大豆トリプシンインヒビターの加熱による トリプシン親和性の変化†

棚橋勝道*・高野克己*・松本信二*・
嶋居郁三*・小原哲二郎*

Effects of Heat Treatment on the Affinity of Soybean Trypsin Inhibitor for Trypsin

(Studies on Soybean Trypsin Inhibitor Part III)

Katsumichi TANAHASHI*, Katsumi TAKANO*, Shinji MATSUMOTO*,
Ikuzo KAMOI* and Tetsujiro OBARA*

* Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

In our study, Trypsin Inhibitor (TI) was inactivated remarkably by heating with soybean 11S protein (11S). Then, denaturation of TI by heating was investigated as a change of the affinity of TI for trypsin. That is, the value of TI activity which made half the affinity of trypsin for the substrate was obtained by the plot of Lineweaver-Burk (defined as K_t), and the K_t of each TI was compared. The K_t of each TI obtained by DEAE-cellulose was about 15 ~ 100 unit, and these values changed little after heating at 100°C for 15 min.. However, when TI was heated with 11S, the value of K_t increased 1.5 ~ 5 times and the affinity of TI for trypsin declined remarkably. Since it was presumed that the K_t of TI in soybean products changed because TI in soybean products received heat treatment with 11S during processing, the K_t of TI in soybean products was measured, and the TI was investigated. As a result, the K_t of TI in Tōnyū was 30 units but that of TI in the other soybean products was unmeasurable, because no effects of TI on K_m value was seen when TI was added up to 500 units. Following this, TI in soybean products was added to the reaction mixture of trypsin and a substrate to investigate the ability of TI to compete with the substrate for trypsin. As a result, the reaction between trypsin and the substrate immediately stopped by adding TI in Tōnyū, but the other soybean products showed no effects for this reaction. The above results indicate that TI in almost all soybean products, while having remaining the anti-tryptic activity, remarkably reduced its affinity for trypsin by heating with 11S and practically had no effect on trypsin activity.

(Received Sep. 28, 1987)

著者らは大豆トリプシンインヒビター（以下 TI と略記）の耐熱性にかかわる一連の研究の中で、TI は精製すると耐熱性が高くなるが未精製の状態では加熱に対して不安定であり、これには大豆タンパク質、特に 11S

が関与していることを明らかにした。さらにその要因を追求した結果、加熱により 11S の持つ SH 基と TI が反応して失活することを報告した¹⁾²⁾。また同時に、この SH 基との反応により TI の構造ならびに性状変化

† 大豆トリプシンインヒビターに関する研究（第 3 報）（前報、文献 1）2）

* 東京農業大学農芸化学科（〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1）

が推察されたが、前報では加熱処理後の活性低下率のみを問題とし、トリプシンに対する親和性の変化については未解明のままであり、またこのような観点から TI の熱失活を検討した報告は見られない。そこで今回は基質として *N*- α -Benzoyl-D, L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPA) を用い、トリプシンの基質に対する K_m 値を 2 倍に変化させる TI 活性量を K_t 値として求め、TI およびこれに 11 S を添加して加熱した場合の TI のトリプシンに対する親和性の変化を検討した。また、前報³⁾で著者らは大豆加工食品中の TI 含有量を調べ、いずれの食品にも TI 活性が認められることを報告した。この食品中に残存する TI の多くは加工工程中で相当の加熱を受けており、そのトリプシン親和性が変化していることが推察される。そこで、一部の食品についても同様に K_t 値を測定し、そのトリプシン親和性を検討した。

実験方法

1. 供試試料

中国より輸入されている食品製造用大豆を試料とし、ヘキサンにより脱脂、粉碎 (80メッシュ以下) して脱脂大豆粉とした。また、市販の豆乳、豆腐、きな粉、ならびにみそを用いたが、豆乳を除く各試料は乳鉢でよくすりつぶした後 10 倍容のリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.6) にて TI を抽出した。なお、きな粉とみその抽出液は Sephadex G-75 を用いたゲル濾過により色素を除去した後 TI 活性画分を濃縮して実験に用いた。

