

キャベツ種子中のトリプシン・インヒビターの 精製と2・3の性質

福沢美喜男 梅田美智子

Purification and some Properties of Trypsin Inhibitor from
Cabbage Seed (*B. Oleracea L. var. Capitata*)

MIKIO FUKUZAWA and MICHIKO UMEDA

著者^{4,5,6)}らはアブラナ科野菜のうち、*Brassica* 属の野菜種子中に存在する trypsin inhibitor (以下 T.I という) の種間における性質の差異について検討を進めている。すでに遺伝的に BC ゲノム ($n=19$) を有する和種ナタネ (*B. napus*) の T.I をゲル濾過, CM セルロースクロマトグラフィーで精製し, その活性画分についてトリプシン及び各種タンパク質分解酵素に対する阻害性, 熱安定性, 電気泳動に対する挙動及び分子量の推定などの諸性質を検討した結果, OGAWA²⁾ 等が詳細に報告している大根などの野菜が属する *Raphanaceae* 属のそれとは明らかな差異があることを報告した。一方ナタネと近縁にある *B. Oleracea L.* (Cゲノム, $n=9$) に属するキャベツ, ケール, 花ヤサイなどの種子中の T.I に関する知見は乏しく, わずかに OGAWA³⁾ 等がキャベツ種子の T.I についてゲル濾過及び等電点電気泳動に対する挙動について述べているだけにとどまり, その詳細についてはほとんど明らかにされていない。

本報では, キャベツ種子より T.I を抽出し, ゲル濾過及び CM セルロースクロマトグラフィーで精製した後, 得られた活性画分についてディスク電気泳動及び等電点電気泳動に対する挙動, ゲル濾過による分子量の推定, 熱安定性, トリプシン及びアルカリプロテア

ーゼに対する阻害活性等の諸性質について検討を加え, 2, 3 の知見を得たので報告する。

材料及び方法

I 実験材料

キャベツ種子(富士早生)は昭和57年度産のものを滝野川種苗より購入して用いた。又, 酵素, 基質及び試薬はすべて既報^{5,6)}に準じたものを使用した。

II 阻害液の精製と阻害活性の測定

1) 阻害液の調製……ナタネの場合と同様種子を手動式粉碎器で荒砕きしたのち, n -ヘキサンに浸漬しバッチ式で脱脂することを数回行なってから風乾後, 小型ミールで粉碎しすべて50メッシュの篩を通して抽出試料を調製した。この脱脂粉末(種子重量に換算した量)に10倍量の0.1M食塩水を加えて1時間振盪攪拌してT.Iを抽出したのち, 濾過助剤(ハイフロスパーセル)を加えて吸引濾過し, 残さは再び半量の0.1M食塩水を加えて同様な操作をし, 得た濾液を前記の濾液と合せて抽出液とした。この抽出液に70%飽和になるように結晶硫酸アンモニウムを加え, 生じたタンパク質の沈でんを遠心分離(8000 rpm, 20 min)して集めた。この沈でんを少量の食塩水で溶解したのち70°Cで熱処理し, 不要のタンパク質を沈でんさせ, 遠心分離(10000 rpm,

30 min)を行ない、上澄液を一夜 0.05 M 食塩を含む 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) にて透析し、再度遠心分離 (10000 rpm, 30 min)を行ない、この上澄液を抽出濃縮液とした。

2) ゲル濾過及び CM セルロースクロマトグラフィーによる T.I の精製……0.1 M 食塩を含む酢酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 (2.6×70cm) カラムに抽出濃縮液を負荷し、同緩衝液でゲル濾過を行ない、活性画分を得た。次に活性画分を硫酸分画し、得たタンパク質を緩衝液で一夜透析し、生じた沈殿を遠心分離 (10000 rpm, 30 min) で除き上澄液を得た。この液を 0.02 M 酢酸緩衝液で平衡化した CM セルロースカラム (2.6×45 cm) に負荷して、緩衝液 250 ml を流出させた後、0.1 M~1.0 M の食塩を含む緩衝液をステップワイズで溶出した。

3) 阻害活性の測定……トリプシンに対する阻害活性は Erlanger et.al の方法で合成基質を用い、その他のプロテアーゼに対する阻害活性はカゼイン消化法により既報に準じて実施⁵⁾した。

