

表面プラズモン共鳴バイオセンサーによるサツマイモ品種すいおうに含まれるカフェオイルキナ酸類とアンギオテンシン I 変換酵素との相互作用解析

波多野哲也・氏原邦博[§]・石黒浩二¹⁾・吉元 誠²⁾・佐藤哲生

(2011年2月10日 受理)

要 旨

波多野哲也・氏原邦博・石黒浩二・吉元 誠・佐藤哲生 (2011) 表面プラズモン共鳴バイオセンサーによるサツマイモ品種すいおうに含まれるカフェオイルキナ酸類とアンギオテンシン I 変換酵素との相互作用解析。九州沖縄農研報告 56: 39-44.

表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用い、サツマイモの茎葉に含有される機能性成分であるカフェオイルキナ酸類と血圧上昇に関与するアンギオテンシン I 変換酵素との相互作用を測定し、解離定数を算出した。その結果、解離定数は3, 4, 5-O-triCQA が最も小さく、次いで、4, 5-O-diCQA, クロロゲン酸, 3, 4-O-diCQA, 3, 5-O-diCQA, カフェ酸の順であった。さらに、解離定数と従来法で得られたアンギオテンシン I 変換酵素50% 阻害濃度との相関を求めたところ、 $r=0.901^{**}$ となり高い正の相関関係が認められた。このことから、表面プラズモン共鳴バイオセンサーはアンギオテンシン I 変換酵素阻害活性の新たな評価法として利用が期待できることが示された。

キーワード：サツマイモ茎葉、すいおう、アンギオテンシン I 変換酵素阻害活性、カフェオイルキナ酸類、表面プラズモン共鳴バイオセンサー。

I. 緒 言

アンギオテンシン I 変換酵素 (以下 ACE) [EC 3. 4. 15. 1] は、アンギオテンシン I を昇圧効果があるアンギオテンシン II に変換し、また降圧作用を持つペプチドのブラジキニンを不活性ペプチドに変換する¹⁰⁾。ACE 阻害により血圧上昇の抑制が可能となることから、阻害活性を有する薬や健康機能食品が開発されている¹⁰⁾。これまで、食品由来としては、ペプチド^{6, 9, 15)}、ニコチアナミン⁷⁾、カテキン²⁾、テアフラビン²⁾、フィチン酸¹⁴⁾ といった成分の ACE 阻害活性が報告されている。

近年、サツマイモ茎葉を食用とする品種「すいおう」が開発された³⁾。この茎葉中に特に多く含まれるポリフェノール類であるカフェオイルキナ酸 (以下 CQA) 類には ACE 阻害活性が認められており、粉末を食餌添加した高血圧自然発症ラット (以下

SHR) での血圧上昇抑制⁴⁾、SHR への CQA 類の直接投与による血圧低下¹¹⁾ が報告されており、CQA 類の ACE 阻害活性が血圧上昇抑制に寄与していることを示している。

既報では、ACE 阻害活性の測定にはマイクロプレートを用い、O-フタルアルデヒドによる蛍光発色を測定する方法が用いられている^{4, 10)} が、数度にわたり酵素や基質の調整が必要となる。

表面プラズモン共鳴 (以下 SPR) バイオセンサーは、リガンドとアナライト、すなわち酵素と生理活性成分との相互作用を微量のサンプルで直接的にリアルタイムな測定ができ、一度センサーチップに固定化したりガンド (酵素) は繰り返し利用することができる^{1, 5, 12)}。この手法を用いてプロテインキナーゼと小分子阻害剤の結合を酵素反応速度論的に解析した結果、新薬発見の過程で役に立つことが示唆されている¹³⁾。

九州沖縄農業研究センター畜産草地研究領域：861-1192 熊本県合志市須屋2421

1) 現、北海道農業研究センター

2) 現、鹿児島女子短期大学

§ 連絡先 (Corresponding author), kuji@affrc.go.jp

本研究では、SPR バイオセンサーに ACE を固定化し、ACE と CQA 類の相互作用を測定することにより、解離定数（以下 K_D ）の算出を試みた。この解離定数と従来法による ACE 阻害活性との相関を調べることにより、SPR バイオセンサーを用いた ACE 阻害活性評価について検討を行った。