2. TI の抽出および分画

前報²⁾に従い、脱脂大豆粉より TI を抽出し Sephadex G-75 (25×960 mm), DEAE-cellulose (12×250 mm) カラムを用いて順次 TI を分画精製し、5 種の TI 画分 (CA, CB-1, CB-2, CB-3, CB-4) を得た。

3. TI 活性の測定

前報²⁾と同様に、基質として *N*- α -Benzoyl-D, L-arginine-*p*-nitroaniride (BAPA) を用いた KAKADE ら⁴⁾の方法 (pH 8.2, 37°C, 10 分間) に従って TI 活性を測定した。

4. 11 S の精製

前報²⁾に準じ、脱脂大豆よりタンパク質を抽出 (pH 8.0) した後、抽出液を塩酸により pH 6.4 に調製して沈澱するタンパク質を分取した。次いでこれを前報と同様に少量の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6, 0.4 M NaCl と 10 mM 2-メルカプトエタノールを含む) に溶解し、Sephacryl CL-6 B, Concanavalin A-Sepharose 4B カラムクロマトグラフィーにより順次精製を進め、精製

11 S を得た。

5. 耐熱性試験

TI および 11 S を 10 mM リン酸緩衝液 (0.4 M NaCl を含む, pH 7.6) に溶解後試験管に採り、100°C の湯浴中で 15 分間加熱処理し、室温にて放冷後 TI 活性ならびにトリプシン親和性を測定した。なお 11 S は、TI 100 unit に対して 1 mg となるように添加した。

6. トリプシン親和性 (K_t 値)

試験管に BAPA 溶液 (1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.33 mg/ml) 5 ml と TI 溶液 2 ml を採り、これにトリプシン溶液 (40 μ g/ml) 2 ml を加えて 37°C で反応させた。10 分後 30% 酢酸 1 ml を加えて反応を停止させ、410 nm の吸光度を測定した。

測定結果をもとに、LINEWEAVER-BURK の方法に従って Y 軸に吸光度の逆数、X 軸に基質濃度の逆数をとったグラフ上にプロットし、得られる直線と X 軸の交点より K_p 値 (TI 存在下での見かけの K_m 値) を読みとり、TI 溶液のかわりに蒸留水 2 ml を加えて同様に試験して得られる K_m 値、さらにこの試験に要した TI 添加量 (unit) を Fig. 1 に示した数式に代入し、トリプシンの K_m 値を 2 倍にするために必要な TI 力価、すなわち K_t 値を求めた。

実験結果および考察

1. トリプシンインヒビター (TI) の K_t 値

DEAE-cellulose により分画精製した各 TI の K_t 値を測定し、その結果を Table 1 に示した。

CA はトリプシンの K_m 値を 2 倍にする、すなわち

Fig. 1 Lineweaver-Burk plot for trypsin and trypsin plus TI

———— Trypsin

----- Trypsin + TI

$$K_t = \frac{i}{K_p / K_m - 1}$$

i : TI activity (unit)

K_p : Michaelis constant of trypsin added TI

Kt 値は約 100 unit であり最も親和性の低い TI であった。これに比べて CB-3 と CB-4 の Kt 値は約 30 unit, また CB-2 は約 20 unit であった。なお CB-1 の Kt 値は約 15 unit であり, トリブシン親和性の最も高い TI であった。

2. トリブシンインヒビター (TI) の加熱による Kt 値の変化

次にこの Kt 値が加熱によりどのように変化するかについて TI のトリブシン親和性の変化から検討した。

各精製 TI およびこれに 11 S を添加して 100°C, 15 分間加熱した後, Kt 値を測定した結果を Table 2 に示した。

CB-4 を除く 4 種の TI は, 加熱処理してもその Kt 値は未加熱時の 1.1 倍にとどまり, そのトリブシン親和性に顕著な変化は認められなかった。これに対して CB-4 は, 未加熱時に 33.1 unit であった Kt 値が加熱後 1.5 倍の 48.7 unit に増加し, トリブシン親和性が低下した。

