

短報

大和マナのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性物質の探索

鷺田和人*・間島いつか*・西本登志・浅尾浩史・野本享資*

Search for Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE) Inhibitors from the Leaves of Yamato-mana (*Brassica rapa* L. Oleifera Group)

Kazuto WASHIDA*, Itsuka MASHIMA*, Toshi NISHIMOTO, Hiroshi ASAO, and Kyosuke NOMOTO*

Key Words: Yamato-mana (*Brassica rapa* L. Oleifera Group), Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE) inhibitor,

大和マナ (*Brassica rapa* L. Oleifera Group) は奈良県在来のツケナである。これまでにその機能性に関する研究は行われていなかったが、最近、大和マナ含有成分が抗炎症作用³⁾、脂質吸収抑制作用⁴⁾、抗肥満傾向⁵⁾を示すことが報告されている。さらに、大和マナは血圧の上昇に関わる酵素であるアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) を阻害する成分を含有すること、生育時期、部位、調理によってその阻害活性が変化することについても報告されている¹⁾。しかしながら、ACE 阻害活性物質については明らかになっていなかった。そこで、その活性成分の探索研究を行ったので、報告する。

材料および方法

供試材料

大和マナは F1 品種「夏なら菜」(ナント種苗)を五条市の露地圃場で栽培し、草丈約 30cm に達した 2009 年 10 月 19 日に収穫した。試料は水で洗浄後、水気をふき取り、直ちに -80 °C で急速冷凍し、凍結乾燥した後、粉末化した。この大和マナ凍結乾燥粉末 (FD) を実験に用いた。

試薬

HPLC には和光純薬製の HPLC 用蒸留水、メタノールおよびアセトニトリル (CH₃CN) を用いた。その他の試薬は和光純薬製の特級のものを使用した。

ACE 阻害活性の測定

ACE kit-WST (同仁化学研究所) を用いて、付属のマニュアルに従い、大和マナ抽出物およびその精製画分の ACE 阻害活性を測定した。ACE kit-WST は、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) により

3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly (3HB-GGG) から生成する 3-Hydroxybutyric acid (3HB) を酵素法により検出する方法である。マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社) を用い、450 nm の吸光度を測定して、ACE 阻害率を評価した。また、精製を進めるときには、それぞれの画分 0.1 mg/ml (最終濃度: 7.7 μg/ml) を添加したときの ACE 阻害率で活性の強度を判断した。

機器

¹H-NMR は Bruker BioSpin GmbH 社製の DMX-500 (500 MHz) で測定した。ESI-MS は Waters 社製の ACQUITY UPLC System を連結させた Waters 社製の LCT premier XE のポジティブモードで測定した。

結果および考察

大和マナ水抽出液の ACE 阻害活性

大和マナ FD100 g に蒸留水 3 l を加え、インキュベーターシェーカー (バーンステッド社) で 30 °C, 160 rpm で一晩攪拌・抽出し、この抽出液を遠心分離後、ろ過した。得られたろ液を段階的に希釈し、試料溶液とした。これを ACE kit-WST を用いて ACE 阻害活性試験を行った結果、大和マナ水抽出物 0.1 mg/ml の ACE 阻害率は 6% であった。

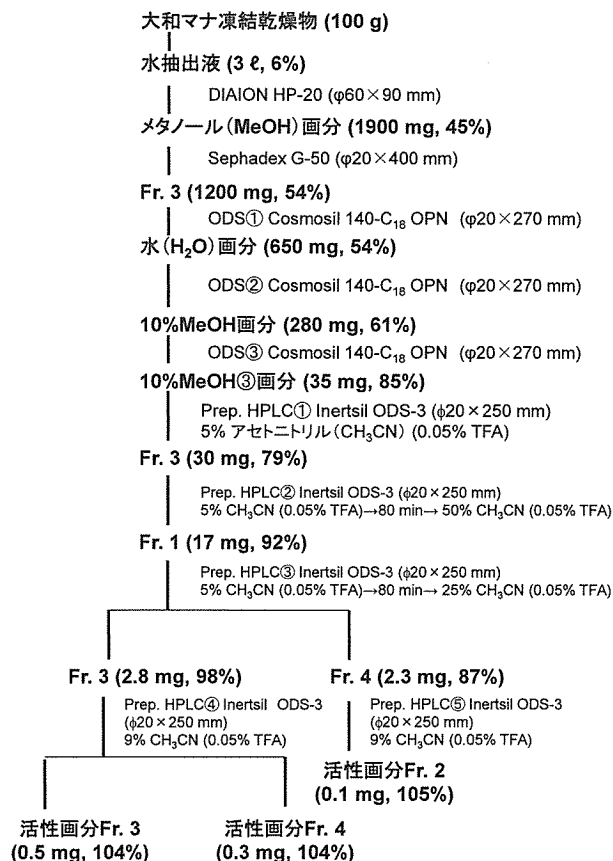
ACE 阻害活性物質の精製

精製は第 1 図のように行った。上述の大和マナ水抽出液 (3 l) をダイヤイオン HP-20 カラムに供し、水 (H₂O) 画分 (重量: 36100 mg, ACE 阻害率: 7%) とメタノール (MeOH) 画分 (1900 mg, 45%) に分画した。

得られた HP-20-MeOH 画分 (1800 mg) を Sephadex G-50 カラム (H₂O) に供し、Fr. 1 (147 mg, 2%),

* 財団法人奈良県中小企業支援センター

この研究は JST の奈良県地域結集型研究開発プログラムのもとで実施した。



第1図 大和マナからACE阻害活性物質の精製 (重量, ACE阻害活性)
Fig. 1. Purification of ACE inhibitor from Yamato-mana (weight, ACE inhibitory activity)

