

大豆 β -コングリシニン構成サブユニットの大腸菌発現と結晶化

内海 成*

京都大学食糧科学研究所

Expression in *Escherichia coli* and Crystallization of Constituent Subunits of Soybean β -Conglycinin

Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

β -Conglycinin is one of the most abundant storage proteins in soybean seeds and is composed of three kinds of subunits (α , α' and β). The construction of *Escherichia coli* expression system and crystallization of constituent subunits were attempted to elucidate their structure-function relationships. Nucleotide sequences corresponding to mature polypeptides of cDNAs encoding individual subunits were placed under the control of T7 promoter in an expression vector pET21d. α , α' and β subunits were expressed as soluble proteins at the levels of 15, 10 and 20% of total *E. coli* proteins, respectively. The properties of α and β subunits which were expressed at a higher level were examined. Self-assembly of α and β subunits into trimers was examined and confirmed by sucrose density gradient centrifugation followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The expressed α and β subunits were purified to near homogeneity ($\sim 90\%$) by ammonium sulfate fractionation, and Q-Sepharose and hydrophobic column chromatographies. The purified subunits were subjected to crystallization under various conditions by the hanging drop vapor diffusion method. Although α subunit formed only small crystals having the maximum dimension of 0.05 mm, β subunit formed crystals having the size (0.3 x 0.2 x 0.1 mm) suitable for X-ray diffraction. The crystals of β subunit were monoclinic, space group $P2_1$, and with unit cell dimensions $a=69.2\text{ \AA}$, $b=85.0\text{ \AA}$, $c=79.8\text{ \AA}$, $\alpha=\gamma=90.0^\circ$ and $\beta=110.8^\circ$. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 6-9, 1996.

Key words: soybean, β -conglycinin, expression, crystallization, X-ray analysis

*〒 611 宇治市五ヶ庄官有地

大豆たん白質はグリシニンと β -コングリシニンを主要成分としている。我々は、グリシニンの栄養性や加工特性の改善をたん白質工学的に試み、いくつかの成果を挙げて来た¹⁻⁴⁾。今回、たん白質工学に基づく改質を β -コングリシニンに応用展開することを計画した。 β -コングリシニンは、 α 、 α' 、 β の3種のサブユニットから構成されている。各サブユニットの一次構造には高い類似性が見られるが、加工特性への寄与は一律ではない⁵⁾。また、 β -コングリシニンは大豆の三大アレルゲンの1つであるが、3種のサブユニットのうち、 α サブユニットのみがアレルゲン性を示す⁶⁾。したがって、 β -コングリシニンの改質を理論的に成し遂げるためには、各サブユニットの高次構造をX線結晶構造解析によって解明する必要がある。 β -コングリシニンには複雑な分子種の多型性があり、大豆種子から調製した標品からはX線解析に供し得る質を持つ結晶を得ることが困難である。そこで、多型性の影響を排除するために各サブユニットの大腸菌発現系を構築し、その発現たん白質の結晶化を試みた。

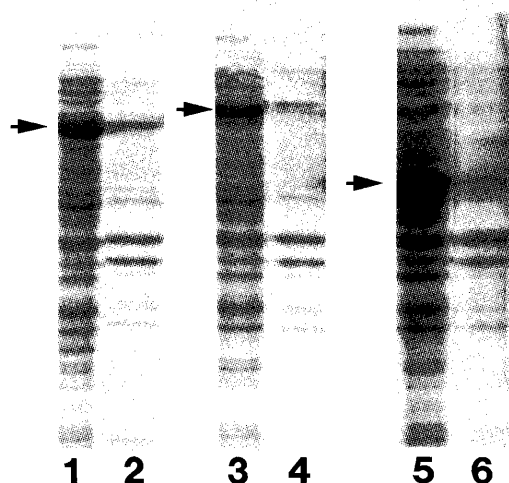


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the solubility of the expressed proteins. The soluble (lanes 1, 3 and 5) and the insoluble (lanes 2, 4 and 6) fractions of *E. coli* cells harboring the expression plasmids for α (lanes 1 and 2), α' (lanes 3 and 4), and β (lanes 5 and 6) were analyzed by SDS-PAGE using 11% gels. The proteins separated in the gels were stained by Coomassie brilliant blue. Arrows indicate the expressed proteins.

