

酸性条件下における米糠トリプシンインヒビターの Asp(19)-Pro(20)結合の開裂

田代 操 ・ 牧 善 輔

The Cleavage of Asp(19)-Pro(20) Bond in Rice Bran Trypsin Inhibitor under Acidic Condition

MISAO TASHIRO and ZENSUKE MAKI

The cleavage of Asp(19)-Pro(20) bond in rice bran trypsin inhibitor(RBTI) occurred non-enzymatically at an acid pH. This was proved by the experiments such as incubation of RBTI at pH 3.0, isolation of a modified RBTI containing a cleaved peptide bond, and chemical analyses of peptides obtained by reduction and S-carboxymethylation of the modified inhibitor. The trypsin inhibitory activity of the modified RBTI was dramatically weaker than that of native RBTI, suggesting that the cleavage of the Asp(19)-Pro(20) bond in RBTI caused a conformational change in the structure of a reactive-site region.

(Received August 15, 1988)

I 緒言

米糠トリプシンインヒビター (RBTI) は分子量 15,000の塩基性単純蛋白質で、ウシ、ブタ、ラット、ヒトのトリプシンを特異的に阻害する、いわゆる蛋白質蛋白質分解酵素阻害物質の一つである

本物質に関しては、すでに我々が単離精製と共にその性質を明らかにし¹⁾²⁾、また阻害活性と構造の関連性追究のため一次構造も解明している³⁾。さらに本インヒビターは抗栄養因子としての性格も有するため、その栄養学的意義についても種々検討を加えている^{1, 6)}。

ところで、一次構造解明の途中、我々はRBTIの阻害活性部位ペプチド結合を特異的に開裂させるため、本インヒビターに酸性条件下で*Streptomyces griseus*由来のトリプシンを作用させたところ、酵素的なペプチ

ド結合の切断と共に非酵素的切断と思われるペプチド結合(Asp(19)-Pro(20))の開裂が生じることを見出し出した³⁾。

本論文では、このAsp(19)-Pro(20)結合の切断が非酵素的に生じることの確認と共に、この結合の開裂がRBTIのトリプシン阻害活性にどのような影響を与えるのかを検討した結果を報告する。

II 実験材料及び方法

1) 実験材料

RBTIは既報²⁾に従い調製し、さらにpH8.7でのDEAE-Sephadex A-25イオン交換クロマトグラフィーによる精製を加えた。酵素活性及び阻害活性測定のためのトリプシン(ウシ膵臓、typeIV)はSigma社より、Benzoyl-D,L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPA)はK.

K.ペプチド研究所より購入した。クロマトグラフィーの担体であるBio-Gel P-10(200-400mesh)はBio-Rad社より、Sephadex G-25、DEAE-Sephadex A-25はPharmacia Fine Chemicals社より得た。末端分析に使用した試薬は和光純薬工業K. K.より、また*Penicillium*由来の酸性カルボキシンペプチダーゼ(Cpase P)はK. K. ペプチド研究所より購入した。その他の試薬はすべてナカライテスクK. K.の特級又は生化学用特製を使用した。

2) 還元およびS-カルボキシメチル化

RBTIの還元およびS-カルボキシメチル化はpH-スタット装置(RTS622型、Radiometer社)を用い、Crestfieldら⁷⁾の方法で行なった。反応終了後、過剰の試薬をSephadex G-25によるゲルろ過により除去した。

3) アミノ酸分析

RBTIおよびペプチドのアミノ酸組成は、サンプルを真空下110°C、22時間、5.7N塩酸で加水分解した後、アミノ酸自動分析機(Kyowa K-202型)を用いて決定した。

4) アミノ酸配列分析

N末端よりのアミノ酸配列分析はIwanagaら⁸⁾による手動エドマン分解法によって行なった。PTH-アミノ酸の同定はSilica Gel 60 F₂₅₄(5×20cm、Merck社)を用いる薄層クロマトグラフィー(TLC)によった。C末端よりのアミノ酸配列分析はCpase Pによる酵素消化法を用い、遊離したアミノ酸をアミノ酸自動分析機で同定した。

