

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 清崎 俊博

本論文は、コムギの新しいシステインプロテイナーゼ (CP) を見出し、その機能に関する食品科学的・植物生理学的研究をまとめたものである。コムギは重要な食糧種実であり、コムギ種子中の主要なタンパク質であるグリアジンとグルテニンから形成されるグルテンの伸展性と弾性が、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に関わるプロテイナーゼとそのインヒビターの関与について、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、コムギ種子中のプロテオリシスのメカニズムを明らかにし、コムギ固有のシスタチン (CP インヒビター) による CP の制御の解明を行った。本論文は5章から構成されている。

本研究の背景と目的を述べた第1章に続き、第2章では、コムギ発芽種子より CP をスクリーニングし、4種類のクローン (トリティカイン α 、 β 、 γ 、グリアダインと命名) を取得した。これらの CP はパパインファミリーに属し、一次構造は互いに 40~62% の相同性を有していた。また、登熟期あるいは発芽期において特徴ある発現パターンを示すことを明らかにし、トリティカイン α 、 γ 、グリアダインはジベレリンによって発現が誘導されることを検証した。これら CP 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ェレンシアルに関与している可能性が推定された。

第3章では、4種の CP 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を行った。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-Phe-Arg-MCA を効率よく水解し、 K_m 値は $9.5 \mu\text{M}$ と高い親和性を示した。また、グリアダインはその至適 pH や一次構造の相同性から、カテプシン L 様の CP であることが確認された。組み換えグリアダインをコムギ貯蔵タンパク質に作用させると、*in vitro* でグリアジンのみを特異的に水解したため、本酵素をグリアダインと命名したものである。組織染色では胚に隣接する胚乳とアリューロン細胞でシグナルが観察された。このことは、アリューロン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 *in vivo* でも分解することを示すものである。

第4章では、コムギ種子内在のシスタチンのスクリーニングを行い、4種類 (WC1, WC2, WC3, WC4) のクローンを得た。既知の植物シスタチンと同様に WC1 および WC4 はカテプシン L お

よびカテプシン H に対して高い阻害活性を示したが、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。また、グリアダインに対する IC_{50} は、WC1 では 1.7×10^{-8} M、WC4 では 5.0×10^{-8} M と高い阻害活性を示した。

第 5 章の総合討論では、コムギ種子に内在する主要な CP であるグリアダインとシスタチンの関係を考察している。すなわち、吸水を引き金として合成されるジベレリンによるシグナルが、グリアダイン遺伝子の cis エlement に作用し、合成が誘導される。その結果、グリアダインは胚乳中の貯蔵タンパク質を分解し、発芽のためのエネルギー源や新生組織の構成要素となるアミノ酸の産生に関与すると結論される。

本研究が提出した上記の知見を一般論へと敷衍すると、基礎面では、コムギ種子内で複数種の CP とそのインヒビターであるシスタチン類が相互制御因子として共発現して種子タンパク質代謝のダイナミズムを決定し、応用面では、コムギ加工の基軸となるグルテンの食品科学的特性を決定すると概括できる。

以上、本研究は、CP によるコムギ種子中のプロテオリシスのメカニズムの一端を明らかにし、シスタチンによる CP の制御の実態を分子レベルで解明したものである。しかも、本研究で見い出したグリアダインは食品に新たな加工特性を付与する可能性が期待され、学術的・応用的意義は大きい。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。