



・准教授
・落合秋人

・経歴
2008 年 京都大学大学院農学研究科
食品生物科学専攻博士後期課程修了
2008 年～2009 年
学術振興会 特別研究員 PD
2009 年～2010 年 京都大学 研究員
2010 年～2019 新潟大学工学部 助教
2020 年～ 新潟大学工学部 准教授

日本酒と酒粕を用いた機能性食品の開発を目指した 基盤技術の構築

・研究の背景と目的

日本酒は、日本の伝統的な醸造酒であるが、1973 年以降その消費量は年々減少傾向にあり、ピーク時の 3 割以下にまで落ち込んでいる(国税庁課税部酒税課「酒のしおり」)。一方で、日本酒の国内出荷数量をタイプ別に区別すると、普通酒などに比べて純米酒及び純米吟醸酒の国内出荷数量は伸びており、日本酒全体に占める割合も増加している。これは、より高付加価値のある差別化された商品への需要の高まりを表している。

レニン-アンジオテンシン系(RAS)は哺乳類の血圧調節機構である。主に腎臓で生合成されたレニンは、アンジオテンシノーゲンに作用してアンジオテンシン I (Ang I) を生成し、アンジオテンシン変換酵素(ACE)によりアンジオテンシン II (AngII) に変換されて血圧上昇を引き起こす。そのため、ACE を阻害する物質は血圧抑制剤として利用される。近年では、ACE の活性を抑制する様々な食品由来ペプチドが見出されている。本研究では、日本酒および酒粕のペプチド成分を利用することにより、高血圧を予防・改善する機能性食品の開発を目指した基盤技術を構築することを目的とした。

・実験方法

(1) 精製・同定

日本酒について、まずアルコール除去後に凍結乾燥して乾燥粉末を得た。酒粕については、水および熱水抽出を行い同様に凍結乾燥粉末を得た。次に、これらの粉末を超純水に溶解し、限外濾過によって分子量ごとに 3 kDa 未満、3～10 kDa、10 kDa 超の 3 画分に分離した。続いて、TOYOPEARL GigaCap Q-650M と CM-650M を用いた陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて、NaCl 濃度を段階的に変化させることで溶出画分を取得した。最後に逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)により精製を行い、得られた画分に対して質量分析(LC-MS/MS)を行うことにより ACE 阻害ペプチドの配列を決定した。

(2) ACE 阻害活性試験

ACE 阻害活性試験は三上一保らの方法(日本食品科学工学会、食品機能性評価マニュアル第 I 集)に基づき以下のように実施した。試料またはコントロール水と ACE 溶液を 96 ウェルプレートに添加し、プレインキュベート後に基質(Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine; HHL)を加えて酵素反応を行った。反応停止後、*o*-フタルアルデヒドによる蛍光誘導体化を行い、3.6 M リン酸で反応を停止させたのち、励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm で蛍光強度を測定し、阻害活性を評価した。

(3) ACE 阻害様式の決定

阻害様式は、ペプチド濃度 0, 80, 320 μ M、基質 HHL 濃度 0.2~1.0 mM の条件下で反応速度を算出し、Lineweaver-Burk プロットを描くことにより解析した。

(4) 分子ドッキングシミュレーション

ヒト ACE の構造は PDB data bank (PDB ID: 1O86) から取得し、Autodock Tools (Molecular Graphics Laboratory at the Scripps Research Institute in La Jolla, California, USA) でリガンドを除去、および必要な修飾を加えた。ペプチド構造は AlphaFold2 (EMBL-EBI) で予測し、Grid 座標と box サイズを設定してドッキングを実施した。ドッキング結果は Pymol (Schrödinger) および Ligplot+ (EMBL-EBI) で可視化し、ACE とそれぞれの阻害ペプチド間の相互作用は WinCoot (<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>) を用いて解析した。

・実験結果

(1) 酒粕由来 ACE 阻害ペプチドの同定とその解析

まず酒粕からペプチドを抽出し、その ACE 阻害活性を評価した。室温および 60°C で超純水を用いて抽出したところ、いずれの画分も濃度依存的に ACE 阻害活性を示し、水抽出が効率的であることが確認された。一方で、加熱抽出では夾雑物の影響により活性が低下する傾向が見られた。

次に、抽出画分を分子量に応じて分画し、ACE 阻害活性を解析したところ、特に 3 kDa 未満の低分子量画分が高い活性を示した。この結果は、既報の低分子ペプチドが強い ACE 阻害活性を持つとの報告と一致していたため、この分画に対してさらにイオン交換クロマトグラフィーを用いた精製を実施した。陰イオン交換クロマトグラフィーの 0.1 M 溶出画分において、比較的高い ACE 阻害活性が観察され、ここに活性成分が集中していると考えられたため、次に逆相クロマトグラフィーを実施し、多数のペプチドピークを分離した。

