



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	https://hdl.handle.net/11094/707
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	柴田浩志
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 7620 号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日
学位授与の要件	理学研究科有機化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	シカクマメ種子プロテイナーゼインヒビターに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 池中 徳治 (副査) 教授 崎山 文夫 教授 福井 俊郎

論文内容の要旨

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

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

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

WC I - 3 は 1 分子で同時に 2 分子のキモトリプシンを強く阻害し、その第 1 反応部位 (Leu⁶⁵-Ser⁶⁶ 結合) をキモトリプシンで限定分解した修飾インヒビター、WC I - 3's の Ser⁶⁶ のアミノ基をカルバモイル化して第 1 反応部位を失活させても、なお 1 分子のキモトリプシンと複合体を形成することは第 2 反応部位の存在を確証している。

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

かとなった。

ダイズトリプシンインヒビター, Ti^a とその 3 種の修飾インヒビター, Ti^{a*}_1 ($\text{Arg}^{63}-\text{Ile}^{64}$ 結合切断), Ti^{a*}_2 ($\text{Met}^{84}-\text{Leu}^{85}$ 結合切断), Ti^{a*}_3 ($\text{Arg}^{63}-\text{Ile}^{64}$ 結合及び $\text{Met}^{84}-\text{Leu}^{85}$ 結合切断), 及びそれらのカルバモイル誘導体を調製し, 高速ゲルろ過法によるキモトリプシンとの複合体形成様式の分析とキモトリプシン阻害活性の測定により, Kunitz型インヒビターの第 2 反応部位の位置についてさらに検討した。

その結果, Ti^a の第 1 反応部位は $\text{Arg}^{63}-\text{Ile}^{64}$ 結合であり, 第 2 反応部位は $\text{Met}^{81}-\text{Leu}^{84}$ 結合付近に存在することが示された。Kunitz型インヒビター間のアミノ酸配列の高い相同性から, その他の Kunitz型インヒビターの第 2 反応部位もそれに相当する位置に存在すると推定される。

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

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

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

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

論文の審査結果の要旨

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

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

それ故、ダイズ中に存在するKunitz型インヒビターTi^aを用い限定酵素分解によりArg⁶³-Ile⁶⁴結合、Met⁸⁴-Leu⁸⁵結合を切断して修飾インヒビターを調製し、それらの阻害様式を研究し、Ti^aにおいてはMet⁸⁴-Leu⁸⁵結合、あるいはその付近に第二反応部位が存在する知見を得た。

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

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