

紅しぼり豆由来タンパク質性 α -アミラーゼインヒビターの 化学的性質と各種 α -アミラーゼに対する阻害活性

橋 口 美智留
吉 川 秀 樹

I. 緒 言

デンプンの消化酵素である α -アミラーゼの活性を阻害する α -アミラーゼインヒビター(AI)は穀類¹⁾、豆類²⁾、イモ類³⁾などの植物性食品中に存在することが数多く報告されている。このような特定の栄養素の消化吸収に影響を与える食品成分は、肥満や糖尿病の予防・治療の際の食事療法の一つとしても関心を集めている⁴⁾。 α -アミラーゼなどの糖質の消化酵素である α -グルコシダーゼに対する阻害作用を活用し、食後血糖の上昇抑制作用が期待出来る旨を表示した特定保健用食品や機能性表示食品は既に多数存在する^{5,6)}。植物性食品由来のAIは、豆類では、特にインゲン豆に強い活性が見出されており、種々のインゲン豆^{2,7,8,9)}からタンパク質性のAIが精製され、その化学的性質が明らかにされている。そこで本研究では、インゲン豆属の中でも報告がされていない品種である紅しぼり豆由来のAI活性とその化学的性質について検証した。

II. 実験方法

1. 試料の調製

試料として乾燥紅しぼり豆 (*Phaseolus vulgaris*, 京都府産, 2015年収穫)を用いた。乾燥豆をミルで粉砕して粉末(20メッシュ)とし、5倍量の純水を加えて室温で1時間攪拌抽出した。その後、布でろ過し、ろ液を遠心分離(8,000回転, 30分)し、得られた上清を紅しぼり豆抽出物原液とした⁸⁾。

2. AIの精製

前述した方法で調製した紅しぼり豆抽出物原液に対して80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え塩析を行った。4℃で12時間放置後、生じた沈殿を遠

心分離(10,000回転, 30分)により回収し、透析用チューブ(分子量3,500カット)に入れて蒸留水に対して透析を行った。透析終了後、内液の遠心分離(10,000回転, 30分)により得られた上清を凍結乾燥し、粗AI画分とした。これを20mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した後、DEAE-セルロースカラム(1.6 ϕ ×30cm)に吸着させ、食塩(0.5M)の直線グラジエントにより溶出させた。得られたAI画分を、0.25M食塩を含む20mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化したトヨパールHW-55カラム(1.6 ϕ ×92cm)によるゲルろ過で分画し、得られたAI画分を透析後、凍結乾燥した。

3. 酵素および阻害活性測定法

先行研究⁸⁾に基づき、 α -アミラーゼ活性は、酵素としてブタ膵臓 α -アミラーゼ(Type I-A, Sigma社)、ヒト唾液 α -アミラーゼ(Type IX-A, Sigma社)、大麦(麦芽) α -アミラーゼ(Type VIII-A, Sigma社)、*Aspergillus oryzae*(カビ) α -アミラーゼ(Type X-A, Sigma社)を用いた。基質には、可溶性デンプンを用いてヨウ素法により測定した。すなわち、50mM塩化ナトリウムと5mM塩化カルシウムを含む20mMピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)緩衝液(pH 6.9)に酵素あるいは酵素とAIを加えた反応液1.0mLを37℃で30分間ブレインキュベーションした後、同緩衝液で調製した1.5%可溶性デンプン溶液0.5mLを加えて10分間反応させた。0.5N塩酸-0.5N酢酸混液(1:5)2.5mLを加えて反応を停止させた後、その0.4mLを取り、ヨウ素液(0.005%ヨウ素と0.05%ヨウ化カリウム混液)5.0mLを加えて発色させ、660nmにおける吸光度を測定した。酵素活性は酵素を含まないものをブランクとして酵素を作用させたものとの吸光度の差で表した。また、AIの阻害活性はAI存在下における残存酵素活性から

