



アズキ種子タンパク質性ズブチリシンインヒビターの構造並びに断片化と再構築に関する研究

埜澤, 尚範

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1992-10-02

(Date of Publication)

2009-04-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1674

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3070639>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001674>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

アズキ種子タンパク質性ズブチリシンインヒビ
ターの構造並びに断片化と再構築に関する研究

平成4年8月

埜 澤 尚 範

目次

第1章 緒論	1
第2章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターの精製	
第1節 材料と方法	6
第2節 結果および考察	
第1項 カラムクロマトグラフィーによる精製	9
第2項 均一性の検討	17
第3節 小括	17
第3章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターの物理化学的、 および化学的諸性質	
第1節 材料と方法	18
第2節 結果	
第1項 物理化学的諸性質	20
第2項 化学的諸性質	22
第3項 酵素阻害活性	24
第4項 ASIの諸性質のまとめ	25
第3節 考察	25
第4節 小括	28
第4章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターのアミノ酸配列と 阻害反応部位	
第1節 材料と方法	29
第2節 結果	
第1項 インタクトASIのN末端配列の同定	32
第2項 ASI-Iのアミノ酸配列	33
第3項 ASI-IIのアミノ酸配列	52
第4項 ASIの阻害反応部位	57
第3節 考察	59
第4節 小括	62

第5章	アズキ種子ズブチリシンインヒビターの断片化と再構築	
第1節	材料と方法	63
第2節	結果	
第1項	反応部位切断フラグメントの調製	64
第2項	反応部位切断フラグメントの酵素阻害活性	69
第3項	阻害活性回復速度の温度依存性	70
第4項	阻害活性回復に及ぼす、酵素とのプレインキュベート 時間の影響	73
第5項	切断反応部位の修復	75
第3節	考察	78
第4節	小括	81
第6章	総合考察	82
要約		87
SUMMARY		88
REFERENCES		90
謝辞		93

本論文では以下の略号を使用した。

DABITC	4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate
DNS	dansyl
TCA	trichloroacetic acid
TFA	trifluoroacetic acid
TPCK	N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
CPase	carboxypeptidase
CM	carboxymethyl
DEAE	diethylaminoethyl
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
HPLC	high performance liquid chromatography
ASI	adzuki bean subtilisin inhibitor
VSI	broad bean (<i>Vicia faba</i>) subtilisin inhibitor
BPTI	bovine pancreatic trypsin inhibitor
PSTI	pancreatic secretory trypsin inhibitor
STI	soybean trypsin inhibitor
BBI	Bowman-Birk inhibitor
SSI	<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor
serpin	mammalian serum serine proteinase inhibitor

第1章 緒論

タンパク質性プロテイナーゼインヒビターの研究は、1936年、Kunitzが、ウシ膵臓に存在する塩基性トリプシンインヒビター(bovine pancreas trypsin inhibitor: BPTI)の結晶化に成功し、これがタンパク質であることを明らかにしたことはじまる(1)。以来、動・植・微生物界から多くのタンパク質性プロテイナーゼインヒビターが単離され、これが、生物界に普遍的に存在する物質であることが示された(2-4)。

植物起源のセリンプロテイナーゼインヒビターの研究は、1938年、ReadとHassが植物体中にプロテイナーゼ阻害能を有するタンパク質成分が含まれているのを確認したことはじまる(5)。特に、植物の貯蔵器官には、動物の消化器官や微生物由来のセリンプロテイナーゼを阻害するインヒビターが多く発見され、当初は栄養学的視点から研究が進んだ(4)。その後、Bowmanは、ダイズ種子からプロテイナーゼインヒビターを単離し(6)、また、Kunitzは、Bowmanが得たインヒビターとは異なるトリプシンインヒビターを、同じダイズ種子から単離し、これを結晶化することに成功した(7)。Kunitzは更に、インヒビターとトリプシンとの複合体の結晶化にも成功し、このインヒビターがトリプシンと1 : 1のモル比で化学量論的に結合し、安定な複合体を形成して、酵素を阻害していることを確認した(8)。

Kunitzによるこれら一連の研究に端を発して、プロテイナーゼインヒビターの研究は、栄養学的研究から、タンパク質化学的研究へと移っていく。Kunitzが得たダイズトリプシンインヒビター(soybean trypsin inhibitor: STI)は、これ以後、インヒビターの反応機構解明の重要な素材となった。Bowmanが得たインヒビターは、その後Birkらにより、詳細に研究され(9, 10)、Bowman-Birk inhibitor (BBI)と命名されている。

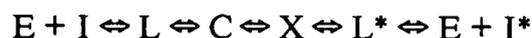
タンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターの研究における、もうひとつの大きな進展は、1966年、OzawaとLaskowski, Jr. による、インヒビターの阻害反応部位の同定、およびその概念の提唱であった(11)。彼らは、ダイズトリプシンインヒビター(STI-Kunitz)に酸性条件下で触媒量のトリプシンを作用させると、Arg(63)-Ile(64)結合だけが特異的に切断されることを

発見し、切断で得られたインヒビターを修飾インヒビター(modified inhibitor)と命名した。この修飾インヒビターは、トリプシン阻害能を有しているが、修飾インヒビターの新しく生成したC末端のArg(63)をカルボキシペプチダーゼB(CPase B)で除いたり(12)、新しく生じたN末端Ile(64)のアミノ基を化学修飾してブロックすると(13)、阻害活性が消失する。このことから、彼らは、酵素による限定加水分解で生じた両アミノ酸残基を、プロティナーゼの活性部位(active site)に対応させて反応部位(reactive site)と呼び、Arg(63)-Ile(64)結合を切断結合(scissile bond)と命名した。また、反応部位前後のアミノ酸は、酵素の活性中心の表記に対応させて、切断結合からN末端側へP₁、P₂、P₃…アミノ酸、C末端側へP'₁、P'₂、P'₃…アミノ酸と表される(14)。

Laskowski, Jr. らは、中性条件下で修飾インヒビターに等モルのトリプシンを作用させて得られる複合体を変性剤で解離させると、Arg(63)-Ile(64)結合が修復された元のSTIが得られること、また更に、修飾インヒビターのP₁ Arg(63)を、酵素的にLys(63)に転換(enzymatic mutations)して得られる、Lys(63)-STIが、元のSTIと同じく、トリプシンを阻害することを発見し(15, 16)、セリンプロティナーゼインヒビターの阻害反応部位の概念を確立した(17)。

これ以降、プロティナーゼインヒビター研究の重点は、その酵素阻害機構の解明、とくに、構造と機能の相関、酵素とインヒビタータンパク質の相互認識機構の解明におかれるようになった。

近年、生化学領域における各種の分析方法が飛躍的に発展し、インヒビタータンパク質のアミノ酸配列や立体構造に関する多くの知見が得られるようになった。その結果、ほとんどのセリンプロティナーゼインヒビターが、次に示す、いわゆるStandard Mechanismに従うことがわかった(18)。



ここで、Eは酵素、IとI*は、それぞれ、インタクトインヒビターと修飾イ

ンヒビター、LとL*は、EとIまたはI*が非共有結合でゆるやかに結合した複合体(19)である。Xは、修飾BPTIとキモトリプシンの反応において確認された、やや長寿命の中間体(20)、Cは安定な酵素-インヒビター複合体である。インヒビターは基質と全く同じ形式で酵素と結合するが、その複合体はきわめて安定で、ほとんど解離しない。

また、アミノ酸配列上の相同性を中心に、タンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターを比較したところ、これらが、いくつかのグループを形成することがわかってきた。現在、確認されているプロテイナーゼインヒビターの分類をTable Iにまとめた(17, 18)。ほ乳類の血中に存在するインヒビター(serpin) (21)を除く、全てのインヒビターが上記のStandard Mechanismに従う。スカッシュ型インヒビターは、最近その存在が認識されたグループで、30残基前後のアミノ酸で構成される最も小さいインヒビターである(22, 23)。また、各グループのインヒビターは、分子内S-S結合の位置が完全に保存されており、阻害反応部位の場所も同一である。

Table I. Classification of protein inhibitors that inhibit serine proteinases.

I.	Bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI-Kunitz) family
II.	Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI-Kazal) family
III.	<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor (SSI) family
IV.	Soybean trypsin inhibitor (STI-Kunitz) family
V.	Bowman-Birk inhibitor (BBI) family
VI.	Potato I inhibitor (PI-I) family
VII.	Potato II inhibitor (PI-II) family
VIII.	<i>Ascaris</i> trypsin inhibitor family
IX.	Squash trypsin inhibitor family
X.	Mammalian serum serine proteinase inhibitor (serpin) family
XI.	Other families

これらのインヒビターのうち、最も多くの研究例が蓄積しているのは、比較的多量にプロテイナーゼインヒビターが含まれているマメ科種子由来のものである。マメ科のインヒビターは、上記に挙げたファミリーのうちSTI(Kunitz)型またはBBI型に大別することができる。STI(Kunitz)型は、分

分子量約20000、分子内S-S結合を2個有し、1分子のトリプシンを阻害する。STI(Kunitz)型インヒビターは、ダイズ種子(24, 25)やシカクマメ(26)から得られている。BBI型は、マメ科で非常に多く見いだされているインヒビターで、分子量約8000、分子内S-S結合を7個有している(10)。このインヒビターは代表的な双頭型(double headed)インヒビターで、分子内に2個の阻害反応部位を持っている(27)。また、BBI型は反応部位周辺のアミノ酸配列からさらにサブクラスに分類することができる(28)。アズキ種子からは、2種類のBBI型インヒビター、API-I、IIが得られているが、API-Iは、2分子のトリプシンを阻害し、API-IIは、トリプシン1分子とキモトリプシン1分子を同時に阻害するなど、阻害機能上の分類もされている(29, 30)。

今日、タンパク質性プロテイナーゼインヒビターの研究は、タンパク質化学上の諸問題を解明するモデルとして重要な位置にある。S-S結合の再生を伴うタンパク質分子のfolding機構は、BPTIをモデルとして研究され(31)、タンパク質工学の基礎的研究においても、SSIをはじめ、多くのインヒビターがその材料となっている(32)。また、プロテイナーゼインヒビターは、生物界に分布が広く、アミノ酸配列上の相同性を利用した、分子進化に関する知見も多く得られている。

本研究は、アズキ種子中に存在するズブチリシンに特異的なプロテイナーゼインヒビター、ASIを分離精製して一次構造解析を行ない、他のインヒビタータンパク質とのアミノ酸配列上の相同性の探査、酵素阻害機構の解明、およびインヒビタータンパク質の断片化と再構築により、タンパク質分子間の相互作用、特に非共有結合によるタンパク質-タンパク質相互認識の解明を行なったものである。

以下、第2、3章ではそれぞれ、アズキ種子(*Vigna angularis*)からのズブチリシンインヒビターの精製およびその諸性質について述べる。マメ科のズブチリシンインヒビターは、報告が少ないので、次の第4章では、他のプロテイナーゼインヒビターとの相同性を探査するため、ASIのアミノ酸配列および酵素阻害反応部位の決定について述べ、他のプロテイナーゼインヒビターとの相同性について考察する。第5章では、このインヒビターと

酵素との相互作用について述べる。また、反応部位で切断された2種の不活性なフラグメントが、もとの活性型ASIに再構築される機構について述べる。最後の第6章では、ASIに特徴的なこれらの現象について総括し、いままでに得られているタンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターの知見と比較しながら、プロテイナーゼインヒビターの阻害反応機構、タンパク質分子間の非共有結合による相互作用について総合的に考察した。

第2章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターの精製

アズキ種子(*Vigna angularis*)中には、少なくとも3種類のタンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターが存在している。インヒビター1分子でトリプシン2分子を阻害するAPI-I(29)、トリプシン1分子とキモトリプシン1分子を阻害するAPI-II(30)、ズブチリシン1分子のみを阻害するASIである(33)。

従来、マメ科植物で見いだされてきたセリンプロテイナーゼインヒビターは、ほとんどが、トリプシンまたはキモトリプシンに作用するインヒビターであり、STI(Kunitz)型かBBI型のいずれかに分類されてきた。ところが、ASIは、その阻害特性から判断する限り、どちらの型にも該当しない。本章では、まずASIの精製について述べ、その均一性について検討する。

第1節 材料と方法

第1項 材料

アズキ種子 (Adzuki beans: *Vigna angularis*) は、市販の北海道産大納言アズキを用いた。

トリプシン [E.C. 3.4.21.4]、キモトリプシン[E.C.3.4.21.1]、ズブチリシン[E.C. 3.4.21.14]は、おのおの、Sigma Chemical 社のtrypsin type II、 α -chymotrypsin type II、protease type XXVII (subtilisin BPN') を使用した。また、Hammarsten's caseinは、E. Merck社のものを用いた。

Sephadex G-50は、Pharmacia LKB Biotechnology 社のものを、また、CM-celluloseおよびDEAE-celluloseは、生化学工業社製のものを用いた。

Commassie brilliant blue R-250は、Sigma Chemical 社のものを使用した。

他の全ての試薬は、和光純薬工業または半井化学工業薬品社製の特級または1級のものを使用した。

第2項 抽出

乾燥アズキ種子から、Yoshikawらの方法(33)を改良して、Fig. 1 に示したように粗インヒビターを調製した。

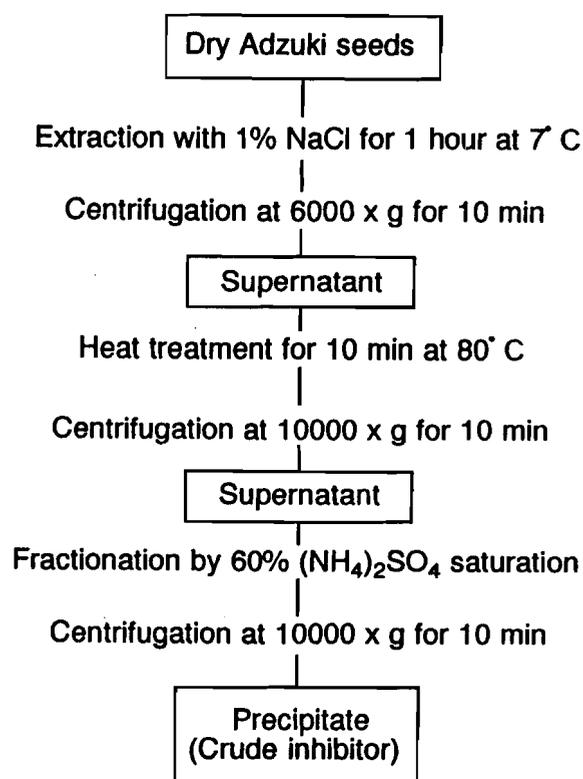


Fig. 1. Preparation procedure of crude inhibitor.

すなわち、種皮を除いた粉碎種子を、4倍量の1% NaClとともに氷冷乳鉢上ですりつぶし、7°Cで1時間抽出した。抽出液を布濾して得られた残渣は、再度、3倍量の1% NaClで抽出した。得られた抽出液を遠心分離(6000 x g, 10 min)して不溶性の残渣を除いた後、混在するプロテイナーゼや貯蔵タンパク質等を除くため、上清を加熱処理(80°C, 10 min)し、生じた変性沈澱物を同様に遠心分離(10000 x g, 10 min)で除いた。

得られた遠心上清は、硫酸60%飽和で塩析し、一晩静置した。塩析物は、遠心分離(10000 x g, 20 min)で回収し、流水(13°C)に対して48時間透析し、脱塩した。

続いて、カラムクロマトグラフィーに供する目的で、20 mM酢酸塩緩衝液(pH 4.0)に対して、7°Cで48時間透析して、緩衝化した。透析中に生じた不溶物を遠心分離(10000 x g, 20 min)で除き、得られた上澄み液を粗インヒビターとした。

第3項 カラムクロマトグラフィー

調製した粗インヒビターから、ASIの精製は、Fig. 2に示すように、DEAE-celluloseおよびCM-celluloseを用いたイオン交換クロマトグラフィーとSephadex G-50によるゲルろ過により行った。各クロマトグラフィーの詳細な条件は、本章第2節「結果と考察」に記した。

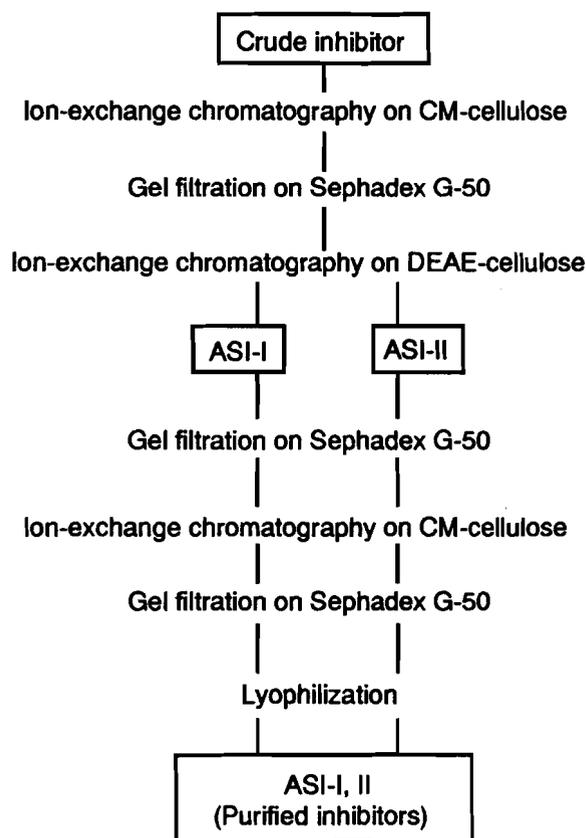


Fig. 2. Purification procedure of ASI's.

第4項 タンパク質の定量

カラムクロマトグラフィーにおける、タンパク質の濃度は、日立UV-VIS分光光度計139型を用いて、蒸留水を対照とした紫外部280 nmの吸光度を求めて測定した。

各精製段階におけるタンパク質の濃度は、Lowryらの方法(34)に従い、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として測定した。

第5項 酵素阻害活性の測定

プロテアーゼ活性は、Kunitzのカゼイン消化法(8)の変法である萩原らの方法(35)に従い、0.5% Hammarsten's caseinを基質として、pH 7.6、30° C、10分間反応で測定した。インヒビターの阻害活性は、20 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)に溶解したインヒビター溶液0.5 mlに、酵素溶液0.5 mlを加え、30° C、5分間インキュベートした後、酵素の残存活性を測定して求めた。

なお、対照として、インヒビター溶液のかわりに0.5 mlのリン酸緩衝液(pH 7.6)を用いて同様の操作を行った。

インヒビター活性の1単位は、酵素2 mgの活性を50%阻害するインヒビター量とした。また、トリプシン、キモトリプシン、ズブチリシンBPN'の酵素量は、上記条件下で酵素活性を測定した時、275 nmの吸光度における対照試験と盲検試験の差が、おのおの0.36、0.49、0.39の時30 μ gとして算出した。

第6項 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動 (disc-PAGE) は、Davisらの方法(36)に従い、pH 4.3、7.5%ゲルを用いて泳動した。染色は、0.1% Commassie Brilliant blue R-250を用い、脱色には7.5%酢酸-5%メタノールを用いた。

第2節 結果および考察

第1項 カラムクロマトグラフィーによる精製

(1) CM-celluloseカラムクロマトグラフィー

粗インヒビターを、予め20mM酢酸塩緩衝液(pH 4.0)で平衡化したCM-celluloseカラム(3.2x40 cm)に供し、同緩衝液2 Lでカラムを洗浄した。溶出は、20 mM酢酸塩緩衝液(pH 4.0) 1.5 Lと0.15 M NaClを含む同緩衝液1.5 Lを用いた直線濃度勾配法により行った。流速は、80 ml/hで行い、15 mlずつ分取した(Fig. 3)。阻害活性の認められた、Fig. 3中の下線で示した画分を合わせ、硫酸60%飽和で塩析した。

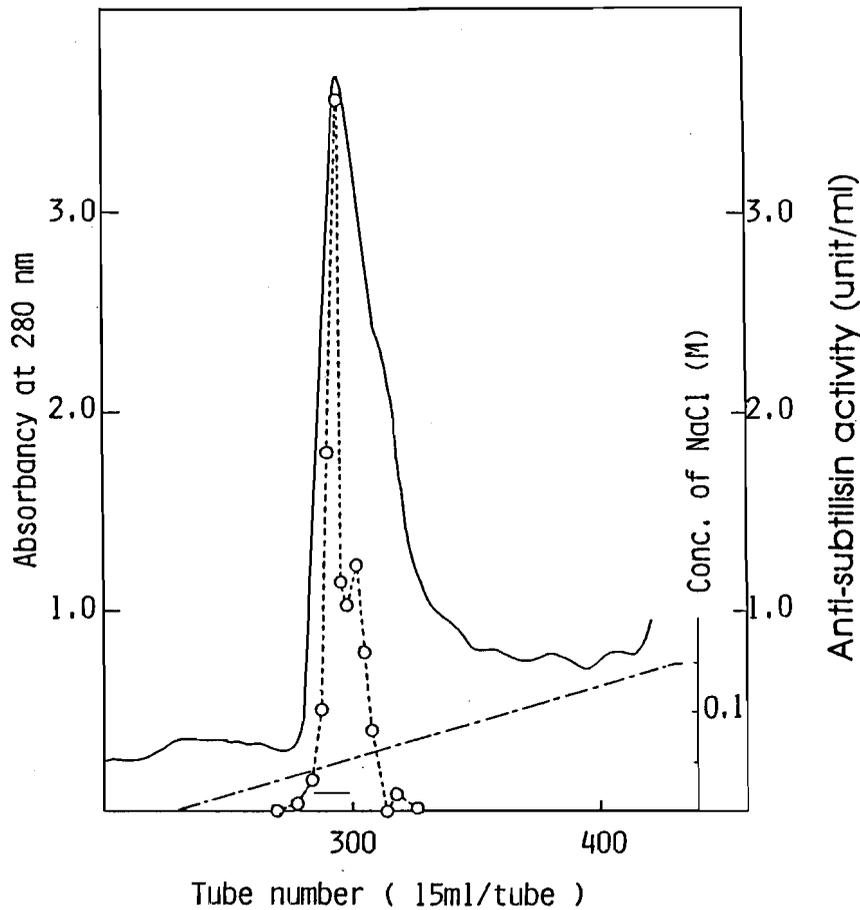


Fig. 3. CM-cellulose chromatography of crude inhibitor from Adzuki beans. The crude inhibitor was applied to a CM-cellulose column (3.2 x 40 cm) previously equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 4.0. After washing the column with 1 liter of the equilibrating buffer, elution was performed with a linear gradient from 0 M to 0.15 M NaCl in 3 liter of the same buffer at a flow rate of 80 ml/h. 15 ml fractions were collected and the fractions having anti-subtilisin activity (indicated by solid bar) were combined.
 — : absorbance at 280 nm; ---○--- : anti-subtilisin activity.

(2) Sephadex G-50ゲルろ過

先のクロマトグラフィーで得られたインヒビター画分の塩析物を、遠心分離 (10000 x g, 20 min) で回収し、20 mlの20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に溶解した後、予め、同緩衝液で平衡化したSephadex G-50カラム (3.2 x 140 cm) に供した。溶出は同緩衝液を用いて、流速80 ml/hで行い、10 mlずつ分取した (Fig. 4)。阻害活性の認められた、Fig. 4 中の下線で示した画分を合わせた。

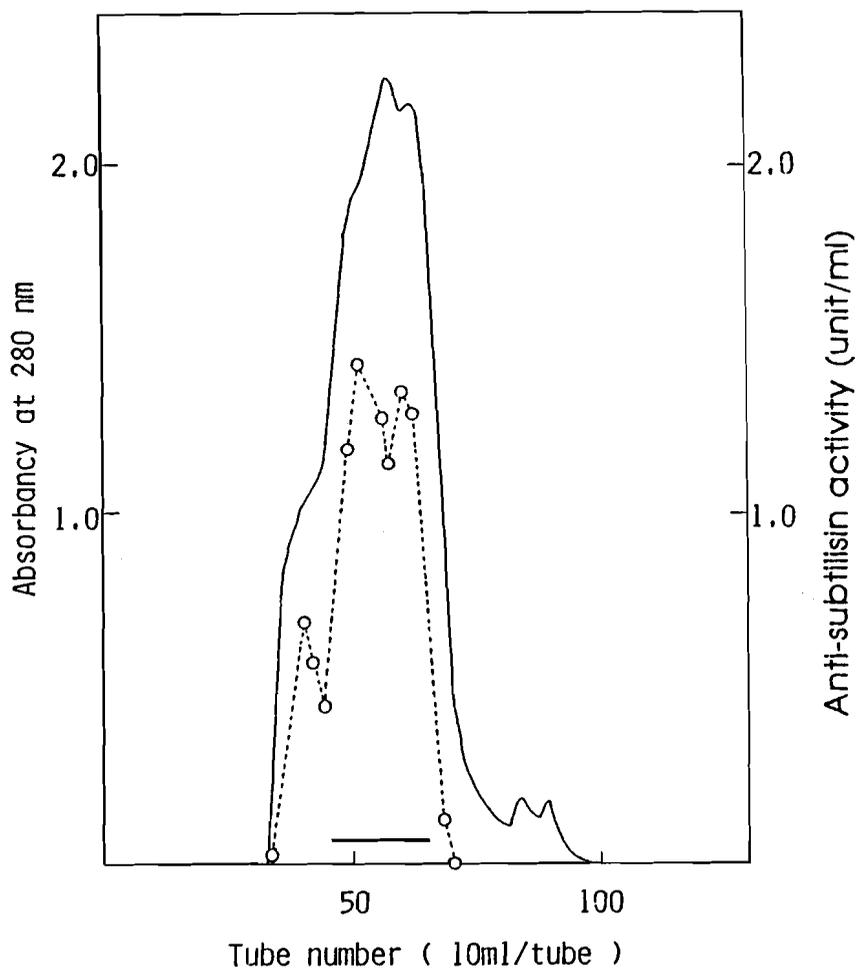


Fig. 4. Sephadex G-50 chromatography of crude ASI. The crude ASI obtained by CM-cellulose chromatography was subjected to a Sephadex G-50 column (3.2 x 140 cm) previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 80 ml/h. 10 ml fractions were collected and those having anti-subtilisin activity (indicated by solid bar) were combined.
 — : absorbance at 280 nm; ---○--- : anti-subtilisin activity.

