

# 花豆種子中純化出一種 Bowman-Birk 型 蛋白酶抑制劑及生化特性分析

## Purification and Biochemical Characterization of a Bowman-Birk-type Protease Inhibitor from *Phaseolus coccineus* Seeds

廖美怡<sup>1</sup> Mei-I Liao      王海龍<sup>2</sup> Hai-Lung Wang

洪志宏<sup>2\*</sup> Chih-Hung Hung

<sup>1</sup> 東元綜合醫院病理檢驗科

<sup>2</sup> 元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術學

<sup>1</sup> Department of Pathology and Laboratory, Ton-Yen General Hospital

<sup>2</sup> Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University of Medical Technology

**摘要：**以花豆 (*Phaseolus coccineus*) 種子為材料，利用硫酸銨分割、DEAE-cellulose 52陰離子交換樹脂及trypsin-Sepharose 4B親和性管柱等方法，純化出一種花豆胰蛋白酶抑制劑 (*Phaseolus coccineus* trypsin inhibitor, PCTI)。以15% SDS-PAGE分析純度及利用MALDI-TOF質譜儀分析PCTI的分子量，得到其分子量為8.92 kDa，屬於Bowman-Birk型蛋白酶抑制劑。進一步研究PCTI的性質，PCTI在溫度到達 80°C及100°C時，其抑制胰蛋白酶的殘留活性仍保持在80%以上，顯示其對溫度具有高度的耐受性；PCTI在不同pH的緩衝溶液處理下，其抑制胰蛋白酶的殘留活性仍保持在80%以上，可知其結構的穩定性不受pH值的改變而有所影響；在不同濃度的DTT（還原劑）處理下，抑制胰蛋白酶的殘留活性隨著DTT濃度升高而下降，顯示維持PCTI活化位（active site）的構形穩定與其分子內雙硫鍵的存在有顯著的相關性。PCTI抑制胰蛋白酶作用其莫耳數比為1：1。以酵素動力學Lineweaver-Burk double reciprocal plot及Dixon plots分析，顯示PCTI對胰蛋白酶的抑制是屬於競爭性抑制作用，抑制常數（inhibition constant,  $k_i$ ）值為 $8.96 \times 10^{-9}$  M。

**關鍵字：**花豆、Bowman-Birk型蛋白酶抑制劑、動力學

\* 通訊作者：洪志宏，地址：30015 新竹市香山區元培街306號  
E-mail：chihhung@mail.ypu.edu.tw，連絡電話：03-6108169，傳真電話：03-6102234



**Abstract:** This study used methods such as ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose 52 anion exchange resin and trypsin-Sepharose 4B affinity columns to purify and extract trypsin inhibitor from *Phaseolus coccineus* (PCTI). 15% SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometers were used to analyze the molecular weight of PCTI, which was 8.92 kDa, belonging to Bowman-Birk-type proteinase inhibitor. Further investigation on the nature of PCTI found that its residue activity for inhibiting trypsin was still maintained above 80% when its temperatures reached 80°C and 100°C, showing its high tolerance to temperature. PCTI's residue activity for inhibiting trypsin was also maintained above 80% when it was treated by buffer solutions with different pH values, suggesting that its structural stability would not change in regard to pH values. When treated with different concentrations of DTT (a reducing agent), PCTI's residue activity for inhibiting trypsin decreased with increasing DTT concentration, showing that the maintenance of the conformational stability of PCTI active site was significantly correlated to disulfide bonds inside the molecule. The mole ratio of PCTI to trypsin is one to one. The enzyme kinetics Lineweaver-burk double reciprocal plot and Dixon plots analysis show that the inhibition effect of PCTI on trypsin is of competitive inhibition, with the inhibition constant ( $k_i$ ) being  $8.96 \times 10^{-9}$  M.

**Keywords:** *Phaseolus coccineus*、Bowman-Birk-type proteinase inhibitor、kinetics

## 1. 前言

蛋白酶 (protease) 為一種可以水解蛋白質胜肽鍵的酵素，在細胞中扮演著重要的角色。胰蛋白酶抑制劑 (trypsin inhibitor) 泛指具有抑制胰蛋白酶活性作用的一類物質，其分子量一般比較小，普遍存在於植物界(Alves et al., 2010)：豆科 (Leguminosae)，茄科 (Solanaceae) 及禾本科 (Gramineae) 是主要的三大來源，特別是在種子中含量最高可達總蛋白的10%。目前蛋白酶的分類主要是依據其活化位與作用方式的不同分成四大類；絲胺酸型蛋白酶 (serine protease) (Steven et al., 1996)、半胱胺酸型蛋白酶 (cysteine protease) (Sivaraman et al., 2000)、金屬型蛋白酶 (metalloprotease) (Chaudhari et al., 2013)、天門冬胺酸型蛋白酶 (aspartyl protease) (Pinho et al., 2009)。這四種蛋白酶的抑制劑，以絲胺酸型蛋白酶抑制劑研究最多，並已經從各種豆科植物種子中分離出來。胰蛋白酶抑制劑根據胺基酸組成及序列、半胱胺酸含量、反應位點的數量與蛋白酶結合的機制可分為不同的類型或家族，主要可分Kunitz型抑制劑、Bowman-Birk型抑制劑、Potato I 型、Potato II 型、Kazal型、Squash及Cereal super等家族。其中研究最為廣泛和深入的是Kunitz型抑制劑及Bowman-Birk型抑制劑兩類。許多植物透過製造防禦性化合物對抗害蟲 (Katoch et al., 2014)。大部分防禦性化合物是蛋白質，特別是干擾害蟲消化系統的酵素抑制劑，例如蛋



