ナルトビエイ活用を志向した抗メタボリック症候群ペプチドの開発

食品工業部
栢植圭介　鶴田裕美　吉村臣史
株式会社オフィス・タカハシ
中村隆俊　高橋勝利　末次哲也
三好友美
佐賀大学農学部
永尾晃治　柳田晃良

西日本沿岸域に回遊する害魚ナルトビエイの有効活用を志向し，ナルトビエイ肉由来血中脂質抑制ペプチドの酵素処理条件について検討した．ナルトビエイ肉を種々のプロテアーゼで処理してペプチドを調製し，血中脂質抑制作用を比較した．血中脂質抑制作用は，ヒト肝がん由来 HepG2 細胞におけるアポリポタンパク質 B100（Apo B100）分泌阻害活性を指標として解析した．その結果，市販のプロテアーゼの中で最も Apo B100 分泌阻害作用の強い酵素としてデナプシン-2P が選抜された．デナプシン-2P 分解物の血中脂質上昇抑制作用を，肥満モデルラット（OLETF）を用いて確認したところ，デナプシン-2P 分解物の摂取により血中コレステロール及びトリグリセリドの上昇抑制作用が認められた. また，デナプシン-2P はペプチド特有の苦味が少なく，好ましい旨味を有していた．これらのことから，デナプシン-2P は，呈味性の高い生理機能性ペプチドとしての優れた性質を有しているものと考えられた．

1．はじめに

1.1　ナルトビエイによる二枚貝の食害

ナルトビエイ（*Aetobatus flagellum*；図 1）は軟骨魚類に属するエイの一種で，最大で体幅 150 cm，体重 50 kg に達する．元来，熱帯・亜熱帯の暖海に生息していたが，近年の海水温上昇に伴い生息域が北上し，1990 年の半ば頃より西日本沿岸域（有明海，周防灘，瀬戸内海等）にも群れをなして回遊してきている．ナルトビエイは，小魚は食べず二枚貝を主な餌とし，解剖検査では胃内に一尾当たり 400～500 個（メス，成体）のアサリが確認されている [1]．このことから，西日本沿岸域における二枚貝減少の最大の要因はナルトビエイによる食害であると考えられている．熊本から長崎までの四県に渡る有明海は日本の干潟の約 4 割の面積を有し，かつてはアサリをはじめとする二枚貝類の好漁場であった．しかしながら，環境変化による資源量減少に追い討ちをかけるようにナルトビエイの回遊量が増大し，それに伴って二枚貝の漁獲高が著しく減少しており，漁業経営は悪化の一途を辿っている．

1.2　ナルトビエイ有効活用と課題

ナルトビエイは，死亡後短期間で悪臭の原因となるアンモニアを組織中に蓄積する性質がある．西日本沿岸域では二枚貝の資源量確保を目的として毎年

図 1 . ナルトビエイ

ナルトビエイが捕獲されているが，保蔵中の悪臭生成により食材価値が落ちることもあり，その殆どが廃棄処分されている．佐賀県では，2005 年度よりナルトビエイの捕獲事業を実施しており，その量は，年間 170～220 トンである．また，現在では福岡，熊本の両県，周防灘及び瀬戸内海においても駆除が実施され, その総量は年間 1000 トン近くにも達すると見積もられている．

最近では，ナルトビエイの食材化を志向した研究開発が，地方自治体レベルで実施されている [2,3]．しかしながら，元々ナルトビエイの食習慣がなかったこともあり，いずれの地域においても従来型の食品化・食材化による資源の活用までには至っていない

のが現状である．

1.3. ナルトビエイ由来ペプチドのメタボリック症候群予防効果

近年，先進国では内臓脂肪型肥満や脂質異常症（高脂血症）等の生活習慣病が増加している．これらの病態の合併が動脈硬化性疾患のリスクを相乗的に上昇させることから，わが国では本病態を「メタボリックシンドローム（メタボリック症候群）」と定義し[4]，その予防を推進している（健康日本 21）．わが国におけるメタボリック症候群該当者・予備群数はそれぞれ 1070 万人及び 940 万人，併せて 2010 万人と推定されている（厚労省平成 19 年国民健康・栄養調査）．また，2004 年度の一般診療医療費約 24 兆円の 3 割はメタボリック症候群をはじめとする生活習慣病が占め，医療費削減のためには生活習慣病の予防が重要である．このことから，食品が有する生体調節機能を利用したストレスが少ない生活習慣病予防法の確立が模索され，これまでにヒトの健康維持に役立つ機能性食品が数多く上市されている．

