

高等植物における含硫黄二次代謝産物
分解系酵素の分子生物学的研究

2001年

真 鍋 知 史

①

高等植物における含硫黄二次代謝産物

分解系酵素の分子生物学的研究

2001年

真 鍋 知 史

薬用資源教育研究センター

(遺伝子資源応用研究室)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科において指名された

下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 齊藤 和季

副査 千葉大学教授（薬学部） 理学博士 石橋 正己

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 小林 弘

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 山本 友子

副査 千葉大学助教授（薬学部） 薬学博士 高山 廣光

略語表

Alkyl-CSO	S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide
Allyl-CSO	S-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide, alliin
BICIN	N,N-bis (2-hydroxyethyl)glycine
C-S lyase	carbon-sulfur bond lyase
CM	carboxymethyl
DEAE	diethylaminoethyl
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
FITC	fluorescein isothiocyanate
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
<i>K_m</i>	Michaelis constant
MTT	3-(4', 5'-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
Methyl-CSO	S-methyl-L-cysteine sulfoxide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
PMS	phenazine methosulfate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
Propenyl-CSO	S-(<i>trans</i> -2-propenyl)-L-cysteine sulfoxide
Propyl-CSO	S-propyl-L-cysteine sulfoxide
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan

目次

はじめに	2
第一部 ニラ (<i>Allium tuberosum</i>) Alliinase の解析	5
序論	5
結果	10
1. ニラ Alliinase タンパク質の抽出・精製	10
2. ニラ Alliinase の諸性質	10
3. ニラ Alliinase cDNA の単離と解析	20
4. ニラ Alliinase の異種生物種における機能的発現と活性中心アミノ酸残基の解析	28
5. 免疫蛍光染色法によるニラ Alliinase の組織極在性の解析	34
考察	36
第二部 ブロッコリ (<i>Brassica oleraceae</i>) Cystine-lyase の解析	44
序論	44
結果	45
1. ブロッコリ Cystine-lyase タンパク質の抽出・精製と解析	45
2. ブロッコリ Cystine-lyase 推定 cDNA クローン の単離と解析	51
考察	54
実験の部	55
参考文献	72
謝辞	78
印刷公表論文	79

はじめに

高等植物には土壤中の無機硫黄を最初の有機性含硫化合物である Cysteine に固定する硫黄同化系が存在する[1, 2]。生成された Cysteine はさらに Methionine への変換、Gultathione の生成、Glucocyanate の様な含硫黄二次代謝産物の合成に利用される。さらにこれら含硫黄二次代謝産物は植物が傷つけられるなどしたときに、アリナーゼ、シスチンリアーゼ、ミロシナーゼなど植物種固有の炭素・硫黄結合開裂酵素 (C-S lyase) により分解されさらに生理活性の高い物質へと変化しその植物特有の臭気などの原因となる。さらに、多くの植物には S-置換システイン類に対する C-S lyase の存在が知られておりその基質特異性には大きな開きがあることが認められている。その一つである Cystathionine β -lyase は、植物における Methionine 生合成過程の Key enzyme として Cystathionine より Homocysteine の生成を触媒している。一連の C-S lyase は、補酵素としてピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を要求すること、推定される反応様式など共通点が多い (Figure 1.)。

アリナーゼ (EC. 4. 4. 1. 4, alliinase, S-alk(en)yl-L-cysteine lyase) はネギ属植物に存在し、PLP を補酵素としてアリイン類 (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, Alkyl-CSOs) の β -脱離反応を触媒する酵素である。生成した Sulfenic acid は、さらに反応してアリシンなどの揮発性刺激臭物質となり植物種特有の刺激臭の原因となる[3, 4]。さらにこれらの変換物質より二次的に生成する物質には、抗アレルギー作用、抗菌作用、抗凝血作用など多彩な生理活性を持つ物質の存在が知られている[5-8]。第一部ではニラ (*Allium tuberosum*) より Alliinase タ

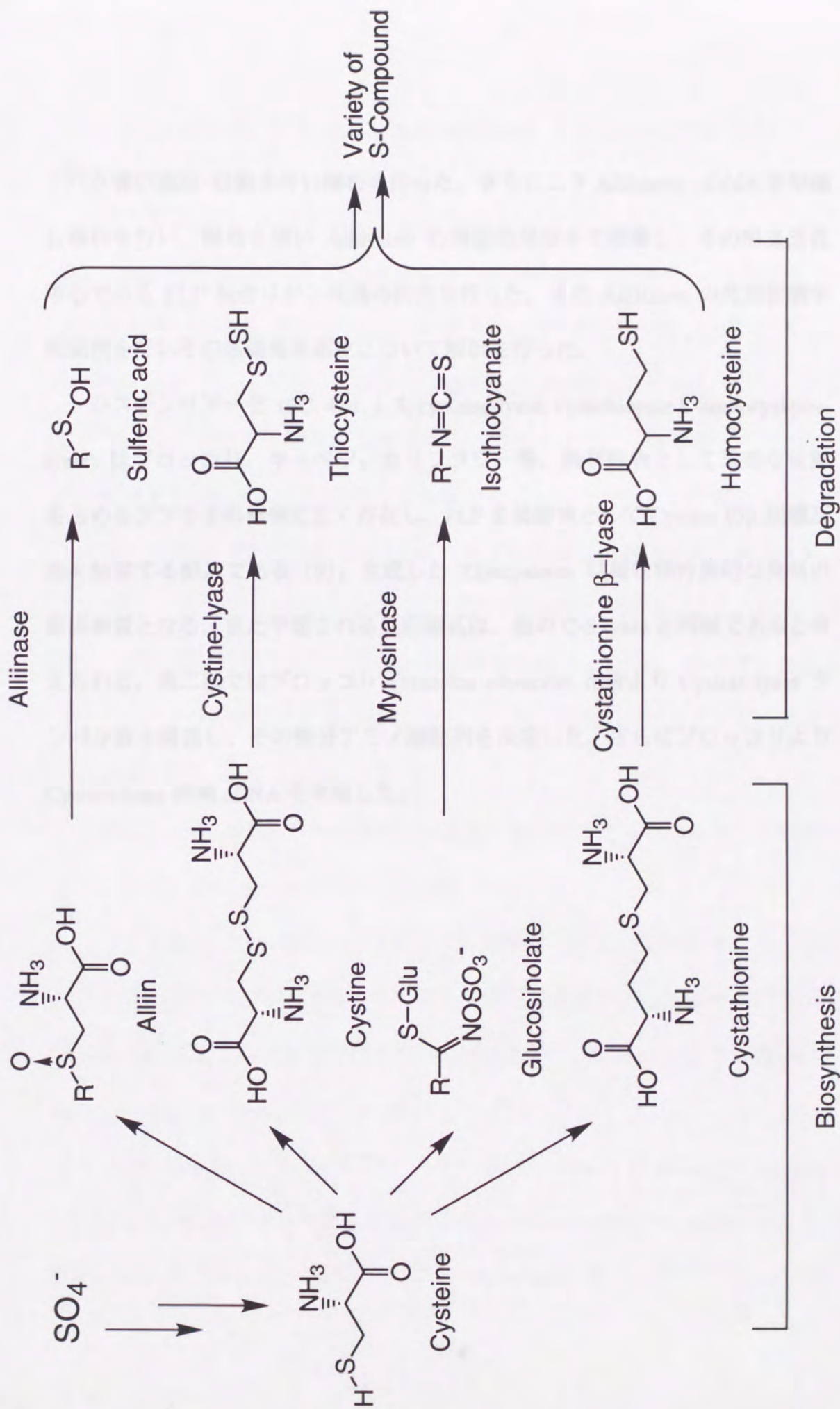


Figure 1. Metabolism of sulfur compounds in plants.

ンパク質の抽出・精製を行い解析を行った。さらにニラ Alliinase cDNA を単離し解析を行い、酵母を用い Alliinase の機能的発現系を構築し、その酵素活性中心である PLP 結合リジン残基の同定を行った。また Alliinase の免疫組織学的染色を行いその組織局在部位について解析を行った。

シスチンリアーゼ (EC. 4. 4. 1. 8, cysteine-lyase, cystathionine L-homocysteine-lyase) はブロッコリ、キャベツ、カリフラワー等、農業作物として重要な位置を占めるアブラナ科植物に広く存在し、PLP を補酵素として Cystine の β -脱離反応を触媒する酵素である [9]。生成した Thiocysteine は植物種特異的な臭気の原因物質となる。また予想される反応様式は、他の C-S lyase と同様であると考えられる。第二部ではブロッコリ (*Brassica oleracea*) 花蕾より Cystine-lyase タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。さらにブロッコリより Cystine-lyase 候補 cDNA を単離した。

第一部 ニラ (*Allium tuberosum*) Alliinase の解析

序論

ネギ属植物は、その特徴として植物種特有の刺激臭を有している。これらは、Alliin に代表される Alkyl-CSOs を Alliinase (EC. 4. 4. 1. 4, Alliinase, S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase) が PLP を補酵素として β -脱離反応を行い Sulfenic acid, α -Aminoacrylic acid に分解する反応に起因している[10-13]。生成した Sulfenic acid は、さらに非酵素的反応によりアリシン等の揮発性刺激臭物質へ変換される。更にこれらの変換物質より二次的に生成する物質として、抗アレルギー作用、抗菌作用、抗凝血作用など多彩な生理活性を持つ物質の存在が知られている[5-8]。(Figure 2)。正常状態の植物中では Alliinase は、液胞に蓄積し、細胞質中に存在するアリイン類と隔絶されている[14]。植物体が傷害を負うことにより、液胞より漏出した Alliinase が、細胞中のアリイン類を分解して刺激臭を発する (Figure 3)。

また、Alliinase は、ネギ属植物の鱗茎、及び葉に含まれる総タンパク質のうち、その主要な画分を占めるほど大量に存在している。

基質となる Alkyl-CSOs の存在比は、植物種間によって異なることが知られている。この存在比の相違より、ネギ属植物を4タイプに分類することができる[3, 4]。調査されたすべてのネギ属植物において、S-Methyl-及び S-Propyl-L-cysteine sulfoxide (Methyl-CSO, Propyl-CSO) が検出されている。これらに加え、タマネギ (*Allium cepa*) など第一グループは、*trans*-S-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide (Propenyl-CSO)を含有するが S-(2-propenyl)-L-cysteine sulfoxide (Allyl-CSO, Alliin)は含有していない。ニンニク (*A. sativum*) などの第二グループは逆

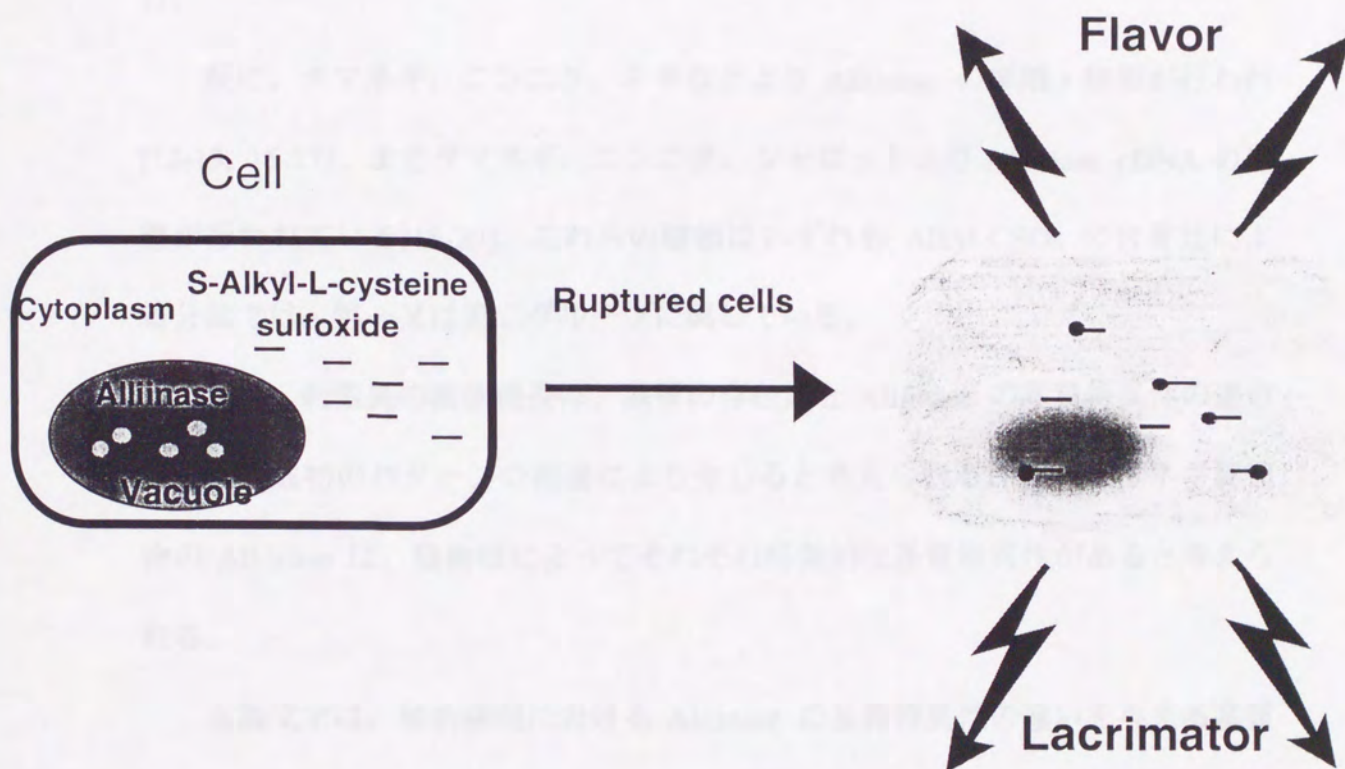


Figure 3. Mechanism for formation of volatile sulfur compounds in *Allium* plants.

に、Allyl-CSO は含有しているが、Propenyl-CSO は含有していない。ニラ (*A. tuberosum*) などの第三グループは、Allyl-CSO、Propenyl-CSO 共に含有している。さらに、両化合物を含まない種よりなる第四グループに分類される (Table 1)。

既に、タマネギ、ニンニク、ネギなどより Alliinase の単離・精製が行われ [12-13, 15-17]、またタマネギ、ニンニク、シャロットより Alliinase cDNA の単離が行われている [18-20]。これらの植物はいずれも Alkyl-CSOs の含有比による分類では、第一又は第二グループに属している。

また、刺激臭の植物種差は、基質の存在比と Alliinase の基質特異性の違いによる生成物のパターンの相違により生じると考えられる。従って、ネギ属植物の Alliinase は、植物種によってそれぞれ特徴的な基質特異性があると考えられる。

本論文では、植物種間における Alliinase の基質特異性の違いを与える基質結合部位などの構造や機能、および C-S lyase の構造的特徴を解明し、分子エンジニアリングすることを最終目的に、アリイン類の含有比による分類では第三グループに属するニラより、Alliinase 及びその cDNA を単離し解析を行った。

Table 1. An estimate of the composition of S-alkyl-L-cysteine sulfoxide in *Alliums*⁽³⁾

Group	Species	S-Methyl C. S.	S-Propyl C. S.	S-Propenyl C. S.	S-Allyl C. S.
1	<i>A. cepa</i>	+	++	+++	0
	<i>A. ascalonicum</i>	++	++	+	0
	<i>A. chinense</i>	++	+	++	0
	<i>A. fitulosum</i>	+	++	++	0
	<i>A. porrum</i>	++	++	+	0
	<i>A. schoenoprasum</i>	+	+	++	0
	<i>A. scorodoprasum</i>	++	++	+	0
	<i>A. christophii</i>	+++	+	+	0
2	<i>A. sativum</i>	++	+	0	+++
	<i>A. moly</i>	+++	+	0	++
	<i>A. ampeloprasum</i>	++	+	0	+++
	<i>A. ursinum</i>	++	+	0	+++
	<i>A. grayi</i>	++	+	0	+
3	<i>A. tuberosum</i>	++	+	+	+++
	<i>A. vineale</i>	+++	++	+	+++
	<i>A. triquetrum</i>	+++	++	+	+++
	<i>A. roylei</i>	+	++	++	+
4	<i>A. aflatunense</i>	+++	+	0	0
	<i>A. ostrawskianum</i>	+++	+	0	0
	<i>A. siculum</i>	+++	+	0	0

+++ =high; ++ =medium; + =low; 0 =absent. C. S.=Cysteine sulfoxide.

結果

1. ニラ Alliinase タンパク質の抽出・精製

ニラの葉部ホモジュネートより Alliinase を硫酸沈殿、CM-Sepharose F. F. カラム、Sephacryl S-3000 ゲル濾過カラムの3段階の処理で SDS-PAGE 上単一バンドとなるまで精製した。この結果、Alliinase は 43.7 倍に精製され、その収率は、26.7%であった (Figure 4, 5, 6, Table 2)。

2. ニラ Alliinase の諸性質

2. 1. 分子量

本酵素のネイティブな分子量を HPLC ゲルろ過カラム SEC-3000 HPLC CC を用いて測定したところ、約 67kDa であった (Figure 7)。また SDS-PAGE により、変性条件下におけるサブユニットの分子量を測定したところ、約 45kDa であった (Figure 8)。また、ウエスタンブロット分析よりニラ Alliinase は、抗ニンニク Alliinase 抗体に対し、交叉活性を示した (Figure 9)。

2. 2. 至適 pH

本酵素は、pH8.0-8.5/Tris-HCl で最大活性を示した。しかし至適 pH は、使用した buffer に依存している。Tris-HCl を用いたときは、pH8.0-8.5 が至適 pH であったが、Na-Pi buffer を用いた場合、至適 pH は、6.5-7.0 にみられ、その酵素活性も Tris-HCl buffer を用いた場合に比較して大幅に低下した (Figure 10)。

2. 3. K_m 値

本酵素の S-ethyl-L-cysteine sulfoxide に対する酵素活性は、古典的 Michaelis-Menten の式に従うことが示された (Figure 11)。本酵素の S-ethyl-L-

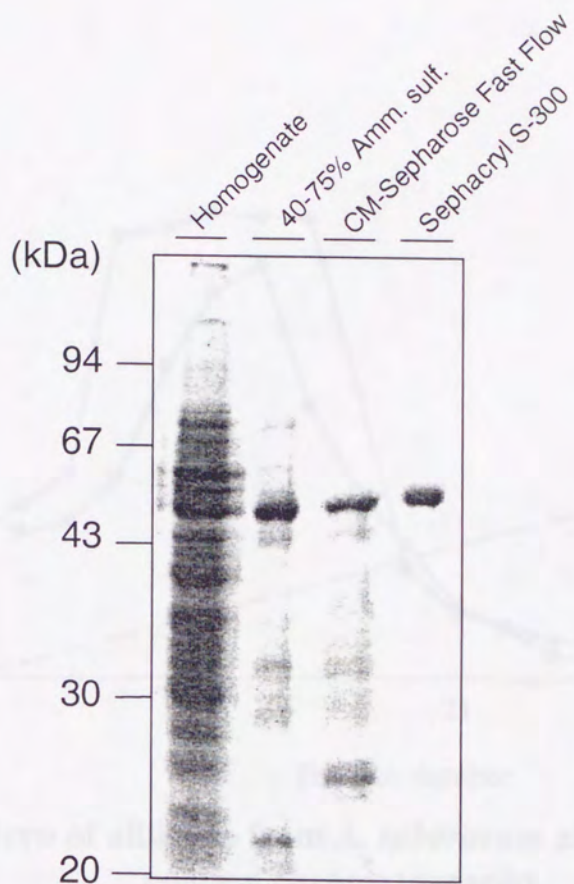


Figure 4. SDS-PAGE analysis in the course of purification of alliinase. The proteins at each step of the purification procedure were separated by 12% SDS-PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue dye staining. The molecular weight markers were phosphorylase *b* ($M_r = 94,000$), bovine serum albumin ($M_r = 67,000$), ovalbumin ($M_r = 43,000$), carbonic anhydrase ($M_r = 30,000$), and soybean trypsin inhibitor ($M_r = 20,100$).

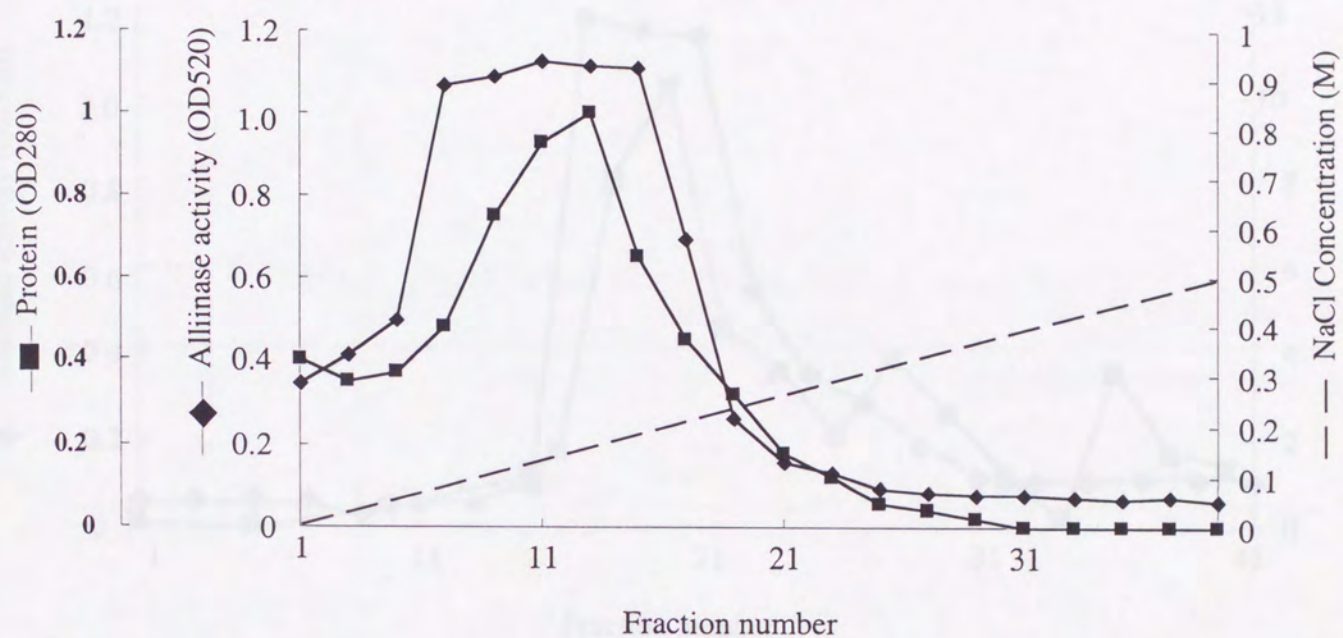


Figure 5. Elution pattern of alliinase from *A. tuberosum* after CM-Sepharose Fast Flow column chromatography.

