生姜アミノペプチダーゼのペプチド性食品に対する利用

大槻　耕三・佐藤　健司・中村　考志
(京都府立大学人間環境学部食保健学科食品科学研究室)

1. はじめに

ペプチド性の食品は，近代科学が発達して無機化学，有機化学，生化学が確立され糖質，脂質，アミノ酸やペプチド，タンパク質がはっきり認識された時代よりはるか昔から，我々人間は無意識に利用してきた。それは味覚を中心に五感を通して選り分けられ，例えば味噌，醤油などの大豆発酵製品の旨味や水産物加工品の旨味，牛乳加工品の味などになっている。

近年になっても，ペプチド性食品は様々に利用されてきている。アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル（Asp-Phe-OMe）の甘味料としての利用，牛乳からのカゼイノホスフォペプチド（CPP）のカルシウム吸収補強剤，各種食品タンパク質のプロテアーゼ加水分解ペプチドの血圧降圧剤等の機能性食品としての利用がある[1]。さらにグルタミンやペプチドが種々の体質改善に働くことが知られ栄養強化剤としてスポーツ飲料や病院で経腸栄養剤として利用されてきている[2]。

このようなペプチド性食品を製造する際，食品タンパク質のプロテアーゼ加水分解で最も問題になるのは，

①チーズ製造の際よく見られるように苦味ペプチドが発生すること[3]。

②目的とするペプチドが過剰反応で壊されること。

③グルタミンがアミノ末端になった時にはピログルタミン酸（Pyr）が生成すること，である。

本研究では，新たに見つけられた生姜アミノペプチダーゼ[4]を利用する事によりこれら①②③の問題解決を計ろうとしている。このアミノペプチダーゼは以前から知られている生姜プロテアーゼ，GP-I, GP-II[5~14,22]とは全く異なる性質を持つ酵素であることが明らかにされた[4]。この生姜アミノペプチダーゼは最近良く使われている微生物系のカルボキシペプチダーゼ[15]やアミノペプチダーゼ[16]や小麦カルボキシペプチダーゼ[17]と異なり「結果と考察」の項に示すように基質特異性が高く，安定性も高いので上記①②の問題解決に合致する可能性が高い。また③の問題に対して合成基質の一つであるピログルタミル-フェニルアラニル-ロイシル-p-ニトロアニリド（Pyr-Phe-Leu-pNA）[18]を使用して，本酵素がこの基質のアミノ末端のPyr基を加水分解する活性があるかどうかをも本研究で検討した。

2. 実験方法

2.1 実験材料

京都府産，高知県産，和歌山県産のひね生姜及び新生姜を使用した。カゼインはMerck社製，ペプチドやインヒビターは㈱ペプチド研究所（大阪），化学薬品は特級のものをナカライテスク社（京都）より購入した。陰イオン交換樹脂のWaters Accell Plus QMAはWaters社（米国），TSKgel Super QとTSK G-2000 SWとTSK G-3000 SWは東ソ社製（東京）である。

2.2 酵素活性の測定法

酵素活性は下記に示すような基質を使用して酵

素反応させ，405mn における吸光度を 550型 Bio Rad 社製マイクロプレートリーダー（米国）で測定した。

（1） アミノペプチダーゼの活性測定法

この活性は G. Pfleiderer の方法[19]を以下のように変更して測定した。マイクロプレート（12×8穴）の各穴に酵素溶液，DTT 溶液，緩衝溶液を加え，ロイシン-p-ニトロアニリド（Leu-pNA）を加え撹拌後，37℃で反応させる（**Fig. 1**）。

他のアミノ酸の p-ニトロアニリドを基質にする時も上記と同様の方法によった。

（2） プロテイナーゼ活性の測定法

生姜中のプロテイナーゼ活性の測定にはスクシニルカゼインを基質にトリニトロベンゼンスルホン酸発色法（TNBS 法）を使用した。**Fig. 1** に示すように Hatakeyama らの方法[20]の改変法によって行なった。ここでの注意点はジチオスレイトール（DTT）の使用量を正確に添加することである。なぜなら DTT も TNBS と反応して発色するからで，この発色を低く押え一定値に安定させる事が必要である。

