



Title	ダイズKunitz型トリプシンインヒビターの構造と酵素阻害活性に関する研究
Author(s)	金, 承鎬
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34618
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について 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

氏名・（本籍）	きむ 金	すん 承	ほ 鎬
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	6 7 7 7	号
学位授与の日付	昭和 60 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	理学研究科 有機化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ダイズ Kunitz 型トリプシンインヒビターの構造と酵素阻害活性に関する研究		
論文審査委員	(主査) 教 授 池中 徳治		
	(副査) 教 授 福井 俊郎 教 授 崎山 文夫 助教授 原 三郎		

論 文 内 容 の 要 旨

ダイズ種子に含まれているKunitz型トリプシンインヒビターには、ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動で識別される3種類のインヒビター Ti^a , Ti^b および Ti^c が存在し、ダイズの品種により含まれるインヒビターの種類が異なっている。これら3種のインヒビターの構造とトリプシン阻害活性との関連を明らかにするため、以下の研究を行った。

ダイズ品種「農林2号」と「ライデン」からそれぞれ Ti^b と Ti^c を精製し、市販の Ti^a とともに試料として使用した。これら3種のインヒビター Ti^a , Ti^b および Ti^c の全一次構造を通常の方法で決定し（図-1），これまでに報告されている Ti^a の全一次構造に誤りのあることを明らかにした。3種のダイズKunitz型インヒビターはいずれも181アミノ酸残基から構成され、下に示したように Ti^a と Ti^c 間に1アミノ酸残基， Ti^a と Ti^b の間に8アミノ酸残基， Ti^c と Ti^b の間に9アミノ酸残基の置換が存在することがわかった。

Ti^a , Ti^b , Ti^c のトリプシンに対する反応部位はいずれも Arg (63) — Ile (64) であり、トリプシンとの複合体の解離定数はそれぞれ $1.5 \times 10^{-10} M$, $1 \times 10^{-8} M$, $2 \times 10^{-10} M$ で、 Ti^b が特に弱い阻害活性を示した。次に、 Ti^a および Ti^b の反応部位 Arg (63) — Ile (64) 結合をトリプシンで切断し、さらにズブチリンを作用させて、Met (84) — Leu (85) 結合を切断して得た両インヒビターの二重修飾インヒビターを酸性条件下でゲルろ過を行い、 Ti^a よりペプチド部分 a (I⁶⁴RFIAEGHPLSLKFDSFAVIM⁸⁴) と残りのタンパク部分 A, Ti^b よりペプチド部分 b (I⁶⁴RFIAEGNPLRLKFDSFAVIM⁸⁴) と残りのタンパク部分 B を分離した。これら A, B, a および b はそれぞれ独立ではトリプシン阻害活性を示さないが、タンパク部分とペプチド部分を A + a, A + b, B + a および B + b の4つの組み合わせで混合すると、

時間の経過とともにいずれの組み合わせのものも阻害活性を回復した。この4通りの組み合わせで再構成したインヒビターTi (Aa), Ti (Ab), Ti (Ba)およびTi (Bb)を精製したところ、4種の再構成インヒビターはトリプシンと1:1で結合して酵素活性を阻害し、それぞれのトリプシンとの複合体の解離定数は $2.0 \times 10^{-10}M$, $1.5 \times 10^{-9}M$, $1.0 \times 10^{-9}M$, $1.1 \times 10^{-8}M$ であった。

以上の結果からPhe (62)がTyr (62)に置換した再構成インヒビター、またAsn (71)がHis (71)に置換した再構成インヒビターがいずれも10倍程度活性が強いこと、ならびにSweet らにより報告されたTi^aとトリプシンとの複合体のX線解析の結果から、インヒビターのTyr (62)とHis (71)がトリプシンの阻害に極めて重要であることがわかった。

