

# 米および大豆の新規アスパラギン酸プロテイナーゼの開発と 食品たん白質修飾への活用

阿部啓子<sup>\*1</sup>・朝倉富子<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科

<sup>2</sup> 跡見学園女子大学短期大学部家政科

## New Aspartic Proteinases of Rice and Soybean Origin : Development and Application to the Modification of Food Proteins

Keiko ABE<sup>1</sup> and Tomiko ASAKURA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

<sup>2</sup> Laboratory of Food Science, Atomi Junior College, Tokyo 112-8687

### ABSTRACT

A number of proteinases occur in food plant seeds. These enzymes play a crucial role in the metabolism of seeds by processing newly synthesized proteins into mature forms during ripening and by decomposing storage proteins into amino acids during germination. However, details of plant proteinases are not so well known as those of animal proteinases including pepsin as a digestive enzyme, cathepsins D and E which are involved in the intracellular protein catabolism, and renin as a blood pressure-controlling enzyme. The aspartic proteinases (APs) of plant origin which, structurally different from those of animal, insect and microbial origins, are each characterized by bearing a ca. 100-amino acid insertion in the C-terminal region. A good example can be provided by rice APs (Oryzasins I-IV) and cardon AP which is contained in an extract of this flower and used for milk clotting to make cheese in Portugal. Considering such a background, we carried out experiments of finding out a new AP that may occur in soybean as well. We first screened cDNA libraries constructed from ripening and germinating rice seeds and thus obtained several independent clones encoding APs. These were found to share 60-80% similarity to one another, each conserving the insertion which characterizes to APs of plant origin. Since one of cloned APs, named soy APa, was most different from oryzasin 1, we tried to express the protein by transformation into *E. coli*, with a satisfactory result. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 11-15, 1999.

Key words : aspartic proteinase, soybean, expression

---

\*〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

食糧種子は、炭水化物等のエネルギーの供給源であると同時にたん白質の供給源でもある。その中でも大

豆は重要なたん白質源であり、大豆たん白質は、大豆の加工特性に密接な関係をもつ。大豆の貯蔵たん白質の約70%は $\beta$ -コングリシニンとグリシニンで占められているが、これらの遺伝子は、mRNAに転写されたのち、翻訳され、前駆体として合成されたのち、修飾をうけて成熟型へと変換する。大豆グリシニンの3種類の種子たん白質の成熟化に関わるチオールプロテアーゼなども見いだされている。また、発芽に際しては、これらの貯蔵たん白質を分解して幼植物体に供給するプロテアーゼが存在する。発芽期にその働きがよく調べられているプロテアーゼはシステインプロテアーゼであり、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素と同様、アリユーロン細胞において合成、分泌されることは古くから知られていた。チオールプロテアーゼに関する知見は多く得られていたが<sup>1)</sup>、近年になって、活性中心にアスパラギン酸残基を有するアスパラギン酸プロテアーゼ (AP) に関して、種子から精製され<sup>2,3)</sup>、その生理機能も解明されつつある<sup>4-6)</sup>。今回主要な食糧種子である大豆のAPをクローニングし、酵素学的性質および発現生産を試み、食品加工へと応用するための基礎データを得ることを目的とした。

## 方 法

### 大豆 cDNA ライブラリーからの AP クローンの単離

大豆 cDNA ライブラリーはベクターとして  $\lambda$ gt11 を用いたもので、CLONTECH 社より購入した。宿主菌として K12 株の誘導体である C600Hfr<sup>-</sup> を使い、約 30 万プラークのナイロンフィルター (バイオダイナ A, BNG タイプ, PALL 社) にトランスファーした。プローブには Soy AP $\alpha$  の RT-PCR 断片 (約 300 bp) を使い、<sup>32</sup>P ラベルをした。ハイブリダイゼーションを 55°C, 24 時間行ったのち、フィルターを 0.1% SDS を含む、2XSSC にて洗浄した。

