

3) ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害活性 (マイクロプレート法)

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保
(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 吉元 誠

はじめに

生体において、血圧は種々の系で調節され、それらの作用機能から、(1) 利尿剤、(2) 交換神経神経遮断剤、(3) 血管拡張剤、(4) アンジオテンシン I 変換酵素 (angiotensin I-converting enzyme, EC 3.4.15.1, 以降 ACE と略す) 阻害剤、(5) 5-HT₂ 受容体遮断剤などに分類される。このうち食品成分と関係が深いのは (1) の利尿作用と (4) の ACE 阻害作用である¹⁾。ここでは、石黒らの方法²⁾を参考に作成した ACE 阻害機能を指標とした *in vitro* での血圧降下作用物質の検索方法を示す。ACE は、不活性なアンジオテンシン I の C 末端ヒスチジルロイシン (以降 His-Leu と記す) を切断し、血管収縮などの強い血管拡張作用を有するブラジキニンを分解する働きをしている昇圧系酵素である (図 1)。この ACE の働きを阻害することにより高血圧の治療を行うことが可能である。

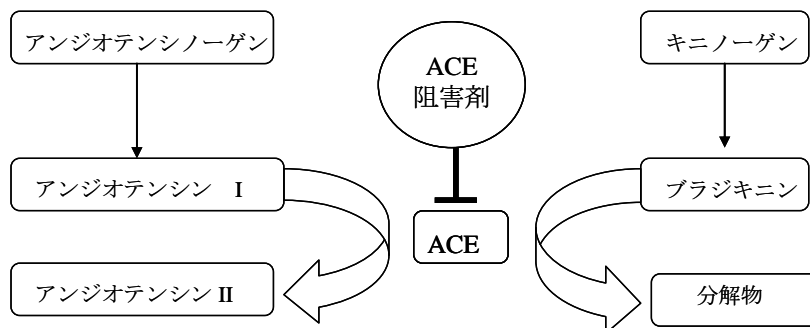


図 1 ACE 阻害薬の作用機序³⁾

人の血管は様々なことが関連して収縮拡張している。1 つとして、アンジオテンシン II が増加すると、血管は収縮し血圧は上昇する。アンジオテンシン II は上図の様にしてつくられるが、この過程には ACE が重要な役割を果たしている。またこの酵素は血圧を下げる作用のあるブラジキニンを分解する作用も発揮する。従って、ACE の作用を抑えれば、アンジオテンシン II が出来なくなり、また、ブラジキニンも分解されなくなる為、血圧は下がる方向に向かう。このような作用を持つ薬を ACE 阻害薬と呼んでいる。本項では、その 1 つであり蛇毒由来のキナーゼ II 阻害ペプチドをもとにして設計されたカプトプリルを用いた実験例も紹介する。

原 理

基質 (Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine ; Hip-His-Leu) に ACE を添加すると酵素反応の結果、基質は馬尿酸と His-Leu とに加水分解される。His-Leu はアルカリ条件下で *O*-フタルアルデヒドにより蛍光付与されるので、蛍光強度により ACE 活性が測定できる。試料を添加して蛍光強度を測定することにより、試料による ACE 阻害活性を測定することができる。

準備するもの

1. 機器及び器具

- ・ 96 穴プレート対応蛍光プレートリーダー (Ex.360nm,Em.480nm 付近のフィルターが装着されているもの)
- ・ 遠心分離機
- ・ 天秤 (最小表示値が 1mg 以下のもの)
- ・ プレートミキサー
- ・ 回転式攪拌機もしくは超音波洗浄機 (サンプル抽出及び基質溶解用)
- ・ ボルテックス
- ・ pH メーター
- ・ 恒温槽 (37°C に設定)
- ・ マルチチャンネルピペット (8 連)
- ・ ピペットマン
- ・ タイマー
- ・ 50mL, 15mL コニカルチューブ
- ・ イエローチップ, ブルーチップ
- ・ 1.5mL マイクロチューブ
- ・ 96 ウェル黒色平底プレート (Corning 3925 等)
- ・ 蓋付き試験管 (ねじ口試験管)
- ・ リザーバー
- ・ プレートシール
- ・ アルミホイル

2. 試薬

- ・ HEPES
- ・ NaCl
- ・ アンジオテンシン変換酵素基質 ; Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine (Hip-His-Leu, Wako 536-50441 等)
- ・ アンジオテンシン変換酵素 ; Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) (SIGMA

A6778-0.25UN,A6778-1UN 等)

- ・ NaOH
- ・ *O*-フタルアルデヒド (Wako 167-09263 等)
- ・ リン酸 (Wako 160-08636 等)
- ・ カプトプリル(Wako 039-16801 等)アンジオテンシン変換酵素阻害薬の 1 つ。
ACE を抑制することにより血圧を低下させる。
- ・ メタノール

プロトコール

1. 試薬の調製

1) 保存溶液

- ・ HEPES バッファー (0.1M HEPES,0.3M NaCl,pH 8.3). 冷蔵保存.
- ・ 酵素反応停止液 ; 1 N NaOH
- ・ 3.6M リン酸溶液 ; 35.28g/100mL. 常温保存.

