

# 黒大豆 (*Glycine max* MERRILL *forma* *Kuromame* MAKINO) のトリプシンインヒビターについて (第2報) —トリプシンインヒビターの性質—

清水 まゆみ, 片桐 千里

Trypsin Inhibitors of Kurodaizu (*Glycine max* MERRILL *forma*  
*Kuromame* MAKINO) (Part 2)  
—Characterization of Trypsin Inhibitors—

Mayumi Shimizu and Chisato Katagiri

前報<sup>1)</sup>において、黒大豆より11種のトリプシンインヒビターを分離したが、さらにこれらの諸性質について検討し、若干の知見を得たので報告する。

## 1. 実 験

1. 実験材料 黒大豆は兵庫県産丹波黒を用いた。トリプシン (牛豚臓, 2回結晶),  $\alpha$ -キモトリプシン (牛豚臓, 3回結晶), ペプシン (豚胃, 2回結晶) は Sigma 社製品を, プロナーゼは科研化学, ナガーゼは長瀬産業の製品を使用した。また,  $\alpha$ -N-ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (BANA) は財団法人蛋白質研究奨励会より, カゼインは Merck 社, ヘモグロビンは Difco 社より入手した。分子量測定用標準タンパク質は Schwarz/Mann 社の製品を使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. トリプシンインヒビターの調製 前報により単離したトリプシンインヒビターを用いた。各調製物は凍結乾燥した後、実験まで冷蔵保存した。

3. 分子量の測定 Shapiro ら<sup>2)</sup>の方法による SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。1% SDS を含む 7%ゲルを用い、0.1Mリン酸緩衝液 (1%SDS 含有, pH 7.1) 中に行った。

4. 等電点の測定 LKB 社製薄層ゲル等電点分離装置を使用し、アンホラインにより 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て測定した。

京都女子大学食物学科食品学第4研究室 (食品化学)

5. アミノ酸の分析 試料を 6M 塩酸中, 110°C で 24 時間加水分解後, 835 型日立高速アミノ酸分析計で分析した。

6. プロテアーゼ活性およびインヒビター活性の測定  
1) トリプシン活性の測定 カゼインを基質とする萩原らのカゼイン消化法<sup>3)</sup>の改良法<sup>4)</sup>, または合成基質 BANA を用いる Erlanger らの方法<sup>5)</sup>の改良法<sup>4)</sup>を用いた。

2)  $\alpha$ -キモトリプシン活性の測定 カゼインを基質とする萩原らのカゼイン消化法<sup>3)</sup>の改良法を用いた。すなわち, 0.2 ml の  $\alpha$ -キモトリプシン溶液 (25 mg %) と 0.5 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (5 mM CaCl<sub>2</sub> 含有, pH 8.0) を混合し, 37°C で 2 分間放置後, 1%カゼイン溶液 (pH8.0) 3 ml を加えて 37°C で 10 分間反応させた。次に 3 ml の反応停止液 (0.13 M トリクロル酢酸, 0.26 M 酢酸ナトリウム, 0.39 M 酢酸よりなる混合液) を加え, 10 分間放置した。これをろ過し, ろ液 1 ml をとり, 0.55 M 炭酸ナトリウム 5 ml と市販フェノール試薬 5 倍希釈液 1 ml を加え, 37°C で 20 分間放置した。この液の 660 nm における吸光度を測定し,  $\alpha$ -キモトリプシン活性とした。この際に 1%カゼイン溶液と反応停止液の添加を逆にしたものをブランクとした。

3) ペプシン活性の測定 ヘモグロビンを基質とする Anson の方法<sup>6)</sup>を改良して用いた。0.2 ml のペプシン溶液 (25 mg %) と 0.5 ml の水を混合し, 37°C で 2 分間放置後, 1.2% ヘモグロビン溶液 (0.13 M

NaCl 含有, pH1.8) 3 ml を加えて 37°C で10分間反応させた。次に 3 ml の反応停止液 (0.44 M トリクロル酢酸) を加え, 10分間放置した。これをろ過し, ろ液 1 ml をとり, 0.55 M 炭酸ナトリウム 5 ml と市販フェノール試薬 5 倍希釈液 1 ml を加え, 37°C で 20分間放置した。この液の 660 nm における吸光度を測定し, ペプシン活性とした。1.2% ヘモグロビン溶液と反応停止液の添加を逆にしたものをブランクとした。