著者らは，肥満モデルラット（OLETF）を用いてナルトビエイタンパク質の栄養生理機能を検討した．その結果，本タンパク質が脂質代謝の改善効果を有することを，他に先駆けて明らかにした[5]．さらに，タンパク質は，摂取後タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）によりすみやかにペプチドにまで分解することから，ナルトビエイタンパク質プロテアーゼ処理物中の脂質代謝関与因子を特定させる目的で，プロテアーゼ処理物のラットへの摂取試験を実施した．ナルトビエイ可食部をプロテアーゼ（ペプシン）で処理し，ペプチド画分を得た．OLETF ラットにペプチド画分を含む食事を摂食させ，脂質代謝やメタボリック症候群に関する生化学的パラメータを測定した．その結果，ナルトビエイペプチドの摂取により，LDL コレステロールやトリグリセリド等の血中脂質濃度が低下し，その作用は可食部をそのまま摂取させた場合よりも強いものであった[6]．また，インスリン抵抗性やレプチン抵抗性の指標である血中インスリン，レプチンレベル，肥満性炎症のマーカーである PAI-1 及び C 反応性タンパク質レベルもナルトビエイペプチドの摂取により低下傾向をみた．これらの結果は，ナルトビエイペプチドの摂取が血中脂質レベルの上昇を抑制し，メタボリック症候群のリスクを低減させることでヒトの健康維持に役立つ可能性を示す，極めて重要な知見である．

特定のアミノ酸配列を持つペプチドがアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有し，その摂取が血圧の上昇を抑える効果があることが報告され，この生理機能を利用した血圧上昇抑制ペプチドが市販されている[7]．また，魚類由来ペプチドにも同様の血圧降下作用が多数報告されており，機能性食品として多くの人の健康維持に貢献してきた．しかしながら，魚類由来ペプチドの脂質代謝改善作用については報告例が少なく，特に，ナルトビエイをはじめとする軟骨魚類由来のペプチドに関しては，既往の研究例が認められなかった．

そこで，本研究では，①有明海等の有害魚であるナルトビエイの有価資源化による持続的な水産資源管理，並びに②メタボリック症候群のリスク低減による健康維持への貢献を目的として，ナルトビエイ由来の血中脂質上昇抑制作用を有する新規高機能ペプチドの製品開発を実施した．本報告ではペプチドの製法を最適化するためのプロテアーゼのスクリーニング並びにペプチドの性状・機能を中心に述べる．

2．実験方法

2.1 試料

2009 年に有明海で捕獲されたナルトビエイより骨及び皮を除去し，可食部位をミートチョッパーによりミンチ処理した．このミンチを直ちに冷凍し，ナルトビエイ肉原料として用いた．

2.2 ペプチドの調製

アルコールによる低分子成分の除去：ナルトビエイ肉ミンチを解凍後，直ちにエタノールを濃度 75～80vol%になるよう添加し，50dC で 1 時間撹拌した．圧搾器を用いて固液分離し，圧搾物にさらに 1 回目の半量のエタノールを加えて再度撹拌し，固液分離した．これを風乾させ，さらに減圧乾燥して水分を除去し，粉砕してアルコール洗浄物を調製した．

ペプチドの調製：市販されているプロテアーゼより，起源・作用条件が異なる 14 種類の酵素を選抜し（表１），これらを用いてペプチドを調製した．ナルトビエイ肉・アルコール洗浄物 5 g を純水 150 mL に分散させ，塩酸ないし水酸化ナトリウムを用いて各酵素の至適 pH まで調整した．プロテアーゼを肉重量に対して 1%の量で添加し，各酵素の至適温度で酵素反応させた．反応は 24 時間とし，途中幾度か撹拌した．反応液の pH を 6.5～7.0 に調整し，105dC で 20 分処理して酵素を失活させた．遠心分離後（18,000 x g, 20 min），上清を限外ろ過（ザルトリウス製ビバスピン，分画分子量 5,000 Da）し，透過液を凍結乾燥してペプチドを得た．ペプチドの調製条件及び特性については表 1 に記した．

