

氏名	ふく だ たか こ 福 田 貴 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1615 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Structure-Function Relationships of Seed Storage Proteins (種子貯蔵タンパク質の構造・特性相関に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 海 成 教 授 谷 坂 隆 俊 教 授 三 上 文 三

論 文 内 容 の 要 旨

食源性疾患の増大，高齢社会の到来，そして食料の不足に対する方策を確立することは今世紀の大きな課題の一つとなっている。ダイズタンパク質をはじめとする植物タンパク質は脂質代謝改善能をもっており，その高度利用法を開発することが望まれている。

多くの植物の種子は，7S グロブリン (7S) や 11S グロブリン (11S) を主要貯蔵タンパク質としている。しかし，7S と 11S の含量比やそれらのサブユニット構成は植物種によって異なっている。ダイズの野生種であるツルマメには，栽培品種がもたないサブユニット種をもつものがあることが報告されており，これらがダイズのものとは異なる優れた特性を示す可能性がある。また，他の植物の 7S や 11S のアミノ酸配列はダイズのものとは異なっており，これらの中にも優れた特性を示すものを見出せる可能性がある。そこで本論文では，種子貯蔵タンパク質の高度利用のための情報を提供することを目的として，ツルマメの 7S と 11S，ダイズの 7S とアミノ酸配列の同一性が高いと考えられるアズキの 7S，およびダイズの 11S と同一性の低いカボチャの 11S について，既に多くの解析が行われたダイズの 7S や 11S と同一条件下で特性を比較するとともに構造の解明を行った。その主な内容は以下の通りである。

1. ツルマメはダイズと同様に，7S (α , α' , β の 3 種のサブユニットより成る) と 11S (A1aB1b, A1bB2, A2B1a, A3B4, A5A4B3 の 5 種のサブユニットより成る) を主要成分としているが，ダイズよりも変異に富むことが知られている。390系統のツルマメを SDS-PAGE によって分析したところ，ダイズにはないサイズのサブユニット種をもつ変異系統を 6 系統見出した。これらの系統の 7S と 11S の溶解性，乳化性，熱安定性を普通系統のツルマメやダイズのものとは比較したところ，熱安定性の低い 11S が存在することが分かった。各変異サブユニットの cDNA をクローニングしてアミノ酸配列を推定した結果，SDS-PAGE でのサイズや熱安定性の差の要因は，可変領域におけるアミノ酸残基の欠失や変異によるものであることが示唆された。

2. アズキは 7S を主要な貯蔵タンパク質として含有しているが，その特性は一部解析されているのみであり，アミノ酸配列などの情報もなかった。アズキ 7S を種子より精製し，サブユニット組成の違いから 2 つの画分として回収した。両標品の糖鎖の有無を分析したところ，画分を問わずハイマンノース型糖鎖が 1 個および 2 個付加しているサブユニット種が存在することが判明した。また，2 標品の特性を測定したところ，熱安定性と表面疎水性にはサブユニット組成の違いによると考えられる差が見られたが，溶解性と乳化性には差は見られなかった。決定した N 末端アミノ酸配列に基づく RT-PCR により 3 種の cDNA をクローニングした。これらの cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列には 95% 以上の同一性があり，いずれも既報のマメ科植物の中でマングビーン (緑豆) のものと最も高い相同性を示した。また，メチオニンとトリプトファンの含量が他の 7S と比較して多く，7S の中で栄養性が優れていることが判明した。

3. 2. で得た 3 種のアズキ 7S cDNA の大腸菌発現系を構築して，組換え型 7S1, 7S2, 7S3 を調製した。それらの特性を解析したところ，熱安定性は 7S2 が他の 2 種よりも高く，脂肪族疎水性は 7S1 が低く，芳香族疎水性は 7S3 が低かつ

