



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	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/707">https://hdl.handle.net/11094/707</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

博士學位論文

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

1987年

大阪大学

柴田浩志

# 目 次

第 1 章 序 論	1
略 号	4
第 2 章 シカクマメ種子プロテイナーゼインヒビター	
の精製と性質	7
第 1 節 材料と方法	8
§ 1 実験材料	8
§ 2 実験方法	9
第 2 節 シカクマメプロテイナーゼインヒビターの精製	13
§ 1 インヒビターの精製	13
§ 2 インヒビターの純度検定	14
第 3 節 シカクマメプロテイナーゼインヒビターの性質	15
§ 1 分子量	15
§ 2 アミノ酸組成	15
§ 3 酵素阻害活性	15
§ 4 免疫学的性質	17
§ 5 WTCI-1 の結晶化	17
§ 6 その他の性質	17
第 4 節 考 察	18
第 3 章 シカクマメキモトリブシンインヒビター	
WCI-3 の一次構造	39
第 1 節 材料と方法	40
§ 1 実験材料	40
§ 2 実験方法	40

第2節	WCI-3 の一次構造	44
§ 1	末端アミノ酸配列	44
§ 2	トリプシンペプチドのアミノ酸配列	44
§ 3	リジルエンドペプチダーゼペプチドのアミノ酸配列	47
§ 4	V8 プロテアーゼペプチドのアミノ酸配列	48
§ 5	WCI-3 の全一次構造	49
第3節	WCI-3 の反応部位	50
第4節	考 察	51

#### 第 4 章 マメ科植物種子 Kunitz 型プロテイナーゼインヒビター

	の阻害様式	111
第1節	材料と方法	113
§ 1	実験材料	113
§ 2	実験方法	114
第2節	WCI-3 の阻害様式	116
§ 1	限定分解	116
§ 2	阻害様式	117
第3節	Ti <sup>a</sup> の阻害様式	119
§ 1	双頭性	119
§ 2	第2反応部位の検索	120
第4節	考 察	122

#### 第 5 章 マメ科植物種子プロテイナーゼインヒビター

	の活性発現	141
第1節	材料と方法	142
§ 1	実験材料	142
§ 2	実験方法	142
第2節	シカクマメにおけるプロテイナーゼインヒビター の分布	145

第3節	マメ科植物種子プロテイナーゼインヒビター	
	の活性発現	146
§ 1	シカクマメプロテイナーゼインヒビターの活性発現	146
§ 2	ダイズプロテイナーゼインヒビターの活性発現	147
第4節	考 察	148
第 6 章	要 約	159
参考文献		163
謝 辞		167

# 第 1 章

## 序 論

プロテイナーゼが生体内において生命現象に広く関与していることが明らかになるにつれて、これを阻害するプロテイナーゼインヒビターの研究も活発となってきた。すなわち、プロテイナーゼの存在するところには必ずといっていいほどプロテイナーゼインヒビターが存在し、それらはお互いに作用しながら複雑な生体反応を制御していると考えられる。

プロテイナーゼインヒビターの研究は、1936年、Kunitz と Northrop がウシすい臓より塩基性トリプシンインヒビター (BPTI) を結晶状に単離して以来(1)、その物質レベルでの研究が始まった。その後、タンパク質の精製法や分析法の著しい進歩とともに、数多くのプロテイナーゼインヒビターが動植物界、さらには微生物界からも発見され、その化学構造や阻害機構、及び立体構造に関する研究が飛躍的に発展した。

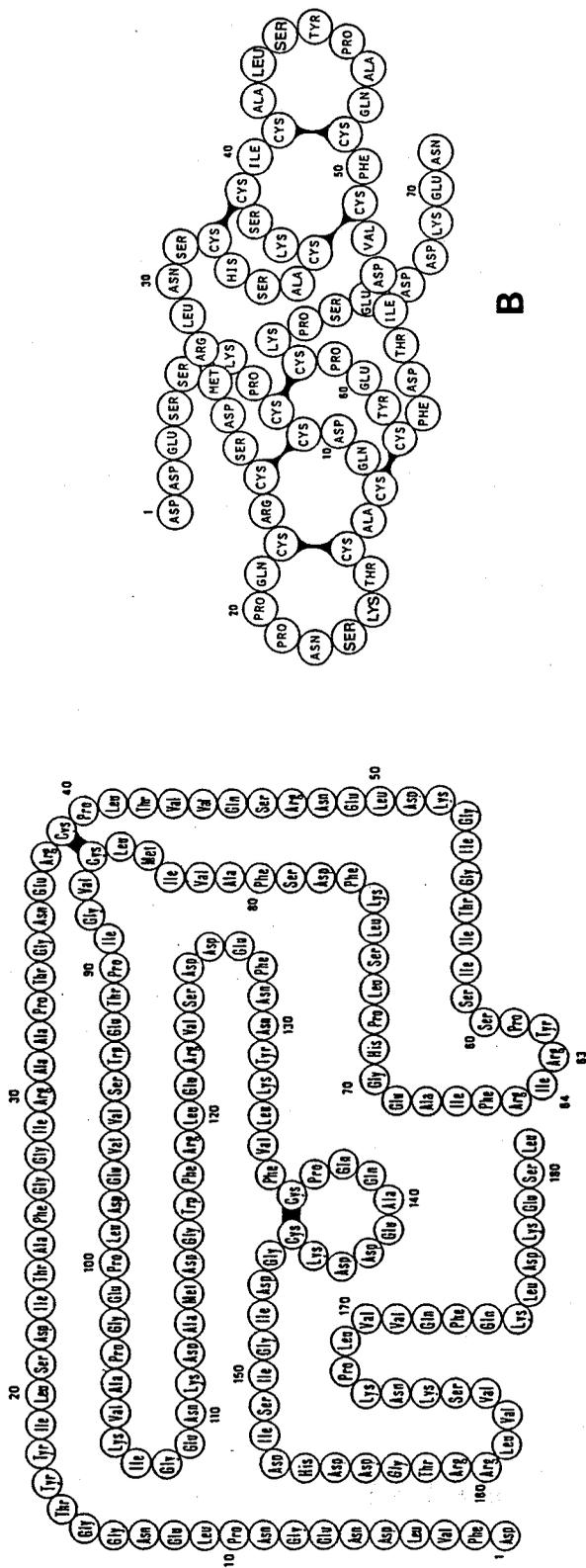
1946年、Kunitz はダイズ種子よりトリプシンインヒビター (STI) を単離し(2)、さらにそのトリプシンとの複合体の結晶化にも成功して、両者が1:1のモル比で結合していることを明らかにした(3)。それ以後、マメ科植物種子から同型のプロテイナーゼインヒビターが多数単離され、分子量約20,000、半シスチンを4個含むこの型のインヒビターを Kunitz 型インヒビターと称するようになった (Fig. 1A)。マメ科植物種子中にはこの他に分子量 6,000 から 8,000、14個の半シスチンを含む Bowman-Birk 型プロテイナーゼインヒビター (Fig. 1B) が存在し、それらの一次構造も報告され、Bowman-Birk 型インヒビター間には高い相同性の存在することが実証された(4)。

プロテイナーゼインヒビターの研究は、分子レベル、さらには遺伝子レベルでの研究へと移行しつつあるが、現在においてもマメ科植物種子プロテイナーゼインヒビターの阻害機構及び一次構造に関する研究は、その標的酵素

の反応機構を解明する上で非常に重要であると考えられる。また、マメ科植物プロテイナーゼインヒビターの種子中における生理的役割を明らかにすることは、阻害を受けるプロテイナーゼ系の解明とともに重要な課題となっている。

熱帯産のマメ科植物であるシカクマメは、形態学的にはマメ目マメ科アズキ属に属し、インゲンマメやササゲ等に近い多年生草本で、サヤの断面が翼を広げたように見えるところから、一般に英語圏では Winged bean と呼ばれている。発展途上国の恒常的な栄養不足が問題となっている現在、種子中にダイズなみのタンパク質と脂肪を含んでいるシカクマメは、この問題を軽減する新たな食糧資源として世界的に注目を集め、1970年代にはシカクマメを主題とした国際学会までが開催されるようになった。わが国でも、1976年から農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所においてその導入が開始され、1983年には、シカクマメに関して農学、栄養学、生化学といった広範な分野にわたる総合的研究体制がスタートした。

本研究はその研究体制の一端を担うものであり、シカクマメ種子よりプロテイナーゼインヒビターを精製してその諸性質について検討し（第2章）、その中のキモトリブシンインヒビター WCI-3 の一次構造を決定して阻害機作と構造との関係を考察するとともに（第3章）、WCI-3 と STI を用いて Kunitz 型インヒビターの双頭性について検討した（第4章）。第5章では、マメ科植物種子の成熟過程にともなうプロテイナーゼインヒビターの活性発現に関する実験結果を示し、プロテイナーゼインヒビターの生理的役割について考察した。



A

Fig. 1. Kunitz- and BBI-type inhibitors in leguminous seeds.

A, soybean trypsin inhibitor (Kunitz) (5); B, soybean Bowman-Birk inhibitor (6).

## <略号>

ATEE	:	N-アセチル-L-チロシン エチルエステル
BAEE	:	N-ベンゾイル-L-アルギニン エチルエステル
BAPA	:	N-ベンゾイル-DL-アルギニン p-ニトロアニリド
BBI	:	ダイズ Bowman-Birk インヒビター
BPB	:	ブロモフェノールブルー
BTPA	:	N-ベンゾイル-L-チロシン p-ニトロアニリド
Cbm-	:	カルバモイル
Cm-	:	カルボキシメチル
DEAE-	:	ジエチルアミノエチル
EDTA	:	エチレンジアミン四酢酸
FPLC	:	高速タンパク質液体クロマトグラフィー
HPLC	:	高速液体クロマトグラフィー
-pNA	:	p-ニトロアニリド
PTH	:	フェニルチオヒダントイン
QAE-	:	ジエチル-(2-ヒドロキシプロピル) アミノエチル
RCm-	:	還元S-カルボキシメチル
SDS	:	ドデシル硫酸ナトリウム
SGPA	:	<u>Streptomyces griseus</u> プロテアーゼA
SGPB	:	<u>Streptomyces griseus</u> プロテアーゼB
SP-	:	スルホプロピル
STI	:	ダイズトリプシンインヒビター (Kunitz)
Suc-	:	サクシニル
TFA	:	トリフルオロ酢酸
TLCK	:	1-クロロ-3-トシルアミド-7-アミノ-2-ヘプタノン
TPCK	:	L-1-トシルアミド-2-フェニルエチル クロロメチルケトン
トリス	:	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン
WCI	:	シカクマメキモトリプシンインヒビター

- W T I : シカクマメトリブシンインヒビター  
 W C I - 3<sub>s</sub><sup>\*</sup> : Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合を切断した修飾 W C I - 3  
 W C I - 3<sub>u</sub><sup>\*</sup> : Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合を切断した修飾 W C I - 3  
 W C I - 3<sub>su</sub><sup>\*\*</sup> : Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合及び Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合を  
 切断した修飾 W C I - 3  
 T i a<sub>i</sub><sup>\*</sup> : Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合を切断した修飾 T i a<sup>a</sup>  
 T i a<sub>L</sub><sup>\*</sup> : Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合を切断した修飾 T i a<sup>a</sup>  
 T i a<sub>IL</sub><sup>\*\*</sup> : Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合及び Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合を  
 切断した修飾 T i a<sup>a</sup>

## 第 2 章

### シカクマメ種子プロテイナーゼ インヒビターの精製と性質

マメ科植物の形態学的進化にともない、その種子プロテイナーゼインヒビターは Kunitz 型から BBI 型へ移行する傾向のあることが Table 2-1 より示唆される。

しかし、BBI 型インヒビターについては14種以上のインヒビターの一次構造が明らかにされているものの(4)、Kunitz 型インヒビターについてはダイズトリプシンインヒビター (STI)  $Ti^a$ 、 $Ti^b$ 、 $Ti^c$ (5,7)、シカクマメトリプシンインヒビター WTI-1A、WTI-1B(8)、*Erythrina latissima* トリプシンインヒビター DE-3(9)の計6種のインヒビターの一次構造が明らかにされているにすぎない。したがって、マメ科植物種子プロテイナーゼインヒビターの阻害機構及び分子進化を論ずるためには、さらに多くの Kunitz 型インヒビターを単離・精製し、その諸性質及び構造を解明していくことが不可欠である。

Kortt は、すでにシカクマメ種子からトリプシン-Sepharose 4B あるいはキモトリプシン-Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより3種の Kunitz 型インヒビターを精製し(10,11)、その諸性質について報告している(12,13)。しかし、この精製法では精製中にインヒビターの反応部位が切断される可能性があり、インヒビターの性質及び構造を研究する上で最良の方法とは言えない。

本研究ではこのような精製途中における修飾を避けるため、シカクマメ種子より数種のイオン交換クロマトグラフィーのみを用いて Kunitz 型インヒビターを精製し、その諸性質について検討した。

## 第 1 節 材料と方法

### § 1 実験材料

シカクマメは、農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所において 1982年に収穫された品種 UPS-31 を用いた。

ウシトリブシン (2回結晶) とウシ $\alpha$ -キモトリブシン (3回結晶) は Sigma 社から購入した。N-ベンゾイル-L-アルギニン エチルエステル (BAEE)、N-ベンゾイル-DL-アルギニン p-ニトロアニリド (BAPA)、N-アセチル-L-チロシン エチルエステル (ATEE)、N-ベンゾイル-L-チロシン p-ニトロアニリド (BTPA) はペプチド研究所から購入した。4M メタンスルホン酸 (0.2% 3-(2-アミノethyl)イソプロパノール 含有) は Pierce 社製を用いた。DEAE-Sephadex A-50、DEAE-Sephacel、SP-Sephadex C-25、Sephadex G-75 (Superfine) は Pharmacia 社から購入した。スペクトラボア (M.W. cut off: 6,000-8,000) は Spectrum 社から購入した。精製寒天 (Noble) は Difco 社製を用いた。ハイフロスーパーセルは Johns-Manville 製を用いた。アンホラインは LKB 社から購入した。ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、ニワトリ卵白リゾチームは生化学工業社から購入した。その他の試薬は用途に応じて特級またはそれ以上のものを用いた。

ウサギ抗 WCI-3 抗血清は関西医科大学の大森浩一郎博士及び田代裕教授に調製して頂いたものを用いた。ヒトトリブシンとヒトキモトリブシンは、大阪大学医学部小川道雄講師から供与されたヒトすい液を硫酸塩析し、塩析物を透析して粗酵素として用いた。

## § 2 実験方法

### 〈酵素阻害活性の測定〉

#### a) BAEE によるトリブシン阻害活性の測定 (Method A) (14)

適当量のインヒビターと 26.3 $\mu$ g のトリブシンを 0.02M 塩化カルシウムを含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 2.5ml に溶解し、30 $^{\circ}$ C で 5 分間加温した後 2ml を試料セルに移した。この混合溶液に上述のトリス-塩酸緩衝液に溶解した 0.01M BAEE 基質溶液 100 $\mu$ l を加えてすばやくかくはんし、253nm における吸光度の変化を自記分光光度計 (日立 320 型) で測定した。対照セルには基質溶液 100 $\mu$ l と緩衝液 2ml を入れておいた。

#### b) BAPA によるトリブシン阻害活性の測定 (Method B) (15)

0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で適当な濃度に希釈したインヒビター溶液 200 $\mu$ l に 0.05M 塩化カルシウム溶液 (pH 3.0) に溶解したトリブシン溶液 (200 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l を加えてかくはんし、30 $^{\circ}$ C で 10 分間加温した後、同じトリス-塩酸緩衝液に溶解した 1mM BAPA 基質溶液 1ml を加えて 30 $^{\circ}$ C で反応させた。10 分後、30% 酢酸 200 $\mu$ l を加えて反応を止め、410nm における吸光度を測定した。

#### c) ATEE によるキモトリブシン阻害活性の測定 (Method C) (14)

ATEE によるキモトリブシン阻害活性の測定は Method A に準じて行った。適当量のインヒビターと 26.3 $\mu$ g のキモトリブシンを 0.02M 塩化カルシウムを含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、アセトニトリルに溶解した 0.02M ATEE 基質溶液を用いて 237nm における吸光度の変化を測定した。

#### d) BTPA によるキモトリブシン阻害活性の測定 (Method D) (16)

BTPA によるキモトリブシン阻害活性の測定は Method B に準じて行った。40% エタノールを含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解したイン

ヒビター溶液とキモトリブシン溶液 (400  $\mu$ g/ml, pH3.0) を混合し、30°C で 10 分間加温した後 1mM BTPA 基質溶液を加えて反応させ、30% 酢酸を加えて反応を止めた後、410nm における吸光度を測定した。

#### e) 阻害活性単位

インヒビターの阻害率は次式により算出できる。

$$\text{阻害率} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

ここでAはインヒビターを含まない反応系の酵素活性、Bは適当量のインヒビターを含む反応系の酵素活性を表している。したがって、上述の4つの活性測定法 (Method A、B、C と D) において試料の阻害率を計算すればその試料により阻害された酵素量を求めることができる。

阻害活性単位は阻害された活性酵素の mg 数、比活性は試料タンパク 1mg が有する阻害活性単位として定義した。酵素タンパク中に含まれている活性酵素量はダイズ種子より精製した BBI を用いて滴定することにより補正した。

#### <ポリアクリルアミドゲル電気泳動>

インヒビターの純度検定及び同定はポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。電気泳動は Davis の方法(17)に従って pH 9.5-7%(W/V) アクリルアミドゲルを用い、ゲル 1 本当り 2.5mA の電流を流して BPB マーカーが分離ゲル上端から 5cm の位置に達したときに泳動を止めた。ゲルは 0.25%(W/V) クーマシーブリリアントブルー R-250(18)で染色し、7%(W/V) 酢酸で脱色した。

#### <分子量測定>

精製インヒビターの分子量測定は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。試料を 5%(W/V) 2-メルカプトエタノールと 2.5%(W/V) SDS を含む 0.01M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、100°C で5分間還元し

た後 King と Laemmli の方法(19)に従って電気泳動を行った。本研究では、12.6%(W/V) アクリルアミドゲルを用い、泳動、染色、脱色の条件はポリアクリルアミドゲル電気泳動に準じた。分子量測定のための標準タンパク質は、ウシ血清アルブミン (M.W. 66,000)、オボアルブミン (M.W. 44,000)、シカマメトリプシンインヒビター WT1-1A (M.W. 19,200)(8)、ニワトリ卵白リゾチーム (M.W. 14,500) を用いた。

#### 〈アミノ酸分析〉

アミノ酸分析は、Spackman らの方法(20)に従い日立 835 型高速アミノ酸分析計で分析した。加水分解は、減圧封管した試験管内で 4M メタンサルホン酸 (0.2% 3-(2-アミノプロピル)イソキサゾール 含有) (21)50 $\mu$ l、あるいは2回蒸留した 6N 塩酸 200 $\mu$ l により 110 $^{\circ}$ C で 24、48、72 時間行った。スレオニンとセリンは 0 時間に外挿した値、バリンとイソロイシンは 72 時間の値を用いた。シスチンは Hirs の方法(22)に従って過ギ酸酸化し、システイン酸として定量した。

#### 〈タンパク質の定量〉

精製過程におけるタンパク量は乾燥重量で示した。精製インヒビター溶液の濃度はアミノ酸分析より求めた。各インヒビターの分子吸光係数はインヒビターの濃度と 280nm における吸光度より計算した。

#### 〈等電点電気泳動〉

スラブゲル等電点電気泳動は Wrigley の方法(23)に従って行った。ゲルは 2%(W/V) アンホライン (pH 5-7 : pH 3.5-10, 4 : 1, (V/V)) と 6M 尿素を含む 4%(W/V) アクリルアミドゲルを用いた。染色は 0.01%(W/V) クーマシーブリリアントブルー G-250(24)で行った。

#### 〈二次元二重免疫拡散法〉

二次元二重免疫拡散法は Ouchterlony の方法(25)に従って行った。寒天ゲ

ルは 0.15M 食塩と 0.1%(W/V) アジ化ナトリウムを含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で寒天濃度が 1%(W/V) になるように調製した。抗原と抗血清をそれぞれの穴に分注し、湿度を保ちながら室温で拡散させることにより沈降線を形成させた。ゲルは上述のリン酸緩衝液で2日間洗浄した後、蒸留水で塩分を除き、1%(W/V) アミドブラック 10B(17)で染色し、酢酸-メタノール (1 : 10) で脱色した。

#### 〈粗インヒビターの調製〉

シカクマメ種子 300g を粉碎機で細かく粉碎した後、氷冷下でかくはんしながら 1500ml のアセトンで脱脂操作を二度行い、ろ過、風乾して、脱脂したシカクマメ粉碎物 235g を得た。これに 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2000ml を加え、4℃ で 20 時間かくはんしながら種子中のタンパク質を抽出した。抽出液は pH 7.5 に調整した後、ハイフロスーパーセルをひいたヌッチェで不溶性物質をろ過除去し、ろ液を氷冷下でかくはんしながら 0.25N 濃度になるように 1N 硫酸を滴下した。1 時間後、生じた変性タンパク質を遠心分離により除き、上澄み液を冷却しながら 10N 水酸化ナトリウムで pH 7.5 に調整した後、80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて塩析を行った。塩析物は 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析し、透析溶液を遠心分離して不溶性物質を除くことにより粗インヒビター溶液 950ml を得た。

## 第 2 節 シカクマメプロテイナーゼ インヒビターの精製

### § 1 インヒビターの精製

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7種の酸性インヒビターを精製した。

まず、種子より抽出した粗インヒビター溶液 340ml を 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (4 x 38cm) にかき、カラムを同緩衝液で洗浄した後、0.5M までの食塩による直線濃度勾配法で溶出して塩基性画分 B と酸性画分 A を得た (Fig. 2-1)。塩基性画分 B からはすでにトリブシンインヒビター WTI-1A と WTI-1B が精製され一次構造も決定されているので(8)、本研究ではこの画分の精製は行わなかった。

酸性画分 A は透析、凍結乾燥後、0.01M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に溶解し、不溶性物質を遠心分離により除いた後、同緩衝液で平衡化した SP-Sephadex C-25 カラム (2 x 70cm) にかき、カラムを 0.8M までの食塩による直線濃度勾配法で溶出することにより、活性のある4画分 SP-A、SP-1、SP-2、SP-3 を得た (Fig. 2-2)。

主要3画分 (SP-1、SP-2、SP-3) については透析、凍結乾燥後、DEAE-Sephacel クロマトグラフィーによりさらに精製を行った。それぞれの画分を 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sephacel カラム (1.5 x 47cm) にかけて吸着させ、0.2M までの食塩による直線濃度勾配法で溶出することにより、画分 SP-1 からはキモトリブシンインヒビター WCI-1 とトリブシンインヒビター WTI-3 (Fig. 2-3)、画分 SP-2 からはキモトリブシンインヒビター WCI-2、WCI-3、WCI-4 (Fig. 2-4)、画分 SP-3 からはトリブシンインヒビター WTI-2 とトリブシン-キモトリブシンインヒビター WTCI-1 (Fig. 2-5) を得た。

以上の精製法により、シカクマメ種子から2種のトリブシンインヒビター

(WTI-2、WTI-3) と4種のキモトリプシンインヒビター (WCI-1、WCI-2、WCI-3、WCI-4)、さらに1種のトリプシン-キモトリプシンインヒビター (WTCI-1) から成る計7種の酸性インヒビターを精製した。Table 2-2 に各精製過程における結果を示した。

なお、SP-A はゲルろ過法により Bowman-Birk 型インヒビター画分であることが明らかになったが、低収量のためそれ以上の精製はしなかった。

## § 2 インヒビターの純度検定

pH 9.5-7%(W/V) ポリアクリルアミドゲル電気泳動により7種の精製インヒビターの純度検定を行った。すべてのインヒビターについて単一なバンドが得られ、これらのインヒビターが純粋であることが示された (Fig. 2-6)。

## 第 3 節 シカクマメプロテイナーゼ インヒビターの性質

### § 1 分子量

精製した7種のインヒビターの分子量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した。2-メルカプトエタノールの存在下で WCI-1 と WCI-4 は2本のバンドを示し、その他5種のインヒビターについては単一なバンドが得られた。したがって、WCI-1 と WCI-4 の分子量測定は 2-メルカプトエタノールの非存在下で行った。精製インヒビターの分子量は WCI-1 が 22,000 で、その他6種のインヒビターはすべて 20,000 であった (Fig. 2-7)。

### § 2 アミノ酸組成

シカクマメ種子より精製した7種の酸性インヒビターのアミノ酸組成を Table 2-3 に示した。アミノ酸組成は各インヒビターの推定分子量に従って計算した。7種のインヒビターすべてが4個の半シスチンを含んでおり、3種のキモトリプシンインヒビター、WCI-1、WCI-2、WCI-3 と WTCI-1 はメチオニンを含んでいなかった。アミノ酸組成の結果は WCI-2 と WCI-3 の間に高い類似性を示した。

### § 3 酵素阻害活性

7種の酸性インヒビターについて、ウシトリプシン及びウシ $\alpha$ -キモトリプシンに対する阻害活性を Method A と Method C を用いて測定した。

WTI-2 と WTI-3 は 1 : 1 のモル比でウシトリブシンを強く阻害したが、ウシキモトリブシンに対しては弱い阻害活性しか示さなかった (Fig. 2-8)。これに対し、WTCI-1 はウシトリブシン及びウシキモトリブシンをいずれも 1 : 1 のモル比で強く阻害したが (Fig. 2-9)、WTCI-1 とトリブシンの複合体はもはやキモトリブシンを阻害することができず、WTCI-1 は同時に両酵素を阻害することはできなかった。

一方、4種のキモトリブシンインヒビターのうち、WCI-1 は 1 : 1.3 のモル比で、WCI-2 と WCI-3 は 1 : 2 のモル比でウシキモトリブシンを強く阻害し、これらのインヒビターがキモトリブシンに対して2個の反応部位を有していることが示唆された。ウシトリブシンに対しては、WCI-1 がわずかに阻害するものの WCI-2 と WCI-3 は全く阻害活性を示さなかった。なお、WCI-4 はウシトリブシンを阻害せず、ウシキモトリブシンに対しても弱い阻害活性しか示さなかった (Fig. 2-10)。

以上の結果をもとに、Green と Work の方法(26)に従って各インヒビターとウシトリブシン及びウシ $\alpha$ -キモトリブシンとの複合体の解離定数  $K_i$  値を計算した (Table 2-4)。WCI-2 と WCI-3 のキモトリブシンに対する  $K_i$  値は、2個の反応部位が等価であると仮定したときの1つの反応部位におけるみかけの  $K_i$  値として示した。WCI-1 と WCI-4 については、それぞれの両酵素に対する化学量論的關係が不明なために  $K_i$  値を計算することはできなかった。

これらのシカクマメインヒビターについては、さらにヒトすい液中のトリブシン及びキモトリブシンに対する阻害活性についても検討した。その結果、シカクマメインヒビターはウシトリブシンあるいはウシキモトリブシンに対する阻害活性に比べると弱い、ヒトすい液中に存在するトリブシン活性やキモトリブシン活性をも阻害することがわかった。

## § 4 免疫学的性質

シカクマメインヒビターの免疫学的性質について Ouchterlony 法を用いて検討した。ウサギ抗 WCI-3 抗血清は4種のキモトリブシンインヒビター、WCI-1、WCI-2、WCI-3、WCI-4 と沈降線を形成したが、その他のトリブシンインヒビター、WTI-1、WTI-2、WTI-3、及びトリブシン-キモトリブシンインヒビター WTCI-1 とは沈降線を形成しなかった (Fig. 2-11)。

## § 5 WTCI-1 の結晶化

WTCI-1 が低イオン強度下では難溶性であることに着目して、このインヒビターを 0.01M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解 (1mg/ml) した後、溶液を 4°C に保つことにより Fig. 2-12 に示すような針状結晶を得た。

## § 6 その他の性質

精製したシカクマメ酸性インヒビターの等電点及び分子吸光係数を Table 2-5 に示した。

## 第 4 節 考 察

マメ科植物種子中にはほとんど例外なくプロテイナーゼインヒビターが存在しているが、本研究によりシカクマメ (UPS-31) 種子にも 10 種以上のトリプシンあるいはキモトリプシンを阻害するプロテイナーゼインヒビターの存在することが明らかとなった。そのうち、一次構造の決定されている WTI-1A と WTI-1B(8)を含め、WTI-2、WTI-3、WCI-1、WCI-2、WCI-3、WCI-4、WTCI-1 の計 9 種のインヒビターは、分子量が約 20,000 であり、1 分子中に 4 個の半シスチンを含んでいることから Kunitz 型インヒビターであると考えられる (Table 2-3)。

本研究では、少量の BBI 型インヒビターの存在も確認されたが、種子抽出液の Sephadex G-75 によるゲルろ過の結果も、Kunitz 型インヒビターの含量が BBI 型インヒビターに比べて非常に高いことを示した。

Kortt はすでにアフィニティークロマトグラフィーを用いてシカクマメ種子より 2 種の Kunitz 型トリプシンインヒビター (Inhibitor 2 と Inhibitor 3) (10)と 1 種の Kunitz 型キモトリプシンインヒビター(11)を精製している。それらのアミノ酸組成から、Kortt が精製した Inhibitor 3 は WTI-1 に対応することが示されていたが、本研究で精製したインヒビターのアミノ酸組成より Inhibitor 2 が WTI-3 に、Kortt のキモトリプシンインヒビターが WCI-2 あるいは WCI-3 に対応することが明らかとなった (Table 2-3)。Kortt は 1 種のキモトリプシンインヒビターしか精製できなかったが、本研究では WCI-2 と WCI-3 という非常によく似た性質のキモトリプシンインヒビターが精製された。おそらく、これは精製に用いたシカクマメの品種の違いに基づくものと考えられる。なお、上記以外のインヒビターは本研究により初めて精製されたインヒビターである。

本研究におけるシカクマメインヒビターの精製法は、イオン交換クロマトグラフィーを利用したものであり、アフィニティークロマトグラフィーにおいて懸念される固定化酵素によるインヒビターの酵素的修飾を考慮する必要

がない。それにもかかわらず、2-メルカプトエタノール存在下での SDS-ポリ  
アクリルアミドゲル電気泳動において WCI-1 と WCI-4 は2本のバンドを示  
した。これは、種子中にこれらのインヒビターを限定分解するプロテイナー  
ゼが存在する可能性を示唆しており、種子中におけるプロテイナーゼとイン  
ヒビターの相互作用の解明に糸口を与えるものとして興味を持たれる。

シカクマメ種子中のキモトリブシンインヒビター含量は、トリブシンイン  
ヒビター含量に比べてはるかに多い (Table 2-2)。WTI-1 は、ウシトリブシ  
ンを強く阻害するが、ウシキモトリブシンをほとんど阻害しない(8)。これに  
対し、本研究で精製した WTI-2 と WTI-3 は、ウシトリブシンに対して  
WTI-1 と同様の強い阻害活性を示すとともに、ウシ $\alpha$ -キモトリブシンに対し  
ても弱い阻害活性を示した (Fig. 2-8)。WTCI-1 はトリブシン及びキモトリ  
ブシン両酵素を強く阻害するインヒビターであるが同時に両酵素を阻害する  
ことはできず (Fig. 2-9)、酸性 pH での両酵素による限定分解で新たに生  
じたN末端からのアミノ酸配列が、どちらも Ser-Gly-Phe-Ile-Pro-Gly- で  
あることから、WTCI-1 の両酵素に対する反応部位は同一であると考えられる。

一方、3種のキモトリブシンインヒビター WCI-1、WCI-2、WCI-3 は1分子  
で同時に2分子のキモトリブシンを阻害する特異なインヒビターである。こ  
のような双頭型の Kunitz 型インヒビターの報告はほんの数例にすぎず、ま  
た、これらのインヒビターがすべてキモトリブシンインヒビターであること  
は非常に興味深い。なお、WCI-4 はトリブシンを全く阻害しないうえにキモ  
トリブシンに対しても弱い阻害活性しか示さず、このインヒビターには他に  
標的酵素が存在することも考えられる (Fig. 2-10)。

本研究で得られたキモトリブシンインヒビター間にはアミノ酸組成に高い  
類似性が認められ、とくに WCI-2 と WCI-3 のアミノ酸組成は非常によく一  
致している。免疫学的性質においても、ウサギ抗 WCI-3 抗血清は4種のキモ  
トリブシンインヒビターと沈降線を形成するが、その他のインヒビターとは  
沈降線を形成しない。このことは、シカクマメキモトリブシンインヒビター  
間にはアミノ酸配列上においても高い相同性が存在することを示唆しており  
(Fig. 2-11)、事実、WCI-2 と WCI-3 はN末端から第 16 残基までのアミノ

酸配列が完全に一致している。

いずれにしても、シカクマメ種子中にはさまざまな阻害活性を示すプロテイナーゼインヒビターが多数存在しており、これらのインヒビターの阻害機  
作及び構造に関する研究は、将来マメ科植物種子インヒビターの分子進化及  
び生理的役割を解明していく上で重要な指針を与えてくれるであろう。

Table 2-1. The distribution of Kunitz-type and BBI-type inhibitors in seeds of leguminous plants(27). Plants are arranged by the morphological classification(28).

Morphological Classification	Distribution of Inhibitors (Kunitz-type) (BBI-type)	
I. Caesalpinieae (ジャケツイバラ亜科)		
1. Barbados pride (オオゴチヨウ)	+	-
II. Mimosaceae (ネムノキ亜科)		
3. <u>Acacia elata</u> (アカシア)	+	ND
6. Silk tree (ネムノキ)	+	ND
III. Fabaceae (マメ亜科)		
17. <u>Wisteria floribunda</u> (フジ)	-	+
36. <u>Erythrina latissima</u> (デイゴ)	+	ND
37. <u>Winged bean</u> (シカクマメ)	+	+
Azuki bean (アズキ)	-	+
Lima bean (アオイマメ)	ND	+
Garden bean	ND	+
<u>Macrotyloma axillare</u>	ND	+
38. Soybean (ダイズ)	+	+
40. Chick pea (ヒヨコマメ)	-	+
<u>Vicia angustifolia</u> (カラスノエンドウ)	ND	+
49. Peanut (ナンキンマメ)	-	+

ND, not determined.

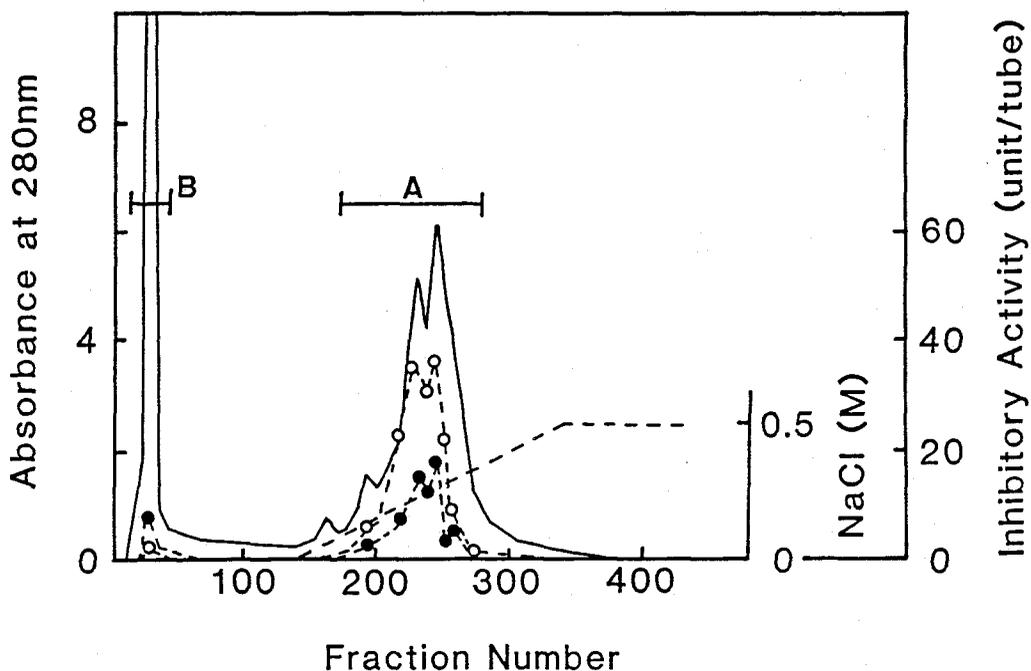


Fig. 2-1. DEAE-Sephadex A-50 chromatography of the crude inhibitors. A solution of crude inhibitors (340 ml) was put on a column (4 x 38 cm) of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5. The column was eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the equilibrating buffer (1.5 liters per bottle). The inhibitory activities were assayed by methods B and D. Fraction size, 16 ml; —, absorbance at 280 nm; ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration.

