

# 論 文

## アンジオテンシン変換酵素活性に及ぼす野菜抽出液の影響

瀬部 和美・進藤 直文

(西九州大学健康福祉学部健康栄養学科)

(平成22年11月19日受理)

### Effects of Vegetables Extract on Activity of Angiotensin Converting Enzyme

Kazumi SEBE and Naofumi SHINDOH

*Department of Health and Nutrition Science, Faculty of Health and Social Welfare Science, Nishikyushu University*

(Accepted: November 19, 2010)

#### Abstract

The angiotensin converting enzyme (ACE) catalyzes the formation of vasoconstrictor, angiotensin II, and the inactivation of vasodilator, bradykinin. The ACE inhibiting activities of vegetables produced in Saga were investigated in vitro using HPLC. Purple asparagus, wax myrtle, spinach, qing geng cai and leaf of Japanese radish showed the high ACE inhibiting activity as compared with other vegetables. Their total polyphenol contents of each extract were measured, the red onion rind showed the highest polyphenol content of gallic acid equivalent. Almost all of the extracts from inedible parts of vegetables possessed higher ACE inhibiting activity and contents of polyphenol, compared to their edible parts. There was no correlation in inhibition of ACE activity and each polyphenol contents of vegetables. However, protocatechuic acid, chlorogenic acid and phloroglucinol inhibited the ACE with  $IC_{50}$  values of 5.2  $\mu$ M, 7.6  $\mu$ M and 63  $\mu$ M respectively. These results suggest that vegetables and polyphenols can expect the effect of inhibition of hypertension.

キーワード：アンジオテンシン変換酵素、野菜、ポリフェノール

Key words : angiotensin converting enzyme, vegetable, polyphenol

## 1. 緒 言

従来、野菜はビタミンやミネラル、食物繊維の重要な供給源であり、健康を維持するためには欠くことのできない役割を果たしてきた。また、それと同時に、種々の野菜にはフリーラジカルを消去する抗酸化活性をもつポリフェノール類が含まれていることがわかっており、生活習慣病の発症予防に効果があるということが有力視されている。

生活習慣病の1つである高血圧症ではレニン・アンジオテンシン系物質が関与している。血圧上昇の過程は、まず肝臓でできるアンジオテンシノーゲンに腎臓から分泌されたレニンが作用して、アンジオテンシンIを生成させる。次に肺から分泌されたアンジオテンシンI変換酵素（以下ACEと略記）がアンジオテンシンIに作用してC末端を切断し、アンジオテンシンIIとジペプチド（His-Leu）が生成される。このアンジオテンシンIIは血管収縮や、アルドステロン分泌によるナトリウムや水の再吸収を引き起こし、血圧を上昇させる。また、ACEは血圧降下作用のあるブラジキニンを分解し、血圧の上昇をもたらす。そのため、ACEの活性を阻害すれば血圧上昇を抑えることができる。近年、さまざまなACE阻害剤の合成や機能性食品の研究<sup>1-3)</sup>が行われている。

当研究室では、佐賀県産品の地産地消を推進するために、佐賀県内で生産されている野菜の機能性の検索を行っている。その1つとして、本研究では血圧上昇抑制効果について検討した。合成基質であるHip-His-LeuにACEを作用させ、野菜抽出液を添加した場合と無添加の場合に生じた馬尿酸の生成量を比較した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試材料

佐賀県内のスーパーおよび道の駅で購入した、佐賀県産の野菜類29種（アイスプラント、赤タマネギ、甘長唐辛子、オクラ、女山大根、キャベツ、きゅうり、グリーンアスパラガス、黒豆、小松菜、しょうが、大根、タマネギ、チンゲンサイ、つわ、なす、にんじん、にんにく、ねぎ、葉わさび、ピーマン、ふき、ブルーベリー、ほうれん草、ホワイトアスパラガス、紫アスパラガス、山桃、レタス、れんこん）を用いた。

