

氏 名(本籍) あら ひら まさ お み
 荒 平 正 緒 美

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 643 号

学位授与年月日 平 成 14 年 3 月 7 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ダイズ11S型貯蔵タンパク質前駆体を成熟化する、新
 規なレグマチュレインに関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是
 教 授 中 島 佑
 教 授 五 味 勝 也

論文内容要旨

序論

植物の生活環の中で、最も物質生産能力の高い時期の1つが登熟期（開花してから完熟種子が出来るまでの期間を指し、ダイズ早生種の場合約60日である。）である。種子はそれ自体、独立した個体であり、次世代の植物体となる胚と、発芽初期の自家栄養的生育期（発芽後約2週間）を支える蛋白質、脂質などの貯蔵組織とに大別される。ダイズの場合、種子のタンパク態窒素は全重量の35~45%を占め、既知の種子でこの値を越えるものはない。15%程を中性脂肪が占め、澱粉粒はほとんどない。ところで、タンパク態窒素の約70%を占めるのが貯蔵タンパク質であり、その約60%が11S型タンパク質（グリシニン）である。このタンパク質はプレプロ型前駆体として膜結合型ポリゾーム上で合成され、リーダー配列除去後、ER内腔でオリゴマーを形成しゴルジ体を経て、小顆粒（vesicle）につめ込まれタンパク顆粒（protein bodies）内へ膜結合により放出蓄積されると考えられている。この11S型貯蔵タンパク質の特徴の1つは、タンパク顆粒内でプロ型タンパク質が酸性サブユニットになる領域のC-末端に位置するAsn残基のカルボキシル基側をただ1ヶ所切断することにより、サブユニット対（酸性サブユニットと塩基性サブユニットの対）を形成することである。

私が、本研究課題に取り組む契機となったのは、（1）貯蔵タンパク質グリシニンが何故Asn残基の後で切断されなければならないのか、（2）切断に関与する酵素の実体とその性質は何か、（3）当該酵素は植物でのみ特異的に発現し、動物には類似の酵素はないのか、という命題に解答を出したいという願望の為である。

本論文では、グリシニン型タンパク質前駆体をプロセスする酵素を精製する為の基質調製の戦略と、酵素の精製法およびその性質についての結果を示した後、この極めて不安定な酵素を用いてのAsn残基切断ルールの解析結果について述べる。次いでこの新規な酵素（レグマチュレインと命名）のcDNAおよび遺伝子のクローニングおよび

その推定一次構造の特徴を明らかにすると共に、大腸菌での発現実験の結果について示す。更に、このレグマチュレインの homologue をヒトの組織からクローニングすることに成功した。この cDNA を成熟型で発現するように加工して大腸菌で発現させたところ Asn-残基特異的な切断活性を確認した。これら一連の実験結果から、レグマチュレインファミリー酵素は少なくとも動植物に存在していることが示された。この事は、本酵素が単に種子貯蔵タンパク質のプロセッシングに関わるだけでなく動植物の生体中で広く機能しているものと考えた。

一方、タンパク質中の Asn 残基を特異的に切断するプロテアーゼとして、ヘモグロビナーゼ様タンパク質と称するタンパクであると主張するグループがある。我々はそのタンパク質をコードする cDNA を大腸菌で発現させた。このタンパク質は inclusion body を形成して不溶性であったが、そのタンパク質に対する抗体を作製した。この抗体を用いて種子から当該タンパク質を精製した。更にレグマチュレインからこのタンパク質成分を完全に分離することが出来た。Asn 残基切断活性の有無を、この精製タンパク質を用いて検討したが見出されなかった。更に、このタンパク質の発現を登熟各期に於ける発現状況をウェスタンブロット法で、又その mRNA の発現をノーザンブロット法で追究したところ、いずれの場合も登熟の後期に発現されること明らかとなった。この結果は到底中期(28-48DAF)に多量に発現されるグリシニン前駆体のプロセッシングに関与出来ないことは明らかである。

本論 ダイズ 11S 型貯蔵タンパク質前駆体を成熟化する、新規な酵素レグマチュレインに関する研究

登熟中に大量に発現する 11S 型種子貯蔵タンパク質グリシニン前駆体を成熟化する酵素をダイズ完熟種子から疎水クロマトグラフィーおよびコンカナバリン A クロマトグラフィー等を用いて精製した。

本酵素は、アスパラギン残基特異的なシステイン型のエンドプロテアーゼであり、レグマチュレインと命名した。本酵素は、ペプチドを基質として用いたときの至適温度 37 °C、至適 pH6.8、温度安定性 20 °C、pH 安定性 5.8-7.5 であった (Fig. 1-4)。精製した本酵素は、安定性が悪く約 4 時間で、活性がカラムからの溶出直後の約 50%にまで低下した (Fig. 5)。また本酵素は、コンカナバリン A に親和性があり、SDS-PAGE による相対分子質量 27.5kDa の糖鎖結合型と、糖鎖が完全に除去されていたか、又は一部除かれた 25.5kDa の成分が存在しており、イオンスプレーマススペクトロメトリーからは、糖鎖結合型は、22,358Da、糖鎖の一部欠損型は 22,197Da の 2 つのピークを示し (Fig. 6)、無糖鎖型は、21,389Da のピークを示した。これら 3 つの型のレグマチュレインから、N-末端、C-末端および内部のアミノ酸配列を決定した結果、同一の配列が認められ、N-末端のアミノ酸はヒスチジン、C-末端のアミノ酸はセリンであった。これらの配列を基にしてプライマーを作製し、PCR 法によって部分的なクローンを得た後に、これをプローブとして登熟初期 (18 日目) の cDNA ライブラリーからスクリーニングを行い、全長のクローンを得た。解析の結果、本 cDNA は、全長 1041bp であり、推定されるアミノ酸配列の内、N-末端から 21 残基のシグナルペプチドと C-末端側から 36 残基のプロペプチドが存在する (Fig. 7)。更に PCR 法を用いて遺伝子のクローニングも行い、解析の結果、cDNA 対応の遺伝子の全長は、3077bp であり、レグマチュレイン構造遺伝子は 4 つのイントロンによって 5 つのエクソンに分断されていることを明らかにした。リーダー配列およびプロ型領域に対応する領域を除く cDNA を用いてレグマチュレインを大腸菌で発現させ、その活性を確認する実験を行った。発現プラスミドの構築は、T7 プロモーターを利用した pET ベクターに成熟型 cDNA を in-frame に結合する方法をとった。発現タンパク質が可溶化し易い様に、大腸菌のシャペロニンを経過発現するベクター pKY206 を共存させた。その結果、レグマチュレインに対する抗体を用いたウエスタンブロット法によりレグマチュレインが可溶性画分に発現している

