

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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。これは生物にとり重要な意味をもつことか予想
されるがその生理機能や阻害反応機構は未だ明らかでない。

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)はこの固分からトリプシンと
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 インヒビターをその
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た。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 N-S 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 N-S 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。

才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 還元蛋白の N-S 結合を還元カルボキレニル化 (RCM 化) 後 トリプシン消化し得られた 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、或種のトリプシンインヒビターに 触媒量のトリプシンと酸性 (pH 3~4) で作用させると インヒビターの活性に影響は無く、一箇所のアルキニン結合がとれること、更に このアルキニンとカルボキレハフチド-β (C-Pase B) とより、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シンインヒビターがアルキ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 天然のトリプシンインヒビターは 極度に露出した

アルキニン 又は リジン 残基を その 阻害活性部位と して 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 キモトリフィン インヒビターについて 調べられ、Birk (10) は BBI に 酸性で 微量の キモトリフィン 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 キモトリフィンを 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 キモトリフィンによる 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 トリフィンと キモトリフィンの インヒビターの 活性部位 ハフチド結合が 酸性領域で 同等のプロテアーゼ により 極めて 水解されることを 示唆していると考えられる。従って 本研究において 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 グイス種子から 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 のトリフィン消化と ハフチドの単離

約 4.3 μmole の 基質を 500 μg の TPCK 処理トリフィンを用いて pH 8.0 37°C 4hr の条件で 消化後 Bio Gel P-4 カラム (1.5 x 220 cm, 0.2 M 酢酸アンモニウム, pH 9.1) で 分離し 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% の TLCK キモトリプシン 或いは TPCK-トリプシン と室温で 24 時間前後 反応させ 常法に於て還元カルボキシフィル化後 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如く この蛋白に欠けているグリレンが全く検出されず 臭播造決定に使用し得るものと見られる。文献値 (16) には若干組成の異同が認められ 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 のトリプシンノブチド

Bio-Gel P-4 カラムにより 次頁の Fig. 1 に示す T-1~T-8 の 8 フラグメントが得られ 更に電気泳動で精製した結果 次頁 Table II に示す 7 つの ノブチドが得られた。これらは上記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 ^{b)}	1.92	2	2
Ser ^{b)}	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.

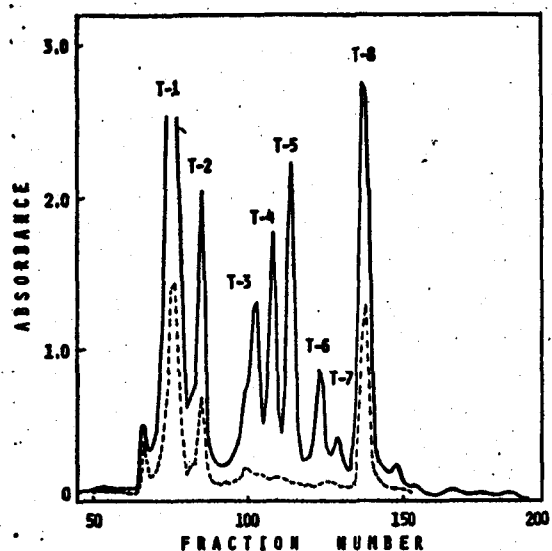


Fig. 1. Fractionation of the tryptic digest of RCM-BBI on Bio-Gel P-4. The digest (1.5 ml) was applied to a column (1.5x220cm) and eluted with 0.2M ammonium acetate, pH 9.1, at a flow rate of 1.5 ml per hr; 1.8-ml fractions were collected. Solid line shows the absorbance at 226m μ (light path, 5 mm) and broken line at 280m μ x2 (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 α - γ - L -グルタミン酸の混合物とわかり、その γ キモトリプシンで消化した。消化物の Bio Gel P4 からによる分画の結果を Fig. 2, α - γ - L -グルタミン酸のアミノ酸組成を 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。

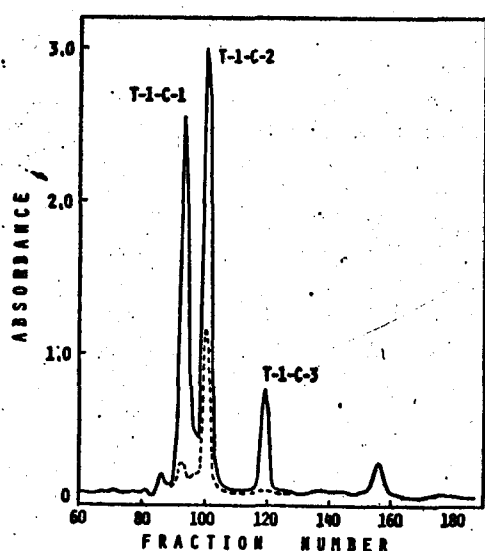


Fig. 2. Gel filtration of the chymotryptic digest of the fraction T-1 on Bio-Gel P-4. The column and eluant were the same as described in the legends for Fig. 1. The flow rate was adjusted to 2.0 ml per hr, and 1.2-ml fractions were collected. Peptides were detected at 226 $m\mu$ (—) and at 280 $m\mu \times 2$ (----). 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 α - γ - L -グルタミン酸が 2 次的に分解されて生じたと考えられる α - γ - L -グルタミン酸が若干得られた。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 が双方に含まれることから推定され、これは配列分析の結果と矛盾しない。

Table IV トリプシン消化に83
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.

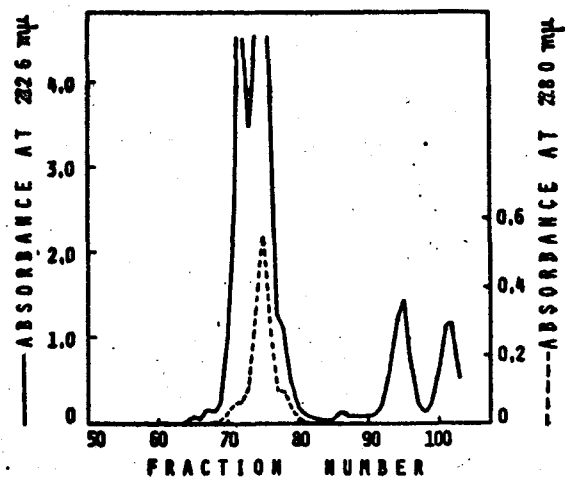


Fig-3 RCM-BBIのトリプシン-キモトリプシン
消化物からのペプチド T-C の分離
カラ: Bio Gel P-4 (1.5x220 cm)

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 のトリプシンと 140 μg のキモトリプシンで消化後、ゲル濾過を行った。Fig. 3 の結果を得た。

ペプチドの分離が十分であったため、目的のペプチドから Tyr 残基を今と異に着色し、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 に示す如く予想された組成より、Asp, Glu から 1 残基ずつ多いことがわかった。

