

東海大学大学院平成 30 年度博士論文

ショウガに含まれる生体防御タンパク質に関する研究

指導 荒 木 朋 洋 教授

東海大学大学院生物科学研究科  
生物科学専攻

池 田 友 貴

ショウガに含まれる生体防御タンパク質に関する研究

2018

池 田 友 貴

## 目次

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 第1章 緒論                             | 1 |
| 第2章 ショウガからのタンパク質精製                 | 2 |
| 緒言                                 | 2 |
| 第1節 実験材料及び実験方法                     | 2 |
| 1) 材料                              | 2 |
| 2) 実験方法                            | 2 |
| i. 抽出方法                            | 2 |
| ii. タンパク質の分析                       | 2 |
| 1. SDD-PAGE                        | 2 |
| 2. エレクトロブロッティング                    | 3 |
| 3. N 末端配列分析                        | 4 |
| iii. 硫安分画                          | 4 |
| 1. 40% 硫安分画                        | 4 |
| 2. 100% 硫安沈殿                       | 4 |
| iv. DEAE-トヨパールによるイオン交換カラムクロマトグラフィー | 5 |
| 第2節 結果                             | 5 |
| 第3節 考察                             | 6 |
| 第3章 ショウガ由来の SOD                    | 8 |
| 緒言                                 | 8 |
| 第1節 実験材料及び実験方法                     | 9 |
| 1) 材料                              | 9 |
| 2) 精製                              | 9 |

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| i. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー           | 9      |
| ii. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー後の逆相 HPLC | 9      |
| 3) 構造解析                         | 10     |
| i. 環元アルキル化                      | 10     |
| ii. 酵素消化                        | 10     |
| iii. アミノ酸組成分析                   | 10     |
| iv. N 末端配列分析                    | 11     |
| v. 質量分析                         | 11     |
| 4) SOD 活性測定                     | 11     |
| 5) pH 及び温度安定性                   | 12     |
| 6) SOD のクローニング, 発現及び精製          | 12     |
| 7) 系統樹分析                        | 13     |
| 第2節 結果                          | 13     |
| 第3節 考察                          | 26     |
| <br>第4章 ショウガ由来のシステインプロテアーゼ      | <br>31 |
| 緒言                              | 31     |
| 第1節 実験材料及び実験方法                  | 32     |
| 1) 材料                           | 32     |
| 2) 精製の検討                        | 32     |
| i. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー           | 32     |
| ii. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー後の逆相 HPLC | 32     |
| 3) 構造解析                         | 33     |
| i. 環元アルキル化                      | 33     |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 1. ピリジルエチル (Pe) 化     | 33 |
| 2. カルボキシルメチル (Cm) 化   | 33 |
| ii. 酵素消化              | 33 |
| 1. トリプシンによる消化         | 33 |
| 2. V8 プロテアーゼによる消化     | 33 |
| iii. アミノ酸組成分析及びアミノ糖分析 | 34 |
| iv. N 末端配列分析          | 34 |
| 4) プロテアーゼ活性測定         | 34 |
| 5) 至適 pH 及び 至適温度      | 34 |
| 6) タンパク濃度の測定          | 35 |
| 7) 切断特異性              | 35 |
| 第2節 結果                | 35 |
| 第3節 考察                | 43 |
| 第5章 総括                | 46 |
| 第1節 総合考察              | 46 |
| 第2節 要約                | 52 |
| 謝辞                    | 54 |
| 文献                    | 55 |
| 本論文にかかわる報告            | 64 |

## 略語一覧

CBB : Coomassie Brilliant Blue

CAPS: 3-シクロヘキシル-1-プロパンスルホン酸

SDS: ドデシル硫酸ナトリウム

TCA: トリクロロ酢酸

TEMED: N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

TFA: トリフルオロ酢酸

ESI Q-TOF MS / MS: エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析装置

MALDI TOF / TOF: マトリックス支援レーザー / イオン化

MeCN: アセトニトリル

PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

ZipTip: ジップチップ

PVDF: ポリビニリデンジフルオリド

BSA: ウシ血清アルブミン, bovine serum albumin

Cu-SOD: *Curcuma aromatica* 由来の Cu/Zn-SOD

Cu/Zn-SOD: 銅/亜鉛 SOD

Cm: カルボキシメチル, carboxymethylated

Fe SOD: 鉄 SOD

GP: *Z. officinale* 由来のシステインプロテアーゼ

HO<sub>2</sub>•: ヒドロペルオキシラジカル

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 過酸化水素

HEL: Hen egg lysozyme

Mn SOD: マンガン SOD

Ni SOD: ニッケル SOD

OEL: ostrich egg-white lysozyme

OVA: ovalbumin

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: 一重項酸素

OH•: ヒドロキシルラジカル O<sub>2</sub><sup>-</sup>•: スーパーオキシドラジカル

Pe: ピリジルエチル, pyridylethylated

PR: 生体防御, Pathogenesis-Related

RO•: アルコキシルラジカル

RO\*: アルコシラジカル

ROS: 活性酸素種

ROO•: ペルオキシラジカル

Zo-SOD: ショウガ (*Zingiber officinale*) 由来の Cu/Zn-SOD

## 第1章 緒論

多年生植物であるショウガ (*Zingiber officinale*)は亜熱帯原産で、3 世紀ごろに中国より伝わり、江戸時代より食用として広まったことが報告されている。ショウガは香辛料成分であるジンゲロール [1], ショウガオール [2] 及びジンゲロン [3] について多く研究されている。また、ショウガは免疫力向上、殺菌作用、抗がん作用及び鎮痛作用などの多くの効能を持つことが報告され注目されている。一方、農林水産省の調べによると熊本県はショウガの生産量が平成 28 年度に国内で第 2 位の生産量であることが報告されている。現在、熊本県でのショウガ栽培は稲作転換作物として棚田で栽培されているが、栽培面積が増加し同一圃場で連作されるようになると、1975 年頃から立ち枯れや根茎が腐敗するショウガ根茎腐敗病症状が発生し問題となっている。熊本県での根茎腐敗病の防除は、効果が高い土壌くん蒸剤である臭化メチル剤が菌防除剤として利用されてきた。しかし、1992 年に臭化メチル剤はオゾン層破壊物質に指定され、2013 年に全廃となった。現在では臭化メチル化剤を使用しない育成方法が多く研究されている。植物は代謝及び防除 (傷害, 病虫害, 低・高温, 干ばつ及び多雨など) によるストレス応答を有している[4]。植物は代謝及び防除のために ROS を誘導させることが報告されている。この ROS (活性酸素種)は多すぎると細胞、遺伝子及びタンパク質を攻撃してしまうことから、抗酸化作用を有する Superoxide dismutase (SOD), アスコルビン酸及びグルタチオンよりもおよそ 100 倍の抗酸化能を示すことが報告されている [5 - 8]。また、植物は病原菌に対して静的抵抗性及び動的抵抗性を持つことが報告されている。静的抵抗性は細胞壁の構成成分であるリグニン及びセルロースなどが抵抗性に関与している。動的抵抗性は菌が侵入すると代謝変動によって抵抗を示すことが報告されている。この抵抗性は菌の侵入によってサリチル酸及びジャスモン酸が発現し、さらに酸性の Pathogenesis-related (PR)タンパク質及び塩基性の PR タンパク質が誘導される。プロテアーゼは植物の老化、貯蔵タンパク質の分解や生体防御などの生命活動に用いられている。プロテアーゼは、特定の機能的役割によって異なる細胞器官 (細胞質, ミトコンドリア, 液胞, リソソーム, 小胞体, 及び細胞外)で局在を有する [9 - 18]。また、植物のシステインプロテアーゼは生体防御反応である細胞死にかかわる動物のカスパーゼと類似の働きを有することが報告されている。このシステインプロテアーゼは植物細胞内の液胞に存在することが報告されている [19 - 26]。また、GP は肉軟化剤として知られている [27]。

本論文では生体防御反応を持つ Ginger protease (GP)の諸性質により、植物体内での反応メカニズムや生育に適した環境が明らかになると期待され、減農薬、食品及び化粧品などに幅広い活用を目指し、ショウガの PR タンパク質の分離、精製、アミノ酸配列及び諸性質を生化学的視点より明らかにすることを目的とした。

## 第2章 ショウガからのタンパク質精製

### 緒言

ショウガは連作障害などが出やすい植物である [1 - 3]. そこでショウガに含まれる植物由来 PR タンパク質を明らかにすることにより減農薬や付加価値につながると考えられた. 本研究では植物由来 PR タンパク質である SOD [5 - 8, 28] 及び プロテアーゼ [9 - 27, 29 - 32] について注目し, ショウガに含まれる PR タンパク質の分離及び精製を目的とした.

### 第1節 実験材料及び実験方法

#### 1) 材料

ショウガの根は JA 熊本うきで3か月以上保存した熊本県産の古ショウガを購入したものを用了.

#### 2) 実験方法

##### i. 抽出方法

ショウガは蒸留水で洗浄し, おろし金またはフードプロセッサーを用いてホモゲナイズし, アイスバス中でガーゼを用いて搾汁を得た. ポリフェノールの除去は, 得られた溶液に Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)を加えて1時間放置後, 遠心分離 (8500 g, 30 min, 4°C) を行い, 上清を得た. その上清を粗抽出液とした.

##### ii. タンパク質の分析

#### 1. SDS-PAGE

SDS-PAGE は, Laemmli ら (1970) の方法にしたがって行った [33]. すなわち, トリス 18.2 g, 1 M 塩酸 24 ml, SDS 0.4 g を蒸留水で溶解し, 全容を 100 ml にしたものを A 液とした. トリス 6.0 g, 1 M 塩酸 48 ml, SDS 0.4 g を蒸留水で溶解し, 全容を 100 ml にしたものを B 液とした. アクリルアミド (モノマー) 30 g, N,N'-メチレンビスアクリルア

ミド 0.8 g を蒸留水で溶解した後、全容を 100 ml にしたものを C 液とした。過硫酸アンモニウム 0.1 g を蒸留水 1.0 ml に溶解し、D 液とした。グリセリン 2.0 ml, B 液 2.5 ml,  $\beta$ -メルカプトエタノール 1.0 ml, SDS 0.4 g, 0.2% ブロムフェノールブルー (BPB) メタノール溶液 0.1 ml を加えた後、蒸留水で 10 ml にしたものを試料調製溶液とした。トリス 6.0 g, SDS 0.1 g, グリシン 28.8 g を蒸留水に溶解して 0.1 ml の 0.2% BPB メタノール溶液を加え、1000 ml にしたものを電気泳動緩衝液とした。分離ゲルは A 液 1.5 ml, C 液 2.5 ml, 蒸留水 2.0 ml を混合して氷水中で脱気した後、TEMED 3  $\mu$ l, D 液 40  $\mu$ l を加え、ゲルプレート (120  $\times$  100 mm) に 5 cm 充填し、サンプルコーム (1 mm 厚, 12 検体) をつけ、ゲル化した (3.0% 濃縮 ゲル)。試料はタンパク質溶液に等量の試料調製溶液を加え、100°C で 2 min 加熱した。電気泳動では電気泳動緩衝液を 2 倍希釈したものを用い、室温で濃縮ゲルを 15 mA, 40 - 50 min で行い、分離ゲルを 20 mA, 40 - 45 min 行った。また、分子量マーカーには、BSA M.W. 66 kDa, カルボニックアンヒドラーゼ (Carbonic anhydrase) M.W. 29 kDa, トリプシンインヒビター (Soybean trypsin inhibitor) M.W. 20 kDa, HEL M.W. 14 kDa を用いた [34]。泳動後のゲルは、染色液 (メタノール : 酢酸 : 蒸留水が 5 : 2 : 5 の溶液中に CBB G250 を 0.1% ) で 10 min 染色し、10% 酢酸で脱色した。

## 2. エレクトロブロットティング

エレクトロトランスブロットティングは、セミドライ方式で行った。ブロットティング溶液には、0.1% SDS を含む CAPS 溶液を用いた。すなわち、11.1 g の CAPS を 450 ml の蒸留水に溶解し、2 M 水酸化ナトリウム, pH 11.0 に調整後、蒸留水で 550 ml に調製し、これを CAPS 保存溶液とした。ブロットティング溶液は、保存溶液 : メタノール : 蒸留水が 1 : 1 : 8 (v/v) に 0.1% SDS を加えたものを用いた。ブロットティング膜は、PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Canada) をミニスラッグゲルの大きさ (10  $\times$  5 cm) に合わせて切断し、メタノールに 10 sec 浸した後ブロットティング溶液中で 30 min 平衡化した。トランスブロットティング装置 (ホライズブロット AE-6675  $\cdot$  P/N 型, ATTO Corp., Japan) の陽極をブロットティング溶液で十分湿らせた後、同様に湿らせた濾紙 (No. 590, ADVANTEC Co., Japan, 10  $\times$  5 cm) 2 枚を重ね、その上に平衡化した PVDF 膜、ブロットティング溶液 5 min 平衡化した泳動終了後のゲル、ブロットティング液に浸した濾紙 4 枚の順に気泡が入らないように重ねた。陰極側電極版を上から押さえて固定した後、120 mA, 2 h ブロッ

ティングした。ブロットィング後、PVDF 膜を CBB 染色した。染色液は 50% メタノール、10% 酢酸溶液中に、0.1% となるように CBB (R-250) を溶解したものをを用いた。脱色液は蒸留水：メタノール：酢酸が 4：5：1 (v/v) になるように調製したものをを用いた。トランスブロットィング後の PVDF 膜は、染色液で 5 sec 間染色し、脱色液で脱色し風乾を行った。

### 3. N 末端配列分析

PVDF 膜の場合はタンパク質バンドを切り取り分析に用いた。DEAE イオン交換クロマトグラフィーから得られたサンプルの場合は SDS-PAGE 後、ブロットィングを行い、PPSQ-21A プロテインシーケンサー (Shimadzu Co., Japan) を用いて分析した。

#### iii. 硫酸分画

##### 1. 40% 硫酸分画

硫酸分画はビーカーに試料を入れ 40% (W/V) になるように加えた。硫酸を加えた試料はスターラーにより 60 min 攪拌させ、その後遠心分離 (8500 g, 30 min, 4°C) を行い上清と沈殿物に分けた。

##### 2. 100% 硫酸沈殿

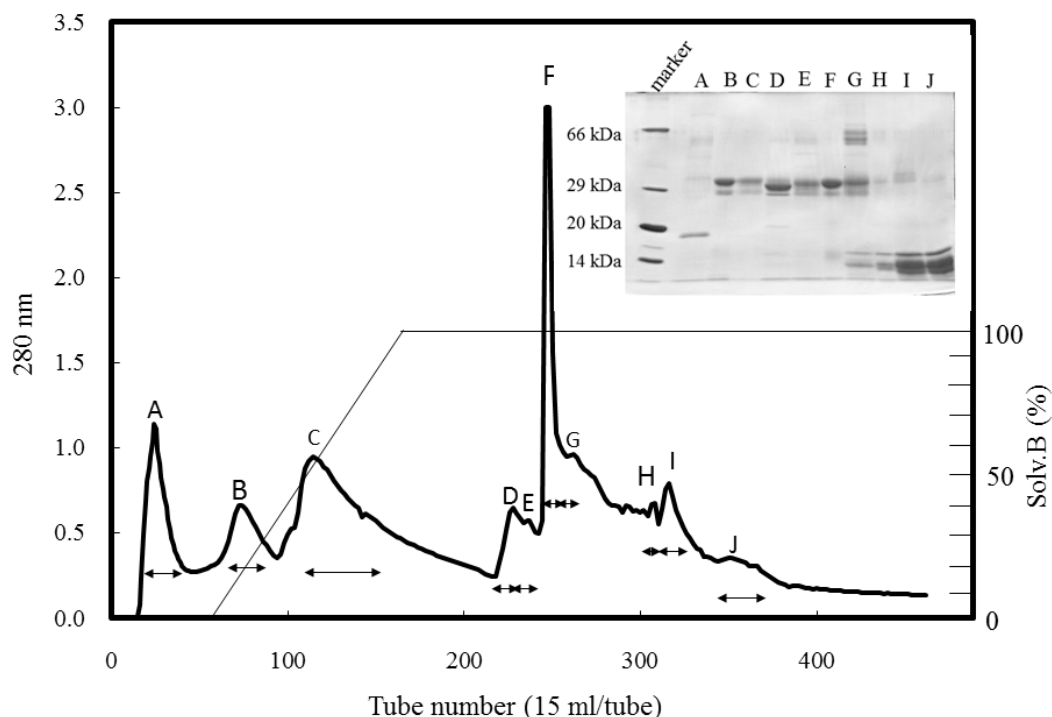
上清に残ったタンパク質の回収は硫酸逆透析によって行った。硫酸逆透析は溶液中の濃度の差を利用し、サンプル中の水分を奪い濃縮沈殿させる方法である。硫酸分画により得た上清は、硫酸アンモニウムが入ったセルロース膜を浸し、濃縮沈殿させた。この操作は 4°C で硫酸アンモニウム側に溶液が出なくなるまで行った。硫酸逆透析後、サンプルは遠心分離 (8500 g, 30 min, 4°C) を行い上清と沈殿物に分けた。タンパク質は沈殿物に含まれているため、沈殿物を試料とした。

#### iv. DEAE-トヨパールによるイオン交換カラムクロマトグラフィー

100% 硫安沈殿物は 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いて溶解後, 透析膜に入れ 1000 ml の 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 で 16 h, 4°C で 3 回透析を行った [35]. その後, 試料溶液は, DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーに供した. まず, カラム (3 × 45 cm) に詰めた樹脂 (DEAE-トヨパール) は 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 で平衡化し, 試料溶液を供した. カラムは同緩衝液で十分に洗浄した後, NaCl 濃度をゼロから 0.25 M にグラジエント法により上昇させてタンパク質を溶出した. 流速は 24 ml/h で行い, 溶出液は 20 ml ずつ分取した. クロマトグラフィーによって得られた画分は 280 nm でタンパク質を測定した. イオン交換クロマトグラフィーで得られた分離タンパク質は 100% となるように硫酸アンモニウムを加え遠心分離 (8500 g, 30 min, 4°C) を行い硫安沈殿物として回収した. さらにリクロマトを行うために 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 により透析を行った [35].

## 第2節 結果

タンパク質の分離は 40 - 100% 硫安分画及び DEAE Toyopearl 650 M のイオン交換クロマトグラフィーを用いて分離を行った (Fig. I -1). その Peak (A-J) は SDS-PAGE を用いてバンドの分析を行った (Fig. I -1). その結果, Peak A は 18.5 kDa, Peak B, C 及び F は 33 kDa 付近にバンドが得られ, それらのバンドはブロッティング後, N 末端配列分析を行った. その結果, Peak A の配列は VKAVAVLGSSEGVKGTIYFVQEGNGPTT であり, *Curcuma aromatica* 由来の Cu/Zn-SOD と相同性が得られた [36]. Peak B の配列は DDLPSIDWREKGAVVPVKNQGGSXWAF であり, ショウガ由来のシステインプロテアーゼの GP2 の配列と相同性が得られた [37]. Peak D の配列は DVLPSIDWREKGAVVAVKNQGRXG であり, ショウガ由来のシステインプロテアーゼの GP3 の配列と相同性が得られた [37]. Peak F の配列は DDLPSIDWRENGAVVPVKNQGGSXWAFS であり, ショウガ由来のシステインプロテアーゼの GP II の配列と相同性が得られた [38, 39]. 以上の結果より日本産のショウガに含まれる PR タンパク質は Cu/Zn-SOD 及び 3 種類のシステインプロテアーゼが含まれていることが明らかになった.



**Fig. I -1. Chromatographic profile and Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel of *Z. officinale* cysteine protease (GPs) eluted using DEAE Toyopearl.** A: 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv. A), 0.25 M NaCl in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv. B). Inset show SDS-PAGE gel of collected fractions.

### 第3節 考察

植物は動物のような免疫システムの生体防御機構を持たないことから特異的な PR タンパク質を有している。植物は病原体感染及び傷害などによりジャスモン酸やサリチル酸が誘導され酸性の PR タンパク質及び塩基性の PR タンパク質が発現することが報告されている [4]。ショウガに含まれる PR タンパク質の分離及び精製は 40 - 100% 硫酸分画及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて行った。イオン交換クロマトグラフィーの結果, Peak A は 18.5 kDa 付近, Peak B, D 及び F は 33 kDa 付近でタンパク質バンドを示した。これらのバンドの N 末端配列情報からタンパク質の同定を行った結果, Peak A は Ca-SOD, Peak B は GP2 由来, Peak D は GP3 由来そして Peak F は GP II 由来に相同性を示した。ショウガ由来の GP は Choi らにより GP I と GP II, Kim らにより GP2

と GP3 が 2 種類ずつ計 4 種類報告されている [37-39]. したがって, 1 種類のショウガには 2 種の GP を含むことが報告されている. 今回用いた日本産のショウガに含まれる GP は 3 種類 (GP II, GP2 及び GP3 に相同性のあるピーク) を含むことが明らかになった. 次章では, イオン交換クロマトグラフィーによって分離した PR タンパク質である SOD 及び GP は精製を行い, 構造解析及び諸性質の分析を行った.

