

トウモロコシ種子シスタチンおよびシステインプロテイナーゼに
関する分子生物学的研究

蓮本千夜子

①

トウモロコシ種子シスタチンおよび
システインプロテイナーゼに関する
分子生物学的研究

道本 千衣子

1995

目次

序論	1
1 システインプロテイナーゼインヒビター	4
2 システインプロテイナーゼ	7
3 本研究の目的	10
第1章 トウモロコシ種子シスタチンに関する分子生物学的研究	13
第1節 トウモロコシシスタチンの阻害活性	13
1 緒言	13
2 材料および方法	15
2-1 材料	15
2-1-1 大腸菌での発現	15
2-1-2 クロマトグラフィー	15
2-1-3 タンパク質分解酵素	15
2-2 方法	16
2-2-1 大腸菌で発現させたCC-Iのゲルろ過カラム クロマトグラフィー	16
2-2-2 CC-Iの精製	16
2-2-3 阻害活性の測定	17
2-2-4 SDS-PAGE	17
2-2-5 抗体作製とウエスタンブロット分析	18
3 結果	19
3-1 大腸菌で発現させたCC-Iの精製	19

3-2	SDS-PAGE	19
3-3	ウエスタンブロット	19
3-4	阻害活性の測定	20
4	考察	21
第2節	トウモロコシシスタチンの局在性	29
1	緒言	29
2	材料および方法	30
2-1	材料	30
2-2	方法	30
2-2-1	種子の固定	30
2-2-2	切片の作製	30
2-2-3	抗体染色	30
3	結果	32
4	考察	33
第3節	トウモロコシ種子中に存在する複数種のシスタチン	35
1	緒言	35
2	材料および方法	36
2-1	材料	36
2-1-1	試薬類	36
2-1-2	調製溶液類	36
2-2	方法	43
2-2-1	核酸溶液の濃縮	43
2-2-2	フェノール, クロロホルム抽出、フェノール抽出 クロロホルム抽出	43
2-2-3	ショートカラムクロマトグラフィー	44

2-2-4	DNAの電気泳動	44
2-2-5	DNA断片のゲルからの回収	45
2-2-6	キャリアーDNA (大腸菌DNA) の作製	46
2-2-7	DNAの標識 (ランダムプライミングによる DNA断片の標)	46
2-2-8	プローブの作製	47
2-2-9	ブランクハイブリダイゼーション	47
2-2-10	サザン分析	48
2-2-11	サブクローニング	49
2-2-12	プラスミドDNAの調製	51
2-2-13	塩基配列の決定	52
2-2-14	大腸菌での発現	52
2-2-15	阻害活性の測定	53
3	結果	54
3-1	クローニングとシーケンス	54
3-2	阻害活性	54
4	考察	55
第4節	トウモロコシシスタチンの遺伝子解析	59
1	緒言	59
2	材料および方法	60
2-1	材料	60
2-2	方法	60
3	結果	61
3-1	スクリーニング	61
3-2	制限酵素地図の作製	61
3-3	塩基配列と推定アミノ酸配列	61

3-4	トウモロコシシスタチンの遺伝子イネシスタチンの 遺伝子との比較	61
3-5	トウモロコシシスタチン cDNA (トウモロコシ シスタチン I および II) とシスタチンの遺伝子との比較	62
3-6	ゲノミックサザン分析	63
4	考察	64
第2章	トウモロコシ種子システインプロテイナーゼに関する 分子生物学的研究	72
第1節	トウモロコシシステインプロテイナーゼの cDNA クローニング	72
1	緒言	72
2	材料および方法	73
2-1	材料	73
2-2	方法	73
2-2-1	cDNAライブラリーの作製	73
3	結果	75
3-1	スクリーニング	75
3-2	制限酵素地図の作製	75
3-3	塩基配列と推定アミノ酸配列	75
3-4	アミノ酸配列の相同性	75
4	考察	77
第2節	CCP1 および CCP2 mRNA の発現様式	89
1	緒言	89
2	材料および方法	90

2-1	材料	90
2-2	方法	90
2-2-1	ノーザン分析用試料の作製	90
2-2-2	ノーザン分析	90
3	結果	92
3-1	発芽期におけるCCP1およびCCP2 mRNAの 発現様式	92
3-2	登熟期におけるCCP1およびCCP2 mRNAの 発現様式	92
4	考察	93
第3節 CCP1 mRNA発現の乾燥ストレスによる影響		99
1	緒言	99
2	材料および方法	100
2-1	材料	100
2-2	方法	100
2-2-1	トウモロコシ種子の乾燥	100
2-2-2	RNAの抽出	100
2-2-3	ノーザン分析	100
3	結果	101
3-1	トウモロコシ種子の乾燥	101
3-2	CCP1 mRNA発現の乾燥ストレスによる影響	101
4	考察	102
第4節 CCP1 およびCCP2 mRNA発現の植物ホルモン による影響		105
1	緒言	105

2	材料および方法	106
2-1	材料	106
2-2	方法	106
2-2-1	ノーザン分析用試料の作製	106
2-2-2	ノーザン分析	107
3	結果	109
3-1	発芽期におけるCCP1およびCCP2 mRNA発現 のGA ₃ およびABAによる影響	109
3-2	矮性種 (d5) 発芽期におけるCCP1および CCP2 mRNA発現	109
3-3	ジベレリン合成阻害剤 (BX-112) による影響	110
3-4	d5の生育状況およびBX-112添加時における正常種の 発芽状況	110
4	考察	112
第5節	トウモロコシ種子中に存在する数種類の システインプロテイナーゼ	122
1	緒言	122
2	材料および方法	123
2-1	材料	123
2-2	方法	123
2-2-1	スクリーニング	123
2-2-2	ノーザン分析	123
3	結果	124
3-1	スクリーニング	124
3-2	制限酵素地図の作製	124
3-3	塩基配列と推定アミノ酸配列	124

3-4	発芽期における mRNA 発現様式と植物ホルモン (GA ₃ およびABA)による影響	124
3-5	CCP84 についての検討	125
4	考察	127
	総括	134
	文献	141
	論文内容要旨	148
	謝辞	153

序論

トウモロコシは、コムギ、イネとともに、3大穀物のひとつであり、世界の生産量は5億2千万トンで、小麦の5億6千万トン、米の5億3千万トンに次いで第3位である（1992年の生産量）。

トウモロコシの起源の年代は古く、考古学的資料によれば、メキシコでは前500年ごろには野生種が分布し、その栽培型は前300年ごろまでにすでに成立しており、農耕が成立した前200年ごろには、現在のような立派な穂型が存在するまで進化していた。又、ペルー、ボリビアでは前1400年頃に栽培型が成立していた。これらは同一の野生祖先種より由来したものと推定されている。メキシコの栽培型は、はやくから北アメリカまでの広い地域にわたって栽培された。考古学的資料によると、前2300年にアメリカニューメキシコ州まで栽培され、この伝播起点から一方はユタ州に、もう一方はコロラド州から中央の大平原を経てミズリー、オハイオ州に広がり19世紀にはコーンベルトとよばれる大生産地となった。ヨーロッパへの伝播は、新大陸発見時にキューバからスペインに持ち帰ったのが最初である。その後フランス、イタリア、トルコさらに北アフリカにまで伝播し、アフリカ各地には16-17世紀の間に普及した。アジアには16世紀の初め、ポルトガル人によって導入され、インド、チベット経由、あるいはトルコ、イラン経由で中国に入った。日本へは、1579年（天正7）にポルトガル人が長崎に持ち込んだのが最初であるが、明治初年に米国から北海道に入り、北海道で盛んに栽培され現在に至っている。現在ではアメリカが種類、生産量とも世界第一であり、栽培分布は北緯60°から南緯40°まで、また平地から標高3500mの高地までと広い。日本に於けるトウモロコシ生産量は1千トン（1991）で北海道の生産が主である。トウモロコシの用途は飼料用としてもっとも多く、食糧、工業製品にも使用されている。

トウモロコシ (*Zea mays* L.) はイネやムギと同じくイネ科植物である。イ

ネ科、キビ亜科、トウモロコシ類、トウモロコシ属に属する1年生の草本であり、イネ科植物としては珍しい他花受精の雌雄同種という植物形態学的にも特徴を有する植物である。風媒花であることも特徴のひとつであり、容易に交雑種を生ずる。受精後数十日で成熟し、子実として収穫できる。成熟したトウモロコシ粒は、四つの主要部分、すなわち果皮（殻または皮）5%、胚芽（胚）12%、胚乳82%および尖帽1%より成っている。果皮は死んだ細長い壁の厚い細胞の外層から成っており、この層の下に海綿状の層があり種皮または外種皮として知られる薄いコルク質の膜が続き、アリューロン層として知られる一つの細胞の厚さの組織がある。形態学的には胚芽の一部である。胚芽は胚盤と胚軸の二つの主要部分からなり、胚軸は発芽時に幼芽となる。胚では発芽時に胚乳部に貯えられた栄養物を分解する為の酵素を誘導する種々のホルモンが生成され、胚乳部、アリューロン層へ移行していると考えられている（Varner 1964; Fincher 1989）。胚乳は粉質部と角質部よりなり、この量比は品種によって大きく異なる。粉質胚乳部は大きな細胞、大きな丸い澱粉粒および乾燥時に破裂して空所をつくる薄い蛋白質マトリックスといった特徴をもつ。この為に粉質部は白く見える。角質胚乳中の蛋白質マトリックスは粉質胚乳部のものに比べて厚く乾燥時も破裂しない。角質部は粉質部よりもタンパク質含量が1.5-2%高くなっている。

以上トウモロコシの形態学的な面について述べてきたが、次に生化学的な面から述べてみたい。一般に穀類種子の胚乳部には澱粉およびタンパク質が豊富でありこれらの含量は種によってかなりの差が見られる。トウモロコシのタンパク質はアルブミン（水溶性）、グロブリン（塩類可溶性）、プロラミン（70-80%エタノール可溶性）、グルテリン（水酸化ナトリウム溶液可溶性）に分けられる。プロラミンは実質的にはツエインであり胚乳部のタンパク質にはツエイン45%、グルテリン40%程度が含まれており、この両者で大部分を占めている。ツエインについても数種類存在することがタンパク質化学的研究で報告

されており、遺伝子レベルでの知見も多数報告されている (Hu *et al.*, 1982; Marks *et al.*, 1982, 1985)。穀類の種子はこの胚乳部に貯蔵タンパク質を分解する為の分解系をもっている。その主役である穀物のプロテイナーゼについては、アミラーゼに比して研究がおくれていたが近年多くの知見が得られている。中でもエンド型プロテイナーゼについては、穀物類の主要タンパク質に関連して解析が行われてきた為、穀物種子中に多種、多様に存在し主要なタンパク質の合成や分解に深く関わっているシステインプロテイナーゼ (CP) が、中心となっている。

遺伝子レベルでの研究も進み、オオムギ種子中のアリュールインに続きイネ種子中に3種のCPの存在が確認され、オリザイン α 、 β 、 γ と命名された (Watanabe *et al.*, 1991)。他のプロテイナーゼについては、セリンプロテイナーゼの穀類についての報告は少ないが、メロンのククミシン (Kaneda *et al.*, 1975)、ホウレンソウのロイシルエンドペプチターゼなどが報告されている。又、プロテアソームが植物に存在することが明らかになり、その構造と機能の関係が注目されている (Ozaki *et al.*, 1992)。アスパラギン酸プロテイナーゼについての報告は比較的多く、ソバ、オオムギ、コムギ、イネ等の穀物種子でその存在が知られており、オオムギおよびイネ種子中に存在するアスパラギン酸プロテイナーゼはその一次構造が明らかにされている (Ruenberg-Roos *et al.*, 1991; Asakura *et al.*, 1995)。メタロプロテイナーゼについては、ダイズ種子中にその存在が確認されその一次構造が明らかにされている (McGeehan *et al.*, 1992)。これらエンド型プロテイナーゼとは別にエキソ型プロテイナーゼもオオムギ、コムギ、イネ種子中 (Washio *et al.*, 1992) に見出され構造が解析されている。

トウモロコシ種子については、Abe *et al.* (1977) が発芽時のトウモロコシ種子中のCPについてタンパク質化学的なレベルでその存在を確認し、触媒機構を検討し、種子内には複数種のCPが存在しており、トウモロコシの主要タン

パク質である数種のツエインの分解に関与していることを報告している。

本研究を始めた当時は遺伝子のレベルでの解明は殆どなされていなかったが、最近になってCPの1種の部分構造が明らかにされた (Everal *et al.*, 1994)。しかしながら、今までのところまだこれらトウモロコシ種子のCPについての知見は乏しく、遺伝子の構造解析、その発現様式並びに発現機構における解明が待たれている。

一方、これらプロテイナーゼの作用を制御し、植物タンパク質代謝、特に発芽期の貯蔵蛋白質分解調節機構としてのプロテイナーゼインヒビターについては、セリンプロテイナーゼインヒビターとしてトリプシンインヒビターがダイズ、イネ種子等で研究されているが (Kunitz *et al.*, 1947)、システインプロテイナーゼインヒビターについては、Abe *et al.* (1985, 1987) がイネ種子中に初めてその存在を確認した。トウモロコシ種子については、同じくAbe *et al.* (1992) がその存在を確認している。

本研究はトウモロコシ種子のプロテイナーゼインヒビターのタンパク質の化学的性質、分解調節機構、種子中での局在性、遺伝子構造解析等の詳細な知見を得ると共に、このシステインプロテイナーゼインヒビターの標的酵素と成り得ると考えられるCPについて遺伝子の構造解析、その発現様式並びに発現機構における詳細な知見を得る為に遂行された。

1 システインプロテイナーゼインヒビター

動植物体に存在するプロテイナーゼには、セリンプロテイナーゼ (EC 3.4.21)、アスパラギン酸プロテイナーゼ (EC 3.4.23)、システインプロテイナーゼ (EC 3.4.22)、メタロプロテイナーゼ (EC 3.4.24) がありそれぞれ

に対応した特異的なインヒビターがある。

植物に存在するプロテイナーゼインヒビターのうちセリンプロテイナーゼインヒビターは害虫、微生物などの外敵のトリプシン、あるいは類似のセリンプロテイナーゼを外来性標的酵素として認識し、阻害し、植物自身を防御するために働くと考えられている。このセリンプロテイナーゼインヒビターの代表であるトリプシンインヒビターは穀実、とくにダイズのものがよく研究されている (Kunitz, 1947; Ozawa *et al.*, 1966)。イネにも存在することが知られている (Horiguchi *et al.*, 1971)。アスパラギン酸プロテイナーゼインヒビターについては、ジャガイモのそれは、構造が明らかにされている (Strukelj *et al.*, 1971; Ritonja *et al.*, 1990)。メタロプロテイナーゼインヒビターは、ソバ種子に存在することが報告されている (Elpidina *et al.*, 1991)。システインプロテイナーゼインヒビター (シスタチンと総称される) については、Abe *et al.* (1985, 1987) がイネ種子中に CP を阻害する活性があることを見出し、精製した活性本体がシスタチンであることを確認しその諸性質を明らかにし、オリザシスタチン I と命名した。オリザシスタチン I は、植物起源では初めて発見されたシスタチンである。

従来、シスタチンはファミリー1、2、3から成るシスタチンスーパーファミリーに統率されている (Korant *et al.*, 1985)。ファミリー1は、分子内にジスルフィド (S-S) 結合を持たないシスタチンから成り、ヒト好中球シスタチン A (Machleidt *et al.*, 1983)、ヒト肝臓シスタチン B (Ritonja *et al.*, 1985)、ラット肝臓シスタチン (Takio *et al.*, 1983) などがこれに属する。ファミリー2のシスタチンは2つの S-S 結合を分子内に持ち、ヒト脳下垂シスタチン C (Grubb *et al.*, 1982)、ウシ初乳シスタチン (Hirado *et al.*, 1985)、ニワトリ卵白シスタチン (Turk *et al.*, 1983) などがこれにあたる。ファミリー3は、キニノーゲンファミリーとも呼ばれ専ら血漿中のキニノーゲンのセグメントから成る (Ohkubo *et al.*, 1984)。また、生体中には CP であるカルバインを特

異的に阻害するインヒビターであるカルバスタチンが存在するが、これはシスタチンスーパーファミリーには属さない。

オリザシスタチン I に次いで、Kondo *et al.* (1989a, 1989b, 1991) は同じくイネ種子中に第二のシスタチンを見だし、オリザシスタチン I I と命名した。これらのオリザシスタチンの一次構造を見ると、オリザシスタチン I 及びオリザシスタチン I I ともにシステイン残基を欠いていることから、S-S結合を持たないという点ではファミリー-1に似ているが、相同性を見るとファミリー-2のシスタチンに最も近いという特徴もっている。これらのことから、上に述べた3つのファミリーとは別のファミリーとして植物シスタチン (phytocystatin) ファミリーに帰属されるべきものであるとされている (Abe *et al.*, 1991; Turk and Bode, 1991)。更に遺伝子についてみると、オリザシスタチン遺伝子のイントロンの位置は動物シスタチンの遺伝子のものとはまったく異なっている (Kondo *et al.*, 1990)。この事実も植物シスタチンが動物シスタチンと類型を異にすることを示唆している。より多くの実例を得るために当研究室では、イネ以外の穀実のシスタチンのクローニングを行っており、トウモロコシ種子 (Abe *et al.*, 1992)、コムギ種子 (未発表)、ダイズ種子 (未発表) からもシスタチンを見だししており、いずれも植物シスタチンに属すると考えられている。

この植物シスタチンは内在性の標的酵素の作用を制御し、植物タンパク質代謝、特に発芽期の貯蔵タンパク質の分解を調節していると考えられる。又一方で、植物シスタチンは昆虫、細菌、ウイルスなどの感染源が有するCPを外来性の標的酵素とすることから (Korant *et al.*, 1985; Bjorck *et al.*, 1989; Liang *et al.*, 1991; Kondo *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 未発表)、生体防御物質とも考えられる。これらのことから、農業、医薬、食品の開発に植物シスタチンの活用を期待することができる。現在当研究室では、イネのプロトプラストへシスタチン遺伝子を導入し、イネ植物体の再生、外来シスタチンを高度に発現するイ

ネ種子の選抜という、いわゆる植物分子育種の手法を試みている。

トウモロコシシスタチンについては、上に述べたようにAbeらが、トウモロコシ種子のcDNAライブラリーからオリザシスタチンをプローブにし、シスタチンをコードするクローンを得た。解析の結果、シグナルペプチド配列を有する新しいシスタチンであることを見いだした。しかしながら、このcDNAを用いた大腸菌でのタンパク質の発現、更に、このタンパク質の局在生等については明らかではない。そこで、このトウモロコシシスタチンについて詳細な知見を得る為本研究を遂行した。

2 システインプロテイナーゼ

プロテイナーゼは先に述べたように、その触媒部位の性質からセリンプロテイナーゼ、アスパラギン酸プロテイナーゼ、メタロプロテイナーゼ、システインプロテイナーゼの4種に分類される。

システインプロテイナーゼ (CP) は、特定システイン残基を触媒基 (詳しくはチオールエステル型アシル中間体形成部位) とするプロテイナーゼの総称である。CPはパバインファミリーとカルバインファミリーの2つのファミリーに大別される (Suzuki, 1987, 1991)。パバインファミリーの代表であるパバイン (EC 3.4.22.2) は、パバイヤ乳液中に多量に存在するプロテイナーゼでその存在が100年以上前に見出されて以来 (Wurtz *et al.*, 1879) 詳しく研究されてきた。このパバインの一次構造、X線解析像、反応速度論などの解析も既に多くなされている (Bode *et al.*, 1879)。プロテイナーゼの基質特異性を説明するうえで有用なサブサイト理論はパバインを1つのモデルとして構築された (Schechter and Bergar, 1967)。また、CPの触媒機能に関与するとされ

る catalytic triad の特定も パパイン の構造解析 によって なされた。この Cys-25、His-159、Asn-175 (Gravito *et al.*, 1977) は他の CP の catalytic triad を決定する際の基準となっている。

これまで一次構造の明らかになっている CP には動物由来ではヒトやラットなどのカテプシン B (Chan *et al.*, 1986)、H (Ishido *et al.*, 1991a)、L (Ishido *et al.*, 1987b)、S (wiederanders *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1992)、C (Ishido *et al.*, 1991)、微生物由来では粘菌の CP-1 (Willimas *et al.*, 1986) や CP-2 (Pears *et al.*, 1985) などが知られている。この他に昆虫(高橋ら、1992)、甲殻類 (Laycock *et al.*, 1991)、トリパノゾーム (Mottram *et al.*, 1989)、マラリヤ原虫 (Rosenthal *et al.*, 1992)、線虫 (Ray *et al.*, 1992)、酵母 (Kambouris *et al.*, 1992) などが知られており最近ではこの他に昆虫の (Takahashi *et al.*, 1993)、(Yamamoto *et al.*, 1994)、(Honma *et al.*, 1994)、(Matumoto *et al.*, 1995) が確認されている。

植物由来の CP としては上に述べたパパインの他に同じパパイヤ中にキモバイン (EC 3.4.22.6) (Jacquet *et al.*, 1989)、イチジクのフィシン (EC 3.4.22.3) (Brion *et al.*, 1985)、パイナップルのプロメライン (EC 3.4.22.33) (Ritonja *et al.*, 1989)、キウイフルーツのアクチニジン (EC 3.4.22.14) (Podivinsky *et al.*, 1989) 等の果実及び果樹に存在するものが知られている。穀物に存在する CP としてはオオムギ種子アリューロン層に存在するアリューレインの cDNA が単離同定されたのが最初である (Rorers *et al.*, 1985)。これは植物ホルモンであるジベレリン (GA) によって発現が誘導され、オオムギ発芽期での種子貯蔵タンパク質の分解に関わっていると考えられる。次いで Watanabe *et al.* (1991, 1992) はイネ種子の cDNA ライブラリーからアリューレインをプローブにクローニングを行い3種の CP の存在を確認し、一次構造を明らかにしてオリザイン α , β , γ と命名した。また、cDNA を用いたノーザン解析により種子の発芽過程での CP の発現状態及び植物ホル

モンに対する応答について検討し、これら三者がジベレリン誘導性酵素であることを明らかにしている。更に、オリザインの局在性について検討を行いアリュウレインと同様に種子のアリュウロン層に存在していることを、コメ組織の抗体染色によって証明している（未発表）。

トウモロコシ種子中には、CPが複数種存在している（Abe *et al.*, 1977; Winnsper *et al.*; 1984, Barros *et al.*, 1990）。これらについて酵素的な研究が行われたが遺伝子レベルでの報告は非常に少なく、植物生理を理解する上での基礎的な知見が求められていた。

オオムギ種子のアリュウレイン、イネ種子のオリザインは上に述べたようにいずれも植物ホルモンの一つであるジベレリンによって発現が誘導され、発芽期での種子貯蔵タンパク質分解が進むと推定される。ジベレリン以外にもアブシジン酸、オーキシン、サイトカイニン、エチレンといった植物ホルモンが存在しさまざまな生理現象に関与している。近年、植物ホルモンの作用機構が分子レベルで研究されるようになった。植物ホルモンの場合、現段階では各ホルモンにより誘導される遺伝子の単離、プロモーターの構造解析および構造比較、遺伝子に結合する核タンパク質（トランス因子）および結合配列（シス因子）の同定、ホルモン受容体の同定について研究が行われている。

トウモロコシ種子中には、Phinney *et al.* (1982a, 1982b, 1984) の示すGA合成系の存在することが本多の研究によって示唆された（本多 1990）。また、本多らは種子内のジベレリンの分布についても検討し、胚乳部にはGA1の前駆体とみられるGA20がより高濃度に存在するが、活性型と言われるGA1は胚により高濃度に存在することが示されている。GAは種子の発芽に際して α -アミラーゼの生成を促進し、澱粉分解に関与することは既によく知られている（四方、1985）。また、上にも述べたようにオオムギ種子中のアリュウレイン、イネ種子中のオリザイン α, β, γ の生成もGAにより促進されることが確認されている。しかしながら、トウモロコシ種子中のCPについては報告が

なく知見が待たれている。これらについて明確な知見を得る為にはGAの生合成系がブロックされている矮性種を用いた検討が必要であると同時にジベレリンの阻害剤を用いた検討も必要であると考えられる。

最近になって植物ホルモン以外にも光、温度、湿度などのさまざまな環境ストレスによって発現が誘導されるCPの存在が報告されている。シロイヌナズナに存在するCPには乾燥ストレスで誘導されるものがあり、これらは高塩濃度でも誘導されることがわかった (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*; 1992, Kozumi *et al.*, 1993)。Yamaguchi-Shinozakiらは、この環境ストレスで誘導されるCPの生理的な意味として (1) これらのCPは乾燥等により植物体内で変性したタンパク質を除去するにはたらく、これは細胞を正常に保つ為に必要である。(2) 乾燥等のストレスに植物が曝されると光合成能力が極端に低下するためこれらのプロテイナーゼが不要のタンパク質を分解し、タンパク質の合成の素材となるアミノ酸を供給するために働いているという2つの可能性を推定している。エンドウマメにも乾燥で誘導されるCPが存在し (Guervero *et al.*, 1990)、シロイヌナズナのCPと相同性が高いことが明らかとなっている。この他にもトマトに存在するCPが低温ストレスで誘導されることも明らかにされている (Schaffer *et al.*, 1988)。穀実のCPについてもこれらに関する知見が待たれている。

3 本研究の目的

以上述べてきたように、植物種子におけるタンパク質分解機構やその制御機構、ジベレリン等の植物ホルモンによる遺伝子発現誘導機構に関する研究は少なく、詳細な知見が待たれている。本研究はこれまで述べてきた知見をもとに