2.3 *in vitro* 評価試験

ApoB100 分泌抑制活性：血中脂質上昇の原因となる超低密度リポタンパク質の合成・分泌阻害作用を，ヒト肝がん由来 HepG2 細胞におけるアポリポタンパク質 B100（Apo B100）分泌阻害活性を指標として解析した[8,9]．分画物の添加濃度は 1 mg/mL とし，培地に分泌される Apo B100 量を ELISA 法により定量して，無添加の場合の分泌量と比較することにより，Apo B100 分泌抑制活性を求めた．

細胞傷害性の確認：Apo B100 分泌抑制活性が，細胞に対する添加物の直接的な障害によるアーティファクトであるどうかを確認すべく，各種ペプチドの HepG2 に対する細胞傷害性を検討した．細胞傷害性は Water-soluble Tetrazolium（WST）法を用いて評価し[10]，サンプルの添加濃度は Apo B100 分泌抑制視件と同一（1 mg/mL）にした．

2.4 *in vivo* 評価試験

ペプチドの大量調製：*in vitro* 評価試験の結果最も血中脂質上昇抑制効果が強いプロテアーゼを用いて，*in vivo* における評価のためのペプチドを大量調製した．ナルトビエイアルコール洗浄物 2000 g を水 20 L に分散させ，撹拌しながら 2 mol/L 塩酸を添加し，pH = 2.5 に調整した．これを 50dC に調温し，プロテアーゼをサンプルに対して 1wt%添加し，18～20 hr 反応させた．反応液に 8 mol/L NaOH を添加して pH = 6.5 に調整し，90dC に温調して酵素を失活させた．反応液を冷却し，フィルタープレスにより固液分離を行った．次に，酵素消化物を分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜（Alfa-laval 製 GR）で限外ろ過して透過液を得た．透過液を凍結乾燥させ，ナルトビエイペプチドを得た．

ラット摂食試験：肥満モデルである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラット（♂）およびそのコントロールラットである Long-Evans Tokushima (LETO)ラット（♂）を用いた．Control 食-LETO， Control 食-OLETF 及びペプチド食-OLETF ラットの 3 群に対し，表２に示す食餌組成で 5～6 週齢より 4 週間摂食させ，腹部大動脈採血により屠殺を行い，血清，肝臓，脂肪組織（白色脂肪組織：腎臓周辺・精巣周辺・腸間膜周辺・腹部皮下脂肪）を摘出し，分析に供した．評価項目は，血中及び肝臓脂質濃度とした．

血中脂質解析：血清トリアシルグリセロール（TG）濃度および総コレステロール（T-Chol）濃度は，ゲル濾過浸透 HPLC を用いたオンライン 2 重酵素法（スカイライトバイオテック）によって測定を行った．肝臓脂質は Folch らの方法[11]により抽出，濃縮した．即ち，摘出した肝臓 0.25 g を 7.5 ml のメタノール, 15 ml のクロロホルムでホモジナイズした後，37dC にて 10 分間加温抽出し，クロロホルム：メタ

表１．酵素並びに調製されたペプチドの平均分子量

番号	酵素名	由来	pH start	pH end	反応温度 (dC)	反応時間 (hr)	重量平均分子量
1	Pepsin	Porcine stomach	1.9	2.8	50	24	1846
2	Protease M	*A. oryzae*	3.0	4.2	50	24	292
3	Denapsin 2P	*A. niger*	3.0	4.0	50	24	663
4	Protin	*B. subtilis*	6.0	5.9	50	24	517
5	Denatyme AP	*A. oryzae*	6.0	5.9	50	24	395
6	Nucleisin	*B. subtilis*	7.0	6.5	50	24	564
7	Neutrase 0.8L	*B. amyloliquefaciens*	8.2	6.9	50	24	610
8	Alcalase 2.4L FG	*B. licheniformis*	9.4	7.0	70	24	548
9	Denatyme AP (with different pH)	*A. oryzae*	9.1	7.1	50	24	395
10	Bioplase OP	*B. clausii*	10.1	7.0	70	24	695
11	Bioplase SP-15FG	*B. sp*	10.0	7.1	65	24	590
12	Flavourzyme 1000L	*A. oryzae*	6.1	6.3	50	24	355
13	Denatyme NP	*A. oryzae*	9.3	7.9	60	24	634
14	Thermolysin	*B. thermoproteolyticus rokko*	9.1	6.7	70	24	643
15	Papain	*Carica papaya* (Papaya)	7.1	6.5	70	24	558