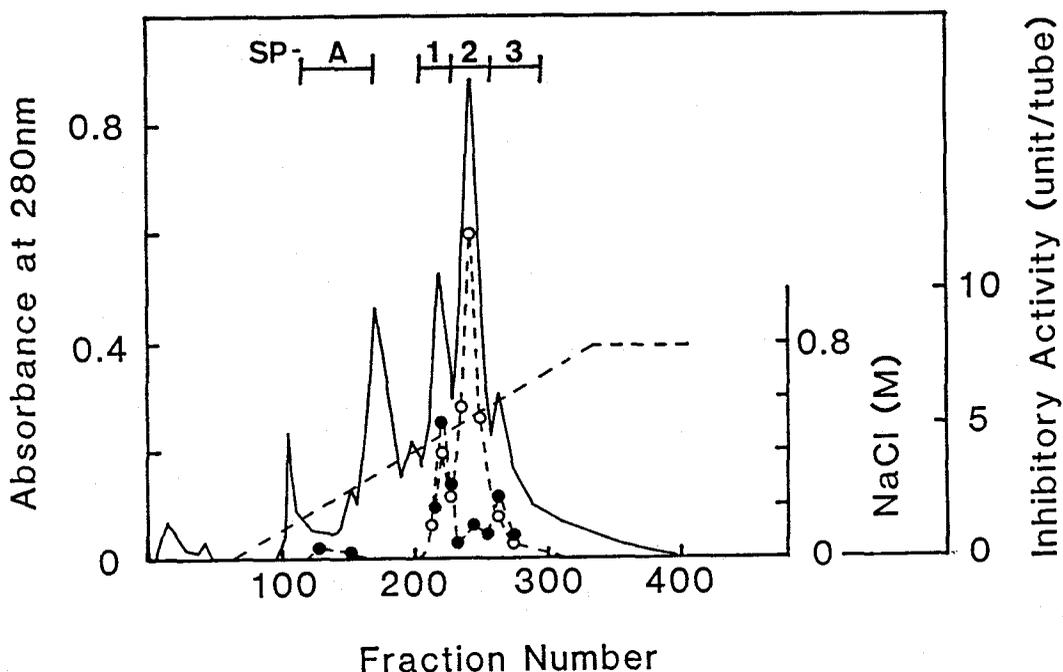


Fig. 2-2. SP-Sephadex C-25 chromatography of fraction A of Fig. 2-1. Lyophilized fraction A (1.07 g) was put on a SP-Sephadex C-25 column (2 x 70 cm) equilibrated with 0.01 M citrate buffer, pH 4.0. The column was eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.8 M in the equilibrating buffer (2 liters per bottle). The inhibitory activities were assayed by methods B and D. Fraction size, 15 ml; —, absorbance at 280 nm; ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration.

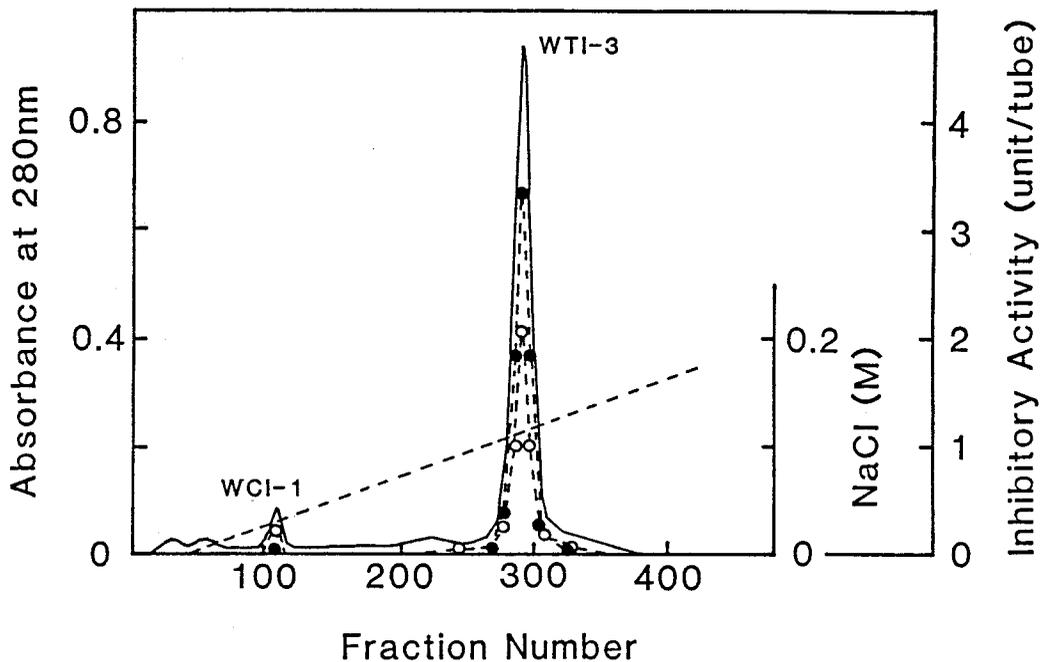


Fig. 2-3. DEAE-Sephacel chromatography of fraction SP-1 of Fig. 2-2. Fraction SP-1 was chromatographed on DEAE-Sephacel. The column (1.5 x 47 cm) was equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.2 M in the equilibrating buffer (1 liter per bottle). The inhibitory activities were assayed by methods B and D. Fraction size, 4 ml; —, absorbance at 280 nm; ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration.

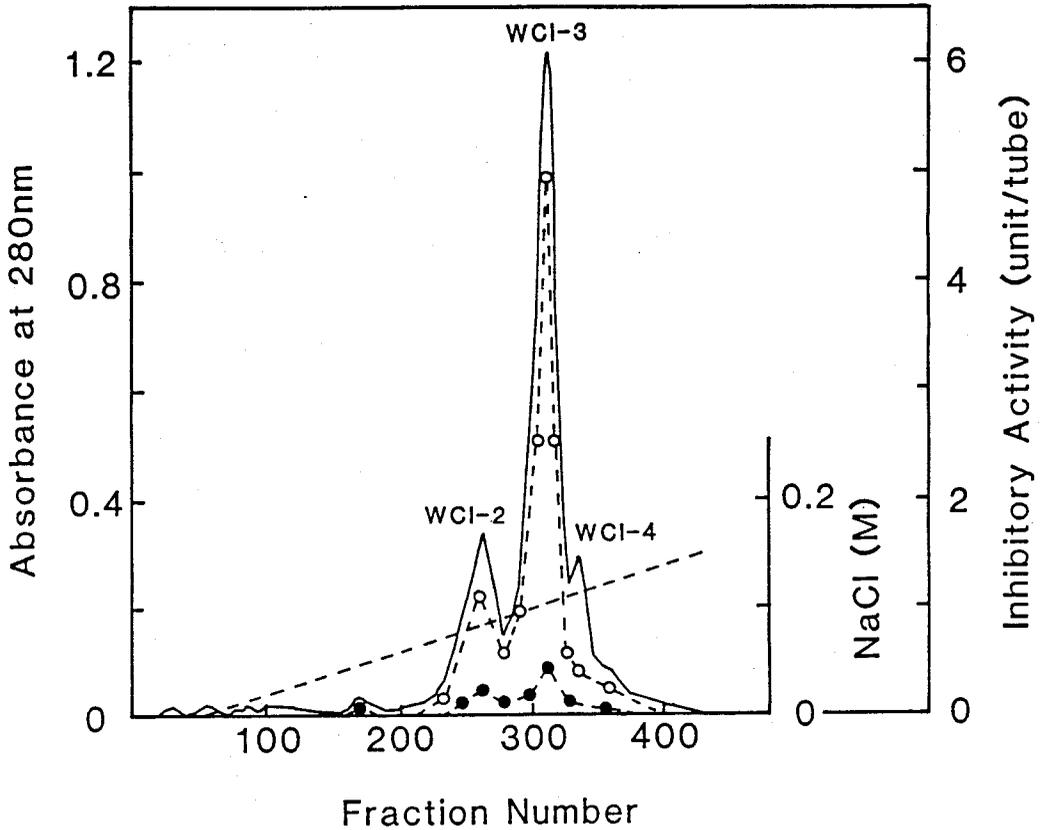


Fig. 2-4. DEAE-Sephacel chromatography of fraction SP-2 of Fig. 2-2. Fraction SP-2 was chromatographed on DEAE-Sephacel. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 2-3. —, absorbance at 280 nm; ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration.

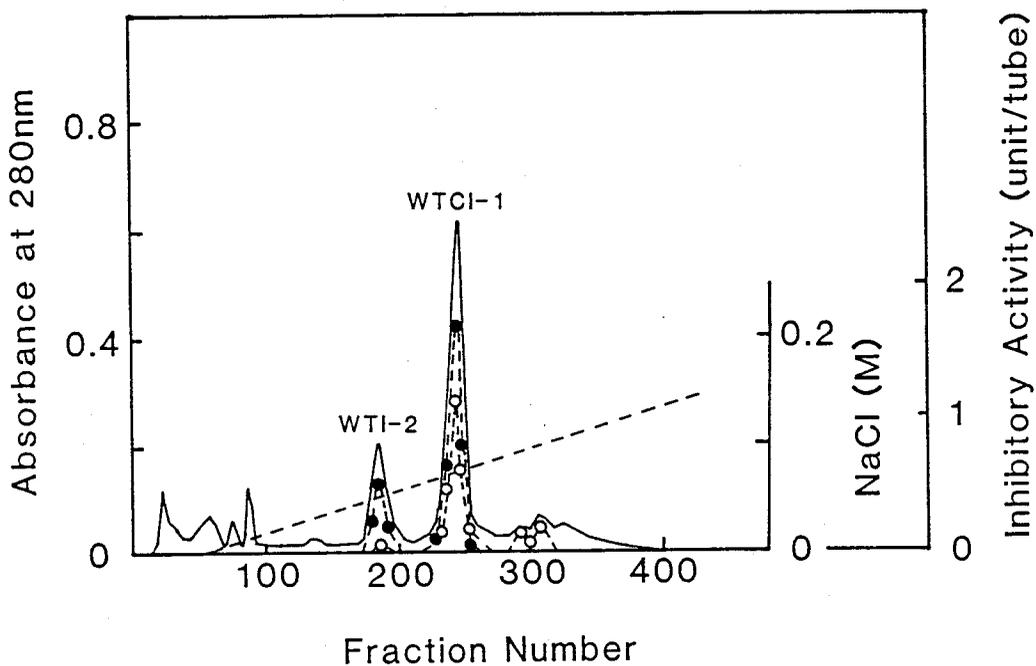


Fig. 2-5. DEAE-Sephacel chromatography of fraction SP-3 of Fig. 2-2. Fraction SP-3 was chromatographed on DEAE-Sephacel. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 2-3. —, absorbance at 280 nm, ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration.

Table 2-2. Purification of proteinase inhibitors from winged bean seeds. Results are indicated as the purification from 10 g of seeds.

	Protein (mg)	T. I. A. <sup>a</sup> (unit)	T. S. A. <sup>b</sup> (unit/mg)	C. I. A. <sup>c</sup> (unit)	C. S. A. <sup>d</sup> (unit/mg)
Extract	1,790	140	0.08	407	0.23
Crude inhibitors	790	106	0.13	259	0.33
Fraction A	469	80.1	0.17	242	0.52
Fraction B	181	10.0	0.06	6.3	0.03
SP-1	52.9	28.6	0.54	32.4	0.61
SP-2	90.8	5.1	0.06	113	1.24
SP-3	97.0	18.6	0.19	22.4	0.23
WTI-1	4.8	5.8	1.21	0.7	0.15
WTI-2	2.1	2.0	0.94	0.6	0.29
WTI-3	17.0	17.2	1.01	9.5	0.56
WCI-1	0.4	0.04	0.10	0.5	1.25
WCI-2	7.7	0.8	0.10	15.4	2.00
WCI-3	24.9	0.9	0.04	48.5	1.95
WCI-4	1.5	0.02	0.01	0.7	0.47
WTCI-1	6.7	7.5	1.12	6.5	0.97

<sup>a</sup>Trypsin inhibitory activity. <sup>b</sup>Specific activity of trypsin inhibitor.

<sup>c</sup>Chymotrypsin inhibitory activity. <sup>d</sup>Specific activity of chymotrypsin inhibitor.

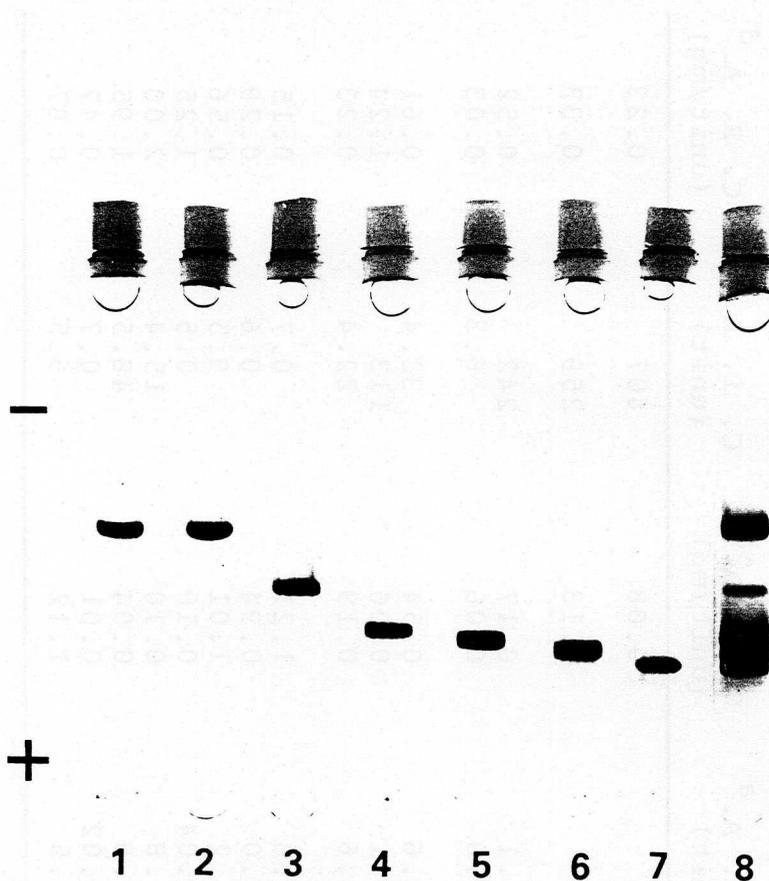


Fig. 2-6. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified inhibitors. Electrophoresis was done under the conditions described in "MATERIALS AND METHODS." 1, WTI-2; 2, WTCI-1; 3, WCI-1; 4, WCI-2; 5, WTI-3; 6, WCI-3; 7, WCI-4; 8, a mixture of the seven inhibitors.

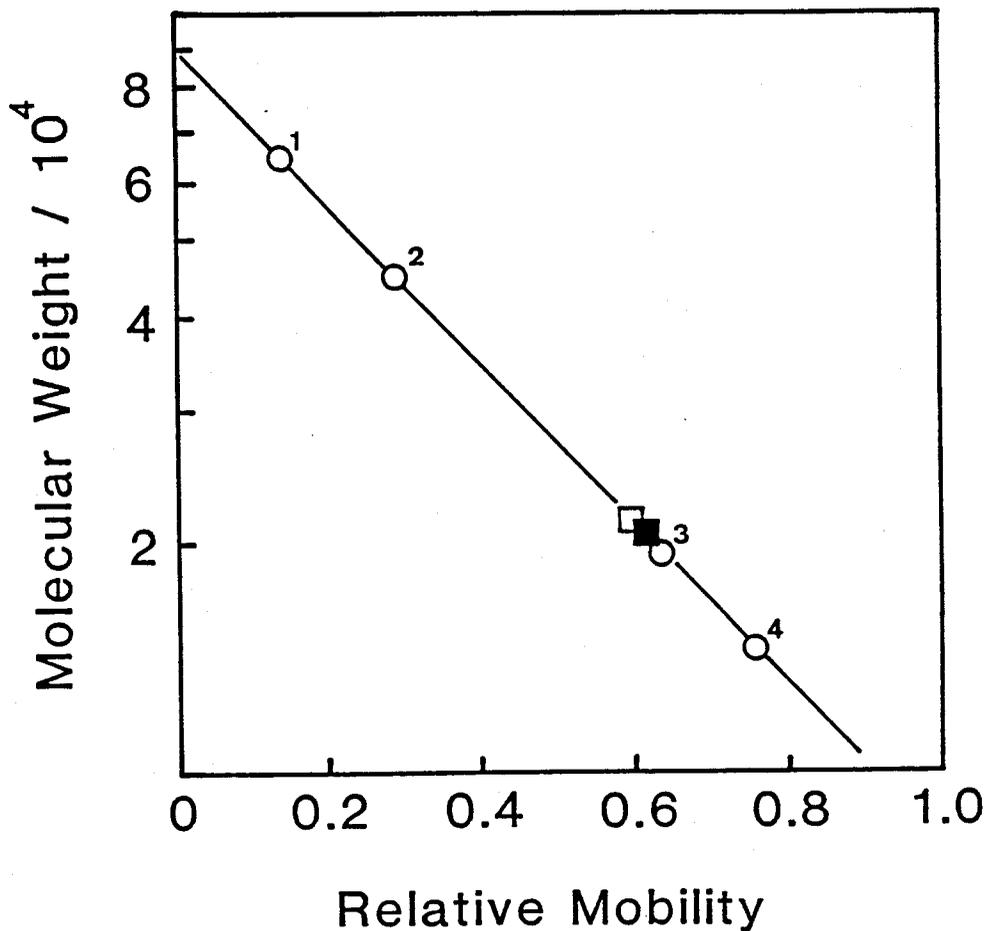


Fig. 2-7. Molecular weight measurement of winged bean inhibitors by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Standard proteins: 1, bovine serum albumin (M.W. 66,000); 2, ovalbumin (M.W. 44,000); 3, WTI-1A (M.W. 19,200) (8); 4, hen egg white lysozyme (M.W. 14,500). Samples: ■, WCI-2, 3, and 4, WTI-2 and 3, and WTCI-1; □, WCI-1.

Table 2-3. Amino acid compositions of purified winged bean inhibitors. Values for serine and threonine are extrapolated to zero time of hydrolysis. Values for valine and isoleucine are those of 72-h hydrolysates. Cystine was measured as cysteic acid. The numbers of residues in parentheses show the nearest integer.

Amino acid	WTI-2	WTI-3	WCI-1	WCI-2	WCI-3	WCI-4	WTCI-1
Aspartic acid	13.6(14)	16.1(16)	21.0(21)	18.9(19)	19.9(20)	25.9(26)	17.4(17)
Threonine	5.8(6)	6.5(7)	11.0(11)	7.1(7)	6.8(7)	6.0(6)	8.0(8)
Serine	14.2(14)	13.6(14)	17.0(17)	14.9(15)	14.6(15)	10.8(11)	15.3(15)
Glutamic acid	22.1(22)	22.5(23)	22.1(22)	19.7(20)	20.0(20)	14.5(15)	20.2(20)
Proline	14.1(14)	12.4(12)	15.4(15)	12.6(13)	12.8(13)	12.4(12)	11.1(11)
Glycine	13.5(13)	15.2(15)	14.8(15)	13.9(14)	13.8(14)	18.9(19)	20.2(20)
Alanine	9.4(9)	8.9(9)	9.7(10)	10.6(11)	10.3(10)	7.9(8)	10.3(10)
1/2 Cystine	3.8(4)	3.9(4)	4.4(4)	3.7(4)	3.8(4)	3.9(4)	3.8(4)
Valine	12.6(13)	15.6(16)	22.0(22)	15.4(15)	16.3(16)	15.9(16)	11.3(11)
Methionine	1.6(2)	3.1(3)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	1.4(1)	0.0(0)
Isoleucine	11.0(11)	5.0(5)	6.6(7)	8.9(9)	9.0(9)	12.5(13)	9.6(10)
Leucine	14.6(15)	15.0(15)	20.0(20)	18.6(19)	18.6(19)	13.0(13)	17.1(17)
Tyrosine	9.5(9)	10.8(11)	6.6(7)	5.6(6)	5.4(5)	8.2(8)	9.0(9)
Phenylalanine	5.8(6)	6.0(6)	5.7(6)	5.4(5)	5.3(5)	7.3(7)	6.8(7)
Lysine	14.6(15)	14.0(14)	11.1(11)	10.9(11)	11.5(11)	11.8(12)	10.4(10)
Histidine	0.9(1)	0.8(1)	3.2(3)	4.5(5)	6.2(6)	3.8(4)	1.1(1)
Tryptophan	1.8(2)	1.2(1)	1.9(2)	2.9(3)	2.8(3)	1.2(1)	1.8(2)
Arginine	9.8(10)	8.5(9)	8.0(8)	8.0(8)	7.0(7)	6.8(7)	9.8(10)
Total	180	181	201	184	184	183	182
Molecular weight	20,300	20,200	22,000	20,300	20,200	20,100	20,000

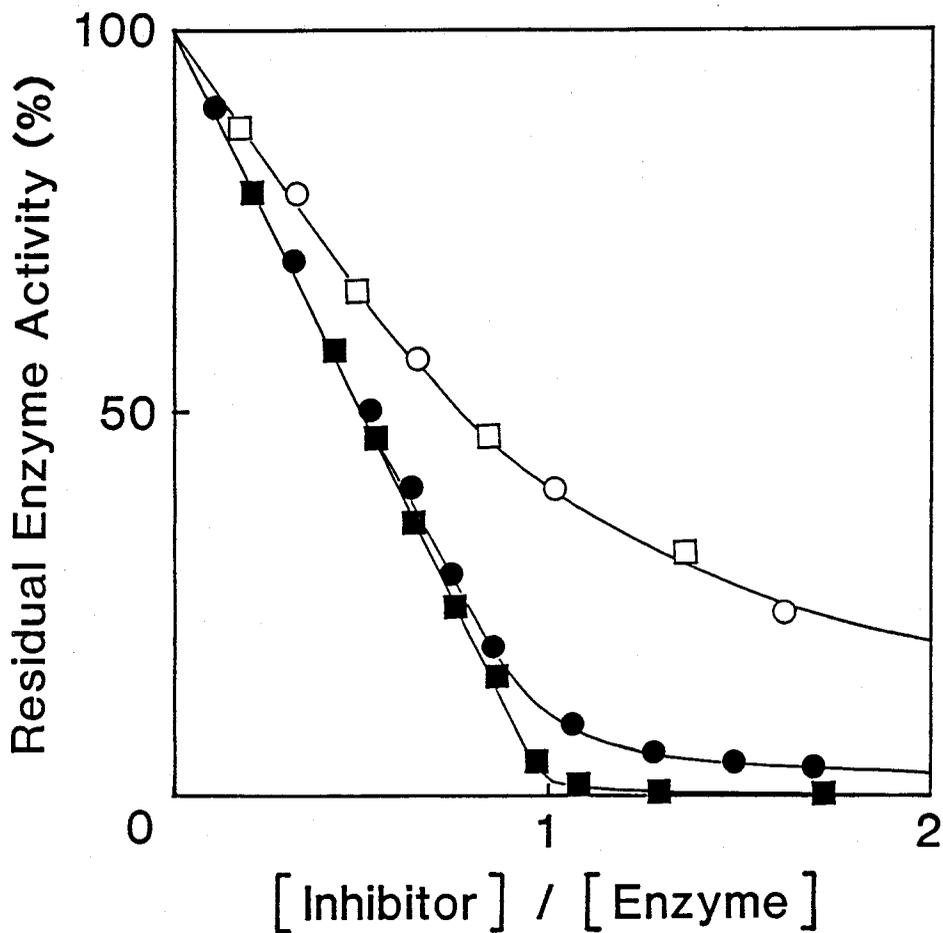


Fig. 2-8. Inhibitory activities of the trypsin inhibitors WTI-2 and 3. A fixed amount of bovine trypsin or  $\alpha$ -chymotrypsin was mixed with increasing amounts of the inhibitors, and the residual enzyme activities were assayed by methods A and C. The enzyme concentration in the reaction mixture was  $2.4 \times 10^{-7}$  M for trypsin and  $2.3 \times 10^{-7}$  M for  $\alpha$ -chymotrypsin. The closed and open marks indicate trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin activities, respectively. ● and ○, WTI-2; ■ and □, WTI-3.

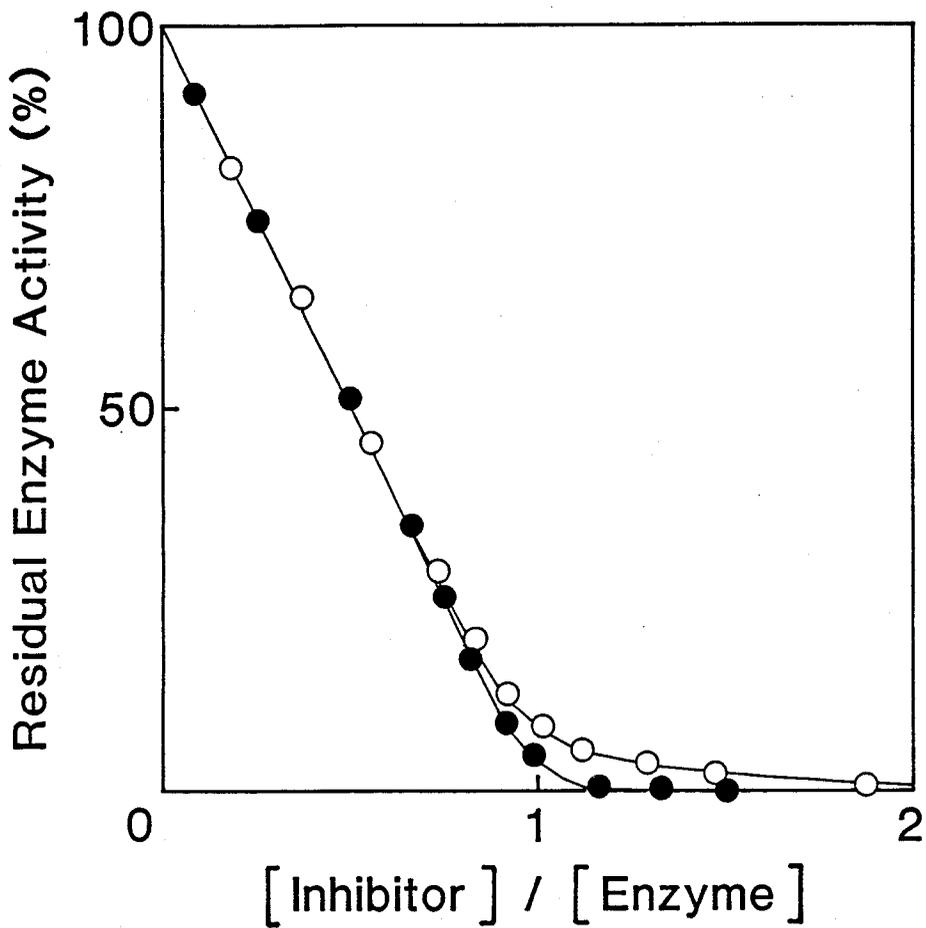


Fig. 2-9. Inhibitory activity of the trypsin-chymotrypsin inhibitor, WTCI-1. The conditions of the assay were as described in Fig. 2-8. ●, trypsin activity; ○,  $\alpha$ -chymotrypsin activity.

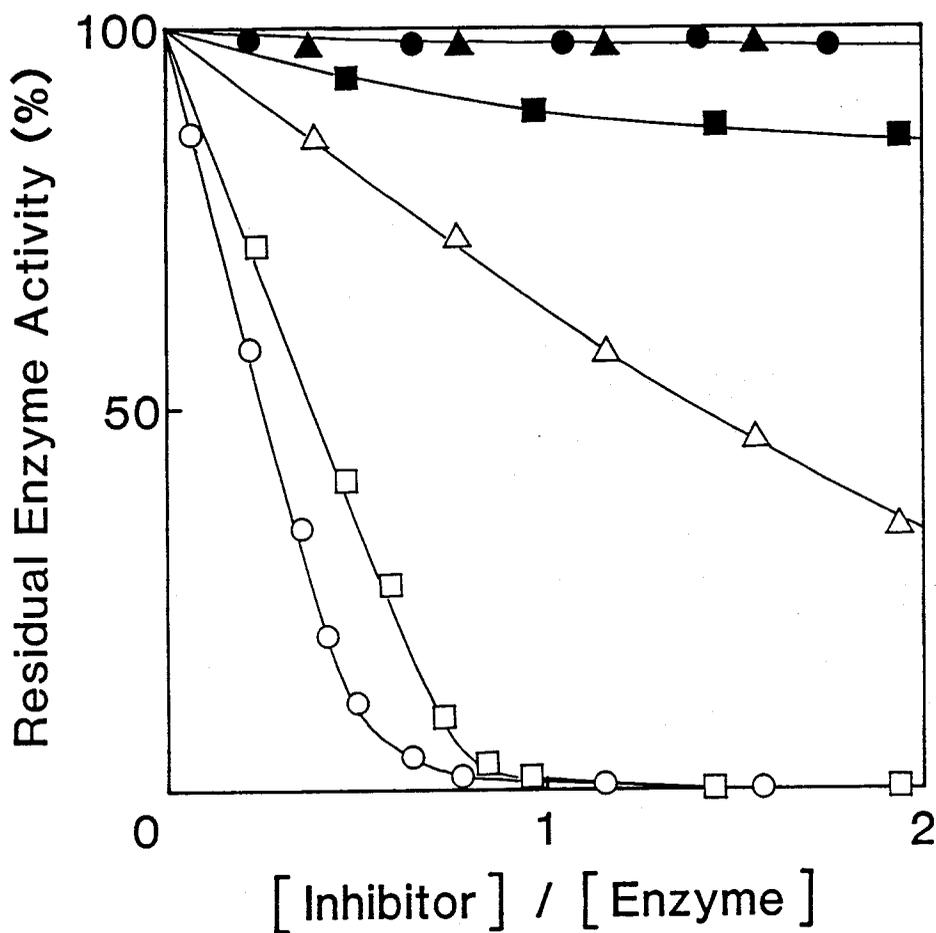


Fig. 2-10. Inhibitory activities of the chymotrypsin inhibitors, WCI-1, 2, 3, and 4. The conditions of the assay were as described in Fig. 2-8. The closed and open marks indicate trypsin and α-chymotrypsin activities, respectively. ■ and □, WCI-1; ● and ○, WCI-2 and 3; ▲ and △, WCI-4.

Table 2-4.  $K_i$  values for the inhibitor-enzyme complexes.

	Trypsin	Chymotrypsin
WTI-2	$4 \times 10^{-9}$ M	$7 \times 10^{-8}$ M
WTI-3	$2 \times 10^{-10}$ M	$7 \times 10^{-8}$ M
WCI-2 and 3	—	$6 \times 10^{-9}$ M <sup>a</sup>
WTICI-1	$6 \times 10^{-10}$ M	$2 \times 10^{-9}$ M

—, not calculated.

<sup>a</sup>Calculated on the assumption that there are two reactive sites with equivalent  $K_i$  values.



Fig. 2-11. Double immunodiffusion tests of winged bean inhibitors. Center wells, anti-WCI-3 antiserum; 1, 3, 5, 7 and 11, WCI-3; 2, WCI-1; 4, WCI-2; 6, WCI-4; 8, WTI-1; 9, WTI-2; 10, WTI-3; 12, WTCI-1. Each well contained 0.4  $\mu$ g of sample.

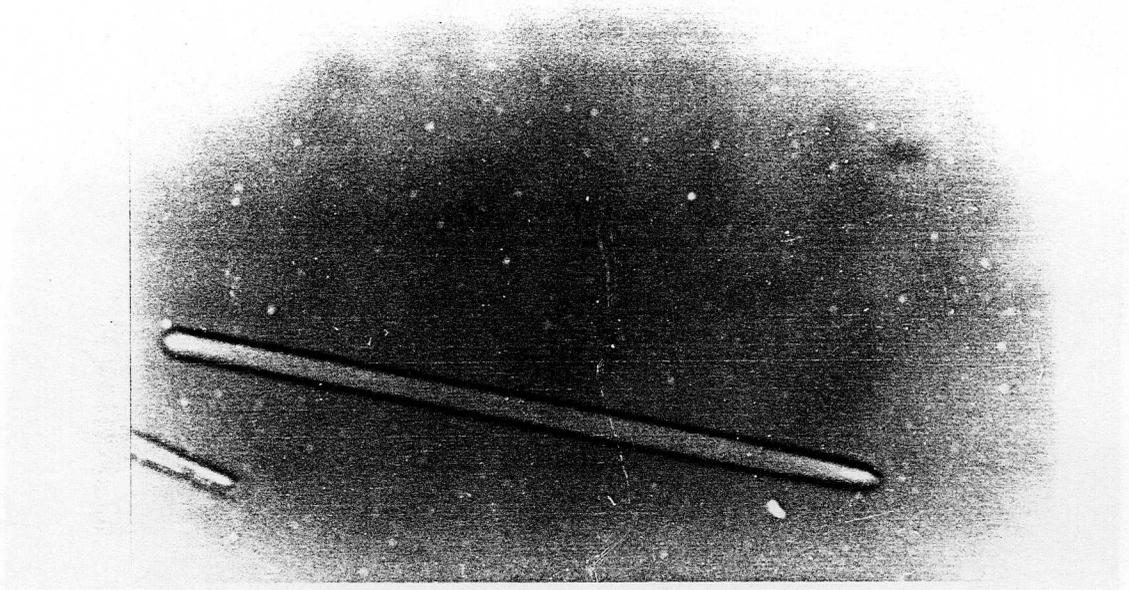


Fig. 2-12. Needle crystal of WTCI-1.

Table 2-5. Isoelectric points and molar extinction coefficients at 280 nm of the inhibitors.

