

たん白質工学に基づく大豆グリシニンの N-グリコシル化

N-GLYCOSYLATION OF SOYBEAN GLYCININ BY PROTEIN ENGINEERING

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

Glycinin is one of the dominant storage proteins of soybean seeds. Glycosylation of glycinin would improve its functional properties with respect to hydrophilicity. We constructed various cDNAs which encode specific variants containing potential N-glycosylation sites into each variable region of the A_{1a}B_{1b} proglycinin subunit. Potential sites were introduced by site directed mutagenesis to form modified proglycinins IIN, IIIN1, IIIN2, IVN and VN. Expression plasmids carrying the modified cDNAs were constructed and expressed in yeast. All of the modified proglycinins except IIIN2 were N-glycosylated. IIN and IVN were efficiently N-glycosylated, although IVN was limited-proteolyzed. N-glycosylation did not cause secretion of proglycinin from the yeast cell. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 127-130, 1993.

大豆たん白質は人血中コレステロール値を低下させる機能を持っており¹⁾, 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性たん白質に比べ見劣りがする。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。既に, グリシニンの可変領域の欠失, 可変領域へのポリメチオニンの挿入²⁾, およびジスルフィド結合の形成に関与しているシステイン残基の欠失³⁾によって, 食品機能を改質することに成功している。今回は, たん白質工学的改質の新しい展開を計ることを試みた。グリシニンに糖鎖を付加するとその親水性度が強化され, 水溶性が増大することになり, 加熱ゲル化性, 乳化性, 保水性, 冷沈性, カルシウム沈澱性などが改変される可能性がある。そこで, 生体内で酵素的に糖鎖が付加される配列の導入による N-グリコシル化グリシニンの創製について検討した。

実験方法

菌株, 培地, プラスミド

大腸菌 HB101, JM109, 酵母 AH22 (*a leu2 his4 can1 cir+*)を宿主菌として用いた。大腸菌の培養は LB 培地, 酵母の培養は SD 培地あるいはパークホルダー最少培地⁴⁾を用いた。A_{1a}B_{1b} サブユニットに対する cDNA を挿入し, その3'-非コード領域末端部に *XhoI* 部位を導入した M13mp18⁵⁾ 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 N-グリコシル化配列を導入した改造グリシニン IIN, IIIN1, IIIN2, IVN および VN (Fig. 1 参照)に対する変異 cDNA を作成した。次いで, *PHO5* プロモーターを持つ酵母発現ベクター pAM82 を用いて, 発現プラスミド pAM IIN, pAMIIIN1, pAMIIIN2, pAMIVN および pAM VN を構築した。

酵母細胞の形質転換

酵母の形質転換は Ito らの方法⁶⁾で行ない, *Leu*⁺ の形質転換体を選択した。

酵母における改造グリシニンの発現と検出

各発現プラスミドを持つ酵母 AH22 をヒスチジンを添加した高リン酸-パークホルダー最少培地10 mL中、30℃で培養した。 $A_{610}=0.3$ の時、酵母細胞を集菌し、低リン酸-パークホルダー培地10 mL additionally $A_{610}=1.0$ まで培養した。菌体を1 mM EDTA, 1 mM PMSF を含む50 mM Tris-HCl (pH 8.0)緩衝液0.7 mL に懸濁し、直径1 mm のガラスビーズの存在下でボルテックスした。この抽出液を SDS ゲル電気泳動用緩衝液中で煮沸し、SDS-PAGE に供した⁷⁾。培地にリゾチームを添加し、アセトンを60%になるように加えて、たん白質を沈澱させ、SDS-PAGE に供した。発現たん白質はクーマジー染色あるいはウェスタンブロットティングで検出した。

