

β -コングリシニンのグリシニン化による食品機能の改質

佐藤良平・丸山伸之・安達基泰・内海 成*

京都大学食糧科学研究所

Evolutionary Relationship between β -Conglycinin and Glycinin and Attempts to Improve Food Functions of β -Conglycinin Based on the Relationship

Ryouhei SATOH, Nobuyuki MARUYAMA, Motoyasu ADACHI and Shigeru UTSUMI

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

ABSTRACT

Soybean proteins consist of two major components, glycinin and β -conglycinin. Both proteins are composed of two domains (glycinin, the acidic and the basic polypeptides; β -conglycinin, N- and C-terminal half molecules). It is believed that both proteins are derived from a duplication of a common ancestral gene. Each domain of both proteins has different hydrophobicity to each other. These suggest that creations of chimeric proteins with novel physicochemical properties between glycinin and β -conglycinin and hexameric β -conglycinin by introduction of the processing site (Asn-Gly) of glycinin and processing may be possible. We constructed *Escherichia coli* expression systems for β -conglycinin β having the processing site and chimeric proteins 11A-7C, 7N-11B, 11A-7N and 7C-11B between β -conglycinin β (7N and 7C) and glycinin A1aB1b (11A and 11B). The β having the processing site was processed, but did not form a hexamer by itself. Folding abilities of chimeric proteins were lower than those of the original β and A1aB1b. The order of the folding abilities of the chimeric proteins was 11A-7C = 7C-11B > 11A-7N $\gg$ 7N-11B (soluble 7N-11B could not be obtained). Only 7C-11B formed oligomers and the others were monomers, although all three chimeras formed similar secondary structures to those of the original proteins. These suggest that β -conglycinin and glycinin followed a different evolutionary mechanism from a common ancestor. Physicochemical properties of 11A-7C and 7C-11B were examined. Although the original β exhibited ionic strength-dependency of solubility at pH 7.6 (insoluble $< \mu = 0.3$), 11A-7C and 7C-11B were soluble at any ionic strengths in analogy with A1aB1b. Both chimeric proteins exhibited better emulsifying abilities than the original β and A1aB1b did, especially at $\mu = 0.1$ at pH 7.6. These indicate that creation of chimeric proteins having good food functions is possible. *Soy Protein Research, Japan* 2, 5-10, 1999.

Key words : soybean, β -conglycinin, glycinin, chimera, food functions

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

大豆たん白質は栄養性、加工特性に富み、しかも血清コレステロール値低下機能など人の健康維持・増進に役立つ特質を備えている。しかし、これらの特質は完全なものではなく、さらなる改善が可能である。我が国における高齢化社会の到来や食源性疾患の増大という社会問題、そして地球規模における将来の食糧不足に対処するために、大豆たん白質の各特質を多面的に改善することが望まれる。

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が、概してグリシニンの方が各特質とも優れている。したがって、 β -コングリシニンの各特質を改善することが望まれる。ところが、グリシニンと β -コングリシニンの1次構造には部分的な相同性があり、両たん白質は共通祖先に由来していると考えられている¹⁾。事実、我々は両たん白質のX線結晶構造解析を行い、両たん白質の基本構造が極めて類似していることを明らかにした^{2,3)}。したがって、グリシニンと β -コングリシニンの進化的関係に基づいて、 β -コングリシニンをグリシニンに近づける改造を施すことが可能かも知れない。そうすると、 β -コングリシニンの各特質の改善とともに、両たん白質とは異なる加工特性の付与も期待できる。