白酶抑制劑、 $\alpha$ -澱粉酶抑制劑、凝集素 (Furstenberg-Hagg et al., 2013)。

在近代醫學中，蛋白酶抑制劑是一種重要的生物藥物和生化試劑，參與了許多重要的生理調控。在醫藥學的研究領域，如細胞週期、細胞死亡、DNA複製、止血、免疫反應、組織重建和傷口癒合等都息息相關。其對生物的生長發育，甚至細胞的凋亡也都有調節作用。目前已知Bowman-Birk型抑制劑的抑癌機制，包括：抑制致癌基因表現 (Dai et al., 2011) 和癌症所誘導之基因增殖 (Heilbronn et al., 1985)，阻止細胞因自由基而誘發產生改變 (Coburn et al., 1981)，具有高度抗發炎能力，能抑制一些與發炎反應有關之蛋白酶。蛋白酶在癌細胞發展上，除了與細胞轉移及侵襲有關外，還可以使細胞失去接觸性生長抑制 (contact inhibitor) 的性質，而使癌細胞毫無限制的生長，甚至發生重疊 (pile up) 現象，並且由於蛋白酶在細胞表面作用，使得細胞膜的性質也發生變化，不但形狀異常，細胞膜上接受器的移動能力也會增加，使得親醣蛋白質對其之凝集活動增加，這些性質在給予蛋白酶抑制劑後將會有所改善 (Kennedy et al., 2002; Malkowicz et al., 2003)。而近些年來人們也注意到了胰蛋白酶抑制劑的抗病毒和抗癌作用，並廣泛開展了這方面的相關研究，如肺癌、子宮、內膜癌、乳腺癌等作用 (Fereidunian et al., 2014)，故如何使用蛋白酶抑制劑來抑制腫瘤細胞的生長，是一件極其有研究意義的工作，也成為近幾年生命科學研究的一個熱門點。

本實驗由花豆 (*Phaseolus coccineus*) 種子裡純化出一種胰蛋白酶抑制劑 (*Phaseolus coccineus trypsin inhibitor*)，簡稱PCTI，利用15% SDS-PAGE及MALDI-TOF質譜儀分析PCTI的分子量，並進行PCTI對溫度、pH值、DTT等的耐受性進行相關研究。利用酵素動力學Lineweaver-Burk double reciprocal plot及Dixon plots兩種方程式，探討PCTI對胰蛋白酶的抑制作用方式及其抑制常數 $K_i$ 值。

## 2. 研究方法

### 2.1 PCTI的萃取

秤取150克的花豆，洗淨去除雜質，浸泡於1公升0.01M，pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液中，放置4°C冰箱過夜。之後利用果汁機 (waring blender) 將花豆打成漿 (每次30秒，10-20次)，離心30分鐘 (4°C，10000 rpm，KUBOTA 7700，AG-2506 rotor)，取上清液，緩緩加入硫酸銨鹽至30%飽和度，待硫酸銨鹽完全溶解後，離心30分鐘 (4°C，10000 rpm)，離心後將沉澱物放置透析袋內 (標示0-30%)，將其上清液緩緩加入硫酸銨鹽至70%飽和度，待硫酸銨鹽完全溶解後，離心30分鐘 (4°C，10000 rpm)。離心後將沉澱物放置透析袋內 (標示30-70%)，將其上清液緩緩加入硫酸銨鹽至95%飽和度，待硫酸銨鹽完全溶解後，離心30分鐘 (4°C，10000 rpm)。最後將沉澱物放置透析袋內 (標示70-95%)。將裝有沉澱物的透析袋浸泡於3公升0.01M，pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液裡，4°C進行透析，每5小時更換一次透析



液（0.01M，pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液），更換5次。透析完畢後透析袋裡的內容物取出，離心30分鐘（4°C，10000 rpm）。取上清液測定活性，將具有抑制胰蛋白酶活性的部分通入預先以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液平衡的DEAE-cellulose 52管柱（10 cm x 1.5 cm），以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液將無法鍵結於樹脂上的蛋白質沖洗完後，再以含0 - 0.5M 氯化鈉的0.01M，pH 8.0磷酸鹽緩衝溶液的離子梯度沖提，分液收集器（GE Healthacre Frac-920）每3ml收集一管，每管測量波長280nm的吸光度，收集具有抑制胰蛋白酶活性的部分通入trypsin-Sepharose 4B親和性管柱（2.2 cm x 20 cm），以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液沖洗，將非特异性蛋白去除，最後用0.01N HCl沖提，沖提出來的PCTI純度可由15% SDS-PAGE分析。

## 2.2 胰蛋白酶活性測定

實驗組是將0.5 ml的PCTI溶液（溶於0.01M的Tris-HCl，pH8.0緩衝溶液）與0.5 ml的胰蛋白酶溶液（10mg/ml）均勻混合，於37°C反應5分鐘後，加入4 $\mu$ l BAPNA（N-benzoyl-DL-arginyl- p-nitroanilide）溶液（50 mg/ml DMSO溶液），於37°C反應30分鐘後，加入0.5 ml 10%醋酸溶液終止反應，測定410nm吸收。對照組以0.5ml磷酸鹽緩衝溶液代替PCTI溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組以0.5 ml的PCTI溶液（實驗空白組）或0.5 ml磷酸鹽緩衝溶液對（對照空白組）依序加入0.5 ml的胰蛋白酶溶液（10mg/ml），1 ml 10%醋酸，4  $\mu$ l BAPNA溶液，測定410nm吸收。所有的實驗都重複做三次。PCTI抑制胰蛋白酶活性能力的計算方法，以用殘餘酶活性（residual trypsin activity，簡稱R.T.A.）或以抑制百分比（percent inhibitor，簡寫為I%）來表示（Mello, etal 2001）。抑制單位的定義：抑制1毫克胰蛋白酶所需的抑制劑量，謂之1抑制單位（inhibition unit），計算公式如下：

$$\text{R.T.A. (\%)} = \frac{A1-A3}{A2-A4} \times 100\%$$

A1=實驗組之A410 nm

A2=對照組之A410 nm

A3=實驗空白組A410 nm

A4=對照空白組A410 nm

I (%) = 1 - R.T.A. (%)

