

ユリ根中トリプシンインヒビター (LTI-II-4)の精製とその性質

寺田 慎子, 堀口 美和, 浅尾 俊夫, 高橋 享子
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Purification and characterization of a trypsin inhibitor (LTI-II-4) from Lily Bulb (*Lilium lancifolium*).

Chikako Terada, Miwa Horiguchi, Toshio Asao and Kyoko Takahashi

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

Several proteins from lily bulb for foodstuffs showed strong inhibitory activity toward bovine trypsin. A trypsin inhibitor (LTI-II-4) was purified from lily bulb by a method including column chromatographies on CM-Sepharose CL-6B and DEAE-Sepharose CL-6B and high-pressure liquid chromatography. Purified LTI-II-4 had a molecular weight of 21,000. The amino acid composition was characterized by high contents of glycine, aspartic acid and serine. The inhibitor contained 4 half-cystines in its constituent amino acids. The N-terminal 25 and the C-terminal 3 residues of LTI-II-4 were sequenced. The inhibitor was stable in a wide pH range under 50°C and was unstable at the higher temperatures than 80°C. The reactive site amino acid of LTI-II-4 was assumed to be lysine. The inhibitor didn't inhibit elastase and subtilisin. From these results, the inhibitor LTI-II-4 is assumed to belong to the Kunitz soybean trypsin inhibitor family.

緒言

動植物界には、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の酵素活性を特異的に阻害するプロテアーゼインヒビターが広く存在している。

植物中のプロテアーゼインヒビターの存在については、植物の環境適応、発芽過程におけるインヒビターの役割、外敵(昆虫、微生物)の攻撃に対する防御反応、プロテアーゼの過剰な作用の防御と言われている。

現在、プロテアーゼインヒビターに関する研究は、動植物界での存在の意義、単離精製、構造決定、酵素阻害反応機構の解明などについて行われている¹⁾²⁾。なかでも、穀類、豆類、芋類などから多くのプロテアーゼインヒビターが精製され^{3)~6)}、特にマメ科植物種子から精製された STI 型

(Kunitz)と BBI 型(Bowman-Birk)⁷⁾⁸⁾がその代表である。

しかしながら食用鱗茎植物の鱗茎部については、僅かにタマネギ鱗茎部の報告がなされているのみである⁹⁾。そこで、我々は食用鱗茎に注目したところ、なかでも食用ユリ根中に数種のトリプシンインヒビターの存在を確認し、その精製と精製インヒビターの性質について検討を行なった。すでに、その一つ(LTI-I-1)については、報告した¹⁰⁾。今回は、最も含有量の多いと思われるトリプシンインヒビターについて検討したので報告する。

実験方法

1. 供試試料

市販食用ユリ根を洗浄後、10倍量のイオン交換水を加え、ホモジナイザーにて均一化した溶液を試

料とした。

2. 酵素及び阻害活性測定法

トリプシン活性の測定には、酵素としてウシ膵臓トリプシン(SIGMA社製, Type III), 基質として合成基質 BAPA (Benzoyl-D, L-arginine-p-nitroanilide)を用いた比色法で行った。すなわち, 0.01M CaCl₂を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)2.2ml に酵素溶液 0.1ml を加え, さらに 0.1ml の合成基質を添加し反応を開始した。37℃, 10 分間の反応後, 1.0ml の 10% 酢酸溶液を加え, 反応を停止させ 410nm での吸光度を測定した。酵素活性は, 酵素を作用させる前に反応を停止させたもの(盲検)と酵素を作用させたものとの吸光度の差で表した。なお, トリプシンは, 0.005M CaCl₂を含む 0.005M HCl 溶液に溶解し, 酵素濃度は吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=15.4^{11)}$ から算出した。合成基質 BAPA は, 10mg を 1ml のジメチルスルホキシドに溶解したものを保存基質溶液とした。トリプシン阻害活性は, トリプシンとインヒビターをあらかじめ 5 分間プレインキュベーションした後, 合成基質を加え測定した残余酵素活性から評価した。

