

海亀卵白の蛋白質に関する研究：(第3報)卵白中の プロテイナーゼインヒビターについて

著者	福永 隆生, 古賀 克也
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	28
ページ	157-168
別言語のタイトル	Studies on the Sea-turtle's Egg White Proteins : III On the Proteinase Inhibitor in the Egg White
URL	http://hdl.handle.net/10232/2449

海亀卵白の蛋白質に関する研究

(第3報) 卵白中のプロテイナーゼインヒビター
について

福永隆生・古賀克也

(昭和52年8月25日 受理)

Studies on the Sea-turtle's Egg White Proteins III On the Proteinase Inhibitor in the Egg White

Takao FUKUNAGA and Katsuya KOGA
(Laboratory of Animal Biochemistry)

緒 論

鳥類の卵白中に存在するオボムコイドはトリプシン作用を阻害することが古くから知られている。また、松島¹⁸⁾は鶏卵白中にオボムコイドと異なるトリプシンインヒビターを見出し、これをオボインヒビターと名付けている。その後 Liu^ら¹⁷⁾も七面鳥、ウズラ卵白よりオボインヒビターを分離している。著者らはウズラ、アヒルの卵白からプロテイナーゼに阻害作用をもつオボムコイド様グロブリンを分離し、これはオボインヒビターとは化学的性質や組成が多少異なることを認めている^{13, 14)}。これらのプロテイナーゼインヒビターの卵白中における役割については、まだ明らかにされていない。しかし、卵白中で何らかの生化学的役割を演じていることが推察される。著者らは前報⁹⁾で海亀卵白蛋白質の塩濃度勾配抽出によって硫酸溶液に対する溶解度からオボムコイドに属する成分(0.63~0.9 飽和で沈殿する成分)が非常に多く、可溶性蛋白質中 37~38%を占めていることを報告した。また、この画分は CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより5~6成分に、また、ゲル濾過により4成分に分かれることも発表した。

海亀卵白の上記オボムコイド成分中にトリプシンインヒビターの存在が予測されたので、今回はこの成分についてインヒビターの検索を行なった。その結果、トリプシンインヒビターの存在が確認され、インヒビターとして5成分が認められた。これらのプロテイナー

ゼインヒビターは溶解性からはオボムコイドに属するが、中性糖、アミノ糖を含まず、鳥類卵白に見出されているプロテイナーゼインヒビターとは全く異なるものである。また、これらのインヒビターは多価性のインヒビターと推定された。

これらのプロテイナーゼインヒビターの分離精製を行ない、2, 3の性質を明らかにしたのでここに報告する。

実験方法

前報⁹⁾に準じて、硫酸塩析法により、海亀卵白から粗オボムコイドを分離し、つぎに水透析により硫酸を除去した。その凍結乾燥粉末を実験材料として使用した。前報⁹⁾に述べたようにオボムコイド画分はゲル濾過と CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより5~6個に分画出来る。しかし、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なう場合、CM-セルロースの部分崩壊物がわずかではあるが溶出してくるので、今回は CM-セファデックスを用いて分画を行なった。以下これらの一連の実験方法について述べる。

1. ゲル濾過

前報⁹⁾での結果を参照してセファデックス G-75 を用い、大量を分画するのに充分な bed volume を得るため 3.8×97 cm カラムを用いた。緩衝液はつぎの CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーにおける最初の緩衝液と同一の緩衝液、すなわち、0.05 M-磷酸塩緩衝液 (pH 5.4) を用いた。試料は緩衝液に透析後約 3% 溶液として 15 ml を流した。緩衝液の流速は定量ポンプを用いて 2.65 ml/cm²・hr とした。

本報告の概要は昭和50年10月(広島市)および昭和52年10月(佐賀市)日本農芸化学会西日本支部大会で発表した。

2. CM-セファデックスカラムクロマトグラフィー

CM-セファデックス C-50 を用い、 $2.2 \times 25 \text{ cm}$ カラムに約 1% の試料液 20~25 ml を注入し、蛋白質を吸着させ、0.05 M-リン酸塩緩衝液 (pH 5.4) 500 ml—0.05 M- Na_2HPO_4 500 ml を用い、pH gradient で溶出した。流速は定量ポンプを用いて $5.5 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{hr}$ に調節した。その他の操作は前報⁹⁾ に準じて行なった。

3. 蛋白質分解酵素阻害活性の測定

蛋白質分解酵素は牛のトリプシン (Miles 社製 2 回結晶)、 α -キモトリプシン (Miles 社製、3 回結晶)、および細菌のアルカリ性プロテイナーゼ (生化学工業製、*Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* FUKU-MOTO の産生するプロテイナーゼ) を使用した。

(1) トリプシン阻害活性 酵素溶液はトリプシンを 0.1 M-リン酸塩緩衝液 (pH 7.6) に溶解して O. D.₂₈₀ を 0.060 とし、基質はカゼインを 0.1 M-リン酸塩緩衝液にとかし、10~15 分間煮沸後、1 N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整し、緩衝液を用いて濃度を 5% となるよう希釈した。

阻害活性測定実験を行なう前に、まず最適な基質量を述べた。すなわち、上記酵素液 2 ml を用い、基質量を適宜増やし、緩衝液との合量を 3 ml になるように緩衝液で調整して、37°C 10 分間反応させ、10% トリクロル酢酸 3 ml を加えて反応を停止させた。この上澄の 280 nm における吸光度を測定した。この吸光度が最高になる基質量を一連の阻害活性測定実験の基質量とした。著者の行なった条件では 1.2 ml であった。

阻害活性測定ではインヒビターの添加量を適宜増やし、基質とインヒビターと緩衝液との合量を 3 ml になるように緩衝液の添加量を加減した。その一例を示すとつぎの通りである。

An example of assay of proteinase inhibition

Trypsin	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Buffer	1.8	1.7	1.6	1.5	1.3
Inhibitor	0	0.1	0.2	0.3	0.5
Substrate	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

インヒビターは好適な阻害曲線が得られるような濃度に調整したものをを用いた。

まず、酵素と緩衝液とインヒビターを加え 10 分間、恒温水槽に保ち、これに基質を加えて分解を開始する。分解は 37°C、10 分間行ない、10% トリクロル酢酸 3 ml を加えて反応を停止する。遠心分離 (3000 r. p. m. 20 分) 後、上澄の吸光度を測定して、これよ