算出した。 α -アミラーゼの1酵素単位は、上述の反応系において660 nmでの吸光度を10分間あたり1.0増加させる酵素量とし、1阻害単位 (IU) は1酵素単位を50%阻害するAI量と定義した。

4. タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準タンパク質として、クマシーブリリアントブルー (CBB) G染色法によって行った¹⁰⁾。

5. 純度検定

C18のODSカラム(4.6 mm × 15 cm)を用いてHPLCによって、精製後のAIの純度を調べた。溶出液には0.1%TFA(トリフロロ酢酸)を使い、流速は1.0 mL/分、温度30°C、検出は280 nmの吸光度を測定した。

6. 電気泳動

精製したAIの均一性を検討するために、前述した手順に従って紅しぼり豆抽出物原液を硫酸アンモニウムで塩析したものとゲルろ過までの処理を行ったものを試料とし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動(PAGE)は、DAVISの方法¹¹⁾に従い12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、pH 8.9で行った。また、SDS-PAGEは、LAEMMLIの方法¹²⁾に従い12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。分子量マーカーは、アトー株式会社のEz Standard(フォスフォリラーゼb (MW 97,200), 血清アルブミン (MW 66,400), オボアルブミン (MW 45,000), カーボニックアンヒドラーゼ (MW 29,000), トリプシンインヒビター (MW 20,100), リゾチーム (MW 14,300))を用いた。泳動後、クマシーブリリアントブルーR250を用いた染色を行った。

7. 糖含量

インゲン豆由来のAIは、先行研究によって糖タンパク質であることが明らかになっている。そのため、AI中の糖含量を測定した。グルコースを標準としてフェノール硫酸法¹³⁾で定量を行った。

8. アミノ酸分析

精製AI中のアミノ酸組成は以下の方法で分析した。

試料を減圧下、6N HClで24時間加水分解した後、遊離アミノ酸の α -アミノ基にフェニルイソチオシアネート (PITC) を微アルカリ性でカップリングさせ、生成するフェニルチオカルバモイルアミノ酸 (PTC-アミノ酸) を高速液体クロマトグラフィーで分離することにより各種アミノ酸を定量した。すなわち、試料またはアミノ酸混合標準液 (Waco, Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H) をエッペンドルフチューブに取り、減圧下で乾燥させた。これにエタノール/蒸留水/トリエチルアミン混合液 (2:2:1) を加えて攪拌した後、再び減圧下で乾燥させた。これにエタノール/蒸留水/トリエチルアミン/PITC混合液 (7:1:1:1) を加えて室温で20分間反応させた後、減圧下で乾燥させ、分析に供した。分析には高速液体クロマトグラフィー (日本分光, PU980) を用い、逆相カラム (Waco, Wakosil-PTC, 4.0 mm × 20 cm) を専用溶離液 (Waco, PTC-Amino Acids Mobile Phase A) で平衡化した後、ミリポアフィルター (0.45 μ m) を通した試料液をかけ、専用溶離液 (Waco, PTC-Amino Acids Mobile Phase B) を用いる直線グラジエント法により溶出した (流速1 ml / 1 min, カラム温度40°C)。溶出液中のアミノ酸は254 nmでの吸光度を測定することにより検出し、試料の吸光度を標準品と比較することによって各アミノ酸量を求めた。データ解析には、BORWIN Chromatography Software (システム・JASCO-HPLC) を使用した。

Ⅲ. 実験結果および考察

1. 紅しぼり豆中のタンパク質量

CBBG染色法によるタンパク質量の測定を行った結果、乾燥豆に純水を加えて抽出した溶液では乾燥豆50 gあたり412.5 mg (乾燥豆1 gあたり8.3 mg)、抽出液に硫酸アンモニウムを加えて塩析を行った溶液では乾燥豆50 gあたり133.2 mg (乾燥豆1 gあたり2.7 mg) のタンパク質量が検出された。本研究では、精製AI中のタンパク質量の測定はCBBG染色法では行わなかった。