得られた各ピークについて ACE 阻害活性を評価したところ、特に b、d、g、h の各画分で約 80% と非常に高い活性が認められた。これらの画分から LC-MS/MS 解析を行い、これら画分に含まれるペプチドの配列を同定した。同定された 10 残基以下のペプチドの中には、イネ (*Oryza sativa*) および酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のタンパク質に由来するものが多く含まれていた。Peptide Ranker によるスコアリングに基づき、特に d-11、h-

1、h-2、h-3 が高スコアを示し、生理活性が期待された。

これらペプチドを化学合成し、それぞれの ACE 阻害活性を評価したところ、すべてのペプチドが活性を有していた。中でも h-3 は $IC_{50}=210\ \mu M$ と最も強い阻害活性を示し、次いで d-7、h-1、h-2 も高い活性を持つことが明らかになった(図 1)。活性の強さは、ペプチドの C 末端に含まれる芳香族アミノ酸(Tyr や Phe)に起因すると考えられた。これらの構造は、ACE との結合に有利であるとされており、本研究でもその傾向が確認された。

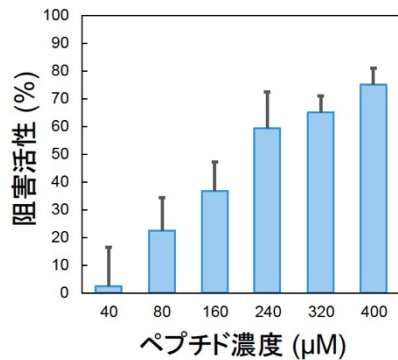


図1. ペプチド h-3 の ACE 阻害活性

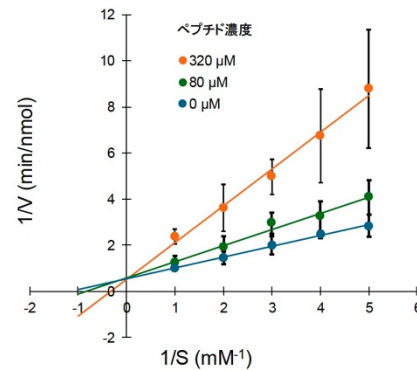


図2. ペプチド h-3 の ACE 阻害様式

h-3 に関しては、Lineweaver-Burk プロットを用いた解析により、ACE の基質と競合して活性部位に結合する「競合型阻害剤」であることが判明した(図 2)。さらに、分子ドッキングシミュレーションにより、h-3 が ACE の活性中心の Zn^{2+} イオンに配位結合し、ACE の推定触媒残基 His-513 などと複数の水素結合および疎水性相互作用を形成していることが視覚的・構造的に確認された(図 3)。このような相互作用が、強力な ACE 阻害活性の基盤となっていると考えられる。

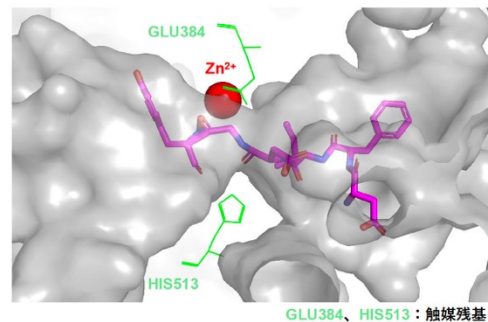


図3. ペプチド h-3 の ACE 活性中心との結合

さらに、他のペプチドとの比較から、 Zn^{2+} や触媒残基との結合の有無が阻害活性の強弱に大きく影響していることが示された。d-7やh-1、h-2も同様に活性中心と相互作用を示し、高い活性を有していた一方で、d-6やd-8は活性中心に結合しておらず、阻害活性も低かった。また、C末端から2～4番目にアニオン性アミノ酸を含むペプチドが、活性中心との結合に有利である可能性が示唆された。このような構造活性相関は、ドッキングシミュレーションによって明らかになったが、最終的な検証にはX線結晶構造解析などによる実証が必要であると考えられる。

以上より、酒粕にはACE阻害活性を持つ複数のペプチドが含まれており、特にh-3は強力な阻害作用を持つことが確認された。今後は、h-3の阻害様式をより詳細に解明するとともに、ヒトACEに有効なペプチドの探索と機能性食品への応用が期待される。これにより、酒粕の新たな機能性成分としての価値が高まることが期待される。

