

論文の内容の要旨

論文題目 コメのアスパラギン酸プロテアーゼ「オリザシン」に関する研究

氏名 朝倉富子

コメは世界中で栽培され、世界人口の4分の1の食糧として消費されている穀物であり、何千年の間、高品質、高収量のコメを目指して改良が進められてきた。コメは、人類にとって重要な作物であるにもかかわらず、分子生物学的研究は立ち遅れていたが、近年になってイネ核ゲノムの解析が進み、生体としてのイネの姿が次第に明らかにされつつある。コメ中には、グルテリンをはじめとする貯蔵タンパク質が約7%存在し、タンパク質源としても重要な種子である。しかし、種子中のタンパク質のプロセッシングや分解を担うプロテアーゼに関する研究はごくわずかであり、システインプロテアーゼ(CP)についての報告があるのみである。コメのCPはオリザインと呼ばれ、コメの発芽期に多く発現し、芽生えに伴う貯蔵タンパク質の分解に関与すると言われている。しかし、他の種類のプロテアーゼに関しての報告例はほとんどない。そこで本研究では、コメ中にCPに次いで多量に含まれ生理的にも重要な役割を持つと予想されるアスパラギン酸プロテアーゼ(AP)に着目した。APは、動物や微生物においては、細胞内、細胞外にあってタンパク質のプロセッシング、消化、生理活性ペプチドの生成等、生理的にも重要なものが多い。植物体内においてもその存在意義は大きいことが予想される。そこで本研究では、コメAPに関して遺伝子工学的的手法およびタンパク質工学的的手法を用いて植物生理学的意義を解明することを目的として解析を行った。以下に、その概要を述べる。

第1に、コメよりAPをコードするcDNAクローンのスクリーニングを行った。RT-PCRにより、APをコードする3種類のクローン pL1, pL4, pL5を得た。これらのクローンはアミノ酸配列で互いに58~76%の高い相同性を有し、他の植物APとも58~80%と高い相同性を有していた。しかし、pL1, pL4, pL5は、動物、微生物APとは35~45%と相同性は比較的良かった。3種のクローンをプローブとして開花2週目の種子から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長2027 bpよりなるAPの配列をコードするcDNAクローンを単離した。本クローンはpL1, pL4, pL5のいずれとも異なるアミノ酸配列をコードしており、そのタンパク質をオリザシン1と命名した。オリザシン1は509アミノ酸残基から成り、約20アミノ酸残基のシグナル配列とそれに続く47アミノ酸残基のプロ配列を有し、活性中心となるアスパラギン酸残基周辺配列は他のAPと同様高度に保存されていた。オリザシン1は、オオムギAPであるHvAPと最も相同性が高く、成熟型酵素部分は88%という非常に高い値であった。オリザシン1の大きな特徴は、既知の動物、微生物APには存在しない104アミノ酸残基からなる巨大インサクションをC末端領域に有していることである。植物(コメ、オオムギ、カルドン)由来のAPにはすべてこのインサクション領域が存在していたが、この領域の機能については解明されていない。

オリザシン1 mRNAの発現時期をノーザン分析により調べたところ、開花直後から生合成が始まり、開花2週目に発現量は最大となって、種子が熟するまでの登熟の間発現量は多いが、完熟種子では著しく減少した。一方、発芽期にあっては、発芽初期の種子および芽では発現量が多いが次第に減少し、発芽7日目ではほとんど検出されなかった。コメの主要貯蔵タンパク質であるグルテリンmRNAは開花後3週目に発現量が最大となるが、オリザシン1はこれに先立ち登熟初期から発現し、完熟に至るまでの間発現量は多く、オリザシン1が貯蔵タンパク質のプロセッシングを行っている可能性が示唆された。

第2に、オリザシン1の遺伝子構造について解析を行った。オリザシン1遺伝子は約6.7 kbpからなり、14のエキソンより構築され、したがって13個のイントロンで分断されていた。活性中心の2つのアスパラギン酸残基は第2エキソンと第8エキソンに由来していた。オリザシン1遺伝子には5'-ノンコーディング領域に第1イントロンが挿入され、また、14エキソン・13イントロン構造であったという点で、9エキソン・8イントロン構造の動物AP遺伝子や微生物AP遺伝子等、既知のAP遺伝子とは著しく異なっていた。オリザシン1遺伝子は、植物APとして初めて解析されたものであり、他の植物APとの比較はできないが、動物・微生物AP遺伝子とはイントロンの挿入位置に関しても、全く一致しなかった。オリザシン1には104アミノ

酸残基からなる動物・微生物APには存在しないインサクションがあり、この領域はオリザシン1遺伝子上では3つのエキソンに分かれてコードされていることが、明らかになった。

一般にAPはN末端およびC末端領域の類似する2つのドメインから構成され、X線結晶解析の結果から、双葉様三次構造をとることが明らかとなっている。また、AP遺伝子の構築過程に関しては、ヒトレニン遺伝子の解析より、gene duplicationが生じた後、融合することによって、現在の形が形成されたという説が出されている。しかし、オリザシン1遺伝子の構造は、この仮説とはほど遠いものであった。すなわち、植物AP遺伝子は、APの基本骨格形成のためのgene duplicationが生じた後動物や微生物APと分かれ、C末端領域にのみ大きなインサクションが挿入され、その後独自の進化過程を辿りながら、イントロンの獲得と欠落が生じて現在の形の遺伝子構造が形成されたものと考えられる。

以上、遺伝子レベルでの解析により、植物APに関する多くの知見を得ることができたが、実際にコメ中におけるオリザシンの性質を解明するためには、そのタンパク質を完熟種子より抽出、精製することが不可欠である。そこで、第3に、オリザシタンパク質を各種クロマトグラフィーを用いて精製した。精製オリザシンは、AP特異的阻害剤であるペプスタチンで完全に阻害されたが、他のプロテアーゼインヒビターでは全く阻害を受けず、アスパラギン酸プロテアーゼであることが確認された。精製オリザシンの分子質量は57kDaで、cDNAから推定される分子質量より数kDaも大きくなっていった。その理由として、オリザシン1cDNAには、2カ所の糖鎖付加部位 NHT²⁹⁴、NKT⁴⁰² が存在し、糖鎖が付加している可能性が考えられる。また、ヘモグロビンを基質とした際の水解至適pHは3.0で、4.0を超えるると著しく活性が低下した。活性の温度依存性を23℃～57℃で測定したところ、50℃までは温度の上昇とともに活性も上昇するが、50℃を超えると急激に減少した。

ノーザン分析によるオリザシン1の発現パターンをみると、これが登熟期に多く発現し、完熟になるとほとんど発現しなくなる。しかし、完熟種子では、明らかにAP活性をもつオリザシンが存在した。これらのことから、オリザシンは、登熟中に種子内で生合成され、不活性のプロ体として完熟種子中に蓄積される。成熟型酵素への変換は何らかのシグナル（例えば活性型オリザシンによるプロ配列の切断）が引き金になると推定される。

第4に、植物APの持つ特異的な構造と酵素学的性質の相関について調べるために、オリザシン1タンパク質を大腸菌で発現させ、活性化機構の解析を行った。方

法としては、GST(glutathione S-transferase) 融合タンパク質としてオリザシン1を大腸菌で発現させた。オリザシン1の活性化は*in vivo*でのオリザシンの活性化を知る上で重要な情報を与えてくれるはずだからである。現実には、GSTに融合させた形で発現させたプロ体オリザシン1は、pH 3.3という酸性条件下で24時間処理することで成熟型となり、プロテアーゼ活性が生じた。すなわち、プロ体のオリザシン1は酸性条件下で自己触媒的に活性型に変換されることを明らかにした。活性型オリザシン1は至適pHが3.0で、コメより精製したオリザシンと同様のpH依存性を示した。

以上の研究を総合し、植物細胞内でのオリザシンの代謝回転について考察すると、オリザシン1は至適pHが酸性領域にあることから、植物細胞内における局在は酸性オルガネラである液胞、プロテインボディーまたはエンドソームなどであろうと推定される。オリザシン1は、他のプロテアーゼと同様、粗面小胞体膜上で生合成され、ゴルジ複合体を經由して液胞へと選別輸送され、液胞内で成熟型オリザシンへと転換されると思われる。液胞内では、プロ型オリザシンと成熟型オリザシンの両方が存在し、プロ型オリザシンは液胞内の酸性条件下で活性型となり、細胞内タンパク質の消化、プロセッシング、異物代謝等に関与すると考えられる。

最後にオリザシンの応用面での研究について付記する。オリザシンに関して遺伝子解析、大腸菌での発現、また酵素の精製といった仕事を行ってきた過程で、多くの凝乳酵素がAPであることに鑑み、オリザシンの凝乳酵素としての可能性を模索した。その結果、オリザシンは、スキムミルク溶液をカルシウムイオン存在下で凝固させ、 κ -カゼインを限定分解することを見出した。完熟イネ種子に存在するオリザシンを凝乳酵素として利用することは、安全で、安価で、しかも、安定供給が確保されているという面でも有益であろう。

以上、本研究は、オリザシンの発見、植物生理学的意義の解析、そして、凝乳酵素への応用の可能性の示唆を通じ、プロテアーゼ研究における新たな展開の一助として寄与しようと考えている。

1. Introduction
2. Methodology
3. Results
4. Discussion
5. Conclusion

The study was conducted in a laboratory setting. The participants were recruited from a local university. The experiment was designed to measure the effect of the independent variable on the dependent variable. The results showed a significant positive correlation between the two variables. The discussion highlights the implications of these findings for future research. The conclusion summarizes the main points of the study.

The data was analyzed using statistical software. The results are presented in the following tables and figures. The first table shows the mean values for each condition. The second table shows the standard deviations. The third figure is a line graph showing the trend of the data over time. The overall findings suggest that the independent variable has a strong influence on the dependent variable.

The study was limited by a small sample size and a short duration. Future research should aim to address these limitations by increasing the number of participants and extending the time period. The findings have important implications for the field of research and should be further explored.

コメのアスパラギン酸プロテアーゼ

「オリザシン」に関する研究

朝倉富子

②

コメのアスパラギン酸プロテアーゼ
「オリザシン」に関する研究

平成 8 年

朝倉 富子

目次

第1章	序論	1
第2章	コメのアスパラギン酸プロテアーゼ（オリザシン）の cDNA クローニング	14
第1節	緒言	15
第2節	RT-PCR によるコメアスパラギン酸プロテアーゼの cDNA フラグメントの解析	15
1.	材料および試薬	
2.	実験方法	
3.	結果および考察	
(1)	cDNA フラグメントの塩基配列及び推定アミノ酸配列の決定	
(2)	他のアスパラギン酸プロテアーゼとの相同性	
(3)	ゲノミックサザン分析	
第3節	登熟イネ種子 cDNA ライブラリーからアスパラギン酸 プロテアーゼ cDNA クローンの単離	37
1.	材料および試薬	
2.	実験方法	
3.	結果および考察	
(1)	制限酵素地図の作製	
(2)	cDNA クローンの塩基配列と推定アミノ酸配列の決定	
(3)	他のアスパラギン酸プロテアーゼとの相同性	
第3章	オリザシン mRNA の発現	47
第1節	緒言	48
第2節	材料および方法	48
第3節	結果	51
1.	オリザシン 1 mRNA の発現時期	
2.	RT-PCR クローン pL5 の発現時期	
3.	各種植物ホルモンの効果	
第4節	考察	52

第4章	オリザシン1の遺伝子解析	54
第1節	緒言	55
第2節	材料および方法	56
第3節	結果および考察	56
1.	クローンの単離と制限酵素地図の作製	
2.	オリザシン1遺伝子の塩基配列	
3.	5'上流域	
4.	他のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子との比較	
第5章	オリザシン1の大腸菌での発現と活性化および抗体作製	61
第1節	緒言	62
第2節	材料および方法	62
第3節	結果	67
1.	pET17bに組み込んだオリザシン1融合タンパク質の発現	
2.	GST-オリザシン1融合タンパク質の発現と精製	
3.	発現タンパク質の活性化	
4.	至適pH	
5.	至適温度	
第4節	考察	70
第6章	オリザシンタンパク質の精製及び酵素学的性質	72
第1節	緒言	73
第2節	材料および方法	74
第3節	結果	78
1.	抽出・精製	
2.	精製オリザシンのSDS-PAGEおよびウエスタン分析	
3.	各種阻害剤の効果	
4.	至適pH	
5.	至適温度	
第4節	考察	80
第7章	オリザシンの食品加工とくに凝乳への応用	83
第1節	緒言	84
第2節	材料および方法	84

第3節 結果	85
1. コメより抽出した粗酵素液の凝乳活性	
2. オリザシンによる κ -カゼインの水解	
第4節 考察	87
第8章 総合討論	88
引用文献	96
謝辞	

略語

AP	aspartic protease
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphate
BSA	bovine serum albumin
CP	cysteine protease
CTAB	cetyl trimethyl ammonium bromide
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetate
GA ₃	gibberellin A ₃
GST	glutathione S-transferase
HvAP	barley grain aspartic protease
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galactoside
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	trichloroacetate
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylene diamine

第1章

序 論

プロテアーゼは、真核生物から原核生物、ウイルスに至るまであらゆる生命体に存在し、その生命活動の中核として細胞内外に広く分布をしている。現在までに報告されたプロテアーゼは Enzyme Nomenclature (1992) に登録された種類だけでも 221 種類にも及ぶ。

プロテアーゼの古典的な研究対象は、消化酵素であった。動物の胃内に存在するペプシンはその代表例であり、ペプシンの生理作用に関する研究はプロテアーゼ研究の主流であった。消化は、栄養素として摂取したタンパク質を分解し、体内タンパク質に作り変えるための原料となるアミノ酸にまで分解する過程であり、消化管酵素はプロテアーゼの作用機作の解明が、最初になされた例である。しかし、プロテアーゼの働きは広く、あらゆる生命現象に関与するといっても過言ではない。その中で、生命を支える基本単位である細胞における細胞内タンパク質の成熟、細胞死の調節、自食・他食作用といった選択的分解をプロテアーゼが行っている。

リソソームに存在するカテプシン群は、リソソーム内タンパク質分解を担っており、カテプシン B、H、L といったシステインプロテアーゼが、エンドサイトーシスで取り込まれた異物を分解し (Katunuma and Kominami 1983)、カテプシン D が、他のカテプシン群酵素のプロセッシングをして活性化する (Nishimura et al. 1989)。またカテプシン群酵素は細胞内タンパク質の寿命を決定し、生体のホメオスタシスの維持に貢献する。体内の代謝調節機能に関わるプロテアーゼとしては、血圧調節に関与するレニン、血液凝固系において凝固カスケードを進行させるセリンプロテアーゼ、キニン-カリクレイン系におけるカリクレインによるキニンノーゲンの限定分解といった、重要な酵素が存在する。細胞内の情報伝達制御に関しては、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインがキナーゼなどの酵素タンパク質、細胞骨格タンパク質等を限定分解することにより、細胞内の正常なターンオーバーを支配していると考えられている (Suzuki et al. 1995)。

以上のように、細胞内の生理機能はプロテアーゼの厳格な制御によって維持されている。厳密な制御機構に乱れが生じると種々の病態へと移行する。近年のプロテアー

ゼ研究は、タンパク質分解の異常により病態へと移行するメカニズムの解明へとつながってきている。また、免疫反応における細菌ウイルスなどの感染制御、癌細胞の転移等に関与するプロテアーゼについても解明されつつある。このようにプロテアーゼはプロテインというギリシャ語のプロテイオス（第一位の神）を語源とする物質の代謝に直接関することから、この名にふさわしい生命の根幹反応を触媒する分子と捉えることができ、その研究は新しい段階へと進みつつある。

本研究では、これら最近の細胞内プロテアーゼの研究動向を踏まえつつ、植物中のプロテアーゼに関する研究を取り上げることにした。植物細胞は基本構造は動物のそれと変わりはないが、分化した細胞が全能性を持つことなど動物細胞とは異なる個性を持つ。個々の細胞の生長と分化についても動物とは明らかに異なり、物質代謝におけるプロテアーゼの機能も独自のものがあると思われる。しかし、植物細胞におけるプロテアーゼの機能については研究例が極めて少なく、しかもその多くはシステインプロテアーゼ(CP)に関するものである。植物種子の中にはシステインプロテアーゼに次いでアスパラギン酸プロテアーゼが多く含まれると予想されるが、現在までのところ、これに関する報告は極めて乏しい。そこで本研究では、主要穀物であるコメのプロテアーゼについて取り上げ、分子生物学的・酵素化学的見地から解析を進める。コメは主要食糧としても重要であり、生理機能の解明は、食糧生産の向上へも貢献するであろう。さらに、本酵素の食品加工への応用についても挑戦したい。これらの研究を進めるにあたって現在までに得られている周辺分野の知見をまず概説し、本研究の意義について言及する。

1. アスパラギン酸プロテアーゼ

プロテアーゼには種々の分類法があるが、触媒機能によって、次の4種類、1. セリンプロテアーゼ(EC 3.4.21)、2. システインプロテアーゼ(EC 3.4.22)、3. アスパラギン酸プロテアーゼ(EC 3.4.23)、4. 金属プロテアーゼ(EC 3.4.24)に分類される。このうち、アスパラギン酸プロテアーゼ(EC 3.4.23)は、活性中心にアスパラギン酸残

基が存在し、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) によって阻害される。アスパラギン酸プロテアーゼ (AP) の多くは酸性領域に至適 pH をもつことから酸性プロテアーゼとも呼ばれていた。しかし、レニンやレトロウィルスプロテアーゼのように弱酸性～中性域に至適 pH をもつものも発見され、酸性プロテアーゼという呼称は必ずしも適当とは言えなくなった。もともと AP はブタ消化酵素として発見されたペプシンがよく研究され、pH 1.5~2 という強酸性域に至適 pH が存在することから呼ばれるようになった名称であった。その後、AP は多くの生物種より分離精製され、高等生物から微生物に至るまで広く分布して細胞内酵素、細胞外酵素として生理的に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

細胞内プロテアーゼとしては、カテプシン D、E がその代表的なものである。前述したようにカテプシン D は動物細胞のリソソーム内に分布し、細胞内タンパク質の代謝回転に重要な役割を果たしている。特に、他のリソソーム酵素、カテプシン B、L を成熟型酵素に変換するプロセシング酵素として作用するという報告が (Nishimura et al. 1989) 得られ、興味深い。また、近年カテプシン D のプロセシングに関する研究が進み、多くの知見が増しつつある (Richo and Conner 1991, 1994)。カテプシン E は、非リソソーム系の細胞内酵素で、骨髄、マクロファージ、白血球、赤血球膜などに分布する (Yamamoto et al. 1991)。

酵母の液胞中に存在するプロテイナーゼ A (YPA) は動物細胞のカテプシン D と同様の働きをすると考えられる。液胞は、研究初期には不要となったタンパク質老廃物を分解する組織と考えられていたが、実は動物細胞のリソソームに相当しており、種々の酵素によるプロセシングや分解といった幅広い酵素反応が行なわれる場であることが判りつつある。YPA は、同じく液胞内酵素であるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) のプロセシングに関わる (Woolford et al. 1986)。YPA の機能は植物 AP の機能を解析する上で良い参考になると考えられる。

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、レトロウイルスに特異的な増殖様式をもつ。増殖段階でレトロウィルスプロテアーゼ (PR) は、ポリプロテインをプロセシングして成熟型へと変換し、ウィルス粒子は感染能を獲得する。このPRもAPの一種でありペプスタチンやDANなどで阻害される。また、X線結晶解析の結果から、APに特徴的な双葉様の立体構造を形成していたが、PRは他のAPが1分子内に2つの似たドメインをもつのに対し、PR 1分子はこれらの1ドメインに相当して、会合することで二量体となり、双葉様の立体配座をとる既知のAPとは異なる構造を保持していた (Mannel et al. 1989)。

細胞外酵素としては、胃底腺で分泌される胃内消化酵素ペプシンがある。ペプシンには、数種のアイソザイムが存在する。ペプシンは消化酵素として、またAPの代表的な例として広く研究対象とされてきた。ペプシンは不活性型前駆体であるペプシノーゲンとして合成され胃腔内に分泌された後、胃酸の酸性 pH 下で自己触媒的に活性化してペプシンとなる (Takahashi and Kageyama 1985, Pichova et al. 1985)。ペプシンの至適 pH は 2 付近にあり、低 pH で基質タンパク質を切断する。ペプシンは基質特異性が広く疎水性アミノ酸や芳香族アミノ酸を含むペプチドによく作用するが、他の結合も切断する。キモシンはペプシンと同様胃内に存在する消化酵素であるが、仔牛の第 4 胃に存在し、ペプシンと異なる点は基質特異性が狭く、 κ -カゼインの 105 Phe - 106 Met 結合を切断して顕著な凝乳作用を示す。

カビ類の産生するAPは細胞外に分泌されるものが多く、*Penicillium* 属の産生するベニシロペプシン (EC 3.4.23.20)、*Rhizopus* 属の産生するリゾプスペプシン (3.4.23.21)、*Endothia* 属のエンドシアペプシン (EC 3.4.23.22.)、*Mucor* 属のムコールペプシン (EC 3.4.23.23)、*Aspergillus* 属のアスパラギロペプシン (EC 3.4.23.18, EC 3.4.23.19) 等が知られている。これらはすべてペプシン型のAPである。一般的に基質特異性は広いが、ムコールレンニンや数種のカビの産生するAPでは、基質特異性の狭いものも存在している。これらは量的にも豊富で菌体外に分泌されるという利点から、結晶のX線解析

(James et al. 1983)、ミュータントを用いた酵素的性質の解明 (Fukuda et al. 1994) 等が数多く報告されている。

他に、細胞外に分泌されるものとしてはレニンがある。レニンは主に腎臓で産生され、血中に分泌されてアンジオテンシノーゲンに作用してアンジオテンシン I を産生し、血圧調節に大きな関わりをもつ。レニンは基質特異性が狭く、至適 pH が6~7と中性付近にあり、ペプスタチンに対する感受性が低いのが特徴である。

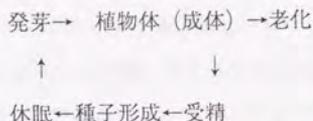
以上述べたように、既知のAPには、細胞内酵素、細胞外酵素とも動物、微生物由来のものが多く、植物や昆虫を起源とするAPに関しては報告例が極めて少なかった。昆虫では最近、卵タンパク質ビテロゲニンの成熟に関与する蚊のAP (mLAP) が精製され、cDNA が単離された (Cho and Raikhel 1992)。また、チャバネゴキブリのアレルゲンが、APであることも報告された (Arruda et al. 1995)。ダニのアレルゲンの1つにCPがあることの報告例 (Matsushima et al. 1993) は過去にあったが、アレルゲンとしてのAPの報告は初めてであった。このようにAPに関する研究対象も近年目覚ましく広がりつつある。

一方、植物 AP では、本研究に着手した時点では、大麦 (Sarkkinen et al. 1992)、小麦 (Dunaevsky et al. 1989, Kawamura et al. 1982)、キュウリ (Polanowski et al. 1984)、カボチャ (Polanowski et al. 1984)、ソバ (Belozersky et al. 1984)、トマト (Rodrigo et al. 1989)、そしてコメ (Doi et al. 1980c) でペプスタチンに感受性のあるプロテアーゼとしてタンパク質レベルで精製された報告があった。生理機能に関しては、近年、アラビドプシスの2Sアルブミンをプロセスするアスバラギン酸プロテアーゼが、報告された (D'Hondt et al. 1993)。それまで主要貯蔵タンパク質のプロセッシング酵素としては、システインプロテアーゼのみが見い出されていたが、APのプロセッシング酵素としては、本酵素がはじめての例となった。また、大麦 AP であるHvAPが、液胞内タンパク質であるレクチンをプロセスするという報告も最近出された (Runeberg-Roos et al. 1994)。現在までのところAPの生理機能として解析されたのは、以上の例のみである。さらに、DNA レベルの解析が行われていたのは、HvAPのみであった (Runeberg-Roos et al. 1991)。単離された

HvAP cDNA クローンは、カテプシンDや酵母のプロテイナーゼAと相同性が高く、APの活性中心の配列は既知のAPと同様に保存されていた。しかし、植物APに関する研究は上記の報告があるのみであった。植物プロテアーゼの機能は、植物特有の生活環と深い関わりがあると考えられる。そこで、次に、植物の生活環のうち、主に種子の形成と発芽に關与するプロテアーゼについて述べる。

2. 植物に存在するプロテアーゼ

植物の生活環は動物とは大きく異なり、下記のように考えられる。



それぞれのステージには時期特異的な遺伝子の発現があり、それらの遺伝子の発現によって、生理機能が支えられている。植物の生活環の中で種子の形成と発芽は、休眠期をはさんでひと続きの植物生長の初期過程ではあるが、両期の間には大きな変換が生じる。すなわち、種子登熟期には子葉や胚乳で貯蔵物質の合成、集積が起こり、これらは貯蔵器官としての役割を果たすが、吸水に始まる発芽期には一転して、これらの器官では貯蔵物質の分解・利用系が発現する。登熟から発芽への相変換には様々な物質の変換が生じるが、中でもその主要な役割を担っているのはプロテアーゼである。さて、植物プロテアーゼに関する研究は、穀物主要タンパク質の合成と分解に関する研究の一環として進められてきた。とりわけ種子中に量的に多く存在するシステインプロテアーゼが、貯蔵タンパク質の合成と分解の鍵酵素と考えられており、多くの研究がなされてきた。

貯蔵タンパク質の合成に關与するCPとして、プロセシング酵素が挙げられる。種子タンパク質が前駆体から成熟型へと変換する際に液胞プロセシング酵素は、プロ型のグロブリンとプロ型2Sアルブミンを限定分解して前駆体から成熟型に変換する酵素であり、登熟カボチャ子葉、ヒマ、ダイズにおいて精製された。プロセシング酵素は

液胞内マトリックスに存在しており、ここが貯蔵タンパク質のプロセシングの場となっていることがわかる (Hara-Nishimura et al.1987, Akasofu et al.1989, Akasofu et al.1990, Scott et al.1992, Okamoto et al.1995)。

また、種子の発芽では種々のプロテアーゼが関わっており、種子中の貯蔵タンパク質を分解し、生成するアミノ酸を新タンパク質合成の素材として用い、芽生えの生長が始まる。これらに関与するものとしては大麦のEP-A、EP-B (Shutov et al.1987)、アリューレイン (Rogers et al. 1985)、コメのオリザイン α 、 β 、 γ (Watanabe et al.1991)等が知られている。これらのうち、EP-A および EP-Bは、分泌性のエンドペプチダーゼであり、cDNA クローニングにより一次構造が解析されている (Koehler et al. 1990)。一方、非分泌性CPであるアリューレインは、アリューロン細胞の液胞に存在する。アリューレインは、液胞に相当する動物細胞リソソームプロテアーゼであるカテプシンHと最も高い相同性を有しており細胞内タンパク質のターンオーバーやプロセシングに関与している可能性が示唆されている (Holwerda et al.1992)。これらはいずれもジベレリン (GA_3) に応答するものである。

しかし、CP以外のプロテアーゼに関する研究は少なくセリンプロテアーゼとしては、プリンスメロンに存在するククミシン (Kaneda et al. 1975)、ダイズ (Nishikata 1984)、カボチャ (Dryjanski et al. 1990) が知られており、金属プロテアーゼでは、サイザルアサのアガバイン、ダイズ金属プロテアーゼ (Mcgeeham et al. 1992) といったプロテアーゼがタンパク質レベルで解析されている。しかし、この中で一次構造まで解析されているものはダイズの金属プロテアーゼのみである。

一方、アスパラギン酸プロテアーゼ (EC 3.4.23) に目を転じてみると、前節で述べたように、アラビドプシスの2SアルブミンをプロセスするAP (D'Hondt et al.1993)やレクチンをプロセスするHvAP (Runeberg-Roos et al. 1994)等のほんの数例の報告があるのみであった。そこで、本研究では、主要穀物であり、近年、分子生物学的研究が進みつつあるコメに着目し、APの解析を行うことにした。

3. コメに存在するプロテアーゼ

コメのAPの研究をはじめると、コメのプロテアーゼで報告されているものを検索した。現在までに存在が確認されているコメのプロテアーゼとして、システインプロテアーゼ(オリザイン)(Abe et al. 1987, Watanabe et al. 1991)、アスパラギン酸プロテアーゼ(Doi et al. 1980)、メタロプロテアーゼ(Horiguchi et al. 1988, Doi et al. 1990)がある。これらエンドペプチダーゼの他には、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ(Doi et al. 1980)が存在し、しかも、これらのタンパク質レベルでの解析は、植物の中では比較的進んでいると思われる。これらのうちで最も良く研究されているのはオリザインで、この酵素のインヒビターであるオリザシスタチン(Kondo et al. 1990)とともに、タンパク質レベル、遺伝子レベルでの構造の解析とともに生理機能やジベレリンによる誘導等、幅広く研究が行なわれている。オリザインには3種の分子種、 α 、 β 、 γ が存在し、cDNAクローニング及び遺伝子クローニングによりその構造が解明されている。このうち α 、 β は一次構造上は70%以上の相同性をもつにもかかわらず、 GA_3 に対する応答性が異なっていた。 α および γ のmRNAは登熟および完熟種子には存在せず、発芽して初めて発現するのに対し、 β は発芽前の種子にも発現していた。オリザインは、主として発芽期におけるタンパク質の分解を3つのアイソザイムが、分担しながら行っていると考えられている(Watanabe et al. 1991)。

コメにおける主要なタンパク質であるグルテリンは、コメのタンパク質中の約80%を占め、登熟後期に発現量は最大となる(Okita et al. 1989)。登熟期におけるタンパク質の合成とプロセッシングは、種子内における重要な生理活動の一つであり、この複雑な反応過程に関与する酵素の存在を明らかにすることは重要である。オリザインが主として発芽期に発現していることを考えると、登熟期における主要なプロテアーゼは他の種類のプロテアーゼである可能性が高い。しかし、他のプロテアーゼに関しては、遺伝子レベルでの解析および生理機能の解明は、全くなされていない。主要穀物の筆頭ともいべきコメの主要タンパク質のプロテオリシスに重要な役割を担うと思われるプロテアーゼに関する研究はまだ緒についたばかりの感がある。

4. 凝乳酵素

近年、日本における牛乳・乳製品の消費量は急激に増加しつつあり、1980年には794万トンであったものが、1993年には1074万トンに達した。日本人の食生活パターンの変化を伺わせる数値である。特にチーズは、輸入食品の増大とともに、市場は拡大し日本でもナチュラルチーズの生産量は増加しつつある。

ナチュラルチーズの一般的な製造法は、まず生乳を乳酸発酵させ、酸度が0.02%に増したところで凝乳酵素を添加しカードを作成する。カードは適度な大きさに切断されたのち、これを樽に移して重しを乗せ水分を絞って出す。適度に水分が減少したところで、これを容器より取り出し、熟成させる。熟成の際に種々のカビまたは細菌を植菌することで独自のフレーバーが生まれる。白カビを用いた代表的なチーズはカンベルチーズであり、約2週間の熟成の後、製品として出荷される。また青カビを植えたものはブルーチーズとなる。細菌で熟成させるチーズは熟成期間の長いものが多く、数ヶ月から数年の熟成期間をおく。この間にチーズは脱水が進み硬化するとともにタンパク質や脂肪分の分解が生じ、チーズ特有の風味が生成される。いづれのチーズの場合も凝乳酵素による生乳の凝固は必要不可欠なプロセスである。

