



Title	ダイズBowman-Birkプロティナーゼインヒビターの構造と阻害活性に関する研究
Author(s)	小谷, 昌司
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1029
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

グイス Bowman-Birk プロテアーゼ インヒビター の構造と 阻害活性 に関する研究

動植物の組織には蛋白質分解酵素の活性を阻害する蛋白質(プロテアーゼ
インヒビター)が広く分布しており特にマメ科植物の種子には例外なく
トリプシンインヒビターが見出される。これは生物にとって重要な意味をもつことが予想
されるがその生理機能や阻害反応機構は未だ明らかになっていない。

本研究はグイス Bowman-Birk プロテアーゼ インヒビターを材料としてインヒビター
分子の構造と阻害活性部位とを決定し阻害機構の解明に資するとともに
この蛋白質が異常に多量のN-N結合をもつことからこの様な蛋白質の構造決定法
を開発することを目的としたものである。

前述の如くマメ科植物の種子には必ずしもプロテアーゼ インヒビターが見出
されるがその最初のものは Kunitz (1) により結晶化された Kunitz トリプシン
インヒビターである。1946年に Bowman (2) はグイス粉末を 60% エタノールで
抽出後2倍量のアセトンを加えて沈澱する部分に Kunitz のものと異なるイン
ヒビターが存在することを示した。Birkら(3)はこの固相からトリプシンと
キモトリプシンの両方を阻害するインヒビター(inhibitor AA)を単離した。

Yamamoto と Ikemaka (4) によりグイスより精製された1.9N インヒビターをトリ
プシンとキモトリプシンの活性を強く阻害したが inhibitor AA とは分子量的に
全く異っており AA の 24,000 に対し 1.9N は 11,000 の値が報告された。

Frattali (5) は Birk の方法を若干改め同様の活性をもつイン
ヒビターを得たが、これは 8,000 の分子量を有した。

この不一致は Millar ら(6) と Frattali (5) により物理化学的
手法で説明された。彼等は、これら3種のインヒビターは電気泳動的に同一で
分子量は 8,000 であるが濃度に依存して単量体 $\leftrightarrow$ 二量体 $\leftrightarrow$ 三量体の如く
解離会合する性質をもつことを示し、このインヒビターを Bowman-Birk
インヒビターとして統一的に呼ぶことを提唱した。本研究においては、この
名称を用い BBI と略記する。

BBI は比較的分子量でありながら トリプシンとキモトリプシンの双方と同時に Complex を形成して その酵素活性を阻害する。また 71 残基の 20% にあたる 14 残基の半シスチンをもつ。及び 最も普通に見出される グリシンを全く含まない。タンパク質としては極めて特異なものである。この様な高シスチン含量の植物起源のインヒビターは各種のマメ類の種子に見出され、そのうち lima bean (*Phaseolus lunatus*) と 落花生 (*Arachis hypogaea*) のものについてはその一次構造が知られている(7)(8)。が、これ等の特徴をなす多数の β - β 結合の位置に関しては全く報告されていない。本研究においては 先ず還元アルキル化した蛋白について その一次構造を決定し、更にトリプシン、キモトリプシンによる限定蛋白質分解の手法を用いて両酵素に対する阻害活性部位を明らかにした。更にインヒビター分子を各種プロテイナーゼや硫酸で分解することにより シスチンハフチドを得てその全 β - β 結合を決定した。以上の結果は この分子が その特異な機能とに対応した非常に興味ある構造をとっていることを示唆している。

第1部 Bowman Birk プロテイナーゼインヒビターの アミノ酸配列と阻害活性部位の決定

インヒビターの一次構造を知るために、まず蛋白の β - β 結合を還元カルボキレノキル化(RCM化)後トリプレン消化し得られたハフチドの構造をエドマン分解直接法で決定した。これ等のトリプシンハフチドの配列はインヒビター分子を酵素的、或いは化学的手法で断片化し得られたフラグメントのアミノ酸組成と、末端アミノ酸配列を知ることにより決定した。

Laskowski, Jr. (9) は、或種のトリプレンインヒビターに 触媒量のトリプレンと酸性(pH 3~4)で作用させるとインヒビターの活性に影響はなく、一箇所のアルギニン結合がとれること、更にこのアルギニンとカルボキレハフチドとを B (Case B) により、除くと阻害活性が全く失われることを見出した。そして、それまで種々のトリプレンインヒビターがアルギニンカリン残基のどちらかの化学修飾で失活することが知られていたことから、天然のトリプレンインヒビターは極度に露出した

アルギニン 又は リジン 残基を その 阻害活性部位と して 示している ところと 示唆した。

この 阻害活性部位 ハフチド結合の 酵素による 限定水解 は キモトリプシン インヒビター について も 調べられ、Birk (10) は BBI に 酸性で 触媒量の キモトリプシン 阻害活性が 失われること、さらに Frattali と Steiner (11) は この 見掛け上 失活した インヒビター に 中性付近で 約当量量の キモトリプシンを 長時間作用せると 活性が回復する (恐らく 切断された ハフチド結合の キモトリプシンによる 再形成に よる) ことを見出した。

また Krahn と Stevens (12) は 同様の 操作で Lima bean inhibitor 分子中 1 個の Leu-Ser 結合が 水解されることを 報告した。

以上の 現象は いずれも トリプシン と キモトリプシンの インヒビターの 活性部位 ハフチド結合 が 酸性領域で これ等の プロテアーゼ により 極めて 水解されやすい ことを 示唆している と 考えられる。従って 本研究に おいては この プロテアーゼ による 蛋白の 限定分解を 構造決定の ための 分子の 断片化と 活性部位の 決定の 手段として 応用した。

実験材料と方法

インヒビター は 文献 4 の 方法により タイス種子から 精製した。

アミノ酸分析 アミノ酸配列分析 還元カルボキシメチル化は それぞれ 文献 13, 14, 及び 15 に 従った。

RCM-BBI のトリプシン消化と ハフチドの単離

約 $4.3 \mu\text{mole}$ の 基質を $500 \mu\text{g}$ の TPCK 処理トリプシンを用いて $\text{pH } 8.0$ 37°C 4 hr の条件で 消化後 Bio Gel P-4 カラム ($1.5 \times 220 \text{ cm}$, 0.2 M 酢酸アンモニウム, $\text{pH } 9.1$) で 分画し 各々を 更に 高压濾紙電気泳動により 精製した。

BBI の プロテアーゼによる限定分解と断片化

BBI (2 μ mole) は pH 3.5~4.0 で 1 モル % の TLCK キモトリプシン あるいは TPCK-トリプシンと室温で 24 時間前後反応させ 常法により還元カルボキシ化後 ゲル濾過法により フラグメントを分離した。

限定分解 BBI の CPase 処理と活性の測定

キモトリプシンで限定分解した BBI (60 μ g) は CPase A (20 μ g) で pH 7 40°C 15 hr の条件で処理し 約 2 倍量 (モル比) のキモトリプシンを加え、合成基質 (4) を用いて 酵素活性を測定し キモトリプシン活性の減少分を インヒビターの阻害活性とした。トリプシンで限定分解した BBI は CPase B を同様の条件下で作用させた後 やはり合成基質を用いて活性を測定した。

結 果

インヒビターの純度とアミノ酸組成

精製標品は電気泳動的に単一で Table I のアミノ酸分析値から明らかで、この蛋白に欠けているグリレンが全く検出されない。臭播造決定に使用し得るものと見られ、文献値 (16) には若干組成の異同があるが、分析値は配列分析の結果から予想されるものと一致している。

RCM-BBI のトリプシンハフチド

Bio-Gel P-4 カラムにより次頁の Fig. 1 に示す T-1~T-8 の 8 フラグレオンが得られ、更に電気泳動で精製した結果次頁 Table II に示す 7 つのハフチドが得られた。これらはその蛋白質の全アミノ酸に一致する。

TABLE I. Amino acid composition of Bowman-Birk inhibitor.

Amino acid	Found ^a	Integer	Literature ^b
Asp	10.91	11	11-12
Thr ^a	1.92	2	2
Ser ^a	8.61	9	8-9
Glu	7.04	7	7
Pro	6.00	6	6
Gly	0.00	0	0
Ala	4.11	4	4
Cys	14.41	14	14
Val	1.05	1	1
Met	0.89	1	1
Ile	1.82	2	2
Leu	2*	2	2
Tyr	1.93	2	2
Phe	1.96	2	2
Lys	5.16	5	5
His	0.95	1	1
Arg	2.08	2	2
Total residues		71	70-72

^a Results of 24 hours' hydrolysis. Leucine was taken as two moles per mole protein. ^b Summarized by Kassell (17). ^c Values of threonine and serine were not corrected.

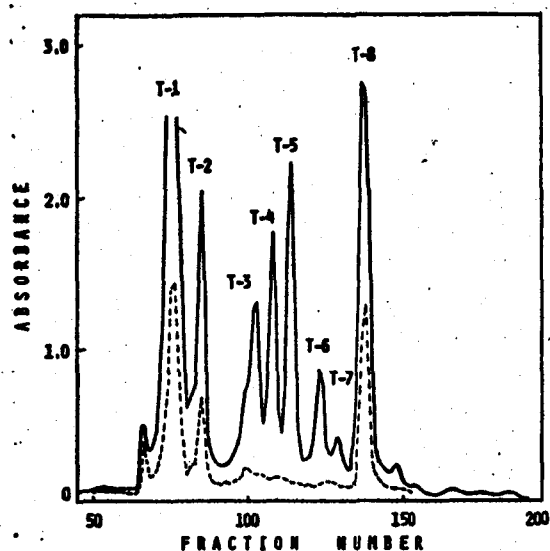


Fig. 1. Fractionation of the tryptic digest of RCM-BBI on Bio-Gel P-4. The digest (1.5 ml) was applied to a column (1.5×220 cm) and eluted with 0.2M ammonium acetate, pH 9.1, at a flow rate of 1.5 ml per hr; 1.8-ml fractions were collected. Solid line shows the absorbance at 226 mμ (light path, 5 mm) and broken line at 280 mμ × 2 (light path, 10 mm).

TABLE II. Amino acid compositions of tryptic peptides of RCM-BBI. Values shown are molar ratios with respect to amino acid denoted with asterisk in each column.