### 塩基配列の決定

陽性となったシングルクローン 22 個をピックアップし、ファージ DNA を抽出した。これを *Eco*RI 処理したのち pUC18 にサブクローニングし、Dye Terminator 法にて塩基配列を決定した。

### Soy AP $\alpha$ の発現用プラスミドの構築

cDNA クローンとして単離された Soy AP $\alpha$  を発現させるためのプラスミドを構築するために 2 種のプライマーを合成した。5' 側のプライマーとして、5'-GCGAATTCCCGATAATGTTAGGAACGCAAGAG-3' (*Eco*RI サイトを含む 32mer)、3' 側プライマーとして、

5'-ATCTCGAGTTAGACTGCTTCGGCAAAGCCAAC-3' (*Xho*I サイトを含む 32mer)。cDNA ライブラリーからクローニングされた  $\lambda$ Soy AP7 $\alpha$  をテンプレートとして増幅を行い、発現ベクター pGEX-5X-2 へ組み込んだ。

### GST-Soy AP $\alpha$ たん白質の発現

上記のようにして構築した GST, Soy AP $\alpha$  融合たん白質発現用プラスミドを大腸菌 AD202 に導入した。阿部らの方法 (*Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **18**, 15-20, 1997) にて形質転換した菌を培養し、菌体に蓄積された GST-Soy AP $\alpha$  の発現を確認したのち、界面活性剤を用いてこれを可溶化させた。

### GST-Soy AP $\alpha$ の精製

菌体より可溶化させた融合たん白質をグルタチオンセファロース 4B を用いて精製した。

### 酵素活性の測定

ヘモグロビンを 0.5% 含む pH 3.3 酢酸緩衝液にアプティン精製をした GST-Soy AP $\alpha$  を加え、37°C にて 60 分間反応させたのち、等量の 0.4 M TCA を加えて反応を止め、上澄の A280 を測定した。1 unit は、本条件で吸光度が 0.01 増加するものとする。

## 結果と考察

### 大豆 AP cDNA クローン

約 30 万プラークのうち、陽性クローン 22 個を得た。この中で、AP をコードしていると思われる 14 個について塩基配列の決定を行った。最も長いクローン  $\lambda$ cSoy AP7 $\alpha$  の塩基配列および推定アミノ酸配列を Fig. 1 に示す。 $\lambda$ cSoy AP7 $\alpha$  は 1653 bp であり、488 アミノ酸をコードしていた。コメ AP であるオリザシン 1 との相同性の比較から開始 Met から約 41 残基のアミノ酸を欠いていると推定された。AP に保存されている活性中心の Asp は 63 番目および 250 番目のアスパラギン酸で、各々の活性中心近傍の配列は FDTGS, AIVDSGT となっており、既知の AP の活性中心近傍配列が保存されていた。植物 AP の特徴であるインサクション (286Gln から 382Glu) も存在した。また、糖鎖付加シグナルは 3 カ所存在した。14 個の陽性クローンのうち、 $\lambda$ cSoy AP7 $\alpha$  と同一のクローンをコードしているものが最も多く 5 個存在し、さらに数種の AP をコードするクローンが存在した。Soy AP $\alpha$  を既知の AP と比較するとオリザシン 1 とは 61.0%、フィテブシン (オオムギ AP) とは 61.6% と植物由来の AP との相同性は約 60% であるが、ヒューマンカテプシン D 45.5% 酵母プロテイナーゼ A 44.5% 等、動物由来および微生物由来の AP とは低い相同性を有していた。

