

大豆アスパラギン酸プロテイナーゼのクローニング、発現、 機能の解析と応用に関する研究

阿部啓子*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Soybean Aspartic Proteinases: Cloning, Expression, Functional Analysis, and Application

Keiko ABE

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
Tokyo, 113

ABSTRACT

Aspartic proteinases (AP) have deserved note because of their significance of not only physiological roles but also applications for food processing. In this study, I tried to define the presence of APs in soybean. Poly(A)⁺ RNA was prepared from 3-day-germinating soybean seeds to synthesize cDNA. Using RT-PCR with oligoprimers synthesized according to the amino acid sequences commonly conserved in known APs, I identified three cDNA fragments encoding parts of APs. The encoded proteins, named soybean AP α , β , and γ , consisted of 102 amino acid residues, containing one of the aspartic acid residues that constitute the active center. In the primary structure, they had 65~77% identity with one another. Especially, the sequences around the active center including the particular aspartic acid residue are highly conserved. The results of the northern blot analysis demonstrated that AP α , β , and γ mRNAs were all expressed as single species of about 2.0 kb in soybean seeds during both ripening and germination. These results suggest that soybean APs play some physiological roles in protein processing and degradation. Practically, they are expected to be used as milk-clotting enzymes for cheese making. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 19-22, 1996.

Key words : aspartic proteinase, soybean, milk clotting

植物プロテイナーゼに関する研究は主としてシステインプロテイナーゼ (CP) に関する研究が大部分を占めてきた。CP はパパイン、ブロメラインをはじめとして植物中に多量に存在し、生理機能、発現様式等

の数多くの知見が得られており、食品加工への応用も広くなされている。しかし、アスパラギン酸プロテイナーゼ (AP) に関する研究はコムギ、コメ、オオムギなどの種子中にその存在が確認され、たん白質レベルでの報告例が数例ある程度で CP に較べて著しく遅れていたが、近年になってようやく数種の植物 AP に

*〒113 東京都文京区弥生1-1-1

ついて cDNA がクローニングされ報告されつつある^{1,2)}。

AP には消化酵素ペプシン、血圧調節に関与するレニン、リソソーム酵素であるカテプシン D、凝乳酵素キモシン等生理的にも、また食品加工上も重要なものが多い。著者らはコメ種子中に AP が存在することを cDNA クローニングにより見出し、オリザシンと命名した³⁾。オリザシンには既知の微生物、動物由来の AP には存在しない約100アミノ酸残基からなる巨大インサクションが C 末端領域に存在していた。このように植物 AP の特徴ある姿が明らかにされつつあるが、植物 AP が食品加工に応用された例としては唯一ポルトガルの伝統的チーズ製造に利用されているサイプロシンが知られているのみである²⁾。サイプロシンはカルドンの花に存在し、この花の抽出液を乳に加えて凝固させたチーズは特有のフレーバーを有するといわれる。

本研究ではダイズの AP に着目し、基礎研究とともにこれを食品加工用としての用途を開くことを目的として行う。ダイズは食用種実として重要であるばかりでなく完熟種子は保存性が高く、その種子に存在するプロテイナーゼを食品加工用として利用することは安定供給の確保ができ、しかも安価である等の利点が多い。

今年度はまず、遺伝子レベルでの研究において、ダイズに AP が存在していることを示し、その発現様式についての解析を行うことにした。

方 法

RNA の抽出

登熟期（開花後約 2 週目、及び 4 週目の種子とさや）および発芽期（発芽 1, 3, 5, 7 日目）のダイズをドライアイスで冷凍し、コーヒーマルを用いて粉末状に

した。各サンプルより全 RNA をフェノール法を用いて抽出した。

1 本鎖 cDNA の合成

発芽 3 日目のダイズより抽出した全 RNA より、オリゴ dT セルロースを用いて mRNA を精製した。1 μ g の mRNA より、オリゴ dT プライマーを使用し、1 本鎖の cDNA を合成した。

RT-PCR

種々のアスパラギン酸プロテイナーゼに高く保存されている領域（NYLDAQY および KFDGILG）を基にして、2 種のプライマーをデザインした。合成した 1 本鎖 cDNA をテンプレートにし、アニーリング温度を 48°C で 50 サイクルの反応を行った。