4) プロナーゼ活性の測定 プロナーゼ溶液 (100 mg%) を用い, BANA を基質とするトリプシン活性の測定法と同じ方法で測定した。

5) ナガーゼ活性の測定 ナガーゼ溶液 (60 mg%) を用い,  $\alpha$ -キモトリプシン活性の測定法と同じ方法で測定した。

6) インヒビター活性の測定 各酵素液とインヒビター液を反応させた後, 同様の操作を行い, 吸光度 ( $T^*$ ) を求めた。これとインヒビターを含まないコントロール ( $T$ ) から次式により阻害度 ( $I$ ) を算出した。

$$I(\%) = 100(T - T^*)/T$$

## II. 結果および考察

1. 分子量の推定 黒大豆より単離した11種のトリプシンインヒビターについて, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量を推定した結果を Fig. 1

に示す。標準タンパク質として, インシュリン (M.W. 6,000), チトクロム C (M.W. 12,400), ミオグロビン (M.W. 17,800), キモトリプシノーゲン A (M.W. 25,000), オボアルブミン (M.W. 45,000) を用いた。11 種中, 最も分子量が小さかったのは 6b の7,200であり, 最も大きかったのは 7 で21,000と推定された。本研究では非透析性のトリプシンインヒビターを対象として単離を行ったが, 透析性と考えられる 6b が単離されたことは, 前報<sup>1)</sup>での分離精製条件にさらに検討が必要であることを示している。

2. 等電点の測定 各インヒビターの pI を測定した結果, 5b がおよそ 4.5 と最も低く, 次いで 6a, 6b, 7 が4.8~4.9という値を示した。最も高いのは 1b でおおよそ6.8であり, その他のインヒビター1a, 2, 3a, 3b, 4 および 5a の等電点はそれぞれ, 6.7, 6.2, 5.8, 5.7, 5.8および5.5であった。

3. アミノ酸組成 11種のインヒビターはすべてアスパラギン酸, セリン, グルタミン酸を多く含んでいた。

4. トリプシンに対する阻害活性の強さ BANA を基質とする方法で測定した。それぞれの試料について, 縦軸にトリプシン残存活性を, 横軸にインヒビター/トリプシンの重量比をとり, トリプシン残存活性曲線を描いた。この曲線のトリプシン残存活性50%の点より接線をのばし, 横軸との交点をトリプシン活性を 100% 阻害する重量比とした。この結果と先に推定し

