

## トラマメとウズラマメの $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの精製と性質

澤田小百合, 竹田 由里, 山口 美子, 金森 正雄, 田代 操  
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

### Purification and Characterization of $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Tora bean and Uzura bean

Sayuri Sawada, Yuri Takeda, Yoshiko Yamaguchi,  
Masao Kanamori and Misao Tashiro

*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

$\alpha$ -Amylase inhibitors were purified from Tora bean and Uzura bean by water extraction, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography and Sephacryl S-200HR gel filtration and referred to as TAI and UAI, respectively. Isoelectric points of TAI and UAI were 4.6 and 4.54. The carbohydrate content was determined to be about 15% for both inhibitors by the phenol sulfuric acid method. TAI and UAI had the same molecular weight of about 45,000 and showed extremely similar amino acid compositions to each other. Subunit components of TAI and UAI were detected by SDS-PAGE and each inhibitor was found to be composed of at least four kinds of subunit with molecular weights between 14,000 and 20,000. TAI and UAI also showed almost the same heat stability and inhibitory activity against porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase.

These results suggest that  $\alpha$ -amylase inhibitors, TAI and UAI were the same protein.

#### 緒 言

多くの食用植物種子中には、種々の加水分解酵素の作用を阻害するタンパク質性の阻害物質が存在することが報告されている。<sup>1)2)</sup>

$\alpha$ -アミラーゼに対するタンパク質性の阻害物質、即ち $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに関しても、前報<sup>3)4)</sup>に記載したように、約半世紀も前よりこれらが広く植物界に存在し、殊にインゲンマメ類には大量に存在することが報告されていた。これらマメ類起源のインヒビターについては、従来消化機能妨害因子とされていたが、最近これらは、インシュリン非依存性糖尿病や、肥満の予防と治療に有効な食品中の機能性因子として評価されつつある。また、この種のインヒビターは、ある種の植物害虫の持つ

$\alpha$ -アミラーゼを阻害し、それに伴う生育阻害作用から生体内農薬の可能性についても興味を持たれている。

ところで、このような $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの実用化を可能にするためには、本物質の構造と機能についての詳細な理解が必要である。近年インゲンマメ系の2, 3の品種よりインヒビターが単離精製され、分子の一次構造や阻害作用機作などに関して研究が進められているが、なお詳細については不明な事が多く、構造と機能の関連を明らかにするには更に、数多くの同様の研究が不可欠となる。特に、近縁の分子種間の比較は最も重要である。

先の報告<sup>3)</sup>では、北海道産のトラマメについてその $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの部分精製と若干の性質について報告したが、本論文では更に、トラマ

メの $\alpha$ -アミラーゼインヒビターを単離精製して諸性質を精査し、新に同じ北海道産ウズラマメについても、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの分離精製を行ってトラマメ、ウズラマメの $\alpha$ -アミラーゼインヒビターについて比較検討したので、その結果について報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 材料

Fig. 1. に示した *Phaseolus vulgaris* L. に属する市販の北海道産トラマメ、ウズラマメ(中長鶉)全粒をミルで粉碎後、60mesh のふるいを通したものをそれぞれ試料とした。



Fig. 1. Pictures of Tora Bean and Uzura Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

### 2. 酵素及び阻害活性測定法

$\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性の測定は、酵素としてブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ(Sigma 社製 Type 1-A)を、基質としてアミラーゼ定量用可溶性澱粉を用いて前報<sup>4)</sup>同様ヨウ素法で行った。

### 3. タンパク質の定量

牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法<sup>5)</sup>で行った。

### 4. 電気泳動

焦点電気泳動は、Vesterberg ら<sup>6)</sup>のカラムを用いる密度勾配等電点分離法を改良した方法<sup>8)</sup>により行った。即ち、120ml 容積のカラムを用い、pH4.0~pH6.0 carrier ampholine(LKB 社製)を使用し、試料 20mg を 4℃ で 72 時間、1W の定電力で電気泳動した。泳動終了後、カラム内容液を 1.5ml ずつ分画し、280nm での吸光度、pH 及び $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性を測定した。

ディスク電気泳動は、Davis の方法<sup>9)</sup>に従い 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

また、SDS 電気泳動は、Laemmli<sup>10)</sup>の方法に従い 14% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。分子量マーカーは、Pharmacia 社のカリブレーションキットを用いた。泳動後、染色にはクマシーブリリアントブルー R250 を用いた。

