

グリシニンの加熱ゲル化におけるジスルフィド架橋部位の 決定へのアプローチ

森 友彦*

京都大学食糧科学研究所

Strategy for Determination of Cysteine Residues Involved in Disulfide Bridge Formation During Thermal Gelation of Glycinin

Tomohiko MORI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

Fractionation of intermediary subunits of glycinin for preparing each highly purified intermediary subunit which provides single molecular species of glycinin through reconstitution procedure was performed. Partially purified glycinin was prepared by column chromatography and subjected to chromatography using Mono Q HR 10/10 column connecting to HPLC system. Fourteen peaks were observed in the elution pattern, nine of which were shown to be the intermediary subunits by SDS-PAGE. The late-eluted fraction which contained peaks corresponding to A_3B_4 type of intermediary subunits was subjected to the chromatography. The first peak in the elution pattern was shown to contain mainly the A_3B_4 and then subjected further to the chromatography. Single peak was observed in the elution pattern. This peak was shown to contain the A_3B_4 intermediary subunit in high purity from analyses by SDS-PAGE and N-terminal amino acid sequencing. On the other hand, application of lysyl endopeptidase for peptide fragment analysis was investigated. α -Lactalbumin was subjected in this investigation. The α -lactalbumin was reacted with transglutaminase, where polymerization of the protein occurs through formation of isopeptide bonds between glutamine and lysine residues. The native and the polymerized α -lactalbumin was digested by lysyl endopeptidase and then the peptide fragment analyses were performed. The lysine and glutamine residues involved in the polymerization of the α -lactalbumin could be determined. From these results, it seems possible to determine cysteine residues involved in disulfide bridge formation during thermal gelation of glycinin, by using the reconstituted A_3B_4 pseudoglycinin for thermal gelation and lysyl endopeptidase for peptide fragment analysis. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 45-50, 1996.

*〒611 宇治市五ヶ庄宮有地

グリシニンは、加熱により分子間で会合してストランド状の会合体を形成し、ストランドはさらに3次元的に連結してネットワーク構造を形成して、ゲル化にいたる。この過程において、グリシニンの分子間にジスルフィド結合や疎水性相互作用が生じることが知られている^{1,2)}。また、ジスルフィド結合の形成の程度はゲルの粘弾性や物性に関係することが示されている³⁾。グリシニンの加熱ゲル化における分子間ジスルフィド結合の形成は基本的にシステイン残基とシスチン残基の間でSH:S-S交換反応が起ることにより生じると考えられる。これらシステインおよびシスチン残基がグリシニンのどのサブユニットのどの位置であるかを明らかにすることは、ゲル化のメカニズムおよびゲル物性の要因を究明する観点から重要で興味深い研究課題である。このような研究を進めるためには、(1)単一な中間サブユニット種の分離精製により単一なグリシニン分子種を再構成して調製すること、(2)システインおよびシスチン残基を特定するためのペプ

チドフラグメント分析の条件を設定すること、が必要である。そこで、本研究では、中間サブユニット種の分離精製およびペプチドフラグメント分析の条件設定について検討を行った。

実験方法

ダイズ（シロツルノコ品種）から既報の冷沈法⁴⁾により粗グリシニン画分を調製し、ついで、DEAE-Toyopearlを用いるカラムクロマトグラフィー⁵⁾により精製グリシニン標品を調製した。グリシニンの構成中間サブユニットの分離精製は、Mono Q HR10/10カラム（ファルマシアバイオテック社）を用いて既報のクロマトグラフィー条件⁶⁾のもとにHPLC（島津LC-10AT）により行った。ペプチドフラグメント分析の条件設定については、モデル系として、 α -ラクトアルブミンをトランスグルタミナーゼにより高分子化⁷⁾したものを供し、リシルエンドペプチダーゼ（和光純

