

9747 タンパク質物性のモジュレーターとしてのシステインプロテアーゼ ・シスタチン系に関する酵素化学的・食品加工学的研究

助成研究者：阿部 啓子 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
共同研究者：松本 一朗 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

食糧種実のうちコムギは世界で消費量の最も多い穀物であり、小麦原料食品の加工工程で形成されるグルテン（グリアジンとグルテニンの混合物）の質的改良には国際的に膨大な研究努力が注がれてきた。にもかかわらず、その鍵を握るであろうプロテイナーゼとインヒビターの関与については、少なくとも分子レベルではほとんど研究されていない。本研究ではコムギシステインプロテアーゼとそのインヒビター、すなわちコムギシスタチン（WC）を対象として、タンパク質物性のモジュレーターとしてのシステインプロテアーゼ・シスタチン系に関する酵素化学的・食品加工学的研究を行った。

コムギ種子より4種類のCPを単離し、そのうちの1つであるグリアダインについて大腸菌での発現生産および組み換えグリアダインの生化学的諸性質の解析を行った。GST融合タンパク質発現プラスミドにprogliadainのコード領域を挿入し、GST-progliadain 発現プラスミドを構築した。これを大腸菌に導入し、IPTG誘導により発現させたところ、GST-progliadain は不溶性画分として得られたが、界面活性剤により可溶化させ、グルタチオアフィニティークロマトグラフィーにかけて単一な発現タンパク質として獲得した。得られたGST-progliadainについて酵素活性の検出を試みた結果、種子CPとして世界で初めて活性を保持した組み換え体を得ることができた。蛍光基質であるZ-Phe-Arg-MCAの分解活性を指標にして検出を行ったところ、至適pHは4.5付近であることが判明した。本酵素は、コムギ種子内在の貯蔵タンパク質の主成分であるプロラミン系貯蔵タンパク質グリアジンを効率よく水解し、発芽過程におけるプロテオリシスを担う主要な酵素であることが示唆された。次に、食塩（NaCl）0~3 M濃度下での組み換えグリアダインの水解活性を測定したところ、1M存在下でも相対活性56%と高い活性を保持した。また、3M NaCl下でも30%以上の活性が残存していることから、グリアダインは耐塩性のCPであることが判明した。一般に市販食パンのNaCl濃度は1.3%（0.2M）程度である。この場合グリアダインの相対活性は70%以上であり、パン加工を含めた食品工学的加工過程で充分実用可能であると思われる。

獲得したGST-progliadainのコムギシスタチンによる阻害活性の検討を行ったところ、効果的に阻害を受けることが判明した。このことからパン加工時にシスタチンを利用することによりグリアダインを適宜調節することが可能であること、また種子内でもグリアジン分解を担うグリアダインの調節をシスタチンが司っていることが十分推定された。

9747 タンパク質物性のモジュレーターとしてのシステインプロテアーゼ
・シスタチン系に関する酵素化学的・食品加工学的研究

助成研究者：阿部 啓子 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
共同研究者：松本 一朗 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

研究目的

タンパク質分解酵素のうちシステイン型プロテアーゼ (CPと略す) は、動物体内で代謝調節に深く関わる酵素として、最近、その存在が改めて見直されている。呼応して、CP を標的としてその活性を特異的に阻害するタンパク質であるシスタチンにも大きな関心が寄せられ、とくに医学・生理学分野では動物のさまざまなシスタチンについて詳しい研究が行われている。

私達は植物のシスタチン(1~3)を初めて見だし、コメ(4~6)、トウモロコシ(7)、ダイズ(8)、そしてコムギのシスタチンについて基礎と応用の両面からの研究を展開してきた。さらにこれらの食糧種実シスタチンが種子内で実際に標的とするCPについても、コメ、トウモロコシより数種類のCP(9,10)を単離し、各々のmRNAの時期特異的・部位特異的 発現パターンは互いに大きく異なることも解明している。

食糧種実のうちコムギは世界で消費量の最も多い穀物であり、小麦原料食品の加工工程で形成されるグルテン (グリアジンとグルテニンの混合物) の質的改良には国際的に膨大な研究努力が注がれてきた。にもかかわらず、その鍵を握るであろうプロテアーゼとインヒビターの関与については、少なくとも分子レベルではほとんど研究されていないまま今日に至っているのである。

