

# 新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

北村 陽子, 南雲 葉子

(平成 11 年 9 月 30 日受理)

## Purification and Characterization of Cysteine Proteinase Inhibitor from Unripe Ginger Rhizome

Yoko KITAMURA and Yoko NAGUMO

(Received on September 30, 1999)

### 緒 言

ショウガは熱帯アジア(インドからマレーシア)原産で高温多湿を好む多年生植物で、その根茎を根分けして種用根茎として栽培される。4月頃種用根茎を植え付けし、9月頃に収穫されるのが新ショウガで新ショウガを収穫した後の根茎を葉のしおれる11月から12月頃まで畑において成熟させた後掘おこす、この根茎は充実し、香気、辛味とも最高になる。これを古根ショウガ又はひねショウガとも云う。

ショウガは古くから、その根茎が薬用あるいは香辛料として広く使用されてきた。ジンギベレーン、ジンギベロールなどの香気性の精油、ジンガロン、ショウガオールなどの辛味成分を有し、健胃、新陳代謝機能促進、消炎鎮痛作用、抗酸化性があることは知られている。

またショウガにはプロテイナーゼの存在することが明らかにされているが<sup>1)2)3)</sup>、プロテイナーゼインヒビターについての報告はほとんどない。植物プロテイナーゼの大部分はシステインプロテイナーゼであることから、これを阻害する物質システインプロテイナーゼインヒビター(CPI)の存在が確認されている<sup>4)5)6)</sup>。前報<sup>7)</sup>では古根ショウガ抽出液から分離、精製を行い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報告した。

本研究では新ショウガ中のシステインプロテイナーゼインヒビターの分離精製を試みたのでその結果を報告する。

栄養学科 食品学第三研究室

### 実験方法

#### 1. 実験材料

新ショウガ根茎は市販のものを購入し、洗浄、剥皮後厚さ1mmの薄切りにしてから試料として用いた。

#### 2. 試 薬

パパイン、基質のベンゾイルアルギニンβ-ナフチルアミド(BANA)は、Sigma社から得た。セファデックスG75と、分子量測定用の標準物質アルブミン、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、はPharmasia社から、DEAE-セルロース(DE-52)はWhatman社から購入した。

#### 3. パパイン活性の測定

前報<sup>7)</sup>と同様にパパイン活性はBANAを基質とし、松谷ら<sup>8)</sup>の方法により測定した。パパイン(0.6μg)を0.4mlの50mMTris-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)中で0.5mMBANAと共に37°Cで16分間作用させ、0.23NHCl/エタノールを0.4ml加えて反応を停止させた後、0.06%p-ジメチルアミノシナムアルデヒド/エタノールを0.4ml加えて遊離したβ-ナフチルアミンを540nmで測定した。1分間にBANA基質1μMを分解するパパイン活性を1unitとした。

#### 4. 新ショウガCPI活性の測定

新ショウガCPI活性はショウガCPI共存下で前記と

同条件にてパパイン活性を測定し BANA 分解活性の減少量として求めた。パパイン 1unit の BANA 分解活性を阻害する量を CPI 活性の 1unit とした。

### 5. 分子量の測定

ゲルクロマトグラフィーを用いて新ショウガ CPI の分子量を測定した。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), リボヌクレアーゼ A (分子量 13,700) を標準物質として 10mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/0.1M NaCl/1mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> で平衡化したセファデックス G75 カラム (1.6×90cm) の溶出位置から新ショウガ CPI の分子量を求めた。

### 6. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はビュレット法により測定した。標準物質としては牛血清アルブミンを用いた。また、カラムクロマトグラフィーで溶出画分に関しては 280nm の吸収を測定することによりタンパク質濃度を求めた

## 結果及び考察

### 1. 新ショウガ CPI の精製

以下の操作は 4℃下で行った。

ショウガの薄片 1000 g に 1.5 倍量の 40mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/4mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を加え、ミキサーで 1 分間ホモジナイズした。このホモジネイトを 2 時間穏やかに攪拌した後、2 層のガーゼを通してろ過した。ろ液は 80℃で 10 分間熱処理し、冷却した後に 7000×g で 20 分間の遠心分離を行い、得られた上澄液を CPI 粗抽出液とした。この段階で新ショウガ CPI 活性を測定したところ、総活性はで古根ショウガの 61% の活性しか示さなかった。

