

油糧種子とくに大豆のシスタチンのクローニング, 発現, 生体防御機能の解析

MOLECULAR CLONING OF SOYBEAN CYSTATIN AND ITS
EXPRESSION IN *E. COLI*

荒井綜一 (東京大学大学院応用生命化学)

Soichi ARAI

Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo,
Tokyo 113

ABSTRACT

Cystatin is a proteinaceous proteinase inhibitor. We have isolated a cDNA clone for a cystatin from a cDNA library of immature soybean seed and named it soyacystatin. Soyacystatin is comprised of 245 amino acid residues. We constructed four kinds of expression plasmids containing open reading frame of soyacystatin. All the expressed protein in *E. coli* inhibited papain activity assayed using N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide as a substrate. From soybean seeds the fractions containing papain inhibitory activity were partially purified by a series of purification including DE-52, Ultrogel AcA 54, Superose 12 and Mono Q chromatography. Western blotting analysis using antibody to soyacystatin showed that in soybean seeds soyacystatin protein was with a molecular weight of about 26,000. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 41-44, 1994.

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。

著者はコメ種子から植物由来のものとして初めてのシスタチン(オリザシスタチンと命名)を発見し¹⁾, *in vitro*の実験によりこのたん白質がポリオウィルス, ヘルペスウィルスの増殖を抑制することを示した²⁾。

一方分子生物学的手法を用いることにより, コメ以外に大豆においてもシスタチン遺伝子が発現していることを昨年度の本研究会において発表し, それをソヤシスタチンと名付けた。このシスタチンたん白質にも抗ウィルス機能が存在していることが期待される。

今年度はソヤシスタチンの抗ウィルス機能を調べる手始めとして, ソヤシスタチンたん白質の大腸菌での発現生産を行い, 酵素学的検討を行った。また大豆種子中でのこのたん白質の形状についても検討を行った。

実験方法

発現プラスミドの構築

ソヤシスタチンの大腸菌で発現するためのプラスミドを4種類デザインした (Fig. 1)。ソヤシスタチン cDNA は245残基をコードしているが, そのうち全長を含むもの (WT; 1~245), N末端を欠失させたもの (Δ N; 45~245), C末端を欠失させたもの (Δ C; 1~146), N末端C末端両方を欠失させたもの (Δ N Δ C; 45~146) をそれぞれ発現するようにプラスミドを構築した。プラスミドベクターには pTV118N を使用し, lac プロモーターの下流にシスタチン遺伝子を挿入した。ベクターに pTV118N を用いることにより, 大腸菌由来のアミノ酸残基を全く含まないたん白質を発現させることにした。

大腸菌でのたん白質の発現

大腸菌 YA21 株を構築した発現プラスミドで形質転換し、一晚液体培養を行った。集菌後、培地を 1 mM の IPTG を含む M9 培地に変えてやることにより発現たん白質を誘導させた。遠心により集菌後、菌体を超音波破碎し、その後沸騰水中で15分の熱処理を行うことにより発現シスタチンを含む粗抽出画分を得た。

発現たん白質の精製

粗抽出画分を遠心後、上清に硫酸アンモニウムを80%になるように加えたたん白質を沈澱させた。20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析後、DE52 カラムで精製を行った。シスタチン画分をさらに Mono Q カラム、Superose 12 カラム (ファルマシア) を用いて精製を行った。

シスタチン活性測定

シスタチン活性はパペインの BANA 水解の阻害活性を指標にして測定した。適当量のシスタチンとパペインに BANA を終濃度200 μ M になるように加え、37°C で30分反応後、ジメチルアミノシンナムアルデヒドで発色させ540 nm での吸光度を測定した。

大豆種子よりシスタチンたん白質の粗精製

完熟大豆種子300 g をリン酸バッファーでホモジナイズし、遠心後の上清を75°C で20分間熱処理を行った。遠心後、上清に硫酸アンモニウムを80%になるように加えたたん白質を沈澱させた。透析後、DE52 カラムによる精製を pH を変えて 2 回、ウルトロゲル AcA54 カ

ラムによるゲル濾過を 1 回行った後、Superose 12 カラム、Mono Q カラム を用いて粗精製を行った。シスタチン活性の存在した画分については SDS-PAGE およびソヤシスタチンによる抗体によりウェスタン分析を行った。

結果と考察

大腸菌 YA21 株を用いて、Fig. 1 に示したような4種類のたん白質を発現させた。他の植物シスタチンが約100アミノ酸からなっているのに対し、ソヤシスタチンは245アミノ酸であり、非常に長いことが分かる。そこでN末端とC末端の片方もしくは両方を欠失させたたん白質も発現させることにした。N末端とC末端の欠失点はオリザシスタチン (102アミノ酸) の末端に相当する位置とした。すると発現後の菌体を超音波破碎した液は4種全てにシスタチン活性が存在したが、N末端を含んだもの (WT, Δ C) は見かけ上活性が弱かった。これが大腸菌内部での発現量の差によるものであるかどうかを検討するため、4種類のたん白質を実験方法のように精製を行った。精製後のたん白質をシスタチンの濃度をそろえて活性測定を行ったところ、4種のたん白質はほぼ同等の活性を示した。

精製後の発現たん白質を SDS-PAGE およびソヤシスタチンに対する抗体でウェスタン分析を行ったところ、SDS-PAGE における分子量は WT (1~245) が約33 kDa, Δ N Δ C (45~146) が約18 kDa を示した。

