

大豆グリシニンのたん白質工学的高品質化

IMPROVEMENT OF NUTRITIONAL VALUE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOYBEAN GLYCININ BY PROTEIN ENGINEERING

鬼頭 誠・金森二郎・内海 成（京都大学食糧科学研究所）

Makoto KITO, Jiro KANAMORI and Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

Glycinin is one of the most predominant storage proteins of soybean. To improve its functional properties (heat-induced gelation and emulsification) and/or nutritional value, the $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin subunit was modified on the basis of genetically variable domains suggested from the comparison of amino acid sequences of glycinin-type globulins from various legumes and nonlegumes and the relationships between the structure and the functional properties of glycinin. Thus, nucleotide sequences corresponding to each of the variable domains were deleted from the cDNA encoding the $A_{1a}B_{1b}$ proglycinin, and a synthetic DNA encoding four continuous methionine residues was inserted into the cDNA region corresponding to each of the variable domains. Expression plasmids carrying the modified cDNAs were constructed and expressed in *E. coli* strain JM105. Some of the modified proteins were accumulated as self-assembled soluble proteins in the cells at a high level. They exhibited functional properties superior to those of the native glycinin from soybean, which indicates the creation of theoretically designed novel glycinins with high-food qualities. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 11, 29-34, 1990.

植物たん白質は動物性たん白質に比べると栄養性、機能特性の点で劣っている。しかし、植物は成人病の主因の一つであるコレステロールを含有していないので、植物たん白質の栄養性、機能特性を改善して高品質化することが望まれている。我々は大豆たん白質の主要成分であるグリシニンの高品質化をたん白質工学の手法を用いて成し遂げるために、グリシニンをコードする cDNA の大腸菌における大量発現系を確立するとともに、本発現系をたん白質工学的研究に応用できることを示すことに成功している¹⁾。

高品質化を理論的に成し遂げるためには、どのような改変を施せば栄養性や機能特性を改善できるか、そして、その改変のためにグリシニン本来の構造形成が損なわれないか、という2点が問題となる。栄養性を

改善するためには、制限アミノ酸（メチオニン）の強化あるいは消化性の改善を行えばよい。機能特性の改善法は構造と機能特性の相関関係²⁻⁵⁾から得られる。つまり、加熱ゲル化性の改善法として構造の不安定化、乳化性の改善法として構造の不安定化と疎水性度の強化を挙げることができる。一方、種々の種子11Sグロブリンの1次構造の比較から、保存領域と可変領域（親水性のアミノ酸に富む）が提示されている⁶⁾。可変領域における改変は構造形成を阻害する可能性が低いと考えられるので、可変領域を改変可能部位と考えることができる。これらの改変法と改変部位を踏まえて、高品質なグリシニンを分子設計し、改変たん白質に対する発現プラスミドを大腸菌で発現させ、高品質化の成否を評価した。

実験方法

菌株, 培地, プラスミド

大腸菌 JM105 を宿主菌として用いた。培養は LB 培地 (pH 7.5) で行った。pKK233-2 (発現ベクター), pUC19, pGST4-2-11-10 (プレプログリニン A_{1a}B_{1b} cDNA を持つ)⁷⁾, pKGA_{1a}B_{1b}-3 (プログリニン A_{1a}B_{1b} の N 末端 3 残基を欠失したものを発現する)⁸⁾, pKGA_{1a}B_{1b}-11 (プログリニン A_{1a}B_{1b} の N 末端 11 残基を欠失したものを発現する)⁸⁾ を用いた。pKGA_{1a}B_{1b}-3 と pKGA_{1a}B_{1b}-11 の発現たん白質を A_{1a}B_{1b}-3, Δ I と名付けた。改変たん白質 DI+4Met, IV+4Met, V+4Met, Δ II, Δ III, Δ IV, Δ V 36, Δ V 8. 発現する発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}DI+4Met, pKGA_{1a}B_{1b}IV+4Met, pKGA_{1a}B_{1b}V+4Met, pKGA_{1a}B_{1b}-II, pKGA_{1a}B_{1b}-III, pKGA_{1a}B_{1b}-IV, pKGA_{1a}B_{1b}-V 36, pKGA_{1a}B_{1b}-V 8 は pKGA_{1a}B_{1b}-3, pUC19, pKK233-2, pGST4-2-11-10 より構築した (Figs. 2, 3 参照)。