### 第3章 ショウガ由来の SOD

#### 緒言

環境のストレスへの反応産物は  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ,  $\text{RO}^{\cdot}$ ,  $\text{ROO}^{\cdot}$  及び  $\text{RO}^*$  などの種類がある [5-8]. ROS は, 好気性菌の生理的機能のために必要であり, 細胞の代謝において重要な役割を持っている. ROS の過剰な生成は, DNA 傷害, 突然変異, メタボリック機能障害及び細胞死を引き起こしている [4]. 一方, ROS の生産は様々な生物に有害な影響を引き起こす可能性がある [40 - 44]. また, SOD は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  による細胞障害に重要な役割がある. この反応は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  から  $\text{O}_2$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  を行うことにより細胞の防御の役割を果たしている [8, 28]. リン脂質を含む細胞膜はチャージされた  $\text{O}_2$  分子対して不透過性であることから  $\text{O}_2^{\cdot-}$  を触媒する毒性に対して SOD を含めて除去メカニズムが細胞内に存在する [46]. この SOD の種類は金属補因子によって 4 つのグループに分けることができる (Fe SOD, Mn SOD, Ni SOD 及び Cu/Zn-SOD) [36, 47 - 49]. Fe SOD は葉緑体, Mn SOD はミトコンドリア及びペルオキシソーム, Ni SOD は細胞質基質, また Cu/Zn-SOD は葉緑体, 細胞質基質及び細胞外間隙に存在することが報告されている [47, 48]. Cu/Zn-SOD は多様な細胞器官の分布及びストレス耐性を持つことが報告されている [50 - 54]. さらに, SOD は食物, 薬品, 及び化粧品工業などに幅広い分野で注目されている [55]. したがって, これらの酵素の産業利用は熱安定性が重要とされている [36]. ショウガは, *p*-シネオール,  $\alpha$ -テルピネオール,  $\alpha$ -ジンギベレン及びペンタデカン酸などが抗酸化活性を有することが報告されている [56]. また, ショウガは様々な植物種 [57, 58] と同様に SOD を含むと考えらるが, ショウガ由来の SOD は報告されていない. そこで, 本研究ではショウガから SOD (Zo-SOD) を抽出し, 分離及び精製した. 精製した SOD はアミノ酸配列決定, アミノ酸分析, 及び質量分析によって完全なアミノ酸配列を決定した. 複数の配列アラインメント及び系統発生解析により Zo-SOD の構造的及び機能的特徴ならびに他の植物の Cu/Zn-SOD との進化的関係を明らかにした. さらに, Zo-SOD のアミノ酸配列から Zo-SOD をコードする塩基配列 (453bp) を有する合成遺伝子を作製し, pET-15b にクローニングした. 組換え Zo-SOD は大腸菌 BL21 (DE3) 中で発現させ, pH 及び熱安定性について分析した.

## 第1節 実験材料及び実験方法

### 1) 材料

第1章 イオン交換クロマトグラフィーによって分離した Peak A を試料として用いた.

### 2) 精製

#### i. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-トヨパールクロマトグラフィーで分離した Peak A は透析後, 陰イオン交換カラムを装着した JASCO 800 シリーズ HPLC (JASCO Co., Japan) で精製を行った. カラムは IEC-DEAE (7.5 × 75 cm; JASCO Co., Japan) を用いた. 緩衝液は 20 mM リン酸緩衝液, pH 8.0 と 0.25 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液, pH 8.0 を用いた. 溶媒 A は 20 mM リン酸緩衝液, 溶媒 B は 0.25 M NaCl を含む溶媒 A を用いた. 分離はグラジエント法を用いて, NaCl 濃度をゼロから 0.25 M に上昇させてタンパク質を溶出した. また, 検出は 280 nm の波長で行った.

#### ii. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー後の逆相 HPLC

高速液体イオン交換クロマトグラフィー (IEC-DEAE カラム) によって精製したピークは逆相 HPLC (C4 カラム: 4.6 × 250 mm, Yamamura Chemical Co., Japan) を装着した JASCO 800 シリーズ HPLC (JASCO Co., Japan) で分離を行った. 溶媒はトリフルオロ酢酸 (TFA : Nacalai Co., Japan) - MeCN 系溶媒を使用した. 溶媒 A は 0.1% TFA, 溶媒 B は 60% MeCN を含む溶媒 A を用いた. 溶出は溶媒 B でグラジエントを行った. また, 検出は 280 nm の波長で行った.

### 3) 構造解析

#### i. 環元アルキル化

タンパク質はCrestfieldら (1963) の方法によりカルボキシメチル (Cm) 化した [59]. すなわち, タンパク質 (10 mg) は 1 ml の 1.4 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.6 に溶解した後, 0.1 ml の 5% EDTA, 1.2 g の尿素及び 33  $\mu$ l の  $\beta$ -メルカプトエタノール を加え, 蒸留水で 2.5 ml にした. 反応溶液は窒素ガスの存在下, 37°C, 1 h 還元した. その後, 89 mg のモノヨード酢酸 を含む 1 M 水酸化ナトリウム 0.3 ml を加え, 窒素ガス存在下, 暗所中で Cm 化した. 反応溶液は 0.2 M アンモニア水溶液中で Sephadex-G50 カラム (2  $\times$  46 cm, Pharmacia 製) によるゲルろ過クロマトグラフィーで試薬を除去し, 凍結乾燥を行った [60].

#### ii. 酵素消化

アルキル化 GP (5 mg) は 1 ml の 0.1 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.0 に溶解した. その後, タンパク質は 1/50 w/w のトリプシン (TR-TPCK, Cooper Biomedical Co., USA) によって 37°C で 4h 切断を行った [34]. トリプシン消化物は JASCO 800 series HPLC システムを用いて ODS 120A S-5 column (4.0  $\times$  250 mm, Yamamura Chemical Co., Japan) によって分離を行った. 逆相 HPLC による分離は 0.1% TFA と 60% MeCN を含む 0.1% TFA を用いてグラジエントを行った. 溶出溶液は 220 nm によって測定した. 一部のペプチドフラクションは 5 mM リン酸緩衝液, pH 6.0 と 60 % MeCN を含む 5 mM リン酸緩衝液によってリクロマトを行った [34].

#### iii. アミノ酸組成分析

加水分解によるアミノ酸組成分析は, 塩酸加水分解法で行った. すなわち, ペプチド試料は小試験管内に乾固させた後, 0.05% の  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む 6 M 定沸点無鉄塩酸 0.5 ml を加え, 減圧下で封管した. その後, 110°C で 20 h 加水分解した. 加水分解物は減圧乾固した後, 0.02 M 塩酸 200  $\mu$ l に溶解し, 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (Merck & Co., Inc., USA) を装着したテルモシリンジ (TERUMO Co., Japan) でろ過し, L- 8500 A 型高速アミノ酸分析計 (Hitachi Co., Japan) を用いて分析を行った [61].

#### iv. N 末端配列分析

N 末端配列分析は、逆相 HPLC で得られたトリプシン消化ペプチドを減圧乾固後、PPSQ-21A プロテインシーケンサー (Shimadzu Co., Japan) によって分析を行った。

#### v. 質量分析

トリプシン消化物は ESI Q-TOF MS / MS で分析し、2+ 及び 3+ ペプチドイオンは MS/MS のデノボシーケンシング法によってアミノ酸配列を決定した。ESI Q-TOF はトリプシン消化ペプチドが長く、アミノ酸組成分析によって配列に置換が見られ、N 末端配列分析によってアミノ酸配列を決定できなかったトリプシン消化ペプチドの分析を目的として行った。さらに、トリプシン消化物は MALDI TOF / TOF によってデノボシーケンシング法を行うために、グアニジン化 [62, 63] 及びスルホン化 [64, 65] によって修飾した。精製されたペプチドまたはペプチド混合物 2  $\mu$ l は真空濃縮器で乾燥させ、7 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  5.5  $\mu$ l, 7.5 M  $\alpha$ -メチルイソ尿素溶液 1.5  $\mu$ l 及び蒸留水 5  $\mu$ l に溶解し、65°C で 15 min インキュベートした。7.5 M  $\alpha$ -メチルイソ尿素溶液は水 50  $\mu$ l に化合物 50 mg を溶解し、調製した。グアニジン化ペプチドは C18 ZipTip を用いて精製し、SPITC 溶液 10  $\mu$ l を加え 50°C で 30 min インキュベートした。SPITC 溶液は 4-スルホフェニルイソチオシアネート 1 mg にピリジン/水/エタノール (1 : 1 : 2, v/v/v) 100  $\mu$ l によって溶解したものをを用いた。サンプルは真空濃縮器で完全に乾燥させ、水 20  $\mu$ l に溶解し、MALDI TOF / TOF で分析した。試料は、API QSTAR Pulsar I ESI Q-TOF システム及び 4800 MALDI TOF / TOF Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Inc., USA) を用いて分析した [60]。

#### 4) SOD 活性測定

SOD 活性は SOD 活性測定キット (SOD Assay Kit-WST) (Dojindo Co., Japan) を用いて測定した。WST 緩衝溶液は緩衝溶液 19 ml に WST 溶液 1 ml を混合した。酵素緩衝溶液は希釈緩衝液 2.5 ml を用いて酵素溶液 15  $\mu$ l (キサンチンオキシダーゼ) を混合した。SOD 活性測定は 96-穴プレートを用いて サンプル, ブランク 1, ブランク 2, 及び ブランク 3 を測定した。すなわち、サンプル溶液はサンプル 20  $\mu$ l, WST 緩衝溶液 200  $\mu$ l, 及び 酵素緩衝溶液 20  $\mu$ l を加えた。ブランク 1 は蒸留水 20  $\mu$ l, WST 緩衝溶液 200

μl, 及び酵素緩衝溶液 20 μl を加えた. ブランク 2 はサンプル 20 μl, WST 緩衝溶液 200 μl, 及び希釈緩衝液 20 μl を加えた. ブランク 3 は蒸留水 20 μl, WST 緩衝溶液 200 μl, 及び希釈緩衝液 20 μl 加えた. 試料を加えた 96 穴プレートは 37°C で 20 min インキュベートを行った. 測定には Microplate reader Multiskan Ascent (Tecan Co., Ltd. Japan)を用いて分析を行った. 各サンプルの阻害%は下記の式を用いて計算した [66].

$$\text{阻害 (\%)} = \{ [(A_{\text{ブランク 1}} - A_{\text{ブランク 3}}) - (A_{\text{サンプル}} - A_{\text{ブランク 2}})] / (A_{\text{ブランク 1}} - A_{\text{ブランク 3}}) \} \times 100. \quad (1)$$

## 5) pH 及び温度安定性

pH 安定性はサンプルに 60 mM ブリットン-ロビンソン緩衝液, pH 2-11 を用いて希釈し, 37°Cで 60 min インキュベートした. 熱安定性はサンプルに 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 を用いて 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 及び 90°Cで 60 min インキュベートした [57]. サンプルは pH 及び温度によって反応後, SOD Assay kit-WST を用いて SOD 活性の分析を行った.

## 6) SOD のクローニング, 発現及び精製

pUC19 に組み込んだ Zo-SOD 合成遺伝子 (453 bp) は Zo-SOD のアミノ酸配列を用いて合成した (Fig. II -1). 合成 Zo-SOD 遺伝子は *Nde*I と *Bam*HI の粘着末端を用いて pUC19 から切断し, Zo-SOD のコード領域は pET-15b 発現ベクター (Novagen, Inc., USA) に組み込み *E. coli* BL21 (DE3) (Agilent Technologies Inc., USA) を用いてタンパク質を発現させた [67]. 組み換え体 Zo-SOD の発現は酵素活性と SDS-PAGE によって分析を行った. 発現タンパク質は Co<sup>2+</sup>-荷電 Talon 金属アフィニティー樹脂カラム (10 × 30 mm; Clontech Laboratories, Inc., USA) を用いて精製した. 緩衝液は 0.5 M NaCl を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0 を用いた. 溶出には 0.2M のイミダゾールを用いた. また, Zo-SOD の His6-tag はトロンビン (1 U/mg; Nacalai Co., Japan) を用いて 20°Cで 16 h 消化し切断した. His-タグを切断した Zo-SOD は 0.5 M NaCl を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0 を用いて Co<sup>2+</sup>-荷電 Talon 金属アフィニティー樹脂カラムによって精製した [68].

## 7) 系統樹分析

系統樹は MEGA 6 を使用して分析を行った [69]. 系統樹解析はショウガと他の植物の SOD 配列を使用して行った. 植物の Cu/Zn SOD 配列は NCBI の BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 及び Swiss Institute の Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) を用いて分析を行った [70].

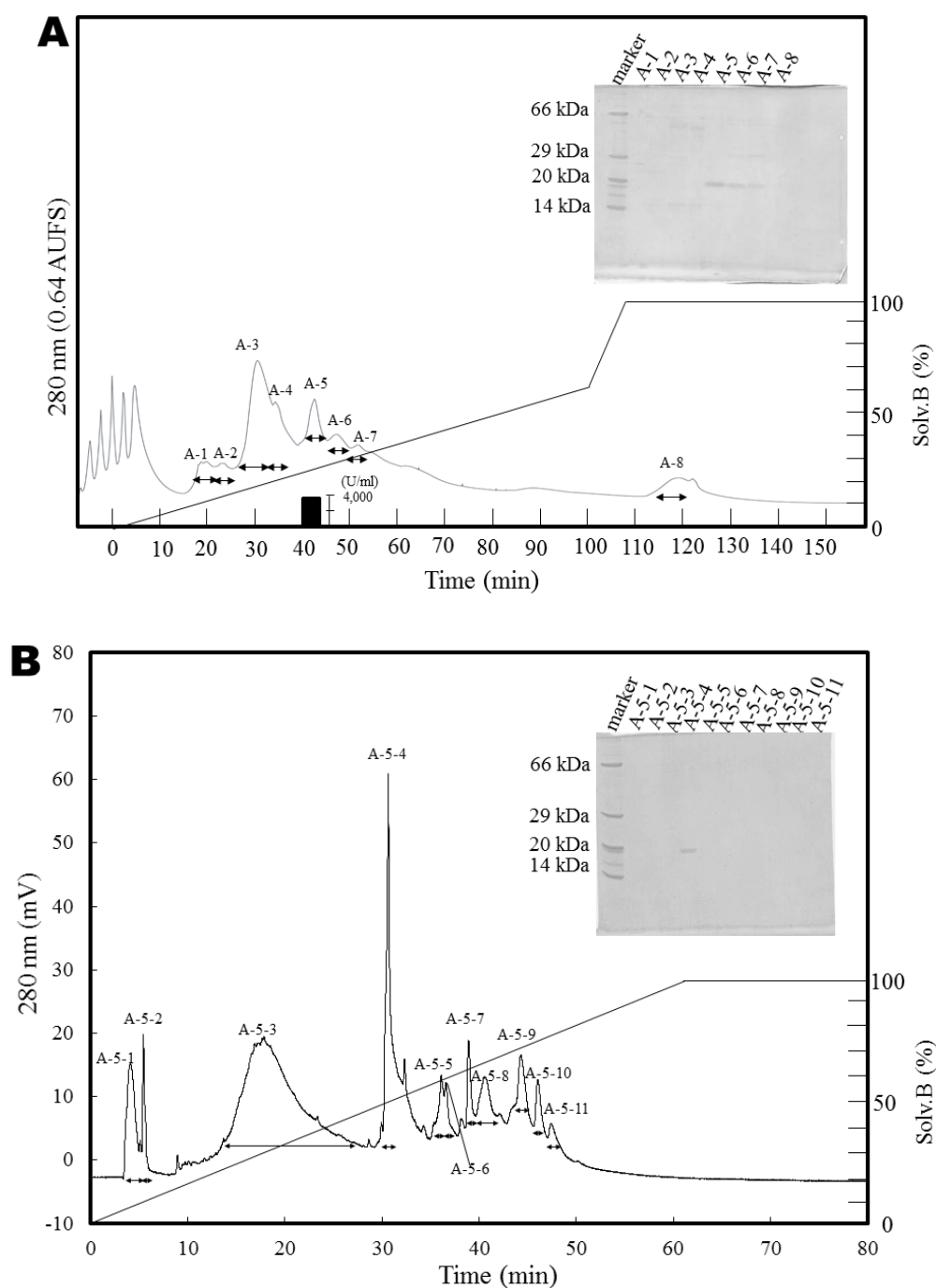
## 第2節 結果

第1章で分離したPeak Aは18.5 kDa付近のバンド以外に複数のバンドが確認された (Fig. I -1). したがって, Peak Aは高速液体イオン交換クロマトグラフィーの IEC-DEAEカラムを用いて精製を行った. IEC-DEAEカラムを用いて精製したサンプルは A-1 から A-8をSDS-PAGE及び活性測定の分析を行った. その結果 Peak A-5に活性及びバンドが検出された (Fig. II -2A). このことからC4カラムを用いてリクロマトを行いPeak A-5-4に18.5 kD付近のバンドが検出された (Fig. II -2B). 次にPeak A-5-4はCm 化後トリプシン消化を行った. 得られたトリプシンペプチド (Ts) のアミノ酸組成はCa-SOD配列と比較した. Zo-SODのアミノ酸配列はN末端配列分析とMSを用いたデノボシーケンシング法によってアミノ酸配列を決定した. Zo-SODはCm化後, トリプシンを用いて切断を行い, 逆相HPLCによって10個のペプチドフラクションを分離した (F-1 から F-10; Fig. II -3). F-2とF-4の各フラクションはリクロマトを行いF-2-1, F-2-2, F-4-1 及び F-4-2に分離した. F-1からF-10のアミノ酸組成はCa-SOD配列と比較し配列決定を行った (Table II -1). その結果, F-1, F-2-1, F-2-2, F-7, F-8, F-9 及びF-10の組成が位置する配列は置換を示した. 置換を有したF-1, F-2-1, F-7, F-8, F-9及びF-10はN末端配列分析を用いてペプチドの配列を決定した. その結果, F-1はTTGNAGGの配列を示し, Ca-SODとZo-SODの置換はSerからThrに置換していることが明らかになった (Table II -2). Peak F-2-1はEHGAPEDENの配列を示し, Ca-SODのアミノ酸配列の8番目のValが Zo-SODのアミノ酸のGluに置換を示した (Table II -2). Peak F-7はVACGIIの配列を示し (Table II -2), Ca-SODのアミノ酸配列の1番目IleがZo-SOD Valに置換を示した. Peak F-8とF-9はGTIYFVQEGDGPTTVTGSITGLKPGLHGFの配列を示し (Table II -2), Ca-SODのアミノ酸配列の24番目AlaがZo-SODではProに置換を示した. Peak F-10はアミノ酸組成分析の結果を用いてCa-SODの配列と比較を行いCa-SOD配列のTs6+7に位置することが明らかになった. MSのデノボ配列を用いて36残基のアミノ酸の配列を決定した. その結果, Ca-SOD配列と比較し, Zo-

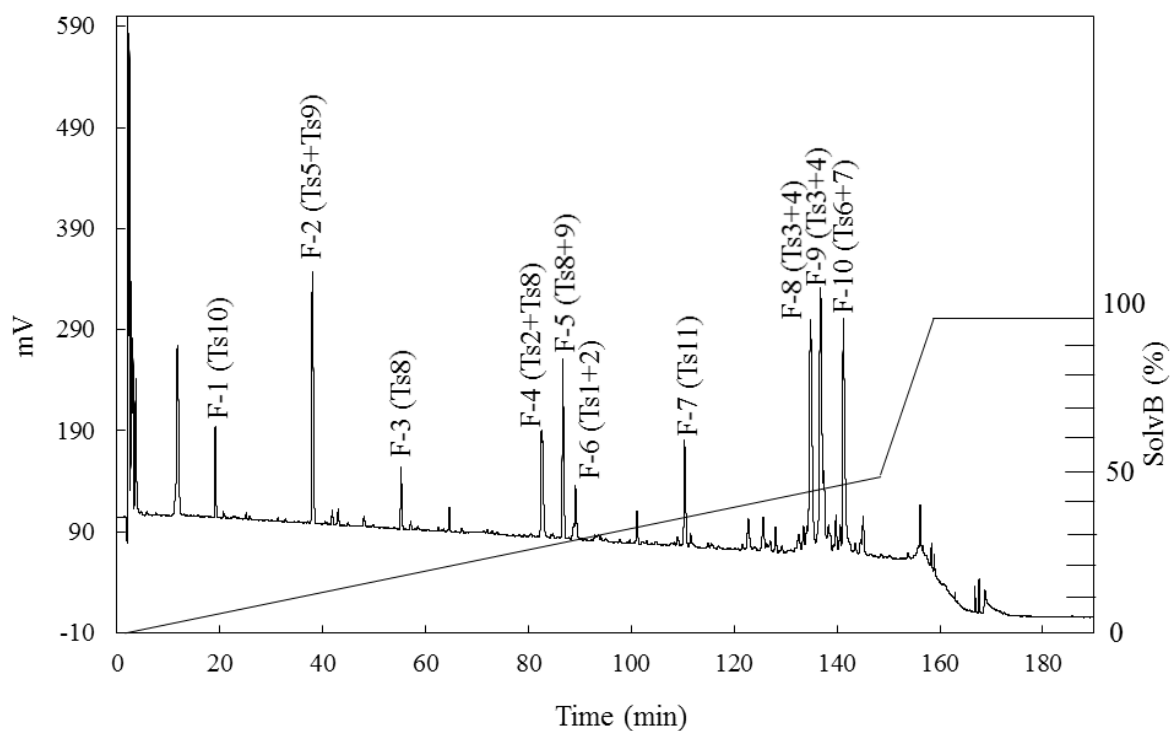
SOD はVal85Ala, Ser88Gly, Ala94Thr, Lys100Ser, Thr105Ser 及び His108Asnに置換が明らかになった (Table II-2). Zo-SODの全アミノ酸配列はCa-SOD 配列と比較しアミノ酸の置換をFig. II-4に示した. それらの結果から, Zo-SODは151残基のアミノ酸からなり, 分子量が14,977.39 Daであることが明らかになった. また, Cu/Zn SODは複数の配列を用いたアライメントによって特異的な配列が明らかになった (Fig. II-5の中のsignature 1及び signature 2). Signature 配列は *Avicennia marina* [71] 及び*Polygonum sibiricum* [72] 由来Cu/Zn-SODから報告されている. Cu及びZnの金属が結合する6つのHis (His44, 46, 61, 69, 78及び 118) 及び1つのAsp (Asp81) はZo-SODに高い保存性を示した. Cytoplasmic 型 Cu/Zn-SODs のN末端はMet であることが報告されている [36]. しかし, Zo-SODのN末端はValであった. 次に配列を決定したZo-SODを用いて合成遺伝子を作製した. Zo-SOD 遺伝子 (519 bp) は増幅, クローニング後, タンパク質を発現させた. 本タンパク質は金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製した (Fig. II-6). またHis6-tag を持つZo-SODと活性の比較を行うために, Zo-SODのHis6-tag はトロンビンによって切断を行った (Fig. II-7). その結果, His タグを持つZo-SODと活性は変わらないことが明らかになった. また, Zo-SODのpH 安定性はpH 5 - 10 (Fig. II-8A), そして熱安定性は 10 - 60°C で安定性を示した (Fig. II-8B).

