コメの新規アスパラギン酸プロテアーゼに関する食品加工学的研究

阿　部　啓　子（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）

緒　言

アスパラギン酸プロテイナーゼ（AP）は動物，植物，微生物の細胞内外に広く分布しており，消化酵素ペプシン，キモシン，血圧調節をするレニン，細胞内プロテオリシスを担うカテプシンD等重要なものが多く存在している。

植物に存在するAPはオオムギ[1]，コムギ[2]，ソバ[3]，コメ[4]等の食糧種実をはじめとして数種の植物からタンパク質が精製され，またcDNAクローニングにより一次構造が明らかにされているものもある。

筆者らはコメ種実よりAP（オリザシンと命名）をクローニングし詳細な研究[5]を行い，オリザシンは登熟期に発現量が著しく多いこと，各種の植物ホルモンの影響を受けない等の性質を有していることを明らかにした。オリザシンが種子登熟期に発現量が増大することから，種子の貯蔵タンパク質のプロセシングに関わりを持ち，また，発芽初期においては成長のための貯蔵タンパク質の分解をも担っているものと考えられる。

本研究ではオリザシンの食品加工への応用面を視野に入れ，そのための基礎研究を行った。すなわち，コメ種子よりオリザシンを精製しその性質を明らかにすると同時に本酵素の食品への応用の一つとして，凝乳酵素としての可能性を検討した。

実験方法

1．材料および試薬

コメは東大田無農場で収穫された日本晴完熟種子を用いた。ウシヘモグロビン（Sigma），DE52（Whatman），Sephadex G-100（Pharmacia LKB Biochemistry），Mono Q（HR5/5）（Pharmacia LKB Biochemistry），ペプスタチンA（ペプチド研究会），ロイペプチン（ペプチド研究会），PMSF（ナカライテスク）E-64（Sigma），マセロザイム R-10（生化学工業），EAH-Sepharose 4B（Pharmacia LKB Biochemistry）を使用した。

スキムミルク（DIFCO）は2×スキムミルク溶液（6％スキムミルク，40mM$CaCl_2$，50mMリン酸緩衝液（pH6.3））を調整し，凝乳活性測定に用いた。

キモシン，ペプシン（Sigma）ならびにκ-カゼイン（Sigma）を使用した。κ-カゼイン水解用試薬は100mMリン酸緩衝液（pH 6.3），100mMグリシン－HCl緩衝液（pH 2.0），あるいは100mM酢酸緩衝液（pH 3.0）に1％になるように調整した。

その他，試薬類はすべて特級を使用した。

2．方　法

1）オリザシンの精製

酵素活性の測定

酸変性ヘモグロビンを基質とし，最終濃度が1％になるように酢酸緩衝液0.1M（pH3.3）で希釈し，酵素液を10～50 μl 加えて100 μl とした。37℃で60分間反応させたのち等量の0.4M TCAを反応液に加えた。氷中に5分間放置したのち，8,000×gで10分間遠心分離をし，上澄の280nmの吸光値を測定した。1unit(U)は上記の条件で

280nm の OD が0.01増加するものとする。

タンパク質量の測定

BCA Kit (BCA Protein Assay Reagent PIERCE) を用い，30 μg/ml～1,000 μg/ml の BSA (bovine serum albumin) をスタンダードとして求めた。

SDS-PAGE

Laemmli の方法[6]に従った。

精製方法

① 粗抽出液：200 g の乾燥完熟種子を粉砕し，25mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)/0.15 MNaCl 400ml を加え氷中で冷やしながらホモゲナイザーで10分間抽出をした。粗抽出液は2000× g，15分遠心分離をし固形物を除き，さらに10,000× g，20分 遠心分離をし澱粉等を除去した。この上澄液を綿布でろ過し粗抽出液を得た。

② 硫安沈殿：①で調製した粗抽出液に30%飽和になるように硫安を加え，1時間以上放置したのち10,000× g，20分遠心分離をし沈殿画分を除去した。上澄液に60%飽和となるように硫安を加えた。これを10,000× g，20分遠心分離をし沈殿を集め次の精製を行った。

③ DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィー：DE52 (Whatman) を25mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し，カラム (φ1.6cm×15cm) を作製した。②で得た硫安30～60%沈殿画分をあらかじめ25mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で透析し，カラムにチャージした後，カラムボリュームの5倍量の25mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で非吸着画分を溶出した。その後25mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)/0.3M NaCl で溶出した画分を集めた。溶出画分は PM10 (Amicon) を用いて限外ロ過を行い1ml 以下に濃縮した。