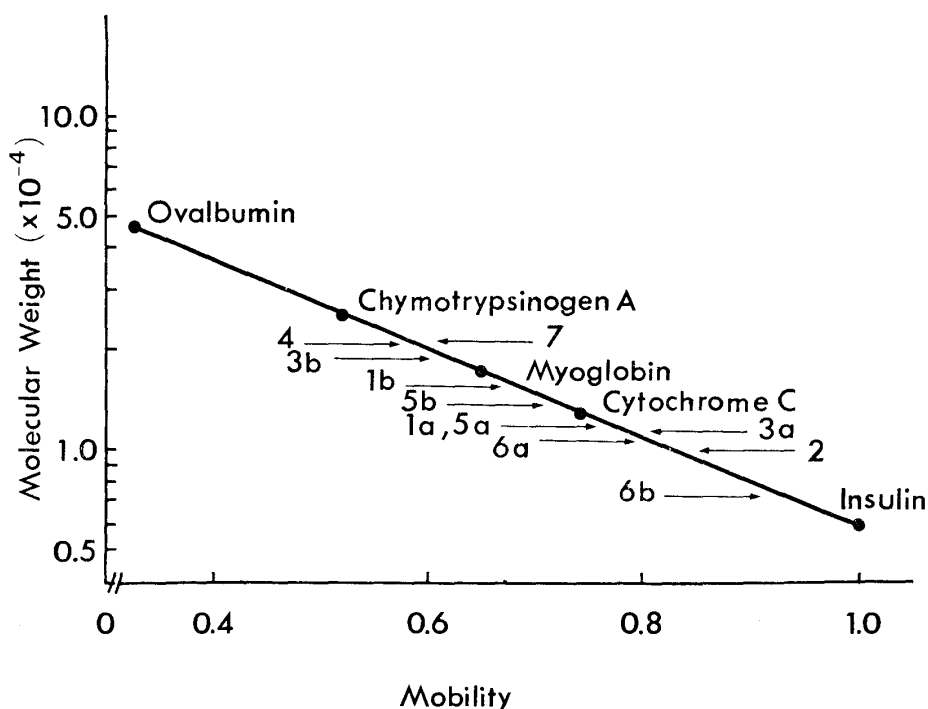


Fig. 1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量の推定

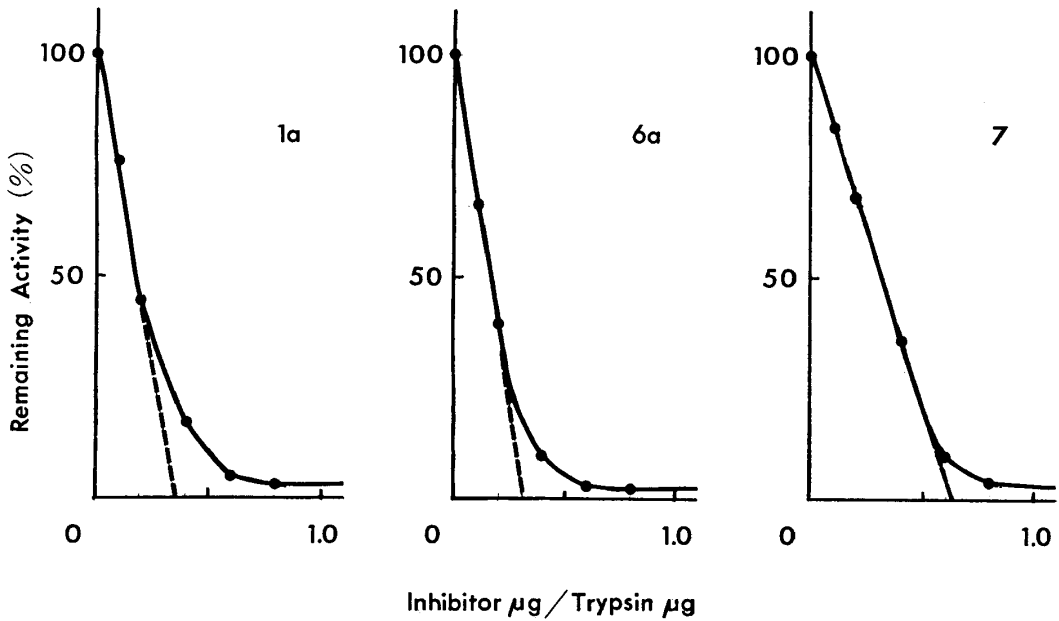


Fig. 2. トリプシンに対する阻害活性の強さ

た各インヒビターの分子量とを考え合わせると、トリプシン1モルに対し、5b と 6a は0.5モルが反応し、その他は1モルが反応することがわかった。各インヒビターともトリプシンと化学量論的に反応し、特に5b と 6a はトリプシンに対する反応中心が1分子当たり2個存在していると推察された。1, 6a, 7 についてのトリプシン残存活性曲線を Fig. 2 に示す。

5. トリプシンインヒビター活性の熱による影響 各インヒビターを 0.01 M リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、60, 80, 98°C の各温度で一定時間熱処理した後、カゼインを基質とする方法でトリプシンに対する

インヒビター活性の強さを測定した。各測定値は未処理のインヒビター活性を100%とした残存活性に換算した。その結果、60°C では60分間熱処理しても全インヒビターともまったく失活しなかった。80°C では60分間の加熱で 6a, 6b, 7 が6~7%失活する程度で、他のインヒビターは変化を示さなかった。98°C では2はまったく安定であり、他のインヒビターも30分で5~10%、60分で10~15%の活性を損失するのみであった。全インヒビターは極めて熱に安定であることが明らかになった。1a, 2, 7 についての結果を Fig. 3 に示す。

