

食糧種実アスパラギン酸プロテイナーゼの生理学的意義と 酵素学的特性の解析

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

Analysis of Physiological Significances and Enzymatic Properties of Aspartic Proteinases Occurring in Food Seeds and Legumes

Keiko ABE¹ and Tomiko ASAKURA²

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

²Atomi Junior College, Tokyo 112-8687

ABSTRACT

Aspartic proteinases (APs) refer to proteinases that have aspartic acid residues at the active centers. These are widely distributed in animals, plants, and micro-organisms as their intracellular and extracellular enzymes. There are several plant APs besides oryzasin 1 we found in rice¹⁾, and they have been cloned at the protein as well as gene level. Plant APs, structurally different from animal and microbial APs, have a large insertion sequence that accounts for one fourth of the molecular size, though the significance of this interesting insertion for any plant AP remains to be interpreted. We have constructed a system for expression of oryzasin 1 by fusing its pro-form in the downstream of glutathione-S-transferase and have thus succeeded in obtaining an enzymatically active oryzasin 1 as a fusion protein²⁾. In the present study conducted in the past year, we used this expression system and produced an oryzasin 1 mutant whose insertion sequence had been deleted. Investigating the effect of the deletion on the enzymatic activity, we found that the mutant was activated as well as the wild oryzasin 1 under an optimally acidic pH condition, with the conclusion that the presence of this insertion is not necessary for the AP activity. However, we also observed that during the activation at the acidic pH, the mutant and the wild enzymes behaved differently. This suggests the possibility that the presence of the insertion may be involved in effectuating the processing of the pro-form into the mature AP and/or in stabilizing the mature form in plant tissues. A histochemical study using an anti-oryzasin 1 antibody is underway to verify this possibility.

¹⁾ *Eur J Biochem*, **232**, 77-83 (1995). ²⁾ *Rep Soy Protein Res Com, Jpn*, **18**, 15-20 (1997).
Soy Protein Research, Japan **1**, 13-18, 1998.

Key words : soybean, rice, aspartic proteinase, expression

*〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

アスパラギン酸プロテイナーゼ (AP) は、活性中心 (クレフト) に2つのアスパラギン酸残基が向かい合った形の双葉様の立体構造をとり、至適 pH を酸性領域に持つものが多く、ペプスタチン、ジアゾアセチル-D L- ノルロイシンメチルエステル (DAN)、1, 2- エポキシ-3- (p- ニトロフェノキシ) プロパン (EPNP) で活性が阻害をうける。AP は動物、植物、微生物の細胞内外に広く分布しており、消化酵素ペプシン、キモシン、血圧調節をするレニン、細胞内プロテオリシスを担うカテプシン D 等重要なものも多く存在している。

植物に存在する AP は、オオムギ¹⁾、コムギ²⁾、ソバ³⁾、コメ⁴⁾ 等の食糧種実をはじめとして数種の植物からたん白質が精製され、また cDNA クローニングにより、一次構造が明らかにされているものもある。植物 AP の構造上の大きな特徴として、分子内に分子量の約 4 分の 1 に当たる巨大インサクションをもつことがあげられる。しかし、最近クローニングされたオオムギ珠心細胞の退化時期に特異的に発現する AP 遺伝子、nuclesin は、プロ配列と植物 AP に特有のインサクションをもたない分子であり、植物 AP がすべてこのインサクションを有するものではないことが示された⁵⁾。インサクションに関しては細胞内ソーティングに関与している等の仮説がたてられているが、未だ解明されていない⁶⁾。我々はコメ AP であるオリザシン 1 の大腸菌を用いた発現系を確立し、インサクションを欠失したオリザシン 1 変異体を作製し、酵素活性への影響を検討した。

オリザシン 1 は登熟期および発芽初期のコメに多く発現していることが、ノーザン解析の結果からわかっている。登熟および発芽初期には貯蔵たん白質の分解やプロセッシングが盛んに行われている⁷⁾ が、オリザシンが種子内でどのような生理機能を果たしているかは全くわかっていない。そこで、オリザシンの抗体を作製し、種子内の所在を検討した。

