

新奇イネ抗菌タンパク質群のゲノム解析と  
プロテオーム解析及びそのヒト病原菌への応用  
(課題番号 18560749)

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金（基盤研究C）  
研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 谷口正之  
(新潟大学自然科学系（工学部）教授)

新潟大学附属図書館



1080034100

## は じ め に

研究代表者は「新奇イネ抗菌タンパク質群のゲノム解析とプロテオーム解析及びそのヒト病原菌への応用」に関して、平成 18 年度文部省科学研究費補助金を申請し、採択された。本報告は、上記研究の成果を総括した内容である。

システインプロテアーゼ阻害因子 (CPI) には、生体防御機能として抗ウイルス、抗細菌、抗真菌ならびに抗病害虫作用があることが知られている。これらの生物機能は産業において利用価値が高く、システインプロテアーゼ阻害因子が健康機能素材として有望であることを示唆している。しかし、天然のシステインプロテアーゼ阻害因子を健康機能素材として積極的に活用した事例はない。この原因は、システインプロテアーゼ阻害因子の健康機能に関する多くの知見が、ヒトをはじめとする動物由来のシステインプロテアーゼ阻害因子について確認されているためである。このような動物由来のシステインプロテアーゼ阻害因子は、BSE（狂牛病：牛海綿状脳症）や鳥インフルエンザが問題となる動物性タンパク質であり、安心な健康機能素材として応用することは極めて困難である。

本研究では、天然素材の優れた原材料としてイネに着目して、その健康機能を有するシステインプロテアーゼ阻害因子の構造と機能を解明することを目指している。イネシステインプロテアーゼ阻害因子を歯周病予防などのための健康機能素材として利用できることを立証できれば、イネ以外の植物由来システインプロテアーゼ阻害因子に対しても開発意欲が大きく高まると期待できる。その結果、システインプロテアーゼ阻害因子の広範な生理機能に立脚した、保健機能食品や薬用日用品に関する様々な基礎研究や応用・開発研究が進み、植物システインプロテアーゼ阻害因子を新たな利用する食品産業を創出できる。BSE（狂牛病：牛海綿状脳症）や鳥インフルエンザが社会問題になる中で、植物のシステインプロテアーゼ阻害因子は、消費者の『安全・安心』に対するニーズにも合致しており、動物性システインプロテアーゼ阻害因子の代替となる優れた健康機能素材として極めて有望である。したがって、本研究は、植物システインプロテアーゼ阻害因子の食品産業における利用の先駆けであり、この研究成果は、植物由来の生理活性タンパク質を利用した食品素材開発における大きなイノベーションに繋がると期待される。本研究では、特にシステインプロテアーゼ阻害因子および抗菌タンパク質を用いた歯周病予防の可能性を中心として検討した。

本研究成果は、米由来の生理活性タンパク質であるシステインプロテアーゼ阻害因子および抗菌タンパク質を用いた歯周病の予防を目的とする保健機能食品や薬用日用品の開発にとって、有益な知見を提供していると確信している。

## 研究組織

研究代表者：谷 口 正 之 （新潟大学自然科学系（工学部）教授）

## 交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,900,000 円	0 円	1,900,000 円
平成 19 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
総 計	3,500,000 円	480,000 円	3,980,000 円

## 研究発表

### （１）雑誌論文等

- 1) S. Ohtsubo, H. Kobayashi, W. Noro, M. Taniguchi, E. Saitoh:  
Molecular Cloning and Characterization of Oryzacystatin-III, a Novel Member of Phytocystatin in Rice (*Oryza sativa* L. *japonica*).  
*J.Agric.Food Chem.*, 査読有, Vol.53, No.13, 5218-5224 (2005).
- 2) S. Ohtsubo, M. Taiyoji, T. Kawase, M. Taniguchi, E. Saitoh:  
Oryzacystatin- II , a Cystatin from Rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) ,is a Dimeric Protein: the Possible Involvement of the Interconversion between Dimer and Monomer in the Regulation of the Activity of Oryzacystatin- II .  
*J.Agric.Food Chem.*, 査読有, Vol.55, No.5, 1762-1766 (2007).
- 3) E. Saitoh, S. Yamamoto, E. Okamoto, Y. Hayakawa, T. Hoshino, R. Sato, S. Isemura, S. Ohtsubo, and M. Taniguchi  
Identification of Cysteine Proteases and Screening of Cysteine Protease Inhibitors in Biological Samples by a Two-Dimensional Gel System of Zymography and Reverse Zymography.  
*Analytical Chemistry Insights*, 査読有, Vol.2, 1-9 (2007).

### （２）口頭発表

- 1) 太養寺真弓、川瀬智一、谷口正之、斎藤英一、大坪貞視：  
イネ新奇シスタチン、オリザシスタチン-IIの生化学的特性化：構造と酵素阻害活性に対する加熱処理の影響。  
2006年度日本農芸化学会大会(京都)、講演要旨集, p. 31 (2006年3月)。
- 2) 川合雄次郎、山崎里佳、丹羽祐基、川瀬智一、薮 泰幸、大坪貞視、斎藤英一、谷口正之：  
イネ由来新規組換えプロテアーゼインヒビターの調製とその性質の比較。  
2006 年度日本生物工学会（大阪）、講演要旨集 p.173 (2006 年 9 月)。
- 3) 川瀬智一、薮 泰幸、川合雄次郎、斎川陽子、太養寺真弓、大坪貞視、小林 仁、斎藤英一、大坪貞視、谷口正之：  
3 種のイネ由来組換えオリザシスタチンの調製とその生化学的性質の比較。

2007 年度日本農芸化学会大会(東京)、講演要旨集, p.221 (2007 年 3 月).

- 4) 太養寺真弓、薮 泰幸、川瀬智一、谷口正之、斎藤英一、大坪貞視：  
コメ・システインプロテアーゼインヒビターの網羅的解析のための活性検出  
方法.

2007 年度日本農芸化学会大会(東京)、講演要旨集, p.221 (2007 年 3 月).

- 5) Yoshimi Hayakawa, Hitoshi Kasahara, Yasuyuki Shitomi, Tomokazu Kawase,  
Masayuki Taniguchi, and Eiichi Saitoh :  
Characterization of papain inhibitors from soybean seeds by a two-dimensional gel  
system of gelatin reverse zymography.  
10th Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, June 23-27, 2007,  
Portoroz, Slovenia.
- 6) Yasuyuki Shitomi, Yuki Niwa, Tomokazu Kawase, Sadami Ohtsubo, Eiichi Saitoh and  
Masayuki Taniguchi :  
Inhibition of the growth and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* by  
recombinant oryzacystatins  
10th Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, June 23-27, 2007,  
Portoroz, Slovenia.
- 7) Tomokazu Kawase, Yasuyuki Shitomi, Yujiro Kawai, Youko Saikawa, Mayumi  
Taiyouji, Hitoshi Kobayashi, Eiichi Saitoh, Sadami Ohtsubo and Masayuki Taniguchi :  
Production and characterization of recombinant Oryzacystatin-XII.  
10th Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, June 23-27, 2007,  
Portoroz, Slovenia.
- 8) 斎川 陽子, 山崎 里佳, 薮 泰幸, 川瀬 智一, 田中 孝明, 谷口 正之：  
プロテアーゼ阻害成分を含む米タンパク質の機能性食品素材としての利用.  
2007年度日本生物工学会(広島)、講演要旨集 p. 172, 1H10-2 (2007年9月).
- 9) 丹羽 祐基, 五十嵐 暁, 薮 泰幸, 川瀬 智一, 田中 孝明, 谷口 正之：  
歯周病菌に対する米由来抗菌タンパク質の検索とそれらの性質.  
2007年度日本生物工学会(広島)、講演要旨集 p. 173, 1H11-3 (2007年9月).

### (3) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

- 1) 名称：「プロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤」  
発明者：太養寺真弓、大坪貞視、谷口正之。  
出願人：新潟県、国立大学法人 新潟大学。  
産業財産権の種類：特願2007-251996。  
出願日：2007年9月27日。

## 目 次

第1章	序 論	1
第2章	オリザシスタチン-Ⅲの分子クローニングとその性質： 米由来の新規植物シスタチン	4
第3章	米由来のオリザシスタチンⅡは二量体タンパク質である	11
第4章	二次元電気泳動とリバースザイモグラフィを用いた植物サンプル からのシステインプロテアーゼの同定とシステインプロテアーゼイ ンヒビターの検索	16
第5章	米由来プロテアーゼ阻害成分の水産練り製品用品質改良剤としての 有用性の評価	25
第6章	米由来ジンジパイン阻害成分と歯周病菌増殖阻害成分の精製および 同定	38
第7章	全体の総括	56

# 第1章 序 論

## 第1章 序 論

### 1. 歯周病予防機能性新素材としてのシスタチン

歯周病菌に関する最近の重要な知見は動脈硬化への関与であり、組織学的検討 (*J. Periodontol.*, 2000, 71, 1554-1560; *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, 1313-1315) や疫学研究 (*J. Clin. Periodontol.*, 2002, 29, 803-810) からその関連性が指摘されている。Hashimoto ら (*J. Biochem.*, 2006, 140, 713-723) は、*Porphyromonas gingivalis* がアテローム動脈硬化の発症を促進し、*P. gingivalis* の CP であるジンジパインの欠損やジンジパイン阻害剤が、その促進作用を消失させることを見いだしている。これらの知見は、歯周病予防が循環器疾患の予防においても重要な意味を持つこと、システインプロテアーゼ阻害因子が歯周病菌の病原性を抑制するのに有用であることを示唆している。ニワトリシスタチンやヒトのシスタチン S および C が *P. gingivalis* の増殖を阻害すること (*Biol. Chem.*, 1998, 379, 1371-1375) も報告されている。歯周病関連以外でシステインプロテアーゼ阻害タンパク質の健康機能性としては、牛乳中の塩基性シスタチンが骨粗鬆症をもたらす骨吸収を抑制すること (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 2531-2536)、システインプロテアーゼ阻害活性を有するラクトフェリンとその分解ペプチドが高カルシウム血症や悪性腫瘍などの CP が関わる様々な病態の治療に利用できること (特開 2004-346020)、ヒトシスタチン C 配列に基づくペプチドがメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* や多剤耐性コアグラールゼ陰性 *Staphylococcus* に抗菌作用を示すこと (*APMIS*, 2003, 111, 1004-1010) が明らかにされている。

一方、植物システインプロテアーゼ阻害タンパク質に関する最近の重要な知見は、イネゲノム配列上に、シスタチンをコードすると予想される 12 種類の遺伝子が見いだされたことである (*Mol. Genet. Genomics*, 2005, 273, 423-432)。それまでに知られていたシスタチンはオリザシスタチン-I と-II のみであるため、当初考えられたよりも多くのシスタチン類がイネに存在し、様々な生理機能を担っていると推定される。また、植物シスタチンが環境ストレス耐性に関わっていること (*Plant Biotechnol. J.*, 2003, 1, 101-112; *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1729, 186-199)、抗真菌作用を示すこと (*J. Exp. Bot.*, 2005, 56, 1821-1829; *Planta*, 2005, 1-12)、防虫作用を有すること (*Plant Biotechnol. J.*, 2004, 2, 439-448) も報告されており、植物の病害防除において、システインプロテアーゼ阻害因子が重要な機能を果たしていることが明らかになりつつある。

### 2. 本研究の特徴

システインプロテアーゼ阻害因子の健康機能性に関する既往の研究は、そのほとんどがヒトなどの動物由来のシステインプロテアーゼ阻害因子を対象としたものである。そのために、システインプロテアーゼ阻害因子が多様な生理機能を有し、健康機能素材として期待できる知見が多く報告されているにもかかわらず、食品・日用品産業における実用化は進んでこなかった。そこで本研究では、原材料として安定的かつ安価に入手が可能な作物であるイネのシステインプロテアーゼ阻害因子に着目した。イネを対象とする利点は、材料としてのみならず、研究面においても大きい。すなわち、ゲノム配列の完全解

読が完了し、完全長 cDNA クローンも入手可能であることから、配列情報に基づいた分子生物学的手法を利用することにより新規システインプロテアーゼ阻害因子の包括解析を効率的に進めることができる。このように、イネシステインプロテアーゼ阻害因子の包括的特性解析を行うのと並行して、健康機能素材（歯周病予防）、農業分野での病害防除因子、および食品加工原材料という幅広い分野でイネシステインプロテアーゼ阻害因子の実用化を図るという本研究の着眼点は、これまでにない独創的かつ先駆的なものであり、その研究成果が産業創造に繋がる可能性も大きいと期待できる。

### 3. シスタチン関連の研究成果の概要

システインプロテアーゼ阻害因子タンパク質が実用面での幅広い有益性を持つことが、このような知見によって推察されている。しかし、植物システインプロテアーゼ阻害因子タンパク質について、生化学的性状から実用化までを系統的に検討した事例は極めて少なく、十分な知見は蓄積されていない。このような状況の中、研究代表者らはイネシステインプロテアーゼ阻害因子を対象とした基礎と応用の両面での研究を展開し、下記のような重要な知見を得ている。すなわち、①イネタンパク質による *P. gingivalis* の増殖阻害（特開 2004-196672）とジンジパイン活性阻害（特開 2007-16002）を初めて明らかにし、②アルカリ溶出する方法がジンジパイン阻害因子の抽出に有効であることを報告した（特願 2005-344520）。また、③精白米から R-ジンジパイン結合タンパク質を同定するとともに、R-ジンジパイン阻害因子を効率的に溶媒抽出する条件を明らかにした。歯周病関連以外にも、④コメタンパク質やオリザシスタチン-I と-II が骨粗鬆症の病理発生に重要な酵素カテプシン K を阻害すること（特開 2006-151843）、⑤精白米のプロテアーゼインヒビターが水産練り製品の製造に利用できる可能性のあることを見いだしている。基礎研究面でも、⑥ネイティブ型のオリザシスタチン-II を同定し、その酵素学的特性を明らかにした（*J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 5218-5224）。また、⑦単量体 - 二量体の相互変換が植物シスタチンの活性調節に関わっている可能性を初めて報告している（*J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 1762-1766）。

### 4. 本研究の目的

米のタンパク質にはタンパク質分解酵素阻害剤（プロテアーゼインヒビター）、レクチン、各種酵素などの生理活性タンパク質が含まれている。しかし、これらのタンパク質については栄養学的な検討以外にはほとんど研究されておらず、その生理機能や構造は完全に解明されていない。そこで、有効利用されていない米糠やくず米などから生理活性タンパク質を検索し、その構造と機能を解明できれば、米タンパク質の新しい用途が開発されると期待される。生理活性タンパク質の中でもシスタチンは、プロテアーゼに対して強い阻害作用を示すため、タンパク質の代謝回転の調節や外敵が分泌するプロテアーゼの阻害に基づく生体防御に関与していることが報告されている。

本研究では、第一にイネに含まれるオリザシスタチンを組換えタンパク質として調製し、得られた組換えタンパク質の性質について比較検討した。また、カマボコの原料であるすり身を 30 ～ 40 ℃に保温すると「座り」と呼ばれる現象が起こる。こ



れは、2 ～ 3%の食塩を添加することによって溶解した筋タンパク質が、内在性トランスグルタミナーゼによって架橋され、足(柔らかいソフトな歯ごたえ)が生じるためである。しかし、すり身には 55 ～ 65 °C付近で作用する内在性各種プロテイナーゼ(タンパク質分解酵素)が存在するため、加熱昇温時に弾力がなくなり、結着性が低下する「もどり」現象が起こる。そこで、本研究では第二に、プロテイナーゼ阻害活性を有する米タンパク質を利用した「もどり」防止技術の開発について検討した。すなわち、米タンパク質の新しい食品素材としての利用について検討した。さらに、歯周病は成人の 80%以上が罹患している生活習慣由来の歯科疾患である。歯周病の主な原因菌は *P. gingivalis* である。これまでに、乳由来の鉄結合タンパク質である Lactoferrin と Lactoferrin の 17-41 残基を含むペプチドである Lactoferricin B に *P. gingivalis* に対する抗菌作用を示すことが報告されている。そこで、本研究では第三に、歯周病菌 *P. gingivalis* に対するイネ由来の新奇抗菌タンパク質を精製し、その *P. gingivalis* に対する抗菌活性の評価とその有効成分の同定を試みた。

## 第 2 章      オリザシスタチン-Ⅲの分子クローニングとその性質：米由来の新規植物シスタチン

第 2 章は下記より転載した。

Molecular Cloning and Characterization of Oryzacystatin-III, a Novel Member of  
Phytocystatin in Rice (*Oryza sativa* L. *japonica*)  
*J.Agric.Food Chem.*, Vol.53, No.13, 5218-5224 (2005).

### 第 3 章 米由来のオリザシスタチンⅡは二量体タンパク質である

第 3 章は下記より転載した。

Oryzacystatin-Ⅱ, a Cystatin from Rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) ,is a Dimeric Protein:  
the Possible Involvement of the Interconversion between Dimer and Monomer in the  
Regulation of the Activity of Oryzacystatin-Ⅱ.

*J.Agric.Food Chem.*, Vol.55, No.5, 1762-1766 (2007).