### 5. 糖の定量

マルトースを標準として Dubois らの方法<sup>11)</sup>によりフェノール硫酸法で測定した。

### 6. 分子量の測定

$\alpha$ -アミラーゼインヒビターの分子量は、Sephacryl S-200HR を用いるゲルろ過法にて測定した。分子量推定の為の標準タンパク質として、牛血清アルブミン(分子量 67,000)、オボアルブミン(分子量 43,000)、キモトリプシノーゲン A(分子量 25,000)、リボヌクレアーゼ A(分子量 13,700)を用いた。

### 7. アミノ酸分析

試料は、脱気した 6N HCl 中で 110℃、24 時間加水分解した後、日立 835 型 Amino Acid Analyzer を用いて分析した。

### 8. 熱安定性

共栓付試験管に、インヒビター活性測定と同様の緩衝液即ち、50mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Triton X-100 を含む 25mM PIPES(Piperazine-N, N'-bis 2-ethanesulfonic Acid)緩衝液(pH6.9) 1.7ml と精製インヒビター 0.3ml を加え、70℃ の湯浴中で 2 時間まで加熱した。その間、5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 分の時間経過毎に、それぞれのインヒビター溶液 0.2ml ずつを、別の試験管に分取し冷却した。続いて同じ緩衝液 1.2ml とブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ 0.2ml を加え、37℃、30 分間ブレインキュベーションの後インヒビターの残存活性を測定した。

## 実験結果及び考察

### 1. $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの精製

トラマメ及びウズラマメの粉末 100g に、それぞれ 10 倍量の水を加え、室温で 3 時間攪拌抽出した後遠心分離(10,000xg, 30 分間)し、それぞれの上清を得た。これらを抽出液とし、次にこの抽出液に、50% 飽和になるように個体硫酸を加え塩析した。一夜放置後、遠心分離して得た沈殿を、少量の蒸留水に溶解し、透析チューブを用いて蒸留水に対して透析した。透析終了後、それぞれの透析内液を遠心分離し、上清を凍結乾燥した。この凍結乾燥物

を粗インヒビター画分とし、次のイオン交換クロマトグラフィーに供した。それぞれの粗インヒビターは、0.02M イミダゾール塩酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、遠心分離後上清を、同じイミダゾール塩酸緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacryl FF カラム (2.5×40cm) に添加し、同緩衝液で未吸着画分を溶出した。トラマメ、ウズラマメ共にこの未吸着画分には、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性は認められなかった。続いてインヒビターを、NaCl 0~0.5M

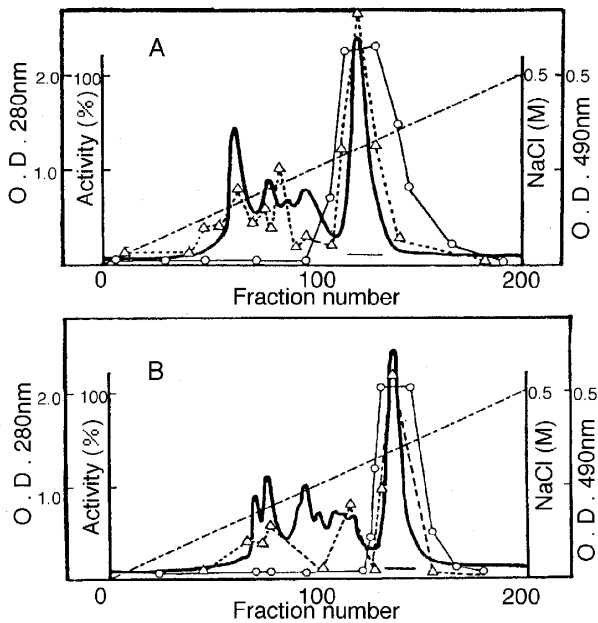


Fig. 2. DEAE-Sephacryl FF Ion Exchange Chromatography of  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Tora Bean (A) and Uzura Bean (B).

- absorbance at 280nm
- $\alpha$ -amylase inhibitory activity
- - - NaCl gradient
- △— absorbance at 490nm

の liner gradient で溶出した。その結果を Fig. 2. に示す。図に示されたように、トラマメ、ウズラマメ両者共にインヒビターは、約 0.3M NaCl 濃度で溶出され、フェノール硫酸法による糖のピーク (490nm での吸光度) と一致し、これらインヒビターが糖タンパク質であることが示唆された。更に、それぞれの $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性画分を集め、再クロマトグラフィーにより純化した。これら $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性画分は、透析、凍結乾燥の後 0.1M NaCl を含む 0.05M リン酸緩衝液に溶解し、同じ緩衝液で平衡化した Sephacryl-S200HR カラム (2.5×80cm) に添加してゲルろ過を行った。結果を Fig. 3. に示す。更に、それぞれの $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性画分を集め透析後凍結乾燥し、これら凍結乾燥標品をトラマメは TAI, ウズラマメは UAI とし最終精製品とした。

