

モロヘイヤ中のトリプシンインヒビターについて

海老原綾子, 中 佳子, 西田 友佳, 大久保美智子

要 旨

プロテアーゼインヒビターは、タンパク質分解作用に関わるのみでなく、さまざまな生理作用を持ち、プロテアーゼの制御因子として重要な役割を果たしている。

モロヘイヤから70%硫酸分画法、ラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法を用いて、トリプシンインヒビター (TI) 活性を持ったタンパク質を分離精製した。モロヘイヤ TI 活性の測定にあたっては、モロヘイヤ70%硫酸分画、トリプシン、基質としてカゼインを混和し、37℃、20分インキュベート後、トリクロロ酢酸を加え、遠心分離し、その上清の280nmの吸光度を分光光度計で測定した。その結果、TI存在下の反応液の吸光度の増加はみられなかった。

プロテアーゼインヒビターのタンパク質を SDS-PAGE 法を用いて解析した結果、100, 59, 55, 50kDa の分子量のタンパク質が存在することが分かった。

非還元条件下での SDS-PAGE 解析の結果では、モロヘイヤの TI タンパク質の分子量は、100 kDa であることが分かった。

TI 活性の熱に対する安定性について、SDS-PAGE 法を用いて解析したところ、100℃で10分間処理した TI タンパク質は、トリプシンを阻害することはできなかった。

キーワード: モロヘイヤ, 硫酸アンモニウム分画, トリプシンインヒビター, SDS-PAGE 法

序 論

プロテアーゼインヒビター (protease inhibitor, PI) はタンパク質代謝の制御因子として重要な役割を担っている。酵素の反応機構は、人の生命活動と密接に関わっているため、数多くの研究が行われており、健康増進や疾患の予防・治療などさまざまな領域で応用されている。動物、植物、微生物から各種の PI が分離され、PI の構造と機能について次々と明らかにされている^{1~5)}。

PI は、対応するプロテアーゼによって、セリン PI やシステイン PI などと分類されている。

セリン PI は、タンパク質性高分子インヒビターと低分子インヒビターに大別されている。動植物界および微生物界に広く存在し、種々の生体内反応に関与するセリンプロテアーゼ機能を制御している。そのため、酵素化学的基礎研究はもとより、一部は臨床応用にも利用され始めている⁶⁾。

トリプシンインヒビター (trypsin inhibitor, TI) による阻害機構は、インヒビターが一種の基質としてプロテアーゼに作用し、インヒビター側の反応部位とプロテアーゼ側の活性中心とが結合して安定な複合体を形成すると考えられている。また、TI には、そのプロテアーゼの活性中心のアミノ酸残基と直接相互作用する役目を持つ反応部位が存在する。こ

の反応部位の構造には、インヒビターが阻害するプロテアーゼの基質特異性に基いたアミノ酸残基が存在する。

動物起源のPIは血漿中のものが最も多く研究されており、その生理的意義も、血液凝固やキニン形成反応、炎症などによる組織や細胞の部分的な損傷の際に関与するプロテアーゼの制御因子としても機能している^{7~8)}。

植物起源のPIについては、多くのマメ類に含まれるものが古くから知られ、代表的なものにKunitzが発見したダイズトリプシンインヒビター(soybean trypsin inhibitor; STI)がある⁹⁾。その他、ジャガイモ、トマト、パッションフルーツなどに含まれていることが報告されている^{10~14)}。

本研究で注目したモロヘイヤ (*tossa jute* (英)・学名: *Corchorus olitorius* L.) は、緑黄色野菜の中でも群を抜いてβ-カロテンが多く含まれており、ビタミンA、Bやカルシウム、鉄などのミネラル、食物繊維なども豊富で、栄養的に大変優れていることがよく知られている。