II. 材料および方法

実験方法

1. 試薬

ACE（ウサギ肺由来）およびクロロゲン酸（chlorogenic acid, 以下 5-CQA）は Sigma-Aldrich 社製（Missouri, US）、カフェ酸（caffeic acid, 以下 CA）は和光純薬工業株式会社製（大阪）、3, 4-*O*-diCQA（以下 3, 4-diCQA）、3, 5-*O*-diCQA（以下 3, 5-diCQA）、4, 5-*O*-diCQA（以下 4, 5-diCQA）および 3, 4, 5-*O*-triCQA（以下 3, 4, 5-triCQA）は石黒ら（2007）の方法によりサツマイモ茎葉から精製したものをを用いた。SPR 分析用のランニングバッファー HBS-EP、アミノカップリングキット等は GE Healthcare 社製（Buckinghamshire UK）を用いた。その他の試薬は、市販の特級試薬を、水は超純水を用いた。

2. 測定機器

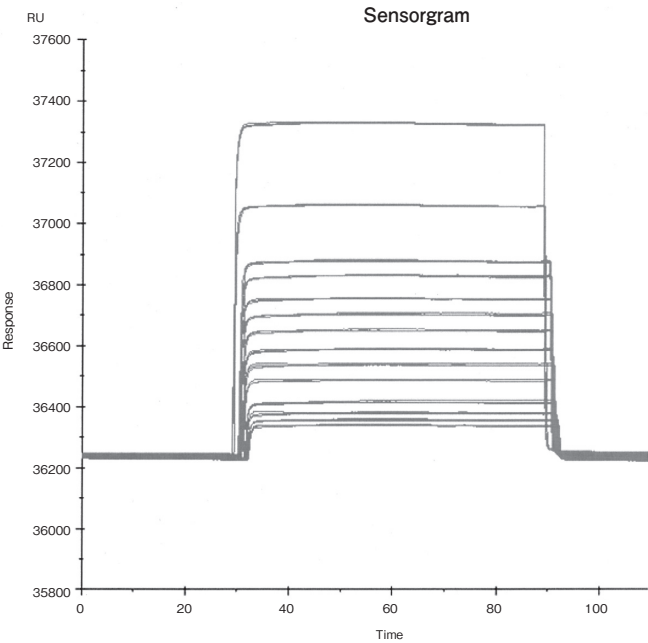
SPR バイオセンサーは、Biacore T100 (GE Healthcare 社製)、 K_D 算出には Evaluation Software (GE Healthcare 社製) を使用した。