現在利用されている凝乳酵素はすべて、APに属するものである。構造的には、類似しているが働きについては個々の酵素で異なり、酵素の性質が完成品であるチーズの品質に大きな影響を与える。

凝乳酵素として最もすぐれていると言われているのは、仔牛の第4胃に存在するキモシンである。キモシンは κ -カゼインの105Phe-106Metを限定的に水解して κ -カゼインをバラ κ -カゼインとカゼイノグリコペプチドにすることでカゼインミセルは安定化能を失い、 α s-カゼイン、 β -カゼインは乳中の Ca^{2+} と結合して凝乳化が起こる。キモシンは凝乳酵素としては最もすぐれているが、仔牛の胃内に存在するということから高価であるという難点がある。一方、同じく牛の胃内に存在する消化酵素ペプシ

ンもキモシンと同様凝乳活性を有しているが、キモシンに較べるとタンパク質分解能が高く苦味の生成が生じるとされる。そこで動物由来の凝乳酵素としては、キモシンのみ、またはキモシンとペプシンの混合物が利用される場合が多い。しかし、いずれにしても牛の胃袋より抽出する凝乳酵素は生産量の点から、高価となるキモシンの不足を解消するために、微生物由来の凝乳酵素が開発され、*Mucor* 属のムコールレンニン、*Endothia* 属のエンドシアペプシンが利用されている。これらの微生物酵素は凝乳活性が高くプロテアーゼ活性が低く凝乳酵素に適していると言われ、アメリカではチーズ製造の約6割に微生物酵素が利用されている。

一方、植物由来の凝乳酵素は、凝乳酵素全体の1%にも満たないが、ポルトガルでは伝統的なチーズの製造法として、カルドン (*Cynara cardunculus*、アザミ科の植物でアーティチョークに類似している)の花をすり潰した抽出液を乳に加えて凝乳させる。カルドンを用いたチーズは特有のフレーバーを有すると言われている。この抽出液中の凝乳酵素はAPに属し、サイプロシンと呼ばれる (Cordeiro et al.1994a)。

チーズ製造は数千年も前から行なわれており、凝乳酵素もこれと同様の古い歴史を持ち、その間新しい凝乳酵素の発見や開発が繰り返されてきた。その中で大きな変革は微生物の作る凝乳酵素の発見と、組み換え体DNAを用いた凝乳酵素の製造であり、大腸菌や酵母で発現させたキモシンが凝乳酵素としてチーズ製造の現場に登場したことであろう。

5. 本研究の目的

以上、述べてきたように生体内におけるアスパラギン酸プロテアーゼに関する解析及び応用面での研究は、動物を対象とするものから、レトロウィルスプロテアーゼまで幅広く、医学的に見ても重要な生理作用をもつものが多い。また前述したようにAPは生命の根幹に係わる細胞内プロテアーゼであり、これらの機能や活性発現制御機構を解明することは重要なことである。

植物プロテアーゼの研究は未だタンパク質レベルでの精製段階であり、詳細な研究

はほとんど行なわれていない。主流となるシステインプロテアーゼに関しては、植物特有の植物ホルモンとの関連や環境ストレス応答等が、少しづつ解明されつつあった。

APにおいては、唯一大麦で cDNA がクローニングされたのみであった。そこで本研究では植物体内において重要な役割を果たしていると思われる AP に関する研究を開始することとした。コメにはグルテリン、プロラミンといった貯蔵タンパク質が存在しているが、これらの貯蔵タンパク質の成熟化、分解過程でプロテアーゼが重大な役割を担っているはずである。そこで本研究では、

1. イネ種子の AP をクローン化し、その一次構造を明らかにする。
2. 発現時期や発現量を明らかにする。
3. 遺伝子構造の解析を行ない、AP の発現機構を解明する。
4. タンパク質レベルでの AP の存在を明らかにし、酵素化学的性質を解明する。
5. cDNA を大腸菌等宿主菌で発現させ、分子内の活性発現システム、プロセッシング様式等を解明する。
6. 精製した酵素の食品加工への応用を模索する。

以上の項目に関して研究を進め、AP に関する新たな知見を得ることを目的とする。

コメ中の AP のもつ生理的意義や発現制御といった全く未知の分野を解明するとともに、大腸菌によってこのタンパク質を発現させ、応用面での途を拓くことをも目的とする。植物は動物や微生物と異なり、細胞は全能性を有している。細胞も強固な細胞壁をもち生長の仕方も異なる。特に種子は次世代への生長のための栄養源を貯え、これを分解して胚が生長し、次世代の植物体が形成されていく。種子は植物にとっては次世代への大切な準備期間であるが、種々の栄養源は人間にとって保存可能な故に重要な食糧ともなりえる。コメを研究対象とするのは、コメが世界中で栽培され、世界人口の 4 分の 1 の食糧として消費されている重要な穀物であり、何千年の間、高品質、高収量のコメを目指して改良が進められてきた、重要な作物であるにもかかわらず

ず、分子生物学的研究は立ち遅れていたが、近年になってイネ核ゲノムの解析が進み、
生体としてのイネの姿が明らかにされつつあり、コメAPに関する研究が、植物プロテ
アーゼの機能解析に新たな一頁を開くことを目指したい。

第2章

コメのアスパラギン酸プロテアーゼ (オリザシン) のcDNAクローニング

第1節 緒言

植物プロテアーゼに関する研究は、第1章で述べた様に、主としてシステインプロテアーゼ (CP) に関する研究が大部分を占めてきた (Acque et al. 1989, Brion et al. 1985, Podivinsky et al. 1989)。CPは、ババインをはじめとして植物中に多量に存在し (Cohen et al. 1986)、研究の主軸とされてきた。したがって、植物種子に存在するプロテアーゼに関してもCPに関するものが主流であり、コメ中でもCPであるオリザインについては発芽期に多く発現し、貯蔵タンパク質のプロテオリシスに関与することが知られている (Watanabe et al. 1991)。しかしながら、CP以外のプロテアーゼも存在して、貯蔵タンパク質や生体内のタンパク質の分解、代謝に関わることが予想される。オリザインタンパク質の精製過程で、他のプロテアーゼが存在することが示唆されていた (Abe et al. 1987)。また、大麦ではEP-A, EP-B (Koehler et al. 1990)、アリューレイン (Holwerda et al. 1991) といったCP以外に、アスパラギン酸プロテアーゼ (AP) の存在が知られていた (Sarkkinen et al. 1992)。

そこで本章では、CP以外でかなりの量が存在すると予想されるAPをcDNAクローニングによりコメから単離し、一次構造を決定することを目的とした。

本研究を開始した時点では、植物APの中で一次構造の明らかになっているものは、大麦のHvAPのみであった (Runeberg-Roos et al. 1991)。そこでHvAPと動物、微生物APとの相同性の高い2ヶ所の配列を選び、この配列をもとに作成した合成DNAをプライマーとして、RT-PCRによってコメAPのcDNAフラグメントを得ることにした。さらにこれをプローブとして、cDNAライブラリーよりcDNAクローンを単離することにした。

第2節 RT-PCRによるコメアスパラギン酸プロテアーゼのcDNAフラグメントの解析

1. 材料および試薬

(1) コメ

コメ (*Oryza sativa* L., cultivar Nipponbare)は、東大農学部田無農場町田寛康氏から供与していただいた。

(2) 大腸菌

大腸菌K12株の誘導体であるMM294、C600Hfr⁻、JM109を使用した。

(3) DNA用試薬類

i. 各種酵素

大腸菌アルカリ性ホスファターゼC75 (BAP)、T4 DNAリガーゼ、及び各種制限酵素は宝酒造株式会社 (京都)、ウシ脾臓リボヌクレアーゼA (RNase A)、卵白リゾチームはSigma社 (St. Louis, U.S.A.) より購入した。

ii. ヌクレオチド

pUC18ベクター、シークエンス用 M13プライマーは宝酒造株式会社、サケ精巢DNA、ATP、dATP、dCTP、dGTP、dTTPはBoehringer-Mannheim 山之内株式会社より購入した。

iii. アイソトープ

[α -³²P] dCTP水溶液 (9.25MBq) は、Amersham社 (Buckingham, England) より購入した。

iv. 各種キット等

Multiprime DNA labelling system、Rapid hybridization buffer はAmersham社、TaKaRa PCR kitは宝酒造株式会社、Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing KitはApplied

Biosystems社(U.S.A.)、1st strand cDNA synthesis kit はPharmacia より購入した。

v. メンブレインフィルター

濾過滅菌フィルターはMillipore社より購入し、ナイロンフィルターはAmersham社のHybondTM-Nを用いた。

(4) DNA用調製溶液類

特に指示したものを除き、試薬類は特級、生化学実験用、またはクロマトグラフィ用試薬を用いて、二次純水で所定の濃度に溶解し、オートクレーブ(+1気圧、120℃、20分)または濾過滅菌(0.22 μ mのフィルターを使用)を施してから使用した。

i. 3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.2または5.3)

酢酸ナトリウム溶液を酢酸でpH5.2または5.3に合わせ、最終的にナトリウムイオン濃度が3Mになるようにした。使用時は必要に応じて適当に希釈した。

ii. 1Mトリス塩酸緩衝液

トリス溶液を塩酸で適当なpH(7.5~9.5)に合わせ、最終的にトリスの濃度が1Mになるようにした。使用時は必要に応じて適当に希釈した。

iii. フェノール溶液

65℃で溶解したフェノールに0.2% β -メルカプトエタノール/0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加えてよく攪拌してから水層を捨てた。この操作を、水層のpHが7.6以上になるまで行い、最後は水層を1cm程残し褐色瓶中で冷暗所に保存した。8-キノリノールを約5mg加えた。

iv. フェノール・クロロホルム溶液

フェノール溶液に等量のクロロホルムを加えたもの。水層を1cm程残し、冷暗所に保存した。

v. 0.5M EDTA (pH8.0)

EDTA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩)を水中に加え、攪拌しながら水酸

化ナトリウム水溶液でpH8.0に合わせ、最終的にEDTAが0.5Mになるようにした。使用時は必要に応じて希釈した。

vii. TE (pH8.0) : 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)

1 mM EDTA (pH8.0)

vii. 10% SDS

SDSが10%になるように、加温して水に溶解し、濾過滅菌した。使用時は適当に希釈した。

(5) 制限酵素消化用緩衝液

次に示す組成のものを用いた。(滅菌除菌してある溶液を混合して作製した。)

	10×L	10×M	10×H	10×K (pH8.5)	5×Sal I
トリス塩酸緩衝液(pH7.5)	100mM	100mM	500mM	200mM	250mM
塩化マグネシウム	100mM	100mM	100mM	100mM	50mM
D T T	10mM	10mM	10mM	10mM	5mM
塩化ナトリウム	—	500mM	1M	—	875mM
塩化カリウム	—	—	—	1M	—

以上の緩衝液は最終的に1×の濃度になるようにして、以下に示す制限酵素に用いた。

10×L *NaeI*, *KpnI*, *SacI*

10×M *AccI*, *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI*, *AflI*, *XbaI*

10×H *PstI*, *XhoI*, *NotI*, *NcoI*, *EcoT14*, *EcoT22*, *HincII*

10×K *BamHI*, *HindIII*

5×Sal I *SalI*

(6) 電気泳動用試薬

i. 50×TAE : 2M トリス酢酸緩衝液 (pH7.5)

57ml 氷酢酸

50mM EDTA

使用時は最終的に1×の濃度になるようにした。

ii. 10×TBE : 108g トリス

55g ホウ酸

9.3g EDTA · 2Na

880ml 水

混合して溶解した。使用時は最終的に1×の濃度になるようにした。

iii. 電気泳動用色素 : 0.25% BPB (ブロムフェノールブルー)

0.25% XC (キシレンシアノール)

25% フィコール

iv. ホルムアミド色素 : 1 mM EDTA (pH8.0)

0.25% BPB (ブロムフェノールブルー)

0.25% XC (キシレンシアノール)

90% ホルムアミド

v. 40% アクリルアミド溶液 : 38% アクリルアミド

2% *N,N*-メチレンビスアクリルアミド

オートクレーブはしない。褐色瓶中で冷暗所に保存した。

vi. アクリルアミド溶液 30% (W/V)

vii. ビスアクリルアミド溶液 2% (W/V)

viii. ゲル溶出液 : 500mM 酢酸アンモニウム

10mM 酢酸マグネシウム

1mM EDTA

0.1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

酢酸アンモニウム、酢酸マグネシウム、EDTA (pH8.0) を混合、溶解し、オートクレーブ滅菌した後、10% SDS を加え、最終的に上記濃度になるようにした。

(7) RNA抽出用試薬

- i. RNA抽出緩衝液：100mM Tris-HCl (pH8.0)
5mM EDTA (pH8.0)
1% SDS
- ii. 1M DTT：滅菌水に溶解後-20℃保存
- iii. 5M LiCl

(8) mRNA精製用試薬

- i. カラム平衡化液：0.1M 水酸化ナトリウム
5mM EDTA
- ii. 2×ローディング緩衝液：40mM トリス (pH7.6)
1M 塩化ナトリウム
1mM EDTA
0.1% SDS

1×ローディング緩衝液は2×ローディング緩衝液を水で希釈して使用した。

- iii. 洗浄用緩衝液：20mM トリス (pH7.6)
0.1M 塩化ナトリウム
1mM EDTA
0.1% SDS
- iv. 溶出用緩衝液：10mM トリス
1mM EDTA
0.05% SDS

(9) 核酸トランスファー試薬

- ii. アルカリ変性液：0.5M 水酸化ナトリウム

1.5M 塩化ナトリウム

- ii. 中和液：0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)

1.5M 塩化ナトリウム

- iii. 20×SSC：3M 塩化ナトリウム

0.3M クエン酸三ナトリウム

使用時には必要に応じて希釈した。

(10) 培地、培養液

- i. χ -ブローズ：2.5% トリプトン

1% 酵母抽出物

0.1% グルコース

20mM 硫酸マグネシウム

50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)

- ii. SOB：2% トリプトン

0.5% 酵母抽出物

10mM 塩化ナトリウム

2.5mM 塩化カリウム

以上の組成の溶液をオートクレーブにかけた後、さらに1M塩化マグネシウム/1M硫酸マグネシウム（濾過滅菌済）を1/100量加えた。

- iii. SOC

SOBに1/100量の2Mグルコース（濾過滅菌済）を加えた。

- iv. アンピシリンプレート

χ -ブローズに1.5%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、約50℃まで冷ました後、1/1000量の60mg/mlアンピシリン（水溶液、オートクレーブはしない）を加えて混合し、素早く滅菌プレート（小）に適量を流し込んで固まらせた。

(11) 形質転換用試薬

- i. アンピシリン水溶液：60mg/ml アンピシリン（滅菌処理を施さない）
- ii. 10×ライゲーションバッファー：100mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)
100mM 塩化マグネシウム
10mM DTT
5mM ATP
1mg/ml BSA
- iii. TFB：10mM MES（2-(N-モリノ)エタンスルホン酸）カリウム緩衝液(pH6.3)
100mM 塩化ルビジウム
45mM 塩化マンガン
10mM 塩化カルシウム
3mM 塩化ヘキサアミンコバルト (III)

以上の濃度になるように滅菌水に溶解し、濾過滅菌後、冷暗所に保存した。

- iv. DIT：2.25M DIT/40mM 酢酸カリウム緩衝液(pH6.0)
滅菌済みの溶液を混合して作った。

(12) プラスミドDNA精製用試薬

- i. リゾチーム溶解液：50mM グルコース
10mM EDTA
25mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)
- ii. アルカリSDS溶液：0.2M 水酸化ナトリウム
1% SDS
- iii. 20% PEG / NaCl : 20% ポリエチレングリコール (#6000)
2.5M 塩化ナトリウム

(13) ゲノム DNA 抽出用試薬

- i. 2 x CTAB 溶液 : 2% CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)
 - 0.1M Tris-HCl (pH 8.0)
 - 1.4M NaCl
 - 1% PVP (poly vinyl pyrrolidone)
- ii. 10% CTAB 溶液 : 10% CTAB
 - 0.7M NaCl
- iii. クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1; V/V)
- iv. 沈殿用緩衝液 : 1% CTAB
 - 5mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - 10mM EDTA
- v. 1M NaCl-TE : 1M NaCl
 - 10mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - 1mM EDTA

2. 実験方法

(1) 核酸溶液の濃縮

エタノール沈殿、イソプロパノール沈殿

核酸を含む溶液に、1/10量の3M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3)、及び2.5倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った。または、1/20量の3M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3)、及び0.6倍量のイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈殿を行った。核酸の沈殿は-80℃で15分以上静置した後、0℃、15000rpmで10~15分間遠心して集めてから、沈殿を75%エタノールで洗い、減圧下乾固させた。最後にこの沈殿を適量の水またはTE (pH8.0) に溶解した。

(2) フェノール・クロロホルム抽出、フェノール抽出

この操作は、核酸を含む溶液の除タンパク質に用いた。

核酸を含む溶液に等量のフェノール・クロロホルム溶液またはフェノール溶液を加え、十分に攪拌した後、室温で3000~15000rpm、1~5分間遠心し、その水層を回収した。この操作は、必要に応じて複数回繰り返した。

(3) ショート・カラム・クロマトグラフィー

直径0.5cm、長さ12cmのシリコンコートしたバスツールピペットに、シリコンコートしたグラスウールを詰め、これにセファデックスG-50を充填してカラムをつくり、TE (pH8.0) で2~3回洗い、試料を載せ、TE (pH8.0) で溶出し、6滴 (約140 μ l) ずつ分画した。

(4) DNAの電気泳動

i. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む1 \times TAEに0.6~1.0%となるようにアガロースを加え、加熱溶解して作製した。検出はトランスイルミネーターを用いて、紫外線照射により行い、ポラロイドフィルムに記録した。

ii. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

a. 非変性ゲル

表に示した組成の液を混合し、これを、組み立てたゲル作製用ガラス板に流し込み、しばらく放置してゲル化させた。泳動試料には1/10量の電気泳動用色素を加え1 \times TBE中、180~200V定電圧 (約10V/cm) で泳動した。検出は0.5 μ g/mlエチジウムブロマイド溶液で染色後、アガロースゲルと同様に検出・解析した。

b. 変性ゲル (塩基配列決定用)

表に示した組成の液を溶解して10分間脱気し、50 μ lのTEMED(N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)を加え、直ちに組み立てておいたシーケンシング用ガラス板に流

し込みゲル化させた。1×TBE中で電気泳動し、泳動後、自動シーケンサーの解析プログラムによって配列を検出解析した。

DNA電気泳動用のポリアクリルアミドゲルの組成

	非変性ゲル 4%	変性ゲル
10x TBE	2.5ml	5.0ml
40%ポリアクリルアミド溶液	2.5ml	
アクリルアミド溶液		9.5ml
ビスアクリルアミド溶液		7.5ml
尿素		25g
純水	198ml	9.0ml
10%過硫酸アンモニウム溶液	0.2ml	0.25ml
TEMRD	50 μ l	50 μ l

(5) DNA断片のゲルからの回収

i. アクリルアミドゲルからの回収

アクリルアミドゲルで電気泳動後、トランスイルミネーターの上で目的のバンドを切り取り、シリコンコートしたガラス遠心管 (COREX 15ml) に入れ、滅菌ガラス棒で十分にホモジネートした。これに1.5mlのゲル溶出液を加え、37°Cで6時間以上保温した後、室温15000rpmで15分間遠心し、上清をとって0.22 μ mのフィルターを自然落下させた。沈澱にさらに1mlのゲル溶出液を加えよく攪拌してから再び遠心し、上清はフィルターを通して先の上清と合わせ、これに2mlのイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈澱をした後、0.3mlの0.3M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.3) に溶解し、1.5mlチューブに移してから、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈澱によりDNAを回収して、75%エタノールで洗い減圧乾固させ、最終的に30~40 μ lの水に溶解し、アガロースゲル電気泳動によって確認を行った。

ii. DNA断片のアガロースゲルからの回収

アガロースゲルで電気泳動後、トランスイルミネーター（波長 $\lambda=354\text{nm}$ ）の上で目的のバンドを切り取り、エッペンドルフチューブに入れフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿で回収したDNAを最終的に $30\mu\text{l}$ の水またはTEに溶かした。

(6) キャリアーDNA（大腸菌DNA）の作成

2.5lの χ -培地に大腸菌MM294を摂取し、 37°C で一晩振盪培養した。翌日、8000rpm、 4°C で10分間遠心する事によって集菌し沈殿を10mlのTEに懸濁したこれをソニファイアードで5分間ほど超音波破碎し、再び12000rpm、 4°C で10分間遠心した。この上清に10%SDSを $1\mu\text{l}$ 、Proteinase Kを $1\mu\text{l}$ に加え 50°C で30分処理した。その後等量のフェノール・クロロホルム溶液で抽出し、水層をイソプロパノール沈殿後、10mlのTEに溶解した。これに0.2mgのRNase Aを加え、 37°C で30分保温し、フェノール・クロロホルム抽出を3回行い、エタノール沈殿をした。沈殿は70%エタノールで洗浄後乾固し、最終的に10mg/mlになるようにTEに溶解した。

(7) DNAの標識 ランダムプライミングによるDNA断片の標識

DNA $0.5\mu\text{g}$ に水を加えて $28\mu\text{l}$ にし、 95°C で5分間の加熱処理後、氷水中にて急冷し、室温に戻してからランダムプライマー $5\mu\text{l}$ 、5×バッファー $10\mu\text{l}$ （いずれもAmersham社DNAラベリングキット）、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP $5\mu\text{l}$ (1.85MBq)を加え、Klenow fragment $2\mu\text{l}$ を加えて 37°C で30分、または室温で2時間以上反応させた。反応液を(3)と同様の方法で分画し、各画分を液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、はじめのピークを形成する画分を回収して標識されたDNAを分画した。

(8) 全RNAの抽出（フェノール/SDS法）

-80°C 凍結した種子をドライアイス中で粉碎したものを50mlプラスチックチューブに

入れ、一晚-80℃に置いてCO₂を蒸発させた。15mlのRNA抽出緩衝液、15mlのフェノール、0.6mlの1M DTTを加えて浸透混和し、3000rpm、室温で遠心して水層を回収した。同様の操作を2回繰り返した後、水層を30mlガラスチューブに入れ、-20℃で一晩エタノール沈殿をした。これを10000rpm、0℃で10分間遠心し、沈殿をリンスした後、沈殿に0.5mlのTEを加えて溶解し、0.6mlの5M塩化リチウム溶液を加え、0℃で2時間以上放置してRNAを沈殿させた。これを15000rpm、0℃で10分間遠心し、リンスした後、回収した沈殿を適当な量の水に溶解し、-80℃で保存した。

(9) 一本鎖cDNAの作製

i. poly(A)⁺RNAの濃縮 (オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラムによる方法)

オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラム (総容量~1ml) は、前もって1mlのカラム平衡化液、続いてpHが7付近になるまで水で洗い、その後5mlの1×ローディング緩衝液を流すことによって平衡化しておく。抽出した全RNA 1μgを含むRNA水溶液0.5mlを65℃で5分間変性し、0.5mlの2×ローディング緩衝液を加えて、室温まで冷却させた後、平衡化したカラムにチャージした。素通り画分をもう一度65℃で5分間熱処理してから室温まで冷却し再びカラムにチャージした。次に、3mlの1×ローディング緩衝液を加えて洗った後、さらに2mlの洗浄緩衝液で洗い、最後に3mlの溶出緩衝液で吸着したRNAを溶出させ、8滴(約200μl)ずつ分画した。分画した液の一部を用いて260nmの吸光度を測定して、溶出された分画を集め、エタノール沈殿した。乾固した沈殿は0.3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.3)に溶かして、もう一度エタノール沈殿を行い、最終的に1mg/mlになるように水に溶解した。

ii. 1本鎖cDNA合成

1~5μgのpoly(A)⁺RNAをRNase-Free Waterで総量8μlになるように希釈し65℃で10分間変性し、氷中で冷却した。キットのFirst-Strand Reaction Mix 5μlに1μlの200mM DTT

溶液を入れ1 μ lの0.5mg/mlオリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマー、または1 μ lの0.037mg/mlのpd(N)₆プライマーを加え、先の変性したpoly(A)⁺RNAを入れ、軽く混ぜて37°Cで1時間反応した。その後、90°Cで5分加熱し、氷中につけて急冷した。

(10) DNA合成機によるプライマーの作成

Oligo1000 DNA synthesizer(Beckmann社)で合成し、同社のCLEVAGE and DEPROTECTION KITを用いて精製した。

(11) PCR法によるDNA断片の増幅

TaKaRa PCR kitを用いて行った。

0.5mlチューブに以下の試薬およびDNAを混合した。

dNTP Mix (dNTP 各2.5mM)	4 μ l
10×バッファー (100mM Tris, 500mM KCl, 15mM MgCl ₂)	5 μ l
テンプレートDNA	0.1~100 ng
センスプライマー	50 pmol
アンチセンスプライマー	50 pmol
水	総量を50 μ lになるように加えた
Taq polymerase (5U/ μ l)	0.5 μ l

以上をよく攪拌した後、ミネラルオイルを1滴 (約50 μ l) 上層して、PCR反応装置にセットした。

(12) サブクローニング

i. pUC18ベクターの調製

1 μ gのプラスミドベクター(pUC18)を過剰量の適当な制限酵素を用いて100 μ lスケールで完全消化した後、その反応液に1 μ lの1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) と1 μ lの

BAPを加えて、さらに37℃で1時間保温し、切断末端のリン酸残基をはずした。フェノール・クロロホルム抽出を2回行った後、エタノール沈澱をして、最終的に30 μ lの水に溶解した。

ii. インサートDNAの調製

DNAの制限酵素消化産物やアクリルアミドゲルから回収したDNA断片を約10ng/ μ lとなるように水で溶解した。

iii. 連結反応 (ライゲーション)

インサートDNA約30ngをpUC18、またはpBluescript KSベクター約10ngと10 \times ligバッファー2 μ lとともに混合し、水で総量を20 μ lにして氷上にて数分間冷却後、1 μ lのT4 DNAリガーゼを加え、14℃で6時間以上連結反応を行った。

iv. 形質転換

a. コンピテント細胞の調製

大腸菌MM294 (またはJM109) をSOBで一晩培養し、その培養液4 μ lをオートクレーブ滅菌した300mlの三角フラスコ中の30mlのSOBに植え継ぎ、A₅₅₀の濁度が0.3~0.4になるまで約3~4時間、37℃で振盪培養した。培養後、ファルコン2070チューブに移して氷中で10分間冷却し、4℃、2000gで5分間遠心して集菌した。10mlのTFBに懸濁し、再度、氷中で10分間冷却後、遠心して集菌し、2.4mlのTFBに懸濁した。これに84 μ lのDMSO (ジメチルスルホキシド) を加え氷中で5分間放置した後2.25M DTTを84 μ l加えて氷中で10分間放置し、さらに84 μ lのDMSOを加えて氷中で5分間放置し、これをコンピテント細胞とした。

b. 形質転換

ファルコン2059チューブにコンピテント細胞210 μ lを取り、iii.で調製したプラスミドDNAを全量加え、氷中に30分間放置した後、42℃の湯浴中で85秒間の熱ショックを

与えて氷中に戻した。これに0.8mlのSOCを加え、37℃で1時間振盪培養した後、遠心(4℃、3000g、5分)により集菌して、アンピシリンプレートに塗り付けた。プレートは37℃で一晩保温してコロニーを生じさせた。

(13) プラスミドDNAの調製

i. 小スケール

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを50 μ gのアンピシリンを含む χ -ブロース1ml中に植え、37℃で4時間振盪培養した。15000rpmで10秒間遠心、集菌し、これを5mg/mlのリゾチームを含むリゾチーム溶液80 μ lで懸濁し、氷上に15分間放置した。次にアルカリSDS溶液200 μ lを加えて転倒混和し、氷上で5分間放置した後、3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.3)150 μ lを加えて攪拌し、氷上に15分間放置した。0℃、15000rpmで5分間遠心してタンパクを除去した上清をフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱した。沈澱を200 μ lのTE(pH8.0)で溶解し、1 μ gのRNaseAを加えて37℃で10分間保温した。フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱して得られた沈澱を40 μ lの水に溶解し、うち半量を制限酵素で反応し、アガロース電気泳動で目的のDNA断片が挿入されていることを確認した。

ii. 大スケール

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを、50 μ g/mlのアンピシリンを含む χ -ブロース30ml中に植え、37℃で一晩振盪培養した後、4℃、3000gで10分間遠心し、沈澱した菌体を10mg/mlのリゾチームを含むリゾチーム溶液800 μ lで懸濁した。これをガラス遠心管(COREX 15ml)に移して氷中に15分以上放置した。次にアルカリSDS溶液2mlを加えて転倒混和し、氷上で5分間放置した後、3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.3)1.5mlを加えて攪拌し、氷上に15分間放置した。0℃、15000rpmで15分間遠心してタンパクを除去した上清をフェノール・クロロホルム抽出後、2.7mlのイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈澱を行った。遠心で集めた沈澱を減圧乾固した後、400 μ lのTE

(pH8.0) で溶解し、エッペンドルフチューブに移してから $10\mu\text{g}$ のRNaseAを加えて、 37°C で30分間保温した。フェノール・クロロホルム抽出を3回行ってRNaseAを除いた後、水層をエーテル抽出してフェノールを除去し、 $200\mu\text{l}$ の20% PEG/NaCl を加えてよく混合し、氷中に45分以上放置した。 0°C 、 15000rpm で15分間遠心してDNAを回収し、75%エタノールで沈澱を洗ってから、減圧下で乾固し、最終的に $80\mu\text{l}$ の水に溶解した。

(14) 塩基配列の決定

Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いた方法

大スケールで調製したプラスミドDNA $1\mu\text{g}$ をプロトコールに従い、反応させた。泳動色素はTaq DyeDeoxy法 (ABI社)用電気泳動色素を用いた。

(15) サザン分析

i. プロットイング (核酸の転写)

