

大豆プログリシニンのX線結晶構造解析

X-Ray Analysis of Soybean Proglycinin

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

Glycinin is one of the most abundant storage proteins in soybean seeds. We earlier reported the preparation of proglycinins modified by protein engineering to improve food functions. Crystals of the normal and the modified proglycinins (ΔI , $\Delta V8$, IV+4Met, V+4Met, C12G, and C88S) expressed in *Escherichia coli* were grown, each under different suitable crystallization conditions. The crystals of the normal, ΔI , V+4Met, C12G, and C88S diffracted X-rays sufficiently for crystallographic analysis. The normal, ΔI , C12G, and C88S crystals were tetragonal, space group $P4_1$ or $P4_3$, and with unit cell dimensions $a=b=114.3-115.9 \text{ \AA}$ and $C=145.1-147.1 \text{ \AA}$. V+4Met crystals were monoclinic, space group $P2$, and with unit cell dimensions $a=118.7 \text{ \AA}$, $b=78.1 \text{ \AA}$, $c=109.9 \text{ \AA}$, and $\beta=119^\circ$. The number of protomers per asymmetric unit of all the crystals of the normal and the four modified proglycinins was about 3. This value is consistent with proglycinins being trimers. Moreover, the structure of the normal proglycinin trimer was determined at $6 \text{ \AA}$ level. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 83-86, 1995.

大豆たん白質はヒト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¹⁾。しかし、加工特性や栄養性の点では動物たん白質に見劣りがする。したがって、大豆たん白質の用途を拡大するためには、加工特性や栄養性を改善することが必要である。大豆たん白質の主要成分であり、血中コレステロール値低下能発現の主体であるグリシニンの加工特性や栄養性を改善すると、理想的な食品機能を備えたものに転換できることになる。このためには、X線結晶構造解析によってグリシニンの高次構造を解明し、構造・加工特性相関を分子レベルで明らかにする必要がある。しかし、大豆から得られるグリシニンには複雑な分子種の多型性があるために結晶化が困難である。我々は、グリシニンcDNAを大腸菌で発現させることによって得られるプログリシニンは単一分子種であるので結晶化が容易であろうと考えた。成熟型グリシニンは6量体であるが、プログリシニンは3量体である²⁾。つまり、プログリシニンの方が分子サイズが小さいので、構造解析が容易であ

ろう。しかも、プログリシニンは成熟型と同様の2次構造を持ち、グリシニンに固有の基本的性質（冷沈性、カルシウム沈殿性）や加工特性（加熱ゲル化性、乳化性）を示す³⁾。したがって、グリシニンの構造解析のモデルとして、またステップとして、プログリシニンの構造解析は非常に重要である。一方、我々は、天然型とは異なる加工特性を示す種々の改造型プログリシニンの作出に成功している^{4,5)}。これらの改造型についても構造解析を行うことができると、グリシニンの構造と加工特性の関係を多面的に解析できることになる。そこで、大腸菌で生産した天然型及び改造型プログリシニンの結晶化とX線結晶構造解析を試みた。

実験方法

菌株、培地、プラスミド

天然型である $A_{1\alpha}B_{1\beta}-3$ (N末端3残基を欠失)⁶⁾、第I、第V可変領域を欠失した ΔI 、 $\Delta V8$ ⁴⁾、第IV、第V可変領域にテトラメチオニンを挿入したIV+4Met、

V+4Met⁴⁾, Cys12をグリシンに置換したC12G⁵⁾, Cys88 をセリンに置換したC88S⁵⁾に対する各発現プラスミドを持つ大腸菌JM105をLB培地 (pH7.5) で培養し, IPTGで発現を誘導した。

発現タンパク質の精製

各発現プラスミドを持つ大腸菌JM105を10L培養し, 超音波処理で抽出液を調製した。抽出液を硫酸分画し, Q-セファロースカラムクロマトグラフィーによって純度95%まで精製した。