3. 実験方法

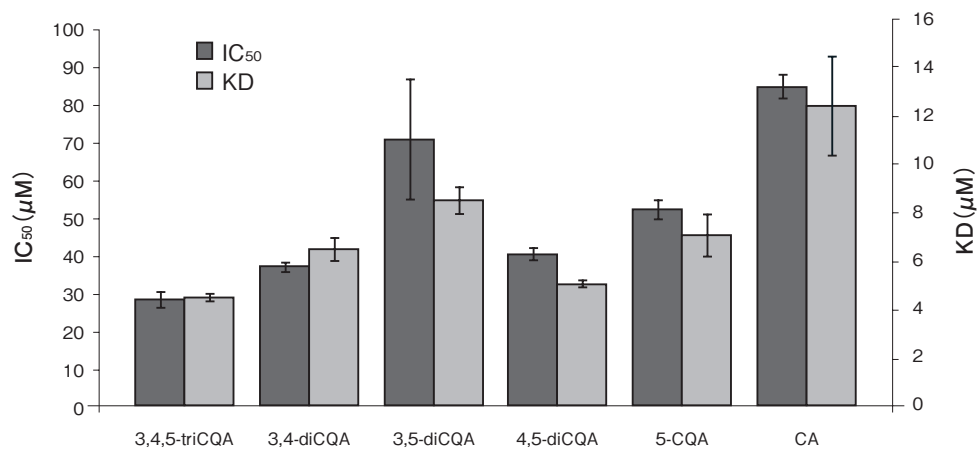
1) SPR バイオセンサーによる ACE と CQA 類との相互作用測定

(1) ACE の固定化

ACE は、アミンカップリング法によりセンサーチップ C1 (GE Healthcare 社製) に以下のステップを経て固定化した。すなわち、ランニングバッファーとして HBS-EP (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% surfactant P20) を用い、センサーチップ表面のカルボキシル基を賦活化させるために、0.2M 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride と 50mM N-hydroxysuccinimide の混合溶液を流速 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で 7 分間注入した。酵素溶液として ACE (0.1U) を $20\mu\text{L}$ の超純水に溶かし、さらに 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) $80\mu\text{L}$ を加え、センサーチップに流速 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で 7 分間注入し、ACE 表面のアミノ基とセンサーチップ表面にある賦活化したカルボキシル基とを結合させた。また、賦活化されているが、ACE と結合しなかつ



第 1 図 SPR バイオセンサーによって測定した ACE と 3, 5-diCQA の相互作用のセンサグラム



第 2 図 CQA 類の ACE に対する IC₅₀と SPR バイオセンサーによる CQA 類と ACE の相互作用 (K_D)

注) IC₅₀は既報 (石黒ら2007) の成績を用いた。

た表面のカルボシル基をブロッキングするため、1M Ethanolamine-HCl を流速10 μL/min で 7 分間注入した。

(2) ACE と CQA 類との相互作用測定

HBS-EP にジメチルスルホキサイド (以下 DMSO) を0.6% 加えてランニングバッファーとして用いた。サンプルは、DMSO で20mM に調整した CQA 類をランニングバッファーで0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 45.0, 50.0 μM に希釈して用いた。サンプル溶液を添加時間60秒、流速30 μL/min で注入し、反応を計測した。サンプル注入終了から140秒後に、20mM NaOH を添加時間60秒、流速30 μL/min で注入し、センサーチップ内に残った CQA 類を除去した。相互作用測定は各濃度について 3 回行った。得られたセンサグラムについて Evaluation Software を使用し、K_D を算出した。

