



Title	腩分泌性トリプシンインヒビターの構造およびトリプシンとの相互作用
Author(s)	菊池, 典久
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36698
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）	菊	池	典	久
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8 5 1 4	号	
学位授与の日付	平成元年	3 月	15 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	膵分泌性トリプシンインヒビターの構造および トリプシンとの相互作用			
論文審査委員	(主査) 教授 崎山 文夫			
	(副査) 教授 池中 徳治 教授 福井 俊郎 教授 植田 育男			

論文内容の要旨

- (1) ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) の多様性を構造的に明らかにする目的で、ヒト膵液より4種類のPSTI (A₁, A₂, B, C) を精製し、一次構造を決定した。その結果、ヒト膵液中に最も多量に含まれるBが本来の型であることが分かったが、報告された構造 (Bartelt et al. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 189-199) と2ヶ所で異なっていた。即ち、Asn (21) はAspであり、Asp (29) はAsnであった。また、A₁はBのGln (45) がGluに、A₂はGln (51) がGluに、それぞれ脱アミド化した結果、生じたPSTIであることが分かった。さらに、CはBのN末端から5個のアミノ酸残基が欠落したPSTIであることが分かった。BおよびCは、ヒトトリプシンを1:1のモル比で化学量論的に阻害し、その解離定数は 10^{-9} Mのオーダーで大差はなかった。しかし、A₁ およびA₂ は、ヒトトリプシンを化学量論的に阻害しなかった。

また、イヌ膵液よりPSTIを精製し、アミノ酸配列の決定を行なった。イヌPSTIは57個のアミノ酸残基からなり、他の哺乳類PSTIの56残基 (ラットPSTI-Iを除く) より1残基多かった。イヌPSTIは、ウシトリプシンを1:1のモル比で化学量論的に阻害し、その解離定数は 10^{-9} M以下であった。

- (2) ヒトPSTIの一時的阻害メカニズムを明らかにする目的で、まず、Met-ヒトPSTIをコードする合成遺伝子を、インターフェロン- γ (IFN- γ) またはアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼII (APH) 遺伝子の下流に融合し、ヒトPSTIをIFN- γ または APHとの融合タンパク質として大腸菌により生産させた。組換え型ヒトPSTIは、ブロムシアンを用いて融合タンパク質から分離し、最終的に、トリプシン-CH-Sepharose 4Bカラムを用いたアフィニティ・ク

ロマトグラフィーで精製した。組換え型ヒトPSTIの構造および諸性質は、天然型ヒトPSTIに完全に一致した。

さらに、APH/PSTI融合タンパク質をコードする遺伝子を用いて、site-directed *in vitro* mutagenesisの手法により、ヒトPSTIのArg(42)をGlnまたはThrに、Lys(43)をThrに、Arg(44)をSerに、それぞれ1残基ずつ置換した変異型PSTIを作製し、ヒトリプシンに対する一時的阻害の変化を調べた。Gln(42)-PSTIおよびSer(44)-PSTIは天然型ヒトPSTIに比べ、ヒトリプシン阻害時間が長くなったが、Thr(42)-PSTIは天然型ヒトPSTIとほぼ同じ阻害時間を示し、Thr(43)-PSTIの阻害時間は天然型ヒトPSTIよりさらに短くなった。これらの結果から、ヒトPSTIの一時的阻害は、Arg(44)-Gln(45)結合の切断に起因することが推定された。

また、天然型および各変異型PSTIのPhe(39)-Ser(47)構造部分のノナペプチドを化学合成し、ヒトリプシンとの相互作用を調べた結果、上記と同様の結論が得られた。

論文の審査結果の要旨

生物はその必須成分である蛋白質を合成する系と分解する系を兼ね備えている。分解系の主役は基質と同じく蛋白質からできているプロテアーゼであるが、自身を含めた蛋白質の無秩序な分解を防ぐため、種々の機構が準備されている。本論文で取扱うトリプシンインヒビターもその一つで、トリプシンの活性を阻害する。膵臓には、分子量6千程度の2種類のトリプシンインヒビターが存在し、1つはトリプシンを長期間阻害し、他の1つは一時的に阻害する。本論文はトリプシンを一時的に阻害するヒト膵臓の分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)の阻害機構を構造的観点から解明したものである。

この阻害機構の研究に際しては、ヒトPSTIの分子多様性について理解しておくことが必要である。そこで、4種のPSTIの単離精製が行われ、それらの一次構造が決定された。その結果、3種の分子は主成分のPSTIの部分的脱アミド化またはN末端アミノ酸の欠落により生じたもので、ヒトPSTIのトリプシン活性の一時阻害機構は分子種によらず同じであることが判明した。一時的な阻害機構の解明は、ヒトPSTI遺伝子の化学合成と部位特異的変異により調製したPSTI変異体を用いて行われた。その結果、トリプシンとPSTIとの結合部位から離れた位置にある42位と44位のアルギニン残基の関与するペプチド結合の切断が、インヒビターの阻害を解消させることが明らかになった。

以上のように、本論文はヒト膵臓PSTIの一次構造の決定と最新の生物学的蛋白質合成法を駆使したトリプシンに対する一時的阻害機構の解明を内容としており、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。