大腸菌における改変たん白質の発現と検出

各発現プラスミドを持つ大腸菌 JM105 の 1 夜培養液 3 ml を 25 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (300 ml) に接種し, 37°C で 90 往復/分で培養した。A₆₀₀ = 0.3 の時に, イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを最終濃度 1 mM になるように加え, 37°C で 20 時間培養した。遠心分離した菌体を超音波破碎し, 遠心分離によって, 上清画分と沈澱画分に分離した。菌体, 上清画分における発現たん白質を SDS-ゲル電気泳動⁹⁾で分析した。

大腸菌からの改変たん白質の精製

各発現プラスミドを持つ大腸菌 JM105 を 6 ~ 8 l 培養し, 集菌後, 超音波破碎した。遠心分離によって得た上清画分から発現たん白質を, 硫酸画分, Q-セファロースカラムクロマトグラフィー, 冷沈 (低イオン強度下で冷却すると沈澱するというグリニニンに固有の性質) によって精製した。

改変たん白質の分子集合能の解析

各発現プラスミドを持つ大腸菌の抽出液 (5 mg/0.4 ml) を 0.4 M NaCl, 1.5 mM PMSF, 1 mM EDTA を含む 35 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.5) に透析後, 10 ~ 30% のショ糖密度勾配遠心分離にかけた。大きさの比較のための標準物質として, 大豆たん白質の 2S, 7S, 11S 画分を用いた。

改変たん白質の乳化活性

3.5 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.6) (緩衝液 A) に透析した精製改変たん白質の 0.05% 溶液 1.5 ml を 0.5 ml の

大豆油と混合し, 25°C, 100 watt で 30 秒間, 超音波処理することによって乳化させた。その 30 μ l を分取し, 0.1% SDS 溶液 20 ml で希釈後, A₅₀₀ を測定した¹⁰⁾。

改変たん白質のゲル化とゲル強度

緩衝液 A に透析した精製改変たん白質溶液 (5 ~ 10 %) のゲル化は微量法¹¹⁾を用いて, 100°C, 30 分間加熱によって行なった。ゲル強度はレオメーター (山電, RE-3305) で測定した。

結果と考察

改変たん白質に対する発現プラスミドの構築

グリニニンは 5 ケ所の親水性アミノ酸に富む改変可能部位を持っている (Fig. 1-A)。各改変可能部位を欠失させることによって, 疎水性が強化されるとともに不安定化すると考えられる。その結果, 加熱ゲル化性や乳化性という機能特性が改善されることが期待できる。そこで, 各改変可能部位を欠失した改変たん白質 (Fig. 1-B) をコードする発現プラスミドを構築した (Fig. 2)。

栄養性を第一義的に改善するために, メチオニンを 4 残基連続してコードする合成 DNA を, 各改変可能部位をコードする cDNA 領域に挿入した発現プラスミドを構築した (Fig. 3)。この場合, 親水性の領域に疎水性のクラスターが形成されることになるので, 栄養性に加えて機能特性も同時に改善されることが期待できる。

改変たん白質の構造形成能

高品質化の成否は, 改変たん白質がグリニニン本来の構造形成能を持つかどうかにかかっている。筆者らは, 非改変たん白質は大腸菌中で可溶性の状態で大腸菌 (全菌体たん白質当り 20%) に発現し, しかも 3 量体に分子集合できることを見出ししている¹⁾。一方, シグナルペプチド部を持つプレプログリニンは, シグナルペプチド部の疎水性のために構造形成が阻害を受け, 非常に分解を受け易い^{8,12)}。従って, (1)大量発現する, (2)可溶性である, (3)3 量体に会合する, の 3 点を正しい構造形成の基準とした。