3. 電気泳動分析及び分子量測定

SDS-PAGE は, Laemmli¹²⁾の方法に従い, pH8.8, 15% アクリルアミドスラブゲルを用いて行った。精製インヒビター(LTI-II-4)の分子量は SDS-PAGE により求めた。標準タンパク質として低分子量測定用キット(Phosphorylase b, MW 94,000; Bovine serum albumin, MW 67,000; Ovalbumin, MW 43,000; Carbonic anhydrase, MW 30,000; Soybean trypsin inhibitor, MW 20,100; α -Lactalbumin, MW 14,400; Pharmacia 社製)を用いた。

4. アミノ酸組成分析

精製インヒビターを 6N HCl に溶解し, 脱気封管後, 110℃, 24 時間加水分解した。加水分解後の分析は Pieniazek らの方法¹³⁾に準じ, 日立 835 型アミノ酸自動分析機および Sic インテグレーター 7000A 型を用いて行った。

5. モル比測定

ウシトリプシンは, 基質 *p*-nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate HCl(NPGB)¹⁴⁾を用いて純度検定を行い, その酵素に対する精製インヒビターの阻害度を測定した。

6. アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸配列分析は, 精製インヒビター

をプロソルブ(Perkin Elmer 社製)に吸着させ, Applied Biosystems 477/120 A 型プロテインシーケンサーを用いて行った。また, C 末端アミノ酸配列分析は, 精製インヒビターを 1M 酢酸緩衝液(pH4.2)に溶解後, カルボキシペプチダーゼ P を加え, 37℃ 条件下で 24 時間反応を行い, 各時間後のアミノ酸分析を行った。

7. pH-熱安定性

緩衝液として, pH2, 3, 4 は, 0.05M クエン酸ナトリウム-HCl を, pH5 は, 0.05M 酢酸ナトリウム-酢酸を, pH6, 7, 8 は, 0.05M リン酸 2 ナトリウム-リン酸 1 ナトリウムを, pH9 と 10 は, 0.05M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウムを用いた。試験管におおのこの緩衝液を 0.293ml と精製インヒビター 7 μ l を入れ重量を測定した, 37, 50, 60, 80, 100℃ の各温度 10 分間インキュベーションを行った。時間経過後, 急速に冷却した。水を加えて重量補正を行い, 各試験管に 0.02M CaCl₂を含む 0.2M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)1.9ml にトリプシン溶液 0.1ml, BAPA 基質溶液 0.1ml を加え, 残存トリプシン阻害活性を測定した。

8. 他のプロテアーゼに対する阻害作用

キモトリプシン活性の測定には, 酵素としてウシ膵臓キモトリプシン(SIGMA 社製, Type II), 基質として合成基質 BTPA (Benzoyl-L-tyrosine-p-nitroanilide)を用いた比色法で行った。すなわち, 0.01M CaCl₂を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)1.7ml に酵素溶液 0.1ml を加え, さらに 0.2ml の合成基質を添加し反応を開始した。37℃, 10 分間の反応後, 1.0ml の 10% 酢酸溶液を加え, 反応を停止させ, 410nm での吸光度を測定した。酵素濃度は吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=20.5^{11)}$ から算出し, 合成基質 BTPA は, 1.22mg を 1ml のジメチルホルムアミドに溶解したものを保存基質溶液とした。キモトリプシン阻害活性は, トリプシン阻害活性と同様の方法で評価した。ズブチリシン(SIGMA 社製, Type VIII)およびエラスターゼ(SIGMA 社製, Type IV)に対する阻害作用について, 基質として合成基質 Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-alanine-p-nitroanilide を用いた。なお, ズブチリシンとエラスターゼは, 0.005M CaCl₂を含む 0.005M 酢酸(pH5.5)に溶解し, それらの酵素濃度は, それぞれ吸光係数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=9.6^{11)}$, $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=20.2^{11)}$ から算出した。なお, ズブチリシンの基質は 20mg, エラスターゼの基質は 10mg を 1ml のジメ