り相対的阻害活性を求めた。

(2) α -キモトリプシン阻害活性 酵素液は α -キモトリプシンを 0.1 M-リン酸塩緩衝液 pH 7.6 に溶解して O. D.₂₈₀ を 0.060 とし、基質はトリプシン活性測定の場合と同様にして調製し、カゼイン濃度を 2.5% にした。

酵素阻害活性測定にあたって、酵素溶液は 1 ml を用い、基質量はトリプシン阻害活性測定の場合と同様にして求め、その値を一連の実験に用いた。その他の条件はトリプシン阻害活性測定の場合と同様にした。

(3) 細菌アルカリ性プロテイナーゼ阻害活性 この酵素の至適 pH は 10 附近であるが、卵白中のインヒビターによる阻害を調べることから、卵白の pH を参考にして 8.6 とした。また、酵素濃度 O. D.₂₈₀ 0.030 を用いること以外は α -キモトリプシン活性測定の場合と同様の条件による。

以上により得られた分解物の吸光度を用いて、つぎの式により相対的阻害活性 (Relative Anti-proteolytic Activity) を求めた。

Relative Anti-proteolytic Activity

$$= \frac{I_0(\text{O. D.}) - I_x(\text{O. D.})}{\text{Inhibitor O. D.}_{280} \times x / \text{Reaction vol.}}$$

I_0 (O. D.) はインヒビター無添加時の分解物の O. D.₂₈₀ を示し、 I_x (O. D.) はインヒビター x ml を添加した時の分解物の O. D.₂₈₀ である。従って x はインヒビターの添加量である。Reaction vol. は反応時の液量でトリプシン阻害活性測定の場合は 5 ml、キモトリプシン、アルカリ性プロテイナーゼ阻害活性測定の場合は 4 ml となる。

4. 分子量測定

Whitaker²¹⁾、Andrews¹⁾ のゲル濾過法によりインヒビターの分子量を測定した。ゲル濾過は $2.64 \times 64 \text{ cm}$ (セファデックス G-100) カラム、0.05 M-炭酸塩緩衝液 pH 10 を用いる上昇法で行なった。別に既知分子量物質として、ブルーデキストラン、牛血清アルブミン (M. W. 67000)、卵白アルブミン (45000)、牛キモトリプシノーゲン A (23000)、鯨ミオグロビン (17800)、馬チトクローム C (12400) を流し、V/V₀ を求め、分子量との関係を対数グラフ上にプロットした。

5. アミノ酸分析

試料溶液 10 ml を加水分解用試験管に入れ、これに等量の特級塩酸を加えて混合し、十分脱気を行なう。さらに試験管中に残る空気を窒素ガスに置換して、さらに吸引し封管する。

これを 110°C, 24 時間, 48 時間加水分解する。加水分解物は減圧濃縮し, 希釈用緩衝液で一定量に希釈し, 柳本高速自動分析機 LS-5S 型により分析を行なった。また, トリプトファンは紫外吸収法¹⁰⁾ により求めた。

6. アミノ糖の定量

試料溶液 10 ml に等量の 8 N-HCl を加え, アミノ酸分析の場合と同様に脱気して封管する。これを 100°C, 6 時間加水分解して, 上記と同様に濃縮, 希釈を行なう。

分析は著者らが改良したアミノ酸自動分析機の短カラムを用いる方法により測定した。溶出用緩衝液は Na イオン濃度 0.15 N, pH 5.70 で行ない, 他はアミノ酸分析と同様に行なった。また, Pearson の方法¹⁹⁾ によって分画し, 溶出液を Elson-Morgan の改良法³⁾ で発色する方法でも確かめた。

7. 中性糖の定量

試料溶液を加水分解することなしに Dubois らのフェノール硫酸法⁷⁾ によって測定した。

8. インヒビターのトリプシン阻害活性中心の検索
インヒビター分子中の阻害活性中心の検索は, 2, 3 の化学修飾を行ない, トリプシンに対する阻害活性の低下により検索した。

(1) サクシニル化 Chu ら^{5, 12)} の方法に準じて行なった。すなわち, 試料溶液 10 ml (約 0.4% 液) に 1 M になるよう酸性炭酸ナトリウムを加え, これに無水コハク酸約 15 mg を 7 回に分けて, 70 分間にわたり加える。その間 pH を 8.0 に維持した。2 時間反応させた後, 水で希釈して, 水透析を行ない酸性炭酸ナトリウム, 無水コハク酸を除去し, 更に 0.1 M-磷酸塩緩衝液 pH 7.6 に透析して修飾試料を得た。同時に無水コハク酸の無添加以外は上記と全く同様に処理したものを盲検試料とした。

(2) グアニジン化 Haynes ら¹¹⁾ の方法に準じて行なった。すなわち, 0.5 M-*o*-メチルイソ尿素と 0.01 M-EDTA になるようにそれぞれを秤量し, 1 N-NaOH で pH 9.5 として一定量とする。この 3 ml に試料の水溶液 (約 2.5%) 0.5 ml を加え, 室温で 60 時間反応させた後, 1 N-酢酸で pH 3.0 として, 反応を停止させた。水透析により *o*-メチルイソ尿素と EDTA を除去後, 0.1 M-磷酸塩緩衝液に透析して修飾試料を得た。同時に *o*-メチルイソ尿素を除いた溶液で同様に処理して盲検とした。

これらの試料について, 前に述べた方法によりプロテイナーゼ阻害活性を測定した。

結果および考察

1. オボムコイド画分のゲル濾過

前報⁹⁾ において, オボムコイド画分は 4 成分に分画されることを報告したが, 今回は大量を分画する目的で 3.8×97 cm カラムを用いてゲル濾過を行なった。この結果 Fig. 1 に示すように, さらに細分画された。すなわち, M₁-1, M₁-2, M₂-1, M₂-2, M₃, M₄ の 6 成分に分かれた。M₁-1, M₁-2 は明瞭な分画はされないが明らかに 2 成分であり, M₂-2 は M₂-1 と M₃ との間に小さいが明瞭なピークとして現われている。前報⁹⁾ においては小さなカラムのために分画が不十分であったものと考えられる。各成分の割合は Table 1 に示した通り, ほぼ 7:7:20:4:33:29 であった。