|                     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| nucleotide sequence | A T G | G G C | A G C | A G C | C A T | C A T | C A T | C A T | C A T | C A C | 30  |
| amino acid sequence | M     | G     | S     | S     | H     | H     | H     | H     | H     | H     | 10  |
| His-Tag of pET15b   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|                     | A G C | A G C | G G C | C T G | G T G | C C G | C G C | G G C | A G C | C A T | 60  |
|                     | S     | S     | G     | L     | V     | P     | R     | G     | S     | H     | 20  |
|                     | A T G | G T G | A A A | G C C | G T T | G C G | G T G | T T G | G G T | T C G | 90  |
|                     | M     | V     | K     | A     | V     | A     | V     | L     | G     | S     | 30  |
| Zo-SOD              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |     |
|                     | T C T | G A A | G G C | G T G | A A A | G G C | A C C | A T C | T A T | T T C | 120 |
|                     | S     | E     | G     | V     | K     | G     | T     | I     | Y     | F     | 40  |
|                     | G T G | C A G | G A A | G G G | G A T | G G T | C C C | A C A | A C C | G T C | 150 |
|                     | V     | Q     | E     | G     | D     | G     | P     | T     | T     | V     | 50  |
|                     | A C T | G G C | A G C | A T T | A C G | G G G | C T G | A A A | C C G | G G C | 180 |
|                     | T     | G     | S     | I     | T     | G     | L     | K     | P     | G     | 60  |
|                     | T T A | C A C | G G C | T T T | C A T | G T C | C A T | G C A | C T T | G G C | 210 |
|                     | L     | H     | G     | F     | H     | V     | H     | A     | L     | G     | 70  |
|                     | G A T | A C C | A C G | A A T | G G C | T G C | A T G | T C A | A C T | G G A | 240 |
|                     | D     | T     | T     | N     | G     | C     | M     | S     | T     | G     | 80  |
|                     | C C G | C A C | T T T | A A C | C C A | G C G | G G T | A A G | G A A | C A T | 270 |
|                     | P     | H     | F     | N     | P     | A     | G     | K     | E     | H     | 90  |
|                     | G G T | G C T | C C A | G A G | G A C | G A G | A A T | C G C | C A T | G C T | 300 |
|                     | G     | A     | P     | E     | D     | E     | N     | R     | H     | A     | 100 |
|                     | G G T | G A T | C T G | G G C | A A T | G C G | A C A | G C A | G G G | G A A | 330 |
|                     | G     | D     | L     | G     | N     | A     | T     | A     | G     | E     | 110 |
|                     | G A T | G G T | A T C | G T C | A C C | G T T | T C C | G T G | G T A | G A C | 360 |
|                     | D     | G     | I     | V     | T     | V     | S     | V     | V     | D     | 120 |
|                     | A G C | C A G | A T T | C C G | C T G | A G T | G G G | C C T | A A C | A G C | 390 |
|                     | S     | Q     | I     | P     | L     | S     | G     | P     | N     | S     | 130 |
|                     | A T C | A T T | G G A | C G C | G C C | G T T | G T G | G T T | C A T | G C A | 420 |
|                     | I     | I     | G     | R     | A     | V     | V     | V     | H     | A     | 140 |
|                     | G A T | C C G | G A C | G A T | C T C | G G T | A A A | G G C | G G T | C A C | 450 |
|                     | D     | P     | D     | D     | L     | G     | K     | G     | G     | H     | 150 |
|                     | G A A | C T G | T C G | A A A | A C G | A C C | G G T | A A C | G C A | G G A | 480 |
|                     | E     | L     | S     | K     | T     | T     | G     | N     | A     | G     | 160 |
|                     | G G C | C G T | G T A | G C C | T G T | G G C | A T T | A T T | G G C | C T G | 510 |
|                     | G     | R     | V     | A     | C     | G     | I     | I     | G     | L     | 170 |
|                     | C A A | G G T | T A A | G G A | T C C |       |       |       |       |       | 525 |
|                     | Q     | G     | stop  |       |       |       |       |       |       |       | 172 |

**Fig. II -1. Nucleotide and amino acid sequences of the recombinant Zo-SOD.**



**Fig. II -2. Chromatographic profiles of *Zingiber officinale* cysteine protease (GPs) eluted using IEC-DEAE (A), and C4 (B) columns.** A: 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv.A), 0.25 M NaCl in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv.B), B: 0.1% TFA (Solv.A), 60% acetonitrile in 0.1% TFA (Solv.B). Insets show SDS-PAGE gels of collected fractions.



**Fig. II -3. C18 reversed - phase HPLC of tryptic peptides from carboxymethylated Zo-SOD.**

Fraction numbers (F) are assigned according to the order of elution. Tryptic peptide numbers (Ts) assigned according to the order of amino acid sequence are indicated in the parenthesis. Solv.A: 0.1% TFA, Solv.B: 60% acetonitrile in 0.1% TFA.

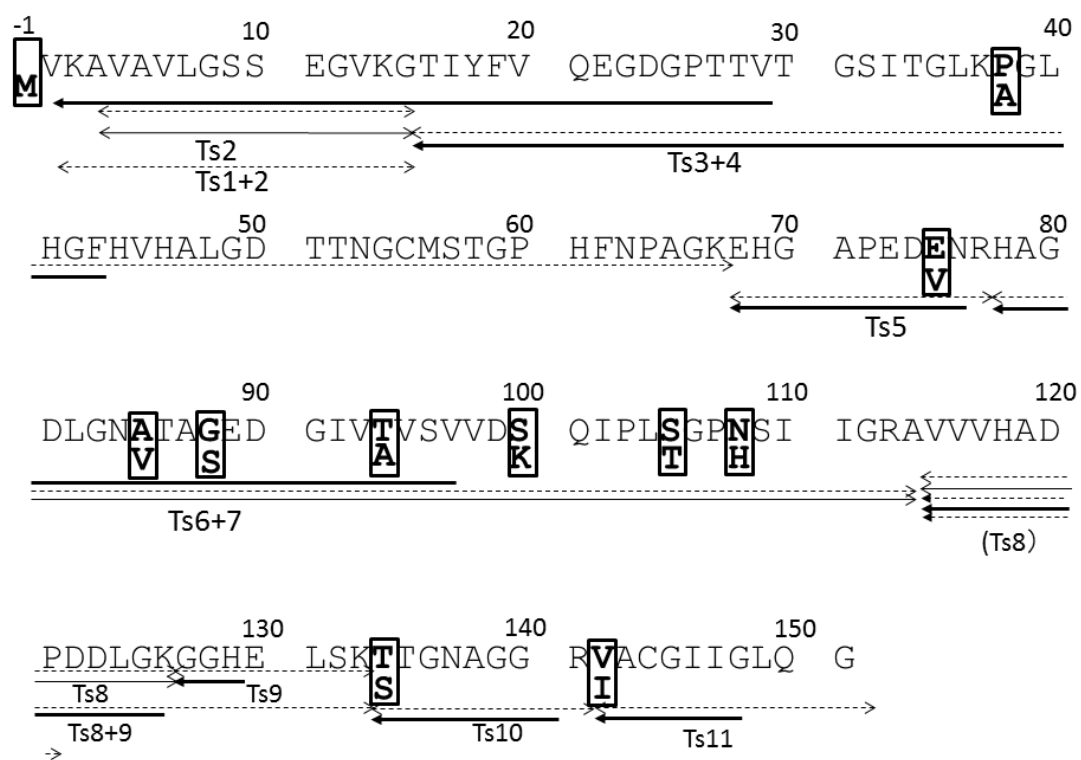
Table. II -1. Amino acid compositions of individual peptide fractions obtained by tryptic digestion of Zo-SOD.

| Fraction number | F-1      | F-2-1    | F-2-2    | F-3      | F-4-1    | F-4-2    | F-5      | F-6      | F-7      | F-8        | F-9        | F-10     |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|----------|
| CmCys           |          |          |          |          |          |          |          |          | 0.97 (1) | 1.06 (1)   | 1.07 (1)   |          |
| Asp             | 0.98 (1) | 1.99 (2) |          | 1.11 (1) | 2.97 (3) |          | 3.17 (3) |          |          | 4.23 (4)   | 4.29 (4)   | 5.01 (5) |
| Thr             | 1.79 (2) |          |          |          |          |          |          |          |          | 7.65 (8)   | 7.75 (8)   | 2.02 (2) |
| Ser             |          |          | 0.87 (1) |          |          | 1.76 (2) | 1.04 (1) | 2.13 (2) |          | 2.23 (2)   | 2.16 (2)   | 3.66 (4) |
| Glu             |          | 2.96 (3) | 1.07 (1) |          |          | 1.07 (1) | 1.12 (1) | 1.20 (1) | 1.02 (1) | 2.32 (2)   | 2.36 (2)   | 2.11 (2) |
| Pro             |          | 0.96 (1) |          |          | 1.08 (1) |          | 0.99 (1) |          |          | 3.98 (4)   | 4.27 (4)   | 1.99 (2) |
| Gly             | 2.85 (3) | 1.13 (1) | 1.97 (2) |          | 1.21 (1) | 2.11 (2) | 3.10 (3) | 2.17 (2) | 2.96 (3) | 11.31 (11) | 11.28 (11) | 6.05 (6) |
| Ala             | 1.01 (1) | 1.31 (1) |          | 2.00 (2) | 2.03 (2) | 2.05 (2) | 2.01 (2) | 1.93 (2) | 1.00 (1) | 2.20 (2)   | 2.23 (2)   | 2.98 (3) |
| Val             |          |          |          | 2.48 (2) | 2.19 (2) | 2.96 (3) | 2.14 (2) | 3.81 (4) | 0.97 (1) | 2.93 (3)   | 3.03 (3)   | 3.10 (3) |
| Met             |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 0.97 (1)   | 1.02 (1)   |          |
| Ile             |          |          |          |          |          |          |          |          | 1.04 (1) | 1.97 (2)   | 2.02 (2)   | 2.89 (3) |
| Leu             |          |          | 1.05 (1) |          | 0.98 (1) | 1.00 (1) | 2.08 (2) | 1.11 (1) | 1.01 (1) | 3.18 (3)   | 3.24 (3)   | 2.04 (2) |
| Tyr             |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 1.05 (1)   | 1.03 (1)   |          |
| Phe             |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 2.98 (3)   | 2.99 (3)   |          |
| Lys             |          |          | 1.00 (1) |          | 1.00 (1) | 1.00 (1) | 2.00 (2) | 2.00 (2) |          | 2.00 (2)   | 2.00 (2)   |          |
| His             |          | 0.88 (1) | 0.88 (1) | 0.89 (1) | 0.90 (1) |          | 1.88 (2) |          |          | 3.77 (4)   | 3.82 (4)   | 1.00 (1) |
| Arg             | 1.00 (1) | 1.00 (1) |          |          |          |          |          |          |          |            |            | 1.00 (1) |
| nmol            | 3.45     | 2.59     | 1.61     | 1.09     | 0.89     | 1.51     | 1.15     | 1.14     | 3.1      | 0.77       | 0.86       | 1.78     |
| total           | 8        | 10       | 7        | 6        | 12       | 12       | 19       | 14       | 9        | 53         | 53         | 34       |
| Assignment      | Ts 10    | Ts 5     | Ts 9     | (Ts 8)   | Ts 8     | Ts 2     | Ts 8+9   | Ts 1+2   | Ts 11    | Ts 3+4     | Ts 3+4     | Ts 6+7   |

(Ts8) assigned to be partial fragment of Ts8.

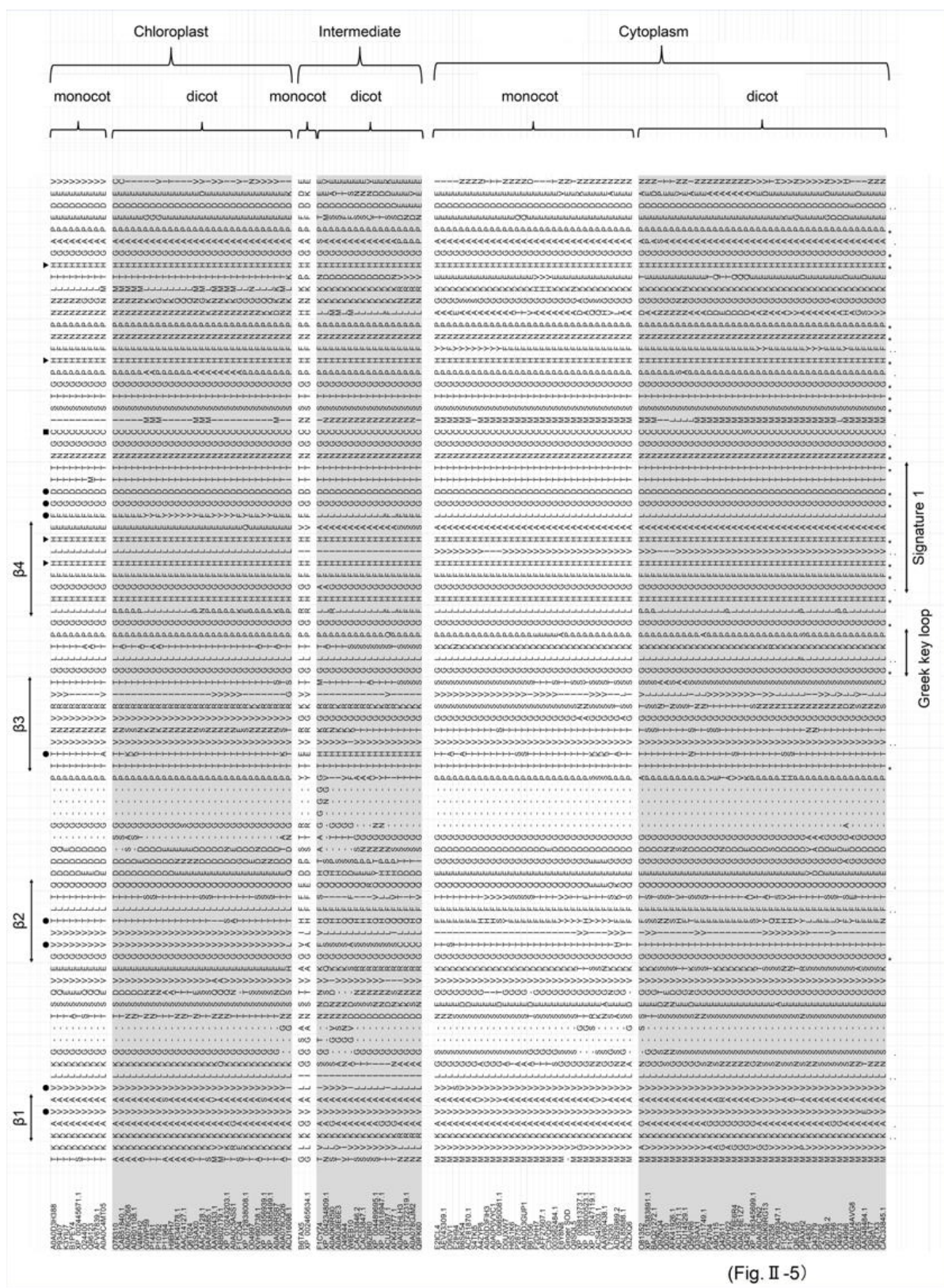
**Table. II -2. Amino acid sequences of Zo-SOD peptides determined by N-terminal sequencing and mass spectrometry.**

| Fractions Assignment                    |        | N-terminal sequence analysis |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
|-----------------------------------------|--------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------------------------|
| F-1                                     | Ts 10  | T                            | T | G | N | A | G | G |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-2-1                                   | Ts 5   | E                            | H | G | A | P | E | D | E | N |                                                       |
| F-2-2                                   | Ts 9   | G                            | G | H |   |   |   |   |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-4-2                                   | Ts 2   | A                            | V | A | V | L | G | S | S |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-5                                     | Ts 8+9 | A                            | V | V | V | H | A | D | P | D | L G K                                                 |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-6                                     | Ts 1+2 | V                            | K | A | V | A | V | L | G | S |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-7                                     | Ts 11  | V                            | A | C | G | I | I |   |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-9                                     | Ts 3+4 | G                            | T | I | Y | F | V | Q | E | G | D G P T T V T G S I T G L K P G L H G F               |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-10                                    | Ts 6+7 | H                            | A | G | D | L | G | N | A | T | A G E D G I V T V S                                   |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| De novo sequencing by mass spectrometry |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| Ts 2                                    |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| Ts 8+9                                  |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
|                                         |        |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                       |
| F-10                                    | Ts 6+7 | H                            | A | G | D | L | G | N | A | T | A G E D G I V T V S V V D S Q I P L S G P N S I I G R |

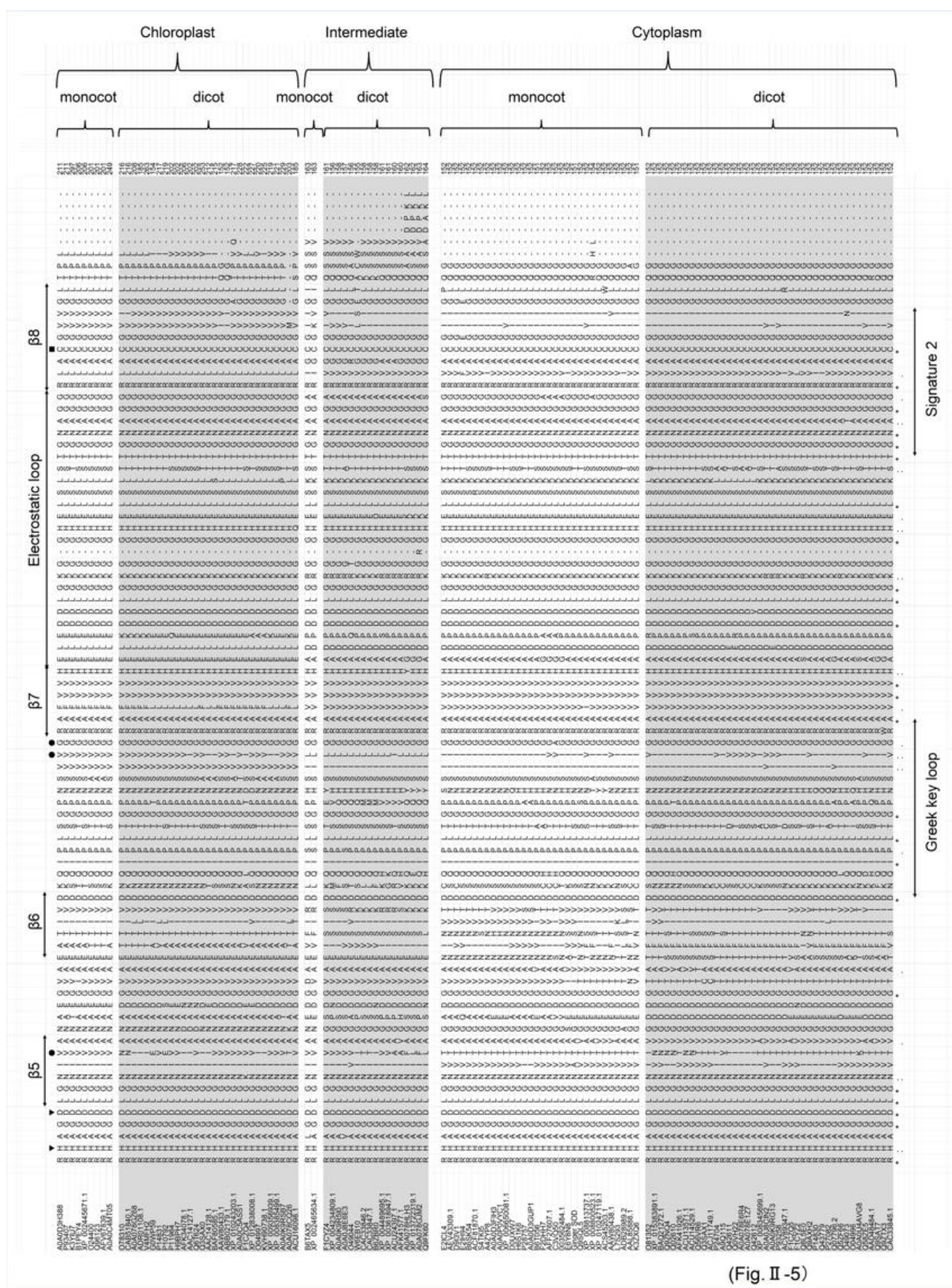


**Fig. II -4. Sequence alignment of Cu/Zn-SOD from *Curcuma aromatica* and *Zingiber officinale*.**

Tryptic peptides (Ts) are indicated.