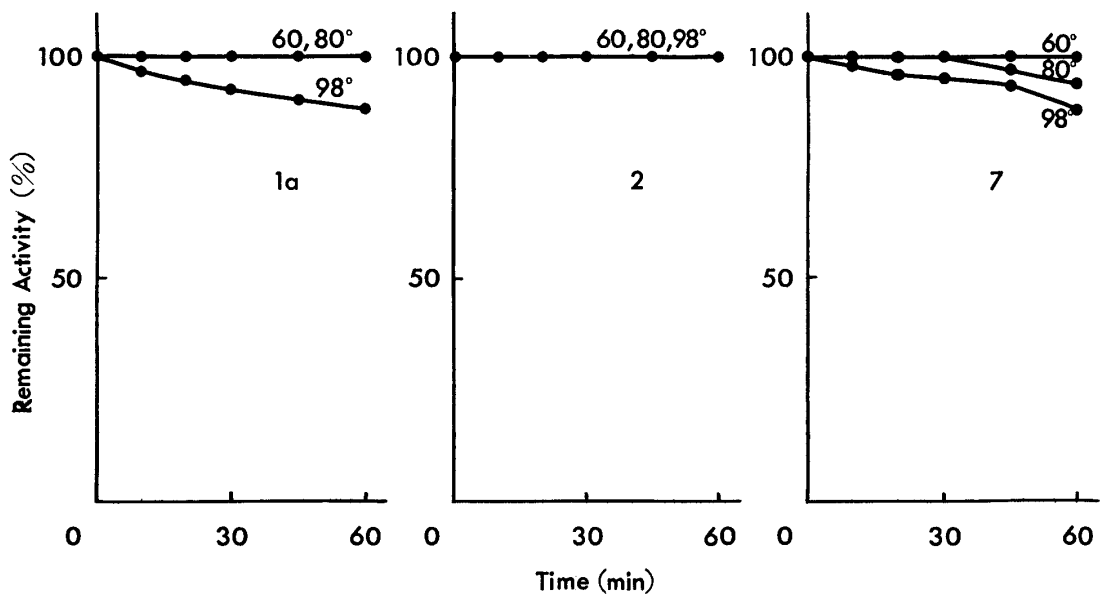


Fig. 3. トリプシンインヒビター活性の熱による影響

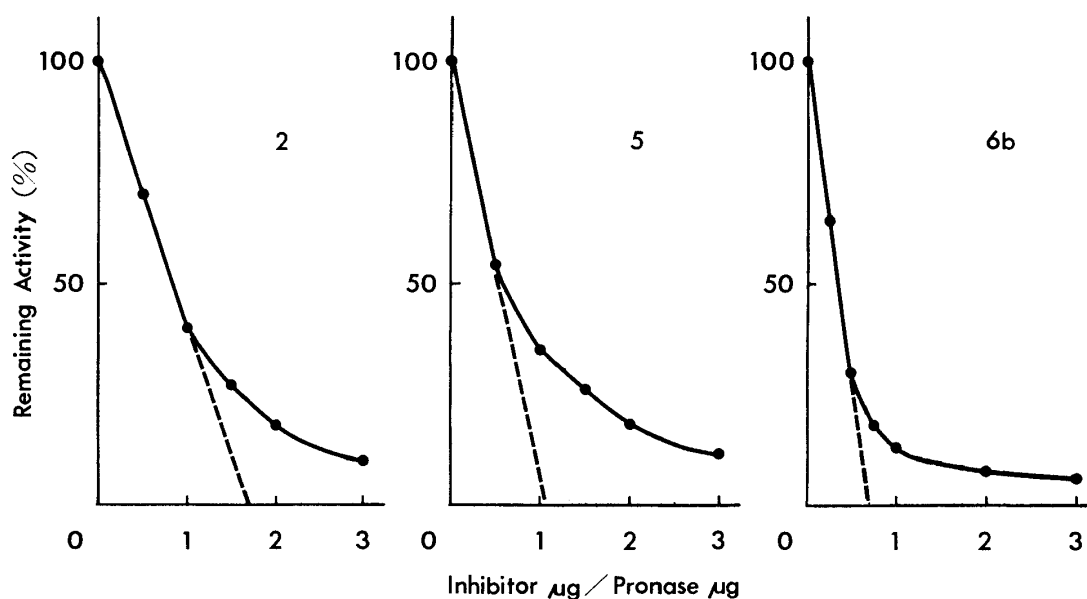


Fig. 4. プロナーゼに対するインヒビター活性

6. 他のプロテアーゼに対するインヒビター活性

1)  $\alpha$ -キモトリプシンに対するインヒビター活性 5, 6a, 6b, 7 が  $\alpha$ -キモトリプシンに対しインヒビター活性を示したが、化学量論的には反応しなかった。そ