## 第 4 章 二次元電気泳動とリバースザイモグラフィを用いた植物サンプルからのシステインプロテアーゼの同定とシステインプロテアーゼインヒビターの検索

第 4 章は下記より転載した。

Identification of Cysteine Proteases and Screening of Cysteine Protease Inhibitors in Biological Samples by a Two-Dimensional Gel System of Zymography and Reverse Zymography

*Analytical Chemistry Insights*, Vol.2, 1-9 (2007).

## 第5章 米由来プロテアーゼ阻害成分の水産練り製品用品質改良剤としての有用性の評価

# 植物性タンパク質の水産練り製品用品質改良剤としての有用性の評価

新潟大学自然科学系(工学部)

谷口正之

(〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町8050、TEL:025-262-6716)

## 要旨

カマボコの製造において、加熱時に原料であるすり身中の種々の内在性プロテアーゼが作用し、カマボコの弾力や結着性を低下させる軟化現象、すなわち『もどり』という深刻な問題が生じている。このもどりを抑制するために、現在は、プロテアーゼインヒビターを含む卵白などの主に動物性タンパク質が使用されている。そこで、本研究では、米に含まれるプロテアーゼインヒビターであるオリザシスタチン(OC)をカマボコのもどり防止に利用することを目的として、第一に組換えタンパク質としてOCを調製し、その性質を検討した。また、OCを含む米タンパク質を添加した「モデルカマボコ」を調製し、米タンパク質の添加効果について評価した。

OC遺伝子を発現用ベクターに組み込んで作製したプラスミドを用いて、大腸菌を形質転換し、OCをGSTとの融合タンパク質として発現させた。その後、酵素を用いてGSTを切り離し、OCをSDS-PAGEで単一成分になるまで精製した。精製したOCを用いて、ウサギを免疫して抗体を調製した。この抗体を用いてイネ中のOCの分布について検討した。フードプロセッサーを用いて解凍したエソのすり身を混練し、すり身の温度が0~1℃になった時に各種濃度の食塩および米タンパク質などの添加物を加えた。その後、すり身の温度が10℃になるまですり身をさらに混練し、ミンチ状にした。ミンチになったすり身を折径48 mmの塩化ビニリデンフィルムに充填し、両端を糸で結んだ。その後、90℃で40分間保温した後、直ちに冷水に浸して冷却した。冷却後、4℃で保存した。調製したカマボコの物性として押し込み最大荷重(押し込み荷重)と弾性ひずみを測定した。また、約5 mmの厚さに輪切りにしたモデルカマボコの切断面に色彩色差計のセンサ部を置き、L(明度)およびaとb(色相と彩度)をそれぞれ測定し、ハンター白度を算出した。

抗OCウサギ抗体を用いて、OCの分布を検討した結果、精白米部分にOCを検出できた。そこで、精白米から調製した成分を米タンパク質として用いることにした。カマボコの一般的な原料として使用されているエソ(lizardfish)のすり身を用いて抽出液を調製し、内在性プロテアーゼ活性に及ぼす米タンパク質の添加効果について検討した。その結果、米タンパク質は、エソのすり身抽出液中の内在性プロテアーゼ(Papain系プロテアーゼ)を部分的に阻害することがわかった。この内在性プロテアーゼの活性は食塩濃度の増加につれて徐々に低下したが、いずれの食塩濃度においても米タンパク質を添加することによって、活性はさらに低下した。また、すり身に米タンパク質を添加して調製したモデルカマボコは、米タンパク質を添加していない対照のカマボコと比較して、その押し込み強度とハンター白度が向上することがわかった。

## 1. 研究目的

魚肉練り製品は日本の代表的な水産加工品であり、すり身を用いた水産練り製品は高タンパク質、低カロリーであることから、世界中で愛されるようになってきている。しかし、冷凍すり身の特性に関する研究は、すり身が近年輸入されるようになってきたことも要因の一つとなって、日本においてはあまり行われていないのが現状である。

カマボコの原料であるすり身を 30℃から 40℃に保温しておく、ネバネバした表面が滑らかとなり、透明感を有するように変化する。この現象は『座り』と呼ばれる。これは、2～3%の食塩を添加することによって溶解したアクトミオシンなどの筋タンパク質が、内在性のトランスグルタミナーゼによって架橋され、カマボコの特徴である『足』(柔らかい歯ごたえ)が生じるためである。『足』はカマボコの品質に影響する重要な因子である。しかし、原料であるすり身には、55℃～65℃付近で作用する内在性の各種プロテアーゼが存在するため、加熱昇温時に弾力がなくなり、結着性が低下する『もどり』現象が起こる<sup>1)</sup>。そこで、この『もどり』現象を防止するために、すり身にはプロテアーゼインヒビターである牛血漿タンパク質、トリ血漿タンパク質、乳精タンパク質単離物/濃縮物、卵白などの動物性タンパク質が添加されている<sup>2,3)</sup>。特に、血漿タンパク質はゲル物性を向上させ、卵白はカマボコの色や光沢を改良し、足を増強することが添加効果として挙げられる。しかし、これらの動物性タンパク質の添加は、近年社会問題になっている狂牛病、トリインフルエンザの発生によって、消費者の志向に合致しなくなっていると考えられる。そこで、安全で安心な植物性タンパク質からなる代替品を開発する必要があると考えられる。

米中の生理活性を有するタンパク質関連成分にはタンパク質分解酵素(プロテアーゼインヒビター)であるオリザシスタチン(OC)、糖結合性タンパク質であり、免疫活性化や癌細胞増殖抑制効果を有するレクチン、血圧降下作用を有するγ-アミノ酸酪酸(GABA)、アンギオテンシン変換酵素阻害剤などが存在することが既に報告されている。そこで、本研究では、これらのタンパク質成分の中から、OCに着目した。システインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンは、細胞内でプロテアーゼ活性を制御し、また、外敵が分泌するプロテアーゼを阻害することから、生体を防御するために必要な物質と考えられている。このシスタチンとは、パパイヤ由来の Papain、イチジク由来の Ficin、キウイフルーツ由来の Actinidin などのシステイン

プロテアーゼを特異的に阻害するタンパク質の総称であり、3つのファミリーに分類され、それらはシスタチンスーパーファミリーとして1つに統合される<sup>4)</sup>。シスタチンには植物シスタチンと動物シスタチンが存在し、植物シスタチンとしてコーンシスタチン<sup>5)</sup>とソヤシスタチンが報告されている。さらに、ジャガイモ、イチゴなどからもシスタチンが発見されている<sup>6)</sup>。OCはシスタチンスーパーファミリーに属する植物シスタチンの1種であり、米種子由来のシスタチンである。これまでにOCについては、次に挙げる特徴が報告されている。① S-S結合、シグナルペプチド、糖鎖を含まない単純タンパク質である。② 植物シスタチンにもかかわらず、動物シスタチンとアミノ酸配列が共通している。③ 耐熱性を有する。④ pH 2～9の広範囲で活性を示す。⑤ 抗ウィルス、昆虫生育阻害、抗菌などの作用を有する。以上の性質と機能を有するOCは、米種子の胚乳などから見出されていることも考慮すると、機能性食品素材、医薬や農薬の原料などへの活用が期待される成分である。

しかし、OCの米からの単離は各種クロマトグラフィーなどの使用が不可欠であること、およびOC自体の含有量が非常に微量であることから、米から直接精製することが困難であると予想される。そこで、本研究では分子生物学的手法を用いて、組換えタンパク質として調製し、その性質を検討することにした<sup>7,8)</sup>。また、最近シスタチンはタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)による魚のすり身タンパク質の分解を抑制することが知られ、その潜在的役割が注目されている。そこで、OCを含む米タンパク質の有用性を評価するために、すり身プロテアーゼによる軟化防止に着目した。

そこで、本研究では、新奇なOCの構造と性質を解明し、またOCを含む米タンパク質を利用したカマボコにおける『もどり』防止技術の開発を目的とした。具体的には、①組換えOCを調製して、それらの性質を検討した。また、OCを含む米タンパク質の有用性について評価するために、②すり身に含まれるプロテアーゼの性質について検討し、さらに③米タンパク質を添加したモデルカマボコを調製し、その添加効果について検討した。

## 2. 研究方法

### 2-1. 実験材料

本研究では組換えOCの発現のために、図1に示すプラスミドが組み込まれた発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21 菌株を用いた。

本研究では、エソのすり身を用いた。すり身は使用するまでは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、使用時は $4^{\circ}\text{C}$ で解凍した。本研究では、システインプロテアーゼとして Papain (Sigma-Aldrich)、Cathepsin B を (Calbiochem) およびセリンプロテアーゼとして Trypsin (和光純薬工業(株)) をそれぞれ用いた。本研究では、モデルカマボコへの添加物として、粉末状の米タンパク質(試作品)、馬鈴薯デンプン、タピオカデンプンおよび乾燥卵白をそれぞれ用いた。

## 2-2. すり身抽出液の調製

冷凍すり身 (1 g) を使用する前日から $4^{\circ}\text{C}$ で解凍した。解凍したすり身を、10 ml の McIlvaine 緩衝液 (0.2 M Sodium phosphate-0.1 M Sodium citrate (pH 7)) を用いて懸濁した。懸濁したすり身をホモジナイザー (POLYTRON, KINEMATICA) を用いて均一化し、 $4^{\circ}\text{C}$ で1時間放置した後、遠心分離 (13,000 rpm、30 分間、 $4^{\circ}\text{C}$ ) を2回行い、上清液 (すり身抽出液 1) と沈殿物に分離した。沈殿物は、再び 10 ml の McIlvaine 緩衝液を用いて懸濁した後、ホモジナイザーを用いて均一化した。その後、遠心分離 (13,000 rpm、30 分間、 $4^{\circ}\text{C}$ ) を行い、上清液 (すり身抽出液 2) と沈殿物に分離した。エソの「すり身抽出液 1」と「すり身抽出液 2」とを混合したサンプルを「すり身抽出液」とした。得られたそれぞれのすり身抽出液を膜ろ過 (ADVANTEC、DISMIC-25、Cellulose Acetate、 $0.22\ \mu\text{m}$ ) した後、限外ろ過により濃縮 (Amicon Ultra、Regenerated Cellulose、MWCO 5,000) したサンプルをすり身抽出液として用いた。

## 2-3. プロテアーゼ活性測定

### 2-3-1. アゾアルブミンを用いた測定

プロテアーゼ全活性と米タンパク質を添加した後の残存活性を測定するために、既に報告されている方法を改変したアゾアルブミン法を用いた。基質溶液として、アゾアルブミン/McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) を用いた<sup>9)</sup>。エソのすり身抽出液に、食塩濃度が 0、2 および 4 % となるようにそれぞれ添加し、それらをプロテアーゼ溶液とした。プロテアーゼ溶液のタンパク質量は Lowry 法により測定した。

### 2-3-2. 蛍光基質を用いた測定

プロテアーゼ活性は反応によって蛍光基質から遊離する 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) の蛍光強度を測定することにより求めた。測定には石英セルを使用し、セルに 1,000  $\mu\text{l}$  の緩衝液、965  $\mu\text{l}$  の蒸留水、15  $\mu\text{l}$  の酵素

溶液および 10  $\mu\text{l}$  のプロテアーゼ溶液を入れ、 $55^{\circ}\text{C}$ で5分間、ブレインキュベートを行った後、10  $\mu\text{l}$  の蛍光基質溶液を添加した。この反応をコントロールとした。一方、セルに 1,000  $\mu\text{l}$  の緩衝液、955  $\mu\text{l}$  の蒸留水、15  $\mu\text{l}$  の酵素溶液、10  $\mu\text{l}$  のプロテアーゼ溶液および 10  $\mu\text{l}$  の米タンパク質溶液を入れ、 $55^{\circ}\text{C}$ で5分間、ブレインキュベートを行った後、10  $\mu\text{l}$  の蛍光基質溶液を添加した。Papain 系、Cathepsin 系および Trypsin 系のプロテアーゼ活性の測定においては、蛍光基質としてそれぞれ Z)-Phe-Arg-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (MCA)、(Z)-Arg-Arg-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (MCA) および (Z)-Boc-Phe-Ser-Arg-4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (MCA) 溶液をそれぞれ用いた。AMC 濃度は蛍光光度計 (RF-5300PC、島津製作所(株)) を用いて 380 nm の励起光、440 nm の蛍光を測定し、1 分間あたりの AMC の吸光度変化から AMC 濃度を算出した。また、Papain 系のプロテアーゼ活性に及ぼす食塩濃度の影響を検討するために、セル中での最終濃度が 0、1、2、3 および 4 % になるように緩衝液に食塩を加えた。

## 2-4. モデルカマボコの調製

エソの冷凍すり身を、調製する前日に、すり身の温度が $-2^{\circ}\text{C}$ 前後になるように半解凍した。解凍したすり身をフードプロセッサー (MK-K58, National) を用いて、混練した。混練をしている間、すり身の温度が $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ になった時に食塩を添加した。また、添加物を加える時は、食塩を添加する時と同時に添加した。添加後、すり身の温度が $10^{\circ}\text{C}$ になるまですり身を混練し、ミンチ状にした。ミンチになったすり身を折径 48 mm の塩化ビニリデンフィルムに充填し、両端を糸で結んだ、その後、 $90^{\circ}\text{C}$ で40分間保温した後、直ちに冷水に浸して冷却した。冷却後、 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。もどりの時間について検討する場合には、 $90^{\circ}\text{C}$ での保温の前に、0.5 および 1 時間保温した。

## 2-5. モデルカマボコの性質評価

押し込み最大荷重 (押し込み荷重) および弾性ひずみを測定するために、レオメーター (NRM-2010J-CW, FR-31、不動工業産業株式会社) を用いて押し込み試験を行った。プランジャーには直径 5 mm の球形プランジャーを使用し、押し込み速度は 6 cm/min とした。モデルカマボコを 2.5 cm の厚さに輪切りにし、その切断面に対して、垂直方向にプランジャーを押し込んだ。押し込み試験は3回行い、得られた測定値の平均値を求めた。



約 5 mm の厚さに輪切りにしたモデルカマボコの切断面に対し、色彩色差計 (CR-400、KONICA MINOLTA センシング株式会社) のセンサ部を置き、L (明度) および a と b (色相と彩度) をそれぞれ測定し、ハンター白度を算出した。

### 3. 実験結果および考察

#### 3-1. 組換えオリザシタチンの調製と性質

組換え OC を次のようにして調製した。まず、オリザシタチン-X II (OC-X II) 遺伝子を発現用ベクターに組み込んで作製したプラスミド (図 1) を用いて、発現用大腸菌を形質転換した。この大腸菌を培養し、OC-X II をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させた。特異的に切断する酵素を用いて GST を切り離して OC-X II を精製した。その結果、図 2 の SDS-PAGE の電気泳動の写真に示すように単一になるまで精製できた。

#### 3-2. イネ中でのオリザシタチンの分布

組換えタンパク質として調製し、精製した OC-X II を用いて、ウサギを免疫し OC-X II 抗体を調製した。この抗体を用いてイネ中の OC-X II の分布を調べた結果を図 3 に示す。精白米において、バンドを検出できたことから、精白米中に OC-X II が存在していることがわかった。そこで、OC-X II を含む精白米タンパク質を調製し、カマボコのもどり防止に利用することにした。

#### 3-3. すり身中の全プロテアーゼ活性の阻害

アゾアルブミンを基質として、エソのすり身抽出液のプロテアーゼ全活性を測定した。その時の波長 420 nm における吸光度の変化を図 4 に示す。米タンパク質の添加によって、全ての食塩濃度において、それぞれプロテアーゼの全活性が約 15~30 % 低下した。次に、すり身抽出液中のプロテアーゼ比活性を比較した。エソのすり身は、食塩を添加しない時のプロテアーゼ比活性が食塩を添加した時に比べて、高い値となったことから、食塩のみでもプロテアーゼ活性が阻害されることがわかった。

エソのすり身抽出液のプロテアーゼ比活性は、米タンパク質の有無および食塩濃度の変化にかかわらず、時間が経過するにつれて増加した。また、米タンパク質を添加した時の相対活性は、時間経過とともに増加した。すなわち、阻害効果が弱まった。この結果から、エソのすり身抽出液中では、時間経過とともに米タンパク質中のプロテアーゼ阻害活性が失われるため、持続

的にプロテアーゼの全活性を阻害することが困難であると考えられる。この現象は、プロテアーゼ阻害因子がプロテアーゼによって分解されたためと考えられる。

#### 3-4. 各種プロテアーゼ活性の阻害

すり身抽出液中の Papain 系、Cathepsin 系および Trypsin 系のプロテアーゼ活性と米タンパク質を添加した時の各プロテアーゼ活性の変化を、それぞれに反応する蛍光基質を用いて測定した。すなわち蛍光基質として (Z)-Phe-Arg-MCA、(Z)-Arg-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA をそれぞれ使用した。米タンパク質を添加することによって、Papain 系のプロテアーゼ活性が約 20% 低下した。Trypsin 系プロテアーゼ活性は、米タンパク質による影響を受けなかった。また、Cathepsin 系プロテアーゼ活性は、米タンパク質を添加すると約 20% 増加した。この結果から、米タンパク質はエソの Cathepsin 系プロテアーゼ活性を増強させる働きがあると考えられる。あるいは、米タンパク質中に Cathepsin 系プロテアーゼが含まれていることも考えられる。

