

# 食糧難回避のための食用昆虫利用による機能性食品原料の開発

徳島大学大学院 社会産業理工学研究部  
佐々木 千鶴

## 1. 研究の目的と背景

昨今のアフリカ大陸を中心とするバッタの大量発生により、農作物が荒らされる被害が出ており、これによる今後の飢餓人口のさらなる増大の懸念に繋がっている。そこで、この「昆虫の大量発生」を巧みに利用することで、「昆虫の食糧としての利用」の可能性に着想した。昆虫はその体の約7割をタンパク質が占め、肉や魚にとって代わる良好なタンパク源となりうる。しかし、高付加価値な素材であるにも関わらず、昆虫食が我々の食生活に浸透し難い理由は、そのグロテスクな見た目に起因していると考えられる。そこで、本研究では、昆虫から機能性素材を創製し、これの付加価値を見極め、高めたうえで、将来の昆虫食の普及に繋がる提案を行うこととした。本研究では、とくに昆虫（フタホシコオロギ）を体内の胃を想定した系、すなわち、タンパク質分解酵素による加水分解によりコオロギタンパク質からのペプチドの生産に着目し、その産生ペプチドの機能性や化学特性を調査した。機能性としては、とくに血圧上昇抑制作用の指標となる、アンジオテンシンI変換酵素阻害活性（ACE阻害活性）について評価を行った。これは、（食用）昆虫タンパク質加水分解物（ペプチド）には、ACE阻害活性を示すものが多数報告されており（Pattarayingsakul *et al.* 2017; Tao *et al.* 2017; Wu *et al.* 2015）、近年注目を集めているため、本研究でもこれに着手した。

## 2. 研究の方法

### 2-1. コオロギタンパク質の酵素加水分解による粗ペプチドの創製

実験試料は、フタホシコオロギの粉末を使用した。粉末中のタンパク質含有率は70.8%であった。これにプロテアーゼを添加し、55℃にて3時間インキュベートし、反応終了後は、沸騰水中（15分反応）にてプロテアーゼを失活させた。その後、反応物を遠心分離（10,000 rpmにて15分）し、上清を凍結乾燥した。これをコオロギタンパク質由来ペプチドとした。溶液中のペプチドの濃度はLowry法により定量した。

### 2-2. コオロギタンパク質由来ペプチドのゲルろ過クロマトグラフィー、逆相 HPLC による精製

2-1 で得たコオロギタンパク質由来ペプチドを 20 mg とり、1 ml のミリ Q 水に溶解し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーは、溶離液をミリ Q 水とし、充填ゲルは Sephadex G-25Fine を用い、流速を 0.8 ml/min とした。各画分について、220 nm と 280 nm での吸光度を測定した。得られた画分について、逆相 HPLC (AKTA Purifier) による精製を行った。1 段階目の精製は、カラムはナカライテスク社の COSMOSIL 5C18 ARII (φ 4.6 mm × 250 mm) を使用した。溶離液は、0.1% トリフルオロ酢酸含有、5-36% アセトニトリルを流速 0.8 ml/min で用いた。また、2 段階目の精製については、カラムを同社の COSMOSIL π NAP に変え、流速 0.8 ml/min にて行った。検出波長はいずれも 220 nm を用いた。

### 2-3. コオロギタンパク質由来ペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性測定 (Friedland *et al.* 1976)

試料溶液 50 μl に 10 mU/ml の ACE (ウサギ肺由来、Sigma 社) 水溶液を 100 μl 添加し、37℃にて 10 分インキュベートした。これに、25 mM の基質 Hip-His-Leu (HHL) 溶液を 25 μL 添加し、37℃にて 40 分反応させた。1 M の NaOH 水溶液 50 μL を添加して反応を停止後、0.2% (w/w) o-フタルアルデヒド 10 μL 添加し 15 分反応を行い蛍光付与したのち、3.6 M リン酸を 15 μL 添加した。360 nm 励起波長、460 nm 蛍光波長により蛍光強度測定を行った。ACE 阻害活性は、以下の式から ACE 阻害率として求めた。

