

食糧種実アスパラギン酸プロテイナーゼのクローニング，発現生産， 食品加工への応用

阿部啓子^{*1}・朝倉富子²

¹東京大学大学院農学生命科学研究科

²跡見学園女子大学短期大学部

Food Seed Aspartic Proteinase : Cloning, Expression, and Application to Food Processing

Keiko ABE¹ and Tomiko ASAKURA²

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113

²Atomi Junior College, Tokyo 112

ABSTRACT

An attempt was made to express oryzasin 1, a new aspartic proteinase of rice seed origin. An expression plasmid was constructed by linking a pro-oryzasin cDNA to the downstream of the region that encoded glutathione-S-transferase (GST) and a GST-oryzasin 1 fusion protein was expressed as an inclusion body in *Escherichia coli*. It was then solubilized with the use of a surfactant and affinity-purified to obtain a recombinant oryzasin 1 preparation, the properties of which were similar to those of original oryzasin. Next, the preparation was applied to protein bodies extracted from rice seeds, with the result that their glutelin fraction was well digested. This suggests the possible utility of oryzasin 1 in modification of structures and functions of legumins including soy glycinin. A clotting phenomenon was also observed when the oryzasin 1 preparation was added to skim milk, indicating the applicability of this enzyme for improvement of functional properties of protein food materials including soy milk. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 15-20, 1997.

Key words : aspartic proteinase, expression

食糧種実には多様なプロテイナーゼが含まれている。わけても、システインプロテイナーゼ (CP) が、次いでアスパラギン酸プロテイナーゼ (AP) が多く存在する。CP に関しては、コメからオリザイン α , β , γ , の三種のプロテイナーゼを cDNA および遺伝子クロー

ニングを行い、これらがジベレリンによって発現が制御され、しかも個々の応答パターンが異なることを見い出している¹⁾。近年、トウモロコシ、コムギ種子からも CP をクローニングし²⁾、主要食糧種実の CP について多くの知見を得てきた。一方、AP に関しては数種の植物種子で見い出されてきたが、我々は完熟イネ種子からペプスタチンアフィニティークラムを用い

*〒113 東京都文京区弥生1-1-1

てたん白質を精製し³⁾、ついで cDNA および遺伝子クローニングを行った⁴⁾。その結果、コメ AP (オリザシンと命名) はオリザインとは異なり、登熟期に発現量が著しく多いこと、各種の植物ホルモンの影響を受けない等の性質を有していることが判明した。オリザシンが種子登熟期に発現量が增大することから、種子の貯蔵たん白質のプロセッシングに関わりを持ち、また、発芽初期においては成長のための貯蔵たん白質の分解をも担っているものと考えられる。

このように植物由来のプロテイナーゼの性質が明らかにされてきたが、これらの酵素をさらに食品加工への応用を考えた場合、活性型酵素を多量にしかも簡便に得る必要がある。それには、大腸菌、酵母等を宿主とし、たん白質を発現させる方法が有効と思われる。オリザシンと同じく AP に属する凝乳酵素キモシンは、すでに酵母を用いて発現され、チーズ製造に利用されている。

組み換え体から、活性をもつ形で発現された植物プロテイナーゼの例はほとんどない。本年度はオリザシンを大腸菌で発現させ、活性型酵素を得、米の貯蔵たん白質をはじめとする食品たん白質への作用も検討した。

方 法

GST-オリザシン 1 融合たん白質発現用プラスミドの構築

オリザシン 1 cDNA のうちシグナル配列を欠いたフラグメントの 5'末端に *Sma*I サイト、3'末端に *Xho*I サイトが導入されるように PCR 用プライマーをデザインした。PCR によって生成したフラグメントを pGEX-5X-2 (Pharmacia) の *Sma*I, *Xho*I サイトに導入して、発現用プラスミドとした。

発現用プラスミドによる大腸菌の形質転換と発現

発現用プラスミドを大腸菌 AD202 に導入した。形質転換した菌を、100 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 培地に塗布した。一晚培養後、プレートからコロニーをピックアップし、100 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、37°C で一晚振盪培養した。この種菌 5 μ L を 100 μ g/mL アンピシリンの LB 培地 100 mL に加え、37°C で振盪培養し、600 nm の吸光値が 0.6~1.0 になったところで IPTG を最終濃度が 1 mM になるように加え、さらに 2 時間培養を続けた。