Amino acid	T-1	T-3-1	T-4-2	T-5-1	T-6-1	T-8-1	T-8-2
CM-Cys	7.09 (7)	1.67 (2)	1.55 (2)	0.94 (1)	1.12 (1)	0.94 (1)	
Asp	7.24 (7)	1.11 (1)		0.84 (1)	1.10 (1)		1* (1)
Thr	1.80 (2)						
Ser	3.27 (3)	2.13 (2)	0.96 (1)	1.09 (1)	1.18 (1)	0.99 (1)	
Glu	4.03 (4)			0.87 (1)		1.08 (1)	1.05 (1)
Pro	3.40 (3)			1.94 (2)		1.09 (1)	
Ala	1.29 (1)	1.07 (1)	1* (1)			1.00 (1)	
Val	0.83 (1)						
Met					1.06 (1)		
Ile	0.86 (1)		0.83 (1)				
Leu		1* (1)	1.03 (1)				
Tyr	0.98 (1)					1.00 (1)	
Phe	1* (1)					1* (1)	
Lys	4.01 (4)	1.11 (1)					
His		0.87 (1)					
Arg				1* (1)	1* (1)		
Total residues	35	9	6	7	5	7	2
Yield (%)	91	29	93	71	71	55	33

T-1 は最初 単一と考えられたが、更に分析した処 2 種のハフ・4ドの混合物とわかり、そのヲ キモトリフレンで消化した。消化物の Bio Gel P4 カラム による 分画の結果を Fig. 2, ハフ・4ドのアミノ酸組成を Table III に示す。後の分析により T-1 は T-1-C-1 と (T-1-C-2) plus (T-1-C-3) との混合物であったことが示された。

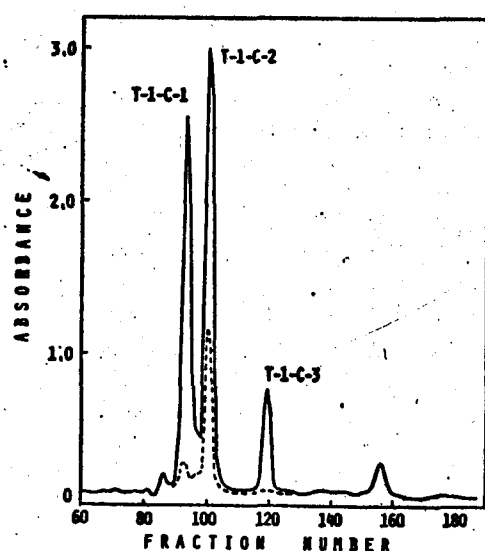


Fig. 2. Gel filtration of the chymotryptic digest of the fraction T-1 on Bio-Gel P-4. The column and eluant were the same as described in the legends for Fig. 1. The flow rate was adjusted to 2.0 ml per hr, and 1.2-ml fractions were collected. Peptides were detected at 226 mμ (—) and at 280 mμ × 2 (----). The last small peak was not a peptide but probably salts.

TABLE III. Amino acid compositions of chymotryptic peptides of T-1 and of carboxyl-terminal peptide, T-C. Values shown are molar ratios with respect to amino acid denoted with asterisk in each column.

Amino acid	T-1-C-1	T-1-C-2	T-1-C-3	T-C
CM-Cys	4.39 (4)	1.87 (2)	0.74 (1)	1.96 (2)
Asp	3.54 (3)	2.28 (2)	2*	2.96 (3)
Thr	1.02 (1)		1.00 (1)	
Ser	2.09 (2)	1.31 (1)		0.96 (1)
Glu	1.95 (2)	2.25 (2)		2.86 (3)
Pro	1.19 (1)	1.98 (2)		2.06 (2)
Ala	1* (1)			
Val			0.92 (1)	
Met				
Ile			1.00 (1)	
Leu				
Tyr		0.93 (1)		0.78 (1)
Phe			1.22 (1)	
Lys	2.05 (2)	2* (2)		2* (2)
His				
Arg				
Total residues	16	12	7	14
Yield (%)	90	75	70	34

これ等の主要なハフ・4ドが 2 次的に分解されて生じたと考えられる ハフ・4ドが若干得られた。そのアミノ酸組成を次頁 Table IV に示す。ここで T-2 は T-1-C-2 に、T-4-3 は T-1-C-3 に対応し、T-5-2 は T-6-1 の Met 残基にカルボキシメチル基の付加したものと考えられる。T-7 は T-3-1 から派生したことが 1 残基しかある His が 双方に含われることから推定され、117 による配列分析の結果と矛盾しない。

Table IV トリフリン消化による
二次的ペプチドのアミノ酸組成

Amino acid	T-2	T-4-3	T-5-2	T-7
CM-Cys	1.84 (2)	1.13 (1)	1.04 (1)	1.08 (1)
Asp	2.27 (2)	1.89 (2)	1.14 (1)	1.31 (1)
Thr		0.92 (1)		
Ser	1.06 (1)		1.12 (1)	1.25 (1)
Glu	2.36 (2)			
Pro	2.22 (2)			
Ala				
Val		0.81 (1)		
Met			0.62 ^b (1)	
Ile		1.10 (1)		
Leu				1* (1)
Tyr	1.09 (1)			
Phe		1* (1)		
Lys	2* (2)			
His				0.91 (1)
Arg			1* (1)	
Total residues	12	7	5	5
Yield (%)	13	14	24	15

^b Determined as methionine, homoserine lactone and S-carboxymethyl homocysteine.

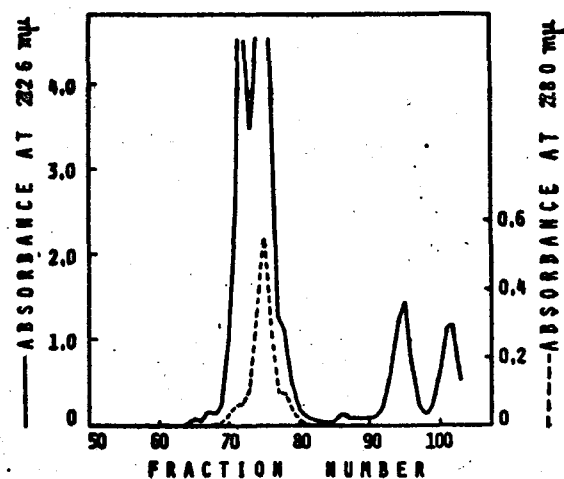


Fig-3 RCM-BBIのトリフリン-キモトリフリン
消化物からのペプチド T-C の分離
カラム: Bio Gel P-4 (1.5×220 cm)

ペプチド T-C の分離

T-1-C-2 (T-2) の配列分析は N 末端より 5 残基以後 明確な結果が得られず、新たにこのペプチドを調製する必要があった。そこで RCM-BBI (3 μmole) に 320 μg のトリフリンと 140 μg のキモトリフリンで消化後、ゲル濾過を行い、Fig. 3 の結果を得た。

ペプチドの分離が十分でなかったため、目的のペプチドは Tyr 残基を含有している。280 nm の吸光度が最大の 75 番目の試験管の内容のみを分析に供した。アミノ酸組成は Table III に示すか、予想された組成より、

Asp, Glu が 1 残基ずつ多いことがわかった。

トリフリンペプチドのアミノ酸配列分析

殆どどの場合 C 末端残基をのぞき、30% フェニルチオヒダントイン (PTH) 誘導体として同定し得た。C 末端残基は、CPase 消化により確認した。結果を

Table V. に示す. このうち T-1-C-2 と T-2 のみ N 末の 5 残基の配列
 L からの分析で得られたが配列は T-C の分析で知り得た. 更に T-C はその C 末端
 部位に T-P-2 と同一の構造をそのことと示された.

TABLE V. Summary of sequence analyses of tryptic peptides of RCM-BBI. The symbols used are as follows: →, Edman degradation; ←, carboxypeptidase A and/or B digestion.

Peptide	Sequence
T-1-C-1	Asp-Asp-Glu-Ser-Ser-Lys-Pro-Cys-Cys-Asp-Gln-Cys-Ala-Cys-Thr-Lys ← ←
T-1-C-2	Cys-Tyr-Glu-Pro-Cys(Lys, Pro, Ser, Glx, Asx, Asx)Lys ← ← ← ← ← ← ← ←
T-1-C-3	Cys-Val-Asp-Ile-Thr-Asp-Phe ←
T-2	Cys-Tyr-Glu-Pro-Cys(Lys, Pro, Ser, Glx, Asx, Asx)Lys ← ← ← ← ← ← ← ←
T-3-1	Leu-Asn-Ser-Cys-His-Ser-Ala-Cys-Lys ← ← ← ← ← ← ← ←
T-4-2	Ser-Cys-Ile-Cys-Ala-Leu ← ←
T-5-1	Ser-Asn-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg ← ← ← ← ← ← ← ←
T-6-1	Cys-Ser-Asp-Met-Arg ← ← ← ← ← ← ← ←
T-8-1	Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln-Cys-Phe ←
T-8-2	Glu-Asn ← ←
T-C	Cys-Tyr-Glu-Pro-Cys-Lys-Pro-Ser-Glu-Asp-Asp-Lys-Glu-Asn ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ← ←

7.0 ティーピーに於ける BBI の限定分解と断片化

キモトリプシンに於ける限定分解物を RCM 化後ゲル濾過した結果を Fig. 4 に
 示す. Table VI に示した. 2 つのフラグメント, F-L と F-S, のアミノ酸組成
 から分子内の 1ヶ所でのハフチドの切断が起ることを示す.

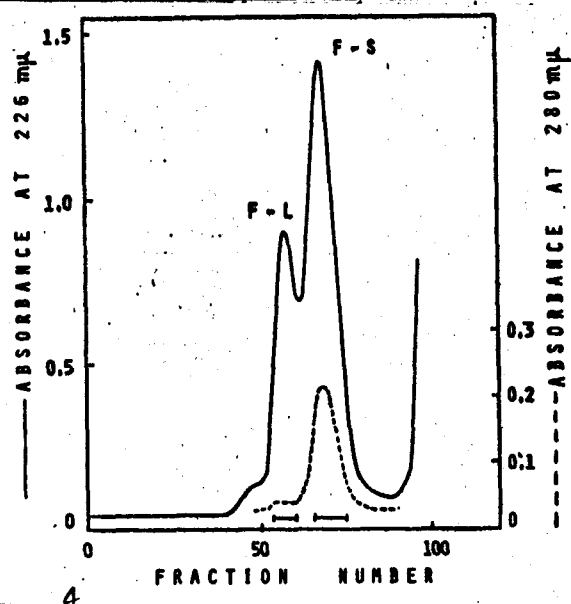


Fig. 4. BDIのトリプトファン限定分解物の RCM化後の Sephadex 650 に 5% グラフィーの結果。

ガラス (1.8 x 150 cm), 溶媒 0.2M 酢酸
アモニアム pH 9.1.

Table VI. トリプトファンに 5% 断片のアミノ酸組成

Amino acid	Fragments		Sum of both
	F-L	F-S	
CM-Cys	9.46 (10)	4.41 (4)	14
Asp	5.95 (6)	5.28 (5)	11
Thr	0.97 (1)	0.99 (1)	2
Ser	6.60 (7)	2.50 (2)	9
Glu	2.98 (3)	4.14 (4)	7
Pro	3.32 (3)	3.18 (3)	6
Ala	3.04 (3)	1.24 (1)	4
Val	0.00 (0)	0.96 (1)	1
Met	0.93 (1)	0.15 (0)	1
Ile	0.99 (1)	1.00 (1)	2
Leu	2* (2)	0.21 (0)	2
Tyr	0.00 (0)	1.79 (2)	2
Phe	0.00 (0)	2* (2)	2
Lys	3.30 (3)	1.88 (2)	5
His	0.90 (1)	0.00 (0)	1
Arg	1.97 (2)	0.00 (0)	2
Total residues	43	28	71
Yield (%)	33	36	

トリプトファンに 5% 限定分解物の Bio-Gel P-10 を用いたゲル印過の結果を Fig. 5 に示す。

この場合限定分解は完全でなく、Fig. 5 に I として示されているのはそのインヒビターである。

得られた 2 つの fragment, F-L-T (ピーク II) と F-S-T (ピーク III) の組成を Table VII に示す。両者の組成の和がそのインヒビターのそれと一致するところから、やはり一箇所でペプチド結合の切断が起ったことがわかる。

