

ナタネ種子中のトリプシン・インヒビターの精製と2・3の性質

Purification and some Properties of Trypsin
Inhibitor from Rape Seed (*B. napus*)

福沢美喜男, 黒田博子

MIKIO FUKUZAWA and HIROKO KURODA

緒 言

アブラナ科野菜種子中のトリプシン・インヒビター(以下TIという)の精製に関する研究には秦及び Ogawa^{8,4)}等が大根種子のTIに関して詳細に報告しているが、大根と属が異なる *Brassica* 属の野菜種子中のTIについては研究が少なく、同氏等が数種類の種子についてゲル濾過を行ない分子量を推定するとともに、阻害活性画分を等電点電気泳動で等電点の異なるフラクションを分離している報告⁵⁾がある以外には見当らず、分離されたTIのうち、*B. Juncea*のTIについては若干の検討がなされているが、それ以外のもののTIに関しては不明な点が多く、ナタネのTIについては等電点電気泳動で4つの等電点をもつフラクションに分離したことだけが報告されているに過ぎない³⁾。

著者等も前報⁹⁾で *Brassica* 属の野菜種子中のTIについて、種間におけるTIの性質を比較検討する目的で数種類の種子からTIを抽出し、その抽出液についてTIの阻害活性度、硫酸塩析に対するTIの挙動、熱及びpHに対する安定性などを測定し、TI精製のための諸条件を検討した結果、TIの性質は種によって若干差があることを報告した。

そこで本報では、ナタネ(*B. napus*)種子から抽出したTIをゲル濾過及びCM-セルロースカラ

ムクロマトグラフィーの手段で部分精製し、さらに分子量の推定及び分離精製された3種類のTIの性質についても若干の検討を加えたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 材 料

ナタネ種子(農林16, 18, 20号)は、昭和54年度産のものを滝野川種苗K・Kより購入した。

2. 酵素及び基質

トリプシン(2×Cryst), キモトリプシン(3×Cryst)はシグマ社から、ナガーゼ(100×10⁴ pun/g)はNAGASE Biochem LTD, プロナーゼPは(750,000チロシン/g)科研科学社のものを用いた。

天然基質はメルク社のハンマーステンカゼインを、合成基質にはシグマ社のBApNA(α -N-Benzoyl-D.L-Arginine p-Nitroanilide)を用いた。

分子量の推定に用いた標準タンパク質はシグマ社のCytochrome-c, Myoglobin, Soybean Trypsin inhibitor, Chymotrypsinogen, Ovalbumin, Bovineである。

3. 阻害活性の測定

トリプシン:カゼインを基質にした場合の阻害活性の測定は前報に準じて行なった。またBApNAを

基質とした場合は Erlanger et al. の方法³⁾ に準じて行なった。すなわち BApNA 50mg を 1 ml のジメチル・スルフォキシドに温めながら溶解し、25℃ の CaCl₂ · 2.0mM を含むトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 100ml に定容し、基質溶液とした。測定はカゼイン消化法に準じて行なったが、反応条件は 25℃ 10 分間反応させた後、10% 酢酸溶液 1 ml を加えて反応を停止させ、生じたニトロアニリドの黄色を O.D. 410 nm で測定しトリプシン残存活性とした。また、試料液の代りに水を加えたものの吸光度を阻害物質を含みぬ対照の活性とし、阻害度の計算及び阻害単位は前報に準じた。

その他の酵素：キモトリプシン、プロナーゼ及びナガラーゼに対する阻害活性の測定はトリプシンのカゼイン消化法に準じて行なった。

4. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準として、Lowry et al. の方法⁶⁾ 及び O.D. 280 nm の吸光度を測定する U.V 法で行なった。

5. T I の抽出と濃縮

T I の抽出と濃縮は、Ogawa 等⁴⁾ の方法を参考にして行なった。すなわち、種子または脱脂粉末 (脱脂粉末は種子に換算した量) に 10 倍量の 0.1 M の食塩水を加え、攪拌しながら 1 時間抽出した後、ハイフロースーパーセルを濾過助剤として吸引濾過し、残渣は再び同様の操作をして前記の濾液と合わせて抽出液とした。