β -コングリシニンは3量体構造を持ち、 α 、 α' 、 β の3種のサブユニットより成る。これらのうち、 β サブユニットが最もグリシニンのサブユニットに似ており、我々はその高次構造を明らかにしている³⁾。一方、グリシニンの構成サブユニットは、小胞体中ではA鎖とB鎖がつながった一本鎖のプロ型として存在し、3量体を形成している。液泡へ運ばれるとA鎖とB鎖のジャンクション部(Asn-Gly)でプロセシングを受け成熟型となり、6量体に分子集合する。このようなグリシニンの構成サブユニットには5種類あるが、我々はそのうちA1aB1bとA3B4の高次構造を解明している^{2,3)}。そこで本研究では、 β -コングリシニン β サブユニット(β)とグリシニンA1aB1bサブユニット(A1aB1b)の立体構造に基づいて、 β へのグリシニンのプロセシングサイトの導入によるグリシニン化、および β とA1aB1bのドメイン交換によるキメラ化を大腸菌発現系を用いて試みるとともに、得られた組み換え型たん白質の構造と特性を解析した。

方 法

β へのプロセシングサイトの導入とキメラ体の構築ならびに大腸菌発現

β のN末端側(7N)およびC末端側(7C)のドメイ

ンを連結するループ部に、グリシニンのプロセシングサイトであるAsn-Gly配列を導入した変異 β (7N-7C)に対する遺伝子を部位特異的変異により作製した。 β の7Nと7CおよびA1aB1bのA鎖(11A)とB鎖(11B)を交換したキメラ体4種(11A-7C, 7N-11B, 11A-7N, 7C-11B)に対する遺伝子をPCR法を用いて構築した。これらの遺伝子を大腸菌発現ベクターpET-21aあるいは-21dに組み込み、発現プラスミドを構築した。発現には、大腸菌HMS174(DE3)を用い、温度などの培養条件を種々検討することによって大量発現させた。発現たん白質の検出は、A1aB1bおよび β に対する抗体を用いるウエスタンブロッティングにより行った。

不溶性組み換え型たん白質の可溶化

組み換え型たん白質を発現している大腸菌を集菌し、抽出用緩衝液(35 mM K-Pi, pH 7.6, 0.4 M NaCl, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM EDTA, 0.1 mM aPMSF)中でソニックすることによって菌体を破碎した。遠心後、可溶性画分と不溶性画分をSDS-ゲル電気泳動にかけて発現たん白質の発現状態を調べた。不溶性での組み換え型たん白質に関しては、不溶性画分を抽出用緩衝液で3回洗浄後、0.2 M 2-メルカプトエタノールを含む6 M 尿素に溶解した。再生用緩衝液(35 mM K-Pi, pH 7.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 M 2-メルカプトエタノール, 0.1 mM aPMSF, 0.2 mM PEG4000, 10% glycerol)に対して、次いで2-メルカプトエタノールを含まない再生用緩衝液に対して各々4℃で48時間静置透析することによって再生させた。さらに透析でグリセロールを除き、遠心後、可溶性画分と不溶性画分をSDS-ゲル電気泳動にかけ、可溶化の程度を判定した。

可溶性組み換え型たん白質の精製

可溶性で発現した組み換え型たん白質は組み換え型 β と同様に精製した⁴⁾。

CD測定

CD測定は、日本分光J720スペクトロポラリメーターを使用し、緩衝液A(35 mM K-Pi, pH 7.6, 0.4 M NaCl)中で、遠紫外CDスペクトルを測定した。

分子集合能

分子集合状態を調べるために、緩衝液A中で、10～30%のショ糖密度勾配遠心分離(サイズマーカー；大豆2S, 7S, 11S画分)を行った⁴⁾。

溶解性

溶解性に対するイオン強度の影響を調べるために、緩衝液Aに溶解した各試料たん白質をpH 7.6において種々のイオン強度のK-Pi緩衝液に対して透析し、上清のたん白質を定量した。

乳化性

大豆油 0.25 mL と緩衝液 A あるいは緩衝液 B (35 mM K-Pi, pH 7.6) に溶解した各試料たん白質溶液 1.5 mL (0.5 mg/mL) をホモゲナイズした後、超音波処理することによってエマルションを調製した。エマルションの粒度分布はレーザー回折式粒度分布測定装置 (モデル LA500, 堀場製作所) を用いて測定した。