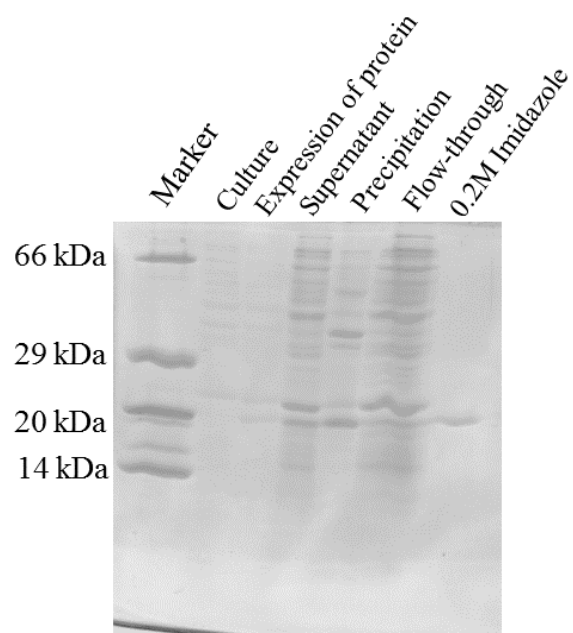
(Fig. II -5)



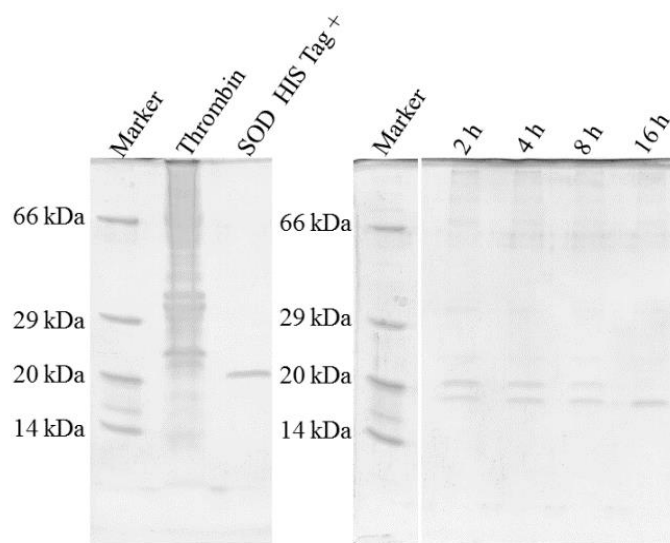
(Fig. II -5)

**Fig. II -5. Alignment of plant SOD protein sequences.** Greek key, signature motifs, and  $\beta$  strands are indicated with double-headed arrows. Amino acids that bind  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  are marked ▼. Cysteine residues predicted to form a disulfide bridge are marked ■, and interacting motifs are marked ●. Accession numbers: A0A0D3H388 (*Oryza barthii*), P93407 (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*), K3YIU7 (*Setaria italica*), B1PEY4 (*Zea mays*), XP\_002445671.1 (*Sorghum bicolor*), O24400 (*Triticum aestivum*), Q96123 (*Triticum aestivum*), AFV67839.1 (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*), A0A0C4MT05 (*Zoysia matrella*), O78310 (*Arabidopsis thaliana*), CAB51840.1 (*Arabidopsis thaliana*), A0A078GZ68 (*Brassica napus*), ADR01108.1 (*Brassica rapa*), V4MFH2 (*Eutrema salsugineum*), G0WP59 (*Withania somnifera*), P14831 (*Solanum lycopersicum*), P10792 (*Petunia hybrida*), P11964.1 (*Pisum sativum*), H9BPH7 (*Vicia faba*), AFK34078.1 (*Medicago truncatula*), AAC14127.1 (*Medicago sativa*), Q6T624 (*Trifolium pratense*), Q3SAX0 (*Gossypium hirsutum*), AAC14128.1 (*Vitis vinifera*), BAF80585.1 (*Populus alba*), AAW80433.1 (*Nelumbo nucifera*), ABB02179.1 (*Nelumbo nucifera*), XP\_010243203.1 (*Nelumbo nucifera*), A0A0C5ASS1 (*Kandelia candel*), F1CZQ4 (*Haberlea rhodopensis*), XP\_012838008.1 (*Erythranthe guttata*), O04997 (*Solidago canadensis* var. *scabra*), KVH90738.1 (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), XP\_009356939.1 (*Pyrus x bretschneideri*), XP\_008385499.1 (*Malus domestica*), A0A0K9RSB7 (*Spinacia oleracea*), A0A078CQ26 (*Brassica napus*), ACU16098.1 (*Glycine max*), B6TAX5 (*Zea mays*), XP\_002465634.1 (*Sorghum bicolor*), F1CYZ4 (*Haberlea rhodopensis*), XP\_004234809.1 (*Solanum lycopersicum*), A0A0K9R5I0 (*Spinacia oleracea*), A0A0J8E6E3 (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), O49044 (*Mesembryanthemum crystallinum*), W6EB10 (*Tamarix hispida*), CAC33846.2 (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*), CAC33847.1 (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*), B6ZBR0 (*Populus tremula*), XP\_004489695.1 (*Cicer arietinum*), XP\_003618947.1 (*Medicago truncatula*), ACU24397.1 (*Glycine max*), AFK41577.1 (*Lotus japonicus*), A0A078HLH3 (*Brassica napus*), XP\_013722319.1 (*Brassica napus*), A0A078GJM2 (*Brassica napus*), Q9FK60 (*Arabidopsis thaliana*), E2ICL4 (*Aeluropus lagopoides*), AEV43309.1 (*Zoysia japonica*), D9I3V1 (*Aeluropus littoralis*), E2IH94 (*Aeluropus lagopoides*), B6SK54 (*Zea mays*), ACF81870.1 (*Zea mays*), S4TKI5 (*Saccharum hybrid cultivar GT28*), A4ZYP8 (*Pennisetum americanum*), A0A0D3FIH3 (*Oryza barthii*), Q0DRV6 (*Oryza sativa* subsp. *japonica*), XP\_006650081.1 (*Oryza brachyantha*), D0UXW7 (*Bambusa oldhamii*), H6S1K6 (*Pleioblastus fortunei*), P28757 (*Oryza sativa* subsp. *japonica*), A0A0D3GUP1 (*Oryza barthii*), B6T056 (*Zea mays*), F2DHH7 (*Hordeum vulgare* var. *distichum*), AFF27607.1 (*Triticum aestivum*), C3VQ50 (*Triticum aestivum*), XP\_003562484.1 (*Brachypodium distachyon*), E6Y8N8 (*Curcuma aromatica*), C0HK70 (*Zingiber officinale*), Q9SQL5 (*Ananas comosus*), XP\_008813737.1 (*Phoenix dactylifera*), XP\_008800523.1 (*Phoenix*

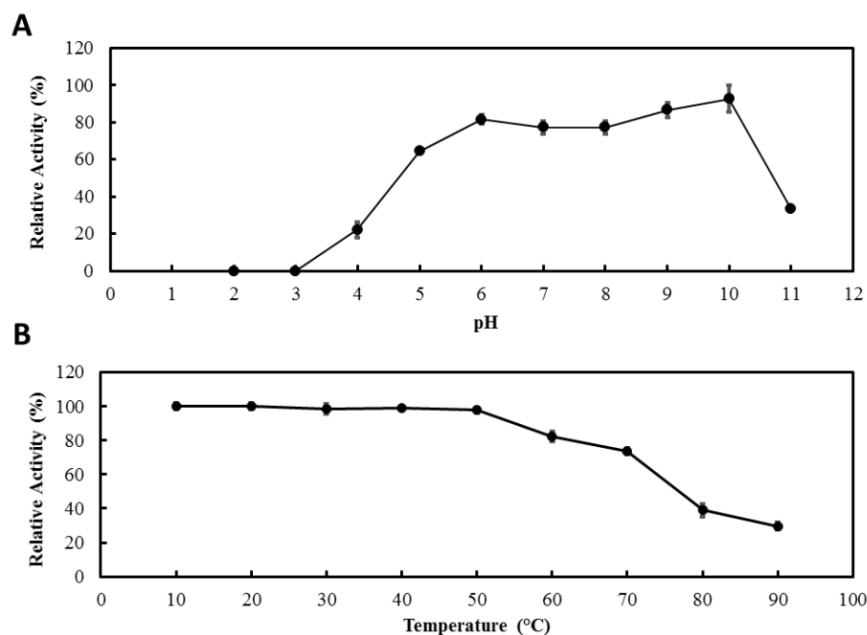
*dactylifera*), XP\_010247119.1 (*Nelumbo nucifera*), ACS45203.1 (*Nelumbo nucifera*), AAW80438.1 (*Nelumbo nucifera*), L7S293 (*Musa acuminata*), ADB28989.2 (*Allium sativum*), AAL85888.1 (*Sandersonia aurantiaca*), K3ZXQ6 (*Setaria italica*), O81352 (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*), XP\_015383891.1 (*Citrus sinensis*), BAQ21272.1 (*Citrus tamurana*), Q9ZNQ4 (*Cicer arietinum*), Q02610.2 (*Pisum sativum*), AFK41926.1 (*Medicago truncatula*), ACU13571.1 (*Glycine max*), ACU14529.1 (*Glycine max*), Q56VR6 (*Lotus japonicus*), Q3SAX1 (*Gossypium hirsutum*), ACJ11749.1 (*Gossypium hirsutum*), P24704.2 (*Arabidopsis thaliana*), A9Q115 (*Eutrema halophilum*), Q42611.3 (*Brassica juncea*), Q0VH22 (*Brassica napus*), A0A078E6R4 (*Brassica napus*), A0A078E1Z7 (*Brassica napus*), Q42612.3 (*Brassica juncea*), XP\_008345699.1 (*Malus domestica*), A0A0J8CIN2 (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), A0A0K9RG13 (*Spinacia oleracea*), P93258.1 (*Mesembryanthemum crystallinum*), ACV89347.1 (*Knorringia sibirica*), F1CZQ5 (*Haberlea rhodopensis*), F1CYZ2 (*Haberlea rhodopensis*), Q8L5E0 (*Olea europaea*), Q9AXH2 (*Avicennia marina*), P14830 (*Solanum lycopersicum*), Q43779 (*Solanum lycopersicum*), P27082.2 (*Nicotiana glauca*), Q07796.2 (*Ipomoea batatas*), Q5ZF66 (*Plantago major*), O49073 (*Paulownia kawakamii*), O04996.3 (*Solidago canadensis* var. *scabra*), A0A0U4AVG8 (*Fraxinus mandshurica*), Q58ZE5 (*Manihot esculenta*), AAD48484.1 (*Manihot esculenta*), Q9SAT7 (*Populus tremuloides*), Q9ZTX3 (*Populus tremuloides*), CAC33845.1 (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) from Protein Information Resource and SWISS-PROT.



**Fig. II -6. SDS-PAGE of collected fractions after affinity column chromatography.**



**Fig. II -7. SDS-PAGE of cleaved Zo-SOD by thrombin digestion.**



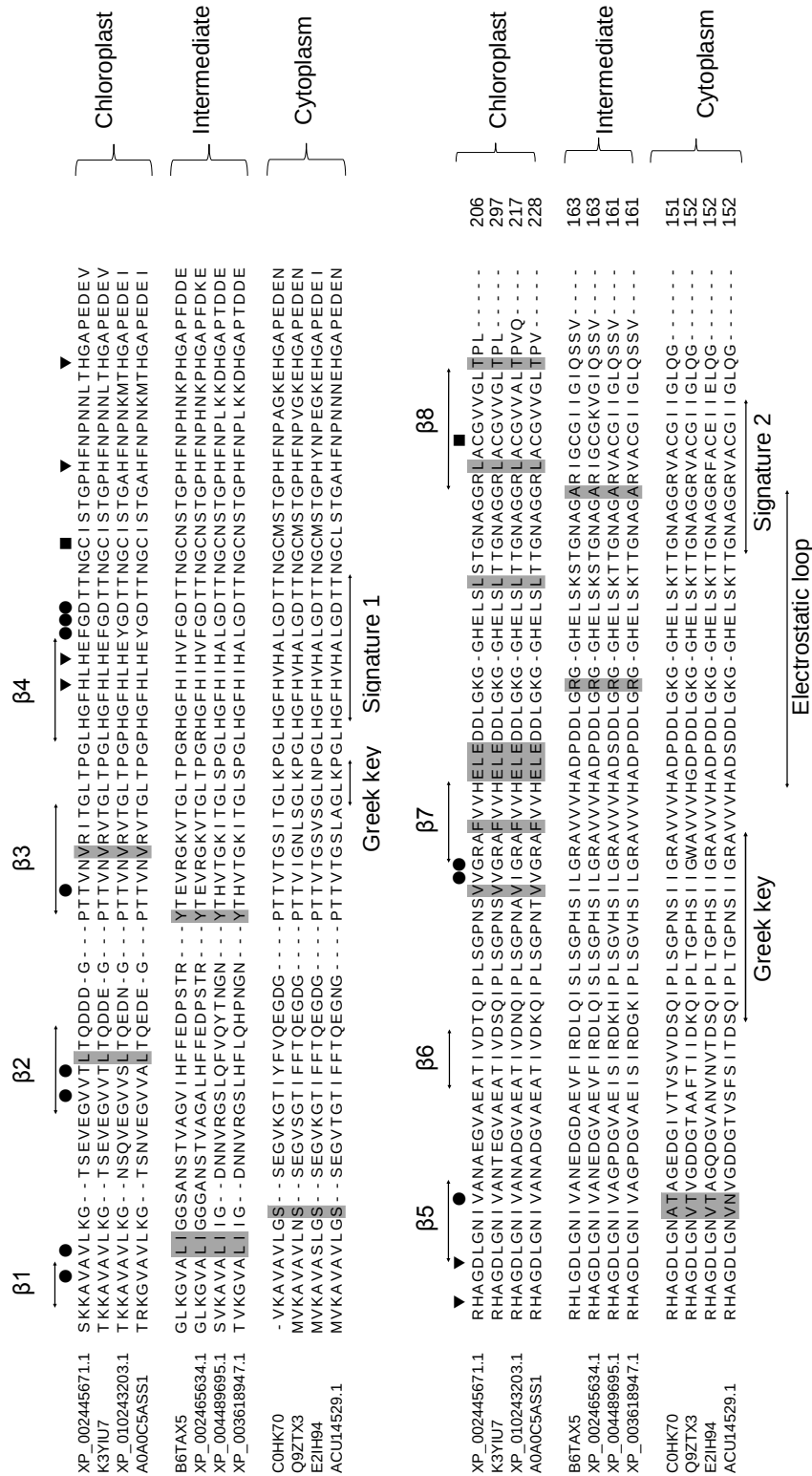
**Fig. II -8. pH and thermal stability of Zo-SOD.** (A) pH stability. Each sample was incubated in 60 mM Britton-Robinson buffer with different pH (2 - 11) at 37 °C for 60 min. (B) Thermal stability. Each sample was incubated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) at 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90°C for 60 min.

### 第3節 考察

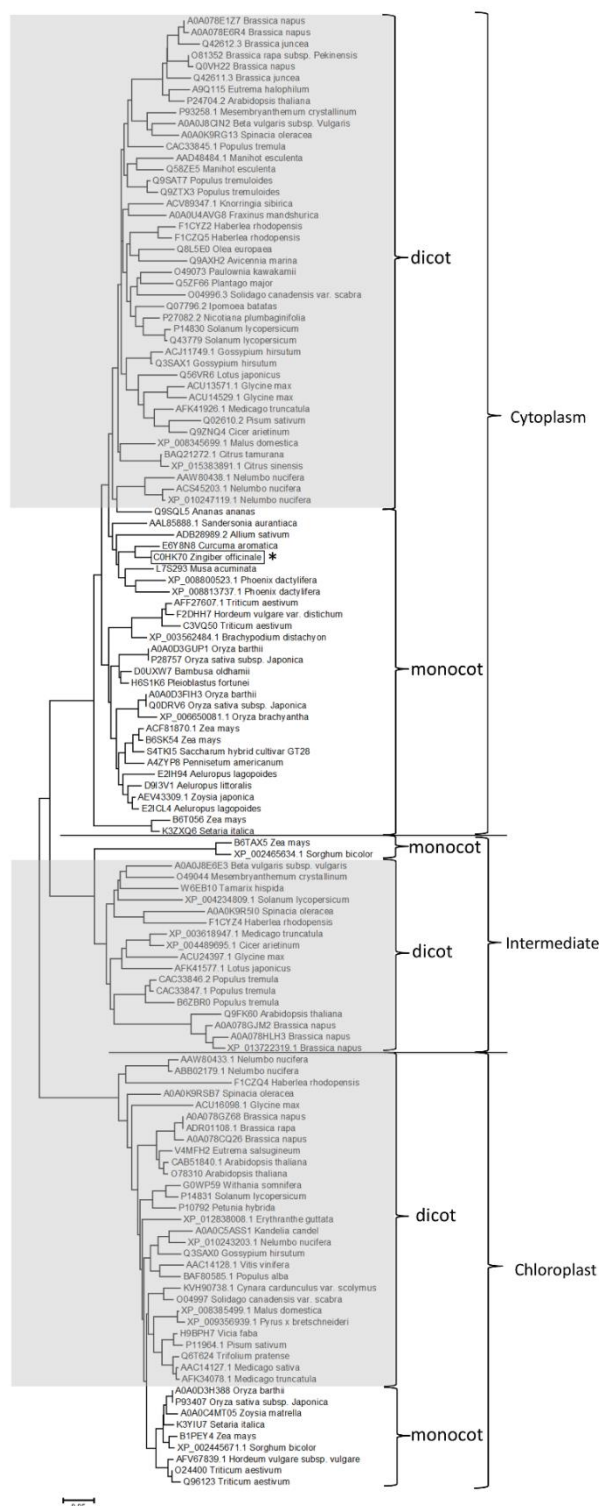
第2章で分離した Peak A は構造解析の結果, SOD であることが明らかになった. SOD は環境のストレスへの反応産物である  $O_2^{\cdot-}$  を不均化する反応を持っている.  $O_2^{\cdot-}$  は ROS のひとつである. ROS は DNA 傷害, 突然変異, メタボリック機能障害及び細胞死引き起こしている [8, 28, 45]. したがって, SOD は  $O_2^{\cdot-}$  による細胞障害に重要な役割がある. この反応は  $O_2^{\cdot-}$  から  $O_2$  と  $H_2O_2$  に反応させることにより不均化をしている. リン脂質を含む細胞膜はチャージされた  $O_2$  分子に対して不透過性であることから  $O_2^{\cdot-}$  を触媒する毒性に対して SOD を含めて除去メカニズムが細胞内に存在する [46]. 第1章で分離した Peak A は逆相 HPLC によって精製された (Fig. II -2A, Fig. II -2B). そこで, 精製したショウガ由来 SOD は Ca-SOD のアミノ酸配列情報を用いてアミノ酸組成分析, 配列分析及び質量分析で得られた配列情報によりアミノ酸配列を決定した. Zo-SOD の配列は Zo-SOD のトリプシン消化ペプチドと Ca-SOD の配列と比較すると 10 個の置換を示した. 決定した Zo-SOD のアミノ酸配列は *C. aromatica* (E6Y8N8; 93%), *Ananas ananas* (Q9SQL5; 92%), *Brachypodium distachyon*