以上の結果から、エソのすり身抽出液に米タンパク質を添加することにより抽出液中のプロテアーゼ活性を部分的に阻害することができた。次に、検出できた Papain 系プロテアーゼ活性に対する米タンパク質の添加効果を、食塩濃度を変えて検討した結果を図 5 に示す。縦軸の相対値は、米タンパク質および食塩を添加しない時のすり身抽出液中の Papain 系プロテアーゼ活性を 100% とした場合の値を示す。エソのすり身抽出液中の Papain 系プロテアーゼ活性は、米タンパク質を添加することによって、低下したことから、米タンパク質は Papain 系プロテアーゼ活性を阻害する成分を含んでいることが確認できた。また、米タンパク質の添加の有無にかかわらず、食塩濃度が高くなるにつれて、Papain 系プロテアーゼ活性が低下したことから、食塩のみでも Papain 系プロテアーゼ活性を阻害されることがわかった。

#### 3-5. すり身を用いたモデルカマボコの性質

エソのすり身から調製したモデルカマボコの押込み荷重、弾性ひずみ、ハンター白度、水分含量および pH を測定した。すり身に対して 5% の米タンパク質を添加した時の影響を検討した結果を図 6 に、食塩濃度を 3% として米タンパク質の添加濃度の影響を検討した結果を図 7 に、食塩濃度を 3% として 55℃での保温時間 (もどり時間) の影響を検討した結果を図 8 に、および添加物の種類を変化させて検討した結果を図

9にそれぞれ示す。

押し込み荷重は、米タンパク質を添加することによって、図6の上の図に示すように、食塩濃度にかかわらず米タンパク質を添加しない場合の約2倍に増加した。米タンパク質の添加濃度を変化させた結果、図7の上の図に示すように、添加濃度が高くなるにつれて、押し込み荷重は増加した。もどり時間を0, 0.5および1時間に変化させた場合を比較した結果、図8の上の図に示すようにもどり時間が長くなるにつれて、押し込み荷重は減少した。また、5%の米タンパク質を添加したモデルカマボコに比べて、10%の米タンパク質を添加したモデルカマボコの押し込み荷重は、もどり時間に関係なく、ほぼ一定の割合で増加した。添加物の種類を変えた場合には、図9の上の図に示すように、押し込み荷重は乾燥卵白を添加した時に最も高い値となった。

具体的な結果は示さないが、弾性ひずみは、食塩濃度に関係なく、米タンパク質を添加することによって、米タンパク質を添加しない場合に比べて、僅かに増加した。米タンパク質の添加濃度を変えて調製したモデルカマボコの弾性ひずみは、添加濃度が5%まではほとんど変化がなく、添加濃度が10%になると増加した。もどり時間を変えた場合を比較した結果、米タンパク質の添加濃度に関係なく、弾性ひずみはもどり時間が0.5時間まではほとんど変化がなく、もどり時間が1時間になると増加した。また、押し込み荷重の場合と同様に、5%の米タンパク質を添加した場合に比べて10%の米タンパク質を添加した時には、もどり時間に関係なく、弾性ひずみがほぼ一定の割合で増加した。添加物の中では乾燥卵白を添加した場合に最も弾性ひずみが大きくなった。弾性ひずみの測定においては、モデルカマボコの調製時に、モデルカマボコ内に気泡が入るために、測定値の精度が低くなった。このため、弾性ひずみは押し込み荷重とは異なる傾向を示すようになったと考えられる。

ハンター白度は、図6の下図に示すように米タンパク質を添加しない場合に比べて、米タンパク質を添加した場合に、食塩濃度に関係なく僅かに増加した。米タンパク質の添加濃度を変えた場合には、図7の下図に示すように、添加濃度が5%までは徐々にハンター白度が増加した。また、図8の下図に示すように、もどり時間を長くしてもほとんど変化がなかった。さらに、図9の下図に示すように、5%の米タンパク質を添加した場合に比べて10%の割合で添加した時には、もどり時間に関係なくほぼ一定の割合でハンター白度が減少した。

具体的な結果は示さないが、水分含量およびpHは、米タンパク質を添加しない場合に比べて、米タンパク質を添加することによって、ともに減少した。また、食塩濃度が増加するにつれて、両者は減少する傾向があることがわかった。この水分含量に及ぼす食塩濃度の影響は、浸透圧によると考えられ、モデルカマボコ内の水分がモデルカマボコの外へ放出されたためと考えられる。米タンパク質の添加濃度を変えて水分含量とpHを比較した結果、添加濃度が高くなるにつれて、両者は減少する傾向があることがわかった。さらに添加物の種類を変化させると、コントロール（無添加）を除いた中では、馬鈴薯デンプンが最も高い水分含量となった。これは、デンプン特有の保水効果によるためと考えられる。また、米タンパク質を添加した場合に、馬鈴薯デンプンの次に高い水分含量であったことから、デンプンと同様な保水効果があったと考えられる。pHは乾燥卵白の場合が最大となった。このような添加物による水分含量の変化は、添加物がモデルカマボコの網目構造中の水分をその構造の外に追い出したためと考えられる。もどり時間を変えても、水分含量はもどり時間に関係なくほとんど変化しなかった。しかし、pHはもどり時間が長くなるにつれて減少した。

以上の結果から、エソのすり身に米タンパク質を添加することによって、モデルカマボコ中の押し込み荷重および弾性ひずみが増加することがわかった。また、ハンター白度も増加したことから、このモデルカマボコの白さも向上できることがわかった。しかし、米タンパク質を添加したモデルカマボコの押し込み荷重と水分含量の間の関係を検討した場合、押し込み荷重が高いほど水分含量が低かったことから、強度の向上の理由として、米タンパク質由来プロテアーゼインヒビターの作用だけでなく、モデルカマボコ内の水分含量の低下の寄与も考えられる。

#### 4. まとめ

カマボコの一般的な原料として使用されているエソのすり身を用いてすり身抽出液を調製し、すり身の内在性プロテアーゼ活性に及ぼす米タンパク質の添加効果を検討した。その結果から、OCを含む米タンパク質は、エソのすり身抽出液中の内在性プロテアーゼの1種類であるPapain系プロテアーゼを阻害することがわかった。また、米タンパク質を添加したすり身からモデルカマボコを調製することによって、カマボコの強度と白さを向上できることがわかった。

た。しかし、水分含量が減少するにつれて、押し込み荷重が増加することから、強度の向上の理由として、米タンパク質のプロテアーゼ阻害作用以外に、水分含量も影響することがわかった。

本研究では、すり身中の Papain 系プロテアーゼのみを詳しく検討したが、将来、米タンパク質が実際にカマボコのもどり防止へ利用することを目標として、Cathepsin 系および Trypsin 系プロテアーゼについても検討する必要がある。さらに、カマボコの強度の向上の理由を明確にするために、米タンパク質のプロテアーゼ阻害作用の効果のみを検討できる実験系を構築する必要がある。

## 5. 研究発表

- 1) S. Ohtsubo, M. Taiyoji, T. Kawase, M. Taniguchi, E. Saitoh: Oryzacystatin-II, a cystatin from rice (*Oryza sativa* L. *japonica*), is a dimeric protein: the possible involvement of the interconversion between dimer and monomer in the regulation of the activity of oryzacystatin-II. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1762-1766 (2007).
- 2) 平成 19 年 9 月に開催された平成 19 年度日本生物工学会大会 (広島) にて発表。

## 6. 引用文献

- 1) M. Ohkubo, K. Osatomi, K. Hara, T. Ishihara and F. Aranishi : Myofibrillar proteolysis by myofibril-bound serine protease from white croaker *Argyrosomus argentatus*. *Fisheries Sci.*, **71**, 1143-1148 (2005).
- 2) O. Akpınar and H. An: Purification and determination of inhibitory activity of recombinant soyacystatin for surimi application. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**, 247-255 (2005).
- 3) S. S. Tzeng and S. T. Jiang: Glycosylation modification improved the characteristics of recombinant chicken cystatin and its application on mackerel surimi. *J. Agr. Food Chem.*, **52**, 3612-3616 (2004).
- 4) A. J. Barrett, H. Fritz, A. Grubb, S. Isemura, M. Jarvinen, N. Katunuma, W.

Machleidt, W. Muller-Esterl, M. Sasaki, and V. Turk: Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin., *Biochem. J.*, **236**, 312 (1986).

- 5) M. Abe, H. Kondo, S. Arai: Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2763-2768 (1987).
- 6) I. Song, M. Taylor, K. Baker, R. C. Jr. Bateman: Inhibition of cysteine proteinases by *carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. *Gene*, **162**, 221-224 (1995).
- 7) S. Ohtsubo, H. Kobayashi, W. Noro, M. Taniguchi, E. Saitoh: Molecular cloning and characterization of oryzacystatin-III, a novel member of phytocystatin in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*). *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5218-5224 (2005).
- 8) S. Ohtsubo, M. Taiyoji, T. Kawase, M. Taniguchi, E. Saitoh: Oryzacystatin-II, a cystatin from rice (*Oryza sativa* L. *japonica*), is a dimeric protein: the possible involvement of the interconversion between dimer and monomer in the regulation of the activity of oryzacystatin-II. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1762-1766 (2007).
- 9) S. Rawdkuen, S. Benjakul, W. Visessanguan and T. C. Lanier: Chicken plasma protein: Proteinase inhibitory activity and its effect on surimi gel properties. *Food Research International*, **37**, 156-165 (2004).