塩基配列の決定

PCR によって得られた約 300 bp のバンドをアガロース電気泳動を行った後に切り出し、pUC18 ベクターに挿入後、塩基配列を決定した。

ノーザンハイブリダイゼーション

登熟期および発芽期のダイズより抽出した全 RNA を各レーン 30 μ g ずつ、1% アガロースゲル・ホルムアミドゲルを用いて泳動し、ナイロンフィルターにブロットニングした。プローブには RT-PCR によって得られた断片を用い、ハイブリダイゼーション後の洗浄は 65°C、0.1×SSC/0.1% SDS で行った。

結果および考察

ダイズにおけるアスパラギン酸プロテイナーゼ（AP）の存在を確認するために、まず RT-PCR を行った。既に遺伝子レベルでの解析が詳細に行われているコメの AP（オリザシン）においては、登熟期から発芽初期において、広く発現していることが確認されている³⁾。ダイズにおいても大きな相違がないと予想し、RT-PCR のテンプレートとして発芽初期の

Table 1. Amino acid sequence similarities among plant aspartic proteinases

	Soy α	Soy β	Soy γ	Rice	Barley	Cardoon
Soybean α						
Soybean β	65					
Soybean γ	78	71				
Rice	64	75	70			
Barley	65	75	67	92		
Cardoon	69	78	71	79	79	

◆

Soybean α	-GEIGIGTTPPQPFIVVFDTGSSNLWVPSPKCYFTLACYTHNWYTAKKSKTH
Soybean β	YGEIAIGTSPQKFIVIFDTGSSNLWVPSSKCTFSVACYFHAKYKSSKSSSTY
Soybean γ	YGEIGIGTTPQKFENVIFDTGSSNLWVPSSKCYFSIACCTHHWYKSKKSKTY
Rice	FGEIGVGTTPQKFIVIFDTGSSNLWVPSPKCYFSIACFFHRSYKSGQSSTY
Barley	FGEIGVGTTPQKFIVIFDTGSSNLWVPSPKCYFSIACYLHRSYKAGASSSTY
Cardoon	FGEIGIGTTPQKFIVIFDTGSSNLWVPSSKCYFSVACLFHRSKYRSTDSTY

Soybean α	VKNGTSCKINYGTSISGFFSQDNVKGSAVVKHODFIEATHEGSLTFLSA
Soybean β	KKNGTAAAIQYGTGAISGFFSYDSVRVGDIFVKNQEFIEATREGVTFSLAA
Soybean γ	TKNGTSCKIGYGSISGFFSKDHVKVGDVVVKHODFIEATREGSLSFVLA
Rice	QKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSEDSVTVGDLVVKDQEFIEATKEPGLTFMVA
Barley	KKNGKPAAIQYGTGSIAGYFSEDSVTVGDLVVKDQEFIEATKEPGITFLVA
Cardoon	KKNGKSAAIQYGTGSIAGFFSQDSVKLGDLLVKEODFIEATKEPGITFLAA

Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of aspartic proteinases of plant origin. White letters in black boxes denote amino acid residues that are conserved among all the proteins.

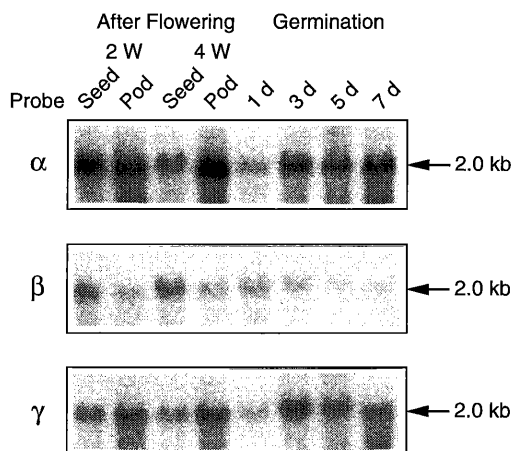


Fig. 2. Northern blot analysis of soybean aspartic proteinases. Thirty micrograms total RNA isolated from soybean was hybridized with 32 P-labeled RT-PCR fragments. Soybean seeds were sampled at 2 and 4 weeks after flowering and 1, 3, 5, and 7 days of germination.

