市販大豆トリプシンインヒビター (Kunitz) に含まれている 高分子量インヒビターの分離と性質

間宮米二, 戸塚耕二, 庄司圭吾, 麻生和衛

(日本農産工業株式会社中央研究所)

昭和 48 年 5 月 17 日 受 理

Separation and Some Properties of High Molecular Weight Inhibitor from Commercial Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz) [Note]

By Yoneji MAMIYA, Koji TOTSUKA, Keigo SHOJI and Kazue ASO

Research Center, Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd.

Commercial Kunitz soybean trypsin inhibitor (STI) has been separated into two components, named STI-1 and STI-2, by gel filtration with Sephadex G-75.

The molecular weights of STI-1 and STI-2 were estimated to be 41,000~42,000 and 20,000~20,500, respectively. The former was twice as large as the molecular weight of STI (20,100) and the latter was identical with that of STI. The amino acid compositions of both STI-1 and STI-2 were in good agreement with that of STI. The trypsin and α -chymotrypsin inhibiting activities of STI-1 were low in comparison with those of STI-2. The trypsin inhibiting activity of STI-1 was 65% of STI-2.

These results suggested that STI-1 was a dimer of STI-2.

(Received May 17, 1973)

市販 Kunitz 大豆トリプシンインヒビター (以下、Kunitz 大豆トリプシンインヒビターを STI と略記) の不均一性に関しては、かなりの報告がある⁽¹⁻³⁾。しかし、STI に含まれている他の成分の性質や不均一性の原因についての報告はほとんどない。

最近、Kowalski と Laskowski⁽⁴⁾ は市販 STI をゲル濾過で精製して実験に用いているが、このとき STI の 2 量体と思われるタンパク質が存在することを認めている (未発表データ)。また、Steiner⁽⁵⁾ は STI の SS 結合を還元後、空気酸化したものはゲル濾過で単量体と会合体とに分画されることを報告している。

著者らは、市販 STI (Worthington Biochemical Corp., クロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥したものである) を Sephadex G-75 ゲル濾過で精製して実験に用いたが、このとき STI より高分子量のインヒビターが含まれているのをみだし、その二、三の性質を調べたので報告する。

トリプシンおよび α -キモトリプシン阻害活性の測定

は、Kunitz のカゼイン消化法⁽⁶⁾ に、インキュベイト温度と時間、タンパク質沈殿試薬および非沈殿性分解物の生成量測定について萩原ら⁽⁷⁾ のカゼイン-275nm 吸収 B 法を適用して行ない、阻害活性度はパーセントで表わした⁽⁸⁾。

ゲル濾過: STI 40 mg を 0.1 M NaCl を含む 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml に溶解し、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-75 (superfine) カラム (2×150 cm) に添加し、5°C で溶出した。Fig. 1 に示すように、二つのインヒビター画分 STI-1 および主成分である STI-2 を得た。それぞれ再ゲル濾過を行ない、2°C で 0.001 M HCl に透析し凍結乾燥した。STI 100 mg より、4 mg の STI-1、60 mg の STI-2 を得た。分子量は、溶出容積 (V_e)/間隙容積 (V_0) と分子量との関係より求めた⁽⁹⁾。Fig. 2 に示すように、STI-1 の分子量は 41,000、STI-2 は 20,000 で、STI-2 は STI の分子量 20,100⁽¹⁰⁾ と一致し、STI-1 は STI の約 2 倍の値を示した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動: ドデシル

硫酸ナトリウム (SDS) を用いるポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動は, 林と大場⁽¹¹⁾ の方法で行なった. 分子量は, ゲル濃度と移動度より retardation coefficient (K_R) を求め, K_R と分子量との関係より求め

Fig. 1. Gel Filtration of Commercial Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor (STI) through Sephadex G-75 Column (2x150 cm).

Protein was eluted with 0.05M Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1M NaCl at a flow rate of 5ml per hr. Fifty μ l of each fraction were used for the measurement of inhibitor activities by the casein digestion method against 25 μ g of enzymes. — absorbance at 280 nm, ●—● trypsin inhibitor activity, ○—○ α -chymotrypsin inhibitor activity, [—] tubes pooled.

Fig. 2. Estimation of the Molecular Weights of STI-1 and STI-2 by Gel Filtration through Sephadex G-75 Column (2x150 cm) in 0.05M Tris-HCl (pH 7.5) Containing 0.1M NaCl.

1. bovine albumin Fr V, 2. pepsin,
3. α -chymotrypsin, 4. cytochrome c.

た⁽¹¹⁾. Fig. 3 B に示したように, STI-1 は移動度の小さい STI-1a と大きい STI-1b とに分離した. 分子量は Fig. 3 A に示したように, STI-1a は 42,000, STI-1b は 20,000, STI-2 は 20,500 で, STI-1b および STI-2 は STI⁽¹⁰⁾ と一致し, STI-1a は STI の約 2 倍の

Fig. 3. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of STI-1 and STI-2 in the Presence of 0.1% SDS.

A: molecular weight estimation, 1. bovine albumin Fr V, 2. pepsin, 3. trypsin, 4. soybean Bowman-Birk inhibitor.

