

氏 名	フ ャ ム テ ィ エ ン ゴ ッ ク PHAM THIEN NGOC
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 118 号
学位授与の日付	平 成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科材料科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on the Serine Protease Inhibitor
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 山 中 寛 城 教 授 松 原 藤 好 助教授 泉 邦 彦

論 文 内 容 の 要 旨

プロテアーゼは消化過程のみならず、生体内生理過程において様々な重要な役割を果たしている。プロテアーゼはインヒビターによってその活性は制御されており、そのバランスの喪失は生体を重大な事態に引き込む。したがって、プロテアーゼとインヒビターの相互作用の解析は両者の直接的関連に止まらず、生命現象全般の理解にとって極めて重要である。このような観点から、プロテアーゼインヒビターの生物界における分布、新規インヒビターの発見、特性解明に基づく有用インヒビターの選別およびそれらの生産方法の確立などを目指して本研究は行われた。

第Ⅰ章 ウリ科植物種子に含まれるプロテアーゼインヒビターの分布

出身国であるベトナムで栽培されている8種類のウリ科植物種子に含まれるトリプシン、キモトリプシンおよびエラスターゼインヒビターの含有量を測定し、*Momordica charantia*に大量のインヒビターが含まれていることを見いだした。他の種子には通常トリプシンインヒビターしか含まれないのに対し、本種子にはキモトリプシンやエラスターゼインヒビターも含まれており、新規なインヒビターの材料として有望であることを明らかにした。

第Ⅱ章 ニガウリ種子に含まれるトリプシンおよびエラスターゼインヒビターの精製とアミノ酸配列の決定

第Ⅰ章における検討に基づき、日本産 *Momordica charantia* であるニガウリ種子から、トリプシンインヒビター3種類とエラスターゼインヒビター4種類を精製し、それらのアミノ酸配列を決定した。また、これらのインヒビターのアミノ酸配列の相違と阻害活性との相関を調べ、標的酵素との結合におけるインヒビター側の各アミノ酸残基の役割を明らかにした。

第Ⅲ章 カイコのカビプロテアーゼインヒビター FPI-F の精製方法の改良と諸特性の解明

カビプロテアーゼを阻害するインヒビターとしてカイコ体液から精製された FPI-F は、今までに報告されているインヒビター類の中でも極めて珍しいものであり、かつカビの増殖抑制など食品工学や医学上の重要性を有するものである。そこでまず簡便で迅速な精製ができるよう、既に報告されている精製方法に改良が加えられた。1) 体液の30~65%飽和硫酸アンモニウムによる分別沈殿、2) 65℃、10分間の熱処理による不純タンパク質の除去、3) CM-セルロファインによるイオン交換クロマトグラフィー、4) ハイロード S によるイオン交換クロマトグラフィー、5) セルロファイン GCL-90m によるゲルろ過、6) 逆相クロマトグラフィー、の計6段階の精製法により純粋の FPI-F を得た。従来法より1段階少なく、かつ収量を約2倍に増加させた。つぎに精製 FPI-F を用いて、ズブチリシンおよび *Aspergillus melleus* のプロテアーゼに対する阻害定数を求め、本インヒビターがこれらのプロテアーゼに対する非常に強いイン

ヒビターであることを明らかにした。

第Ⅳ章 阻害反応部位の決定

酸性条件下に FPI-F にズブチリシンを作用させて限定分解し、得られた修飾インヒビターをさらに還元 S-カルボキシメチル化して 2 つのペプチドに分離して、切断箇所をアミノ酸配列分析により決定した。また、修飾インヒビターに等モルのズブチリシンで複合体を形成させて切断箇所を修復することにより、Thr(29)-Val(30) が阻害反応部位であることを明らかにした。