のを認めた。糖鎖のとれたタイプのレグマチュレインのマススペクトロメトリーにより得た分子量と、クローニングして得た推定アミノ酸配列を N-末端および C-末端配列分析から得た知見を基に決定した成熟型レグマチュレインの算定分子量とは完全に一致した。従って、コンカナバリン A との親和性が無いタイプのレグマチュレインには糖鎖が完全にはずれているとみなした。また、糖鎖の付いているレグマチュレインは、コンカナバリン A の親和力に差があり、コンカナバリン A との親和力の弱いレグマチュレインは、糖鎖分析の結果およびマススペクトロメトリーの結果から、糖鎖の非還元末端のマンノース残基が一つはずれているものと推定した。糖鎖のないレグマチュレインは、糖鎖のある成分と比較して、安定性が低下し易い傾向が認められた。レグマチュレインの持つ、基質タンパク質の表面に出ている Asn 残基のカルボキシル側を切断する活性が、全く相同性のないヘモグロビナーゼ様タンパク質にも存在すると主張する研究グループがいる。そこで、レグマチュレインの精製過程においてこのヘモグロビナーゼ様タンパク質の挙動を免疫化学的に追跡したところ、レグマチュレインと同一の画分にくることが多く、しかしながらこの混合物をクロマトフォーカシングで分離出来ることを見出した。分離したヘモグロビナーゼ様タンパク質にはレグマチュレイン活性はなかった (Fig. 8)。ノーザンブロット解析の結果、レグマチュレインは、基質となるグリシニン前駆体が発現する以前の登熟初期から登熟の後期まで持続的に発現するのに対して、ヘモグロビナーゼ様タンパク質は、登熟の後期に強く発現していた (Fig. 9)。

我々は、11S 型種子貯蔵タンパク質の構造的特徴を知るために銀杏種子の 11S 型貯蔵タンパク質 (ギンナシンと命名) をクローニングした。このギンナシン cDNA の推定一次構造はレグマチュレインの作用点である切断部位の配列が、Asn-Asn であることを示していた (Fig. 10)。

一方、ギンナシン成熟型タンパク質を精製した。酸性サブユニッ

トの C-末端配列解析は C-末端から N、G であり、塩基性サブユニットの N-末端解析は、N-末端から N・V・E・E ———— D・D¹⁷ を与えた。すなわちギンナシンプロセッシング酵素は、——GN NV EE ——を N↓N で切断していた。ギンナシンのプロ型タンパク質を大腸菌で発現・精製し、精製レグマチュレインを用いた *in vitro* プロセッシングを行った。ギンナシン前駆体はダイズ由来のレグマチュレインにより SDS-ゲル電気泳動により酸性サブユニットおよび塩基性サブユニットに相当する位置に泳動されるポリペプチドに 2 分された。各ポリペプチドの N-末端並びに C-末端解析から、ダイズ由来のレグマチュレインが天然のプロセッシングと同様に、ギンナシンを切断することが示された。このことは、酵素の由来が異なっても、他の植物の 11S 型貯蔵タンパク質前駆体を正しく成熟化することを意味している。次の疑問として、何故 Asn 残基特異的なプロテアーゼであるレグマチュレインが N と N の間のみを切断するのかということである。この為、ギンナシンの切断部位の一次配列を変換したオリゴペプチドを合成し、これを基質としてレグマチュレインによる切断のされ方を追究した。その結果、GNNVEE の様に N の後に V、I、L の様な疎水性アミノ酸がくると N は切断されないことが明らかとなった。従って、上記の配列では N と N の間のみが切断されることになる。

ところで、グリシニンを構成する 5 種類のサブユニット対分子種 (A1aB1b, A2B1a, A1bB2, A3B4 および A5A4B3) の内、A5A4B3 は 2 ヶ所の Asn 残基が切断される。そこで、同様に A5A4B3 前駆体を大腸菌で合成し、これを基質としてレグマチュレインで 2 ヶ所切断されるのか否かを検討した。その結果、A5A4B3 は *in vitro* 系で 2 ヶ所の Asn 残基の後で切断されて 3 つのサブユニット A5、A4 および B3 が出来ることが明らかとなった。分解の過程を追うことにより、A5A4 ↓ B3 が始めに起こり、次いで A5 ↓ A4 の切断が行われることをから、切断部位 (Asn のカルボキシル基側) の後 P2 の位置に I、V、L などの疎水性アミノ酸残基がきた場合、P1 位の Asn の切断速度が大きくなる (Fig.