制限酵素消化したDNAを0.7%アガロース (SeaKem MEアガロースを使用) ゲル電気泳動した後、ゲルをアルカリ変性液に浸し、室温で30分間ゆっくり振盪してDNAを変性させ、次にゲルを中和液に移して30分間振とうし、中和液を替えてさらに30分間振とうしてから、最後に $2\times\text{SSC}$ に浸して15分間振とうした。ラップを敷いた平らな台の上にゲルを載せ、ゲルの上に前もって $2\times\text{SSC}$ に浸しておいたナイロンフィルター、その上に $2\times\text{SSC}$ に浸したWhatman 3MMろ紙、乾いたろ紙、ペーパータオル (2~3cm分) を順に載せ、さらに、平らなガラス板と約1kgの重しを重ね、室温で6時間以上放置してDNAをフィルターに転写した。フィルター上にボールペンでゲルのスロットの位置をマークしてからフィルターを剥がし、 $2\times\text{SSC}$ に浸して素早く洗浄した後、ペーパータオルでよく水分を除き、 80°C で2時間加熱をするか、または、完全に乾燥させた後、紫外線10分間照射してDNAを固定した。

ii. プレハイブリダイゼーション

Amersham社のRapid hybridization buffer (以下ハイブリダイゼーションバッファーと略す) 1ml当たりそれぞれ100 μ gのキャリアーDNAとサケ精子DNAを、約2倍量の水とともに沸騰水中で10分間加熱した後、氷水中で急冷した。室温に戻してからハイブリダイゼーションバッファーを加えてよく混合し、予洗液 (3 \times SSC / 0.1%SDS) 中で洗浄したフィルターとともにポリバッグにシールした。60 $^{\circ}$ Cで3時間以上保温した後、ポリバッグからフィルターをとりだし、ペーパータオル上で軽く水分を拭とり、ハイブリダイゼーションに供した。

iii. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッファー1ml当たりそれぞれ100 μ gのキャリアーDNAとサケ精子DNAに、約100万cpm/mlとなるようにプローブDNAを加え、これに約2倍量の水を加えて沸騰水中で10分間加熱した後、氷水中で急冷した。室温に戻してからハイブリダイゼーションバッファーを加えてよく混合し、プレハイブリダイゼーション後のフィルターとともにポリバッグにシールした。反応温度は i. のプレハイブリダイゼーションと同様で、反応時間を3時間以上とした。

iv. 洗浄

フィルターはまず3 \times SSC / 0.1%SDS中、室温で1回洗浄した後、それぞれ適当な条件で1~2回洗浄した。

v. オートラジオグラフィ

洗浄後フィルターを風乾、Whatman3MMろ紙に貼り付け、増感用スクリーン (Dupont Lightening Plus) を用いて-80 $^{\circ}$ CでX線フィルム (フジフィルム社) または室温でイメージングプレートに露光させた。

(16) コロニーハイブリダイゼーション

i. コロニーリフティング

前もって4 $^{\circ}$ Cに冷やしておいたブランクあるいはコロニーの生じたプレートの上に、丸型のナイロンフィルターを密着させた。フィルターとプレートには針で穴を開けて

位置をマークした後で、静かにピンセットでフィルターを剥がし、平らな机の上で、アルカリ変性液の上のせ、5分間静置した。次に、中和液の上にフィルターをのせて中和させ、もう一度中和液上に5分間静置し、最後に2×SSC上に5分間のせた。フィルターはペーパータオルの上でよく水分を除き、80℃で完全に乾燥させた後、紫外線をブランクあるいはコロニーが付着した面に10分間照射してDNAを固定した。

ii. ハイブリダイゼーション

基本的にサザンハイブリダイゼーションと同様の方法で行った。

(17) RT-PCR

i. プライマーの合成

センス側のプライマーとして、5'-GATCGAATTTCGACACCGGCAGCTCCAACCTC-TGG-3'を合成した。HvAPの36DTGSSNL43Wに相当する配列の5'側にEcoRIサイト(アンダーラインを引いた箇所)を付加したものである。アンチセンス側のプライマーとして5'-GATCAAGCITGAAGACGTCTCCCAGGATCC-3'を合成した。これはHvAPの415WILGDV421Fに対応する塩基配列をアンチセンス側プライマーとなる様にし、5'末端にHindIIIサイト(アンダーラインを引いた箇所)を導入したものである(Runeberg-Roos et al. 1991)。どちらのプライマーもポリメラーゼ反応が開始する3'末端は特に保存度が高く、また、使用コドンが一種しか存在しないTrpになる様に設計した。

ii. PCR反応

登熟2週目、完熟、発芽8日目の種子からRNAを抽出し、第2節(9)の方法に従い1本鎖cDNAを作製した。この3種のcDNAをテンプレートとして、第2節(11)の組成にてPCR反応を行った。変性96℃・45秒、再生50℃・2分、伸長反応7

2℃・2分を25サイクル行なった。

(18) ゲノム DNA の抽出

コメ 5g にドライアイスを加え、コーヒーマイルで粉碎した。-80℃ に一晩放置しドライアイスを上昇させたのち、70℃ 程度の 5ml 2x CTAB を加え 55℃ に 10 分間静置した。5ml のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え 30 分間ゆっくりと振盪させた。スイングローターで 2800 rpm 15 分間遠心分離し、上澄に 5ml の 2x CTAB を加えてさらに 30 分間ゆっくりと振盪させた。2800 rpm 15 分間遠心分離し、上澄に 1/10 容の 10% CTAB 液を加えた。30 分間転倒混和させたのち、2800 rpm 15 分間遠心分離し、沈殿を得た。5ml 1M NaCl-TE を加えて 55℃ で沈殿が、溶けるまで加温したのち 5ml のイソプロピルアルコールを加えて転倒混和させたのち、2800 rpm 10 分間遠心分離し、沈殿を得た。70% のエタノールでリンスしたのち 200 μ l の TE に溶解した。

(19) ゲノミックサザン分析

ゲノム DNA は、制限酵素で完全に消化させたのち、サザン分析と同様の方法でフィルターを作成した。

i. プローブの作製

第 2 節で得られた 3 種の RT-PCR クローン約 10 μ g を、過剰量の *Eco*RI、*Hind*III で消化したのち、第 2 節 (5) の方法で、インサート DNA を抽出し、第 2 節 (7) の方法で [α -³²P] 標識した。

ii. ハイブリダイゼーション

基本的にサザンハイブリダイゼーションと同様の方法で行った。

3. 結果および考察

(1) cDNA フラグメントの塩基配列及び推定アミノ酸配列の決定

RT-PCR の結果、図 2-1 に示すように登熟 2 週目及び完熟種子から抽出した mRNA を

テンプレートとして用いた場合、HvAPの一次構造から推定される大きさのバンド (1.2kbp) が増幅された。これらのバンドをゲルから切り出し、*EcoRI*、*HindIII*で消化したのち、pUC18へサブクローニングした。18個のクローンは制限酵素地図の異なる3種のクローンに分類された。Dideoxy法を用いて塩基配列を決定し、3種のクローンを pL1、pL4、pL5と命名した。(図2-2, 2-3, 2-4)

3種のクローンのうち、pL4とpL5はAPの2つの活性中心となるAspのうち、C末端側のAspを含む約850bpのフラグメントであった。pL1は、同じくC末端側のAspを含む約600bpのフラグメントであった。PCRで増幅されたDNAフラグメントは約1.2kbpであったが、サブクローニングの際に*EcoRI*および*HindIII*で消化させたところ、3つのクローンともインターナルに*EcoRI*サイトがありPCR産物よりも小さなものになってしまった。

3つのクローンとも完熟種子および開花2週目種子の両方に存在していた。

APは活性中心に2つのAspを有している。得られた3つのクローンはいずれもこのうち的一方のみを含む配列であったが、既知のAPと相同性があり、特に活性中心Asp近傍の配列は、AI(V/A)D(S/I)GTで他のAPと同様よく保存されていた。

pL1では、糖鎖付加可能性のある配列が123NQT、pL4では、199NKT、pL5では199NQTに位置していた。

ホモロジー検索の結果、pL4はGeneBankに登録されているD12777と塩基配列が完全に一致していた。pL1、pL5はコメのAPとしては新規のものであった。

3つのPCRクローンより推定されるアミノ酸配列の相同性を図2-5に示す。3クローン全てに一致するアミノ酸を白ぬきの文字で示してある。図に示されるように3つのクローンの相同性はかなり高く、pL4とpL5は76%、pL4とpL1は61%、pL1とpL5は58%であった。174Q175N(pL4, pL5)の間にギャップが存在するが、この領域は後に述べる植物特異的なインサクション領域内に当たり、他の植物APでもこの領域のアミノ酸残基数には、多少の違いがある。

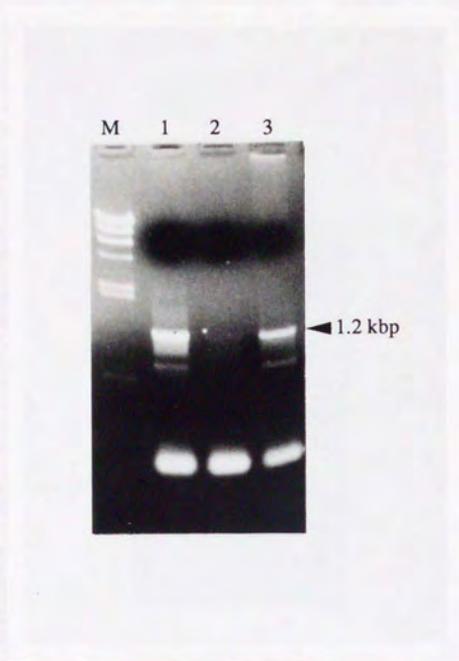


図2-1 コメcDNAを鋳型としたRT-PCR

M：ラムダファージDNAの*Hind*III消化物、1：開花2週目種子、2：発芽8日目の種子、3：完熟種子のcDNAをそれぞれ鋳型とした場合のPCR産物。反応は、変性96℃、45秒、アニール50℃、2分、伸長72℃、2分の条件で25回行った。矢印で増幅された断片の位置と予想塩基数を示す。

ACAGGATGGTGTGCAGCTGGGTGTGCAGCAATAGCAGATTCTGGAACCTCACTGCTTACT	60
T G W C A A G C A A I A D S G T S L L T	20
GGTCCCACGGCCATAATTACTCAGATAAATGAAAAGATTGGTGCTACTGGGGTAGTCAGT	120
G P T A I I T Q I N E K I G A T G V V S	40
CAAGAGTGAAGGCAGTTGTTCTCAATATGGTCAACAGATCCTAGATCAGCTGCGAGCA	180
Q E C K A V V S Q Y G Q Q I L D Q L R A	60
GAGACAAAACCAGCGAAAGTATGCTCTTCGGTCGGCTTATGTACTTTTGATGGTACTCAT	240
E T K P A K V C S S V G L C T F D G T H	80
GGTGTAGTGTCTGGTATTTCGGAGTGTGGTGGATGATGAAGTTGAAAAATCAAGTGGTCCC	300
G V S A G I R S V V D D E V G K S S G P	100
TTCAGCAGTGCAGATGTGCAATGCTTGTGAGACAGCTGTTGTATGGATGCATACCCAACCT	360
F S S A M C N A C E T A V V W M H T Q L	120
GCACAAAATCAAACCTCAGGATCTCGTATTGCAGTACATTGATCAGCTATGTGACCGTCTT	420
A Q <u>N Q T</u> Q D L V L Q Y I D Q L C D R L	140
CCTAGTCTTATGGGAGAATCATCTGTGACTGCAGCAGCCTTGCATCCATGCCTGACATT	480
P S P M G E S S V D C S S L A S M P D I	160
GCCTTCACAATCGGTGGCAACAAGTTTGTCTCAAACCAGAACAATACATCCTGAAGGTT	540
A F T I G G N K F V L K P E Q Y I L K V	180
GGTGAGGGAAGTGTACCCAGTGCATCAGTGGATTACAGCTATGGACATTCCTCCTCCT	600
G E G T A T Q C I S G F T A M D I P P P	200
CCTGGTCTCTCTGGATCCTGGGAGACGTCTTC	633
P G P L W I L G D V F	211

図2-2 RT-PCRクローンpL1の塩基配列と推定アミノ酸配列

黒四角は活性中心のアスパラギン酸残基を示す。下線はプライマーに用いた配列を示し、二重下線は糖鎖結合部位を示す。

TACCTGAAATCTCTGTTGGGAAAGCTCCTCCGATTTGGCAGAGCATGCAGGAGCAGGAA	60
Y P E I S V G K A P P I W Q S M Q E Q E	20
CTGCTTGCAGATGATGTCTTCTCGTTTTGGCTGAACCGAGACCCGGATGCATCCTCTGGT	120
L L A D D V F S F W L N R D P D A S S G	40
GGTGAGCTCGTCTTTGGTGGCATGGATCCGAAGCATTATAAGGGGGATCACACCTACGTC	180
G E L V F G G M D P K H Y K G D H T Y V	60
CCTGTTTTCCCGCAAAGGCTACTGGCAGTTTAAACATGGGGGATCTCCTTATTGATGGCCAC	240
P V S R K G Y W Q F N M G D L L I D G H	80
TCAACTGGCTTCTGTGCAAAGGCTGTGCTGCTATTGTGCGACTCCGGAACCTCCTTGCTT	300
S T G F C A K G C A A I V D S G T S L L	100
GCTGGTCCAACAGCTATAGTTGCTCAGGTGAACCATGCTATTGGGGCTGAAGGAATCATC	360
A G P T A I V A Q V N H A I G A E G I I	120
AGCACGGAATGCAAAGAAGTGGTTAGCGAGTATGGAGAGATGATCCTCAACTTGCTCATA	420
S T E C K E V V S E Y G E M I L N L L I	140
GCACAGACAGATCCGCAGAAAAGTATGCAGCCAGGTTGGTCTGTGTATGTTTGACGGTAAA	480
A Q T D P Q K V C S Q V G L C M F D G K	160
CGCTCAGTAAGCAATGGGATTGAATCTGTGTGCGACAAAAGAAAAGTTGGGTTCTGATGCT	540
R S V S N G I E S V V D K E N L G S D A	180
ATGTGTTTCAAGTTGTGAGATGGCTGTTGTGTGGATAGAGAACCAGCTACGCGAAAATAAA	600
M C S V C E M A V V W I E N Q L R E <u>N K</u>	200
ACGAAGGAGCTGATATTGAATTATGCTAATCAGTTATGTGAGCGTCTACCAAGCCCAAT	660
<u>T</u> K E L I L N Y A N Q L C E R L P S P N	220
GGAGAATCAACTGTCAGCTGCCATCAAATCTCGAAGATGCCTAATCTTGCATTCACCATT	720
G E S T V S C H Q I S K M P N L A F T I	240
GCAACAAGACATTTATTCCTTACACCAGAGCAGTACATCGTGAAACTGGAGCAAGGAGGG	780
A N K T F I L T P E Q Y I V K L E Q G G	260
CAAACCGTCTGCATCAGCGGGTTCATGGCGTTCGACATACCTCCACCACGCGGTCTCTT	840
Q T V C I S G F M A F D I P P P R G P L	280
<u>TGGATCCTGGGAGACGTCTTC</u>	861
W I L G D V F	287

図2-3 RT-PCRクローンpL4の塩基配列と推定アミノ酸配列

黒四角は活性中心のアスパラギン酸残基を示す。下線はプライマーに用いた配列を示し、二重下線は糖鎖結合部位を示す。

TTTCCGGAGATCTCTGTGGGAGGAGCCCTCCAGTTTGGCAGGGAATGAAAGAGCAGCAA	60
F P E I S V G G A P P V W Q G M K E Q Q	20
CTGATCGAGAAGGATGTATTCTCCTTCTGGCTCAACCGCGATCTGTATGCACCGACAGGG	120
L I E K D V F S F W L N R D P D A P T G	40
GGTGAGTTAATCTTTGGTGGTGTAGACCCAAATCATTACAAGGGGAGCCATACATATGTT	180
G E L I F G G V D P N H Y K G S H T Y V	60
CCTGTTACCCGCAAAGGCTACTGGCAGTTTGTAGATGGGGGATCTTCTTATTGATGACTAC	240
P V T R K G Y W Q F E M G D L L I D D Y	80
TCAACTGGGTTCTGTTCTGGTGGTTCGCGCGCTATTGCGGATTACAGGACTTCATTGCTC	300
S T G F C S G G C A A I A D S G T S L L	100
GGTGGCCCAACAACCTATTGTTGCTCAAATTAATCACGCAATTGGAGCTGAGGGAATTGTT	360
G G P T T I V A Q I N H A I G A E G I V	120
AGTATGGAATGCAAACAAGTTGTGCGGGACTACGGGGACATGATCCTCGAGATGCTCATA	420
S M E C K Q V V R D Y G D M I L E M L I	140
GCACAGGAAGCCCATGAAACTGTGCTCTCAGATTGGTCTCTGTGCATTTGATGGTACT	480
A Q A S P M K L C S Q I G L C A F D G T	160
CGTTCTGTGAGAAACAATATAGAGTCTGTTGTTGATAAAGAAAAGSTGGGCTCAGATCTT	540
R S V R N N I E S V V D K E K V G S D L	180
TCCTGCACTGCTTGGGAGATGTCTGTTGCTGGATACAGAATCAGCTCCGACATAACCAA	600
S C T A C E M S V V W I Q N Q L R H <u>N Q</u>	200
ACAAGGGAGCTCATTTTGAATATGCTGACCAGCTCTGCGAGCGTCTCCAAGCCCAAT	660
<u>T</u> R E L I L Q Y A D Q L C E R L P S P N	220
GGCGAATCGGGAGACGACTGCGATGAGATCTCAAACATGCCAACCTTTCATTACCCATA	720
G E S G D D C D E I S N M P N L S F T I	240
CCAAACAAGACCTTACCTTGACACCAGAGCAGTACGTAGTGAAGCTGGAGCAGCAAGT	780
P N K T F T L T P E Q Y V V K L E Q Q G	260
CAAACCTGTTGCATCAGCGGGTTCATGGCGTTCGACGTGCCACCTCCACCCGGCCACTC	840
Q T V C I S G F M A F D V P P P P G P L	280
<u>TGGATCCTGGGAGACGTCTTC</u>	861
W I L G D V F	287

図2-4 RT-PCRクローンpL5の塩基配列と推定アミノ酸配列。

黒四角は活性中心のアスパラギン酸残基を示す。下線はプライマーに用いた配列を示し、二重下線は糖鎖結合部位を示す。

pL4
pL5

1 10 20
 YPEISVGRAPP¹⁰HWQSMQEQE²⁰LLADDF
 FPEISVGGAPP¹⁰VWQGMREQOL²⁰IEKDF

pL4
pL5
pL1

30 40 50 60 70 80
 SFWLN³⁰RDPDASSGGEL⁴⁰LVFGGMDPKHYKGD⁵⁰HTYVPSRKGYW⁶⁰QFNMGDLL⁷⁰LIDGHSTG⁸⁰FCAK
 SFWLN³⁰RDPDAPTGGEL⁴⁰LIFGGVDPNH⁵⁰YKGSHTYV⁶⁰VTRKGYW⁷⁰QFNMGDLL⁸⁰LIDDYSTG⁸⁰FCSG
 TGWCAA

pL4
pL5
pL1

90 * 100 110 120 130 140
 GCAA⁹⁰I^{*}VDSGTSLLAG¹⁰⁰P¹¹⁰TAI¹²⁰VAOVNHAIGAB¹³⁰GIISTE¹⁴⁰CKE¹¹⁰VVSEY¹²⁰GEMILNLLIAQTDPOR
 GCAA⁹⁰I^{*}ADSGTSLLAG¹⁰⁰P¹¹⁰TAI¹²⁰VAQINHAIGAB¹³⁰GIISTE¹⁴⁰CKE¹¹⁰VVSEY¹²⁰GEMILNLLIAQASPMK
 GCAA⁹⁰I^{*}ADSGTSLLAG¹⁰⁰P¹¹⁰TAI¹²⁰IT¹³⁰INEKIGAT¹⁴⁰GVVSECKEVVSCYQCCILDLRAETKPAK

pL4
pL5
pL1

150 160 170 180 190 200
 VCSQV¹⁵⁰GLCMFDGKRSV¹⁶⁰SNGETSVVDKE¹⁷⁰-----NLGSDAMCSVCEMAV¹⁸⁰W¹⁹⁰W²⁰⁰TENQLRENKTK
 LCSQI¹⁵⁰GLCAFDGTRSVRNNIESVVDKE¹⁷⁰-----KVGSDLSCTACEMS¹⁸⁰VVW¹⁹⁰IQNQLRHNQ²⁰⁰TR
 VCSSV¹⁵⁰GLCTFDGTHGWSAGI¹⁶⁰RSVVDKE¹⁷⁰EVGKSSGPFSSAMCNACE¹⁸⁰TAVVW¹⁹⁰MHTQLAQNQTQ

pL4
pL5
pL1

210 220 230 240 250 260
 ELILN²¹⁰YANQLCERLPS²²⁰PNGESTV²³⁰SCHQISKMPNLAFTIANK²⁴⁰TFILTPEQYIVKLE²⁵⁰QGGQT
 ELILN²¹⁰YADQLCERLPS²²⁰PNGESGDDCDEISNMPNLSFTI²³⁰PNKTFILTPEQYVVKLE²⁴⁰QGGQT
 DLVLY²¹⁰YIDQLCDRLPS²²⁰PMGESSVDGSSLASMPDIAFTIGGNKE²³⁰V²⁴⁰LKPEQYILK²⁵⁰VEGTAT

pL4
pL5
pL1

270 280
 VCISGFMAED²⁷⁰IPPPRGPL²⁸⁰WLLGDVF
 VCISGFMAEDVPPPPRGPL²⁷⁰WLLGDVF
 QCISGFTAMD²⁷⁰IPPPRGPL²⁸⁰WLLGDVF

図2-5 3種のRT-PCRクローンpL4、pL5およびpL1のコードするタンパク質の相同性。
 互いの相同性が最大になるように配列し、3つに相同なアミノ酸残基は反転してある。
 *で活性中心のアスパラギン酸残基を、下線でアンチセンスのプライマー部分を示す。

(2) 他のアスパラギン酸プロテアーゼとの相同性

pL1、pL4、pL5のホモロジー検索を行なったところ、表 2-I に示すように、大麦種子APである HvAP (Runeberg-Roos et al. 1991)、*Cynara cardunculus* の花のAPであるサイプロシン (Cordeiro et al. 1994) と高い相同性を有していた。一方、動物、微生物由来のAP との相同性は約35~40% と植物APに較べると低くはなっているが、有意な相同性ももっていた。しかし、植物APは、図 2-5 の122 Thr から220 Asn (pL4の配列による) の間に、pL1では104 アミノ酸残基、pL4、pL5では99 アミノ酸残基からなる約100 アミノ酸残基の植物特異的領域が存在した。この大きなインサクションは既知の動物AP (Faust et al. 1985, Harris et al. 1982, Misono et al. 1982, Snewale et al. 1984, Marciszyn et al. 1975, Imai et al. 1983)、微生物AP (Woolford et al. 1986, Horiuchi et al. 1988, Berka et al. 1990, Arikawa et al. 1993) では存在例はなく、一方既知の植物AP (大麦、カルドン) には存在していた (Runeberg-Roos et al. 1991, Cordeiro et al. 1994)。

(3) ゲノミックサザン分析

RT-PCR により、コメ中に少なくとも3種のAPが存在することが確認された。3種のクローンについて、ゲノミックサザン分析を行ない遺伝子のコピー数の検討を行なった。完熟コメよりゲノムDNAを抽出し、各種制限酵素で消化し、ハイブリダイゼーションを行なった。

ハイブリダイゼーション温度65℃、洗いを0.1 X SSC/0.1% SDSという厳しい条件下では、図 2-6 に示すように、シングルコピーであることが示唆された。しかし、pL5をプローブとして、ハイブリダイゼーション温度50℃、洗いを2 X SSC/0.1% SDSという温和な条件で行なうと、複数のクロスするバンドが現われた (図 2-7)。

以上の結果から、AP遺伝子はコメ中には複数種が存在し、マルチジーンファミリーを形成していることが明らかになった。

表2-I RT-PCRクローンのコードするタンパク質と他の植物APとの相同性

	(%)			
	pL1	pL4	pL5	HvAP
pL4	61			
pL5	58	76		
HvAP	80	64	60	
Cyprosin	64	58	61	70

HvAP：大麦AP， Cyprosin：カルドンAP

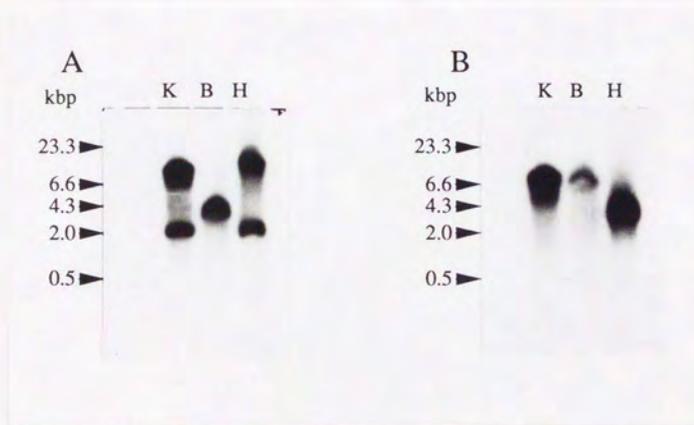


図2-6 pL4およびpL5のゲノムサザン分析

A. プローブにpL4を用いたもの

B. プローブにpL5を用いたもの

ハイブリダイゼーションは65℃で行い、洗いは0.1 x SSC / 0.1% SDSで行った。サイズマーカーの位置を左端に矢印で示してある。制限酵素の略号はK: *Kpn* I, B: *Bam*HI, H: *Hind* III。

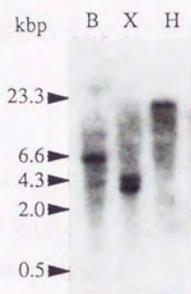


図2-7 pL5のゲノムサザン分析

pL5をプローブとして50℃でハイブリダイゼーションを行い、洗いは2xSSC/0.1% SDSで行った。サイズマーカーの位置を左端に矢印で示してある。制限酵素の略号は、B: *Bam*HI、X: *Xho*I、H: *Hind*III。

第3節 登熟イネ種子cDNAライブラリーからアスパラギン酸プロテアーゼ
cDNAクローンの単離

1. 材料および試薬

(1) 開花2週目のコメ

(2) 大腸菌

大腸菌K12株の誘導体であるC600h⁻を使用した。

(3) ヌクレオチド

λ gt10ベクターアームはPromega Biotec社、pUC18ベクター、シークエンス用 M13プライマー、及び λ ファージDNAは宝酒造株式会社、サケ精巢DNA、ATP、dATP、dCTP、dGTP、dTTPはBoehringer-Mannheim 山之内株式会社より購入した。

(4) アイソトープ

[α -³²P] dCTP水溶液 (9.25MBq) は、Amersham社 (Buckingham shire, England)より購入した。

(5) 各種キット等

in vitro パッケージングキット Gigapack II Gold は Stratagene Cloning Systems社、Multiprime DNA labelling system、Rapid hybridization buffer Batch 6はAmersham社、Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing KitはApplied Biosystems社(U.S.A.)より購入した。

(6) cDNAライブラリー作成用試薬

i. SM溶液：100mM 塩化ナトリウム

50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)

0.2% 硫酸マグネシウム・7水和物

0.01% ゼラチン

ii. 20%PEG/SM：20% ポリエチレングリコール (#6000)

2M 塩化ナトリウム

以上の濃度になるようにSM溶液に溶解した。

iii. NZCYM：1% NZアミン

0.5% 塩化ナトリウム

0.5% 酵母抽出液

0.1% カザミノ酸

0.2% 硫酸マグネシウム・7水和物

水酸化ナトリウム水溶液でpH7.5に合わせた。

iv. NZプレート

NZCYMに1.5%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、滅菌プレートに適量を流し込んで固まらせた。

v. アガロースプレート

NZCYMに0.67%のアガロースを加えてオートクレーブにより滅菌溶解した。使用時は再度オートクレーブ（5分）により滅菌溶解し、約50℃まで冷まし、その温度で使用時まで保存した。使用後はオートクレーブ（5分）してから保存した。

2. 実験方法

(1) 2本鎖cDNA合成

キットのSecond-Strand Reaction Mixに第2節(9)で合成した1本鎖cDNAを加え軽く混ぜ12℃に30分置いた後、22℃で1時間反応させた。その後65℃で10分加熱し反応を止め、室温に戻した後、フェノール・クロロホルム抽出を行い水層をセファロースCL-4B ショートカラムに通した。

(2) EcoRI/NotIアダプターの付加

合成した2本鎖cDNAに1~5 μ lのEcoRI/NotIアダプターとPEG緩衝液30 μ l、15mM ATP溶液1 μ l、T4 DNA ligase 1 μ lを加え、16 $^{\circ}$ Cで1時間反応した。その後65 $^{\circ}$ Cで10分加熱し氷中で冷却した。次に1.5 μ lの75mM ATP溶液1 μ l、T4 Polynucleotide Kinaseを1 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで30分反応した後65 $^{\circ}$ Cで10分加熱し、室温まで戻した後、フェノール・クロロホルム抽出を行い水層をセファロースCL-4Bショートカラムに通した。

(3) cDNAの長さによる分画

アダプターを付加した2本鎖cDNAを低融点アガロースゲルで電気泳動し、約0.5kbp以上を切り出して精製した。最終的に19 μ l約0.3 μ gの λ gt10ベクターアームDNAを加え1 \times ライゲーションバッファーに溶解した後エタノール沈殿し、沈殿を8 μ lの1 \times ライゲーションバッファーに溶解した。

(4) λ gt10ベクターへの連結

先の0.5kbp以上のcDNA1 μ l (30ng)と1 μ l (500ng)の λ gt10ベクター、1mM ATPを混合して、0.5 μ lのT4DNAリガーゼを加えて一度氷中で冷却し16 $^{\circ}$ Cで一晩連結した。これに、市販のパッケージングキット (Gigapack II Gold) を用いて、22 $^{\circ}$ Cで2時間反応させ、連結したDNAをパッケージングし、ファージ粒子を形成させた。パッケージング反応後、0.5mlのSM溶液と1~2滴のクロロホルムを加え、軽く振盪混和して、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

(5) ファージの力価測定

i. 指示菌の調製

0.2%のマルトースを含むNZCYM20mlに指示菌 (大腸菌C600Hfl) を入れて、37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。4 $^{\circ}$ C、3000rpmで10分間遠心して集菌し、10mlの10mM硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した。

ii. ファージの感染

指示菌 $100\mu\text{l}$ に、(4)で調製したファージ液 $0.5\mu\text{l}\sim 5\mu\text{l}$ を加え、 37°C で15分間感染させてから、一度溶解して 50°C に保存しておいたソフトアガロスを 2.5ml 加え、直ちにNZプレート(小)に撒いた。 37°C で一晩保温してプラークを生じさせた。

(6) cDNAライブラリーの作製

ii. の結果からファージ液 $1\mu\text{l}$ 当りのファージ粒子数を算出し、NZプレート(大)1枚当りのプラーク数が1万~4万になるように指示菌 $400\mu\text{l}$ にファージ液を加え、 37°C で15分間感染させてから溶解し、 50°C に保温しておいたソフトアガロスを 7.5ml 加えて、直ちにNZプレート(大)に撒いた。 37°C で一晩保温してプラークを生じさせた。

(7) プロープの作製

第2節で得られた3種のRT-PCRクローン約 $10\mu\text{g}$ を、過剰量の *EcoRI*、*HindIII*で消化したのち、第2節(5)の方法で、インサートDNAを抽出し、第2節(7)の方法で ^{32}P ラベルした。

(8) プラークリフティング

コロニーリフティングと同様に行った。

(9) プラークハイブリダイゼーション

i. プレハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

ii. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッファー 1ml 当たりそれぞれ $100\mu\text{g}$ のキャリアーDNAとサケ精子DNAに、約 100万cpm/ml となるようにプロープDNA ($\text{pL}1$ 、 $\text{pL}4$ 、 $\text{pL}5$ の混合)を加え、これに約2倍量の水を加えて沸騰水中で10分間加熱した後、氷水中で急冷した。

