

大豆発酵食品のアンジオテンシン I 変換酵素阻害作用

江崎秀男*・志村亜希子*・長谷川淑己*・及川佐枝子*

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Effect of Fermented Soybeans

Hideo ESAKI, Akiko SHIMURA, Yoshiko HASEGAWA and Saeko OIKAWA

1. はじめに

近年、脳血管疾患と心疾患を含む循環器系疾患者は、癌と並んで日本人の主要な死因となっている。2016年の心疾患死亡者数は年間19.8万人であり、全死亡者数の15.1%を占めている¹⁾。また、脳血管疾患死亡者数は10.9万人であり、全死亡者数の8.4%を占めている²⁾。高血圧は、虚血性心疾患や慢性心不全、脳血管疾患など、あらゆる循環器系疾患の原因となり、その予防が強く求められている。高血圧を予防・改善するためには、日常の食生活の習慣を見直すことが望まれる。

高血圧の発症には種々の要因が関与しているが、特に食品成分との関連が深いものとしてアンジオテンシン変換酵素（Angiotensin I-converting enzyme：ACE）阻害作用がある。ACEは、腎臓のプロテアーゼ・レニンが血液中の糖たんぱく質（アンジオテンシンノーゲン）に作用して生成するアミノ酸10個のデカペプチド（DRVYIHPFHL）からなるアンジオテンシン I に作用して、昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II（DRVYIHPF）を生成する反応を触媒する酵素である。従って、食品中の成分がこの ACE の酵素反応を抑制（阻害）すれば、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II への変換量を減少させることになり、生体内での血圧上昇抑制効果が期待される。鈴木ら³⁾は、117種類の食品の ACE 阻害能を調べ、食品中には様々な ACE 阻害物質が存在することを示唆した。川上ら⁴⁾は、種々のハーブ水抽出物の ACE 阻害能を報告している。また、伊沢ら⁵⁾はキノコ類の ACE 阻害活性についてスクリーニング試験を行うとともに、活性成分としてニコチアミンを報告している。ACE 阻害作用を示す食品の研究は多く行われているが、一方では、たんぱく質の加水分解物であるペプチド類の血圧降下作用（「血圧が高めの方に適する」という表示）を目的とした数多くの特定保健用食品（ラクトリペプチド、ノリペプチド、ローヤルゼリーペプチドなど）が市場に出回っている。

本研究では、日常の食生活において利用している納豆および味噌、さらにインドネシアの伝統的な大豆発酵食品であるテンベを用いて、これらの ACE 阻害作用を調べたところ、

* 生活科学部 管理栄養学科

若干の知見が得られたので報告する。

2. 実験方法

2.1 テンペ、味噌および納豆の凍結乾燥物の調製

本実験で使用したテンペ（Y社の大豆テンペ，T社の大豆テンペおよびT社の黒豆テンペ）は，それぞれ岡山市および東京都の製造元より入手した。味噌（豆味噌，こうじ味噌および西京白味噌）は，愛知県清須市のN社より入手した。納豆（KS納豆，MG納豆，DR納豆およびMZ納豆）は，名古屋市の三越星ヶ丘店にて購入するとともに，三重県桑名市のK社よりKS納豆およびその原料として使用した発酵前の蒸煮大豆を入手した。テンペ，納豆および蒸煮大豆は，予備凍結後，凍結乾燥機（EYELA FDU-1100）を用いて4日間乾燥を行った後，コーヒーマルで粉末化した。一方，味噌はその重量の半量の蒸留水を加え，乳鉢を用いてホモジネートを調製した後，予備凍結を行い，同様に凍結乾燥・粉末化を行った。これらの凍結乾燥粉末FDP（Freeze-dried powder）は，使用時まで -30°C で保存した。

2.2 試料溶液の調製

まず，テンペ（3種類），味噌（3種類）および納豆（4種類）のFDP100mgを精秤し，ここに10%エタノール7.0mLを加え，室温で一晩振とう抽出を行った。その後，遠心分離（15000rpm，室温，20分間）を行い，各種大豆発酵食品の10%エタノール抽出液を回収した。

また，K社より直接に入手したKS納豆およびその原料である蒸煮大豆も，そのFDP500mgを精秤し，ここに10%エタノール7.0mLを加えて同様に抽出を行い，10%エタノール抽出液を調製した。この抽出液を10%エタノールで2倍，4倍，8倍希釈し，各希釈液をACE阻害活性の試料溶液とした。

