

クロレラからの血圧降下作用糖蛋白質の検索

土井裕司・島 宗宏・河端 康・頼田正信・金森正雄

HIROSHI DOI, MUNEHIRO SHIMA, YASUSHI KAWABATA
MASANOBU YORITA and MASAO KANAMORI

Detection of antihypertensive glycoprotein from chlorella

要旨：クロレラから、血圧降下作用物質が部分精製された。生クロレラの細胞壁破砕物を冷アセトンにて脱脂脱色後、冷水抽出物が得られた。冷水抽出物の80%エタノール不溶性画分に降圧作用が認められた。80%エタノール不溶性画分の Bio-Gel P-60ゲルろ過、DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより、ほぼ均一な降圧画分D-IIが得られた。画分D-IIの分子量は、約80,000と推定された。画分D-IIを、13週令の血圧180~190mmHgのSHRに0.5mg/100g体重の割合で腹腔内投与すると、1時間後に140~160mmHgという血圧になり、強い降圧効果が認められた。画分D-IIは、ガラクトース、マンノース、グルコサミンを含む糖蛋白質で、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、プロリンの含量が高く、塩基性アミノ酸が少なかった。

結 言

健康が食生活に大きく左右されることは言うまでもないことだが、病気が、日常の食生活を少し改善することによって容易に治癒することが望まれてしかるべきである。即ち、食事療法は大切な治療法である。特に、原因が不明で、従って治療法も確立されていない病気の場合には、食事療法に頼らざるを得ず、また、それが最も望ましい治療法でもある。そう言った意味から、日常の食品中に健康を促進する作用物質が存在することが期待される次第である。

本態性高血圧は、現在のところ、原因が全く不明であり、しかも、この病気で悩んでいる人が極めて多い。

本症には、食事療法として、減塩食に切り換えたり、肥満の人には体重減少が指導されている。日常の食品の中に、血圧降下作用物質が含まれていれば、本症に悩む人は少なくなるであろう。

岡本らは、様々な植物について降圧物質の検索を行い^{1),2)}、カキの葉、ハダカ麦の若葉、ミカンの皮、ササ、トマトの葉などに有効成分の存在を認めている。

また、動物由来のものについても、Suzukiらは、オキアミやフィッシュミールの蛋白質、カゼイン³⁾およびそれらの酵素水解物^{4),5)}中に降圧物質の存在を報告している。

クロレラについても岡本らは、アルカリ条件下で、60°C、15時間の抽出物のエタノール可溶性画分中に、高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧を降下させる物質の存在を示唆している⁶⁾。その物質は、高分子の糖蛋白質様の物質であると言う。一般に、蛋白質は熱に不安定であり、アルカリ溶液中では、セリン、トレオニンなどのアミノ酸は変化し、O-グリコシド結合の糖鎖は容易に β -脱離することが知られている。

また、クロレラエキス中に存在するアデノシンによって血圧が降下したことを、村上らは報告している⁷⁾。

クロレラは、蛋白含量が高く、増殖が早いことなどから、新しい蛋白食糧資源として検討され、最近では、各種の生理活性物質を含むことから再認識され⁸⁾、従って、食事療法の好材料となることが期待される。

前報において、著者らは、クロレラを含む食餌によ

京都府立大学農学部栄養化学研究室

Laboratory of Nutritional and Food Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Kyoto 606, Japan.

