

植物シスタチンに関する研究

STUDIES ON PLANT CYSTATINS

荒井 綜一 (東京大学農学部)

Soichi ARAI

Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113

ABSTRACT

A full-length cDNA clone for a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) was isolated from a λ gt10 cDNA library of immature corn kernels by screening with a mixture of cDNA inserts for oryzacystatins I and II. The cDNA clone spans 960 base pairs, encoding a 135 amino acid protein containing a signal peptide fragment. The protein, named corn cystatin I, is considered to be a member of the cystatin superfamily, since it contains the commonly conserved Gln-Val-Val-Ala-Gly region that exists in most known cystatins as a probable binding site and is significantly similar to other cystatins in its overall amino acid sequence. Northern blot analysis showed that the amount of mRNA for corn cystatin I reaches a maximum 2 weeks after flowering and then decreases gradually. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn*, **13**, 22-26, 1992.

システイン (チオール) プロテイナーゼを特異的に阻害するたん白質であるシスタチン類は動物の各組織に広く分布しており、生体防御の機能を果たすとされる。著者はコメ種子中に植物からは最初のシスタチンを発見し、オリザシスタチンと命名してその遺伝子構造とアミノ酸配列を決定し、これが腸管ウィルスの増殖を強く抑制することを *in vitro* の実験で示した。本研究は、これらの知見を基に、トウモロコシ種子、コムギ種子及びダイズ種子のシスタチンのクローニングを行い、種子たん白質の栄養生理学的意義の一面の解明に寄与することを目的として実施した。

実験方法

材料

トウモロコシ (甲州), コムギ (農林1号) は東京大学附属田無農場, ダイズは農林水産農業研究センターで栽培された試料を用いた。開花1週間目より1週間おきに種子を採集し-80℃に急冷保存した。

cDNA ライブラリーの作製

種子よりフェノール, SDS 法¹⁾により, 全 RNA を抽出し, オリゴ(dT)-セルロースカラムにより mRNA

を精製した。ついで cDNA 合成キッド (ファルマシア社) を用い, ds-cDNA を得, λ gt10 ファージベクターに組み込み cDNA ライブラリーを作製した。

トウモロコシシスタチン cDNA クローンの単離

オリザシスタチン I および II の cDNA フラグメント^{2,3)}を ³²P でラベル (マルチプライム DNA ラベリングシステム; アマシャム社) したプローブを用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションおよび洗いの条件は 50℃ で 0.5×SSC (0.1% SDS) で行った。

PCR 法

λ gt10 ファージに組みこまれた陽性クローンはそのインサートフラグメントを得るため PCR 反応⁴⁾ (PCR 増幅キッド; パーキン・エルマ・シータス社) を行った。その条件は 94℃ 1 分, 55℃ 2 分, 72℃ 2 分で行い 25 サイクル実施した。

DNA 解析

陽性クローンのインサートは pUC18 プラスミドベクターに挿入し, サブクローニングを行った。シーケンスはサンガーらの dideoxy 法⁵⁾ (シーケンシング V, 2, DNA シーケンシングキッド; ユナイテッドステート

バイオケミカル社)により行った。

ノーザンハイブリダイゼーション

各ステージから抽出した全 RNA を1%アガロース・ホルムアミドゲルに流し、ナイロンフィルターにブロッティングした。ハイブリダイゼーションは65℃、24時間行い洗滌は65℃、0.1×SSC (0.1% SDS) で行った。

結果と考察

トウモロコシシスタチンの cDNA クローニングと

トウモロコシシスタチン I の cDNA の全塩基配列の決定を行った。

登熟中のトウモロコシ種子から RNA を経時的に抽出し、オリザシスタチン I と II の混合物をプローブとしてノーザン分析を行ったところ開花直後から5週目にかけて約1 kbp の mRNA の存在が認められた。開花0, 1, 2 週後の RNA の混合物から mRNA を分離し、これを鋳型にして cDNA を合成し、λgt10 ファージベクターに組み込み、30万個のプラークからなる cDNA ライブラリーを作製した。オリザシスタチ