④ ゲルろ過：Sephadex G-100 (Φ1.8×85 cm) を25mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.35)/0.15M NaCl で平衡化した後③で濃縮した活性画分をカラムにチャージし，4ml ずつ溶出液を分取した。

⑤ MonoQ(FPLC)クロマトグラフィー：④の活性画分を MonoQ(HR5/5)カラムを用いて精製を進めた。LCC500system (Pharmacia) を使用した。カラムを20mM Tris-HCl (pH8.0)/0.1 M-NaCl で平衡化させ④の活性画分をチャージした。NaCl 濃度を0.15MNaCl，0.2M，0.3M と段階的に上昇させ溶出した。流速は0.5ml/min とした。

⑥ ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィー：ペプスタチンアフィニティーカラムは，EAH-Sepharose 4B(Pharmacia LKB Biochemistry) にペプスタチンA (ペプチド研究会) をカップリングすることによって調製した。ペプスタチンAを12mM になるように75%メタノールに溶解した。溶液の中にアミノ酸，カルボキシル基，リン酸基が混入しない様イオン交換，MiliQ 水を用いた。EAH-Sepharose 4B はあらかじめ75%メタノールに懸濁した12mM ペプスタチン溶液を EAH-Sepharose 4B に加え，最終濃度が0.1M となるよう EDC(N-etyl-N'(-3-dimetyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride を加え (pH を4.5～6.0の間に調整しながら) 室温でゆっくりと上下に回転させ24時間反応終了後，未反応のペプスタチンを75%MeOH で洗浄した。次に，得られたペプスタチンセファロース 4B (5 ml) をカラムに詰め，0.4M 酢酸緩衝液 (pH 4.0/1M NaCl/0.5%Brij (吸着用バッファー)) で平衡化させた。⑤の MonoQ クロマトグラフィーの活性画分 P2は，最終濃度が0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.0)/1M-NaCl/0.5%Brij になる様に調整した後，ペプスタチンセファロース4B に吸着させた。吸着後同バッファーで溶出したフラクションの280nm の吸光値がベースラインに落ちるまで充分に洗い，0.1M Tris-HCl (pH8.2)/1M

NaCl/0.1%Brij で溶出し，1ml ずつフラクションを集め，タンパク質量と活性を測定した。活性画分は DE52 を用いて界面活性剤を除き，限界ロ過にて脱塩，濃縮を行った。

各種阻害剤の効果

精製オリザシン5unit を１%ヘモグロビン/0.1 M 酢酸緩衝液（pH3.3）に溶解し，各々の阻害剤を**表 2** に示す濃度で加え，37°C，１時間反応後の活性を測定した。

2)　食品加工への基礎実験方法

凝 乳 活 性

スキムミルク溶液に酵素液を加え，37°C，120 分インキュベートした。テストチューブは傾けた状態で静置し，凝乳活性はテストチューブを水平に倒したゲル化の状態により観察した。

κ-カゼインの水解

κ-カゼイン溶液（1%）16μl にオリザシン0.6 μg，キモシン1.6μg あるいはペプシン1.6μg を加え37°C，60分反応させた。反応液は Laemmli の方法で SDS-PAGE を行い CBB 染色をした。

結　　果

1.　コメ種子のオリザシンの精製

オリザシンの精製は**表 1** に示すように６ステップで行った。コメのホモジネートは澱粉含量が多く，これを除くために硫安分画を行った。硫安画分のタンパク質は17%に減少し，プロテアーゼ活性は27%となりかなりの活性が消失したが，粗抽出液に含まれる微粒子の白濁夾雑物はほぼ完全に除去された。ついで，陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE-セルロース）を行い，NaCl 濃度０～0.3M で溶出される画分を集めた。このステップでは，４%の活性が失われただけで総タンパク質量は半分となり，比活性は1.7倍に上昇した。ゲルロ過による精製ステップでは，タンパク質の溶出パターンは１つの小さなピークと１つの大きなピークとして現われ，プロテアーゼ活性は低分子量の大きなピークとオーバーラップし，単一ピークとして現われた（**図 1**）。MonoQ 分画では塩濃度0.15M，0.2M，0.3M で溶出した画分すべてにプロテアーゼ活性が認められた（**図 2**）。各フラクションのプロテアーゼ活性を測定したところ，P1は総タンパク質量2.2mg，総活性503U，比 活 性229U/mg，P2は 各々，2.8mg，877U，313U/mg，P3は6.4mg，1195U，187U/mg となった。P1～P3までのすべてのプロテアーゼ活性及びタンパク質量を合計すると11.4mg，2575U となり，前段階の精製ステップの31.2%の収量と