4) タンパク質濃度の測定……タンパク質濃度はケルダール法及び 280 nm の吸光度を測定する U.V 法で測定した。

III T.I の電気泳動

1) ディスク電気泳動……pH 9.5-7.0 % アクリルアミドゲルを用いてトリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) を電極液としてガラス管 1 本当り 2~4 mA 通電し、泳動後ゲルを 1% アミドブラック 10 B で染色した。またインヒビター活性のあるバンドの活性染色は Uriel 法により実施^{1,7)}した。すなわち、泳動後ゲルをトリプシン溶液 (40 μ g/ml 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) に 37°C, 10 分間浸漬してから酵素液を捨て、30 分間室温に放置後、N-アセチル-DL-フェニルアラニン- β ナフチルエステル 5 mg を N,N' ジメチルホルムアミド 2 ml で溶してから、*o*-ジアニサイドテトラジアゾタイトド 10 mg, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 18 ml 加えると発熱して溶解し赤紫色となる。この溶液に処理したゲルを浸漬して室

温で 40 分間反応させると、活性のない部分は赤紫色に染着するがインヒビター活性のあるバンドは透明なバンドとして認められる。

2) 等電点電気泳動……ゲル濾過した後の活性画分を 110 ml 容カラムを用いて 40% キャリアーアンホライン (pH 3.0~10.0, BIO-RAD 社製) を 1% になるように加えた蔗糖液で糖濃度が 0~50% になるように密度勾配を作り、前報⁶⁾に準じて等電点電気泳動を行った。

VI 分子量の推定

ゲル濾過に用いた Sephadex G-75 (2.6×70 cm) のカラムを用いブルーデキストラン G-2000 でこのカラムの Voidvolume (V_0) を求め、チトクローム C, ミオグロビン, 大豆トリプシンインヒビター, キモトリプシノーゲン, オボアルブミン, そして牛血清アルブミンの六種類の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 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、標準線を作り活性画分の V/V_0 値を求め分子量を推定した。

結果及び考察

I キャベツ T.I の精製

キャベツ種子の T.I の熱安定性は他の *Brassica* 属の野菜のそれよりも不安定であることをすでに報告しており、抽出濃縮液の調製時の加熱による除タンパクで T.I の活性が低下することが懸念されたので、60°C, 70°C, 80°C でそれぞれ 10 分間湯浴上で処理したのち、T.I の残存活性を測定した結果、いずれの場合も影響がなかったから抽出濃縮液の調製時における除タンパクはすべて 70°C, 5 分で行なった。又、OGAWA³⁾等はキャベツ種子の T.I をゲル濾過で精製し、2つの活性画分があることを報告しているの、ゲル濾過による精製の前に予備試験的に前述の方法で種子 5 g から調製した抽出濃縮液 10 ml を 0.1 M 食塩水で平衡化した Sephadex G-75 を充てんした 2.6×70 cm のカラムに負荷してゲル濾過を行なった結果を図 1 に示す。タンパク質は 5 つの