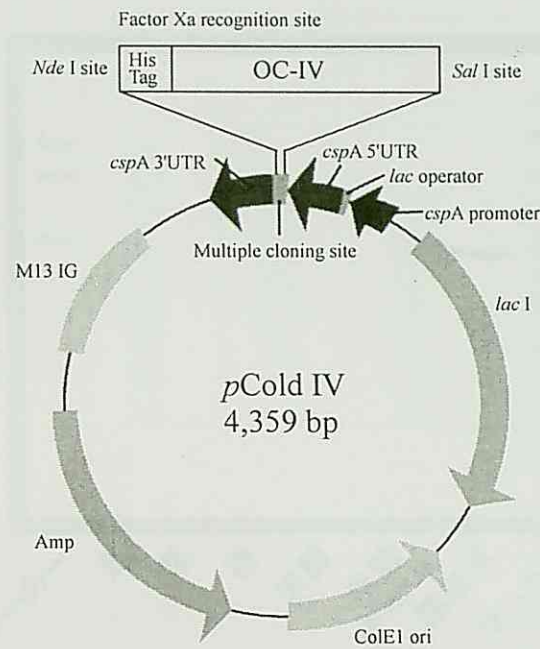


図1 本研究で使したプラスミド

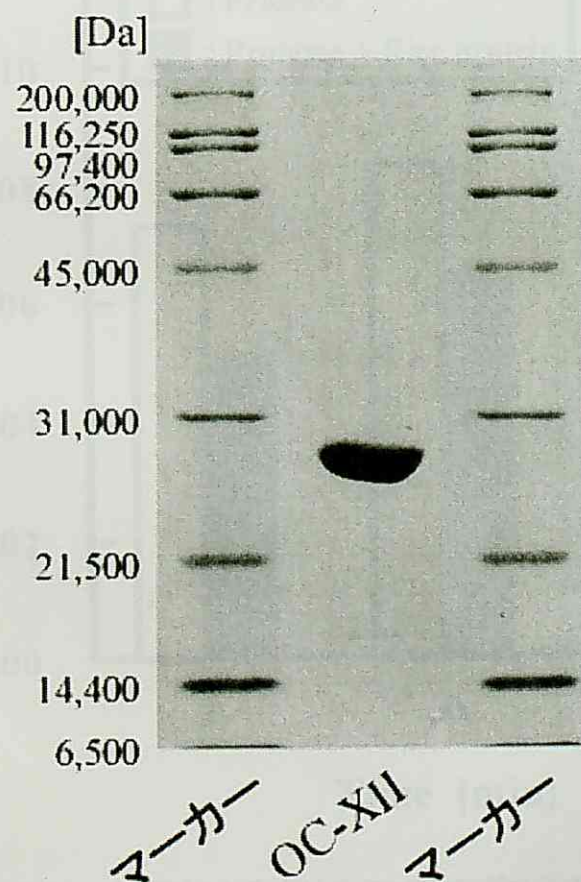


図2 SDS-PAGE による組換えオリザシスタチンの純度検定

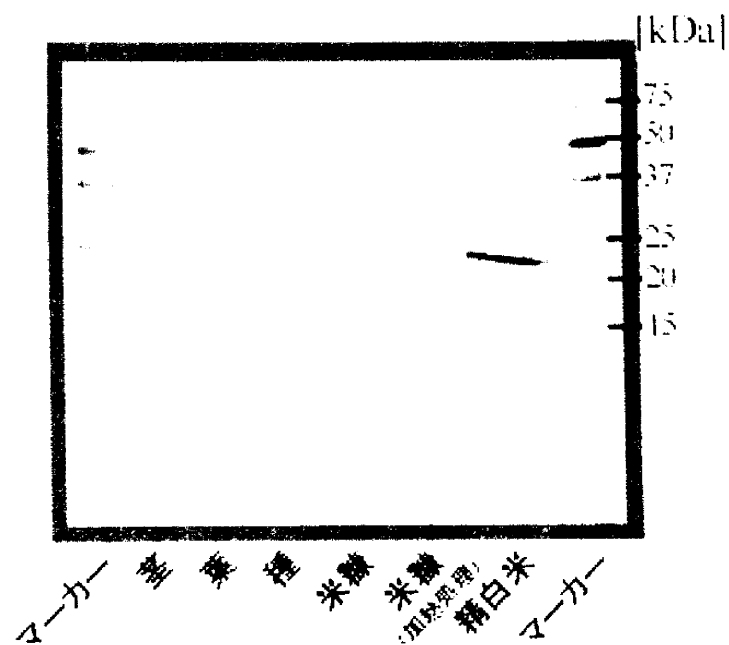


図3 抗体を用いたイネ由来サンプル中のオリザシタチンの検出

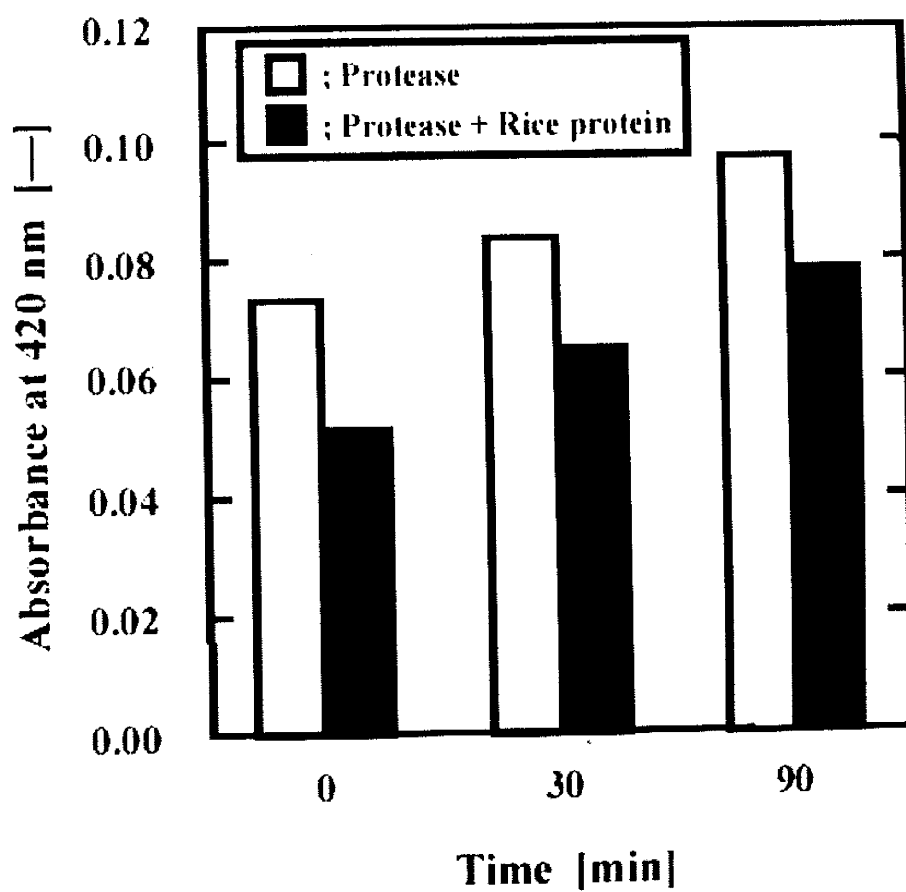


図4 米タンパク質によるすり身(エソ)のプロテアーゼ全活性の阻害

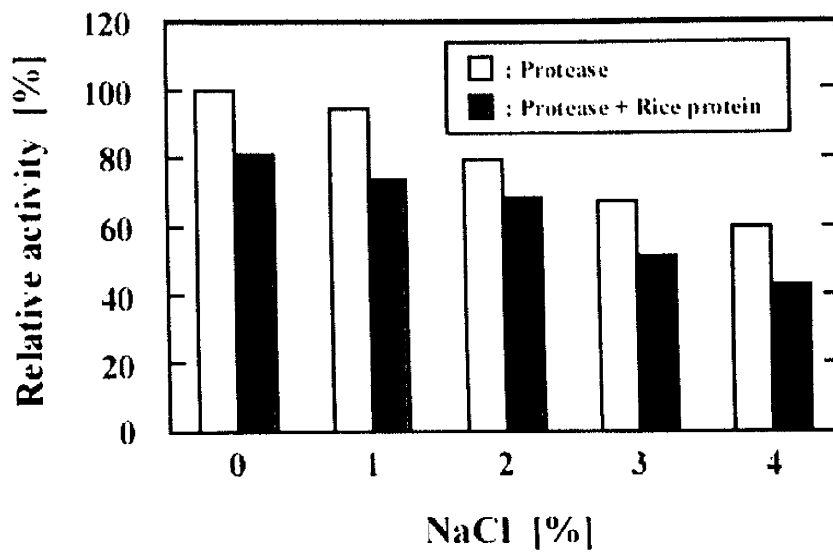


図5 すり身(エソ)の Papain 系プロテアーゼ活性に及ぼす米タンパク質の阻害効果

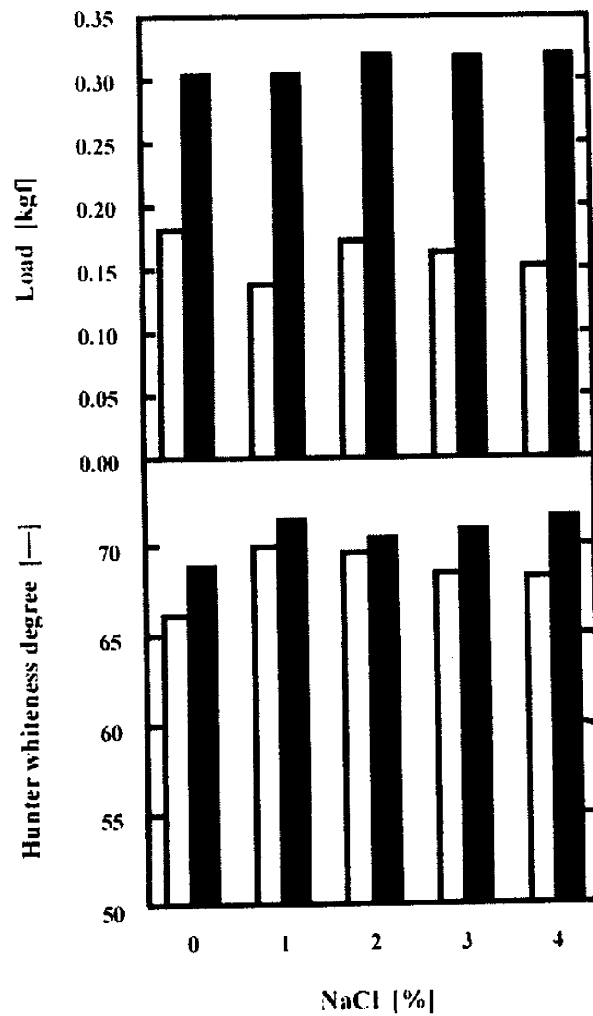


図6 モデルカマボコ(エソ)の性質に及ぼす米タンパク質の添加効果  
 押込み強度(上图), ハンター白度(下图),  
 米タンパク質濃度;0%(左)、5%(右)

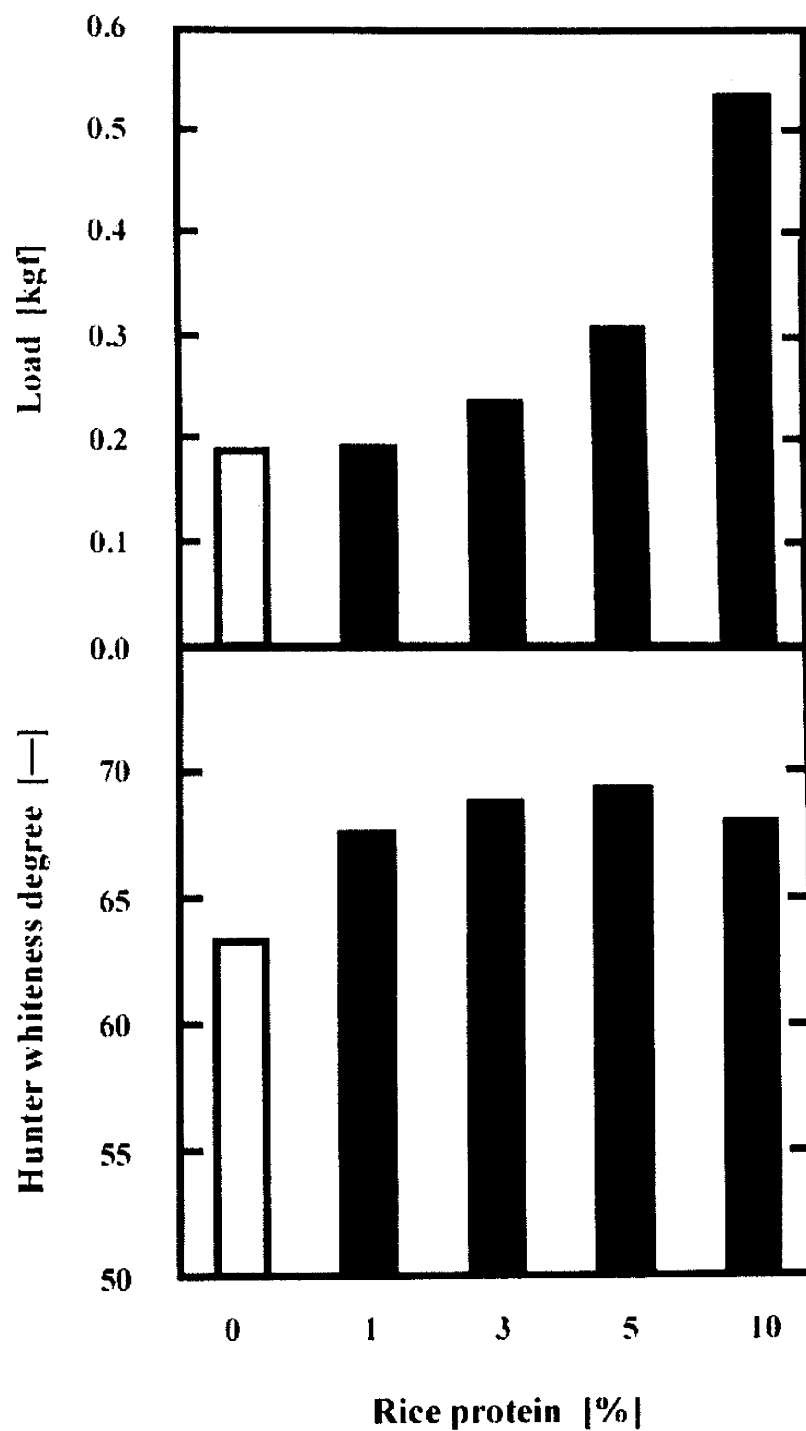


図7 モデルカマボコ(エソ)の性質に及ぼす米タンパク質の添加濃度の影響  
 押込み強度(上図), ハンター白度(下図),  
 NaCl; 3 %

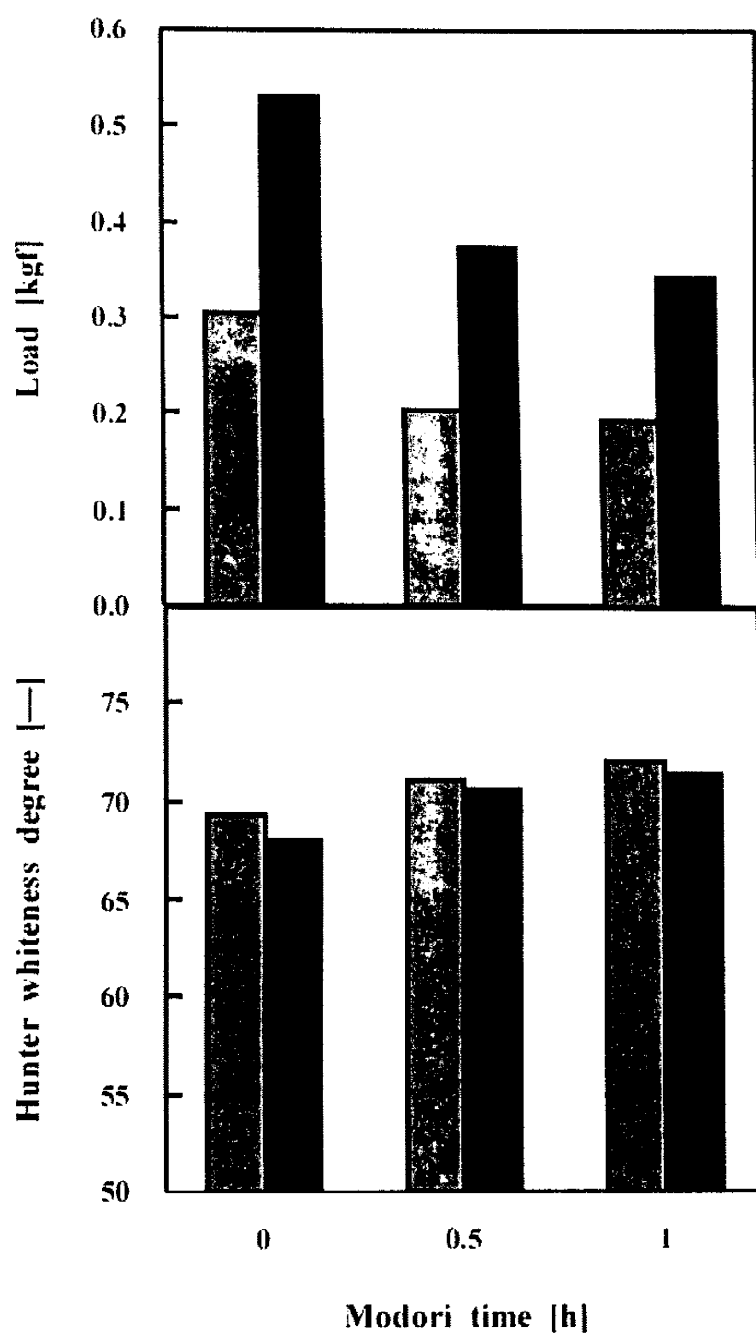


図8 モデルカマボコ(エソ)の性質に及ぼす戻り時間の影響  
 押込み強度(上図)、ハンター白度(下図)、  
 米タンパク質濃度;5%(左)、10%(右)、NaCl;3%



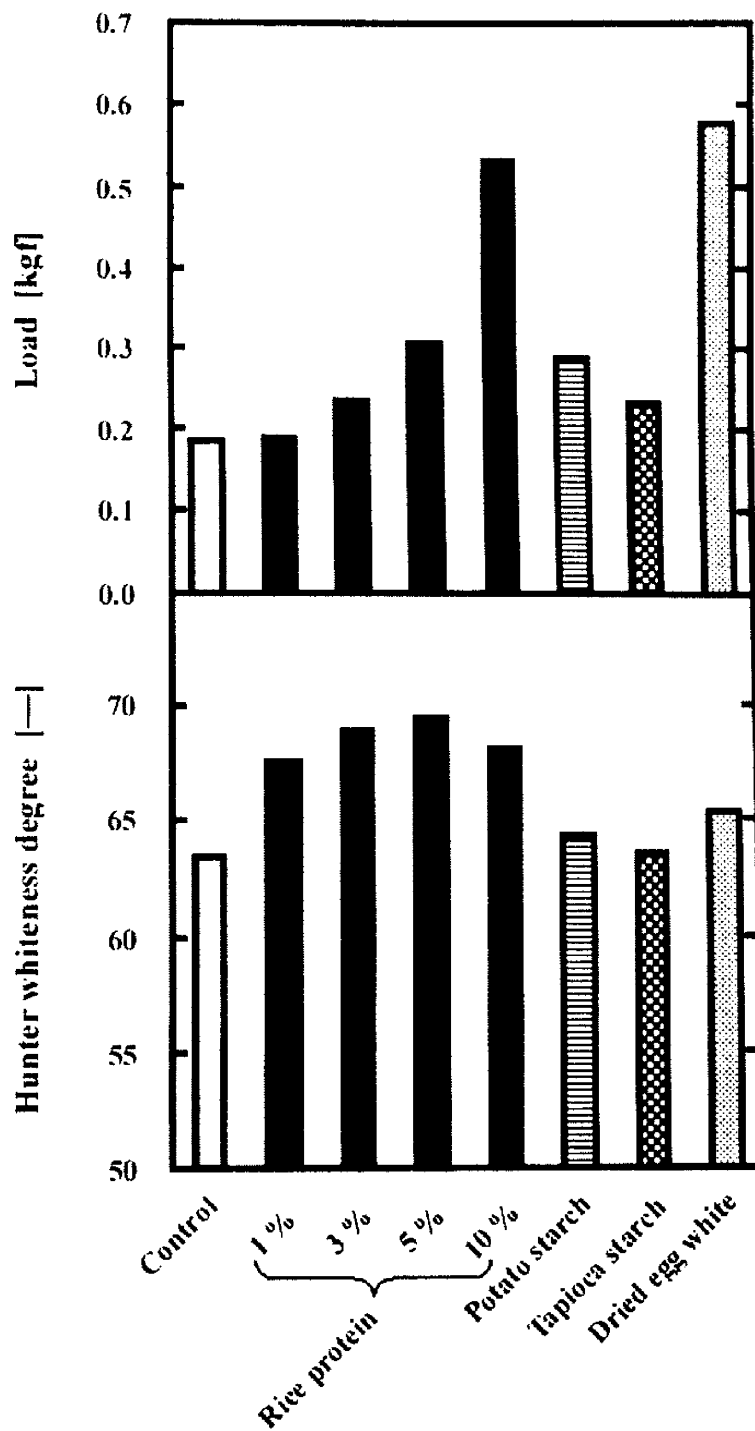


図9 モデルカマボコ(エソ)の性質に及ぼす添加物の種類の影響  
 押込み強度(上図), ハンター白度(下図),  
 NaCl; 3 %

# Effect of addition of plant protein with protease inhibitory activity on quality of Kamaboko

Masayuki Taniguchi

Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Niigata University  
Ikarashi 2, Niigata 950-2181, Japan, phone: 025-262-6716

## Abstract

In manufacture of Kamaboko, several endogenous proteases autohydrolyse partially proteins in surimi (fish meat paste); the proteolysis by endogenous proteases in surimi causes Modori (softening) and therefore lowering of quality of Kamaboko. In this study, we examined prevention of the softening of Kamaboko using rice protein (oryzacystatin) with protease inhibitory activity.

Western blot analysis using antibody against a recombinant oryzacystatin, which was prepared and purified in this study, showed that polished rice contains rice protein (oryzacystatin) with protease inhibitory activity. Moreover, by using a synthetic fluorescent substrate of protease, we found that the rice protein contains inhibitors toward papain like protease and that the extracts of surimi (lizardfish) showed papain like protease. On the basis of these results, we prepared model Kamaboko using surimi (lizardfish) as a starting material. When the rice protein was added to surimi paste with 3% NaCl, the breaking force and deformation of Kamaboko obtained were higher than those without the rice protein. Moreover, the whiteness of Kamaboko was improved by adding rice protein. Therefore, we clarified that the addition of the rice protein to surimi (lizardfish) was effective to prevent Kamaboko from Modori (softening) in the presence of 2-3% NaCl. Further study on clarification of relationship between degree of inhibition of protease activity in surimi and physical properties of Kamaboko is necessary.