## 2.3 蛋白質濃度測定

本實驗使用Pierce公司所出品的BCA protein assay reagent（bicinchoninic acid）。

## 2.4 SDS-聚丙烯醯胺電泳法（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis）

利用15 % 的SDS-PAGE來分析蛋白質。而膠片上蛋白質的位置則用0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250染色來偵測。



## 2.5 溫度、pH值及DTT對PCTI的穩定度影響

### 2.5.1 溫度的影響

PCTI以不同的溫度（37°C-100°C）處理30分鐘，之後加入10  $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml）、5  $\mu$ l的BAPNA（50 mg/ml），放置於37°C反應30分鐘後，加入100  $\mu$ l 50%的醋酸（終止反應），以波長410nm測定吸收光，測量其殘餘胰蛋白酶的活性。每次重複三次，取平均值 $\pm$ SE。

### 2.5.2 pH值的影響

將PCTI溶於不同緩衝溶液（100 mM）100  $\mu$ l，緩衝溶液的種類如下：檸檬酸鈉（pH 4.0）、醋酸鈉（pH 5.0）、磷酸鈉（pH 6.0、7.0）、Tris-HCl（pH 8.0）、碳酸氫鈉（pH 9.0、10.0）。在37°C反應1小時之後，加入900 $\mu$ l 0.01M Tris-HCl（pH 8.0）、10 $\mu$ l trypsin（2 mg/ml）、5 $\mu$ l BAPNA（50 mg/ml），放置於37°C反應30分鐘後，加入100 $\mu$ l 50%的醋酸（終止反應），以波長410nm測定吸收光，測量其殘餘胰蛋白酶的活性。每次重複三次，取平均值 $\pm$ SE。

### 2.5.3 DTT的影響

PCTI與最後濃度為1、10、100 mM還原劑DTT（dithiothreitol）在37°C反應15、30、60、90分鐘，藉由加入兩倍DTT濃度的碘醋酸（iodoacetic acid）終止反應，再加入10  $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml）、5  $\mu$ l的BAPNA（50 mg/ml），37°C反應30分鐘，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。每次重複三次，取平均值 $\pm$ SE。

## 2.6 蛋白質N端定序

使用ABI Procise® System，進行蛋白質N端Edman Degradation序列分析。

## 2.7 酵素動力學實驗

利用不同重量PCTI（0  $\mu$ g、2  $\mu$ g、4  $\mu$ g、6  $\mu$ g）與10  $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml）37°C反應10分鐘後，加入1 ml的0.01M Tris-HCl與1.3  $\mu$ l、2.0  $\mu$ l、4.0  $\mu$ l的BAPNA（50 mg/ml）反應10分鐘，並在每一分鐘紀錄OD<sub>410</sub>偵測吸光值，之後再使用Lineweaver-burk double reciprocal plot，並以1/V對1/S作圖畫出雙倒數圖來決定其抑制胰蛋白酶的作用形式。再以Dixon plot作圖（Dixon, 1953），利用0.5 mM、0.75 mM兩種濃度的BAPNA，以1/A<sub>410nm</sub>對PCTI的濃度（4 $\mu$ g、6 $\mu$ g）作圖所畫出的兩條直線，求出交叉點的值，即為PCTI對胰蛋白酶的抑制常數（ki）。

## 3. 結果

### 3.1 花豆胰蛋白酶抑制劑（PCTI）純化

PCTI純化是先將花豆種子的粗萃取液，利用不同濃度的硫酸銨溶液進行鹽析，具有活性的部分是位於70%至95%飽和度硫酸銨沉澱下的蛋白質，經由DEAE-52 cellulose陰離



子交換樹脂，以0至0.5M氯化鈉濃度之直線梯度，沖出蛋白質，結果得到三個吸收峰（圖1A），經活性分析試驗得知第二個吸收峰具有抑制胰蛋白酶的活性，收集有活性的部分再通入trypsin-Sepharose 4B親和性管柱，此管柱先以0.01 M磷酸鹽緩衝液pH 8.0，含0.2 M氯化鈉平衡，樣品通入管柱中，之後再以上述緩衝液沖洗至無蛋白質流出為止，最後以0.01N鹽酸溶液將胰蛋白酶抑制劑沖提出，經活性分析試驗可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的吸收峰（圖1B）。利用15%的SDS-PAGE分析其純度（圖1C），得到一條純化的蛋白質，將PCTI加入還原劑 $\beta$ -mercaptoethanol處理後，仍只得到一條色帶，表示PCTI是由單一多肽鏈所組成。純化的蛋白質以MALDI-TOF分析後得知分子量為8.92 kDa。在表一顯示純化花豆胰蛋白酶抑制劑時，每一個步驟獲得的回收產率及純化倍數，最後經trypsin-Sepharose 4B affinity column純化，PCTI其回收率為25.8%（表一）。由圖1D顯示不同量PCTI對定量胰蛋白酶的抑制作用，可知胰蛋白酶與PCTI作用的莫耳數比為1：1。