こうした背景から、本研究ではコムギCPとして新たに見い出したgliadainとtriticain, それらのインヒビターであるコムギシスタチン (WCと略す) を対象として、タンパク質物性のモジュレーターとしての両者の相互作用系に関する酵素化学的・食品加工学的研究を行った。

研究方法

1. RNAの抽出

-80℃凍結したサンプル約3gをドライアイスと共にコーヒーミル中で粉碎し、RNA抽出緩衝液およびフェノールを加えて激しく振って混和した。さらに、クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて再び激しく振り、遠心して水層を回収した。同様の操作を3回繰り返した後、水層を合した。これに塩化リチウムを加えて遠心し、生じた沈澱を回収した。

2. cDNAライブラリーの作製

上記RNA抽出液をオリゴdTカラムに供し、mRNA画分を精製した。この画分からPharmacia社のcDNA synthesis kitを用いて合成したds cDNAにNot I-EcoRIアダプターを付加し、λgt10ベクターに導入した。

3. CPのcDNAクローニング

コメCPであるオリザイン α 、 β 、 γ (9)のcDNAインサートをEcoRIとHindIIIで切断し、生じた断片をアガロース電気泳動ゲルで分画し、それぞれを回収した。³²Pラベルしたプローブを用いて個々の回収画分に対してハイブリダイゼーションを行い、陽性プラークを選択した。

4. CPの大腸菌による発現生産

4.1. 発現プラスミドの構築と発現

Glutathione S-transferase(GST)-progliadin、GST-protriticain γ についてはそれぞれcDNAを鋳型としてsense側プライマー、antisense側プライマーでPCRを行ってcDNA断片を増幅し、pGEX-3Xベクターに連結し塩基配列を確認した。GST-triticain γ についてもPCRを行ってcDNA断片を増幅後、同様にpGEX-3Xベクターに挿入した。次いで大腸菌AD202株、YA21株を用いて形質転換を行った。

4.2. 発現産物の精製、活性の検出

形質転換株を培養し、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)で発現誘導後菌体を回収した。沈澱を懸濁後ザルコシルを加え、懸濁液の透明度が増加するまで超音波をかけて菌体を破碎した。次にトリトンを加えて、界面活性剤をザルコシルからトリトンへと移行させた。これを遠心して上清を回収し、試料溶液とした。

次にglutathione Sepharose 4B樹脂に試料溶液を吸着させた。0.2%トリトン/PBSでカラムを洗浄後、グルタチオン溶液で溶出し分取した。CP活性は以下のように

行った。酵素反応緩衝液に基質 (Z-Phe-Arg-MCA) 濃度 $10 \mu\text{M}$ 、適量の水を加え、反応溶液 $500 \mu\text{l}$ を調製した。精製した酵素を反応液中に添加し、10 分間、 37°C で反応させ、反応溶液と等量のエタノール/塩酸で反応を停止させた。励起波長 370 nm で発生する蛍光の 460 nm における強度を測定し、活性の指標とした。

4.3. GST-progliadain の WC による阻害活性の検討

CP インヒビター (WC61、WC92、卵白シスタチン、E-64) をそれぞれ $10 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 100 nM 、 10 nM の濃度で含有するストックを用意し、適量を酵素反応液中にあらかじめ添加しておき、蛍光基質の分解活性を指標にして活性を検出した。インヒビター無添加条件での蛍光強度を 100% とし、それぞれの残存活性を百分率で表してプロットし、 50% の残存活性を示すインヒビター濃度をグラフから読みとり、 IC_{50} とした。

4.4. GST-progliadain とコムギ種子内在の貯蔵タンパク質の相互作用

4.4.1 コムギ種子内在の貯蔵タンパク質の調製

コムギ種子を一旦 -80°C で凍結し、コーヒーマイルでドライアイスと共に粉碎した。ドライアイス昇華させた後、抽出溶液を加え室温で振盪した。遠心して上清を取り除き、沈澱に再び抽出溶液を加え同様の操作を 3 回繰り返す。抽出溶液に可溶性タンパク質を取り除いた。残った沈澱に水を加え軽く振り混ぜてから同様に遠心し、塩を取り除いた。最後に抽出液である 70% エタノールを加えて激しく振り混ぜてグリアジン画分を溶解し、遠心して上清を得た。これを凍結乾燥し、グリアジン画分 (プロラミン系タンパク質) を得た。グルテニン画分 (グルテリン系タンパク質)、グロブリン画分 (塩可溶画分)、不溶性タンパク質画分 (尿素可溶画分) は東京学芸大学教育学部田辺創一博士より供与して頂いた。

