

## 血圧調節因子RA系におけるレニン活性とACE活性に関する研究

木元 幸一, 黒田 裕子

(平成7年10月12日受理)

### Studies on Renin and ACE Activities of Factors in Hypertension

Koichi KIMOTO and Yuhko KURODA

(Received October 12, 1995)

#### 緒 言

近年のわが国に於ける平均寿命の伸びは著しいものであり、それは、環境因子も含めて医学を始めとした諸科学の成果に負うところであることは誰もが認めるところであろう。しかし、老年期に関わらず、成人病として知られている幾つかの疾病があり、健康に対する不安が依然として存在していることも事実である。その中で心臓や脳血管系の障害が高い確率であり一時期わが国に於ける死因の第一位を占めていた。そのリスクファクターは、高血圧と高コレステロール血症でありその発症には、いずれも遺伝的要因と食習慣が深く関与している事は周知の事実である。食習慣がその発症に深く関わっているという事は、予防ばかりでなく予後の生活も極めて重要であること、そしてこれらの疾病対策には医学のみならず栄養学的視点からのアプローチが必須であり、健康維持のための栄養学的戦略の構築が望まれている。高血圧が長期間続くと動脈硬化・心筋梗塞・脳卒中等を誘発して死に至る場合がある。これらは、一種の高血圧合併症であり、わが国でも欧米でも全死者の40%にも達するといわれている。このように高血圧症は、心筋梗塞や脳卒中等の誘引となることは多くの研究の結果明らかになってきておりその改善と予防は中高年者の健康問題を考える上で重要なことである。

人間の高血圧の90%を占めるといわれるのは、本態性高血圧である。血圧調節系としては、交感神経系、バソプレッシン系、エンドセリン系などの昇圧系と、カリクレイン・キニン系、プロスタグランジン系、心房利尿ホルモン系などの降圧系が知られている。最近の種々の基

礎的研究の結果、本態性高血圧の2/3においてレニン・アンジオテンシン系が中心的役割をしているということが分かってきた。レニンの研究は、1898年ウサギの腎臓からの抽出液が血圧上昇作用を有することが発見されたことが最初である。この抽出液に存在するであろう酵素は、腎臓のラテン名にちなんでレニンと名づけられた<sup>1)</sup>。この後の研究により血圧上昇を起こす物質は、レニン自信ではなくレニンによって産出されるアンジオテンシンII(AII)であることが明らかになった。レニンは、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンに作用しデカペプチドであるアンジオテンシンI(AI)を生成する。これにはほとんど昇圧作用は無く、続いてアンジオテンシン変換酵素(ACE)によりAIIとなる。このAIIがAII受容体と結合し、強い血管収縮作用を示す。AIIはさらに副腎皮質ホルモンであるアルドステロンの分泌を刺激しナトリウムを貯留する。この酵素・ホルモン系の血圧調節システムは様々な高血圧を呈する病態の解析や治療において最も重要な指標となってきた<sup>2)</sup>。現在まで、レニンアンジオテンシン系(RA系)を抑制する降圧剤としてcaptopril<sup>3)</sup>などが有用で広範に使われているが降圧剤は、一旦服用すると生涯に亘って使用しなければならずその副作用が心配される。高血圧状態を薬物によって正常に戻すことは、病気の治療や症状の改善にとって必須のことであり、今日特に劇的な効果が期待できるまでになっている。しかしながら薬物の場合は、一旦服用始めるとその後手放すことは難しく、降圧剤を生涯に亘って服用することは様々な副作用を起こしたり、他の疾病の引き金になったりする恐れもある。そこで栄養学の果たす役割としては、日常生活の中で疾病を防ぎ健康を維持するための手助けをすることが使命となってくる。日常生活とは、食べ物であり、もう一つは運動で

ある。前者については食事成分そして近年の機能性食品等がある。後者については、今や栄養所要量(厚生省)の中で栄養摂取量と共に運動所要量まで述べられていることからその必要性は明らかである。我々は、以上の2点を栄養学上の重要な視点として血圧調節に関わる種々の因子について生化学的研究を進めている。

著者らは、今までにRA系に関わるhumanとratのアンジオテンシノーゲンのcDNAをchinese hamster ovary cell (CHO cells)に導入、遺伝子発現アンジオテンシノーゲンの培養細胞による産生に成功し、その生化学的検討を行った<sup>4, 5)</sup>。