以下の問題を取り挙げてその解明を目的として遂行されたものである。

1 トウモロコシ種子中に存在を確認し、一次構造を明らかにしたシステインプロティナーゼインヒビター（シスタチン）を大腸菌に発現させ、CPに対する阻害活性の解析を行う。

2 トウモロコシシスタチンの種子中での局在性についての知見を得る。

3 トウモロコシ種子のシスタチン遺伝子のクローニングを行い、その一次構造を明らかにする。

4 トウモロコシ種子に存在するCPのcDNAクローニングを行い、その一次構造を明らかにする。

5 得られたCPについて登熟期及び発芽期に於けるmRNAの発現機構、植物ホルモンの影響についての知見を得る。

以上の結果を2章に分けて記述した。

第1章は、トウモロコシ種子のシスタチンに関する研究について記述した。

第1節では、トウモロコシシスタチンcDNAを用いて大腸菌に発現させたシスタチンのCPに対する阻害活性の解析を行い、阻害の特性を示した。

第2節では、トウモロコシシスタチンの種子中での局在性についての知見を得るために、抗体染色を行い局在部位を明らかにした。

第3節では、トウモロコシ種子中にはシスタチンが複数種存在すると考え、これらの存在を確認しその一次構造及び阻害活性について検討した。

第4節では、トウモロコシ種子の遺伝子ライブラリーよりトウモロコシシスタチンcDNAをプローブにクローニングを行い、シスタチンをコードする遺伝子を得、その一次構造を解析し当研究室で構造が明らかにされているイネ種子のシスタチン（オリザシスタチンI及びオリザシスタチンII）との比較検討をおこなった。

第2章では、トウモロコシ種子のCPに関する研究について記述した。

第1節では、トウモロコシ乾燥種子及び発芽1日目より7日目までの種子よりcDNAライブラリーを作成し、イネ種子のCP（オリザイン）をプローブにクローニングを行いCPをコードするクローンを得、その一次構造を解析しオリザイン、アリュールレイン等との比較検討を行った。

第2節では、上記トウモロコシ種子のCPのmRNAの発現様式を明らかにするため、発芽第1日目より7日目までの種子より得たRNAのノーザン解析を行った。

第3節では、トウモロコシCPのうち、Pea 15aやRD19と相同性の高いCP1についてmRNA発現に対する乾燥ストレスの影響を検討した。

第4節では、トウモロコシCPのmRNA発現に対する植物ホルモンの影響についての知見を得るために、1 μ Mのジベレリン（GA₃）及びアブシジン酸液で発芽させた種子についてもノーザン解析を試みた。更に詳細な知見を得る為にトウモロコシ矮性品種（d5）での発現、ジベレリン生合成阻害剤（BX-112）効果についても検討した。

第5節では、トウモロコシ種子中には数種のCPが存在するという酵素学的研究知見をふまえて、cDNAライブラリーより上記CPをプローブに低ストリンジェントな条件でクローニングを行い、得られたクローンについて検討した。

第1章 トウモロコシ種子シスタチンに関する分子生物学的研究

第1節 トウモロコシシスタチンの阻害活性

1 緒言

植物中のタンパク質分解酵素インヒビターに関する研究は、植物そのものにとっての生理学的な役割と、食品として有害なものとしての二つに大別されてきた。しかしながら、これらの研究はトリプシンインヒビターを中心になされておりシステインプロテイナーゼインヒビターであるシスタチンに関しては、Abe *et al.* (1987) およびKondo *et al.* (1990) がイネ種子に2種のシスタチンを見出しその諸性質を明らかにしオリザシスタチンI及びオリザシスタチンIIと命名したのが最初である。このシスタチンはトリプシンインヒビターと異なりヒトに無害であり、医薬、農薬、としての活用が期待できる。

この植物シスタチンは3つのグループに類別される動物由来のシスタチンとは構造が異なっており、阿部らは4番目のグループとしてフィトシスタチンを提唱した(Abe *et al.*, 1991)。このフィトシスタチンについて、より多くの知見を得る為にイネ以外の種子についての検討が必要であり、著者等はトウモロコシ種子、コムギ種子、ダイズ種子についても検討を試みている。最近当研究室では、トウモロコシ種子のcDNAクローニングを行いシスタチンをコードするクローンを単離し、その塩基配列と推定アミノ酸配列を決定し、コーンシスタチンI(CC-I)とした(Abe *et al.*, 1992)。しかしながら、その一次構造ならびにmRNAの発現様式については明らかにされたもののタンパク質化学的、酵素化学的には研究がなされていない。そこでここでは、以上の点に

関して検討することを目的に C C - I を大腸菌 (*Escherich coli*) 中に発現させ、種々の C P に対する阻害活性についての検討を試みた。

2-1-1 材料

2-1-1-1 大腸菌 (E. coli)

この実験に用いた大腸菌は、大腸菌標準株として、大腸菌標準株に由来する O157 血清型、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157)、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157) である。この大腸菌は、大腸菌標準株として、大腸菌標準株に由来する O157 血清型、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157)、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157) である。

2-1-1-2 プラスミド DNA

この実験に用いたプラスミド DNA は、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157) から抽出されたプラスミド DNA である。このプラスミド DNA は、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157) から抽出されたプラスミド DNA である。

2-1-1-3 プラスミド DNA

この実験に用いたプラスミド DNA は、E. coli O157:H7 (ATCC 35297) (O157) から抽出されたプラスミド DNA である。

2 材料および方法

2-1 材料

2-1-1 大腸菌での発現

CC-I発現プラスミドとして発現量を増すために多量発現に適したpCC7Hを用い、CC-Iのシグナル配列部分を欠いた105アミノ酸（Glu31、Ala135）をコードするフラグメントを挿入した。宿主には*E.coli* YA21を使用した。この結果発現したタンパク質はシグナル配列を欠いた120アミノ酸残基から成る（このうち15残基はlacZ由来）。CC-Iと比較するためにKondo *et al.* (1990) によって発現、精製されたオリザシスタチンI及びIIを使用した。

2-1-2 クロマトグラフィー

Sephadex G-50、G-75、G-100、PBE 94、Polybuffer 74、Concanavalin A-Sepharose（Pharmacia社）、DEAE-cellulose(DE-52）（Whatman社）、Phospho-cellulose（生化学工業）、CM-Toyopearl（東商）を使用した。HPLCにはShimazu LC-9A systemを用いた。イオン交換HPLCにはSimapack PA-DEAE（島津工業）及び逆層HPLCにはSenshu Pack VP-318-1251（センシユウ化学）を用いた。

2-1-3 タンパク質分解酵素

パパイン、カテプシンBはSigma社製品を使用した。カテプシンH及びLはウ

サギ肝臓より Okitani *et al.* (1988) の方法によって調製した。

2-2 方法

2-2-1 大腸菌中で発現させたCC-Iのゲルろ過カラムクロマトグラフィ

発現プラスミドpCC7H組のみ込んだ50mlの χ -broth培養液中(50 μ g/mlアンピシリンを含む)で37°Cで、18時間インキュベートし、細胞をM9培養液(50 μ g/mlアンピシリンを含む)30ml中に37°Cで1.5時間処理した後、1mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)で1.5時間インキュベートした。遠心して集めた細胞は10mM Tris/HCl緩衝液10mlに懸濁し、超音波処理をして粗抽出物を得た。85°Cで20分間熱処理をした粗抽出物の可溶性画分10mlを0.1M NaClを含む25mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡にしたSephadex G-50カラム(4.5X70cm)にかけ、同じ酸緩衝液で溶出させ、15mlづつのフラクションに分取した。これらのフラクションのパパインに対する阻害活性を測定した。

2-2-2 CC-1の精製

ゲルろ過により得た活性画分を集め、10mM Tris/HCl(pH8.0)に対して透析を行い、同じく10mM Tris/HCl(pH8.0)で平衡化したShim-pack PA-DEAEカラム(0.8X10cm)を用いてHPLCにかけ、0-0.8MNaClのgradientで流速1ml/minで溶出した。これにより得られた活性画分は0.1% trifluoroacetic acid処理したODSカラム(Senshu Pack VP-318-1251, 0.46X25cm)を用いイオン

交換HPLCを行い、0.1% trifluoroacetic/acid 0-75% acetonitrileのlinear gradientを用いて溶出した。

2-2-3 阻害活性の測定

トウモロコシシスタチン (CC-I) の精製過程に於いて、パパインに対する阻害活性をBarrett *et al.* (1981) の方法に従い測定した。

阻害活性用緩衝液 (2.5mM EDTA及び25mM 2-メルカプトエタノールを含む0.2Mのリン酸緩衝液) にCC-I溶液とパパイン溶液を適量入れ、37°Cで5分間保温し、基質である2nmolのN-benzoyl-L-arginine-2-naphthamide (BANA) 溶液を0.2ml添加し37°Cで10分間保温した。反応を2% HCl/ethanolと0.06% p-dimethylaminocinnamaldehyde/ethanolをそれぞれ1ml加えることで止め10分間放置の後、540nmの吸光度にて測定した。

反応速度解析のための、活性測定には、パパイン及びカテプシンLに対してはN-carbobenzyloxy-L-phenylalanyl-L-arginine-7-(4-methyl)coumarylamide(Z-Phe-Arg-MCA)をカテプシンHに対してはL-arginine-7-(4-methyl)coumarylamide(Arg-MCA)を基質として用いDixon plots (Dixon *et al.*, 1979) より解析した。タンパク質濃度はWhitaker *et al.* (1980) の方法により測定した。阻害されたプロテイナーゼの活性測定はCC-Iとプロテイナーゼを37°Cで5分間反応させた後、パパイン及びカテプシンBについてはBANAを、カテプシンHについてはL-arginine-2-naphthylamine (ANA) 基質として測定した。

2-2-4 SDS-PAGE

Laemmli (1970) の方法により、0.1% SDSを含む15% gelを用いて電気泳動を行った。

2-2-5 抗体作成とウエスタンブロット分析

抗体作成の為に精製したCC-I 150 μ g(2ml) を等量のプロインズコンプリートアジュバンドと混合しウサギに注射し、更に2週間隔で2回にわたり100 μ g を注射し、抗血清を得てウエスタンブロット分析を行った。

3 結果

3-1 大腸菌中で発現させたCC-Iの精製

発現プラスミドpCC7Hを用いて大腸菌で発現させたCC-Iの粗精製物をSephadex G-50カラムにかけ、得られたフラクションのパパイン阻害活性を測定しFig.1に示す結果を得た。活性を示す画分をF-1とした。この活性画分(F-1)をHPLC(Shim-pack PA-DEAEカラム)にかけ、各フラクションのパパインに対する阻害活性を測定しFig.2(A)に示すように活性画分のピーク(P-1)を得た。これを更に精製するために逆層HPLCを行いFig.2(B)に示す画分を得た。

3-2 SDS-PAGE

3-1により精製したCC-IのSDS-PAGEをFig.3に示したものである。lane 1は精製したCC-I、Lane 2はサイズマーカーを示している。この結果よりCC-Iは13kDaにバンドを持ち完全に精製されたことが明らかとなった。従って以下の実験はこの画分を用いて行った。

3-3 ウエスタンブロット

CC-Iの抗血清を用いてウエスタンブロット分析を行った結果、Fig.4に示すような結果を得た。Fig.4(A)はSDS-PAGEの結果を、(B)はウエスタンブロット分析の結果を示したものである。使用したサンプルは大腸菌中で発現させた粗タンパク質(A:lane 1, 88.4 μ g; B:lane 1, 0.13 μ g)、トウモロコシ種子の粗抽出物をSephadex-G50カラムで分画して得た低分子量タンパク質

(A:lane 2, 11.2 μ g; A:lane 3, 5.6 μ g; B:lane 2, 5.6 μ gおよびB:lane 3, 1.9 μ g)である。この結果、13kDa付近に抗体と反応するバンドが見られた。

3-4 阻害活性の測定

次にパバインに対する阻害様式を調べたところ、Fig.5に示すように非拮抗的に阻害することが判明した。Fig.6はCC-Iパバイン阻害活性を量論的に調べるためパバイン20 μ gに対して異なった量のCC-Iを加え阻害の効果を調べた。その結果、Fig.6に示すように12 μ g CC-Iで20 μ gのパバインを完全に阻害することがわかった。

更に、パバイン以外のCPであるカテプシンB、HおよびLにたいする阻害活性を測定し、 K_i 値を求めた (Table 1)。すなわち、CC-Iはパバイン、カテプシンHおよびLに対しては強い活性を持ち、カテプシンBに対しては弱いことが示された。すなわち、パバインに対してはオリザシスタチンIと同様 K_i 値は 10^{-8} M程度であり、オリザシスタチンI Iよりは低い値を示した。カテプシンBに対しては、オリザシスタチンI Iより1桁低い値を示した。更に、カテプシンHに対しては K_i 値が 5.7×10^{-9} MとオリザシスタチンIおよびI Iと比べてかなり低い値を示した。

4 考察

発現プラスミドpCC7Hを用いて大腸菌中で発現させ、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製したトウモロコシシスタチン (CC-I) の阻害活性について検討したところ、CC-I はババイン、カテブシンH及びカテブシンLに対しては強力に阻害効果を示した。カテブシンBに対しては比較的弱い阻害であったが、オリザシスタチン (OC-I、OC-II) と比較すると、ババインに対しては K_i 値が 10^{-8} M程度でOC-Iと同程度であり、OC-IIより低い値を示した。カテブシンBに対してOC-IIより低い値を示した。カテブシンHに対しては K_i 値が $5.7 \cdot 10^{-9}$ MとOC-I、OC-IIのいずれよりも低い値を示した。これらの値はCC-IがOC-I及びOC-IIよりも優れた、幅広いシステインプロテイナーゼインヒビターであることを示唆していると考えられる。オリザシスタチンは抗害虫剤である (Kondo *et al.*, 1992)。この抗害虫効果は、昆虫の消化作用に必須であるCPの阻害に基づいていると考えられる。

CC-IのSDS-PAGE及びウエスタンブロット分析の結果からCC-Iタンパク質 (シグナルペプチドを離した成熟タンパク質) は約13kDaであることがわかった。しかしながら、Fig.4に示すようにトウモロコシ種子から精製したCP阻害作用を持つタンパク質は、分子量が約9.2kDaであり、これがCC-Iか、あるいは精製の過程で分解されたCC-I断片であるかということについては、現時点でははっきりしない。この点については今後検討が必要であろうと思われる。

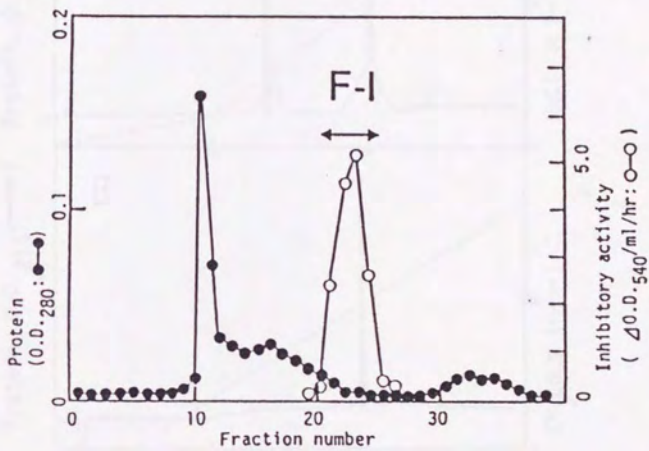
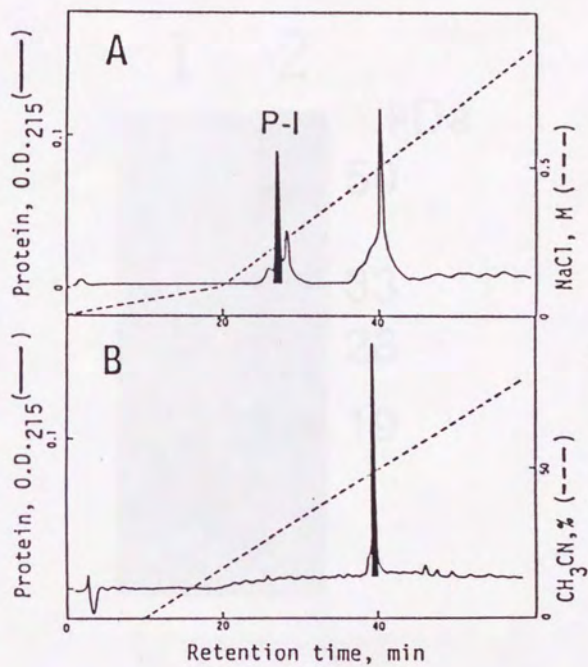
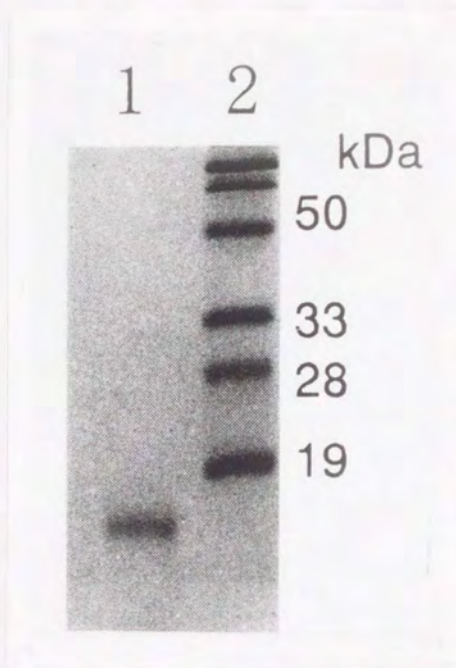


Fig. 1 Gel filtration of the crude extract of corn cystatin I expressed in *E. coli*.



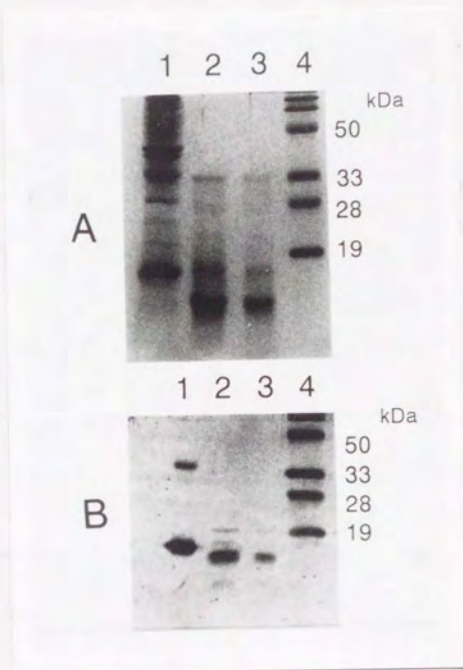
A: Ion-exchange HPLC
 B: Reversed-phase HPLC

Fig. 2 Purification of corn cystatin I by two types of HPLC



1: Purified CC-I
2: Size markers

Fig. 3 SDS-PAGE of purified corn cystatin I



A: SDS-PAGE
 B: Western blotting analysis
 1: Crude protein expressed in *E.coli*
 2, 3: Crude extract from corn kernels
 4: Size makers

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of corn cystatin I

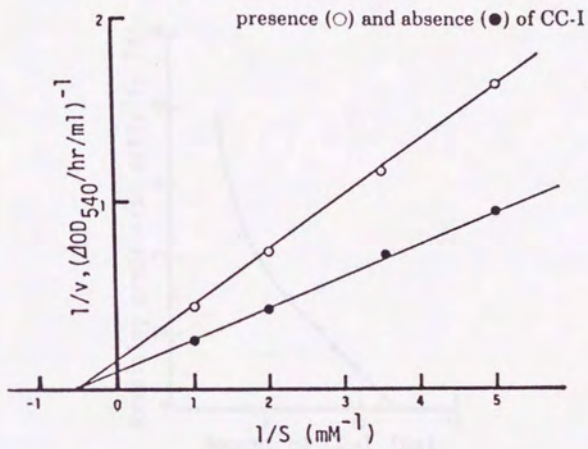


Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for the inhibition of papain by corn cystatin I

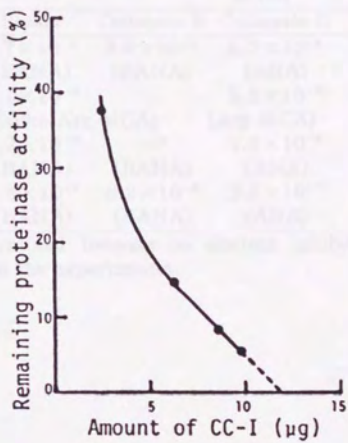


Fig. 6 Inhibition of the activity of papain by corn cystatin I

Table 1 Inhibition of cysteine proteinases by corn cystatin I (CC-I) and by oryzacystatins I and II (OC-I and OC-II)

Cystatin	K_i (M)			
	Papain	Cathepsin B	Cathepsin H	Cathepsin L
CC-I	3.7×10^{-8} (BANA)	2.9×10^{-7} (BANA)	5.7×10^{-9} (ANA)	1.7×10^{-8} (Z-Phe-Arg-MCA)
	1.1×10^{-8} (Z-Phe-Arg-MCA)		9.8×10^{-9} (Arg-MCA)	
OC-I	3.2×10^{-8} (BANA)	— ^a (BANA)	7.8×10^{-8} (ANA)	5.1×10^{-9} (Z-Phe-Arg-MCA)
OC-II	2.6×10^{-7} (BANA)	8.2×10^{-8} (BANA)	2.5×10^{-7} (ANA)	3.9×10^{-8} (Z-Phe-Arg-MCA)

^aNot determined because no distinct inhibitory activities were observed in the experiments.

第2節 トウモロコシシスタチンの局在性

1 緒言

シスタチンの局在性については、Kondo *et al.* (1989) がオリザシスタチン I についてポリクローナル抗体を作成し、種子活断面の抗体染色により胚乳部全体が染色されることを示している。しかしながら、この方法は組織の破損が大きく、染色状態もかなり不明瞭であることなどから限界があると考えられた。そこで著者らは C C - I 種子中に於ける局在性についても、検討した。

2 材料および方法

2-1 材料

トウモロコシ種子は、デント種の一つである甲州種の開花5週目のものと乾燥完熟種子を用いた。

2-2 方法

2-2-1 種子の固定

Hsuらの方法 (Hsu *et al*, 1981) を用いた。一晩水に浸漬したトウモロコシ種子をカッターで細切し、5%のホルムアルデヒドを含む100mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) に4°Cで1時間浸漬し、固定した。その後100mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) で3回洗浄した。固定後のサンプルをOTC compoundに包埋し、凍結して-80°Cで保存した。

2-2-2 切片の作製

切片の作製はクライオスタットHM 500 (マイクローム社) を用い7-10 μ mの厚さとした。

2-3-3 抗体染色

反応は5%ネオブレンでコートしたスライドガラス上で行った。まず、サンプルをPBSで5分間洗う。これを3回繰り返した後、0.3%過酸化水素/メタノ

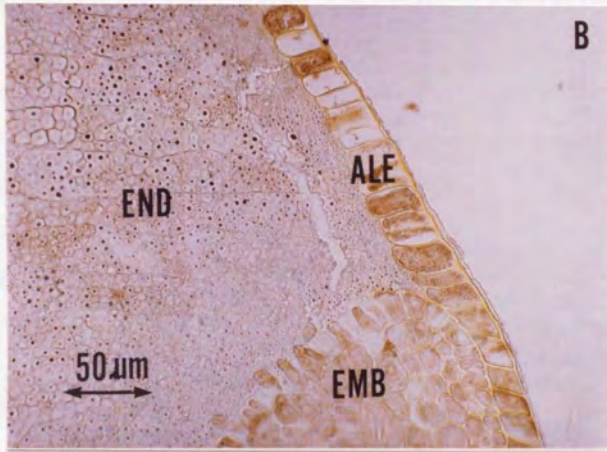
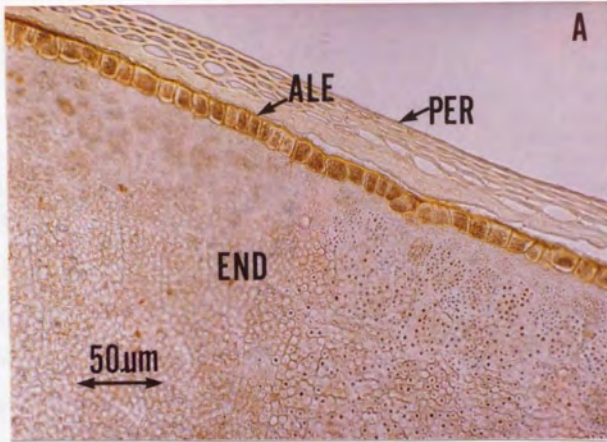
ールに30分間浸漬して内在のペルオキシダーゼを除去した。その後PBSで洗い5%ヤギ正常血清/PBSに30分間浸漬しPBSで1/1000-1/10000に希釈した抗-CC-I血清に一晚浸漬し、PBSで洗浄後二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、PBSで洗浄しABC液 (Vectastain) を加えて室温で30分間反応させた。これに0.05%DAB/PBSと0.01%の過酸化水素水溶液を添加して5-10分間反応させた後水洗し保存した。

3 結果

抗トウモロコシシスタチン I (CC-I) 抗体を用いてトウモロコシ種子中の CC-I の局在性を調べたところ Fig.7 に示すような結果が得られた。PER は種皮を、ALE はアリュロン層を、EMB は胚を、END は胚乳を表している。A 図は開花5週目の種子、B 図は完熟乾燥種子を用いたものである。両者共にアリュロン層がはっきりと染色されていた。また完熟乾燥種子の胚も同様に染色されていた (B 図)。また胚乳の部分はいずれのサンプルにおいてもわずかではあるが染色されていた (A 図および B 図)。