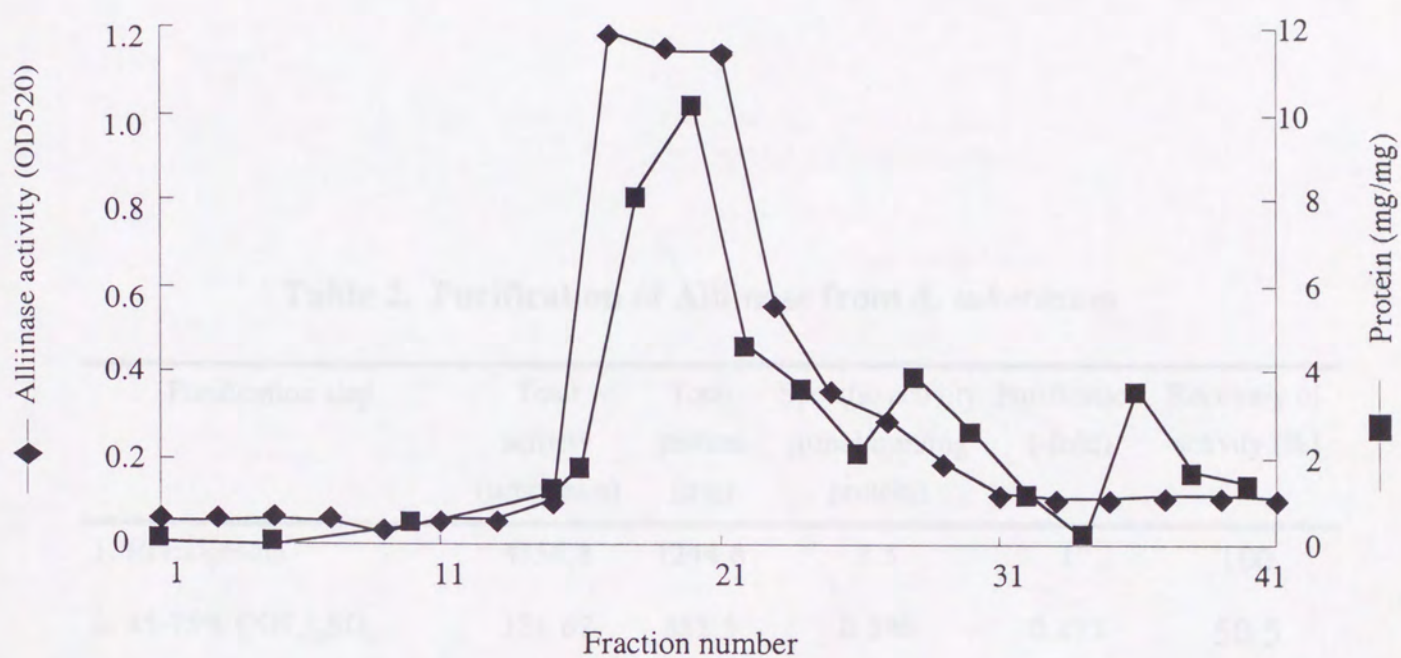


Figure 6. Elution patterns of Alliinase after the Sephacryl S-300 column chromatography

Table 2. Purification of Alliinase from *A. tuberosum*

Purification step	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Total protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Purification (-fold)	Recovery of activity (%)
1. Homogenate	4356.8	1244.8	3.5	1	100
2. 45-75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	131.67	332.5	0.396	0.113	50.5
3. CM-Sepharose Fast Flow	4072.9	56.1	72.5	20.5	93.5
4. Sephacryl S-300	1164.3	7.62	152.8	43.7	26.7

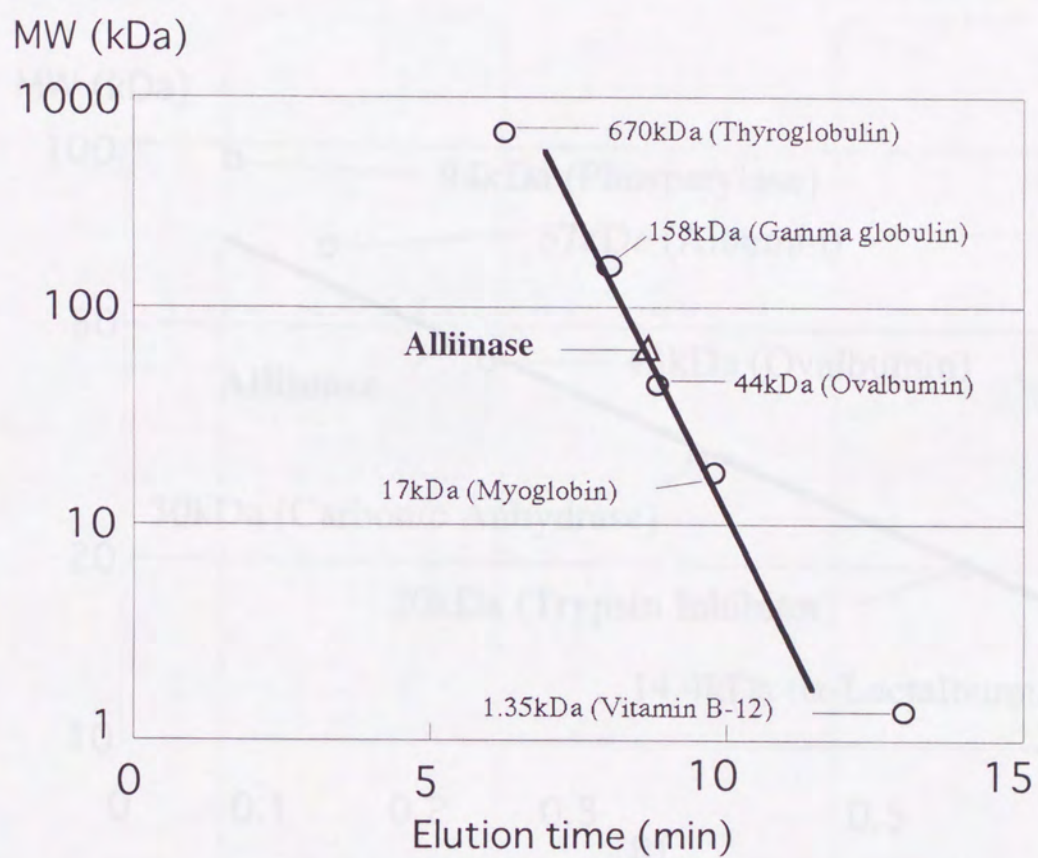


Figure 7. Determination of molecular weight of alliinase by gel filtration through SEC-3000 HPLC CC.

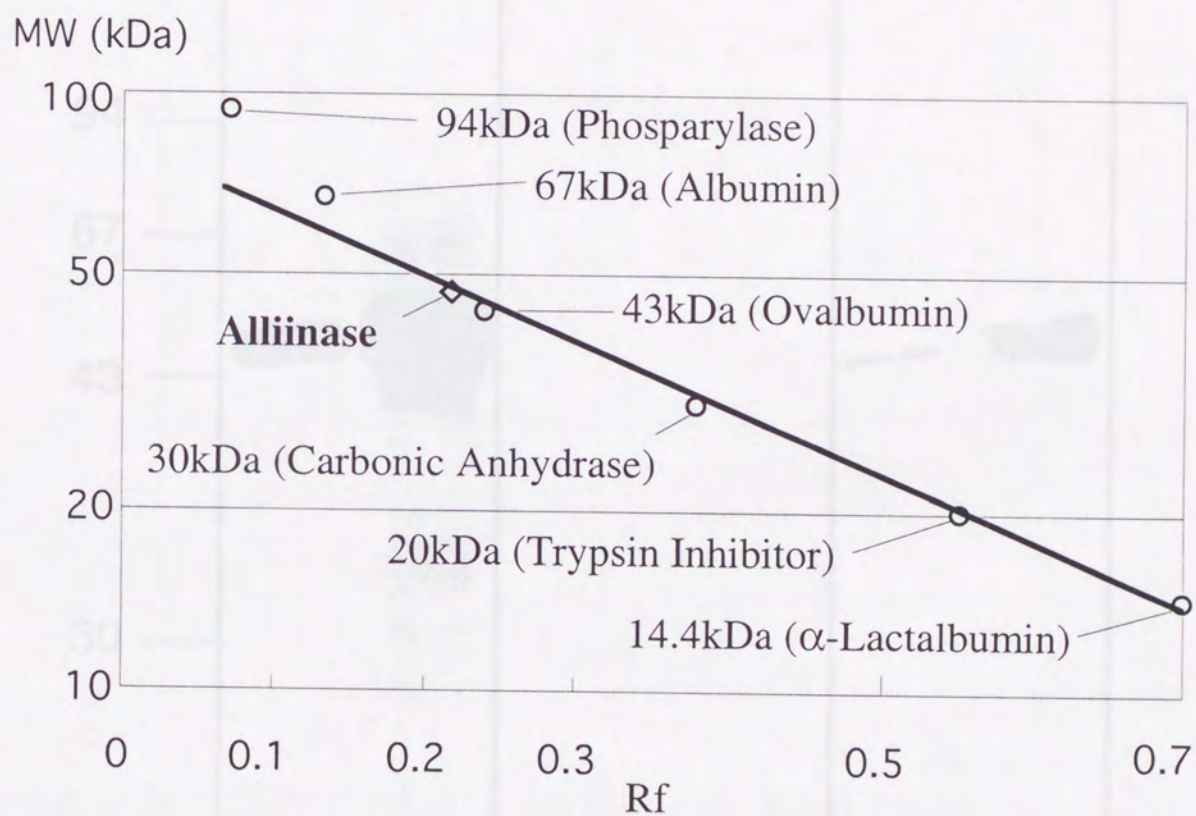


Figure 8. Determination of molecular weight of alliinase by SDS-PAGE

Figure 9. Western blot analysis of alliinase from *A. tuberosum* and *A. sativum*.

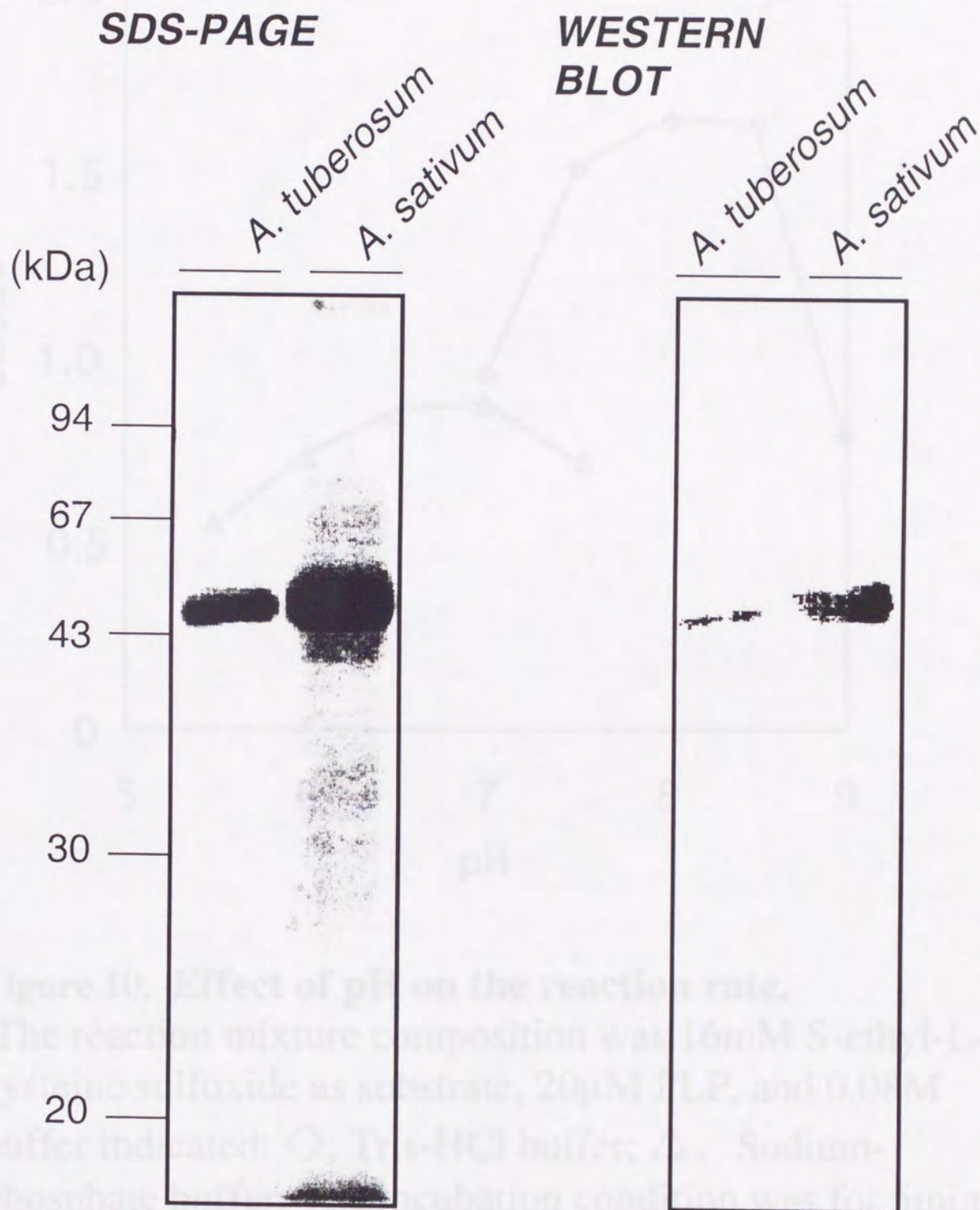


Figure 9. Western blot analysis of alliinase from *A. tuberosum* and *A. Sativum*.

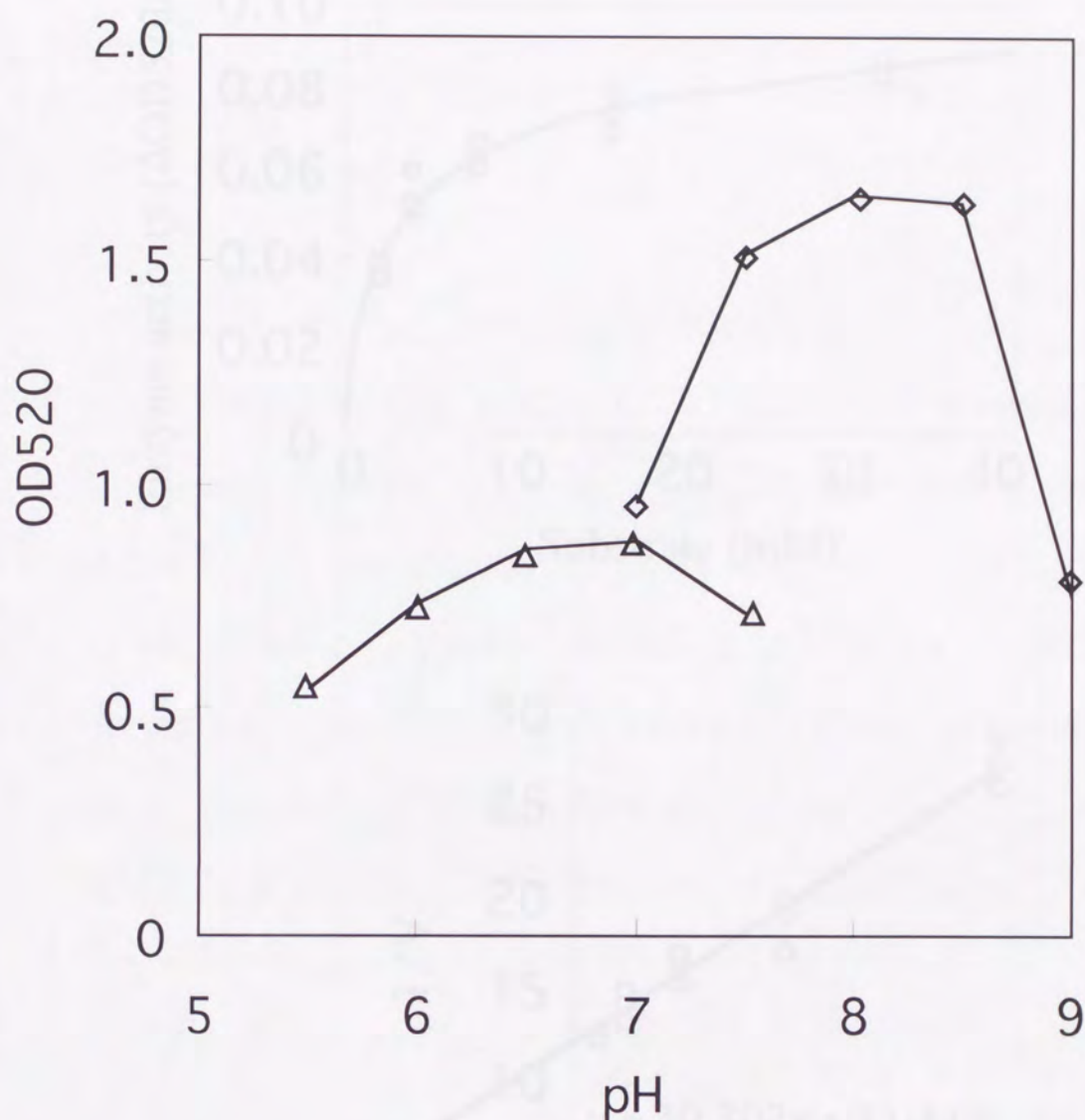


Figure 10. Effect of pH on the reaction rate.

The reaction mixture composition was 16mM S-ethyl-L-cysteine sulfoxide as substrate, 20 μ M PLP, and 0.08M buffer indicated: $\diamond$, Tris-HCl buffer; $\triangle$, Sodium-phosphate buffer. The incubation condition was for 5min. at 25 $^{\circ}$ C with 0.3 μ g/125 μ l of nira-alliinase. The activity of enzyme was established from the amount of pyruvate formed.

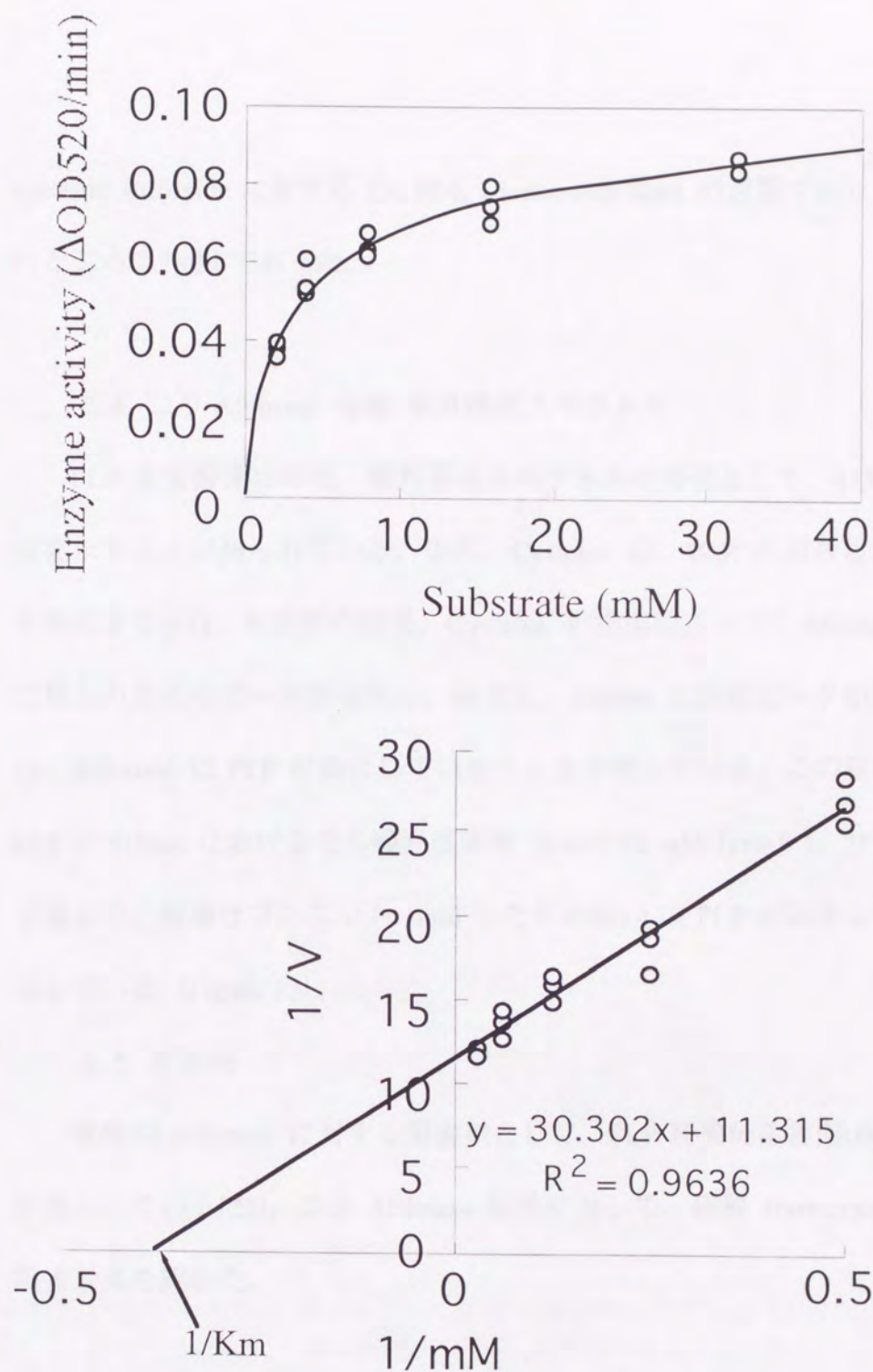


Figure 11. Graphic determination of K_m for S-ethyl-L-cysteine sulfoxide in catalyzed by alliinase. The reaction mixture composition was S-ethyl-L-cysteine sulfoxide as substrate, 20 μM PLP, and 0.08 M tris-HCl buffer (pH 8.5). The incubation condition was at 25 $^{\circ}\text{C}$ with 0.12 μg /125 μl of *A. tuberosum* alliinase. Curves obtained in a determination of K_m by the Lineweaver-Burk method are presented in under.