11)ことを知った。すなわち、A5A4とB3の間の切断速度は、A5とA4のその約6倍にのぼる(Table 1)。

更に、ヒト組織からレグマチュレイン様タンパク質をコードするcDNAのクローニングを行った。このレグマチュレイン homologueの成熟型を大腸菌で上記と同様に発現させたところ Asn 残基の切断活性が確認できた(Fig. 12)。このことは、レグマチュレインファミリーが、植物特有のものではなく、動物にも広く存在していることを示唆するものである。

レグマチュレインにより、ダイズ種子貯蔵タンパク質グリシニンの前駆体が何故プロセスを受けるのかという命題に迫るため、グリシニン前駆体とグリシニンの溶解性の差に注目した。すなわち、グリシニンは、5種類のグリシニン分子種がヘテロに組み合せて6量体を形成した貯蔵タンパク質であり、塩可溶性であるが水には溶けないグロブリン系タンパク質である。この前駆体タンパク質は、3量体又は6量体をとっているが、水にも可溶である。つまり、前駆体タンパク質は成熟したグリシニンに較べて溶解性が非常に高い。これら溶解性の違いを、前駆体と *in vitro* でプロセスして成熟化したタンパク質とで比較した。結果は、前駆体タンパク質が、レグマチュレインにより溶解性を著しく低下させてタンパク顆粒内に自然に沈澱することを伺わせた。このことから、ER内腔に分泌されたグリシニン前駆体がゴルジ体を経て小顆粒(vesicle)に詰め込まれ液胞に運ばれて、膜融合により液胞内に放出される。このグリシニン前駆体は、液胞内のレグマチュレインにより Asn 残基の後で切断され、急激に溶解性が低下して、切断系から沈澱することにより自然と除かれる。従って、切断反応は常に一方向にのみ留りなく進行し、少量の酵素で多量の貯蔵タンパク質を処理・蓄積することが可能になるものと推定した。

まとめ

1. 種子貯蔵タンパク質グリシニンのプロ型前駆体を成熟化する酵素である新規なアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼ（レグマチュレイン）をダイズの種子から SDS 電気泳動的、N-および C-末端的およびマスマスペクトロメトリー的に単一になるまで精製し、タンパク化学的および酵素化学的性質について明らかにした。精製酵素は、約4時間で活性が半減するなど不安定であった。

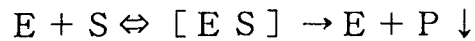
2. レグマチュレインは、その cDNA 及び遺伝子をクローニングし、この構造をタンパク化学的解析結果を比較したところ、プレプロ型の酵素であった。また、推定される糖鎖結合部位が1カ所存在した。完熟型 cDNA の大腸菌発現プラスミドを作成したところ、可溶区分に、酵素の存在を認めたので SDS で単一になるまで精製し、活性を調べたところ、プログリシニンを Asn の後で1カ所切断した。

3. 本酵素は、登熟初期（開花後18日目）から合成され始め、初め糖鎖の付いた成分のみであるが、完熟期には、糖鎖のとれた状態の酵素が大部分を占める。糖鎖の役割については、不明であるが、糖鎖のない酵素は不安定であるのに対し、糖鎖の付いた酵素は、やや安定な傾向がみられた。

4. レグマチュレインの切断ルールを検討する為、大腸菌で合成したプロ型グリシニンおよびオリゴペプチドを基質にした。その結果、アスパラギン残基のカルボキシル基側（P1）にロイシン、イソロイシン、バリンなど疎水性アミノ酸が存在すると切断しないが、（P2）に存在する場合は、P1位のアスパラギン残基の切断速度が増加した。

5. 11S 型貯蔵タンパク質の成熟化の意義については、プロ型のグリシニンは、レグマチュレインによる Asn 残基の切断を受けて酸性サブ

ユニットと塩基性サブユニットに S-S 結合を介して接続した状態で分かれ、この分子型の塩基性サブユニットはスタックして溶解性が著しく低下しプロテインボディー内に沈殿して溶液系から除去される。この product の系外除去によりプロセッシングが効率良く行われると考えた。



6. ヒト胎盤組織由来 mRNA からレグマチュレイン類似の配列を持つタンパク質の cDNA をクローニングして、大腸菌で発現させたところ、このタンパク質は、プロ型グリシニン Asn の後で切断すると共に Asn を含むオリゴペプチドをも Asn の後で切断した。このことは、レグマチュレイン様プロテアーゼがヒト組織にも存在することを意味する。

7. 他の研究グループがアスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼであると主張しているヘモグロビナーゼ様タンパク質は、レグマチュレインの精製過程で最後まで一緒の画分にくるタンパク質であるが、我々は本酵素と完全に分離した。この精製ヘモグロビナーゼ様タンパク質は、アスパラギン残基特異的エンドプロテアーゼはない。

8. この結果は、このヘモグロビナーゼ様タンパク質およびその mRNA の登熟期に於ける発現パターンからも明らかである。すなわち、ヘモグロビナーゼ様タンパク質の mRNA 及びタンパク質いずれの発現も、登熟の後期になっており、登熟 21 日目頃から発現し始める貯蔵タンパク質の成熟化に関与するものであれば、登熟の初期から発現していなければならない。

原著論文

1. **Arahira, M.** and Fukazawa, C. (1994) Ginkgo 11S seed storage protein family mRNA: unusual Asn-Asn linkage as post-translational cleavage site. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 597-605
2. **Arahira, M.**, Phan, V. C., and Fukazawa, C. Two post-translational cleavage sites in pro-A5A4B3 subunit of glycinin 11S-seed storage protein of soybean, are processed differentially by an asparagine-specific endoprotease (legumaturain). *Eur. J. Biochem.*, *In-press*.
3. **Arahira, M.** and Fukazawa, C. A novel asparaginyl residue-specific endoprotease, termed legumaturain, from human. *In preparation for Nature*
4. Kitamura, K., **Arahira, M.**, Itoh, Y. and Fukazawa, C. (1990) The complete nucleotide sequence of soybean glycinin A2B1a gene spanning to another glycinin gene A1aB1b. *Nucl. Acid Res.*, **25**, 4245
5. Itoh, Y., Kitamura, K., **Arahira, M.** and Fukazawa, C. (1993) Cis-acting regulatory region of the soybean seed storage 11S globulin gene and their interaction with seed embryo factors. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 973-984