発現タンパク質の結晶化

結晶化はまず, 透析平衡法で試みた。発現タンパク質溶液 (タンパク質濃度6.6–15 mg/mL) を0.05–0.2 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に対して温度 4°C–20°Cで透析した。透析法で十分な結晶が得られなかった標品に関しては, ポリエチレングリコール 6000 (PEG) を沈殿剤として用いるハンギングドロップ蒸気拡散法に供した。

結晶密度の測定

結晶の密度は, Ficoll 400密度勾配遠心分離を25°Cで行うことによって測定した⁷⁾。

結晶構造データの測定

予備的な結晶学的データの測定は, 理学X線発生器とノニウスプレセッションカメラを用いて行った。さらなる回折データの測定はシーメンスX-1000マルチワイヤーエアリアディテクターを用いて行った。

結 果 と 考 察

天然型及び改造型プログリシニンの結晶化

天然型プログリシニンは, 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に対して 4°Cで透析することによって48時間以内に結晶が得られ, 1週間以内に1 mm以上に成長した。その結晶の写真をFig. 1 (A)に示した。試料中のプログリシニンの70%以上が結晶化した。こういった事実は, 大腸菌で生産したプログリシニンが正しい構造を形成できることを示している。

透析法で, 改造型プログリシニンのうち, Δ I, C12G, IV+4MetとV+4MetはX線解析可能なサイズの結晶を与えたがその至適濃度や温度は互いに異なっていた (Table 1)。一方, Δ V8は小さな結晶のみ形成し, C88Sは全く結晶化しなかった。 Δ V8とC88Sに関して, PEGを沈殿剤として利用するハンギングドロップ法によって結晶化を試みた。C88SはX線解析可能な結晶を与えた, Δ V8は透析法よりも大きな結晶を与えたが, X線解析には不十分なものであった。各改造型プログリシニンの典型的な結晶をFig. 1 (B)–(G)に示し

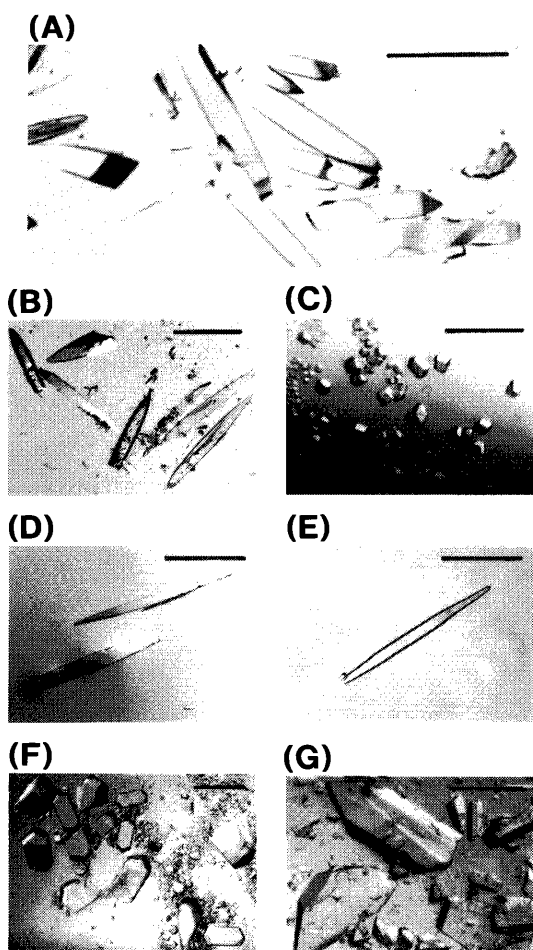


Fig. 1. Photomicrographs of crystals of the normal and the modified proglycinins Δ I, Δ V8, C12G, C88S, IV+4Met, and V+4Met. The bar in each panel represents 1 mm. (A) Typical crystals of the normal proglycinin grown by dialysis. The crystals of the modified proglycinins were grown under the following conditions: (B) Δ I, in 0.135 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, by dialysis at 4°C; (C) Δ V8, by hanging drop at 4°C in 0.035 mol/L potassium phosphate buffer, pH 7.6, containing 3.4% PEG; (D) C12G, in 0.125 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, by dialysis at 6°C; (E) C88S, by hanging drop at 8°C in 0.035 mol/L potassium phosphate buffer, pH 7.6, containing 9% PEG; (F) IV+4Met, in 0.15 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, by dialysis at 8°C; (G) V+4Met, in 0.125 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 by dialysis at 8°C.

