

氏名(国籍)	ばく 朴	へい きよん 憲 卿 (韓 国)
学位の種類	博 士 (農 学)	
学位記番号	博 甲 第 2548 号	
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 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	農学研究科	
学位論文題目	BIOCHEMICAL STUDIES ON THE ASPARTIC PROTEINASE FROM SUNFLOWER SEEDS (ヒマワリ種子のアスパラギン酸プロティナーゼの生化学的研究)	
主査	筑波大学教授	農学博士 日下部 功
副査	筑波大学教授	農学博士 祥雲 弘文
副査	筑波大学教授	農学博士 田 仲 可 昌
副査	筑波大学併任助教授	農学博士 小 林 秀 行 (食品総合研究所)

論 文 の 内 容 の 要 旨

プロティナーゼは触媒残基の種類により 4 グループに分類されている。その中でもアスパラギン酸プロティナーゼは、活性中心に 2 つのアスパラギン酸を持ち、動物、微生物由来の酵素に関してはその立体構造や酵素化学的性質、生理学的役割についても明らかにされている。一方、植物のアスパラギン酸プロティナーゼは特に種子に多く含まれており、大麦やイネの種子、朝鮮アザミの花に含まれる酵素が主に研究されているが、その構造と性質に関して十分解明されているとは言えない。また、ヒマワリ種子の搾油残さは現在家畜の飼料として利用されているが、残さの主成分の 1 つであるタンパク質の有効利用が期待されている。そこで、ヒマワリ種子に含まれるアスパラギン酸プロティナーゼを単離し、その諸性質を検討した。

ヒマワリ種子及びその発芽中のタンパク分解活性の変化を調べたところ、休眠種子中の活性は殆どがペプスタチンで阻害されるアスパラギン酸プロティナーゼ由来の活性であり、その活性は吸水と同時に減少しはじめ、2 日後にはおよそ 10% まで低下した。アスパラギン酸プロティナーゼ精製のサンプルとしては、その活性が最も高い休眠種子を用いた。種子のアセトンパウダーを pH5 の酢酸緩衝液に懸濁し、遠心分離後その上清を粗酵素液とし、ペプスタチンをリガンドとするアフィニティーゲルを用いて精製した。このステップでの収率は 65.7% であり、この画分をさらに DEAE-Sepharose FF を用いて精製したところ、3 つの画分に分かれ、全体の収率は 47% であった。DEAE-Sepharose FF により得られたピークをそれぞれ溶出順に I, II, III とした。還元剤非存在下では、I は SDS-PAGE で 38kDa のバンド、II, III では 29kDa と 9kDa のバンドを示し、還元剤存在下では I, II, III ともに 29kDa と 9kDa のタンパク質のバンドが観察された。これらのことから、I, II, III はそれぞれ 29kDa と 9kDa のサブユニットからなるが、I は S-S 結合を持ち、II, III は持たないと考えられる。それぞれの性質を検討した結果、I, II, III ともに至適 pH は 2.6-3.0、至適温度は 40℃、安定な pH 領域は 6 付近、また 25℃ 程度までは安定であった。

ヒマワリ種子アスパラギン酸プロティナーゼの 29kDa と 9kDa のサブユニットの N-末端アミノ酸配列をもとにプライマーを合成し、RT-PCR 及び 5', 3'-RACE を行い本酵素の cDNA をクローニングした。塩基配列から推定されるその一次構造と他の植物由来のアスパラギン酸プロティナーゼの一次構造を比較してみると 50-80% の相同性を示し、植物由来のアスパラギン酸プロティナーゼ特有の約 100 アミノ酸残基からなる植物特異的領域が確認

された。ヒマワリ種子アスパラギン酸プロテイナーゼと、高い凝乳活性を示す朝鮮アザミ由来の酵素との間には高い相同性（78%）が認められるが、ヒマワリの酵素には凝乳活性は認められないなどの特筆すべき性質も確認された。

次に酸化インスリンB鎖を用い精製酵素の基質特異性を検討した。その結果、他のアスパラギン酸プロテイナーゼと比較すると、それらと同様に疎水性アミノ酸で構成されたペプチド結合に良く作用するが、切断点が少ないことから更に特異性が厳密であることが示唆された。

アフィニティークロマトグラフィーで得られた酵素は、還元剤非存在下のSDS-PAGEで48kDa, 38kDa, 29kDa, 9kDaのバンドを示し、還元剤存在下では、34kDa, 29kDa, 14kDa, 9kDaのバンドが観察された。これらのタンパク質バンドのN-末端アミノ酸配列及びC-末端アミノ酸配列配列の解析により、48kDaの酵素からその他のバンドが自己触媒的に生成すること、また、この自己触媒のプロセッシングにより植物特異的領域が取り除かれ、ヘテロダイマーになることが明らかになった。更に、大麦のアスパラギン酸プロテイナーゼであるphytepsinの立体構造をもとにプロセッシング過程について検討を加えた結果、分子表面に位置している揺らぎの大きい部分からプロセッシングが起こることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

動物や微生物由来のアスパラギン酸プロテイナーゼの立体構造や酵素化学的性質、生理的役割などについては明らかにされているが、同酵素は植物にも広く存在しているにもかかわらず、その構造と諸性質については不明な点が多い。このような背景から申請者はヒマワリ種子の酸性プロテイナーゼの研究に着手した。同酵素は酸性プロテイナーゼの中で凝乳活性が微弱であることが特徴であった。研究を推進するにあたり、同酵素の精製は必須であるが、精製過程で同酵素は自分分解能において類例が少ない酵素であることがわかり、精製に苦勞し、長時間要した。しかし、試行錯誤を繰返し、同酵素の精製を完成し、その諸性質、特に自己分解のメカニズムを見事に解明した。一方、本酵素は疎水性アミノ酸領域のペプチドによく作用し、また、プロセッシングの過程ではplant-specific regionが取除かれヘテロダイマーになることを明らかにした。さらに、高い凝乳活性を示す朝鮮アザミの酵素とは78%の相同性が認められたが、ヒマワリ種子の酵素には凝乳活性が認められないなどの特筆すべき性質があることも明らかにした。

今後、本酵素の立体構造を含むプロセッシングの解析を進める必要があるが、申請者の一連の研究は、自己分解のメカニズムを見事に解明した点にあるが、一方、農学の食品分野との関連性が高く、また、ヒマワリ種子の搾油残さの酵素の利用に対する応用性にも期待できる研究成果は酵素化学の発展に寄与しており、高く評価できる研究である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。