

機関番号：81409

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380081

研究課題名（和文）レニン阻害物質探索系の構築と食物由来レニン阻害物質の構造機能相関解析

研究課題名（英文）Development of renin inhibitor screening system and structure-function relationship of renin inhibitor(s) from food stuffs

研究代表者

高橋 砂織（TAKAHASHI SAORI）

秋田県総合食品研究センター・食品加工研究所・所長

研究者番号：10142184

研究成果の概要（和文）：本研究においてバキュロウイルス・昆虫細胞培養系を用いて高効率に組換え型ヒトレニンを発現することに成功した。組換え型ヒトレニンを用いて各種食材よりレニン阻害物質を探索し、大豆にレニン阻害物質の存在することを見出し、その構造をソヤサポニンIと同定した。また、各種サポニンによるレニン阻害活性を検討した結果、サポゲノールの3位にグルクロン酸が結合したいわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを見出した。さらに、米にもレニン阻害物質の存在を見出し、その構造を遊離のオレイン酸とリノール酸と同定した。

研究成果の概要（英文）：We succeeded effective production of recombinant human renin by baculovirus-insect cell expression system. Using recombinant human renin as a target enzyme, we found renin inhibitory activity in soybean and isolated soybean renin inhibitor. The physico-chemical data on the isolated inhibitor were identical with those of soyasaponin I. In addition, we studied the effects of various saponins on recombinant human renin activity and found that so-called glucuronide saponin which glucuronic acid connected to the third position of sapogenol was renin inhibitory saponins. Furthermore, we found the existence of the renin inhibitor to rice and identified the structure with oleic acid and linoleic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：酵素化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：レニン、アンギオテンシン、血圧調節、大豆、ソヤサポニン、米、オレイン酸、リノール酸

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、1983年に内在性のレニン阻害物質であるレニン結合タンパク質 (RnBP) をブタ腎臓から最初に単離した。その後、RnBPのcDNAクローニング、ゲノム遺伝子構造解析やラットにおける組織特異的発現の解析などを進めた。さらに、RnBP遺伝子ノックアウトマウスの作成による生理機能解析なども行っている。また、最近RnBPがレニン阻害活性とともに、*N*-アセチルグルコサミンと*N*-アセチルマンノサミンとの相互変換を触媒するGlcNAc 2-エピメラーゼであることが判明し、多機能タンパク質として注目されている。一方、ヒトレニンの大腸菌での発現に成功した。発現タンパク質は封入体を形成し、その一部について巻き戻しと活性化を達成した。これを用いて食物由来レニン阻害物質の探索を進めた結果、味噌、大豆や雑豆類にレニン阻害物質の含まれることを明らかとした。さらに、バキュロウイルス・昆虫細胞培養系において、活性型レニンの生産されることを見出している。しかしながら、食物由来レニン阻害物質の精製、構造解析や構造機能相関解析に関する研究は皆無である。そこで、本研究では高血圧の原因酵素であるレニンの食物由来阻害物質の同定を目指す。

## 2. 研究の目的

レニン・アンジオテンシン系は最も良く研究が進んでいる血圧調節機構である。その中でレニンは、律速酵素として重要な役割を担っている。これまでにアンジオテンシン変換酵素を標的とした食物由来阻害物質の探索が数多く行われており、多くのペプチド類や低分子化合物が同定されている。しかしながら、食物由来レニン阻害物質に関する研究は殆ど行われて来なかった。それは、酵素入手と活性測定法の煩雑さに起因している。本研究においては、バキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるレニンの効率的発現系の構築と新規レニン活性測定法の開発を進め、レニンをターゲットとした迅速阻害活性測定法の開発し、食物由来レニン阻害物質を探索する。さらに、阻害物質の精製と構造解析を行うとともに、阻害物質の構造機能相関を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 組換え型ヒトレニンの調製：昆虫細胞発現用組換えベクターの構築にはBac-to-Bac法 (Invitrogen) を用いた。ヒトプロレニンを導入した組換えバキュロウイルスをヨトウ蛾由来の昆虫細胞 (Sf-9) に多重感染させレニンの発現を行った。