今回我々は、これらのテーマに対する研究法を確立するためにRA系血圧調節システムの追跡としてEIA法、CLEIA法の検討並びにACE活性の検討を行った。また極めて飲水量が少なく尿量も少ないといわれ、その電解質代謝に興味を持たれる *Mongolian gerbil* スナネズミのRA系の検討と植物・食品中のACE阻害活性ペプチドの検索を行った。

## 方 法

### 1. 抗体の作成

アンジオテンシン I の抗体作成はパナファームラボラトリーズにおいて行った。免疫用抗原としてアンジオテンシン I-BSAをグルタルアルデヒド法で作成した。アジュバンド I (FCA) とアジュバンド II (FIA) を抗原溶液と共に混和しウサギ皮内に接種し免疫を行った。力価は得られた血清について A I に対する抗体価を ELISA法により求めた。標識は、horse raddish peroxidase, rabbit IgG, goAt IgGを使用した。

### 2. A I generation assay

plasma 50  $\mu$ ml, angiotnsinogen 100  $\mu$ ml,

A I generation bufferを混合し、37  $^{\circ}$ C、1時間反応させて、生成する A I をELISA法により定量した。

A I generation bufferは、0.1Mリン酸buffer, pH 7にEDTA, DFP, を含んでいる。腎臓からの抽出は、A I generation bufferにヘモグロビンを加えたものを抽出液とした。ホモキナイズし、100,000  $\times$  gで遠心後上澄液を得た。

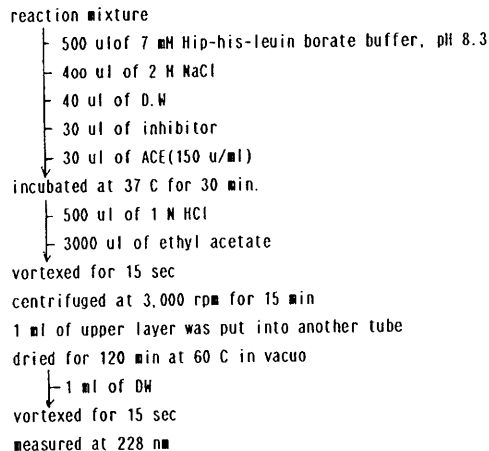
### 3. ELISA法による A I の定量

鈴木らの方法<sup>5)</sup>により行った。A I 抗体をイミュノプレート96穴に固定化、ブロッキング後、A I とHRP-A I を競合法による免疫測定法を行った。固定 A I -Ab結

合HRP-A I と過酸化水素の反応後TMB (3355-tetra methyl bezidine/dimethylformamide) 試薬で発色させて450nmで定量した。なお力価は変動するので毎回検量線を求めてA I RIA mateにより計算した。ルミノールによるCLEIA (化学発光法) は、Krickarra<sup>7)</sup>の方法に準じて同じくHRP-A I を用いた。ただしTMB試薬の代わりにluminol/p-iodophenol (enhancer) を用いた。測定は、Dynatech ML3000を用いて行った。

### 4. ACE害活性の測定法

Cushman & Cheungらの方法を改良して行った。アンジオテンシン変換酵素はrabbit lung aceton powder (sigma chemicals) を使用し、基質は, hip-his-leu, またはhip-gly-glyを用いて, scheme 1 に示すように行った。hippuric acidの溶液を基質の代わりに用いて全く同様に処理しFig. 1に示されるような検量線を得た。検量線より1分間に $\mu$ molのhippuric acidを生成する酵素量を1unit (U) とした。一方HPLCによる反応と生成物を確認した。



$$\text{Residual activity}(\%) = \frac{\text{Sample-Blank}}{\text{Control-Blank}} \times 100$$

