

油糧種子の抗ウイルスたん白質シスタチンの分子クローニング

MOLECULAR CLONING OF OILSEED CYSTATINS AS ANTIVIRAL PROTEINS

荒井 綜一 (東京大学農学部)

Soichi ARAI

Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113

ABSTRACT

Cystatin is a proteinaceous cysteine proteinase inhibitor. We isolated a soybean genomic DNA clone for a cystatin from a soybean genomic library by screening with a cDNA clone for oryzacystatin I. A cDNA clone corresponding to the genomic clone was obtained from a cDNA library of immature soybean seeds using the genomic DNA fragment as a probe. The cDNA clone encodes a 245 amino acid protein. The protein, named soyacystatin, contains the sequence Gln-Val-Val-Ala-Gly conserved among most members of the cystatin superfamily and is similar to other plant cystatins in overall amino acid sequence, especially to oryzacystatin I. Large expression of the soyacystatin mRNA in soybean seeds was observed in an early stage of maturation. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 1-3, 1993.

シスタチンはシステインプロテイナーゼを特異的に阻害するたん白質であり、ヒトやラットなど動物起源のものが数多く知られている。このたん白質は単にインヒビターとして働くだけでなく、生体防御の役割をも果している。

著者はコメ種子から最初の植物シスタチンを発見し、オリザシスタチンと命名した¹⁾。in vitro の実験によりこのたん白質がポリオウイルスおよびヘルペスウイルスの増殖を強く抑制することが判り、シスタチンたん白質の抗ウイルス機能が示された²⁾。

コメ以外にトウモロコシ種子中にもシスタチンが存在することを昨年の本研究会で示し、これにより植物にも広くシスタチンが分布していることが示唆された。今回は大豆種子中のシスタチンについて分子生物学的手法を用いて研究を行い、大豆たん白質の生理的機能の一面を明らかにする端緒を拓いた。

実験方法

材料

RNA の抽出に用いたダイズは農水省農研センター喜多村啓介博士より供与して頂いた。開花後約2週目および4週目に大豆を収穫し、種子とさやとに分け、-80℃に保存しておいたものを使用した。

大豆シスタチンのゲノム DNA クローンの単離

大豆ゲノムライブラリーはクローンテック社のものを使用した。オリザシスタチン I の cDNA フラグメントを ³²P 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ゲノム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は 50℃, 1×SSC (0.1% SDS)で行った。

DNA 解析

陽性クローンのインサートは pUC 18 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 ABI 373 A DNA シークエンサー(アプライド

バイオシステム社)を用いた。

ノーザンハイブリダイゼーション

4種のサンプル(開花後約2週目, および4週目の種子とさや)からフェノール・SDS法により全RNAを抽出し, 1%アガロースゲル・ホルムアミドゲルに流し, ナイロンフィルターにブロットングした。プローブにはゲノムライブラリーよりスクリーニングされた陽性クローンの断片を用い, ハイブリダイゼーションおよび洗いは60℃, 3×SSC (0.1% SDS)で行った。

cDNA ライブラリーの作製

開花後2週目の種子より得られた全RNAよりオリゴ(dT)セルロースカラムを用いて mRNA を精製した。cDNA 合成キット(ファルマシア社)を用いて cDNA を合成し, 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。

大豆シスタチン cDNA クローンの単離

作製した cDNA ライブラリーをノーザンハイブリダイゼーションと同じプローブを用いてスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションおよび洗いは60℃, 3×SSC (0.1% SDS)で行った。得られたクローンは前述のようにシーケンスを行った。

結果と考察

約100万ブランクよりなる大豆ゲノムライブラリーをオリザシスタチン I の cDNA をプローブとしてスクリーニングを行ったところ, 3個の陽性クローンを得ることができた。そのうちの1つについてサブクローニングを行い, 塩基配列を決定した。このクローンは約14 kbp のインサートを含んでおり, そのうち約6 kbp についてシーケンスを行ったところ, シスタチンの保存配列が見つかり, このクローンがシスタチンをコードしていること, そして大豆中にシスタチンが存在していることが遺伝子レベルから明らかとなった。そこで大豆由来のシスタチンであることから, これをソヤシスタチンと命名した。

次にソヤシスタチンたん白質がどの時期に発現しているかを特定するためにノーザン分析を行った(Fig. 1)。オリザシスタチンでは開花後1, 2週目の種子において強く発現しており, 発芽期にはほとんど発現していないことから, 種子中のプロテイナーゼによる貯蔵たん白質の分解を抑制していることが推察されている。大豆においても同様のことが考えられるので, 種子登熟期における発現量について分析を行った。開花後2週目および4週目の種子およびさやより RNA を抽出し, ソヤシスタチンゲノム DNA クローンの断片をプローブとして用いノーザン分析を行ったところ,

