

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	和田濱 裕之
論文題目	Identification and Characterization of Soybean Protein Disulfide Isomerase Family Proteins as Functional Proteins for Folding of Seed-storage Proteins (ダイズプロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーの同定および種子貯蔵タンパク質の高次構造形成における役割に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ダイズ種子貯蔵タンパク質は子葉細胞の粗面小胞体で生合成され、タンパク質貯蔵液胞に集積する。その際、小胞体での貯蔵タンパク質の高次構造形成が必須であると考えられている。動物細胞および酵母を用いた研究により、小胞体でのタンパク質の高次構造形成は、分子シャペロンおよびプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)ファミリーの介助により行われることが明らかにされてきた。しかし、植物のPDIファミリーに関する研究はほとんど行われていなかった。本研究は、このような背景に基づいて、代表的なダイズPDIファミリーを同定し、それらのダイズ種子貯蔵タンパク質の高次構造形成における役割を検討することを目的としたものである。本論文の内容は以下のように要約される。</p> <p>1. ダイズ新規PDIファミリー遺伝子のクローニングとリコンビナントタンパク質の大腸菌発現系の確立：ダイズから8種のPDIファミリー遺伝子をRACE法によりクローニングし、GmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIL-3a、GmPDIL-3b、GmPDIS-1a、GmPDIS-1b、GmPDIS-2およびGmPDIMと命名した。クローニングしたこれらの遺伝子を用いて大腸菌発現系でリコンビナントタンパク質を大量発現させるとともに、各タンパク質に特性の高いウサギ抗血清を作製した。</p> <p>2. 高次構造形成活性および分子シャペロン活性の測定：新たに見出したダイズPDIファミリーのうち5種(GmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1b、GmPDIS-2、GmPDIM)に酸化的高次構造形成活性が、また4種(GmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1b、GmPDIS-2)に変性タンパク質の凝集分子シャペロン活性があることを明らかにした。</p> <p>3. ダイズ各組織でのPDIファミリーの発現：ウエスタンブロットィングにより各タンパク質の発現量を調べたところ、いずれのPDIファミリーもほとんどの組織(根、茎、葉、花)に広く発現しており、特に種子貯蔵タンパク質の生合成を行う子葉で高発現していた。さらに、免疫染色法などにより細胞内の局在性を調べたところ、いずれのPDIファミリーも子葉細胞では小胞体内腔に局在していた。またGmPDIL-1、GmPDIS-1、GmPDIMの子葉での発現は種子貯蔵タンパク質の生合成が行われる登熟期に高くなった。</p> <p>4. ダイズ種子貯蔵タンパク質11Sおよび7SとPDIファミリーとの会合：PDIファミリーがタンパク質の高次構造形成を介助する際には、基質となるタンパク質と一過性に会合することが動物細胞で明らかにされている。そこで、代表的なダイズ種子貯蔵タンパク質であるグリシニン(11S)およびβ-コングリシニン(7S)とダイズPDIファミリーとの会合を、各PDIファミリーウサギ抗血清を用いた免疫沈降実験により解析した。その結果、小胞体内腔で高次構造の形成途中にあると考えられる前駆体型の11SとGmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1、GmPDIS-2およびGmPDIMが会合していることが明らかになった。また、7SとGmPDIL-1、GmPDIL-2およびGmPDIMの会合も明らかになった。以上の結果から、これらのダイズPDIファミリーが貯蔵タンパク質である11Sおよび7Sの高次構造形成に関わっていることが示唆された。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

日本の伝統的な食品素材である大豆(ダイズ種子)に含まれる主要な種子貯蔵タンパク質7Sおよび11Sは、優れた栄養性に加えて血清中性脂肪値の適正化作用などの有用な生理機能性を有している。また、ダイズ種子はその高いタンパク質生合成能と蓄積能から、遺伝子改変タンパク質や他の生物由来の有用タンパク質の効率的な生産装置としても有望視されている。小胞体でのタンパク質の高次構造形成は、小胞体に存在する分子シャペロンおよびPDIファミリーの介助により行われる。従って、ダイズ種子貯蔵タンパク質の立体構造形成における分子シャペロンおよびPDIファミリーの役割の解明は、ダイズ種子を用いた有用タンパク質の効率的な生産を目指す上で重要である。

本論文は、ダイズのPDIファミリーに着目し、遺伝子のクローニングと同定、およびダイズ貯蔵タンパク質の高次構造形成における役割を検討したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. これまで十分な研究が行われていなかった植物の貯蔵タンパク質形成におけるPDIファミリーの機能に着目し、8種のダイズPDIファミリー遺伝子を新規にクローニングし、命名した。それらのリコンビナントタンパク質の大腸菌発現系を確立するとともに、特異性の高いウサギ抗血清を作製した。

2. 各PDIファミリーのリコンビナントタンパク質のうち、GmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1b、GmPDIS-2、GmPDIMには酸化的高次構造形成活性が、GmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1b、GmPDIS-2には分子シャペロン活性があることを明らかにした。したがって、これらのPDIファミリータンパク質がダイズ植物体中でも活性をもつ可能性を見出した。

3. 各PDIファミリーのダイズ各組織における発現を調べた。その結果、いずれのPDIファミリーも根、茎、葉、花で発現しており、各組織に広く発現していることを明らかにした。特に貯蔵タンパク質の生合成の場である子葉の小胞体で強く発現していることを明らかにした。

4. 代表的なダイズ種子貯蔵タンパク質である11Sおよび7SとダイズPDIファミリーとの会合を免疫沈降実験により解析した。高次構造の形成途中にあると考えられる前駆体型の11SとGmPDIL-1、GmPDIL-2、GmPDIS-1b、GmPDIS-2およびGmPDIMが会合していること、また、7SとGmPDIL-1、GmPDIL-2およびGmPDIMが会合していることも明らかにした。すなわち、ダイズPDIファミリーが11Sおよび7Sの高次構造形成に関わっていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、ダイズのPDIファミリーを初めて同定し、貯蔵タンパク質の高次構造形成を担うことを初めて明らかにしたものであり、食品機能学、生物機能変換学、酵素化学に寄与するところが大きい。

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22年1月14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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降