T I 濃縮液は抽出液に 60% 飽和になるように結晶の硫酸アンモニウムを加えて、タンパク質を沈澱させ、生じた沈澱を遠心分離 (8000 rpm, 20 分) して集め、少量の食塩水で溶解したのち、60℃ で熱処理して不要のタンパク質を沈澱させ、遠心分離 (10000 rpm, 30 分) を行なって上澄液を T I 濃縮液とした。ただし、CM-セルロースカラ

ムクロマトグラフィーに負荷する T I 濃縮液は、一夜室温で T I 濃縮液の 10 倍量の 0.02M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で透析し、生じた沈澱は遠心分離 (10000 rpm, 30 分) で除去して T I 濃縮液とした。

実験結果および考察

1. ゲル濾過による精製

前報で *Brassica* 属の野菜種子中に存在する T I を精製する場合の諸条件を検討した結果、ナタネの T I は 60% 飽和の硫酸塩析で完全に沈澱区分に移行し、60℃ の加熱ではほとんど影響を受けず、非透析性であることを認めているので、負荷する T I 濃縮液の調製はすべてこの条件で行なった。

ゲル濾過は 0.02 M 酢酸塩緩衝液 (0.1 M 食塩を含む pH 5.5) で平衡化した Sephadex G-75 カラム (5 × 40 cm) に種子 (農林 18 号) 10g に相当する脱脂粉末から得た T I 濃縮液 (11ml) を負荷してゲル濾過を行なった結果を Fig. 1 に示す。

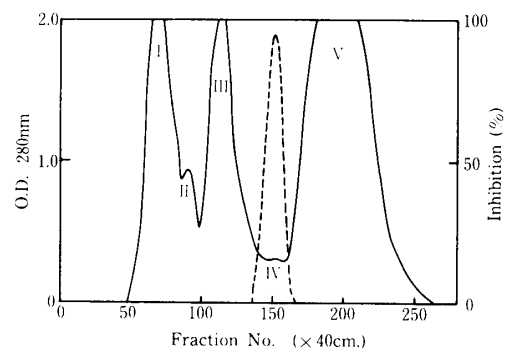


Fig. 1. Gel Filtration of the Trypsin Inhibitor Concentrate which was extracted from Rape Seed on a Sephadex G-75 Column (5 x 40 cm)

Inhibitor was eluted with the 0.1 M NaCl containing 0.02 M sodium acetate buffer (pH 5.5) at a flow rate of 10 ml/hour. Inhibitory activity was assayed using 0.2 ml. of each fraction.

———— absorbance at 280 nm,
 - - - - - inhibitory activity.

タンパク質は5つの区分に分離され、阻害活性はⅣの区分に出現した。この阻害活性の区分を集め、70%飽和で硫酸塩析を行なって、T Iを濃縮した後、カラム(2.6×70cm)を長くした以外は同じ条件で再度ゲル濾過を行なった溶出パターンをFig. 2に示す。

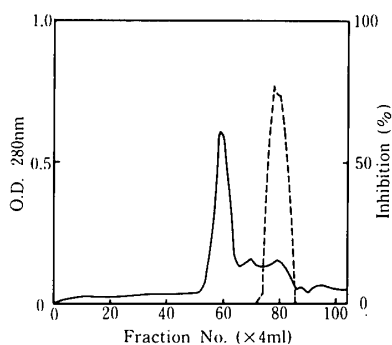


Fig. 2. Rechromatography of the active Fraction by Chromatography on Sephadex G-75

Column=2.6 x 70 cm, A flow rate=10 ml/hour,
 — absorbance at 280 nm,
 - - - - inhibitory activity,

溶出されたタンパク質は、さらに5つの区分に分離し、阻害活性はⅢの区分にあった($V/V_0 = 2.36$)。Ogawa等⁵⁾は *Brassica* 属のうち、*B. Juncea*, *B. Napella*, *B. Oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra* の種子のT Iについてゲル濾過を行ない、阻害活性のある2つの区分 ($V/V_0 = 1.8$, $V/V_0 = 2.4$)があることを報告しているが、ナタネの場合にはカラムの長さに関係なく、いずれも阻害活性のある区分は1つであった。

なお、1回目のゲル濾過による精製で、タンパク質当りの比活性 (unit/mg protein) は抽出液の4.5倍になり、さらに2回目には、25.1倍に比活性が上昇した。

2. CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製

前述のごとく、Ogawa等はナタネ種子の等電点電気泳動を行なって等電点の異なる4種類のT Iフラクションを分離しているが、ゲル濾過ではそれ

以上の分離が出来なかったので、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーで分離精製を試みた。

精製に先立ってナタネの品種間でT Iの性質に差異があるか否かを検討するために、予備試験的に0.02M酢酸塩緩衝液(pH 5.5)で平衡化したCM-セルロースカラム(1.5×30cm)を用いて、農林16, 18, 20号の3品種の種子10gから得たT I濃縮液30mlのうち5mlを負荷したのち、同じ緩衝液で吸着されないで素通りするタンパク質を溶出させたあと、0.1, 0.25, 1Mの食塩を含む同緩衝液を溶出液として、ステップワイズでクロマトグラフィーを行なった結果をFig. 3に示す。

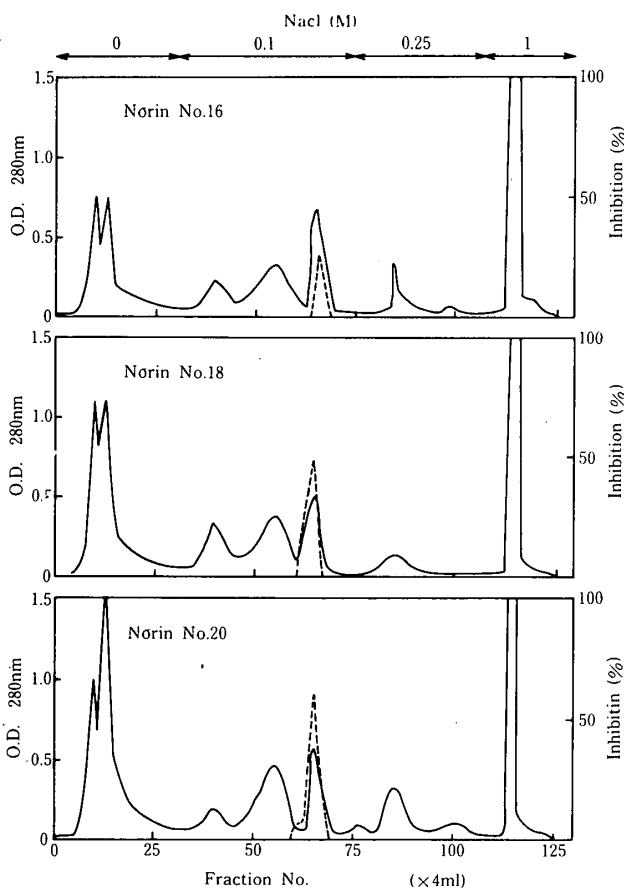


Fig. 3. Chromatography of the Trypsin Inhibitor Concentrate extracted from the Three Kinds of Rape Seed on a CM-cellulose Column (1.5 x 30 cm)

Inhibitor activity of each fraction was assayed by the same method as Fig. 1.

— absorbance at 280 nm,
 - - - - inhibitory activity,

いずれの品種も 0.1 M の食塩を含む溶出液で溶出される 3 番目のタンパク質のピークに阻害活性のあることを示している。3 品種のタンパク質の溶出パターン及び T I の溶出位置は極めて類似している点から品種間には大きな差がないと考え、以下の精製に

は農林 18 号の種子を用いて実施した。

前述の方法で種子 25 g に相当する脱脂粉末から調製した T I 濃縮液を 2.6 × 40 cm のカラムに負荷して、予備試験と同様にステップワイズで溶出した結果を Fig. 4 に示す。