糖染色

SDS-PAGE 後の試料をニトロセルロース膜にブロットティングし、パーオキシダーゼを結合させた Con A を用いて、糖たん白質を検出した⁸⁾。

改造グリシニンの大量発現

各発現プラスミドを持つ酵母 AH22 を前記のように培養し(500 mL)、得られた菌体をブラウンホモゲナ

イザーで破碎した。その沈澱画分及び上清画分を SDS-PAGE にかけ、ウェスタンブロットティングあるいは糖染色で分析した。

結果と考察

N-グリコシル化配列の導入と発現プラスミドの構築

グリシニンサブユニットには5ヶ所の可変領域が同定されており、 $A_{1a}B_{1b}$ サブユニットの場合、その位置は Fig. 1-A の通りである。可変領域は強い親水性の性質を持つので、分子表面に位置していると考えられる²⁾。そのような領域が N-グリコシル化可能部位と考えることができる。そこで、IIからVまでの可変領域に N-グリコシル化配列(Fig. 1-B)をオリゴヌクレオチドを介する部位特異的変異の手法で導入した。変異の結果、IIN, IIIN1 およびIVN では *Tfi* I 部位、IIIN2 では *Hap* II 部位、VN では *Cfr* 10 I 部位が生成するように設計し、各制限酵素による切断の可否によって、変異体をスクリーニングした。さらに、それらの塩基配列を調べることによって確認した。変異の導入された cDNA を *Xho* I で切り出し、酵母発現ベクター pAM82 の *PHO5* プロモーターの下流に挿入し、

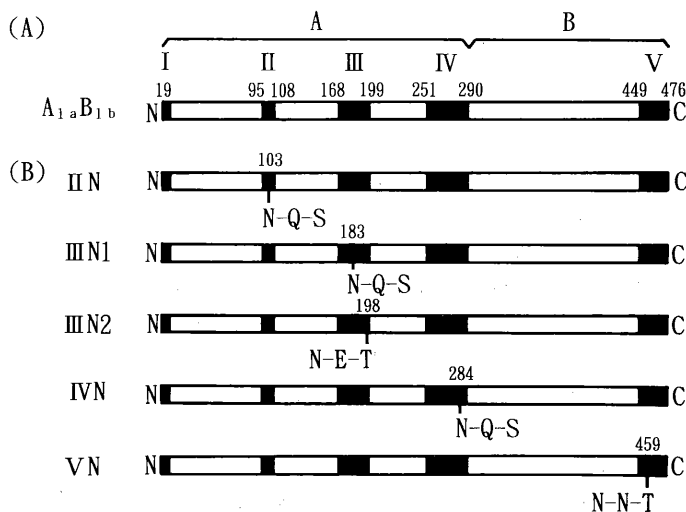


Fig. 1. (A) The variable and conserved regions of $A_{1a}B_{1b}$ proglycin subunit. The numbers of the residues from N-terminus are described for the variable regions above the alignment. The five variable regions were termed I to V. A and B refer to the acidic and basic polypeptides, respectively. Shaded areas, variable regions; open areas, conserved regions. (B) Construction of variants containing a potential N-glycosylation site into each variable region.

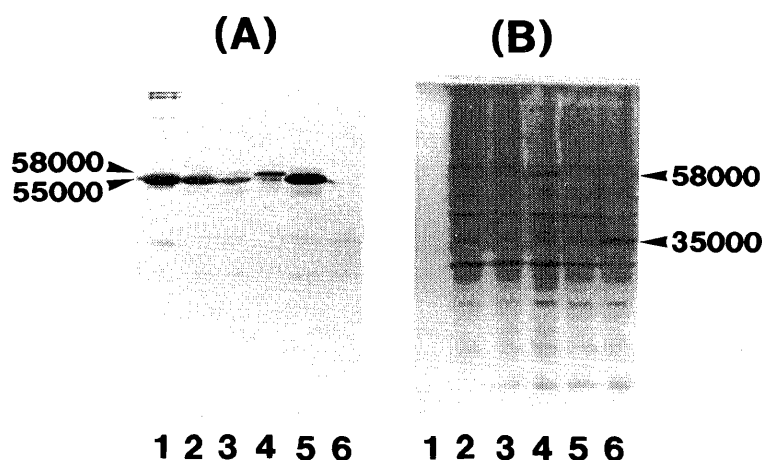


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the expressed proteins from yeast cells harboring individual expression plasmids for modified glycinins. The total yeast cells were analyzed by SDS-PAGE using 11% gels. The proteins separated in the gels were blotted to nitrocellulose membrane and were detected by glycinin-antibody (A) or peroxidase-conjugated Con A (B). Lane 1, proglycinin from *E. coli* harboring pKGA_{1a}B_{1b}-3; lane 2, IIIN2; lane 3, VN; lane 4, IIN; lane 5, IIIN1; lane 6, IVN. Arrowheads indicate the positions of N-glycosylated proglycinins.

