

インゲン属マメ由来 α -アミラーゼインヒビターのサブユニットの単離

澤田小百合, 竹田 由里, 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)

Isolation of Subunits of α -Amylase Inhibitors from *Phaseolus* Beans.

Sayuri Sawada, Yuri Takeda, Masao Kanamori and Misao Tashiro

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

Subunit structures were examined for proteinaceous α -amylase inhibitors, TAI, UAI, DAI, OAI-2, MAI-2, and SAI-2, from respective *Phaseolus* beans of Toramame, Uzuramame, Daifuku, Otebou, Murasakihanamame, and Shirohanamame. Firstly, TAI was denatured by heating at 50°C for 30 min in 50 mM imidazol-HCl buffer (pH 7.2) containing 6 M guanidine HCl. The denatured protein was chromatographed on DEAE-Sephacel in the presence of 8 M urea, resulting in a separation of two protein components, α and β . Size-exclusion HPLC also separated the denatured inhibitor into two protein peaks, I and II. N-Terminal 20 amino acid sequences showed that the protein components, α and β , corresponded to II and I, respectively. The other inhibitors denatured by the above procedure were also analyzed for their subunit structures by HPLC, and found to be composed of two subunits, α and β like that TAI consisted of α and β . Comparison of N-terminal 20 amino acid sequences of subunits indicated the presence of a few amino acid substitutions among the inhibitors.

緒 言

α -アミラーゼに対するタンパク質性の阻害物質、即ち α -アミラーゼインヒビター(AI)は広く植物界に存在し、殊にインゲンマメ類に多く存在することが報告されている^{1)~9)}。一般にAIは、微生物及び植物由来の α -アミラーゼに対しては不活性であるが、昆虫及び動物の α -アミラーゼに対しては阻害作用を有しており、消化を妨害する反栄養物質とされてきた。しかし、最近ではAIの有する糖質消化阻害作用のゆえにインシュリン非依存性糖尿病^{10)~17)}や、肥満の予防と治療¹⁸⁾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、AIがマメゾウムシなど植物種子を食害する昆虫の持つ α -アミラーゼを阻害し、それに伴い昆虫の生育を阻害すること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^{19)~22)}。このようなAI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詳細な理解が必要である。

近年インゲンマメの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^{23)~26)}が進められているが、詳細については不明な事が多い。AIの構造と機能の関連を明らかにし、更に機能の改善や向上をはかるには、特に近縁の分子種間の比較が重要である。著者等は、従来よりインゲン属の数種のマメよりAIの分離精製を行っており、得られたAIの諸性質などを比較検討してきた。その研究の途上、トラマメ、ウズラマメ、ダイフク、オテボウ、ムラサキハナマメ、シロハナマメより得られたAIについては、アミノ酸分析及びSDS-PAGEからCysを含みぬサブユニット構造から成る事が示された^{27)~30)}。今回、これらのAIについてサブユニットの分離を検討し、更に単離したサブユニットについてアミノ

酸配列分析を行ったので報告する。

実験材料及び方法

1. 材料

市販の北海道産トラマメ、ウズラマメ、ダイフク、オテボウ(何れも *Phaseolus vulgaris* L.)、ムラサキハナマメ、シロハナマメ(何れも *Phaseolus coccineus* L.)は、それぞれ全粒をミルで粉碎後、60 mesh のふるいを通したものを試料とした。

2. α -アミラーゼインヒビターの調製

各マメの α -アミラーゼインヒビター(AI)、TAI(トラマメ)、UAI(ウズラマメ)、DAI(ダイフク)、OAI-2(オテボウ)、MAI-2(ムラサキハナマメ)、SAI-2(シロハナマメ)は、前報^{27)~30)}で述べたように各マメ粉末試料から、水抽出、硫酸塩析、DEAE-Sephacel FF(Pharmacia 社)イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-200HR(Pharmacia 社)によるゲルろ過により精製した。各精製 AI 標品は、透析後凍結乾燥し以下の実験に供した。

3. サブユニットの分離

3.1 α -アミラーゼインヒビターの変性

各 AI を、6M 塩酸グアニジンを含む 50mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、50℃で30分間処理したものを変性 AI 試料とした。