(2) 新規蛍光消光法によるレニン活性測定：

ヒト型レニンの活性測定には、我々が新たに開発した蛍光消光基質 (Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>, \*, scissile peptide bond) を用いた。

(3) 食物由来レニン阻害物質探索方法：各種食物由来粗抽出液を用いて上述の組換え型ヒトレニンを標的酵素として用いレニン阻害活性を検定した。

(4) 大豆及び米由来レニン阻害物質の精製と構造解析：大豆胚軸の熱水抽出液より各種クロマトグラフィーを用いてレニン阻害物質を精製した。また、平成20年度産秋田県産米 (あきたこまち) よりレニン阻害物質を精製した。阻害物質の精製標品を用いて、各種分析機器を駆使して構造を決定した。

(5) プロレニン活性化酵素の測定方法：バキュロウイルス・昆虫細胞培養系で発現した組換え型レニンのN末端配列を基に、新規蛍光消光基質 Nma-Leu-Thr\*Leu-Gly-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>を開発した。本基質を用いてプロレニン活性化酵素を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 大豆由来レニン阻害物質の精製と構造解析：大豆にレニン阻害活性を見出した。阻害物質の組織内分布を検討した結果、胚軸にレニン阻害活性が局在することが判明した。そこで、胚軸よりレニン阻害物質を精製し、その構造をソヤサポニンIと同定した。

成果は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **72**, 3232-3236 (2008) などに発表された。

(2) バキュロウイルス・昆虫細胞培養系の効率化に関する研究：バキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるヒトレニンの生産性の向上について検討した。その結果、ウイルスの多重感染度と培養時間が酵素発現に重要であることを見出した。

成果は、*Biochemical Engineering Journal* (査読有) **43**, 216-220 (2009) などに発表された。

(3) プロレニン活性化酵素の精製と特性解析：これまでにバキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるレニンの発現系では、培養最後期に活性型レニンの発現することが知られていた。しかしながら、プロレニンの活性化機構については不明であった。そこで、バキュロウイルス

感染昆虫細胞培養液よりプロレニン活性化酵素を精製し、その諸性質を検討した。その結果、プロレニン活性化酵素は、バキュロウイルスゲノム遺伝子由来であることが証明された。

成果は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 370-374 (2010) などに発表された。

- (4) **レニン活性に及ぼす各種サポニンの影響解析**:大豆由来レニン阻害物質としてソヤサポニンIを同定したが、サポニン類の構造とレニン活性阻害との関係は不明であった。そこで、各種サポニン類を用いてレニン阻害活性を検討した。その結果、サポゲノールの3位にグルクロン酸が結合した、いわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを明らかとした。

成果は、*Biomedical Research* (査読有) **31**, 155-159 (2010) などに発表された。

- (5) **バキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるレニンの分解抑制解析**:バキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるレニンの発現では、発現したレニンの分解があり、生産性に影響を与えることが知られていた。そこで、発現酵素の分解を阻止する手法について検討した。その結果、各種プロテアーゼ阻害剤とアミノ酸・ペプチド類を多量に含有するポリペプトン添加により発現タンパク質の安定生産が可能となった。

成果は、*Journal of Chemical Engineering of Japan* (査読有) **43**, 603-607 (2010) などに発表された。

- (6) **米由来レニン阻害物質の同定と構造機能相関解析**:大豆以外の各種食材を用いてレニン阻害物質を探索した結果、秋田県産米にレニン阻害活性を見出した。8種類の秋田県奨励品種を用いて阻害活性を検討したところ全ての品種にレニン阻害活性を認めた。そこで、秋田県の代表的奨励米である「あきたこまち」よりレニン阻害物質の精製を行った。阻害物質の構造解析の結果、遊離のオレイン酸及びリノール酸が米由来レニン阻害物質であることが判明した。さらに、各種遊離脂肪酸を用いてレニン阻害活性を検討した結果、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸にもレニン阻害活性のあることを見出した。一方、パルミチン酸やステアリン酸などの不飽和脂肪酸やトリグリセリドには阻害が認められなかった。

成果は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**, 1713-1715 (2010) などに発表された。