5) 電気泳動

Davis⁹⁾の方法に従い、pH9.4、7.5%のゲル濃度でディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動(Disc-PAGE)を行なった。泳動後、ゲルを1%アミドブラック液に浸し、蛋白質バンドを染色した。

6) トリプシン阻害活性の測定

ウシ・トリプシンに対するRBTIの阻害活性をBAPAを基質として前報⁶⁾と同様の方法で測定した。なお、トリプシン濃度は活性部位滴定法¹⁰⁾により、RBTI濃度は280nmでの吸光度係数($E_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 1.61$)²⁾から求めた。

III 実験結果

1) 酸性条件下におけるRBTIの変化

10mgのRBTIを1mlの0.1M酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液(pH3.0)に溶解し、37°Cで48時間インキュベーションした。Fig.1-bはインキュベーション終了後のRBTIのDisc-PAGEの結果を示している。Fig.1-aで示される未処理RBTIと比較すると、明らかに易動度の異なる新たな蛋白質バンドが出現したことが認められる。この新たな蛋白質バンドは元のRBTIに比べ陽極の方へより多



Fig. 1. Disc electrophoretic patterns of native rice bran trypsin inhibitor(RBTI) and RBTI incubated in 0.1 M Na-acetate-HCl buffer(pH 3.0) at 37°C for 48hr.

a, native RBTI ; b, RBTI incubated.

く動いていることから、このものはpH9.4の条件下では未処理RBTIよりもより多くマイナスに荷電していることが理解される。RBTI分子の一部がこのようにpH3.0のインキュベーションで変化し、修飾インヒビターとなるには二つの原因が考えられる。一つはRBTI分子中のアスパラギン又はグルタミン残基が脱アミノ化される場合であり、もう一つは分子中のペプチド結合が開裂する場合である。後者の場合であれば、修飾RBTIを還元した後S-カルボキシメチル化すれば低分子化したペプチドが得られるはずである。いずれにしても、RBTI分子は酸性条件下で一部修飾され変化することが明らかとなった。

2) 修飾RBTIの単離

先の電気泳動の結果より、修飾RBTIを単離するには陰イオン交換クロマトグラフィーが適当であると理解される。そこでpH3.0でインキュベーションしたRBTI溶液を脱塩し、凍結乾燥した後、0.05Mトリス・塩酸緩衝液(pH8.8)に溶解し、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(1×20cm)に添加し、イオン交換クロマトグラフィーを行なった。結果をFig.2に示す。RBTIは未吸着画分に溶出するA-1と0~0.1Mの食塩グラジエントで溶出するA-2の二つの画分に分離した。それぞれのDisc-PAGEの結果はFig.3に示される。電気泳動パターンから明らかな様に、A-1は未処理

RBTi, A-2は修飾RBTiに相当した。また、両者のアミノ酸組成は未処理RBTiと同一であった。以上の結果より、pH3.0でのインキュベーションにより生成した修飾RBTiは本クロマトグラフィーにより完全に単離されること、さらにA-1とA-2の紫外吸収値の比較から、pH3.0、37°C48時間のインキュベーションにより全RBTiの約30%が修飾されることが示された。

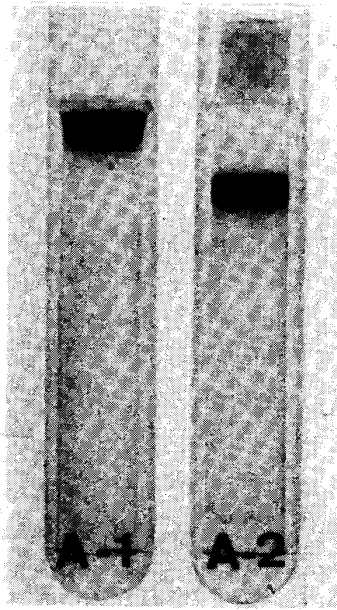


Fig. 3. Disc electrophoretic patterns of two protein peaks (A-1 and A-2) separated by DEAE-Sephadex A-25 chromatography. A-1 and A-2 are those shown in Fig. 2.

