

大豆グリシニンの食品機能のたん白質工学的改質

IMPROVEMENT OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOYBEAN GLYCININ BY PROTEIN ENGINEERING

鬼頭 誠・内海 成（京都大学食糧科学研究所）

Makoto KITO and Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

To improve functional properties of soybean glycinin, A_{1a}B_{1b} proglycinin subunit was modified on the basis of the structural characteristics by means of protein engineering. The A_{1a}B_{1b} proglycinin subunit has two disulfide bonds Cys12-Cys45 and Cys88-Cys298, and has a polyglutamate region in the fourth variable domain. Then, we constructed various cDNAs which encode specific variants of A_{1a}B_{1b} proglycinin subunit in which cysteine residues were replaced by glycine or serine to form modified glycinins Gly12, Ser88 and Gly12Ser88, and in which the polyglutamate region was deleted or replaced by polylysine, polyglutamine or polymethionine to form modified glycinins IV(ΔGlu), IV(Lys), IV(Gln) and IV(Met). Expression plasmids carrying the modified cDNAs were constructed and expressed in *Escherichia coli* strain JM105. All of the modified proteins except IV(Met) accumulated as self-assembled soluble proteins in the cells at a high level. This indicates that the disulfide bonds Cys12-Cys45 and Cys88-Cys298 are not necessary to form correct conformation of glycinin molecule, and that it is possible to dramatically change the net charge of glycinin molecule. The modified glycinin Gly12, Ser88 and Gly12Ser88 expressed were purified and their gelation and gel properties were examined. All of them formed heat-induced gels and especially Ser88 exhibited excellent gel-forming ability, indicating that the change in the number and/or the topology of free sulfhydryl residues of glycinin is a powerful method for improving the gel-forming ability. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 14-18, 1991.

大豆たん白質栄養研究会において明らかにされて来たように、大豆たん白質は血中コレステロール値の上昇を抑制する機能を持っており、成人病予防の観点から優れた食品素材である。しかし、機能特性の点では動物たん白質に見劣りがする。そこで、我々は大豆たん白質の主要成分であるグリシニンの食品機能をたん白質工学の手法を用いて改質する研究を展開している。すでに、グリシニンの可変領域の欠失および可変領域へのポリメチオニンの挿入によって、食品機能を改質することに成功している^{1,2)}。今回は、新たな観点から、グリシニンをたん白質工学的に改質することを試

みた。大豆たん白質はその等電点が pH 4.5 付近であるために、pH 3～6 という酸性領域で機能特性を発現しにくいという欠点がある。一方、グリシニンの加熱ゲル化性やゲル物性は遊離 SH 基の数やトポロジーと密接に関係している³⁾。そこで、グリシニンの静電的特性の変換による酸性領域における機能特性発現の可能性および遊離 SH 基の数とトポロジー変換によるゲル化特性の改善の可能性について検討した。

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。A_{1a}B_{1b}-3 (プログリシニン A_{1a}B_{1b} の末端 3 残基を欠失したもの) を発現する発現プラスミド pKGA_{1a}B_{1b}-3⁴⁾ を用いて, オリゴヌクレオチドを介する部位特異的変異により改変グリシニン (Figs. 1, 2 参照) Gly12, Ser88, Gly12Ser88, IV(Δ Glu), IV(Lys), IV(Gln), IV(Met) に対する発現プラスミド

を構築した。

大腸菌における改変グリシニンの発現と検出

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/分で振盪培養した。A₆₀₀=0.3 の時, 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画した。両画分における発現たん白質を SDS-ゲル電気泳動⁵⁾