昭和58年7月20日受理

って SHR の血圧が降下することを見出した⁹⁾。前報での有効物質は、量的に考えて、アデノシンではないと考えられる。そこで本研究では、クロレラ中の降圧

作用物質の検索を目的として、細胞壁破碎クロレラの冷水抽出物のエタノール不溶性画分中に降圧物質の存在を確認し、そのゲルろ過クロマトグラフィーおよび

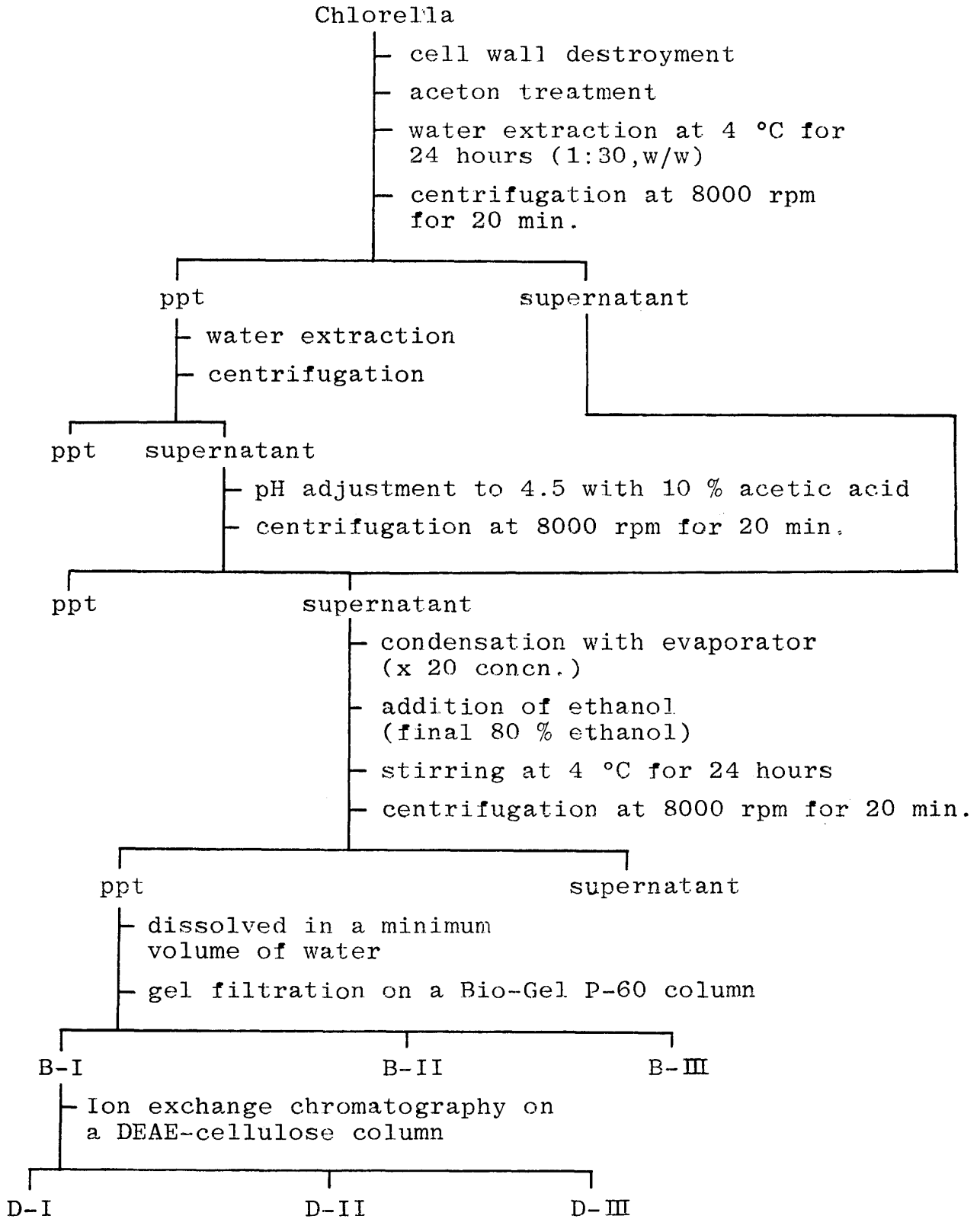


Fig. 1. Schematic Representation of Preparation Method of Antihypertensive Glycoprotein from Chlorella.

イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製に至ったのでここに報告する。

材料と方法

1. クロレラ

使用したクロレラは、ジェファー・ジェフシー(株)の屋外培養プール(石垣市)で大量培養され、蒸留水にて洗浄後、凍結状態で著者らの研究室まで送られ、融解後、蒸留水にて1/10濃度としてDyno-millで処理され、凍結乾燥法で粉末化されたものである。

2. SHR および血圧測定

SHRは、日本ラット(株)より入手し、オリエンタル酵母(株)製固型飼料にて飼育した。血圧測定法は、前報⁹⁾と同じであった。対照群には0.85% NaCl 溶液が腹腔内投与された。

3. 降圧物質の抽出および精製

細胞壁破碎されたクロレラを冷アセトン(-20°C)にて2度脱脂脱色した後、30倍量の蒸留水にて、4°Cで24時間抽出された。冷水抽出液は、10%酢酸にてpHを4.5とした後、その8000rpm、20分遠心の上清が集められた。得られた上清を、室温でエバポレーターを用いて濃縮し、最終濃度80%となるようにエタノールを加えた。80%エタノール抽出を4°Cで24時間行った後、8000rpm、20分間の遠心により80%エタノール不溶性画分を得た。エタノール不溶性画分は少量の蒸留水に溶かされた後、Bio-Gel P-60 カラムにアプライされ、得られた活性画分B-Iは、DEAE-セルロースにて更に精製された(Fig. 1)。