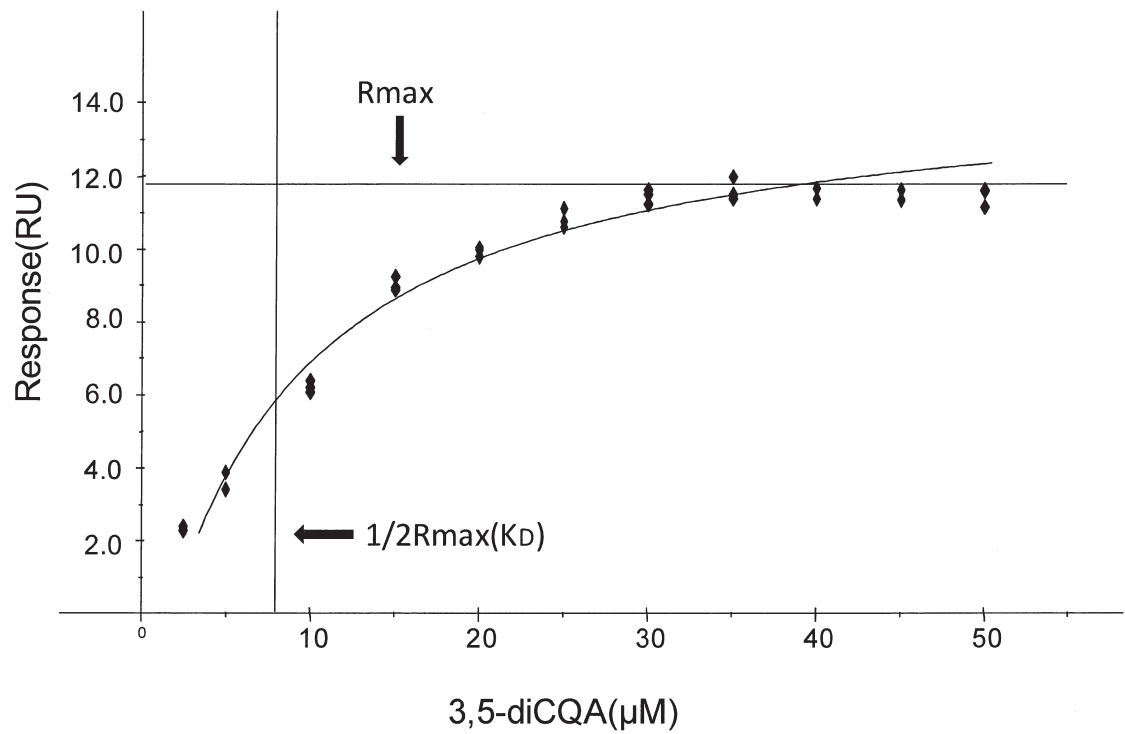
2) 従来法による CQA 類による ACE 阻害活性の測定

既報⁴⁾の50% 阻害濃度 (IC₅₀) の成績を用いた (第 3 図)。

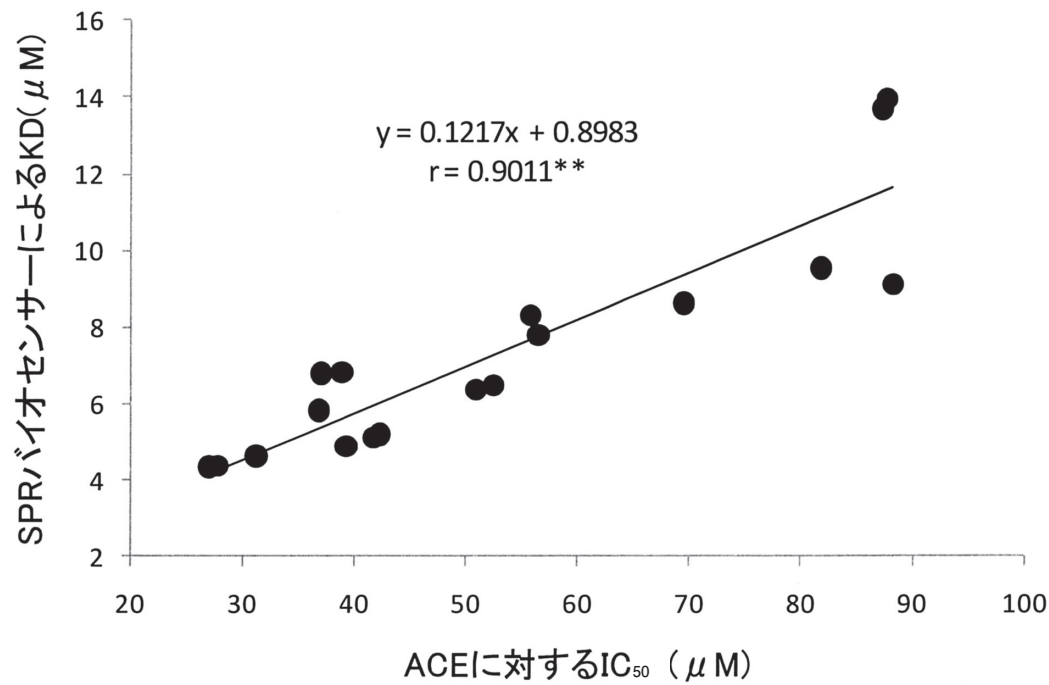
Ⅲ. 結果および考察

ACE のセンサーチップ C1 への固定化量は 623.5RU であった。SPR バイオセンサーによって得られたセンサグラムは箱形であり (第 1 図)、結合領域および解離領域は極めて短く、直接反応速度式をあてはめて解離定数を導き出すことが不可能で

