

キャベツ種子 (中性サクセッション) の低分子トリプシン インヒビターの部分一次構造

渡邊 悟 北尾 悟* 牛澤良美 古仲江梨子 福澤美喜男

Partial Primary Structure of Low-Molecular Trypsin Inhibitor from Cabbage Seed (*Brassica oleracea*)

SATORU WATANABE, SATOSHI KITAO*, YOSHIMI USHIZAWA,
ERIKO KONAKA and MIKIO FUKUZAWA

Partial primary structure of low-molecular trypsin inhibitor (LMTI) from cabbage seed was estimated. Four peptide fractions (I ~ IV) were obtained from the purified LMTI by lysyl endopeptidase cleavage. N-Terminal amino acid sequences of two peptides (II and IV) were identified as follows; $\begin{matrix} \text{C} \\ \text{D} \end{matrix}$ IWGQQGNVK for II and EYGG $\begin{matrix} \text{C} \\ \text{D} \end{matrix}$ VGF $\begin{matrix} \text{E} \\ \text{G} \end{matrix}$ F $\begin{matrix} \text{C} \\ \text{D} \end{matrix}$ APRI... for IV.

既報¹⁾において、キャベツ種子 (中性サクセッション) の低分子トリプシンインヒビター (以下LMTIという) の精製標品の諸性質を検討した。その結果、このT I 標品は逆相HPLCで単一のピークを示し、また、pH 9.45付近に等電点があり、分子量約5000程度のポリペプチドで耐熱性のあることなどを明らかにした。

今回は、この精製標品について、一次構造の決定を試みた結果、若干の知見を得たので報告する。なお一次構造の解析は宝酒造(株)に委託分析を依頼して行った。

方 法

1. 還元、カルボキシメチル化および脱塩

精製LMTI (2 nmol)を500 μ lの5 M グアニジン塩酸および、0.1mM EDTA を含む2 M

トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、窒素置換後、 β -メルカプトエタノール (5 μ M) を加え、40℃、12時間反応を行った。モノヨード酢酸 (4 μ M) を加え、遮光下、室温で30分反応後、逆相HPLCを用いて脱塩を行った。

2. リジルエンドペプチダーゼ (*Achromobacter protease* I : 和光純薬) による切断

還元、カルボキシメチル化したLMTIを100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH9.0) 中で、37℃、12時間、リジルエンドペプチダーゼを作用させた (酵素と基質のモル比は1対100)。

3. HPLCによる分取およびN末端アミノ酸配列分析

酵素処理したサンプルを逆相HPLCにかけ、ペプチド断片と思われるピークを分取し、プ

*キッコマン(株)研究本部 Kikkoman Corporation, Research and Development Division

Key words : Primary structure, Trypsin inhibitor, Cabbage seed

ロテインシーケンサーにより各画分のN末端アミノ酸配列分析を行った。

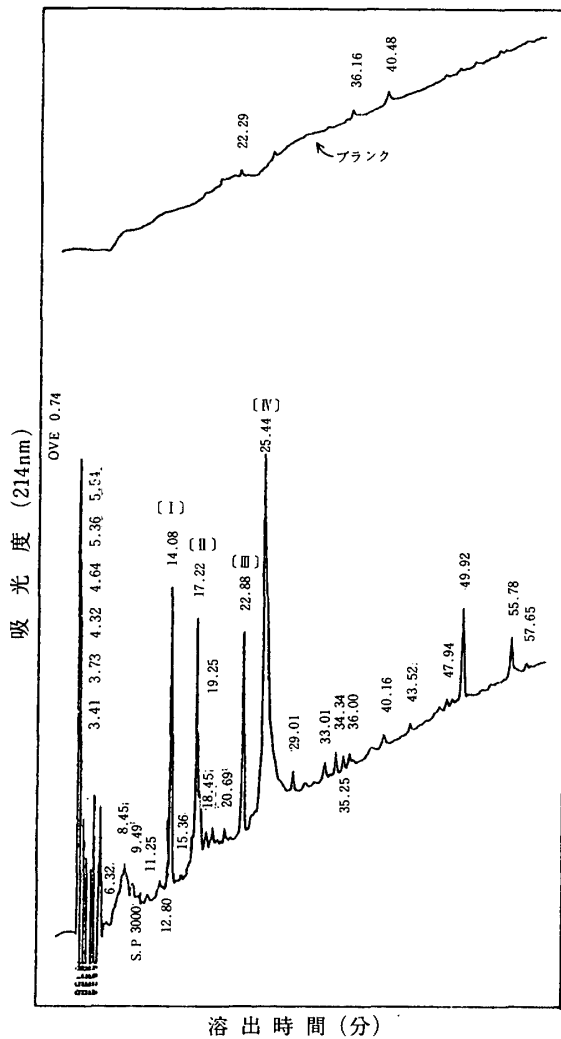


図 1 Achromabacter protease I 分解物の逆相HPLCによる分離

ペプチド断片の分取には Waters 社製 μ Bondasphere ($\phi 2.1 \times 150\text{mm}$, C4 300Å) を用い、流速 0.2ml/min 、検出波長 214nm 、溶離液として A 液： 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液、B 液： 0.1% トリフルオロ酢酸-（2-プロパノール：アセトニトリル = 7：3）溶液を用い、60分 で B 液が 0 から 80% になるように濃度勾配をかけて溶出した。