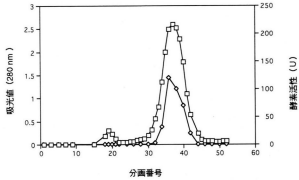

図 1　ゲルろ過クロマトグラム（Sephadex-G100）
—□— タンパク質量
—◇— ヘモグロビンを基質とした酵素活性

表 1　オリザシンの精製段階における比活性および収率

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

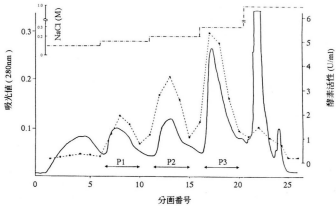

図2　MonoQ クロマトグラム
タンパク質量
ヘモグロビンを基質とした酵素活性
NaCl 濃度
P1，P2，P3は分取したサンプルを表す。

なった。P1～P3の中で最も比活性の高いものはP2であった。cDNA の研究からコメ中のオリザシンがマルチジーンを形成していることがすでに明らかであるが，今回のタンパク質レベルでの研究からも複数のアイソザイムが存在している可能性が示唆された。

つぎに，P2画分をペプスタチンアフィニティーカラムにて精製を行った（図3）。一般的にアフィニティー精製は精製の早い段階で利用される例が多いが，コメの場合，早い精製段階でのペプスタチンアフィニティー精製は成功しなかった。原因として，オリザシンがコメ中の他成分と結合してアフィニティカラムに吸着し難い状態になっている等が挙げられる。ペプスタチンアフィニティー精製により，比活性は前精製段階の10倍，粗抽出液に対しては約50倍になった。（**表1**）

2．オリザシンの SDS-PAGE

精製オリザシンを SDS-PAGE に供したところ，57kDa，53kDa，35kDa，25kDa の 4 本のバンドが検出された。これに対してオリザシン 1 の C 末端側抗体を用いてウエスタン分析をしたところ，57kDa のバンドに強いシグナルが，53kDa には弱いシグナルが現われ，低分子の 2 つのバンドにもごく弱いシグナルが現われた（**図4**）。

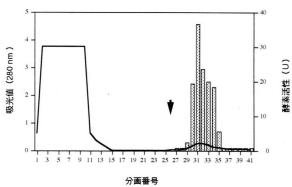

図3　ペプスタチンアフィニティークロマトグラム
ヘモグロビンを基質とした酵素活性
タンパク質量
溶出緩衝液への交換点を示す

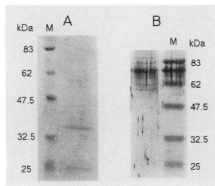

図4　精製オリザシンの SDS-PAGE およびウエスタン分析
A．SDS-PAGE
B．オリザシン 1 に対する抗血清を用いたウエスタン分析
M：サイズマーカー

3．各種阻害剤の効果

精製したオリザシンに対して，各種のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べたところ，ペプスタチン

では100％活性が阻害されたが，EDTA，E-64，PMSF，ロイペプチン等，他のプロテアーゼインヒビターによる影響は全く受けなかった（**表2**）。

4．オリザシンの食品加工への応用のための基礎的解析

種子中にはAPをはじめシステインプロテアーゼのオリザイン等タイプの異なるプロテアーゼが存在する。そこでコメの粗酵素液（硫安30-60％飽和画分）についてスキムミルクを用いた凝乳活性の測定を行った（**図5**）。$CaCl_2$存在下，3％スキムミルク溶液（pH6.3）に粗酵素液を加えて，37℃でインキュベートすると試験管を水平に倒しても形が崩れないゲル状に凝固した（レーン2）。コントロールとして酵素液のかわりに25mMリン酸緩衝液（pH7.35）を加えたものは凝固せず，水平に倒した試験管内で液状のままである（レーン1）。粗酵素液を加えた反応系に0.1mMペプスタチン（レーン3），1mM EDTA（レーン4），0.01mMロイペプチン（レーン5），0.5mM PMSF（レーン6）を各々加え，凝乳するか否かを調べたところ，ペプスタチンを加えたものはコントロールと同様に全くゲル化せず，ミルクは液状のままであったが，他のインヒビターを加えたものではインヒビターを加えないレーン2と同様ゲル化をした。以上のことから，コメ中に存在するプロテアーゼのうちAPが有意にスキムミルクを凝固させることを見い出した。