3.2 イオン交換クロマトグラフィー

変性 AI を DEAE-Sephacel(Pharmacia 社)カラム(1.5×13cm)を用いて 8M 尿素存在下でイオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出は、8M 尿素を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)中で食塩濃度 0~1.0M のリニアグラジエントで行った。流速は 15ml/時間、検出は 280nm の吸収とした。

3.3 HPLC によるゲルろ過

HPLC は、東ソー製を用いた。カラムは、TSK-GEL G3000SWXL(東ソー製、7.8×300mm)を用い変性 AI をゲルろ過した。溶出は、8M 尿素を含む 50mM リン酸緩衝液(pH6.0)により、流速は 0.5ml/min、検出は 280nm で行った。

4. アミノ酸配列分析

各 AI のサブユニットのアミノ酸配列分析は、Applied Biosystems 477/120A プロテインシーケンサーを用いて行った。

実験結果及び考察

1. DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーによる TAI のサブユニットの分離

TAI 50mg に 6M 塩酸グアニジンを含む 50mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH7.2)を 1.5ml 加え、50℃で30分間処理した。続いて、8M 尿素を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)に対して室温で一晩透析した。透析終了後、透析内液を 8M 尿素を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)で平衡化した DEAE-Sephacel カラム(1.5×13cm)に添加しイオン交換クロマトグラフィーを行った。結果を Fig. 1. に示す。変性条件下で TAI は、未吸着部と 0~1.0M 食塩グラジエント溶出部に、それぞれ α と β の2つのタンパク質画分に分離した。次に、 α 、 β 画分をそれぞれ脱塩後一部を Prospin(ABI 製)に吸着させ、アミノ酸配列分析に供した。N 末端より 20 残基までの結果を Fig. 2. に示す。2つのタンパク質画分 α 、 β の N 末端アミノ酸はそれぞれ単一であり、 α の N 末端がアラニン、 β の N 末端がセリンであった。このことより TAI は DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーにより α 、 β 2種類のサブユニットに分離されることが示された。また、 α サブユニットの 12 残基目は、同定されなかった。

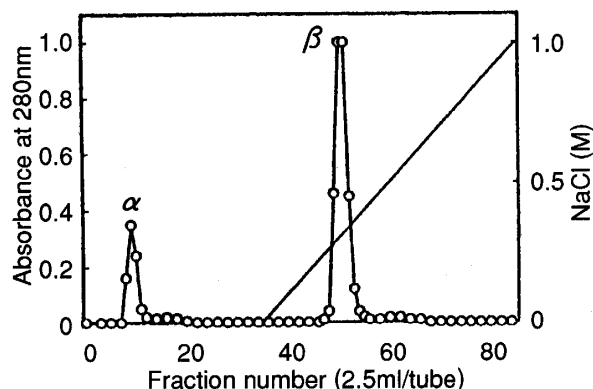


Fig. 1. Separation of the TAI Subunits by DEAE-Sephacel Ion Exchange Chromatography under Denaturing Conditions.

Cycle No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
α	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Ile	Asp	Ala
β	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val

Cycle No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
α	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
β	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr

Fig. 2. N-Terminal Sequence Analysis of α and β Subunits of TAI

2. ゲルろ過 HPLC による TAI のサブユニットの分離

TAI 1.0mg を、6M 塩酸グアニジンを含む 50mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH7.2) 200 μ l に溶解し、50 $^{\circ}$ C で 30 分間処理した。遠心ろ過 (0.45 μ m) 後、ろ液を TSK-GEL G3000SWXL ゲルろ過カラムに供した。結果を Fig. 3. に示す。TAI は変性条件下でのゲルろ過では、溶出時間 16 分と 19 分にそれぞれ I と II の 2 つのタンパク質画分を与えた。次ぎにこの画分についてそれぞれ脱塩し、一部を Prospin に吸着させ、アミノ酸配列分析に供した。N 末 20 残基までの結果を Fig. 4. に示す。2 つのタンパク質画分 I と II はそれぞれ N 末端アミノ酸が単一であり、I は、先のイオン交換クロマトグラフィーにより得られたタンパク質画分 β と、II は α と N 末 20 残基まで同一シーケンスを示した。このことより DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過 HPLC 何れにおいてもサブユニットの分離は可能である事が示され、TAI は、分子量の異なる 2 種類のサブユニット α (II) と β (I) から構成される事がわかった。また、同定されなかった α サブユニットの 12 残基目は、前報²⁷⁾²⁹⁾でも述べたように TAI が糖タンパク質であること