cysteine sulfoxide に対する K_m 値を Lineweaver-Burk の逆数プロットにより求めたところ 2.7mM であった。

2.4. ニラ Alliinase 可視・紫外吸収スペクトル

PLP 含有酵素の可視・紫外吸収スペクトルの特徴として、415nm 付近に吸収を示すことが知られている。また、Cysteine は、PLP と結合し、Thiazolidine を形成する[21]。本研究の結果、Cysteine の添加によって、Alliinase の 420nm に見られた吸収ピークが消失し、新たに、320nm に吸収ピークが現れた。これは、Alliinase に PLP が結合していることを示唆している。この吸収の消失と、PLP の 410nm におけるモル吸光度係数 ($\epsilon=2.92 \text{ nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、サブユニット分子量より、酵素サブユニット 1mol 当たり 0.9mol の PLP が結合していることを示している (Figure 12)。

2.5. 阻害剤

既知の Alliinase に対する阻害剤として、PLP 特異的阻害剤(Hydroxylamine)が知られている[22]。ニラ Alliinase 活性に対して、硫酸 Hydroxylamine による阻害効果を認めた。

3. ニラ Alliinase cDNA の単離と解析

3.1. ニラ cDNA ライブラリーのスクリーニング

既知のタマネギ、ニンニク、シャロットの Alliinase cDNA 塩基配列[18]より、高度に保存されている領域の 50mer をスクリーニングプローブとして合成した。独立した 10 万クローンよりなる cDNA フェージライブラリーを、プラ

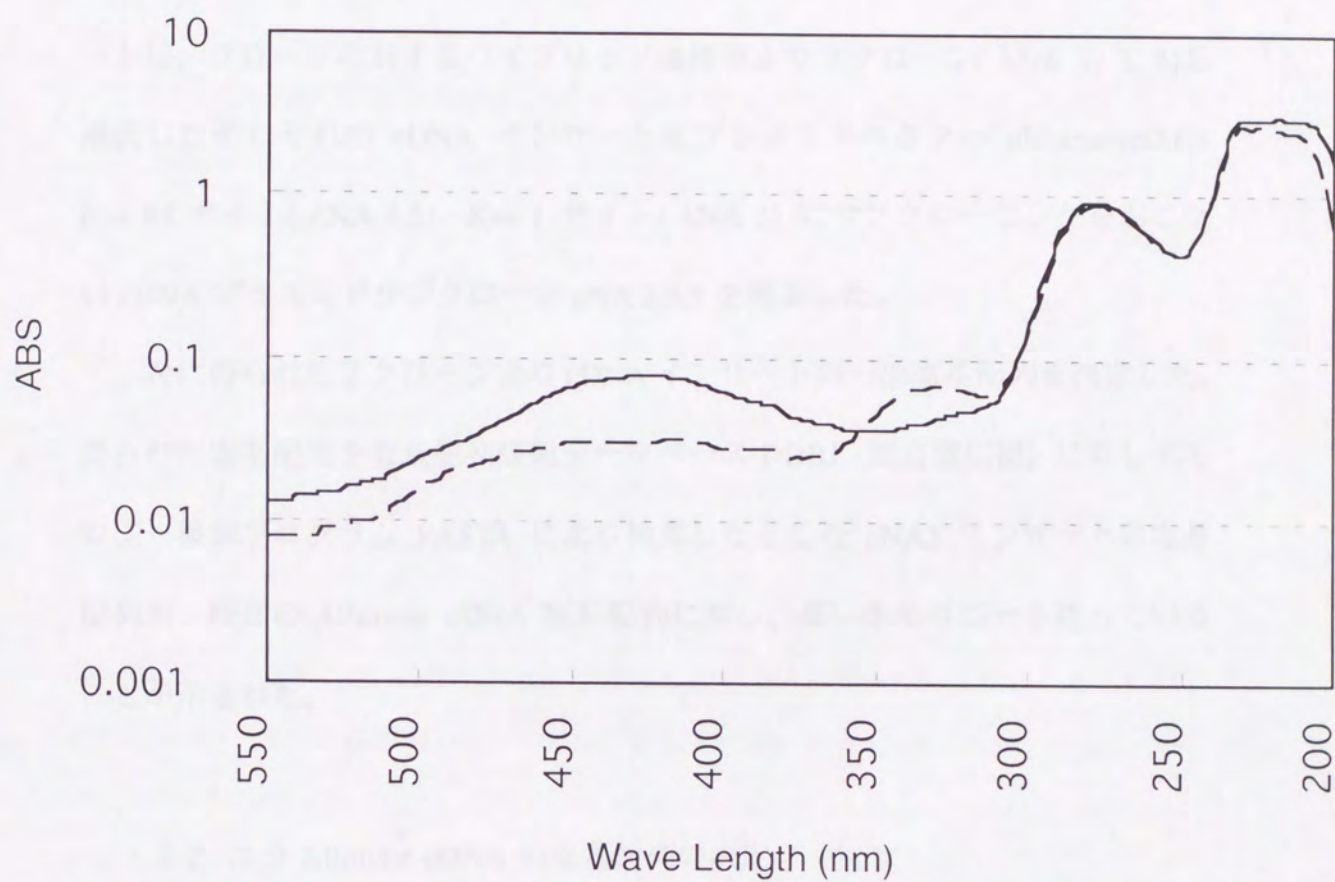


Figure 12. Spectrum of a solution of alliinase (0.9mg/ml) in presence (- -) and absence (—) of 1mM L-cysteine.

ークハイブリダイゼーションによって、スクリーニングをおこなったところ 40 クローンが陽性を示した。陽性を示した 40 クローンのうちランダムに選択した 10 クローンに対し再度同様のスクリーニングを繰り返したところ 7 クローンの単離に成功した(λ NA 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10)。これら 7 クローンについてインサート長、プローブに対するハイブリッド強度等より 3 クローン(λ NA 2, 3, 5)を選択したそれぞれの cDNA インサートをプラスミドベクター pBluescriptSK+ *Eco* RI サイト(λ NA 3,5)、*Kpn* I サイト(λ NA 2) にサブクローニングをおこなった cDNA プラスミドサブクローン pNA 2,3,5 を構築した。

次に得られた 3 クローンより cDNA インサートの一部塩基配列を決定した。得られた塩基配列を塩基配列情報データベース DDBJ (国立遺伝研) に対しホモロジー検索プログラム FASTA により検索したところ pNA5 インサートの塩基配列が、既知の Alliinase cDNA 塩基配列に対し、高いホモロジーを持っていることが示された。

3. 2. ニラ Alliinase cDNA の塩基配列の決定

前項で既知の Alliinase に対し高いホモロジーを示したクローン pNA5 について、デリーションクローンを作成し、サイクルシーケンシング法により全長の塩基配列を決定した。その結果、このクローンは、全長 1654bp よりなり、476 アミノ酸残基からなる分子量 54083Da のポリペプチドをコードしていることが示された。開始 ATG コドンの決定は、5'上流側に、in-frame 停止コドンが存在すること、及び植物型 ATG 周辺領域のコンセンサス配列[23]が存在することにより決定した (Figure 13)。精製ニラ Alliinase タンパク質の *Staphylococcus*

ATGGAAACATACAAACCAGGCAACAAAATGCCTTACCTGATAATATTACTCTGTGTTTCG	97
M E T Y K P G N K M P Y L I I L L C V S	20
TTCCCATTTCTTTAACTGTTCAAACACTAAGCTGGACCTTAAAGGCAGCAGAAGAGGCA	157
F P F F N T V Q T L S W T L K A A E E A	40
GAGGCAGTGGCTGCTATCAAGTGCTCTGGTCATGGCCGAGCTTATCAGGATGGAGTTCTT	217
E A V A A I K C S G H G R A Y Q D G V L	60
TCTAAAGGTTCTCCAATATGTGAATGCAATACCTGCTACGAGGGTTCTGATTGCTCTACG	277
S K G S P I C E C N T C Y E G S D C S T	80
AAGACCCCTAATTGCTCTGCTGATGTGCGCAGCGGAGATGCACTGTTCTTAGAGGAATAC	337
K T P N C S A D V A S G D A L F L E E Y	100
TGGAAGGACCACAAGGAAAATACAGCAGTGCTAGTTTCAGGATGGCACAGGATGAGCTAC	397
W K D H K E N T A V L V S G W H R M S Y	120
TTCTTCCCTGAAAAAGACAGCGACTTCATGTGCTGAACTTAAAGAACATTACAGAA	457
F F P E K D S D F M S A E L K R T I T E	140
CTACACGAGATTGTTGGCAATGCTGAAACGAAGGGAAGCACATTGTGTTTGGTGTGGT	517
L H E I V G N A E T K G K H I V F G V G	160
GTAACCCAACTTCTCCATGGATTAGTTCTTACTATTTCTCCAAACATATCCAATTGTCCT	577
V T Q L L H G L V L T I S P N I S N C P	180
ACCGCTGGGCGGCAAAAGTTGTCGCTCGTGCTCCATACTATGCAGTGTTTAGGGATCAA	637
T A G P A K V V A R A P Y Y A V F R D Q	200
ACCAGCTATTTTGACAATAAAGGGTACGAGTGGAAGGAAATGCAGCAAATTATGTGAAC	697
T S Y F D N K G Y E W K G N A A N Y V N	220
GATCCGAACCCCAATCAATTCATCGAGTTGGTTACTTCGCCGAATAATCCTGAAGGCAAC	757
D P N P N Q F I E <u>L V T S P N N P E G N</u>	240
CTTCGTAAGGCGATGATCGTAGGCTCTACGGCCATTATGACATGGTTTACTACTGGCCT	817
L R K A M I V G S T A I Y D M V Y Y W P	260
CATTTACACCAATCACGTATAAAGCTGACGAAGATATCATGTTGTTTACTATGTCTAAA	877
H F T P I T Y K A D E D I M L F T M S K	280
TATACCGGACATTCTGGTAGTCGATTTGGCTGGGCGATTATAAAGGACGAAAATGTGGCT	937
Y T G H S G S R F G W A I I K D E N V A	300
ATAAACTGGTAGAGTTCATGTCAAAGAACACCGAAGGAACTTCACGTGAAACACAGCTA	997
I K L V E F M S K N T E G T S R E T Q L	320
CGGACGCTAATTTTATTGAAAGAAGTGATAGCAATGATCAAAACACATAAAGGTACCCCG	1057
R T L I L L K E V I A M I K T H K G T P	340
AAAGACATCAATTTTTTTTGGTTTTCAGCATCTGAGGCAGAGGTGGGAAAAAGTTACCGAG	1117
K D I N F F G F Q H L R Q R W E K V T E	360
CTACTCGATCAATCAATAAGAGATTCTCCTATCAACATCTTAATCAAAGTGAACACTGC	1177
L L D Q S N K R F S Y Q H L N Q S E H C	380
AATTACATGAGAATGAAGAGACCTCCTTCTCCATCGTATGCATGGGTGAGGTGCAATTGG	1237
N Y M R M K R P P S P S Y A W V R C N W	400
CCAGGAGAGGAAAAGTTCGGAAGTATTCAAGGAAGGGGGTATTATAACACAAGATGGA	1297
P G E E N C S E V F K E G G I I T Q D G	420
<u>CCGCGTTTTGAAGCAGGTAGTCAATATGTGCGCCTGAGTCTGATCAAGACAAACGACGAC</u>	1357
P R F E A G S Q Y V R L S L I K T N D D	440
TTTGATCAAATGATGGACCATCTGAAGAAAATGATCAAAGAGAAGAGGCCTACTGTGATT	1417
F D Q M M D H L K K M I K E K R P T V I	460
AAGGAGATTCTGGTGAAGTTGATAAGGGCAGCCGTCGTCCATTTATATGAACTTGGTTT	1477
K E I S G E V D K G S R R P F I *	476
GAATTGAGTTGTTTGTGTATCTAACGTACTACTACTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT	1537
TAAGGGAAGATGGTAAGTCTTATTGCTAGTCTGGAGGTGTAAGAAGTATTGATGCAATGA	1597
<u>ATAAAATTCACATGAGCTGAATGAAATTTGTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	1653

Figure 13. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a cDNA clone, pNA5, encoding alliinase from *A. tuberosum*. The underlined amino acid sequence indicates the partial peptide fragment determined by protein microsequencing for the purified alliinase. The dots indicate the positions of three equivocal amino acids. Dashed underlining indicates the sequence homologous with the synthetic oligonucleotide used for hybridization screening. Double underlining indicates putative polyadenylation signals. *, stop codon. The sequence reported here has been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database under accession no. AB004269.

aureus V8 protease を用い作成したペプチド断片の部分アミノ酸配列が、cDNA 予想アミノ酸配列中に確認された。

3.3. Alliinase のアミノ酸配列多重アライメント

ニラ Alliinase cDNA より予想されるアミノ酸配列を用いたアミノ酸配列多重アライメントを示す (Figure 14)。今回得られたニラ Alliinase は、既知の Alliinase に対し、49~69%の同一性を示した。またニンニク Alliinase に見いだされた N-グリコシド結合部位とその周辺部に対応する位置のアミノ酸残基[24]は、よく保存されていることが示された。またシロイヌナズナの Cystathionine β -lyase の PLP 結合部位と考えられる領域の配列[25]も保存されていることが示された。

3.4. ゲノム DNA のサザンブロット分析

ニラのゲノム DNA に対し pNA5 のインサートをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションをおこなった。この結果すべてのレーンに複数のバンドが観察された。このことより、この遺伝子が、ゲノム中に複数コピー存在することが示唆された (Figure 15)。

3.5. ノーザンブロット分析

発芽3週目の緑色及び黄化植物体の、地上部、地下部より全 RNA を調製し、pNA5 インサートをプローブとしてノーザン分析をおこなった (Figure 16)。その結果約 1.9knt の位置にニラ Alliinase 遺伝子転写産物の発現が認められた。

A. tuberosum .METYKPGN...KMPYLIILLCVSFP.....FFNTV.....QTLSWTLKAAEEAEAVA: 44
A. cepa-root .MDSDKSVMSRNKLWLITFLFTSLVVNLYFYDNSFALSSPFLRLTWTTKAATEAEKVA: 59
A. cepa-bulb .AMESYDKVG.SNKVPCLLILTCIIMS....SFVNNN.IVQ...AKVSWSLKAAEEAEAVA: 51
A. ascalonicum Q...AKVTWSLKAAEEAEAVA: 18
A. sativum MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCTIIMSN...SLVNNNNMVQ...AKMTWTMKAAEEAEAVA: 54

↑

A. tuberosum AIKCSGHGRAYQDGVLSKGSPIECNTCYEGSDCSTKTPNCSADVASGDALFLEEYWKDH:104
A. cepa-root AIYCSDHGRAYLDGIPVNGVPICECHNCYSGPTCSVLASNCTADATTGDAMFLEKYWLHH:119
A. cepa-bulb NINCSGHGRAFLDGIILSDGSPKCECNTCYTGADCSEKITGCSADVASGDGLFLEEYWQQH:111
A. ascalonicum NINCSGHGRAFLDGIILSDGSPKCECNTCYTGADCSEKITGCSADVASGDGLFLEEYWQQH: 78
A. sativum NINCSEHGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCESEKIQGCSADVASGDGLFLEEYWKQH:114

A. tuberosum KENTAVLVSGWHRMSYFFPEKDSDFMSAELKRTITELHEIVGNAETKKGKHIVFGVGVTQL:164
A. cepa-root RVNTAMLESWHRMSYFIG...HNFMSDELDRHIRLLHNAVGNNAKVDKFLVFGNGVTQL:176
A. cepa-bulb KENSAVLVSGWHRMSYFFN.PVSNFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRIYFVGVTQL:170
A. ascalonicum KENSAVLVSGWHRMSYFFN.PVSNFISFELEKTIKELHEIVGNAAAKDRIYFVGVTQL:137
A. sativum KEASAVLVSPWHRMSYFFN.PVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAAKDRYIVFGVGVTQL:173

○

A. tuberosum LHGLVLTISPNI SNCP TAGPAKVVARAPYYAVFRDQTSYFDNKG YEWKGNAAANYVNDPNP:224
A. cepa-root LNGV IISLSPNVTATPTAPIKKVVAYVPYYPVFKSQTSFFNFKG YEWKGNASDYVNTTNP:236
A. cepa-bulb IHGLVISLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTKYFDKKGYEWKGNAAADYVNTSTP:230
A. ascalonicum IHGLVISLSPNMTATPCAPQSKVVAHAPYYPVFREQTKYFDKKGYEWKGNAAADYVNTSTP:197
A. sativum IHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFPVVFREQTKYFNKKGYVWAGNAANYVNVSNP:233

A. tuberosum NQFIELVTSPNNPEGNLRKAMIVGSTAIYDMVYYWPHFTPITYKAD DEDIMLF TMSKYTG H:284
A. cepa-root QDFIELVTSPNNPDGLLRKSIIPGSLAVYDHATYWP HYAPIKYAS DEDIMLFALS KYTG H:296
A. cepa-bulb EQFIEMVTSPNNPEGLLRHEVIK GCKSIYVMVYYWPHYTP IKYKA DEDIMLF TMSKYTG H:290
A. ascalonicum EQFIEMVTSPNNPEGLLRHEVIK GCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKA DEDIMLF TMSKYTG H:257
A. sativum EQYIEMVTSPNNPEGLLRHA VIK GCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKA DEDILLF TMSKFTG H:293

A. tuberosum SGRSFGWAI IKDENVAIKLVEFMSKNTEGTSRETQLRTLILLKEVIAMIKTHKGTPKDIN:344
A. cepa-root SGRSFGWAFVRDKSVYDKLTTYISTNSEGVSRESQLRTLFI IKEILLQIKLNRGTIGDFN:356
A. cepa-bulb SGRSFGWALIKDET VYNKLLNYMTKNTEGTSRETQLRSLKILKEVIAMVKTQNGTMRDLN:350
A. ascalonicum SGRSFGWALIKDET VYNKLLNYMTKNTEGTSRETQLRSLKILKEVTAMIKTQKGTMRDLN:317
A. sativum SGRSFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLN:353

A. tuberosum FFGFQHLRQRWEKVTELLDQSNKRFSYQHLNQSEHCNYMRMRPPSPSYAWVRCNWPGE:404
A. cepa-root WYGHHTLRARWVQLNRLVAQST.RFSLQEIS.AEYCNYFQRI RNPSPTYGWLKCEWEEDT:414
A. cepa-bulb TFGFQKLRRERWVNITALLDKSD.RFSYQKLPQSEYCN YFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDK:409
A. ascalonicum TFGFQKLRRERWVNITALLDKSD.RFSYQKLPQSEYCN YFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDK:376
A. sativum TFGFKKLRRERWVNITALLDQSD.RFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDK:412

A. tuberosum NCSEVFKEGGIITQDGPRFEAGS QYVRLSLIKTND DFDQMMDHLKKMIKEKRPT.VIKEI:463
A. cepa-root DCAAVLSNGKILTQSGVLFEASSRYARLSIIKTQDDFNQLMERLSVLVMAKRSTSGYNYD:474
A. cepa-bulb DCYQTFQNGRINTQSGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKIMVEAKRKTPLIKQL:469
A. ascalonicum DCYQTFQNGRINTQSGEGFEAGSRYVRLSLIKTKDDFDQLMYYLKIMVEAKRKTPLIKQL:436
A. sativum DCYQTFQNGRINTQNGVGFEASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKA RKTPLIKQL:472

A. tuberosum SGEVDK.GSRRPFI.....:476
A. cepa-root IINQER..SKRPFIYGGDEGSYEST:497
A. cepa-bulb SNDQ...ISRRPFI.....:480
A. ascalonicum SNDQ...ISRRPFI.....:447
A. sativum FIDQTETASRRPFI.....:486

Figure 14. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of alliinase. Dashes indicate gaps for the best alignment. The arrow indicates the N-terminal amino acid residues of the mature *A. sativum* and *A. cepa* alliinase proteins. ○, the glycosylation site of the alliinase protein from *A. sativum*. The box indicate PLP consensus binding sequence.