2. イオン交換クロマトグラフィーによるAIの精製

紅しぼり豆抽出物原液を塩析後、DEAE-セルロー

スカラムにかけた際の溶出プロファイルを図1に示した。フラクション No.59 から 0 ~ 0.5 M 食塩のグラジエント溶出を行った。図中の実線は各画分の 280 nm での吸光度を、破線は AI 活性を示している。図

1 に示すように、pH 7.0 の条件では未吸着部分には AI 活性は認められなかった。また、食塩濃度が 0.2 M 付近の画分から AI 活性が確認され、フラクション No.65 ~ 91 において活性を認めた。

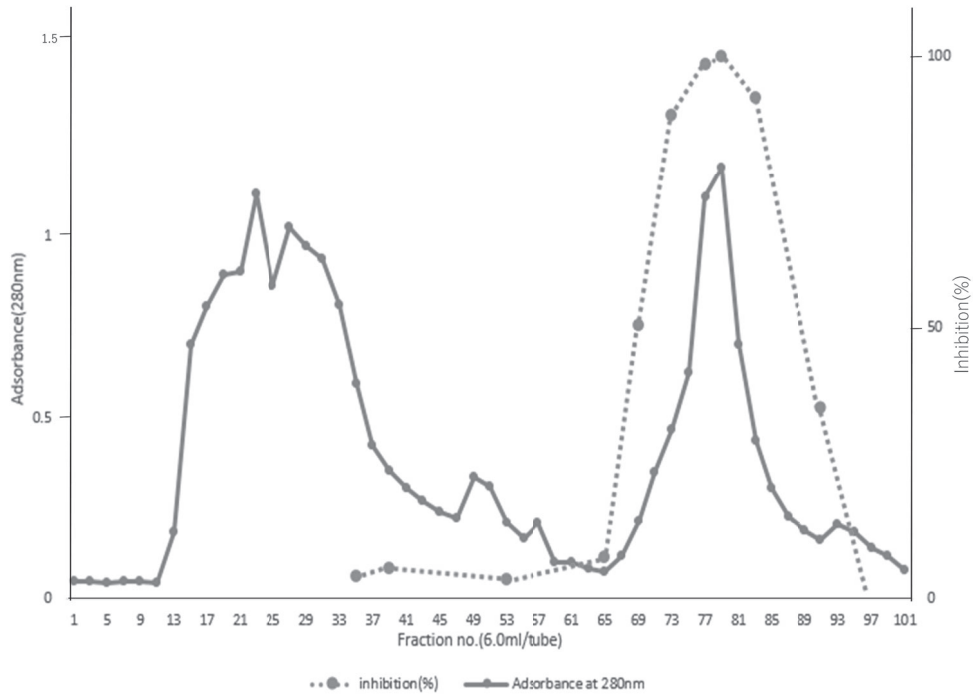


図1. イオン交換クロマトグラフィーによる AI の単離

3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる AI の精製

イオン交換クロマトグラフィーで得たフラクション No.69 ~ 91 の試料を使用し、トヨパール HW-55 を用いてゲルろ過による AI の精製を行った。図2はその

結果を示している。図中の実線は各画分の 280 nm での吸光度を、破線は AI 活性を示している。フラクション No.19 前後に AI 活性が検出され、最も AI が溶出している画分は No.19 であった。

