

ピーマン種子抽出物から分離した抗菌性物質の特徴（第2報）*

小窪 正人*¹・三角 敏明*¹・水谷 政美*²

Purification and Characterization of Antimicrobial Substances from Green Pepper Seeds (II)

Masato KOKUBO, Toshiaki MISUMI, and Masami MIZUTANI

塩析およびカラムクロマトグラフィーにより、ピーマンの成熟種子の水抽出物から抗菌性物質を分離精製した。その結果、陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE Sepharose FFカラム）により分画した抗菌性画分の数、中熟種子の場合に比べて大幅に増加し、その分子量は数千から数千万とそれぞれ異なっていた。また、抗菌性画分は酵母の細胞を縮小させ、破裂を誘導するとともに、その増殖も長時間にわたり抑制することを確認した。

キーワード：ピーマン、成熟種子、水抽出物、抗菌性、陰イオン交換クロマトグラフィー

1 はじめに

ピーマン種子の水抽出物に酵母や細菌の増殖を抑制する作用のあること、ならびに、種子内に抗菌性物質が生成されるには果実の熟度と種子の乾燥温度が大きく関わっていることをこれまでに明らかにしてきた¹⁻³⁾。本研究では、成熟した果実より採取した種子（成熟種子）の水抽出物を用い、カラムクロマトグラフィーなどにより抗菌性物質を分離精製し、その特徴について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 水抽出物の分画⁴⁾

真空凍結乾燥した成熟種子の水抽出物を水1Lに溶かし、氷水で冷却しながら561gの硫酸アンモニウムを徐々に加え、完全に溶解させた後、4℃で一夜放置した。生成した沈殿物は、遠心分離（10,000rpm, 20min）により回収し、20mMりん酸カリウム緩衝液（pH7.0）100mlに溶解させた。これを同上緩衝液に対して室温で透析した後、透析液を真空凍結乾燥し、脱硫酸試料とした。

脱硫酸試料は同上緩衝液20mlに溶かし、DEAE

Sepharose FFカラムに重層した後、同上緩衝液で溶出した（0.7ml/min, 0.5M-NaClリニアグラジエント）。溶出液は、280nmにおける吸光度によりそれぞれの画分に分画し、水に対して透析した後、真空凍結乾燥してDEAE分画試料とした。

DEAE分画試料は、水に溶かしSephadex G200カラムに重層した後、同上緩衝液で溶出した（0.2 ml/min, 0.2M-NaCl）。溶出液はDEAE分画試料と同様の方法で分画し、水に対して透析した後、真空凍結乾燥して最終分画試料とした。

2-2 抗菌活性の評価

抗菌活性の評価は、DEAE分画試料および最終分画試料について行った。各分画試料1mgにYMP培地0.9mlを加え良く混合し、オートクレーブ（120℃, 20分）で滅菌した。放冷後、10⁴個/mlオーダーに希釈した酵母（*S.cerevisiae*）0.1mlを加え良く混合し、28℃で48時間培養後の増殖の程度を観察した。

2-3 溶出位置による分子量の測定⁵⁾

分子量の測定は、最終分画試料について行った。前述と同様の条件で、Sephadex G200カラムに分子量が既知の標準タンパク質を重層し、その溶出位置から標準曲線を作成した。得られた標準曲線上に各分画試料の溶出位置をプロットして分子量を求めた。使用した標準タンパク質は、Catalase,

* 農林畜水産物を用いる食品開発に関する研究

* 1 食品開発部

* 2 応用微生物部

BSA, OvalbuminおよびCytochrome Cの4種である。

2-4 酵母の生育状況の観察

DEAE分画試料1mgにYMP培地0.9mlを加え良く混合し、オートクレーブ (120℃, 20分) で滅菌した。放冷後, 10⁵個/mlオーダーに希釈した酵母0.1mlを加え良く混合した。その一部をスライドガラスにとりカバーガラスをかけ, 周囲を接着剤で密封し, 28℃で培養しながら酵母の状態を経時的に観察した。また, 試験管を用いて同様に培養し, 菌数の経時的な増減を測定した。

