

# 小麦胚乳の Minor Protease Inhibitors の 部分精製および 2, 3 の性質

木村 祐子, 清水まゆみ, 布浦 弘

## Partial Purification and Some Properties of Minor Protease Inhibitors in Wheat Endosperm

Yuko Kimura, Mayumi Shimizu and Hiroshi Nunoura

### I はじめに

植物性食品の中には、多くの哺乳動物のタンパク分解酵素 (Protease) を阻害する物質 (Protease Inhibitor) が、広く分布している。

一般には、1種類の植物性食品から数種類の Inhibitors が見い出されている。たとえば、大豆<sup>1)</sup>からは7種類あるいはそれ以上の Inhibitors が分離され、その各々は Protease に対して固有の特異性を示すものであったり、または特異性や分子量がほぼ同一でありながらタンパク質構造が異なるという報告<sup>2)</sup>がされている。さらに、リマ豆<sup>3)</sup>、じゃがいも<sup>4)</sup>、大麦<sup>5)</sup>、小麦胚芽<sup>6)</sup>、なすの果皮<sup>7)</sup>についても報告がされている。これらの Protease Inhibitors の存在やその性質を明らかにすることは、食品を評価する上で非常に重要なデータになる。また、なぜこのような Inhibitor が存在するか、しかも数多く存在するか、その意義についても討議されているが推測の域を出ていない。これらについて検討することも極めて興味深い研究課題である。小麦胚乳についてもすでに1種類の Protease Inhibitor が単離され、その性質について報告<sup>8)</sup>されているが、これ以外にも阻害活性成分が認められている。

そこで本研究では、これらの成分の分離・精製法を検討するとともに、得られた Minor Protease Inhibitors について性質を明らかにすることを目的とした。

### II 実験方法

1. 材料：試料として、1979年カナダ産カナダウェスタン種硬質小麦の胚乳を日清製粉株式会社より入手

した。Sephadex G-75 (fine, super fine), SP-Sephadex C-25 は Pharmacia Fine Chemicals Co. 製品を、Trypsin (2×cryst. from bovin pancreas),  $\alpha$ -Chymotrypsin (3×cryst. from bovin pancreas) は Sigma Chemical Co. 製品を、 $\alpha$ -N-Benzoyl-D.L.-Arginine-p-Nitroanilide • HCl (BANA) は財団法人蛋白質研究奨励会の製品を、N-Acetyl-L-Tyrosine Ethyl Ester Monohydrate (ATEE) は半井化学薬品株式会社の製品をそれぞれ使用した。また、その他の試薬は市販特級試薬を用いた。

2. 小麦胚乳の Minor Protease Inhibitors の分離・精製：小麦胚乳に10倍量の0.1M塩化ナトリウム溶液を加え活性成分を抽出後、この抽出液を60°C、10分間加熱処理し、遠心分離後、上清を硫酸アンモニウムで塩析した(0.8飽和)。沈殿物を少量の水に溶かした後、水に対して透析し、得られた透析液を粗製 Protease Inhibitor とした。この粗製 Protease Inhibitor は CM-Sephadex C-25 を用いるイオン交換クロマトグラフィーで、活性画分 I, II, III, IV に分離された。画分 IV については、すでに報告<sup>8)</sup>しているごとく、さらに精製を行い、電気泳動的に単一物を得た (WETI-I)。ここでは画分 II, III について Sephadex G-75, SP-Sephadex C-25 を用いるクロマトグラフィーを行い精製法を検討した。

3. タンパク質の定量法：タンパク質の定量は Lowry-Folin 法<sup>9)</sup>を用いた。

4. 糖の定量法：糖の定量はフェノール-硫酸法<sup>10)</sup>を用いた。

5. 純度の確認および分子量の測定：純度の確認にはポリアクリルアミドゲル電気泳動法<sup>11)</sup>、分子量の測定には SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法<sup>12)</sup>を

用いた。

6. 等電点の測定<sup>13)</sup>：等電点は Ampholine により、pH3.5~9.5の勾配を有するポリアクリルアミドゲルを用い、LKB Co. 製 Multiphor 薄層ゲル等電点分離装置により行った。

7. 阻害活性の測定：Trypsin に対する阻害活性は BANA を基質とする BANA 法<sup>14)</sup>を、 $\alpha$ -Chymotrypsin に対する阻害活性は ATEE を基質とする pH stat 法<sup>15)</sup>を用いた。