第Ⅴ章 S-S 結合の位置決定

FPI-F は 4 個の S-S 結合を含んでおり、その位置を決定するためズブチリシンによる限定分解、70% ギ酸による Asp(20)-Pro(21) 結合の切断、トリプシンおよびサーモリシンによる分解により断片化に成功した。逆相クロマトグラフィにより S-S 結合を含むペプチド断片を分離し、それらのアミノ酸配列分析を行うことにより 4 個の S-S 結合の位置を決定した。アミノ酸配列、阻害反応部位の位置および S-S 結合の位置に合致する既知のインヒビターファミリーは存在せず、FPI-F が全く新規なインヒビターであることを証明した。以上の結果に基づき、本インヒビターの型を Bombyx Family と命名した。

第Ⅵ章 FPI-F 遺伝子を含むベクターウイルスの構築とカイコにおける遺伝子発現

FPI-F 遺伝子をリガーゼで pAcYM1 ベクターに挿入することにより、トランスファーベクターを構築した。ヨトウガ細胞 sf 21 を用いて、トランスファーベクターをカイコ・ヨトウガ両用ウイルス HyNPV の DNA と相同組み替えしてリコンビナントウイルス Hy-IF を調製した。Hy-IF を sf 21 細胞に感染させ、培養上清のインヒビター活性の増加を確認した。次に、カイコ品種大平長安および新竜角に感染させ、いずれの場合もインヒビターが生産されることを実証した。特に、新竜角においてはその生産量は多く、FPI-F 生産品種 C124 の約 4 倍に達した。一方、大平長安においては感染後急激にカイコの成長が遅延し死期が速まるため、実質的なインヒビターの生産量は極めて少なくなることを明らかにした。このことはカイコ・バキュロウイルス系によるタンパク質生産において、品種の選択が極めて重要であることを実証した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、出身国ベトナム産ウリ科植物種子に含まれるプロテアーゼインヒビターの分布を検索し、新規インヒビターを含む有用種を見つけた。さらに日本産の同種ウリ科植物ニガウリから新規インヒビターを精製および構造決定し、プロテアーゼとの結合に関与するアミノ酸残基の重要性を明らかにした。さらに、カイコ体液中に見いだされたセリンプロテアーゼインヒビター FPI-F の阻害反応部位および S-S 結合の位置を決定し、本インヒビターが既知のインヒビター類とは全く異なった新規なものであることを証明することにより、Bombyx Family と言う新たなインヒビターの型を提唱した。また、本インヒビターの遺伝子をバキュロウイルスに挿入し、カイコによるインヒビターの大量生産の道を開いた。学位論文草稿に記載された内容には新規性があり、学術研究の発展に寄与するものと考えられる。

なお、本論文審査に添付された発表論文は下記の通りである。

1. Serine proteinase inhibitors of cucurbitaceous seeds cultivated in Vietnam.

Thien Ngoc Pham, Ryo Takano, Kaeko Kamei-Hayashi and Saburo Hara, Medical Biochemistry-Researchwork (1994) 1, 34-35 (in Vietnamese)

2. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN) seeds: Purification, amino acid sequences and inhibitory activities of four new inhibitors.

Nobuaki Hamato, Tadashi Koshiha, Thien-Ngoc Pham, Dai Nakamura, Ryo Takano, Kaeko Hayashi, Yeong-Man Hong and Saburo Hara, J. Biochem. (1995) 117, 432-437

3. A new family of serine protease inhibitors (bombyx family) as established from the unique topolo-

gical relation between the position of disulfide bridges and reactive site.

Thien-Ngoc Pham, Kaeko Hayashi, Ryo Takano, Masanobu Itoh, Masaharu Eguchi, Hiroshi Shibata, Takaharu Tanaka and Saburo Hara, J. Biochem. (1996) **119**, 428-434

4. Expression of bombyx family fungal protease inhibitor F from *Bombyx mori* by baculovirus vector.

Thien-Ngoc Pham, Kaeko Hayashi, Ryo Takano, Hiroshi Nakazawa, Hajime Mori, Masatoshi Ichida, Masanobu Itoh, Masaharu Eguchi, Fujiyoshi Matsubara and Saburo Hara, J. Biochem. (1996) **119**, 1080-1085