

大豆たん白質のオートアシル化に関する研究

AUTOACYLATION OF SOY PROTEINS

鬼頭 誠・内海 成（京都大学食糧科学研究所）

西村隆司（不二製油株式会社）

Makoto KITO¹, Shigeru UTSUMI¹ and Takashi NISHIMURA²

¹Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

²Fuji Oil Co., Izumisano 598

ABSTRACT

Soy proteins were autoacylated with palmitoyl-CoA. Soy proteins were denatured with 6 M urea and/or reduced with 0.2 M 2-mercaptoethanol, and then the reagents were removed by gel filtration. The reduced, and denatured and reduced glycinins were well acylated, although the native and the denatured glycinins were not. These observations demonstrated that the cleavage of disulfide bonds was essential for the autoacylation. In addition, the autoacylation was strongly inhibited by the presence of urea and detergents. Inhibition of the autoacylation by 2-mercaptoethanol and N-ethylmaleimide and the release of palmitic acid by 2-mercaptoethanol and hydroxylamine indicated that palmitic acid was covalently linked via thioester bond to the cysteine residue. The autoacylation of glycinin was dependent on time, temperature, pH and concentrations of palmitoyl-CoA and glycinin, but independent of the saturation of fatty acids. Acylated glycinin exhibited excellent emulsification activity, compared with native glycinin. β -Conglycinin was not acylated with palmitoyl-CoA. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 7-12, 1989.

大豆たん白質は食品素材として優れた機能特性を豊富に具えている¹⁾が、その乳化性を高めることによって用途を拡大することができる。たん白質の乳化性を向上させる手段として、疎水性基の導入によるたん白質の両親媒性の強化がある。我々は大豆たん白質の主要成分であるグリシニンやミルクカゼインに脂肪酸を化学的に導入することによって、それらの乳化性を強化することに成功している²⁻⁵⁾。

自然界には多数のアシル化たん白質が存在している⁶⁻¹⁰⁾。そのアシル化はアシル基転移酵素によるアシル CoA のアシル基転移反応によって起こる¹¹⁾。しかし、最近、アシル化がアシル基転移酵素によらず、オートアシル化という生体触媒反応によって起こる例が報告されてきた¹²⁻¹⁴⁾。

本研究では、大豆たん白質のうち、グリシニンがオートアシル化能を持っていることを見出し、この

現象を利用することによって乳化性の優れた新規なアシル化グリシニンを調製した。

実験方法

材料

グリシニン、 β -コングリシニンは Thanh と Shibasaki の方法¹⁵⁾により、大豆（ツルノコ品種）抽出液のアセトン沈澱¹⁶⁾から分離精製した。蒸留水(pH 7.5)に透折後、凍結乾燥した標品を実験に供した。[1-¹⁴C]パルミトイル-CoA は Dupont NEN より購入した。尿素、2-メルカプトエタノール (2 ME) (ナカライテスク)、SDS (和光純薬) は特製試薬級を用いた。その他の試薬類はすべて特級を用いた。

たん白質標品の前処理

凍結乾燥たん白質標品 (10 mg) を 6 M 尿素と 0.2 M 2 ME (還元変性)、6 M 尿素 (変性) あるいは 0.2

M 2 ME (還元) を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中で 4℃, 15 時間放置後, 各たん白質標品を 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化したセファデックス G-50 ファインカラムに通した。

オートアシル化反応

未処理あるいは前処理標品 (250 μ g) を 250 μ l の 0.15 M NaCl を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液中で 12 μ M [1- 14 C] パルミトイル-CoA と反応させた。冷アセトン (1.2 ml) の添加によって反応を停止した。10000 \times g で 5 分間遠心し, 沈澱画分を SDS-電気泳動に供した。

SDS-電気泳動によるアシル化の検出

[1- 14 C] パルミトイル化たん白質を冷アセトンで 3 回洗浄し, 乾燥させた。乾燥たん白質を SDS-サンプル緩衝液 (100 μ l) に溶解し, Laemmli の方法¹⁷⁾ により SDS-電気泳動 (11%) を行った。染色後, グリシニンと β -コングリシニンの構成サブユニットに相当するバンドを切り出し (1 cm \times 2 mm), NCS tissue solubilizer (0.5 ml, Amersham) の中で, 50℃, 2 時間可溶化した後, 放射活性を測定した。