(003562484.1; 85%) 及び *Nelumbo nucifera* (ACS45203.1; 85%) に高い類似性を示した。McRee らの論文ではホウレン草由来 Cu/Zn-SOD (1SRD) の立体構造が熱安定性の高いウシの Cu/Zn-SOD 構造と類似していることが報告されている [73]。ホウレン草由来 Cu/Zn-SOD は 8 つの  $\beta$  鎖が整列することから Zo-SOD のアミノ酸配列も同様に  $\beta$  鎖が存在すると考えられた (Fig. II-5) [74]。このアライメントの中で、Greek-key の結合は  $\beta 3$  及び  $\beta 4, \beta 6$  及び  $\beta 7$  の一次構造の中で  $\beta$  シートを形成している。さらに、すべての  $\beta$  鎖は立体構造上で隣接している。特に Cu/Zn-SOD の中で  $\beta 4$  及び  $\beta 5$  中のループはジスルフィド結合によって安定し、活性サイトと Cu/Zn 結合サイトを形成している [75, 76]。Zo-SOD 中に見出されたアミノ酸置換の Ala38Pro, Val75Glu, Val85Ala, Ser88Gly, Ala94Thr, Lys100Ser, Thr105Ser, His108Asn, は活性サイトから離れた位置であることから活性には影響しないと考えられた。また、Ca-SOD の Ser134 及び Ile142 が Zo-SOD では Thr と Val であった。これらの置換は活性サイト近くであったが、活性にはアミノ酸の性質上影響しないと考えられた。したがって、Zo-SOD は Ca-SOD と類似の作用を示すと考えられた。さらに Clustal W による植物 Cu/Zn-SOD 配列分析の結果、chloroplastic 型、cytoplasmic 型 及び intermediate 型に分類された。また、Zo-SOD は cytoplasmic 型であることが明らかになった。報告されている植物の Cu/Zn-SOD は配列を比較することによって、クラス特異的なアミノ酸置換を示した (Fig. II-5)。Cytoplasmic 型の特異的な 5 つの置換は  $\beta 1, \beta 3$  及び  $\beta 5$  の近くに存在した。一方、intermediate 型の置換特異性は  $\beta 1, \beta 2, \beta 3$  及び  $\beta 7$  と静電ループの近くに存在した。対照的に、chloroplastic 型の置換は  $\beta 2, \beta 7$ , 及び  $\beta 8$  のループ 及び Greek-key ループモチーフの近くに多く見られた。さらに、chloroplastic 型の特異的なアミノ酸置換は触媒サイト近くに見られた。したがって、chloroplastic 型は cytoplasmic 型及び intermediate 型と異なる触媒活性を持つと考えられた (Fig. II-9)。また、系統樹は Clustal W と同様に 3 つのクラスに分岐を示した (Fig. II-10) [77, 78]。Zo-SOD は cytoplasmic 型に属しているが、chloroplastic 型、cytoplasmic 型及び intermediate 型の SOD のすべての祖先が同じであることを示した。さらに、すべての SOD は chloroplastic 型、cytoplasmic 型及び intermediate 型全てにおいて monocot 及び dicot に分岐を示した。この結果から、Zo-SOD は cytoplasmic 型 monocot であることが明らかとなった。

Zo-SODの酵素学的性質を調べた結果、pH 5 - 10で安定であることが示された。また、*Glycine max* cv. (pH 5.0 - 9.0) [35], *Pisum sativum* (pH 6.0 - 10) [79], *Sonneratia alba* (pH 4.0 - 7.0) [80] 及び *Radix lethospermi* (pH 6.0 - 10.0) [81] 由来 SOD は 30 - 60 min インキュベート後に 80%の活性を保持することが報告されている。Ca-SOD は 120 min, pH (3 - 9) の範囲で安定を示すと報告されている。一方, Zo-SOD は 60°C で 60 min インキュベート後 80%の活性を保持していた。Zo-SOD の熱安定性を他の酵素と比較した結果, Ca-SOD [36] は 80°C で 120 min のインキュベートによって高い熱安定性が報告されているが、他の植物の SOD は Zo-SOD よりも熱安定性が低いことが報告されている。例えば, *G. max* cv. [35] と *Pennisetum glaucum* [82] の SOD は 50°C, *Pisum sativum* [79] は *Sonneratia alba* [80] は 55°C で 60 min のインキュベート後 80%の活性を保持している。*Withania somnifera* [83] 由来 SOD は 95°C で 60 min インキュベート後 80%の活性を保持している。一方, *R. lethospermi* は 45°C 30 min でインキュベート後 80%の活性を保持している[81]。SOD の高い熱安定性は *Potentilla atrosanguinea* Lodd, var. *argyrophylla* [8] 由来の 94 番目の Cys から Ala の変異体が報告されている。変異タンパク質は 80°C で 60 min インキュベート後 80%の活性を保持している。一方, SOD はダイマー構造をとり、モノマーだと活性が低下することが報告されている [36]。多くの植物との Cu/Zn-SOD は熱変性に異なる抵抗性を示した。Zo-SOD 及び Ca-SOD の pH 安定性及び熱安定性が異なるのはアミノ酸の置換が原因であると考えられた。すなわち、*Potentilla atrosanguinea* Lodd, var. *argyrophylla* の Cys94Ala は変異を加えることによって熱安定性が変化することが報告されている [8]。Ca-SOD も同様に 94 残基目のアミノ酸が Ala であり、ショウガ由来 SOD は 94 残基目のアミノ酸 Thr に置換を有している。したがって、94 番目のアミノ酸の置換が熱安定性に関与していると考えられた。



**Fig. II -9. Class-specific amino acid substitutions in different plant-derived SODs.** Sequence alignment of selected enzymes representing each SOD class. Class-specific amino acid substitutions are shaded. Greek key, signatures, and  $\beta$  strands are indicated with double-headed arrows.  $\blacktriangledown$ , amino acids binding  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $\bullet$ , cysteine residues predicted to form a disulfide bridge;  $\blacksquare$ , interacting motifs. Accession numbers: XP\_002445671.1 (*Sorghum bicolor*), K3YIU7 (*Setaria italica*), XP\_010243203.1 (*Nelumbo nucifera*), A0A0C5ASS1 (*Kandelia candel*), B6TAX5 (*Zea mays*), XP\_002465634.1 (*Sorghum bicolor*), XP\_004489695.1 (*Cicer arietinum*), XP\_003618947.1 (*Medicago truncatula*), C0HK70 (*Zingiber officinale*), Q9ZTX3 (*Populus tremuloides*), E2IH94 (*Aeluropus lagopoides*), ACU14529.1 (*Glycine max*).



**Fig. II -10. Phylogenetic relationship of plant derived Cu/Zn-SODs.** The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method; Zo-SOD is marked with an asterisk.

## 第4章 ショウガ由来のシステインプロテアーゼ

### 緒言

植物のプロテアーゼはシステインプロテアーゼ [84], セリンプロテアーゼ [85], 金属プロテアーゼ [86] 及びアスパラギン酸プロテアーゼ [87] に分類されている. ショウガに含まれるシステインプロテアーゼ (GP) は1973年に市川らが初めて報告している [88]. 他の植物ではパパイヤ [29], パイナップル [30], キウイフルーツ [31] 及びイチジク [32] 由来のシステインプロテアーゼが既に報告されている. また, ショウガからはDEAEセルロースイオン交換クロマトグラフィーによってプロテアーゼの精製が報告されている [37-39, 88]. 一方, GPの配列はKimらによりGP2とGP3 [37], ChoiらによりGP I とGP II [38, 39]が2種類ずつ計4種類報告されている. GP II の配列はGP2の配列と比較すると96%の相同性を示し, GP3の配列では73%の相同性を示すことが報告されている. また, GP II はX線結晶構造による立体構造及び糖鎖の分析が報告されている [39]. GP II の立体構造を用いてGP2とGP3の基質結合にかかわるS2ポケットに関して比較が行われ, アミノ酸の置換は Met68→ProとThr133→Glyであり, この2つのアミノ酸の変異によってGP3 はGP2よりもS2ポケットがコンパクトであることが報告されている [37]. 一方, GP2 はGP3, パパイン及びブロメラインよりも高いコラゲナーゼ活性を示し, GP2の切断特異性は合成ペプチド及びコラーゲン を用いて切断特異性の分析が報告されている [37]. この解析では切断部位からN末端側の1つ目のアミノ酸がP1, 2つ目のアミノ酸がP2 及び3つ目のアミノ酸がP3と定義し, 切断部位からC末端側の1つ目のアミノ酸をP1', 2つ目のアミノ酸をP2' 及び3つ目のアミノ酸をP3'と定義している [37]. その結果, GP2の切断特異性はP2の場所でAla及びProを認識し切断することが報告されている [37]. しかし, コラーゲン以外のタンパク質の切断の分析は報告されていない. そこで, 本研究では日本産のショウガに含まれるGPの構造解析とアミノ酸配列にProを含む各種タンパク質を用いた切断特異性の分析を行った.

## 第 1 節 実験材料及び実験方法

### 1) 材料

第 1 章 イオン交換クロマトグラフィーによって分離し得られた Peak F を本章でのサンプルとして用いた.

### 2) 精製の検討

#### i. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-トヨパールクロマトグラフィーで得られた Peak F は透析後陰イオン交換カラムを装着した JASCO 800 シリーズ HPLC (JASCO Co., Japan) で精製を行った. カラムは IEC-DEAE (7.5 × 75 cm; JASCO Co., Japan) を用いた. Peak F は 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 と 0.25 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いた. 溶媒 A は 20 mM リン酸緩衝液, 溶媒 B は 0.25 M NaCl を含む溶媒 A を用いた. 分離はグラジエント法を用いて, NaCl 濃度を 0 M から 0.25 M に上昇させてタンパク質を溶出した. また, 検出は 280 nm の波長で行った.

#### ii. 高速液体イオン交換クロマトグラフィー後の逆相 HPLC

高速液体イオン交換クロマトグラフィー後の Peak F は逆相 HPLC でリクロマトを行った. 分取した Peak F-3 は C4 カラム (4.6 × 250 mm, Yamamura Chemical Co., Japan) を装着した JASCO 800 シリーズ HPLC (JASCO Co., Japan) で精製を行った. 溶媒は TFA (Nacalai Co., Japan), MeCN 系溶媒を使用した. 溶媒 A は 0.1% TFA, 溶媒 B は 60% MeCN を含む溶媒 A を用いた. 溶出は溶媒 B でグラジエントを行った. また, 検出は 280 nm の波長で行った.

### 3) 構造解析

#### i. 環元アルキル化

##### 1. ピリジルエチル (Pe) 化

タンパク質は Friedman らの方法により還元 Pe 化した [89]. すなわち, タンパク質 (10 mg) は 600  $\mu$ l の 10 mM EDTA を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.5, 1 g の塩酸グアニジン, 5  $\mu$ l の 4-4-ビニルピリジン及び 10  $\mu$ l のトリボチルホスフィンを加えた. その溶液は 37°C で 4 h インキュベートを行った. 反応溶液は 30% ギ酸 2-3 滴を混合した. 反応溶液は 0.1% TFA を用いて Sephadex-G50 カラム (2  $\times$  46 cm, Pharmacia Ltd., UK) によるゲルろ過クロマトグラフィーで試薬を除去し, その後凍結乾燥を行った.

##### 2. カルボキシルメチル (Cm) 化

Cm 化は第 2 章の酵素消化と同様の方法で行った.

#### ii. 酵素消化

##### 1. トリプシンによる消化

トリプシン消化は第 2 章 酵素消化と同様の方法で行った.

##### 2. V8 プロテアーゼによる消化

アルキル化 GP (5 mg) は 1 ml の 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.8 に溶解した. 溶解したタンパク質は 1/50 w/w の V8 プロテアーゼ (Boehringer Mannheim., Ltd., U.K) によって 37°C で 10 h 切断を行った [90]. トリプシン消化物は JASCO 800 series HPLC システムを用いて ODS 120A S-5 カラム (4.0  $\times$  250 mm, Yamamura Chemical Co., Japan) によって分離を行った.

### iii. アミノ酸組成分析及びアミノ糖分析

アミノ酸組成分析は第 2 章と同様の方法で行った。アミノ糖分析及びアミノ酸組成分析は塩酸加水分解法で行った。すなわち、ペプチド試料は小試験管内に乾固させた後、3 M 塩酸 0.5 ml を加え、減圧下で封管した。その後、100°C で、16 h 加水分解した。加水分解物は減圧乾固した後、0.02 M 塩酸 200  $\mu$ l に溶解し、0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (Merck & Co., Inc., USA) を装着したテルモシリンジ (TERUMO Co., Japan) でろ過し、L-8500 A 型高速アミノ酸分析計 (Hitachi Ltd., Japan) を用いて分析を行った。

### iv. N 末端配列分析

N 末端配列分析は第 3 章と同様の方法で行った。

## 4) プロテアーゼ活性測定

プロテアーゼ活性は 1% 牛乳カゼインを基質とするタンパク質消化法で測定した [20]。すなわち、1% カゼインを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2.0 ml に 0.2 ml の 10 mM Cys 溶液、0.3 ml の酵素液を加え、50°C で 30 min インキュベート後、3.0 ml の 5% TCA 溶液を加えて反応停止させた。反応液は 4°C で 2 h 静置後、1.5 ml エッペンチューブに分注し、遠心分離 (8500 g, 30 min, 4°C) を行った。遠心分離後、U-1100 型分光光度計 (Hitachi Ltd., Japan) を用いて吸光度 280 nm にて測定し、プロテアーゼ活性とした。ブランクは 2.0 ml のカゼイン溶液に 3.0 ml の 5% TCA を加え、0.2 ml の 10 mM Cys 溶液及び 0.3 ml の酵素液を加え上記と同様に処理し、280 nm により測定を行った。

## 5) 至適 pH 及び至適温度

至適 pH は基質であるカゼインを 100 mM ブリットンロビンソン緩衝液, pH 2-11 を用いて溶解し分析を行った [91]。至適温度は反応を 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 及び 90°C で分析を行った [91]。

## 6) タンパク濃度の測定

タンパク質濃度は、CBB がタンパク質と結合する際の吸光の変化を測定する Bradford 法を用いて測定した [92]. 色素保存溶液は、2.5 ml の 95% エタノールに溶かした 5 mg の CBB に 5 ml の 85% (W/V) のリン酸を加えて攪拌後、蒸留水にて 50 ml にフィルアップしたものを一晩静置した. 0.1 ml のサンプルは、5 倍希釈した 1 ml の色素溶液を加え、攪拌後 10 分間静置し、吸光度 595 nm で測定した. また、ブランクには蒸留水を使用した. タンパク質の濃度は HEL を同方法で測定して得られた標準曲線から算出した [92].

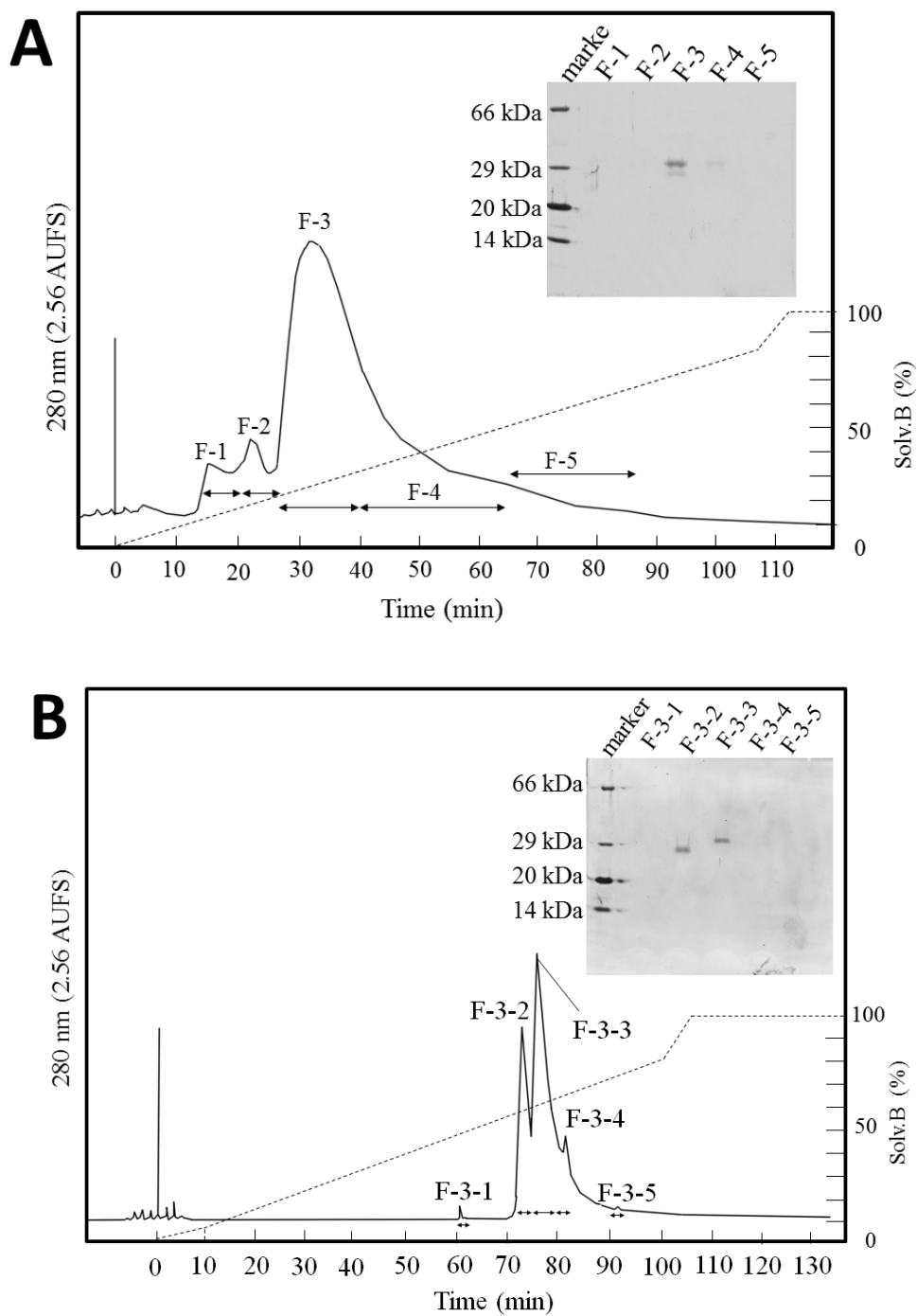
## 7) 切断特異性

Cm 化及び Pe 化タンパク質 (5 mg) は 1.0 ml の 0.1 M リン酸緩衝液, pH 6.0 に溶解した. GP ii は Bradford 法によってタンパク質濃度を測定後、酵素消化を行うタンパク質に対して酵素が 1/50 (w/w) になるよう加え、37°C で 1, 2, 3 及び 4 h 消化した [34].

## 第 2 節 結果

第 1 章で述べたショウガ由来のタンパク質の精製方法を用いて精製した Peak F は構造解析を行うために、逆相 HPLC を用いて精製を行った. 精製したサンプルは F-1 から F-8 の SDS-PAGE を行い Peak F-3 はプロテアーゼ活性及び電気泳動によるバンドを確認した (Fig. III-1A). Peak F-3 はリクロマトを行い Peak F-3-3 に 33 kDa 付近のバンドが検出された (Fig. III-1B). 精製した Zo-SOD は Cm 化後トリプシン消化を行った. GP II の配列をもとに構造解析を行った結果, GP II と比較して 2 カ所に置換が見られ, 99% の相同性を示した (Fig. III-2). 決定した Peak F の配列は分子量が 23,873.061 Da であることが明らかになった. 構造を決定した Peak F を GP ii と名付けた. また GP II は糖タンパク質であり、その糖鎖の構造は Kim らによって報告されている. そこで GP ii の糖鎖はアミノ糖分析を行った結果, GP II と同様のアミノ酸に Table III-1 に示したように 99 残基目に存在する糖鎖 (GlcNH<sub>2</sub>) が 2 つ, 156 残基目に存在する糖鎖 (GlcNH<sub>2</sub>) が 3 つ存在することが明らかになった. GP ii の至適 pH と至適温度は基質にカゼインを用いて分析を行った. その結果, 至適 pH は 6.0 (Fig. III-3A), 至適温度は 60°C (Fig. III-3B) であった. 次に切断特異性の GP ii によって切断した Cm 化 OEL, Pe 化 OEL, Cm 化 BSA, Pe 化 BSA, Cm 化 OVA 及び Pe 化 OVA を逆相 HPLC によって分離

した結果, Pe OEL, Cm OEL 及び Pe BSA はいくつかの GP ii 消化ペプチドのピークを得ることができた (Fig. III-4). これらの GP ii 消化ペプチドのピークはアミノ酸組成分析及び N 末端配列分析を行った (Table III-2, Table III-3). その結果, GP ii を用いて消化した Cm 化及び Pe 化 OEL は切断した断片と OEL の配列を比較し切断部位を決定した (Table III-4A). GP ii による切断部位は 2 つ N 末端側の P2 で Pro 及び Ala を多く示した (Table III-4B). 切断が見られなかった Cm 化 BSA, Pe 化 BSA, Cm 化 OVA 及び Pe 化 OVA は基質が懸濁状態であり, Cm 化及び Pe 化タンパク質はリン酸緩衝液による溶解度に差が見られた (Table III-5). 一方, Trypsin を用いて GP ii と同様に Cm 化及び Pe 化タンパク質の切断を行いすべてのタンパク質を切断することが明らかになった (Fig. III-5).



