

高メチオニン含有大豆グリシニン cDNA の調製

CLONING OF cDNAs ENCODING SOYBEAN GLYCININ SUBUNITS WITH HIGHER CONTENTS OF METHIONINE

内海 成・鬼頭 誠（京都大学食糧科学研究所）

Shigeru UTSUMI and Makoto KITO

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

The nucleotide sequences of cDNA encoding glycinin $A_{1a}B_{1b}$ and A_2B_{1a} subunits, which are richer in methionine than other subunits, from var. Shirotsurunoko were determined and compared with those in the case of var. Bonminor. The comparison showed the differences in the nucleotide and amino acid sequences in coding regions of both cDNAs between cultivars. In addition, we observed the presence of an alternate cDNA encoding $A_{1a}B_{1b}$ subunit in var. Shirotsurunoko. These results suggest the occurrence of polymorphism of glycinin subunit genes among cultivars and even within a single cultivar. We constructed artificial glycinin subunit cDNAs by interchanging the domains of methionine-rich subunits and inserting synthetic oligonucleotide with four methionine codons. In order to study the consequences of methionine enrichment to glycinin subunits on their ability to assemble and to exhibit functional properties, we have established the expression system of glycinin subunit cDNAs employing *Escherichia coli*. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 9, 5-9, 1988.

大豆たん白質栄養研究会で明らかにされてきたように、大豆たん白質は成人に対して制限アミノ酸を持たない¹⁾。しかし、他の植物たん白質との併用や、乳幼児を対象にする際、高含硫アミノ酸大豆たん白質が利用されることが望ましい。大豆たん白質はグリシニンとコングリシニンを主要成分としているが、グリシニンの方が栄養性で優れている²⁾。グリシニンのサブユニットは A_1B_1 タイプ ($A_{1a}B_{1b}$, $A_{1b}B_2$, A_2B_{1a}) と A_3B_4 タイプ (A_3B_4 , $A_5A_4B_3$) に分類されるが、前者の方が、メチオニン含量が高い。そこで、前者のグループに属するサブユニットをコードする完全鎖長 cDNA をクローニングして塩基配列を決定するとともに、微生物における発現系の確立を計った。

実験方法

cDNA ライブラリーの調製

登熟中期の大豆種子（シロツルノコ）より、バナジ

ルリボスクレオシドコンプレックスの存在下で RNA を抽出した。オリゴ d(T) セルロースカラムクロマトグラフィーにより、ポリ(A)RNA を調製し、ショ糖密度勾配遠心分離によりグリシニン mRNA-リッチ画分を得た。この画分を鋳型として、Okayama-Berg 法³⁾に従って cDNA ライブラリーを調製した。

$A_{1a}B_{1b}$ および A_2B_{1a} cDNA の同定

本研究に先立って、 A_1B_1 タイプサブユニットをコードする不完全鎖長 cDNA (pGST8) を得ていた。pGST8 をプローブとして、 $A_{1a}B_{1b}$ をコードする cDNA (pGST4-2-3-5, 4-2-11-10) と A_2B_{1a} をコードする cDNA (pGST4-3-1-4) をスクリーニングした。