次いで TI 100 unit 当たり 11 S を 1 mg 添加して同様に加熱すると, いずれの TI も Kt 値が増加し, トリブシン親和性が低下したが, 親和性低下の程度は TI に

Table 1 Kt value of TI fraction

TI fraction	Kt
CA	97.9
CB-1	14.7
CB-2	18.9
CB-3	30.5
CB-4	33.1

Table 2 Effects of heat treatment on Kt value

TI fractions	Non heated	Heated*	
		without 11S	with 11S
CA	97.9 (1.0)**	105.3 (1.1)	147.2 (1.5)
CB-1	14.7 (1.0)	16.1 (1.1)	25.5 (1.7)
CB-2	18.9 (1.0)	20.5 (1.1)	32.1 (1.7)
CB-3	30.5 (1.0)	33.1 (1.1)	57.3 (1.9)
CB-4	33.1 (1.0)	48.7 (1.5)	165.3 (5.0)

* Heated at 100°C for 15 min

** Ratio of Kt value

よって異なり, 未加熱時に比べて CA は Kt 値が 1.5 倍, CB-1, CB-2 は 1.7 倍, CB-3 は 1.9 倍と比較的親和性低下は少なかったが, CB-4 は 5 倍にまで増加し, 著しい親和性の低下が認められた。

前報²⁾において, 11 S が共存すると加熱により TI は著しく失活し, これは 11 S 分子内の SH 基が関与していることを明らかにした。小原ら⁵⁾は, DEAE-cellulose により分画した 6 種の TI についてアミノ酸分析を行い, 本実験で得られた CA に相当する TI の半シスチン量が 2.94%, CB-1 に相当する TI では 1.50%, CB-2 に相当する TI では 1.48%, CB-3 に相当する TI では 9.89%, CB-4 に相当する TI では 8.70% であると報告しているが, これと対応して親和性の変化を考察すると半シスチン含量の低い TI (CA, CB-1, CB-2) では 11 S 共存下で加熱しても親和性は著しく低下しない傾向が認められた。

3. 大豆加工食品中のトリブシンインヒビター (TI) の Kt 値

上記の結果より TI 加熱時に 11 S が存在すると著しくトリブシンとの親和性が低下することが明らかになった。そこで次に大豆加工食品中に残存する TI の Kt 値を測定しトリブシンとの親和性について検討を行った。

まず各食品試料中の TI 活性を常法により測定し, 次いでそれぞれの Kt 値を測定した結果を Table 3 に示した。

TI 活性は乾物 1 g 当たり豆乳では 4 000 unit, 豆腐では 4 700 unit, みそでは 1 200 unit, きな粉では 4 600 unit と高い活性が認められたが, その各食品中の TI について Kt 値を測定したところ豆乳中 TI ではトリブシンの Km 値を 2 倍にする, すなわち Kt 値は約 30 unit であった。これに対して豆腐, みそ, きな粉中の各 TI では 500 unit を添加してもトリブシンの Km 値は変化せず, これらの食品に残存する TI はトリブシン親和性が著しく低下しており Kt 値は測定できなかった。

Table 3 Kt value and remaining activity of TI from soy products

Products	Kt	TI activity
Tōnyū	30.2	4 000*
Tōfu	—	4 700
Miso	—	1 200
Kinako	—	4 600

* Unit/g dry matter

Fig. 2 Effects of TI from soybean products on trypsin activity

- Trypsin
- Trypsin added TI extracts from Tōfu, Miso, Kinako or steamed soybean
- △—△ Trypsin added TI extracts from Tōnyū or purified TI