	Isoelectric point	Molar extinction coefficient
WTI-2	5.9	29,400
WTI-3	5.1	22,600
WTI-1	6.0	25,300
WCI-2	5.6	33,100
WCI-3	5.6	29,700
WCI-4	5.7	25,500
WTCI-1	5.9	25,200

### 第 3 章

## シカクマメキモトリブシンイン ヒビター WCI-3 の一次構造

第2章において、シカクマメ種子 Kunitz 型プロテイナーゼインヒビターの精製と性質について述べた。

そのなかで、シカクマメキモトリブシンインヒビター WCI-3 はシカクマメ種子中に最も多く存在する Kunitz 型インヒビターで、1分子で同時に2分子のキモトリブシンを阻害する特異な阻害活性を示し、キモトリブシンに対して分子内に2個の反応部位を有していると考えられる。また、このインヒビターに対するウサギの抗血清は、キモトリブシンインヒビター (WCI-1、WCI-2、WCI-3、WCI-4) 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反応せず、インヒビターの抗原性と阻害活性、さらには構造との間に相関関係があることを示唆した。

一方、現在までに全一次構造が明らかにされた Kunitz 型インヒビターは、ダイズトリブシンインヒビター(5)をはじめ、すべてトリブシンを強く阻害するインヒビターであり、Kunitz 型インヒビターの阻害機作と構造との関係を解明していく上で、トリブシン以外に標的酵素をもつ Kunitz 型インヒビターの一次構造を決定することは意義深い。

そこで本研究では、WCI-3 の特異な阻害機作と構造との関係について考察するため、WCI-3 の一次構造を決定し、そのキモトリブシンに対する反応部位について検討した。

## 第 1 節 材料と方法

### § 1 実験材料

シカクマメキモトリブシンインヒビター WCI-3 は第2章で精製したものを  
用いた。

TPCK-トリブシンと TLCK-キモトリブシンは Sigma 社から購入した。  
Staphylococcus aureus V 8 プロテアーゼは Pierce 社製を用いた。  
Achromobacter liticus リジルエンドペプチダーゼは和光純薬から、酸性カ  
ルボキシペプチダーゼ (カルボキシペプチダーゼ P) はペプチド研究所から  
購入した。Sephadex G-25 (Superfine) と Sephadex G-75 (Superfine) は  
Pharmacia 社から購入した。Cosmosil 5C<sub>18</sub> は半井化学から、YMC-GEL  
ODS S-5 A Type は山村化学から購入した。Ultrasphere-ODS カラム (4.6 x  
250mm) は Beckman 社から、BIO-RAD Hi-Pore RP-304 カラム (4.6 x 250mm)  
は BIO-RAD 社から購入した。その他の試薬は用途に応じて特級またはそれ以  
上のものを用いた。

### § 2 実験方法

#### <還元 S-カルボキシメチル化>

WCI-3 の還元 S-カルボキシメチル化は Crestfield らの方法(29)に従って  
行った。WCI-3 (500nmol) を 2mM EDTA と 6M グアニジン塩酸を含む 0.5M  
トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) 2ml に溶解した後、半シスチンの 100 倍モル  
量の 2-メルカプトエタノールを加え、窒素置換して 37℃ で4時間還元した。  
還元後、加えた 2-メルカプトエタノールよりいくぶん少なめのモノヨード酢  
酸 (180 μmol) を溶解した 4N 水酸化ナトリウム溶液 60 μl を滴下し、遮光  
下室温で 15 分間反応させた後、50% 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 カラ

ム (1.5 x 25cm) により試薬を除去した。

#### <高速液体クロマトグラフィーによるペプチドの分離>

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるペプチドの分離は、日立 638 型高速液体クロマトグラフを用いて行った。カラムは C<sub>18</sub> 逆相系カラム (Cosmosil 5C<sub>18</sub> あるいは YMC-GEL ODS S-5 A Type, 4 x 300mm) 及び C<sub>4</sub> 逆相系カラム (BIO-RAD Hi-Pore RP-304, 4.6 x 250mm) を使用し、ペプチドは 220nm と 280nm の吸光度により検出した。溶出系としては次に示す 3つの溶媒系を使用し、それぞれ流速 1ml/min で、0→100% B液の 60 分直線濃度勾配法により溶出した。

##### (1) TFA系A

A液: 0.05% TFA 水溶液

B液: A液 - 2-プロパノール - アセトニトリル (20 : 21 : 9)

##### (2) TFA系B

A液: 0.05% TFA 水溶液

B液: A液 - アセトニトリル (2 : 3)

##### (3) 酢酸アンモニウム系

A液: 0.01M 酢酸アンモニウム (pH 5.6)

B液: 75% アセトニトリルを含むA液

#### <アミノ酸分析>

アミノ酸分析は、第2章で述べた方法に従って分析した。試料はすべて 4M メタンサルホン酸 (0.2% 3-(2-アミノエチル)インドール 含有) を用いて 24 時間加水分解した(21)。

#### <アミノ酸配列分析>

ペプチドのアミノ酸配列は、エドマン分解法及びカルボキシペプチダーゼ法により決定した。

手動エドマン分解法は岩永らの方法(30)に従い、自動エドマン分解法には、日本電子 JAS-570K 液相シーケンサーを使用した。エドマン分解による各 PTH-アミノ酸の同定は、妻鹿らの方法(31)に従い、Ultrasphere-ODS カラム (4.6 x 250mm) を用いた C<sub>18</sub> 逆相系 HPLC により行った。

カルボキシペプチダーゼ法はカルボキシペプチダーゼ P を用いて行った。試料 (5-10nmol) を 0.1% Triton X-100 を含む 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.7) 200  $\mu$ l に溶解した後、1/500 モル量の酵素を加えて 37°C で反応させ、時間経過にともなう遊離のアミノ酸量をアミノ酸分析計で定量した。

### <酵素消化>

#### a) トリプシン消化

RCm-WCl-3 (150nmol) を 1M 尿素を含む 0.01M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.0) 700  $\mu$ l に溶解した後、1/100 モル量の TPCK-トリプシンを加えて 37°C で 4 時間反応させた。

#### b) リジルエンドペプチダーゼ消化

RCm-WCl-3 (150nmol) を 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.5) 500  $\mu$ l に溶解した後、1/800 モル量のリジルエンドペプチダーゼを加えて 30°C で 2 時間反応させた。

#### c) V8プロテアーゼ消化

RCm-WCl-3 の V8プロテアーゼ消化は、RCm-WCl-3 (120nmol) を 0.05M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.0) 500  $\mu$ l に溶解した後、1/100 モル量の酵素を加えて 37°C で 10 時間反応させた。

トリプシンペプチド TB-6 及び TB-8 の V8プロテアーゼ消化は、ペプチド (30nmol) を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 200  $\mu$ l に溶解した後、1/25 モル量の酵素を加えて 37°C で 24 時間反応させた。

#### d) キモトリプシン消化

リジルエンドペプチダーゼ消化により得られたペプチド混合物画分 L-8 のキモトリプシン消化は、L-8 (15nmol) を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 200  $\mu$ l に溶解した後、1/400 モル量の TLCK-キモトリプシンを加えて 37°C

で2時間反応させた。

V8プロテアーゼペプチド V-14 のキモトリブシン消化は、V-14 (15nmol) を 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 200  $\mu$ l に溶解した後、1/400 モル量の TLCK-キモトリブシンを加えて 37°C で2時間反応させた。

#### <ヒドラジン分解>

WCI-3 (20nmol) を無水ヒドラジン 100  $\mu$ l に溶解し、冷却下で減圧封管した後、100°C で8時間ヒドラジン分解を行った(32)。分解後開管し、トルエンを数滴加えて減圧下でヒドラジンを除去した後、残った分解物を 800  $\mu$ l の水に溶解し、さらに 200  $\mu$ l の蒸留ベンズアルデヒドを加えてはげしく振りまぜた。室温で1時間放置した後、遠心分離により油層を分離除去し、水層を窒素気流中で濃縮乾固した。C末端アミノ酸は、この乾固物を 0.2M クエン酸緩衝液 (pH 2.2) に溶解してアミノ酸分析計により同定した。

#### <WCI-3 のキモトリブシンによる限定分解>

WCI-3 (500nmol) を酢酸水溶液 (pH 4.1) 2ml に溶解し、1/25 重量の TLCK-キモトリブシンを加えた後、トルエンを1滴滴下して室温で4週間反応させた。

## 第 2 節 WCI-3 の一次構造

### § 1 末端アミノ酸配列

WCI-3 を還元 S-カルボキシメチル化した後、液相シーケンサーにより N 末端から第 64 残基のフェニルアラニンまでのアミノ酸配列を決定した (Fig. 3-1)。

C 末端アミノ酸はヒドラジン分解により同定したが、遊離のアミノ酸として、WCI-3 1 モル当りスレオニン 0.12 モル、セリン 0.52 モル、アラニン 0.15 モル、ヒスチジン 0.16 モルが検出され、WCI-3 における C 末端領域の不均一性が示唆された。

### § 2 トリプシンペプチド のアミノ酸配列

RCm-WCI-3 (150nmol) をトリプシン消化した後、消化物を 0.01M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-25 (Superfine) カラム (0.9 x 136cm) にかけて TA から TF までの画分を得た (Fig. 3-2)。

画分 TF からは遊離のアルギニンのみが検出され、WCI-3 中に Arg-Arg 結合あるいは Lys-Arg 結合の存在することが示唆された。TA から TE までの 5 つの画分については、C<sub>18</sub> 逆相系 HPLC によりトリプシンペプチドを精製し、それぞれのペプチドについてアミノ酸配列分析を行った。

画分 TA からは HPLC により 3 つのペプチドを精製した (Fig. 3-3)。ペプチド TA-2 と TA-3 は HPLC 上で 2 つのピークに分かれたが、そのアミノ酸組成は完全に一致し (Table 3-1)、N 末端から第 22 残基及び C 末端 3 残基のアミノ酸配列も同じであった (Fig. 3-4)。ペプチド TA-1 は、その C 末端アミノ酸がヒスチジンであることからトリプシン消化により非特異的に

切断されて生じたペプチドであると考えられる (Fig. 3-4)。

画分 TB の HPLC では、Fig. 3-5 に示すように 15 個以上のピークが得られたが、そのうち純粋に得られた TB-1 から TB-8 までの 8 個のペプチドについてアミノ酸配列分析を行った。各ペプチドのアミノ酸組成とアミノ酸配列を Table 3-2 と Fig. 3-6 に示した。

ペプチド TB-6 と TB-8 の配列分析で決まらなかった部分のアミノ酸配列は、それぞれのペプチドをさらに V8 プロテアーゼ消化して決定した。TB-6 の V8 プロテアーゼ消化物からは、HPLC により 3 つのペプチドが得られた (Fig. 3-7)、それらのアミノ酸組成より TB-6-V2 は未消化物であることがわかったので (Table 3-3)、TB-6-V1 と TB-6-V3 のアミノ酸配列分析より TB-6 の全アミノ酸配列を決定した (Fig. 3-8)。TB-8 の V8 プロテアーゼ消化物の HPLC から 3 つのペプチドが得られた (Fig. 3-9)。各ペプチドのアミノ酸組成及びアミノ酸配列分析より、TB-8 の V8 プロテアーゼペプチドの配列順序は N 末端側から TB-8-V2、TB-8-V1、TB-8-V3 の順であることがわかった (Table 3-4、Fig. 3-10)。

画分 TC の HPLC では 2 つの精製ペプチド TC-2、TC-3 とペプチド混合物画分 TC-1 が得られた (Fig. 3-11)。画分 TC-1 は、充填剤と溶出系をかえた HPLC で再分画して 9 個のペプチドを精製した (Fig. 3-12)。ペプチド TC-1-8 及び TC-1-9 は、それぞれペプチド TC-2 及び TC-3 とアミノ酸組成が一致することから、画分 TC を 50% 酢酸に溶解して HPLC にかけてたために、その一部がカラムに吸着せず、画分 TC-1 と同時に溶出してきたものと考えられる (Table 3-5)。Fig. 3-13 に示したように、TC-1-1 から TC-1-7 までの 7 個のペプチドはそのアミノ酸配列から WC1-3 の C 末端ペプチドであると考えられ、前セクションのヒドラジン分解の結果から予想された C 末端領域の不均一性とも一致している。

画分 TD の HPLC からは、混合物画分 TD-1 と 5 つの精製ペプチド (TD-2 から TD-6) が得られた (Fig. 3-14)。画分 TD-1 は、画分 TC-1 と同様、溶出系をかえた HPLC でさらに分画し、TD-1-1 と TD-1-2 の 2 つのペプチドを得た (Fig. 3-15)。こうして得られた 7 個のペプチドのアミノ酸組成とア

ミノ酸配列を Table 3-6 と Fig. 3-16 に示した。アルギニンペプチド TD-1-1 は手動エドマン分解法により Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup> までしかアミノ酸配列を決定することができなかった。

画分 TE からは HPLC により3つの精製ペプチド TE-2、TE-3、TE-4 とペプチド混合物画分 TE-1 が得られた (Fig. 3-17)。画分 TE-1 については、画分 TC-1 及び TD-1 と同様、再 HPLC を行うことにより9個のペプチドを精製した (Fig. 3-18)。

Table 3-7 のアミノ酸組成分析の結果より、ペプチド TE-4 は画分 TE に混入したペプチド TD-6 (Table 3-6) であり、ペプチド TE-1-8 と TE-1-9 は画分 TE-1 に混入したペプチド TE-2 と TE-3 であることが明らかとなった。また、Fig. 3-19 のアミノ酸配列分析の結果より、ペプチド TE-1-4 と TE-1-5 及び TD-1-1、さらに TE-1-7 と TD-1-2 は同一のペプチドであると考えられる。TE-1-5 及び TE-1-6 は、3段目以降のエドマン分解が進まなかったため、全アミノ酸配列を決定することはできなかった。

以上の結果をもとに、WCI-3 を構成するトリブシンペプチドのアミノ酸組成を Table 3-8 に、アミノ酸配列分析の結果を Fig. 3-20 に示した。Table 3-8 に示したトリブシンペプチドのアミノ酸組成の総和が WCI-3 のアミノ酸組成と一致することから、本酵素消化においてすべてのトリブシンペプチドが回収されたと考えられる。

また、Fig. 3-20 におけるトリブシンペプチド間の配列順序は、TA-2 から TD-6 までは WCI-3 の N 末端配列分析より、TB-5 と TB-6 の接続は TB-7 より、TD-2 と TD-5 の接続は TB-4 より、TE-1-2 と TE-1-3 の接続、及び TE-1-1 と TC-1-6 の接続はそれぞれ TE-1-4 と TC-1-7 のアミノ酸配列より決定した。その他の配列順序については、ダイズトリブシンインヒビター STI(5)及びシカクマメトリブシンインヒビター WTI-1(8)との相同性に従って推定した。

### § 3 リジルエンドペプチダーゼ ペプチドのアミノ酸配列

WC1-3 のアルギニル結合の接続を明らかにするために、リジルエンドペプチダーゼ消化を行い、前セクションで得たトリプシンペプチドのうち、すべてのアルギニンペプチドと一部のリジンペプチドの配列順序を決定した。

RCm-WC1-3 (150nmol) をリジルエンドペプチダーゼで消化した後、BIO-RAD Hi-Pore RP-304 (C4) カラムを用いた TFA 系 A の HPLC によりリジンペプチド及びC末端ペプチドを分離した (Fig. 3-21)。分取した12個の画分のうち、L-1 と L-8 を除く10個の画分はそのアミノ酸組成から単一のペプチド画分であると考えられたので (Table 3-9)、それらについてはそのままアミノ酸配列分析を行った。L-9 と L-10 は、HPLC 上で2つのピークに分かれたが、ともに同じアミノ酸組成を示し、末端アミノ酸配列も一致していた。

画分 L-1 からはC<sub>18</sub> 逆相系カラムを用いた HPLC により9個の小ペプチドが分離・精製され (Fig. 3-22)、そのうち L-1-2 から L-1-7 までの6つのペプチドはそのアミノ酸組成からC末端ペプチドであることが明らかとなった (Table 3-10)。

画分 L-8 については、溶出系をかえて再 HPLC を行うことにより3つのペプチド L-8A、L-8B<sub>1</sub>、L-8B<sub>2</sub> を得たが (Fig. 3-23)、L-8B<sub>1</sub> と L-8B<sub>2</sub> はそのアミノ酸組成が一致していることから同一のペプチドであると考えられる (Table 3-11)。

以上の方法により精製したリジンペプチドのうち、アルギニンを含んでいるペプチド及びリジンを2個含むペプチドについてアミノ酸配列分析を行った (Fig. 3-24)。ペプチド L-5 のアミノ酸配列はトリプシンペプチドの TB-3 と TC-2、ペプチド L-7 のアミノ酸配列は TD-5 と TE-2 の配列順序を明らかにした。また、ペプチド L-11 はそのアミノ酸組成と末端アミノ酸配列から L-5 と L-12 が接続したペプチドであり、ペプチド L-12 のアミノ酸配列は、TD-3、TD-6、TB-5、TB-6 の4つのトリプシンペプチドがこの順序で

接続していることを示した。Fig. 3-24 に示したように、画分 L-8 から得られたペプチド L-8A のアミノ酸配列は、トリブシンペプチド TB-2 と TD-4 の接続を明らかにし、ペプチド L-8B<sub>1</sub> 及び L-8B<sub>2</sub> は、L-8A の Lys<sup>143</sup>-Cys<sup>144</sup> 結合が切断されて生じたC末端側ペプチドであることが確認された。WCI-3 のトリブシン消化において配列順序が不明であったアルギニンペプチドのうち、TD-4、TE-1-2、TE-1-3、及び TF の4つのペプチドは、そのアミノ酸組成から推定して L-8 に含まれていると考えられるので、ペプチド混合物画分 L-8 をそのままキモトリブシン消化した。消化物の HPLC より6個のキモトリブシンペプチドを精製し (Fig. 3-25)、それらのアミノ酸組成より L-8-C6 に4残基のアルギニンが含まれていることが明らかとなった (Table 3-12)。そこでこの L-8-C6 のアミノ酸配列を決定して、トリブシンペプチド TD-4、TE-1-2、TE-1-3、TF、TB-8 がこの順序で接続していることを明らかにした (Fig. 3-26)。

Table 3-13 は上述の結果より WCI-3 を構成するリジルエンドペプチダーゼペプチドのアミノ酸組成を示したものであるが、それらのペプチドのアミノ酸組成の総和が WCI-3 のアミノ酸組成と一致することから、本酵素消化においてすべてのリジンペプチドが回収されたと考えられる。

Fig. 3-27 にリジルエンドペプチダーゼ消化によるアミノ酸配列分析の結果を示した。

## § 4 V 8 プロテアーゼペプチド のアミノ酸配列

トリブシン及びリジルエンドペプチダーゼ消化により決定できなかった部分のアミノ酸配列を明らかにするために V 8 プロテアーゼ消化を行い、5つのペプチド結合 Lys<sup>103</sup>-Leu<sup>104</sup>、Lys<sup>108</sup>-Leu<sup>109</sup>、Lys<sup>121</sup>-Val<sup>122</sup>、Lys<sup>131</sup>-Leu<sup>132</sup>、Lys<sup>174</sup>-Ala<sup>175</sup> (Fig. 3-27) の接続を確定した。

RCm-WCI-3 (120nmol) を V 8 プロテアーゼで消化した後、C<sub>18</sub> 逆相系

HPLC によりグルタミン酸ペプチド及びC末端ペプチドを分離した (Fig. 3-28)。その結果、V-1 から V-14 までの画分が得られた。それぞれのアミノ酸組成より V-1 はC末端ペプチド混合物であり、V-2 から V-14 は WCI-3 のアミノ酸配列において Table 3-14 に示した位置を占めるペプチドであると考えられる。

上述の5個のリジル結合の接続を明らかにするためには、ペプチド V-6、V-8、V-14 のアミノ酸配列を明らかにすればよいことがわかったので、それらのアミノ酸配列分析を行った。ペプチド V-6 のアミノ酸配列は Lys<sup>174</sup>-Ala<sup>175</sup> の結合を確定し、ペプチド V-8 のアミノ酸配列より Lys<sup>121</sup>-Val<sup>122</sup> 結合と Lys<sup>131</sup>-Leu<sup>132</sup> 結合の接続を決定した (Fig. 3-29)。

ペプチド V-14 は、さらにキモトリプシン消化を行い、消化物の HPLC により6個の精製ペプチドを得た (Fig. 3-30)。それらのアミノ酸組成より、V-14-C1 が Lys<sup>108</sup>-Leu<sup>109</sup> 結合を含むペプチドであり、V-14-C5 と V-14-C6 が Lys<sup>103</sup>-Leu<sup>104</sup> 結合を含むペプチドであると推定された (Table 3-15)。そこで、V-14-C1 と V-14-C5 のペプチドについてアミノ酸配列分析を行って、上述の2つの結合の接続を決定した (Fig. 3-31)。

## § 5 WCI-3 の全一次構造

RCm-WCI-3 の末端アミノ酸配列及び3種の酵素消化によるアミノ酸配列分析により WCI-3 の全一次構造を決定した (Fig. 3-32)。これにより、WCI-3 は 183 個のアミノ酸から成り、C末端領域に不均一性の存在することが明らかとなった。

なお、上述の各酵素消化物の HPLC において番号の表示されていないピークは、低収量のペプチド混合物あるいはアミノ酸を含んでいないピークであり、本研究の配列分析には用いなかった。

### 第 3 節 WCI-3 の反応部位

WCI-3 のキモトリプシンに対する反応部位を決定するため、小沢と Laskowski, Jr. の方法(33)(Fig. 3-33)に従って酸性条件下(pH 4.1)でキモトリプシンによる限定分解を行った。

反応はポリアクリルアミドゲル電気泳動で追跡し、4週間で約 60% の修飾インヒビター WCI-3<sup>\*</sup> が生成した (Fig. 3-34)。反応溶液を凍結乾燥後還元 S-カルボキシメチル化し、試薬の除去とフラグメントの分離を兼ねて Sephadex G-75 (Superfine) カラム (1.9 x 195cm) によるゲルろ過を行って、MA から MC までの 3 つの画分を得た (Fig. 3-35)。3 つの画分 MA、MB、MC のアミノ酸組成は、MA が修飾を受けなかった WCI-3 画分であり、MB と MC は限定分解により生じたフラグメントであることを示し、2 つのフラグメントのアミノ酸組成の総和は WCI-3 のアミノ酸組成と一致した (Table 3-16)。また、フラグメント MB と MC のアミノ酸配列分析より、WCI-3 は酸性条件下でキモトリプシンにより Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合の位置で切断されることが明らかとなった (Fig. 3-36)。

なお、第 4 章で詳述するが、Fig. 3-35 において画分 MB と MC の間のピークは、酸性条件下で Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合が非酵素的に切断されたために生じたピークである。

## 第 4 節 考 察

シカクマメキモトリブシンインヒビター WCI-3 は、シカクマメ種子中に最も多く存在し、1分子で同時に2分子のキモトリブシンを強く阻害する Kunitz 型インヒビターである。本研究ではこの WCI-3 の特異な阻害機作と構造との関係について考察するため、その一次構造を決定し、キモトリブシンに対する反応部位について検討した。

第2章で、WCI-3 は分子量約 20,000、半シスチンを4個含む単純タンパク質で、分子内にメチオニンを全く含んでいないことを示した。したがって、本研究では構造解析の常法であるプロモシアン分解によるメチオニル結合の化学選択的切断法を利用することができなかつたので、まず、RCm-WCI-3 のトリブシン消化を行い、全トリブシンペプチドのアミノ酸配列を決定することにした。WCI-3 は分子内に11個のリジンと7個のアルギニンを含んでおり (Table 2-3)、RCm-WCI-3 のトリブシン消化は多数のトリブシンペプチドを生じることが予想されたので、HPLC を行う前にトリブシン消化物を Sephadex G-25 カラムを用いたゲルろ過により TA から TF までの6つの画分に分画した (Fig. 3-2)。

画分 TF は遊離のアルギニンのみを含んでいたが、画分 TA から TE までの5つの画分は、さらに HPLC を行ってトリブシンペプチドを分離・精製し、それぞれのペプチドについてアミノ酸組成及びアミノ酸配列分析を行った。そのなかで、TA-2 と TA-3、TC-1-2 と TC-1-3、及び TE-1-4 と TE-1-5 のペプチドは、それぞれアミノ酸組成が完全に一致しているにもかかわらず HPLC 上で異なる位置に溶出されてきた。おそらく TA-2 と TA-3 は、Trp<sup>25</sup> の修飾により、TE-1-4 と TE-1-5 はゲルろ過後の塩基性溶液中での長期保存による Asn<sup>155</sup>-Gly<sup>156</sup> 結合のβ転位により生じたものと考えられ、事実、TE-1-5 は3段目以降のエドマン分解が進まなかつた (Fig. 3-19)。TC-1-2 と TC-1-3 が2つに分かれた理由については明らかでない。

RCm-WCI-3 のトリブシン消化において、TB-5 と TB-6 のペプチドが高収量

で得られたが (Table 3-2)、このことは Leu<sup>77</sup>-Gly<sup>78</sup> 結合がトリプシンにより非特異的に切断されたことを示している。このようなトリプシンによる非特異的切断は、TA-1 (Fig. 3-4) と TC-3 (Fig. 3-13) のアミノ酸配列分析より、His<sup>23</sup>-Ile<sup>24</sup> 結合と His<sup>27</sup>-Gly<sup>28</sup> 結合でも認められた。

WCI-3 では、TC-1-1 から TC-1-7 までのアミノ酸配列より C 末端領域に不均一性が認められる (Fig. 3-13)。この結果はヒドラジン分解の結果ともよく一致しているが、この不均一性が WCI-3 の精製中に生じたのか、あるいは生合成後種子中での酵素的切断により生じたのかは明らかではない。

WCI-3 の N 末端からのアミノ酸配列分析は液相シーケンサーにより行った (Fig. 3-1)。この分析では高収率でエドマン分解が進み、第 64 残基のフェニルアラニンまでの 5 つのトリプシンペプチドの接続が明らかとなった (Fig. 3-32)。

シカクマメでは、すでにトリプシンインヒビター WTI-1 の一次構造が決定されており (8)、WTI-1 及び STI (5) との相同性 (Fig. 3-37) に従ってトリプシンペプチドを並べることにより WCI-3 の一次構造をほぼ完全に推定することができた。しかし、トリプシン消化による遊離のアルギニンの位置を確定するためにはこれだけでは不十分であり、また推定部分の確証のためにも RCm-WCI-3 のリジルエンドペプチダーゼ消化を行う必要があった。

本酵素消化ではリジル結合で非常に特異的に切断が起こり、HPLC で高収率のリジンペプチドが得られた。そして、そのアミノ酸配列分析よりトリプシン消化におけるすべてのアルギニンペプチドと一部のリジンペプチドの配列順序を決定することができた。L-9 と L-10 のペプチドは、トリプシン消化における TA-2 と TA-3 と同様、同一のペプチドが Trp<sup>25</sup> の修飾により HPLC 上で 2 つに分かれたものと考えられる (Fig. 3-21)。また、L-8B<sub>1</sub> と L-8B<sub>2</sub> が HPLC 上で 2 つに分かれた理由は、Asn<sup>14</sup>-Gly<sup>15</sup> 結合の  $\beta$  転位によるものと考えられる (Fig. 3-23)。

RCm-WCI-3 の V 8 プロテアーゼ消化は、トリプシンおよびリジルエンドペプチダーゼ消化で決定できなかったリジル結合の接続を明らかにするために行った。Lys<sup>103</sup>-Leu<sup>104</sup> 結合と Lys<sup>108</sup>-Leu<sup>109</sup> 結合の接続はペプチド V-14

を用いて決定したが、アスパラギン酸のC末端側でも切断される条件（リン酸緩衝液（pH 7.8））でのV8プロテアーゼ消化では、37°C で 24 時間反応させても Glu<sup>51</sup>-Val<sup>52</sup> 結合の一部が切断されるだけで、Asp<sup>95</sup>-Ser<sup>96</sup> 結合は全く切断されなかった。そこで、最終的には V-14 のキモトリブシン消化によって得られたペプチド V-14-C1 と V-14-C5 のアミノ酸配列から2つの Lys-Leu 結合の接続を決定した（Fig. 3-31）。V8プロテアーゼにおいて、TB-6 に含まれる Asp<sup>95</sup>-Ser<sup>96</sup> 結合が切断され、V-14 に含まれる Asp<sup>95</sup>-Ser<sup>96</sup> 結合が切断されなかった理由は不明である。

以上、上述の酵素消化及び末端配列分析により WCI-3 の全一次構造を決定した。WCI-3 は 183 個のアミノ酸から成る Kunitz 型キモトリブシンインヒビターで、ダイズトリブシンインヒビター Ti<sup>a</sup>(5)と 46%、シカクマメトリブシンインヒビター WTI-1(8)と 62%、*Erythrina latissima* トリブシンインヒビター DE-3 と 56% の相同性を示すことが明らかとなった（Fig. 3-37）。これらの相同性は分子全体にわたって認められ、Kunitz 型インヒビターはその立体構造においても相互に類似していると推定される。

第2章において、シカクマメインヒビターの免疫学的性質がトリブシンインヒビターとキモトリブシンインヒビターで異なっていることより、両者の構造上の違いを示唆する結果を得た。しかし、WCI-3 と WTI-1 のアミノ酸配列は高い相同性を示しており、これより抗 WCI-3 抗体に対するエピトープはインヒビターの極めて狭い部分に限定されているものと考えられる。

シカクマメインヒビター WCI-3 と WTI-1 のアミノ酸配列には STI の His<sup>71</sup>-Pro<sup>72</sup>-Leu<sup>73</sup> に相当する部分に deletion が認められた（Fig. 3-37）。同様の deletion の存在は *Erythrina latissima* インヒビターにも認められる。立体構造に大きな影響を与えるプロリンの位置も、シカクマメインヒビターではダイズインヒビターより *Erythrina latissima* インヒビターとよく一致している。シカクマメは分類学上では *Erythrina*（デイゴ）とダイズの中間に位置しているが、インヒビターのアミノ酸配列で見るとシカクマメはダイズよりもデイゴと近縁であると考えられる。

一般に、プロテイナーゼインヒビターはいわゆる“反応部位”を中心とし

て酵素と複合体を形成する。この“反応部位”の概念は1966年、小沢とLaskowski, Jr. によって提唱された(33)。彼らは、酸性条件下で STI に触媒量のトリプシンを作用させると Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合が特異的に切断されることを発見し、この結合を酵素の活性部位に対応させて反応部位と命名した (Fig. 3-33)。以後、この手法は多くのプロテイナーゼインヒビターの反応部位決定法として用いられ、インヒビターと酵素の相互作用を解明していく上で重要な糸口を与えてきた。

WCI-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することからキモトリプシンに対して分子内に2個の反応部位を有していると考えられるが、WCI-3 のキモトリプシンによる限定分解では Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合 (第1反応部位) のみが切断され、第2反応部位を同定することはできなかった。WCI-3 の双頭性及び第2反応部位の検索については第4章で詳述する。

Sweet らは、STI とブタトリプシンの複合体の X 線解析より、STI が Asp<sup>1</sup>、Phe<sup>2</sup>、Asn<sup>13</sup>、Ser<sup>60</sup>、Pro<sup>61</sup>、Tyr<sup>62</sup>、Arg<sup>63</sup>、Ile<sup>64</sup>、Arg<sup>65</sup>、Phe<sup>66</sup>、His<sup>71</sup>、Pro<sup>72</sup> の12個のアミノ酸で酵素と接触していると報告している (Fig. 4-12) (34)。そこで、キモトリプシンインヒビター WCI-3 も含めて Fig. 3-37 に示した7種のインヒビターについて、Sweet らの結果より得られたインヒビターと酵素の接触領域における12個のアミノ酸を比較検討してみた。その結果、この領域ではそれほど高い相同性は認められなかったが、STI の第13残基に相当するアスパラギンと反応部位 P<sub>4</sub>位のセリン、さらに P<sub>3</sub>'位のフェニルアラニンだけはすべてのインヒビターについて共通であった。また、P<sub>1</sub>位はキモトリプシンインヒビターである WCI-3 のみがロイシンで、他はすべてトリプシンの基質特異性に一致したアルギニンであった。

トリプシンとキモトリプシンは、一次構造の高い相同性と活性部位を構成するアミノ酸残基の空間的配置の類似性より(35)、共通の祖先から divergent evolution により分岐した2つの酵素であると考えられている。インヒビターの阻害特異性の相違にもかかわらず、上述の12個のアミノ酸領域で3つのアミノ酸 (アスパラギン、セリン、フェニルアラニン) がすべてのインヒビターに共通であることは、トリプシンとキモトリプシンの構造

上の類似性となんらかの相関を示唆しているのではないかと考えられる。

```

1      5      10
Asp-Asp-Leu-Val-Asp-Ala-Glu-Gly-Asn-Leu-Val-
// // // // // // // // // // // // // //

15      20
Glu-Asn-Gly-Gly-Thr-Tyr-Tyr-Leu-Leu-Pro-His-Ile-
// // // // // // // // // // // // // //

25      30      35
Trp-Ala-His-Gly-Gly-Ile-Glu-Thr-Ala-Lys-Thr-
// // // // // // // // // // // // // //

40      45
Gly-Asn-Glu-Pro-Cys-Pro-Leu-Thr-Val-Val-Arg-Ser-
// // // // // // // // // // // // // //

50      55      60
Pro-Asn-Glu-Val-Ser-Lys-Gly-Glu-Pro-Ile-Arg-Ile-
// // // // // // // // // // // // // //

64
Ser-Ser-Gln-Phe-
// // // // //

```

Fig. 3-1. The amino-terminal sequence of WCI-3. Sequence determination was performed with a liquid-phase automatic sequencer. Cysteine was identified as Cm-cysteine.

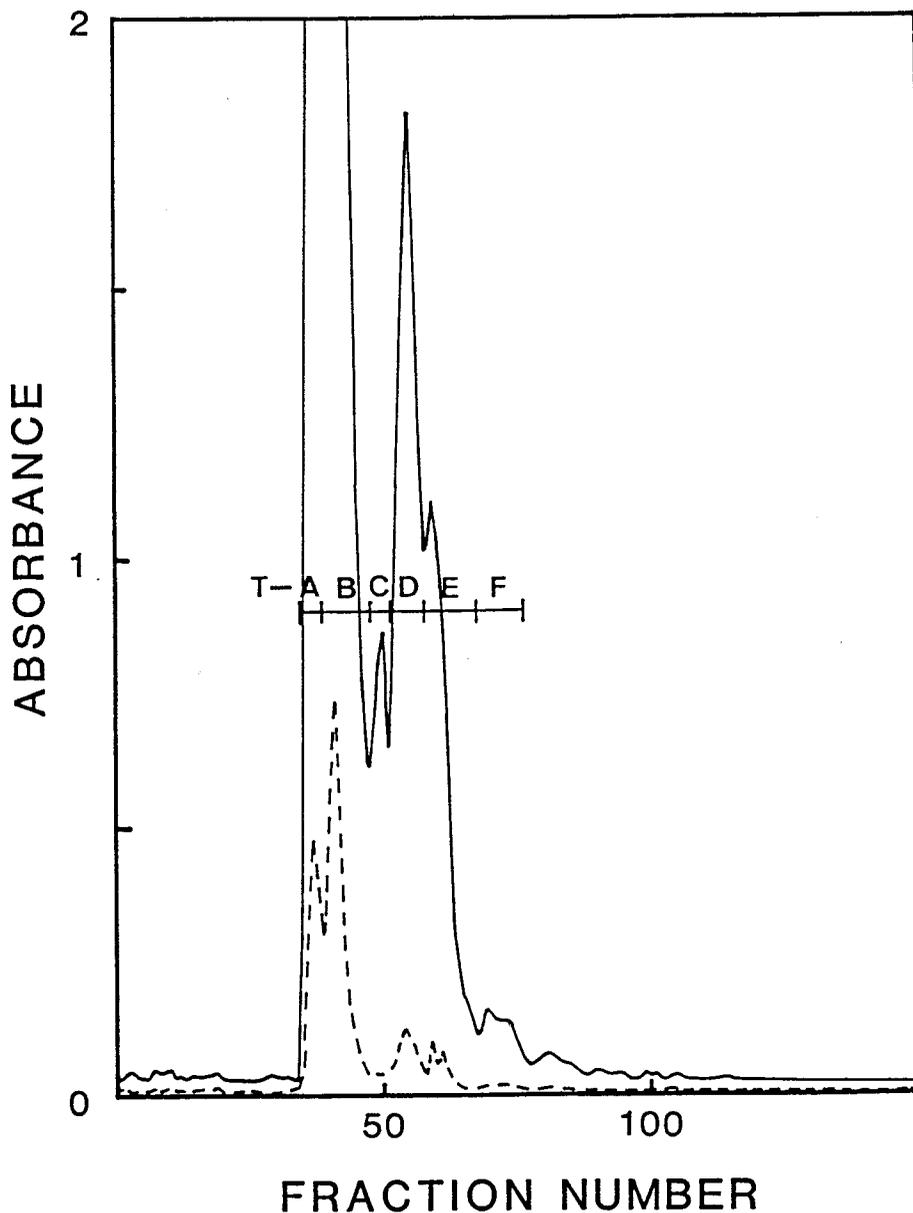


Fig. 3-2. Gel filtration of tryptic peptides of RCm-WCI-3 on Sephadex G-25. The tryptic digest of RCm-WCI-3 (150 nmoml) was chromatographed on a Sephadex G-25 column (0.9 x 136 cm) equilibrated with 0.01 M ammonium bicarbonate, pH 8.0. Fraction size, 1 ml; —, absorbance at 220 nm; ---, absorbance at 280 nm.

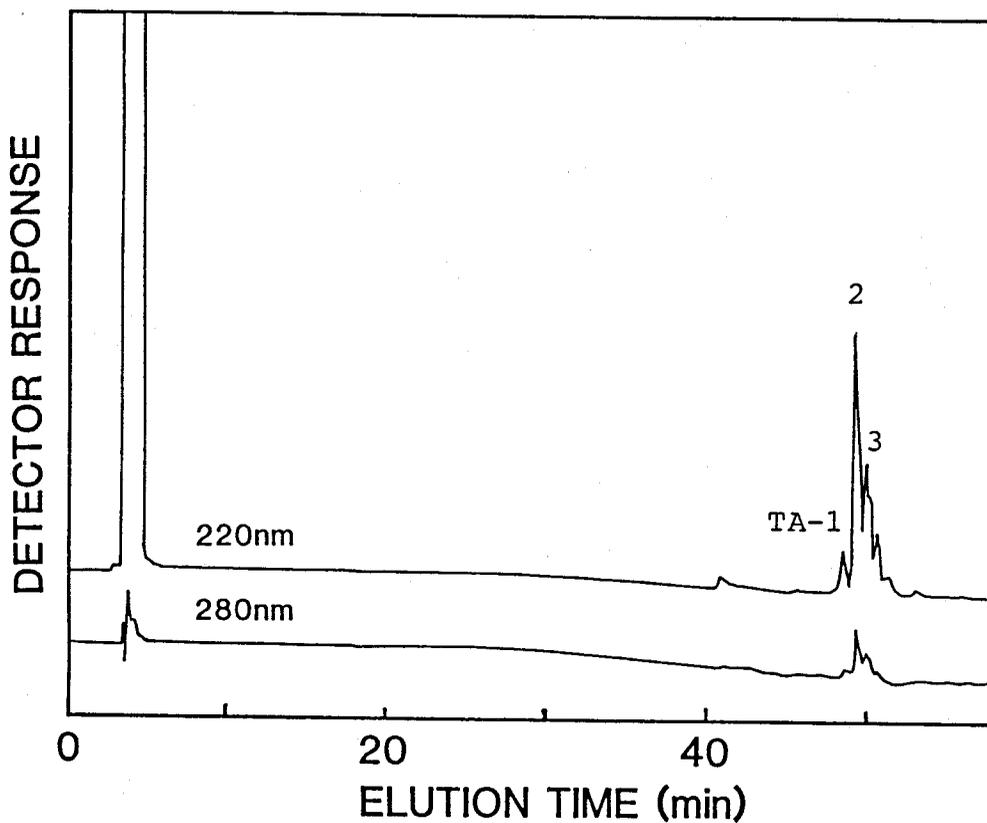


Fig. 3-3. Separation of tryptic peptides from fraction TA by HPLC. Lyophilized fraction TA was dissolved in 50% acetic acid and chromatographed on a Cosmosil 5C<sub>18</sub> column (4 x 300 mm) by TFA system A described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-1. Amino acid compositions of the tryptic peptides from fraction TA. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TA-1	TA-2	TA-3
Cm-Cysteine			
Aspartic acid	5.8 (6)	6.3 (6)	6.3 (6)
Threonine	1.0 (1)	1.8 (2)	1.8 (2)
Serine			
Glutamic acid	2.1 (2)	3.3 (3)	3.0 (3)
Proline	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)
Glycine	3.1 (3)	6.1 (6)	5.9 (6)
Alanine	1.1 (1)	2.6 (3)	2.7 (3)
Valine	2.1 (2)	2.3 (2)	2.3 (2)
Methionine			
Isoleucine		1.7 (2)	1.8 (2)
Leucine	3.8 (4)	4.3 (4)	4.2 (4)
Tyrosine	1.9 (2)	2.1 (2)	2.0 (2)
Phenylalanine			
Lysine		0.9 (1)	0.9 (1)
Histidine	0.9 (1)	1.9 (2)	2.0 (2)
Tryptophan		0.7 (1)	0.6 (1)
Arginine			
Total Res. Num.	23	35	35
Yield (%)	17	29	13

	1		5		23
TA-1	Asp-Asp-Asp-Leu-Val-----				Leu-Pro-His
	↘	↘	↘	↘	↙
	1		5		10
TA-2,3	Asp-Asp-Asp-Leu-Val-Asp-Ala-Glu-Gly-Asn-				
	//	//	//	//	//
			15		20
	Leu-Val-Glu-Asn-Gly-Gly-Thr-Tyr-Tyr-Leu-				
	//	//	//	//	//
	22				35
	Leu-Pro-----				Thr-Ala-Lys
	//	//			↙

Fig. 3-4. The amino acid sequences of tryptic peptides from fraction TA. ↘, Manual Edman degradation; //, liquid-phase automatic sequencer; ↙, carboxypeptidase P digestion.