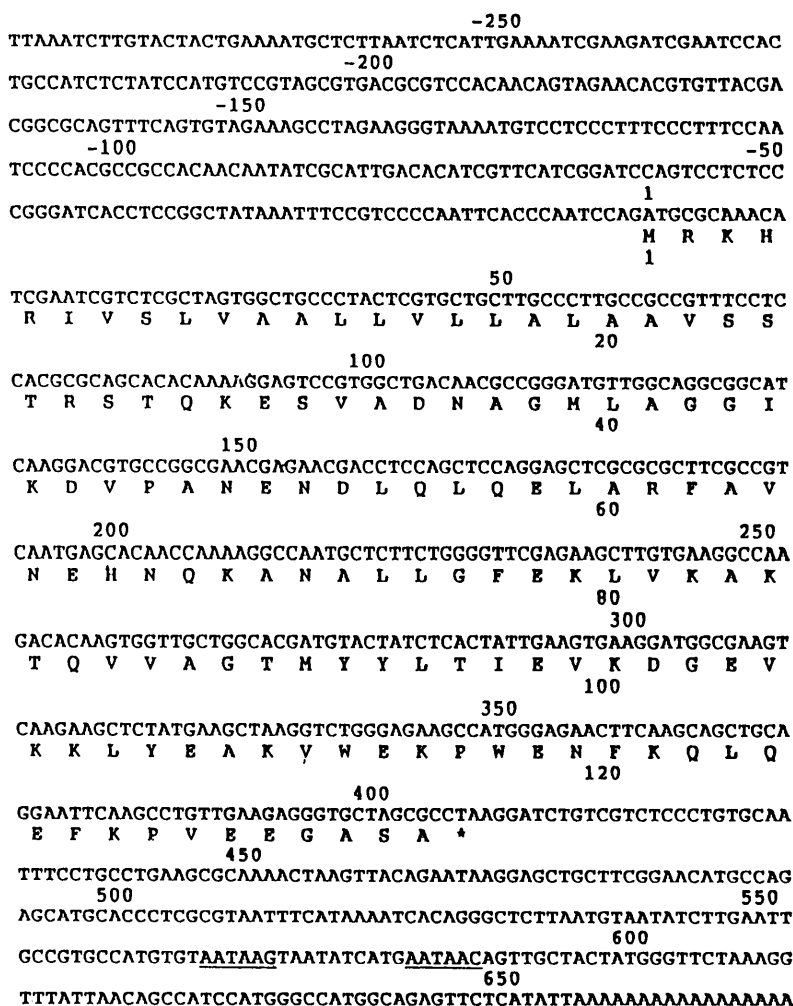


Fig. 1. The nucleotide sequence of the corn cystatin I insert and the deduced amino acid sequence. Numbering of the nucleotide residues starts at the first base of the initiation methionine codon (ATG): the upstream sequence is denoted by negative numbers. The predicted amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The analogues of the polyadenylation signal sequence are underlined.

ン I と II の混合物をプローブにしてスクリーニングした結果、3つの陽性クローンを得た。これらのインサートを PCR 法で増幅しアガロース電気泳動にかけたところ、λZC7 のインサートが約 1 kbp で最長であったのでそのシーケンスを決定することにした。λZC7 を EcoRI で処理したところ 2 つの断片に分かれ、λZC7 のインサートには internal の EcoRI サイトが存在した。この 2 つのインサートの断片を別々に

EcoRI 処理 pUC18 にサブクローニングし、pcc7A と pcc7B を得、それぞれの塩基配列を dideoxy 法により決定した。2 つの断片の塩基配列から λZC7 のインサートの全塩基配列を Fig. 1 のように決定した。