塩基配列分析

cDNA の塩基配列は M13 を用いるジデオキシ法⁴⁾で決定した。

発現プラスミド pKGA $_{1a}B_{1b}$ Full, A_2B_{1a} Full の構築

pGST4-2-11-10, 4-3-1-4 より、cDNA 部を NcoI,

ACAACCTCAAACATTCTCTCCATTGGTC	27
CTTAAACACTCATCAGTCATCACCATTGCCAAGCTAGTTTTTCCCTTTGTTTTCTGCTTTTCAGTGGCTGCTGCTTCGCT	108
MetAlaLysLeuValPheSerLeuCysPheLeuLeuPheSerGlyCysCysPheAla	-1
* TTCAGTTCCAGAGAGCAGCTCAGCAAAACAGTGCAGATCCAAAACCTCAATGCCCTCAAACCGGATACCGTATAGAG	189
PheSerSerArgGluGlnProGlnGlnAsnGluCysGlnIleGlnLysLeuAsnAlaLeuLysProAspAsnArgIleGlu	27
T CAG AAG GAG GGG C T C A T T G A G A C A T G G A A C C C T A A C A A G C C A T T C C A G T G T G C C G G T G T T G C C C T C T C G T G C A C C	270
SerGluGlyGlyLeuIleGluThrTrpAsnProAsnAsnLysProPheGlnCysAlaGlyValAlaLeuSerArgCysThr	54
C T C A A C C G C A A C G C C T T C G T A G A C C T T C T A C A C C A A C G G T C C C C A G A A A T C T A C A T C C A A C A A G G T A A G G T A T T T T	351
LeuAsnArgAsnAlaLeuArgArgProSerTyrThrAsnGlyProGlnGluIleTyrIleGlnGlnGlyLysGlyIlePhe	81
G G C A T G A T A T A C C C G G T T G T C C T A G C A C A T T T G A A G A G C C T C A A C A C C T C A A A A G A G G A C A A A G C A G C A G A C C A A	432
GlyMetIleTyrProGlyCysProSerThrPheGluGluProGlnGlnProGlnGlnArgGlyGlnSerSerArgProGln	108
G A C C G T C A C C A G A A G A T C T A T A A C T T C A G A G A G G T G A T T G A T C G C A G T G C C T A C T G G T T T G C A T G G T G G A T G T A C A A C	513
AspArgHisGlnLysIleTyrAsnPheArgGluGlyAspLeuIleAlaValProThrGlyValAlaTrpTrpMetTyrAsn	135
A A T G A A G A C A C T C C T G T T G T T G C C G T T T C T A T T A T T G A C A C C A A C A G C T T G G A G A A C C A G C T C G A C C A G A T G C C T A G G A G A	594
AsnGluAspThrProValValAlaValSerIleIleAspThrAsnSerLeuGluAsnGlnLeuAspGlnMetProArgArg	162
T T C T A T C T T G C T G G G A A C C A A G A G A C A A G A G T T T C T A A A A T A T C A G C A A G A G C A A G G A G G T C A T C A A A G C C A G A A G G A A A G	675
PheTyrLeuAlaGlyAsnGlnGluGlnGluPheLeuLysTyrGlnGlnGluGlnGlyGlyHisGlnSerGlnLysGlyLys	189
C A T C A G C A A G A A G A A A A C A A G A A G G C A G C A T A T T G A G T G G C T T C A C C C T G G A A T T C T T G G A A C A T G C A T T C A G C G T G	756
HisGlnGlnGluGluGluAsnGluGlyGlySerIleLeuSerGlyPheThrLeuGluPheLeuGluHisAlaPheSerVal	216
G A C A A G C A G A T A G C G A A A A C C T A C A A G G A G A G A A C G A A G G G A A G C A A G G G A G C C A T T G T A C A G T G A A A G G A G G T C T G	837
AspLysGlnIleAlaLysAsnLeuGlnGluAsnGluGlyGluAspLysGlyAlaIleValThrValLysGlyGlyLeu	243