これら 3 つの基準を各改変たん白質について検討した (Table 1)。その結果, 第 I 改変可能部位を欠失した Δ I, 第 V 改変可能部位を 8 残基欠失した Δ V 8, 第 IV あるいは第 V 改変可能部位にメチオニンを 4 残基導入した IV+4Met, V+4Met は比較的大量に発現し, しかも可溶性であり分子集合もした。しかし, これら以外の改変たん白質はほとんど発現しない (Δ II, Δ III, DI+4Met) か, あるいは比較的大量に発現しても不溶性 (Δ IV, Δ V 36) であった。

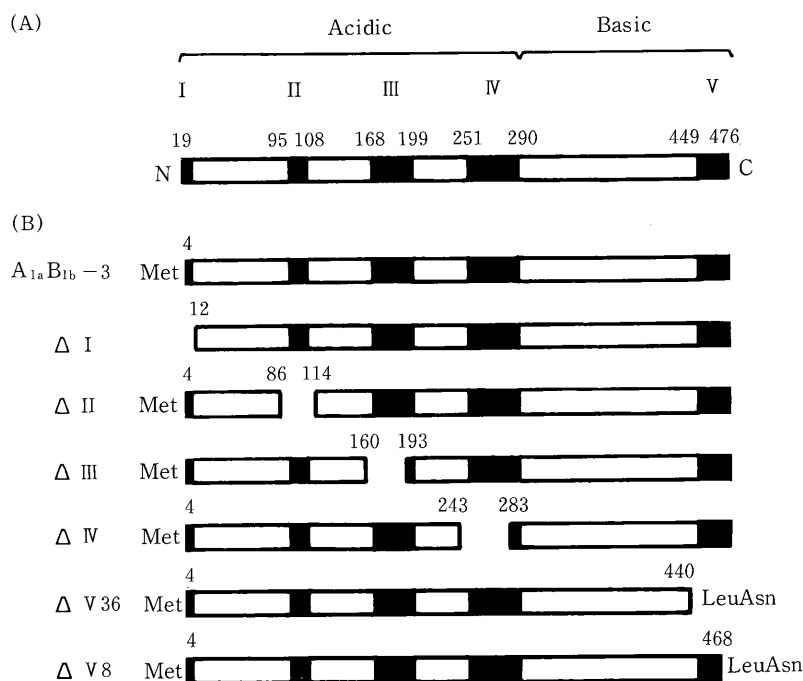


Fig. 1. (A) The variable and conserved domains of glycinin $A_{1a}B_{1b}$ subunit aligned by Wright (1988). The numbers of the residues from N-terminus are described for the variable domains above the alignment. The five variable domains were termed I to V. , variable domain; , conserved domain. Acidic and Basic refer to the acidic and basic polypeptides, respectively. (B) Construction of the deleted proteins and $A_{1a}B_{1b}-3$. $A_{1a}B_{1b}-3$ lacks N-terminal 3 amino acids, ΔI N-terminal 11, ΔII from the 87th to the 113rd, ΔIII from the 161st to the 192nd, ΔIV from the 244th to the 282nd, $\Delta V36$ from the 441st to the C-terminus and $\Delta V8$ from the 469th to the C-terminus. The N-terminal methionine was retained in $A_{1a}B_{1b}-3$, ΔII , ΔIII , ΔIV , $\Delta V36$ and $\Delta V8$ and cleaved in ΔI . $\Delta V36$ and $\Delta V8$ have two extra amino acids Leu-Asn at their C-terminus.