室温に戻してからハイブリダイゼーションバッファーを加えてよく混合し、プレハイブリダイゼーション後のフィルターとともにポリバッグにシールした。60℃で24時間ハイブリダイゼーションを行った。

iii. 洗浄

フィルターはまず3×SSC/0.1%SDS中、室温で1回洗浄した後、1×SSC / 0.1%SDSで2回洗浄した。

iv. オートラジオグラフィ

洗浄後フィルターを風乾、Whatman3MMろ紙に貼り付け、増感用スクリーン (Dupont Lightening Plus) を用いて-80℃でX線フィルム (フジフィルム社) に、露光させた。

(10) スクリーニング

i. 単ブランク単離

ブランクハイブリダイゼーションによって陽性となったブランクをマークの位置からプレート上に同定し、その部分のプレートをアガーごとパスツールピペット (210℃で乾熱滅菌したものを使用) で吸い取り、1滴のクロロホルムの入った1mlのSM溶液に入れてよく攪拌し、室温で1時間以上放置した。この液のファージ力価を測定した後、1プレート当りのブランク数が100~200個となるようにNZプレート (小) に撒き、ナイロンフィルターを作製してブランクハイブリダイゼーションを行い、独立した1つのブランクに由来する陽性なブランクを単離した。目的のブランクを、同じくプレートのアガーごとパスツールピペットで吸い取り、クロロホルムを1滴加えた0.5mlのSM溶液に入れ、よく攪拌し、室温で1時間以上放置してから4℃で保存した。

ii. ファージDNAの精製

i. で単離したファージ懸濁液100 μ lに、指示菌300 μ lを加え、37℃で15分間保温してから、2.5mlのソフトアガロースを加え、アガロースプレートに撒いた。37℃で一晩

保温し、プレート全面が溶菌斑で覆われていることを確認して、これに5mlのSM溶液と2滴のクロロホルムとを加え、室温で1時間以上振盪した。ファージ粒子が遊離した懸濁液を遠心管に移し、0℃、13,000rpmで10分間遠心して菌残渣を除き、DNase I及びRNase Aを各10 μ g加えて37℃で30分間消化した。これに5mlの20%PEG/SMを加え氷中で1時間静置してから、0℃、13,000rpmで10分間遠心し、上清を除いた。沈澱を0.5mlのSM溶液に懸濁した後、エッペンドルフチューブに移して10 μ lの10%SDSと10 μ lの0.5M EDTA (pH8.0)を加えて65℃で10分間保温し、タンパク質を変性させた。フェノール・クロロホルム抽出を3回以上行い、水層のDNAをエタノール沈澱で集め、最終的に60 μ lの水に溶解して-20℃で保存した。このうち20 μ lを30~80ユニットのNodで完全消化し、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い、消化産物を精製、回収した。消化産物の半量をサザン分析に、あと半量を次のサブクローニングに用いた。

3. 結果および考察

(1) 制限酵素地図の作製

第2節で得られた3種のAPのcDNAフラグメントをプローブとして32万個のブラークからなる開花2週目の登熟種子ライブラリーをスクリーニングした。その結果、5個の陽性クローンを得た(図2-8)。5個のクローンは制限酵素地図が等しく同一のクローンをコードしていた。図2-8に示したシーケンスストラテジにしたがって塩基配列を決定した。

(2) cDNAクローンの塩基配列と推定アミノ酸配列の決定

5個のクローンのうち、 λ cRAP4と λ cRAP12はノーザン分析で推定されたmRNA約2.1 kbpとほぼ長さが等しいことから、cDNAの全長をコードしていると考えられた(図

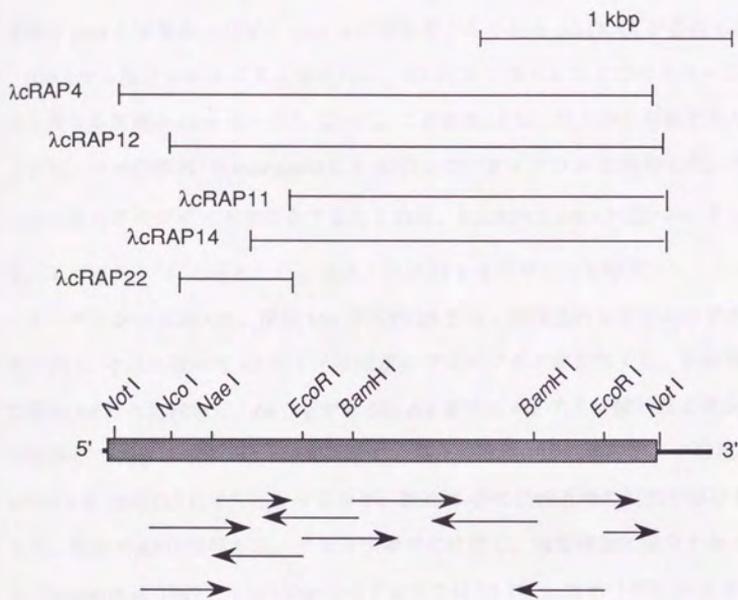


図2-8 cDNAライブラリーより得られた5種のcDNAクローンの制限酵素地図
太線はコード領域を示し、矢印は塩基配列を決定した方向と長さを示す。

2-9)。

最も長い λ cRAP4は2027 bpであり、open reading frameは、大麦HvAP cDNAとの比較から開始Metを決定した。 λ cRAP4および、 λ cRAP12は、509 アミノ酸をコードし、3'末端にpoly Aはなかったが、poly A付加シグナルであるAATAAAが存在した。

cDNAから推定されるアミノ酸配列は、RT-PCRで得られた3つのクローンのいずれとも異なる新規のAPをコードしていた。この新規APは、コメ中に存在するAPということから、コメの学名(*Oryza sativa* L.)に因んで、オリザシンと命名した。オリザシンには複数のアイソザイムが存在することから、 λ cRAP4と λ cRAP12がコードしているAPを、オリザシン1と命名した。以後、コメAPをオリザシンと呼ぶ。

オリザシン1 cDNAは、開始Metから約20アミノ酸残基のシグナルペプチドがあり(図2-10)、それに続いて47アミノ酸残基のプロペプチドが存在する。成熟型酵素は、大麦HvAPとの比較から、68 Glyから509 Alaまでの442アミノ酸残基と推定される。活性中心のAspは103 Aspと290 Aspで、各々の活性中心近傍のアミノ酸配列は102F DTGSS, 290DSGTSとなっており、既知のAPの活性近傍の配列が保存されていた。また、既知のAPに保存され、フラップ領域に位置し、触媒機能に関与するとされている(Suzuki et al. 1989) 147 Tyr (ペブシンでは75 Tyr)はオリザシン1でも保存されていた。

47アミノ酸残基よりなるプロ配列は、塩基性アミノ酸に富み、他のAPであるペブシン、カテブシンDと類似のアミノ酸構成となっていた。。ペブシンの場合ペブシノーゲンとして合成され、プロペプチドが除去され活性型ペブシンとなる。ペブシノーゲンのプロペプチドはペブシンのカルボキシル基と静電的に結合し活性中心近傍をブロックしており、この際塩基性アミノ酸が重要であると考えられている。オリザシンにおいてもペブシンの様な活性化機構が予想される。

プロペプチドには、ペブシンの様に活性発現制御に係わる働きの他に、ソーティングシグナルとなる配列が存在することも知られている。植物では液胞ソーティングシ

AGCTCGGTTGTTGCTGCTGCTGCTCCTCCGGTTTTCCGATCCGAGCC

ATGGAAACCCGACGCTGGCTTCCTCGCGGGCGGCTGCTCCAGGCCCTCCCTCCCGTTGGGGAGGAGGTTGGTCCGATTCGGCGCTGAAGAAGCGCCGATCGACGAG
 M G T R S V A L V L L A A V L L Q A L L P A S A G E G L V R I A L K K R P I D E 40
 AACAGCGGGTCCGCGCCGCACTCTCGCGCAGAAAGGGCGCGCGGCTGGCGCCGCAACTCCCTTGGCGCGCGGAGTGAAGGGGACATCGCTGGCGCTGAAGAATAC
 N S K R V A L S G E G A R R L G L R G A N S L G G G G G E G D I V A L K N Y 80
 ATGAAGCCAGTACTTCGGGGAAATTGGCTGGGCACTCCCGCGCAGAAATTCACCGTCACTTCAGACTCCAAAGCTCGGCTGGGTCGGCCCAAGCTACTTCTCGATT
 M N A Q Y F G E I G V T P P Q K F I F D T G S S N L W V P S A A K C T Y F S I 120
 CGGTGCTTCCACTCTCCFACAAGTCCGGACAGTGGAGCAATTCAGAAGAATGAAMAAACCTGGCACTCAGATGSCACTGGTTCOAATGGTGGGTTTTTCAGCGAGGATACT
 A C F H S R Y K S G O S S T Y Q K N G K P A A I Q Y G T G S I A G F F S E D S 160
 GTTACAGTGGTCACTGCTGCAAGGACGGAATTCATGAACTACCAAGGACGAGGCTTACTTCTT F M V A K A K F T G A T G C G A I T T C T G G G T T G G A T T C A G A A T A
 V T V G D E L V V Q A A Q C G G A I T E A T K E P G L T T F M V A K A K F T G A T G C G A I T T C T G G G T T G G A T T C A G A A T A 200
 TCCGTTGGAGTCCAGTACTGCTGCTAGATGAGTGTAGCAGCAAGCTTGTGCACTGACCCCTGTTTCTCCCTTGGTTCAACCGTCACTGTAGAGGAGAGCTGGTGAATTGTG
 S V G D A V P V W Y K M V E Q G L V S E P V F S F W F N R H S D E G E G E I V 240
 TTTGGAGGATGGATCCCTAGCCACTACAGGCAACCATACATATGTCACAGTCTCCAGAGGATAATGGCAAGTATTGGCAAGTTGAGTAGGAGGAGCTGCTCAATGGAGAAAGCACCAAGATT
 F G G M D P S H Y K G N H T Y V V P V S Q K G Y W Q F E M G D V L I G G K T T G F 280
 TGTCTAGCGTGTTCACGCTATAGCAGACTCTGGACATCAATGGTCTGGCCCCACAGCCATACTCACTGAATCAATCAGAGATCGGTCTACTGGGTACTCACCAGAACTG
 C A S G C S A I A S G T S L L A G P T A I I T E I N E K I G A T G V V S Q E C 320
 AAGACAGTGTCTCAATATGGACAACAGATCCTAGATCTGTGTGCTGAGACAGCCATCAAAATCTGCTCAGGTTGGTGTGCTACTTTTATGGAGAGCTGGTGTACT
 K T V V S V V D D E A G E S N G L Q S G P M C N A C E M A V V W M Q N Q L A Q N 360
 SCTGGAAATTAAGAGCTAGTAGATGATGAGCTGTGTGACAGCTCCGAACTCCCAAGTGGTCCCAATGCTCCAGATGCGCTGCAATGCCCTGTGAGATGGCTTGTATGATCGACACCACTTCGACAGAAC
 A G I K S V V D D E A G E S N G L Q S G P M C N A C E M A V V W M Q N Q L A Q N 400
 AAGACTCAGGATCTCACTTGAAGTACATTAATCAGCTGTGTGACAGCTATTTCTGAAGTTGTCAGAGAGCTCTGCCACNGTCCGACCTTGCATCCATCGCTGAGATTTCAITACC
 K T Q D L I L N Y I N Q L C D K L P S P M G E S S V D C G S L A S M P E I S F T 440
 ATTGGAGCCAAAAGTTTGCAGTCCACCTACCAACCGTGTTCGACTACCGCCAGATGAGGGTGTGCTGGCGAAGTCCGGGCTTAAACGGTGTGTCACGCTTCCATGACGAG
 I G A K K F A L K P E E Y I L K V G E G A A A Q C I S G F T A M D I P P P R G P 480
 CTCTGATCCCTGGGTGACGTTTTCATGGTCCCTACCAACCGTGTTCGACTACCGCCAGATGAGGGTGTGCTGGCGAAGTCCGGGCTTAAACGGTGTGTCACGCTTCCATGACGAG
 L W I L G D V F M G A Y H I V F D Y G K M R V G F A K S A * 520
 GTGACCGATTCGGGAGAGAGACCGCTTACTAGCGTATTTATCCGGCGATGTGTATATGCACTGCTACATAACATGTTTATGTTTCCAGGCCGTGAGATGGCGC
 CCTGATTTTTCGCTTGGAGATATCCGGACAGCTCTGTTGCAATTCGCTGATGATGCTGCACTGTAACATGACATGCGACTGTGTTTGTGACTGATTCGATTCGCGA
 ASGTHATTCGATCCGATGGAGAGCCCGGATATTCGAGCTGTGATTCGAGCTGTGATTCAGCTTAAAGCCCTTAAAGCTGAGTGGTGGTCTTCACGATAAATCTAAGTGGTGGTCTTCAG
 CTGAGTCTTCCACTTACTCTTACTCTCTCCGCTCCCAATATAA AGA 1920

図2-9-9 λcR4P4 (オリザシン1) の塩基配列および推定アミノ酸配列
 黒四角は2つの活性中心のアスパラギン酸残基の位置を示す。1本下線はシグナル配列を示し二重下線は糖鎖付
 加部位を示す。上向き矢印(↑)は成熟酵素のN末端を示す。ボリ(A)付加シグナル配列は下線太字で示した。
 上段の番号は開始メチオニンを1としたときの塩基数を示し、下段は、アミノ酸残基数を示す。

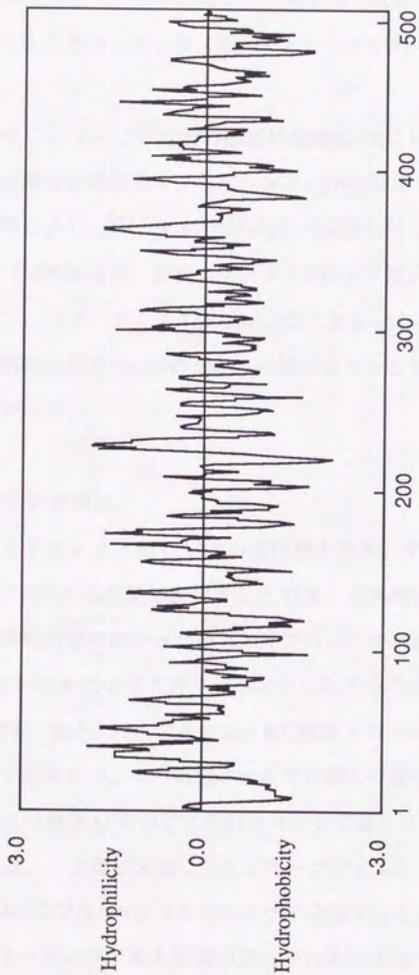


図2-10 オリザシン1の疎水性度の分布

疎水性度はHoop&Woodらの方法を用いて5アミノ酸の平均値として算出した。横軸はオリザシンのアミノ酸数を示す。

ゲナルとして、さつまいもスボラミンのプロシークエンス中に (Matsuoka and Nakamura 1991) 存在する N P I R 配列が報告されている。大麦アリュレーイン (Holwerda et al. 1991) や、ポテト 22kDa プロテイン (Suh et al. 1990)、ポテトカタブシン D インヒビター (Strukelj et al. 1990) といったタンパク質も液胞において存在が確認されており、これらのプロ配列中にもコンセンサス配列として N X (I/L) R が存在する。オリザシン 1 にも N S L G というこのコンセンサス配列に近いものがあり、液胞酵素である可能性が示唆された。

また、オリザシン 1 には 2 ヶ所の糖鎖付加部位 (252 N H T, 400 N K T) が存在した。このうち後者は植物に特有なインサクションの中に位置しており、HvAP、サイプロシン、第 2 節で得た pL1、pL4、pL5 いずれもこの位置には、糖鎖付加部位が存在した。

オリザシン 1 cDNA には、終止コドンより 433bp 下流にポリ A 付加シグナル AATAAA が存在し、3' ノンコーディング領域が少なくとも 450bp 以上あり、コード領域では非常に高い相同性を示す HvAP の 280bp に較べるとかなり長く、両者のこの領域における相同性は低かった。

(3) 他の AP との相同性

表 2-II にオリザシン 1 と他の AP との相同性を示す。オリザシン 1 は HvAP と非常に相同性が高く、cDNA の全長を比較すると 85%、成熟酵素部分では 88% の相同性を有していた。次に相同性の高かったのはサイプロシンで、成熟酵素部分では 73% であった。前節で、RT-PCR によりスクリーニングした 3 つのクローンとの相同性は pL1 とは 82%、pL4、64%、pL5、59% であった。RT-PCR クローンは各々がコードする cDNA のフラグメントであるので、この数値は全長で比較した場合とは幾分誤差が生じるものの、pL4 や pL5 とは植物 AP の中では相同性は決して高くはない。オリザシン 1 を含めてコメの AP 4 種は、一次構造を基にしてグループ化するとオリザシン 1 および pL1 のグループと、pL4 および pL5 の 2 つのグループに分類することができる。

植物プロテアーゼの中で最も研究が進んでいるのは CP であるが、大麦の CP は分泌

表2-I I オリザシン1と他のAPとの相同性

	oryzasin1 full length	oryzasin1 mature region
HvAP	85	88
Cyprosin	67	73
HCD	45	49
HCE	43	46
Pepsin	41	45
RR	39	44
BC	38	42
YPA	45	45
RNAP	34	35
mLAP	48	53

HvAP: 大麦 AP (Runeberg-Roos et al. 1991)

Cyprosin: カルドン花 AP (Cordeiro et al. 1994),

HCD: ヒトカテプシン D (Faust et al. 1985),

HCE: ヒトカテプシン E (Azuma et al. 1989),

Pepsin: ヒトペプシノーゲン A (Sogawa et al. 1983),

RR: ラットレニン (Fukamizu et al. 1988),

BC: ウシキモシン (Harris et al. 1982),

YPA: 酵母プロテイナーゼ A (Woolford et al. 1986),

RNAP: リゾプスベプシン (Horiuchi et al. 1988),

mLAP: 蚊リソソーム AP (Cho and Raikhel 1992)

型のEP-A、EP-Bと非分泌型のアリュウレインが見い出されている(Shutov et al.1987, Holwerda et al.1992)。アリュウレインは、植物CPのパバイン、アクチニジン以上に動物のカテプシンHと高い相同性を持っている(Rogers et al.1985)。コメのCPであるオリザシンも α 、 β 、 γ の3種のアイズォイムが存在して α 、 β はパバインと γ はアリュウレインやカテプシンHと相同性が高く、しかもジベレリンに対する応答性が異なっていた(Watanabe et al.1991)。APの場合、複数のアイズォイムが異なる機能や活性化機構等を有するという報告はない。しかし、オリザシンとHvAPが非常に高い相同性を持ち同じコメの他のAPとは相同性が低くなっていることから、複数のAPは、植物体内で異なる役割を分担している可能性が高い。

一方、オリザシン1と植物以外のAPとの相同性は図2-11に示すように植物APに比べるとかなり低く、最も相同性が高いもので蚊リソソームAP(mLAP)の53%、続いてヒトカテプシンD(HCD)(Faust et al.1985)の49%、ヒトカテプシンE(HCE)(Azuma et al.1989)46%、酵母のプロテイナーゼA(Woolford et al.1986)45%であり、全体として35~53%であった(表2-II)。

植物APには、動物や微生物由来のAPには存在しない約100アミノ酸残基からなる巨大なインサーションが存在する。この巨大なインサーションは機能的にはどのような働きをもつのであろうか。HvAPでは、 $kcat/Km$ を測定したところ、これが、HCDとYPAに近似していたとの報告がある(Kervinen et al.1993)。とすれば、インサーションペプチドは、酵素活性には影響を与えていないと推定される。インサーションの一次構造と相同性のあるものを、データベースで検索を行なった。しかし、有意に相同性をもつものは見当たらなかった。最近、GuruprasadらによってHvAPのインサーションの二次構造がサポシンと類似しているという報告がなされた(Guruprasad et al.1994)。サポシンは、グルコシダーゼを活性化し、プロカテプシンDの液胞へのターゲティングに重要な役割を果たす。サポシンは液胞に存在するタンパク質であり、HvAPが分子内にサポシン様の配列をもつことは、HvAPが自身で、液胞へソーティングする可能性を示すというものであった。オリザシン1 cDNAから推定される一次構造はHvAPと非

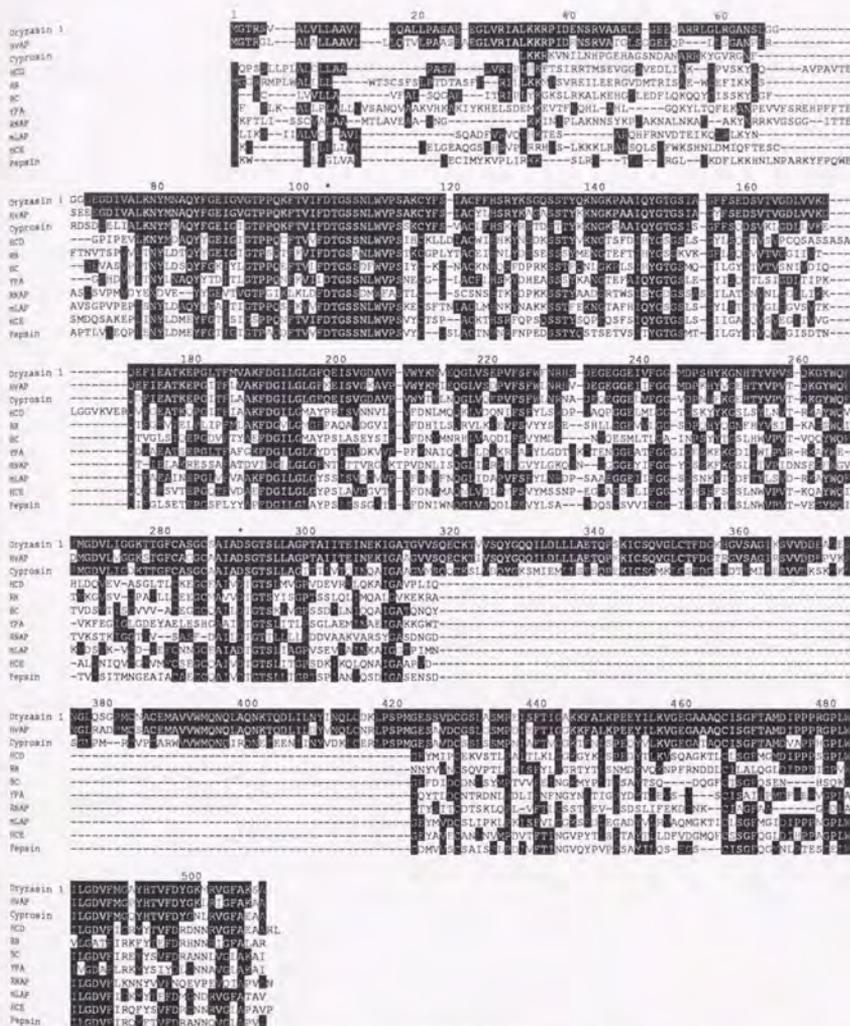


図2-11 オリザシン1と他のAPとの相同性

*は活性中心のアスパラギン酸残基を示す。アミノ酸はオリザシン1との相同性が最も高くなるように並べ、相同なアミノ酸を白抜きで示した。各酵素の成熟タンパク質のN末端は二段目の左端に来るように並べた。上段の番号はオリザシン1のアミノ酸番号である。酵素の略号を以下に示す、Oryzasin1：オリザシン1、HvAP：大麦AP、Cyprosin：カルドン花AP、HCD：ヒトカテプシンD、RR：ラットレニン、BC：ウシキモシン、YPA：酵母プロテイナーゼA、RNAP：リゾブスベプシン、mLAP：蚊リソゾームAP、HCE：ヒトカテプシンE、Pepsin：ヒトペプシノーゲンA。

常に相同性が高く、このことはオリザシンの機能を解明する手掛かりとなると思われる。

第3章

オリザシンmRNAの発現

第1節 緒言

前章では、RT-PCR 及び cDNA ライブラリーをスクリーニングし、オリザシンcDNA の構造解析を行った。cDNA クローンを単離する際行なったRT-PCRでは、開花2週目、及び完熟種子では、オリザシンをコードするバンドが増幅されたが、発芽8日目の種子を用いた場合には該当するバンドは生成しなかった。このことから、APが時期特異的発現をすることが予想された。また、コメのシステインプロテアーゼであるオリザインは、ジベレリンによる発現誘導を受けるが、オリザシンも植物ホルモンのレスポンスをするか否かは興味深い。そこで、本章ではオリザシンの発現機構を解明することを目的としてノーザン分析を行なった。

第2節 材料および方法

1. 材料および試薬

(1) コメ

コメ日本晴（東京大学農学部付属田無農場より恵与）を使用した。また、登熟期の種子及び植物体も、同農場より同品種のものを恵与いただいた。

(2) 植物ホルモン

ジベレリン A3（半井化学）

β -インドール酸カリウム（和光純薬）

トランスゼアチン（和光純薬）

β -クロロエチルリン酸ジクロリド（和光純薬）

ジャスモン酸（東京大学・山根久和博士より恵与）

アブシジン酸（和光純薬）

(3) RNA電気泳動試薬

i. 10×MOPS : 0.4M MOPS (モノフォリノプロパンスルホン酸)

0.1M 酢酸ナトリウム

10mM EDTA

pH7.0に合わせ、オートクレーブする。

ii. 20×SSC : 3M塩化ナトリウム

0.3Mクエン酸三ナトリウム

使用時には必要に応じて希釈した。

(4) RNA抽出用試薬

i. RNA抽出緩衝液 : 100mM Tris-HCl (pH8.0)

5mM EDTA (pH8.0)

1% SDS

ii. 1M DTT : 滅菌水に溶解後 -20℃保存

iii. 5M LiCl

試薬類は、すべて特級を用いた。

2. 実験方法

(1) 発芽過程での発現

水を添加したパーミキュライトの上に種子を置き、30℃ 明条件で発芽させた。インキュベート開始後、3, 5, 8日目の種子からRNAを抽出した。

(2) 登熟過程での発現

田無農場で栽培されている日本晴を開花、2,3,4週目ごとに種子を収穫し、RNAを抽出した。

(3) 各種植物ホルモンの効果

完熟種子をジベレリンA3 (1mM)、 β -インドール酸カリウム (1ppm)、トランスゼアチン (0.2ppm)、 β -クロロエチルリン酸ジクロリド (1ppm)、ジャスモン酸

(1ppm)、およびアブシジン酸(1ppm)各1種を含む水に入れ、30℃、4時間および24時間インキュベートした後、RNAを抽出した。

同様に、開花2週目のイネの穂より約10cm下を上記のホルモンの水溶液中で切り、そのまま切り口を溶液に浸した状態で30℃、4時間および24時間おいた後RNAを抽出した。

(4) RNAの電気泳動

72mlの滅菌水にアガロース1gを加えて滅菌溶解し、約65℃に保温しながら10×MOPS緩衝液10mlとホルムアルデヒド18mlを素早く加えてゲルを作製した。泳動試料には1/10量の泳動用色素を加え、1×MOPS緩衝液中、50V定電圧で泳動した。泳動マーカースは0.5μg/mlエチジウムブロマイド溶液で一晩染色後、トランスイルミネーターを用いて、紫外線照射で検出し、定規を添付してポラロイドフィルムに記録した。

(5) ノーザン分析

i. プロットイング (核酸の転写)

RNA10μgに5μlの10×MOPS緩衝液、8.75μlのホルムアルデヒド、25μlのホルムアミドを加え、水で総量を50μlにし、55℃で15分間変性させ、氷中で冷却し、これをRNA用1%アガロースゲルで、50V定電圧、1×MOPS緩衝液中で電気泳動した。泳動後、ゲルを3分間水洗してからプロットイングに供した。20×SSCで満たした2つのタッパーにラップで覆ったガラス板を架橋させ、前もって20×SSCに浸しておいたWhatman 3MM口紙を両端が20×SSCに浸るように載せ、その上にゲルを置き、ゲルの周りの口紙はラップで覆い、これらの上に、前もって20×SSCに浸しておいたナイロンフィルター、20×SSCに浸したWhatman 3MM口紙、乾いた口紙、乾いたペーパータオル(2~3cm分)を順に載せ、さらに平らなガラス板と約1kgの重しを重ね、室温で6時間以上放置して、RNAをフィルターに転写した。フィルター上にボールペンでゲルのスロットの位置をマークしたのちフィルターを剥がし、20×SSCで約3分間洗浄し、第2章のサ

ザンプロッティングと同様にRNAをフィルターに固定した。

ii. ノーザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーション（第2章）と同様に行った。

第3節 結果

1. オリザシン 1 mRNAの発現時期

ノーザン分析の結果、2.1kbにオリザシン 1 mRNAのバンドが検出された。その発現量は、開花後2週目が最も多く、3週目、4週目の登熟後期でも相当量の発現が見られた。しかし、完熟種子では著しく減少していた(図3-1)。一方、発芽期のオリザシンの発現は、発芽後（種子を洗い、土に蒔いたときから数える）3, 5, 7日目の種子、5, 7日目の根と芽について、ノーザン分析を行なったところ、種子では、3日目には、発現量が非常に多かったが、5日目ではやや減少し、8日目ではほとんど発現が検出されない程になった。幼芽でも、5日目には明らかに発現していたものの、7日目（芽は約10cmほどに伸びていた）には、全く発現しておらず、幼根では5日目に多く発現し、7日目には減少していた。しかし、根では、種子や芽のように全く発現が消失することはなく、十分に検出できる程度の発現量が存在した(図3-1)。

2. RT-PCR クローン pL5 の発現時期

RT-PCR クローン pL5について、オリザシン 1と同様の方法でmRNAの発現量を調べた。pL5は登熟期には発現したが、発芽期の種子には検出されなかった。ところが、発芽直後の幼根と幼芽では発現量が多かった(図3-2)。

3. 各種植物ホルモンの効果

オリザシン 1は、完熟種子をホルモン溶液に浸漬した場合、開花後2週目の植物体

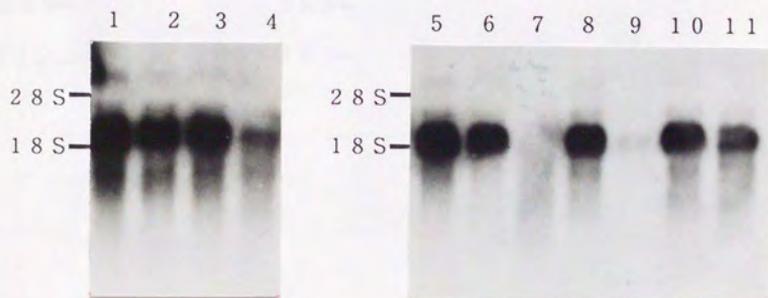


図3-1 コメ登熟期および発芽期におけるオリザシン1 mRNAの発現

10 μ g の RNA を泳動し、プローブには³²P 標識したオリザシン1 cDNA の *Eco*RI 1.2 kbp 断片を用いた。1：開花2週目、2：開花3週目、3：開花4週目、4：完熟種子、5：発芽3日目の種子、6：発芽5日目の種子、7：発芽7日目の種子、8：発芽5日目の芽、9：発芽7日目の芽、10：発芽5日目の根、11：発芽7日目の根。

