

インゲン豆抽出物のラット小腸粘膜二糖類水解酵素阻害作用に関する研究

橋 口 美智留
小 垂 眞
吉 川 秀 樹

I 序

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) は様々な植物性食品中に見出されており、穀類¹⁾、豆類²⁾、イモ類³⁾ 中よりその存在が報告されている。豆類では、特にインゲン豆^{2, 4, 5)} に強い活性が見出されており、種々のインゲン豆から AI が単離・精製されている。小垂らは、インゲン豆の一種である金時豆よりタンパク質性の AI を単離し、その性質について報告している⁶⁾。AI は、ヒトやブタなど、動物の消化管に存在する α -アミラーゼを強く阻害することから糖質の消化吸収に与える影響について様々な検討がなされており、糖尿病や肥満症の予防および治療を目的とした機能性食品成分としての可能性も検討されている。

一方、AI の中には、他の糖質消化酵素に対しても阻害作用を示すものがあり、グアバ茶ポリフェノールは α -アミラーゼに対して阻害作用を有するだけでなく、ヒトやブタの小腸粘膜に存在する二糖類水解酵素であるスクラーゼやマルターゼに対しても阻害作用を示すことが報告されている⁷⁾。この作用を活用して、糖質の吸収を穏やかにする効果が期待出来る特定保健用食品として、グアバ茶ポリフェノールを含む茶系飲料が既に商品化されている。また、筆者らは、二糖類水解酵素阻害作用を有する桑葉エキス末やアルギン酸分解物等の植物性成分が、 α -グルコシダーゼの一種であるラクトース由来のグルコース転移酵素、グルコシルトランスフェラーゼに対しても阻害作用を持つことを明らかにしてきた^{8, 9)}。このように、特定の糖質水解酵素に対して阻害作用を有する成分が、他の糖質水解酵素に対してもまた阻害作用を発現する可能性は十分にある。しかしながら、インゲン豆抽出物については、 α -アミラーゼ以外の糖質消化酵素に対する影響を観察した報告は未だない。そこで本研究では、インゲン豆より精製される AI が二糖類水解酵素に対して阻害

作用を有するか否かを検証することを目的として実験を行った。

II 実験材料ならびに方法

1. 試料

(1) 使用した豆類

本研究では、インゲン豆属の中でも AI 活性が比較的強く¹⁰⁾、国内での流通量が多い金時豆 (*Phaseolus vulgaris* cultivar Kintoki) とトラ豆 (*Phaseolus vulgaris* cultivar Tora) の2種類を試料として用いた。金時豆とトラ豆は共に2016年に製造された北海道産のものを使用した。

(2) 試料の抽出方法

金時豆とトラ豆を各50gずつ豆の状態のままミルで粉末(20メッシュ以下)にした後、5倍量の純水を加えて室温で60分間攪拌した。その後、布でろ過して遠心分離(8,000回転, 30分間)により上清を回収した。この上清をインゲン豆抽出物原液とした。

2. ラット小腸粘膜を用いた二糖類水解酵素阻害実験

(1) ラット小腸粘膜微絨毛膜刷子縁膜の調製

田辺賢一講師(名古屋女子大学)より供与頂いたラット小腸粘膜由来の微絨毛膜刷子縁膜画分 (brush border membrane vesicles; 以下, BBMV と示す) を使用した。このBBMVは、Kesslerらの方法¹¹⁾ に準じて調製されたもので、実験に供するまで凍結保存した。

(2) 二糖類水解酵素に対する豆抽出物の阻害実験

二糖類水解酵素であるスクラーゼ、マルターゼ、ラクターゼ、トレハラーゼの活性は、グルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法¹²⁾ を一部改変した奥らの方法¹³⁾ により、グルコース溶液を標準液とし

て測定した。それぞれの基質として、スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースを0.1 M マレイン酸-NaOH 緩衝液 (pH6.0) を用いて濃度が112 mM になるように調製した。酵素標本として、適当に希釈したBBMVを用いた。適切量 (0.1 mL) の酵素標本を予備加温し、これに同量の基質 (0.1 mL) を加えて37℃で適当な時間反応させた。盲検は基質の酵素反応を事前に停止させたものとした。阻害を観察する実験では、基質を加える前にインゲン豆抽出物原液 (50 μ L および 100 μ L) を添加した。対照は試料と同量の純水を添加して同一の方法で操作した。反応終了後、分光光度計 (UV-1240mini, 島津製作所, 京都府) を用いて波長 500 nm における吸光度を測定した。検量線はグルコースを用いて作成し、酵素反応によって遊離したグルコース量を算出した。各酵素の比活性はタンパク質 1 mg あたり 1 時間に加水分解された基質量を μ mole 数 (μ moles of substrate hydrolyzed/ mg/ protein/ hr) で表した。

