

大豆プログリシニンの高分解能X線結晶構造解析

安達基泰・三上文三・内海 成*

京都大学食糧科学研究所

X-Ray Crystallography of Soybean Proglycinin at High Resolution

Motoyasu ADACHI, Bunzo MIKAMI and Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611

ABSTRACT

Glycinin is one of the most abundant storage proteins in soybean seeds. To design a modified glycinin with improved food functions at the atomic level, three-dimensional structure of glycinin has to be elucidated at high resolution. Previously, we reported the structure of the recombinant proglycinin trimer at 6.0 Å resolution based on the data from three kinds of heavy atom derivatives. However, it was not enough to build the model of the proglycinin at high resolution, because these derivatives had the same binding sites of heavy metals each other at pH 7.6. Change of soaking conditions from pH 7.6 to pH 5.5 provided derivatives suitable for isomorphous replacement method. A good electron density map was made at 3.2 Å resolution by solvent flattening and averaging with program PHASES. We built the model of the proglycinin with R-factor of 22.7 using program XPLOR. Comparison of the structure of β -barrel in the proglycinin with that of phaseolin showed a high similarity between those. This supports the hypothesis that both proteins are derived from a common ancestor. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 21-24, 1997.

Key words : crystallography, glycinin, proglycinin, soybean proteins, X-ray analysis

大豆たん白質は、ヒト血清コレステロール値を低下させるという健康維持・増進性を備えている¹⁾。したがって、今後深刻化する高齢化社会に適した食品素材である。しかし、その用途を拡大・開発するためには、さらなる健康維持・増進性と加工特性の強化・付与が望まれる。このためには、大豆たん白質の高次構造を解明し、構造・機能相関を分子レベルで明らかにする必要がある。高次構造の解明には、X線結晶構造解析が有効であるが、大豆たん白質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、大豆たん白質の主要成分であり、血清コレステロール値低下能の主体であると考えられているグリシニンのcDNAを大腸菌で発現させることによって得られる組み換え型プログリシニンの結晶化とその低分解能での構造解析に成功した^{2,3)}。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量体であり分子サイズが小さく、構造解析が容易であると期待できる。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、カルシウム沈澱性）や加工特性を示す⁴⁾。したがって、プログリシ

*〒611 宇治市五ヶ庄官有池

ニンの構造解析はグリシニンの構造解析のモデルとしても、またステップとしても重要である。そこで、本研究では、プログリシニンの構造解析を2.9 Åのレベルで解明することを試みた。

実験方法

発現たん白質の結晶化

結晶化は透析法により行った。発現たん白質溶液 (6.6 mg/L) を0.1 Mのトリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に対して8°Cで5日間透析することにより作製した²⁾。

回折データの収集

回折データの測定はマックスサイエンス社X線発生器とシーメンス社マルチワイヤーエアリアディテクター High-Star,あるいはX-1000を用いて行った。回折データのプロセスはプログラム SAINT と SADIE を用いて行った。

回折データの解析とモデルの構築

得られた回折データからパターンソマップを解くことで重原子の位置を決定した後、プログラム PHASES によって位相計算を行った。さらに、ソルベントフラットニングとアベレーシングにより、位相の改善を行った。モデルの構築にはプログラム TURBO-FRODO を、精密化にはプログラム XPLORE⁹⁾を用いた。

結果と考察

プログリシニンのX線結晶構造解析

X線結晶構造解析を行う場合、回折点の強度と位相を必要とする。位相情報は、通常、回折データを測定することのみでは得られないので、分子置換法あるいは多重重原子同型置換法などによって求める。分子置換法を行う場合には、モデルとなるたん白質の座標が必要となる。しかし、グリシニン型たん白質で構造解

析された例は報告されていない。そこで、構造が比較的類似していると考えられ、しかも、高次構造が解明されているファゼオリン⁶⁾およびカナバリン⁷⁾の座標を用いて分子置換法を試みたが、両者とも十分なモデルとなり得なかった。したがって、プログリシニンの構造を解くにあたって、多重重原子同型置換法を用いることにした。いくつかの重原子を用いて良好なデリバティブの検索を行ったところ、パラクロロメルクリフェニルスルホン酸 (PCMB) や水酸化メチル水銀などが有効であることが確認できた。しかし、それらデリバティブ中における重原子の結合部位はすべて等しく、プログリシニンのモデルの構築に十分な高分解能の電子密度マップを得ることはできなかった。そこで、別の部位に重原子を結合させることによってよりよい位相を得ることを目的として、ソーキングバッファを結晶化の時に使用している pH 7.6のトリス塩酸緩衝液から、pH 5.5のMESの緩衝液に変えて回折データを測定した (Table 1)。KAu(CN)₂ と PCMB をともにその条件でソーキングし、パターンソマップより重原子の位置を確認したところ、pH 7.6の場合とは異なった部位に重原子が結合することが明らかとなった (Table 2)。このことから、モデリングに十分な高分解能の電子密度マップを得ることができるものと期待されたので、プログラム PHASES を用いて位相計算を行った。その時の信頼度因子 (figure of merit) は0.57であったが、ソルベントフラットニングにより0.82まで改善することができた。さらに、平均化を行った後の電子密度マップは良好であった。得られた電子密度マップに基づいてモデルを構築し、15から3.0 Åの回折データを使い精密化を行った結果、R値22.7%にまで精密化することができた。