た。一方、溶解性は7S3のみが異なる挙動を示した。このように、これらの3種は高いアミノ酸配列の同一性を示すにも関わらず、特性が互いに異なっている。この要因を理解するためには、各7Sの立体構造を解明する必要がある。そこで、3種の組換え型7Sの結晶化を試みたところ、7S1と7S3に関しては良質の結晶が得られ、それぞれ1.8 Å, 2.25 Åの分解能で立体構造を解明できた。これらの2種に加えて、組換え型の特性と立体構造が解明されているダイズ7S α' cと β 、およびマングビーン7S α に関して、構造と特性の関係を考察した。その結果、熱安定性は水素結合、塩結合、疎水性相互作用、キャビティーのサイズ、ループの長さなどの種々の要因の総合として決まるが、中でもキャビティーのサイズの寄与が大きいこと、表面疎水性は疎水性残基の分布のみでは決まらないこと、低イオン強度下における中性~弱塩基性付近での溶解性は静電ポテンシャル状態と対応することが、植物種やサブユニット種を問わずに言えると考えられた。なお、7S1の1.8 Åの分解能は、これまでに報告されている各種7Sのものの中で最も高いものである。

4. カボチャは11Sを主要貯蔵タンパク質として含有している。カボチャ11Sとダイズ11Sのアミノ酸配列の同一性は35%しかない。既報の塩基配列に基づくRT-PCRによってカボチャ11ScDNAをクローニングし、その大腸菌発現系を構築して組換え型カボチャ11Sを調製した。その特性を解析し、特性と立体構造が解明されている組換え型ダイズ11SA1aB1bのものと比較したところ、カボチャ11Sは組換え型ダイズ11SA1aB1bよりも表面疎水性が高いこと、そして極めて異なる溶解性を示すことが分かった。このような特性の違いを構造要因から考察するために結晶化を試みたところ、良質の結晶が得られ、2.2 Åの分解能で立体構造を決定することができた。両者の構造と特性の関係を考察した結果、7Sの場合と同様のことが言えると考えられた。

論文審査の結果の要旨

生活習慣病が増加している現代社会においては、脂質代謝改善能をもっている種子貯蔵タンパク質の高度利用法を開発することが望まれる。しかし、これまでに行われた種々の種子貯蔵タンパク質の特性解析は、異なる研究グループが個々に条件設定して行ったものであり、直接的に比較することができないのが現状である。本論文では、ダイズと比較して変異に富むことが報告されている、ダイズの野生種であるツルマメの7Sと11S、ダイズの7Sとアミノ酸配列の同一性が高いアズキの7S、ダイズの11Sとの同一性が低いカボチャの11Sの特性と構造の解析を行った。評価される主な点は以下の通りである。

1. 390系統のツルマメの分析より、ダイズにはないサイズのサブユニット種をもつ系統を見出し、その中には加工特性の優れたものがあることを示すとともに、その構造要因が可変領域におけるアミノ酸残基の欠失や変異によることを推定した。

2. アズキ7Sの特性を解析し、熱安定性の高い分子種が存在することを見出し、その要因がサブユニット組成にあることを示唆した。アズキ7SのcDNAを3種クローニングし、それらの推定されるアミノ酸配列から、アズキ7Sは種々の種子の7Sの中で栄養性が優れていることを示した。

3. 上記の3種のcDNAがコードするアズキ7Sの特性を比較するために、大腸菌発現系を構築して組換え型7Sを調製した。各標品の特性を解析するとともに、結晶化に供した。その結果、2種の組換え型7Sについて良質の結晶を得ることに成功し、それらの立体構造を明らかにした。

4. 上記の2種のアズキ7Sに加え、既に組換え型の特性と立体構造が解明されているダイズ7S α' cと β 、およびマングビーン7S α について総合的に考察することにより、熱安定性、表面疎水性、溶解性と構造との相関を明らかにした。

5. ダイズ11Sとアミノ酸配列の同一性が低いカボチャ11SのcDNAをクローニングし、大腸菌発現系を構築した。組換え型カボチャ11Sの特性を既報の組換え型ダイズ11SA1aB1bのものと比較するとともに、立体構造の解明に成功した。両者の構造と特性との関係を考察した結果、7Sの場合と同様の相関があることを明らかにした。

以上のように、本論文では、ツルマメの変異サブユニット種の特徴的な特性の構造要因を推定した。さらに、ダイズと遺伝的に近縁および遠縁の植物について、それらの種子貯蔵タンパク質の特性と立体構造を明らかにし、既報の報告とともに総合的に考察することによって、種子貯蔵タンパク質の熱安定性、表面疎水性および溶解性と構造との相関の一般則を明らかにしており、品質設計開発学、分子育種学、応用構造生物学などに寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。