パルミトイル化たん白質からのパルミチン酸の脱離

グリシニンとパルミトイル基の結合様式を調べるために以下の実験を行った。パルミトイル化グリシニンを 50~200 mM 2 ME と, 25℃, 16 時間インキュベートした。たん白質をアセトン沈澱で回収後, SDS-電気泳動で分析した。また, パルミトイル化グリシニンを SDS-電気泳動したゲルを 1 M ヒドロキシルアミン (pH 10) あるいは 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中で 37℃, 24 時間インキュベートした後, 各バンドの放射活性を測定した。

アシル化グリシニンの機能特製

アシル化グリシニンの乳化活性を Pearce と Kinsella の方法¹⁸⁾ で, 表面疎水性を Kato と Nakai の方法¹⁹⁾ で測定した。

結 果 と 考 察

大豆たん白質のオートアシル化

未処理あるいは前処理したグリシニンおよび β -コングリシニンのオートアシル化能を Table 1 に示した。還元変性処理グリシニンが最も強い反応性を示し, 還元処理グリシニンはその半分程の反応性を示した。一方, 未処理, 変性処理グリシニンおよび β -コングリシニンは反応性を示さなかった。 β -コングリシニンは SH 基をほとんど持たないということ^{20~22)} も考慮すると, 以上の結果はグリシニンの S-S 結合の開裂がオートアシル化に重要であることを示唆していると考え

Table 1. Autoacylation of glycinin and β -conglycinin

Protein	Palmitic acid incorporated nmole			
	Native	D.*	R.*	D. R.*
β -Conglycinin	0.006	—	—	—
α Subunit	—	N. D.**	N. D.	0.014
α' Subunit	—	N. D.	N. D.	0.015
β Subunit	—	N. D.	N. D.	0.026
Glycinin	0.005	—	—	—
Acidic polypeptide	—	<0.005	0.163	0.396
Basic polypeptide	—	<0.005	0.402	0.690

Protein samples (250 μ g) of native, denatured, reduced and both denatured and reduced states were incubated with palmitoyl-CoA as described in Materials and Methods. After incubation, samples were analyzed by SDS-PAGE, and radioactivity was measured as described in Materials and Methods. *D. and R. denote denatured and reduced, respectively. ** N. D.: Not determined.

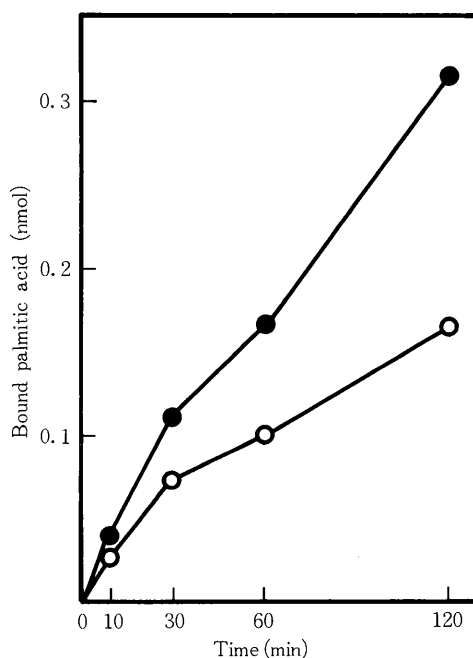


Fig. 1. Time course of autoacylation of glycinin. Both denatured and reduced glycinins (250 μ g) were incubated with palmitoyl-CoA at 37℃ for the indicated time as described in Materials and Methods. (○) acidic polypeptide; (●) basic polypeptide.