$$\text{ACE 阻害率 (\%)} = \{1 - (S - S_b)/(C - C_b)\} \times 100$$

S: 試料溶液の蛍光強度

Sb: S に対し酵素液の代わりにミリ Q 水を添加した時の蛍光強度

C: 試料溶液の代わりにミリ Q 水を添加した時の蛍光強度

Cb: C に対し酵素液の代わりにミリ Q 水を添加した時の蛍光強度

### 2-4. 逆相 HPLC で精製したコオロギタンパク質ペプチドのアミノ酸組成分析

逆相 HPLC にて精製したペプチドの構成アミノ酸配列

は、エドマン分解後、プロテインシーケンサー (Shimadzu PPSQ-31A) にて解析した。

### 3. 研究結果

#### 3-1. コオロギタンパク質由来ペプチドのゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

コオロギタンパク質のプロテアーゼによる加水分解反応を行った結果、タンパク質当たりのペプチド回収率は39.7%であった。得られたペプチドをゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ、Fig. 1のクロマトを得た。試験管番号6から13までをG1、試験管番号14から21までをG2、22から33までをG3として回収し、凍結乾燥し粉末として得た。次に、G1からG3についてミリQ水により再溶解し、所定の濃度としたのち、ACE阻害活性についてIC<sub>50</sub>値(50%阻害する濃度)を測定した。その結果、Fig. 2に示すように、G1では0.27 mg/ml、G2では0.20 mg/ml、G3では0.42 mg/mlとそれぞれ確認できた。以降の実験では、IC<sub>50</sub>値が最も低い(IC<sub>50</sub>値は低い方が活性が強い)G2のペプチドの精製を進めることとした。

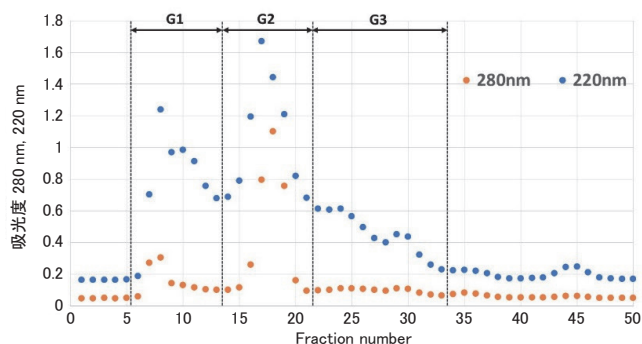


Fig. 1 コオロギタンパク質加水分解物(ペプチド)のゲルろ過クロマト

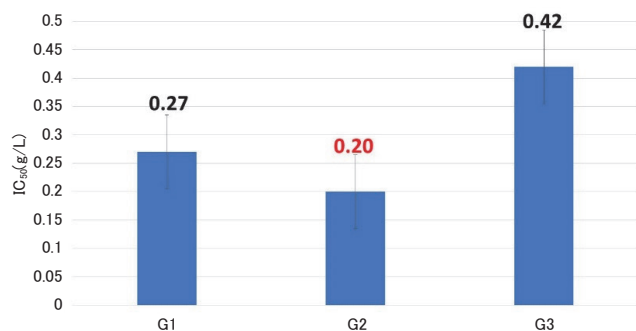


Fig. 2 ゲルろ過クロマトグラフィー精製ペプチドのACE阻害活性測定

#### 3-2. コオロギタンパク質由来ペプチドのゲルろ過クロマトグラフィー精製物の逆相HPLCによる精製

ゲルろ過クロマトグラフィー精製によるコオロギタンパク質由来ペプチドのG2画分について、逆相HPLCによる精製を行った。クロマトをFig. 3に示す。多くのピークが確認できたが、比較的単一成分ピークに見え、かつ、220 nmにおける検出強度の高い9つのピークを選択し、①から⑨とした。これら①-⑨について、ペプチド濃度を1.2 mg/mlに調整し、ACE阻害活性を測定した。結果をFig. 4に示す。ACE阻害活性の最も高いものは、⑨のピークであり、71.5%を示した。次いでACE阻害活性が高いものは、⑥や⑧の60%程度であり、この結果から、逆相HPLCクロマトグラフィーの溶出条件において後半部、すなわち溶離液中のアセトニトリル濃度の高い条件において溶出されるペプチドが比較的高いACE阻害活性を有していることが示された。一方で、逆相HPLCで精製したペプチドのACE阻害活性は、精製前、すなわちゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した粗精製のペプチドのACE阻害活性(G2のIC<sub>50</sub>は0.2 mg/ml)よりも高濃度が必要であることが示唆された。

