

ツルマメの11SグロブリンA₅サブユニットの変異に関する研究

Genetic Variation of 11S Globulin A₅ Subunit in *Glycine soja*

原田久也 (千葉大学園芸学部)

Kyuya HARADA

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo 271

ABSTRACT

It is well known that A₄ and A₅ acidic (group II) subunits of soybean 11S globulin are responsible for gel hardness and gelling characteristics of tofu gels and heat-induced gels. I have searched accessions of *Glycine soja* for new variants of the group II subunits. Among seeds of one accession, a few seeds were found to lack the A₅ subunit but to have a novel acidic subunit (A_{5a}). Genetic analysis revealed that A_{5a} is encoded by an allelic gene at the same locus as that for the A₅ subunit. The A_{5a} subunit was found to have a molecular weight of about 27,000 and an isoelectric point of less than 3.0. No disulfide bond was detected between A_{5a} subunit and other subunits. The group II subunits of the mutant were separated by two-dimensional electrophoresis, and the N-terminal amino acid sequence of the A_{5a} subunit was determined by gas-phase sequencer. Fifteen out of twenty amino acid residues from the N-terminal were aspartic acids or glutamic acids and there was no homology with previously reported sequences of 11S globulin acidic subunits. To evaluate the effects of the A_{5a} subunit on properties of heat-induced gels of 11S globulin, A_{5a} was introduced into soybean varieties having different 11S globulin subunits. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 51-54, 1995.

ダイズ11SグロブリンのA₄, A₅サブユニット（グループIIサブユニット）は加熱ゲル、豆腐ゲルのゲル強度、ゲル化特性に大きな影響を及ぼすことが知られている¹⁻⁴⁾。ダイズではA₅サブユニットの欠失、A₄サブユニットの含量の変異が見い出されているが、更にグループIIサブユニットの新規な変異を探索するため、農水省農林水産生物遺伝資源管理センターに保存されているツルマメ (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) を中心に11Sグロブリン酸性サブユニットの変異を分析した。

ツルマメの11Sグロブリンはダイズと極めて類似した酸性サブユニット組成を示したが、一般にA₅の含量が高かった。ツルマメではA₅欠失は報告されていなかったが、一つの系統の種子の一部にA₅欠失が見い出された。それらの種子は同時に等電点の低い、新規なバンド (A_{5a}) を保有していた。この研究では、A_{5a}の

遺伝学的、生化学的特性を解析した。

実験方法

電気泳動法

11Sグロブリンの酸性サブユニットの解析には喜多村のアルカリ尿素系電気泳動法⁵⁾を改良して用いた。より鋭いスターティング帯を形成させるため、試料用ゲルのイオン強度を分離用ゲルの1/5として、試料は8 M 尿素、0.2M 2-メルカプトエタノールに溶解した。分離用ゲルのアクリルアミド濃度に6～11%の濃度勾配をつけ、平板ゲルの両端が直接泳動用緩衝液に触れるようにした。

分子量の推定にはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁶⁾、等電点の推定には尿素を含む等電点電気泳

動法を用いた。サブユニットの単離には1次元目にアルカリ尿素系電気泳動法、2次元目にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使った2次元電気泳動法を用いた。

11Sグロブリンの調製

脱脂した子葉粉末から0.01M 2-メルカプトエタノール、0.02%アジ化ナトリウム、及びポリビニルポリピロリドンを含む標準緩衝液でたん白質を抽出、遠心後上澄みを0.065 M食塩を含む水に対して透析後、pHを5.8~5.9に合わせて沈澱したものを粗11Sグロブリン画分とした。