3 結果および考察

3-1 抗菌性画分の分別

80%飽和硫酸アンモニウムを使用して, 成熟種子の水抽出物18.4gから塩析を行った結果, 8.9gの脱硫酸試料が得られた。

この脱硫酸試料0.3gを用いて, DEAE Sepharose FFカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果, 9つの画分 (A~I) に分画された (図1)。各画分の抗菌活性を評価したところ全ての画分に抗菌活性が認められ, その収量は順に23.6, 25.0, 15.5, 12.3, 19.5, 12.0, 51.1, 22.0および15.0mgであった。

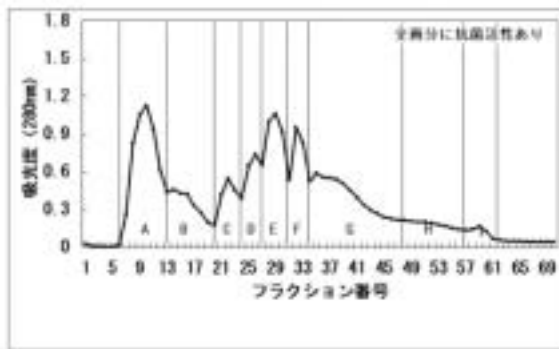


図1 陰イオン交換クロマトグラフィーによる成熟種子の分画

A~I画分のそれぞれ半量を用いて, Sephadex G200カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果, A~G画分は2画分 (I・II), HおよびI画分は3画分 (I・II・III) に分画された (図2)。各画分の抗菌活性を評価したところ

D-II画分にも抗菌活性が認められ, その収量は2.8mgであった。

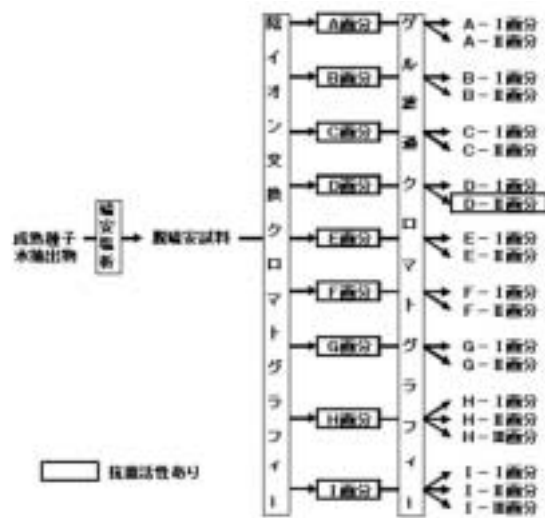


図2 ゲルろ過クロマトグラフィーによる成熟種子の分画

これらの結果から, 陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose FFカラム) により分画された抗菌性画分の数, 中熟果実より採取した種子 (中熟種子) を用いた場合に比べて大幅に増加していることが分かった²⁾ (図3)。

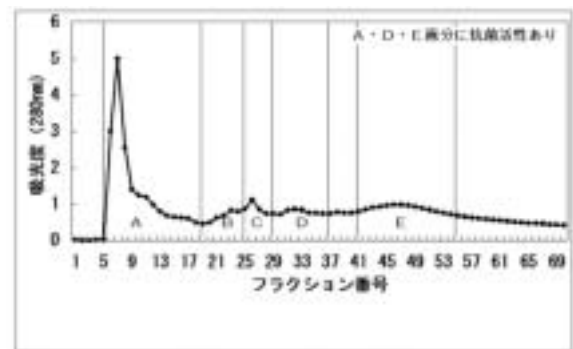


図3 陰イオン交換クロマトグラフィーによる中熟種子の分画

しかし, これらの抗菌性画分をゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G200カラム) により分画すると, ほとんどの画分で抗菌活性が失われていた。その原因として, 2つ以上の物質が分離されることにより抗菌活性を失った可能性が考えられた。そのため, 分画したものを再度混合してみたが, 抗菌活性は復活しなかった。