また F-S-T の組成はトリプトファンペプチドの T-I-C-L に一致している。

CNBr に 5% F-L の分解

トリプトファンに 5% 断片 F-L を 1 つの Met を含み、更に着目し、70% 酢酸中で CNBr を作用させたあと、Bio-Gel P-10 の

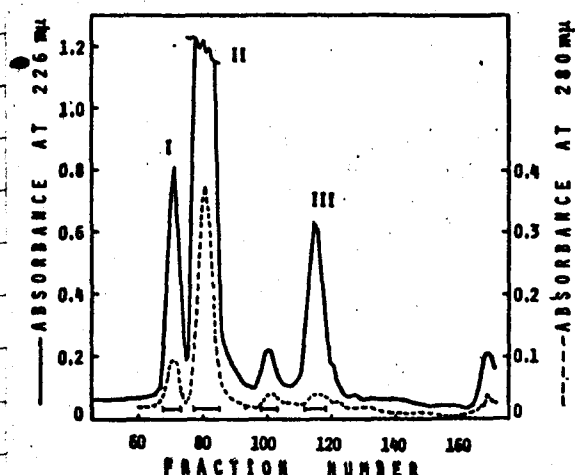


Fig. 5. トリプトファンに 5% 限定分解物の RCM化後の Bio-Gel P-10 に 5% グラフィー。

ガラス 1.8 x 152 cm, 溶媒 0.2M 酢酸アモニアム

Table VII. —

トリファンシンに53 BBIの断片の
アミノ酸組成

Amino acid	Fragments		Sum of both
	F-L-T	F-S-T	
CM-Cys	9.99 (10)	3.82 (4)	14
Asp	8.02 (8)	3.23 (3)	11
Thr	1.07 (1)	0.94 (1)	2
Ser	6.54 (7)	1.99 (2)	9
Glu	5.13 (5)	1.72 (2)	7
Pro	4.95 (5)	1.05 (1)	6
Ala	2.99 (3)	1* (1)	4
Val	1.04 (1)	0.00 (0)	1
Met	0.67 (1)	0.00 (0)	1
Ile	1.81 (2)	0.00 (0)	2
Leu	2.11 (2)	0.00 (0)	2
Tyr	1.57 (2)	0.00 (0)	2
Phe	2.04 (2)	0.00 (0)	2
Lys	2.88 (3)	1.76 (2)	5
His	0.95 (1)	0.00 (0)	1
Arg	2* (2)	0.00 (0)	2
F. Total residues	55	16	71
Yield (%)	36	47	

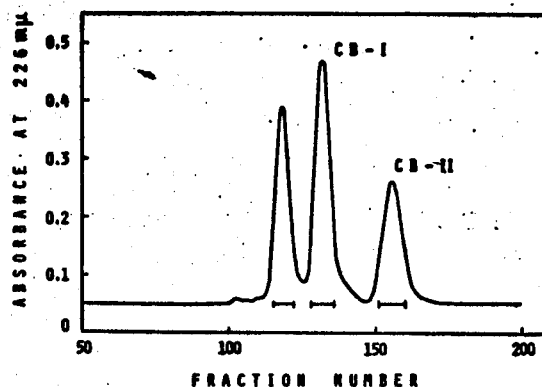


Fig. 6. キモトリファンシンに53断片 F-L
のフロムシアン分解物の
Bio Gel P-10 に53 分画。
カラムの条件等は Fig. 5 と
同一。

カラムで分画した。Fig. 6 に示す如く 3つの
ピークが得られたが、最初のピークは CNBrの
作用を受けた後のフラグメント F-L であった。
CB-I と CB-II の組成は Table VIII に示す。
CB-I に Met の分解物である ホモセリンがみられ
たので、2つのフラグメントの順序は (CB-I)-(CB-II)
と推定された。

BBI の アミノ酸配列

トリファンシンペプチドの順序を決定するための
分析の結果を Table IX に示した。
まず、RCM-インヒビターに112 N末端の18
残基の配列を求めたところ、これは T-1-C-1 と
それにつく T-5-1 の N末端 2残基の部分と
あることがわかった。

Table VIII. F-L のフロムシアンに
53断片のアミノ酸組成

Amino acid	CNBr Fragments		Sum of both
	CB-I	CB-II	
CM-Cys	5.98 (6)	3.93 (4)	10
Asp	5.54 (5)	1.22 (1)	6
Thr	1.01 (1)	0.00 (0)	1
Ser	3.85 (4)	2.88 (3)	7
Glu	3.09 (3)	0.00 (0)	3
Pro	3.08 (3)	0.00 (0)	3
Ala	1.08 (1)	2.15 (2)	3
Val	0.00 (0)	0.00 (0)	0
Met	0.00 (0)	0.00 (0)	0
Ile	0.00 (0)	0.83 (1)	1
Leu	0.00 (0)	2.00 (2)	2
Tyr	0.00 (0)	0.00 (0)	0
Phe	0.00 (0)	0.00 (0)	0
Lys	1.79 (2)	1.02 (1)	3
His	0.00 (0)	0.95 (1)	1
Arg	1* (1)	1* (1)	2
Homo Ser	0.92 (1)	0.00 (0)	1
Total residues	27	16	43
Yield (%)	54	54	

Table IX トリプシンハフチドの配置と決めるための分析結果。→イオン分解 ← CPase 消化

Protein and fragment	Sequence
RCM-Inhibitor	$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{Asp-Asp-Glu-Ser-Ser-Lys-Pro-Cys-Cys-Asp-}} \\ \leftarrow \text{T-1-C-1} \end{array}$ $\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{Gln-Cys-Ala-Cys-Thr-Lys-Ser-Asn-}} \\ \leftarrow \text{T-5-1} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{-Lys-Glu-Asn} \\ \leftarrow \text{T-8-2} \\ \text{---T-C---} \end{array}$
Chymotryptic fragments ^{a)}	
F-L	$\begin{array}{c} \text{.....Ala-Leu} \\ \leftarrow \text{T-4-2} \end{array}$
F-S	$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln-}} \\ \leftarrow \text{T-8-1} \end{array}$
Cyanogen bromide fragment ^{b)}	
CB-II	$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{Arg-Leu-Asn-Ser-Cys-His-Ser-Ala-Cys-Lys-}} \\ \leftarrow \text{T-6-1} \quad \quad \quad \text{T-3-1} \end{array}$

^{a)} Fragments obtained by limited hydrolysis of BBI with chymotrypsin. ^{b)} Fragment obtained by cyanogen bromide degradation of F-L.

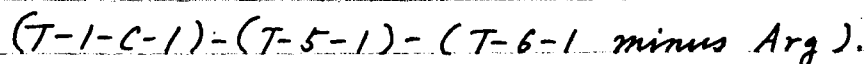
RCM-BBIのC末端は CPase A, B 消化で -Lys-Glu-Asn とわかれた。このうち -Glu-Asn は T-8-2 に相当し、-Lys-Glu-Asn は T-C の C 末端部分に相当する。従って上記の結果は次の様にまとめられる。



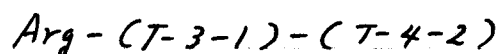
キモトリプシンによる2つの断片のうち、F-L は CPase 消化し、-Ala-Leu なる断片を得た。これはその蛋白のC末端と一致せず、F-L のアミノ側にあったことを示す。従って、2つの断片の順序は (F-L)-(F-S) とする。

F-L 部分の ハフチドの配列

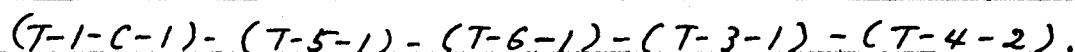
CB-I のみにホモセリンがあるため、CNBr のフラグメントは (CB-I)-(CB-II) の順になり Met を含み T-6-1, Cys-Ser-Asp-Met-Arg, かの2つのフラグメント間を連結することになる。CB-I のアミノ酸組成から、CB-I の配列は



CB-II の Edman 分解でこの断片が T-6-1 の Arg から始まり、次の 9 残基が T-3-1 に対応することからわかった。更に F-L の C 末端 $\rightarrow$ L-Ala-Leu は CB-II のそれと同じであり、またこれが T-4-2 に対応することから CB-II の構造は

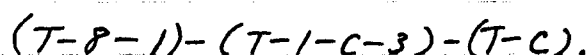


となる。従って F-L 中の $\text{H}^{\circ}\text{F}^{\circ}\text{A}^{\circ}\text{T}^{\circ}$ の配置は、

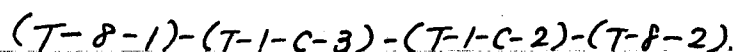


F-S 部分の $\text{H}^{\circ}\text{F}^{\circ}\text{A}^{\circ}\text{T}^{\circ}$ の配置

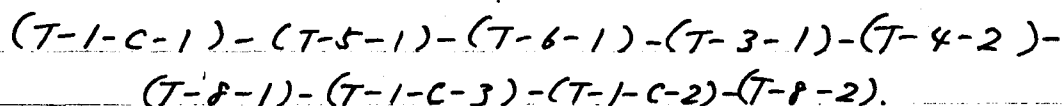
F-S の N 末端部分は Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln で T-8-1 に相当する。また、F-S の C 末端部分は そのインヒビター-のそれと同じなので、T-C が F-S の C 末端部分に配される。この結果残るのは T-1-C-3 のみであり、F-S の構造は



T-C は [T-1-C-2] と [T-8-2] から成ることを考慮するとこの構造は



と書き得る。以上の結果から全トリプレン $\text{H}^{\circ}\text{F}^{\circ}\text{A}^{\circ}\text{T}^{\circ}$ の配置は次の様になる。



この配置にそつづいたインヒビター-の全一次構造を次ページ Fig. 7 に示す。

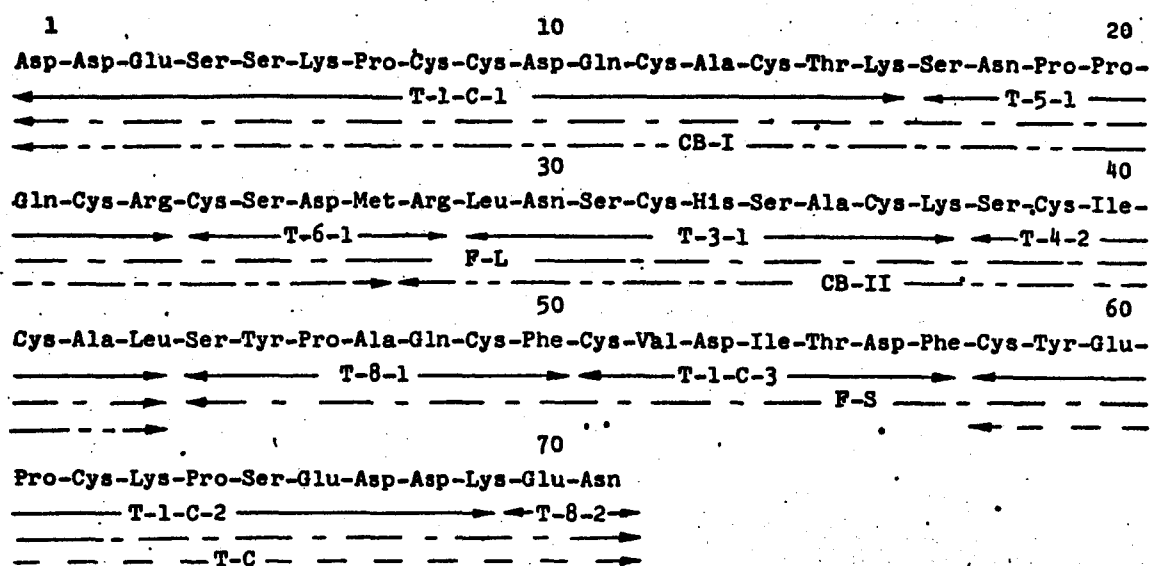


Fig. 87. Bowman-Birk イニヒターの一次構造

プロテナーゼ阻害活性部位

Table 6, 7 のアミノ酸組成と全構造からトリプシンとチモトリプシンに対する阻害活性部位はそれぞれ Lys(16)-Ser(17) 及び Leu(43)-Ser(44) と推定される。これを確かめるためプロテナーゼで限定分解し、生じた新しい C 末端残基 Leu(43) や Lys(16) を CPase A 又は B で除去、阻害活性を測定した。結果を Table X に示す。

Table X. プロテナーゼ処理 BBI の阻害活性

		Inhibitory activity against	Carboxypeptidase treatment ²⁾					
			None Preincubation (min)			CPase treated Preincubation (min)		
			2 ¹⁾	30	900	2	30	900
Chymotryptic modification	Control ¹⁾	Chymotrypsin	100	100	100	100	97	103
		Trypsin	100	100	100	—	—	—
	Modified	Chymotrypsin	34	68	104	4	11	17
		Trypsin	104	—	104	—	—	—
Tryptic modification	Control ¹⁾	Chymotrypsin	100	100	—	—	—	—
		Trypsin	100	100	—	100	102	97
	Modified	Chymotrypsin	100	100	—	—	—	—
		Trypsin	86	98	—	44	44	34

¹⁾ Inhibitor treated under the same conditions for the proteinase modification except for the omission of enzymes. ²⁾ Inhibitory activity of control samples under this condition was taken as 100%. ³⁾ Carboxypeptidase A or B was used for chymotryptic or tryptic modifications, respectively.