### 2.2 試薬の調製

基質は、Bz-Gly-His-Leu・H<sub>2</sub>O（ペプチド研社製）を400mM塩化ナトリウムを含むホウ酸緩衝液（pH7.5、2.5mMホウ酸-2.5mM四ホウ酸ナトリウム）に溶解し、2.5mMとした。ACE（SIGMA社製）はウサギ胚由来のものをBES緩衝液（pH7.5、50mMBES-50mM水

酸化ナトリウム）に溶解し、2.5mUとした。プロトカテキユ酸、没食子酸はSIGMA社製、クロロゲン酸、フロログルシノールは和光純薬社製の特級試薬を用い、蒸留水にて各濃度に溶解した。

### 2.3 野菜試料の調製<sup>4)</sup>

供試野菜の汚れや種を取り除き、それぞれ細かく切り、約100g秤量した。これに蒸留水120mlを少量ずつ加えミキサーにかけ、更にホモジナイザーで磨砕した。この試料を均一に混合し、-80℃の冷凍庫で凍結後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥野菜試料をそれぞれ0.2g秤量し、蒸留水10mlで5分間室温にて攪拌抽出した。この溶液を遠心分離（15min、3500rpm）し、上清をメンブランフィルターで吸引ろ過したものを試料溶液とした。

### 2.4 野菜抽出液のACE阻害活性の測定

ACE阻害活性はCushman法の変法により測定した<sup>5-6)</sup>。2.5mM Hip-His-Leu 20μlに各野菜抽出液20μlと2.5mU ACE 20μlを加え、37℃で30分間反応させた。コントロールは野菜抽出液の代わりに蒸留水20μlを添加した。30分後、0.5M塩酸を10μl加えて反応を停止した。ブランクはACE 20μlに0.5M塩酸10μlを添加し、ACEを失活させたものを用いた。次に、この反応液中の馬尿酸量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で求めた。馬尿酸のHPLCによる測定の方法は以下のとおりである<sup>7)</sup>。装置は日立ハイテック社製のELITE La Chromシステム、カラムはShodex ODSpak-F-411（4.6mm×250mm）、溶離液はアセトニトリルおよび10mMリン酸（10mM β-シクロデキストリン含有）緩衝溶液の12：88混合液を用い、流速1.0ml/min、カラム温度40℃、検出波長は225nmとした。

コントロールの馬尿酸ピーク面積値をA<sub>c</sub>、野菜抽出液を添加したサンプルの馬尿酸ピーク面積値をA<sub>s</sub>、ブランクの馬尿酸ピーク面積値をA<sub>b</sub>とし、ACE阻害活性率（%）を次式で算出した。

$$\text{ACE 阻害活性率}(\%) = \{1 - (A_s - A_b) / (A_c - A_b)\} \times 100$$

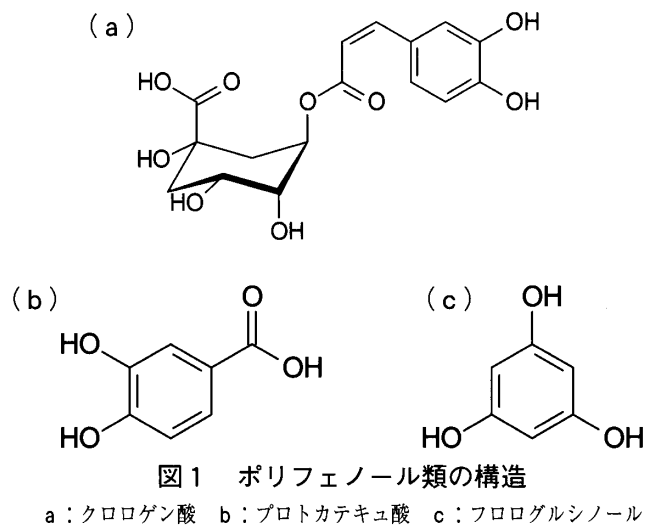
### 2.5 ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量の測定は、フォリン・デニス法<sup>8)</sup>で行った。段階希釈した没食子酸標準溶液（0, 10, 25, 50, 75μg/ml）または適宜希釈した分析試料溶液、各々100μlを96穴マイクロプレートに3箇所ずつ入れ、2倍希釈したFolin試薬50μlと2.5%炭酸ナトリウム溶液50μlを加えた。攪拌後、1時間室温で反応させ、マイクロプレートリーダー（コロナ電気社製MTP-450）で波長660nmの吸光度を測定した。なお、ブランクは分析試料溶液の代わりに、蒸留水100μlを加えた。没食