や、12 残基目からのトリペプチドの配列を考えると糖鎖結合部位のアスパラギンであると推定され、そこにアスパラギン結合型糖鎖の存在することが示唆された。

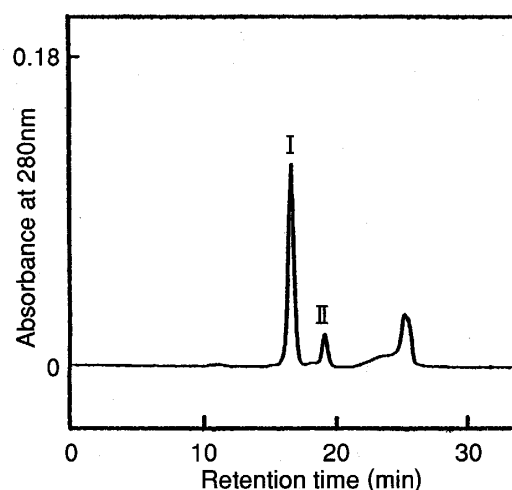


Fig. 3. Separation of the TAI Subunits by Size-Exclusion HPLC under Denaturing Conditions.

Cycle No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val
II	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Ile	Asp	Ala

Cycle No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
I	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr
II	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly

Fig. 4. N-Terminal Sequence Analysis of Subunits I and II of TAI

3. 各種 α -アミラーゼインヒビターのサブユニット構成の比較

UAI, DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2についてTAI同様変性条件下でゲルろ過HPLCを行った結果をFig. 5.に示す. 各AI共に, 16分と19分にタンパク質ピークが検出され, UAI, DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2は, 何れもTAI同様分子量の異なる2種類のサブユニット α と β から構成されている

ことが示された.

4. 各種サブユニットのアミノ酸配列

TAIと同様にUAI, DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2についても, 2種類のサブユニット α と β をそれぞれ脱塩後, 一部をProspinに吸着させ, アミノ酸配列分析に供した. N末20残基までの結果をFig. 6.に示す. TAIとUAI, DAIとOAI-2, MAI-2とSAI-2は, それぞれサブユニット α , β 共

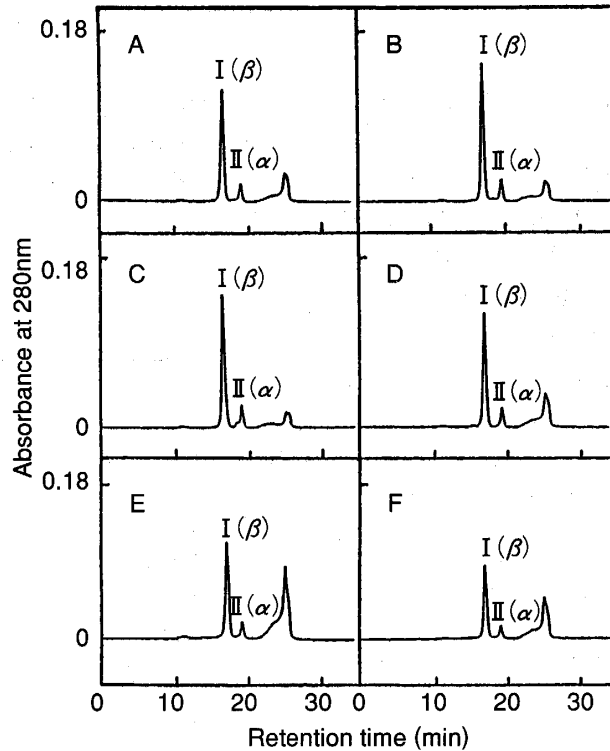


Fig. 5. Separation of Subunits of α -Amylase Inhibitors by Size-Exclusion HPLC under Denaturing Conditions. A; TAI, B; UAI, C; DAI, D; OAI-2, E; MAI-2, F; SAI-2

Cycle No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
α -subunit																				
TAI	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Ile	Asp	Ala	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
UAI	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Ile	Asp	Ala	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
DAI	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
OAI-2	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
MAI-2	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
SAI-2	Ala	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	-	Lys	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly
β -subunit																				
TAI	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr
UAI	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr
DAI	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr
OAI-2	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	Thr
MAI-2	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Lys	Phe	Lys	Gly	Asp	Thr
SAI-2	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Lys	Phe	Lys	Gly	Asp	Thr