トリプシ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℃ に 7% フェニルチオヒドントイン (PTH) 誘導体と 12 時間反応し得た。C 末端残基は、C 末端消化により確認した。結果を

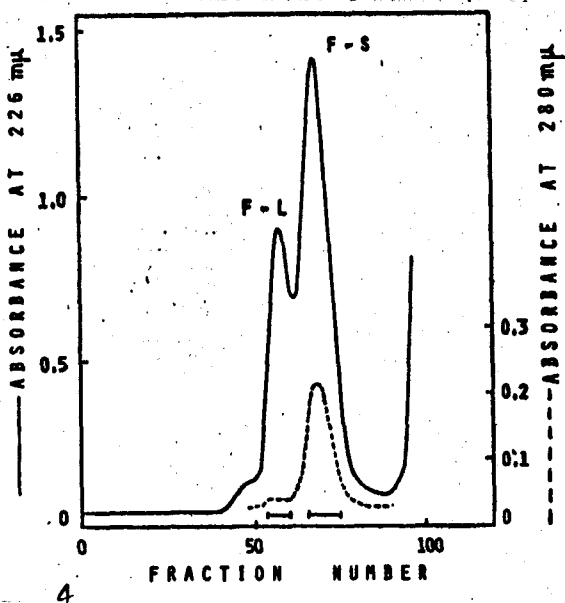


Fig. 4. BDIのトリプトファン限定分解物の RCM化後の Sephadex 650 に 5% グラフト-757 の結果。

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

Table VI. トリプトファンに 5% グラフト-757 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 II を示しているのは 2 つのインピーグである。

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。両者の組成の和が元のインピーグのそれと一致するから、やはり一箇所でトリプトファン結合の切断がおこったことがわかる。

また F-S-T の組成はトリプトファンに 5% グラフト-757 の F-L-C-1 に一致している。

CNBr に 5% F-L の分解

トリプトファンに 5% グラフト-757 の 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

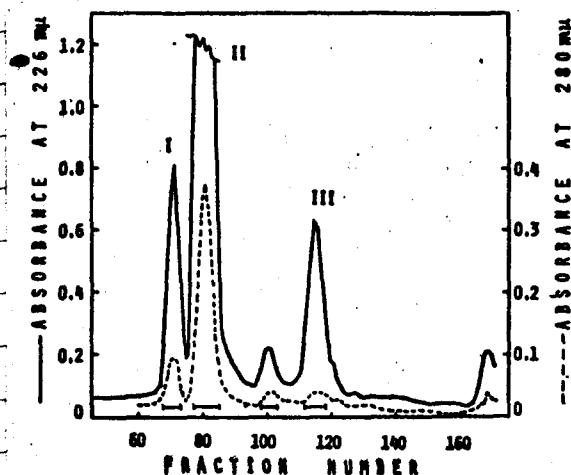


Fig. 5. トリプトファンに 5% 限定分解物の RCM化後の Bio-Gel P-10 に 5% グラフト-757 の結果。

ガラス管 1.8 x 152 cm, 溶媒 0.2M 酢酸 アモニア

Table VII. —

トリファンニニ 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	

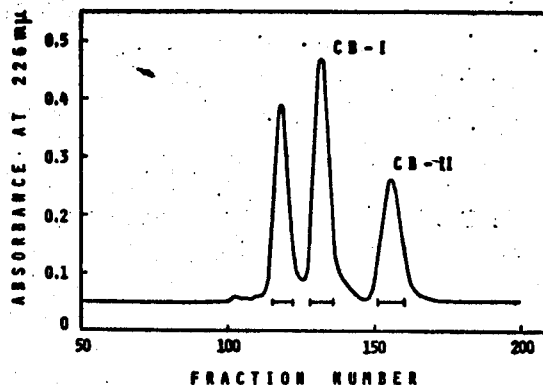


Fig. 6. フェトリファンニニ 53 断片 F-L の
プロムシアン分解物の
Bio Gel P-10 ニニ 53 分画。
カラムの条件等は Fig. 5 と
同一。

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。最初のピークは CNBr の
作用をう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 は Met の分解物である フェリリンにみられ
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

トリファンニニハフオドの順序を決定する為の
分析の結果を Table IX に示した。
まず RCM-イソヒドニニ 2 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
それについで 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 のプロムシアンニニ
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を決めるための分析結果。 → イモ分解 ← CPase 消化

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

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

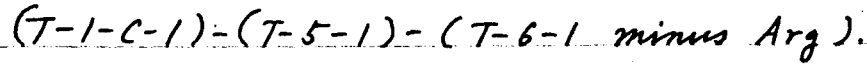
RCM-BBIのC末端はCPase A, B 消化で -Lys-Glu-Asn とわかれた。この -Glu-Asn は T-8-2 に相当し、-Lys-Glu-Asn は T-C の C 末端部分に相当する。従って上記の結果は次の様にまとめられる。



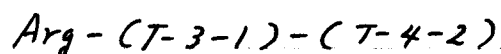
キモトリプシンによる2つの断片のうち、F-LをCPase消化し、-Ala-Leu 等の配列を得た。これはその蛋白のC末端と一致せず、F-Lのアミノ側にあったことを示す。従って、2つの断片の順序は (F-L)-(F-S) とする。

F-L 部分のハフチドの配列

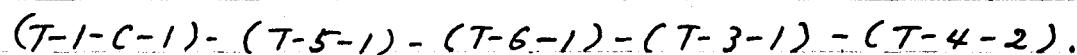
CB-I のみにホモセリンがあるため、CNBr の757反応は (CB-I)-(CB-II) の順により Met を含み T-6-1, Cys-Ser-Asp-Met-Arg, の2つのフラグメント間を連結することになる。CB-I のアミノ酸組成から、CB-I の配列は



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、それにより T-4-2 に対応することから CB-II の構造は

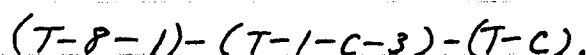


となる。従って F-L 中の Δ^7 -4 トの配置は、

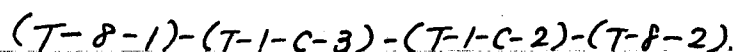


F-D 部分の Δ^7 -4 トの 配置

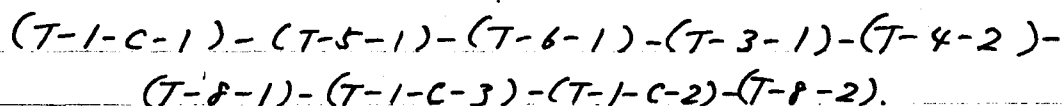
F-D の N 末端部分は Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln で T-8-1 に相当する。また、F-D の C 末端部分は そのインヒビター-のそれと同じなので、T-C が F-D の C 末端部分に配される。この結果残るのは T-1-C-3 のみであり、F-D の構造は