2.3 HPLCを用いたACE阻害活性の測定

ACE阻害活性の測定は，前報⁶⁾に従って行った。ACEは(株)SIGMAのウサギ肺アセトンパウダー（Lung acetone powder from rabbit, L0756）を使用し，その300mgに125mMホウ酸緩衝液（pH8.3）9.0mLを加え， 4°C で一晩抽出した。その後，遠心分離（15000rpm， 4°C ，20分間）を行い，得られた上清をACE酵素液とした。基質は(株)ペプチド研究所のHHL（hippuryl-L-histidyl-L-leucine）（Bz-Gly-His-Leu $\cdot\text{H}_2\text{O}$ ，3064）を使用し，その26.1mgに125mMホウ酸緩衝液（pH8.3）10.0mLを加えて溶解した（5.33mM HHL溶液）。

各種大豆発酵食品の10%エタノール抽出液50 μL に5.33mM HHL溶液を150 μL 加え，予備加温した（ 37°C ，5分間）。その後，ACE酵素液100 μL を加え， 37°C で60分間加温した。エタノール700 μL を加えて酵素反応を停止させた後，遠心分離（12000rpm， 4°C ，10分間）を行い，上清を回収した。その上清20 μL を試料溶液として，生成した馬尿酸量（試料群の馬尿酸生成量）をフォトダイオードアレイ検出器（SPD-M10A，Shimadzu）装備の三次元HPLC（ポンプ：LC-10AT，カラムオープン：CTO-10AC）を用いて測定した。HPLCの分析条件は，カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6mm i.d. \times 250mm，NOMURA

CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度: 35°C, 溶離液: メタノール: 水: トリフルオロ酢酸 (20: 80: 0.1, v/v), 流速: 0.7mL/分, 注入量: 20μL, 検出波長: 228nm とした。

本実験では, 各試料溶液 1 種類につき 3 検体の抽出液 ($n=3$) を用いて酵素反応を行った。また, 対照試験として, 各試料溶液の代わりに抽出溶媒である 10% エタノールを用いた 3 検体も同様に酵素反応を行い, 生成した馬尿酸量 (コントロール群の馬尿酸生成量) を測定した。各試料溶液の阻害活性は, 次式を用いて算出し, 阻害率 (%) として表した。

$$\text{阻害率}(\%) = (1 - \text{試料群の馬尿酸生成量} / \text{コントロール群の馬尿酸生成量}) \times 100$$

3. 結 果

3.1 テンペの ACE 阻害作用

Y 社の大豆テンペ, T 社の大豆テンペおよび T 社の黒豆テンペの 10% エタノール抽出液 (実験方法 2.2) の ACE 阻害活性を図 1 に示した。いずれのテンペにおいても, 50% 以上の阻害率が認められたが, 特に Y 社の大豆テンペは T 社の大豆テンペより有意に ($p<0.01$) 強い阻害活性を示した。また, T 社の黒大豆を使用した黒豆テンペは, 同じテンペ菌を使用した T 社の大豆テンペより強い ACE 阻害作用を示した。

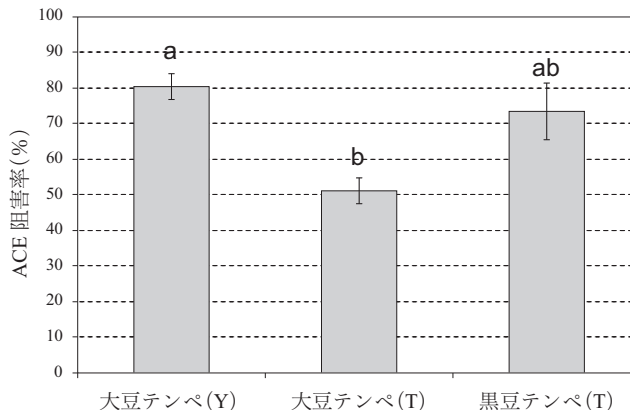


図 1 大豆テンペおよび黒豆テンペの ACE 阻害作用

それぞれのグラフの値は, 平均値±標準偏差 ($n=3$) を示す。異なるアルファベットは, 有意差 ($p<0.01$, Tukey) があることを示す。

3.2 味噌の ACE 阻害作用

味噌の ACE 阻害作用については, N 社より入手した豆味噌, こうじ味噌および西京白味噌の 10% エタノール抽出液 (実験方法 2.2) を用いて阻害活性を測定した。その結果を図 2 に示した。この図から明らかなように, いずれの味噌においても 50%~60% 程度の阻害率が得られたが, 原料および製造法が異なる 3 種類の味噌の間には有意差は認められなかった。

