

トラマメとウズラマメ由来 α -アミラーゼインヒビターの同一性

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

The identity of α -amylase inhibitors from Toramame (*Phaseolus vulgaris* L.) and Uzuramame (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

The identity of α -amylase inhibitors (TAI and UAI) from Toramame (*Phaseolus vulgaris* L.) and Uzuramame (*Phaseolus vulgaris* L.) was examined by comparing peptide maps and sugar chain compositions of both inhibitors. The amino acid compositions of α and β subunits of UAI were very similar to those of TAI, respectively. The peptide maps in the *Staphylococcus* protease digestion of α -subunit and in the lysylendopeptidase digestion of β -subunit of UAI were identical with those of TAI, respectively. These results showed that both inhibitors had the same amino acid sequence. The comparison of sugar chain compositions of both inhibitors suggested that the major glycoforms of UAI and TAI were the same and even glycoform compositions of UAI and TAI were very similar.

緒言

多くの食用植物種子中には、 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)が存在し、特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る^{1)~5)}。これらインヒビターは、一般に動物の α -アミラーゼに特異的で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。このことから消化を妨害する反栄養物質とされてきた。しかし近年では、AIの糖質消化抑制作用がインシュリン非依存性糖尿病⁶⁾⁷⁾や、肥満⁸⁾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り、その利用に大きな関心が寄せられている。しかしながら、実際にAIの実用化を可能にするためには、本物質の適当な改質が必要であり、そのためには構造と機能についての詳細な理解が求められる。特に近縁の分子種間の比較は機能の改善や向上をはかる上で重要である。

著者らは、8栽培種のインゲン属のマメ種子より8種の同族のAIを分離精製し、その性質及び構造を明らかにしてきた^{9)~17)}。その中でもトラマメ α -アミラーゼインヒビター(TAI)とウズラマメ α -アミラーゼインヒビター(UAI)は、酵素化学的性質及び物理化学的性質が非常に類似しており、同一の構造を有するインヒビターである可能性が示唆されていた¹¹⁾。実際TAIとUAIは同一のサブユニット構造を有し、それぞれのサブユニット α と β のN末20残基の配列が同一であった¹⁴⁾。そこで本報告では、UAIとTAIの同一性をペプチドマップや糖鎖組成を比較することにより検討した。

実験方法

1. 供試料

α -アミラーゼインヒビター、TAIとUAIはそれぞれ北海道産のトラマメ(*Phaseolus vulgaris* L.)とウズラマメ(*Phaseolus vulgaris* L.)から既報¹¹⁾に従

い精製した。

2. サブユニットの分離

TAIとUAIは、それぞれ50 mgを6 M塩酸グアニジンを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0) 1.5 mlに溶解し、37°Cで40分間処理後8 M尿素を含む同緩衝液(pH 8.0)に対して透析し、変性AI試料とした。更に8 M尿素を含む同緩衝液(pH 8.0)で平衡化したDEAE-Sephacelカラムを用い、それぞれのAIを既報¹⁴⁾に従ってサブユニット α と β に分離した。脱塩は、50 mM NH_4HCO_3 で平衡化したSephadex G-25に供して行った。

3. アミノ酸配列分析

サブユニットのアミノ酸配列は、Hewlett-Packard 241 N&C protein sequencerを用い分析した。

4. アミノ酸分析

各AIのサブユニット α と β は、脱気した5.7 N HCl中で110°C、24時間加水分解した後、日立835型アミノ酸分析計に供して分析した。

5. 酵素消化

TAIとUAIは、サブユニット α では50 mM NH_4HCO_3 溶液中で、*S. aureus* V8 proteaseを用い、酵素:基質=1:50(w/w)で37°C、24時間消化を行った。

サブユニット β では、lysylendopeptidaseを用い50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 9.0)中で、酵素:基質=1:50(w/w)で37°C、2時間の消化を行った。

6. ペプチドの分離

酵素消化により得られたそれぞれのペプチドは、0.05% TFAで平衡化したTSKgel ODS-80TSカラム(0.45×15 cm, 東ソー)を用いた逆相HPLCにより分画、精製した。ペプチドは、流速0.5 ml/min, 0.05% TFAを含むアセトニトリルのlinear gradient(0-50%, 30 minまたは40 min)で溶出した。検出は220 nmで行った。

