

大豆シスタチン(soyacystatin)の発現および構造, 活性相関の検討

Expression of Soyacystatin in *E. Coli* and Investigation of Its Inhibitory Activity

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 inhibitor against cysteine proteinases. Soyacystatin is a phytocystatin which has been cloned from soybean seed. Soyacystatin protein has extension sequences in NH₂- and COOH-termini. The effect of extension sequences of soyacystatin against inhibitory activities was investigated. As a result, the truncated mutant of soyacystatin from which both extension sequences were deleted showed lower inhibitory activity against papain than wild type and the other mutants of soyacystatin. Therefore, the extension sequences of soyacystatin have a certain effect on the intensities of inhibitory activities. On the other hand, expressed soyacystatin protein in *E. coli* showed the inhibitory activity against proliferation of poliovirus *in vitro*. This activity is as effective as both those of other cystatins of plant origin and that of the egg white cystatin. This result indicated that soyacystatin has anti-virus effect. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 67-69, 1995.

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るシスタチンは生物界に広く存在していることが知られている。著者はコメ種子中に植物由来のものとして初めてのシスタチンを見だし、オリザシスタチンと命名した¹⁾。その後分子生物学的手法を用いて、トウモロコシ²⁾、コムギ、そしてダイズ種子中よりシスタチンを見だし、植物種子においてもシスタチンたん白質が普遍的に存在することを示唆してきた。

今年度はダイズより見いだされたソヤシスタチンに特異的に存在するN末端およびC末端の延長配列の機能解析の一端として、延長配列の有無によるシステインプロテイナーゼの阻害に対しての効果についての検討を行った。

また大豆種子中におけるソヤシスタチンたん白質の局在についての知見を得るため、登熟過程における大豆種子を用いて抗体染色を行った。

さらにシスタチンたん白質の有効利用の検索の試みとしてソヤシスタチンのウィルス増殖抑制効果および抗害虫効果について検討を行った。

実験方法

大腸菌でのシスタチンたん白質の発現

ソヤシスタチン(245残基)の発現プラスミドを4種構築し、それぞれの発現産物をWT(1~245), ΔN(45~245), ΔC(1~146), ΔNΔC(45~146)と命名した。大腸菌YA21株を用いてシスタチンたん白質を発現させ、DE52カラム, MonoQカラム, Superose12カラムおよびC18-ODSカラムを用いて各発現たん白質の精製を行った。

シスタチン活性測定

シスタチン活性はパパインの阻害活性として測定し

た。基質としてはBANAを用い、パパインによるBANA水解の阻害を吸光度により測定した。 K_i 値はDixonプロット法により算出した。

大豆種子の抗体染色

登熟初期および終期の大豆種子をホルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作製した。切片をソヤシスタチン抗体と反応後、ABC法により発色を行った。

抗ウィルス効果の測定

近藤らの方法³⁾をもとに実験を行った。ウィルス(弱毒ポリオウィルス)と細胞(Vero cell)を約1対4となるようにし、37°Cで30分培養後、洗浄した。その後シスタチンの存在、非存在下37°Cで18時間細胞を培養し、細胞を凍結融解して得られた上清に含まれるウィルスのタイターを測定した。

虫プロテアーゼに対する阻害

コクゾウ(*S. zeamais*)の消化器官に発現しているシステインプロテイナーゼのcDNAをグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合たん白質を発現させるような発現ベクターに組み込み、大腸菌にてプロテアーゼの発現を行った。発現後、グルタチオンカラムを用いて精製した酵素に対する植物シスタチンの阻害を蛍光基質(α -F-R-MCA)を用いて測定した。

Table 1. K_i values for inhibition of papain by wild-type soyacystatin (WT) and its deletion mutants

Protein	K_i (M)
WT	2.7×10^{-8}
ΔN	2.3×10^{-8}
ΔC	3.7×10^{-8}
$\Delta N\Delta C$	1.5×10^{-7}

BANA was used as a substrate for the reaction.

Table 2. Anti-polioviral activities of various cystatins

Conc.	Soyacystatin	Oryzacystatin-I	Corn cystatin-I	Wheat cystatin	Egg cystatin
8 (nmol/mL)	++	++	++	++	++
4	++	++	++	++	++
2	N. D.	N. D.	+	±	N. D.
1	±	N. D.	±	±	N. D.
0 (Control)			—		

Virus : Poliovirus type 1.

Virus yields are calculated by plaque-forming assay.

