

녹두(*Vigna radiata* L.) Trypsin Inhibitor의 정제 및 약물학적 특성

문성은 · 신영희*

경성대학교 약학대학

Characterization and Pharmacological Effect of Mung Bean Trypsin Inhibitor

Sung-Eun Moon and Young-Hee Shin*

College of Pharmacy, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

Abstract

A trypsin inhibitor was isolated and purified from Mung bean (*Vigna radiata* L. wilczek) which has been used as a galenic and traditional food. In addition, we evaluated the pharmacological effect of the mung bean trypsin inhibitor (MBTI) using septic shock induced guinea pig model. Purification was carried out by Sephadex G-50 gel filtration, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, and trypsin affinity column. The molecular weight of MBTI was estimated to be about 8,000 Da by 20% SDS-PAGE under reducing condition. The chemically determined partial amino acid sequences of the purified MBTI perfectly coincide with those of previously reported MBTI which is BBI type trypsin inhibitor (Bowman-birk inhibitor type). These results suggest that the purified MBTI is authentic. Hypotension shock was prevented by the pretreatment of the MBTI (10 mg/kg of the body weight) on the septic shock guinea pig model caused by pseudomonas elastase.

Key words – Mung bean trypsin inhibitor (MBTI), BBI-type, pseudomonas elastase, pharmacological effect, septic shock model.

서 론

Serine proteinase inhibitor는 동식물계 및 미생물계에 널리 존재하는 serine proteinase의 기능을 제어하는 단백질을 칭하며 생체내 많은 생리학적 과정에 중요한 역할을 수행하고 있다[1,17]. 예로써 사람의 혈중에 존재하는 10종 이상의 protease inhibitor 중 반수 이상이 serine proteinase inhibitor가 차지하고 있을 만큼 serine protease inhibitor는 생물학적으로 여러 가지 중요한 기능을 담당하고 있다.

혈액 응고계, 보체계, kinin 유리계 등에서 serine proteinase inhibitor는 serine proteinase 기능의 제어 인자로서 작용함과 동시에, 염증 등에 의한 조직 세포의 부분적 손상에 의하여 혈중에 혼입되는 조직이나 세포내의 serine proteinase의 제어 인자로서 기능하는 것이 잘 알려져 있다[19].

현재 임상에 응용되고 있는 대표적인 serine protease inhibitor[8]로는 gabexate mesilate[4], nafamostat mesilate[9] 등의 합성품과 소의 췌장에서 분리 정제한 aprotinin[20], 사람의 뇨중에서 분리 정제한 urinary trypsin inhibitor[18] 등이 있다. 그리고 특히 콩과식물에서 분리 정제된 serine protease inhibitor가 강한 생리활성을 가지는 것으로 보고되었다. 그 중 kallikrein 저해능이 큰 물질이 약물로서의

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-4886, Fax : 051-620-4886
E-mail : yhshin@star.ks.ac.kr

개발 가능성 있는 후보물질로 추천되면서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. Maeda 등은[16] kinin generation cascade에 관여하는 여러 가지 식물기원 serine protease inhibitor에 관하여 보고 하였다. 이중 kallikrein 저해능이 가장 큰 soybean trypsin inhibitor (Kunitz type, SBTI)에 관한 연구가 현재 활발히 진행중이다. SBTI를 약물로서의 응용하기 위하여서는 여러가지 문제점을 극복하여야 한다. 예를들면 생체내에서의 분해반응, 빠른 배설, 뿐만아니라 이종단백에 기인하는 면역원성 문제등이 있다. Takakura 등[23] 과 Shin 등[2,21,22]은 이러한 문제점을 극복하기 위하여 약물송달시스템(DDS, Drug Delivery System)에서 가장 효과적으로 검토되고 있는 chemical modification method를 이용하여 polymer conjugate 화합물을 합성하고 이들의 치료계수 증가 및 면역원성 억제 등에 관하여 보고한 바 있다.