- (7) **昆虫細胞由来新規アスパルテックプロテアーゼの精製と特性解析**:バキュロウイルス・昆虫細胞培養系におけるレニンの発現過程で、新規アスパルテックプロテアーゼの存在を見出した。本酵素が発現タンパク質の分解に関与する可能性があることから、精製してその諸性質を明らかとした。

成果は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**(10), 2154-2157 (2010) などに発表された。

- (8) **大豆サポニンによる高血圧抑制作用解析**:大豆由来レニン阻害物質であるソヤサポニンIについては、高血圧抑制効果のあることが期待されていた。そこで、市販の大豆サポニンを用いて本態性高血圧ラットにおける血圧上昇抑制効果を検討した。その結果、大豆サポニン投与後1週間目からサポニン投与群に血圧上昇抑制効果が観察され、7～8週目で有意に血圧上昇抑制効果が確認された。

成果は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**(11), 2310-2312 (2010) などに発表された。

- (9) **雑穀類由来レニン阻害物質の探索**:大豆や米以外の食材についてレニン阻害活性を探索した結果、雑穀類の一部にレニン阻害活性を見出した。GC/MSなどの解析からレニン阻害物質として遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸の存在が示唆された。

成果は、*Journal of Biological Macromolecules* (査読有) **10**(3), 83-91 (2010) などに発表された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) 樋渡一之、高橋砂織:昇圧系の律速酵素を阻害する血圧制御 ～レニン活性阻害による新しいアプローチ～ (査読無) *化学と生物* **49**, 83-85 (2011)
- 2) Saori Takahashi, Tetsuo Tokiwano, Nao Suzuki, Yuko Yoshizawa, and Takeshi Gotoh: Renin inhibitory activity in rice and cereals. *Journal of Biological Macromolecules* (査読有) **10**, 83-91 (2010)
- 3) Kazuyuki Hiwatashi, Hitoshi Shirakawa, Kazuyuki Hori, Yumiko Yoshiki, Nao

- Suzuki, Michio Kimao, and Saori Takahashi: Reduction of blood pressure by soybean saponins, renin inhibitor from soybean, in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**, 2310-2312 (2010)
- 4) Takeshi Gotoh, Hiroki Ono, Ken-Ichi Kikuchi, Satoru Nirasawa, and Saori Takahashi: Purification and characterization of aspartic protease derived from Sf-9 insect cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**, 2154-2157 (2010)
- 5) Saori Takahashi, Tetsuo Tokiwano, Keishi Hata, Mika Hokari, Nao Suzuki, Ikuko Kodama, Yuko Yoshizawa, and Takeshi Gotoh: The occurrence of renin inhibitor in rice: Isolation, identification, and, structure and function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **74**, 1713-1715 (2010)
- 6) Takeshi Gotoh, Ken-Ichi Kikuchi, and Saori Takahashi: Active human renin production using a baculovirus expression vector system: An effective way to prevent excessive photolytic degradation of recombinant proteins. *Journal of Chemical Engineering of Japan* (査読有) **43**, 603-607 (2010)
- 7) Saori Takahashi, Kazuyuki Hori, Mika Hokari, Takeshi Gotoh, and Toshihiro Sugiyama: Inhibition of human renin by saponin. *Biomedical Research* (査読有) **31**, 155-159 (2010)
- 8) Takeshi Gotoh, Hirono Awa, Ken-Ichi Kikuchi, Satoru Nirasawa, Saori Takahashi: Prorenin processing enzyme (PPE) produced by baculovirus-infected insect cells: PPE is the cysteine proteinase in AcMNPV gene. (査読有) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 370-374 (2010)
- 9) Takeshi Gotoh, Hirono Awa, Ken-Ichi Kikuchi, and Saori Takahashi: Expression and in situ processing of human prorenin to active renin in baculovirus-infected Sf-9 cell culture under several infective conditions. *Biochemical Engineering Journal* (査読有) **43**, 216-220 (2009)
- 10) Saori Takahashi, Kazuyuki Hori, Mamoru Shinbo, Kazuyuki Hiwatashi, Takeshi Gotoh, and Seihan Yamada: Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor in soybean. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) **72**, 3232-3236 (2008)
- [学会発表] (計 32 件)
- 1) 高橋砂織他、米由来レニン阻害物質の同定と構造機能相関解析、2011 年度日本農芸化学大会、2011 年 3 月 23 日、(震災の為大会中止、但し学会の意向で要旨発行をもって発表とみなす)
- 2) 高橋砂織他、レニン阻害サポニン：構造・機能相関解析、第 83 回日本生化学会・第 33 回日本分子生物学会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- 3) 樋渡一之他、ダイズサポニンの血圧上昇抑制作用、第 17 回秋田応用生命科学研究会学術講演会、2011 年 11 月 12 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)
- 4) 高橋砂織他、バキュロウイルス・昆虫細胞におけるヒトレニンの効率的生産とそれを用いた阻害物質探索について、第 10 回食品酵素化学研究会学術講演会、2010 年 9 月 4 日、大阪府立大学 (大阪府堺市)
- 5) 高橋砂織他、レニン活性に及ぼすサポニン類の影響について：構造機能相関解析、第 57 回日本食品科学工学会大会、2010 年 9 月 2 日、東京農業大学 (東京都)
- 6) 水原麻美子他、バキュロウイルス感染昆虫細胞 (Sf-9) 由来キチナーゼの反応特性、第 24 回キチン・キトサン・シンポジウム、2010 年 7 月 13 日、東京大学 (東京都)
- 7) 小野洋輝他、Sf-9 昆虫細胞ーバキュロウイルス発現系におけるアスパルテックプロテアーゼの生成挙動と特性解析、第 16 回秋田応用生命科学研究会学術講演会、2010 年 5 月 28 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)
- 8) 小野洋輝他、昆虫細胞ーバキュロウイルス発現系におけるアスパルテックプロテアーゼについて、第 76 回日本生化学会東北支部例会、2010 年 5 月 8 日、コラッセ福島 (福島市)
- 9) 樋渡一之他、ダイズサポニンはレニンを

