

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 李 乃元
学位授与の日付	平成19年2月20日
論文名	「Antihypertensive Activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolated from Transferrin Family Protein(トランスフェリンファミリータンパク質より単離したアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの血圧降下作用)」
論文審査委員	主査 中野 長久 副査 宮武 和孝 副査 乾 博 副査 榎本 俊樹(石川県立大学)

論文要旨

Hypertension is a risk factor for cardiovascular diseases, including coronary heart disease, peripheral arterial disease and stroke. Synthetic angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors like captopril and enalapril are effective to hypertension, but some adverse effects including dry cough, lost of taste, renal impairment, allergic reactions, skin rashes and angioneurotic oedema were observed. Therefore, development of safer ACE inhibitors has been an important research. In recent, there has been a trend toward development of natural ACE inhibitory peptides generated during hydrolysis of food protein.

Transferrin family protein (lactoferrin and ovotransferrin) are functional proteins exist in milk and egg white, and antimicrobial domain was isolated by peptic or tryptic hydrolysis, respectively. However, effect of transferrin family protein on ACE activity remained obscure. Therefore, we employed

bovine lactoferrin and hen ovotransferrin to purify new peptides using the enzymatic hydrolysis method and effects of new peptides on ACE activity and blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHRs) were investigated. Furthermore, ACE inhibitory peptide was investigated with preincubation method and serum analysis to characterize that peptide is a true ACE inhibitor or a pro-drug like inhibitory peptide.

ACE inhibitory peptides were isolated from transferrin family protein hydrolysate using enzymatic hydrolysis by high-performance liquid chromatography. The amino acid of the peptides was identified as LRPVAA (peptic hydrolysis of bovine lactoferrin) and KVREGTTY (chymotryptic hydrolysis of hen ovotransferrin), and both peptides produced a concentration-dependent inhibition of ACE activity *in vitro* with an IC₅₀ value of about 4.14 μM and 102.8 μM, respectively.

The antihypertensive activity of LRPVAA and KVREGTTY was investigated by SHRs, and the systolic blood pressure (SBP) of SHRs was measured by tail-cuff method. A dose-dependent reduction of SBP was observed by 13.2 % and 10.3 % due to the two peptides at 60 min and 40 min after injection, respectively. The antihypertensive action of LRPVAA exhibited throughout 120 min after injection, and the activity of KVREGTTY exhibited during 60 min after administration.

A HPLC analysis of KVREGTTY after the incubation with ACE showed that this peptide was totally converted by ACE into KVREGT and TY. After hydrolysis of KVREGTTY by ACE, the product (KVREGT) has an IC₅₀ value of 9.1 μM that was about 11-fold of the parent peptide (KVREGTTY). Thus, KVREGTTY can be considered as a pro-drug. Moreover, KVREGTTY and KVREGT were administered into SHRs to monitor the time-course change of

SBP. It was found that KVREGTTY produced the maximal reduction of SBP at 40 min later of injection. But, the maximal decrease of SBP by KVREGT was observed at 20 min later of injection. This 20 min delay might be considered as the time required for conversion of KVREGTTY into KVREGT that is the true ACE inhibitor.

Identification of LRPVAA and KVREGTTY in the blood of SHR_s was carried out chromatographically. Reduction of SBP coincides with the LRPVAA fractionated from serum drew from femoral vein of SHR_s, but KVREGTTY was not observed on HPLC. It means that LRPVAA reacted with ACE by the form of hexa-peptide, but the active form of KVREGTTY on lowering of blood pressure is a derivative of this peptide.

By transferrin family protein, peptic hydrolysis of bovine lactoferrin and chymotryptic hydrolysis of hen ovotransferrin may release ACE inhibitory peptides possessing antihypertensive activity in SHR_s. Thus, the ACE inhibitory peptides derived from lactoferrin and ovotransferrin hydrolysates would be useful for development of new antihypertensive agent and/or new ACE inhibitor. The result of this research would be importantly basic data required for practically clinic application in human subjects in the future.

審査結果の要旨

高血圧は多くの生活習慣病発症の原因疾患として社会問題化している。そして対症療法として一般に、高血圧原因因子である血圧上昇ホルモン、アンジオテンシンの過剰分泌を抑制するために、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害剤が用いられる。カプトプリルやエナラプリルのような代表的な合成降圧剤が広く用いられるが、これらの薬剤は血管浮腫、腎不全、発疹等のアレルギー症状、味覚異常、貧血、光線過敏症、食欲不振、倦怠感等の多くの副作用を示すことが観察されている。そこで、より安全な ACE 阻害剤の開発が早急

に必要であることが望まれている。また出来るならば天然物質の中から、そのような物質の発見が望まれる。すなわち、食品中タンパク質の体内での加水分解で生成するペプチドが ACE 阻害効果を示すならば最も温和に降圧効果を示すことが期待できる。

このような観点から、新しい血圧上昇抑制効果を示す ACE 阻害剤の開発とその生理機能について検討を加えて、以下のような研究成果をあげた。

ミルク中のラクトフェリンや卵白中の卵トランスフェリンに代表されるトランスフェリンファミリータンパク質はトリプシン処理により、抗菌性のペプチドを生成することが知られる機能性タンパク質である。しかしながら、ACE 阻害活性については未検討であり、牛乳ラクトフェリンと鶏卵白トランスフェリンのトリプシン処理により得られたペプチドについて、ACE 阻害活性を指標として検討を加えた。その結果、粗製品で高い ACE 阻害活性が認められ、これらの標品から、HPLC を駆使することにより、活性ペプチドを精製し、その構造を決定した。ラクトフェリンからはアミノ酸配列が LRPVAA、卵白トランスフェリンからは KVREGTTY の配列を持つペプチドが同定された。両ペプチドの ACE 阻害活性は濃度依存性を示し、LRPVAA は $4.14 \mu\text{M}$ 、KVREGTTY では $102.8 \mu\text{M}$ の IC₅₀ 値を示し、前者が強い活性であった。

そこで、これらのペプチドを用いて、高血圧易発症性ラット (SHR) に腹腔内投与し、時間を追って収縮期血圧を tail-cuff 法で測定した。LRPVAA は投与後 60 分で 13.2%の血圧上昇抑制が認められ、120 分まで持続した。一方、KVREGTTY は 40 分で 10.3%の抑制にとどまり、60 分まで持続した。

さらに、ACE 阻害活性では、阻害濃度において、LRPVAA と KVREGTTY には大きな相違があったが、ラットへの投与実験ではその効果の差異は小さくなった。そこで、KVREGTTY のアミノ酸配列の中に、ACE の作用部位があることを見出し、ACE と反応後、HPLC でその生成物の同定を試みた。その結果、KVREGT と TY の二つのペプチドが検出された。これらのペプチドの内、KVREGT に ACE 阻害活性が認められ、ACE 阻害の、IC₅₀ 濃度が $9.1 \mu\text{M}$ と、元の KVREGTTY の阻害活性より 11 倍高い活性を示した。このことは、多分生体に投与された時には、KVREGT というペプチドに変換されて効果を示すものと考えられる。

これらの結果から、一般的に広く利用されている、食品素材である牛乳や鶏卵の中のありふれたタンパク質のプロテアーゼ加水分解物であるオリゴペプチドが血圧上昇抑制効果、すなわち高血圧予防効果を示すことを初めて明らかにした。

以上の成果は、生化学、分子生物学、医学、酵素化学および栄養分子生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、学力確認の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。