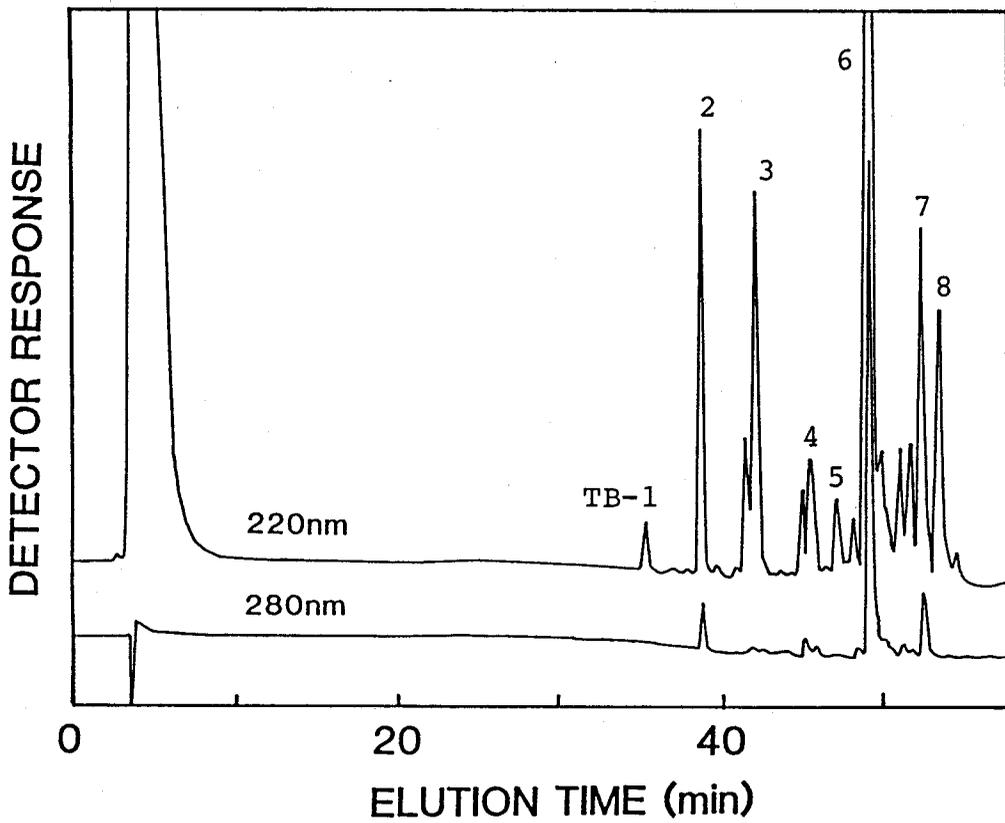


Fig. 3-5. Separation of tryptic peptides from fraction TB by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-3.

Table 3-2. Amino acid compositions of the tryptic peptides from fraction TB. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TB-1	TB-2	TB-3	TB-4	TB-5	TB-6	TB-7	TB-8
Cm-Cysteine		1.0(1)	1.0(1)			1.0(1)	1.1(1)	
Aspartic acid	1.1(1)	2.1(2)	1.1(1)	1.1(1)		2.2(2)	2.4(2)	1.3(1)
Threonine			1.9(2)			0.9(1)	1.1(1)	1.0(1)
Serine	1.8(2)				1.0(1)	2.6(3)	3.7(4)	
Glutamic acid	2.1(2)	3.2(3)	1.1(1)	1.1(1)		1.1(1)	0.9(1)	3.0(3)
Proline	1.8(2)		2.0(2)	0.9(1)		5.2(5)	4.5(5)	1.0(1)
Glycine	1.3(1)		1.2(1)		1.0(1)	2.0(2)	3.0(3)	
Alanine					1.0(1)	3.9(4)	4.8(5)	
Valine	0.9(1)	1.1(1)	1.8(2)	1.1(1)	1.0(1)	2.9(3)	3.5(4)	2.9(3)
Methionine								
Isoleucine	0.8(1)			0.8(1)				
Leucine		2.2(2)	1.1(1)	1.8(2)	2.0(2)		1.8(2)	5.0(5)
Tyrosine		1.0(1)						
Phenylalanine				0.8(1)		1.0(1)	1.1(1)	
Lysine	0.8(1)	1.0(1)		1.8(2)		1.0(1)	0.9(1)	1.0(1)
Histidine		1.0(1)						
Tryptophan						1.7(2)	1.7(2)	
Arginine	1.0(1)		1.0(1)					
Total Res. Num.	12	12	12	10	6	26	32	15
Yield (%)	13	48	85	21	67	81	11	74

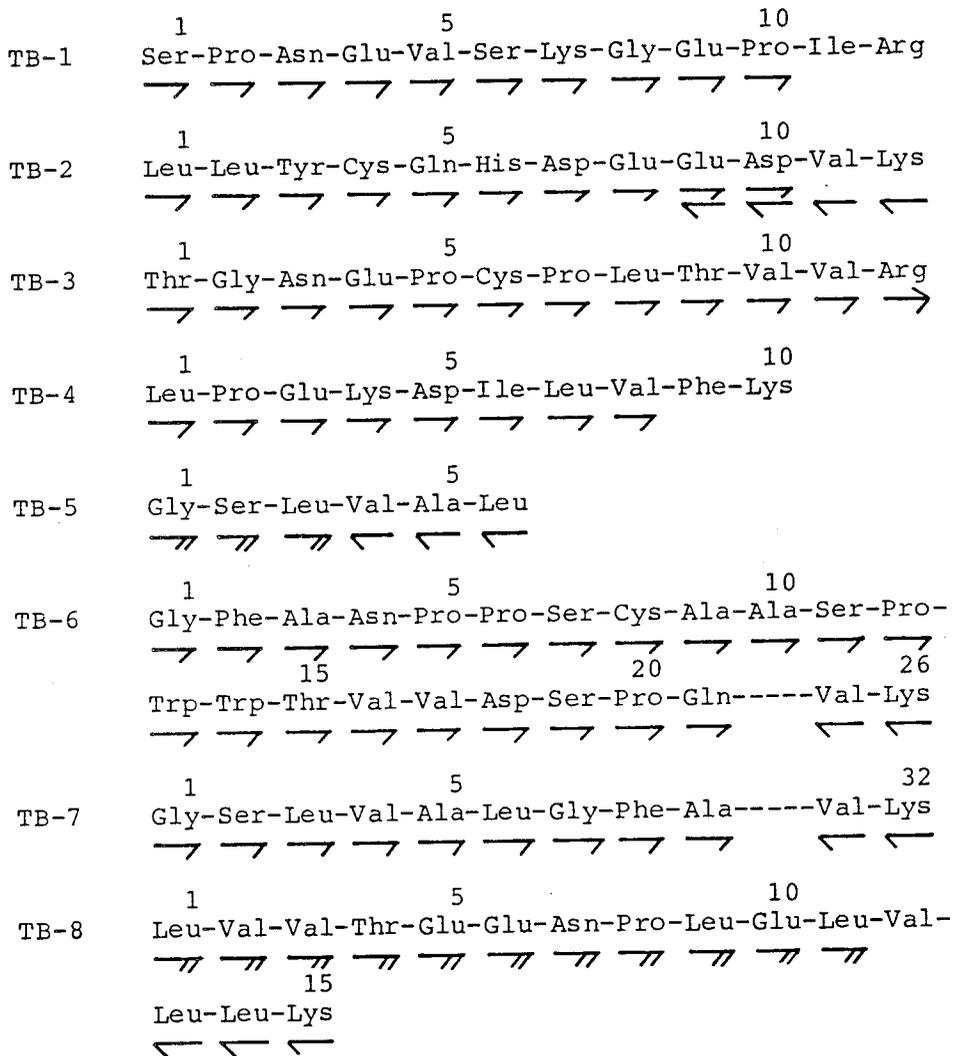


Fig. 3-6. Amino acid sequences of the tryptic peptides from fraction TB. →, Manual Edman degradation; ↗, liquid-phase automatic sequencer; ↖, carboxypeptidase P digestion; →, amino acid analysis. Cysteine was identified as Cm-cysteine.

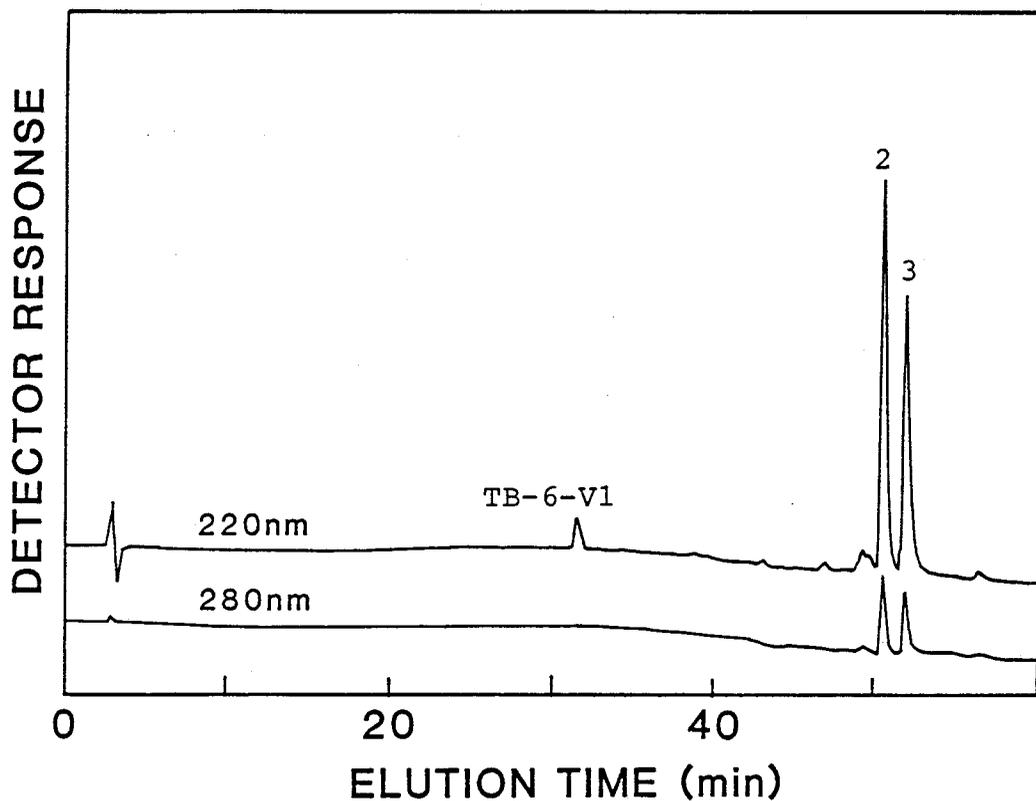


Fig. 3-7. Separation of V8 protease peptides of TB-6 by HPLC. The chromatography was done by TFA system B described in "MATERIALS AND METHODS," using a YMC-GEL ODS S-5 column (4 x 300 mm). Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-3. Amino acid compositions of the V8 protease peptides of TB-6. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TB-6-V1	TB-6-V2	TB-6-V3	TB-6
Cm-Cysteine		1.0 (1)	0.8 (1)	1
Aspartic acid		2.2 (2)	2.2 (2)	2
Threonine		1.0 (1)	1.0 (1)	1
Serine	1.0 (1)	2.8 (3)	2.0 (2)	3
Glutamic acid	1.1 (1)	1.0 (1)		1
Proline	2.1 (2)	5.1 (5)	3.3 (3)	5
Glycine	1.2 (1)	2.0 (2)	1.4 (1)	2
Alanine	1.1 (1)	4.1 (4)	2.7 (3)	4
Valine	1.0 (1)	3.0 (3)	1.8 (2)	3
Methionine				
Isoleucine				
Leucine				
Tyrosine				
Phenylalanine		1.0 (1)	1.0 (1)	1
Lysine	1.0 (1)	1.0 (1)		1
Histidine				
Tryptophan		2.0 (2)	1.6 (2)	2
Arginine				
Total Res. Num.	8	26	18	26
Yield (%)	37	37	37	



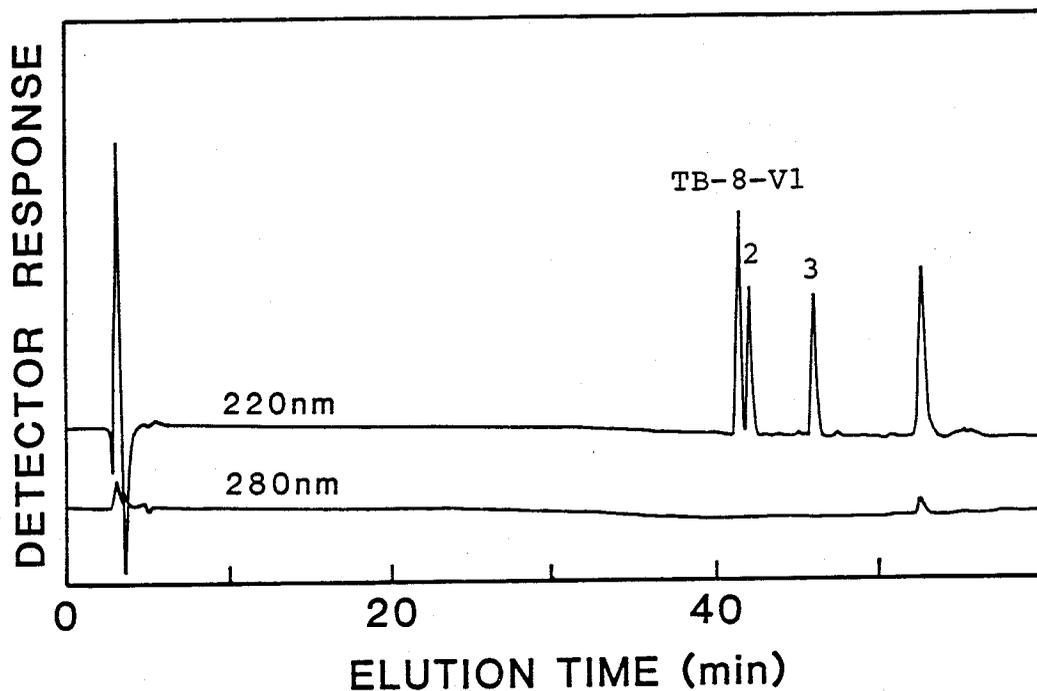


Fig. 3-9. Separation of V8 protease peptides of TB-8 by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-7.

Table 3-4. Amino acid compositions of the V8 protease peptides of TB-8. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TB-8-V1	TB-8-V2	TB-8-V3	TB-8
Cm-Cysteine				
Aspartic acid	1.0 (1)			1
Threonine		0.9 (1)		1
Serine				
Glutamic acid	2.0 (2)	1.0 (1)		3
Proline	0.9 (1)			1
Glycine				
Alanine				
Valine		1.7 (2)	1.0 (1)	3
Methionine				
Isoleucine				
Leucine	0.9 (1)	1.0 (1)	2.9 (3)	5
Tyrosine				
Phenylalanine				
Lysine			1.0 (1)	1
Histidine				
Tryptophan				
Arginine				
Total Res. Num.	5	5	5	15
Yield (%)	80	80	80	

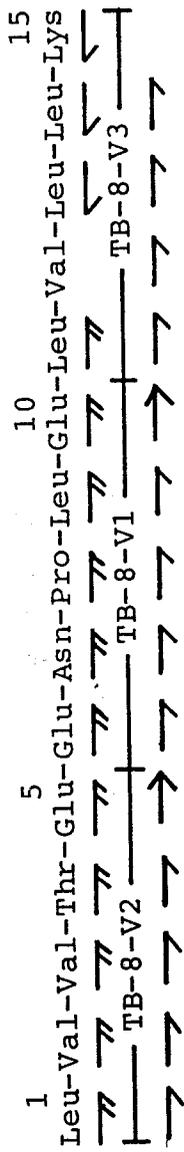


Fig. 3-10. Amino acid sequence of TB-8.  $\rightarrow$  , Manual Edman degradation;  $\rightarrow$  , liquid-phase automatic sequencer;  $\leftarrow$  , carboxypeptidase P digestion;  $\rightarrow$  , amino acid analysis.

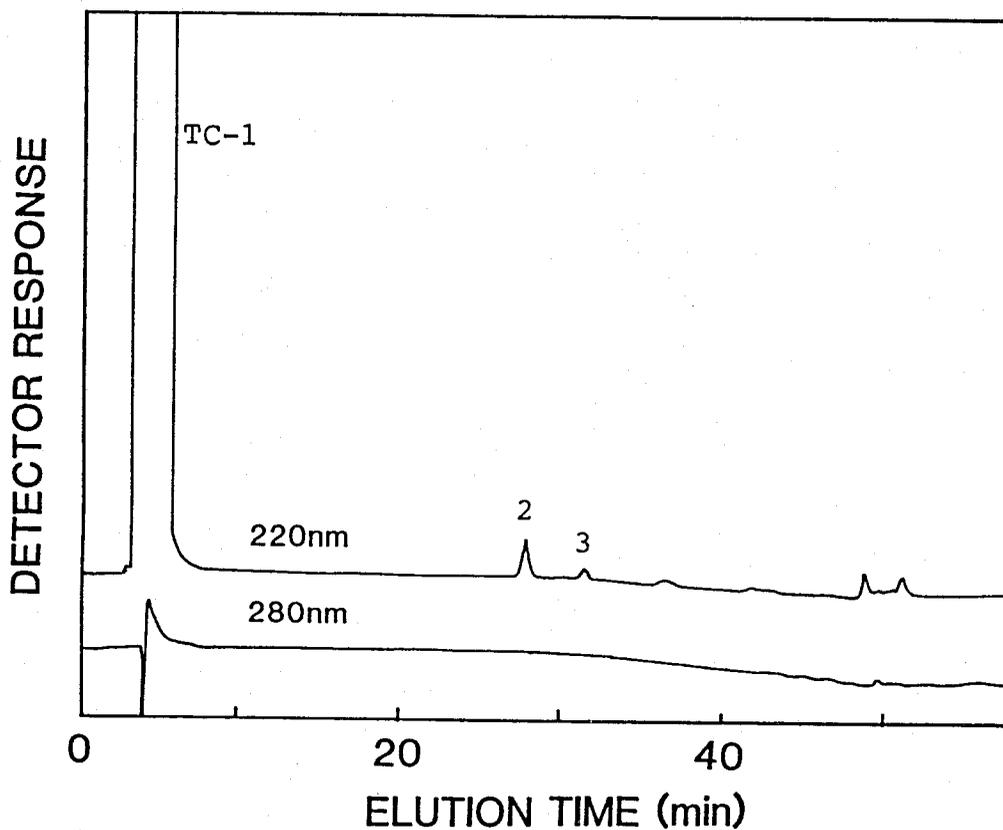


Fig. 3-11. Separation of tryptic peptides from fraction TC by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-3.

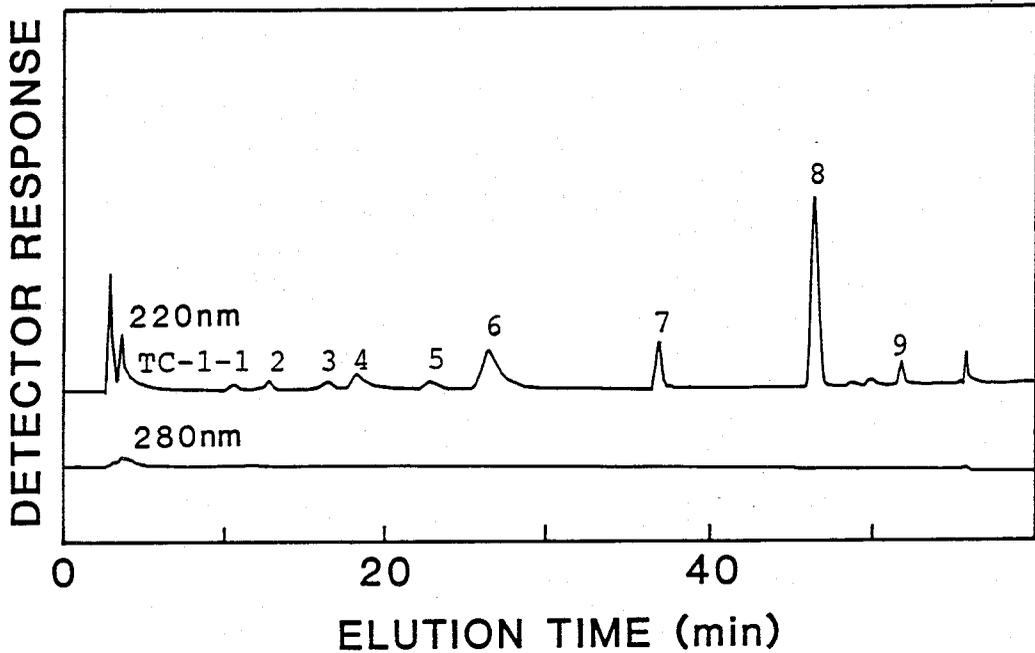


Fig. 3-12. Separation of tryptic peptides from fraction TC-1 by HPLC. Lyophilized fraction TC-1 was dissolved in 0.05% TFA, and injected on a YMC-GEL ODS S-5 column (4 x 300 mm) equilibrated with 0.05% TFA. The column was eluted with the equilibrating buffer for 20 min, and then by TFA system B described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-5. Amino acid compositions of the tryptic peptides from fraction TC. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TC-1-1	TC-1-2	TC-1-3	TC-1-4	TC-1-5	TC-1-6	TC-1-7	TC-1-8	TC-1-9	TC-2	TC-3
Cm-Cysteine											
Aspartic acid							1.1 (1)			0.9 (1)	
Threonine	1.0 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)			0.9 (1)
Serine	1.2 (1)	1.8 (2)	1.5 (2)	2.5 (3)	1.2 (1)	2.5 (3)	3.0 (3)	1.9 (2)		1.5 (2)	
Glutamic acid	0.9 (1)	1.3 (1)	1.0 (1)	1.2 (1)	1.3 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	0.9 (1)	1.2 (1)
Proline							1.1 (1)			1.1 (1)	
Glycine								3.0 (3)			3.2 (3)
Alanine	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.8 (2)	1.2 (1)	2.2 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)		0.9 (1)
Valine							1.1 (1)			0.9 (1)	
Methionine											
Isoleucine									0.9 (1)		1.0 (1)
Leucine											
Tyrosine											
Phenylalanine											
Lysine	1.0 (1)				1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Histidine						0.7 (1)	0.8 (1)				
Tryptophan											
Arginine											
Total Res. Num.	5	5	5	6	6	7	9	7	8	7	8
Yield (%)	2	7	7	7	5	20	6	26	5	33	13



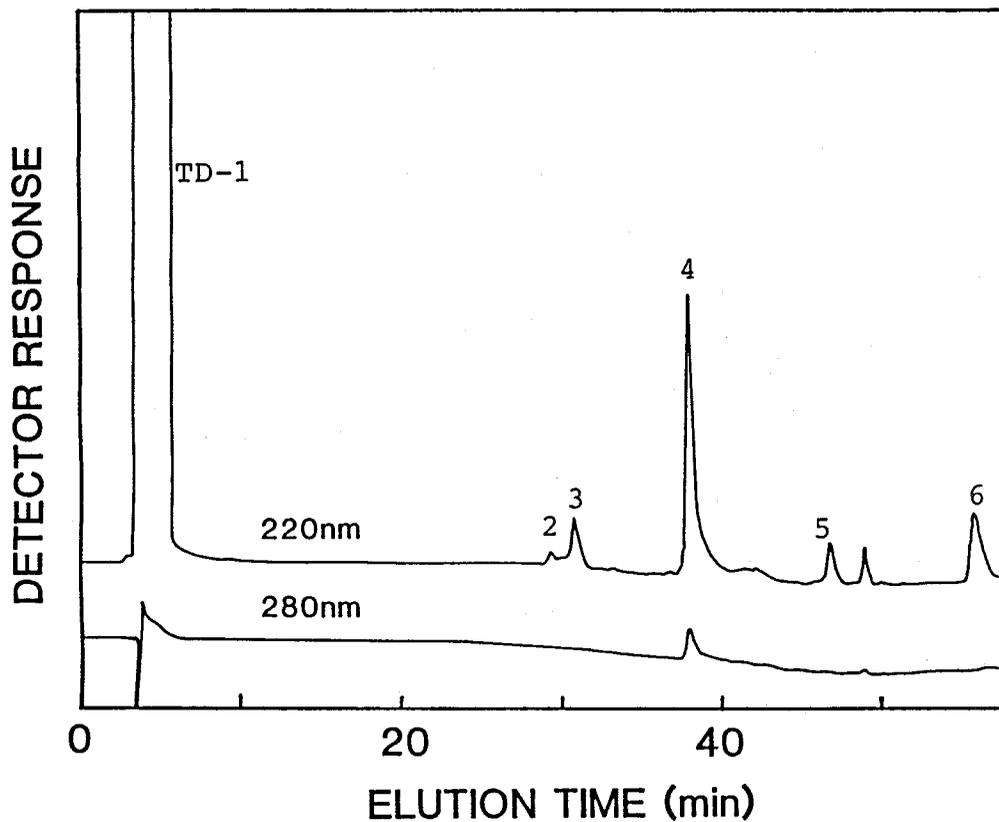


Fig. 3-14. Separation of tryptic peptides from fraction TD by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-3.

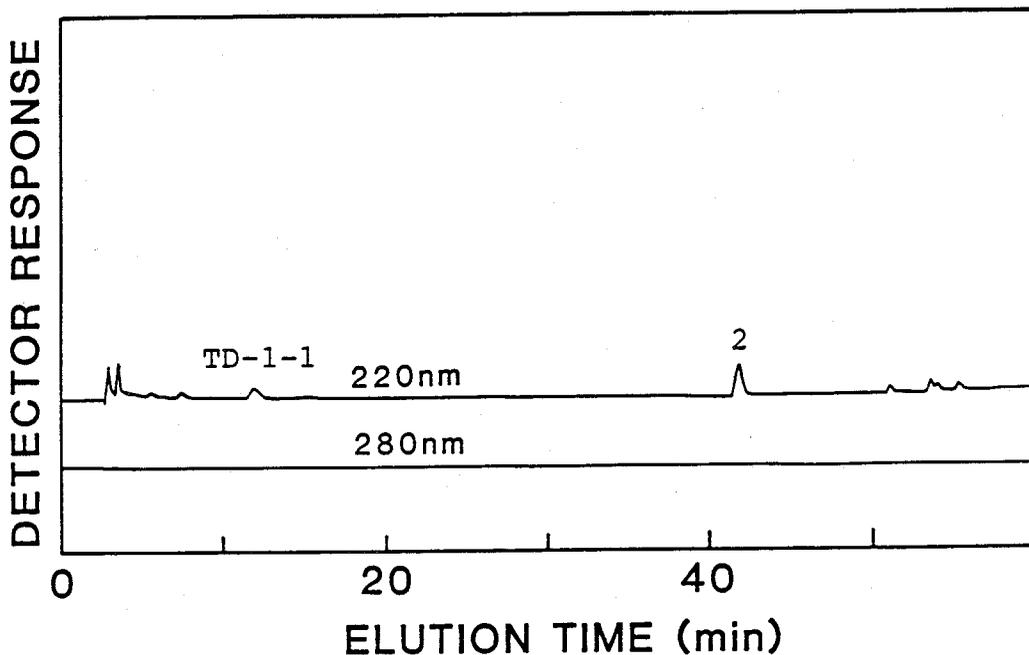


Fig. 3-15. Separation of tryptic peptides from fraction TD-1 by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-12.

Table 3-6. Amino acid compositions of the tryptic peptides from fraction TD. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TD-1-1	TD-1-2	TD-2	TD-3	TD-4	TD-5	TD-6
Cm-Cysteine					1.0 (1)		
Aspartic acid	2.8 (3)				1.1 (1)	1.0 (1)	
Threonine							
Serine		0.9 (1)					2.9 (3)
Glutamic acid		2.0 (2)	1.2 (1)	1.2 (1)	1.2 (1)		1.2 (1)
Proline			0.8 (1)	1.0 (1)			1.1 (1)
Glycine	1.0 (1)			1.2 (1)	1.4 (1)		
Alanine							
Valine						1.1 (1)	
Methionine							
Isoleucine				1.1 (1)	2.3 (2)	0.9 (1)	2.1 (2)
Leucine		1.0 (1)	1.0 (1)			1.1 (1)	2.1 (2)
Tyrosine					1.0 (1)		
Phenylalanine						1.0 (1)	2.1 (2)
Lysine		1.0 (1)	1.0 (1)			1.0 (1)	
Histidine					1.1 (1)		
Tryptophan							
Arginine	2.0 (2)			1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)
Total Res. Num.	6	5	4	5	9	6	12
Yield (%)	12	32	13	57	76	35	32



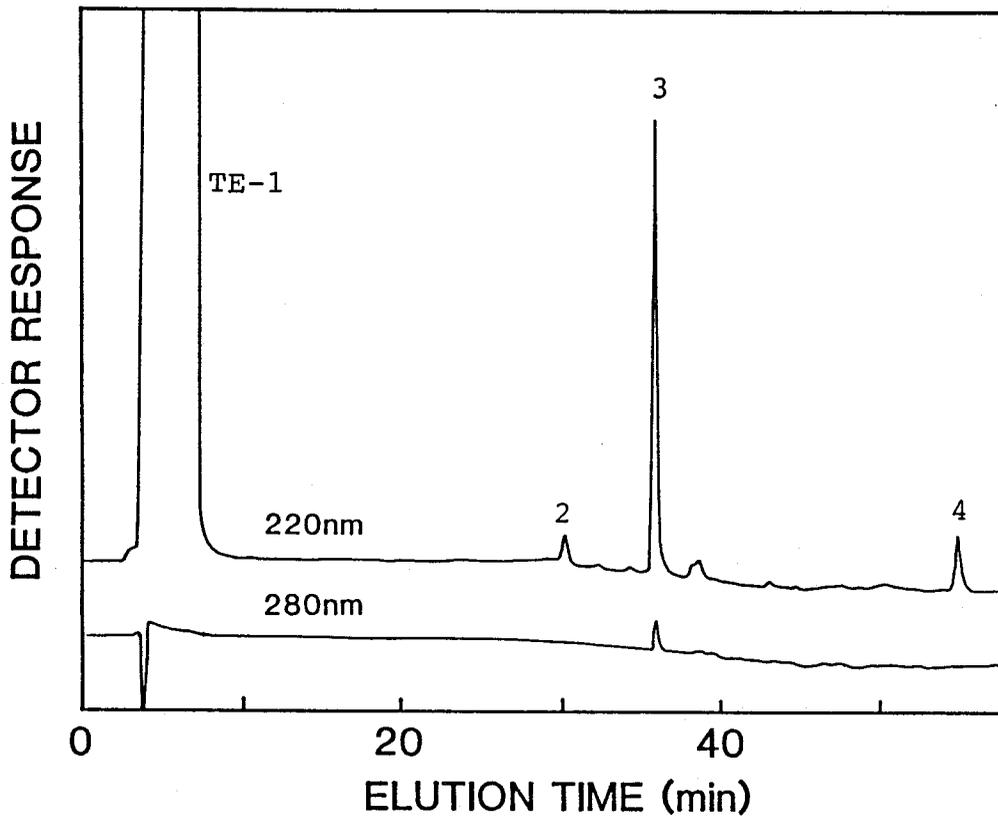


Fig. 3-17. Separation of tryptic peptides from fraction TE by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-3.

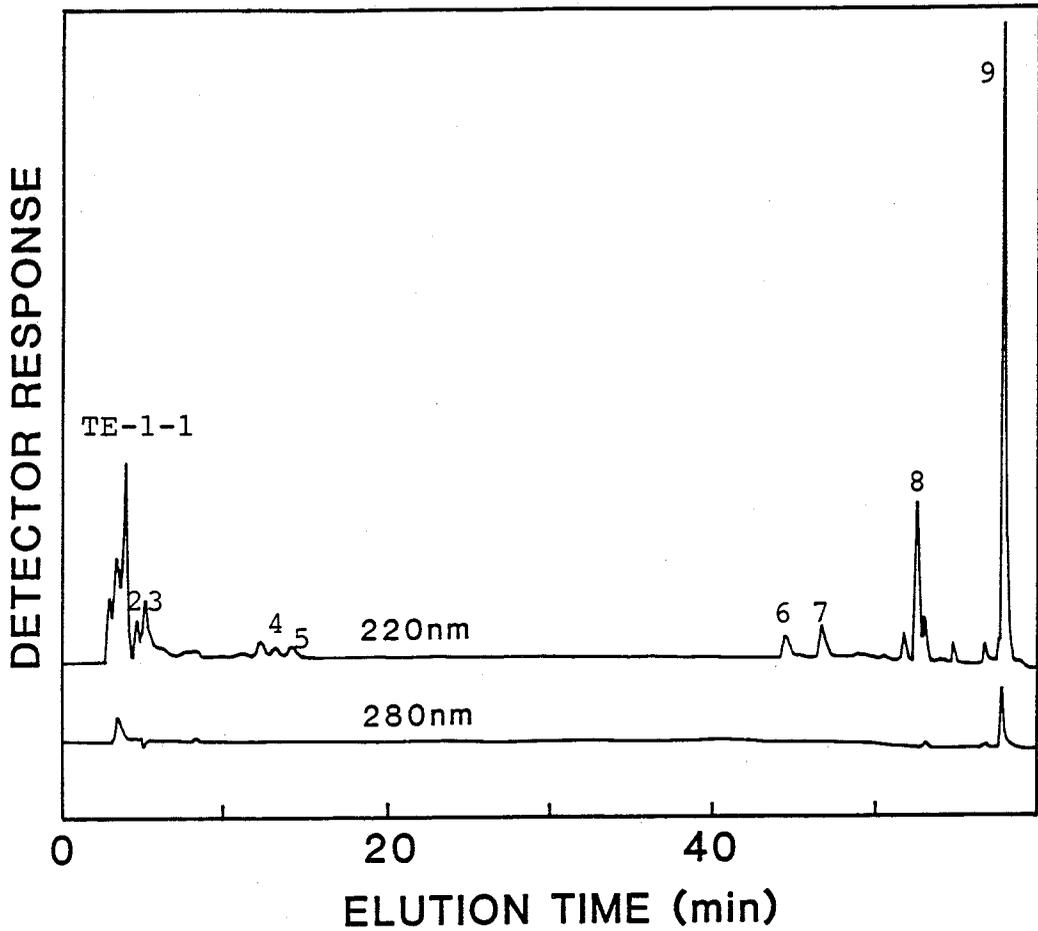


Fig. 3-18. Separation of tryptic peptides from fraction TE-1 by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-12.

Table 3-7. Amino acid compositions of the tryptic peptides from fraction TE. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	TE-1-1	TE-1-2	TE-1-3	TE-1-4	TE-1-5	TE-1-6	TE-1-7	TE-1-8	TE-1-9	TE-2	TE-3	TE-4
Cm-Cysteine												
Aspartic acid	1.0(1)	2.0(2)	3.1(3)	3.0(3)	3.0(3)		1.1(1)			1.0(1)		
Threonine												
Serine							1.0(1)			1.8(2)		2.9(3)
Glutamic acid							2.0(2)		0.9(1)			1.1(1)
Proline							1.1(1)					1.3(1)
Glycine												
Alanine	0.8(1)											
Valine			1.0(1)	1.4(1)	1.3(1)	1.1(1)						
Methionine								2.0(2)		2.1(2)		
Isoleucine								0.7(1)		0.9(1)		2.0(2)
Leucine								1.0(1)				2.0(2)
Tyrosine										1.0(1)		
Phenylalanine								1.0(1)	0.9(1)			2.0(2)
Lysine	1.0(1)							1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)		
Histidine								1.1(1)	1.0(1)	1.0(1)		
Tryptophan								1.8(2)		1.7(2)		
Arginine	1.0(1)	1.0(1)	1.7(2)	1.9(2)	2.8(3)							1.0(1)
Total Res. Num.	2	2	4	6	6	7	5	3	10	3	10	12
Yield (%)	60	24	24	3	6	11	9	27	10	40	45	12



Table 3-8. Summary of amino acid compositions of the tryptic peptides of WCI-3. The numbers of residues are from the established sequences.