あった。このため、CQA 類濃度に対するレスポンス値 (RU: Resonance units) が平衡値 (R_{max}) の 1/2 となる時の CQA 類濃度を K_D として算出するアフィニティー解析法を用いた。第 2 図に SPR バイオセンサーによる ACE と 3, 5-diCQA の相互作用を示した。K_D はレスポンス値が R_{max} の 1/2 となる時の 3, 5-diCQA の濃度であり、この場合には 8.5 μM であった。同様に分析した 6 種の CQA 類と ACE との相互作用は 3, 4, 5-triCQA が最も強く、K_D は 4.4 μM であり、次いで 4, 5-diCQA (K_D: 5.1 μM), 3, 4-diCQA (K_D: 6.5 μM), 5-CQA (K_D: 7.1 μM), 3, 5-diCQA (K_D: 8.5 μM), CA (K_D: 12.4 μM) の順であった (第 3 図)。従来法による CQA 類の ACE 阻害活性は 3, 4, 5-triCQA (IC₅₀: 28.7 μM), 3, 4-diCQA (IC₅₀: 37.5 μM), 4, 5-diCQA (IC₅₀: 41.0 μM), 5-CQA (IC₅₀: 53.0 μM), 3, 5-diCQA (IC₅₀: 71.3 μM), CA (IC₅₀: 85.5 μM) の順であった (第 3 図)。4, 5-diCQA と 3, 4-diCQA の順序が逆転する結果となったが、4, 5-diCQA の K_D 値と 3, 4-diCQA の K_D 値との間に有意な差は認められず、IC₅₀ 値についても同様に有意な差は認められなかった。また、SPR バイオセンサーによる K_D 値と従来法による CQA 類の ACE 阻害活性 (IC₅₀) との間には r=0.901** と高い正の相関が認められた (第 4 図)。これらのことから SPR バイオセンサーを用いて ACE と CQA 類の相互作用を測定し、K_D を算出することにより、CQA 類の ACE 阻害活性が評価できることが示唆された。



第3図 SPR バイオセンサーによって測定した ACE に対する 3, 5-diCQA の濃度の影響



第4図 CQA 類の ACE に対する IC₅₀と SPR バイオセンサーによる CQA 類と ACE の相互作用 (KD) の相関関係

注) **: 1%水準で有意差があることを示す。

SPR バイオセンサーのセンサーチップへ固定化するために必要な ACE は 70 mU であり、固定化 20 日後までに 648 サンプルについて分析を行ったが、測定値に大きな変動は認められなかった（データ省略）。従来法では 1 サンプルあたり 1 mU が必要であることから、ACE の必要量では SPR バイオセンサーによる分析が 10 倍近く効率的であった。また、分析に必要な CQA 類の成分量も、ACE との相互作用が強い 3, 4, 5-triCQA では SPR バイオセンサーによる K_D が $4.4 \mu\text{M}$ に対して従来法の IC_{50} は $28.7 \mu\text{M}$ と 6.5 倍の差があった（第 3 図）。ACE との相互作用が最も弱い CA でも SPR バイオセンサーによる K_D が $12.4 \mu\text{M}$ に対して従来法の IC_{50} は $85.5 \mu\text{M}$ と 6.9 倍の差であった（第 3 図）。CQA 類による ACE 阻害活性測定において、SPR バイオセンサーを用いることにより、従来法に比較して試料量が減少できることが示された。

以上のように SPR バイオセンサーにより ACE と CQA 類の相互作用を測定することにより、CQA 類による ACE 阻害活性が評価できること、従来法に比較して試料量が節約できることが示され、新たな評価法としての利用が期待できる。従来法による ACE 阻害活性測定では ACE と CQA 類だけではなく基質（HHL）が不可欠であり、CQA 類が ACE に作用しているのか、基質に作用しているのか、あるいはその両方なのかは明らかにできない。今回の結果から CQA 類が少なくとも ACE に結合し、ACE の活性を阻害していることが明らかとなった。今後、葉からの抽出物で相互作用測定ができれば、成分育種の効率化等に寄与するものと期待できる。