3)修飾RBTiの還元及びS-カルボキシメチル化と生成したペプチドの分離及び末端分析

先に述べた様に、修飾RBTi(A-2)が分子内に開裂したペプチド結合を有していると仮定すると、本分子を還元さらにS-カルボキシメチル化し、S-S結合を切断すればペプチドが得られるはずである。Fig.4はA-2を還元さらにS-カルボキシメチル化して得た試料(Cm-A-2)をBio-Gel P-10を用いてゲルろ過した時の溶出パターンを示している。すなわち、数回のDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーで単離されたA-2画分を集め、還元、S-カルボキシメチル化した後、その5mgを0.2M酢酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)で平衡化したBio-Gel P-10カラム(2.5×150cm)に添加した。図に示される様に、二つのペプチド画分(A-2-1及びA-2-2)が得られた。なお、A-2-2画分の後方に見られる230nmでの吸収ピークは試薬由来のものであった。これら両ペプチドのアミノ酸組成はTable 1に示される。A-2-1とA-2-2のアミノ酸組成の総和はほぼ元のRBTiのアミノ酸組成と一致した。先のアミノ酸配列分析の結果³⁾を参考にするとA-2-1は114残基、A-2-2は19残基より成ると考えられる。さらにこれを確認すべく両ペプチドの末端アミノ酸配列分析をした結果をTable 2に示す。A-2-2のN末端付近のアミノ酸配列はRBTiのN末端アミノ酸配列と完全に一致し、一方、A-2-1のC末端アミノ酸はRBTiのC末端アミノ酸と一致した。さらにA-2-2のC末端アミノ酸はAspであり、A-2-1のN末端付近の配列はPro- Pro- Gln- Trp-であった。

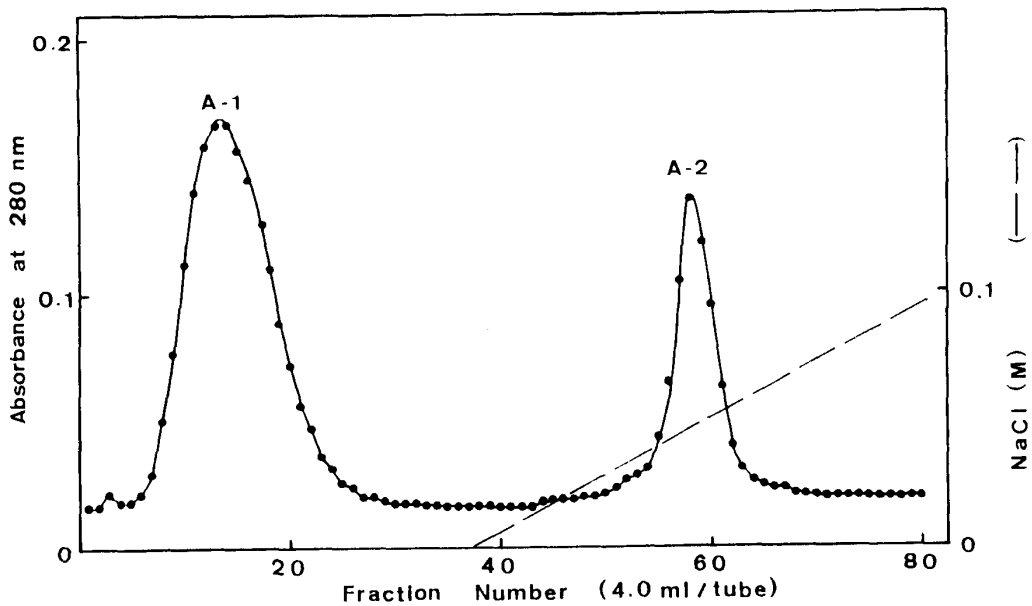


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange chromatography of RBTi incubated in pH 3.0 buffer at 37°C for 48hr. The inhibitor sample was applied on a column(1x20cm)equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.8). The protein was eluted first with the same buffer and then with a linear gradient of NaCl concentration from 0 to 0.1 M in the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr.