ノール混液（C:M＝2:1，v/v）で 25 ml に定容し濾過した．濾液量測定後，蒸留水を 20%容加え転倒混和し，一晩放置した．翌日，エバポレーターを用いてクロロホルム層を減圧濃縮し，石油エーテルに再溶解した後 25 ml に定容した．

肝臓脂質解析：肝臓 TG 濃度は Fletcher らの方法[12)]により定量した．脂質抽出液を窒素ガス下で乾燥後，クロロホルム 5　ml 及びシリカゲル 1.0 g を添加し，よく振とうした後，遠心分離した（3000 rpm, 10 分）．そのうち 1 ml を再び窒素ガス下で乾燥し，イソプロパノール：蒸留水（isopropanol:H2O＝9:1, v/v）2 ml，5%水酸化カリウム液（in isopropanol: H2O＝2:3，v/v）0.6 ml を加え，栓をして 60～70dC 水浴中で 30 分間加温した（ケン化）．3 mM メタ化ヨウ素酸ナトリウム 1 ml，アセチルアセトン液 0.5 ml を加え十分混和し，50dC 水浴中で 30 分間加温発色させた．冷却後，405 nm で吸光度を測定した．肝臓 T-Chol 濃度は，コレステロール E-テストワコー（和光純薬）を用いてコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法により測定した．脂質抽出液を乾燥後，発色液を入れて攪拌し，30dC で 5 分間加温した．次に，クロロホルム 1.5 ml を加え，シェーカーで 5 分間混和し，20 分間遠心分離（3000 rpm, 10dC）後，波長 600 nm で吸光度を測定した．

統計解析：*in vivo* 評価試験によって得られたデータは，Tukey-Kramer の多重比較により統計学的有意差の検定を実施した．

Group	1	2	3
Rat	LETO	OLETF	
Ingredients (%)	Control	Control	Denapsin
Casein	20.0	20.0	10.0
Peptide (denapsin)	0.0	0.0	10.0
Cornstarch	15.0	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture*	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture*	1.0	1.0	1.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
FAT†	10.0	10.0	10.0
Sucrose		make to 100	

*AIN-76, † Lard : Corn oil = 1 : 1

2.5　呈味成分の解析

味覚認識装置（インテリジェントセンサーテクノロジー製 TS-5000Z：平成 21 年度電源立地地域対策交付金補助）によりデナプシン-2P 分解物並びにペプシン分解物の 1wt%水溶液における味評価を実施した．

３．結果及び考察

3.1　*in vitro* 評価試験

図２に，HepG2 における各種ペプチドの細胞傷害性をまとめた．ここで，ペプチド無添加区に比して WST 活性が 90%以下のペプチドは，HepG2 に対して細胞傷害性を有するとみなし，Apo B100 分泌抑制作用の評価対象から除外した．細胞障害性を認めなかったペプチドの内，従来ペプチド（ペプシン分解物）に比して統計学的に有意な Apo B100 分泌抑制作用を示したのは，図３に示すごとく *Aspergillus niger* 由来デナプシン-2P（ナガセケムテックス株式会社.製）分解物のみであった．この結果より，候補プロテアーゼの中で最も血中脂質抑制作用が強いものは，デナプシン-2P であると判断された．以後，*in vivo* 評価試験に本プロテアーゼで調製したペプチドを供し，その効果を検証した．

3.2　*in vivo* 評価試験

大量調製ペプチドの分子サイズ分布：*in vitro* 試験に用いたデナプシン分解物と動物試験用のそれとで分子サイズ分布を比較したところ，顕著な分布の違いは認められなかった（図４）．このことから，ラボスケールで調製したデナプシン-2P 分解物がパイロットスケールでも問題なく調製されているものと判断された．

動物試験結果：デナプシン-2P 分解物の血清/肝臓脂質低減効果について図５に示した．OTETF ラットはコントロールラットである LETO ラットに比べて血清トリグリセリド（中性脂肪），血清コレステロール，肝臓トリグリセリド並びに肝臓コレステロールの値

