

氏名(本籍)	李 <sup>リ</sup> 鶴 <sup>ハク</sup> 洙 <sup>ス</sup>
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 3 8 1 号
学位授与年月日	昭 和 63 年 4 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻
学位論文題目	タバコ葉からの RuBisCO 蛋白の抽出利用に関する基礎的研究
論文審査委員 (主 査)	
	教授 水野 重樹
	教授 一島 英治
	教授 大平 幸次
	助教授 前 忠彦

# 論文内容要旨

## 序

Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4. 1. 1. 39, 以下 RuBisCO と略する) は光合成の CO<sub>2</sub> 固定と光呼吸の基質生成を同時に担う 2 つの機能をもつ酵素であるとともに、成熟葉においては可溶性蛋白質の半分を占め、地球上で最も多量に存在する蛋白質である。

RuBisCO はタバコ葉から初めて無色・無味・無臭の結晶体として単離された。タバコは他の植物の場合と違って、葉の抽出液を脱塩することで RuBisCO が比較的容易に結晶化する。また、タバコの RuBisCO は必須 Amino 酸の含量が FAO の標準蛋白食品のものに比べ 2 倍も高く、栄養価も casein より高い。

以上、すなわち結晶化の簡便さと栄養価の高いことから、最近タバコ葉の Homogenate を作り RuBisCO 蛋白を抽出単離し、医薬や人間の食料、または家畜の飼料として利用し、抽出残渣は喫煙物質の製造材料に利用することが考えられている。この process 全体は、Homogenized Leaf Curing-Tobacco Protein (=HLC-TOBPRO) と呼ばれている。しかし、この方法にはまだ数多くの問題点が残されており、その手法を実用化するにはいくつかの解明すべき点がある。

RuBisCO 蛋白の利用という観点からの重要な点は、純度の高い RuBisCO 蛋白を大量生産することである。そのためには、RuBisCO 蛋白含量の高いタバコ葉の生産とその葉から RuBisCO 蛋白を高収率で回収することが重要となる。しかしながら、今日までの RuBisCO 蛋白の利用に関する研究の多くは栽培単位面積当りのタバコ biomass の絶対量の増収法に集中しており、RuBisCO 蛋白含量の高いタバコ葉の生産という観点から扱ったものは少ない。また、葉からの RuBisCO 蛋白の回収率の向上のために抽出条件やその際、問題となる RuBisCO 蛋白の分解を詳細に検討した研究例はほとんど見られない。

そこで本研究は特に、タバコ葉の RuBisCO 蛋白の利用という点に注目し、その基礎となる以下の研究を行なった。まず、タバコを栽培し RuBisCO 蛋白の葉中での含量の変動と窒素栄養との関係を追跡した。次に、葉からの RuBisCO 蛋白の抽出条件と抽出の時に大きな問題となる抽出液中でのその分解について調べ、最後に、RuBisCO 蛋白の分解に関与する protease の性質について調べた。

## 第 1 章 タバコ葉の一生における RuBisCO の量的変動と protease 活性との関係

RuBisCO 蛋白含量は、葉の age によって大きく異なることが、水稻や小麦などの主要作物で明らかにされている。しかしタバコにおいては、RuBisCO 生産の上で参考になる詳細な研究例がほとんど見られない。本章では、RuBisCO 蛋白含量の高い葉の生産における基礎的な知見を得るために、葉の一生を通して RuBisCO 蛋白量の変動、窒素栄養の影響、そしてタバコ葉の抽出液から RuBisCO 蛋白を回収する際に問題となってくる protease 活性と葉 age との関係につい

て追跡した。

## タバコ葉の一生における RuBisCO の量的変動

葉の一生を通して RuBisCO の量的変動を調べた。7 葉期の苗を 4-liter pot に移植し、ガラス室内で栽培した。下から数えて 10 番目の葉を試料とし、その成長・老化の過程について調べた。すなわち、葉長が 1 cm になった日を出葉の初日とし、葉の先端部が枯死するまで 5 日おきに分析を行なった。可溶性蛋白質は、Kjeldahl 窒素量に蛋白係数 6.25 をかけて算出し、RuBisCO 含量は可溶性蛋白画分を SDS-PAGE を行なった後に、Densitometer (Shimadzu CS-930) で定量した。

