

# たん白質工学的に改質した大豆グリシニンの高等植物における発現挙動

## EXPRESSION AND ACCUMULATION OF SOYBEAN GLYCININS MODIFIED BY PROTEIN ENGINEERING IN HIGHER PLANTS

内海 成(京都大学食糧科学研究所)

Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

### ABSTRACT

Chimeric genes composed of A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub> preproglycinin cDNA and its modified versions (IV+4Met and V+4Met), nopaline synthase gene terminator and the cauliflower mosaic virus 35S promoter or the class I patatin promoter were inserted into the genome of tobacco or potato, respectively, by *Agrobacterium*-mediated transformation. Both normal and modified glycinins accumulated in the leaves, stems and seeds of transgenic tobacco, and no differences in the level of accumulation were observed among the expressed proteins in leaves and seeds. The proteins expressed in each tissue were processed to the mature form, and those expressed in the seeds assembled into hexamers. Translational products in the tubers were observed in parenchyma cells of potato plants transformed with the normal and modified glycinin cDNAs. This distribution is consistent with the expression specificity of the patatin promoter. The expression levels of the normal and the modified glycinins were 0.2-1.0% of the total soluble tuber proteins. Both the normal and the modified glycinins expressed in the tubers were present as proglycinin trimers. These results indicate that the modifications in IV+4Met and V+4Met did not disrupt any stage in the biosynthetic process of glycinin in tobacco seeds and potato tubers, supporting the possibility that we can create novel soybean plants which can produce modified glycinins having better nutritional and functional properties. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 1-6, 1994.

大豆たん白質は人血中コレステロール値を低下させるなどの機能を持っており、成人病予防の観点から優れた食品素材である<sup>1)</sup>。しかし、動物性たん白質と比較すると加工特性や栄養性の点で見劣りがする。我々は大豆たん白質の最も重要な成分であるグリシニンの加工特性や栄養性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きた。グリシニンの可変領域の欠失<sup>2)</sup>、可変領域へのポリメチオニンの挿入<sup>2)</sup>、及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<sup>3)</sup>によって食品機能を改質することに成功した。特に、グリシニンの第IVあるいは第V可変領域にテトラメチオニンを挿入した改質グリシニンIV+4MetとV+4Metは栄養性に加えて加工特性も優れていた<sup>2)</sup>。このような改質グリシニンを産生する有用作物を開発する基盤を確立することを目的として、形質転換体を得ることが比較的容易なタバコとジャガイモにおける天然型及び改質グリシニン遺伝子の発現と蓄積の挙動を解析した。

## 実験方法

### キメラ遺伝子の構築とタバコ及びジャガイモの形質転換

グリシニン  $A_{1a}B_{1b}$  サブユニットの天然型あるいは改質型 (IV+4Met, V+4Met) をコードする cDNA を植物バイナリーベクター pBI121 のカリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーターの下流に連結し、タバコへの導入用プラスミド pBIG<sub>1</sub>, pBIG<sub>1</sub>IV, pBIG<sub>1</sub>V を構築した (Fig. 1)。

ジャガイモ塊茎特異的たん白質であるパタチンのプロモーターを PCR 法で調製した。Fig. 1 と同様に、このプロモーターと天然型  $A_{1a}B_{1b}$  あるいは改質型 IV+4Met, V+4Met をコードする cDNA を植物バイナリーベクター pBI101 に連結し、ジャガイモへの

導入用プラスミド pBPG<sub>1</sub>, pBPG<sub>1</sub>IV, pBPG<sub>1</sub>V を構築した。

各導入用プラスミドをアグロバクテリウムを介してタバコリーフディスクあるいはジャガイモ塊茎ディスクに導入し、カナマイシン耐性を指標にして形質転換体を選択した。各遺伝子導入体について 5～10 個体の植物体を再生した。

