

変異大豆を利用する β -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析

丸山伸之・内海 成*

京都大学食糧科学研究所

Investigation of Structure-function Relationships of Soybean β -Conglycinin Using Mutant Soybean Cultivars

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

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

ABSTRACT

β -Conglycinin is a trimeric protein consisting of three subunits α , α' and β . All subunits are N-glycosylated and α and α' contain extension regions in addition to the core regions common to all subunits. We prepared homogeneous trimers consisting of only α , α' or β from soybean mutant cultivars lacking one or two subunits: α homotrimers from an α' -lacking mutant, α' homotrimers from an α -lacking mutant and β homotrimers from an $\alpha\alpha'$ -lacking mutant. Structural features (secondary structure, thermal stability) and functional properties (solubility, emulsifying ability, heat-induced association) of the three homotrimers were examined and compared with those of recombinant homotrimers having no carbohydrate moiety (*Soy Protein Research, Japan* **1**, 19-24, 1998) in order to elucidate the structure-function relationships and the roles of the carbohydrate moieties of β -conglycinin. The results indicate that 1) the recombinant homotrimer has the same structure as that of the native one, 2) thermal stability is different among subunits ($\beta > \alpha' > \alpha$) and the carbohydrate moieties do not contribute to thermal stability, 3) α and α' having the extension regions exhibit better solubility, emulsifying ability and heat-induced association than does β , and 4) the carbohydrate moieties contribute to solubility of three subunits at low ionic strength, emulsifying ability of β and heat-induced association of α and α' . *Soy Protein Research, Japan* **3**, 12-17, 2000.

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

大豆たん白質は優れた生理機能を持っており食品素材としての潜在能力が高く、その用途の拡大が望まれ

る。このためには、大豆たん白質の構造と加工特性の相関の解明が不可欠である。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。グリシニンの構造・加工特性相関に関してはサブユニット

* 〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

レベルおよび分子レベルで解析され、いくつかの関係が明らかにされていたが¹⁾、 β -コングリシニンについての解析はほとんど成されていなかった。そこで、我々は、 β -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析を開始した²⁾。

β -コングリシニンは3量体構造を持ち、 α 、 α' 、 β の3種のサブユニットから構成されている。各サブユニットは糖たん白質であり、 α と α' には2カ所、 β には1カ所に糖鎖が付加されている。 β は、3種のサブユニット間で1次構造の相同性の高いコア領域(416残基)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および141残基より成る親水性の強いエクステンション領域を持っている³⁾。これらの各サブユニットの特性を解析するためには、各サブユニットのホモ3量体が必要であるが、大豆種子中には3種のサブユニットがランダムに組み合わさった種々の分子種が存在するためにその調製が困難である。そこで、大腸菌発現系を利用して、3種のサブユニットの糖鎖を持たない組み換え型ホモ3量体を調製するとともに、 α と α' のコア領域も調製して解析することによって、3種のサブユニットが互いに異なる特性を持つこと、表面疎水性と熱安定性はコア領域によって決定されていること、溶解性、乳化性、加熱会合性にはエクステンション領域が関与することを見出した^{2,4)}。

最近、 α 欠失、 α' 欠失、 $\alpha\alpha'$ 欠失大豆が農水省の研究者によって開発された。これらを利用すると各サブユニットの天然型である糖鎖付加型ホモ3量体を容易に調製することができる。そこで、これらを用いて解析することによって、組み換え型の結果を検証するとともに、糖鎖の効果を精密に解明することを試みた。

方 法

天然型ホモ3量体の調製

α 欠失大豆より α' ホモ3量体を、 α' 欠失大豆より α ホモ3量体を硫酸分画およびモノQカラムクロマトグラフィーにより、 $\alpha\alpha'$ 欠失大豆より β ホモ3量体を硫酸分画によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にはほぼ均一に精製した。