3-2 抗菌性画分の分子量

標準タンパク質の溶出位置と最終分画試料の溶出位置から各画分のおおよその分子量を求めたところ、A-I～G-I画分は120万～220万、A-II～G-II画分は1,400～6,500の範囲であった。また、H-IおよびI-I画分はそれぞれ1,400万および2,100万、H-IIおよびI-II画分はそれぞれ72万および130万、H-III及びI-III画分はそれぞれ1,700および4,300であった(表1)。

表1 抗菌性画分の分子量

画分	分子量	画分	分子量
A-I	1,600,000	F-I	1,600,000
A-II	1,600	F-II	3,900
B-I	1,200,000	G-I	1,600,000
B-II	1,400	G-II	3,500
C-I	1,500,000	H-I	14,000,000
C-II	1,700	H-II	720,000
D-I	2,200,000	H-III	1,700
D-II	6,500	I-I	21,000,000
E-I	1,500,000	I-II	1,300,000
E-II	3,500	I-III	4,300

このように、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画された抗菌性画分の数、中熟種子の場合に比べて3種から9種へ大幅に増加したこと、また、その分子量が数千から数千万とそれぞれ異なっていたことから、種子内の抗菌性物質は、種子の成熟に伴う代謝などにより修飾を受けたり、重合したりすることによって、分子構造が変化していくものと考えられた。

3-3 酵母の生育状況

0.1%のDEAE分画試料を含むYMP培地で酵母を培養しながら細胞の状態を観察したところ、数時間で細胞が徐々に縮み始め、その後破裂する細胞がいくつか観察された。またこの間、菌数の増加は全く認められなかった(図4)。

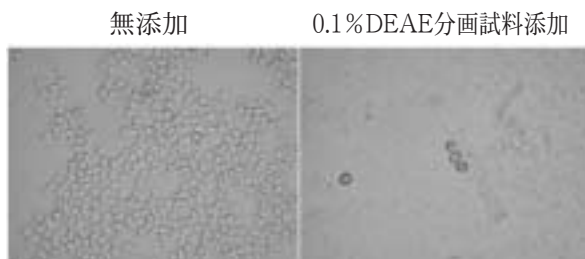


図4 抗菌性画分が酵母の生育に及ぼす影響

4 まとめ

成熟種子の抽出物から抗菌性物質を分離精製し、その特徴について検討したところ、以下のことが分かった。

- 1) 成熟種子の水抽出物を陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose FFカラム) により分画した抗菌性画分の数、中熟種子の場合に比べて3種から9種へ大幅に増加し、その分子量は数千から数千万とそれぞれ異なっていた。これらの原因として、種子の成熟に伴う抗菌性物質の分子構造の変化が考えられた。
- 2) DEAE分画試料をゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G200カラム) により分画すると、ほとんどの画分で抗菌活性が失われた。原因については今後の検討が必要である。
- 3) 抗菌性画分は酵母の細胞を縮ませ、破裂を誘導するとともに、その増殖も長時間にわたり抑制した。

5 参考文献

- 1) 平川良子, 水谷政美, 小窪正人, 宮崎県食品開発センター研究報告, 48, 105 (2003)
- 2) 小窪正人, 三角敏明, 水谷政美, 宮崎県食品開発センター研究報告, 49, 77 (2004)
- 3) 水谷政美, 平川良子, 小窪正人, 特願2004-197813 (特開2006-14695)
- 4) Mizuo Yajima, Tsutomu Takayanagi, Kazuhiko Nozaki and Koki Yokotsuka, *Food Sci. Technol. Int.* 2, 234 (1996)
- 5) 岡田雅人, 宮崎香 編: “改訂タンパク質実験ノート上巻” p.13-135, 羊土社 (1999)