

黒大豆 (*Glycine max* MERRILL *forma Kuromame* MAKINO)

のトリプシンインヒビターについて (第1報)

—トリプシンインヒビターの分離精製—

片桐千里, 清水まゆみ

Trypsin Inhibitors of Kurodaizu (*Glycine max* MERRILL
forma Kuromame MAKINO) (Part I)

—Separation and Purification of Trypsin Inhibitors—

Chisato Katagiri and Mayumi Shimizu

植物性食品中のプロテアーゼインヒビターの研究は1946年に Kunitz¹⁾ が大豆よりトリプシンインヒビターを単離して以来, 著しい進展がみられている。現在まで大豆^{2~13)}を中心に豆類, 穀類をはじめ種々の植物性食品から多数のインヒビターが単離され, それらの性質が明らかにされてきた。このプロテアーゼインヒビターの研究のきっかけとなった大豆はさまざまな気象条件や土壌条件に適應でき, 品種の選定と適当な栽培管理を講ずれば至る所で成育が可能である。そのため, 大豆は品種の分化が進み, 多くの種類が存在している。大豆の一品種である黒大豆は一般に黒豆と呼ばれ, わが国では限られた地域で生産されており, 古くから煮豆に調理されて親しまれている。この黒大豆にも大豆と同様に多くのトリプシンインヒビターが存在し, 予備的に行われた実験¹⁴⁾では少なくとも5種類のトリプシンインヒビターが存在していることが確認された。本研究は黒大豆のトリプシンインヒビターについて検討するため, さらに分離精製を進めることを目的として行った。

I. 実 験

1. 実験材料 黒大豆は兵庫県産丹波黒を入手し, 粉碎後, 石油エーテルで脱脂して用いた。トリプシン (牛膀胱, 2回結晶) は Sigma 社製品を購入した。基質としてのカゼインは Merck 社より, α -N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩

(BANA) は財団法人蛋白質研究奨励会より入手した。またカラムクロマトグラフィーに用いた Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-25, CM-Sephadex C-25, QAE-Sephadex A-25 は Pharmacia Fine Chemicals 社の製品を使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. タンパク質の定量 卵製アルブミン (2回結晶, NBC 社製品) を標準タンパク質として, Lowry 法¹⁵⁾の方法に従った。カラムからの溶出液については 280 nm における吸光度を測定した。

3. 糖の定量 グルコースを標準糖とし, フェノール硫酸法¹⁶⁾により定量した。

4. トリプシン活性およびトリプシンインヒビター活性の測定

1) トリプシン活性の測定 カゼインを基質とする萩原らのカゼイン消化法¹⁷⁾の改良法¹⁸⁾, または BANA を用いる Erlanger らの方法¹⁹⁾の改良法¹⁸⁾により測定した。

2) トリプシンインヒビター活性の測定 トリプシン活性の測定法のトリプシン液にインヒビター液を反応させた後, 同様の操作を行い, 吸光度 (T*) を求めた。これとインヒビターを含まないコントロール (T) から次式により阻害度 (I) を算出した。

$$I(\%) = 100(T - T^*)/T$$

インヒビター単位はトリプシン 1 μ g の酵素活性を 100%阻害するインヒビター量 (μ g) を 1 単位とし, unit で表わした。なお, 収率の測定にはカゼイン消

化法を,その他のインヒビター活性の測定には BANA 法を用いた。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Davis ら²⁰⁾の方法により7.5%ゲル, トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.4) 中で行った。

II. 結果および考察

1. インヒビターの抽出 粉碎脱脂黒大豆に同量の海砂を加えて乳鉢で磨砕し,少量の 0.1 M NaCl 溶液を加えてペースト状にした。さらに黒大豆重量の10倍量の0.1M NaCl 溶液を加えて混合し, 4°C で2時間放置した。この混合液をろ過し,ろ液を 60°C で1分間熱処理して熱に不安定な成分を遠心分離 (8,000 rpm, 10分) 後,得られた上清を抽出液とした。これに硫酸アンモニウムを0.8飽和になるまで加えて塩析を行い,生じた沈殿を水に対して透析した。透析中に生じた不溶のグロブリン系タンパク質を遠心分離 (8,000 rpm, 10分) で除き,得られた液を透析液とした。透析液を凍結乾燥し,粗製トリプシンインヒビターを得た。これらの処理でもとの活性 (抽出液) の53%が失われた。これは主として透析により分子量10,000以下の低分子性のインヒビターが透析外液に流出したためと思われる。本研究では非透析性のインヒビターを対象としてさらに分離精製を進めた。

