氏　名（本籍）	ナレンドラ　デュヒタ（インドネシア）
学位の種類	博　　士（学　　術）
学位記番号	博　甲　第　5742　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	**A Simple Purification Method of Miraculin from Miracle Fruits and Transgenic Tomato, and the Biochemical Mechanism of Sweetness-inducing Activity of Miraculin.** （ミラクルフルーツと組換えトマトからのミラクリン簡易精製法およびミラクリンの甘味誘導活性の生化学機構）

主　　査	筑波大学教授	博士（農学）	江　面　　浩
副　　査	筑波大学教授	農学博士	宮　崎　　均
副　　査	筑波大学准教授	博士（農学）	福　田　直　也
副　　査	筑波大学准教授	博士（農学）	松　倉　千　昭

論　文　の　内　容　の　要　旨

ミラクリンは、西アフリカ原産のミラクルフルーツ（*Richadella dulifica*）の果実中に高蓄積する糖タンパク質である。それ自体に甘味はないが、食品の酸味を甘味に変えるユニークな特性を有している。そのため、代替甘味料、具体的には生活習慣病予防のための、カロリー摂取制限を行う素材としての利用が期待されている。一方、ミラクルフルーツが熱帯原産の低木であること、果実生産性が所謂、作物に比べて非常に低いことなどから、その有効活用が進んでいない。そこで、1980年代にミラクリン遺伝子が単離されたことを期に、ミラクリンを微生物や植物で組換えタンパク質として生産する研究が行われてきている。本申請者の研究グループは、トマト果実にミラクリンを遺伝的に安定した状態で高蓄積することに成功し、ミラクリンの大量生産の基盤を確立した。ミラクリンの有する食品の酸味を甘味に変える味覚修飾作用については周知の事実であるが、その分子機構に関しては、いまだに仮説の域を出ていない。その原因の一つとして、従来の精製法ではタンパク質の構造解析などに利用できるような高純度の活性ミラクリンを大量に精製することが困難な点をあげることができる。

本研究では、1）ミラクルフルーツからの簡易の活性ミラクリン抽出法の開発、2）開発した精製方法の組換えトマトからの活性ミラクリンの精製への適用、3）これらの方法で得られた活性ミラクリンを用いた味覚修飾作用の分子機構解析に取り組んだ。

はじめに、コンピューターシミュレーションによって得られたミラクリンの立体構造モデルの解析を行った。その結果、ミラクリン分子の表面にヒスチジン残基が存在することを予測し、そのヒスチジン残基をHis-tagとして使用することで、簡易精製が出来ることを考案した。実際に、これらのヒスチジン残基をターゲットに固定化ニッケルイオンクロマトグラフィー（ニッケルIMAC）を用いることで、ミラクルフルーツから抽出した粗タンパク質溶液から活性のあるミラクリンを簡易かつ高純度（97%以上）に精製できることを実証した。この実験から、その立体構造モデルから予測したとおり、ミラクリン分子の表面にヒスチジン

残基が所在していることを実験的に始めて証明できた。さらに、精製したミラクリンを用いて、尿素添加実験を行い、IMACへの結合にはミラクリン分子の3次元構造の維持が重要であることも実験的に証明した。続いて、ミラクルフルーツからの活性ミラクリン精製のために開発したニッケルIMAC法で組換えトマト果実からのミラクリン精製を試みたが、同純度のミラクリンは得られなかった。考察の結果、トマト果実に含まれている糖などの代謝物の影響が示唆された。しかし、ニッケルIMAC処理の後に、イオン交換クロマトグラフィーを一ステップ追加することで、組換えトマトからも高純度（93%以上）の活性ミラクリンが精製できた。以上の一連の研究から、活性のある高純度のミラクリンを簡易に精製･提供できる技術が確立した。なお、精製ミラクリンを食品添加物として使用するような商業化を目的とした大量精製にはシステムのスケールアップが今後の課題となる。一方、ミラクリンを試薬として利用するような研究目的の使用では、本法により十分量の活性ミラクリンの精製・提供が可能である。

続いて、得られた精製ミラクリンを用いて、味覚修飾作用の分子機構の解析を行った。従来の研究では、酸性条件下でヒスチジン残基のプロトン化が起こり、その結果、ミラクリン分子が“open structure”に変化する立体構造変化が生じ、さらに、その構造変化が甘味受容体により認識され、甘味が誘導されると予想されていた。このモデルでは、ヒスチジン残基はプロトン化を介してミラクリンの立体構造変化を引き起こす上で重要であると考えられた。本研究では、前段の研究から得られた活性ミラクリンを用いて、様々なpH及び温度条件下でミラクリンのCDスペクトルを測定した。その結果、ミラクリン分子の表面に所在するヒスチジン残基は、ミラクリンの味覚修飾機能の発現において、従来のモデル予測で提案された酸性条件下でのミラクリン分子の立体構造変化を誘発する役割ではなく、ミラクリン分子と甘味受容体の結合に関与していることを実験的に示唆した。以上の結果は、ミラクリンの味覚修飾作用の分子機構の全容解明に向けた新たな知見を提供するものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本申請論文は、活性ミラクリンの新規精製法の開発、および得られた精製ミラクリンを使ったミラクリンの味覚修飾作用の分子機構の解明に取り組んだ。その結果、ミラクリンの立体構造モデルを基に、ニッケルIMAC法による精製法を考案し、高純度のミラクリンを簡易に得る新規精製法を開発した。さらに、得られた精製ミラクリンを用いて、味覚修飾機能の発現には、ミラクリン分子の構造変化ではなく、ヒスチジン残基を介したミラクリン分子と甘味受容体の結合が重要であることを実験的に証明した。これらは技術開発的かつ学術的視点から非常に有益であり、本論文は十分に博士論文として審査に値するものと認めた。

以上のように本研究で得られた新しい技術と知見は、遺伝子組換えトマト果実に蓄積したミラクリンを商業化に向けて大量精製するための技術基盤を提供したことから産業上の価値が大きく、またミラクリンの味覚修飾作用の分子機構を解明するための新たな知見を提供したことから学術上の価値も大きい。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。