なお, この実験においては, 豆味噌, こうじ味噌および西京白味噌の食塩含量が, それ

ぞれ10.9%，11.4%および6.6%である事を考慮して，予備実験として，試料溶液として使用した10%エタノール抽出液の食塩濃度がACE酵素反応に影響を及ぼさないことを確認した。

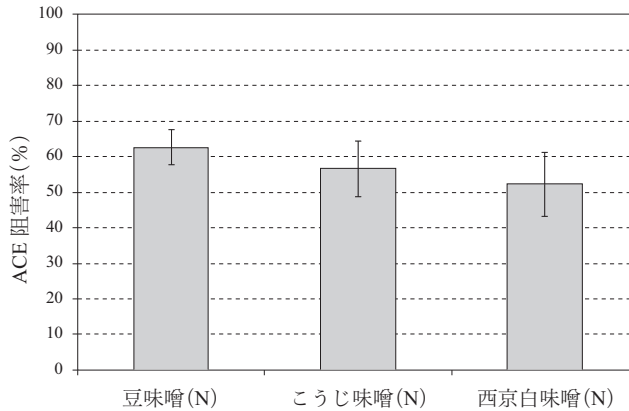


図2 豆味噌，こうじ味噌および西京白味噌の ACE 阻害作用
それぞれのグラフの値は，平均値±標準偏差 (n=3) を示す。

3.3 納豆の ACE 阻害作用

納豆の ACE 阻害作用については，先ず，実験方法2.2で調製した KS 納豆，MG 納豆，DR 納豆および MZ 納豆の10%エタノール抽出液を用いて阻害活性を測定した。その結果，KS 納豆，MG 納豆，DR 納豆および MZ 納豆の阻害率は，それぞれ90.1%，91.0%，93.0%および85.9%となり，強い阻害活性を示したが，各納豆間において阻害活性の大きな差異を得ることはできなかった。

そこで，これらの10%エタノール抽出液を5倍希釈し，この希釈液を用いて阻害活性

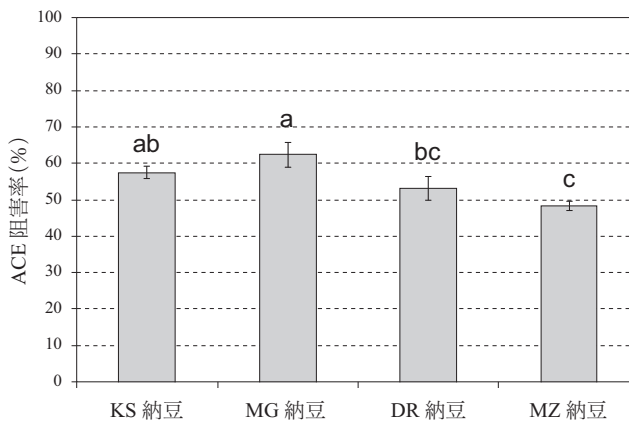


図3 製造元の異なる納豆の ACE 阻害作用

それぞれのグラフの値は，平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは，有意差 ($p < 0.05$, Tukey 検定) があることを示す。

を測定し、その結果を図3に示した。KS 納豆、MG 納豆、DR 納豆およびMZ 納豆の阻害率は、それぞれ57.5%、62.4%、53.1%および48.3%を示した。高い阻害率が見られたKS 納豆およびMG 納豆の間には、有意差は認められなかった。MG 納豆はDR 納豆およびMZ 納豆より有意に ($p<0.05$) 強い阻害活性を示した。また、KS 納豆もMZ 納豆より有意に ($p<0.05$) 強い阻害活性を示した。

3.4 納豆および蒸煮大豆の ACE 阻害作用

図3において強い ACE 阻害活性が認められた KS 納豆と、発酵前の蒸煮大豆を入手し、これらの ACE 阻害活性を測定した。納豆および蒸煮大豆の FDP500mg を 10% エタノール 7.0mL で抽出した試料溶液の 2 倍希釈液の阻害率は、蒸煮大豆で 84.3%、納豆で 95.3%であった。両者の間に大きな阻害率の差異が認められなかったため、さらに 4 倍希釈液および 8 倍希釈液を調製し、これらの希釈液の阻害活性を調べた。8 倍希釈液の阻害活性を図4に示した。この図から明らかなように、納豆の阻害率は 81.6% を示し、蒸煮大豆の阻害率 21.8% に比べ、約 4 倍の有意に ($p<0.01$) 強い阻害活性を示した。