Fig. 6. N-Terminal Sequence Analysis of Subunits of α -Amylase Inhibitors

に N 末端から 20 残基まで同一シーケンスを示した。各 AI 間のサブユニット別に比較すると、 α サブユニットについては、TAI と UAI では、7 残基目がイソロイシンで、10 残基目がアラニンであったが、DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2 では、それぞれアスパラギンとグリシンであった。また、何れの AI も α サブユニットの 12 残基目は未同定であり、12 残基目からの配列が X-Lys-Thr であることから 12 残基目は、糖鎖結合部位のアスパラギンと考えられ、この位置にアスパラギン結合型糖鎖の存在することが示唆された。 β サブユニットについては、MAI-2, SAI-2 では、15 残基目がリジンで 16 残基目がフェニルアラニンであった。一方、TAI, UAI, DAI, OAI-2 では、それぞれグルタミン酸とセリンであった。

インゲン属由来の種々のマメより精製されたこれら AI は、SDS-PAGE では分子量 14,000~20,000 の間に 2~4 本バンドが認められた^{27)~30)}。このことは、今回の結果とは一致していない。しかしながら、Moreno と Chrispeel²³⁾²⁴⁾ らは、Greensleeves seed から分離した AI では、分子量 15,000~19,000 に 5 つのサブユニットが認められそのうち 4 つのサブユニットが糖鎖を共有結合していると報告している。更に彼等は AI を脱糖鎖後アミノ酸配列分析などから、このインヒビターが 2 種類のサブユニットから成ることを明らかにした。また、山口⁹⁾ は、White kidney bean の AI は、2 つのサブユニットを有しそれぞれ高マンノース及びキシロマンノース型の糖鎖が主糖鎖であると報告している。これらのことより、SDS-PAGE で認められたサブユニット数と今回分離したサブユニット数に違いが見られたのは、AI が 10~15% の糖を含む糖タンパク質であることから、サブユニットへの糖鎖の付加の違いが SDS-PAGE における易動度に影響を及ぼしたためであると考えられた。

また、これら AI は、種が同一のマメ (*Phaseolus coccineus*) より得られた MAI-2, SAI-2 では構成されるサブユニットが N 末 20 残基まで同一シーケンスであることが示されたが、TAI, UAI, DAI, OAI-2 は種が同一 (*Phaseolus vulgaris*) であるにもかかわらず同一シーケンスを示さなかった。しかし、TAI と UAI, DAI と OAI-2 ではそれぞれ構成サブユニットが同一シーケンスを示し、特に、TAI と UAI は前報²⁹⁾ で報告したように物理化学的性質、酵素化学的性質共に非常に類似していたこと

より、両 AI 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た。

要 約

トラマメ、ウズラマメ、ダイフク、オテボウ、ムラサキハナマメ、シロハナマメより得られたタンパク質性の α -アミラーゼインヒビター、TAI, UAI, DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2 は、Cys を含まぬサブユニット構造を構成していることから、各 AI のサブユニットの分離を検討した。各 AI は、6M 塩酸グアニジンに溶解後加熱処理したものを変性 AI 試料とした。変性 TAI について 8M 尿素存在下で DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過 HPLC を行ったところ、イオン交換クロマトグラフィーでは、未吸着部と 0~1.0M 食塩グラジエント溶出部にそれぞれ α と β のタンパク質画分が分離回収された。一方、ゲルろ過 HPLC では溶出時間 16 分と 19 分にそれぞれ I と II のタンパク質ピークが分離溶出した。更に、N 末端から 20 残基までのアミノ酸配列分析では、 α と II が同一シーケンスを示し、また、 β と I が同一シーケンスであった。このことより TAI は、分子量の異なる 2 種類のサブユニット α (II) と β (I) から構成されていることが示された。TAI と同様に UAI, DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2 についてもゲルろ過 HPLC でサブユニットの分離を行ったところ何れも溶出時間 16 分に β , 19 分に α サブユニットが溶出し、分子量の異なる 2 種類のサブユニットから構成されていることが示された。各 AI のサブユニットについて N 末端から 20 残基までのアミノ酸配列分析を行ったところ α サブユニットは、TAI, UAI の 7 残基目がイソロイシンで、10 残基目がアラニンであったが DAI, OAI-2, MAI-2, SAI-2 はそれぞれアスパラギンとグリシンであった。また、何れの AI も 12 残基目は未同定であった。12 残基目からのトリペプチドの配列より 12 残基目はアスパラギンと考えられ、そこにアスパラギン結合型糖鎖の存在が示唆された。一方、 β サブユニットでは、MAI-2, SAI-2 の 15 残基目がリジン、16 残基目がフェニルアラニンであったが TAI, UAI, DAI, OAI-2 はそれぞれグルタミン酸とセリンであった。

