

大豆 β -コングリシニンの構造・機能相関

丸山伸之・内海 成*

京都大学食糧科学研究所

The Structure-function Relationships of Soybean β -Conglycinin

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

Soybean proteins are composed of two major components, β -conglycinin and glycinin. Elucidation of the structure-function relationships of soybean proteins is required for development of new food products from soybean proteins. Such relationships of glycinin at subunit and molecular levels have been investigated in detail. However, such a study on β -conglycinin has been scarcely carried out. β -Conglycinin is a trimeric protein consisting of three subunits α , α' and β . The α and α' subunits are composed of the extension and the core regions, whereas the β subunit consists of only the core region. We prepared the individual subunits and the deletion mutants lacking the extension regions of the α and α' subunits using the *Escherichia coli* expression system and examined their structures and functions. All recombinant proteins appeared to adopt a correct conformation as judged by CD and density gradient centrifugation profiles. Surface hydrophobicity and thermal stability of the β -conglycinin constituent subunits are likely to be conferred by their core regions, which exhibit different properties to each other. Solubility, formation of heat-induced soluble aggregates, and emulsifying ability of individual subunits remarkably depend on the extension regions and the carbohydrate moieties in addition to the structural features of the core regions. These facts indicate that we can produce various end products by selecting soybean varieties containing β -conglycinins having different subunit compositions. *Soy Protein Research, Japan* 1, 19-24, 1998.

Key words : soybean, β -conglycinin, structure-function relationships

近年、我が国においては脳卒中、心疾患などの食源性疾患や高齢化社会の到来が重大な問題となっている。大豆たん白質は血清コレステロール値低下能¹⁾などの生理機能をもっており、そのような食糧を巡る問題を

解決するために、その用途を拡大することが望まれる。このためには大豆たん白質の構造と食品機能特性との相関を明らかにすることが必要である。

大豆たん白質はグリシニンとコングリシニンを主成分としている²⁾。グリシニンの構造・食品機能特性相関はサブユニットレベルおよび分子レベルで解析され、

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

いくつかの関係が明らかにされているが²⁾, β -コングリシニンについてはほとんど解析されていない。 β -コングリシニンは α , α' , β の3種類のサブユニットより構成されており, 各サブユニットには糖鎖が付加されている。 β は1次構造の類似したコア領域(416残基, 約75%の類似性)のみから構成されているが, α と α' はそのN末端側に各々125及び141のアミノ酸残基よりなる親水性の強いエクステンション領域(60%の類似性)を持っている³⁻⁵⁾。このように各サブユニット間には高い類似性があるが, その特性が異なっており, 各サブユニットの構造・食品機能特性相関を解明することが望まれる。大豆種子中には3種のサブユニットが組み合わさった数多くの分子種が存在しており, 単一サブユニットからなる分子種を精製することが困難である。そこで, 本研究では大腸菌発現系を利用して, β -コングリシニンの各サブユニットの単一分子種を調製することにした。また, 大腸菌発現系では糖鎖の付加が起こらないので, 組み換え型たん白質と天然の β -コングリシニンとの比較により糖鎖の影響を考察することができる。さらに, その解析を詳細に行うために, α と α' のコア領域(α コア, α' コア)のみも調製し, 各組み換え型たん白質の構造と食品機能特性を比較, 解析した。

方 法

組み換え型たん白質の調製

α , α' , β の各サブユニット⁶⁾ および α コア, α' コアをそれぞれ発現させた大腸菌を超音波破碎した。 α , α' , β に関しては, 硫安分画, イオン交換クロマトグラフィー, ゲル濾過クロマトグラフィーなどにより, また, α コア, α' コアに関しては低イオン強度下での透析, ゲル濾過クロマトグラフィーによりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ単一のバンドになるまで精製した。

CD測定

CD測定は日本分光J720分光偏光測定器を使用し, 0.4 M塩化ナトリウムを含む35 mMリン酸緩衝液, pH 7.6, (緩衝液A)に溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンの遠紫外スペクトルを波長196 nmから257 nmの範囲で測定した。データは残基平均楕円率で示した。

ショ糖密度勾配遠心分離

分子集合状態を調べるために, 緩衝液Aに溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンのショ糖密度勾配(10～30%)遠心分離を行った⁷⁾。

大豆から調製した2S, 7S, 11S画分をサイズマーカーとして用いた。

表面疎水性

緩衝液Aに溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンの8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸(ANS)との結合による蛍光強度を日立F-3000蛍光分光光度計によって測定することにより表面疎水性を評価した。励起波長は350 nm,