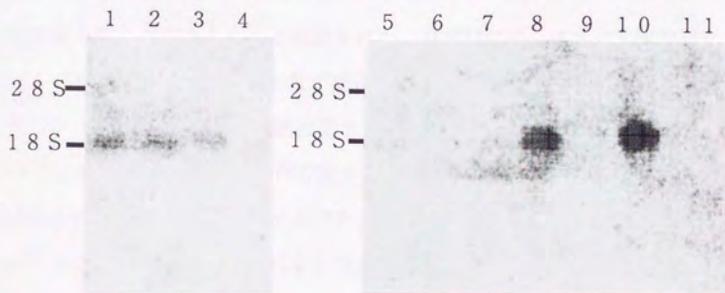


図3-2 コメ登熟期および発芽期におけるpL5 mRNAの発現

10 μ gのRNAを泳動し、プローブには 32 P標識したpL5のEcoRI-HindIII 0.8 kbp断片を用いた。1：開花2週目、2：開花3週目、3：開花4週目、4：完熟種子、5：発芽3日目の種子、6：発芽5日目の種子、7：発芽7日目の種子、8：発芽5日目の芽、9：発芽7日目の芽、10：発芽5日目の根、11：発芽7日目の根。

にホルモン溶液を吸収させた場合、いずれも、上記5種のホルモンによる誘導は全く受けなかった。

第4節 考察

オリザシン 1 mRNAは、開花直後から生合成され、種子が熟するまでの間に起こる生理現象と関わりがあるものと推定された。登熟期には、イネの主要貯蔵タンパク質であるグルテリンmRNAの発現量が開花後3週目に最大となる (Okita et al. 1989)。オリザシン 1はこれに先立ち登熟初期から発現し、完熟に至るまでの間発現量は多い。このことから、オリザシン 1が貯蔵タンパク質のプロセッシングを行なっている可能性が考えられる。登熟期の貯蔵タンパク質はプレプロ体で生合成され、その後プロセッシング、すなわちプロテアーゼによる限定分解を受けて成熟体となる。大豆グリシニン はCPにより酸性pH下でAsn-Gly結合が水解を受け (Scott et al. 1992)、アラビドプシスの 2Sアルブミンは、APによって成熟型へと変換されるという報告もあり (D'Hondt et al. 1993)、オリザシン 1も貯蔵タンパク質のプロセッシングに関与している可能性が考えられる。種子が完熟となり水分が減少して休眠期に入った完熟種子では、貯蔵タンパク質のプロセッシングは必要最小限に留まり、オリザシン 1の生合成も休止すると思われる。

オリザシン 1は、発芽初期の貯蔵タンパク質が激しく代謝される時期に発現量が多かった。発芽期に特異的に発現するシステインプロテアーゼ、オリザインでは、 α 、 γ は、発芽5日目で発現量が最大となり、 β のみはこれよりも早く3日目に発現量は最大となる (Watanabe et al. 1991)。オリザシン mRNA量は β と同様、発芽種子の早い時期に他のプロテアーゼに先立って発現する。しかしながら、オリザシン 1の標的タンパク質は不明であり、今後の解析が待たれる。一方、pL5の発現パターンは幼根、幼芽に発現量が多く、オリザシン 1とは異なっていた。このことは、複数のオリザシンが各々異なる役割を担っている可能性を示唆している。

また、オリザシン 1 は植物ホルモンの誘導を受けなかったが、HvAPも各種植物ホルモンの誘導されなかったという報告がある(Törmäkangas et al. 1994)。APは、GA3によって誘導を受けるCPとは、生合成における制御機構が異なるものと思われる。

第4章

オリザシン 1 の遺伝子解析

第1節 緒言

開花2週目の登熟種子から、アスパラギン酸プロテアーゼのcDNAクローンを単離し、これをオリザシン(oryzasin) 1と命名した。オリザシン 1 cDNAの一次構造は、動物、微生物由来のAPとは35~40%と相同性が低かったが、植物APのHvAP (大麦; Runeberg-Roos et al. 1991)、サイプロシン (カルドン; Cordeiro et al. 1994) とは各々88%、73%と高い相同性を有していた (Asakura et al. 1995a)。

植物APに関しては、上記の3種の植物由来のcDNAがクローニングされているのみで、植物APの遺伝子構造は報告例がない。動物APでは、その遺伝子構造の多くが解析されており、いずれも、9エキソン8イントロンの構造をとる (Sogawa et al. 1983, Redecker et al. 1991, Fukamizu et al. 1988, Hidaka et al. 1986)。ヒトレニン (Miyazaki et al. 1984) が9bpの小さなエキソンをもち、10エキソン9イントロンになっている例外を除くと、既知のAP遺伝子は類似の構造をもち、しかも、イントロンの挿入位置は、すべてのAPで一致している。

一方、微生物由来のAP遺伝子は、全くイントロンが存在していない酵母のプロテイナーゼA (Woolford et al. 1986)、2エキソンに分断されているリゾプスベプシン (Horiuchi et al. 1988)、4エキソンに分断されているアスペルギロベプシン (Berka et al. 1990) 等の報告がある。

オリザシンをはじめ植物APは、動物、微生物由来の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存在していた。インサクションの挿入位置が動物AP遺伝子の、第8イントロンの挿入位置とほぼ一致することから、このインサクションは、進化過程で、ウイルス遺伝子などが挿入されてしまったのだろうという推論も出されていた (Runeberg-Roos et al. 1991)。しかし、植物APの遺伝子の解析例は皆無であり、これらの仮説は、実証されるに至っていない。オリザシンの遺伝子構造を解明することは、植物APと他のAPとの類縁関係や発現制御機構の解明にもつながると思われた。本章ではオリザシンの遺伝子クローニングを行い、構造解析を行なった。

第2節 材料および方法

1. イネ遺伝子ライブラリー

イネ遺伝子ライブラリーは、ベクターとして λ EMBL3を用いたものでStratagene社より購入した。宿主菌としてLE392株を用い、約100万ブランクのファージをナイロンフィルター (HybondTM-N, Amersham) にトランスファーした。

2. スクリーニング

プローブには、オリザシン 1 cDNAのEcoRI断片 (約1.2kbp) を用い、第2章で述べたランダムプライミングkitを用いて³²P-ラベルを行なった。フィルターは60°Cで24時間、大腸菌キャリアDNAおよびサーモン精巢DNAにてプレハイブリダイゼーションを行なった。プレハイブリダイゼーション後、上記のプローブにて60°Cで24時間ハイブリダイゼーションを行なった。0.1% SDSを含む1×SSCにて60°Cで洗浄した。

陽性となったシングルブランクからファージDNAを抽出し、そのSalI消化物に対して上記のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性となった断片をpUC18にサブクローニングした。

第3節 結果および考察

1. クローンの単離と制御酵素地図の作製

約100万ブランクからなるライブラリーをスクリーニングしたところ、1つの陽性クローン λ gRAP11が得られた。 λ gRAP11は約10kbpであり、図4-1の制限酵素地図に示すシークエンストラテジに従って塩基配列を決定した。

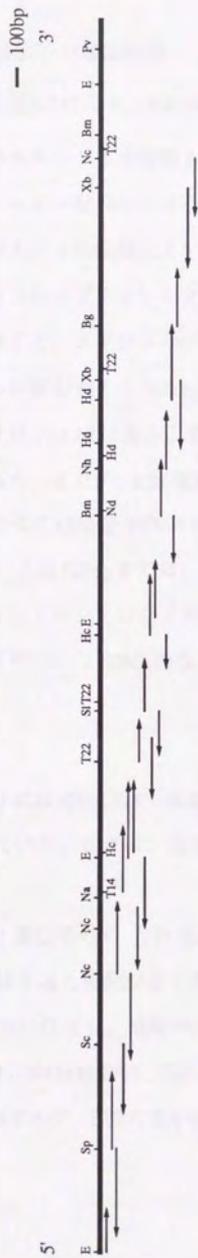


図4-1 コメゲノムライブラリーより得られたλファージクローンλgRAP3の制限酵素地図

矢印は塩基配列を決定した方向を示す。制限酵素の略号は、Bm: *Bam*HI, Bg: *Bgl*II, E: *Eco*RI, Hc: *Hinc*II, Hd: *Hind*III, Nc: *Nco*I, Nd: *Nde*I, Nh: *Nhe*I, Na: *Nae*I, Pv: *Pvu*II, Sc: *Sac*I, Sl: *Sal*I, Sp: *Spe*I, T14: *Eco*T14I, T22: *Eco*T22I, Xb: *Xba*I。

2. オリザシン 1 遺伝子の塩基配列

λgRAP11の塩基配列を図4-2に示す。約6.6kbpのオリザシン 1 遺伝子は、13個のイントロンで分断され、14のエキソンより構築されていた。第1イントロンはcDNAの開始Metよりも9bp上流のリーダー配列中に存在した。活性中心の2つのアスパラギン酸は、第2エキソンと第8エキソンに位置していた(図4-3)。

エキソンとイントロンのスプライシングは、GT/AGルールに従っており、図4-4に示す様に、1か所をのぞくと、エキシソンの3'末端はすべてGになっていた。エキシソンのサイズは、第1エキシソンが最も大きく366 bpであるが、その他のエキシソンは、細かく分断されていた。イントロンはATに富み、最も比率の低い第2イントロンで51%であり、第9イントロンは70%で、また5'上流域約1kbpの間もATに富んでいた(59%)。このようにイントロンはすべてAT含量が高いもののcDNAの5'末端のすぐ上流域のみは著しくGCに富んでおり、上流120bpまでは、71%、200bp上流まででは65%のGC含量で、その領域のみは他のイントロンとは全く異なっていた(表4-I)。オリザシン1遺伝子のコード領域は、オリザシン1 cDNAの塩基配列と完全に一致していた。

3. 5' 上流域

オリザシン 1 遺伝子にはcDNAの5'末端より上流約400bpにTATA box、約480bp上流にCAAT boxが存在していた。これは、通常知られている両配列の位置に比べるとはるかに上流にあたる。

一方、オリザシン 1 遺伝子の5'上流域は、前述したようにGCに富んだ領域となっており、しかもGCの繰り返し配列が多く存在した。ホモロジー検索の結果、小麦ヒストン遺伝子の5'上流域に存在し、植物のハウスキープング遺伝子のシスエレメントと言われている配列(Chaubet et al.1986, Kawata et al.1988, Nakayama et al.1992)と類似の配列がオリザシン1遺伝子の5'上流に見い出された。これは小麦ではCATCCAACGと

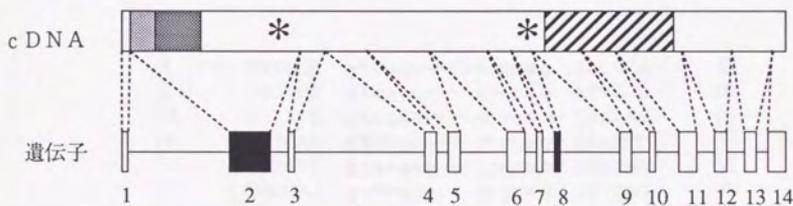


図4-3 オリザシン1のcDNAおよび遺伝子構造

cDNAはコード領域のみを示す。*は活性中心のアスパラギン酸残基、薄い影はシグナル配列、濃い影はプロ配列、斜線部分は植物特異的な挿入配列にそれぞれ対応する部分を示す。遺伝子はエクソンを箱で、イントロンを線で示してある。黒い部分は活性中心のアスパラギン酸残基をコードする部分を含むエクソンを表し、下段にはエクソン番号を示す。

I	TTTCCG · gtg agc---ccg ca g · ATCGCA	II
II	TTCTCG · gtg agt---atg ca g · ATTGCG	III
III	AGAATG · gtc cg---ct ca g · GAAAAC	IV
IV	GATCAG · gtc tg---ct ta g · GAATTC	V
V	TGTGTG · gta aga---tc ca g · GTATAA	VI
VI	TGGCAG · gtt ggt---gt ca g · TTTGAG	VII
VII	CCACAG · gt actg---tat ca g · GATTTT	VIII
VIII	CCCACA · gt acg---cg ca g · GCCATA	IX
IX	GCTGAG · gtt tgt---tt ca g · ACACAG	X
X	TGTTAG · gta aga---ac ca g · TGCTGG	XI
XI	AATCAG · gtg agc---tt ca g · CTCTGT	XII
XII	GAAGAG · gtg cga---gt ca g · TATATT	XIII
XIII	TCTCTG · gta aac---tt ca g · GATCCT	XIV

図4-4 λ gRAP3のエクソン-イントロン境界部分の塩基配列

数字はエクソン番号を示す。大文字はエクソンの配列、小文字はイントロンの配列を示す。

表4-I オリザシン1遺伝子のイントロンおよび5'上流域の塩基数とA+T比率

	塩基数	A+T 比率 (%)
5'-上流域 (1-1095)	1 0 9 5	5 9
5'-上流域 (976-1095)	1 2 0	2 9
5'-上流域 (896-1095)	2 0 0	3 5
第1イントロン	6 4 2	5 8
第2イントロン	1 0 9	5 1
第3イントロン	9 6 7	6 6
第4イントロン	9 1	6 6
第5イントロン	3 7 9	6 7
第6イントロン	7 2	5 8
第7イントロン	8 0	6 3
第8イントロン	6 2 5	6 2
第9イントロン	8 8	7 0
第10イントロン	1 7 5	6 4
第11イントロン	8 3	5 7
第12イントロン	1 6 0	5 8
第13イントロン	9 5	6 4

報告されたノナー配列で、オリザシンには、これと一塩基のみ置換した GATCCAACGが981~989bp に存在した。また、小麦ヒストン遺伝子のシスエレメントである、オクタマー様配列と類似の配列 GGAGGATC (1007~1014 bp)、CGCGGTTCG (1064~1071bp) も存在した(図4-2)。

4. 他のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子との比較

オリザシン 1 遺伝子は、既知の動物、微生物APとは数々の点で異なるものであった。第1に、オリザシン 1 遺伝子は5'-ノンコーディングにイントロンが挿入されていた。既知のAPではこのような例はない。第2に、14個のエキソンが13個のイントロンで分断されていた(図4-5)。動物のAP遺伝子は図4-5に示される様に、9 エキソン 8 イントロンで、しかもイントロンの挿入位置は保存されている(Sogawa et al. 1983, Redecker et al. 1991, Fukamizu et al. 1988, Hidaka et al. 1986)。一方、微生物由来のAPでは、酵母のプロテイナーゼA (Woolford et al. 1986) はイントロンレスであり、リゾプスベプシン(Horiuchi et al. 1988) は1イントロンが、活性中心のAspを分断する形で挿入されている。アスベルギロベプシン(Berka et al. 1990) は、4 エキソン 3 イントロン構造をもち、第1イントロンの挿入位置はリゾプスベプシンとの間で保存されている。このように微生物由来のAPは、類似性を保ちながらも個々には異なる遺伝子構造を有している。

オリザシン 1 遺伝子は、植物APとしては初めて解析されたもので、他の植物APとの比較はできないが、動物、微生物AP遺伝子とは著しく異なり、14個のエキソンと13個のイントロンという非常に細かく分断された構造をしていた。イントロンの挿入位置も、動物、微生物APとは1か所も一致する場所はなかった(図4-6)。

Tangら(1978)は、APの一次構造の特徴をgene duplicationにより説明している。すなわち、APの2つの活性中心近傍の配列が類似しており、N端ドメインとC端ドメインの中で類似の配列をもつこと、また、特にヒトレニン(Miyazaki et al. 1984)の遺伝子は、エキソン1~4と5~8がエキソンの大きさ及びイントロンの長さがほぼ等しい

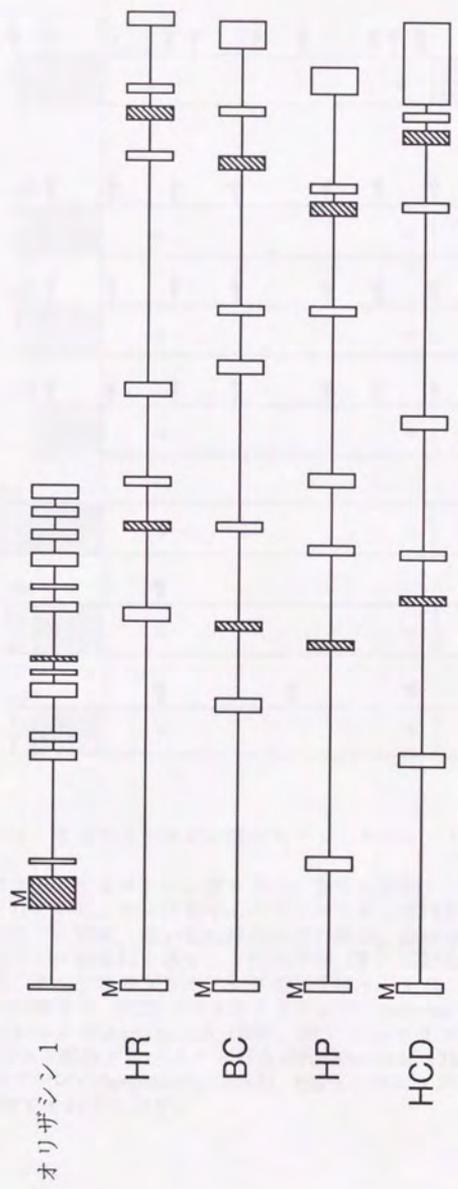


図4-5 各種アスパラギン酸プロテアーゼの遺伝子構造の比較
 Mは開始メチオニンを、箱の部分はエクソンを、線の部分はイントロンをそれぞれ示す。斜線は活性中心のアスパラギン酸をコードする部分を含むエクソンを示す。プロテアーゼの略号は、HR：ヒトレンニン、BC：ウシキモシン、HP：ヒトベプシノーゲン、HCD：ヒトカタレプシンDをそれぞれ示す。

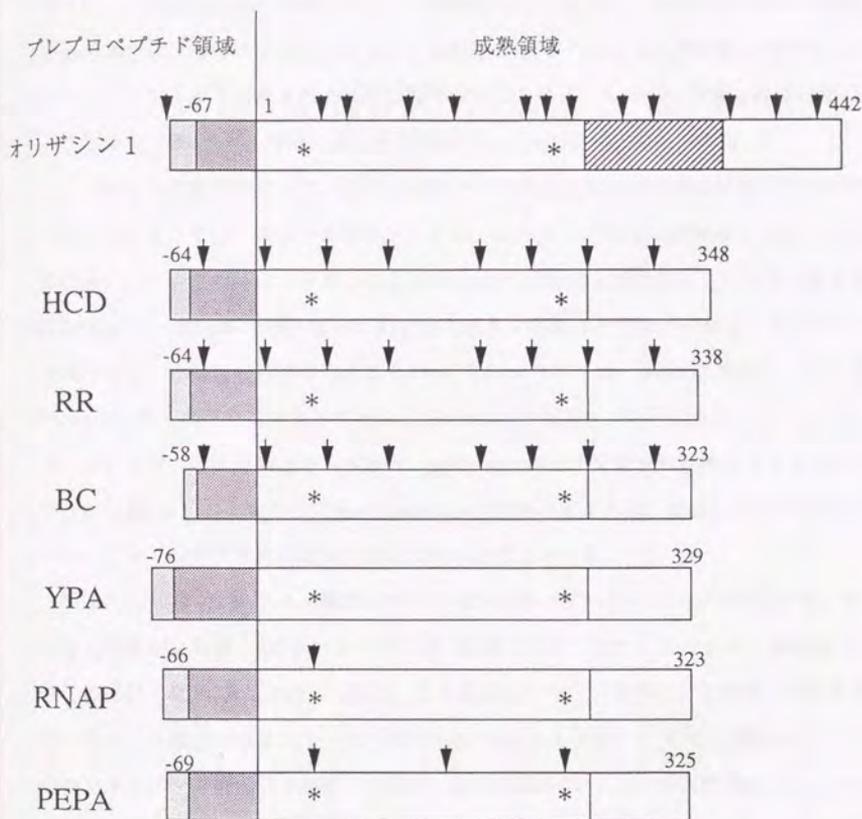


図4-6 各種アスパラギン酸プロテアーゼのイントロン挿入位置

箱はコードするタンパク質を示し、番号は成熟タンパク質のN末端を1としている。*は活性中心のアスパラギン酸残基を示し、薄い影の部分はプレ領域、濃い影の部分はプロ領域、斜線部分は植物特異的な挿入アミノ酸配列を示す。下向き矢印(▼)に対応する遺伝子上の位置に、それぞれのプロテアーゼ遺伝子はイントロンを持つ。プロテアーゼの略号は、HCD：ヒトカテプシンD (Redecker et al. 1991)、RR：ラットレニン (Fukamizu et al. 1988)、BC：ウシキモシン (Hidaka et al. 1986)、YPA：酵母プロテイナーゼA (Woolford et al. 1986)、RNAP：リゾプスベプシン (Horiuchi et al. 1988)、PEPA：ペニシロベプシン (Berka et al. 1990)をそれぞれ示す。

ことから、gene duplicationが起こったのち融合することにより、現在のAP遺伝子の構造が出来上がったものとするものである(図4-7)。ヒトレニン以外の動物AP遺伝子についても、イントロンの長さはそれぞれ差異があるものの、エキソンの長さはほぼ等しいことから(図4-5)、同様の遺伝子構築過程をとったものと考えられる。

オリザシン遺伝子について、動物AP遺伝子の構築過程における仮説が適用できるであろうか。オリザシン遺伝子の特徴としては、エキソンが14個と動物APと比較して非常に多いこと、また、イントロンの長さが72bp~967bpと比較的に短いことから、全長が約5.7kbpと、10kbp前後の動物APの約半分の長さであることが挙げられる。オリザシン遺伝子では、一番目の活性中心となるAspを含むエキソンは、366 bpと大きく、二番目のAspは、第8エキソンにあって65 bpと非常に小さいエキソン上にある。このようにオリザシンは、遺伝子構造からみると、gene duplicationを想定させる構造をとっていない(図4-5)。したがってgene duplicationが起きたとすれば、動物APやオリザシンのイントロンが挿入される以前のことであると考えられる。

植物のAPには約100 アミノ酸残基からなる特異的なインサクションが存在する。その挿入位置が、動物の第8イントロンの挿入位置とほぼ一致することから、植物APが、進化の過程で動物APと分岐した後に、この領域をエキソン交換により獲得したのではないかという推定がなされていた(Runeberg-Roos et al. 1991)。今回、植物APとして初めてオリザシン遺伝子を解析した結果、動物の第8イントロン挿入位置にイントロンは存在せず、またインサクション自体も3つのエキソン(第9、10、11エキソン)に分断されていることが明らかとなった。これらのデータから、インサクションの挿入はエキソン交換によるものではなく、別の機構によるものであると考えられる。

APと異なり、CPについては動物、植物ともに多くの遺伝子構造が解析されている。植物のCPであるアクチニジン(キウイフルーツ; Snowden and Gardner 1990)、SH-EP(ケツルアズキ; Akasofu et al. 1990)などはイントロンの挿入位置は全く同一であり、植物固有の遺伝子構造をもつことが明らかとなっている。APの場合、他の植物からの遺伝子解析を待つ必要があるが、以上述べたようなオリザシン遺伝子の構造から、植

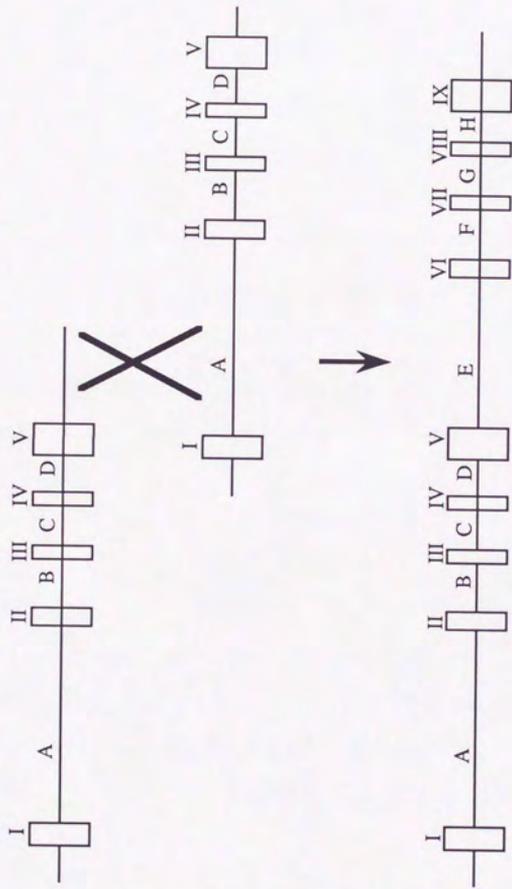


図4-7 ラットレニン遺伝子エクソンの組替え、重複モデル (Burt et al. 1985)

物のAP遺伝子は動物、微生物APと祖先遺伝子は同じくするものの古い時代にこれらから分岐し、イントロンの獲得、欠落による独自の進化を遂げたものと考えられる。

第5章

オリザシン1の大腸菌での発現と活性化

および抗体作製

第1節 緒言

第2章では、コメから複数のAPをコードするcDNAフラグメントを得た。また、登熟2週目の種子からは、オリザシン1 cDNAを単離し、その構造を解析した (Asakura et al. 1995a)。

オリザシン1は、HvAP、サイプロシンと同様、動物、微生物APには存在しない約100アミノ酸から成る巨大インサーションをC末端領域に保有しており、これは、植物APに特有の領域であった。また、オリザシン1遺伝子を解析したところ、インサーションは3つのエキソンにコードされ、この領域がオリザシン分子内ではかなり古い時代に獲得されたものと推察された。植物APが動物、微生物APと大きく異なる特徴をもつのは、翻訳産物である酵素タンパク質だけではなく遺伝子構造についても、既知のものとは全く異なる構造をしている点である。遺伝子サイズ、イントロンの挿入位置や数等も、動物、微生物APとは全く異にしていた (Asakura et al. 1995a)。このように、植物APの特徴ある性質が解明されつつあるが、構造の特異性と酵素の機能との関係についての報告例は皆無であり、興味深い課題である。そこで、本章ではオリザシン1を大腸菌を用いて発現させ、酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。

近年、目的とする遺伝子をGST (glutathione S-transferase) 遺伝子の下流に挿入し、GST融合タンパク質として発現させ、これをグルタチオンアフィニティーカラムにて精製する方法が開発された。このシステムは発現産物の精製が簡便であり、比較的収量も高いことから、本法を採用した。また、種子中に存在するオリザシンについても解析を進めるために、オリザシン1に対する抗体を作製した。

第2節 材料および方法

1. 抗オリザシン1抗体の作製

(1) オリザシン1タンパク質発現用プラスミドの作製

オリザシンcDNAのうち、開始Metからシグナル配列を欠いたプロ型タンパク質をコードするフラグメントをPCRにより作製した。

この際N末端側にはSacIサイトを、C末側にはXhoIサイトを導入した。発現ベクターとしてpET17b (Novagen) を用い、これをSacI、XhoI消化し、BAP処理をしたのち、上記のオリザシン1フラグメントとライゲーションし、オリザシン1発現用ベクターを構築した。

(2) 発現用プラスミドによる大腸菌の形質転換

(1) で構築した発現ベクターを、宿主大腸菌として、BL21 (DE3) pLys S株を用いた。形質転換は、第2章と同様の方法を用いて行い、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地に塗布した。37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、生じたコロニーを形質転換菌とした。

(3) オリザシン1タンパク質の発現

形質転換した大腸菌を34 μ g/mlのクロラムフェニコールおよび50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地10mlに、(2)のプレートからコロニーをピックアップして、懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。その後、上記と同じ培地中に、一晩培養した菌を5 μ l植え継いだ。37 $^{\circ}$ Cで振盪培養し、600nmの吸光値が0.4~1.0になったところで、IPTGを最終濃度が0.4mMになるように加え、さらに2時間培養を続けた。4 $^{\circ}$ C、5000 x gで5分間遠心分離をして集菌し、2.5mlの2mMのEDTAを含む50mM Tris-HCl (pH8.2) 溶液に再溶解し、再び遠心分離して菌体を集め、-20 $^{\circ}$ Cに保存した。

(4) 発現タンパク質の抽出

-20 $^{\circ}$ Cに保存した菌体を室温で溶解後、1mlのオリザシン抽出緩衝液を加え、氷中で冷やしながら超音波で菌体を破碎した。4 $^{\circ}$ C 15000 x g 20分間遠心分離をして上清と沈殿に分離した。

SDS-PAGEにより、オリザシン1由来のバンドを確認し、これをゲルから切り出して、

抗体作製用の抗原として用いた。

(5) 発現産物のN末端分析

Matsudaira(1987)の方法に従った。SDS-PAGE後のゲルをトランスファーバッファー(TB: 10mM CAPS、10%メタノール、pH11.0)に浸した。ゲルより一回り大きく切ったPVDF膜(Immobilon Transfer)を20秒間メタノールに浸した後、セミドライ型のプロットティング装置(アトー、AE-6670)に、TBに浸しておいたアブソルベントペーパー4枚を置き、PVDF膜、ゲル、アブソルベントペーパー4枚の順に置き、0.5A/cm²で1時間通電した。転写後の膜は脱イオン水で洗い、0.1%のクマシープリリアントブルーR-250を含む50%メタノールで5分間染色した。これを10%酢酸-50%メタノールで脱色し、脱イオン水で洗浄、風乾して-20℃で保存した。膜に転写された発現産物のバンドを切り取り、気相シーケンサー(Applied Biosystems 470A)でN末端配列を決定した。

(6) ウサギへの免疫

(5)で確認した約37kDaのバンドをゲルから切り出し、試験管中でガラス棒で細かくつぶし、Freundの完全アジュバントとシリンジ内で混合し、抗原溶液を調製した。これをウサギの背中のおよび後肢の指の間に注射し、初回免疫を行った。3週間後、不完全アジュバントと等量の蛋白溶液で調製した抗原溶液をブーストし、2週間おきに、合計5回ブーストをした後、採血をした。採血した血液は室温で1時間、次いで4℃で、一晚静置したのち、800 x gで5分間遠心分離した。得られた血清を抗血清として分注し、-80℃で保存した。