2. インヒビターの分離精製 先の報告¹⁴⁾では 1st クロマトグラフィーとして Sephadex G-75カラムによるゲルろ過を行い3つの活性画分を得たが,分離の状態はやや不十分であった。そこで今回は 1st クロマトグラフィーに DEAE-Sephadex A-25カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。

粗製トリプシンインヒビター 200 mg を 4 ml の 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解し,同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-25カラム (2.5×31 cm) に加えて吸着させた。次に同緩衝液 50 ml でカラムを洗浄し, NaCl 濃度勾配 (0→0.5 M) で溶出させた。このクロマトグラムを Fig. 1 に示す。7つの活性画分に分離し,それぞれ水に対して透析後,凍結乾燥した。各画分についてディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果,画分7は単一なバンドを示し,電気泳動的に均一であった。他の画分はそれぞれ数種類のバンドが存在しており,部分精製物であった。画分1~6について,さらに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い,部分精製物としての分子量を推定した。その結果,画分1,5は分子量にして約2,000しか差がない混合物であり,他は約3,000以上差があった。そこで前者2画分はイオン交換クロマトグラフィーにより,後者4画分はゲルろ過によりさらに精製した。

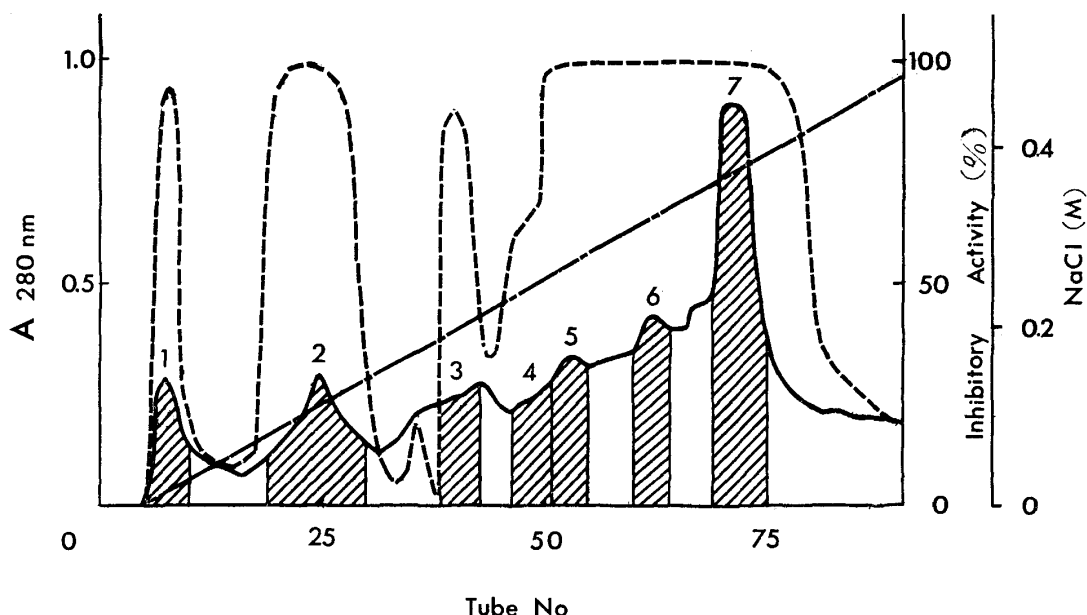


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-25カラムによる粗製トリプシンインヒビターの溶出パターン。粗製トリプシンインヒビター 200 mg を 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 4 ml に溶解し,同緩衝液で平衡化したカラム (2.5×31 cm) に加え吸着させた。同緩衝液 50 ml でカラムを洗浄した後, NaCl 濃度勾配 0→0.5 M で溶出させた。流速は16 ml/hr, 1 tube 5 g とした。—, 280 nm の吸収; ---, トリプシンインヒビター活性; - - -, NaCl 濃度。