実験方法

菌株、培地、ベクター

cDNA クローニングには、XL1-Blue 及び SOLR, サブクローニングには HB101, 発現には BL21 (DE3) を宿主菌として用いた。培養は LB 培地で行った。発現ベクターとしては、T7プロモーターを持つ pET21d を用いた。

cDNA クローニング

登熟期の大豆種子 (品種ワセズナリ) より調製した mRNA から、Uni-ZAP XR クローニングキットを用いて cDNA ライブラリーを構築した。 α 、 α' 、 β の各サブユニットの既報の塩基配列⁷⁻⁹⁾に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングした。

発現プラスミドの構築

α 、 α' 、 β の各サブユニットに対する cDNA を鋳型として PCR を行うことによって、成熟型をコードする cDNA 領域を調製した。それらを pET21d の T7プロモーターの下流に挿入することによって各サブユニットに対する発現プラスミド pEC α m, pEC α' m, pEC β m を構築した。

発現と発現たん白質の精製

各発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、LB 培地中 37°C で波長 610 nm における吸収が 0.3 まで培養した後、IPTG を 1 mmol/L になるように添加し、20°C で一晚培養することによって発現させた。菌体を超音波破碎して得た菌体抽出液を硫酸分画、Q-セファロースカラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィーに供することによって発現たん白質を精製した。

発現たん白質の分子集合能

各菌体抽出液を 10~30% のショ糖密度勾配遠心分離に供した。分子集合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。得られた各フラクションを SDS-ゲル電気泳動にかけ、クーマシーブリアントブルーで染色した。

発現たん白質の結晶化

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によって試みた。たん白質濃度 5~10 mg/mL において、沈澱剤としてポリエチレングリコール 6,000 (PEG)、硫酸、及びエタノールを用いて行った。

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リセッションカメラを用いて行った。

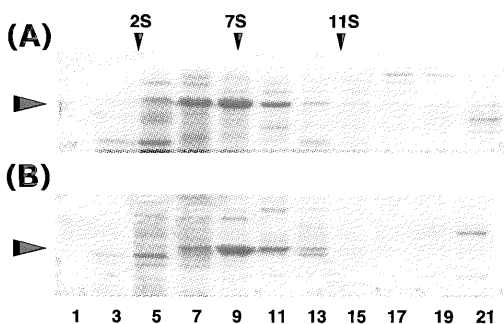


Fig. 2. Analysis of self-assembly of the expressed proteins. Assembly was assayed by sucrose density gradient centrifugation and the proteins in each fraction were detected by Coomassie brilliant blue staining. Arrow heads indicate the position of α subunit (A) and β subunit (B). Sedimentation is from left to right. Sedimentation standards are given.

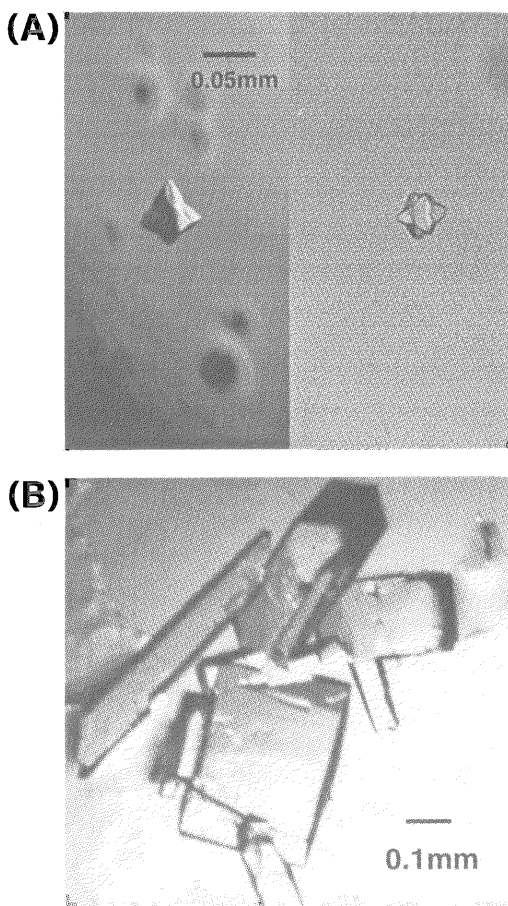


Fig. 3. Photographs of crystals of the recombinant α and β subunits. (A), α subunit ; (B), β subunit.