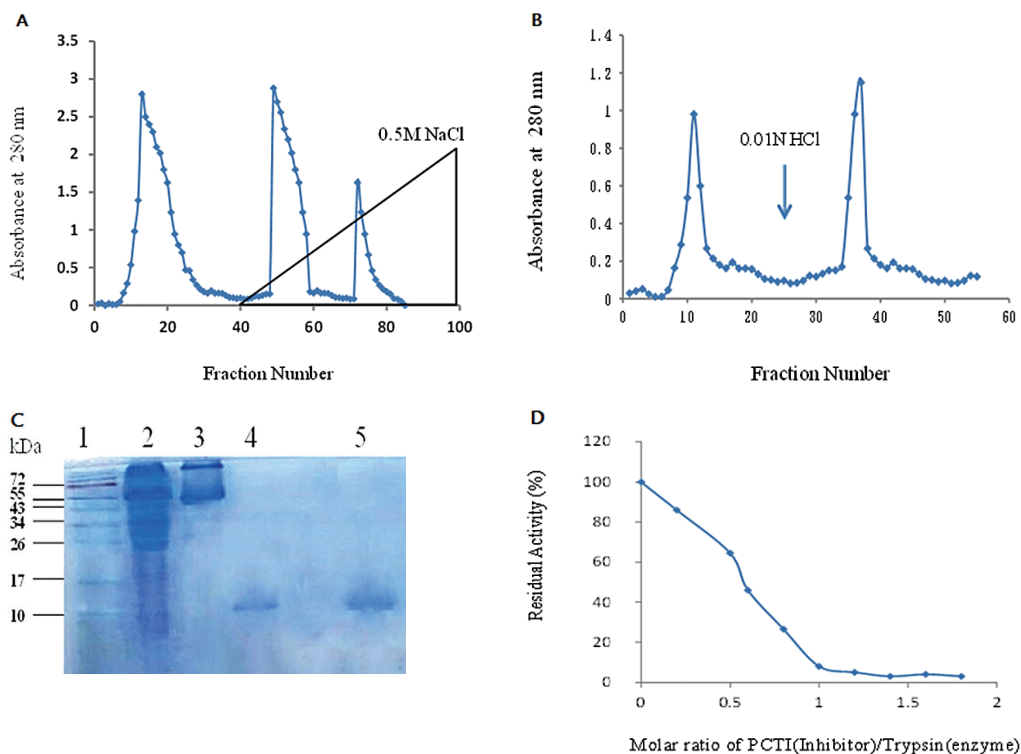


圖1 PCTI 之純化。(A) DEAE-cellulose 52 陰離子交換樹脂（10 cm x 1.5 cm）。將花豆種子粗萃取物經過70%-95%飽和度硫酸銨鹽析、透析後，通入預先以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液平衡的DEAE-cellulose 52管柱，以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液（含0-0.5M氯化鈉離子梯度）沖提，測OD<sub>280</sub> nm分析，偵測到三個吸收峰，經活性分析發現第二個吸收峰具有抑制胰蛋白酶活性。(B) 將具有活性的部分通入trypsin-Sepharose 4B親和性管柱（1.5cm x 10cm），以0.01M，pH 8.0的磷酸鹽緩衝溶液沖提，將非特異性蛋白去除，最後用0.01N HCl





沖提，OD<sub>280</sub> nm及活性分析，發現第二個吸收峰具有抑制胰蛋白酶活性。(C) 利用15% SDS PAGE電泳分析。Lane 1: protein markers；Lane 2: 粗萃取液；Lane 3: 通入 DEAE-52管柱後具有活性的部分；Lane 4: 通入trypsin-Sepharose 4B親和性管柱後所純化得到的PCTI；Lane 5: PCTI以β-mercaptoethanol還原劑處理。(D) PCTI對胰蛋白酶抑制作用的分析。利用不同濃度的PCTI與固定濃度的胰蛋白酶在37°C反應5分鐘，再加入5μl的BAPNA溶液（50mg/ml），37°C反應30分鐘，再加入0.5 ml醋酸溶液（10%）終止反應，利用410nm吸光值測其抑制作用的活性分析。

表一、由花豆種子所分離出的PCTI純化倍數及回收率

Steps	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	3000	5700	1.9	1	100
Fraction 70-95%	360	3506	9.7	5.1	61.5
DE-52 cellulose	88.5	1832	20.7	10.9	32.1
Trypsin-Sepharose-4B	21.0	1470	70	36.8	25.8

### 3.2 酵素動力學實驗

以不同重量的之PCTI與10 μl的trypsin（2 mg/ml），37°C、反應10分鐘後，加入1 ml 的0.01M Tris-HCl與1.3μl、2μl、4μl三種不同的BAPNA（50 mg/ml），每個濃度反應10分鐘，紀錄每一分鐘時的OD<sub>410</sub>吸光值，之後以1/A<sub>410</sub>（OD<sub>410</sub>/h/ml）<sup>-1</sup>對1/受質濃度（BAPNA）作Lineweaver-burk double reciprocal plot（圖2A），四條直線方程式相交於y軸，可知PCTI對胰蛋白酶的抑制是屬於競爭性的抑制作用。以Dixon plots作圖（圖2B），在不同濃度（0.5mM、0.75mM）之BAPNA（50mg/ml），以1/A<sub>410</sub>（OD<sub>410</sub>/h/mL）<sup>-1</sup>對PCTI的濃度(μmole/L)作圖，相交於兩條直線方程式的交點數值，即可知PCTI對胰蛋白酶的抑制常數Ki值為8.62 x 10<sup>-9</sup> M。