본 연구는 우리나라에서 식용으로 이용되고 있으며, 또한 한방에서 정열, 해독, 이수의 효능이 있고, 하리, 수종, 단독, 응종의 치료에 응용되고 있는 녹두를 이용하여 trypsin inhibitor (Mung bean trypsin inhibitor, MBTI)를 분리, 정제하여 이들의 특성을 알아보고 또한 약물학적 효과를 알아보기 위하여 병태 동물 모델 즉, septic shock induced guinea pig model을 이용하여 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 분양받은 guinea pig (Hartley albino, 250-350 g, 웅성)을 일정한 조건(온도: 22 ± 1°C, 습도 50 ± 5%, 명암: 12시간주기)에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용한 녹두(*Vigna radiata* L. wilczek)는 농협중앙회(예산농협제품)에서 구입하였으며, 시약으로는 N-benzoyl-dl-arginine p-nitroanilide (BAPNA), trypsin (from porcine pancreas), trypsin inhibitor (from soybean, BBI type), p-nitroanilide, elastase, chymotrypsin, plasmin, thrombin, N-Benzoyl-L-arginine-4-methyl-coumarine-7-amide (Bz-Arg-MCA)은 Sigma Chem. Co (MO, USA)에서, Suc-

Leu-Leu-Var-Tyr-MCA, Suc-Ala-Pro-Ala-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Boc-Val-Pro-Arg-MCA는 Peptide Institute (Osaka, Japan), DEAE-cellulose, Sephadex G-50은 Pharmacia (Uppsala, Sweden)에서 각각 구입하여 사용하였다. Pseudomonas elastase는 Nagase Biochemical Co. (Kobe, Japan)로부터 기증받아 사용하였으며, 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기구로는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1601), spectrofluorometer (Jasco FP-750), blood pressure transducer (TP-400T, Nihon Koden, Japan), ultrafiltration system (Amicon 8200) 등을 사용하였다.

실험방법

MBTI의 분리 및 정제

MBTI의 분리 및 정제는 koo, Crispeels 및 Gennis의 방법[12,3,7]을 변형하였으며 간단히 설명하면 다음과 같다.

Crude extract의 준비

녹두(*Vigna radiata* L. wilczek) 200 g을 분쇄하여 분말로 한 후 hexane 800 ml를 가하여 상온에서 12시간동안 교반한 후 0.45 μm의 필터로 여과하여 탈지한다. 탈지된 녹두 분말에 1200 ml의 10 mM 인산염 완충액(pH 6.0, 25 mM NaCl, 0.1 mM thiourea 포함)를 첨가하여 37°C에서 5시간 교반 추출하고 이를 가제로 여과한 후 그 여액에 HCl을 사용하여 pH를 4.01로 조절한다. 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상등액을 취하여 Amicon ultrafiltration cell (membrane cut off 3,000)을 사용하여 농축하였다.

MBTI의 정제

Step I : Sephadex G-50 gel filtration chromatography

Crude extract를 0.1 M의 NaCl을 포함하는 10 mM 인산염완충액으로 평형시킨 Sephadex G-50(3.5×80 cm)에 가한 후 20 ml/hr의 속도로 동일한 완충액을 사용하여 용출시키고 BAPNA를 기질로 사용한 trypsin 가수분해의 저해시험[5]에서 trypsin 저해 활성이 있는 분획만을 모아 Amicon ultrafiltration cell (membrane cut off 3,000)을 사용하여 농축하였다.

Step II : DEAE cellulose Ion-exchange chromatography

Sephadex G-50 chromatography에서 trypsin 저해 활성

을 가진 분획을 50 mM 인산염완충액(pH 7.4)로 미리 평형시켜 놓은 DEAE cellulose column (2.5×50 cm)에 가하고 동일한 완충액을 사용하여 40 ml/hr의 속도로 DEAE cellulose column에 결합되지 않는 물질을 용출하여 제거하고, 결합되어 있는 물질은 동일 속도에서 0~1 M의 염농도 linear gradient로 용출시킨 후 BAPNA를 기질로 사용한 trypsin 저해 활성 시험에서 활성이 있는 분획을 모아 Amicon ultrafiltration cell (membrane cut off 3,000)을 사용하여 농축한 후 동결건조하였다.