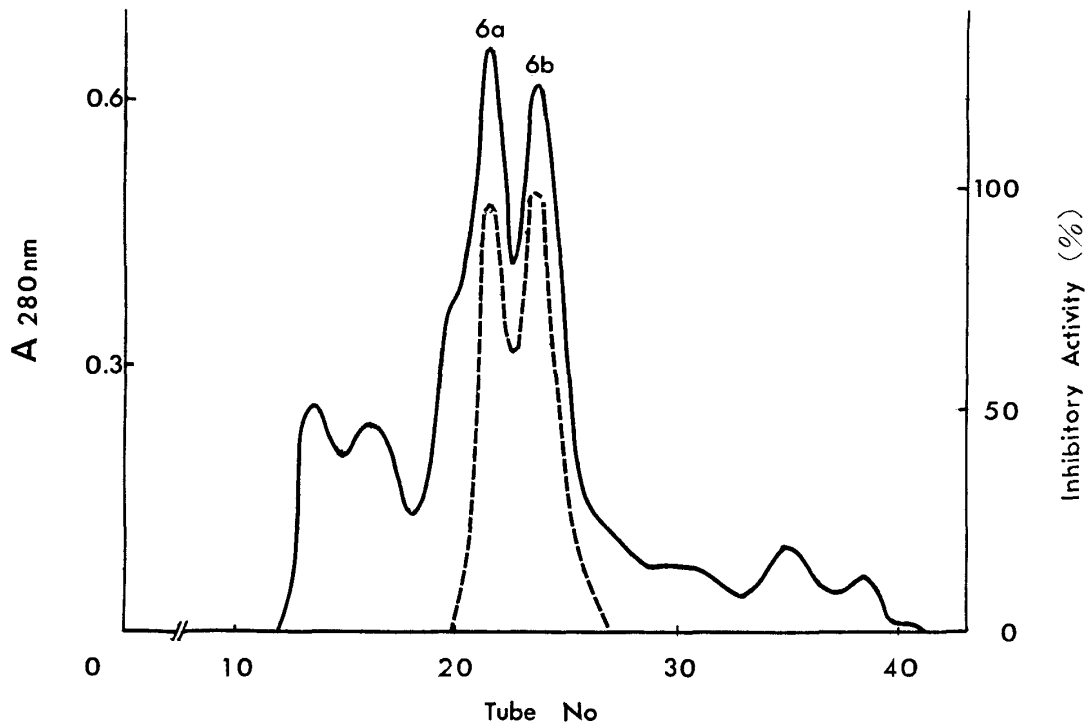


Fig. 2. Sephadex G-75 カラムによる画分 6 の溶出パターン。画分 6 60 mg を 0.05 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) 2 ml に溶かし、同緩衝液で平衡化したカラム (2.5×65 cm) に加え同緩衝液で溶出させた。流速は 2 ml/hr, 1 tube 5 g とした。—, 280 nm の吸収; ---, トリプシンインヒビター活性。

Table 1. Summary of Purification of Trypsin Inhibitors (from Kurodaizu 50g)

Step	Total protein ($\mu\text{g} \times 10^{-3}$)	Total unit (unit $\times 10^{-3}$)	Specific activity (unit/ μg protein)	Yield (%)
Extract	6811.0	3868.4	0.57	100.0
Dialysate	1130.0	1808.0	1.60	46.7
1st Chromatography				
Fraction 7	224.3	349.4	1.56	9.0
2nd Chromatography				
Fraction 1a	3.3	9.3	2.78	0.3
1b	9.8	21.2	2.17	0.5
2	20.4	70.2	3.45	1.8
3a	8.2	24.1	2.94	0.6
3b	5.7	10.2	1.78	0.3
4	4.0	7.8	1.92	0.2
5b	41.3	100.7	2.44	2.6
3rd Chromatography				
Fraction 5a	16.5	82.7	5.00	2.1
6a	72.6	220.7	3.03	5.7
6b	55.6	252.8	4.55	6.5
Total yield				26.2