参考論文

1. Yeboah, N. A., Arahira, M., Udaka, K. and Fukazawa, C. (1996) A rapid purification method for soybean Bowman-Birk protease inhibitor using hydrophobic interaction chromatography. (The first two authors contributed equally to this work) *Protein Expression and Purification* **7**, 309-314
2. Arahira, M., Nong, V. H., Kadokura, K., Kimura, K., Udaka, K. and Fukazawa, C. (1998) Molecular cloning and expression patterns of Cu/Zn-superoxide dismutases in developing soybean seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1018-1021
3. Arahira, M., Nong, V. H., Udaka, K. and Fukazawa, C. (2000) Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2649-2657
4. Yeboah, N. A., Arahira, M., Nong, V. H., Zhang, D., Kadokura, K., Watanabe, A. and Fukazawa, C. (1998) A class III acidic endochitinase is specifically expressed in the developing seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Mol. Biol.*, **36**, 407-415
5. Watanabe, A., Nong, V. H., Zhang, D., Arahira, M., Yeboah, N. A., Udaka, K. and Fukazawa, C. (1999) Molecular cloning and ethylene-inducible expression of *chib1* chitinase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 251-256
6. Wang, Y., Arahira, M. and Fukazawa, C. (1999) An isoelectric separation of soybean β -amylase isoforms and their enzymic characteristics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 726-730