葉一枚当りの可溶性及び不可溶性蛋白質の量は葉の展開がほぼ終わる出葉後 20 日目頃に最大に達した。その後は、両画分の蛋白量ともに徐々に減少し続けたが、Chlorophyll 含量の減少が著しくなった 35 日頃を境に、急に減少した。

可溶性蛋白質中に占める RuBisCO の量的割合は、葉の出葉展開に伴い急激に増加し展開終了直後の出葉後 20 日目頃には 60% 程度までに達したが、老化後期には 25% 前後にまで減少した (Fig. 1)。

このことから、RuBisCO は葉の展開期において活発に生合成され、老化期においては他の蛋白質に比較してより早く分解される蛋白質であることがわかった。また、RuBisCO 含量は Chlorophyll 含量と高い正の相関関係が認められ、葉色は RuBisCO 蛋白含量の高い葉を収穫するための実用的な判断基準として有効であることを確認した。

## RuBisCO 含量に及ぼす窒素栄養の影響

培養液の窒素濃度を変えて砂耕栽培し、その第 13 番目の葉について 2 週間おきに Sampling し、葉中の RuBisCO 含量を分析した。

窒素の増施によって葉一枚当りの新鮮重、可溶性蛋白量、および RuBisCO 含量の増加が認め

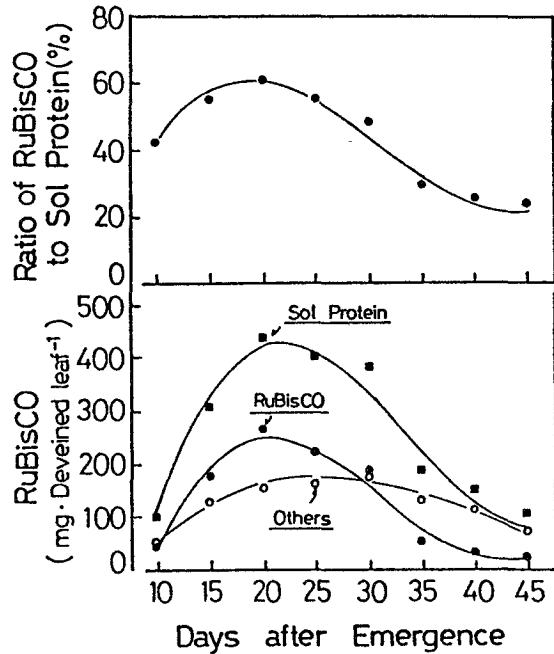


Fig. 1 Changes in the ratio of RuBisCO to soluble protein and RuBisCO content in the 10th leaf during the life span of tobacco leaf. The amount of soluble protein was determined as the N content with Nessler's reagent after Kjeldahl digestion, using TCA precipitate, and the amount of protein was calculated by multiplying its N content by 6.25. The ratio of RuBisCO to soluble protein was determined using SDS-PAGE with a Dual-wavelength Chromato Scanner (Shimadzu, CS-930) at 565nm.

られた。このことより窒素栄養を十分にすることが、RuBisCO量の増大に有効であることがわかった。

## RuBisCOの消長と protease 活性との関係

葉の一生を通して、RuBisCO 蛋白の消長と protease 活性との関係を調べた。

protease 活性は、葉の粗抽出液を用い、pH 5.5, 7.0 および 8.5 の条件下で、casein を基質に40℃で3時間 incubation し測定した。

protease の活性は葉令によらず常に酸性側でアルカリ側より高かった。そして、これらの活性は RuBisCO の含量が著しく減少する老化初期から中期にかけては徐々に上昇し、葉の枯死の直前に急上昇した (Fig. 2)。

このような結果は、RuBisCO 蛋白含量の高いタバコ葉の生産において、収穫する葉の age が重要であることを示している。すなわち RuBisCO 蛋白の抽出利用のためのタバコ葉の収穫時期は、RuBisCO 含量の高い出葉後20日目頃から、protease 活性が上昇する前の出葉後30日目の間が適当であると結論された。