改変たん白質の機能特性

正しく構造形成をすると考えられた ΔI 、 $\Delta V8$ 、 $IV+4Met$ 、 $V+4Met$ の4種を大量に調製し、その機能特性を大豆グリシニンのものと比較した。4種の改変たん白質とも、大豆グリシンよりも高い乳化活性を示した。特に、 $\Delta V8$ と $V+4Met$ は2倍以上の値を与えた。このことは、グリシニンのC末端部の疎水性が乳化性と密接に関係していることを示しているのか

も知れない。一方、4種の改変たん白質とも加熱ゲルを形成した。そして、 ΔI 、 $IV+4Met$ 、 $V+4Met$ は大豆グリシンよりも高いゲル強度を与えた。

以上のように、グリシニンの構造的特徴とそれらの機能特性との相関関係を踏まえて理論的に改変たん白質を分子設計し、グリシンを高品質化することに成功した。

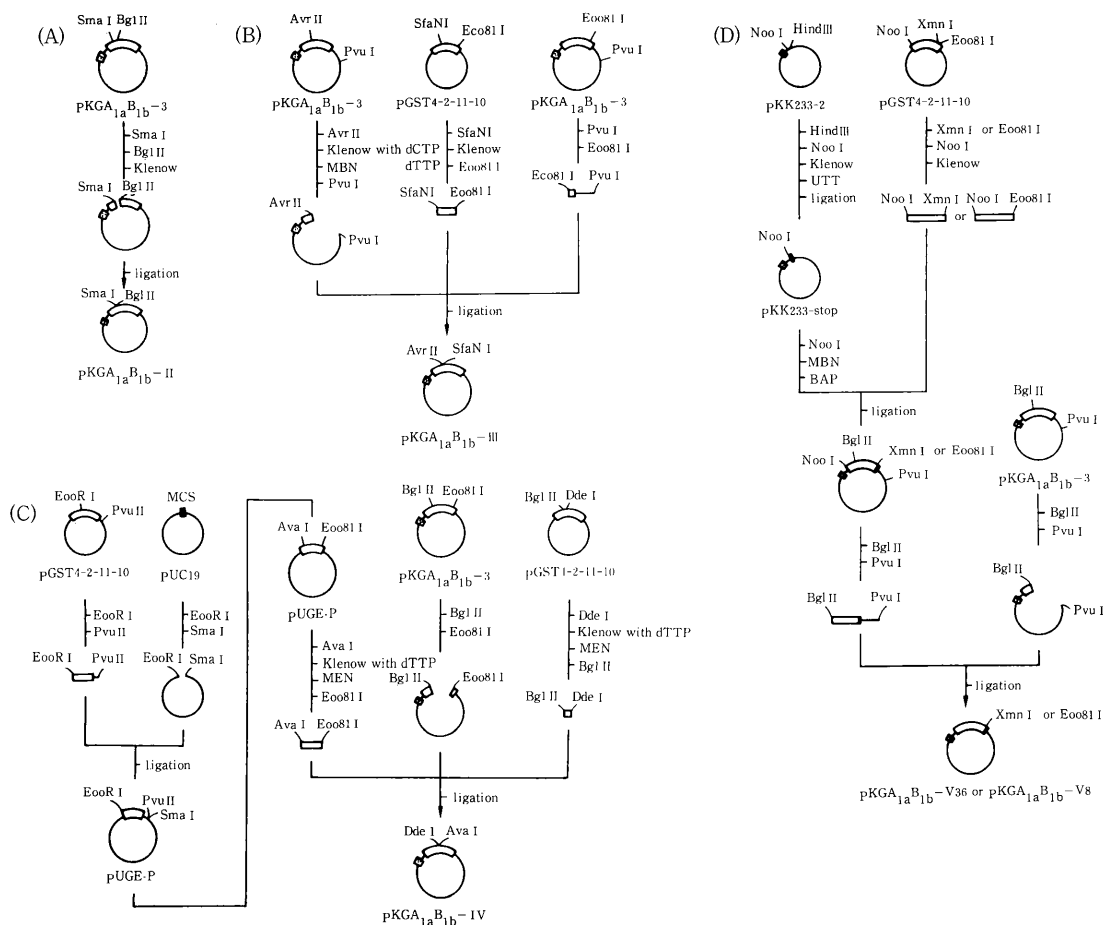


Fig. 2. Scheme for construction of expression plasmids pKGA_{1a}B_{1b}-II (A), pKGA_{1a}B_{1b}-III (B), pKGA_{1a}B_{1b}-IV (C), and pKGA_{1a}B_{1b}-V36 and pKGA_{1a}B_{1b}-V8 (D). Stippled box and open box represent *trc* promoter and A_{1a}B_{1b} cDNA, respectively. Symbols: MBN, mung bean nuclease; BAP, bacterial alkaline phosphatase; MCS, multi cloning site; UTT, universal translation terminator (5'-d [GCTTAATTAATTAAGC]-3', Pharmacia).

Table 1. Expression level of modified proglycinin A_{1a}B_{1b} cDNAs in *Escherichia coli* and properties of expressed proteins

Modified regions	Methods of modification	Names of modified proteins	Levels of expression ¹	Solubility	Assembly
Variable region I	deletion	△ I	◎	soluble	Yes
Domain I ²	Met-insertion	DI+4Met	△	soluble	Yes
Variable region II	deletion	△ II	△	insoluble	?
Variable region III	deletion	△ III	△	insoluble	?
Variable region IV	deletion	△ IV	○	insoluble	?
	Met-insertion	IV+4Met	◎	soluble	Yes
Variable region V	deletion 36 residues	△ V36	○	insoluble	?
	8 residues	△ V8	◎	soluble	Yes
	Met-insertion	V+4Met	○	soluble	Yes

¹ ◎, 10-20% of total proteins; ○, 5-10%; △, less than 0.1%.

² Domain I corresponds to the regions between variable regions I and II, and is proposed to be variable from the comparison of 7S and 11S globulins.¹³⁾

