

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成12年度博士課程 進学
氏名 入本 慶宣
指導教官 田之倉 優

論文題目

オリザシスタチンのホモダイマーの機能構造解析

シスタチンはシステインプロテアーゼを特異的に阻害する蛋白質の総称であり、オリザシスタチンIはコメ (*Oryza sativa* L. *japonica*) 中に含まれるシスタチンである。これまでの研究では、この蛋白質はパパインを量論的に阻害するほか、極めて高い耐熱性を持ち、炊飯条件である 100℃、30 分の加熱でパパイン阻害活性は低下しないといわれてきた。また、酸やアルカリに対しても安定であり pH2~9 の広い範囲で活性を示すといわれている。植物システインプロテアーゼは様々な時期と部位で種子内蛋白質分解 (種子の成長) に関与しており、これらを内在的標的酵素とするオリザシスタチンIは種子中での蛋白質分解を調節する因子である。またオリザシスタチンIは、昆虫、細菌、ウイルスなどの感染源に存在するシステインプロテアーゼを外来性標的酵素として認識し、その活性を阻害するとも言われている。この様に、調節機能と防御機能を兼ね備えたオリザシスタチンIを、大腸菌で発現生産し医薬や機能性食品として用いる試みや、他の植物に遺伝子導入することで食用として安全な耐虫食物の開発が近年世界中で行われている。

オリザシスタチンIはダイマーになることが確認されている。一度ダイマーになると非常に安定であり、変性させないとモノマーへの変換が出来ない。このことは、これまで報告されたオリザシスタチンIの阻害活性に関する研究では注目されてこなかった。

本研究では、ダイマー化がどのような条件で引き起こされるのかを検討し、ダイマーになることでどれだけオリザシスタチン I の阻害活性に影響が出るのか、モノマー、ダイマーの阻害活性比較を行うと同時に、立体構造を解析することで解明する。

1. オリザシスタチン I のモノマーダイマー変換

大量精製法の確立

各種の測定を行うために、オリザシスタチン I の大量精製法について検討した。大腸菌による大量発現→集菌→菌体破碎→硫酸沈殿→熱処理(80℃30分)→疎水性クロマトグラフィー→ゲルろ過クロマトグラフィーの手順で速やかに大量のオリザシスタチン I を精製することが可能となった。オリザシスタチン I が熱を加えても変性しないという性質を利用し熱処理を途中に加えることで、タグをつけていなくても単一タンパク質の精製がすみやかに行えるようになった。この工程で精製されたオリザシスタチン I は全てダイマー状態であった。

モノマーダイマー変換

オリザシスタチン I がどのような条件で、ダイマー化するか調べるために、いくつかの温度条件でモノマーをインキュベートし、ゲルろ過クロマトグラフィーによりモノマーとダイマーを検出した。その結果、70℃を超えたあたりからダイマー化が始まり、80℃ではほぼダイマー化することがわかった(図1参照)。インキュベートする時間についても検討を行ったが、10分間加熱すれば、ダイマー化が進行することがわかった。また、モノマーの濃度が800 μ Mより低い場合、高温でインキュベートしてもモノマー成分が残るが、濃度を800 μ M以上にすると、すべてダイマー化することがわかった。pHを9.0以上にするとダイマー化が起こることもわかっている。

ダイマー化したオリザシスタチン I を 6M guanidine hydrochloride もしくは 8M urea, 50%(v/v) CH₃CN により変性させた後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行うとモノマー化することも確認された。

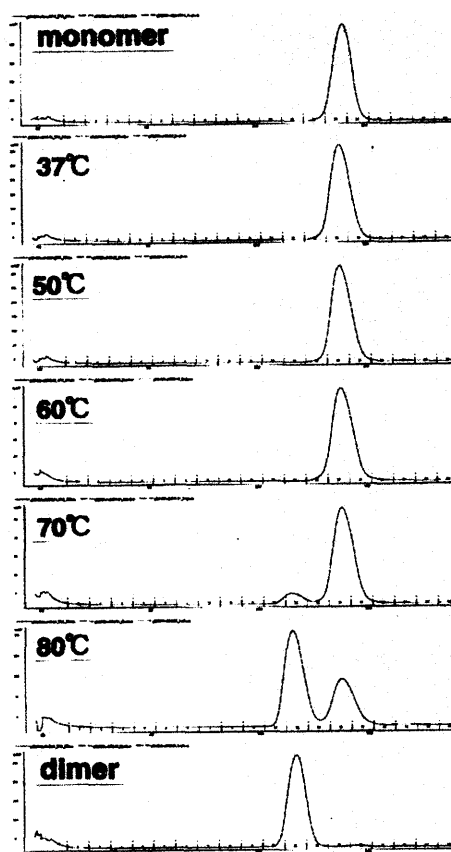


図1 OC-Iのダイマー化(100 μ M)