文 献

- 1) Jaffe, W.G., Moreno, R., & Wallis, V., *Nutr. Rept. Intern.*, 7, 169-174 (1973)

- 2) Marshall, J.J., *Am. Chem. Soc. Symp.*, **15**, 244-266(1975)
- 3) Marshall, J.J. & Sauda, C.M., *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030-8037(1975)
- 4) Powers, J.R. & Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **1**, 217-238(1977)
- 5) Pick, K.H. & Wober, G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1371-1377(1978)
- 6) Lajolo, F.M. & Finarde-Filho, F., *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132-138(1985)
- 7) Kotaru, M., Saito, K., Yoshikawa, H., Ikeuchi, T., & Ibuki, F., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 577-578(1987)
- 8) Kotaru, M., Yeh, H-Y., Yoshikawa, H., Ikeuchi, T., Iwami, K., & Ibuki, F., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **35**, 71-80(1989)
- 9) Yamaguchi, H., *J. Biochem.*, **110**, 785-789(1991)
- 10) Puls, W. & Keups, V., *Diabetologia*, **9**, 97-102(1973)
- 11) Bo-Linn, G.W., Santa Ana, C.A., Morawski, S.G., & Fordtran, J.S., *New Engl. J. Med.*, **307**, 1413-1416(1982)
- 12) Carlson, G.L., Li, B.U.K., Bass, P., & Olson, W.A., *Science*, **219**, 393-395(1983)
- 13) Liener, I.E., Donatucci, B.A., & Tarcza, J.C., *Am. J. Clin. Nutr.*, **39**, 196-200(1984)
- 14) Lajolo, F.M., Nancini-Filho, J., & Menezes, E.W., *Nutr. Rept. Intern.*, **30**, 45-54(1984)
- 15) Layer, P., Carlson, G.L., & Dimagno, P., *Gastroenterology*, **88**, 1895-1902(1985)
- 16) Layer, P., Rizza, R., Zinsmeister, A.R., Carlson, G.S., & Dimagno, E.P., *Mayo Clin. Proc.*, **61**, 442-447(1986)
- 17) Menezes, E.W. & Lajolo, F.M., *Nutr. Rept. Intern.*, **36**, 1189-1195(1987)
- 18) 横田 隆, 桐原 修, 大石一二三, 谷 久典, 渡辺乾二, 大網 弘, *日本栄養食糧学会誌*, **47**, 341-348(1994)
- 19) Powers, J.R. & Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **1**, 239-260(1977)
- 20) Frels, J.M. & Rupnow, J.H., *J. Food Sci.*, **50**, 72-77(1985)
- 21) Ishimoto, M. & Kitamura, K., *Appl. Entomol. Zool.*, **27**, 281-286(1992)
- 22) Suzuki, K., Ishimoto, M., Kikuchi, F., & Kitamura, K., *Jpn. J. Breed.*, **43**, 257-265(1993)
- 23) Moreno, J. & Chrispeels, M.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 7885-7889(1989)
- 24) Moreno, J., Altabella, T., & Chrispeels, M.J., *Plant Physiol.*, **92**, 703-709(1990)
- 25) Ho, M.F. & Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **17**, 35-52(1993)
- 26) Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T., Philo, F.S., Wen, J., Hara, S., & Yamaguchi, H. *J. Biochem.*, **120**, 177-183(1996)
- 27) 澤田小百合, 金森正雄, *武庫川女子大学紀要*, **40**, 39-43(1992)
- 28) 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)
- 29) 澤田小百合, 竹田由里, 山口美子, 金森正雄, 田代 操, *武庫川女子大学紀要*, **46**, 87-92(1998)
- 30) Swada, S., Yamaguchi, Y., & Knamori, M., *Abstr. 7th Asian Cong. Nutrition (Beijing, China)*, p.248(1995)