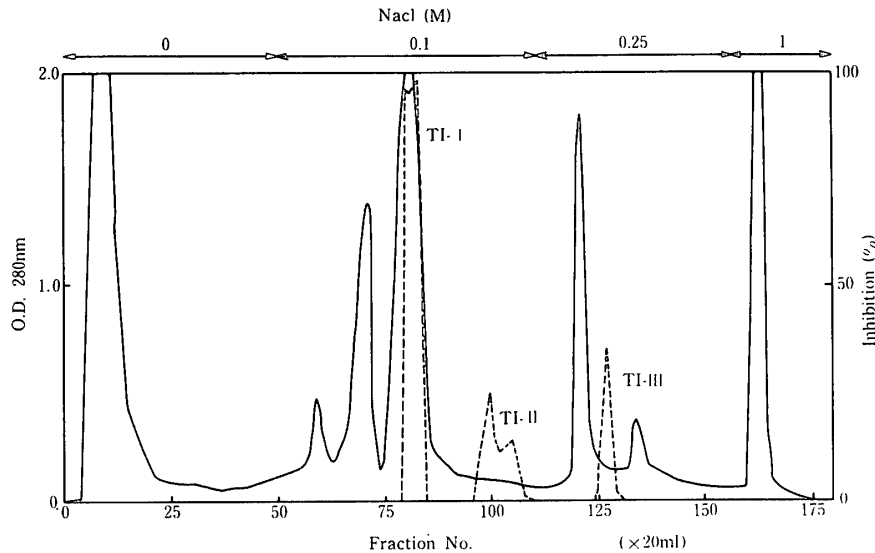


Fig. 4. Chromatography of the crude Trypsin Inhibitor Concentrate on a CM-cellulose Column (2.6 x 40 cm)

Inhibitor activity of each fraction was assayed by the same method as in Fig. 1.
 ----- inhibitory activity, ——— absorbance at 280 nm,

タンパク質の溶出パターンは予備試験の結果に類似しているが、阻害活性のある区分が 3 つに分離した。この 3 つの画分を T I - I, II 及び III とした。

T I - I は 30 cm カラムで実施したときとほぼ同じ位置に溶出され、阻害活性も他の 2 つの画分に比較して、強いところからナタネの主要な T I であることが考えられる。また、阻害活性区分を含むタンパク質の溶出がほぼ終る位置に T I - II が溶出される。この阻害画分はタンパク質の少ない割に強い活性があり、比較的広範囲に渡って溶出されているところから、2 つの T I が重なり合って溶出されたことも考えられるが、今回は T I - II として区分した。さらに T I - III は 0.25 M の食塩を含む緩衝液で溶出される 2 つのタンパク質のピークの間で溶出された。

さらに精製をするため、各画分ごとに溶出液を集め、T I 濃縮液の場合と同様にして上澄液を調製し、同じカラム (2.6 × 40 cm) に負荷して食塩濃度が

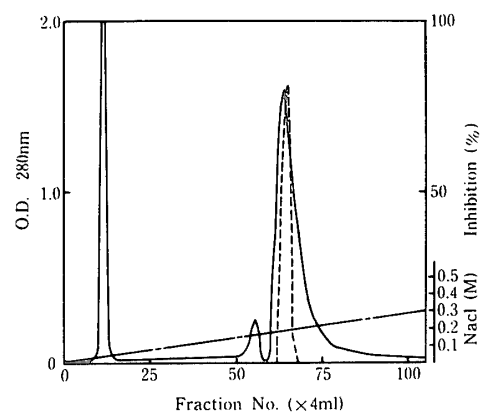


Fig. 5. Rechromatography of Inhibitor(-) I which was fractionated by the First Chromatography

———— absorbance at 280 nm,
 ----- inhibitory activity, - - - NaCl,

0 ~ 0.3 Mに増加するような条件でグラディエントで溶出した結果をFig. 5に示す。

この精製では溶出されるタンパク質のピークと阻害活性のピークがほぼ重なっているが、完全には一致していなかった。しかし、T I - II 及び III は濃縮中に活性の低下が著しく、これ以上の精製は断念せ

ざるを得なかった。

以上、CM-セルロースカラムによる精製をまとめてTable . 1 に示す。その結果、T I - I は第1回の精製で比活性は約5倍に上昇し、さらに2回目には約1.3倍になった。また、T I - II 及び III の比活性はそれぞれ約1.8倍、9倍であった。

Table 1. Specific Activity of Rape Seed Inhibitors

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg prot.)	Yield (%)
Crude extract	320	3472	1984	0.6	100.0
Chromatography on a CM-cellulose column Inhibitor - I	96	150	416	2.8	20.0
Inhibitor - II	210	14	153	10.9	7.7
Inhibitor - III	75.5	16	82	5.1	4.1
Rechromatography of Inhibitor I	26.5	28	225	13.3	11.3

One unit = The amount of inhibitor which was required for complete inhibition of 24/ μ g of trypsin.