方 法

発現プラスミドの構築

- 1) GST プロオリザシン 1 (GST-proOS1) 融合たん白質発現用プラスミドの構築:
阿部、朝倉の方法⁸⁾ に従って作製した。
- 2) インサクション欠失 GST プロオリザシン 1 (GST- Δ proOS1) 融合たん白質発現用プラスミドの構築:
オリザシン 1 の cDNA 配列のうちインサクション部分を欠失させたプラスミドを構築するために 1) で作製した GST-proOS1 融合たん白質発現用プラ

スミドを鋳型として Fig. 1 に示す 2 種のプライマー α (5' GCTGACTACCCCAGTAGCAC3')、および β (5' GGA GAATCATCTGTGGACTG3') を用いて PCR 法にて DNA を増幅した。末端を平滑化したのちライゲーションし、発現プラスミドを作製した。

たん白質の発現と精製

阿部、朝倉の方法⁸⁾ に従って発現し、精製した。

抗原ペプチドの作製

オリザシン 1 に対する抗体を作製するためにオリザシン 1cDNA より推定されるアミノ酸配列中 N 末端近傍配列 (GEGDIVALKNYMN) および C 末端領域配列 (DYGKMRVGFAKSA) の C 末端にシステインを加えた 14 アミノ酸残基のペプチドを合成した。2 種のペプチドを三坂ら⁹⁾ の方法でウサギに免疫し、抗原ペプチドを結合させたアフィニティーカラムで精製した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli¹⁰⁾ の方法にしたがった。

ウエスタン分析

アルカリフォスファターゼ標識抗ラビット IgG 抗体による酵素反応にて検出した。

酵素活性の測定

ヘモグロビンを基質とし、最終濃度 0.5% になるように緩衝液で希釈した。酵素液を加え、37℃、5 時間反応させたのち、等量の 0.4 M TCA を加えて反応を停止し水中に放置したのち 8,000 g で遠心し、上澄の 280 nm の吸光値を測定した。

発芽種子切片の作製

イネ種子は 1997 年東京大学田無農場にて収穫した日本晴を用いた。これを水洗い後、十分に吸水させた

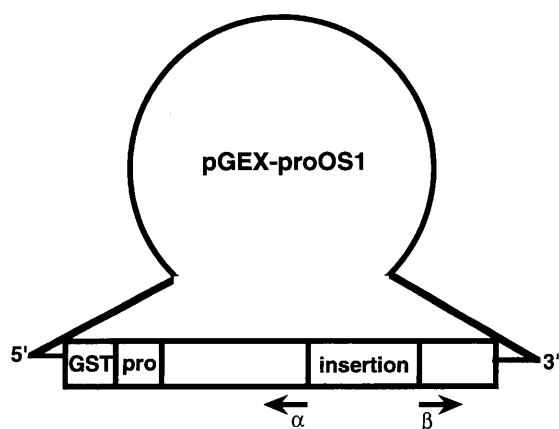


Fig. 1. Construction of expression plasmid for oryzasin 1 deletion mutant. α and β , anti-sense and sense primers, respectively.

脱脂綿に播種し、30℃で発芽させた。収穫後種子の部分縦、横に四分割し、10%ホルムアルデヒドを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。サンプルはO.C.T. compoundを用いて包埋し、液体窒素で凍結した。切片はミクロトームで10 μmに切断しスライドグラスに固定した。

組織染色

阿部らの方法¹¹⁾でおこなった。

結果と考察

GST-proOS1, GST-ΔproOS1の活性化

GST-ΔproOS1の酵素活性をヘモグロビンを基質として測定したが、GST-proOS1と同様酵素活性を示した。基質存在下では、GST-proOS1, GST-ΔproOS1ともほぼ同様のタイムコースを経て活性型酵素へと変換していくが、GST-ΔproOS1では52 kDaと54 kDaに明瞭なバンドが現われた。一方、GST-proOS1では新た