7. 糖鎖構造の推定

1) PA化糖鎖の調製

サブユニットからの糖鎖は、高橋らの方法^{18)~20)}によりglycopeptidase Aを用いて、pH 5.0, 37°C, 16時間の酵素消化により調製した。また、糖鎖のPA化は、長谷らの方法²¹⁾²²⁾に従った。

2) PA化糖鎖の分析

PA化糖鎖の構造は、PALPAK Type Sカラム(0.46×25 cm, 宝酒造)を用いるsize-fractionation HPLCで推定した。溶出はA液:3% 酢酸-トリエチルアミン(pH 7.3)/アセトニトリル, 35 / 65(v/v)

v)で平衡化したカラムにB液:3% 酢酸-トリエチルアミン(pH 7.3)/アセトニトリル, 50 / 50(v/v)を0-60%B, 30 minのlinear gradientで行った。カラム温度は40°C, 流速は1.0 ml/min, 検出は励起波長320 nm, 測定波長400 nmで蛍光強度を測定した。標準PA化糖鎖は、宝酒造社製のPA-Sugar Chain M3~M9, M3, $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$; M5, $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$; M6, $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$; M7, $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$; M8, $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$; M9, $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$ を用いた。

実験結果

1. イオン交換クロマトグラフィーによるサブユニットの分離とそのアミノ酸組成

変性UAIを8 M尿素を含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)で平衡化したDEAE-Sephacelカラムに供して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UAIは、TAI同様未吸着部と0~1.0 M NaCl gradient溶出部に、それぞれ α と β 2つのタンパク質画分に分離した。分離の確認にはN末端分析を行った。 α はアラニン、 β は

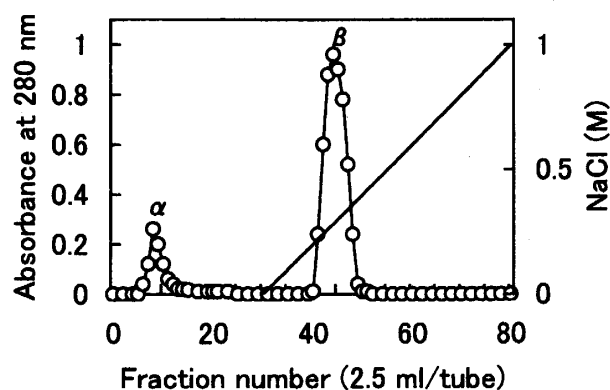


Fig. 1. Separation of the UAI subunits by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography under a denaturing condition.

—○—, absorbance at 280 nm; —, NaCl concentration.

セリンの単一な N 末端が得られ、TAI と同様の結果であった¹⁴⁾。

また、C 末端配列分析では UAI のサブユニット β は、TAI のサブユニット β 同様 C 末端領域に不均一性が見られた。 β の C 末端よりの配列はアスパラギン、セリン、アルギニンであった。 α はアラニン、グルタミン酸であり両者とも TAI と同じであった¹⁷⁾。

次に TAI と UAI のそれぞれのサブユニット α 、 β についてアミノ酸分析を行った結果を Table 1. に示す。アミノ酸組成はそれぞれ対応する画分(サブユニット)において非常に類似していた。

2. サブユニットの酵素消化とペプチドマップ

サブユニット α を *S. aureus* V8 protease を用いて 24 時間消化後、逆相 HPLC に供した結果を Fig. 2. に示す。TAI と UAI は、まったく同一のパターンを示した。また、サブユニット β について Lysyl-endopeptidase を用い 2 時間消化後、同じく逆相 HPLC に供した結果を Fig. 3. に示す。サブユニット β においてもその溶出パターンは同一であった。

3. サブユニットの糖鎖組成

TAI と UAI それぞれのサブユニットより調製した PA 化糖鎖のサイズ分画 HPLC パターンを Fig. 4. に示す。得られたピークのうちサブユニット α (A)

Table 1. Amino acid composition of the subunits of α -amylase inhibitors.

