

# 蛋白質性プロテアーゼインヒビターと トリプシンの会合平衡定数測定

田代 操

## The Measurement of Association Equilibrium Constants of Trypsins with a Protein Proteinase Inhibitor

MISAO TASHIRO

An improved procedure for the measurement of association equilibrium constants of trypsins with a protein proteinase inhibitor has been established. The procedure consists of three stages: (a) standardization of trypsin and inhibitor solutions by the active-site titration with *p*-nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate and by an enzyme-inhibitor titration at a high concentration ( $\sim 10^{-7}$ M), (b) second is the accurate measurement of free enzyme activities for Green and Work titrations, where low enzyme concentrations ( $\sim 10^{-10}$ M) and a highly sensitive substrate are used, and (c) nonlinear least-squares analyses of the data by a microcomputer, which make it possible to accurately estimate the constants. By this procedure, the association equilibrium constants of bovine and hog trypsins with foxtail millet trypsin inhibitor II were determined to be  $3.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  and  $4.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , respectively, at 25°C and pH 8.0.

(Received August 15, 1989)

### I 緒言

トリプシンなどのセリンプロテアーゼを阻害する蛋白質, すなわち蛋白質性プロテアーゼインヒビター (以下インヒビター) は, 広く動植物界に存在している<sup>1,2)</sup>。これらインヒビターは, プロテアーゼの制御という面から, さらには, 食品中の成分として動物に摂取された時, 抗栄養因子として作用するという点から, 生理学および栄養学的に重大な関心を向けられている。ところで, 生体内におけるインヒビターの役割, または挙動を解明するには標的プロテアーゼとの相互作用を詳細に検討することが必要である。インヒビターの酵素阻害メカニズムについては, Laskowski, Jr. らの精密な研究<sup>2)</sup>により明らかにされているが, 彼らはインヒビター-プロテアーゼ間の相互作用を特

徴づけるパラメーターとして会合平衡定数 ( $K_a$ ) を最も重視している。

インヒビターとプロテアーゼの最も単純な阻害メカニズムは, 式(1)で示される。



$$K_a = \frac{[EI]}{[E][I]} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \quad (2)$$

式(2)に示される $K_a$ において,  $[E]$  は平衡時での遊離酵素濃度,  $[I]$  は平衡時での遊離インヒビター濃度,  $[EI]$  は平衡時での複合体濃度である。従来, 多くの研究者は, この $K_a$ を求めるためにGreenとWork<sup>3)</sup>の古典的な方法を用いてきた。この方法では,

京都府立大学生活科学部食物学科栄養学講座

Laboratory of Nutritional Physiology and Biochemistry, Department of Food Science and Nutrition, Kyoto Prefectural University.

酵素の全量は一定に保たれ、種々のインヒビター量が各酵素試料に加えられ、適当なインキュベーション時間を経た後試料液中の遊離の酵素量が測定される。この方法は高いKa値を測定するには簡単で有用であるが、得られるKaには、しばしば真の値より低く見積もられるものがある。誤差が大きい主な理由は次のごとくである。(a) プロテアーゼ、およびインヒビターの正確な濃度に関する情報が欠けていること、これが不正確な酵素-インヒビターの当量点を与える。(b) 用いる酵素の初濃度が高すぎるため、Kaを計算する際に用いられる当量点での解離が小さく、遊離酵素量に大きな誤差を生じる。(c) 不適当なインキュベーション時間を用いることが多く、これが不十分な平衡、またはインヒビターの損傷を引き起こす。(d) 遊離酵素量測定に用いる基質についての理解が不十分のため、プロテアーゼ-インヒビター系の平衡を乱す。したがって、GreenとWorkの方法をKa測定に用いるには、このような問題点を取り除く必要がある。

本論文では、上記問題点を克服するとともに、Kaの計算にマイクロ・コンピューターを用いた結果を、プロテアーゼとしてトリプシン、インヒビターとして粟種子トリプシンインヒビターII (FMTI-II) を題材としたものについて報告する。