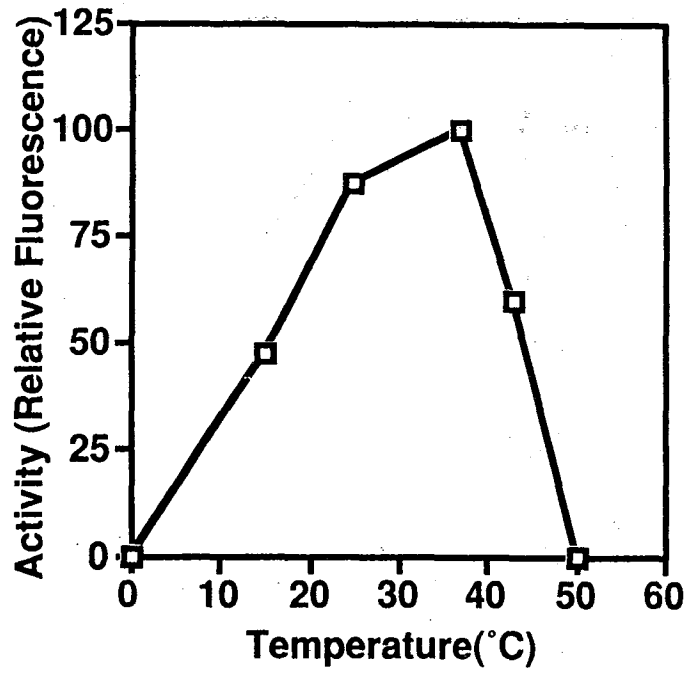


Fig. 1. Optimum temperature of legumaturain

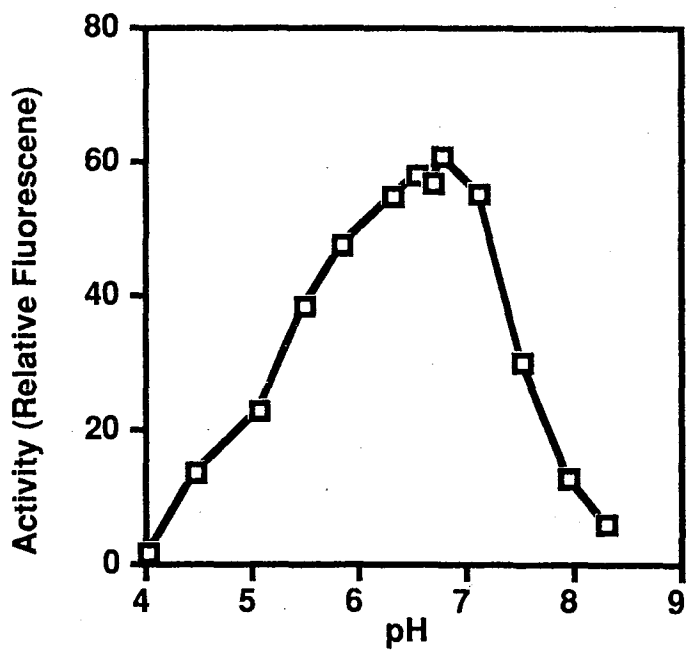


Fig. 2. Optimum pH of the legumaturain

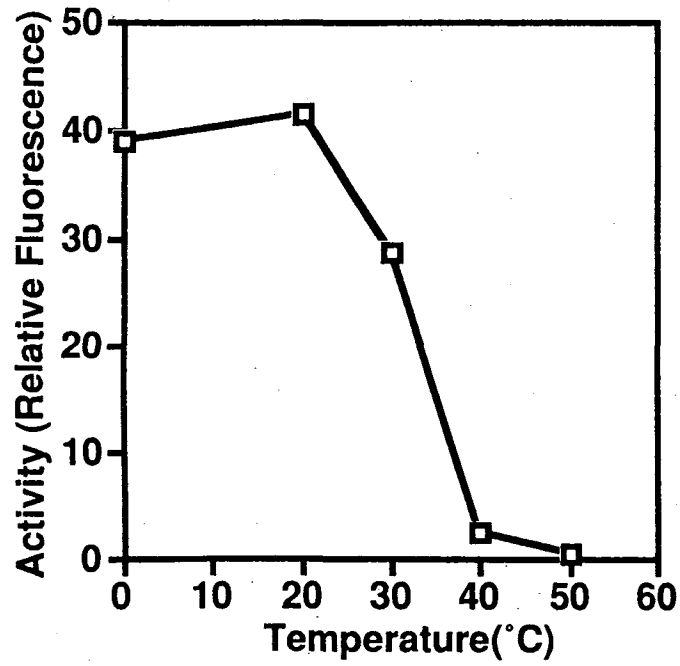


Fig.3
Thermostability of the legumaturain

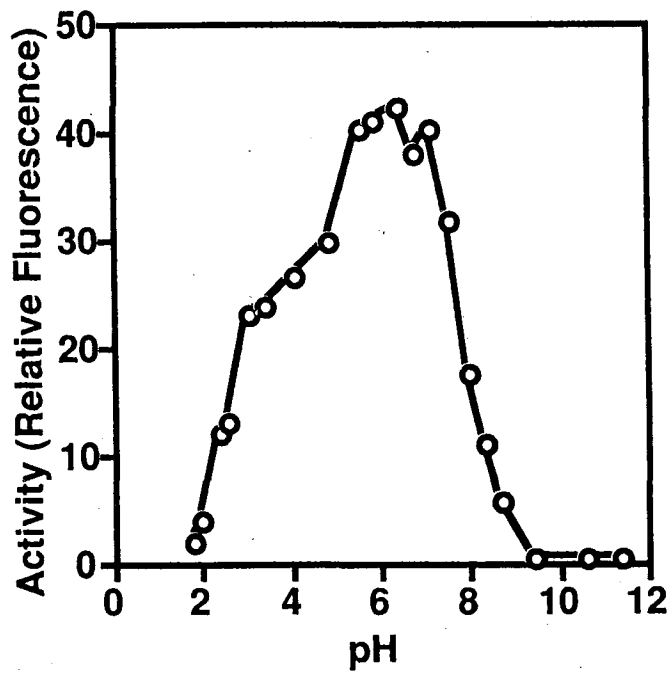


Fig.4
pH stability of legumaturain

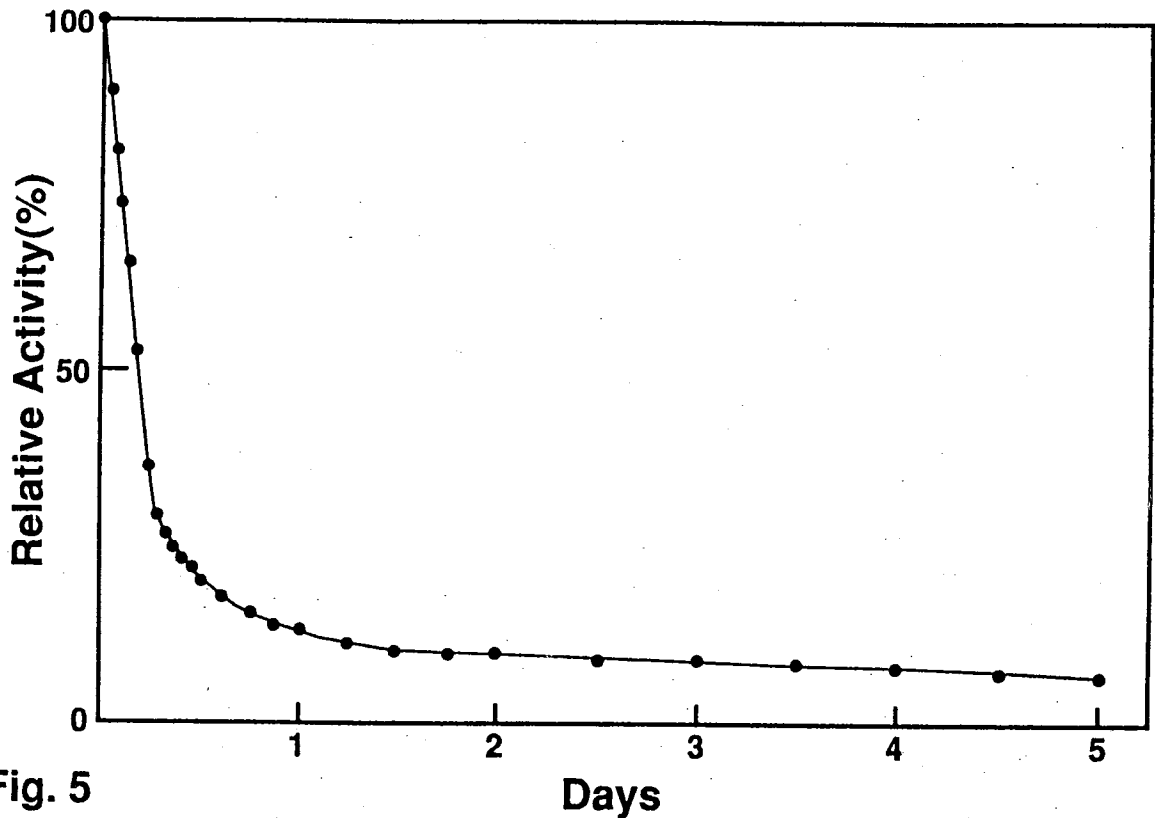


Fig. 5 Stability of enzymic activity in the purified legumaturain during storage

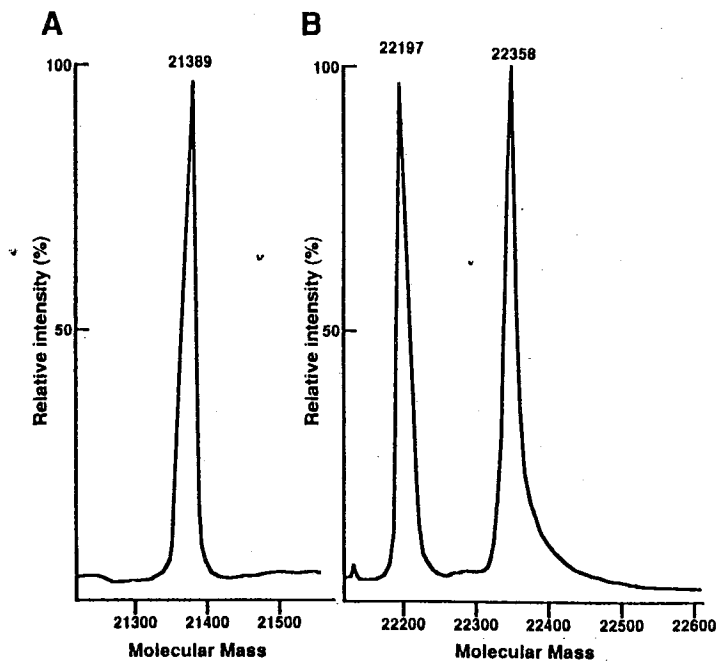


Fig. 6 Ion-spray mass spectrometry of legumaturain
 A; inactive form (passing-through Con A column),
 B; active form (adsorption of Con A column).

TTGGTGGTAGCTGTTACGAGTCAGCAAGAGAGAAATATCTTGTGAGTTGATTTCTGATC	60
CCAAATTGAGTTTGAGTTTCAGCCATGGTATCTGTTTCTCTGCTCTTATTCCTATCTTTC	120
M V S V S L L L F L S F	
TTTGCCTTCTTTGCACCCTCTGAATCTCAGGACAAAGTCTCGTTGGAATTGTA [○] ACTACGAA	180
F A F F A P S E S <u>(H) D K V S L E L Y Y E</u>	
AGCTTATGCCCTACAGCGCCAACCTTCATCGTGAATCACCTCCCAAAAATCTTCACCCCA	240
<u>S L C P Y S A N F I V N H L P K I F T P</u>	
GATCTTGCCCCAATCGTTACCTCAAACCTCGTTCCTTGGGGCAATGCCAAACTCCGTGCC	300
<u>D L A P I V H L K L V P W G N A K L R A</u>	
AACGCCACCTTTGACTGCCAGCATGGGCCATATGAGTGCTTGCTGAACACAGTTGAAGCC	360
<u>[N] A T F D C Q H G P Y E C L L N T V E A</u> .	
TGTGCAATTACATCTGGCCTCAACTCAGCAAACATTTTCTTTTCATCTACTGTGTTGAG	420