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トファン Δ^7 -4 トの配置は次の様になる。



この配置にそってインヒビター-の全一次構造を次ページの Fig. 7 に示す。

117例の場合も 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

117例の 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 117例は別の特異性の酵素でその蛋白質を消化し、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般的に配列し得た。

Fig. 8 からわかる様に、このインビヒター-の 71 残基のうち 49 残基は Lima bean のインビヒター- (87) の 11 の相同若しくは極めて類似した 117例部分に配置できる。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 インビヒター- の N 末端に 10~12 残基程の余分は 117例が付け加わっているのみであると云える。

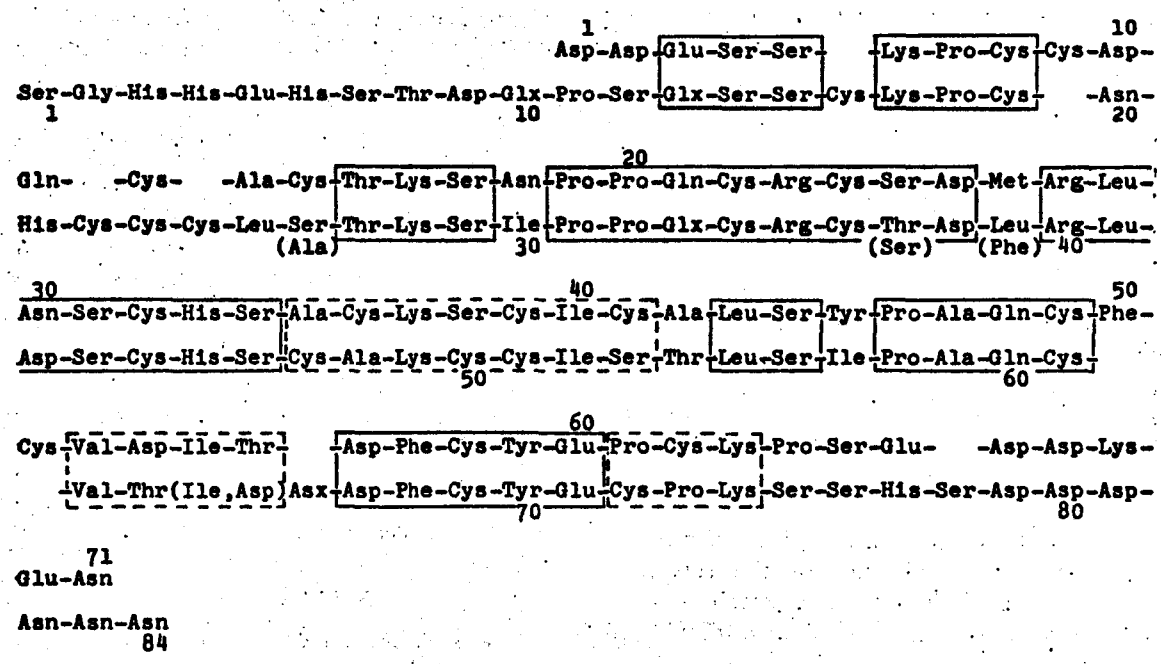


Fig. 8. BBI と Lima bean インビヒター- の一次構造の比較。

□ ... 同一の構造 ▨ ... 同一の組成

第2部 Bowman-Birk インヒビターの N-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、比較的分子量 ($\leq 10,000$) でありながら例外的に多数の N-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 N-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 N-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。

また同じグ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莫二つのグイズインヒビターを N-S 結合に関して比較する興味を考えられる。

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 N-S 結合を1つ含むシスチン・ペプチドを4種 (3つの N-S 結合に対応) と4つの N-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消化し1つの N-S 結合を決め、またプロテアーゼとスチリジンによる同時消化で N-S 結合を2つ含むフラグメントを得、残りの N-S 結合が消去法的に推定された。この N-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 N-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-セロ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 x 201 cm, 0.1 M 酢酸) で分画した。

β - β 結合を含む大分子フラグメントの酵素消化

β - β 結合を含む大分子フラグメント (Fig. 1 に示す 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 x 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、酵素消化を受けず 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を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 x 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] で染色させ、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) 中 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。

シスチンハフオドの収率計算

シスチンハフオド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チモライレンで十分消化された部分を 100% とし、シスチンハフオド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

BBI の酸性プロテアーゼとチモライレンによる消化の分画で Fig. 1 に示す(次頁) A~G の 6 フラクショ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、フラクション 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。

フラクション 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ドが得られた。

フラクション F と G とはかなり不均一で組成的には、D, E から派生したと思われる。詳細な分析はしなかった。

δ - δ 結合 VII-IX

フラクション E の電気泳動により得られた 2 種のハフオド 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示す。