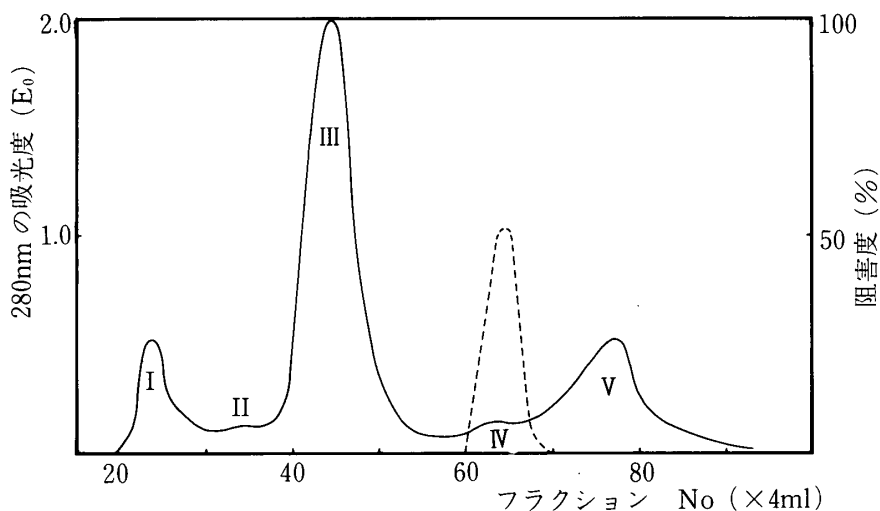


図1 キャベツ種子抽出濃縮液のゲル濾過による溶出曲線

—280 mm の吸光度阻害度

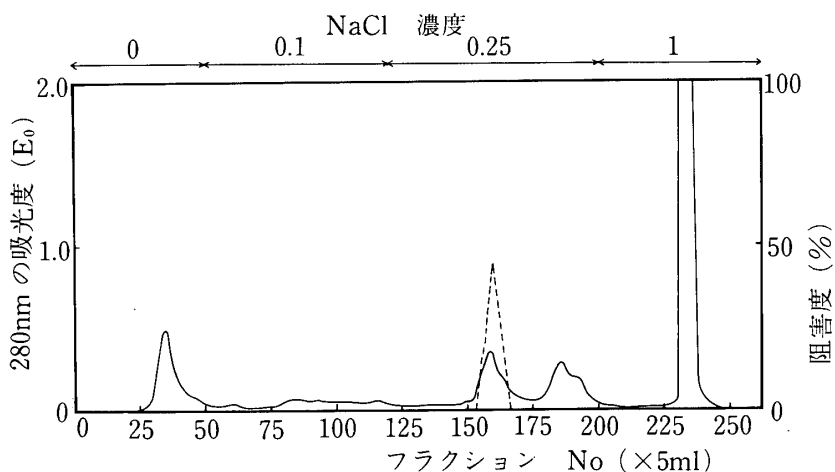


図2 ゲル濾過活性画分のCMセルロースカラムによるT.Iの精製

—280 mm の吸光度阻害度

区分に分離され、阻害活性はIVの区分のみに出現しただけであった。そこで同様な方法で種子 50 g に相当する脱脂粉末から調製した抽出濃縮液を数回に分けてゲル濾過を行ない活性画分を得た。この活性画分を再び硫酸分画を行ない得た沈でん物を少量の食塩水に溶かしたのち、0.02 M 酢酸塩緩衝液で一夜透析後、不溶物を遠沈して上澄液を 2.6×40 cm のCMセルロースカラムに負荷し、ステップワイズ(食塩濃度 0, 0.1, 0.25, 1.0 M)で溶出した結果を図2に示す。活性画分は 0.25 M で溶出され、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た。この溶出パターンをナタネの場合と比べると、溶出位置がナタネ

T.I⁵⁾ の T.I-III の活性画分に類似している。以上、ゲル濾過及びCMセルロースカラムでの精製をまとめて表1に示す。その結果ゲル濾過で比活性は3倍になり、さらにCMセルロースカラムによって比活性は約21倍に上昇した。

II T.Iのディスク電気泳動パターンについて

CMセルロースカラムクロマトグラフィーで精製したT.I活性画分を40°Cで減圧濃縮した液を試料として、pH 9.5~7.0%アクリルアミドゲルを用いてディスク電気泳動を実施した結果、図3(A)に示す如く2つの種類のバンドが出現した。このバンドをトリプシン

表1 キャベツトリプシンインヒビターの精製

	液量 (ml)	タンパク質 (mg)	阻害度 (単位)*	比活性 (単位/タンパク質)	収率 %
抽出液	670	7839	6700	0.9	100
抽出濃縮液 (70%(NH ₄) ₂ SO ₄ 飽和)	77	3565	2567	0.7	38
ゲル濾過活性画分	199	557	1488	2.7	22
CMセルロースによる 精製の活性画分	37	67	1233	18.5	18.4

* 結晶トリプシン 24 μ g を完全に阻害するために必要なインヒビターの量を1単位とする。

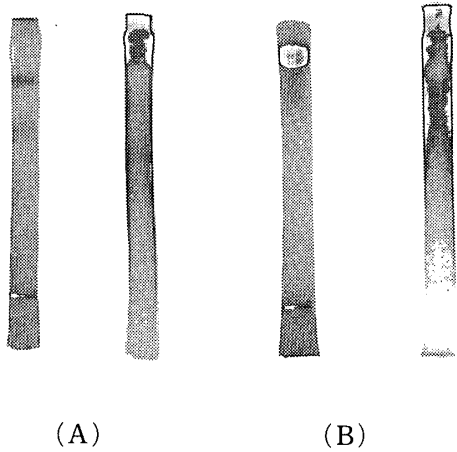


図3 ディスク電気泳動パターン

(A) はCMセルロースカラムによる活性画分

(B) は等電点電気泳動の活性画分

及びキモトリプシンを用いて Uriel 法で活性染色を試みた結果2種類のバンドともトリプシン阻害活性のあることが認められたが、キモトリプシン活性は認められなかったことから、キャベツ T.I.には少なくともトリプシンを阻害する2種類のタンパク質があることを認めた。また、図3(B)に示すように後述する等電点電気泳動で分離した T.I. 活性画分の泳動像には、より移動度の大きいバンドが消失している。この原因について、等電点電気泳動前の試料調製時にこの画分のタンパク質が消失したのか、又は泳動中にタンパク質の会合が起きたためなどが考えられる。なお泳動後の活性画分について、ゲル濾過による分子量を推定すると、泳動前の画分よりも分子