	TA			TB				TC		TD					TE				TF	Total WCI-3			
	-2,3	-2	-3	-5	-6	-8	-1-6	-2	-1-2	-2	-3	-4	-5	-6	-1-1	-1-2	-1-3	-2			-3		
Cm-Cysteine		1	1		1			1		1						1	2	1					4
Aspartic acid	6	2	1	2	1	1	1					1											19
Threonine	2	2	1	1	1																		7
Serine				1	3		3	2					3					2					15
Glutamic acid	3	1	1	3			1	1	1	1		1					1						20
Proline	1	2	1	5	1		1	1		2	1	1	1										13
Glycine	6	1	1	2						1	1						1						13
Alanine	3	1	1	4			1									1							10
Valine	2	1	2	1	3	3		1				1						2					16
Methionine																							0
Isoleucine	2									1	2	1	2					1					9
Leucine	4	2	1	2		5				1	1	1	2										19
Tyrosine	2	1										1											5
Phenylalanine					1						1	1	2					1					5
Lysine	1	1		1	1					1	1	1						1					11
Histidine	2	1						1															7
Tryptophan	1																						3
Arginine			1		2						1	1	1								1		7
Total Res. Num.	35	12	12	6	26	15	7	7	5	4	5	9	6	12	2	2	4	3	10	1	183	183	



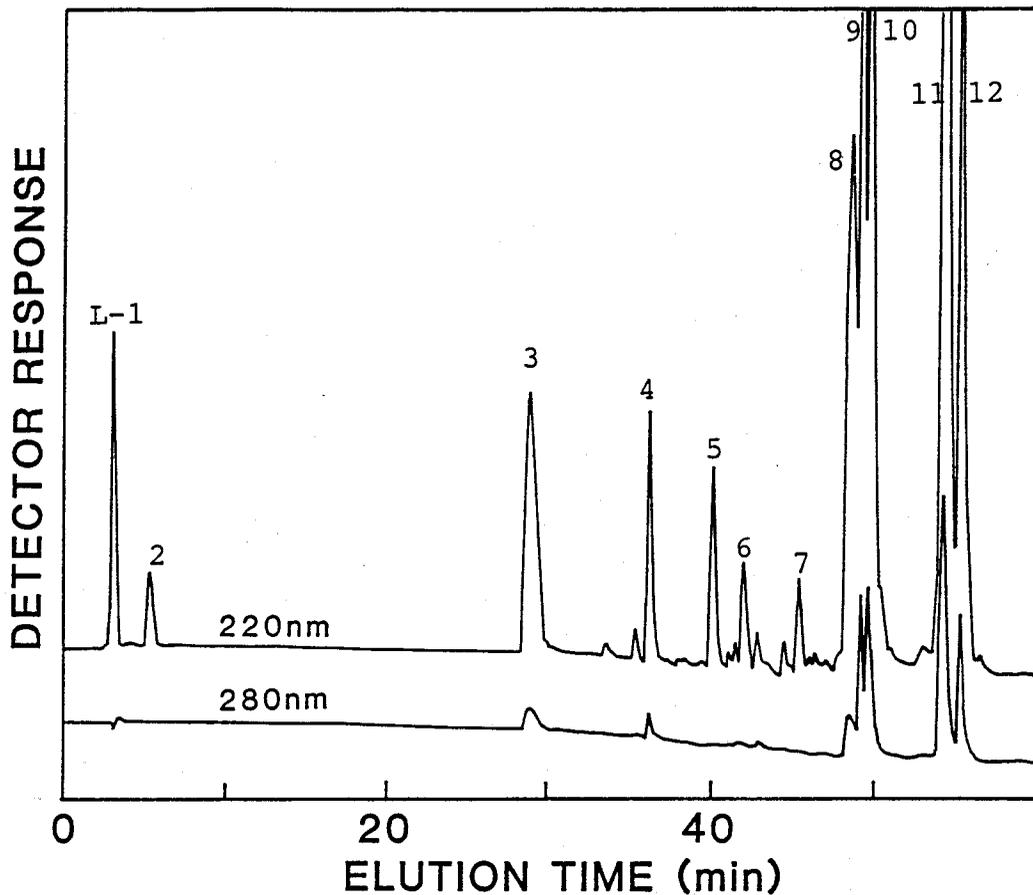


Fig. 3-21. Separation of lysylendopeptidase peptides of RCm-WCI-3 by HPLC. The lysylendopeptidase digest of RCm-WCI-3 (150 nmol) was chromatographed on a BIO-RAD Hi-Pore RP-304 column (4.6 x 250 mm) by TFA system A described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-9. Amino acid compositions of the lysylendopeptidase peptides of RCm-WCI-3. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7	L-9	L-10	L-11	L-12
Cm-Cysteine			1.0(1)	0.9(1)					2.1(2)	1.0(1)
Aspartic acid		1.0(1)	2.0(2)	2.0(2)	1.0(1)	1.1(1)	5.9(6)	6.1(6)	4.2(4)	2.3(2)
Threonine				1.7(2)			1.8(2)	1.7(2)	2.9(3)	1.1(1)
Serine		1.6(2)		1.5(2)					8.8(9)	6.6(7)
Glutamic acid	1.0(1)		3.0(3)	2.2(2)		1.1(1)	3.0(3)	3.1(3)	5.4(5)	3.3(3)
Proline	1.0(1)			2.6(3)			0.9(1)	1.0(1)	9.9(10)	7.3(7)
Glycine				1.2(1)			5.9(6)	5.7(6)	5.2(5)	4.0(4)
Alanine							2.8(3)	2.7(3)	5.2(5)	4.8(5)
Valine		2.0(2)	0.9(1)	2.7(3)	1.0(1)	1.0(1)	2.1(2)	2.3(2)	7.0(7)	4.2(4)
Methionine										
Isoleucine		0.9(1)			1.0(1)	1.0(1)	2.0(2)	1.9(2)	3.1(3)	2.9(3)
Leucine	1.0(1)		2.0(2)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	4.2(4)	4.1(4)	5.3(5)	4.2(4)
Tyrosine		1.0(1)	1.0(1)				1.9(2)	1.9(2)		
Phenylalanine					1.0(1)	2.1(2)			3.1(3)	3.1(3)
Lysine	1.0(1)	1.0(1)	0.9(1)	1.0(1)	1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)	1.0(1)	2.1(2)	1.1(1)
Histidine		1.9(2)	1.0(1)				1.9(2)	2.0(2)		
Tryptophan							0.5(1)	0.5(1)	1.7(2)	1.5(2)
Arginine				0.9(1)					3.1(3)	2.1(2)
Total Res. Num.	4	10	12	19	6	9	35	35	68	49
Yield (%)	88	85	40	33	61	24	24	49	63	29

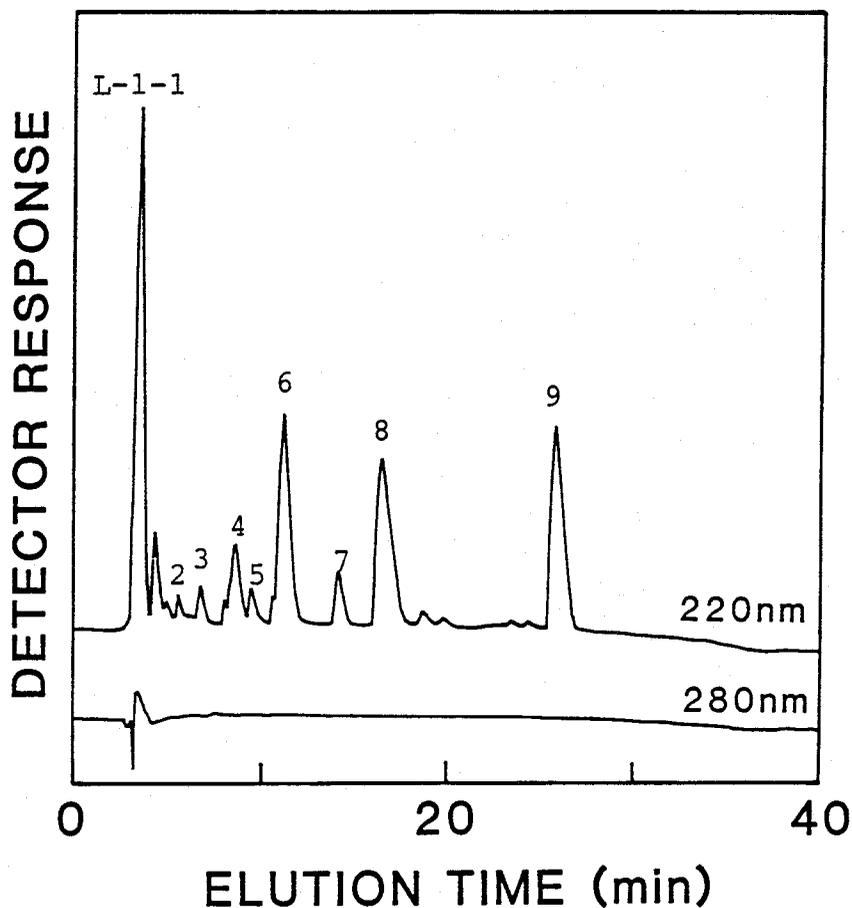


Fig. 3-22. Separation of lysylendopeptidase peptides from fraction L-1 by HPLC. Lyophilized fraction L-1 was dissolved in 0.05% TFA and chromatographed on a YMC-GEL ODS S-5 column (4 x 300 mm) by TFA system B described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-10. Amino acid compositions of the lysylendopeptidase peptides from fraction L-1. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	L-1-1	L-1-2	L-1-3	L-1-4	L-1-5	L-1-6	L-1-7	L-1-8	L-1-9
Cm-Cysteine									
Aspartic acid									
Threonine		0.9(1)	0.9(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)		
Serine		0.9(1)	1.9(2)	1.9(2)	1.0(1)	2.7(3)	2.8(3)	0.9(1)	
Glutamic acid		1.2(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.1(1)	2.1(2)	1.0(1)
Proline									
Glycine									
Alanine	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	2.1(2)	1.1(1)	2.0(2)		
Valine									
Methionine									
Isoleucine								1.0(1)	
Leucine									
Tyrosine									1.0(1)
Phenylalanine									1.0(1)
Lysine	1.0(1)	0.9(1)			1.0(1)		1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)
Histidine									
Tryptophan									
Arginine									
Total Res. Num.	2	5	5	5	6	7	9	5	3
Yield (%)	72	6	8	19	8	27	5	87	66

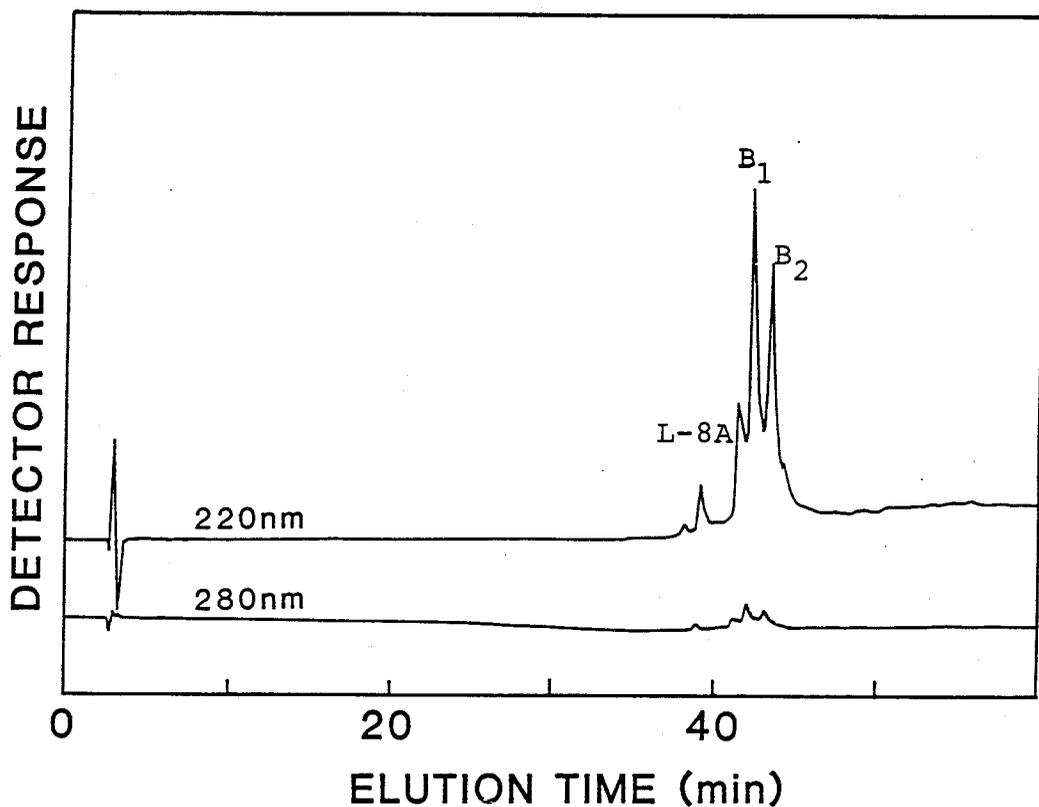


Fig. 3-23. Separation of lysylendopeptidase peptides from fraction L-8 by HPLC. Lyophilized fraction L-8 was dissolved in 0.01 M ammonium acetate (pH 5.6) and chromatographed on a BIO-RAD Hi-Pore RP-304 column (4.6 x 250 mm) by ammonium acetate system described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-11. Amino acid compositions of the lysylendopeptidase peptides from fraction L-8. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	L-8A	L-8B <sub>1</sub>	L-8B <sub>2</sub>
Cm-Cysteine	1.6 (2)	0.9 (1)	1.0 (1)
Aspartic acid	7.1 (7)	5.1 (5)	5.2 (5)
Threonine	1.1 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Serine			
Glutamic acid	7.1 (7)	4.4 (4)	4.4 (4)
Proline	0.8 (1)	0.5 (1)	0.5 (1)
Glycine	2.4 (2)	2.1 (2)	2.2 (2)
Alanine			
Valine	3.8 (4)	2.5 (3)	2.5 (3)
Methionine			
Isoleucine	1.6 (2)	1.6 (2)	1.7 (2)
Leucine	6.7 (7)	4.9 (5)	5.1 (5)
Tyrosine	1.8 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)
Phenylalanine			
Lysine	1.8 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)
Histidine	2.4 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)
Tryptophan			
Arginine	3.8 (4)	3.6 (4)	3.9 (4)
Total Res. Num.	43	31	31
Yield (%)	11	20	17

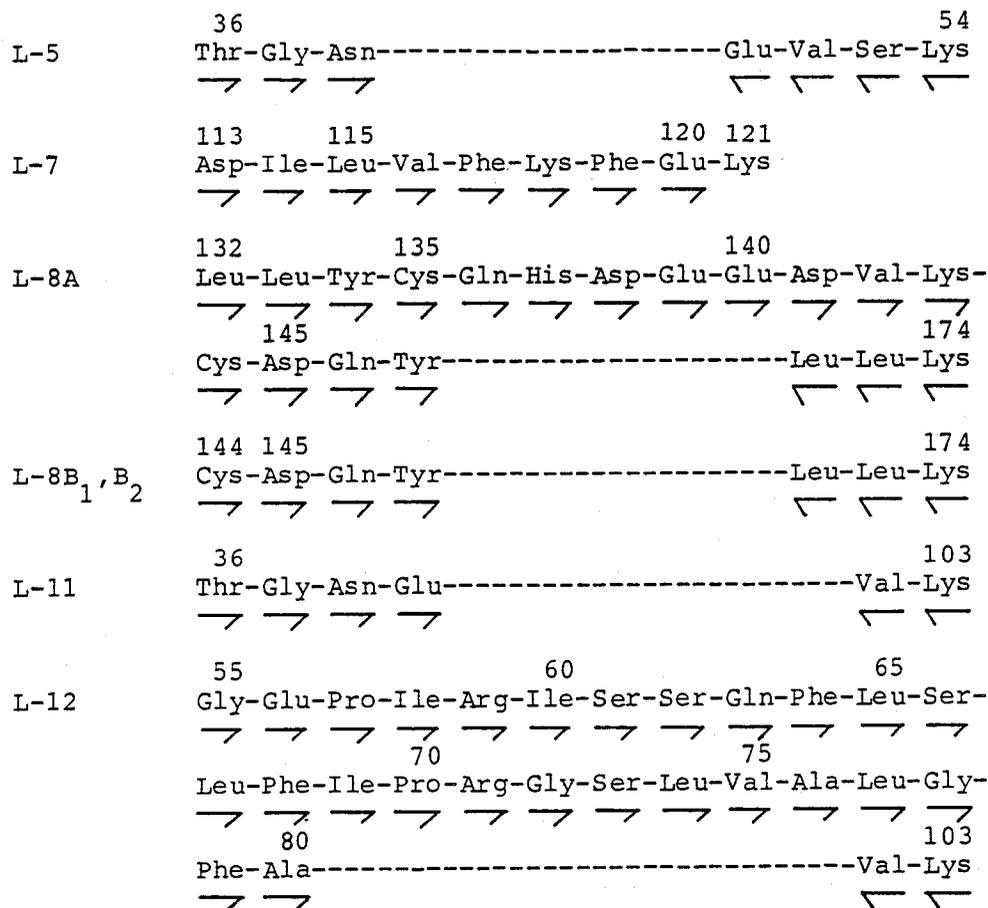


Fig. 3-24. Amino acid sequences of the lysylendopeptidase peptides of RCm-WCI-3. ↘, Manual Edman degradation; ↙, carboxypeptidase P digestion. Cysteine was identified as Cm-cysteine. Numbering of amino acids is based on the sequence of WCI-3.

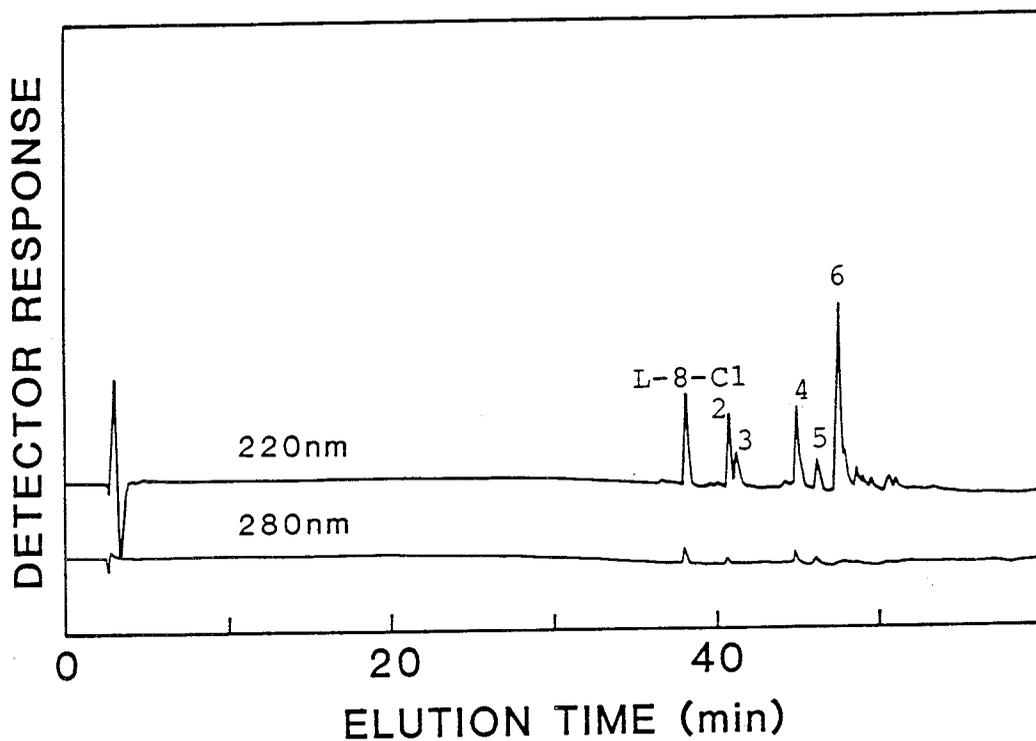


Fig. 3-25. Separation of chymotryptic peptides of fraction L-8 by HPLC. The chymotryptic digest of fraction L-8 was chromatographed on a YMC-GEL ODS S-5 column (4 x 300 mm) by TFA system B described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-12. Amino acid compositions of the chymotryptic peptides of L-8. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	L-8-C1	L-8-C2	L-8-C3	L-8-C4	L-8-C5	L-8-C6
Cm-Cysteine	1.0 (1)	1.6 (2)		1.5 (2)		4.3 (4)
Aspartic acid	1.3 (1)	3.1 (3)		2.6 (3)		1.0 (1)
Threonine						
Serine						
Glutamic acid	1.1 (1)	3.5 (4)		3.6 (4)		3.3 (3)
Proline						0.7 (1)
Glycine						2.2 (2)
Alanine						
Valine		1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.5 (2)
Methionine						
Isoleucine						1.5 (2)
Leucine			1.9 (2)	1.8 (2)	2.0 (2)	3.2 (3)
Tyrosine	1.0 (1)	0.9 (1)		1.7 (2)	1.0 (1)	
Phenylalanine						
Lysine		0.8 (1)	1.0 (1)	0.8 (1)		0.8 (1)
Histidine		1.3 (1)		1.2 (1)		
Tryptophan						
Arginine						4.1 (4)
Total Res. Num.	4	13	4	16	3	23
Yield (%)	89	40	93	38	45	80



Table 3-13. Summary of amino acid compositions of the lysylendopeptidase peptides of WCI-3. The numbers of residues are from established sequences.

	L-1-1	L-1-6	L-1-8	L-1-9	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-8B	L-9,10	L-12	Total	WCI-3
Cm-Cysteine							1	1		1			1	4
Aspartic acid						1	2	2	1	5	6		2	19
Threonine								2		1			1	7
Serine		3	1			2		2				7	7	15
Glutamic acid		1	2	1	1		3	2	4		3	3	3	20
Proline					1			3	1	1	1	7	7	13
Glycine								1	2		6	4	4	13
Alanine	1	1									3	5	10	10
Valine						2	1	3	1	3	2	4	4	16
Methionine														
Isoleucine						1			1	2	2	3	3	9
Leucine					1		2	1	1	5	4	4	4	19
Tyrosine						1	1			1	2			5
Phenylalanine									1			3	3	5
Lysine					1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Histidine						2	1			1	2		2	7
Tryptophan		1									1		2	3
Arginine								1		4		2	2	7
Total Res. Num.	2	6	5	3	4	10	12	19	6	31	35	49	183	183



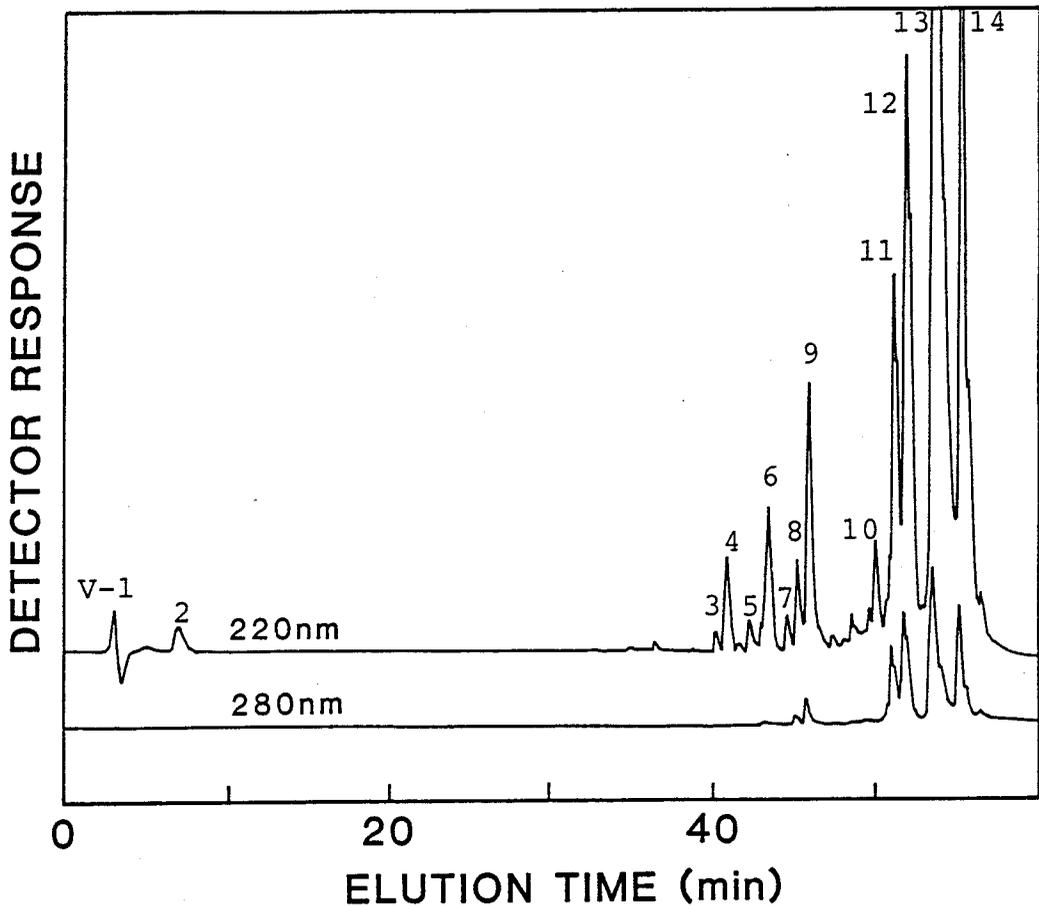


Fig. 3-28. Separation of V8 protease peptides of RCm-WCI-3 by HPLC. The V8 protease digest of RCm-WCI-3 (120 nmol) was chromatographed on a YMC-GEL ODS S-5 column (4 x 300 mm) by TFA system B described in "MATERIALS AND METHODS." Peptides were monitored at 220 nm and 280 nm.

Table 3-14. Amino acid compositions of the V8 protease peptides of RCm-WCI-3. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6	V-7	V-8	V-9	V-10	V-11	V-12	V-13	V-14
Cm-Cysteine						0.8(1)	0.9(1)	2.0(2)				3.9(4)	1.9(2)
Aspartic acid				4.0(4)		2.4(2)	2.4(2)	7.1(7)	1.2(1)	1.2(1)	2.2(2)	12.1(12)	4.3(4)
Threonine	1.0(1)	1.0(1)				2.5(3)		1.1(1)		0.8(1)	1.0(1)	4.6(5)	3.6(4)
Serine	1.9(2)				1.0(1)	0.9(1)	1.8(2)	2.0(2)				10.7(12)	8.6(10)
Glutamic acid		1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)	1.0(1)	2.0(2)	2.7(3)	5.3(5)	1.1(1)	1.2(1)	1.9(2)	14.0(14)	7.9(8)
Proline		0.9(1)				2.8(3)				1.2(1)	1.3(1)	10.5(11)	10.4(11)
Glycine		1.0(1)			1.0(1)	1.1(1)		2.3(2)		4.5(5)	5.8(6)	7.3(7)	5.1(5)
Alanine	1.0(1)			1.0(1)	1.0(1)	1.1(1)				1.0(1)	1.2(1)	5.9(6)	5.7(6)
Valine		1.0(1)		1.0(1)	1.0(1)	1.8(2)	2.0(2)	4.2(5)	1.0(1)		1.0(1)	11.4(13)	6.4(7)
Methionine							0.7(1)	2.5(3)	0.9(1)	1.5(2)	1.9(2)	6.5(7)	2.9(3)
Isoleucine							2.1(2)	3.3(3)	1.0(1)	1.8(2)	3.0(3)	10.8(11)	6.8(7)
Leucine		1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	3.0(3)	1.2(1)	1.6(2)	3.0(3)		1.6(2)	2.1(2)	3.1(3)	
Tyrosine									1.6(2)			4.8(5)	3.0(3)
Phenylalanine						1.1(1)	1.9(2)	3.1(3)	1.8(2)	1.5(2)	2.0(2)	8.7(9)	4.0(4)
Lysine					2.1(2)		2.5(3)	3.5(4)		0.9(1)	1.1(1)	3.6(4)	
Histidine	1.0(1)											2.1(2)	1.9(2)
Tryptophan						0.9(1)		3.9(4)				6.8(7)	2.9(3)
Arginine													
Total Res. Num.	5	5	5	8	9	19	20	44	9	19	24	132	79
Sequence No.	179-183	9-13	165-169	1-8	170-178	33-51	121-140	121-164	112-120	14-32	9-32	33-164	33-111
Yield (%)	26	30	91	46	88	10	8	16	31	23	24	38	24

	170				175			178		
V-6	Leu	-Val	-Leu	-Leu	-Lys	-Ala	-Lys	-Ser	-Glu	
	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
	121				125			130		
V-8	Lys	-Val	-Ser	-His	-Ser	-Asn	-Ile	-His	-Val	-Tyr
	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
					135			140		
	Lys	-Leu	-Leu	-Tyr	-Cys	-Gln	-His	-Asp	-Glu	-Glu
	→	→	→	→						

Fig. 3-29. Amino acid sequences of V-6 and V-8.  $\rightarrow$  , Manual Edman degradation;  $\longrightarrow$  , amino acid analysis. Numbering of amino acids is based on the sequence of WCI-3.

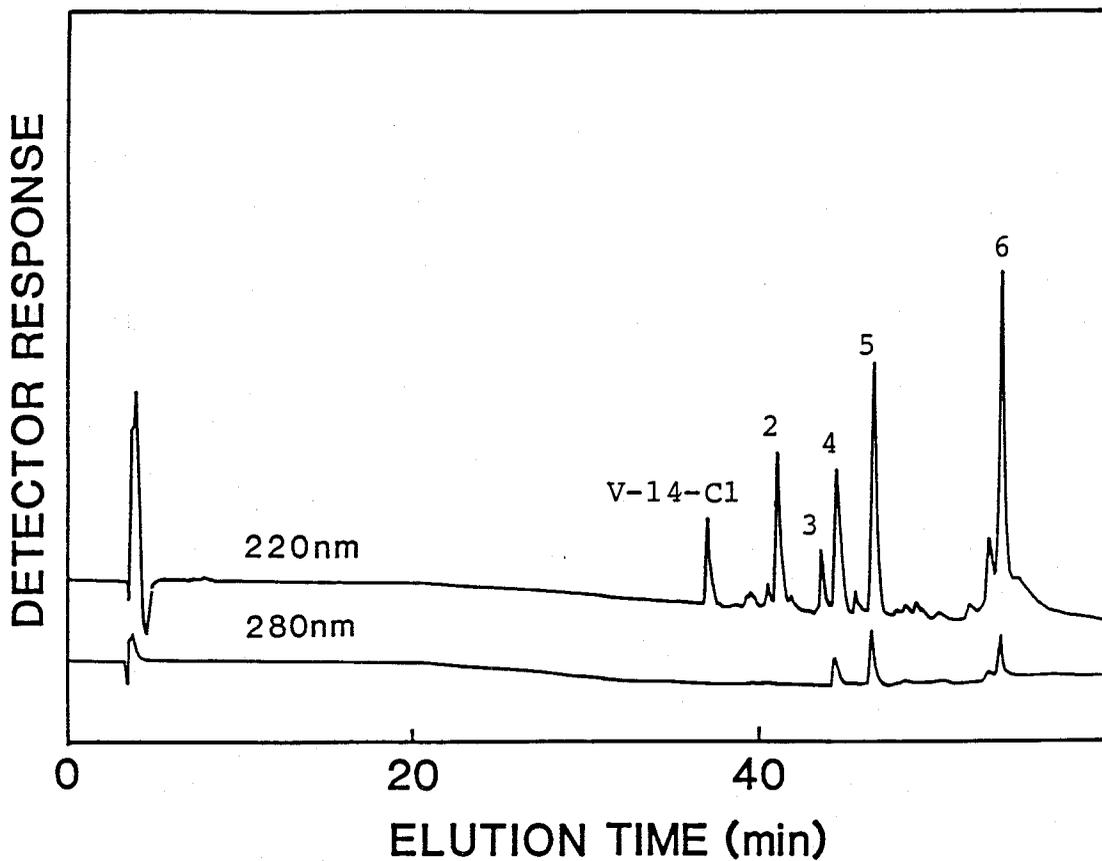


Fig. 3-30. Separation of chymotryptic peptides of V-14 by HPLC. The conditions of the chromatography were as described in Fig. 3-28.

Table 3-15. Amino acid compositions of the chymotryptic peptides of V-14. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

Amino acid	V-14-C1	V-14-C2	V-14-C3	V-14-C4	V-14-C5	V-14-C6
Cm-Cysteine		0.9(1)		0.9(1)		0.9(1)
Aspartic acid		1.0(1)	1.4(1)	1.1(1)	1.0(1)	3.1(3)
Threonine		1.8(2)	1.0(1)		0.8(1)	1.7(2)
Serine	0.9(1)		3.7(4)	1.9(2)	1.0(1)	8.3(9)
Glutamic acid	3.0(3)	1.0(1)	3.2(3)		1.1(1)	4.2(4)
Proline	1.2(1)	2.1(2)	2.2(2)	3.0(3)	2.0(2)	8.0(8)
Glycine		1.1(1)	1.3(1)		1.2(1)	4.2(4)
Alanine		0.9(1)		2.7(3)	1.1(1)	5.0(5)
Valine			2.5(3)		2.5(3)	5.5(7)
Methionine						
Isoleucine			1.9(2)			2.9(3)
Leucine	1.0(1)	1.0(1)			1.2(1)	5.3(5)
Tyrosine						
Phenylalanine			1.1(1)			3.2(3)
Lysine	1.0(1)	0.9(1)	1.1(1)		0.9(1)	1.9(2)
Histidine						
Tryptophan					0.8(1)	1.5(2)
Arginine			1.9(2)			3.1(3)
Total Res. Num.	7	11	21	11	14	61
Sequence No.	105-111	33-43	44-64	80-90	91-104	44-104
Yield (%)	68	79	12	21	38	16



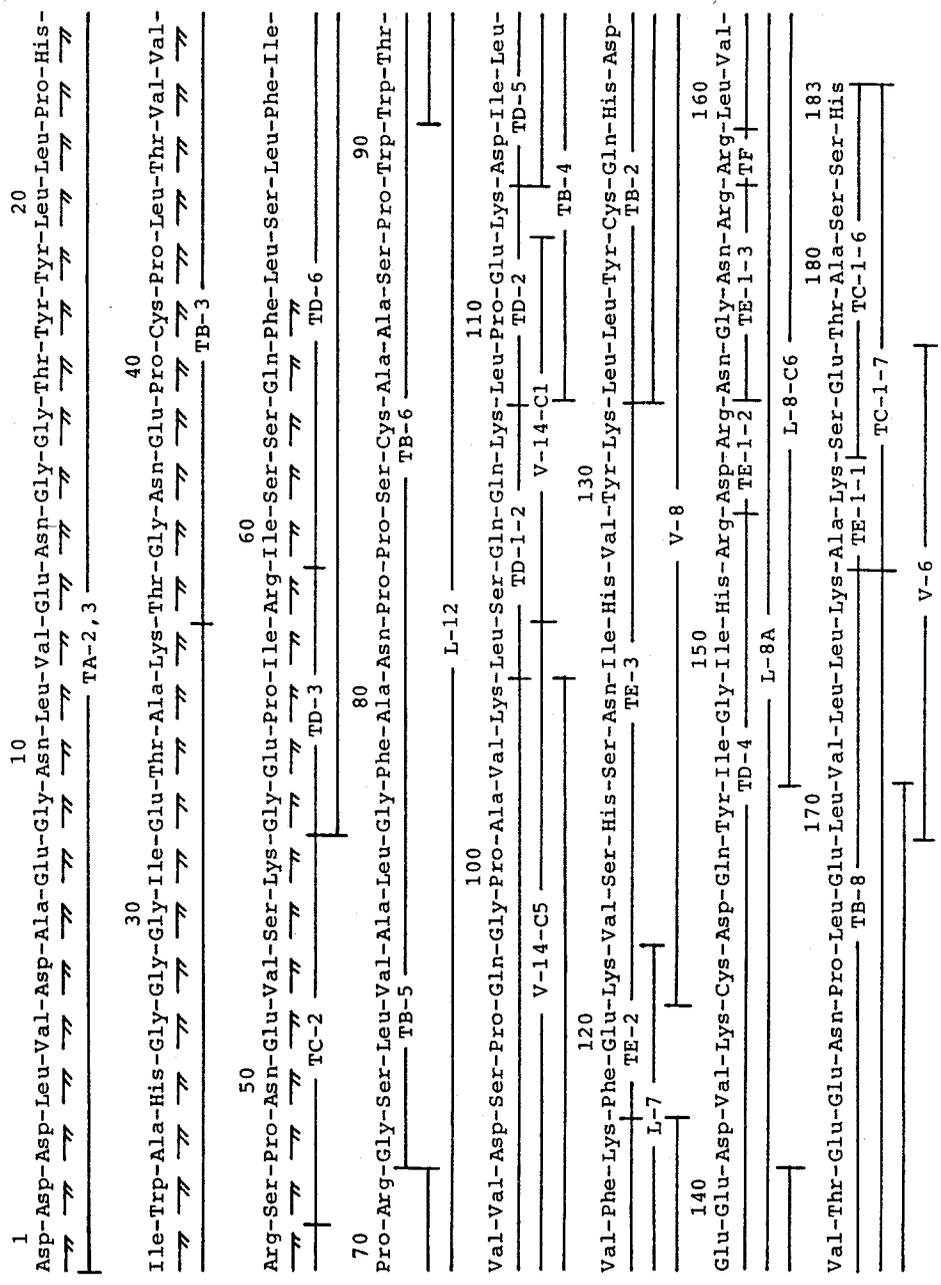


Fig. 3-32. The Complete amino acid sequence of WCI-3. ———, liquid-phase automatic sequencer.

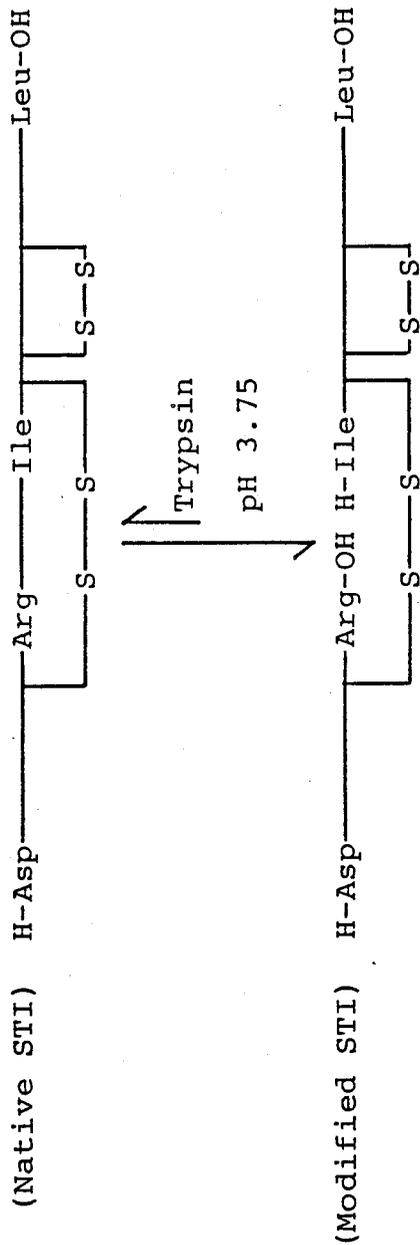


Fig. 3-33. Schematic diagram of the hydrolysis of the reactive site (conversion of native inhibitor to modified inhibitor) in soybean trypsin inhibitor (Kunitz).