A G C G T G A T A A A A C C C C A C G G A C G A G C A C A A A G A C C C A G G A A G A G A A G A A G A A G A G A G G A T G A G A A G C C A C A G	918
SerValIleLysProProThrAspGluGlnGlnGlnArgProGlnGluGluGluGluGluGluAspGluLysProGln	270
T G C A A G G G T A A A G C A A A C A C T G C C A A C G C C C C G A G G A A G C C A A A G C A A A A G C A G A A A A T G G C A T T A C G A G A C C A T A	999
CysLysGlyLysAspLysHisCysGlnArgProArgGlySerGlnSerLysSerArgArgAsnGlyIleAspGluThrIle	297
T G C A C C A T G A G A C T T C G C C A C A A C A T T G G C C A G A C T T C A T C A C T G A C A T C T A C A C C C T C A A G C C G G T A G C G T C A A A C C	1080
CysThrMetArgLeuArgHisAsnIleGlyGlnThrSerSerProAspIleTyrAsnProGlnAlaGlySerValThrThr	324
G C C A C C A G C C T T G A C T T C C C A G C C C T C T C G T G G C T C A G A C T C A G T G C T G A G T T T G G A T C T C T C C G C A A G A A T G C A A T G T T C	1161
AlaThrSerLeuAspPheProAlaLeuSerTrpLeuArgLeuSerAlaGluPheGlySerLeuArgLysAsnAlaMetPhe	351
G T G C C A C A C T A C A A C C T G A A C G C G A A C A G C A T A A T A C G C A T T G A A T G G A C G G C A T T G A T A C A A G T G G T G A A T T G C A A C	1242
ValProHisTyrAsnLeuAsnAlaAsnSerIleIleTyrAlaLeuAsnGlyArgAlaLeuIleGlnValValAsnCysAsn	378
G G T G A G A G A G T T T G A T G G A G A G C T G C A A G A G G G A C G G G T G C T G A T C G T G C C A C A A A A C T T T T G G T G G C T G C A A G A T C A	1323
GlyGluArgValPheAspGlyGluLeuGlnGluGlyArgValLeuIleValProGlnAsnPheValValAlaAlaArgSer	405
C A G A G T G A C A A C T T C G A G T A T G T G C A T T C A A G A C C A A T G A T A C A C C C A T G A T C G G C A C T C T T G C A G G G G C A A A C T C A T T G	1404
GlnSerAspAsnPheGluTyrValSerPheLysThrAsnAspThrProMetIleGlyThrLeuAlaGlyAlaAsnSerLeu	432
T T G A A C G C A T T A C C A G A G A A G T G A T T C A G C A C A C T T T C A A C C T A A A A G C C A G C A G G C C A G G C A G A T A A G A A C A C A A C	1485
LeuAsnAlaLeuProGluGluValIleGlnHisThrPheAsnLeuLysSerGlnGlnAlaArgGlnIleLysAsnAsnAsn	459
C C T T T C A A G T T C T G G T T C C A C C T C A G G A G T C T C A G A A G A G A G C T G T G G C T T A G A G C C C T T T T T G T A T G T C T A C C C A C T	1566
ProPheLysPheLeuValProProGlnGluSerGlnLysArgAlaValAla	476
T T T G T C T T T T T G C A A T A G T G C T A G C A A C C A A T A A A T A A T A A T A A T A A T A A T A A G A A A A C A A A G G C T T A G C T T G C C	1647
T T T T G T C A C T G T A A A A T A A T A A T G T A A G T A C T C T A T A A T A A G T C A C G A A A C T T T T G C G G G A A T A A A A G G A G A A A T T C C	1728
A A T G A G T T T T C T G T C - poly(A)	1743

