

アコヤガイ貝肉アルカリプロテアーゼ分解物の降圧効果と アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの単離・同定

片野 静次,¹ 沖 智之,² 松尾由佳,³ 義平 邦利,⁴
奈良 安雄,¹ 三木 知博,⁵ 松井 利郎,² 松本 清²

(2002 年 12 月 9 日受付, 2003 年 6 月 4 日受理)

¹東亜大学大学院生命科学科, ²九州大学大学院生物資源環境科学研究科,

³カタノ物産株式会社, ⁴東亜大学大学院食品科学科,

⁵WHO 循環器疾患予防国際共同研究センター

Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of the pearl oyster
Pinctada fucata martencii & separation and identification of angiotensin-I
converting enzyme inhibitory peptides

SEIJI KATANO,^{1*} TOMOYUKI OKI,² YUKA MATSUO,³ KUNITOSHI YOSHIHIRA,⁴
YASUO NARA,¹ TOMOHIRO MIKI,⁵ TOSHIRO MATSUI² AND KIYOSHI MATSUMOTO²

¹Graduate School of life science and technology, University of East Asia Simonoseki, Yamaguchi 751-8503, ²Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School Kyushu University, Fukuoka 812-8581, ³Katano bussan Co.Ltd, Simonoseki, Yamaguchi 751-0816, ⁴Graduate School of food science, University of East Asia, Simonoseki, Yamaguchi 751-8503, ⁵WHO Collaborating Center for Research on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Sakyo, Kyoto 606-8413, Japan

We hydrolyzed pearl oyster meat with alkaline protease treatment. We administered orally hydrolysate of pearl oyster meat to 8 week-old male SHR/Izm. As a result, the systolic blood pressure of SHR fell significantly from our last quotation of 202.4 mmHg to 180.0 mmHg in six hours. We controlled, isolated and identified four kinds of physiologically active peptides with low molecular weight and high level of ACE inhibition, and refined and identified them as Phe-Tyr, Ala-Trp, Val-Trp, and Gly-Trp with reversed phase chromatography. Among them, Ala-Trp was new and naturally occurring peptide. We estimated that the percentage contributing to ACE inhibition by those four peptides is 4.5%. Based on the study, we believe that promote pearl oyster meat as nutritious and functional food reduces blood pressure.

キーワード：アコヤガイ, 酵素分解, ペプチド, 血圧降下, SHR, Ala-Trp, アンジオテンシン I 変換酵素

養殖アコヤガイは、真珠採取後、貝柱を除いて貝肉のほとんどが廃棄され海洋汚染の要因にもなっている。しかし、アコヤガイ *Pinctada fucata martencii*, 貝肉の生理活性物質の存在を確認し、その活性が有効に利用できれば、新たな機能性食素材としての価値が見出される。アコヤガイ酵素分解物についての研究は、平滑筋収縮活性を有する酸性ペプチドの存在確認¹⁾や貝肉からのタウリン抽出試験の基礎研究、²⁾しよつる風味の調味液開発、³⁾ Zn ペプチド粉末開発⁴⁾など調味料としての開発研

究がある。一方、他の魚介類では、イワシ筋肉、ヒジキタンパク質ペプシン消化物、スルメイカ肝臓ならびに遡上シロサケ筋肉由来アルカリプロテアーゼ分解物からの ACE 阻害ペプチドの分離精製⁵⁻⁷⁾などが行われている。また、イワシタンパク質由来サーデンペプチドによるヒトの血圧の降圧作用⁸⁾などが報告されている。魚介類以外の食品分野でも乳清タンパク質のアルカリプロテアーゼ分解物による血圧上昇抑制効果⁹⁾などが報告されている。

* Tel : 81-832-32-3721. Fax : 81-832-22-3711. Email : BZZ20553@nifty.ne.jp

本研究では、アコヤガイ貝肉タンパク質をアルカリプロテアーゼ分解し、その分解液による血圧降下作用を高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) を用いて調べ、濃度の違いによる降圧効果を確認した。分解液の低分子溶出画分側から ACE 阻害活性の高い画分を得たので、これを逆相クロマトグラフィーに供し、ACE 阻害活性の高い生理活性ペプチドを Ala-Trp を含めて 4 種類分離精製し同定した。さらにこれらのペプチドの ACE 阻害への寄与率を調べ、機能性食素材としての可能性を検討したので報告をする。