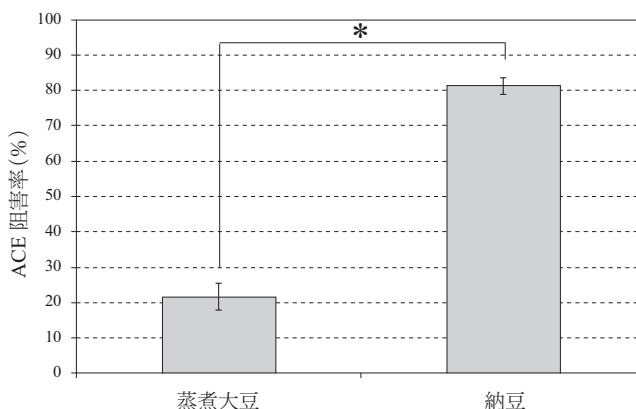


図4 納豆および発酵前の蒸煮大豆の ACE 阻害作用

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 ($n=3$) を示す。

*は、有意差 ($p<0.01$, t検定) があることを示す。

4. 考察・まとめ

大豆発酵食品は、発酵・熟成というプロセスのなかで大きく変化を受けた加工食品である。原料となる大豆中に含まれる種々の食品成分は、微生物の産生する様々な酵素によって微生物変換をうけ、新たな物質を生成する可能性も大である。従って、大豆発酵食品には、原料大豆には見られなかった新たな機能（栄養機能、嗜好機能、生体調節機能）が付与される場合が多い。消化性や風味の向上に加え、健康の維持・増進に寄与するいくつかの機能性が報告されている。

納豆の生体調節機能として注目された一つに、ナットウキナーゼ (NK) の発見がある⁷⁾。脳梗塞、心筋梗塞のほか、糖尿病、難聴などの多くは、血管内での血栓形成が引き

金となっている。このNKは血栓の主成分であるフィブリンを分解する強力な酵素であり、これらの疾病の予防・治療にその効果が期待されている。

味噌や醤油に含まれるメラノイジン（褐色色素）は、血中コレステロールを低下させたり⁸⁾、多くの生理機能を示す。また、豆味噌中に特異的に含まれる8-OHD（8-Hydroxydaidzein）、8-OHG（8-Hydroxygenistein）および6-OHD（6-Hydroxydaidzein）は、味噌の発酵・熟成中に麹菌の産生する酵素の作用によって新たに生成する抗酸化物質であり⁹⁾、食品の酸化的品質劣化を防ぐとともに、生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルを捕捉・消去し、がんをはじめとする生活習慣病の予防や老化の抑制に役立つ¹⁰⁾⁻¹²⁾。

インドネシアにはテンペとよばれる伝統的な無塩大豆発酵食品がある。大豆を一晩水に浸漬させた後、加熱処理を行い、ここにくものすかび（*Rhizopus* 属）を接種し、発酵させたものである。このテンペは、日本ではあまり馴染みがない食品であるが、その栄養価、嗜好性、健康機能性においては優れた食品である。

本研究では、これら大豆発酵食品を用いて血圧上昇抑制に関与するACE阻害作用について調べた。テンペ、味噌、納豆および蒸煮大豆は、それぞれ水分含量が異なるため凍結乾燥を行い、得られた乾燥粉末の一定量（100mg）に一定量の10%エタノール（7.0mL）を加え、その抽出液のACE阻害活性を測定した。

テンペのACE阻害率は、製造元や原料大豆の種類の違いによって異なっており、50%～80%の値を示した（図1）。T社の黒大豆を使用した黒豆テンペは、同じテンペ菌を使用したT社大豆テンペより強いACE阻害作用を示したが、この原因としては、テンペ発酵に使用した通常大豆と黒大豆に含まれる成分が、その種類や含有量において異なることが一要因として考えられる。

味噌のACE阻害作用については、同じ製造元（N社）で醸造された3種類の味噌（豆味噌、こうじ味噌、西京白味噌）を用いて阻害活性を測定した。その結果（図2）、大豆だけを主原料（少量の香煎を使用）とした豆味噌の阻害率は62.6%の値を示した。また、主原料（大豆と米の総重量）の47%に相当する米を使用したこうじ味噌および主原料の61%の米を使用した西京白味噌の阻害率は、それぞれ56.6%および52.3%を示した。この結果から、原料として大豆だけを使用した豆味噌の阻害活性は強く、主原料の50%以上を米に置き換えた米味噌は多少阻害活性が弱くなる傾向にあったが、両者の間には有意な差は認められなかった。