に58 kDa～66 kDaに不明瞭なバンド群が見られた。OS1を阻害するペプスタチンをこの系に最終濃度0.01m Mとなるように加えたところ、GST-proOS1, GST-ΔproOS1ともにこの系においては変化がなく、本酵素は自己消化により、活性型酵素に順次変換することがわかった (Fig. 2, Fig. 3)。

基質非存在下でpH 3.3, 室温, 24 h 処理をした場合、SDS-PAGEではGST-proOS1およびGST-ΔproOS1ともに約34 kDaに明瞭なバンドが現われ、GST-proOS1では、62～70 kDa付近にも弱いバンドが数本出現した。約34 kDa付近のバンドはGST-抗体とクロスすること及びGSTの分子量より5 kDaほど大きいことからGSTにプロ配列またはプロ配列の一部が繋がったものであると推定された。GST-proOS1に関してはN末端配列を解析し、GSTであることをすでに確認してある。これをウエスタン分析に供したところ (Fig. 4(B)), GST-proOS1は、GSTとの融合体及び56 kDa～68 kDa付近に複数のバンドが出現していたがGST-ΔproOS1では、

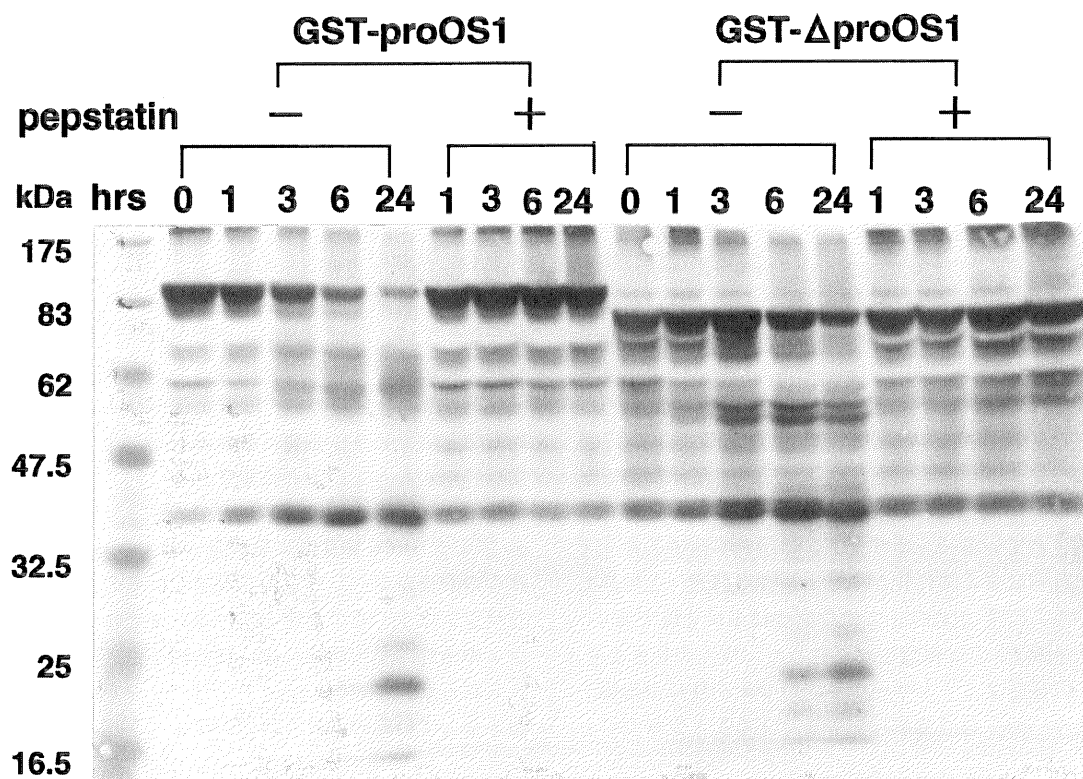


Fig. 2. Western blot analysis of GST-proOS1 and GST-ΔproOS1 with anti-oryzasin 1 antibody raised against the NH₂-terminal region. Conditions; pH 3.3, 37°C, 0, 1, 3, 6, 24 h. Substrate; 0.5% of acid denatured hemoglobin. Pepstatin was added at the concentration of 10 μM.