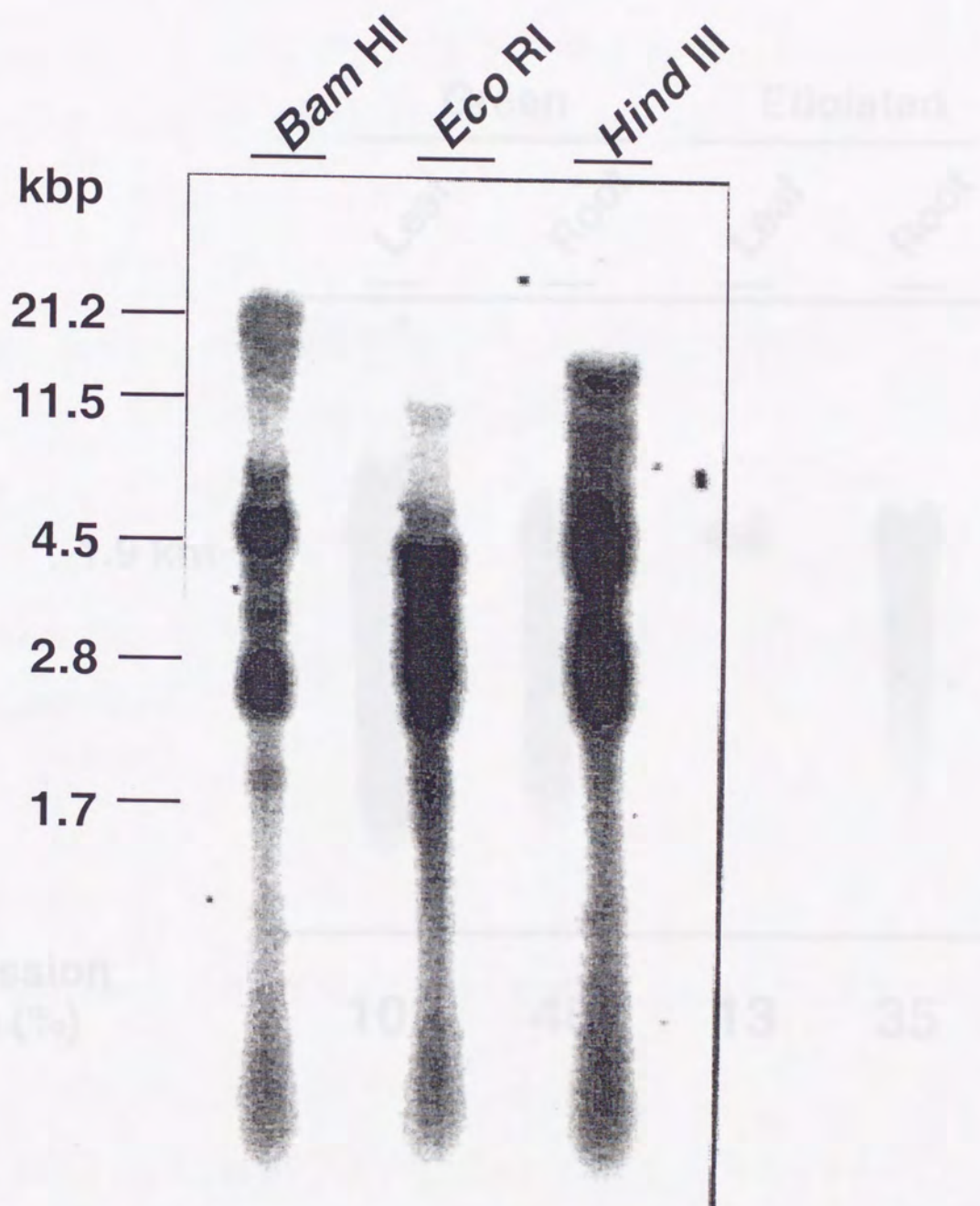


Figure 15. Southern blot of genomic DNA from *Allium tuberosum*. Genomic DNA (30 μ g) was digested with restriction enzyme, separated on an agarose (0.7%), transferred to a Hybond-N+ filter, and then hybridized with the ^{32} P-labeled coding region of pNA5 as a probe.

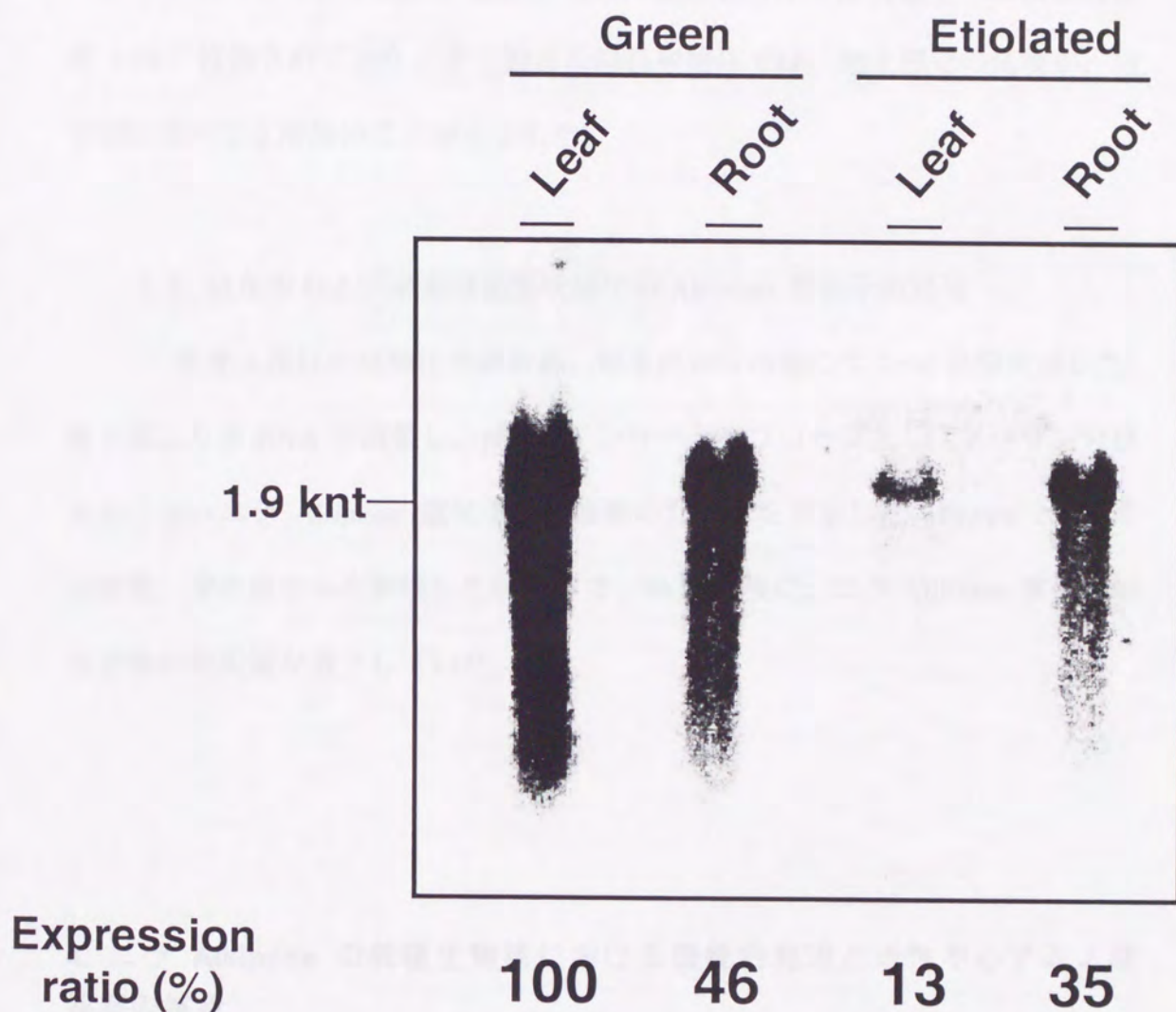


Figure 16. Expression of mRNA for alliinase in *Allium tuberosum* . The total RNA (20 μ g) was separated by agarose-formaldehyde gel (1.2%) electrophoresis, transferred onto Hybond-N+, and then hybridized with the ^{32} P-labeled cDNA insert of pNA5 and rice rDNA. Expression ratio of hybridized RNA was normalized by signal intensity of ^{32} P-labeled rice rDNA hybridization.

ニラ緑化植物体と黄化植物体における Alliinase 遺伝子の発現量は、地下部においてはほぼ同等であったが、地上部では、黄化植物体の発現量は、緑化植物体の 13%に抑制されていた。また通常の緑色植物体では、地上部での発現が、地下部に比べて 2 倍高いことが示された。

3. 6. 硫黄源および窒素源制限状態での Alliinase 遺伝子の発現

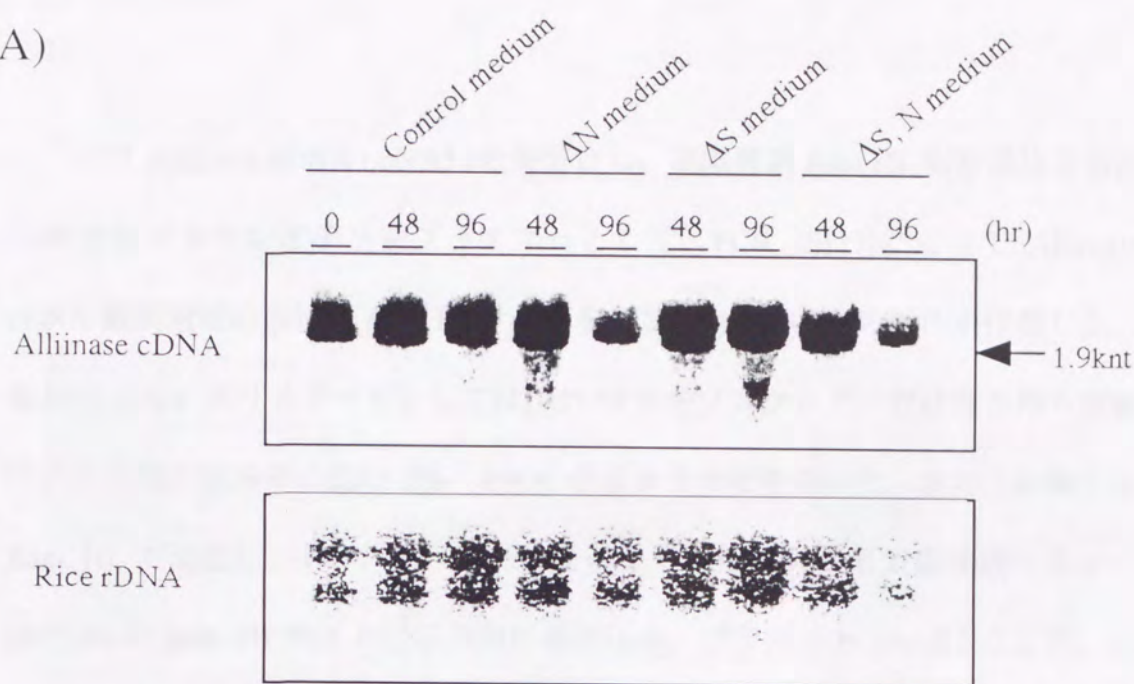
発芽 3 週目の植物体を硫黄源、窒素源制限培地にて 2~4 日間育成した。地上部より全 RNA を調製し、pNA5 インサートをプローブとしてノーザン分析をおこないニラ Alliinase 遺伝子転写産物の発現量を測定した (Figure 17)。その結果、窒素源のみを制限した植物体で、96 時間後に、ニラ Alliinase 遺伝子転写産物の発現量が低下していた。

4. ニラ Alliinase の異種生物種における機能的発現と活性中心アミノ酸残基の解析

4. 1. ニラ Alliinase の大腸菌での機能的発現

大腸菌における、酵素の大量発現系を確立することは、その酵素の活性中心などの研究において重要である。すなわち、遺伝子に人工変異を導入するなどして酵素の構造を自由に変換し、その変換酵素を大量に得ることが可能になる。そこで、ニラ Alliinase cDNA を大腸菌高発現ベクター pET15b に導入し、その酵素活性を検討した。

(A)



(B)

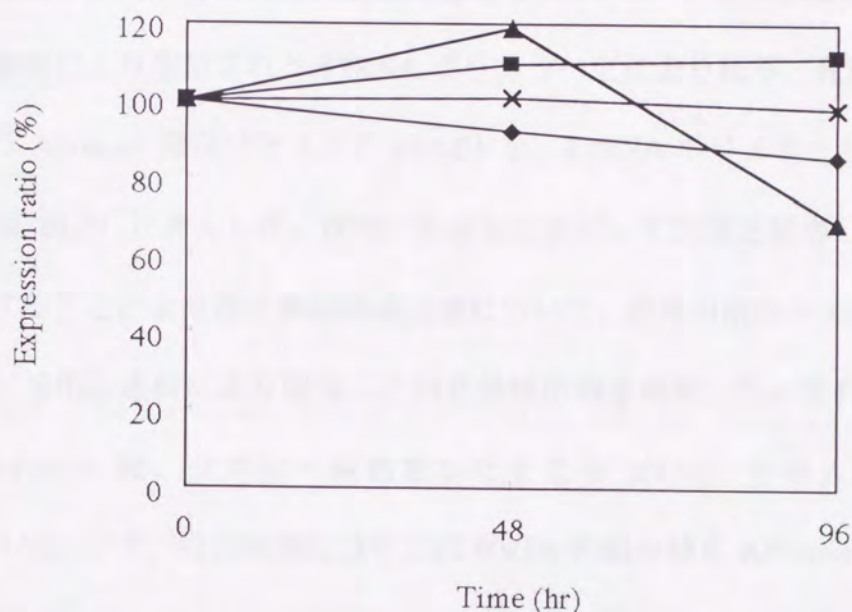


Figure 17. Change of mRNA accumulation of Alliinase under sulfur and/or nitrogen starvation. (A) The northern blot analysis. The total RNA (20 μ g) was separated by agarose-formaldehyde gel (1.2%) electrophoresis, transferred onto Hybond-N+, and then hybridized with the ^{32} P-labeled cDNA insert of pNA5 and rice rDNA. Expression ratio of hybridized RNA was normalized by signal intensity of ^{32} P-labeled rice rDNA hybridization. (B) The time-course of mRNA accumulation of alliinase after transfer to control (-♦-), ΔS (-■-), ΔN (-▲-), ΔSN (-×-) media.

ニラ Alliinase cDNA (pNA5) を鋳型とし、制限酵素 *Bam* HI 切断部位を含む合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCR 法[27]によって Alliinase cDNA 翻訳領域の前後に *Bam* HI サイトを付加した 1.44kbp の断片を作製した。耐熱性 DNA ポリメラーゼとしては、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持ち増幅時の変異取り込み率の低い *Pfu* DNA ポリメラーゼを用いた。次にこの断片を *Bam* HI で消化し、T7 フェージプロモーターを持つ大腸菌大量発現ベクター pET15b の *Bam* HI サイトに正方向に組み込み、プラスミド pNAE1 とした。ニラ Alliinase cDNA は、pET15b 上の強力な T7 フェージプロモーター下流に挿入され、発現タンパク質精製時に利用可能なヒスチジン・タグを融合した形で、宿主大腸菌により供給される T7RNA ポリメラーゼにより転写、発現される。

ニラ Alliinase 発現プラスミド pNAE1 を、T7RNA ポリメラーゼが溶源化した大腸菌 BL21 に導入した。IPTG を培地に添加して発現を誘導し菌体を超音波破碎することにより得た無細胞抽出液について、菌体可溶画分と、沈殿を 6M 尿素で可溶化し透析により脱塩した抱合体抽出液を調製した。それぞれについて SDS-PAGE 後、クマシー染色をしたところ pNAE1 を導入した大腸菌 BL21/pNAE1 では、抱合体抽出液中に約 60kDa の組み換え Alliinase タンパクが発現していた (Figure 18)。さらに Alliinase 活性を測定したところ、同画分において、活性が観測された (Table 3)。組み換え体タンパク質に Alliinase 活性が確認されたのは、今回のニラ cDNA クローンが初めてであり、本 cDNA が活性のある Alliinase をコードしている直接的な証拠が得られたと考えられる。

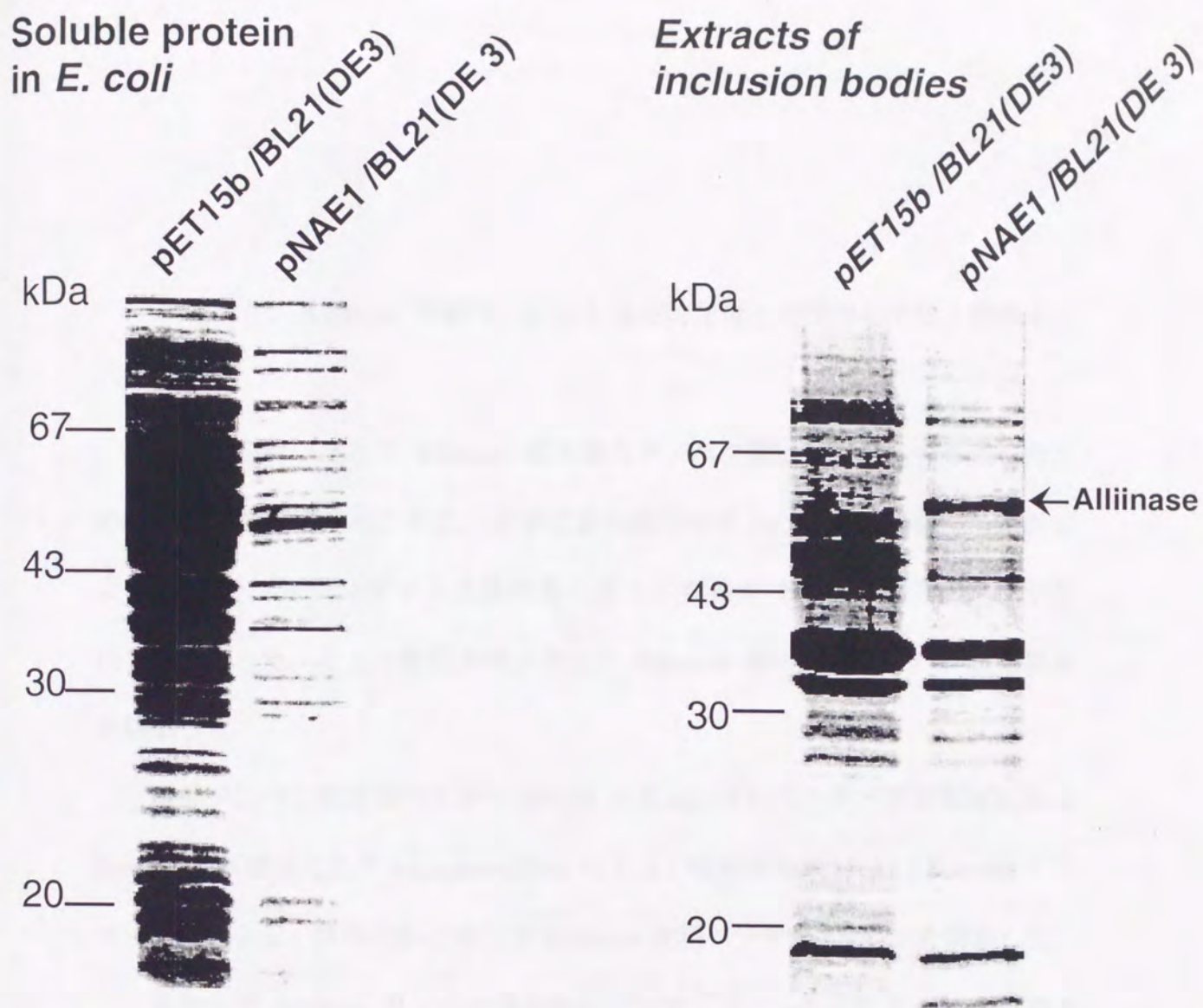


Figure 18 . SDS-PAGE of extracts of *E. coli* transformants.

Table 3. Enzymatic activities for alliinase in protein extracts of *E. coli* transformants.

	Soluble protein in <i>E. coli</i>		Extracts of inclusion bodies	
	pET15b	pNAE1	pET15b	pNAE1
Alliinase activity (pmol /min / μ g protein)	< 5	< 5	< 5	71

4. 2. ニラ Alliinase の酵母における機能的発現と活性中心アミノ酸残基の解析

大腸菌を用いたニラ Alliinase 組み換えタンパク質は、抱合体を形成したため酵素活性を回復するために、尿素による抱合体タンパク質の可溶化、透析による脱塩・リフォールディング操作を必要とし煩雑かつ酵素活性の安定性が低いものであった。そこで酵母を用いたニラ Alliinase 組み換えタンパク質発現系を構築した。

酵母タンパク質発現ベクター pYES2 の *GALI* プロモーター下流領域にある *Bam*HI 切断部位にニラ Alliinase cDNA のアミノ酸翻訳領域 pNAE1 *Bam* HI インサートを挿入し、酵母におけるニラ Alliinase 発現ベクター pNAY1 を構築した。

またニラ Alliinase タンパク質の解析よりサブユニットあたり 1 分子の PLP が結合していると推定されること、Alliinase cDNA より推定されるアミノ酸配列中にシステイン／ホモシステイン／メチオニン代謝酵素群の PLP 結合サイトの保存モチーフと高い相同性のある配列を見いだしたことから、共通配列中の Lysine を PCR 法により Alanine、Arginine に変異させた組み換えニラ Alliinase 発現ベクター pNAY1(K280A), pNAY1(K280R)を作成し、酵母を形質転換し Galactose を用い発現を誘導した。それぞれの酵母抽出液より抗 Alliinase 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、54kDa に組み換え Alliinase タンパク質が検出された (Figure 19)。ワイルドタイプの Alliinase 遺伝子を導入したものは、酵素活性を検出することができたが、変異を導入したものは同程度の強度

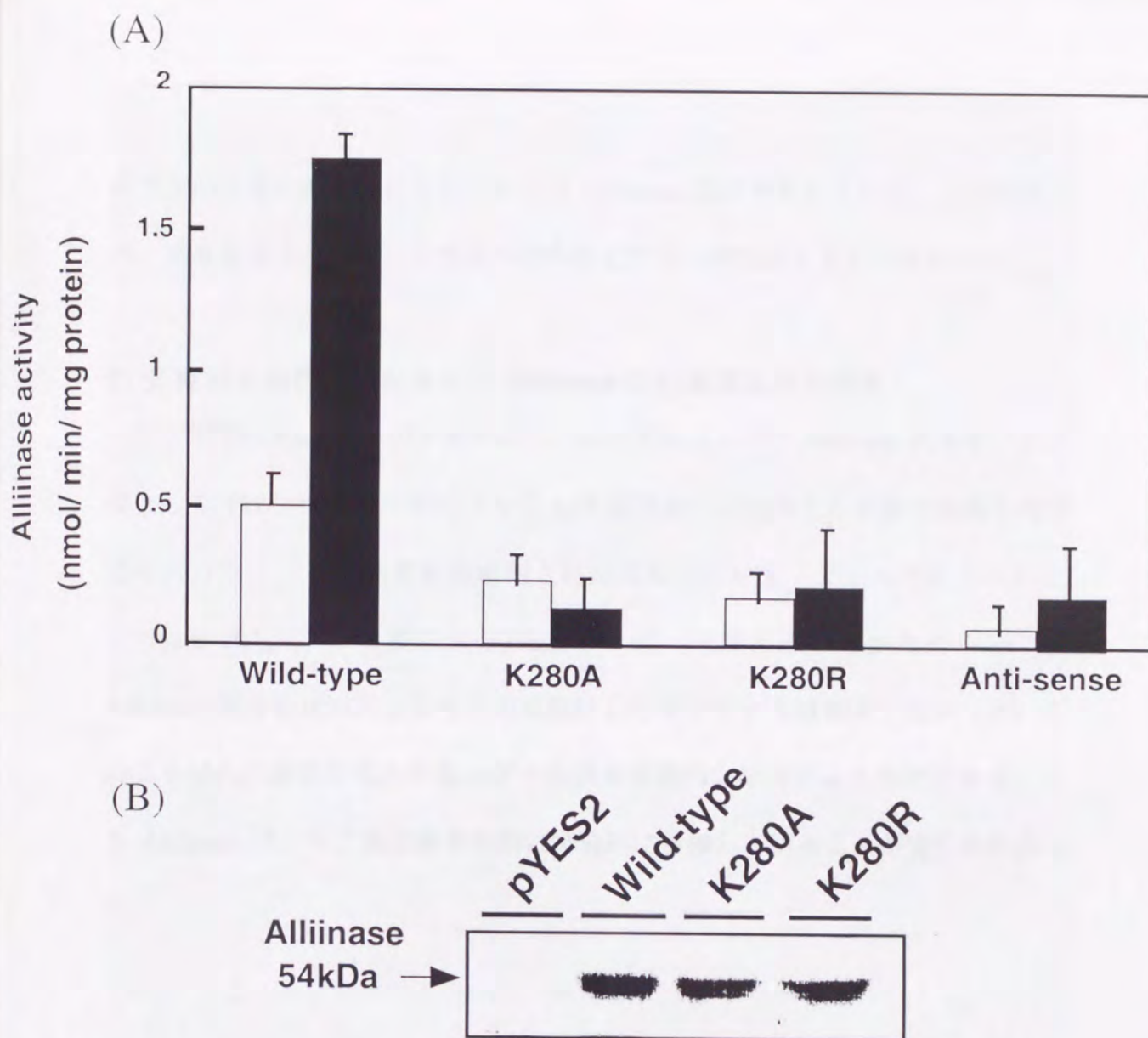


Figure 19. Detection of alliinase activity and immunoreactive proteins in transformed yeast expressing wild and mutated cDNAs. (A) Alliinase activity was determined in the soluble protein extracts as described under Materials and Methods. Open boxes were alliinase activity before induction by galactose. Closed boxes were alliinase activity after 6hr induction. (B) The soluble protein extracted from yeast (20 μ g per lane) were separated by 10% SDS-PAGE, with subsequent immunoblotting analysis with antibodies against alliinase of *A. sativum* as described under Materials and Methods. *Lanes:* pYES2, a vector control; pNAY1, the wild alliinase cDNA; K280A, the plasmid expressing a mutated cDNA of lysine-280 to alanine; K280R, the plasmid expressing a mutated cDNA of lysine-280 to arginine.