えられる。

グリシニンのオートアシル化能の特性

還元変性処理グリシニンを用いて、グリシニンのオートアシル化能の特性を調べた。オートアシル化反応は反応時間 (Fig. 1), パルミトイル-CoA 量およびグリシニン量に比例した。本反応はグリシニンの等電点付近 (pH 4.5) では進行しないが, pH が中性からアルカリ性になるに従って, 大幅に増大した (Fig. 2)。また低温ではほとんど進行せず, 温度の上昇と共に増大し, 60~70°C で結合パルミチン酸量が最高値を示した (Fig. 3)。しかし, それ以上の高温では反応性は低下した (Fig. 3)。これはグリシニンの構造変化のためと考えられる。そこで, オートアシル化に対する各種変性剤の影響を調べた。変性剤の存在下では, オートアシル化は70~80%阻害された (Table 2)。これらの結果は, グリシニンの特異的な構造がオートアシル化能に必要であることを示している。

パルミチン酸の結合部位と結合様式

グリシニンのオートアシル化能発現にジスルフィド

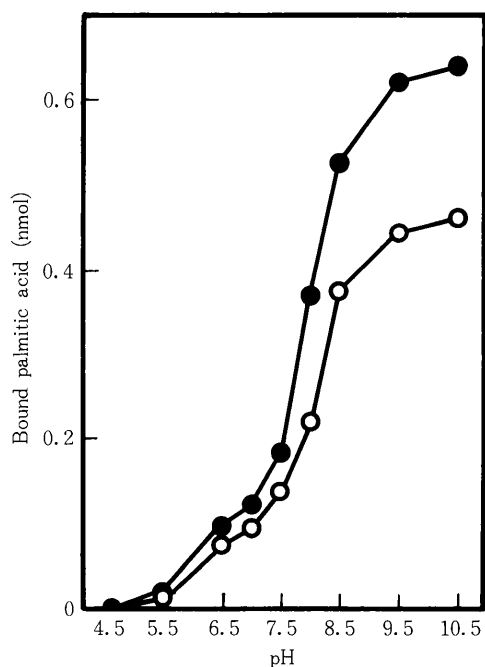


Fig. 2. Effect of pH on the autoacylation of glycine. Both denatured and reduced glycinins (250 μ g) were incubated with palmitoyl-CoA at 37°C for 2 h under various pH. Twenty-five mM citrate-phosphate buffer (pH 4.5-5.5) and 25 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5-10.5) were used. Symbols are the same as in Fig. 1.

Table 2. Effects of various reagents on the autoacylation of glycine

Additive	Autoacylation %
None	100
6 M urea	27
0.15% Nonidet P-40	23
0.15% Triton X-100	21
0.15% Tween 20	32
0.15% NaDodSO ₄	20
10 mM N-ethylmaleimide	5
100 mM N-ethylmaleimide	0.8

Both reduced and denatured glycinins (250 μ g) under the standard reaction conditions were mixed with each reagent indicated in the table and incubated for 1 h at 37°C. Then, palmitoyl-CoA was added and the mixture was incubated at 50°C for 2 h. After the reaction, samples were analyzed by SDS-PAGE, and the radioactivity was measured as described in Materials and Methods.

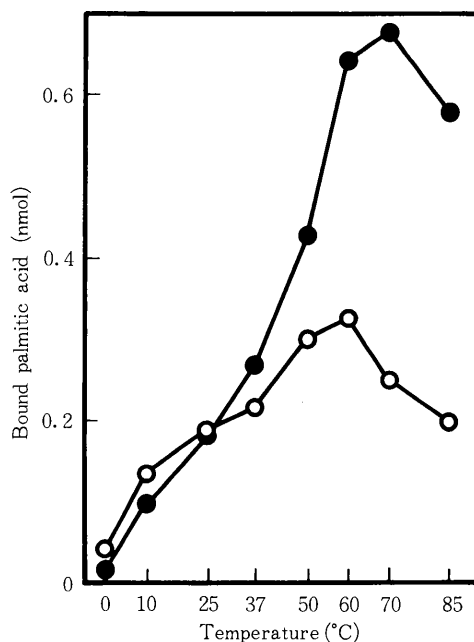


Fig. 3. Effect of temperature on the autoacylation of glycine. Both denatured and reduced glycinins (250 μ g) were incubated with palmitoyl-CoA for 2 h at various temperatures. Symbols are the same as in Fig. 1.