(3) DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィー

ゲルろ過で得たインヒビター画分を、予め、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化したDEAE-celluloseカラム (2.2 x 30 cm) に供した。溶出は、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 750 mlと0.3 M NaClを含む同buffer 750 mlを用いた、直線濃度勾配法により行った。流速は30 ml/hで行い、10 mlずつ分取した (Fig. 5)。得られたインヒビター画分は、各々、硫安60%飽和で塩析した。

阻害活性は、主に2つの画分に認められ、少なくとも2種類のASIが存在することが示された。このため、以降のクロマトグラフィーは、DE-1、DE-2画分それぞれについて同様の操作を行い、別個に精製を続けた。以下の結果は、ASIの主要分子型であるASI-Iを含むDE-2画分についての記述であるが、ASI-IIを含むDE-1画分についても同様に行なった。

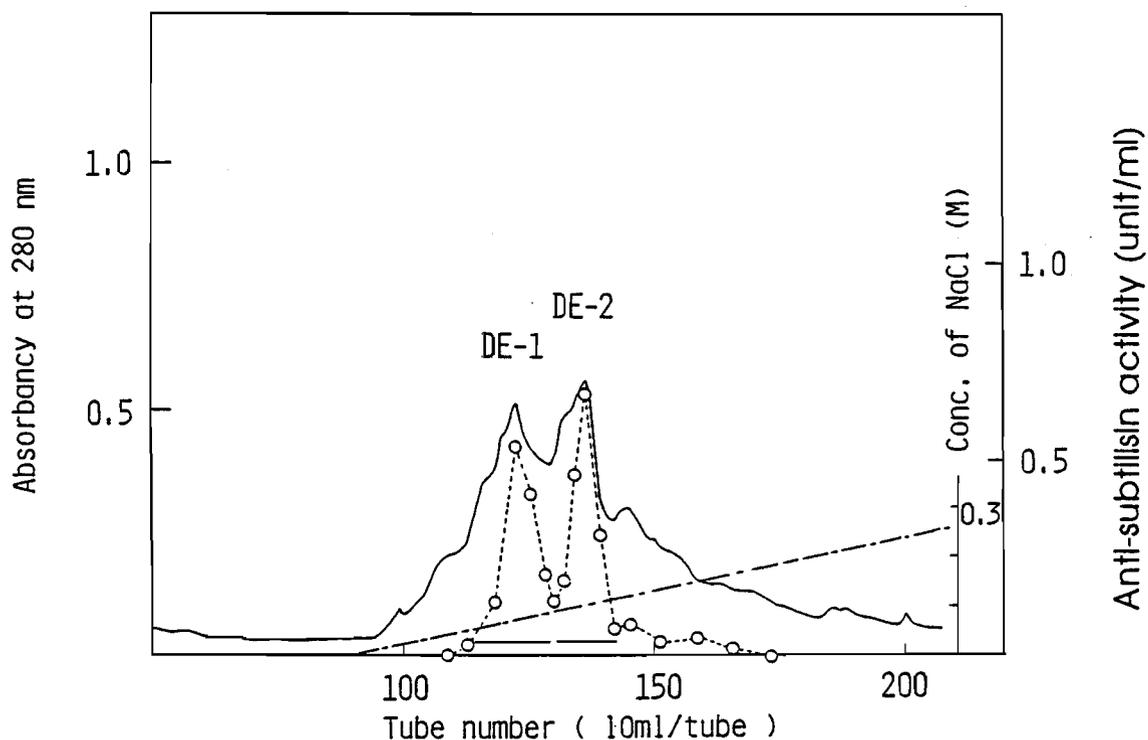


Fig. 5. DEAE-cellulose chromatography of crude ASI. The crude ASI obtained by gel filtration was applied to a DEAE-cellulose column (2.2 x 30 cm) previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The column was washed with 1 liter of the equilibrating buffer and developed with a linear gradient from 0 M to 0.3 M NaCl in 1.5 liter of the same buffer at a flow rate of 30 ml/h. 10 ml fractions were collected and two fractions having anti-subtilisin activity (DE-1 and DE-2, respectively) were pooled.
 — : absorbance at 280 nm; ---○---: anti-subtilisin activity.

(4) Sephadex G-50ゲルろ過

DEAE-celluloseカラムで得られた、DE-2画分の塩析物を遠心分離 (10000 x g, 20 min) で回収し、5 mlの0.1 M酢酸に溶解した後、予め0.1 M酢酸で平衡化したSephadex G-50カラム (2.0 x 180 cm) に供し、同溶液で溶出した。流速は30 ml/hで行い、10 mlずつ分画した (Fig. 6)。阻害活性の認められた Fig. 6中の下線部を合わせ、凍結乾燥した。

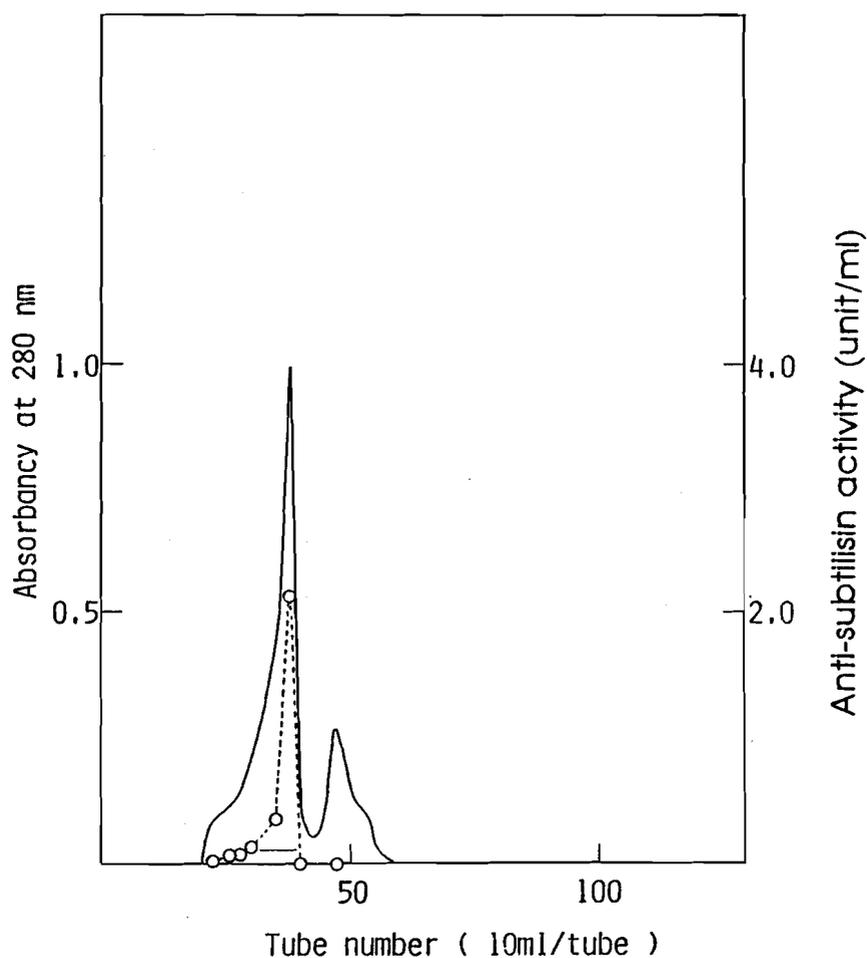


Fig. 6. Sephadex G-50 chromatography of DE-2 (crude ASI-I). The crude ASI-I obtained by DEAE-cellulose chromatography was subjected to a Sephadex G-50 column (2.0 x 180 cm) previously equilibrated with 0.1 M acetate. Elution was carried out with the same solution at a flow rate of 30 ml/h. 10 ml fractions were collected and those having anti-subtilisin activity (indicated by solid bar) were combined.
——— : absorbance at 280 nm; ---○--- : anti-subtilisin activity.

(5) CM-celluloseカラムクロマトグラフィー

インヒビターの凍結乾燥標品を10 mlの20 mM酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) に溶解した後、予め、同緩衝液で平衡化したCM-celluloseカラム (2.2 x 30 cm) に供した。溶出は、20 mM酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) 1 Lと0.1 M NaClを含む同緩衝液1 Lを用いた直線濃度勾配法により行った。流速は30 ml/hで行い、各々5 mlずつ分取した (Fig. 7)。阻害活性の認められたFig. 7中の下線部を合わせ、硫酸60%飽和で塩析した。

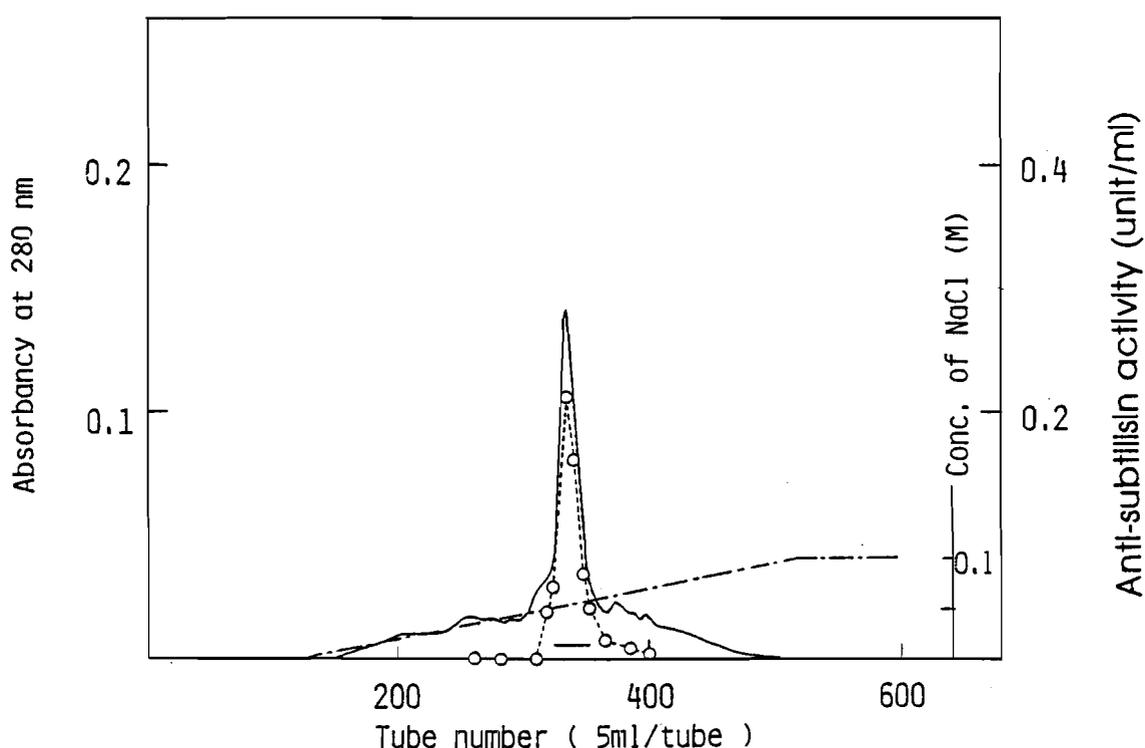


Fig. 7. CM-cellulose chromatography of crude ASI-I. The crude ASI-I obtained by gel filtration was applied to a CM-cellulose column (2.2 x 30 cm) previously equilibrated with 20 mM acetate buffer, pH 4.0. After washing the column with 500 ml of the equilibrating buffer, elution was carried out with a linear gradient from 0 M to 0.1 M NaCl in 2 liter of the same buffer at a flow rate of 30 ml/h. 10 ml fractions were collected and those having anti-subtilisin activity (indicated by solid bar) were combined.

————: absorbance at 280 nm; ---○---: anti-subtilisin activity.

(6) Sephadex G-50 ゲルろ過

ゲルろ過で得られたインヒビター画分の塩析物を遠心分離 (10000 x g, 20 min) で回収し、5 mlの0.1 M酢酸に溶解した後、予め0.1 M酢酸で平衡化したSephadex G-50カラム (2.0 x 180 cm) に供し、同溶液で溶出した。流速は、10 ml/hで行い、10 mlずつ分取した (Fig. 8)。Fig. 8中の下線部を合わせ、凍結乾燥した。この標品を、ASIの最終精製標品とした。

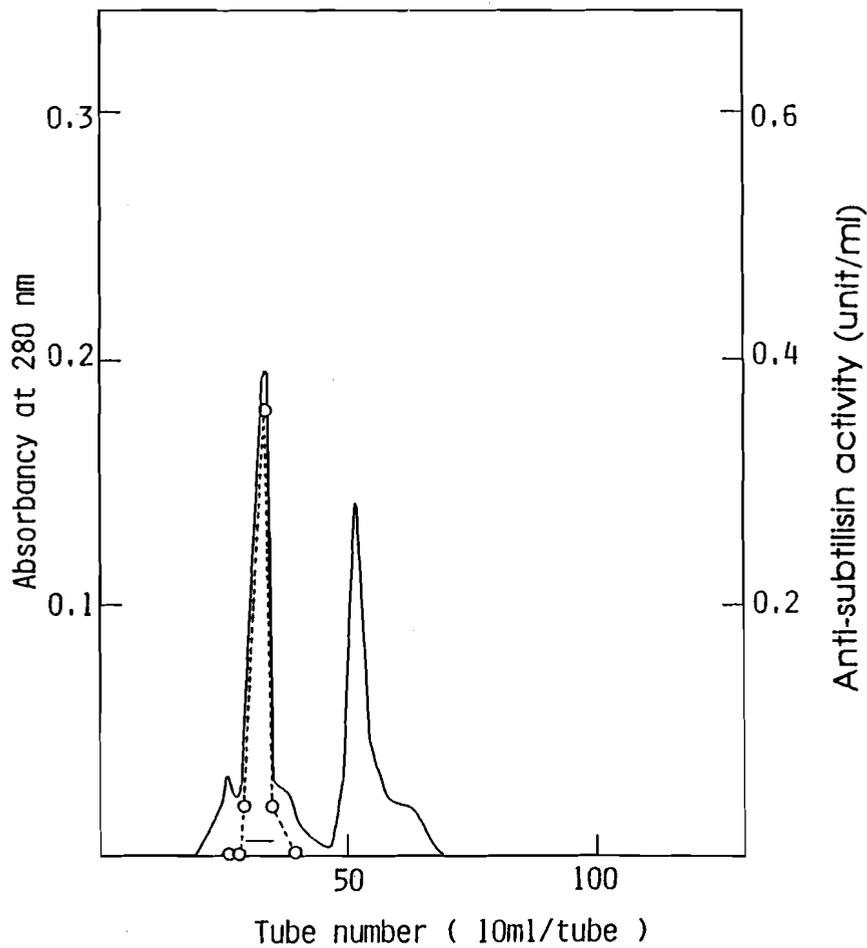


Fig. 8. Sephadex G-50 chromatography of crude ASI-I. The crude ASI-I obtained by CM-cellulose chromatography was subjected to a Sephadex G-50 column (2.0 x 180 cm) previously equilibrated with 0.1 M acetate. Elution was carried out with the same solution at a flow rate of 10 ml/h. 5 ml fractions were collected and those having anti-subtilisin activity (indicated by solid bar) were combined.

———— : absorbance at 280 nm; ---○--- : anti-subtilisin activity.

(7) ASI精製のまとめ

アズキ種子1 kgからASIを精製する過程の精製度、回収率をTable IIにまとめた。ASI-I、IIともに約120倍に精製された。回収率はそれぞれ、13.4%、10.2%であった。DEAE-celluloseクロマトグラフィーにより、回収率は71.2%から34.6%(ASI-I)、23.9%(ASI-II)と約1/2に低下しているが、これは、ゲルろ過で得られた活性画分を2つの成分に分け(Fig. 5)、各々について計算したためである。両成分を合わせたDEAE-celluloseクロマトグラフィー後の回収率は60.5%であり、この精製過程で、特にインヒビター活性の損失がおこったわけではない。

精製過程後半のCM-celluloseクロマトグラフィーでは、精製度の増加に比べて回収率が低下しているが、ここでは、ASIの2成分を完全に分離することに重点をおき、この方法を選択した。

Table II. Purification of subtilisin inhibitors from Adzuki Beans.

Purification step	Total protein (mg)	Total inhibitory activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude inhibitor	11500	260	0.023	1	100
CM-cellulose column	960	200	0.21	9.1	76.9
Sephadex G-50 column	420	185	0.44	19.2	71.2
DEAE cellulose column					
ASI-I	54.2	90.0	1.66	72.2	34.6
ASI-II	34.3	62.1	1.81	78.7	23.9
Sephadex G-50 column					
ASI-I	35.8	83.5	2.33	101.4	32.1
ASI-II	22.9	54.0	2.36	102.5	20.8
CM-cellulose column					
ASI-I	16.9	42.3	2.50	108.8	16.3
ASI-II	13.2	35.7	2.71	117.6	13.7
Sephadex G-50 column					
ASI-I	13.1	34.8	2.66	115.5	13.4
ASI-II	9.4	26.4	2.81	122.1	10.2

第2項 均一性の検討

得られた標品の均一性を、disc-PAGEにより検討した (Fig. 9)。ASI-I、IIが相互に混在していたDE-1、DE-2画分から、2成分が分離され、それぞれ、均一なインヒビタータンパク質が精製されたことが確認できた。

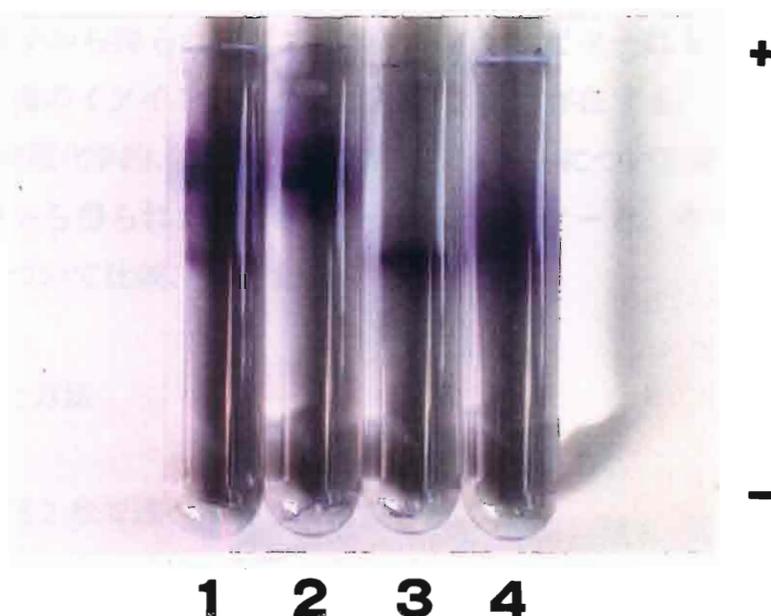


Fig. 9. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified subtilisin inhibitors. Gels 2 and 3, purified ASI-I and II; gels 1 and 4, subtilisin inhibitor fraction (DE-2 and DE-1, respectively) eluted from DEAE-cellulose column. Samples were run in 7.5 % acrylamide gel at pH 4.3.

第3節 小括

乾燥アズキ種子から、ズブチリシンインヒビターを抽出し、各種クロマトグラフィーによって2種のインヒビタータンパク質 (ASI-I、II) を精製した。粗抽出液からの回収率は、それぞれ13.4%、10.2%で、ともに約120倍に精製された。

一般に、マメ科植物種子に含まれるタンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターは、STI(Kunitz)型およびBBI型のいずれかに分類されるが、そのどちらにも属さない第3のインヒビターグループの存在が示唆された。

第3章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターの物理化学的、および化学的諸性質

タンパク質性プロテイナーゼインヒビターは、イソインヒビターが存在する例が多い。特に、マメ科植物由来のものは一般に多型(multiplicity)である(4)。

アズキ種子から得られたズブチリシンインヒビターにも、阻害特性を同じくする2種のイソインヒビター、ASI-I、IIが存在する。本章では、これら両ASIの物理化学的、並びに化学的諸性質の違いについて述べるとともに、他のマメ科から得られたズブチリシンインヒビターと、そのタンパク質化学的特性について比較、検討する。

第1節 材料と方法

第1項 材料

ASIは、第2章で述べたように精製した。

分子量マーカーとして用いたbovine serum albumin、ovalbumin、chymotrypsinogen A、myoglobinは、Pharmacia LKB Biotechnology社のものを使用した。焦点電気泳動には、LKB Produkterのcarrier ampholine (pH 3.5-10.0)を用い、pIマーカーには、オリエンタル酵母社製のcytochrome c 誘導体 (pI=4.1, 4.9, 6.4, 8.3, 9.7, 10.6)を使用した。

N末端分析で用いたdansyl chloride、および、dansylアミノ酸(DNS-アミノ酸)は、Sigma Chemical社から購入した。また、薄層クロマトグラフィーには、Cheng Chin社のpolyamide sheetsを使用した。

Carboxypeptidase Aは、オリエンタル酵母社から購入した。それ以外の、酵素または試薬は、第2章に記載したのと同様のものを用いた。

第2項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliらの方法(37)に従い、6 M尿素存在下、または、非存在下で、13%ゲルを用いて泳動した。ゲルの染色は、0.1% Coomassie brilliant blue R-250を用い、脱色

には7.5%酢酸-25%メタノールを用いた。なお、分子量マーカーとして、ウシ血清アルブミン(66250)、オボアルブミン(43000)、キモトリプシノーゲンA(25700)、ミオグロビン(17200)を用いた。

第3項 等電点電気泳動

等電点電気泳動は、キャリアアンホライン(pH 3.5-10.0)を用い、7.5%ポリアクリルアミドゲルで行なった。なお、pIマーカーとして、チトクロームC誘導体を使用した。

第4項 紫外外部吸収スペクトル

ASIの紫外外部吸収スペクトルは、日立ダブルビーム分光光度計124型を用いて測定した。

第5項 アミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析は、Spackmanらの方法(38)に従い、試料を定沸点塩酸(b.p.=108.6°C)に溶解し、減圧下で封管後、110°Cで24、48、72時間加水分解した。加水分解物は、日立アミノ酸自動分析機835型に供して分析した。

トリプトファン(Trp)の定量は、Simpsonらの方法(39)に従い、試料を0.2% tryptamineを含む4M methanesulfonic acidに溶解し、減圧下で封管後、110°Cで24時間加水分解した。加水分解物は、2 N NaOHで中和した後、同様に分析した。

第6項 アミノ末端分析

アミノ末端アミノ酸残基の分析は、Grayのダンシルクロリド法(DNS法)(40)に従った。DNS-アミノ酸は、ポリアミドシートを用いて薄層クロマトグラフィーを行った後、UVランプ下で同定した。

第7項 カルボキシル末端分析

カルボキシル末端アミノ酸残基の分析は、カルボキシペプチダーゼ法により行なった。0.5 μ molのASIに、0.2 M N-エチルモルホリン酢酸緩衝液 (pH 8.5) 1 mlに溶解した、1/40モル比のカルボキシペプチダーゼA (CPase A) を添加し、30° Cで反応させた。反応液を経時的に分取し、塩酸で反応を停止した後、日立アミノ酸自動分析機835型に供して分析した。

第8項 酵素阻害活性

インヒビターの阻害活性は、第2章で述べたのと同様に、カゼインを基質として測定した。インヒビター活性の1単位は、酵素 2 mgの活性を50%阻害するインヒビター量とした。

第2節 結果

第1項 物理化学的諸性質

(1) 分子量

ASI精製過程で用いたゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、ASI-Iの分子量は約1万と推定された。またASI-IIはASI-Iよりも低分子で約8千の分子量をもつと推定された。

両インヒビターをSDS-PAGEに供したところ、Fig. 10に示す泳動図が得られた。分子量マーカーを標準として、それぞれの分子量を計算したところ、尿素非存在下では、ASI-Iが約15000、ASI-IIが約23000と算出された (Fig. 10a)。タンパク質が比較的低分子の場合、尿素を含むゲルを用いてSDS-PAGEを行なうと、分子量に比例した泳動図が得られることがあるので、次に、6 M尿素を含むゲルを用いたSDS-PAGEを行なった (Fig. 10b)。その結果、ASI-Iの方が若干、分子量が大きいが、どちらも約22000と計算された。

ASI-I、IIは、尿素存在下では近い位置に泳動されたが、尿素のない場合は、両者の泳動位置が大きく異なる。ここで用いた試料は、尿素非存在下でSDS化しているが、6 M尿素存在下で試料を調製した場合でも同じ泳動図

が得られた。すなわち、泳動パターンの変化は、ゲル中に尿素が存在するか否かに依存していることがわかった。これは、ASIがSDS-PAGE中に可逆的に構造変化していることを示唆しており、この方法による分子量の推定は不可能であると考えられる。

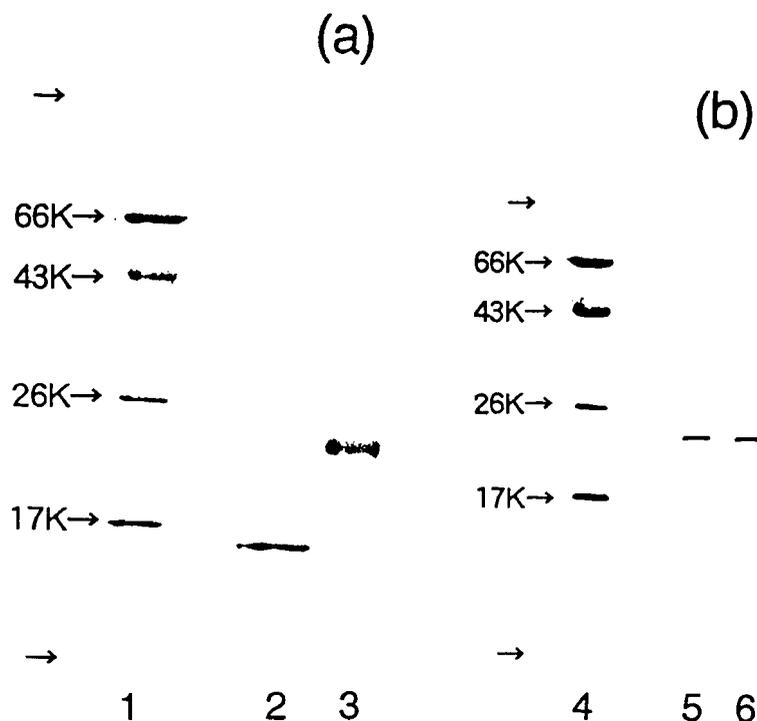


Fig. 10. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of ASI's. Samples were run in 13 % acrylamide gel containing no urea (a) and 6 M urea (b) at pH 8.3. Gels 1 and 4, bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, myoglobin (from top), gels 2 and 5, ASI-I (5.0 μ g); gels 3 and 6, ASI-II (4.25 μ g). Horizontal arrows indicate the top and the bottom of gels.

(2) 等電点

ASI-I、IIの等電点(pI)は各々3.7、および4.0であった。両インヒビターとも、酸性側に等電点を持つタンパク質であった。

(3) 紫外外部吸収スペクトル

ASI-I、IIの紫外外部吸収スペクトルをFig. 11に示した。100 mM酢酸塩緩衝液(pH 6.0)中では、ASI-Iの極大吸収は278 nm、極小吸収は250 nmにみられた。ASI-IIは、275 nmに極大、249 nmに極小吸収を示した。両者の吸光係数($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)は、pH 6.5、280 nmにおいて、ASI-Iが7.1、ASI-IIが5.7と計算された。

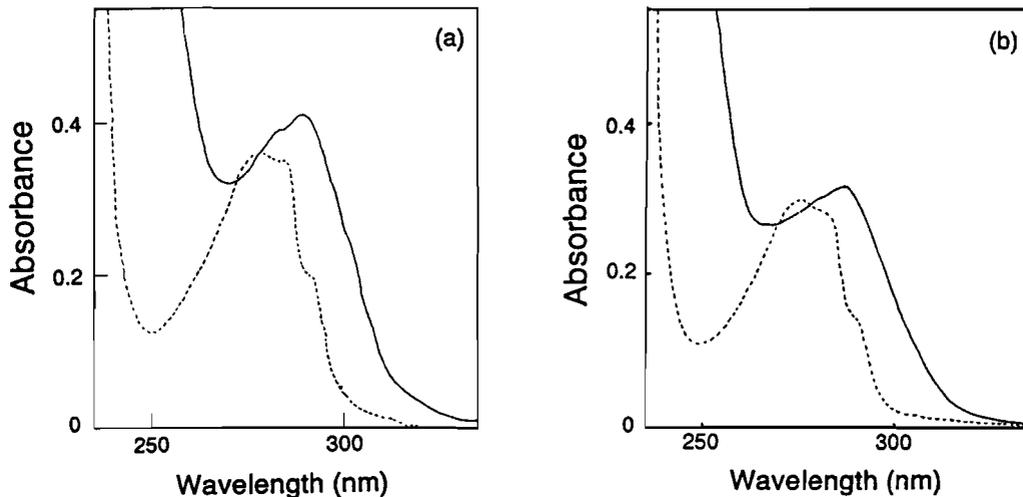


Fig. 11. UV-spectrums of ASI's. UV-spectrums of ASI-I (a) and ASI-II (b) were measured at a concentrations of 0.05% (w/w) in 0.1 M NaOH (—), or in 0.1 M acetate buffer, pH 6.5 (-----).