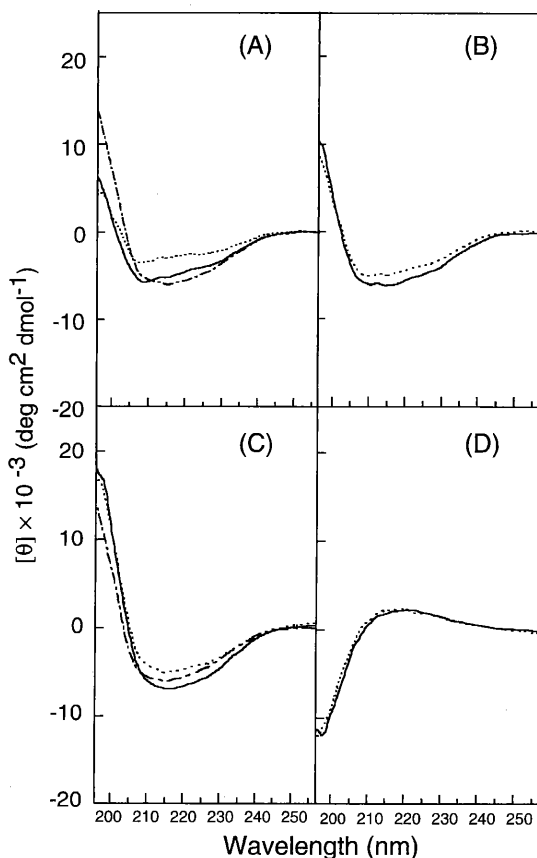


Fig. 1. CD spectra of the recombinant normal and mutant subunits, and the native β -conglycinin. (A) CD spectra of α (solid line), α' (dashed line) and β (dashed and single-dotted line) subunits. (B) The observed CD spectrum of the native β -conglycinin (solid line) and the calculated CD spectrum from those of individual α , α' and β subunits(dashed line). (C) CD spectra of α core (solid line), α' core (dashed line) and β (dashed and single-dotted line). (D) The difference CD spectrum between α and α' core(solid line) and that between α' and α' core(dashed line).

測定波長は 360 nm から 600 nm で行った。

示差走査熱量測定

緩衝液 A に溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンの示差走査熱量測定をマイクロキャル MC-2 ウルトラセンシティブマイクロキャロリメーター (マイクロキャル) を用いて行った。スキャン速度は 1°C/分で行った。

溶解度測定

0.5 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.6 に溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンに種々の緩衝液を添加することにより, イオン強度および pH を調節し, 4°C で 20 時間静置した。静置後, 17,000 g で 15 分間遠心分離し, 上清に含まれているたん白質量を定量し, 全体のたん白質量に対する割合から溶解度を算出した。

加熱会合性測定

緩衝液 A に溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンを 70°C, 80°C, 90°C で 5 分間加熱処理し, 0.22 μ m のフィルターで濾過した後, ショウデックス KW-804 および SB-806 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。さらに多角度光散乱検出器 (ワイアットテクノロジー) により, 各ピークの分子量を測定した。

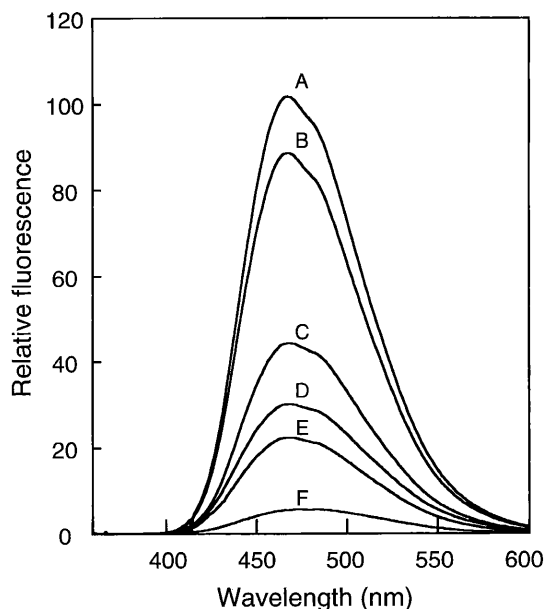


Fig. 2. Fluorescence emission spectra of the recombinant normal and mutant subunits, and the native β -conglycinin. Curves: A, α' core; B, α' ; C, the native β -conglycinin; D, α ; E, α core; F, β .