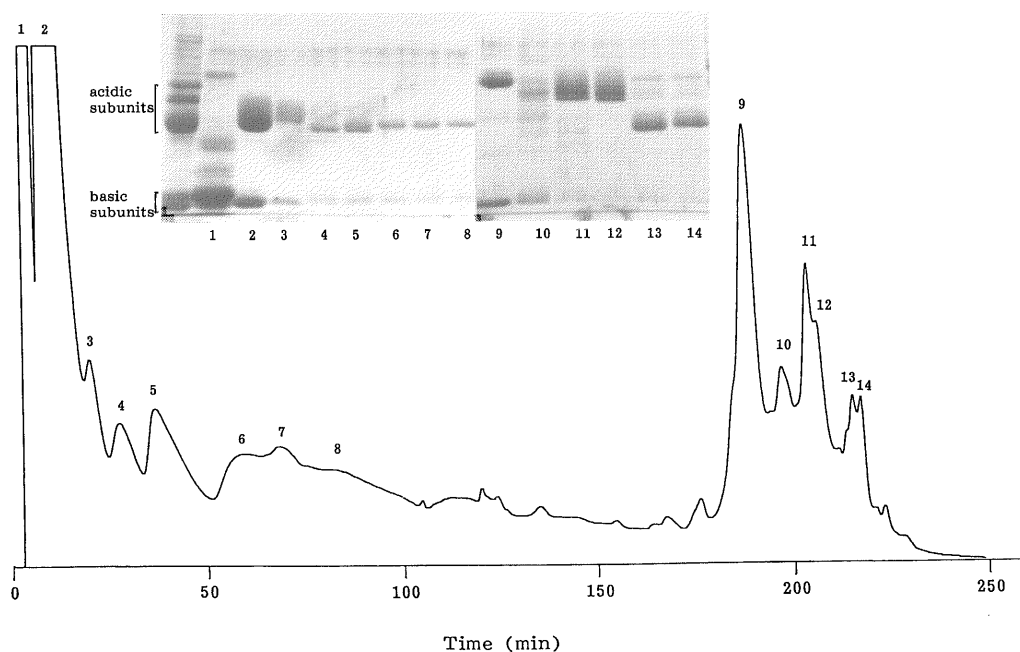


Fig. 1. Fractionation of the intermediary subunits of glycinin using a Mono Q column HPLC. Glycinin solution was applied and eluted continuously up to 100 min at a speed of 1.5 mL/min, and then NaCl linear gradient elution was performed from 0 to 0.3 mol/L up to 220 min at a speed of 2.5 mL/min. The elution pattern is shown in an arbitrary unit of OD₂₈₀. The insertion shows SDS-PAGE of each peak in the elution pattern.

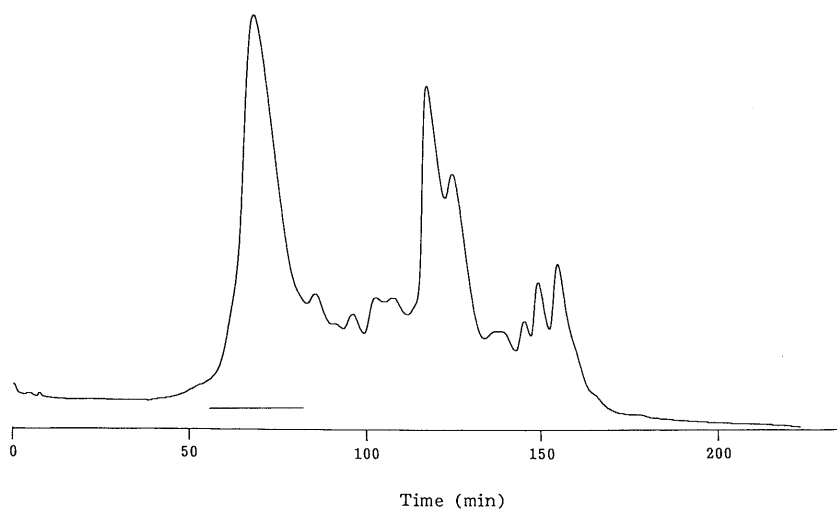


Fig. 2. Fractionation of the intermediary subunits of glycinin. The late-eluted fraction, peaks 9 to 14, in Fig. 1 was subjected to Mono Q column HPLC. Elution was performed in NaCl linear gradient from 0.15 to 0.3 mol/L at a speed of 2.5 mL/min. The underlined fraction was subjected to further HPLC.

