

氏名	まる やま ゆき え 丸 山 如 江
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1422 号
学位授与の日付	平成 16 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	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Crystal Structure of Soybean β -Conglycinin and Its Application to Introduction of Bioactive Peptides (ダイズ β -コングリシニンの結晶構造と生理活性ペプチド導入への応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 内海 成 教授 廣瀬 正明 教授 吉川 正明

論 文 内 容 の 要 旨

ダイズタンパク質は栄養性や加工特性に優れており、古くから食品素材として広く利用されてきた。さらに近年では、ダイズタンパク質が血清コレステロール値の低下能などの優れた生理機能性を示すことが明らかにされ、食品素材として注目されている。タンパク質工学的手法を用いてこれらの特性を強化することによって、ダイズタンパク質の食品利用の拡大を期待できる。このような改変を理論的に設計するためには、第一にタンパク質の立体構造と構造に基づく特質を理解し、そして、これらのデータを基盤として、構造形成能を損なわずに高機能化しなければならない。そこで本論文では、ダイズの主要タンパク質の一つである β -コングリシニンを対象として、まず、X線結晶構造解析により、三種の構成サブユニット(α , α' , β)の一つである α' サブユニットの立体構造を決定した。さらに、結晶構造に基づいて改変設計を行うことによって、高次構造を維持したまま、 α' サブユニットと β サブユニットの生理機能性を強化することを試みた。その主な内容は以下の通りである。

1. β -コングリシニンの三種の構成サブユニットのうち、これまでに立体構造が明らかにされていたのは β サブユニットのみであった。 α と α' サブユニットの良質の結晶が得られなかった理由として、これらのサブユニットのN末端部には、 β サブユニットにはないエクステンション領域が存在することが影響していると考えられた。そこで第一章では、大腸菌発現系を用いて α' サブユニットからエクステンション領域を除去した変異体である α' コアを調製し、結晶化を試みた。その結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤とした蒸気拡散法により良質の結晶が得られ、分解能2.3Åでの構造決定に成功した。

得られた α' コアの全体構造は、 β サブユニットと非常に良く似ていた。しかし、これらの構造を詳細に比較すると、①分子内キャビティの大きさ、②分子表面の荷電性アミノ酸の分布、③表面疎水性度、④ループの揺らぎ、に差があることが明らかになった。これらの構造差異が、構造に基づく特質である熱安定性が両サブユニット間において異なっている要因と考えられる。

2. 第一章で明らかにした α' コアの結晶構造中に、座標を決定できない構造可変領域が、N末端部以外に三箇所存在していた。このような領域は、アミノ酸置換や挿入といった種々の改変を比較的許容しやすいと考えられる。そこで第二章では、構造可変領域に血圧降下活性を持つペプチド(RPLKPW)をタンデムにつないだ配列を、三箇所の構造可変領域それぞれに挿入した変異体(ap200, ap020, ap002)と三箇所同時に挿入した変異体(ap222)を作成した。これらの変異体はすべて野生型と同様の高次構造を形成していた。*in vitro*の消化により、全ての変異体からRPLKPWペプチドが派生し、派生効率は変異体の熱安定性とは相関せず、むしろ挿入した場所に依存していた。したがって、生理活性ペプチドをタンパク質に導入するには導入部位の選定が重要であることが示唆された。

3. β -コングリシニン α' サブユニットのトリプシン消化物から単離されたファゴサイトーシス促進ペプチド(ソイメタイド)はMITLAIPVKNKPGRという配列をしており、N末端のメチオニン残基は活性に不可欠であること、3番目のトレオニ

ン残基をフェニルアラニンやトリプトファンに置換するとT<F<Wの順に活性が上昇することが報告されている。しかし、 β サブユニットでは1番目と3番目の残基がそれぞれイソロイシンとリシンであるために、ファゴサイトーシス促進活性を示さない。そこで第三章では、ファゴサイトーシス促進活性を持つ β サブユニットを作成するために、ソイメタイド配列の β サブユニットへの置換導入を試みた。導入部位が変異を許容しにくい分子内部であったので、まず、三種の変異体(I122M/K124T, I122M/K124F, I122M/K124W)の立体構造をシミュレーションした。その結果、これらの変異が構造形成能を損なわないことが予測されたので、大腸菌発現系を用いて三種の変異体を調製した。精製した変異体はいずれも野生型と同様の高次構造を形成しており、それらのトリプシン消化物は期待通りのファゴサイトーシス促進活性を示した。

論文審査の結果の要旨

近年、ダイズタンパク質は優れた生理機能性を示すことが明らかにされ、食品素材として注目されている。しかし、現在世界中で生産されているダイズは主に製油に利用され、製油残渣に含まれるタンパク質の利用は限られている。したがって、この製油残渣中の大量の低利用タンパク質を、食品素材として効果的に利用することは、生活習慣病と食糧不足という21世紀の食糧問題に対処するために有効である。ダイズタンパク質の持つ栄養性、加工特性、生理機能性などの性質を、タンパク質工学的手法を用いて強化することによって、ダイズタンパク質の利用価値が高まり、その利用を促進できると考えられる。ダイズタンパク質を理論的に改変するためには詳細な構造情報が必要である。しかし、これまでにダイズ種子の主要なタンパク質の一つである β -コングリシニンについては、三種の構成サブユニット(α , α' , β)のうち β サブユニットの結晶構造のみが明らかにされていた。本論文では、新たに β -コングリシニンの α' サブユニットの結晶構造を明らかにし、得られた α' サブユニットの構造と、すでに得られていた β サブユニットの構造に基づいて、それぞれのサブユニットへ生理活性ペプチド配列を導入するという応用研究に展開させた。評価される主な点は以下の通りである。

1. これまでに良質の結晶が得られていなかった α' サブユニットから、N末端のエクステンション領域を除去することによって、良質の結晶を得ることに成功し、その立体構造を明らかにした。得られた立体構造は、 β -コングリシニンに関する今後の研究に非常に有用である。
2. α' サブユニットの立体構造を β サブユニットの構造と詳細に比較し、両サブユニットの熱安定性の差は、多数の構造差異の影響が積み重なって生じていると結論づけた。
3. α' サブユニットの三箇所の構造可変領域に血圧降下ペプチド配列を最大6個導入した。改変が構造形成を損なわないこと、また、消化酵素により血圧降下ペプチドが切り出されることを示した。これらのことから、変異を導入した構造可変領域は生理活性ペプチド配列の導入に適していることを示唆した。
4. 血圧降下ペプチド配列を導入した部位とペプチドの派生効率、および変異体の熱安定性を比較し、それぞれの相関を調べた結果、ペプチドの派生効率は変異体の熱安定性とは相関せず、むしろ挿入した場所に依存していることを示唆した。すなわち、生理活性ペプチドをタンパク質に導入する際には導入部位の選定が重要であることを示した。
5. β サブユニットの立体構造情報を用いてファゴサイトーシス促進ペプチドの導入設計を行い、変異導入が難しいとされる分子内部の β バレル領域に、野生型の構造を維持したまま、変異を導入することに成功した。
6. β サブユニットにファゴサイトーシス促進ペプチドを導入した変異体のトリプシン消化物がファゴサイトーシス促進活性を示すことを確認した。

以上のように、本論文で明らかにした立体構造は β -コングリシニンの持つ特性を改変するための重要な情報となるものである。また、実際に立体構造に基づいて β -コングリシニンへの新たな生理活性の付与に成功したことも評価に値する。したがって、新食糧設計学、食品利用学、品質設計開発学など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16年2月16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。