（3） ペプチダーゼ活性の測定法

生姜アミノペプチダーゼのペプチド基質に対する活性を測定するために，上記プロテアーゼ活性と同様の方法を使用した。基質には S-3-トリメチルアミノプロピル-リゾチーム（TMA-リゾチーム）[25]，牛インシュリン，バシトラシン，アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル（Asp-Phe-OMe），Leu-Gly-Gly，Gly-Leu，Leu-Gly，Met-Met，His-Leu，Gly-Phe，Pyr-Phe-Leu-pNA を濃度 0.2～0.3mM で使用した。

2.3 生姜アミノペプチダーゼの抽出と精製

生姜根茎を水洗後，ジューサーで搾汁を得た（**Fig. 2**）。この搾汁液からデンプンや不溶性のものを除くために 6,000rpm で20分間，遠心分離した。この上清に3倍量のアセトンを加え酵素タンパク質を沈殿させ，遠心分離で集めリン酸バッファーに溶かす。これを遠心分離にかけ上清の粗酵素を得た。上清中のアミノペプチダーゼを分離精製するために，陰イオン交換樹脂の Waters Accell Plus QMA-カラムに吸着させるが，そのた

●合成基質 Leu-pNA を用いたアミノペプチターゼ活性の測定法

- 酵素溶液　20 μl
- 0.1 M リン酸バッファー pH 6.0　60 μl
- 3.32 mM Leu-pNA　100 μl
  （0.1 M リン酸バッファー pH 6.0，0.05 mM DTT，0.1 mM EDTA）
- 37℃，15 min
- 405 nm における吸光度を測定

● TNBS によるプロテイナーゼ活性の測定法

- 酵素溶液　20 μl
- 0.5 % サクシニルカゼイン（0.05 mM DTT）　85 μl
- 37℃，15min
- 反応停止液（5 % SDS，0.1 M 硼酸，0.1 M NaOH）　50 μl
- 室温，10 min
- 50 mM TNBS　30 μl
- 室温，5 min
- 405 nm における吸光度を測定

Fig. 1 Assays of Aminopeptidase and Proteinase

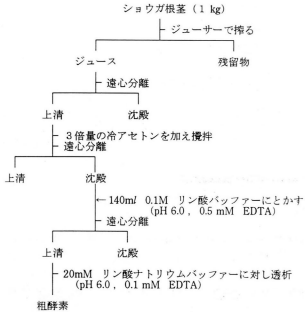

Fig. 2 Purification of Ginger Aminopeptidase

めに上清液のイオン強度を下げるために0.1mM EDTAを含む20mMリン酸バッファー，pH 6，に透析した。透析後，これをQMA-カラム（30 Φ×60mm）に吸着させ次に0～0.5M NaClのグラジエント溶出を行なった。

3. 結果と考察

本研究では，未知であった生姜アミノペプチダーゼを抽出，精製し酵素的性質を検討して，ペプチドの脱苦味やヒログルタミルペプチドの除去など，高度な利用を計画した。生姜プロテアーゼについては，道ら[5,6]，Tompsonら[7]の研究があり，その後も数編，酵素の精製，食肉の軟化作用，酵素の構造などの研究報告がある[8~14,22]。

3.1 生姜アミノペプチダーゼの精製とHPLCゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定

生姜からアミノペプチダーゼを抽出するには**Fig. 2**に示した方法で出来るが，この粗酵素には生姜プロテアーゼ（GP I とGP II）[6]が混在しており生姜アミノペプチダーゼの酵素的性質を知るためには精製しなければならない。**Fig. 2**の粗酵素からアミノペプチダーゼを分離精製するためにAccell Plus QMAの陰イオン交換樹脂クロマトグラフィーを試みたところ，**Fig. 3**に示すようなクロマトグラムが得られた。このパターンからプロテイナーゼ活性とアミノペプチダーゼ活性部分がよく分離できていることが判明した。本研究ではアミノペプチダーゼが必要なので，この部分をさらに精製するために25mMりん酸バッファー，pH 6.5に透析し，TSKgel Super Qに吸着させ500mMりん酸バッファーへのグラジエント溶出を行なったところ**Fig. 4**に示したような分離パターンが得られた。これによりプロテイナーゼ活性部分が取除かれアミノペプチダーゼがかなり精製されたと考えられる。これを分子量的に更に精

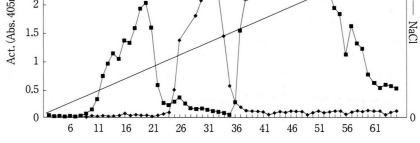

Fig. 3 Chromatography of Ginger Proteinases on Accell Plus QMA
(Gradient elution of NaCl in 20mM phosphate, pH 6.0.)