このように、モロヘイヤはさまざまな栄養生理作用を有しているが、TIについては、まだ不明な点が多く、十分な研究がされていない。そこで、本研究ではモロヘイヤのタンパク質を硫酸アンモニウム分画後、ラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)法および280nmの吸光度の測定法を用いて、主としてトリプシンに対するインヒビター活性について解析を行った。さらに、モロヘイヤのTI活性を持った画分についてSDS-PAGE法を用いた活性染色による解析を試みた。これらの結果から、モロヘイヤのTI活性についていくつかの特徴が明らかになったので報告する。

実験材料および方法

試薬

Trypsin, Trypsin inhibitor (Type: Chicken Egg White) and Soybean trypsin inhibitor (Sigma), Protein assay 試薬 (Bio-Rad), 電気泳動用分子量マーカー LMW Kit (Pharmacia), 染色液 Quick-CBB (和光純薬)

1. protease inhibitorの精製

1) 硫酸アンモニウム処理

モロヘイヤは、生鮮食料品として販売されている鹿児島県産のものを使用した。このモロヘイヤを50mM Phosphate buffer (pH7.5) 中でホモジナイズ後、ガーゼで濾し、絞り汁を得た。これを遠心分離(6000rpm, 20min, 4℃)し、得られた上清液に70%飽和になるように硫酸アンモニウム(硫安)を加え、30分間攪拌後、遠心分離(6000rpm, 25min, 4℃)し、沈殿を得た。この沈殿に50mM Phosphate buffer (pH7.5)を加えて懸濁し、透析膜を用いて、50mM Phosphate buffer 中で約18時間透析した。透析後、遠心分離(6000rpm, 15min, 4℃)し、これより得られた上清液をモロヘイヤ70%硫安画分溶液(以後モロヘイヤ硫安画分とする)として実験に用いた。

2) モロヘイヤ中のタンパク質の定量

タンパク質の定量は、牛血清アルブミン(BSA)を標準液としてProtein Assay 試薬を用いて行った。

2. Trypsinに対する阻害活性の測定

1) 吸光度によるTI活性の測定

モロヘイヤ硫安画分, 0.1M Phosphate buffer (pH7.5), Casein (1 mg), Trypsin (1.25 μg) の混和液 1.0ml を37℃で20分間インキュベートした。その後、20% TCA をそれぞれ200 μl 加え反応を止め、30分間水中で静

置し、遠心分離 (12000rpm, 10min, 4 °C) した。その上清液の280nmの吸光度を測定した。

2) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法を用いた Trypsin に対する阻害活性の測定

反応液の組成は、Table 1 に示した。モロヘイヤ硫安画分, 0.1mM Phosphate buffer (pH7.5), Trypsin (1.25 μ g または 2.5 μ g) を混和し, 37°C で10分間プレインキュベートした後, Casein (0.1mg) を加え, 37°C で20分間反応させた。また, 市販の Soybean trypsin inhibitor (0.5 μ g) を用い同様にを行った。これらの反応液15 μ l に, 4 倍の濃度の電

気泳動用 SDS sample buffer 5 μ l を混和し, 沸騰浴中で90秒間熱処理を行った。熱処理後の反応液を SDS-PAGE 法で解析した。SDS-PAGE は Laemmli の方法¹⁵⁾ で行った。分子量のマーカには電気泳動用の LMW Kit を用い, 泳動は20mA で行った。泳動後のゲルを, 固定液中で10分間処理し, この操作を二回繰り返した。固定後のゲルを染色液 Quick-CBB 中で30分間振盪しながら染色し, その後, 染色されたタンパク質のバンドが鮮明に確認できるまで, 蒸留水で洗浄した。

3) TI の熱に対する安定性

Table 2 に示した Casein 溶液以外の溶液を混和し, 37°C で10分間プレインキュベートし

Table 1 Composition of reaction solution

	1	2	3	4	5
Casein (10mg/ml)	10	-	10	10	10
70%A.S. *fraction	-	20	-	30	-
0.1mM Phosphate buffer (pH7.5)	50	50	50	50	50
Trypsin (50 μ g/ml)	-	-	2.5	2.5	5
Soybean trypsin inhibitor (50 μ g/ml)	-	-	-	-	10
D.W.	40	30	37.5	7.5	25
Total	100	100	100	100	100