1) 7つの場合も CPhase 処理により著しい失活がみられ、これらの残基が阻害活性に大きく寄与していることが推定される。

考察

ハフ・4つの Bio-Gel による Gel 透過は極めて効果的で、分子量以外の種々の要素で分離が行われる様である。一般にトリプトン・ハフ・4つは、別の特異性の酵素で主として蛋白質を消化し、いわゆる overlapping peptide を分離してその順序を決めるのが常法であるが、本研究では、蛋白質分子の断片化を組合せて一義的に配列し得た。

Fig. 8 からわかる様に、このインヒビター・の 71 残基のうち 49 残基は、*Lima bean* のインヒビター・(87) の 11 の相同若しくは極めて類似したハフ・4つ部分に配置できる。また C 末端部分を互いによく似ており、両者の相違は、*Lima bean* インヒビター・の N 末端に 10~12 残基程の余分なハフ・4つが付加している点のみであると云える。

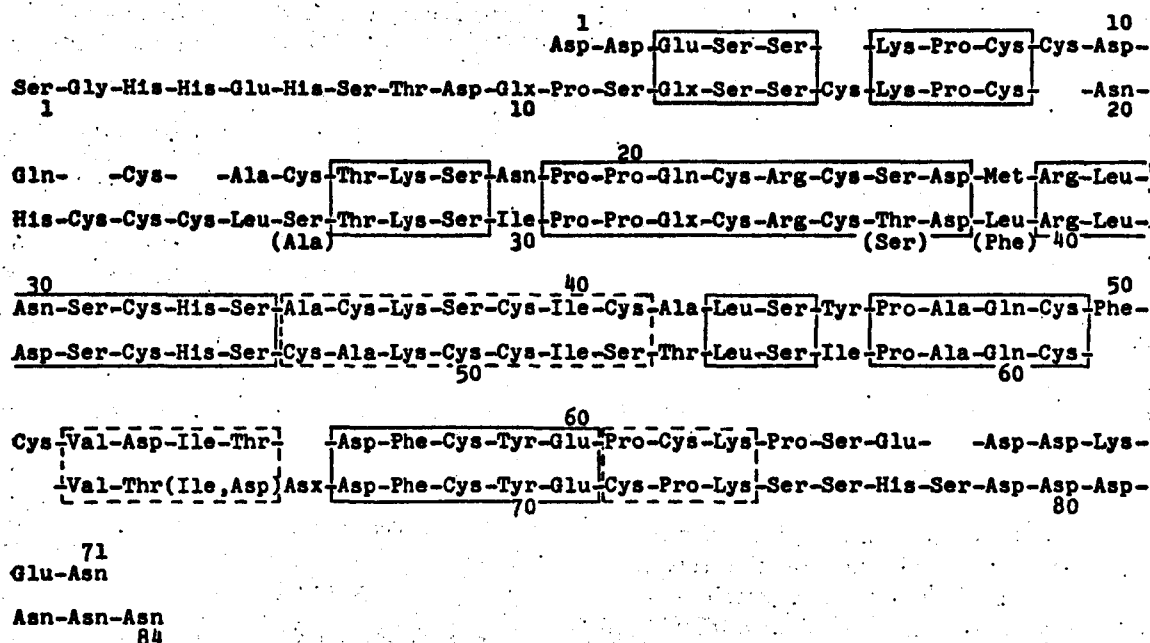


Fig. 8. BBI と *Lima bean* インヒビター・の一次構造の比較。

 ... 同 - の 構 造 ... 同 - の 組 成

二つのインヒビターの対応した位置にある残基のいくつかは互いに異なっているが、その側鎖の性質はそれ程ちがっていない様である。

活性部位 *Leu-Ser* と *Lys-Ser* は *lima bean* と相同と考えられ、この二つのインヒビターは極めて近い関係にあると云える。

キモトリフィンには80%限定分解は殆んど定量的にすぎ、キモトリフィンでは約20%が *intact* のまま残った。しかし一般に *lysoyl-X* を活性部位にキモトリフィンインヒビターは *Arg-X* を持つものより限定水解が行われ難いとされているが(17)、BBIの場合には *Arg-X* の場合と同程度に限定水解が行われることがわかった。

BBIのアミノ酸配列について極めて特徴的なことは、二つの阻害活性部位周辺の配列が互いに極めてよく似ていることで、これは *lima bean* のインヒビターについて推定されたが、BBIでは特に顕著で Fig. 9に示す様にキモトリフィン阻害活性部位を含む残基 9~26 とキモトリフィン阻害活性部位を含む残基 36~53 の二つの部分は、18残基中9残基までが全く同一であり、特に5箇つつの半シスチン残基の位置は厳密に一致している。

このことはBBIが、それぞれの活性部位を含む二つの大きなヘリックス部分から成ることを示している。更にこれ等の部分は互いに干渉しない様な空間配置に構っているものと考えられる。

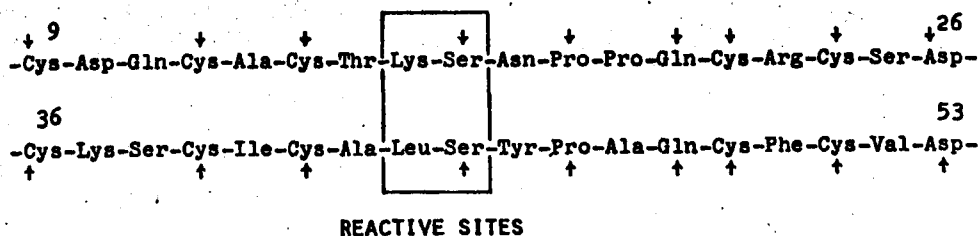


Fig. 9. BBIの二つの阻害活性部位周辺のアミノ酸配列の繰返し。

より興味あることは落花生のトリフィンインヒビターの一次構造は *lima bean* や BBI とは殆んど共通しているが、唯一ヶ所、BBIにおける *Lys-Ser-Asn-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg-Cys*、*lima bean* インヒビターの *Lys-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg* と酷似した配列、*Arg-Ser-Asx-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg* が見出され、この構造が活性発現に重要ではないかと予想させる。

第2部 Bowman-Birk インヒビターの S-S 結合の決定

第1部において述べた様に Bowman-Birk インヒビター (BBI) など植物性インヒビターの あるものは、比較的 低分子量 ($\leq 10,000$) でありながら例外的に多数の S-S 結合をもちいる。これ等は 高分子量 (20,000 前後)、低シスチン含量の別の一群のインヒビターと際立った対照をなしている。前者は、熱、酸、酵素消化に対して強い抵抗性をもち、多数の S-S 結合が非常に強固な構造を形成しているものと考えられる。

更に一次構造の分析から明らかなる如く、BBI は 2つのプロテアーゼに対する阻害活性部位周辺の アミノ酸配列、特に半シスチン残基の配列が繰返しと云える程に類似していることから、高次構造形成に重要な働きをする S-S 結合を決定することは、インヒビター分子の構造を知る上に必須と思われる。

また同じダイズ種子から得られる Kunitz トリプシンインヒビターの構造が既に報告されており (18)、このものがもう一つのグループに属している。又二つのダイズインヒビターを S-S 結合に関して比較する興味も考えられる。

本実験では まず BBI をカビの酸性プロテアーゼとサーモライシンで消化し S-S 結合を 1つ含む シスチン・ペプチドを 4種 (3つの S-S 結合に対応) と 4つの S-S 結合を含む 大きなフラグメントを得た。このものは更にプロテアーゼで消化し 1つの S-S 結合を決め、またプロテアーゼとスファテリシンによる同時消化で S-S 結合を 2つ含むフラグメントを得、残りの S-S 結合が消去法的に推定された。この S-S 結合を 2つ含むフラグメントは硫酸で部分水解して構造を決め、BBI の全 7個の S-S 結合の位置を知ることができた。

実験材料及び方法

インヒビターは配列分析に用いた標品と同一のものである。

使用した酵素のうち、*Aspergillus niger* var. *macrosporus* の産生する酸性プロテアーゼ Type A は生化学工業(株)より購入した。

微生物のプロテアーゼによる BBI の消化と消化物の分画

5 μ moles の BBI を 5 ml の水に溶解し (pH 1.8) 2 mg の酸性プロテアーゼで 37°C 24 時間消化後、pH を 6.5 に上げ、2 mg の L-ソライシンを加え同じ温度で 48 時間消化したあと Bio-Gel P-10 カラム (1.5 $\times$ 201 cm, 0.1 M 酢酸) で分画した。

β - β 結合を 4 つ含む大きなフラグメントの酵素消化

β - β 結合を 4 つ含む大きなフラグメント (Fig. 1 にある Fraction B) はまずプロテアーゼで消化した。1.12 μ mole のフラグメントに 0.2 mg の Pronase P を pH 6.5 で 40°C 6 hr 更に 30°C 12 hr 消化後 Bio-Gel P-4 カラム (1.5 $\times$ 201 cm, 0.1 M 酢酸) で分画した。この操作で β - β 結合が 1 つ決定されたか残りの β - β を決めるため、フラグメントをプロテアーゼとスフチリシンで徹底的に消化した。2.5 μ moles のフラグメントを上記と同じ条件で 0.6 mg のプロテアーゼ、0.2 mg のスフチリシン BPN' と消化し同じカラムで分画した。

硫酸分解

プロテアーゼ、スフチリシン同時消化により得られた β - β を 2 つ含むフラグメントは -Cys-Cys- 結合をもち、酵素消化を受けない為 Ryley (19) の方法で 10N 硫酸による部分分解を行った。

2.4 μ moles のフラグメントを 0.7 ml の硫酸 (10N, 約 10^{-3} M のチオグリコール酸とジスルフィド転移を防ぐ為含む) と 100°C 40 分加熱し、硫酸を Amberlite CG-4B カラムで除いた後、Bio Gel P-2 カラム (1.5 $\times$ 150 cm) にのせ 0.1 M 酢酸で溶出、分画した。

