



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

小麦粉由来蛋白質性リパーゼインヒビターに関する 食品化学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 谷, 久典 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2408

氏名（本籍）	谷久典（徳島県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第67号
学位授与年月日	平成8年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	小麦粉由来蛋白質性リパーゼインヒビターに関する食品化学的研究
審査委員	主査 岐阜大学教授 渡邊乾二 副査 岐阜大学教授 加藤宏治 副査 岐阜大学教授 柘植治人 副査 信州大学教授 細野明義 副査 静岡大学教授 碓氷泰市

論文の内容の要旨

植物種子中には種々の酵素活性を阻害するインヒビターが存在する。それらの中でも特にプロテアーゼインヒビター(PI)やグリコシダーゼインヒビター(GI)については古くから研究されてきた。それらはすでに単離・精製され、各性状が明らかにされている。一方、リパーゼインヒビター(LI)については、リパーゼの挙動がとらえ難いことから、その研究が著しく遅れていた。現在では、基質に吸着してリパーゼの作用を間接的に阻害する蛋白質性のLI(PLI)が、大豆や他の穀物から単離されてきたに過ぎない。即ち、PIやGIのごとく酵素に対して直接的に結合して複合体を形成するタイプのPLIについての報告はない。そこで、まずは直接的あるいは間接的タイプにしろ、PLIにつき穀類や豆類について検索を行った。その結果に基づき、LI活性の高い小麦粉から、直接的タイプのPLIの単離・精製を考慮した研究戦略のもとに精製を試みた。この精製物につき蛋白質化学的性状と *in vivo* における血清脂質への影響を検討した。このように、本研究は小麦粉由来のPLIを成人病の予防・治療などに有効利用するための基礎研究として実施したものであり、その内容は次のように要約される。

植物種子素材のPLIの検索：大豆及び豆乳より調製した抽出画分の内、60% 飽和硫酸沈殿物の分子量50kDa以上の画分にそれぞれLI活性を認めた。小麦及び大豆のふす

ま、さらには小麦粉からグルテンを除去した残液中にも、大豆と同様に60% 飽和硫酸沈殿—分子量50kDa 以上画分中にLI活性を認めた。しかし、これらのいずれも市販小麦粉由来のその画分のLI活性に比べて低いものであった。

小麦粉由来精製PLI の性状：市販小麦粉（薄力粉）を出発原料として用い、60%(v/v)エタノールで処理した後、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.2)にてPLI 含有画分を抽出した。これを疎水クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー及びリパーゼ固定化セファロース樹脂によるアフィニティークロマトグラフィーによりPLI を精製した。二次元電気泳動により3 個のLI活性を示すスポット(PLI-Ea-1-1, PLI-Ea-1-2 及びPLI-Ea-1-3)を確認した。PLI-Ea-1-1とPLI-Ea-1-2の分子量、等電点は共に25kDa と6.9 であり、両者のN 末端から9 残基までのアミノ酸配列はArg-Ser-Ala-His-Glu-Pro-Gln-Gln-Pro-と同一であった。また、PLI-Ea-1-3の分子量と等電点は28kDa と6.7 であり、N 末端から9 残基までのアミノ酸配列はArg-Ser-Ala-His-Glu-Glu-Gln-Gln-His-であった。これらの相同性が非常に高いことから、3 個のPLI は遺伝的多型体であると推測した。さらにNational Biomedical Research Foundation 及びEuropean Molecular Biology Laboratory 蛋白質データベースでの検索において、相同性を有するフラグメントは確認できなかったことから、本蛋白質は新規なものであると考えられた。

熱及びpH安定性：65℃の加熱により最大30% のLI活性の増大が、80℃の加熱においても最大20% のLI活性の増加がみられた。80℃、60分間の加熱でもLI活性が保持されたままであり、熱安定性が非常に高いという特徴を示した。さらにpH3 から7 の間では安定であったが、pH8 以上のアルカリ側においてLI活性の低下を認めた。

種々のリパーゼに対する阻害スペクトラム：PLI-Ea-1は、豚とヒト腭液由来リパーゼに対して強いLI活性 (905 及び827units/mg. solid)を示した。しかし、微生物由来リパーゼに対してはCandida cylindracea(102units/mg. solid) 以外には作用しなかった。このことからPLI は哺乳類由来リパーゼに対して強く作用することが示唆された。

PLI の速度論的解析：ヒトと腭液由来、及びCandida cylindracea 由来リパーゼに対する速度論的解析を、表面プラズモン共鳴法によるBIA coreとBIAlogue™ Kinetics Evaluation Softwareにて検討した。それぞれのリパーゼに対する親和定数 (K_a, M^{-1}) は各々 8.05×10^8 , 9.14×10^8 , 及び 5.21×10^6 であった。また、PLI の阻害のタイプはLineweaver-Burk plotより非拮抗阻害であり、リパーゼに直接的に作用するものであるとした。

in vivo でのLI活性：in vitro同様in vivo においてもLI活性を示すか否かをラットによる動物実験にて検討した。高脂肪食を負荷した群とこれにPLI を投与した群に分け、3 週間まで検討した。PLI 投与群は血清トリアシルグリセロールの上昇が有意に抑制された。また、血清総コレステロールの上昇も抑制された。さらに肝臓組織の