* A.S., ammonium sulfate

(μ l)

Table 2 Composition of reaction solution

	1	2	3	4	5
Casein (10mg/ml)	10	-	10	10	10
70%A.S. fraction	-	20	-	30	30*
0.1mM Phosphate buffer (pH7.5)	50	50	50	50	50
Trypsin (50 μ g/ml)	-	-	2.5	2.5	2.5
D.W.	40	30	37.5	7.5	7.5
Total	100	100	100	100	100

*The sample was heated for 10 min at 100°C.

(μ l)

た後、Casein 溶液を加え、さらに37℃で20分間インキュベートした。これらの反応液15 μ l について SDS-PAGE で解析した。

4) 活性染色による市販の TI およびモロヘイヤ硫安画分の阻害活性の確認

活性染色は、Segarra¹⁶⁾らの方法を参考にして行った。1レーン当りの市販の TI のタンパク質は、10 μ gとした。モロヘイヤの TI 活性をもった画分についてはタンパク質量を60, 120, 180 μ g と量を変えて解析を行った。

ゲルは12.5% (w/v) の polyacrylamide に、基質としてのゼラチンを0.1% (w/v) 含む分離ゲルを用い、Trypsin に対するモロヘイヤ中の inhibitor 活性の確認と同時にそのタンパク質の分子量を求めた。ゼラチン濃度は Heussen らの方法¹⁷⁾を用いた。市販の TI およびモロヘイヤの TI 阻害活性の確認のための電気泳動は非還元条件下で行った。活性染色法ではゲル中のゼラチンも染色されるため、染色後、分子量のマーカのバンドの確認が困難であることからマーカは通常の3倍量を用いた。

電気泳動は20mA で65分間行い、泳動後、ゲルを1% (w/v) Triton-X100で60分間振盪し、さらに10mM CaCl₂で5分間振盪して、ゲル中の SDS を除去した。次に25mM Tris-HCl (pH8.0) 50ml に Trypsin 2mg を溶かした溶液にゲルを浸した。これを37℃インキュベーター中で20分間処理し、ゲル中のゼラチンと Trypsin を反応させた。反応後のゲルを蒸留水で洗浄後、固定液中で10分間振盪し、これを2回繰り返した。このゲルを Quick-CBB 染色液で30分間染色し、さらに蒸留水で一晩振盪して脱色した。

結果および考察

1. Trypsin に対する阻害活性の測定

モロヘイヤ22.20g から70%硫安画分によりタンパク質は85.7mg得られた。

1) 吸光度による TI 活性の測定

280nm の吸光度を測定した結果より、Casein を Trypsin で処理した時の反応液の吸光度は、0.99であった。Casein と Trypsin にモロヘイヤ硫安画分を加えた反応液の吸光度は0.05であった。この結果から、モロヘイヤ中の硫安画分は、Casein を分解する Trypsin の働きを阻害することが確認でき、その阻害率は95%であった。このように、吸光度の解析から、モロヘイヤ硫安画分は Trypsin に対して強力な阻害活性の存在を示している。

2) SDS-PAGE 法による阻害活性の測定

基質に Casein, プロテアーゼに Trypsin を用いて、モロヘイヤ硫安画分の TI 活性を SDS-PAGE で解析し、その結果を Fig.1 に示した。

Lane 1 より Casein は分子量34, 31, 29 kDa の三つのバンドが確認できた。また Lane 2 より、モロヘイヤ硫安画分中のタンパク質については、100, 59, 55, 50 kDa の分子量のタンパク質が確認できた。これらのタンパク質が Trypsin に対して抵抗性のあることを示している。反応液の条件下では20分間で Casein は、Trypsin によって分解され (Lane 3), 一方モロヘイヤ硫安画分を加えた Lane 4 では Trypsin による Casein の分解はみられなかったが、わずかに低分子のタンパク質のバンドが見られる。Lane 5 は、市販の大豆トリプシンインヒビターを用いた結果である。Lane 4 と同様に Trypsin に対する阻害が確認できた。

