



# 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。



氏名・（本籍）	の ぎき ひさ のり 埜 澤 尚 範	（兵庫県）
博士の専攻 分野の名称	博 士（農学）	
学位記番号	博ろ第24号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成4年10月2日	
学位論文題目	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	
審査委員	主査 教授 岩 崎 照 雄	
	教授 相 菌 泰 生	教授 団 野 源 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質性プロティナーゼインヒビターは、動・植・微生物界の全てに普遍的に存在するタンパク質であり、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上げられてきた。また、最近では、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、タンパク質工学の発展に大きく寄与している。特に、植物起源のタンパク質性セリンプロティナーゼインヒビターについては、これまでに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プロティナーゼインヒビター (Adzuki bean subtilisin inhibitor; ASI) を分離精製してその一次構造および酵素との反応部位を決定し、他のプロティナーゼインヒビター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を行った。ついで本インヒビターに分子内S-S結合が存在しないことに注目して、インヒビタータンパク質の阻害反応部位を切断して断片化し、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企図した。

第2章では、まず、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。従来、マメ科では、トリプシンおよびキモトリプシンに対する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インヒビターは稀である。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、トリプシン及びキモトリプシンのインヒビターと同じ程度に含まれて

いることを明らかにした。

第3章では、ASI-I、IIの物理化学的なら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 Soybean trypsin inhibitor (STI-Kunitz) family や Bowman-Birk inhibitor (BBI) family とは異なるタイプの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った。ソラマメ種子からも、ASIとタンパク質化学的性質の似たズブチリシンインヒビターの報告があり、ASI様のインヒビターが、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可能性を推測した。

第4章では、ASI-I、IIの完全一次構造および反応部位プロ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)であることを確認した。また、ASIの反応部位はAla-Aspで、インヒビターのアミノ酸配列上C末端寄りに位置すること、およびASI-IIが、ASI-Iと同位のインヒビターであることを明らかにした。また、両者ともS-S結合を欠くことも明らかとなった。

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型ファミリーは生物界に分布が広く、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3次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進化論的に完全に保存されており、阻害活性発現上、最も重要なインヒビターの特性であると考えられている。ところが、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大半で、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明らかにされている。このように、阻害活性発現に必須の構造を保持するために、分子内S-S結合を必要としないことが確認されたインヒビターファミリーは、これまでポテトIのみである。

一般に、反応部位を限定水解され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からだと説明されてきた。

ポテトI型インヒビターの場合、分子内の非共有結合的相互作用が、他のインヒビターにおける分子内S-S結合の役割を担っているものと考えられるが、このような、非共有結合的相互作用のみで構造を保持したプロティナーゼインヒビターの反応部位切断で得られる修飾インヒビターの特性、特にインタクトインヒビターとの酵素阻害機能上の比較や、プロティナーゼとの相互作用については、これまでに知見が得られていない。

そこで、第5章では、ASI-IIとズブチリシンとの等モル複合体をトリフルオロ酢酸(TFA)酸性下

の逆相HPLCに供して、反応部位 (Aoa-Asp) で切断された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) を調製した。そして、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発見し、その条件および機構について調べた。

その結果、中性pHで、両フラグメントの等モル混合物 (1  $\mu$ 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、酵素阻害活性が完全に回復することを確認した。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。逆に、阻害活性が低下した再構築ASIを、再び2 $^{\circ}$ Cでインキュベートすると、阻害活性は徐々に回復した。以上の結果から、N-、C-フラグメントの解離、会合状態が、インキュベート温度に依存して、可逆的に変化していると推察した。

従来、他のS-S結合を有する反応部位切断修飾インヒビターでは、阻害活性が低い場合は、標準酵素とともに、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の場合も、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の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おこることが確認された。これは、本研究ではじ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、一部は反応部位の再結合によって元のインタクトインヒビターにもどることが明らかとなった。

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、一つの興味ある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、詳しく研究が進めば、タンパク質-タンパク質相互認識機構の解明について、更に重要な知見の蓄積が得られるものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

植物起源のタンパク質分解酵素阻害物質 (プロテイナーゼインヒビター)、就中、タンパク質性のセリンプロテイナーゼインヒビターについては、その理化学的性質、構造及び酵素阻害機構等に関して多数の研究が行われている。本論文は、アズキ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のうち、ズブチリシンに特異的に阻害するインヒビターについての研究成果を纏めたものである。その内容は、インヒビターの分離精製、化学構造の解析、ズブチリシンとの反応部位の検索及びインヒビター分子の断片化と再構築等の実験成果に関するものであり、このインヒビターの阻害活性並びに特異性の発現と構造との相関について興味ある新知見を得ている。論文は6章よりなる。