CPI 粗抽出液をアセトン分画した。0~33%アセトン濃度で沈殿する画分 (A<sub>0-33</sub>), 33~55%アセトン濃度で沈殿する画分 (A<sub>33-55</sub>), 55~77%アセトン濃度で沈殿する画分 (A<sub>55-77</sub>) を 7,000×g, 15 分間の遠心分離をして得た。各沈殿画分は少量の 10mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/1mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> で溶解し同溶液で透析した後、CPI 活性を測定した。古根ショウガにおいては A<sub>33-55</sub> 画分と A<sub>55-77</sub> 画分に CPI 活性が回収されたが、新ショウガでは CPI 活性の約 90% が A<sub>55-77</sub> 画分に回収された。この新ショウガの A<sub>55-77</sub> 画分を 10mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/1mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> で平衡化された DEAE-セルロースカラム (2.6

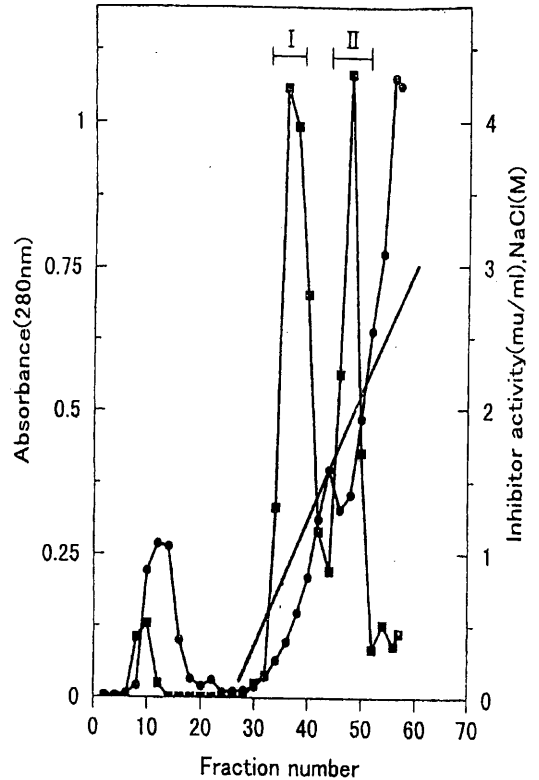


Fig.1. DEAE-cellulose column chromatography of cysteine proteinase inhibitor

The crude extract was applied to a column (2.6×15cm) equilibrated with 10mMTris-HCl buffer (pH7.2)/1mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3M.

Fraction of 7.5 ml were collected. Absorbance at 280nm (●); inhibitor activity against papain (■).

×15cm) にかけた。CPI は、0 から 0.3M までの NaCl 濃度勾配法により溶出した。(Fig. 1) CPI は 0.09MNaCl 濃度付近 (Fig. 1 | I |) と 0.18MNaCl 濃度付近 (Fig. 1 | II |) の位置に大きなピークとして現れた。この 2 つの CPI 活性画分をそれぞれ集めて濃縮し、10mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/0.1MNaCl/1mMNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> で平衡化されたセファデックス G75 (1.6×90cm) にかき同溶液で溶出した。その結果を Fig. 2, 3 に示した。0.09MNaCl 濃度付近の活性画分は分子量 11,000~11,800 に相当する位置に 0.18MNaCl 濃度付近の活性画分は分子量 15,500~16,000 に相当する位置にそれぞれ大きな CPI 活性のピークが現れた。この精製段階までの比活性は分子量 11,000~11,800 の CPI では 23.5mU/mg, 分子量 15,500