- 阻害して SHR の血圧上昇を抑制する、2010 年度日本農芸化学会大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学駒場キャンパス、東京都)
- 10) 高橋砂織他、サポニン類によるレニン阻害作用 —構造と阻害活性相関解析—、2010 年度日本農芸化学会大会、2010 年 3 月 28 日、東京大学 (東京都)
  - 11) 小野洋輝他、Sf-9 昆虫細胞—バキュロウイルス発現系由来アスパルテックプロテアーゼ (SAP) の特性解析、第 44 回秋田化学技術協会技術発表会、2010 年 3 月 5 日、秋田大学 (秋田市)
  - 12) 樋渡一之他、SHR における大豆サポニンの血圧上昇抑制作用、第 43 回日本栄養・食糧学会東北支部大会、2009 年 11 月 7 日、青森県立保健大学 (青森市)
  - 13) 高橋砂織他、レニンの昆虫細胞発現系の構築とレニン阻害物質、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸国際会議場 (神戸市)
  - 14) Takeshi Gotoh *et al.*, Characterization of prorenin processing enzyme responsible for *in situ* active human renin production by baculovirus-infected Sf-9 cells and inhibition of excessive processing. 14<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, 2009 年 9 月 14 日, Palau de Congressos de Catalunya, Barcelona, Spain)
  - 15) 高橋砂織他、食物由来レニン阻害物質：大豆由来レニン阻害物質の精製と構造解析、第 56 回日本食品科学工学会大会、2009 年 9 月 11 日、名城大学 (名古屋市)
  - 16) 後藤猛他、バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養におけるプロレニンプロセッシング酵素の特性とレニン過剰分解の抑制、第 9 回食品酵素化学研究会・第 15 回秋田応用生命科学研究会学術講演会、2009 年 9 月 4 日、秋田県総合食品研究所 (秋田市)
  - 17) 高橋砂織他、バキュロウイルス遺伝子由来キチナーゼの性質、第 9 回食品酵素化学研究会・第 15 回秋田応用生命科学研究会学術講演会、2009 年 9 月 4 日、秋田県総合食品研究所 (秋田市)
  - 18) 高橋砂織他、大豆由来レニン阻害物質：大豆サポニンがレニン活性を阻害する、第 9 回食品酵素化学研究会・第 15 回秋田応用生命科学研究会学術講演会、2009 年 9 月 4 日、秋田県総合食品研究所 (秋田市)
  - 19) Takeshi Gotoh *et al.*, Direct production of active human renin by baculovirus-infected Sf-9 insect cell culture. 8<sup>th</sup> World Congress of Chemical Engineering, 2009 年 8 月 26 日 Montreal Convention Centre, Canada
  - 20) 高橋砂織他、バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養系におけるキチナーゼの発現、第 23 回キチン・キトサン・シンポジウム、2009 年 8 月 20-21 日、佐賀大学 (佐賀市)
  - 21) 安和広乃他、Sf-9 昆虫細胞におけるプロレニンの発現とプロレニンプロセッシング酵素の動態、2009 年度日本生化学会東北支部例会、2009 年 5 月 9 日、東北大学 (仙台市)
  - 22) 高橋砂織他、大豆由来レニン阻害物質、2009 年度日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡国際会議場 (福岡市)
  - 23) 後藤猛他、バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養系におけるプロレニンプロセッシング酵素の動態とレニン生成に及ぼす影響、化学工学会 第 74 年会、2009 年 3 月 18 日、横浜国立大学 (横浜市)
  - 24) 高橋砂織、血圧調節酵素レニンの活性制御について ～内源性阻害物質と食物由来阻害物質～、日本化学会東北支部秋田地区講演会 (招待講演)、2009 年 1 月 9 日、秋田大学 (秋田市)
  - 25) Hirono Awa *et al.*, Prorenin processing enzyme in baculovirus- infected SF-9 cells 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際会議場 (神戸市)
  - 26) 安和広乃他、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系によるプロレニン発現及びプロレニンプロセッシング酵素による *in situ* レニン生成、第 43 回秋田化学技術協会研究技術発表会、2008 年 12 月 5 日、秋田大学 (秋田市)
  - 27) 安和広乃他、昆虫細胞発現系によるプロレニンプロセッシング酵素の特性解析、秋田応用生命科学研究会 第 14 回講演