Table 1. Amino acid composition of peptides of A-2-1 and A-2-2 obtained by reduction and S-carboxymethylation of modified RBTI, A-2. Numbers in parentheses are the residue numbers determined after sequence analysis.

Amino acid	A-2-1	A-2-2	Cm-RBTI*
Cm-Cysteine	15.8(16)	2.3(2)	18
Aspartic acid	12.2(12)	3.2(3)	15
Threonine	3.9 (4)	1.0(1)	5
Serine	3.6 (4)	0.2	4
Glutamic acid	11.2(11)	1.1(1)	12
Proline	16.2(17)	3.3(3)	20
Glycine	7.3 (7)	0.1	7
Alanine	7.6 (7)	0.1	7
Valine	3.4 (4)		4
Methionine	1.9 (2)	0.6(1)	3
Isoleucine	1.7 (2)	0.9(1)	3
Leucine	1.9 (2)	1.1(1)	3
Tyrosine	2.1 (2)		2
Phenylalanine	4.7 (4)		4
Lysine	7.5 (8)	3.0(3)	11
Histidine	0.8 (1)		1
Arginine	7.4 (8)	2.0(2)	10
Tryptophan	+ (3)	+(1)	4
Total residues	114	19	133

*Obtained from reference 3).

Table 2. Terminal sequences of peptides, A-2-1 and A-2-2, obtained by reduction and S-carboxymethylation of modified RBTI, A-2.

Peptide	Sequence
Cm-RBTI*	Met-Glu-Arg-Pro-Trp.....Arg
A-2-1	Pro-Pro-Gln-Trp.....Arg
A-2-2	Met-Glu-Arg-Pro.....Asp

*Obtained from reference 3).

RBTI 分子中に Asp (19) -Pro (20) -Pro (21) -Gln (22) -Trp (23) の配列が存在することからも³⁾、A-2-2は修飾RBTIのN末端側ペプチドであり、A-2-1はC末端側ペプチドであると結論できる。またこのことより、修飾RBTI(A-2)は分子内にただ一ヶ所Asp(19)-Pro(20)結合が切断されているものであることが明らかとなった。

4) 修飾RBTIのトリプシン阻害活性

Fig.5はDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーによって分離されたA-1とA-2のウシ・トリプシンに対する阻害活性を示したものである。A-1の阻害活性は未処理RBTIの活性とほとんど同一であったのに対し、A-2の活性は著しく低下していた。A-1とA-2の阻害活性を定量的に比較することは阻害メカニズムとの関連で非常に難しいが、たとえば50%阻害に必要なインヒター量で強て比較するなら、A-2はA-1の約倍量を必要とし

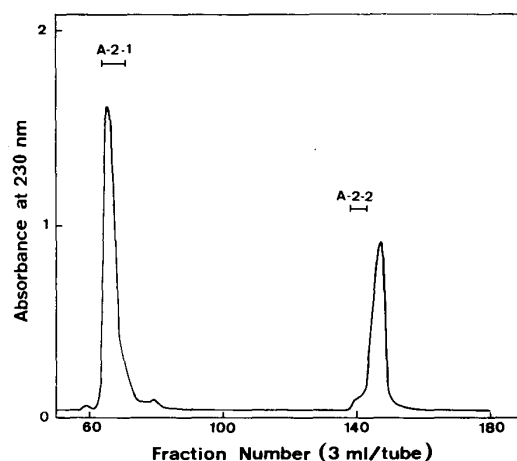


Fig. 4. Bio-Gel P-10 gel filtration of reduced and S-carboxymethylated modified RBTI, Cm-A-2. The sample was applied on a column(2.5x150cm) equilibrated with 0.2 M ammonium acetate buffer(pH 9.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 10 ml/hr.