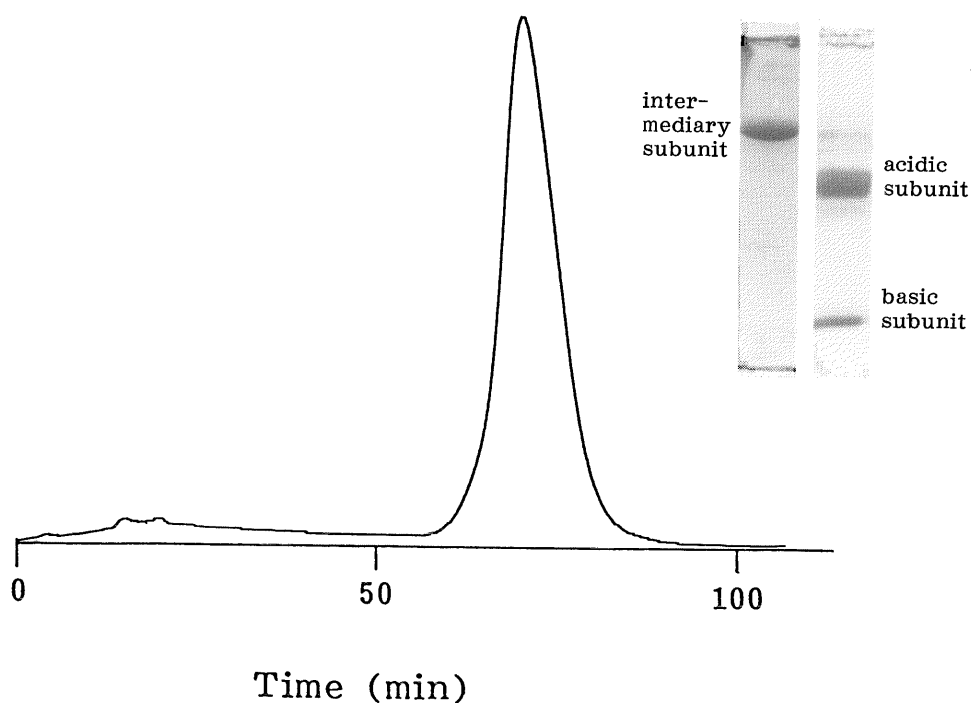


Fig. 3. Fractionation of the intermediary subunits of glycinin. The underlined fraction shown in Fig. 2 was subjected to Mono Q column chromatography. Elution was performed in NaCl linear gradient from 0.15 to 0.21 mol/L at a speed of 2.5 mL/min.

薬工業) による分解を行った⁸⁾。ついで、ペプチドフラグメント分析について、逆相カラム-HPLC による分画および分画されたペプチドフラグメントの N 末端アミノ酸配列分析を行った。

結果と考察

グリシニンの構成中間サブユニットは DEAE-セファデックスを用いたカラムクロマトグラフィーにより 3 種が分画されることをすでに報告した⁶⁾。しかし、分離性能が優れているといわれる Mono Q カラムを用いた HPLC においては、少なくとも 9 種の中間サブ

Lyophilized protein samples

- 0.9 mL 8 mol/L Urea
- 0.1 mL 0.5 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)
- 37°C, 30 min
- 1.25 mL 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)
- 1/200 ~ 1/300 (weight) Lysyl endopeptidase I
- 37°C, 6 hr
- TFA (final 0.1%)

HPLC analysis

Fig. 4. Procedure for lysyl endopeptidase digestion.