エマルション調製及び粒度分布測定

大豆油 0.25 mL と緩衝液 A に溶解した各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニン (0.5 mg/mL) 1.5 mL をホモゲナイズした後, さらに超音波処理することによりエマルションを調製した。レーザー回折式粒度分布測定装置 (モデル LA500, 堀場製作所) を用いて, 各エマルションの粒度分布を測定した。

結果と考察

組み換え型たん白質の構造形成能

組み換え型たん白質の 2 次構造の正しさを調べるために, 各組み換え型たん白質および天然の β -コングリシニンの CD スペクトルを測定した。 α , α' , β は, それぞれ特徴的なスペクトルを示した (Fig. 1-A)。これらのスペクトルを用いて天然の β -コングリシニンの各サブユニットの構成比に基づいて計算したスペクトルは, 天然の β -コングリシニンの測定スペクトルと非

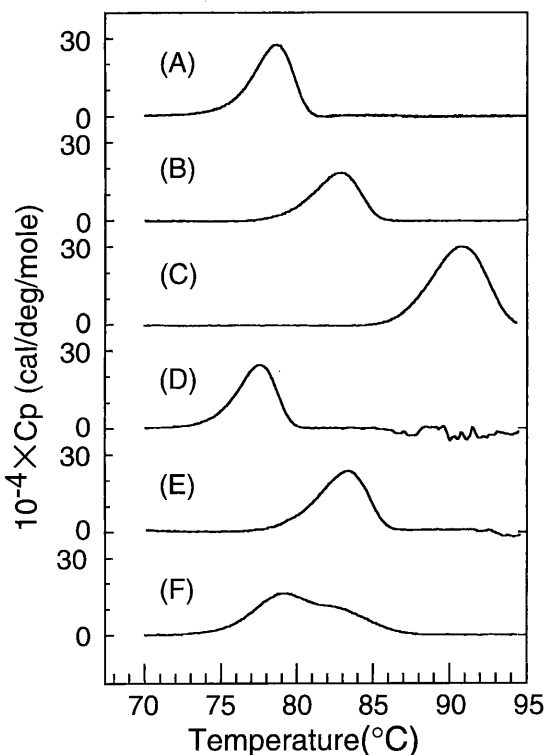


Fig. 3. D. S. C. scans of the recombinant normal and mutant subunits, and the native β -conglycinin. Scan rates were 1°C/min. (A), α ; (B), α' ; (C), β ; (D), α core; (E), α' core; (F), the native β -conglycinin.

常に近似していた (Fig. 1-B). このことから各組み換え型たん白質は天然の β -コングリシニンと同様の2次構造を形成していると考えられた. 一方, α コア, α' コア及び β は少しの違いはあるが互いに類似したスペクトルを与えた (Fig. 1-C). また, α と α コアの差スペクトル, および α' と α' コアの差スペクトル, つまり α と α' のエクステンション領域に由来すると考えられるスペクトルは非常に類似していた (Fig. 1-D). すなわち, 各サブユニットのコア領域およびエクステンション領域は互いに比較的類似した2次構造を形成していることが示唆された.

次に, 組み換え型たん白質の分子集合能を解析するために, イオン強度0.5においてショ糖密度勾配遠心分離を行った. α , α' , β および α コアは, 3量体の大きさである7Sの位置に沈降した. このことから, これらは, 天然の β -コングリシニンと同様に3量体を形成していることが示された. α' コアは, 6量体の大きさである9Sの位置に沈降したが, ゲル濾過クロマトグラフィーでの溶出時間の比較から, イオン強度1.0では

3量体を形成していることが判明した.

以上の結果は, 各組み換え型たん白質が天然の β -コングリシニンと同様の高次構造を形成していることを示している. 従って, これらの組み換え型たん白質を β -コングリシニンの構造・食品機能特性相関の解析に用いることができると判定した.

組み換え型たん白質の構造的特徴

ANSとの結合による蛍光強度から判定される表面疎水性は各サブユニットにより異なっており, $\alpha' > \alpha > \beta$ の順であった (Fig. 2). また, α コアは α と, α' コアは α' と近い値を与えたことから, 各サブユニットの表面疎水性は主にコア領域に基づいていることが明らかとなった.

示差走査熱量測定により求めた変性温度は, $\alpha < \alpha' < \beta$ の順であった (Fig. 3). そして, α コアは α と, α' コアは α' とほぼ同じ変性温度を与えた. つまり, 各サブユニットの熱安定性はコア領域が決定していることが判明した. 一方, 天然の β -コングリシニンは, α と α' それぞれの変性温度に近似する2つの変性温度を