3. BBMV および豆抽出物のタンパク質濃度の測定

色素を用いる Bradford 法¹⁴⁾ に準じて BBMV および豆抽出物のタンパク質濃度を測定した。適当に希釈した試料 50 μ L に Coomassie Brilliant Blue を 5 倍量の蒸留水で希釈し、No. 1 ろ紙でろ過して調製した溶液を 2.5 mL 加え、攪拌した。室温で 5 分間放置した後、分光光度計を用いて波長 595 nm における吸光度を測定した。タンパク質標準液は、牛血清アルブミンを用いた。

4. 試薬など

スクロース、ラクトース、牛血清アルブミンは Wako より購入した。マルトースおよびトレハロースは奥恒行教授 (十文字学園女子大学) より供与頂いたものを使用した。また、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼはシグマ薬品 (株) から、Coomassie Brilliant Blue は Bio-Rad (株) から購入したものを使用した。

Ⅲ 実験結果および考察

図 1 は、スクラーゼ活性に対するインゲン豆抽出物の影響を観察した結果である。コントロールのグル

コース生成量を 100% とした場合に対する比率で示した。金時豆抽出物を 50 μ L 添加した場合には、コントロールと比べてグルコース生成量は 30.1% 減少し、100 μ L 添加した場合には 42.9% 減少した。トラ豆抽出物を 50 μ L 添加した場合には、コントロールと比べてグルコース生成量は 16.9% 減少し、100 μ L 添加した場合には 18.6% 減少した。したがって、金時豆およびインゲン豆いずれも豆抽出物の添加量に依存して阻害作用が観察された。

図 2 は、トレハラーゼ活性に対するインゲン豆抽出物の影響を観察した結果である。金時豆抽出物を 50 μ L 添加した場合、グルコース生成量はコントロールに対して 11.5% 減少し、100 μ L 添加した場合には 8.5% 減少した。トラ豆抽出物を 50 μ L 添加した場合には、コントロールと比較してグルコース生成量は 24.0% 減少し、100 μ L 添加した場合には 16.3% 減少した。いずれの豆抽出物においてもトレハラーゼに対する阻害作用が観察されたが、容量依存性はみられなかった。

図 3 は、マルターゼ活性に対するインゲン豆抽出物の影響を観察した結果である。金時豆抽出物を 50 μ L 添加した場合にはコントロールに比べてグルコース生成量は 39.2% 増加し、100 μ L 添加では 32.3% 増加した。トラ豆抽出物を 50 μ L 添加した場合、グルコース生成量はコントロールと比較して 63.4% 増加し、100 μ L 添加した場合は 41.5% 増加した。したがって、スクラーゼやトレハラーゼとは異なり、インゲン豆抽出物はマルターゼに対しては阻害作用を示さなかった。

図 4 は、ラクターゼ活性に対するインゲン豆抽出物の影響を観察した結果である。マルターゼ活性と同様に、金時豆およびトラ豆いずれにおいても豆抽出物を添加した場合にグルコース生成量は増加し、阻害作用は観察されなかった。

インゲン豆中の AI は、デンプン中の α -1,4 結合を加水分解する α -アミラーゼを阻害する。一方で、 α -アミラーゼと同様にグルコースが α -1,4 結合したマルトースを基質とするマルターゼに対しては阻害作用を示さなかった。マルターゼ活性は消化管内に存在する水解酵素であるグルコアミラーゼ、スクラーゼならびにイソマルターゼ活性の総和であるとされている。グルコアミラーゼ、イソマルターゼ単独の活性に

については検討していないが、本研究の結果より、インゲン豆抽出物がスクラーゼに対しては阻害作用を持つことが明らかになった。さらに、 α -1,1 グリコシド結合を切断するトレハラーゼに対しても阻害作用を示した。その一方で、ラクターゼ活性に対しては影響を与えなかった。したがって、 α -アミラーゼに対する阻害作用の有無や活性の強さが二糖類水解酵素に対する阻害の有無や強さと相関するとは言いがたいが、 α -アミラーゼに対する阻害活性が他の糖質水解酵素阻害物質を探索する上での糸口とはなり得ると考える。

