

ショウガ根茎中のシステインプロテイナーゼ インヒビターの精製と性質

中村 俊美, 北村 陽子

(平成8年10月7日受理)

Purification and Characterization of Cysteine Proteinase Inhibitor from Ginger Rhizome

Toshimi NAKAMURA and Yoko KITAMURA

(Received October 7, 1996)

緒 言

スパイスとして料理によく使われるショウガには多くの有用成分が含まれており、辛味成分であるジンゲロール類、ショウガオールなどは健胃、鎮痛、鎮咳作用を有していることが知られている。また、ショウガにはプロテイナーゼの存在することが、市川ら¹⁾、妻鹿ら²⁾、および橋本ら³⁾により報告されている。しかし、プロテイナーゼインヒビターについてはほとんど報告されていない。植物にはシステインプロテイナーゼインヒビター(CPI)の存在することが明らかになっているが、それは植物中に含まれるプロテイナーゼが主としてシステインプロテイナーゼであることから理解できる。植物中のシステインプロテイナーゼすなわち植物シスタチンについては米^{4) 5) 6)}、コーン^{7) 8)}などの種子中に、その他バナナ⁹⁾、ポテト¹⁰⁾にその存在が報告されている。この植物シスタチンは植物のタンパク質代謝の調節や生体防御作用をもつとされ、新しい食品の機能性の開発に役立つと思われる。

そこで本研究ではショウガ根茎中性抽出液からショウガ中のシステインプロテイナーゼインヒビターを分離し、その性質の一部を明らかにした。

実験方法

1. 試 料

試料は市販のショウガ根茎を剥皮後、厚さ1mmの薄切りにしてから使用した。操作はすべて4℃で行った。

2. 試 薬

ベンゾイルアルギニン-β-ナフチルアミド(BANA)、パパインはSigma社から購入した。アルブミン、オボアルブミン、キモトリプシノーゲンA、リボヌクレアーゼA、セファデックスG-75はPharmasia社から得た。DEAE-セルロース(DE-52)はWhatman社から購入した。

3. パパインとフィシンならびにそのCPI活性の測定

パパイン、フィシンの活性はBANAを基質とし、松谷ら¹¹⁾の方法により測定した。その方法は次のとおりである。パパイン(0.61 μg)、フィシン(1.33 μg)を0.4mlの50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.2)/2mMエチレンジアミンテトラアセテート(EDTA)/1mMジチオスレイトール(DTT)の中で0.5mM BANAと共に37℃で20分間作用させた後、0.23NHCl/エタノール溶液を0.4ml加えて反応を停止させ、さらに0.06%p-ジメチルアミノシナムアルデヒド/エタノール溶液を0.4ml加え、遊離したβ-ナフチルアミンを540nmで測定した。1分間に基質1 μmolを分解する酵素活性を1unitとした。またインヒビターの活性はCPI共存下で上記と同条件で酵素活性を測定し、BANA分解活性の減少量を求めた。すなわち1unitの酵素がBANA分解活性を阻害する量をCPI活性の1unitとした。

4. トリプシン活性の測定

トリプシン(7.5 μg)を0.4mlの0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.2)の中で0.5mM BANAの基質と共に37℃で20分間作用させた後、0.23NHCl/エタノール溶液を0.4ml加えて反応を停止させ、さらに0.06%p-ジメチルアミノシナムアルデヒド/エタノール溶液を0.4ml加え、遊離

したβ-ナフチルアミンを540nmで測定した。1分間に基質1μmolを分解する活性をトリプシンの1unitとした。

5. 分子量の測定

CPIの分子量は10mMTris-HCl緩衝液(pH7.2)/0.1MNaCl /1mMNaN₃で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×91cm)のゲルクロマトグラフィーにより求めた。標準物質としてアルブミン(分子量67,000), オボアルブミン(分子量45,000), キモトリプシノーゲンA(分子量25,000), リボスクレアーゼA(分子量13,700)を用いた。

6. 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たビュレット法で求めた。カラムクロマトグラフィーで溶出した画分のタンパク質濃度は280nmの吸収を測定した。

結果および考察

1. ショウガCPIの精製

ショウガの薄片500gに1.5倍量の40mMTris-HCl緩衝液(pH7.2)/4mMNaN₃を加えてホモジナイズした。このホモジネイトを2時間攪拌した後ガーゼでこし、ろ液を得た。この段階でCPI活性の測定を試みたが、共存物質の影響で測定ができなかった。次にこのろ液を80℃で10分間熱処理し、冷却後7000×gで20分間遠心分離して得た上澄液を粗抽出液とし、アセトン分画を行った。