Scheme 1 Assay method of ACE inhibitory

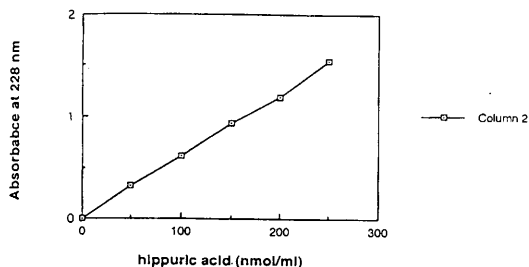


Fig 1 Standard curve for hippuric acid at 228nm

5. 血圧測定

Softron非観血式自動血圧測定装置BP-98A (ソフトロンKK) を用いて行った。

6. 実験材料

スナネズミは, *M. gerbil* 種の無菌飼育した7週齢のものを日本医科大より得た。試料は日本クレア社CE-2を使用した。

マイタケは, 栃木県鹿沼農協より人工栽培のものを購入した。そのほかの茸については, 栄養短大食品化学の青柳先生が各地で採取し洗浄後凍結乾燥したものを提供していただいた。

結果及び考察

1. 抗体の精製

得られた血清の一部をファルマシアMabTrap G IIのaffinity columnを使って抗体を精製した。Fig. 2にその結果を示した。未精製の血清と精製した抗体をimmuno plateに固定化して検討したところ精製抗体は力価は十分保持していたが血清よりも不安定であったので以下の実験には血清を使用した。

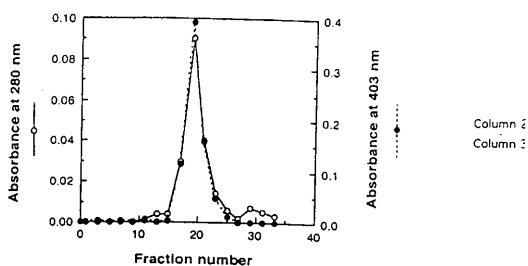


Fig 2 Gel filtration of HRP-A I on Sephacryl S300 column

2. 標識A Iの作成

horse raddish peroxidase (EIA grade, Behringer mannheim) をグルタルアルデヒドで活性化し, Econo-Pac 10DG columnで活性HRPを得た。

これをアンギオテンシンIと反応させ, Sephacryl-S300で精製した。結果はFig. 3に示した。500倍から2,500倍に希釈して抗体との反応条件を検討した結果十分な量の標識A Iが得られた。

3. ELISAの検討

鈴木らの開発したHRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB系のEIAとHRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Luminol/p-iodophenol系によるCLEIAとを行い, A I standardによる検量線を求めた。

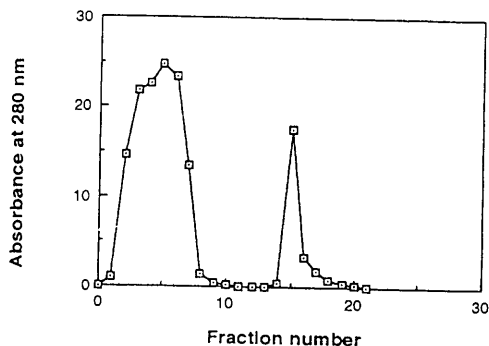


Fig 3 Affinity chromatography of A I-Bb on Mab Trap G II column

Fig. 4から明らかのようにTMB-EIAでは, 50-2500 pgの範囲でカーブを得たがCL-EIAでは10-500のpgの範囲で定量性のあるカーブが得られた。単純に計算すれば5倍の感度ということになる。今後A I-generation assayとの組合せで生体試料でのさらなる定量性の検討を行い実用化を試みたい。

3. *M. gerbil* のレンイン活性及びACE活性

バルビタール麻酔下で屠殺後採血, 及び臓器摘出を行った。結果はTable Iに示した。PRAは, 平均33.9で高いものと低いもので2倍の差があった。一部無麻酔下で心臓採血を試みたが余り影響がなかった。麻酔によってレンイン活性は高くなると言われているので今回の結果は麻酔下での屠殺後の採血であったので今後さらに検討したい。血中ACE活性は, 余り大きな固体差は見られず, 平均124であった。kidney renin activityはやはり固体による差が大きかった。血圧は収縮期血圧が12週齢で平均105 (体重平均55g) ラットより低くマウスに近いところであった。RA系において固体差が大きかったレンインは律速段階の酵素であるが, 一方ACE活性は最終的な昇圧ペプチドを生成するためその時の血圧の繁栄しているために固体差が少なかったのかもしれない。今回は, *M. gerbil* としては初めて実験であったので一