### DNA 及び RNA 分析

タバコ葉及びジャガイモ葉より DNA を調製し、グリシニン cDNA をプローブとしてサザンブロッティングを行った。

ジャガイモ葉及び塊茎より RNA を調製し、グリシニン cDNA をプローブとしてノザンブロッティングを行った。

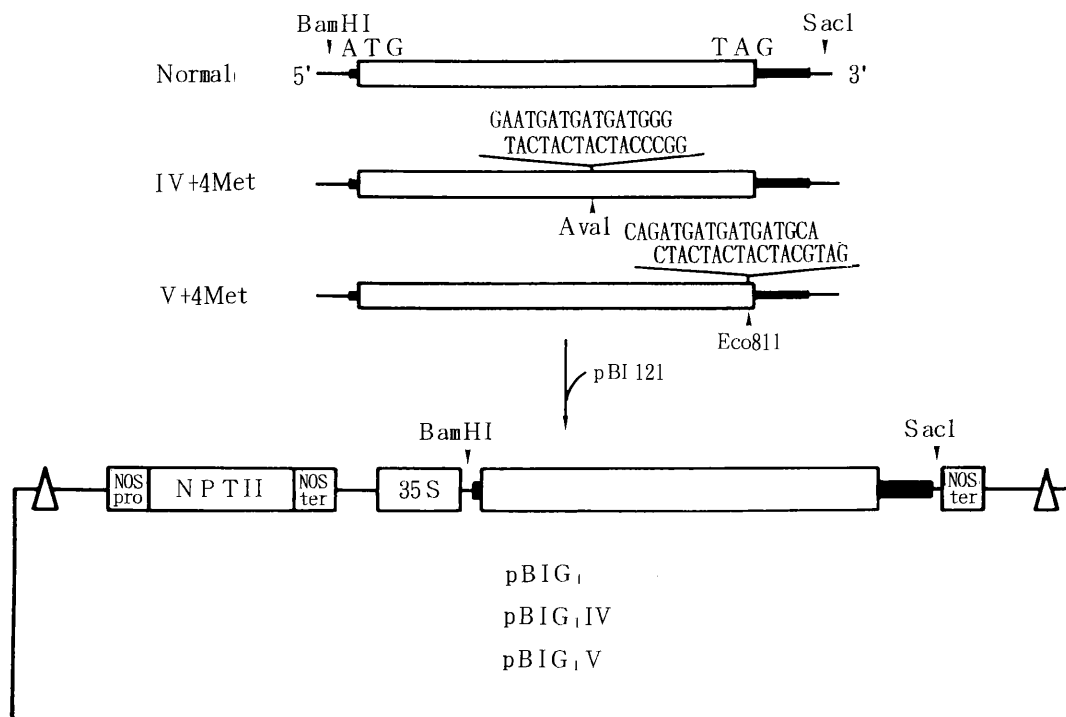


Fig. 1. Schematic representation of the normal and modified glycinin cDNAs and binary plasmids for their chimeric genes. Open and shaded boxes indicate coding region and 5' and 3' non-coding regions of glycinin cDNA, respectively. NOS-pro, NPTII, NOS-ter, and 35S are nopaline synthase gene promoter, neomycin phosphotransferase II gene, nopaline synthase gene terminator and CaMV35S promoter, respectively. Triangles are right and left border of T-DNA.

### 翻訳産物の抗体による検出

タバコ葉、茎、種子及びジャガイモ塊茎よりたん白質を0.4 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA を含む35 mmol/L K-Pi 緩衝液 (pH 7.6) で抽出した。各抽出液をニトロセルロース膜にドットブロットし、グリシニン抗体及びアルカリフォスファターゼを結合させた2次抗体と反応させる<sup>4)</sup>ことによって発現量を調べた。

### 翻訳産物の分子集合の分析

たん白質抽出液をショ糖密度勾配遠心分離 (10-30, 36,000 rpm×16 h, 20℃) にかかけ、得られた画分を、SDS-PAGE に引き続くウェスタンブロットングで分析した<sup>5)</sup>。

### 組織化学的分析

ジャガイモ塊茎の切片 (1 mm) を3%ホルムアミド、0.5%グルタルアルデヒドを含む0.1 mol/L Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4) で固定化し、グリシニン抗体とアルカリホスファターゼを結合させた2次抗体で処理することにより翻訳産物の組織化学的分布を調べた。

## 結果と考察

### 形質転換植物体の作出と発現の検出

各遺伝子コンストラクトを持つタバコ及びジャガイモの葉より抽出したDNAを用いるサザンブロットングの結果より、各形質転換体がグリシニン遺伝子を持つことが確認できた。