ATTCGGATAATGTAGGAACCGAAGAGAGGCTCTAAGATCTGTAGACCAATGATGGTGCACATGATCAGTTTATTTGGTAAGTCAAAGGTGAAGATATAGTACCTTTGAAGAATTAT 120  
 I P D N V R N A R E G L R S V R P M M G A H D Q F I G K S K G E D I V P L K N Y 40  
 TTGGACGCTCAATATTTTGGTGAGATGGAAATGGCACACCCCAAGCCCTTCACTGTAGTGTGTGACACTGGGAGTTCCAACTTTGGGTCCATCATCAAGTGTACTTTACTCTT 240  
 L D A Q Y F G E I G I G T P P Q P F T V V F D T G S S N L W V P S S K C Y F T L 80  
 GCTTGCATATACCAATAATTTGGTACACGGCTAAGAAATCAAGACACATGTCAAAAATGGAACCTTCATGTAAATAAACTATGGAACCTGGATCAATATCTGGTTCTTCACTCAAGATAAT 360  
 A C Y T H N W Y T A K K S K T H V K N G T S C K I N Y G T G S I S G F F S Q D N 120  
 GTTAAAGTTGGCAGTGTCTGTCTCAAGCATCAGGATTTTCTTGAAGCTACCCACGAAGGAAGTCTTACCTTTCTGTGACGAAGTTCGATGGAATCTGGGACTTGGATTTTCAGGAGAT 480  
 V K V G S A V V V K H Q D F I E A T H E G S L T F L S A K F D G I L G L G F Q E I 160  
 TCAGTTGAAATGCTGTCCCGTATGGTTCAAAATGGTGGAGCAAAAACCTTATCAGTGAGAAGGTGTCTCTTTTGGCTTAATGGGGATCCGAATGCGAAAAAGGTGGTGAATTAGTT 600  
 S V E N A V P V W F K M V E Q K L I S E K V F S F W L N G D P N A K K G G E L V 200  
 TTTGGTGGTGTGACCAAAAGCACTTCAAAGGAACACCACTTATGTTCCAATTTACTGAAAAGGTACTGGCAGATTGAAATGGGAGATTTTTCGTGGAGTGTGTTCACAGGTGT 720  
 F G G V D P K H F K G N H T Y V P I T E K G Y W Q I E M G D F F V G G V S T G V 240  
 TGTGAGGTTGGTGTCTGTCTATTTGGATTCAGAACATCTTTGCTTGTCTGCTCAACTCTGTGTGGCTGAAATCAACCATGCCATGGAGCTGAAGAGTTCTCAGTGTAGAATGT 840  
 C E G G C A A I V D S G T S L L A G P T P V V A E I N H A I G A E G V L S V E C 280  
 AAGGAAGTCTTCTCAATATGGAGATTGATATGGGATCTCTTGGTATCAGGGGTGAAACCATGACATATGTTTCAAGTTGGTTTATGTTCTTCCAAAAGGCATCAATCTAAGAGT 960  
 K E V V S Q Y G E L I W D L L V S G V K P D D I C S Q V G L C S S K R H Q S K S 320  
 GCTGGAATGAAATGGTGAAGTGAAGGAACAGGAGTTGGCAGCGAGAGATCTCTTTTGTGTCTTCTGTGAGATGCTGTCTTCTTGGATCCAGAATCAACTAAACAAAAGGCA 1080  
A G I E M V T E K E Q E E L A A R D T P L C S S C O M L V L W I Q N O L K Q K A 360  
 ACGAAGGACAGAGTATTTCAACTATGTAATCAACTGTGTGAGAGCTGCCAAGTCCATCTGGAGAGTCAAGTATAAGCTGTAATAGTCTTTTCCAAAGATGCCAAACATTTACGTTTCAATTT 1200  
T K D R V F N Y V N Q L P S E S L P S G E S V I S C N S L S K M P N I T F T I 400  
 GGAAATAAACCTTTTGTCTCTACACGAGCAGTATATTTCAAGAACTGGAGAAGGCATACAGAAGTCTGCCCTTAGTGGGTTTATTTGCTTTTGTATGTTCTTCTCCAAAAGGTCCATTG 1320  
 G N K P F V L T P E I L R T G E G I T E V C L S G F I A F D V P P P K G P L 460  
 TGGATTCTTTGGCGATGTTTTCATGAGGTCATATCACACCGCTTTTGTATGGAATCTTCAAGTTGGCTTTGCCGAAGCAGTCTAATTTACGCTTTCTGGAGGATTTTCTTTGTAAATTT 1440  
 W I L G D V F M R A Y H T V F D Y G N L Q V G F A E A V \* 488  
 GTTAAAGCTGTGTAATAAGCTGTATATATGTAGCTCTGTCTTCTTGAACACGAAATGATTTATCCATTTAAGACGTAGAAGTATCCCACTTCAAGATGTTGTGTCTCTTTTGA 1560  
 TATGAAAAACCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCTCTAGAGTCGACCTGCAGGACGCAAGCTTGGCACTGGCNGTCGTTTATACAC 1653