鳥類卵白中にはトリプシン阻害作用を示す成分としてオボムコイド¹⁵⁾, オボインヒビター¹⁸⁾ が知られており, 著者らはウズラ, アヒル卵白から, これらとは別のおボムコイド様グロブリン (プロテイナーゼインヒビター) を分離している¹³⁾¹⁴⁾。海亀卵白中に存在するトリプシン阻害蛋白質についてはまだ明らかにされていない。従って海亀のおボムコイド画分中におけるインヒビターの存在を確認するため, ゲル濾過で分画した各成分について, 定性的にトリプシン阻害活性を測定した。その結果を Table 2 に示した。それによると M₂-2 にはやや弱い阻害活性がみられるが, M₃ に顕著な阻害活性が認められることから M₂-2 の阻害作用は M₃ の混入によるものと推定した。

そこでトリプシン阻害活性を有する M₃ 成分をゲル濾過により集め, CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーを行なった。

2. M₃ 画分の CM-セファデックス C-50カラムクロマトグラフィー

前報⁹⁾ ではオボムコイド画分を CM-セルロースカラムにより分画したが, その中に CM-セルロース崩壊物が溶出し, 糖の定量に不適當であるので, 今回は CM-セファデックスを用いて分画を行なった。

鳥類卵白のトリプシンインヒビターは一般に糖含量が多い(鶏オボムコイド: 中性糖 8%, アミノ糖 12~13%⁴⁾, 鶏オボインヒビター: 中性糖 8~10%, アミノ糖 11~15%⁹⁾)。しかし前報⁹⁾ でも明らかのように M₃ 画分の糖含量は非常に少ない。今回は M₃ 画分がトリプシン阻害作用をもつので, とくに M₃ 画分に分画には CM-セルロースの使用を避けた。

CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーの

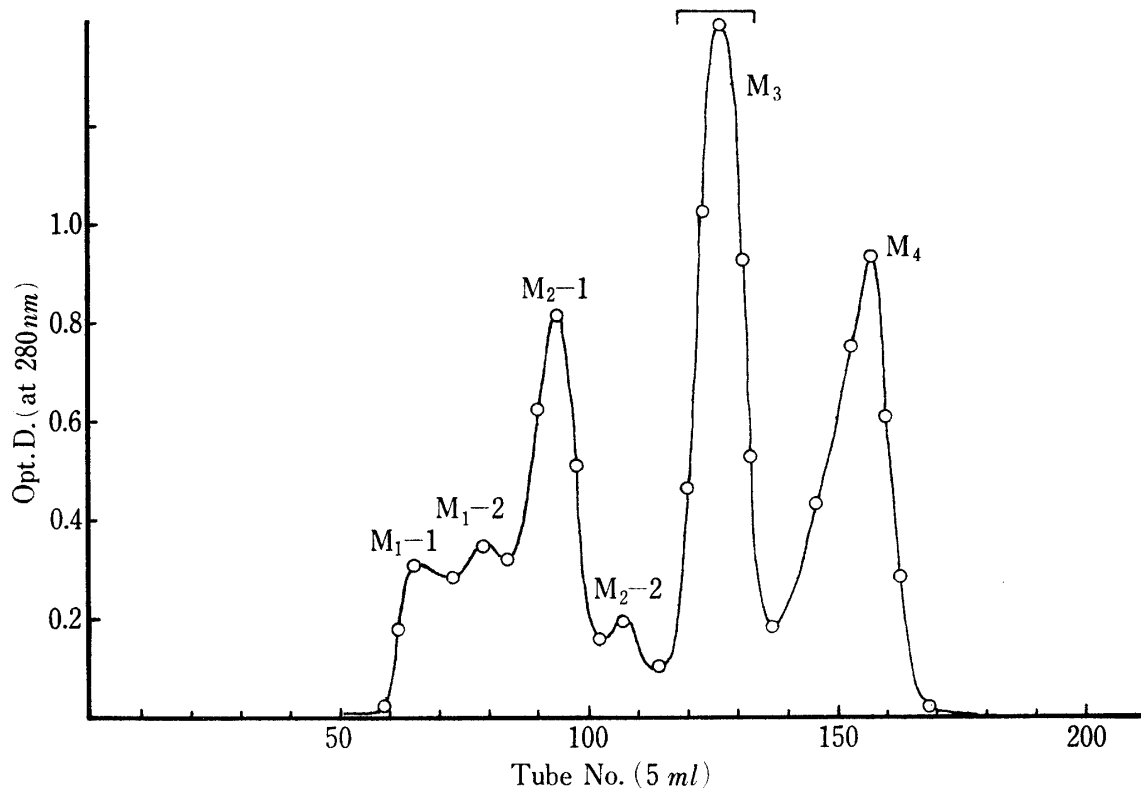


Fig. 1. Elution diagram of ovomucoid fraction by gel filtration through Sephadex G-75 column.
Column: $3.8 \times 97 \text{ cm}$, Buffer: 0.05 phosphate (pH 5.4)

Table 1. Proportion of the components separated from ovomucoid by gel-filtration through Sephadex G-75

	M ₁ -1	M ₁ -2	M ₂ -1	M ₂ -2	M ₃	M ₄
Protein (%)	6.68	7.24	20.03	3.76	33.09	29.20

Table 2. Anti-tryptic activities of the components from gel filtration on Sephadex G-75 column

	M ₁ -1	M ₁ -2	M ₂ -1	M ₂ -2	M ₃	M ₄
Anti-tryptic activity	--	--	--	±	‡	--

Substrate: 5% Casein.
Trypsin concentration: O.D.₂₈₀ 0.060.
Buffer solution: 0.1M phosphate pH 7.6.

結果を Fig. 2 に示した. 図示したごとくプロテイナーゼ阻害活性をもつ M₃ 画分は 5 成分に分画された. 溶出順位の早いものから CM-1, CM-2, CM-3, CM-4, CM-5 と記号をつけた. CM-4, CM-5 についてはクロマトを繰返すことにより精製されたが, CM-1, CM-2, CM-3 はまだ充分な精製には至っていない. このクロマトグラムより求めた各成分の割合は Table 3 の通りである. CM-4, CM-5 の 2 成分の

合計が M₃ 画分中 73% を占めており, さらに CM-1 は含量は少ないけれどもトリプシンのみならず, キモトリプシン, アルカリ性プロテイナーゼにも阻害作用を示すことを定性的に認めた.