各発現プラスミドを構築した。

N-グリコシル化配列導入グリシニンの発現と検出

酵母培養液由来たん白質画分を SDS-PAGE にかけ、ニトロセルロースにブロッティングした後、グリシン抗体で検出したが、発現たん白質は検出されなかった。そこで、不溶性画分も含む酵母抽出液を同様に分析したところ、発現たん白質が検出された (Fig. 2-A)。IIIN2 ではプログリシニンと同サイズ (MW~55000) のバンドのみが検出されたが、IIN、IIIN1、VN ではそれよりも分子量が数1000大きなバンドが検出された。特に、IIN では分子量の大きい方のバンドがドミナントであった。一方、IVN では MW~55000 のバンドは検出されずに、MW~35000 のバンドが検出された。このことは、IVN が限定分解を受けたことを意味している。

同様にしてブロッティングしたメンブレンを糖染色法によって分析した (Fig. 2-B)。IIN および IVN のメインバンドは糖染色された。つまり、これらには糖鎖が付加されていることが判明した。IIIN1 および VN では糖染色されたバンドが検出されなかった。これは、糖鎖を持つものの割合が低いためと考えられる。

発現たん白質の溶解性

グリシン cDNA を酵母に発現させると、その A 鎖の領域からの何らかの不溶化原因物質と相互作用するために、不溶化する⁴⁾。糖付加グリシニンの溶解性を調べるために、酵母を大量に発現させ、細胞を破碎後、その上清画分と沈澱画分をウエスタンブロッティングで分析した。その結果、各発現グリシニンはドミナントに沈澱画分に存在していた。IIN および IVN は部分的に可溶性画分にも存在していた。

発現グリシニンの大部分が存在する不溶性画分を糖染色したところ、IIN や IVN に加えて IIIN1 や VN の分子量約 58000 のバンドには糖が付加されていることが確認出来た。これらの結果と Fig. 2-A の結果を比較することにより、糖鎖の付加率は、IIN で 70%、IIIN1 で 10%、IVN で 100%、VN で 20% と計算された。

可変領域 II と IV は N-グリコシル化の頻度が高く、III や V では低いことが判明した。今後、これらの N-グリコシル化グリシニンの分子集合能、細胞内局在性、細胞内輸送機構との関わり、さらには、機能特性などを解析していく計画である。

文 献

- 1) Kito M, Moriyama T, Kimura Y and Kambara H (1993): Changes in plasma lipid levels in young healthy volunteers by adding an extruder-cooked soy protein to conventional meals. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 354-355.
- 2) 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.
- 3) Utsumi S, Gidamis AB, Kanamori J, Kang IJ and Kito M (1993): Effects of deletion of disulfide bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin. *J Agric Food Chem*, **41**, 687-691.
- 4) Utsumi S, Kanamori J, Kim C-S, Sato T and Kito M (1991): Properties and distribution of soybean proglycinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, **39**, 1179-1186.
- 5) Utsumi S, Kitagawa S, Katsube T, Kang IJ, Gidamis AB, Takaiwa F and Kito M (1993): Synthesis, processing and accumulation of modified glycinins of soybean in the seeds, leaves and stems of transgenic tobacco. *Plant Sci*, in press.
- 6) Ito H, Fukuda Y, Murata K and Kimura A (1993): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.
- 7) Læmmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 8) Utsumi S, Sato T, Kim C-S and Kito M (1988): Processing of preproglycinin expressed from cDNA-encoding A_{1a}B_{1b} subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **233**, 273-276.