4 考察

抗体染色法を用いてトウモロコシ種子中のCC-Iの局在性を調べたところ、Fig.14に示すように胚及びアリュuron層の部分に局在していることが確認された。アリュuron層は、形態学的には胚の一部であることから胚と共にアリュuron層に局在することは納得できることである。アリュuron層には発芽時に生成、あるいは活性化されるプロテイナーゼやアミラーゼ等の加水分解酵素が局在することが知られている (Jacobsen *et al.*, 1987; Cejudo *et al.*, 1992) またWatanabe *et al.* (未発表) はイネ種子のCPであるオリザイン α および β がアリュuron層に局在していることを示している。これについては序論にも述べた様に、植物シスタチンの生理学的意味(役割)が内在性の標的酵素(CP)の作用を制御し植物タンパク質代謝、特に発芽期の貯蔵タンパク質の分解を調節することであると共に昆虫、細菌、ウイルスなどの感染源の持っているCPを外来性の標的酵素とすることであるということに、大きく関わっていると考えられる。



A : Corn seeds taken 5 weeks after flowering

B : Mature corn seeds

ALE : aleurone EMB : embryo END : endosperm PER : pericarp

Fig. 7 Immunostaining microscopy of corn seed sections

第3節 トウモロコシ種子中に存在する複数種のシスタチン

1 緒言

前述の様に植物種子中には動物由来のシスタチンと異なるタイプのシスタチンが存在することが、オリザシスタチンに関する研究より明らかにされている。またイネの他にコムギ、ダイズ及びトウモロコシ種子中にもシスタチンを確認している。しかしながら、植物シスタチンに関する報告は非常に少ない。一方、同一植物中に存在するシスタチンは、1種ではなく複数種共存し、各々異なる生理作用を示すと思われる。事実、イネにはOC-IおよびOC-IIが存在し各々ターゲットとするシステインプロテイナーゼ(CP)に対応しているようである。またコムギにも少なくとも3種以上のシスタチンが存在することがわかっている。そこで本節では、トウモロコシ種子中にも複数種のシスタチンが存在することが予想されることから、CC-I cDNAをプローブにしシスタチンクローンのスクリーニングを行った。その結果多数のシスタチンの存在を確認し、その一次構造及び阻害活性についてCC-Iと比較検討することを試みた。

2 材料および方法

2-1 材料

Abe *et al.* (1992) が作製していたトウモロコシ種子の cDNA ライブラリーを使用した (Abe *et al.*, 1992)。

2-1-2 試薬類

(1) 各種酵素

大腸菌 DNA ポリメラーゼ I とその Klenow fragment、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ C75 (BAP)、エキソヌクレアーゼ III、マングビーンヌクレアーゼ、T4 DNA ポリメラーゼ、T4 DNA リガーゼ、Taq DNA ポリメラーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、及び各種制限酵素は宝酒造株式会社 (京都)、ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A)、ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I)、卵白リゾチームは Sigma 社 (St. Louis, U.S.A.)、より購入した。

(2) ヌクレオチド

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 は Sigma 社、ATP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP は Boehringer-Mannheim 山之内株式会社より購入した。

(3) アイソトープ

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP 水溶液 (370 MBq/ml)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 水溶液 (370 MBq/ml) は、Amersham 社より購入した。

(4) 各種キット等

TimeSaver™ first strand cDNA Synthesis Kit は Pharmacia 社、Multiprime DNA labelling system、Rapid hybridization buffer は Amersham 社、GeneAmp PCR reagent kit は Perkin-Elmer Cetus 社、Sequenase Version 2.0 Sequencing kit

はUnited States Biochemical社、Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing KitはApplied Biosystems社(U.S.A.)より購入した。

(5) クロマトグラフィー担体、メンブレインフィルター

セファデックスG-50はPharmacia社、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。

2-1-3 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ー用試薬を用いて、2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。

(1) 基本試薬

(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、少量の8-キノリノールを加えて着色し、褐色瓶中で冷暗所に保存した。

(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) 0.5MEDTA (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。

(vi) TE (pH7.5~8.0) : 10mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5~8.0)

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。

	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
DTT	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	<i>Apa</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Sac</i> I
10×M	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Xba</i> I
10×H	<i>Bst</i> P I, <i>Cla</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Eco</i> R I
10×K	<i>Bam</i> H I, <i>Hind</i> III
5×Sal I	<i>Sal</i> I

(3) 電気泳動用試薬

(i) 50×TAE: 2M トリス酢酸緩衝液 (pH7.5)

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: 108 g トリス

55 g ホウ酸

9.3 g EDTA · 2 Na

880 ml 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) ゲル溶出液: 500 mM 酢酸アンモニウム

10 mM 酢酸マグネシウム

1 mM 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。

(4) 核酸トランスファー用試薬

(i) アルカリ変性液：0.5 M 水酸化ナトリウム

1.5 M 塩化ナトリウム

(ii) 中和液：0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)

1.5 M 塩化ナトリウム

(iii) 20×SSC：3 M 塩化ナトリウム

0.3 M クエン酸三ナトリウム

使用時は必要に応じて適当に希釈した。

(5) ハイブリダイゼーション用試薬

(i) 10×MOPS緩衝液：0.4 M MOPS (モルフォリノプロパンスルホン酸)

0.1 M 酢酸ナトリウム

10 mM EDTA

水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.0に合わせた。

(ii) 20×Denhardt's溶液：4% BSA

4% ポリビニルピロリドン

4% フィコール

(6) 培地、培養液

(i) γ -ブコース：2.5% トリプトン

1% 酵母抽出物

0.1% グルコース

20 mM 硫酸マグネシウム

50 mM 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

10 mM 塩化ナトリウム

2.5 mM 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てからさらに1 M塩化マグネシウム / 1 M 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2 M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ross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°Cまで冷ました後、1/1000量の50 mg/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。

(v) NZCYM: 1% NZアミン

0.5% 塩化ナトリウム

0.5% 酵母抽出物

0.1% カザミノ酸

0.7% 硫酸マグネシウム・7水和物

最終的に水酸化ナトリウム溶液でpHを7.5に合わせた。

(vi) 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 (大または小) に適量を流し込んで固まらせた。

(vii) ソフトアガロース

NZCYMに0.7%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、約50°Cまで冷ましその温度で使用時まで保温した。

(7) ファージDNA精製用試薬

20% PEG/SM: 20% ポリエチレングリコール (#6000)

2 M 塩化ナトリウム

以上の濃度になるようにSMに溶解した。

(8) 形質転換用試薬

(i) アンピシリン水溶液: 50 mg/ml アンピシリン(滅菌処理を施さない)

(ii) 10×lig.buf.: 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)

100 mM 塩化マグネシウム

10 mM DTT

5 mM ATP

1 mg/ml BSA

(iii) TFB: 10 mM MES (2-(N-モホリノ)エタンスルホン酸) カリウム緩衝液
(pH6.3)

100 mM 塩化ルビジウム

45 mM 塩化マンガン

10 mM 塩化カルシウム

3 mM 塩化ヘキサアンミンコバルト (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) DTT: 2.25 M DTT

40 mM 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。

(9) プラスミドDNA精製用試薬

(i) リゾチーム溶解液: 50 mM グルコース

10 mM EDTA

25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)

(ii) アルカリ SDS 溶液 : 0.2 M 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)

2.5 M 塩化ナトリウム

(10) DNA、RNA 抽出用試薬

TE/SDS : 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)

5 mM EDTA

1% SDS

2-2 方法

2-2-1 核酸溶液の濃縮 (エタノール沈澱、イソプロパノール沈澱)

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2~3倍量のエタノールを加えてエタノール沈澱を行った。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澱を行った。核酸の沈澱は-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、沈澱を75%エタノールで洗い、減圧下乾固させた。最後にこの沈澱を適量の水またはTE (pH8.0) に溶解した。

2-2-2 フェノール・クロロホルム抽出、フェノール抽出、クロロホルム抽出

この操作は、核酸を含む溶液の除蛋白質に用いた。

核酸を含む溶液に等量のフェノール・クロロホルム溶液、フェノール溶液、またはクロロホルムを加え、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す。

した。

2-2-3 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ガラスウールを詰め、これにセファデックスG-50を充填して $V_t = 2.4\text{ml}$ のカラムをつくり、TE (pH8.0) で2~3回洗い、試料を載せ、TE (pH8.0) で溶出し、6滴 (約 $140\mu\text{l}$) ずつ分画した。

2-2-4 DNAの電気泳動

(1) アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは0.5mg/mlのエチジウムブロマイドを含む $1\times\text{TAE}$ 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。

(2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(i) 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、 $1\times\text{TBE}$ 中、180~200V定電圧 (約 10V/cm) で泳動した。検出は0.5mg/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。

(ii) 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、 $50\mu\text{l}$ 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

ておいたシークエンズ用ガラス板に流し込みゲル化させた。泳動はパーキンエルマー・ジャパンアプライドバイオシステムズのDNAシークエンサー373Aを用いて行った。泳動後、シークエ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
10×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	19.8ml	9.0ml
10%過硫酸アンモニウム溶液	0.2ml	0.25ml
TEMED	50 μ l	50 μ l

2-2-5 DNA断片のゲルからの回収

(1) 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。

(2) 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:354nm）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 μ lの水またはTE (8.0)に溶解した。

2-2-6 キャリアーDNA（大腸菌DNA）の作成

2.5l のc-培地に大腸菌MM294を接種し、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 μ l、Proteinase Kを1 μ l 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、水層をインプロパノール沈殿後、10mlのTEに溶解した。これに0.2mgのRNaseA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 (8.0)に溶解した。

2-2-7 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 μ gに水を加えて28 μ 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 μ l、5 \times バッファー10 μ l（いずれもAmersham社DNAラベリングキット）、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 5 μ l (1.85MBq)を加え、Klenow fragment 2 μ 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。反応後1 μ lの0.5 MEDTA (pH 8.0)を加え反応を停止させ、0.2% SDS / TEを50 μ l、10 μ gのキャリアーDNA（大腸菌DNA）を加えてセフ

アデックスG-50ショートカラムクロマトグラフィーを通して標識されたDNAを未反応基質と分けて回収した。

2-2-8 プローブの作成

トウモロコシシスタチンcDNAを2-2-7の方法で標識して使用した。

2-2-9 ブラークハイブリダイゼーション

(1) ブラークリフティング

ブラーク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中和させた。もう一度中和液上に5分間乗せた後、最後に2XSSC上に5分間のせた。フィルターはペーパータオルの上で水分を除き、80°Cで完全に乾燥させた後紫外線をブラークが付着した面に0分間照射してDNAを固定した。

(2) 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(3XSSC/0.1%SDS)中で洗ったフィルターとともにポリバッグにシールしスクリーニング時と同じ温度で30分以上保温した。プレハイブリダイゼーション後、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。

(3) 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(1)のプレハイブリダイゼーションと同様で、反応時間を1時間以上とした。

(4) 洗浄

フィルターはまず2 \times SSC/0.1%SDS中、室温で2回洗浄した後、スクリーニング時のファージDNAのサザン解析は55 $^{\circ}$ C、2 \times SSC/0.1%SDSの条件で、ゲノミックサザン分析では65 $^{\circ}$ C、0.1 \times SSC/0.1%SDSの条件で、それぞれ1~2回洗浄した。

(5) オートラジオグラフィー

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

2-2-10 サザン分析

(1) 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分間ゆっくり振とうして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×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×SSCに浸しておいたナイロンフィルター、その上に2×SSCに浸したWhatman 3MMろ紙、乾いたろ紙、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×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拭き取り、80℃で30分以上焼き付け、さらにフィルターのDNAを転写した面にトランスイルミネーターで紫外線を照射して、DNAをフィルター上に固定した。

(2) プレハイブリダイゼーション

2-2-9-(2)と同様におこなった。

(3) ハイブリダイゼーション

2-2-9-(3)と同様におこなった。

(4) 洗浄

2-2-9-(4)と同様におこなった。

(5) オートラジオグラフィー

2-2-9-(5)と同様におこなった。

2-2-11 サブクロニング

(1) 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°C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。

(2) 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。

(3) 連結反応

インサートDNA約30ngを、pUC18ベクター約10ngと10 \times lig.buf.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°Cで6時間以上連結反応を行った。

(4) 形質転換

(i) 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°Cで振とう培養した。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°C、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を加えて水中で5分間放置した。これをコンピテント細胞とした。

(ii) 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、(3)で調製したプラスミドDNAを全量加え、水中に30分間放置した後、42°Cの湯浴中で80秒間の熱ショックを与えて水中に戻した。これに0.8mlのSOCを加え、37°Cで1時間振とう培養した後、遠心(4°C、2000g、5分)により集菌し、アンピシリンプレートに塗り付けた。プレートは37°Cで一晩保温してコロニーを生じさせた。

2-2-12 プラスミドDNAの調製

(1) 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 -ブ羅斯1ml中に植え、37°Cで4時間振とう培養した。15000rpmで10秒間遠心して集菌し、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°C、15000rpmで5分間遠心して蛋白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°C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。

(2) 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℃で一晩振とう培養した後、4℃、2000gで10分間遠心し、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、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℃、1500rpm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下で乾固した後、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 μ gのRNaseAを加えて37℃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 μ 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℃、1500rpmで15分間遠心してDNAを回収し、75%エタノールで沈澱をよく洗ってから、減圧下で乾固し、最終的に80 μ lの水に溶解した。

2-2-13 塩基配列の決定

Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー・ジャパンバイオシステム社) を用いた方法

大スケールで調製したプラスミドDNA1 μ gをプロトコールに従い、反応させた。泳動用色素はTaq DyeDeoxy法 (パーキンエルマー・ジャパンバイオシステム社)用電気泳動色素を用いた。

2-2-14 大腸菌での発現

発現プラスミドとしてpCC37を、宿主には*E. coli* YA21を用いて発現させた

タンパク質は第1節と同様に、SephadexG-50、Shim-pack PA-DEAE イオン交換-HPLC 及びCapcell Pak C8-逆層HPLCで精製した。

2-2-15 阻害活性の測定

CC-Iと同様の方法でババイン、カテプシン(B、HおよびL)に対する阻害活性を測定した。

3 結果

3-1 クローニングとシーケンス

上記ライブラリーよりCC-I cDNAをプローブにしてスクリーニングを行い、数種のクローンを得た。 λ gt10プライマーを用いてPCRを行い、pUC18にサブクローンし、得られた9個のクローンのシーケンスを調べたところFig.8に示す様に4つのグループに分けることができた。isoform 1と2および3と4は、各々類似していた。これらのうちisoform 1と2はCC-Iに類似しており、このことからCC-Iタイプと新しいトウモロコシシスタチンタイプであるCC-III各々2つに大別することができた。CC-IとCC-IIIの塩基配列及びそれらの推定アミノ酸配列を比べたところFig.9に示す結果を得た。CC-IIIはCC-Iと17アミノ酸だけ異なっており、CC-Iの21番目のアミノ酸であるアラニンが欠損していた。またシグナル配列に続く21番目のアミノ酸から41番目のアミノ酸までの間のアミノ酸の相同性は低く52%であったが、中央部とC末端部分の相同性は非常に高かった。

3-2 阻害活性

種々のプロテイナーゼすなわち、パバイン、カテプシン(B、HおよびL)に対する阻害活性を調べた(Table 2)ところ、両シスタチンは、パバイン、カテプシンHおよびLに対しては強い阻害物質であるが、カテプシンBに対しては弱い阻害物質であった。カテプシンLに対するCC-I及びCC-IIIの阻害活性を比較するとCC-IIIの K_i は2桁低いことが判明した。

4 考察

大腸菌中に発現させたCC-I Iのタンパク質を精製し種々のCPに対する阻害活性を測定しCC-Iと比較したところ、ババイン、カテプシンH及びLに対しては高い阻害活性を示し、カテプシンBに対しては比較的低い阻害活性を示した。CPの種類に対する阻害活性の傾向は類似しているが、カテプシンLについてみると、CC-I Iの K_i 値 ($1.1 \times 10^{-10} \text{M}$)はCC-Iの K_i 値 ($1.7 \times 10^{-8} \text{M}$)よりもかなり小さいと言える。これは成熟タンパク質のN末端領域のアミノ酸配列が異なっていることに帰因するのかもしれない。よってCC-I Iの方がCC-Iと比べてより強いインヒビターであると考えられる。CC-I及びCC-I Iは、シグナルペプチド領域を欠いた溶解タンパク質として発現させてはいるが、イネ種子中に存在するオリザシスタチンと溶解タンパク質として発現させたタンパク質との K_i 値間には、はっきりとした差が見られないことから問題はないと考えられる。しかしながら、これらの事柄を明確にする為に今後の課題としてトウモロコシ種子からシスタチンを分離、精製しアミノ酸配列を明らかにすると共に阻害活性を測定することが必要である。


```

[isoform1] MRKHRIVSLVAALLVLLALAAVSSTRSTQKESVADNAGMLAGGIKDV PANENDLQL
[isoform2] .....A.....A.....
[isoform3] .....I.....N·NA·ED·M···T·V···Q···E···H·
[isoform4]      ··A·I······N·NA·ED·M···T·V···Q···E···H·

[isoform1] QELARFAVNEHNQKANALLGFEKLVKAKTQVVAGTMYYLTIEVKDGEVKKLYEAKV
[isoform2] .....K.....D.....
[isoform3] .....D···K.....
[isoform4] .....D···K.....

[isoform1] WEKPWENFKQLQEFKPVVEEGASA*: λ ZC7, λ ZC8, λ ZC10, λ ZC21, ZC105
[isoform2]                               : λ ZC5
[isoform3] .....K··E..... : λ ZC15
[isoform4] .....K··E.....P·· : λ ZC11, λ ZC37

```

Fig. 8 Amino acid sequences of the isolated clones encoding cystatins

```

1
CC-I: AATTTCCGTCCCAATTCACCCAATCCAGATGGCAACATCGAATCGTCTCGGTAGTGG
CC-II: .....A..C...
CC-I:
CC-II: M R K H R I V S L Y A
50
CC-I: CTGCCCTACTCGTCTGCTTGGCCCTTGGCCGGTTTCTCCACGGCAGCACACAAAAGG
CC-II: .....G..A..C.....A..G...AC...A..G...GG...
CC-I: A L L V L L A L A A V S S T R S T Q K E
CC-II: . . . I . . . . . N . N A . E D
100
CC-I: AGTCCGTGGCTGACAACGCCGGGATGTTGGCAGGCGGCATCAAGGACGTGCCGCCAAGC
CC-II: T...A...C...A...C...TG...C...
CC-I: S V A D N A G M L A G G I K D V P A N E
CC-II: . M . . . T . T . V . . . Q . . . E . .
150
200
CC-I: AGAACGACCTCCAGCTCCAGGAGCTCGCCGCTTCCGCTCAATGAGCACACAAAAGG
CC-II: .....T..C.....C.....G.....A..G...
CC-I: N D L Q L Q E L A R F A V N E H N Q K A
CC-II: . . . H . . . . . D . . . K . .
250
CC-I: CCAATGCTCTTCTGGGGTTCGAGAAGCTTGGAAAGCCAAGACACAAGTGGTGGTGGCA
CC-II: .....
CC-I: N A L L G F E K L V K A K T Q V V A G T
CC-II: . . . . . . . . . . . . . . . . . .
300
CC-I: CGATGTACTATCTCACTATTGAAGTGAAGGATGGCGAAGTCAAGAAGCTCTATGAAGCTA
CC-II: .....C.....
CC-I: M Y Y L T I E V K D G E V K K L Y E A K
CC-II: . . . . . . . . . . . . . . . . . .
350
CC-I: AGGTCTGGGAGAAGCCATGGGAGAAGTCAAGGAGCTGCAGGAATTCAGCCCTGTTGAAG
CC-II: .....G.....G.....
CC-I: V W E K P W E N F K Q L Q E F K P V E E
CC-II: . . . . . K . . E . . . . . . . . . .
400
CC-I: AGGGTGTAGCCCTAAGGATCTGTGCG-TCTCCCTGTGCAATTTCTGCTGAAGC---
CC-II: .....C..CT...A...G.....TCAA
CC-I: G A S A *
CC-II: . . . . .
450
500
CC-I: -GCAAACCTAAGTTACAGAATAAGGAGCTGCTCGGAACATGCCAGAGCATGCCACCTCG
CC-II: A.....G.....CA..C..CC.....T..C...T...T..
600
CC-I: CGTAATTCATAAAATCACA
CC-II: T.....G..CT...

```

Fig. 9 Comparison of corn cystatin I and II (CC-I and CC-II) for nucleotide and deduced amino acid sequences

Table 2 Inhibition of cysteine proteinases by corn cystatin I and II (CC-I and CC-II)

Cystatin	<u><i>K_i</i> (M)</u>			
	Papain	Cathepsin B	Cathepsin H	Cathepsin L
CC-I	3.7×10^{-8}	2.9×10^{-7}	5.7×10^{-9}	1.7×10^{-8}
CC-II	6.6×10^{-8}	1.3×10^{-7}	1.1×10^{-9}	1.1×10^{-10}

第4節 トウモロコシシスタチンの遺伝子解析

1 諸言

今まで述べてきたように、トウモロコシ種子中には多種のシスタチンが存在し、それらの一次構造の相同性から2つのタイプに分けられることを示した。それぞれのシスタチン I およびシスタチン I I (Abe *et al.*, 1992, 1995) はいずれもシグナル配列を有し、オリザシスタチンとは異なっていた。また、mRNA の発現様式にも特徴が見られた。開花後1週目まではわずかに発現しているが2週目に急激に強く発現し完熟時まで続いている。これはオリザシスタチン I が2週目に特異的に発現し1週目及び完熟時には全く発現しないこと、およびオリザシスタチン I I が1週目に急激に発現しその後完熟時まで弱いながら発現し続けるのとも異なっていた。そこで、トウモロコシシスタチンの特性、機能を解明する目的で遺伝子の解析を試みた。

2 材料および方法

2-1 材料

CLONTECH Laboratories 社製（第二葉生成期の前植物体より作製したゲノムライブラリー）を使用した。

ゲノミックサザン分析用の種子は「甲州」、爆裂種の一つ、「ゴードンクロスバンタム」を用いた。

2-2 方法

2-2-1 クローニングとシーケンス

第3節と同様に行った。

2-2-2 ゲノミックサザン分析

上記各々の種子より常法によりDNAを抽出しCC-IおよびCC-IIをプローブにしサザン分析を行った（ハイブリダイゼーション60°C、洗浄0.1XSSC/0.1%SDS）。

3 結果

3-1 スクリーニング

トウモロコシ種子のゲノムライブラリーよりトウモロコシシスタチン cDNA をプローブにしてスクリーニングを行い、約250万プラークから得られた陽性クローンをpUC18にサブクローニングし、1種のシスタチン遺伝子を得た。

3-2 制限酵素地図の作成

得られたシスタチン遺伝子 gCC-42 を各種の制限酵素で処理し、その断片の長さから制限酵素地図を作成した (Fig.10)。これを基に矢印で示した向きと範囲の塩基配列を調べた。

3-3 塩基配列と推定アミノ酸配列

シスタチン遺伝子 gCC-42 の全塩基配列とその推定アミノ酸配列を Fig.11 に示した。全長約2.2kbp で、開始メチオニンから70番目のアミノ酸Ala と71番目のアミノ酸Asn の間に882bp の第1イントロン、および134番目のアミノ酸Ala の後の終止コドンの直後に162bp の第2イントロンが挿入されており、3つのエキソンが2つのイントロンにより分断されていた。5' 上流域は、開始コドンATG から262bp 上流にTATA box385bp 上流にCAAT boxが存在していた。3' 側は転写終結信号であるTTTT、TCC T およびポリA シグナルであるAATAGA が存在していた。

3-4 トウモロコシシスタチン遺伝子とイネ種子シスタチン遺伝子との比

トウモロコシシスタチン遺伝子 g C C - 4 2 の構造を模式的に示した (Fig. 12)。黒く塗りつぶしたところはコード領域、影の部分はイントロンを示している。これをイネ種子の遺伝子であるオリザシスタチン I およびオリザシスタチン I I 遺伝子と比較した (Fig. 13)。トウモロコシシスタチンは、オリザシスタチン I および I I と異なりシグナル配列を持っている為 N 末端からすべてのシスタチンに共通な N 末端近傍のグリシン (G) まだが 41 残基と長くなっていた。第 1 イントロンはオリザシスタチン I および I I と同じくアラニン (A) とアスパラギン (N) との間に挿入されており、オリザシスタチン I の 336bp、オリザシスタチン I I の 408bp の 2 倍以上の 822bp であった。これらに続くエクソンのサイズは 3 種とも同じであった。第 2 イントロンはいずれも終止コドンの直後に存在し、サイズはオリザシスタチン I I とほぼ同様に短く 162bp であった。このように、トウモロコシシスタチン遺伝子はイントロンの数、分断のされ方がオリザシスタチンに非常によく似ていた。5' 上流域についてもオリザシスタチンと比較するために、トウモロコシシスタチンとオリザシスタチン I および I I について Harr plot を行った (Fig. 14)。すなわち、横軸にトウモロコシシスタチン T A T A box、C A T box 近辺、縦軸にオリザシスタチン I 及び I I の T A T A box、C A T box 近辺をとったところ 5' 上流域についてはコード領域とは異なり、相同性が低いことがわかった。

3-5 トウモロコシシスタチン c DNA (トウモロコシシスタチン I 及び I I) とシスタチン遺伝子との比較

トウモロコシシスタチン I および I I と g C C - 4 2 のアミノ酸を比較したところ、C C - I とは 13 アミノ酸、C C - I I とは 3 アミノ酸だけ異なってお