(7) ウエスタンブロットティング

i. 転写

SDS-PAGEを行った後のゲルをwestern buffer (WB: 0.1mM Tris、0.2mM グリシン、20%メタノール) に30分浸漬、振盪した。ゲルより一回り大きく切ったPVDF膜 (Immobilon Transfer) を20秒間メタノールに浸した後、また、アブソベントペーパーは直接にそれぞれWBに30分間浸した。セミドライ型のプロットティング装置 (アトー、AE-6670) に下 (陽極) からアブソベントペーパー 4 枚、膜、ゲル、アブソベントペーパー 4 枚の順に置き、WBに浸し、70V一定で1時間通電した。

ii. ブロッキング

転写終了後の膜を5%スキムミルクを含むTBS 5mlに浸し、プラスチックバッグ中で37℃、一晚放置した。その後0.05% Tween20をふくむTBSで膜を4回洗浄した。

iii. 一次抗体との反応

5%スキムミルクを含むTBS 5mlに抗オリザイン抗血清 $20\mu\text{l}$ を加えたものに膜を浸し、プラスチックバッグ中で37℃、2hrから一晚放置した。その後0.05% Tween20をふくむTBSで膜を4回洗浄した。

iv. 二次抗体との反応

5%スキムミルクを含むTBS 5mlにアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体 (Sigma) $1\mu\text{l}$ を加えたものに膜を浸し、プラスチックバッグ中で37℃、2時間から一晚放置した。その後0.05% Tween20をふくむTBSで膜を4回洗浄した。

v. 酵素反応

反応液 (0.1M Tris-HCl pH9.5、5mM MgCl₂、0.1M NaCl) に基質としてNBTを $66\mu\text{l}$ 、BCIPを $34\mu\text{l}$ に加え、これに膜を浸して遮光条件で、数分間反応させ、発色させた。

2. GST-オリザシン1融合タンパク質の発現と精製

(1) GST-オリザシン1融合タンパク質発現用プラスミドの構築

オリザシンcDNAのうちシグナル配列を欠いたものに、5'末端に*Sma*Iサイト、3'末端に*Xho*Iサイトが導入される様に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。

(2) 発現用プラスミドによる大腸菌の形質転換と発現

(1)で構築した発現ベクターを大腸菌AD202に第2章(12)の方法で導入した。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 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。この種菌5 μ lを100 μ g/mlアンピシリンのLB培地に加え、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養し、600nmの吸光値が0.6-1.0になったところでIPTGを最終濃度が1mM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 $^{\circ}$ C、2000 x g、5分遠心分離をして集菌し、2.5mlの2mM EDTAを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)に懸濁し、再び遠心分離後1mlのオリザシン抽出用バッファーを加え、1%ザルコシル、2%Triton X-100を加えて氷中で冷やしながらか菌体を超音波破碎した。4 $^{\circ}$ C、15000rpm、20分遠心分離して上清と沈殿に分けた。SDS-PAGEにより発現を確認した。

(3) GST-オリザシン融合タンパク質の精製

発現した融合タンパク質は、グルタチオンセファロース4Bを用いて精製した。1mlのグルタチオンセファロース4Bを5~10倍量のPBSで洗った。菌体を破碎して得られた上清を1%のTriton X-100を含むPBSで希釈し、パスツールピペットに充填したグルタチオンセファロース4Bカラムにチャージした。カラムを5~10倍量のPBSで十分に洗った。溶出は、10mMのグルタチオンを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)で行ない、1mlずつ分取した。

3. 酵素活性の測定

(1) 基質の調製

ウシヘモグロビンを4%濃度に溶解し、6N HClを加えてpH1.4~1.7に下げ攪拌しながら30分室温に放置した。その後、5N NaOHを加えてpHを3.5付近まで上げ、1M酢酸緩衝液(pH3.3)を加え最終濃度を0.1M、ヘモグロビン濃度が2%になるように調製した。これをよく攪拌したのち、ろ紙で不溶性のものを除去し、ろ過液を使用した。4℃に保存し活性測定時に希釈して使用した。

(2) 活性測定

(1)で調製した基質をヘモグロビンの最終濃度が1%になるように酢酸緩衝液0.1M (pH3.3)で希釈し、酵素液を10~50 μ l加えて100 μ lとした。37℃で60分間反応させたのち等量の0.4M TCAを反応液に加えた。氷中に5分間放置したのち、8000 x gで10分間遠心分離をし、上澄の280nmの吸光値を測定した。

1unit (U)は上記の条件で280nmのODが0.01増加するものとする。

第3節 結果

1. pET17bに組みこんだオリザシン1タンパク質の発現

シグナル配列を除いたオリザシン1前駆体タンパク質部分のcDNAを組み込んだ発現プラスミドを大腸菌に導入し、菌体破砕物をSDS-PAGEに供した。その結果を図5-1に示した。レーン1およびレーン4は、pET17bにオリザシン1 cDNAを導入したプラスミドで形質転換した大腸菌、レーン2および5は、 β -ガラクトシダーゼcDNAをpET17bに組み込み形質転換し、インダクションコントロールとして用いた。菌体破砕後遠心分離をした上清のSDS-PAGEでは、オリザシン1を導入したプラスミド(レーン

1) とベクターを導入したプラスミド (レーン 3) のパターンは全く同じであった。しかし、沈殿画分で比較をするとオリザシン 1 cDNA インサートを導入した形質転換菌 (レーン 4) には、コントロール (レーン 6) にはない 37kDa と 27kDa の 2 本のバンドが現われた。

構築したプラスミドから推定される発現タンパク質の分子量は、オリザシン 1 (52kDa) に pET17b 由来の 19 アミノ酸が付加し、約 54kDa となる。しかし、構築プラスミドで形質転換した菌体にも認められたバンドは、37kDa と 27kDa の 2 本であった。そこで、これらの 2 つの発現タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、37kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列は MVEQG であり、これはオリザシン 1 の 212 番目の Met からの配列 (図 2-2 参照) に一致した。すなわち、このタンパク質はオリザシン 1 の C 末端側タンパク質の産物であることが判った。一方、27kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列は、ベクター由来の 19 アミノ酸に続いて、オリザシン 1 プロ配列の N 末端に相当する PAS となっており、こちらは、オリザシン 1 のプロ配列を含む N 末端側タンパク質であることが明らかとなった。2 本のバンドは、発現プラスミドの構築過程で行った PCR においてポリメラーゼのミスリーディングによりオリザシン 1 cDNA 配列中に終止コドンが挿入されていることがシーケンスの結果判明した。そのために N 末端側のタンパク質 (27kDa) と C 末端側 (37kDa) の 2 本のバンドとして現れたものと思われる。そこで、抗原用タンパク質としては pET17b 由来のペプチドが付加していない 37kDa のバンドを用いた。

2. GST-オリザシン 1 融合タンパク質の発現と精製

オリザシン 1 タンパク質は、図 5-2 で示されているように GST-オリザシン融合タンパク質として発現した。GST-オリザシン 1 融合タンパク質を発現した菌体を超音波で破碎し、上清と沈殿に分離したところ、GST-オリザシン 1 融合タンパク質は沈殿画分に蓄積されていた。そこで、菌体を破碎する際に、2 種の界面活性剤 (ザルコシル、Triton X-100) を加え、封入体に封じこめられていた発現タンパク質を可溶化させ



図5-1 オリザシン1タンパク質の大腸菌での発現

- 1 : オリザシン1を発現させた大腸菌タンパク質の可溶性画分
 2 : β -ガラクトシダーゼを発現させた大腸菌タンパク質の可溶性画分
 3 : ベクター(pET17b)のみを導入した大腸菌タンパク質の可溶性画分
 4 : オリザシン1を発現させた大腸菌タンパク質の不溶性画分
 5 : β -ガラクトシダーゼを発現させた大腸菌タンパク質の不溶性画分
 6 : ベクター(pET17b)のみを導入した大腸菌タンパク質の不溶性画分
 M : サイズマーカー。サイズマーカーの分子量を右端に示してある。矢印
 (▲) はオリザシン1由来のタンパク質を示す。



図5-2 GST融合タンパク質として発現させたオリザシン1
タンパク質のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動

1 : pGEX-5X-2ベクターにオリザシン1のcDNAを
組み込んだプラスミドを導入した大腸菌が発現したタンパク質、
2 : pGEX-5X-2ベクターのみを導入した大腸菌が発現し
たタンパク質。

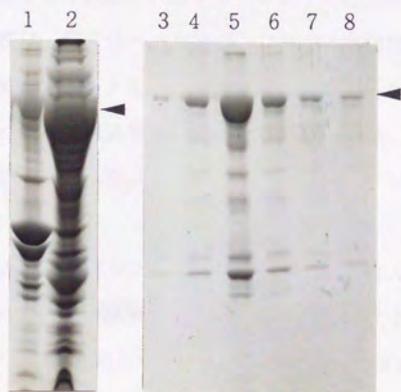


図5-3 GST-オリザシン1融合タンパク質の可溶化
とグルタチオンカラムによる精製

- 1：菌体破砕物の不溶性画分、
- 2：菌体破砕物の水溶性画分、
- 3～8：菌体破砕物の水溶性画分をグルタチオンカラムに
吸着させたのち溶出させ、1ml ずつ分取した画分
矢印はGST-オリザシン1融合タンパク質を示す。

た（図 5-3 レーン1および2）。さらに可溶化発現タンパク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融合タンパク質が、ほぼ完全に精製された（図 5-3 レーン3-8）。

3. 発現タンパク質の活性化

GST融合タンパク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融合タンパク質は、酵素活性を全く示さなかった。そこでGST-オリザシン1融合タンパク質の酸処理を経時的に行なった結果、25℃、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融合タンパク質のSDS-PAGEを図 5-4 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、40kDa、34kDaにバンドが現われた。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、48kDaであるが、これに相当する位置には明確なバンドは出現しなかった。不活性型のGST-オリザシン1融合タンパク質が消失し、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2本のバンドに関しては、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が、現時点では明らかではない。

活性化したオリザシンは、最終濃度0.1mMのペプスタチンにより完全に活性は阻害され、0.1mM E-64、1mM EDTA、0.5mM PMSFでは影響を受けず、他の酵素（大腸菌由来）の混入はないことを確認した。

4. 至適pH

活性化したオリザシン1をpH1.5～pH6.5の間で水解活性を測定した。オリザシン1はpH3.0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。（図 5-5）

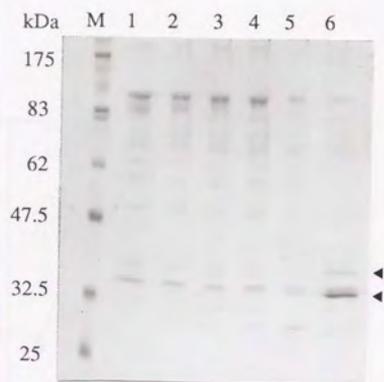


図5-4 GST-オリザシン1融合タンパク質の活性化

- 1 : pH 3.3, 25°C, 1 時間処理
- 2 : pH 3.3, 25°C, 2 時間処理
- 3 : pH 3.3, 25°C, 4 時間処理
- 4 : pH 3.3, 25°C, 6 時間処理
- 5 : pH 3.3, 25°C, 10 時間処理
- 6 : pH 3.3, 25°C, 24 時間処理

M : 分子量 サイズマーカーを左端に示す。矢印は24 時間処理後出現したバンドを示す。

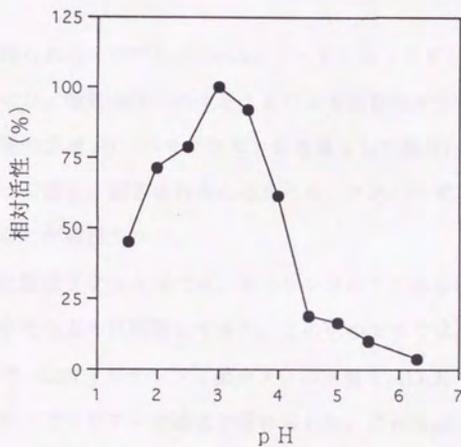


図5-5 GST-オリザシン1融合タンパク質の酵素活性のpH依存性

ヘモグロビンを基質とし、各pHでの活性を最大活性に対する百分率で表示した。

5. 至適温度

活性化オリザシンの至適温度は45℃であったが(図5-6)、30℃、37℃でもかなりの活性を示した。しかし、57℃という高温では酵素活性は著しく減少した。

第4節 考察

第2章で得られたオリザシンcDNAがコードするオリザシン1タンパク質を大腸菌により発現させた。酸性条件下にすることにより活性型オリザシン1を得ることができた。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に融合したタンパク質として発現させるように構築しており、この形のままではおそらく活性はないと思われた。そこで、GSTオリザシン1融合タンパク質をpH3.3、25℃、24時間の酸処理を行ったところ、プロテアーゼ活性が認められた。これはpH3.3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(Takahashi and Kageyama 1985)。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(Erickson et al. 1981, Turk et al. 1985, Richo

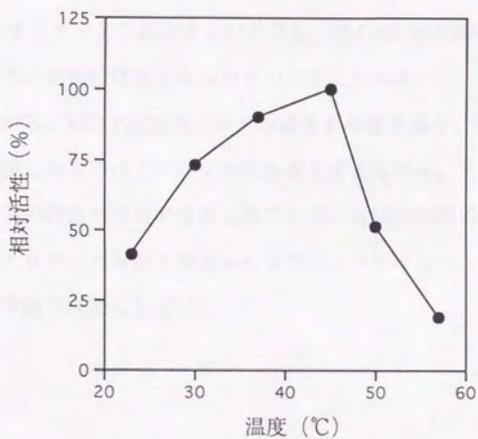


図5-6 GST-オリザシン1融合タンパク質の酵素活性の温度依存性

ヘモグロビンを基質とし、各温度での活性を最大活性に対する百分率で表示した。

and Conner 1994)。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 (Emtage et al. 1983, Hill et al. 1993, Hill et al. 1994)。

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融合タンパク質も、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ごくわずかであると考えられる。その原因として、封入体からの高次構造の再生が完全でなかったことや、可溶化の際に加えられる界面活性剤の影響などが大きかったものと考えられるが明らかではない。再生に関してはさらに検討を要し、今後の課題としたい。

第6章

オリザシンタンパク質の精製

および酵素学的性質

第1節 緒言

著者らは第2章で明らかにしたようにコメからアスパラギン酸プロテアーゼ(AP)のcDNAをクローニングし、オリザシンと命名した。オリザシンはRT-PCRによって、複数のアイソザイムが存在することが判明した。この中で開花後2週目の登熟種子から単離したオリザシン1は、509アミノ酸をコードし、20アミノ酸残基のシグナル配列および47アミノ酸残基のプロ配列を有していた。オリザシン1は、動物や微生物APには存在しない104アミノ酸残基より成るインサーションをC末端領域に有するという大きな特徴があった。また、第4章ではオリザシンの遺伝子を植物APとしてはじめて解析した結果、動物APに共通するイントロン-エキソンジャンクションとは全く異なる構造を持ち、進化的に見ると、他の種属のAP (Redcker et al. 1991, Fukamizu et al. 1988, Hidaka et al. 1988, Berka et al. 1990, Woolford et al. 1986)とは、古い時代に分岐したものであることを明らかにした。

APは高等生物から微生物にいたるまで広く分布し、細胞内および細胞外プロテアーゼとして広くタンパク質の代謝分解やプロセッシングに関与して生理的に重要な役割を果たしているものが多い。活性部位に共通して2つのアスパラギン酸が存在し、若干の例外を除き、ペプスタチン、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)により阻害される。

APの性状と分子形態も多様性に富んでおり、ペプシン(Chen et al. 1975)、キモシン(Foltman et al. 1979)は、胃内に分泌される消化酵素とともに分子量約35kDaの1本のポリペプチド鎖からなる単量体酵素である。また、生体における血圧調節系に関与する重要な酵素であるレニン(Haber et al. 1969)は基質特異性が極めて狭く、起源により1本鎖又は2本鎖構造をもつ分子量36~40kDaの糖タンパク質である。細胞内プロテアーゼとしてはリソソーム内酵素のカテプシンDがあり、細胞内タンパク質分解に関与する最も重要な酵素の1つで、40~45kDaの糖タンパク質である(Richo and Conner 1991)。また、酵母の液胞に存在するプロテイナーゼAもカテプシンDと類似の生理活性を持つと

考えられる、41kDaの糖タンパク質である(Ammerer et al. 1986)。

一方、植物に存在するAPに関しても数種の植物体から精製されている。その中でオリザシン以外で一次構造の明らかになっているのは、大麦のHvAP (Runeberg et al. 1991)とカルドン(Cordeiro et al. 1994)のサイプロシんで、オリザシンはこれらの酵素と成熟型酵素領域では73~88%の相同性を有していた。植物APで一次構造の解析されているのは僅かに上記の3つの植物のみであるが、3種のAPは一次構造上の相同性は非常に高いものの様々な相違点が存在する。オリザシン、HvAPは葉、根、種子と植物体に広く存在するのに対し(Asakura et al. 1995a, Tormakängas et al. 1994)、サイプロシンは花にのみ存在している(Cordeiro et al. 1994)。分子形態は、HvAPは分子量48kDaのヘテロダイマーで、サイプロシンも同じくヘテロダイマーの糖タンパク質である。一方、至適pHはHvAPが3.5~3.9 (Sarkkinen et al. 1992)、サイプロシンは植物APの中では最も高く、5.1と弱酸性領域にある(Heimgartner et al. 1990)。このように植物APも動物APと同様多彩な形態を現わしている。しかし、生理的意義に関する報告は僅かである(Runeberg-Roos et al. 1994, Belozersky et al. 1989, Rodrigo et al. 1989, D'Hondt et al. 1993)。

そこで本章では、cDNAクローニングによって得られたオリザシン1のコメ中での分子形態を明らかにするとともに、酵素学的性質を調べる目的でコメからのオリザシンの精製を試みた。

第2節 材料および方法

1. 材料

コメ

東大田無農場で、その年に収穫された日本晴完熟種子を用いた。

ウシヘモグロビン (Sigma)

DE 52 (Whatman)

Sephadex G-100 (Pharmacia LKB Biochemistry)

Mono Q (HR5/5) (Pharmacia LKB Biochemistry)

ペプスタチン A (ペプチド研究会)、ロイペプチン (ペプチド研究会)、PMSF (ナ
カライテスク) E-64 (Sigma)

マセロザイム R-10 (生化学工業)

EAH-Sepharose 4B (Pharmacia LKB Biochemistry)

その他の試薬はすべて特級を用い、試薬の調製にあたっては、イオン交換水を用いた。

2. 方法

(1) 酵素活性の測定

第5章の方法を用いた。

(2) 精製方法

i. 粗抽出液

200 g の乾燥完熟種子をコーヒーミルで細かく粉碎し、25 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) / 0.15M NaCl 400mlを加え水中で冷やしながらホモジネーターで10分間抽出をした。粗抽出液は2000 x g 15分間、遠心分離をしておおよその固形物を除き、さらに10,000 x g 20分間遠心分離をして細かいでんぶん等を取り除いた。この上澄を綿布でろ過して粗抽出液を得た。

ii. 硫酸沈殿

i. で調製した粗抽出液に30%飽和になるように硫酸を加え、1時間以上放置したのち10,000 x g 20分間遠心分離をして沈殿した画分を取り除いた。上澄液に60%飽和となるように硫酸を加えた。これを10,000 x g 20分間遠心分離をして沈殿を集め、次の精製を行った。

iii. DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィー

DE52(Whatman)を25mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化しておき、 $\Phi 1.6\text{cm} \times 15\text{cm}$ のカ

ラムを作製する。 iiで得た硫酸30~60%沈殿画分をあらかじめ25mMリン酸緩衝液 (pH7.4)で透析しておきカラムにチャージした後、カラムボリュームの5倍量の25mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で非吸着画分を溶出した。その後25mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4) / 0.3M NaClで溶出した画分を集めた。PM10 (Amicon)を用いて限外口過を行い1ml以下に濃縮した。

iv. ゲルろ過

Sephadex G-100 (Φ1.8×85cm)を25mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.35) / 0.15M NaClで平衡化した後 iii. で濃縮した活性画分をカラムにチャージし、4mlづつ溶出液を分取した。

v. MonoQ (FPLC)クロマトグラフィー

iv. の活性画分をMonoQ (HR5/5)カラムを用いて精製を進めた。LCC500 system (Pharmacia)を使用した。カラムを20mM Tris-HCl (pH8.0) / 0.1M-NaClで平衡化させivの活性画分をチャージした。NaCl濃度を0.15M NaCl、0.2M、0.3Mと段階的に上昇させ溶出した。流速は0.5ml / minとした。

vi. ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィー

ペプスタチンアフィニティークラムは、EAH-Sepharose4B (Pharmacia LKB Biochemistry)にペプスタチンA (ペプチド研究会) をカップリングすることによって調製した。ペプスタチンAを12mMになるように75%メタノールに溶解した。溶液の中にアミノ酸、カルボキシル基、リン酸基が混入しない様イオン交換、MilliQ水を用いた。EAH-Sepharose4Bはあらかじめ75%メタノールに懸濁しておいた。12mMペプスタチン溶液をEAH-Sepharose4Bに加え、最終濃度が0.1Mとなるよう fresh EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride)を加え(pHを4.5~6.0の間に調整しながら)室温でゆっくりと上下に転倒させ24時間反応させた。反応終了後、未反応のペプスタチンを75% MeOHで十分に洗浄した。

ペプスタチンセファロース4B 5mlをカラムに詰め、0.4M酢酸緩衝液(pH4.0) / 1M NaCl / 0.5%Brij (吸着用バッファー) で平衡化させた。v. のMonoQ クロマトグラフィーで集

めた活性画分P2は、最終濃度が0.1M酢酸緩衝液(pH4.0) / 1M-NaCl / 0.5% Brijになる様に調整した後、ペプスタチンセファロース4Bに吸着させた。吸着後同バッファーで溶出したフラクションの280nmの吸光値がベースラインに落ちるまで十分に洗い、0.1M Tris-HCl(pH8.2) / 1M NaCl / 0.1% Brij (溶出用バッファー) で溶出し、1mlずつフラクションを集め、タンパク質量と活性を測定した。活性画分は、DE52を用いて界面活性剤を除き、限界口過にて脱塩、濃縮を行なった。

(3) タンパク質量の測定

BCA Kit (BCA Protein Assay Reagent PIERCE)を用い、 $30\mu\text{g/ml}$ ~ $1000\mu\text{g/ml}$ のBSAをスタンダードとして求めた。あるいは、280nmの吸光値より $1\text{O.D.} = 1\text{mg/ml}$ を用いて算出した。

(4) 各種阻害剤の効果

精製オリザシン 5 unit を1%ヘモグロビン / 0.1M酢酸緩衝液(pH3.3)に加え、各々の阻害剤を表 6-II に示す濃度で加え、 37°C 、1時間反応させ、前述の活性測定方法を用いて活性を測定した。

(5) 至適pHの測定

pH1.5~pH 8.0 までの緩衝液に1%のヘモグロビンまたは、1%のカゼインを溶解し、これに精製オリザシンを 10 unit を加え、 37°C 1時間反応させた。前出の活性測定方法を用いて活性測定をした。

(6) 至適温度の測定

1%ヘモグロビンを基質として、0.1M酢酸緩衝液(pH3.3)に精製オリザシンを加え、 23°C ~ 57°C の間で活性を測定した。

(7) プロテインボディの抽出

精白コメ 3g に抽出用緩衝液(20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0) / 0.5M シュークロース / 0.1% KBrO_3) 20ml とマセロザイム 60mg 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 、 $400 \times g$ で2分間遠心分離をした上澄を $10,000 \times g$ で5分間遠心分離をして沈殿を集めた。この操作を数回繰り返した。

(8) SDS-PAGE

Laemmli (1970)の方法に従った。

第3節 結果

1. 抽出, 精製

オリザシンの精製は表6-Iに示すように6ステップで行なった。コメのホモジネートはでんぷん含量が多く、これを除くために硫酸分画を行なった。硫酸分画でタンパク質は17%に減少し、プロテアーゼ活性は27%になり比活性は1.6倍上昇した。かなりの量の活性が失われたが、粗抽出液に含まれる、遠心分離によって除去できない細かく白濁している夾雑物はほぼ完全に除去された。

次の精製ステップでは、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロース) を行ない、NaCl濃度0~0.3Mで溶出される画分を集めた。この分画では、4%の活性が失われただけで、総タンパク質量は半分となり、比活性は1.7倍に上昇した。

次のゲルろ過による精製ステップでは、タンパク質の溶出パターンは1つの小さなピークと1つの大きなピークとして現われ、プロテアーゼ活性は低分子量の大きなピークとオーバーラップし、単一ピークとして現われた (図 6-1)。MonoQ分画では塩濃度 0.15M、0.2M、0.3Mで溶出した画分にプロテアーゼ活性が、分かれて現れた (図 6-2)。P1、P2、P3のフラクションを各々集めてプロテアーゼ活性を測定したところ、P1は総タンパク質量2.2mg、総活性503U、比活性229U/mg、P2は各々、2.8mg、877U、313U/mg、P3は6.4mg、1195U、187U/mgとなった。P1~P3までのすべてのプロテアーゼ活性及びタンパク質量を合計すると 11.4mg、2575Uとなり、前段階の精製ステップからの収量は31.2%となった。P1~P3の中で最も比活性の高いものはP2であった。

コメ中のオリザシンはcDNAレベルで確認した様に、マルチジーンを形成していると思われる。今回のタンパク質レベルでの研究からも複数のアイソザイムが存在している可能性が示唆された。

P2画分をペプスタチンアフィニティーカラムにて精製を行なった(図6-3)。一般的にアフィニティー精製は精製の早い段階で利用される例が多いが、コメの場合、早い精製段階でのペプスタチンアフィニティー精製はうまくいかなかった。

原因として、オリザシンがコメ中の他成分と結合し、アフィニティカラムに吸着し難い状態になっている等が挙げられる。

ペプスタチンアフィニティーによる精製により、比活性は前精製段階の10倍、粗抽出液に対しては約50倍になった。(表6-I)

2. オリザシンのSDS-PAGEおよびウエスタン分析

精製オリザシンをSDS-PAGEに供したところ、57kDa、53kDa、35kDa、25kDaの4本のバンドが検出された。これに対して、第5章で作製したオリザシン1のC末端側抗体を用いてウエスタン分析をしたところ、57kDaのバンドに強いシグナルが、53kDaには弱いシグナルが現われ、低分子の2つのバンドにもごく弱いシグナルが現われた(図6-4)。また、オリザシンの精製段階におけるウエスタン分析では、57kDaと35kDaが反応していた(図6-5)。

3. 各種阻害剤の効果

精製したオリザシンに対して、各種のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べたところ、ペプスタチンでは100%活性が阻害されたが、EDTA、E-64、PMSF、ロイペプチン等、他のプロテアーゼインヒビターによる影響は全く受けなかった(表6-II)。

4. 至適pH

オリザシンの至適pHは、図6-6に示すように、ヘモグロビンを基質とすると、pH3.0で最大となり、pH4.0を超えると著しく活性が低下した。また、カゼインを基質とした場合(pH 5.5~pH 8.0)ではpHの上昇とともに活性は低下した。

5. 至適温度

温度による活性を23℃～57℃までの間で測定したところ、50℃までは温度の上昇とともに活性も上昇するが50℃を超えると急激に減少した(図6-7)。

第4節 考察

精製したオリザシンは、AP特異的阻害剤であるペプスタチンで完全に阻害されたが、他のプロテアーゼインヒビターでは全く阻害を受けず、pepstatin-sensitive aspartic protease であることが確認された。

MonoQで分画した際に複数のAP活性をもつピークが出現したが、このことはコメ中に異なる分子種のAPが複数個存在することを示唆している。第2章で、APをコードするcDNAが複数個存在することは既に報告したが、タンパク質レベルでも同様の結果となった。また、これらのクローンは互いに58～82%の相同性を有していた。ウエスタン分析では、第5章で作製したオリザシン1の抗体と反応をしたことから、精製オリザシンはcDNAから解析されたオリザシン1と近似の構造をもつことが確認された。

精製オリザシンの分子量はSDS-PAGEでは57kDaで、オリザシン1cDNAから推定される分子量は、プロ型では52kDa、成熟型では48kDaであった(第2章参照)。土井らの報告(Doi et al. 1980)ではコメ中に存在するAPの分子量はゲル過法により60～65kDaとされている。精製オリザシンは、cDNAから推定されるものより数kDaも大きくなっていた。その理由として、オリザシン1cDNAには2カ所の糖鎖付加部位が252N H T, 400N K Tに存在し、糖鎖が付加している可能性が考えられる。糖鎖に関してはサイプロシンが糖タンパク質であることの報告があるが、オリザシン1の糖鎖付加部位のうち400N K Tはサイプロシンにも同じ場所にN E T配列として保存されていた。

精製オリザシンのSDS-PAGEでは、4本のバンドが検出されたが、57kDaと53kDaのバンドについては、異なるプロセシング段階のものであると推定される。57kDaのバンドはcDNAから推定される分子量より計算するとプロ体である可能性が高い。53kDaのバ

表 6 - I オリザシンの精製段階における比活性および収率

Purification step	Total protein (mg)	Total Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
1. Crude extract	839	50700	60.4	100
2. Ammonium sulfate	147	14070	95.7	27.8
3. DEAE-Cellulose	74	12000	162	23.7
4. Sephadex G-100	37	8150	220	16.1
5. Mono Q	2.8	877	313	1.7
6. Pepstatin-Sepharose 4B	0.047	138	2930	0.27

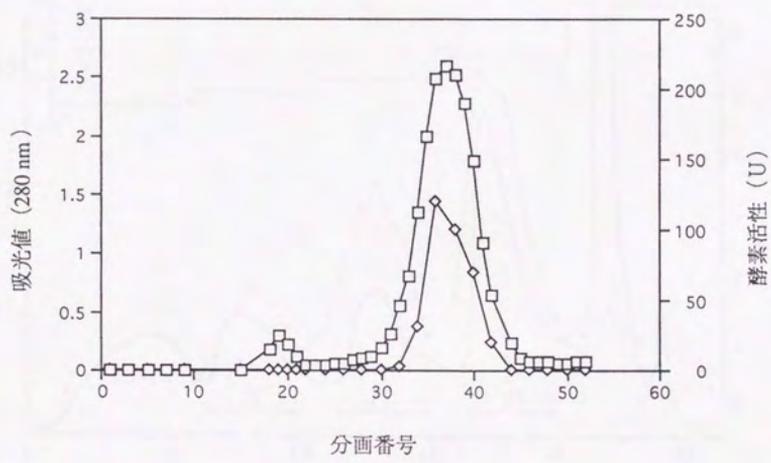


図 6-1 ゲルろ過クロマトグラム (Sephadex-G100)