Step III : Trypsin affinity chromatography

미리 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 평형시켜 놓은 trypsin affinity column (1.5×30 cm)에 DEAE cellulose ion-exchange chromatography에서 얻은 물질을 가한 후 같은 완충액으로 column에 결합하지 않은 물질을 용출하여 제거하고 280nm에서 흡광도가 0.01이하가 되도록 계속하여 세척한 후 50 mM citrate buffer (pH 3.0)로 column에 결합되어 있는 trypsin inhibitor를 용출시켰다. 용출액을 모아 Tris-HCl buffer로 pH를 7.0으로 조정한 후 Amicon ultrafiltration cell (3,000 cut membrane)을 사용하여 농축하였다. 이를 동결건조한 후 -20℃에 보관하여 다음의 실험에 시료로 사용하였다.

전기 영동

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법[13]에 따라 4% stacking gel과 20% separating gel로 수행한 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. SDS-PAGE를 위한 sample 10 μ l에 2X loading buffer 10 μ l와 2-mercaptoethanol 2 μ l를 첨가한 후 90℃에서 5분간 열처리하여 사용하였다.

MBTI의 아미노산 서열결정

분리정제한 MBTI를 Fuller등의 방법[6]에 따라 환원반응 후 S-pyridyl화 반응을 하였다. S-pyridylated MBTI를 trypsin으로 가수분해한 다음 C18-reverse phase HPLC column으로 각각의 펩타이드들을 분리하였다. 이를 환원 조건에서 SDS-PAGE에 적용하여 얻어진 밴드를 Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane, Millipore)에 blotting 하여 자동 아미노산 서열분석기로 아미노산 서열을 결정하였다 [14]. 단백질 함량은 Lowry 등의 방법[15]에 따라 측정하였다.

MBTI의 저해활성 측정

Inhibition concentration 50% (IC₅₀)의 측정

Trypsin affinity column을 통과한 sample의 trypsin

inhibition activity를 측정하기 위해 N α -benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin (Bz-Arg-MCA)을 기질로 사용하여 반응시 나타내는 형광의 세기를 측정하여 계산하였다. Sample을 50 μ l 취했을 때 최종 농도가 각각 1, 0.6, 0.2, 0.1, 0.05 μ g이 되도록 희석하여 각각에 trypsin (25 μ g/ml) 40 μ l를 첨가하고 37℃에서 10분간 incubation 시킨 후, 기질액으로 디메틸설폭사이드에 용해한 5 mM Bz-Arg-MCA 10 μ l를 첨가하고 다시 37℃에서 10분간 incubation 시킨다. 반응 정지를 위해 17% acetic acid를 1ml 첨가한다. 생성된 7-amino-4-methyl coumarine (AMC)을 여기파장 380 nm, 발광파장 460 nm에서 형광세기를 측정하여 트립신의 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다.

MBTI의 trypsin에 대한 저해형 결정

MBTI가 trypsin에 대하여 어떤 형태의 저해 반응을 일으키는 지 알아보기 위하여 기질인 BAPNA의 농도 및 inhibitor의 농도를 변화시켜 효소의 활성을 측정하였다. 먼저 trypsin의 BAPNA에 대한 가수분해 반응속도를 측정하였다. 즉, BAPNA의 농도를 여러가지로 변화시켜 저해 활성 실험을 한 후 그 반응속도(10분 동안 반응용액에서 생성된 p-nitroaniline의 mmole 수)를 측정하여 Lineweaver-Birk방법으로 도식하여 trypsin의 BAPNA에 대한 V_{max}와 Km값을 결정하였다. MBTI의 저해형을 결정하기 위하여 정제한 MBTI 일정량을 위의 각 반응용액에 함께 첨가하여 그 때의 반응속도를 측정한 후 마찬가지로 V_{max}와 Km값을 구하여 결정하였다.