りこの遺伝子から推定されるシスタチンはCC-IとCC-IIの両方によく類似しているものの、IIのタイプにより近いことが判明した (Fig.15)。

3-6 ゲノミックサザン分析

1はCC-I cDNAをプローブに、2はCC-II cDNAをプローブにしてゲノミックサザン分析を行った結果Fig.16に示すように数本のバンドが見られた。トウモロコシ種子としては、2-1に示した3種類の種子を用いた。Fig.7に示すように各々のプローブを用いて高いストリンジェントな条件でハイブリダイゼーション (60° C) および洗浄 (0.1XSSC/0.1SDS 60° C) を行ってもバンドは数本見られCC-IおよびCC-IIに対する、あるいは非常によく似た遺伝子が複数個存在することが推定された。

4 考察

トウモロコシのゲノムライブラリーより、トウモロコシシスタチン cDNA をプローブにスクリーニングを行い、得られた陽性クローンを解析してオリザシスタチン I 及び II と比較したところイントロンの数、挿入のされ方、分断のされ方が非常によく似ていた。これは、従来の3つのファミリーから成っているシスタチンスーパーファミリーのどれとも異なっており、当研究室の阿部等が提唱しているファミリー4に属すると言える。すなわち、植物シスタチンが動物シスタチンと類型を異にするという実例を一つ追加したことになる。しかしながら、5' 上流域について見るとその相同性の低さ、トウモロコシシスタチンがシグナル配列を有することなど構造的に異なっていることがわかった。又、cDNA 解析、ゲノミックサザン分析等の結果からトウモロコシ種子中には、類似したシスタチン遺伝子が複数個存在し、シスタチンマルチジーンファミリーを形成していることが推定された。

100bp

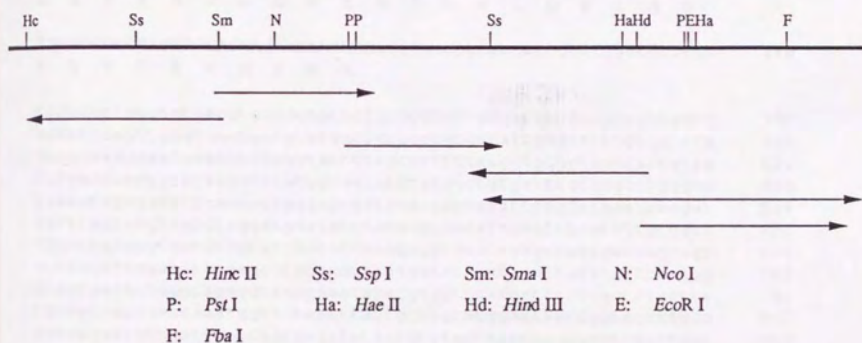


Fig. 10 Restriction map of gCC-42

CCAGGCGGTACAAAGTCAACGATCACATACATGGCGGTGGAAAATTCTGTACATACGTTT	-541
CCTTGGGTGCAACAGTTGCGCATTGATCGACGACTAGTACTCCTCCGTGATAGACGCGA	-481
GCAACCTATATGCACATGGAGCCATCCTTACACGCTAAATTGGAGCAACTTCACGTTATT	-421
TCTATAAAATAACATGCTAAATTAATAAATTTACCAA	-361
AATTTATTTCTCTCTCTAATAATTTATTATAGTACGTCCTTCGTTTTTTATTTGTTCCA	-301
AATCAACTAAAGAGCGACAATATTTTAAAACCTATAAA	-241
TATTTTTAACCGCCTAGCATATTTAACTGTTCTTTTCTCTATCTCTATCATTTTCT	-181
CACCTGAAAAGTTCGCAGCTTACCGAACGAAAATGCCTGTCTGTTCCCTTCCCAACC	-121
CGTCTCCGTCTCCGCCGCCACAACAATATCGCATTGACAGATCGTTCATCGTAGCCTCC	-61
TCCAGTCGTCTCCGGGATCTTCTCCGGCTATAAATTTCCGCCCAATTCCCAATCCAG	-1
ATGCGCAAACATCGAATCGTCTCGCTCGTGGCTGCCCTGCTCATACTGCTTGCCTCGCC	60
M R K H R I V S L V A A L L I L L A L A	
GTATCGTCCACCCGCAACGCACAGGAGGATTCCATGGCCGACAACACCGGGACGTTGGCG	120
V S S T R N A Q E D S M A D N T G T L A	
GGCGGCATCAAGGACGTGCCGGGAACGAGAACGACCTTACCTCCAGGAACCTGCCCGC	180
G G I K D V P G N E N D L H L Q E L A R	
TTCCCGTCGATGAGCACAACAAGAAGGCCGtaagccctcaacccctttggctgtttgc	240
F A V D E H N K K A	
tacccecttctctgtgacgtgcccgtgttctgctggcattgagatccgctctgcagttacct	300
ccctgcagttgggtcactgatgtgtggccccggccatggcatcgagcatttgcgataca	360
gacacaaacaaacgaaaaatttgctattttagccttttaacgtgggctaaataactatta	420
tgtgaccctctgtctatgatttatgggaccatctgtgtctatgatttggggcctgggtc	480
taaaatagagaagttcacaactgagagtgataaaatagcaaatccccacaaacaagat	540
ggctcagtatgtaatctaggctgaagatttctgcgccacattgaatttcatatgtcgct	600
tggattacaggtaatcacgtatcaccacccaagaggtcacctgagccattgaccagcagt	660
actaatattgaacttgaagcctagtgcagatcagatattaataaaattcgatgttttatgg	720
atagtactcggtagaggtaaagaaaatagaggtggttcaagatttaccactatcgтта	780
tgcaatcacaaaacaattggtactaatttattgtttgtatggaataattggtatcttgca	840
actcagaatgttgattgattagtcagatctactgtgtgctaaactcagaatgttgattgat	900
tagtcagatctattgttttatgataatgatactcggtagaggtaaagaaaatagagatcta	960
tgctaattgtttggtccacggcaaatacgaaatttggattgcaataaaccttctcgctt	1020
ggcgctgtgcagAATGCTCTTCTGGGGTTCGAGAAGCTTGTGAAGCCAAGACACAAGTG	1080
N A L L G F E K L V K A K T Q V	
GTGCTGGCAGCATGTACTATCTCACTATTGAAGTGAAGGATGGCGAAGTGAAGAAGCTC	1140
V A G T M Y Y L T I E V K D G E V K K L	
TACGAAGCTAAGGTCTGGGAGAAGCCATGGGAGAACTTCAAGGAGCTGCAGGAATCAAG	1200
Y E A K V W E K P W E N F K E L Q E F K	
CCTGTTGAAGAGGGTCTAGCGCCCTAAGGtagatttgtgcatgttttcatactatctggt	1260
P V E E G A S A *	
ccagttctgttctgttcattgctgaacgatgcatcttccagtccttttattaggttt	1320
ttagctgttcaacagtcggtgggagagttttatcttcatggtacattgatcaaaatcta	1380
ccaattgcagGATCTCTCCTTCTCCATGTGCGAGCCTGAAGCTCAAAGCAAAGTTGCAGA	1440
ATAAGGAGCCACCTCCCAACATGCTAGACCATGCTCCCTTGTGTAATTTCAATAGACTAC	1500
AACCTTTTAGGGCTTGTCCGGTGGTGTCTGTGCTTAAGGGAATTGAGGGTGATTAA	1560
TTTTCTTCTTTTACAAATAGAGGGGGTTTTAATCCACTCCAAA	1604

Fig. 11 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the DNA fragment encoding corn cystatin

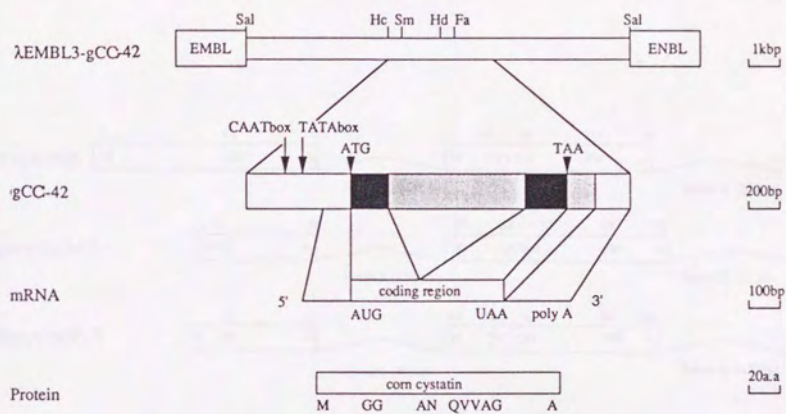


Fig. 12 Gene structure of corn cystatin

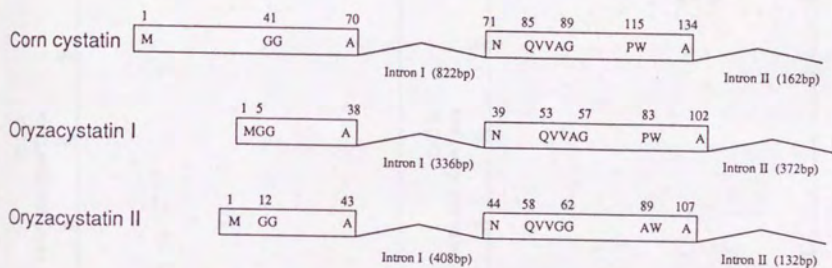


Fig. 13 Comparison of the gene structures of corn cystatin and oryzacystatins

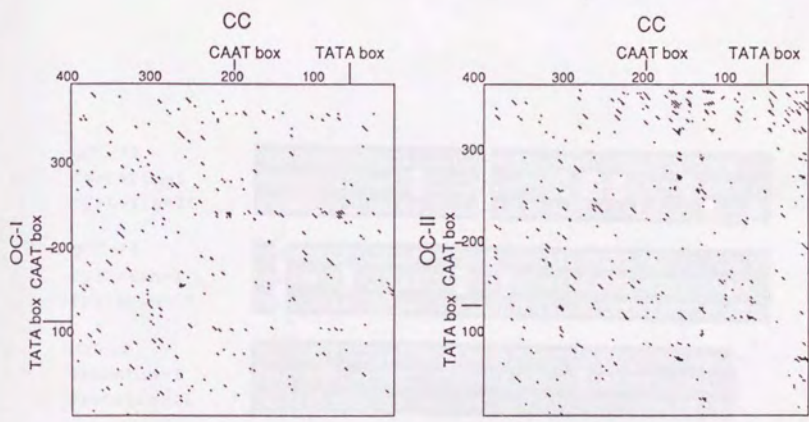
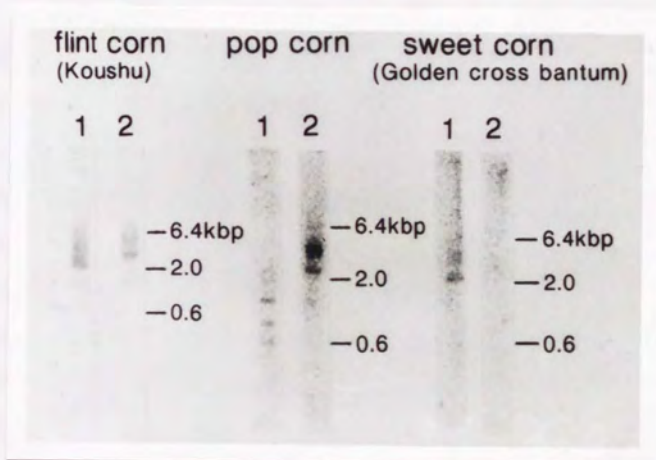


Fig. 14 Harr plot analysis of the 5'-upstream regions of corn cystatin (CC) and oryzacystatins I and II (OC-I and OC-II)

gCC-42	MRKHRIVSLVAALLLILLALA-VSSTRNAQEDSMADNTGTLAGGIKD
cystatin-I	MRKHRIVSLVAALLLILLALAAVSSTRSTQKESVADNTGTLAGGIKD
cystatin-II	MRKHRIVSLVAALLLILLALA-VSSTRNAQEDSMADNTGTLVGGIAD
gCC-42	VPENENDLHLQELARFAVDEHNKKANALLGFEKLVKAKTQVVAGTM
cystatin-I	VPANENDLQLQELARFAVNEHNKANALLGFEKLVKAKTQVVAGTM
cystatin-II	VPENENDLHLQELARFAVDEHNKKANALLGFEKLVKAKTQVVAGTM
gCC-42	YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKPWENFKELQEFKPVEEGASA*
cystatin-I	YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKPWENFRQLQEFKPVEEGASA*
cystatin-II	YYLTIEVKDGEVKKLYEAKVWEKPWENFKELQEFKPVEEGASA*

Fig. 15 Comparison of the amino acid sequences of corn cystatins



1: CC-I
2: CC-II

Fig. 16 Genomic Southern analyses of CC-I and CC-II

第2章 トウモロコシ種子システインプロテイナーゼに関する分子生物学的研究

第1節 トウモロコシシステインプロテイナーゼのcDNAクローニング

1 緒言

前章でトウモロコシ種子中にシスタチンが存在することを明らかにした。しかも複数種確認された。そこでトウモロコシ種子中にはこれらシスタチンの標的となるシステインプロテイナーゼ(CP)が存在することが考えられる。これらのCPは、貯蔵タンパク質の種子登熟過程でのプロセッシングや発芽過程でのプロテオリシス、その他に関与していると推定される。事実、Abe *et al.* (1977) は発芽時のトウモロコシ種子からCPを単離し、酵素レベルでの特性を検討した。本研究を始めた当時は、遺伝子レベルでの解明は殆どなされていなかったが、最近になってCPの1種の一次構造が部分的に明らかにされた(Everaldo *et al.*, 1994)。しかしながら現時点ではトウモロコシCPについての知見は少なく、その一次構造を明らかにすることを第一の目的としてcDNAクローニングを行った。

2 材料および方法

2-1 材料

トウモロコシ種子はデント種の一つ「甲州」を用いた。

2-2 方法

2-2-1 cDNAラブラリーの作製

(1) トウモロコシ種子の発芽

トウモロコシ種子を水に浸漬したパーミュキーライト上に播き、26°Cの暗所に置いて1、3、5、7日目後に約25粒ずつ採取し、芽および根を除去しファルコン2070に入れ使用時迄-80°Cで凍結保存した。

(2) RNAの抽出

-80°Cで凍結した上記トウモロコシ種子をドライアイスの小片と共にブレンダーで粉碎して、ファルコン2070に移し-80°C中に一晩置きドライアイスを除去した後15mlの5mM EDTA及び1%SDSを含む100mM Tris/HCl (pH8.5)、15mlのTris飽和フェノール、さらに600 μ lの1M DTTを添加して直ちに激しく攪拌した後12000g、10分間遠心して水層をとった。続いてフェノール抽出を3回行った後、-20°Cで一晩エタノール沈殿を行った。15000gで10分間遠心した後、沈殿を80%エタノールで洗浄し減圧乾固した。これを400mlのTE(10:1)に溶解し等量の5M塩化リチウムを加えて氷中に2時間放置した後12000gで15分間遠心しRNAを沈殿させた。沈殿を80%エタノールで洗浄し500 μ lのTEに溶解した。

(3) poly(A⁺)RNAの精製

上記RNAをoligo(dT)-セルロースカラムクロマトグラフィーによりpoly(A⁺)RNAの精製を行った(Aviv et al, 1972)。すなわち、前もってローディングバッファーで平衡化しておいたoligo(dT)-セルロースカラムに上記全RNAを65°Cで8分間変性し、等量の2Xローディングバッファーを加え、室温に冷却しカラムにチャージした。素通り画分をもう一度65°Cで変性後カラムにチャージし、溶出バッファーでRNAを溶出し、0.5mlづつ分画し260nmの吸光度を測定し、ピーク画分を集めエタノール沈殿の後乾固した沈殿物をH₂Oに溶解した。

(4) cDNAの合成

得られたpoly(A⁺)RNAを鋳型にして、Timesaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 社)を用いてFig.17に示すようにDouble-stranded cDNAを合成しT4DNA合成酵素を用いて平滑末端とした後EcoRI/NotIアダプターをライゲーションした。

(5) λgt10ベクターへの連結

λgt10ベクターへの連結は、パッケージングキットGiga Pack God II (Stratagene社)を、又ファージ力価の測定には大腸菌C600Hflを用いた。

3 結果

3-1 スクリーニング

得られたcDNAライブラリーより、オリザインをプローブにしてスクリーニングを行い約50万プラークから数10個の陽性プラークが検出された。これらを単一プラークとして分離し、ファージDNAを精製した。ファージDNAをEcoRIで消化した後pUC18にサブクローニングした。

3-2 制限酵素地図の作製

得られたプラスミドを制限酵素各種で処理し、その断片の長さから制限酵素地図を作製したところFig.18に示すようなCCP1とCCP2の二つのグループに大別された。このCCP1とCCP2について塩基配列を調べた。

3-3 塩基配列と推定アミノ酸配列

Fig.19およびFig.20にCCP1およびCCP2の塩基配列とそれらの推定アミノ酸配列を示した。CCP1は、1311bpからなり371アミノ酸をコードしていた。CCP2は、1382bpからなり360アミノ酸をコードしていた。これらはいずれもCPの活性中心となるC²⁵、H¹⁵⁹、N¹⁷⁵（パパイイン基準）を保存しており又、その付近の配列は特に相同性が高いことからCPをコードすると考えられる。矢印はプロセシングの位置を、二重下線は糖鎖結合可能部位を示している。

3-4 アミノ酸配列の相同性

CCP1とCCP2についてアミノ酸配列を比較してみるとFig.21に示すように、活性中心となるC付近、次いでN付近の配列は比較的相同性は高いがmature部分全体で比較すると42% (Table 3) と低いことがわかった。このトウモロコシCPについて既知のCPのうちアリュレーイン (Rogers *et al.*, 1985)、イネのCPであるオリザイン α 、 β および γ (Watanabe *et al.*, 1991)、乾燥によってその発現が誘導されるエンドウマメのPea 15a (Guerrero *et al.*, 1990) およびシロイヌナズナに存在するRD 19 (Yamabuchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Koizumi *et al.*, 1993) などとの比較を行った。CCP1はFig.22に示した様にPea 15およびRD19と相同性が高く、特にmature部分ではそれぞれ72%、79%であった (Table3)。又、アミノ酸配列HECDSS (194-200番目) 及びFAPIRL (315-320番目) (Fig.19の下線で示した部分) のようなオリザインやアリュレーインには存在しない配列も確認された。CCP2はFig.23に示すようにオリザイン γ 及びアリュレーインとの相同性が非常に高く、特にmature部分はそれぞれ87%、89%であった (Table3)。CCP2にはオリザイン γ (Watanabe *et al.*, 1992)のNPIRSV、アリュレーイン (Holwerda *et al.*, 1992)のNPIRPV、ジャガイモの22kdタンパク質 (Suh *et al.*, 1990; Ymagishi *et al.*, 1991)のNPIVLP、同じくジャガイモカテプシンDインヒビター (Strukelj *et al.*, 1990; Ritonja *et al.*, 1990)のNLIDL、さつまいものスポラミンAのNPIRLP (Matuoka *et al.*, 1991)に見られるような液胞へのソーティングシグナルと類似する配列NPIRPVが存在した (Fig.20)。

CCP1及びCCP2のhydropathy profile (Fig.24)に示すように、両者共シグナルペプチドを有していることが確認できた。シグナルペプチドが切断される部位はAla、SerあるいはGlyのあとが多いとされている。(Watson *et al.*, 1984) CCP1、CCP2における切断部位の可能性は、CCP1はAla20の後、CCP2ではAla19の後か、Ala26の後に考えられる。

4 考察

発芽期のトウモロコシ種子より作製したcDNAライブラリーよりオリザインをプローブにクローニングを行い、一次構造の異なる2種のシステインプロテイナーゼであるCCP1およびCCP2を得た。この2種のCPのうちCCP1は穀実には見出されていないが、近年、乾燥や高塩類溶液あるいは光といった環境ストレスに曝されることにより、その発現が誘導されるシステインプロテイナーゼということで注目されているCPのうち、乾燥により誘導されるエンドウマメ葉茎のPea 15aおよびシロイヌナズナ葉茎のRD 19との相同性が高く、発芽期における貯蔵タンパク質の分解に関与するだけではなく、別の生理作用にも関与している可能性が考えられる。CCP2はオリザイン γ およびアリュウレインとの相同性が高く、オリザイン γ やアリュウレイン、さつまいものスボラミンA等に見いだされた液胞へのソーティングシグナルも存在し穀実一般に存在するCPであろう。ソーティングシグナルは見られないものの、CCP1にもCCP2やオリザインと同様にN末端側にシグナル配列を有していたことからいずれも細胞外に分泌されるか、液胞のようなオルガネラ中にソーティングされることが示唆された。オリザインのC末端に見られるような延長ペプチドの存在についてはCPタンパク質についての検討がなされていない現時点での言及は出来ない。このように一次構造の相違から、この2種のCPは異なったタイプのCPで異なった生理作用に関与していることが推定された。

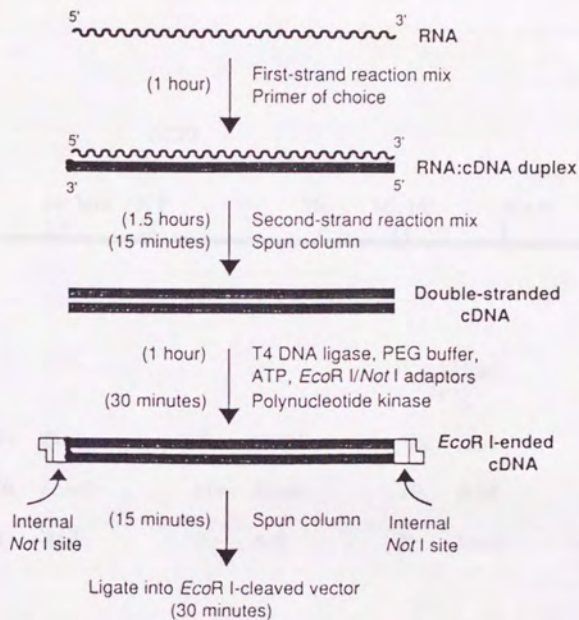
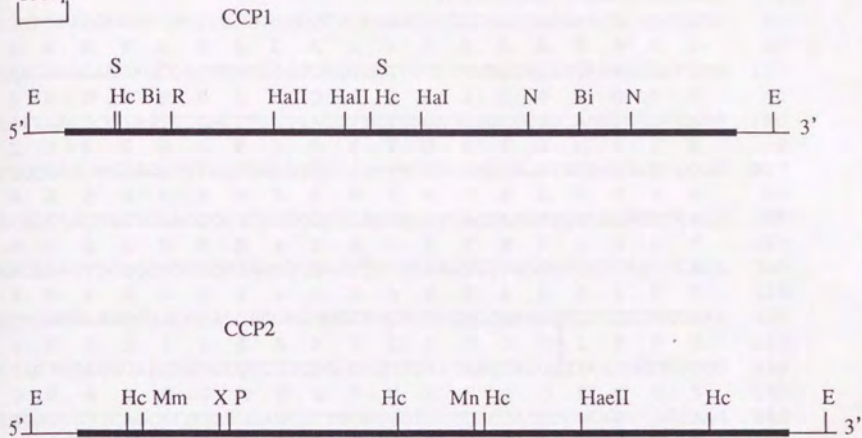


Fig. 17 Procedure for cDNA synthesis

100bp



Bi: <i>BlnI</i>	E: <i>EcoRI</i>	Hal: <i>HaeI</i>	Hall: <i>HaeII</i>
Hc: <i>HincII</i>	Mm: <i>MmeI</i>	N: <i>NcoI</i>	P: <i>PvuII</i>
R: <i>RsaI</i>	S: <i>SalI</i>	X: <i>XhoII</i>	