Amino Acid	(mol%)			
	TAI		UAI	
	α	β	α	β
Asp	17.8	16.2	17.3	16.1
Thr	11.5	7.2	11.2	7.4
Ser	11.6	14.6	11.3	15.2
Glu	6.9	9.3	6.7	9.5
Pro	1.4	3.3	1.6	2.9
Gly	4.1	5.6	4.0	5.1
Ala	9.2	3.1	9.0	3.3
Cys	0	0	0	0
Val	3.3	13.8	3.2	13.4
Met	3.4	0	4.7	0
Ile	7.1	3.3	7.8	3.5
Leu	5.0	4.7	5.2	5.0
Tyr	4.1	4.1	3.8	3.8
Phe	6.7	5.3	6.5	5.3
Lys	1.5	6.1	1.4	6.0
His	1.5	1.7	1.4	1.7
Arg	5.2	2.1	5.1	2.1

では主要な 11 種をピーク 1~11 と命名した。HPLC パターンは TAI と UAI では僅かに異なっていた。即ち TAI はピーク 6 とピーク 11 が主要な糖

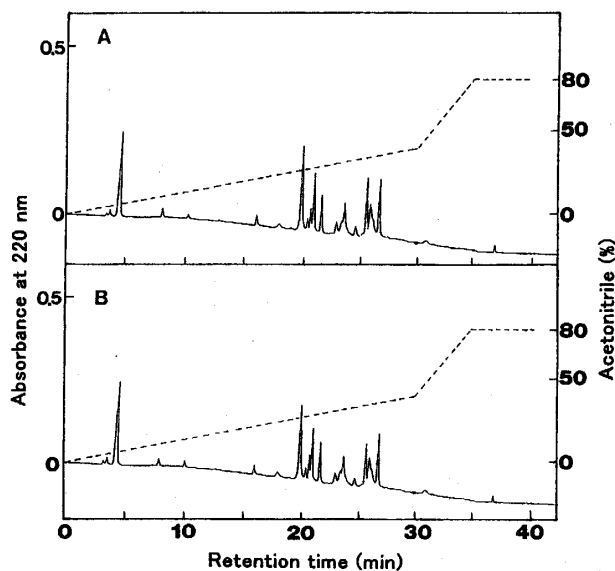


Fig. 2. Peptide maps of TAI α (A) and UAI α (B). The *Staphylococcus* protease digests of α -subunits of TAI and UAI were separated by HPLC. —, absorbance at 220 nm; -----, acetonitrile concentration.

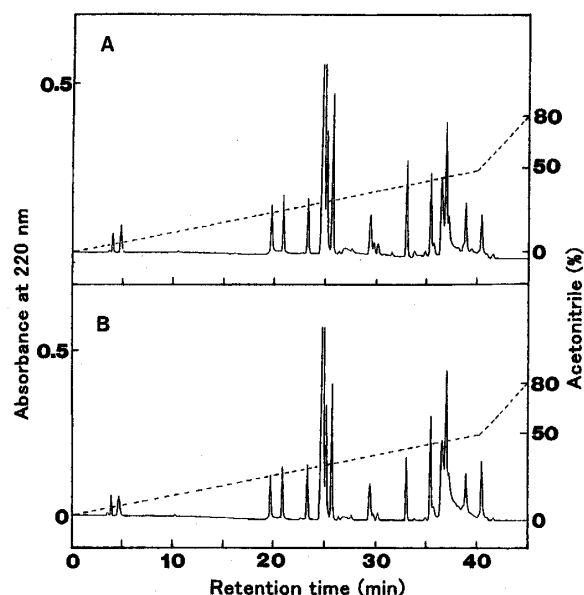


Fig. 3. Peptide maps of TAI β (A) and UAI β (B). The lysylendopeptidase digests of β -subunits of TAI and UAI were separated by HPLC. —, absorbance at 220 nm; -----, acetonitrile concentration.