λZC7 のインサートは 135 アミノ酸残基の open reading frame を含み、3' 末端にポリ A を、その少し上流にポリ A 付加シグナルのアナログである AATAAG および AATAAC の配列を有している。

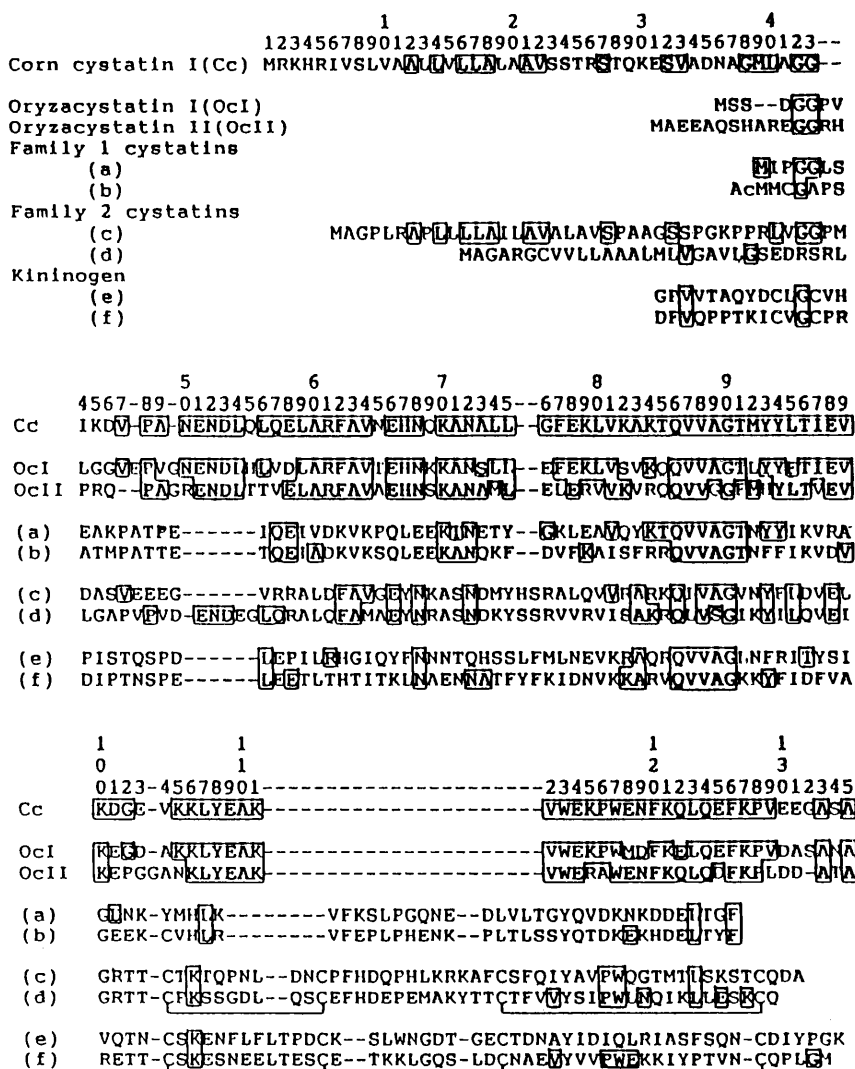


Fig. 2. Comparison of the amino acid sequence of corn cystatin I with sequences of other cystatins. Identical amino acid residues are boxed. The numbering starts from the N-terminal methionine residue of corn cystatin I. Gaps have been introduced to maximize sequence similarity. a, human cystatin A; b, rat cystatin; c, human cystatin C; d, chicken cystatin beta; e, human kininogen segment (residues 130-251); f, human kininogen segment (residues 252-372).