Fig. 18 Restriction maps of CCP1 and CCP2

TCAGACAAGCAAGGAATCCCCCG -1

ATGGCTCATCGCGTTCTCCTCCTCTCTCTCGCGTCGGCCGCCGGTTGCCGCCGC 60
M A H R V L L L L S L A S A A A V A A A 20
CTCGACGCGGAGGACCCGCTGATCCGGCAGGTGGTCCCGGTGGAGATGACAACGATCTG 120
V D A E E D P L I R Q V V P G G D D N D L 40
GAGCTGAACCGGAGTCCCACTTCTGAGCTTCGTGCAGCGGTTCCGGCAAGTCCCTACAG 180
E L N A E S H F L S F V Q R F G K S Y K 60
GACGCCGACGAGCAGCGTACCGCTGTCGTTTCAAGGACAACCTGCGCCGCCGCGC 240
D A D E H A Y R L S V F K D N L R R A R 80
CGCACCAAGCTGCTGGACCCGTCGGCGGAGCACGGCGTCACTAAGTTCCTCCGACTCAG 300
R H Q L L D P S A E H G V T K F S D L T 100
CCGGCAGAGTTCGCCGGACTACCTCGGCCCTCCGCAAGTCCCGCGCGCTCTCCTCAGA 360
P A E F R R R T Y L G L R K S R R A L L R 120
GAAGTCCGGGAGTCCGGCCAGGAGGCCCGTGTCTCCCAACCGATGGTCTCCCGACGAT 420
E L G E S A H E A P V L P T D G L P D D 140
TTCGACTGGAGGGACCAGGTGCCGTCCGCCCGTCAAGAACCAGGGTTCGTGCCGGTGC 480
F D W R D H G A V G P V K N Q G S C G S 160
TGCTGGTGGTTCAGCGCGTCTGGAGCGCTGGAGGGTGCACACTACCTCGCAACTGGCAAG 540
W S F S A S G A L E G A H Y L A T G K 180
CTGGAGGTGCTTTCGGAGCAGCAGTTCGTCGACTGTGACCACGAGTGTGATTCATCGGAG 600
L E V L S E Q Q F V D C D H E C D S S E 200
CCTGATTCATGTGATTCGGGTTGCAATGGTGGGCTAATGACGACGGCATTGAGTTATCTC 660
P D S C D S G C N G G L M T T A F S Y L 220
CAGAAGGCCGGTGGCCTTGAGAGTGAGAAGGATTACCCCTACACTGGGAGTGGCAAA 720
Q K A G G L E S E K D Y P Y T G S D G K 240
TGCAAGTTGACAAGTCCAAGATTGTTGCTTCAGTTCAGAACTTCAGTGTGTGTCTGTG 780
C K F D K S K I V A S V Q N F S V V S V 260
GACGAGGCTCAAATTTCTGCTAACCTCATCAACATGGCCATTGGCAATCGGCATCAAT 840
D E A Q I S A N L I K H G P L A I G I N 280
GGTGCCTACATGCAGACATACATCGGAGCGTGTGATGCCATACATCTGTGGCAGGCAC 900
A A Y M Q T Y I G G V S C P Y I C G R H 300
CTTGACCATGGTGTCTCCTTGTGGATATGGTGCTTCTGGTTTCGCCCCCATTCGCCTG 960
L D H G V L L V G Y G A S G F A P I R L 320
AAGGACAAGCCTTACTGGATCATCAAGAACTCGTGGGGCAGAACTGGGGGGAGAACGGA 1020
K D K P Y W I I K N S W G E N W G E N G 340
TACTACAAGATATGCAGGGGTTCCAACGTTTCGCAACAAGTGGCGGCTCGATTCCATGGTC 1080
Y Y K I C R K S N V R N K C G V D S M V 360
TCTACCGTGTCCCGAGTCCAGCCCTCGAAGGAGTAGACTCTGGTCAGCGGTGATAATCGT 1140
S T V S A V H A S K E * 371
GATTCCATATATGTAGAATATAATCCCTGCTAGTAATCCATTTGTGCTGTTTATGTAT 1200
CGAAGGCAGCAAAGATGTGTGAAAGCGGCAATGGGATGCTTGTGTAAGGTAATATGTT 1260
GGCTTGTAGGCATGTACACGCTATTA

Fig. 19 Nucleotide and deduced amino acid sequences of CCP1 cDNA

CTCTTACTCCCTCACAGAACCCAGTAAAATATCGCCAGTCCCGCCGTCGAG -1

ATGGTCCCACGCCGCTGTTCGTCTCGCCGTCGTCGCTCCTCGGGACACCCGCCGCTG 60

M V P R R L F V L A V V V L A D T A A V 20

GTCAACTCCGGCTTCGCGGACTCCAACCCGATCCGCCCCGTCACCGACCCGCGGCTCC 120

V N S G F A D S N P I R P V T D R A A S 40

GCGCTCGAGTCCACGGTCTTCGCGCGCTCGGCCGACCCGCGACGCGCTCCGCTTCGCA 180

A L E S T V F A A L G R T R D A L R F A 60

CGTTCGCCGTCAGGTACGGCAAGAGCTACGAGAGCGCGGGGAGGTCCACAAGCGGTT 240

R F A V R Y G K S Y E S A A E V H K R F 80

AGGATCTTCTCCGAGAGCCTCCAGTGGTCCGCTCCACCAACCGCAAGGCCTCTCTAC 300

R I F S E S L Q L V R S T N R K G L S Y 100

CGCTCGGCATCAACCGTTCGCGGACATGAGCTGGGAGGAGTCCGTGCGACCCGGCTC 360

R L G I N R F A D M S W E E F R A T R L 120

GGCGCAGCCAGAACTGCTCCGCCACGCTTACCGCAACCACCGGATGCGCGCCGCC 420

G A A Q N C S A T L T G N H R M R A A A 140

GTTGCGTCCCGGAGACGAAAGACTGGAGGGAGGATGGGATTGTGAGCCAGTGA AAAAC 480

V A L P E T K D W R E D G I V S P V K N 160

AGGGCCACTGTGGATCATGCTGGACCTTACGACTACTGGTGCCTTGAGGCTGCATAT 540

Q G H C G S **C** W T F S T T G A L E A A Y 180

ACCCAGGCAACTGGCAAGCCCATCTCTCTCTGAGCAACAGCTTGTGACTGTGGTTTT 600

T Q A T G K P I S L S E Q Q L V D C G F 200

GCATTCACAATTTCCGGATGCAACGGAGGCCCTCCATCCCAGGCCTTTGAATACATCAA 660

A F N N F G C N G G L P S Q A F E Y I K 220

TACAATGGTGGCCTTGACACTGAGGAATCTTACCCTTACCAAGGTGTAATGGAATCTGC 720

Y N G G L D T E E S Y P Y Q G V N G I C 240

AAGTTAAGAATGAGAATGTTGGAGTCAAGGTTTTGGACTCGGTTAACATCACCCCTGGGT 780

K F K N E N V G V K V L D S V N I T L G 260

GCTGAGGATGAAC TGAAGGATGCTGTTGGTCTGTTGCTCGCCAGT TAGTGTGCCTTCGAG 840

A E D E L K D A V G L V R P V S V A F E 280

GTGATCACTGGTTTCAGGCTGTACAAGAGCGGAGTTTACTACTAGCGACCATTGTGGAAC 900

V I T G F R L Y K S G V Y T S D H C G T 300

ACACCGATGGATGTAACACGCTGTTCTGGCTGTTGGCTACGGTGTGCAAGATGGTGTA 960

T P M D V N **H** A V L A V G Y G V E D G V 320

CCCTACTGGCTCATCAAGAACTCATGGGGCGCTGACTGGGGTGATGAGGGTTACTTCAAG 1020

P Y W L I K **N** S W G A D W G D E G Y F K 340

ATGGAAATGGGCAAGAACATGTGCGGTGTTGCTACGTGTGCATCCTACCCTATTGTGCGA 1080

M E M G K N M C G V A T C A S Y P I V A 360

TGAGGCCCTTACGAAATGTTACATGGTCTGTTTGGCATCAATAATGCATGTTTAACTGA 1140

*

GCTTGGCGATGGGTTATACAGAACGGAAACTCTGTTTGTGAATAGAAAAATCATGAAGGGA 1200

AGGAGTTGACCGGATTCCTGCTGTACGCTCCTCCCGACTGTGTAGGTAGATTGTCAGTTG 1260

GGGTTCCGAAGTACTTACTCATACGTGTGTATGACAGTTTATTATTATGAAACCAAAATACG 1320

CATTGATCGTA

Fig. 20 Nucleotide and deduced amino acid sequences of CCP2 cDNA

CCP1		MAHRVILLLL	9
CCP2		MVPRRLFV-	8
CCP1	SLASAA-AVA AAV DAEDPL----TRQVVPGGDDNDLELNAESHF-LSFVQ		53
CCP2	-LAVVVLADTA AVVNS GFADSNP IR PVT---DRAASALESTVFAALGRTR		54
CCP1	---RF-----GKSYKDADEHAYRLSVEKDNLRARRR HQL LDPSAEHGV		93
CCP2	DAL RF ARFAVRYGKSYESA AEV HKRFRIFES SL -----QLV R STNRKGL		98
CCP1	T-----KFS DL TPAEFRRTYLGLRKSRRALLRELGESAH EAP -VLPTDG		136
CCP2	SYRLGINRE FAD MSWBE FR ATRLGAAQNC SAT L T GNHRMRAA AVA -----		142
CCP1	LE DD EDWRDHGAVG SP VKNQGS CG SCW SFS ASGALE GA HYLATGKLEVLSE		186
CCP2	LE ET EDWREDGIV SP VKNQGH CG SCW TFS TTGALE EA YTOATGK PIS LSE		192
CCP1	QCFVDCDHECDSS EP DCDS GC NGGLMTTAF SY LQKAGGLESEKDYPTG		236
CCP2	QQLVDCG GFA FN NF -----GCNGGLP SQA F BY IKYNGGLDTE SY PYCG		235
CCP1	SDGKCK FD KSKI VAS VQNF SV SVDEA QIS ANLIKHG PLA IGIN-AAYMQ		285
CCP2	VNGICK F -KNENVGVK VLD SVNITLGA EDEL KDAVG--LVRPVS VAF EVI		282
CCP1	TYIGGV- SCP Y---ICG---RHL DH GVLLVGYGASGFAPIRLKD KPY WII		328
CCP2	TGFRLYKSGVY TS DHCGTTPMDVNH AVL AVGYGVED-----GV PY WII		325
CCP1	KNSWGEN WC ENGYKIC RG SNVRN KCG VDSMV ST VS AV HASKE		371
CCP2	KNSW GAD WG EG YKMEMG---KNM CG VATCASYP I VA		360

Fig. 21 Comparison of the amino acid sequences of CCP1 and CCP2

CCP1	MAHR-VLLLLSLASAAVAAAV-DAEDPL----	IROVFGGDN---	DLE	41
Oryzain α	M--RISM---ALA-AAA-----	LLLLSL-AAADMSIVSYG--ER--SEE		34
Oryzain β	MAARAAAAFLLL--IVV-GHRASMSII	SYNAEHGARGL--EEGPT	EA	45
Oryzain γ	MAHRRIILLAVAAVAATSAAAASSGF	DDSNPIRSVTDHAASALESTVI		50
Aleurain	MAHARVLLLALAVLATAAVAVASSSFA	-DSNPIREVTDRAASTLESAVL		49
Pea 15 a	MDRFLFLALFLFAVAVAVTDDTNNDDFI	----	IROVV---DNEE--DHL	41
RD 19	MDRLKLYFSVFLSFFIVSVSSDVNDG	-DDLVIROVV--GG--AE--PQV		44
CCP1	LNAESHFLSFVORFGKSYKDADEHAYRLSVFK-	DNLRRARR-HQLLDPSA		89
Oryzain α	EARRLYAEWKAE-HGKSYNAVGEERRYA	AFRDNLRYIDEHNAAADAGV		82
Oryzain β	EARAAYDLWLAENGCGSPNALGGEHERR	FLVFDNLKFVDAHARADGG		95
Oryzain γ	AALGFTRGALRFARFAVRHGKRYGDAE	VQRRFRIFSESLELVRSTNRRG		100
Aleurain	GALGRTRHALRFARFAVRVYKSYESAAE	VRRRFRIFSESLEEVSTNRKG		99
Pea 15 a	LNAEHHFTSFKSFKSYATKEEHDFRFGVFK-	SNL-IAKALHONRDP	IA	89
RD 19	LTSEDFHSLFKRKFGRVYASNEEHDFR	SVFK-ANLRRARR-HQLDPSA		92
CCP1	EH---GVTKFSDLTPAEFRRTYLGLRKS	RALLRELGE SAHEAPVLP	TDG	136
Oryzain α	HSFRLGLNRFADLTNEEYRDTYLGLRN	KPERR-ERKVS-DRYLADNEA--		128
Oryzain β	G-FRLGMNRFADLTNEEFRAFLGAKVA	BR--SRAAGE RYRHDGV-EE--		139
Oryzain γ	LPYRLGINRFADMSWEEFQASRLGAAQ	NCSATL--AGNHRMR--DAPA--		144
Aleurain	LPYRLGINRFSDMSWEEFQATFLGAAQ	TCSATL--AGNHLMR--DAAA--		143
Pea 15 a	EH---GITKFSDLTASEFRROFLGLKKRLR-	LP-A--HAQKAPILPTTN		131
RD 19	TH---GVTQFSDLTRSEFRKKHLGVR-	SGFK-LPKDANKAP---	TLPTEN	134

Fig. 22-1 Comparison of the amino acid sequences of CCP1 and other plant seed cysteine proteinases (prepro regions)

CCP1	LPDFDWRDHGAVGPKVNOGSCGSCWFSASGALEGAHYLATGKLEVLSE	186
Oryzain α	LPESVDWRTRKGAVAETKQGGCGSCWAFSAIAAVEDINQIVTGD L I S L S E	178
Oryzain β	LPESVDWREKGAVAIPKNOGCGSCWAFSAVSTVESINCLVTGEMITLSE	189
Oryzain γ	LPETKOWREDGLVSPVKDQGHGSCWFFSTTGSLEARYTCATGPPVSLSE	194
Aleurain	LPETKOWREDGLVSPVKNOAHGSCWFFSTTGALEBAYTCATGKNI S L S E	193
Pea 15 a	LPEDFDWREKGAVIPKQGGSCGSCWAFSTTGALEGAHYLATGKLVSLSE	181
RD 19	LPEDFDWRDHGAVTPKNOGSCGSCWFSATGALEGANFLATGKLVSLSE	184
CCP1	QQEVDCDHECDSEFPDSCDSGCGNGLMTTAFSYLOKAGGLESEKDYPTG	236
Oryzain α	QELVDCD-----TSYN-EGCNGGLMDYAFDFIINNGGIDTEDDYPKG	220
Oryzain β	QELVECS-----TNGQNSGCGNGLMADAFDFIINNGGIDTEDDYPKA	232
Oryzain γ	QQIADCA-----TRYNNFGCSGGLPSQAFYIKYNGGLDTEEA Y P Y T G	237
Aleurain	QQIVDCA-----GGFNNEGCGNGLPSQAFYI-OYNGGIDTEES Y P Y K G	235
Pea 15 a	QQIVDCDHVCDPEOAGSCDSGCGNGLMNAFAFYLLESGGVVQEKDYPTG	231
RD 19	QQIVDCDHECDPEEPDSCDSGCGNGLMNSAFYTLKAGGLMKEDDYPTG	234
CCP1	SDGK-CKF-DKSKIVASVNFVSVVDEAIOISANLIKHGPLAIGTNAAYM	284
Oryzain α	KDER-CDVNRKNKAVVTIDSIEDVTPNSETSLQAVRNCPPVSAIEAGGR	269
Oryzain β	VDGK-CDINRENKVVSIDGEEDVFPONDEKSLQKAVAHCPVSAIEAGGR	281
Oryzain γ	VNGI-CHYKPENAGVKVLDVSNITLVAEDELKNAVGLVRPVSVAFOVING	286
Aleurain	VNGV-CHYKAENAAVQVLDVSNITLNAEDELKNAVGLVRPVSVAFOVIDG	284
Pea 15 a	RDGS-CKF-DKSKIVASVSNFVSVVFLDEEIOIAANLVKNGPLAVAINAAYM	279
RD 19	KDGTKCKL-DKSKIVASVSNFVSVVLSIDEEOIAANLVKNGPLAVAINAGYM	283
CCP1	--QTYIGGV-SCP Y I C G R---HLDHGVLV-VGYGAS-GFAP I R L K D K P Y W	326
Oryzain α	AFQLYSSGIFTGK--CGT---ALDHGVAA-VGYGTENG-----KD--YW	305
Oryzain β	EFQLYHSGVFSGR--CGTS---LDHGVA-VGYGTENG-----KD--YW	317
Oryzain γ	FRMYKSGVYTSDFH--CGTSPMDVNHAVLA-VGYGVENG-----VPYW	325
Aleurain	FRQYKSGVYTSDFH--CGTTPDDVNHAVLA-VGYGVENG-----VPYW	323
Pea 15 a	--QTYMSGV-SCP Y V C A K S R---LDHGVLV-VGEGKGA-YAP I R L K D K P Y W	322
RD 19	--QTYIGGV-SCP Y I C R R---LNHGVLV-VGYGA-AGYAP A R F K E K P Y W	325
CCP1	IIKNSWGENWGENGYKICRGSNV---FNKCGVDSMVSTVSAVHASKE*	371
Oryzain α	IIVNSWGRKSWGESGY-VR-MERNIKASSGKCGIAVERSYPLKKGENPPNP	353
Oryzain β	IIVNSWGRKSWGESGY-VR-MERNINVTTCRCKGIAMMASYPTKSGANPPPK	365
Oryzain γ	LIKNSWGDWGDNGYF--TMEMGK---NMCGIATCASYPIVA*	362
Aleurain	LTKNSWGDWGDNGYF--KMEMGK---NMCATATCASYPVVA*	361
Pea 15 a	IIKNSWGRNWSGEGYKICRGRNV-----CGVDSMVSTVRAAQ-SNH*	363
RD 19	IIKNSWGETWGENGYKICRGRNI-----CGVDSMVSTVRAATV-STTAH*	368

Fig. 22-2 Comparison of the amino acid sequences of CCP1 and other plant seed cysteine proteinases (mature regions)

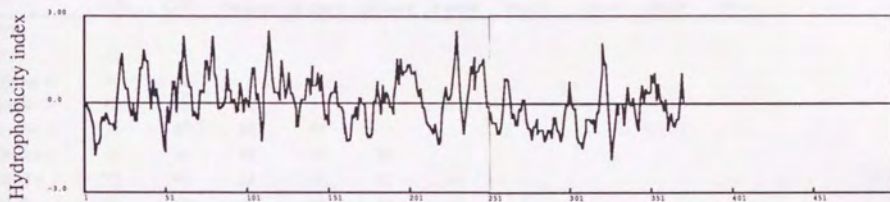
CCP2	MVPRRL EV -LAVVVLADTAAVVN---SGFADSNP-IRPVTDRAASALE	44
Oryzain α	M--R-ISMALAAAA LLLLLSLAAA ---DMSIVSY-GERSEEE--ARRLYA	41
Oryzain β	MAAR---AAAA AFLLLI -VVGHRASDMSIISY-NAEHG---ARGLEEG	41
Oryzain γ	MAHRR IILL LAVAAVAATSAAAA--SSGFDDSNP-IRSVTDHAASALE	47
Aleurain	MAHARVLL-LALAVLA-TAAVAVASSS-FADSNP-IRPVTDRAASTLES	46
Pea 15 a	MDPRFLE-AL---FL--FAAVATAVDDTNNDD-FIIROVVDN---EEDH	40
RD 19	MD-R-LKLYFSV FVLSFFI -VSVSSSDVNDGDD-LVIRQVVG G ---AEPQ	43
CCP2	TVFAALGRTRD ALRFARFAVRYGKSYESA AEVH-KRFRIFSESLELVRST	93
Oryzain α	EWKAEHC---KSYNAV-GEEE-RRY--AAFRDNLRY-ID-E-H-NAAAD	79
Oryzain β	PTEA-EARAAYDLWLAE NGGGSPNALGGEHERRFLV FDNLK FVDAHNAR	90
Oryzain γ	TVFAALGRTRD ALRFARFAVRYGKSYESA AEVQR-RFRIFSESLELVRST	96
Aleurain	AVLGAALGRTRD ALRFARFAVRYGKSYESA AEVRR-RFRIFSESLELVRST	95
Pea 15 a	LLNAEHHF TSPKSKF S KSYA -TKEEH YRFGVF -KSNLIKAKLHQ-NRDP	87
RD 19	VLTS EDHFSLFKRKE GK VYA -SNEEH YRFSVF -KANLRRARRHQ-KLDP	90
CCP2	NRKGLSYRLGINRFADMSWEEFRATRLGAAQNC SATL AGNHMR--AAAVA	142
Oryzain α	AGVH-SERLGINRFADLTNEEYRDTYLG LRNKPRRERKVS DRYLAADNEA	128
Oryzain β	ADEGGGERLGMNRFADLTNEEFRA TEFLGAKVAERSRAAG -ERYRHDGV EE	139
Oryzain γ	NREGLPYRLGINRFADMSWEEFQA SRLGAAQNC SATLAGNHMR--DAPA	144
Aleurain	NRKGLPYRLGINRFSDMSWEEFQA TRLGAAQNC SATLAGNHMR--DAPA	143
Pea 15 a	TAEHGITKFSDLT-A--S--E FRRQFLGLK KRLRLP-AHAQKAPILPTTN	131
RD 19	SATHGVTQFSDLT-R--S--E FRKKHLG VRS GF KLP-KDANKAPILPTEN	134

Fig. 23-1 Comparison of the amino acid sequences of CCP2 and other plant seed cysteine proteinases (prepro regions)

CCP2	LPETKDWRE GI VS PVK NQ HCG SC WTF ST TGA LE AA Y TO AT GK PI SL SE	192
Oryzain α	LPESVDWR TK GAV AE TK QGG CG SC W AF S AI AV ED IN QI VT GD I IS LE	178
Oryzain β	LPESVDWRE KG AV AP V K NO CG SC WAF S AV ST VE S IN QL VT GE NI TL SE	189
Oryzain γ	LPETKDWRE GI VS PVK Q HCG SC WTF ST TGS LE AA Y TO AT GK PI SL SE	194
Aleurain	LPETKDWRE GI VS PVK NA HCG SC WTF ST TGA LE AA Y TO AT GK NI SL SE	193
Pea 15 a	LPEDFDWRE KG AV TP V K Q GS CG SC W AF ST TGA LE AA Y LA T GK LV SL SE	181
RD 19	LPEDFDWR DH GA VT P V K NO GS CG SC WTF S AT T GA LE AA N FL AT GK LV SL SE	184
CCP2	QQLVDCG-----FA N N F GC N GGL P SO A FE Y I K Y N GGL D TE E S Y PY CG	235
Oryzain α	QELVDCD-----T-SY N EG C N G GL M DY A FD F I I N G GL D TED D Y P Y CG	220
Oryzain β	QELVDCS-----TNG C NS G C N GGL M AD A FD F I I K N GGL D TED D Y P Y KA	232
Oryzain γ	QQLADCA-----TRY N N F GC S GGL P SO A FE Y I K Y N GGL D TE E S Y PY ITG	237
Aleurain	QQLVDCG-----GG F N N F G C N GGL P SO A FE Y Q-Y N GGL D TE E S Y PY CG	235
Pea 15 a	QQLVDCD H V C D PE Q AG S C D S GC N GGL M N N A F E Y L L E S GG V V C E K D Y A Y T G	231
RD 19	QQLVDCD H EC D PE E AD S CD S GC N GGL M NS A FE Y TL K T G GL M KE E D Y PY ITG	234
CCP2	VNGI-CK F K N EN V G V K V LD-SV N IT L GA E DEL K DA V GL V R--P V SV A FE V	281
Oryzain α	KDER-CD V NR R NA K V V T I D-SY E D V TP N -SE T S L O K A-V R N Q P V S V A I E A	266
Oryzain β	VDGK-CD I N R EN A K V V S ID-G F ED V P Q N-DE K S L O K A-VA H Q P V S V A I E A	278
Oryzain γ	VNGI-CH Y K P EN A G V K V LD-SV N IT L VA E DEL K NA V GL V R--P V SV A F C V	283
Aleurain	VNGV-CH Y K A EN A A V V L D-SV N IT L NA E DEL K NA V GL V R--P V SV A F C V	281
Pea 15 a	RDGS-CK F D K SK V V A S V SN F SVV-TL---DE D Q I AA N LV K NG L AV A INA	276
RD 19	KD G K T CK L DK S K I V A S V SN F SV-T S I---DE E Q I AA N LV K NG L AV A INA	280
CCP2	IT-G F R L Y K SG V Y T SD H CG T TP-M D V N H A V L AV G Y G V E D G -----V P	321
Oryzain α	GGRA F CL Y SS G I F TE K -CG T A-L-D--H S V V A V GY G T E NG-----K D --	303
Oryzain β	GGRE F CL Y H S GV F -S E RC G T S -L-D--H S V V A V GY G T E NG-----K D --	315
Oryzain γ	IN-G F R Y Y K SG V Y T SD H CG T SP-M D V N H A V L AV G Y G V E NG-----V P	323
Aleurain	ID-G F R Y Y K SG V Y T SD H CG T TP-M D V N H A V L AV G Y G V E NG-----V P	321
Pea 15 a	AWM--Q T Y M SG V SCP Y V C AK S R L -D--H S V L L V GE G K G A-Y A P I R L KE K P	320
RD 19	GYM--Q T Y I GG V SCP Y IC-T R RL---NH S V L L V GY G A-A G Y A P A R F KE K P	323
CCP2	YWL I K N SWG A D W GD E GY F K M EM---G K N M CG V AT C AS Y P I V A * 360	360
Oryzain α	YWL I V R NS W G K SWG E S G Y V R M ERN I K A SS G K G LA V ES S Y P L K KG E N P PN P	353
Oryzain β	YWL I V R NS W G P K W GES G Y V R M ERN I N V TT G K G CA M MA S Y P K S G A N P PK P	365
Oryzain γ	YWL I K N SWG A D W GD N GY F EMEM---G K N M CG I AT C AS Y P I V A * 362	362
Aleurain	YWL I K N SWG A D W GD N GY F K M EM---G K N M CA I AT C AS Y P V V A A* 361	361
Pea 15 a	YWL I K N SWG Q N W G E Q G Y Y K I CR---G R N V CG V DS M V S T--V A AA Q SNH* 363	363
RD 19	YWL I K N SWG E T W GEN G Y F K I CK---G R NI C G V DS M V S T--V A AT V ST T AH*368	368

Fig. 23-2 Comparison of the amino acid sequences of CCP2 and other plant seed cysteine proteinases (mature regions)

CCP1



CCP2

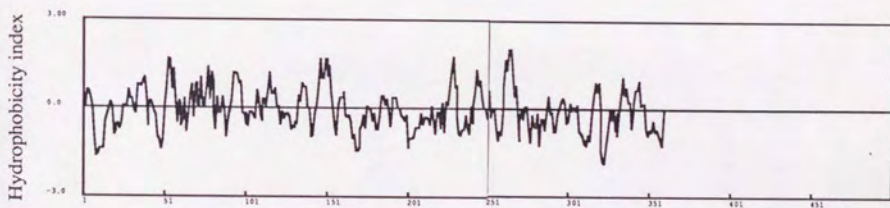


Fig. 24 Hydropathy profiles of CCP1 and CCP2

Table 3 Amino acid sequence similarities among the mature regions of plant seed cysteine proteinases

