

氏名	ベガム シャミマ BEGUM SHAMIMA
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲第308号
学位授与年月日	平成15年 9月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Cloning and Characterization of Multivalent Protease Inhibitor in Chicken Egg White (鶏卵白中の多価プロテアーゼインヒビターのクローニングとその特性)
学位論文審査委員	(主査) 加藤 昭夫 (副査) 松富直利 森嶋伊佐夫 松田英幸 柴田 均

学位論文の内容の要旨

The multivalent protease inhibitor in chicken egg white termed as ovoinhibitor was subjected to cloning and characterization. Although ovoinhibitor can be potentially used for industrial application, the properties of ovoinhibitor were not well investigated. In order to elucidate the structural and functional properties, recombinant ovoinhibitor was constructed by genetic engineering. Chicken ovoinhibitor cDNA was prepared by RT-PCR using chicken oviduct mRNA. The ovoinhibitor cDNA was successfully cloned downstream from the AOXI promoter of pPICZ α A plasmid vector to facilitate its expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The pPICZ α A carrying the ovoinhibitor cDNA was integrated into the *Pichia* genome. The expression and secretion of recombinant ovoinhibitor in *Pichia pastoris* were successfully performed. The recombinant ovoinhibitor had a molecular weight 49 kDa, just as the native ovoinhibitor, and showed inhibitory activity against trypsin, chymotrypsin and elastase.

An attempt was carried out to express the small fragment of the elastase inhibitory domain as part of ovoinhibitor in *Pichia pastoris*. The elastase inhibitor fragment, consisting of the sixth and seventh domains in ovoinhibitor, was genetically fragmented and successfully integrated into the *Pichia pastoris* genome. The 15 kDa recombinant elastase domain was secreted in to the cultivation medium. The recombinant elastase inhibitor domain showed inhibitory activity against elastase and chymotrypsin. The same inhibitory activity of the fragmented domain against elastase suggests the correct folding of the domain in *Pichia pastoris*. Thus it can be concluded that recombinant ovoinhibitor might become an excellent research tool that may contribute in the food industries. However, the industrial applications of ovoinhibitor are limited because of their susceptibility to heat, organic solvents and some proteolytic attacks. Therefore ovoinhibitor galactomannan conjugate was prepared by Maillard reaction in dry state to make resistant the protein from unfavorable conditions. The resulting ovoinhibitor-galactomannan

conjugates showed almost the same inhibitory activity for trypsin, chymotrypsin and elastase as untreated ovo-inhibitor. The conjugates showed stronger heat stability and better emulsifying properties than untreated ovo-inhibitor. These results suggest that the ovo-inhibitor-galactomannan conjugate can be used as a protease inhibitor having heat stability and excellent emulsifying properties for industrial application.

論文審査の結果の要旨

卵白に存在するオボインヒビターはトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、微生物由来プロテアーゼなどに広く阻害活性を示す多価のプロテアーゼ阻害蛋白質であるが、その特性についての研究が少なく、その詳細な機能については不明な点が多い。近年、遺伝子工学的な手法の発展により、こうした機能未知のタンパク質の解析を行うことが可能になっている。本研究では、遺伝子工学とタンパク質工学的手法を用いて、この興味深い蛋白質の機能解析を行った。

第一部ではニワトリ輸卵管組織からオボインヒビターの mRNA を抽出し RT-PCR 法により cDNA を作成し、酵母 *Pichia pastoris* 発現系で分泌することに成功し、オボインヒビターの特性を検討することを可能にした。また、オボインヒビターのエラスターゼ阻害ドメインの cDNA を作成し、酵母で発現分泌することにも成功し、今後各プロテアーゼ阻害ドメインの cDNA を作成し、酵母発現系で分泌し特性を研究する方向を明らかにした。酵母発現系で得られたオボインヒビター (OVI) は卵白中に存在するものと同様に、グリコシル化 OVI と非グリコシル化 OVI の存在が確認された。本研究では非グリコシル化 OVI の性質を検討したところ、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼに対して阻害活性を示すことが確認された。また、エラスターゼドメインはエラスターゼに対してのみならず、キモトリプシンに対しても阻害活性を示すことが示された。本研究により、OVI の 7 個のプロテアーゼ阻害ドメインをそれぞれ独立に cDNA を作製し、各々の性質を調べることが可能となったので、今後より詳細に各ドメインの役割、相互作用、糖鎖結合箇所が検討できると思われる。

第二部ではオボインヒビターの産業的な利用を拡大するための高機能化を目的として、多糖修飾オボインヒビターの作製を化学試薬を使用せずに、自然に生じるメイラード反応を利用して行った。オボインヒビターは多価のプロテアーゼに対して阻害作用があるために、医薬・食品への利用が考えられてきたが、アレルゲン性が問題となり、その利用が妨げられている。本研究室ではすでにオボインヒビターを多糖修飾することによって、その抗原性を著しく低減化できることを確認しているので、この多糖修飾により、プロテアーゼ阻害作用が保持されているかどうかを確認することは残された重要な課題である。こうして多糖修飾オボインヒビターの機能が検討された。その結果、多糖修飾してもオボインヒビターのプロテアーゼ阻害作用は全く影響を受けないことが示された。また、多糖化により耐熱性が著しく改変されることが明らかにされた。すなわち、オボインヒビターは 100℃ に加熱するどすべての阻害活性が消失するが、多糖化オボインヒビターは、100℃ に加熱してもトリプシン阻害活性は 80% 保持され、キモトリプシン阻害活性は 60% 保持された。しかし、エラスターゼ阻害活性は 20% しか保持されず、この原因として C-末端側に阻害ドメインがあることが考察された。また、多糖化により、その乳化性が著しく改変できることも示され、産業的な利用が可能であることが示された。

本研究は卵白オボインヒビターの機能解析、その産業的な利用にとって意義のある研究として位置づけられるものであり、博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。