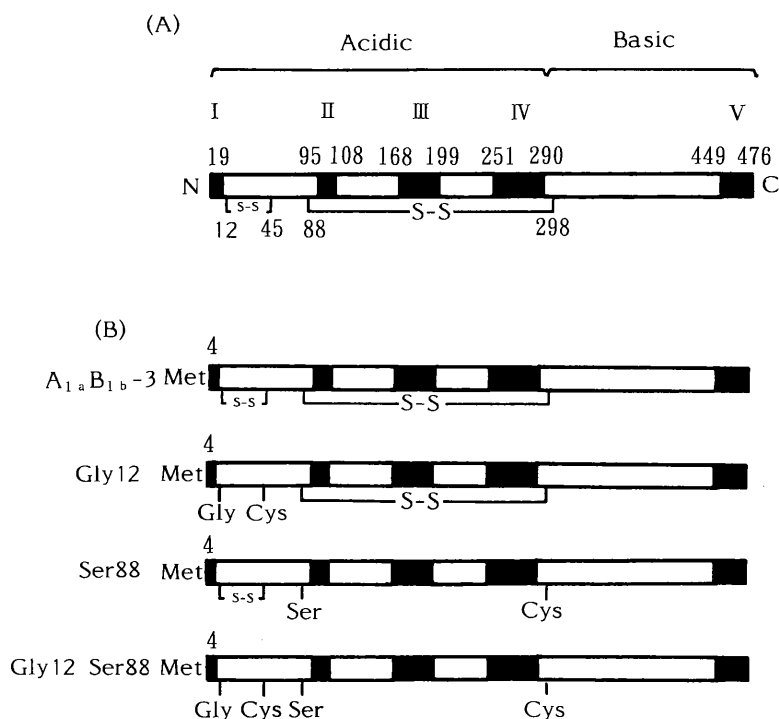


Fig. 1. (A) The variable and conserved domains of glycinin A_{1a}B_{1b} subunit aligned by Wright⁹⁾. The numbers of the residues from N-terminus are described for the variable domains above the alignment, and those for the cysteine residues below the alignment. The five variable domains were termed I to V. Acidic and basic refer to the acidic and basic polypeptides, respectively. ■, variable domain; □, conserved domain; S-S, disulfide bond. (B) Construction of the disulfide bond deleted proteins and A_{1a}B_{1b}-3. A_{1a}B_{1b}-3 lacks N-terminal 3 amino acids. Cys12 and Cys88 are substituted with Gly and Ser in Gly12 and Ser88, respectively. Both Cys12 and Cys88 are respectively substituted with Gly and Ser in Gly12Ser88.

で分析した。

大腸菌からの改変グリシニンの精製

各発現プラスミドを持つ大腸菌 JM105 を 10 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、硫酸分画、Q-セファロースカラムクロマトグラフィー、冷沈⁶⁾によって精製した。

改変たん白質の分子集合成能

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 7.6) 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。

改変たん白質のゲル化とゲル強度

3.5 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.6) に透析した精製改変たん白質溶液 (3~10%) のゲル化は微量法⁷⁾を用いて、100℃, 30分間加熱によって行った。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

改変グリシニンに対する発現プラスミドの構築

A_{1a}B_{1b} サブユニットには 2 つのジスルフィド結合が同定されている。1 つは鎖間の Cys88-Cy298 であり、もう 1 つは A 鎖内の Cys12-Cys45 である⁹⁾。そこで、Cys12 → Gly12, Cys88 → Ser88, Cys12, Cys88 → Gly12, Ser88 に変換した改変グリシニン (Fig. 1) 対

する発現プラスミドをオリゴヌクレオチドを介する部位特異的変異によって構築した。

グリシニンの第 IV 可変領域⁹⁾には、8 残基のグルタミン酸と 1 残基のアスパラギン酸が連続したポリグルタミン酸領域がある¹⁰⁾。その 6~7 残基を欠失させたものとリジン、グルタミンあるいはメチオニンに置換した改変グリシニン (Fig. 2) に対する発現プラスミドをオリゴヌクレオチドを介する部位特異的変異によって構築した。

改変グリシニンの構造形成能

改質の成否は改変グリシニンがグリシニン本来の構造形成能をもつかどうかにかかっている。筆者らは、非改変グリシニンは大腸菌中で可溶性の状態で大量 (全菌たん白質当たり 20%) に発現し、しかも、3 量体に分子集合できることを見い出している¹¹⁾。一方、シグナルペプチド部をもつプレプログリシニンは、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^{4,12)}。また、構造形成に不都合のある改変を受けたグリシニンは分解を受けるか不溶性となる¹⁾。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 つの基準を各改変グリシニンについて検討した (Table 1)。その結果、システイン残基を置換した 3 種 (Gly12, Ser88, Gly12Ser88) と、ポリグルタミン酸領域を欠失させた IV (ΔGlu)、この領域をリジンあるいはグルタミンに置換した IV (Lys) および IV (Gln)