(A)

のタンパク質の蓄積は見られたものの Alliinase 活性を失っていた。この結果より、変異を導入したリジン残基が活性中心アミノ酸残基であると同定した。

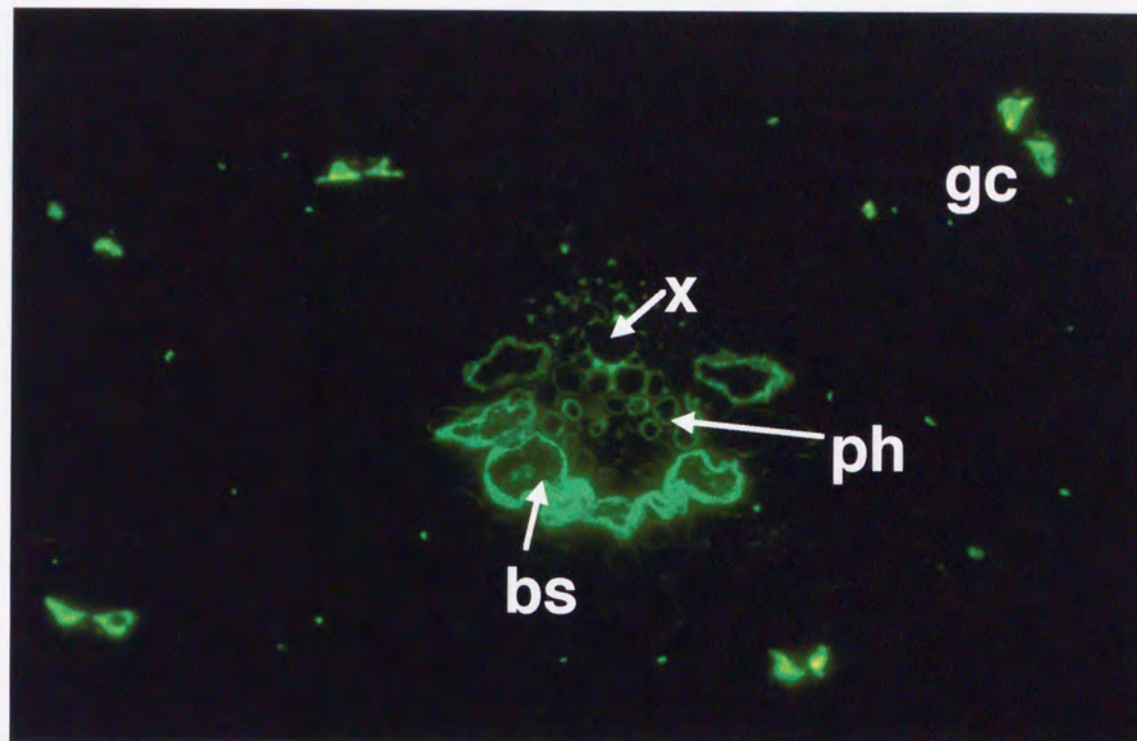
5. 免疫蛍光染色法によるニラ *Alliinase* の組織極在性の解析

ニラ葉部の 8 μ m 厚の切片を作成し、ウサギ抗ニンニク *Alliinase* 抗体を一次抗体として FITC ラベルヤギ抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体として蛍光組織免疫染色を行ったところ、維管束鞘細胞と孔辺細胞においてシグナルが認められた (Figure 20)。予め精製ニラ *Alliinase* を用い免疫沈降を行った抗ニンニク *Alliinase* 抗体を用いたところ孔辺細胞におけるシグナルは消失しなかった。このことは孔辺細胞に見られるシグナルは非特異的な結合によるものであり、ニラ *Alliinase* タンパク質は維管束鞘に特異的に蓄積していることが明らかに成った。



Figure 20. Microsample immunofluorescence of the alliinase protein in *A. tuberosum*. The green shoots of *A. tuberosum* were fixed and sectioned as described under Materials and Methods. After reaction with the primary antibodies, the immunoreactive were visualized with FITC-labeled secondary antibodies. (A) Rabbit anti-alliinase against *A. tuberosum* alliinase were used as the primary antibodies. (B) Anti-alliinase antibodies were adsorbed with the purified *A. tuberosum* alliinase, and then the supernatant was used for immunofluorescence of the sections was used as the primary antibodies as a control. ph: phloem, gc: guard cell.

(A)



(B)

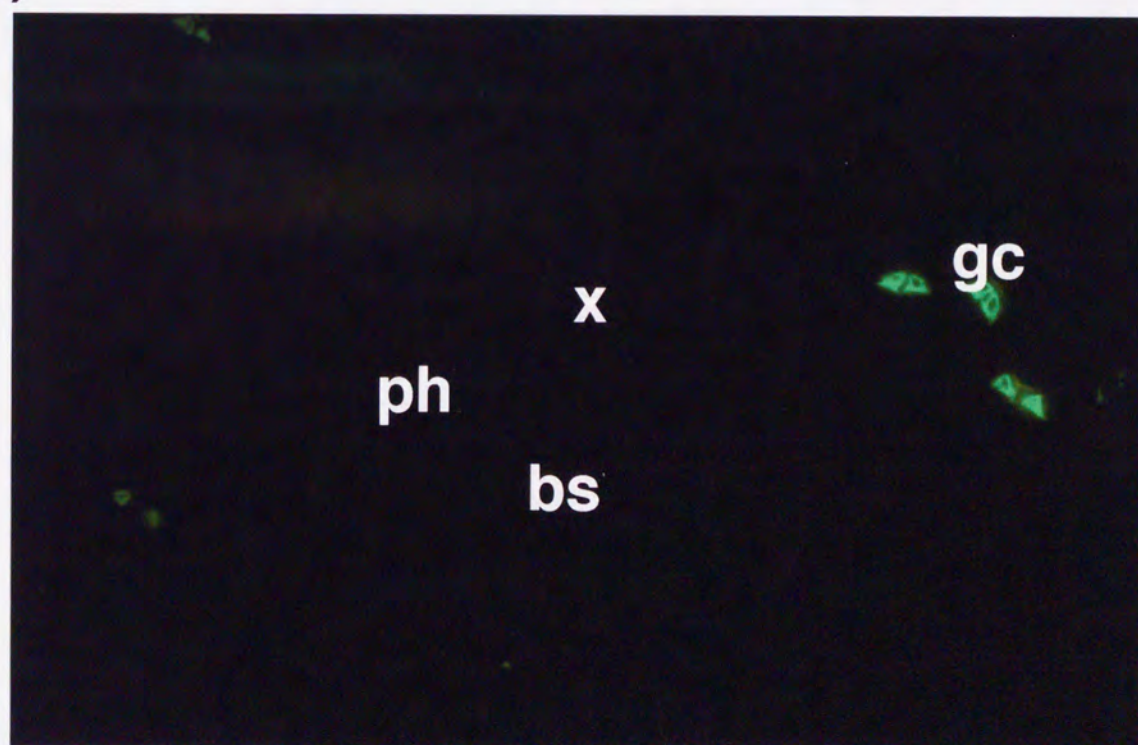


Figure 20. Microscopic immunolocalization of the alliinase protein in *A. tuberosum*. The green shoots of *A. tuberosum* were fixed and sectioned as described under Materials and Methods. After reaction with the primary antibodies, the immunosignals were visualized with FITC-labeled secondary antibodies. (A) Rabbit antibodies against *A. sativum* alliinase were used as the primary antibodies. (B) Anti-alliinase antibodies were absorbed with the purified *A. tuberosum* alliinase, and then the supernatant resulting on centrifugation of the mixture was used as the primary antibodies as a control. bs; bundle sheath, x; xylem, ph; phloem, gc; guard cell.

考察

本研究により、アリイン類の含有パターンにおいて、Propenyl-CSO と Allyl-CSO を両方含有する第三グループに分類されるニラよりネイティブな Alliinase を抽出・精製した。この酵素を用い、諸性質を検討した (Table 4)。

分子量については、ネイティブなタンパク質として分子量約 67kDa、サブユニットの分子量として約 45kDa であった。糖鎖を持つタンパク質が糖鎖と、ゲル濾過カラム担体との相互作用により溶出位置が遅くなり、そのため小さな分子量を示すことがよく観察されることから、本酵素は、約 45kDa のサブユニットからなるホモダイマーであると考えられる。ニンニク、タマネギ Alliinase と比較して、ネイティブな Alliinase の分子量に大きな違いが見られた [12,13]。

至適 pH は、pH8.0-8.5/Tris-HCl であったが、強い buffer 依存性を示した。これは、タマネギ Alliinase と同様の結果であった。しかし、ニンニク Alliinase には、この様な結果は得られていない。

可視・紫外吸収スペクトルにおいて、本酵素は、PLP 結合タンパク質の特徴である 415nm 付近に吸収を示した。また、Cysteine 添加実験による吸収ピークの消失から計算される PLP の結合量は、サブユニット 1mol 当たり 0.9mol の PLP が結合していることが示された。また、PLP 特異的阻害剤である硫酸 Hydroxylamine[22]により、本酵素は、強く阻害される。可視・紫外吸収スペクトル分析、硫酸 Hydroxylamine による阻害実験より本酵素には、補酵素として、PLP が結合していると考えられる。

Table 4. Purified Alliinases from Various *Allium* Plants

	<i>A. tuberosum</i> (Chinese chive)	<i>A. cepa</i> (Onion)	<i>A. sativum</i> (Garlic)
Purification fold	43.7	16.6	8.0
Molecular weight of subunit on SDS-PAGE	45 kDa	50 kDa	42 kDa
Molecular weight of native enzyme on gel filtration	67 kDa (dimer)	200 kDa (tetramer)	85 kDa (dimer)
Content of PLP <i>per</i> subunit	0.88 mol	1 mol	1 mol
<i>K_m</i> for S-ethyl-L-cysteine sulfoxide	2.7 mM	5.7 mM	6 mM
Optimum pH	pH 8.0-8.5	pH 8.5	pH 6.5-6.7
Inhibition by hydroxylamine	+	+	+

すでに、ニンニク、タマネギ、シャロットより抽出・精製された Alliinase の N-末端アミノ酸配列が報告されている[18]。いずれも N-末端アミノ酸には、保護基は結合していない。しかし、ニラ Alliinase においては、Edman 分解がおきず、N-末端アミノ酸は、何らかの保護基が結合していると考えられた。これは、ニンニク、タマネギ、シャロット Alliinase 成熟タンパク質の N-末端アミノ酸である 39-Lys (*A. sativum*) に相同する位置のアミノ酸残基がニラ Alliinase では、欠失していることと関係がある可能性がある。タマネギの根より Alliinase が精製された[20]。タマネギ根 Alliinase は 2 アイソフォームが単離されたがその内 1 アイソフォームについてニラ Alliinase と同様に N-末端アミノ酸は、何らかの保護基が結合していると報告されている。

アリイン類の含有パターンにおいて第三グループに分類されるニラより初めて Alliinase cDNA が単離された。本クローン pNA5 は、476 アミノ酸残基からなる分子量 54083Da のポリペプチドをコードしていることが示された。開始 ATG codon 付近の塩基配列 AGCTATGGA (position 34-42) は、植物における翻訳開始モチーフ、AACAAUGGC と高い類似性を示した [23]。また、in-frame の終始 codon TAG が開始 ATG codon の 18bp 上流に存在した。このことは、この cDNA が、ポリペプチドの全長をコードしていることを示している。また、3'側非翻訳領域には、ポリ A 付加シグナル領域の存在が示された。この cDNA より予想されるアミノ酸配列は、既知の Alliinase cDNA に対してアミノ酸配列で、49～69%の同一性が認められた。アミノ酸配列アライメントの結果、ニンニク Alliinase 蛋白質より見出された糖鎖結合位置である 147-Asn はニラ Alliinase

cDNA においても保存されており、その周辺部のアミノ酸配列も保持されていた[24]。シロイヌナズナ Cystathionine β -lyase とのアミノ酸配列アライメントの結果、システイン/メチオニン代謝酵素の PLP 結合サイトの保存モチーフ、[DQ]-[LIVM]-x(3)-[STAGC](2)-T-K-[FYW]-[LIVMF]-x-G-H-[SGN]と1アミノ酸残基の欠損はあるものの、高い類似性を示す配列が Alliinase のアミノ酸配列に存在した (Figure 21) [25, 26]。酵母による機能的発現系を用いこの部位のリジン残基を Alanine、Arginine に変異した組み換え Alliinase を作成した。この結果、変異を加えた組み換え Alliinase は酵素活性を失っていた。従ってこの領域に含まれる 280-Lys が PLP 結合部位 (酵素活性中心) と予想される。このリジン残基はタマネギ Alliinase タンパク質において NaBH_4 により PLP を標識した研究による報告と同一の結果を得た[27]。Alliinase を含めて一般的な C-S lyase の新たな PLP 結合 site の保存モチーフ、[DQ]-[LIVM]-x(3)-[STAGC]-[MSTAGC]-[ST]-K-[FYW]-[LIVMF](1-0)-x-G-H-[SGN]を提案することが出来る。また推定される proprotein の N-末端アミノ酸配列からは、すでに報告されている液胞輸送タンパク質である napin, sporamin にみられる N-末端 pro-domains のような強い液胞配向性の配列はみられなかった[28, 29]。しかし、ニラ Alliinase のアミノ酸配列を、タンパク質の細胞内局在性を推定するプログラム PSORT によって検討したところ、ニラ Alliinase の予想される蛋白質輸送オルガネラとして、小胞体が生唆された。液胞膜は、小胞体から形成されると考えられるので (endomembrane system)、PSORT の結果は、従来の植物生理学的な知見と矛盾しない。

また、ゲノミックサザンブロット分析の結果、ゲノム中に、複数の Alliinase 遺伝子のコピーの存在が生唆されたが、この結果も、他の Alliinase 遺伝子にお



ATA	(268)	KADEDIMLFTMSKY-TGHSGSRFGWAI
ACA	(273)	KADEDIMLFTMSKY-TGHSGSRFGWAL
ASA	(277)	KADEDILLFTMSKF-TGHSGSRFGWAL
ACAR	(236)	ASDEDIMLFALSKY-TGHSGSRFGAFV
ATCBL	(266)	ELGADIVMHSATKFIAGHSDVMAGVLA
CGS1	(367)	ALGADLVVHSATKYIGGHNDVLAGCIC
CYS-3	(191)	NFGADIVVHSATKYINGHSDVVLGVLA
MET17	(196)	KYGADIVTHSATKWIGGHGTTIGGIIV
METB	(186)	ALGADLVVHSC TKYLNGHSDVVAGVVI
METC	(197)	H-GIDISVEAGTKYLGGHSDLLIGLAS
METZ	(207)	KLGADVVIHSATKYIDGQGRGMGG-VV
MGL	(199)	ELGADLVVHSATKYLSGHGDITAGIV-
Consensus		:...G.D.....TKY..GH.....G...

Figure 21. Comparison of the conserved region containing the PLP binding site in the amino acid sequences of C-S lyases. The numbers in parentheses indicate the location of the first amino acid of the region in the respective complete sequence. Consensus indicates matching amino acids in at least eight sequences among those of the eleven proteins. The K residue indicated by an arrow is the binding site of PLP. The sequences are: ATA, *A. tuberosum* alliinase; ACA, *A. cepa* alliinase [18]; ASA, *A. sativum* alliinase [18]; ACAR, *A. cepa* root alliinase[20]; ATCBL, *Arabidopsis thaliana* cystathionine β -lyase [25]; CGS-1, *A. thaliana* cystathionine γ -synthase [30]; CYS-3, *S. cerevisiae* cystathionine γ -lyase [31]; MET17, *S. cerevisiae* O-acetyl homoserine sulfhydryase [32]; METB, *E. coli* cystathionine γ -synthase [33]; METC, *S. cerevisiae* cystathionine β -lyase [34]; METZ, *Pseudomonas aeruginosa* O-succinyl homoserine sulfhydrylase [35]; MGL, *P. putida* methionine γ -lyase [36].