第2項 化学的諸性質

(1) アミノ酸組成

ASI-I、IIのアミノ酸組成をTable IIIに示した。

特筆すべきことは、両インヒビターとも1/2シスチンを含んでいないことである。このことは、これらのインヒビター分子内にS-S結合が存在していないことを意味している。これまで得られたプロティナーゼインヒビターは、ほとんどが分子内にS-S結合を有しており、ASIがタンパク質化学的に非常に特徴のあるインヒビターであることを示唆している。

また、両インヒビターともアスパラギン(酸)、およびグルタミン(酸)を多く含み、ASI-Iでは30%、ASI-IIでは25%に相当していた。この点、植物の貯蔵タンパク質と似ていた。

両インヒビターのアミノ酸組成を比較すると、ASI-IIはASI-Iよりも19残基少ないことがわかる。なお、アミノ酸組成とゲルろ過の結果に基づいて分子量を算出したところ、ASIは10800、ASI-IIは8600であった。

Table III. Amino acid compositions of ASI's.

Amino acid	ASI-I		ASI-II	
Asp	9.9	(10)	6.9	(7)
Thr ^a	9.6	(10)	8.9	(9)
Ser ^a	5.8	(6)	5.1	(5)
Glu	17.3	(17)	10.7	(11)
Pro	7.9	(8)	4.5	(5)
Gly	3.2	(3)	2.4	(2)
Ala	4.5	(4)	4.3	(4)
1/2Cys	0.0	(0)	0.0	(0)
Val ^b	10.3	(10)	8.7	(9)
Met	1.0	(1)	1.1	(1)
Ile	3.0	(3)	3.0	(3)
Leu	3.9	(4)	3.0	(3)
Tyr	3.1	(3)	2.0	(2)
Phe	1.1	(1)	1.0	(1)
Lys	6.1	(6)	6.0	(6)
His	1.2	(1)	1.3	(1)
Arg	4.0	(4)	3.3	(3)
Trp ^c	1.0	(1)	1.0	(1)
Total	(92) ^d		(73) ^d	
Molecular weight	10,800		8,600	

a. Extrapolated to zero hour. b. For 72 h-hydrolyzate. c. Obtained by hydrolysis for 24 h in 4 M methanesulfonic acid containing tryptamine (39). d. Numbers in parentheses are those obtained from sequence analysis (chapter 4).

(2) アミノ末端アミノ酸残基

ダンシルクロリド法で分析した結果、ASI-Iのアミノ末端アミノ酸は、グルタミン酸と同定された。ダンシルクロリド法では、酸加水分解を行なうため、グルタミンとグルタミン酸の区別はできないので、ASI-IのN末端アミノ酸は、グルタミンもしくはグルタミン酸と同定された。また、ASI-IIの場合はリジンと同定された。

(3) カルボキシル末端アミノ酸残基

CPase Aを用いて、ASI-I、IIのC末端アミノ酸の同定を試みたが、いずれの場合も、遊離アミノ酸は検出できなかった。反応は24時間まで行なったが、遊離アミノ酸は微量に検出されたのみで、酵素特異的な切断は確認できなかった。CPase Bを用いた場合も同様の結果であった。このことから、ASI-I、IIのC末端アミノ酸は、プロリン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸など、CPaseによる作用を受けにくいアミノ酸ではないかと考えられた。

第3項 酵素阻害活性

ASI-I、IIの各プロテイナーゼに対する阻害曲線をFig. 12に示した。ASI-I、IIともに、ズブチリシンを強く阻害し、トリプシンには全く作用しなかった。また、キモトリプシンに対しては、弱い阻害を示した。

用いたズブチリシンを完全に阻害するのに必要なインヒビター量は、阻害直線から判断して、ASI-Iの場合 $9.9\mu\text{g}$ 、ASI-IIでは $8.3\mu\text{g}$ であった。ズブチリシンの分子量を27500とし、インヒビター1分子でズブチリシン1分子を阻害すると考えると、阻害曲線から得られる分子量は、ASI-Iの場合11000、ASI-IIでは9100と計算され、アミノ酸分析から得られた値とほぼ一致した。

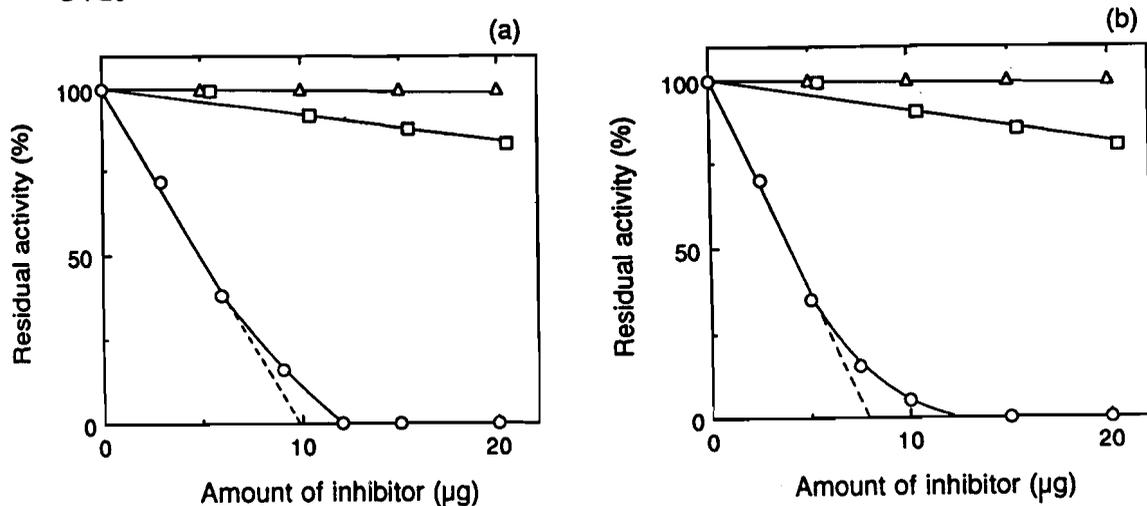


Fig. 12. Titration curves of proteinases with the ASI's. Residual caseinolytic activity of subtilisin ($25\mu\text{g}$) (○), trypsin ($16\mu\text{g}$) (Δ) and chymotrypsin ($24\mu\text{g}$) (□) were measured in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.6) at 30°C after preincubation for 5 min with ASI-I (a) or ASI-II (b).

第4項 ASIの諸性質のまとめ

以上の結果から得られた、ASI-I、IIの物理化学的、並びに化学的諸性質をTable IVにまとめた。

Table IV. Summary of the properties of ASI's.

Properties	ASI-I	ASI-II
Molecular weight ^a	10,800	8,600
Isoelectric point (pI)	3.7	4.0
Extinction coefficient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) ^b	7.1	5.7
Inhibitory specificity	Subtilisin	Subtilisin
N-terminal amino acid	Glx	Lys
C-terminal amino acid	N.D. ^c	N.D. ^c

a. Calculated from the results of amino acid analysis and gel filtration. b. Determined at pH 6.5 and 280 nm. c. Not detected.

第3節 考察

ASI-I、IIのアミノ酸組成から、ASI-IIがASI-Iに含まれる可能性が推察された。また、両インヒビターのN末端が異なることから、これらはN末端側で変異したイソインヒビターではないかと考えられる。アミノ酸組成から得られた両者の分子量を基に、両者の酵素阻害曲線を解析すると、ASI-I、II各1分子は、ともにズブチリシンを1分子阻害する、すなわち酵素と1:1の複合体を形成していることがわかった。このことから、ASI-I、IIは酵素阻害機能上、同位のインヒビターであると考えられる。

一般に、タンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターは、そのアミノ酸配列上の相同性から幾つかのグループに分類される(18)。これらのインヒビターファミリーには、すべてに共通のタンパク質化学的特徴がみられる。そして、インヒビターの阻害反応部位は通常、特定のS-Sループ内に存在し、その所在とS-S結合の位置が、一次構造上、各グループで完全に保存されている(18)。

マメ科植物の場合、STI(Kunitz)型インヒビターは、分子内に2個のS-S

結合を有し、その一方に反応部位が局在している。BBI型インヒビターは、S-S結合を7個有しており、そのうち最も小さな2つのS-Sループ内にそれぞれの反応部位を持っている。他のグループのインヒビターと同様に、これらの両ファミリーのインヒビターも耐熱性であるが、それは分子内S-S結合によってインヒビタータンパク質の構造が保持されているからだと言明されてきた(27)。

ASIのタンパク質化学的特性のうち最も特徴的なことは、分子内S-S結合が存在しないことである。インヒビターの分子構造に重要な影響を与えるS-S結合について、ASI-I、IIともにSTI(Kunitz)型やBBI型インヒビターと著しく異なっているという事実は、ASIが、従来マメ科から得られてきた2つのインヒビターファミリーのいずれかのサブファミリーとして存在するのではなく、明らかに第3のファミリーを形成するインヒビターである可能性を支持している。

Table Vに、ソラマメ(broad bean: *Vicia faba*)のズブチリシンインヒビター(VSI) (41)、およびcowpea (*Vigna unguiculata*) (42, 43)、black bean (*Phaseolus vulgaris*) (44, 45)から得られたズブチリシンインヒビターのアミノ酸組成を挙げた。それぞれ、完全なアミノ酸配列が決定されていないので、分子量が約9000(約80残基)となるように再計算してある。このうち、ソラマメ種子ズブチリシンインヒビター(VSI)は、ASIと同じく1/2シスチンが存在しないインヒビターで、他のアミノ酸組成も非常によく似ている。このことから、ASIは、VSIと同じファミリーのインヒビターではないかと考えられる。

ズブチリシンに特異的なインヒビターは、幾つかのマメ科植物からも検索されており、マメ科に一群のズブチリシンインヒビターファミリーが存在することが推察される(46)。しかし、それらの詳しい性質、特にS-S含量については、ASI、およびTable Vに挙げたインヒビター以外には報告がなく、STI(Kunitz)型やBBI型ファミリーとの違いは明らかではない。

VSIは、部分一次構造が決定されており、ポテトI型インヒビターと高い相同性を示すことが確認されている(41)。このことから、ASIもポテトI型

ファミリーに属するインヒビターではないかと推察された。

Table V. Amino acid compositions of subtilisin inhibitors from other leguminous seeds^a.

Amino acid	Broad bean (41)	Cowpea (42, 43)	Black bean (44, 45)
Asp	5.2	8.3	7.0
Thr	4.6	7.0	6.6
Ser	4.1	5.3	5.0
Glu	11.9	13.0	10.7
Pro	6.2	4.5	5.9
Gly	5.3	5.0	4.3
Ala	7.5	7.6	6.1
1/2Cys	0.0	0.6	3.4
Val	11.2	7.1	8.1
Met	0.2	2.6	1.3
Ile	3.1	2.5	4.2
Leu	2.6	3.1	3.2
Tyr	2.0	1.6	1.7
Phe	2.0	1.2	2.7
Lys	7.5	5.3	5.7
His	1.1	1.1	0.6
Arg	4.3	3.0	3.1
Trp	1.0	1.4	0.7

a. Recalculated for molecular weight of 9000.

ポテトI型に属するインヒビターは、ポテト塊茎キモトリプシンインヒビター(PI-I) (47-51)、トマト葉キモトリプシンインヒビター(TI-I) (52)、大麦キモトリプシンインヒビター(CI-2, CI-1C) (53, 54)、ヒルエラスターゼインヒビターEglin C (LIE) (55)などが知られており、動・植物界にまたがって、相同性が確認された唯一のインヒビターファミリーである。また、大麦のインヒビターとEglin Cには、S-S結合が存在しておらず、ASI-I、IIがVSIとともにこのグループのインヒビターである可能性が示唆される。

従来、マメ科植物のタンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターは、STI(Kunitz)型およびBBI型の2つのファミリーに大別されてきたが、マメ科には、ズブチリシンに特異的な、もうひとつのグループが存在していることがわかった。また、ASIやVSIで得られた知見、特にS-S含量から判断すると、このグループは、ポテトI型インヒビターファミリーであることが示唆された。

第4節 小括

アズキ種子から得られたズブチリシンインヒビター、ASI-I、IIの物理化学的、および化学的諸性質について調べた。その結果、ASI-IIはASI-Iよりも、やや低分子のインヒビターであることが推定された。両インヒビターには阻害特性上の差異は認められず、酵素との結合領域は同様である可能性が考えらる。

ASI-I、IIには、一般にプロティナーゼインヒビターの構造維持に重要な役割を演じると説明されている、分子内S-S結合が存在しない。ASI-I、IIのタンパク質化学的特性は、ポテトI型ファミリーのインヒビターと相似していた。マメ科植物由来のタンパク質性セリンプロティナーゼインヒビターで、STI(Kunitz)型あるいはBBI型以外のインヒビターは、アズキのほか、ソラマメのズブチリシンインヒビターからも確認されており、マメ科にポテトI型ファミリーのインヒビターが、第3のグループとして存在していることを示唆している。

第4章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターのアミノ酸配列と阻害反応部位

タンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターは、アミノ酸配列上の相同性に基づいて、幾つかのファミリーに分類されるが、阻害反応部位と分子内S-Sループの配置は、各ファミリーで完全に一致しており、これらの特性からもインヒビターの分類が可能である(18)。

ASIは、その分子内にS-S結合が存在しないことから、ポテトI型ファミリーとの相関が示唆される。本章では、ASI-I、IIの全アミノ酸配列と阻害反応部位について述べ、ポテトI型インヒビターとの相同性を探索するとともに、このファミリーに属するインヒビターのタンパク質化学的特徴について考察する。

第1節 材料と方法

第1項 材料

ASI-I、IIは第2章で述べたようにして精製した。

TPCK-trypsinはSigma Chemical社から、lysyl-endopeptidaseは和光純薬工業から、また、*Staphylococcus aureus* V8-Proteaseは、Miles Laboratories社から購入した。

逆相HPLCには、ケムコ社のChemcosorb 7 ODS H カラム(4.6 x 250 mm, C18)、または、Bio-Rad社のHi-Poreカラム(4.6 x 250 mm, C4)を用い、アミノ酸同定の為の薄層クロマトグラフィーには、Cheng Chin社のpolyamide sheetsを使用した。また、Sephadex G-25、G-50は、Pharmacia LKB Biotechnology社のものを使用した。

4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate (DABITC)は同仁化学研究所のものを、phenylisothiocyanate (PITC)、trifluoroacetic acid (TFA)は、和光純薬工業のアミノ酸配列分析用を使用した。

その他の試薬は、第2章に記載したものと同様のものを用いた。

第2項 酵素消化による断片化

(1) ASI-Iのリジン残基のシトラコニル化

TPCK-トリプシン消化に先立ち、ASI-Iのリジン残基を、シトラコニル化した(56)。NaOHでpH 8.2に調整した50 mlの蒸留水に、ASI-I(30 mg, 2.8 μ mol)を溶解し、100 μ lの無水シトラコン酸を、30分毎に計4回添加した。試薬添加後、pHを8.2に保ちながら、更に2時間反応を続けた。反応終了後、過剰の試薬を除くため、予め希アンモニア水(pH 8.6)で平衡化しておいたSephadex G-25カラム(2.2 x 170 cm)に反応液を供し、同溶液で脱塩した後、凍結乾燥した。

(2) シトラコニル化ASI-IのTPCK-トリプシンによる断片化

シトラコニル化ASI-I (33 mg, 2.8 μ mol)のTPCK-トリプシン消化は、酵素と基質のモル比が1/20 (E/S)となるようにTPCK-トリプシンを添加し、0.2 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)中で、37 $^{\circ}$ C、6時間行なった。なお、酵素安定化のために、反応液中に10 mMの塩化カルシウムを添加した。反応終了後、消化物を予め5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)で平衡化したSephadex G-50カラム(1.8 x 180 cm)に供した。

(3) ASI-Iのリジルエンドペプチダーゼによる断片化

ASI-I (27 mg, 2.5 μ mol)に、酵素と基質のモル比が1/250 (E/S)になるようにリジルエンドペプチダーゼを添加し、10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)中で、37 $^{\circ}$ C、6時間消化させた。消化物は、反応終了後、予め5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)で平衡化したSephadex G-50カラム(1.8 x 180 cm)に供した。

(4) ASI-Iの*S. aureus* V8-Proteaseによる断片化

ASI-I (11 mg, 1.0 μ mol)に、酵素と基質のモル比が1/25 (E/S)になるように*S. aureus* V8-Proteaseを添加し、50 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)中で、37 $^{\circ}$ C、12時間消化させた。反応終了後、消化物を、予め5 mM酢酸ア

ンモニウム緩衝液(pH 4.0)で平衡化しておいたSephadex G-50カラム(1.8 x 180 cm)に供した。

(5) ASI-IIの*S. aureus* V8-Proteaseによる断片化

ASI-II(18 mg, 2 μ mol)に、酵素と基質のモル比が1/25 (E/S)になるように*S. aureus* V8-Proteaseを添加し、50 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)中で、37 C、10時間消化させた。反応終了後、消化物を、予め5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.0)で平衡化しておいたSephadex G-50カラム(1.8 x 180 cm)に供した。

第3項 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

ASI-IまたはASI-IIの消化物を、ゲルろ過で粗分画したのち、HPLCを用いてペプチドを分離、精製した。

HPLC装置は、Waters 510型ポンプシステム、およびWaters 660型ソルベントプログラマーを使用した。ペプチドの検出および記録は、相馬光学社製のS-310型UV-検出器、および日立056型記録計を用いた。

ゲルろ過で得られた各分画は、0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)に溶解した後、逆相カラム(Chemcosorb 7 ODS H、またはBio-Rad Hi-Poreカラム)に供し、アセトニトリルの直線濃度勾配法により溶出した。各HPLCの詳細な条件は、本章第2節「結果」に記した。

第4項 アミノ酸組成分析

得られたペプチドのアミノ酸組成は、第3章で述べたのと同様に、Spackmanらの方法(38)で分析した。

第5項 アミノ酸配列分析

ペプチドのアミノ酸配列分析は、ChangらのDABITC法(57, 58)に従って行なった。DABITCとのカップリング反応、N末端アミノ酸残基の環化・切断反応により得られた4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-thiohydantoin

(DABTH)アミノ酸の同定は、ポリアミドシート上での2次元薄層クロマトグラフィーにより行なった。なお、ロイシンとイソロイシンは、ここで用いた方法では判別できないが、各ペプチドのアミノ酸組成から区別することができた。

第6項 ズブチリシンによる限定水解

ASIのズブチリシンに対する反応部位を決定する目的で、ズブチリシンによる限定加水分解を行なった。

ASI-II(1.2mg, 140 nmol)に、酵素と基質のモル比が1/88 (E/S)になるように、ズブチリシンBPN[®]を添加し、50 mMピリジン酢酸緩衝液(pH 3.8)中で、30°C、30時間反応させた。反応終了後、消化物を、予め0.05%TFAで平衡化しておいたChemcosorb 7 ODS H逆相カラム(4.0 x 250 mm)に供した。

第2節 結果

第1項 インタクトASIのN末端配列の同定

各消化断片の配列分析に先立ち、インタクトASI-I、IIのN末端配列をDABITC法で分析した。

ASI-IのN末端配列は、Gln-Glu-Gln-と同定され、第3章に記したダンスル法によるN末端アミノ酸の分析と一致した。ASI-IIは、Lys-Gln-Ala-Leu-Glu-と同定され、これも先の結果と一致した。DABITC法で分析が可能な配列の長さは、ペプチドの性質によって大きく異なり、特に、インタクトなタンパク質では分析できないこともある。

なお後述するように、ASI-IIの全アミノ酸配列がASI-Iのそれに含まれることが一次構造解析の結果から推定されたが、両者のN末端アミノ酸の相違から、N末端側で相違したインヒビターであると推察される。以下、この推察に基づき、まず、主要分子型と考えられるASI-Iの全一次構造の分析を行なった。

第2項 ASI-Iのアミノ酸配列

(1) ASI-IのTPCK-トリプシン消化物の分離、精製

シトラコニル化ASI-IのTPCK-トリプシン消化物は、Fig. 13に示すようにゲルろ過で粗分画し、HPLCで精製した。消化物のSephadex G-50カラム上での溶出パターンをFig. 14に示した。得られた溶出液を、図に示すように4つの画分(T-I, II, III, IV)に分け、それぞれ濃縮乾固して酢酸およびアンモニアを除去した。

溶出位置から判断して、画分T-Iは、未消化のインタクトASI-Iを含む画分と考えられたので、以降の操作には用いなかった。画分IVにおいて、後半に230 nmにおける吸収が見られるのは、試薬由来のピークであると考えられたが、前半の少なくとも2つのペプチドを十分に回収するために、この段階では、インヒビター消化物の1つとして取り扱った。

画分T-II、T-IIIは、凍結乾燥したのち、少量の5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)に溶解し、予め同緩衝液で平衡化したSephadex G-50カラム(1.8 x 180 cm)に供し、更に分画した(Figs. 15, 16)。画分T-IIは、280 nmの吸収から判断して、Fig. 15に示したように2つの画分(T-IIa, IIb)に分けた。画分T-IIIも同様に3つの画分(T-IIIa, IIIb, IIIc)に分けた。

画分T-IVは、凍結乾燥したのち、少量の0.1 M酢酸に溶解し、予め同溶液で平衡化しておいたSephadex G-25カラム(2.0 x 160 cm)に供し、同溶液で溶出した(Fig. 17)。Fig. 17中の画分(T-IVa, IVb, IVc)のうち最後のT-IVc画分は、主に、酸性溶媒中で遊離したシトラコン酸を含む画分と判定されたため以降の操作には用いなかった。

以上のゲルろ過で、計7つの画分を得たが、Fig. 14での溶出パターンから判断して、T-IIbとT-IIIa、またT-IIIcとT-IVaを合わせ、それぞれ、T-IIbIIIa、T-IIIcIVaとした。この段階で、ゲルろ過により、5つの画分が得られた。

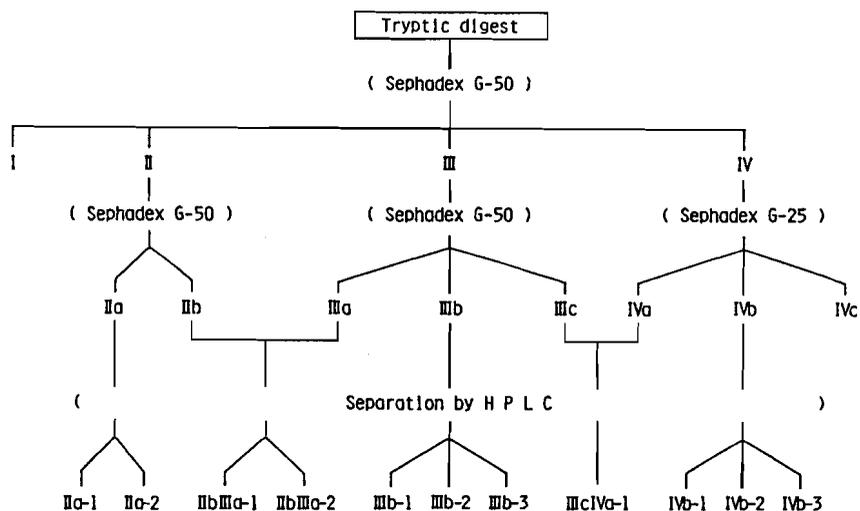


Fig. 13. Separation of the tryptic peptides of citraconylated ASI-I.

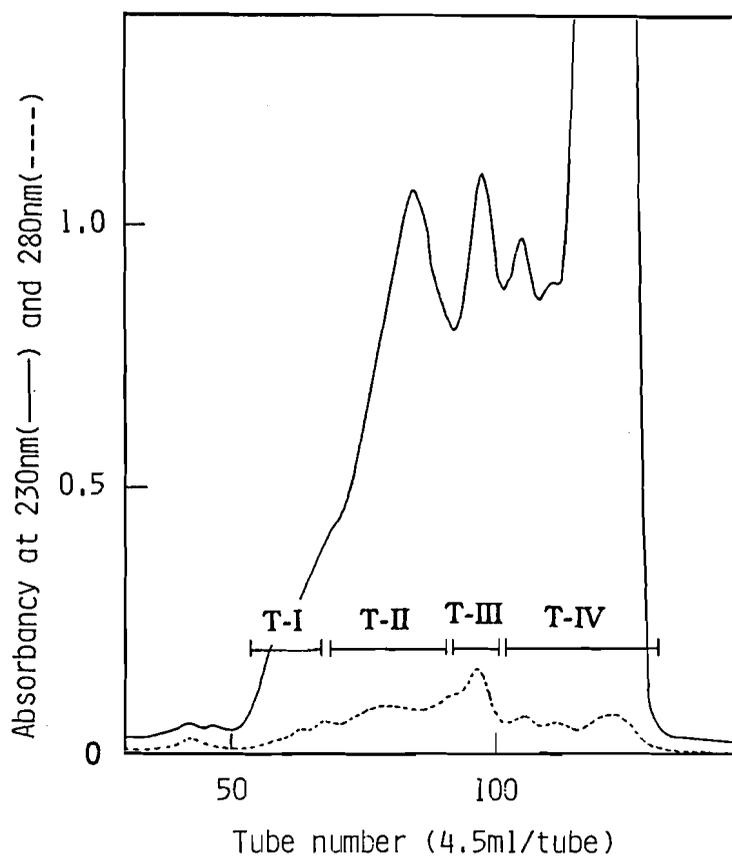


Fig. 14. Gel filtration of TPCK-trypsin digest of citraconylated ASI-I. The digest (3.0 ml) was separated on a Sephadex G-50 column (1.8 x 180 cm) in 0.2 M ammonium acetate buffer (pH 8.0) at a flow rate of 30 ml/h. Effluent fractions of 4.5 ml were collected.

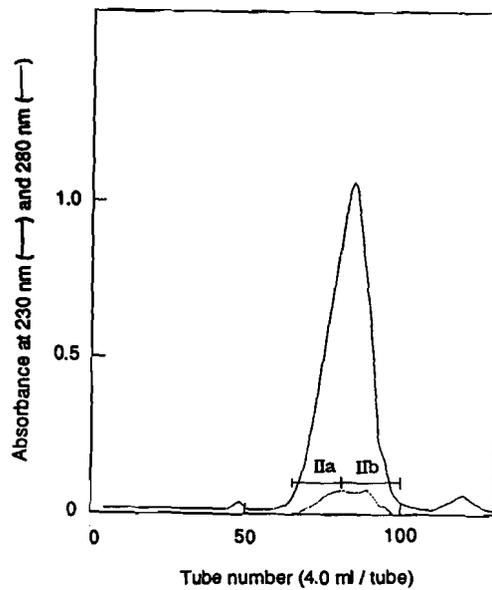


Fig. 15. Re-chromatography of fraction T-II. The fraction T-II in Fig. 14 was further separated on a Sephadex G-50 column (1.8 x 180 cm) in 5 mM ammonium acetate buffer (pH 8.0) at a flow rate of 30 ml/h. Effluent fractions of 4.0 ml were collected.

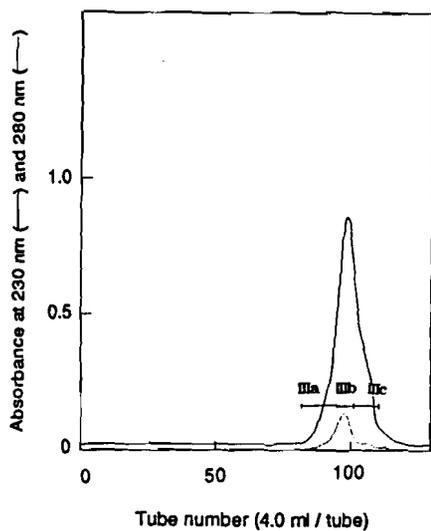


Fig. 16. Re-chromatography of fraction T-III on Sephadex G-50 column. The fraction T-III in Fig. 14 was further separated as described in the legend to Fig. 15. Effluent fractions of 4.0 ml were collected.