2. オリザシスタチン I のモノマーとダイマーの阻害活性比較

オリザシスタチン I のモノマーとダイマーそれぞれの状態について阻害活性測定を行い比較検討した。

標的酵素をパパイン、基質に Benzoyl - arginine β -naphthylamide、検出液として *p*-dimethylamino-cinnamaldehyde を用いて 540nm の吸光度の変化を測定した。

その結果、同濃度で比較した場合、ダイマーはモノマーよりも阻害活性は低いが、阻害活性を持つことが確認された (図 2 参照)。

これまでに他のシスタチンはダイマー化すると阻害活性が無くなることが報告されており、オリザシスタチン I は他のシスタチンとはダイマー化の機構が異なることが考えられる。また、オリザシスタチン I が耐熱性を持つのは、濃度が薄く加熱しても全てがダイマー化せずモノマーが残存しているため、もしくは加熱しダイマー化が起っても阻害活性が残っているためであると考えられる。

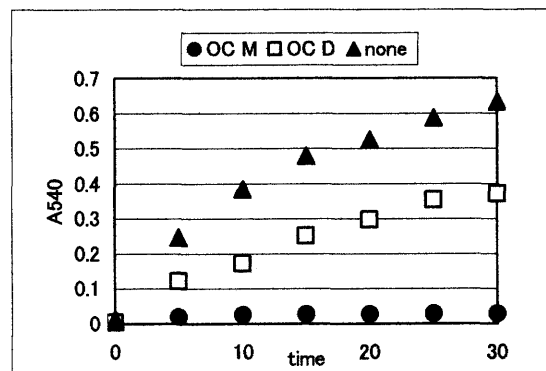


図 2 OC-I の阻害活性測定

3. オリザシスタチン I のホモダイマーの NMR 溶液構造解析

オリザシスタチン I ホモダイマーの溶液中での立体構造を解析するために NMR スペクトルを測定した。

これらのスペクトル (2D ^1H - ^{15}N HSQC 3D CBCA (CO) NH HNCACB HNCO) から主鎖 (HN、N、CA、CB、C') に関して 94% の帰属を完了させた (以下のアミノ酸配列の下線部)。帰属に関してはソフトウェア sparky を用いた。

◇ Amino acid sequence of OC I

MSSDGGPVLG GVEPVGNEND LHLVDLARPA VTEHNKKANS LLEFEKLVSV
KQQVVAGTLY YFTIEVKEGD AKKLYEAKVW EKPWMDFKEL QEFKPVDASA
NA (102)

モノマーとダイマーの ^1H - ^{15}N HSQC を比較することで、Q 52-L 59、V 79-L 90 の部分が構造変化を引き起こしていることがわかった。この二つの部位は、阻害活性に重要であると考えられている第一ループと第二ループに相当する部位である。ダイマー化した際に、この部位に何らかの構造変化が起きているため、阻害活性が低下していると考えられる。

4. オリザシスタチン I ホモダイマーの X 線結晶構造解析

オリザシスタチン I ホモダイマーの結晶化

オリザシスタチン I ホモダイマーの X 線結晶構造解析にむけて結晶化条件のスクリーニングを行った。リザーバー溶液の種類、タンパク質濃度、温度、pH の条件を検討することで、次の最適条件で単結晶を得ることが出来た (図 3 参照)。

タンパク質溶液 : 15 mg/ml OC I d, 10 mM MES, pH 6.0

リザーバー溶液 : 33% PEG4000, 0.1 M MES, pH 6.0

温度 : 20°C

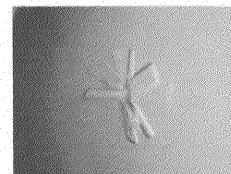


図 3 OC-I ダイマーの結晶

上記の結晶についてシンクロトロン放射光で測定を行ったところ、2.9Å程度の分解能のデータを得ることに成功した。

5. まとめ

温度条件、濃度、pH を変化させたり、変性させることでオリザシスタチン I を自由にダイマーやモノマーに変換出来るようになった。

また、オリザシスタチン I のモノマーとダイマーの阻害活性を比較した所、ダイマーはモノマーよりも阻害活性は低くなるが、他のシスタチンとは違い、ダイマー状態になっても阻害活性を持つことがわかった。このことから、オリザシスタチン I は他のシスタチンとはダイマー化の機構が違う可能性が示唆された。

NMR スペクトルの解析により、オリザシスタチン I はダイマー化すると、阻害活性に重要とされている第一ループと第二ループの構造が変化していることがわかった。このためオリザシスタチン I はダイマー化すると阻害活性が低下すると考えられる。

オリザシスタチン I ホモダイマーの結晶化に成功し、2.9Å程度の分解能のデータを得ることに成功した。