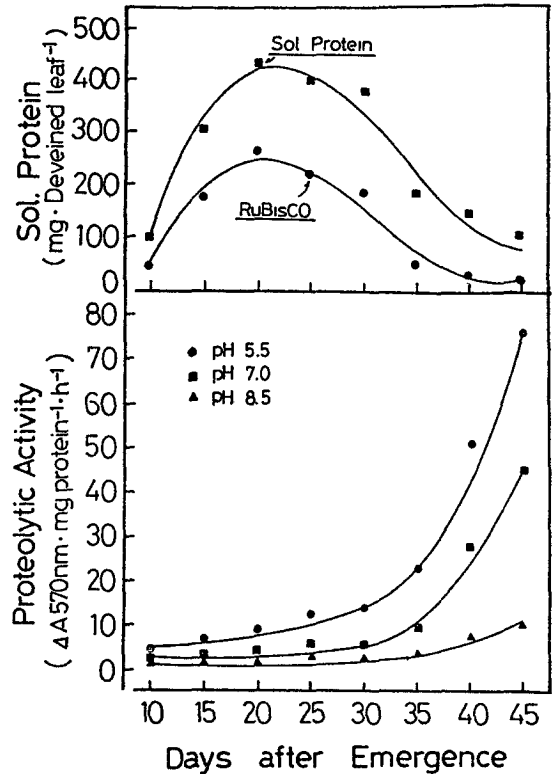


Fig. 2 Changes in soluble protein content and casein-proteolytic activity in the 10th leaf during the life span of tobacco leaf. The crude extracts were desalted on Sephadex G-25 equilibrated with 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 7.0), and used to assay proteolytic activity. The reaction was carried out at 40°C for 3h, and terminated by 7.5% (w/v) TCA. The amounts of acid soluble amino acids were determined by Ninhydrin reaction.

## 第2章 タバコ葉 RuBisCOの抽出条件とその分解

第1章において、葉の一生を通した RuBisCO 含量の消長と protease 活性との関係について詳細に調べた。その結果、葉の収穫時期が重要な因子であることと、抽出にあたって問題となる protease 活性は老化後期に急上昇することがわかった。

本章では収穫した葉より RuBisCO を、可能な限り大量にかつ未変性の状態で抽出できる buffer の条件を、葉令の異なる葉を用いて詳細に検討した。

### 磨碎 buffer の pH が、葉蛋白の抽出及び分解に及ぼす影響

可溶性蛋白の抽出及び分解に及ぼす pH の影響を pH 5.5 から 8.5 の範囲で調べた。蛋白分解活性は、それぞれ異なる buffer で調製した粗抽出液を、40°C、3 時間の incubation か、または 0°C で 24 時間保存した後に残存する蛋白量から求めた。

抽出蛋白量は酸性側の buffer で低く、その傾向は生長葉にくらべ老化葉でより著しかった。蛋白の抽出量が一番多かった pH 7.5 に比べ、pH 5.5 においてはその 84~73% ほどであった。粗抽出液中の RuBisCO 蛋白の分解活性は酸性側の pH 5.5 で最も高く、その傾向は生長中の葉よりも老化葉で特に著しかった (Fig. 3)。

すなわち、タバコ葉の可溶性蛋白質の調製の際の buffer の条件としては、pH 7.5 付近の中性域が適当で、しかも老化葉よりも生長中の葉がより有利であることがわかった。

### 磨碎 buffer の構成成分の影響

磨碎 buffer の構成成分として一般によく添加される還元剤をはじめ、glycerol, EDTA 等のいくつかの成分について、それらの可溶性蛋白の抽出及び分解に及ぼす影響を調べた。

検討した構成成分中、NaCl の添加は抽出蛋白量を 15% ほど増加させ、そして 12.5% (v/v) の glycerol の添加は、特に低温で長時間保存する時、蛋白の分解を抑える効果がみられた。