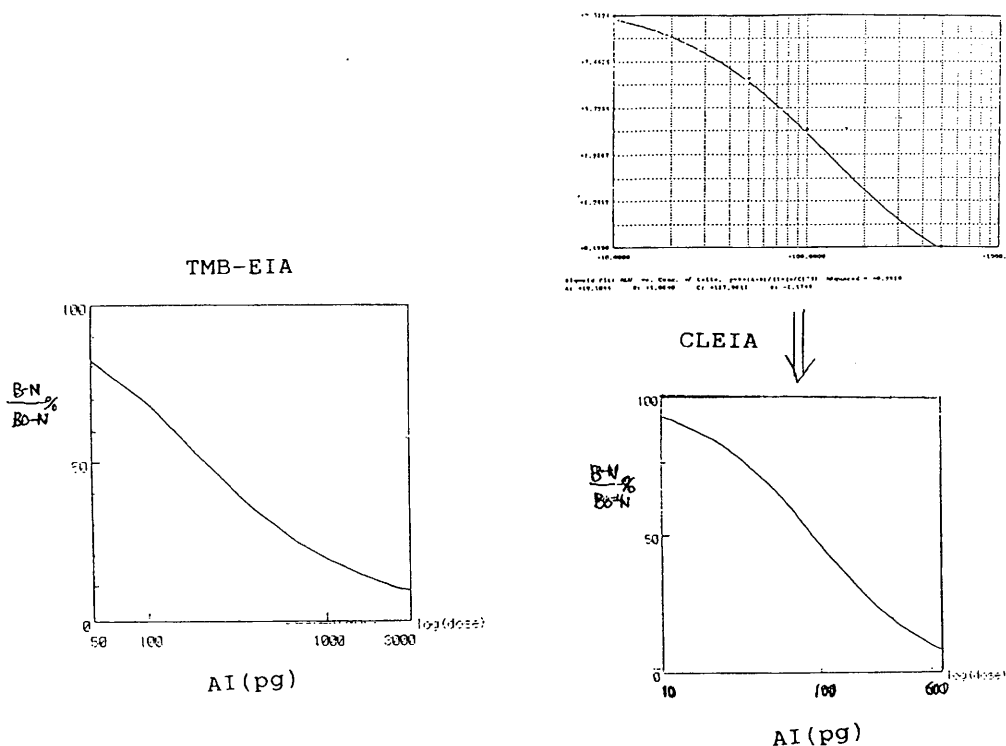


Fig 4 standard curves for AI on ELISA

Table I Renin activity and ACE activity of *M. gerbil*.

M.gerbil	PRA (AI ng/ml/hr)	ACE (AIU/ml/min)	Kidney (AI ug/ml/hr)
A.	35.4	122	11.5
B.	24.5	128	28.8
C.	28.6	122	31.9
D.	50.0	129	15.4
E.	24.4	114	16.9
F.	40.4	130	26.5

Table II ACE inhibition activity of extracts with water.

	inhibition %
<i>G. frondosa</i>	80
anzutake	52
uzuhatu	33
amitake	90
amitake(cold)	80

切の調節はせず、餌も水も自由に摂取させた。特徴といわれている水飲量の調節も行わなかったので水ないしは電解質代謝に特徴があると予想される結果は見出されなかった。アメリカなどでは、水飲量が少なく尿量も僅かでペットとして飼いやすいということなので、さらに固体数を増やして水飲量の調節をおこない、食塩などミネラル摂取の影響について興味を持たれる。

### 3. ACE活性のHPLCによるの確認

30分の反応後rt22のピークが減少rt20のピークが上昇したことよりrt22のピークがhip-his-leu、rt20のピークが生成物のhippuric acidと推定した。以上のことよ

りACEによる基質の分解を確認した。また、rt20のピークはhip-gly-glyの加水分解後も確認された。

### 4. マイタケ、アンズタケ、ウズハツ、アマタケのACE阻害活性の検討

各々の凍結乾燥品の30倍量の熱水により抽出をおこない遠心分離後の上澄みについてACE阻害活性を測定した。Table IIに示されたようにアマタケとマイタケに強い阻害活性がみられた。次に冷水での抽出も検討するためにアマタケについて冷水抽出を行い活性を測定したのでその結果をTable IIに示した。熱水でも冷水による抽出でも活性は変わらなかった。熱水による抽出は酵素による影響を防ぐことができるが加熱による2次反応