プログリシニンとファゼオリンの高次構造の比較

R値から考えて現在構築されているモデルは十分なものとは言えないが、β-バレルを形成している部分のモデルは重原子同型置換法によって得られた電子密度

Table 1. Data collection of native proglycinin crystals and derivatives

Derivative	Detector	No. collected reflections	No. independ. reflections	R-merge (%)	Resolution (Å)	Completeness (%)
Native	High Star	156,844	52,099	11.9	2.7	98.3
PCMB-1	X-1000	68,998	23,245	14.9	3.4	74.2
CH ₃ HgOH	X-1000	127,263	29,156	14.0	3.2	86.7
KAuCl ₄	X-1000	50,480	8,470	10.4	5.0	99.7
KAu(CN) ₂	High Star	152,342	51,491	10.5	2.6	88.4
PCMB-2	High Star	147,621	44,651	14.1	2.8	94.0

Table 2. Summary of statistics for heavy atom derivatives

Derivative	Soaking conditions	Resolution (Å)	R-Cullis	R-Kraut	Phasing power	Heavy atom	Site			Occupancy (%)	B-factor (Å ²)
							x	y	z		
PCMB-1	1 mM ¹⁾ 18 h	3.4	0.673	0.102	1.31	Hg-1	0.133	0.537	0.005	0.142	10.70
						Hg-2	0.989	0.781	0.107	0.238	2.00
						Hg-3	0.349	0.870	0.159	0.145	2.00
CH ₃ HgOH	10 mM ¹⁾ 15 h	3.2	0.697	0.098	1.34	Hg-1	0.132	0.536	0.007	0.113	2.00
						Hg-2	0.990	0.781	0.109	0.214	2.00
						Hg-3	0.348	0.869	0.161	0.140	2.00
KAu(Cl) ₄	2 mM ¹⁾ 18 h	5.0	0.634	0.073	1.59	Au-1	0.130	0.538	0.008	0.187	25.73
						Au-2	0.988	0.780	0.106	0.256	18.13
						Au-3	0.350	0.871	0.159	0.189	17.68
KAu(CN) ₂	1 mM ²⁾ 15 h	3.2	0.698	0.120	0.95	CN-1	0.933	0.779	0.220	0.444	16.61
						CN-2	0.141	0.389	0.044	0.417	22.06
						CN-3	0.412	0.725	0.151	0.363	12.49
						CN-4	0.354	0.608	0.219	0.353	15.83
						CN-5	0.725	0.066	0.246	0.199	2.00
						CN-6	0.700	0.991	0.057	0.166	8.09
PCMB-2	10 mM ²⁾ 1.5 h	3.2	0.567	0.135	1.60	MB-1	0.131	0.536	0.000	0.529	32.39
						MB-2	0.989	0.782	0.102	0.633	16.82
						MB-3	0.348	0.869	0.153	0.572	32.69
						MB-4	0.893	0.365	0.021	0.710	54.26
						MB-5	0.714	0.614	0.096	0.688	45.88
						MB-6	0.979	0.536	0.220	0.677	39.27
						MB-7	0.534	0.801	0.061	0.609	59.83
						MB-8	0.802	0.884	0.165	0.434	57.65
						MB-9	0.245	0.462	0.144	0.297	42.77
						MB-10	0.069	0.270	0.065	0.251	72.45
						MB-11	0.446	0.611	0.209	0.329	45.03
						MB-12	0.710	0.077	0.063	0.069	29.27

1) Soaking solution is 0.1 M Tris, pH 7.6.

2) Soaking solution is 0.1 M MES, pH 5.5.

マップとよく一致し、しかもモデルから得られる 2FO-FC マップも重原子のマップにうまく重ね合わせることができた。つまり、 β -バレルを形成している部分のモデルはほぼ完成されていると考えられた。そこで、 β -バレル内に限って 7S 貯蔵たん白質ファゼオリンのモデルと比較したところ、両者の $C\alpha$ 間の root mean square (RMSD) の値は $1.2\text{\AA}$ であった。さらに、サブ

ユニット内の 2 つのバレルを N 末端側と C 末端側に分けて比較すると RMSD はそれぞれ 0.9 に減少した。このことは、サブユニット間のバレルの相対位置には少しずれがあるが、両者の骨格構造に類似性があることを示している。これらの結果は、グリシニンとファゼオリンが進化上共通の祖先に由来するという説を支持するものである。

要 約

プログリシニンの X 線結晶構造解析を多重重原子同型置換法により試みた。合計 5 つのデリバティブより位相を計算し、 $3.2\text{\AA}$ で重原子マップを得て、モデルを R 値 22.7% にまで精密化した。その結果、プログリシニンは β -バレルを持ち、7S 貯蔵たん白質と構造的に類似していることが明らかになった。

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, Gidamis AB, Mikami B and Kito M (1993) : Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **233**, 177-178.
- 3) Utsumi S, Gidamis AB, Takenaka Y, Maruyama N, Adachi M and Mikami B (1996) : Crystallization and X-ray analysis of normal and modified recombinant soybean proglycinins—three-dimensional structure of normal proglycinin at $6\text{\AA}$ resolution. In : *Macromolecular Interactions in Food Technology, ASC Symposium Series 650*. Parris N, Kato A, Creamer LK and Pearce J, eds., American Chemical Society, Washington DC, pp. 257-270.
- 4) Kim C-S, Kamiya S, Kanamori J, Utsumi S and Kito M (1990) : High-level expression, purification and functional properties of soybean proglycinin from *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, **54**, 1543-1550.
- 5) Brüger AT, Kuriyan J and Karplus M (1987) : Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science*, **35**, 458-460.
- 6) Lawrence MC, Izard T, Beuchat M, Blagrove RJ and Colman PM (1994) : Structure of phaseolin at $2.2\text{\AA}$ resolution. *J Mol Biol*, **238**, 748-776.
- 7) Ko TP, Ng JD and McPherson A (1993) : The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol*, **101**, 729-744.