## 第 6 章 米由来ジンジパイン阻害成分と歯周病 菌増殖抑制成分の精製および同定

## 6-1 精白米からの CPI の分画・濃縮のための単位操作に関する基礎研究

### 1. 目的

イネ CPI (ジンジパイン阻害因子) の抽出に有効かつ工業規模で利用可能な分画・濃縮法を確立することを目的とした。

### 2. 実験方法と結果

#### 1) アルカリ抽出法を用いた古米 (H16 年産カリフォルニア米) からの CPI の抽出

古米をアルカリ溶液に一晩浸漬した後、磨砕した。その懸濁液を遠心分離することによって上清液 (古米アルカリ抽出タンパク質画分) をアルカリ抽出液として回収した。さらに pH 調整による溶解度差を利用して分別抽出した。すなわち、HCl 溶液にてアルカリ抽出液 (pH 10.7) の pH をそれぞれ 10、8.5、7、5 に直接調整した後、遠心分離によりその可溶性タンパク質画分を回収した。また、アルカリ抽出液の pH を段階的に調整し、そのときの各可溶性タンパク質画分を同様に回収した。

CPI 抽出効率の指標として、各分画溶液中のジンジパイン阻害活性を蛍光基質を用いて測定した。アルカリ抽出液の pH を直接各 pH に調整して分画した場合、pH 5 可溶性画分 (pH 5 D sol.) が、初発の古米アルカリ抽出画分 (pH 10.7) と比較して、約 2.5 倍高いジンジパイン阻害活性を示した (図 6-1)。

次に CPI の分画・濃縮操作として、工業規模へのスケールアップが比較的容易なアルコール抽出法について検討した。pH 5 D sol.画分からエタノール (EtOH) を用いた段階抽出により、それぞれ 30% EtOH 不溶性、30-70% EtOH 不溶性、70% EtOH 可溶性画分に分別した。その結果、70% EtOH 可溶性画分は初発の古米アルカリ抽出画分よりも約 3.5 倍高いジンジパイン阻害活性を示し (図 6-1)、EtOH 抽出法がジンジパイン阻害因子の調製に有効であることが判明した。

また、SDS-PAGE 解析により pH 5 D-70% EtOH sol.画分は、分子サイズ 14~15 kDa の低分子タンパク質を含むことを確認した (図 6-2)。さらに、後述するように pH 5 D-70% EtOH sol.画分の歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する増殖抑制効果が見出された。

#### 2) バッファー抽出法を用いた新米 (H18 年産コシヒカリ) からの CPI の抽出

新米を粉砕し、500 mM NaCl を含む pH 5、7 および 8.5 の各バッファーに浸漬して 20 分間振盪した。その後、遠心分離により可溶性画分を回収した。内在性プロテアーゼを失活

させるために、この可溶性画分を 95 ℃で 10 分間加熱し、遠心分離して上清を回収した。この画分を脱塩・濃縮して、ジンジパイン阻害活性を測定した。pH 5 のバッファーで抽出した新米タンパク質画分のジンジパイン阻害活性は、古米アルカリ抽出画分 (pH 10.7) のそれより約 3 倍向上した (図 6-3)。また、この画分は古米アルカリ抽出タンパク質の pH 5 D-70% EtOH sol.画分と同等の阻害活性を保持していた。

### 3. 考察

これまでの研究成果から、精白米をアルカリ浸漬することで CPI を含有する低分子タンパク質画分が効率的に得られることを見出していた。しかし、この方法だけでは、優れた機能を発揮する高い CPI 活性を保持した画分を調製するには不十分であり、新たに調製方法を開発する必要があった。今回の研究により、アルカリ抽出後のサンプルを用いた場合には、pH 調整による溶解度差を利用した分画法およびエタノールを用いた分画法が有効であることを明らかにできた。この抽出・濃縮画分の歯周病菌に対する増殖抑制効果も見出しており、イネ CPI を天然系機能性素材として工業規模で製造できることが示唆された。更にバッファーを用いた精白米からのタンパク質抽出画分からは、従来のアルカリ抽出後のサンプルからよりも高効率に CPI を抽出できることも見出した。これらの方法で抽出した精白米タンパク質画分が示すジンジパイン阻害活性と後述する抗菌プロファイルに関する成果に基づいて、古米アルカリ抽出タンパク質ならびに新米バッファー抽出タンパク質は、それぞれ 1 mg 当たり  $1.2 \times 10^6$  および  $4.8 \times 10^6$  cells の歯周病菌の増殖を抑制することが判明した。これはイネ CPI が歯周病予防に有効であることを示唆しており、今回の知見が国民のニーズに応え得る天然系機能性新素材の開発に繋がると期待している。

これらの知見からイネ CPI の抽出に有効な単位操作を確定し、以下の抽出プロセス案を提唱する。まずステップ 1 として精白米タンパク質をバッファーにより抽出し、可溶性画分を回収する。この時に得られた残渣をアルカリ浸漬して更にタンパク質を抽出する (ステップ 2)。ステップ 2 で得られた残渣は従来通りデンプン製造に使用可能である。ステップ 3 で今回得られた知見に基づいて、ステップ 1 及び 2 で回収した可溶性画分に含まれる CPI を分画・濃縮する。以上の抽出プロセスにより、米デンプンだけでなく、これまでデンプン製造工程において副産物として廃棄されていた米タンパク質成分を有効活用することが可能になると確信している。今回開発した米タンパク質を製造するための新技術は、新規性が高く優位な技術である。

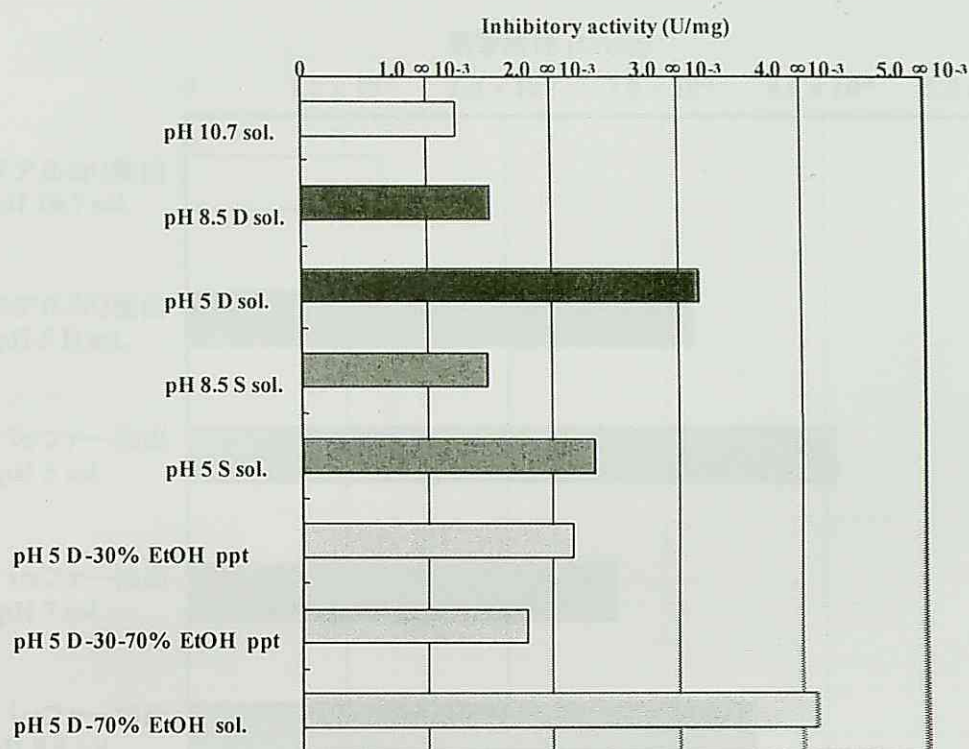


図 6-1 ジンジパイニン阻害活性を含む古米タンパク質画分の調製

D: 一回で pH を調整、S: 段階的に pH を調整

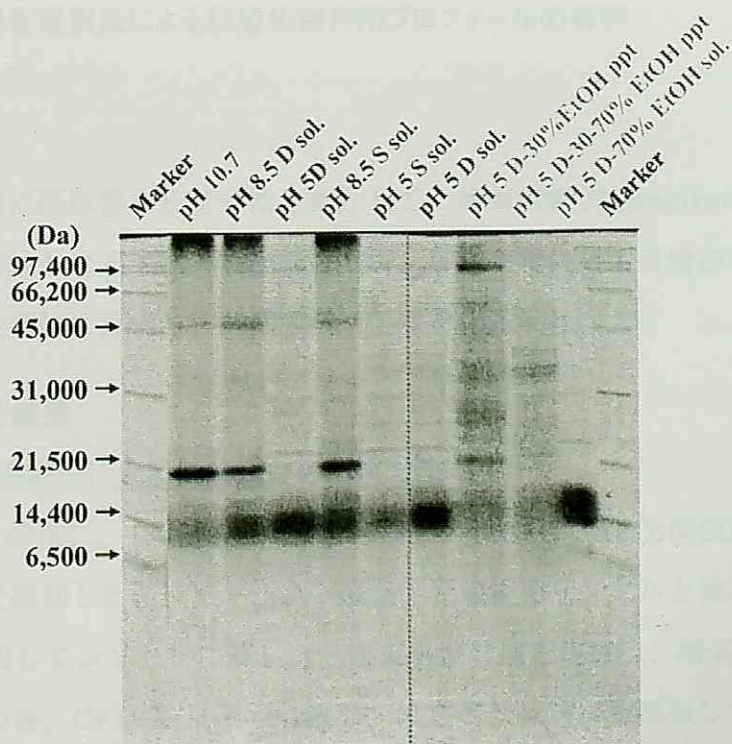


図 6-2 ジンジパイニン阻害活性を含む古米タンパク質画分の SDS-PAGE 解析

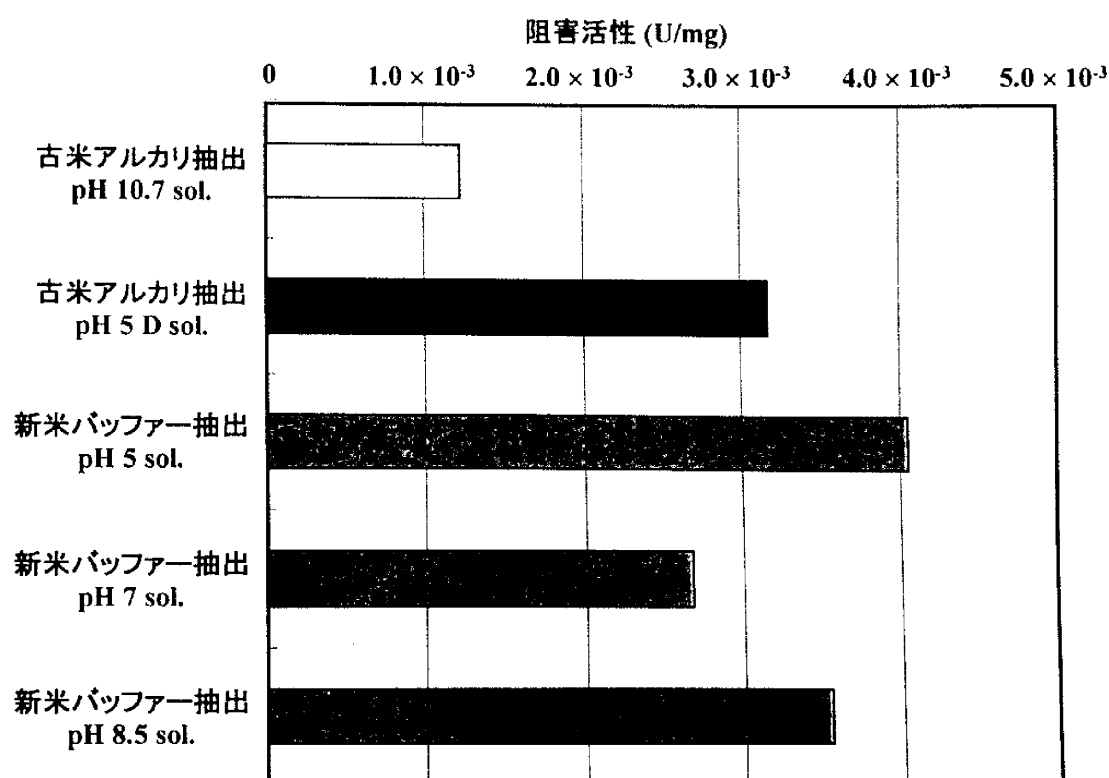


図 6-3 ジンジパイン阻害活性を含む新米タンパク質画分の調製

## 6-2 寒天平板混釈法による抗微生物作用プロフィールの解明

### 1. 目的

ヒトの健康に悪影響を及ぼす微生物として、歯周病菌 *P. gingivalis* JCM 8525 を選定し、寒天平板培養における CFU を指標として、各微生物に対する精白米タンパク質成分の抗微生物作用を定量的に評価し、抗菌スペクトルを作成する。

### 2. 実験方法と結果

#### 1) 寒天平板混釈法による抗菌活性の測定方法

変法 GAM 培地に、1% (w/v) 寒天を添加し、120 °C で 15 分間滅菌した。滅菌した培地を約 55 °C まで冷却した後、フィルター滅菌した検定用サンプルと検定菌（初期 OD<sub>655</sub>=3.1 × 10<sup>-6</sup>）を混釈してシャーレに流し込み寒天平板培地を作成し、嫌気条件下、37 °C で静置培養した。その後、CFU を目視で計測し、検定用サンプルを添加していない対照区との間で CFU を比較することによって、抗菌活性を評価した（図 6-4）。

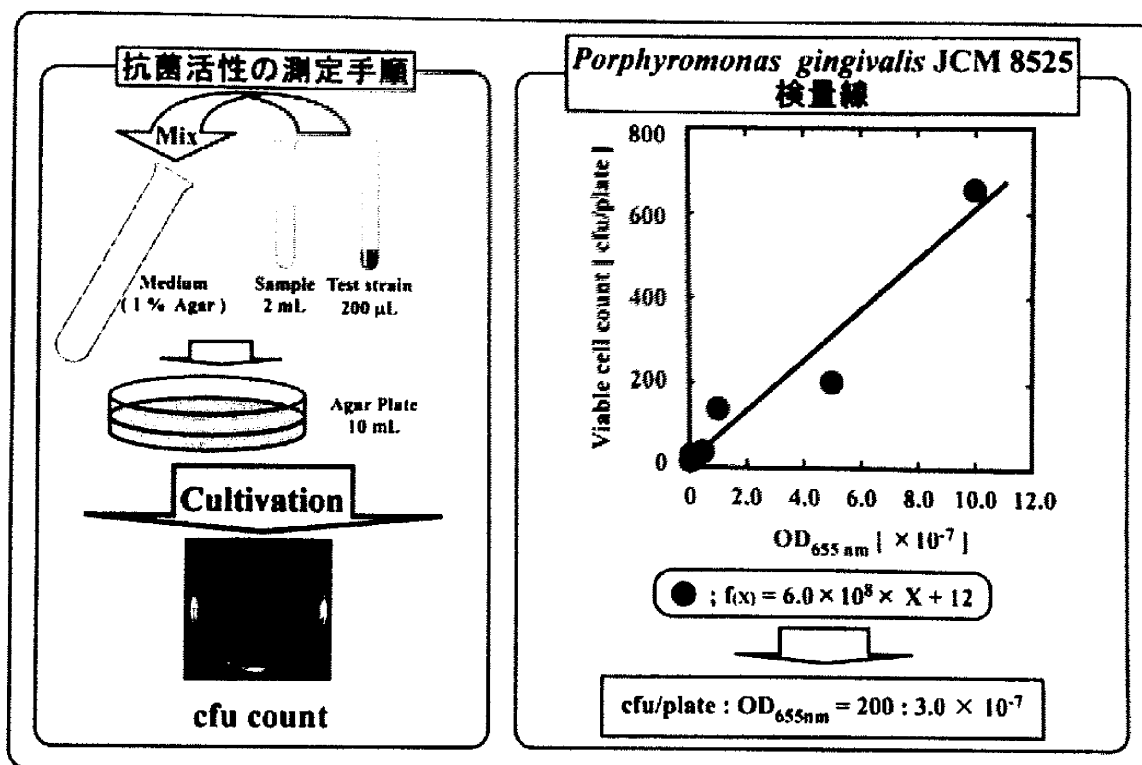


図 6-4 寒天平板混釈法を用いた抗菌活性の測定方法

## 2) 古米アルカリ抽出タンパク質画分の抗菌活性の評価

寒天平板混釈法を用いて、島田化学工業(株)において古米アルカリ抽出液から新たに調製した画分 (pH 5 D-70% EtOH sol. : 0.25 mg/ml) の歯周病菌に対する増殖阻害活性を測定した結果、その増殖は対照区と比べて約 12%阻害された (図 6-5)。

また、食品研究センター及び島田化学工業(株)において、精白米の低分子量タンパク質画分に強いジンジパイン阻害活性が見出された。そこで、透析膜を用いて分子サイズ 16 kDa 以上および 1~16 kDa のタンパク質を含む古米アルカリ抽出画分 (pH 7) をそれぞれ調製し、寒天平板混釈法を用いて歯周病菌に対する増殖阻害活性を測定した。しかし、各タンパク質画分の濃度をそれぞれ 0.23 mg/ml および 0.049 mg/ml としたときには、歯周病菌に対する増殖阻害活性を検出できなかった (図 6-6)。

## 3) 米糠抽出タンパク質画分の抗菌活性の評価

米糠抽出タンパク質画分を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で溶解後、95 °C で加熱し、可溶性画分を回収した。この画分をさらに分子量カット (MWCO) 16 kDa の透析膜を用いて、16 kDa 以上と 16 kDa 以下のタンパク質に分別して回収した。16 kDa 以下の画分を凍結乾燥により濃縮後、MWCO 1 kDa の透析膜を用いてさらに透析し、1~16 kDa 画分を調製した。



寒天平板混釈法を用いて、16 kDa 以上および 1～16 kDa のタンパク質画分の歯周病菌 *P. gingivalis* に対する増殖阻害活性を測定した。その結果、1.46 mg/ml の 16 kDa 以上画分には増殖阻害が認められなかった。一方、1.11 mg/ml の 1～16 kDa 画分は 300 CFU の歯周病菌の増殖を完全に阻害した（図 6-7）。この画分のジンジパイン阻害活性は、島田化学工業（株）において精白米から抽出したタンパク質画分と比較して 1/2～1/7 倍であった。