** フラクション E 数字は電気泳動における移動の順序(一側から)を示す。

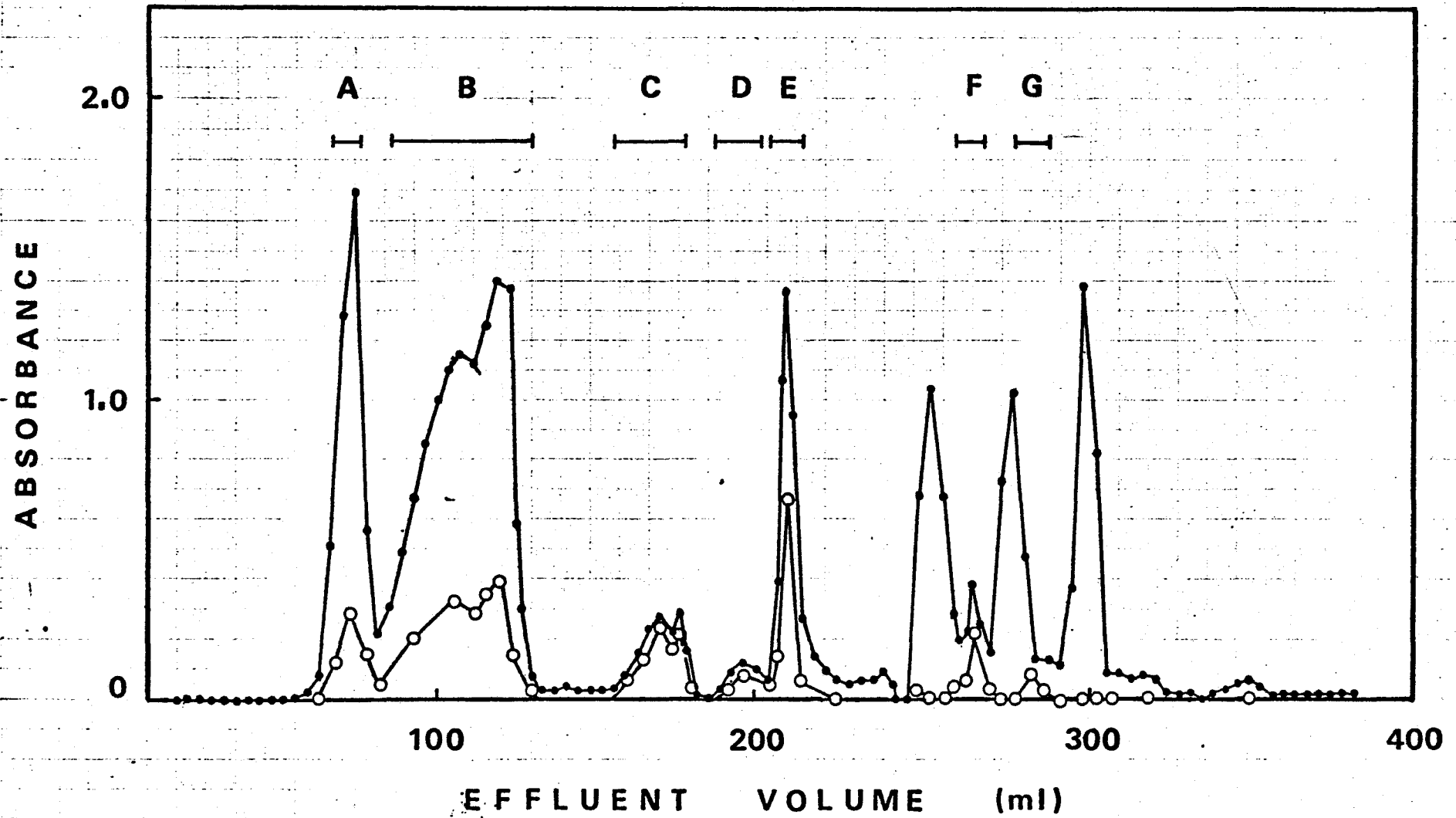


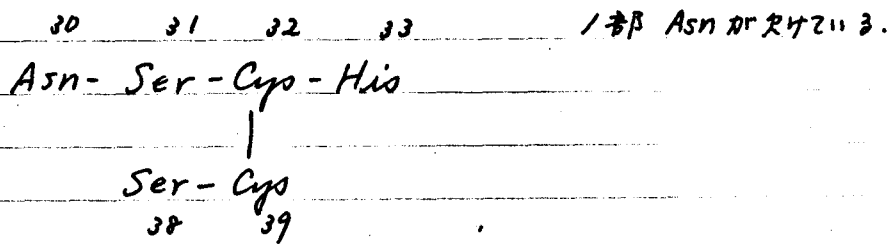
Fig. 1. Bio Gel P4 カラム に 対し 酸性プロテアーゼ・サモライシン消化物の分画
 —●— 230nm の吸収 (ハ・7・4ト) —○— 412nm の吸収 (システイン)

アミノ酸 E-3 を過酸化水素酸で酸化し生じたシステイン酸 E-3A, E-3B を濾紙電気泳動で分離後 N 末端を Edman 分解法で決定し、その電荷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). アミノ酸 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



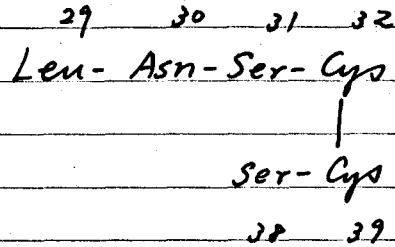
同様の手続で E-6 の構造を次の如く解析した。

Table II. N-N 結合 VII-IX (2) アミノ酸 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 C 末端に由来する N^o7⁺4⁺ Asp-Lys-Glu-Asn と分離された。

E-6 の構造



これらの N^o7⁺4⁺ の収率は全部で 28% であった。

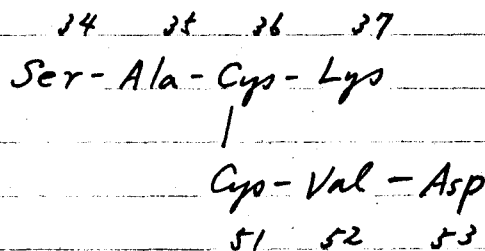
S-S 結合 VIII-XII

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		
Half-cystine	1.81 (2)				
Valine	0.93 (1)			1.16	1.17
Lysine	0.90 (1)	1.00	1.04		

C-3 の構造

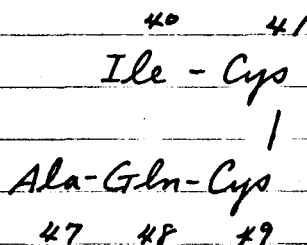


この N^o7⁺4⁺ の収率は 54% であった。

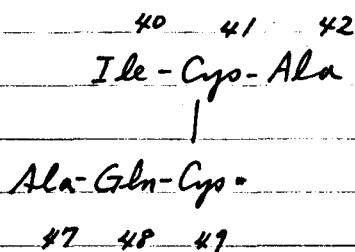
S-S 結合 X-XI

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)				
Iso-leucine	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 107.4 は D-2 の 1 Alanine の残基より 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 1267-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 9 つを合計して

13. 過酸化後 システイン酸ハフオドを分離し 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)

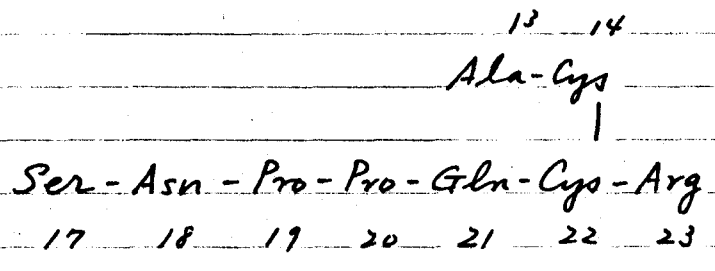
β-β結合 IV-V

777302B 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 β-β結合 IV-V に対応するハフオドが見出された。 分析結果を Table VI に示す。

Table VI β-β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 略すか 同じ β-β を含ぶ ハフオドが得られた。 その構造は、

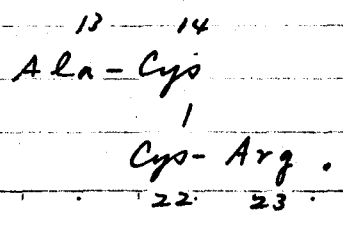


TABLE V. Amino acid composition of Fraction B and its oxidized derivatives A to H. The nearest integers are in parentheses. Recoveries are calculated on the basis of Fraction B oxidized with performic acid.