	CCP1	CCP2	Oryzain α	Oryzain β	Oryzain γ	Aleurain	Pea 15 a	RD 19	SH-EP	EP-B
CCP1										
CCP2	42									
Oryzain α	40	47								
Oryzain β	43	48	70							
Oryzain γ	38	87	48	48						
Aleurain	40	89	47	48	87					
Pea 15 a	72	46	39	43	42	44				
RD 19	79	45	43	43	43	43	78			
SH-EP	38	45	62	62	45	45	43	42		
EP-B	39	47	62	58	47	44	41	41	64	

RD 19; *Arabidopsis thaliana* CP, SH-EP; Rice Bean CP, EP-B; Barley CP

第2節 CCP1及びCCP2 mRNAの発現様式

1 緒言

トウモロコシ種子は開花後2-3週目から澱粉やタンパク質の蓄積が進行する。一方、この種子のプロテオリシスの制御に関わっていると考えられるトウモロコシシスタチンmRNAの発現は、開花1週前から始まり、開花2週目で最大となりその後幾分減少するが、5週目迄続いていることがAbe *et al.* (1992) によって報告されている。このトウモロコシシスタチンの標的酵素となりうると考えられているCPは、登熟期のどの時期に発現し、シスタチンの制御を受けているのか、又プロテオリシスの場である発芽期ではどのような状態にあるのか非常に興味深い研究対象である。そこで、CCP1及びCCP2の登熟期及び発芽期のmRNAの発現様式を調べ、シスタチンとの関わりを検討した。

2 材料および方法

2-1 材料

登熟期のトウモロコシ種子は「農林」を用いた。

発芽期のトウモロコシ種子は「甲州」を用いた。

2-2 方法

2-2-1 ノーザン分析用試料の作製

(1) 登熟期のトウモロコシ種子の採集

開花-1、0、2、3、4、5週目のトウモロコシ種子を採取し、実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

(2) トウモロコシ種子の発芽

cDNAライブラリー作製時と同様に、発芽1、3、5、7日目の種子の芽及び根を除き -80°C で凍結保存した。0日目の種子として、完熟乾燥種子も -80°C で凍結保存した。

(3) RNAの抽出

cDNAライブラリー作製時と同様に抽出し、それぞれの試料はノーザン分析まで -80°C で凍結保存した。

2-2-2 ノーザン分析

(1) ノーザンプロットティング (RNAの転写)

RNA 10 μ gに5 μ lの10XMOPS 緩衝液、8.75 μ lのホルムアルデヒド、25 μ lのホルムアミドを加え、水で総量を50 μ lにし、55 $^{\circ}$ C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（72mlの滅菌水にアガロース1gを加えて滅菌溶解し、約65 $^{\circ}$ Cに保温しながら10XMOPS 緩衝液10mlとホルムアルデヒド18mlを加える。）で70V定電圧、1XMOPS 緩衝液中で電気泳動をした。泳動後、ゲルを3分間水洗してからプロットングに供した。20XSSCで満たした二つの容器にガラス板を架橋させ前もって20XSSCに浸しておいたWhatman 3MMろ紙を両端が20XSSCに浸るように載せ、その上にゲルを置きゲルの周りのろ紙はラップで覆い、その上に前もって20XSSCに浸しておいたナイロンフィルター、Whatman 3MMろ紙を置き次いで乾いたろ紙、ペーパータオルを順に載せ平らなガラス板と約kg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。

(2) ノーザンハイブリダイゼーション

プロットングし、熱乾燥、UV固定したフィルターは65 $^{\circ}$ Cの3XSSC/0.1%SDSで3分間洗浄した後、65 $^{\circ}$ Cで一晩サザンハイブリダイゼーションと同様にプレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、プローブcDNA（CCP1及びCCP2）をそれぞれ約150万cpm/mlになるように加えた反応液を用いて同じく65 $^{\circ}$ Cで一晩行った。

(3) 洗浄

65 $^{\circ}$ Cの1XSSC/0.1%SDS中で3-4回行った。

(4) 解析

フィルターはイメージングアナライザーで解析した。

3 結果

3-1 発芽期に於けるCCP1及びCCP2 mRNAの発現様式

Fig.25に示すようにCCP1は完熟時に既に発現しており、1日目で強くなり、3日目にピークになり、7日目まで継続していた。CCP2はFig.26に示すように完熟種子には発現しておらず、1日目に発現し、3日目に強くなり、5日目でピークに達していた。

3-2 登熟期に於けるCCP1及びCCP2 mRNAの発現様式

Fig.27に示すようにCCP1は開花と共に発現が始まり1週目には強くなり、2週目にはピークに達し、その後徐々に弱まり完熟時(5週目)には開花開始時位迄になり、乾燥しても同程度に発現していた。CCP2はFig.28に示すように開花と共に弱いながらも発現が確認されその後わずかに強まり3週目迄継続するが、4週目から完熟期には発現せず、更に乾燥種子にも発現していないことが確認できた。

4 考察

プロテオリシスの主役を演じているであろうと考えられるCP mRNAの発現様式を調べた。プロテオリシスの場である発芽期について見ると、CCP1は完熟時に既に発現しており、1日目で強くなり、3日目にピークになり、7日目まで継続していた。CCP2は完熟種子には発現しておらず、1日目に発現し、3日目に強くなり、5日目でピークに達していた。CCP1が完熟時に既に発現が認められることから、登熟のどの時期から発現し始めるのかという疑問に答えるために、登熟期の発現様式について検討したところ、開花と共に発現が始まり1週目には強くなり、2週目にはピークに達し、その後徐々に弱まり完熟時（5週目）には開花開始時位迄になり、乾燥しても同程度に発現していることが確認できた。CCP2については、完熟種子には発現していないことから登熟期には発現していないことが予測されたが、確認の為にノーザン分析を行ったところ、開花から3週間の間だけ発現が認められたが、その後は発現しておらず、発芽期に於けるmRNAの発現様式を検討した際と同様に、乾燥種子にも認められなかった。CPのインヒビターであるシスタチンmRNAの発現は開花1週前に始まり開花2週目で最大になり完熟時まで継続することがAbeらによって確認されている（Abe *et al.*, 1992）。このシスタチンmRNAの発現時には、CCP1 mRNAがそれ程強くはないにしても継続して発現している。発芽がスタートする為には、スタートの為のCPが必要であり、それには発芽以前、すなわち、完熟時に既に存在していなければならない。この時期のCPが暴走しない為にはCPのインヒビターが必要となる。シスタチンがその役割を担っているのかもしれない。又、CPが暴走しない様にプロテオリシスを進行するには一度に多種のCPが発現せず時期をずらして発現する必要があると考えられる。CCP1 mRNAが登熟時にそれ程強くはないにしても継続して発現し、発芽がスタートすると非常に強く発現しCCP1とは別

種のCCP2 mRNAが続いて発現するという事は、上記の理に合っていると考えられる。これらの点から、CCP1およびCCP2以外の種類のCPの存在が示唆される。これらCCP1、CCP2以外のCPの存在の確認については第5節で検討した。



Fig. 25 Expression of the mRNA for CCP1 during germination

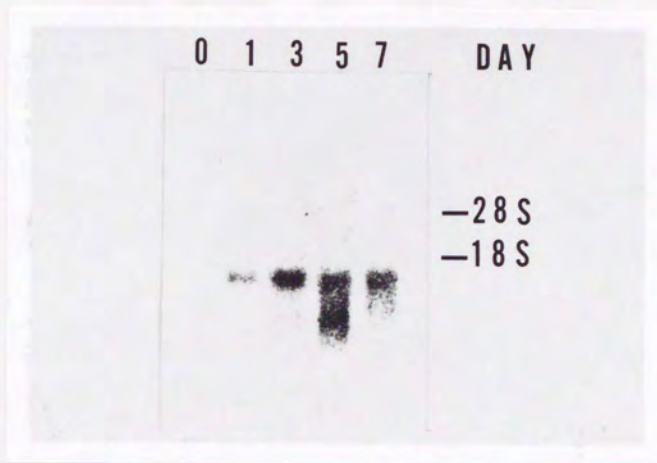


Fig. 26 Expression of the mRNA for CCP2 during germination



Fig. 27 Expression of the mRNA for CCP1 during maturation

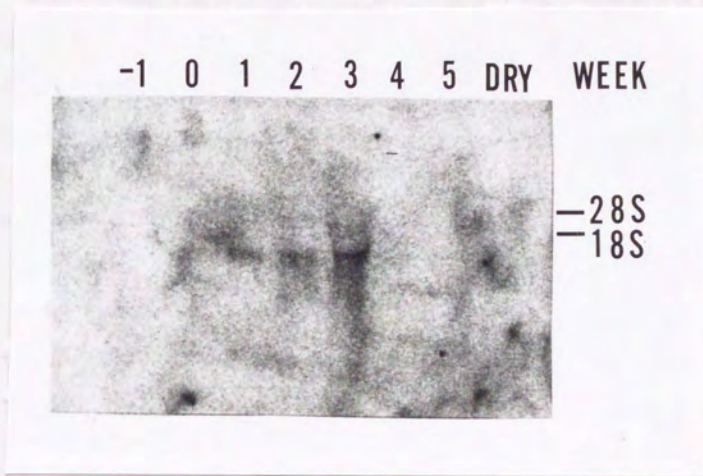


Fig. 28 Expression of the mRNAs for CCP 2 during maturation

第3節 CCP1 mRNA発現の乾燥ストレスによる影響

1 緒言

CCP1は第1節に述べた様に、mature部分のアミノ酸配列を既知のCPと比較したところCCP2、アリュールイン、オリザイン、SH-EP、EP-Bとの相同性が低く、乾燥によってその発現が誘導されるエンドウマメのPea 15aおよびシロイヌナズナに存在するRD 19とは相同性が高く、それぞれ72%および79%であった。そこで、CCP1についても乾燥によって発現が誘導されるかどうか検討を試みた。

2 材料および方法

2-1 材料

食用に市販されていた沖縄産スイートコーンを使用した。

2-2 方法

2-2-1 トウモロコシ種子の乾燥

前もって秤量しておいた4枚のシャーレに生トウモロコシ粒をそれぞれ25粒ずつ入れ秤量したものを0時間とした。37° Cのインキュベーターに入れ6時間後に2枚を、24時間後に残りの2枚を取り出し秤量した後それぞれをファルコンに入れ-80° CでRNAを抽出する迄凍結保存した。

2-2-2 RNAの抽出

第2節と同様に行った。

2-2-3 ノーザン分析

第2節と同様に行った。

3 結果

3-1 トウモロコシ種子の乾燥

トウモロコシ種子を37°Cのインキュベーターで乾燥した。6時間後には重量の約22%が減少し、24時間後には約61%が減少した。

3-2 CCP1 mRNA発現の乾燥ストレスによる影響

Fig. 29に示すように0、6、24時間後に於けるCCP1 mRNAの発現には差が認められなかった。すなわち、トウモロコシ種子中のCCP1は乾燥によって発現が誘導されないと考えられる。

4 考察

CCP1のmature部分のアミノ酸配列は、乾燥によってその発現が誘導されるエンドウマメ葉茎のPea 15a及びシロイヌナズナ葉茎のRD 19と相同性が高い(それぞれ72%、79%)ことから、CCP1についても乾燥によって発現が誘導されるかどうか非常に興味を持たれたので確認の為に以下の様な実験を行った。

市販されていた沖縄産スイートコーンを購入し、種子を37°Cのインキュベーターで乾燥した。RD 19については、シロイヌナズナの葉茎を22°Cの乾燥で、Pea 15については23°Cの乾燥で発現が誘導されることが確認されている。これらの葉茎は水を与えると生き返るすなわち「しおれ」た状態である。トウモロコシ種子の乾燥温度は、種子用については43°C迄は問題はないというAnderson *et al.* (1954)の報告があり、この場合の乾燥温度として37°Cは適当であると判断した。25粒を6時間乾燥すると重量の約22%が減少し、24時間では約61%が減少した。これらの種子からRNAを抽出し、CCP1 cDNAをプローブにノーザン分析を行いCCP1 mRNAの発現様式を調べたところ、乾燥前の生種子、6時間および24時間乾燥した種子中のCCP1 mRNAの発現量には、明らかな差は認められなかった。従って、CCP1はエンドウマメのPea 15aおよびシロイヌナズナのRD 19とmature部分のアミノ酸配列の相同性は高いが、乾燥によって発現が誘導されないことからこれら二者とは異なる転写機構を持つCPであると考えられる。CCP2についても検討したところFig.30に示す様に誘導されないことが確認された。CCP2 mRNAは登熟時の前半、すなわち1-3週目迄に発現しその後は完熟種子及び完熟乾燥種子には発現していないことが第2節で確認されている。今回使用した市販のスイートコーン種子は登熟3週目頃のものであり、CCP2 mRNAが発現していた時期であったと考えられる。



Fig. 29 Expression of the mRNA for CCP1 under dry stress

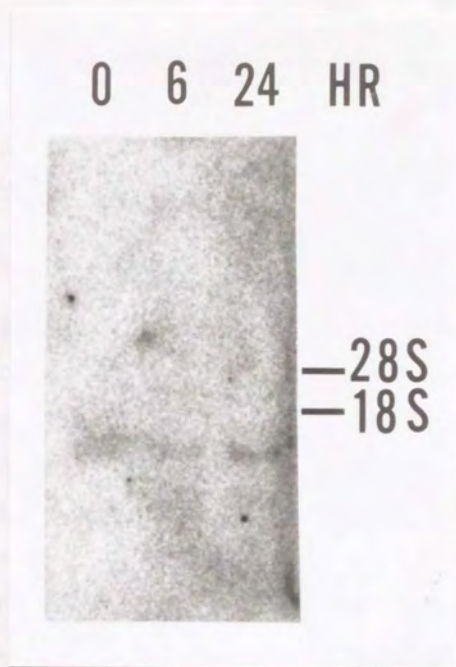


Fig. 30 Expression of the mRNA for CCP2 under dry stress

第4節 CCP1及びCCP2 mRNA発現の植物ホルモンによる影響

1 緒言

植物種子は、登熟の過程で蓄積した貯蔵物質を発芽時に分解してエネルギー源とする。この分解を司る加水分解酵素群は、ジベレリン (GA) により誘導されることが明らかとなっている (Fincher, 1989)。先に述べたように、オオムギ種子のアリュールン、イネ種子のオリザインはいずれもジベレリンによって発現が誘導され発芽期での種子貯蔵タンパク質分解が進むと考えられている。ジベレリン以外にもアブシジン酸、オーキシン、サイトカイニン、エチレンといった植物ホルモンが存在し、さまざまな生理現象に関与している。

現時点でトウモロコシ種子中に存在するCPについての遺伝子レベルでの報告は少ない。上記植物ホルモンはCCP1及びCCP2にどのような影響を与えているのであろうか。非常に興味深い疑問である。トウモロコシ種子中にはPhinney *et al.* (1982a, 1982b, 1984, 1990) の示すGA生合成系が存在することが示唆されている (本多, 1990)。この生合成系によって合成されたいわゆる内生ジベレリンはどのような影響を与えているのであろうか。これらを解明するために、ジベレリン(GA₃)添加の発芽時に於けるmRNA発現様式の検討、GA生合成系がブロックされている矮性種を用いての検討、およびジベレリン合成系の阻害剤を用いての検討等を試みた。

2 材料および方法

2-1 材料

(1) 正常種として「甲州」を用いた。矮性種として、大阪市立大学の上田純一先生より御供与頂いたd5を用いた。

(2) 植物ホルモンとしてジベレリン(GA₃)、アブシジン酸(ABA)はナカライテスク(株)を用いた。

(3) ジベレリン合成阻害剤としては(株)クミアイ化学(東京 台東区)より御供与頂いたBX-112(prohexadione-calcium)を用いた。

2-2 方法

2-2-1 ノーザン分析試料の作製

(1) GA₃添加に於ける発芽

GA₃を1 μ M含む水に浸したパーミキュライトに種を播き、1、3、5、7日目毎に種子を採取し芽および根を除き-80°Cで凍結保存した。0日目の種子として完熟乾燥種子も-80°Cで凍結保存した。コントロールとしてGA₃を添加しないで発芽させた種子も同様に1、3、5、7日目毎に種子を採取し芽および根を除き-80°Cで凍結保存した。

(2) ABA添加に於ける発芽

GA₃と同様にABAを1 μ Mを含む水に浸したパーミキュライトに種を播き、

1、3、5、7日目毎に種子を採取し芽および根を除き -80°C で凍結保存した。コントロールも同様にして採取し -80°C で凍結保存した。

(3) 矮性種 (d5) の発芽

d5種も正常種と同様に発芽させ、1日目および3日目の種子を採取し -80°C で凍結保存した。0日目の種子として乾燥d5種子を -80°C で凍結保存した。更に、 $1\mu\text{M}$ の GA_3 を含む水でも同様に発芽させ、1日目および3日目の種子を採取し -80°C で凍結保存した。

(4) ジベレリン合成阻害剤 (BX-112) 添加に於ける発芽

正常種をBX-112 (120mg/l) を含む水で上記同様に発芽させ、1日目および3日目の種子を採取し -80°C で凍結保存した。コントロールとしてBX-112を添加しないで発芽させた種子も同様に採取し -80°C で凍結保存した。

(5) RNAの抽出

cDNAライブラリー作製時と同様に抽出し、それぞれの試料はノーザン分析迄 -80°C で凍結保存した。

2-2-2 ノーザン分析

ノーザンプロットング及びイメージングアナライザーを用いた解析は、第2節と同様に行った。

2-2-3 d5の生育状況及びBX-112添加時に於ける正常種の発芽状況

(1) d5を水に浸したパーミキュライトに播きバイオトロン ($25-30^{\circ}\text{C}$

自然光) 中で生育し、観察した。

(2) 正常種をBX-112 (120mg/l) を含む水に浸したパーミキュライトに播きRNA抽出時と同様に26°Cの暗所で発芽させ、その状況を観察した。

3 結果

3-1 発芽期に於けるCCP1およびCCP2 mRNA発現のGA₃およびABAによる影響

Fig. 31に示す様にCCP1 mRNAは乾燥種子中にすでに発現しており、1日目に強く発現し、3日目、4日目と更に強くなった。GA₃添加においてもABA添加においても同様であった。しかしながら、吸水すなわち発芽が始まると非常に強く発現することから、添加したGA₃やABA量よりも種子中に存在する内性ジベレリンによって誘導を受けると考えられる。これを確認する為に、ジベレリン合成の中心的部位である胚を除去した種子について、吸水後1日で強く発現するCCP1 mRNAの発現状態を調べた。Fig. 32に示す様に吸水開始から8時間後の種子でコントロールよりも強く発現していることが認められた。

CCP2は乾燥種子には存在せず、1日目に弱く発現し、3日目から強く発現した。GA₃及びABAによる影響は、CCP1と同様にこのFig. 33からは認められなかった。

3-2 矮性種(d5)発芽時に於けるCCP1及びCCP2 mRNAの発現

d5種子を水および1 μ MのGA₃を含む水で発芽させ、CCP1 mRNAおよびCCP2 mRNAの発現様式を調べた。コントロールとして正常種を水で発芽させ同様にCCP1 mRNAおよびCCP2 mRNAの発現様式を調べ、Fig. 34およびFig. 35を得た。CCP1 mRNAは、d5種子では乾燥種子中には正常種と比べてわずかに発現が認められる程度であり、1日目には幾分強くなり、3日目にはかなり強くなった。このd5種子を1 μ MのGA₃を含む水で発芽さ

せると、1日目から強く発現し、3日目も同様な強い発現が続いていたことから、d5種子のジベレリン生合成系に於ける異常が確認された。この結果と正常種の発現様式を比較することにより、CCP1 mRNAの発現は、種子中の内生ジベレリンによる誘導を受けると判断した。

CCP2 mRNAについては、正常種と同様にd5乾燥種子中にも発現していないことがわかった。Fig.35に示す様にd5種子を1 μ MのGA₃を含む水で発芽させると、水での発芽と異なり1日目から発現していることが認められ、CCP1 mRNAと同様に種子中の内生ジベレリンによる誘導を受けることが確認された。

3-3 ジベレリン合成阻害剤 (BX-112) による影響

CCP1 mRNAおよびCCP2 mRNAの発現がジベレリンによって誘導を受けることを確認する為に、矮性種 (d5) についての検討に続いて、ジベレリン合成阻害剤 (BX-112) による影響を調べたところFig.36に示すような結果を得た。CCP1 mRNAについては、発芽第1日目ではBX-112を添加した方がわずかに弱くなっており、3日目ではかなり弱くなっていた。CCP2 mRNAについてもFig.37に示すようにBX-112の影響が認められた

3-4 d5の生育状況及びBX-112添加時に於ける正常種の発芽状況

Fig.38は播種後約20日目のd5である。すべてd5として播種したものであるが、短葉の現れ方にこのような差が生じている。最も特徴のある葉茎を矢印で示した。BX-112を添加すると、発芽第3日目では発芽した粒数は水だけのものに比して2倍位多いが、芽の長さは水だけのものに比して1/2の長さであった。このBX-112は発芽そのものよりも、成長に係わると考えられる。これはクミ

アイ化学（株）よりご提示頂いたコメ種子に関するデータとも一致していた。

4 考察

オオムギ種子のアリュールイン、イネ種子のオリザインはいずれもジベレリンによって発現が誘導され発芽期での種子貯蔵タンパク質分解が進むと考えられている。トウモロコシ種子中に存在するCPであるCCP1およびCCP2は、植物ホルモンの影響をどのように受けているのであろうか。これらの疑問を解明する為に、まずジベレリンとアブシジン酸についての検討を試みた。トウモロコシ種子を、水、 $1\mu\text{M}$ のGA₃水溶液、 $1\mu\text{M}$ ABA水溶液で発芽させ、CCP1 mRNAおよびCCP2 mRNAの発現様式を比較した。Fig.31及びFig.33に示す様に1 mRNA、CCP2 mRNA両者共に明らかな差は認められなかった。しかしながら、吸水すなわち発芽が始まると非常に強く発現することから、Phinney *et al.* (1982a, 1982b, 1984, 1990) およびHonda (1990)の研究によって明らかにされているトウモロコシ種子中で合成されるいわゆる内生ジベレリンの影響が大きく、添加による影響が認められなかったと考えられた。そこで、これらを明確にする為にGA生合成系(GA₁生合成系機能欠失)がブロックされている矮性種(d5)を用いての検討、及びジベレリンの阻害剤を用いての検討等を試みたところ、Fig.34に示す様にd5 CCP1 mRNAの発現は発芽1日目迄は正常種に比べてかなり弱く、3日目で正常種程度になったがジベレリン添加では1日目から強く発現していた。これはd5種子のGA生合成系の異常を示すと共に、CCP1 mRNAの発現が種子中の内生ジベレリンによつて誘導されていることを示しているものと考えられる。CCP2 mRNAについては、正常種と同様にd5乾燥種子中にも発現していないことがわかった。又、Fig.35に示す様にd5種子を $1\mu\text{M}$ のGA₃を含む水で発芽させると、水での発芽と異なり1日目から発現していることが認められ、CCP1 mRNAと同様に種子中の内生ジベレリンによつて誘導されていると考えられる。

ジベレリン合成阻害剤(BX-112)を含む水で発芽させると、CCP1 mR

NAは水だけで発芽させた場合よりも1日目はわずかに弱く成る程度であったが3日目ではかなり弱くなることが認められた。CCP2は1日目にかなり弱くなり3日目にはコントロール程度になった。よって、正常種のみ発芽させた場合にはジベレリンの影響を確認することができなかったが、矮性種(d5)およびジベレリン合成阻害剤(BX-112)を用いることにより、CCP1およびCCP2共にジベレリンによってその発現が誘導されることが確認できたとと言える。アブシジン酸については、今後研究を継続するつもりである。又、このジベレリンによる誘導についてはCCP1およびCCP2遺伝子の構造解析が不可欠であると考え、現在クローニングを行い、得られた陽性クローンの構造解析中である。



Fig. 31 Expression of the mRNAs for CCP1 in corn seeds (cv Koshiyu) during germination in the presence of H₂O, GA₃ or ABA

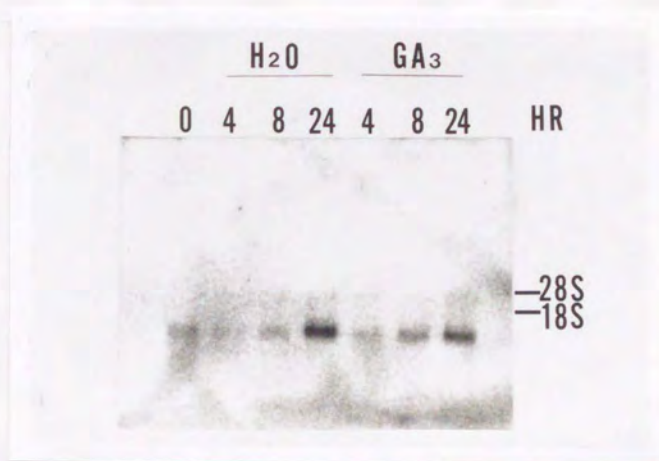


Fig. 32 Expression of the mRNAs for CCP1 (without embryo) in corn seeds (cv Koshiyu) during germination in the presence of H₂O or GA₃



Fig. 33 Expression of the mRNAs for CCP2 in corn seeds (cv Koshiyu) during germination in the presence of H₂O, GA₃ or ABA