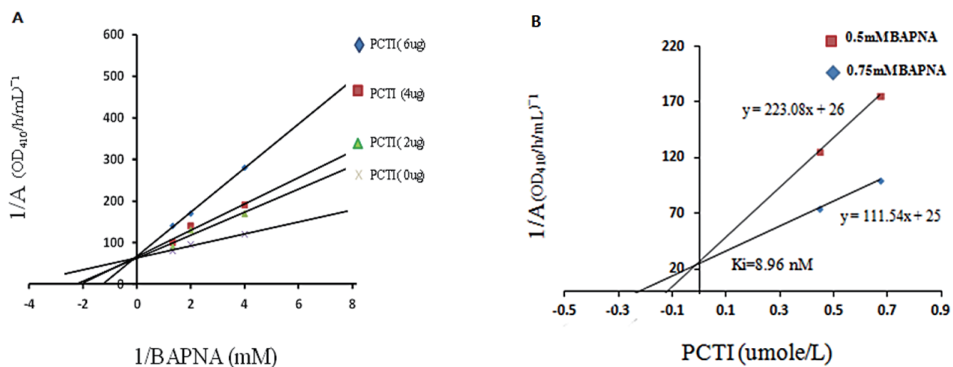


圖2 酵素動力學的分析（Lineweaver-Burk double reciprocal plot）。(A)以不同重量的PCTI與胰蛋白酶反應10 min，之後加入不同濃度的BAPNA，測其410nm吸光值的變化，將測得的



吸光值導入Lineweaver-Burk double reciprocal plots，並以 $1/V$ 對 $1/S$ 進行作圖，劃出雙倒數圖交於Y軸，表示為競爭性的抑制作用。(B) 利用Dixon plot 計算出PCTI對胰蛋白酶的抑制常數( $k_i$ )。在不同濃度的BAPNA，以 $1/A$  ( $OD_{410}/h/mL$ )<sup>-1</sup>對PCTI的濃度( $\mu\text{mole/L}$ )作圖，可得到兩條直線方程式，求出交叉點數值，即是PCTI對胰蛋白酶之抑制常數( $K_i$ )，其 $k_i$ 值為 $8.62 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

### 3.3 溫度、pH值及DTT對PCTI的穩定度影響

PCTI以不同溫度(37-100°C)處理30分鐘後，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性，以100°C高溫處理30分鐘，仍具有約80%的活性，可得知PCTI對熱具有非常高的穩定性(圖3A)；PCTI以不同的pH值(4-10)的環境下處理1小時，活性仍保持80%以上，其結構的穩定性不受pH值改變而有所影響(圖3B)；PCTI以不同濃度(1mM、10mM、100mM)的DTT反應15、30、60、90分鐘，之後測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性(圖3C)，可得知在DTT濃度1mM時，隨著反應的時間增加，PCTI的殘留胰蛋白酶抑制活性約由89%降至62%，當DTT濃度為10mM時，隨著反應的時間增加，PCTI的殘留胰蛋白酶抑制活性約由77%降至52%，DTT濃度到達100mM時，隨著孵育的時間增加，PCTI的殘留胰蛋白酶抑制活性降至42%，可知雙硫鍵對其結構的穩定度有絕對的重要性。

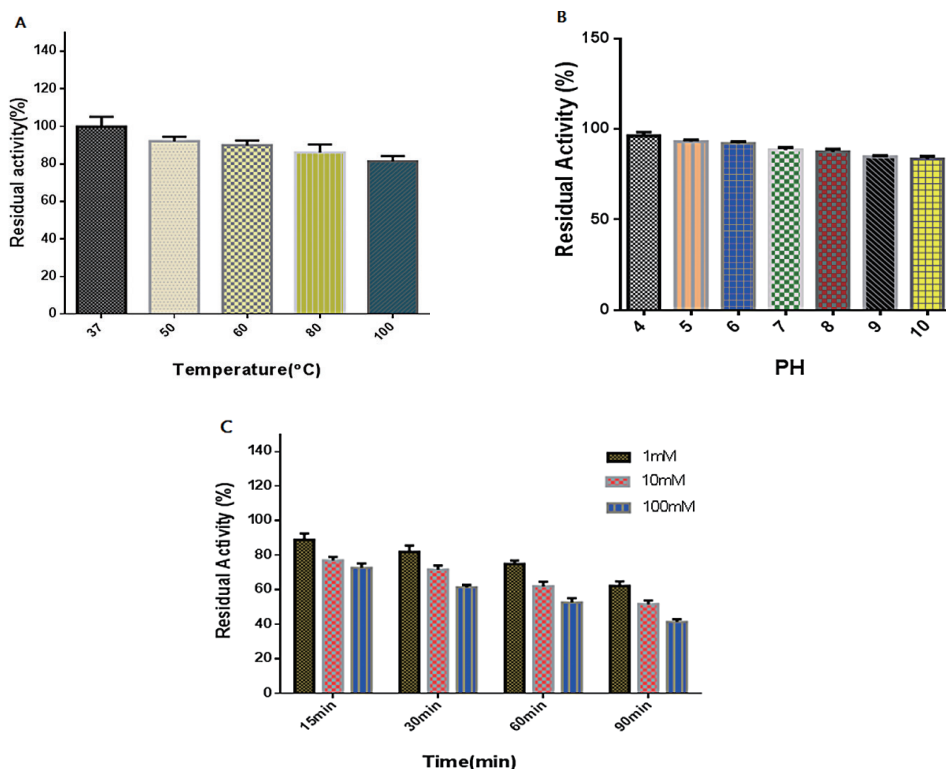


圖3 溫度、pH值及DTT對PCTI的穩定度影響。(A)溫度對PCTI穩定度的影響。(B) pH值對PCTI穩定度的影響。(C) 不同濃度的還原劑DTT對PCTI抑制胰蛋白酶活性的影響。





### 3.4 PCTI的N-端胺基酸序列定序

PCTI蛋白質N-端胺基酸定序是使用Applied Biosystems，最後得到15個胺基酸序列EPSESSEPCCDICVC，PCTI的N-端胺基酸序列與其他BBI家族N端序列相比較，PCTI與菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 完全相同100%，與雙花扁豆 (*Dolichos biflorus*) 相同性有80%，大豆 (*Glycine max*) 60%，小扁豆 (*Lens culinaris*)、*Vigna faba*及豌豆 (*Pisum sativum*) 都是40%的相同性 (圖4)。

