

Title	ダイズトリプシンインヒビター (Kunitz) の構造と活性に関する研究
Author(s)	小出, 武比古
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30970
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[26]

氏名・(本籍)	こ	いで	たけ	ひこ	
	小	出	武	比	古
学位の種類	理	学	博	士	
学位記番号	第	2919	号		
学位授与の日付	昭和48年9月20日				
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
学位論文題目	ダイズトリプシンインヒビター (Kunitz) の構造と活性に関する研究				
論文審査委員	(主査)				
	教授	成田	耕造		
	(副査)				
	教授	松島	祥夫	教授	鈴木 友二
	教授	松原	央		

論文内容の要旨

1. ダイズトリプシンインヒビター (Kunitz) (以下STIと略) の分画。

酸性pHでのtrypsinによる限定水解、CNBrによるmethionyl結合の化学的開裂、及びジスルフィド結合の還元カルボキシメチル化を種々組合せることにより、STIを4つのフラグメント(アミノ末端より、フラグメントA, B, C及びD)に分画した。STIは分子量20,100でアミノ酸残基数181個からなり、フラグメントA, B, C及びDはそれぞれ63, 21, 30及び67個のアミノ酸残基で構成されていた。(以上part 1)。

2. アミノ酸配列の決定

上述の各フラグメントをtrypsin消化、chymotrypsin消化の後、得られたpeptideについて直接Edman法、及びカルボキシペプチダーゼ法を用いてSTIの全アミノ酸配列を決定した。(以上part 2及び3)。

3. STI-Cの再構成

STIにCNBrを作用させて得られる2つのフラグメントABC(114残基)とD(67残基)はそれぞれ単独では阻害活性を有していないが、中性pHにおいて混合すると約1時間(half-timeは3分)でほぼ100%の阻害活性を有する物質(以下STI-Cと呼ぶ)が再構成された。STI-Cは酸性pHで解離し、2つのフラグメントが共有結合したものでないにもかかわらず、CD的に、又阻害活性からもnative STIとほぼ同じものと考えられた。しかし凍結乾燥後に得られたSTI-Cの阻害活性はtrypsinと混合後、次第に失われてゆき「一時的阻害」の現象が見られた。又、STI-Cの収率は70%前後であるが、これはフラグメントを単離精製の過程で一部トリプトファン残基(以下Trpと略)が酸化的修飾を受けてフラグメントがaggregateし、STI-Cを形成し得なくなるもの(modified fragment)が出来てくる為と考えられた。従って、STI-Cを形成し得るフラグメント(intact fragment)を精製し、以下

の実験に用いた。(以上 part 4)。

4. トリプトファン残基の化学的修飾と STI-C 形成及び阻害活性への影響

STI 中には 93 番目、及び 117 番目に 2 残基の Trp が含まれている。H₂O₂-dioxane (2°C, 3 時間) による Trp の酸化の結果、STI-C は native STI と同じ oxidation curve で酸化され、0.8 残基相当酸化した STI-C は約 80% の阻害活性を有していた。4 M urea 中でゲルろ過し、分別した結果、フラグメント D 中の Trp-117 のみが酸化されていることがわかった。

又、フラグメント ABC 中の Trp-93 を H₂O₂ で酸化後、等モル量のフラグメント D と混合すると両者の complex は得られるが、阻害活性は Trp-93 の酸化の程度に比列して減少し、1 モル相当の Trp-93 が酸化された complex では活性は全く見られなかった。又、その complex は CD 的にも特異な conformation をとっていることがわかった。

一方、フラグメント D 中の Trp-117 を酸化後、等モル量のフラグメント ABC と混合した時に見られる現象は、先の STI-C を H₂O₂ で酸化した場合と相同であった。

以上の結果から、STI 中の 2 個の Trp のうち、Trp-93 は STI が活性発現に必要な conformation をとるのに、又は活性発現そのものに重要な役割をしていると結論され、Trp-117 は STI の conformation にも活性発現にも余り重要ではないと結論された。(以上 part 5)。

論文の審査結果の要旨

ダイズ中に含まれるトリプシン活性阻害タンパク質は、Kunitz により 1946 年に始めて分離され、このインヒビターの構造と阻害反応機構は多くの研究者の研究対象となっていたが、小出君は他にさきにかけてこのインヒビターの全共有結合構造を決定した。このインヒビター 1 分子中には、181 個のアミノ酸が含有されていて、ダイズ中に含まれるもう一種の Bowman-Birk プロテイナーゼインヒビターより分子量が大きい。Kunitz インヒビターの一次構造の決定に際し、小出君は阻害活性中心に存在する -Arg-Ile- 結合のみをまづ pH 3.8 でトリプシンの作用によって切断し、さらに CNBr によるメチオニル結合の切断、あるいはトリプシン消化することなく、インヒビターに含まれる 2 個のメチオニル結合を直接 CNBr で切断、S-S 結合の還元アルキル化等の手段を巧妙に組合わせて、4 個の断片に分離し、これら断片中のアミノ酸配列は、断片それぞれをさらにトリプシン消化によって再断片化したペプチドについて常法に従って決定し、同時に各断片中に含まれる S-S 結合の位置も決定して、Kunitz インヒビターの全共有結合構造を決定した。

次には、このインヒビターに直接 CNBr を作用させて 2 個のメチオニル結合を切断し、2 個の断片(この中 1 個の断片は 2 個のペプチドからなるが、両者は S-S 結合で連結されている)をそれぞれ単一状態に分離した。これら 2 断片は、それぞれ単独ではトリプシン阻害活性を示さないが、中性 pH で両者を等モルずつ混合すると、ほぼ 100% の阻害活性をもつものが再構成され、このものは円二色性のもとのインヒビターと同一であることを認め、共有結合の一部が切断されていても、阻害活性に必要な立体構造をとることを示した。さらに各断片中に 1 個ずつ含有されているトリプトファン残基の役割

を解明するために、過酸化水素水・ジオキサンでそれぞれの断片の酸化を試みた。その結果、一方の断片中に含まれる Trp-93が酸化されると、Trp-117を含む他方の未酸化断片と混合した場合、阻害活性は完全に消失するが、Trp-93が未酸化の場合には、他方の断片中の Trp-117を酸化して混合しても、活性の消失は殆んどないことを明らかにし、Trp-93は阻害活性発現に必要な立体構造の維持に重要な役割を演じていることを明らかにした。

以上の小出君の論文は、ダイズ Kunitz トリプシンインヒビターの構造と阻害活性との相関性を解明する上に重要な貢献をなしたものであり、同君の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと判定する。