

11S たん白質サブユニット組成の異なるダイズ同質遺伝子系統の育成と利用

矢ヶ崎和弘^{*1}・喜多村啓介^{1,2}

¹農業研究センター ²筑波大学連携大学院(現農林水産技術会議事務局)

Breeding of Soybean Isogenic Lines Consisting of Different Subunits of Glycinin and Their Biochemical Characterization

Kazuhiro YAGASAKI¹ and Keisuke KITAMURA^{1,2}

¹National Agriculture Research Center, Tsukuba 305

²The Graduate School of Agriculture and Forest, Tsukuba University, Tsukuba 305

ABSTRACT

Glycinin, a major storage protein of soybean seed, consists of six subunits, each made up of an acidic (A) and basic (B) polypeptide component linked by a single disulfide bond. Five major subunits of glycinin have been grouped into three intermediate subunit groups, i. e., group I (A_{1a}B₂, A_{1b}B_{1b} and A₂B_{1b}), IIa (A₅A₄B₃) and IIb (A₃B₄). Isogenic lines having different glycinin subunits are now being bred. In this paper, effects of ionic strength on solubility and molecular assembling of glycinin subunits were analyzed using the breeding lines. When NaCl was added to the total protein and glycinin solution, glycinin consisting of only group I subunits was highly soluble compared to the IIa or (and) IIb subunit at NaCl concentration lower than 0.05 M at pH 5.5. The molecular weight of glycinin consisting of only group I subunits was estimated as about 150 kDa at NaCl concentration more than 0.1 M by gel chromatography. It was half volume of wild type having all subunits of glycinin. Therefore, the glycinin lacking both IIa and IIb subunits is not able to assemble to form the 11S structure under this ionic strength condition. Structural changes caused by a lacking of glycinin subunit(s) are expected to influence the food-processing properties of soybeans. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 10-14, 1997.

Key words: soybean, glycinin, subunit composition, biochemical characterization, food-processing property

ダイズ貯蔵たん白質の主要成分であるグリシニン(11S グロブリン)は、 β -コングリシニン(7S グロブリン)に比べ、豆腐ゲルの強度、ゲル形成速度等のダ

イズ加工適性に大きな影響を及ぼすことが知られている^{1,2)}。これまでグリシニンを構成するサブユニットの欠失変異体が栽培種や野生種(ソルマメ)に見いだされ、また、突然変異誘発により作出されてきた³⁻⁵⁾。これら欠失変異体を利用してサブユニットの遺伝様式が

*〒305 茨城県つくば市観音台3-1-1

解明され、5つの主要なサブユニットのうち、中間サブユニットグループIに属する $A_{1a}B_2$ 、 $A_{1b}B_{1b}$ 及び A_2B_{1b} サブユニットを支配する遺伝子座が強連鎖関係にあることが明らかにされ、また、グループIIに属する $A_5A_4B_3$ 及び A_3B_4 サブユニットは独立遺伝することから、それぞれIIa, IIb に細分された⁶⁾。

現在、ダイズの加工適性を改良する目的で、グリシニンサブユニット組成の異なる同質遺伝子系統の育成が進められている。ここではサブユニット組成の異なるダイズ種子タン白質の生化学的特性を解明するために、タン白質の溶解性と分子構成に及ぼすイオン強度の影響について解析した。

実験方法

材料

グリシニン中間サブユニットI及びIIbを保有する品種タマホマレと、IIaのみを保有する育成系統の交配後代 (F_3 世代) 種子を分析に用いた。サブユニット組成は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法及び抗 A_3 血清を用いたウェスタンブロット法により判定した。

タン白質の調製

脱脂した種子粉末を0.098% SBS を含む0.05 M ト

リス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で抽出し、遠心後の上清を全タン白質溶液とし、さらに Nagano ら (1992) の方法⁷⁾に従い粗 11S タン白質を分離した。抽出と同じ緩衝液を用いて Con A カラムを通し、残存する 7S タン白質 β -サブユニットを除去し、精製した 11S タン白質溶液を得た。ここでは、抽出用緩衝液に溶解した3種類のタン白質をそれぞれ全タン白質溶液、粗 11S タン白質溶液、精製 11S タン白質溶液とした。

タン白質溶液の濁度の測定

各タン白質溶液を抽出用緩衝液で希釈し、牛血清アルブミンを標準試料として Lowry 法⁸⁾によりタン白質濃度を0.02%に調整した。pH 5.5に調整し懸濁したタン白質溶液に NaCl を添加しイオン強度を変え、濁度の変化を分光光度計 (吸光度600 nm) で測定した。