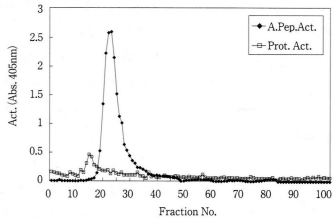

Fig. 4　Chromatography of Ginger Amino Peptidase on Toyopearl SuperQ (Gradient elution from 25 to 500mM phosphte, pH 6.5.)

製するために東ソ社製 TSK　G-3000 SW による HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。その結果 **Fig. 5** に示したように 6～9 分と 11～15分には活性のない不純蛋白質が溶出され，9～11分に精製生姜アミノペプチダーゼを得ることができた。この HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量的に均一になったと考えられる。この **Fig. 5** の溶出パターンから，この HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーだけでも酵素蛋白質は約10倍精製されたと考えられる。また分子量66 K，45K，20K ダルトンのマーカー蛋白質をこの HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーにかけてプロットすると，この生姜アミノペプチダーゼは溶出位置から分子量が約48K ダルトンであることが判明した。

3.2　生姜アミノペプチダーゼのポリアクリルアミド電気泳動および活性染色

上記の HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーで精製されたアミノペプチダーゼの，SDS を含まない Laemmli のポリアクリルアミド電気泳動[21]および Leu-pNA による活性染色法で純度検定を行なった。その結果 **Fig. 6** の左端 2 レーンの

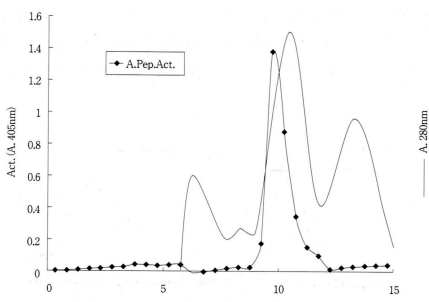

Fig. 5　Gel-chromatography of Ginger Aminopeptidase on TSK G-3000 SW XL in 0.15M CH_3COONH_4, pH 7

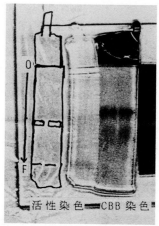

Fig. 6 Activity-staining and CBB-staining of Ginger Aminopeptidase on Native-PAGE

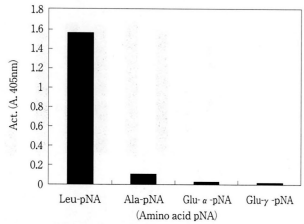

Fig. 7 Hydrolysis of various Amino acid p-nitroanilides

トレーシングの四角い囲みに活性部分（原点Oから先端FへRf=0.61）があり，中央2レーンはその実写である。右端2レーンは同一試料の同一電気泳動スラブでCBB染色したもので，スポットの中心は活性染色の中心とは異なっていて，不純蛋白質が未だ含まれていることを示していた。焦点電気泳動[23]の結果からはこの活性部分はpI=4.7であった[4]。

3.3　生姜アミノペプチダーゼの酵素的性質

この精製生姜アミノペプチダーゼの酵素反応の至適pHは5.5から8.0であり，最適はpH 6.5であり，酵素反応の至適温度は30～70°C で，最高は65°Cであった[4]。この精製アミノペプチダーゼの活性測定はこれまでLeu-pNAを使用してきたが，その他の合成基質すなわち種々のアミノ酸のパラニトロアニリドへの活性を調べたのが**Fig. 7**である。この図からLeu-pNAが最も良い合成基質であることがわかる。またGlu-γ-pNAに対して殆ど活性がないということはこの生姜アミノペプチダーゼにはγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性がないことを示している。

このLeu-pNAにたいする生姜アミノペプチダーゼのカイネテックパラメーターを求めたのが**Fig. 8**であって，これからKm=0.35mM，Vmax=1.75であった。