### 3. 考察

既存技術では、検定用サンプルー検定菌混合液を寒天培地上に塗布していたため、培養期間を通して嫌気状態を保つ点に問題があった。本研究では液状の寒天培地に検定用サンプルと検定菌を混釈して固化する方法を用いることによって、上記の問題点を解決し、寒天平板混釈法を確立することができた。

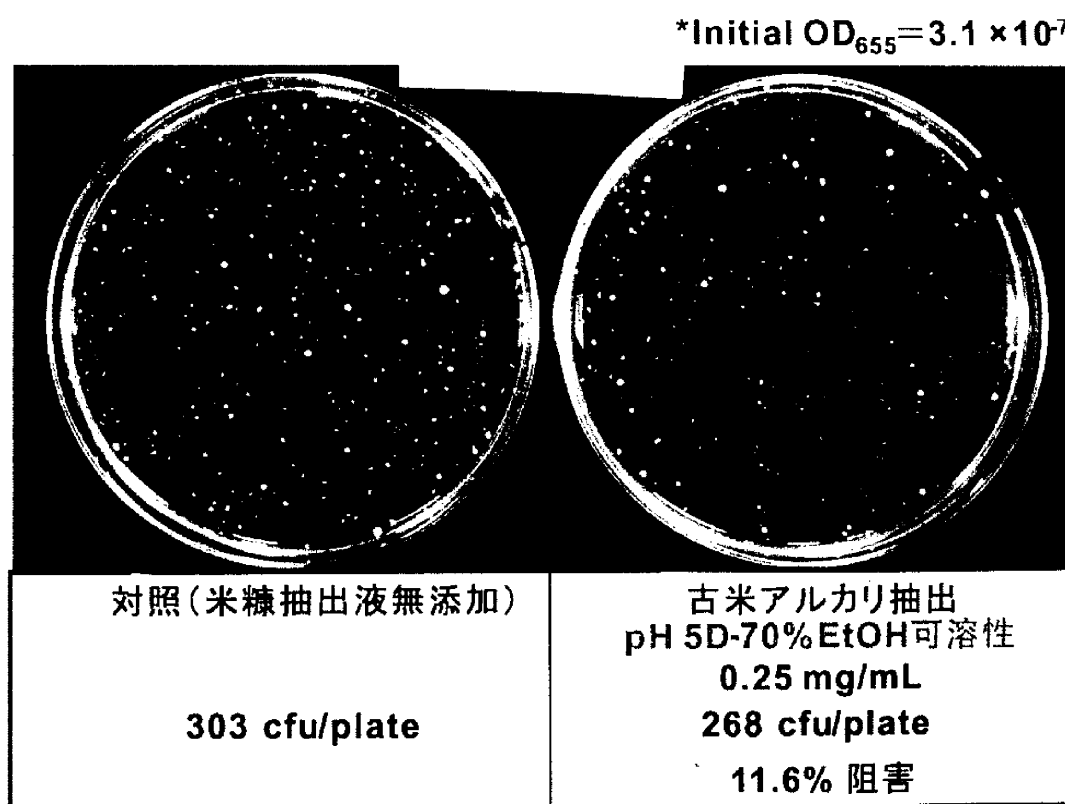


図 6-5 寒天平板混釈法を用いた古米アルカリ抽出液から調製した画分の歯周病菌に対する増殖阻害活性の評価

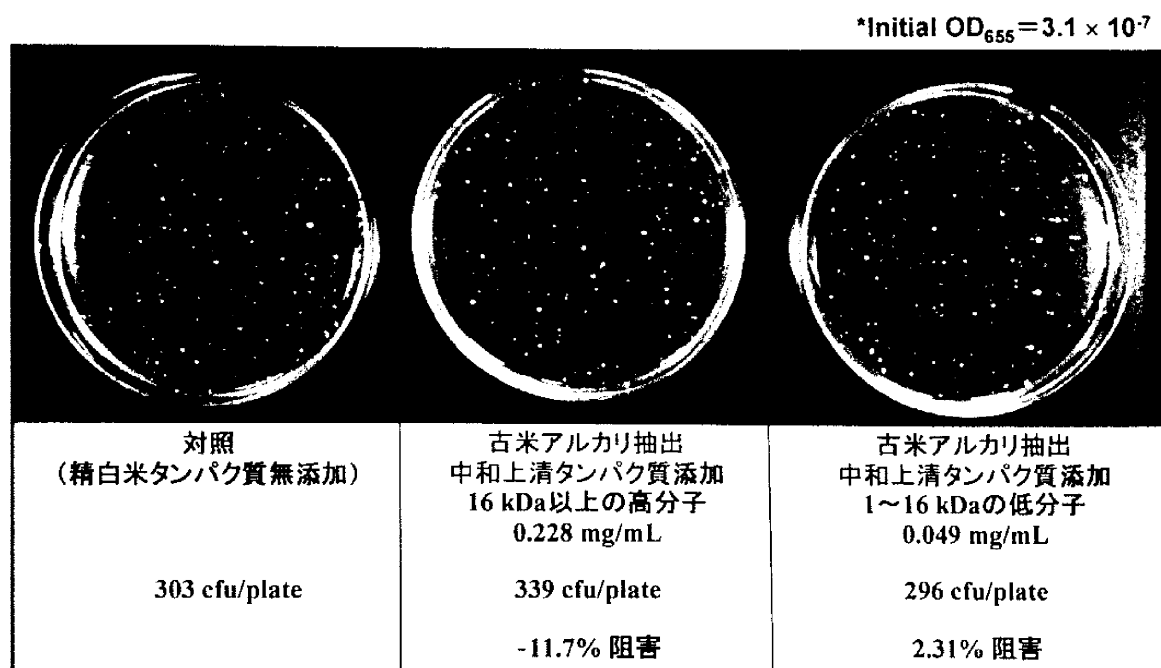


図 6-6 寒天平板混釈法を用いた古米アルカリ抽出液から調製したタンパク質画分の  
歯周病菌に対する増殖阻害活性の評価

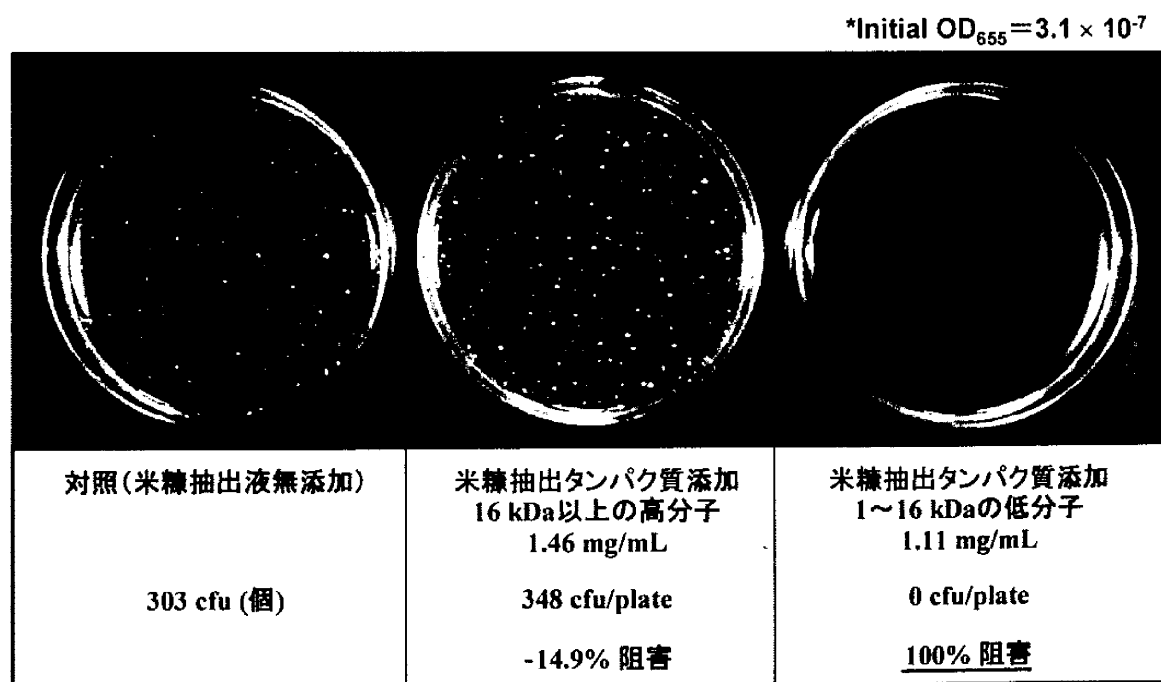


図 6-7 寒天平板混釈法を用いた米糠抽出液から調製したタンパク質画分の  
歯周病菌に対する増殖阻害活性の評価

### 6-3 濁度法による抗微生物作用プロフィールの解明

#### 1. 目的

抗微生物作用の活性レベルを評価することは、抗微生物作用とジンジパイン阻害活性を含むシステインプロテアーゼインヒビター (CPI) 活性の相関を解明する上で必須であるため、上述の寒天平板混濁法による結果を踏まえて、マイクロタイタープレートを用いた濁度アッセイ法によって抗微生物作用を定量的に評価する。特に、pH 調整による溶解度差、エタノールを用いた段階抽出法を利用した分画などの複数の異なる方法で、島田化学工業(株)において調製した精白米タンパク質標品について、抗微生物作用およびプロテアーゼ阻害活性を評価する。

#### 2. 実験方法と結果

##### 1) 濁度アッセイ法による抗菌活性の測定方法

検定菌として歯周病菌 *P. gingivalis* JCM 8525、ニキビ菌 *Propionibacterium acnes* JCM 6425 および日和見感染原因菌 *Candida albicans* NBRC 1385 を選択し、各菌株をそれぞれ変法 GAM 培地、GAM 培地および YM 培地を用いて培養した。すなわち、培地、検定用サンプルおよび検定菌 (初期 OD<sub>655</sub>=0.005) を混合した後、96 ウェルマイクロタイタープレートに分注し、*P. gingivalis* と *P. acnes* は嫌気条件下、37 °C で、*C. albicans* は好気条件下、27 °C で静置培養した。*P. gingivalis* と *P. acnes* は培養 0、24、48、72 時間目に、*C. albicans* は培養 0、12、24、48 時間目に、それぞれ 655 nm の吸光度 (OD<sub>655</sub>) を濁度として経時的に測定し、抗微生物活性を評価した (図 6-8)。

##### 2) 古米アルカリ抽出及び新米バッファー抽出タンパク質画分の抗菌活性の評価

マイクロタイタープレートを利用した濁度アッセイ法を用いて、島田化学工業(株)において古米アルカリ抽出液から新たに調製した画分 (pH 5 D-70% EtOH sol. : 0.5 mg/ml) の歯周病菌 *P. gingivalis* に対する増殖阻害活性を測定した結果、培養 48 時間目まで増殖抑制作用が確認された (図 6-9)。また、分子サイズ 16 kDa 以上または 1~16 kDa のタンパク質を含む古米アルカリ抽出画分 (pH 7) を調製し、濁度アッセイ法により歯周病菌に対する増殖阻害活性を測定した。その結果、1~16 kDa 画分 (終濃度 0.097 mg/ml) は歯周病菌に対して培養 48 時間目まで増殖抑制作用を示した (図 6-9)。

新米からバッファー抽出によって得られたタンパク質画分 (0.169 mg/ml) の歯周病菌に

対する増殖阻害は観察できなかった。また、精白米タンパク質画分のニキビ菌 *P. acnes* と日和見感染原因菌 *C. albicans* に対する増殖阻害活性は検出されなかった。

### 3) 米糠抽出タンパク質画分の抗菌活性の評価

マイクロタイタープレートを利用した濁度アッセイ法を用いて、16 kDa 以上および 1~16 kDa の米糠抽出タンパク質画分の歯周病菌 *P. gingivalis* に対する増殖阻害活性を測定した。その結果、2.91 mg/ml の 16 kDa 以上画分には増殖阻害活性が認められなかったが(図 6-10)、3.45 mg/ml の 1~16 kDa 画分は歯周病菌の増殖を完全に阻害した(図 6-10)。

米糠抽出タンパク質画分は歯周病菌に対して強い増殖阻害を示したが、ニキビ菌 *P. acnes* と日和見感染原因菌 *C. albicans* に対して増殖阻害活性を示さなかった。

## 3. 考察

サンプル使用量が少なく、多検体・複数条件での解析が可能なマイクロタイタープレートを利用した濁度アッセイ法による抗菌活性評価法を確立できた。この濁度アッセイ法は検定菌増殖の経時変化を測定でき、寒天平板混釈法と比較して、検出感度は約 10 倍高い方法である。今回の研究成果より、米抽出タンパク質の病原微生物に対する抗菌活性を定量する手法を確立でき、米由来 CPI や CPI 以外の米タンパク質を抗菌成分として実用化する今後の研究開発にとって重要な成果となった。

歯周病菌 *P. gingivalis* が生産するシステインプロテアーゼであるジンジパインは、その増殖や病原性に重要な役割を果たしている。これまでの研究からジンジパインを阻害する CPI が歯周病菌の病原性を抑制するために有効であることが示唆されている。本研究で強いジンジパイン阻害作用を示す古米のアルカリ抽出液から得た画分 (pH 5 D-70% EtOH sol.) が、歯周病菌に対して増殖抑制作用を示したことから、CPI 活性と抗菌活性に相関性が見いだされた(図 6-5 と図 6-9)。一方、米糠タンパク質から調製した 1~16 kDa 画分のジンジパイン阻害活性は精白米から調製した画分よりも低いにもかかわらず、歯周病菌に対して強い増殖阻害活性を有することが見いだされた(図 6-10)。これらの結果から、精白米および米糠中には作用機構が異なる歯周病菌増殖阻害因子が存在することが予想される。

以上の結果に示したように、蛍光基質を用いた CPI 活性測定および濁度法による抗微生物活性の評価方法を駆使することによって、CPI 活性と抗微生物活性の相関性を明らかにできる実験系を確立することに成功した。