## II 実験材料及び方法

### 1) 実験材料

粟種子トリプシンインヒビターII (FMTI-II) は、既報<sup>4)</sup>に従い調製した。ウシ・トリプシン (Type III), ブタ・トリプシン (Type IV),  $\alpha$ -N-Benzoyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine-*p*-nitroanilide HCl (Bz-Pro-Phe-Arg-*p*NA) はSigma社より、 $\alpha$ -N-Benzoyl-D, L-arginine-*p*-nitroanilide HCl (Bz-DL-Arg-*p*NA) はK. K. ペプチド研究所より購入した。その他の試薬はすべてナカライテスク K. K. の特級を使用した。

### 2) トリプシンおよびインヒビターのストック溶液

トリプシンのストック溶液は酵素約2.5mgを5mM CaCl<sub>2</sub>を含む5mM HClの3mlに溶解して作成した。このストック溶液は後述する活性部位滴定法<sup>5)</sup>により活性トリプシン濃度を測定された後、Ka測定のために適当に希釈された。FMTI-IIストック溶液はインヒビター約2mgを2mlの0.05M酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶解して作成した。

### 3) 酵素およびインヒビター溶液の希釈

トリプシンおよびFMTI-IIのストック溶液は、0.01M CaCl<sub>2</sub>と0.005% (W/V) Triton X-100を含む0.1Mトリス・塩酸緩衝液 (pH8.0) で希釈された。

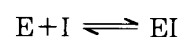
### 4) 酵素およびインヒビター溶液の濃度測定

ウシおよびブタのストックトリプシン溶液の濃度測定にChaseとShawの活性部位滴定法<sup>5)</sup>を用いた。すなわち、キュベットに2.88mlの0.1Mバルビタールナトリウム・塩酸緩衝液 (pH8.3) と20 $\mu$ lの10mM *p*-Nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate HCl (NPGB) アセトニトリル溶液を加え自記分光光度計 (Hitachi 557型) にセットし、410nmでNPGBの非酵素的分解の速度を記録した。つづいて0.1mlのストック酵素溶液を加え、NPGBの分解により生じる*p*-Nitrophenolの出現を記録した。バーストにより生じた*p*-Nitrophenolの量は両者の差から求め、これよりpH8.3での*p*-Nitrophenolの分子吸光係数16,600を用いて活性トリプシン濃度を計算した。なお、測定は各々5回行い、その平均値を使用した。一方、ストックFMTI-II溶液の濃度測定には、ウシ・トリプシンとFMTI-IIの滴定法が用いられた。すなわち、ウシ・トリプシンのストック溶液10 $\mu$ lに各々ストックFMTI-II溶液1~10 $\mu$ lを加え、0.01M CaCl<sub>2</sub>を含む0.1Mトリス・塩酸緩衝液 (pH8.0) で全量を2.3mlとした後、0.1mlのBz-DL-Arg-*p*NAジメチルスルホキシド溶液 (10mg/ml) を加え、37°Cで5分間反応させた。10%酢酸1.0mlを加え、反応を停止させた後、410nmでの吸光度を測定し、各インヒビター濃度での残存トリプシン活性を求めた。滴定データよりトリプシンの完全阻害に必要なインヒビター量を求め、これよりFMTI-IIストック溶液の濃度を計算した。

### 5) 会合平衡定数の測定

Kaの測定は、本質的にはGreenとWorkの方法<sup>3)</sup>で行われた。すなわち、濃度決定されたトリプシンのストック溶液を10<sup>-9</sup>Mオーダーの濃度まで希釈した。この溶液3.0mlに、10<sup>-6</sup>Mオーダーの濃度に希釈したFMTI-II溶液を各々1~15 $\mu$ l加え、25°Cで15時間放置した。つづいて10 $\mu$ lのBz-Pro-Phe-Arg-*p*NAジメチルスルホキシド溶液 (40mg/ml) を加え、反応溶液をキュベットに移し、自記分光光度計で410nmでの吸光度変化を測定した。各反応溶液の吸光度変化速度をトリプシン濃度に変換し、その値と対応するインヒビター初濃度をそれぞれマイクロ・コンピューター (NEC PC9801) にインプットし、Kaの計算を行った。