4.4.2 GST-progliadain によるコムギ種子貯蔵タンパク質の分解反応

200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 4.5$) / 0.2 M EDTA を $2 \times$ 酵素反応緩衝液とし、 β -メルカプトエタノールを最終濃度 2.5 mM になるように添加し、上述したタンパク質基質を 0.2% (v/w) になるように懸濁させ、GST-progliadain を 37°C で 12 時間反応させた。酵素無添加で 37°C 12 時間保持したものを対照とした。

研究結果

1. コムギ CP cDNA の単離およびその解析

1.1. コムギ種子mRNAの発現

コムギ種子におけるCPの発現パターンを観察するためにノーザン解析を行った。他の植物では発芽過程でCPの強い発現が観察されることから、コムギ種子の発芽0、1、2、3、5日目種子よりRNAを抽出した。各発芽段階の全RNA 10 μ g を泳動し、オリザイン α 、 β 、 γ のコード領域を含むcDNA断片をプローブとして用いて37°Cでハイブリダイゼーションを行った。 α 、 β については50°C、2 \times SSC、 γ については55°C、2 \times SSC/0.1% SDS で洗いを行ったところ、発芽1日目(まだ芽、根は見えない)に γ と強くクロスするバンドが検出された。また、 α 、 β についても弱いながらもクロスするバンドが検出された。

1.2. スクリーニングおよび塩基配列とアミノ酸配列の決定

1.2.1. プローブとしてオリザイン γ cDNAを用いて

約50万プラークからなるcDNAライブラリーを、オリザイン γ のコード領域を含むcDNA断片をプローブとして用いて55°Cでハイブリダイゼーションを、55°C、2 \times SSC/0.1% SDS 洗浄条件でスクリーニングを行ったところ、6個の陽性クローンを得た。これらのクローンについて制限酵素地図を作製したところ、すべて同じmRNA由来だと考えられた。そのうちの1つWCP122を解析したところ、Cys-His-Asnの触媒トライアドを有しており、CPをコードしていることが確認された。その推定アミノ酸配列はオリザイン γ およびアリュレーインのそれと高い相同性を示し、アミノ酸配列中には、液胞ターゲッティングシグナル(11)も存在していた。

一般に植物種子中には数種類のCPが存在し、貯蔵タンパク質のプロテオリシスを調節していると言われている。そこで、コムギ種子内のCPの動態を詳細に解析するため、さらにオリザイン β のコード領域を含むcDNA断片をプローブとして用いてスクリーニングを行うことにした。

1.2.2. プローブとしてオリザイン β cDNAを用いて

1.2.1.と同じcDNAライブラリーを、オリザイン β のコード領域を含むcDNA断片をプローブとして用いて50°Cでハイブリダイゼーションを、50°C、2 \times SSC/0.1% SDS 洗浄条件でスクリーニングを行ったところ、32個の陽性クローンを得た。解析の結果、得られた32個の陽性クローンはWCP122とは異なる3種類(WCP133、WCP92/WCP211、WCP81B)に大別され、各々種別のCPをコードすることが判明した。このうちWCP92とWCP211は塩基レベルで91.6%、アミノ酸レベルで95.8%ときわめて高い相関性を示した。

1.3. 既知のCPとのアミノ酸配列の相同性

2度のスクリーニングによって得られた4種類のCPについて既知のCPとアミノ酸配列を比較した。その結果、WCP133はオリザイン α と82.9%、WCP92/WCP211はオリザイン β と83.8%/83.4%、WCP122はオリザイン γ と82.4%と非常に高い相同性を示したことから、コムギの学名 (*Triticum*) に因んで、それぞれトリティカイン (triticain) α 、 β 1/ β 2、 γ と命名した。また後述するが、WCP81Bについてはグリアダイン (gliadain) と命名することにした。