しかし、30mM 2-mercaptoethanol や 1mM EDTA の添加は incubation の

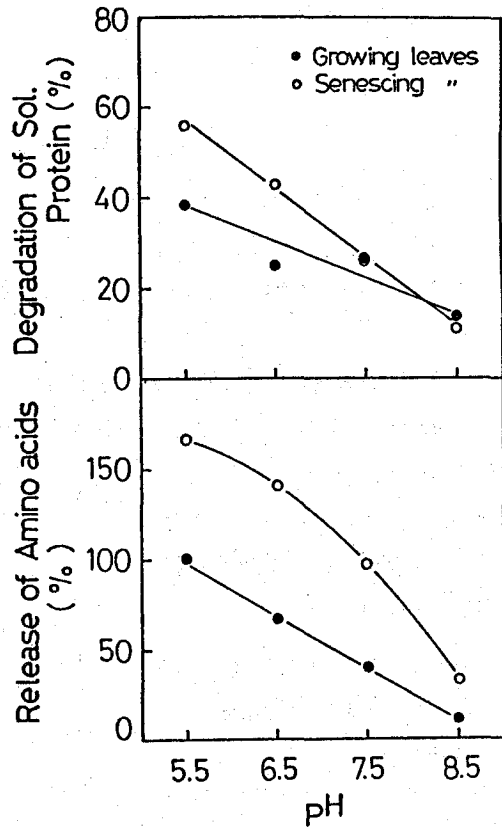


Fig. 3 Effects of pH on degradation of soluble protein and release of amino acids in crude extracts at 40°C for 3h.

Table 1 Effects of 2-ME on degradation of soluble protein and release of amino acids

	2-ME	Incubation			LSD	
		0h	3h at 40°C	24h at 0°C	5%	1%
Sol. Protein mg·ml <sup>-1</sup> (%)	Without <sup>a)</sup>	1.93 (100)	0.71 (37)	1.90 (98)	0.03	0.04
	With <sup>b)</sup>	1.87 (100)	0.39 (21)	1.59 (85)		
Amino acids μmol·ml <sup>-1</sup> (%)	Without <sup>a)</sup>	26.0 (100)	43.2 (166)	29.5 (113)	1.3	1.8
	With <sup>b)</sup>	28.9 (100)	73.8 (255)	38.6 (134)		

Senescent leaf disks were ground in 0.1M Citrate-phosphate buffer (pH 5.5) only (a) or the same buffer containing 30mM ME (b).

温度に関わらず蛋白の分解を著しく促進することが認められた (Table 1)。

### 第 3 章 タバコ粗抽出液中の protease の種類とその性質

第 2 章で、抽出 buffer の pH は蛋白の抽出量及び分解に大きく影響し、酸性側の buffer に 2-mercaptoethanol を添加した場合、可溶性蛋白質の分解を著しく促進することがわかった。本章では、粗抽出液中の RuBisCO の分解に関与する protease の性質について調べた。

#### タバコ葉からの RuBisCO の結晶化

protease による RuBisCO 蛋白の分解を見るため必要な RuBisCO 蛋白を、Lowe の方法をもとに一部改良した操作により結晶として得た。SDS-PAGE で調べた結晶 RuBisCO 蛋白の純度は 96% で、RuBisCO 結晶は 3 ヶ月間の間は SDS-PAGE で調べた限り分解されなかった。

#### RuBisCO 蛋白を含まない protease 酵素液の調製法の検討

protease による RuBisCO の分解の様子を正確に知るためには、RuBisCO が含まれていない酵素液を調製して反応に用いる必要がある。そのため、第 2 章の結果を考慮して、RuBisCO が残存していない protease 酵素液の調製法及びその利用性を検討した。

粗抽出液に Gel 濾過と DEAE-cellulose chromatography 法を直接用いる方法は、RuBisCO 蛋白の除去に有効でなかった。様々な方法を検討した結果、粗抽出液の pH を 5.5 に調整し 40°C で 3 時間 pre-incubation することが、粗抽出液からの RuBisCO 蛋白の除去に有効であることがわかった。