각종 protease에 대한 MBTI의 저해도 측정

Serine protease인 chymotrypsin, elastase와 plasmin, thrombin에 대해 MBTI의 저해정도를 측정하기 위하여 기질로 Bz-Arg-MCA, Suc-Leu-Leu-Var-Tyr-MCA, Suc-Ala-Pro-Ala-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Boc-Val-Pro-Arg-MCA를 각각 사용하여 실험하였다. 50 mM Tris-HCl (containing 20 mM CaCl₂) 400 μ l에 chymotrypsin, elastase, plasmin, thrombin 각각 50 μ l와 MBTI 40 μ l를 가하고 37℃에서 10분간 incubation시킨다. 여기에 각각의 기질액을 10 μ l 가하고 다시 37℃에서 10분간 incubation시킨 후 30% acetic acid로 반응을 중지시킨다. 생성된 7-amino-4-methyl coumarine을 여기파장 380 nm, 발광파장 460

nm에서 형광세기를 측정하여 사용한 각각의 효소의 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다.

MBTI의 pharmacological effect 측정

Septic shock caused by pseudomonal elastase in guinea pig[2,10,11]

펜토바르비탈 나트륨을 복강주사(30 mg/kg)하여 마취한 guinea pig의 경정맥을 약물주입을 위하여 PE-50 튜브로 케뉴레이션하고, MABP (Mean Arterial Blood Pressure) 측정을 위해 경동맥을 케뉴레이션하여 blood pressure

transducer (Nihon Koden, TP-400T)에 연결하였다. 경정맥에 연결된 케뉴라에 대조군으로 생리식염수, 시료로서 분리정제한 MBTI를 생리식염수에 용해하여 10 mg/kg 로 전처치 한 후, 1분 후 *pseudomonal elastase* (P.E., 0.3 mg/kg)를 투여하여 MABP의 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