トリティカイン α はシロイヌナズナのRD21A(12)と67.4%、オリザイン β と62.7%、ナタネCOT44(13)と60.7%の相同性を有していた。同様に、トリティカイン β はオリザイン α と65.0%、シロイヌナズナのRD21Aと60.7%、ナタネのCOT44と54.7%の相同性を有していた。トリティカイン γ はオオムギのアリュウレインと94.5%、トウモロコシのCCP2(10)と84.8%の相同性を有していた。グリアダインはオオムギのEP-B(14~16)と87.8%、ユリのSEN102(17)と58.7%、インゲンマメのEP-C1(18)と58.7%、ケツルアズキのSH-EP(19)と55.8%の相同性を有していた。これらすべてのCPについてアミノ酸配列の相同性を図1にまとめた。

2. コムギ種子CPの大腸菌での発現生産

2.1. コムギ種子CP発現プラスミドの作製

上述したようにトリティカイン γ (プロ領域からのものと成熟領域からのもの)、グリアダイン (プロ領域からのもの) について発現プラスミドを作製した。それぞれを大腸菌に導入し、IPTG誘導により発現させたところ、期待される分子サイズをもつ目的タンパク質はいずれも不溶画分として得られた。界面活性剤により可溶化させ、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーにかけて単一な発現タンパク質として獲得した。

2.2. 組み換えCP酵素活性の検出

2.2.1. トリティカイン γ

トリティカイン γ はカテプシンH様の活性を持つアリュウレインと相同性が高く、トリティカイン γ もカテプシンH様の活性を持つものと考えられたため、カテプシンHが特異的に切断する蛍光基質 Arg-MCA を用いて検出を行った。その結果、いずれのもの (プロ領域からのものと成熟領域からのもの) も活性を検出できなかった。

2.2.2. グリアダイン

グリアダインについてはカテプシンL様の活性を持つものと考えられたため、

カテプシンLが特異的に切断する蛍光基質 Z-Phe-MCA を用いて検出を行った。その結果、活性を保持した植物CPを組換え体として得ることができた。これは過去に報告例がなく、おそらく世界初の成果であると考えている。

2.3. 組み換えCPのpH依存性

酵素反応緩衝液を pH 2.5~7.0 まで 0.5 きざみでふって、GST-progliadain 活性の pH 依存性を検討したところ、至適 pH は 4.5 付近に存在することがわかった。

2.4. 組み換えグリアダインとWCの相互作用

上述したように植物シスタチンはカテプシンL様のCPを効果的に阻害することから、上記の組み換えグリアダインもカテプシンL様の活性を有していた。したがって植物シスタチンにより効果的に阻害されることが予想された。また、各種インヒビターの使用で、算出されたIC₅₀はいずれも10⁻⁸Mであった。

2.5. 組み換えグリアダインとコムギ種子内在の貯蔵タンパク質との相互作用

ノーザン解析、あるいはウェスタン分析により本酵素が発芽過程で著しく発現量が増大することが判明したが、この知見からグリアダインが貯蔵タンパク質のプロテオリシスを担う主要な酵素であることが予想された。そこで、実際にコムギ種子内在の貯蔵タンパク質を抽出し、グリアダインにより切断されるかどうかを検討した。その結果、貯蔵タンパク質の主成分であるグリアジン（プロラミン系貯蔵タンパク質）を効率よく水解することが判明した。本酵素をグリアダイン (gliadain) と命名した所以である。また、他の貯蔵タンパク質であるグルテニン、グロブリン、不溶性タンパク質についても同様の検討を試みた。その結果、グルテニンは、グリアジンほどではないが、一部切断されることが観察された (図 2)。

2.6 組み換えグリアダイン活性に関する塩濃度の影響

NaCl 0~3 M濃度での組み換えグリアダインの水解活性を測定したところ、1 M濃度でも相対活性 56.2%と高い活性を保持した。また、3 M濃度でも30%以上の活性が残存していることから、グリアダインは耐塩性のCPであることが判明した。

一般に市販食パンのNaCl濃度は1.3% (0.2M)程度である。この場合グリアダインの相対活性は70%以上であり、パン加工を含めた食品工学的加工過程で充分実用可能であると思われる。