分子量の推定

0.098% SBS を含む0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した精製 11S タン白質を用いてゲルクロマトグラフィー (吸光度280 nm, Superose 6 HR10/30 カラム, FPLC システム LCC-500PLUS, ファルマシア) により分子量を推定した。検量線作製のための標準試料には、チトクローム C (分子量12.3 kDa)、キモトリプシノーゲンA (25 kDa)、アルブミン (卵製) (45 kDa)、アルブミン (牛血清) (67 kDa)、アルドラーゼ (160 kDa)、カタラーゼ (240

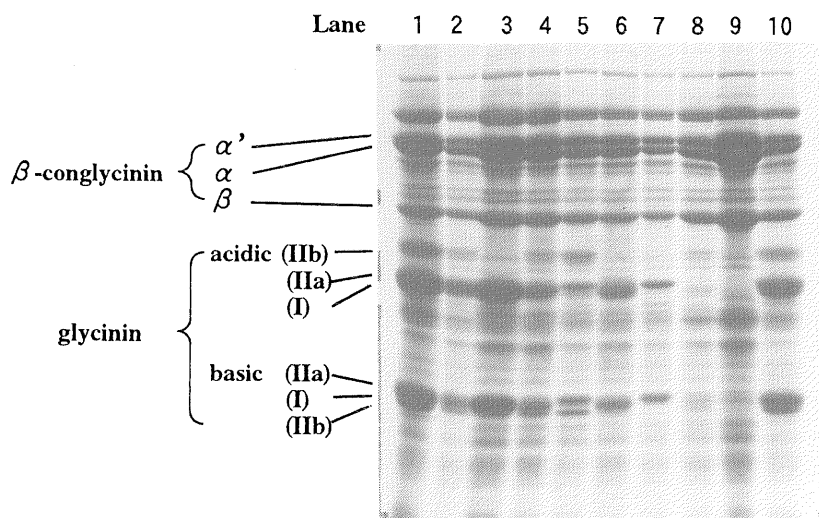


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of protein obtained from soybean lines having different glycinin subunit compositions: a soybean line having groups I, IIa and IIb subunits (lanes 1 and 10), group I and IIb subunits (lanes 2 and 4), group I and IIa subunits (lane 3), the IIa and IIb subunits (lane 5), group I subunit (lane 6), the IIa subunit (lane 7), the IIb subunit (lane 8) and lacking three groups (lane 9).

kDa), フェリチン (450 kDa) 及びブルーデキストラン2000 (2,000 kDa) を用いた。

結果と考察

たん白質の溶解性

グリシニンサブユニット組成の異なる8種類の系統を選抜し (Fig. 1), たん白質の溶解性を解析した。

サブユニット I, IIa 及び IIb の全てを欠失する系統を除く7種類の全たん白質溶液は, pH 6~7の範囲において濁度の変化が認められなかったが, pH 4~5の範囲ではたん白質の不溶化により濁度は最大値に達した。pH に対する溶液の濁度の変化がいずれの溶液も類似したことから, 全たん白質溶液ではグリシニンサブユニット組成が溶解性に及ぼす影響は小さいといえる。一方, 3種類のグリシニンサブユニットを欠失する全たん白質溶液では, pH 5.5以下で濁度の上昇が認められた。これは, グリシニンに比べより酸性の領域で不溶化する特性をもつ β -コングリシニン成分が相対的に多くなったことに起因するものと考えられる (Fig. 2)。

全たん白質溶液の相対濁度が約50%に達する pH 5.5における, 各たん白質の溶解性とイオン強度の関係

を検討した。全たん白質溶液中の NaCl が0.1 M 以上の場合は, いずれのたん白質溶液においても溶解性の上昇にともない濁度は低下した。0.05 M では, グリシニンサブユニット組成の違いにより溶解性に差が認められ, IIa 欠失型, IIa 及び IIb 欠失型では著しく濁度が低下した。粗 11S たん白質溶液及び精製 11S たん白質溶液では IIa 及び IIb 欠失型, すなわちグループ I 単独で構成されるグリシニン溶液においてのみ濁度の低下が認められ, これ以外のサブユニット組成のグリシニンでは NaCl が0.05 M で一旦溶液の濁度が上昇した後, イオン強度の増加にともなって濁度が低下した (Table 1)。この結果から, グループ I 単独で構成されるグリシニンは, 低イオン強度下における溶解性が他のサブユニット構成のたん白質とは異なると考えられる。