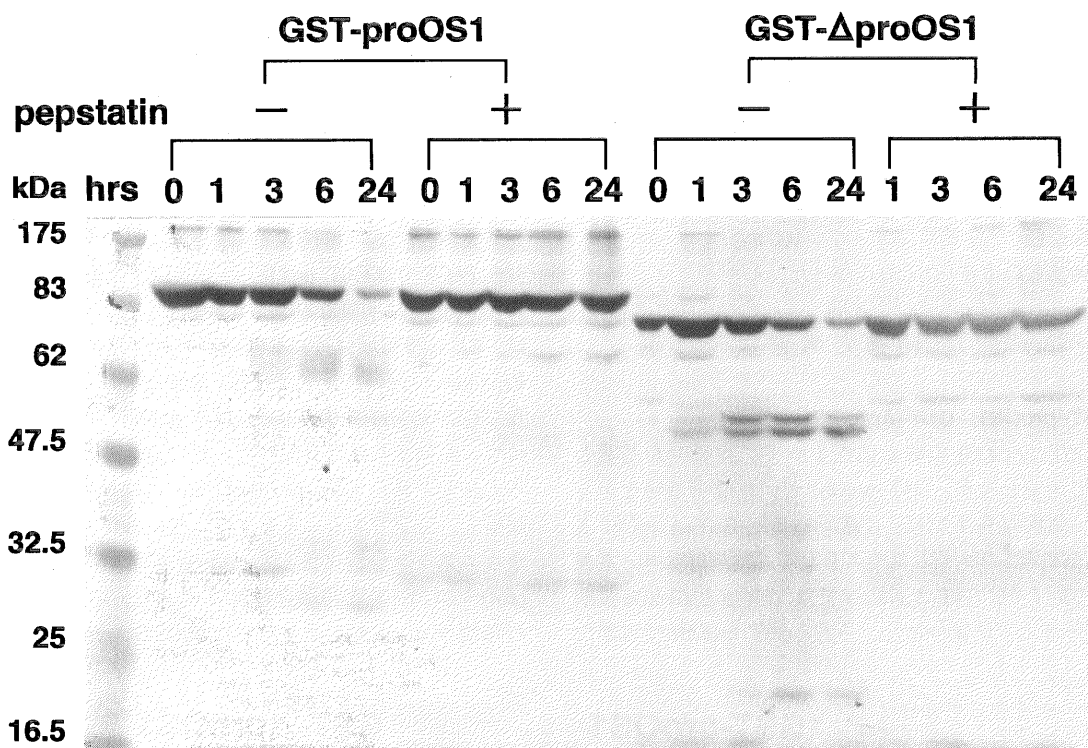


Fig. 3. Western blot analysis of GST-proOS1 and GST- Δ proOS1 with anti-oryzasin 1 antibody raised against the COOH-terminal region. Conditions; pH 3.3, 37°C, 0, 1, 3, 6, 24 h. Substrate; 0.5% of acid denatured hemoglobin. Pepstatin was added at the concentration of 10 μ M.

GST との融合体は消失しており約 55 kDa 及び数本の薄いバンドがあるのみであった。

消化酵素であるペプシンは、ペプシノーゲンとして分泌されたのち、自己消化によりプロペプチド部分が切断され、活性型へと転換していく。この際プロペプチドは、44 個のプロペプチドのうち、16 番目と 17 番目のペプチド結合を切断し、活性を有する中間体を経る段階的活性化と 1 段階で成熟型へと変換する経路が証明されている¹²⁾。オリザシンの場合も酸性条件下で自己分解による活性化が生じ、活性型酵素へと転換していく。GST- Δ proOS1 では中間体は 1～2 種であり、GST-proOS1 では複数種が存在した。以上の結果より、OS1 に存在するインサクションは酵素活性には影響を与えないが、自己分解に影響を与えることが推察された。