考察

本研究で4種類の新規のCPのクローニングに成功した。そのうち、トリテイカン α 、 β はコメのオリザイン α 、 β 、とそれぞれ非常に高い相同性を有しており、これらはオリザイン α 、 β 、のカウンターパートである可能性が高い。同様に、トリテイカン γ はアリュレーイン、オリザイン γ のカウンターパートであると考えられる。また、グリアダインもオオムギのEP-Bと非常に高い相同性を有しており、これもEP-Bのカウンターパートであると考えられる。

これら4種のCPはいずれもN末端側にシグナル配列を有しており、このことから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。また、シグナル配列の後にはプロペプチドも有しており、他のCPと同様に不活性なプロテイナーゼ前駆体で合成されることが示された。

植物種子として初めて活性を保持した状態で組換えCPを獲得することができた。グリアダインはコムギ種子中で最もメジャーに発現しているCPであり、発現量が増大すること、また、抗体染色の結果においては発芽期の壊れたプロテインボディーの近辺に存在が確認されたこと、これらの状況証拠により、発芽期の貯蔵タンパク質のプロテオリシスを担うことが十分予想できた。本研究で、獲得した組換えグリアダインが *in vitro* での実験ではあるが、実際にコムギ種子の最もメジャーな貯蔵タンパク質であるグリアジンを分解したという事実は非常に興味深いことである。

グリアジン以外のタンパク質であるグルテニンは4% 酢酸可溶画分として、グロブリンは1M 塩可溶画分として分画されたものである。グリアダインはグロブリンを全く切断しなかったが、グルテニンはある程度切断した。グリアダインは発芽過程において貯蔵タンパク質(グリアジン)のプロテオリシスに関与していることから、コムギ食品特有のタンパク質(グルテン)の品質改良、あるいは食品加工過程、例えば製パン行程等での利用の余地が大いにあると考えられる。さらに食品加工上都合のよい種類のCPを適量含むような小麦の分子育種も可能であり、安定した品質の穀物の供給に寄与できると期待される。

謝辞

本研究は財団法人ソルトサイエンス研究財団の助成により行われた。

文献

1. Abe, K. and Arai, S. (1985) *Agric. Biol. Chem.* **49**, 4439

2. Abe, K., Kondo, H., and Arai, S. (1987a) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2763
3. Abe, K., Kondo, H., and Arai, S. (1987b) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1509
4. Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, S., and Arai, S. (1987c) *J. Biol. Chem.* **262**, 16793
5. Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y., and Arai, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15832
6. Abe, M., Abe, K., Kuroda, M., and Arai, S. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 933
7. Abe, M., Abe, K., Iwabuchi, K., Domoto, C., and Arai, S. (1994) *J. Biochem.* **12116**, 488
8. Misaka, T., Kuroda, M., Iwabuchi, K., Abe, K., and Arai, S. (1996) *Eur. J. Biochem.* **240**, 609
9. Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H., and Arai, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16897
10. Domoto, C., Watanabe, H., Abe, M., Abe, K. and Arai, S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1264**, 241
11. Holwerda, B.C. and Rogers, J.C. (1991) *Plant Physiol.* **99**, 848
12. Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., and Shinozaki, K. (1993) *Gene* **129**, 175
13. Dietrich, R.A., Maslyar, D.J., Heupel, R.C., Harada, J.J. (1989) *Plant Cell* .1, 73
14. Koehler, S. and Ho, T-H. D. (1988) *Plant Physiol.* **87**, 95
15. Koehler, S. and Ho, T-H. D. (1990) *Plant Physiol.* **94**, 251
16. Koehler, S. and Ho, T-H. D. (1990) *Plant Cell* .2, 769
17. Valpuesta, V., Lange, N.E., Guerrero, C., Reid, M.S. (1995) *Plant Mol Biol.* **28**, 595
18. Ogushi, Y., Tanaka, T., Yamauchi, D., and Minamikawa, T. (1992) *Plant Mol. Biol.* **19**, 705