試料および方法

酵素分解液の作製 愛媛県宇和島産アコヤガイの真珠採取後の貝肉 850 g に、3.4 L の脱イオン水を加え、20～30℃ で 10 分間攪拌して洗浄した。30 mesh のふるいで水きり後の肉質重量に対し等量の脱イオン水を加え、0.5% のクエン酸溶液を加えて pH 4.0±0.5 とした。次に、120℃ で 2 時間加圧ボイルし 50℃ まで冷却した後、セルラーゼ (セルレーズナガセ、比活性、ナガセ生化学工業) を 8.5 g 加えて、50℃ で 3.5 時間反応させた。さらにアンモニア水を加えて pH 10.0±0.5 に調整し、8.5 g のアルカリプロテアーゼ (Novo, アルカラーゼ 2.4 L) を加え、50℃ で 17.5 時間、アルカリプロテアーゼ分解を行った。反応後、100℃ で 15 分加熱し、酵素を失活させた。これを 200 mesh のふるいでスクリーニングした後、3000 rpm で 10 分間遠心し常圧で濃縮し、さらに上清を 3000 rpm で 10 分間遠心した。この上清を酵素分解液 (P-1) とした。

血圧への影響 上記酵素分解液 (P-1) の in vivo で血圧上昇抑制効果を測定するため、8 週令の雄性高血圧自然発症ラット (SHR/Izm, SHR 等疾患モデル共同研究会) に体重 1 kg 当り 400 mg, 1000 mg の P-1 水溶液を金属製ゾンデにより経口投与した。400 mg/kg 投与群は 4 匹、1000 mg/kg 投与群は 5 匹を 1 群とした。血圧測定は、SHR を 1 匹ずつ 37℃ に保温した固定器に入れ 5 分間保温後、非観血式血圧測定装置 (UR5000, ウエダ) を用いて投与前 (前値) と投与後 2, 6 および 24 時間の尾動脈圧 (SBP) を測定した。測定はそれぞれ連続 5 回行い、収縮期血圧 (SBP), 平均血圧 (MBP), 拡張期血圧 (DBP), 心拍数について、得られた測定値の最高最低値を除き 3 回の平均値を求めた。収縮期血圧の投与前 (前値), 投与後 2 および 6 時間における、5 匹の平均値±標準誤差を示した。Tukey-Kramer の HDS 検定 ($P<0.05$) を使い、投与前 (前値), 投与後 2 および 6 時間における 5 匹の平均値を比較した。

アルカリプロテアーゼ加水分解物の分離 Sep-Pak® Vac カートリッジ (12 cc, Waters 社製) に 99.5% エタ

ノール (和光純薬工業) を 10 mL 流し、さらに超純水を 10 mL 流して平衡化を行った。これに P-1 を 1 mL 通し、超純水 10 mL で洗浄して F-0 を得た。次に 10, 25, 50, 99.5% のエタノール各 10 mL による溶出を行い F-1～F-4 を得た。これらを 50℃ で減圧濃縮してエタノールを除去し凍結乾燥した。

次に ACE 阻害ペプチド精製のため、ACE 阻害活性の高かった F-1 および F-2 の 0.1 mg/mL 溶液 500 μ L を Sephadex G-15 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を充填したカラム (ϕ 1.6 cm×45 cm) に負荷し、50 mM の NaH_2PO_4 で pH7.4 に調整した 150 mM の NaCl 溶液で溶出した。各画分について 220 nm での吸光度を測定した。

さらに高分子側溶出画分の ACE 阻害活性測定のため、F-1 についてピークを 4 つに分け、F-2 についてはピークを 3 つに分け、各ピークに相当する画分を再度 Sep-Pak® Vac カートリッジに吸着させた。F-1 は 10%, F-2 は 25% エタノールで再溶出して緩衝液を置換し 50℃ で減圧濃縮して凍結乾燥し精製粉末を得た。