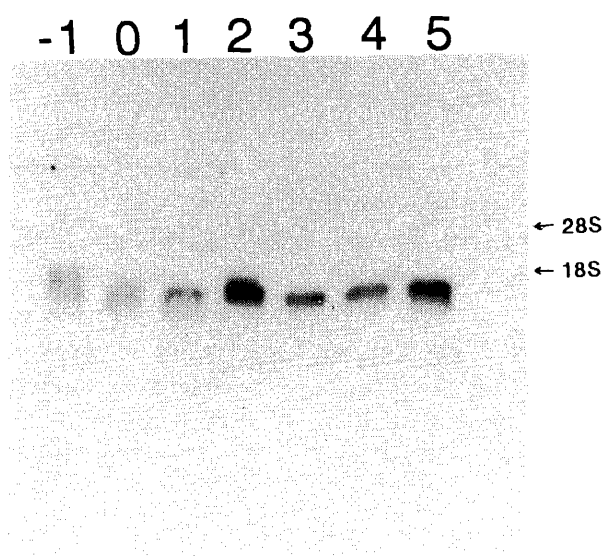


Fig. 3. Northern blot analysis. Twenty micrograms each of the total RNA from corn kernels harvested 1 week before flowering (lane-1) and at 0 week (lane 0), 1 week (lane 1), 2 weeks (lane 2), 3 weeks (lane 3), 4 weeks (lane 4), and 5 weeks (lane 5) after flowering were subjected to electrophoresis, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with the ^{32}P -labeled insert from corn cystatin I. The positions of 18 S and 28 S ribosomal RNA markers are shown.

塩基配列から決定されたアミノ酸配列を Fig.1 の塩基配列の下に示す。この配列の中にはシスタチンに共通して存在し、システインプロテイナーゼとの結合サイトの1つであると考えられている QVVAG 配列⁶⁾が存在しており、 λ ZC7 のインサートがコードするたん白質はシスタチンであることを示した。以下このシスタチンをトウモロコシシスタチン I と命名しその配列を他のシスタチン類と比較した (Fig. 2)。

オリザシスタチンとは高い相同性を示し、特にオリザシスタチン I とは71%の相同性を示した。一方、動物シスタチンとの相同性は低く、family 1 シスタチンとは24-29%, family 2 とは28-33%, family 3 とは15-23%であった。S-S 結合は存在せず、この点では family 1 に類似していると言えるが、アミノ酸配列の点では family 2 との類似性の方が大であった。トウモロコシシスタチン I は Fig. 3 のようにN末端近傍に疎水度の高い配列があり、シグナルペプチドを有している。

本研究で発見されたトウモロコシシスタチン I はコメ以外の植物シスタチンとしてはその構造が解明された最初のものであり、またシグナルペプチドを有する

最初の植物シスタチンである。

コムギおよびダイズ種子中のシスタチンについてはたん白レベルでの研究は殆んど行なわれていない。従ってこれらの発現時期が不明確であるので、cDNA の単離に先だち遺伝子解析を行った。いずれもゲノムライブラリーを作製し、オリザシスタチン I の翻訳領域に相当する DNA フラグメントをプローブにし、スクリーニングした。その結果コムギは約 3 kbp、ダイズは 4 kbp のフラグメントをもつ陽性クローンが得られた。これらの一部解析したところ、いずれもシスタチン特有の部分アミノ酸配列を含んでいることが判明し、コメ、トウモロコシ以外のコムギおよびダイズ種子中にシスタチンが存在することが示唆された。今後さらに詳しく解析する予定である。

文 献

- 1) Brawerman G, Mandecki J and Lee SY (1972): A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochem* 11, 637-641.

- 2) Abe K, Emori Y, Kondoh, Suzuki K, and Arai S (1987): Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *J Biol Chem.* **262**, 16793-16797.
- 3) Kondo H, Abe K, Nishimura I, Watanabe H, Emori Y and Arai S (1990): Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *J Biol Chem.* **265**, 15832-15837.
- 4) Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K and Erlich H (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- 5) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- 6) Abe K, Emori Y, Kondo H, Arai S and Suzuki K (1988): The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. *J Biol Chem*, **263**, 7655-7659.