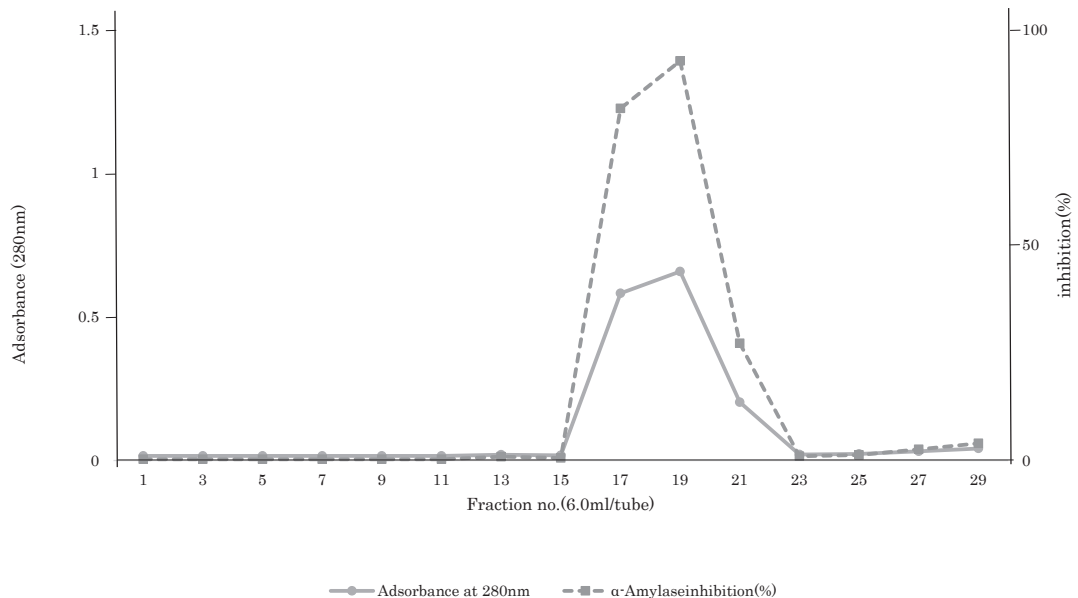


図2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる AI の単離

4. アミラーゼ阻害活性

精製したAIの阻害活性を調べるために、4種類の α -アミラーゼ、すなわち、ブタ膵臓 α -アミラーゼ、ヒト唾液 α -アミラーゼ、大麦（麦芽） α -アミラーゼおよび*Aspergillus oryzae*（カビ）グルコアミラーゼに対する阻害活性を調べた。図3にはAIのブタ膵臓 α -アミラーゼ、ヒト唾液 α -アミラーゼに対する阻害活性を、表1にはAIのブタ膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性を100%としたときの麦芽 α -アミ

ラーゼおよびカビグルコアミラーゼに対する阻害活性を示した。図3に示すように、紅しぼり豆AIは、ブタ膵臓 α -アミラーゼと同程度にヒト唾液 α -アミラーゼを阻害した。また、表1に示すように麦芽 α -アミラーゼに対しては阻害活性を示したが、カビグルコアミラーゼに対しては阻害活性を示さなかった。これらのことから、紅しぼり豆由来のAIは動物や植物の α -アミラーゼを特異的に阻害するものと考えられる。