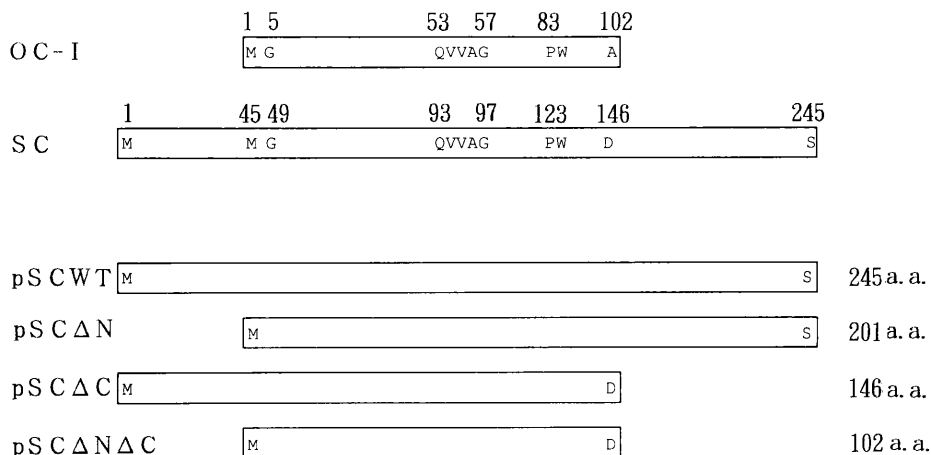


Fig. 1. Schematic diagrams of expression proteins of recombinant soyacystatins. The open boxes show coding regions. Amino acid residues are numbered beginning with the first methionine. OC-I, oryzacystatin-I; SC, soyacystatin.

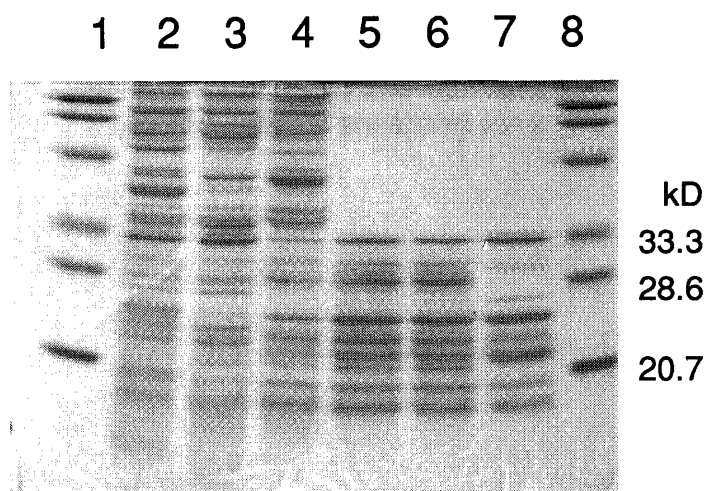


Fig. 2. SDS-PAGE of partially purified soyacystatin. Samples were as follows: crude extract after ammonium sulfate saturation 0-80% (lane 2), fractions after treatment with 1st DE-52 (lane 3), fractions after treatment with 2nd DE-52 (lane 4), solution after treatment with Ultrogel AcA 54 (lane 5), solution after treatment with Superose 12 (lane 6), fractions after treatment with Mono Q (lane 7). Size markers are included (lanes 1 and 8).

Table 1. Partial purification of soyacystatin from soybean seeds

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold
(NH ₄) ₂ SO ₄	7290	13284	1.822	1.00
1st DE 52 (pH 7.5)	3859	12920	3.348	1.84
2nd DE 52 (pH 8.0)	263.8	3300	12.51	6.86
Ultrogel AcA 54	99.75	3125	31.33	17.2
Superose 12	76.95	2760	35.91	19.7
Mono Q	4.56	298	65.35	35.8

Inhibition of papain was assayed measuring BANA hydrolysis. One unit of cystatin was defined as the amount which decreased 1 OD of assayed mixture.

次にソヤシスタチンが大豆種子中でどのような形状かを調べるために、大豆よりシスタチンたん白質の精製を行った。完熟種子300 gを粉砕後、リン酸バッファーでホモジナイズし、遠心で得られた上清を75℃で20分間熱処理を行った。これにより種子中に含まれるプロテアーゼや他の酵素を失活させた。硫酸沈澱で得られたたん白質を20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に透析し、DE-52 カラムに供したところ、素通り画分にシスタチン活性が存在した。そこで素通り画分を20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析し再び DE-52 カラムに供したところ、約0.08 M NaCl 付近で溶出する画分にシスタチ

ン活性が存在した。これらを限外濾過で濃縮し、ウルトロゲル AcA 54 および Superose 12 カラムによりゲル濾過を行った。さらに20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析し Mono Q カラムに供したところ、0.95 M NaCl で溶出する画分に強いシスタチン活性が存在した。これらのステップにより大豆種子よりシスタチンたん白質の粗精製を行った。

Fig. 2 に各段階でのサンプルの SDS-PAGE を示した。Mono Q カラムにより得られた画分をソヤシスタチンに対する抗体でウェスタン分析を行ったところ、約26 kDa の位置にバンドが観察された。大腸菌での発

現たん白質の分子量と比較すると、WTよりは低い位置に抗体とクロスするたん白質が存在することが判明した。

今後はさらに精製を進め、ソヤシスタチンの種子内でのN末端とC末端を特定したいと考えている。またこのたん白質の局在性などについて検討を進めていきたい。

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.