MBTI의 분리 및 정제

녹두로부터 MBTI를 Sephadex G-50을 이용한 gel filtration

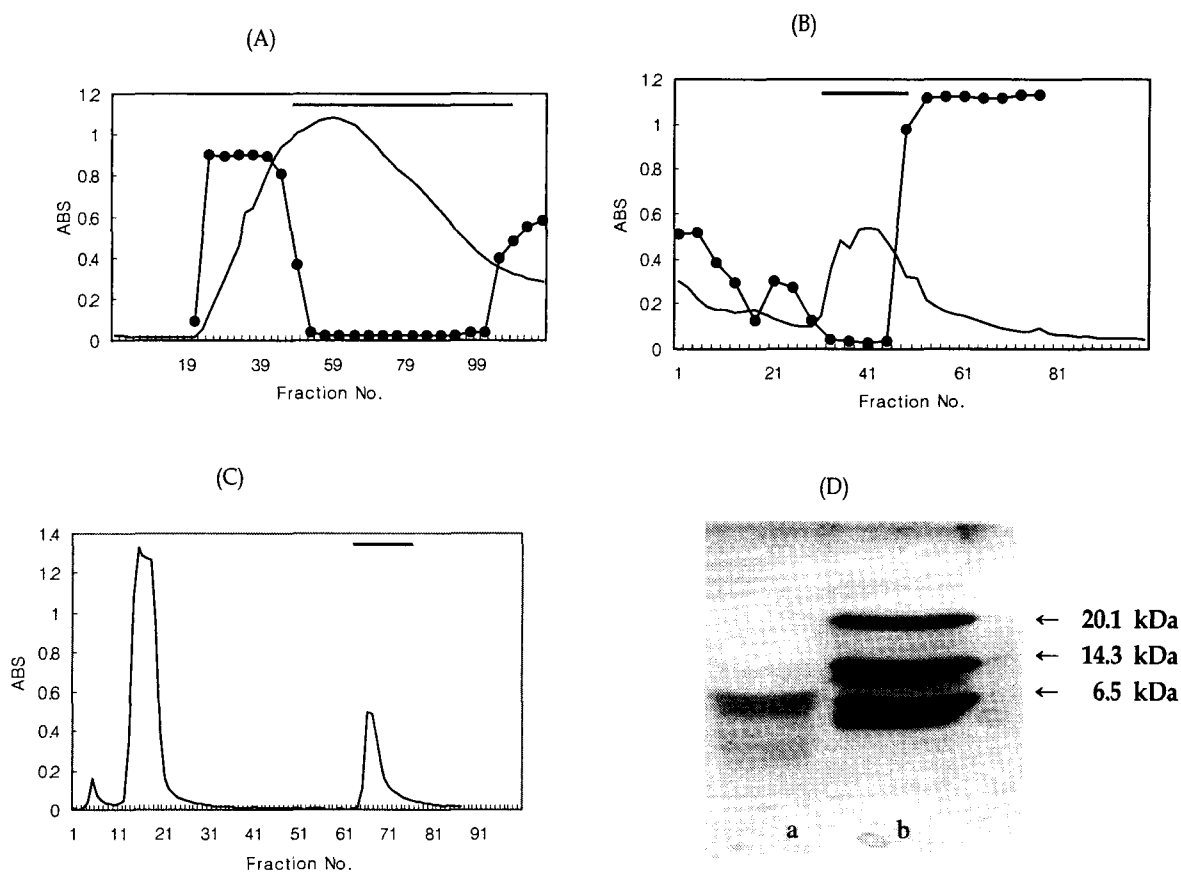


Fig1. (A) Elution pattern of trypsin inhibitors from sephadex G-50 (3.5×80 cm). Elution was performed with the 10 mM phosphate buffer solution (pH 7.2, containing 0.1 M NaCl) at a flow rate 20 ml/hr. Fractions showing inhibitory activity against trypsin were indicated by a solid bar and pooled. —, protein(absorbance at 280 nm), - · -, protease activity (absorbance at 410nm). (B) Elution pattern of trypsin inhibitors from DEAE column (2.8×45 cm). Elution was performed with the 5 mM phosphate buffer solution (pH 7.4, containing 1 M NaCl) at a flow rate 40 ml/hr. Fractions showing inhibitory activity against trypsin were indicated by a solid bar and pooled. —, protein(absorbance at 280 nm), - · -, protease activity (absorbance at 410 nm). (C) Elution pattern of trypsin inhibitors from trypsin affinity column (1.5×25 cm). Elution was performed with the 50 mM tris buffer (pH 7.4) and 50 mM Citrate buffer (pH 3.0) at a flow rate 30 ml/hr. Fractions showing inhibitory activity against trypsin were indicated by a solid bar and pooled. —, protein (absorbance at 280nm). (D) Electrophoresis on a 20 % polyacrylamide gel. Lane a, purified MBTI and lane b, Maker protein.

chromatography (Fig. 1A), DEAE-cellulose ion exchange chromatography (Fig. 1B), trypsin affinity chromatography (Fig. 1C) 등을 행하여 차례로 분리, 정제하였으며, 전기영동 결과 하나의 밴드가 나타나(Fig. 1D) 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다.

MBTI의 분자량 및 아미노산 서열 결정

MBTI의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동 결과 약 8,000 Da의 monomer임을 알 수 있었다. 또한 MBTI의 부분 아미노산 서열을 분석한 결과는 Cys-Arg-Cys-Leu-Asp-Thr-Asp-Asp-Phe-Cys-Tyr-Lys-Pro 으로 나타났다. 이는 Wilson 및 Zhang 등에[24,25] 의하여 보고된 MBTI의 부분 서열중 59-71의 아미노산 서열과 동일함으로 기 보고된 MBTI와 같은 물질인 BBI type의 MBTI임을 알 수 있었다.

MBTI의 trypsin 저해활성 및 trypsin에 대한 저해형 결정

일정한 농도의 trypsin에 대해 MBTI의 농도를 증가시키면서 저해능을 측정한 결과 Table 1와 같이 나타났다. Trypsin (1 µg/mL) 활성에 대해 50% 저해능을 나타내는 농도는 0.154 µg/mL이다. 한편, MBTI의 저해형을 결정하기 위해 먼저 trypsin의 BAPNA에 대한 가수분해 반응속도를 측정한 다음 Lineweaver - Birk graph를 도식하여 (Fig. 2)과 같은 결과를 얻었다. 그 결과 Km 값은 0.92 µM이었으며 Vmax는 0.25 µM/min이었다. 저해형을 알아보기 위해 MBTI를 반응용액에 함께 첨가한 후 반응속도를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그림에서 나타난 바와 같이 Vmax값은 0.10 µM/min으로 변화하였지만 Km 값

Table 1. The inhibitory activity of purified MBTI and commercial soybean trypsin inhibitor with various concentrations.