アルカリプロテアーゼ加水分解物の ACE 阻害活性 被検溶液 25 μ L に対して 25 mU/mL の ACE (ウサギ肺由来, Sigma 社製) 溶液を 50 μ L 添加し、37℃ で 5 分間インキュベートした後、12.5 mM の基質 Hip-His-Leu (HHL) 溶液を 50 μ L 添加し 37℃ で 1 時間反応させた。0.5M 塩酸 (125 μ L) による反応停止後、生成した馬尿酸を Lieberman の測定法を改変した山本らの方法¹⁰⁾ に準じて測定した。すなわち、反応後の溶液に対して酢酸エチル (750 μ L) を添加し 2000 rpm で 10 分間の遠心分離後、酢酸エチル層を 250 μ L 分取、減圧乾固を行った。次に、1 M 塩化ナトリウム 750 μ L に再溶解させ、15 秒間攪拌ののち 228 nm での吸光度を測定した。ACE 阻害活性は検体溶液の吸光度を AS, 検体溶液の代わりに水を加えた時の吸光度を AC, 水にあらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光度を AB, として以下の式から ACE 阻害率を求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = \{(AC - AS) / (AC - AB)\} \times 100$$

なお、阻害率が 50% を示したときの酵素反応時における検体濃度を IC_{50} 値と定義し、これを ACE 阻害活性の尺度とした。タンパク質量はケルダール法で得られた窒素量に係数 6.25 を乗じて求めた。

ACE 阻害ペプチドの単離と同定 ACE 阻害ペプチドを単離するため、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC; 島津 LC-9A) による分離を行った。カラムはナカライテスク社製 COSMOSIL 5C18-AR 及び 5 Ph (ϕ 4.6 mm×250 mm) を使用した。溶離液として 0.1% トリフルオロ酢酸含有、5-36% アセトニトリル (60 分, リニアグラジエント) 及び 5-19% アセトニトリル (50 分, リニアグラジエント) を用いた (流速;

0.4 mL/min (COSMOSIL5C₁₈-AR) 及び, 0.3 mL/min (COSMOSIL 5Ph)。検出器は, 島津紫外可視検出器 SPD-6AV を用い, 検出波長 220 nm で検出した。

アミノ酸組成分析は, 単離物を 1.0% フェノールを含む 6M 塩酸によって 150℃ で 1.5 時間加水分解後, *N*-hydroxysuccinimidyl-6-amino-quinoliny-carbamate (AQC) を用いて誘導体化し, HPLC に供することにより行った (AccQ・Tag 法, Waters 社)。アミノ酸配列はプロテインシーケンサー (島津 PPSQ-21) を用いて決定した。

単離 ACE 阻害ペプチドの定量と阻害寄与率の測定
単離した 4 種類の ACE 阻害ペプチドの定量を目的として, 合成ペプチド (Phe-Trp, Ala-Trp, Val-Trp および Gly-Trp) を購入した (国産化学株式会社)。先に示した F-1 を用いて, COSMOSIL 5Ph を用いた逆相 HPLC で, 4 種類の合成ペプチドの保持時間に対応した画分を分取した。分取は合成ペプチドの保持時間前後の 1 分間行った。Gly-Trp および Ala-Trp は分離が認められなかったことから同一画分とした。分取時間は, Gly-Trp, Ala-Trp 含有画分 (F1-1); 20.6 分~22.6 分, Phe-Trp 含有画分 (F1-2); 25.7 分~27.7 分, Val-Trp 含有画分 (F1-3); 29.6 分~31.6 分であった。次に得られた各画分を COSMOSIL 5C₁₈-AR II カラムを用いた逆相 HPLC に供した。ピークの確認をプロテインシーケンサー (島津 PPSQ-21) によって行った。各ジペプチドの定量は, 合成ペプチドで得られたピーク高さから作成した検量線を用いて行った。さらに F-1 の各ジペプチド ACE 阻害寄与率を以下の式によって算出した。

$$\text{寄与率}(\%) = \left\{ \frac{\text{ペプチド含有量}}{\text{ペプチドの IC}_{50}} \right\} / \left\{ \frac{100 \text{ g/F1 画分の IC}_{50}}{100} \right\} \times 100$$

次に, 酵素分解液 (P-1) の各ジペプチド ACE 阻害寄与率を, P-1 に対する F-1 の収率と P-1 の IC₅₀ 値から, 以下の式によって算出した。

$$\text{寄与率}(\%) = \left\{ \frac{\text{ペプチド含有量}}{\text{ペプチドの IC}_{50}} \right\} / \left\{ \frac{100 \text{ g/P1 画分の IC}_{50}}{100} \right\} \times 100$$