- タンパク質量
- ◇— ヘモグロビンを基質とした酵素活性

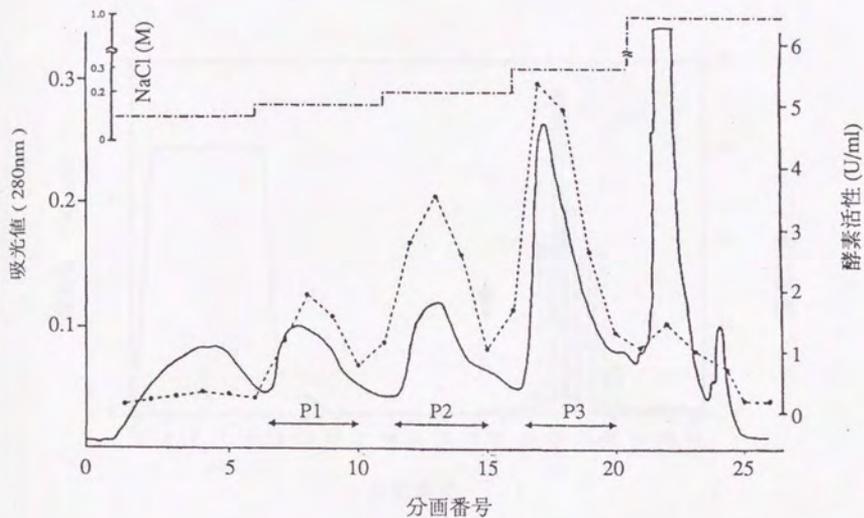


図6-2 Mono Qクロマトグラム

—— タンパク質量

---●--- ヘモグロビンを基質とした酵素活性

..... NaCl濃度

P1、P2、P3は分取したサンプルを表す。

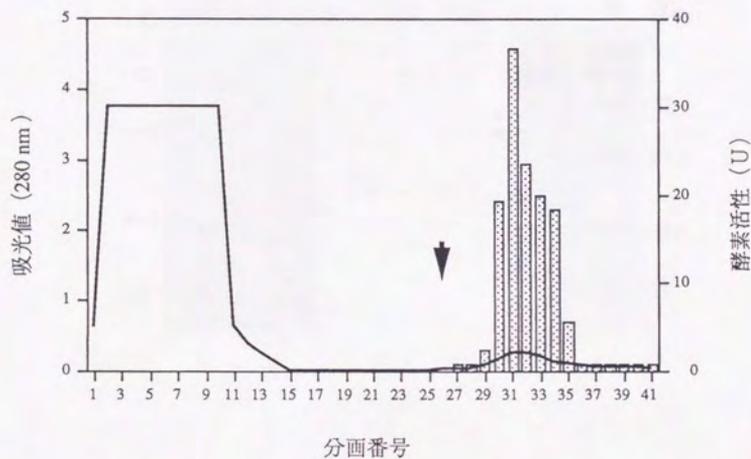


図 6-3 ペプスタチンアフィニティークロマトグラム

- ヘモグロビンを基質とした酵素活性
 タンパク質量

 溶出緩衝液への交換点を示す

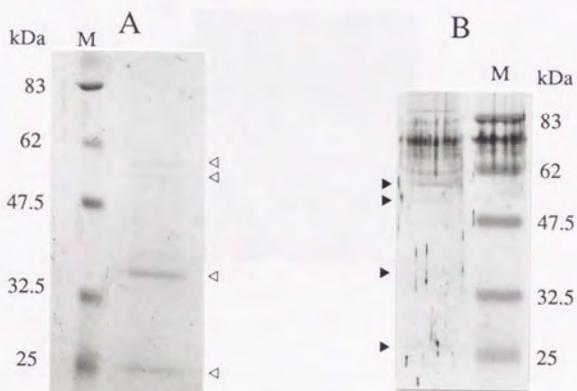


図6-4 精製オリザシンの SDS-PAGEおよびウエスタン分析

A. SDS-PAGE

B. オリザシン1に対する抗血清を用いたウエスタン分析

M: サイズマーカー。(Δ)および(▲)は、各々出現したバンドを示す。

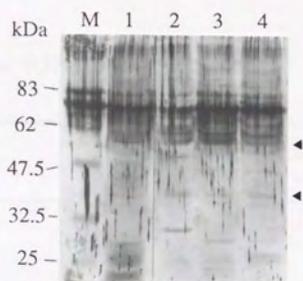


図6-5 オリザシン精製過程におけるウエスタン分析

反応は、オリザシン1に対する抗血清を用いた。

1：硫酸30～60%沈澱画分

2：MonoQ P1画分

3：MonoQ P2画分

4：MonoQ P3画分

M：サイズマーカー、(▲)はすべての画分に共通して反応したバンドの位置を示す。

表6-I I オリザシンに対する各種プロテアーゼインヒビターの効果

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
Pepstatin	0.1	0
EDTA	1	100
Leupeptin	0.01	104
E-64	0.1	97
PMSF	0.5	97

反応は酸変性ヘモグロビンを基質として、0.1M酢酸緩衝液 (pH 3.3) で 37°C、60分間の条件で行った。

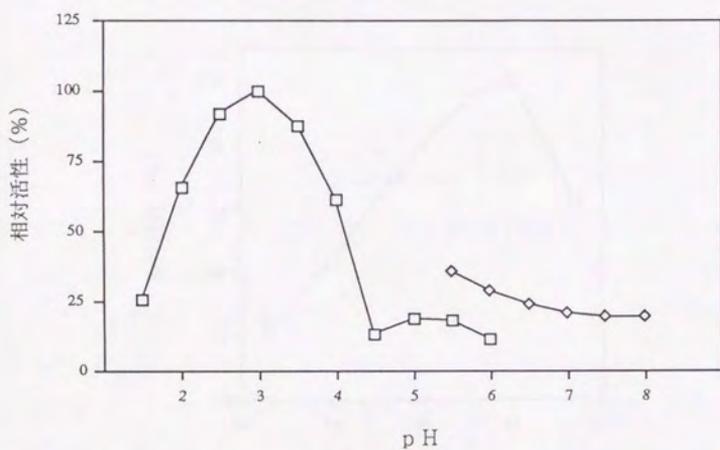


図6-6 ヘモグロビン、カゼインを基質とした精製オリザシン
酵素活性のpH依存性

各pHにおける活性を、最大活性に対する百分率で示した。

- ヘモグロビン
- ◇— カゼイン

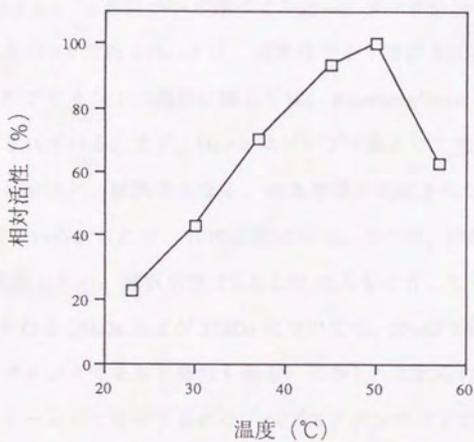


図6-7 ヘモグロビンを基質とした精製オリザシン酵素活性の温度依存性
各温度における活性を最大活性に対する百分率で示した。

ンドは57kDaがプロセッシングをうけたものであると推定される。しかし、この仮説は、各々のタンパク質のN末端のアミノ酸配列を決定することによって明確になると思われる。57kDaのバンドは、メルカプトエタノール還元状態のSDS-PAGEでも存在しており、また各精製段階において見られるバンドでしかも必ずオリザシン1抗体と反応することから、少なくともコメにはモノマーのオリザシンが存在すると思われる。一方、上記以外にCBB染色により非常に強い2本の低分子のバンド(35kDa, 25kDa)が見られたが(図6-4A)、これについて述べてみたい。オリザシン1と一次構造が非常に類似している大麦のAPであるHvAPは、大麦種子より精製された結果、ヘテロダイマーであった。そのプロセッシング機構に関しては、Runeberg-Roosら(1991)によって図6-8のように説明されている。まず、HvAPはプレプロ体として生合成されたのち、プレプロ配列が順次切断され、成熟体となる。-S-S-架橋が形成されたのち、heavy chainとlight chainに切断される。これが、IIの状態である。その後、両鎖ともプロセッシングを受けてIIIへと変換される。酵素活性はIIおよびIIIともに有していた。精製オリザシンSDS-PAGEで見られる35kDaおよび25kDaについては、HvAPと同様、ヘテロダイマーを形成するフラグメントである可能性もある。しかし、これらのバンドが、元々コメ中にヘテロダイマーとして存在するのか、ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィーに供したため(酸性条件下で行うために自己消化しやすい状況下にある)に生じたかは不明であり、今後検討すべき重要課題の一つである。いずれにせよ、本実験により活性画分中にオリザシンが微量ではあるもののモノマーとして存在することが明らかになり、この事実はHvAPとの大きな相違点である。

植物APでは、細胞内輸送やプロセッシングに関する情報が乏しいが、動物細胞では特にリソソーム酵素であるカテプシンDについてよく研究されている。カテプシンDは、粗面小胞体でプレプロ体として生合成されたのち、シグナルペプチドの切断を経て、プロ型となり、プロエンザイムは酸性条件下で、アミノ末端プロペプチド部分が切断され成熟型酵素へ変換される。成熟型カテプシンDは1本鎖および1本鎖がプロセスを受け2本鎖になった分子の両方が存在する(Blum et al.1991)。また、植物プロテアーゼ

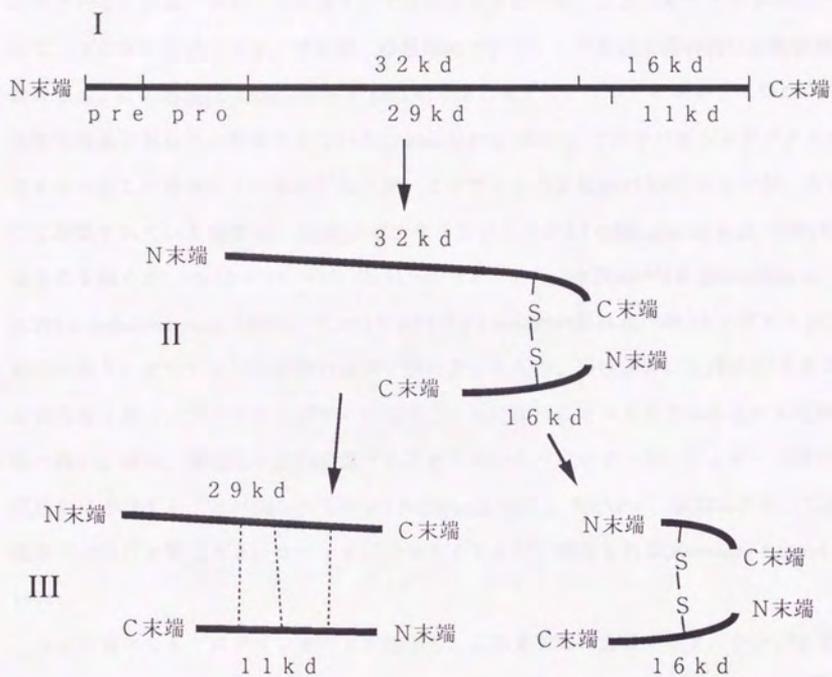


図6-8 大麦APのプロセッシング過程

実線は共有結合、点線は非共有結合をそれぞれ表す。

では、プロセシングに関する報告は数例あるが、ケツルアズキのSH-EP（システインプロテアーゼ）では、プレ・プロ体として生合成されたのち、シグナルペプチドがはずれて、プロ体が形成される。その後、多段階のプロセシングを経て最終的に成熟型酵素になる。この活性化は低pH条件下(pH5.4)で生じやすく、プロテインボディ等がこの活性化の場であろうと推測されている(Akasofu et al.1989)。ではオリザシンはコメオルガネラのどこに局在しているのだろうか。オリザシンの至適pHは3.0であったが、今までに精製されている植物APの至適pHは、サイプロシンが5.1 (Heimgartner et al. 1990)であるのを除くと、HvAPが3.5 ~3.9 (Sarkkinen et al. 1992)、小麦APが3.0 (Belozersky et al.1984, Belozersky et al. 1989)、キュウリAPが3.2 (Polanowski et al.1985)といずれもpH3周辺にあり、オリザシン同様酸性領域で強い活性をもつ。酸性領域に至適pHがあることから考えると、プロテインボディや液胞といった酸性のオルガネラに存在する可能性が高い。事実、酸性加水分解酵素であるカルボキシペプチダーゼ、フィターゼ等が液胞中に存在することが知られている (Nishimura 1987)。HvAPは、液胞に存在して液胞中のタンパク質であるレクチンをプロセスするという報告もある(Runeberg-Roos et al. 1994)。

コメにおいてもプロテインボディを抽出し、これを37℃に放置すると、タンパク質は次第に分解されていく(図6-9)。しかし、ペプスタチンを加えておくと、この分解は有意に抑制された(図6-9)。オリザシンは、プロテインボディ中、又はプロテインボディの膜に結合していると推測される。

第3章のノーザン解析から、オリザシン1は登熟期に多く発現し、完熟になるとほとんど発現しなくなる。しかし、完熟種子では、明らかにAP活性をもつオリザシンが存在し精製された。これらのことから、オリザシンは登熟中に種子内で生合成され、不活性な形として蓄積されると推定される。

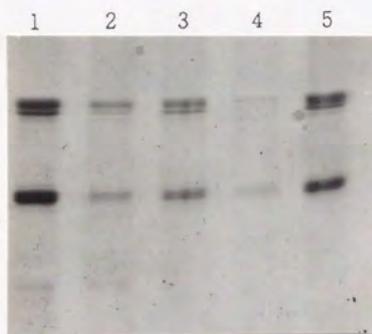


図 6-9 コメ種子より抽出したプロテインボディーの経時変化

- 1: 未処理のプロテインボディー溶液
- 2: プロテインボディー溶液に 0.1mM ロイペプチンを加え
37℃で30分間保温
- 3: プロテインボディー溶液に 0.1mM ペプスタチンを加え
37℃で30分間保温
- 4: プロテインボディー溶液を 37℃で30分間保温
- 5: プロテインボディー溶液を 0℃で30分間保温

第7章

オリザシンの食品加工とくに凝乳への応用

第1節 緒言

前章までは、オリザシンのcDNA、遺伝子、タンパク質レベルでの解析など、基礎研究に関するものを報告した。タンパク質分解酵素の中には動物、植物、微生物、各々の由来とは関係なく様々な面で、応用、利用されているものが少なくない。食品加工では、チーズ製造時に利用される凝乳酵素、肉の軟化に利用されるミートテンダライザー等が主なものとしてあげられる。

そこでオリザシンの応用面での研究の第一歩として、牛乳に対する凝固能を調べることにした。APの中にはウシキモシン、ウシペブシン (Tam and Whitaker 1972) と *Mucor miehei*, *Mucor Pusillus* の産生するムコールレンニン (Sternberg 1971, Arima et al. 1967, Iwasaki et al. 1967)、*Endothia parasitica* の産生するエンドシアペブシン (Sacdinas 1968) など凝乳作用をもつものがあり、このうち商業的に主に利用されている凝乳酵素はキモシン、ペブシン、ムコールレンニン (Park and Horinouchi) である。一方、植物APでも凝乳活性をもつ酵素としてサイプロシン (カルドンの花に存在し、ポルトガルの伝統的チーズ製造に利用されている) がある。さらに、数種の植物から、凝乳活性を持つ酵素が、見い出されている (Tamer 1993, Aworth and Nakai 1986, Fevereiro et al. 1986)。しかし、これらの植物は生産が限定されているという面から、幅広い利用は難しい。

コメのAPであるオリザシンを凝乳酵素として利用することが可能であれば、安全でしかも安定した供給が確保される。

本章では、オリザシンの凝乳活性及び、 κ -カゼインに対する作用機作について検討した。

第2節 材料及び方法

1. 材料

スキムミルク (DIFCO)

キモシン、ペプシン (Sigma)、 κ -カゼイン (Sigma)

2. 試薬

(1) 2x スキムミルク溶液: 6% スキムミルク

40mM CaCl_2

50mM リン酸緩衝液 (pH 6.3)

(2) κ -カゼイン水解用試薬

100mM リン酸緩衝液 (pH 6.3)

100mM グリシン-HCl 緩衝液 (pH 2.0)

100mM 酢酸緩衝液 (pH 3.0)

その他、試薬類はすべて特級を使用した。

3. 方法

(1) 凝乳活性

スキムミルク溶液に酵素液を加え、最終濃度が3% スキムミルク / 20mM CaCl_2 /

25mM リン酸緩衝液 (pH 6.3) となる様に希釈し、37°C 120 分間でインキュベートする。

テストチューブは傾けた状態で静置し、反応後、テストチューブを水平に倒してゲル化の状態を観察した。

(2) κ -カゼインの水解

κ -カゼインを上記の緩衝液に溶解し、最終濃度が1% になるように希釈する。この溶液 16 μ l にオリザシン 0.6 μ g、キモシン 1.6 μ g、ペプシン 1.6 μ g を加え 37°C、60 分間反応させた。反応液は、Laemmli の方法で SDS-PAGE を行ない、CBB 染色をした。

第3節 結果

1. コメより抽出した粗酵素液の凝乳活性

種子中にはAPをはじめ、システインプロテアーゼのオリザイン等、タイプの異なる

プロテアーゼが存在する。そこでコメの粗酵素液（硫酸 30-60 %飽和画分）についてスキムミルクを用いた凝乳活性の測定を行なった（図 7-1）。CaCl₂存在下、3%スキムミルク溶液（pH 6.3）に粗酵素液を加えて、37℃でインキュベートすると試験管を水平に倒しても形が崩れない様なゲル状に凝固した（図 7-1 レーン 2）。コントロールとして酵素液のかわりに 25mM リン酸緩衝液（pH 7.35）を加えたものは凝固せず、水平に倒した試験管内で液状のままである（図 7-1 レーン 1）。粗酵素液を加えた反応系に 0.1mM ペプスタチン（レーン 3）、1mM EDTA（レーン 4）、0.01mM ロイペプチン（レーン 5）、0.5mM PMSF（レーン 6）を各々加え、凝乳するか否かを調べたところ、ペプスタチンを加えたものはコントロールと同様に全くゲル化せず、ミルクは液状のままであったが、他のインヒビターを加えたものではインヒビターを加えないレーン 2と同様ゲル化をした。以上のことから、コメ中に存在するプロテアーゼのうち AP が有意にスキムミルクを凝固させることを見出した。

2. オリザシンによるκ-カゼインの水解

オリザシンに凝乳活性が存在することが確認できたので、他の凝乳酵素との作用機作の比較として、凝乳に最も関係の深いκ-カゼインを精製オリザシンで消化させた。κ-カゼインはカゼインミセルの表層を取り巻き、牛乳中で疎水性のα_s-カゼインやβ-カゼインをミセル内に安定化させる働きをもつ。凝乳酵素は、κ-カゼインの 105 Phe - 106 Met を限定分解することでミセルの安定化を崩し、凝乳させる。凝乳は Ca²⁺存在下、弱酸性で行なわれる。

κ-カゼインは付加する糖鎖の大きさによって数種のバリエーションが存在するが、主なものは分子量 28kDa である（図 7-2 レーン 3）。pH 3.0 ではオリザシンはκ-カゼインをランダムに水解し（レーン 1）、pH 6.3 では 12kDa のバンドが生成し、しかしそれ以上の低分子化をしなかった（レーン 2）。一方、ペプシンを pH 2.0 で反応させたところ、これをランダムに低分子化した（レーン 4）が、pH 6.3 では、限定的な分解のみが生じていた（レーン 5）。キモシンの場合も pH 3.0 で作用させるとレーン 7 に示すように低分

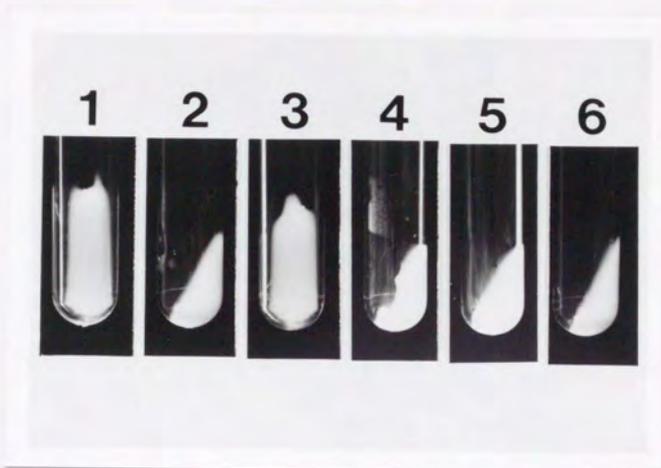


図7-1 コメ抽出粗酵素液のスキムミルクに対する凝固活性

試験管のスキムミルク溶液に粗酵素液を加え、試験管を斜めに傾けてpH6.3, 37°C, 120分間放置した。その後、試験管を水平に倒し、凝固の有無を観察した。

- 1 : スキムミルク溶液 (コントロール)
- 2 : スキムミルク溶液+粗抽出液
- 3 : スキムミルク溶液+粗抽出液+ 0.1mM ペプスタチン
- 4 : スキムミルク溶液+粗抽出液+1mM EDTA
- 5 : スキムミルク溶液+粗抽出液+0.01mMロイペプチン
- 6 : スキムミルク溶液+粗抽出液+0.5mM PMSF



図7-2 各種酸性プロテアーゼによる κ -カゼインの水解

1 : 0.6 μ g オリザシン (pH 3.0)

2 : 0.6 μ g オリザシン (pH 6.3)

3 : 未処理の κ -カゼイン

4 : 1.6 μ g ペプシン (pH 6.3)

5 : 1.6 μ g ペプシン (pH 2.0)

6 : 1.6 μ g キモシン (pH 6.3)

7 : 1.6 μ g キモシン (pH 3.0)

M : レーン1および2の分子量マーカーは左端に、レーン3~7は右端に示す。

子化し、pH 6.3では限定分解が生じて低分子化は起こらなかった（レーン6）。

第4節 考察

ペプシン、キモシンといった凝乳酵素は、胃底腺から胃腔に分泌される消化酵素であって、酸性条件下において活性化し、カゼインを消化する。しかし、凝乳酵素は、プロテオリシスの最大を示すpHとは異なる弱酸性下において凝乳反応の引き金を引く。一方、オリザシンの所在はノーザン分析によって、種子のみではなく、葉や根にも発現していることが既に確認されているが、その植物体内における機能については未知である。凝乳酵素としての条件はプロテアーゼ活性が低く、しかも凝乳活性が高い（つまり限定分解することが望まれる。低分子ペプチドの生成はしばしばミルクに苦味を与える結果となるからである。微生物由来の凝乳活性を有する酵素ムコールレンニン、エンドシアペプシン、リゾスベプシン等は凝乳活性が高くプロテアーゼ活性は低い。オリザシンの場合、至適pHは3.0であり、弱酸性下(pH6.3)では、プロテアーゼ活性は非常に低い。植物の凝乳酵素として最もよく研究されているのは、カルドンの花に存在するアスパラギン酸プロテアーゼ、サイプロシンである。サイプロシンは、 κ -カゼインの105 Phe - 106 Met 結合を切断することが報告されている(Faro et al. 1992)。オリザシンも同様の作用を有することが期待される。オリザシンは、新規の凝乳酵素であってもコメ由来であるという点から安全性に不安がなく、完熟種子中に存在することは、安価でしかも安定した供給が確保される点からも有益である。

第8章

総合討論

イネの生長・分化といった形態形成や種子の成熟と発芽には、時期特異的な遺伝子が発現し、生体機能を調節している。プロテアーゼはこれらの生理機能の中で、タンパク質の代謝回転という最も重要な機能を担っている。しかし、現在までのところ、先に述べたように、コメを含む植物プロテアーゼに関する研究は著しく立ち遅れていた。本研究では、コメ中にシステインプロテアーゼ (CP) に次いで多量に含まれると予想されるアスパラギン酸プロテアーゼ (AP) をオリザシンと命名し、解析を行った。

コメのAPであるオリザシンのcDNAクローンをRT-PCRによって3種類単離した。これらのクローンは互いに58~76%の相同性を有し、コメ以外の植物APである大麦のHvAPとカルドンのサイプロシントも58~80%の相同性であった。3つのRT-PCRクローン(pL1, pL4, pL5)は、動物、微生物APとは35~45%の相同性を有していた。3種のクローンのアミノ酸配列のうち、APの活性中心となるAsp残基周辺配列は、他のAPと同様高度に保存されていた(Asakura et al. 1995b)。また登熟種子から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、5個の陽性クローンを得たが、これらはすべて同一クローンをコードしており、しかも、pL1, pL4, pL5とは異なっていた。最も長いクローンは、全長2027 bpよりなり、APの全長を含む配列をコードし、本クローンがコードするタンパク質をオリザシン1と命名した。オリザシン1は、大麦のAPであるHvAPと最も相同性が高く、成熟型部分では88%という非常に高い値であった。しかし、同じコメから得られたAPであるにもかかわらず、pL4, pL5とは64%, 59%と値はかなり低かった(Asakura et al. 1995b)。一次構造上、pL4とpL5、pL1とオリザシン1は互いに相同性が高く、コメ中のオリザシンは、pL4とpL5、pL1とオリザシン1の2つのグループに分類されることが明らかになった。コメのCPであるオリザンにも α 、 β 、 γ という3種のcDNAが存在し、各々は発現時期やGA₃に対する応答性が異なり種子中における役割分担がなされているのであろうと推定されている(Watanabe et al. 1991)。オリザシンの場合は果たしてどうであろうか。オリザシン1は、登熟2週目の種子cDNAライブラリーから得られたクローンである。スクリーニングの際に、pL1, pL4, pL5をプローブにしたにもかかわらず、陽性クローンがすべてオリ

ザシン1をコードしていたことを考えると、おそらくこの時期においてはオリザシン1の発現が他のクローンより多いと思われる。ノーザン分析の結果、オリザシン1 mRNAは登熟2週目に発現量は最大となり、3週目4週目とやや減少するものの登熟時期の発現量は多い。オリザシン1と相同性の低かったpL5の発現パターンは、オリザシン1と同様登熟期に多く発現していたが、最も発現量の多かったのは発芽期における幼芽と幼根であった。この差が個々のオリザシンの機能と直接関係するものであるか否かはさらに詳細な研究を必要とするが、各々が役割分担を行っている可能性が高いと思われる。同一植物中に同種のプロテアーゼが複数種存在する例は、オリザシン α 、 β 、 γ の他に大麦のEP-A, EP-B, アリュウレインがある。3者はすべてCPであるが、EP-A, EP-Bが分泌型であるのに対して、アリュウレインは非分泌型である(Holwerda et al.1992, Koehler et al. 1990a)。また、ごく最近、トウモロコシのCPについても道本らによってGA₃ 応答性の異なる2種のクローンCCP1およびCCP2が単離された。CCP1はプロペプチド中に液胞ソーティングシグナルNPIR配列が存在し、液胞酵素であろうと推定されている(Domoto et al. 1995)。これらの例のように、複数のアイソザイムが存在する場合、個々の酵素は異なる局在・機能または発現制御を受ける場合が少なくない。オリザシンの場合、オリザシン1はHvAPやカテプシンD、酵母のプロテイナーゼAといった細胞内酵素と相同性が高い。カテプシンDはリソソーム内で他のカテプシン群酵素のプロセッシングを行っている。また、プロテイナーゼAは同じく液胞中に存在するカルボキシペプチダーゼYのプロセッシング酵素である(Ammerer et al.1986)。HvAPは、レクチンを基質としてそれを水解するという報告がある(Runeberg-Roos et al.1994)。オリザシン1がHvAPと極めて高い相同性を有することは、オリザシン1が液胞内にあって細胞内タンパク質の代謝回転に係わるプロテアーゼであることは容易に予想される。オリザシン1 mRNAは、種子の形成・発芽という生理活性状況が激しい状況では多く発現するのに比べ、休眠期ではその発現は見られなかった(第3章)。おそらく登熟中に蓄積されたオリザシンが生命活動に必要なとされる最小限の量だけ活性型となって種子の中に存在するのではなかろうか。

オリザシンは既知のAPにはない特徴を備えていた。特有な約100アミノ酸残基からなるインサーションをC末端領域に有しており、植物由来のAP(大麦、カルドン)にはすべてこのインサーション領域が、存在していた。100アミノ酸残基という分子全体のほぼ4分の1を占める様な巨大なインサーションは、どのようにして生じ、また、どのような機能を持っているのであろうか。結晶化した植物APのX線解析等によるインサーションの立体配座の解析、又は、インサーションを欠失させたミュータントの作製による酵素化学的性質の変化の追跡等によって今後明らかにされるだろう。APは、2つの類似するドメインより構成されている。2つのドメインの中央部分のくぼみに活性クレフトが存在し、基質ポケットが形成される構造をとる(James and Sielecki 1983, Andreeva et al.1985, Blundell et al. 1985, Safro et al.1985)。オリザシン1が、APの基本構造といえる双葉様の構造をとるであろうことは、一次構造が他のAPと相同性が高いことから想像できる。しかし、100アミノ酸残基もの巨大なペプチドはオリザシンの構造や機能においてどのような位置を占めているのであろうか。このことに関して本研究では、以下の3点のアプローチにより推定した。第1に、オリザシン1の遺伝子構造の解析を行い、遺伝子の側からインサーションについて考察することである。もし、インサーション部分のみが後から挿入された場合、たとえば、インサーション挿入位置とイントロン挿入位置が一致するなどの痕跡が残るはずである。ところが、オリザシン1遺伝子では図4-4に示す様に、インサーションは第9エクソンの一部、第10エクソン、第11エクソンの一部の3つのエクソンにコードされ、インサーションの入口にも出口にもイントロンの挿入は認められなかった。動物由来のAP遺伝子では、植物インサーション挿入位置とほぼ一致する場所にイントロンが挿入されていることから(図4-5)、インサーション部分は、トランスポゾン等がオリザシン遺伝子上にインテグレートされることによって生成したのではないかとの仮説が立てられた(Runeberg-Roos 1991)。しかし、オリザシン遺伝子の構造はこれを否定するものであった。第2のアプローチは実際に立体構造を解析することだが、植物APでは解析例はない。最近、GuruprasadらによってHvAPのインサーションの二次構造がサボシン

と類似しているという報告がなされた (Guruprasad et al.1994)。サポシンはグルコシダーゼを活性化し、プロカテプシンDの液胞へのターゲティングに重要な役割を果たしている。サポシンは液胞に存在するタンパク質であり、HvAPも分子内にサポシン様の配列をもつことから、自身で液胞へソーターリングする可能性を示している。しかしながら、すべての植物APが長いインサクションを保持しているという事実は、これらのインサクションそのものが、個々の酵素が各々備えている基質特異性や局在性といった独自の性質を決定するためのファクターではないと考えられる。第3点は、インサクション欠失オリザシンを大腸菌等で発現させ、その酵素的性質の違いを調べることだが、GST融合タンパク質として発現させたネイティブなオリザシン1について検討中であり、これに関しては今後の課題としたい。

オリザシン1の遺伝子は、先に述べた植物特異的インサクションのみならず、既知のAPとは全く異なる構造を有していた。オリザシン1遺伝子は、動物AP遺伝子が、約10 kbpと大きいのに比べ、約6 kbpと小さいが、前者が、8イントロン9エクソンであるのに対し、後者は、13イントロン14エクソンと細分化されている。動物のAP遺伝子は図3-5に示される様に、9エクソン8イントロンで、しかもイントロンの挿入位置は保存されている。一方、微生物由来のAPでは、酵母のプロテイナーゼAはイントロンレスであり、リゾブスベプシンは1個のイントロンが活性中心のAspを分断する形で挿入されている。ペニシロペプシンは、4エクソン3イントロン構造をもち、第1イントロンの挿入位置はリゾブスベプシンとの間で保存されている。このように微生物由来のAPは、類似性を保ちながらも個々には異なる遺伝子構造を有している。

Tangらは、APの一次構造の特徴をgene duplicationにより説明している (Tang et al.1978)。すなわち、APの2つの活性中心近傍の配列が類似しており、N端ドメインとC端ドメインの中で類似の配列をもつこと、また、特にヒトレニンの遺伝子はエクソン1~4と5~8がエクソンの大きさ及びイントロンの長さがほぼ等しいことから、gene duplicationが起こった後融合することにより、現在のAP遺伝子の構造が出来上がったものとされる (Burt et al.1985)。ヒトレニン以外の動物AP遺伝子についても、イントロン