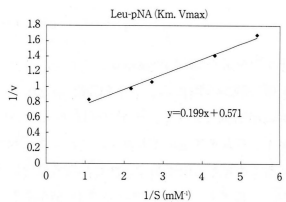

Fig. 8 Determination of Kinetic parameters of G. Aminopeptidase

この精製した生姜アミノペプチダーゼの活性にたいする各種阻害剤の影響を調べたのが**Fig. 9**である。活性中心がシステイン残基のいわゆるSH-酵素に働く阻害剤は4-チオン酸カリウム，ヨード酢酸，ビニルピリジン，E-64，PCMS（p-クロロマーキュリーフェニルスルホン酸）であるがPCMSだけがこのアミノペプチダーゼを失活させた。ペプシンのようなアスパラチル酵素に働くのがエポキシp-ニトロフェノキシプロパンとペプスタチンであるが，これらも生姜アミノペプチダーゼには反応しなかった。カルボキシペプチダーゼなどの金属酵素の活性阻害剤はEDTA，o-phenanthrolineであるが，これらも生姜アミノペプチダーゼには反応しなかった。さらにアミノペプチダーゼの活性阻害剤アマスタチンとベス

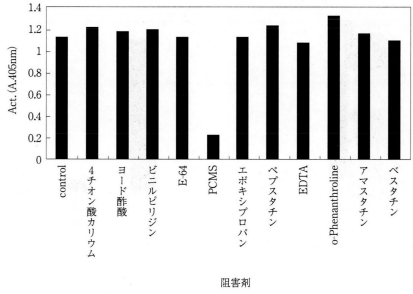

Fig. 9　Effects of Inhibitors on G. Aminopeptidase

タチン[26]を試みたが阻害反応は見られなかった。以上の実験から現在のところ PCMS のみがこの酵素の阻害剤であるが，一般に SH-酵素ではシステインやジチオスレイトールのような還元剤を加えると水銀系の阻害剤で失活した場合は復活するが，このアミノペプチダーゼは PCMS 阻害失活後，還元剤を加えても活性が戻らなかったので，これが疑問点として残る。

3.4　生姜アミノペプチダーゼの各種ペプチド，蛋白質，食品に対する酵素作用

牛乳 100m*l* を pH 6.0に調整し，これにキウィフルーツジュース 5 m*l* またはキウィフルーツプロテアーゼ[24]を37℃で15分間作用させ，生成物の官能テストを行ない味覚を調べたところ，すでに多くの研究者が報告しているように[3]苦味ペプチド生成による苦味が生じた。この苦みを持った溶液に風味の改善を図るため本研究で得た精製生姜アミノペプチダーゼを加え 37℃で反応させた。その結果15分間で，ほぼその苦味を除去できた。精製アミノペプチダーゼのかわりに生姜ジュースの濾過液 2 m*l* を加えても同じように苦味は除去されたが，これでは色々なプロテアーゼが含まれており脱苦味反応が，どの酵素によるものか特定できず，また生姜ジュースには他にも各種の味物質が含まれているためその遮蔽効果ともとられる。しかし今回の実験で明らかにこの精製アミノペプチダーゼが脱苦味の働きを示した。

そこでこの精製生姜アミノペプチダーゼがどのようなペプチドを分解するかを調べたところ **Fig.10** に示したように Met-Met や Leu-Gly-Gly に対してはかなり強い分解活性が見られ，他のペプチドに対しては殆ど分解反応しなかった。この他 Gly-Phe や人工甘味剤ペプチドの Asp-Phe-OMe をも分解できなかった。さらに大きなペプチドやタンパク質のアミノ末端加水分解にはインシュリン，TMA-リゾチーム，カゼインを基質にして酵素反応させたがそれぞれのアミノ基末端のアミノ酸の遊離は認められなかった。以上の結果からこの酵素はかなり基質特異性の高いアミノペプチダーゼであると判明した。この点で，この酵素は本研究の②の目的（過剰反応しないこと。）に合致していると言える。

次に本研究の第三番目の目的，③ピログルタミン酸ペプチドの Pyr 基除去作用を合成基質の Pyr-Phe-Leu-pNA で検討した。この精製生姜アミノペプチダーゼとこの合成基質を反応させた

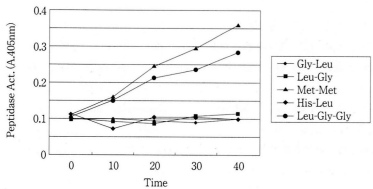

Fig.10 Hydrolysis of Various Peptides with G. Aminopeptidase

だけでは黄色の発色（Leu-pNA 間の切断）は認められずエンド型プロテアーゼ加水分解が無いことを示していた。またこの反応液に TNBS 試薬を加えても黄色の発色（Pyr-Phe 間の切断）は無かったので脱ピログルタミン酸反応もこの酵素は触媒しないことが判明した。