2 時間後、4°C、2,000 $\times$ g、5 分遠心分離をして集菌し、2.5 mL の 2 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、再び遠心分離後、1% ギャラクソール

を加えて氷中で冷やしながらか菌体を超音波破碎した。さらに 2% Triton X-100 を加えて 4°C、15,000 rpm、20 分遠心分離後、上清と沈殿に分け、SDS-PAGE により GST-オリザシン 1 融合たん白質の発現を確認した。

GST-オリザシン 1 融合たん白質の精製

発現した融合たん白質は、グルタチオンセファロース 4B カラムを用いて精製した。

酵素活性の測定

酸変性ヘモグロビンを基質とし、最終濃度が 1% になるように酢酸緩衝液 0.1 M (pH 3.3) で希釈し、酵素液を 10~50 μ L 加えて 100 μ L とした。37°C で 60 分間反応させたのち等量の 0.4 M TCA を反応液に加えた。氷中に 5 分間放置したのち、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離をし、上澄の 280 nm の吸光値を測定した。1 unit (U) は上記の条件で 280 nm の OD が 0.01 増加するものとする。

たん白質量の測定

BCA Kit (BCA Protein Assay Reagent PIERCE) を用い、30 μ g/mL~1,000 μ g/mL の BSA (bovine serum albumin) をスタンダードとして求めた。

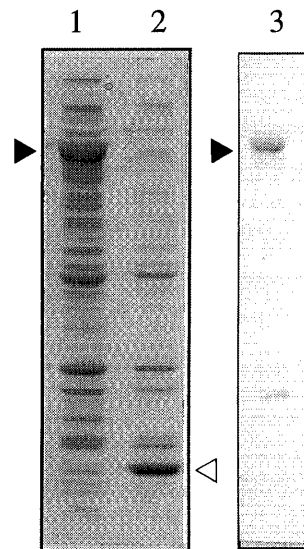


Fig. 1. Expression and purification of GST-oryzasin 1 fusion protein. Lane 1, total bacterial protein containing GST-oryzasin 1; lane 2, total bacterial protein containing GST; lane 3, purified GST-oryzasin 1 with glutathione affinity column. Filled triangles indicate GST-oryzasin 1, and open triangle GST.

コメのプロテインボディーの抽出

精白米 3 g に抽出用緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)/0.5 M シュークロース/0.1% KBrO₃) 20 mL とマセロザイム 60 mg を加え, 30°C で 3 時間攪拌した。これを氷冷した乳鉢でゆっくりすり潰したのち, 4°C, 400×*g* で 2 分間遠心分離をした上澄を 10,000×*g* で 5 分間遠心分離をして沈澱を集めた。この操作を数回繰り返した。内在の酵素を失活させるために 100°C, 5 min の加熱をした。

結 果

GST-オリザシン 1 融合たん白質の発現と精製

オリザシン 1 たん白質は, Fig. 1 で示されているように GST-オリザシン融合たん白質として発現した。GST-オリザシン 1 融合たん白質を発現した菌体を超音波で破碎し, 上清と沈澱に分離したところ, GST-オリザシン 1 融合たん白質は沈澱画分に蓄積されていた。界面活性剤を用いて, 封入体に封じこめられていた発現たん白質を可溶化させ, さらに可溶化発現たん白質をグルタチオンセファロースカラムで精製したところ, GST-オリザシン 1 融合たん白質がほぼ完全に精製さ

れた (Fig. 1, lane 3)。

発現たん白質の活性化

GST 融合たん白質として精製されたオリザシン 1 を活性型酵素に変換するための条件を検討した。活性は, 酸変性ヘモグロビンに対する水解度で調べた。精製した GST-オリザシン 1 融合たん白質は, 酵素活性を全く示さなかった。そこで GST-オリザシン 1 融合たん白質の酸処理を経時的に行なった結果, 室温, 24 時間, pH 3.3 の酸処理により最も活性化された。このときの GST-オリザシン 1 融合たん白質の SDS-PAGE を Fig. 2A に示す。

24 時間処理後, GST-オリザシン 1 複合体のバンドはほとんど消失した。cDNA から推定されるオリザシン 1 の成熟酵素部分の分子量は, 48 kDa であるが, これに相当する位置には明確なバンドは出現せず, 低分子量のバンドが出現した。不活性型の GST-オリザシン 1 融合たん白質が消失し, 少なくとも一部は自己消化により活性型に転換することが判ったが, SDS-PAGE において新たに出現したバンドに関しては, これらが活性型のオリザシン 1 であるか, オリザシン 1 の分解物のいずれかであると思われる。低分子量の新たに出現したバンドの N 末端アミノ酸配列を解析した

