

氏 名	こ 寺 とも ひろ 小 智 博
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2622 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Establishment of an effective preparation method for a novel soybean protease and investigation of the functional properties of the protease derived protein hydrolysates (ダイズ由来新規プロテアーゼの効率的調製法確立と、新規プロテアーゼで調製したタンパク質加水分解物の機能特性評価)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伏 木 亨 教 授 井 上 國 世 教 授 大 東 肇

論 文 内 容 の 要 旨

ダイズタンパク質には、心疾患予防効果、コレステロール低下効果、骨粗鬆症予防効果等、多岐にわたる生理活性が明らかとなっている。ダイズタンパク質は溶解性が低いため、酵素分解処理により加水分解ペプチドを調製する方法が試みられてきた。しかし、この加水分解物は苦味が強く食品素材として十分に活用されていないのが現状である。本論文は、発芽ダイズ子葉中に新規プロテアーゼ D3 を見いだすとともに、それを利用して調製した新たな機能性ペプチドを健康食品素材として利用しようとするものであり、その内容は次のように要約できる。

1. ダイズ発芽時に特異的に発現するプロテアーゼの探索

ダイズ発芽時の子葉中貯蔵タンパク質解析から、 β -コングリシニンの限定分解物 (c30) が播種 5 ～ 7 日目に特異的に存在することを見いだした。c30 は市販プロテアーゼに対し難分解性を示す一方で、発芽 7 日目以降の子葉抽出液では容易に分解された。そこで c30 分解活性を指標に、ダイズ発芽子葉より新規プロテアーゼを探索した結果、プロテアーゼ D3 を単離した。プロテアーゼ D3 (D3) はシステインプロテアーゼファミリーに属し、基質特異性やタンパク質分解活性がカテプシン L やカテプシン K と類似していた。

2. D3 のクローニングと効率的な酵素調製法の確立

発芽ダイズ子葉より精製した D3 の N 末端アミノ酸配列情報より、D3 のクローニングを実施し、全遺伝子配列を得た。D3 は 25 アミノ酸残基のプレ配列、107 残基の N 末端プロ配列、247 残基の成熟体配列、85 残基の C 末端プロ配列からなる 464 残基の前駆体として発現されていると推定された。大腸菌で発現させた D3 前駆体の自己触媒による活性化は非常に時間を要し、制御も不安定であったため、subtilisin 処理後の反応液 pH を D3 の至適 pH である pH 4.5 に調整し、インキュベーションすることで、天然体と同じ比活性を有する活性体 D3 が効率よく取得できた。

3. D3 によるダイズタンパク質からの低苦味性ペプチドの調製

一般に、食品用プロテアーゼは疎水性アミノ酸付近を切断する基質特異性を有する。その結果、疎水性アミノ酸が加水分解ペプチド末端に露出する確率が高く、強い苦味を呈する主要因となっている。一方、D3 は P2 位に疎水性アミノ酸を認識するため、加水分解ペプチドの C 末端から 2 番目に疎水性アミノ酸が位置するように切断する確率が高くなる。その結果、ペプチド末端に疎水性アミノ酸が存在する可能性は低く、その加水分解ペプチドは低苦味性が期待できる。ダイズタンパク質とカゼインを基質に各種プロテアーゼ加水分解ペプチドを調製し、カフェインを苦味標準物質とした主観的等価濃度 (PSE) 測定により、苦味の強度を比較した。D3 で調製した加水分解ペプチドは、ダイズタンパク質、カゼインのいずれを基質にした場合も他酵素で調製した加水分解ペプチドよりも明らかに低苦味性を示した。

4. D3 加水分解物からアンジオテンシン変換酵素阻害活性ペプチド取得と抗高血圧活性の確認

ダイズタンパク質に D3 を作用させて調製した加水分解ペプチド中から新規な ACE 阻害ペプチドを探索した。加水分解

物をゲルろ過クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーにより分離し、高い ACE 阻害活性を示す画分を取得した。次に MS / MS 分析に供し、イオンフラグメントとタンパク質のアミノ酸配列データベースとの解析から、ACE 阻害活性が予期されるペプチドを選択し合成した。それらの ACE 阻害活性を測定することで、実際に ACE 阻害活性を有しているペプチドを同定した。自然発症高血圧モデルラット（SHR）への経口投与で血圧降下作用を試験した結果、得られたペプチドはいずれも有意な血圧降下を示した。

5. D3 調製ペプチドの小腸での吸収性

D3 で調製した加水分解物ペプチドは消化酵素の攻撃を受けやすいアミノ酸配列を有しており、本加水分解物の人工腸液酵素による分解特性は pepsin 加水分解物の人工腸液酵素による分解特性と同等以上であった。

論文審査の結果の要旨

本論文は発芽ダイズ子葉から発見した新規酵素を利用して、ダイズタンパク質を新たな特異性のもとで加水分解し、付加価値の高いペプチド食品を製造することを目的としている。評価できる主な成果は以下の通りである。

1. ダイズの発芽過程に発現するカテプシン様プロテアーゼの探索

ダイズ発芽時の子葉中貯蔵タンパク質解析から、 β -コングリシニンの限定分解物（c30）が播種 5 ～ 7 日目に特異的に存在することを見いだした。ダイズ発芽子葉より c30 の分解活性を指標としてダイズ発芽時のみに発現する新規プロテアーゼ D3 を単離することに成功した。

2. プロテアーゼ D3 のクローニングと効率的な酵素調製法の確立

発芽ダイズ子葉より精製したプロテアーゼ D3 の N 末端アミノ酸配列情報より、D3 のクローニングを実施し全遺伝子配列を得た。プロテアーゼ D3 の大腸菌での発現系構築と効率的な活性体の取得法を確立した。

3. プロテアーゼ D3 を利用した低苦味性ペプチドの調製

プロテアーゼ D3 で切断したペプチド末端には疎水性アミノ酸が存在する可能性は低く、その加水分解ペプチドは食品に利用しやすい低苦味性のものが多いことを示した。プロテアーゼ D3 を利用して調製した各種タンパク質の分解ペプチドから低苦味性のものを多数取得した。

4. プロテアーゼ D3 調製ペプチドからのアンジオテンシン変換酵素阻害活性ペプチドの調製

プロテアーゼ D3 で調製した苦味の少ない加水分解ペプチド中から新規な ACE 阻害ペプチドを見いだした。自然発症高血圧モデルラット（SHR）への経口投与で血圧降下作用を有することを確認した。

5. プロテアーゼ D3 調製ペプチドの消化・吸収性

プロテアーゼ D3 で調製したペプチドは消化酵素の作用を受けやすいアミノ酸配列を有しており、小腸で速やかに分解され、優れた分解・吸収特性を持つことを示した。

以上のように、本論文は新規に見いだしたプロテアーゼを利用してダイズタンパク質分解物から新たな機能性ペプチドを探索し、生活習慣病予防などへの応用の観点から検討を加えたものであり、栄養科学、食品科学、食品健康科学の発展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18年10月19日、論文なら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。