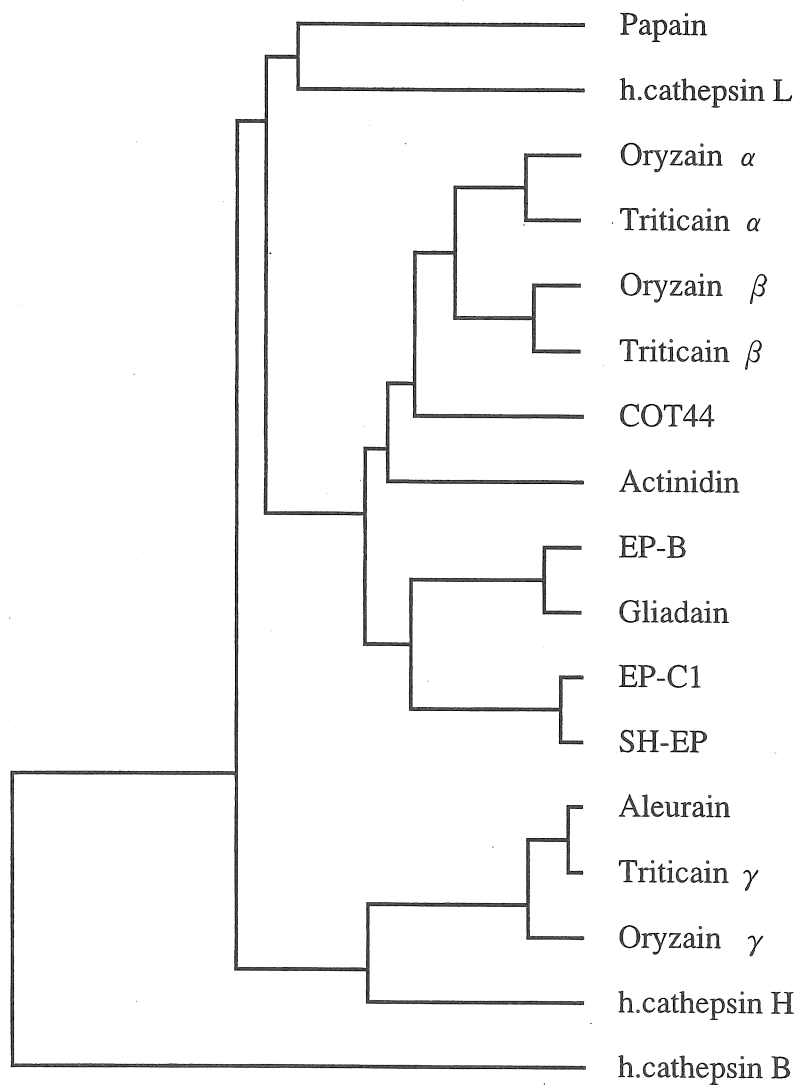


図1 パパインファミリーのシステインプロテイナーゼの系統樹

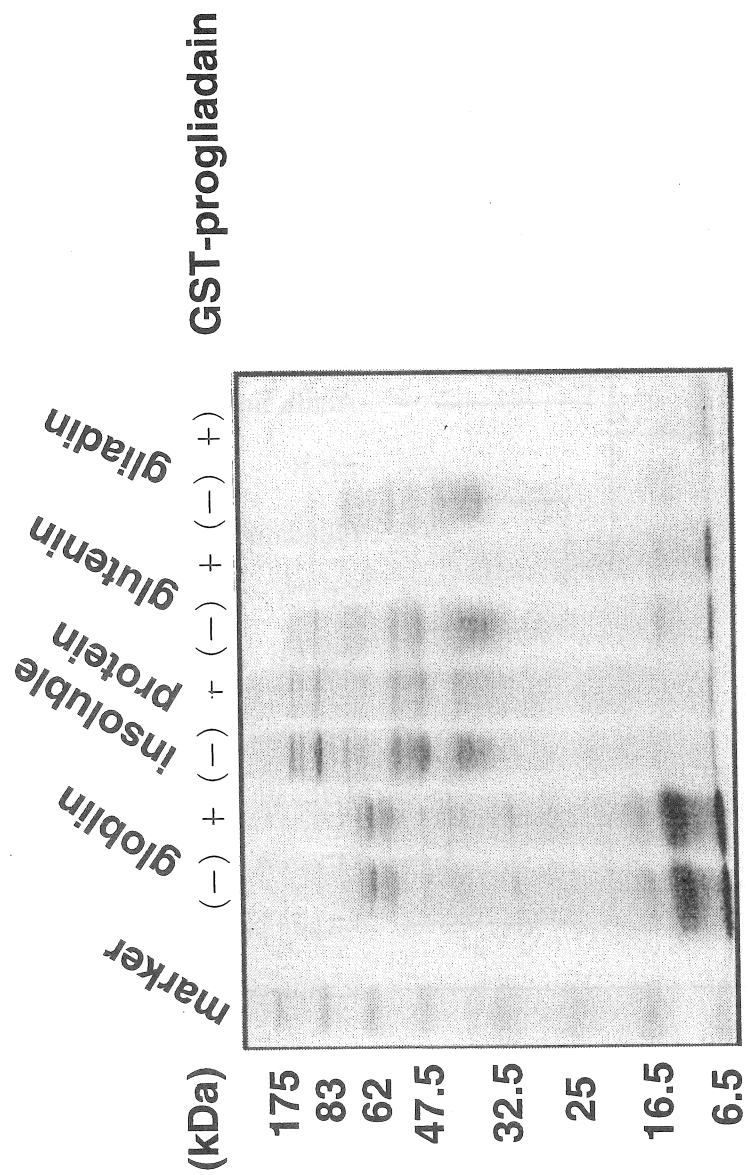


図2 組換えグリアダインによる小麦貯蔵タンパク質の分解様式

Cysteine Protease-Cystatin System As a Modulator for Physical Properties of Proteins: A Study from the Aspect of Enzyme Chemistry and Food Processing

Keiko Abe and Ichiro Matsumoto

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Among a variety of food legumes, wheat is one of these which are most abundantly produced and most popularly consumed in the world. A great deal of research endeavors have been made so far to improve the quality of gluten, a mixture of gliadin and glutenin, which forms during the processing of wheat-based foods. Despite that, no extensive studies have been conducted, at least from a molecular aspect, on wheat proteases and their inhibitors that may serve as key factors involved in the processing. With this as a background, we noticed wheat cysteine proteases and their inhibitors, cystatins, and started a food-technological as well as enzyme-chemical study on the enzyme-inhibitor system as a factor modulating physical properties of food proteins.

We first isolated four cysteine proteases from wheat seeds and found that one of these, named gliadain, can almost specifically hydrolyze gliadin. To dissect biochemical properties of gliadain, we obtained its recombinant product by overexpression in *Escherichia coli*. For this in detail, the coding region of the cDNA encoding progliadain was inserted into an expression plasmid to produce it as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein. The plasmid was then introduced into *E. coli* and forced to express the fusion protein by induction with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside. This