



蛋白質の一アミノ酸を他のアミノ酸に置換したときの生理活性の変化

池 中 徳 治*

はじめに

生体を構成している蛋白質は約20種類のアミノ酸が数十ないし数千が一定の配列でペプチド結合により重合したものであり、この一定のアミノ酸配列が蛋白質の三次元的立体構造を支配している。この三次元的構造が破壊されるとその蛋白質特有の生理活性が失われることが多い。蛋白質のアミノ酸配列はその合成の場である小胞体中のリボゾーム上でメッセンジャーRNAの塩基配列により規制されているが、メッセンジャーRNAの塩基配列は遺伝子であるDNAの塩基配列により決定されている。このためDNAの塩基1個が突然変異を起こせば、メッセンジャーRNA、次いで蛋白質中のある1個のアミノ酸が置換された蛋白質が合成されることになり、置換されたアミノ酸の種類によってはその蛋白質特有の生理機能も失われ、いわゆる分子病とよばれる遺伝的疾患の起こる原因になる。人血液中で酸素運搬の役目をしているヘモグロ빈は、 α 鎖と呼ばれるアミノ酸141個からなるポリペプチドと β 鎖と呼ばれるアミノ酸146個からなるポリペプチドがそれぞれ2本ずつから構成されているが、 β 鎖のN-末端から6番目のグルタミン酸のみがバリンに置換したヘモグロビン（ヘモグロビンS）を持っている人は還元型（酸素を離した状態）のヘモグロビンSが正常のヘモグロビンに比し50分の1の溶解度であるため粘度の上昇が起こり、これが引金となって貧血を起こすことになる。ヘモグロビンの574個のアミノ酸中2個のアミノ酸の置換により大きく生理機能を変化させるのである。このようにある蛋白質中の

一アミノ酸を他のアミノ酸に簡単に置換することが出来、それに伴う生理活性の変化を調べることが出来れば、その蛋白質の生理機能によろばアミノ酸残基の寄与を研究することが出来る。

蛋白質は化学的ペプチド合成法によりアミノ酸を素材として順次延長して合成することも出来るが、この方法を用いて目的とする蛋白質を純粋に合成することは大仕事であり、またその一アミノ酸を他のアミノ酸に置換した蛋白質を何種類も合成することは更に大変である。1974年米国Purdue大学のLaskowski, Jr., 教授らは大豆種子中に含まれているKunitzトリプシンインヒビター（分子量20,000, 181個のアミノ酸からなる蛋白質でトリプシンの活性を阻害する）のトリプシン阻害部位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することに成功し、置換インヒビターのプロテアーゼ阻害活性について興味ある結果を報告したが、われわれも同様な方法を用いて大豆中に存在するBowman-BirkプロテアーゼインヒビターのN-末端から44番目のセリンを他のアミノ酸に置換した数種のインヒビター蛋白質を合成し(?)そのプロテアーゼ阻害活性におよぼす置換アミノ酸の影響を調べた。

2. 大豆 Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターのキモトリプシン阻害部位セリンの他のアミノ酸による置換

大豆中には分子量20,000のKunitzトリプシンインヒビターの他に分子量8,000のBowman-Birkインヒビター（BBIと略す）と呼ばれる蛋白質性の小分子プロテアーゼインヒビターが存在する。このインヒビターは71個のアミノ酸から構成される一本のポリペプチドであるが、14個のシステイン残基が含まれ、それらが7個のジスルフィド結合を作っているため非常

* 池中徳治 (Tokuji IKENAKA), 大阪大学理学部, 化学科, 有機生物化学講座, 教授, 理学博士, 有機生物化学

に安定な構造をとっている。BBI は2つの相同なドメインから構成され、その一つはトリプシンを阻害する部位 $\text{Lys}^{16}\text{-Ser}^{17}$ を含み、他のドメインはキモトリプシンに対する阻害部位 $\text{Leu}^{43}\text{-Ser}^{44}$ を含んでいるため一分子の BBI は同時にトリプシン、キモトリプシン各一分子を結合して両酵素活性を阻害することが出来るので double headed inhibitor (双頭型インヒビター) と呼ばれている。