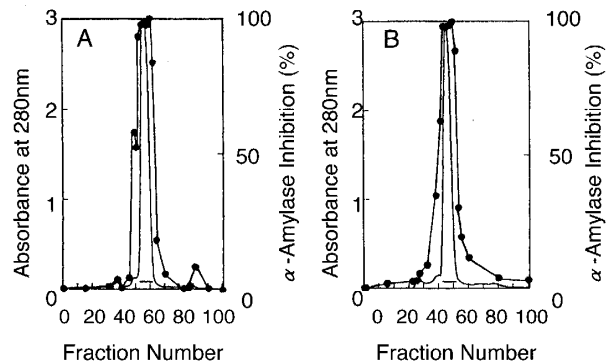


Fig. 3. Gel Filtration of the Inhibitors Obtained by DEAE-Sephacryl FF Chromatography on a Sephacryl S-200HR Column (2.5×80cm).

- A : Tora Bean, B : Uzura Bean
- absorbance at 280nm
- $\alpha$ -amylase inhibitory activity

## 2. 等電点

TAI 及び UAI を焦点電気泳動した結果を Fig. 4. に示す. 図より等電点は, TAI が pH4.60, UAI が pH4.54 で, ほぼ同じ pI 値を示した.

## 3. 電気泳動

Fig. 5. は, TAI, UAI のディスク電気泳動を行った結果を示す. TAI, UAI は共に, ブロードではあるが単一のバンドを示した. しかし, SDS 電気泳動では Fig. 6. に示すように, TAI, UAI 共に分子量 14,000~20,000 の間に 4 本のバンドが認められ, これら  $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは, 少なくとも 4 種のサブユニットから成る事が示唆された.

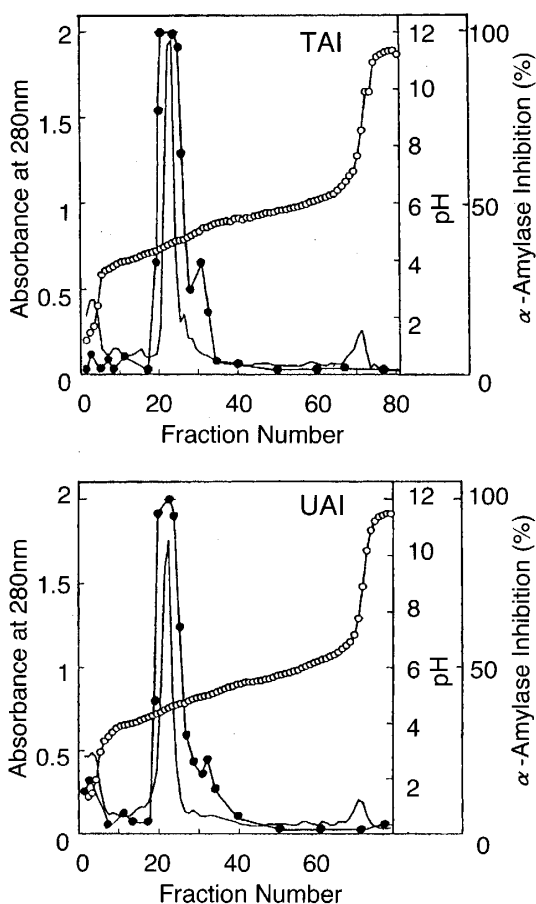


Fig. 4. Determination of Isoelectric Points of TAI and UAI by Isoelectric Focusing.

— absorbance at 280nm  
—●—  $\alpha$ -amylase inhibitory activity  
○○○○○ pH gradient

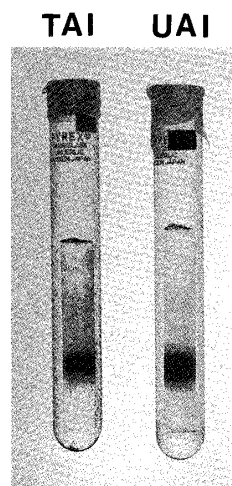


Fig. 5. Disc-PAGE Patterns of TAI and UAI.