ていた。このことは換言すると、A-2の阻害活性はA-1の約50%程度であるということである。しかしながら、両者のトリプシン阻害ハターンは図から明らかな様に本質的に異なっており、阻害定数 (Ki) における大き

な違いを示唆している。いずれにしても、RBTI分子内におけるAsp(19)-Pro(20)結合の開裂がトリプシン阻害活性の低下に大きな役割を演じていることが明らかにされた。

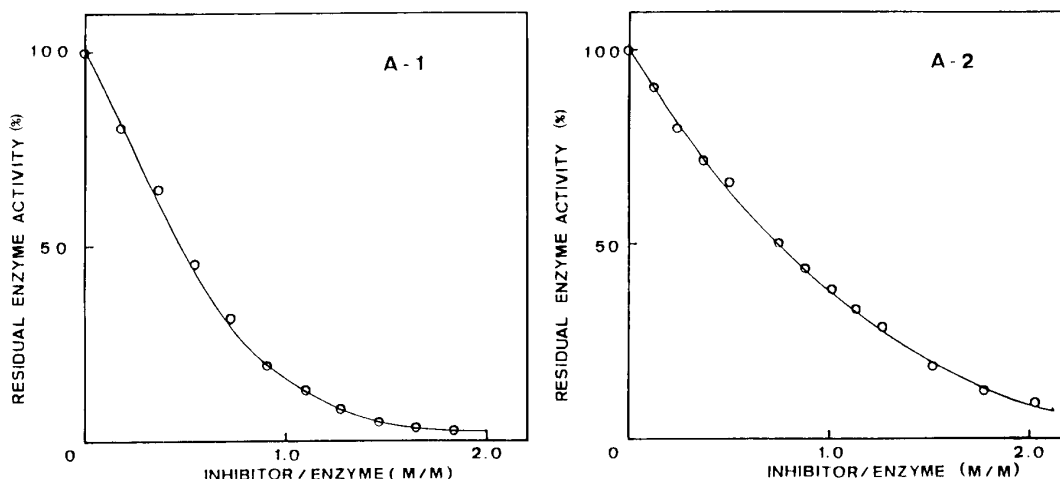


Fig. 5. Trypsin inhibitory activities of A 1 and A 2 shown in Fig. 2. Enzyme inhibitor titration was carried out at 37 C and pH 8.0 using 2×10^{-7} M trypsin concentration.

IV 考 察

本研究により、米糠トリプシンインヒビター、RBTIは酸性条件下で一部Asp(19)-Pro(20)結合の開裂した修飾RBTIに変じること、その程度はpH3.0、37C、48時間の処理で約30%であること、さらに修飾されたRBTIのトリプシン阻害活性は未修飾のものに比べ著しく減少することが明らかにされた。これらの結果は、先に我々が一次構造解明の途中見出したAsp(19)-Pro(20)結合の異常な切断³⁾が間違いなく非酵素的切断であったということを証明するだけでなく、前報⁶⁾で報告しているRBTIの酸性条件下での活性低下の分子構造的根拠をも与えている。

酸性条件下における蛋白質分子中のAsp-Pro結合の異常な切断についてはいくつかの報告¹¹⁻¹³⁾があり、そのメカニズムについても検討されている¹³⁾。また最近ではこの反応を積極的に一次構造解明のための手段として用いようとの試みもなされている¹⁴⁾。しかしながら、蛋白質性トリプシンインヒビターにおいてこの結合の切断が報告されたのはRBTIが最初である。このことは本RBTIがインヒビター分子中における一ヶ所のヘプチド結合の開裂と三次構造変動との関連性を追求する上で格好のモデルとなり得ることを意味する。

RBTIは133残基のアミノ酸より成る単純蛋白質で、

その一次構造はFig.6に示されている様に二つの相同な蛋白質が直列に連らなつた形をとっていると考えられている³⁾。これは恐らく遺伝子の重複の結果であると思われる。さらに、その基本蛋白質は大豆に存在するBowman-Birkインヒビター (BBI) と極めて高い類似性を示しており、RBTIはBBI型インヒビターが直列に