CD測定

日本分光J720スペクトロポリリメーターを用いて、0.4 M NaClを含む35 mM リン酸緩衝液、pH 7.6(緩衝液A)に溶解した各ホモ3量体のCD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。

溶解性

0.5 M NaClを含む10 mM リン酸緩衝液、pH 7.6に溶解した各ホモ3量体に種々の緩衝液を添加することによりイオン強度(0.5あるいは0.08)およびpH(3-9)を調製し、4℃で20時間静置した。17,000 g、15分間遠心分離の上清のたん白質を定量し、用いたたん白質量に対する割合から溶解度を算出した。

熱安定性

マイクロキャル社 MC-2 ウルトラセンシティブマイクロキャロリメーターを用いて、緩衝液Aに溶解した各ホモ3量体の示差走査熱量測定を行うことにより熱安定性を調べた。走査速度は1℃/分で行った。

乳化性

緩衝液Aに溶解した各ホモ3量体1.5 mL(0.5 mg/mL)と大豆油0.25 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(堀場製作所、モデルLA500)を用いて各エマルションの粒度分布を測定した。

加熱会合性

緩衝液Aに溶解した各ホモ3量体を70℃、80℃、90℃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 SB806M カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。各ピークの分子量は、多角度光散乱検出器によって行った。

結果と考察

ホモ3量体の高次構造

各ホモ3量体の2次構造をCDスペクトルによって比較した(Fig. 1A)。 α と α' は非常に類似したスペクトルを与え、 β はそれらとは異なるスペクトルを与えた。このことには、エクステンション領域の有無が影響していると考えられる。天然型のホモ3量体のスペクトルを組み換え型のものと比較したところ(Fig. 1B-D)、いずれのホモ3量体ともほぼ一致していた。また、後に示すように、天然型と組み換え型は同様の3量体を形成していることがゲル濾過によって確認された。これらの結果は、糖鎖が高次構造の形成に不必要であること、そして組み換え型が天然型のものと同じ高次構造を形成しうることを意味している。

溶解性

天然型ホモ3量体の溶解性のpH依存性に対するイオン強度の影響を調べた。イオン強度0.5では、全てのホモ3量体がpHによらず可溶性であった。イオン強度0.08では、 β はpH 4.8～8.5で不溶性であったが、