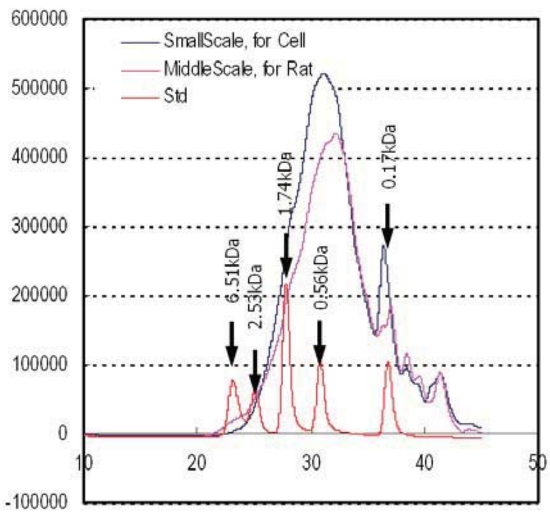

図４．デナプシン分解物の
分子サイズ分布

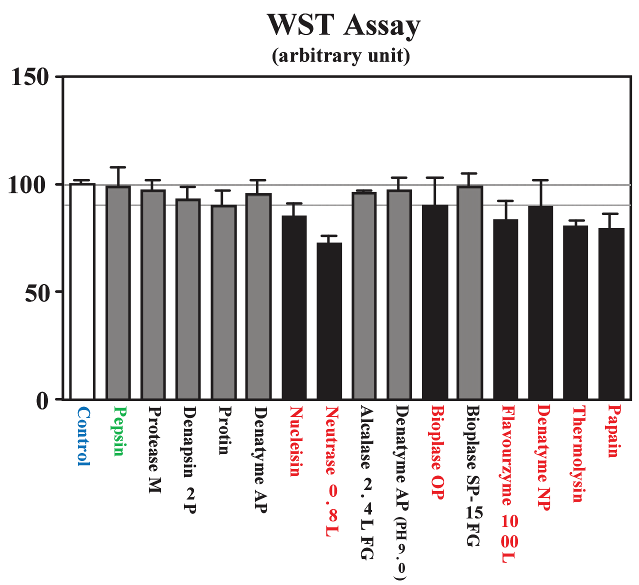

図２．HepG2 細胞に対するペプチドの細胞傷害性

細胞に対し，各種ペプチドを 1 mg/mL の濃度で添加した．赤字はコントロール（ペプチド無添加区）に対して WST 活性が低いペプチド区を示す．これらのサンプルは Apo B100 分泌抑制作用の評価から除外した．

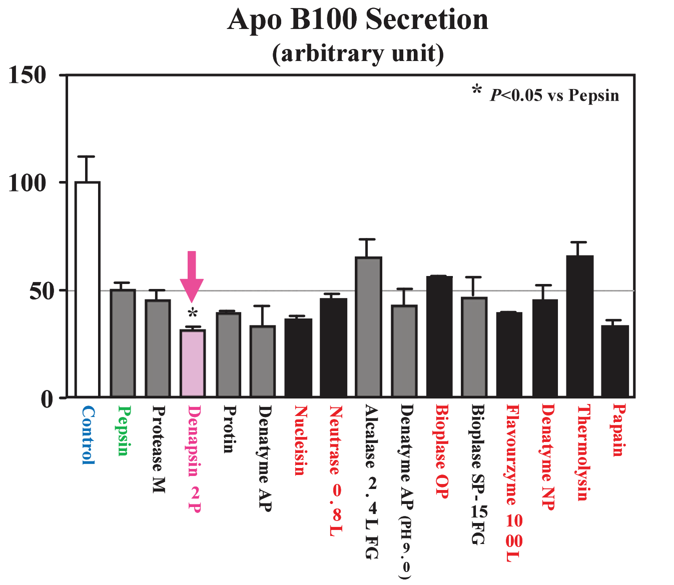

図３．HepG2 細胞の Apo B100 分泌に及ぼすペプチドの影響

細胞に対し，各種ペプチドを 1 mg/mL の濃度で添加した．赤字は細胞傷害性を有するペプチド区（評価対象から除外）．Denapsin-2P 分解物（矢印）に強い Apo B100 分泌抑制作用が見られ，その作用はペプシン分解物に比して有意に強かった．