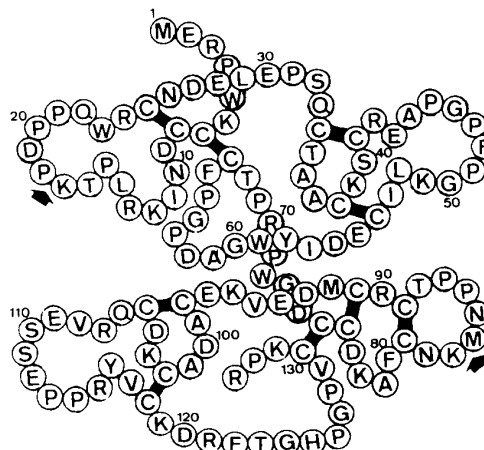


Fig. 6. The primary structure of RBTI. The locations of disulfide bridges were speculated by analogy with the structure of soybean Bowman-Birk inhibitor. Arrows indicate two putative reactive sites.

連なったものであると言える。すでに我々は、RBTIが二頭性のインヒビターであることを証明しているが¹⁵⁾、その活性部位はBBIとの類似性から、Fig.6中の矢印で示されるLys(17)-Pro(18)とLys(83)-Met(84)と想定している。Lys(17)-Pro(18)が活性部位ペプチド結合であるという点については、トリプシンの基質特異性から考えると異常であると思われる。しかしながら、今回その近傍に位置するAsp(19)-Pro(20)結合の切断が阻害活性を著しく低下させたことから上記想定は充分妥当性が高いと考えられよう。すなわち、Asp(19)-Pro(20)結合の開裂により阻害活性部位周辺の立体構造に変動が生じたものと理解される。この点に関しては、しかしながら、さらに検討する必要があると思われる。

V 要 約

米糠トリプシンインヒビター(RBTI)分子中のAsp(19)-Pro(20)結合の開裂が酸性pH下で非酵素的に生じた。このことは、pH3.0でのRBTIのインキュベーション、開裂したペプチド結合を有する修飾RBTIの単離、さらに修飾インヒビターの還元およびS-カルボキシメチル化によって得られたペプチドの分析などにより明らかにされた。修飾RBTIのトリプシン阻害活性は未修飾のものに比べ著しく低下しており、これはRBTI分子中のAsp(19)-Pro(20)結合の開裂により阻害活性部位周辺の立体構造に変動が生じたためであると考えられた。

本研究に多大の御協力をいただきました橋野仁一氏に深く感謝いたします。

(1988年8月15日受理)

引用文献

- 1) M.Tashiro and Z.Maki : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1119 (1978).
- 2) M.Tashiro and Z.Maki : *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 255 (1979).
- 3) M.Tashiro, K.Hashino, M.Shiozaki, F.Ibuki, and Z.Maki : *J.Biochem.*, **102**, 297 (1987).
- 4) 田代 操, 牧 善輔 : 京都府立大学学術報告(理学・生活科学)第30号, p.27 (1979).
- 5) Z.Maki, and M.Tashiro : *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 293 (1983).
- 6) M.Tashiro and Z.Maki : *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 591 (1986).
- 7) A. M. Crestfield, S. Moor, and W. H. Stein : *J.Biol. Chem.*, **238**, 22 (1963).
- 8) S.Iwanaga, P. Wallen, N. J. Groendahl, A.Henschen, and B.Blombaek : *Eur.J. Biochem.*, **8**, 189(1969).
- 9) B. J. Davis : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- 10) T.Chase, Jr. and E. Show : *Methods in Enzymology* (ed. by G. E. Perlman and L. Lorand), vol. 19, p.20 (1970), Academic Press, New York.
- 11) K.Dus, K. Sletten, and M.D.Kamen : *J. Biol. Chem.*, **243**, 5507 (1968).
- 12) G. L. Klippenstein, J. W. Holleman, and I.Klotz : *Biochemistry*, **7**, 3868(1968).
- 13) D. Piszkiwicz, M. Landon, and E. L. Smith : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1173 (1970).
- 14) A. S. Inglis : *Methods in Enzymology* (ed. by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff), vol. 91, p. 324(1983), Academic Press, New York.
- 15) Z.Maki, M.Tashiro, N. Sugihara and M.Kanamori : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 953 (1980)