2. TI の熱に対する安定性

TI の熱に対する安定性について SDS-PAGE で解析した結果を Fig. 2 に示した。熱

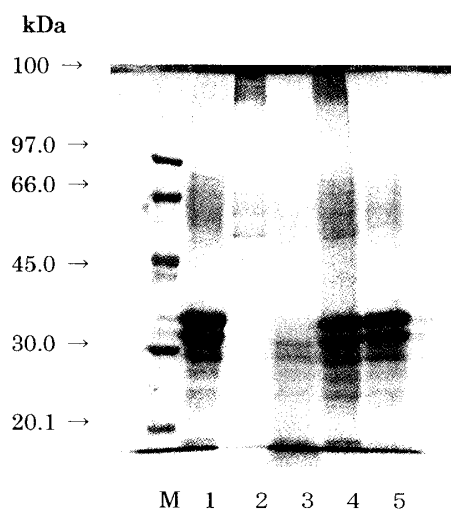


Fig.1 SDS-PAGE of the protein isolated from tossa jute. Lane M, marker ; Lane 1, Casein ; Lane 2, TI isolated from tossa jute ; Lane 3, Reaction mixture of Casein and Trypsin ; Lane 4, Reaction mixture of Casein, Trypsin and TI isolated from tossa jute ; Lane 5, Casein, Trypsin and Soybean trypsin inhibitor

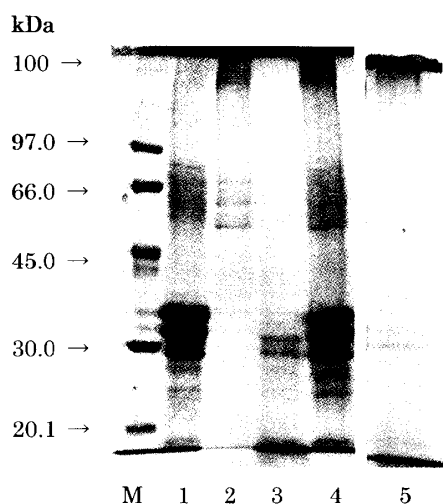


Fig.2 SDS-PAGE of the heat stability of the trypsin inhibitor from tossa jute.

Lane M, marker ; Lane 1, Casein ; Lane 2, TI isolated from tossa jute ; Lane 3, Reaction mixture of Casein and Trypsin ; Lane 4, Reaction mixture of Casein, Trypsin and TI isolated from tossa jute ; Lane 5, Casein, Trypsin and TI* isolated from tossa jute.

* TI was heated for 10 min at 100°C.

処理をしたモロヘイヤ硫安画分存在下で、CaseinとTrypsinを反応させたところ、Lane 5はCaseinとTrypsinのみのLane 3と同じ結果が観察された。この結果より、モロヘイヤ中の阻害活性は、熱を加えることで失われることが確認できた。

3. 活性染色による市販のTIおよびモロヘイヤ70%硫安画分溶液の阻害活性の確認

市販のTIおよびモロヘイヤ硫安画分を用いて活性染色で解析した結果をFig.3に示した。

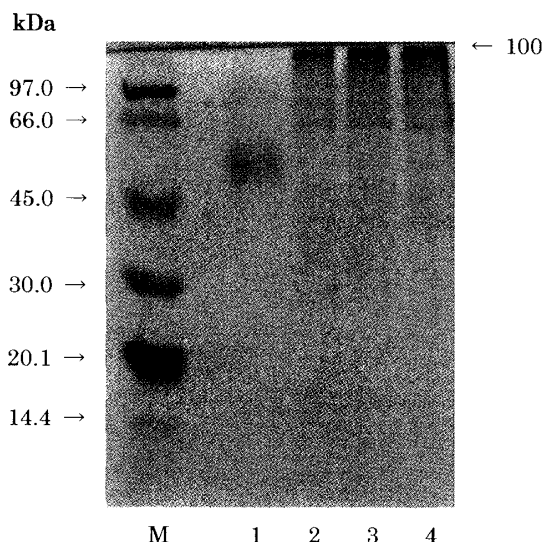


Fig.3 Native-PAGE analysis of the isolated trypsin inhibitor from tossa jute.