結果と考察

プロセッシングサイト導入体およびキメラ体の発現と構造形成能

β -コングリシニンとグリシニンが共通祖先から進化した際に、 β -コングリシニンの N 末端側 (7N) と C 末端側 (7C) およびグリシニンの A 鎖 (11A) と B 鎖 (11B) は逆に重複した、つまり、7N は 11B に、7C は 11A により類似していることが指摘されている⁵⁾。 β にプロセッシングサイトを導入した変異体 (7N-7C)、 β の 7N と 7C および A1aB1b の 11A と 11B を交換したキメラ体 (11A-7C, 11A-7N, 7N-11B, 7C-11B) を設計した (Fig. 1)。これらの大腸菌発現系を構築し、HMS174 (DE3) 中で発現させた。グリシニンおよび β -コングリシニン β に対する抗体でキメラ体の発現

を確認できた。培養条件を種々検討したところ、7N-7C は可溶性の状態が発現させることができたが、キメラ体は全て可溶性で発現させることができなかった。したがって、キメラ体はいずれのものも構造形成能が低いと考えられる。

不溶性画分におけるキメラ体の純度は 70 ~ 80% であった。そこで、この標品を用いて再生による可溶性を試みた。つまり、還元・変性後、2 段階透析により再生させた。その結果、イオン強度 0.5, 0.5 mg/mL の条件において 11A-7N と 7N-11B は全く可溶化しなかったが、11A-7C と 7C-11B は 90% 以上が可溶化した。イオン強度 0.5, 0.1 mg/mL において 11A-7N は 20% が可溶化したが、7N-11B は全く可溶化しなかった。また、イオン強度 0.08, 0.2 mg/mL においては 11A-7N は 80 ~ 90% が可溶化したが、7N-11B は全く可溶化しなかった。11A-7C と 7N-11B よりも 11A-7N, 7C-11B の方が再生効率が高いという事実は、 β -コングリシニンとグリシニンが共通祖先から進化した時に、両者で逆に重複が起こったという説を支持するものである。

構造形成能を調べるために、まず CD スペクトルを比較した (Fig. 2)。その結果、7N-7C は β サブユニットと同じスペクトルを与え、キメラ体は β や A1aB1b のスペクトルとは少し異なるパターンを与えた。これら

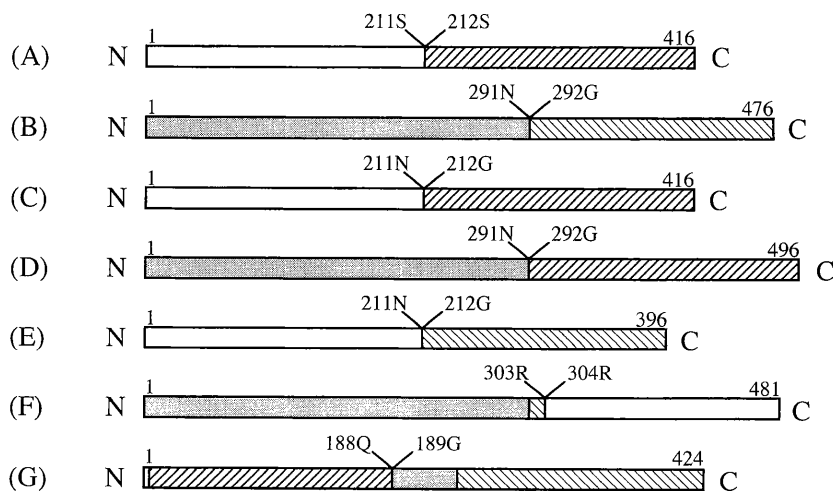


Fig. 1. Schematic representation of the original and mutant proteins. (A) β -Conglycinin β subunit ; (B) glycinin A1aB1b subunit ; (C) mutant β subunit (7N-7C) having the processing site of glycinin ; (D) chimeric protein 11A-7C composed of the acidic polypeptide of A1aB1b (11A) and the C-terminal half molecule of β (7C); (E) chimeric protein 7N-11B composed of the N-terminal half molecule of β (7N) and the basic polypeptide of A1aB1b (11B); (F) chimeric protein 11A-7N ; (G) chimeric protein 7C-11B. N and C denote N- and C-termini. The numbers of the residues are from the N-terminus. , 7N ; , 7C ; , 11A ; , 11B.