4. ゲル電気泳動

ディスクゲル電気泳動は、Davisの方法に従った¹⁰⁾。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、WeberとOsbornにより示された方法でもって行った¹¹⁾。

5. 構成成分の分析

アミノ酸分析は、6*N* HCl中、脱気し、110°Cで24時間加水分解した後、0.01*N* NaOH中で空気酸化したものを、日立自動アミノ酸分析計KLA-5型にて行った。アミノ糖は、2*N* HCl中、100°C3時間、6時間、10時間加水分解の後、上記アミノ酸分析計にてホウ酸バッファー、pH 7.6を用いて定量された¹²⁾。ヘキソースの定量は、フェノール硫酸法によった¹³⁾。構成糖の分析は、標品を100°C、2時間封管中で加水分解した後、常法¹⁴⁾に従って、alditol acetateとし、島津ガスクロマトグラフGC-4CMにて行った。用いられたカラムは、3% ECNSS-M/Gaschrom Q(和光純薬工業(株)を充填した1mのカラムであり、190°Cで

実施された。

結果および考察

1. エタノール不溶性画分の調製

クロレラは単細胞の緑藻で、堅い細胞壁を有している。そこで本報においても前報⁹⁾と同様、細胞壁破碎のため、生クロレラは、Dyno-mill処理された。岡本らによるとクロレラ中の降圧物質はアデノシン以外に高分子様糖蛋白質性物質が存在すると言う⁶⁾。そこで著者らは、前報で述べた降圧物質が蛋白質である可能性をも考慮して、蛋白質抽出の常法に従って、冷アセトンによる脱脂脱色の後、冷水にて抽出物を得た。

多くの蛋白性食品(例えば、大豆、卵、牛乳)にはpH 4.5で沈澱する蛋白質が多く含まれているので、分画の最初として、pH 4.5での酸沈澱分画が行われた。得られた酸沈澱物は、SHRに対して降圧効果を持っていなかった。酸処理の上清は、エバポレーターにて室温で20倍まで濃縮された後、終濃度80%(v/v)となるようにエタノールが加えられ、4°Cで24時間攪拌された。80%エタノール溶液は、4°Cで8000rpm、20分間遠心され、上清と沈澱に分けられた。

80%エタノール可溶性画分は、弱いながらも降圧効果があり、血圧165~185mmHgのSHRに、15mg/100g体重の割合で腹腔内投与すると1時間後に約5%の血圧降下が認められた。

他方、80%エタノール不溶性画分は、生クロレラ10gから約500mg得られ、エタノール可溶性画分の場合と同じ条件下では、約10%の血圧降下が観察された。

2. Bio-Gel P-60 ゲルクロマトグラフィー

80%エタノール不溶性画分のBio-Gel P-60ゲルクロマトグラムがFig. 2に示されている。エタノール

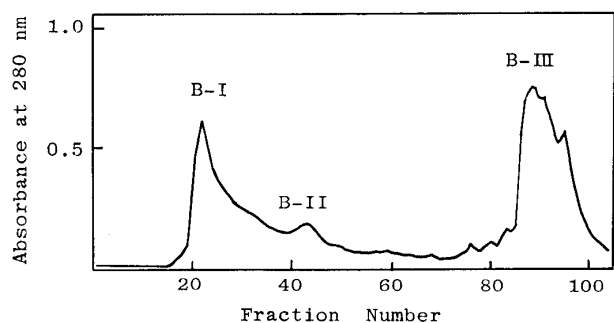


Fig. 2. Gel Filtration Profile on a Bio-Gel P-60 Column of the Precipitate after 80% Ethanol Extraction.

5ml of sample (100mg) were applied on a column (2.5×80cm). Elution was carried out with distilled water. A flow rate was 16.3 ml/hr. One tube contained 4.5ml.