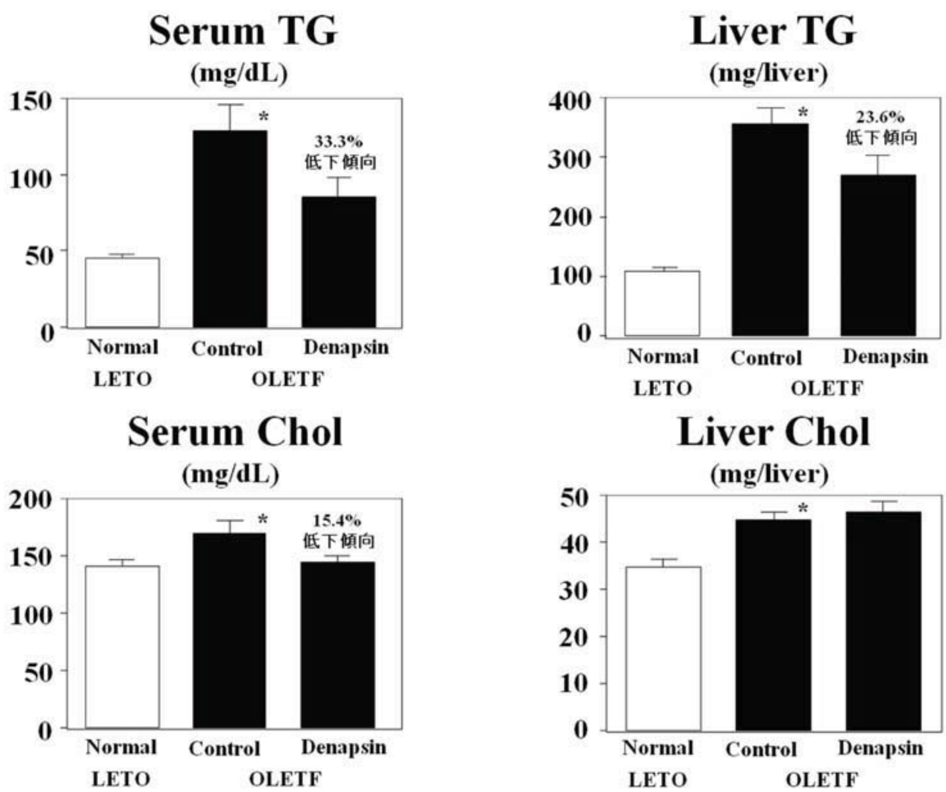

図５．OLETF/LETO ラットの脂質パラメータに及ぼすデナプシン-2P 分解物摂取の影響

OLETF ラットに Denapsin-2P 分解物を食餌中 10%添加し摂食させた．OLETF は LETO に比べ血清脂質及び肝臓脂質レベルが高かったが，Denapsin-2P 分解物の摂取は OLETF における肝臓コレステロール以外の脂質レベルを低下させた．TG; トリグリセリド, Chol; コレステロール, *$P < 0.05$ vs Normal LETO.

が有意に上昇していたが，デナプシン-2P 分解物の摂取により，肝臓コレステロールを除くこれら脂質パラメータの値が低減し，正常ラットの値とほぼ同等になっていた．この結果は，デナプシン-2P 分解物の摂取による血中脂質抑制作用を示唆するものであった．

3.3 呈味の評価

デナプシン-2P 分解物の風味について従来のペプシン分解物と比較したところ，ペプシン分解物に特有の強い苦味を殆ど感じず，むしろペプシン分解物にない旨み・塩味を強く感じた．図６に，味覚認識装置によるデナプシン-2P 分解物並びにペプシン分解物の味評価結果を示す.「旨み」「旨みコク」「塩味」については，官能評価の結果をよく反映するものであった．他方，苦味についてはペプシン分解物とデナプシン-2P で差が認められず，官能評価における両サンプルの明白な苦味の違いは味覚認識装置では表現されなかった．