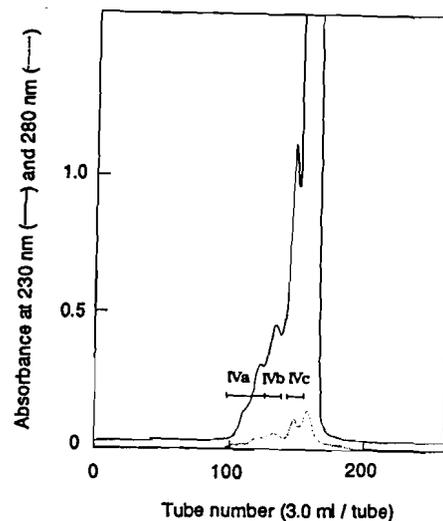


Fig. 17. Re-chromatography of fraction T-IV on Sephadex G-25 column. The fraction T-IV in Fig. 1 was further separated on a Sephadex G-25 column (2.0 x 160 cm) in 0.1 M acetic acid at a flow rate of 30 ml/h. Effluent fractions of 3.0 ml were collected.

得られた5つのゲルろ過画分(T-IIa, T-IIbIIIa, T-IIIb, T-IIIcIVa, T-IVb)は、凍結乾燥したのち、少量の0.05%TFAに溶解し、予め同溶液で平衡化しておいたHi-Pore逆相カラムに供した。溶出は、0.05%TFAと70%のアセトニトリルを含む0.05%TFAを用いた、有機相の直線濃度勾配法により行なった。流速は、0.5 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した。各々の、溶出パターンをFigs. 18-22に示した。

図中の下線で示したメインピークを凍結乾燥し、配列分析用の標品とした。溶出パターン上に見られるピークは、主に、試薬由来のバックグラウンドピークと考えられるが、酵素消化の際に目的とした箇所以外での切断がおこり、多数のペプチドが生じたことも原因と考えられた。

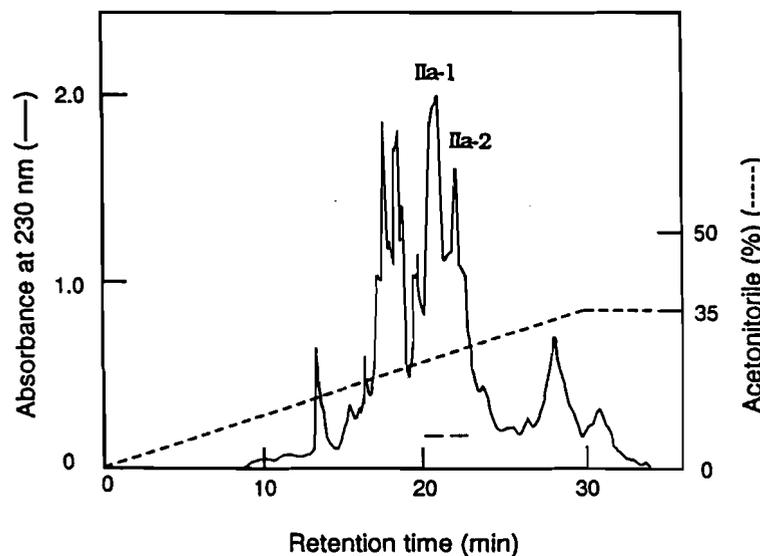


Fig. 18. Reversed-phase HPLC of fraction T-IIa. The fraction T-IIa in Fig. 15 was applied to a Hi-Pore column (4.6 x 250 mm, C4) and peptides were eluted at a flow rate of 0.5 ml/min in 0.05% TFA with a linear gradient of acetonitrile (0-35%/30 min).

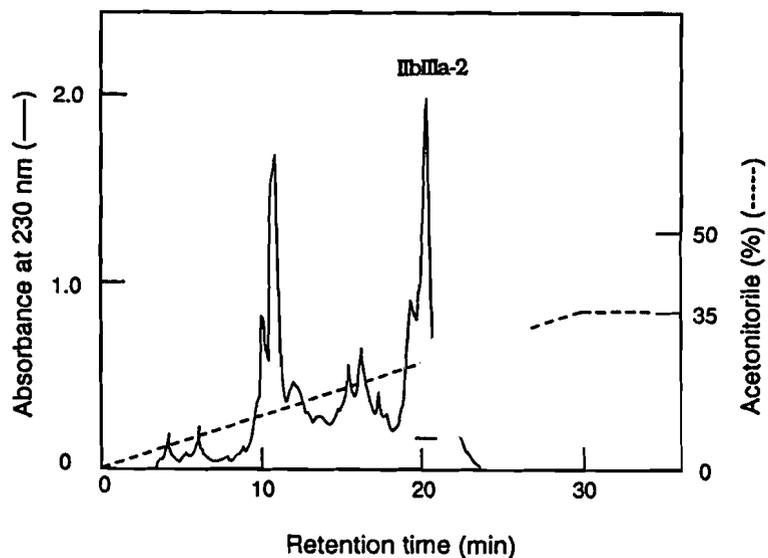


Fig. 19. Reversed-phase HPLC of fraction T-IIbIIIa. The fraction T-IIbIIIa which contains the fractions T-IIb in Fig. 15 and T-IIIa in Fig. 16 was separated on a reversed-phase column as described in the legend to Fig. 18.

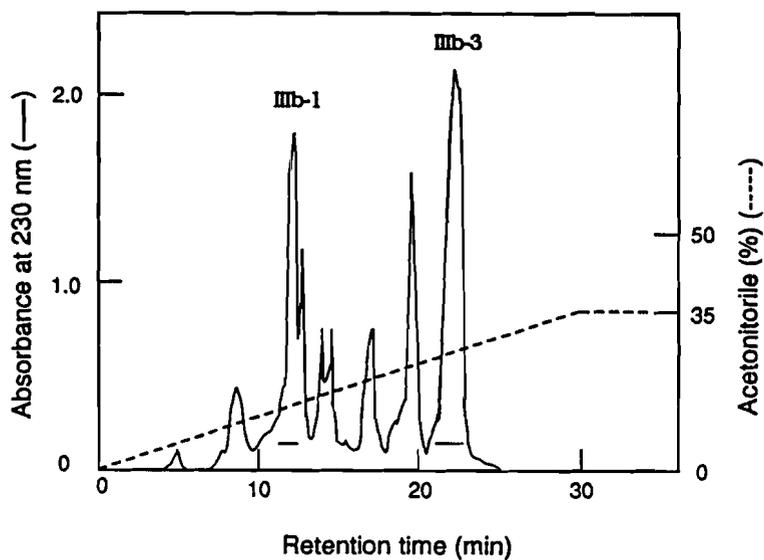


Fig. 20. Reversed-phase HPLC of fraction T-IIIb. The fraction T-IIIb in Fig. 16 was separated on a reversed-phase column as described in the legend to Fig. 18.

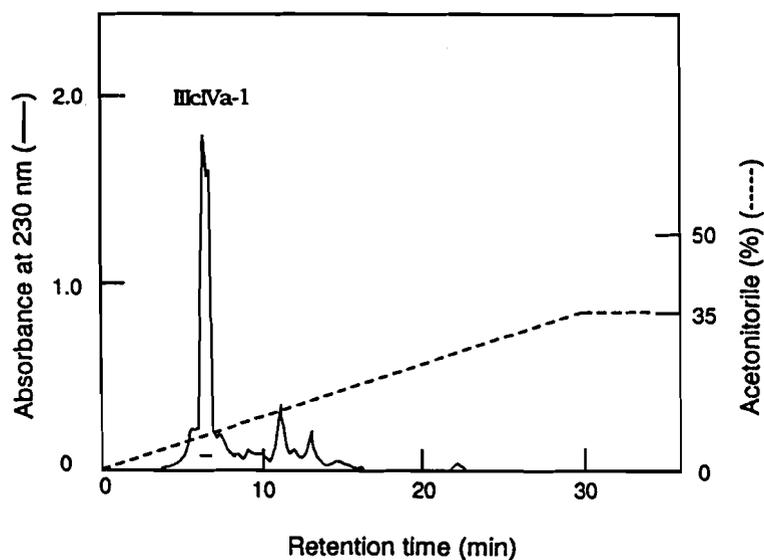


Fig. 21. Reversed-phase HPLC of fraction T-IIIcIVa. The fraction T-IIIcIVa which contains the fractions T-IIIc in Fig. 16 and T-IVa in Fig. 17 was separated on a reversed-phase column as described in the legend to Fig. 18.

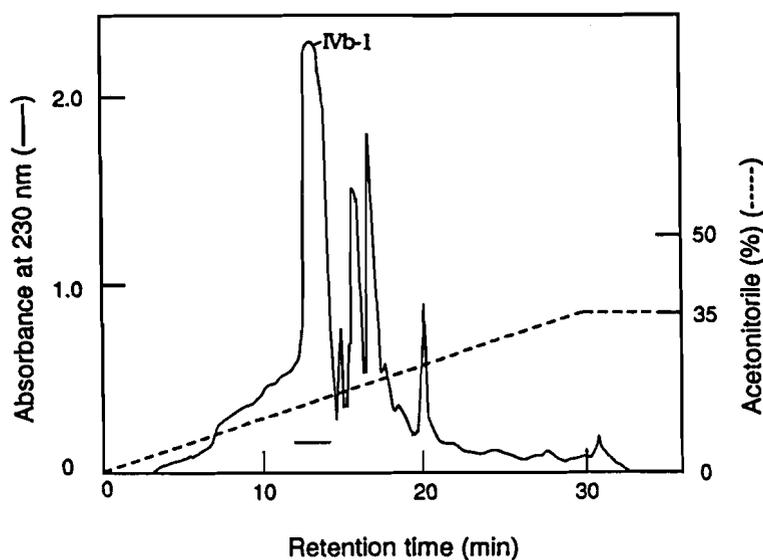


Fig. 22. Reversed-phase HPLC of fraction T-IVb. The fraction T-IVb in Fig. 17 was separated on a reversed-phase column as described in the legend to Fig. 18.

(2) シトラコニル化ASI-IのTPCK-トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列

得られた、TPCK-トリプシン消化ペプチドのアミノ酸組成をTable VIに示した。その結果、T-IIa-1とT-IIa-2、および、T-IIbIIIa-2とT-IIIb-3は、同一のペプチドであることが確認された。ASI-Iを、予めシトラコニル化し、リジン残基をブロックしたのは、TPCK-トリプシンによってArg-X結合のみを切断する目的であったが、得られたペプチドのなかには、アルギニン残基を含んでいないものもあり、非特異的な切断がおこっていることが予想された。また、Table VIに挙げたペプチドの組み合わせだけでは、ASI-Iの全アミノ酸残基数を計算できなかった。このため、TPCK-トリプシン消化ペプチドは、ASI-Iの配列を補佐する目的に用いた。

Table VIに挙げたペプチドのアミノ酸配列分析の結果をTable VIIにまとめた。

Table VI. Amino acid compositions of tryptic peptides from citraconylated ASI-I. Numbers in parentheses are those determined after sequence analysis.

Amino acid	IIa-1, IIa-2	IIbIIIa-2, IIIb-3	IIIb-1	IIIcIVa-1	IVb-1
Asp	1.4		2.1 (2)	1.9 (1)	2.0 (1)
Asn	(1)			(1)	(1)
Thr	4.9 (6)	2.7 (3)	1.2 (1)	0.9 (1)	
Ser	0.9 (1)	1.0 (1)	0.8 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)
Glu	5.9 (4)	4.3 (3)	5.0 (2)	1.3 (1)	1.1 (1)
Gln	(2)	(1)	(4)		
Pro	1.7 (2)	1.0 (1)	3.6 (3)		
Gly	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		
Ala	2.6 (3)	1.9 (2)			
1/2Cys					
Val	2.0 (2)	2.2 (2)	1.0 (1)	1.8 (2)	1.0 (1)
Met					
Ile					
Leu	1.7 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)
Tyr				1.0 (1)	0.9 (1)
Phe					
Lys	2.0 (2)	1.1 (1)		1.1 (1)	1.0 (1)
His					
Arg			0.9 (1)	0.9 (1)	
Trp	ND. (1) ^a	ND. (1)	ND.	ND.	ND.
Total	(27)	(17)	(17)	(11)	(8)
N-terminal	Gln	Thr	Gln	Leu	Leu
Yield (%)	33.2 ^b	20.6 ^c	48.4	23.1	36.6

a. Not determined. b. Sum of IIa-1 and IIa-2. c. Sum of IIbIIIa-2 and IIIb-3.

Table VII. Amino acid sequences of tryptic peptides from citraconylated ASI-I.

Peptide	Sequence
IIa-1	QALETNTPTK TSWPELVGVT AEQAETK
IIa-2	QALETNTPTK TSWPELVGVT AEQAETK
IIbIIIa-2	TSWPELVGVT AEQAETK
IIIb-1	QEQGTNPSQE QNVPLPR
IIIb-3	TSWPELVGVT AEQAETK
IIIcIVa-1	LYVDESNKVT R
IVb-1	LYVDESNK

(3) ASI-Iのリジルエンドペプチダーゼ消化物の分離、精製

TPCK-トリプシン消化で非特異的な切断が生じたことが予測されたため、より特異性の高いリジルエンドペプチダーゼによる消化を併せて行なった。消化物は、Sephadex G-50により粗分画し、K1-K8の各画分を得た(Fig. 23)。このうち、K2画分は、未消化のインタクトインヒビターであった。また、K2画分の前後の画分(K1, K3)と、マイナーなK4画分には、ペプチドが含まれていなかった。このため、これらの画分を除いた、K5、K6、K7、K8画分を以降のHPLCに供した。

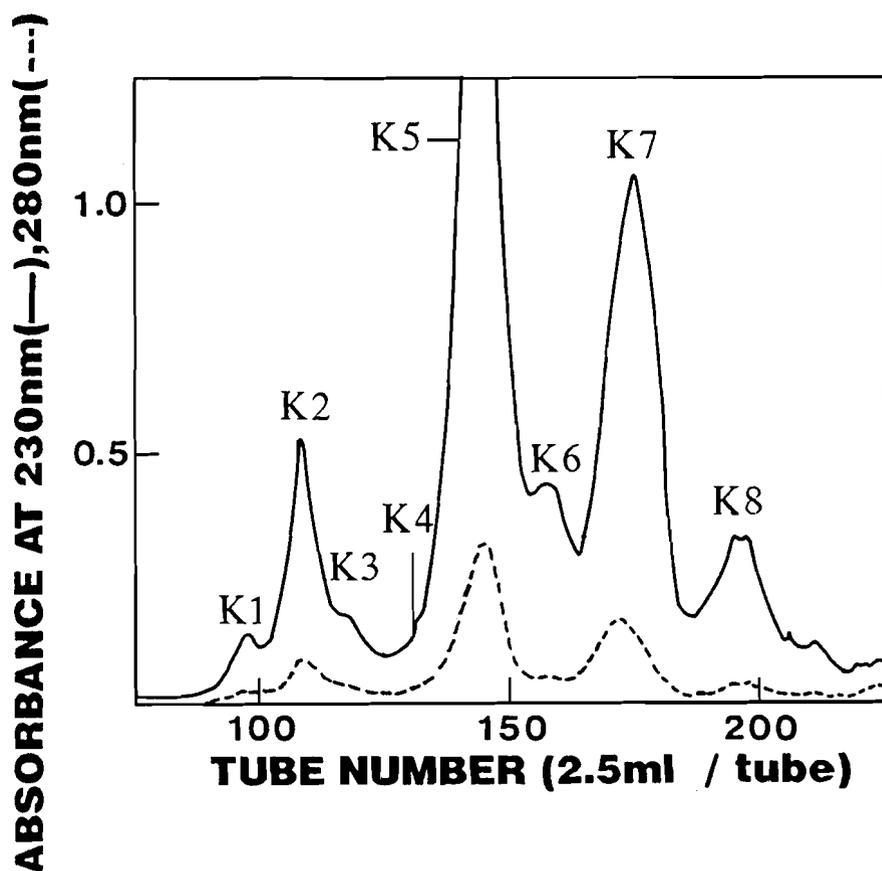


Fig. 23. Gel filtration of lysyl-endopeptidase digest of ASI-I. The digest (3.0 ml) was separated on a Sephadex G-50 column (1.8 x 180 cm) in 5 mM ammonium acetate buffer (pH 8.5) at a flow rate of 21 ml/h. Effluent Fractions of 2.5 ml were collected.

上記4画分は、凍結乾燥したのち、少量の0.05%TFAに溶解し、予め同溶液で平衡化しておいたChemcosorb 7 ODS H逆相カラムに供した。溶出は、TPCK-トリプシン消化物の場合と同様にアセトニトリルの直線濃度勾配法により行なった。流速は、0.7 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した。各々の、溶出パターンをFigs. 24-27に示した。

TPCK-トリプシン消化の場合よりも、比較的特異性の高い切断がおこっていることが示唆された。このようにして、得られた各ペプチドを配列分析の標品とした。

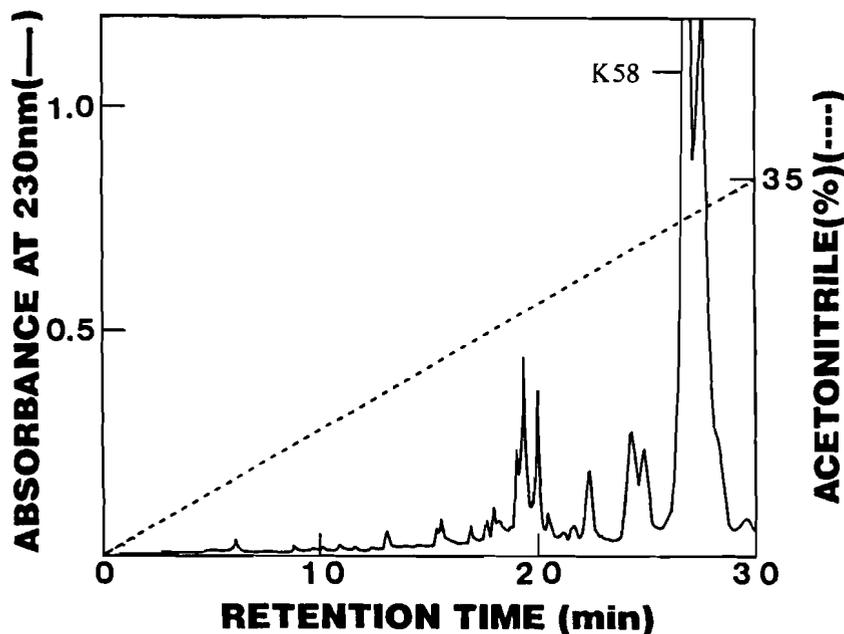


Fig. 24. Reversed-phase HPLC of fraction K5. The fraction K5 in Fig. 23 was dissolved in 1.5 ml of 0.05% TFA. A portion (100 μ l) was applied to a Chemcosorb 7 ODS H column (4.6 x 250 mm, C18) and peptides were eluted at a flow rate of 0.7 ml/min in 0.05% TFA with a linear gradient of acetonitrile (0-35%/30 min).

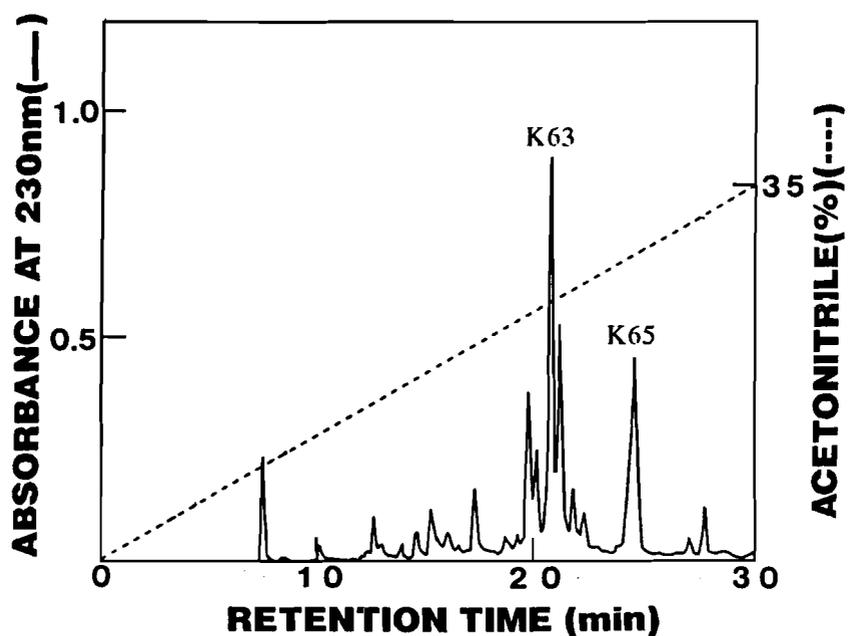


Fig. 25. Reversed-phase HPLC of fraction K6. Handling of the fraction K6 in Fig. 23 and the conditions for elution were the same as described in the legend to Fig. 24.

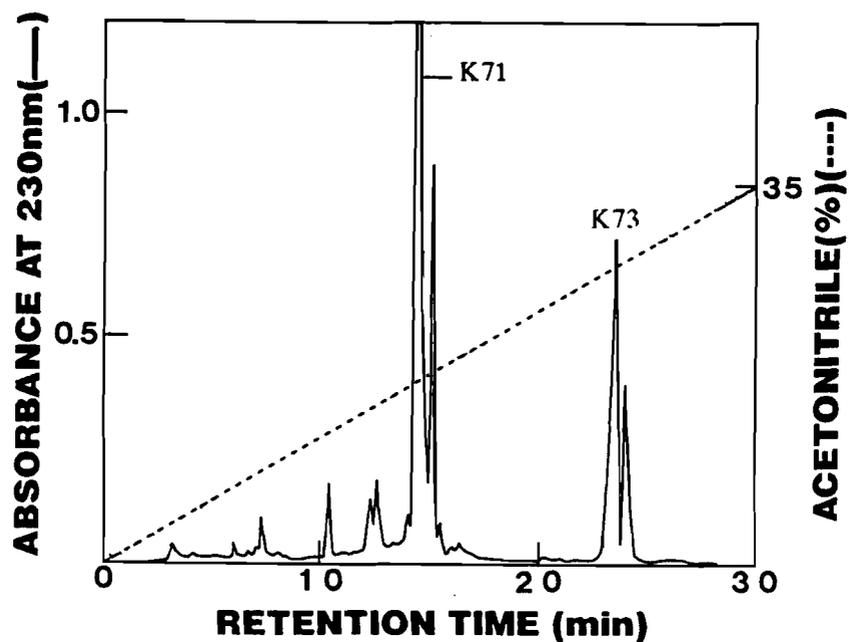


Fig. 26. Reversed-phase HPLC of fraction K7. Handling of the fraction K7 in Fig. 23 and the conditions for elution were the same as described in the legend to Fig. 24.

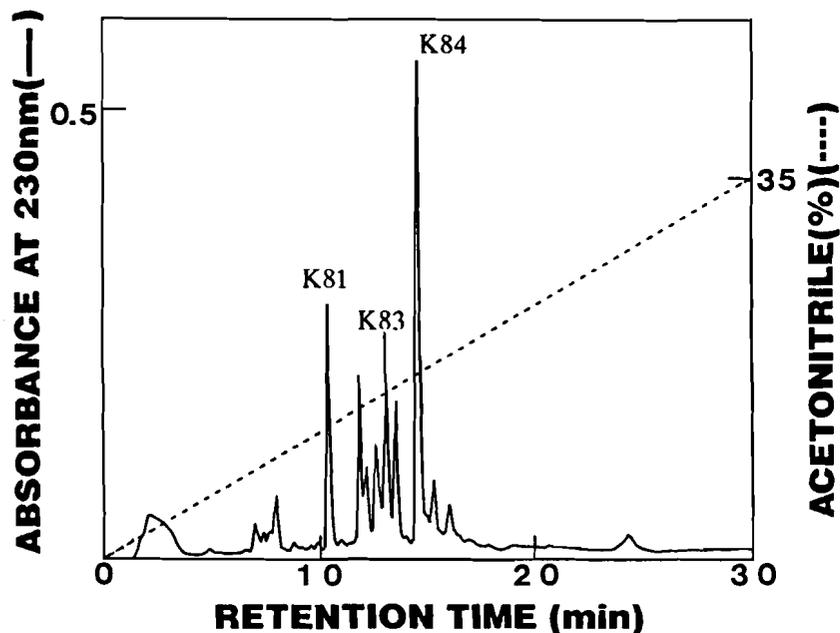


Fig. 27. Reversed-phase HPLC of fraction K8. Handling of the fraction K8 in Fig. 23 and the conditions for elution were the same as described in the legend to Fig. 24.

(4) ASI-Iのリジルエンドペプチダーゼ消化ペプチドのアミノ酸配列

得られたリジルエンドペプチダーゼ消化ペプチドのアミノ酸組成をTable VIIIに示した。また、そのアミノ酸配列分析の結果をTable IXにまとめた。ペプチドK58は、N末端より13残基分析することができた。残りの、ペプチドは全配列を分析できた。

このうち、K65とK73は、同一のペプチドであった。K58は、ASI-IのN末端側20残基のみが切断された部分消化ペプチドであることが示唆された。ペプチドK63、K65(K73)、K71、K81、K83、およびK84のアミノ酸残基数の合計は、ASI-Iの全アミノ酸残基数と一致した。

Table VIII. Amino acid compositions of lysyl-endopeptidase peptides from ASI-I. Numbers in parentheses are those determined after sequence analysis.

Amino acid	K-58	K-63	K-65,73	K-71	K-81	K-83	K-84
Asp	7.0 (4)	4.0 (3)	2.8	1.0	2.4 (1)		
Asn	(3)	(1)	(3)	(1)	(1)		
Thr	8.7 (9)	1.1 (1)	2.5 (3)	1.0 (1)	2.6 (3)	1.7 (2)	
Ser	4.7 (5)	1.6 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)	1.2 (1)
Glu	11.0 (7)	4.3 (2)	3.7 (3)	6.0 (2)	2.0 (1)	0.8	1.3 (1)
Gln	(4)	(2)	(1)	(4)	(1)		
Pro	4.6 (5)	2.2 (2)	0.8 (1)	3.2 (3)	0.8 (1)	1.1 (1)	
Gly	2.2 (2)		1.1 (1)	1.0 (1)		1.2 (1)	0.7
Ala	4.3 (4)	1.3 (1)	2.0 (2)		1.0 (1)	0.6	
1/2Cys							
Val	8.2 (9)	4.2 (4)	1.9 (2)	1.0 (1)		1.5 (1)	2.0 (2)
Met	1.0 (1)	1.0 (1)					
Ile	2.9 (3)	2.0 (2)			1.0 (1)		
Leu	3.0 (3)		1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)
Tyr	2.1 (2)	0.9 (1)		0.9 (1)		0.8 (1)	
Phe	1.3 (1)	1.0 (1)					
Lys	5.2 (5)	1.9 (2)	0.9 (1)	1.1 (1)	0.9 (1)		0.8 (1)
His	1.1 (1)	1.1 (1)					
Arg	3.1 (3)		1.0 (1)		0.8 (1)	1.7 (2)	
Trp	ND. (1) ^a	ND.	ND. (1)	ND.	ND.	ND.	ND.
Total	(72)	(26)	(17)	(20)	(10)	(8)	(11)
N-terminal	Gln	Ile	Thr	Gln	Gln	Val	Arg
Yield (%)	40.3	20.2	31.2 ^b	67.2	26.8	20.7	14.3

a. Not determined. b. Sum of K64 and K73.