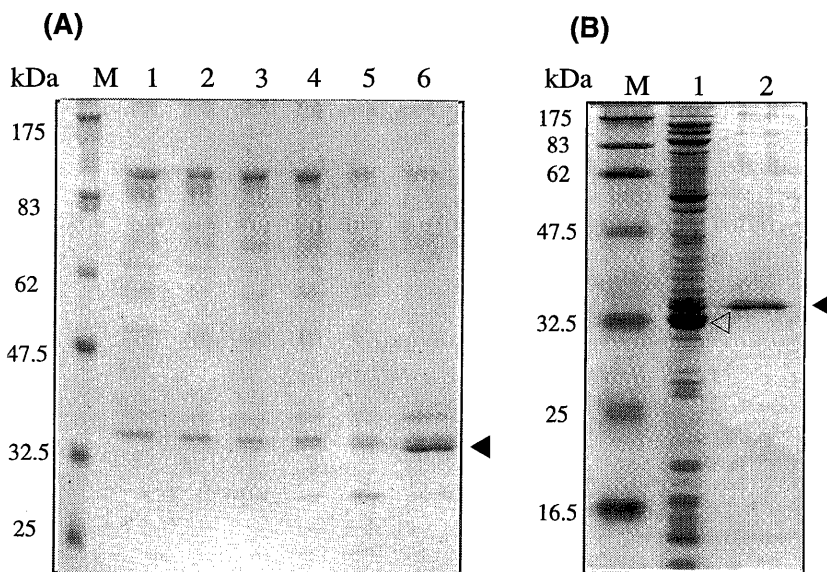


Fig. 2. Activation of GST-oryzasin 1 fusion protein. (A) Purified GST-oryzasin 1 was incubated in 0.1 mM acetate buffer (pH 3.3) at room temperature for 1 h to 24 h. Lane 1, 1 h; lane 2, 2 h; lane 3, 4 h; lane 4, 6 h; lane 5, 10 h; lane 6, 24 h. (B) Lane 1, bacterial total protein containing GST; lane 2, activated GST-oryzasin 1. The marker positions are shown on the right of the gels. Filled triangles indicate newly expressed fragments. Open triangle indicates GST.

ところ, GST のN末端配列と一致した。さらにこのフラグメントは GST よりも分子量が約 5 kDa 大きく, これはオリザシン 1 のプロ配列部分の分子量とほぼ一致することから, オリザシン 1 が自己消化的にプロ配

列を切断し, 活性型酵素に変換したと考えられる (Fig. 2B)。

至適 pH

活性化したオリザシン 1 を pH 1.5~6.5 の間で水解活性を測定した。オリザシン 1 は pH 3.0 で活性が最大となり, 4.0 でかなりの活性が減少したのち, 4.5 では激減する。弱酸性領域では, ほとんど活性は検出されなかった (Fig. 3)。

Table 1. Effect of various reagents on the activity of activated GST-oryzasin 1

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
Pepstatin	0.01	0
EDTA	1	92
Leupeptin	0.01	99
E-64	0.1	99
PMSF	0.5	97

Reactions were carried out with acid denatured hemoglobin as a substrate in 0.1 M acetate buffer (pH 3.3) at 37°C for 60 min.

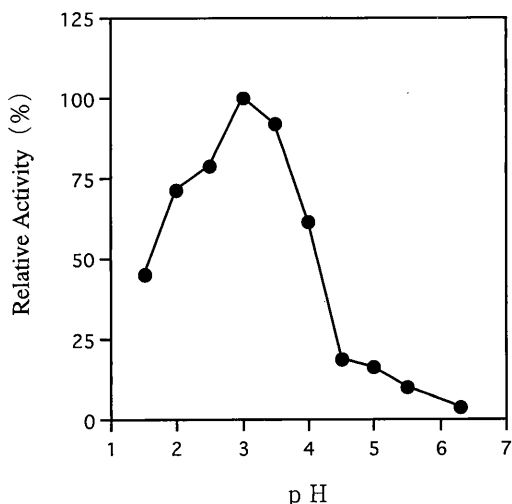


Fig. 3. pH dependency of the hemoglobin digesting activity of activated GST-oryzasin 1. 100 μ L of reaction mixtures containing 3.5 μ g activated GST-oryzasin 1 and 1% acid denatured hemoglobin at various pH were incubated at 37°C for 60 min.