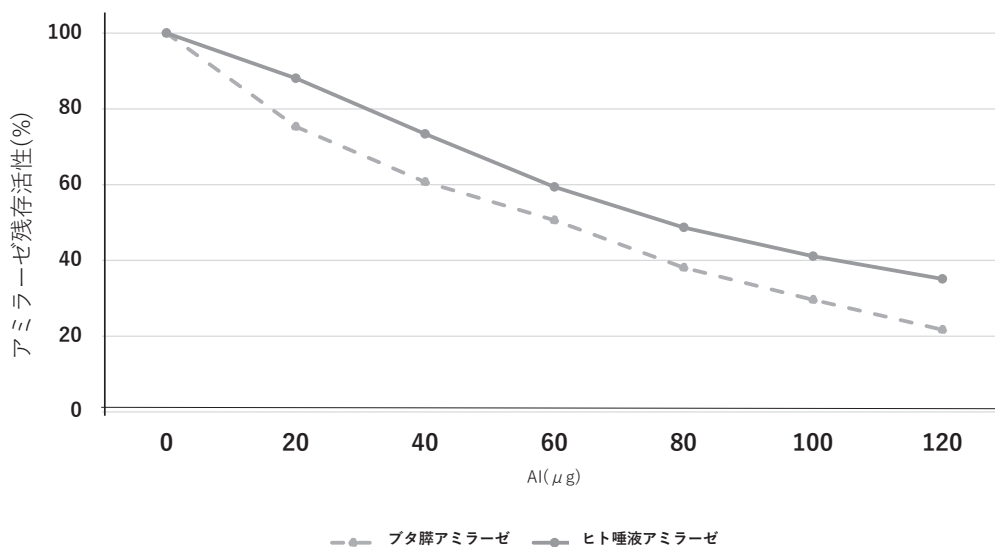


図3. ブタ膵臓 α -アミラーゼ、ヒト唾液 α -アミラーゼに対する阻害活性

表1 紅しぼり豆AIの阻害活性

	阻害活性 (%)
ブタ膵臓 α -アミラーゼ	100
麦芽 α -アミラーゼ	65.1
カビグルコアミラーゼ	0

ブタ膵臓 α -アミラーゼに対する活性を100%とした時の比率で示した。

5. AIの精製と性質

紅しぼり豆粉末の水抽出液を塩析後、DEAE-セルロースカラムにかけ、0～0.5 M食塩のグラジエント溶出を行った。また、その結果得られた試料を使用し、トヨパールHW-55を用いてゲルろ過によるAIの精製を行った。以上の各精製過程で得られたAI活性、たんぱく質量、比活性、収率を表2に示した。精製過程が進むにつれ、AI活性、たんぱく質量は減少しており、ゲルろ過クロマトグラフィー後は抽出後と比較して比活性は約188倍に上昇し、収率は11.3%であった。これらのことから、紅しぼり豆由来のAIは前述した方法で精製が可能であることが明らかになった。

表2 紅しぼり豆AIの精製

	AI 活性 (IU)	たんぱく質量 (mg)	比活性 (IU/mg)	比	収率 (%)
抽出液	13199.6	16409.6	0.80	1.00	100.0
塩析後	5372.1	1999.3	2.69	3.36	40.7
イオン交換クロマトグラフィー	4180.6	39.7	150.20	131.5	31.7
ゲルろ過クロマトグラフィー	1490.8	9.9	150.44	188.05	11.3

6. 純度検定

図4はゲルろ過クロマトグラフィーにより精製したAI (フラクションNo.19) の純度検定を行った結果を示している。純度検定は、HPLCを用いた逆相クロマトグラフィーで行った。精製試料をカラムにかけてから2分以降に複数のピークが確認された。図に示すように、ほぼ単一のタンパク質ピークが検出され、純

度は約95%であった。この結果から、ほぼ均一なAIがイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって精製可能であることが確認された。また、トヨパールHW-55カラムを用いたゲルろ過によって精製AIの分子量を標準タンパク質と比較した結果、精製AIの分子量は約40,000と推定された。