の他のインヒビターはまったく活性を示さなかった。

2) ペプシンに対するインヒビター活性 全トリプシンインヒビターとも活性を示さなかった。

3) プロナーゼに対するインヒビター活性 全トリプシンインヒビターがプロナーゼに対して強く阻害した。重量比でプロナーゼ1に対し、0.5~1の比で阻害し、ほぼ化学量論的に反応することを示した。Fig. 4 は 2, 5, 6b についての阻害曲線である。プロナーゼ1に対し、2は1.7, 5はほぼ1, 6bは0.7の重量比で阻害した。

4) ナガーゼに対するインヒビター活性 すべて阻害活性をもたなかった。

以上、黒大豆より単離した11種のトリプシンインヒビターの諸性質について調べた。大豆のトリプシンインヒビターのうち、もっともよく研究され、知られているのは Kunitz インヒビター (STI) と Bowman-Birk インヒビター(BBI) だが、画分7は、STI の分子量が20,100<sup>7)</sup> であることとアミノ酸組成<sup>8)</sup> から比較してみるとほぼ一致しており、Kunitz 型インヒビターであろうと推察された。しかし、等電点<sup>9)</sup> がやや異なり、ヒスチジン含量に差があるため、さらに検討が必要である (Table 1)。また、画分 6b の分子量は BBI に近い値<sup>10)</sup> であるが、アミノ酸組成において半シスチン、セリン、プロリンの残基数<sup>11)</sup> が異なっており、別のインヒビターであると考えられる。

11種のトリプシンインヒビターは熱に対して非常に安定であり、プロナーゼに対しても阻害活性を示した。これらのことは黒大豆を食品として調理加工した場合、

Table 1. 画分7とSTIの比較

	Fraction 7	STI
Molecular weight	21,000	20,100
Isoelectric point	4.8~4.9	3.5~4.4
Amino acid composition (No. of residues per molecule)		
Aspartic acid	28	26
Threonine	9	7
Serine	15	11
Glutamic acid	21	18
Glycine	16	16
Alanine	11	8
Half-cystine	6	4
Valine	11	14
Methionine	1	2
Isoleucine	10	14
Leucine	10	15
Tyrosine	3	4
Phenylalanine	9	9
Lysine	10	10
Histidine	10	2
Arginine	9	9
Proline	10	10
Tryptophan	1	2

どのような挙動を示すのか非常に興味深いことである。

本研究を行うにあたり、御指導下さいました本学光永俊郎教授に深く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) 片桐千里, 清水まゆみ: 京都女子大学食物学会誌, 38, 17 (1983).
- 2) A.L. Shapiro and J.Y. Maziel: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815 (1967).
- 3) B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai and K. Okunuki: *J. Biochem.*, 45, 185 (1958).
- 4) 光永俊郎, 清水まゆみ: 農化, 56, 7 (1982).
- 5) B.F. Erlanger, N. Kokowsky and W. Cohen: *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271 (1961).
- 6) M.L. Anson: *J. Gen. Physiol.*, 22, 79 (1939).
- 7) T. Koide and T. Ikenaka: *Eur. J. Biochem.*, 32, 401 (1973).
- 8) T. Koide and T. Ikenaka: *Eur. J. Biochem.*, 32, 417 (1973).
- 9) I.E. Liener, and M.L. Kakade: "Toxic Constituents of Plant Foodstuffs", ed. by I.E. Liener, Academic Press Inc., New York, 1980, pp 14-17.
- 10) V. Frattali: *J. Biol. Chem.*, 244, 274 (1969).
- 11) M. Yamamoto and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, 62, 141 (1967).