のスペクトルから2次構造含量を計算すると、いずれのキメラ体も2次構造を形成し、特に β 構造の含量は天然型と類似した値を与えた。すなわち、各キメラ体は天然のものと同様の β -バレル構造を形成していると考えられる。可溶性で発現した7N-7C、および可溶化できたキメラ体11A-7C、7C-11B、11A-7Nの分子集合能をショ糖密度勾配遠心分離によって調べた (Fig. 3)。その結果、7N-7Cは3量体として、11A-7Cと11A-7Nはモノマーとして存在していること、7C-11Bはモノマーに加えて3量体や6量体としても存在していることが判明した。したがって、キメラ体はその天然のものに近い2次構造を持つが、7C-11B以外はサブユニット間相互作用をしにくい状態にあると考えられる。このように、7C-11Bが分子集合能を持つということは、上述の進化の機構を支持している。

プロセッシングサイトを導入した7N-7Cをプロセッシング酵素で処理したところ、用いた基質の70%がプロセッシングされた。その分子集合状態をショ糖密度勾配遠心分離によって調べたところ、全て3量体として存在していた。 β はプロセッシングされても、少なくとも単独では6量体を形成する能力はないと考えられる。

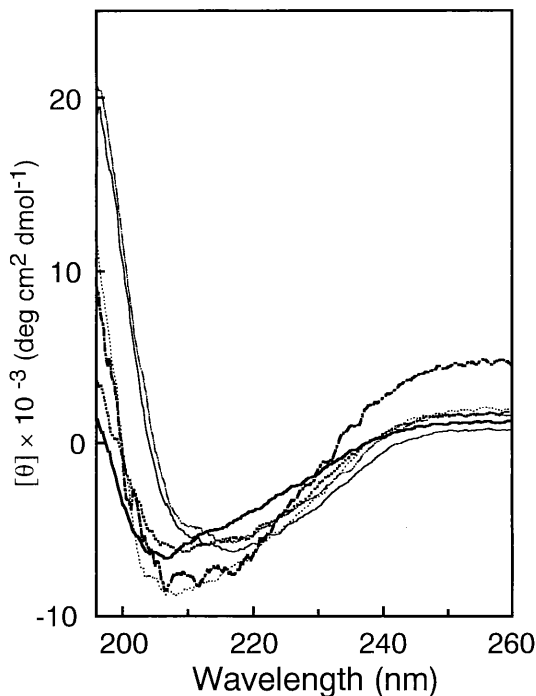


Fig. 2. CD spectra of the recombinant original and mutant proteins. —, β ; ----, A1aB1b; - · - ·, 7N-7C; — — —, 11A-7C; · · · · ·, 11A-7N; - - - - -, 7C-11B.

キメラ体の加工特性

β の7Nと7C、およびグリシニンのA鎖とB鎖は互いに異なる疎水性度を持っている。したがって、キメラ体は天然のものとは異なる溶解性や乳化性を示すことが期待される。そこで、大量再生のできた11A-7Cと7C-11Bに関して、まず溶解性に対するイオン強度の影響をpH 7.6で調べた。その結果、組み換え型 β はイオン強度0.3以下で不溶性となるが、キメラ体はA1aB1b