ペプチド含有量; (mg/100 g-F1 画分) × 0.231 (P1 に対する F1 の収率), F-1 画分の IC₅₀: 0.057 mg/mL, P-1 画分の IC₅₀: 0.15 mg/mL。

結 果

血圧降下作用 SHR の拡張期血圧測定は一般的に不安定であるため, 収縮期血圧を用いて降圧効果を比較した。400 mg/kg の濃度で P-1 を投与して降圧効果を測定した SHR 4 匹のうち 3 匹では投与後コントロール値としての前値に対して 2 時間, 6 時間後に明らかに降圧効果が認められたが, 1 匹には認められなかった。次に 1000 mg/kg の濃度で 5 匹 1 群の降圧効果を測定したと

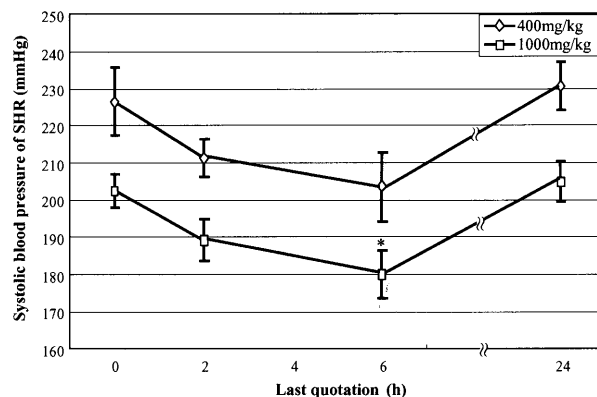


Fig. 1 Effect of oral administration of P-1 on the systolic blood pressure of SHR.

ころ 2 時間後にすべての SHR において血圧が低下した (5 匹平均 13.2 mmHg)。6 時間後に最低値を示した (5 匹平均 22.4 mmHg)。Tukey-Kramer の HSD 検定を行った結果, 有意差があり 1000 mg/kg の濃度では明らかに降圧効果が認められた (Fig. 1)。

ACE 阻害活性 F-0 は阻害活性が非常に弱く (0.15 mg/mL), F-1, F-2 および F-3 は, P-1 よりも約 2 倍強い ACE 阻害活性が認められた。F-4 では阻害活性がみられなかった。F-1 および F-2 の 220 nm での吸光度は分画番号 30 まではほぼ同じパターンを示した (Fig. 2)。ACE 阻害活性を測定したところ, F-1 および F-2 の高分子側溶出画分すべてのピークにほとんど阻害活性はみられなかった (>2 mg/mL 濃度)。この結果をもとに, 阻害活性が一番強かった F-1 の低分子側溶出画分について, 各ピーク毎に詳しく調べたところ, 特に分画番号 39 および 43 の画分で高い吸光度と強い阻害活性がみられた (Fig. 3)。

ACE 阻害ペプチドの構造 分画番号 39 および 43 の画分を逆相クロマトグラフィーにかけると, 分画番号 39 では A-a, b, c, d の 4 本のピークが認められた。さらに COSMOSIL 5Ph で精製し, A-a1, b1, c1, d1 を単離した。分画番号 43 では, B-a, b, c の 3 本が得られた。さらに COSMOSIL 5Ph で精製すると, B-a1, b1, c1 の 3 本を単離できた。各ピークによる ACE 阻害活性は, A-b1 (阻害率: 47.8%), A-c1 (42.2%), A-d1 (58.5%), B-b1 (40.9%) および B-c1 (17.2%) に認められた。それらをアミノ酸シーケンサーで分析したところ, A-b1, A-c1, A-d1 および B-c1 はそれぞれジペプチド Phe-Trp, Ala-Trp, Val-Trp および Gly-Trp であった (Table 1)。B-b1 はアミノ酸シーケンサー分析によって構造が決定されなかったことから, ペプチド以外の物質であることが示唆された。