Species	Primary Sequences	Identity (%)
<i>Phaseolus coccineus</i>	EPSESSEPCCDICVC	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	EPSESSEPCCDICVC	100
<i>Dolichos biflorus</i>	EPSESSKPCCDQCTC	80
<i>Glycine max</i>	DD-ESSKPCCDQCAC	60
<i>Lens culinaris</i>	GDDVKSA-CCDTCLC	40
<i>Vigna faba</i>	GDDVKSA-CCDTCLC	40
<i>Pisum sativum</i>	GDDVKSA-CCDTCLC	40

圖4 PCTI的N-端胺基酸序列與其他BBI家族N-端胺基酸序列比對。Accession numbers: *Phaseolus vulgaris* - P01060; *Dolichos biflorus* - Q9S9E3; *Glycine max* - P01055; *Lens culinaris* - Q8W4Y8; *Vigna faba* - P24661; *Pisum sativum* - Q41065。

## 4. 討論

植物中的胰蛋白酶抑制劑屬於絲胺酸型蛋白酶抑制劑 (serine protease inhibitor)，依其分子量大小及半胱胺酸含量，大致可成分成兩大類，一類為Kunitz型蛋白酶抑制劑，分子量約為18-24 kDa，通常含有四個半胱胺酸，可形成兩對雙硫鍵，具有一條或兩條多肽鏈所組成。另一類為Bowman-Birk型蛋白酶抑制劑，分子量較小約為8-10 kDa，由70-90個胺基酸所組成的單一多肽鏈，半胱胺酸含量很高，通常可形成7-8對雙硫鍵 (Kumar and Gowda, 2013)。本研究以花豆種子為材料，利用硫酸銨分割，DEAE-52 cellulose陰離子交換樹脂及 trypsin-Sepharose 4B親和性管柱，可純化出一種胰蛋白酶抑制劑PCTI，以MALDI-TOF質譜儀分析PCTI，得知其分子量為8.92 KDa，由分子量大小可知其屬於Bowman-Birk型蛋白酶抑制劑。

接著探討可能會影響其結構及穩定性的物理、化學因素：如溫度、pH值、還原劑。將PCTI以不同溫度孵育30分鐘後，測量其殘留活性，以100°C高溫孵育30分鐘後，仍具有約80%的活性，可得知PCTI對熱具有非常高度的穩定性，這與從巴西木蝶豆 (*Clitoria fairchildiana*) (Dantzger et al., 2015)、雙花扁豆 (*Dolichos biflorus*) (Kumar and Gowda, 2013) 及鵲豆 (*Lablab purpureus*) (Lin et al., 2016) 所分離的蛋白酶抑制劑有相似的結果。而PCTI在pH值4-10的環境下，其結構的穩定性不受pH值的改變而有所影響。從油菜



(*Brassica campestris*)、雙花扁豆 (*Dolichos biflorus*)、鵲豆 (*Lablab purpureus*) (Hung et al., 2003; Lehle et al., 1996; Lin et al., 2016) 及花豆種子中 (PCTI) 分離的 Bowman-Birk 型蛋白酶抑制劑，這些抑制劑經由還原劑 DTT 處理過後，其殘留抑制胰蛋白酶的活性皆明顯下降，由此可知，雙硫鍵對它們構型的穩定度有絕對的重要性及相關性。

接著探討其酵素動力學，以 Lineweaver-burk double reciprocal plot 分析，其 PCTI 對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用，牛蹄豆 (*Pithecellobium dulce*) (Pandey et al., 2015)、DtTCI (Bhattacharyya et al., 2009) 及 LPTI (Lin et al., 2016) 也是競爭性的抑制作用；然而部分的 Bowman-Birk 型蛋白酶抑制劑為非競爭性的抑制作用，如 BgPI (Prasad et al., 2010)。利用 Dixon plot 作圖求得對胰蛋白酶的  $k_i$  值為  $8.96 \times 10^{-9}$  M。決明 (*Senna tora*)、香草 (*Trigonella foenum-graecum*)、巴西芸香 (*Dimorphandra mollis*)、巴西盾柱木 (*Peltophorum dubium*)、柔毛艾納香 (*Dimorphandra mollis*) 及鵲豆 (*Lablab purpureus*) 所純化的胰蛋白酶抑制劑的抑制常數分別為  $0.23 \times 10^{-9}$  M、 $3.01 \times 10^{-9}$  M、 $5.3 \times 10^{-10}$  M、 $4.0 \times 10^{-10}$  M、 $1.7 \times 10^{-9}$  M 及  $1.9 \times 10^{-9}$  M (Muricken et al., 2010; Lin et al., 2016)。

很多豆科植物種子中可以分離出幾種 BBI 異構型 (isoform)，如大豆 (*Glycine max*)，菜豆 (*Phaseolus acutifolius*)，四季豆 (*P. vulgaris* L.)，花豆 (*P. coccineus*)，*P. dumosus*、*P. costaricensis* 和豌豆 (*Pisum sativum* L.) (Campos et al. 2004; Domoney et al. 1995; Morrison et al. 2007; Lioi, et al. 2010; Wu and Whitaker 1990)，不同異構型的 BBI 可能對不同的害蟲有不同的抑制效果。本實驗由花豆所分離的 PCTI 其 N 端序列 EPSESSEPCCDICVC，與其他花豆所分離的 BBI 基因轉譯的胺基酸序列 (EPSESSEPCCDLCVC) 相似性非常高，僅有第十二的胺基酸殘基不同 (Lioi, et al. 2010)，兩者應是由不同異構型 BBI 基因所表現。豆科種子中 BBI 多基因家族的發現，將有助於了解 BBI 基因的分子演化及系統發育關係。