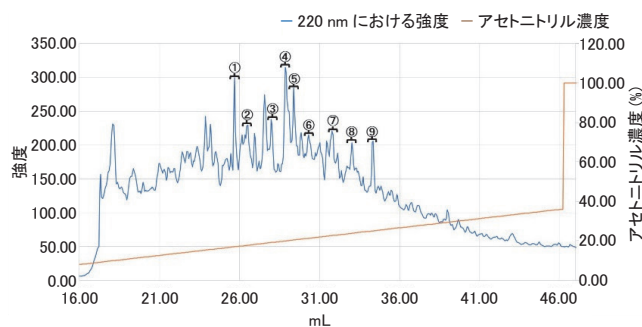


Fig. 3 G2の逆相HPLCクロマトグラフィー

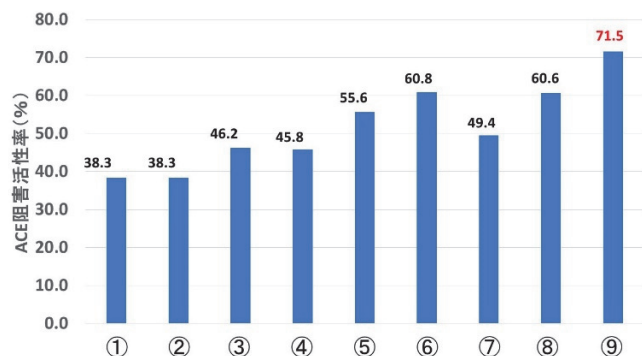


Fig. 4 G2の逆相HPLC画分①~⑨のACE阻害活性値(ペプチド濃度は1.2 mg/ml)

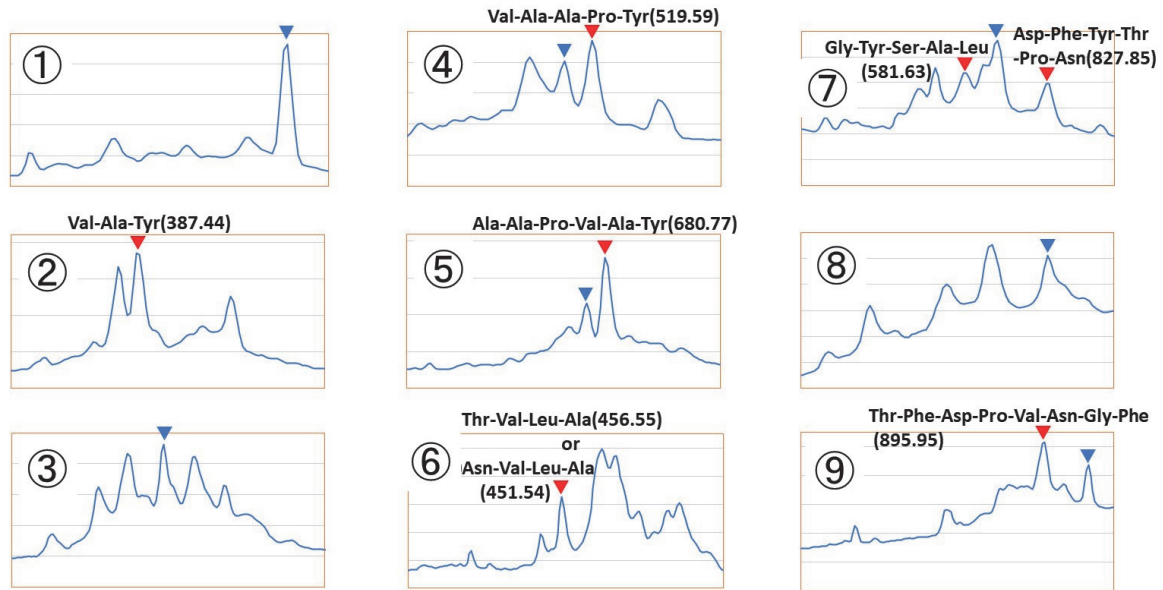


Fig. 5 G2の逆相 HPLC 画分①~⑨を各々再精製したクロマトと得られたペプチドの amino 酸配列および分子量 (▼の上に amino 酸配列が付していないものは、解析不可であったもの)