CaMV35S プロモーターは構成的に発現しうるので、タバコ形質転換体の葉、茎、種子のたん白質抽出液をドットブロットングで解析した。その結果、天然型、改質型ともいずれの組織においても発現・蓄積しうることが判明した。発現のレベルは各個体で異なっていたが、最高発現レベルには遺伝子種間及び組織間で大差はなく、各組織たん白質の0.02-0.1%程度であった。

パタチンプロモーターが塊茎特異的に発現しているかどうかを調べるために、葉及び塊茎より調製したRNAに関してノザンブロットングを行った。その結果、パタチンプロモーターの塊茎特異的発現がいずれの遺伝子コンストラクトについても保持されていることが確認できた。また、塊茎たん白質抽出液をドットブロットングで解析したところ、最高発現レベルに遺伝子種間で大差はなく、塊茎たん白質の0.2-1.0%程度であった (Fig. 2)。

### 翻訳産物の分子集合とプロセッシング

大豆グリシニンは大豆種子中では、A鎖とB鎖にプロセッシングされた成熟型のサブユニット6個が分子集合してヘキサマーを形成している。このような分子集合やプロセッシングが各組織において見られるかどうかを調べるために、各抽出液をショ糖密度勾配遠心分離にかかけ、得られた各画分を還元剤の不在下におけるSDS-PAGE に引き続くウェスタンブロットングによって分析した。タバコ種子の場合、いずれの遺伝子コンストラクトの翻訳産物とも 11S の大きさに相当

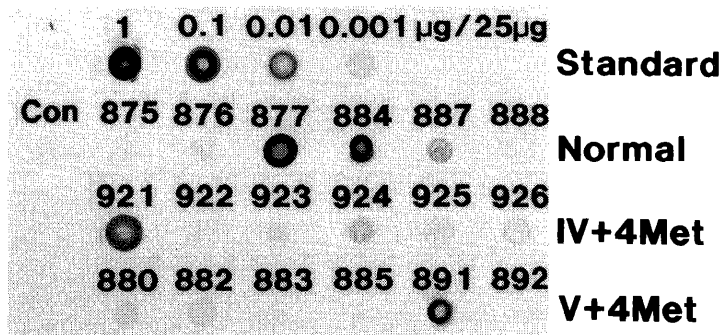


Fig. 2. Detection of the translational products in potato tubers by dot blotting. The extracts of tubers of potato plants transformed with the normal and modified glycinin cDNAs were analyzed by immunoblotting. Purified glycinin (0.001-0.1 µg) mixed with 25 µg proteins of tuber extract of untransformed potato plants were used as standard. Con denotes the extract of untransformed potato tuber. The numbers above each dot indicate individual plants transformed with the normal and modified glycinin cDNAs.

する画分15-17を中心にして観察された(Fig. 3)。つまり、6量体に分子集合していることが判明した。しかし、タバコ葉及び茎においては、何らかの理由で構造形成が不完全になり大部分がトップの画分に分画された。一方、ジャガイモ塊茎では、翻訳産物はいずれのものも7Sの大きさに相当する画分9-13を中心にして観察された(Fig. 4)。つまり、3量体に分子集合していることが判明した。したがって、タバコ種子ではブ

ロ型から成熟型へのプロセッシングが起こっているが、塊茎ではプロセッシングされていないと考えられる。この点を調べるために、タバコ種子については画分15を、ジャガイモ塊茎については画分11を還元剤の存在下でSDS-PAGEにかけ、A鎖に対する抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。その結果、いずれの翻訳産物ともタバコ種子においては成熟型へのプロセッシングを受けるが、ジャガイモ塊茎においては受けな