3. トリプシン, キモトリプシンおよびアルカリ性プロテイナーゼに対する阻害活性

M₃ 画分から分画された CM-1, CM-2, CM-3, CM-4, CM-5 のすべてにトリプシン阻害作用が認め

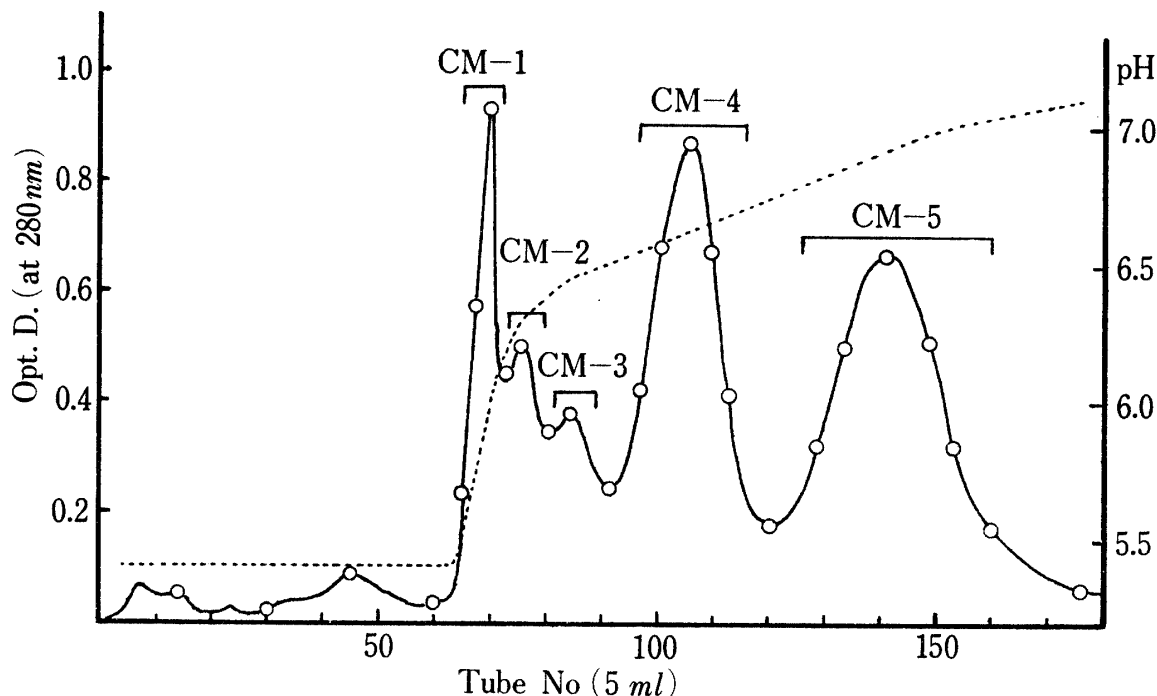


Fig. 2. Elution diagram of component M_3 from CM-sephadex C-50 column,
 Column: 2.2×25 cm, —○—○— Protein, - - - - - pH
 Buffer: 0.05 M phosphate buffer (pH 5.4) 500 ml. —
 0.05 M Na_2HPO_4 500 ml.

Table 3. Proportion of the components separated from component M_3 by CM-Sephadex C-50 column chromatography

	CM-1	CM-2	CM-3	CM-4	CM-5
pH Value for elution	6.0	6.29	6.45	6.63	6.91
Protein index (%)	10.44	9.05	7.51	34.09	38.90

られたので、さらにトリプシン、キモトリプシンおよびアルカリ性プロテイナーゼの各酵素に対する阻害曲線を求めた。その結果を Fig. 3, 4, 5 に示した。図はインヒビターの添加量と残存プロテイナーゼ活性の割合との関係を示す。Fig. 3 はトリプシンに対して、Fig. 4 はキモトリプシンに対し、さらに Fig. 5 はアルカリ性プロテイナーゼに対する阻害状況を示したものである。これらの関係から相対的阻害活性を算出した結果を Table 4 に示した。

トリプシンに対しては5成分とも阻害作用を示すが成分間には著しい差は認められない。キモトリプシンに対してはCM-1のみが著しく強い阻害作用を示し、CM-2は弱い阻害作用を示した。これはCM-1が著しく強いこと、CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーにおいてCM-1とCM-2が完全に分離出来ないことからCM-1がCM-2に混入したためにCM-2は弱い阻害を示したものと考えられる。CM-3, CM-4, CM-5はキモトリプシンに対して全