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of A_{1a}B_{1b} cDNA from var. Shirotsurunoko. Amino acid residues are numbered in the NH₂ to COOH direction starting with the NH₂-terminal residue of the mature acidic polypeptide. * and ** indicate the NH₂-terminal residues of the mature acidic and basic polypeptides, respectively. The AATAAA sequences in the 3'-untranslated region are underlined. Nonidentical codons between var. Shirotsurunoko and Bonminori were squared.

Table 1. Effects of amino acid replacements on side-chain properties of the residues and the secondary structure around the amino acid replacements

Residue No.	Amino acids		Hydropathy index**		Secondary structure	
	S. T.*	B. M.*	S. T.	B. M.	S. T.	B. M.
23	Asp	Gly	-3.5	-0.4	β -Turn	β -Turn
89	Pro	Ser	-1.6	-0.8	β -Turn	β -Turn
117	Phe	Ser	2.8	-0.8	Random	Random
341	Glu	Gly	-3.5	-0.4	α -Helix	β -Turn

* S. T. and B. M. refer to Shiotsurunoko and Bonminori, respectively.

** The index from (Kyte and Doolittle, 1982)

PvuII で切り出し、発現ベクター pKK233-2⁵⁾の SD 配列直後の NcoI 部へ挿入することにより、シグナルペプチド部を含む発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}Full, A₂B_{1a}Full を構築した。

発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}X の構築

A_{1a}B_{1b}cDNA のシグナルペプチド部を B_a13I で段階的に除去し、発現ベクター pKK233-2 の修復 NcoI 部位に挿入して、発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}X を構築した。

結果と考察

高メチオニン含有グリシニン cDNA の調製

本研究に先立って調製していた A₁B₁ タイプの不完全鎖長 cDNA (pGST8) をプローブとして、Okayama-Berg 法³⁾ によって調製した cDNA ライブラリーより、完全鎖長 cDNA を A_{1a}B_{1b}cDNA について 2 種、(pGST4-2-3-5, 4-2-11-10), A₂B_{1a}cDNA について 1 種選別し、その塩基配列を決定した (Fig. 1)。pGST4-2-3-5 と 4-2-11-10 の塩基配列は完全に一致した。既に報告されていたボンミノリ品種のもの^{6,7)} との比較は、品種による塩基配列、アミノ酸配列の差異、つまり多形性を示していた。A_{1a}B_{1b}cDNA において、両品種で差異の見られる部位についてハイドロパシーインデックス⁸⁾と Chou-Fasman 法⁹⁾によって予測さ

れる 2 次構造を比較した (Table 1)。部位によっては、両品種で全く異なった性質を示していた。このことはグリシニンをたん白質工学的に改変することが可能であることを示唆している。

プローブに用いた pGST8 の塩基配列は本 cDNA が A_{1a}B_{1b}cDNA であり、B 鎖全域と A 鎖の一部をコードしていることを示していた。しかし、pGST4-2-3-5, 4-2-11-10 とは 3 ヲ所で塩基配列、アミノ酸配列とも異なっていた。このことは多形性が同一品種の同一サブユニットにも見られることを示している。一方、本 cDNA の B 鎖は、メチオニンを 1 残基多くコードしていた。この cDNA を利用することにより、天然には存在しない高メチオニン含有 cDNA を作り出した。さらに、メチオニンを連続して 4 残基コードする合成 DNA を構造形成上あまり重要でないと考えられる部位¹⁰⁾に挿入することによっても、高メチオニン含有化 cDNA を作り出した (Fig. 2)。

微生物での発現系の確立

高メチオニン含有化 cDNA がコードする変異グリシニンが、天然グリシニンと同様の構造形成をするのか？ 本来持っている機能特性が損なわれていないか？ を明確にする必要がある。そのためには、微生物での大量発現系を確立する必要がある。

A_{1a}B_{1b}, A₂B_{1a}cDNA でも、シグナルペプチドを持

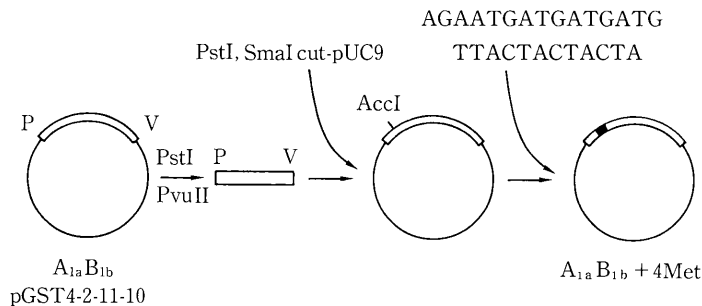


Fig. 2. Insertion of oligonucleotide with four methionine codons into A_{1a}B_{1b} cDNA. cDNA region of pGST4-2-11-10 was cut out by PstI and PvuII and then inserted into pUC9 cut by PstI and SmaI. Then, an oligonucleotide with four methionine codons was inserted into AccI site of A_{1a}B_{1b} cDNA.