シスチンハフチドの検出

ゲル濾過により分画されたフラクションは NaBH_4 で β - β 結合を還元した後 5,5'-Dithio(bis-2-nitrobenzoic acid) [DTNB] で発色させ、シスチンハフチドを

検出した。

すなわち、50~100 μ l のサンプルに 1M NaBH₄ (in 0.1M NaOH) を加え室温で 1 hr 還元後過剰の還元剤を塩酸で分解した後濃厚な Tris 緩衝液 (2M, pH 8.2) 2" pH を 8 付近に合わせた。これに DTNB 溶液を加え 412 m μ で比色した。

シスチンハフオートの収率計算

シスチンハフオートの量はアミノ酸分析で求め、分析に用いた部分のみを補正した。出発物質のうち、酸性プロテアーゼとサモライレンで十分消化された部分を 100% とし、シスチンハフオートの収率をこれに基づき計算した。

アミノ酸分析、アミノ酸配列分析

これ等は第 1 部に記した方法で行った。

結 果

BB1 の酸性プロテアーゼとサモライレンによる消化の分画で Fig. 1 に示す(次頁)。A~G の 8 フラクシオンにシスチンが含まれることがわかった。

アミノ酸分析の結果 A はそのインヒビター N, C 末端数残基が欠けたもの、フラクシオン B は 8 つの半シスチン残基 I, II, III, IV, V, VI, XIII, XIV* を小さく互に大きなフラグメントであることが示された。

フラクシオン C, D, E からは 3 つの δ - δ 結合, VII-IX, VIII-XII, X-XI に対応する 5 種のシスチンハフオートが得られた。

フラクシオン F と G とはかなり不均一で組成的には、D, E から派生したものと見られ、詳細な分析はしなかった。

δ - δ 結合 VII-IX

フラクシオン E の電気泳動により得られた 2 種のハフオート E-3, E-6** が VII-IX に対応する A: とが次の如く示された。

* ローマ数字は N 末から順に 14 個の半シスチン残基を表わす。

** アラビア数字は電気泳動における移動の順序(一側から)を示す。

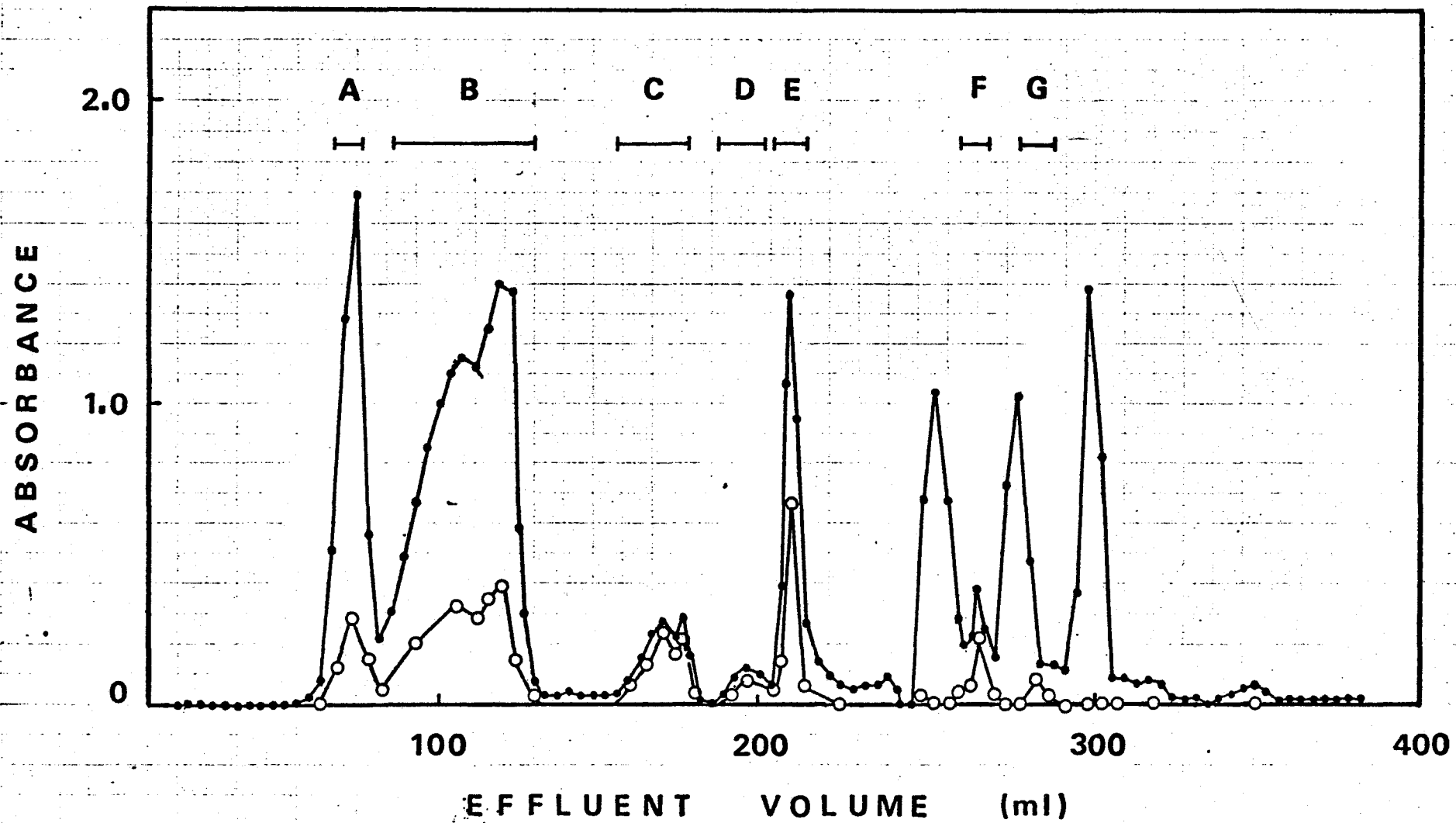


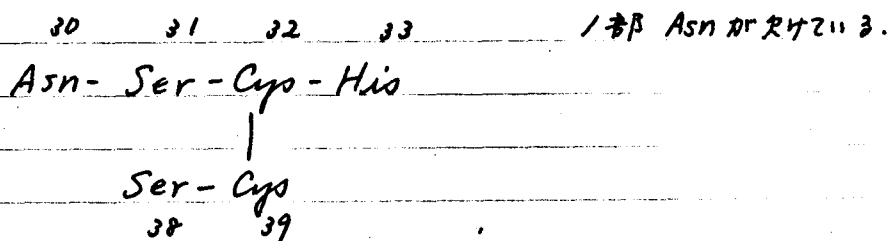
Fig. 1. Bio Gel P4 から 3 酸性プロテアーゼ・サモライシン消化物の分離
 —●— 230 nm の吸収 (ハ・フ・4ト) —○— 412 nm の吸収 (システイン)

γ-L-シスチン ノボナト E-3 を過硫酸酸化し生じた シスチン酸 ノボナト E-3A, E-3B を 濾紙電気泳動で分離後 N末端を Edman 分解消滅法で決定し その量比のどの部分に由来するかを調べた。結果を Table I に示す。

Table I. N-N 結合 VII-IX (1). ノボナト E-3 の構造分析の結果。

Amino acid	E-3	E-3 A		E-3 B	
		Edman		Edman	
		Before	After	Before	After
Cysteic acid		1.25	1.00	1.00	1.00
Aspartic acid	0.76 (1)	0.50	0.09		
Serine	2.36 (2)	1.00	0.63*	0.68	0.14
Half-cystine	2.00 (2)				
Histidine	0.99 (1)	0.75	0.82		

E-3 の構造



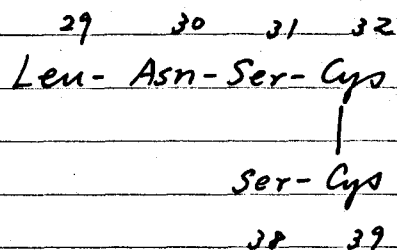
同様の手続で E-6 の構造を次の如く解析した。

Table II. N-N 結合 VII-IX (2) ノボナト E-6 の分析結果

Amino acid	E-6*	E-6 A		E-6 B	
		Edman		Edman	
Cysteic acid	(0)	1.05	1.36	1.00	1.00
Aspartic acid	(1)	1.00	1.00		
Serine	(2)	0.92	0.97	0.91	0.11
Half-cystine	(2)				
Leucine	(1)	0.91	0.10		

* 過硫酸酸化前に17 C末端に由来するハフチド Asp-Lys-Glu-Asn と分離された。

E-6 の構造



これらのハフチドの収率は全部で28%であった。

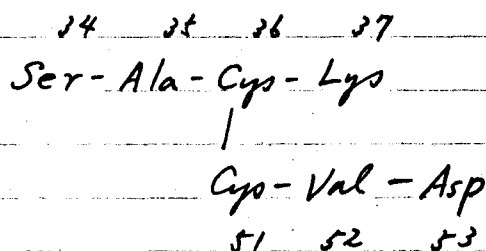
S-S 結合 VIII-XII

フラクション C から得られた C-3 の分析結果を Table 3 に示す。

Table III

Amino acid	C-3	C-3 A		C-3 B	
		Edman		Edman	
		Before	After	Before	After
Cysteic acid		1.15	1.36	1.00	0.19
Aspartic acid	1.04 (1)				
Serine	0.78 (1)	0.58	0.11		
Alanine	1.00 (1)	1.00	1.00		
1/2 Cysteine	1.81 (2)				
Valine	0.93 (1)			1.16	1.17
Lysine	0.90 (1)	1.00	1.04		

C-3 の構造

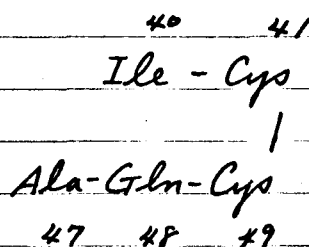


このハフチドの収率は54%であった。

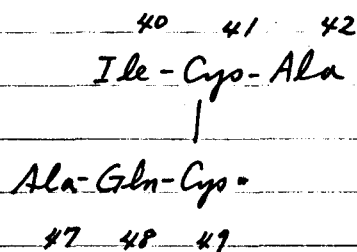
S-S 結合 X-XI

フラクション D から得られた D-2 の分析結果を表 IV に示す。

Amino acid	D-2	D-2 A Edman		D-2 B Edman	
		Before	After	Before	After
Cystic acid		1.17	1.19	1.00	1.00
Glutamic acid	1.00 (1)	1.00	1.00		
Alanine	1.00 (1)	0.92	0.17		
Half-cystine	1.65 (2)				
Isoleucine	0.80 (1)			0.80	1.03

D-2 の構造

C のフラクションから C-4 として得られた化合物は D-2 の Alanine の 1 残基多く 次の構造とものと推定された。



D-2, C-4 の収率は合計 46% であった。

Fraction B の構造

Table V に示した アミノ酸分析値より、フラクション B は イソヒスチジン分子の残基 4 ~ 26 と 57 ~ 67 付近とに相当することが推定された。

従って、半胱氨酸残基 III, IV, V, VI, VII, VIII, IX の位置は合計 22 に

183. 過硫酸酸化後 システイン酸ハフ・4ドを分離し そのアミノ酸組成 (Table V) から Fig. 2 の様な構造が推定された。(次頁)

