

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 貝 沼 謙

---

タンパク質の立体構造を形成する結合のうち、ジスルフィド結合はタンパク質の機能発現と構造保持に大きく寄与する。本論文は、ジスルフィド結合の掛け替えによる立体構造形成を触媒しタンパク質の機能発現に重要な役割を果たす酵素、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) のうち、ほとんど解析されていなかった植物由来の PDI について、その単離、構造/機能の解析を行ったもので7章からなる。

第1章で PDI 研究の背景について述べた後、第2章ではまず各種食用植物種子中の PDI 活性を検討した。豆、小麦、大麦、米、トウモロコシなどの植物種子中に見出された PDI 活性は、チオレドキシンや他の低分子チオール化合物とは分子量的に区別された。これら PDI 活性と植物種子抽出液中のタンパク質含量を比較検討した結果、両者の間には高い正の相関が認められた。

第3章では上記種子中から、豊富な貯蔵タンパク質を有し、その一次構造と生成過程についての報告はあるものの、高次構造形成過程がほとんど明らかにされていない大豆種子に注目し、その PDI 活性変動と部位特異性について検討している。その結果、大豆種子登熟過程の PDI 活性は開花後 15~20 日の間にピークを示し、その後徐々に減少した。発芽中の PDI 活性は浸漬開始後 2~3 日目でピークを示し、その後減少した。登熟過程における PDI 活性のピークは、大豆種子中のプロテインボディ形成期とほぼ一致していた。また、発芽初期における大豆種子中の PDI 活性上昇の大部分は胚乳由来であった。しかし胚軸を除去して水中に浸漬した大豆種子の活性上昇は、胚軸を残したまま浸漬したものの約 1/2 であった。これらの結果は胚軸の存在あるいは胚軸中の何らかの因子が胚乳中の活性上昇に関与することを示唆した。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド存在下で浸漬した発芽中大豆種子の PDI 活性変動は、非存在下のものとほぼ同等であったことから、発芽初期の大豆 PDI の活性は休眠大豆種子中に存在する不活性型 PDI が、何らかの刺激により活性型に変化したため発現することが示唆された。

第4章では大豆 PDI の特性をさらに詳細に解析するためにその精製を試み、特異性および一次構造の解明を行っている。発芽中の大豆をホモジナイズした抽出液を初発サンプルとし、最終的な精製効率は 12,000 倍であった。これは高等植物由来の PDI としてははじめての精製例である。精製された大豆 PDI はこれまでに報告された多くの微生物或いはほ乳類の PDI と同様、分子量 60,000 程度のサブユニットが2分子結合したホモダイマーであった。しかし、その等電点は従来報告されたもの (pI4.0

～4.2)とは異なり弱アルカリ域にあった。精製された大豆 PDI を2種類のペプチダーゼで分解後、そのペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。その結果、二つの加水分解ペプチド中に、それぞれ異なる活性部位アミノ酸配列 APWCGHCK が見いだされた。また活性中心近傍のアミノ酸配列は、これまでに DNA 配列から推測された他の PDI と高い相同性を示した。

第5章では、大豆 PDI のジスルフィド結合掛け替え能の普遍性を確認するため、各種還元変性タンパク質を用いてリフォールディング実験を行っている。リフォールディング実験には、卵白リゾチーム、大豆由来トリプシンインヒビター、卵白アルブミンなどの還元変性物を基質として供し、活性や CD スペクトルの吸収に見られる二次構造の消長を指標にして高次構造の回復を観察した。PDI が存在するといわれる小胞体とほぼ同様の酸化還元的な環境下で、PDI を共存させた変性トリプシンインヒビターは、高いトリプシン阻害能の回復を示した。また、還元変性卵白アルブミンは、大豆 PDI 存在下でその2次構造をほぼ完全にリフォールディングさせた。

従来一次構造が明らかにされた PDI には、大豆 PDI と同様に APWCGHCK のアミノ酸配列が2ヶ所保存されている。この配列はチオレドキシソキシソ活性部位との相同性から、ジスルフィド結合交換反応の活性中心であると考えられている。第6章ではこの配列を有するペプチドを MAP ペプチド上に合成し、その PDI 活性を測定した。その結果から、ジスルフィド結合交換反応に CXXC モチーフが必須であること、この配列が何らかの立体構造をとり、チオール基間に適当な位置関係を築いた場合にはじめて PDI としての活性を持ちうるということが明らかになった。第7章は総合考察となっている。

以上本論文は、これまで解析されていなかった植物由来 PDI を初めて単離精製することに成功し、その構造を明らかにするとともに、PDI の機能をタンパク質側から詳細に検討したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。