不溶性画分は、Bio-Gel P-60により3つの画分 (B-I, B-II, B-III) に分画された。各画分は、降圧効果検討のため、SHRに腹腔内投与された。画分B-Iは、100mgのエタノール不溶性画分から、約30mg得られる画分で、そのSHRへの降圧効果をFig. 3に示す。血圧160~170mmHgのSHRに、15mg/100g体重の割合で投与した時には、1時間後に20%の、5mg/100g体重の割合で投与した時には10%の血圧降下が観察された。画分B-IIおよびB-IIIには、降圧効果は認められなかった。

画分B-Iは、ポイドボリュームで溶出され、Bio-Gel P-60の分画範囲が分子量60,000までであることから、画分B-Iは、分子量が60,000以上であることが考えられる。

3. DEAE-セルロースクロマトグラフィー

画分B-Iは、DEAE-セルロースによるイオン交換クロマトグラフィーにかけられ、降圧物質の精製が進められた。Fig. 4は、画分B-IのDEAE-セルロー

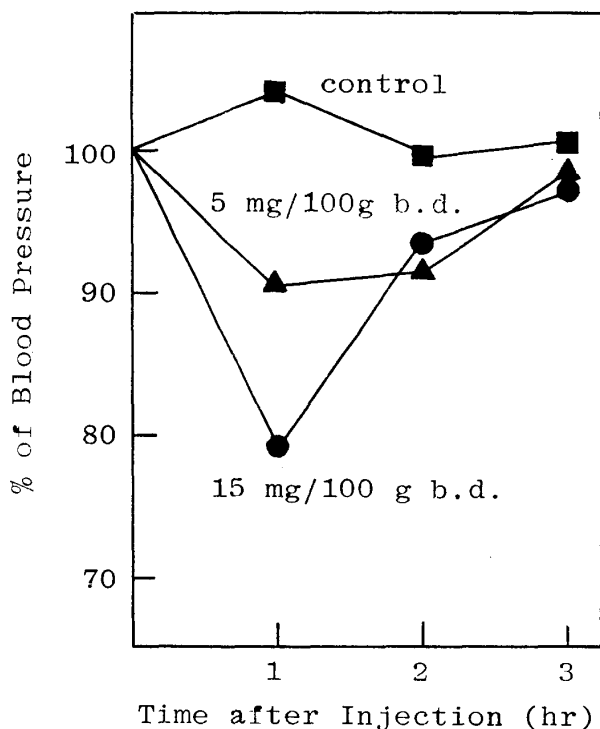


Fig. 3. Time Course of Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rat Intraperitoneally Fraction B-I.

Six SHR were tested. The initial blood pressure was about 165 mmHg. Fraction B-I was dissolved in 0.85% NaCl solution and injected intraperitoneally at the concentration of 15 or 5 mg/100g of body weight. Control was 0.85% NaCl solution.

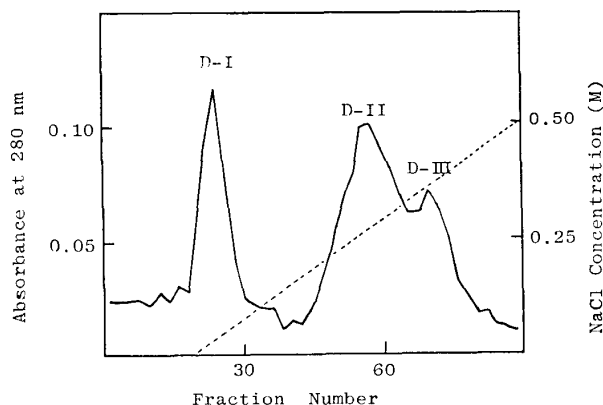


Fig. 4. DEAE-Cellulose Chromatographic Pattern of Fraction B-I.

20mg of fraction B-I were chromatographed on a DEAE-cellulose column (2.5×27cm) with a linear NaCl gradient (0 to 0.5 M) in 10 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.1, containing 70 mM KCl. A flow rate was maintained at 37 ml/hr. One tube contained 4 ml.