チルスルホキンドに溶解したものを使用した。阻害活性測定は、トリプシンと同様の方法で評価した。

9. 酵素反応部位測定

アルギニン残基化学修飾は Patthy と Smith の方法¹⁵⁾に基づき、アミノ基化学修飾は Iijima らの方法¹⁶⁾に基づき、精製インヒビターの化学修飾を行った後、残存トリプシン阻害活性を測定し、精製インヒビターの反応部位アミノ酸残基を推定した。

実験結果

1. ゆり根トリプシンインヒビター(LTI-II-4)の精製

市販ゆり根の重量に対して10倍量のイオン交換水を加えてホモジナイザーにて均一に抽出した後、ガーゼにて濾過し、濾液を冷却遠心分離(10,000×g, 30min)した。上清液に結晶硫酸を50%飽和になるように加え、塩析を行った。塩析で生じた沈殿物を冷却遠心分離(15,000×g, 30min)にて回収し、その沈殿物に少量のイオン交換水を加え溶解した。溶解後、イオン交換水にて透析を行い粗インヒビターを得た。つづいて、粗インヒビター溶液を0.02M酢酸緩衝液(pH5.0)で透析し、0.02M酢酸緩衝液(pH5.0)にて平衡化した

CM-Sepharose CL-6B カラム(2.6×45 cm)に添加しイオン交換クロマトグラフィーを行った。結果は Fig. 1. に示す。未吸着部(LTI-I)および0.2Mから0.8M食塩グラジェント溶出によりトリプシン阻害活性を有するタンパク質画分(LTI-II, LTI-III)を得た。溶出画分でトリプシン阻害活性の高いLTI-II画分について、0.05M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)で透析後、0.05M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(2.0×31 cm)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. 2. に示す。0から0.5M食塩グラジェント溶出部にトリプシン阻害活性を有する複数のピークのタンパク質画分を得た。なかでも最も阻害活性の高い画分(LTI-II-4)を回収し、再び、0.05M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bカラム(2.0×31 cm)にてクロマトグラフィーを行い、先と同様の食塩グラジェント溶出によりトリプシン阻害活性を有するメインピークのタンパク質画分を回収した(Fig. 3.)。回収画分をイオン交換水で透析後、凍結乾燥粉末試料とした。次に、乾燥粉末試料を0.05%トリフルオロ酢酸溶液に溶解後、HPLC(TSKgel ODS-80TS