C A I H I W P Q L S K H F P F I Y C V E	
GATCTGGTGTTCAGAGTAAGCGTGAGGAATGGGAATCTTGT'TTTGAGAAACTGGATCTT	480
D L V F Q S K R E E W E S C F E K L D L	
GATTCCGGAACCTATTAATCAGTGTATAATAGTGAACATGGAAAACAGTTGGAGCTACAA	540
D S E P I N Q C Y N S E H G K Q L E L Q	
TATGCAGCTGAAACAAGTGCTCTGGAGCCTCCTCACAAGTATGTTTCCTTGGGTAGTTGTG	600
<u>Y A A E T S A L E P P H K Y V P W V V V</u>	
GATGGAGAACCCTCTATGAGGATTATGAGAACTTCTTAAGCTATCTTTGTAAGGCTTAT	660
<u>D G E P L Y E</u> D Y E N F L S Y L C K A Y	
AAAGGCACTGTTACACCCCAAAGTTGCACCCAAGCATCATACCTAAGAGAAGTGAATGCA	720
K G T V T P Q S C T <u>Q A S</u> [▲] Y L R E V N A	
AAGCCTAAGCATTTCGGTTTGTCTACAAGGACAGTGGGATATGCTAACATGGGAAAAAGTG	780
K P K H S V C Y K D S G I M L T W E K V	
AGGTCAACCATTGCATCATGGATGCACTAGATGAATCTTGGCAGTGCATTTTAGATGTGC	840
R S T I A S W M H *	
CAATGCTGCATTTAGTAGCAGTTTGTTCGTGTTATCTTGTGTGTAGTTGTGTTGATCCCT	900
CCAAAAGTGCAAATAGAACTTGTGATGCACATAAAAACCATATCGTACTCTCATAAAAAA	960
ATAAAACCATGATGTGTATGTGTATGAGGTACTTAAGTACAATATATATAGAGAGAGAAA	1020
AAAAAAGTAAGTGAATTCT-poly (A) 14	1041

Fig. 7 Nucleotide and deduced amino acids sequence of legumaturain

○ is N-terminus residue, the amino acid segments that could be identified by protein sequencing underlined. □ is putative N-glycosylation site, ▲ is cleavage site of putative propeptide.