～16,000 の CPI では 44.9mU/mg となった。前報<sup>7)</sup> の古根ショウガでその存在が明らかになった分子量 14,500 の CPI と今回新ショウガ中に存在が認められた分子量 15,500～16,000 の CPI とは DEAE-セルロースカラムの溶出位置がほぼ一致しており、分子量の差も少ないことから同一のものと推測される。新ショウガにはもう一つ分子量 11,000～11,800 の CPI が確認され、ショウガ根茎中には複数の CPI が存在しているものと考えられる。

## 2. 新ショウガ CPI の熱安定性

新ショウガに存在が認められた 2 種の CPI を 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2)/ 0.1M NaCl/1mM NaN<sub>3</sub> 中で 40,50,60,70,80,90,100℃ の各温度に 10 分間加熱した後、残存する CPI 活性を測定した。その結果を Fig.4

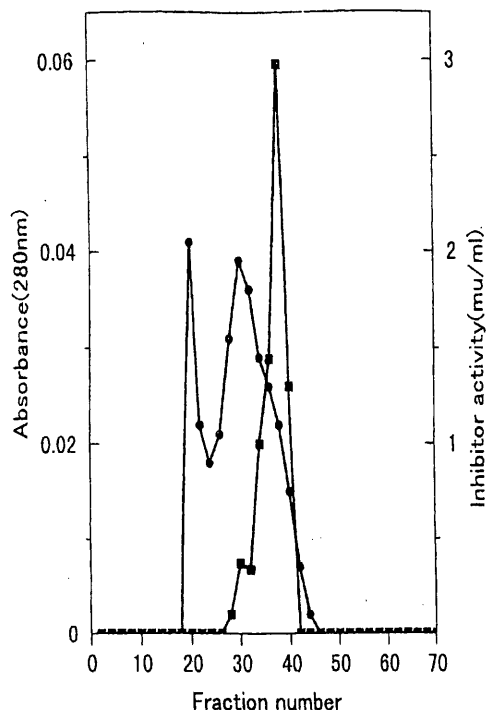


Fig.2. Sephadex G-75 column chromatography of cysteine proteinase inhibitor

The active fraction from the DEAE-cellulose column (Fig.1. I-I) were pooled and concentrated.

The concentrated solution was applied to a column (1.6×90cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2)/0.1M NaCl/1mM NaN<sub>3</sub>, and eluted with the same solution.

Fraction of 3ml were collected. Absorbance at 280nm (●); inhibitor activity against papain (■).

に示した。分子量 11,000～11,800 の CPI は 40℃では 100%の活性を保持していたが、50℃で 80%, 80℃で 40%と徐々に活性が減少し、100℃では 13%しか活性が残存していなかった。分子量 15,500～16,000 の CPI は 60℃まで 100%の活性を維持していたが、90℃で急激に活性が 43%まで減少し、100℃では 22%の活性しか残存していなかった。

米<sup>4)</sup>、コーン<sup>5)</sup>などの種子、アボガドの果肉<sup>6)</sup>中の CPI は熱安定性がかなり高いと報告されている。また、古根ショウガの分子量 14,500 の CPI も 100℃10 分間の加熱で 96%活性が残っており、熱に対してかなり安定であった。しかし、新ショウガ中の CPI は、これらの植物 CPI とは性質が異なっていた。とくに分子量 11,000～11,800 の CPI は熱安定性が低かった。今後、さらに精製を行い、これら CPI の性質を明らかにしたい。