結合の開裂が必要であるということはオートアシル化に対するシステイン残基の関与を示唆している。このことを確かめるために以下の実験を行なった。アシル化反応系に2 MEを添加すると、オートアシル化は25 mMで60%, 200 mMで90%以上阻害された(Fig. 4)。また、N-エチルマレイミドでSH基をブロックすると、オートアシル化はほぼ完全に阻害された(Table 2)。これらの結果はシステイン残基がパルミチン酸と共有結合していることを意味している。

次にシステイン残基とパルミチン酸の結合様式を明らかにするために、結合の安定性を調べた。セリン、スレオニンそしてシステインとのエステルあるいはチオエステル結合はヒドロキシルアミン感受性であるが、アミド結合は非感受性である²³⁾。そこで、アシル化グリシニンを分離したSDS-ゲルを1 M ヒドロキシルアミン (pH 10) に37°C, 24時間浸漬した。その結果、結合パルミチン酸の65%が解離した(Table 3)。その量はコントロールの1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 10) に浸漬した場合に比べてはるかに多かった (Table 3)。

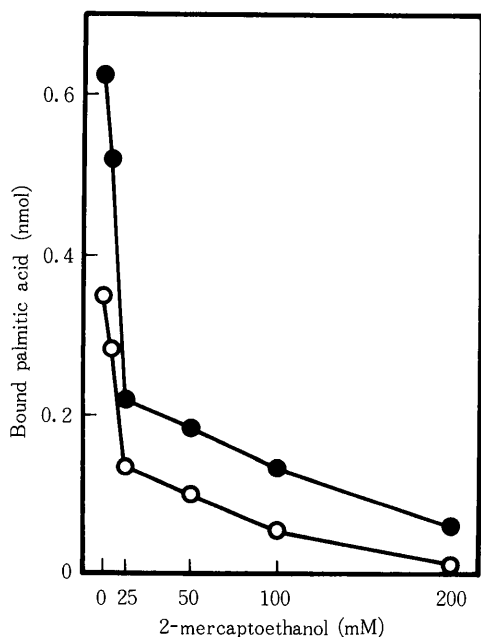


Fig. 4. Effect of 2-mercaptoethanol on the autoacylation of glycine. Both denatured and reduced glycinins (250 μ g) were incubated with palmitoyl-CoA at 50°C for 2 h in the presence of various concentrations of 2-mercaptoethanol. Symbols are the same as in Fig. 1.

また、アシル化グリシニンを2 ME存在下でインキュベイトすると、50 mM以上の存在下では結合パルミチン酸の40~60%が解離した (Fig. 5)。これらの結果は、パルミチン酸がグリシニンのシステイン残基とチオエステル結合していることを示している。

Table 3. Release of bound palmitic acid from glycine.

Treatment	Release of ^{14}C -palmitic acid %
1 M Tris-HCl, pH 7.5	0
1 M Tris-HCl, pH 10	31
1 M Hydroxylamine, pH 10	65

NaDodSO₄-polyacrylamide gels containing acylated glycine were soaked in each solution indicated in the table and incubated at 37°C for 24 h as described in Materials and Methods. After incubation, the bands corresponding to glycine were cut out and radioactivity was measured as described in Materials and Methods.

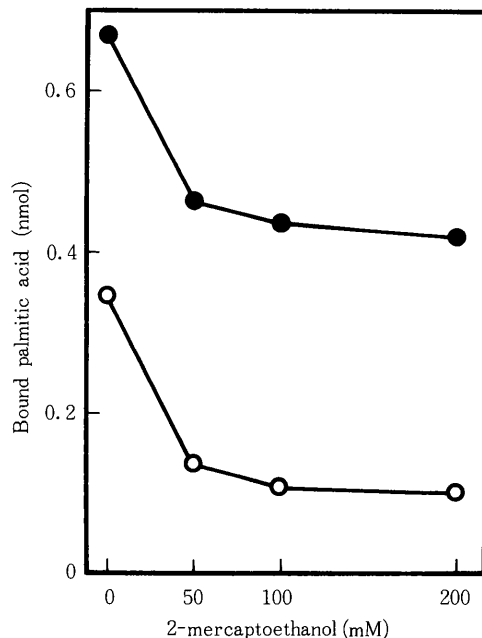


Fig. 5. Release of palmitic acid from acylated glycine by 2-mercaptoethanol. Both denatured and reduced glycinins were incubated with palmitoyl-CoA at 50°C for 1 h as described in Materials and Methods. After the reaction, various concentrations of 2-mercaptoethanol were added, and the reaction mixture was incubated for 16 h at 25°C. Symbols are the same as in Fig. 1.

