

## トラ豆 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに関する研究

澤田小百合, 金森 正雄

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

## Studies on $\alpha$ -Amylase Inhibitor of Tora Bean (Phaseolus vulgaris)

Sayuri Sawada and Masao Kanamori

Department of Food Sciences, Faculty of Home Economics.

Mukogawa Women's University Nishino-miya, Hyogo 663, Japan

The inhibitor of  $\alpha$ -amylase was purified from the Tora bean (*Phaseolus vulgaris*) by heat treatment, ethanol fractionation, diethylaminoethyl cellulose (DEAE-C) ion exchange chromatography, gel filtration on a column of Sephadex G-150, chromatofocusing, and isoelectric focusing.

The inhibitor was found to be homogeneous by Disc polyacrylamid gel electrophoresis, but the inhibitor dissociated into different subunits in the presence of sodium dodecylsulfate (SDS).

The molecular weight of the inhibitor was 49,000 by the method of gel filtration and also carbohydrate content of the inhibitor was 16%.

An  $\alpha$ -amylase inhibitor of Tora bean inhibited porcine pancreatic and human salivary  $\alpha$ -amylase, but not inhibited bacterial, fungal or plant  $\alpha$ -amylase and plant  $\beta$ -amylase.

### 緒 言

多くの植物には Protease, Invertase, Polygalacturonase, Cellulase, Ribonuclease,  $\alpha$ -Amylase などの加水分解酵素作用を阻害する蛋白性の物質が存在することが知られている。 $\alpha$ -Amylase 活性を阻害するインヒビターは、大別して非蛋白性の低分子のもの(窒素を含んだオリゴ糖の構造を有し<sup>(1)</sup>、糖尿病の治療剤としての関心ももたれている)と蛋白質性のものとに分類される。

$\alpha$ -Amylase の蛋白質性インヒビターに関しては、約半世紀の間に、広く植物界に存在し、殊に小麦・キビ類などの穀物類、豆類および微生物の生産物などに存在することが報告<sup>(2)-(24)</sup>された。このインヒビターの大部分のものは、微生物および植物由来の $\alpha$ -Amylase に対しては、不活性であるが、昆虫および動物の $\alpha$ -Amylase に対しては、阻害作用を有している。この特異的な阻害は、大変に興味のあるところであり、その阻害のメカニズムの解明を目的に研究を進めてい

る。

本研究では約 28 種の日本産・外国産の豆類について  $\alpha$ -Amylase インヒビター活性を調べ、そのうち強いインヒビター活性を有していたトラマメについて、含まれる $\alpha$ -Amylase インヒビターの分類、精製と若干の性質について研究した結果について記述する。

### 材料と実験方法

#### 1. 材料

商品名アラスカ円豆, アルゼンチン落花生, 英国マロハットピース, カナダトラッパーピース, カナダファーバービーン, 北朝鮮キドニー, タイ国赤竹小豆, タイ国グリニマッペ, 中国雲南蚕豆, 中国大黒花芸豆, 中国張家口蚕豆, 中国シンボ蚕豆, ニュージーランドマロハットピース, ビルマバター, ビルマボケートビーン, 米国ウインターピース, 米国ピンクビーンズ, 米国ベビーライマ, 米国ホウトガーデン, 米国ミシガンピービーン, 北海道小豆, 北海道大福豆, 北海道手亡, 北海道中長享鳥, 北海道トラ豆, 北

海道白花豆など 28 種の豆類を大豆油糧協会から入手した。Porcine Pancreatic $\alpha$ -Amylase は, Sigma Chemical Co. から, その他の試薬類はナカライテスク KK から購入した。

## 2. $\alpha$ -Amylase Inhibitor の抽出と活性

測定豆を粉碎し 60mesh の篩を通して試料とし, 5 倍量の水を加えて 3 時間室温で攪拌抽出した後, 10000r. p. m., 30 分遠心分離し, 上澄液を pH4.0, 70 $^{\circ}$ C, 15 分加熱して, 存在する $\alpha$ -Amylase を不活性化した後, 中和し, 遠心分離後, 上澄液について $\alpha$ -Amylase インヒビター活性を調べた。