Concentration of inhibitor (µg/ml)	Inhibition(%)	
	MBTI	BBI
0.05	84.56	83.78
0.1	70.94	60.1
0.2	39.92	38.5
0.6	3.97	3.25
1	3.46	2.85

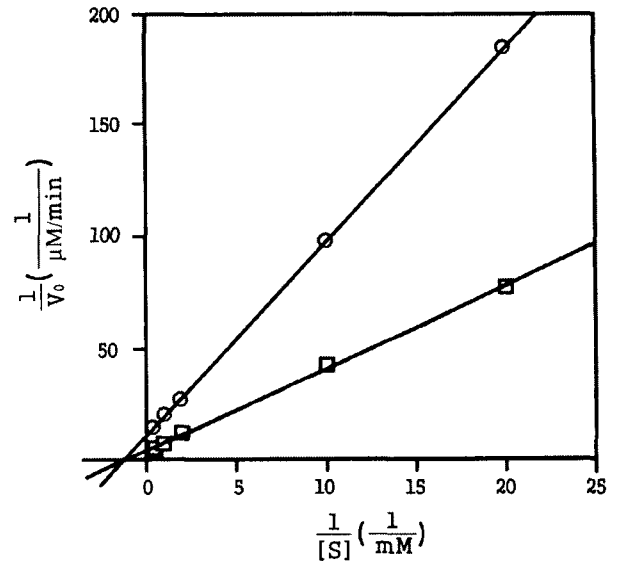


Fig. 2. Inhibition of p-nitroaniline formation by purified MBTI.

Key : - □ -; no inhibitor, - ○ -; with inhibitor, purified MBTI

은 불변임을 볼 수 있다. 이 실험결과로부터 MBTI는 trypsin에 대하여 비경쟁적 저해를 하는 것으로 추정할 수 있다. 그러므로 경쟁적 억제작용을 하는 inhibitor와는 다른 조절작용을 하는 것으로 추정된다.

각종 protease에 대한 MBTI의 저해도 측정

여러 종류의 serine protease, 즉 trypsin, chymotrypsin, elastase, plasmin 및 thrombin에 대한 MBTI의 저해능을 조사하기 위하여 기질로 N-Benz-Arg-MCA, Suc-Leu-Leu-Var-Tyr-MCA, Suc-Ala-Pro-Ala-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Boc-Val-Pro-Arg-MCA를 각각 사용하여 실험한 결과는 Table 2와 같다. MBTI는 실험에 사용한 serine protease들

Table 2. Inhibitory activity of MBTI against several serine protease

Protease (1 µg/ml)	Substrate	IC50(µg/ml)	
		BBI	MBTI
Trypsin	N-Benz-Arg-MCA	0.137	0.154
Chymotrypsin	Suc-Leu-Leu-Var-Tyr-MCA	0.944	-
Elastase	Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	-	-
Plasmin	Boc-Val-Leu-Lys-MCA	1.31	5.55
Thrombin	Boc-Val-Pro-Arg-MCA	-	-

중 trypsin을 가장 강하게 저해하는 것으로 나타났으며 plasmin은 약하게 저해하였다. 그리고 chymotrypsin, elastase 및 thrombin에 대한 억제활성은 측정범위내에서는 나타나지 않았다. BBI (from Soybean)는 chymotrypsin에 억제효과를 나타내는데 비하여 본 실험에서 분리, 정제한 MBTI는 억제활성을 나타내지 않는 것은 chymotrypsin affinity column을 사용하여 chymotrypsin inhibitor를 별도로 분리하지 않은 것에 기인되는 것으로 사료된다.

