

論文の内容の要旨

論文題目 コムギの新しいシステインプロテイナーゼとその機能に関する
食品科学的・植物生理学的研究

氏 名 清 崎 俊 博

コムギは世界の三大穀物の一つで、世界中の人々の「食」を支えている。コムギ種子中には約10~14%のタンパク質が含まれているが、主要なタンパク質成分は、水や食塩水に不溶性のグリアジンとグルテニンである。粉に水を加えてこねると、グリアジンとグルテニンはグルテンを形成する。グルテンが持つ伸展性と弾性が、パン、麺類、菓子類などをはじめとする小麦独特の加工食品を作り出す。この最も重要な加工特性を担うタンパク質の品質改良には膨大な研究努力が注がれてきた。しかしながら、その鍵を握るとされるプロテイナーゼとそのインヒビターの関与については、分子レベルでは詳細に研究されないままであった。本研究では、コムギ種子貯蔵タンパク質のダイナミズムに関する知見を得るために、主要なプロテイナーゼと思われるシステインプロテイナーゼをスクリーニングし、貯蔵タンパク質に対する作用を検討するとともに、内在のシスタチン(システインプロテイナーゼインヒビター)のスクリーニングをも行い、システインプロテイナーゼとシスタチンの相互作用の解明、およびジベレリンによる活性制御について詳細に解析した。

第1章序論に続き第2章では、コムギ発芽種子よりシステインプロテイナーゼをスクリーニングし、4種類の異なるクローン、トリチカイン α 、 β 、 γ 、グリアダインを取得したことに言及した。こ

これらのクローンはパパインタイプのシステインプロテイナーゼに属し、一次構造は互いに 40～62%の相同性を有していた。種子における発現時期と部位を解析した結果、トリチカイン α および γ mRNA は開花後 1～2 週目までの登熟期と吸水 1～3 日目の発芽種子で発現し、グリアダインは発芽種子に特異的に発現し、トリチカイン β はいずれの種子においても僅かな発現しか認められなかった。これらのシステインプロテイナーゼが特徴ある発現パターンを示すことを明らかにした。吸水時にジベレリンの生合成阻害剤であるウニコナゾールを培地に添加したところ、トリチカイン α 、 γ 、グリアダインは発現が抑制され、ジベレリンによって発現が誘導されることが検証された。*In situ hybridization* の結果、4 つのシステインプロテイナーゼは、いずれも発芽種子の胚およびアリュéron細胞で発現していた。すなわち、トリチカイン α 、 β 、 γ 、グリアダインは発現時期をずらしながら、貯蔵タンパク質の分解にディファレンシアルに関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、4 種のシステインプロテイナーゼのうち、最も発現量が多く、ジベレリンによって発現が顕著に誘導されるグリアダインについての詳細な解析について述べた。グリアダインを大腸菌を宿主として発現生産させ、酵素学的解析を行った結果、カテプシン L の基質である z -FR-MCA を効率よく水解し、 K_m 値は $9.5 \mu M$ で、高い親和性を示した。また、グリアダインの至適 pH がカテプシン L に近いこと、一次構造の相同性からも、グリアダインがカテプシン L 様のシステインプロテイナーゼであることが確認された。

組み換えグリアダインを作出し、コムギ貯蔵タンパク質に作用させると、グリアジン画分のみを特異的に水解した。本酵素の名称は、この性質ゆえに付けたものである。グリアダイン抗体を製し、組織染色によって発現する組織を検討したところ、胚に隣接する胚乳とアリュéron細胞でシグナルが観察された。このことは、アリュéron層で合成されたグリアダインが胚乳へと漏出し、胚乳にあるプロテインボディーを分解することを示唆する。

第 4 章の研究では、コムギ種子内在のシスタチンのスクリーニングを行った。登熟過程にあるコムギ種子から作製した cDNA ライブラリーから、WC1, WC2, WC3, WC4, の 4 つのシスタチンクローンを得た。WC1 および WC4 の阻害活性をカテプシン B, H, L に対して行った結果、カテプシン L および H に対して卵白シスタチンと同程度の阻害活性を示した。コムギシスタチンは、種子、芽、根など植物体のいたるところで発現が確認されたが、WC1 および WC4 は、既知の植物シスタチンと

は異なり、発芽期にも強い発現が観察された。発芽期に発現が認められたWC1 および WC4 はグリアジンに対して、 IC_{50} がWC1 では 1.7×10^{-8} M, WC4 では 5.0×10^{-8} M と強い阻害活性を示した。

本研究の結果より、コムギ発芽種子におけるシステインプロテイナーゼおよびシスタチンの関係を考察することができる。コムギ種子では吸水を引き金としてジベレリンが胚で合成され、胚盤を通過してアリューロン層へ達する。アリューロン細胞のジベレリン受容体で受容されたジベレリンのシグナルは、グリアジン遺伝子のシスエレメントに応答し、グリアジンの合成が誘導される。アリューロン細胞で合成されたグリアジンは、胚乳に分泌され、貯蔵タンパク質を分解し、発芽のために必要なエネルギー源や新生組織の構成要素となるアミノ酸を産生するためのプロテオリシスに関与する。一方、シスタチンもアリューロン細胞で合成され、グリアジンの活性制御を行い、プロテイナーゼによる過剰なタンパク質分解の制御を担っているものと思われる。すなわち、コムギ種子内では、プロテイナーゼとそれを制御するインヒビターが、共に発現することによってバイオレギュレーターとして作動し、種子内のプロテオリシスのダイナミックな秩序を保っている可能性が示唆された。

また、グリアジンは、食品加工への応用も期待できる。グリアジンは、難消化性タンパク質グリアジンの特異的に切断し、同じプロラミンに分類されたコメのプロラミンには作用しなかったことから、コムギのグリアジンに対して高い特異性を持つと考えられる。コムギ粉に水を加えて捏ねることによって生成するグルテンは、コムギ食品の品質に大きく影響を与えることから、グリアジンを利用してグルテンの物性をコントロールできる可能性が示唆された。今後、本酵素を用いた新しい加工食品の創出に期待したい。