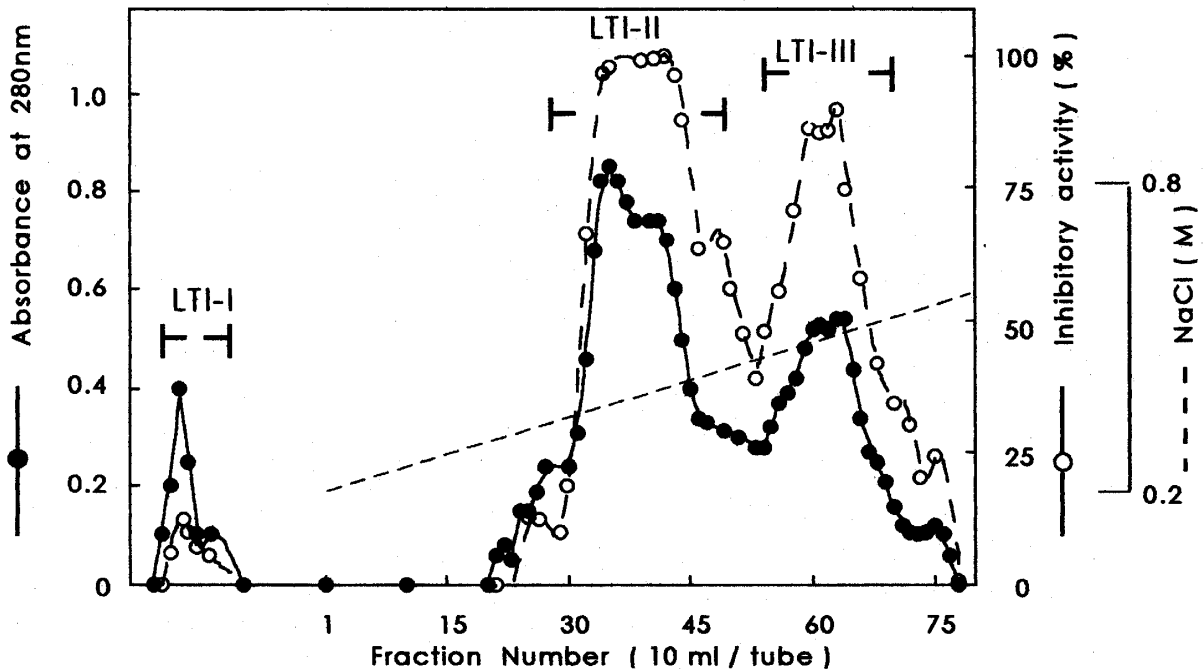


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of the inhibitor on a column of CM-Sepharose CL-6B

●, absorbance at 280 nm; ○, trypsin inhibitory activity; ----, NaCl concentration.

The sample was applied to the column(2.6×45cm)equilibrated with 0.02M acetate buffer(pH5.0). After washing the column with the buffer, the proteins were eluted with a linear gradient of NaCl(0.2-0.8M in the same buffer) at a flow rate of 30ml/h.

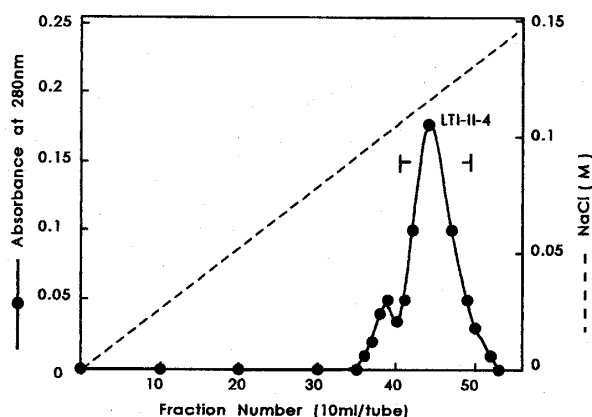


Fig. 2. Ion-exchange chromatography of the inhibitor obtained by CM-Spharose CL-6B
●, absorbance at 280 nm; ○, trypsin inhibitory activity; ----, NaCl concentration.

The sample was applied to the column (2.0×30cm) equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer (pH8.0). After washing the column with the buffer, the proteins were eluted with a linear gradient of NaCl(0-0.2M in the same buffer) at a flow rate of 30ml/h.

4.6 mm×15 cm)にて精製を行った。トリプシンインヒビターは、Fig. 4. に示すように単一タンパク質ピークとして溶出し、これを凍結乾燥し最終精製品(LTI-II-4)とした。

2. 電気泳動分析と分子量

最終精製品(LTI-II-4)の均一性の確認と分子量測定のため SDS-PAGE を行った。その結果、Fig. 5. に示すように LTI-II-4 に単一のバンドが確認され均一標品であることを確認した。また、標準タンパク質の易動度との比較により本インヒビターの分子量を 21,000 と推定した。

3. トリプシン阻害活性

精製 LTI-II-4 のトリプシンに対する阻害活性を測定した結果を Fig. 6. に示す。本インヒビターは、トリプシンに対して完全阻害の外挿値より、インヒビター/酵素の重量比 1.02 の阻害当量を示した。

4. アミノ酸組成、N 末端、C 末端アミノ酸配列

LTI-II-4 のアミノ酸組成は、Table 1. に示すように Asp, Ser, Gly が比較的多く存在していた。一方、Cys は 1 分子中に 4 残基と算出された。