MBTI의 pharmacological effect 측정

MBTI의 약물학적 효과를 평가하기 위하여 guinea pig에 pseudomonal elastase induced septic shock의 병태 모델을 작성하고 MBTI를 전처치하여 그 효과를 평가하였다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서처럼 pseudomonal elastase (P.E.)만을 정맥주사 하였을 때 뚜렷한 저혈압이 나타나지만 MBTI (10 mg/kg of body weight)를 P.E. 투여 1분전에 전처치하므로써 severe hypotension이 억제되는 것으로 나타났다. Trypsin inhibitor를 약물로 응용하고자 하는 연구는 매우 활발히 진행되고 있다. 그 대표적으로 추천되고 있는 물질은 kunitz type의 soybean trypsin inhibitor이다. 이는 kallikrein 억제 활성이 매우 크므로 kinin cascade에 작용하여 serine protease의 생체내 불균형에 기인되는 질환 즉, MOF (multi organ failure), septic shock, DIC (disseminated intravascular coagulation) 등에 응용하고자 하는 것이다. 한편 BBI type의 serine protease inhibitor는 암질환 치료에 적용할 목적으로 많이 검토되고

있다. 본 연구에서는 BBI type 인 MBTI를 pseudomonal elastase에 의해 유발되는 septic shock의 대한 약물효과를 평가하여 보았으며 그 결과 10 mg/kg의 농도에서 septic shock유발 동물의 hypotension을 억제함을 알 수 있었다. 나아가 BBI type trypsin inhibitor의 septic shock 억제작용에 대한 작용메카니즘 등을 구명하고자 한다.

요 약

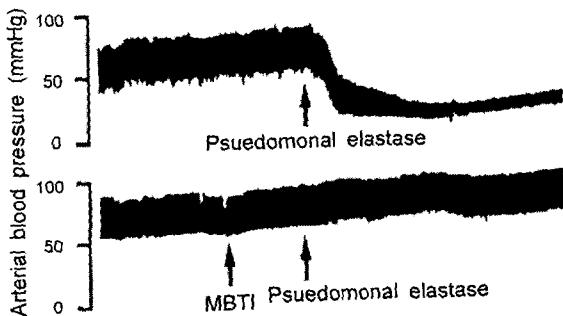
우리나라에서 식용으로 뿐만아니라 한방재료로 널리 사용되고 있는 녹두(vigna radiata L. wilczek)로부터 trypsin inhibitor (Mung bean trypsin inhibitor, MBTI)를 분리정제하여 그 특성을 조사하였다. 또한 병태동물모델 즉, septic shock induced guinea pig model을 이용하여 MBTI의 약물학적 효과를 평가하였다. MBTI의 분리 및 정제과정은 Sephadex G-50 chromatography, DEAE-cellulose ion exchange chromatography 및 trypsin affinity column을 차례로 이용하였다. 정제한 MBTI는 전기영동 및 아미노산 서열분석결과 분자량 약 8,000 Da의 BBI-type (Bowman-birk inhibitor type)임을 알 수 있었으며 이들의 생화학적 특성을 구명하였다. 또한 pseudomonal elastase로 유도된 septic shock guinea pig model에서 MBTI 10 mg/kg를 전처치한 결과 hypotension shock 유발이 억제됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호 R02-2000-00174)지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 아미노산 서열 결정 실험을 수행하여 주신 부산대학교 이복률 교수에게 감사드립니다.

참고 문헌

1. Barrett, A. J., N. D. Rawlings and J. F. Woessner. 1998. *Handbook of proteolytic Enzymes* Academic Press, Inc., London.
2. Choi, Y. L., H. G. Nam. and Y. H. Shin. 2000. Evaluation of Pharmacological effect of Soybean trypsin inhibitor- Chondroitin sulfate conjugates. *J.*



Figur 3. Tracings of the arterial blood pressure after the pretreatment on the quinea pig with purified MBTI (10 mg/kg) and then 1 min later i.v. injection of pseudomonal elastase (0.3 mg/kg).