B: electrophoretic patterns. The gels contained 5% acrylamide. left: STI-2, right: STI-1, upper band STI-1a, lower band STI-1b.

Fig. 4. Inhibition of Trypsin and α -Chymotrypsin by STI-1 and STI-2.

Trypsin and α -chymotrypsin inhibitor activities were determined by the casein digestion method. On the abscissa are plotted ratios of inhibitor to enzyme, inhibitor (μ g/ml 0.001M HCl) per enzyme (40 μ g/ml 0.001M HCl). ●—● inhibition of trypsin by STI-1, ▲—▲ inhibition of α -chymotrypsin by STI-1, ○—○ inhibition of trypsin by STI-2, △—△ inhibition of α -chymotrypsin by STI-2.

Table I. Amino Acid Composition

	g Amino acid per 100 g protein		
	STI-1	STI-2	STI ^{a)}
Asp	16.50	16.46	18.00
Thr	4.39	4.32	4.28
Ser	5.92	5.64	5.78
Glu	13.43	13.47	13.02
Pro	5.44	5.59	5.91
Gly	6.13	6.10	5.85
Ala	3.50	3.71	3.62
Val	7.33	7.90	8.40
Cys/2	2.34	2.09	2.44
Met	1.16	1.49	1.77
Ile	7.92	8.02	9.09
Leu	9.35	9.62	9.10
Tyr	3.46	3.21	3.52
Phe	7.21	7.10	7.43
Lys	7.25	8.00	8.42
His	1.67	1.50	1.65
Arg	8.19	7.73	7.96
Try			1.82

^{a)} Reported by Yamamoto and Ikenaka.⁽¹²⁾

値を示した。

酵素阻害活性 : Fig. 4 に示すように, STI-1 のトリプシンおよび α -キモトリプシン阻害活性は STI-2 より低く, STI-1 のトリプシン阻害活性は STI-2 の約 65% であった。

アミノ酸組成 : アミノ酸は, インヒビターを減圧封管中 6N HCl で 110°C, 24 時間加水分解し, Technicon オートアナライザー (chromobeads A resin, 0.6×60 cm カラム) で分析した。Table I に示したように, STI-1 および STI-2 のアミノ酸分析値は, STI のアミノ酸組成⁽¹²⁾ とほぼ一致した。

以上の結果より, 主成分である STI-2 は STI であることがわかり, 高分子量の STI-1 は STI の 2 量体であると考えられる。STI-1 は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Fig. 3B) で STI-2 と同じ位置にバンドを示したが, これは STI-1 が一部解離したものである。また, 従来報告されている市販 STI の不均一性の原因の一つとして, STI の会合体形成が考えられる。

Millar ら⁽¹³⁾ は, 大豆 Bowman-Birk インヒビターについて沈降平衡法で調べた結果, 単量体-2 量体-3 量体

の平衡関係があり, 低濃度では解離し, 高濃度では会合することを報告している。Kiyohara ら⁽¹⁴⁾ は, potato proteinase inhibitor I は 0.1M 酢酸中では 2 量体, 0.1M 塩化ナトリウム中では 3 量体で存在することをゲル濾過でみだしている。また Odani ら⁽¹⁵⁾ は, 大豆より STI の精製過程において, メチオニン, トリプトファン, チロシンなどのアミノ酸残基が修飾された STI を得, これはゲル濾過により, 阻害活性 83% の単量体, 40% の 2 量体および不活性な多量体に分画されることを報告している。市販 STI の場合も, このような諸条件により解離会合が引き起こされているものと思われる。その要因についてさらに検討する予定である。

終りに本研究の発表に際し, ご校閲を賜った東京大学農学部農芸化学科亀高正大教授に深謝します。

- (1) J. J. Rackis, H. A. Sasame, R. K. Mann, R. L. Anderson and A. K. Smith: *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 471 (1962).
- (2) A. C. Eldridge, R. L. Anderson and W. J. Wolf: *ibid.*, **115**, 495 (1966).
- (3) L. C. Wang: *Cereal Chem.*, **48**, 303 (1971).
- (4) D. Kowalski and M. Laskowski, Jr.: *Biochemistry*, **11**, 3451 (1972).
- (5) R. F. Steiner: *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 111 (1965).
- (6) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- (7) 赤堀四郎ら編: 酵素研究法, 第 2 巻, 朝倉書店, 1956, p. 237.
- (8) 間宮米二, 戸塚耕二, 庄司圭吾, 麻生和南: 食品工誌, **19**, 514 (1972).
- (9) 宇井信生: 新しい生物物理化学研究法 (上), 化学同人, 1967, p. 259.
- (10) T. Koide, S. Tsunasawa and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **71**, 165 (1972).
- (11) 林 健志, 大場義樹: 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 304 (1972).
- (12) M. Yamamoto and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **62**, 141 (1967).
- (13) D. B. S. Millar, G. E. Willick, R. F. Steiner and V. Frattali: *J. Biol. Chem.*, **244**, 281 (1969).
- (14) T. Kiyohara, T. Iwasaki and M. Yoshikawa: *J. Biochem.*, **73**, 89 (1973).
- (15) S. Odani, T. Koide and T. Ikenaka: *ibid.*, **70**, 925 (1971).