### III 結果および考察

1. Minor Protease Inhibitors の分離・精製：CM-Sephadex C-25 カラムにより得られた画分 II, III をそれぞれ Sephadex G-75 (fine または super fine) カラムによるゲル濾過を行い、その結果画分 II は1つの、画分 III は2つの活性画分 (III<sub>a</sub>, III<sub>b</sub>) に分離された。クロマトグラムは Fig. 1, Fig. 2 に示す。つぎに画分 II, III<sub>a</sub> は SP-Sephadex C-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行い精製した。この結果は、Fig. 3, Fig. 4 に示すように、画分 II, III<sub>a</sub> は各々2つの活性画分 (II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub> および III<sub>a-1</sub>, III<sub>a-2</sub>) に分離できた。

以上のようにして画分 II, III から5つの活性画分が

得られた。これらは WETI-I と比較すると微量であるので、各々を Minor Protease Inhibitor II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, III<sub>a-1</sub>, III<sub>a-2</sub>, III<sub>b</sub> (MPI-II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, III<sub>a-1</sub>, III<sub>a-2</sub>, III<sub>b</sub>) とした。

2. Minor Protease Inhibitors の純度および分子量の測定：ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で純度の確認を行った結果、MPI-II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub> は主なバンドのほかにも僅かに2本のバンドが認められた。また、MPI-

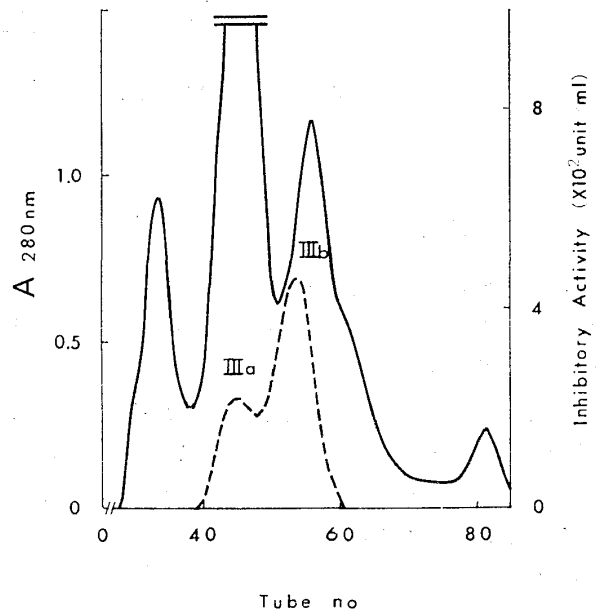


Fig. 2 Sephadex G-75 (super fine) カラム (1.8×98cm) による画分 III の分画。  
画分 III 140mg を 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 7 ml に溶かし、カラムに加えて溶出させ、1画分 3 g で分画した。

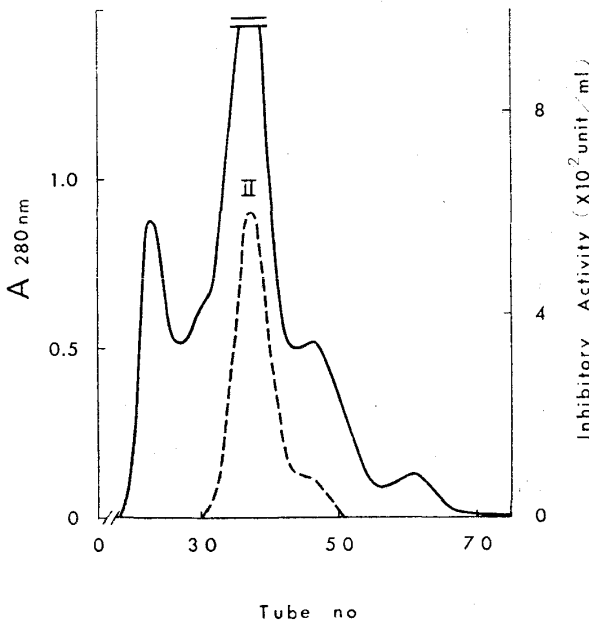


Fig. 1 Sephadex G-75 (fine) カラム (1.8×98cm) による画分 II の分画。  
画分 II 140mg を 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 7 ml に溶かし、カラムに加えて溶出させ、1画分 3g で分画した。実線は 280 nm の吸光度を、破線は阻害活性を示す。