先行研究より、インゲン豆中の AI は、タンパク質性の物質であり、金時豆中の AI は分子量 45,000 の糖タンパク質であるとされている⁴⁾。また、様々なインゲン豆種子およびそれらの加工品に含まれる AI 活性について調べた結果、トラ豆の AI 活性が最も高く、次いで金時豆の活性が高いことが明らかにされている¹⁰⁾。本研究に用いた試料中のタンパク質濃度を測定した結果、金時豆抽出物では $9.4 \mu\text{g/mL}$ 、トラ豆抽出物では $11.2 \mu\text{g/mL}$ であった。一方で、本研究で観察されたスクラーゼ阻害活性はトラ豆よりも金時豆においてより強い活性を有していた。トレハラーゼに対する阻害活性は、金時豆およびトラ豆のいずれにおいても観察されたが、スクラーゼ阻害作用に比べると弱く、容量依存性も観察されなかった。本研究で使用したインゲン豆抽出物は、試料となる豆種子より水抽出したものであるため、試料中に存在する AI 以外の成分が実験結果に影響を及ぼした可能性は否定できない。また、阻害作用を持つ物質が複数存在する可能性も考えられる。したがって、今後、インゲン豆抽出物中の二糖類水解酵素阻害物質の単離・精製を行う必要があると考える。さらに、 α -アミラーゼや二糖類水解酵素に対する阻害作用がヒトの消化管内で発現されるためには、熱安定性や至適 pH などの化学的性質を明らかにする必要がある。一方で、本研究によってインゲン豆抽出物はデンプンを基質とする酵素だけではなく、スクラーゼを基質とする酵素に対しても阻害作用を示すことが明らかになった。このことは、インゲン豆抽出物が米やパンなどのデンプンを主成分とする主食に該当するような食品だけではなく、砂糖を主成分とする菓子類を対象とした機能性食品素材として活用出来る可能性が示唆されたことを示している。