また、N 末端アミノ酸配列については、Fig. 7. に示すように 25 残基まで同定し、C 末端アミノ酸

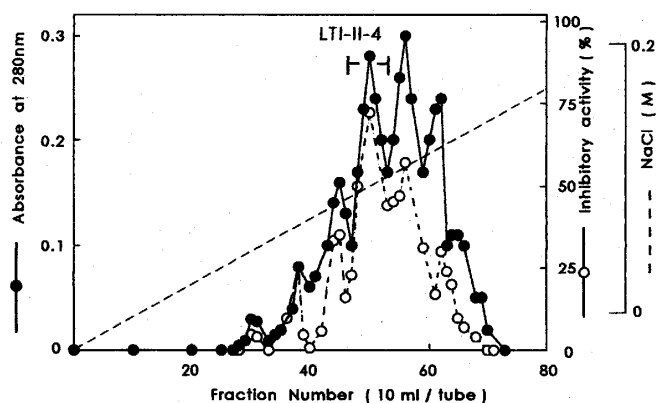


Fig. 3. Ion-exchange chromatography of the inhibitor (LTI-II-4) on a column of DEAE-Sephacel CL-6B
●, absorbance at 280 nm; ----, NaCl concentration.

The sample was applied to the column (2.0×30cm) equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer (pH8.0). After washing the column with the buffer, the proteins were eluted with a linear gradient of NaCl(0-0.15M in the same buffer) at a flow rate of 30ml/h.

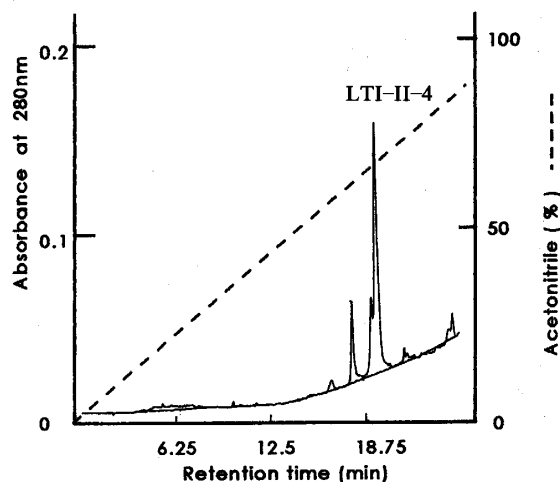


Fig. 4. Purification of trypsin inhibitor (LTI-II-4) by HPLC

The inhibitor obtained by DEAE-Sephacel CL-6B ion-exchange chromatography was applied to a column (TSK gel ODS-80Ts 4.6mm×15cm) equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid, and LTI-II-4 was eluted at a flow rate of 1.0ml/min with a linear gradient of acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid(0-80%, 30min).

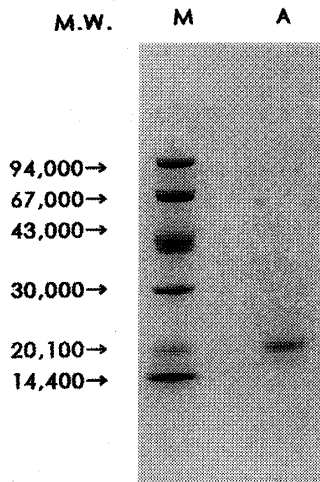


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of trypsin inhibitor(LTI-II-4)from Lily bulb M ; Marker proteins used were : MW 94,000 phosphorylase b, MW 67,000 bovine serum albumin, MW 43,000 ovalbumin, MW 30,000 carbonic anhydrase, MW 20,100 soy-bean trypsin inhibitor, MW 14,400 α -lactalbumin.
A ; Purified trypsin inhibitor(LTI-II-4)