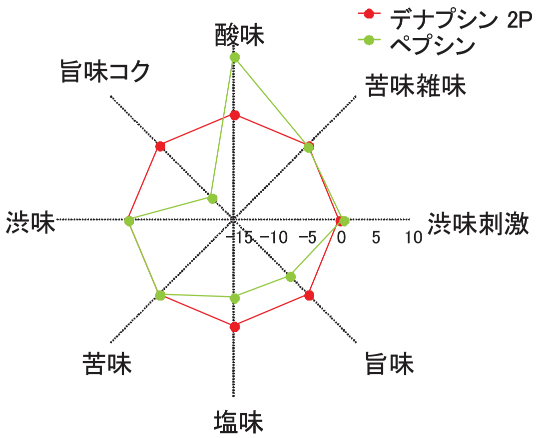

図６． 味認識装置（TS-5000T）によるペプチドの味評価

デナプシン-2P 分解物(赤)はペプシン分解物（緑）に比して旨み、旨味コク、塩味に強い応答を示す。他方、官能評価では明白であった「苦味」は、味認識装置の応答には反映されなかった。

4．おわりに

ペプチド製造のためのプロテアーゼの選抜試験を実施した. 候補として 14 種類の市販酵素よりラボスケールでペプチドを調製し，培養細胞の Apo B 100 分泌抑制能を比較した結果，最も高い Apo B 100 分泌抑制能が認められたのは，*Aspergillus niger* 由来の酸性プロテアーゼ（デナプシン-2P）であった．さらに，肥満モデルラットを用いた評価試験によりデナプシン-2P 分解物の血中脂質抑制作用を検証したところ，デナプシン-2P 分解物の摂取により，血中コレステロール及び中性脂質の低減が認められた．しかしながら，ペプシン分解物における過去の *in vivo* 試験の結果 [6] と比べる限り，ペプシン分解物とデナプシン-2P 分解物との血中脂質低減作用の差は、*in vitro* における結果ほど明確なものではないように思われた．デナプシン-2P 分解物の血中脂質低減作用の優位性については，*in vivo* の試験によるさらなる検証が必要と考えられる．

他方，デナプシン-2P 分解物には好ましい旨味があり，スープ等に添加した際に，旨味を付与できる可能性が示された．今後の検討により，デナプシン-2P の旨味を生かしつつ，生理機能性に優れたペプチドの開発につながることが期待される．

なお，本研究は，経済産業省・平成 21-22 年度地域イノベーション創出研究開発事業の補助を得て実施された．

参考文献

1) Yamaguchi et al., Occurrence, growth and food of longheaded eagle ray, *Aetobatus flagellum*, in Ariake Sound, Kyushu, Japan, , *Environmental biology of fishes*, 74(2), pp229-238 (2005).
2) 山浦啓治・小澄千尋・広瀬茂，ナルトビエイの利用加工技術の開発試験- I，佐賀県玄海水産振興センター研究報告，第 3 号, pp55-60 (2005).
3) 高橋勝利，ナルトビエイを使った商品開発で有明海の再生を目指す，九州農政局現地情報九州版・情 420 号-12,
4) メタボリックシンドロームの定義と診断基準., 日本内科学会雑誌（2005）.
5) 柳田晃良・永尾晃治・王玉明，ナルトビエイの栄養生理機能に関する研究, 佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集，第 1 巻，pp137-140 (2005).
6) 特願 2008-155078「新規ペプチド分解物」.
7) 食品成分のはたらき．“食品ペプチドの血圧低下機構”，松本清・松井利郎，朝倉書店，pp59–70（2004）.
8) Inoue N., N. Yamano, K. Sakata, K. Arao, T. Kobayashi, T. Nagao, Y. Shimada, K. Nagao, T. Yanagita, Linoleic acid-mentyl ester reduces the secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells, *J. Oleo Sci.*, 58:4, pp171-175 (2009).
9) Walldius G., Jungner I., Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I, risk indicators of coronary heart

disease and targets for lipid-modifying therapy, *Journal of Internal Medicine*, 255, pp188-205 (2005).

10) Ishiyama M, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet, *Biol. Pharm. Bull.*, 19:11, pp1518-1520 (1996).

11) Folch J. *et. al.*, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem*., 226, pp497-506 (1957).

12) Fletcher M. J., A colorimetric assay methods for estimating serum triglyceride, *Clin. Chem. Acta,* 22, pp393-397 (1968).