**Fig.III-1. Chromatographic profiles and Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of *Zingiber officinale* cysteine protease (GPs) eluted using IEC-DEAE (A), and C4 (B) columns. A: 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv.A), 0.25 M NaCl in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (Solv.B), B: 0.1 % TFA (Solv.A), 60 % acetonitrile in 0.1 % TFA (Solv.B). Insets show SDS-PAGE of collected fractions.**

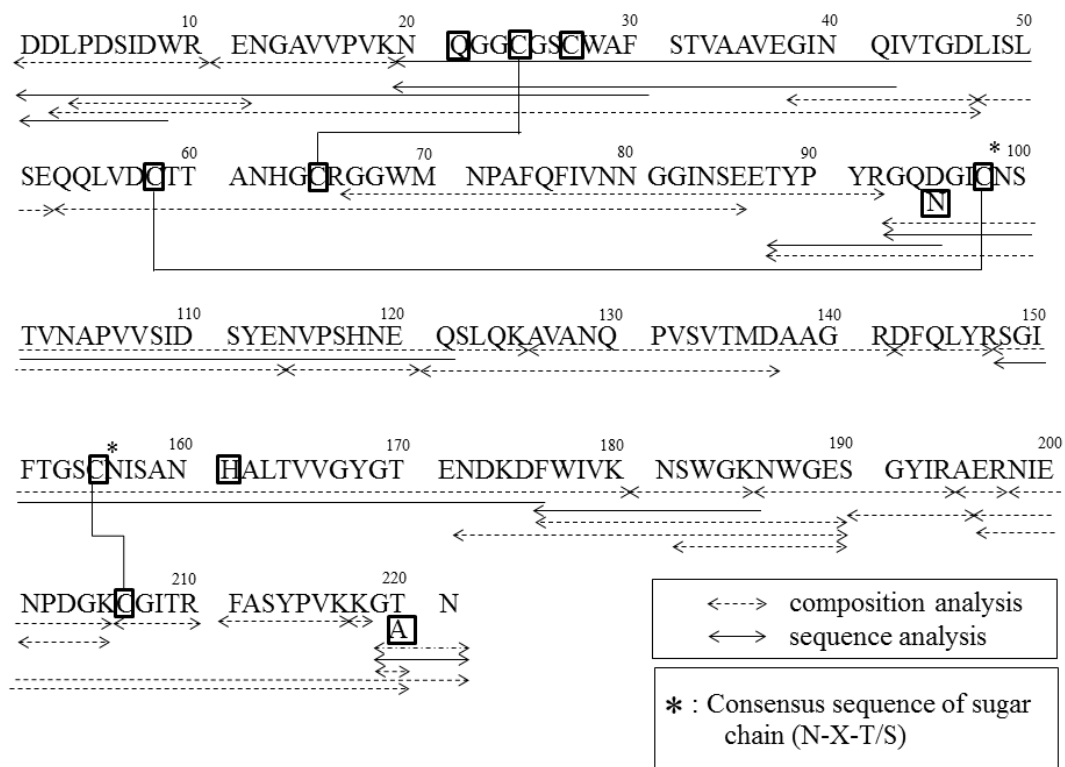


Fig. III-2. Positions of trypsin and V8 protease peptides of GPII on GPII sequence.

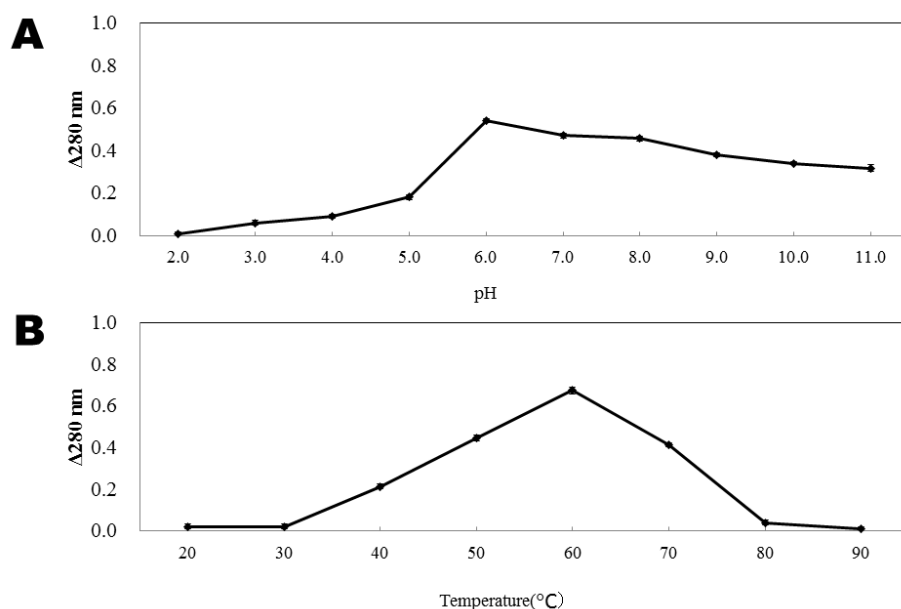
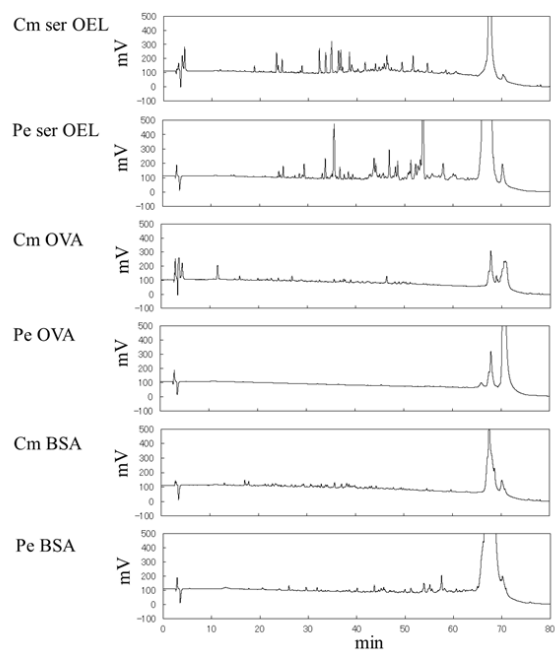
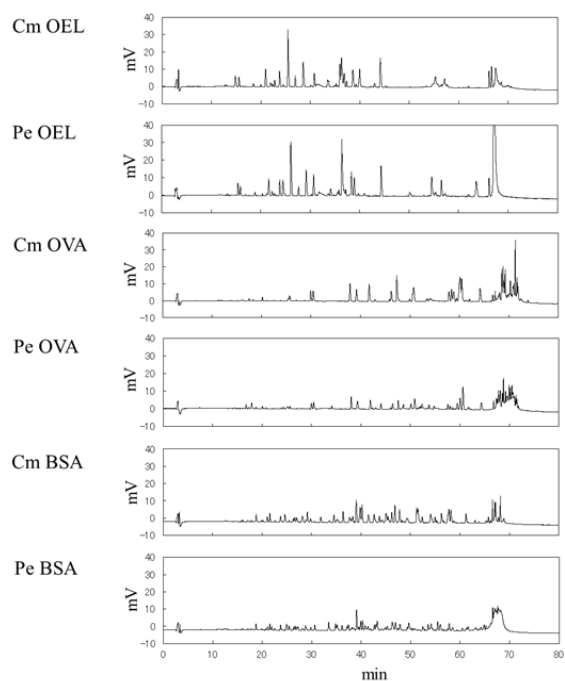


Fig. III-3. Optimum pH of GPII (A), and Optimum temperature of GPII (B).



**Fig. III-4. Separation of cleavage peptides of Cm and PeOEL, OVA, and BSA proteins by the cysteine protease GPii. Solv.A: 0.1 % TFA, Solv.B: 60 % acetonitrile in 0.1 % TFA**



**Fig. III-5. Cleavage of Cm and Pe OEL, OVA, and BSA proteins by trypsin. Solv.A: 0.1 % TFA, Solv.B: 60 % acetonitrile in 0.1 % TFA**

**Table III-1. Analysis of amino sugars by amino acid analysis.**

|     |                    | V65 (99) | T37 (156) |
|-----|--------------------|----------|-----------|
| 6 M | Cm-Cys             | 0.95 (1) |           |
|     | Asp                | 4.00 (4) | 4.53 (5)  |
|     | Thr                | 1.81 (2) | 2.62 (3)  |
|     | Ser                | 2.46 (2) | 2.58 (3)  |
|     | Glu                | 2.06 (2) | 1.35 (1)  |
|     | Pro                | 2.00 (2) |           |
|     | Gly                | 2.05 (2) | 4.00 (4)  |
|     | Ala                | 1.14 (1) | 2.73 (3)  |
|     | Val                | 2.45 (3) | 2.06 (2)  |
|     | Met                |          |           |
|     | Ile                | 1.80 (2) | 2.21 (2)  |
|     | Leu                |          | 1.06 (1)  |
|     | Tyr                | 2.78 (3) | 0.91 (1)  |
|     | Phe                |          | 1.49 (1)  |
|     | Lys                |          | 2.48 (2)  |
|     | His                |          | 0.74 (1)  |
|     | Trp                | 1.02 (1) | 0.59 (1)  |
|     | Arg                |          |           |
| 3 M | Pe-Cys             |          | 0.54 (1)  |
|     | GlcNH <sub>2</sub> | 1.65 (2) | 2.81 (3)  |
|     | GalNH <sub>2</sub> |          |           |
|     | total              | 26       | 34        |

Amino acids and amino sugars were detected after 6M and 3M HCl hydrolysis, respectively.

**Table III -2. Amino acid compositions of *ostrich egg-white lysozyme* peptides cleaved by cysteine protease (GPii).**

|        | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10       | 11       | 12       | 13       |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| cm-cys | 0.58 (1) |          |          |          |          |          |          |          | 0.80 (1) |          | 0.88 (1) |          |          |
| Asp    |          |          |          | 1.03 (1) |          |          |          | 1.23 (1) | 1.40 (1) | 4.35(4)  | 1.52 (2) | 1.44 (1) | 2.56 (3) |
| Thr    |          |          |          |          |          | 0.84 (1) |          |          | 1.23 (1) | 2.10(2)  | 1.28 (1) | 1.05 (1) | 0.92 (1) |
| Ser    | 0.85 (1) |          |          |          |          |          |          | 1.03 (1) | 1.22 (1) |          | 1.21 (1) | 1.14 (1) | 1.57 (2) |
| Glu    | 1.09 (1) | 1.00 (1) | 0.84 (1) |          | 1.06 (1) | 3.00 (3) | 1.94 (2) |          | 0.58 (1) |          | 0.59 (1) | 3.07 (3) | 2.32 (2) |
| Pro    | 0.75 (1) |          |          | 1.11 (1) |          |          |          | 1.05 (1) |          |          | 0.51 (1) | 0.99 (1) | 1.10 (1) |
| Gly    |          | 1.03 (1) | 1.17 (1) | 2.08 (2) | 1.24 (1) | 0.50 (1) | 1.24 (1) | 3.89 (4) | 1.45 (1) |          | 1.51 (2) | 3.86 (4) | 2.62 (3) |
| Ala    | 1.00 (1) |          |          | 2.00 (2) |          |          | 1.00 (1) | 2.00 (2) | 1.00 (1) | 2.07(2)  | 1.00 (1) | 2.05 (2) | 2.75 (3) |
| Val    |          |          |          |          |          |          |          |          | 0.87 (1) | 1.57 (2) | 0.92 (1) |          | 1.60 (2) |
| Met    |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Ile    |          |          |          |          |          |          |          | 0.95 (1) |          |          |          | 0.95 (1) | 0.86 (1) |
| Leu    |          |          |          |          |          | 0.77 (1) |          |          |          |          |          | 1.00 (1) | 0.91 (1) |
| Tyr    |          | 0.96 (1) | 1.35 (1) | 1.13 (1) | 2.56 (3) |          | 3.17 (3) | 0.99 (1) |          | 0.76 (1) | 0.53 (1) | 0.98 (1) | 1.23 (1) |
| Phe    |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Lys    | 1.53 (2) |          | 1.00 (1) |          | 1.00 (1) | 1.96 (2) | 1.07 (1) |          | 0.92 (1) |          | 1.08(1)  | 2.00 (2) | 2.00 (2) |
| Trp    |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | 0.73 (1) |
| His    |          | 0.87 (1) | 0.71 (1) |          | 0.85 (1) |          | 0.93 (1) |          |          | 1.08 (1) |          |          |          |
| Arg    |          |          |          |          |          |          |          |          | 0.90 (1) | 1.00 (1) | 0.94 (1) | 0.63 (1) | 1.60 (2) |
| nmol   | 0.198    | 0.243    | 0.085    | 0.135    | 0.133    | 0.083    | 0.061    | 0.262    | 0.370    | 0.150    | 0.328    | 0.253    | 0.032    |
| Total  | 7        | 4        | 5        | 7        | 7        | 7        | 9        | 11       | 10       | 13       | 14       | 19       | 25       |

**Table III- 3. Partial amino acid sequence of ostrich egg-white lysozyme peptides.**

| Peak number | Sequence |   |   |   |                |
|-------------|----------|---|---|---|----------------|
| 5           | Y        | Y | K | Q | <sup>5</sup> H |
| 6           | W        | T | K | E | <sup>5</sup> Q |
| 7           | A        | Q | Y | Y | <sup>5</sup> K |
| 9           | S        | R | T | C | <sup>5</sup> G |

**Table III-4. Position of amino acids adjacent to the cleavage site deduced from the N- and C-terminal regions of the ostrich egg-white lysozyme (OEL) sequence.**

**A**

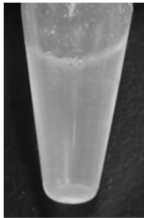
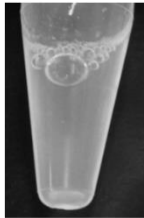
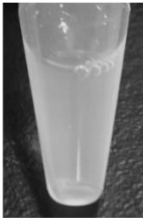
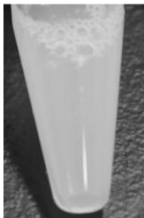
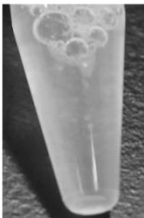
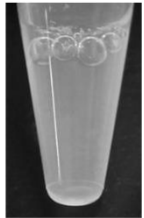
| Peak number           | P3' | P2' | P1' | ↓ | P1 | P2 | P3 |
|-----------------------|-----|-----|-----|---|----|----|----|
| 1(N)                  | G   | A   | S   |   | C  | K  | S  |
| 1(C), 9(C)            | K   | P   | E   |   | K  | L  | N  |
| 2(N)                  | Y   | Y   | K   |   | Q  | H  | G  |
| 3(N)                  | Q   | Y   | Y   |   | K  | Q  | H  |
| 4(N)                  | G   | I   | S   |   | A  | Y  | N  |
| 4(C),8(C),11(N),12(C) | G   | P   | G   |   | N  | V  | R  |
| 5' (N)                | R   | A   | Q   |   | Y  | Y  | K  |
| 6(N),12(N)            | F   | P   | R   |   | W  | T  | K  |
| 6(C)                  | L   | K   | G   |   | G  | I  | S  |
| 7(N),10(C), 11(C)     | V   | A   | R   |   | A  | Q  | Y  |
| 8(N)                  | Q   | L   | K   |   | G  | G  | I  |
| 10(N)                 | D   | I   | G   |   | T  | T  | H  |
| 13 (C)                | G   | V   | A   |   | A  | S  | R  |

**B**

|             |               | P3' | P2' | P1' | ↓ | P1 | P2 | P3 |
|-------------|---------------|-----|-----|-----|---|----|----|----|
| hydrophobic | Ala           | 0   | 3   | 1   |   | 3  | 0  | 0  |
|             | Gly           | 4   | 0   | 3   |   | 2  | 1  | 1  |
|             | Val           | 1   | 1   | 0   |   | 0  | 1  | 0  |
|             | Leu           | 1   | 1   | 0   |   | 0  | 1  | 0  |
|             | Ile           | 0   | 2   | 0   |   | 0  | 1  | 1  |
|             | his           | 1   | 0   | 0   |   | 0  | 0  | 0  |
|             | Tyr           | 1   | 2   | 1   |   | 1  | 2  | 1  |
|             | Trp           | 0   | 0   | 0   |   | 1  | 0  | 0  |
|             | Met           | 0   | 0   | 0   |   | 0  | 0  | 0  |
|             | Cm and Pe Cys | 0   | 0   | 0   |   | 1  | 0  | 0  |
| hydrophilic | imino acid    | Pro | 0   | 3   |   | 0  | 0  | 0  |
|             | Gln           | 2   | 0   | 1   |   | 1  | 2  | 0  |
|             | Asn           | 1   | 0   | 0   |   | 1  | 0  | 2  |
|             | Thr           | 0   | 0   | 0   |   | 1  | 2  | 0  |
|             | Ser           | 0   | 0   | 2   |   | 0  | 1  | 2  |
|             | acidic        | Asp | 0   | 0   |   | 0  | 0  | 0  |
|             | Glu           | 0   | 0   | 1   |   | 0  | 0  | 0  |
|             | basic         | Lys | 1   | 1   |   | 2  | 1  | 2  |
|             | His           | 0   | 0   | 0   |   | 0  | 1  | 2  |
|             | Arg           | 1   | 0   | 2   |   | 0  | 0  | 2  |
| Total       |               | 13  | 13  | 13  |   | 13 | 13 | 13 |

Cleavage site of OEL (A), number of amino acids on the different positions of the cleavage site (B).

**Table III-5. Relationship between solubility of substrate and cleavage ability of GPii.**

|                     | OEL                                                                                |                                                                                    | OVA                                                                                |                                                                                     | BSA                                                                                  |                                                                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Cm/Pe               | Cm                                                                                 | Pe                                                                                 | Cm                                                                                 | Pe                                                                                  | Cm                                                                                   | Pe                                                                                   |
| Cleavage by GPii    | ○                                                                                  | ○                                                                                  | △                                                                                  | ×                                                                                   | △                                                                                    | △                                                                                    |
| Cleavage by Trypsin | ○                                                                                  | ○                                                                                  | ○                                                                                  | ○                                                                                   | ○                                                                                    | ○                                                                                    |
| 600 nm              | 0.376                                                                              | 0.627                                                                              | 1.629                                                                              | 2.174                                                                               | 1.028                                                                                | 1.450                                                                                |
| Photo               |  |  |  |  |  |  |

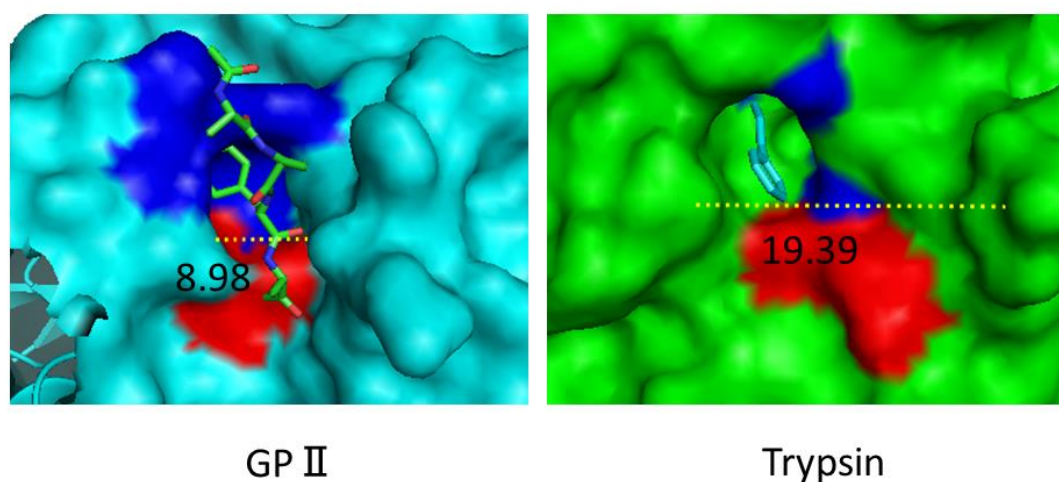
Cm OEL, Pe OEL, Cm OVA, Pe OVA, Cm BSA, and Pe BSA were dissolved in phosphate buffer (pH 6.0). ○: cleaved, △: slightly cleaved, ×: not cleaved.