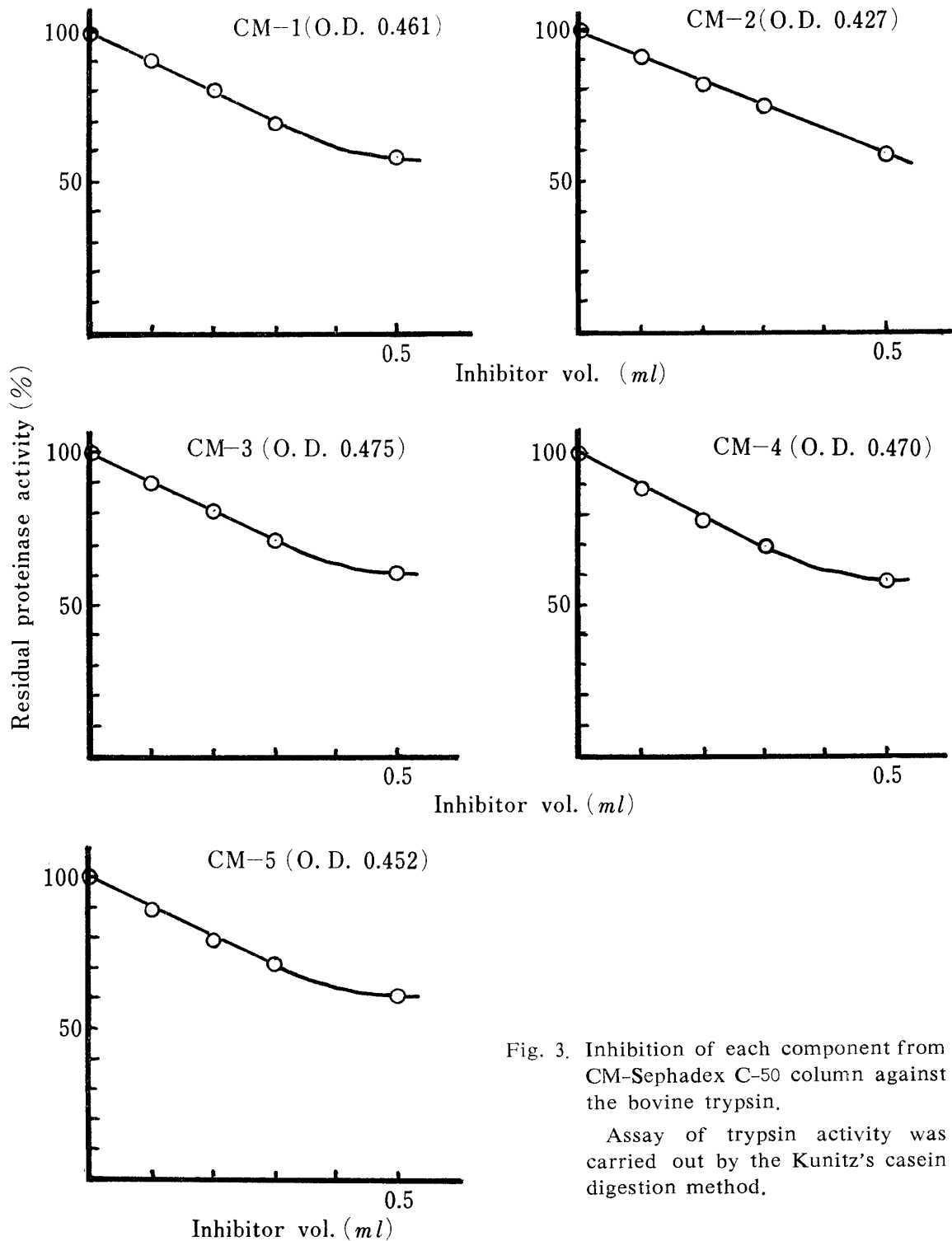


Fig. 3. Inhibition of each component from CM-Sephadex C-50 column against the bovine trypsin.

Assay of trypsin activity was carried out by the Kunitz's casein digestion method.

く阻害作用を示さない。アルカリ性プロテイナーゼに対しては CM-1 のみが著しく強い阻害作用を示し、他の成分はどれも弱い阻害作用を示した。

CM-1 の各酵素に対する阻害活性をみると、キモトリプシンに対してはトリプシンの約 5 倍、アルカリ性プロテイナーゼに対してはトリプシンの約 10 倍の

阻害作用を示した。これらの結果から CM-1 は多価性インヒビターであろうと推定された。

海亀卵白中には数種のプロテイナーゼインヒビターの存在が認められることから、卵白中におけるその役割の検討が今後必要である。その一つとしては孵化のさいの外圍微生物に対する化学的防御が考えられ、他

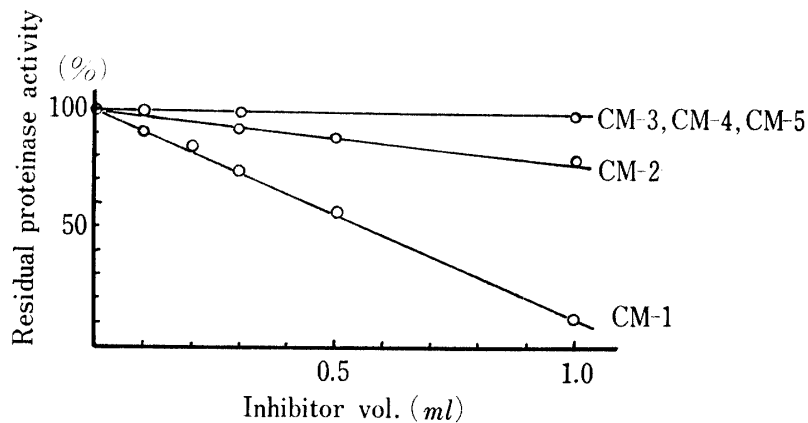


Fig. 4. Inhibition of each component from CM-Sephadex C-50 column against the bovine chymotrypsin. Assay of chymotrypsin activity was carried out by the Kunitz's casein digestion method.

Inhibitor concentration:

CM-1:	O.D. _{280nm}	0.073.
CM-2:	O.D. _{280nm}	0.263.
CM-3:	O.D. _{280nm}	0.238.
CM-4:	O.D. _{280nm}	0.275.
CM-5:	O.D. _{280nm}	0.216.

の面では卵の発生過程における蛋白質代謝制御作用、すなわち、プロテイナーゼ作用の制御が考えられる。今後はインヒビターの阻害中心の検索、阻害機構の解明と共に卵中での役割の追求が課題であろう。

4. 分子量

各成分の分画に当って、先ず最初ゲル濾過によって得た M_3 画分をさらに CM-セファデックスにより分画したものであるから各成分とも類似の分子量をもつことが予想される。

ゲル濾過法によって分子量を求めると、すべて 17000 ± 800 であった。ゲル濾過の結果は Fig. 6 の通りである。

海亀卵白のプロテイナーゼインヒビターは鶏のオボムコイド中のトリプシンインヒビター (M. W. 28000) に比較して非常に小さいことが認められた。

5. アミノ酸, アミノ糖および中性糖含量

トリプシン阻害活性を示す5成分についてアミノ酸, アミノ糖および中性糖の分析を行なった結果を Table 5 に示した。なお、5成分中 CM-1, CM-2, CM-3 は精製が不充分であるので参考のために掲示したものである。

アミノ酸組成を全体的にみればアルギニンが全くないか、あるいは微量であること、またメチオニンを全く含まないことは5成分に共通している。さらに著しく多いものはグルタミン酸、リジンであり、つぎにシ

スチンが多い。シスチンが多いことは三次構造の維持に大きな役割をはたしていることが推測される。またトリプシンインヒビターは一般にトリプトファンをほとんど含まないが海亀卵白中のプロテイナーゼインヒビターはこのアミノ酸を4%程度含有していることは大きな特徴である。

また、5成分とも中性糖はフェノール硫酸法によって認めることは出来なかった。さらにアミノ糖も検出されないことから、これらのインヒビターは化学組成面からはオボムコイドに属さない蛋白質である。すなわち、従来知られている卵白中のインヒビターとは全く異なるものであることが確認された。

以上のように、糖を含まない、すなわち、化学組成面からはオボムコイドに属さない蛋白質が溶解性の面からはオボムコイド画分 (アルブミンが沈殿するより高濃度の硫酸で沈殿する画分) 中に見出されたわけである。蛋白質の溶解性は親水性基と疎水性基の相対的位置に関係することが考えられる。さらに分子内にシスチンが多いことから強固な立体構造も溶解性に何らかの役割をはたしているであろう。

