

氏 名	ヤン 楊 樹 長
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1270 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	Studies on Novel Neuroactive Peptides Derived from Plant Rubisco (神経系に作用する植物 Rubisco 由来の新規ペプチドに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 吉 川 正 明 教 授 伏 木 亨 教 授 北 畠 直 文

論 文 内 容 の 要 旨

近年、動物性並びに植物性の各種食品タンパク質の酵素消化によって種々の生理活性ペプチドが派生し、様々な生体調節機能を示す例が見い出されている。Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は光合成の際の炭酸固定に関与する酵素であり、緑葉タンパク質の約 1/3-1/2 を占めることから、地球上で最も豊富に存在するタンパク質と言われている。また、Rubisco は植物タンパク質としては例外的にきわめて良好なアミノ酸組成を有することから、食品タンパク質資源として期待されている。Rubisco はそれぞれ 8 個の large subunit と small subunit から成っているが、本論文ではほとんどすべての植物の Rubisco large subunit 中に共通に保存されているペプチド配列が動物のオピオイドレセプターおよび σ (シグマ) レセプターに対する親和性を有することを新たに見出し、消化管プロテアーゼによる生理活性ペプチドの生成条件、構造 - 活性相関、生理作用および作用機構等について検討した。

1. 従来、オピオイドレセプターに対する親和性には、Tyr-Pro-芳香族アミノ酸という構造が必須と考えられていたが、Tyr-Pro-疎水性アミノ酸という構造で十分であるという仮説に基づいて検索した結果、これを満たす YPLDL および YPLDLF という配列のペプチドを植物 Rubisco large subunit に見出し、それらのオピオイド活性を確認すると共に、それぞれ rubiscolin-5 および rubiscolin-6 と命名した。また、両ペプチドが、ハウレンソウ Rubisco からペプシンとロイシンアミノペプチダーゼの作用により派生することを見出した。その際の rubiscolin-5 生成量は rubiscolin-6 のその約 10 倍であった。両ペプチドは δ オピオイドレセプターに対して選択性を示し、rubiscolin-6 は rubiscolin-5 より約 2 倍強力な活性を示した。第 3 番目の Leu を Ile または Met に置換することによって、オピオイド活性は上昇するが、原始的な藻類の Rubisco はこの強力な YPIDLF 配列を含んでいることは注目に値する。

2. rubiscolin-6 および -5 はそれぞれ、マウスに対する 100 mg/kg および 300 mg/kg の経口投与で鎮痛作用を示した。一方、ステップスルー装置を用いた一試行受動的回避実験において、rubiscolin-6 は 100 mg/kg の訓練後経口投与により学習記憶促進作用を示した。これらの作用はいずれも、 δ オピオイドアンタゴニストである naltrindole によってブロックされることがら、 δ レセプターを介したものである。なお、rubiscolin-5 には学習記憶促進作用は認められなかった。

3. 高架十字迷路実験において、rubiscolin-5 は 10 mg/kg の経口投与により抗不安作用を示した。一方、rubiscolin-6 には同様な作用は認められなかった。また、naltrindole によって阻害されないことから、rubiscolin-5 の抗不安作用には δ オピオイド以外のレセプターが関与することが示唆された。種々検討した結果、rubiscolin-5 は $\sigma 1$ レセプターに対しても親和性を有することが判明した ($IC_{50}=41 \mu M$)。実際、rubiscolin-5 の抗不安作用は $\sigma 1$ アンタゴニストである BMY14802 によってブロックされ、また、 $\sigma 1$ レセプターに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド処置で消失することから、 $\sigma 1$ レセプターを介していることがわかった。rubiscolin-5 は食品タンパク質由来の $\sigma 1$ リガンドとしては最初の例である。当初、 σ レセプターはオピオイドレセプターサブタイプ的一种と考えられていたが、今日では別のレセプターであることが判明している。 σ レセプターに関しては、真の内因性リガンドを含めて未だ不明な点が多いが、今回、rubiscolin-5 が抗不

安作用を有する $\sigma 1$ リガンドとして Rubisco の酵素消化物から初めて単離されたことは注目に値する。

論文審査の結果の要旨

Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は炭酸固定に関与する酵素であり、すべての光合成生物に存在し、緑葉タンパク質の約 1/3-1/2 を占めることから、地球上で最も豊富に存在するタンパク質と言われている。Rubisco は植物タンパク質としては例外的に理想的なアミノ酸組成を有する点で、栄養学的に優れたタンパク資源であるが、本研究は Rubisco の動物に対する生体調節機能について検討し、多くの植物の Rubisco に共通に保存されているペプチド配列が神経系に対してオピオイド活性等の生理活性を示すことを新たに見出したものであり、成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. Tyr-Pro-疎水性アミノ酸という条件を満たすペプチドがオピオイド活性を有するという新しい仮説に基づいて、多くの植物の Rubisco large subunit 中に存在する YPLDLF および YPLDL という配列がマウス輸精管のアッセイ系でオピオイド活性を有することを見出し、それぞれ、rubiscolin-6 および-5 と命名した。ハウレンソウ Rubisco からペプシンおよびロイシナミノペプチダーゼの作用によって両ペプチドが派生することがわかった。レセプター結合実験から両ペプチドは δ オピオイドレセプターに選択性を示し、前者は後者より約 2 倍強力な親和性を示した ($IC_{50}=0.9 \mu M$)。原始的な藻類の Rubisco 中に存在する [Ile³]-rubiscolin-6 配列 (YPIDLF) はさらに約 2 倍強力な親和性を示した。

2. マウスに対して rubiscolin-6 および-5 はそれぞれ、100 mg/kg および 300 mg/kg の経口投与で鎮痛作用を示した。一方、rubiscolin-6 はステップスルー装置による一試行受動的回避実験において、訓練後の 100 mg/kg の経口投与により学習記憶促進作用を示した。これらの作用はいずれも、 δ オピオイドアンタゴニストである naltrindole によって阻害された。なお、rubiscolin-5 は学習記憶促進作用を示さなかった。

3. rubiscolin-5 は高架十字迷路実験において 10 mg/kg の経口投与により抗不安作用を示したが、rubiscolin-6 は同様な作用を示さなかった。また、rubiscolin-5 の抗不安作用は naltrindole によって阻害されないことから、 δ オピオイド以外のレセプターの関与が示唆された。実際、rubiscolin-5 は $\sigma 1$ レセプターに対しても親和性を有することがわかった ($IC_{50}=41 \mu M$)。rubiscolin-5 の抗不安作用は $\sigma 1$ アンタゴニストである BMY14802 によって阻害され、また、 $\sigma 1$ レセプターに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド処置で見られなくなることから、 $\sigma 1$ レセプターを介していることが判明した。rubiscolin-5 は食品タンパク質から派生する $\sigma 1$ リガンドとしては最初の例である。

以上のように、本論文は植物 Rubisco から派生し、神経系に作用する 2 種類のペプチドの中樞作用とその作用機構を明らかにしたものであり、その成果は機能食糧学、薬理学、栄養化学、食品機能調節学等の発展に寄与するところが大い。

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14年2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。