以上の諸性質の他に，この酵素は溶液状態で冷蔵でも約２年間活性が安定であった。これはこの酵素が比較的耐熱性があり食品加工利用に適していることを示している。

4. 要　約

ペプチドは食品工業界で広く利用されてきている。本研究では食品中の色々なペプチドに働く生姜アミノペプチダーゼを単離・精製しその利用について検討した。通常の方法では生姜プロテアーゼ類（GP I，GP II）から分離が困難であるが，本研究では２種のイオン交換クロマトグラフィーと分子篩クロマトグラフィーによって生姜アミノペプチダーゼを単離・精製することができた。この精製生姜アミノペプチダーゼは合成基質 Leu-pNA，Ala-pNA，Glu-α-pNA，Glu-γ-pNA のうち Leu-pNA に対して最も活性が強力だった。ペプチドに対しては Met-Met，Leu-Gly-Gly に対して活性が強く，Leu-Gly，Gly-Leu，His-Leu に対しては活性は殆ど無かった。食品の甘味料の Asp-Phe-OMe に対しても活性は認められなかった。アミノ末端が特殊な抗生物質のバシトラシンや合成基質 Pyr-Phe-Leu-pNA に対しては活性は認められなかった。さらに高分子基質のインシュリンやタンパク質基質の TMA-リゾチームやカゼインに対して加水分解反応をさせたが活性は認められなかった。

これらのことからこの生姜アミノペプチダーゼは，ごく限られたペプチドに対してだけ加水分解活性があることが判明した。実際にプロテアーゼ分解で苦味を発現した牛乳にこの精製酵素を作用させると苦味は迅速に消滅する。このことからこの酵素は苦味をもつ疎水性アミノ末端ペプチドのみに（特異性の高い）脱苦味作用し，かつ他のペプチド等には影響を与えない（過剰反応の心配のない）酵素であるといえる。この精製酵素溶液は４℃でも酵素活性が２年間以上保存されているように，アミノペプチダーゼ活性の安定性が良好であることを考え合わせると，食品加工工程で脱苦味と過剰反応の問題を解決できる重要な酵素であろう。

謝　辞

本研究に対し多大のご助成を下さいました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また，ご協力頂きました江角尚子氏，廣瀬香絵氏，高橋典果氏に感謝します。

文 献

1) 藤巻正生監修，岩井和夫，河村洋二郎，多田富雄，井村裕夫，松下雪郎，矢野俊正，山内邦男，千葉英雄，荒井綜一編集「食品機能」機能性食品創製の基盤，学会出版センター (1988)

2) J. Shabert, N. Ehrlich「The Ultimate Nutrient Glutamine」Avery Publishing Group (1994)

3) R. E. Feeney, J. R. Whitaker 編 (千葉英雄，荒井綜一監訳)「食品・医薬品分野における蛋白質テーラリング」学会出版センター (1988)

4) 大槻耕三ら「生姜根茎アミノペプチダーゼの精製とその性質」日本農芸化学会大会，農化誌，72巻，p.152 (1998)，同74巻，増刊 p.243 (2000)

5) 道喜美代，大沢はま子，中浜信子，桜井幸子「しょうがの肉軟化効果について」家政誌，19巻，p.167 (1968)

6) 市川芳江，佐々初江，道喜美代「ショウガ蛋白分解酵素の分離精製」栄養と食糧，26巻，p.377 (1973)

7) E. H. Thompson, I. D. Wolf, C. E. Allen「Ginger Rhizome: A New Source of Proteolytic Enzyme」J. Food Sci., **38**, p.652 (1973)

8) 大槻耕三，河端信，田口邦子「生姜プロテアーゼのクロマトグラフィーによる精製」生化学，47巻，p.470 (1975)

9) 大槻耕三，河端信，田口邦子「ショウガ・プロテアーゼの精製と安定化」京府大学術報告，理学・生活科学，29号，p.33 (1978)

10) 妻鹿絢子，三橋富子，藤本澄子，荒川信彦「ショウガプロテアーゼの筋原繊維蛋白質におよぼす影響」家政誌，34巻，p.79 (1983)

11) Y. B. Lee, D. J. Sehnert, C. R. Ashmore「Tenderization of Meat with Ginger Rhizome protease」J. Food Sci., **51**, p.1558 (1986)

12) 橋本昭彦，竹内洋子，河原有三，安本教傳「ショウガ根茎のプロテイナーゼおよびコラゲナーゼ活性」日栄・食誌，44巻，p.127 (1991)