Kaの計算にはBiethの理論式<sup>6)</sup>が用いられた。すなわち、



の反応モデルにおいて、[E<sub>0</sub>]を全酵素濃度、[E]を遊離酵素濃度、[I<sub>0</sub>]を全インヒビター濃度、[I]を遊離インヒビター濃度とすると、

$$K_a = \frac{[EI]}{[E][I]} = \frac{[E_0] - [E]}{[E]([I_0] - [E_0] + [E])}$$

したがって,

$$[E]^2 + ([I_0] - [E_0] + 1/Ka)[E] - [E_0]/Ka = 0$$

この方程式を解くと,

$$[E] = 1/2 \left( ([E_0] - [I_0] - 1/Ka) + \sqrt{([E_0] + [I_0] + 1/Ka)^2 - 4[E_0][I_0]} \right) = 1/2 \left( ([E_0] - [I_0] - 10^{-\log Ka}) + \sqrt{([E_0] + [I_0] + 10^{-\log Ka})^2 - 4[E_0][I_0]} \right)$$

となる。コンピューターを用いてデータと理論式の適合を見るために2種類の非線型最小自乗プログラムが用いられた。1つは,

$$[E] = f([E_0], \log Ka; [I_0])$$

で表わされる2つのパラメーター  $[E_0]$  と  $\log Ka$  を含むプログラムで、もう一方は、さらにinhibitor/enzyme equivalence factor (F) を加えた,

$$[E] = f([E_0], \log Ka, F; [I_0])$$

で表わされる3つのパラメーターを含むプログラムである。Fは  $[I_0]$  の補正值で、 $[I_0]_{corrected} = F \times [I_0]_{initial}$  で示される。データは、まず1番目のプログラムで処理され、誤差の小さい結果 ( $[E_0]_{error} < 1\%$  of  $[E_0]$ ,  $\log Ka_{error} < 0.1$ ) を与えるデータのみが2番目のプログラムで処理された。最終的に、2番目のプログラムにおいて、 $[E_0]_{error} < 1\%$

of  $[E_0]$ ,  $\log Ka_{error} < 0.1$ ,  $0.9 < F < 1.1$  を満たす結果のみが受理された。

### III 実験結果

#### 1) ウシ・トリプシンとFMTI-IIの会合平衡定数

ウシ・トリプシンのストック溶液は濃度決定された後希釈され、 $1.19 \times 10^{-9} M$  の濃度とされた。一方、ストックFMTI-II溶液も希釈され、 $7.00 \times 10^{-7} M$  の濃度とされた。両希釈溶液を用いて行った滴定をコンピューター処理した結果をFig. 1に示す。なお、Fig. 1-aは1番目のプログラムを用いた結果であり、Fig. 1-bは2番目のプログラム実行の結果である。1番目のプログラム実行において結果は定められた誤差範囲内にあり、データと理論式の適合は勝れていた。ここで得られた  $Ka = 2.4 \times 10^{10} M^{-1}$  は、しかしながら、最終結果としては受理されなかった。これは、酵素およびインヒビター溶液とも希釈されており、これらの希釈が定量的に行われたかの保障が無いからである。実際、高い希釈度では蛋白質のガラス面への吸着なども無視できない。本実験ではこの防止策として緩衝液中へ界面活性剤であるTriton X-100を加えているが、さらにデータ処理に2番目のプログラムを用いることによりこの問題を解決しようとした。本実験データは、2番目のプログラム実行においても良好な結果を与え、