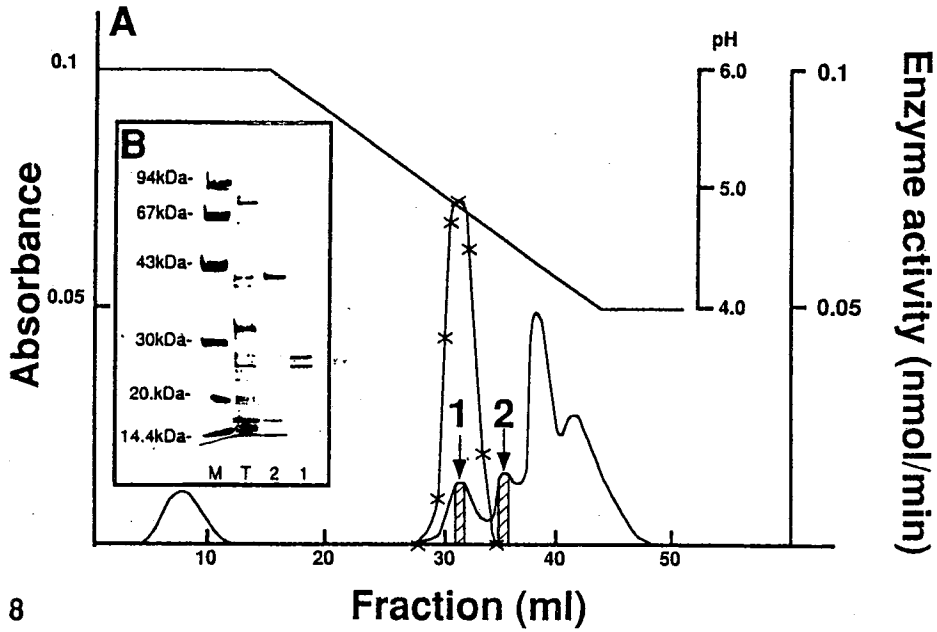


Fig. 8

Chromatofocusing pattern of the legumaturain

A: 1; legumaturain fraction, 2; hemoglobinase-like protein fraction, **B:** M; marker, T; before applied on chromatofocusing, 1; legumaturain fraction, 2; hemoglobinase-like protein fraction

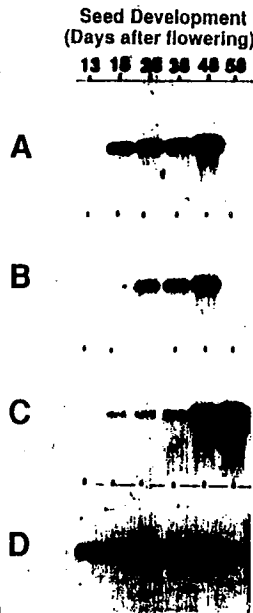


Fig. 9

Northern blot analysis of
A; A2 subfamily of glycinin,
B; A3 subfamily of glycinin,
C; hemoglobinase-like protein,
D; legumaturain

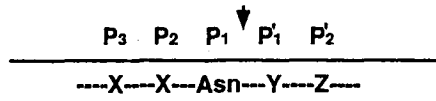

```

-----CAAAGATGGAGAACAACAACGTTATTGATATTGTTGGTTTGGTTATTTTCGATACAATGTTTCAAGGATTAATGCC
M E K Q T T L L I L L V C L L F S I Q C F T S N A -1
AGAGAGGCAGAAGTAGAACCGAGGAGAGAGCAGCTGCAGCAGTCATGCAGGTTCCAGCCTCTCAACGCACAGGAGCCACGCAGCGG
R E A E V E R R Q R E Q L Q Q S C R F D R L N A Q E P T Q R 30
ATAACATCAGAGGGTGGTCTGTGAGTTGTTAAACGTGGAGACAGCGAGCAATCCAAATGTCAGCGCTGCCCCACTGGCAGAGACA
I T S E G G S V E L L N V E D S E Q F Q C A G V A P L R E T 60
CTCAATCCCAACGCCCTTTCCGCTGCCAGATACACCAATACTCCCAATGGCCTACGTTGGTGAAGGTGAGGGCAGGCTTGGAGTTGTT
L N P N A L S L P R Y T N T P T H A Y V V E G E G R L G V V 90
TTCCCGGGTGTCCAGAAACGTTCCAAAGCTCCACGTCTAGAGGAGGCGAAGGCCAACAGACTCAAGAAAGGTCCCAGAAAGATAAGGCGA
F P G C P E T F Q S S T S R G G E G Q Q S Q E R S Q K I R R 120
*
GTCGGAGAGGAGATGCGTGGCTATTCCCTCGGGAGTCCCTACTGTTGTACAACGATGGTAACCGACGCCTCCAGATTGTGGCCATT
V R R G D V V A I P A G V A Y W L Y N D G N R R L Q I V A I 150
GCCGACACTTCCAACGATCAGAATCAGCTCGACAAACATATCGCCCTTCTATCTGGCTGGGCTCGCCCATCAGGTGCCCAAAAGCA
A D T S N D Q N Q L D Q T Y R P F Y L A G S A P S G A Q K A 180
GCAGGTGCAACATCAATTTGGTGATAACATCTTCAAGGATTCGACACCGACACATTTGGCTGAGGCGATGGGCATAGCCAGACTGCC
A G A T S I G D N I L Q G F D T D T L A E A H G I S Q D T A 210
AGACGCATTACGACAGACCAGAAGAAGGACTCAITGTCAAGGTGGAACGAGGCTCAGAATGCCCGGCCCTTCCGATGATTACGAG
R R I Q Q N Q K K G L I V K V E R G L R H P G P P S D D Y E 240
AGGCAGAGGGCAGGGGAGAAATATGTCGAGAAATGTACTGCTCTATGCTCTGAGACAAATGCCGATGATCCGAGGATGCTGAC
R E R E R E G N A N V E E L Y C S H R L R H N A D D S E D A D 270
*
GTGTATGTAAGAAATGGAGGCGGTTGAATACAGTGAACCGATTGAAGCTTCCGCTCGACTCCGATCCTTAAGATTGGCCCGGAGAGGGCC
V Y V R N G G R L N T V N R L K L P A L R S L R L G A E R G 300
ATTCTGCAACCGAATGCCATGTTCCGACCTTCGTTGATGCGCATGCAAGTCAATGATACGTGACGAGGGCAGGGCAGAATCCAAAT
I L Q P N A H F A P S W L N A H A S H V R D E R A G Q N P N 330
CGTCCAAACGAAGCCAGGAGAGTGTCCGACGGCCCTGTGAAAGAGGGCCAGTTTCTGTTAATCCGCAATGTCACGCAATGCCAAACAG
R P K R R Q E S V D G A V K E G Q F L V I P Q L H A I A K Q 360
GCTGAAAGGATGGGCTGGAGTGGATCAGCTTTACTACTTCCGACAGTCCAATTCGGTCCGACCTCACAGGAAGAACTCAGTGCCTAAG
A G K D G L E W I S F T T S D S P I R S T L T G R N S V L K 390
GCAATGCCTCAAGAAGTGGTGATGAACCGGTACAGAATCAATGAGAAGGATGCTCGGATTTGAGACGAAATCGAGAACATGAACCCATT
A M P Q E V V M N A Y R I N E K D A R D L R R N R E H E T I 420
ATTCTCTCCAACACCTCAACACCAGCAGCCGAGCAATGAATGAACACCATTTCCTTCCGCTCTCATGTGTTCAACGATCAATA
I L S F T P Q H Q Q P R A I E *** 435
TTCTCAGAGCCAAATAGCAATCCTATGTACACGACCGGCTTCCGCTCCTCGCATACATAACTAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACATCCACCCTTTTGCATCAATAATCATTCAATGTTCAATATACTACGATGATATATATATATATAATGACCATCCCAAGCTTTC
ATTC-A18