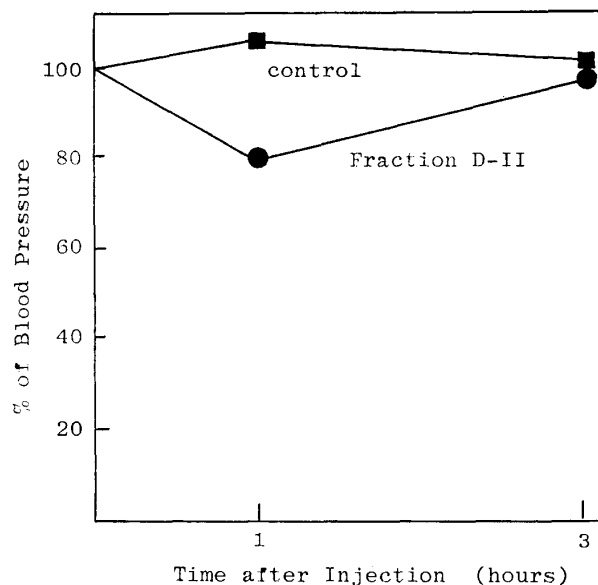


Fig. 5. Time Course of Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rat Injected Fraction D-II.

Experiment was carried out as described in Fig. 3. The initial blood pressure was about 185 mmHg. Fraction D-II was injected at the concentration of 0.5 mg/100g of body weight.

スクロマトグラムを示している。画分B-Iは、DEAE-セルロースにより3つの画分D-I, D-II, D-IIIに分画された。画分D-Iには、降圧効果が認められなかった。Fig. 5に、画分D-IIを0.5mg/100g体重の割合で、血圧180~190mmHgのSHRに投与した時の

血圧の変化が示されている。即ち、1時間後には、約20%の血圧降下が認められ、3時間後には殆んど投与前の血圧に戻っていた。画分D-IIIには、降圧効果はほとんど認められなかった。20mgの画分B-Iより、7mgのD-IIが得られた。

4. 画分D-IIのゲル電気泳動

Fig. 6は、画分D-IIのディスクおよびSDS電気泳動パターンを示している。ディスク電気泳動では、還元剤である2-メルカプトエタノールの存在および非存在、並びに尿素の存在および非存在のいずれの場合でも、泳動パターンに変化は認められなかった。このパターンから、精製は、相当進んでいるものと思われる。

また、SDS電気泳動の場合も、2-メルカプトエタノールの存在の有無にかかわらず同じパターンを示し、メインバンドの分子量はおよそ80,000と推定された。

5. 組成分析

画分D-IIのアミノ酸分析の結果をTable Iに示す。画分D-IIは、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、プロリンに富み、塩基性アミノ酸含量が小さかった。

Table IIは、画分D-IIの糖含量を示している。画分D-IIから誘導されたalditol acetateのガスクロマトグラムから、ガラクトース、マンノースおよびグルコサミンの存在が明らかとなった。これら構成糖のうち、ガラクトースが最も多く、次いでマンノース、グルコサミンとなっていた。

糖含有率が、全体で約38%となり、糖蛋白質としては極めて糖含量の高いものであった。

なお、著者らの焦点電気泳動法を用いた予備的な実

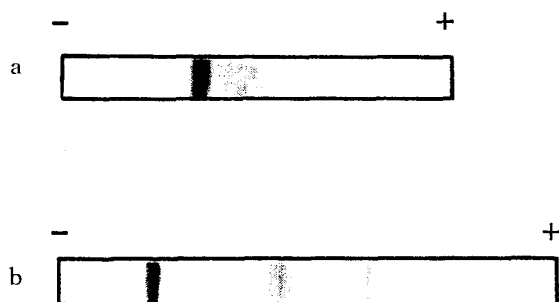


Fig. 6. Gel Electrophoresis of Fraction D-II.

a: Disc gel electrophoresis at pH 8.9-7.5% gel

b: Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Table I. Amino Acid Composition of Fraction D-II.

amino acid	
Lysine	3.2 mole%
Histidine	0.6
Arginine	2.2
Aspartic acid	10.9
Threonine	4.9
Serine	5.4
Glutamic acid	10.9
Proline	9.5
Glycine	8.3
Alanine	11.8
1/2 cystine	2.9
Valine	7.4
Methionine	2.1
Isoleucine	8.8
Tyrosine	2.3
Phenylalanine	4.8

Fraction D-II was hydrolyzed in 6N HCl at 110°C for 24 hours in a sealed tube under vacuum.

Table II. Carbohydrate Content of Fraction D-II.

galactose	291 mg/g
mannose	51
glucosamine	34

Hexose was determined by phenol-sulfuric acid method. The ratio of galactose to mannose was measured by gas-liquid chromatogram of alditol acetate derived from Fraction D-II. Amino sugar was determined with an amino acid analyzer after acid hydrolysis in 2N HCl at 100°C for 6 hours.