2) 当日調製溶液

- (1) アンジオテンシン I 変換酵素基質溶液 ; 25mM Hip-His-Leu (HHL) 溶液
32.4mg HHL に 3mL の HEPES バッファー (pH 8.3) を加え, 超音波洗浄機
を使用して完全に溶解させる.
- (2) 10mU/mL ACE 溶液
0.25unit の酵素を使用する場合, ACE に 2.5mL の超純水を加え, これを 10
倍 ACE 酵素溶液として 4℃で保存する. 実験当日は 600μL の 10 倍 ACE 酵
素溶液に 5400μL の超純水を加え, ACE 酵素溶液として使用する.
- (3) 0.2% *O*-フタルアルデヒド溶液 (蛍光試薬)
8mg の *O*-フタルアルデヒドを 4mL のメタノールに溶解する. 使用直前に調
製し, 使用するまではアルミホイルなどで遮光しておく.

2. 操作の実際

1) 試料溶液の調製 (例) (試料により抽出法は考慮する.)

水抽出

- (1) 蓋付きねじ口試験管に凍結乾燥試料 0.1g をはかりとる.
- (2) 超純水 4mL を加え, 混和する.
- (3) 室温で 1 時間振とうする.
- (4) 3500rpm, 10 分間遠心する.
- (5) 上清をマイクロチューブに分注し, ACE 阻害活性測定試料とする.

熱水抽出

- (1) 蓋付きねじ口試験管に凍結乾燥試料 0.1g をはかりとる.

- (2) 100℃に加熱した超純水 4mL を加える。
- (3) 10 分間, 100℃で温める。
- (4) 冷却後, 十分にホモジナイズする。
- (5) 3000rpm, 10 分間遠心する。
- (6) 上清をマイクロチューブに分注し, ACE 阻害活性測定試料とする。

2) 酵素反応

- (1) 図 1 を参考に黒色マイクロプレートの各ウェルに適度に希釈した試料 50 μ L を入れる。希釈は超純水 (もしくは HEPES バッファー) で行い, Blank には超純水 (もしくは HEPES バッファー) を入れる。
- (2) 10mU/mL の ACE 溶液 100 μ L を添加する。
注; プレートの半分には, ACE 溶液の代わりに同量の超純水を入れ, 試料ブランクとする。
- (3) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (4) 37℃にて 10 分間プレインキュベートする。
- (5) ACE 基質溶液 (25mM Hip-His-Leu) を 25 μ L ずつ添加する。
- (6) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (7) 37℃にて 40 分間インキュベートし反応させる。
- (8) 1N NaOH 溶液を 50 μ L ずつ加え反応を停止させる。
- (9) プレートミキサーで混ぜる。
- (10) 0.2% *O*-フタルアルデヒド溶液を 10 μ L 添加する。
- (11) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (12) 室温にて 15 分反応させる (アルミホイルで遮光する)。
- (13) 3.6M リン酸を 15 μ L 添加する。
- (14) プレートミキサーで混ぜる。
- (15) 360nm 励起波長, 460nm 蛍光波長で蛍光強度を測定する。

データのとりまとめ

1. ACE の阻害活性 (%) は下記の計算式により算出する。

$$\text{阻害活性 (\%)} = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$$

試料液の蛍光強度を *S*, 試料液の代わりに超純水を使用した場合の蛍光強度を *C* とする。また, *S* 及び *C* に対し, 酵素液の代わりに超純水を添加した場合の蛍光強度を *S_B* 及び *C_B* とする。

2. 試料添加量・試料濃度を横軸, 阻害活性を縦軸としたプロットにおいて, 直線的に阻害活性が減少する範囲で, ACE 活性減少率が 50%を示すときの反応液中の試料添加量・試料濃度を IC₅₀ 値とする。なお, 1 サンプルについて 2