### 第3節 考察

植物由来生体防御タンパク質は病原体の攻撃による感染細胞のアポトーシスなどに関与している。プロテアーゼは、特定の機能的役割によって異なる細胞器官（細胞質、ミトコンドリア、液胞、リソソーム、小胞体、及び細胞外）で局在を有する [9 - 18]。また、植物のシステインプロテアーゼは生体防御反応である細胞死にかかわる動物のカスパーゼと類似の働きを有することが報告されている。このシステインプロテアーゼは植物細胞内の液胞に存在することが報告されている [19 - 26]。したがってGPも同様に細胞死に用いられる可能性が考えられた。このことから、ショウガに含まれるシステインプロテアーゼはPRタンパク質として働いていると考えられる。また、ショウガのシステインプロテアーゼはコラゲナーゼ活性を有することが報告されている。この植物コラゲナーゼは食品や化粧品などの用途に使用できるペプチドを製造するために有用な酵素である [40]。

第1章で分離し、最も収量の多いプロテアーゼであるPeak Fについて構造解析を行った。Peak F は33 kDa付近のバンド以外にいくつかのバンドを示したことから、高速液体イオン交換クロマトグラフィーの IEC-DEAEカラム及びC4カラムを用いて精製し、アミノ酸配列を決定した。配列決定したPeak FはGP ii と名付けた。GP ii のアミノ酸配列はGP II のアミノ酸配列と比較すると触媒付近から離れた位置に2か所 (Asp95Asn及びThr220Ala) の置換を示したが活性には影響しないと考えられた。また、Nafiら [91] によって、精製されていないGPの至適pHはpH 6.0 – 7.0, 至適温度は60°C, また, Ichikawaら [88] によってGP I 及びGP II の至適pHはpH 6.5 - 7.0であることが報告されている。一方, GP ii の至適pHはpH 6.0であり, 至適温度は60°C であった。したがって, GP ii の至適pH 及び至適温度はNafiら及びIchikawaらの報告と同様であることが明らかになった。また, GP II と相同性のあるGP2 はコラゲナーゼ活性を有することが報告されている [37]。GP II とGP2の置換は12, 95, 175, 176, 177, 195, 200及び203番目のアミノ酸残基の置換が触媒部位から離れているところに存在したことから同様にコラゲナーゼ活性を有すると考えられた。この酵素の切断特異性は基質の切断部位から 1 つN末端側のアミノ酸をP1, 2つ目のアミノ酸をP2及び3つ目のアミノ酸をP3, 切断部位から 1 つC末端側のアミノ酸をP1', 2つ目のアミノ酸をP2' 及び3つ目のアミノ酸をP3' と定義されている [37]。GP2の切断特異性はコラーゲン及び合成ペプチドを用いて分析を行いP2でProとAlaを認識し切断すると報告されている [37]。しかし, GPはコラーゲン以外のタンパク質での切断特異性の報告がない。そこで, 本研究はコラーゲン以外のタンパク質に対してGP II とほぼ同様の構造を有するGPiiの切断特異性を明らかにすることを目的とした。切断特異性の分析は至適pH が6.0であることから0.1 M リン酸緩衝液, pH 6.0 を用いて切断を行った。至適温度は60°Cであるが反応に用いるため変性の少ない37°Cで行った。基質はOEL, OVA及びBSAを用いて分析を行った。基質に用いるタンパク質は, 切断反応を阻害する立体構造を形成するジスルフィド結合を切断するためPe化及びCm化後分析を行った。Cm化及びPe化はCysにそれぞれ-チャージ及び+チャージを付与することから, 両者で異なる性質の基質を調製することができ, 切断の特異性を両者で解析できる。GP ii の切断を用いて得られたペプチドの構造解析から推定する切断特異性は収量の多いPe化OEL及びCm化OELを用いて分析を行った。その結果, 切断特異性はP2部位でAla及びProで多くの切断を示した。したがって, GP ii の切断特異性はKimらの論文で報告されているGP2の切断特異性よりも幅広い切断特異性を有すると考えられた [37]。一方, Cm BSA, Pe OVA及びCm OVA は GP ii によって切断を示さなかった。分析に用いたタンパク質基質は溶解度に差が見られ, 切断できていないものは懸濁状態のものであった (Table III-5)。GP ii により切断を示さなかった懸濁状態のタンパク質は基質及び

酵素のどちらかが影響したと考えられた。そこで、プロテオーム解析におけるタンパク質切断に良く用いられるセリンプロテアーゼであるトリプシンを用いて切断を行った。その結果、トリプシンは不溶性のタンパク質であっても切断することが明らかになった。また、GP II とトリプシンはX線結晶解析により立体構造が報告されている [39]。トリプシンとGP II の切断部位周辺のの大きさを比較したところ、トリプシンの方が大きく開いていることが明らかになった (Fig.III-6)。したがって、GP ii の切断特異性は切断部位のポケットの大きさに影響していると考えられた。



**Fig.III-6. Pocket size of GPII and trypsin.** Modelled structure of GPII and trypsin were show from the protein data bank, GP II (PDB ID: 1CQD), Trypsin (PDB ID: 2PTN).

Red: active site, Blue: substrate bindig site.

## 第5章 総括

### 第1節 総合考察

ショウガは免疫力向上, 殺菌作用, 抗がん作用及び鎮痛作用など多くの効能を持つことが報告され注目されている. その中でもショウガは香辛料成分であるジンゲロール [1], ショウガオール [2] 及びジンゲロン [3] について多く研究されている. 一方, ショウガは根茎腐敗病になりやすいことから土壌を臭化メチル剤によってくん蒸を行っていた. しかし, 臭化メチルはオゾン層破壊物質に指定され, 2013 年に全廃となった. 現在では臭化メチル化剤を使用しない育成方法が多く研究されている. 本来, 植物は傷害, 病虫害, 低・高温, 干ばつ及び多雨などによるストレス応答を有している. その中で病害に関しては病原菌に対して静的抵抗性及び動的抵抗性を持つことが報告されている [4]. 静的抵抗性は細胞壁の構成成分であるリグニン及びセルロースなどがその抵抗性に関与している. 動的抵抗性は菌が侵入することにより植物体中の代謝変動によって病害抵抗を示すことが報告されている. この動的抵抗性は菌が侵入することによってサリチル酸及びジャスモン酸が誘導され, 酸性 PR タンパク質及び塩基性 PR タンパク質を発現する. 植物由来 PR タンパク質には SOD [5 - 8] 及びプロテアーゼ [9 - 18] などが報告されている.

第1章ではショウガに含まれる PR タンパク質の分離を目的とした. ショウガに含まれる PR タンパク質は 40 - 100% 硫酸分画及び DEAE Toyopearl 650 M のイオン交換クロマトグラフィーを用いて分離を行った. その結果, DEAE イオン交換クロマトグラフィーによって Peak A-J を得ることができた. SDS-PAGE の結果, Peak A のメインバンドは 18.5 kDa, Peak B, D 及び F のメインバンドは 33 kDa 付近に得られた. それらのバンドはブロッティング後, N 末端配列分析を行った. その結果, Peak A の配列は *Ca*-SOD [36], Peak B の配列はショウガ由来のシステインプロテアーゼ (GP) である GP2 [37], Peak D の配列は GP3 [37], Peak F の配列は GP II [38, 39] の配列と相同性が得られた. また, GP の配列は Choi らにより GP I 及び GP II, Kim らにより GP2 及び GP3 が 2 種類ずつ計 4 種類報告されている. したがって, 1 種類のショウガには 2 種の GP を含むことが報告されている. 今回用いた日本産のショウガに含まれる GP は初めて 1 つのショウガの中に 3 種類 (GP II, GP2 及び GP3 に相同のある Peak B, D 及び F) を含むことが明らかになった [37 - 39].

第2章では第1章のイオン交換クロマトグラフィーによって分離した *Ca*-SOD に相同性を持つ Peak A の構造解析及び諸性質の分析を目的として行った. PR タンパク質である SOD は ROS の中の  $O_2^{\cdot-}$  の不均化を行っている. 反応は 2 分子の  $O_2^{\cdot-}$  から

O<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の不均化を行っている [5 - 8]. この ROS は <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>•, OH•, HO<sub>2</sub>•, RO•, ROO• 及び RO\*などがあげられ、環境のストレスへの反応産物である [5 - 8]. ROS の生産は抗酸化作用の反応不足によって DNA 傷害, 突然変異, メタボリック機能障害及び細胞死が引き起こされ、様々な生物に有害な影響を引き起こす可能性がある [40 - 43]. ROS は、細胞の代謝において重要な役割を持っている [5 - 8]. 植物は代謝及び生体防御のため ROS を誘導することが報告されている. この ROS は過剰に生成すると細胞, 遺伝子及びタンパク質を攻撃することから、抗酸化作用を有する SOD, ポリフェノール, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ, カタラーゼ及びグルタチオンなどを必要とする. 特に O<sub>2</sub><sup>-</sup>•を不均化する酵素は SOD が知られており、アスコルビン酸及びグルタチオンよりも 100 倍の反応性を示すことが報告されている [4, 6]. リン脂質を含む細胞膜はチャージされた O<sub>2</sub> 分子に対して不透過性であることから O<sub>2</sub><sup>-</sup>•を触媒する毒性に対して SOD を含めた除去メカニズムが細胞内に存在する [46].

SOD は金属補因子によって 4 つのグループに分けることができる. Fe SOD, Mn SOD, Ni SOD 及び Cu/Zn-SOD である [47 - 49]. Fe SOD は葉緑体, Mn SOD はミトコンドリア及びペルオキシソーム, Ni SOD は細胞質基質, また, Cu/Zn-SOD は葉緑体, 細胞質基質及び細胞外間隙に存在することが報告されている [32, 33]. また, ショウガは *p*-シネオール,  $\alpha$ -テルピネオール,  $\alpha$ -ジネギベレン及びペンタデカン酸などが抗酸化活性を有することが報告されている [56]. また, ショウガ根茎は様々な植物と同様に SOD を含むと考えられるが, ショウガの SOD は報告されていない. そこで, Peak A に含まれる SOD は高速液体イオン交換クロマトグラフィーの IEC-DEAE カラム及び C4 カラムを用いて精製を行った. 精製されたタンパク質は構造解析のため, Cm 化後トリプシン消化を行った. トリプシンペプチド (Ts) の構造解析により *Ca*-SOD と比較し, 10 カ所の置換 (Ala38Pro, Val75Glu, Val85Ala, Ser88Gly, Ala94Thr, Lys100Ser, Thr105Ser, His108Asn, Ser134Thr 及び Ile142Val) が明らかになった. この結果から *Zo*-SOD は 151 残基のアミノ酸で構成され, 分子量が 14,977.39 Da であった. 決定した *Zo*-SOD のアミノ酸配列は *C. aromatica* (E6Y8N8; 93%), *Ananas ananas* (Q9SQL5; 92%), *Brachypodium distachyon* (003562484.1; 85%) 及び *Nelumbo nucifera* (ACS45203.1; 85%) に高い類似性を示した.

SOD の立体構造はハウレン草由来 Cu/Zn-SOD が報告されており, bovine SOD の構造と類似し, 8 つの  $\beta$  鎖が整列することが報告されている (Fig. II -5) [73 - 78]. また, Clustal W による植物由来 Cu/Zn-SOD の配列は chloroplastic 型, cytoplasmic 型 及び intermediate 型のクラスに分岐を示し, さらに monocot 及び dicot に分岐した. この解析により, *Zo*-SOD は cytoplasmic 型の monocot であるこ

とが明らかになった (Fig. II -5). また, 複数の SOD 配列のアミノ酸配列を比較することによって, グループ特異的アミノ酸置換が明らかになった. すべての  $\beta$  シートは隣接しており,  $\beta 3$  及び  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  及び  $\beta 7$  は  $\beta$  ドメインが逆平行  $\beta$  シートの核を持ちドメインの構造をとっている. さらに Cu/Zn-SOD の中で  $\beta 4$  及び  $\beta 5$  の大きいループはジスルフィド結合によって安定化に関与し, Cu 及び Zn 結合サイトのアミノ酸残基が存在している [75,76]. Cytoplasmic 型の特異的な 5 つの置換は  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  及び  $\beta 5$ , intermediate 型は  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  及び  $\beta 7$  と静電ループの近く, chloroplastic 型の置換は  $\beta 2$ ,  $\beta 7$ , 及び  $\beta 8$  静電ループ及び Greek-key のループ近くに多く見られた. さらに, chloroplastic 型の置換は触媒サイト近くに見られたことから, 異なる触媒活性を持つと考えられた (Fig. III-6). さらに系統樹は SOD の細胞内発現場所から 3 つのクラスに分類され, さらに植物の種類によって分岐した [72, 74]. 多くの植物由来 Cu/Zn-SOD を用いた系統樹は発現場所によって 3 つのクラス (chloroplastic 型, cytoplasmic 型 及び intermediate 型) に分類され, さらに植物の種類によって 2 つのクラス (monocot 及び dicot) に分岐を示した. 系統樹による分析により Zo-SOD は cytoplasmic 型の monocot に分類を示した (Fig. III-7). Cytoplasmic 型の Cu/Zn-SODs の N 末端は Met であることが報告されているが, Zo-SOD の N 末端は Val であった.

Zo-SOD はタンパク質の発現量が非常に少ないことから, 酵素学的解析のため合成遺伝子を作製した. Zo-SOD の合成遺伝子 (519 bp) は タンパク質を発現させ, 酵素学的性質を調べた. その結果, Zo-SOD の pH 安定性は pH 5 - 10 であった. また, *Glycine max* cv. (pH 5.0 - 9.0) [35], *Pisum sativum* (pH 6.0 - 10) [79], *Sonneratia alba* (pH 4.0 - 7.0) [80], 及び *Radix lethospermi* (pH 6.0 - 10.0) [81] 由来 SOD の pH 安定性は 30 - 60 min インキュベート後 80%の活性の安定が報告されている. Ca-SOD の pH 安定性は 120 min, pH 3 - 9 の範囲で安定であることが報告されている [36]. Zo-SOD は 60°C で 60 min インキュベート後 80%の活性で安定であった. Ca-SOD は 80°C で 120 min インキュベート後熱に安定であることが報告されている [36]. 他の植物由来 SOD は熱の安定性が Zo-SOD よりも低い値であった. *Glycine max* cv. [35] 及び *Pennisetum glaucum* [66] 由来 SOD は 50°C, *Pisum sativum* [79] 及び *Sonneratia alba* [80] 由来 SOD は 55°C で 60 min, *Withania somnifera* [83] 由来 SOD は 95°C で 60 min, *R. lethospermi* は 45°C で 30 min インキュベート後 80%の活性の保持が報告されている [82]. また, *P. atrosanguinea* Lodd, var. *argyrophylla* [8] 由来 SOD は Cys94Ala に変異を加えることによって熱安定性が変化することが報告されている

[8]. 変異体タンパク質は 80°C で 60 min インキュベート後 80%の活性を保持している.

Cu, Zn SOD サブユニットの金属イオン配位及びジスルフィド形成を促進するダイマー化は Cu, Zn SOD の配座安定性に関連していることが報告されている [93]. 94 残基目のアミノ酸を置換することにより, ダイマー構造のにかかわるアミノ酸の近くであることから環境が影響しているのではないかと考えられた. また, SOD 活性はダイマー構造で高く, モノマーだと低下することが報告されている [8]. Zo-SOD の熱安定性の違いは 94 残基目のアミノ酸である Ala の置換が原因であると考えられた.

第4章は第2章のイオン交換クロマトグラフィーによって分離したPeak F に含まれるシステインプロテアーゼの構造解析, 諸性質, 及び切断特異性の分析を目的とした. システインプロテアーゼは植物の多くにPRタンパク質として存在することが報告されている. 植物のシステインプロテアーゼは動物のカスパーゼと類似する働きを行うことが報告されている [19-26]. カスパーゼはプログラム細胞死にかかわる酵素である. さらに, 植物に含まれるシステインプロテアーゼは害虫の食害を防ぐ働きを持っている. すなわち, 昆虫はプロテアーゼと同時に植物中に存在するシュウ酸カルシウムの針状結晶を摂取すると, 腸管に損傷を受け, 死に至ることが報告されている [94]. したがって, GPも同様の反応が考えられた. そこで, 本章ではGPの構造解析及び切断特異性の分析を目的とした.

1973年に市川らによってショウガに含まれるGPが報告され, GPのアミノ酸配列はChoiらによりGP I とGP II [38, 39], KimらによりGP2とGP3 [37] が2種類ずつ計4種類報告されている. GP II 及びGP2の配列は96%の相同性を示し, GP II 及びGP3の配列では73%の相同性を示すことが報告されている. GP2及びGP II の触媒部位は置換がないことから同じ活性を示すと考えられた. また, GP II はX線結晶構造による立体構造及び糖鎖の分析が報告されている [37]. GP II の立体構造を用いてGP2とGP3の基質結合にかかわるS2ポケットのアミノ酸の2か所の置換 (Met68→Pro及びThr133→Gly) はGP3がGP2よりもコンパクトであることが報告されている [37]. GP2はGP3, パパイン及びブロメラインよりも高いコラゲナーゼ活性を示し, GP2の切断特異性は合成ペプチド及びコラーゲンを用いて切断特異性の分析が報告されている [37]. 基質の切断部位は切断された場所の1つN末端側のアミノ酸をP1, 2つ目のアミノ酸をP2及び3つ目のアミノ酸をP3と示し, 切断部位からC末端側の1つ目のアミノ酸をP1', 2つ目のアミノ酸をP2'及び3つ目のアミノ酸をP3'で定義し, 解析されている [37]. GP2の切断特異性はP2の場所でAla及びProを認識し, 切断することが報告されている

[37]. しかし、コラーゲン以外のタンパク質の切断の分析は報告されていないことからProを含む種々のタンパク質を用いて切断特異性の分析を行った. Peak Fはイオン交換HPLCのIEC-DEAEカラム及び逆相HPLCのC4カラムを用いてリクロマトを行った. 得られたPeak FはGP IIの配列をもとに構造解析を行った. その結果, GP IIと比較して2カ所に置換が見られ, 99%の相同性を示した. その置換の位置は触媒付近から遠い部分であることから活性には影響しないと考えられた. 構造を決定したPeak Fは分子量が23,873.061 Daで GP iiと名付けた. またGP iiの糖鎖はアミノ糖分析を行った結果, GP IIと同様のアミノ酸に糖鎖が存在することが明らかになった. GP iiの至適pHと至適温度は基質にカゼインを用いて分析を行った. その結果, 至適pHは6.0, 至適温度は60℃であることが明らかになった. また, Nafiら [91] によって精製されていないGPの至適pHはpH 6.0 - 7.0, 至適温度は60℃, そしてIchikawaら [88] によってGP I 及びGP IIの至適pHはpH 6.5 - 7.0であることが報告されている. したがって, GP iiの至適pH 及び至適温度はこれらの報告と同様であった. また, GP IIと相同性のあるGP2はコラゲナーゼ活性を有することが報告されている [37]. GP IIはGP2との置換が触媒部位から離れているところにあったことからGP2と同様にコラゲナーゼ活性を有すると考えられた.

本研究ではGP II とほぼ同様の構造を有するGPiiがコラーゲン以外の一般的タンパク質に対してどのような切断特異性を示すか分析を行った. 切断特異性の分析は反応させる緩衝液のpHが至適pHであるpH 6.0及び反応温度が長時間の分析のため変性の少ない37℃で分析を行った. しかし, GP iiによって切断したCm化及びPe化各種タンパク質を逆相HPLCによって分離し, 分析を行った. その結果, Pe OEL, Cm OEL及びPe BSAはいくつかのピークを得ることができた. GP iiの切断によって得られたペプチドの構造解析から推定する切断特異性は収量の多いPe化OEL及びCm化OELを用いて分析を行った. GP iiによるCm化及びPe化OEL消化物は切断した断片及びOELの配列を比較し切断部位を決定した. その結果, 切断部位から2つN末端側のP1ポジションでSer, Gly, Lys, 及びArg, P2ポジションでAla, Pro, Ile, 及び Tyr, P3ポジションでGlyを多く示した. したがって, GP iiの切断特異性はKimらの論文で報告されているGP2の切断特異性よりも広い範囲の切断特異性を示すことが明らかとなった [37]. 一方, 切断が見られなかった Cm化BSA, Pe化BSA, Cm化OVA及び Pe化OVAは基質が懸濁状態であり, Cm化及びPe化タンパク質はリン酸緩衝液に対する溶解度に差を示した. そこで, 溶解度の違いによる切断の違いを明らかにするため, 構造解析などの分析に良く用いられるセリンプロテアーゼであるトリプシンを用いて切断を行った. トリプシンは不溶性のタンパク質であっても切断することが明らかになった. また, GP IIとトリプシンはX線結晶解析により立体構造が報告されている [39]. トリプシンの触媒基及びGP IIの切断部位周辺のの大き

さを比較したところ、トリプシンの方が切断部位のポケットが大きく開いていることが明らかになった (Fig. III-7). すなわち、溶液基質及び固体基質に対する切断特性は切断部位のポケットの大きさが影響していると考えられた。

以上の結果から、ショウガに含まれるPRタンパク質であるSOD及びGPの分離、精製に成功し、その構造及び諸性質を明らかにした。このことにより、ショウガを食品素材として活用する基礎的情報を提供するのみならず、植物の生態防御のメカニズム解明に有用な情報を提供するものと思われ、減農薬などの取り組みに寄与が期待される (Fig. IV-1) [95].