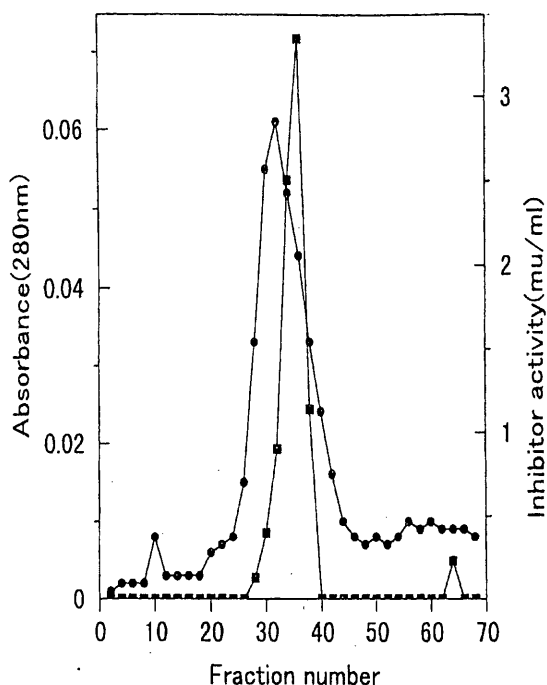


Fig.3. Sephadex G-75 column chromatography of cysteine proteinase inhibitor

The active fraction from the DEAE-cellulose column (Fig.1. II-II) were pooled and concentrated.

The concentrated solution was applied to a column (1.6×90cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2)/0.1M NaCl/1mM NaN<sub>3</sub>, and eluted with the same solution.

Fraction of 3ml were collected. Absorbance at 280nm (●); inhibitor activity against papain (■).

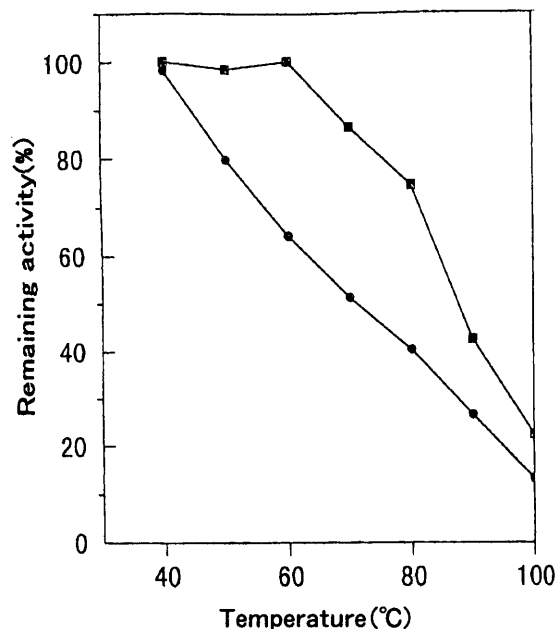


Fig.4. Heat stability of the cysteine proteinase inhibitor from ginger rhizome

Two purified CPI was incubated in the presence of 10mM Tris-HCl buffer (pH7.2)/0.1M NaCl/1mM NaN<sub>3</sub>, for 10min, at various temperatures. After the treatment the remaining activity against papain was measured.

The CPI with a molecular weight of 11000~11800 (●); the CPI with a molecular weight of 15500~16000 (■).

### 要 約

新ショウガ中のシステインプロテイナーゼインヒビターの分離精製を試みた。新ショウガ根茎を中性緩衝液で抽出後、80°Cで10分間熱処理し、遠心分離を行って得た上澄液をアセトン分画し、55~77%アセトン濃度で沈殿する画分をDEAE-セルロース、セファデックス G75のカラムにかけ、精製を行った。その結果、パパインを強く阻害する分子量11,000~11,800と分子量15,500~16,000の2種のシステインプロテイナーゼインヒビターの存在が確認できた。これらの2種のシステインプロテイナーゼインヒビターは熱に対しての安定性があまり高くなかった。

### 文 献

- 1) 妻鹿絢子, 三橋富子, 藤木澄子, 荒川信彦: 家政学雑誌, 34, 79 (1983)
- 2) 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)
- 3) Ohtsuki, K., Taguchi, K., Sato, K. and Kawabata, M.: Biochimica et Biophysica Acta, 1243, 181 (1995)
- 4) Abe, K., Kondo, H. and Arai, S.: Agric. Biol. Chem., 51, 2763 (1987)
- 5) Abe, M., Abe, K., Kuroda, M. and Arai, S.: Eur. J. Biochem., 209, 933, (1992)
- 6) 米倉政実: New Food Industry, 39, (6), 45 (1997)
- 7) 中村俊美, 北村陽子: 東京家政大学研究紀要, 37, (2), 77 (1997)
- 8) 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)