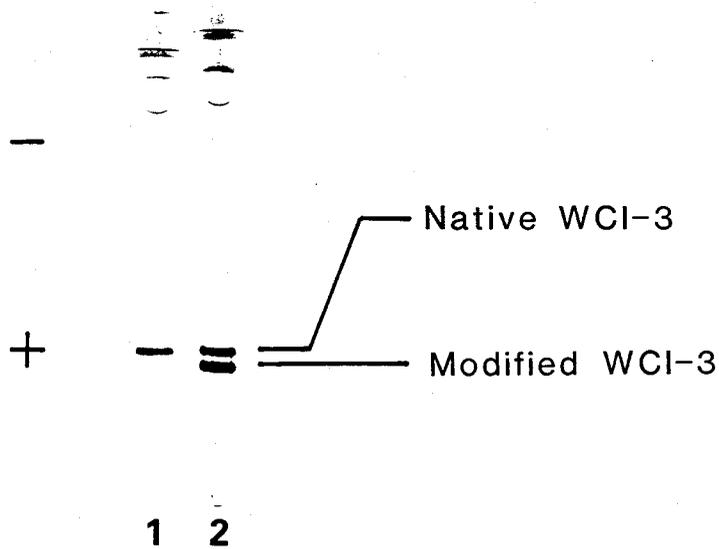


Fig. 3-34. Polyacrylamide gel electrophoresis of native and modified WCI-3. WCI-3 was incubated with bovine  $\alpha$ -chymotrypsin at pH 4.1. Electrophoresis was done under the conditions described in "MATERIALS AND METHODS" in chapter 2. 1, at zero time; 2, after four weeks incubation.

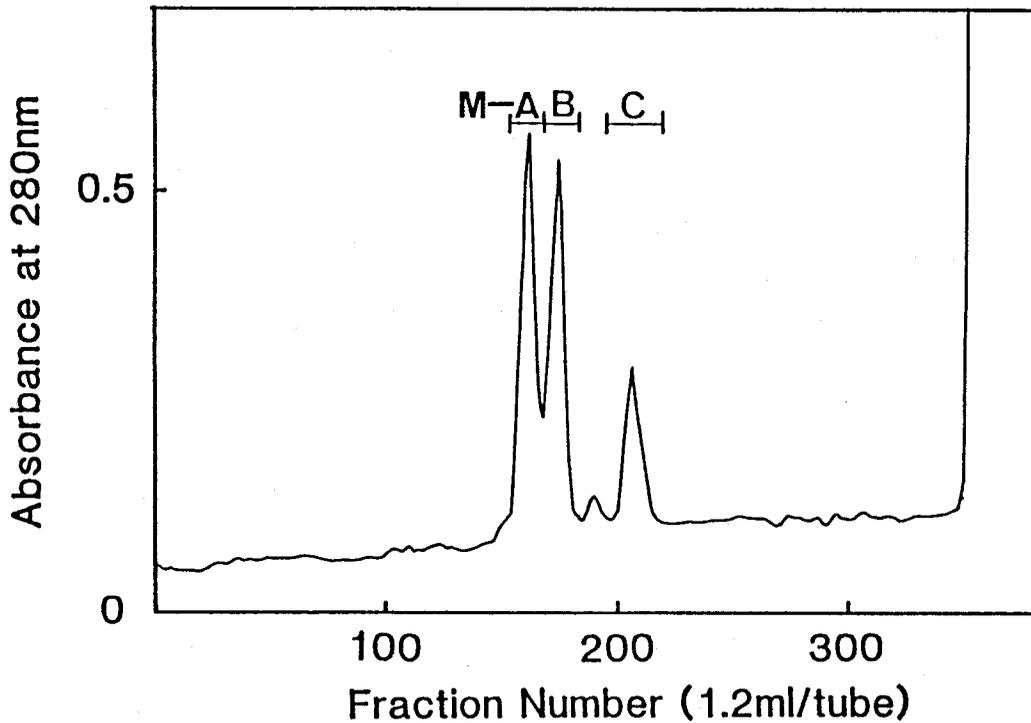


Fig. 3-35. Gel filtration of RCM-modified WCI-3 on Sephadex G-75. Modified WCI-3 was reduced and S-carboxymethylated, and then chromatographed on a Sephadex G-75 column (1.9 x 195 cm) equilibrated with 50% acetic acid.

Table 3-16. Amino acid compositions of the fragments from RCM-modified WCI-3. The numbers of residues in the parentheses are from the established sequences.

	MA	MB	MC	MB + MC	WCI-3
Cm-Cysteine	3.9 ( 4)	2.9 ( 3)	1.1 (1)	4	4
Aspartic acid	19.3 (19)	11.3 (11)	7.9 (8)	19	19
Threonine	6.3 ( 7)	2.5 ( 3)	3.1 (4)	7	7
Serine	11.2 (15)	9.7 (11)	3.0 (4)	15	15
Glutamic acid	19.8 (20)	13.0 (13)	6.9 (7)	20	20
Proline	13.2 (13)	7.8 ( 8)	4.8 (5)	13	13
Glycine	13.8 (13)	5.2 ( 5)	7.5 (8)	13	13
Alanine	9.8 (10)	6.7 ( 7)	2.6 (3)	10	10
Valine	16.1 (16)	10.6 (11)	5.3 (5)	16	16
Methionine	0.0 ( 0)	0.0 ( 0)	0.0 (0)	0	0
Isoleucine	8.9 ( 9)	4.9 ( 5)	3.7 (4)	9	9
Leucine	19.0 (19)	12.5 (13)	5.8 (6)	19	19
Tyrosine	5.4 ( 5)	3.1 ( 3)	2.1 (2)	5	5
Phenylalanine	5.3 ( 5)	4.0 ( 4)	1.1 (1)	5	5
Lysine	11.1 (11)	8.7 ( 9)	2.3 (2)	11	11
Histidine	6.1 ( 7)	3.8 ( 5)	1.7 (2)	7	7
Tryptophan	1.5 ( 3)	1.5 ( 2)	0.2 (1)	3	3
Arginine	7.2 ( 7)	4.8 ( 5)	2.3 (2)	7	7
Total Res. Num.	183	118	65	183	183



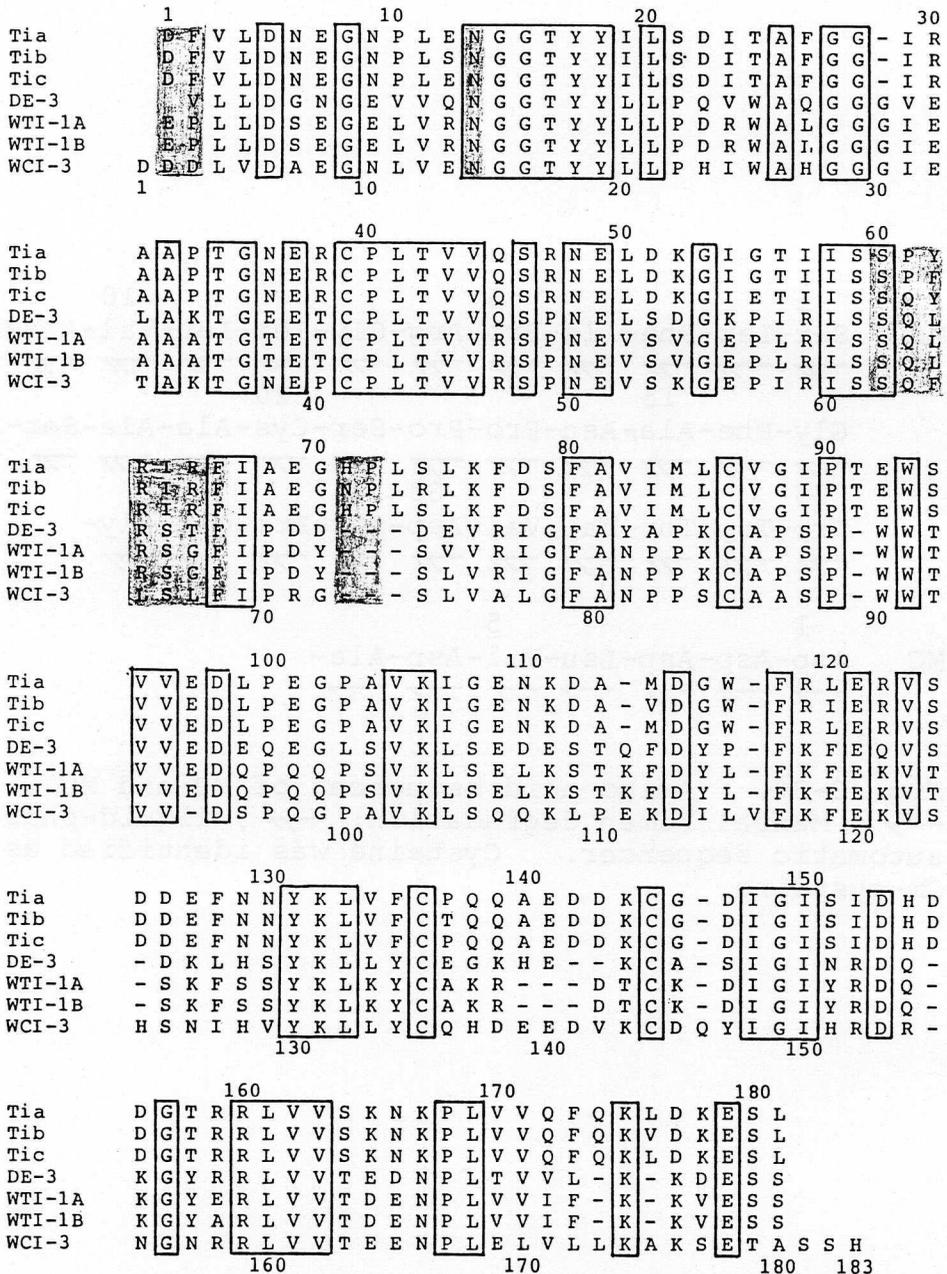


Fig. 3-37. Comparison of the amino acid sequences of Kunitz-type inhibitors. The identical amino acids in all seven sequences are enclosed in boxes. The shaded amino acids correspond to the contact regions between Tia and porcine trypsin. Tia, Tib, and Tic, soybean trypsin inhibitors(5); WTI-1A and WTI-1B, winged bean trypsin inhibitors(8); WCI-3, winged bean chymotrypsin inhibitor; DE-3, *Erythrina latissima* trypsin inhibitor(9).

## 第 4 章

### マメ科植物種子 Kunitz 型プロテイナーゼインヒビターの阻害様式

マメ科植物種子に存在するプロテイナーゼインヒビターのうち、Bowman-Birk 型インヒビター (M.W. 6,000-8,000) は分子内に 2 つの反応部位を有する双頭型インヒビターであることが確かめられているが、Kunitz 型インヒビター (M.W. 20,000) は一般に分子内に 1 つの反応部位を有する単頭型インヒビターであると考えられている。

1955年、すでに Wu と Laskowski, Sr. は、1モルの STI が2モルのキモトリプシンを阻害することを報告し(36)、1981年には、Bösterling と Quast が、STI とキモトリプシンが 1 : 2 のモル比で複合体を形成することを示したが(37)、STI は従来トリプシンインヒビターとして知られており、キモトリプシンに対する阻害活性が弱いために Kunitz 型インヒビターの双頭性は重要視されなかった。しかし、本研究において精製したシカクマメキモトリプシンインヒビター WCI-2 及び WCI-3 が1分子で同時に2分子のキモトリプシンを強く阻害する Kunitz 型インヒビターであることが明らかとなり、これより Kunitz 型インヒビターも双頭型インヒビターである可能性が極めて強くなった。

Kunitz 型インヒビターが双頭型インヒビターであるならば、分子内に 2 つの反応部位を有しているはずである。これまでに一次構造の決定されたすべての Kunitz 型インヒビターは、STI の Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合の位置に 1 つの反応部位 (第 1 反応部位) を有していることが報告されているだけで、第 2 の反応部位についてはなんの知見も得られていない。

そこで、本研究ではシカクマメキモトリプシンインヒビター WCI-3 と STI のイソインヒビターの 1 つ Ti<sup>a</sup>、及びそれらの修飾インヒビターを用いて、Kunitz 型インヒビターにおける第 2 反応部位の存在、及びそのアミノ酸

配列上での位置について検討した。

## 第 1 節 材料と方法

### § 1 実験材料

シカクマメキモトリブシンインヒビター WCI-3 は第2章で精製したものを、ダイズトリブシンインヒビター  $Ti^a$  は Sigma 社製を用いた。

TPCK-トリブシン、ウシ $\alpha$ -キモトリブシン、ズブチリシン BPN<sup>7</sup>、ブタエラストラーゼ、及び N-サクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-プロリル-L-フェニルアラニン p-ニトロアニリド (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) は Sigma 社から購入した。BTPA はペプチド研究所から購入した。QAE-Sephadex A-25 と Sephadex G-25 (Fine)、及び Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) 装置と Mono Q HR 5/5 カラムは Pharmacia 社から購入した。TSK gel G3000SW カラム (7.5 x 600mm) は東洋曹達工業から購入した。その他の試薬は用途に応じて特級またはそれ以上のものを用いた。

ブタキモトリブシンは、Sigma 社製粗ブタトリブシンからシカクマメキモトリブシンインヒビター-Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー(38,39)により精製した。Streptomyces griceus プロテアーゼ A (SGPA) と Streptomyces griceus プロテアーゼ B (SGPB) は、北海道大学薬学部石井信一教授より供与されたものを用いた。

## § 2 実験方法

### 〈キモトリブシン阻害活性の測定〉

キモトリブシン阻害活性は次に示す2方法に従って測定した。また、活性酵素量はダイズ Bowman-Birk インヒビターを用いて補正した。

#### a) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA によるキモトリブシン阻害活性の測定 (Method E) (40)

適当量のインヒビターと 15 $\mu$ g のキモトリブシンを 0.02M 塩化カルシウムと 0.005% Triton X-100 を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 3.2ml に溶解し、22 $^{\circ}$ C で5分間加温した後 3ml を試料セルに移した。この混合溶液にジメチルスルホキシドに溶解した 0.03M Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 基質溶液 10 $\mu$ l を加えてすばやくかくはんし、410nm における吸光度の変化を自記分光光度計 (日立 320 型) で測定した。対照セルには基質溶液 10 $\mu$ l と上述の緩衝液 3ml を入れておいた。

#### b) BTPA によるキモトリブシン阻害活性の測定 (Method F)

BTPA によるキモトリブシン阻害活性の測定は Method E に準じて行った。適当量のインヒビターと 57.2 $\mu$ g のキモトリブシンを 0.02M 塩化カルシウムと 40% エタノールを含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 1.2ml に溶解し、30 $^{\circ}$ C で5分間加温した後 1ml を試料セルに移した。この混合溶液にジメチルスルホキシドに溶解した 0.05M BTPA 基質溶液 10 $\mu$ l を加えてすばやくかくはんし、410nm における吸光度の変化を測定した。

### 〈カルバモイル化〉

インヒビターのカルバモイル化は Kowalski と Laskowski, Jr. の方法(41)に従って行った。インヒビター 2mg を 0.2M シアン酸カリウムを含む 0.2M N-エチルモルホリン-酢酸緩衝液 (pH 8.0) 400 $\mu$ l に溶解し、25 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた。反応後、残った試薬は 0.01M 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 8.1) で平衡化した Sephadex G-25 (Fine) カラム (1 x 70cm) を用

いたゲルろ過により除去した。

#### <WCI-3 のキモトリブシン様酵素による限定分解>

WCI-3 を pH 0.5 間隔で pH 1 から 12 までの種々の緩衝液に溶解した後、1/10 モル量のキモトリブシン様酵素（ブタキモトリブシン、ブタエステラーゼ、ズブチリシン BPN'、SGPA、SGPB）を加えて 37°C で反応させた。反応の追跡は、FPLC システムを用いて行い、時間経過にともなって反応液の一部を 0.1M 食塩を含む 0.02M トリエチルアミン-塩酸緩衝液（pH 9.5）で平衡化した Mono Q HR 5/5 カラムに吸着させ、0.25M までの食塩による直線濃度勾配法で溶出して修飾インヒビターの生成量を求めた。

#### <Ti<sup>a\*</sup>、Ti<sup>a\*</sup><sub>L</sub>、Ti<sup>a\*\*</sup><sub>IL</sub> の調製>

修飾ダイズインヒビター Ti<sup>a\*</sup>、Ti<sup>a\*</sup><sub>L</sub>、Ti<sup>a\*\*</sup><sub>IL</sub> の調製は小沢と Laskowski, Jr. の方法(33)及び加藤と Laskowski, Jr. の方法(42)を併用して行った。

Ti<sup>a</sup> を 0.1M 塩化カリウムと 0.02M 塩化カルシウムを含む希塩酸（pH 3.0）に溶解した後 3.4% モル量の TPCK-トリブシンを加え、25°C で 15 時間反応させて Ti<sup>a\*</sup> を調製した。Ti<sup>a\*\*</sup><sub>IL</sub> は、この反応液をトリスで pH 8.0 に調製した後、Ti<sup>a</sup> の 1% モル量のズブチリシン BPN'を加え、25°C で 15 時間反応させることにより調製した。Ti<sup>a\*</sup><sub>L</sub> の調製は、Ti<sup>a</sup> を 0.05M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解した後、1% モル量のズブチリシン BPN'を加え、25°C で 15 時間反応させて行った。

上述の反応により生成した Ti<sup>a\*</sup>、Ti<sup>a\*</sup><sub>L</sub>、Ti<sup>a\*\*</sup><sub>IL</sub> は、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。反応液を 0.2M 食塩を含む 0.02M モノエタノールアミン-塩酸緩衝液（pH 9.4）で平衡化した QAE-Sephadex A-25 カラムにかけた後、0.4M までの食塩による直線濃度勾配法で溶出することによりそれぞれの修飾インヒビター画分を得た。

## 第 2 節 WCI-3 の阻害様式

### § 1 限定分解

WCI-3 の双頭性及び2つの反応部位の性質を検討するために、種々の pH (1-12) においてブタキモトリプシンによる限定分解を行い、WCI-3 の修飾インヒビターを調製した。第3章では WCI-3 の限定分解にウシキモトリプシンを用いたが、本章では各 pH における安定性や WCI-3 との親和性が強く限定分解速度も大きいブタキモトリプシンを用いることにより、ウシキモトリプシンでは切断されなかった第2反応部位の切断を期待した。

pH 3.0 において、WCI-3 はブタキモトリプシンにより2週間で約 80% が修飾を受け、Mono Q HR 5/5 カラムを用いた FPLC により4つの画分 (F1、F2、F3、F4) を得た (Fig. 4-1)。それぞれの画分は、アミノ酸分析及びエドマン分解により、F1 は修飾されなかった WCI-3、F2 は Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合が切断されたインヒビター WCI-3<sup>\*</sup><sub>s</sub>、F3 は Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合が切断されたインヒビター WCI-3<sup>\*</sup><sub>u</sub>、F4 は Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> と Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> の2つの結合が切断されたインヒビター WCI-3<sup>\*\*</sup><sub>su</sub> であることが示された。

各 pH における限定分解物の FPLC は、WCI-3 のキモトリプシンによる限定分解において pH 1.0 から 2.0 までは Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合のみが切断され、pH 2.5 から 4.0 までは上述の3種の修飾インヒビターすべてが生成し、さらに pH 4.5 以上では Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合のみが切断されることを示し、第1反応部位 (Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合) が切断された修飾インヒビターの生成量は、酸性あるいは塩基性ほど多く、中性における加水分解定数  $K_{\text{hyd}} (= [I^*]/[I])$  はほぼ1であった。

一方、酵素を加えない対照実験でも WCI-3 の Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合は pH 1.0 から 4.0 の緩衝液中で切断を受け、WCI-3 の限定分解においてこの Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合は酸性条件下で非酵素的に切断されたものと考えられる。また、WCI-3<sup>\*</sup><sub>s</sub> あるいは Cbm-WCI-3<sup>\*</sup><sub>s</sub> にさらにキモトリプシンを加えて限定分

解を試みても新たな結合の切断は起こらなかった。

WCI-3 の第2反応部位を検索するため、本研究ではさらにキモトリブシン以外のキモトリブシン様酵素（ブタエラスターゼ、ズブチリシン BPN<sup>7</sup>、SGPA、SGPB）でも限定分解を行った。WCI-3 を pH 1.0 から pH 12.0 までの種々の緩衝液に溶解した後、1/10 モル量の酵素を加えて 37°C で反応させ、FPLC により修飾インヒビターの生成を追跡したところ、上述のすべての酵素が広い pH 領域で修飾 WCI-3 を生成することが明らかとなった。

そこで、pH 8.0 でそれぞれの酵素により限定分解された修飾 WCI-3 の切断部位をエドマン分解法により決定した。エラスターゼは WCI-3 の Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合のみを切断し、SGPA と SGPB は、Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合あるいは Phe<sup>68</sup>-Ile<sup>69</sup> 結合のどちらか一方が切断された修飾 WCI-3 を生成した。ズブチリシンでは Leu<sup>67</sup>-Phe<sup>68</sup> 結合が高収率で切断された。このことより、これらの酵素が WCI-3 のキモトリブシンに対する第1反応部位（Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合）あるいはそれに近接したペプチド結合で WCI-3 と相互作用することが明らかとなったが、WCI-3 の第2の反応部位を推定することはできなかった。

なお、これらの酵素は WCI-3 により全く阻害を受けなかった。

## § 2 阻害様式

WCI-3 の双頭性を検討するため、WCI-3 と前セクションで調製した修飾インヒビター WCI-3<sup>‡</sup> のキモトリブシンに対する複合体形成様式を高速ゲルろ過法で調べた。

WCI-3 及び WCI-3<sup>‡</sup> を 0.1M 食塩を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中 37°C で、2倍モル量のキモトリブシンと5分間反応させ、同緩衝液で平衡化した高速ゲルろ過用 TSK gel G3000SW カラム (7.5 x 600mm) で分析した。Fig. 4-2 に示したように、この条件下ではキモトリブシン-WCI-3 複合体、キモトリブシン-WCI-3<sup>‡</sup> 複合体、WCI-3 (または WCI-3<sup>‡</sup>)、キモトリブシンの順に溶出され、WCI-3 がキモトリブシンと 1 : 2 のモル比

で反応するのに対して、WCI-3 の Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合が切断された WCI-3<sup>\*</sup> は 1 : 1 のモル比でしか複合体を形成しなかった。

WCI-3<sup>\*</sup> のキモトリプシンに対する阻害活性からも、WCI-3<sup>\*</sup> は 1 : 1 のモル比でキモトリプシンを阻害することが示された (Fig. 4-3)。Fig. 4-3 と Fig. 4-4 で、WCI-3 とそのカルバモイル誘導体 Cbm-WCI-3 のキモトリプシンに対する阻害活性がほぼ同じであることは、カルバモイル化が WCI-3 のキモトリプシンに対する阻害活性にほとんど影響を及ぼさないことを示している。

そこで、修飾インヒビター WCI-3<sup>\*</sup> 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 (Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合) だけを失活させた Cbm-WCI-3<sup>\*</sup> のキモトリプシンに対する阻害活性を測定した (Fig. 4-4)。Cbm-WCI-3<sup>\*</sup> は、1 : 1 のモル比でキモトリプシンを阻害し、その阻害定数 (K<sub>i</sub> 値) は WCI-3<sup>\*</sup> の阻害定数とほぼ一致していた (Table 4)。

なお、前セクションで調製した修飾インヒビター WCI-3<sup>\*</sup> 及び WCI-3<sup>\*\*</sup> は、キモトリプシンに対してそれぞれ WCI-3 及び WCI-3<sup>\*</sup> と同じ阻害活性を示し、このことより Asp<sup>141</sup>-Val<sup>142</sup> 結合は WCI-3 のキモトリプシンに対する阻害活性に関与していないと考えられる。

### 第 3 節 $Ti^a$ の阻害様式

WCI-3 の第 2 反応部位の検索が不成功に終わったので、Fig. 4-5 に示した STI のイソインヒビター  $Ti^a$  及びその修飾インヒビター  $Ti^{a*}$  (Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合切断)、 $Ti^{a*}$  (Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合切断)、 $Ti^{a**}$  (Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合及び Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合切断) を用いて  $Ti^a$  の双頭性とその第 2 反応部位について検討した。

#### § 1 双頭性

高速ゲルろ過法により  $Ti^a$  のトリブシン及びキモトリブシンとの複合体形成様式を調べた (Fig. 4-6)。本実験では、酵素-インヒビター複合体の解離を防ぐため、酵素及びインヒビターの濃度をかなり高濃度 ( $\sim 10^{-3}M$ ) にして複合体を形成させた。

Fig. 4-6 より、 $Ti^a$  のトリブシン及びキモトリブシンとの複合体形成様式はつぎのように要約できる。

- (1)  $Ti^a$  は 1 : 1 のモル比でトリブシンと複合体を形成する。
- (2) トリブシン- $Ti^a$  複合体はさらに 1 : 1 のモル比でキモトリブシンと複合体を形成する。
- (3)  $Ti^a$  はキモトリブシンと 1 : 2 のモル比で複合体を形成する。

この結果は、 $Ti^a$  がキモトリブシンに対して 2 つの反応部位を有していることを支持している。

## § 2 第 2 反応部位の検索

$Ti^a$  の第 2 反応部位を検索するために  $Ti^a$ 、 $Ti^{a*}$ 、 $Ti^{a*}$ 、 $Ti^{a**}$  のキモトリブシンとの複合体形成様式を高速ゲルろ過法で検討した。

$Ti^a$  及び 3 種の修飾インヒビターを 0.1M 食塩を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中 37°C で 2 倍モル量のキモトリブシンと 5 分間反応させ、同緩衝液で平衡化した高速ゲルろ過用 TSK gel G3000SW カラム (7.5 x 600mm) で分析した。Fig. 4-7 に示したように、 $Ti^a$  の Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合あるいは Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合を切断したインヒビターは、いずれもキモトリブシンと 1 : 1 のモル比でしか複合体を形成せず、両方の結合を同時に切断した修飾インヒビター  $Ti^{a**}$  では、もはやキモトリブシンと複合体を形成しなかった。以上の結果は、Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合が  $Ti^a$  の第 2 反応部位の阻害活性になんらかの関与をしていることを示している。

Fig. 4-8 と Fig. 4-9 は、 $Ti^a$  とその修飾インヒビター、及びそのカルバモイル誘導体のキモトリブシンに対する阻害活性を示しているが、それらの結果も上述のゲルろ過法の結果を支持し、また、 $Ti^a$  と Cbm- $Ti^a$  の阻害活性が同じであることから、 $Ti^a$  でもカルバモイル化はそのキモトリブシンに対する阻害活性にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。

一般に、インヒビターの切断された反応部位は標的酵素により再結合することが知られているが(43)、 $Ti^a$  において Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合及び Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合がキモトリブシンに対する反応部位であるならば、これらの切断された結合はキモトリブシンにより再結合される可能性が強い。そこで、 $Ti^{a*}$  あるいは  $Ti^{a*}$  を 2 倍モル量のキモトリブシンと 0.1M 食塩を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中 30°C で反応させ、時間経過にともなう複合体形成様式を高速ゲルろ過法で追跡して、切断された Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合及び Met<sup>84</sup>-Ile<sup>85</sup> 結合の再結合について検討した。

$Ti^{a*}$  はキモトリブシンにより Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合が再結合されて  $Ti^a$  となり、(キモトリブシン)<sub>2</sub>- $Ti^a$  複合体を生成したが、 $Ti^{a*}$  では Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合は再結合されず、逆に Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合の一部が切断されて  $Ti^{a**}$  が

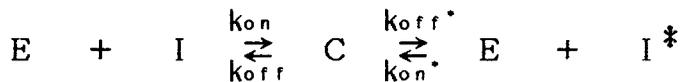
生じた (Fig. 4-10)。

以上の高速ゲルろ過法及びキモトリブシンに対する阻害活性の測定結果より、Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合がキモトリブシンに対する反応部位 (第1反応部位) であることが確かめられ、また、Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合付近に第2反応部位の存在する可能性が示唆された。

## 第 4 節 考 察

高速ゲルろ過法及び阻害活性測定による解析の結果は、 $Ti^a$  及び WCI-3 がキモトリブシンに対して分子内に2つの反応部位を有していることを示し、Kunitz 型インヒビターの双頭性を確認した。

一般にセリンプロテイナーゼは次式に示すような反応機構でインヒビターと相互作用している(43)。



ここでEは酵素、Iと $I^*$ はインヒビター及び反応部位が切断された修飾インヒビター、Cは酵素-インヒビター複合体を示し、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、 $k_{on}^*$ 、 $k_{off}^*$ はそれぞれの反応にともなう速度定数を表している。

本研究のゲルろ過において WCI-3<sup>\*</sup> はキモトリブシンと 1 : 1 のモル比の複合体しか形成せず、キモトリブシンに対する阻害活性からも第1反応部位が切断されただけでその第1反応部位の阻害活性を消失する結果となった。これは、WCI-3 では上式の  $k_{on}^*$  が非常に小さく、本章におけるゲルろ過法及び阻害活性測定法の5分間の加温では切断された反応部位でキモトリブシンと複合体を形成しないためと考えられる。

一方、 $Ti^a$  の修飾インヒビター  $Ti_I^{a*}$  及び  $Ti_{IL}^{a**}$  では、Fig. 4-7 に示したキモトリブシンとの複合体形成反応で、キモトリブシン- $Ti_I^{a*}$  複合体及び  $Ti_{IL}^{a**}$  のピークの前側に肩が存在した。これは、反応中に切断されていた Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合がキモトリブシンにより再結合され、そこでキモトリブシンと複合体を形成したためと考えられる。したがって、これら2種のインヒビターのカルバモイル誘導体では再結合が起こらないために上述のような肩は完全に消失していた (Fig. 4-7)。

N末端アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基及びリジンの $\epsilon$ -アミノ基をカルバモイル基

でブロックした Cbm-WCI-3 のキモトリブシンに対する阻害活性 (Fig. 4-4) が WCI-3 の阻害活性 (Fig. 4-3) とほぼ同じであることより、カルバモイル化は WCI-3 の両反応部位におけるキモトリブシン阻害活性に影響を及ぼさないものと考えられる。また、Table 4 において、2つの反応部位が等価であるとしたときの Cbm-WCI-3 の1つの反応部位のキモトリブシンに対する見かけの阻害定数 ( $K_i$  値) が、第1反応部位を失活させた Cbm-WCI-3<sup>‡</sup> の阻害定数と一致していることは、WCI-3 の第1反応部位及び第2反応部位のキモトリブシンに対する阻害活性が同程度であることを示している。

以上の結果より、キモトリブシン及びキモトリブシン様酵素によって第2反応部位が切断されなかったためにその第2反応部位の位置を特定することはできなかったが、WCI-3 にはほぼ同じ強さの阻害活性を有する2つの反応部位が存在することが明らかとなった。

小沢と Laskowski, Jr. は、酸性条件下で  $Ti^a$  に触媒量のトリブシンを作用させると Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合が切断され (Fig. 4-5)、この結合がトリブシンに対する反応部位であることを報告した(33)。その後 Bidlingmeyer らによってこの Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合はキモトリブシンに対する反応部位でもあることが確認された(44)。さらに、Sweet らの STI とブタトリブシンとの複合体の X線解析により、Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合がトリブシンの活性部位と相互作用していることが示された(34)(Fig. 4-12)。

加藤と Laskowski, Jr. は、 $Ti^a$  の Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合が中性条件下でズブチリンにより切断されることを報告している(42)。また、Sweet らの X線解析の結果(34)を大阪大学蛋白質研究所附属結晶解析センターのグラフィックディスプレイシステムで検討したところ、この Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合と上述の Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合は、STI 分子内で空間的にかなり離れた部位に位置していることが明らかとなった。このこととズブチリンがキモトリブシン様酵素であることから、Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合が  $Ti^a$  のキモトリブシンに対するもう1つの反応部位 (第2反応部位) である可能性が浮かび上がってきた。

そこで、 $Ti^a$ 、 $Ti^a_{I1}$ 、 $Ti^a_L$ 、 $Ti^a_{IL}$  を用いて  $Ti^a$  の第2反応部位について検索した結果、 $Ti^a$  の Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合あるいは Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合を切

断したインヒビターはいずれもキモトリブシンと 1 : 1 のモル比でしか複合体を形成せず、また、両方の結合を同時に切断した修飾インヒビターではもはやキモトリブシンと複合体を形成しないことが明らかとなり (Fig. 4-7)、 $Ti^a$  の第 2 反応部位が Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合付近に存在することが推定された。

また、WCI-3 と同様、 $Ti^a$  でも Cbm- $Ti^{a*}$  と Cbm- $Ti^{a*}$  のキモトリブシンに対する阻害活性が一致することから (Fig. 4-9)、 $Ti^a$  の 2 つの反応部位はキモトリブシンに対して同程度の阻害活性を示すことが確かめられた。

Fig. 4-8 で  $Ti^{a*}$  が  $Ti^{a*}$  よりもキモトリブシンに対して強い阻害活性を示したのは、切断されていた  $Ti^{a*}$  の Arg<sup>63</sup>-Ile<sup>64</sup> 結合がキモトリブシンにより再結合され、その位置でも複合体を形成したためと考えられる。 $Ti^{a**}$  がわずかに阻害活性を示したのもそのためで、したがってそのカルバモイル誘導体 Cbm- $Ti^{a**}$  は阻害活性を示さなかった。

WCI-3 のキモトリブシンに対する第 2 反応部位もこの Met-Leu 結合に相当する位置に存在すると考えられるが、Kunitz 型インヒビター間のアミノ酸配列の高い相同性から (Fig. 3-37)、他の Kunitz 型インヒビターもこの付近に反応部位を有していると推測される。

Kunitz 型インヒビターの第 2 反応部位については、WCI-3 における Phe<sup>79</sup>-Ala<sup>80</sup> 結合の位置も候補に挙げることができる。この Phe-Ala 結合は、 $Ti^a$  をはじめ、いままでに一次構造の決定されたすべての Kunitz 型インヒビターに存在し (Fig. 3-37)、 $Ti^a$  における Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合にも近接している。また、WCI-3 の Phe<sup>79</sup>-Ala<sup>80</sup> 結合の後のアミノ酸配列がダイズ Bowman-Birk インヒビターの第 1 反応部位のアミノ酸配列と相同であることも、この位置が第 2 反応部位である可能性を示唆している (Fig. 4-11)。

本研究において第 2 反応部位の位置を特定することはできなかったが、いずれにしても Kunitz 型インヒビターの第 2 反応部位は、第 1 反応部位から 20 残基程度 C 末端側に存在していることは間違いないであろう。

WCI-3 と  $Ti^a$  では、第 1 反応部位と第 2 反応部位がキモトリブシンに対して同程度の阻害活性を示すが、第 1 反応部位のペプチド結合がキモトリブシンにより切断、再合成を受けるのに対し、第 2 反応部位はそのような挙動を

全く示さない。したがって、両反応部位の構造あるいは阻害様式の間にはなんらかの相違があると考えられる。また、WCI-3 の第2反応部位がキモトリブシン以外のキモトリブシン様酵素を全く阻害しないことは非常に興味深い。

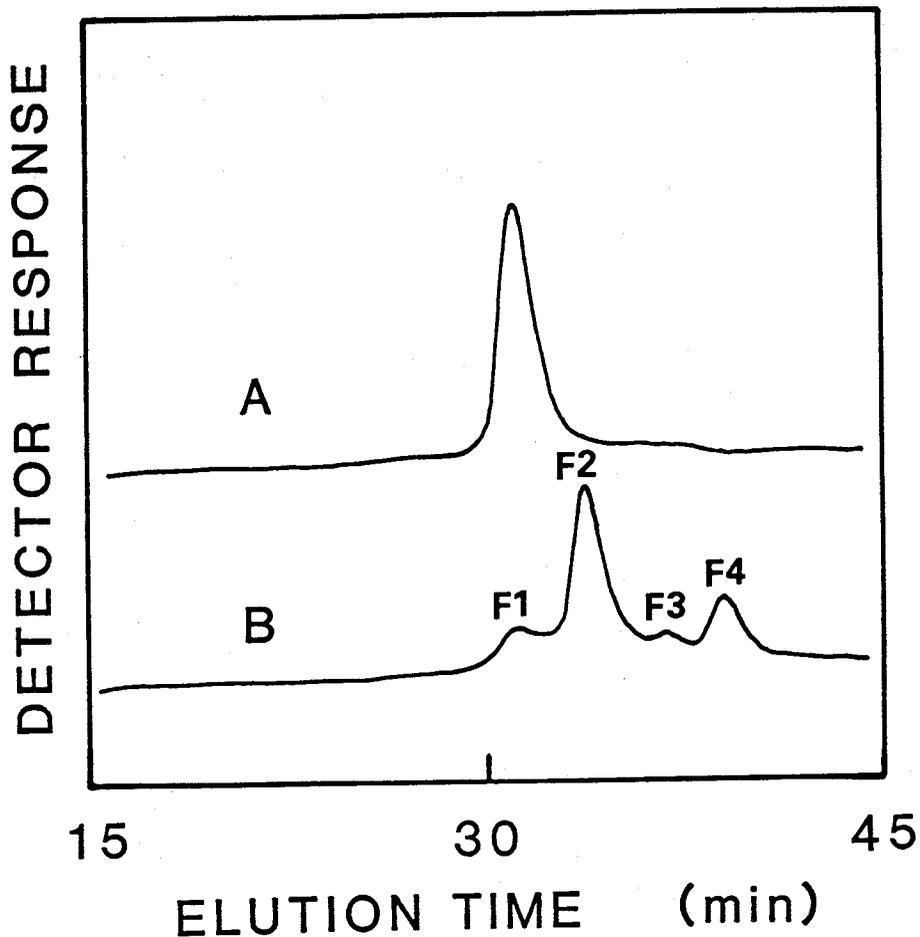


Fig. 4-1. Separation of modified WCI-3s by FPLC. WCI-3 was incubated with porcine chymotrypsin at pH 3.0. Aliquots of the reaction mixture were put on a Mono Q HR 5/5 column equilibrated with 0.02 M triethylamine-HCl buffer, pH 9.5, containing 0.1 M NaCl. The column was washed with the equilibrating buffer for 5 min, and then eluted with a linear gradient of NaCl from 0.1 M to 0.25 M in the equilibrating buffer for 30 min. A flow rate was 0.5 ml per min. Proteins were monitored at 280 nm. A, at zero time; B, after two weeks incubation.