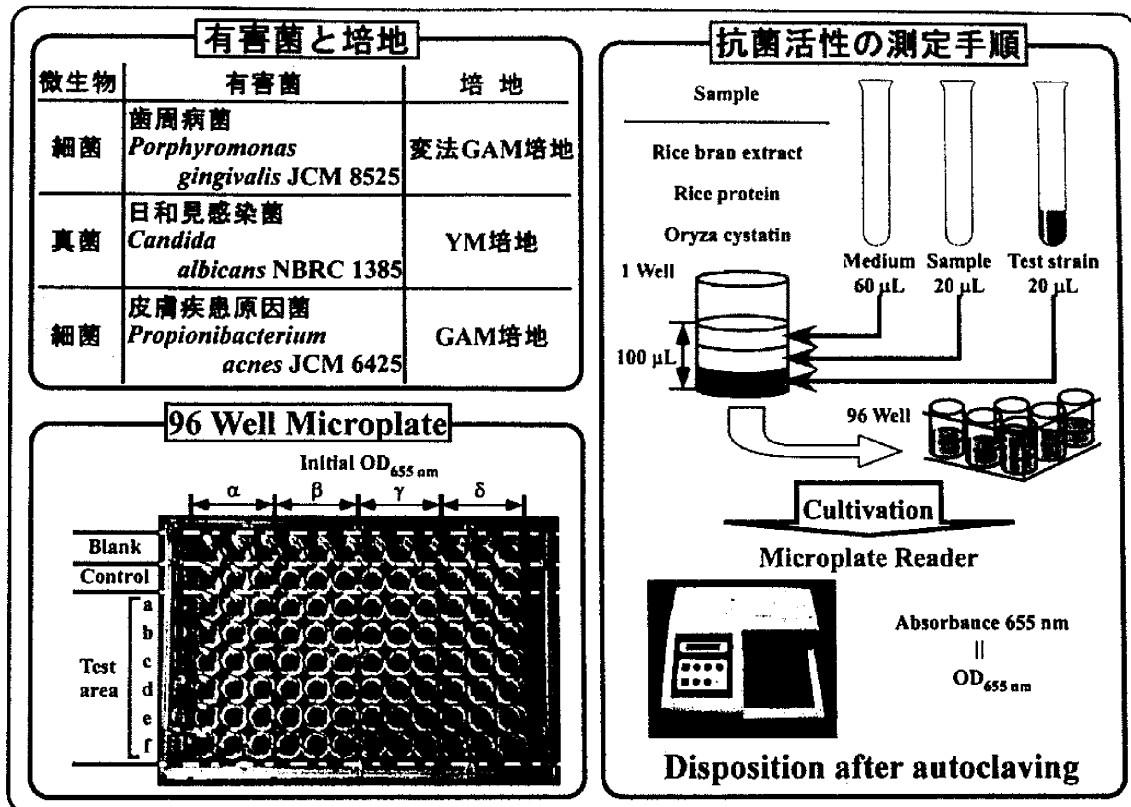


図 6-8 濁度アッセイ法を用いた抗菌活性の測定方法

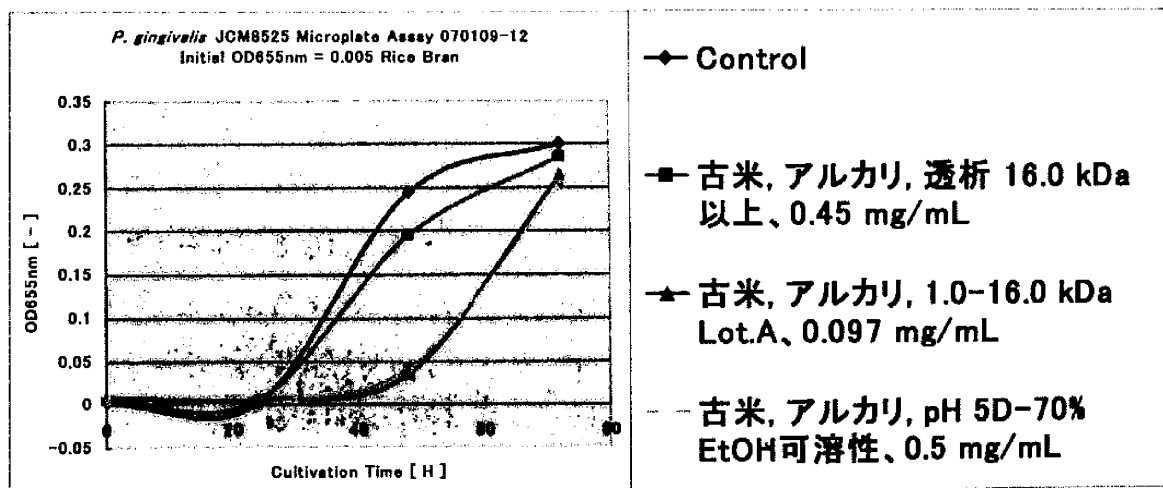


図 6-9 濁度アッセイ法を用いた古米アルカリ抽出液から調製したタンパク質画分の歯周病菌に対する増殖阻害活性の評価

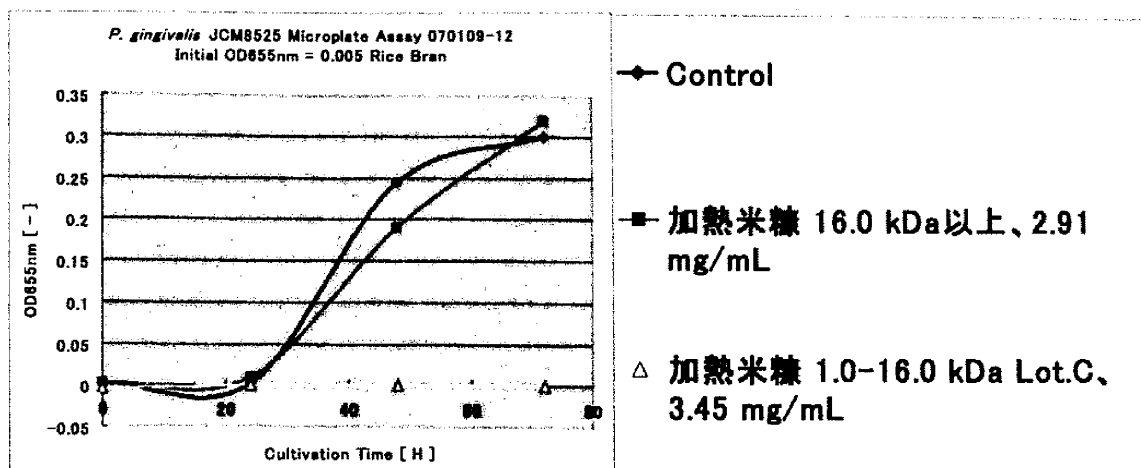


図6-10 濁度アッセイ法を用いた米糠抽出液から調製したタンパク質画分の  
歯周病菌に対する増殖阻害活性の評価

#### 6-4 精白米タンパク質からの Arg-ジンジパイン阻害因子の精製

##### 1. 目的

精白米に含まれる Arg-ジンジパイン阻害因子を各種クロマトグラフィー（イオン交換クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィーなど）により精製する。

##### 2. 実験方法と結果

精白米アルカリ抽出物に含まれる特定のタンパク質が Arg-ジンジパイン阻害活性を有すると推察し、各種クロマトグラフィーによるその精製を行った。陽イオン/陰イオン交換クロマトグラフィー（図6-11）、疎水性クロマトグラフィー（図6-12）、Arg-ジンジパインアフィニティークロマトグラフィーによって、精白米タンパク質画分からの Arg-ジンジパインの分離を試みたが、いずれのクロマトグラフィーでも活性分布は幅広く、明瞭な活性ピークは認められなかった。精白米には複数の Arg-ジンジパイン阻害因子が存在し、従来のクロマトグラフィーではその精製は困難であることがわかった。

上記の結果を踏まえて、Arg-ジンジパイン阻害活性を有するタンパク質を高感度かつ網羅的に同定する方法を検討した。システインプロテアーゼ阻害因子であるオリザシスタチン-I (OC-I) をモデルとした実験により、『二次元電気泳動→リバー染色→タンパク質スポットの回収・リフォールディング→プロテアーゼ阻害活性測定』という一連のプロトコルにより、

プロテアーゼ阻害因子を網羅的に検出できることを明らかにした（図 6-13）。そこで、本プロトコルにより、精白米アルカリ抽出物から Arg-ジンジパイン阻害活性を有するタンパク質を検出し、その N 末端アミノ酸配列から同定を行う検討を実施した。しかしながら、N 末端アミノ酸配列を決定するのに十分な量の Arg-ジンジパイン阻害因子を得ることができず、精白米アルカリ抽出物に含まれる Arg-ジンジパイン阻害因子は、酵素阻害活性は高いものの、量的には極めて少ないであることが明らかとなった（図 6-14）。

さらに上述の結果を踏まえて、同定の出発材料として精白米アルカリ抽出物が適しているか否かを、再検討した。そのために、精白米から中性条件でタンパク質を抽出し、ゲルろ過でのタンパク質溶出パターンと Arg-ジンジパイン阻害活性溶出パターンを、精白米アルカリ抽出物の場合と比較検討した。精白米アルカリ抽出物では、タンパク質と Arg-ジンジパイン活性のいずれも、極めて広い溶出パターンを示した（図 6-15）。一方、中性で抽出したタンパク質画分の場合、Arg-ジンジパイン活性パターンは明白な 2 峰性を示し、狭い分子量分布を示すことがわかった（図 6-16）。これらの結果から、精白米アルカリ抽出物では、アルカリ抽出段階で、Arg-ジンジパイン阻害因子の分解が生じていること、その様々な分解産物（ペプチド）も Arg-ジンジパイン阻害活性を保持していることが示唆された。従って、精白米アルカリ抽出物は応用面での利用に問題はないものの、Arg-ジンジパイン阻害因子を同定するための材料としては適さないと判断できた。

### 3. 考察

システインプロテアーゼ阻害因子を植物組織から検出・同定するための方法として、新たなプロトコル『二次元電気泳動→リバー染色→タンパク質スポットの回収・リフォールディング→プロテアーゼ阻害活性測定』を確立した。この方法では、実際に個々のタンパク質の酵素阻害活性を測定するため、既知のプロテアーゼ阻害因子と配列相同性が低い阻害因子であっても、検出が可能である。また、N 末端アミノ酸配列決定に基づく同定だけでなく、質量分析と組み合わせることにより、微量な因子（pmol レベル）の同定も可能なことを明らかにした。本プロトコルは、システインプロテアーゼ阻害因子以外の酵素阻害因子への展開もできると考えられ、プロテアーゼ阻害因子の研究において非常に有用であると推察した。

精白米アルカリ抽出物が示す高い Arg-ジンジパイン阻害活性は、当初予想したような、そこに含まれる特定のタンパク質によるものではなく、複数のタンパク質とその分解物による阻害活性の総和であることがわかった。従って、クロマトグラフィーなどの常法では、Arg-

ジンジパイン阻害因子の同定は極めて困難であった。また、nmol レベルでのタンパク質同定が可能な N 末端アミノ酸配列決定に基づく同定法も検討したが、Arg-ジンジパイン阻害因子の同定には更なる高感度化が必要であった。

上述したように、当初の想定とは異なる結果が得られたため、研究方針の変更を余儀なくされた。しかしながら、本検討により、Arg-ジンジパイン阻害因子の量や分子量分布に関する貴重なデータを得ることができた。また、アルカリ処理が Arg-ジンジパイン阻害因子の分解を招き、Arg-ジンジパイン阻害活性を保持した多くの断片を生じさせることがわかった。同定方法の高感度が必要であることも明らかとなった。これらの知見はいずれも、Arg-ジンジパイン阻害因子を同定する上で重要であり、本研究の目的は概ね達成できたと考えている。