グリシニン分子構成への影響

NaCl 濃度0.05 M 条件下で他の溶液とは異なる溶解性を示したグループ I たん白質について, ゲルクロマトグラフィーにより分子量を推定した。グリシニンサブユニットを全て保有する精製 11S たん白質の溶液では, NaCl が0.05 M 以上の場合に推定される分子量は約300 kDa であった。この値は, グリシニンの分子量が300~350 kDa というこれまでの報告⁹⁾に一致

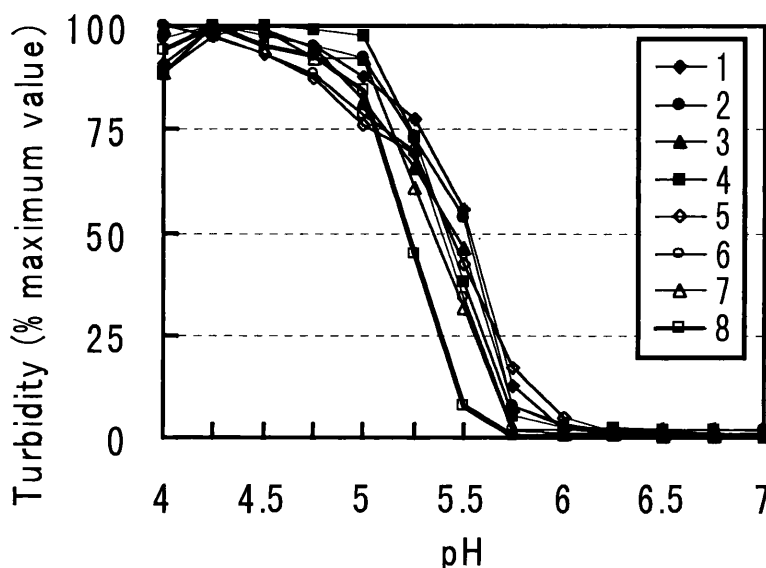


Fig. 2. pH-dependent precipitation curve of total protein in 0.05 M Tris-HCl buffer: A soybean line having groups I, IIa and IIb subunits (1), groups I and IIa subunits (2), groups I and IIb subunits (3), the IIa and IIb subunits (4), group I subunit (5), the IIa subunit (6), the IIb subunit (7) and lacking three groups (8). The protein concentration was 0.02%.

Table 1. Effect of 0.05 M NaCl on the turbidity of total protein, crude glycinin and purified glycinin containing 0.02% at pH 5.5

Glycinin subunit composition ^a			Turbidity of total protein		Turbidity of crude glycinin		Turbidity of purified glycinin	
I	IIa	IIb	0 M ^b	0.05 M	0 M	0.05 M	0 M	0.05 M
+	+	+	100	110 ^c	100	162	100	176
+	+	—	100	126	100	157	100	122
+	—	+	100	88	100	125	100	131
—	+	+	100	139	100	104	100	106
+	—	—	100	76	100	95	100	93
—	+	—	100	115	100	106	100	113
—	—	+	100	98	100	147	100	203
—	—	—	100	96	ND ^d	ND	ND	ND

^a + and — indicate presence and absence of subunits, respectively. ^b Concentration of NaCl. ^c Relative value to the value of turbidity of solution containing no NaCl. ^d Not determined.

Table 2. Molecular weight of glycinin having different subunit compositions estimated by gel chromatography in different ionic strength

Concentration of NaCl (M)	Molecular weight (kDa)	
	Glycinin having groups I, IIa and IIb subunits	Glycinin having group I subunit
0	449	96 and 230
0.01	406	89 and 212
0.05	345	73 and 177
0.1	294	151
0.5	294	148

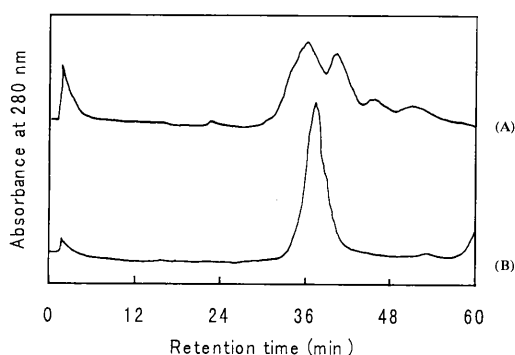


Fig. 3. Typical gel chromatography patterns of glycinin having only group I subunit in different ionic strength on Superose 6 HR10/30 column. NaCl concentration was 0 M (A) and 0.5 M (B).