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 %

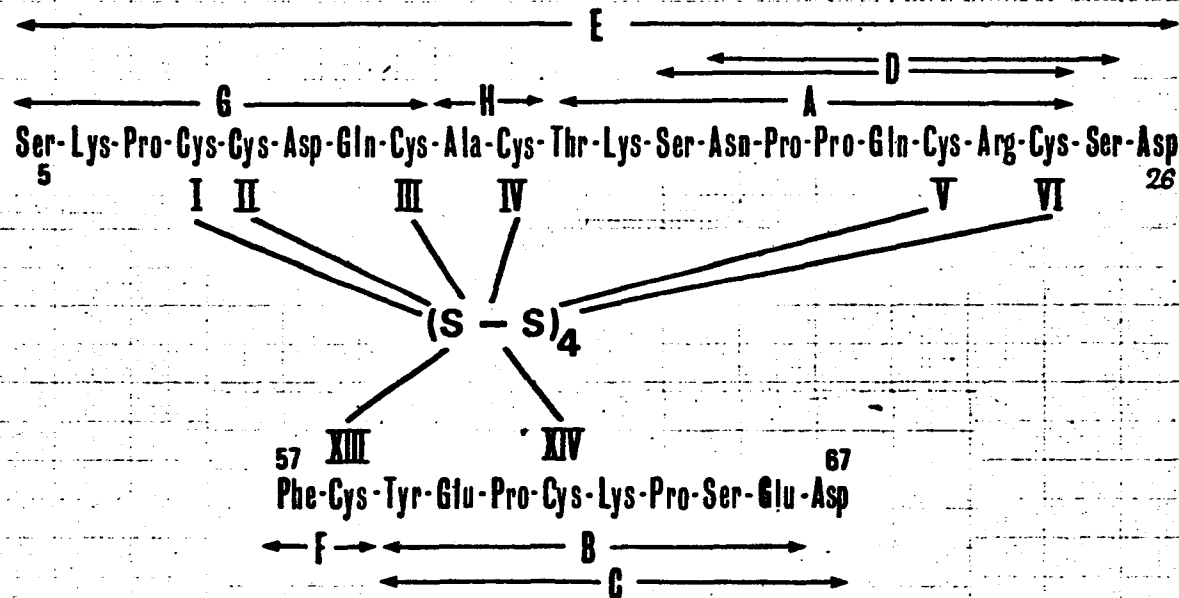


Fig. 2 Fraction B の構造

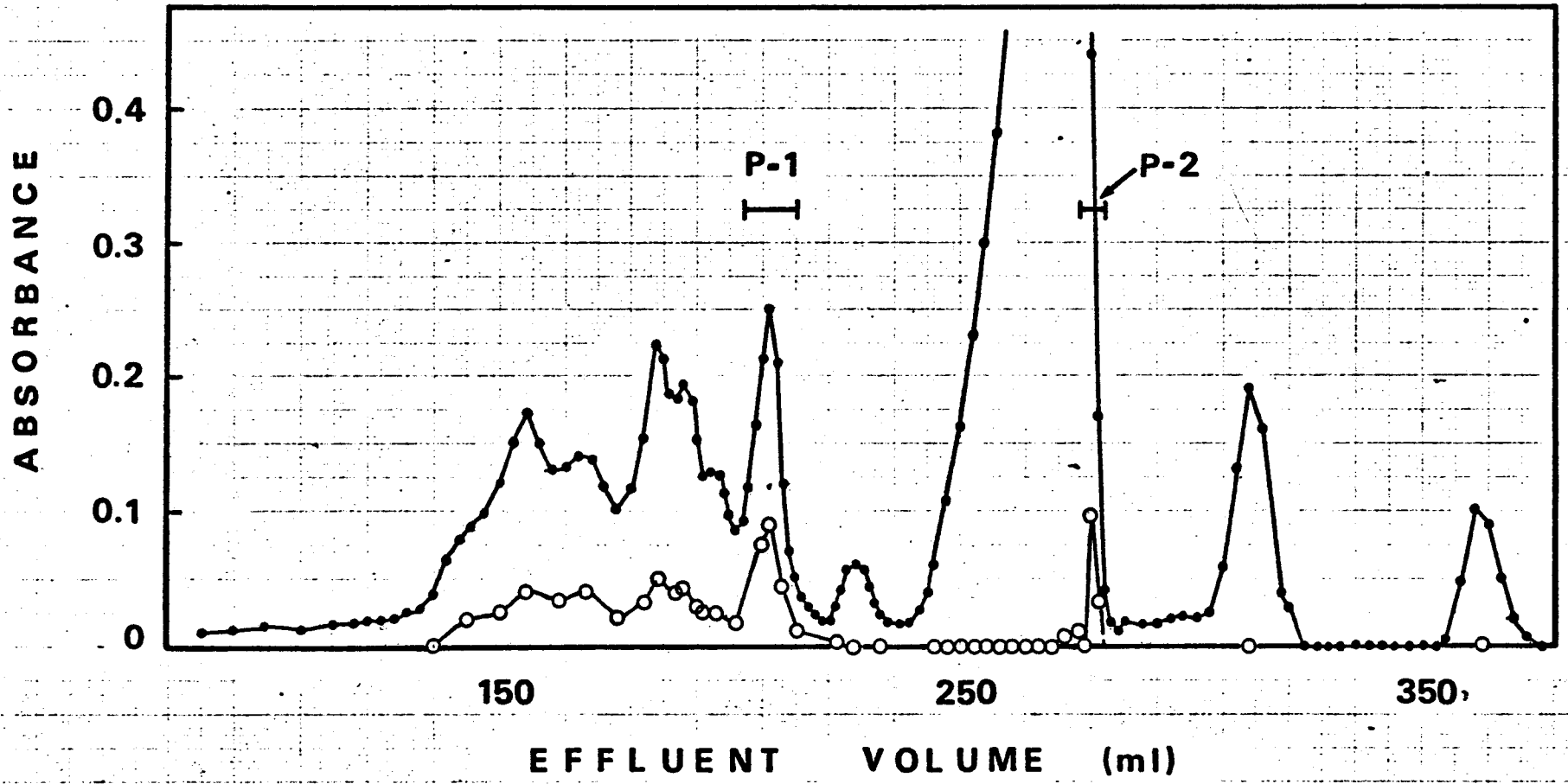


Fig. 3. 757230Bのポオセ消化物の Bio-Gel P-4 装置による分離
 ●— 230 nm の吸光度 ○— 412 nm の吸光度 (システイン)

26

これ等の107.4ドの収率は62%であった。

N-N結合 I-IV, II-VI, III-XIII

残り3つのN-N結合を決める為、フラクションBをプロテゼとステファチシンとで消化しゲル透過により分離した。(Fig. 4).