験では、画分D-IIは、その等電点をpH 3.5~pH 4.1にもっており、この結果は、酸性アミノ酸含量が高く、塩基性アミノ酸が少なかったことや、pH 4.5での酸沈澱で失われなかったこととも符号するものである。

高血圧症の原因として、現在まで、内分泌系、Na系、腎性因子など様々なものが採りあげられ研究されてきている。本研究で見い出された糖蛋白質が、どのような系に作用しているのかは、今後興味ある課題である。

謝 辞

本研究における構成糖の分析には、ゼリア新薬工業株式会社山科研究所、小島 寛氏、岡平 明氏の御指

導を願った。ここに謝意を表するものである。

引用文献

- 1) 岡本耕造・鈴木庸之・三宅英夫・飯塚義富・村上哲男・本田進・掛樋一晃 (1979) : 植物中の降圧物質について——抽出法とラット血圧に及ぼす影響, 近大医誌, **4**(2)補冊, 83~88.
- 2) 岡本耕造・鈴木庸之・三宅英夫・飯塚義富・村上哲男・本田進・掛樋一晃 (1980) : 植物中の降圧物質について (第二報), 近大医誌, **5**(3)補冊, 107~112.
- 3) SUZUKI, T., T.MURAKAMI, H.ITOH, N.MORITA, K. YAMAMOTO, and K. OKAMOTO (1977): Dietary effects on blood pressure and incidence of stroke in SHRSP. (2) Effects of protein source recieved some treatment. *Jap. Heart J.*, **18**, 531-532.
- 4) SUZUKI, T., T.MURAKAMI, H. MIYAKE and K. OKAMOTO (1978) : Hypotensive effects of peptide substanes separated from different protein sources in foods given SHRSP and SHR *Acta Medica Kinki Univ.*, **3**, 11-18.
- 5) SUZUKI, T., T.MURAKAMI, H. MIYAKE and K. OKAMOTO (1978) : Effects of peptide substances separated from several protein sources (white fish meal, euphausia. etc.) on blood pressure in SHRSP. *Jap. Heart J.*, **19**, 620-621.
- 6) OKAMOTO, K., Y. IIZUKA, T. MURAKAMI, H. MIYAKE and T. SUZUKI (1978) : Effects of chlorella alkali extract on blood pressure in SHR. *Jap. Heart J.*, **19**, 622-623.
- 7) 村上哲男・飯塚義富・松原義治・横井勝美・本田進・掛樋一晃・岡本耕造・三宅英夫 (1980) : クロレラエキスに含まれている血圧降下物質の分離固定, 近大医誌, **5**(3)補冊, 119-130.
- 8) 西土井 睦 (1982) : クロレラエキス ACE の生物活性, 食品科学研究会誌 (帝塚山短大), **4**, 1-7.
- 9) 金森正雄・島宗宏・野村晃・土井裕司 (1983) : クロレラの経口投与の高血圧自然発症ラットにおよぼす影響, 京都府大学報・農, **35**, 133-137.
- 10) DAVIS, B. J. (1964) : Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- 11) WEBER, K. and M.OSDORN (1969) : The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- 12) YAGUCHI, M. and M.B. PERRY (1970) : Ion exchange chromatography of 2-amino-2-deoxy-D-hexoses. *Cad. J. Biochem.*, **48**, 386-388.
- 13) DUBOIS, M., K. A. GILLS, J. K. HAMILTON, P.A. REDERS, and F.SMITH (1956) : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-365.
- 14) LEHNHARDT, W.F. and R.J. WINZLER (1968) : Determination of neutral sugars in glycoproteins by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **34**, 471-479.

Summary

The antihypertensive material was partially purified from chlorella. Cell wall of chlorella was destroyed with Dyno-mill. After defatted and decolorized with cold acetone, water extract was obtained from chlorella by the extraction at 4°C for 24 hours. 80% ethanol precipitate from water extract was fractionated by Bio-Gel P-60 gel filtration followed by DEAE-cellulose chromatography. About 50 mg of antihypertensive fraction D-II were obtained from 10g of chlorella. The molecular

weight of fraction D-II was about 80,000 dalton. The blood pressure of spontaneously hypertensive rat (13 weeks of age) was decreased from 185 to 150 mmHg, when fraction D-II was injected intraperitoneally at the concentration of 0.5 mg/100g of body weight. Fraction D-II contained galactose, mannose and glucosamine. The contents of aspartic acid, glutamic acid, alanine and proline in fraction D-II were large.