した。一方、グループ I 単独で構成されるたん白質では、NaCl が 0.1 M 以上で約 150 kDa と正常型の半分の分子量が推定された (Table 2)。前者においては、NaCl 0~0.5 M の範囲で常に溶出ピークは一つであったのに対し、後者では 0.05 M 以下のイオン強度で複数のピークが出現した (Table 2, Fig. 3)。2 種類のたん白質の分子量の相違は、NaCl が 0.5 M 条件下で実施した超遠心分析の結果で 7S 成分が 92% を占めるという既報の結果¹⁰⁾とも一致した。すなわち、グループ I 単独では、低イオン強度条件下溶液中でたん白質分子が解離していると考えられ、また、イオン強度を高めても 11S 分子を構成できないと推察される。

加工適性への影響

グリシニンサブユニットが欠失するダイズ系統では、グリシニンと β -コングリシニンの比率 (11S/7S 比) が低下し¹¹⁾、豆腐ゲルの強度も低下する。したがって、サブユニットを遺伝的に欠失させることにより豆腐ゲ

ルの物性を改変することが可能である。また、たん白質の溶解性は乳化性や起泡性に影響を及ぼす¹²⁾ことから、グリシニンサブユニットグループ I のみを保有す

る系統については、その特性を利用して加工適性の改良が可能か検討する予定である。

要 約

グリシニン中間サブユニットグループ I, IIa 及び IIb の組成の異なるダイズ系統を育成し、たん白質の溶解性と分子構成に及ぼすイオン強度の影響を解析した。pH 5.5 で不溶化したたん白質は、溶液中のイオン強度を高めることにより溶解性を高めることができる。しかし、低イオン強度条件下 (0.05 M NaCl) でグループ IIa, IIb を含むたん白質溶液の濁度が上昇するのに対し、グループ I 単独で構成されるたん白質では、速やかに濁度が低下することから、溶解性が高いことが明らかとなった。また、NaCl が 0.1 M 以上のイオン強度条件下において、ゲルクロマトグラフィーにより推定されるグループ I たん白質の分子量がグリシニンの約半分であったことから、本たん白質が正常な 11S 分子を構成できないものと推察された。今後は、このような特性を利用した加工適性の改良が可能か検討する必要がある。

文 献

- 1) Kohyama K and Nishinari K (1993) : Rheological studies on the gelation process of soybean 7S and 11S proteins in the presence of glucono- δ -lactone. *J Agric Food Chem*, **41**, 8-14.
- 2) Saio K, Kamiya M and Watanabe T (1969) : Food processing Characteristics of soybean 11S and 7S proteins. Part I. Effect of difference of protein components among soybean varieties on formation of tofu-gel. *Agric Biol Chem*, **33**, 1301-1308.
- 3) Harada K, Toyokawa Y and Kitamura K (1983) : Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunits and related characters in soybean seeds. *Japan J Breed*, **33**, 23-30.
- 4) 喜多村啓介, 石本政男, 海妻距彦 (1993) : ダイズ 11S 蛋白質サブユニット支配遺伝子の遺伝的關係. 育種学雑誌, **43**(別2), 159.
- 5) 小田中広哉, 海妻距彦 (1989) : 放射線によって誘発された大豆貯蔵タンパク質に関する遺伝的変異体について. 育種学雑誌, **39**(別1), 430.
- 6) Yagasaki K, Kaizuma N and Kitamura K (1993) : Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Breed Sci*, **46**, 11-15.
- 7) Nagano T, Hirotsuka M, Kohyama K and Nishinari K (1992) : Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybean. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 9) 山内文男 (1980) : 食品タンパク質の科学—大豆タンパク質の構造と機能特性—. *New Food Industry*, **22**, 26-44.
- 10) Yagasaki K, Takagi T, Sakai M and Kitamura K (1997) : Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J Agric Food Chem*, **45**, 656-660.
- 11) 矢ヶ崎和弘, 山田直弘, 喜多村啓介 (1996) : 11S 蛋白質サブユニット組成の異なるダイズ同質遺伝子系統の育成と利用 IV. サブユニット欠失系統の豆腐ゲル形成能. 育種学雑誌, **46**(別2), 209.
- 12) Kinsella JE (1979) : Functional properties of soy proteins. *J Am Oil Chem Soc*, **38**, 669-674.