PN-1はN-N結合2つを含むフラグメントで(N-N)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)

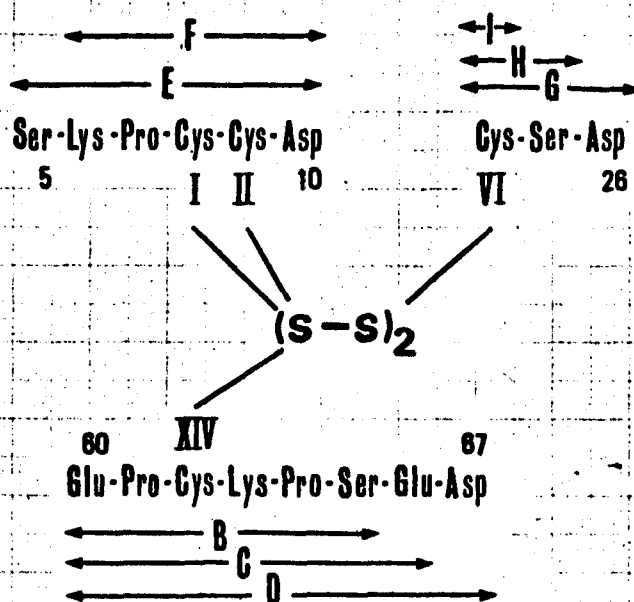


Fig. 5. (N-N)₂-fragmentの構造

この段階で残りの半胱氨酸残基は、IIIとXIIIのみであり、この2つがN-N結合で結びつけていたものと結論された。

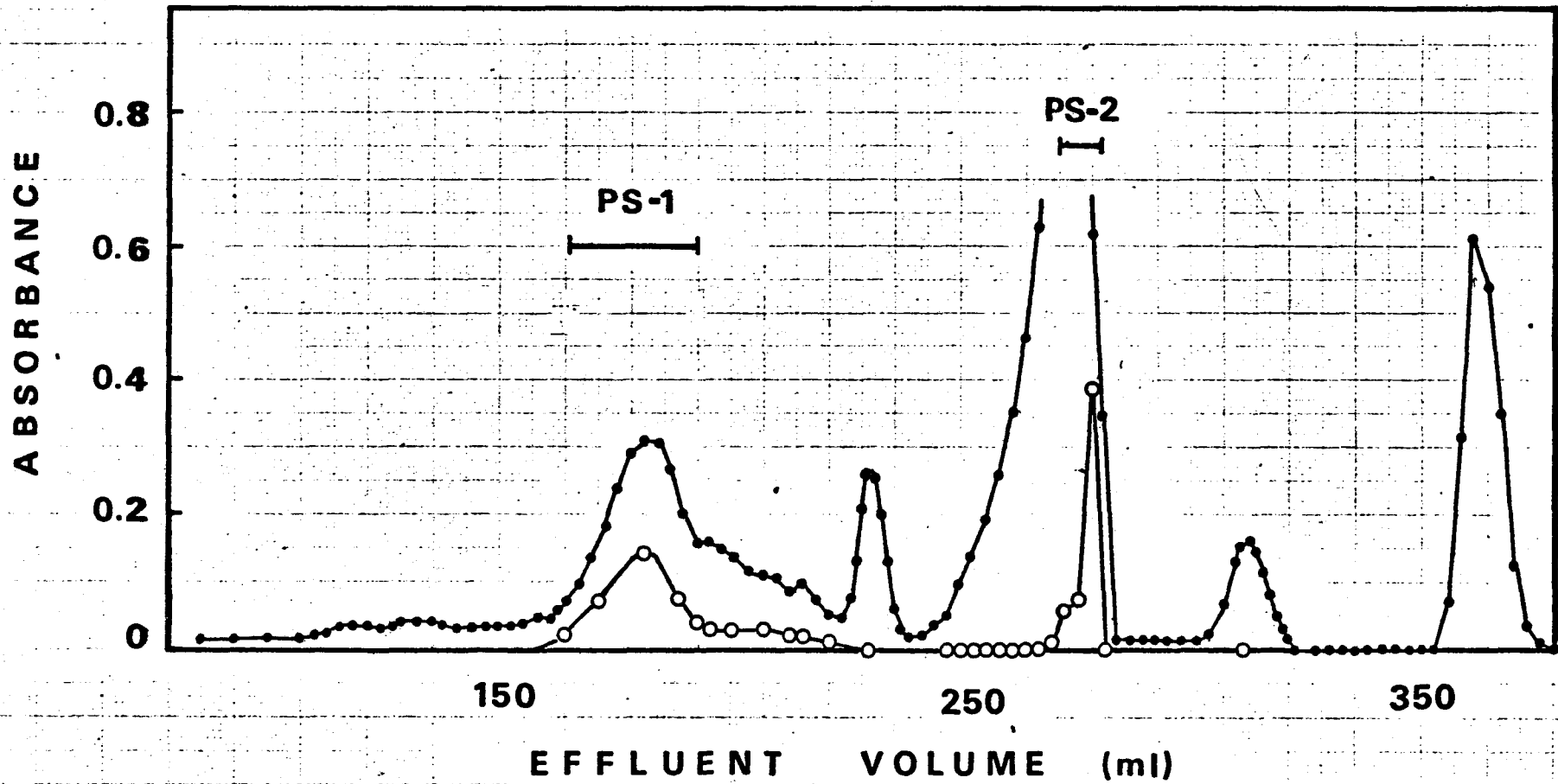


Fig. 4. フラクシヨンの フォルマゼと スブチリシンに 対する 消化物の Bio-Gel P-4 による 分離

● — フォルマゼ (230 nm の 吸光度) ○ — スブチリシン (412 nm の 吸光度)

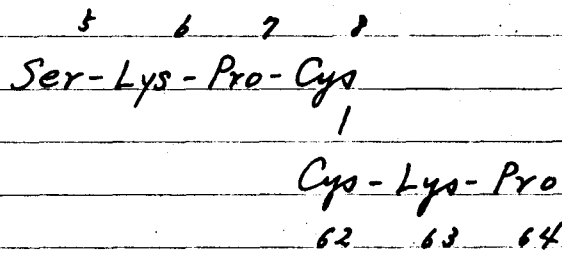
TABLE VII. Amino acid composition of (S-S)₂-fragment of PS-1 fraction and its oxidized derivatives. The nearest integers are in parentheses. Recoveries are calculated on the basis of the fragment oxidized with performic acid.

