

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森田 悠治

本論文は X 線結晶構造解析により、味覚修飾活性を持つ甘味タンパク質として世界で初めてネオクリンの立体構造を解くとともに、pH 依存的な構造変化と味覚修飾活性との相関を明らかにし、さらには、ネオクリンの産業利用に向けての安全性評価を行った結果をまとめたものである。論文は 5 章からなり、第 1 章は序論、第 2, 3, 4 章が本論、第 5 章が総括と今後の展望である。

第 2 章では、クルクリゴ果実より精製したネオクリンの立体構造を X 線結晶構造解析により、分解能 2.76 Å で明らかにした結果を述べている。ネオクリンの 2 つのサブユニット NAS, NBS の構造は互いに大変類似しており、それぞれのサブユニットは 4 本の β ストランドからなる 3 つの β シートが **triangular prism** 様に配置されている構造をとっていることが明らかになった。全ての β シートは逆平行であり、最後の 12 番目の β ストランドはもう一方のサブユニットからのもので構成されていた。また、高いアミノ酸相同性から推察されたように、ネオクリンとマンノース結合型レクチンの全体構造は良く類似しているものの、各サブユニットの C 末端領域の構造において大きな違いが認められた。ネオクリンサブユニットにおける 12 番目の β ストランドは 3-4 残基で構成されており、その後方の大きなターンは Cys109-Cys77 間の分子間ジスルフィド結合によって固定されているのに対し、レクチンにおいて対応する C 末端領域はもう一方のサブユニットの表面へ直線的に伸びている構造であった。さらにタンパク質表面における静電ポテンシャル、マンノース結合部位周辺の構造などにおいても両者は大きく異なっており、これらの違いが両者の機能の相違に反映していることが立体構造から示唆された。

第 3 章では、分子動力学を用いたコンピュータシミュレーション、および CD, Trp 蛍光スペクトル解析等のタンパク質化学的解析により、ネオクリンの pH 依存的な立体構造変化と味覚修飾活性が相関することを明らかにした結果を述べている。分子動力学を用いたコンピュータシミュレーションによって解析した結果、ネオクリンは酸性条件下において立体構造変化を起こし、中性条件下の構造に比べてサブユニット間が開いた構造を取ることが示唆された。これよりネオクリンの立体構造は **open \leftrightarrow closed** の平衡状態にあり、その平衡は pH により変化するという仮説を提唱した。次に、Trp 蛍光スペクトル測定、CD 測定などの物理化学的解析により、ネオクリンの pH 依存的な立体構造変化を示した。ネオクリンが立体構造変化を起こす pH 領域と味覚修飾活性が生じる範囲が一致したこと、および、味覚修飾活性が失われたネオクリン変異体においてはそのような立体構造変化が認められな

いことが明らかとなった。これはネオクリンの立体構造変化が味覚修飾活性機構の一部であることを強く示唆している。

第4章では、産業利用に向けてネオクリンの安全性評価を行った結果を述べている。Caco-2細胞を用いて、細胞毒性についての解析、およびDNAマイクロアレイによるネオクリンの安全性の評価を行った。その結果、ネオクリンと相同性の高いレクチンが細胞毒性を示したのに対し、ネオクリンには細胞毒性作用は認められなかった。また、DNAマイクロアレイの結果においても、ネオクリンを添加した場合は遺伝子変動パターンがコントロールとほぼ同じであることが示された。これらの結果はネオクリンの食品としての安全性を示唆するものである。

本研究は、ネオクリンの立体構造、およびpH依存的な構造変化と味覚修飾活性の相関を世界で初めて明らかにすることが出来たとともに、味受容機構を理解、解析するための立体構造情報を提供するものである。また、ネオクリンの安全性評価を行ったことで、産業利用につながることも期待されるものであり、学術的・応用的に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。