第1章は緒論であり、植物界のみならず、微生物、動物界に普遍的に見出されているタンパク質性プロテイナーゼインヒビターについて、その研究の歴史とこれまでに蓄積されているデータを総合的

に考察すると共に本研究の目的について述べている。

第2章では、まず、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及びゲル濾過により、2種のインヒビター (ASI-I、II) を比活性約120倍まで精製した。従来、マメ科植物にはトリプシンファミリーのセリンプロテイナーゼを阻害するインヒビターとして Kunitz 型と Bowman-Birk 型のもが存在することが知られていたが、本研究により、第3型のインヒビターの存在が示唆された。

第3章では、このことを確認するために、分離精製した ASI-I、ASI-II の物理化学的並びに化学的諸性質を調べている。そして、両者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、酵素阻害上の特異性だけでなく、タンパク質化学的にも従来報告されているマメ科の Kunitz 型や Bowman-Birk 型のインヒビターとは異なるインヒビターであることを示している。

第4章では、ASI-I 及び II の1次構造解析を行って、それぞれの全アミノ酸配列を決定し、ASI-I は、92残基のアミノ酸から構成されたインヒビターであり、ASI-II は、ASI-I のN末端側から19残基のアミノ酸が欠落したものであることを明らかにしている。また酵素ズブチリシンとの反応部位が、それぞれ ASI-I では、69-70番目の、ASI-II では49-50番目の Ala-Asp 結合であることも確認している。

次に ASI-I 及び II のアミノ酸配列を他のタンパク質性インヒビターのものと比較した結果、ASI-I と相同なインヒビターはマメ科植物以外の植物や動物界にも存在することを確認している。なお、これらのインヒビターは ASI と同様に分子内に S-S 結合を1個も持たないものが多く、他の型のインヒビターと違って、酵素阻害活性の発現に S-S 結合が無関係であることも確認している。

従来、タンパク質性セリンプロテイナーゼインヒビターの酵素との反応部位は S-S ループ内に位置しているため、反応部位のペプチド結合が標的酵素により切断されても阻害活性は殆ど低下しないことが知られている。そこで、ASI 型のインヒビターでは分子内の非共有結合が S-S 結合の役割を担っていると推測している。

第5章では、このことを実証するために、より低分子の ASI-II を用いて、まず、インヒビター分子の反応部位 (49-50番目 Ala-Asp 結合) を標的酵素ズブチリシンで限定加水分解して切断することを試みている。その結果、反応部位切断により、N末端側フラグメント (49アミノ酸残基) と C末端フラグメント (24アミノ酸残基) を効率的に得る方法を確立している。

次に、これら二つの不活性フラグメントから活性のあるインヒビター分子を再構築することを試みている。その結果、中性pHにおいて両フラグメントの等モル混合物をインキュベートすると、徐々にズブチリシン阻害活性が回復し、2~15℃では最終的にインタクトなインヒビターと同じ活性を持つ再構築インヒビターが得られることを認めている。この際、1時間以上インキュベートすると、切断された反応部位のペプチド結合が一部再生されるが、阻害活性は反応部位の再結合がなくても100%回復することを確認している。なお、活性の回復速度は温度上昇に伴って速くなるが、15℃以上では、最終的な回復度が温度上昇につれて低下するという興味ある現象を見出している。これにはいろいろな原因が考えられるが、両フラグメントの解離 (不活性型) と会合 (活性型) の平衡がインキュベ-

ション温度に依存して可逆的に変化する可能性が大きいと推察している。

更に、不活性フラグメントから活性型インキュベートの再構築は酵素ズブチリシンが共存すると起こらないこと、そしてこれがフラグメントの酵素分解のためではないことを確認している。

第6章では以上の研究成果について総合的に考察している。本研究のポイントは、ASIが分子内にS-S結合を1個も持っていないことに注目し、反応部位切断による断片化と再構築を行った点にある。この実験によってASI反応部位切断で得られるN末端側フラグメントとC末端側フラグメントが、まず、特異的に相手を認識して会合し活性型インヒビターを再構築すること、次にこれがインタクトなASIの場合と同様に、速やかにズブチリシンと安定な複合体を形成して阻害すること、この際、時間の経過とともに一部は反応部位が再結合されたインタクトインヒビターへと再生されることなど、いろいろ興味深い知見を得ている。これらの知見は、本研究で初めて得られてものである。

本研究は、タンパク質の構造と機能発見に関する研究分野に一つの興味あるモデルを提供するとともに、タンパク質分子間の相互認識機構の研究に寄与する新しい知見と材料を提供するものとして、価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者埜澤尚範は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。