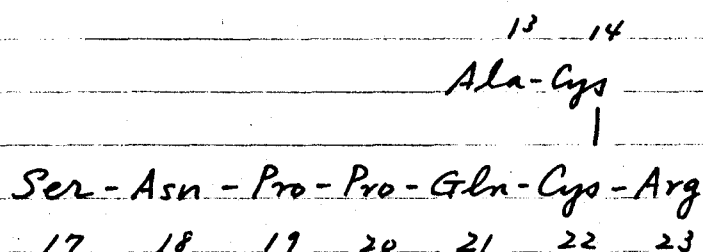
γ-γ結合 IV-V

7ラフ・3B の フロト・E 消化物を Bio-Gel P-4 で分離した結果を Fig. 3 に示す。 P-1 の部分に γ-γ結合 IV-V に対応するハフ・4ドが見出された。 分析結果を Table VI に示す。

Table VI γ-γ結合 IV-V 構造分析の結果。

Amino acid	P-1	P-1 A		P-1 B	
		Edman		Edman	
		Before	After	Before	After
Cysteic acid		1.00	1.00	1.00	1.00
Aspartic acid	1.02 (1)	1.03	0.93		
Serine	0.98 (1)	1.00	0.14		
Glutamic acid	1.12 (1)	1.03	0.89		
Proline	2.00 (2)	1.80	1.90		
Alanine	0.73 (1)			0.81	0.05
Half-cystine	1.89 (2)				
Arginine	0.65 (1)	0.90	0.85		

P-1 の構造



P-2 の部分からは 分析の詳細は 略すが 同じ γ-γ結合を有するハフ・4ドが得られた。 その構造は、

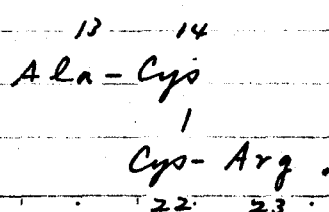


TABLE V. Amino acid composition of Fraction B and its oxidized derivatives A to H. The nearest integers are in parentheses. Recoveries are calculated on the basis of Fraction B oxidized with performic acid.

Amino acid	Fraction B	Cysteic acid peptide							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Cysteic acid		2.14 (2)	1.20 (1)	1.23 (1)	2.22 (2)	6.48 (6)	1.00 (1)	2.91 (3)	1.00 (1)
Aspartic acid	2.84	1.05 (1)		1.10 (1)	0.92 (1)	2.66 (3)		0.87 (1)	
Threonine	0.77	0.82 (1)				0.96 (1)			
Serine	3.24	1.01 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	1.02 (1)	2.63 (3)		0.79 (1)	
Glutamic acid	3.49	1.00 (1)	1.93 (2)	1.87 (2)	1.23 (1)	1.79 (2)		0.93 (1)	
Proline	4.72	1.86 (2)	2.00 (2)	1.86 (2)	2.00 (2)	3.18 (3)		1.00 (1)	
Alanine	1.01					1.05 (1)			0.79 (1)
Half-cystine	7.74								
Tyrosine	0.77		0.75 (1)	0.58 (1)					
Phenylalanine	0.93						0.97 (1)		
Lysine	2.81	0.80 (1)	0.85 (1)	0.80 (1)		1.96 (2)		0.78 (1)	
Arginine	1.00	1.00 (1)			0.80 (1)	1.00 (1)			
Recovery		29 %	39 %	46 %	16 %	18 %	60 %	45 %	50 %

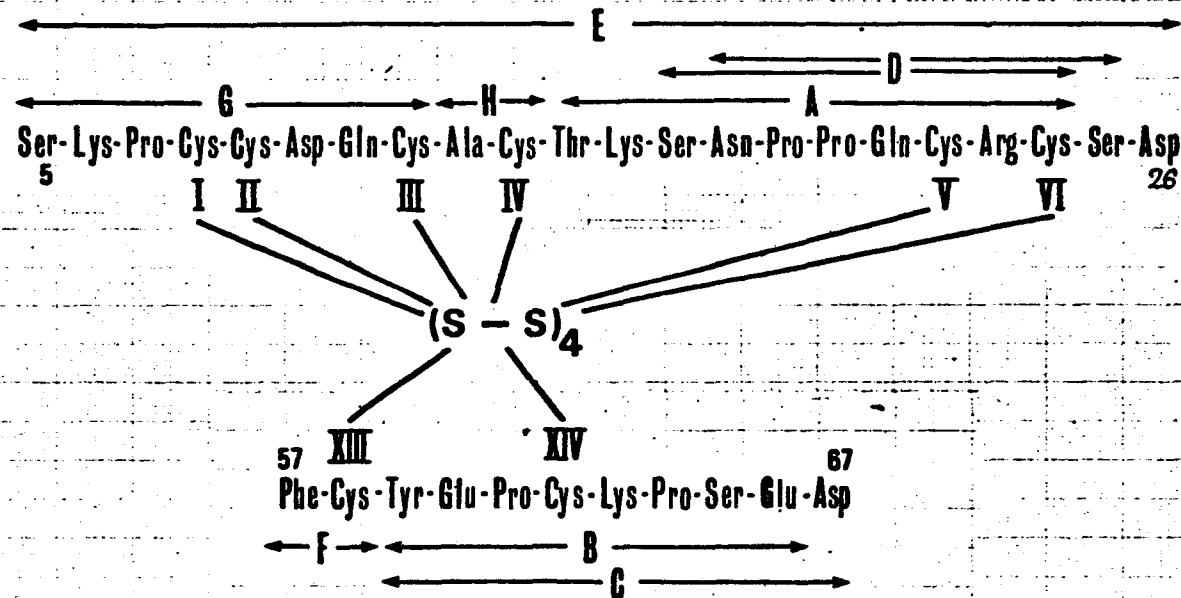


Fig. 2 Fraction B の構造

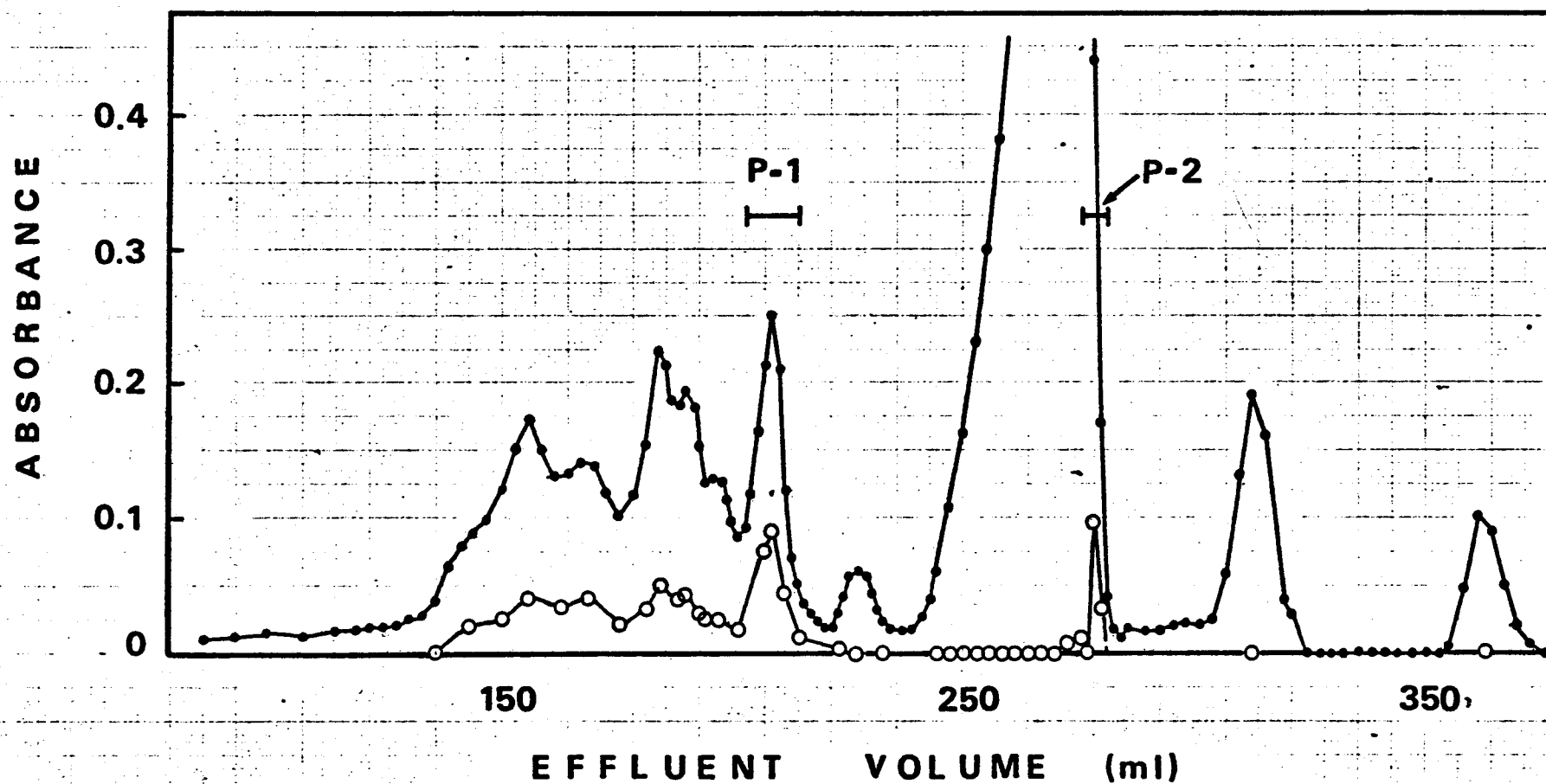


Fig. 3. フラクシオンBのプロナセ消化物の Bio-Gel P-4 柱上に示す分画

● 230 nm の吸光度 ○ 412 nm の吸光度(システイン)

これ等の1074トの収率は62%であった。

N-S 結合 I-IV, II-VI, III-XIII

残り3つのN-S結合を決める為、フラクションBをプロナーゼとステファリシンとで消化しゲル中過により分画した。(Fig. 4).