病理学的所見ではPLI 投与群の肝臓への脂肪の蓄積が減少しており、且つ組織への損傷も軽減化していた。この結果から、PLI は in vivo においても十分に作用すると認められた。

本研究にて単離されたPLI は哺乳類（ヒト、豚）膵液リパーゼ活性を特異的に阻害し、そのタイプはリパーゼに直接的に作用する非拮抗型であった。そのリパーゼ阻害活性は in vitro のみならず in vivo においても十分に認められ、腸管内脂質の消化と吸収に作用して血清脂質を改善した。このように、小麦粉由来PLI は今後ますます増加する成人病の予防と治療に有効な食品機能成分であるとした。

審 査 結 果 の 要 旨

平成8年1月23日、岐阜大学大学院連合農学研究科において、審査員全員出席のもとに約30分間に亘る発表と、約20分間の質疑応答が行われた。各審査員からの質問に対しては論理的かつ具体的に答えたとは必ずしも言い難いが、発表態度は良好であった。得られた成果はいずれも新奇であり、新リパーゼインヒビターの今後の食品機能成分としての応用に途を拓くものと評価した。

本論文の内容につき、岐阜大学大学院連合農学研究科博士課程博士学位論文として十分価値のあるものと認め、審査員全員一致で「合格」と判定した。

学位申請者、谷 久典の「小麦粉由来蛋白質性リパーゼインヒビターに関する食品化学的研究」は、小麦粉より蛋白質性リパーゼインヒビター(PLI) を単離・精製し、その蛋白質化学的諸性質と食品機能を解析した研究成果を3章に亘って述べたものである。なお、研究の内容は下記の学術雑誌に掲載されている。

植物種子中のPLI の研究は、リパーゼの挙動が捕らえ難いことから著しく遅れてきた。そこでPLI 活性を持つ食品素材を検索し、小麦粉がそのような素材であるとまず認め、小麦粉よりPLI の単離・精製を開始した。高脂血症、動脈硬化及び肥満といったいわゆる成人病の治療と予防のために、食品成分としてのPLI を有効利用するための基礎研究となるように企画したものである。

第1章では、植物種子食材中のPLI につき検索し、大豆や大麦・小麦ふすま及び小麦粉にその存在を認め、特に市販小麦粉（薄力粉）にその活性が最も高いと示した。

第2章では小麦粉由来PLI の精製と性質につき解析した結果につき、第1節と第2節に分けて述べた。

第1節：小麦粉（薄力粉）からの粗抽出物を疎水クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、リパーゼ固定化アフィニティークロマトグラフィー、SDS-PAGE及び二次元電気泳動クロマトグラフィーにて分画し、PLI を精製した。PLI の分子量はSD

S-PAGEにより28と25kDaであった。二次元電気泳動によって得られた3種のPLIのN末端からの9種のアミノ酸配列は、2種の25kDaのものはArg-Ser-Ala-His-Glu-Pro-Gln-Gln-Proであり、1種の28kDaのものではArg-Ser-Ala-His-Glu-Glu-Gln-Gln-Hisであった。これらは遺伝的変異体であると考察した。PLIは80℃までの加熱により活性化され、3.0から7.0までのpH範囲で安定であった。PLIは、豚とヒト膵液由来リパーゼに対して強いLI活性を示した。しかし、微生物由来リパーゼに対しては Candida cylindracea 以外には作用しなかった。[Purification and Characterization of Proteinous Inhibitor of Lipase from Wheat Flour. H. Tani et al., J. Agr. Food Chem., 42, 2382 (1994)]

第2節：ヒト及び豚膵液由来リパーゼと Candida cylindracea 由来リパーゼに対する速度論的解析を、表面プラズモン共鳴法によって検討した。それぞれのリパーゼに対する親和定数(k_a, M^{-1})は各々 8.05×10^8 , 9.14×10^8 , 及び 5.21×10^6 であった。また、PLIの阻害のタイプはLineweaver-Burk plotより非拮抗阻害であり、リパーゼに直接的に作用するものであるとした。[Kinetic Studies of a Wheat-derived Lipase Inhibitor. H. Tani et al., J. Agr. Food Chem., 43, 2796 (1995)]

第3章では小麦粉由来PLI-Ea-1によるラット血清脂質の改善につき述べた。in vitro 同様 in vivo においてもLI活性を示すか否かをラットによる動物実験にて検討したものである。高脂肪食を負荷した群とこれにPLIを投与した群に分け、3週間まで検討し、PLI投与群は血清トリアシルグリセロールの上昇が有意に抑制されたこと、血清総コレステロールの上昇も抑制されたこと、さらに肝臓組織の病理学的所見ではPLI投与群の肝臓への脂肪の蓄積が減少しており、且つ組織への損傷も軽減化していたことを示した。[Wheat Flour Lipase Inhibitor Decreases Serum Lipid Levels in Male Rats. H. Tani et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol., 41, 699 (1995)]

以上に述べたように、本論文では小麦粉由来新奇PLIを蛋白質化学的に解析し、さらに今後ますます増加する成人病の予防と治療に有効な食品機能成分であるとした。