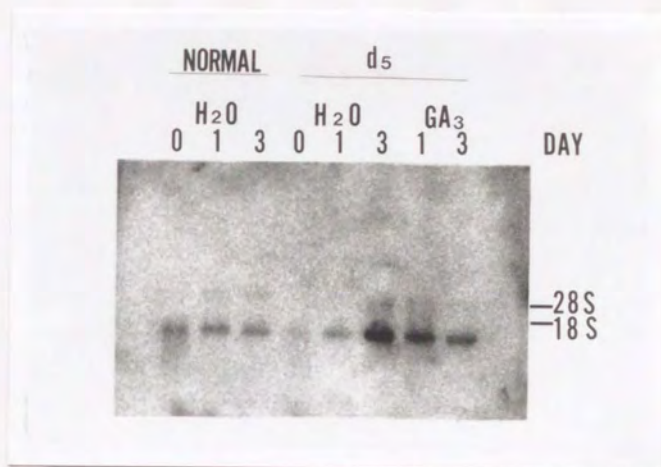


Fig. 34 Expression of the mRNAs for CCP1 in corn seeds of a dwarf cultivar (d₅) during germination in the presence of H₂O or GA₃

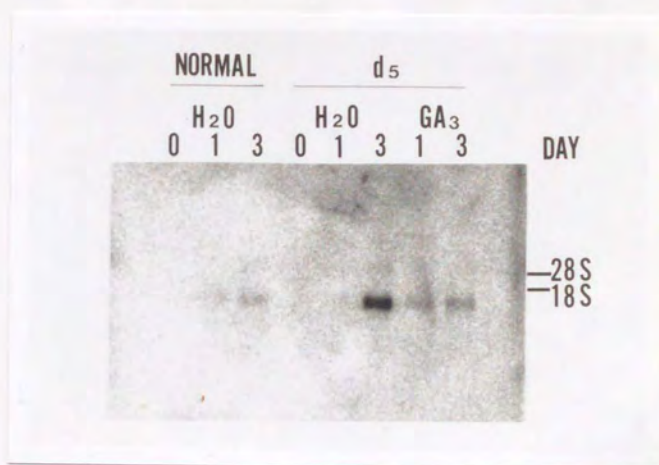


Fig. 35 Expression of the mRNAs for CCP2 in corn seeds of a dwarf cultivar (d₅) during germination in the presence of H₂O or GA₃

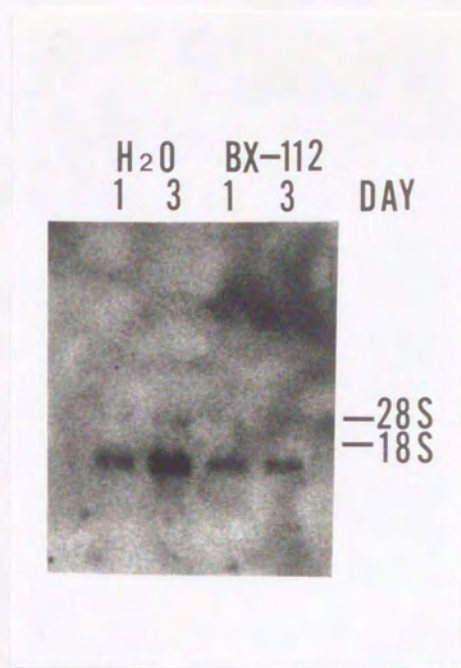


Fig. 36 Expression of the mRNAs for CCP1 in corn seeds of a BX-112 treated normal cultivar (koshiyu) during germination

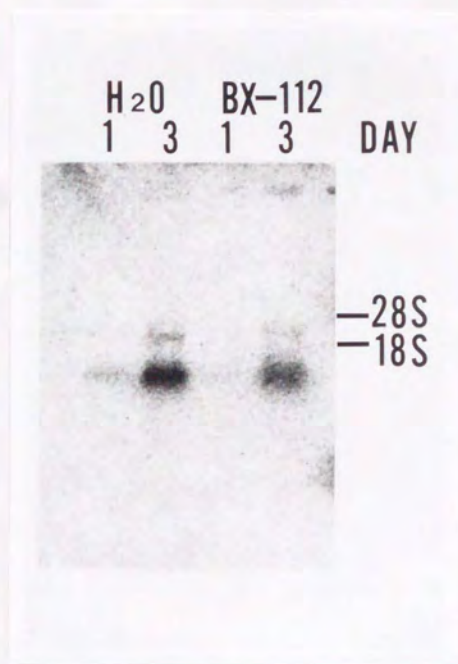


Fig. 37 Expression of the mRNAs for CCP2 in corn seeds of a BX-112 treated normal cultivar (koshiyu) during germination

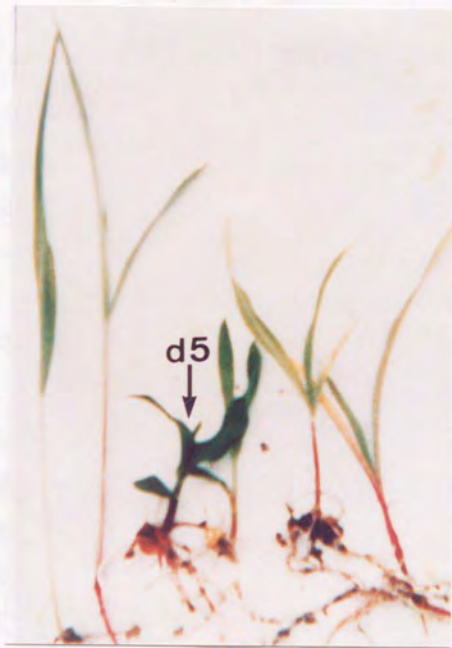


Fig. 38 Corn plant of dwarf cultivar (d5)

第5節 トウモロコシ種子中に存在する数種類のシステインプロ テイナーゼ

1 緒言

トウモロコシ種子中に存在するCPとしてCCP1およびCCP2について検討を続けてきたが、これ以外にも数種類のCPが存在し、登熟過程でのプロセッシングや、発芽過程でのプロテオリシスに関与していると考えられる。著者らは、トウモロコシ種子中に数種のCPが存在する事を酵素レベルでの研究で確認している。本研究に於いても、CCP1 mRNAとCCP2 mRNAの登熟過程および発芽過程での発現の時期が異なっていることがノーザン分析で証明されている。発芽過程でのプロテオリシスのスタートとして、登熟過程で準備されているCPが暴走しないように、この時期でのCPの種類と量を最小限にして発芽が進むにつれてその時期により適したCPが次々と発現するという事は非常に合理的なことだと考えられる。そこでこれまで検討を続けてきたCCP1及びCCP2以外のCPの存在を確認し、その植物体での役割を解明するためにCCP1及びCCP2をプローブにして低ストリンジェントな条件でcDNAライブラリーよりクローニングを行い、得られたクローンについて解析を試みた。

2 材料および方法

2-1 材料

cDNAライブラリーは第1節で作製したものをを用いた。

トウモロコシ種子は前実験と同様に正常種として「甲州」、矮性種としてd5を用いた。

ジベレリン (GA₃)、ジベレリン合成阻害剤BX-112も同じものを使用した。

2-2 方法

2-2-1 スクリーニング

CCP1 cDNAおよびCCP2 cDNAをプローブにして、第1節と同様に行った。

2-2-2 ノーザン分析

ノーザン分析試料の作製およびノーザン分析は第2節と同様に行った。

3 結果

3-1 スクリーニング

cDNAライブラリーよりCCP1およびCCP2を比較的 low stringency 条件 (ハイブリダイゼーション 55°C、洗浄 2XSSC/0.1% SDS 55°C) でハイブリダイゼーションを行い、50万プレートからCCP1とあるいはCCP2と弱くクロスするクローンを数10個選出し、単一プレートとして分離し、ファージDNAを精製した。ファージDNAをEcoRIで消化した後、pUC18サブクローンをした。

3-2 制限酵素地図の作製

得られたプラスミドを各種の制限酵素で処理し作製した制限酵素地図の異なる5種を、CCP16、CCP41、CCP64、CCP81、CCP84とした。このうちCCP1をプローブとして得られたものはCCP16のみで、残り4種はすべてCCP2をプローブとして得られたものである。

3-3 塩基配列と推定アミノ酸配列

上記5種のプラスミドについて塩基配列 (部分塩基配列) を調べたところ、CCP41はCP特有の配列部分を有しCPであると推定されたが、他はCPと異なると思われる配列であった。

3-4 発芽期に於ける mRNA の発現様式と植物ホルモン (GA₃および ABA) による影響

これら5種について発芽期に於けるmRNAの発現様式とGA₃およびABAによる影響を調べたところFig.39に示す結果を得た。CCP16は完熟乾燥種子にわずかに発現し、発芽1日目ではCCP1より強く発現しそのまま7日目迄継続していた。GA₃では発現が誘導されず、ABAが存在すると発現が弱くなっていた。CCP2をプローブにして得たCCP41、CCP68、CCP81はCCP2とよく似た発現様式を示し、この分析結果からはホルモンの影響は見られなかった。しかしながら、同じようにCCP2をプローブにして得たCCP84はmRNAの発現様式が他とは大きく異なっており、特にGA₃およびABAによる影響が異なっていた。このFig.39に示すノーザン分析からもホルモンの影響を受けることが示唆されていた。

3-5 CCP84についての検討

CCP84は、Fig.39に示すようにCCP2をプローブにして得た他のCCP41、CCP68、CCP81とは異なり、完熟乾燥種子にすでに発現しており、発芽第1日目でかなり強くなり、3日目には弱くなり7日目迄弱いながら発現が続いていた。GA₃存在下では、1日目は水の場合と同程度に強く発現していたが、2日目には更に発現が強まり、5日目になって弱くなった。つまり、GA₃によって強い発現が保持されたことになる。ABA存在下では、強い発現が1日目から7日目迄続いていた。この様にホルモンの影響を受けることが示唆されたので、CCP84についても、矮性種(d5)およびジベレリン合成阻害剤BX-112を用いてジベレリンの影響を検討した。Fig.40に示す様にCCP1およびCCP2よりもGA₃添加効果があった。BX-112についても1日目は殆ど発現しない程の阻害効果があらわれた。(Fig.41)次いで登熟期における発現様式、乾燥による影響も検討したところ開花と共に発現し徐々に強まり完全まで継続し完熟乾燥種子では幾分弱まっていた。また乾燥により幾分弱まってい

た (Fig.42)、(Fig.43)。さらに、このCCP84の全塩基配列およびその推定アミノ酸配列を調べ相同性について検索を試みたところ、シロイヌナズナ中の未知物質(71%)、線虫(*C. elegans*)の第3染色体の遺伝子解析の際見いだされたラミニンレセプター様物質と部分的に相同性が高かった(Wilson *et al.*, 1994)。

考察

イネ種子をはじめ穀実には数種のCPが存在し登熟過程でのプロセッシングや発芽過程でのプロテオリシスに関与していると考えられている。トウモロコシ種子にも同様に数種のCPが存在しさまざまな生理作用に関わっているのであろうとの考えを基に検討を続け、CCP1およびCCP2存在を確認した。これらトウモロコシ種子のCPもオリザインやアリュールレインの様に植物ホルモンの影響を受けることがわかった。一般に植物ホルモンのうち、GAによって誘導を受けるものはABAによって阻害される。すなわちGAとABAは拮抗作用をするとされている。しかしながら、CCP1およびCCP2については必ずしもそれがあてはまらないと思えるが、ABAについての検討が不十分であるため断定できない。GAやABA以外にもオーキシシン、サイトカイニン、エチレンといった植物ホルモンが存在しさまざまな生理現象に関与している。トウモロコシ種子についても、これらのホルモンについて検討することにより種々のCPの役割がより明確になると思われる。そこで、この2種のCP以外にこれらのホルモンの影響をより大きく受けるCP存在を確認するために、cDNAライブラリーよりCCP1およびCCP2をプローブにしてそれぞれに弱くクロスするクローンを集め解析を試み、5個のクローン得た。このうち、CPをコードするものは1個(CCP41)だけであった。これらのうち2個(CCP16およびCCP84)以外はホルモンの影響を受けると判断できなかった。CCP16はGA₃の影響は認められなかったが、ABA存在下ではmRNAの発現が抑えられていた。また、CCP84はmRNAの発現様式が他とは大きく異なっていると共にGA₃及びABAの影響も受けることが示唆された。、そこでこのCCP84について更に詳細な知見を得るべく検討を試み、全塩基配列とその推定アミノ酸配列の検索から、シロイヌナズナの未知物質と、線虫(*C. elegance*)の第3染色体の遺伝子解析に於けるラミニンリセプター様物質の一部が浮かび

あがった (Wilson *et al.*, 1994)。このラミニンリセプターは、近年細胞接着に関して注目されているものの一つである (Mecham, 1991; Engel, 1992)。この細胞接着に関連する物質は、動物細胞を中心に検討されてきたが、最近植物細胞にも類似の物質らしきものが存在することが報告されている (Axelos *et al.*, 1993; Garcia-Hernandez *et al.*, 1994)。これらのことも考慮に入れ、CCP84について更なる知見を得る為に、現在このCCP84をプローブにしてトウモロコシ種子のゲノムライブラリーよりスクリーニングを行い、数個の陽性クローンを得たので解析を行っている。

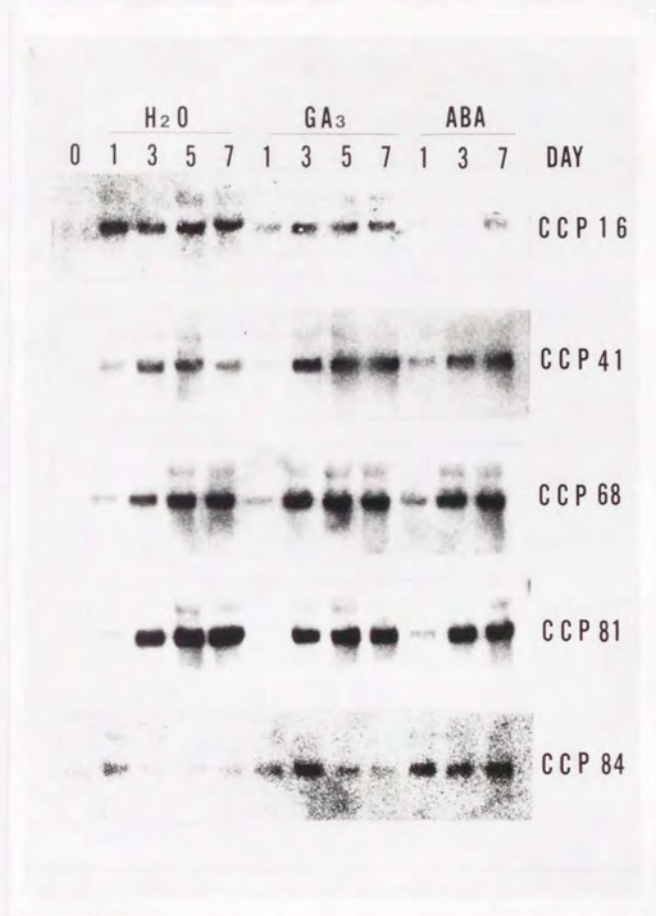


Fig. 39 Expression of the mRNAs for the other CCPs in corn seeds (cv Koshiyu) during germination in the presence of H₂O, GA₃ or ABA



Fig. 40 Expression of the mRNAs for CCP84 in corn seeds of a dwarf cultivar (d5) during germination in the presence of H₂O or GA₃

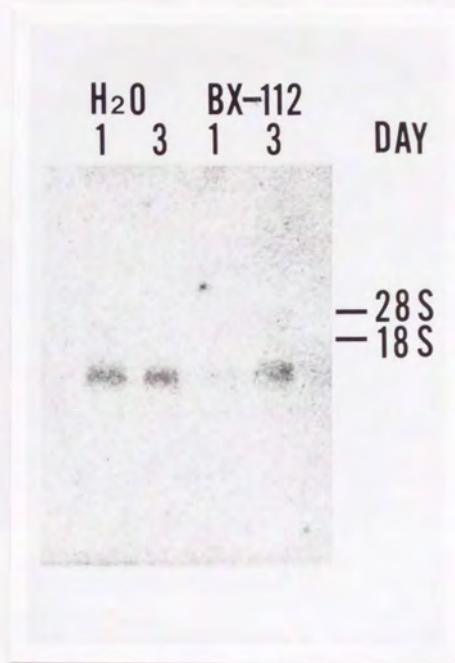


Fig. 41 Expression of the mRNAs for CCP84 in corn seeds of a BX-112 treated normal cultivar (koshiyu) during germination

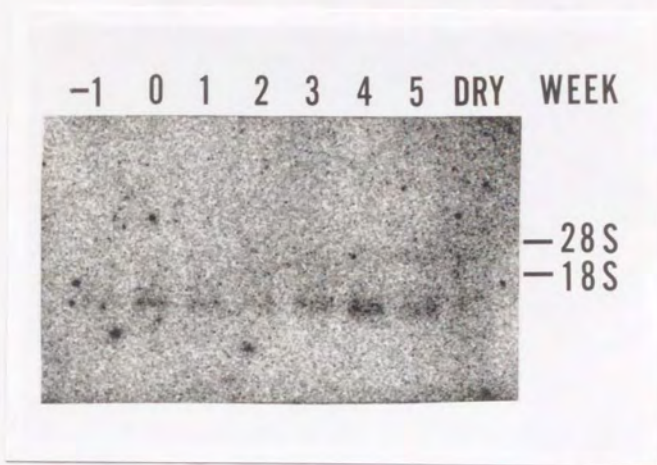


Fig. 42 Expression of the mRNA for CCP84 during maturation

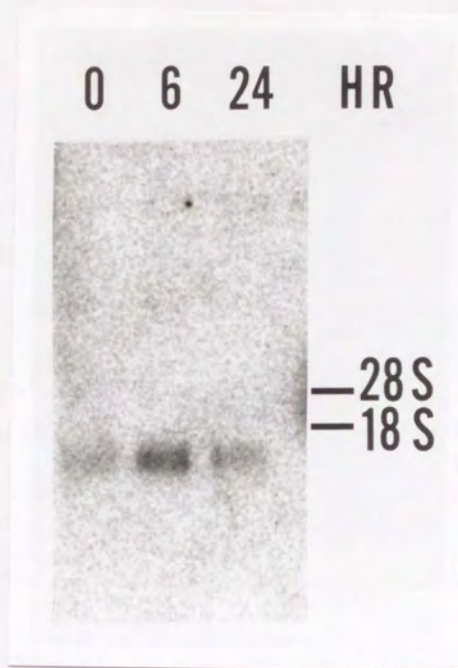


Fig. 43 Expression of the mRNA for CCP84 under dry stress

総括

1. トウモロコシシスタチンの一次構造とその生理作用

植物に存在するプロテイナーゼインヒビターのうち、Abeらはイネ種子中に初めてタンパク質システインプロテイナーゼインヒビター（シスタチン）の存在を確認し、オリザシスタチンI（OC-I）およびオリザシスタチンII（OC-II）と命名した。このオリザシスタチンの一次構造および遺伝子構造が従来のファミリー1、2、3シスタチンのそれに一致しないことから、シスタチンスーパーファミリーの中に植物シスタチン（phytocystatin）ファミリーを新設すべきであると提唱している。Abeらはより多くの実例を得るために、コムギおよびダイズ種子についても検討を行い、それぞれの種子中にシスタチンを見いだしておりいずれも植物シスタチンに属することを確認している。

本研究ではトウモロコシ種子にターゲットを絞り、この点について考察した。その結果トウモロコシ種子中には複数種のシスタチンが存在することを示し、これらの一次構造はオリザシスタチン、コムギシスタチン、ダイズシスタチンと同様で、植物シスタチンファミリーに属するものであった。次いでトウモロコシシスタチン遺伝子の構造を解析したところ、イントロンの数、挿入の位置がオリザシスタチン遺伝子と非常によく類似していることが確認された。この結果からも植物シスタチンファミリーに帰属する1例が追加されたことになる。しかしながら、トウモロコシシスタチン遺伝子の5'上流域について、他のシスタチン遺伝子のそれらと比較して見ると相同性が低いことがわかった。一般に動植物細胞の遺伝子は、その上流部分に発現領域を持ち、特有の構造を持っている。これは多細胞生物として複雑な遺伝子機能の調節が必要であることを反映していると考えられている。OC-IとOC-IIは、登熟過程に発現するという点では一致するが、OC-Iは開花後2週目に特異的に発現し、完熟

種子には全く発現していないのに対して、OC-I Iは開花後1週目に特異的に発現するものの、全登熟過程に発現しており、発現様式が異なっている。この両者の遺伝子の5'上流域の相同性も低いことが確認されている。本研究で明らかにしたトウモロコシシスタチン遺伝子はOC-IおよびOC-I I遺伝子と5'上流域の相同性は全く見られなかった。さらに、既知のトウモロコシ由来遺伝子とも上流域での相同性がなくこの上流域の意義を今後検討する必要があると思われる。

トウモロコシシスタチンには他の植物シスタチンと異なり、シグナル配列が存在していた。これは、ヒトシスタチンCの26アミノ酸から成るシグナルペプチドがプロセシングされて成熟化する (Abrahamson *et al.*, 1987) と同様にプロセシングされる可能性を示している。このようにトウモロコシシスタチンはシグナルペプチドを有することより、細胞中の特定部位への輸送が考えられる。種子中ではアリューロン層、胚中に局在している (後述) が、その植物生理的意味を今後解析する必要があるであろう。

一般に植物種子は多種多様なプロテイナーゼインヒビターを含んでいる。これらは種子内固有のプロテイナーゼを標的にして、種子登熟過程でのタンパク質のプロセシング、発芽過程での貯蔵タンパク質のプロテオリシスの調節や、外来プロテイナーゼを標的にし、昆虫、細菌、ウイルスなどからの防御に関与すると考えられている。事実、Kurodaらは大腸菌で発現させ精製したOC-IおよびOC-I I、2つのトウモロコシシスタチン (CC-IおよびCC-I I) およびダイズシスタチン (soyacystatin) が抗ポリオウイルス効果を持つことを確認している。

トウモロコシシスタチンは、カテプシンB、カテプシンHおよびカテプシンLのいずれに対してもオリザシスタチンよりも阻害活性が大きく、特にカテプシンLに対しては1-2桁程度大きい (CC-Iの K_i 値: 1.7×10^{-8} 、CC-I Iの K_i 値: 1.1×10^{-10} 、OC-Iの K_i 値: 5.1×10^{-9} 、OC-I Iの K_i 値: 3.9×10^{-8})。

このことからトウモロコシシスタチン（特にCC-I I）は強力なシステインプロテイナーゼインヒビターであることが示唆された。この知見をもとに、現在CC-I Iをイネのプロトプラストへ導入し、植物体の再生、外来シスタチンを高度に発現するイネ種子の選抜を試みている。この種子を用いて防御活性の検証を行うことにより、上記知見がより明確になると考えている。

シスタチンの生理作用を解明する上でシスタチン生成の時期および種子内の局在性を確認することは極めて重要である。Kondoらはイネ種子の登熟および発芽過程におけるオリザシスタチンの消長を検討し、登熟過程においてはグルテリンを主成分とする貯蔵タンパク質の生合成に先立ち、開花3-4週目に生合成が完了し、逆に発芽過程においては他の生体構成成分よりも先に分解消失することを報告している。これはシスタチンの役割が、発芽の制御すなわち貯蔵タンパク質がプロテイナーゼによって偶発的に分解されるのを制御することにあるとしている。また、発芽過程において他の生体構成成分よりも先に分解消失することは逆にプロテイナーゼの作用を阻止しないためであろう。登熟過程でのトウモロコシシスタチン（CC-I）mRNAの発現様式を調べたところ、開花前1週目より発現が始まり2種目に強くなりそのまま完熟時まで継続していた。すなわち、CC-Iもオリザシスタチンと同様に貯蔵タンパク質に先立って生合成されていることを示唆している。

CC-Iの抗体を用いてトウモロコシの完熟種子および完熟乾燥種子についてCC-Iの局在性を調べたところ、両者ともにアリュuron層および胚に局在していることが確認された。アリュuron層は種子表面部に位置し形態学的には胚の一部であり、発芽時生成あるいは活性化されるプロテイナーゼやアミラーゼ等の加水分解酵素が存在することが知られている。Watanabeらはイネ種子のCPであるオリザイン α および β がアリュuron層に局在していることを確認している（未発表）。トウモロコシのCPがオリザイン α および β と同様にアリュuron層に局在していると仮定すると、プロテイナーゼとインヒビ

ターが同一場所に存在することになり、極めて興味深い。これについてはトウモロコシCPの局在性についての検討が不可欠である。またCC-Iが種子表面部に位置するアリュuron層に局在するということは外来プロテイナーゼすなわち昆虫、細菌、ウイルスなどからの防御という意味でも興味深いことである。これまでに得られた知見により、トウモロコシ種子中にもイネを始めとする他の穀実と同様に複数種のシスタチンが存在し異なった生理作用に関与していることが確認された。

2. トウモロコシCPの一次構造とその生理作用

CPの役割は主として、種子登熟過程でのタンパク質のプロセッシング、発芽過程での貯蔵タンパク質のプロテオリシスに関与することであるが、最近では温度や光といった環境ストレスにも対応していることが報告されている。穀実に存在するCPとしては、オオムギ種子のアリュuron層にアリュレインが存在することを、またWatanabeらはイネ種子中に3種のCP（オリザイン α 、 β および γ ）が存在することをいずれもcDNAクローニングにより確認している。一方、Abeらはトウモロコシ種子中には数種類のCPが存在し、トウモロコシ種子の主要タンパク質であるツエインの分解機構に関与していることを、酵素学的研究において報告している。