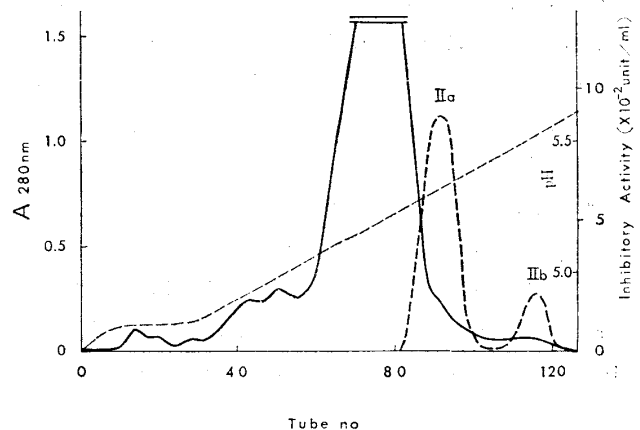


Fig. 3 SP-Sephadex C-25 カラム (1.6×25cm) による画分 II の分画。  
画分 II 100mg を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.7) 7 ml に溶かし、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.7) → 0.5M 酢酸ナトリウム溶液 (pH8.0) の pH グラジエントで溶出し、1画分 2g で分画した。長破線は pH 勾配を示す。

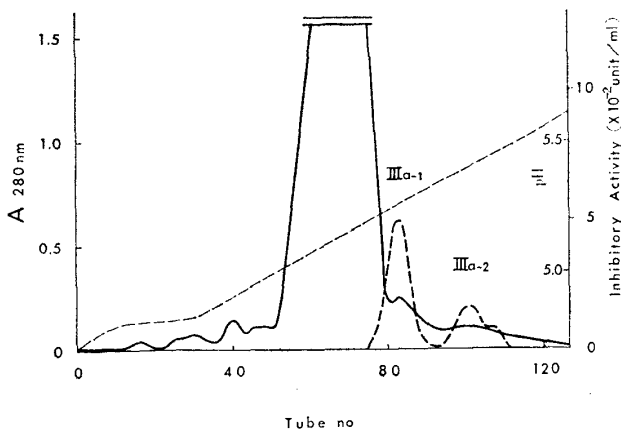


Fig. 4 SP-Sephadex C-25 カラム (1.6×25cm) による画分Ⅲ<sub>a</sub>の分画。

画分Ⅲ<sub>a</sub> 100mg を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.7) 7 ml に溶かし, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.7) → 0.5M 酢酸ナトリウム溶液 (pH8.0) の pH グラジエントで溶出し, 1画分2gで分画した。

Ⅲ<sub>a-1</sub>, Ⅲ<sub>a-2</sub> は主なバンドのほかに3本のバンドが認められた。各々は電気泳動的に均一でなく僅かに不純物を含む部分精製物であった。また, MPI-Ⅲ<sub>b</sub> はポリアクリルアミドゲル電気泳動法では3本の等間隔のバンドを示し, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では単一のバンドを示した。このことより, MPI-Ⅲ<sub>b</sub> は解離会合系の単一なタンパク質か, あるいは分子量が同一またはほぼ等しい異種のタンパク質の混合物であると推測される。つぎに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量の推定を行った結果, MPI-Ⅱ<sub>a</sub> は 16,000~19,000, MPI-Ⅱ<sub>b</sub> は 19,500~21,500 の間に, MPI-Ⅲ<sub>a-1</sub> は約 15,000 と約 41,000 の混合物, MPI-Ⅲ<sub>a-2</sub> は約 42,000, MPI-Ⅲ<sub>b</sub> は約 11,500 の分子量をもつものであった。

3. 糖質の有無: 各々の画分をフェノール-硫酸法により糖の定量を行った結果, 5画分とも糖質の存在は認められず, これらはいずれもポリペプチドのみからなる Inhibitors であった。

4. 等電点の測定: 各 Inhibitors の等電点は, MPI-Ⅱ<sub>a</sub> 8.2~9.4, MPI-Ⅱ<sub>b</sub> 8.0~9.0, MPI-Ⅲ<sub>a-1</sub> 9.0~9.5, MPI-Ⅲ<sub>a-2</sub> 8.0以上, MPI-Ⅲ<sub>b</sub> 7.5~9.4 の間であった。各々の等電点の範囲から考えて, これらの Inhibitors は塩基性のタンパク質であろうと考えられる。MPI-Ⅲ<sub>b</sub> については, 等電点電気泳動法で3画分に分画されたことと, ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の結果より, これは分子量がほぼ等しい異種のタンパク質の混合物であることが示唆された。