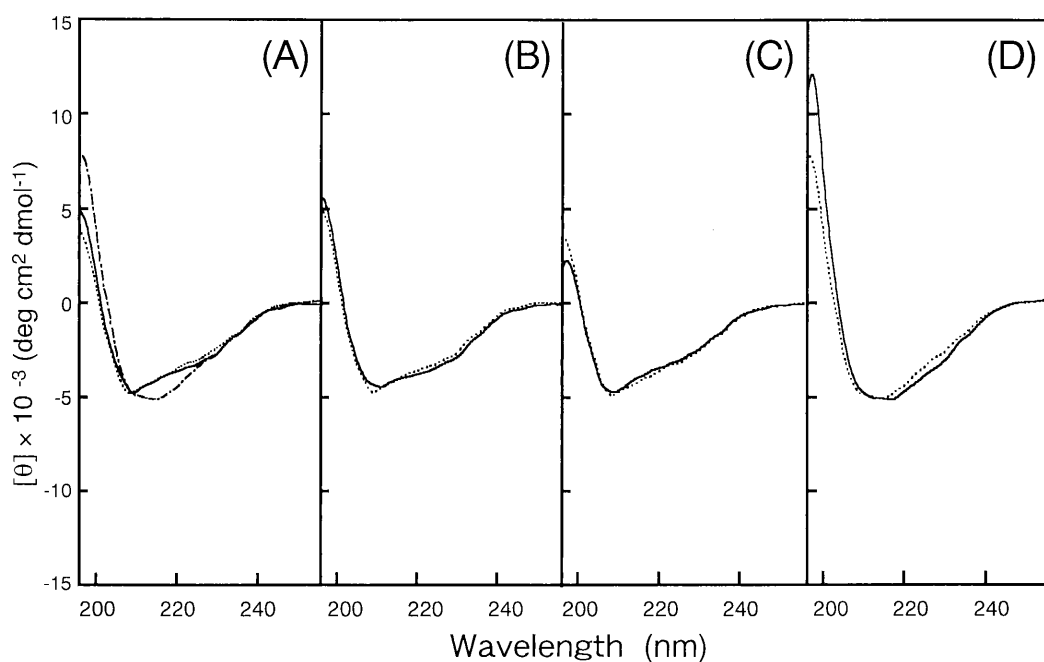


Fig. 1. CD spectra of β -conglycinin homotrimers. (A) CD spectra of the native α (solid line), α' (dotted line) and β (dashed and single-dotted line) homotrimers prepared from soybean mutant cultivars. (B) α . (C) α' . (D) β . CD spectra of the native and recombinant homotrimers are shown by dotted and solid lines, respectively.

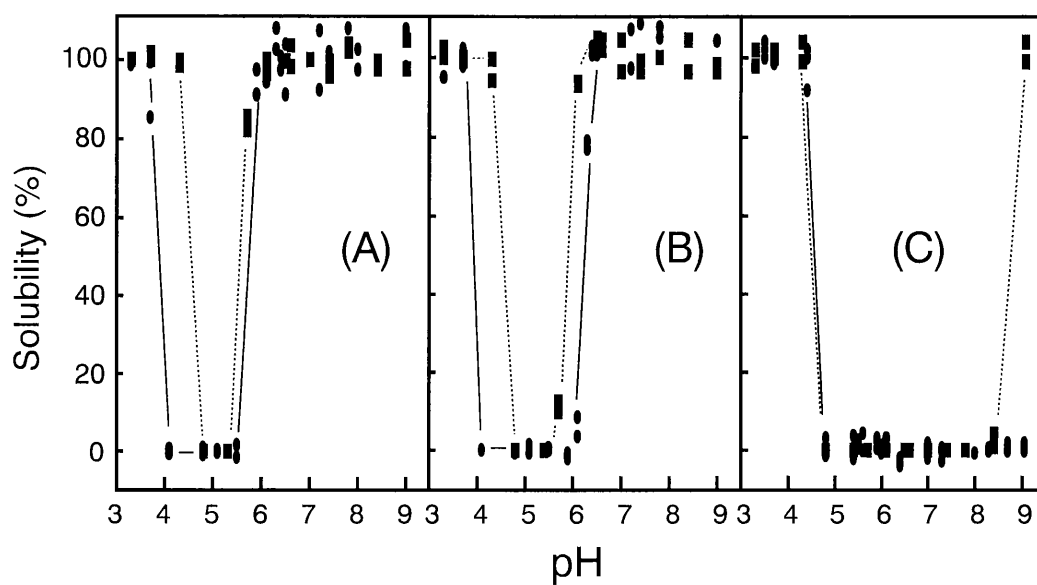


Fig. 2. Dependency of the solubility of β -conglycinin homotrimers on pH at ionic strength 0.08. (A) α . (B) α' . (C) β . Solubilities of the native and recombinant homotrimers are shown by dotted line with squares and solid line with circles, respectively.

α は pH 4.8~5.3, α' は pH 4.8~5.7 の間でのみ不溶性であった (Fig. 2). このパターンは組み換え型と同様であったが, 天然型の方が不溶性となる pH 範囲が狭かった. すなわち, 糖鎖は低イオン強度下における溶解性に関与することが明らかとなった.