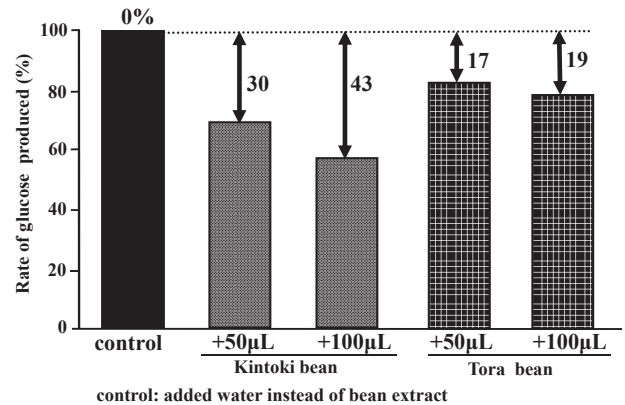


Fig 1. Inhibitory effects of kidney beans on sucrase

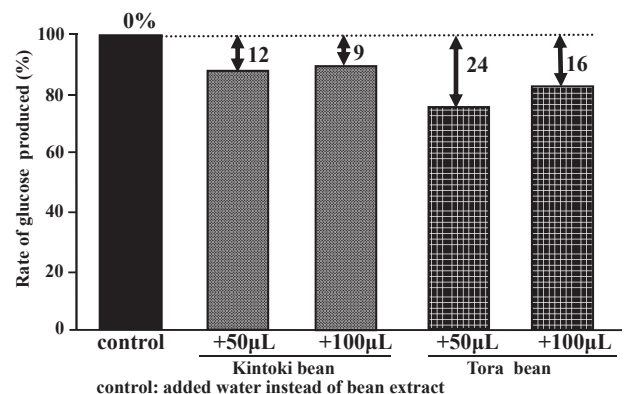


Fig 2. Inhibitory effects of kidney beans on trehalase

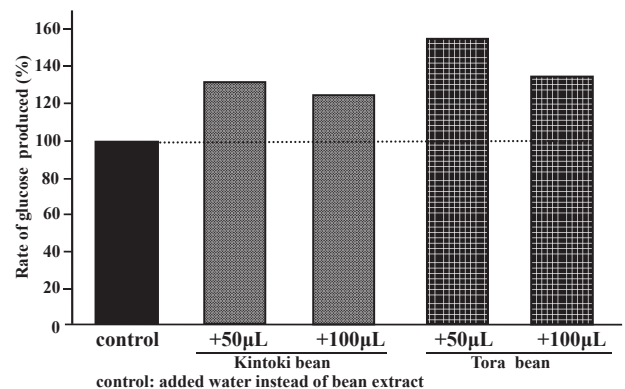


Fig 3. Effects of kidney beans on maltase

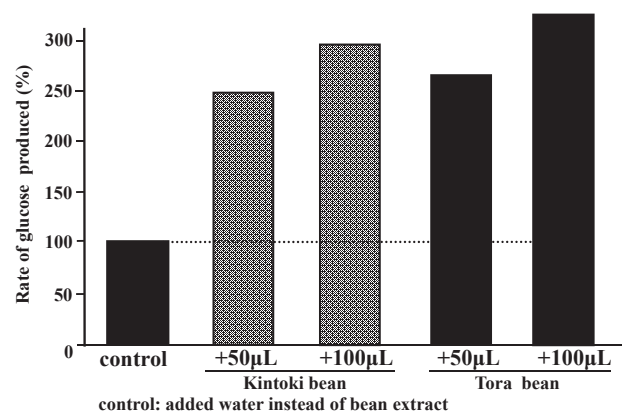


Fig 4. Effects of kidney beans on lactase

Ⅳ 要 約

α -アミラーゼに対して阻害作用を持つインゲン豆抽出物がラット小腸粘膜微絨毛膜中に存在する二糖類水解酵素に対しても阻害作用を示すか否かを検討した。試験物質として、インゲン豆属の中でも比較的強い α -アミラーゼ阻害活性を有することが明らかになっている金時豆およびトラ豆を使用した。

ラット小腸粘膜スクラーゼ活性およびトレハラーゼ活性は、金時豆およびトラ豆いずれの抽出物添加においても阻害が観察された。阻害効果は、金時豆抽出物においてより顕著であった。一方で、マルターゼおよびラクターゼ活性に対しては金時豆およびトラ豆いずれの抽出物添加においても阻害が観察されなかった。

Ⅴ 謝 辞

本研究を行うにあたり、マルトースおよびトレハロースを供与して下さった十文字学園女子大学、奥恒行教授ならびに中村禎子准教授、BBMVを供与して下さった名古屋女子大学の田辺賢一講師に深甚の謝意を表します。また、実験にご協力頂いた本学卒業生の中川由菜さん、松井小百合さん、宮田真菜さん、山田菜摘さん、若林友夏さんに深謝致します。

Ⅵ 文 献

- 1) O'donnell, M. D., Mcgeeney, K. F.: *Biochim. Biophys. Acta* 422:159-169 (1976).
- 2) Marshall, J. J., Lauda, C. M.: *J. Biol. Chem* 250:8030-8037 (1975).
- 3) Sharma, K.K., Pattabiraman, T. N.: *J. Sci. Food. Agric* 33:255-262 (1982).
- 4) 小垂眞, 吉川秀樹: 日本家政学会誌 39:1065-1070 (1988).
- 5) Powers, J.R., Whitaker, J.R.: *J. Food. Biochem* 1:217-238 (1977).
- 6) 小垂眞, 吉川秀樹: 日本家政学会誌 42:817-819 (1991).
- 7) 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: 日本農芸化学会誌 72:923-931 (1988).
- 8) 橋口美智留, 中村禎子, 奥恒行: 日本食物繊維学会誌 15:13-19 (2011).
- 9) Hashiguchi-Ishiguro M, Nakamura S, Oku T: *Int. J. Food. Sci. Nut* 60 (s4):224-231 (2009).
- 10) 吉川秀樹, 桑島千栄, 小垂眞: 京都光華女子大学研究紀要 47: 227-237 (2009).
- 11) Kessler M, Acuto O, Etirelli C, Murer H, Smenza G: *Biochim. Biophys. Acta* 506:136-154 (1978).
- 12) Dahlqvist A.: *Anal. Biochem* 7:18-25 (1964).
- 13) Oku T, Konishi F, Hosoya N: *J. Nutr* 112:410-415 (1982).
- 14) Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976).