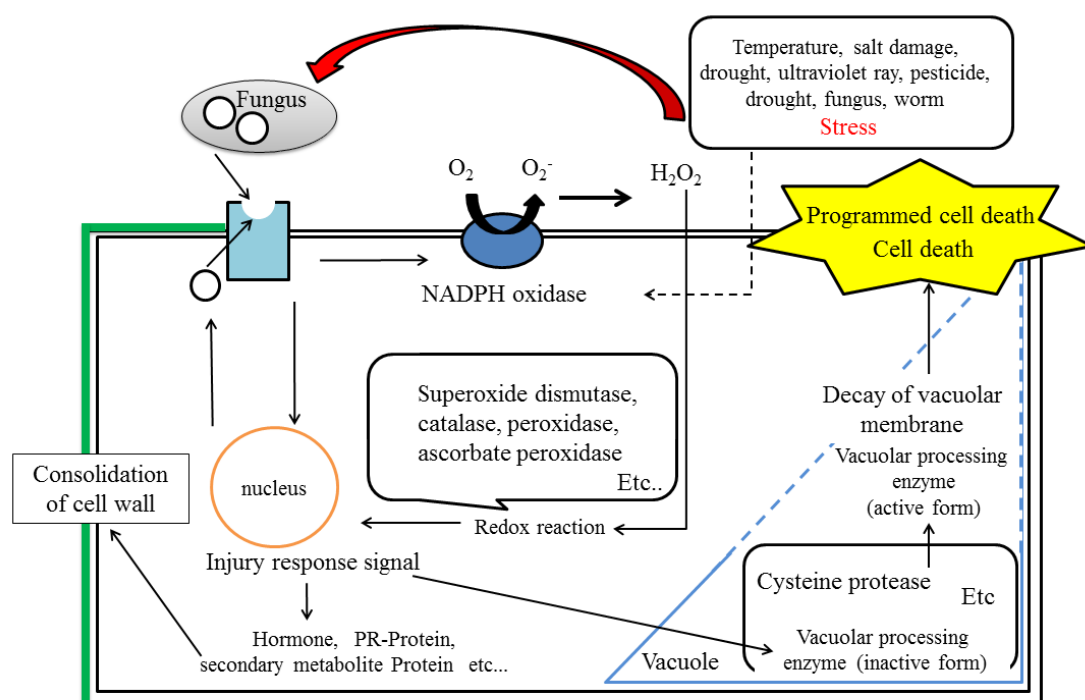


Fig. IV-1. Plant defense mechanism

## 第2節 要約

ショウガに含まれる PR タンパク質は 40 - 100% 硫酸分画及びイオン交換クロマトグラフィーを用い分離した。イオン交換クロマトグラフィーで得られた、Peak A は 18.5 kDa 付近, Peak B, D 及び F は 33 kDa 付近でバンドが見られた。得られた SDS-PAGE のバンドを用いて N 末端配列分析を行い, Peak A は, *Ca*-SOD, Peak B はショウガに含まれるシステインプロテアーゼの GP2, ピーク D はショウガに含まれるシステインプロテアーゼの GP3 そしてピーク F はショウガに含まれるシステインプロテアーゼの GP II に相同性を有することを明らかにした。

Peak A に存在する SOD はイオン交換および逆相 HPLC によって精製した。精製した SOD はトリプシンによる断片化後, *Ca*-SOD の配列と比較して全アミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列は *Ca*-SOD と比較し 10 個のアミノ酸に置換 (Ala38Pro, Val75Glu, Val85Ala, Ser88Gly, Ala94Thr, Lys100Ser, Thr105Ser, His108Asn, Ser134Thr 及び Ile142Val) を有した。それらの置換は活性サイトから離れた位置であることから活性には影響しないと考えられた。さらに Clustal W 及び系統樹による植物 Cu/Zn-SOD 配列分析はすべての SOD の起源が同一の祖先であり, 発現場所 (chloroplastic 型, cytoplasmic 型 及び intermediate 型) および形態 (monocot, dicot) で分岐を示した。Zo-SOD は cytoplasmic 型の monocot であることが明らかになった。また, 発現場所の 3 つのクラスの配列を比較することによって, クラステリクアミノ酸置換を同定した。また, Zo-SOD は決定した配列を用いて合成遺伝子を作製し, タンパク質発現を行い, 酵素学的性質を調べた。Zo-SOD の pH 及び熱安定性は pH 5 - 10 で 60°C の範囲で安定を示した。Zo-SOD は *Ca*-SOD [36] の熱安定性よりも低かったが, この低下は 94 番目のアミノ酸の置換がダイマー構造に影響し [8], Zo-SOD は 94 番目が Thr であることから活性が低いモノマー構造である可能性が考えられた。

Peak F に存在するシステインプロテアーゼはイオン交換および逆相 HPLC によって精製後, 構造解析を行った。構造を決定した GP ii の配列は GP II の配列と 2 か所のアミノ酸置換を有したが, その位置は触媒付近から遠い部分であったことから活性には影響しないと考えられた。GP ii の至適 pH は 6.0 であり, 至適温度は 60°C であり, GP2 と同様であった。各種タンパク質は基質 (OEL, OVA, 及び BSA) として Pe 化及び Cm 化で変性させた後分析を行った。その結果, 切断部位から 2 残基 N 末端側で Ala 及び Pro で多く存在した。報告されている GP2 の切断特異性よりも広い範囲の切断特異性であった。一方,

溶解性が低かった Cm BSA, Pe OVA及びCm OVA は GP ii によって切断を示さなかったが, これはSerプロテアーゼであるトリプシンを用いて切断を行った結果, 基質の状態が固体か液体かで切断部位のポケットの大きさが切断特性に影響していることが考えられた.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました東海大学農学部教授 荒木朋洋先生、同教授 星良和先生そして准教授 米田一成先生に心より深甚なる感謝の意を表します。また、論文作成においてご指導を賜りました。近畿大学農学部教授 深溝慶先生に心より感謝いたします。

## 文献

1. Rai S., Mukherjee K., Mal M., Wahile A., Saha BP., Mukherjee PK., (2006). Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography. *J Sep Sci.* 29: 2292–2295.
2. Pan MH., Hsieh MC., Hsu PC., Ho SY., Lai CS., Wu H., Sang S., Ho CT., (2008). 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 52: 1467–1477.
3. Kunyou Z., Kun X., Hongzong Y., (2011). Preparative separation and purification of gingerols from ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) by high-speed counter-current chromatography. *Food Chem.* 126: 1959–1963.
4. 瓜谷郁三 (2001), ストレスの植物性化学・分子生物学 熱帯性イモ類とその周辺. 学会出版センター,
5. Ruth GA., John LH., (1993). Antioxidants in higher plants. *CRC Press.* 31-58.
6. John GS., (1997). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. *Cold Spring Harbor Laboratory press.* 527-568.
7. Richard AL., (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 27, 964-978.
8. Kumar A., Dutt S., Bagler G., Ahuja PS., Kumar S., (2012). Engineering a thermo-stable superoxide dismutase functional at sub-zero to >50°C, which also tolerates autoclaving. *Sci Rep.* 2: 387. doi : 10.1038/srep00387.
9. Ehrmann M., Clausen T., (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet.* 38, 709–724.
10. van der Hoorn RA., (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 191–223.
11. Chapman HA., Riese RJ., Shi GP., (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 59, 63–88.
12. Turk B., Turk D., Turk V., (2012). Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* 31, 1630–1643.

13. Okomoto T., Minamikawa T., Edward G., Vakharia V., Herman El., (1999). Posttranslational Removal of the Carboxyl-terminal KDEL of the Cysteine Protease SH-EP Occurs Prior to Maturation of the Enzyme. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 16, 11390 – 11398
14. Weihao W., Jianghua C., Peiwen W., Shiping T., Guozheng Q., (2017). Post-transcriptional regulation of fruit ripening and disease resistance in tomato by the vacuolar protease SIVPE3. *Genome Biology*. 18:47. doi: 10.1186/s13059-017-1178-2.
15. Fischer<sup>1</sup> J., Becker<sup>1</sup> C., Hillmer<sup>1</sup> S., Horstmann<sup>1</sup> C., Neubohn<sup>1</sup> B., Schlereth<sup>1</sup> A., Senyuk V., Shutov A., Müntz<sup>1</sup> K., (2000). The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant Molecular Biology*. 43, 83–101.
16. Wyatt P., Jane A., Richard T., Uta P., Rod S., Harry S., (1995). Correct Processing of the Kiwifruit Protease Actinidin in Transgenic Tobacco Requires the Presence of the C-Terminal Propeptide. *Plant Physiol*. 108, 261-268.
17. Noa M., Silvia S., Adi A., (2005). A Novel Plant Cysteine Protease Has a Dual Function as a Regulator of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Expression. *The Plant Cell*. 17, 1205–1216.
18. Vikash KD., Monu P., Bishal KS., Medicherla VJ., (2007). Papain-like proteases. Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*. 6, 1077-1086.
19. Jose MA., Antonio C., (1995). A Putative Vacuolar Processing Protease 1s Regulated by Ethylene and also during Fruit Ripening in Citrus Fruit. *Plant Physiol*. 109, 541-547.
20. Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (1999). Vacuolar processing enzyme is upregulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J*. 19, 43–53.
21. Harrak, H., Azelmat, S., Baker, E.N., and Tabaeizadeh, Z. (2001). Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* 44, 368–374.

22. Pontier D., Balague C., Bezombes-Marion I., Tronchet M., Deslandes L., Roby D., (2001). Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene HSR203J, a molecular marker of the hypersensitive response. *Plant J.* 26, 495–507.
23. 植物で細胞死を実行する分子の発見-液胞プロセシング酵素というプロテアーゼの役割. (2005). *蛋白質 核酸 酵素*. 50, 343-349.
24. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., (2011). The role of vacuole in plant cell death. 18, 1298-1304.
25. Hatsugai, N., (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. 6, 234.
26. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855–858.
27. 橋本 昭彦., 竹内 洋子., 河原 有三., 安本 教博., (1991). ショウガ根茎のプロテアーゼおよびコラゲナーゼ活性. *日本栄養・食糧学会誌*. 44, 127-132.
28. Auclair JR., Brodtkin HR., D'Aquino JA., Petsko GA., Ringe D., Agar JN., (2013). Structural consequences of cysteinylolation of Cu/Zn-superoxide Dismutase. *Biochemistry*. 52, 6145–6150.
29. De Lencastre, J., Jozala AF., Lopes AM., de CSEV., Mazzola PG., Pessoa JA., (2016) . Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol Prog.* 32,5-13.
30. Fekete A., Komáromi I., Phys CCP., (2016). Modeling the archetype cysteine protease reaction using dispersion corrected density functional methods in ONIOM-type hybrid QM/MM calculations; the proteolytic reaction of papain. *Phys Chem Phys*. 18,32847-32861.
31. Nieuwenhuizen NJ., Maddumage R., Tsang GK., Fraser LG., Cooney JM., De SHN., Green S., Richardson KA., Atkinson RG., (2012). Mapping, complementation, and targets of the cysteine protease actinidin in kiwifruit. *Plant Physiol.* 158, 376-388.
32. Zare H., Moosavi MAA., Salami M., Mirzaei M., Saboury AA., Sheibani N., (2013). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. *Sabz*) latex. *Phytochemistry*. 87, 16-22.
33. Laemmli UK., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.

34. Pooart J., Torikata T., Araki T., (2004). The primary structure of a novel goose-type lysozyme from rhea egg white. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 159–169.
35. Wang S., Shao B., Liu S., Ye X., Rao P., (2012). Purification and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase from black soybean. *Food Res Int.* 47, 374–379.
36. Kumar A., Kaachra A., Shruti B., Kumar S., (2014). Copper, zinc superoxide dismutase of *Curcuma aromatica* is a kinetically stable protein. *Process Biochem.* 49, 1288–1296.
37. Kim M., Hamilton SE., Guddat LW., (2007). Overall, C.M. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochim Biophys Acta.* 1770, 1627 - 1635.
38. Choi KH., Laursen R.A., Allen KN., (2000). Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome *Zingiber officinale*. *Eur. J. Biochem.* 267, 151-1526.
39. Choi KH., Laursen RA., Allen KN., (1999). The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochemistry.* 38, 1624-1163.
40. Apel K., Hirt H., (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55, 373–399.
41. Suzuki N., Mittler R., (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plantarum.* 126, 45–51.
42. Karuppanapandian T., Moon JC., Kim C., Manoharan K., Kim W., (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci.* 5, 709–725.
43. Sharma P., Jha AB., Dubey RS., Pessarakli M., (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012, 1 -26..
44. Echaury SAG., Gidekel M., Moraga AG., Santos L., Rodriguez ADL., (2009). Heterologous expression of a novel psychrophilic Cu/Zn superoxide dismutase from *Deschampsia antarctica*. *Process Biochem.* 44, 969-974.
45. Foyer CH., Noctor G., (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal.* 11, 861–905.

46. Alscher RG., Erturk N., Heath LS., (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 53, 1331–1134.
47. Bafana A., Dutt S., Kumar A., Ahuja PS., (2011). The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J Mol Catal B-Enzym.* 68, 129–138.
48. Youn HD., Kim EJ., Roe JH., Hah YC., Kang SO., (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* *Biochem J.* 318, 889–896.
49. Abreu IA., Cabelli DE., (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta.* 1804, 263–274.
50. Kumar S., Sahoo R., Ahuja PS., (2002). inventors; Council of Scientific and Industrial Research, assignee. Isozyme of autoclavable superoxide dismutase (SOD), a process for the identification and extraction of the SOD in cosmetic, food and pharmaceutical compositions. United States patent US 6,485,950 B1
51. Kumar S., Sahoo R., Ahuja PS., (2006). inventors; Council of Scientific and Industrial Research, assignee. Isozyme of autoclavable superoxide dismutase (SOD), a process for the identification and extraction of the SOD and use of the said SOD in cosmetic, food, and pharmaceutical compositions. United States patent US 7,037,697 B2
52. Yogavel M., Mishra PC., Gill J., Bhardwaj PK., Dutt S., Kumar S., Ahuja PS., Sharma A., (2008). Structure of a superoxide dismutase and implications for copper-ion chelation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* D64, 892–901.
53. Bhardwaj PK., Sahoo R., Kumar S., Ahuja PS., (2011). inventors; Council of Scientific and Industrial Research, assignee. Superoxide dismutase (SOD) gene and a method of identifying and cloning thereof. United States patent US 7,888,088 B2. Feb 15.
54. Li RK., Fu CL., Chen P., Ng TB., Ye XY., (2013). High-level expression of a sika deer (*Cervus nippon*) Cu/Zn superoxide dismutase in *Pichia pastoris* and its characterization. *Environ Toxicol Pharmacol.* 35, 185–192.
55. Watanabe K., (2004). Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 63, 520-526.
56. Husain SS., Ali M., Ansari SH., (2011). Composition of the volatile oil of *Zingiber officinale* roscoe rhizomes and effects of physical factors on the oil. *Int Res J Pharm.* 2, 173–177.

57. Lin MW., Lin MT., Lin CT., (2002). Copper/zinc-superoxide dismutase from lemon cDNA and enzyme stability. *J Agric Food Chem.* 50, 7264-7270.
58. Kitagawa Y., Tsunasawa S., Tanaka N., Katsube Y., Sakiyama F., Kozi A., (1986). Amino acid sequence of copper, zinc-superoxide dismutase from spinach leaves. *J Biochem.* 99, 1289–1298.
59. Crestfield AM., Moore S., Stein WH., (1963). The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J Biol Chem.* 238, 622–627.
60. Kuwano Y., Yoneda K., Kawaguchi Y., Araki N., Araki T., (2013). The complete amino acid sequence and enzymatic properties of an i-type lysozyme isolated from the common orient clam (*Meretrix lusoria*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 77, 2269–2277.
61. Araki T., Kuramoto M., Torikata T., (1994). The amino acid sequence of copper pheasant lysozyme. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58, 794–795.
62. Brancia FL., Oliver SG., Gaskell SJ., (2000). Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 14, 2070–2073.
63. Hale JE., Butler JP., Knierman MD., Becker GW., (2000). Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Anal Biochem.* 287, 110–117.
64. Gevaer K., Demol H., Martens L., Hoorelbeke B., Puype M., Goethals M., Van Damme J., De Boeck S., Vandekerckhove J., (2001). Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 22, 1645–1651.
65. Chen P., Nie S., Mi W., Wang XC., Liang SP., (2004). De novo sequencing of tryptic peptides sulfonated by 4-sulfophenyl isothiocyanate for unambiguous protein identification using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 18, 191–198
66. Zhou JY., Prognon P., (2006). Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods—the example of superoxide dismutase (SOD). *J. Pharmaceut Biomed.* 40, 1143–1148.

67. Xu HH., Ma H., Hu BQ., Lowrie DB., Fan XY., Wen CG., (2010). Molecular cloning, identification and functional characterization of a novel intracellular Cu-Zn superoxide dismutase from the freshwater mussel *Cristaria plicata*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 615–622.
68. Drees C., Sturmer CA., Moller HM., Fritz G., (2008). Expression and purification of neurolin immunoglobulin domain 2 from *Carrassius auratus* (goldfish) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 59, 47–54.
69. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
70. The UniProt Consortium, (2015). Uniprot: a hub for protein information. *Nucl Acids Res.* 43, D204-D212.
71. Jabeen U., Salim A., Abbas A., (2012). Prediction of post translational modifications in *Avicennia marina* Cu-Zn superoxide dismutase: implication of glycation on the enzyme structure. *J Chem Soc Pakistan.* 34, 404–414.
72. Qu CP., Xu ZR., Liu GJ., Liu C., Li Y., Wei ZG., Liu GF., (2010). Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems and underground stems, subjected to high-salt stress. *Int J Mol Sci.* 11, 5234–5245.
73. McRee DE., Redford SM., Getzoff ED., Lepock JR., Hallewell RA., Tainer JA., (1990). Changes in crystallographic structure and thermostability of a Cu, Zn superoxide dismutase mutant resulting from the removal of a buried cysteine. *J Biol Chem.* 265, 14234–14241.
74. Kitagawa Y., Tanaka N., Hata Y., Kusunoki M., Lee GP., Katsube Y., Asada K., Aibara S., Morita Y., (1991). Three-dimensional structure of Cu,Zn-superoxide dismutase from spinach at 2.0 Å Resolution. *J Biochem.* 109, 477–485
75. 1. Bourne Y., Redford SM., Steinman HM., Lepock JR., Tainer JA., Getzoff ED., (1996). Novel dimeric interface and electrostatic recognition in bacterial Cu, Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93, 12774–12779.
76. Forest KT., Langford PR., Kroll JS., Getzoff ED., (2000). Cu, Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with a conserved dimer interface. *J Mol Biol.* 296, 145–153

77. Dong C., Zheng X., Li G., Zhu H., Zhou M., Hu Z., (2011). Molecular cloning and expression of two cytosolic copper-zinc superoxide dismutases genes from *Nelumbo nucifera*. *Appl Biochem Biotechnol*. 163, 679–691.
78. Fink RC., Scandalios JG., (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*. 399, 19–36.
79. Tuteja N., Mishra P., Yadav S., Tajrishi M., Baral S., Sabat SC., (2015). Heterologous expression and biochemical characterization of highly active and stable chloroplastic CuZn-superoxide dismutase from *Pisum sativum*. *BMC Biotechnol*. 15: 3. doi:10.1186/s12896-015-0117-0.
80. Yang E., Yi S., Bai F., Niu D., Zhong J., Wu Q., Chen S., Zhou R., Wang F., (2015). Cloning, Characterization and Expression Pattern Analysis of a Cytosolic Copper/Zinc Superoxide Dismutase (SaCSD1) in a Highly Salt Tolerant Mangrove (*Sonneratia alba*). *Int J Mol Sci*. 17: pii: E4. doi: 10.3390/ijms17010004.
81. Haddad NI., Yuan Q., (2005). Purification and some properties of Cu, Zn superoxide dismutase from *Radix lethospermi* seed, kind of Chinese traditional medicine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 808, 123–131.
82. Mahanty S., Kaul T., Pandey P., Reddy RA., Mallikarjuna G., Reddy CS., Sopory SK., Reddy MK., (2012). Biochemical and molecular analyses of copper-zinc superoxide dismutase from a C4 plant *Pennisetum glaucum* reveals an adaptive role in response to oxidative stress. *Gene*. 505, 309–317.
83. Madanala R., Gupta V., Deebea F., Upadhyay SK., Pandey V., Singh PK., Tuli R., (2011) . A highly stable Cu/Zn superoxide dismutase from *Withania somnifera* plant: gene cloning, expression and characterization of the recombinant protein. *Biotechnol Lett*. 33, 2057–2063.
84. Jamir K., Seshagirirao K., (2017). Purification, biochemical characterization and antioxidant property of ZCPG, a cysteine protease from *Zingiber montanum* rhizome. *Int J Biol Macromol*. S0141-8130, 32513-32518.
85. Muthu S., Gopal VB., Soundararajan S., Nattarayan K., Narayan SK., Lakshmikanthan M., Malairaj S., Perumal P., (2017). Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. *Plant Physiol Biochem*. 112, 161-172.

86. Ha JH., Jang HA., Moon KB., Baek KH., Choi GJ., Choi D., Cho HS., Kwon SY, Jeon JH., Oh SK., Kim HS., (2017). *Nicotiana benthamiana* Matrix Metalloprotease 1 (NMMP1) gene confers disease resistance to *Phytophthora infestans* in tobacco and potato plants. *J Plant Physiol.* 218, 189-195.
87. Kadek A., Tretyachenko V., Mrazek H., Ivanova L., Halada P., Rey M., Schriemer DC., Man P., (2013). Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expr Purif.* 95, 121-128.
88. Ichikawa Y., Sasa H., Michi K., (1973). Purification of ginger protease. *J Jap Soc Food and Nutr.* 26, 377-383.
89. Friedman M., Krull LH., Cavins JF., (1970). The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as S- $\beta$ -(4-Pyridylethyl) cysteine. *J Biol Chem.* 245, 3868-3871.
90. Chijiwa Y., Kawamura S., Torikata T., Araki T., (2006). Amino acid sequence and activity of green turtle (*Chelonia mydas*) Lysozyme. *Protein J.* 25, 336-344.
91. Nafi A., Foo HL., Jamilah B., Ghazali HM., (2013). Properties of proteolytic enzyme from ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) . *Int Food Res. J.* 20, 363-368.
92. Bradford MM., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
93. Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T., (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye thioflavin T1. *Anal Biochem*, 177, 244 - 249
94. Konno K., Inoue TA., Nakamura M., (2014). Synergistic defensive function of raphides and protease through the needle effect. *PLoS ONE* 9 : e91341
95. 池田 和博 (2016). 日本植物学会 植物学の百科事典 丸善出版 pp482－491.

### 本論文にかかわる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである.

- Nishiyama, Y., Fukamizo, T., Yoneda, K. and Araki, T., (2017). Complete amino acid sequence of a copper/zinc-superoxide dismutase from ginger rhizome. *Protein J.*, 36, 98-107.
- Nishiyama, Y., and Araki, T., (2017). Substrate Profiling of Cysteine Protease from *Zingiber officinale*. *Food biotechnology*. (In press)