0%から33%間のアセトン濃度で沈殿する画分(A₀₋₃₃), 33%から55%間のアセトン濃度で沈殿する画分(A₃₃₋₅₅), 55%から77%間のアセトン濃度で沈殿する画分(A₅₅₋₇₇)を7000×g, 20分間の遠心分離で得た。各沈殿物を少量の10mMTris-HCl緩衝液(pH7.2)/1mMNaN₃で溶かし、同液で透析した後、CPI活性を測定した。CPI活性はA₃₃₋₅₅とA₅₅₋₇₇に回収された。

比活性の上昇が著しかったA₅₅₋₇₇画分を10mMTris-HCl緩衝液(pH7.2)/1mMNaN₃で平衡化したDEAE-セルロースカラム(2.6×16cm)にかけた。CPIはすべて吸着し、0.0Mから0.3MまでのNaCl濃度勾配法で溶出した(Fig.1)。CPIは0.15Mから0.21MNaClの位置に溶出した。その活性画分を集めて10mMTris-HCl緩衝液(pH7.2)/0.1MNaCl/1mMNaN₃で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×91cm)にかけ同液で溶出した。CPI活性は大きな1つのピークとその肩に小さなピークとして現れた。その大きな1つのピークを集

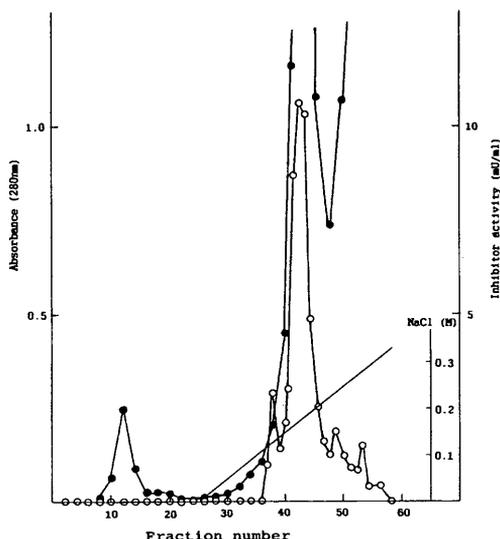


Fig. 1 DEAE-cellulose column chromatography of cysteine proteinase inhibitor The crude extract (827.7ml, 2855mg of protein) was applied to a column (2.6×16cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2) /1mM NaN₃, and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3M. Fraction of 7.5ml were collected. Absorbance at 280nm (●); inhibitor activity against papain (○).

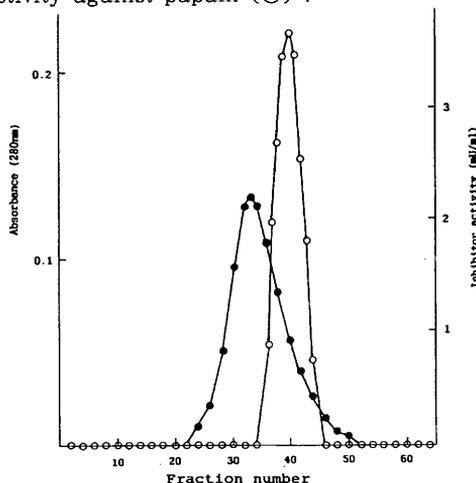


Fig. 2. Second Sephadex G-75 column chromatography of cysteine proteinase inhibitor The active fractions from the first Sephadex G-75 column were pooled and concentrated by Centriflo. The concentrated solution (7.2ml, 4.51mg of protein) was applied to a column (1.6×91cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2) /0.1M NaCl/1mM NaN₃, and eluted with the same solution. Fraction of 3ml were collected. Absorbance at 280nm (●); inhibitor activity against papain (○).

めてセントリフローで濃縮し、再び同条件下でセファデックスG-75カラムにかけた。その結果をFig.2に示した。CPI活性は分子量14,500に相当する位置に1つのピークとして溶出した。この精製段階までで比活性は42.59 mU/mgとなり、粗抽出液のその約40倍まで上昇した。この分子量14,500のショウガCPIは分子量12,000の米CPI⁽⁴⁾、分子量9,200のコーンCPI⁽⁷⁾よりやや分子量が大きいのがこれらと同種のものであろうと考えられる。

尚、パパインに対してかなり強い阻害活性を示す33%から55%間のアセトン濃度で沈殿する画分については現在検討中である。

2. ショウガCPIの熱安定性

ショウガCPIを10mM Tris-HCl緩衝液(pH7.2)/0.1 M NaCl / 1mM NaN₃中で40,50,60,70,80,90,100℃の各温度で10分間加熱した後、残存するCPI活性を測定した。その結果はFig.3のとおりであった。ショウガCPIは40から90℃で安定、100℃でも96%の活性が残っており、かなり高い熱安定性を示した。今まで報告された動物のCPIと植物のCPIは共にかなり高い熱安定性を示している。ショウガCPIもそれらと類似していた。