すべてのサンプルに約1.2 kb のバンドが確認された。発現量は開花後2週目の種子が最も多いことが分かった。そこで開花後2週目の種子より抽出した全 RNA より mRNA を単離し, cDNA を合成し cDNA ライブラリーを作製した。

cDNA ライブラリーをゲノム DNA の断片をプローブとして同様にスクリーニングを行ったところ陽性クローンが得られ, 塩基配列を解析したところ, 先のゲノム DNA クローンに相当する cDNA であることが判明した。この cDNA は1.2 kbp のインサートを含んでおり, これはノーザン分析により推定される長さとはほぼ同じであることから, ソヤシスタチン mRNA の全長に相当するものと推定される。

cDNA の塩基配列よりソヤシスタチンのアミノ酸配列が決定された。この配列の中にはシスタチンに共通して存在し, プロテイナーゼとの主要な結合部位であると考えられている QVVAG 配列が存在していた。

ソヤシスタチンのアミノ酸配列を他の植物シスタチ

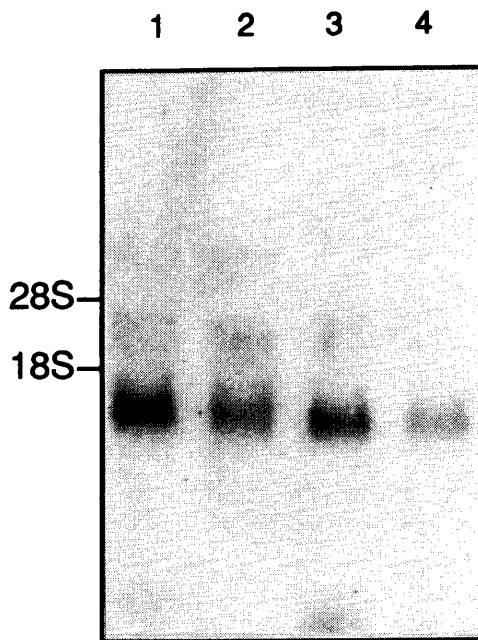


Fig. 1. Northern blot analysis. Forty micrograms each of the total RNA from soybean seeds harvested at 2 weeks (lane 1), pods at 2 weeks (lane 2), seeds at 4 weeks (lane 3), pods at 4 weeks (lane 4) after flowering were subjected to electrophoresis, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with the 32 P-labeled fragment from genomic DNA clone for soyacystatin. The positions of 18S and 28S ribosomal RNA makers are shown.

	43	53	90	101	121	125
SC	 MA T I GG -- LRD	TOE	QVVAGT L HH	V KPW L.....		
OC-I	 M S SD GG P V L GG	V KQ	QVVAGT L YY	EKP W M		
OC-II	 H A RE GG R HP RO	V RQ	QVV GG F MY	ERA N E		
CC-I	 G M L AGG -- IKD	A KT	QVVAGT M YY	EKP W E		

Fig. 2. Comparison of partial amino acid sequence of soyacystatin with those of other plant cystatins. Identical amino acid residues with soyacystatin are shaded. The numbering starts from the N-terminal methionine residue of soyacystatin. SC, soyacystatin; OC-I, oryzacystatin-I; OC-II, oryzacystatin-II; CC-I, corn cystatin-I.

ンと比較してみた(Fig. 2)。アミノ酸残基の長さをみると、オリザシスタチン I は102残基、オリザシスタチン II³⁾が107残基、N末端にシグナルペプチドを持っているコーンシスタチン I⁴⁾が135残基であるのに対し、ソヤシスタチンは245残基と非常に長いことが分かった。特にC末端は他に比べ約100残基も長く、ソヤシスタチンに特徴的な配列と言える。N末端とC末端の他に比べて長いところを除いた部分(45番目の Met から142番目の Phe)における他の植物シスタチンとの相溶性は非常に高く、いずれも50%以上あり、植物シスタチンにおける1次構造の近似性が確認された。

以上のようにして、大豆種子中に生理機能を持ったたん白質であるシスタチンが発現していることを分子生物学的手法を用いて確認することができた。これは双子葉植物に見いだされた最初のシスタチンである。今後はこのたん白質に対する抗体を作製し、種子中での局在性などについてさらに検討を進めていく予定である。

文 献

- 1) Abe K, Emori Y, Kondo H, Suzuki K and Arai S (1987): Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *J Biol Chem*, **262**, 16793-16797.
- 2) Kondo H, Ijiri S, Abe K, Maeda H and Arai S (1992): Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected Vero cells. *FEBS Lett*, **299**, 48-50.
- 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) Abe M, Abe K, Kuroda M and Arai S. (1992): Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur J Biochem*, **209**, 933-937.