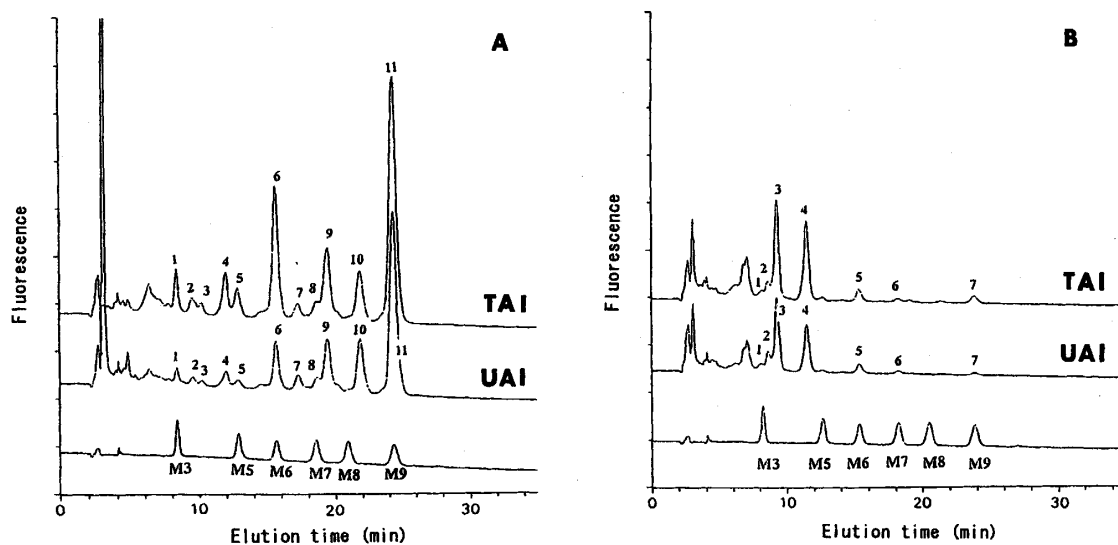


Fig. 4. Fractionation of PA-oligosaccharides from α -subunits(A) and β -subunits(B) of TAI and UAI by size-fractionation HPLC.

M3, M5, M6, M7, M8 and M9 were authentic PA-oligosaccharides.

鎖であり、構造既知のPA化オリゴマンノース型糖鎖の溶出位置よりそれぞれM6, M9と推定された。またその存在比は、ピークの面積比よりピーク6が17.9%、ピーク11が43.0%であった。しかしUAIではM9と推定されるピーク11が50.3%の面積比を占め主糖鎖と考えられた。その他、M6と推定されるピーク6は11.0%、ピーク9, 10がそれぞれ11.1%、12.9%であった。ピーク9と10についてはTAIでもほぼ同じ比率であることから、TAIのサブユニット α とUAIのサブユニット α の糖鎖組成はピーク6(M6)とピーク11(M9)の存在比に僅かな違いがあるのみであると考えられた。

一方、サブユニット β (B)では主要な7種をピーク1~7と命名した。TAIとUAI両者のHPLCパターンはほぼ同じであった。即ちピーク3とピーク4が主要な糖鎖であり、その存在比は、TAIが43.1%と39.0%、UAIが43.8%と35.2%でサブユニット β の結合糖鎖の約80%を占めた。

考 察

我々が精製した種々のインゲンマメ α -アミラーゼインヒビターのうちTAIとUAIは、等電点、分子量、糖含量、アミノ酸組成、阻害活性、熱安定性など酵素化学的性質及び物理化学的性質がほぼ同一であった¹¹⁾。更に、これらは同一のサブユニット構造をとることから、同一の四次構造を有する同族のタンパク質であると考えられた¹¹⁾¹⁴⁾。TAIについ

ては既に構造を決定¹⁷⁾していることから、本論文ではUAIをTAIと比較することにより両者の構造的同一性について検討した。

UAIそれぞれのサブユニットのアミノ酸組成は、TAIのサブユニットと非常に類似していた。更にTAIとUAIを、同条件で酵素消化を行い比較したところ、それぞれ対応するサブユニットのペプチドマップが一致した。また既に報告しているようにUAIのサブユニット α と β は、N末端より20残基のアミノ酸配列がTAIのそれぞれ対応するサブユニットと一致している¹⁴⁾。これらの結果より、UAIとTAIのアミノ酸配列は同一であると考えられる。