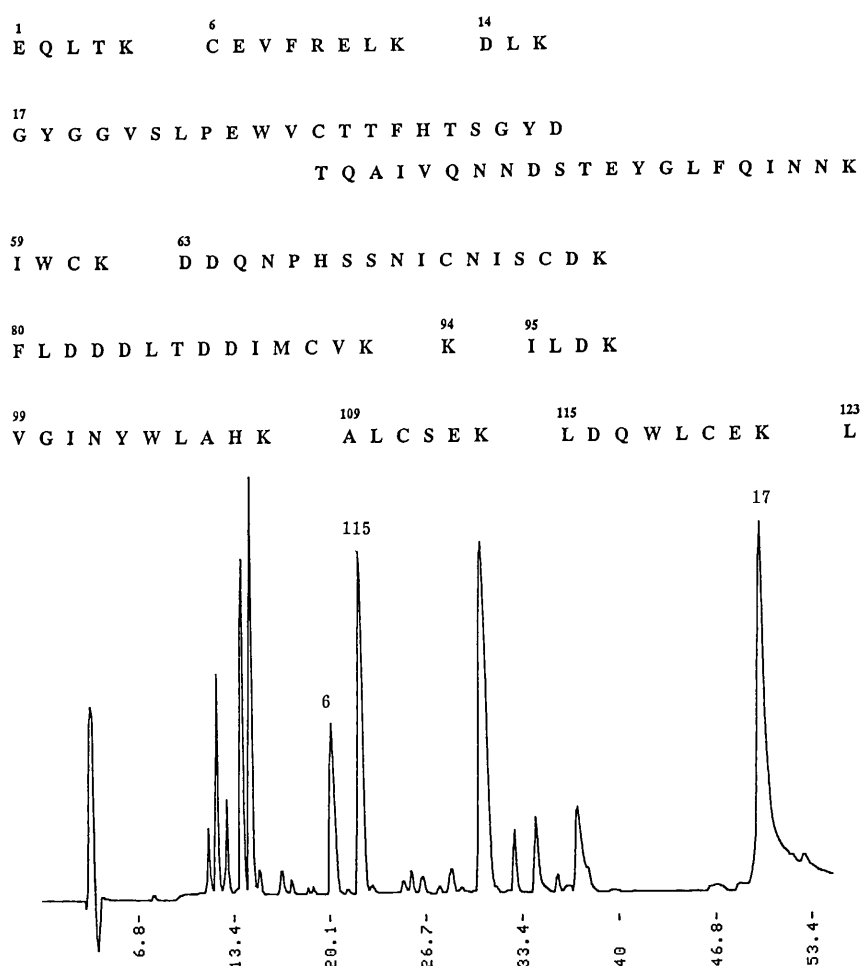


Fig. 5. Expected peptide fragments from digestion of α -lactalbumin by lysyl endopeptidase and fractionation of peptides of α -lactalbumin digested by the peptidase. Upper part shows the expected peptides and the lower part shows the fractionation of the peptides. The fractionation was performed by a reverse phase HPLC using YMC-Pack ODS-AP column connected to a HPLC apparatus of Shimadzu LC-4A.

ユニットが分画されることがわかった (Fig. 1). 溶出パターン中に14コのピークが認められ、そのうちピーク2からピーク10において酸性サブユニットと塩基性サブユニットがSDS-PAGE (Fig. 1, 挿入図)により認められた。これまでの実験からは中間サブユニットは3種のものがあると考えていたが、今回の実験結果によりさらに多くの中間サブユニット種が存在することが明らかとなった。単一な中間サブユニットを分離精製するためには、再あるいは再クロマトグラフィーが必要であることを示している。そこで、ピーク9からピーク14を回収し、溶出の際のNaCl濃度勾配をゆるくして再クロマトグラフィーを行った。その結果、各ピークの分離が良好になることがわかった (Fig. 2)。溶出パターン中の最初のピークはA₃B₄タイプの中間サブユニットであることがFig. 1の結果との対照から示されるが、それに加えてA₃B₄タイプには微量ではあるがさらに数種類のものが存在することが最初のピークに続くいくつかの小ピークの出現から予想される。この最初のピーク (Fig. 2, 棒線で示した部分) についてさらに再クロマトグラフィーを行った結果、Fig. 3に示すように単一の溶出ピークが得られた。このピークについてSDS-PAGEおよびN末端アミノ酸配列 (10残基) 分析を行った結果、A₃B₄に相当する中間サブユニット⁹⁾が高純度で分離精製されていることが示された。以上の結果から、Mono Q カラム-HPLCにより、グリシニンの中間サブユニットは予想以上に種類が多いことが明らかになるとともに、単一な中間サブユニット種の調製が可能であることがわかった。

つぎに、 α -ラクトアルブミンについて、リシルエンドペプチダーゼによる分解 (Fig. 4) およびペプチドフラグメントの分析を行った。 α -ラクトアルブミンのアミノ酸配列から予想されるペプチドフラグメント (Fig. 5, 上部) および分解物の逆相カラム-HPLCの溶出パターン (Fig. 5, 下部) から、リシルエンドペプチダーゼを用いることによりペプチドフラグメント分析が可能であることが示された。Fig. 5の下部の溶出パターン中のいくつかのピーク (6, 115, 17) についてN末端アミノ酸配列分析を行った結果、ピーク6, 115, 17はそれぞれN末端から6番目, 115番目, 17番目から始まるペプチドに相当することが明らかとなった。トランスグルタミナーゼにより高分子化したものについて同様の分析を行うことにより、高分子化の際に形成されるイソペプチド結合に