いてみられた結果と同様であった[18]。

ノーザンブロット分析より、1.9knt にバンドが認められた。得られたニラ cDNA の全長 1654bp から見て妥当な長さであった。今回、ニラ緑化植物体と、黄化植物体における Alliinase 遺伝子の発現量を比較したところ、地下部においてはほぼ同等であったが、地上部では、黄化植物体の発現量は、緑化植物体の 13%に抑制されていた。このことより、Alliinase 遺伝子の発現には、地上部、地下部では、異なった制御因子が存在している可能性が示された。地上部における制御因子は、光による影響を受け易い因子である可能性がある。

硫黄源、窒素源制限培地において成育した植物体における Alliinase 遺伝子の発現量を比較したところ、窒素源のみを制限した植物体の発現量が抑制されていた。植物は、環境のストレスに対して、代謝系の調節などによって対応し、環境に適応していく。窒素源を制限することによって、植物体内のアミノ酸を始めとする含窒素化合物が不足していることは容易に想像できる。生命維持に重要な酵素群の発現量を維持するために2次代謝系酵素である Alliinase の発現を抑制する調節因子の存在が考えられる。しかし、窒素源に加え、硫黄源までも制限した植物体における Alliinase 遺伝子の発現量は低下していない。このことより、植物体内で不足した硫黄源を細胞質に蓄積している含硫化合物である Allyl-CSO で補償する系が働いていると考えられる。しかし、Alliinase は、植物体内に大量に存在するため恒常的な発現量で不足した硫黄源を補償することが可能であると推定できる。Alliinase 遺伝子の発現には、窒素源不足により発現を抑制する調節因子と、これよりも上位に位置する硫黄源不足に対応して、発現量を維持する調節因子の存在が示唆される。

Alliinase の大腸菌発現系を構築した。T7RNA ポリメラーゼを利用した発現ベクター pET15b にニラ Alliinase cDNA の翻訳領域を導入したが、IPTG により T7 RNA ポリメラーゼの発現を誘導した後に菌体の増殖が停止していた。これは、発現した Alliinase ペプチドが、大腸菌に対し、何らかの毒性を示したためと考えられる。しかし、大腸菌による Alliinase ペプチドの発現を SDS-PAGE で確認することが出来た。発現したペプチドは、抱合体画分に見出されたが、6M 尿素により可溶化した後、透析により、徐々に尿素をのぞきリフォールディングを行ったところ、この画分に酵素活性を検出することが出来た。大腸菌におけるタンパク質発現系では発現したタンパク質は糖鎖の付加を受けないことより Alliinase において糖鎖の付加は、酵素活性においては不可欠のものではないことが明らかになった。

酵母におけるニラ Alliinase の発現系では、活性 Alliinase は、可溶画分から得られた。大腸菌と酵母における局在性の違いは、膜構造、酵母における液胞の存在など、細胞構造の違いが影響している可能性がある。

ニラ Alliinase タンパク質の組織極在性について免疫蛍光染色法を用いて解析した。ニラ Alliinase タンパク質は維管束鞘の師部側に局在している。ニンニク鱗茎における Alliinase タンパク質の組織局在性について、同様に維管束鞘に蓄積していると報告されている[37]。ネギ属植物[38]および小麦[39]において Cysteine 合成酵素についても同様に維管束鞘に局在して蓄積している。このことは、植物、少なくとも単子葉植物において維管束鞘が硫黄代謝において重要な役割を担っていることを示唆している。

ニラ Alliinase は、ニンニク、タマネギ Alliinase と類似している部分のみな

らず、かなり類似していない部分も持つ Alliinase であると考えられる。この 4 種の Alliinase を比較検討することで、さらに Alliinase の性質が解明されていくと期待できる。特にタマネギ根より抽出された Alliinase には Cystine-lyase 活性が見いだされ、ニラ Alliinase と比較検討することで基質特異性の違いを与える部位などより深い分子生物学的情報を得ることができるであろう。また Alliinase は、補酵素として PLP を要求する事、および推定される酵素反応様式から植物における硫黄代謝系の重要な位置をしめる C-S lyase のモデルとなりうる酵素である。本研究では、初めて Alliinase cDNA の異種生物種での活性発現系を構築した。この系を利用し酵素活性中心部位のアミノ酸残基の同定を行った。さらにこの系は Alliinase の反応機構に関する研究や、含硫黄二次代謝産物の遺伝子レベルでの代謝工学的な研究の基礎となりうるものである。

第二部 ブロccoli (*Brassica oleraceae*) Cystine-lyase の解析

序論

Cystine-lyase を含有するアブラナ科植物は、キャベツ、ブロッコリ、カリフラワー、マスタード等重要な農業生産物である。これらアブラナ科植物は植物種特有の臭気を有している。これは Cystine を Cystine-lyase が PLP を補酵素として、 β -脱離反応を行い Thiocysteine, Pyruvate, Ammonia を生成する事により生じる。ここに予想される反応様式は他の C-S lyase による反応と同様のものであると考えられる。

植物における Cystine-lyase 活性についての報告は 1966 年、Tishel and Mazelis によってキャベツ抽出液を用いて行なわれた [40]。キャベツ抽出液は L-cystine を基質とするが、L-cystathionine を基質としなかった。ラット肝臓やアカパンカビより抽出された Cystathionase が Cystine、Cystathionine とともに基質とする点とは異なっていた [41]。

ブロッコリにおける Cystine-lyase の活性は Hamamoto and Mazelis により 1986 年に報告された [42]。ブロッコリより 2 アイソザイムが単離され、うち 1 アイソザイムについて精製された。Ukai and Sekiya は、ブロッコリより 3 アイソザイムを単離・精製した [43]。しかし、cDNA クローニングなど分子生物学的解析はいまだ行われていない。

本研究では、ブロッコリより Cystine-lyase を抽出・精製し、Cystine-lyase タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、これを用いブロッコリ Cystine-lyase 候補 cDNA クローンを単離した。

結果

1. ブロッコリ Cystine-lyase タンパク質の抽出・精製と解析

Cystine-lyase は酸処理、硫酸沈殿、DEAE-Sepharose F. F. カラム、Cibacron blue 3GA カラムを経て 95 倍に精製された (Figure 22, 23, Table 5)。精製画分を Native-PAGE にかける活性画分を切り出し、タンパク質を抽出し SDS-PAGE を行ったところ 45kDa に 2 本のバンドを示しそれぞれ *Brassica oleracea* cystine-lyase、BOCL-1A、BOCL-1B とした (Figure 24)。両バンドを分離し、それぞれリシルエンドペプチダーゼによる in-gel digestion を行い逆層 HPLC によりペプチドマップを作成した。溶出タンパク質は 280nm および 210nm の吸光度変化によりモニターされた (Figure 25)。BOCL-1A, B 両ペプチドマップは、BOCL-1A において 47 分、52 分に特異的フラグメントが見られる。この両フラグメントを除いたすべてのフラグメントの溶出パターンが同一であることより BOCL-1A, B はアイソザイムであると考えられる。ペプチドマッピングにより分離した Fr. 63 (63 分溶出画分)、Fr. 75 (75 分溶出画分、210nm における吸収が強く芳香族アミノ酸含量が高いと考えられる) の両ペプチドフラグメントについて N-末端アミノ酸配列を決定した。BOCL-1A Fr. 63 より Phe-Ser-X-Ile-Val-Pro-Val-Val-Thr-Leu-Gly-Ser-Leu-Ser-Lys の 14 アミノ酸残基が、BOCL-1A Fr. 75 より Gly-Trp-Asn-Val-Pro-Gly-Trp-Arg-Thr-Gly-Trp-Leu-Ala-Leu-His-Asp-Leu-Asp-Gly-Val-Phe-Arg-Asn の 23 アミノ酸残基の配列を決定することができた。部分アミノ酸配列をアミノ酸配列データベース DDBJ (国立遺伝研) に対しホモロジー検索プログラム FASTA により検索した。BOCL-1A Fr. 63, Fr. 75 アミノ酸配列が、既知の Tyrosine transaminase に対し高いホモロジーを持っていることが示された。

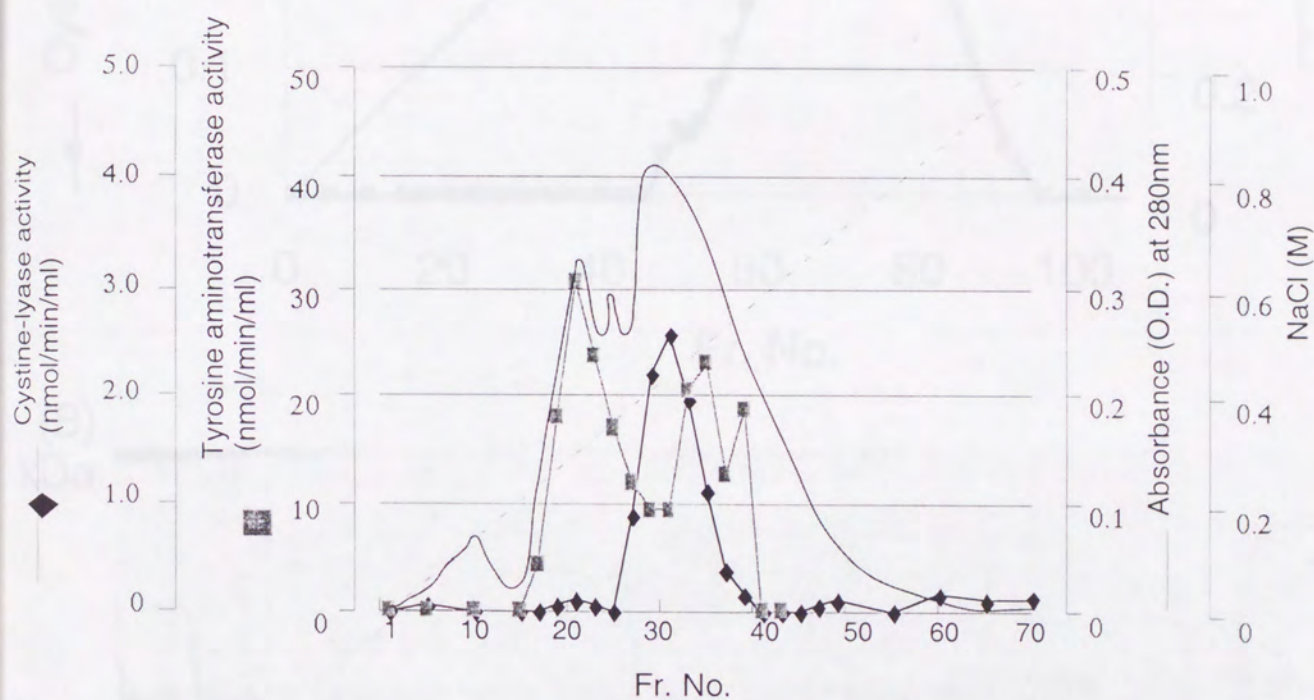


Figure 22. Elution pattern of Cystine-lyase from DEAE-Sephadex F. F. column.

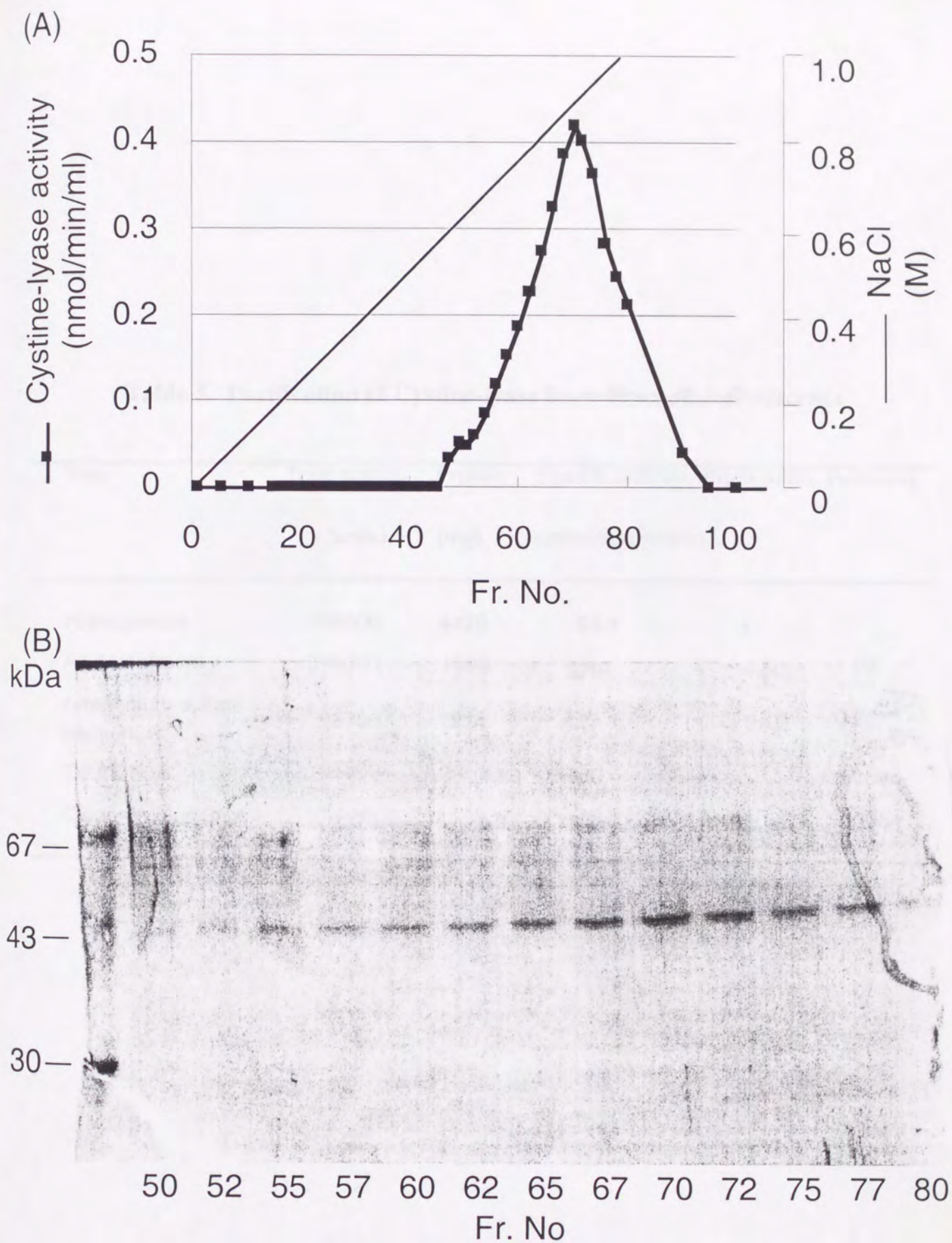


Figure 23. Elution pattern Cystine-lyase from *B. oleacea* after cibacron blue 3GA column. A; Elution pattern of cystine-lyase activity, B; SDS-PAGE of cystine-lyase active fraction (20 μ l per lane).

Table 5. Purification of Cystine-lyase from *Broccoli Inflorescence*

Step	Total activity	Protein	Specific activity	Purification	Recovery
	(units)	(mg)	(units/mg protein)		
Homogenate	369000	4420	83.4	1	
Acid treatment	376000	1000	376	4.50	1.02
Ammonium sulfate fraction	95700	224	427	5.12	0.26
DEAE F. F.	21800	4.29	5080	61	0.059
Cibacron blue 3GA	2370	0.3	7900	95	0.0064

Figure 24. Native- and SDS-PAGE of cystine-lyase.

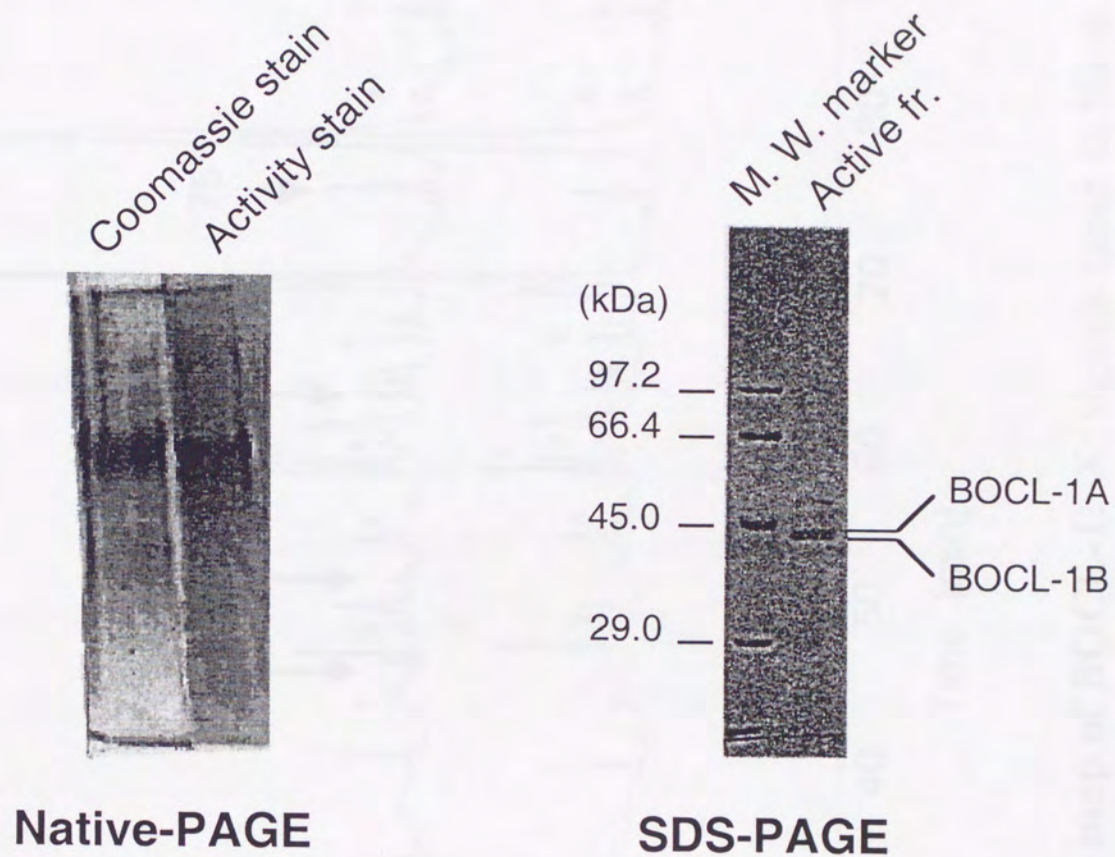


Figure 24. Native- and SDS-PAGE of cystine-lyase.

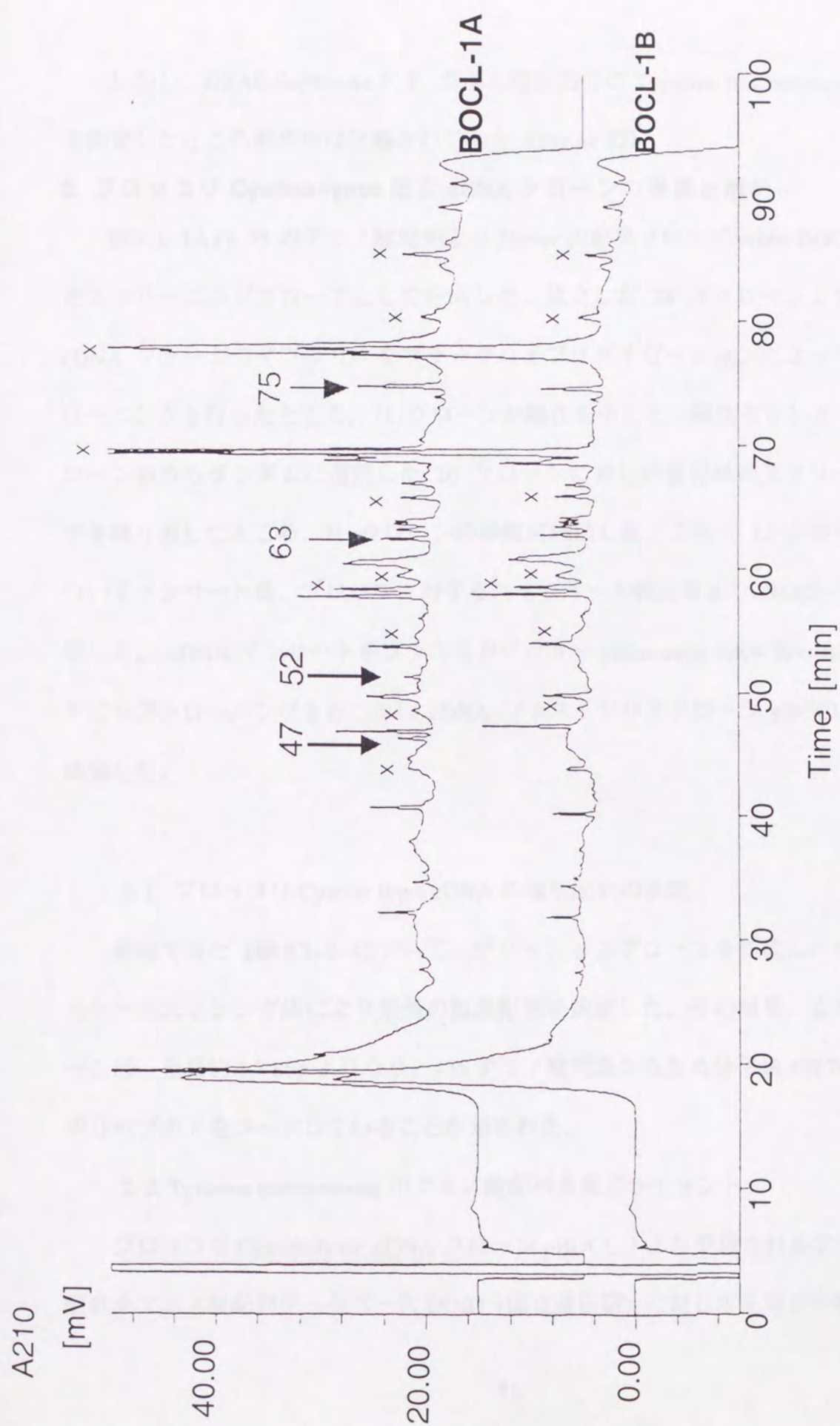


Figure 25. Peptide map of BOCL-1. X; signals same as blank gel.