3. 分子量の測定

ゲル濾過に用いた Sephadex G-75 (2.6 × 70 cm) のカラムで分子量を推定するために、ブルーデキストラン G-2000 でこのカラムの Void Volume (V_0) を求め、標準タンパク質を負荷して、各標準タンパク質が溶出するまでの液量 (V) を測定し、 V/V_0 の値を縦軸に各タンパク質の分子量の対数を横軸にとって、標準線を作成し、先に行なったゲル濾過での精製の際に求めた値 ($V/V_0 = 2.36$) から分子量を測定した結果、Fig. 6 のように分子量は7000 ~ 8000 であり、分子量が10000 以下の低分子性のインヒビターであった。このような低分子性のインヒビターであると、T I 濃縮液の調製の際に透析外液に出ることが考えられ、前報で得た透析の結果と矛盾する結果であった。しかし、Iwasaki²⁾等 はジャガイモ、インヒビターで、また Tashiro⁷⁾等 は米糠インヒビターでゲル濾過に

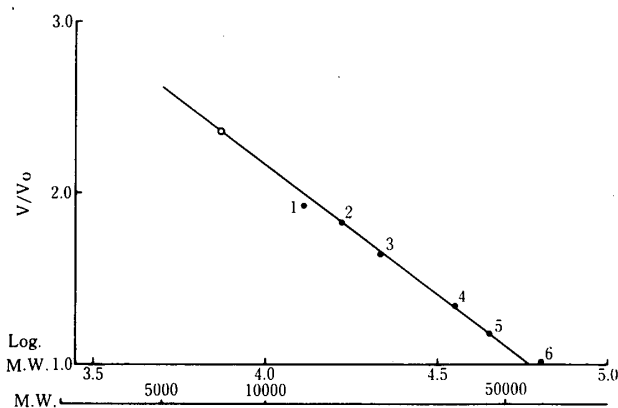


Fig. 6. Estimation of Molecule Weight of Inhibitor by Gel Filtration Method

1. Cytochrome c (M.W. = 13000)
 2. Myoglobin (M.W. = 16900)
 3. Trypsin inhibitor (soy bean, M.W. = 21500)
 4. Chymotrypsinogen (M.W. = 35000)
 5. Ovalbumin (M.W. = 45000)
 6. Bovine serum albumin (M.W. = 65000)
- Torypsin inhibitor of rape seed

よる分子量の推定を行なった結果、同一のインヒビターを溶出させる場合、溶出液の性質が異なると分子量に変化が起ることを観察し、条件によってイン

ヒビター同志の会合が起る可能性のあることを示唆している。伊吹¹⁾はまた、低分子性のインヒビターを調製する場合、透析に注意を払っている報告が少ないのは前述の理由から実際には二量体、三量体で存在することが多く、分子量が大きくなっているからであろうと指摘している。もし、このことがナタネ T I にも起っているならば前述の矛盾がなくなる。

なお、先にあげた文献では⁵⁾ ナタネ以外のブラシカ属の T I の分子量が 10000 と 20000 のものがあり後者は二量体であろうと推定している。

4. 部分精製された T I の若干の性質

(a) 熱安定性

前報で、種間における T I の耐熱性を比較した結果、ナタネの場合は 60°C 10 分ではほとんど影響をうけなかったものの、70°C 10 分では約 10%、80°C 10 分では約 24% 程度の損失があったので、新たに、CM-セルロースで分離した 3 つのインヒビターの溶出液を試験管に 5ml ずつ分取し、90°C ± 2°C の沸騰水中で 15、30、45、60 分の熱処理を行ない、ただちに冷却して、不足した水を補って残存活性を測定した結果を Fig. 7 に示した。3 つの T I は明らかに熱に

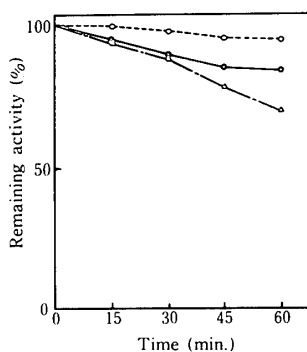


Fig. 7. Heat Stability of the Three Inhibitors which were fractionated by Chromatography on CM-cellulose