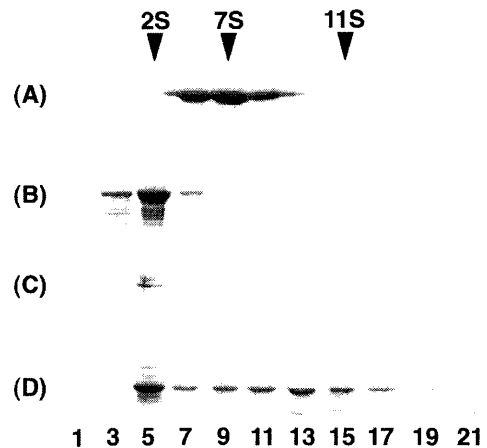


Fig. 3. Self-assembly of the recombinant mutant β and chimeric proteins. Assembly was analyzed by means of sucrose-density-gradient centrifugation and immunoblotting. (A) 7N-7C; (B) 11A-7C; (C) 11A-7N; (D) 7C-11B.

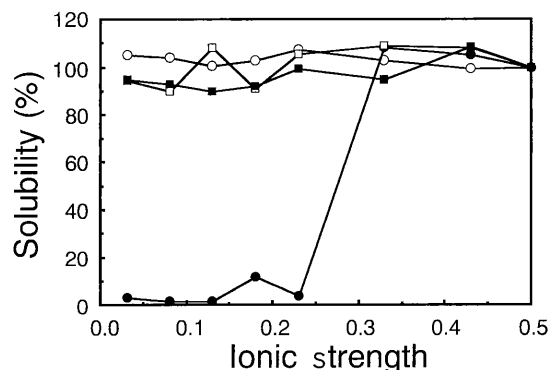


Fig. 4. Solubility of the recombinant original and chimeric proteins as a function of ionic strength. —●—, β ; —○—, A1aB1b; —□—, 11A-7C; —■—, 7C-11B. Solubility was expressed as a percentage of the initial total protein content.

と同様に全イオン強度下で可溶性であった (Fig. 4). また, 乳化性を pH 7.6 において, イオン強度 0.5 と 0.1 で測定した (Fig. 5). イオン強度 0.1 においては, β は不溶性となり測定できなかったが, その他の試料に関しては測定できた. A1aB1b は極めて低い乳化性を示したが, 11A-7C と 7C-11B とも A1aB1b よりも優れ

た, 特に 11A-7C ははるかに優れた乳化性を示した. イオン強度 0.5 においては, 7C-11B は β よりも優れている A1aB1b と同程度の乳化性を示し, 11A-7C は, それよりも優れた乳化性を示した. ここで得られた結果は, キメラ体の作製は新規な有用食品たん白質の作出法として適していることを示している.