BBI のキモトリプシン阻害部位 $\text{Leu}^{43}\text{-Ser}^{44}$ のセリン残基を図1に示すような方法で他のアミノ酸に置換することが出来た。即ち BBI 中に存在する5個のリジンの ϵ -アミノ基を O -メチルイソ尿素でグアニジル化し、 N -末端アス

パラギン酸の α -アミノ基をシアン酸カリでカルバモイル化することにより保護したのち (図1, I), うし腭臓 α -キモトリプシンを pH 3.0 で2晩作用させると $\text{Leu}^{43}\text{-Ser}^{44}$ 結合が特異的に切断される (II)。新しく生じた N -末端セリンをエドマン法 (蛋白質の N -末端アミノ酸から逐次1個ずつアミノ酸をフェニルチオヒダントイン誘導体にして外し、アミノ酸配列を決定する方法) により除去して $\text{des-Ser}^{44}\text{-BBI}$ (III) を得るが、(I) および (II) はキモトリプシンを阻害する活性を有するが (III) は阻害活性を持たなくなる。Ser⁴⁴ の代りに他のアミノ酸を挿入するためアミノ酸の活性エステル (Boc-(amino acid) ONSu) を作用せしめて Tyr⁴⁵ の α -アミノ基に Boc-amino acid を付加したのち (IV), トリフルオロ酢酸で Boc 基を除くことにより amino acid⁴⁴ の挿入された BBI を作ることが出来る。

このような方法で amino acid⁴⁴ としてグリシン (Gly), アラニン (Ala), セリン (Ser), トレオニン (Thr), バリン (Val) およびロイシン (Leu) の挿入した BBI を作ることが出来た。これら置換 BBI はキモトリプシンと複合体を形成して酵素活性を阻害するが、複合体の解離恒数 (解離が小さい程阻害が強い) を測定すると表1のごとくである。[Ala⁴⁴] BBI は [Ser⁴⁴] BBI とほぼ同じ程度の阻害活性を有するが、[Gly⁴⁴] BBI が全く阻害活性を持たないことから amino acid⁴⁴ の αCH_3 基ある

表1. 置換 Bowman-Birk インヒビターとキモトリプシンの複合体の解離恒数

置換 BBI	Kd (M)
[Ser ⁴⁴] BBI	3×10^{-7}
[Ala ⁴⁴] BBI	7×10^{-7}
[Thr ⁴⁴] BBI	6×10^{-6}
[Val ⁴⁴] BBI	1×10^{-5}
[Leu ⁴⁴] BBI	5×10^{-5}
[Gly ⁴⁴] BBI	—
des-Ser ⁴⁴ -BBI	—

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$K_d = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