しかし、DEAE-Sepharose F. F. カラム溶出画分の Tyrosine transaminase 活性を測定したところ両活性は分離されていた (Figure 22)。

2. ブロッコリ Cystine-lyase 推定 cDNA クローンの単離と解析

BOCL-1A Fr. 75 のアミノ酸配列より 56mer の縮重プローブ probe BOCL-175 をスクリーニングプローブとして合成した。独立した 28 万クローンよりなる cDNA ファージライブラリーをプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングを行ったところ、71 クローンが陽性を示した。陽性を示した 71 クローンのうちランダムに選択した 20 クローンに対し再度同様のスクリーニングを繰り返したところ、10 クローンの単離に成功した。これら 10 クローンについてインサート長、プローブに対するハイブリッド強度等より λ BOCL-3 を選択した。cDNA インサートをプラスミドベクター pBluescript SK+ *Eco* RI サイトにサブクローニングをおこない cDNA プラスミドサブクローン pBOCL 3 を構築した。

2. 1. ブロッコリ Cystine lyase cDNA の塩基配列の決定

前項で得た pBOCL-3 について、デリーションクローンを作成し、サイクルシーケンシング法により全長の塩基配列を決定した。その結果、このクローンは、全長約 1.7 kbp よりなり、435 アミノ酸残基からなる分子量 47874Da のポリペプチドをコードしていることが示された。

2. 2. Tyrosine transaminase のアミノ酸配列多重アライメント

ブロッコリ Cystine-lyase cDNA クローン pBOCL-3 より予想されるアミノ酸配列をアミノ酸配列データベース DDBJ (国立遺伝研) に対しホモロジー検索プ

pBOCL3	-----MASQGCVDWQFSGSDAAEKAAQASLGTYSSSEIFSLCDPQGKPILPPL
A.thaliana	-----MATTPMCTEWQFSGNEAAKEAAAAALGAYTSKLMALCDPNGKPILPSPS
HUMAN	MDPYMIQMSKGNLPSILDVHVNVGGRSSVPGKMKGRKARWSVRPSDMAKKTFFNPRAIV
RAT	MDSYVIQTDVDDSLSSVLDVHVNIGGRNSVQGRKKGRKARWDVRPSDMSNKTFFNPRAIV
	: : . . . : * . . . : : : : * : *
pBOCL3	S-----EEAETSHTAEKAVVKAVLCGTGNAYAPSIGLPVAKR
A.thaliana	N-----KAVETSNLAEKAVVKFILSGTGNAYAPSIGLPVAKS
HUMAN	DNMKVKPNPNKTMISLSIGDPTVFGNLPDPEVTQAMKDALDSGKYNGYAPSIGFLSSRE
RAT	DNMKVQPNPNKTVISLSIGDPTVFGNLPDPEVTQAMKDALDSGKYNGYAPSIGYLSRE
	. * . . : * : . : * . * . * * * * : :
pBOCL3	AVAEYLNRLDNLKLTGDDVYMTVGCKQAIELAVSILAKPKANILLPRPGFPWDMVHSIYK
A.thaliana	AVAEYLNRLDNLKLTGDDVYMTVGCKQAIELAVSILAKPKANILLPRPGFPWDMVHSIYK
HUMAN	EIASYY-HCPEAPLEAKDVILTSGCSQAIDLCCLAVLANPGQNILVPRPGFSLYKTLAESM
RAT	EVASYY-HCPEAPLEAKDVILTSGCSQAIDLCCLAVLANPGQNILVPRPGFSLYKTLAESM
	: * . * : * . * * : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : *
pBOCL3	HLEVRRYEFIPERDFEIDFNSVREMVDENTFAIFIIINPHNPNGNYYTEAHLKQLATLAR
A.thaliana	KLEVPLHMISSLNKTLRSTSKASKKVTDKNTFAIFIIINPHNPNGNTYSEAHLKQLAELAK
HUMAN	GIEVKLYNLLPE-KSWEIDLKQLEYLIDEKTACLIVNNPSNPCGSVFSKRHLQKILAVAA
RAT	GIEVKLYNLLPE-KSWEIDLKQLESLEIDEKTACLIVNNPSNPCGSVFSKRHLQKILAVAE
	: * * : : . : . : . : * : * : * : * * * * : * * : * * : *
pBOCL3	ELGIMVVSDEVYRWSVFGSNPFVPMGKFSSIVPVITLGSISKGWIVPGWRTGWLALHDLN
A.thaliana	ELSIMVVSDEVYRWSVFGSNPFVPMGKFSSIVPVITLGSISKGWIVPGWRTGWLALHDLN
HUMAN	RQCVPILADEIYGDVMFSDCKYEPLATLSTDVPIILSCGGLAKRWLVPGWRLGWILIHDRR
RAT	RQCVPILADEIYGDVMFSDCKYEPLANLSTNVPILSCGGLAKRWLVPGWRLGWILIHDRR
	. : : * * : * * . : * : * : * * : * : * : * * * * * * : * *
pBOCL3	GVFRSTKVPAYLVLYGQVLKAAKEFLEITSKPPTVIQAAIPTILEKTPQDFFEKRGIFLK
A.thaliana	GVFRNTNVLQAAQDFIQTKGLFPKTVHLKTS-----SETTIESSLANFSELFEMSLR
HUMAN	DIFGNEIRDGLVKLSQRILGPCTIVQGALKS-----ILCRTPGEFYHNTLSFLK
RAT	DIFGNEIRDGLVKLSQRILGPCTIVQGALKS-----ILQRTPQEFYHDTLSFLK
	: * . : : . . * : : : * . * :
pBOCL3	DKVDFGYSKLKNIPTLTTCYMKPESCTFLWFETNFSWIIIRIAQTKLDPLHFVDIEDDHDF
A.thaliana	VSVSIGIVRLMIN-----IAKVFLSCHLFDFAFEVDLKVLFERDEIIVTDLEFLIDA
HUMAN	SNADLCYALAAIPG-----LRPVRPSGAMYLMVGIEMEHFPEFENDVEF
RAT	SNADLCYALAAIPG-----LQPVRPSGAMYLMVGIEMEHFPEFENDVEF
	. . . : * . . . : : * : :
pBOCL3	CRKLAKEENLVVLPGLAFGQNNWLRHSIDMETPRLEDAFERLKSFCERHSVIVEASSLKD
A.thaliana	AYYIPREAWPRKQNVGFWSQNIHRKSIARLHPTVINTSAAVSFFGRSLFRYSATALLAS
HUMAN	TERLVAEQSVHCLPATCFEYPNFRVITVPEVMMLEACSRIQEFCEQHYHCAEGSQEEC
RAT	TERLIAEQAVHCLPATCFEYPNFRVITVPEVMMLEACSRIQEFCEQHYHCAEGSQEEC
	: * : * * * : : : . * . :
pBOCL3	VNGVN--
A.thaliana	GRPMLGA
HUMAN	DK-----
RAT	DK-----

Figure 26. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of pBOCL-3 and Tyrosine transaminase. A. thaliana; A. thaliana putative tyrosine transaminase gene, HUMAN; Homo sapiens tyrosine transaminase, RAT; Rattus norvegicus tyrosine transaminase.

考察

ブロッコリ花蕾より Cystine-lyase を抽出・精製しその部分アミノ酸配列を決定し、この配列を利用し、Cystine-lyase 推定 cDNA を単離、塩基配列を決定した。cDNA より推定されるアミノ酸配列は、シロイヌナズナ推定 Tyrosine transaminase 遺伝子と相同性が高いが、予想された Alliinase、Cystathionine β -lyase などの C-S lyase との相同性は認められなかった。抽出・精製された Cystine-lyase の分子量は SDS-PAGE で 45kDa であった。これは Ukai and Sekiya による報告 [43]と同じであった。また、DEAE-Sepharose F. F. カラムからの溶出パターンにおいて Cystine-lyase 活性と tyrosine transaminase 活性が分離されたこと(Figure 22)、Cibacron blue 3GA カラムからの Cystine-lyase 活性溶出パターンと同画分の SDS-PAGE による 45kDa タンパク質溶出パターンがよく対応されること(Figure 23)から、今回精製されたタンパク質は Cystine-lyase であると考えられる。Tyrosine transaminase は Cystine-lyase と同様に PLP を補酵素とする酵素であるがその反応形態は α -炭素における脱アミノ反応である。しかし、PLP を補酵素としてアミノ酸結合開裂に関与している点は同じであり今後、この cDNA の機能的発現などによる詳細な検討が必要となる。

実験の部

1. 使用した大腸菌・酵母

ファージライブラリーのスクリーニング

大腸菌 NM514 [hsd R514 (rk-mk-), arg H, gal E, gal X, str A, lyc B7, (Hfl+)]

プラスミドの調製

大腸菌 XL1-blue {end A1, hsd R17, sup E44, thi-1, rec A1, tyr A96, rel A-1, lac, [F', proAB, lacI qZΔM15, Tn10 (Tet')]}
大腸菌 XL1-blue {end A1, hsd R17, sup E44, thi-1, rec A1, tyr A96, rel A-1, lac, [F', proAB, lacI qZΔM15, Tn10 (Tet')]}

組み換えタンパク質の発現

大腸菌 BL-21(DE3) pLysE {F- , ompT, hsdSB (rB- mB-), gal, dcm, (DE3) pLysE (CmR)}

酵母 INVSc1 {MATα, his3Δ1, leu2, trp-1-289, ura3-52}

2. 植物体

ニラ(*A. tuberosum*) は、株式会社サカタのタネより供与された「ワイドグリーン」種子を用いた。種子は、湿らせたペーパータオルに播き、4℃に 2 日間置き休眠を打破した後、パーミキュライトに移し野外 (20-28℃, 7 月) 成育させた。肥料として、1000 倍希釈 Hyponex を一週間に二回与えた。

ブロッコリ (*B. oleracea*) は山武農業改良普及センターより露地栽培された播種後 6 カ月のものを分与された。

3. 酵素活性の測定

Alliinase 酵素活性の測定

3. 1. 1. 基質 S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide の合成

以下に示す Stoll & Seebeck の方法 [44] により S-Ethyl-L-cysteine を過酸化水素で酸化することにより S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide を得た。

S-Ethyl-L-cysteine (Reserch Organics Inc.) (MW. 149) 303mg (2.03mmol) を酢酸 60ml に水浴で加温しながら溶かし、31%過酸化水素水 (MW. 34) 6ml (27.4mmol)を加え、一晩放置した。少量の水を加え、ロータリーエバポレーターで溶媒を除き、析出した結晶を少量の水にとかし、水-エタノールにより再結晶させた。再結晶を繰り返し、結晶を減圧乾燥器にて乾燥させた。 S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide (MW. 165, mp. 182-184°) 収量 271.4mg 収率 81%

3. 1. 2. 酵素活性測定

Alliinase の酵素活性は、酵素反応により生成したピルビン酸を Walsh らの方法 [45] により定量する事により測定した。0.08M Na-phosphate buffer (pH 7.0), 16mM S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide, 20 μ M PLP を含む final volume 250 μ l の標準反応溶液中で酵素反応を行った。反応は酵素溶液 を加えることにより開始し、25℃にて 5 分間インキュベート後、10% TCA 250ml を加え反応を停止させた。このうち 250 μ l の反応液に 250 μ l の 0.033% 2,4-Dinitrophenylhydrazine/2N HCl を加え 5 分間放置した。次に 1ml 2N NaOH を加え、酵素反応により生成したピルビン酸の 2,4-Dinitrophenylhydrazone 誘導体を 520nm の吸収により測定した。精製した Alliinase の至適 pH の測定には、標準反応溶液の buffer を 0.08M Na-Pi buffer (pH 5.5-7.5) もしくは、0.08M Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0) とし、final volume

125 μ l、0.3mg Alliinase タンパク質を用い酵素反応を行い、10% TCA 125 μ l を加え反応を停止させた。 K_m 値の測定には、標準反応溶液の buffer を 0.08M Tris-HCl (pH 8.5) とし、S-Ethyl-L-cysteine sulfoxide の終濃度を 2-32mM とし、final volume 125 μ l、0.12mg Alliinase タンパク質を用い酵素反応を行い、10% TCA 125 μ l を加え反応を停止させた。

Cystine-lyase 酵素活性の測定

Cystine-lyase の酵素活性は、酵素反応により生じたピルビン酸を上記 3. 1. 2 の方法に準じ Walsh らの方法[45]により定量する事により測定した。標準 Cystine 溶液(0.04M L-Cystine)は、96mg の L-Cystine を 0.5ml 2.5M NaOH に完全に溶かし総量を 10ml に希釈した。150mM BICIN buffer (pH 8.4), 25 μ M Pyridoxal-5'-phosphate, 12mM L-Cystine を含む final volume 500 μ l の標準反応溶液中で酵素反応を行った。反応は酵素溶液 を加えることにより開始し、30 $^{\circ}$ C にて 8 分間インキュベート後、10% TCA 500 μ l を加え反応を停止させた。このうち 250 μ l の反応液に 250 μ l の 0.033% 2,4-Dinitrophenylhydrazine/2N HCl を加え 5 分間放置した。次に 1ml 2N NaOH を加え、酵素反応により生成したピルビン酸の 2,4-Dinitrophenylhydrazone 誘導体を 520nm の吸収により測定した。

Tyrosine transaminase 酵素活性の測定

Tyrosine transaminase 酵素活性は、酵素反応により生じた *p*-Hydroxyphenyl-pyruvate が、アルカリ性で酸化され 331nm に吸収極大を持つ *p*-Hydroxybenzaldehyde に変化する反応を利用した、Diamondstone の方法を使用した [46]。0.2M K-Pi buffer (pH 7.3), 37 μ M Pyridoxal-5'-phosphate, 10mM α -Ketoglutarate, 6mM L-tyrosine を含む final volume 3.2ml の標準反応溶液中で 37 $^{\circ}$ C にて 10 分間

インキュベート後、0.2ml 10N NaOH を加え、室温にて 30 分後 310nm の吸光度を測定した。

4. アクリルアミドゲル電気泳動

4. 1. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli 法 [47] により 12%アクリルアミドゲルにておこなった。分子量マーカーとして Phosphorylase (94kDa), albumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa), Carbonic anhydrase (30kDa), Trypsin inhibitor (20kDa), α -Lactalbumin (14.4kDa)を含む LMW Kit (Pharmacia Biotech) を用いた。約 10mg のタンパク質を電気泳動後、Quick CBB (和光純薬) によりクマシーブリリアントブルー染色を行った。

4. 2. Native-PAGE

Native-PAGE は、12%アクリルアミドゲルを用いおこなった。Cystine-lyase の活性染色は、Ukai and Sekiya の方法 [48] に従い、酵素反応により生じたチオール基による 3-(4',5'-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) の還元による呈色を利用した。50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 10mM L-Cystine, 100 μ M PLP, 600 μ M MTT, 800 μ M PMS を含む活性染色液に Native-PAGE 後のゲルを浸し、30℃にて 10 分間反応させた。反応は 7.5%酢酸溶液にゲルを浸すことにより停止させた。

5. ニラ Alliinase の精製と性質

5. 1. ニラ Alliinase の抽出・精製

ニラ Alliinase の精製は、Fujita らによる Welsh Onion (*A. fistulosum*) からの Alliinase 精製法 [17] を改変して行った。

酵素の精製過程中の全ての操作は、0-4℃で行った。

Step 1. 粗酵素溶液の抽出

市販のニラの葉部 200g を、10% glycerol, 5% NaCl, 0.05% 2-mercaptethanol および 1mM PMSF を含む 0.02M Na-Pi buffer (pH 7.0) 中、PVPP (5%) と共に、Warning blender を用いて破碎し、得られた homogenate をガーゼでろ過し、粗抽出液とした。

Step 2. 硫安分画

粗抽出液に対して 40-75%飽和の硫安分画を行い、次いで、冷却遠心 (10000 g, 20min) により得られた沈殿を 5% glycerol, 20mM PLP, 5mM CaCl₂, 0.01% 2-mercaptethanol を含む 5mM K-Pi buffer (pH 4.7) [buffer A] に溶かし、同 buffer に対し、透析を行い脱塩、平衡化を行った。遠心により、不溶分を除き step 2 酵素溶液とした。

Step 3. CM-Sepharose Fast Flow Ion-exchange Column Chromatography

step 2 酵素溶液を、buffer A で平衡化した CM-Sepharose Fast Flow Ion-exchange Column (3.0x6.5cm) (Pharmacia Biotech) に吸着させ、UV detector の吸光度が安定するまで buffer A で洗浄した後、buffer A に NaCl の linear gradient 溶出 (0→0.5M NaCl) を行い、溶出された画分について Alliinase 酵素活性を測定し、高活性画分 (NaCl 濃度 0.09-0.18M)を集めて step 3 酵素溶液とした。

Step 4. Sephacryl S-300 Gel Filtration

Step 3 酵素溶液を Stirred Ultrafiltration cell 8050 (Amicon), DIAFLO Ultrafiltration Membrane PM-10 (Amicon) による濃縮を行った。濃縮溶液を buffer A で平衡化した Sephacryl S-300 Column (1.0x90.0cm) (Pharmacia Biotech) に供した。溶出した高活性画分を集めニラ Alliinase 溶液とし酵素の諸性質の検討に用いた。

5. 2. ニラ Alliinase タンパク質の諸性質

5. 2. 1. ゲル濾過法による分子量の決定

100mM Na-Pi (pH 7.0) で平衡化した Ultrashergel SEC-3000 HPLC CC(7.5mm x 30cm) (BECKMAN) に、精製した (前述の step 4) ニラ Alliinase 溶液をアプライし、Alliinase の溶出位置を測定した。カラムは、Thyroglobulin (670kDa), Gamma globulin (158kDa), Ovalbumin (44kDa), Myoglobin (17kDa), Vitamin B-12 (1.35kDa) を含む Gel Filtration Standard (Bio-Rad) を標準タンパク質として校正した。

可視・紫外吸収スペクトルの測定

精製したニラ Alliinase 溶液を Centricon-30 concentrator (Amicon) により 500ml に濃縮した。濃縮液を 5% glycerol を含む 0.01M Na-Pi buffer (pH7.5) により平衡化した NAP-5 カラム (Pharmacia Biotech) に供し、溶出画分を用いた。可視・紫外吸収スペクトルは、HITACHI U-2001 Spectrophotometer を用い測定した。

ウエスタンブロット分析

ウエスタンブロット分析は、約 0.1mg のタンパク質を SDS-PAGE で分離後、ホライズブロット (ATTO) を用い Immobilon P membrane (Millipore) にタンパ

ク質を転写し、免疫染色を行った。一次抗体として、ニンニク Alliinase に対するウサギ抗血清を 400 倍に希釈して用いた。次にホスファターゼ標識されたヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Lab.) を二次抗体として用い、5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-Toluidine Salt (BCIP) / Nitroblue Tetrazolium Chloride (NBT) (Gibco BRL) を基質として免疫染色を行った。抗ニンニク Alliinase ウサギ抗血清は、E. J. M. Van Damme 博士 (Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium) より分与された。

ニラ Alliinase タンパク質の内部アミノ酸配列の解析

精製ニラ Alliinase タンパク質の内部ペプチド断片は *Staphyrococcus aureus* V8 protease を用い[49] の方法により作成し、Immobilon P membrane に固定した。固定されたペプチドのアミノ酸配列の決定は gas-phase proteome sequencer を用い[50]に従い行った。

6. ニラ Alliinase cDNA クローンの単離

6. 1. ニラ cDNA ファージライブラリーの構築

発芽後野外 (20-28°C, 7 月) にて 3 週間成育させたニラより塩酸グアニジン / フェノール法 [51] により全 RNA を調製した後、mRNA Separator (CLONTECH) による Oligo (dT)-cellulose column 法 [52] によって poly (A+) RNA を分離した。これを鋳型として cDNA synthesis module (Amersham) を用い Gubler and Hoffman 法 [53] により二本鎖 cDNA を合成した。Complete rapid cloning system λ gt10 (Amersham) により *Eco* RI アダプターとのライゲーション、サイズフラクショネーション、リン酸化処理を順次行い、cDNA を λ gt10 の *Eco* RI site に連結し

た。連結した cDNA を GIGAPACK II Puls Packaging Extract (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージングし、ニラ cDNA フェージライブラリーを作製した。

6. 1. 1. プローブの作製

ニンニク (*A. sativum*)、タマネギ (*A. cepa*)、シャロット (*A. ascalonicum*) Alliinase cDNA クローンの相同性の高い塩基配列 50mer (5'-GACCTCC ATCCCCATCTTATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGAC-3') を合成しプローブ MAlli-1 とした[18]。MAlli-1 を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (ToYoBo) により、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP で末端標識した。

6. 1. 2. ニラ Alliinase cDNA のスクリーニング

未増幅のニラ cDNA フェージライブラリーを大腸菌 NM514 に感染させ 50,000pfu/plate を LB 培地 2 枚にまき、生じた 10 万プラークを Hybond-N+ (Amersham) にトランスブロットし、MAlli-1 を用いハイブリダイズした。最終洗浄は、0.1xSSPE、0.1% SDS、65°C、15 分で行い、オートラジオグラフィーを行った。2 枚のフィルター上で一致する陽性クローンを拾い、さらに同様にしてセカンドスクリーニングを行った。陽性を示したクローンを pBluescript II SK+ *Eco*RI site (一部 *Kpn*I site) にサブクローニングした。得られたクローンの一部塩基配列を決定し DNA データバンク DDBJ に対し検索プログラム FASTA によって検索し既に報告されている Alliinase cDNA と高い相同性を示したものをニラ Alliinase cDNA クローン pNA5 とした。

6. 1. 3. 塩基配列の決定

スクリーニングによって得られたニラ Alliinase cDNA クローン pNA5 インサートの全塩基配列を決定した。複数個の部分的に重複したデリージョンクロ

ーンを作製し、それぞれのクローンの塩基配列を自動蛍光式 DNA シークエンサー DSQ-1000 システム (SHIMADZU) を用いて決定した。デリーションクローンの作製には、*ExoIII/Mung Bean Deletion Kit* (Stratagene)、シークエンス反応には、*TaKaRa Taq Cycle Sequencing Kit* (TaKaRa)、Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham) を使用した。

6. 1. 4. アミノ酸配列多重アライメントの作製

アミノ酸多重アライメントは、遺伝情報処理ソフト GENETYX (SDC ソフトウェア開発) または DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて作製した。

6. 2. サザンハイブリダイゼーション

ニラ全草より Dellaporta らの方法 [54] により抽出した全 DNA 8mg を制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III により消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスブロットし、pNA5 *Eco*RI インサートをプローブとしてハイブリダイズした。プローブの作製には、Random Primer DNA ラベリングキット Ver. 2 (TaKaRa) を使用し、cDNA を [α -32P] dCTP で標識した。最終洗浄は、0.1xSSPE、0.1% SDS、65℃、15 分で行った。オートラジオグラフィは、バイオ・イメージングアナライザー BAS-2000II (富士フィルム) を用いておこなった。

6. 3. ノーザンハイブリダイゼーション

発芽後 3 週間野外(20-28℃, 7 月)で育成させたニラ緑化植物体及び暗黒下(20-28℃)で育成させたニラ黄化植物体を各々、地上部、地下部に分け、塩酸グアニジン/フェノール法[53]により全 RNA を調製し、10mg の RNA を 1.2%ホル

ムアミド/アガロースゲル電気泳動後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスブロットした。ハイブリダイゼーションは、Random Primer DNA ラベリングキット Ver. 2 (TaKaRa) により [α -32P] dCTP で標識した pNA5、構成的発現のコントロールとして pRR217 [55] (イネ rDNA クローン) の各インサートをプローブとして用いておこなった。最終洗浄は、0.1xSSPE、0.1% SDS、65℃、15 分で行った。オートラジオグラフィーは、バイオ・イメージングアナライザー BAS-2000II (富士フィルム) を用いておこなった。定量には、各プローブでのシグナル強度を測定後、pRR217 のシグナル強度で補正を行った。

6. 4. 硫黄、窒素栄養制限下でのニラ Alliinase mRNA の発現

植物の栽培

以下に述べるニラのロックウール耕に用いた栄養制限培地は次の通りである [56]。

6. 4. 1. 培地組成

コントロール培地

1.5mM	NaH ₂ PO ₄	10.3μM	MnCl ₂
0.26mM	Na ₂ HPO ₄	1.0μM	ZnCl ₂
1.5mM	MgSO ₄	0.96μM	CuCl ₂
2.0mM	Ca(NO ₃) ₂	30μM	H ₃ BO ₃
3.0mM	KNO ₃	24nM	(NH ₄) ₅ Mo ₇ O ₂₄
8.7μM	NaFeEDTA	130nM	CoCl ₂