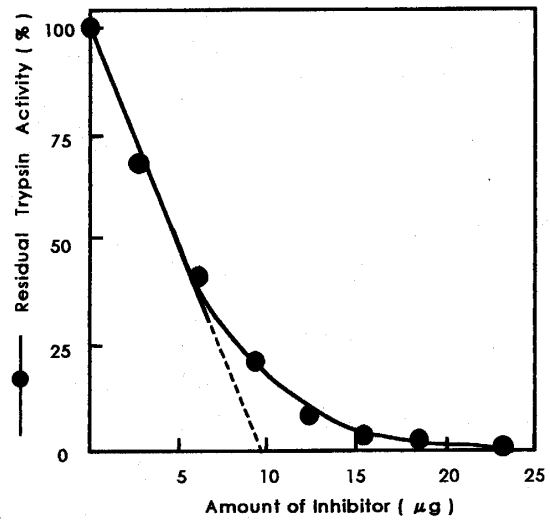


Fig. 6. A titration curve of bovine trypsin with lily bulb trypsin inhibitor(LTI-II-4)
A constant amount of bovine trypsin(3.44×10^{-7} M) was mixed with various amounts of LTI-II-4 and the amount of free enzyme in each mixture was measured with BAPA as a substrate at 37°C and pH8.0.

配列については、Fig. 7. に示すように 3 残基まで同定した。

5. 安定性

pH と熱安定性について Fig. 8. に示すように pH5 から 8 では 37°C および 50°C, 10 分間の加熱処理を行ってもトリプシン阻害活性は比較的安定していた。また、80°C および 100°C ではどの pH においても残存トリプシン阻害活性が非常に低く熱に対して不安定であった。

6. 他のプロテアーゼに対する阻害作用

Fig. 9. に示すように LTI-II-4 は、ズブチリン、エラスターゼに対しては阻害作用を示さなかった。しかし、キモトリプシンに対しては若干の阻害作用を示した。

7. 化学修飾

LTI-II-4 のアミノ残基を 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸で化学修飾を行った。LTI-II-4 の残存トリプシン阻害活性を測定した。その結果、アミノ基修飾 90% で完全に阻害活性を失った。一方、1,2-シクロヘキサジオンによるアルギニン修飾を行った LTI-II-4 のトリプシン残存阻害活性は、100% となった。

Table 1. Amino acid composition of trypsin inhibitor from lily bulb

Amino acid	Integer
Asp	20
Thr	7
Ser	19
Glu	12
Pro	16
Gly	21
Ala	11
Cys	4
Val	15
Met	3
Ile	7
Leu	17
Tyr	6
Phe	8
Lys	11
His	2
Arg	5
Total	182

考 察

精製したユリ鱗茎部 25g より粗インヒビターを約 230 mg 得た。粗インヒビターを用いて CM-

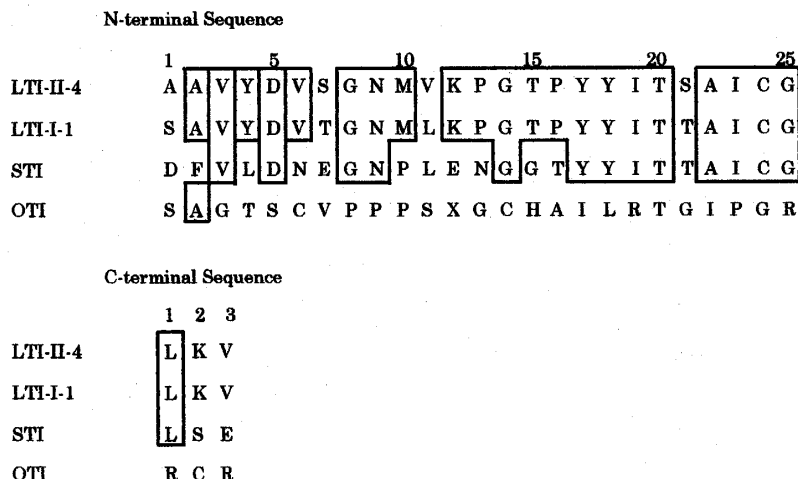


Fig. 7. Comparison of N-terminal and C-terminal sequences of LTI-II-4 and LTI-I-1 from lily bulb, soy bean trypsin inhibitor (STI) and onion trypsin inhibitor (OTI). Identical residues are enclosed in blocks.