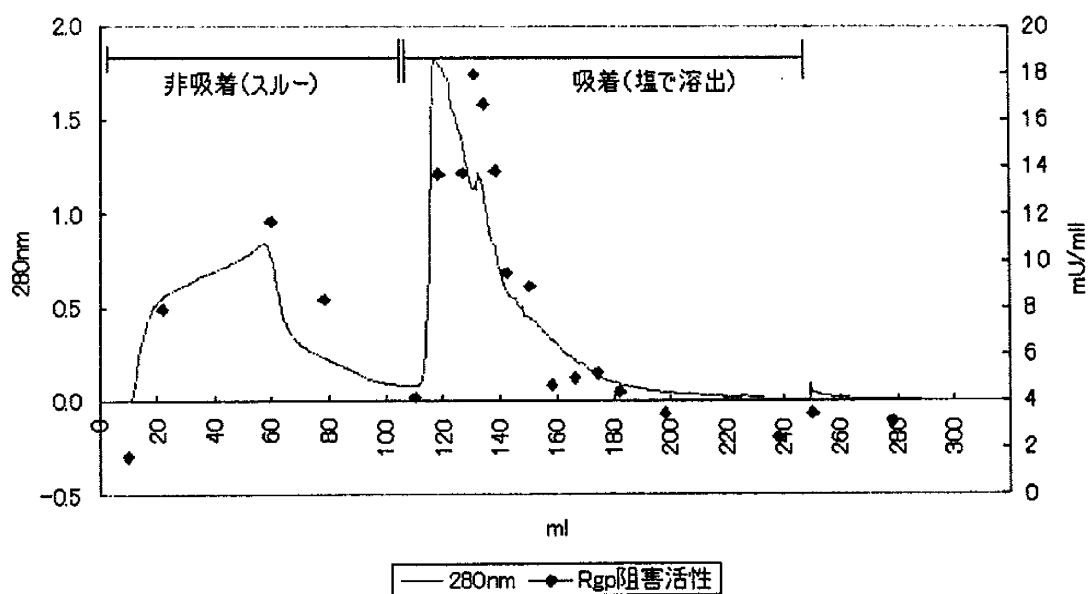


図6-11 Arg-ジンジパイン(Rgp)阻害活性の陰イオン交換クロマトグラフィー



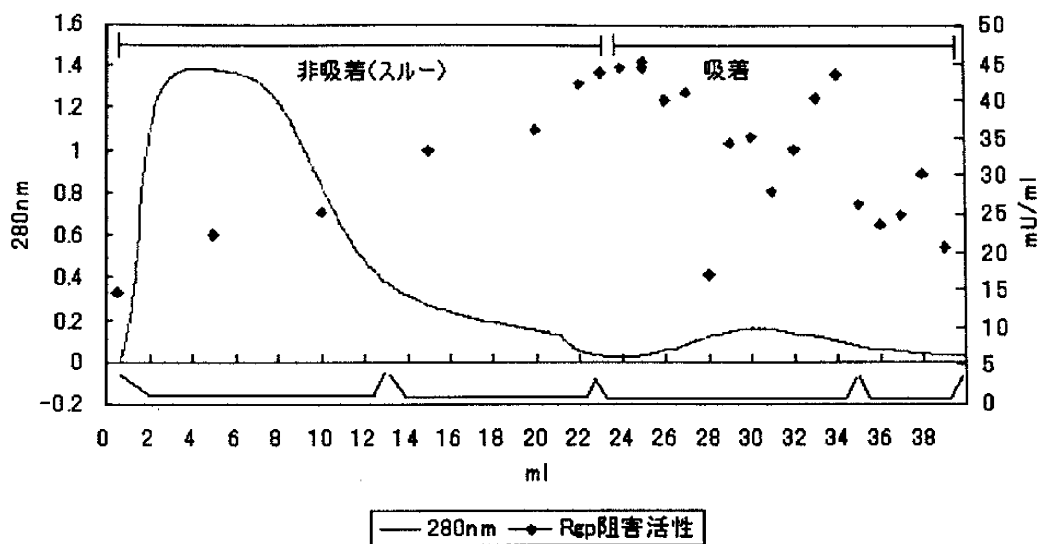


図6-12 Arg-ジンジパイン(Rgp)阻害活性の疎水性クロマトグラフィー

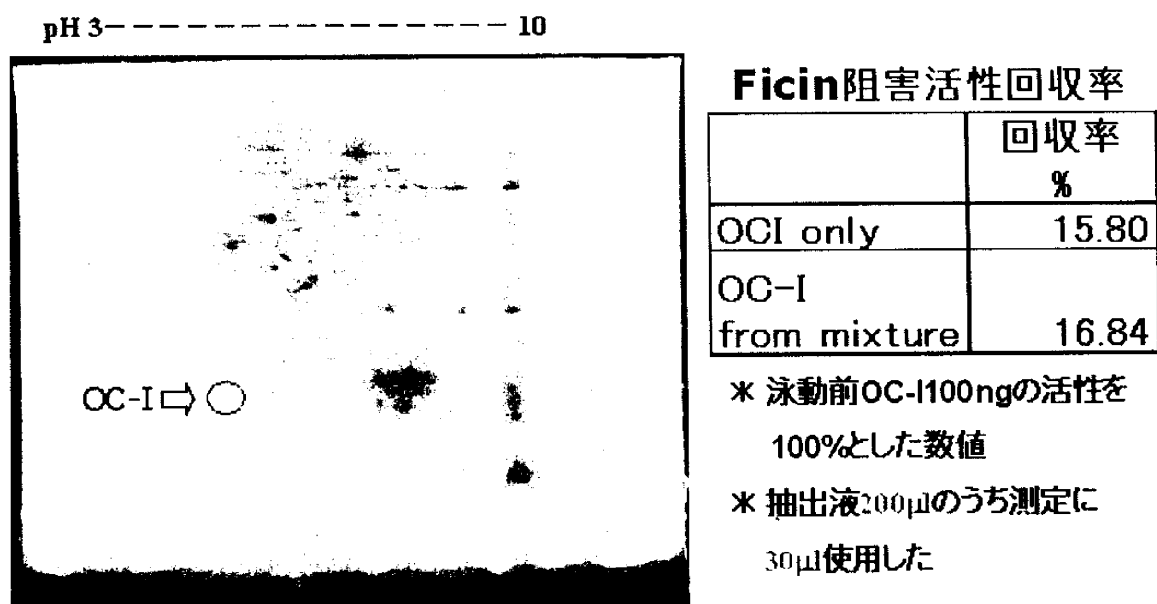


図6-13 二次元電気泳動によるオリザシスタチン(OC)-I の分離と阻害活性の回収

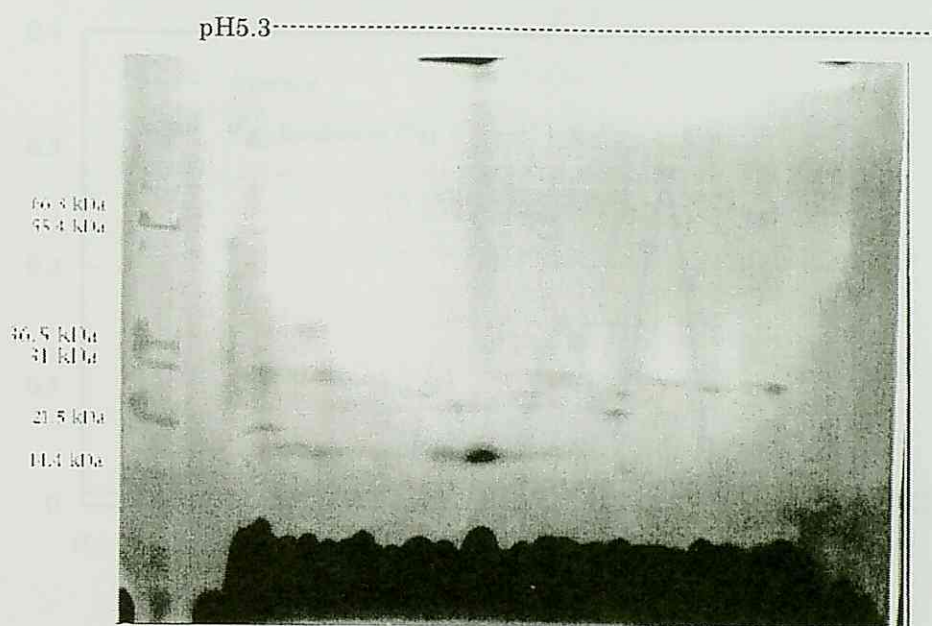


図6-14 二次元電気泳動による Arg-ジンジパイン (Rgp) 阻害活性画分の分離

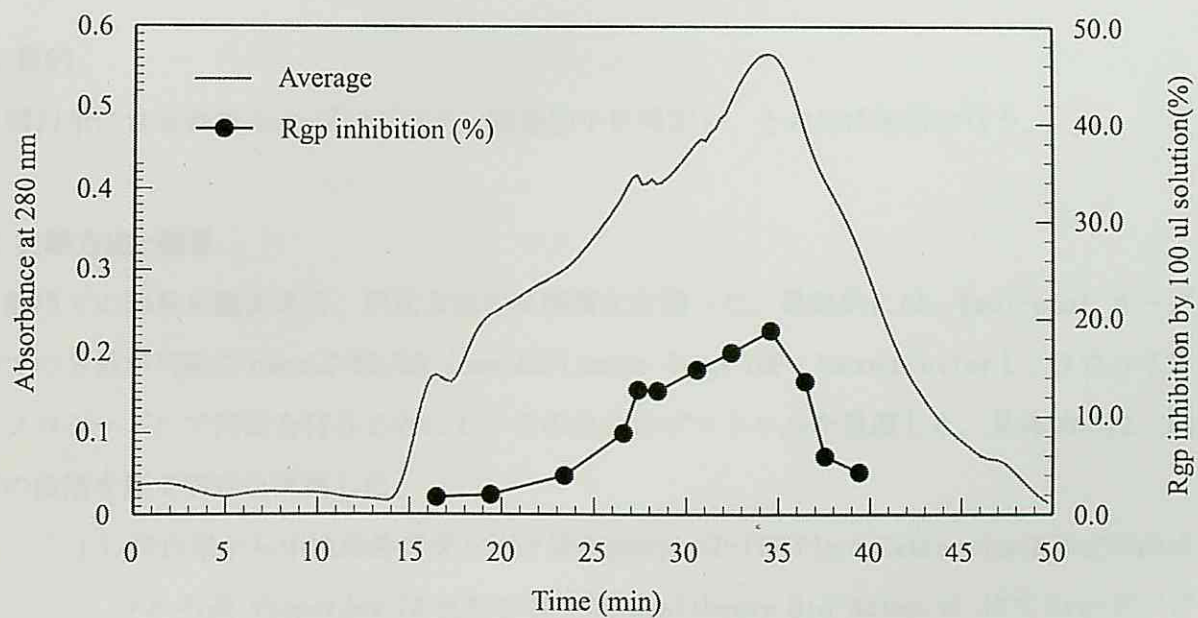


図6-15 精白米アルカリ抽出物における Arg-ジンジパイン (Rgp) 阻害活性の  
ゲルろ過分離パターン

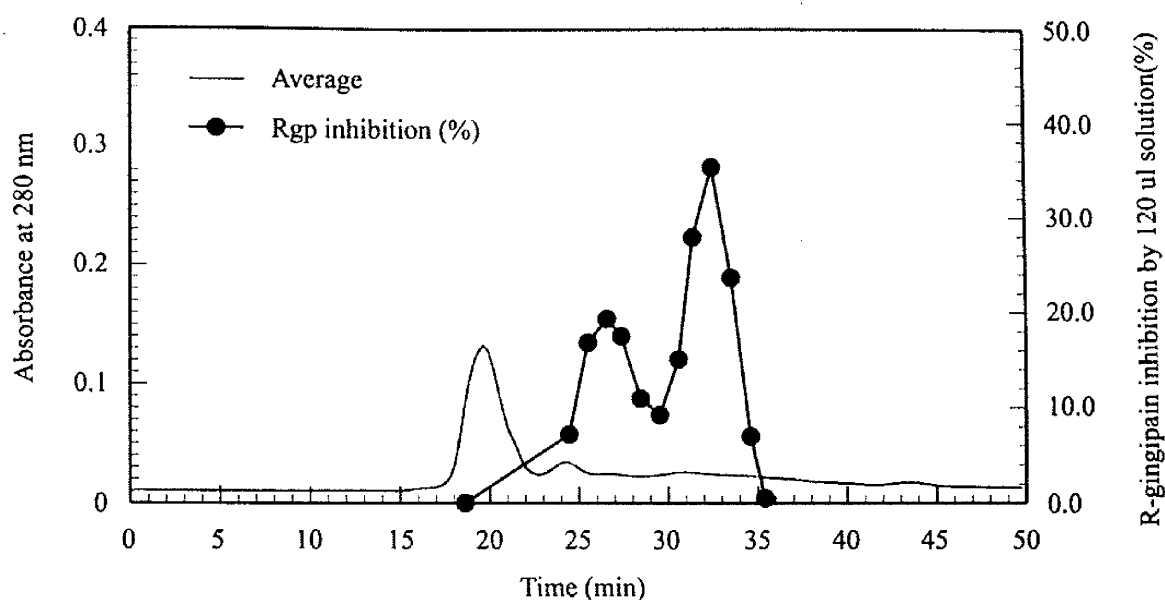


図6-16 中性条件で抽出した精白米タンパク質画分における Arg-ジンジパイン(Rgp)阻害活性のゲルろ過分離パターン

## 6-5 Arg-ジンジパイン阻害因子の同定と酵素阻害活性の特性化

### 1. 目的

精白米に含まれる Arg-ジンジパイン阻害因子を同定し、その特性解析を行う。

### 2. 実験方法と結果

前項での知見を踏まえて、同定方法の高感度化を図った。最終的には、fmol-pmol オーダーでの分析が可能な nanoLC-MS/MS (nanoLC/Linear-Trap-TOF ; NanoFrontier L ; 日立ハイテクノロジーズ) で同定を行うことにし、そのためのプロトコルを見直した。具体的には、以下の段階を経て同定を実施した。

- 1) 精白米から中性条件でタンパク質を抽出し(P-PER Plant Extraction Kit;Pierce)、ゲルろ過 (Superdex 75 PC3. 2/30 ; GE Healthcare Bio-Science) にて Arg-ジンジパイン阻害活性画分を分取。
- 2) Arg-ジンジパインを固定化した磁性粒子 (MagnaBind Amine Derivatized Beads; Pierce) を用いて、マイクロスケールでのアフィニティー精製。
- 3) Arg-ジンジパインに特異的に結合するタンパク質を磁性粒子から回収。

4) 回収したタンパク質をトリプシン消化により断片化し (All-in-One Trypsin Digestion Kit ; Calbiochem)、nanoLC-MS/MS で分析。

5) MS/MS データーをデーターベース (MASCOT, NCBI nr search) と照合することにより、Arg-ジンジパイン結合タンパク質を同定。

以上の検討から、以下に示す 6 種類の Arg-ジンジパイン結合タンパク質を同定することができた。

- Locus ID.: Os07g0214100  
Description: Seed allergenic protein RA17 precursor  
(予想分子量 17,556 ; 予想 pI 6.92)
- Locus ID.: Os07g0213800  
Description: Alpha-amylase inhibitor BMAI-1 precursor  
(予想分子量 17,259 ; 予想 pI 8.72)
- Locus ID.: Os07g0216600  
Description: trypsin/alpha-amylase inhibitor family protein  
(予想分子量 16,395 ; 予想 pI 7.48)
- Locus ID.: Os12g0115100  
Description: Nonspecific lipid-transfer protein 1 precursor (LTP 1)  
(予想分子量 8,903 ; 予想 pI 9.41)
- Locus ID.: Os04g0431100  
Description: GrpE protein family protein  
(予想分子量 31,491 ; 予想 pI 7.00)
- Locus ID.: Os10g0471300  
Description: Cyanate hydratase  
(予想分子量 18,596 ; 予想 pI 5.61)

これらのタンパク質に共通な構造領域が、Arg-ジンジパイン阻害に関わっていると推定される。そこで、予想シグナル配列を除いた領域について相同性解析を行った (図 6-17)。その結果、アミノ酸配列が同一な領域は見いだすことができなかったが、配列の類似性、ならびに Arg-ジンジパインが Arg 残基の C 末端側を切断する酵素であることから、Arg 残基を含む N 末端側に位置する領域 (Os07g0214100 ではアミノ酸残基 15-38) が、Arg-ジンジパイン阻害に関与する可能性が高いと推察した。

### 3. 考察

精白米タンパク質に Arg-ジンジパイン阻害活性を見いだしたのは本研究が最初であり、また、今回の検討によってその分子実体を初めて明らかにすることができた。その知見は、Arg-ジンジパイン阻害活性の定量性や作用機序の解明を行う上で端緒となるものであり、菌周病予防用の天然素材を具現化するためには、極めて重要である。

```

Os07g0214100 -----D---HQV---S---EQ---R---ISYPTYSLQ---RTV---Q---VGRG
Os07g0213800 -----D---RGQVV---T---Q---L---A---R---YPMYPLR---RA---K---Q---GGA
Os07g0216600 -----A---S---G---D---V---EY---RV---KAVSRNP---S---RNYIA---W---AAG
Os12g0115100 -----I---TC---QVNSA---GP---LTY---GGAGPSA
Os04g0431100 MAATFSAAAAAASPTYL---RPRTLAP---ASTPARLSHSSSSRRPAT---SLLS---R---THA---PPP
Os10g0471300 -----M---E---G---E---R---A---A---G---V---RRLMA---KAESRKSF

Os07g0214100 -----A---A---S---A---A---EQVWQ---Q---V---D---G---W---G---D---H---M---L---S---I---Y---R---T---E---
Os07g0213800 -----V---E---Q---V---R---Q---Q---A---I---D---S---F---P---S---H---M---L---V---M---Y---K---P---A---K---
Os07g0216600 GRMSDR---KQPPREFLEP---E---A---V---P---M---Q---D---S---V---L---V---R---V---V---T---E---D---R---V---S---
Os12g0115100 -----A---C---S---G---V---R---S---L---K---A---A---S---T---T---A---D---R---R---T---
Os04g0431100 LRAAADPKVVNGE---FPPMK---L---L---Y---K---K---F---L---G---N---D---E---A---L---G---G---I---E---S---A---I---A---I---E---K---R---S---N---S---A---Q---Y---E---
Os10g0471300 SEIGEE---A---G---L---T---N---V---Y---V---A---Q---L---L---R---Q---S---Q---L---K---P---E---T---A---P---R---A---A---Y---P---L---T---D---D---V---L---M---M---E---

Os07g0214100 H---M---A---V---F---R---D---L---E---R---A---A---N---
Os07g0213800 Q---M---D---V---F---R---D---M---K---R---V---A---N---
Os07g0216600 M---I---S---Q---H---A---A---D---A---T---I---A---A---S---A---T---D---Y---G---R---C---N---
Os12g0115100 N---C---L---K---N---A---A---R---I---K---L---N---A---N---I---S---K---G---S---
Os04g0431100 S---I---A---T---I---T---S---K---D---K---F---L---R---I---N---A---D---L---E---N---F---R---K---Q---T---E---K---E---R---A---R---F---T---S---N---I---Q---V---D---V---Q---S---L---L---T---L---V---D---S---E---K---N---
Os10g0471300 P---F---R---S---Y---H---D---I---V---H---E---P---A---I---Y---R---L---N---E---A---V---M---H---F---G---E---S---I---K---E---I---N---E---E---F---G---D---I---M---S---A---I---D---F---Y---S---

Os07g0214100 I---N---G---P---Y---W---L---Y---R---T---R---T---G---
Os07g0213800 I---I---G---I---Y---W---L---S---Y---M---N---A---T---G---
Os07g0216600 L---Q---H---T---A---S---F---A---L---M---F---G---G---M---D---
Os12g0115100 V---Y---T---I---S---A---S---I---D---S---R---V---S---
Os04g0431100 Q---E---I---T---P---E---T---D---K---E---Q---T---I---S---Y---Q---G---I---Y---K---Q---L---V---E---T---L---R---S---L---G---V---G---V---E---T---V---K---F---D---S---I---H---E---A---I---A---R---E---E---S---Q---P---K---
Os10g0471300 K---V---Q---G---A---D---K---D---R---V---V---T---F---D---G---K---Y---L---Y---S---E---Q---R---S---D---

Os07g0214100 -----
Os07g0213800 -----
Os07g0216600 -----
Os12g0115100 -----
Os04g0431100 A---G---I---V---S---H---E---V---K---R---G---F---L---L---R---E---R---L---L---R---P---A---T---V---K---V---S---T---G---S---G---T---Q---E---T---S---S---P---S---T---E---K---P---V---E---D---S---K---E---D---A---A---V---
Os10g0471300 -----M---M---S---R---L---T---R---K---T---S---

```

図6-17 Arg-ジンジパイン結合タンパク質の配列相同性

Arg-ジンジパイン阻害に関わる予想領域をボックスで表示した。

## 第 7 章 全体の総括

## 第7章 全体の総括

### 1. 組換えオリザシスタチンの調製とその性質

組換えオリザシスタチン (OC) を精製した結果、OC-I と OC-II は分子量が約 14,000 Da 付近に、OC-X II は分子量が 26,000 Da 付近に、OC-VI は分子量が 10,000 Da 付近に、His-tag 融合 OC-IV は分子量が 17,000 Da 付近に、His-tag 融合 OC-VI は分子量が 12,000 Da 付近に、それぞれ単一のバンドとして検出できた。すなわち、それぞれの組換え OC とその His-tag 融合タンパク質は、不純物を含んでいないことがわかった。得られた組換え OC-I, OC-II, OC-X II, OC-VI 及び His-tag 融合 OC-VI の各プロテアーゼに対する  $K_i$  の値を測定した。その結果、OC-I と OC-X II は Ficin, Papain, Cathepsin H, Cathepsin K, Cathepsin L 及び Cathepsin S を阻害することができたが、Cathepsin B を阻害できないことがわかった。OC-II は、すべてのプロテアーゼを阻害することができた。OC-VI と His-tag 融合 OC-VI は Ficin, Papain, Cathepsin H, Cathepsin K 及び Cathepsin L を阻害することができたが、Cathepsin B と Cathepsin S を阻害できなかった。各プロテアーゼに対する阻害活性は OC-I, OC-II 及び OC-X II に比べて OC-VI と His-tag 融合 OC-VI は低かった。

OC-I, OC-II および OC-VI と、それらの加熱物の歯周病菌由来プロテアーゼである Arg-gingipain と Lys-gingipain に対する阻害活性を測定した結果、OC-I と OC-II は弱い阻害活性を示し、OC-VI は強く阻害することがわかった。これらの結果より、新たに組換えタンパク質として調製した OC-VI は、OC-I, OC-II および OC-XII とは異なる性質を有することがわかった。

### 2. プロテアーゼ阻害活性を有する米タンパク質の食品素材としての利用

オートリシスに及ぼす温度の影響を検討した結果、スケトウダラ A のすり身は、内在性プロテアーゼによって 55 °C の温度で最も自己分解が起こりやすいことがわかった。反応温度が 55 °C 以上になると、内在性プロテアーゼが失活するため、すり身は徐々に分解されにくくなった。次に pH の影響について検討した結果、オートリシスによってスケトウダラ A のすり身から可溶化してくるタンパク質量は、pH の影響をほとんど受けないことがわかった。食塩濃度の影響を検討した結果、すり身に添加した食塩濃度が高くなるにつれて、すり身から抽出される全タンパク質量が多くなることがわかった。

すり身から抽出したプロテアーゼの活性に対する米タンパク質の阻害効果について検討した。すり身抽出液中のパパイン系プロテアーゼに対する阻害効果を検討した結果、スケソウダラ A のプロテアーゼは、2 種類の米タンパク質によって、部分的に阻害された。また、反応系の食塩濃度を高めても、阻害効果が確認された。一方、エソのプロテアーゼ活性は、2 種類の米タンパク質によって、わずかであるが阻害された。そこで、スケソウダラ A のすり身を用いてモデルカマボコを調製し、カマボコの性質に及ぼす米タンパク質の添加効果について検討した。5 % の各種添加物をすり身に添加して調製したカマボコの破断力とハンタ

一白度を検討した結果、米タンパク質を添加した場合に、破断力が最も高くなり、ハンター白度も対照に比べてわずかに向上した。これらの結果から、米タンパク質はカマボコ製造において「もどり」を防止するための新しい食品素材として期待される。

### 3. 米由来抗歯周病菌タンパク質の精製とその作用解析

2種類の透析膜を用いて分画した米糠由来タンパク質である RB 1-16 kDa 画分の *P. gingivalis* に対する抗菌活性を、濁度法を用いて評価した。この画分は、*P. gingivalis* の生育を培養 72 時間目まで完全に阻害した。次に、RB 1-16 kDa 画分を陽イオン交換樹脂を用いて、吸着画分である RB 1-16 kDa-CMB 画分と非吸着画分である RB 1-16 kDa-CMNB 画分に分離した。分離した米糠タンパク質の抗菌活性を測定した結果、RB 1-16 kDa-CMNB 画分が *P. gingivalis* に対して強い増殖阻害活性を示した。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて RB1-16 kDa CMNB 画分を精製することによって得られた 5 つの画分のうち、4 および 5 番目の画分が *P. gingivalis* に対して増殖阻害活性を示した。そこで、これら 2 つの画分を二次元電気泳動法によって分析した結果、複数のスポットが検出された。また、この 2 つの画分を MALDI-TOF-MS または MALDI-TOF-MS/MS を用いて分析した結果、それぞれ複数のタンパク質が存在することがわかった。