$\alpha$ -Amylase 活性と阻害活性は Bernfeld<sup>(25)</sup> の Dinitro-salicylic acid (DNS) を用いる $\alpha$ -Amylase 活性測定法に基づいて行った。即ち豆の粗抽出液 0.5ml に $\alpha$ -Amylase 0.5ml を加え, 30 $^{\circ}$ C, 25 分加温反応させたのち, 1% 可溶性澱粉 1ml を加えて 30 $^{\circ}$ C, 3 分加温し, DNS2ml を加え, 5 分沸騰湯煎中で処理し, 冷却後, 水 20ml を加えて 540nm での吸光度を測定した。

可溶性澱粉溶液から 1 mg マルトースを遊離する $\alpha$ -Amylase 活性を 1 単位として, 1 単位の $\alpha$ -Amylase 活性を 50% 低下させるインヒビター量をもって 1 阻害単位 (I. U.) とした。

## 3. $\alpha$ -Amylase Inhibitor の分離精製

豆の粉末試料に 5 倍量の水を加え, 室温で 3 時間攪拌抽出したのち, 10000r. p. m. で 30 分遠心分離した。上澄液を 1NHCl で pH4.0 とし, 75 $^{\circ}$ C, 15 分熱処理し, 生ずる沈殿を遠心除去し, 上澄液を 1N NaOH で pH7.0 とした。

次に -10 $^{\circ}$ C でエタノールによる分別沈殿を行って, エタノール 40%~80% で沈殿する画分を得て, 水に溶解した後, 透析して凍結乾燥標品を得た。

この試料を用いて DEAE-C によるイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。300 mg 試料を 5ml の 10mM McIlvaine buffer pH8.0 にとかし, 同 buffer で平衡化した DEAE-C カラム (2.5 $\times$ 40 cm) に吸着させ, NaCl 0~0.5M の直線濃度勾配で溶出した。

また, この試料を用いて SephadexG-150 によるゲルろ過を行った。100 mg 試料を 5ml の 5mM CaCl<sub>2</sub> を含む 50mM 酢酸 buffer, pH5.0 に溶解し Sephadex G-150 カラム (2.5 $\times$ 90 cm) を用いてゲルろ過した。

## 4. 電気泳動

ディスク電気泳動は Davis<sup>(26)</sup> の方法に従って 7.5% polyacrylamid gel を用い, SDS 電気泳動は

Weber<sup>(27)</sup> らの方法により 12.5% polyacrylamide gel を用いて行った。分子量マーカーとしてはファルマシア社のカリブレーションキットを用いた。焦点電気泳動は, Wrigley<sup>(29)</sup> の方法により polyacrylamide を支持体とするゲル等電点分離法と Vesterberg<sup>(30)(31)</sup> らのカラムを用いる密度勾配等電点分離法を改良した著者<sup>(32)</sup> らの方法によって行い等電点を決定した。さらに蛋白質をその等電点で分離するカラムクロマトグラフィーによるクロマトフォーカシング法により等電点を調べた。

## 5. 糖の分析

マルトースを標準として Dubois<sup>(33)</sup> らの方法によりフェノール硫酸法により測定した。

## 6. 分子量の測定

Sephadex G-75 によるゲルろ過法で分子量を測定した。標準蛋白質としては牛血清アルブミン(分子量 67,000), オボアルブミン(分子量 43,000), キモトリプシノーゲン A (分子量 25,000), リボヌクレアーゼ A (分子量 13,000) を用いた。

## 7. アミノ酸分析

試料を 6NHCl で 110 $^{\circ}$ C, 24 時間および 48 時間加水分解したのち, 日立 835 型 Amino Acid Analyzer を用いて分析した。

# 実験結果および考察

## 1. 各種豆類の $\alpha$ -Amylase Inhibitor 活性

大豆油糧協会から入手した 28 種の豆について $\alpha$ -Amylase インヒビター活性を調べた結果を, Table-1 に示した。28 種の豆のうち 8 種に阻害活性が認められ, トラ豆に強い阻害活性があった。

## 2. トラ豆 $\alpha$ -Amylase Inhibitor の精製

トラ豆粉末の水抽出液を熱処理したのち, エタノール 40%~80% 分画を行った。この試料を DEAE-C カラムにかけて 0~0.5M NaCl グラジエント溶出した結果を Fig-1 に示した。未吸着部分にはインヒビター活性はなく, 約 0.2M NaCl 濃度で溶出された fraction No.50~90 画分に活性が認められた。

次に上記エタノール 40%~80% 画分を用いて Sephadex G-150 によるゲルろ過を行った結果を Fig-2 に示した。画分 I に大部分の阻害活性が認められた。更にこの画分 I を用いてクロマトフォーカシング及び焦点電気泳動分析を行った結果は Fig-3, Fig-4 の如くであり, 何れもピーク II に強い阻害活性が認められた。この結果からトラ豆 $\alpha$ -Amylase インヒビ

ターは、pH4.6 付近に等電点を有していることが認められた。クロマトフォーカシング、焦点電気泳動分析により得られた純化試料について、阻害活性を調べたところ、比活性は約 30 倍に純化されていた。この純化試料について Disc-PAG 電気泳動及び SDS-PAG 電気泳動を行った結果、Disc-PAGE ではブロードな単一ピークを示したが、SDS-PAGE では 2 つの subunit から成ることが認められた。還元剤の存、否によっても電気泳動パターンの相違はなく、また後述のアミノ酸分析結果からシステインの存在が認められないことから、subunit 間には -s-s- 結合の関与は考えられなく、水素結合によるものであることが推定される。Power<sup>(11)</sup>らがインゲン豆について 4 つの subunit を認め糖との結合の相違を論議しているが、subunit の数、構造については今後の重要な研究課題であり、最近の山口<sup>(23)</sup>の白インゲン豆についての subunit 構造についての詳細な研究は、大変示唆に富み、興味深いものである。

Table 1.  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activity of Several Beans

Market Name of Bean	$\alpha$ -Amylase Inhibitory Activity (units/g)
Tora Bean (Hokaido)	251.7
Pea Bean (U.S.A.)	200.2
Daifuku Bean (Hokaido)	106.5
Taisho Kintoki Bean (Hokaido)	70.8
Otebo Bean (Hokaido)	57.4
Kidney Bean (Korea)	53.9
Shirohana Bean (Hokaido)	37.5
Pink Bean (U.S.A.)	35.8
White Garden Bean (U.S.A.)	30.5
Daikoku Hanagei Bean (China)	16.6

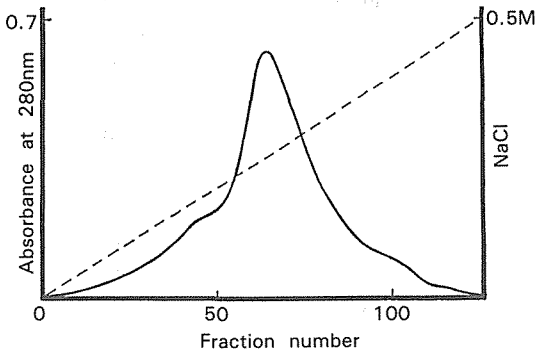


Fig. 1. Ion exchange chromatography of 40~80% ethanol fraction on a DEAE-cellulose column.

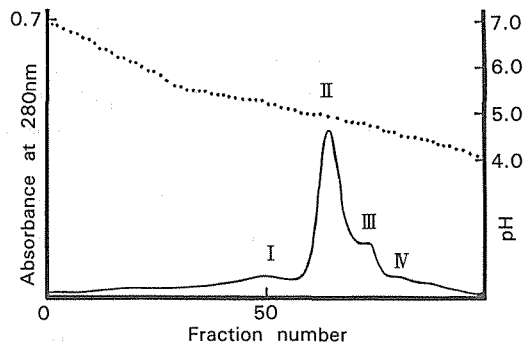


Fig. 3. chromatofocusing pattern of Tora bean  $\alpha$ -amylase inhibitor.

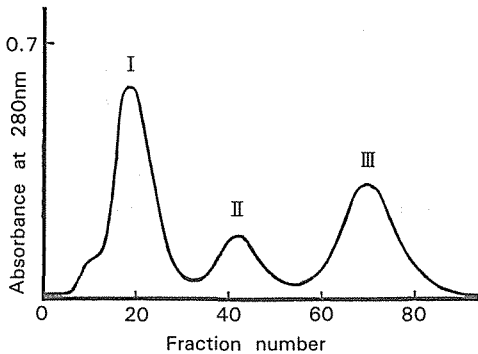


Fig. 2. Gel filtration of 40~80% ethanol fraction on a Sephadex G-150.

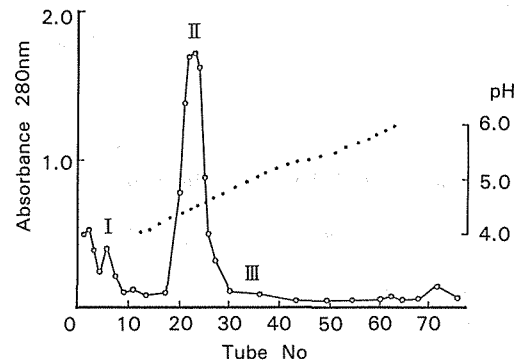


Fig. 4. Isoelectric focusing pattern of Tora bean  $\alpha$ -amylase inhibitor.

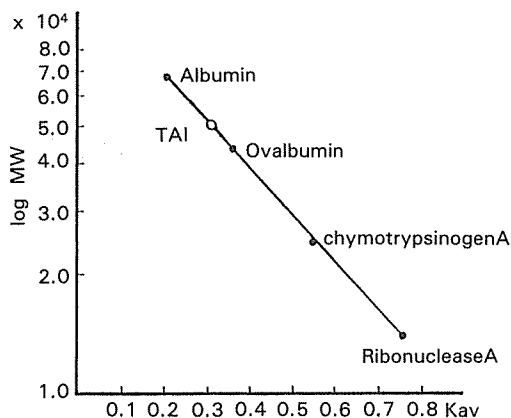


Fig. 5. Estimation of molecular weight of Tora bean  $\alpha$ -amylase inhibitor by gel filtration on Sephadex G-75.

次にこの純化試料について、その分子量を測定した結果を Fig-5 に示した。標準物質をプロットして得られた直線とインヒビターの  $K_{av}$  値からトラ豆  $\alpha$ -Amylase インヒビターの分子量は約 49,000 と推定された。またフェノール硫酸法によって糖含量を測定した結果、約 16% の糖を含有していた。インゲン豆<sup>(8)(10)(17)</sup>と比較するとトラ豆  $\alpha$ -Amylase インヒビターの分子量はほぼ類似するが、糖含量に差が認められる。種による糖鎖構造、含量、subunit の数、構成アミノ酸の種類と含量の差違が推定される。

### 3. アミノ酸組成

純化試料のアミノ酸組成を調べたところ Table-2 に示した如くであり、システインは検出されなかった。アスパラギン酸含量は高く、セリン、バリン、スレオニン、グルタミン酸などの含量も高かった。糖含量が高いことから、糖の結合部位はアスパラギン酸であろうと推定されるが、糖鎖構造とその結合部位は検討すべき課題である。

Table 3. Inhibition of Various  $\alpha$ -Amylases by the Purified Tora Bean Inhibitor

origin	Inhibition (%)
Porcin pancreas	100
Human saliva	100
Barley malt	0
Bacillus licheniformis	0
Aspergillus oryzae	0

### 4. 各種の $\alpha$ -Amylase に対する阻害

各種の  $\alpha$ -Amylase に対する阻害を調べた結果を Table-3 に示した。トラ豆  $\alpha$ -Amylase インヒビターはブタ膵臓  $\alpha$ -Amylase 及びヒト唾液  $\alpha$ -Amylase を強く阻害し、大麦麦芽  $\alpha$ -Amylase である植物起源の  $\alpha$ -Amylase 及びバクテリア、カビなどの微生物起源の  $\alpha$ -Amylase 活性を阻害しなかった。なお小麦、粟など穀類の  $\alpha$ -Amylase に対する阻害作用の特異性についての報告が<sup>(34)(35)(36)</sup>あり、更に昆虫の  $\alpha$ -Amylase に対する阻害作用に関する研究<sup>(8)(10)(17)</sup>などから考察すると、トラ豆など豆類の  $\alpha$ -Amylase インヒビターの存在意識は、外敵に対する防御機構のためであろうと考えられるが、そのメカニズムについては検討研究する必要がある。