```

Fig. 10 Nucleotide sequence of a ginnacin (11S type storage protein from ginkgo) Arrow indicates the cleavage site of this ginnacin precursor.

-Preferentially-



This pattern belongs to a novel family of endoprotease.

X=Any aa; Y=Hydrophilic residue; Z=Hydrophobic residue such as Ile, Leu, or Val.

Fig. 11 Cleavage rules of legumaturain

Table 1 Cleavability of peptides containing A5A4B3 cleavage sites

Peptide	nmol/min/mg	Ratio
↓ QEQSNRRG(A5-A4)	0.29	1.0
↓ CETRNGVE(A4-B3)	1.80	6.3
↓ QEQSNRLG(modified A5-A4)	0.86	3.0

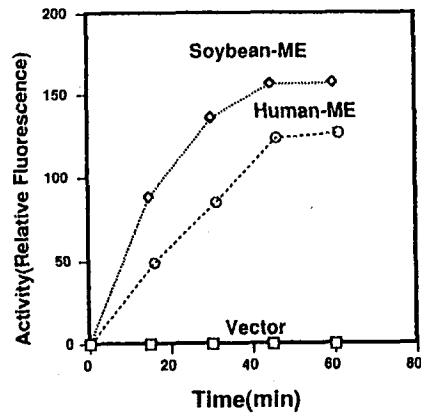


Fig. 12 Expressed legumaturain Activity
 Soybean-ME: soybean legumaturain,
 Human-ME: human legumaturain,
 Vector: pET/pKY206 vector

論文審査結果要旨

多くのタンパク質は、翻訳後に様々な特異的プロテアーゼによる切断（修飾）を受けることにより、生体内の適切な場所で適切な時に機能を発現する分子に変換される。従って、たとえ完全長のcDNAがクローニングされ、その塩基配列の解析からタンパク質の全一次構造が明らかになっても、活性型のタンパク質の構造は、当該タンパク質のN-末端並びにC-末端配列の解析なくしては確定しないことになる。ところで、翻訳後のタンパク質（前駆体タンパク質）の修飾（成熟化）に関する特異的プロテアーゼに関する研究は、一部を除いて著しく遅れているのが現状である。

本博士論文の提出者は、種子の貯蔵タンパク質の1つとして知られる11S型タンパク質の前駆体が、特定の領域にあるアスパラギン残基のカルボキシル基側で切断（one-point cleavage）を受けて成熟化する機構の解明を行うべく、主としてダイズ種子を用いて、11S型前駆体タンパク質をプロセスする新規な酵素（レグマチュレインと命名した）の分離同定に成功した後、その分子的、並びに酵素化学的特徴を世界で初めて明らかにした。更に、研究の遂行途上で他の研究グループがアスパラギン残基特異的プロテアーゼであるとしたタンパク質（レグメインあるいは液胞由来プロセッシング酵素と呼んでいる）は、当該活性を有さず、精製過程でレグマチュレイン画分に強く混在する当該酵素とは無縁のタンパク質であることを示した。研究は更に発展し、ヒト胎盤からレグマチュレインのホモログの精製に成功し、そのクローニングと大腸菌に於ける発現実験からアスパラギン残基特異的切断活性を確認した。

上記の先進的研究の遂行に当たりその隘路を越えるために、多くの新手法が生み出された。中でも重要な点は、精製が進むにつれて不安定化する酵素‘レグマチュレイン’を早く確実に単一分子にするために、消光性蛍光基質を開発したことである。これにより活性を手早く、定量的に測定することが可能となり、当該酵素活性を持つタンパク質分子の同定につながった。更に、レグマチュレインが当該酵素活性を持つことを明確に示す為、大腸菌で酵素を発現させた後、精製して活性を確認するなど、念には念を入れた研究態度も評価出来る。一方、レグマチュレインによるアスパラギン残基切断ルールの確立は、①天然では入手できない11S型貯蔵タンパク質前駆体を大腸菌で合成し、精製し基質とした。又、部位特異的変異導入により切断部位の配列を変換した11S型変異タンパク質前駆体を大腸菌で生産し、基質として供した。②この基質群へ精製酵素を作用させて得た切断タンパク質のN-およびC-末端解析から切断部位を確認している。③これらの結果に基づいてペプチドを合成してその切断ペプチドをHPLCで分離し切断部位を確認している。等、一連の手間のかかる実験を丁寧に積み上げることから帰納して安心出来る。最近ヒトの樹状細胞を用いた研究で、抗原の第一義的提示には、アスパラギン残基切断酵素が関与しているのではないかとの説が出されているが、当該研究者はヒト由来のレグマチュレイン活性を持つ酵素の精製、そのクローニングと大腸菌に於ける発現にも成功している。新たなる分野での発展が期待される。

以上、本論文の全体を通じて、研究動機、目的達成のための実験手法の構築、得られた結果に対する真摯な評価と確認の姿勢、及び将来への発展性などを慎重に吟味した時、審査員一同は、当該論文を纏めた此の研究者を東北大学博士（農学）の学位授与者に相当するものと認定した。