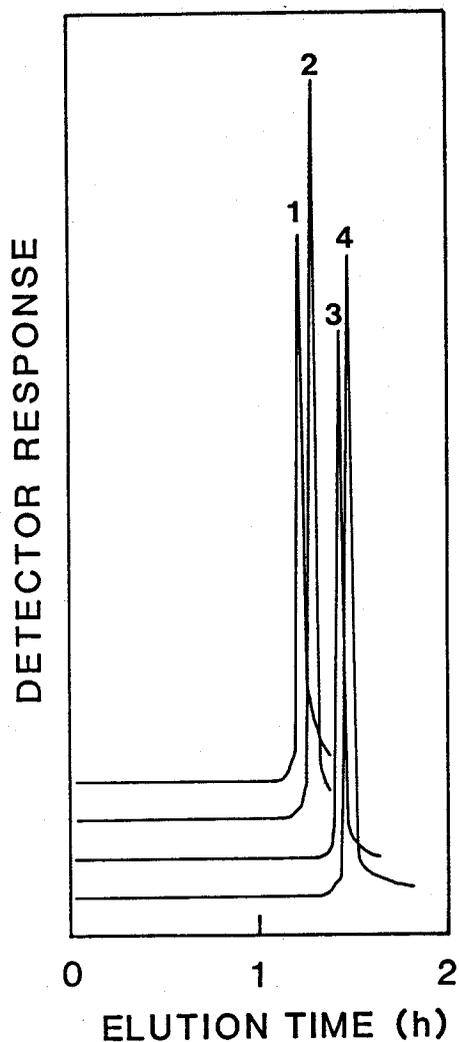


Fig. 4-2. Complex formations of WCI-3 and WCI-3S\* with bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. The sample solution (5  $\mu$ l) was injected on a TSK gel G3000SW column (7.5 x 600 mm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl. Flow rate, 0.2 ml/min; detection, absorbance at 280 nm.

1, (chymotrypsin)<sub>2</sub>-WCI-3 complex ( $5 \times 10^{-5}$  M);  
 2, chymotrypsin-WCI-3S\* complex ( $1 \times 10^{-4}$  M);  
 3, WCI-3 and WCI-3S\* ( $1 \times 10^{-4}$  M); 4, chymotrypsin ( $1 \times 10^{-4}$  M).

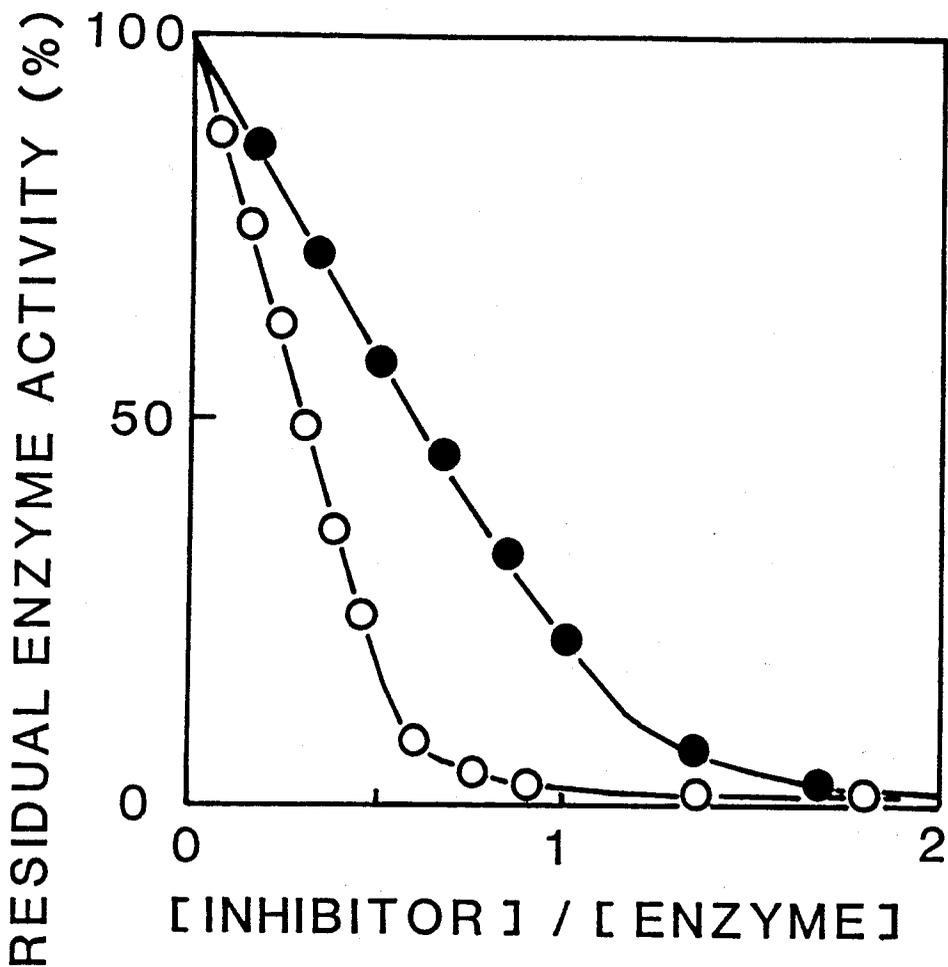


Fig. 4-3. Inhibitory activities of WCI-3 and WCI-3S\* against bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. A fixed amount of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin was mixed with increasing amounts of the inhibitors, and the residual enzyme activities were assayed by method E. The enzyme concentration in the reaction mixture was  $8.0 \times 10^{-8}$  M. ○, WCI-3; ●, WCI-3S\*.

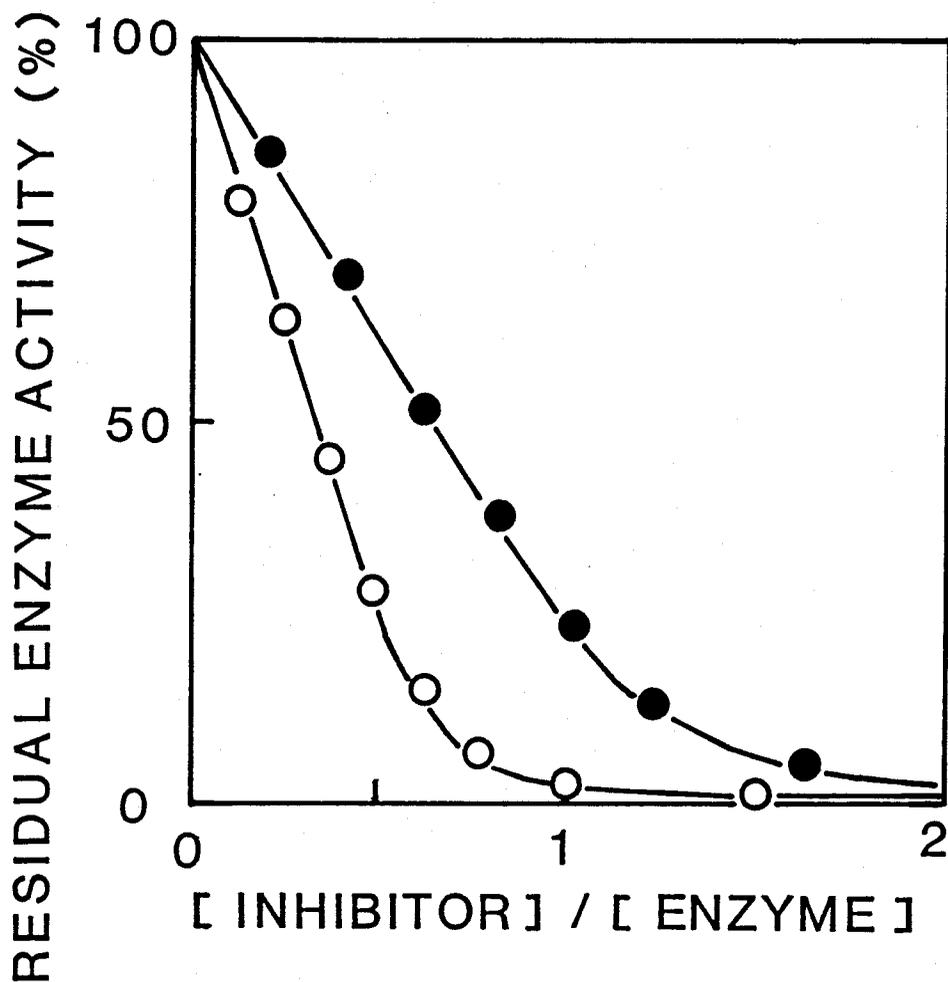


Fig. 4-4. Inhibitory activities of Cbm-WCI-3 and Cbm-WCI-3\* against bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. The conditions of the assay were as described in Fig. 4-3. ○, Cbm-WCI-3; ●, Cbm-WCI-3\*.

Table 4.  $K_i$  values for the complexes with chymotrypsin.

Inhibitor	$K_i$ Value
WCI-3	$4 \times 10^{-9} \text{ M}^a$
Cbm-WCI-3	$6 \times 10^{-9} \text{ M}^a$
WCI-3S*	$5 \times 10^{-9} \text{ M}$
Cbm-WCI-3S*	$6 \times 10^{-9} \text{ M}$

<sup>a</sup>Calculated on the assumption that there are two reactive sites with equivalent  $K_i$  values.

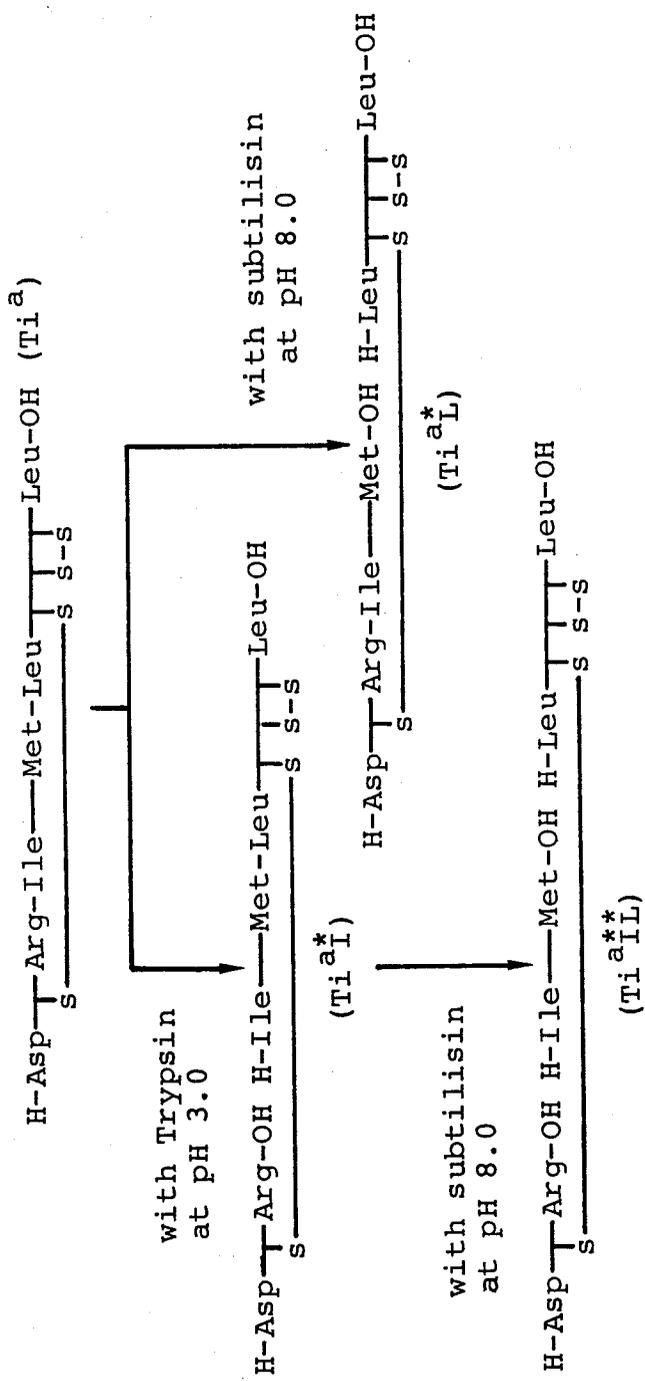


Fig. 4-5. Schematic diagram of the conversion of Ti<sup>a</sup> to Ti<sup>a</sup>I, Ti<sup>a</sup>L, and Ti<sup>a</sup>IL.

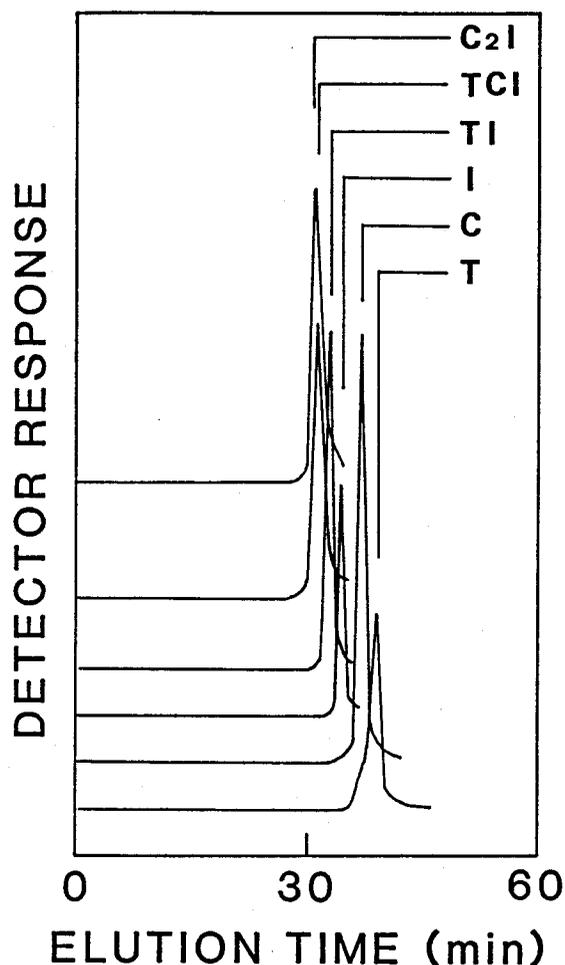
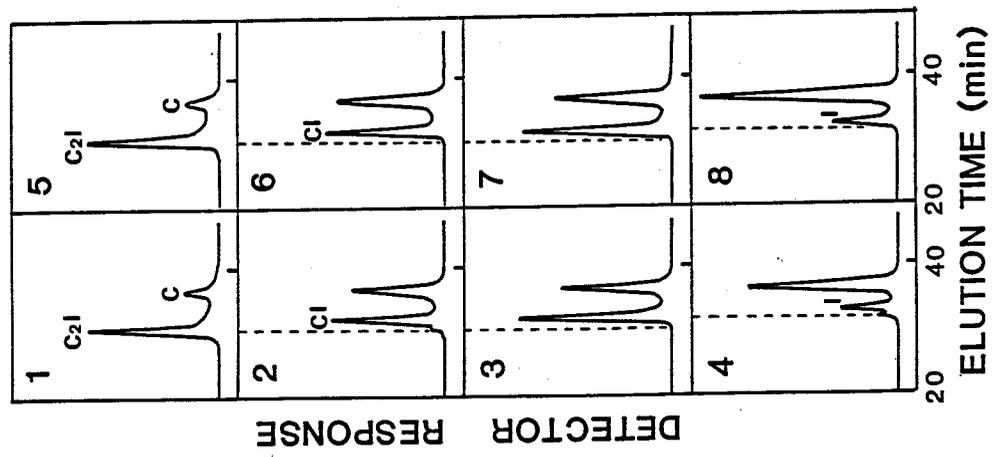


Fig. 4-6. Complex formations of  $Ti^a$  with bovine trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. The sample solution (5  $\mu$ l) was injected on a TSK gel G3000SW column (7.5 x 600 mm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl. Flow rate, 0.5 ml/min; detection, absorbance at 280 nm; C<sub>2</sub>I, (chymotrypsin)<sub>2</sub>- $Ti^a$  complex ( $1 \times 10^{-3}$  M); TCI, trypsin- $Ti^a$ -chymotrypsin complex ( $1 \times 10^{-3}$  M); TI, trypsin- $Ti^a$  complex ( $1 \times 10^{-3}$  M); I,  $Ti^a$  ( $2 \times 10^{-3}$  M); C, chymotrypsin ( $2 \times 10^{-3}$  M); T, trypsin ( $2 \times 10^{-3}$  M).

Fig. 4-7. Complex formations of  $Ti^a$  and modified  $Ti^a$ s with bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. Each inhibitor was incubated with 2-fold amounts of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin at 37°C for 5 min. The reaction mixture

(5  $\mu$ l) was injected on a TSK gel G3000SW column (7.5 x 600 mm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl. The enzyme concentration in the reaction mixture was  $2 \times 10^{-3}$  M. Flow rate, 0.5 ml/min; detection, absorbance at 280 nm.

$C_2I$ , (chymotrypsin)<sub>2</sub>-inhibitor complex; CI, Chymotrypsin-inhibitor complex; I, inhibitor.  
 1,  $Ti^a$ ; 2,  $Ti^{a*}$ ; 3,  $Ti^{aL}$ ; 4,  $Ti^{aLL}$ ;  
 5, Cbm- $Ti^a$ ; 6, Cbm- $Ti^{a*}$ ;  
 7, Cbm- $Ti^{aL}$ ; 8, Cbm- $Ti^{aLL}$ .



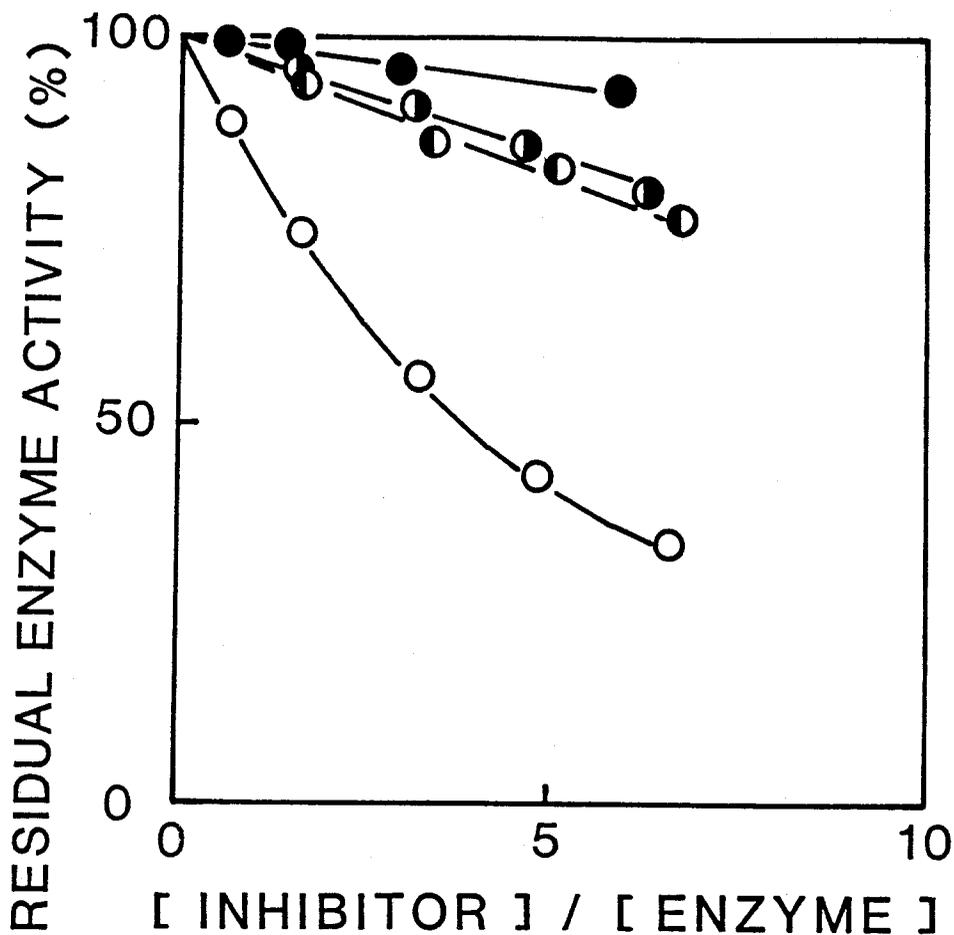


Fig. 4-8. Inhibitory activities of  $\text{Ti}^{\text{a}}$ ,  $\text{Ti}^{\text{a*}}$ ,  $\text{Ti}^{\text{aL}}$ , and  $\text{Ti}^{\text{a**}}$  against bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. A fixed amount of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin was mixed with increasing amounts of the inhibitors, and the residual enzyme activities were assayed by method F. The enzyme concentration in the reaction mixture was  $1.0 \times 10^{-6}$  M.  $\bigcirc$ ,  $\text{Ti}^{\text{a}}$ ;  $\bigcirc$ ,  $\text{Ti}^{\text{a*}}$ ;  $\bullet$ ,  $\text{Ti}^{\text{aL}}$ ;  $\bullet$ ,  $\text{Ti}^{\text{a**}}$ .

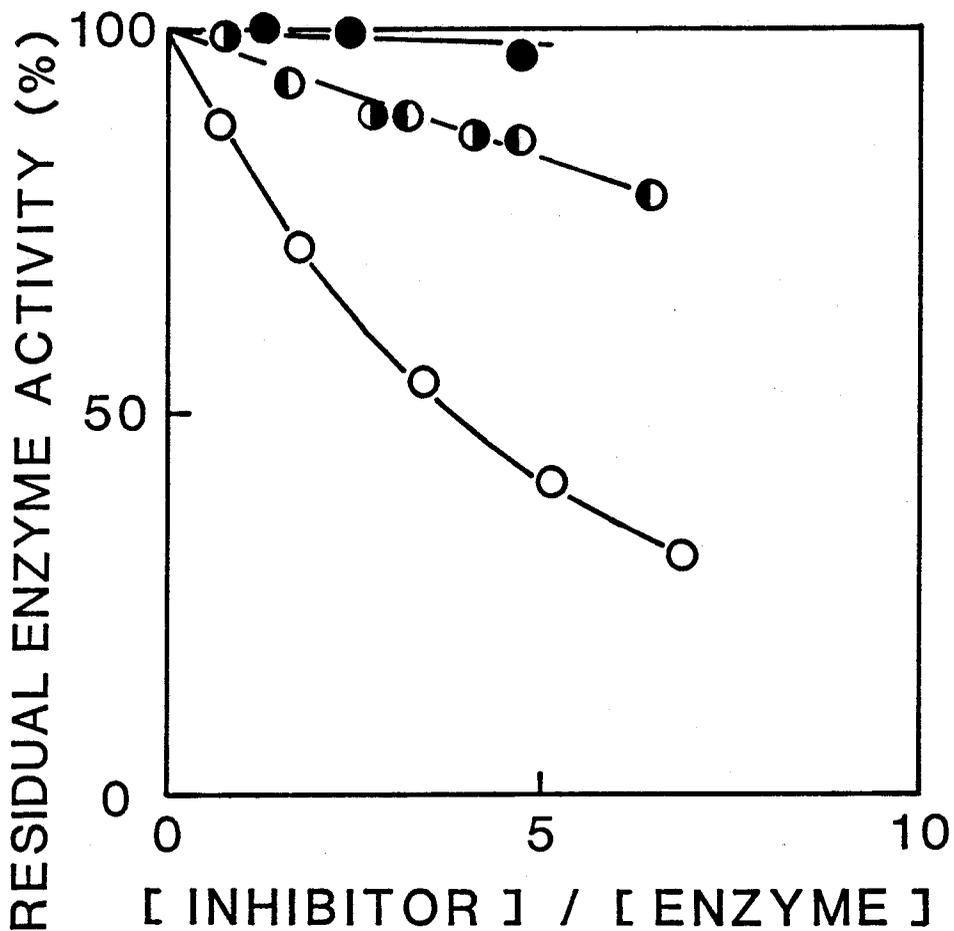


Fig. 4-9. Inhibitory activities of Cbm-Ti<sup>a</sup>, Cbm-Ti<sup>a\*I</sup>, Cbm-Ti<sup>a\*L</sup>, and Cbm-Ti<sup>a\*\*IL</sup> against bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. The conditions of the assay were as described in Fig. 4-8.  $\circ$ , Cbm-Ti<sup>a</sup>;  $\odot$ , Cbm-Ti<sup>a\*I</sup>;  $\bullet$ , Cbm-Ti<sup>a\*L</sup>;  $\bullet$ , Cbm-Ti<sup>a\*\*IL</sup>.

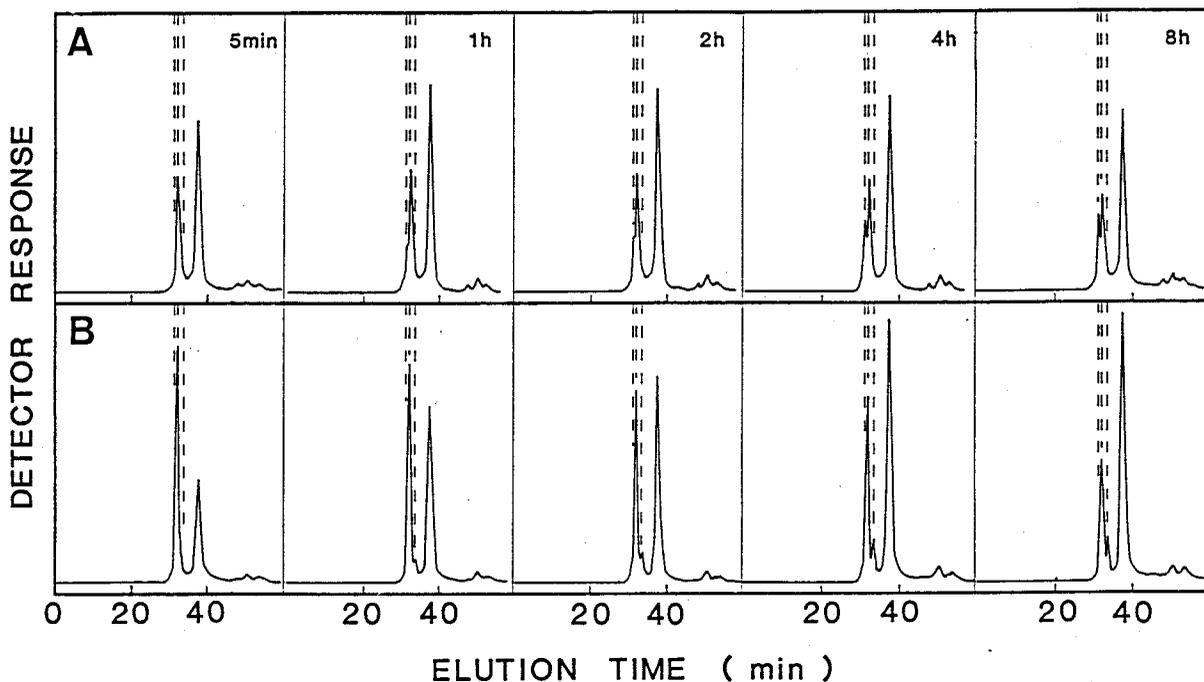


Fig. 4-10. Resyntheses of the cleaved bonds in modified  $Ti^{a_s}$  ( $Ti^{a*_I}$  and  $Ti^{a*_L}$ ) by bovine  $\alpha$ -chymotrypsin.  $Ti^{a*_I}$  and  $Ti^{a*_L}$  were incubated with 2-fold amounts of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin at  $30^\circ\text{C}$ , respectively. At various incubation times, the reaction mixture ( $5\ \mu\text{l}$ ) was injected on a TSK gel G3000SW column ( $7.5 \times 600\ \text{mm}$ ) equilibrated with  $0.1\ \text{M}$  Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing  $0.1\ \text{M}$  NaCl. The enzyme concentration in the reaction mixture was  $2 \times 10^{-3}\ \text{M}$ . Flow rate,  $0.5\ \text{ml/min}$ ; detection, absorbance at  $280\ \text{nm}$ . Lane A,  $Ti^{a*_I}$ ; lane B,  $Ti^{a*_L}$ . The broken lines in each figure indicate the elution positions of  $(\text{chymotrypsin})_2$ -inhibitor complex, chymotrypsin-inhibitor complex, and inhibitor, from the left.

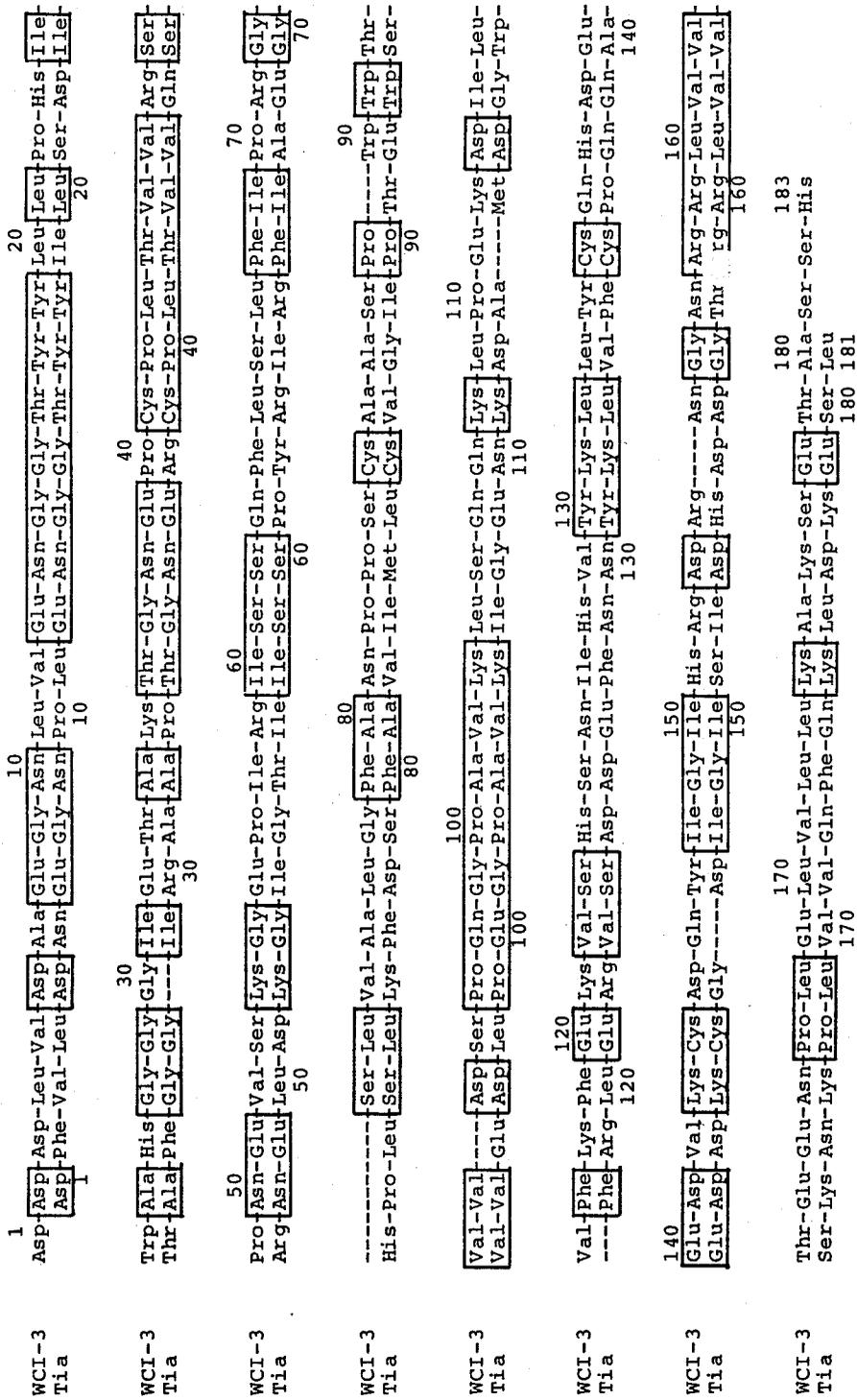


Fig. 4-11. The amino acid sequences of WCI-3 and Tia. The identical amino acids in the two inhibitors are enclosed in boxes.

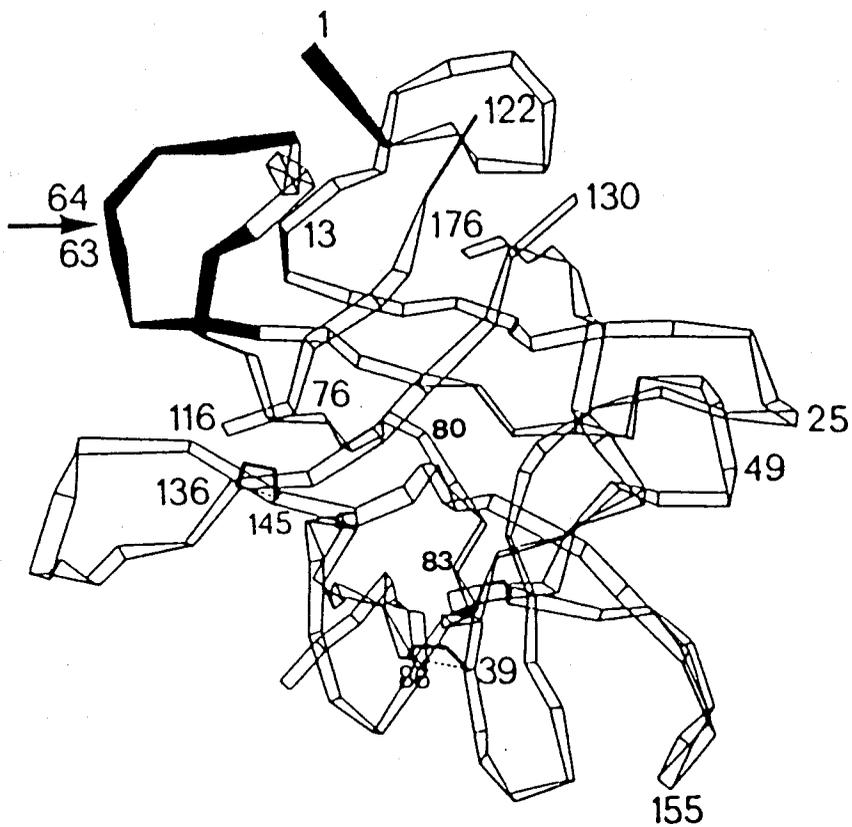


Fig. 4-12. The cain folding of STI (34). Residues which are in contact with trypsin are blackened.