Table IX. Amino acid sequences of lysyl-endopeptidase peptides from ASI-I.

Peptide	Sequence
K58	QALETNTPTK TSW---
K63	IKEEMVDVQI QVSPHDSFVT ADYNPK
K65	TSWPELVGVT AEQAETK
K71	QEQTNPSEQ QNVPLPRNYK
K73	TSWPELVGVT AEQAETK
K81	QALETNTPTK
K83	VTRTPSIG
K84	RVRLYVDESN K

ペプチドK71のN末端側3残基の配列は、インタクトASI-Iのものと同じであった。さらに、ペプチドK71とK58の構成アミノ酸残基数の合計は、インタクトASI-Iのそれと一致した。よって、ペプチドK71はASI-IのN末端に位置するペプチドであると推定した。また、ペプチドK81の配列は、K58のN末端側の配列と完全に一致し、ペプチドK81のあとにK65(73)が続くことも推察された。得られたペプチドのうち、K83は、唯一、リジン残基を欠いており、ASI-IのC末端ペプチドと考えられる。

以上の結果から、得られたリジルエンドペプチダーゼ消化ペプチドの順序は、

K71—K58

また、

K71—K81—K65(K73)—(K-63, K-84)—K83

と推定された。

一方、ASI-IIと、ASI-Iの部分消化物であるペプチドK58のアミノ酸組成およびアミノ酸配列を比較したところ、ASI-IIからN末端リジンを除いたものが、ペプチドK58であると推察された。

(5) ASI-Iの*S. aureus* V8-Protease消化物の分離、精製

TPCK-トリプシン消化、または、リジルエンドペプチダーゼ消化で得られたペプチドのオーバーラッピングを行なう目的で、更に、特異性の異なる*S. aureus* V8-ProteaseでASI-Iを消化した。

消化物のSephadex G-50による溶出パターンをFig. 28に示す。得られたSV1、SV2の2画分は、凍結乾燥したのち、少量の0.05%TFAに溶解し、予め同溶液で平衡化しておいたChemcosorb 7 ODS H逆相カラムに供した。溶出は、TPCK-トリプシン消化物の場合と同様にアセトニトリルの直線濃度勾配法により行なった。流速は、0.7 ml/minないし1.0 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した。各々の、溶出パターンをFigs. 29、30に示した。

ここで得られたペプチドのうち、主にリジルエンドペプチダーゼ消化で得られたペプチドのオーバーラッピングが可能なもの、すなわち、リジン残基を含む各ペプチドを配列分析の標品とした。

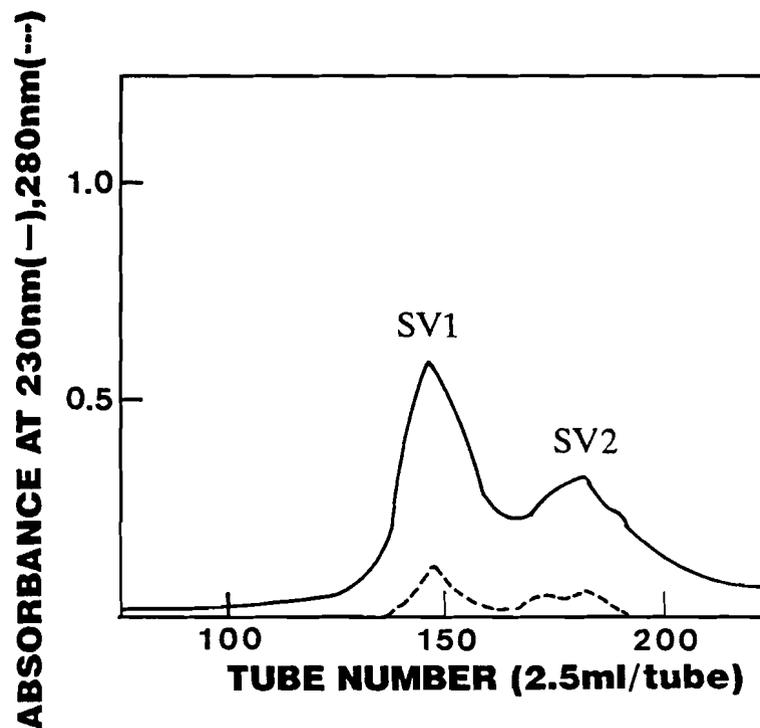


Fig. 28. Gel filtration of *S. aureus* V8-Protease digest of ASI-I. The digest (1.0 ml) was separated as described in the legend to Fig. 23. Fractions of 2.5 ml were collected.

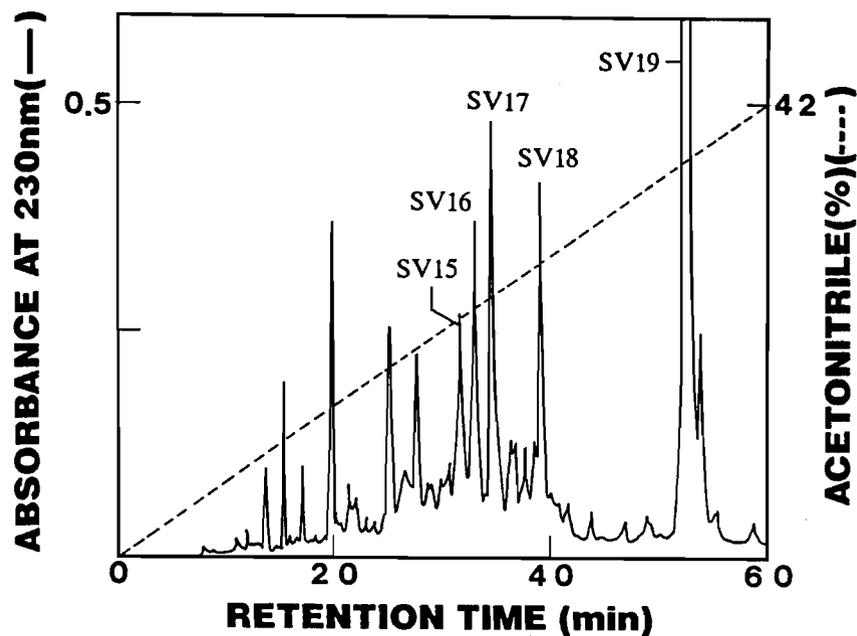


Fig. 29. Reversed-phase HPLC of fraction SV1. The fraction SV1 in Fig. 28 was dissolved in 2 ml of 0.05% TFA. A portion (200 μ l) was applied to a Chemcosorb 7 ODS H column (4.6 x 250 mm, C18) and peptides were eluted at a flow rate of 0.7 ml/min in 0.05% TFA with a linear gradient of acetonitrile (0-42%/h).

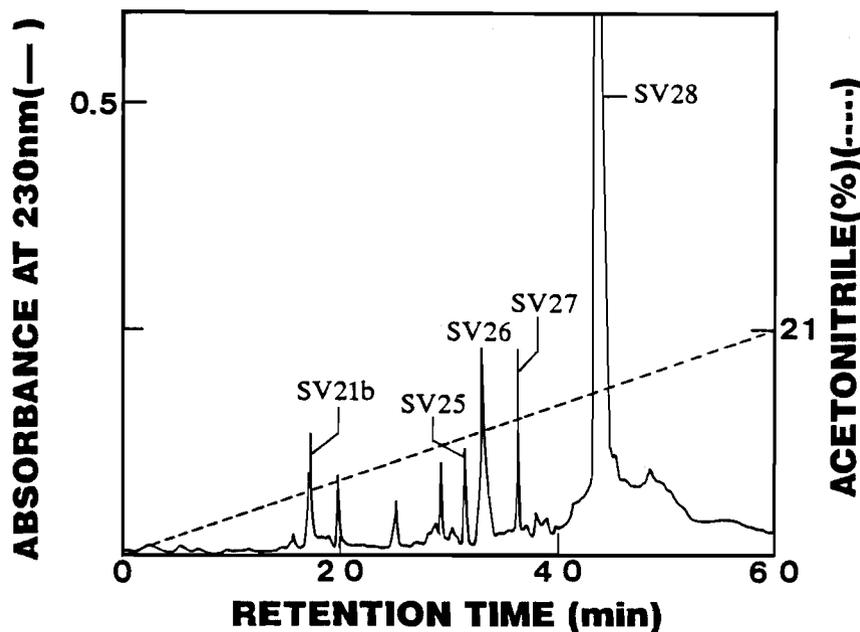


Fig. 30. Reversed-phase HPLC of fraction SV2. Handling of the fraction SV2 in Fig. 28 was the same as described in the legend to Fig. 29. Peptides were eluted at a flow rate of 1.0 ml/min in 0.05% TFA with a linear gradient of acetonitrile (0-21%/h).

(6) ASI-Iの*S. aureus* V8-Protease消化物のアミノ酸配列

得られた*S. aureus* V8-Protease消化ペプチドのアミノ酸組成をTable Xに示した。また、そのアミノ酸配列分析の結果をTable XIにまとめた。ペプチドSV19は、N末端より13残基分析することができた。残りの、ペプチドは全配列を分析できた。

ペプチドSV17、SV28、SV21b、SV25、SV26は、各々、リジルエンドペプチダーゼペプチドであるK71とK81、K81とK65(K73)、K65(K73)とK63、K63とK84、K84とK83をオーバーラップすることができた。また、ペプチドSV18とSV27の配列分析により、リジルエンドペプチダーゼペプチドK63、K65(73)の配列が正しいことが確認できた。なお、ペプチドSV25は、アミノ酸組成とアミノ酸配列分析の結果が、若干異なっていたが、配列分析においては、他のペプチド成分の混在は検出されなかった。ペプチドSV25は、他のペプチドに比べて収量が低いことから、両分析結果の違いは、アミノ酸組成分析時における検出感度上の測定誤差に因るものではないかと考えている。

ペプチドSV19は、リジルエンドペプチダーゼ消化の時に得られたペプチドK58と同様、ASI-Iの部分消化物である。両部分消化ペプチドの切断部位から判断して、ASI-Iの20残基目周辺は、もっとも酵素消化を受けやすい部位であると示唆された。

Table X. Amino acid compositions of *S. aureus* V8-Protease peptides from ASI-I. Numbers in parentheses are those determined after sequence analysis.

Amino acid	SV-17	SV-18	SV-19	SV-21b	SV-25	SV-26	SV-27	SV-28
Asp	3.0	2.0 (2)	6.7 (4)		2.0 (1)	1.0		1.0
Asn	(3)		(3)		(1)	(1)		(1)
Thr	1.1 (1)	1.3 (1)	8.7 (9)	0.8 (1)		2.1 (2)	1.0 (1)	3.8 (4)
Ser	1.0 (1)	1.7 (2)	4.6 (5)			1.6 (2)		0.8 (1)
Glu	5.6 (4)	2.0	8.8 (6)	1.2 (1)	2.3 (1)		1.1 (1)	1.0 (1)
Gln	(2)	(2)	(3)					
Pro	3.6 (3)	1.2 (1)	4.7 (5)		0.7 (1)	1.2 (1)		2.0 (2)
Gly	1.2 (1)		2.2 (2)			1.2 (1)	1.0 (1)	
Ala	1.1 (1)	1.0 (1)	3.1 (3)		0.6		1.0 (1)	
1/2Cys								
Val	1.2 (1)	3.3 (3)	8.3 (9)		2.8 (2)	1.3 (1)	2.1 (2)	
Met			0.9 (1)					
Ile		1.0 (1)	2.9 (3)	1.0 (1)		1.2 (1)		
Leu	1.9 (2)		2.0 (2)		0.8 (1)		1.1 (1)	
Tyr	0.8 (1)		1.9 (2)		1.7 (2)			
Phe		0.8 (1)	1.0 (1)					
Lys	1.1 (1)		4.8 (5)	1.9 (2)	0.7 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)
His		0.8 (1)	1.0 (1)					
Arg	1.0 (1)		2.9 (3)		1.8 (2)	1.2 (1)		
Trp	ND. ^a	ND.	ND. (1)	ND.	ND.	ND.	ND.	ND. (1)
Total	(22)	(15)	(68)	(5)	(12)	(11)	(7)	(11)
N-terminal.	Gln	Val	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Thr
Yield (%)	26.8	31.4	49.3	22.3	14.4	39.6	28.8	37.8

a. Not determined.

Table XI. Amino acid sequences of *S. aureus* V8-Protease peptides from ASI-I.

Peptide	Sequence
SV17	QGTNPSQEQN VPLPRNYKQA LE
SV18	VQIQVSPHDS FVTAD
SV19	TNTPTKTSWP ELV---
SV21b	TKIKE
SV25	YNPKRVRLYV DE
SV26	SNKVTRTPSI G
SV27	LVGVTAE
SV28	TNTPTKTSWP E

第3項 ASI-IIのアミノ酸配列

(1) ASI-IIの*S. aureus* V8-Protease消化物の分離、精製

ASI-IIの全一次構造を確認するため、ASI-Iとのオーバーラップを目的としてASI-IIの*S. aureus* V8-Proteaseによる消化を行なった。

消化物のSephadex G-50による溶出パターンをFig. 32に示す。得られたII-SV1、II-SV2の2画分は、凍結乾燥したのち、少量の0.05%TFAに溶解し、予め同溶液で平衡化しておいたChemcosorb 7 ODS H逆相カラムに供した。溶出は、TPCK-トリプシン消化物の場合と同様にアセトニトリルの直線濃度勾配法により行なった。流速は、0.7 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した。各々の、溶出パターンをFigs. 33、34に示した。

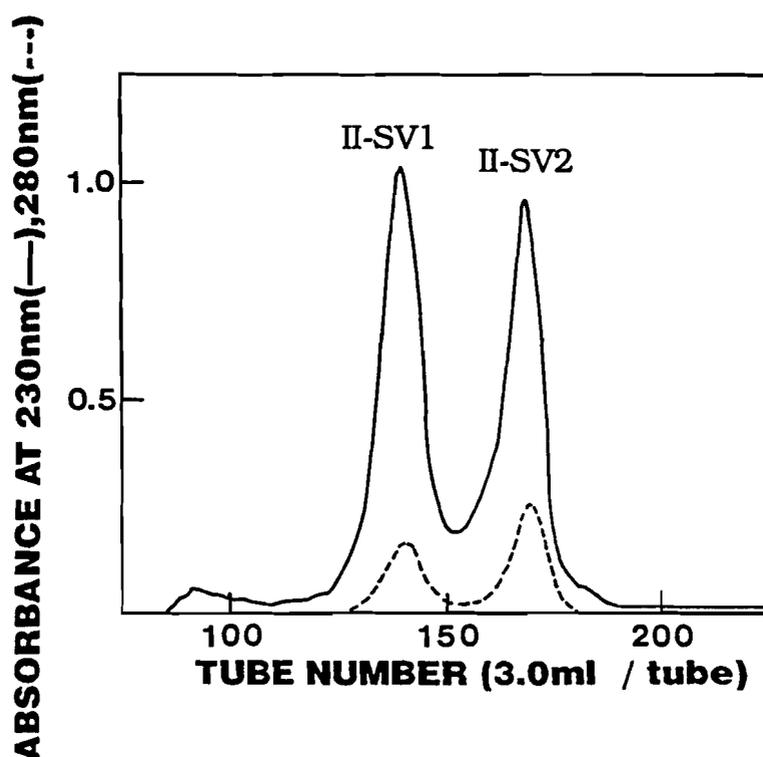


Fig. 32. Gel filtration of *S. aureus* V8-Protease digest of ASI-II. The digest (2.0 ml) was separated as described in the legend to Fig. 23. Fractions of 3.0 ml were collected.

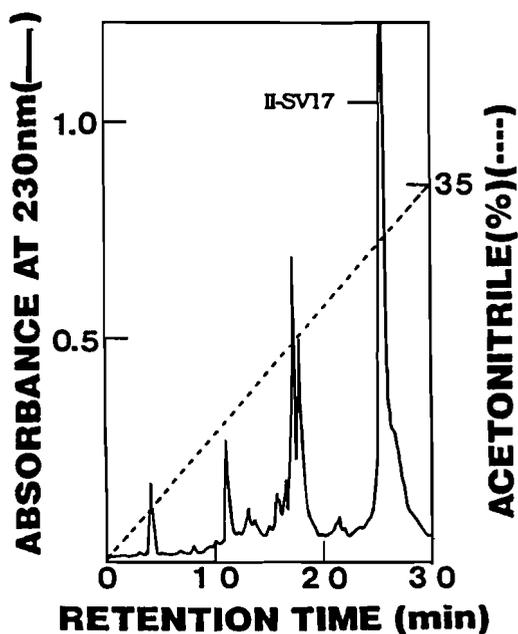


Fig. 33. Reversed-phase HPLC of fraction II-SV1. Handling of the fraction II-SV1 in Fig. 32 and the conditions for elution were the same as described in the legend to Fig. 24.

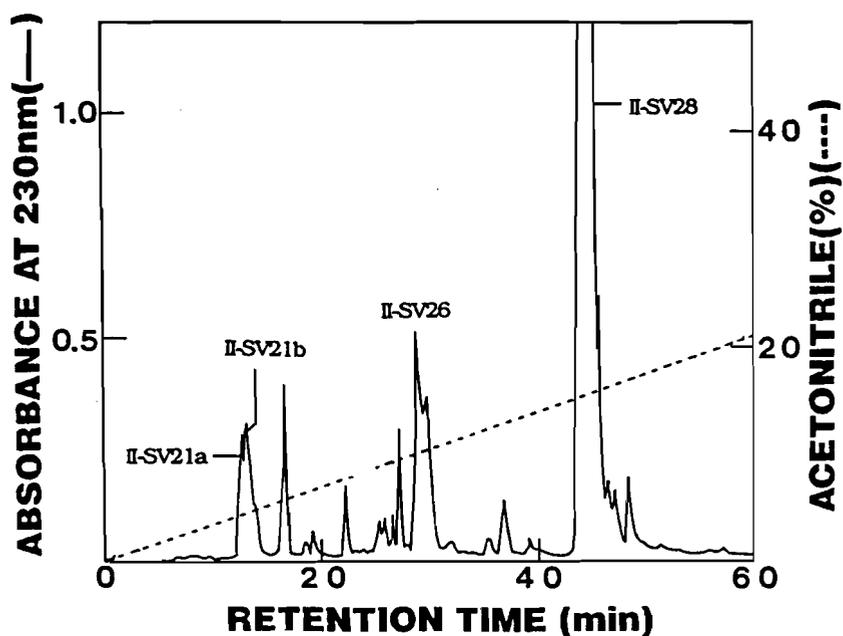


Fig. 34. Reversed-phase HPLC of fraction II-SV2. Handling of the fraction II-SV2 in Fig. 32 and the conditions for elution were the same as described in the legend to Fig. 30.

(2) ASI-IIの*S. aureus* V8-Protease消化物のアミノ酸配列

得られた*S. aureus* V8-Protease消化ペプチドのアミノ酸組成をTable XIIに示した。また、そのアミノ酸配列分析の結果をTable XIIIにまとめた。ペプチドII-SV17は、N末端より18残基分析することができた。残りのペプチドは、全配列を分析できた。

ペプチドII-SV21aのアミノ酸配列は、インタクトASI-IIのN末端配列に一致しており、このペプチドがASI-IIのN末端に位置するペプチドであることがわかった。ペプチドII-SV21aとII-SV17の構成アミノ酸残基数の合計は、ASI-IIの全アミノ酸残基に一致し、さらに、ASI-Iの20残基目のリジン以降のアミノ酸残基数と一致した。

ペプチドII-SV17は、ASI-Iの消化で得られた部分消化ペプチドSV19とアミノ酸組成が一致していた。両者のN末端側のアミノ酸配列も分析した範囲において完全に一致し、異なるタンパク質から得られたこれらの両ペプチドが同一のペプチドであることが示された。

また、ASI-IIから得られたペプチドII-SV28、II-SV21b、II-SV26のアミノ酸配列は、ASI-Iの25-35残基、46-50残基、82-92残基の配列と完全に一致することが確認された(Fig. 35)。

Table XII. Amino acid compositions of *S. aureus* V8-Protease peptides from ASI-II. Numbers in parentheses are those determined after sequence analysis.

Amino acid	II-SV17	II-SV21a	II-SV21b	II-SV26	II-SV28
Asp	7.0 (4)			1.0	1.0
Asn	(3)			(1)	(1)
Thr	8.6 (9)		1.0 (1)	1.9 (1)	3.5 (4)
Ser	4.5 (5)			1.8 (2)	0.8 (1)
Glu	9.0 (6)	2.1 (1)	1.1 (1)		1.0 (1)
Gln	(3)	(1)			
Pro	5.8 (5)			1.0 (1)	2.1 (3)
Gly	2.1 (2)			1.0 (1)	
Ala	3.0 (3)	1.0 (1)			
1/2Cys					
Val	8.4 (9)			1.0 (1)	
Met	0.8 (1)				
Ile	2.9 (3)		1.0 (1)	1.0 (1)	
Leu	2.1 (2)	1.0 (1)			
Tyr	2.0 (2)				
Phe	1.0 (1)				
Lys	5.0 (5)	1.3 (1)	2.0 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)
His	1.0 (1)				
Arg	3.0 (3)			1.0 (1)	
Trp	ND. (1) ^a	ND.	ND.	ND.	ND. (1)
Total	(68)	(5)	(5)	(11)	(11)
N-terminal	Lys	Lys	Thr	Ser	Thr
Yield (%)	40.9	31.0	24.4	42.2	30.0

a. Not determined.

Table XIII. Amino acid sequences of *S. aureus* V8-Protease peptides from ASI-II.

Peptide	Sequence
II-SV17	TNTPTKTSWP ELV---
II-SV21a	KQALE
II-SV21b	TKIKE
II-SV26	SNKVTRTPSI G
II-SV28	TNTPTKTSWP E

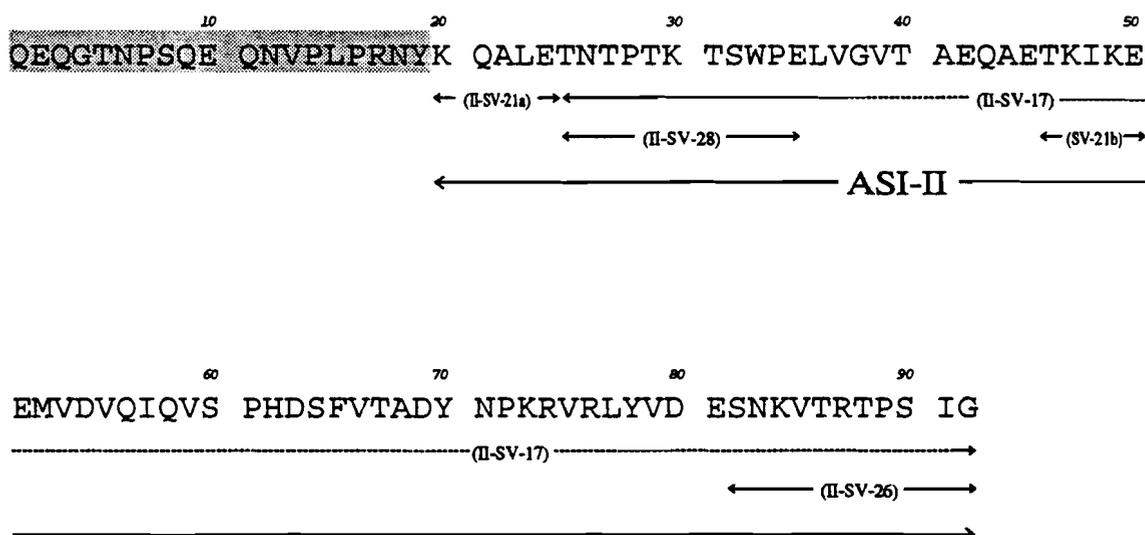


Fig. 35. Amino acid sequence of ASI-II. The peptides which were obtained from digests with *S. aureus* V8-Protease (II-SV-) are arranged on the sequence of ASI-I. The numbering refers to the sequence of ASI-I. The amino-terminal 19 residues of ASI-I indicated with shadow are lost in the sequence of ASI-II. Dotted line region was not sequenced.

以上の結果から、ASI-IIのアミノ酸配列は、ASI-Iの20残基目のリジンからC末端グリシンまでの配列と同一であると決定した。すなわち、ASI-IIはASI-IのN末端側19残基のペプチドが欠落した形態の73残基のアミノ酸で構成されるインヒビターで、その分子量は8600と計算された。

ASI-Iの酵素消化実験において部分消化ペプチドが得られたが、それらの切断部位はASI-Iの20-21残基、24-25残基であった。このことから、ASI-Iの20残基目周辺はプロテイナーゼによる攻撃を受けやすい部位と考えられる。ASI-IIが、20残基目以降のASI-Iに相当することを考え合わせると、ASI-Iの19-20残基の結合が内在するプロテイナーゼなどにより修飾を受け、ASI-IIが生じたことが推定される。

第4項 ASIの阻害反応部位

ASI-IIのズブチリシンによる限定水解物は、逆相HPLCにより分離、精製した。溶出は、上記と同様に、0.05%TFAと70%のアセトニトリルを含む0.05%TFAを用いた、有機相の直線濃度勾配法により行なった。流速は、1.0 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した(Fig. 36)。

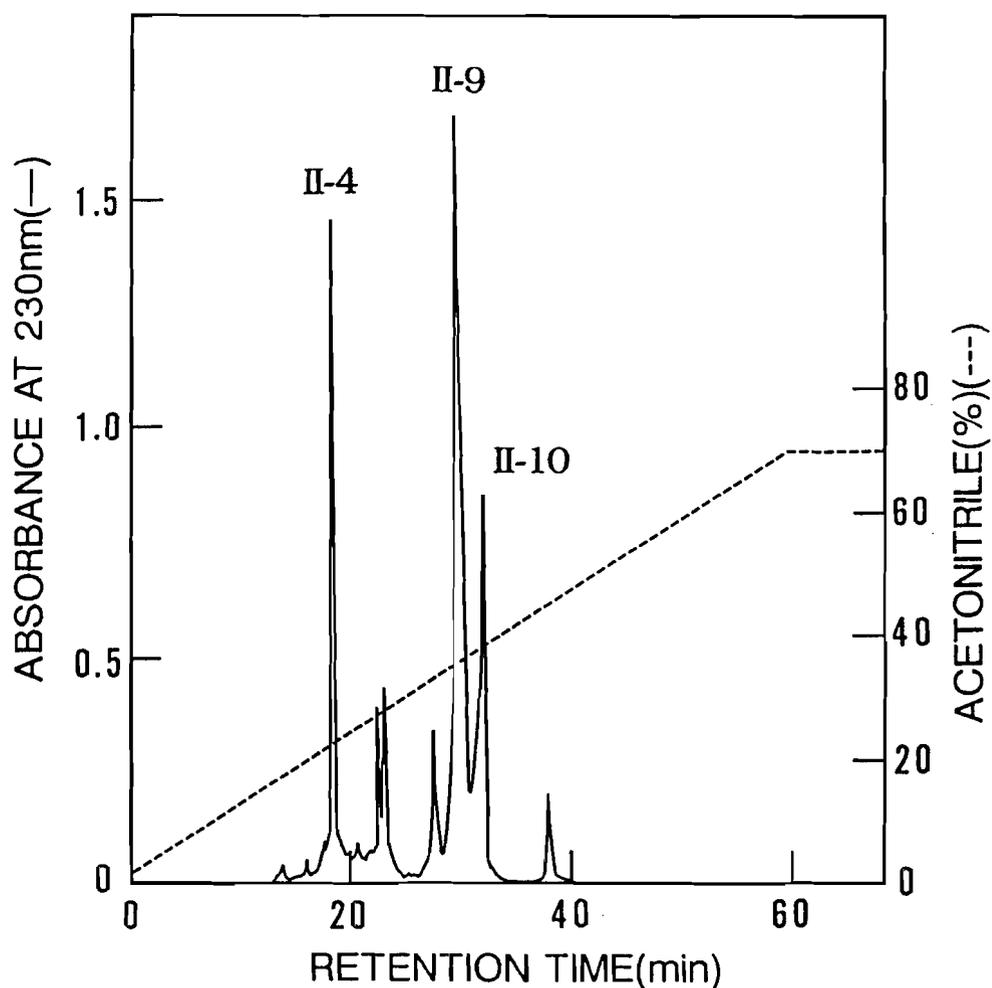


Fig. 36. Reversed-phase HPLC of limited hydrolyzate of ASI-II. After limited hydrolysis of ASI-II (140 nmol) with catalytic amount of subtilisin (1.6 nmol), the digest was separated on a Chemcosorb 7 ODS H column (4.6 x 250 mm) using a linear gradient of 2-70% AcCN in 0.05% TFA for 60 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

得られた3つのペプチドのアミノ酸組成、およびアミノ酸配列を分析したところ、ペプチドII-9は、未消化のASI-IIであることがわかった(Table XIV)。また、ペプチドII-4、II-10のアミノ酸残基数の合計は、インタクトASI-IIの構成アミノ酸残基数と一致しており、先に記した条件で反応部位の特異的な切断がおこることが確認できた。

Table XIV. Amino acid compositions of the peptides derived from modified ASI-II by subtilisin. Numbers in parentheses are those calculated for the corresponding sequence of ASI-II.