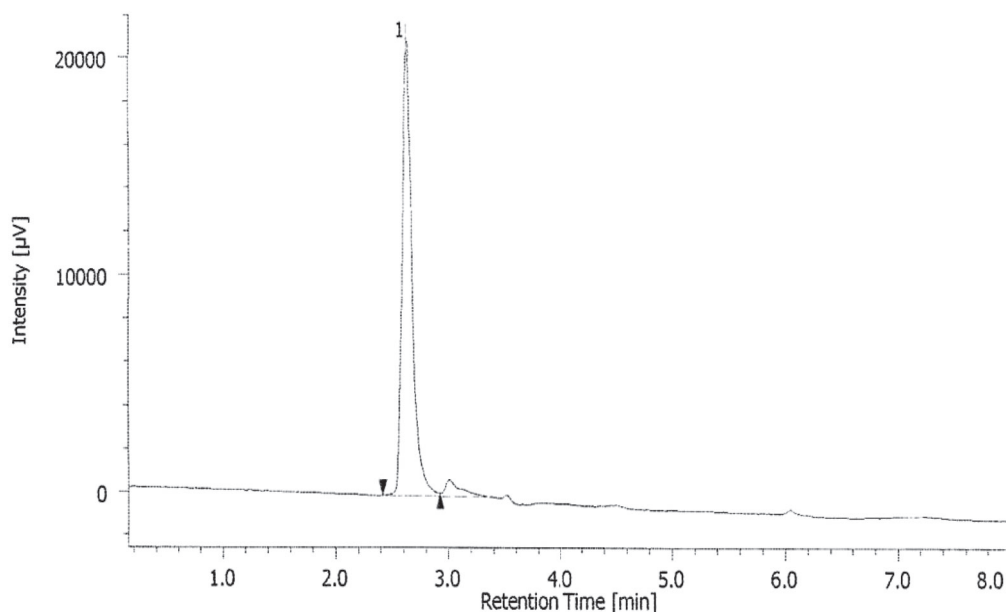


図4. HPLCによる純度検定

7. 電気泳動

精製したAIの均一性をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって調べた結果を図5に示した。塩析段階では複数のタンパク質が確認され、ゲルろ過後では主要なインヒビターのバンドが確認されたが、マイナーなバンドも複数確認された。したがって、均一性を上げるにはさらなる精製過程が必要であると推察される。また、精製したAIの分子量およびサブユニット構造をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって調べた結果を図6に示した。確認出来た主要なバン

ドの分子量は、16,600と14,800であった。AIが2つのサブユニットから構成されると仮定すると分子量は31,400と推察される。しかし、精製段階で行われたトヨパールHW-55カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーの結果から分子量は約40,000と推定されていることから、AIの分子量は30,000～40,000程度と考えられる。先行研究より、他のインゲン豆より単離されたAIの分子量は47,000～49,000程度^{2,7,14)}であることから、紅しほり豆中のAIは他のインゲン豆由来のAIよりも分子量が小さいことが明らかになった。

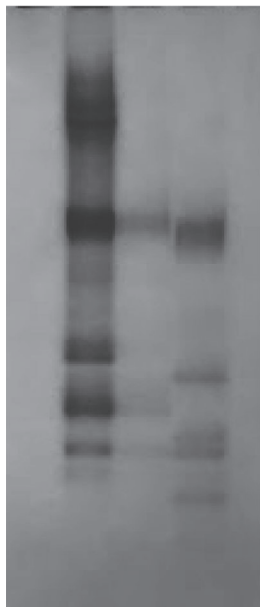


図5. 紅しぼり豆 AI の電気泳動

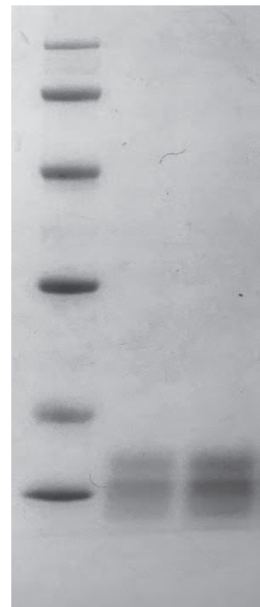


図6. 紅しぼり豆 AI の SDS - 電気泳動

7. 糖含量

インゲン豆に含まれる AI は糖タンパク質であることが知られている。そこで、精製した紅しぼり豆由来 AI の糖含量をフェノール硫酸法によって測定した。紅しぼり豆由来の AI と先行研究によって示された他のインゲン豆由来 AI の糖含量^{2,7,8,14)}を表3に示した。表3に示したように、他のインゲン豆由来 AI の糖含量と比較すると、紅しぼり豆 AI に含まれる糖含量は平均的であると考えられる。