一方、糖鎖組成の比較ではサブユニット α において僅かに違いが見られるものの両者は非常に類似していた。すでにTAIの糖鎖結合位置及びそこに結合する主要な糖鎖構造は、サブユニット α のAsn(12)がM6B, Asn(65)がM9A, サブユニット β のAsn(63)がM3X, Asn(83)がM3FXであると報告している¹⁷⁾。おそらくUAIの主要なグリコフォームもTAIと同じであると考えられる。

既に報告している様に、TAIとUAIはほとんど同一の阻害活性や熱安定性を示している¹¹⁾。両インヒビターのアミノ酸配列が同一と考えられるため、これらの性質は両者の微細な糖鎖組成の違いによっては影響されないものと思われる。勿論、両インヒビターは、多数のグリコフォームの混合物であるため、両者の性質は各グリコフォームの性質の平均的

なものであると考えられる。この点を十分に考慮することも必要であろう。

要 約

ウズラマメ α -アミラーゼインヒビター(UAI)は、トラマメ α -アミラーゼインヒビター(TAI)と酵素化学的性質及び物理化学的性質が非常に類似しており、同一の構造を有するインヒビターである可能性が示唆されていた。そこでTAIとUAIの酵素消化によるペプチドマップと糖鎖組成を比較することにより両者の同一性を検討した。

UAIはTAIと同様イオン交換クロマトグラフィによりサブユニット α と β に分離された。UAIそれぞれのサブユニットのアミノ酸組成は、TAIそれぞれの対応するサブユニットと非常に類似していた。サブユニット α の*S. aureus* V8 protease消化におけるTAI, UAIのペプチドマップは同一であった。また、 β のLysylendopeptidase消化における両者のペプチドマップも同一であった。これらのことからTAIとUAIは同一のアミノ酸配列を有するインヒビターであることが示された。

各サブユニットの糖鎖組成は、サブユニット α においてはTAIとUAIで僅かに異なったが、 β においてはほぼ同じであった。従ってTAIとUAIの主要なグリコフォームは同じであり、かつ両インヒビターのグリコフォームの構成比率も完全には同一ではないものの、非常に類似していることが推察された。

文 献

- 1) Powers, J.R. and Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **1**, 217-238(1977)
- 2) Wilcox, E.R. and Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **8**, 189-213(1984)
- 3) Lajolo, F.M. and Finardi Filho, F., *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132-138(1985)
- 4) Yamaguchi, H., *J. Biochem.*, **110**, 785-789(1991)
- 5) Ho, M.F. and Whitaker, J.R., *J. Food Biochem.*, **17**, 15-33(1993)
- 6) Puls, W. and Keups, V., *Diabetologia*, **9**, 97-102(1973)
- 7) Layer, P., Carlson, G.L., and Dimagno, P., *Gastroenterology*, **88**, 1895-1902(1985)
- 8) 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)
- 9) 澤田小百合, 金森正雄, 武庫川女子大学紀要, **40**, 39-43(1992)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 日本食品科学工学会誌, **48**, 182-188(2001)
- 14) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 武庫川女子大学紀要, **47**, 95-100(1999)
- 15) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 武庫川女子大学紀要, **48**, 45-47(2000)
- 13) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 日本食品科学工学会誌, **48**, 671-676(2001)
- 16) 澤田小百合, 竹田由里, 金森正雄, 田代 操, 武庫川女子大学紀要, **49**, 85-88(2001)
- 17) Sawada, S., Takeda, Y., and Tashiro, M., *J. Protein Chem.*, **21**, 9-17(2002)
- 18) Takahashi, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1194-1201(1977)
- 19) 高橋禮子, 富谷 昇, 吉田友昭 共著 化学と生物実験ライン 20 糖タンパク質と糖結合タンパク質 廣川書店 pp. 31-43(1992)
- 20) 高橋禮子 編著 生物化学実験法 23 糖蛋白質糖鎖研究法追補版 学会出版センター pp. 23-34(1996)
- 21) Hase, S., Ikenaka, T. and Matsushima, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 257-263(1978)
- 22) Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I. and Ikenaka, T., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2169-2170(1990)