PN-1 は N-S 結合 2つを含むフラグメントで (N-S)₂-fragment と呼ぶ。

フラクションBと同じ手法で構造を分析した結果を Table VII, Fig. 5 に示す。
(次頁)

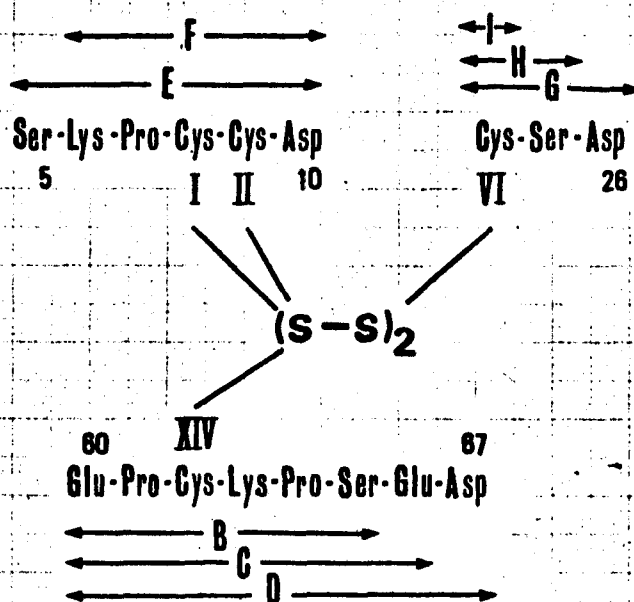


Fig. 5. (N-S)₂-fragment の構造

この段階で 残りの半システイン残基は、III と XIII のみであり、この2つが N-S 結合で 結びつけていたものと結論された。

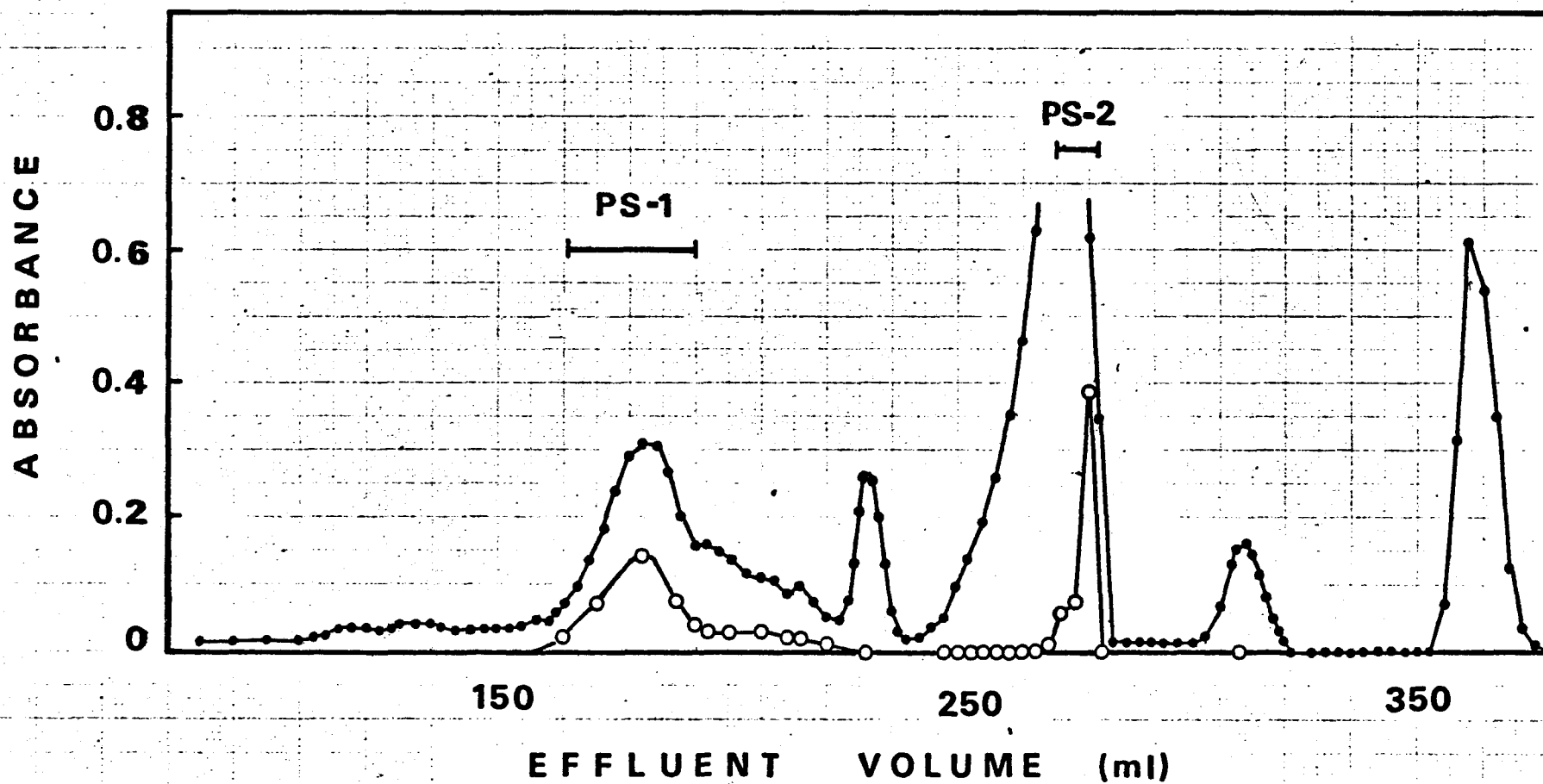


Fig. 4. フラクションの フロナーゼと スブチリシンに 対する 消化物の Bio-Gel P-4 カラム に 対する 分画

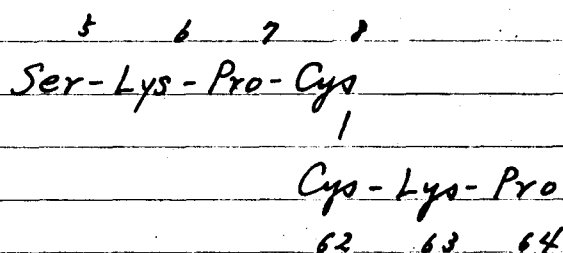
—●— ヘパード (230 nm の 吸収度) —○— システイン (412 nm の 吸収度)

TABLE VII. Amino acid composition of (S-S)₂-fragment of PS-1 fraction and its oxidized derivatives. The nearest integers are in parentheses. Recoveries are calculated on the basis of the fragment oxidized with performic acid.

Amino acid	PS-1	Cysteic acid peptide								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Cysteic acid		1.34 (1)	1.15 (1)	1.13 (1)	1.25 (1)	2.00 (2)	2.26 (2)	0.88 (1)	1.12 (1)	1.00 (1)
Aspartic acid	1.14				1.05 (1)	0.82 (1)	0.95 (1)	1.00 (1)		
Serine	2.37	0.90 (1)	0.92 (1)	0.93 (1)	0.92 (1)	0.92 (1)		1.01 (1)	1.00 (1)	
Glutamic acid	1.40		1.00 (1)	1.72 (2)	1.89 (2)					
Proline	3.00	1.25 (1)	2.03 (2)	2.00 (2)	2.00 (2)	1.08 (1)	1.24 (1)			
Half-cystine	4.08									
Lysine	1.86	1.00 (1)	0.98 (1)	0.82 (1)	0.92 (1)	0.89 (1)	1.00 (1)			
Recovery		4%	25%	14%	6%	27%	8%	17%	5%	21%

(γ - γ)₂-fragment の中の Cys-Cys 結合は酵素学的には切断されず、硫酸部分水解を用いた。水解物の Bio-Gel P-2 に 13 分画を Fig. 6(2) に示す。このうち (γ - γ) 結合が Cys(I) — Cys(XIV) 間にかかっていることを証明する 3 種のハフチドが SA-2 と 3 のフラクションから精製された。

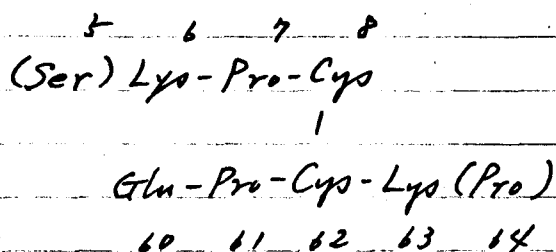
このうち SA-2-1 は塩基性であるが酸化後も電気泳動では中性の単一スポットを与えた。組成は Cys(O₂H) 2.05, Ser 0.82, Pro 1.72, Lys 2.00 と考えられ、アミノ酸分析計を用いたハフチド分析では、2つの成分に分離された。酸化後中性である点とを考慮すると SA-2-1 は次の様に推定される。



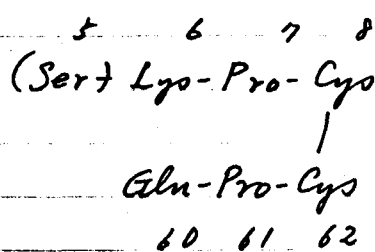
残る 2つのシスチンハフチドの酸化後の成分の組成を Table VII に示す。

Amino acid	SA-2-3		SA-3-5	
	A	B	A	B
Cysteic acid	1.02 (1)	1.09 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)
Serine	0.47*		0.48*	
Glutamic acid		1.00 (1)		0.87 (1)
Proline	1.00 (1)	1.51* (1)	1.14 (1)	1.13 (1)
Lysine	0.91 (1)	1.08 (1)	0.80 (1)	

SA-2-3 の構造



SA-3-5 の構造



* 端数は () で示した残基の割合に付加したハフチドの存在を示すと思われる。

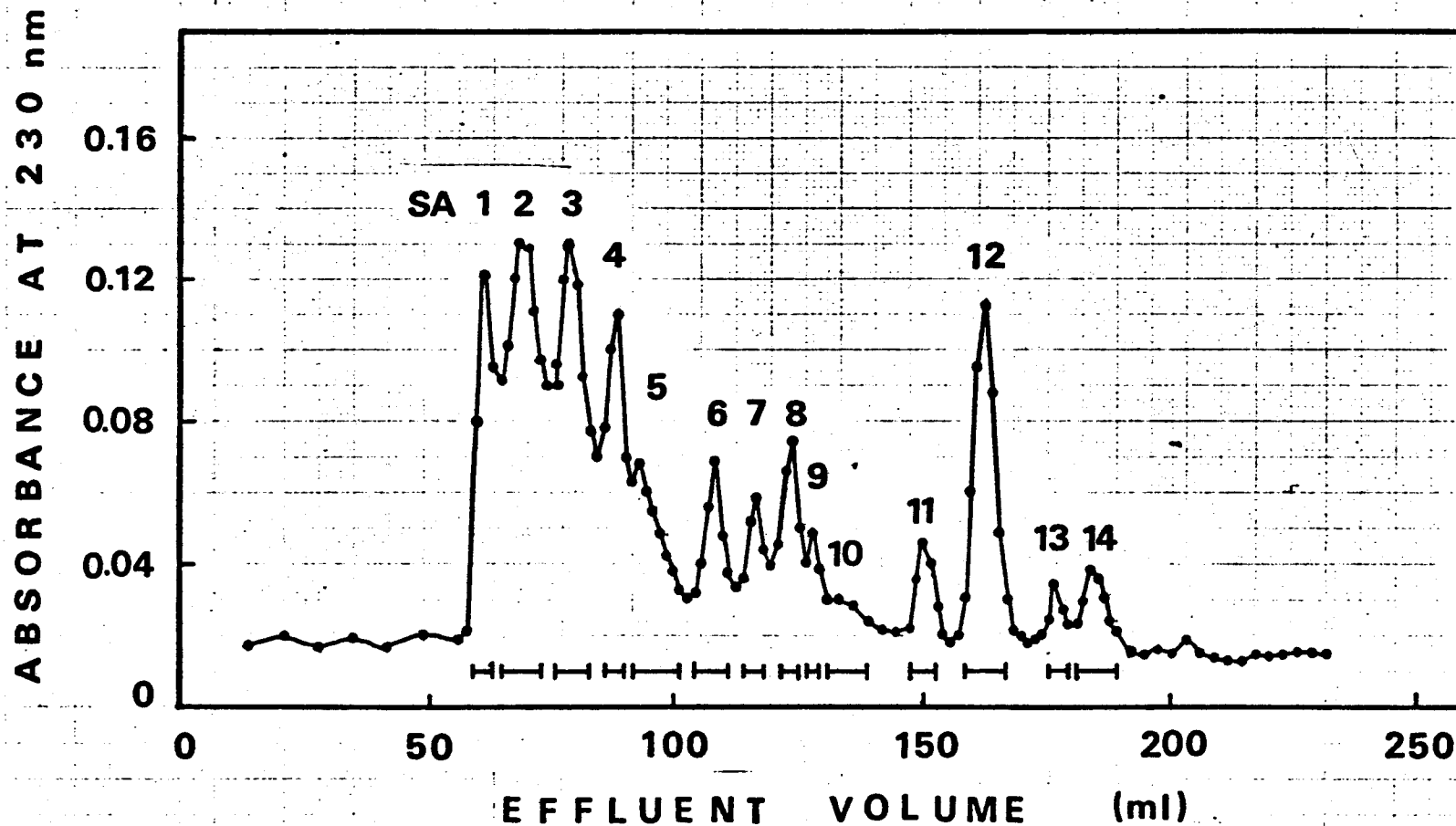


Fig. 6. $(D'-S)_2$ -fragment (Fig. 4のPS-1)の硫酸分解物のBio-Gel P-2に於ける分離

考察

実験の各段階で β - β 結合の交換を最小に抑え シスチンヘフチドの収率を最大にする様 細心の注意が払われた。結果として β - β 交換は検出される程には起っていないと結論された。

