

氏 名	メリー ローズ ヘコレア タンダン Mary Rose Gecolea Tandang
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1436 号
学位授与の日付	平成 16 年 5 月 24 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 Structure and Physicochemical Function Relationships of Rapeseed and Soybean Storage Proteins by Protein Engineering (ナタネおよびダイズ貯蔵タンパク質の構造と物理化学的性質との相関に関するタンパク質工学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 海 成 教 授 北 畠 直 文 教 授 松 村 康 生

論 文 内 容 の 要 旨

世界で1年間に数億トン生産されるダイズやナタネなどの油糧種子は、主に製油に利用されている。製油残滓中には、タンパク質が豊富に存在しているが、ダイズではその一部が食品素材として利用されているものの、ナタネではそのほとんどが飼料や肥料として利用されるにとどまっている。低利用資源であるナタネタンパク質を高度利用できると食糧不足の解決に貢献できる。この達成のためには、ナタネタンパク質の構造と物理化学的性質との相関を、ダイズタンパク質における同様な相関に関する知見を踏まえて解明することが望まれる。

ナタネの主要タンパク質はクルシフェリン(11S グロブリン)であり、全タンパク質の約60%を占めている。一方、ダイズの主要タンパク質はグリシニン(11S グロブリン)と β -コングリシニン(7S グロブリン)である。本論文では、まず、クルシフェリンのcDNAをクローニングし、その大腸菌発現系を構築した。次いで、この大腸菌発現系を用いてタンパク質工学的に、クルシフェリンの構造と物理化学的性質との相関を解析した。さらに、クルシフェリン、グリシニン及び β -コングリシニンに関して、構造と溶解性及び乳化性との相関を解析した。その主な内容は以下の通りである。

第一章では、クルシフェリン cDNA のクローニング、その大腸菌発現系の構築と組換え型クルシフェリンの結晶化を行った。2種のcDNAをクローニングし、その塩基配列を決定することによって、1種は既知のものと同種のものであること、そしてもう1種は新規なものであることを見出した。さらに、これら2種及び既知のものがコードするアミノ酸配列を比較した結果、他の種子の11S グロブリンでは見られない、12個のアミノ酸からなる保存配列を見出した。種々の種子の11S グロブリンのアミノ酸配列には、5ヶ所の保存性の低い領域(可変領域)があるが、この12個のアミノ酸からなる保存配列は、クルシフェリンにおける最も長い可変領域である第2可変領域の末端に位置しており、その安定化に寄与していると推定した。cDNAの大腸菌発現系を構築し、組換え型クルシフェリンを可溶性の状態で大量に発現させることに成功した。組換え型クルシフェリンが本来の構造を形成していることをゲル過カラムクロマトグラフィー及び結晶化によって確認した。すなわち、クルシフェリンのタンパク質工学的研究に利用可能な大腸菌発現系を構築した。

第二章では、クルシフェリンの構造と物理化学的性質との相関をタンパク質工学的に解析した。多くの種子の11S グロブリンには見られないシステイン残基がクルシフェリンには存在している。また、クルシフェリンでは、第2可変領域が最も長く、グルタミンに富んでいるが、他の多くの11S グロブリンでは第4可変領域が最も長く、酸性アミノ酸に富んでいる。そこで、クルシフェリンに特異的に存在しているシステイン残基を除去した変異組換え型、第2可変領域を除去した変異組換え型、及び第4可変領域をグリシニンのものと交換した変異組換え型を調製した。各変異組換え型クルシフェリンの熱安定性、加熱沈殿性、溶解性、乳化性、プロテアーゼ感受性などを野生型のものと比較した。クルシフェリンに特異的なシステイン残基は加熱沈殿性と、第2可変領域は溶解性、加熱沈殿性及びプロテアーゼ感受性と正に相関すること、そして、構造的不安定性と分子表面の親水性度は乳化性と相関しないことを見出した。

第三章では、 β -コングリシニンあるいはグリシニンの酸性アミノ酸に富む領域を、クルシフェリン、グリシニン及び β -

コングリシニンの分子表面に位置する各可変領域に付加あるいは挿入することによる溶解性と乳化性に対する影響を解析した。同じ領域を同じタンパク質に付加あるいは挿入しても、その部位によって溶解性、乳化性が異なっていた。すなわち、溶解性は、アミノ酸組成ばかりでなく、酸性アミノ酸に富む領域の付加あるいは挿入部位にも大きく影響を受けること、並びにC末端部への付加は乳化安定性を飛躍的に増大させることを見出した。

論文審査の結果の要旨

食糧不足に対処するため、ナタネなどの製油残滓中に含まれる大量の低利用タンパク質を食品素材として有効利用する方策の確立が望まれる。このためには、利用度の高いダイズタンパク質の構造と物理化学的性質との相関を踏まえて、ナタネタンパク質の相関を解明することが望まれる。

ナタネはクルシフェリンを、ダイズはグリシニンと β -コングリシニンを主要貯蔵タンパク質としている。本論文では、まず、クルシフェリンのcDNAをクローニングし、その大腸菌発現系を構築している。次いで、クルシフェリンの構造と物理化学的性質との相関をタンパク質工学的に解析している。さらに、クルシフェリン、グリシニン及び β -コングリシニンの構造と溶解性並びに乳化性との相関をタンパク質工学的に解析し、乳化安定性の画期的な改善法を提起している。評価される主な点は以下の通りである。

1. クルシフェリンのcDNAを2種クローニングし、他の種子の11Sグロブリンには見られない保存配列を見い出している。クルシフェリンのアミノ酸配列の特徴から、この保存配列は、クルシフェリンの最も長い可変領域である第2可変領域の安定化に寄与していると推定している。クルシフェリンcDNAの大腸菌発現系を構築し、この発現系をタンパク質工学的研究に用いることができることを示している。
2. クルシフェリンに特有のシステイン残基を除去した変異組換え型、第2可変領域を除去した変異組換え型、及びクルシフェリンの第4可変領域をグリシニンの酸性アミノ酸に富むものと交換した変異組換え型を大腸菌発現系を用いて調製し、それらの各種物理化学的性質を野生型のものと比較している。クルシフェリンに特有のシステイン残基や第2可変領域がどのような物理化学的性質と相関するのかを明らかにしている。また、構造の不安定性と分子表面の親水性度は乳化性と相関しないことを見い出している。
3. β -コングリシニンあるいはグリシニンの酸性アミノ酸に富む領域を、クルシフェリン、グリシニン及び β -コングリシニンの分子表面に位置する各可変領域に付加あるいは挿入した各種変異体を大腸菌発現系を用いて調製し、それらの溶解性と乳化性を野生型のものと比較している。溶解性は、アミノ酸組成によって一義的に決まるのではなく、酸性アミノ酸に富む領域の付加あるいは挿入部位にも大きく影響を受けること、並びにC末端部への付加は乳化安定性を大きく増大させることを見い出している。

以上のように本論文は、タンパク質工学的手法を用いて、クルシフェリンの構造と物理化学的性質の相関を解析し、多くの新しい知見を見い出すとともに乳化安定性の改善法を提起したものである。したがって、新食糧設計学、品質設計開発学、品質評価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16年3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。