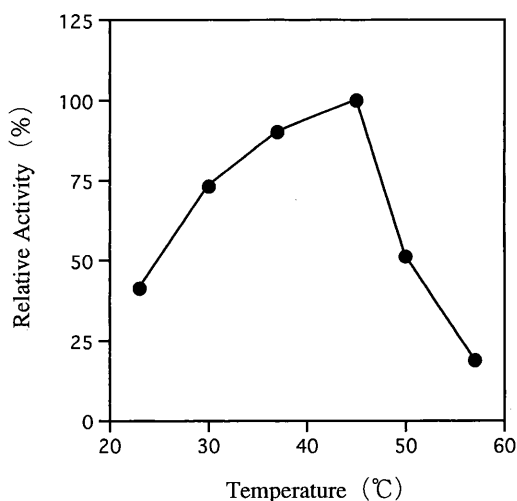


Fig. 4. Effect of temperature of activity of activated GST-oryzasin 1. 3.5 μ g of activated GST-oryzasin 1 were assayed in 100 μ L of 0.1 M acetate buffer (pH 3.3) containing 1% acid denatured hemoglobin at incubation ranging from 23 to 57°C.

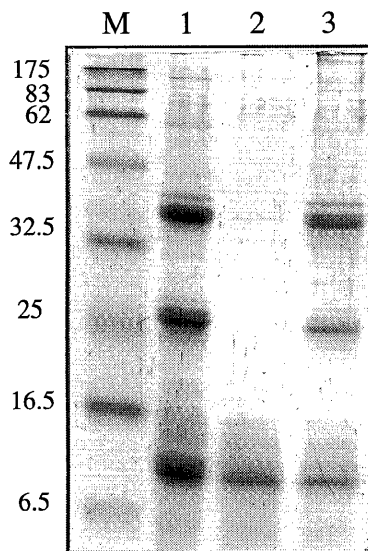


Fig. 5. Digestion of rice protein body with activated GST-oryzasin 1. Lane 1, intact protein body; lane 2, 12.6 μ g of protein body and 5.8 μ g activated GST-oryzasin 1 in 14 μ L of 0.1 M acetate buffer (pH 3.3); lane 3, 12.6 μ g of protein body and 5.8 μ g activated GST-oryzasin 1 in 14 μ L of 0.1 M acetate buffer (pH 3.3) containing 0.1 mM pepstatin. Both lane 2 and lane 3 were incubated at 37°C for 120 min.

至適温度

活性化オリザシンの至適温度は45°Cであったが (Fig. 4), 30°C, 37°Cでもかなりの活性を示した。しかし, 57°Cという高温では酵素活性は著しく減少した。

阻害活性

活性化したオリザシンは, 最終濃度0.01 mM のペプスタチンにより完全に活性は阻害され, 0.1 mM E-64, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF では影響を受けなかった (Table 1)。

コメのプロテインボディーの水解

オリザシン1をコメのプロテインボディーに作用させたところ, PBIIに存在するグルテリン画分のたん白質をよく水解したが, PBIの主要たん白質であるプロラミンにはほとんど作用しなかった (Fig. 5)。

考 察

オリザシン cDNA がコードするオリザシン1たん白質を大腸菌により発現させた。この酵素の至適 pH (ヘモグロビンを基質とした場合) は3.0であり, また, ペプスタチンによって活性が阻害されることから, アスパラギン酸プロテアーゼに属するものであることが確認された。

今回用いた発現プラスミドでは, オリザシンのプロ体を GST に融合したたん白質として発現させるように構築しており, この形のままで活性はなかった。そこで, GST オリザシン1融合たん白質を pH 3.3, 室温, 24時間の酸処理を行なったところ, プロテアーゼ活性が認められた。これは pH 3.3という条件下で, オリザシンのプロ体が活性型に変換したものと考えられる。