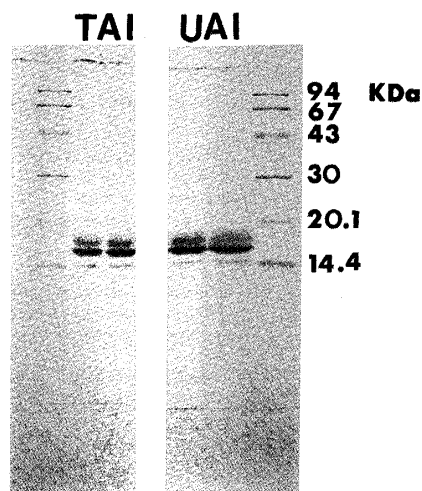


Fig. 6. SDS-PAGE Patterns of TAI and UAI.

## 4. アミノ酸組成

TAI 及び UAI についてアミノ酸分析を行った結果を Table 1. に示す. TAI と UAI は, 構成アミノ酸が非常に類似していた. 殊に, アスパラギン酸, セリン含量が高く, バリン, スレオニン, グルタミン酸などの含量も高かった. また, 含硫アミノ酸であるメチオニン含量は低く, システインは検出されなかった. このことから Fig. 6. に示されたような, TAI 及び UAI それぞれを構成するサブユニット間の結合には, -S-S- 結合の関与はなく水素結合などの他の相互作用が関与しているものと推定される. また, これらインヒビターのアミノ酸組成が非常に類似していたことは, 先の等電点並びにディスク電気泳動の結果を支持するものである.

## 5. 分子量, 糖含量

Sephacryl S-200HR でのゲルろ過により測定し

た TAI, UAI の分子量は, Fig. 7. に示すように  $45,000 \pm 5,000$  であった. この値は, 先の報告<sup>3)4)</sup>及び他のインゲンマメからのインヒビターの分子量<sup>12)13)14)15)</sup>とほぼ類似していた. また, フェノール硫酸法により糖含量を測定した結果も, TAI が 15.4%, UAI が 15.1% でありほぼ同じ糖含量であった.

Table 1. Amino Acid Composition of  $\alpha$ -Amylase Inhibitors

Amino Acid	(mol%)	
	TAI	UAI
ASP	16.7	16.7
THR	9.0	8.8
SER	13.1	13.2
GLU	8.4	8.7
PRO	2.0	2.5
GLY	4.6	4.8
ALA	5.6	5.6
CYS	0	0
VAL	9.7	9.6
MET	1.7	1.8
ILE	5.3	5.1
LEU	5.4	5.2
TYR	3.8	3.7
PHE	5.8	5.6
LYS	4.3	4.3
HIS	1.4	1.4
ARG	3.1	3.1

### 6. ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性

TAI と UAI のブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害作用を調べた結果を Fig. 8. に示す. ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼをインヒビターと 30 分間プレインキュベーションの後, その残存酵素活性を測定した. TAI と UAI は, ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対し, 共に同じような阻害能力を有していた. 即ち, 阻害パターン of 直線部分を外挿し 100% 阻害(残存酵素活性 0%)に必要なインヒビター量を求めると, 両者共約  $8\mu\text{g}$  であった.

### 7. 熱安定性

TAI 及び UAI について  $70^\circ\text{C}$  (pH6.9)における熱安定性を Fig. 9. に示す. TAI と UAI は, 共に 20 分までは熱安定性を示したが, 20 分以降は緩やかに活性を失い, 120 分後には両者共ほぼ失活した.

熱安定性においても TAI と UAI は, 類似の傾向を示した.

以上, TAI と UAI については, それらの物理化学的性質や酵素化学的性質が非常に類似しており, 両インヒビターは, 同一の構造を有するタンパク質である可能性が高いと考えられる.

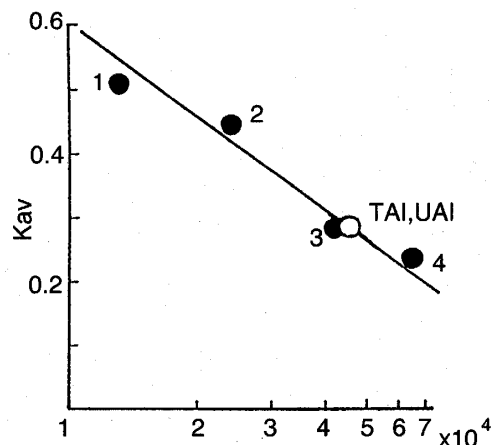


Fig. 7. Molecular Weight Estimation of TAI and UAI by Gel Filtration on Sephacryl S-200HR.