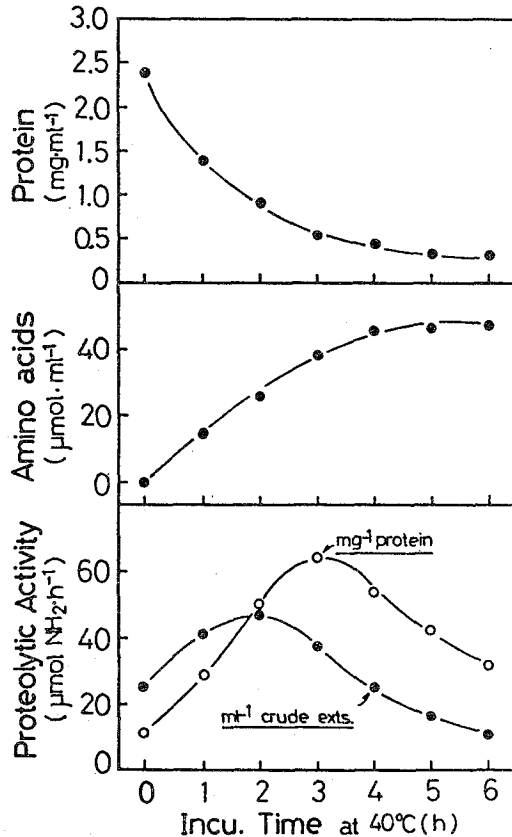


Fig. 4. Changes in the amounts of protein and amino acids, and proteolytic activity in the crude extracts at 40°C and pH 5.5 as a function of time. The senescent leaves were homogenized with 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5), containing 30 mM 2-ME.

その際、proteaseの総活性、および蛋白あたりの比活性はともに上がることがわかった(Fig.4)。これは、粗抽出液中には不活性型のproteaseが存在し、それらが、pre-incubationによって活性化されたか、またはproteaseの不活性化因子がpre-incubationにより除かれたことなどに起因した結果と思われた。粗抽出液のpre-incubation法は、protease活性を低下させずに粗抽出液中のRuBisCO蛋白を除去できることから、粗抽出液中のproteaseによるRuBisCO蛋白の分解を見るための酵素液の調製法として利用できると判断した。

### 粗抽出液中のproteaseの性質について

老化葉を用い、pre-incubation法で粗protease酵素液を調製したのち、硫酸分画、DEAE-celluloseカラムクロマトで分画を行なった(Fig.5)。

caseinを基質として測ったproteaseの活性は、非吸着画分と吸着画分に分けられ、吸着画分では3つの肩をもつ大きな一つpeakとして現われた。吸着画分を4つのFractionに分け、それぞれ濃縮してからSephadex G-100でゲル濾過し、活性画分の中央部を集め、それぞれの画分のproteaseの性質を比較した。

至適pHはいずれのpeak画分もpH 5.0~5.5にあつて、そのpH条件下でRuBisCO蛋白を分解した。protease inhibitorに対する影響を調べたところ、DEAE-cellulose非吸着画分と吸着画分とにおいて大きな差が見られた。

非吸着画分の活性はthiol, serine, metal, aspartic proteaseのinhibitorによってはほとんど阻害されなかった。

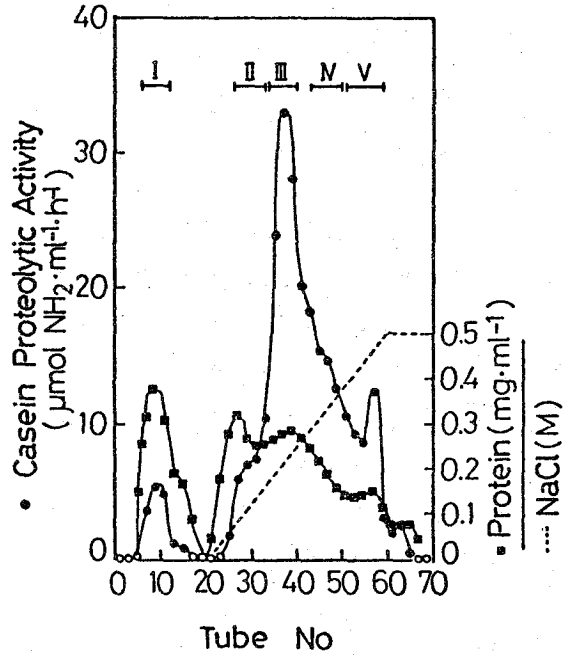


Fig. 5 DEAE-Cellulose chromatography. Each tube contained 5ml. Protein was measured by dye-binding method(Esen,1978), and casein-proteolytic activity was assayed at 40°C for 3h.