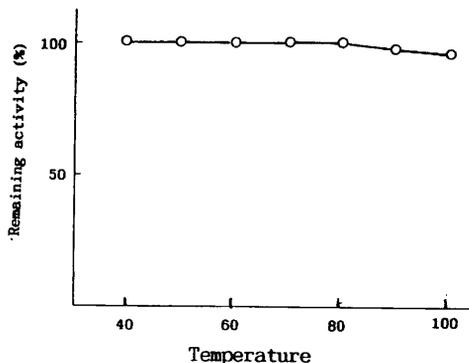


Fig. 3. Heat stability of the cysteine proteinase inhibitor from ginger rhizome

The purified CPI was incubated in the presence of 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2) / 0.1M NaCl / 1mM NaN₃, for 10min, at various temperatures. After the treatment the remaining activity against papain was measured.

3. ショウガCPIのpH安定性

ショウガCPIをpH4,5は50mM酢酸緩衝液 / 1mM NaN₃, pH6,7は50mMリン酸緩衝液 / 1mM NaN₃, pH8,9は0.1M Tris-HCl緩衝液 / 1mM NaN₃の各pH

の緩衝液中に37℃で3時間貯蔵した後、残存するCPI活性を測定した。その結果はFig.4に示した。ショウガCPIの活性はpH4付近で90%を保持しており、pH5からpH9では安定であった。米CPI⁽⁴⁾、コーンCPI⁽⁷⁾が酸性側からアルカリ性側までかなり広い範囲で高いpH安定性を示したのに対し、ショウガCPIではpH4付近で若干不安定であった。

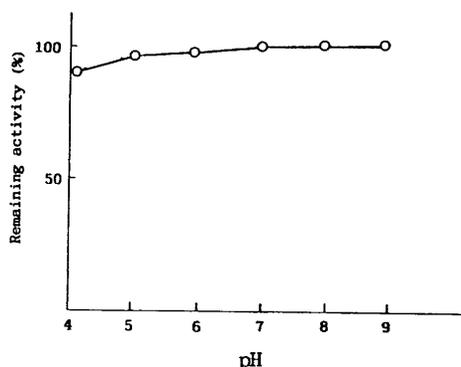


Fig. 4. pH stability of the cysteine proteinase inhibitor from ginger rhizome

The purified CPI was incubated in the presence of the buffer at various pHs and 37°C for 3hr. The remaining activity against papain was measured.

4. 各酵素に対する阻害

パパイン、フィシン、トリプシンに対するショウガCPIの活性を測定したところ、システインプロテナーゼであるパパインとフィシンがショウガCPIによって阻害された。パパインとフィシンに対するショウガCPIの阻害活性の強さはほぼ同程度であった。セリンプロテナーゼであるトリプシンはショウガCPIによって阻害されなかった。

要 約

ショウガ根茎を中性緩衝液で抽出後、80℃で10分間熱処理し、遠心分離により得た上澄をアセトン分画した。55%から77%間のアセトン濃度で沈殿する画分をDEAE-セルロース、2回のセファデックスG-75の順でカラムにかけ精製した結果、パパインを強く阻害する分子量14,500のシステインプロテイナーゼインヒビターの存在を確認した。このCPIは熱に安定であった。pH5からpH9では安定であったがpH4付近でやや不安定の傾向が

みられた。パパインとフィシンを阻害したが、トリプシンに対しては阻害活性を示さなかった。

文 献

- 1) 市川芳江, 佐々初世, 道喜美代: 栄養と食糧, 26, 377(1973)
- 2) 妻鹿絢子, 三橋富子, 藤木澄子, 荒川信彦: 家政学雑誌, 34,79(1983)
- 3) 橋本昭彦, 竹内洋子, 河原有三, 安本教傳: 日本栄養・食糧学会誌, 44,127(1991)
- 4) Abe,K., Kondo, H. and Arai, S.:Agric. Biol. Chem., 51, 2763 (1987)
- 5) Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, K. and Arai, S.:J. Biol. Chem., 262, 16793 (1987)
- 6) Kondo,H.,Abe,K.,Nishimura,I.,Watanabe,H., Emori, Y., and Arai, S.: J. Biol. Chem., 265, 15832 (1990)
- 7) Abe, M. and Whitaker, J.R. : Agric. Biol. Chem., 52, 1583 (1988)
- 8) Abe, M., Abe, K., Kuroda, M. and Arai, S.:Eur. J. Biochem., 209, 933 (1992)
- 9) M. N. Reddy, P. S. Kein, R. L. Heinrikson and F.J. Kezdy:J. Biol. Chem., 250, 1741 (1975)
- 10) P. Roids and J. E. Hoff: Plant Physiol., 74, 907 (1984)
- 11) 松谷衛, 竹久元彬, 福波梁子, 島末明, 菊川縫子: 臨床検査, 11,92(1967)