組織免疫染色

OS1 は *in vitro* でグルテリンを消化する。またノーザン分析の結果からは、発芽の初期である 3 日目、5 日目において mRNA の発現が多い。そこで発芽種子における OS1 の所在を検討した。約 30 mm に発芽したコ

メを OS1 抗体で染色した結果、アリューロン層から胚乳にかけて染色されている様子が観察された (Fig. 5)。発芽種子では、貯蔵でんぷんや貯蔵たん白質を分解して胚へ輸送し、エネルギー源等として利用する。オリザシン 1 の場合発芽の早い段階から mRNA が発現していることは、発芽に必要とされる N 源 (アミノ酸) の供給にかかわっていると推定される。同じくコメに存在するシステインプロテアーゼであるオリザインや、 α -アミラーゼも発芽期に発現量が増大する。しかしこれらの酵素がジベレリンの誘導を受けるのに対し、オリザシンは全くその影響を受けないことから、オリザシンの活性の発現調節には、別の因子が存在すると考えられるが、実際に *in vitro* でオリザシンがどのような働きをしているのかは今後の解明すべき課題である。

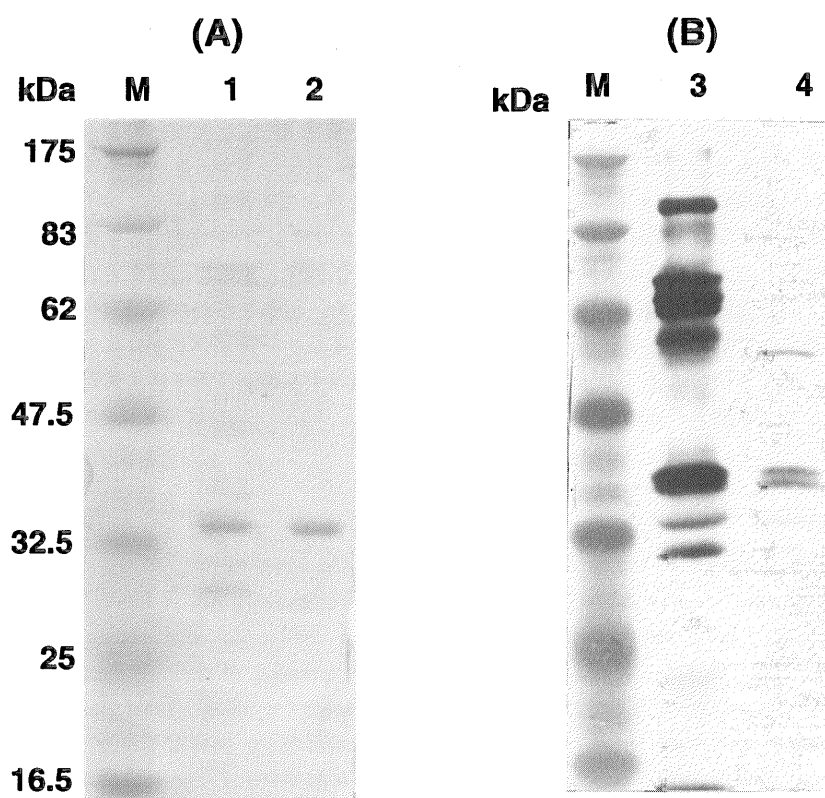


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blot analysis of activated GST-proOS1 and GST- Δ proOS1 with antibody against the NH₂-terminal region. Conditions; room temperature, 24 h, pH 3.3. (A) and (B), SDS-PAGE and Western blot analysis, respectively. Lanes 1 and 3, GST-proOS1, and lanes 2 and 4, GST- Δ proOS1, respectively.