在流行病學方面的研究，發現多攝食豆類、蔬菜的人，其乳癌、直腸癌、攝護腺癌的罹患率下降，Boman-Birk 大豆胰蛋白酶抑制劑，在十二指腸中仍保有很好的活性，並與蛋白酶形成複合體，造成蛋白質吸收減少，而在直腸壁上也有高濃度蛋白酶抑制劑存在，這些結果使得癌症罹患率降低。因此推論蛋白酶抑制劑可能扮演間接或直接的一種抗癌因子 (Gocho et al., 2013; Hsieh et al., 2013; Zhang et al., 2011)。除了抗癌效果，Bowman-Birk-type 蛋白酶抑制劑也表現出具有免疫刺激特性及抗發炎作用 (Souza et al., 2014; Utrilla et al., 2015)。最近的研究也顯示 Bowman-Birk-type 蛋白酶抑制劑對於自身免疫性腦脊髓炎 (autoimmune encephalomyelitis) 也具有抑制的效果，可減輕神經元損失，使其成為口服治療多發性硬化症 (multiple sclerosis) 的目標之一 (Touilet al., 2008; Daiet al., 2012)。



參考文獻

- [1] Alves, M., Chaves, I., Carrilho, D., Veloso, M. and Ricardo, C. P., “Detection of Novel Trypsin Inhibitors in the Cotyledons of *Phaseolus vulgaris* Seeds” *Journal of Plant Physiology*, Vol. 167, 2010, pp. 848-854.
- [2] Bhattacharyya, A. and Babu, C. R., “Purification and Biochemical Characterization of a Serine Proteinase Inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into Structural and Antimalarial Features,” *Phytochemistry*, Vol. 70, 2009, pp. 703-712.
- [3] Campos, J. E., Whitaker, J. R., Yip, T. T., Hutchens, T. W. and BlancoLabra, A., “Unusual Structural Characteristics and Complete Amino Acid Sequence of a Protease Inhibitor from *Phaseolus acutifolius* Seeds” *Plant Physiology Biochemistry*, Vol. 42, 2004, pp. 209-214.
- [4] Chaudhari, P. N., Chaudhari, B. L. and Chincholkar, S. B., “Iron Containing Keratinolytic Metallo-protease Produced by *Chryseobacterium gleum*,” *Process Biochemistry*, Vol. 48, 2013, pp. 144-151.
- [5] Coburn, M., Schuel, H. and Troll, W., “A Hydrogen Peroxide Block to Polyspermy in the Sea Urchin *Arbacia punctulata*.” *Developmental Biology*, Vol. 84, 1981, pp. 235-238.
- [6] Dai, H., Ciric, B., Zhang, G.X., Rostami, A., “Bowman-Birk Inhibitor Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Delaying Infiltration of Inflammatory Cells into the CNS,” *Immunologic Research*, Vol. 51, 2011, pp. 145-52.
- [7] Dai, H., Ciric, B., Zhang, G-X. and Rostami, A., “Interleukin-10 Plays a Crucial Role in Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Bowman–Birk Inhibitor,” *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 245, 2012, pp.1-7.
- [8] Dantzger, M., Vasconcelos, I. M., Scorsato, V., Aparicio, R., Marangoni, S. and Macedo, M. L. R., “Bowman–Birk Proteinase Inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, Biochemical Properties and Insecticidal Potential,” *Phytochemistry*, Vol. 118, 2015, pp. 224-235.
- [9] Dixon, M., “The Determination of Enzyme Inhibitor Constants,” *Biochemical Journal*, Vol. 55, 1953, pp. 170-171.
- [10] Domoney, C., Welham, T., Sidebottom, C. and Firmin, J.L., “Multiple Isoforms of Pisum Trypsin Inhibitors Result from Modification of Two Primary Gene Products” *FEBS Letters*, Vol. 360, 1995, pp. 15-20.
- [11] Fang, E. F., Wong, J. H. and Ng, T. B., “Thermostable Kunitz Trypsin Inhibitor with Cytokine Inducing, Antitumor and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Korean Large Black Soybeans,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, 2010, pp. 211-217.