Fr. 2 (166 mg, 20%), Fr. 3 (1285 mg, 54%), Fr. 4 (80 mg, 39%), Fr. 5 (84 mg, 30%) に分画した。

最も活性の高い G-50-Fr. 3 (1200 mg) を ODS カラムで分画し, H₂O 画分 (670 mg, 54%), 20%MeOH 画分 (293 mg, 42%), 40%MeOH 画分 (104 mg, 33%), 60%MeOH 画分 (110 mg, 40%), 100%MeOH 画分 (46 mg, 18%) に分離した。

最も活性の高い ODS①-H₂O 画分 (650 mg) をもう一度 ODS カラムで, H₂O①画分 (4 mg, 25%), H₂O②画分 (109 mg, 23%), H₂O③画分 (30 mg, 57%), H₂O④画分 (50 mg, 36%), 10%MeOH 画分 (289 mg, 61%), 100%MeOH 画分 (170 mg, 56%) に分画した。

最も活性の高い ODS②-10%MeOH 画分 (280 mg) を再度 ODS カラムで分画し, H₂O 画分 (3 mg, 23%), 5%MeOH 画分 (74 mg, 32%), 10%MeOH①画分 (55 mg, 43%), 10%MeOH②画分 (74 mg, 42%), 10%MeOH③画分 (36 mg, 85%), 10%MeOH④画分 (13 mg, 83%), 100%MeOH 画分 (15 mg, 90%) に分画した。

活性が高く重量の多かった ODS③-10%MeOH③画分 (35 mg) を分取 HPLC (10 ml/min, UV 254 nm) で 3

画分に分取した。

最も活性の高い HPLC①-Fr. 3 (30 mg, 79%) を分取 HPLC (10 ml/min, UV 254 nm) で 6 画分に分取した。

最も活性の高い HPLC②-Fr. 1 (17 mg, 92%) を分取 HPLC (10 ml/min, UV 254 nm) で 12 画分に分取した。

活性の高い HPLC③-Fr. 3 (2.8 mg, 98%) を分取 HPLC (10 ml/min, UV 254 nm) で 5 画分に分画し, 活性画分 Fr. 3 (0.5 mg, 104%), 活性画分 Fr. 4 (0.30 mg, 104%) を得た。同様に, 活性の高い HPLC③-Fr. 4 (2.3 mg, 87%) を分取 HPLC (10 ml/min, UV 254 nm) で 4 画分に分画し, 活性画分 Fr. 2 (0.1 mg, 105%) を得た。

活性画分の構造解析

活性画分 Fr. 2, 3, 4 の構造解析を行った。まず, それぞれについて, ¹H-NMR スペクトルを測定したが, 測定溶媒由来のシグナル以外は観測されなかった。一方, ESI-MS においては, これら 3 つの活性画分中の主要な化合物と推測される物質の分子量が観測された。分子量は, 3 つの画分に共通であり, 分子量 325 に相当する *m/z* 326 (M+H)⁺ にイオンピークが観測された。このことから, これら 3 つの活性画分の主要な化合物は共通であり, 分子量 325 の低分子化合物であることが推測された。

まとめ

大和マナの ACE 阻害活性物質の探索を行った。その結果, 非常に強力な活性を示す 3 つの画分を得ることができた。しかし, これらの画分の重量が微量であったために, 活性物質の単離には至らなかった。これらの画分それぞれについて, ¹H-NMR を測定したところ, シグナルはほとんど観測できなかった。しかしながら, ESI-MS では, これらの画分の主要な化合物の分子量に対応すると予測されるイオンピークが観測された。これら 3 つの画分から得られるマススペクトルの主要なイオンピークは同じであり, 主要成分は同じであると考えられた。これらのことから, 3 つの活性画分中の活性物質は, 共通であり, 極微量に存在する低分子化合物であると推定される。アブラナ科植物の ACE 阻害活性物質としてはブロッコリーからトリペプチドが単離されている²⁾。大和マナの活性物質もトリペプチドである可能性がある。今後は, 活性物質を単離し, その構造と活性を明ら

かにする予定である。

引用文献

1. 浅尾浩史・西本登志・間島いつか・奥田まみ子・鷲田和人・野本享資. ‘大和マナ’ の様々な生育時期, 部位および調理法におけるアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性と糖含量. 園芸学研究. 投稿中.
2. Lee, J-E., I. Y. Bae, H. G. Lee and C-B. Yang. 2006. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). Food Chem. 99: 143-148.
3. Murakami, A., Song, M. and Ohigashi, H. 2007. Phenethyl isothiocyanate suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis by blocking activation of ERK1/2 and p38 MAPK in RAW264.7 macrophages. Biofactors. 30: 1-11.
4. Washida, K., Miyata, M., Koyama, T., Yazawa, K. and Nomoto, K. 2010. Suppressive effect of yamato-mana (*Brassica rapa* L. Oleifera Group) constituent 3-butenyl glucosinolate (gluconapin) on postprandial hypertriglyceridemia in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74 (6): 1286-1289.
5. 鷲田和人・宮田光義・小山智之・矢澤一良・西本登志・浅尾浩史・野本享資. 2011. 大和マナに含まれる 3-ブテニルグルコシノレートおよびフェネチルグルコシノレートの食餌誘導性肥満モデルマウスでの効果. 奈良農総セ研報. 42:34-37.