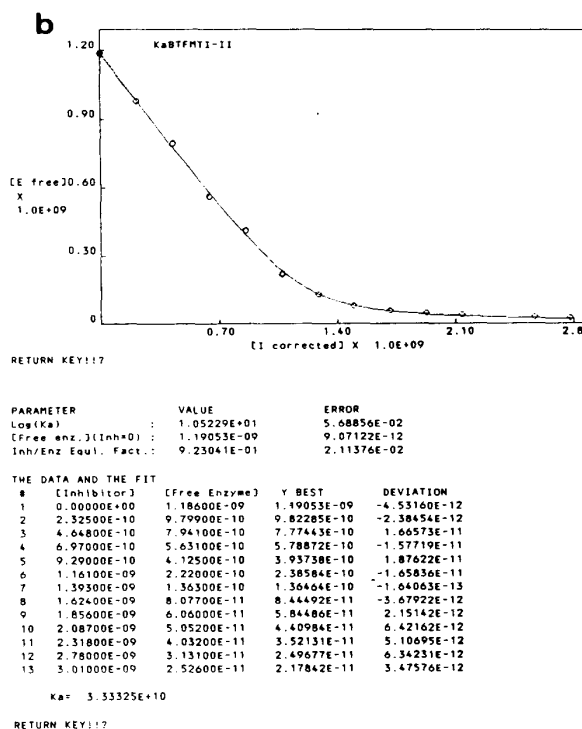
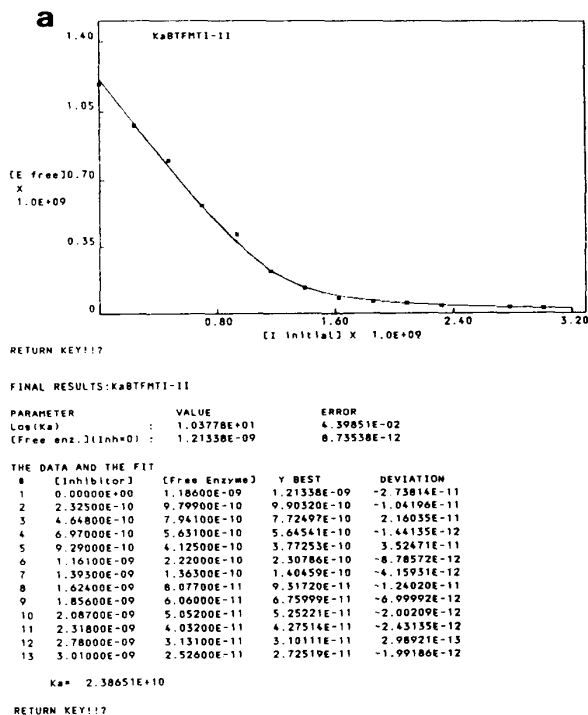


Fig. 1. Titration curve and calculated Ka value generated by computer treatments using nonlinear least-squares analysis programs with (a) 2 parameters and (b) 3 parameters. The data were for bovine trypsin interacting FMTI-II at 25°C in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH8.0) containing 10mM CaCl<sub>2</sub> and 0.005% (W/V) Triton X-100.