(2) 日本酒由来 ACE 阻害ペプチドの同定とその解析

日本酒からアルコールを除去して得られた乾燥粉末より、超純水に溶解した溶液を用いて ACE 阻害活性を評価したところ、 IC_{50} 値は $350 \mu\text{g/ml}$ であり、日本酒由来のペプチドが ACE 阻害作用を有することが確認された。

得られた溶液に対して限外濾過を行い、分子量による画分を作製したところ、 3 kDa 以下の画分が最も強い ACE 阻害活性(IC_{50} 値: $210 \mu\text{g/ml}$)を示したため、この画分に着目してさらなる分離を行った。

3 kDa 以下の画分に対し陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを適用した結果、陰イオン交換における $\text{NaCl } 0.1 \text{ M}$ 溶出画分および陽イオン交換における 0.3 M 溶出画分に高い ACE 阻害活性が認められた。特に、前者は後者に比べてタンパク質含量が著しく多かったことから、陰イオン交換クロマトグラフィーの 0.1 M 溶出画分を対象にして逆相クロマトグラフィーを行った。

逆相クロマトグラフィーによって得られた各画分のうち、画分 f、g、i において ACE 阻害活性が 50% 以上と高く、活性の中心となる候補と考えられた(図 4)。ただし、これらの画分はタンパク質量が極めて少なく、同定が困難であった。そこで、阻害活性が高く、かつ十分なタンパク質量が確認された画分 d および e を、今後のペプチド同定に向けた有力候補として選定した。これらの画分から LC-MS/MS 解析を行い、これら画分に含まれるペプチドの配列を同定した。同定された 11 残基以下のペプチドから Peptide Ranker によるスコアリングに基づき、特に d-1、d-2、e-1、e-2、e-3 が高スコアを示し、生理活性が期待された。現在その ACE 阻害活性の解析を進めている。

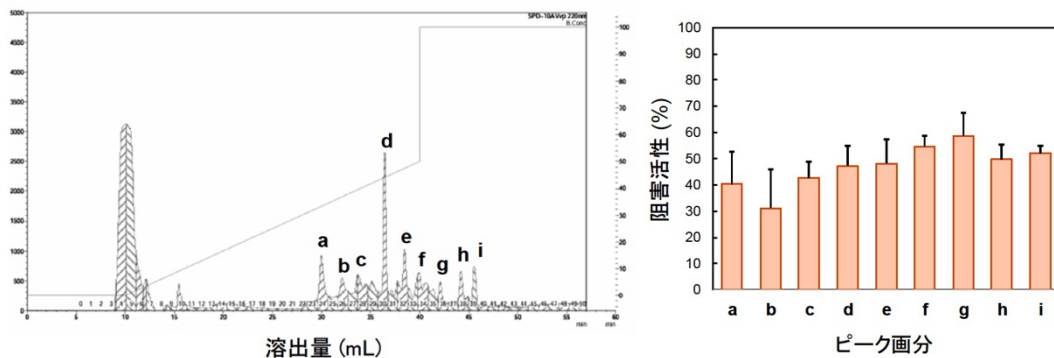


図4. 逆相クロマトグラフィーにおけるクロマトグラム(左)とそのピーク画分の ACE 阻害活性(右)

・ 結論

本研究により、日本酒および酒粕に含まれるペプチド成分の中に、ACE(アンジオテンシン変換酵素)阻害活性を有する複数の機能性ペプチドが存在することが明らかとなった。特に、酒粕から抽出・精製された h-3 は、強い ACE 阻害作用を示す競合型阻害ペプチドであり、その作用は分子ドッキング解析により構造的にも裏付けられた。また、日本酒に由来するペプチドについても、分子量分画およびクロマトグラフィーによる段階的な精製により、阻害活性を持つ画分が特定され、今後の有望な候補となる複数のペプチド配列が同定された。これらの成果は、日本酒および酒粕の高付加価値化につながる新たな機能性の一端を示

すものである。

- ・ 今後の展望

今後は、同定されたペプチドの構造と ACE 阻害活性のさらなる関連性を明らかにするため、X 線結晶構造解析などによる分子レベルでの検証を進めるとともに、*in vivo* 試験を通じた生理活性の評価が求められる。また、酒粕や日本酒を原料とした機能性食品やサプリメントへの応用を視野に入れ、ペプチドの安定性や体内吸収性に関する評価も進める必要がある。これにより、伝統的酒類産業の再評価と新たな市場創出が期待される。