熱安定性

示差走査熱量測定により求めた天然型ホモ 3 量体の熱変性温度 (Fig. 3) は $\alpha=78.2^{\circ}\text{C}$, $\alpha'=82.6^{\circ}\text{C}$, $\beta=87.0^{\circ}\text{C}$ であった. 組み換え型と比較すると, α と α' はほぼ同じ値であったが, β では, 天然型の方が 3.8°C 低かった. この原因は, α と α' の結果から糖鎖の有無のためではなく, 天然型と組み換え型のアミノ酸配列の違いのためと推定された. そこで, 組み換え型を作製するために用いた cDNA を調製した品種ワセズナリオおよび $\alpha\alpha'$ 欠大豆よりゲノム DNA を調製し, それらの β 遺伝子の塩基配列を決定した. その結果, 組み換え型の 2 カ所のフェニルアラニンが $\alpha\alpha'$ 欠大豆ではロイシンとなっていることが判明した. また, 品種ワセズナリから調製した天然型 β は, 組み換え型とほぼ同じ熱安定性を示した. したがって, アミノ酸配列の違いが β の天然型と組み換え型の変性温度の違いの原因と考えられる.

乳化性

天然型各ホモ 3 量体と大豆油とのエマルションの粒子径分布を測定した (Fig. 4). 平均粒子径は, $\alpha=5.2\ \mu\text{m}$, $\alpha'=9.8\ \mu\text{m}$, $\beta=28.5\ \mu\text{m}$ であり, α と α' では組み換え型とほぼ同じ値であったが, β では, 組み換え型よりも小さな値であった. したがって, エクステンション領域を持つ α や α' の乳化性に対しては糖鎖は寄与しないが, エクステンション領域を持たない β の乳化性には大きく寄与すると考えられる.

加熱会合性

天然型ホモ 3 量体の加熱による会合性を 70°C , 80°C , 90°C 加熱において調べた (Fig. 5). その結果, 天然型も組み換え型と同様に, α と α' はその変性温度に依存して可溶性の会合体を形成するが, β は不溶化することが明らかとなった. また, 組み換え型と比較すると, 天然型の方が会合体の形成量が少なく, そのサイズも小さい. このことは, 糖鎖は, 可溶性会合体の形成を阻害していることを意味している. 一方, β が可溶性の会合体を形成できないのは, エクステンション領域を持たないためと考えられる.

以上の結果から, 各サブユニットは互いに異なる構

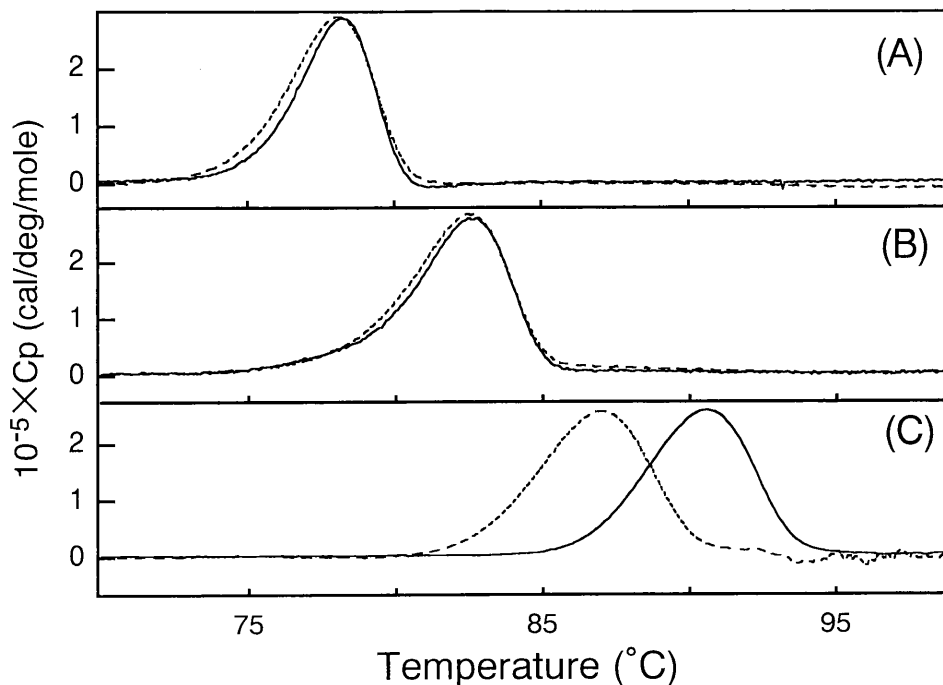


Fig. 3. DSC scans of β -conglycinin homotrimers. (A) α . (B) α' . (C) β . The native and recombinant homotrimers are shown by dotted and solid lines, respectively.

