

学位論文題名

甘味誘導タンパク質ミラクリン、クルクリンおよび
耐熱性甘味タンパク質マビンリンの遺伝子工学的研究

学位論文内容の要旨

一般に、タンパク質は味細胞上の味覚受容体を刺激することができないので味が無い。甘味タンパク質(モネリン、ソーマチン、マビンリン、ブラゼイン)および甘味誘導タンパク質(ミラクリン、クルクリン)は味覚受容体を刺激するごく限られたタンパク質である。これらのタンパク質は、その特異な作用から甘味の発現機構の解明に有力な手がかりを与えるものと期待されている。また、低濃度で甘味を呈するので、副作用のない低カロリー甘味剤として利用することが考えられている。

甘味タンパク質および甘味誘導タンパク質のうち、マビンリン、ミラクリン、クルクリンの精製および構造決定は、横浜国立大学の栗原らにより行われたものである。今後、これらのタンパク質の構造と活性に関する研究を進めるためには、これらの遺伝子レベルでの研究が必要であると考えられる。

本研究では、マビンリン同族体タンパク質の構造および性質を解析することにより、マビンリンの熱安定性と構造の関係を明らかにした。次に、ミラクリンおよびマビンリンcDNAのクローニングを行い、これらの前駆体の構造を明らかにした。さらに、遺伝子工学的手法により、大腸菌、酵母、タバコを用いてミラクリン、クルクリン、マビンリンの発現・生産系の確立を試みた。

1. 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの構造と熱安定性

まず、従来の精製品の純度を高めるため、さらにイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを行い、精製マビンリンⅠ-Ⅰ、ⅢおよびⅣを得ることに成功した。

マビンリン同族体の熱安定性を調べた。その結果、マビンリンⅡ、Ⅲ、Ⅳの甘味活性は80℃で1時間加熱しても失活しなかったが、Ⅰ-Ⅰのそれは失活した。

マビンリンⅠ-Ⅰ、Ⅲ、Ⅳのアミノ酸配列およびⅠ-Ⅰ、Ⅱのジスルフィド結合位置を決定した。すでに決定されているマビンリンⅡのアミノ酸配列と、本研究で決定したマビンリンⅠ-Ⅰ、ⅢおよびⅣのアミノ酸配列を比較したところ、高い相同性があることがわかった。また、マビンリンⅠ-ⅠおよびⅡのジスルフィド結合位置を決定したところ、両者のジスルフィド結合位置は完全に一致した。したがって、ジスルフィド結合が熱安定性の差異の主要な原因にはなっていないことが明らかになった。マビンリンⅠ-Ⅰと他の同族体の熱安定性は大きく異なるのに、Ⅰ-Ⅰと他の同族体のアミノ酸配列順序は非常によく似ている。とくに、Ⅰ-ⅠとⅢではアミノ酸が3個(A鎖の22番目、A鎖の32番目、B鎖の47番目)違うだけである。このうち、Ⅰ-ⅠA鎖の32番目のアミノ酸はⅣに存在しないし、Ⅰ-ⅠA鎖の22番目のアミノ酸はⅡで置換がみられない。したがって、残りの1個のアミノ酸(B鎖の47番目)が熱安定性に大きく寄与していることが明らかになった。

2. 耐熱性甘味タンパク質マビンリンⅡのcDNAクローニングおよび大腸菌における発現

マビンリンⅡ cDNAのクローニングを行い、マビンリンⅡ 前駆体は、シグナルペプチド20残基、N末端延長ペプチド15残基、成熟マビンリンⅡ A鎖33残基、リンカーペプチド14残基、成熟マビンリンⅡ B鎖72残基およびC末端延長ペプチド1残基からなっていることを明らかにした。

大腸菌を宿主として組換えマビンリンⅡの発現を試みた。その結果、抗マビンリンⅡ血清と交差反応を示す分子量約15,000のタンパク質の発現を確認した。発現したタンパク質を精製し、甘味活性を測定したところ、活性を認めた。