オリザシンに凝乳活性が存在することが確認できたので，他の凝乳酵素との作用機作の比較として，凝乳に最も関係の深いκ-カゼインを精製オリザシンで消化させた（**図6**）。κ-カゼインはカゼインミセルの表層を取り巻き，牛乳中で疎水性のαs-カゼインやβ-カゼインをミセル内に安定化させる働きをもつ。凝乳酵素は，κ-カゼインの105Phe-106Metを限定分解することでミセルの安定化を崩し，凝乳させる。凝乳はCa^{2+}存在下，弱酸性で行われる。κ-カゼインは付加する糖鎖の大きさによって数種のバリアントが存在するが，主なものは分子量28kDaである（**図6**レ

表2　オリザシンに対する各種プロテアーゼインヒビターの効果

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

反応は酸変性ヘモグロビンを基質として，0.1M酢酸緩衝液（pH3.3）で37℃，60分間の条件で行った。

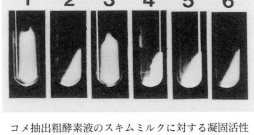

図5　コメ抽出粗酵素液のスキムミルクに対する凝固活性
試験管のスキムミルク溶液に粗酵素液を加え，試験管を斜めに傾けてpH 6.3，37℃，120分間放置した。その後，試験管を水平に倒し，凝固の有無を観察した。
1：スキムミルク溶液（コントロール）
2：スキムミルク溶液＋粗抽出液
3：スキムミルク溶液＋粗抽出液＋0.1mM ペプスタチン
4：スキムミルク溶液＋粗抽出液＋1mM EDTA
5：スキムミルク溶液＋粗抽出液＋0.01mM ロイペプチン
6：スキムミルク溶液＋粗抽出液＋0.5mM PMSF

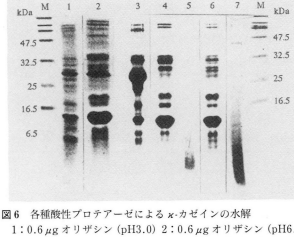

図6　各種酸性プロテアーゼによるκ-カゼインの水解
1：0.6μg オリザシン（pH3.0）　2：0.6μg オリザシン（pH6.3）
3：未処理のκ-カゼイン　4：1.6μg ペプシン（pH6.3）
5：1.6μg ペプシン（pH2.0）　6：1.6μg キモシン（pH6.3）
7：1.6μg キモシン（pH3.0）
M：レーン1および2の分子量マーカーは左端に，レーン3～7は右端に示す。

ーン3)。pH3.0ではオリザシンはκ-カゼインをランダムに水解した（レーン1)が，pH6.3では12kDaのバンドが生成し低分子のバンドは認められなかった（レーン2)。また，ペプシンもpH2.0で反応させるとκ-カゼインはランダムに低分子化した（レーン4）が，pH6.3では，限定的な分解のみが生じていた（レーン5)。キモシンの場合も同様で，pH3.0ではレーン7に示すように低分子化するのに対しpH6.3では限定分解が生じて低分子化は起こらなかった（レーン6)。

考　察

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

MonoQで分画した際に複数のAP活性をもつピークが出現したが，このことはコメ中に異なる分子のAPが複数種存在することを示唆している。筆者らは，APをコードするcDNAが複数存在しこれらのクローンは互いに58～82%の相同性を有していることを明らかにしたが，タンパク質レベルでも同様の結果となった。ウエスタン分析では，オリザシン1の抗体と反応をしたことから，精製オリザシンはcDNAから解析されたオリザシン1と近似の構造をもつことが確認された。

精製オリザシンの分子量はSDS-PAGEでは57kDaで，オリザシン1 cDNAから推定される分子量は，プロ型では52kDa，成熟型では48kDaであった。土井らの報告[7]ではコメ中に存在するAPの分子量はゲルろ過法により60～65kDaとされている。本研究では精製オリザシンの分子量は，cDNAから推定されるものより数kDa大きかった。その理由として，オリザシン1 cDNAには2ヵ所の糖鎖付加部位が（252NHT,400NKT）が存在し実際に糖鎖が付加している可能性が考えられる。糖鎖に関してはサイプロシンが糖タンパク質であることの報告[8]があるが，オリザシン1の糖鎖付加部位である400NKTはサイプロシンにも同様な配列がある。