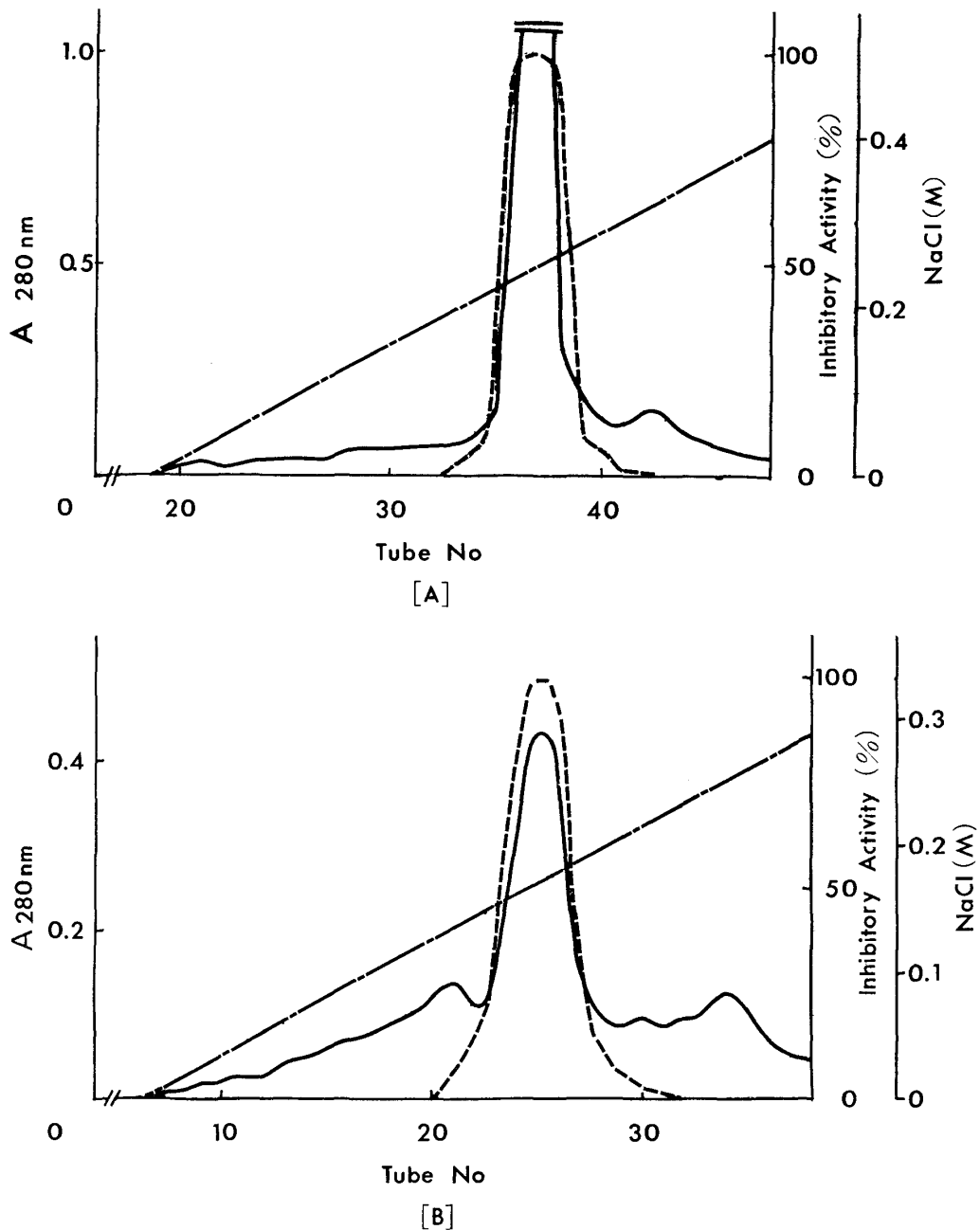


Fig. 3. QAE-Sephadex A-25 カラムによる画分 6 a, 6 b の溶出パターン。画分 6 a または 6 b 25 mg を 0.05 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) 2 ml に溶解し、同緩衝液で平衡化したカラム (1.5×25 cm) に加え吸着させた。同緩衝液 20 ml でカラムを洗浄した後、NaCl 濃度 0→0.5 M で溶出させた。流速は 9 ml/hr, 1 tube 3 g とした。[A] は画分 6 a, [B] は画分 6 b の溶出パターンを示す。—, 280 nm の吸収; ---, トリプシンインヒビター活性; - - -, NaCl 濃度。