子酸の検量線よりポリフェノール含量を没食子酸相当量に換算し、各野菜の1g乾燥重量当たりの含量を求めた。

## 2.6 ポリフェノールのACE阻害活性の測定

前項と同様の方法で、3種類の標準ポリフェノール試薬(クロロゲン酸、プロトカテキュ酸、フロログルシノール)(図1)を阻害剤として試験を行った。2.5mM His-Leu 20 $\mu$ lにポリフェノール試薬の0.1mM溶液を適宜希釈した溶液または蒸留水を添加し、2.5mU ACE20 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。この生成馬尿酸量をHPLCで測定し、阻害活性率を求めた。それぞれのポリフェノールの濃度のACE阻害活性率を求め、ポリフェノール濃度と阻害活性率のプロット上50%阻害に対応するポリフェノール濃度を読み取り、50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。



## 3. 結果および考察

### 3.1 野菜抽出液のACE阻害活性

HPLCによる測定の結果、野菜抽出液を加えたサンプルは蒸留水を加えたコントロールと比較すると、保持時間2.5分付近のHis-Leuと8.5分付近の馬尿酸の生成量が明らかに減少しており、ACEの活性を阻害していることがわかった(図2)。このピーク面積値より求めた各野菜の抽出液のACE阻害活性率を表1に示した。オクラ以外のすべての野菜類にACE阻害作用がみられ、紫アスパラガスが最も強い阻害作用を示した。紫アスパラガスはアントシアニンを多く含むため、これらがACE阻害に関与しているのではないかと考えられる。また、アスパラガスには $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)が多く含まれているとの報告もある<sup>9)</sup>。GABAは末梢神経において血管収縮作用のあるノルアドレナリンの分泌を抑えることにより、降圧効果をもたらすといわれている。よって紫アスパラガスを多く摂取することで、血圧上昇抑制効