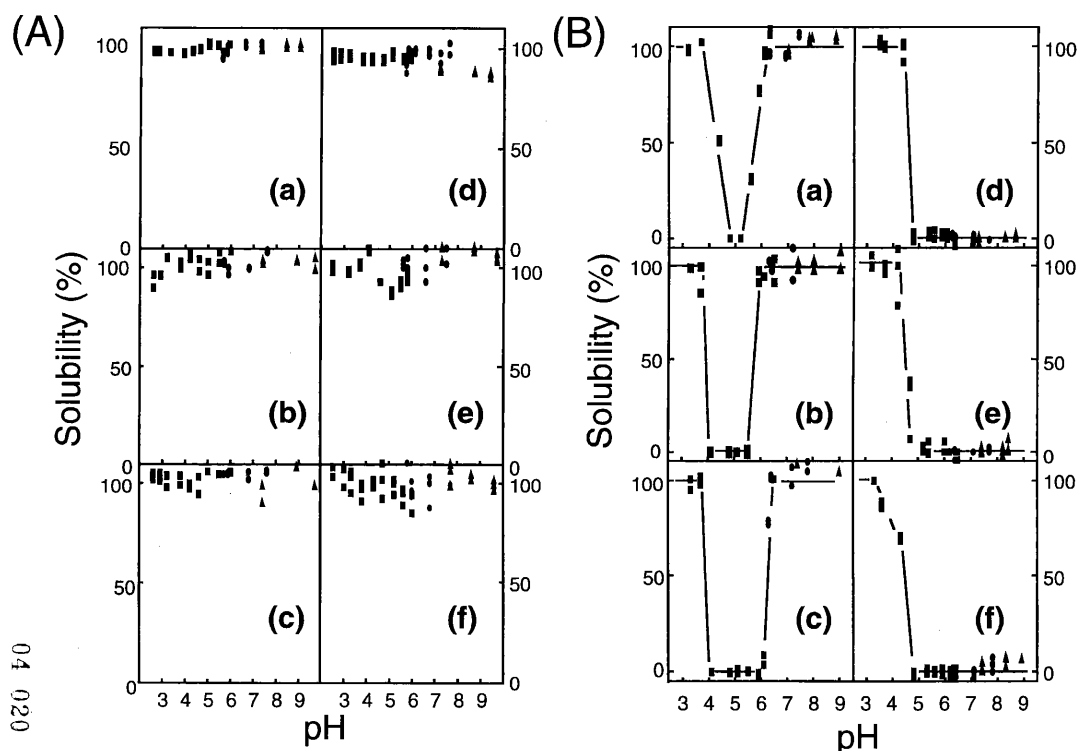


Fig. 4. Effects of pH on the solubility of the recombinant normal and mutant subunits, and the native β -conglycinin under the ionic strength 0.5(A) and 0.08(B). The pH of sample was adjusted by adding the McIlvaine buffer (square), the phosphate buffer(circle) and the ammonium buffer(triangle). (a), the native β -conglycinin; (b), α ; (c), α' ; (d), β ; (e), α core; (f), α' core.

示した。このことは、糖鎖は熱安定性に影響しないこと、そしてヘテロ3量体の熱安定性は、変性温度の低いサブユニットに支配されていることを示している。

組み換え型たん白質の食品機能特性

食品機能特性として、溶解性、加熱会合性、乳化性について検討した。まず、溶解性に対するpHとイオン強度の影響を調べた。イオン強度0.5では、全ての組み換え型たん白質がpHに依存せず可溶性であった (Fig. 4-A)。イオン強度0.08では、 β 、 α コア、 α' コアはpH4から5以上で全く不溶性であったが、 α 、 α' はpH4からpH6～6.5のみで不溶性であった (Fig. 4-B)。したがって、pH6～6.5以上の溶解性の違いにはエクステンション領域が影響を与えていると考えられた。

pH 7.6, イオン強度0.5の条件下における加熱会合性を調べた。全ての組み換え型たん白質が変性温度に従い会合体を形成した (Fig. 5)。しかし、 α 、 α' は分子量200万～300万の可溶性の会合体を形成したのに対し、 β 、 α コア、 α' コアは沈澱を形成した。つまり、エクステンション領域の存在により加熱会合体が可溶性となることが判明した。また、天然の β -コングリシニンも加熱により沈澱を生じず、分子量100万から600万の可溶性の会合体を形成した。可溶性会合体のサイズが単一サブユニットの場合と違うことには、ヘテロ3量体を含んでいることや糖鎖が影響していると考えられる。