Lane M, marker ; Lane 1, Trypsin inhibitor (Chicken Egg White) ; Lane 2, TI isolated from tossa jute (60 µg) ; Lane 3, TI isolated from tossa jute (120 µg) ; Lane 4, TI isolated from tossa jute (180 µg).

Fig.3の結果より、市販のTrypsin inhibitorの分子量は55kDaのタンパク質が確認でき(Lane1)、モロヘイヤ硫安画分も分子量100kDaのタンパク質が残存していたことが分かった。また、この結果より、モロヘイヤ硫安画分のタンパク質量の増加に伴い、TI活性が高まっていることが確認できた(Lane2,

3, 4)。なお、マーカーはTrypsin 処理時に分解されるため、通常の3倍量を用いた。

植物起源のPIは、種子や塊茎に多量に存在していることが分かっており、そのタンパク質の構造や阻害の分子機構が明らかにされている。これらPI存在の植物生物学的意義は昆虫などの攻撃に対する防御のためなどと推測されている。植物が局所的に障害を受けると、傷害を受けた組織では癒傷のための諸反応が誘起されるが、同時に傷害刺激が他の組織にも伝達されて個体全身に応答反応が起こると言われている¹⁸⁾。このような全体的応答に関して最もよく研究されているのは、ジャガイモやトマトを用いてのPIの誘導合成についてである¹⁹⁾。動物のえじきになりやすい種子や塊茎には構成的にPIを合成蓄積して動物による摂取の度合いを少なくしているのではあるといわれている。

また、最近の研究によると、伝統的なChinese herb や malaytea scurfpea (*Psoralea corylifolia* L.) から分離された抗菌性のタンパク質 (Psc-AFP) にPI活性があり、このPsc-AFPが微生物の成長を阻害したことから、PIが高い抗菌作用を持ち、病原体に対して防御機構があることが報告されている²⁰⁾。その他、動物、植物、微生物から分離したPI活性を持つタンパク質にも、抗菌作用を有することが解明されている^{21~26)}。モロヘイヤ中のPIも防御機構および抗菌作用に関与している可能性が高いことが考えられる。特に、モロヘイヤ中の100kDaのタンパク質の機能や構造について検討を進めていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Delgado-Vargas, F., *et al.* : Isolation and properties of a Kunitz-type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. *J. Agric. Food. Chem.*, 52 : 6115-6121, 2004
- 2) Ruoppolo, M., *et al.* : Characterization of five new low-molecular-mass trypsin inhibitors from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *Eur. J. Biochem.*, 267 : 6486-6492, 2000
- 3) Gomes, C.E., *et al.* : Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). *Plant. Physiol. Biochem.*, 43 : 1095-1102, 2005
- 4) Tanaka, N., *et al.* : Characterization of a 54 kDa, α_1 -antitrypsin-like protein isolated from ascitic fluid of an endometrial Cancer Patient, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82 : 693-700, 1991
- 5) Schmelz, E.A., *et al.* : Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103 : 8894-8899, 2006
- 6) 早石 修 : プロテアーゼとそのインヒビター, メジカルビュー社, 東京, 1993, 126-137.
- 7) Erdos, E.G., : Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiol Pharmacol.*, 15 (Supple 6) : S20-S24, 1990
- 8) Suzuki, Y., *et al.* : Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs coding for guinea pig alpha 1-antiproteases S and F and contrapsin. *J. Biol. Chem.*, 266 : 928-932, 1991
- 9) Kunitz, M. *J. Gen. Physiol.*, 30, 311, 1947