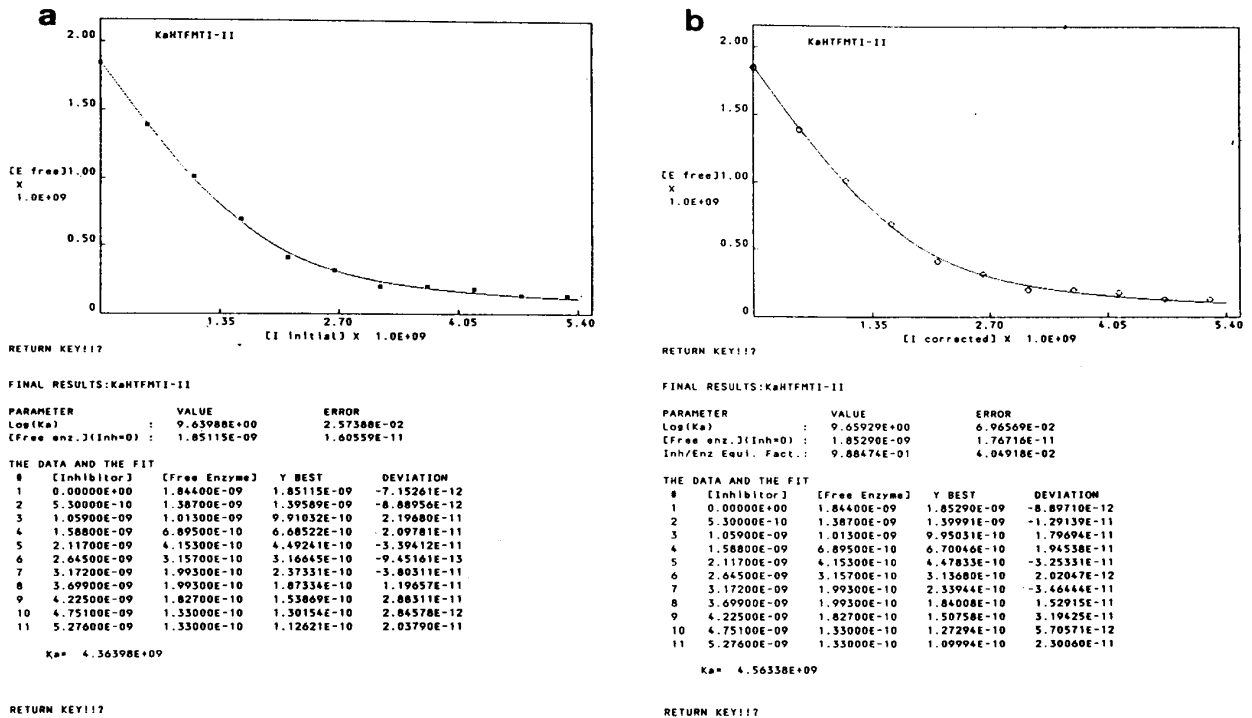


Fig. 2. Titration curve and calculated  $K_a$  value generated by computer treatments using nonlinear least-squares analysis programs with (a) 2 parameters and (b) 3 parameters. The data were for hog trypsin interacting FMTI-II at 25°C in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH8.0) containing 10mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.005% (W/V) Triton X-100.

特にF値は $0.9 < F < 1.1$ の条件を満足させた。これより、ウシ・トリプシンとFMTI-IIの $K_a$ を $3.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ と決定した。

## 2) ブタ・トリプシンとFMTI-IIの会合平衡定数

Fig. 2にブタ・トリプシンとFMTI-IIの $K_a$ 測定におけるコンピューター処理の結果を示す。先の場合と同様、ブタ・トリプシンのストック溶液は希釈され、 $1.85 \times 10^{-9} \text{ M}$ の濃度にされた。この場合も、Fig 2-aで示される様に1番目のプログラム実行で結果は小さい誤差しか示さなかった。つづいて行われた2番目のプログラムによるデータ処理も良好な結果を与え(Fig 2-b), 最終的にブタ・トリプシンとFMTI-IIの $K_a$ を $4.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ と決定した。なお、この値はウシ・トリプシンの時の値よりほぼ1オーダー小さく、FMTI-IIはブタ・トリプシンよりもウシ・トリプシンにより強い親和性を示すことが明らかにされた。

## IV 考察

本報告では、GreenとWorkの方法<sup>3)</sup>に種々の改良を加え、 $K_a$ をより正確に測定する方法について述べている。GreenとWorkの方法<sup>3)</sup>は先に述べた様に、種々の問題点を有しているが、この最大の原因は、本法が高い酵素濃度で酵素-インヒビターの滴定を行い、