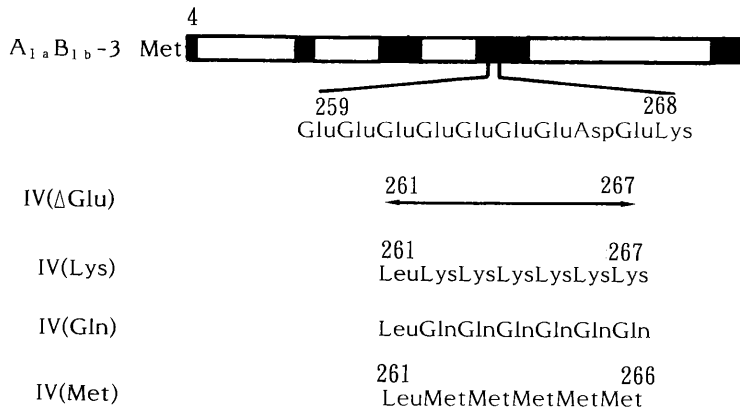


Fig. 2. Construction of the polyglutamate-deleted and substituted proteins. The amino acids between 261 and 267, 261 and 267, 261 and 266 are deleted in IV (ΔGlu) and substituted with lysine, glutamine and methionine in IV (Lys), IV (Gln) and IV (Met), respectively.

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

Names of modified proteins	Levels of expression	Solubility	Assembly
	% ¹		
Gly12	20	soluble	yes
Ser88	20	soluble	yes
Gly12Ser88	20	soluble	yes
IV(Δ Glu)	10	soluble	yes
IV(Lys)	20	soluble	yes
IV(Gln)	15	soluble	yes
IV(Met)	<1	soluble	yes

¹ % of total bacterial proteins.

の6種は大量に発現し、しかも可溶性であり分子集合もした。一方、ポリグルタミン酸領域をメチオニンに置換したIV(Met)は、可溶性で分子集合もしたが、発現量は極めて低かった。つまり、Gly12, Ser88, Gly12Ser88, IV(Δ Glu), IV(Lys), IV(Gln)の6種はグリシニン本来の構造を形成できると判定された。しかし、IV(Met)は、分子集合はできるが構造が非常に不安定であると推定される。従って、鎖間、鎖内ジスルフィド結合はともに構造形成に不必要と考えられる。また、ポリグルタミン酸領域における荷電の有無や種類は構造形成に無関係であり、親水性であることのみ重要であると推定された。このことは、グリシニンの静電的特性を変換し、弱酸性領域においても機能特性を発現させることが可能であることを意味している。

改変グリシニンの機能特性

正しく構造形成をすると考えられた改変グリシニンのうち、Gly12, Ser88, Gly12Ser88の3種を大量に調製し、その加熱ゲル化性を大豆グリシニンのものと比較した。3種の改変グリシニンとも加熱ゲルを形成し、特にSer88は大豆グリシニンが微弱なゲルしか形成できないような低たん白質濃度(4.4%)においても強固なゲルを形成した。つまり、遊離のSH基の数とトポロジーを変換することによって、大豆グリシニンの加熱ゲル特性を改善することが可能である。

文 献

- Kim, C.-S., Kamiya, S., Sato, T., Utsumi, S. and Kito, M. (1990): Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin by protein engineering. *Protein Engineering*, **3**, 725-731
- 鬼頭 誠, 金森二朗, 内海 成 (1990): 大豆グリシニンのたん白質工学的の高品質化. 大豆たん白

質栄養研究会会誌, **11**, 29-34.

- 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.
- Utsumi, S., Kim, C.-S., Sato, T. and Kito, M. (1988): Signal sequence of preproglycinin effects production of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene*, **71**, 349-358.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- Wolf, W. J. and Sly, D. A. (1967): Cryo-precipitation of soybean 11S protein. *Cereal Chem.*, **44**, 653-668.
- 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.
- Staswick, P. E., Hermodson, M. A. and Nielsen, N. C. (1984): Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13431-13435.
- Wright, D. J. (1988): The seed globulins—part II, in *Developments in Food Proteins*, ed. by Hudson, B. J. F., Elsevier Applied Science, London, Vol. 6, pp. 119-177.
- Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T. and Kito, M. (1987): An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a}B_{1b} subunit. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 210-214.

- 11) Kim, C.-S., Kamiya, S., Kanamori, J., Utsumi, S. and Kito, M. (1990): High-level expression, purification and functional properties of soy-bean proglycinin from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1543-1550.
- 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.