納豆についても、テンペや味噌と同様な方法で調製した10%エタノール抽出液を用いて阻害活性を測定した。製造元の異なる4種類の納豆は、すべて90%程度の非常に高い阻害率を示し、各納豆間において活性の差異を知ることはできなかった。そこで、この10%エタノール抽出液を5倍希釈し、その希釈液の阻害活性を調べた。この結果（図3）、5倍希釈液において、50%～60%程度のテンペや味噌とほぼ同等の阻害率が得られた。これらの実験結果より、納豆のACE阻害作用は、テンペや味噌より5倍近く強いことが明らかとなった。

本研究においては、最も強いACE阻害活性を示した納豆について、その阻害作用が発酵というプロセスのなかで新たに生じることを確認した。実験試料として、強い阻害活性が認められたKS納豆（MG納豆と有意差なし）とその原料である蒸煮大豆を製造元より入手した。ACE阻害活性を測定した結果（図4）、納豆の阻害率は81.6%となり、蒸煮大

豆の阻害率21.8%に比べ、約4倍の強い阻害活性を示した。この結果より、納豆は発酵により、ACE阻害活性が顕著に増強することが分かった。ACE阻害作用を示す活性成分として報告されている物質の多くはペプチド類であるが、キノコ類⁵⁾や大豆¹³⁾には活性成分としてニコチアナミンが含有されている。また、米糠中のフィチン¹⁴⁾、茶成分であるカテキン類やその酸化生成物であるテアフラビンもACE阻害物質として報告されている¹⁵⁾。

今後は、納豆中の発酵によって生成したペプチド類やその他の活性物質を各種クロマトグラフィーにて分離・精製し、その化学構造を決定するとともに、ACE阻害作用の強い納豆の創製についても検討していきたい。

謝辞

本研究において、納豆およびその原料である蒸煮大豆をご提供いただきました(株)小杉食品に、また各種味噌を提供いただきましたナカモ(株)に感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり、実験に取り組んでいただいた大橋瑛莉さんおよび大江麻希さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 久松隆史, 三浦克之, 我が国における心疾患の死亡率・罹患率の動向, 日循予防誌, **53**, 1-8 (2018).
- 2) 厚生労働省, 平成28年(2016)人口動態統計(確定数)の概況. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/index.html>
- 3) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙, 食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について, 農化, **57**, 1143-1146 (1983).
- 4) 川上晃, 茅原紘, 忌部東洋, 只佐弘治, ハーブ水抽出物のアンジオテンシン I 変換酵素及びコラーゲン阻害能, 信州大学農学部紀要, **31**, 97-107 (1994).
- 5) 伊藤華子, 青柳康夫, キノコのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性, 食科工, **53**, 459-465 (2006).
- 6) 志村亜希子, 及川佐枝子, 江崎秀男, HPLC 法によるアンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定と各種スプラウトの阻害活性, 椛山女学園大学研究論集, 46号, 71-80 (2015).
- 7) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H., A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; a Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet. *Experientia.*, **43**, 1110-1111 (1987).
- 8) Miura, M., Gomyo, Effect of Melanoidin on Cholesterol in Plasma, Liver and Feces in Rats Fed a High-cholesterol Diet. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2403-2408 (1988).
- 9) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T., New Potent Antioxidative *o*-Dihydroxyisoflavones in Fermented Japanese Soybean Products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1637-1639 (1999).
- 10) Esaki, H., Shirasaki, T., Yamashita, K., Nakamura, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T., Absorption and Excretion of the 8-Hydroxydaidzein in Rats after Oral Administration and Its Antioxidant Effect. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 80-86 (2005).
- 11) Tikkanen, M. J., Wähälä, K., Ojala, S., Vihma, V. and Adlercreutz, H., Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 3106-3110 (1998).
- 12) Watanabe, S., Haba, R., Tarashima, K., Arai, Y., Miura, T., Chiba, D. and Takamatsu, M., Antioxidant activity of isoflavones in humans. *BioMarker*, **10**, 227-232 (2000).

- 13) 竹中哲夫, 村山崇志, 竹中陽子, 大豆煮汁からのニコチアナミンの単離と加熱処理による変動, 食科工, **56**, 6-13 (2009).
- 14) 斎藤義幸, 中村桂子, 川戸章嗣, 今安聡, 清酒, および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質, 農化, **66**, 1081-1087 (1992).
- 15) 原征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫, 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について, 農化, **61**, 803-808 (1987).