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	1114				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%

29

(N^ε-N^ε)₂-fragment 中の Cys-Cys 結合は酵素的に切断されず、
 硫酸部分水解を用いた。水解物の Bio-Gel P-2 に 83 分画を Fig. 6(2) に示す。
 このうち (N^ε-N^ε) 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。

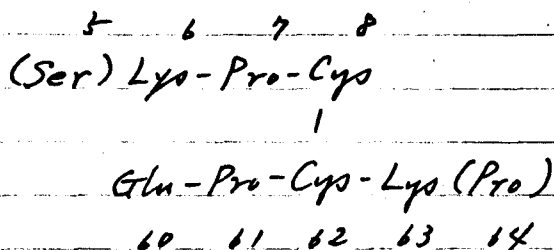
このうち SA-2-1 は塩基性であるが酸化後も電気泳動では中性の単一スポットを与えた。
 組成は Cys(O₂H) 2.05, Ser 0.82, Pro 1.72, Lys 2.00 と考えられ、アミノ酸分析計を用いたハフチド分析では、2つの成分に分離された。
 酸化後中性である臭気とを考慮すると SA-2-1 は次の様に推定される。



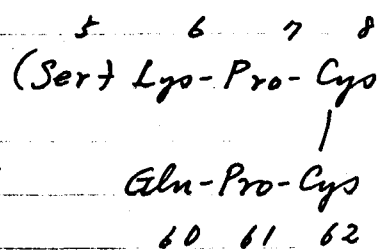
残る 2つのシスチンハフチドの酸化後の成分の組成を Table VII に示す。

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何加したハフチドの存在を示すと思われ。

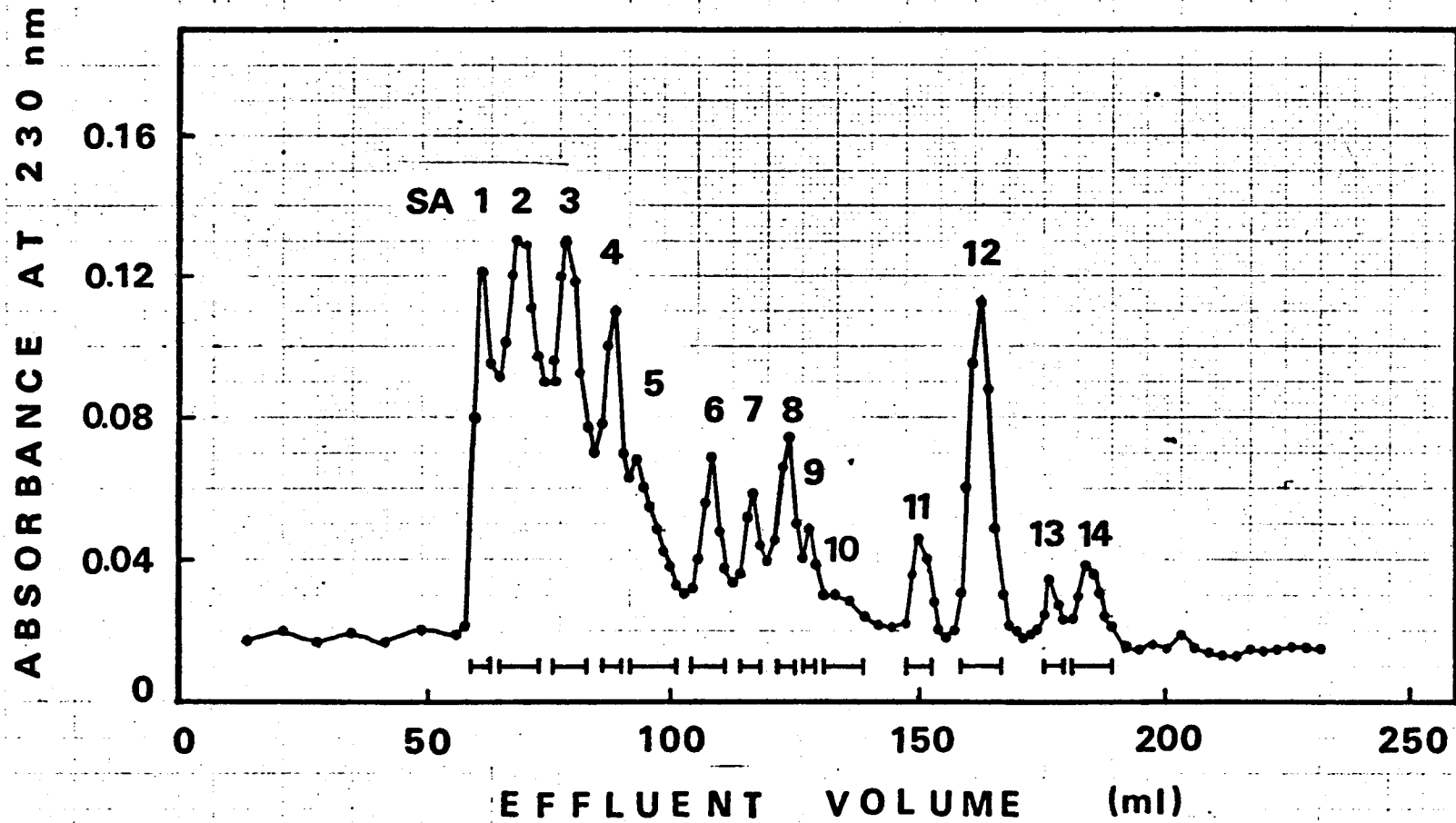


Fig. 6. $(D-S)_2$ -fragment (Fig. 4のPS-1)の硫酸分解物のBio-Gel P-2に於ける分離

これ等は いずれも $N-N$ 結合 I-XIV の存在を示してあり、全収率は 11.2% であつた。従つて残りの II-VI 間にも $N-N$ 結合が加はつてゐることは容易に結論できる。残りのフラクションの分析結果からは、この結論に矛盾するデータは得られず、上記の結論が信頼できるものと見られる。

