



| | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | なんきん豆プロテアーゼインヒビターの構造と阻害機 作に関する研究 |
| Author(s) | 乗岡, 茂巳 |
| Citation | 大阪大学, 1984, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33938 |
| 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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文につい て 〈/a〉 をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

テアーゼ阻害反応部位を決定するため、酸性下で触媒量の Trypsin および Chymotrypsin による限定分解、およびその限定分解で切断を受けたペプチド結合のプロテアーゼによる再合成を行った結果、Arg (19)–Arg (20)結合で Trypsin と Chymotrypsin を阻害し、その K_i 値はそれぞれ $K_i(\text{try}) = 2.1 \times 10^{-9}$, $K_i(\text{chy}) = 1.2 \times 10^{-8}$ M であった。Arg (47)–Ser (48)結合は Trypsin のみの阻害反応部位で K_i 値は 8.5×10^{-8} M と判明した。

BBI 型インヒビターは左右対象に 3 個の S–S 環から成り、反応部位は最も外側の環(環 I と I'; 図 2) に存在している。Edman 分解により B–III 内の S–S 環を内側の環 (環 III) より順次開裂させその酵素阻害活性を測定すると、環 III が開裂すると第一反応部位 Arg (19)–Arg (20) の阻害能力が 13 分の 1 に低下、環 II、III がともに開裂すると 100 分の 1 に低下した。尚、環 II、III の開裂は第二反応部位 Arg (47)–Ser (48) の阻害活性には影響を与えなかった。以上の結果、B–III の 1 つの反応部位の活性構造は三重

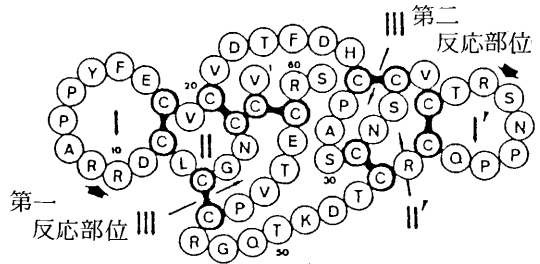


図 2. B–III の Covalent Structure

S–S 環 (第一反応部位は環 I ~ III, 第二反応部位は環 I' ~ III') によって作られていると考えられる。

最後にこのインヒビターの阻害反応部位周辺アミノ酸の化学修飾による阻害活性の変化を調べた。B–III の第一反応部位の P_1' の Arg (20) を Ser に置換しても阻害活性は低下しなかったが、 P_2 の Asp (18) をアミド化により Asn にすると阻害活性は著しく低下した。従来の BBI 型インヒビターは反応部位周辺が P_1 の位置以外はすべて中性アミノ酸で占められているので Arg (20) の正電荷と Asp (18) の負電荷の相互作用により反応部位周辺が活性な構造になると予想されたが、以上の結果 Arg (20) と Asp (18) の相互作用はなく Asp (18) の負電荷のみ酵素阻害に関与していると考えられる。また P_1 のアミノ酸を除去したインヒビターは阻害活性を全く失い、 P_2 の Ala (21) と Asn (49) を Ser に置換されたインヒビターの活性もかなり弱いことから、 P_1' の Arg (20) (Ser でも可) と Ser (48), P_2' の Ala (21) と Asn (49) はプロテアーゼの阻害に重要な役割を果たしていると考えられる。

論文の審査結果の要旨

豆科植物種子中には多くのプロテアーゼインヒビターが存在しているが、その生理的意義および阻害機作に関して十分な研究は行われていない。

乗岡君は豆科植物中でもつとも形態学的に進化しているといわれているなんきん豆種子より 5 種の Bowman–Birk 型プロテアーゼインヒビターを単離精製しその構造を決定、他の Bowman–Birk 型インヒビターとは異なる構造を持つことを見出した。また Bowman–Birk 型インヒビターの分子進化的考察からこれらインヒビターを 4 グループに分け得ること、また各グループに特徴的な阻害反応部位アミノ酸配列を有することを見出した。5 種類のなんきん豆インヒビターは同じ阻害活性を有する

ので、特にその1種B-IIIの阻害機作について研究を行い、トリプシンに対する反応部位はArg(19)–Arg(20), Arg(47)–Ser(48), またキモトリプシンに対する反応部位はArg(19)–Arg(20)であることを決定し、酵素の基質特異性に合わない阻害反応部位を有することを見出した。さらにインヒビターB-IIIのS–S環を順次化学的方法で開裂させ、その阻害活性の変化より三重のS–S環が活性に対して非常に重要であることを証明するとともに、阻害反応部位のアミノ酸残基を化学修飾、あるいは他のアミノ酸に置換することによる阻害活性を調べ、P₂–Aspのβ-カルボキシル基が活性発現に必要な蛋白のコンフォメーションの維持に重要な役割を果たしていること、P₁, P₂位置のアミノ酸も活性に必須であることを見出した。

以上乗岡君の研究はBowman–Birk型プロテアーゼインヒビターの阻害活性とアミノ酸残基との関係について研究し、インヒビターの阻害機作に対して重要な知見を与えたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。