

エチゼンクラゲの有効利用に関する研究 —高濃度ペプチド溶液の調製法の開発—

森永 八江¹⁾ 岩井 邦久¹⁾ 富田 秀弘²⁾
奈良岡哲志³⁾ 松江 一¹⁾

1) 青森県立保健大学大学院健康科学研究科

2) 青森県ふるさと食品研究センター

3) 青森県工業総合研究センター

Key Words : ①エチゼンクラゲ ②降圧ペプチド
③ドラムドライヤー

I. はじめに

エチゼンクラゲは大型の食用クラゲの一種で、傘の直

径が2m、重さ150kgになるものもあるが、全体の97%が水分である。エチゼンクラゲの大量発生は漁業に大きな被害を与えている。近畿大の牛田ら¹⁾は、クラゲタンパク質からペプシン消化により8種の降圧作用ペプチドを報告した。

エチゼンクラゲの97%は水分で、従来の方法では薄い濃度のペプチド溶液しか作成できずその利用に限界があった。青森県ふるさと食品センター下北ブランド研究開発センター富田ら²⁾は、碎片化したエチゼンクラゲをドラムドライヤー法で直接乾燥させることで、粉末状のクラゲをつくることに成功した。

II. 目的

本研究では粉末クラゲを用いて高濃度の降圧ペプチド溶液の作成と、そのペプチドの分離精製と配列の決定を目的とした。

III. 研究方法

エチゼンクラゲは、2006年1月に八戸南浜沖で水揚げされたものの口腕、下傘等を切除し、洗浄・冷凍保存されたものを解凍後、細断・脱塩及び粉碎し、減圧ミキサーで濃縮し、ドラム乾燥機で乾燥させ用いた。重量の異なる粉末エチゼンクラゲに0.5Mの酢酸をそれぞれ75ml加え、それぞれの溶液にクラゲの1%の量のペプシンを添加し、37℃で24時間攪拌、その後同量のペプシンを添加し24時間反応を行った。反応終了後、沸騰水中で10分間ペプシンの不活化を行い、遠心分離したものの上清をエバポレートし凍結乾燥を行った。そのペプシン処理サンプルをSep-Pak Vac C18に供し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)-アセトニトリル(CH₃CN)のCH₃CN濃度を0%から20%、40%、60%に段階的にあげて溶出を行った。各溶出画分を回収後エバポレートし、凍結乾燥を行った。ACE阻害活性の強かった40%CH₃CN溶出画分をC18逆相HPLCを用いて20%から40%CH₃CN/0.1%TFAの直線的濃度勾配溶出し、0-20分(Fr.1)、20-30分(Fr.2)、30-40分(Fr.3)、40-50分(Fr.4)、50-60分(Fr.5)、60-90分(Fr.6)をそれぞれ分画した。Fr.3はさらにC18逆相HPLCによる再分画を行った。各ペプチドのアミノ酸配列決定はEdman分解法で行った。

IV. 結果および考察

表1より、クラゲの濃度が濃くなってもACE阻害活性はあることが分かり、このことから高濃度のクラゲ溶液の調製が可能となった。最高で約20%の溶液をつくることができ、活性は薄いものと変わりなく、クラゲペプチド溶液の大量調製が可能となった。Sep-Pak Vac C18による粗分画から40%CH₃CN画分が最も活性が強いことが解った。この画分はC18逆相HPLCによりさらに分離精製を進め、6つに分画後ACE阻害活性を測定した所、Fr.3に強い活性が見られた。この画分は幾つかのピークが見られたの

でさらに6つに再分画(図1)、それぞれのACE阻害活性を測定したところ、Fr.3-1、Fr.3-3、Fr.3-6に強い活性が見られた(表2)。3つのペプチドFr.3-1、Fr.3-3、Fr.3-6についてアミノ酸配列決定を行った結果、純度はFr.3-6、Fr.3-1、Fr.3-3順であった。Fr.3-1は-Pro-Leuを含むデカペプチドである事がわかった。Fr.3-3は低収量のドデカペプチドであった。Fr.3-6はTyrをN末端とし、芳香族アミノ酸とProを含むペプチドで純度も高く、量的に多く含まれる活性の強いペプチドであった(表3)。今後、Fr.3-6を化学合成し、活性の確認をおこなって行きたい。

V. 参考文献

- 1) 牛田崇博ほか：くらげタンパク質由来 ACE 阻害活性ペプチド，日本農芸化学会 2005 年度大会講演要旨集，社団法人日本農芸化学会，276，2005。
- 2) 富田秀弘，永峰文洋：大型クラゲドラム乾燥による粉末化；平成 16 年度下北ブランド研究開発センター研究報告 70,2004。

表1 クラゲペプシン処理のアミノ酸量、IC₅₀ 値

粉末クラゲ (g)	pH	回収アミノ酸量 (mg)*	アミノ酸量 (mg/g粉末クラゲ)*	IC ₅₀ (mg/mL)
0.5	2.66	51.09	102.19	6
1.5	2.97	160.04	106.69	5.8
5.0	3.39	504.39	100.88	7
5.0**	2.51	430.4	86.08	7.6
7.5	3.49	807.51	107.67	6.1
7.5**	2.51	571.42	76.19	5.2
10	3.54	1170.78	117.08	8.3
15	3.68	1526.7	101.78	6.2

*アミノ酸量：ロイシン換算（分子量131.18）、** pHを調整

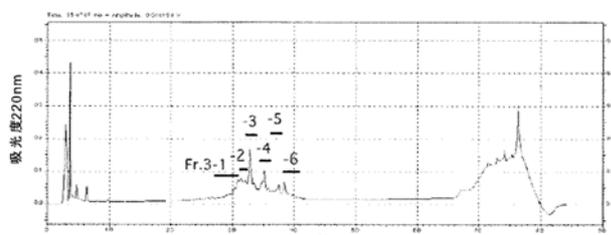


図1. Fr.3分画のC₁₈逆相HPLC

図1 Fr.3分画のC₁₈逆相HPLC

表2 Fr.3-1～Fr.3-6の収量と阻害率

画分 (ピーク)	収量 (mg) *	ACE阻害率 (%) **
Fr.3-1	0.2	71.2
Fr.3-2	0.3	8.0
Fr.3-3	0.1	71.8
Fr.3-4	0.1	35.2
Fr.3-5	0.1	33.6
Fr.3-6	0.1	90.3

*全注入力量=1.0mg、回収率=90%

**阻害率 (%) はサンプル0.1mgあたりで計算した。

表3 ACE阻害活性ペプチドのアミノ酸配列

画分	アミノ酸配列	
	1文字	3文字
Fr.3-1	IGDEPLANYL	Ile-Gly-Asp-Glu-Pro-Leu-Ala-Asn-Tyr-Leu
Fr.3-3	FGG(orP)IDDINQ Y(orI)GQSD	Phe-Gly-Gly-(or Pro)Ile-Asp-Asp-Ile-Asn-Gln-Tyr-(or Ile)Gly-Gln-Ser-Asp
Fr.3-6	YYAPF	Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe