

穀類におけるシステインプロテアーゼインヒビターの存在

田代 操・倉田明枝・牧 善輔

Occurrence of Cysteine Proteinase Inhibitors in Cereals

MISAO TASHIRO, AKIE KURATA, and ZENSUKE MAKI

Seeds of corn (*Zea mays* L.), foxtail millet (*Setaria italica*), barnyard millet (*Echinochloa utilis*), wheat (*Triticum aestivum* L.), and barley (*Hordeum distichum* L.), and bran of rice (*Oryza sativa* L.) have been examined for cysteine proteinase inhibitor activity using papain as a target enzyme.

All of the crude samples prepared from the NaCl extracts of these cereals by ammonium sulfate fractionation were found to contain a substance(s) inhibiting papain. The highest inhibitory activity was shown in corn, followed by foxtail millet, and the other cereals had only weak activity. Heat treatments of the crude samples at 90°C and pH 7.5 revealed that the inhibitors from corn, foxtail millet, and barnyard millet were thermo-stable, whereas those from wheat, barley, and rice thermo-labile. Preliminary experiments concerning foxtail millet indicated that the grain contained at least a proteinaceous cysteine proteinase inhibitor having an isoelectric point of 4.9 and a molecular weight of 13,000, and this inhibitor was relatively stable under alkaline conditions.

(Received August 10, 1990)

I 緒 言

穀類は人間の主要なエネルギー源であるとともに、重要なタンパク質源の一つでもある。さらに、穀類には種々の生理活性物質が含まれており、これらの生理学および栄養学的意義に関しては重大な注目が払われている。

穀類に存在する生理活性物質の一つに、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) を阻害するタンパク質性の物質、いわゆるプロテアーゼインヒビターと呼ばれる一群の物質がある¹⁾。このうち、トリプシン等のセリンプロテアーゼを阻害する物質はセリンプロテアーゼインヒビターと呼ばれ、その栄養学的重要性から数多

くの研究がなされている^{2,3)}。一方、パパイン等のシステインプロテアーゼを阻害する物質、システインプロテアーゼインヒビターに関しては、近年、米胚乳よりオリザシスタチンと命名された物質の単離精製⁴⁾を除いては見るべき研究はない。植物起源システインプロテアーゼインヒビターの存在意義、さらに動物に摂取された時の栄養生理学的效果についても、現在ほとんど不明の段階であり、本物質についてはさらに研究を進めていくことが重要と考えられる。

本論文では、トウモロコシ、アワ、ヒエ、小麦、大麦の種子、および米糠を題材として、それらにおけるシステインプロテアーゼインヒビターの存在について

検索した結果を報告する。また、アワ種子に認められたインヒビターに関して、その若干の性質を検討した結果についても併せて報告する。

II 実験材料および方法

1) 実験材料

トウモロコシ、アワ、ヒエ、小麦、大麦の全粒は市販品を用い、脱穀することなくミルで粉碎し、つづいて冷アセトンで脱脂したものを風乾し試料とした。また、米糠については市販品を直接先と同様に脱脂後風乾したものを試料とした。パパイン (Type III, 2 回再結晶物) は米国 Sigma 社より、カゼインは西独 Merck 社より購入した。透折用のセルロースチューブ (M. W. cut off 8,000) はナカライテスク社より得た。

2) タンパク質の定量

タンパク質は牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法⁵⁾により定量した。またパパイン溶液のタンパク質定量には、E_{1%}^{1cm}=25.0 (at 278 nm)⁶⁾を用いる紫外吸光度法を使用した。

3) システインプロテアーゼインヒビター活性の測定

システインプロテアーゼインヒビター活性は、標的酵素としてパパイン、基質としてカゼインを用い、インヒビター試料存在下での残存パパイン活性から評価した。すなわち、パパイン水溶液 (0.05mg/ml) 0.1 ml, 活性化剤 (60mM システイン, 24mM エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム塩, pH7.5) 0.3ml に、インヒビター試料および 0.1M トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) を加え全量を 1.6ml とする。37℃ でプレインキュベーションした後、2 ml の基質溶液 (1.8g のカゼインを 100ml のトリス緩衝液に溶解し、さらに 2 N NaOH で pH を 7.5 に調整したもの) を加え酵素反応を開始する。正確に 37℃, 30 分間反応後、10% トリクロロ酢酸 3 ml を加え反応を停止させ、Toyo No. 5 C の濾紙で反応混合液を濾過し、濾液の 280nm での吸光度を測定した。なお盲検としては、インヒビター試料に内在するプロテアーゼ活性を考慮するため、酵素溶液を加えずに上と同様の処理を行い、反応停止後酵素溶液を加えたものを使用した。

なお、パパインの 1 酵素単位は、上述の反応系において、280nm での吸光度を 1 分間当り 0.001 増加させる酵素量と定義し、1 阻害単位 (1 IU) は 1 酵素単位を阻害するインヒビター量と定義した。

4) 粗インヒビター調製品の作成

各穀物のアセトン脱脂粉末試料 200g に 5 倍量の 1

% 食塩水を加えホモジナイズし、遠心分離 (10,000 g, 15 分間) し上清を得た。残渣をさらに同様に処理し、得られた上清と先の上清を合わせて抽出液とした。この抽出液に 90% 飽和となるよう固体硫酸を加え、一夜放置後、沈殿物を濾別した。つづいて沈殿を少量の蒸留水に懸濁し、セルロースチューブを用いて蒸留水に対して透折した。透折終了後、透折内液を遠心分離し、得られた上清を凍結乾燥し、これを粗インヒビター調製品とした。

5) 粗調製品の熱処理

各種穀類より得た上述の粗インヒビター調製品を 0.1M トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、その 3 ml を 90℃ で各々 5, 10, 15 分間処理した。各時間の加熱終了後、氷水中で急冷し、遠心分離 (10,000 g, 10 分間) で沈殿を除去し、上清のインヒビター活性とタンパク質量を測定した。なお、粗インヒビター溶液の初濃度は次の様であった。トウモロコシ 2.0mg/ml, アワ 2.0mg/ml, ヒエ 4.0mg/ml, 小麦 10.0mg/ml, 大麦 10.0mg/ml, 米糖 4.0mg/ml。また、インヒビター活性測定に用いた上清の量は、トウモロコシ 0.2ml 以外はすべて 0.5ml であった。

6) 焦点電気泳動

120ml 容積のカラムで、pH 4 ~ 6 の carrier ampholyte (LKB 社製) を使用し、アワ粗インヒビター調製品 30mg を 4℃ で 82 時間電気泳動した。なお、泳動の最初 2 時間は 200V で、残りは 450V の定電圧を用いた。泳動終了後、カラム内容液を 2 ml ずつ分画し、280nm での吸光度、pH、インヒビター活性を測定した。

7) ゲル濾過

アワ粗インヒビター試料 50mg を 2 ml の 0.1M 食塩を含む 0.1M トリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、遠心分離後、上清を Sephadex G-75 カラム (2.5 × 54cm) に添加した。溶出液には上述のトリス緩衝液を用い、流速は 10ml/hr, 3.5ml ずつ分画し、280nm での吸光度とインヒビター活性を測定した。分子量推定のために、標準タンパク質 (牛血清アルブミン MW67,000, 卵白アルブミン MW45,000, キモトリプシノーゲン A MW25,000, ミオグロビン MW17,800, チトクローム c MW12,300) を上と同様にゲル濾過した。

8) pH 安定性

緩衝液として、pH 2, 3 は 0.05M 酢酸ナトリウム・塩酸系を、pH 4, 5 は 0.05M 酢酸ナトリウム・酢酸

系を, pH 6, 7は0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液を, pH 8, 9は0.05Mホウ酸ナトリウム・リン酸1ナトリウム系を, pH10, 11は0.05M炭酸ナトリウム・ホウ酸ナトリウム緩衝液を使用した。これらの緩衝液各3 mlにアワ粗インヒビター試料 (20mg/ml水溶液) 1 mlを加え, 37°Cで2時間および24時間放置した。放置後, 各溶液の1.5mlに6 mlの0.2Mトリス・塩酸緩衝液 (pH7.5) を加え, pHを7.5にした後, その1.2 mlを試料としてインヒビター活性を測定した。

III 実験結果および考察

1) 各種穀類の粗インヒビター調製品のパパイン阻害活性

トウモロコシ, アワ, ヒエ, 小麦, 大麦の種子および米糠の1%食塩水による抽出液は明瞭なパパイン阻害活性を示さなかった。そこで各抽出液を硫酸90%飽和して得た粗調製品に関しそれらのパパイン阻害活性を検討した。Fig. 1はその結果を示したものである。いずれの調製品もその量が増すに従いパパイン活性を強く阻害する傾向を示した。したがって, ここで調べ

られた穀類についてはすべてシステインプロテアーゼインヒビターを含んでいるものと結論できる。粗調製品1 mg当りの阻害活性は, トウモロコシ20.4 IU, アワ6.8 IU, ヒエ2.4 IU, 小麦1.7 IU, 大麦0.8 IU, 米糠3.0 IUであり, また比活性 (IU/mgタンパク質) は, トウモロコシ25.5, アワ7.2, ヒエ3.3, 小麦3.3, 大麦1.5, 米糠4.0であった。トウモロコシが最も高い活性を示し, つづいてアワ, 残りの穀類については皆低い阻害活性しか示さなかった。また, Fig. 1に見られる様に, トウモロコシとアワについては阻害が80~90%まで直線的であり, 両者についてはパパインに特異的あるいは強い親和性を有するインヒビターの存在が考えられた。なお, トウモロコシに関してはすでにシステインプロテアーゼインヒビターの存在が報告されており⁷⁾, 本実験結果もそれを確認するものと言える。米糠に関してはあまり高い活性は認められなかったが, 米胚乳からはすでにオリザシスタチンが単離されており⁴⁾, 今後は米糠に存在するインヒビターとオリザシスタチンが同一物質か否かを検討することが課題となろう。

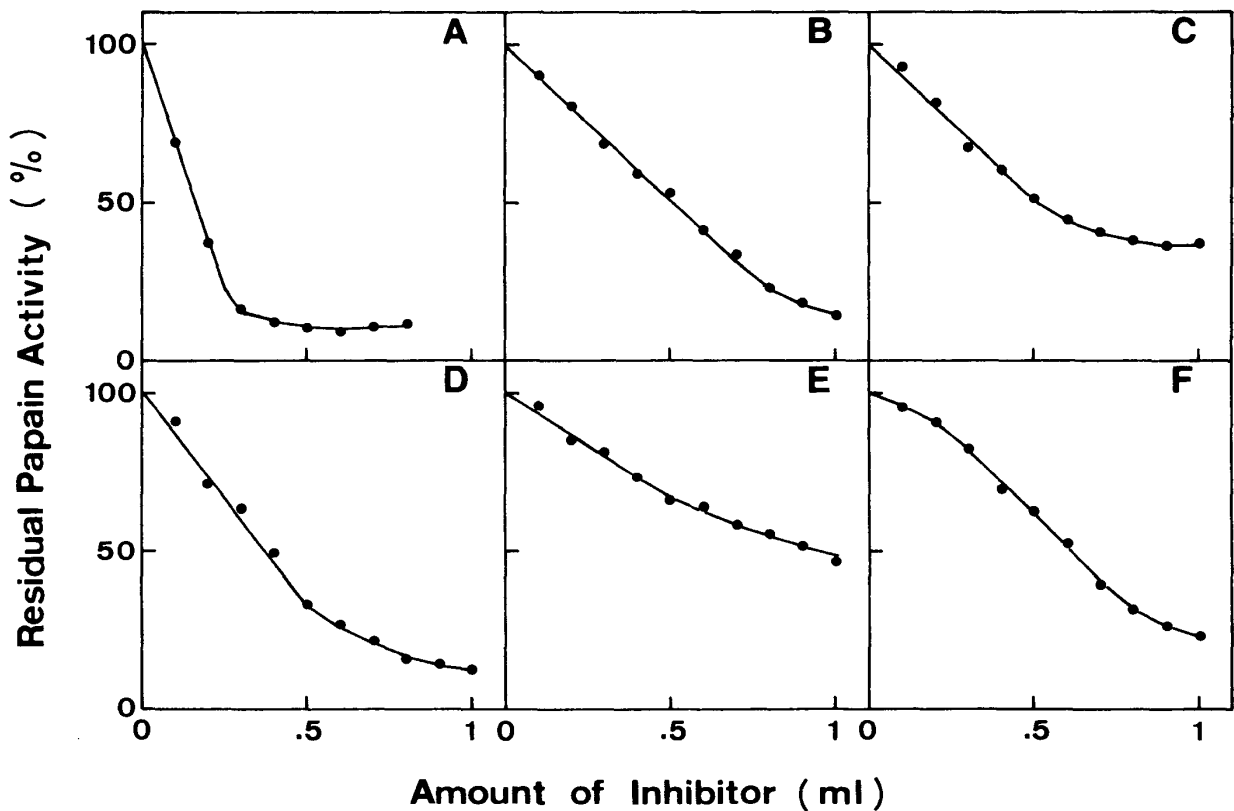


Fig. 1. Papain inhibitory activities of the crude preparations from cereals. A, corn seed (2 mg/ml) ; B, foxtail millet seed (2 mg/ml) ; C, barnyard millet seed (6 mg/ml) ; D, wheat seed (10mg/ml) ; E, barley seed (10mg /ml) ; F, rice bran (4 mg/ml) .

2) 熱安定性

各種穀類の粗インヒビター調製品を90℃、pH 7.5で0～15分間熱処理した時のパイン阻害活性における変動をFig. 2に示す。トウモロコシ (A), アワ (B), ヒエ (C) では15分間の熱処理でも約80%以上の阻害活性が残存していたのに対し、小麦 (D), 大麦 (E), 米糠 (F) では50～90%の阻害活性が失われた。また、15分間の熱処理された各試料の比活性は、トウモロコシ30.0, アワ13.4, ヒエ6.1, 小麦2.0, 大麦0.4, 米糠0.5となり、トウモロコシ, アワ, ヒエについては熱処理前の比活性より上昇していたのに対し、小麦, 大麦, 米糠では下降していた。したがって、トウモロコシ, アワ, ヒエのシステインプロテアーゼインヒビターはpH 7.5では耐熱性であると結論できる

とともに、その精製には熱処理が有効であることも示唆された。一方、小麦, 大麦, 米糠のインヒビターは明らかに熱不安定性と言える。なお、米糠の結果については、熱安定性と報告されているオリザシスタチン⁴⁾と対照的であり、両者の同一性に関する興味ある知見を与えているものと考えられる。

3) アワ種子インヒビターの性質

本研究においてはトウモロコシとアワの粗調製品が比較的高いパイン阻害活性を示したが、その内、インヒビターの報告がほとんどされていないアワに焦点を絞り、そのインヒビターの性質に関し若干の検討を加えた。

Fig. 3はアワ粗インヒビターを焦点電気泳動した

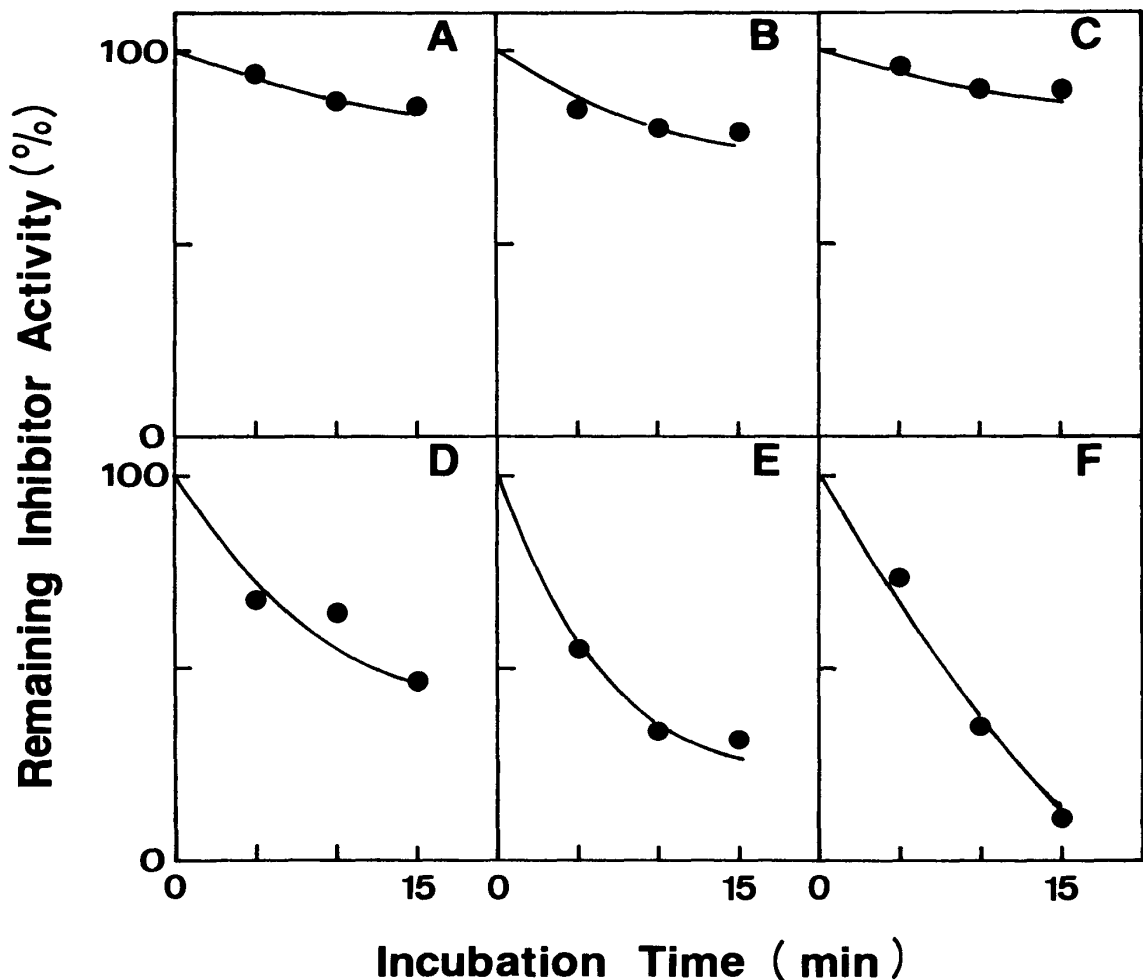


Fig. 2. Stabilities of cysteine proteinase inhibitors in the crude preparations from cereals to heat treatment at 90℃ and pH 7.5.

A, corn seed ; B, foxtail millet seed ; C, barnyard millst seed ; D, wheat seed ; E, barley seed ; F, rice bran.

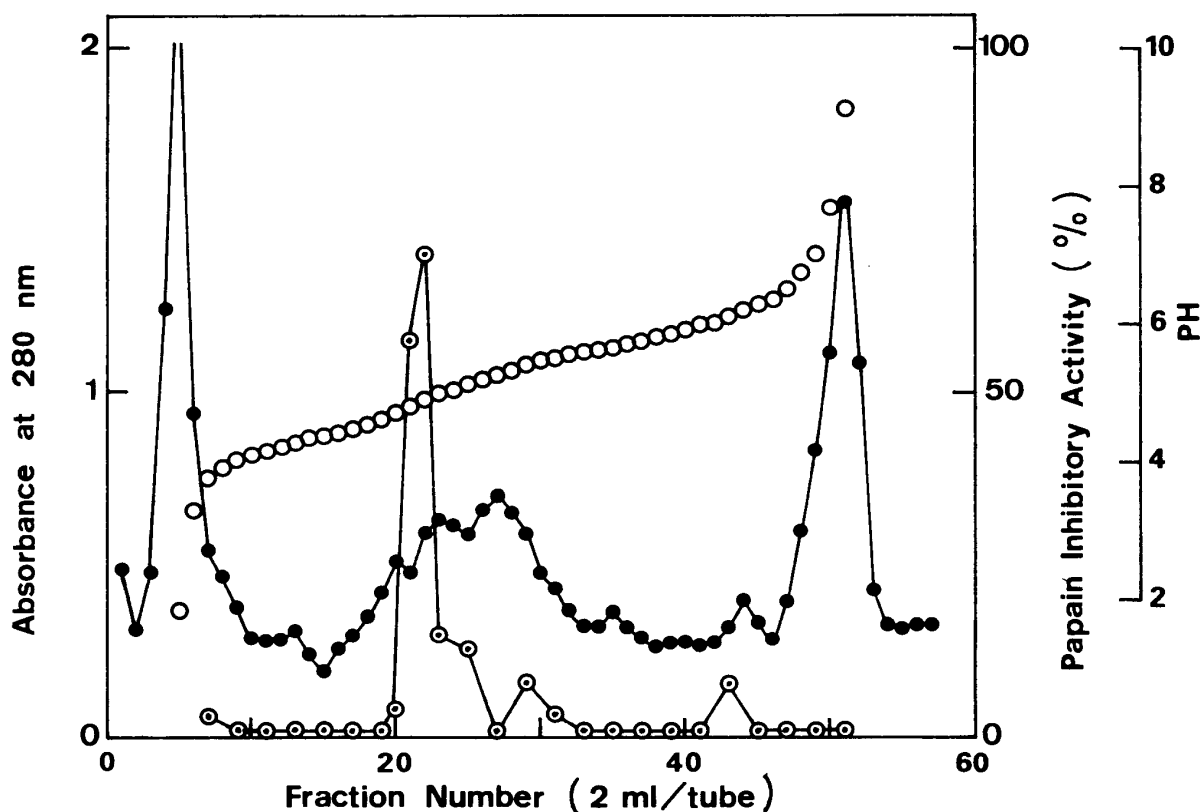


Fig. 3. Isoelectric focusing of the crude cysteine proteinase inhibitor preparation from foxtail millet seed.

●—●, absorbance at 280 nm ; ●—●, papain inhibitory activity ; ○, pH.

時の結果を示している。pH 3.5~10のcarrier ampholiteを用いた焦点電気泳動の予備実験において、パパイン阻害活性の主要ピークがpH 5付近で認められたので、本実験ではpH 4~6のcarrier ampholiteを用いてより詳細に検討した。図に示されている様に、主要な阻害活性のピークはpH 4.9に認められ、これよりアワ粗インヒビター調製品に存在するシステインプロテアーゼインヒビターの大部分は等電点4.9を有するタンパク質であることが示唆された。なお、米胚乳に存在するオリザシスタチンの等電点は5.3と報告されており⁴⁾、アワのインヒビターはそれと非常に近い値を示した。

Fig. 4にアワ粗インヒビターのSephadex G-75でのゲル濾過溶出パターンを示す。パパイン阻害活性は単一ピークとして検出され、その分子量は、標準タンパク質のゲル濾過から得られた分子量検量曲線より13,000と評価された。

アワ粗インヒビター調製品をpH 2~11の条件下、37℃でインキュベーションした時のパパイン阻害活性における変動をFig. 5に示す。粗調製品の阻害活性

は、pH 3以下の条件下では、2時間のインキュベーションによりほぼ完全に失われた。一方、pH 7以上では90%以上の阻害活性を保っていた。24時間のインキュベーションでは、さらにpH 4以下で完全に活性を失い、pH 10以上でも活性の低下が認められた。これより、アワのシステインプロテアーゼインヒビターは比較的アルカリ条件下、特にpH 8付近で安定であると思われる。しかしながら、本インヒビターのpH安定性に関しては、本実験では粗調製品を用いたこともあり、真のpH安定性を表していない可能性も考えられる。すなわち、試料に内在するプロテアーゼの活性化と至適pH域でのインヒビターに対する攻撃などが考えられる。これらの点に充分考慮しながらインヒビターの精製を進めていくことが今後の課題となろう。

IV 要 約

トウモロコシ、アワ、ヒエ、小麦、大麦の種子および米糠について、システインプロテアーゼインヒビター活性の有無を検索した。各穀類の1%食塩水抽出液を硫酸90%飽和して得た粗調製品は、すべて、パパイン

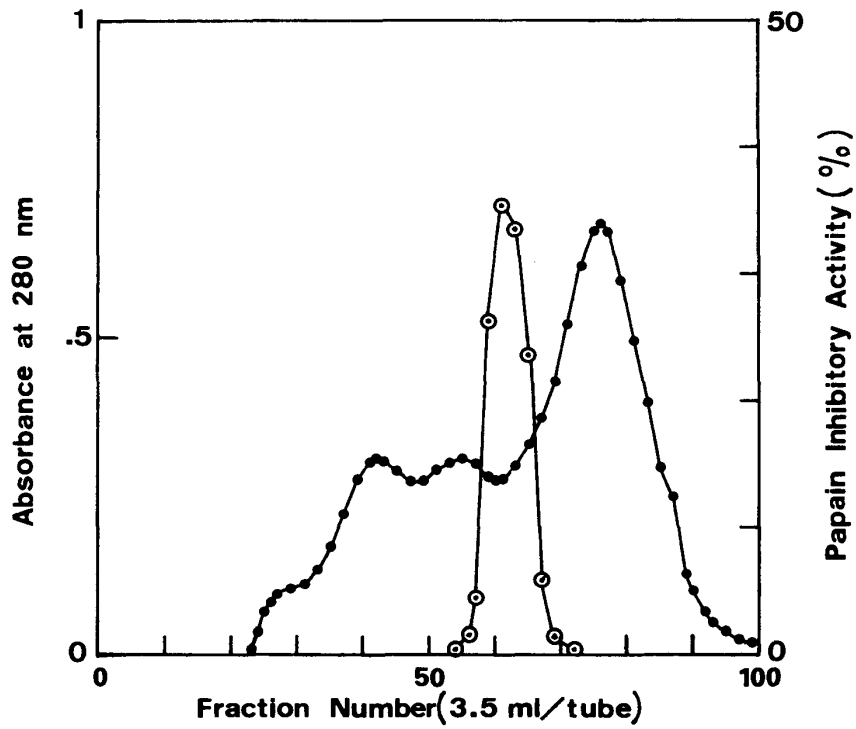


Fig. 4. Gel filtration of the crude cysteine proteinase inhibitor preparation from foxtail millet seed on Sephadex G-75.

●—●, absorbance at 280 nm ; ○—○, papain inhibitory activity.

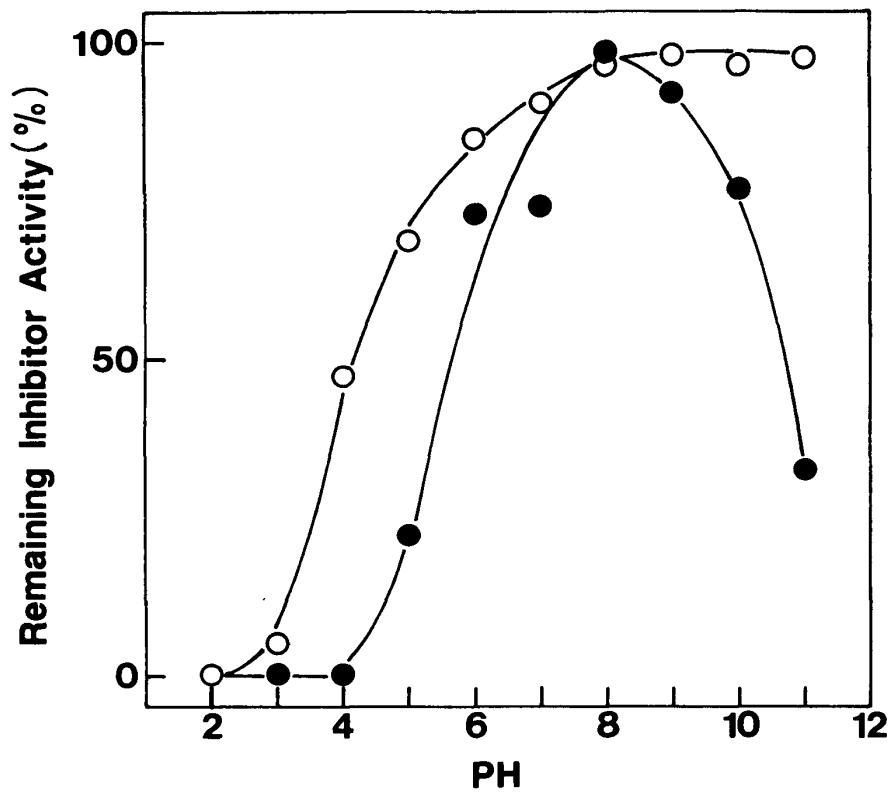


Fig. 5. Effect of pH on the stability of foxtail millet cysteine proteinase inhibitor.

○—○, 2 hr-incubation at 37°C ; ●—●, 24 hr-incubation at 37°C.

に対する阻害活性を示した。最も高い阻害活性はトウモロコシに見られ、つづいてはアワであった。他の穀類に認められた活性は弱いものであった。粗調製品のpH 7.5, 90℃における熱処理からは、トウモロコシ、アワ、ヒエのインヒビターは熱安定性であり、小麦、大麦、米糠のインヒビターは熱不安定性であることが示された。アワの粗インヒビターを用いた予備的実験から、アワ種子には等電点4.9, 分子量13,000の少なくとも一種のタンパク質性システインプロテアーゼインヒビターが存在しており、本インヒビターは比較的アルカリ条件下で安定であることが示された。

本研究に協力していただいた尾上(旧姓浅沼)宏美氏に深く感謝の意を表します。

引用文献

1) I. E. Liener and M. L. Kakade : in " Toxic

Constituents of Plant Foodstuffs, " ed. by I. E. Liener, p. 7 (1969), Academic Press, New York.

2) S. Boisen : *Acta Agric. Scand.*, 33, 369 (1983).

3) M. Laskowski, Jr. and I. Kato : *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 593 (1980).

4) K. Abe, H. Kondo and S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2763 (1987).

5) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

6) A. N. Glazer and E. L. Smith : *J. Biol. Chem.* 236, 2948 (1961).

7) M. Abe and J. R. Whitaker : *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1583 (1988).