表3 インゲン豆 AI の糖含量

	糖含量 (%)
金時豆	15.0
黒インゲン豆	14.5
紅しぼり豆	10.3
トラ豆	9.1
白インゲン豆	7.5

8. アミノ酸組成

精製した紅しぼり豆由来 AI のアミノ酸組成を調べた結果を、表4に示した。紅しぼり豆由来 AI はアスパラギン酸、セリンを多く含み、システイン、バリン、チロシンは微量であることが分かった。紅しぼり豆由来 AI のアミノ酸組成を金時豆 AI やトラ豆 AI のアミノ酸組成と比べると、アスパラギン酸やセリン、スレオニンを多く含む点では同じだが、金時豆 AI とトラ

豆 AI では比較的多く含まれるバリンの含有量が少なく、金時豆 AI⁸⁾ やトラ豆 AI¹⁵⁾ では含有量が少ないメチオニンが約5倍含まれ、金時豆 AI やトラ豆 AI では含まれていないシステインが微量ではあるが含まれているという特徴がみられた。

表4 紅しぼり豆 AI のアミノ酸組成

アミノ酸	% mol
Asp	23.2
Glu	7.1
Ser	12.1
Gly	3.9
His	2.4
Arg	2.5
Thr	7.6
Ala	5.9
Pro	4.7
Tyr	2.1
Val	1.9
Met	4.9
Cys	1.8
Ile	4.4
Leu	4.9
Phe	4.0
Lys	6.8

IV. 要約

インゲン豆の一種である紅しほり豆から精製した AI の化学的性質と各種アミラーゼに対する阻害活性を調べた。紅しほり豆由来 AI は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによってある程度均一な物質に精製された。また、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび電気泳動の結果より、紅しほり豆由来 AI の分子量は 30,000 ~ 40,000 程度であることが明らかになった。この AI の糖含量は 10.3% である。AI 活性は、ブタ膵臓 α -アミラーゼとヒト唾液 α -アミラーゼに対しては同程度であったが、麦芽 α -アミラーゼに対してはやや弱く、カビグルコアミラーゼに対しては活性を持たなかった。すなわち、動物だけでなく植物由来の α -アミラーゼに対して阻害活性を有することが明らかになった。膵臓 α -アミラーゼと唾液 α -アミラーゼに対する阻害作用が同程度であることは、これまでに報告されているインゲン豆由来の AI にも観察されたが、植物由来 α -アミラーゼに対して阻害作用を有する点は他のインゲン豆由来 AI の性質とは異なっていた。

終わりに、本研究を行うにあたり、実験にご協力頂きました本学卒業生鈴木あすみさん、山田恵利花さん、中津果也さん、三溝理沙さん、湯瀬志保さん、吉田雅美さん、森本彩花さんに深謝致します。

参考文献

- 1) O'donnell, M.D. and Mcgeeney, K.F. : *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 159 (1976).
- 2) Marshall, J.J. and Lauda, C.M. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030 (1975).
- 3) Sharma, K.K. and Pattabiraman, T.N. : *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 255 (1982).
- 4) 横田 隆, 桐原 修, 大石一二三, 谷 久典, 渡辺 乾二, 大網 弘 : 栄食誌, **47**, 341 (1994).
- 5) 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川 雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章 : 日農化会誌, **72**, 923 (1988).
- 6) 下田博司, 川守秀輔, 河原有三 : 栄食誌, **51**, 279 (1998).

- 7) Powers, J.R. and Whitaker, J.R. : *J. Food Biochem.*, **1**, 217 (1977).
- 8) 小垂 眞, 吉川秀樹 : 家政誌, **39**, 1065 (1988).
- 9) Yoshikawa, H., Kotaru, M., Tanaka, C., Ikeuchi, T. and Kawabata, M. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45**, 797 (1999).
- 10) Bradford, M.M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 11) Davis, B.J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- 12) U.K. Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 13) Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith F. : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 14) Frels, J.M. and Rupnow, J.H. : *J. Food Biochem.*, **8**, 281 (1984).
- 15) Yoshikawa, H., Kotaru, M., Tanaka, C., Kawabata, M. and Ikeuchi, T. : *J. Home Econ. Jpn.*, **50**, 243 (1999).