Feeney ら⁹⁾ はオボムコイドにノイラミダーゼを作用させ、シアル酸を除いてもトリプシン阻害活性に著しい影響を与えないと報告しており、さらに Astrup ら²⁾ も尿中のトリプシンインヒビターについて、同様の結果を得ている。これはシアル酸が阻害作用に関与

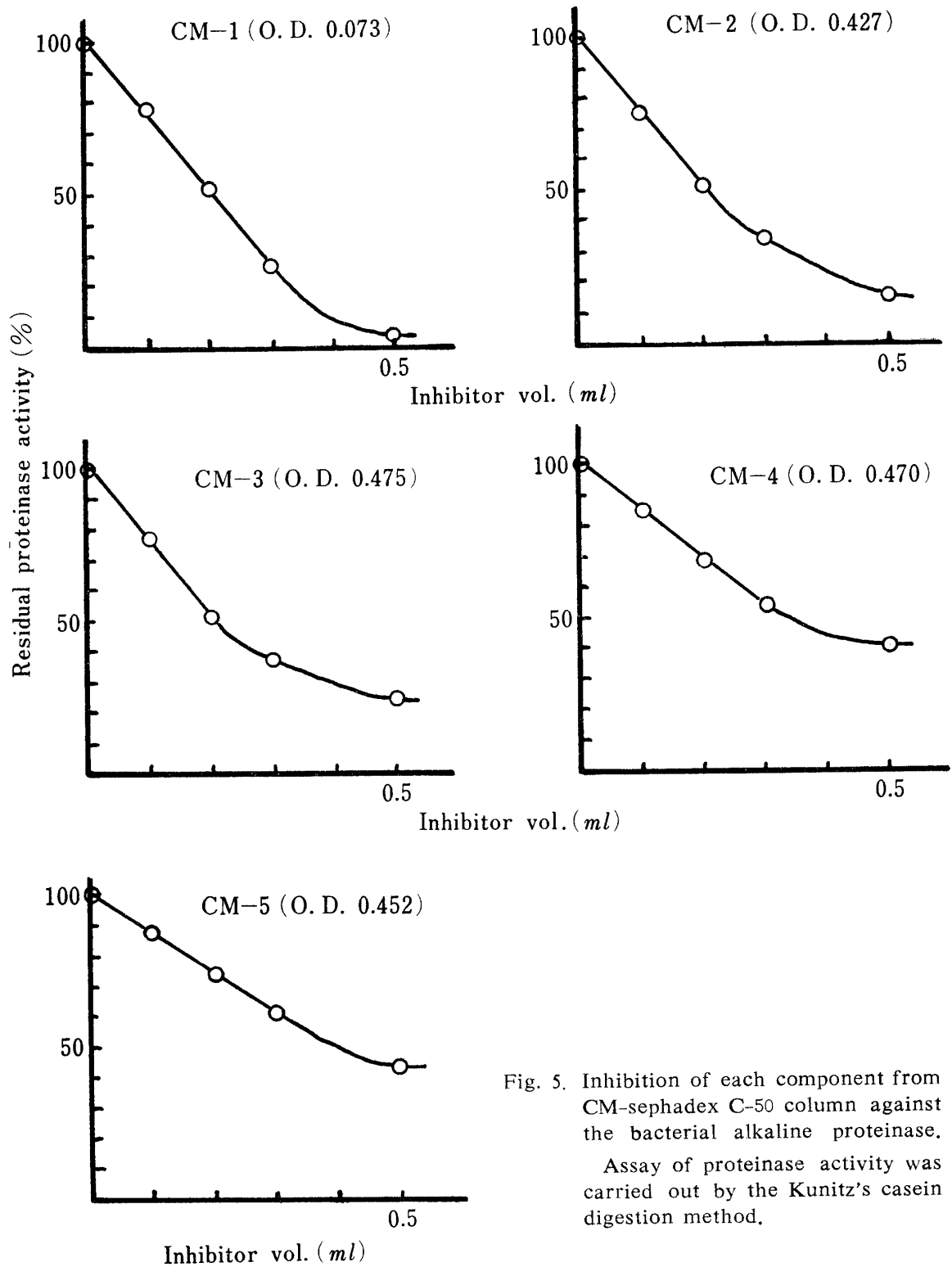


Fig. 5. Inhibition of each component from CM-sephadex C-50 column against the bacterial alkaline proteinase.

Assay of proteinase activity was carried out by the Kunitz's casein digestion method.

Table 4. Relative anti-proteolytic activities of the respective components against three kinds of proteinase

	CM-1	CM-2	CM-3	CM-4	CM-5
Trypsin	6.4	6.0	6.4	7.6	7.5
Chymotrypsin	31.5	2.6	—	—	—
Alkaline proteinase	63.7	10.6	9.9	6.5	5.7

$$\text{Relative anti-proteolytic activity} = \frac{I_0(\text{O.D.}) - I_x(\text{O.D.})}{\text{Inhibitor}(\text{O.D.}) \times x / \text{Reaction vol.}}$$

I: Inhibitor, x: Added-inhibitor volume (ml).

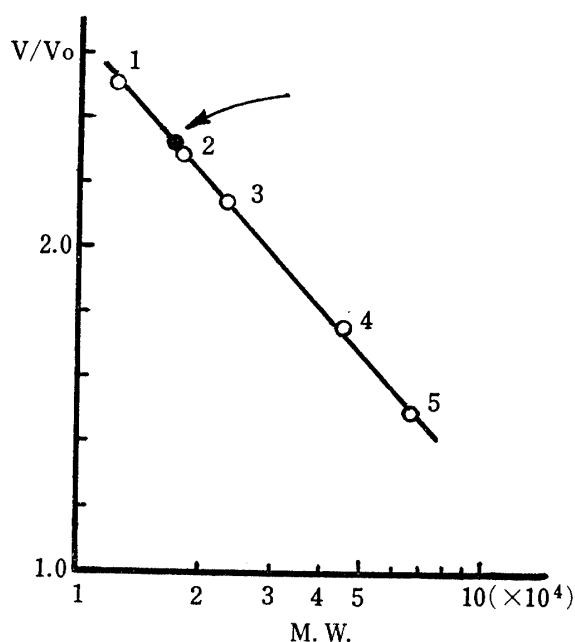


Fig. 6. Relationship between elution volume and molecular weight of the authentic protein.

Column: 2.64×64 cm Sephadex G-100,
Buffer: 0.05M-carbonate pH 10.0,

Authentic proteins:

1. Cytochrome C, 2. Myoglobin,
3. Chymotrypsinogen A,
4. Ovalbumin, 5. Serum albumin

Arrow mark: Proteinase inhibitors
from sea turtles egg white.