この結果から加工食品中の TI は、一般の TI 活性測定操作のようにあらかじめ TI とトリプシンとを反応させれば阻害効果を示すが、TI と基質 (BAPA) の混合溶液中にトリプシンを加えた場合は TI のトリプシンに対する親和性が低下しているため、BAPA と拮抗できずトリプシンの K_m 値が変化しないのではないかと推察された。そこで次にこれらの食品中 TI をトリプシン-BAPA 反応溶液に添加し、その反応に変化が見られるかどうかを試験した。比較として大豆中の TI を Sephadex G-75 により精製した TI 画分およびみそ製造時の蒸煮大豆中の TI についても試験を行った。

Fig. 2 に示したとおり、トリプシン溶液に BAPA を添加して反応させ、反応開始 5 分後に TI 画分および豆乳中 TI 100 unit を添加した場合は、それ以降のトリプシンと BAPA の反応は停止したが、その他の食品中の TI では 100 unit を添加してもトリプシンと BAPA の反応に変化は認められず、TI 無添加の場合同様に 410 nm の吸光度は増加した。

以上より、加熱された TI はトリプシンとの親和性が著しく低下し、豆乳中 TI を除く食品中の TI はトリプシンの K_m 値を変化させない程度にまで親和性が低下していた。なお実際食用に供した際の影響についてはさらに消化試験等詳細な検討が必要であると考えられる。

要 約

トリプシンの基質 (BAPA) に対する K_m 値を 2 倍にする TI 力価を LINEWEAVER-BURK のプロットより求め、これを K_t 値として加熱された TI のトリプシン親和性の変化および大豆加工食品中に残存する TI のト

リプシン親和性について試験し、以下の結果を得た。

(1) 食品加工用の中国大豆より DEAE-cellulose により分画した 5 種の TI について K_t 値を測定したところ K_t 値には差異が見られ、CB-1, CB-2 は約 15~19 unit, CB-3, CB-4 は約 30 unit であったが、CA は約 100 unit と最も親和性が低かった。

(2) TI を 100°C, 15 分間加熱処理した後の K_t 値は、未加熱 TI に比べて CB-4 (1.5 倍) 以外はいずれも 1.1 倍と、トリプシンに対する親和性の低下は僅かであった。しかし、11 S を添加して加熱した場合は、 K_t 値が CB-4 では 5 倍となり親和性が大きく低下し、その他の TI も K_t 値は 1.5~1.9 倍を示した。

(3) 大豆加工食品中に残存する TI の多くは、加工工程中で加熱処理されていることからその K_t 値を測定したところ、豆乳中 TI はトリプシンの K_m 値を 2 倍にする、すなわち K_t 値は 30 unit であったが、他の食品中の TI は 500 unit まで添加してもトリプシンの K_m 値は変化せず、トリプシン親和性が著しく低下していることが推察された。

(4) そこでトリプシンと BAPA をあらかじめ反応させた溶液に、食品中より抽出した TI を 100 unit 添加したところ、豆乳中 TI の添加によってトリプシンと BAPA の反応は停止したが、他の食品中 TI の添加ではその反応に変化は見られなかった。

本研究の概要は日本食品工業学会第 34 回大会 (昭和 62 年, 富山) において発表した。

終りに臨み、試料を御提供下さったマルサンアイ株式会社に礼申し上げます。また、本研究に御協力いただいた近藤浩章君に深謝いたします。

文 献

- 1) 棚橋勝道・高野克己・松本信二・鴨居郁三・小原哲二郎: 東京農大農学集報, 32, 164 (1987).
- 2) 棚橋勝道・高野克己・松本信二・鴨居郁三・小原哲二郎: 日食工誌, 35, 534 (1988).
- 3) 棚橋勝道・高野克己・松本信二・鴨居郁三・小原哲二郎: 東京農大農学集報, 32, 206 (1987).
- 4) KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E. and PUSKI, G.: *Cereal Chem.*, 51, 376 (1974).
- 5) OBARA, T., KIMURA, M., KOBAYASHI, M., KOBAYASHI, T. and WATANABE, Y.: *Cereal Chem.*, 47, 597 (1970).

(昭和 62 年 9 月 28 日受理)