### 3-3. コオロギタンパク質由来ペプチドの逆相 HPLC による再精製

前述の逆相 HPLC で得られた①~⑨の画分に含まれるペプチドの amino 酸配列を解析するために、溶出条件とカラムを変更して再精製を行った。結果を Fig. 5 に示す。Fig 中の①から⑨は 3-2 節の逆相 HPLC クロマト (Fig. 3) でのピーク番号を示す。この中で、②、④、⑤、⑥、⑦および⑨の画分中に含まれるペプチドの一部が amino 酸シーケンサー解析により明らかとなった。②には Val-Ala-Tyr (分子量は 387.44) のトリペプチド、④には Val-Ala-Ala-Pro-Tyr (519.59) のペプタペプチド、⑤には Ala-Ala-Pro-Val-Ala-Tyr (680.77) の 7 残基からなるペプチドが含まれることがわかった。⑥には、Thr-Val-Leu-Ala (456.55) あるいは Asn-Val-Leu-Ala (451.54) のどちらかのテトラペプチドの存在が推定された。⑦に含まれるペプチドは、Gly-Tyr-Ser-Ala-Leu (581.63) と Asp-Phe-Tyr-Thr-Pro-Asn (827.85) の 2 つが明らかとなった。⑨には 8 残基からなる Thr-Phe-Asp-Pro-Val-Asn-Gly-Phe (895.95) が含まれることがわかった。逆相クロマトグラフィーのアセトニトリルが高濃度条件 (すなわち分析後半部) になるに従い、検出されるペプチドの分子量は大きくなる傾向が見られた。

## 4. 結論・考察

将来の食糧難問題を克服するとして期待されている食用昆虫のうちの 1 つであるフタホシコオロギのタンパク質から ACE 阻害活性を示す有用機能性ペプチドを創製することができた。ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相 HPLC

を利用したペプチドの精製法を提案することができた。また、精製した機能性ペプチドの一部において構成する amino 酸配列を特定した。

## 5. 今後の課題

ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを経ると、ペプチドの回収量が極端に減るため、スケールアップさせた精製工程の条件検討が必要である。これにより、量産可能となれば、amino 酸配列が特定できた単離ペプチドの ACE 阻害活性  $CI_{50}$  だけでなく、阻害様式を明らかにすることができる。また、ACE 阻害に強く関与する amino 酸部位の特定を行うことで、医薬品原料としての可能性をさらに高めることができる。さらに、ヒトへの負荷試験をする前段階として、高血圧発症ラット等の動物実験を行い、今回見出した機能性ペプチドの血圧上昇抑制の効果について検討する必要がある。今回はコオロギ粉末の酵素加水分解物のゲルろ過クロマトグラフィー画分中の一部である G2 画分についてのみ研究を進めたが、G1 や G3 中のペプチドについても解析を行い、機能性食品原料の開発に向けて、有用機能性ペプチドの解析を進めて行く必要がある。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係各位に厚く御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

- Friedland J.; Silverstein E., 1976, A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Clin. Pathol.*, **66**(2), p.416-424. DOI: 10.1093/ajcp/66.2.416.
- Pattarayingsakul W.; Nilavongse A.; Reamtong O.; Chittavanich P.; Mungsantisuk I.; Mathong Y.; Prasitwuttisak W.; Panbangred W., 2017, Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides from digestion of larvae and pupae of Asian weaver ant, *Oecophylla smaragdina*, Fabricius. *J. Sci. Food Agric.*, **97**(10), p. 3133-3140. DOI: 10.1002/jsfa.8155.
- Tao M.; Wang C.; Liao D.; Liu H.; Zhao Z.; Zhao Z., 2017, Purification, modification and inhibition mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein hydrolysate. *Proc. Biochem.*, **54**, p. 172-179. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.022.
- Wu Q.; Jia J.; Yan H.; Du J.; Gui Z., 2015, A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: biochemical characterization and molecular docking study. *Peptides*, **68**, p.17-24. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.07.026.