の長さはそれぞれ差異があるものの、エキソンの長さはほぼ等しいことから (図4-5)、同様の遺伝子構築過程をとったものと考えられる。一方、オリザシン遺伝子は、イントロンの挿入位置や長さからは、動物APにおけるようなgene duplicationは想定されない。しかし、オリザシンの一次構造は、他のAPと類似しており、しかも活性中心の2つのAsp残基周辺の配列が保存されていることなどを考えると、オリザシンの場合、他のAPと同様祖先型遺伝子がgene duplicationを起こし、融合タンパク質となり、その後、オリザシンは頻繁なイントロンの獲得と欠失が生じ、今日の構造となったと推定される。オリザシン1の遺伝子構造が、植物APの典型であるか否かは、今後の研究に譲ることとして、オリザシン1独自の発現制御を司るとされる5'上流域について考察してみたい。オリザシン1遺伝子は、5'ノンコーディング領域にイントロンが挿入されていた。cDNAの5'末端は顕著なGC rich領域になっていた。動物のカテプシンL、カテプシンDやカルバインなどのハウスキーピング遺伝子の5'上流域には、通常存在するプロモーターであるTATA boxやCAAT boxは存在せず、顕著なGC rich領域が認められた (Hata et al. 1989, Ishidoh et al. 1989, Redecker, et al. 1991)。オリザシン1遺伝子の場合、TATA boxやCAAT boxは認められるものの遙か上流 (-394 および -436) に存在していた。また、小麦ヒストン遺伝子より見いだされた植物のハウスキーピング遺伝子のシスエレメントであるノナマー配列及び、オクタマー配列と類似する配列 (GATCCAACG, GGAGGATC, CGCGGTCG) が存在した (Chaubet et al. 1986, Nakayama et al. 1992)。このことからオリザシン1が、ハウスキーピング的な (哺乳類のカテプシン群的な) 機能をもつことも充分考えられる。

完熟種子から精製されたオリザシンは、cDNA構造上相同性が高かった大麦のHvAPとタンパク質レベルでは、かなり異なっていた。第一に、精製オリザシンは、第6章で述べたように、量的な問題はあっても57kDaのモノマーでも存在することが確認されたことである。57kDaのモノマーは、オリザシンcDNAからの推定分子量ならびに糖鎖付加部位の存在から、糖鎖の付加したプロ体であると推定された。一方、HvAPは、48kDa (32kDa+16kDa) と40kDa (29kDa+11kDa) のヘテロダイマーであり、モノマーの存

は報告されておらず、両者で異なっていた。HvAPの48kDa分子は、heavy chain と light chain の各々のC末端がプロセッシングされて、40kDaの酵素へと変換されるというものであった(Runeberg-Roos et al., 1991)。本研究においてもペプスタチンアフィニティー後のほぼ精製された画分においても57kDa以外に35kDa, 25kDaのバンドが現れることから、コメのオリザシンも大麦HvAP同様にヘテロダイマーの形態で存在するのかもしれない。また、ヘテロダイマーであるとしても、その分子形態は複数種あることも考えられ、更なる検討を必要とする。両者のヘモグロビンを基質としたプロテアーゼ活性の至適pHが、オリザシンが3.0であるのに対し、HvAPは3.5-3.9と明らかに高い。このように精製酵素として眺めた二者は、互いにカウンターパートとは言えない程の相違点を有していた。この事実は、遺伝子レベルから解析した一次構造の相同性がタンパク質レベルでの酵素の相同性に必ずしも直結せず、酵素の解析には、遺伝子およびタンパク質の両面からのアプローチが必要であることを改めて認識させた。

GST融合タンパク質として大腸菌で発現させたオリザシンの活性化は、*in vivo*でのオリザシンの活性化を知る上で重要な情報を与えてくれるはずである。GSTにプロ体のオリザシン1を融合させた形で発現させたプロ体オリザシン1は、pH 3.3という酸性条件下で24時間処理することでプロテアーゼ活性を生じた。植物細胞内で酸性であるオルガネラは、液胞、プロテインボディーまたはエンドソームである。オリザシンの代謝回転について考察してみたい。オリザシン1は、おそらく他のプロテアーゼと同様、粗面小胞体膜上で生合成され、ゴルジ複合体を經由して液胞へと選別輸送され、液胞内で成熟型オリザシンへと転換されると思われる。液胞内では、プロ型オリザシンと成熟型オリザシンの両方が存在し、プロ型オリザシンは液胞内の酸性条件下で活性型となり、細胞内タンパク質の消化、プロセッシング、異物代謝等に関与すると考えられる。この際他のプロテアーゼによるプロセッシングは必要とされないであろう。しかし、大腸菌で発現させたオリザシンは、大半が不活性型であったことから、発現オリザシンの活性化についてはさらに検討を要する。

最後にオリザシンの応用面での研究について述べる。オリザシンに関して遺伝子解

析、大腸菌での発現、また酵素の精製といった仕事を行ってきた過程で、多くの凝乳酵素が、オリザシンと同じアスパラギン酸プロテアーゼであることに着目し、オリザシンの凝乳酵素としての可能性を模索した。オリザシンはスキムミルク溶液をカルシウムイオン存在下で凝固し、弱酸性下(pH 6.3)で κ -カゼインを限定分解することを見出した。今後、凝乳活性の強さ、産生するペプチド等を、キモシン、ペブシンといった他の凝乳酵素と比較検討する必要性はあるものの、完熟コメに存在するオリザシンを凝乳酵素として利用することは、安価で、しかも、安定供給が確保されているという面でも有益であると考えられる。

以上、本研究は、コメAPであるオリザシンを多方面から解析し、その全容を明らかにすることを目的として開始した。この目的は、一部は達成されたと思うが、未だに未知のヴェールに包まれている部分も多く、その姿を見るには、さらなる研究の積み重ねが必要であると思われる。オリザシンの研究が、植物プロテアーゼの全体像の解明と応用面での開発に貢献するものと期待している。

引用文献

- Abe, K., Kondo, H., and Arai, S. (1987) Purification and properties of a cysteine proteinase from germinating rice seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1509-1514.
- Akasofu, H., Yamauchi, D., Mitsuhashi, W., and Minamikawa, T. (1989) Nucleotide sequence of cDNA for sulfhydryl-endopeptidase (SH-EP) from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6733.
- Akasofu, H., Yamauchi, D., Mitsuhashi, W., and Minamikawa, T. (1990) Nucleotide sequence of the gene for the *Vigna mungo* sulfhydryl-endopeptidase (SH-EP). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1892.
- Ammerer, G., Hunter, G. P., Rothman, J. H., Saari, G. C., Valls, L. A., and Stevens, T. H. (1986) *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2490-2499.
- Andreeva, N., Zdanov, A., Gustchina, A., and Fedorov, A. (1985) X-ray diffraction analysis of porcine pepsin structure. In: Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 137-150.
- Arai, S., Hosoyama, H., and Abe, K. (1988) Gibberellin-induced cysteine proteinase occurring in germinating rice seeds and its specificity for digesting oxidized insulin B-chain. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2957-2959.
- Arima, K., Iwasaki, S., and Tamura, G. (1967) Milk clotting enzyme from microorganisms. Part I. Screening test and the identification of the potent fungus. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 540-545.
- Arruda, L. K., Vailes, L. D., Mann, B. J., Shannon, J., Fox, J. W., Vedvick, T. S., Hayden, M. L., and Chapman, M. D. (1995) Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19563-19568.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K., and Arai, S. (1995a) 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.
- Asakura, T., Abe, K., and Arai, S. (1995b) Evidence for the occurrence of multiple aspartic proteinase in rice seed. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1793-1794.
- Aworh, O. C., and Nakai, S. (1986) Extraction of milk clotting enzyme from sodom apple (*Calotropis procera*). *J. Food Sci.*, **51**, 1569-1570.
- Aworh, O. C., and Muller, H. G. (1987) Cheese-making properties of vegetable rennet from sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chem.*, **26**, 71-79.
- Azuma, T., Pals, G., Mohandas, T.K., Couvreur, J. M., and Taggart, R.T. (1989) Human gastric cathepsin E. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16748-16753.
- Belozersky, M. A., Sarbakanova, S. T., and Dunaevsky, Y. E. (1989) Aspartic

- proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*, **177**, 321-326.
- Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Rudenskaya, G.N., and Stepanov, V.M.(1984) Carboxylic proteinases from buckwheat seeds. *Biokhimiya* **49**,479-485.
- Berka, R. M., Ward, M., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Kodama, K. H., Carlomagno, L. P. and Thompson, S. A.(1990) Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, *Gene*(Amst.) **86**, 153-162.
- Blum, J. S., Fiani, M.L., and Stahl, P.D.(1991) Localization of Cathepsin D in endosomes. In : Structure and function of the aspartic proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **306**, Plenum Press, NY and London. 281-287.
- Blundell, T., Jenkins, J., Pearl, L., Sewell, T., and Pederson, V. (1985)The high resolution structure of endothiasepsin. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 151-161.
- Brown, J. W. S. (1986) A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 9549-9559.
- Burt, D.W., Beecroft, L.J., Mullins, J.J., Pioli, D., George, H., Brooks, J., Walker, J., and Brammer, W.J. (1985) Mouse renin gene structure, evolution and function. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 355-377.
- Chaubet, N., Philipps, G., Chaboute, M.-E., Ehling, M., and Gigot, C. (1986) Nucleotide sequences of two corn histone H3 genes. Genomic organization of the corn histone H3 and H4 genes. *Plant Mol. Biol.*, **6**, 253-263.
- Chen, K. C. S., Tao, N., and Tang, J. (1975) Primary structure of porcine pepsin. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5068-5075.
- Cho, W.-L., and Raikhel, A. S. (1992) Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease: Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21823-21829.
- Cordeiro, M. C., Xue, Z.-T., Pietrzak, M., Pais, M. S., and Brodelius, P. E. (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.
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S., and Brodelius, P. E. (1994) Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiol. Plant.*, **92**, 645-653.
- D'Hondt, K., Bosch, D., Damme, J. V., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Krebbers, E. (1993) An aspartic proteinase present in seeds cleaves *arabidopsis* 2S albumin precursors *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20884-20891.
- Doi, E., Komori, N., Matoba, T., and Morita, Y. (1980a) Some properties of carboxypeptidases in germinating rice seeds and rice leaves. *Agric. Biol.*

Chem., **44**, 77-83.

- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T., and Yonezawa, D. (1980b) Evidence for the presence of two types of acid proteinases in germinating seeds of rice. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 435-436.
- Doi, E., Shibata, D., Matoba, T., and Yonezawa, D. (1980c) Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 741-747.
- Doi, E., Komori, N., Matoba, T., and Morita, Y. (1980) Carboxypeptidase-like metal enzyme in rice seedlings. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 921-922.
- Domoto, T., Watanabe, T., 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.
- Dryjanski, M., Otlewski, J., Polanowski, A. and Wilusz, T. (1990) Serine proteinase from *Cucurbita ficifloila* seed; purification, properties, substrate specificity and action on native squash trypsin inhibitor (CMTII). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **371**, 889-895.
- Dunaevsky, Y. E., Sarbakanova, S. T., and Belozersky, M. A. (1989) Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. *J. Exp. Bot.*, **40**, 1323-1329.
- Dunn, B. M. (1991) Structure and function of the aspartic proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **306**, Plenum Press, NY and London.
- Emtage, J. S., Angal, S., Doel, M. T., Harris, T. J. R., Jenkins, B., Lilley, G., and Lowe, P. A. (1983) Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3671-3675.
- Erickson, A. H., Conner, G. E., 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.
- Faro, C. J., Moir, A. J. G., and Pires, E. V. (1992) Specificity of a milk clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: Action on oxidised insulin and κ -casein. *Biotech. Lett.*, **14**, 841-846.
- Faust, P. L., Kornfeld, S., and Chirgwin, J. M. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4910-4914.
- Feverheiro, P., Cabral, J. M. S., Fonseca, M. M. R., Novais, J. M., and Pais, M. S. S. (1986) Callus and suspension culture of *Silybum marianum*. biosynthesis of proteins with clotting activity. *Biotech. Lett.*, **8**, 19-24.
- Foltmann, B., Pedersen, V. B., Kauffman, D., and Wybrandt, G. (1979) The primary structure of calf chymosin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8447-8456.
- Fukamizu, A., Nishi, K., Cho, T., Saitoh, M., Nakayama, K., Ohkubo, H., Nakanishi, S., and Murakami, K. (1988) Structure of the rat renin gene. *J. Mol. Biol.*, **201**, 443-450.

- Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M., (1994) The prosequence of *Rhizopus niveus* aspartic proteinase-I supports correct folding and secretion of its mature part in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 9556-9561.
- Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the acid protease-encoding gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1095-1100.
- Guruprasad, K., Törmäkangas, K., Kervinen, J., and Blundell, T. L. (1994) Comparative modelling of barley-grain aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity. *FEBS Lett.*, **352**, 131-136.
- Haber, E., Koerner, T., Page, L. B., Kliman, B., and Purnode, A. (1969) Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. Clin. Endocr.*, **29**, 1349-1355.
- Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (1987) Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.*, **85**, 440-445.
- Harris, T. J. R., Lowe, P. A., Lyons, A., Thomas, P. G., Eaton, M. A. W., Millican, T. A., Patel, T. P., Bose, C. C., Carey, N. H., and Doel, M. H. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2177-2187.
- Hata, A., Ohno, S., Akita, Y., and Suzuki, K. (1989) Tandemly Reiterated negative enhancer-like elements regulate transcription of a human gene for the large subunit of calcium-dependent protease. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6404-6411.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Figueiredo, A. C. S., Pais, M. S. S. (1990) Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **29**, 1405-1410.
- Hidaka, M., Sasaki, K., Uozumi, T., and Beppu, T. (1986) Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene (Amst.)*, **43**, 197-203.
- Higgins, T. J. V. (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 191-221.
- Hill, J., Tyas, L., Kay, P., Dunn, B. M., and Berry, C. (1994) High level expression and characterisation of Plasmepsin II, an aspartic proteinase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.*, **352**, 155-158.
- Hills, J., Montgomery, D. S., and Kay, J. (1993) Human cathepsin E produced in *E. coli*. *FEBS*, **326**, 101-104.
- Holwerda, B. C., and Rogers, J. C. (1992) Purification and characterization of aleurain: A plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. *Plant Physiol.*, **99**, 848-855.
- Horiguchi, T., and Kitagishi, K. (1976) Studies on rice seed protease: VI. Metal ion activation of rice seed peptidase. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**, 73-80.
- Horiuchi, H., Yanai, K., Okazaki, T., Takagi, M., and Yano, K. (1988) Isolation and

- sequencing of a genomic clone encoding aspartic proteinase of *Rhizopus niveus*. *J. Bacteriol.*, **170**, 272-278.
- Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S., and Murakami, K. (1983) Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7405-7409.
- Ishidoh, K., Kominami, E., Suzuki, K., and Katunuma, N. (1989) Gene structure and 5'-upstream sequence of rat cathepsin L. *FEBS Lett.*, **259**, 71-74.
- Iwasaki, S., Tamura, G., and Arima, K. (1967) Milk clotting enzyme from microorganisms Part II The enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 546-551.
- James, M. N. G., and Sielecki, A. R. (1983) Structure and refinement of penicillopepsin at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **163**, 299-361.
- Kaneda, M. and Tominaga, N. (1975) Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem.* **78**, 1287-1296.
- Kageyama, T., Ichinose, M., Tsukada, S., Miki, K., Kurokawa, K., Koiwai, O., Tanji, M., Yakabe, E., Athauda, S. B. P., and Takahashi, K. (1992) Gastric procathepsin E and progastricsin from guinea pig: Purification, molecular cloning of cDNAs, and characterization of enzymatic properties, with special reference to procathepsin E. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16450-16459.
- Katunuma, N., and Kominami, E. (1983) Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitors. *Curr. Top Cell Regul.*, **22**, 77-101.
- Kawamura, Y., and Yonezawa, D. (1982) Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 767-773.
- Kawata, T., Nakayama, T., Mikami, K., Tanata, T., Takase, H., and Iwabuchi M. (1988) DNA-binding protein(s) interacts with a conserved nonameric sequence in the upstream regions of wheat histone genes. *FEBS Lett.*, **239**, 319-323.
- Kervinen, J., Sarkkinen, P., Kalkkinen, N., Mikola, L., and Saarna, M. (1993) Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase. *Phytochemistry*, **32**, 799-803.
- Koehler, S.N., and Ho, Tuan-Hua D. (1990a) Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell*, **2**, 769-783.
- Koehler, S.N., and Ho, Tuan-Hua D. (1990b) A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiol.* **94**, 251-258.
- Koelsch, G., Mares, M., Metcalf, P., and Fusek, M. (1994) Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Lett.*, **343**, 6-10.
- Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y., and Arai, S. (1990) Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases, *J. Biol. Chem.* **265**, 15832-15837.
- Kostka, V. (1985) Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course*

- 84/07, Walter de Gruyter, Berlin and NY.
- Laemmli, U.K. (1990) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **277**, 680
- Lenarcic, B., Kos, J., Dolenc, I., Lucovnik, P., Krizaj, I., and Turk, V. (1988) Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitors cystatins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 765-772.
- Lin, X., Wong, R.N.S., and Tang, J. (1989) Synthesis, purification, and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4482-4489.
- Manuel, A. N., Fitzgerald, M. D., McKeever, B.M., Leu, Chih-Tai, Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L., Springer, J. P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*, **337**, 615-620.
- Marciniszyn, J. J., Sepulveda, P., Huang, W.-Y., Lanier, J. P., and Tang, J. (1975) Primary structure of porcine pepsin: II amino acid sequence of two cyanogen bromide fragments, CB3 and CB4. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5076-5081
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035-10038.
- Matsuoka, K. and Nakamura, K. (1991) Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 834-838.
- Matsushima, A., Inada, Y., Maeda, H. (1993) 家ダニプロテアーゼとアレルギー、蛋白質 核酸 酵素 **38**, 2734-2739.
- McGeehan, G., Burkhart, W., Anderegg, R., Becherer, J. D., Gillikin, W., and Graham, J. S. (1992) Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase. *Plant Physiol.*, **99**, 1179-1183.
- Misono, K. S., Chang, J.-J., and Inagami, T. (1982) Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4858-4862.
- Mitsuhashi, W., and Minamikawa, T. (1989) Synthesis and posttranslational activation of sulfhydryl-endopeptidase in cotyledons of germination *vigna mungo* seeds. *Plant Physiol.* **89**, 274-279.
- Miyazaki, H., Fukamizu, A., Hirose, S., Hayashi, T., Hori, H., Ohkubo, H., Nakanishi, S., and Murakami, K. (1984) Structure of the human renin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5999-6003.
- Nakayama, T., Sakamoto, A., Yang, P., Minami, M., Fujimoto, Y., Ito, T., and Iwabuchi, M. (1992) Highly conserved hexamer, octamer and nonamer motifs are positive *cis*-regulatory elements of the wheat histone H3 gene. *FEBS Lett.*, **300**, 167-170.
- Nishikata, M. (1984) Trypsin-like protease from soybean seeds. Purification and some properties. *J. Biochem.* **95** 1169-1177.
- 西村幹夫, (1987) 蛋白質 核酸 酵素, **30**, 55-60.
- Nishimura, Y., Kawabata, T., Furuno, K., and Kato, K. (1989) Evidence that

- aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**, 400-406.
- Okamoto, T., and Minamikawa, T. (1995) Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SH-EP). *Eur. J. Biochem.*, **231**, 300-305.
- Okita, T. W., Hwang, Y. S., Hnilo, J., Kim, W. T., Aryan, A. P., Larson, R., and Krishnan, H. B. (1989) Structure and expression of the rice glutelin multigene family. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12573-12581.
- Park, Y.N. and Horinouchi, S. (1995) Protein engineering of milk-clotting enzyme, chymosin and *Rhizomucor* rennin. *乳業技術*, **45**, 16-26.
- Pichova, I., Pohl, J., Strop, P., and Kostka, V. (1985) Activation of chicken pepsinogen and chicken pepsin-propart peptide (p1-p42) complex. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 301-308.
- Polanowski, A., Wilusz, T., Kolaczowska, M.K., Wieczorek, M., and Wilimowska-Pelc, A. (1985) Purification and characterization of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* seeds. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 49-52.
- Redecker, B., Heckendorf, B., Grosch, H.-W., Mersmann, G., and Hasilik, A. (1991) Molecular organization of the human cathepsin D gene. *DNA Cell Biol.*, **10**, 423-431.
- Richo, G.R., and Conner, G.E. (1994) Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14806-14812.
- Richo, G.R., and Conner, G.E. (1991) Proteolytic activation of human procathepsin D. In : Structure and function of the aspartic proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **306**, Plenum Press, NY and London., 289-296.
- Rodrigo, I., Vera, P., and Conejero, V. (1989) Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 663-669.
- Rogers, J. C., Dean, D., and Heck, G. R. (1985) Aleurain: A barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6512-6516.
- Rosenfeld, M. G., Kreibich, G., Popov, D., Kato, K., and Sabatini, D. D. (1982) Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post-translational processing in determining their subcellular distribution. *J. Cell Biol.*, **93**, 135-143.
- Runeberg-Roos, P., Törmäkangas, K., and Östman, A. (1991) Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1021-1027.
- Runeberg-Roos, P., Kervine, J., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. and Gal, S. (1994) The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley

- lectin *in vitro*. *Plant Physiol.*, **105**, 321-329.
- Saccinas, J. L. (1966) USA Patent 3,275,453.
- Safro, M., Andreeva, N., and Zdanov, A. (1985) The determination of the three-dimensional structure of chymosin. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY.183-187.
- Sarkkinen, P., Kalkkinen, N., Tilgmann, C., Siuro, J., Kervinen, J., and Mikola, L., (1992) Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta*, **186**, 317-323.
- Salmia, M. A., Nyman, S. A., and Mikola, J. J. (1978) Characterization of the proteinases present in germinating seeds of scots pine, *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.*, **42**, 252-256.
- Scott, M. P., Jung, R., Muntz, K., and Nielsen, N. C. (1992) A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 658-662.
- Shewale, J. G., and Tang, J. (1984) Amino acid sequence of porcine spleen cathepsin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3703-3707.
- Shutov, A. D., and Vaintraub, I. A. (1987) Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, **26**, 1557-1566.
- Snowden, K.C. and Gardner R.C. (1990) Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6684.
- Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Ichihara, Y., and Takahashi, K. (1983) Primary structure of human pepsinogen gene. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5306-5311.
- Sternberg M.Z. (1970) Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.*, **54**, 159-167.
- Strukelj, B., Pungercar, J., Ritonja, A., Krizaj, I., Gubensek, F., Kregr, I., Turk, V. (1990) Nucleotide and deduced amino acid sequence of an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4605.
- Suh, S.G., Peterson, J. E., Stiekema, W. J., and Hannapel, D.J. (1991) Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tuber proteins. *Plant Physiol.*, **94**, 40-45.
- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yonezawa, T., Kinbara, K., and Ishiura, S. (1995) Calpain: Novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem.* **376**, 523-529.
- Suzuki, J., Sasaki, K., Sasao, Y., Hamu, A., Kawasaki, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1989) Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis. *Protein Engineering*, **2**, 563-569.
- Takahashi, K. and Kageyama, T. (1985) Multiplicity and intermediates of the activation mechanism of zymogens of gastric aspartic proteinases. In : Aspartic proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de

- Gruyter, Berlin and NY. 265-282.
- Tam, J. J. and Whitaker, J. R. (1972) Rates and extents of hydrolysis of several caseins by pepsin, rennin, *Endothia parasitica* protease and *Mucor pusillus* protease. *J. Dairy Sci.*, **55**, 1523-1531.
- Tamer, I. M. (1993) Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotech. Lett.*, **15**, 427-432.
- Tang, J. (1977) Acid protease, structure, function and biology. Penum press.
- Tang, J., James, M. N. G., Hsu, I. N., Jenkins, J. A. and Blundell, T. L. (1978) Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature*, **271**, 618-621.
- 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.
- 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 proteinase and their inhibitors. *FEBS advanced course 84/07*, Walter de Gruyter, Berlin and NY. 283-299.
- Vernet, T., Berti, P. J., Montigny, C., Musil, R., Tessier, D. C., Ménard, R., Magny, M.-C., Storer, A. C., and Thomas, D. Y. (1995) Processing of the papain precursor: The ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10838-10846.
- von der Helm, K. (1977) Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins *in vitro* involves viral protein p15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 911-915.
- 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.
- Whittier, R. F., Dean, D. A., and Rogers, J. C. (1987) Nucleotide sequence analysis of alpha-amylase and thiol protease genes that are hormonally regulated in barley aleurone cells. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2515-2535.
- Woolford, C. A., Daniels, L. B., Park, F. J., Jones, E. W., Arsdell, J. N. and Innis, M. A. (1986) The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2500-2510.
- Yamagishi, K., Mitsumori, C., and Kikuta, Y., (1991) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the putative trypsin inhibitor in potato tuber. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 287-288.
- Yamamoto, K., Katsuda, N., Himeno, M., and Kato, K. (1979) Cathepsin D of rat spleen: Affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur. J. Biochem.*, **95**, 459-467.

Yamamoto, K., Sasaki, H., Ueno, E., and Kato, Y Biological significance and activity control of cathepsin E compared with cathepsin D. In : Structure and function of the aspartic proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **306**, Plenum Press, NY and London., 297-306.

Yamasita, T., Tonouchi, N., Uozumi, Y., and Beppu, T. (1987) Secretion of Mucor rennin, a fungal aspartic protease of *Mucor pusillus*, by recombinant yeast cells. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 462-647.

鈴木紘一編 (1993) プロテアーゼと生体機能. 東京化学同人

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

岡田吉美・池田穰衛編 (1990) 高等植物の情報発現と制御. 丸善

Encyclopedia of Food Science and technology (1992) Edited by Hui, Y. H., A Wiley-Interscience Publication, John & Sons Inc.

農林水産省『平成6年度 農業の動向に関する年次報告』p.143.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学教授、荒井綜一先生に深謝いたします。また、直接御指導いただきました東京大学助教授、阿部啓子博士には、お茶の水女子大学在学中より、筆舌に尽くせないほどお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

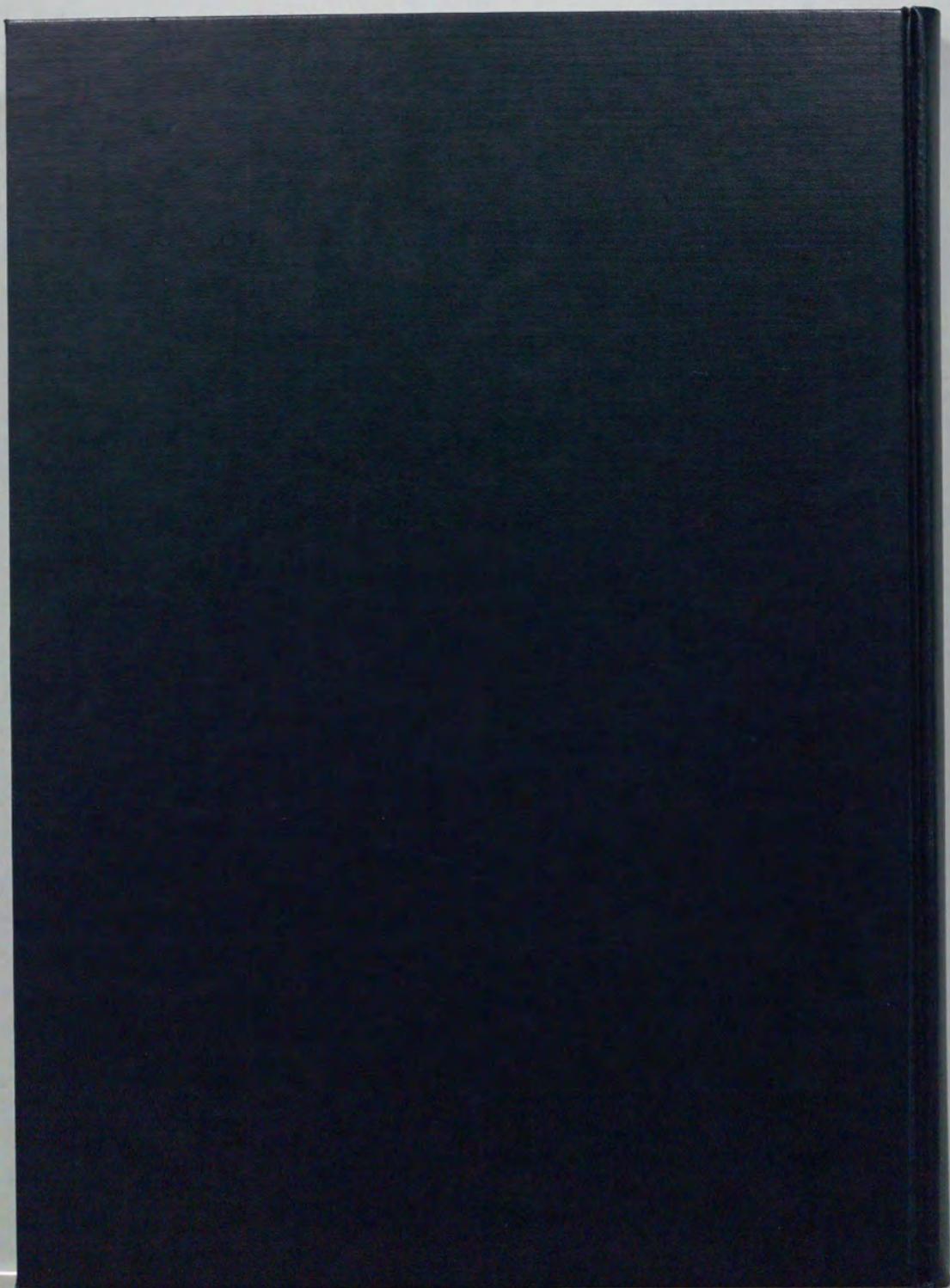
東京都臨床医学総合研究所にて御指導を賜りました、現東京大学分子細胞生物学研究所教授鈴木絃一先生、現東京大学理学部助教授榎森康文博士、現東京大学分子細胞生物学研究所助手反町洋之博士に感謝いたします。

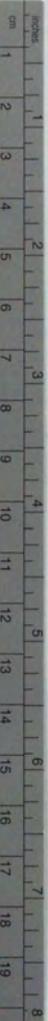
合成基質を恵与くださった東京大学教授堀之内末治先生に御礼申し上げます。

稲を恵与くださった東京大学田無農場町田寛康氏に御礼申し上げます。

また、日頃御助言、ご協力をいただいた東京大学助手渡辺寛人博士、跡見学園女子大学短期大学部教授道本千衣子博士、福岡女子大学助教授舟木淳子博士、東京大学岩淵京子博士、論文作成にご協力いただいた安岡顕人氏をはじめとする食糧化学研究室の皆様へ御礼申し上げます。

最後に、研究生活を終始支えてくれた両親に心より感謝いたします。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