が心配された。しかし、活性の点からは影響ないと推定された。次にマイタケ中のACE阻害物質についておよその分子量の推定を行った。分画分子量10,000のモルカットフィルターを用いて測定した。遠心分離後のろ液は分子量10,000以下で残りは10,000以上となる。マイタケの場合は10,000以上の高分子性のものと10,000以下の低分

Table III MW fractionation of ACE inhibition activity.

molecular weight	inhibition %
over 10,000	76
under 10,000	75

子性のものが存在する事が判明した。ACE阻害物は、低分子性のものが知られているが、高分子のものについては、その消化過程による分解が考えられ、利用上の障害があるといわれている。低分子で吸収され易く血管中でのプロテアーゼなどの攻撃にたいして安定である必要がある。川岸ら<sup>10)</sup>は、各種キノコのACE阻害について低分子で特に疎水性のものについて報告しているが、今回はマイタケやアマタケ中に見出されたものには高分子のものも存在すると思われる低分子に加えて今後さらに精製を進めその性質を明らかにしたい。

#### まとめ

1. A I generation assayのためのA I抗体及び標識A Iを作成・調製し良好なものを得た。
2. CLEIAでのA I standardによるものでは、凡そ5倍の感度で測定できうるものと推定された。生存中の採血は難しく量が少ないので実際の血清の使用が少なく済めば大いに期待できると思われる。
3. *M. gerbil*のRA系の測定は、今までに報告されておらず今回初めての報告であるが、ラットより低く、マウスより高かった。しかし、その飲水と尿量から適正な条件を検討する必要がある。
4. マイタケとアマタケにACE阻害活性が見出されたことよりRA系を通しての血圧調節に期待が持たれた。血圧調節システムについては、特にRA系において分子生物学的発展<sup>11)</sup>に目を見張るものがありその結果今度は遺伝子的分子機構のはっきりした固体レベル(トランスジェニックマウスなど<sup>12)</sup>)での検討が可能になり興味を持たれつつある。今後は、それらの知見と方法も取り入れて栄養と血圧の研究を進めていき

い。

#### 謝 辞

ELISAの測定に際して多大なるご指導とご援助をいただいた岐阜大学鈴木文昭教授に深謝致します。また日本医科大学実験動物管理室七戸和博先生、清水真澄先生、同法医学教室長谷場健先生にはスナネズミの供与とご助言を戴き深謝致します。また長年に渡って採取された貴重なキノコをご提供戴きました女子栄養短期大学青柳康夫に慎んでお礼申し上げます。また、卒業論文としてELISA実験に一生懸命に取り組まれた見留知子、真中史子、小林愛、谷中希実子に感謝致します。

また本実験の一部は、私学助成による大型機器備品購入により導入した機器を使用し、本学特別研究費の援助により遂行された事を合わせて記し関係各位にお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Tigerstedt, R. and Bergummann, P.N., Scand. Arch. Physiol., 8, 223-270, (1898)
- 2) Hsueh, W.A. and Bxter, D.J., Hypertension, 17, 469-479, (1991)
- 3) Brunner, H.R., Garvas, H., Waeber, B., eto al., Ann. Intern. Med., 90, 19 (1979)
- 4) Kimoto, K., Murakami, K., Inagami, T., et al., Biomed. Res., 13, 41-46 (1992)
- 5) Htae, T., Kimoto, K., Murakami, K., et al., Biochimica et Biophysica, 1121, 335-338 (1992)
- 6) Szuki, F., Yamashita, S., Nakamura, Y., et al., Clin. Exp. Hyper-Theory and Practice, A12(1), 83-95 (1990)
- 7) Kricka, L.D. (ed.) in Ligand-Binder Assays, Lahele s and Analytical Strategies, Mersel Dekk en (1985)
- 8) Cushman, D.W., and Cheung, H.S., Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1648 (1971)
- 9) Oshima, G., and Nagasawa, K., Biochem. J., 81, 57-63 (1977)
- 10) 川岸洋和, 小島文博, 杉山公男他, 第47回日本栄養食糧学会講演要旨集pp242 (1993)
- 11) Sasaki, K., Yamano, Y., Inagami, T.,

木元 幸一・黒田 裕子

Nature, 351, 230-233 (1991)

K., et al., Hypertension Res., 18, 7-18 (1995)

12) Tamamura, R., Umemura, S., Murakami,