインのN末端側84-86番目にIPP、74-76番目にVPPが存在し、 κ カゼインのN末端側108-110番目にIPPが存在した。*L.helveticus*の細胞壁結合型プロテイナーゼは、 α および β カゼインを分解するが、 κ カゼインを分解しにくい酵素であることから、両ペプチドは、 β カゼインに由来すると考えられた。しかしながら、VPPとIPPは1:1で乳中に生成せず、常にVPPが多く、IPPは少なかった。*L.helveticus*の酵素系を解析した結果、細胞壁結合型プロテイナーゼの分解により生成するペプチド断片(f74-97)に、さらに未知のエンド型酵素、アミノペプチダーゼおよびX-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼが作用しVPP,IPPが生成すると推察された。また、ペプチド断片(f74-97)には、細胞壁結合型プロテイナーゼの切断点がもう1箇所あり、エンド型酵素が作用する前に切断を受けるとIPPまでの分解が進まなくなり、これによってIPP生成量は制限を受けていると考えられた。

ACEは、様々な組織の血管内皮細胞中に存在する。そこで、*L.helveticus*発酵乳をSHRラットに与え飼育し血圧が低下した23週齢に、組織ACE活性を測定した結果、大動脈ACE活性が有意に半減することが判明した(図2)。

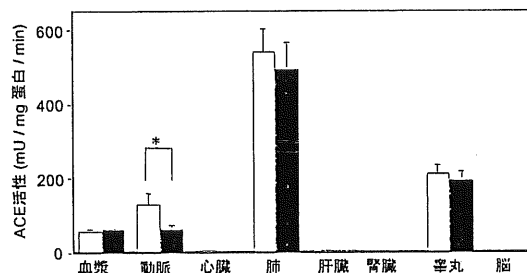


図2. *L.helveticus*発酵乳を投与したSHRラットの組織ACE活性

□ : 対照, ■ : *L.helveticus*発酵乳, * : $p < 0.05$

SHRラットとWKYラットの各組織ACE活性を比較すると、SHRラットの大動脈ACE活性が約10倍亢進しており、本部位のACE活性の阻害が、*L.helveticus*発酵乳の血圧降下作用に重要な役割を果たしていると考えられた。発酵乳を投与したSHRラットの腹部大動脈の抽出物から、数種類のカラムクロマトグラフィーを行い、2種類のピークを検出した。一方、同ラットの血清をはじめ他の組織からはピークを検出しなかった。アミノ酸組成および配列分析の結果、2種のピークは、Val-Pro-ProおよびIle-Pro-Proと同定された。一般にProを有するペプチドは、ペプチダーゼ等の酵素分解をうけにくい。低分子ペプチドは、アミノ酸や長めのオリゴペプチドに比べ小腸において、より吸収されやすいことが報告されている。

よって、経口摂取された VPP および IPP ペプチドは、消化酵素による分解をうけず、吸収され、インタクトな形で大動脈に到達し、ACE 活性を減少させたと考えられた。

これまでの結果より、ヒト高血圧患者が高血圧の予防・改善のために、*L. helveticus* 発酵乳を食生活に取り入れることは効果的であると考えられた。そこで、降圧剤を服用しない軽症および中等症高血圧者（収縮期血圧 140~179mmHg および拡張期血圧 90~109mmHg）32 名を対象として、*L. helveticus* 発酵乳を摂取した時における有用性を検討した。その結果、*L. helveticus* 発酵乳を摂取した群の収縮期血圧は、開始時に比べ摂取 2 週後に 10.3mmHg、摂取 4 週後には 12.5mmHg 降下し、摂取した 8 週後まで持続した（図 3）。一方、プラセボ群の収縮期血圧に大きな変化はみられず、摂取期間中の収縮期血圧において両群間に有意な差を認めた。拡張期血圧についても同様の傾向が観察された。

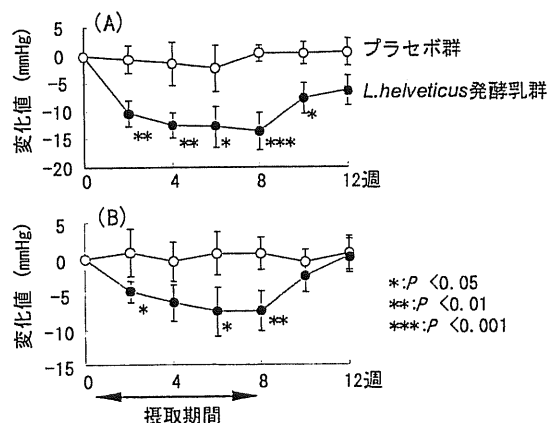


図 3. *L. helveticus* 発酵乳を摂取した軽症および中等症高血圧者の収縮期血圧 (A) および拡張期血圧 (B) の変化

以上、本研究をまとめると、*L. helveticus* 発酵乳中より 2 種の ACE 阻害ペプチド Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro を単離・同定し、両ペプチドが SHR ラットへの経口投与で血圧降下作用を示すことを明かにした。*L. helveticus* 発酵乳を摂取した SHR ラットの大動脈 ACE 活性が減少し血圧が降下することを明かにし、さらに同部位より Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro ペプチドを検出した。両ペプチドは、経口投与しても消化管内で消失することなく体内へ吸収され効果を発揮していると推察した。軽症および中等症高血圧者 32 名を対象とし、プラセボを対照としたダブルブラインド 2 群比較試験を実施した結果、*L. helveticus* 発酵乳を摂取した群では、収縮期および拡張期血圧に有意な降下を認め、*L. helveticus* 発酵乳が実用化できる食品であることを明かにした。