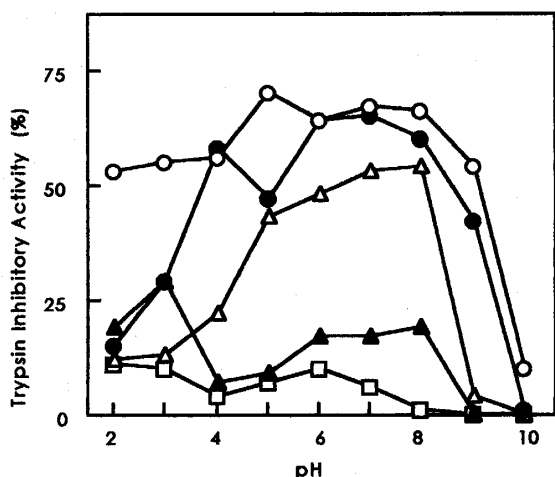


Fig. 8. Stability of LTI-II-4 from lily bulb. After LTI-II-4 solutions had been incubated at various pH's for 10 min at 37, 50, 60, 80, 100°C, the remaining trypsin inhibitory activity of each incubation mixture was measured. ○, 37°C; ●, 50°C; △, 60°C; ▲, 80°C; □, 100°C.

Sepharose CL-6B イオン交換クロマトグラフィーを行った。全く吸着されない未吸着画分(LTI-I)と吸着画分(LTI-II, LTI-III)に分かれ、それぞれにトリプシンに対して高い阻害活性を持ったインヒビターが存在していた。既に未吸着画分(LTI-I-1)については、報告済みである¹⁰⁾。最も阻害活性の高

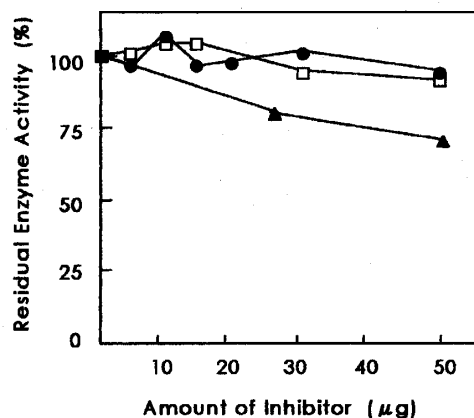


Fig. 9. Inhibitory activity of LTI-II-4 from lily bulb against chymotrypsin, subtilisin and elastase [Chymotrypsin] = 5.0×10^{-7} M, [Subtilisin] = 7.0×10^{-7} M, [Elastase] = 3.98×10^{-7} M. A constant amount of each enzyme was incubated with various amounts of the inhibitor for 2 min at pH 8 and the residual enzyme activity in each mixture was measured for 10 min at 37°C. ●, subtilisin; □, elastase; ▲, chymotrypsin.

い吸着画分(LTI-II)を DEAE-Sepharose CL-6B によるイオン交換クロマトグラフィーと HPLC により精製して均一インヒビターを得、本インヒビターを LTI-II-4 としてその性質について検討した。

本インヒビターの分子量は 21kDa, アミノ酸組成からシステイン残基を 1 分子中に 4 ケ所有してい

た。「pir protein sequence data base」より、Fig. 7. の N 末端アミノ酸配列を用いてインヒビターのファミリー検索を行った結果、sweet potato 中の sporamin と identity 47.8% と相同性が高く、STI とは identity 39.1% の結果を得た。また、一次構造が明らかにされている同じユリ科のタマネギトリプシンインヒビターとは、N 末端より 2 と 20 残基目のアミノ酸が同じであった。

次に、LTI-II-4 はアルギニン修飾による阻害作用の影響はなく、アミノ基修飾によって阻害活性が低下したことにより、LTI-II-4 の反応部位アミノ酸残基はリジンと推定された。LTI-I-1 の反応部位アミノ酸残基がアルギニンと推定されることにより¹⁰⁾LTI-II-4 は LTI-I-1 とは反応部位のアミノ酸残基が異なったインヒビターであると考えられる。LTI-II-4 は、pH5~8 の範囲で、37~60℃ ではトリプシン阻害活性にほとんど影響がなく安定であった。しかし、80℃、100℃ ではどの pH においても不安定で、また、pH5~8 の範囲を越える酸性側とアルカリ側では 60℃ 以下でも不安定であった。LTI-II-4 の酵素阻害対応は、LTI-II-4 : Trypsin = 1 : 1(W/W)となった。両者の分子量を考えると LTI-II-4 の 1 モルはトリプシン 1 モルを阻害すると考えられる。キモトリプシンに対しては、非常に低い阻害対応であった。本インヒビターは、少なくとも 2 種類の酵素に対する阻害反応を示すことにより、多価性のインヒビターであると推定した。なお、ズブチリシン、エラスターゼに対しては阻害作用を示さなかった。