画分 1 については CM-Sephadex C-25 カラムを用いて活性画分 1a と 1b に、画分 5 は QAE-Sephadex A-25 カラムを用いて画分 5a と 5b に分画した。2, 3, 4, 6 画分はそれぞれ Sephadex G-75 カラムにより、活性画分 2, 3a, 3b, 4, 6a, 6b を得た。これらの画分はディスク電気泳動を行うと、5a, 6a, 6b に複数のバンドが認められたので、さらにこれらについて

クロマトグラフィーを行った。

画分 5a は Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過、画分 6a, 6b は QAE-Sephadex A-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、それぞれ均一な活性画分を得た。

以上の分離精製のうち、画分 6 についての結果を示すと Fig. 2, 3 のとおりである。画分 6 を 60 mg と

り 0.05 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) 2 ml に溶かし, 同緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 カラムに添加し溶出させると, 2 活性画分 6a, 6b を得た (Fig. 2)。両画分をさらに QAE-Sephadex A-25カラムで分離すると, 6a は NaCl 濃度 0.25 M に活性画分が溶出し (Fig. 3 [A]), 6b は 0.17 M に溶出した (Fig. 3 [B])。

Table 1 はこれらの分離精製の結果をまとめたものである。黒大豆 50g より抽出した液の総インヒビター活性は 3,868,400 unit であったが, これは小麦種子各部位 (麩¹⁸⁾, 胚芽²¹⁾, 胚乳²²⁾ を例にとって比較してみると, 約 140~600 倍と非常に高い数値を示し, 比活性も 60~120 倍と極めて強い値であった。各過程の精製度を比活性でみると, 熱処理, 塩析, 透析の操作で 3 倍に, 各クロマトグラフィーにより単離された 11 種のトリプシンインヒビターは 3~9 倍に精製された。これらのインヒビターは糖を含まない, アミノ酸のみからなるタンパク質であった。また, 収率では, 塩析, 透析過程で 53% が失われ, 低分子量のインヒビターの存在を示した。黒大豆にも大豆と同じインヒビターが含まれると考えられ¹⁴⁾, この損失の際に Bowman-Birk タイプのインヒビターも失われたのではないかと思われる。

このように黒大豆にも大豆と同様, 多量にしかも多種のトリプシンインヒビターが存在することは, 遺伝的不均一性による²³⁾, 大豆の品種に遺伝的変異がある²⁴⁾などと考えられているが, 推測の域を出ず, 今後の検討が待たれる。

本研究を行うにあたり, 御指導下さいました本学光永俊郎教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149 (1946).
- 2) D.E. Bowman: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**, 547 (1946).
- 3) J. Racks, H.A. Sasame, R.L. Anderson and A. K. Smith: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6265 (1953).
- 4) J. Racks and R.L. Anderson: *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 471 (1962).
- 5) Y. Birk, A. Gerttler and S. Khalof: *Biochem. J.*, **87**, 281 (1963).
- 6) J. Racks and R.L. Anderson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 230 (1964).
- 7) V. Frattali and R.F. Steiner: *Biochemistry*, **7**, 521 (1968).
- 8) T. Obata, M. Kimura, T. Kobayashi and Y. Watanabe: *Cereal Chem.*, **42**, 597 (1970).
- 9) S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **82**, 1513 (1977).
- 10) S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **82**, 1523 (1977).
- 11) S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **83**, 737 (1978).
- 12) I. Koshiyama, M. Kikuchi, K. Harada and D. Fukushima: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 336 (1981).
- 13) I. Koshiyama, M. Kikuchi and D. Fukushima: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 340 (1981).
- 14) 荒堀圭子, 岡野充子: 京都女子大学食物学会誌, **36**, 45 (1981).
- 15) O.H. Lowry, N.J. Rosenbough, A.L. Forr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 16) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 17) B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki: *J. Biochem.*, **45**, 185 (1958).
- 18) 光永俊郎, 清水まゆみ: 農化, **56**, 7 (1982).
- 19) B.F. Erlanger, N. Kokowsky and W. Cohen: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
- 20) B. Davis and L. Ornstein: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
- 21) T. Mitsunaga: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 43 (1979).
- 22) T. Mitsunaga, Y. Kimura, M. Shimizu: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **28**, 419 (1982).
- 23) V. Frattali and R.F. Steiner: *Biochemistry*, **7**, 521 (1968).
- 24) L. Singh, C.M. Wilson and H.M. Hadley: *Crop Sci.*, **9**, 489 (1969).