- Kor. Pharm. Sci.* **30(3)**, 159-166.
3. Chrispeels, M. J. and B. Baumgartner. 1978. Trypsin inhibitor in mung bean cotyledons. *Plant Physiol.* **61**, 617-623.
 4. Colasanti, M., T. Persichini, G. Venturini, E. Menegatti, G. M. Lauro and P. Ascenzi. 1998. Effect of gabexate mesylate (FOY), a drug for serine proteinase-mediated diseases, on the nitric oxide pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246(2)**, 453-6.
 5. Erlanger, B. F., N. Kokowsky and E. Cohen. 1961. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271-278.
 6. Fullmer, C. S. 1984. Identification of cysteine-containing peptides in protein digests by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **142**, 336-339.
 7. Gennis, L.S. and C. R. Cantor. 1976. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. *J. Biol. Chem.* **251(3)**, 734-740.
 8. Hayaishi, O.(ed). 1993. Protease and Protease inhibitor, Medical view, Tokyo, Japan .
 9. Iwama, H., M. Nakane, S. Ohmori, T. Kaneko, M. Kato, K. Watanabe and A. Okuaki. 1998. Nafamostat mesilate, a kallikrein inhibitor, prevents pain on injection with propofol. *Br. J. Anaesth.* **81(6)**, 963-4.
 10. Khan, M. M. H., T. Yamamoto, H. Araki, Y. Shibuya, and T. Kambara. 1993. Role of Hageman factor/ Kallikrein-Kinin systemic pseudomonal elastase induced shock model. *Biochem. Biophys. Acta.* **1157**, 119.
 11. Khan, M. M. H., T. Yamamoto, H. Araki, Y. Ijiri, Y. Shibuya, M. Okamoto and T. Kambara. 1993. Pseudomonal elastase injection causes low vascular resistant shock in guinea pigs. *Biochem. Biophys. Acta.* **1182**, 83.
 12. Koo, S. H., Y. L. Choi, S. K. Choi, Y. H. Shin, Y. H. Kim and B. L. Lee. 2000. Purification and characterization of serine protease inhibitors from *Dolichos Lablab* seed ; Prevention effects on pseudomonal elastase induced septic hypotention. *J. Biochem. & Mol. Biol.* **33(2)**, 112-119.
 13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 14. LeGendre, N. and P. Matsudaira. 1988. Direct protein microsequencing from Immobilon-P transfer membrane. *Biotechniques.* **6**, 154-159.
 15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 16. Maeda, H., K. Maruo, T. Akaike, H. Kaminishi and Y. Hagiwara. 1992. pp.362 *In Kinin VI*, Fritz, H. (ed.) Birkhauser Verlag AG, Basel.
 17. Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
 18. Ooka, T., Y. Hatano, M. Yamamoto, K. Ogawa and S. Saika. 1996. Protective effects of human urinary trypsin inhibitor against trypsin-induced relaxation in rat aorta. *Crit. Care. Med.* **24(11)**, 1903-7.
 19. Powers, J. C. and J. W. Harper. 1986. Inhibitors of serine protease, pp55-152. *In Protease inhibitors*, Barrett and Salvesen (eds.) Elsevier Science Publishers Biomedical Division.
 20. Seto, S., V. Kher, A. G. Scicli, W. H. Beierwaltes and O. A. Carretero. 1983 The effect of aprotinin (a serine protease inhibitor) on renal function and renin release. *Hypertension* **5(6)**, 893-9.
 21. Shin, Y. H., Y. Kojima, M. Otagiri and H. Maeda. 1996. Conjugation of succinylated gelatin to soybean trypsin inhibitor. *Bioactive Compatible Polymers* **11(1)**, 3-16.
 22. Shin, Y.H., T. Akaike, M. M. H. Khan, Y. Sakada and H. Maeda. 1996. Further evidence of bradykinin involvement in septic shock : reduction of kinin production in vivo and improved survival in rats by use of polymer tailored SBTI with longer $t_{1/2}$. *Immunopharmacology* **33**, 369-373.
 23. Takakura, Y., T. Fujita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki. 1989. Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran. II: Biopharmaceutical and pharmacological properties. *J. Pharm. Sci.* **78**, 219-22.
 24. Wilson, K. A. and J. C. Chen. 1983. Amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified forms appearing during germination. *Plant Physiol.* **71**, 341-349.
 25. Zhang, Y., S. Luo, F. Tan, Z. Qi, L. Xu and A. Zhang. 1982. Complete amino acid sequence of mungbean trypsin inhibitor. *Scientia Sinica(series B)* **15(3)**, 268-277.

(Received July 10, 2002; Accepted August 23, 2002)