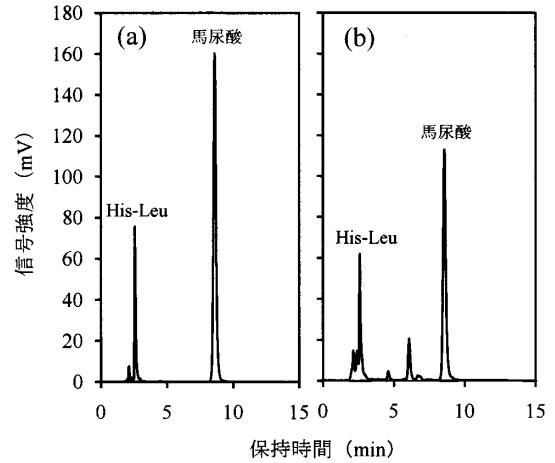


図2 HPLCクロマトグラム

a: コントロール b: サンプル

表1 佐賀県産野菜類のACE阻害活性およびポリフェノール含量

試料名	ACE阻害率 (%)	ポリフェノール含量 (mg/g 乾量)
アイスプラント	76.37	17.58
赤タマネギ (球部)	14.48	19.74
赤タマネギ (外皮)	46.02	197.50
甘長唐辛子	19.56	18.35
オクラ	-1.85	22.29
女山大根 (根身)	15.74	27.88
女山大根 (葉部)	50.59	98.05
キャベツ	78.10	21.78
きゅうり	50.17	7.13
グリーンアスパラガス	57.65	13.23
黒豆	10.98	4.43
小松菜	67.78	47.59
しょうが	24.61	43.38
大根 (根身)	54.87	25.03
大根 (葉部)	89.79	48.22
タマネギ (球部)	20.37	12.06
タマネギ (外皮)	36.06	49.28
チンゲンサイ	90.11	59.17
つわ	38.64	27.03
なす	46.84	21.43
にんじん	24.00	6.01
にんにく	28.71	8.21
ねぎ	64.01	19.02
葉わさび (茎部)	16.33	20.41
葉わさび (葉部)	23.55	100.53
ピーマン	25.76	11.57
ふき	44.47	14.50
ブルーベリー	70.24	24.95
ほうれん草	91.70	35.56
ホワイトアスパラガス	60.04	10.54
紫アスパラガス	97.87	23.69
山桃	95.95	17.06
レタス	73.29	18.01
れんこん	77.86	46.68

果が得られると考えられる。その他の野菜では、山桃、ほうれん草、チンゲンサイ、大根の葉部でも90%以上の強い阻害作用がみられた。また、同じ野菜でも部位で比較すると、大根は根身よりも葉部、タマネギは球部よりも外皮の阻害作用が高くなっており、可食部よりも廃棄部分である皮や葉の方が高いACE阻害作用を有することがわかった。ACE阻害物質については、お茶やワインの成分であるポリフェノール類が報告されている<sup>10-11)</sup>。そこで、本実験で用いた野菜類のACE阻害活性とポリフェノール含量との相関について検討した。

### 3.2 野菜抽出液のポリフェノール含量

各野菜の抽出液のポリフェノール含量を表1に示した。総ポリフェノール量を没食子酸相当量で求めたところ、野菜1g乾燥重量当たりでは、赤タマネギの外皮が最も多く含まれており、次に葉わさびの葉部、女山大根の葉部に多く含まれていた。ACE阻害作用と同様に、同じ野菜でも部位で比較すると可食部よりも不可食部である皮や葉の方に多く含まれていることがわかった。

このポリフェノール含量とACE阻害活性の相関を図3に示した。ポリフェノール含量とACE阻害活性の相関係数(R)は0.0659となり、相関はみられなかった。野菜にはさまざまな種類のポリフェノール類が含まれており、そのすべてのポリフェノールがACE阻害活性を示すとは限らず、ポリフェノールの種類によって阻害作用の強さに差異があるためと考えられる。また、ACE阻害物質はポリフェノール類の他にペプチド類も多く知られており<sup>12-13)</sup>、これらが関与していることも考えられる。

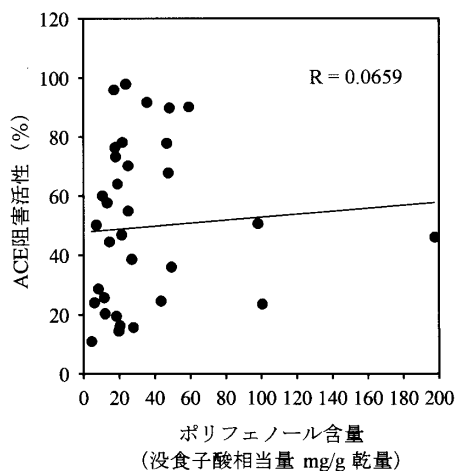


図3 ポリフェノール含量とACE活性の相関

### 3.3 ポリフェノールのACE阻害活性

ポリフェノール類のACE阻害作用の強さを比較するため、試験に用いた野菜類に比較的多く含まれるクロロゲン酸、フロログルシノールおよび、プロトカテキュ酸について野菜抽出液と同様の試験を行った。その結果、