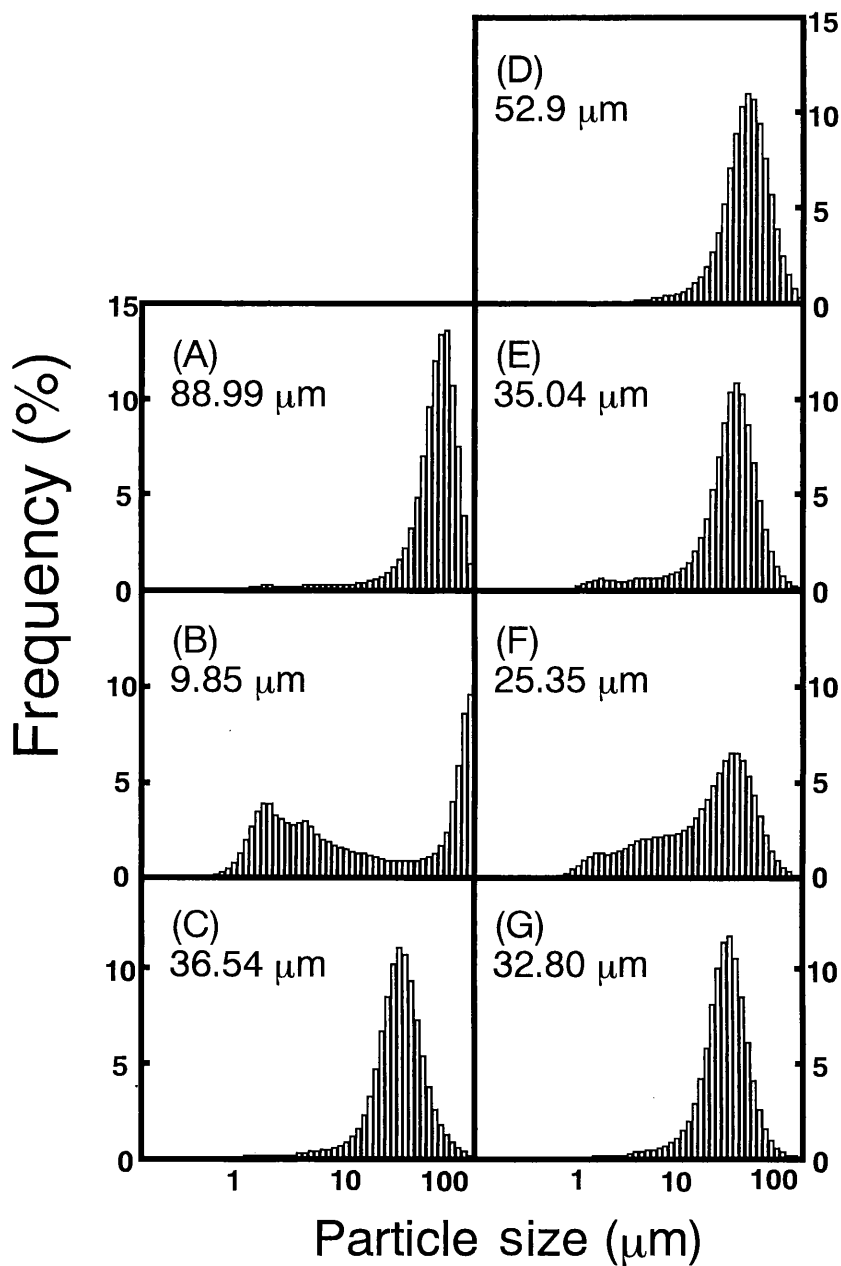


Fig. 5. Particle size distributions of emulsions from the recombinant original and chimeric proteins. Emulsions were formed at pH 7.6 at $\mu = 0.1$ (A-C) and $\mu = 0.5$ (D-G). An average particle size is shown in each panel. (A) A1aB1b; (B) 11A-7C; (C) 7C-11B (D) β ; (E) A1aB1b; (F) 11A-7C; (G) 7C-11B.

要 約

β -コングリシニン β とグリシニン A1aB1b のドメインを交換したキメラ体および β にグリシニンのプロセシングサイトを導入した変異体に対する大腸菌発現系を構築し、それらの構造的特徴と加工特性を β および A1aB1b と比較した。その結果、 β -コングリシニンとグリシニンは共通祖先の重複によって生じたが、重複の仕方が異なるという説を支持する結果が得られた。また、キメラ体のいくつかは、天然のものよりも優れた溶解性および乳化性を示すことが判明した。

文 献

- 1) 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.
- 2) 安達基泰, 三上文三, 内海 成 (1997) : 大豆プログリシニンの高分解能 X 線結晶構造解析. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 21-24.
- 3) 内海 成, 安達基泰, 丸山伸之, 三上文三 (1999) : 高機能化ダイズタンパク質の分子設計基盤と作出. 日本農芸化学会会誌, **73**(増), 478.
- 4) Maruyama N, Katsube T, Wada Y, Oh MH, Barba de la Rosa AP, Okuda E, Nakagawa S and Utsumi S (1998) : The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur J Biochem*, **258**, 854-862.
- 5) Shutov AD, Kakhovskaya IA, Braun H, Baumlein H and Müntz K (1995) : Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins : Evidence for a common single-domain ancestral gene. *J Mol Evol*, **41**, 1057-1069.