ACE 阻害ペプチドの定量と寄与率の算出 ジペプチ

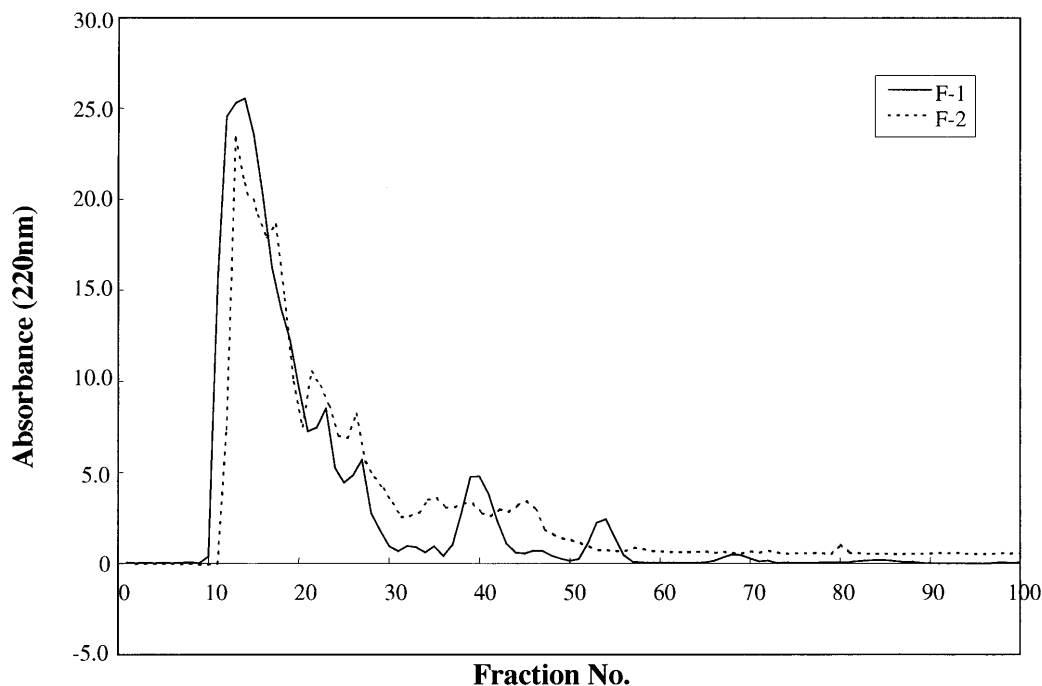


Fig. 2 Chromatogram with Sephadex G-15 column of active fraction (F-1, F-2). Column, Sephadex G-15 (1.6 cm × 45 cm); Eluent, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.4), 150 mM NaCl; F-1, eluted with 10% ethanol; F-2, eluted with 25% ethanol.

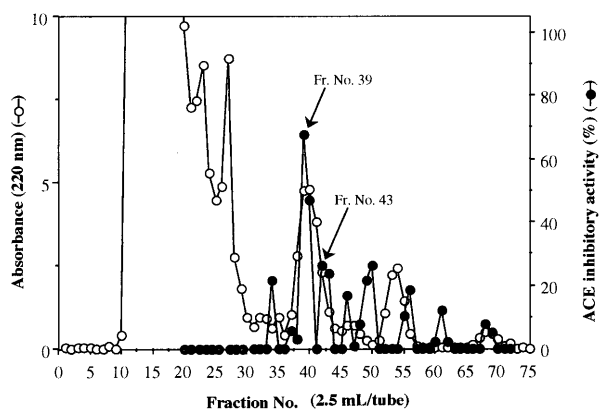


Fig. 3 Separation with Sephadex G-15 (F-1). Column, Sephadex G-15 (1.6 cm × 45 cm); Eluent, 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.4) + 150 mM NaCl; flow rate, 6.0 mL/h.