結果と考察

発現系の構築と発現たん白質の分子集合能

大豆 (品種ワセズナリ) 登熟期種子に対する cDNA ライブラリーをスクリーニングし、各サブユニットに対する完全鎖長 cDNA をクローニングした。得られた cDNA の塩基配列を部分的に決定することによって、それらの帰属を確認した。

大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現プラスミド pEC α m, pEC α' m 及び pEC β m の発現条件 (培地, 培養温度, 培養時間など) を種々検討した。37°C では不溶性の状態に蓄積したが, 20°C では可溶性に蓄積し, 24時間培養することによってその発現レベルは全菌体たん白質あたり α , α' , β で各々 15, 10, 20% に達した (Fig. 1)。

α 及び β サブユニットに関して, 分子集合状態をショ糖密度勾配遠心分離で調べた (Fig. 2)。両サブユニットとも 7 S の大きさに相当するフラクション 9 を中心にして沈降していることが判明した。つまり, 両サブユニットとも 3 量体を形成していることが確認された。

発現たん白質の精製, 結晶化と予備的 X 線解析

α 及び β サブユニットを発現している大腸菌の抽出液を硫酸分画 (20~40% 飽和画分) し, Q-セファロース及び疎水性カラムクロマトグラフィーを行うことによって約 90% の精製度の標品を得た。

PEG, 硫酸, エタノールを沈澱剤として, 種々の条件下で α 及び β サブユニットの結晶化を試みた。 α サブユニットは小さな結晶しか与えなかったが, β サブユニットは X 線解析に供し得るサイズ (0.3 × 0.2 × 0.1 mm) の結晶を 0.1 mol/L MES (pH 5.5), 0.4 mol/L NaCl, 7% PEG において与えた (Fig. 3)。

β サブユニットの結晶について予備的 X 線解析を行った。分解能は 2.9 Å であり, 晶系は単斜晶系, 空間群は $P2_1$, 格子定数は $a = 69.2 \text{ \AA}$, $b = 85.0 \text{ \AA}$, $c = 79.8 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90.0^\circ$, $\beta = 110.8^\circ$ であった。現在, この結晶に関して, カナバリ¹⁰⁾及びファゼオリン¹¹⁾の構造データを用いる分子置換法によって 3 レベルでの構造解析を進めている。さらに, α サブユニットについても結晶化条件を工夫することにより, X 線結晶構造解析を行いたい。

要 約

大豆貯蔵たん白質の主要成分の一つである β -コングリシニンの構成サブユニット (α , α' , β) の大腸菌発現系を構築し, 各発現たん白質の結晶化を試みた. α および β については結晶化に成功し, 特に β については予備的構造解析にも成功した. その晶系は単斜晶であり, 空間群は $P2_1$, 格子定数は, $a=69.2\text{\AA}$, $b=85.0\text{\AA}$, $C=79.8\text{\AA}$, $\alpha=\gamma=90.0^\circ$, $\beta=110.8^\circ$ であった.

文 献

- 1) 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高品質化. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 29-34.
- 2) 鬼頭 誠, 内海 成 (1991): 大豆グリシニンの食品機能のたん白質工学的改質. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 14-18.
- 3) 内海 成, 鬼頭 誠 (1993): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 127-130.
- 4) 内海 成 (1994): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 1-6.
- 5) 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.
- 6) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K (1995): α -Subunit of β -conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotech Biochem.* **59**, 831-833.
- 7) Doyle JJ, Schuler MA, Godette WD, Zenger V, Beachy RN and Slightom JL (1986): The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem*, **261**, 9228-9238.
- 8) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell*, **1**, 415-425.
- 9) Sebastiani FL, Farrell LB, Schuler MA and Beachy RN (1990): Complete sequence of a cDNA of α subunit of soybean β -conglycinin. *Plant Mol Biol*, **15**, 197-201.
- 10) Ko TP, Ng JD and McPherson A (1993): The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol*, **101**, 729-744.
- 11) Lawrence MC, Izard T, Beuchat M, Blagrove RJ and Colman PM (1994): Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J Mol Biol*, **238**, 748-776.