- [12] Fereidunian, A., Sadeghalvad, M., Oscoie, M. O., Mostafaie, A., “Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI): Identification of the Mechanisms of BBI Suppressive Effect on Growth of Two Adenocarcinoma Cell Lines: AGS and HT29.” *Archives of Medical Research*, Vol. 45, 2014, pp. 455-461.
- [13] Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M. and Bak, S., “Plant Defense Against Insect Herbivores,” *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 14, 2013, pp. 10242-10297.
- [14] Gocho, T., Uwagawa, T., Furukawa, K., Haruki, K., Fujiwara, Y., Iwase, R., Misawa, T., Ohashi, T. and Yanaga, K., “Combination Chemotherapy of Serine Protease Inhibitor Nafamostat Mesilate with Oxaliplatin Targeting NF- $\kappa$ B Activation for Pancreatic Cancer,” *Cancer Letters*, Vol. 333, 2013, pp. 89-95.
- [15] Heilbronn, R., Schlehofer, J. R., Yalklnoglu, A. O. and Hausen, H. Z., “Selective DNA-Amplification Induced by Carcinogens (Initiators): Evidence for a Role of Proteases and DNA Polymerase  $\alpha$ ,” *International Journal of Cancer*, Vol. 36, 1985, pp. 85-91.
- [16] Hsieh, Y. S., Chu, S. C., Hsu, L. S., Chen, K. S., Lai, M. T., Yeh, C. H. and Chen, P. N., “*Rubus idaeus* L. Reverses Epithelial-to-mesenchymal Transition and Suppresses Cell Invasion and Protease Activities by Targeting ERK1/2 and FAK Pathways in Human Lung Cancer Cells.” *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 62, 2013, pp. 908-918.
- [17] Hung, C. H., Huang, C. C., Tsai, W. S., Wang, H. L. and Chen, Y. L., “Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Brassica campestris* Seeds,” *Journal of Yuanpei University Science Technology*, Vol. 10, 2003, pp. 13-22.
- [18] Kennedy, A. R., Billings, P. C., Wan, X. S. and Newberne, P. M., “Effects of Bowman-Birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis,” *Nutrition and Cancer*, Vol. 42, 2002, pp. 174-186.
- [19] Katoch, R., Singh, S. K., Thakur, N., Dutt, S., Yadav, S. K., Shukle, R., “Cloning, characterization, expression analysis and inhibition studies of a novel gene encoding Bowman-Birk type protease inhibitor from rice bean,” *Gene*, Vol. 546, 2014, pp. 342-351.
- [20] Kumar, V. and Gowda, L. R., “The contribution of two disulfide bonds in the trypsin binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 537, 2013, pp. 49-61.
- [21] Lehle, K., Kohnert, U., Stern, A., Popp, F. and Jaenicke, R., “Effect of Disulfide Bonds on the Structure, Function, and Stability of the Trypsin/tPA Inhibitor from *Erythrina caffra*: Site-directed Mutagenesis, Expression, and Physicochemical Characterization,” *Nature Biotechnology*, Vol. 14, 1996, pp. 476-480.
- [22] Lin, M. C., Wang, H. L. and Hung, C. H., “Purification and Characterization of a Bowman-



- Birk-type Trypsin Inhibitor from the Seeds of *Lablab purpureus*,” *Journal of Health Management*, Vol. 14, 2016, pp. 69-82.
- [23] Lioi, L., Galasso, I., Daminati, M. G. and Piergiovanni, A.R., “Inhibitory Properties and Binding Loop Polymorphism in Bowman-Birk Inhibitors from *Phaseolus* Species” *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol. 57, 2010, pp. 533-542.
- [24] Malkowicz, S.B., Liu, S. P., Broderick, G. A., Wein, A. J., Kennedy, A. R. and Levin, R. M., “Effect of the Bowman-Birk Inhibitor (a Soy Protein) on in Vitro Bladder Neck/Urethral and Penile Corporal Smooth Muscle Activity,” *Neurourology and Urodynamics*, Vol. 22, 2003, pp. 54-57.
- [25] Morrison, S.C., Savage, G.P., Morton, J.D. and Russell, A.C., “Identification and Stability of Trypsin Inhibitor Isoforms in Pea (*Pisum sativum* L.) Cultivars Grown in New Zealand” *Food Chemistry*, Vol. 100, 2007, pp. 1-7.
- [26] Muricken, D. G. and Gowda, L. R., “Functional Expression of Horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk Inhibitor and Its Self-association,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1804, 2010, pp. 1413-1423.
- [27] Pandey, P. K., Singh, D. and Jamal, F., “The influence of a 21 kDa Kunitz-type trypsin inhibitor from nonhost madras thorn, *Pithecellobium dulce*, seeds on *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae),” *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 89, 2015, pp. 18-34.
- [28] Pinho, R. T., Beltramini, L. M., Alves, C. R. and De-Simone, S. G., “*Trypanosoma cruzi*: Isolation and Characterization of Aspartyl Proteases,” *Experimental Parasitology*, Vol. 122, 2009, pp. 128-133.
- [29] Prasad, E. R., Dutta-Gupta, A. and Padmasree, K., “Purification and Characterization of a Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from the Seeds of Black Gram (*Vigna mungo*),” *Phytochemistry*, Vol. 71, 2010, pp. 363-72.
- [30] Sivaraman, J., Nögler, D. K., Zhang, R., Ménard, R. and Cygler, M., “Crystal Structure of Human Procathepsin X: a Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine,” *Journal of Molecular Biology*, Vol. 295, 2000, pp. 939-951.
- [31] Souza, L. D. C., Camargo, R., Demasi, M., Santana, J. M., Sa’ , C. M. and de Freitas, S. M., “Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells.” *PLoS One*, Vol. 9, 2014, e86600
- [32] Steven, C. B. and Russ, B. A., “Conserved Features in the Active Site of Nonhomologous Serine Proteases,” *Folding and Design*, Vol. 1, 1996, pp 371-379.



- [33] Touil, T., Ciric, B., Ventura, E., Shindler, K. S., Gran, B. and Rostami, A., “Bowman–Birk Inhibitor Suppresses Autoimmune Inflammation and Neuronal Loss in a Mouse Model of Multiple Sclerosis,” *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 271, 2008, pp. 191-202.
- [34] Utrilla, M. P., Peinado, M. J., Ruiz, R., Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., Rodriguez-Cabezas, M. E., Clemente, A., Galvez, J. and Rubio, L. A., “Pea (*Pisum sativum L.*) Seed Albumin Extracts Show Antiinflammatory Effect in the DSS Model of Mouse Colitis,” *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol. 59, 2015, pp. 807-819.
- [35] Wu, C. and Whitaker, J. R., “Purification and Partial Characterisation of Four Trypsin/Chymotrypsin Inhibitors from Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris var. Linden*)” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 38, 1990, 1523-1529.
- [36] Zhang, Y., Zhou, C., Tang, S., Yu, X., Kouzuma, Y. and Yonekura, M., “Effect of AATI, a Bowman-Birk type Inhibitor from *Apios americana*, on Proliferation of Cancer Cell Lines.” *Food Chemistry*, Vol. 128, 2011, pp. 909-915.