E: キモトリプシン

I: 置換 BBI

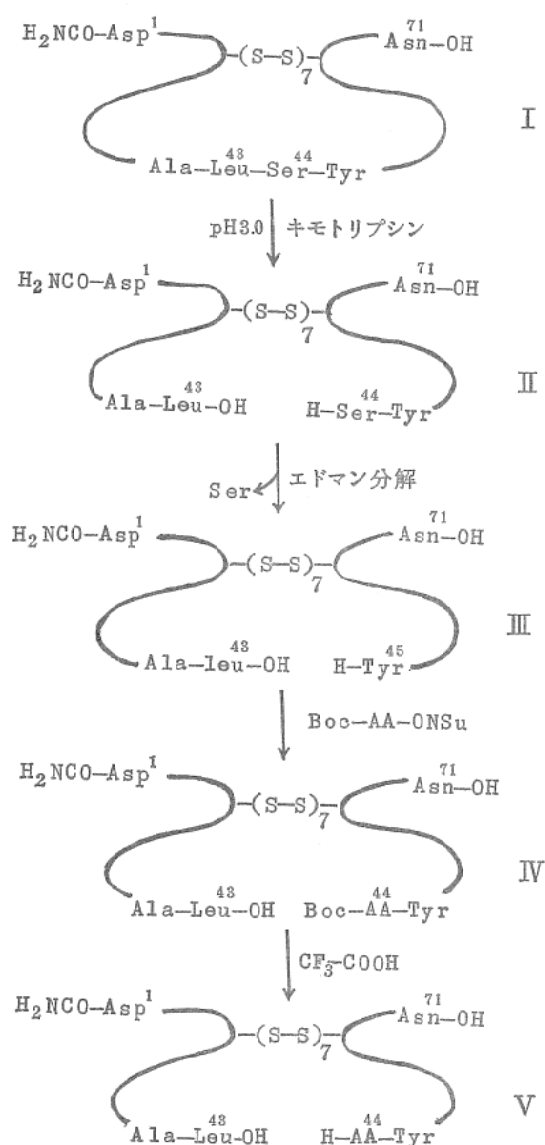


図1. Bowman-Birk インヒビターの Ser⁴⁴ の他のアミノ酸による置換

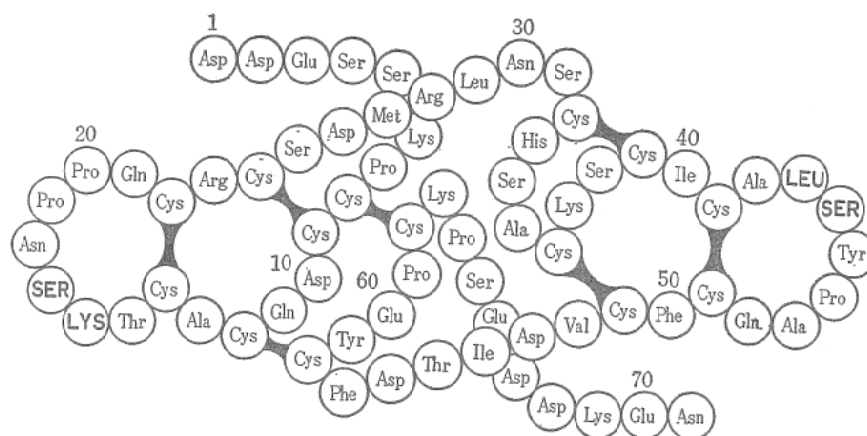
いは αCH_2 基が 酵素阻害活性発現に 必要であることがわかる。一方 $[\text{Thr}^{44}]\text{BBI}$, $[\text{Val}^{44}]\text{BBI}$, $[\text{Leu}^{44}]\text{BBI}$ と amino acid⁴⁴ の側鎖が大きくなるに従って解離恒数が大きくなることは βCH_2 基あるいはそれ以上の大きな側鎖の立体障害によりインヒビターがキモトリプシンの活性中心に密に接触し得なくなることを物語っていると考えられよう。

3. む す び

以上簡単に蛋白質として大豆 Bowman-Birk インヒビターを用いて N-末端から44番目のセリンを数種のアミノ酸に置換する方法について述べたが、この方法は全ての蛋白質に適用して任意のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することが出来るのではなく、われわれが用いた蛋白質がプロテアーゼイヒビターであり、プロテアーゼがインヒビターの阻害部位を特異的に切断するためにアミノ酸置換に成功したのである。それ故特殊なペプチド結合が特異的に切断される

ような方法が開発されれば、ここに述べた方法でアミノ酸置換が行われる可能性があるわけである。

興味あることは豆科植物種子から数多くの Bowman-Birk 型の double headed inhibitor が単離され、そのプロテアーゼ阻害部位が決定されているがその全てが Bowman-Birk インヒビターの2つの阻害部位 Leu-Ser, Lys-Ser と同様 X-Ser であり、Xは阻害するプロテアーゼの基質特異性により異なるにも拘わらず、セリン Ser が共通であることは、このアミノ酸が阻害活性発現に重要な役割を果していると考えられる。確かにこのセリンを他のアミノ酸が置換すると阻害活性が減少あるいは全く無くなることから自然淘汰により最もプロテアーゼ阻害活性の強い X-Ser 型のインヒビターのみが生き残ったと考えると現在自然界に存在する蛋白質中の各アミノ酸の存在意義が意味づけられるであろう。



Bowman-Birk インヒビターの全構造