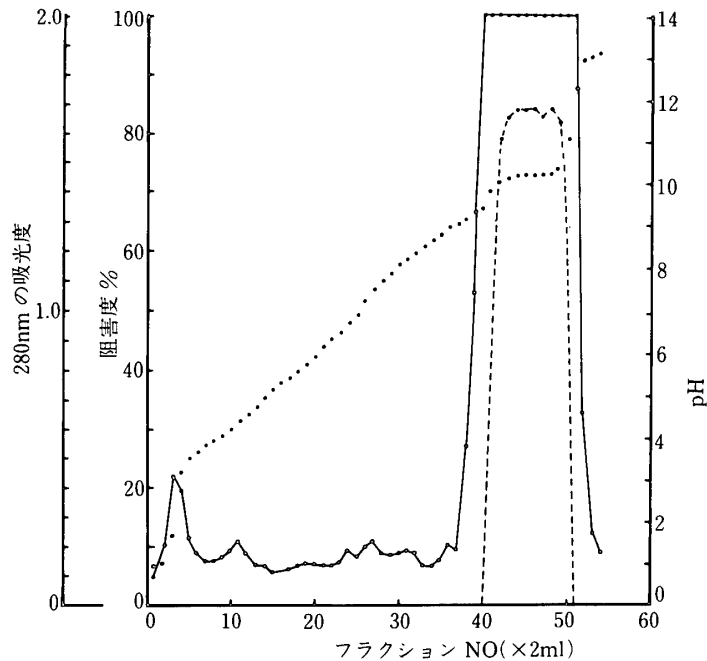


図4 ゲル濾過活性画分の等電点電気泳動

— 280 mm の吸光度, - - - - 阻害度, pH 値

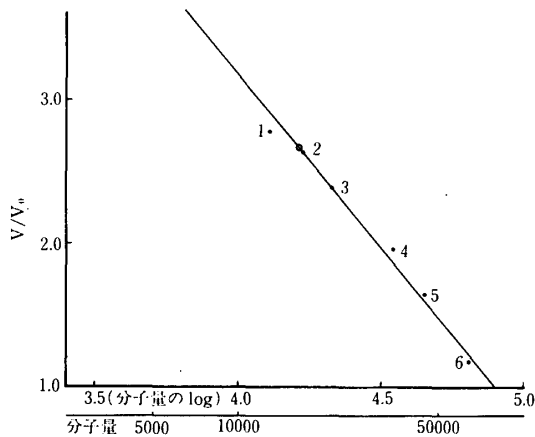


図5 ゲル濾過による分子量の推定

●1~6 標準タンパク質

- 1) チトクロームC (分子量 13000)
- 2) ミオグロビン (分子量 16900)
- 3) 大豆トリプシンインヒビター (分子量 21500)
- 4) キモトリプシノーゲン (35000)
- 5) 卵アルブミン (分子量 45000)
- 6) 牛血清アルブミン (分子量 65000)

○-----キャベツトリプシンインヒビター

量が約 8000 程大きくなることを観察しているの、後者の現象が起っていることも考えられる。

III 等電点電気泳動パターン

ゲル濾過活性画分の濃縮液について pH 3.0 ~ 10.0 のキャリアーアンホラインを用いて等電点電気泳動を実施した泳動図を図 4 に示す。キャベツ T.I の活性画分の pI 値は 10.2 であり、前報⁶⁾で報告したようにナタネ T.I の pI 値と同様にアルカリ側に pI 値をもつタンパク質であり、ナタネ T.I のうちでは T.I-III に近い等電点をもっていた。しかし、Ogawa 等³⁾は *B. Oleracea* の T.I について等電点電気泳動を実施しているが、著しく異なった結果を報告している。

IV 分子量の推定

Sephadex G-75 (2.6×70 cm) のカラムを用いたゲル濾過による分子量の推定の結果を図 5 に示す。抽出濃縮液中の活性画分の溶出量を (V) とし、ブルーデキストラン G-2000 の溶出量を (V₀) として V/V₀ を計算しタンパク質標準線より分子量を推定すると、16500 の分子量が得られた。しかし、等電点電気泳動で得られた結果は分子量 25200 程度であり、分子