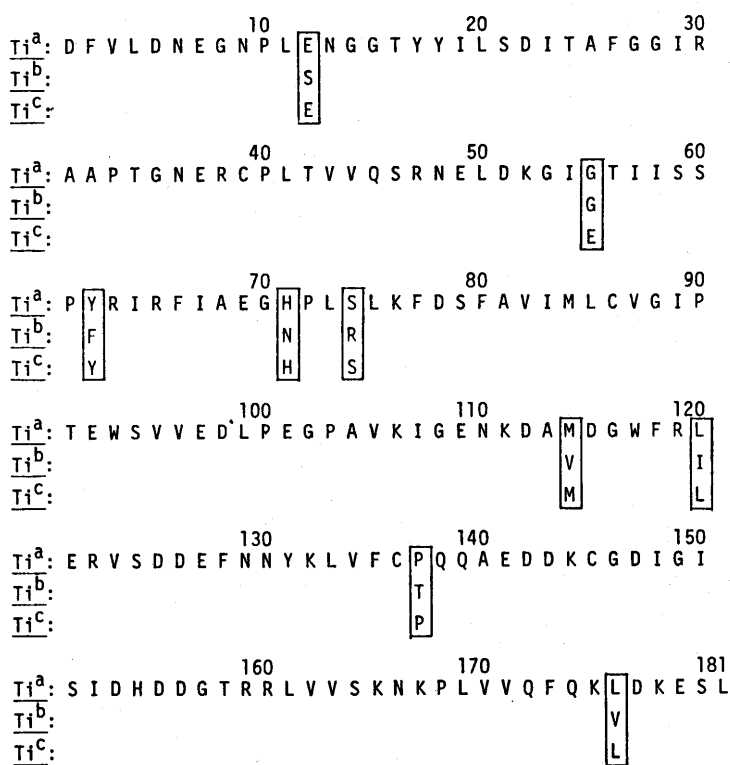


図1. Kunitz型ダイズトリプシンインヒビター, Ti^a, Ti^b およびTi^cの amino 酸配列の比較。Ti^aの amino 酸配列を基準にして置換している amino 酸のみを□で示す。

論文の審査結果の要旨

ダイズ中には遺伝的に異なる3種類のKunitz型トリプシンインヒビター、 Ti^a 、 Ti^b および Ti^c が存在するが、これらのインヒビターの酵素阻害活性、物理化学的性質の微妙な差異は、主としてそのアミノ酸配列の相違によると考えられる。一方ダイズの品種により含有するKunitz型インヒビターの種類が異なり、それら品種の分布にも地域性のあることが知られている。これらの事実を解明するためにも、これら3種のインヒビターの一次構造を決定することは重要である。

金承鎬君は、インヒビター Ti^b および Ti^c を、それぞれを主として含むダイズの2品種「農林2号」ならびに「ライデン」から精製し、市販のインヒビター Ti^a との諸性質を比較するとともに、これらインヒビターの181残基からなるアミノ酸配列を決定した。その結果、 Ti^a と Ti^c 間には1個のアミノ酸置換、 Ti^a と Ti^b の間には8個のアミノ酸置換が存在し、またこれまでに報告されていた Ti^a のアミノ酸配列の2ヶ所に誤りのあることを見出した。

さらに Ti^a 、 Ti^b にトリプシンおよびズブチリシンを作用させて限定酵素分解を行い、両インヒビターからアミノ酸21残基からなるペプチド(Ile(64)~Met(84))を切り出し、残りのタンパク部分と、このペプチドを相互交換することにより Ti^b のペプチド部分を含んだ新 Ti^a インヒビター、 Ti^a のペプチド部分を含む新 Ti^b インヒビターを再構成することに成功し、これら新インヒビターの酵素阻害活性をもとの Ti^a および Ti^b の活性と比較することにより、 Ti^a のTyr(62)の水酸基とHis(71)のイミダゾール基がプロテアーゼの阻害に極めて重要であることを明らかにした。

これらの成果はKunitz型トリプシンインヒビターの構造と阻害活性の相互関係の解明に重要な寄与であり、理学博士の学位に十分値するものと認める。