プロテアーゼのプロセッシングについては, プロセシ

ングエンザイムによって活性型に変換されるもの (トリプシンなど), 自己消化によって活性化するもの (ペプシンなど) がある。いずれも N 末端側に存在する約 50 アミノ酸残基のプロペプチドが除去されることによって生じる。ペプシンではプロペプチドには塩基性アミノ酸が多く, この電荷が静電的に活性中心の電荷を中和し, 不活性化していると考えられている。このプロペプチドの除去にはほかのプロテアーゼは必要ではなく, 自己触媒的分解によるとされている⁵⁾。カテプシン D の場合も, プロカテプシン D がカテプシン D に変換する際, 他のプロテアーゼは必要とせず, 酸性溶液中で自己消化により活性化するという報告がある⁶⁻⁸⁾。大腸菌で発現させた AP の再生に関しては, 数々の報告例があり, 酸処理を行うことによって活性化される例が多い⁹⁻¹¹⁾。

オリザシンは, 一次構造上, カテプシン D およびペプシンと高い相同性 (それぞれ45%, 41%) を有しており, プロペプチドには, Lys, Arg といった塩基性アミノ酸が多く含まれていることから, 同じ活性制御機構を有すると推定される。したがって, 今回の GST-オリザシン1融合たん白質も, 他の AP と同様に酸性溶液中でプロペプチドがはずれ, 活性型酵素となったものと考えられる。

しかしながら, SDS-PAGE のバンドの濃さを考慮すると, 発現したオリザシンのうち活性型に変換したものは数%であると考えられる。

オリザシン1はコメのグルテリンをよく水解したことから, 貯蔵たん白質のプロセッシングに関与している可能性がある。グルテリンは水不溶性のたん白質であり, オリザシン1がこのたん白質を pH 3.3の酢酸緩衝液中で水解したことは, コメの食味の改善や機能特性の改変に有効であると思われる。

要 約

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の下流にプロ型オリザシン1 (コメのアスパラギン酸プロテイナーゼ) を連結した発現プラスミドを構築し, GST-オリザシン1融合たん白質を発現させた。発現たん白質は封入体として蓄積したが, 界面活性剤を用いて可溶化したのちアフィニティー精製し, 天然型オリザシンと類似の性質を示す組換えオリザシン1を得た。そこで, コメのプロテインボディーを抽出し, これに組換えオリザシン1を作用させたところグルテリンをよく消化した。このことは, 水に不溶の食糧種実貯蔵たん白質の構造と機能の修飾にオリザシンが有効に利用される可能性を示す。一方, スキムミルクにオリザシンを加えると凝乳がみられることから, 乳素材の加工特性の改良にもこの酵素を利用しうる可能性が示された。

文 献

- 1) Watanabe H, Abe K, Emori Y, Hosoyama H and Arai S (1990) : Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J Biol Chem*, **266**, 16897-16902.
- 2) Domoto C, Watanabe H, Abe M, Abe K and Arai S (1995) : Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cysteine proteinases. *Biochim Biophys Acta*, **1263**, 241-244.
- 3) Asakura T, Watanabe H, Abe K and Arai S (1997) : Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds : purification, characterization, and application to milk clotting. *J Agric Food Chem*, **45**, 1070-1075.
- 4) 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.
- 5) Takahashi K and Kageyama T (1985) : Multiplicity and intermediates of the activation mechanism of zymogens of gastric aspartic proteinases. In : *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors. FEBS Advanced Course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY, pp. 265-282.
- 6) Erickson AH, Conner GE and Blobel G (1981) : Biosynthesis of a lysosomal enzyme : Partial structure of two transient and functionally distinct NH₂-terminal sequences in cathepsin D. *J Biol Chem*, **256**, 11224-11231.
- 7) Turk V, Lah T, Puizdar V, Babnik J, Kotnik M and Kregar I (1985) : Cathepsins D and E : molecular characteristics and mechanism of activation. In : *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors. FEBS Advanced Course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY, pp. 283-299.
- 8) Richo GR and Conner GE (1994) : Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem*, **269**, 14806-14812.
- 9) Emtage JS, Angal S, Doel MT, Harris TJR, Jenkins B, Lilley G and Lowe PA (1983) : Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 3671-3675.
- 10) Hill J, Montgomery DS and Kay J (1993) : Human cathepsin E produced in *E. coli*. *FEBS Lett*, **326**, 101-104.
- 11) Hill J, Tyas L, Kay J, Dunn BM and Berry C (1994) : High level expression and characterisation of Plasmepsin II, an aspartic proteinase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*, **352**, 155-158.