濃度決定と $K_a$ 測定を同時に済ませているということにある。すなわち、濃度決定のためには、滴定曲線はできるだけ直線性に富み、当量点での解離が小さくなければならない。一方、 $K_a$ 測定の精度を上げるにはまったくその逆である。つまり、GreenとWorkの方法<sup>3)</sup>はそれ自体に大きな矛盾を含んでいることである。これを解決するためには、明らかに両測定を切り離す必要がある。酵素-インヒビターの結合様式は、当量点での解離が $[E_0] \times K_a$ に依存していることを示している<sup>6)</sup>。 $[E_0] \times K_a$ が大きい場合解離は小さく、 $[E_0] \times K_a$ が小さい場合解離は大きい。したがって、濃度決定の為に滴定には高い酵素濃度が、また $K_a$ 測定には低い酵素濃度での滴定が有用である。本報告の $K_a$ 測定法は、この考え方が基本となっている。

本改良法は、3段階から成っている。第1段階は、トリプシンおよびインヒビターの濃度決定である。トリプシンの濃度決定は活性部位滴定法<sup>5)</sup>で行われたが、この方法は最も推奨される方法である。インヒビターの濃度決定は濃度既知のトリプシンとの滴定で行われた。濃度決定のための滴定では $[E_0] \times K_a > 1000$ の条件を満たすことが重要である<sup>6)</sup>。本実験では、ウシ・トリプシンの反応時の初濃度は $2.65 \times 10^{-7} \text{ M}$ であり、FMTI-IIのウシ・トリプシンとの $K_a$ は $3.3 \times 10^{10}$

$M^{-1}$ であったことから、充分上の条件を満たしていた。なお、滴定では常に基質の影響を考慮する必要がある、平衡を著しく乱さないためには、a) 基質の容量は反応液総容量の1%以下が望ましく、悪くとも5%以下でなければならない。b) 酵素反応の時間は複合体の解離の半減期の10%以内。c) b) の条件が満たされない時は基質の反応時の初濃度は $K_m$ 値の10%以内でなければならない。本実験では基質の容量は反応液総容量の4.2%、また、本複合体の解離速度定数 $k_{off}$ は $10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 程度と考えられることからその半減期は約6000秒(100分)であり、いずれも上のa) b) の条件に合致しているものと考えられる。次に、第2段階は、希釈溶液を用いた滴定である。Ka測定の為の滴定では、 $2 < [E_0] \times K_a < 20$ の条件が最適と考えられる。この条件下では、当量点における遊離酵素量[E]は全酵素量 $[E_0]$ の20%以上50%以下に相当する。本実験では、ウシ・トリプシン-FMTI-IIの場合は、 $[E_0] \times K_a \approx 40$ 、一方、ブタ・トリプシン-FMTI-IIの場合は $[E_0] \times K_a \approx 8$ であった。なお、ここで問題となるのは上の条件を満たすための酵素溶液の希釈に伴う種々の困難さである。まず、低濃度で問題となる蛋白質の容器への吸着であるが、これは緩衝液へ界面活性剤を加えることにより解決された。次に、希釈酵素液の反応検出系の確立であるが、これには大きな $k_{cat}/K_m$ 値を有す安定なp-nitroanilide基質と高感度の分光光度計が必要であった。より高い希釈が必要な場合には蛍光基質の導入も必要となってこよう。最後は、高希釈に伴うインキュベーション時間の増大である。これは、酵素とインヒビターの結合は2次反応速度式に従うため、平衡に達するまでの時間が低濃度では長くなるためである。インキュベーション時間は、反応のhalf time ( $t_{1/2}$ )の10倍以上としたが、この適否は後に述べるコンピューターの使用で判断された。なお、酵素とインヒビターの濃度が等しい時の $t_{1/2}$ は