- 10) Ryan, C.A., Hass, G.M., Kuhn, R.W., : Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes, *J. Biol. Chem.*, 249 : 5495-5499, 1974
- 11) Hass, G.M., Hermodson, M. A., : Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry*, 20 : 2256-2260, 1981
- 12) 橋口智子, 稲井道子, 大久保美智子 : パッションフルーツ中のプロテアーゼインヒビター, *日本栄養・食糧学会誌*, 46 : 409-415, 1993
- 13) Ohkubo, M., Hashinaga, F., Morinaka, F. : Purification and characterization of protease from the juice of passion fruit. *鹿児島純心女子短期大学研究紀要*, 25 : 281-287, 1995
- 14) 橋口智子, 橋永文男, 大久保美智子 : パッションフルーツ中のプロテアーゼインヒビターの研究, *鹿児島純心女子短期大学研究紀要*, 26 : 199-205, 1996
- 15) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970
- 16) Segarra, C.I. *et al.* : A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *J. Experimental. Botany.*, 54 : 1335-1341, 2003
- 17) Heussen, C., Dowdle, E.B. : Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, 102 : 196-202, 1980
- 18) 旭 正編 : 岩波講座—分子生物科学 12 植物の機能, 岩波書店, 東京, 1993, 157-158
- 19) Graham, J.S. *et al.* : Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. *J. Biol. Chem.*, 260 : 6555-6560, 1985
- 20) Yang, X-Y. *et al.* : Psc-AFP, : an anti-fungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds, *Peptides*, 27 : 1726-1731, 2006
- 21) Aguirre, C., *et al.* : A novel 8.7kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera : Bostrichidae). *Comp. Biochem. Physiol. B. : Biochem. Mol. Biol.*, 138 : 81-89, 2004
- 22) Doumas, S., *et al.* : Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect. Immun.*, 73 : 1271-1274, 2005
- 23) Kim, J. Y., *et al.* : Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330 : 921-927, 2005
- 24) Park, Y. *et al.* : Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *J. Agric. Food. Chem.*, 53 : 6491-6496, 2005
- 25) Vernekar, J.V., : Alkaline protease inhibitor : A novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262 : 702-707, 1999
- 26) Ye, X.Y., Ng, T.B., : A new peptidic protease inhibitor from *Vicia faba* seeds

exhibits antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibiting and mitogenic acti-

vities. *J. Pept. Sci.*, 8 : 656-662, 2002

Study on Trypsin Inhibitor from Tossa Jute

Ayako Ebihara, Yoshiko Atari, Yuka Nishida, Michiko Ohkubo

Department of Nutrition, Faculty of Nursing and Nutrition,
Kagoshima Immaculate Heart University

Key Words : tossa jute, ammonium sulfate treatment,
trypsin inhibitor, SDS-PAGE

Abstract

The protease inhibitor may be playing an important role in the metabolism of the plant restraining the endogenous proteinases or protecting the plant against foreign proteinases.

A trypsin inhibitor(TI) was isolated and purified from the tossa jute (*Corchorus olitorius* L.) juice by 70% ammonium sulfate treatment. The inhibitory activity of TI was examined by photometrical method and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The trypsin activity was analyzed by incubating 70% ammonium sulfate fraction of tossa jute mixed with trypsin and casein as substrate. The mixture was incubated at 37°C for 20 minutes before trichloroacetic acid (TCA) solution was added to stop the process. After centrifugation, the absorbance of the supernatant of this reaction mixture was measured at 280nm with a spectrophotometer. The absorbance at 280nm of the reaction mixture containing TI has not increased at all. TI inhibited trypsin activities which catalyzed casein.

Analyzed by SDS-PAGE, the molecular weights of TI was found to be 100, 59, 55, 50kDa. Under non-reducing conditions in SDS-PAGE gel, TI showed a single protein band with estimated molecular weight of 100kDa.

After being treated at 100°C for 10 minutes, TI could no longer inhibit trypsin activities, which proved that the trypsin-inhibitory activity of TI was heat-unstable.