以上の結果から、Bowman-Birk インヒビター-の全構造が Fig. 7 に示す様に決定された。

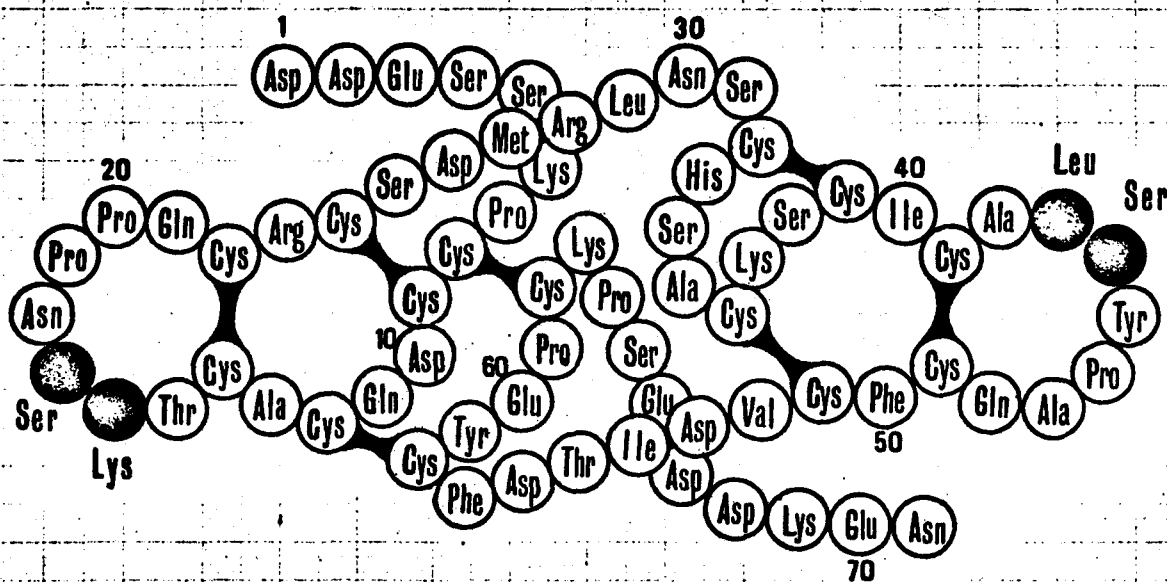


Fig. 7. Bowman-Birk インヒビター-の全構造。

トリプトファンとキモトリコニンとの阻害活性部位を黒色で示す。

考察

実験の各段階で β - β 結合の交換を最小に抑え、シスチンハ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 のプロテアーゼ インヒビターであるため、中性では全く消化をうけず、酸性プロテア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ハ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ハフチドの β 二硫組成のみでその構造が推定できるが BBI の場合はシスチンハフチドの酸化と、その N 末端分析が不可欠であった。例えば、 $[Cys(O_2H), X]$ の組成のハフチドは $Cys-X$ 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有していることを強く支持している。その 3 つのハフチド主鎖は、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 つのハフチドのかたまりから成っている。1 つはトリフリン阻害部位、 $Cys(8) \sim Cys(24)$ plus $Cys(59) \sim Cys(62)$ 。それとキモトリフリン阻害部分、 $Cys(32) \sim Cys(51)$ であり、この 2 つは 2 本のポリハフチド鎖で互に結合されている。この 2 つのハフチド鎖は $Ser(25) - Ser(31)$ と $Val(52) - Phe(57)$ で 7 或いは 6 残基から成る。

トリファン阻害部分は N , C 末端部分の余分の α -アミノ酸をえている。
 このプロテアーゼ阻害部分は殆んど同じ構造をえ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
 α -アミノ酸ループ中にあり、このループ^に別の 9残基のループが続く。更に
 10残基(トリファン阻害部分) 或いは 8残基(キモトリファン阻害部分)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。

前部に記した如く、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つづつの半胱チン残基の分布は全く同一で
 あった。従って、これ等の半胱チン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。

上記のトリファン、キモトリファン阻害部位周辺の配列と β - β 結合の
 相同性は、その高次構造にそ反映し、両者は殆んど同一の立体構造
 をえ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
 を持つプロテアーゼと結合するからである。

特に最近 Leary と Raskowski Jr. (Raskowski, Jr. 私信) は 9-アミノの
 Kunitz トリファン インヒビターの活性部位 アルキル残基を 酵素的に トリファン
 で置換することに成功した。このトリファンを活性部位に持つ インヒビター
 は、トリファンを阻害せず、強かに キモトリファンを阻害した。この結果は
 トリファン、キモトリファン 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本のホリ α -アミノ酸鎖で結合されているが、
 このインヒビターが トリファンとキモトリファンと同時に Complex を形成する
 ことから、この α -アミノ酸鎖は 2つの活性部位を含む α -アミノ酸部分を空間的
 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、トリファン阻害部分に付加した α -アミノ酸鎖の役割に
 ついては分らないが、BBIの C 末端部分 3残基と 加糖キモトリファンで

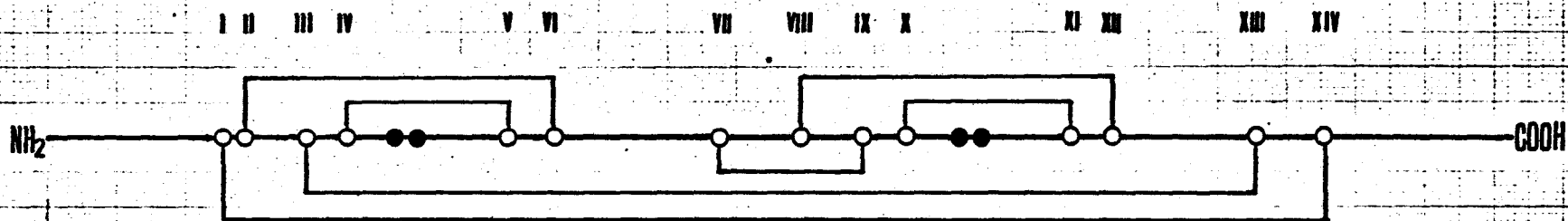


Fig. 8. Bowman-Birk Inhibitor における N-N 結合の配置

○ 半システイン残基

● 活性部位残基

35

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末端部分配列が大中に異なっている点(7)などから この2本の N74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 N-Nの12-70中にあるとされているが BBIの場合にそれにあてはまり、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 N-N 12-70中に存在することが示された。

BBIの小分子活性部位 N74ド 12-70(9残基)は同じサイズの Kunitz インヒビターの48残基から成る大分子12-70と対照をとっている。分子量とシステイン含量の相違が、活性部位12-70の大まかに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、半システイ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 N-N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 N-N結合が仮定される。

本研究の結果は、いわゆる "multi-headed inhibitor" の構造の一般モデルを示唆している。すなわち、1つ々の阻害活性部位と含む相同のポリ N74ド12-70がいくつか相互に重なり合ふ様に組合せられた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。

Soybean Bowman-Birk
(this work)

13 [Ala-Cys-Thr-Lys-Ser-Asn-Pro-Pro-Gln-Cys-Arg-Cys-] 24

40 [Ile-Cys-Ala-Leu-Ser-Tyr-Pro-Ala-Gln-Cys-Phe-Cys-] 51

Lima bean IV (26)

23 [Cys-Cys-Leu-Ser-Thr-Lys-Ser-Ile-Pro-Pro-Glx-Cys-Arg-Cys-] 36

50 [Cys-Cys-Ile-Ser-Thr-Leu-Ser-Ile-Pro-Ala-Gln-Cys-Val-Thr-] 63

Peanut (27)

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

Fig 9. 植物起源のプロテアーゼインヒビターの活性部位周辺の構造

37

要約

1. グイスの Bowman-Birk 抑制剤の一次構造とトリプトファンとキモトリプトファンに対する阻害活性部位を明らかにした。
2. 抑制剤分子の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とっていることを示した。

謝辞

本研究を行ふに当たり、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。

又、種々御助言を頂戴し、出武比古博士（北の新潟大学生化学
教室、大阪大学理学部松島研究室）の謝兄弟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. Miller, 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.*, 34, 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.*, 2, 189 (1967).
- 15) A.M. Crestfield, S. Moore and W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, 238 622 (1963).
- 16) B. Kassel, "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. Tschöckel, Walter de Gruyter, Berlin and New York, p. 142 (1971).