ΔS 培地 コントロール培地の MgSO₄ を等モル濃度の MgCl₂ に代えた。

ΔN 培地 コントロール培地の Ca(NO₃)₂、KNO₃ を等モル濃度の CaCl₂、KCl に代えた。

ΔSΔN 培地 コントロール培地の MgSO₄ を等モル濃度の MgCl₂ に、Ca(NO₃)₂、

KNO₃を等モル濃度の CaCl₂、KCl に代えた。

6.4.2. 栽培方法

ニラ種子を表面滅菌後、寒天培地に播き発芽させた。ロックウールをコルクボーラーで円柱状に切り、底部とフタを切り取って円柱状にしたエッペンドルフチューブに差し込みオートクレーブにて滅菌後、コントロール培地に浮かべ、発芽した種子を移植した。白色蛍光灯下 (3000Lux, 16 時間日長) で3週間栽培した。培地は1週間に2回交換した。3週後 (本葉が3枚展開を始める頃) ランダムに4群に分け、各々新しいコントロール培地、及び上記の各種栄養制限培地に変え、2～4日間栽培し、地上部のみを回収し、液体窒素により凍結した。

6.4.3. ノーザンハイブリダイゼーション

フェノール/SDS法により各植物から全RNAを調製し、20mgのRNAを1.2%ホルムアミド/アガロースゲル電気泳動後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスブロットした。ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーは、3.7に示した方法により行った。

7. ニラ *Alliinase* の異種生物種における発現

7.1. ニラ *Alliinase* の大腸菌における発現

7.1.1. ニラ *Alliinase* の大腸菌発現ベクター pNAE1 の構築

35merの合成プライマー NABamF-primer,

(5'-GACTGGATCCGATGGAAACATACAAACCAGGCAAC-3') と 33merの

NABamR-primer, (5'-GCTAGGATCCTCATATA AATGGACGACGACGGCTGC-3')を

用いた PCR 法[57]により、ニラ Alliinase cDNA クローン pNA5 インサートの翻訳領域の両端に、*Bam*HI 切断部位を付加した。得られた cDNA 断片は、制限酵素 *Bam*HI で切断後、低融点アガロースゲル電気泳動によるサイズフラクション、PEG 沈殿法により精製し、ベクター pET15b (Novagene) *Bam*HI site に連結した。得られた正方向クローンを pNAE1 とし大腸菌 BL21 に導入した。

7. 1. 2. 大腸菌無細胞抽出液の調製

LB/Cb 液体培地にてニラ Alliinase の発現ベクター pNAE1 を導入した大腸菌 BL21 を 37℃で終夜培養させ、培養液 500μl を 50ml の同培地に加え 37℃で本培養した。本培養を始めて 3hr 後、終濃度 1mM となるように IPTG を添加し、さらに 3hr 培養を行った。培養液を遠心して回収した菌体を 0.9% NaCl で懸濁し、再度遠心を行いペレットとして-80℃で凍結した。凍結した菌体を抽出緩衝液 (0.05M Na-phosphate (pH7.0), 30% Ethylene glycol) 4ml に懸濁し 100W、20sec の超音波処理を間隔をおいて 15 サイクル行い破碎した。これを 15krpm. 4℃ 20min 遠心し上清を菌体可溶画分とした。沈殿を抽出緩衝液で洗浄後 6M 尿素を含む抽出緩衝液 4ml を加え 1hr 氷中で可溶化した。遠心により不溶分を除き透析 (3M 尿素を含む抽出緩衝液 12hr, 尿素を含まない抽出緩衝液 24hr, 4℃) を行い抱合体抽出液とした。タンパク質は、Bradford 法に基づき Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用い定量した。

7. 2. ニラ Alliinase の酵母における発現

7. 2. 1. ニラ Alliinase の酵母発現ベクター pNAY1 の構築

7. 1.において作成した pNA5 インサートの翻訳領域フラグメントを酵母発現ベクター pYES2 (Invitrogen) *Bam* HI site に連結した。得られた正方向クローンを

pYAE1 とし酵母 INVSc1 に Electroporation 法 [58] により導入した。

7.2.2. 酵母無細胞抽出液の調製

YPD 液体培地 (2% polypepton, 1% yeast extract, 2% glucose) にて Alliinase 発現ベクター pNAE1 を導入した酵母 INVSc1 を 30°C で 48 時間培養させた。菌体を集め YPG 培地 (2% polypepton, 1% yeast extract, 2% galactose) に移し *GALI* プロモータによる発現を誘導した。6 時間の誘導の後、遠心により回収した菌体を 0.9% NaCl で懸濁し、再度遠心を行い抽出緩衝液 (0.05M Na-phosphate (pH7.0), 30% Ethylene glycol, 1mM PMSF) に懸濁しガラスビーズ法により菌体を破壊した。15krpm. 4°C 20min 遠心し上清を酵母無細胞抽出液とした。

7.2.3. 変異の導入

変異の導入は overlap extension 法 [59, 60] によりおこなった。ニラ Alliinase Lys-280 を Alanine、Arginine に変異させるために次のように次のように合成プライマーを用いた。

280Af: 5'-TATGTCTGCATATACCGGAC-3'

280Ar: 5'-GTCCGGTATATGCAGACATAG-3'

280Rf: 5'-TATGTCTAGATATACCGGAC-3'

280Rr: 5'-GTCCGGTATATCTAGACATAG-3'

PCR により増幅された DNA 断片のシーケンスを確認した後、酵母発現ベクター pYES2 *Bam* HI site に導入した。

8. 蛍光免疫染色法

ニラは固定液 (3% *p*-formaldehyde, 50% ethanol, 5% acetic acid) により固定され Ethanol により脱水された Poly ethylene glycol 1540 に包埋された。免疫標識と洗

浄は Marrison and Leech の方法 [61] によった。8 μ m 厚の切片を抗ニンニク Alliinase ウサギ抗血清にて免疫標識した。また予め精製ニラ Alliinase タンパク質により免疫沈降を行った抗ニンニク Alliinase ウサギ抗血清を対照実験として用いた。二次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG を用いた。蛍光顕微鏡 (Olympus BX 50)、フィルター U-DM-FI/TR を用い観察した。

9. ブロッコリ Cystine-lyase の抽出・精製

酵素の精製過程中の全ての操作は、0-4 $^{\circ}$ Cで行った。

Step 1. 粗酵素溶液の抽出

市販のブロッコリ 350g を 5% NaCl, 0.05M Na-citrate buffer (pH 6.4) 中、PVPP (5%) と共に、Warning blendor を用いて破碎し、得られた homogenate をガーゼでろ過し、粗抽出液とした。

Step 2. 酸処理

粗抽出液に対して 6N HCl を用い pH 4.0 に調整した。室温で 15 分処理した後遠心により不溶物をのぞき step 2 酵素溶液とした。

Step 3. 硫安分画

step 2 酵素溶液に対して 40-60%飽和の硫安分画を行い、次いで、冷却遠心 (10000 g, 20min) により得られた沈殿を 20 μ M PLP を含む 20mM K-Pi buffer (pH 6.4) [buffer B] に溶かし、同 buffer に対し、透析を行い脱塩、平衡化を行った。遠心により、不溶分を除き step 3 酵素溶液とした。

Step 4. DEAE-Sepharose Fast Flow Ion-exchange Column Chromatography

step 2 酵素溶液を、buffer B で平衡化した DEAE-Sepharose Fast Flow Ion-exchange Column に吸着させ、UV detector の吸光度が安定するまで buffer B で洗浄した後、buffer A に NaCl の linear gradient 溶出 (0→1.0M NaCl) を行い、溶出された画分について Cystine-lyase 酵素活性、Tyrosine transaminase 酵素活性を測定し、高活性画分 (NaCl 濃度 0.35-0.50M)を集めて step 4 酵素溶液とした。

Step 5. Cibacron blue Column Chromatography

step 4 酵素液を buffer B で平衡化した Cibacron blue Column に吸着させ、UV detector の吸光度が安定するまで buffer B で洗浄した後、buffer B に NaCl の linear gradient 溶出 (0→1.0M NaCl) を行い、溶出された画分について Cystine-lyase 酵素活性を測定し、高活性画分 (NaCl 濃度 0.09-0.18M)を集めて Step 5 酵素液とした。

10. ブロッコリ Cystine-lyase cDNA クローンの単離

10.1. ブロッコリ cDNA フェージライブラリーの構築

露地にて6ヶ月育成させたブロッコリ花蕾部より塩酸グアニジン/フェノール法[51]により全 RNA を調製した後、mRNA Separator (CLONTECH) による Oligo (dT)-cellulose column 法[52]によって poly (A+) RNA を分離した。これを鋳

型として cDNA synthesis module (Amersham)を用い Gubler and Hoffman 法[53]により二本鎖 cDNA を合成した。Complete rapid cloning system λ gt10 (Amersham)により *Eco* RI アダプターとのライゲーション、サイズフラクショネーション、リン酸化処理を順次行い、cDNA を λ gt10 の *Eco* RI site に連結した。連結した cDNA を GIGAPACK II Puls Packaging Extract (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージングし、ブロッコリ cDNA ファージライブラリーを作製した。

10. 1. 1. プロープの作製

ブロッコリ Cystine-lyase 部分アミノ酸配列より 50mer の縮重プロープ probe BOCL-175 を合成した。Probe BOCL-175 を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (ToYoBo) により、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP で末端標識した。

probe BOCL-175: 5'-

GGITGGAATGTICCGGITGGMGIACIGGITGGTTIGCITTICATGATTTIGATGG-3'

(M=A+C, I=Inosine)

10. 1. 2. ブロッコリ Cystine-lyase cDNA のスクリーニング

未増幅のブロッコリ cDNA ファージライブラリーを大腸菌 NM514 に感染させ 35,000pfu/plate を LB 培地 8 枚にまき、生じた 28 万プラークを Hybond-N+ (Amersham) にトランスブロットし、probe BOCL-175 を用いハイブリダイズした。最終洗浄は、5xSSPE、0.1% SDS、65°C、15 分で行い、オートラジオグラフィを行った。2 枚のフィルター上で一致する陽性クローンを拾い、さらに同様にしてセカンドスクリーニングを行った。陽性を示したクローンを pBluescript II SK+ *Eco*RI site にサブクローニングした。

10.1.3. 塩基配列の決定

スクリーニングによって得られたブロッコリ cDNA クローン pBOCL3 インサートの全塩基配列を決定した。複数個の部分的に重複したデリーションクローンを作製し、それぞれのクローンの塩基配列を自動蛍光式 DNA シークエンサー DSQ-1000 システム (SHIMADZU) を用いて決定した。デリーションクローンの作製には、*ExoIII*/Mung Bean Deletion Kit (Stratagene)、シークエンス反応には、TaKaRa Taq Cycle Sequencing Kit (TaKaRa)、Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham) を使用した。

10.1.4. アミノ酸配列多重アライメントの作製

アミノ酸多重アライメントは、遺伝情報処理ソフト GENETYX (SDC ソフトウェア開発) または DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて作製した。

参考文献

1. Saito, K., (1999) Biosynthesis of cysteine. In: Singh, B. (Ed.), *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 267-291
2. Leustek, T., and Saito, K., (1999) Sulfate transport and assimilation in plants, *Plant Physiol.* **120**, 637-643.
3. Lancaster, J. E., and Boland, M. J. (1990) Flavor biochemistry, in *Onions and Allied Crops* (Brewsro, J. D., and Rabinovich, H., eds.), pp. 33-72, Vol. III vols., CRC Press, London
4. Mazelis, M. (1993) Catabolism of sulfur-containing amino acids, in *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (De Kok, L. J., Stulen, I., Rennenberg, H., Brunold, C., and Rauser, W. E., eds.), pp. 95-108, SPB Academic Publishers, The Hague.
5. Block, E. (1992) The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 1135-1178.
6. Block, E. (1992) The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic chemistry of sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 1135-1178.
7. Jain, M. K., and Apitz-Castro, R. (1987) Garlic: molecular basis of the putative 'vampire - repellent' action and other matters related to heart and blood, *Trend. Biochem. Sci.* **12**, 252-254.
8. Scharfenberg, K., Wagner, R., and Wagner, K. G. (1990) The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell line, *Cancer Lett.* **53**, 103-108.
9. Hamamoto, A., and Mazelis, M. (1986) The C-S lyase of higher plants: Isolation and properties of homogeneous cystine lyase from broccoli buds. *Plant Physiol.* **80**, 702-706.
10. Block, E. (1985) The chemistry of garlic and onions, *Sci. Amer.* **252**, 94-99.
11. Akhtar, M., Emery, V. C., and Robinson, J. A. (1984) in *The Chemistry of Enzyme Action* (Page, M. I., ed.), pp. 303-372, Elsevier Science Publishers,

Amsterdam

12. Nock, L. P., and Mazelis, M. (1986) The C-S lyases of higher plants: preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*), *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 27-33.
13. Nock, L. P., and Mazelis, M. (1987) The C-S lyases of higher plants: direct comparison of the physical properties of homogeneous alliin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*), *Plant Physiol.* **85**, 1079-1083.
14. Lancaster, J. E., and Collin, H. A. (1981) Presence of alliinase in isolated vacuoles and alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*), *Plant Sci. Lett.* **22**, 169-176.
15. Jansen, H., Müller, B., and Knobloch, K. (1989) Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*), *Planta Med.* **55**, 434-439.
16. Won, T., and Mazelis, M. (1989) The C-S lyases of higher plants: purification and characterization of homogeneous alliin lyase of leek (*Allium porrum*), *Physiol. Plant.* **77**, 87-92.
17. Fujita, M., Endo, M., and Sano, M. (1990) Purification and characterization of alliin lyase from Welsh onion, *Allium fistulosum*, *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1077-1079.
18. Van Damme, E. J. M., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Peumans, W. J. (1992) Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species, *E. J. Biochem.* **209**, 751-757.
19. Rabinkov, A., Zhu, X.-Z., Grafi, G., Galili, G., and Mirelman, D. (1994) Alliin lyase (Alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning, *Appl. Biochem. Biotech.* **48**, 149-171.
20. Lancaster, J. E., Shaw, M. L., Joyce, M. D. P., McCallum, J. A., McManus, M. Y., (2000) A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.* **122**, 1269-1279.
21. Walsh, C., (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, pp. 777-827, W. H. Freeman and company, San Francisco
22. Meister, A. (1965) in ed. *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd., Vol. 1 (Academic Press, New York), pp. 386.
23. Lütcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F., and

- Scheele, G. A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals, *EMBO J.* **6**, 43-48.
24. Rabinkov, A., Wilchek, M., and Mirelman, D. (1995) Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at ASN146 and forms a complex with a garlic mannose-specific lectin, *Glycoconj. J.* **12**, 690-698.
 25. Ravanel, S., Ruffet, M. L., and Douce, R. (1995) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cystathionine beta-lyase by functional complementation in *Escherichia coli*, *Plant Mol. Biol.* **29**, 875-882.
 26. Martel, A., Bouthier de la Tour, C., and Le Goffic, F. (1987) Pyridoxal 5'-phosphate binding site of *Escherichia coli* beta cystathionase and cystathionine gamma synthase comparison of their sequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 565-571.
 27. Kitamura, N., Shimomura, N., Iseki, J., Honma, M., Chiba, S., Tahara, S., and Mizutani, J. (1997) Cysteine-S-conjugate beta-lyase activity and pyridoxal phosphate binding site of onion alliin lyase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1327-1330
 28. Ericson, M. L., Rodin, J., Lenman, M., Glimelius, K., Josefsson, L.G. & Rask, L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14576-14581.
 29. Hattori, T., Ichihara, S. & Nakamura, K. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 533-538.
 30. Kim, J., and Leustek, T. (1996) Cloning and analysis of the gene for cystathionine γ -synthase from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.* **32**, 1117-1124.
 31. Ono, B. I., Tanaka, K., Naito, K., Heike, C., Shinoda, S., Yamamoto, S., Ohmori, S., Oshima, T., and Toh-E, A. (1992) Cloning and characterization of the CYC3 (CYI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **174**, 3339-3347.
 32. D'Andrea, R., Surdin-Kerjan, Y., Pure, G., and Cherest, H. (1987) Molecular genetics of *met17* and *met25* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: intragenic complementation between mutants of single structural gene, *Mol. Gen. Genet.* **207**, 165-170.
 33. Belfaiza, J., Parsot, C., Martel, A., Bouthier de la Tour, C., Margarita, D., Cohen, G. N., and Saint-Girons, I. (1986) Evolution in biosynthetic pathways:

- two enzymes catalyzing consecutive steps in methionine biosynthesis originate from a common ancestor and possess a similar regulatory region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 867-871.
34. Murakami, Y., Naitou, M., Hagiwara, H., Shibata, T., Ozawa, M., Sasanuma, S. I., Sasanuma, M., Tsuchiya, Y., Soeda, E., Yokoyama, K., Yamazaki, M., Tashiro, H., and Eki, T. (1995) Analysis of the nucleotide sequence of chromosome VI from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Genet.* **10**, 261-268.
 35. Foglino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G., and Patte, J. C. (1995) A direct sulfhydration pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* **141**, 431-439.
 36. Inoue, H., Inagaki, K., Sugimoto, M., Esaki, N., Soda, K., and Tanaka, H. (1995) Structural analysis of the L-methionine γ -lyase gene from *Pseudomonas putida*, *J. Biochem.* **117**, 1120-1125.
 37. Ellmore, G. S., and Feldberg, R. S. (1994) Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium sativum*), *Am. J. Botany* **81**, 89-94.
 38. 杉山 光代 (1999) 千葉大学大学院薬学研究科, 修士論文
 39. Schmutz, D., and Brunold, C. (1984) Intercellular localization of assimilatory sulfate reduction in leaves of *Zea mays* and *Triticum aestivum*, *Plant Physiol.* **74**, 866-870.
 40. Tishel, M., and Mazelis, M., (1966) Enzymatic degradation of L-cystine by cytoplasmic particles from cabbage leaves. *Nature.* **211**, 745-746.
 41. Flavin, M., (1962) Microbial transsulfuration: the mechanism of an enzymatic disulfide elimination reaction. *J. Biol. Chem.* **237**, 768-777.
 42. Hamamoto, A., and Mazelis, M., (1986) The C-S lyase of higher plants: isolation and properties of homogeneous cysteine lyase from broccoli bud. *Plant Physiol.* **80**, 702-706.
 43. Ukai, K., and Sekiya, J., (1997) Purification and characterization of cysteine lyase a from broccoli inflorescence. *Biosci. Biothech. Biochem.* **61**, 1890-1895.
 44. Stoll, A., and Seebeck, E. (1951) Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic, *Adv. Enzymol.* **11**, 377-400.
 45. Walsh, C. T., Schonbrunn, A., and Abeles, R. H. (1971) Studies on the mechanism of action of D-amino acid oxidase, *J. Biol. Chem.* **246**, 6855-6866.
 46. Diamondstone, T. I., (1966) Assay of tyrosine transaminase activity by

- conversion of *p*-hydroxyphenylpyruvate to *p*-hydroxybenzaldehyde. *Anal. Biochem.* **16**, 395-401.
47. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685
 48. Ukai, K., and Sekiya, J., (1997) A new staining method for lyases catalyzing cleavage of a C-S bond in sulfur-containing compounds after polyacrylamide gel electrophoresis, *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 124-126.
 49. Cleveland, D. W., Fisher, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* **252**, 1102-1106.
 50. Hirano, H., and Watanabe, T. (1990) Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein, *Electrophoresis* **11**, 573-580
 51. 渡辺格, 杉浦昌弘 (1989) クローニングとシーケンス (農村文化社, 東京)
 52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. edn., Cold Spring Harbor Lab., New York
 53. Gubler, U., and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries, *Gene* **25**, 263-269
 54. Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II, *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21.
 55. Takaiwa, F., Oono, K., and Sugiura, M., (1985) Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rDNA. *Plant Mol. Biol.* **4**, 355-364.
 56. 平井優美 (1994) 東京大学大学院農学生命科学研究科、博士論文
 57. Scharf, S. J., Horn, G. t., and Erlich, H. A., (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences, *Science*, **233**, 1076-1078.
 58. Becker, D. M., and Guarente, L. (1991) High-efficiency transformation method of yeast by electroporation, *Methods Enzymol.* **194**, 182-187.
 59. Higuchi, R. (1989) *PCR Technology*, (Erlich, H. A., ed.) pp 60-89, Stockton Press, New York.
 60. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989)

Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene (Amst.)* **77**, 51-59.

61. Marrison, J. L., and Leech, R. M. (1992) Co-immunolocalization of topoisomerase II and chloroplast DNA in developing, dividing and mature wheat chloroplasts, *Plant J.* **2**, 783-790.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学薬学部薬用資源教育研究センター遺伝子資源応用研究室の斉藤和季教授に心より感謝いたします。また、多くの貴重な御助言、御協力をいただきました同研究室山崎真巳博士ならびに野路征昭博士に心より御礼を申し上げます。

抗ニンニク Alliinase 抗体を快く分与してくださったベルギー国 Katholieke 大学 W. Peumans 博士、E. Van Damme 博士に心より感謝いたします。

Alliinase peptide fragment のアミノ酸配列決定に御協力いただきました横浜市立大学平野久博士に心より感謝いたします。

本研究に御協力していただいた蓮見朝子氏、杉山光代氏、浦野泰臣氏をはじめ遺伝子資源応用研究室のみなさまに心より御礼を申し上げます。

最後に、私を支えてくれた家族ならびにお世話になった方々に心より感謝いたします。

印刷公表論文

主論文

1. Manabe, T., Hasumi, A., Sugiyama, M., Yamazaki, M., and Saito, K., (1998)
Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive), purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *Eur. J. Biochem.* **257**, 21-30.
2. Manabe, T., Hasumi, A., Sugiyama, M., Yamazaki, M., and Saito, K., (2000)
Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive). In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: molecular, biochemical and physiological aspects*. Brunold, C., Rennenberg, H., De Kok, L. J., Stulen, I., and Davidian, J. C. (eds), Paul Haupt, Bern, pp. 419-420.

副論文

1. Urano, Y., Manabe, T., Noji, M., and Saito, K., (2000) Molecular cloning and functional characterization of cDNAs encoding cysteine synthase and serine acetyltransferase that may be responsible for high cellular cysteine content in *Allium tuberosum*. *Gene*, **257**, 269-277.