Table 2. Amino Acid Composition of  $\alpha$ -Amylase Inhibitors

Amino Acid	TAI
ASP	58
THR	36
SER	53
GLU	29
PRO	14
GLY	41
ALA	32
CYS	—
VAL	35
MET	3
ILE	19
LEU	19
TYR	9
PHE	16
LYS	15
HIS	5
ARG	10

Number of residues per molecule of protein

文 献

1. Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D.D., & Wingender, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20** 744-761 (1981)
2. Bowman, D.E., *Science* **102** 358-359 (1945)
3. Jaffé, W.G. & Lette, G.L.V., *J. Nutrition* **94** 203-210 (1968)
4. Hernandez, A. & Jaffé, W.G., *Acta. Cient. Venezolano* **19** 183-185 (1969)
5. Shainkin, R. & Birk, Y., *Biochem. Biophys. Acta* **221** 502-513 (1970)
6. Jaffé, W.G., Moreno, R & Wallis, V., *Nutr. Rep. Intern.* **7** 169-174 (1974)
7. Marshall, J. J., *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **15** 244-266 (1975)
8. Marshall, J. J. & Lauda, C. M., *J. Biol. Chem.* **250** 8030-8037 (1975)
9. O'Donnell, M. D., & McGreeney, K. F., *Biochim. Biophys. Acta.* **422** 159-169 (1976)
10. Powers, J. R. & Whitaker, J. R., *J. Food Biochem.* **1** 217-238 (1977)
11. Powers, J. R. & Whitaker, J. R., *J. Food Biochem.* **1** 239-260 (1977)
12. Pick, K. H. & Wöber, G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359** 1371-1377
13. Granum, P. E., *J. Food Biochem.* **2** 103 (1978)
14. Blanco-Labra, A., & Iturbe-Chinas, F. A., *J. Food Biochem.* **5** 1 (1981)
15. Sharma, K. K., & Pattabiraman, T. N., *J. Sci. Food Agric.* **33** 255 (1982)
16. Hoover, R. & Sosulski, F., *Stärke* **36** 246-250 (1984)
17. Frels, J. M. & Rupnow, J. H., *J. Food Biochem.* **8** 281-301 (1984)
18. Lajolo, F. M. & Finardi-Filho, F., *J. Agric. Food Chem.* **33** 132-138 (1985)
19. Frels, J. M. & Rupnow, J. H., *J. Food Sci.* **50** 72-77 (1985)
20. Cinco, F. J., Frels, J. M., Holt, D. L., & Rupnow, J. H., *J. Food Sci.* **50** 533-534 (1985)
21. Kotaru, M., Saito, K., Yoshikawa, H., Ikeuchi, T., & Ibuki, F., *Agric. Biol. Chem.* **51** 577-578 (1987)
22. Moreno, J., Altabella, T., & Chrispeels, M. J., *Plant Physiol.* **92** 703-709 (1990)
23. Yamaguchi, H., *J. Biochem.* **110** 785-789 (1991)
24. Lajolo, F. M., Filho, F. F., & Menezes, E. W., *Food Technology* **9** 120-121 (1991)
25. Bernfeld, P., *Methods in Enzymol.* **1** 149-158 (1955)
26. Davis, B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121** 404-424 (1964)
27. Weber, K., & Osborn, M., *J. Biol. Chem.* **244** 4406-4412 (1969)
29. Wrigley, C. M., *Methods in Enzymol* **22** 559-564 (1971)
30. Vesterberg, O., & Svensson, H., *Acta. Chem. Scand*, **20** 820-834 (1966)
31. Vesterberg, O., *Acta. Chem. Scand*, **23** 2653-2666 (1969)
32. Ibuki, F., & Kanamori, M., *Sci. Rep Kyoto Pref. Univ.* **29** 95-100 (1977)
33. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F., *Anal. Chem.* **28** 350 (1956)
34. Kotaru, M., Yoshikawa, H., Ikeuchi, T., Saito, K., Iwami, K., & Ibuki, F., *J. Nutr. Sci. Vitaminol* **33** 359- (1987)
35. Buonocore, V., Petrucci, T., & Silanon, V., *Phytochemistry* **16** 811- (1977)
36. Kutty, A. V. M., & Pattabiraman, T. N., *J. Food Biochem.* **10** 117- (1986)