mRNA から合成した cDNA を用いることにした。

動物、植物を問わず、既知の AP は活性中心を構成する 2 カ所のアスパラギン酸残基付近に保存性の高い領域が存在している。そのうち 1 つ目のアスパラギン酸残基の前後に位置する配列 (アミノ酸配列で NYLDAQY および KFDGILG) を基にして、センス、

アンチセンスのプライマーを作製した。

発芽 3 日目のダイズより得た mRNA から合成した 1 本鎖 cDNA をテンプレートにし、上記のプライマーの組み合わせで、アニーリング温度を 48°C で 50 サイクルの反応を行ったところ、予想される約 300 bp のバンドが増幅された。このバンドを電気泳動後切り出し、プラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。塩基配列より推定されるアミノ酸配列中には既知の AP と相溶性の高い配列が存在しており、さらに活性中心のアスパラギン酸残基も存在していたことから、この PCR によりダイズの AP をコードする cDNA の断片が獲得できたことが確認された。

さらに複数の PCR 断片の解析により、今回の PCR によって Fig. 1 に示すような推定アミノ酸配列を持つ 3 種類の cDNA 断片が得られたことが判明した。そこでこれらにコードされているダイズの AP をそれぞれ α 、 β 、 γ と命名した。

PCR によって増幅された部分の推定アミノ酸配列を既知の植物由来の AP のものと比較した結果を示した (Fig. 1, Table 1)。ダイズの 3 種の間では 65~77% の相溶性を有しており、また既知のものとは 64~78% の相溶性を示していた。特に活性中心のアスパラギン酸付近の 11 残基については全てにおいて完全に保存されていた。

次に今回 PCR により得られたダイズの AP がどの時期に発現しているかを調べるため、登熟期および発

芽期のダイズより抽出した RNA を用いてノーザン分析を行った。プローブには 3 種の PCR 断片 (α , β , γ) を用い、それぞれの発現時期に差があるかどうかについても、同時に検討することにした。その結果、いずれのクローンをプローブに用いたときにも約 2.0 kb の位置にバンドが確認され、コメの AP であるオリザシンの場合と同様に、登熟期から発芽期にかけて広く発現していることが判明した (Fig. 2)。

クローン間の差異について見てみると、 α , γ の発現パターンと、 β のものとの間に違いが見られた。 α , γ においては登熟期に発現していたものが発芽 1 日

目では減少し、その後発現量が増えていくのに対し、 β においては登熟期から発芽 1, 3 日目までは発現しているが、その後急速な発現量の減少が確認された。発現パターンが異なることから、これらのプロテイナーゼはダイズの中で異なった役割を果たしていることが推定される。

今後、これらの複数の AP の全長をコードするクローンを得、それぞれを活性のある状態で発現させた後に、酵素学的な相違についての検討を行い、その機能について推定していきたい。

要 約

アスパラギン酸プロテアーゼ (AP) は生理学的にも、また食品工業への利用においても重要な酵素として知られている。植物においても幾つかの種においてその存在が明らかとなっており、ダイズにおいても AP が存在することが期待された。そこでまず RT-PCR によってダイズにおける AP の存在を確認した。AP に保存されている配列を基に作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行ったところ、AP をコードすると思われる断片が 3 種見い出された。これらのクローンは互いに 65~77% の相同性を有しており、特に活性中心のアスパラギン酸残基付近は完全に保存されていた。ノーザン分析により、3 種のクローンはいずれも登熟期、発芽期を通じて発現していることが観察された。

文 献

- 1) Runeberg-Roos P, Törmäkangas K and Östman A (1991) : Primary structure of a barley grain aspartic proteinase. *Eur J Biochem*, **202**, 1021-1027.
- 2) Cordeiro MC, Xue ZT, Pietrzak M, Pais MS and Brodelius PE (1994) : Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Mol Biol*, **24**, 733-741.
- 3) Asakura T, Watanabe H, Abe K and Arai S (1995) : Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur J Biochem*, **232**, 77-83.