ドの量は、ピークの高さから求めると F-1 画分 100 g に対して Gly-Trp, Ala-Trp (Fig. 4), Phe-Tyr および Val-Trp がそれぞれ 16.4 mg, 159 mg, 30.0 mg および 20.4 mg であった。ACE 阻害活性 (IC_{50} : $\mu\text{M}/\text{mL}$) は Gly-Trp (44 μM), Phe-Tyr (14 μM), Ala-Trp (9.5 μM), Val-Trp (1.1 μM) の順に高くなった。F-1 画分による ACE 阻害に対する各ペプチドの寄与率は、Gly-Trp, Ala-Trp, Phe-Tyr および Val-Trp でそれぞれ 0.078%, 3.5%, 0.37%, 3.5% であり、Ala-Trp, Val-Trp の寄与率がもっとも大きかった。4 ペプチドの合計寄与率は

Table 1 ACE inhibitory peptides in alkaline hydrolysate with Srp-pak Vac column

Fraction	Amino acid sequence	Amino acid in acid hydrolysate	IC_{50} (μM)
A-b1	Phe-Tyr ¹⁴)	Tyr 1.0, Phe 1.12	14.0
A-c1	Ala-Trp ¹⁷)	Ala 1.0, Trp-	9.5
A-d1	Val-Trp ^{15,17})	Val 1.0, Trp-	1.1
B-c1	Gly-Trp ^{16,17})	Gly 1.0, Trp-	44.0

7.4% であった (Table 2)。また、酵素分解液 (P-1) に対する F-1 の収率は 23.1% であった。P-1 の各ペプチドの寄与率は、それぞれ Gly-Trp (0.05%), Ala-Trp (2.12%), Phe-Trp (0.23%), Val-Trp (2.14%) であり、P-1 画分による ACE 阻害に対する各ペプチドの合計寄与率は 4.5% であった。(寄与率はアコヤガイペプチド量を、その IC_{50} 値で除した値に対する、アコヤガイペプチド中に含有する各ジペプチド量をその IC_{50} 値で除した値の相対比と定義する。)

考 察

日本人の主要死因は悪性新生物、心臓疾患、脳血管疾患が三大要因である。また高血圧症罹病率をみると男女とも 60 歳以上では 62% 以上の人が、WHO/ISH ガイドラインによる高血圧または境界域高血圧となっている。高血圧症により脳・心血管系疾患や腎不全などの発症が助長されるため、これらの疾患を予防することが求

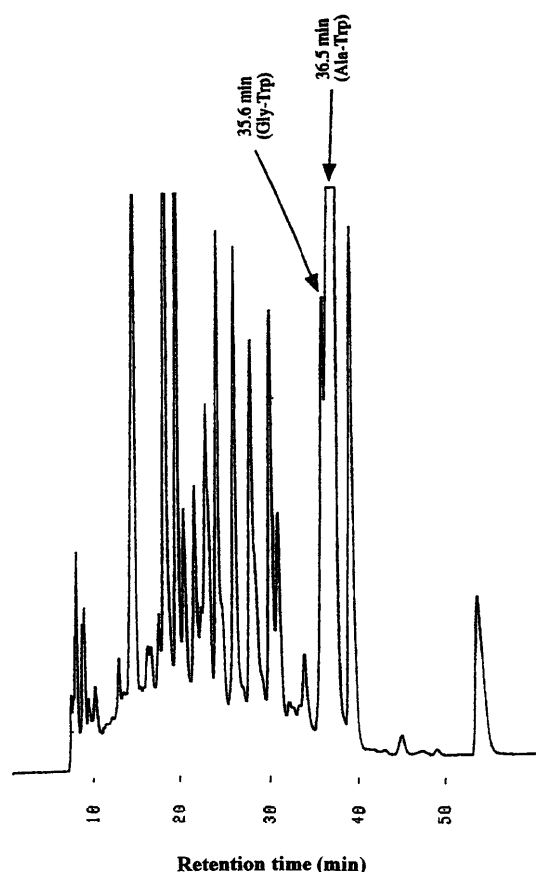


Fig. 4 Separation by reversed phase chromatography in fraction F1-1. Column, Cosmosil 5C₁₈-ARII (φ4.6 mm×250 mm); Solvent system, 12.5% CH₃CN in 0.1 % TFA; Flow rate, 0.4 mL/min; monitoring absorbance, 220 nm.