してないことを示している。しかし、海亀卵白のプロテイナーゼインヒビターはアミノ糖、中性糖をそもそも含有していないのであって、プロテイナーゼ阻害作用には糖の存在が必須ではないことを示すものである。卵白のプロテイナーゼインヒビターでは現在までに明らかにされているものはすべて糖を相当量含有している^{4,6,14}。従って海亀卵白のプロテイナーゼインヒビターは卵白中のインヒビターとして糖を含まない点では特異的なものである。しかし、植物性のトリプシンインヒビターのほとんどは糖を含まないもののみであり、わずかに白いんげんのトリプシンインヒビターが糖をわずかに含んでいることが報告されている²¹。従って糖はトリプシン阻害作用には必須ではなく、他に役割をもっているであろう。

6. インヒビターのトリプシン阻害活性中心

鳥類のトリプシンインヒビターの阻害活性中心は鶏オボムコイド¹⁶と鶏¹⁷、七面鳥¹⁷、ウズラ¹⁷のオボインヒビターはアルギニンであり、七面鳥²⁰、ウズラ、ヒクイドリ¹¹、アヒル¹¹のオボムコイドはリジンであることが報告されている。

海亀卵白のプロテイナーゼインヒビターはアルギニンを含まないことから、リジンが阻害活性中心であろうと推定される。これを明らかにするため、化学修飾を行ない、阻害作用の変化を調べた。まず、アミノ基の修飾剤である無水コハク酸で修飾を行なった。その

Table 5. Each components proportion on the basis of 100g of total amino acid residues

	CM-1	CM-2	CM-3	CM-4	CM-5
Lys	12.13	13.06	13.25	13.39	14.01
His	1.92	1.87	1.91	1.88	2.01
Amm	1.33	1.29	1.54	1.33	1.85
Arg	0.35	0	0	0	0
Trp*	4.44	4.78	4.99	4.72	4.23
Asp	8.58	8.73	8.19	8.36	8.50
Thr	3.45	3.17	3.08	3.03	3.08
Ser	5.82	6.08	5.98	6.00	5.96
Glu	15.93	16.42	16.20	15.81	16.89
Pro	5.62	5.56	5.67	5.75	4.86
Gly	5.23	5.04	5.05	5.09	4.97
Ala	1.23	1.10	1.11	1.09	1.15
Cys/2	9.76	9.70	9.61	9.81	9.33
Val	2.66	2.78	2.77	2.79	2.83
Met	0	0	0	0	0
Ile	1.78	1.55	1.48	1.64	1.68
Leu	5.13	4.85	4.93	4.91	5.01
Tyr	5.18	4.91	4.99	5.03	4.56
Phe	9.47	9.11	9.24	9.39	9.08
Sugar	0	0	0	0	0
Gluc-NH ₂	0	0	0	0	0
Total	100	100	100	100	100

* Tryptophan content was determined by the ultraviolet absorption method.

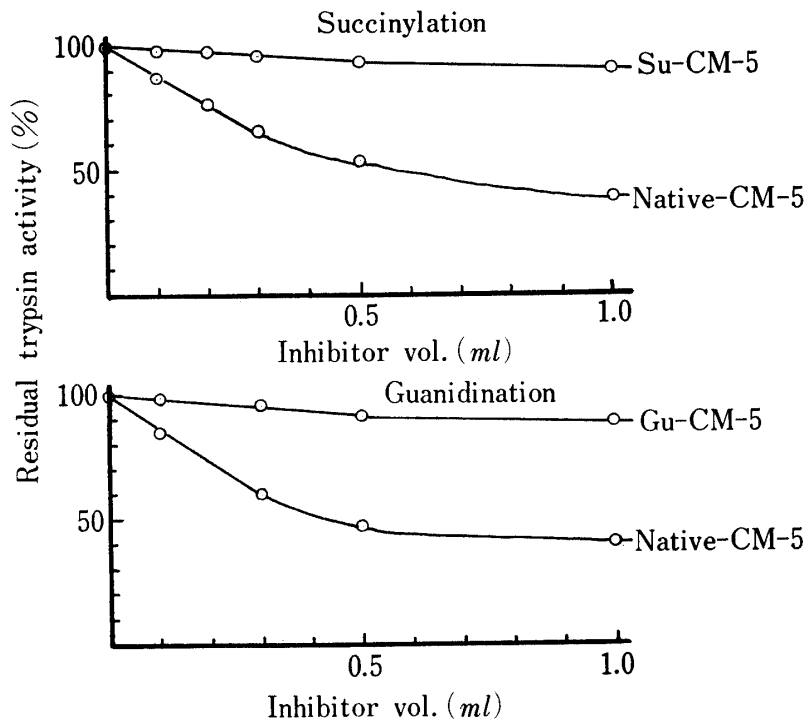


Fig. 7. Inhibition of native and modified-CM-5 against the bovine trypsin.

Inhibitor concentration:

Succinylation

Native-CM-5 O.D. 0.480

Succinylated CM-5(Su-CM-5) O.D. 0.550

Guanidination

Native-CM-5 O.D. 0.675

Guanidinated-CM-5 (Gu-CM-5) O.D. 0.700

結果, トリプシン阻害作用は失活した. サクシニル化によりインヒビターのアミノ基が関与していることが明確になったので ϵ -アミノ基の修飾剤である *o*-メチルイソ尿素によりグアニジン化を行なった. グアニジン化の場合もサクシニル化と同様にトリプシン阻害作用を失活させた. CM-5 についてのサクシニル化およびグアニジン化のさいの阻害変化の状態を Fig. 7 に 1 例として示したが, CM-1, CM-2, CM-3, CM-4 についても全く同様な結果が認められた.

以上の結果からトリプシンに対する阻害中心はリジンの ϵ -アミノ基であることが明らかである. 従って海亀卵白のプロテイナーゼインヒビターのトリプシン阻害作用の必須アミノ酸残基はリジンであることが確認された.

要 約

海亀卵白のオボムコイド画分中にトリプシンインヒビターの存在を確認したのでその細分画を行なった.

その結果を要約するとつぎの通りである.

1) オボムコイド画分をセファデックス G-75 により分画したところ, 6 成分 (M_1-1 , M_1-2 , M_2-1 , M_2-2 , M_3 , M_4) に分かれ, その中 M_3 画分にトリプシン阻害活性を認めた.