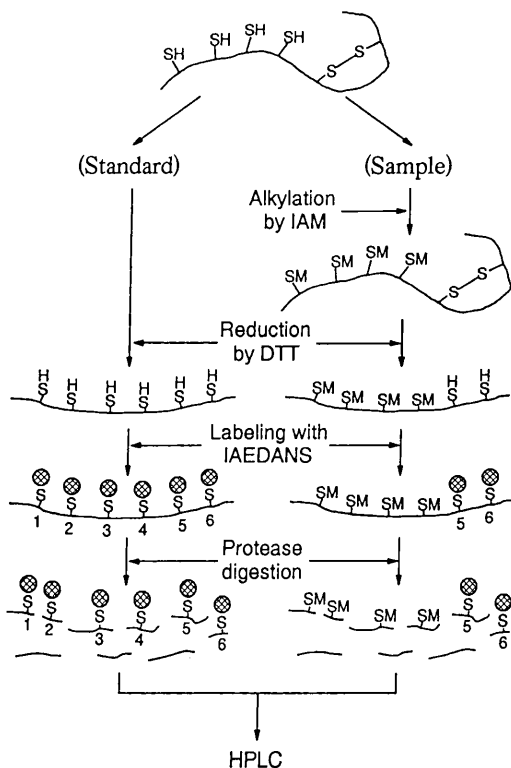


Fig. 6. Procedure for the determination of cysteine peptides involved in the disulfide formation by labelling with a fluorescent dye.
(from *J Biol Chem*, 269, 28063, 1994)

参加するリシンおよびグルタミン残基の位置の決定が可能であった。

以上の結果に基づいて、グリシニンの加熱ゲル化の際に形成されるジスルフィド結合に参加するシステインおよびシスチン残基を特定するための実験計画の立案が可能となった。単一な中間サブユニット (A₃B₄) から成る単一グリシニン分子種を用いて加熱により会合体を形成させた後、Fig. 6に示すようにシステインおよびシスチン残基を別々に修飾し、リシルエンドペプチダーゼ分解を行い、ペプチドフラグメント分析を行う。その結果を未加熱の場合の結果と比較することにより、加熱により新たに形成されるジスルフィド結合に関係するシステインおよびシスチン残基が特定できるものと考えられる。

要 約

単一のサブユニット種から成るグリシニンを再構成法により調製するために、グリシニンの中間サブユニット種の分画・精製を試みた。イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製したグリシニンを尿素存在下で Mono Q HR 10/10 カラムを用いる HPLC に供した。その結果、14コのピークが分画され、そのうち9コのピークが中間サブユニットであることが SDS-PAGE によりわかった。それら中間サブユニットのうち A_3B_4 に相当するピークについて再および再々クロマトグラフィーを行った。これにより、SDS-PAGE および N 末端アミノ酸配列の点で高純度と判定しうる A_3B_4 中間サブユニット種を調製することができた。一方、リシルエンドペプチダーゼによるペプチドフラグメント生成とそのアミノ酸配列分析を α -ラクトアルブミンについて検討した。トランスグルタミナーゼによりグルタミンとリシン残基間にイソペプチド結合を形成させポリマー化した α -ラクトアルブミンを調製し、未反応のモノマー状態の α -ラクトアルブミンとともにペプチドフラグメント分析を行い両者の比較を行った。これによりポリマー中の分子間イソペプチド結合に関係するグルタミンとリシン残基の位置が決定できた。これらの結果から、グリニシンの加熱ゲル化における分子間ジスルフィド架橋に関係するシステイン残基の特定に関して、 A_3B_4 中間サブユニットから再構成した単一なグリシニン分子種を用いて加熱ゲル化およびペプチドフラグメント分析を行うことにより可能であると考えられる。

文 献

- 1) Nakamura T, Utsumi S and Mori T (1984) : Network structure formation in thermally induced gelation of glycinin. *J Agric Food Chem*, **32**, 349-352.
- 2) Mori T, Nakamura T and Utsumi S (1986) : Behavior of intermolecular bond formation in the late stage of heat-induced gelation of glycinin. *J Agric Food Chem*, **34**, 33-36.
- 3) Mori T, Mohri M, Artik N and Matsumura Y (1989) : Rheological properties of heat-induced gel of soybean 11S globulin under high ionic strength. *J Texture Studies*, **19**, 361-371.
- 4) Thanh V H, Okubo K and Shibasaki K (1975) : Isolation and characterization of the multiple 7S globulin of soybean protein. *Plant Physiol*, **56**, 19-22.
- 5) Zheng B A, Matsumura Y and Mori T (1991) : Thermal gelation mechanism of legumin from broad beans. *J Food Sci*, **56**, 722-725.
- 6) 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.
- 7) Matsumura Y, Chanyongvorakul Y, Kumazawa Y, Ohtsuka T and Mori T (1996): Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. *Biochim Biophys Acta*, **1292**, 69-76.
- 8) Masaki T, Tanabe M, Nakamura K and Soejima M (1981) : Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. I. Purification and some enzymatic properties. *Biochim Biophys Acta*, **660**, 44-50.
- 9) Wright DJ (1988) : The seed globulins-Part II. In : *Developments in Food Protein*-6. Hudson BJF, ed., Elsevier Applied Science, London, pp. 119-177.