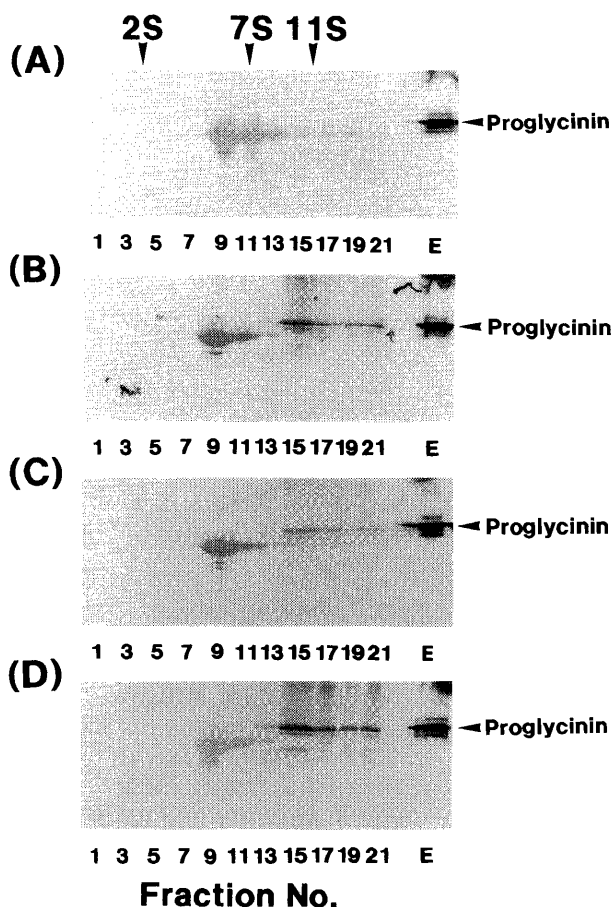


Fig. 3. Analysis of the assembly of the normal and modified glycinins expressed in the seeds of transgenic tobacco. The seed extracts from tobacco plants non-transformed (A) and expressing normal glycinin (B), modified glycinin IV+4Met (C) and modified glycinin V+4Met (D) were subjected to centrifugation on a 12 mL 10-30% (W/V) linear sucrose density gradient and analyzed by SDS-PAGE (in the absence of 2-mercaptoethanol) and immunoblotting. Sedimentation is from left to right. Sedimentation standard is given. Arrow head indicates the position of proglycinin expressed in *E. coli*. E denotes proglycinin from *E. coli* JM105 harboring pKGA<sub>1a</sub> B<sub>1b</sub>-3.

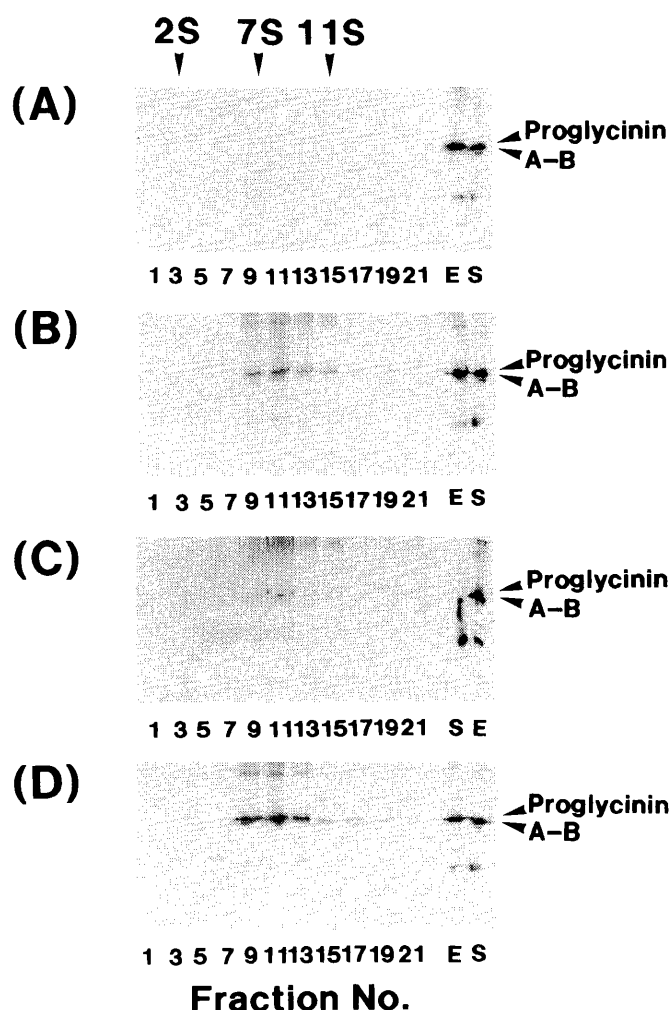


Fig. 4. Analysis of the assembly of the normal and modified glycinins expressed in the tubers of transgenic potato. The tuber extracts were subjected to sucrose density gradient centrifugation as described in Fig.3. S denotes mature glycinin (A-B) from soybean seeds. All conditions are the same as in Fig. 3 except that lanes S and E of panel C were done in the presence of 2-mercaptoethanol.