13) K. Ohtsuki, K. Taguchi, K. Sato, M. Kawabata「Purification of Ginger Proteases by DEAE-Sepharose and Isoelectric Focusing」Biochim. Biophys. Acta, **1243**, p.181 (1995)

14) K. H. Choi, R. A. Laursen, K. N. Allen「The 2.1Å Structure of a Cysteine Protease with Proline Specificity from Ginger Rhizome, Zingiber officinale」Biochemistry, **38**, p.11624 (1999)

15) S. Arai, M. Noguchi, S. Kurosawa, H. Kato, M. Fujimaki「Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 6. Deodorization Effect of Aspergillopeptidase A and Debittering Effect of Aspergillus Acid Carboxypeptidase」J. Food Sci., **35**, p.392 (1970)

16) N. Izawa, K. Tokuyasu, K. Hayashi「Debittering of Protein Hydrolysates Using Aeromonas caviae Aminopeptidase」J. Agric. Food Chem., **45**, p.543 (1997)

17) H. Umetsu, E. Ichishima「Mechanism of Digestion of Bitter Peptide from a Fish Protein Concentrate by Wheat Carboxypeptidase」Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **32**, p.281 (1985)

18) I. Yu. Filippova, E. N. Lysogorskaya, E. S. Oksenoit, G. N. Rudenskaya, V. M. Stepanov「L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide-A Chromogenic Substrate for Thiol Proteinase Assay」Anal. Biochem., **143**, p.293 (1984)

19) G. Pfleiderer「Particle-Bound Aminopeptidase from Pig Kidney」Methods in Enzymology ed. by G. E. Perlmann & L. Lorand, **19**, p.514, Academic Press, New York (1970)

20) T. Hatakeyama, H. Kohzaki, N. Yamasaki「A Microassay for Proteases using succinylcasein as a substrate」Anal. Biochem., **204**, p.181 (1992)

21) U. K. Laemmli「Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4」Nature, **227**, p.680 (1970)

22) 小路庸子 (大槻耕三，佐藤健司，中村考志)「ショウガ根茎プロテアーゼの3成分への分離およびそのキャラクタリゼイション」京都府立大学大学院生活科学研究科修士論文 (1997)

23) O. Vesterberg「Isoelectric Focusing of Proteins」Methods in Enzymology ed. by W. B. Jakoby, **22**, p.389, Academic Press, New York (1971)

24) S. Sugiyama, K. Ohtsuki, K. Sato, M. Kawabata「Purification and Characterization of Six Kiwifruit Proteases Isolated with Two Ion-exchange Resins, Toyopearl Super Q and Bakerbond WP-PEI」Biosci. Biotech. Biochem., **60**, p.1994 (1996)

25) K. Okazaki, T. Imoto, H. Yamada「A Convenient Protein Substrate for the Determination of Protease Specificity, Reduced and S-3-(trimethylated amino) propylated Lysozyme」Anal. Biochem., **145**, p.87 (1985)

26) 青柳高明「プロテアーゼ・インヒビターの生物活性」蛋白質・核酸・酵素，25巻，p.597 (1980)

Utilization of Ginger Aminopeptidase for the Improvement of Various Peptides in Food

Kozo Ohtsuki, Kenji Sato and Yasushi Nakamura
(Department Food Science Nutrition Health, Kyoto Prefectural University)

The peptides in food products have been widely utilized in food industry. In this report for the heigher utilization of various peptides in food, especially for debittering of food peptide, a new aminopeptidase was isolated and purified from ginger rhizome (*Zingiber officinale*) by ion-exchange- and gel-chromatographies. This aminopeptidase showed debittering activity against the bitterness of a milk-protein hydrolysate by a kiwifruit protease. This aminopeptidase could hydrolyse Leu-pNA, Leu-Gly-Gly and Met-Met very well. On the other hand, the enzyme did not hydrolyse Leu-Gly, Gly-Leu, Gly-Phe, His-Leu, Glu-α-pNA, Glu-γ-pNA, Asp-Phe-OMe (a sweetener), bacitracin and Pyr-Phe-Leu-pNA. This aminopeptidase could not hydrolyse larger peptides and proteins, such as Insulin, TMA-lysozyme and casein. Since the enzyme solution is stable for more than two years at 4°C without any loss of the activity, this enzyme would be useful in food processing.