つプレプロ型では、各種大腸菌で種々の条件下で発現を検出できなかった。そこで、シグナルペプチド部を段階的に欠失させた発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}X を構築した (Fig. 3)。その結果、シグナルペプチド部を5残基以上含むものでは発現を検出できなかったが、3残基以下含むもの、およびN末端部を部分的に欠失したものでは発現が検出された (Table 2)。また、抗体カラムで精製した各発現たん白質のN末端アミノ酸配列は、各 cDNA から推測されるものと一致した。すなわち、大豆グリシニンを大腸菌で発現させる系を確立できた。

この系を使って、高メチオニン含有化グリシニンの構造形成能および機能特性発現能を解析していく計画である。

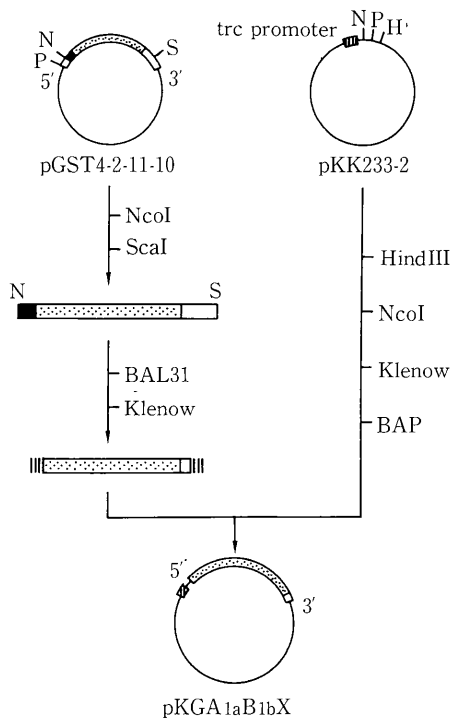


Fig. 3. Stepwise deletion of the signal sequence and N-terminal region of the cDNA encoding glycinin A_{1a}B_{1b} subunit precursor and construction of expression plasmids. NcoI-ScaI fragments of A_{1a}B_{1b} cDNA were digested with Bal31 and treated with DNA polymerase (Klenow Fragment) in the presence of all four deoxynucleotides in order to flush off possible overhanging ends. The resultant fragments were inserted into the filled-in NcoI and HindIII sites of pKK233-2.

Table 2. Production of A_{1a}B_{1b} protein in JM105 cells harboring individual expression plasmids

Plasmids	Expressed protein
	mg/l
pKGA _{1a} B _{1b} Full	N. D.
5	N. D.
3	0.1—0.2
1	0.5—1.0
— 1	0.5—1.0
— 3	5.8—9.3
— 4	0.5—1.0
— 11	2.1—3.2

N. D.: not detectable

文 献

- 1) World Health Organization Technical Report Series 724 (1985): Factors affecting energy and protein requirements in "Energy and Protein Requirements", report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. pp. 113-130.
- 2) Pernollet, J. C. and Mossé, J. (1983): Structure and location of legume and cereal seed storage proteins, in "Seed Proteins", ed. by Daussant, J., Mossé, J. and Vaughan, J., Academic Press, London, pp. 155-191.
- 3) Okayama, H. and Berg, D. (1982): High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170.
- 4) Sanger, F., Nickler, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- 5) Amann, E. and Brosius J. (1985): "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, **40**, 183-190.
- 6) Negoro, T., Momma T. and Fukazawa C. (1985): A cDNA clone encoding a glycinin A_{1a} subunit precursor of soybean. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6719-6731.
- 7) Momma, T., Negoro, T., Udaka, K. and Fukazawa, C. (1985): A complete cDNA coding for the sequence of glycinin A₂B_{1a} subunit precursor. *FEBS LETTERS*, **188**, 117-122.
- 8) Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982): Simple

- method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- 9) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974) : Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, **13**, 211-222.
- 10) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974) : Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, **13**, 222-245.
- 11) Argos, P., Narayana, S. V. L. and Nielsen, N. C. (1985) : Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *EMBO*, **4**, 1111-1117.