Fig. 1. Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of Soy AP $\alpha$ . The nucleotide sequence contained in the cDNA clone, *lcSoyAP7 $\alpha$*  is shown in upper lane and the deduced amino acid sequence is shown in lower lane. Open triangle indicates putative N-terminal of matured Soy AP $\alpha$  protein, shaded triangle is active center of Soy AP $\alpha$ . Plant specific insertion is doubly underlined. The crosses indicate potential N-glycosylation site.

Table 1. Comparison of deduced amino acid sequence of Soy AP $\alpha$  to other APs

|                 | (%)  |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                 | BAP  | CAP  | HCD  | RAP  | YPA  | BC   | RR   | RNAP |
| Soy AP $\alpha$ | 61.6 | 61.0 | 45.5 | 61.0 | 44.5 | 42.0 | 46.9 | 36.4 |

BAP, barley AP; CAP, cardoon AP; HCD, human cathepsin D; RAP, rice AP; YPA, yeast proteinase A; BC, bovine chymosin; RR, rat renin; Rnap, rhizopuspepsin

(Table 1). オリザシン 1 はフィテプシン, サイプロシンとの相同性が 85%, 69% と非常に高い相同性を示すのに比べると, Soy AP $\alpha$  は, 植物 AP 群の中では他の AP と遠縁ではないかと推定された. 相同性と機能特性の違いとが関連のあるものかどうかは解明されていないが, たん白質レベルでは分離が不可能なものでも遺伝子工学的手法を駆使することで分子間の機能の違い等を解明することが可能になる. そこで次に Soy AP $\alpha$  を大腸菌を用いて発現させることを試みた.

## GST-SOY AP $\alpha$ の発現と酵素活性

GST 融合たん白質として AD202 菌を用いて発現させた. 融合たん白質は SDS-PAGE で約 80 kDa の位置に泳動され, 高発現量が確認された. 菌体内に蓄積されたこのたん白質を可溶化させてアフィニティー精製を行ない, ほぼ単一のバンドがえられた (Fig. 2). 本酵素を pH 3.3 でヘモグロビンを基質として反応させたが, 活性を示さなかった. そこで, これを酸処理し, 活性化させることを試みた. 精製した GST-Soy AP $\alpha$  を pH

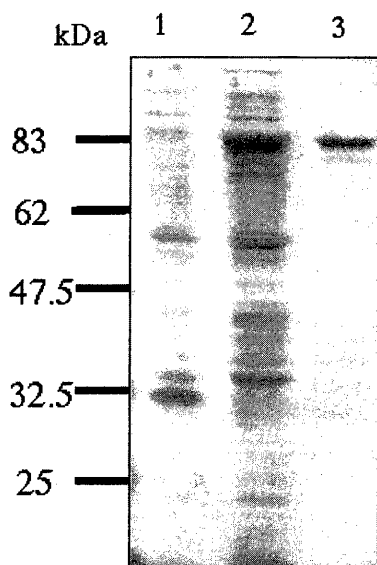


Fig. 2. Expression and purification of GST-Soy AP $\alpha$  fusion protein. Lane 1, total bacterial protein containing GST; lane 2, total bacterial protein containing GST-Soy AP $\alpha$ ; lane 3, purified GST-Soy AP $\alpha$  with glutathione affinity column.