Table 2 Content and inhibitory activity of ACE inhibitory peptides in F-1 Fraction

peptides	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (mg/mL)	Content (mg/100 g)	Contribution of Inhibitory activity (%)	
				F-1	P-1
Gly-Trp	44.0	1.2×10^{-2}	16.4	0.078	0.05
Ala-Trp	9.5	2.6×10^{-3}	159.0	3.5	2.12
pha-Tyr	14.0	4.6×10^{-3}	30.0	0.37	0.23
Val-Trp	1.1	3.3×10^{-4}	20.4	3.5	2.14
Total			225.8	7.448	4.54

められている。¹¹⁾ 高血圧は発症原因が特定される二次性高血圧症と原因不明の一次性高血圧症(本態性高血圧症)とに分けられるが、約 90% が一次性高血圧症とされている。その昇圧要因にレニン・アンジオテンシン系(R-A系)がある。ACEを阻害することでこのR-A系を制御して降圧効果を得ようとさまざまな研究がなされてきた。食品タンパク質由来生理活性ペプチドのACE阻

害による降圧作用に注目して、機能性食品素材として生理活性ペプチドを活用する研究が進められている。杉山らはいわし魚粉のアルカリプロテアーゼ分解物を SHR に 2.0 g/kg 単回経口投与して、6 時間後において約 10 mmHg の血圧降下作用の持続が認められたことを報告している。¹²⁾ 松井らはいわしすり身のアルカリプロテアーゼ分解物を SHR に 20, 40, 80, 200 mg 急性投与試験を行い投与量に依存して血圧降下作用を認めている。⁸⁾ また、関らはいわしタンパク質由来の精製したペプチド Val-Tyr の単回経口投与試験において、1 mg/kg の投与で 8 時間以上の降圧効果を認めている。¹³⁾

本実験では、ヒトの本態性高血圧症のモデル動物である SHR/Izm を用いてアコヤガイ貝肉アルカリプロテアーゼ分解物(P-1)による in vivo での経口投与試験を行ない降圧効果の確認をした。P-1 の投与量を上記の試験結果から 400 mg/kg, 1000 mg/kg としたところ 400 mg/kg を投与した 4 匹のうち 3 匹に降圧効果があったが 1 匹には効果が認められなかった。1000 mg/kg の濃度では、投与 2 時間後 5 匹すべて低下、投与 6 時間後に 5 匹平均で 22.4 mmHg 低下し明らかな降圧効果があった。また、降圧効果は投与量に依存することが示された。

降圧効果の確認後、精製した F-1 のピークを単離して同定をしたところ 4 つのジペプチド Gly-Trp, Ala-Trp, Phe-Tyr および Val-Trp が検出された。このうち、Gly-Trp, Phe-Tyr および Val-Trp は α-カゼイン由来、¹⁴⁾ 酒粕由来¹⁵⁾ およびイワシ由来ジペプチド¹⁶⁾ などにも認められている。また、合成ペプチドによる効果作用も調べられている。¹⁷⁾ Ala-Trp については、ヒト血清アルブミン由来の報告¹⁸⁾ があるが、著者はこれより先に報告しており、^{19,20)} 新規の天然由来ジペプチドであった。Ala-Trp の含有量は 159 mg/100 g F-1 画分と最も多く、阻害活性が IC₅₀ 9.5 μM と高いため F-1 での阻害寄与率が 3.5% と高かった。同じく 3.5% だった Val-Trp と合わせて 7% の阻害寄与率であり、アコヤガイ貝肉の降圧効果は、主に Ala-Trp, Val-Trp に依存する効果であることが示唆された。F-1 の各ペプチドの合計阻害寄与率は 7.4% であった。本実験で SHR に投与した P-1 の各ジペプチドの合計阻害寄与率は、P-1 に対する F-1 の収率から、4.5% と見積もられた。

F1 において、ピーク面積の大半を占める高分子側溶出画分(10~30)にはほとんど ACE 阻害活性は見られず(>2 mg/mL 濃度)、ピーク面積の小さい低分子側溶出画分に強い ACE 阻害活性を示す物質が見られた。このことから低分子側溶出画分の阻害寄与率は見かけ上低い、実際の寄与率は見かけよりも高いことがわかった。また、一般にジペプチドは消化耐性が強く、中でも N 末端に Val を持つジペプチドの消化耐性は強いこと

が知られており,²¹⁾ Val-Trp の降下効果への寄与が示唆された。

4 つのジペプチドの寄与率が実際には見かけよりも高いことから, 分解液 P-1 または精製した F-1 を利用することによって真珠採取後廃棄されているアコヤガイ貝肉から血圧降下作用をもつ機能性食品の製造が可能だと考えられる。また F-1 の収率 (23.1%) からみても精製効率が良く, 精製した機能性食品の製造も容易であると考えられる。