いことが確認された。このように、IV+4Met やV+4Met のような改造が分子集合やプロセッシングを全く阻害しないことが判明した。したがって、改質グリシニンを産生する有用作物を開発することが可能であると判定できる。

#### ジャガイモ塊茎における翻訳産物の蓄積挙動

グリシニンのジャガイモ塊茎における特異的発現のためにパタチンのプロモーターを用いたが、パタチンは塊茎の柔細胞で発現し、周皮細胞では発現していな

いことが知られている<sup>9)</sup>。そこで、このような蓄積の特異性がグリシニンについても見られるかどうかを調べるために、固定化したジャガイモ塊茎を直接グリシニン抗体と反応させ、アルカリフォスファターゼを結合させた2次抗体で処理した (Fig. 5)。非形質転換体においては全く発色が見られなかったが、グリシニン遺伝子が導入された形質転換体では、柔細胞 (Pa) が青く発色し、周皮細胞は発色しなかった。つまり、パタチンの蓄積の特異性と一致していた。同様の結果が改

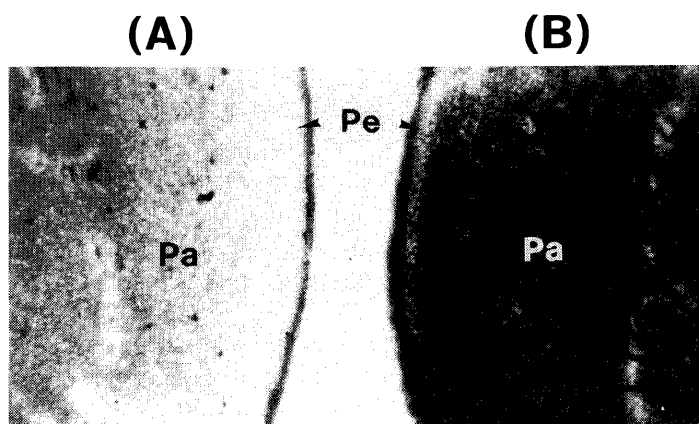


Fig. 5. Histochemical localization of the expressed glycinin in potato tuber. The tuber sections of potato non-transformed (A) and expressing normal glycinin (B) were treated with anti-glycinin serum, followed by a goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate. Pa, parenchyma; Pe, periderm.

質グリシニン遺伝子の形質転換体についても観察された。

翻訳産物が液胞に運ばれているのか、あるいは別のオルガネラに存在しているのかを調べるために、塊茎切片を免疫電顕に供した。金コロイドは特定のオルガネラに局在せず、分散した状態で観察された。このパターンは金コロイドと銀増感によって観察されたパタチンの細胞内分布（液胞に存在する）のパターン<sup>6)</sup>とよく類似していたので、塊茎で発現したグリシニンは巨大な液胞に分散した状態で存在していると推定された。

ジャガイモ塊茎中では成熟化が起らず、プロ型で蓄積したが、我々はプロ型の改質グリシニンが天然のグリシニンよりも優れた加工特性を示すことを確認している<sup>2,3)</sup>。したがって塊茎中での発現レベルを高めることによってたん白質食糧としての特性を備えたジャガイモを開発することが可能と期待できる。

## 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, Sato T, Kim C-S and Kito M (1988): Processing of preproglycinin expressed from cDNA-encoding A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub> subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **233**, 273-276.
- 5) Utsumi S, Kim C-S, Sato T and Kito M (1988): Signal sequence of preproglycinin affects production of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene*, **71**, 349-358.
- 6) Sonnewald U, Studer D, Rocha-Sosa M and Willmitzer L (1989): Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta*, **178**, 176-183.