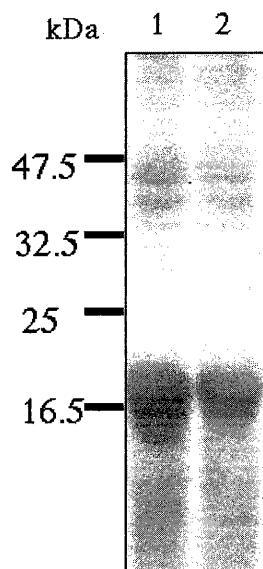


Fig. 3. Digestion of hemoglobin with activated GST-SoyAP $\alpha$ . Lane 1 containing 0.01 mM pepstatin and lane 2 without pepstatin. Both lane 1 and lane 2 are incubated at 37°C, pH 3.3 for 24 h.

3.3 室温にて経時的に活性を測定していった。48 時間後、わずかに酵素活性の出現がみられた (3 units)。酵素活性の出現を確認するために、48 時間処理後の酵素を、ヘモグロビンを基質としてペプスタチンを含む系と含まない系とで 37°C, 24 時間反応させた。Fig. 3 に見られるように明らかに AP による水解が見い出された。しかしながら、反応系に加えた酵素量を考慮すると、活性型酵素に変換した量は著しく少ない。

今回発現させた Soy AP $\alpha$  は、プロ配列を約 20 アミノ酸残基欠いているクローンであり、この点で活性化型への変換に影響が現れている可能性もあるが、明確ではない。

Soy AP $\alpha$  は、ノーザン分析の結果から、種子のみでなく、根、茎、葉など植物体全体に発現しており、生理機能の根本的な作用の担い手である可能性があり、今後詳細な解析が期待される。

## 要 約

食糧種子には多くのプロテアーゼが含まれている。これらの酵素は種子内の代謝に関与しており、登熟期には貯蔵たん白質の成熟化を、発芽時には貯蔵たん白質の分解を担っていると予想される。動物では消化酵素ペプシン、細胞内たんぱく質分解に関与するカテプシン D, E、血圧調節と密接な関わりを持つレニン等、各々が異なる生理機能を担っているものの、植物体におけるプロテアーゼに関する知見は少ない。その中でアスパラギン酸プロテアーゼ (AP) は、近年一次構造が微生物、動物、昆虫とは異なり C 末端領域に約 100 アミノ酸残基からなるインサーションを持つという特徴ある構造を持っている。このうち、コメ、カルドン (ポルトガルではこの花の絞り汁をヒツジのミルクに加えて凝乳させる) では、複数種の AP 分子の存在が明らかになっている。今回大豆の発芽

および登熟期の種子より作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングし, AP をコードする複数種のクローンを得た。これらは既知の植物 AP 群とは相同性が低いものもあり, 互いに 60 から 80% の相同性を有し, 植物 AP に特徴とされるインサクションはすべてのクローンで保存されていた。大豆の AP のうち, オリザシン 1 (コメ AP) と相同性の低いクローン Soy AP $\alpha$  について大腸菌を用いてたん白質の発現を試み好結果を得ている。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) Heather MB and Dianna JB (1983) : Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates. *Plant Physiol*, **72**, 345-350.
- 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) Törmäkangas K, Kervinen J, Östman A and Teeri (1994) : Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta*, **195**, 116-125.
- 5) Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1997) : An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur J Biochem*, **246**, 133-141.
- 6) Mutlu A, Pfeil JE and Gal S (1998) : A probarley lectin processing enzyme purified from *Arabidopsis thaliana* and seeds. *Phytochemistry*, **47**, 1453-1459.