## 第 5 章

### マメ科植物種子プロテイナーゼ インヒビターの活性発現

プロテイナーゼが生体内において生命現象に広く関与していることが明らかになるにつれて、これを阻害するプロテイナーゼインヒビターの生理的役割の重要性にも関心が高まってきた。植物におけるインヒビターの生理的役割及び機能については、内在性プロテイナーゼの活性調節及び昆虫などの外敵プロテイナーゼに対する防御作用などが考えられているが(46)、現段階においてその真の生理的役割について明確な解答は得られていない。

そこで、マメ科植物におけるプロテイナーゼインヒビターの生理的役割を解明する手がかりとして、シカクマメの各部分におけるインヒビター活性を調べるとともに、シカクマメ、およびダイズ両種子の成熟過程にともなうインヒビター活性の変化を追跡した。

## 第 1 節 材料と方法

### § 1 実験材料

シカクマメの各部分は、農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所において1982年11月中旬に品種 UPS-31 から採集した。各成熟段階の種子は、1984年、大阪大学において栽培したシカクマメ（品種ウリズン）及びダイズ（品種白鳥枝豆）から調製した。

ウシトリブシン、ウシ $\alpha$ -キモトリブシン、N-ベンゾイル-L-プロリル-L-フェニルアラニル-L-アルギニン p-ニトロアニリド (Bz-Pro-Phe-Arg-pNA) は Sigma 社から購入した。BAEE、ATEE、BAPA はペプチド研究所から購入した。ウシ血清アルブミンは生化学工業社から購入した。TSK gel G3000SW カラム (7.5 x 600mm) と TSK gel G2000SW カラム (7.5 x 600mm) は東洋曹達工業から購入した。その他の試薬は用途に応じて特級またはそれ以上のものを用いた。

ウサギ抗 WCI-3 抗血清は第2章で調製したものを用いた。

### § 2 実験方法

#### 〈酵素阻害活性の測定〉

各試料の酵素阻害活性は、試料抽出液を活性測定用緩衝液で適当な濃度に希釈した後、第2章で述べた活性測定法 Method A 及び Method C に従って測定した。阻害活性単位及び比活性は第2章に準じた。

#### 〈二次元一重免疫拡散法〉

二次元一重免疫拡散法は Mancini の方法(47)に従って行った。寒天ゲルは、5% 抗 WCI-3 抗血清と 0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.15M 食塩水で寒天濃

度が 1.2%(W/V) になるように調製した。各試料抽出液 4 $\mu$ l をそれぞれの穴に分注し、湿度を保ちながら室温で3日間拡散させて沈降輪を形成させた。ゲルは 0.15M 食塩水で2日間洗浄した後、蒸留水で塩分を除き、1%(W/V) アミドブラック 10B(17)で染色し、酢酸-メタノール (1 : 10) で脱色した。抗 WCI-3 抗血清と反応したインヒビターの含量は、WCI-3 を標準物質として各試料の沈降輪の面積から計算した。

#### <HPLC による Kunitz 型インヒビターと BBI 型インヒビターの分別定量>

試料抽出液に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて塩析した後、塩析物を少量の 3M 尿素を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、その一部を同緩衝液で平衡化した TSK gel G3000SW カラム (7.5 x 600mm) と G2000SW カラム (7.5 x 600mm) の接続カラムにかけてゲルろ過を行った。HPLC はガスクロ工業 570B 型高速液体クロマトグラフを用いて行い、流速は 0.4ml/min とした。この条件で Kunitz 型インヒビターと BBI 型インヒビターはそれぞれ異なる位置に溶出するので、それぞれの画分のトリプシン阻害活性を第2章で述べた Method A に従って測定することにより2つの型のインヒビターを分別定量した。

#### <タンパク質の定量>

試料抽出液におけるタンパク質の定量は、ウシ血清アルブミンを標準物質として Lowry 法(48)により定量した。

#### <各成熟段階の種子の採集>

シカクマメを大阪大学豊中キャンパス内において5月初旬に播種し、花が咲くと同時に色の異なる毛糸で印をつけて開花日を明確にし、10月下旬にそれらをいっせいに収穫して種々の成熟段階の種子を採集した。Fig. 5-1 は、本実験におけるシカクマメ (ウリズン) の開花数と結実数を示したグラフである。ダイズ (品種白鳥枝豆) については5月に播種し、シカクマメと同様の方法で7月下旬に収穫した。

各成熟段階の種子は、それぞれ液体窒素中ホモジェナイザーで粉碎し、1g 当り 0.02M 塩化カルシウムを含む 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6) 10ml で抽出し、遠心分離してその上澄み液を試料抽出液とした。

## 第 2 節 シカクマメにおけるプロテ イナーゼインヒビターの分布

シカクマメ (UPS-31) 各部分 1g 当り 10ml の 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.7) を加えてホモジェナイザーで粉碎・抽出し、ろ過・遠心分離して得られた上澄み液を適当な濃度に希釈してインヒビター活性を測定した。

Table 5 に示すように、つぼみ (Bud)、花 (Flower)、さや (Pericarp)、茎 (Stem)、葉 (Leaf) などにはほとんどインヒビター活性がなく、タンパク質の貯蔵器官であり、また発芽能力を有する完熟種子 (Ripe seed) と塊根 (Tuber) にトリプシンインヒビター活性及びキモトリプシンインヒビター活性のあることが認められた。

なお、シカクマメの異なる品種である Tpt-2 についても同じ結果が得られた(49)。

### 第 3 節 マメ科植物種子プロテイナーゼインヒビターの活性発現

#### § 1 シカクマメプロテイナーゼインヒビターの活性発現

石垣島での予備実験(49)より、シカクマメ (UPS-31) のキモトリブシンインヒビターとトリブシンインヒビターは、開花後種子が成熟していく過程のある時期 (開花後約30日) にその活性を発現し、その後急速に増加していくことが示されたので (Fig. 5-2)、1984年、大阪大学において再実験を行い、この石垣島における結果をさらに詳しく検討した。

Fig. 5-3 に示したように、シカクマメ (品種ウリズン) 種子は開花後約30日頃からほぼ一定の割合で生長し、約60日で完熟種子に達した。インヒビター活性の発現は、石垣島における実験結果と同様であった。すなわち、キモトリブシンインヒビター、トリブシンインヒビターとも開花後36日から38日にその活性を発現し、その後約1週間は急速な活性の増大を示してやがて一定値に達した。

本研究では、さらにインヒビター前駆体の存在を調べるため、Mancini 法により抗 WCl-3 抗体を用いてシカクマメ種子の各成熟段階におけるキモトリブシンインヒビターあるいはその前駆体含量を測定した。Fig. 5-4 に示したように、Mancini 法においても活性で追跡した結果と同様、シカクマメキモトリブシンインヒビターは開花後約38日目に出現し、その後急速に増加することが明らかとなった。

## § 2    ダイズプロテイナーゼ          インヒビターの活性発現

前セクションにおける結果が他のマメ科植物でも同様であるかを検討するため、ダイズ種子の成熟過程にともなうインヒビター活性の変化をも追跡した (Fig. 5-5)。

各成熟段階におけるトリブシンインヒビター活性の測定結果より、ダイズ (白鳥枝豆) では開花後約 13 日目にインヒビター活性が発現し、シカクマメ同様、活性はその後急速に増加することが明らかとなった。

ダイズ種子は Kunitz 型と BBI 型の両者のインヒビターを含んでいるので、高速ゲルろ過法を用いて各成熟段階の種子における Kunitz 型インヒビターと BBI 型インヒビターの分別定量を行った (Fig. 5-5)。その結果、Kunitz 型インヒビターと BBI 型インヒビターはどちらも開花後約 13 日目から活性を発現し、以後数日間は直線的に増加するが、Kunitz 型インヒビターでは次第にその増加率が低下し、20 日目以後はほぼ一定値を示した。逆に、BBI 型インヒビターの増加期間は Kunitz 型インヒビターに比べて長く、種子成熟後期の全活性量の増加は、主として BBI 型インヒビターの増加に起因していることが明らかとなった。

## 第 4 節 考 察

シカクマメでは若さやをササゲやインゲンのように食べる方法が最も普及しているが、熱帯地方においては植物全体を食用に利用しているため、シカクマメの各部分におけるインヒビターの分布を調べることは意義があった。本章の実験結果より、完熟種子と塊根を除くその他の部分と成熟初期の種子についてはほとんどインヒビター活性がなく (Table 5)、これらの部分が食用とされていることは興味ある事実である。一方、タンパク質の貯蔵器官であり発芽を行う繁殖器官でもある完熟種子と塊根にのみプロテイナーゼインヒビターが存在することから、インヒビターが繁殖能力を有するこの2器官を外敵から守るといった積極的な働きをしているのではないかと考えられる。

種子中のインヒビター活性は、開花後種子が成熟していく過程のある時期に発現し、その後急速に増加していくことが明らかとなった。活性発現時期で石垣島と大阪の実験結果では開花後日数に6~8日の差が認められたが、これは両地の気象条件の違いによるものと考えられる。開花から活性発現までの積算気温 (平均気温の和) ではいずれも 700℃ 付近に相当し、シカクマメ種子では開花後積算気温が 700℃ 付近に達した時にインヒビター活性が発現するものと考えられる (Fig. 5-3)。

種子の成熟過程にともなうインヒビターの活性発現とその増加の傾向は、ダイズを用いた実験においても同じ結果が得られた (Fig. 5-5)。

シカクマメでは、このインヒビターの活性発現時期が種子の発芽能力を獲得する時期と一致している(49)。プロテイナーゼインヒビターが種子の発芽とともに代謝されて消失していくことはすでに報告されているが(50,51)、このことと発芽能力を獲得した種子中にインヒビターが出現することから、マメ科植物プロテイナーゼインヒビターは発芽機構においてなんらかの作用をしているのではないかと考えられる。

その機能の1つとして種子の成熟、休眠、あるいは発芽時におけるペプチダーゼ等の制御作用が考えられるが、本研究ではインヒビターによって直接

阻害を受ける酵素を検出することはできなかった。これに関連して、西方もダイズ完熟種子より BAPA 加水分解酵素を精製しているが、その酵素もダイズ種子インヒビターで阻害を受けなかったと報告している(52)。

種子の成熟過程にともなうインヒビターの発現及びそれ以後の活性の急速な増加より、インヒビターの生合成あるいはそのプロセッシングに関して次のような可能性が考えられる。

- (1) インヒビターは活性発現期に mRNA から生合成され、直ちにプロセッシングを受けて活性なインヒビターとなる。
- (2) インヒビターは活性のないプロインヒビターの型で生合成され、活性発現期になんらかの作用により活性型に転換する。
- (3) 酵素と複合体を形成していたインヒビターが、活性発現期に複合体から解離して活性を示す。

これらの可能性に対して、ウサギ抗 WCI-3 抗体を用いた Mancini 法によるキモトリブシンインヒビタータンパクの定量は明確な解答を与えた。すなわち、抗 WCI-3 抗体を用いて種子の成熟過程にともなうキモトリブシンインヒビター含量を測定した結果は、活性測定から求めたインヒビター量の変化と非常によく一致し、活性発現期以前にプロインヒビターあるいはインヒビター複合体が存在しないことを示している (Fig. 5-4)。したがって、上述の3つの可能性のうち(1)が正しいものと考えられる。

このことはさらに遺伝子レベルでの研究によっても支持されている。大野らは WCI-3 の mRNA がインヒビターの活性発現期と同じ時期に合成され始めることを示し、WCI-3 がまずシグナルペプチドをもった前駆体 (M.W. 22,000-24,000) として合成され、直ちにプロセッシングを受けて成熟インヒビターになることを明らかにした(53)。ダイズ種子においてもインヒビターの mRNA が種子成熟のある時期に合成され始めることが報告されており(54)、本研究の活性レベルでの追跡結果とも一致している (Fig. 5-5)。

ダイズ種子の成熟過程にともなう Kunitz 型インヒビターと BBI 型インヒ

ビターの分別定量により得られたインヒビターの発現及び活性変化に関するデータは、発芽時における両インヒビターの消長に関するデータとともに、種子中における両インヒビターの機能を解明していく上で重要な情報であると考えられるが、今後さらに検討を加える必要がある。

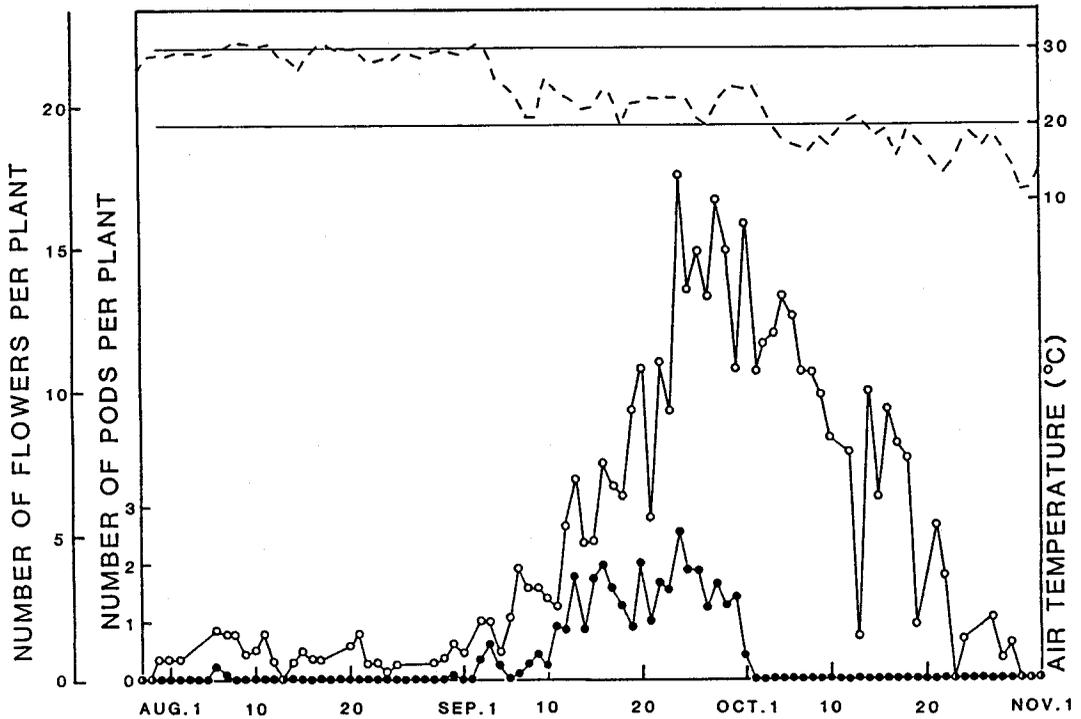


Fig. 5-1. Flowering and pod setting in growing winged bean (cv. Urizun). Winged bean seeds were sown in the field of Osaka university on May 10, 1984. Newly formed flowers were tagged by different color knitting wool to mark the date of flowering.

Table 5. Trypsin and chymotrypsin inhibitory activities in each part of winged bean (UPS-31).

PART	INHIBITORY ACTIVITY (U/g) (TRYPSIN)	INHIBITORY ACTIVITY (U/g) (CHYMOTRYPSIN)
Bud	0.4	0.4
Flower	0	0.1
Pericarp	0.1	0.1
Stem	0.1	0.1
Leaf	0	0.1
Seed	16	38
Tuber	7	11

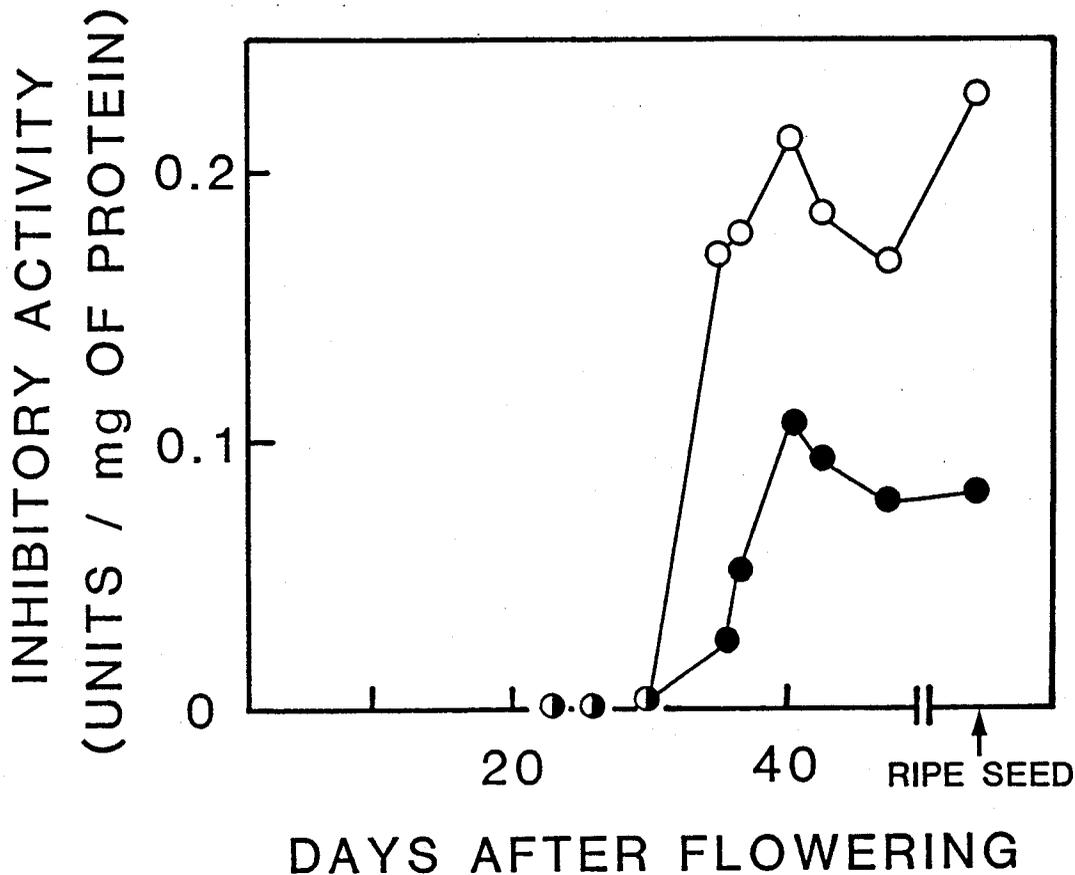


Fig. 5-2. Changes of inhibitory activities in developing winged bean (UPS-31) seeds. The inhibitory activities were assayed as described in "MATERIALS and METHODS." ●, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity.

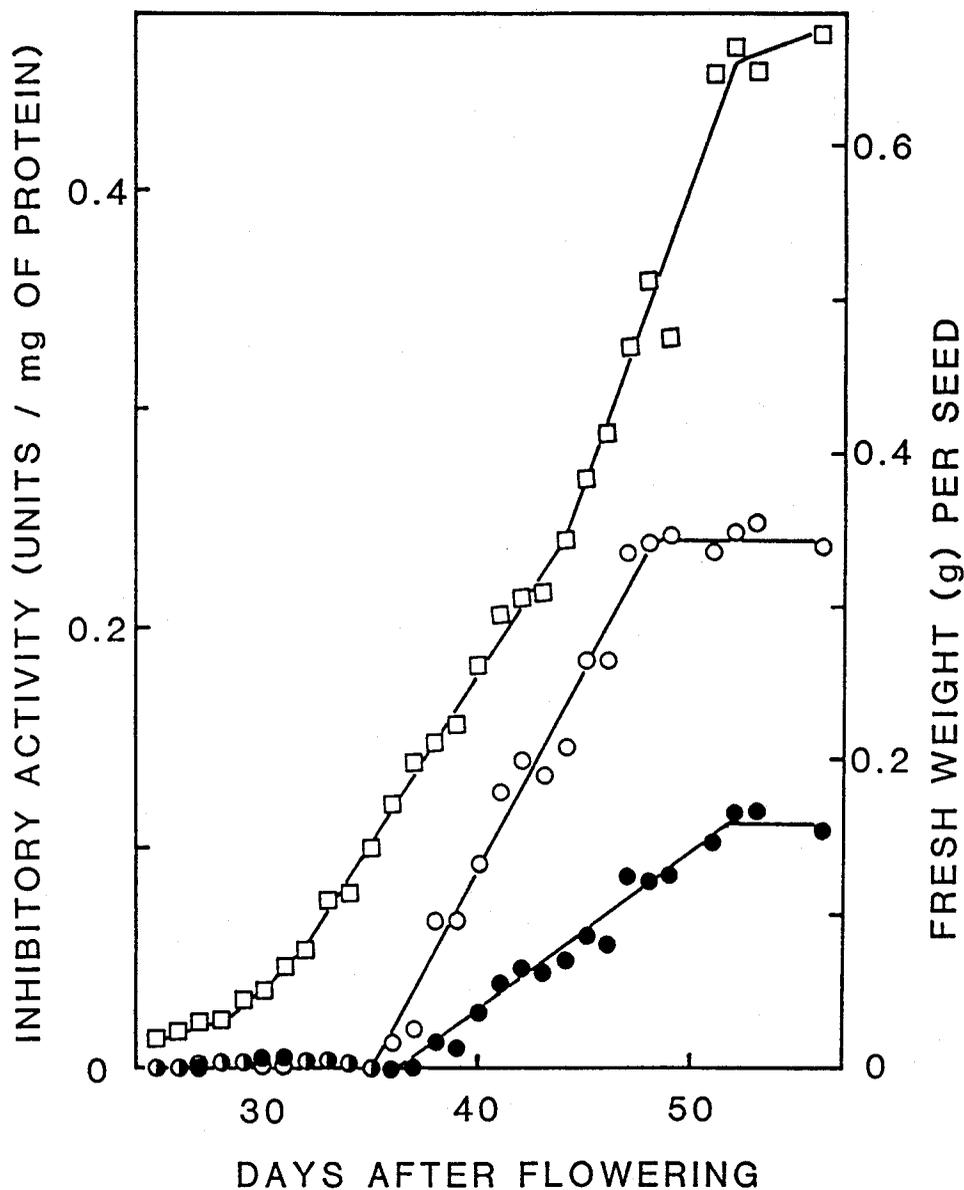


Fig. 5-3. Changes of inhibitory activities in developing winged bean (Urizun) seeds. The inhibitory activities were assayed as described in "MATERIALS AND METHODS."  $\square$ , fresh weight of seed;  $\bullet$ , trypsin inhibitory activity;  $\circ$ , chymotrypsin inhibitory activity.

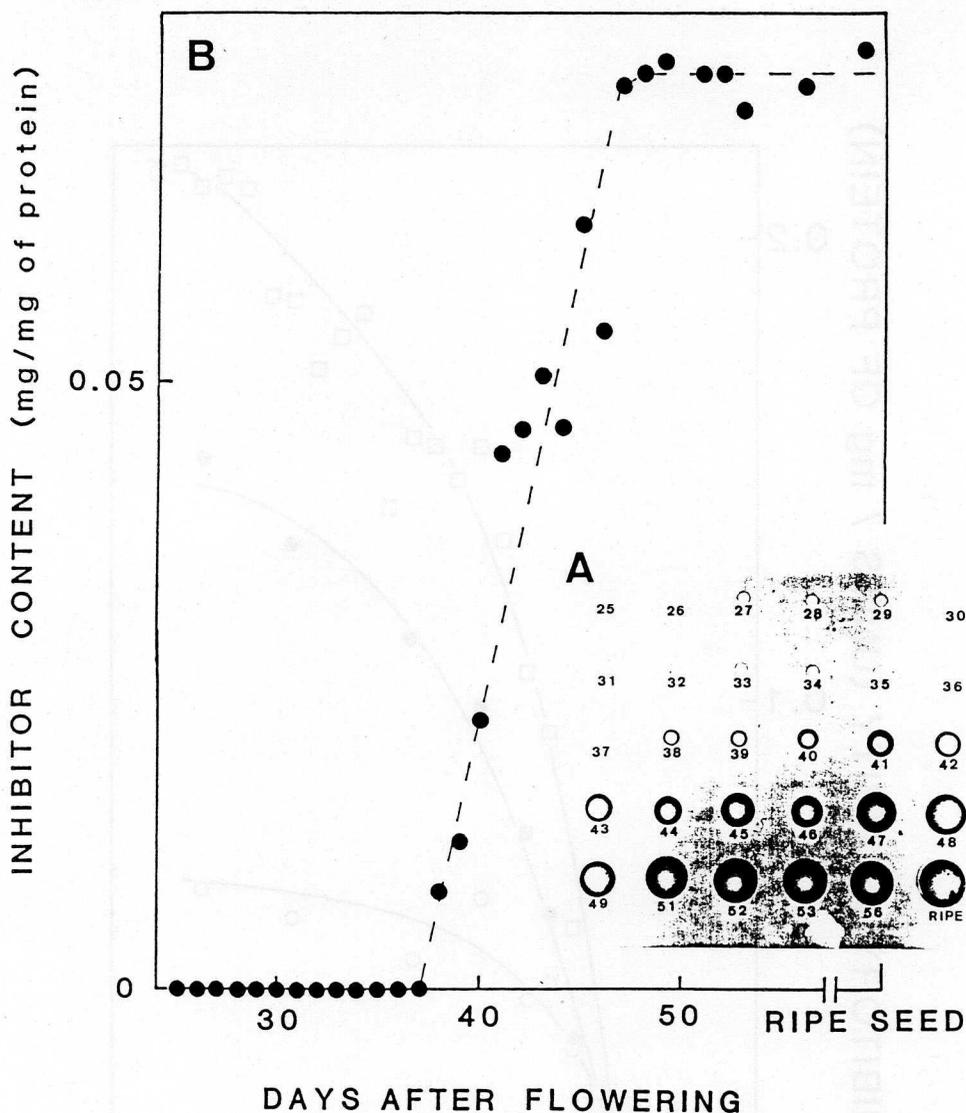


Fig. 5-4. Changes of chymotrypsin inhibitor contents in developing winged bean (Urizun) seeds. Inhibitor contents were assayed by single radial immunodiffusion method using rabbit anti-WCI-3 antiserum as described in "MATERIALS AND METHODS." A, single radial immunodiffusion pattern. The numbers below the wells indicate the days after flowering. B, chymotrypsin inhibitor contents cross-reacted with anti-WCI-3 antiserum calculated from the results of A.

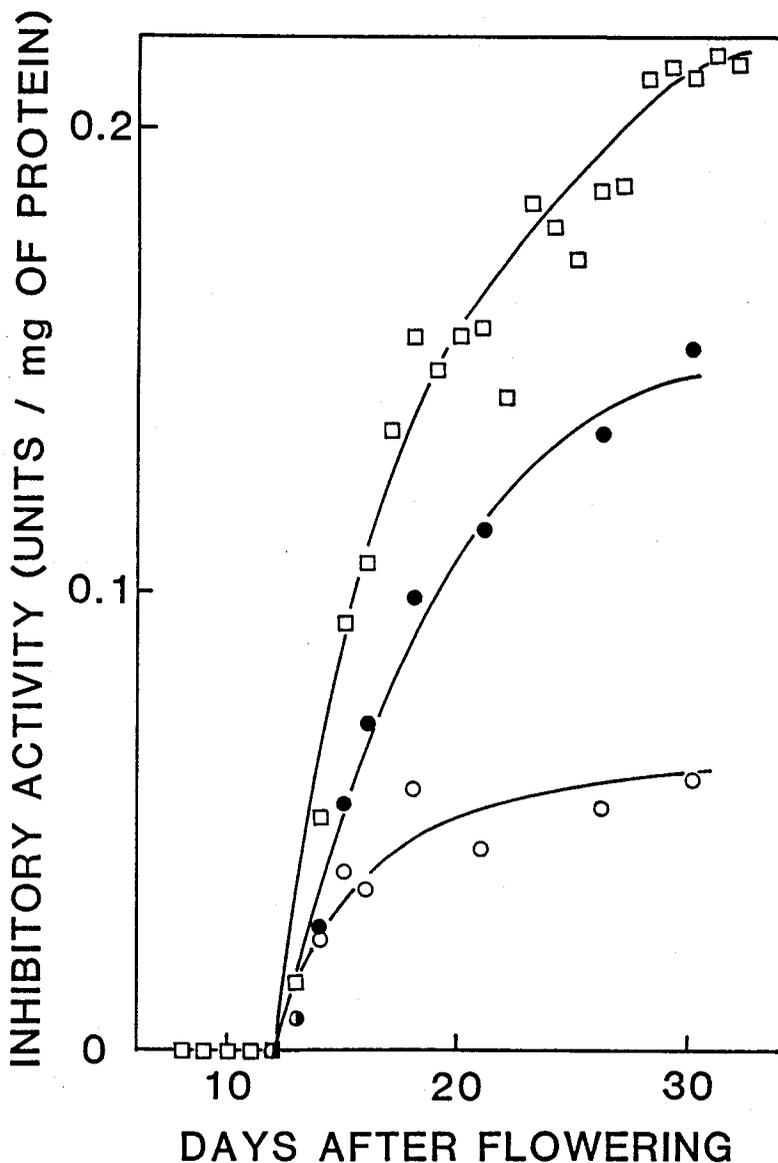


Fig. 5-5. Changes of contents of Kunitz- and BBI-type inhibitors in developing soybean (Hakucho-edamame) seeds. The total trypsin inhibitory activities were assayed by method A in chapter 2. Contents of Kunitz- and BBI-type inhibitors were assayed as described in "MATERIALS AND METHODS." □, total trypsin inhibitory activity; ●, BBI-type inhibitor; ○, Kunitz-type inhibitor.

## 第 6 章

### 要 約

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分子量約 20,000、半シスチンを4個含む7種の Kunitz 型インヒビターを精製した。

2種のトリプシンインヒビター (WTI-2、WTI-3) は 1 : 1 のモル比でトリプシンを強く阻害し、4種のキモトリプシンインヒビター (WCI-1、WCI-2、WCI-3、WCI-4) のうち、WCI-1 は 1 : 1.3 のモル比で、WCI-2 と WCI-3 は 1 : 2 のモル比でキモトリプシンを阻害した。WCI-4 はトリプシンを阻害せず、キモトリプシンに対しても弱い阻害活性しか示さなかった。残る1つのインヒビター WTCI-1 は、トリプシン及びキモトリプシンを 1 : 1 のモル比で阻害したが、同時に両酵素を阻害することはできなかった。

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認められ、とくに WCI-2 と WCI-3 の N 末端アミノ酸配列は完全に一致していた。抗 WCI-3 抗血清は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したが、その他のシカクマメインヒビターとは反応しなかった。

#### (第2章)

シカクマメキモトリプシンインヒビター WCI-3 の特異な阻害機作と構造との関係について考察するため、WCI-3 の一次構造を決定した。WCI-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、C 末端領域に不均一性が認められた。一次構造の比較は、ダイズトリプシンインヒビター  $Ti^a$  と 46%、シカクマメトリプシンインヒビター WTI-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。

#### (第3章)

WCI-3 のキモトリブシンによる限定分解では、その第1反応部位 (Leu<sup>65</sup>-Ser<sup>66</sup> 結合) のみが切断を受け、第2反応部位は全く切断を受けなかった。しかし、第1反応部位を失活させた Cbm-WCI-3<sup>\*</sup> が、なお1分子のキモトリブシンと複合体を形成することから、WCI-3 の双頭性、すなわち第2反応部位の存在が確認された。Cbm-WCI-3<sup>\*</sup> のキモトリブシンに対する阻害活性より、第1反応部位と第2反応部位はキモトリブシンに対して同程度の阻害活性 (阻害定数  $K_i = \sim 10^{-9}M$ ) を示すことが明らかとなった。

WCI-3 については、第2反応部位を同定するために4種のキモトリブシン様酵素 (エラスターゼ、ズブチリシン、SGPA、SGPB) による限定分解を試みたが、第2反応部位に相当するペプチド結合の切断は起こらなかった。

#### (第4章)

ダイズトリブシンインヒビター  $Ti^a$  及び3種の修飾インヒビター  $Ti^{a*}$ 、 $Ti^{a\ddagger}$ 、 $Ti^{a\ddagger\ddagger}$  と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りそれぞれのキモトリブシンに対する複合体形成様式を調べた。 $Ti^a$  は1:2のモル比で、 $Ti^{a*}$  と  $Ti^{a\ddagger}$  は1:1のモル比でキモトリブシンと複合体を形成するが、 $Ti^{a\ddagger\ddagger}$  はもはやキモトリブシンと複合体を形成しなかった。

以上の結果はキモトリブシンに対する阻害活性の測定からも支持され、 $Ti^a$  における第2反応部位は Met<sup>84</sup>-Leu<sup>85</sup> 結合付近に存在し、Kunitz 型インヒビター間の高い相同性から、その他の Kunitz 型インヒビターの第2反応部位もこれに相当する位置に存在するものと考えられる。

#### (第4章)

マメ科植物種子プロテイナーゼインヒビターの生理的役割を解明するため、シカクマメ及びダイズ種子の成熟過程にともなうインヒビター活性の変化を追跡した。

シカクマメ (ウリズン) 種子中のトリブシン及びキモトリブシンに対するインヒビター活性は開花後36日目 (積算気温 700°C) にはじめて発現し、

それ以後急速に増加した。免疫学的追跡も同様の結果を示し、インヒビターは種子形成の初期において活性のないプロインヒビターの型で生合成されるのではなく、活性発現期に直接インヒビタータンパクとして生合成されることが明らかとなった。

一方、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 BBI 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出現し、その後異なる速度で生合成されることを示した。

（第 5 章）

## 参 考 文 献

1. Kunitz, M. & Northrop, J. H. (1936) J. Gen. Physiol. 19, 991-1007
2. Kunitz, M. (1946) J. Gen. Physiol. 29, 149-154
3. Kunitz, M. (1947) J. Gen. Physiol. 30, 311-320
4. Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983) J. Biochem. 94, 589-599
5. Kim, S., Hara, S., Hase, S., Ikenaka, T., Toda, H., Kitamura, K., & Kaizuma, N. (1985) J. Biochem. 98, 435-448
6. Odani, S. & Ikenaka, T. (1973) J. Biochem. 74, 697-715
7. Koide, T. & Ikenaka, T. (1973) Eur. J. Biochem. 32, 417-431
8. Yamamoto, M., Hara, S., & Ikenaka, T. (1983) J. Biochem. 94, 849-863
9. Joubert, F.J., Carlsson, F.H.H., & Haylett, T. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 531-538
10. Kortt, A.A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 577, 371-382
11. Kortt, A.A. (1980) Biochim. Biophys. Acta 624, 237-248
12. Kortt, A.A. (1981) Biochim. Biophys. Acta 657, 212-221
13. Gruen, L.C., Tao, Z.-J., & Kortt, A.A. (1984) Biochim. Biophys. Acta 791, 285-293
14. Schwert, G.W. & Takenaka, Y. (1955) Biochim. Biophys. Acta 16, 570-575
15. Erlanger, B.F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-278
16. Budy, H.F. (1962) Anal. Biochem. 3, 431-435
17. Davis, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427
18. Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965) Biochim. Biophys. Acta 107, 144-145

19. King, J. & Laemmli, U.K. (1971) J. Mol. Biol. 62, 465-477
20. Spackman, D.H., Stein, W.H., & Moore, S. (1958) Anal. Chem. 30, 1190-1206
21. Simpson, R.J., Neuberger, M.R., & Liu, T.Y. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1936-1940
22. Hirs, C.H.W. (1967) Methods Enzymol. 11, 197-199
23. Wrigley, C.W. (1971) Methods Enzymol. 22, 559-564
24. Diesel, W., Kopperschläger, G., & Hofmann, E. (1972) Anal. Biochem. 48, 617-620
25. Ouchterlony, Ö. (1958) Prog. Allergy 5, 1-78
26. Green, N.M. & Work, E. (1953) Biochem. J. 54, 347-352
27. Hara, S., Norioka, N., Ikenaka, T., & Abe, J. (1985) Seikagaku (Abstract in Japanese) 57, 911
28. Hutchinson, J. (1969) Evolution and Phylogeny of Flowering Plants pp. 221-489, Academic Press, Inc., London & New York
29. Crestfield, A.M., Moore, S., & Stein, W.H. (1963) J. Biol. Chem. 238, 622-627
30. Iwanaga, S., Wallen, P., Groendahl, N.J., Henschen, A., & Blombaek, B. (1969) Eur. J. Biochem. 8, 189-199
31. Mega, T., Hamazume, Y., Nong, Y.-M., & Ikenaka, T. (1986) J. Biochem. 100, 1109-1116
32. Narita, K., Matsuo, H., & Nakajima, T. (1975) in Protein Sequencing Determination (Needleman, S.B., ed.) 2nd Ed., pp. 70-79, Springer-Verlag, Berlin
33. Ozawa, K. & Laskowski, M., Jr. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3955-3961
34. Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chothia, C.H., & Blow, D.M. (1974) Biochemistry 13, 4212-4228

35. Straud, R.M., Kay, L.M., & Dikerson, R.E. (1971) Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 125-140
36. Wu, F.C. & Laskowski, M., Sr. (1955) J. Biol. Chem. 213, 609-619
37. Böstering, B. & Quast, U. (1981) Biochim. Biophys. Acta 657, 58-72
38. Axën, R., Porath, J., & Ernback, S. (1967) Nature 214, 1302-1304
39. Porath, J., Axën, R., & Ernback, S. (1967) Nature 215, 1491-1492
40. Park, S.J., Tashiro, M., Empie, M.W., Finkenstadt, W.R., Cook, J.A., & Laskowski, M., Jr. (1984) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 43, 1962
41. Kowalski, D. & Laskowski, M., Jr. (1972) Biochemistry 11, 3451-3459
42. Laskowski, M., Jr., Kato, I., Leary, T.R., Schrade, J., & Sealock, R.W. (1974) in Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors" (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., & Truscheit, E., eds.) pp. 597-611, Springer-Verlag, Berlin
43. Finkenstadt, W.R. & Laskowski, M., Jr. (1967) J. Biol. Chem. 242, 771-773
44. Bidlingmeyer, V.D.V., Leary, T.R., & Laskowski, M., Jr. (1972) Biochemistry 11, 3303-3310
45. Rayan, C.A. (1973) Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 173-196
46. Mayer, A.M. & Shain, Y.C. (1974) Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 167-193
47. Mancini, G., Carbonara, O., & Heremans, J.F. (1965) Immunochemistry 2, 235-254

48. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
49. Abe, J., Nakamura, H., Shibata, H., Norioka, S., Hara, S., & Ikenaka, T. (1985) Japan Agricultural Research Quarterly 18, 229-232
50. Madden, M.A., Tan-Wilson, A.L., & Wilson, K.A. (1985) Phytochemistry 24, 2811-2815
51. Hartl, P.M., Tan-Wilson, A.L., & Wilson, K.A. (1986) Phytochemistry 25, 23-26
52. Nishikata, M. (1984) J. Biochem. 95, 1169-1177
53. Ohno, T., Matsui, T., Okada, Y., Hara, S., & Ikenaka, T. (1986) Seikagaku (Abstract in Japanese) 58, 1026
54. Hammond, R.W., Foand, D.E., & Larkins, B.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9883-9890

## 謝 辞

本研究は大阪大学理学部池中研究室において行われたものであり、終始御懇篤なる御指導、御鞭たつを賜りました池中徳治教授と原三郎助教授に謹んで御礼申し上げます。また、適切な御助言、御討論を賜りました長谷純宏講師、妻鹿友弘博士、大道薫博士、乗岡茂巳博士と尚子夫人、ならびに理学研究科の諸先生方に心より感謝いたします。本研究を行うにあたり、シカクマメを御供与下さるとともに、第5章の石垣島での予備実験において御協力下さりました当時農林水産省熱帯農業研究センター沖縄支所の阿部二郎博士と中村浩博士、ウサギ抗 WCI-3 抗体を調製して頂きました関西医科大学の大森浩一郎博士と田代裕教授、ヒトすい液を御供与下さりました大阪大学医学部小川道雄講師、SGPA と SGPB を御供与下さりました北海道大学薬学部石井信一教授に心より御礼申し上げます。X線解析に関して御助言、御討論を賜りました大阪大学蛋白質研究所北川康行博士、田中信夫助教授と勝部幸輝教授に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、第5章の実験において多大の御援助を頂きました釜谷好美さん、修飾ダイズインヒビターの調製に御協力下さりました山村ゆかりさんをはじめ、本研究を温かく見守って下さりました稲垣淑子事務官ならびに池中研究室の学生、研究生、卒業生の皆様に心より感謝いたします。