の会合が起っていることも予想されるので目下、SDS 電気泳動等で検討中である。

V T.I の 2, 3 の性質について

1) 熱安定性について……等電点電気泳動で得た活性画分を用いて、90°C、80°C、70°C、で 1 時間湯浴中で加熱した場合の残存活性を図 6 に示す。70°C では 1 時間の加熱でも失活しないが、80°C では 1 時間の加熱で残存活性が約 35% になり、90°C では 20 分で完全に失活した。ナタネ T.I のうち加熱に最も弱い T.I-III のフラクションでも 90°C、1 時間の加熱に対して 70% の残存活性があるのに比べるとキャベツ T.I は加熱に対し相当に不安定である。

2) トリプシン以外のアルカリプロテアーゼに対する作用……多くの T.I がトリプシン以外のプロテアーゼに対しても阻害活性があることが知られているので、キモトリプシンプロナーゼ、及びアルカリプロテアーゼ (ナガゼ) に対する阻害活性を検討した結果を表 2 に示す。いずれの精製段階でもトリプシン以外の酵素は阻害されなかったことから、精製時での消失は考えにくく、キャベツ T.I はトリプシンのみを阻害することを認めた。

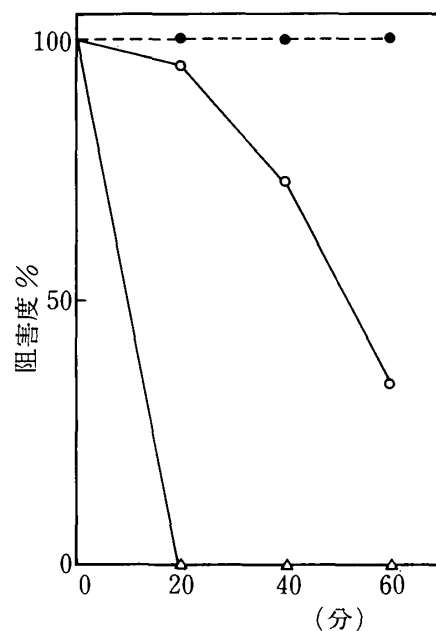


図6 TIの熱安定性

△—△ 90°C, ○—○ 80°C, ●—● 70°C

表2 アルカリプロテアーゼに対する
阻害特性

トリプシン	+
キモトリプシン	-
ナガーゼ	-
アルカリプロテアーゼ	-

+ : 阻害活性がある。- : 阻害活性なし

要 約

キャベツ種子中の T.I をゲル濾過, CM セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し, さらに分離した T.I について電気泳動的挙動, 分子量の推定及びその他の性質について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 1 つの画分に溶出され, 比活性は抽出液の 3 倍に上昇した。

2) ゲル濾過によって得た活性画分をさらに CM セルロースクロマトグラフィーで精製すると, 食塩濃度 0.25 M の溶出液で溶出され, 1 つの活性画分を得た。その比活性は 21 倍に上昇した。

3) 精製された画分についてディスク電気泳動を実施した結果, 2 つのバンドが存在し活性染色の結果, 両方ともトリプシンを阻害しキモトリプシンに作用しないことを認めた。

4) ゲル濾過活性画分を用いて等電点電気泳動を実施した結果, pI 値は 10.2 であった。

5) ゲル濾過による分子量の推定では 16500

であったが等電点電気泳動の画分について同様な方法で求めると, 25200 の結果が得られたことからタンパク質の会合が起きたことも考えられるので, 目下, 検討中である。

6) キャベツ T.I の耐熱性について検討した結果, 70°C では安定であったが, 80°C, 1 時間では約 65 % が失活し, 90°C では 20 分で完全に失活し, 大根, ナタネの T.I に比較して熱に対して不安定であることが認められた。

7) キャベツ T.I はトリプシン以外のキモトリプシン, ナガーゼ, プロナーゼなどに対する阻害活性は認められなかった。

文 献

- 1) URIEL, J. and BERGES, J. : Nature. 218(5), 578 (1968).
- 2) OGAWA, T. HIGASA, T. and HATA, T. : Agri. Biol. Chem., 32, 484 (1968).
- 3) OGAWA, T. HIGASA, T. and HATA, T. : Bull. Res. Inst. Food Sci, Kyoto Univ. No. 32, 1 (1971).
- 4) 福沢美喜男, 阿部博子 : 聖徳栄養短期大学紀要, 9, 15 (1978).
- 5) 福沢美喜男, 阿部博子 : 聖徳栄養短期大学紀要, 11, 15~21 (1980).
- 6) 福沢美喜男, 梅田美智子. : 聖徳栄養短期大学紀要, 12, 33~38 (1981).
- 7) 福田亘博, 古謝隆, 知念功, 本郷富士弥, 城間定夫, 四方治五郎. : 農化, 54, 1015~1019 (1980).