実際の食品製造過程では, ジペプチドの味やにおいなど呈味性に課題が考えられるが, これらの各ペプチドを含有した食品の, 調味料配合と希釈度合等による呈味性の改良が進められており, 味の面からも食品として製造の可能性があると思われる。

文 献

- 1) 前田正道. 未利用アコヤガイの有効利用に関する研究. アコヤガイ閉殻筋中の天然ペプチドの探索. 長崎県工業技術センター研究文献. 1993; **17**: 130-133.
- 2) 滝本真一. アコヤガイ肉のタウリンについて. 愛媛水試研報. 1986; **4**: 14-19.
- 3) 前田正道. アコヤガイ肉発酵調味液の製造試験. 長崎県工業技術センター研究文献. 1992; **12**: 129-130.
- 4) 松下 至. 真珠貝残さの有効利用技術開発. Food & Development, 1996; **Z1786A**: 0911-3932.
- 5) Matsui S, Matufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993; **57**: 922-925.
- 6) 末綱邦男. ヒジキタンパク質ペプシン消化物のアンジオテンシン 1 変換酵素阻害ペプチドの分離と同定. 日本誌 1998; **64**: 862-866.
- 7) 小野世吾, 細川雅史, 井上 明, 山田大介, 高橋是太郎. スルメイカ肝臓ならびに遡上シロサケのプロテアーゼ加水分解によるアンジオテンシン 1 変換酵素阻害ペプチドへの変換. 日本誌 2002; **68**: 192-196.
- 8) 松井利郎, 川崎晃一. 食品タンパク由来機能性ペプチドによる血圧降下作用. 栄食誌 2000; **53**: 77-85.
- 9) 江藤義春, 伊藤友美, 西岡茂子. 乳清タンパク質のアルカリプロテアーゼ分解物による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制効果. 栄食誌 1999; **52**: 301-306.
- 10) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎. 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討. 日胸疾会誌 1980; **18**: 297-302.
- 11) 箆島克裕. Val-Tyr を主体とするイワシ由来ペプチドの血圧降下作用と機能性食品への適用性. 博士論文, 九州大学大学院農学研究科, 福岡, 1997.
- 12) 杉山圭吉, 高田康二, 江川 真, 山本郁雄, 恩塚 博, 大場健吉. 魚タンパク加水分解物の高血圧抑制作用. 農化 1991; **65**: 35-43.
- 13) 関 英治, 吉田真弓, 箆島克裕, 川崎晃一, 玉屋 圭, 松井利郎, 箆島 豊. イワシタンパク質由来ペプチドならびに Valyl-Tyrosine の降圧作用. 栄食誌 1998; **52**: 271-277.
- 14) Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme Inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 1991; **55**: 1313-1318.
- 15) Saito Y et al. Antihypertensive effects of peptide in Sake. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994; **58**: 1767-1771.
- 16) 関 英治, 箆島克裕, 松井利郎, 箆島 豊. イワシ筋肉由来アルカリプロテアーゼ分解物からのアンジオテンシン I 変換酵素ペプチドの分離精製. 日食工誌 1993; **40**: 783-779.
- 17) Cheung HS, Wang FL, Ondetti NA, Sabo EF, and Cushman DW. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 401-407.
- 18) Nakagomi K, Ebidu H, Sadakane Y, Fujii N, Akizawa T, Tanimura T. Properties and human origin of two angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides isolated from a tryptic hydrolysate of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 2000; **23**: 879-883.
- 19) 沖 智之, 片野静次, 松尾由佳, 義平邦利, 松井利郎, 松本 清. アコヤ貝加水分解物からの ACE 阻害ペプチドの調整と単離. 日本食品科学工学会大会講演集 2000; **47**: 18.
- 20) 片野静次, 松本 清. アコヤ貝由来の ACE 阻害ペプチド. 公開特許公報. 特願 2000-275078. 特開 2002-88098.
- 21) 関 英治, 箆島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箆島 豊. 小腸粘膜ペプチターゼ消化耐性を持つ ACE 阻害ジペプチドの定量分析. 日食工誌 1996; **43**: 967-969.