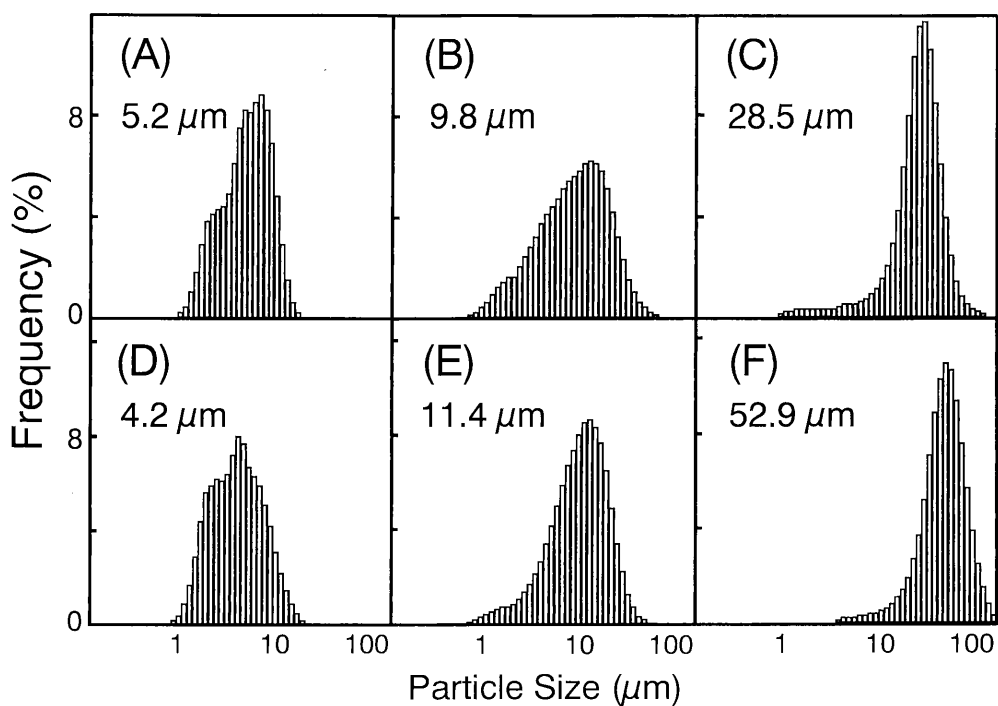


Fig. 4. Particle size distributions of emulsions from β -conglycinin homotrimers. The native (A-C) and recombinant (D-F) α (A, D), α' (B, E) and β (C, F) homotrimers were measured.