引用文献

- 1) Biacore Sensor Surface Handbook, Version AA (2003) : 27. GE Healthcare Co.
- 2) 原征彦・松崎尚子・鈴木建夫 (1987) 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.
- 3) K. Ishiguro, J. Toyama, MD. Shahidul Islam, M. Yoshimoto, T. Kumagai, Y. Kai, Y. Nakazawa, O. Yamakawa (2004) Suioh, A new Sweetpotato Cultivar for Utilization in Vegetable Greens. Acta Hort. **637** : 339-345.
- 4) 石黒浩二・吉元誠・鐔田仁人・高垣欣也 (2007) サツマイモ茎葉の血圧降下作用. 食科工 **54** : 45-49.
- 5) 磯部俊明・中山敬一・伊藤隆司 (2007) 分子間相互作用解析ハンドブック. 羊土社, 東京.
- 6) 伊澤華子・青柳康夫 (2006) 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.
- 7) 伊澤華子・吉田望・白貝紀江・青柳康夫 (2008) 豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性. 食科工 **55** : 253-257.
- 8) 河村幸雄 (2000) アンジオテンシン変換酵素阻害. 食品機能性研究法 : 109-112. 光琳, 東京.
- 9) MATSUI, T., MATSUFUJI, H., SEKI, E., OSAJIMA, K., NAKASHIMA, M. and OSAJIMA, Y. (1993) Inhibition of Angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. Biosci. Biotech. Biochem. **57** : 922-925.
- 10) 三上一保・吉元誠 (2009) ACE 変換酵素阻害活性 (マイクロプレート法). 食品機能性評価マニュアル集 第Ⅲ集 : 68-73.
- 11) Satoshi MISHIMA, Chie YOSHIDA, Sayuko AKINO and Takashi SAKAMOTO. (2005) Antihypertensive Effects of Brazilian Propolis: Identification of Caffeoylquinic Acids as Constituents Involved in the Hypotension in Spontaneously Hypertensive Rats. Biol. Pharm. Bull. **28** : 1909-1914.
- 12) 永田和宏・半田宏 (2002) 生体相互作用のリアルタイム解析実験法. シュプリンガー・フェアラーク, 東京.
- 13) Helena NORDIN, Maria JUNGNELIUS, Robert KARLSSON, of P. KARLSSON (2005) Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology Analytical Biochemistry. **340** : 359-368.
- 14) 斉藤義幸・中村圭子・戸川章嗣・今西聡 (1992) 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.
- 15) 末綱邦男・箴島克裕 (1989) イワシ筋肉由来ペプチドの in vivo における血圧降下作用ならびに血管拡張作用について. 栄食誌 **42** : 47-54.

Using Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors for Analyzing the Interaction Between Caffeoylquinic Acid Derivatives Contained in the Stems and Leaves of Sweetpotato Variety “Suioh” and Angiotensin I-converting Enzyme

Tetsuya Hatano, Kunihiro Ujihara[§], Koji Ishiguro¹⁾, Makoto Yoshimoto²⁾ and Tetsuo Sato

Summary

The Functional elements caffeic acid and caffeoylquinic acid (CQA) derivatives are contained in the stems and leaves of sweetpotato variety “Suioh” CQA derivatives are expected to inhibit angiotensin I-converting enzyme (ACE) and thus to lower the blood pressure level. The interactions between six CQA derivatives and ACE were analyzed by using surface plasmon resonance (SPR) biosensors. Affinity analysis was performed, and then K_D values were calculated with the installed software. The K_D values were found to be 3,4,5-*O*-triCQA, 4,5-*O*-diCQA, 3,4-*O*-diCQA, chlorogenic acid, 3,5-*O*-diCQA, and caffeic acid in ascending order. The previously obtained correlation coefficient between K_D and IC_{50} was $r=0.901^{**}$. The high and positive correlation obtained suggested that this may be a promising new analysis method

Key words: Sweetpotato tops, Suioh, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, caffeoylquinic acids, surface plasmon resonance (SPR) biosensor.

Livestock and Grassland Research Division, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, 2421 Suyu, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan.

Present address:

1) NARO Hokkaido Agricultural Research Center

2) Kagoshima Women's Junior College

§ Corresponding author, kuji@affrc.go.jp