乳化性を比較するために、ダイズ油を用いてホモゲナイズと超音波処理により調製したエマルションの粒

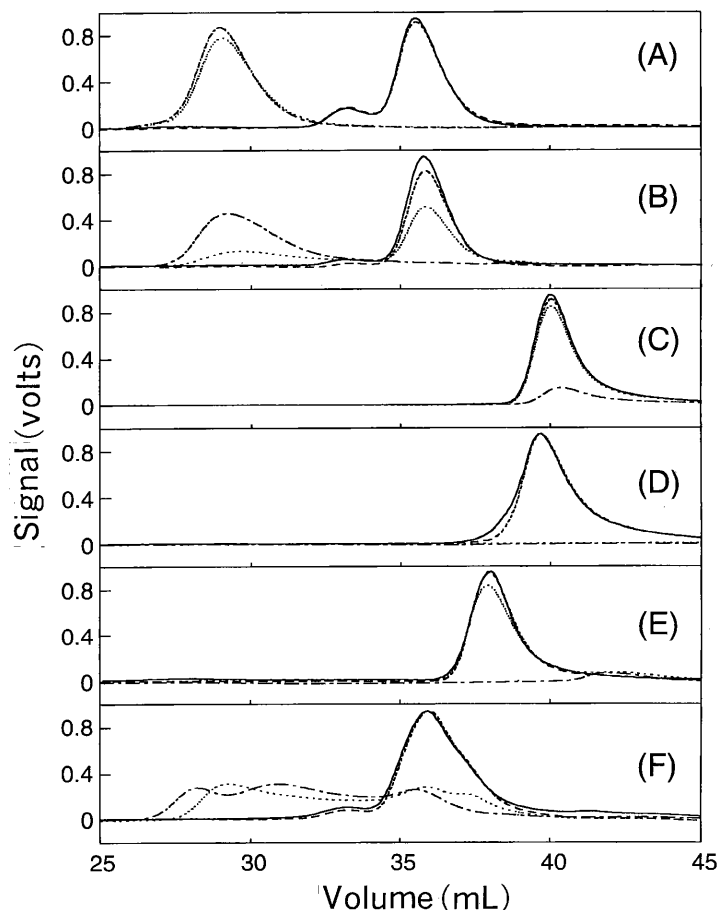


Fig. 5. Elution patterns of heat-induced soluble aggregates of the recombinant normal and mutant subunits, and the native β -conglycinin. (A), α ; (B), α' ; (C), β ; (D), α core; (E), α' core; (F), the native β -conglycinin. Solid line, nonheated; dashed line, 70°C; dotted line, 80°C; dashed and single-dotted line, 90°C.

度分布を測定した。粒子径は $\alpha < \alpha' < \alpha$ コア $< \alpha'$ コア $< \beta$ の順であった。 α と α' がそれぞれのコア領域よりも細かい粒子を形成したことから、エクステンション領域が存在することにより乳化性が良くなることが示唆された。また、天然の β -コングリシニン は α よりも細かい粒子を形成したが、このことには糖鎖が関与していると考えられる。

以上の結果から、食品機能特性は各サブユニットで互いに異なっており、これにはコア領域の構造的特徴の違いとともに、糖鎖やエクステンション領域も大きく寄与していることが明らかとなった。このことは、 β -コングリシニンのサブユニット組成の異なるダイズ品種を用いて、種々の機能特性を備えた食品素材を開発できる可能性を示している。

要 約

大腸菌発現系を用いて大豆 β -コングリシニンの3種類のサブユニット (α , α' , β) および α と α' のコア領域 (α コア, α' コア) の均一分子種を調製し、それらの構造と食品機能特性を解析した。各組み換え型たん白質は天然の β -コングリシニンと同様の高次構造を形成していることがCD測定および、シヨ糖密度勾配遠心分離によって示された。また、各サブユニットの表面疎水性及び熱安定性などの構造的特徴はサブユニット間でそれぞれ異なっており、それは主にコア領域の特徴に依存していることが明らかとなった。一方、溶解性、加熱会合性、乳化性などの食品機能特性にはコア領域の構造的特徴と共に、エクステンション領域や糖鎖も大きく寄与していることが判明した。

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, Matsumura Y and Mori T (1997): Structure-function relationships of soy proteins. In: *Food Proteins and Their Applications*. Damodaran S and Paraf A, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 257-291.
- 3) 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.
- 4) Harada JJ, Barker SJ and Goldberg RB (1989): Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and regulated by transcriptional and posttranscriptional process. *Plant Cell*, **1**, 415-425.
- 5) Sebastiani FJ, Farrell LB, Schuler MA and Beachy RN (1990): Complete sequence of cDNA of a subunit of soybean β -conglycinin. *Plant Mol Biol*, **15**, 197-201.
- 6) 内海 成 (1996): 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。大豆たん白質研究会誌, **17**, 6-9.
- 7) Utsumi S, Kim CS, Sato T and Kito M (1988): Signal sequence of preproglycinin affects production of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene*, **71**, 349-358.