反復で測定し、これを何回か繰り返し平均値を算出する。

A	Blank	Sample1 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample1 5倍希釈	Blank	酵素添加
B	カプトプリル 1ng/mL	Sample1 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample1 10倍希釈	カプトプリル 1ng/mL	
C	カプトプリル 5ng/mL	Sample1 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample1 20倍希釈	カプトプリル 5ng/mL	
D	カプトプリル 10ng/mL	Sample1 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample1 40倍希釈	カプトプリル 10ng/mL	
E	Blank	Sample1 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample1 5倍希釈	Blank	酵素 無添加
F	カプトプリル 1ng/mL	Sample1 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample1 10倍希釈	カプトプリル 1ng/mL	
G	カプトプリル 5ng/mL	Sample1 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample1 20倍希釈	カプトプリル 5ng/mL	
H	カプトプリル 10ng/mL	Sample1 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample1 40倍希釈	カプトプリル 10ng/mL	

図 1 96well プレートの試料配置例

プレートの半分 (A, B, C, D) には酵素を添加し、残り (E, F, G, H) には酵素を添加する代わりに水を入れ試料blankとする。

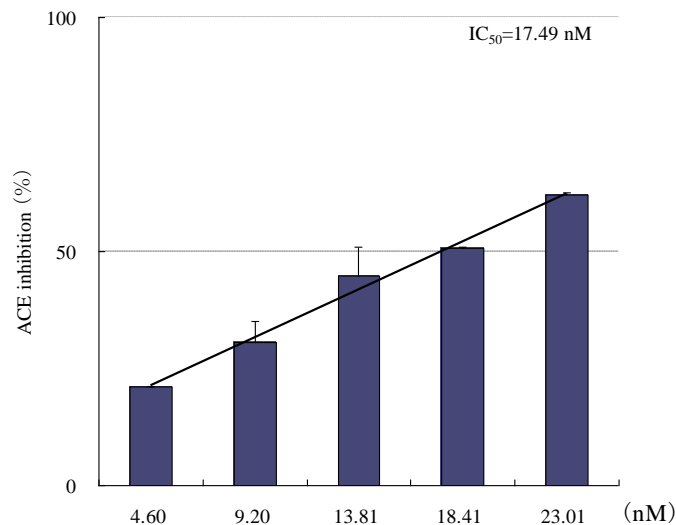


図 2 実験例 ; カプトプリルの ACE 阻害活性

試料 (カプトプリル) 濃度を変えて ACE 阻害率を求め、阻害率と試料濃度のプロット上 50% 阻害に対応する試料 (カプトプリル) 量を読み取ることで IC_{50} が得られる。

おわりに

Hip-His-Leu (Hip は馬尿酸残基), Hip-Gly-Gly, Hip-Ala-Pro など ACE の合成基質を用いる ACE 阻害活性測定法では、従来、遊離した馬尿酸を測定することが多かった⁴⁾。しかし、酵素反応停止後、酢酸エチルを用いて遊離した馬尿酸を抽出

する際、デシケーターやヒートブロックを用いた酢酸エチルの除去が煩雑であることや、酢酸エチルの除去が不完全であると酢酸エチルの影響で吸光度が高くなる等、馬尿酸の抽出効率の問題から測定値の再現性に問題があった⁴⁾。また、紫外域の吸光度測定による分光法では、混雑物からの吸収が高いときには測定しにくい欠点があった。

本法では蛍光プレートリーダーを用い蛍光付与された His-Leu を測定するため、以上の様な心配がない。何より従来法では試験管を使用していたのに対し、本法では 96 穴マイクロプレートを用いて評価するため、試料や試薬が少なくすむと共に、多数のサンプルを効率良くかつ簡便に評価することが可能である。

参考文献

- 1) 河村幸雄, 「アンジオテンシン変換酵素阻害」, 「3-3-5 循環系機能調節①血圧降下機能, 食品機能研究法」, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, (光琳, 東京), pp.109-112 (2000).
- 2) 石黒浩二, 吉元誠, 諤田仁人, 高垣欣矢, サツマイモ茎葉の血圧降下作用, 食科工, 54, 45-49 (2007).
- 3) 中原保裕, 中原さとみ, 「高血圧の治療薬」, 「薬理学」, (秀和システム, 東京), pp.96-104 (2007).
- 4) 丸山進, 「アンジオテンシン変換酵素阻害物質」, 「食品中の生体調節物質研究法 (生物化学実験法 38)」, 川岸舜朗編, (学会出版センター, 東京), pp.116-129 (1997).