Table 2 Effects of protease inhibitors on proteolytic activity of each fraction

Effectors	Relative Activity				
	Fc. I	Fc. II	Fc. III	Fc. IV	Fc. V
Control	100	100	100	100	100
5mM ME	103	113	250	169	202
0.1% SDS	84	81	55	73	77
10μM LPT	107	105	67	42	64
5mM IAA	103	92	65	40	61
2mM PMSF	85	47	32	93	77
10mM EDTA	108	112	103	122	130
5mM DANM	87	109	103	103	86

それに対し、吸着画分の Fraction は activator や Inhibitor によって Fraction ごとに異なる程度で影響を受けていた (Table 2)。

これらのことにより、タバコ葉の粗抽出液には、serine protease, thiol protease を主体とした複数の protease が存在しており、DEAE-cellulose により分画された各 Fraction にはこれらが異なった比率で混入していると考えられた。

## ま と め

タバコ葉の RuBisCO 蛋白の抽出利用という観点から、純度の高い RuBisCO 蛋白の大量生産のための基礎的な研究を行ない、以下の結果を得た。

- 1) RuBisCO 蛋白は葉の展開期において活発に生合成され、老化期においてはより早く分解される蛋白であることがわかった。またこの蛋白は葉の一生において Chlorophyll 含量と高い正の相関関係が認められ、葉色は RuBisCO 蛋白含量の高い葉を収穫するための実用的な判断基準として有効であることを確認した。
- 2) RuBisCO 蛋白生産のための葉の収穫時期は、RuBisCO 蛋白含量が最大に達した出葉後 20 日目頃から、protease 活性が上昇する前の出葉後 30 日目の間が適当であると結論された。
- 3) RuBisCO 蛋白の抽出の際の buffer の条件としては、RuBisCO 蛋白の抽出量が多くかつその分解度が低い pH 7.5 付近の中性域が適当で、粗抽出液を低温で長時間保存する時、glycerol の添加は RuBisCO 蛋白の分解を抑えることが明らかにされた。
- 4) 老化したタバコ葉より調製した粗抽出液には、酸性側で RuBisCO 蛋白を強く分解する serine protease, thiol protease を中心とする複数の protease が存在することが示された。それらは DEAE-cellulose chromatography により、5 つの Fraction にわけられ、protease inhibitor による阻害の程度や RuBisCO 蛋白の分解のしかたは、それぞれの Fraction で微妙に異なっていることが認められた。



## 審査結果の要旨

光合成におけるCO<sub>2</sub>固定酵素としてのRuBisCO (Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) は、成熟葉では可溶性蛋白の約半分を占め、植物葉中でもっとも多量に存在する蛋白である。タバコ葉からはRuBisCOが比較的容易に結晶として得られその栄養価の高いことから、近年、この蛋白をタバコ葉の磨砕液から単離して医薬あるいは飼料として利用し、抽出残渣を緩やかな喫煙物質の製造に用いることが提案されている。

本論文は、タバコ葉蛋白の利用に関して、RuBisCO含量の高い葉の生産と、高収率での蛋白抽出条件を中心として基礎的問題を解明したものである。

まず栽培実験により、タバコ葉の一生におけるRuBisCOの量的変化、窒素栄養の影響、抽出液中のprotease活性の変動などを調べた。RuBisCO蛋白生産のための葉の収穫時期は、この蛋白含量が最大に達する出葉後20日目頃から、protease活性が上昇する以前の出葉後30日目の間が適当であること、蛋白含量とクロロフィル含量とは高い正の相関関係があるので葉色はRuBisCO含量の多い葉を収穫するための有効な基準として実用的であることを確認した。

抽出条件として、pH7.5付近の中性bufferが適当であり、粗抽出液を低温で長時間保存するときにはglycerolの添加がRuBisCO分解を抑えることなどを認めた。さらに、老化葉で高まる蛋白分解活性は酸性側で強く、それには性質の異なる複数のproteaseが関与することを明らかにした。

以上のように、本論文はタバコ葉からのRuBisCO蛋白の抽出利用に関する基礎的問題を解析したものであり、著者は農学博士の学位を授与される資格を有するものと審査員一同は判定した。