Table 1. Statistical analysis for segregation of A_5 and A_{5a}

Subunit type	A_5	F_1	A_{5a}
Observed numbers	23	41	16
Expected ration	1	2	1

$$\chi^2=1.28 < \chi^2_{0.05}(1)=3.84$$

N末端アミノ酸配列の決定

2次元電気泳動法により単離したたん白質をポリビニリデンジフルオリド膜に転写した後、自動エドマン分解により気相プロテインシーケンサーを用いて決定した。

結果と考察

ツルマメの A_5 欠失性の遺伝的特性

A_5 欠失は系統番号050005の種子の一部に見い出された。これらの種子は同時に等電点の低い新規なバンド(A_{5a})を保有していた。 A_{5a} は通常のアルカリ尿素系電気泳動のゲルのpHでは先端に移動して分離できないため、pH9.0に上げて泳動しなければならなかった。050005の種子の中には A_5 と A_{5a} を半量ずつ持つものも見い出されたが、 A_5 を欠失した種子から得られた次代の種子は分析した範囲で、すべて A_5 を欠失していて、 A_{5a} を保有していた。これは、この特性が遺伝的に安定であることを示している。この系統を050005-2、 A_5 サブユニットを保有する系統を050005-1として区別した。

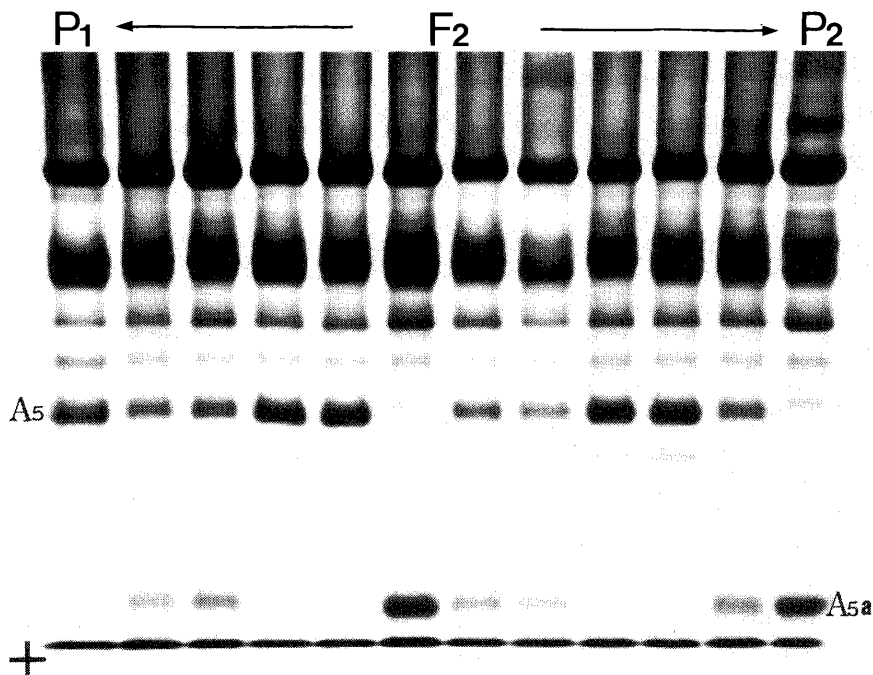


Fig. 1. Segregation of A_5 and A_{5a} in F_2 seeds derived from Moshidou Gong 503 and 050002-2. P_1 , Moshidou Gong503; P_2 , 050005-2

A₅を保有するダイズ秣食豆公503と050005-2を交雑して、A_{5a}の遺伝性を解析した。F₁種子はA₅とA_{5a}を両親の半量ずつ保有しており、F₂種子では両親の型とF₁型が1:1:2に分離した (Fig. 1, Table 1)。このことからA_{5a}の遺伝子はA₅を支配している遺伝子座に存在していることが明らかとなった。

A_{5a}の生化学的特性

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるとA_{5a}の分子量は約27,000であった。尿素を含む等電点電気泳動法で等電点を決定することができなかったが3以下であると言える。2-メルカプトエタノールの有無の電気泳動像の比較から、A_{5a}は11Sグロブリン分子中で分子間ジスルフィド結合を持たないことが明らかとなった。