Amino acid	Fraction		
	II-4	II-9	II-10
Asp	3.8 (2)	7.4 (4)	3.2 (2)
Asn	(2)	(3)	(1)
Thr	1.9 (2)	9.1 (9)	6.8 (7)
Ser	2.0 (2)	4.6 (5)	2.6 (3)
Glu	2.0 (1)	11.2 (7)	9.7 (6)
Gln		(4)	(4)
Pro	1.9 (2)	5.0 (5)	2.9 (3)
Gly	1.7 (1)	2.1 (2)	0.9 (1)
Ala	0.5	4.0 (4)	3.9 (4)
1/2Cys			
Val	2.9 (3)	8.6 (9)	5.6 (6)
Met		0.6 (1)	0.4 (1)
Ile	1.0 (1)	3.0 (3)	1.9 (2)
Leu	0.9 (1)	3.0 (3)	2.0 (2)
Tyr	1.6 (2)	1.8 (2)	
Phe		1.1 (1)	1.0 (1)
Lys	2.3 (2)	6.0 (6)	3.9 (4)
His		1.1 (1)	1.0 (1)
Arg	2.6 (3)	3.1 (3)	
Trp	ND. ^a	ND. (1)	ND. (1)
Total	(24)	(49)	(73)
N-terminal sequence	DYN-	KQA-	KQA-
Yield (%)	30.3	35.5	12.9

a. Not determined.

ペプチドII-10は、インタクトASI-IIのN末端と同じアミノ酸配列を持ち、反応部位からN末端側のフラグメントに相当することがわかった。ペプチドII-4のアミノ酸配列は、ASI-IIの50残基目のアスパラギン酸からC末端グリシンまでの配列と完全に一致した。以上の結果から、ズブチリシンに対

する反応部位は、ASI-IIの49-50残基に相当するAla-Aspであると決定した。この反応部位は、ASIの主要分子型であるASI-Iのアミノ酸配列上では69-70残基に対応する(Figs. 31, 35)。

反応部位のN末端側アミノ酸(P_1 アミノ酸)は、阻害標的酵素の基質特異性に対応することがわかっているが、ASIの場合も、 P_1 アミノ酸はアラニンで、ズブチリシンの基質特異性に一致していた。

第3節 考察

ASIのアミノ酸配列を他のプロテイナーゼインヒビターの配列と比較したところ、ポテトI型に属するインヒビターとの高い相同性が確認された(Fig. 37)。ASI-Iとの相同性は、同じマメ科(Leguminosae)の broad beanズブチリシンインヒビター(VSI) (41)がもっとも高く68%であった。イネ科(Gramineae)の大麦のインヒビターCI-2、CI-1C (53, 54)とは、それぞれ41%、39%の相同性を、また、ナス科(Solanaceae)のポテトI型インヒビター(PI-I) (49)、トマトI型インヒビター(TI-I) (52)とは、33%、29%の相同性を示した。環型動物(Annelida)の蛭類(Hirudinea)のインヒビターEglin C (55)とも31%の相同性を示した。

ASI-Iは、このファミリーの中で、最も長い配列を有しているが、インヒビター間の相同性は、ASI-Iの30残基目のリジン残基からC末端側にみられる。ASI-IのN末端側29残基に相当する部分は、配列の長さもまちまちで、インヒビター間での相同性は全く見られない。ASI-IとASI-IIには、阻害機能上の差異が見られないことから考えても、このN末端側領域は、インヒビターの阻害活性に寄与していないことが推察できる。

ASI-Iの30残基目以降では、ASIとVSIの差は、わずかに20残基で、反応部位も完全に一致している。また、両者のみで一致している領域は、他のいずれのインヒビターとも顕著な相同性はない。一般に、タンパク質分子の配列相同性は、共通の祖先遺伝子からの分岐によるものと、機能上の収斂によるものに大別されるが、ASIとVSIの場合は、共通の遺伝子からの分岐ではないかと予測される。

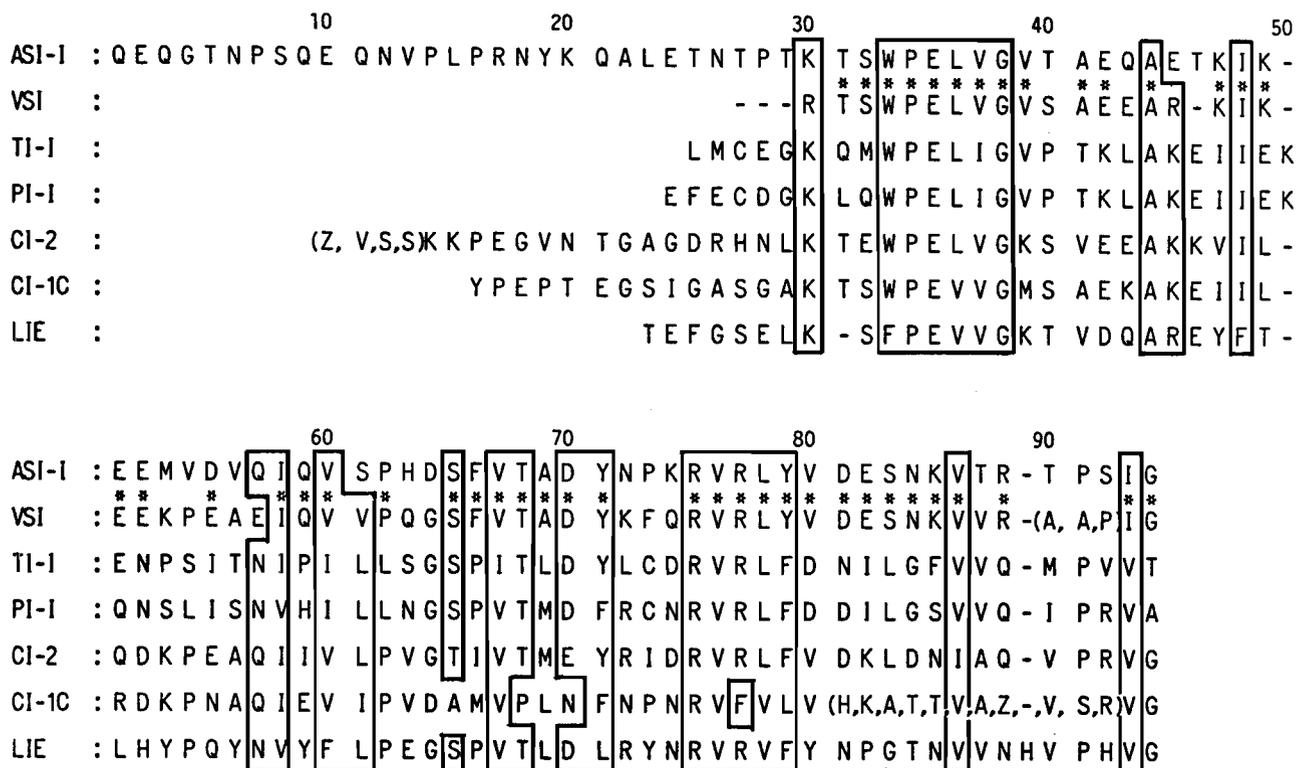


Fig. 37. Comparison of the amino acid sequence of adzuki subtilisin inhibitor I (ASI-I) with those of broad bean subtilisin inhibitor (VSI) (41), tomato leaf Inhibitor I (TI-I) (52), potato tuber Inhibitor I (PI-I) (49), barley chymotrypsin inhibitors (CI-2, CI-1C) (53, 54), and the leech inhibitor eglin C(LIE) (55). Identical and conservative sequences in seven inhibitors are boxed. Asterisks (*) indicate identical and conservative sequences between ASI-I and VSI. Solid bars (—) indicate gaps introduced to obtain maximal homology among the sequences. The dotted line (---) indicates the amino-terminal sequence of VSI not yet determined. The numbering refers to the sequence of ASI containing 2 gaps (positions 50 and 89). The residues at positions 69 and 70 are the P₁-P₁' sequences at the reactive sites of the inhibitors.

これまでに得られた、キモトリプシンインヒビターの反応部位P₁アミノ酸は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、メチオニンである(18)。ポテトI型インヒビターのうち、マメ科以外のものは、P₁位にロイシン、またはメチオニンを有しており、ズブチリシンとともにキモトリプシン阻害活性を示す。マメ科のASI、VSIはともに、アラニンがP₁位を占め、キモトリプシンを阻害しない。ポテトI型インヒビターの場合、その阻害機能の差は、P₁アミノ酸の変異によって生じていることがわかる。このファミリーのうち、ポテト、およびトマトから得られたインヒビター、PI-I、TI-Iはともにトリプシンを弱く阻害する(9, 10)。トリプシンに対応し

た反応部位は、キモトリプシン阻害反応部位とは別に存在し、PI-Iの場合、Lys(50)-Gln(51)、TI-IではLys(50)-Glu(51)と同定されている(Fig. 37)。この領域は、トリプシンを阻害しない他のインヒビターには存在せず、トリプシンに対する阻害特異性の差が、Lys(50)の欠損に因るものであることがアミノ酸配列上から確認できる。

ポテトI型と同種のインヒビターは、上記の他に、パン酵母(59)、ウリ科の*Momordica charantia* (60)、アワ(foxtail millet: *Setaria italica*) (61)からも報告されている。この様な、動物、植物、微生物界にまたがる広い分布は、他のインヒビターファミリーにはみられず、ポテトI型インヒビターの生理学的重要性が示唆される。

ポテトI型ファミリーは、他のインヒビターグループにはみられない、非常に際立ったタンパク質化学的特徴を有している。他のファミリーのインヒビターは、分子内にS-S結合を幾つか有しており、阻害反応部位は、いずれかのS-Sループ上に存在している。一般に、阻害反応部位で切断を受けた修飾インヒビターは、もとのインヒビターとほぼ同じ酵素阻害活性を有しているが、この現象は、限定水解によって解離した反応部位P₁位、およびP₁'位の両アミノ酸が、分子内S-S結合によって保持されている、あるいは、活性発現に必須の構造がS-S結合によって維持されているからだと説明されてきた(18)。

ポテトI型インヒビターは、ASIの様に、分子内S-S結合が存在しないものが多く、インヒビタータンパク質の構造は、非共有結合によってのみ維持されている。このうち、ナス科から得られたインヒビター、PI-I、TI-Iはその分子内にS-S結合を1個有しているが、Ryanらは、PI-Iの分子内S-S結合を還元カルボキシメチル化して得た化学修飾インヒビターが、もとのPI-Iと全く同じキモトリプシン阻害活性を維持していることを確認し、これが阻害活性発現に無関係であることを証明した(62)。このように、活性発現に必須の構造を保持するために、分子内S-S結合が必要ではないことが確認されたインヒビターは、ポテトI型ファミリーだけである。

近年、タンパク質工学の進歩に伴って、タンパク質の構造と機能に関す

る研究が盛んであるが、ASIのような、ポテトI型ファミリーのインヒビターは、タンパク質の構造と機能の関係、特に非共有結合による、タンパク質分子間の相互作用を研究する上で、よい材料であると考えられる。

第4節 小括

アズキ種子ズブチリシンインヒビター、ASI-I、IIの完全アミノ酸配列を手動DABITC法によって決定した。その結果、これらが、ポテトI型インヒビターであることが確認された。ASI-Iは、このファミリーの中で最も長い配列(92残基)を有しており、ASI-IIは、ASI-IのN末端側19残基のペプチドが欠落した低分子型ASI(73残基)であることが確認された。

ポテトI型インヒビターは、分子内S-S結合が、インヒビターの阻害活性発現とは無関係であることが確認された唯一のインヒビターファミリーである。ASIを含めた、これらポテトI型インヒビターの大半のものは、分子内の非共有結合相互作用によってのみ、その構造を保持しており、タンパク質の構造と機能の関係を研究する際の、貴重な材料であることが示唆される。

第5章 アズキ種子ズブチリシンインヒビターの断片化と再構築

一般に、反応部位を標的酵素で限定水解して得られる、修飾インヒビターは、もとのインヒビターとほぼ同じ阻害活性を有している。これは、反応部位ペプチド結合が切断していても、分子内S-S結合、ないしは、分子内外の非共有結合により、活性発現に必須の構造が維持されているからだ説明されている。

本章では、分子内S-S結合を持たない、ポテトI型インヒビター、ASIを材料にして、反応部位で切断を受けた2つのペプチドフラグメントが、活性型ASIに再構築される機構について述べるとともに、これらのフラグメント間の非共有結合的な相互認識機構について考察する。

第1節 材料と方法

第1項 材料

ASIは、第2章で述べたようにして精製した。このうち、本章では、ASI-IIを材料として用いた。

Pharmacia Fast Protein Liquid Chromatography system (FPLC system)に用いた Superose 12 HR 10/30カラム(10 x 300 mm)は、Pharmacia LKB Biotechnology 社より購入した。逆相HPLCには、第4章と同様にケムコ社のChemcosorb 7 ODS H カラム(4.6 x 250 mm, C18)を用いた。

阻害活性測定、およびアミノ酸配列分析に用いた試薬は、それぞれ第2章、第4章に記述したのと同様のものを使用した。

第2項 高速液体クロマトグラフィー

(1) Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

E-I複合体の分離は、Superose 12 カラム(10 x 300 mm)を用いたFPLCで行なった。FPLC装置は、Pharmacia model P-500ポンプ、およびPharmacia model GP-250+グラジエントプログラマーを使用した。

ペプチドの検出および記録は、日立L-4000型UV-検出器、およびPantos

model U-228 Unicorderを用いた。FPLCゲルろ過の詳細な条件は、本章第2節「結果」に記した。

(2) HPLC

反応部位の切断、および、生じたフラグメントの分離は、逆相HPLCを用いて行なった。HPLC装置は、第4章に記したのと同様のものを用いた。逆相HPLCの詳細な条件は、本章第2節「結果」に記した。

第3項 アミノ酸組成分析

ペプチドのアミノ酸組成分析は、第3章で述べた方法を改良し、試料を、0.01% phenol、および0.2% 2-mercaptoethanolを含む5.7 N HClに溶解し、減圧下で封管後、115° Cで24時間加水分解した。加水分解物は、日立アミノ酸自動分析機L-8500型に供して分析した。

第4項 アミノ酸配列分析

ペプチドのアミノ酸配列分析は、第4章で述べたのと同様に、ChangらのDABITC法(57)に従って行なった。

第5項 酵素阻害活性の測定

ズブチリシンに対する、ASIまたは反応部位切断フラグメントの阻害活性は、萩原らのCasein-Folin法(35)を1/10に縮小し、0.5% Hammarsten's caseinを基質として、pH 7.6、30° Cで測定した。その他の詳細な条件は、本章第2節「結果」に示した。

第2節 結果

第1項 反応部位切断フラグメントの調製

ASIの反応部位切断フラグメントは、第4章で述べたような、酸性溶媒中における限定水解法でも調製が可能である。しかし、本章では、操作時間が短く、またより特異性の高い切断が可能な、以下に示す方法を用いて

フラグメントを調製した。

(1) 酵素-インヒビター複合体(E-I複合体)の調製

Figure 38に示したように、まず、ASI-II (0.5 mg, 58 nmol)に、ズブチリシン (0.75 mg, 27 nmol)を添加し、200 μ lの0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.6)中で30°C、1時間インキュベートし、酵素とインヒビターを結合させた。

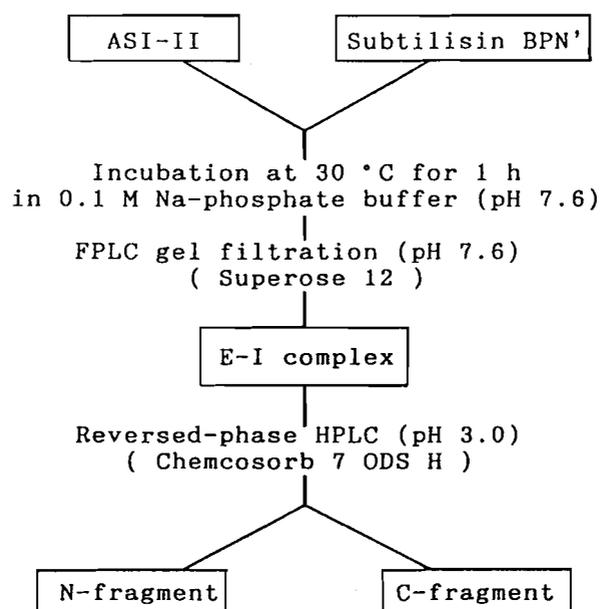


Fig. 38. Preparation of the N- and C-fragments of the reactive site-modified ASI-II.

反応終了後、反応混液を、予め50 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で平衡化しておいたSuperose 12カラムに供した。溶出は、同緩衝液を用いて、流速0.3 ml/minで行なった。230 nmでペプチドを検出した結果、E-I複合体に相当する画分G-1が得られた(Fig. 39)。

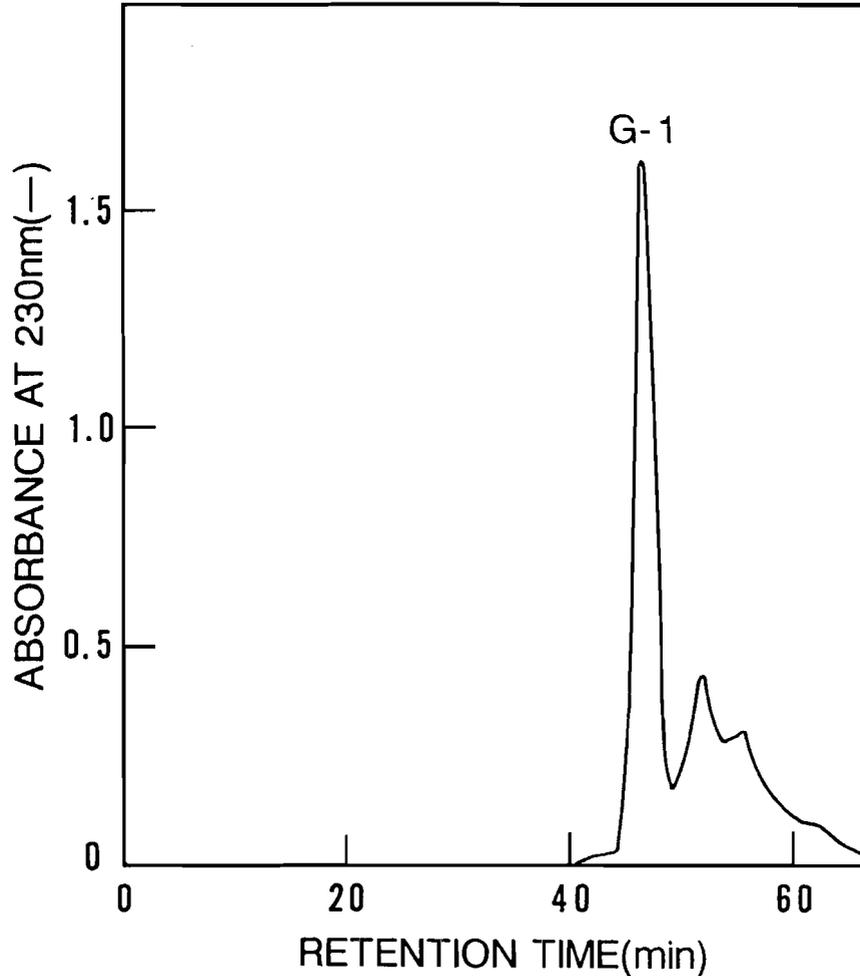


Fig. 39. Gel filtration of an E-I reaction mixture with FPLC system. A reaction mixture (200 μ l) of ASI-II (58 nmol) and subtilisin (27 nmol) was applied to a Superose 12 column equilibrated with 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.6). Elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 0.3 ml/min. Fraction G-1 was collected for further analysis on a reversed-phase HPLC column.

(2) 反応部位切断フラグメントの分離、精製

得られた画分G-1を、予め0.05%TFAで平衡化しておいたChemcosorb 7 ODS H逆相カラムに供し、アセトニトリルの直線濃度勾配で溶出した。流速は0.7 ml/minで行ない、230 nmでペプチドを検出した(Fig. 40)。

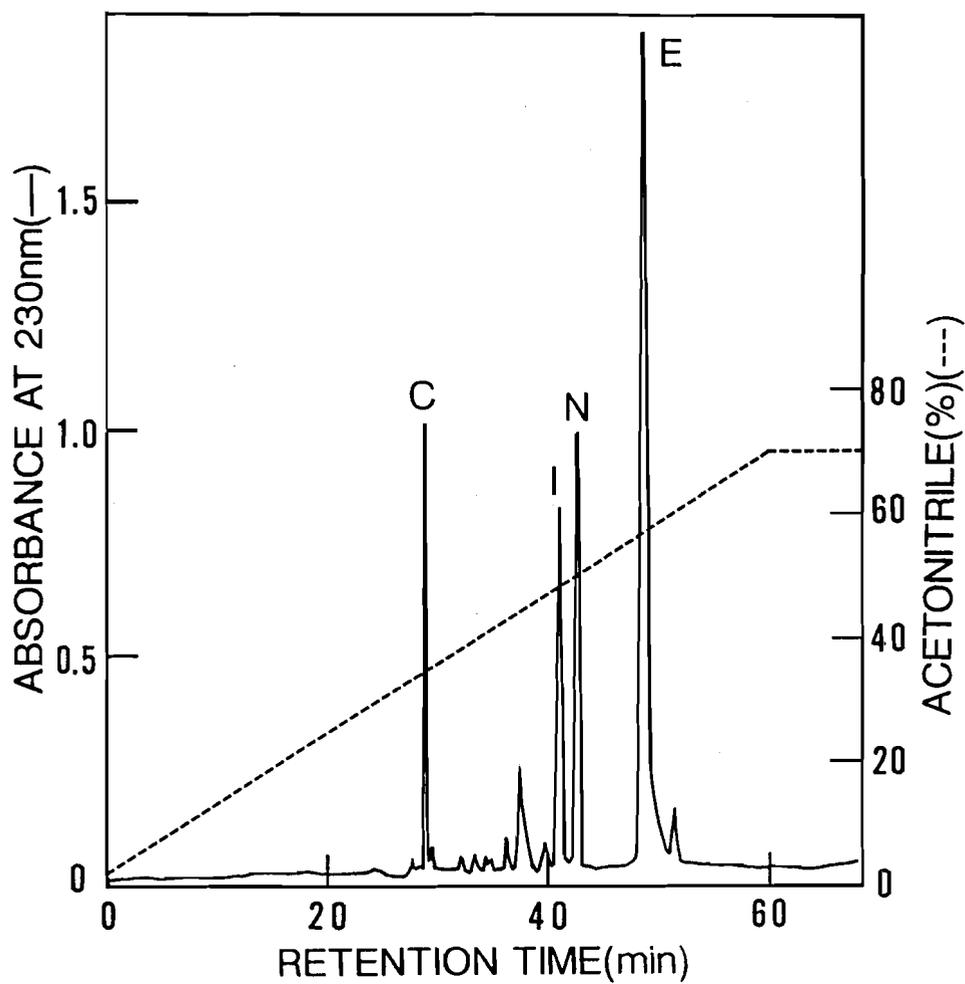


Fig. 40. A reversed-phase HPLC profile of fraction G-1 obtained from the FPLC Superose 12 column with TFA-acetonitrile system. Fraction G-1 (in Fig. 39) was separated on a Chemcosorb 7 ODS H column using a linear gradient of 2-70% acetonitrile in 0.05% TFA for 60 min at a flow rate of 0.5 ml/min. C, C-fragment; I, intact inhibitor; N, N-fragment; E, subtilisin.

その結果、4つのピークが得られた。アミノ酸組成と部分アミノ酸配列を分析した結果、これらのピークはそれぞれ、溶出順に、反応部位のC末端側に相当するペプチド(C-フラグメント)、インタクトASI-II、反応部位のN末端側に相当するペプチド(N-フラグメント)、酵素ズブチリシンと判明した。また、この方法によるASI-IIの修飾化率は65%であった。

以上の方法で得られた、反応部位切断両フラグメントとインタクト ASI-IIのアミノ酸組成をTable XVに示す。以下の実験には、このようにして得た、N、C両フラグメント、およびE-I複合体から回収したインタクト ASI-IIを用いた。また、Fig. 41に、両フラグメントとASI-IIのアミノ酸配列上の位置関係をまとめた。

Table XV. Amino acid compositions of the peptides derived from modified ASI-II by subtilisin. Numbers in parentheses are those calculated for the corresponding sequence of ASI-II.

Amino acid	Fraction		
	C ^a	I ^b	N ^c
Asp	3.4 (2)	6.4 (4)	2.9 (2)
Asn	(2)	(3)	(1)
Thr	1.8 (2)	9.0 (9)	6.9 (7)
Ser	1.7 (2)	4.2 (5)	2.6 (3)
Glu	1.1 (1)	10.7 (7)	9.8 (6)
Gln	(0)	(4)	(4)
Pro	2.2 (2)	5.8 (5)	3.4 (3)
Gly	0.9 (1)	2.1 (2)	1.5 (1)
Ala	0.0 (0)	3.5 (4)	3.5 (4)
1/2Cys	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Val	2.9 (3)	8.6 (9)	5.6 (6)
Met	0.0 (0)	0.9 (1)	0.6 (1)
Ile	1.1 (1)	3.4 (3)	2.3 (2)
Leu	1.1 (1)	3.3 (3)	2.3 (2)
Tyr	1.7 (2)	1.7 (2)	0.0 (0)
Phe	0.0 (0)	1.2 (1)	1.2 (1)
Lys	2.2 (2)	6.1 (6)	3.7 (4)
His	0.0 (0)	1.1 (1)	1.1 (1)
Arg	3.3 (3)	3.6 (3)	0.0 (0)
Trp	ND. ^d	ND. (1)	ND. (1)
Total	(24)	(73)	(49)
N-terminal sequence	DYN-	KQA-	KQA-

a. C-fragment. b. intact ASI-II. c. N-fragment. d. not determined.