Table 1. Crystallization conditions and maximum crystal length of the modified proglycinins

Proglycinins	Suitable temperature (°C)	Maximum crystal length (mm)							
		Concentration of Tris-HCl ^a (mol/L)							
		0.05	0.1	0.125	0.135	0.15	0.16	0.175	0.2
Δ I	4	0.2	- ^b	0.2	1.5	0.2	ND	-	-
Δ V8	8	ND	0.1	0.1	ND	0.1	0.1	ND	ND
I V + 4Met	8	ND	0.2	0.2	ND	1.0	ND	-	ND
V + 4Met	8	ND	0.2	3.0	0.2	0.2	ND	ND	ND
Gly12	6	ND	0.5	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
Ser88		ND	-	-	ND	-	ND	-	-

^apH 7.6.^bNo crystals.

ND, not done.

Table 2. Preliminary X-ray crystallographic data for the modified proglycinins

Proglycinins	Maximum resolution (Å)	Crystal system	Space group	Unit cell dimensions (Å)			Density (g cm ⁻³)	Protomers/asymmetric unit	Vm ^a (Å ³ Da ⁻¹)
				a	b	c			
Normal	2.9	Tetragonal	<i>P</i> 4 ₁ / <i>P</i> 4 ₃	115.2	115.2	147.1	1.16	3.17	3.05
Δ I	3.5	Tetragonal	<i>P</i> 4 ₁ / <i>P</i> 4 ₃	115.9	115.9	145.1	1.16	3.25	3.12
Gly12	3.4	Tetragonal	<i>P</i> 4 ₁ / <i>P</i> 4 ₃	114.9	114.9	146.1	1.16	3.13	3.02
Ser88	3.0	Tetragonal	<i>P</i> 4 ₁ / <i>P</i> 4 ₃	114.3	114.3	145.7	1.16	3.09	2.98
V + 4Met	4.1	Monoclinic	<i>P</i> 2	118.7	78.1	109.9	1.16	2.87	2.76

^aRatio of unit cell volume to unit protein mass.

た。

各改造型プログリシニンの結晶型や至適結晶化条件が互いに異なっていることは、各改造型グリシニンが互いに異なる構造的特徴を持っていることを反映していると考えられる。

X線結晶構造解析

天然型及び各改造型プログリシニンの結晶について予備的X線解析を行ったところ、天然型、Δ I、V + 4Met、C12G、C88Sが解析可能な回折強度を与えた。これらの結晶の結晶学的データをTable 2にまとめた。天然型とΔ I、C12G、C88Sの結晶は互いに同じ晶系、空間群、格子定数であったがV + 4Metの結晶は異なっていた。これは、C末端部である第V可変領域にテトラメチオニンが挿入されることによって、タンパク質間相互作用の性質が変わったためと考えられる。

天然型プログリシニンに関して、重原子同型置換法に利用できる重金属を検索した。その結果、パラクロロメルクリフェニルスルホン酸や水酸化メチル水銀(II)などが比較的有效であった。ネイティブ及び重原子誘導体の回折強度に基づく差パターンソン法により重原子位置を推定し、これを差フーリエ合成によって

確認した。各重原子ともプロトマー当たりの結合数は1個であった。各重原子誘導体から得られた最良位相に基づいて6 Åレベルでの電子密度図を信頼度因子0.85で求めた。その結果、プログリシニン3量体のディメンションは93×93×36 Åであることが判明した。現在、高分解能での解析を進めている。

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) Utsumi S (1992) : Plant food protein engineering. In : *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol.36, Kinsella JE, ed., Academic Press, San Diego. pp.89-208.
- 3) 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.
- 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) Bode W and Schirmer T (1985) : Determination of the protein content of crystals formed by *Mastigocladus laminosus* C-phycocyanin, *Chroomanas spec.* Phycocyanin-645 and modified human fibrinogen using an improved ficoll density gradient method. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **366**, 287-295.