$$t_{1/2} = 1 / (k_{on} \cdot [E_0])$$

で与えられる。ウシ・トリプシン-FMTI-IIおよびブタ・トリプシン-FMTI-IIの系での会合速度定数 $k_{on}$ をそれぞれ $3 \times 10^6 \text{sec}^{-1} \cdot M^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{sec}^{-1} \cdot M^{-1}$ と仮定すると、最低必要なインキュベーション時間はそれぞれ約50分と3時間となる。本実験では、どちらも15時間のインキュベーションを用いたが、長時間のインキュベーション時間によるインヒビターの損傷(テンポラリー阻害<sup>7)</sup>)は認められなかった。また希釈系における滴定も先に述べた様に基質の影響を考慮する必要がある。本滴定の場合先述のa)、b)の条件を満足させていた。最後の第3段階はマイクロ・コンピューターによるデータの処理である。ここでは

2つのプログラムが用いられたが、特に2番目のプログラムは有効であった。これはパラメーターとしてinhibitor/enzyme equivalence factor (F)を採用した結果である。溶液の希釈において、もし誤りがあったならば、ピベツティングが正しい限りにおいて得られたデータは理論曲線と系統的なずれを示すであろう。同様に、インキュベーション時間が短過ぎて平衡に到っていないか、逆に長過ぎてテンポラリー阻害<sup>7)</sup>が生じた場合もそうであろう。なぜなら、いずれも入力した値と真実の値に系統的なずれが存在するはずだからである。パラメーターFはこれらの系統的なずれを補正する役割を有している。逆に言うと、F値が1.0より大きくずれることにより、データと理論曲線との適合が良くなった時は、実験データに何らかの大きな系統的誤差が存在していたことを示すものである。したがって、本実験では、まずパラメーターFの無い1番目のプログラムで良好な結果を示すデータのみが受理され、つづいてこのデータが2番目のプログラムでも良好な適合を示した時のみ、そこで得られたKaが採用された。

以上、トリプシンとインヒビターの会合平衡定数測定に関し改良を試み満足すべき結果を得た。本改良法はまた他のプロテアーゼインヒビター系にも応用が可能であり、本法により得られるより正確な定数はインヒビターの生体内での役割や動きを理解する上での有力な情報となろう。

## V 要約

トリプシンとインヒビターの会合平衡定数測定のための改良法を確立した。本法は3段階より成っており、1段階は、活性部位滴定や酵素-インヒビター滴定によるトリプシンおよびインヒビターの濃度標定、2段階は、GreenとWork法での滴定のための遊離酵素活性の正確な測定で、ここでは、低酵素濃度と高感度基質が用いられる。最後の段階は、マイクロ・コンピューターによるデータの非線型最小自乗分析で、これにより正確に定数を評価できうる。この方法により、ウシおよびブタ・トリプシンと粟種子トリプシンインヒビターIIとの会合平衡定数は、25°C、pH8.0で、それぞれ $3.3 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $4.6 \times 10^9 M^{-1}$ と決定された。

(1989年8月15受理)

## 引用文献

- 1) I. E. Liener and M. L. Kakade : Toxic Constituents of Plant Foodstuffs (ed. by I. E. Liener), p. 7 (1969) Academic Press, New York.
- 2) M. Laskowski, Jr. and I. Kato : Annual

- Review of Biochemistry (ed. by E. E. Snell, P. D. Boyer, A. Meister and C. C. Richardson), p.593 (1980) Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- 3) N. M. Green and E. Work : *Biochem.J.*, **54**, 347 (1953).
  - 4) M. Tashiro, Y. Kihira, Y. Katayama, and Z. Maki : *Agric.Biol.Chem.*, **53**, 443 (1989).
  - 5) T. Chase, Jr. and E. Shaw : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 508 (1967).
  - 6) J. Bieth : Bayer Symposium V, Protease Inhibitors (ed. by H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene and E. Truscheit), p.463 (1974) Springer-Verlag, Berlin.
  - 7) M. Laskowski, Sr. and F. C. Wu : *J. Biol. Chem.*, **204**, 797 (1953).