

Title	シカクマメ種子プロテイナーゼインヒビターに関する研究
Author(s)	柴田, 浩志
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/707">http://hdl.handle.net/11094/707</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【12】

氏名・(本籍)	柴 田 浩 志
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 7 6 2 0 号
学位授与の日付	昭 和 6 2 年 3 月 2 6 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	シカクマメ種子プロテイナーゼインヒビターに関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 池 中 徳 治 (副査) 教 授 崎 山 文 夫 教 授 福 井 俊 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

シカクマメ種子よりイオン交換クロマトグラフィーを利用して2種のトリプシンインヒビター (WT I-2, WT I-3) と4種のキモトリプシンインヒビター (WC I-1, WC I-2, WC I-3, WC I-4), 1種のトリプシン-キモトリプシンインヒビター (WTC I-1) の計7種のKunitz型インヒビター (分子量約20,000, 半シスチン4個) を精製した。

アミノ酸組成はキモトリプシンインヒビター間に高い類似性があり, ウサギ抗WC I-3抗体は4種のキモトリプシンインヒビターと抗原抗体反応を示すが, その他のシカクマメインヒビターとは抗原抗体反応を示さなかった。

WC I-3のアミノ酸配列を決定した結果, WC I-3は183個のアミノ酸から成るメチオニンを含まない単純タンパク質であることが明らかとなり, C末端領域に不均一性が認められた。いままでに構造の明らかにされている他のKunitz型インヒビターとアミノ酸配列を比較したところ, WC I-3はダイズトリプシンインヒビター-Ti<sup>+</sup>と46%, シカクマメトリプシンインヒビター-WT I-1と62%, *Erythrina latissima*トリプシンインヒビター-DE-3と56%の相同性を示した。

WC I-3は1分子で同時に2分子のキモトリプシンを強く阻害し, その第1反応部位 (Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup>結合) をキモトリプシンで限定分解した修飾インヒビター, WC I-3sのSer<sup>66</sup>のアミノ基をカルバモイル化して第1反応部位を失活させても, なお1分子のキモトリプシンと複合体を形成することは第2反応部位の存在を確認している。

また, WC I-3と上述のカルバモイル誘導体のキモトリプシンに対する阻害活性の測定により, 第1反応部位と第2反応部位はキモトリプシンに対して, ともに同程度の阻害活性を有していることが明ら

かとなった。

ダイズトリプシンインヒビター、 $Ti^a$ とその3種の修飾インヒビター、 $Ti^a i$  ( $Arg^{63}-Ile^{64}$ 結合切断)、 $Ti^a i i$  ( $Met^{84}-Leu^{85}$ 結合切断)、 $Ti^a i i i$  ( $Arg^{63}-Ile^{64}$ 結合及び $Met^{84}-Leu^{85}$ 結合切断)、及びそれらのカルバモイル誘導体を調製し、高速ゲルろ過法によるキモトリプシンとの複合体形成様式の分析とキモトリプシン阻害活性の測定により、Kunitz型インヒビターの第2反応部位の位置についてさらに検討した。

その結果、 $Ti^a$ の第1反応部位は $Arg^{63}-Ile^{64}$ 結合であり、第2反応部位は $Met^{84}-Leu^{85}$ 結合付近に存在することが示された。Kunitz型インヒビター間のアミノ酸配列の高い相同性から、その他のKunitz型インヒビターの第2反応部位もそれに相当する位置に存在すると推定される。

つぎに、マメ科種子インヒビターの生理的役割を解明するために、種子成熟過程におけるインヒビターの活性発現について検討した。

シカクマメ(ウリズン)では、開花後36日目にはじめてインヒビター活性が発現し、活性はそれ以後急速に増加した。

免疫学的実験も同様の結果を示し、インヒビターが活性発現期に直接インヒビタータンパクとして合成されることを示唆した。

ダイズ(白鳥枝豆)種子でもシカクマメと同様の結果が得られ、Kunitz型インヒビターとBB I型インヒビターの分別定量は、両インヒビターが同じ時期に活性を発現し、その後異なる速度で生合成されることを示した。

## 論文の審査結果の要旨

マメ科植物種子中には分子量約20,000で2個の-S-S-結合を有するKunitz型プロテイナーゼインヒビターと分子量約8,000で7個の-S-S-結合を有するBowman-Birk型(BB I型)プロテイナーゼインヒビターが存在している。現在までに数多くのBB I型インヒビターの一次構造が報告されているが、Kunitz型インヒビターについては数種のインヒビターについて、化学的、物理化学的性質、ならびに阻害機構について研究されているのみである。それ故、Kunitz型プロテイナーゼインヒビターの阻害機構の解明には、さらに多くの同型インヒビターについて研究する必要がある。

柴田君は熱帯産のマメ科植物であるシカクマメの種子を材料とし、イオン交換クロマトグラフィーを利用して、7種類のKunitz型プロテイナーゼインヒビターを単離し、その諸性質を明らかにした。これらインヒビターのうち、含量のもっとも多いキモトリプシンインヒビターWC I-3は1分子当り2分子のキモトリプシンを強く阻害するというこれまでのKunitz型インヒビターと異なる阻害活性を有するので、このWC I-3の一次構造を決定した。WC I-3は183個のアミノ酸から成る単純タンパク質であり、キモトリプシンに対する第一反応部位は $Leu^{65}-Ser^{66}$ であることを明らかにした。しかし、いろいろの実験結果から、他の第二反応部位の存在することを明らかにしたが、ペプチド鎖上での位置は決定できなかった。

それ故、ダイズ中に存在するKunitz型インヒビターTi<sup>a</sup>を用い限定酵素分解によりArg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup>結合、Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup>結合を切断して修飾インヒビターを調製し、それらの阻害様式を研究し、Ti<sup>a</sup>においてはMet<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup>結合、あるいはその付近に第二反応部位が存在する知見を得た。

次にシカクマメおよびダイズの種子成熟過程におけるプロテイナーゼインヒビターの活性発現について検討し、開花後30~35日目にはじめてインヒビター活性が出現すること、この発現時期に、インヒビタータンパクが直接合成されることを示唆する結果を得た。

以上、柴田君の研究は、これまで明らかでなかったマメ科植物Kunitz型プロテイナーゼインヒビターの阻害活性の双頭性を明らかにしたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。