今回精製された LTI-II-4 は熱に強いマメ科植物の BBI(Bowman-Birk)型ではなく、分子量、システイン含量、データベースとの比較により、STI(Kunitz)型と考えられた。

要約

食用ユリ根中には、CM-Sepharose CL-6B に吸着されないトリプシンインヒビター(LTI-I)と吸着されるトリプシンインヒビター(LTI-II, LTI-III)が存在した。吸着された LTI-II を DEAE-Sepharose CL-6B にてイオン交換クロマトグラフィーを行い、さらに HPLC にて精製を行った。精製されたインヒビターは SDS-PAGE にて均一であることを確認し、精製インヒビター LTI-II-4 とした。分子量は、21,000、トリプシンに対する阻害のモル比は 1 と考えられた。LTI-II-4 のアミノ酸

組成から、1 分子中にシステイン残基数が 4 ヶ存在した。N 末端アミノ酸 25 残基と C 末端アミノ酸 3 残基を同定した。LTI-II-4 の反応部位アミノ酸はリジン残基と推定された。また、キモトリプシンに対して弱い阻害活性を示したが、エラスターゼ、ズブチリシンに対しては全く阻害反応を示さなかった。食用ユリ根トリプシンインヒビターの分子量、システイン残基含有量、データバンクからの結果より、Kunitz 型トリプシンインヒビターファミリーに属すると推定した。

文献

- 1) Hara, S., Makimo, J., and Ikenaka, T., *J. Biochem.*, **105**, 88-91(1989)
- 2) Laskowski, M. JR., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **199**, 1-17(1986)
- 3) Melvill, J.C., Ryan, C.A., and Gentry, L., *J. Biol. Chem.*, **258**, 7998-8003(1983)
- 4) Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L.H. and Ryan, C.A., *J. Biol. Chem.*, **260**(11), 6561-6564(1985)
- 5) Pandya, M.J., Smith, D.A., Yarwood, A., Gilroy, J. and Richardson, M., *Phytochemistry*, **43**(2), 327-331(1996)
- 6) Kainuma, K., Ookuwa, T. and Kawamura, Y., *J. Biochem.*, **117**(1), 208-215(1995)
- 7) Kim, S.-H., Hara, S., Hase, S., Ikenaka, T., Toda, H., Kitamura, K. and Kaizuma, N., *J. Biochem.*, **98**, 435-448(1985)
- 8) Odani, S. and Ikenaka, T., *J. Biochem.*, **74**, 697-715(1973)
- 9) Dayhoff, M.O., "Atlas of protein sequence and structure", National Biomedical Foundation, Washington D.C., **5**(1972)
- 10) 浅尾俊夫, 堀口美和, 寺田慎子, 高橋享子, 日本食品化学工学会誌, **4**(11), 663-670(1998)
- 11) 生化学データブック(I), 日本生化学会編, 東京化学同人, 91-114(1979)
- 12) Laemmli, U.K., *Nature*, **227**, 680-685(1970)
- 13) Pieniazek, D., Rakowska, M., Szkilladziowa, W., and Grabarek, Z., *Br. J.*

- Nutr.*, **34**, 175-190(1975)
- 14) Sharma, K.K., Olesen, P.R. and Ortworth, B.J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **915**, 284-291(1987)
 - 15) Patthy, L. and Smith, E.L., *J. Biol. Chem.*, **250**, 557-564(1975)
 - 16) Iijima, H., Patzyc, H. and Bello. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **491**, 305-316(1977)