1. Ribonuclease A (MW 13,700)
2. Chymotrypsinogen A (MW 25,000)
3. Ovalbumin (MW 43,000)
4. Bovine Serum Albumin (MW 67,000)

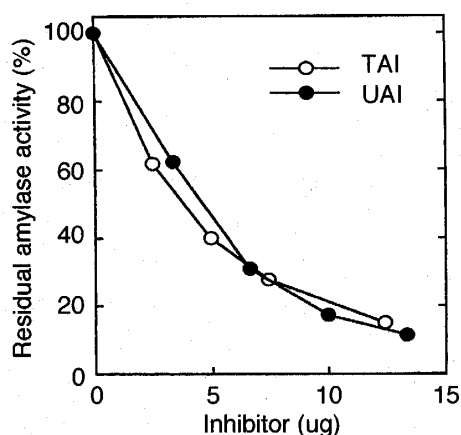


Fig. 8. Inhibitory Activities of TAI and UAI Against Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase.

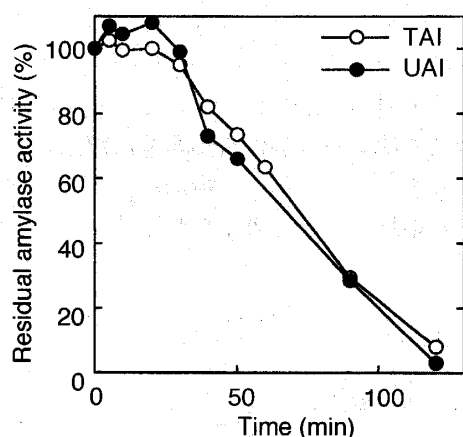


Fig. 9. Effect of Heat Treatment at 70°C, pH6.9 on Purified  $\alpha$ -Amylase Inhibitors TAI and UAI.

### 要約

トラマメ、ウズラマメの全粒微粉末試料より、水抽出、硫酸塩析、DEAE-Sepharose FF イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-200HR ゲルろ過にてタンパク質性の $\alpha$ -アミラーゼインヒビター TAI と UAI を精製した。

TAI と UAI は、焦点電気泳動から等電点は、pH4.6 及び pH4.54 と近く、糖含量は共に約 15% であった。Sephacryl S-200HR のゲルろ過による分子量は、 $45,000 \pm 5,000$  であった。ディスク電気泳動では、TAI と UAI 共にブロードではあるが単一バンドを示した。しかし、SDS 電気泳動では、両者に分子量約 14,000~20,000 の範囲に易動度の類似する 4 本のバンドが観察されたことにより、インヒビターはサブユニットから構成されることが示唆された。アミノ酸分析の結果システインが存在しないことから、これらサブユニット間には-S-S-結合以外の相互作用が働いていることが推定された。また、アミノ酸組成においても TAI と UAI は非常に高い類似性を示した。更に、70°C (pH6.9) における熱安定性は、TAI, UAI 共に 20 分まで安定であり、2 時間でほぼ失活した。ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対しても TAI と UAI は、同じ阻害能力を有していた。

以上のことから、トラマメ、ウズラマメから精製した $\alpha$ -アミラーゼインヒビター TAI と UAI は、同一の構造を有するインヒビターである可能性が高い

と考えられた。

### 文献

- 1) Liener, I.E., & Kakade, M.L., in *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs* 2nd ed., by Liener, I.E., Academic Press, New York, pp.7-71(1980)
- 2) Buonocore, V., & Silano, V., in *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods* ed. by Friedman, M., Prentice Hall, New York, pp.483-507(1986)
- 3) 澤田小百合, 金森正雄, 武庫川女子大学紀要, 40, 39-43(1992)
- 4) 澤田小百合, 山口美子, 金森正雄, 武庫川女子大学紀要, 43, 17-23(1995)
- 5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951)
- 6) Vesterberg, O., & Svensson, H., *Acta. Chem. Scand.*, 20, 820-834(1966)
- 7) Verterberg, O., *Acta. Chem. Scand.*, 23, 2653-2666(1969)
- 8) Ibuki, F., & Kanamori, M., *Sci. Rep. Kyoto Pref. Univ.*, 29, 95-100(1977)
- 9) Davis, B.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-424(1964)
- 10) Laemmli, U.K., *Nature.*, 227, 680(1970)
- 11) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F., *Anal. Chem.*, 28, 350-356(1956)
- 12) Marshall, J.J. & Lauda, C.M., *J. Biol. Chem.*, 250, 8030-8037(1975)
- 13) Powers, J.R. & Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, 1, 217-238(1977)
- 14) Pick, K.H. & Wöber, G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359, 1371-1377(1987)
- 15) Frels, J.M. & Rupnow, J.H., *J. Food Biochem.*, 8, 281-301(1984)