

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	藤原 圭吾
論文題目	種子を利用した有用物質生産系に関わるダイズタンパク質の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>植物種子を用いた有用タンパク質発現系は、微生物あるいは哺乳動物細胞での発現系と比較して低コストでの大量生産や安全性などに利点があり、さらなる発展が望まれている。特にダイズ種子は、高いタンパク質合成能および蓄積能を有するため有用タンパク質の生産プラットフォームとして有望であると考えられている。</p> <p>そこで、ダイズ種子を用いた有用タンパク質の高生産システムの基盤確立を目指し、有用タンパク質を子葉細胞内のタンパク質貯蔵液胞に高蓄積させる発現系および種子から有用タンパク質のみを高純度で溶出させる発現系の二つの方策を立て、それぞれの確立に向けた研究を行った。本論文の内容は以下のように要約される。</p>			
<p>1. ダイズ種子を有用タンパク質生産のプラットフォームとして利用する一つ目の方策として、ダイズ種子細胞内のタンパク質貯蔵液胞に蓄積するグリシニンのA1aB1bサブユニットを改変し、可変領域に有用ペプチドを複数個タンデムに挿入したペプチド挿入型A1aB1bを種子特異的プロモータ下流下に発現させた。内在性の主要種子貯蔵タンパク質が欠失すると他の種子貯蔵タンパク質の発現量が増加する現象を利用して、ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質であるグリシニンと<math>\beta</math>-コングリシニンを欠失したダイズ品種JQに発現させることで、これまでに報告されたダイズを用いた有用タンパク質発現系と比較して数倍量のペプチド挿入型A1aB1bを蓄積させることに成功した。また、蓄積したペプチド挿入型A1aB1bの大部分がペプチドを挿入していないA1aB1bと同様にタンパク質貯蔵液胞にプロセッシングを受けた可溶性の六量体として蓄積していることを示し、A1aB1bの可変領域への有用ペプチドの挿入は <i>in vivo</i>における立体構造形成、分子会合、液胞輸送および液胞でのプロセッシングに影響を与えないことを明らかにした。</p>			
<p>2. ダイズ種子を有用タンパク質生産のプラットフォームとして利用する二つ目の方策として、ダイズ種子から有用タンパク質を種子外に特異的に溶出させる発現系構築を目指して、basic 7S globulin (Bg7S) の50 °C浸漬処理(湯浴処理)による溶出機構の解析を行った。Bg7Sの湯浴溶出機構に関する知見を得るために、4品種のダイズ(ペキン、タマホマレ、エンレイ、IOM)を湯浴処理に供し、Bg7Sの溶出量に品種間差があることを明らかにした。各品種のダイズの種子内外のBg7Sの定量分析を行い、Bg7Sの溶出量はBg7Sの発現量と溶出効率により大きく影響されることを明らかにした。すなわち、Bg7Sは湯浴処理下で発現が誘導されて細胞間隙に蓄積するが、品種間で発現量に大きな差があることを明らかにした。また、発現したBg7Sの溶出を種皮が阻害するため、湯浴処理に対する種皮の脆弱性の品種間差により溶出効率が異なることを明らかにした。</p>			

3. ダイズ登熟種子のタンパク質貯蔵液胞に存在し、種子貯蔵タンパク質のプロセッシングや蓄積量に影響し得る新規プロテアーゼの探索を行った。公開されているトランスクリプトームデータを用いた遺伝子発現解析によりダイズ登熟種子で発現するプロテアーゼ候補を探索し、候補遺伝子としてシステインプロテアーゼのC1ファミリーに属すると推定される *GMCP3* を見いだした。ピキア酵母発現系を用いてリコンビナントプロ型GMCP3の大量発現と精製に成功した。リコンビナントプロ型GMCP3はピキア酵母で調製したリコンビナントダイズ液胞プロセッシング酵素sVPE1によりプロセッシングを受け、液胞内と同じpH 5.0-6.0の弱酸性条件下で基質の塩基性アミノ酸残基のC末端側でペプチド結合を切断するエンドプロテアーゼ活性を有することを示した。また、GMCP3はダイズ登熟種子で発現し成熟型として存在していることをWestern blot分析により明らかにした。さらに、GMCP3が登熟種子子葉細胞のタンパク質貯蔵液胞に存在することを免疫電子顕微鏡観察により明らかにした。これらの結果から、ダイズ登熟種子で発現したGMCP3は活性な成熟型としてタンパク質貯蔵液胞に存在し、種子貯蔵タンパク質のプロセッシングや分解に関与することが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ダイズ種子は高いタンパク質合成能と蓄積能を有するため、有用タンパク質の生産系として利用できる可能性をもつ。ダイズ種子を用いた有用タンパク質の高生産技術を確立するためには、ダイズ種子で合成される種子タンパク質の蓄積機構および種子貯蔵タンパク質のプロセッシングや分解に関与するプロテアーゼに関する基盤的知見が必要となる。本論文は、ダイズ種子の主要タンパク質の一つであるグリシニンA1aB1bサブユニットおよびBg7Sをモデルタンパク質として用い、有用タンパク質生産系の構築および生産系の確立に資する基盤的知見の獲得を目指したものである。さらに、有用タンパク質のプロセッシングや分解に関与するタンパク質貯蔵液胞の新規プロテアーゼの探索も行った。本研究の評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 有用ペプチドをダイズグリシニンA1aB1bサブユニットの可変領域に挿入することで、改変A1aB1bが野生型と同様の安定な立体構造形成が可能となることを *in vivo* で明らかにし、A1aB1bのキャリアータンパク質としての有効性を示した。また、内因性種子貯蔵タンパク質欠損品種JQに有用ペプチド挿入型A1aB1bを発現させることで、有用ペプチドを高蓄積させることができることを見いだした。
2. ダイズ種子の湯浴処理によるBg7Sの溶出量には品種間差が存在し、それらは品種間でのBg7Sの発現量および溶出効率の差異が要因となっていることを明らかにした。また、湯浴処理によるBg7Sの溶出経路を明らかにし、Bg7Sの溶出効率が主にダイズ種皮の脆弱性に依存することを明らかにした。
3. ダイズ登熟期に種子で高発現する新規システインプロテアーゼGMCP3を見だし、リコンビナントプロ型GMCP3のピキア酵母発現系の構築に成功し、GMCP3が液胞と同じ酸性条件下で塩基性アミノ酸のC末端側で基質を切断するプロテアーゼであることを明らかにした。また、成熟型GMCP3がタンパク質貯蔵液胞に存在していることを明らかにした。

以上のように、本論文は、ダイズ種子を用いた有用ペプチドの大量生産系の構築および生産系に関与するダイズ種子タンパク質の基盤的な知見を得たものであり、品質設計開発学、品質評価学、育種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26年7月18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) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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 (学位授与日から3ヶ月以内)