会、2008年11月14日、秋田県総合食品研究所（秋田市）

- 28) Saori Takahashi *et al.*, Human renin inhibitory activity in miso, soybean, and minor legumes. 8<sup>th</sup> International Symposium on the Role of Soy in Health Promotion and Chronic Disease Prevention and Treatment. 2008年11月11日、Hilton Tokyo（東京都）
- 29) Saori Takahashi *et al.*, Processing of recombinant human prorenin expressed in Sf-9 cells. 20<sup>th</sup> FAOBMB Symposium, 2008年10月23日、台北市(台湾)
- 30) 高橋砂織他、Sf-9細胞におけるヒトレニンの発現とヒトレニン阻害物質探索系の構築、第8回食品酵素化学研究会講演会、2008年9月8日、高知大学（高知市）
- 31) 高橋砂織他、昆虫細胞を用いた組換え型ヒトレニン発現系の構築とレニン阻害物質探索系の確立、第55回日本食品科学工学会、2008年9月7日、京都大学（京都市）
- 32) 安和広乃他、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系によるプロレニン発現及び *in situ* プロセッシングによるレニン生成の挙動、秋田応用生命科学研究会 第13回講演会、2008年5月23日、秋田県総合食品研究所（秋田市）

〔図書〕（計1件）

Saori Takahashi, Takeshi Gotoh, and Kazuyuki Hori, Soybean renin inhibitor, in *Soybean -Biochemistry, Chemistry and Physiology-* pp389-400 ISBN 978-953-307-219-7 Edited by Tzi-Bun Ng, InTech (Open Access Publisher)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.arif.pref.akita.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 砂織 (TAKAHASHI SAORI)

秋田県総合食品研究センター・食品加工研究所・所長

研究者番号：10142184

### (2) 研究分担者

堀 一之 (HORI KAZUYUKI)

秋田県総合食品研究センター・企画マーケティング班・上席研究員

研究者番号：50181516

### (3) 研究分担者

後藤 猛 (GOTOH TAKESHI)

秋田大学・工学資源学部・教授

研究者番号：10215494

### (4) 研究分担者

吉澤 結子 (YOSHIZAWA YUKO)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20269202