アシル化グリシニンの機能特性

オートアシル化によってパルミチン酸をグリシニン 1 mole 当り 0.06 mole 結合したパルミトイルグリシニンの乳化活性¹⁸⁾ および表面疎水性¹⁹⁾ を測定した。パルミトイルグリシニンは未処理のグリシニンと比較して、乳化活性が1.6倍に、表面疎水性が1.3倍に増加していた。結合パルミチン酸量を増大させることによって、各機能特性をさらに改善し、新規な高品質大豆たん白質を作り出すことが可能と期待される。

文 献

- 1) Kinsella, J. E., Damodaran, S. and German, B. (1985) : Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins, in *New Protein Foods*, ed. by Altschul, A. M. and Wilche, H. L., Academic Press, New York, Vol. 5.
- 2) Haque, Z. and Kito M. (1982) : Lipophilization of soybean glycinin : covalent attachment to long chain fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 597-599.
- 3) Haque, Z., Matoba, T. and Kito, M. (1982) : Incorporation of fatty acid into food protein : Palmitoyl soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 481-486.
- 4) Haque, Z. and Kito, M. (1983) : Lipophilization of α_{s1} -casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1225-1230.
- 5) Haque, Z. and Kito, M. (1983) : Lipophilization of α_{s1} -casein. 2. Conformational and functional effects. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1231-1237.
- 6) Stoffyn, P. and Folch, J. (1971) : On the type of linkage binding fatty acids present in brain white matter proteolipid apoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 157-161.
- 7) Hantke, K. and Braun, V. (1973) : Covalent binding of lipid to protein. diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 284-296.
- 8) Schmidt, M. F. G., Bracha, M. and Schlesinger, M. J. (1979) : Evidence for covalent attachment of fatty acids to sindbis virus glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1687-1691.
- 9) Omary, M. B. and Trowbridge, I. S. (1981) : Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12888-12892.
- 10) Liao, Y. H., Murty, V. L. N., Gwozdinski, K., Slomiany, A. and Slomiany, B. L. (1986) : *In vitro* fatty acid acylation of mucus glycoprotein from sublingual salivary glands. *Biochim Biophys. Acta*, **880**, 108-116.
- 11) Schmidt, M. F. G. and Schlesinger, M. J. (1980) : Relation of fatty acid attachment to the translation and maturation of vesicular stomatitis and sindbis virus membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3334-3339.
- 12) Berger, M. and Schmidt, M. F. G. (1984) : Cell-free fatty acid acylation of semliki forest viral polypeptides with microsomal membranes from eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 7245-7252.
- 13) O'Brien, P. J., St. Jules, R. S., Reddy, T. S., Bazan, N. G. and Zatz, M. (1987) : Acylation of disc membrane rhodopsin may be nonenzymatic. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5210-5215.
- 14) Bizzozero, O. A., McGarry, J. F. and Lees, M. B. (1987) : Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13550-13557.
- 15) Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1976) : Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117-1121.
- 16) Mori, T., Utsumi, S., Inaba, H., Kitamura, K. and Harada, K. (1981) : Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 20-23.
- 17) Laemmli, U. K. (1970) : Cleaving of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, **227**, 680-685.
- 18) Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978) : Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-723.
- 19) Kato, A. and Nakai, S. (1980) : Hydrophobicity determined by a fluorescence probe meth-

- od and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 13-20.
- 20) Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1978) : Major proteins of soybean seeds. subunit structure of β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 692-695.
- 21) Nielsen, N. C. (1985) : Structure of soy proteins, in *New Protein Foods*, ed. by Altschul, A. M. and Wilche, H. L., Academic Press, New York, Vol. 5.
- 22) Doyle, J. J., Schuler, M. A., Godette, W. D., Zenger, V., Beachy, R. N. and Slightom, J. L. (1986) : The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9228-9238.
- 23) Kaufman, J. F., Krangel, M. and Strominger, J. L. (1984) : Cysteines in the transmembrane region of major histocompatibility complex antigens are fatty acylated via thioester bonds. *J. Biol. Chem.*, **259**, 7230-7238.