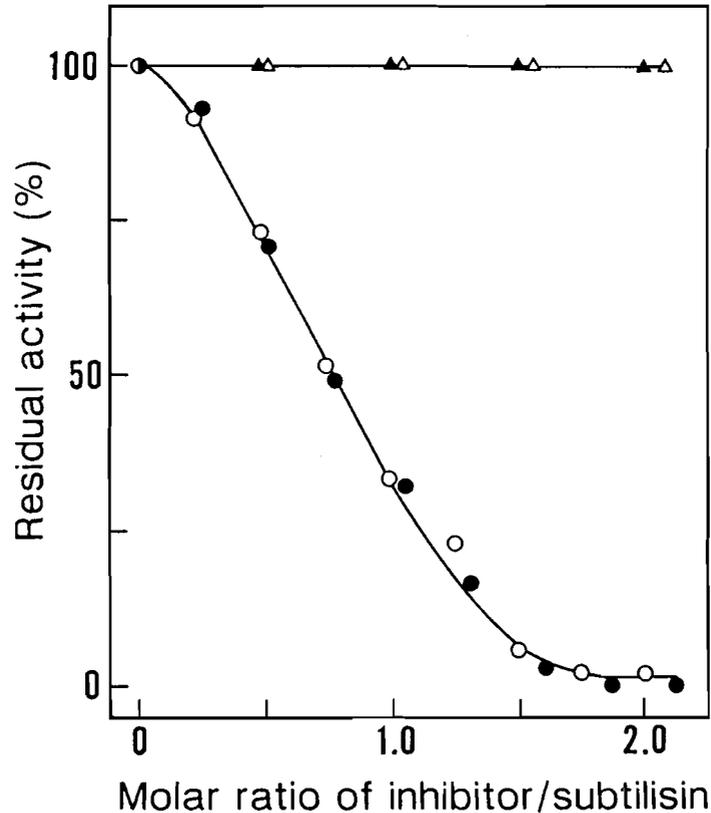


Fig. 42. Titration curve of subtilisin with the inhibitor. Residual caseinolytic activity of subtilisin ($0.5 \mu\text{M}$) was measured in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.6) at 30°C after preincubation for 5 min with intact ASI-II (○) or an equimolar mixture of N- and C-fragments (●). The inhibitory effect of N-fragment (△) or C-fragment (▲) alone was also measured under the same conditions.

第3項 阻害活性回復速度の温度依存性

不活性な両フラグメントが、活性型インヒビターへ再構築される速度、および回復の程度に及ぼす、フラグメント混合物のインキュベーション温度の影響について検討した。

各温度でフラグメント混合物をインキュベートしたときの、阻害活性回復の経時的変化をFig. 43に示す。なお、いずれの場合も、フラグメント混合物を各温度でインキュベート後、ズブチリシンと 30°C で5分間プレインキュベートした後、阻害活性を測定した。

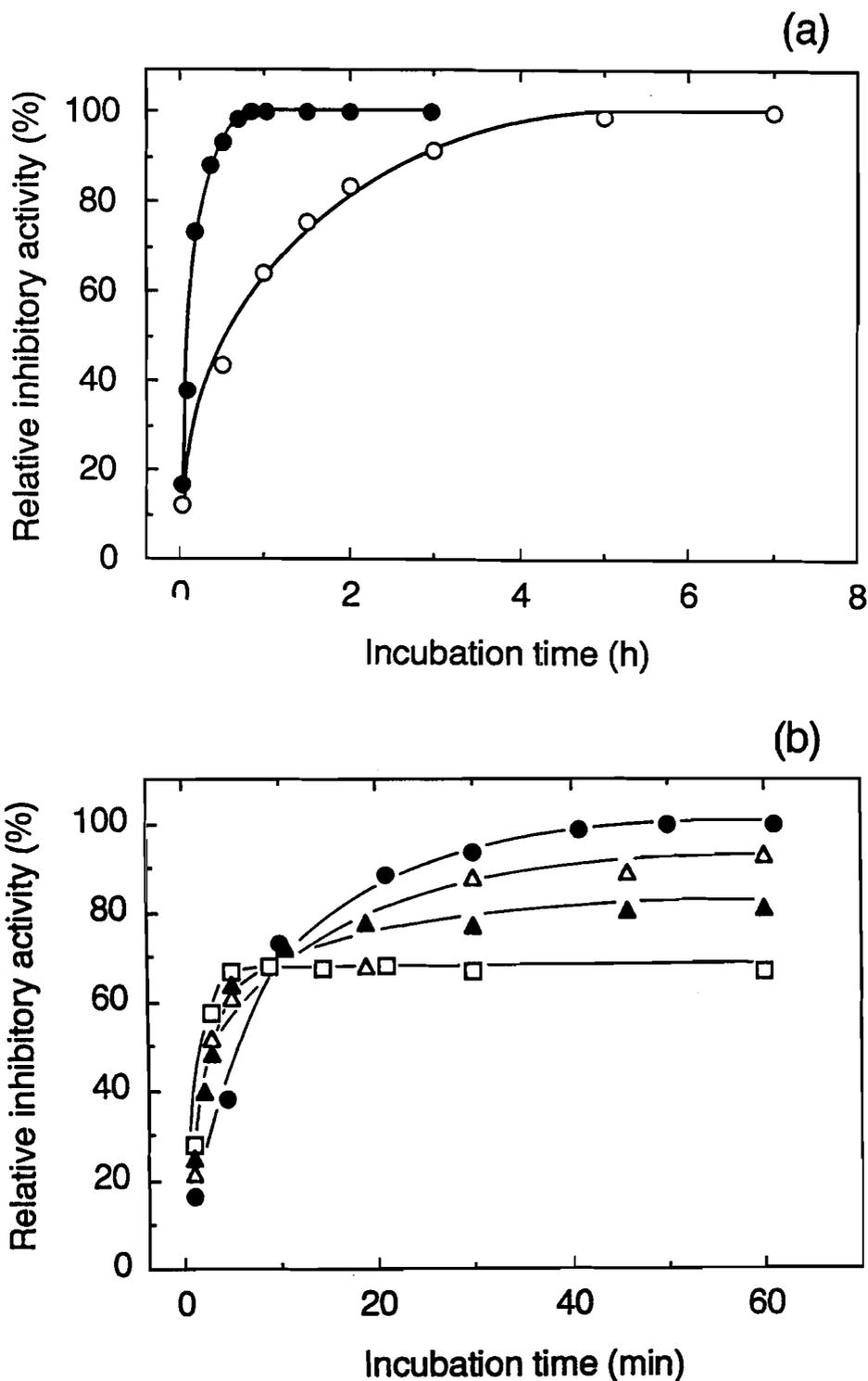


Fig. 43. Incubation of the equimolar mixture of the inactive N- and C-fragments at different temperature and increase in the anti-subtilisin activity of the mixture with time. An equimolar mixture of both fragments ($1 \mu\text{M}$ each) was incubated in 0.1 M Na-phosphate buffer ($\text{pH } 7.6$) at: (a), 2°C (○) and 15°C (●); (b), 15°C (●), 20°C (△), 25°C (▲), and 30°C (□). After the incubation times indicated, $50 \mu\text{l}$ of the fragment mixture was added to $50 \mu\text{l}$ of subtilisin solution (0.5 nmol of the enzyme) and preincubated at 30°C for 5 min. The remaining subtilisin activity was measured using 0.5% Hammarsten's casein as a substrate. The inhibitory activity of the intact ASI-II determined under the same condition was referred to as 100%-inhibition.

フラグメント混合物を2°Cでインキュベートした場合、約5時間で、インタクトインヒビターと同じ阻害活性（100%活性）に達した。また、この活性は、インキュベート24時間後でも低下しなかった。15°Cでインキュベートした場合、阻害活性回復は速くなり、約1時間で100%活性となった(Fig. 43a)。

不活性な両フラグメントから活性型インヒビターが再構築される反応が、一次反応であると仮定すると、最終到達活性の半分の活性に達するのに要する時間、 $t_{1/2}$ は、2°Cで53.3分、15°Cで7.3分と計算され、両者の間で約7.3倍の阻害活性回復速度の差が見られる。

ところが、フラグメント混合物を15°Cより高温側でインキュベートした場合(Fig. 43b)、阻害活性の回復はより速やかにおこるが、最終的に到達する活性は、インキュベート温度の上昇とは逆に低下した。30°Cでインキュベートした場合、インキュベート5分後で阻害活性は68%回復するが、その後それ以上の回復は見られなかった。

2°Cで7時間インキュベートして100%活性にまで回復させておいたフラグメント混合物を、30°Cから50°Cの各温度で再びインキュベートしたときの阻害活性の低下を同様にFig. 44に示した。30°Cから50°Cでの、インキュベーションは、10分から30分まで行なったが、活性の低下はいずれのインキュベーション時間でも同じであった。本来、インタクトインヒビターと同じであった活性は、30°Cで72%、50°Cでは35%に低下した。また、活性の低下は、インキュベーション温度に依存していた。しかし、このような現象は、インタクトインヒビターでは見られなかった。

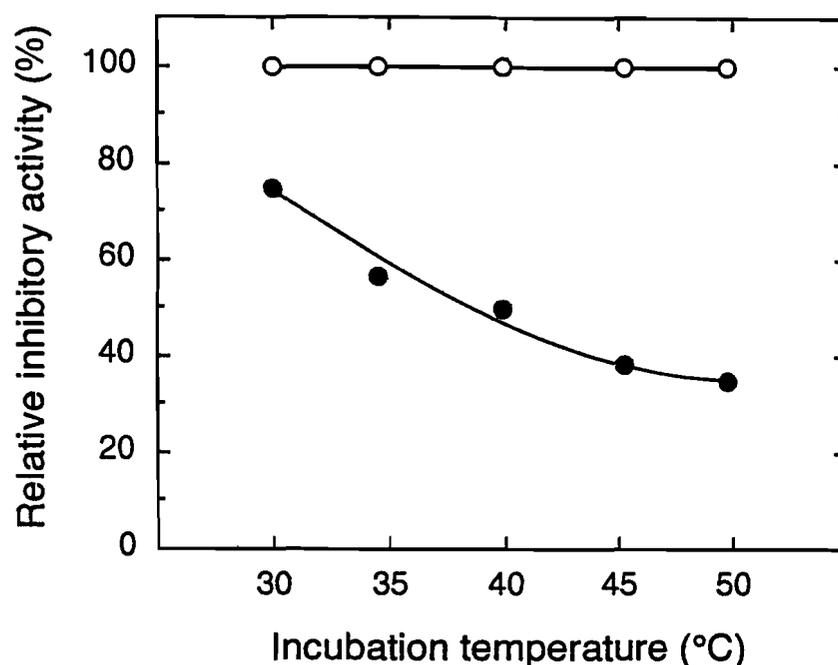


Fig. 44. Temperature-dependence of the anti-subtilisin activity of the reconstituted modified ASI-II. After an equimolar mixture of the N- and C-fragments with full inhibitory activity, which had been prepared by incubation of both fragments for 7 h at 2°C, was further incubated at different temperatures up to 50°C for 30 min, and anti-subtilisin activity was measured as described in the legend to Fig. 43 (●). The inhibitory activity of the intact ASI-II incubated under the same conditions was also measured (○).

この結果は、反応部位切断フラグメントから再構築された修飾ASIと、インタクトASIが、温度変化に対して異なる挙動をとることを示している。

30°Cで不活性なフラグメント混合物をインキュベートした場合も、同温度で100%活性の再構築修飾インヒビターをインキュベートした場合も、到達した阻害活性は約70%であった。このことから、フラグメント混合物をインキュベートする温度に依存して、解離した状態のN-、C-フラグメントと、会合した状態のN-、C-フラグメントとの間の平衡が可逆的に移動していることが示唆された。なお、平衡移動の他に、N-、C-フラグメントが温度上昇により不活性型会合体を形成する可能性も考えられるが、疎水結合、イオン結合の形成と温度の関係を示していると推察する方がより妥当と考えている。

第4項 阻害活性回復に及ぼす、酵素とのプレインキュベーション時間の影響

不活性なフラグメント混合物から活性型インヒビターが再構築される反

応が、標的酵素との相互作用の結果なのか、非酵素反応的なN-およびC-フラグメント間の相互作用に因るものなのかを検討した。

不活性なフラグメント混合物を、2°Cで1分間インキュベートした後、ズブチリシンと30°Cで5分間プレインキュベートすると10%の阻害活性を示す。このような10%活性混合物を、ズブチリシンと30°Cで種々の時間プレインキュベートし、阻害活性の変化を調べた(Fig. 45)。その結果、酵素と30分までプレインキュベートしても、阻害活性は10%と一定で、阻害活性の回復はみられなかった。Figure 43に示したように、酵素非存在下で不活性なN、C両フラグメントをインキュベートすると、30°Cでは約5分後に70%の阻害活性が回復し、1時間後も阻害活性は変化しない。ズブチリシン存在下で、同様に30°Cでインキュベートした場合、阻害活性が10%のままで、それ以上に回復しないということは、ズブチリシンによって、N-、C-フラグメントの活性型会合体形成が妨害されていることを意味している。

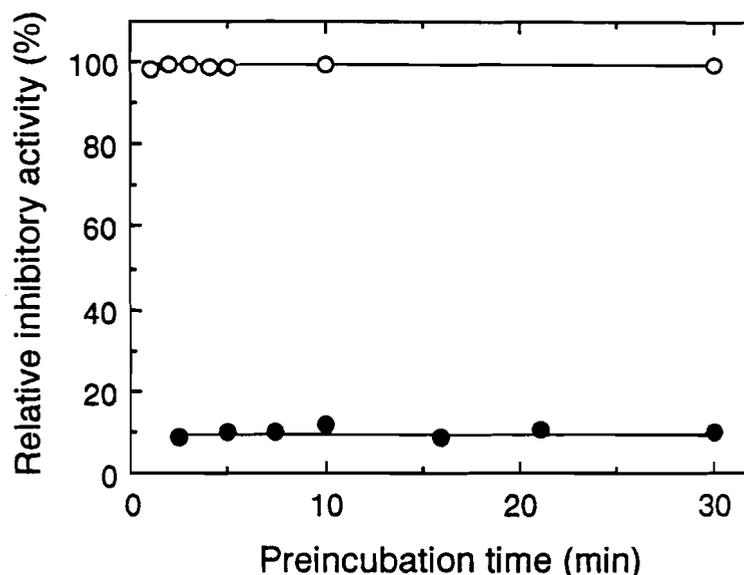


Fig. 45. The effect of preincubation time with subtilisin on the inhibitory activity of the equimolar mixture of the N- and C-fragments. Both fragments (50 pmol each) were mixed in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.6). After incubation at 2°C for either 7h (○) or 1 min (●), the mixture was added to subtilisin at the molar ratio of 1.0 (enzyme/inhibitor). After preincubation with the enzyme at 30°C for indicated times, the remaining enzyme activity was determined. The inhibitory activity of intact ASI-II determined under the same condition was referred to as 100%-inhibition.

酵素存在下では、N-またはC-フラグメントの一方が、あるいは、両フラグメントがともに阻害反応部位とは異なる部位で、ズブチリシンと結合し、活性型会合体が形成されないのではないかと考えているが、いずれにしても標的酵素の存在が、不活性フラグメントの活性型会合体形成を妨害することが明らかとなった。

一方、不活性なフラグメント混合物を2°Cで7時間インキュベートした後、酵素と5分間プレインキュベートすると阻害活性は100%に回復した。しかし、このような100%活性混合物は、ズブチリシンと1分間インキュベートするだけで既に100%の阻害活性を発現していることがわかった(Fig. 45)。これは、阻害活性を回復したフラグメント混合物が、インタクトインヒビターと同様に、酵素と速やかに結合していることを示している。

第5項 切断反応部位の修復

これまでは、不活性なN、C両フラグメント混合物からの、阻害活性の回復について述べてきたが、反応部位ペプチド結合の再生をともなったインタクトASI-IIの再構築についても検討を加えた。

再構築されたインタクトインヒビターの量は、中性pHでの逆相HPLCカラム上で試料を分離して行なった。この理由は、これまで用いてきたTFA酸性下の逆相HPLCで分離した場合、再構築されたインタクトインヒビターが、再び、N、C両フラグメントへ修飾されることが懸念されたためである。

本条件における、E-I複合体中の各成分の溶出位置を確認するため、FPLCで調製したG-1画分(Fig. 39)を、予め10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したChemcosorb 7 ODS H逆相カラムに供した。溶出は、アセトニトリルの直線濃度勾配を用い、流速0.5 ml/minで行なった(Fig. 46)。

得られた各ピークのアミノ酸組成およびアミノ酸配列を分析した結果、それぞれ溶出順に、酵素ズブチリシン、インタクトASI-II、N-フラグメント、C-フラグメントと同定された。

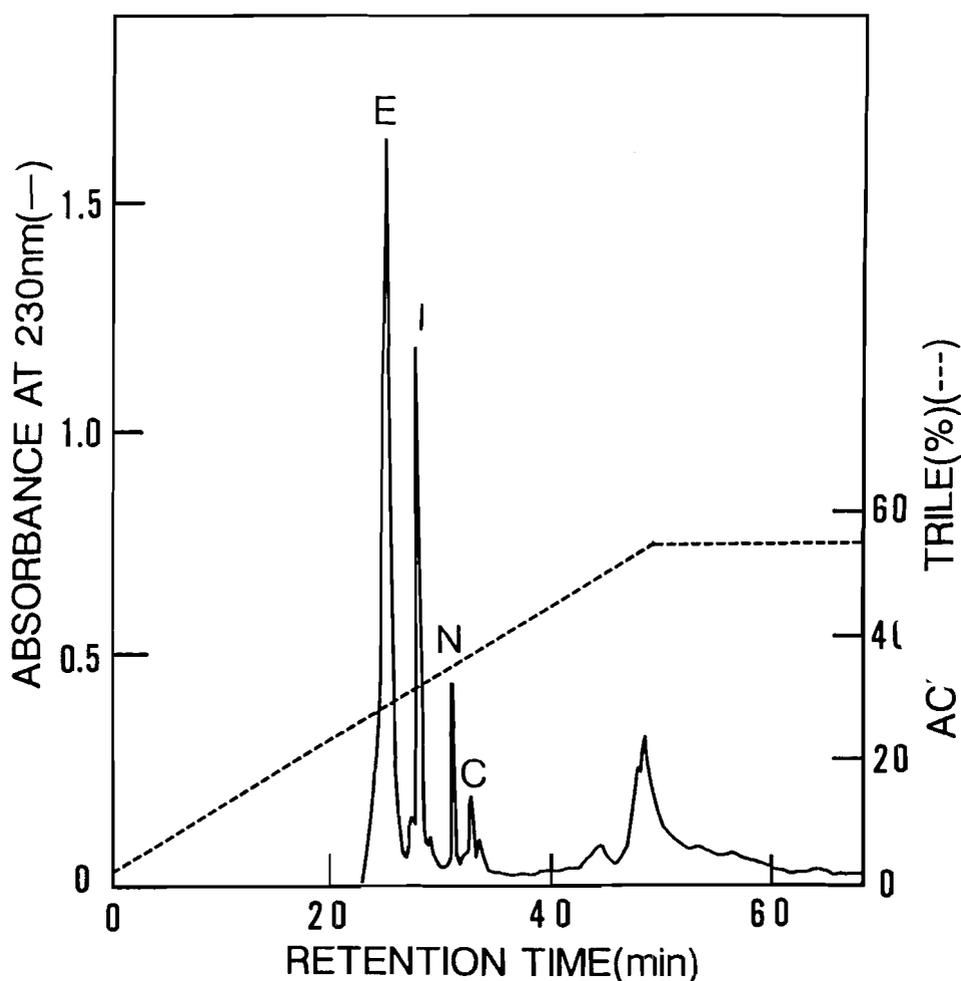


Fig. 46. A reversed-phase HPLC profile of fraction G-1 obtained from the FPLC Superose 12 column with Na-phosphate buffer-acetonitrile system. Fraction G-1 (in Fig. 39) was separated using a linear gradient of 2-55% acetonitrile in 10 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ml/min. The column used and the letters on the peaks are the same as those described in the legend to Fig. 40.

インタクトASI-IIの再構築は、予め2° Cで7時間保っておいたN-およびC-フラグメントの等モル混合物(各0.66 nmol)とズブチリシン(0.2 nmol)を400 μ lの0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.6)に溶解し、30° Cでインキュベートして行なった。各時間反応させた後、80 μ lの反応混液を、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化した、上記条件の逆相HPLCに供して分析した。再構築されたインタクトASI-II、N-、およびC-フラグメント量は、230 nmの吸収を島津C-R3A型Chromatopacで測定して求めた。酵素阻害活性は、各時間反応させたのち、20 μ lの反応混液を用いて測定した。

酵素とのプレインキュベーション時間と再構築されたインタクトASI-II量の関係をFig. 47に示した。再構築されたインタクトASI-IIは、プレインキュベーション1時間後で顕著に検出され、その後、徐々に形成されることがわかった。しかし、阻害活性が十分に発現しているにもかかわらず、プレインキュベーション5分後では、再構築インタクトインヒビターは、ほとんど確認できなかった。一方、N-およびC-フラグメント量は、インタクトASI-IIの形成とは反対に、プレインキュベーション時間に依存して減少した。この結果は、N-、C-フラグメントが部分的にインタクトASI-IIに再構築されていくことを示している。

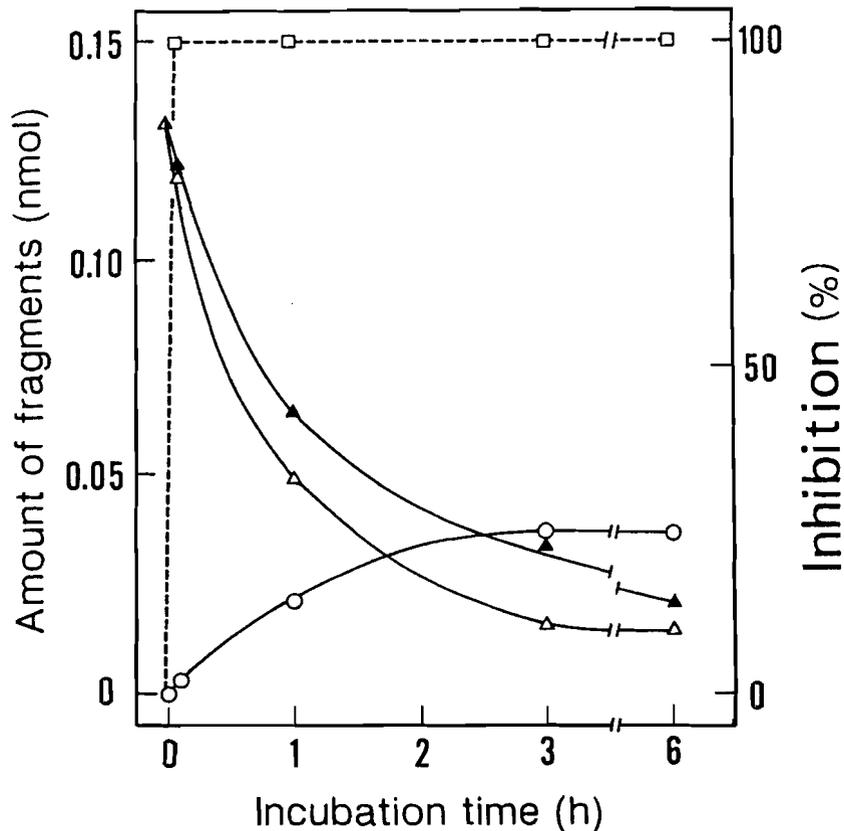


Fig. 47. Reconstitution of the intact ASI-II from the N- and C-fragments. The N- and C-fragments (0.66 nmol each) were mixed and stored at 2°C for 7 h in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.6), and then incubated with subtilisin (0.2 nmol) in the same buffer at 30°C. After the indicated incubation times, 80 μ l of the reaction mixture was applied to a reversed-phase column (4.6 x 250 mm) of Chemcosorb 7 ODS H using a linear gradient of 2-55% acetonitrile in 10 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ml/min. The amounts of intact ASI-II (○), the N-fragment (△), and the C-fragment (▲) were determined by measuring the absorbance at 230 nm. Inhibitory activity against subtilisin (□) of the mixture of both fragments was also determined after each incubation time indicated.