プロテインシーケンサーは島津製作所製、PSQ-1 型を用いた。

結果および考察

LMTI の一次構造を解析するためにエドマン法を試みたが、反応しなかったため、N 末端がブロックされていることが考えられた。そこで LMTI をプロテアーゼにより水解し、ペプチド断片を得、内部配列の解析を行った。

プロテアーゼとしてはリジン残基のカルボキシル基末端側を切断するリジルエンドペプチダーゼを用いたが、LMTI はトリプシンを阻害するとともにリジルエンドペプチダーゼも阻害するため、LMTI の立体構造をくずす必要性があった。そこで LMTI を還元後、カルボキシメチル化し、遊離のシステインをカルボキシメチルシステインにした状態で酵素処理を行った。この酵素分解物の逆相 HPLC による分離を示したのが図 1 である。4 つの主要なペプチド断片と思われるピーク（I～IV）が見られ、それらを分取し、エドマン法^{2,3)}を基礎とした N 末端配列分析を行った。

表 1 N 末端アミノ酸配列分析結果

ペプチド断片	溶出時間(分)	アミノ酸配列
I	14.08	N 末端ブロックの可能性
II	17.22	(C)-I-W-G-Q-G-G-N-V-K (D)
III	22.88	解析不能 (いくつかのペプチド混在の可能性)
IV	25.44	E-Y-G-G-(C)-V-G-F-(E)-F-(C)-A-P-R-I- (D) (G) (D)

() はいずれのアミノ酸か判断が難しいもの

その結果をまとめたのが表1である。

ペプチド断片ⅠはPTH(フェニルチオヒダントイン)-アミノ酸が見られず、N末端アミノ酸が修飾されている可能性が考えられた。

ペプチド断片Ⅱは10残基目にリジン(K)が見られたことからデカペプチドであると思われた。1残基目はPTH-カルボキシシステインとPTH-アスパラギン酸の判別が付きにくいいため、システイン(C)とアスパラギン酸(D)の両者の可能性を示している。

ペプチド断片Ⅲは、複数のPTH-アミノ酸がかなり同時に見られ、複数のペプチドが混在している可能性があり、解析不能と判断した。

ペプチド断片Ⅳは15残基まで同定ができた。5残基目と11残基目はCとDの両者の可能性を示し、9残基目は操作上の問題でグルタミン酸(E)とグリシン(G)の両者の可能性が考えられた。なお、リジルエンドペプチダーゼの特異性から考えてこの断片が、C末端である可能性も考えられるが、推定の域を出ない。

今後、他の酵素で水解して得られるペプチド断片のN末端配列分析を行い、本結果と重ね合わせをして、アミノ酸配列順序(一次構造)の解析を進めていきたい。

要 約

キャベツ種子(中性サクセッション)の低分子トリプシンインヒビターの部分一次構造解析を行った。

(1) リジルエンドペプチダーゼによる水解で、4つの主要なペプチド断片(Ⅰ~Ⅳ)が得られた。

(2) そのうち2つの断片(ⅡとⅣ)についてN末端アミノ酸配列が以下のように同定できた。Ⅱは $\left\{ \begin{matrix} C \\ D \end{matrix} \right\} I W G Q G G N V K$ 、Ⅳは $E Y G G \left\{ \begin{matrix} C \\ D \end{matrix} \right\} V G F \left\{ \begin{matrix} E \\ G \end{matrix} \right\} F \left\{ \begin{matrix} C \\ D \end{matrix} \right\} A P R I \dots\dots$ であった。

稿を終わるにあたり、一次構造の解析にご協力いただいた宝酒造株式会社に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 渡邊 悟、北尾 悟、牛澤良美、森末裕子、梅田美智子、福澤美喜男：聖徳栄養短期大学紀要、**24**、35 (1993)。
- 2) EDMAN, P. : Acta Chem. Scand., **4**、283 (1950)。
- 3) HUNKAPILLER, M. W. and HOOD, L. E. : Science, **219**、650 (1983)。