5. Protease に対する阻害活性の測定: Trypsin,

$\alpha$ -Chymotrypsin に対する阻害活性の強さは Fig. 5, Fig. 6 に示す。Fig. 5 において, 阻害曲線の50%の点から接線をおろし, 横軸と交わった点を Trypsin 1 $\mu$ g を100%阻害する Inhibitor の重量比とした。その結果, Trypsin に対しては MPI-Ⅱ<sub>a</sub> が 1:2.3, MPI-Ⅱ<sub>b</sub> が 1:1.3, MPI-Ⅲ<sub>a-1</sub> が 1:1.4, MPI-Ⅲ<sub>a-2</sub> が 1:3.5, MPI-Ⅲ<sub>b</sub> が 1:5.9 の比で100%阻害を示し

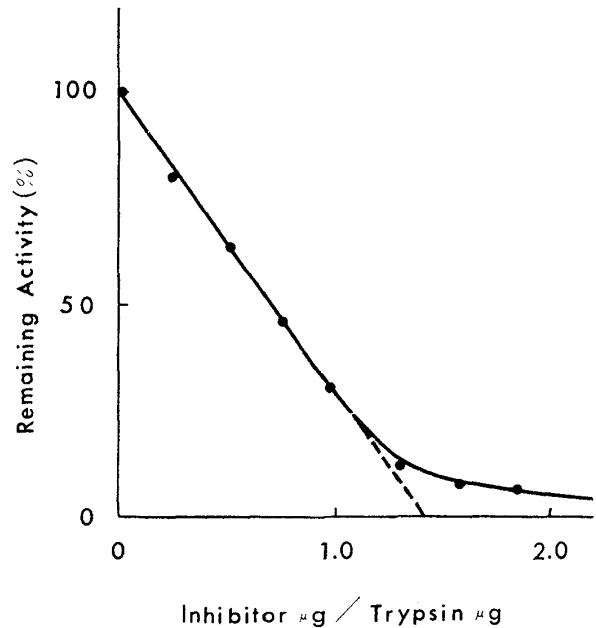


Fig. 5 MPI-Ⅲ<sub>a-1</sub> の Trypsin に対する阻害活性の強さ。

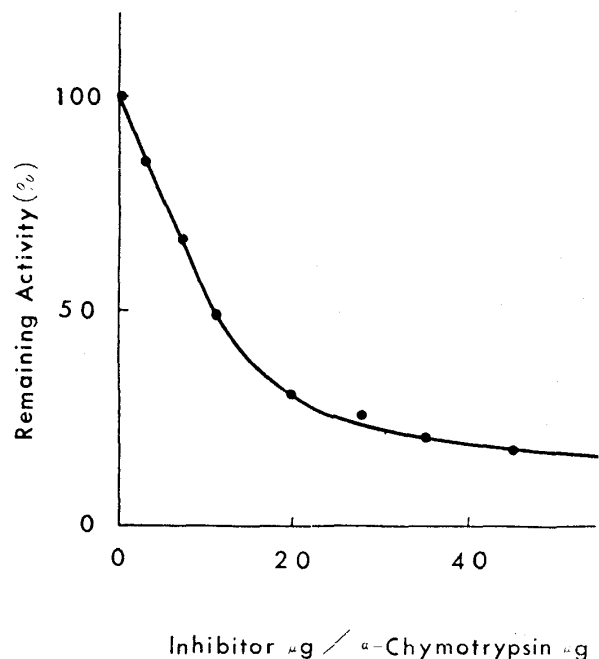


Fig. 6 MPI-Ⅲ<sub>b</sub> の  $\alpha$ -Chymotrypsin に対する阻害活性の強さ。

た。同様に  $\alpha$ -Chymotrypsin に対しては  $\text{III}_b \gg \text{II}_b \geq \text{II}_a > \text{III}_{a-1} > \text{III}_{a-2}$  の順に阻害活性の強さを示した。MPI- $\text{III}_b$  は MPI- $\text{III}_{a-2}$  の約10倍の阻害活性の強さを示したが、各画分とも Trypsin に対するほど強い阻害活性は示さなかった。MPI- $\text{III}_b$  については、他の4種類の画分に比べて、Trypsin に対しては阻害活性が弱く、 $\alpha$ -Chymotrypsin に対しては最も強い阻害活性を示したことから、これは Trypsin 以外の Protease に対する Inhibitor として存在するのではないかと予測される。

以上の結果より、CM-Sephadex C-25, Sephadex G-75, SP-Sephadex C-25 カラムを用いる分離精製法では、Minor Protease Inhibitors は僅かな不純物を含む部分精製物であり、単一物を得ることはできなかった。量的にみると、Minor Protease Inhibitors は、総阻害活性の約40%を占めているが、種類が多く最終部分精製物としては、小麦胚乳 1 kg より凍結乾燥物として、MPI- $\text{II}_a$  が 4.4mg, MPI- $\text{II}_b$  は 0.5mg, MPI- $\text{III}_{a-1}$  は 6.8mg, MPI- $\text{III}_{a-2}$  は 1.6mg しか得ることができなかった。MPI- $\text{III}_b$  については 1 kg から 60mg と量的には多いが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果からも明らかなように、分子量のほぼ等しい異種のタンパク質の混合物であった。これら5種類の Inhibitors の分離精製は、分子量あるいは電気的性質の差を利用した従来の方法では難しいと考えられる。そこでこの点については、最近開発された等電点の差による分離方法である Chromatofocusing を利用しての分離精製について検討中である。