両フラグメントの減少量は、インタクトASI-IIの増加量よりも多いが、プレインキュベート中に各フラグメントの消化産物が検出されないことから判断すると、逆相HPLCカラムからの回収率の差によるものではないかと考えられる。

以上の結果より、修飾インヒビターの反応部位の再結合は、酵素存在下で徐々におこることが示された。また、これまでの阻害活性回復実験で用いたような条件では、インヒビターはほとんどが修飾インヒビターとして存在していることが推察された。

第3節 考察

通常、プロテイナーゼインヒビターの阻害反応部位の切断は、酸性条件下での標的酵素による限定加水分解によっておこなわれる。あるいは、インヒビターと酵素との安定な複合体を、変性剤やTCAによって解離させる方法でも修飾インヒビターが得られる(18)。ASI-IIの場合、中性pHで調製したズブチリシンとの複合体を、酸性条件下の逆相HPLCに供し、アセトニトリルの濃度勾配で溶出することによって、修飾インヒビター(N、C両フラグメント)を得た。一般に、マメ科のズブチリシンインヒビターの反応部位は、酸性条件下での限定水解による方法では切断されないといわれている(54)。VSIの反応部位は、エステラーゼによって限定的に水解を受けた3箇所の中で、アミノ酸配列上から一致するものを推定しただけで、ズブチリシンによる限定水解は成功しなかったと報告されている(41)。本研究で用いた反応部位切断方法は、短時間で修飾インヒビターが得られること、切断とフラグメントの分離が一緒にできることから、いままで限定水解が不成功であったマメ科のズブチリシンインヒビターに対しても、有効な方法であると推察される。

不活性なフラグメントから活性型インヒビターが再構築される機構は、ASIの他にSTI(Kunitz)を材料にした、2種類の研究が報告されている。KatoとTominagaは、STI(Kunitz)をブロムシアン処理して得られる、二つの不活性なフラグメントを、中性pHでインキュベートすると阻害活性が

80%以上回復したインヒビターが得られることを発見した(63)。Ikenakaらは、同様の不活性なブロムシアンフラグメントを用い、阻害活性が回復したフラグメント混合物のCDスペクトルが、もとのSTI(Kunitz)とよく似ていることを示した(27)。これらの研究では、STI(Kunitz)のトリプシンに対する反応部位は、不活性なフラグメントの片方のS-Sループ上に、インタクトなまま保存されている。

もう一つの研究は、STI(Kunitz)の反応部位切断を伴うもので、Laskowski, Jr.らにより行なわれている(64)。STI(Kunitz)は、ズブチリシン阻害活性を有していないが、ズブチリシンにより特異的に切断を受けるペプチド結合が分子内に1箇所存在する。これは、トリプシン阻害反応部位とは異なっている。彼らは、トリプシンで修飾したSTI(Kunitz)を、更にズブチリシンで修飾し(double modification)、不活性な二つの成分を得た。この不活性な2成分を、同様に中性pHでインキュベートすると活性型のSTI(Kunitz)が得られる。この場合、不活性な成分の片方は、分子内S-Sループを2個有する160残基のタンパク質で、もう片方は、21残基のペプチドである。

不活性な2種のフラグメントから活性型インヒビターが再構築するという報告は、現在のところ、ASI-IIとSTI(Kunitz)でしか得られていない。しかし、STI(Kunitz)を材料とした、一連の研究では、いずれの再構築実験においても、不活性フラグメントの構造が分子内S-S結合によって保持されており、ASI-IIの様に、構造が破壊された2種の不活性なペプチドから、活性型インヒビターが再構築するという報告は、本研究がはじめてである。

Kimらは、最近、STI(Kunitz)の標的酵素との接触領域を検索する目的で、阻害活性の異なるSTI(Kunitz)のイソインヒビターをdouble modificationにより組み替える研究を行なっている(65)。彼らは、25°C、pH7.5の条件下で再構築を行なっているが、不活性な2成分の等モル混合物は、インキュベーション5時間後でも70%しか活性が回復しないので、その後不活性なペプチド成分を更に添加して、90%以上に活性が回復した再構築STI(Kunitz)を得ている。Kimらの目的は、再構築の機序に関するものではなく、本研究と直

接比較することはできない。また、STI(Kunitz)の場合、フラグメントの一方はS-S結合とP₁アミノ酸残基、更にC末端領域を含む大きなフラグメントであり、他方は、P₁残基を含む極めて小さいペプチド断片であり、ASIの場合とかなり異なっている。一方、ASI-IIの場合、切断箇所は、標的酵素に対する反応部位だけなので、活性の完全な回復が生じたと考えられる。

一般に、反応部位修飾インヒビターの活性が低い場合、中性pHで標的酵素とプレインキュベートすると、もとのインヒビターとほぼ同じ活性が得られることが知られている(18)。ASI-IIの場合、活性が完全に回復した修飾インヒビターは、インタクトインヒビターと同じように、速やかに酵素と結合し阻害するにもかかわらず、活性型修飾インヒビターへの再構築には、酵素は全く関与せず、むしろ標的酵素ズブチリシンの存在が、不活性なN、C両フラグメントからの再構築を妨害していることが示された。このような現象は、ASI-IIを用いた本研究で初めて得られた新しい知見である。

他のインヒビターにおける分子内S-S結合の役割に相当する、ポテトI型インヒビターの分子内外における相互作用は、大麦のインヒビターCI-2、およびEglin Cの立体構造の解析から推定されている。CI-2とズブチリシンの複合体(66)、またCI-2単独のX線結晶解析(67)の結果は、Eglin Cの核磁気共鳴スペクトル分析(68)の結果とよく似ており、反応部位のC末端側に存在するアルギニン残基、Arg(75)とArg(77) (Fig. 37)が、反応部位周辺、特にP₁-P₄位領域のアミノ酸と相互作用し、反応部位ループとインヒビター本体を結び付ける役割を果たしていることを示している。また、CI-2では、この両アルギニンの側鎖がP₁'アミノ酸側鎖の負の電荷を安定化していること、Eglin Cでは更に、このアルギニン領域とC末端グリシンが、周りの水分子と非常に多くの水素結合を形成し、構造を安定化させていることが示されている。この両アルギニン残基の存在する領域は、ポテトI型インヒビター間でよく保存されている。このことから、ASI-IIの不活性フラグメント間の相互認識の一部は、N-フラグメントのC末端数残基と、C-フラグメントのN末端側から6、8残基目のアルギニン側鎖との間の非共有的相互作用によるのではないかと推察される。ポテトI型インヒビターでは、これらの領

域の他にも、アミノ酸配列が高度に保存された領域があり、フラグメント間の相互認識に密接に関与していると考えられる。

第4節 小括

分子内S-S結合のないASI-IIとズブチリシンの等モル複合体をTFA酸性下の逆相HPLCに供し、反応部位(Ala-Asp)で切断された、N末端側フラグメント(49残基)とC末端側フラグメント(24残基)を調製した。中性pHで、不活性な両フラグメントの等モル混合物(1 μ M)をインキュベートすると、1時間後(15 $^{\circ}$ C)、または5時間後(2 $^{\circ}$ C)に完全に酵素阻害活性を回復した。

また、両フラグメントは、標的酵素が存在しない条件でのみ完全に活性型インヒビターへ再構築され、これまで報告のなかった現象が確認された。このことから、不活性な両フラグメントは、互いに特異的に相手を認識して、活性型修飾インヒビターを再構築し、そののち、酵素と複合体を形成し、一部は反応部位P₁、P₁'残基の再結合によりインタクトインヒビターへ再構築されることが示唆された。ASI-IIで見られた、これらフラグメント間の非共有的結合による相互作用の研究は、タンパク質間の相互認識機構を解明するうえで、重要な知見を与えるものと考えられる。

第6章 総合考察

タンパク質性プロテイナーゼインヒビターは、タンパク質化学的研究の対象として、多くの研究者によって取りあげられてきた。また、最近では、タンパク質工学の発展の基盤としてのタンパク質分子間相互作用の研究材料としてもよく用いられている。特に、植物起源のタンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターについては多くの知見が蓄積されており、タンパク質分子の構造と機能の関係を解明する上でも有用である。

本研究では、マメ科のアズキ種子(*Vigna angularis*)に存在する、ズブチリシンに特異的なタンパク質性インヒビター、ASI、の一次構造解析と酵素との反応部位の決定を行なった。その結果、このインヒビターのタンパク質化学的な特性やアミノ酸配列上の特徴が明らかになった。ついで、本インヒビター分子内にS-S結合が全くないことに注目して、インヒビタータンパク質を反応部位で切断して断片化し、二個の不活性フラグメントを調製した。そして不活性フラグメントから活性型インヒビターが再構築されることを発見し、その機構、特に非共有結合によるタンパク質分子間の相互認識の解明を行なった。

まず、第2章では、アズキ種子から、ズブチリシンインヒビターを抽出し、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過により、2種のインヒビタータンパク質、ASI-I、IIを約120倍に精製した。マメ科では、従来、トリプシンやキモトリプシン阻害活性を有するインヒビターの報告がほとんどで、ズブチリシンにのみ特異的な阻害機能を発現するインヒビターは稀であるが、アズキ種子には、このようなズブチリシンインヒビターが、トリプシンおよびキモトリプシンインヒビターと同じ程度に含まれていることがわかった。

第3章では、ASI-I、IIの物理化学的並びに化学的諸性質を調べ、両インヒビターのタンパク質化学的な差異を明らかにするとともに、ASIが、従来、マメ科で報告されているSTI(Kunitz)型やBBI型とは著しく異なったインヒビターであることを示した。ASIの諸性質の中で最も特徴的なことは、その分子内にS-S結合が存在しないことである。ソラマメでも、ASIとよく似た

タンパク質化学的特性を持ったズブチリシンインヒビターの報告もあるので、ASI様のインヒビターグループが、第3のマメ科インヒビターファミリーとして存在していることが示唆された。

第4章では、ASI-I、IIの完全一次構造および反応部位ペプチド結合を決定した。ASI-Iは、92残基のアミノ酸から構成されるインヒビターで、ASI-IIは、ASI-IのN末端側19残基のペプチドが欠落したより低分子のASI(73残基)であることが確認された。また、ASIの反応部位はAla-Aspで、インヒビターのC末端寄りに位置していた。ASI-IIは、阻害機能上、ASI-Iと同位のインヒビターであった。

ASIのアミノ酸配列を他のインヒビタータンパク質のものと比較したところ、ASIがポテトI型ファミリーのインヒビターであることが明らかとなった。ポテトI型ファミリーは、ASIの他に、ポテト、トマト、大麦から得られたキモトリプシンインヒビター、ソラマメのズブチリシンインヒビター、ヒルのEglin Cなどが確認されており、生物界に広く分布している。

ポテトI型ファミリーは、タンパク質化学的に、他のインヒビターファミリーとは、著しく異なった特性を有している。他のファミリーのインヒビターは、分子内S-S結合によって、その構造を保持しており、プロティナーゼに対する阻害反応部位は、いずれかのS-Sループ上に局在している。特に、インヒビター分子内のS-S結合の配置と、反応部位が存在する位置との構造的な関係は、各ファミリーにおいて一致している。

一般に、反応部位修飾インヒビターは、もとのインヒビターとほぼ同じ酵素阻害機能を示すが、この現象は、反応部位の切断で新たに生じた、 P_1 位、および P_1' 位の両末端が拡散しないように、分子内S-S結合が構造を保持している、あるいは、反応部位アミノ酸が離れた位置にあっても、活性発現に必須の構造はS-S結合によって維持されているからだと説明されてきた。

ポテトI型インヒビターは、ASIのように分子内S-S結合を持たないものが多く、S-S結合が存在している場合でも、酵素阻害には関係していないことが確認された唯一のインヒビターファミリーである。ポテトI型インヒビターは、分子内の非共有的相互作用によって、その構造を保持している。

第5章では、ASI-IIの反応部位(Ala-Asp)を切断して、2種のペプチド、N-フラグメント(49残基)とC-フラグメント(24残基)を調製し、これらの不活性な両フラグメントから、活性型インヒビターが再構築されることを示した。

中性pHで、両フラグメントの等モル混合物(1 μ M)をインキュベートすると、1時間後(15 $^{\circ}$ C)または5時間後(2 $^{\circ}$ C)に、完全に酵素阻害活性を回復した。ところが、30 $^{\circ}$ Cでフラグメント混合物をインキュベートした場合は、酵素阻害活性は、約70%にまでしか回復しなかった。一方、フラグメント混合物を2 $^{\circ}$ Cで7時間インキュベートして、阻害活性が完全に回復した再構築ASIを、更に30 $^{\circ}$ Cでインキュベートしたところ、阻害活性は、先の場合と同様に約70%に低下した。以上の結果から、N-、C-フラグメントの解離、会合状態は、インキュベーション温度に依存して、可逆的に変化していることが示唆された。

従来、他の分子内S-S結合を持つインヒビターについては、反応部位修飾(切断)インヒビターの阻害活性が低い場合でも、標的酵素とともに中性pHでインキュベートすると、徐々に阻害活性が回復することが知られている。ASIの場合、切断された反応部位ペプチド結合(Ala-Asp)の修復は、標的酵素と複合体を形成した状態で、徐々に起こるが、N-、C-フラグメントから活性型インヒビター(修飾インヒビター)への再構築は、標的酵素が存在しない条件でのみ起こることが確認された。これは、本研究で初めて得られた知見である。

以上の結果から、反応部位で切断されたN-、C-フラグメントは、まず、互いに特異的に相手を認識して、活性型インヒビターを再構築し、そのうち、酵素と複合体を形成することが明らかとなった(Fig. 48)。

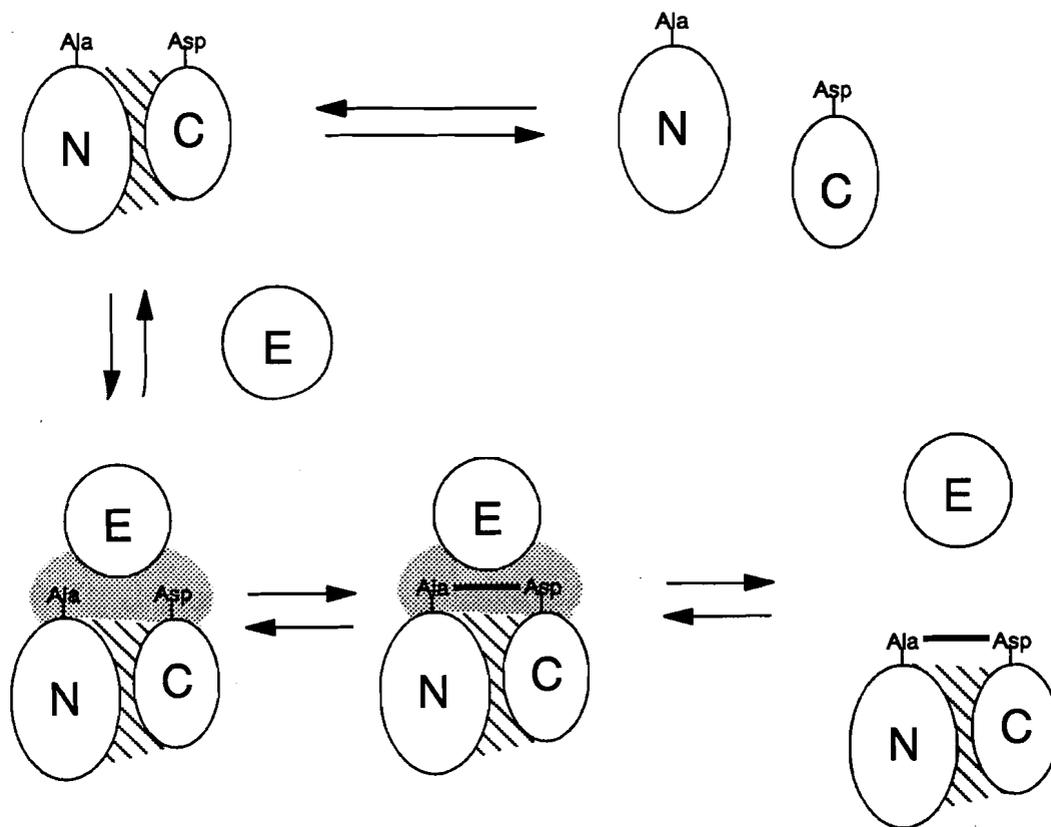


Fig. 48. Reconstitution of active ASI from inactive N- and C-fragments.

セリンプロテイナーゼは、基質と結合してミカエリス複合体(Michaelis complex)を生成し、四面体型中間体(tetrahedral intermediate)を経て、アシル酵素となる。この時、切断されたペプチド結合のC末端側ペプチドが生成物として遊離する。ついで、アシル酵素に水が付加して、四面体型中間体、酵素-生成物ミカエリス型複合体を経て、酵素と生成物(N末端側ペプチド)になる。プロテイナーゼインヒビターの反応部位は、基質と全く同じ様式で酵素と結合するが、脱アシル化以前の状態で反応が停止していると考えられている(18)。

酵素-インヒビター複合体の立体構造解析の結果、Kazal型のオボムコイド、PSTI、BPTI、BBIはいずれも、ミカエリス複合体と四面体型中間体の間の状態で反応が停止しており、反応部位ペプチド結合は切断されていない。STI(Kunitz)型は、四面体型中間体を取り、serpinはアシル酵素の状態で、酵素との反応が停止している(69)。ASIは、N-フラグメントが酵素を阻

害しないことからserpinのようにアシル化型のインヒビターではない。ポテトI型ファミリーの大麦CI-2やEglin Cの立体構造解析でも、反応部位はインタクトであることが示されており、ポテトI型インヒビターは、他の多くのインヒビターと同様に、ミカエリス複合体から四面体型中間体にいたる途中で、酵素との反応が停止した状態をとっているのではないかと考えられる。

現在、15種類の酵素-インヒビター複合体のX線結晶構造解析が得られており、インヒビターに共通する構造的特性が幾つか確認されている(70)。複合体中の、酵素とインヒビターの相互認識部位の構造は多様であるが、接触領域は、全て双方の30-40残基のアミノ酸で構成されている。また、相互認識領域には、約10個の分子間水素結合が関わっている。これは、抗原と抗体の相互認識部位においても確認されている。このタンパク質分子間水素結合の25%は、接触領域に位置する特定のアルギニン残基側鎖、またはリジン残基側鎖が関与している。タンパク質分子間の直接的な水素結合の他にも、分子間に存在する水分子と極性アミノ酸の間に多くの水素結合が見られる。

ポテトI型インヒビターのうち、大麦のCI-2およびEglin Cの立体構造解析の結果からも、反応部位のC末端側に存在するアルギニン残基、Arg(75)とArg(77) (Fig. 37)が、反応部位周辺のアミノ酸と相互作用し、反応部位ループとインヒビター本体を結び付ける役割を果たしていることが示されている(66, 68)。この両アルギニン残基の存在する領域は、ポテトI型インヒビター間でよく保存されており、ASI-IIのN-フラグメントとC-フラグメントの特異的な相互認識の一部は、C-フラグメントに存在する、アルギニン残基が関与していることが示唆される。

本研究で示した、不活性N-、C-フラグメントから活性型ASIへの再構築機構は、タンパク質の構造と機能の関係を研究する上で、よいモデルであると考えられる。今後、これらN-、C-フラグメント間の特異的相互認識に関わる領域について更に詳しい研究が進めば、タンパク質-タンパク質相互認識機構の解明にとって、新たな知見の蓄積が得られるものと期待される。

要約

乾燥アズキ種子から2種のズブチリシンインヒビター、ASI-I、IIを精製し、その物理化学的および化学的特性を調べた。両ASIは、分子内S-S結合を持たない点で、他のインヒビターに比べて特徴的であった。

次に、両インヒビターの完全アミノ酸配列および阻害反応部位を手動DABITC法によって決定した。ASI-Iは92残基のアミノ酸で構成されるインヒビターで、反応部位はAla-Aspであった。また、ASI-IIは、ASI-IのN末端側19残基のペプチドが欠落した低分子型ASI(73残基)であった。ASIは、ポテトI型インヒビターで、マメ科植物にSTI(Kunitz)型やBBI型以外の第3のインヒビターグループが存在することが示唆された。

分子内S-S結合のないASI-IIの反応部位(Ala-Asp)を切断し、N末端側フラグメント(49残基)とC末端側フラグメント(24残基)を調製した。最適な条件で、不活性な両フラグメントをインキュベートすると、完全に酵素阻害活性を回復した。活性型インヒビターへの再構築は、標的酵素が存在しない場合のみおこることが、本研究ではじめて確認された。両フラグメント間の非共有的相互作用の研究は、タンパク質分子間の相互認識機構を解明する上で、重要な知見を与えるものと期待される。

SUMMARY

Two molecular forms of protein subtilisin inhibitor were isolated from Adzuki beans (*Vigna angularis*) by successive column chromatography on CM-cellulose, Sephadex G-50, and DEAE-cellulose. The final preparations were confirmed to be homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis.

The complete amino acid sequence of a major molecular form of adzuki beans subtilisin inhibitor ASI-I was established by manual analysis using 4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate (DABITC). Sequencing was performed on the peptides which were derived by digesting the inhibitor with TPCK-trypsin, lysyl-endopeptidase and *Staphylococcus aureus* V8-protease. ASI-I consisted of a single polypeptide of 92 amino acid residues and the molecular weight was calculated to be 10,800. A minor form of subtilisin inhibitor ASI-II was also sequenced. The amino acid sequences of the two forms of ASI were identical except that ASI-I had an extra amino-terminal sequence of 19 amino acid residues. The reactive site peptide bond of ASI was determined to be Ala-Asp. Comparison of amino acid sequences revealed that ASI's were 29-68% homologous in sequence to the inhibitors of so called "potato Inhibitor I family". The members of this family have been confirmed to require no intramolecular disulfide linkage to retain the suitable conformation for enzyme inhibition.

The reactive site peptide bond of ASI-II was readily cleaved with subtilisin during a reversed-phase HPLC of the enzyme-inhibitor complex using a trifluoroacetic acid-acetonitrile elution system. Since ASI-II had no intramolecular

disulfide linkage, the inhibitor was converted into two fragments after the limited cleavage at its reactive site. One of them corresponded to the region from the amino-terminal Lys to the reactive site P₁ Ala and the other to the region from the reactive site P₁' Asp to the carboxyl-terminal Gly of the inhibitor (N- and C-fragments, respectively). Although each fragment showed no effect on subtilisin activity, an equimolar mixture of both inactive fragments inhibited the target enzyme as did the intact ASI-II.

In general, the reactive site-modified serine-proteinase inhibitors can be reconstituted almost completely by incubation with their target enzymes for long time even if a modified inhibitor has reduced inhibitory activity. As for ASI-II, however, the present study indicated that the N- and C-fragments of the inhibitor could be reconstituted into an active form of the inhibitor by incubation only in the absence of the target enzyme. Both fragments associate each other to form a fully-active inhibitor under suitable incubation condition, and then inhibit subtilisin as strong as does the intact ASI-II.

Further investigation on the properties of the recognition sites and the non-covalent forces responsible for the association of the N- and C-fragments may provide some useful information on the protein-protein interaction.

REFERENCES

1. Kunitz, M. & Northrop, J. H. (1936)*J. Gen. Physiol.*, **19**, 991
2. Laskowski, M. Jr. & Sealock, R. W. (1971)*The Enzymes III.* (Boyer, P. D., ed.) pp. 375, Academic Press, New York
3. Fritz, H., Tschesche, H. & Green, L. J. (1974) in *Bayer Symposium V. Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E., eds.) pp. 597, Springer-Verlag, Berlin
4. Liener, I. E. & Kakade, M. L. (1980) *Toxic Constituent of Plant Foodstuffs* (Liener, I. E., ed.) pp. 7, Academic Press, New York
5. Read, J. W. & Hass, L. W. (1938)*Cereal Chem.*, **15**, 59
6. Bowman, D. E. (1946)*Proc. Sci. Exp. Biol.*, **63**, 547
7. Kunitz, M. (1947)*J. Gen. Physiol.*, **30**, 311
8. Kunitz, M. (1947)*J. Gen. Physiol.*, **30**, 291
9. Birk, Y. (1961)*Biochem. Biophys. Acta*, **54**, 378
10. Birk, Y., Gertler, A & Khalef, S. (1963)*Biochem. J.*, **87**, 281
11. Ozawa, K. & Laskowski, M. Jr. (1966)*J. Biol. Chem.*, **241**, 3955
12. Finkenstadt, W. R. & Laskowski, M. Jr. (1965)*J. Biol. Chem.*, **240**, 961
13. Kowalski, D. & Laskowski, M. Jr. (1972)*Biochem.*, **11**, 3451
14. Schecheter, I. & Berger, A. (1967)*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157
15. Sealock, R. W. & Laskowski, M. Jr. (1969)*Biochem.*, **8**, 3703
16. Kowalski, D., Leary, T. R., McKee, R. E., Sealock, R. W., Wang, D. & Laskowski, M. Jr. (1974) in *Bayer Symposium V. Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E., eds.) pp. 311, Springer-Verlag, Berlin
17. Hara, S. (1989) *Tanpakushitu Kakusan Koso* (in Japanese) **34**, 920
18. Laskowski, M. Jr. & Kato, I. (1980)*Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 593
19. Luthy, J. A., Praissman, M., Finkenstadt, W. R. & Laskowski, M. Jr. (1973)*J. Biol. Chem.*, **248**, 1760
20. Quast, U., Engel, J., Steffen, E., Tschesche, H. & Kupfer, S. (1978)*Eur. J. Biochem.*, **86**, 353
21. Carrell, R. W. & Boswell, C. W. (1986)*Protease Inhibitors* (Barrett, A. J. & Salvesen, G., eds.) pp. 403, Amsterdam, New York
22. Wilusz, T., Wiczorek, M., Polanowski, A., Denton, A., Cook, J. & Laskowski, M. Jr. (1983)*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 93

23. Wieczorek, M., Otlewski, J., Cook, J., Parks, K., Leluk, J., Wilimowska, A., Polanowski, A., Wilusz, T. & Laskowski, M. Jr. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 646
24. Koide, K. & Ikenaka, T. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **32**, 417
25. Kim, S., Hara, S., Hase, S., Ikenaka, T., Toda, H., Kitamura, K. & Kaizuma, J. (1985) *J. Biochem.*, **98**, 435
26. Yamamoto, M., Hara, S. & Ikenaka, T. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 849
27. Ikenaka, T., Odani, S. & Koide, T. (1974) in *Bayer Symposium V. Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E., eds.) pp. 311, Springer-Verlag, Berlin
28. Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 589
29. Kiyohara, T., Yokota, K., Masaki, Y., Matsui, O., Iwasaki, T. & Yoshikawa, M. (1981) *J. Biochem.*, **90**, 721
30. Yoshikawa, M., Kiyohara, T., Iwasaki, T., Ishii, Y. & Kimura, N. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 787
31. Staley, J. P. & Kim, P. S. (1990) *Nature*, **344**, 685
32. Kojima, S., Kumagai, I. & Miura, K. (1989) *Tanpakushitu Kakusan Koso* (in Japanese) **34**, 939
33. Yoshikawa, M., Yokota, K., & Hiraki, K. (1985) *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 367
34. Lowry, O. H. & Ciocalteu, V. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265
35. Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M. & Okunuki, K. (1958) *J. Biochem.*, **45**, 185
36. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404
37. Laemli, U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680
38. Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958) *Anal. Chem.*, **30**, 1190
39. Simpson, R. J., Neuberger, M. R., & Liu, T. Y. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936
40. Gray, W. R. (1972) *Methods in Enzymology* vol. 25 (Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N., eds.) pp. 128, Academic Press, New York
41. Svendsen, I., Hejgaard, J. & Chavan, J. K. (1984) *Carlsberg Res. Commun.*, **49**, 493
42. Vartak, H. G., Bodhe, A. M., Paranjpe, S. V. & Jagannathan, V. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 129
43. Vartak, H. G., Rele, M. V. & Jagannathan, V. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 134
44. Seidl, D. S., Abreu, H. & Jaffe, W. G. (1978) *FEBS Lett.*, **92**, 245
45. Seidl, D. S., Abreu, H. & Jaffe, W. G. (1982) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **19**, 153

46. Gonzalez, E., Callejas, A., Seidl, D. & Jaffe, W. G. (1979) *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 912
47. Melville, J. C. & Ryan, C. A. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3445
48. Kiyohara, T., Iwasaki, T. & Yoshikawa, M. (1981) *Potato Science*, **1**, 35
49. Richardson, M. (1974) *Biochem. J.*, **137**, 101
50. Richardson, M. & Cossins, L. (1974) *FEBS Lett.*, **45**, 11
51. Richardson, M. & Cossins, L. (1975) *FEBS Lett.*, **52**, 161
52. Graham, J. S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L. & Ryan, C. A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 6555
53. Svendsen, I., Jonassen, I., Hejgaard, J. & Boisen, S. (1980) *Carlsberg Res. Commun.*, **45**, 389
54. Svendsen, I., Boisen, S. & Hejgaard, J. (1982) *Carlsberg Res. Commun.*, **47**, 45
55. Seemuller, U., Eulitz, M., Fritz, H., & Strobl, A. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1841
56. Habeeb, A. F. S. A. & Atassi, M. Z. (1970) *Biochem.*, **9**, 4939
57. Chang, T. Y., Brauer, D., & Wittmann-Liebold, B. (1978) *FEBS Lett.*, **93**, 205
58. Hirano, H. (1984) *Tanpakushitu Kakusan Koso* (in Japanese) **29**, 374
59. Maier, K., Muller, H., Tesch, R., Witt, I. & Holzer, H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1390
60. Zeng, F., Qian, R. & Wang, Y. (1988) *FEBS Lett.*, **234**, 35
61. Tashiro, M., Asao, T., Nakano, H., Takahashi, K. & Kanamori, M. (1991) *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 265
62. Plunkett, G. & Ryan, C. A. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 2752
63. Kato, I. & Tominaga, N. (1970) *FEBS Lett.*, **10**, 313
64. Laskowski, Jr. M., Kato, I., Leary, T. R., Schrode, J. & Sealock, R. W. (1974) in *Bayer Symposium V. Proteinase Inhibitors* (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E., eds.) pp. 325, Springer-Verlag, Berlin
65. Kim, S., Hara, S. & Ikenaka, T. (1991) *J. Biochem.*, **109**, 929
66. McPhalen, C. A., Svendsen, I., Jonassen, I. & James, M. N. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7242
67. McPhalen, C. A. & James, M. N. G. (1987) *Biochem.*, **26**, 261
68. Hyberts, S. G. & Wagner, G. (1990) *Biochem.*, **29**, 1465
69. Suzuki, A., Yamane, T. & Ashida, T. (1989) *Tanpakushitu Kakusan Koso* (in Japanese) **34**, 929
70. Janin, J. & Chothia, C. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 16027

謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご指導、御鞭撻を賜りました、神戸大学農学部生物化学講座教授 岩崎照雄先生、生物機能利用学講座教授 相菌泰生先生、食品及び栄養化学講座教授 団野源一先生に心より感謝の意を表します。

本研究を行なうにあたり、適切にご指導をいただきました神戸大学農学部生物化学講座 山形裕士先生に深く感謝いたします。

また、本研究を行なうにあたり、有益なご助言、御鞭撻をいただきました北海道大学水産学部生物化学講座教授、新井健一先生に心より感謝いたします。