The inhibitor solution was heated at 90 ± 2°C.
 ○—○ inhibitor-I, ○- - -○ inhibitor-II,
 ▴- - ▽ inhibitor-III,

対する抵抗性が異なることを示している。T I - I は 60 分の処理で約 85% の活性が残存している。また T I - II は耐熱性があり 60 分の処理で約 5% が失活するだけであった。T I - III は最も弱く時間の経過と共に直線的に残存活性が減少し、60 分後残存活性は約 70% であった。

(b) 種々のプロテアーゼに対する作用

多くのインヒビターがトリプシン以外のプロテアーゼに対して特異性があることが知られているので、最適 pH がアルカリ側にあるキモトリプシン (5mg/100ml . 0.001N-HCl),

Table 2. Inhibitory Specificities of Inhibitor on different Proteinases

Proteinases	Inhibitor		
	I	II	III
Trypsin	+	+	+
Chymotrypsin	±	±	+
Nagarse	+	-	-
Pronase	+	±	-

+ positive, ± trace, - negative,

プロナーゼ及びナガーゼ (10mg/100ml pH 7.6 リン酸緩衝液) について、それぞれの酵素に対する特異性を検討した結果を Table. 2 に示す。

T I - I は 4 種のプロテアーゼのうちキモトリプシンに対する阻害活性が極めて微弱である他は、すべて阻害する。T I - II はトリプシン以外の酵素をほとんど阻害せず、ナガーゼはこのインヒビターに阻害されない。T I - III はナガーゼ以外の酵素を阻害する。なお、これらのインヒビターが阻害作用を行なう際、single head であるか、multi head であるかは検討しなかった。

要 約

ナタネ種子の中の T I をゲル透過及び CM-セル

ロースカラムクロマトグラフィーで部分精製し、さらに分離したT Iの性質についても検討した結果を要約する。

- 1) ゲル濾過による精製ではT Iは常に1つのフラクションに溶出され、比活性は抽出液の約2.5倍に上昇した。
- 2) 1回目のCM-セルロースカラムクロマトグラフィーで、インヒビターはT I-I, II及びIIIの3つのフラクションに分離し、それぞれの阻害活性はT I-I, II及びIIIの順に小さくなり、比活性は2.8, 10.9及び5.1であった。
- 3) T IのIのインヒビターをCM-セルロースによるグラディエントで精製を行なったが、タンパ

ク質の溶出曲線と阻害曲線は完全に重ならなかったが、比活性は、抽出液の13.3に上昇した。

- 4) ゲル濾過で得たT Iについてゲル濾過法で分子量を推定したところ、7000~8000であった。
- 5) 分離された3種類のT Iの耐熱性には明らかな差があり、T I-IIは耐熱性があり、90℃60分の加熱で約5%であったがT I-Iは約15% T I-IIIは約30%の活性が失われた。
- 6) 4種類のアルカリプロテナーゼに対する阻害特異性を検討した結果、T I-Iはキモトリプシン以外はすべて阻害した。T I-IIはトリプシンのみを阻害するがT I-IIIはナガーゼ以外はすべて阻害した。

文

- 1) 伊吹文男：栄養と食糧，**32**, 75 (1979).
- 2) IWASAKI, T. KIYOHARA, T. and YOSHIKAWA, M.: J. Biochem, (Tokyo) **72**, 1029 (1972).
- 3) ERLANGER, B. F. KOKOWSKY, N. and COHEN, W.: Arch. Biochem. Biophys, **95**, 271 (1961).
- 4) OGAWA, T. HIGASA, T. and HATA, T.: Agri. Biol. Chem., **32**, 484 (1968).
- 5) OGAWA, T. HIGASA, T. and HATA, T.: Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. No. **32**, 1 (1971).

献

- 6) 副島正美，菅原潔：生物化学実験法（一般分析析法），東大出版会，P 89 (1971).
- 7) TASHIRO, M. and MAKI, Z.: Agri. Biol Chem., **42**, (6), 1119. (1978).
- 8) 秦忠夫，小川正，林力丸：京大食糧研究所報告，(30), 51 (1967).
- 9) 福沢美喜男，阿部博子：聖徳栄養短期大学紀要，**9**, 15 (1978).