小麦胚乳には、 $\alpha$ -Chymotrypsin に対しても強い阻害活性を示すという報告<sup>16)</sup>があるが、これらの5種類の Inhibitors の画分は、 $\alpha$ -Chymotrypsin に対する阻害活性は非常に弱いことから、Trypsin または他の Protease に対して阻害する Inhibitors であるが、 $\alpha$ -Chymotrypsin Inhibitors ではないといえる。 $\alpha$ -Chymotrypsin に対する阻害活性については、阻害活性成分の抽出過程の60°C、10分間の熱処理の際に失活したのではないかと予想される。

最後に、等電点の範囲から、5種類の Inhibitors は pI 7.0 以上の塩基性 Inhibitors であると考えられる。一般に、大豆を中心に植物性食品に存在する Inhibitor の等電点は7.0以下のものが多く米ぬか<sup>17)</sup>などの一部に塩基性の Inhibitor が認められているにすぎない。これに反し、これら5種類すべてが塩基性 Inhibitors であることは極めて興味深く、この Minor Protease Inhibitors についてはさらに詳しく検討する予定であ

る。

#### IV 要 約

1. CM-Sephadex C-25 カラムにより得られた画分 II, III を Sephadex G-75, SP-Sephadex C-25 カラムにより分離精製を行った結果、5種類の Minor Protease Inhibitors の存在を認めた。

2. これらは、僅かに不純物を含む部分精製物であり、分子量が 11,500~42,000 の間にあり、等電点が 7.0 以上の塩基性の糖を含まないポリペプチドであった。

3. Trypsin に対しては重量比で MPI- $\text{II}_a$  が 1:2.3, MPI- $\text{II}_b$  が 1:1.3, MPI- $\text{III}_{a-1}$  が 1:1.4, MPI- $\text{III}_{a-2}$  が 1:3.5, MPI- $\text{III}_b$  が 1:5.9 の割合で阻害活性を示したが、 $\alpha$ -Chymotrypsin に対しては非常に弱い阻害活性しか示さなかった。

#### 参 考 文 献

- 1) T. Obata, M. Kimura, T. Kobayashi and Y. Watanabe: *Cereal Chem.*, **47**, 597 (1970).
- 2) M. Laskowski, Jr. and R.W. Sealock: "The Enzymes", Vol. 3, ed. by P.D. Boyer, Academic Press Inc., New York, N.Y. 1971, p. 375.
- 3) H. Fraenkel-Conrat, R.C. Bean, E.D. Ducay and H.S. Olcott: *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 393 (1952).
- 4) T. Iwasaki, T. Kiyohara and M. Yoshikawa: *J. Biochem.*, **70**, 817 (1971).
- 5) T. Ogiso, T. Noda, Y. Sako, Y. Kato and M. Aoyama: *J. Biochem.*, **78**, 9 (1975).
- 6) T. Mitsunaga: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 43 (1979).
- 7) M. Yamada, S. Santo, H. Yamaguchi, M. Tashiro, F. Ibuki and M. Kamamori: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2343 (1977).
- 8) T. Mitsunaga, Y. Kimura and M. Shimizu: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, in press.
- 9) O.H. Lowry N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 10) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 11) L. Ornstein and B. Davis: *Ann. New York*

- Arad. Sci.*, **321**, 404 (1964).
- 12) 高木俊夫, 三宅 淳, 菜島健司: 蛋白質・核酸・酵素, **15**, 447 (1977).
  - 13) A. Winter, Kristina EK and Ulla-Birgitta Andersson: LKB Application Note, 250, December (1977).
  - 14) H. Fritz, I. Trautschold and E. Werle: "Methods of Enzymatic Analysis" Vol. 2, ed. by H.U. Bergmeyer; Academic Press Inc., New York and London, 1974, p. 1064.
  - 15) 石井信一: "生化学実験講座 5 酵素研究法上", 東京化学同人, 1950, p. 73.
  - 16) T. Mistumaga: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 153 (1974).
  - 17) M. Tashiro and Z. Maki: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1119 (1978).