

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 入本慶宣

本論文は、イネの種子に含まれるシステインプロテアーゼインヒビターである、オリザシスタチン I のホモダイマーの阻害活性と構造との相関について、解析を行った結果について述べている。生化学的解析と立体構造解析という二つの手法を組み合わせることで、オリザシスタチン I ホモダイマーの活性機構の解明を行った。本論文は 5 章からなる。

序章においては、オリザシスタチン I のこれまでの研究が説明された。

第二章では、オリザシスタチン I の精製法を改良し、モノマーダイマー変換の外的環境の条件が検討された。その結果、精製過程に熱処理を加えることで、すみやかに大量のオリザシスタチン I を精製することが可能となった。また、温度、タンパク質濃度、pH 等の条件を変化させたり、変性させることでオリザシスタチン I は、その状態をモノマーからダイマーに、もしくはダイマーからモノマーに自由に変換できることが説明された。外的環境に極度に変化が起こった際に、オリザシスタチン I はその構造を変化することが示唆された。

第三章では、オリザシスタチン I のモノマー状態とダイマー状態のプロテアーゼ阻害活性が比較された。その結果、ダイマー状態の方がモノマー状態よりも阻害活性は低くなることがわかった。また、オリザシスタチン I がモノマーからダイマーへ、もしくはダイマーからモノマーへ状態が変化する過程において、その系全体の阻害活性能に変化が起こることもわかった。このことから、外的環境が変わることで、オリザシスタチン I は自分自身の状態（構造）変化を起こし、阻害活性能を変化させることで、プロテアーゼ活性の制御を行っていることが示唆された。

オリザシスタチン I はイネの種子に存在するタンパク質であり、イネの生育段階で様々な環境変化による影響を受けると考えられる。それは発芽の時や、外敵の体内に取り込まれた時など、様々な場合が考えられる。その際にオリザシスタチン I は自分自身でコンフォメーションを変化させて、プロテアーゼ活性を制御し、イネの生長を促したり、外敵から身を守ってきたことが示唆された。

また、他のシスタチンとは違い、オリザシスタチン I はダイマー状態になっても阻害活性を持つことが説明された。このことから、オリザシスタチン I は他のシスタチンとはダイマー化の機構が違う可能性が示唆された。

第四章では、NMR によりオリザシスタチン I の溶液構造の解析が行われた。ラベルしたオリザシスタチン I を大量精製し、スペクトルの測定を行い、連鎖帰属により主鎖の H^N 、 N 、 C^α 、 C^β 、 C' の化学シフトがほぼ決定された。NMR スペクトルの比較により、オリザシスタチン I はダイマー化すると、阻害活性に重要とされている第一ループと第二ループの構造が変化していることがわかった。このためオリザシスタチン I はダイマー化すると阻害活性が低下すると示唆された。

第五章では、オリザシスタチン I ホモダイマーの結晶化と X 線結晶構造解析が行われた。オリザシスタチン I ホモダイマーの結晶化に成功し、2.9 Å 程度の分解能のデータを取得することに成功した。また、モデル分子を用いて分子置換法を行った。

以上の研究により、初めて植物由来のシスタチンのダイマーに関する詳細な情報が得られた。植物においては、オリザシスタチン I 以外にもその植物固有のシスタチンが存在するが、アミノ酸配列の相同性が高いために、その構造や、状態変化の挙動、活性制御には共通点がみられることが考えられる。

本研究で得られた知見は、学術上貢献するところが大きいと考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。