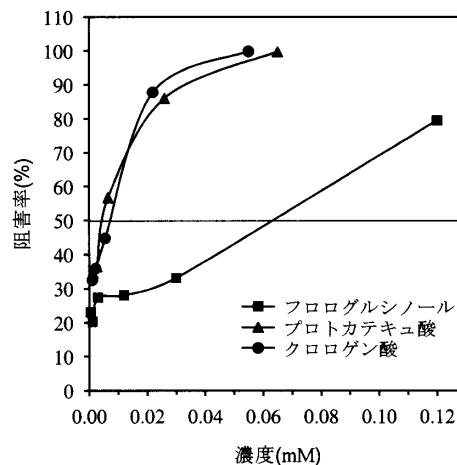


図4 ポリフェノール類のACE阻害活性

3種のポリフェノールすべてがACE活性に対して阻害作用を示し、クロロゲン酸とプロトカテキュ酸には特に強い阻害作用がみられた(図4)。また、ポリフェノール類の濃度が高くなるほど、強い阻害作用がみられ、濃度依存的に阻害することが明らかとなった。本反応系でのクロロゲン酸、プロトカテキュ酸、フロログルシノールの50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)は、それぞれ7.6μM、5.2μM、63μMであった。以上のことから、これらのポリフェノール類を含む食物を多く摂取することで、血圧上昇抑制の効果が期待できる。

## 4. 要 約

佐賀県産野菜類の機能性の検索を目的として、野菜抽出液がACE活性に及ぼす影響について検討した。基質にHip-His-Leuを用い、野菜抽出液とACEを添加し、37℃で30分間反応させた。反応停止後、反応溶液中の生成馬尿酸量をHPLCにて測定した。試験に用いた数種の野菜類のうち、紫アスパラガス、山桃、ほうれん草、チンゲンサイ、大根の葉部が特に強い阻害作用を示した。また、同じ野菜でも可食部と比較すると、不可食部である皮や葉に強い阻害作用がみられた。これらの野菜類のポリフェノール含量を測定したところ、ACE阻害活性とポリフェノール含量には相関はみられなかった。このことより、すべてのポリフェノールがACE阻害活性を示すとは限らず、野菜中の個々のポリフェノールの種類により阻害作用に差異があると考えられた。そこで、野菜類に比較的多く含まれているポリフェノールであるクロロゲン酸とプロトカテキュ酸とフロログルシノールについてACE阻害活性試験を行った。これらの50%阻害濃度は、プロトカテキュ酸はIC<sub>50</sub>=5.2μM、クロロゲン酸はIC<sub>50</sub>=7.6μM、フロログルシノールはIC<sub>50</sub>=63μMとなった。すなわち、ポリフェノールの種類によってACE阻害作用に差異があることが示唆された。以上の結果から、野菜類やポリフェノールの高血圧抑制

効果が期待できることがわかった。

## 5. 参考文献

- 1) 早川和仁：化学と生物, **44**, 705 (2006)
- 2) 鈴木健夫, 石川宣子, 目黒熙：日本農芸化学会誌, **57**, 1143 (1983)
- 3) 木村英夫, 長沼孝多, 小嶋匡人, 恩田匠：山梨県工業技術センター研究報告, **21**, 115 (2007)
- 4) 篠原和毅, 鈴木健夫, 上野川修一：“食品機能研究法”, 220 (2000), (光琳)
- 5) D. W. Cushman, H. S. Cheung: *Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637 (1971)
- 6) 川岸舜朗：“生物化学実験法38 食品中の生体機能調節物質研究法”, p.119 (1996), (学会出版センター)
- 7) <http://www.shodex.com/japanese/dc040405.html>
- 8) 前田智雄, 吉田智明, 角田英男：日本農業気象学会全国大会・日本生物環境調節学会合同大会講演要旨, 225 (2004)
- 9) 小野貴博, 中村亮太, 長谷川明彦, 谷口慎治, 木村隆, 山元英樹, 鈍宝宗彦：日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, **60**, 378 (2006)
- 10) 原征彦, 松崎妙子, 鈴木健夫：日本農芸化学会誌, **61**, 803 (1987)
- 11) L. A. Goretta, J. I. Ottaviani, C. G. Fraga: *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 229 (2006)
- 12) 吉川正明, 千葉英雄：食品工業, **33**, 4, 20 (1990)
- 13) C. Guang, R. D. Phillips: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5113 (2009)