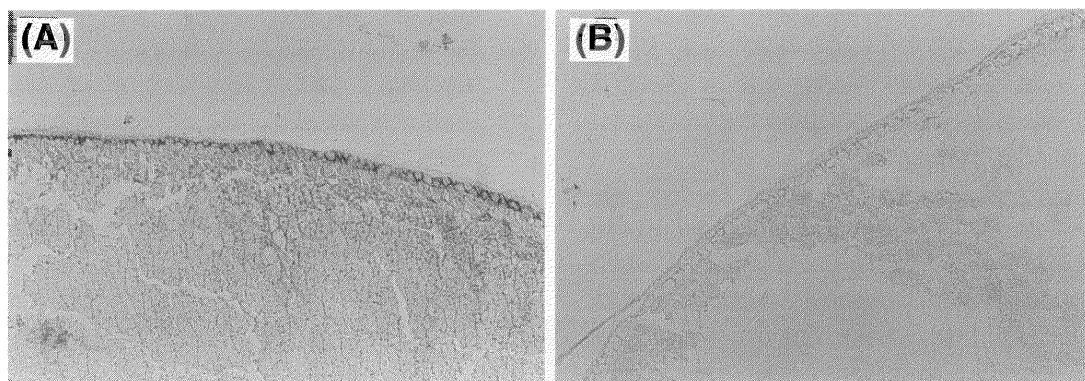


Fig. 5. Immunostaining of germinated rice seeds with anti-oryzasin 1 antibody raised against the NH₂-terminal region. (A), staining with the antibody. (B), staining without the antibody. Magnification; 400 times.

要 約

植物 AP は動物・微生物 AP と違って、分子内に分子量の約4分の1に当たるサイズの巨大インサクションをもつことがあげられる。このインサクションが植物 AP にとってどのような意味をもっているかは興味あるところである。我々はグルタチオン-S- トランスフェラーゼの下流にプロオリザシン1を融合した形で発現する系を確立し、活性型酵素を得ることに成功した。本年は、この系を用いてオリザシン1のインサクションを欠失させた変異型オリザシン1を作製し、その酵素活性に及ぼす影響を検討した。変異型も天然型と同様酸性条件下で活性化し、酵素活性を有したことから、インサクションが活性の出現に必須ではないことが判明した。しかしながら、活性化される過程で天然型と変異型とでは異なる挙動を示した。したがって、インサクションがプロ体から成熟体へのプロセッシングならびに成熟体の植物中での安定化等に関与する可能性が予想された。これを検証する一助として、本酵素の組織抗体染色を行った。

文 献

- 1) Törmäkangas K, Kervinen J, Östman A and Teeri T (1994): Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta*, **195**, 116-125.
- 2) Belozersky MA, Sarbakanova ST and Dunaevsky YE (1989): Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*, **177**, 321-326.
- 3) Belozersky MA, Dunaevsky YE, Rudenskaya GN and Stepanov VM (1984): Carboxyl proteinases from buckwheat seeds. *Biochemistry (USSR)*, **49**, 479-485.
- 4) 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.
- 5) Chen F and Foolad MR (1997): Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Mol Biol*, **35**, 821-831.
- 6) Guruprasad K, Törmäkangas K, Kervinen J and Blundell TL (1994): Comparative modeling of barley-grain aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity. *FEBS Lett*, **352**, 131-136.
- 7) Watanabe H, Abe K, Emori Y, Hosoyama H and Arai S (1991): Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J Biol Chem*, **266**, 16897-16902.
- 8) 阿部啓子, 朝倉富子 (1997): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 15-20.
- 9) Misaka T, Kusakabe Y, Emori Y, Gonoi T, Arai S and Abe K (1997): Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J Biol Chem*, **272**, 22623-22629.
- 10) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 11) Abe M, Abe K, Iwabuchi K, Domoto C and Arai S (1994): Corn cystatin I expressed in *E. coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *J Biochem*, **116**, 488-492.
- 12) 早石 修編 (1993): プロテアーゼとそのインヒビター: 生理的意義および病態との関連. グロビュー社.