アルカリ尿素系電気泳動法とSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による2次元電気泳動法を用いた050005-1と050005-2のグループII酸性サブユニットの分離をFig. 2に示した。A_{5a}のN末端アミノ酸配列はEGXDDQEEEEDEPEEVEEEEEであった。ダイズのA₅サブユニットのN末端アミノ酸配列とは全く異っていた。A₅サブユニットのC末端に近い領域にも酸性アミノ酸に富んだ領域があるが、ツルマメのA₅サブユ

ニットにはよりN末端に近い領域に酸性アミノ酸に富んだ領域があり、050005-2ではそこで切断を受けた可能性がある。A_{5a}のcDNA等の解析が必要である。ツルマメのA₅サブユニットを詳細に解析することで、ダイズとツルマメの関係について新しい情報が得られることが期待される。

A_{5a}の育種における意義

A_{5a}をダイズの育種に役立てることができるかどうかは、A_{5a}が11Sグロブリンの加熱ゲルの物性、ゲル化特性にどのような影響を及ぼすかにかかっている。グループI酸性サブユニットが同一で、A₅を保有する11SグロブリンとA_{5a}を保有する11Sグロブリンを比較するため、050005-2と秣食豆公503に由来するF₂種子から、秣食豆公503型のグループI酸性サブユニットを持ち、A₅を保有する系統とA_{5a}を保有する系統を選抜して、種子を増殖した。またA₅サブユニットを欠失する大館1号と050005-2とのF₂種子から、大館1号型のグループI酸性サブユニットを持ち、A₅を欠失した系統とA_{5a}を保有する系統を選抜して同様に種子を増殖した。前の組合せからはA₅とA_{5a}の加熱ゲルに及ぼす差異、後の組合せからはA_{5a}の存在による加熱ゲルへの影響が解析できると期待される。大館1号と

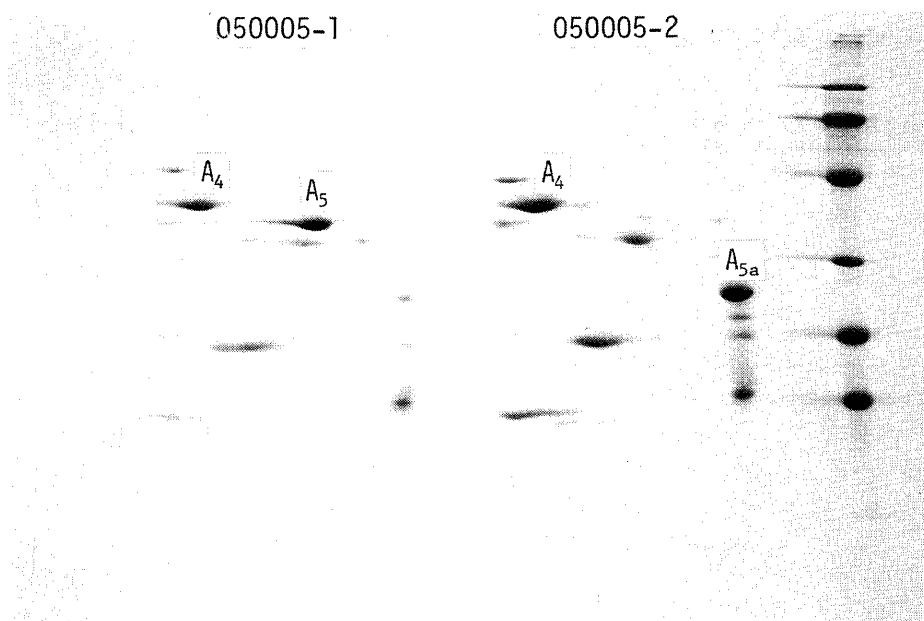


Fig. 2. Two-dimensional electropherogram of group II subunits from 050005-1 and 050005-2 (mutant).