resulted in producing it as an insoluble fraction which, however, was solubilized by treatment with a surfactant. We then purified the product by glutathion-affinity chromatography to obtain a single protein whose enzymatic activity was clearly observed. This is apparently the world first that succeeded in obtaining a recombinant cysteine protease of plant origin in the active form.

An activity assay based on the hydrolysis of a fluorescent substrate, Z-Phe-Arg-MCA, demonstrated that the gliadain preparation thus obtained is most active at pH 4.5 and that it most efficiently hydrolyzes gliadin, a prolamin-classed component of major storage proteins in wheat seeds. The assay suggests that this enzyme may be largely involved in the proteolysis during seed germination.

Salt effect on the enzymatic activity of gliadain were evaluated. It resulted that the enzyme preparation was active enough in the presence of NaCl, retaining 56% and 30% of its original activity at 1M and 3M NaCl, respectively. The result thus indicates that gliadain should be a salt-tolerant cysteine protease. Since the salt concentration in commercial bread items is usually around 0.2M, gliadain is almost fully active and may thus be successfully used for food processings in general as well as for baking in particular.

We then investigated the inhibitory effect of wheat cystatin on the gliadain preparation obtained as a GST fusion protein and found that the inhibition actually takes place efficiently. This investigation strongly suggests that the use of cystatin can optimize the cysteine protease-catalyzed reaction to proceed during baking and also that gliadain possibly modulate the proteolysis of seed storage proteins *in vivo*.