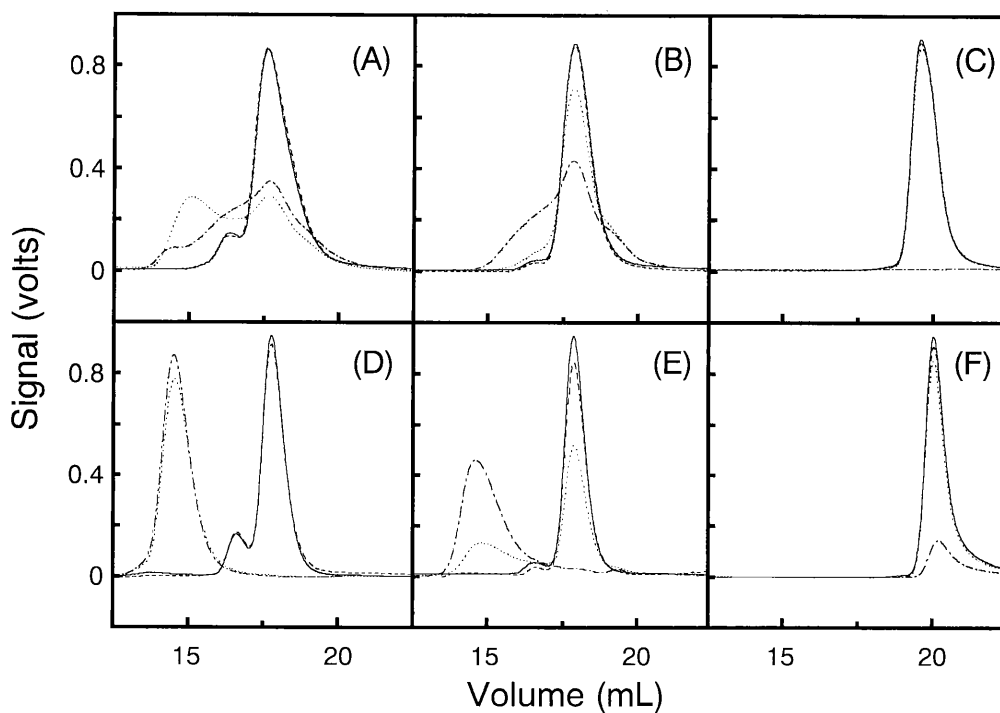


Fig. 5. Elution patterns of heat-treated β -conglycinin homotrimers. The native (A-C) and recombinant (D-F) α (A, D), α' (B, E) and β (C, F) homotrimers were heated at 70°C (dashed line), 80°C (dotted line) and 90°C (dashed and single-dotted line). Nonheated samples were shown by solid line.

造的特徴（熱安定性）や加工特性（溶解性、乳化性、加熱会合性）を持つこと、これらの性質のうち、加工特性には糖鎖も大きく関与すること、そして相対的に、 β よりも α と α' の方が優れた特性を持つことが明らか

となった。 α はアレルゲンであるという報告⁵⁾を考慮すると、 α' のみを持つ大豆を育種することが望まれる。

要 約

大豆 β -コングリシニンの構造・加工特性相関を明らかにするために、 β -コングリシニンの3種のサブユニット (α , α' , β) に変異を持つ大豆 (α 欠失, α' 欠失, $\alpha\alpha'$ 欠失) を利用して、天然型の単一サブユニット分子種 (α ホモ3量体, α' ホモ3量体, β ホモ3量体) を調製し、各ホモ3量体の構造的特徴（二次構造、熱安定性）および加工特性（溶解性、乳化性、加熱会合性）を解析するとともに、糖鎖を持たない組み換え型ホモ3量体と比較した。その結果、組み換え型ホモ3量体は天然型ホモ3量体と同じ構造を持つこと、熱安定性は互いに異なり、 $\alpha < \alpha' < \beta$ であり、糖鎖は関与しないこと、溶解性、乳化性、加熱会合性はエクステンション領域を持たない β よりもエクステンション領域を持つ α や α' の方が優れていること、そして糖鎖は、低イオン強度下における溶解性、 β の乳化性、 α と α' の加熱会合性に影響することが明らかとなった。

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) 丸山伸之, 内海 成 (1998): 大豆 β -コングリシニンの構造・機能相関. 大豆たん白質研究, **1**, 19-24.
- 3) 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.
- 4) Maruyama N, Sato R, Wada Y, Matsumura Y, Goto H, Okuda E, Nakagawa S and Utsumi S (1999): Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *J Agric Food Chem*, **47**, 5278-5284.
- 5) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K and Kitamura K (1995): α -Subunit of β -conglycinin, and allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 831-833.