第2章ではシスタチンと相互作用するであろうトウモロコシ種子CPについてクローニングを行った。トウモロコシ種子中にもイネ種子と同様に複数種のCP（CCP1およびCCP2）の存在を確認した。これらの一次構造を解析したところCCP1は穀実に存在するいずれのCPとも類似しておらず、最近乾燥によってその発現が誘導されるエンドウマメの葉茎のPea 15aおよびシロイヌナズナの葉茎RD19と高い相同性を示し、CCP2はアリュレインおよびオリザイン γ と高い相同性を示した。この一次構造の相違はAbeらが報告しているような単なるプロテオリシスの対象となる基質の違いを示しているの

はなく、他の異なった生理作用に関与していることを示唆していると考え、登熟期及び発芽期におけるこれらC P m R N Aの発現様式について検討した。C C P 1は登熟の初期に発現しその後強くなり4週目以降は幾分弱まり乾燥種子にも同程度発現しており、発芽1日目で強くなり3日目でピークになり7日目まで継続していた。このようにC Pが登熟の初期に発現することは、この時期にツェインなどの貯蔵タンパク質の成熟化や蓄積が生ずることから、これらを調節するプロセシング酵素に関与していることが考えられる。あるいは受精後の花粉の処理などへの関与を示唆していることも考えられる。Shinozakiらは乾燥等のストレスで細胞構造が破壊されたり、膜を通してイオンや溶質が漏れたりすることにより、タンパク質の部分的変性が起こるので、変性タンパク質を除去し細胞を正常に保つために、あるいは乾燥等のストレスで光合成能が極端に低下するため、これら不要のタンパク質を分解し、タンパク質合成の素材となるアミノ酸を供給といった代謝回転のためにRD19のようなC Pが働くと推定している。C C P 1 m R N Aの発現は乾燥ストレスによって誘導されないことが確認されており、C C P 1はRD19やPea 15aとは発現機構は異なるものと考えられる。しかしながら、成熟化部分の構造は非常に相同性が高く（それぞれ79%および72%）、プロテイナーゼとして作用する場合その活性はRD19やPea 15aと極めて近い挙動を示すことが考えられる。従ってC C P 1もRD19やPea 15aと同様に細胞内で不要になったタンパク質の分解に関与しているとも考えられる。

C C P 2は登熟の初期にわずかに発現するものの、後期および乾燥種子には存在せず、発芽第1日目で発現が始まり2日目に強くなり5日目にピークになり7日目まで継続し、C C P 1とは明らかに発現様式が異なっていた。また、C C P 2はアリュウレインおよびオリザイン γ との相同性が高いことから、このC Pは主として貯蔵タンパク質のプロテオリシスに関与していると考えられる。C Pの主要な役割である発芽過程での貯蔵タンパク質のプロテオリシス

に関与という観点から見ると、CCP1に続いてCCP2が発現するというこ
とは極めて合理的である。発芽過程でのプロテオリシスを効率良くスタートさ
せるために登熟過程で準備されているCPが暴走しないように、この時期での
CPの種類と量を最小限にし、発芽が進むにつれてその時期により適したCP
が次々と発現すると考えられるからである。この時期のCPの制御（とくにC
CP1の制御）にシスタチンが関与していると考えられる。すなわちCCP1
とシスタチンは同時期に発現しており、シスタチンの標的酵素に成り得ると考
えられる。また、基質となるツエインの多様性という点からも、より適したC
Pが次々と発現するという考え方には妥当性がある。また、この推論が的を射
ているとすると、CCP1およびCCP2以外のCPが存在することになる。
そこでCCP1およびCCP2以外のCPの存在を確認するためにCCP1お
よびCCP2をプローブに低ストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーシ
ョンを行い、得られたクローンについて解析を行っている。

アリュレーインやオリザインはいずれも植物ホルモンであるジベレリン
(GA)によってその発現が誘導され、発芽期での種子貯蔵タンパク質の分解
に関与していると考えられている。CCP1およびCCP2についてジベレリ
ン(GA₃)、アブシジン酸(ABA)の影響を調べたところ、正常種にGA₃や
ABAを添加して発芽させたものと、水だけで発芽させたものとはmRNAの
発現量の差は認められなかった。トウモロコシ種子中にはPhienneyらの示す
GA生合成系が存在することをHondaらが報告している。この生合成系によっ
て合成された内生ジベレリンの作用により添加効果が認められなかったと考え、
Varnerらがオオムギ無胚種子を用いてGA₃添加効果を示したことを参考に、ジ
ベレリン生合成の中心部位である胚を除去したトウモロコシ種子について検討
した。その結果、吸水後8時間後にコントロールの有胚種子に比べてわずかに
添加効果が認められた。そこで、GA生合成系がブロックされている矮性種(d
5)を用いての検討、及びジベレリンの合成阻害剤(BX-112)を用いての検

討を試みた。その結果、CCP1およびCCP2もジベレリンの誘導を受けるCPであることが確認された。ABAについては今後検討するつもりである。これら以外にもオーキシン、サイトカイニン、エチレンといった植物ホルモンがさまざまな生理現象に関与していることが他の植物について報告されている。今後はこれらについても検討する必要があると考えている。

CPの種子内での生理作用を解明するには種子内での局在性を検討する必要がある。酵素学的知見よりトウモロコシCPは、酸性下(pH3付近)で最も強い活性を示しており、このことは液胞中での条件と符合する。事実、CCP2はプロシークエンス中に液胞へのソーティングシグナルを持っており、CCP2が液胞に局在している可能性は高い。またトウモロコシシスタチンに関してはこれらもシグナル配列を有していることから、液胞への輸送も考えられる。いずれにしても、トウモロコシシスタチンと同時にトウモロコシCPの局在性を検討することは種子生理学的にも必須である。

以上、本研究は植物種子の生命活動に於いてきわめて重要なタンパク質分解のプロセスをトウモロコシ種子について、その担い手であるプロテイナーゼとインヒビターに照準を合わせて分子生物学的解明を試みたもので、タンパク質分解機構の理解の一助として寄与することができたと考えられると共に、新たな課題を得ることができた。今後、本研究から得た知見は、植物生理学、ひいては食糧生産のための基礎農学にも貢献できるものと期待される。

文献

- Abe, K. and Arai, S. (1985) *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3349
- Abe, K., Kondo, H. and Arai, S. (1985) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2763
- Abe, K., Kondo, H., Watanabe, H., Emor, Y. and Arai, S. (1991) *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 637
- Abe, M., Arai, S., Fjimaki, M. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 893
- Abe, M., Abe, K., Kuroda, M. and Arai, S. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 993
- Abe, M., Abe, K., Domoto, C. and Arai, S. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, (4) 756
- Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I. and Lundwall, A. (1987) *FEBS Lett.* **216**, 229
- Akasofu, H., Yamauchi, D., Mituhashi, W. and Minanikawa, T. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 6733
- Akasofu, H., Yamauchi, D. and Minanikawa, T. (1990) *Nucleic Acid Res.* **18**, 1892
- Anderson, A.J. and Alocook, A.W. (1954) *Storage of Cereal Grains and Their Products*. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K. and Arai, S. (1995) *Eur. J. Biochem.* (in press)
- Aviv, H. and Leder, P. (1972) *Proc. Natl. Sci. USA* **69**, 1408
- Axelos, M., Bardet, C. and Lescure, B. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 299
- Bjorck, K., Akesson, P., Trojnar, J., Adrahamson, M., Olafsson, I. and Grubb, A. (1989) *Nature* **337**, 385
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, V., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J. and Turk, V. (1988) *EMBO J.* **7**, 2593

- Brion, J.P., Van Den Bosh de Agullar, P. and Flament-Durand, J. (1985)
Advances in Applied Neurological Sciences (Traber, J. and Gispens, W.H., eds)
2, 164 Springer Berlin
- Cejudo, F.J., Murphy, G., Chinoy, C. and Baulcombe, D.C. (1992) *Plant J.* **2**,
937
- de Barros, E.G. and Larkins, B.A. (1990) *Plant Physiol.* **94**, 297
- Eipidina, E.V., Voskoboynikova, N.E., Belozersky, M.A. and Dunaevsky, Y.E.
(1991) *Planta* **185**, 46
- Engel, J. (1992) *Biochem.* **31**, 10643
- Everado, G.B. and Brain, A.L. (1994) *Plant Sci.* **99**, 189
- Fincher, G.B. (1989) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **44**, 305
- Garcia-Hernandez, M., Davies, E. and Stawick, P.E. (1994) *J. Biol. Chem.*
269, 20744
- Gravito, R.M., Rossman, M.G., Argos, P. and Eventoff, W. (1977) *Biochem.*
16, 5065
- Guerrero, F.D., Jones, J.T. and Mullet, J.E. (1990) *Plant Molecular Biol.* **15**,
11
- Gurb, A. and Lofberg, H. (1982) *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3024
- Hirado, M., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Niinobe, M. and Fujii, S. (1985)
FEBS Lett. **186**, 41
- Holwerda, B.C., Padgett, H.S. and Rogers, J.C. (1992) *Plant Cell* **4**, 307
- Homma, K., Kurata, S. and Natori, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15258
- Horiguchi, T. and Kitaguchi, K. (1971) *Plant Cell Physiol.* **12**, 907
- Hu, N.T., Peifer, M.A., Heidecker, G. and Messing, J. (1982) *EMBO J.* **1**,
1337
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, (1981) *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577

- Ishidoh, H., Imajoh, S., Emori, Y., Ohno, S., Kawasaki, K., Minami, Y., Kominami, E., Katunuma, N. and Suzuki, K. (1987a) *FEBS Lett.* **226**, 33
- Ishidoh, K., Towatari, T., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kominami, E., Katunuma, N. and Suzuki, K. (1987b) *FEBS Lett.* **223**, 69
- Ishidoh, K., Muno, D., Sato, N. and Kominami, E. (1991) *J. Biol. Chem.* **226**, 16312
- Jacobsen, J.V. and Chandler, P.M. (1987) *Plant Hormons and Their Role in Plant Growth and Development* (Davies, P.J.ed.) pp164, Martinus Nijhoff, Dordercht
- Jacquet, A., Kleinschmidt, T., Schnek, A.G., Looze, Y. and Braunitzer, G. (1989) *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **370**, 425
- Kambouris, N.K., Burke, D.J. and Creutz, C.E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21570
- Koehler, S.M. and Ho, T-H.D. (1990) *Plant Cell* **2**, 769
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tuji, H. and Shinozaki, K. (1993). *Gene* **129**, 6279
- Kondo, H., Emori, Y., Abe, K., Suzuki, K. and Arai, S. (1989a) *Gene* **81**, 259
- Kondo, H., Abe, K. and Arai, S. (1989b) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2949
- Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y. and Arai, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15832
- Kondo, H., Abe, K., Emori, Y. and Arai, S. (1991) *FEBS Lett.* **278**, 87
- Kondo, H., Ijili, S., Abe, K., Maeda, H. and Arai, S. (1992) *FEBS Lett.* **299**, 48
- Korant, B.D., Brzin, J. and Turk, V. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **127**, 1072

- Korant, B.D., Towatari, T., Ivannff, L., Petteway, S.Jr., Brizin, J., Lenarcic, B. and Turk, V. (1986) *J. Cell Biochem.* **32**, 91
- Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* **30**, 331
- Laycock, M.V., Mackay, R.M., Fruscio, M.D. and Gallant, J.W. (1991) *FEBS Lett.* **292**, 115
- Leamli, U.K. (1970) *Nature* **277**, 680
- Liang, C., Broolhart, G., Feg, G.H., Reek, G.R. and Kramer, K.J. (1991) *FEBS Lett.* **278**, 139
- Machleidt, W., Borchart, U., Fritz, H., Brzin, J., Ritonja, A. and Truk, V. (1983) *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* **364**, 1481
- Marks, M.D. and Larkins, B.A. (1985) *J. Biol. Chem.* **257**, 9976
- Marks, M.D., Lindell, J.S. and Larkins, B.A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 16451
- Matuoka, M. and Nakamura, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 834
- Matumoto, I., Watanabe, H., Abe, K., Arai, S. and Emori, Y. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 582
- Mecham, R.P. (1991) *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 71
- Mituhasi, W. and Minamikawa, T. (1989) *Plant Physiol.* **89**, 274
- Mottram, J.C., North, M.J., Barry, J.D. and Coombs, G.H. (1989) *FEBS Lett.* **258**, 211
- Ohkubo, I., Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H. and Sasaki, M. (1984) *Biochem.* **23**, 5691
- Okitani, A., Matuishi, M., Matumoto, T., Kamoshida, E., Sato, M., Matukura, U., Watanabe, M., Kato, H. and Fujimaki, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 377
- Ozawa, M., Laskowski, M. Jr. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3955

- Pears, C.J., Mahbubani, H.M. and Williams, J.G. (1985) *Nucleic Acid Res.* **13**, 8853
- Phinney, B.O. (1982b) *Plant Growth Substances* (Wareing, P.F. ed) Academic press, 683
- Phinney, B.O. (1984) *Plant Growth Regulators* (International Symposium)
- Podivinsky, E., Forster, R.L.S. and Grandner, R.C. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 8363
- Ray, C. and Mckerrow, H. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 239
- Ritonja, A., Machleidt, W. and Barrett, A.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **131**, 1187
- Ritonja, A., Rowan, A.D., Buttle, D.J., Rawlings, N.D., Turk, V. and Ballett, A.J. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 419
- Ritonja, A., Krizaj, I., Mesko, P., Kopitar, M., Lucovnik, P., Strukejji, B., Pungercar, J., Buttle, D.J., Barrett, A.J. and Turk, V. (1990) *FEBS Lett.* **267**, 13
- Rogers, J.C., Dean, D. and Heck, G.R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6512
- Rosenthal, P.J. and Nelson, R.G. (1992) *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 143
- Schaffer, M.A. and Fisher, R. (1988) *Plant Physiol.* **87**, 431
- Schechter, I. and Bergar, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157
- Shi, G.P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H. and Chapman, H.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 7258
- Strukelj, B., Pungercar, J., Ritonja, A., Krizaji, I., Gubensek, F., Kregar, I. and Turk, V. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 4605
- Strukelj, B., Pungercar, J., Mesko, P., Barlic-Maganja, D., Gubensek, F.,

- Kregar, I. and Turk, V. (1992) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**, 447
- Suh, S.-G., Peterson, J.E., Stiekema, W.J. and Hannapel, D.J. (1990) *Plant Physiol.* **94**, 40
- Suzuki, K. (1987) *Trens Biochem. Sci.* **8**, 167
- Suzuki, K. (1991) *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 483
- Takahasi, N., Kurata, S. and Natori, S. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 153
- Turuk, V., Brzin, J., Longer, M., Ritonja, A., Eropkin, M., Borchart, U. and Machleidt, W. (1983) *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* **364**, 1487
- Varner, J.E. (1964) *Plant Physiol.* **39**, 413
- Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H. and Arai, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16897
- Watanabe, H., Abe, K., and Arai, S. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1154
- Watson, M.E.E. (1984) *Nuclie Acids Res.* **12**, 5145
- Whitaker, J.R. and Granum, P.E. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 156
- Wiederanders, B., Broemme, D., Kirschke, H., Kalkkinen, N., Rinne, A., Paquette, T. and Toothman, P. (1991) *FEBS Lett.* **286**, 189
- Williams, J.G., North, M.J. and Mahbubani, H. (1985) *ENBOJ.* **4**, 999
- Winsper, M.j., Preston, K.R., Rastogi, V. and Oask, A. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 480
- Wurtz, A. and Bouchut, E. (1979) *Compt. Rend.* **89**, 425
- Willson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fraser, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hiller, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kristen, J., Laisster, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C.,

- Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Roopra, A, Saunders, D., Shownkeen, R., Sims, B., Smaldon, N., Smith, A., Smith, M., Sonnhammer, E., Standen, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkison-Sproat, J. and Wohldman, P. (1994) *Nature* **368**, 32
- Yamagishi, M., Mitumori, C. and Kikuta, Y. (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 287
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urano, S. and Shinozaki, K. (1992) *Plant Cell Physiol.* **33**, 217
- Yamamoto, Y., Takimoto, K., Izumi, S., Toriyama-Sakurai, M., Kageyama, T. and Takahashi, Y. (1994) *J. Biochem.* **116**, 1330
- 高野泰吉、田中正武 (1989) 園芸植物大辞典 相賀徹夫編集 小学館
- 高橋登、倉田祥一郎、名取俊二 (1992) 生化学 64 717
- Phinney, B.O. 勝見允行 (1982a) 植物の化学調節 17 106
- 本多一郎 (1990) 東京大学農学部 修士論文
- 森嵩 (1995) 世界国勢図絵 国勢社
- 四方治五郎 (1985) 植物の化学調節 20 12

要旨

論文題目 トウモロコシ種子シスタチンおよび
システインプロテイナーゼに関する
分子生物学的研究

氏名 道本 千衣子

システインプロテイナーゼインヒビターであるシスタチンは動植物組織に広く存在し、シスタチンスーパーファミリーを形成していることが知られている。Abeらは、イネ種子中にオリザシスタチンが存在し、動物由来のシスタチンとは構造が異なることを報告し、従来のファミリー1、2、3から成るシスタチンスーパーファミリーのどれにも属さない別のファミリー (phytocystatin) に帰属されるべきものであると提唱し、より多くの実例を得るためにコムギ種子、ダイズ種子についても検討を試みシスタチン遺伝子について多くの知見を得ている。トウモロコシ種子についてもシスタチンcDNAの解析を行い、シグナル配列を持つ新しいシスタチンであることを既に報告している。このトウモロコシシスタチンについての詳細な知見を得ることを目的に第1章の研究を遂行した。次いでシスタチンの標的酵素と考えられるシステインプロテイナーゼ

(CP) についての検討を試みた。穀物種子に多種、多量に存在しタンパク質の合成および分解に深く関与しているCPについては、オオムギ種子のアリュールン層にアリュールンが存在することが遺伝子レベルで初めて確認された。これは植物ホルモンであるジベレリン (GA) によって発現が誘導され、発芽期での種子貯蔵タンパク質の分解に関わっているとされている。Watanabeらはイネ種子中に3種のCPの存在を確認し、オリザイン α 、 β および γ と命名した。オリザインもまた発芽過程でGAの誘導を受けることが明らかにされている。

トウモロコシ種子中には複数種のCPが存在し、主要タンパク質である数種のツエインの分解に関与していることが酵素学的研究により明らかにされている。しかしながら、遺伝子レベルでの報告は少なく、植物生理を理解する上で基礎的な知見を得ることを目的に第2章の研究を遂行した。

トウモロコシシスタチン (CC-I) を大腸菌中に発現させ、得られたシスタチンタンパク質を精製し、種々のCPに対する阻害活性を測定したところ、パバインを非拮抗的に阻害した ($K_i: 3.7 \times 10^{-8}$)。パバイン以外のCPについて検討したところ、カテプシンH及びカテプシンLに対しては強い活性 (それぞれ $K_i: 5.7 \times 10^{-9}$ および $K_i: 1.7 \times 10^{-8}$) を示し、カテプシンBに対しては比較的弱い活性 ($K_i: 2.9 \times 10^{-7}$) を示した。オリザシスタチン (OC-I、OC-II) と比較すると、パバインに対しては同程度であったがカテプシンBおよびカテプシンHにたいしてはオリザシスタチンよりも強い活性が認められた。

このCC-Iの種子中での局在性を抗体染色法を用いて調べたところ、アリュールン層と胚の部分が他の部分と比べて濃く染色され、この部分に局在することが確認された。

トウモロコシ種子中にはCC-I以外に複数種のシスタチンが存在すると考え、更にクローニングを行い得られたクローンの塩基配列からCC-IIを得た。この二つのシスタチンは前半(N末端側)部分の相同性が低く(52%)、CPに対する阻害活性の傾向は似ているが、カテブシンLに対してはCC-Iに比べてかなり強く($K_i: 1.1 \times 10^{-10}$)、強力なインヒビターであると考えられる。現在このCC-IIをイネのプロトプラストへ導入し、イネ植物体の再生、外来シスタチンを高度に発現するイネ種子の選抜という、いわゆる植物分子育種の手法を試みている。

トウモロコシシスタチンについて更に詳細な知見を得るために、シスタチン遺伝子のクローニングを行い得られた遺伝子の解析を行った。全長約2.2k bpで134アミノ酸をコードしており70番目と71番目のアミノ酸の間に882 bpの第1イントロン、終止コドンの直後に162 bpの第2イントロンが挿入されており、3つのエキソンが2つのイントロンによって分断されていた。イントロンの挿入位置および数はオリザシスタチンと全く同じであり、Abeらが提唱しているファミリー4に属し、植物シスタチンが動物シスタチンと類型を異にするという実例の一つ追加したことになる。一方、5'上流域については相同性が低いことが示された。

CPについては、まずトウモロコシの発芽0、1、3、5、7日目の種子より λ gt10cDNAライブラリーを作製し、オリザインをプローブにスクリーニングを行い、得られた陽性クローンより制限酵素地図の異なるCCP1およびCCP2の解析を行った。CCP1は全長1311bpで371アミノ酸をコードし、CCP2は全長1382bpで360アミノ酸をコードしていた。両者とも活性中心となるC、H、Nを保存しておりCPであると判断した。CCP2にはオリザイン γ 、

アリュールインに見られる液胞へのソーティングシグナルと類似する配列 (NPIRPV) が存在したがCCP1には見られなかった。この二つのCPの相同性は低く(42%)、CCP1は乾燥によって発現が誘導されるエンドウマメのPea 15aおよびシロイヌナズナのRD19との相同性が高く(それぞれ72%および79%)、CCP2はオリザイン γ およびアリュールインとの相同性が高く(それぞれ87%および89%)、異なったタイプのCPであると考えられた。

登熟期および発芽期のmRNAの発現様式について検討した。CCP1 mRNAは開花と共に発現し、3週目に強くなりその後弱まり、完熟時には開花時程度になり、乾燥しても同程度で、発芽1日目で強く発現し3日目でピークになり7日目迄継続していた。つまり、CCP1は登熟期に弱いながらも発現し続けていることから、シスタチンと同一時期に発現していることになりお互いに相互作用し得る可能性が示唆された。CCP2は開花時わずかに発現が認められるが、登熟後半にも、完熟乾燥種子にも発現せず、発芽1日目に弱い発現が認められ5日目にピークになるなど、発現様式も異なり、機能的にもCCP1と異なると判断した。またCCP1とCCP2の局在生も異なるのではないかと考えられる。すなわち、CCP1はトウモロコシシスタチンの局在する胚およびアリュールン層に、CCP2は胚乳に局在する可能性がある。

次にこれらのCPについて植物ホルモンであるジベレリン(GA₃)およびアブジジン酸(ABA)の影響について検討したところ、1 μ MのGA₃およびABAで発芽させたものと水だけで発芽させたものとのmRNAの差は認められなかった。しかしながら、発芽すなわち吸水が始まると非常に強く発現することから、種子中で生合成される内生ジベレリンの影響が大きく、外からの添加による影響が見られなかったと考え、GA合成系がブロックされている矮性種(d5)お

よびGA合成阻害剤 (BX-112) を用いて検討した。CCP1 mRNA に対して、d5は正常種に比べ1日目の発現がかなり弱く3日目で同程度になったが、このd5をGA₃添加で発芽させたものは1日目から強く発現し、GAの誘導を受けることが認められた。BX-112については、BX-112を添加した方は発芽第1日目ではCCP1 mRNA発現がわずかに弱まる程度であるが、3日目にはかなり弱くなっていた。CCP2 mRNAは1日目にはかなり弱まり、3日目にはコントロールと同程度になった。

CCP1が乾燥によって誘導されるCPと相同性が高いことから、トウモロコシ種子を乾燥し発現状態を調べたところ変化は認められず、これらのCPとは別種のものであり、異なった役を担っていると考えられる。

トウモロコシ種子中に存在するCPとして、CCP1およびCCP2について検討を続けてきたが、他の穀実に見られるように、トウモロコシ種子中にもこれらのCP以外に数種類のCPが存在しており、種々の生理作用に関与し、ホルモンによる影響にも差があると考え、CCP1およびCCP2をプローブに低ストリンジェントな条件でスクリーニングを行い、得られたクローンの解析中である。

以上本研究において、トウモロコシシスタチン遺伝子を単離し構造の解析を行い、阻害活性、種子における局在性を明らかにし、プロテイナーゼインヒビターとしてのその生理作用を検討すると共に、シスタチンの標的酵素となり得るシステインプロテイナーゼについても、これらをコードするcDNAの構造を解析し、植物ホルモンによる作用機構について検討した。

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大学院農学生命科学研究科教授 荒井綜一先生に厚く御礼申し上げます。 研究全般にわたり、直接御指導を賜りました東京大学助教授阿部啓子先生には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。

また、数々の有益な御助言ならびに御指導を賜りました学習院女子短期大学教授阿部誠先生、東京大学助教授山口五十磨先生、東京大学助教授山根久和先生、東京大学助手渡辺寛人博士、岩淵京子博士、跡見学園短期大学の朝倉富子先生に厚く御礼申し上げます。

貴重なサンプルならびに有益な御助言を頂きました東京大学助手高野哲夫博士、大阪市立大学の上田純一先生、クミアイ化学工業株式会社の井沢典彦氏に厚く御礼申し上げます。

また日頃、御助言ならびに御協力を頂きました食糧化学研究室の皆様、跡見学園短期大学の今中正美氏に深謝いたします。

最後に、いつも暖かく見守り、励ましてくれた両親と、研究生生活を支えてくれた夫 道本徹、娘 薫、息子 智に感謝します。



inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



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