2) M_3 画分は CM-セファデックスにより 5 成分 (CM-1, 2, 3, 4, 5) に分かれ, 5 成分ともにトリプシン, アルカリ性プロテイナーゼ作用を阻害した. CM-1 はさらにキモトリプシンをも阻害し, キモトリプシン, アルカリ性プロテイナーゼに対してはトリプシンに対するよりも著しくつよく阻害した.

3) ゲル濾過法により求めた各インヒビターの分子量はそれぞれ 17000 ± 800 であった.

4) 各インヒビター間のアミノ酸組成には顕著な差はなく, アルギニン, メチオニンを含まないこと, およびグルタミン酸, リジン, シスチンが多いことが特徴である.

5) 各インヒビターはいずれも中性糖, アミノ糖を

含有しない。

6) 各インヒビターともトリプシン阻害活性中心の
アミノ酸残基はリジンであることを認めた。

文 献

- 1) Andrews, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem. J.*, **91**, 222-233 (1964)
- 2) Astrup, D. T. and Nissen, U.: Urinary trypsin inhibitor (mingin); Transformation into a new trypsin inhibitor by acid hydrolysis or by sialidase, *Nature*, **203**, 255-257 (1964)
- 3) Boas, N. F.: Method for the determination of hexosamine in tissues, *J. Biol. Chem.*, **204**, 553-563 (1953)
- 4) Bragg, P. D. and Hough, L.: An investigation of the egg white mucoproteins; Ovomuroid and ovalbumin, *Biochem. J.*, **78**, 11-23 (1961)
- 5) Chu, F. S., Crary, E. and Bergdoll, M. S.: Chemical modification of amino groups in staphylococcal enterotoxin B, *Biochemistry*, **8**, 2890-2896 (1969)
- 6) Davis, J. G., Zahnley, J. C. and Donovan, J. W.: Separation and characterization of the ovoinhibitors from chicken egg white *Biochemistry*, **8**, 2044-2053 (1969)
- 7) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956)
- 8) Feeney, R. E., Rhodes, M. B. and Anderson, J. S.: The distribution and role of sialic acid in chicken egg white, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2633-2637 (1960)
- 9) 福永隆生・吉賀克也: 海亀卵白の蛋白質に関する研究 (第1報) とくに電気泳動, 塩濃度勾配および CM-セルロースカラムクロマトグラフィー, 農大農学術報告, No. 24, 89-105 (1974)
- 10) Goodwin, T. W. and Morton, R. A.: The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins, *Biochem. J.*, **40**, 628-640 (1946)
- 11) Haynes, R. and Feeney, R. E.: Transformation of active-site lysine in naturally occurring trypsin inhibitors; A basis for a general mechanism for inhibition of proteolytic enzymes, *Biochemistry*, **7**, 2879-2885 (1968)
- 12) 石井信一監訳: タンパク質の化学修飾法, p. 235-235, 広川書店 (1973)
原著 Means, G. E. and Feeney, R. E.: Chemical modification of proteins,
- 13) 吉賀克也・福永隆生・田畑道広: アヒルの卵白の蛋白質に関する研究 (第2報) グロブリンフラクションについて, 農化大会講演要旨集, 307-307 (1970)
- 14) 吉賀克也・福永隆生・杉元康志: アヒル, ウズラ卵白のオボムコイド様グロブリンおよび蛙卵のプロテアーゼ阻害, 農化誌, **49**(2), 76-78 (1975)
- 15) Lineweaver, H. and Murray, C. W.: Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid, *J. Biol. Chem.*, **171**, 565-581 (1947)
- 16) Liu, W. H., Feinstein, G., Osuga, D. T., Haynes, R. and Feeney, R. E.: Modification of arginines in trypsin inhibitors by 1,2-cyclohexanedione, *Biochemistry*, **7**, 2886-2892 (1968)
- 17) Liu, W. H., Means, G. E. and Feeney, R. E.: The inhibitory properties of avian ovoinhibitors against proteolytic enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **229**, 176-185 (1971)
- 18) 松島欽一: 麴菌プロテアーゼの天然性阻害物質に関する研究 (第3報) 卵白中の阻害物質 (ovoinhibitor) に就いて, 農化誌, **32**, 211-215 (1958)
- 19) Pearson, C. H.: The rapid determination of small amounts of glucosamine and galactosamine in protein preparations, with special reference to skin tissue, *Biochem. J.*, **88**, 540-545 (1963)
- 20) Stevens, F. C. and Feeney, R. E.: Chemical modification of avian ovomucoid, *Biochemistry*, **2**, 1346-1352 (1963)
- 21) Wagner, L. P. and Riehm, J. P.: Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the navy bean, *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 672-677 (1967)
- 22) Whitaker, J. R.: Determination of molecular weights of proteins by gel-filtration on Sephadex, *Anal. Chem.*, **35**, 1950-1953 (1963)

Summary

In the previous investigation, authors reported that the amount of ovomucoid fraction in the soluble protein of sea-turtle's egg white was 37-38%. Trypsin inhibitory activity has been found to exist in the ovomucoid fraction of sea-turtle's egg white. The separation of trypsin inhibitor was rendered possible by gel-filtration followed by the CM-Sephadex column chromatography. The results obtained were summarized as follows:

1. The ovomucoid fraction was separated into six components (M_1-1 , M_1-2 , M_2-1 , M_2-2 , M_3 , M_4) on Sephadex G-75 column and trypsin inhibitory activity was found to exist in the component M_3 .
2. The component M_3 was subsequently separated into five components (CM-1, 2, 3, 4, and 5) on CM-Sephadex column, and all of these components inhibited the bovine trypsin and bacterial alkaline proteinase, (produced by *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* FUKUMOTO); moreover, CM-1 was noted to inhibit bovine chymotrypsin. The inhibitory activities of CM-1 against the chymotrypsin and alkaline proteinase were observed to be remarkably stronger than that against the trypsin.
3. Amino acid compositions of these five inhibitors were mutually similar and their characteristics consist in being free from arginine and methionine, while, containing the large amount of glutamic acid, lysine and half-cystine.
4. Neither neutral sugar nor amino sugar was found to be contained in these inhibitors, by the phenol-sulfuric acid method and using with the amino acid analyzer, respectively.
5. From the gel-filtration on Sephadex G-100, the molecular weights of five inhibitors were assumed to be about 17000.
6. From the chemical modification with succinic anhydride and *o*-methylisourea, it was confirmed that the ϵ -amino groups of lysine in the inhibitors are in the active-sites of combination with trypsin.