BBI は プロテイナーゼ インヒビターであるため、中性では 全く消化をうけず、酸性プロテイナーゼでまず消化してから 中性で サモライシン消化する方が、非常に効果的であった。特に この 酵素系は $-Cys-X-Cys-$ の配列において 2つの半シスチン残基間の ヘフチド結合を切断する場合 有効で、BBI 中の 4つの $-Cys-X-Cys-$ 中 切断されなかったのは $-Cys-Arg-Cys-$ のみであった。

DNTB とシスチンの検出に用いる方法を開発したが、本研究では 大変有効であった。本方法は 今までに報告されたものに比し 操作が 簡単で、blank が低く且つ安定しており、linearity も秀れているため、特に感度は 高くはないが、微量のサンプルで、確実に β - β を 検出できることが示された。

通常 単離した シスチンヘフチドの アミノ酸組成のみで その構造が 推定できるが BBI の場合は シスチン酸ヘフチドへの酸化と、その N末端分析が 不可欠であった。例えば、 $[Cys(O_2H), X]$ の組成の ヘフチドは $Cys-X$ と $X-Cys$ の双方の可能性があり、D-2A の如き $Ala-Gln-Cys(O_2H)$ 、(残基番号 47-49) は 組成からでは $Gln-Cys(O_2H)-Ala$ 、(残基番号 11-13) と 区別できない。

本研究の結果は、図 7 に示した如く、この二価性インヒビターの 際立った 対称的構造を 持っていることを 強く支持している。そして 3つのヘフチド主鎖は、もっと複雑な高次構造へと 折りたたまれているはずであるが この Covalent Structure には、インヒビター分子の興味ある 立体構造を示唆する いくつかの特徴が見出される。

BBI は 殆んど 同じ大きさで構造の 2つのヘフチドのかたまりから成っている。1つは トリプシン阻害部位、 $Cys(8) \sim Cys(24)$ plus $Cys(59) \sim Cys(62)$ 。それと キモトリプシン阻害部分、 $Cys(32) \sim Cys(51)$ であり、この 2つは 2本のポリヘフチド鎖で 互に結合されている。この 2つのヘフチド鎖は $Ser(25) - Ser(31)$ と $Val(52) - Phe(57)$ で 7 或いは 6 残基より成る。

トリプレン阻害部分は N , C 末端部分の余分なハフチドをもっている。このプロテアーゼ阻害部分は殆んど同じ構造をもっている様に思われる。すなわち、それぞれ阻害活性部位は 1 つの β - β 結合で形成される 9 残基のハフチド ループ 中にあり、このループ^に別の 9 残基のループが続き更に 10 残基 (トリプレン阻害部分) 或いは 8 残基 (キモトリプレン阻害部位) のループが続く。この連続した 3 つのループが インヒビターとして要求される特別の構造を形成していることが考えられる。

第 1 部に記した如く、BBI の一次構造には 顕著な繰返しが存在する。特に 2 つの活性部位周辺の 5 つずつの半胱氨酸残基の分布は全く同一であった。従って、これ等の半胱氨酸残基間にはやはり同一の組合せが期待されたが、Fig. 8 に示す如く、この期待に合致した結果が得られた。

上記のトリプレン、キモトリプレン阻害部位周辺の配列と β - β 結合の相同性は、その高次構造に反映し、両者は殆んど同一の立体構造をもっているものと考えられる。何故なら、両者は互いに類似した三次元構造をもつプロテアーゼと結合するからである。

特に最近 Leary と Laskowski Jr. (Laskowski Jr. 私信) は、グイズの Kunitz トリプレンインヒビターの活性部位 アルギニン残基を酵素的にトリプトファンで置換することに成功した。このトリプトファンを活性部位に持つインヒビターは、トリプレンを阻害せず、強かにキモトリプレンを阻害した。この結果はトリプレン、キモトリプレンインヒビターの両者に要求される立体構造は本質的には同一で、阻害の特異性が、活性部位の残基の種類で主として決められることを示しており、上記の BBI の構造についての推定を支持していると思われる。

2 つの阻害活性部位は 2 本のポリハフチド鎖で結合合されているが、このインヒビターがトリプレンとキモトリプレンと同時に Complex を形成することから、このハフチド鎖は 2 つの活性部位を含むハフチド部分を空間的に離し、互いに干渉しない様保持しているものと推定される。

本結果の対して、トリプレン阻害部分に付加したハフチド鎖の役割については分らないが、BBI の C 末端部分 3 残基とカルキレキハフチンで

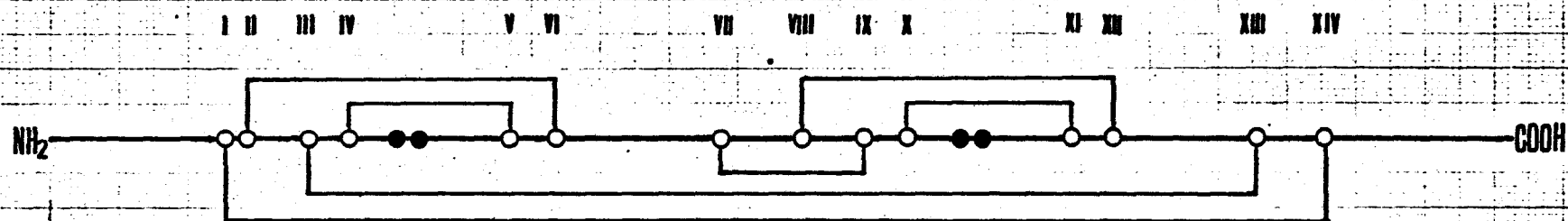


Fig. 8. Bowman-Birk Inhibitor における β - β 結合の配置

○ 半システニン残基

● 活性部位残基

除系にて失活しないこと(20), 極めて良く似た *lima bean* インヒビターと N末端部分配列が大巾に異なっている点(7)などから この2本のヘプタドは インヒビター活性にはそれほど重要でないと考えられる。

一般にトリプシン インヒビターの活性部位は α - β のループ中にあるとされているが BBI の場合にそこにあてはまり、更にキモトリプシンに特異的な阻害活性部位もやはり同様の α - β ループ中に存在することが示された。

BBI の小さい活性部位ヘプタドループ(9残基)は同じサイズの Kunitz インヒビターの48残基から成る大マジュールと対照をなしている。分子量とシスチン含量の相違が、活性部位ループの大さきにも反映している様である。

lima bean インヒビターのアミノ酸配列は BBI と大変よく似ており(7) 更に、両者は化学、物理化学、生物学的にも似ているため、半シスチン残基の分布は若干異なっているが、特徴的は活性部位周囲の α - β 結合が Fig. 9 に示す如く期待される。

同様に才1部で述べた如く、落花生のインヒビター(8)に、BBI や *lima bean* インヒビターの活性部位と同様の配列をその部分があり、やはり Fig. 9 に示す様な α - β 結合が仮定される。

本研究の結果は、いわゆる "multi-headed inhibitor" の構造の一般的モデルを示唆している。すなわち、1つ1つの阻害活性部位を含む相同なポリヘプタドループがいくつか相互に重り合われ様々に組合せられ形をとっているものと思われる。

Tan と Stevens(7) が示唆した様にこれらの多価インヒビターは原始的な1価のインヒビターから *internal gene duplication* とそれに続く *mutation* の結果進化してきたものと想像される。

13 [24
-Ala-Cys-Thr-Lys-Ser-Asn-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg-Cys-
40 51
-Ile-Cys-Ala-Leu-Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln-Cys-Phe-Cys-

-Cys-Cys-Leu-Ser-Thr-Lys-Ser-Ile-Pro-Pro-Glx-Cys-Arg-Cys-

-Cys-Cys-Ile-Ser-Thr-Leu-Ser-Ile-Pro-Ala-Gln-Cys-Val-Thr-

14 23
-Cys-Arg-Ser-Asx-Pro-Pro-Glx-Cys-Arg-Ala-

Fig 9. 植物起源のプロテナーゼインヒビターの活性部位周辺の構造

要約

1. ガイスの Bowman-Birk インヒビターの一次構造とトリプトシンとキモトリプトシンに対する阻害活性部位を明らかにした。
2. インヒビター分子の7つの N-N 結合を決めこの分子が、その機能に合致した特異な構造を有していることを示した。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導御高配を賜り、
新潟大学医学部教授 池中徳治先生、大阪大学理学部教授
松島祥夫先生に心から感謝申し上げます。

また種々御助言を頂戴し、出武比古博士、北川新潟大学生化学
第2教室、大阪大学理学部松島研究室の謝兄姉に深く感謝致します。

文献

- 1) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* 29 149 (1946).
- 2) D.E. Bowman, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 63, 547 (1963).
- 3) Y. Birk, A. Gertler and S. Khalef, *Biochem. J.*, 87 281 (1963).
- 4) M. Yamamoto and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, 62 141 (1967).
- 5) V. Frattali, *J. Biol. Chem.*, 244, 274 (1969).
- 6) D.B.S. Millar, G.E. Willick, R.F. Steiner and V. Frattali, *J. Biol. Chem.*, 244 281 (1969).
- 7) L.G.L. Tan and F.C. Stevens, *Eur. J. Biochem.*, 18 515 (1971).
- 8) K. Hochstrasser, K. Illchmann and E. Werle, *Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem.*, 351, 1503 (1970).
- 9) K. Ozawa and M. Laskowski, Jr. *J. Biol. Chem.*, 241 3955 (1966).
- 10) Y. Birk, A. Gertler and S. Khalef, *Biochim. Biophys. Acta* 24, 402 (1967).
- 11) V. Frattali & R.F. Steiner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 480 (1969).
- 12) J. Krahn and F.C. Stevens, *Biochemistry*, 9 2626 (1970).
- 13) D.H. Spackman, W.H. Stein and S. Moore, *Anal. Chem.* 30 1190 (1958).
- 14) S. Iwanaga et al. *Eur. J. Biochem.*, 1, 189 (1969).
- 15) A.M. Crestfield, S. Moore and W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, 238 622 (1963).
- 16) B. Kassell, "Methods in Enzymology," ed. by G.E. Perlman & L. Lorand. Acad. Press, New York, Vol. 19, p. 853 (1970).
- 17) R.W. Sealock and M. Laskowski, Jr. *Biochemistry*, 8, 3703 (1969).
- 18) T. Koide, S. Tsunawawa and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, 71 165 (1972).
- 19) A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith and R. Kitai, *Biochem. J.* 60 541 (1955).
- 20) Y. Birk and A. Gertler, "Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors," ed. by H. Fritz and H. Tschocke, Walter de Gruyter, Berlin and New York, p. 142 (1971).