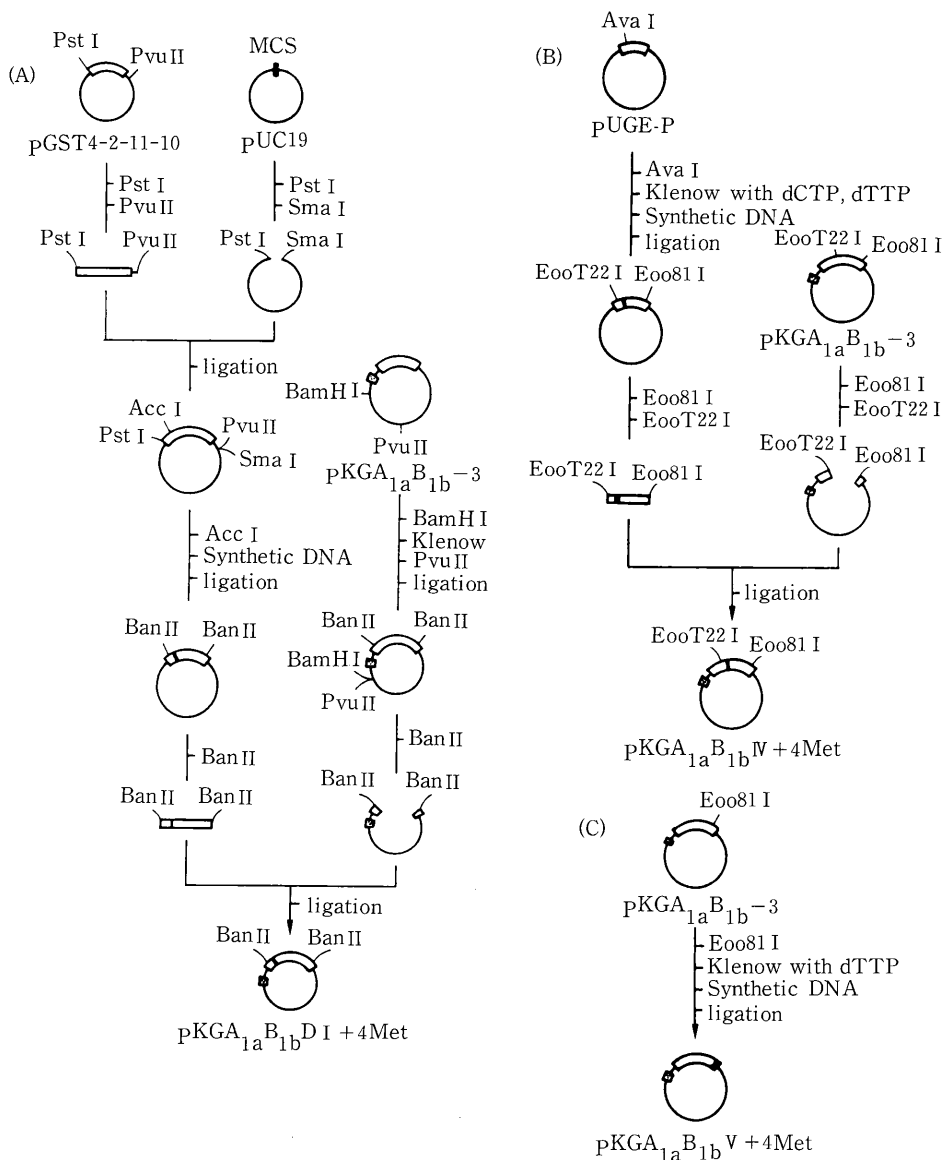


Fig. 3. Scheme for construction of expression plasmids pKGA_{1a}B_{1b}DI+4Met (A), pKGA_{1a}B_{1b}IV+4Met (B) and pKGA_{1a}B_{1b}V+4Met (C). Synthetic DNAs used for pKGA_{1a}B_{1b}DI+4Met, pKGA_{1a}B_{1b}IV+4Met and pKGA_{1a}B_{1b}V+4Met were 5'-AGAATGATGATGATG-3' 3'-TTACTACTACTACTC-5' 5'-GAATGATGATGATGGG-3' 3'-TACTACTACTACCCGG-5' and 5'-CAGATGATGATGATGCA-3' 3'-CTACTACTACTACGTAG-5' respectively.

文 献

- 1) Kim, C.-S., Kamiya, S., Kanamori, J., Utsumi, S. and Kito, M. (1990) : High-level expression, purification and functional properties of soybean proglycinin from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1543-1550.
- 2) Nakamura, T., Utsumi, S., Kitamura, K., Harada, K. and Mori, T. (1984) : Cultivar differences in gelling characteristics of soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 647-651.
- 3) Haque, Z and Kito, M. (1982) : Lipophilization of soybean glycinin : Covalent attachment to long chain fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 597-599.

- 4) Nishimura, T., Utsumi, S. and Kito, M. (1989) : Autoacylation of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1266-1270.
- 5) Kato, A. and Yutani, K. (1988) : Correlation of surface properties with conformational stabilities of wild-type and six mutant tryptophan synthase α -subunits substituted at the same position. *Protein Engineering*, **2**, 153-156.
- 6) Wright, D. J. (1988) : The seed globulins—part II, in *Developments in Food Proteins*, ed. by Hudson, Elsevier Applied Science, London, Vol. 6, pp. 119-177.
- 7) Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T. and Kito, M. (1987) : An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a}B_x subunit. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 210-214.
- 8) Utsumi, S., Kim, C.-S., Sato, T. and Kito, M. (1988) : Signal sequence of preproglycinin affects of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene*, **71**, 349-358.
- 9) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- 10) Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. (1978) : Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 716-723.
- 11) Utsumi, S., Nakamura, T. and Mori, T. (1982) : A micro-method for the measurement of gel properties of soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1923-1924.
- 12) Utsumi, S., Kim, C.-S., Kohno, M. and Kito, M. (1987) : Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3267-3273.
- 13) Argos, P., Narayana, S. V. L. and Nielsen, N. C. (1985) : Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *EMBO. J.*, **4**, 1111-1117.