3. 甘味誘導タンパク質ミラクリンのcDNAクローニングおよび酵母、タバコにおける発現

ミラクリンcDNAのクローニングを行い、ミラクリン前駆体は、シグナルペプチド29残基および成熟ミラクリン191残基からなっていることを明らかにした。

ミラクリンmRNAの時期特異的発現を調べた。その結果、ミラクリンmRNAはすでに3週目の実において発現しており、その後8週目まではほぼ同程度に発現していた。抗ミラクリン血清を用いた実験によると、ミラクリンタンパク質は受粉後8週目になってから多量に生合成されていた。したがって、ミラクリンのmRNAは早期に発現し、8週目になるとさらにミラクリンの生合成を厳密に制御する機構が働き、成熟ミラクリンが生合成をするものと考えられる。

酵母を宿主として、組換えミラクリンの発現を試みた。その結果、ミラクリン前駆体タンパク質を発現することに成功した。得られたタンパク質の粗精製物の甘味誘導活性を測定したところ、甘味誘導活性は認められなかった。今回構築した系は、ミラクリンの発現量が微量であったため、イムノプロットングにおいてのみ検出することができた。しかし、ノーザンブロット分析からは菌体内にミラクリンmRNAが安定に存在していることが示唆された。したがって、タンパク質の発現量が微量であるのは、mRNAの構造あるいはコドンの使用頻度に起因する翻訳効率の低さ、または、菌体内プロテアーゼによるタンパク質の分解が原因である可能性が考えられる。

タバコを宿主として、組換えミラクリンの発現を試みた。タバコ遺伝子へのミラクリン遺伝子の導入はアグロバクテリウムを用いたリーフディスク法により行った。その結果、植物体破碎液上清に、抗ミラクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した。

4. 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における発現

大腸菌を宿主として、マルトース結合タンパク質-クルクリン融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の上清に、抗クルクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した。次に、得られたタンパク質の融合部分を切断し、組換え体クルクリンの活性を測定したところ、甘味活性および甘味誘導活性は認められなかった。今回確立した系を用いることにより、はじめて可溶性タンパク質としてクルクリンを得ることに成功した。しかし、これにより得られた組換えクルクリンに、活性は認められなかった。これは、組換えクルクリンの立体構造が、天然クルクリンのそれと異なっていたためと考えられる。

次に、大腸菌を宿主として、チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の上清に、抗クルクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した。今回確立した系では、菌体内でのジスルフィド結合形成が可能になるため、組換えクルクリンが天然クルクリンと同様な立体構造を形成し、活性を有するクルクリンが得られることを期待している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	栗原堅三
副査	教授	有賀寛芳
副査	助教授	三宅教尚
副査	助教授	加藤宏幸

学位論文題名

甘味誘導タンパク質ミラクリン、クルクリンおよび 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの遺伝子工学的研究

申請者は長年、甘味誘導タンパク質と甘味タンパク質に関する研究を行ってきたが、このほどその研究を上記の論文にまとめ、博士論文として提出してきた。審査委員会では、上記の論文を慎重審議した。

一般に、タンパク質は味細胞上の味覚受容体を刺激することができないので味が無い。甘味タンパク質（モネリン、ソーマチン、マビンリン、ブラゼイン）および甘味誘導タンパク質（ミラクリン、クルクリン）は味覚受容体を刺激するごく限られたタンパク質である。これらのタンパク質は、その特異な作用から甘味の発現機構の解明に有力な手がかりを与えるものと期待されている。また、低濃度で甘味を呈するので、副作用のない低カロリー甘味剤として利用することが考えられている。

甘味タンパク質および甘味誘導タンパク質のうち、マビンリン、ミラクリン、クルクリンの精製および構造決定は、横浜国立大学の栗原らにより行われたものである。今後、これらのタンパク質の構造と活性に関する研究を進めるためには、これらの遺伝子レベルでの研究が必要であると考えられる。

申請者は、マビンリン同族体タンパク質の構造および性質を解析することにより、マビンリンの熱安定性と構造の関係を明らかにした。つぎに、

ミラクリンおよびマビンリン cDNA のクローニングを行い、これらの前駆体の構造を明らかにした。さらに、遺伝子工学的手法により、大腸菌、酵母、タバコを用いてミラクリン、クルクリン、マビンリンの発現・生産系の確立を試みた。