All figures represent the relative virus yields compared with the result of control assay (++, 10% < ; +, 10~50% ; ±, 50~90% ; -, 90% >). N. D. ; not determined.

結果と考察

ソヤシスタチンに特異的に存在するN末端、C末端の延長配列の機能を調べるため、両延長配列を片方または両方欠質させたたん白質を発現するように発現プラスミドの構築を行った。大腸菌で4種類のたん白質を発現させた後、菌体破砕物をソヤシスタチンに対する抗体を用いたウェスタン分析に供したところ、それぞれ1本のバンドが確認でき、デザインしたたん白質の発現が確かめられた。発現させた4種類のシスタチンたん白質はいずれもパパインに対する阻害活性を有していた。精製後のたん白質を用いてパパインに対する K_i 値を測定したところ、Table 1のようになった。延長配列を有するたん白質はいずれも 10^{-8} のオーダーの値を示したのに対し、延長配列を欠いたたん白質は 10^{-7} と一桁大きな値を示した。これによりソヤシスタチンの延長配列がプロテイナーゼの阻害活性に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。具体的にはプロテイナーゼとの結合や親和性に対しての影響が考えられるが、この点については他のシスタチンとソヤシスタチンの延長配列をつないだキメラシスタチンを作製することによって確かめていきたいと考えている。

次に大豆種子中でのソヤシスタチンの局在を調べるため、抗体染色を行った。登熟初期および終期の大豆種子より切片を作製し、ソヤシスタチン抗体を用いて染色を行ったところ、いずれの切片においてもコントロールには見られない染色が主に子葉において観察された。抗体の希釈濃度をそろえて行ったところ、登熟終期の切片の方が強く染色され、登熟に従ってソヤシスタチンたん白質が蓄積していくことが示唆される。また染色は子葉全体に、一様に観察され、特に局在している部分は認められなかった。トウモロコシにおい

Table 3. Effect of phytocystatins against the recombinant cysteine proteinase of *S. zeamais*

Cystatins	Concentration		
	10 nM	50 nM	100 nM
Soyacystatin ($\Delta N\Delta C$)	58.7	76.9	88.5
Oryzacystatin I	25.3	67.3	83.8
Wheat cystatin	49.7	74.6	87.3

Inhibitory activities (%) were shown.

Conditions : Buffer, pH 4.5 (CH_3COONa buffer)

Substrate, z-F-R-MCA

Reaction, 37°C, 20 min

て同様にシスタチンの抗体染色を行ったところ、アリューロン層および胚に強い局在が観察されており⁴⁾、種子内の局在性が大きく異なっていることが明らかとなった。

さらにシスタチンたん白質の有効利用への検索の一環として、ソヤシスタチンのウィルス増殖抑制機能について検討を行った。方法に述べたように実験を行ったところ、培地中にソヤシスタチン（今回は分子量を他とそろえるために $\Delta N\Delta C$ の発現産物を使用した）を加えた際には 4 nmol/mL以上の濃度において顕著にポリオウィルスの増殖を抑制することが判明した（Table 2）。この濃度はポジティブコントロールとして用いた卵白シスタチンや、他の植物シスタチンと同等であり、これによりソヤシスタチンのウィルス増殖抑制機能が確かめられた。一般的にシスタチンの効果としては、感染後のウィルスのゲノムRNAより生じたポリペプチドの切断を阻害することにより増殖が抑制されるものと考えられている。もしもそのような仕組みであるなら、ウィルスに感染した細胞の細胞質中に培地中のシスタチンが取り込まれる必要が出てくる。そこで分子量の大きく異なるシスタチン、例えば他のたん白質との融合たん白質等を用いて実験を行うこと

によりその仕組みが推定されるものと考えている。

大腸菌で発現を行ったコクゾウのシステインプロテイナーゼに対する植物シスタチンの阻害について検討したところ、ソヤシスタチンのみでなく、コメ、コムギのシスタチンいずれも強く阻害を行った（Table 3）。しかし低濃度においてはソヤシスタチンがオリザシスタチンよりも強く阻害しており、このことはソヤシスタチンのコクゾウに対する強い致死効果を示唆するものである。消化酵素としてシステインプロテイナーゼを有する虫は多く、人間にとって害虫となっている虫に対するシスタチンの有効な利用の方法の開発が望まれる。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) Abe M, Abe K, Iwabuchi K, Domoto C and Arai S (1994) : Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli* : Investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *J Biochem*, **116**, 488-492.