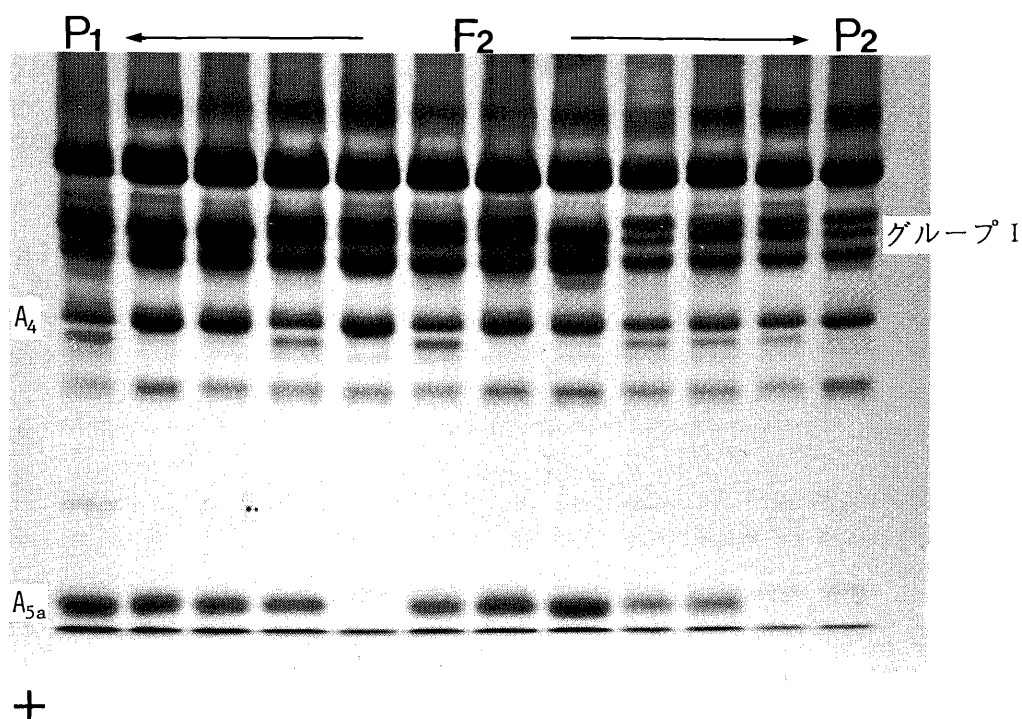


Fig. 3. A part of F_2 seeds derived from Odate No.1 and 05000-2.
 P_1 : 050005-2 (mutant) P_2 : Odate No.1

050005-2の F_2 種子の分析例をFig. 3に示した。

また11Sグロブリン欠失系統を用いて、 A_{5a} のみの11Sグロブリン酸性サブユニットを保有する系統を作出中である。これにより、 A_{5a} と対応する塩基性サブユニットのみで、11Sグロブリン分子が構成されるかどうか、どのような物性を示すかを知ることができる。

文 献

- 1) Mori T, Nakamura T and Utsumi S (1982) : Formation of pseudoglycinins and their gel hardness. *J Agric Food Chem*, **30**, 828-831.
- 2) Murasawa H, Sakamoto A, Sasaki H and Harada K (1991) : The effect of a glycinin subunit on tofu-making. In : Proceedings of the International Conference on Soybean Processing and Utilization, pp. 53-57.
- 3) Nakamura T, Utsumi S and Mori T (1984) : Cultivar differences in gelling characteristics of soybean glycinin. *J Agric Food Chem*, **32**, 647-651.
- 4) Nakamura T, Utsumi S and Mori T (1985) : Formation of pseudoglycinins from intermediary subunits of glycinin and their gel properties and network structure. *Agric Biol Chem*, **49**, 2733-2740.
- 5) Kitamura K and Shibasaki K (1975) : Isolation and some physico-chemical properties of the acidic subunits of soybean 11S globulin. *Agric Biol Chem*, **39**, 945-951.
- 6) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.