ペプシン，キモシンといった凝乳酵素は，胃底腺から胃腔に分泌される消化酵素で酸性条件下において活性化し，カゼインを消化する。しかし，凝乳酵素はプロテオリシスの最大を示すpHとは異なる弱酸性下において凝乳反応の引き金を引く。本研究で精製したオリザシンのコメでの局在は，種子のみではなく，葉や根にも発現していることが既に確認されているが，その植物体内における機能については未知である。しかしながらオリザシンはペプシン，キモシンのような凝乳酵素として利用できることを示す基礎データが得られた。すなわち至適pHは3.0であるが，弱酸性下（pH6.3）では，プロテアーゼ活性は非常に低く限定分解をした。微生物由来の凝乳活性を有する酵素ムコールレンニン，エンドシアペプシン，リゾプスペプシン等も凝乳活性が高くプロテアーゼ活性は低い。植物の凝乳酵素として最もよく研究されているのは，カルドンの花に存在するアスパラギン酸プロテアーゼ，サイプロシンである。サイプロシンは，κ-カゼインの105Phe-106Met結合を切断することが報告[9]されている。また，すでにサイプロシンを用いた羊の乳からのチーズが市販されている。オリザシンも同様の作用を有することから将来食品加工に利用し得ると考えられる。また，オリザシンはコメ由来であり安全性に不安がない点や完熟種子中に存在することから安価でしかも安定した供給が確保される点からも食品加工に利用する上で有益であると思われる。

ま と め

コメ種子のアスパラギン酸プロテイナーゼ（オ

リザシン）を硫安分画，DEAEセルロース交換カラム，セファデックスG-100ゲルロ過カラム，モノQ陰イオン交換カラムおよび，ペプスタチンアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製した。

アフィニティ精製後のオリザシンはペプスタチンにより酵素活性を阻害されたが，EDTA，ロイペプチン，PMSF，E-64といった他のタンパク分解酵素の阻害剤では影響を受けなかった。凝乳活性は30～60%硫安分画した粗オリザシンを用いて行った。その結果pH6.3でスキムミルク液を固めることができ，そのさいのκ-カゼインの分解パターンは，キモシンやペプシンを用いて行ったときに見られる分解バンドである12KDaが生成し，凝乳酵素として可能性が示唆された。

本研究を遂行するにあたり，研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。また，本研究に協力を頂きました跡見学園女子大学短期大学部助教授 朝倉富子博士に謝意を表します。

文 献

1) Tõmākangas, K., Kervinen, J., Östman, A. and Teeri, T. *Planta*, **195**, 116-125. (1994)
2) Belozersky, M. A., Sarbakanova, S. T. and Dunaevsky, Y. E. *Planta*, **177**, 321-326. (1989)
3) Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Rudenskaya, GN. and Stepanov, V. M. *Biokhimiya*, **49**, 479-485. (1984)
4) Asakura, T., Abe, K.and Arai, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1793-1794. (1995)
5) Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K. and Arai, S. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 77-83. (1995)
6) Laemmli, U. K. *Nature*, 277, 680. (1990)
7) Doi, E. N. Matoba, T., and Morita, Y. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 77-83. (1980)
8) Cordeiro, M. C., Xue, Z.-T., Pietrzak, M., Pais, M. S. and Brodelius, P. E. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 733-741. (1994)
9) Faro, C. J., Moir, A. J. G., Pires, E. V. *Biotech. Lett.*, **14**, 841-846 (1992)

Food Processing Study with a New Aspartic Protease of Rice Origin

Keiko Abe (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

An aspartic proteinase in rice seeds (oryzasin) was purified by $(NH_4)_2SO_4$ fractionation, DEAE-celluose anion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration, Mono Q anion exchange chromatography, and pepstatin-affinity chromatography. SDS-PAGE showed the affinity-purified enzyme to have two molecular forms, 57 and 53 kDa, together with their probable autolysates appearing as two small bands at 35 and 25 kDa. The affinity-purified oryzasin is completely inhibited by pepstatin but not affected by other proteinase inhibitors such as EDTA, leupeptin, PMSF, and E-64. The milk-clotting activity of oryzasin was investigated using the crude enzyme obtained by precipitation at 30% and 60% $(NH_4)_2SO_4$ saturation. The enzyme clotted a skim milk solution at pH6.3, yielding the same κ-casein digest pattern as those of chymosin and pepsin producing a 12kDa band.