1. 耐熱性甘味タンパク質マビンリンの構造と熱安定性

まず、従来の精製品の純度を高めるため、さらにイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを行い、精製マビンリンおよびを得ることに成功した。つぎに、マビンリン同族体の熱安定性を調べた。その結果、マビンリン II, III, IV の甘味活性は 80℃で 1 時間加熱しても失活しなかったが、I-1 のそれは失活した。つづいて、マビンリン I-1, III, IV のアミノ酸配列を決定した。マビンリン同族体のアミノ酸配列を比較したところ、マビンリン I-1 と他の同族体の熱安定性は大きく異なるのに、それらには高い相同性があることがわかった。とくに、I-1 と III とではアミノ酸が 3 個違うだけである。このうち、A鎖の 32 番目のアミノ酸は IV に存在しないし、A鎖の 22 番目のアミノ酸は I-1 と II で同じであった。したがって、残りの 1 個のアミノ酸（B鎖の 47 番目）が熱安定性に大きく寄与していることを明らかにした。

2. 耐熱性甘味タンパク質マビンリン II の cDNA クローニングおよび大腸菌における発現

マビンリン II の cDNA のクローニングを行い、マビンリン前駆体は、シグナルペプチド 20 残基、N末端延長ペプチド 15 残基、成熟マビンリン A鎖 33 残基、リンカーペプチド 14 残基、成熟マビンリン B鎖 72 残基および C末端延長ペプチド 1 残基からなっていることを明らかにした。

つぎに、大腸菌を宿主として組換えマビンリンの発現を試みた。その結果、抗マビンリン血清と交差反応を示す分子量約 15,000 のタンパク質の発現を確認した。発現したタンパク質を精製し、甘味活性を測定したところ、活性を認めた。

3. 甘味誘導タンパク質ミラクリンの cDNA クローニングおよび酵母、タバコにおける発現

ミラクリン cDNA のクローニングを行い、ミラクリン前駆体は、シグナルペプチド 29 残基および成熟ミラクリン 191 残基からなっていることを明らかにした。つぎに、ミラクリン mRNA の時期特異的発現を調べた。その結果、ミラクリン mRNA はすでに 3 週目の実において発現しており、その後 8 週目までほぼ同程度に発現していた。抗ミラクリン血清を用いた実験によると、ミラクリンタンパク質は受粉後 8 週目になってから多量に生合成されていた。したがって、ミラクリンの mRNA は早期に発現し、8 週目になるとさらにミラクリンの生合成を厳密に制御する機構が働き、成熟ミラクリンが生合成をするものと考えられる。

つぎに、酵母を宿主として、組換えミラクリンの発現を試みた。その結果、ミラクリン前駆体タンパク質を発現することに成功した。得られたタンパク質の粗精製物の甘味誘導活性を測定したところ、甘味誘導活性は認められなかった。今回構築した系は、ミラクリンの発現量が微量であったため、イムノブロッティングにおいてのみ検出することができた。しかし、ノーザンブロット分析からは菌体内にミラクリン mRNA が安定に存在していることが示唆された。したがって、タンパク質の発現量が微量であるのは、mRNA の構造あるいはコドンの使用頻度に起因する翻訳効率の低さ、または、菌体内プロテアーゼによるタンパク質の分解が原因である可能性が考えられる。

つぎに、タバコを宿主として、組換えミラクリンの発現を試みた。その結果、ミラクリンタンパク質を発現することに成功した。しかし、ミラクリンの発現量が微量であったため、イムノブロッティングにおいてのみ検出することができた。

4. 甘味誘導タンパク質クルクリンの大腸菌における発現

大腸菌を宿主として、マルトース結合タンパク質—クルクリン融合タンパク質の発現を試みた。その結果、可溶性タンパク質としてクルクリンを得ることに成功した。しかし、これにより得られた組換えクルクリンに、

甘味活性および甘味誘導活性は認められなかった。これは、組換えクルクリンの立体構造が、天然クルクリンのそれと異なっていたためと考えられる。

つぎに、大腸菌を宿主として、チオレドキシン-クルクリン融合タンパク質の発現を試みた。その結果、菌体破碎液の上清に、抗クルクリン血清と交差反応を示すタンパク質の発現を確認した。今回確立した系では、菌体内でのジスルフィド結合形成が可能になるため、組換えクルクリンが天然クルクリンと同様な立体構造を形成し、活性を有するクルクリンが得られることを期待している。

以上のように、申請者の論文は、甘味誘導タンパク質および甘味タンパク質に関する多くの興味ある知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるにふさわしい論文と判定した。