

変異大豆を利用する β -コングリシニンのサブユニットレベルにおける 構造・加工特性相関の解明

丸山伸之・内海 成*

京都大学大学院農学研究科

Elucidation of Structure-physicochemical Function Relationships at Subunit Level of Soybean β -Conglycinin by Using Mutant Cultivars

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

We purified four single molecular species of β -conglycinin heterotrimers consisting of the α and β subunits or the α' and β subunits from mutant soybean cultivars lacking the α or α' subunit, respectively, and examined their structural features and physicochemical functions. The presence of more α and α' subunits in heterotrimer makes it more hydrophobic. The thermal stabilities of heterotrimers composed of two kinds of subunit are mainly influenced by that of the subunit which has lower thermal stability. Solubilities at low ionic strength ($\mu=0.08$) of the heterotrimers containing the α and α' subunits are very similar to those of the α and α' homotrimers (*Soy Protein Research, Japan* **3**, 12-17, 2000), respectively. Emulsifying abilities and heat-induced associations of the heterotrimers containing one β subunit are similar to those of the α or α' homotrimer, while those of the heterotrimers containing two β subunits are similar to those of the β homotrimer. Furthermore, it was suggested that the number of the extension region, the surface hydrophobicity and the structural stability relate to the emulsifying abilities of the individual trimers of β -conglycinin. *Soy Protein Research, Japan* **4**, 19-26, 2001.

Key words : β -conglycinin, structure-physicochemical function relationship,
solubility, thermal stability, soybean

大豆たん白質は食品素材として重要な地位を占めている。それは大豆たん白質が優れた加工特性を持つことに依る。大豆たん白質は優れた生理機能を有してお

り、その用途を拡大することが望まれる。このためには、その構造と加工特性の関係を明確にすることが必要である。我々は、このような観点から、大豆たん白質の主要構成成分である β -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析を進めてきた¹⁻³⁾。

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

β -コングリシニン 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 は一次構造の類似したコア領域(416残基, 約75%の相同性)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および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%の相同性)を持っている⁴⁾。一般的な大豆品種の種子中には, 10種類のホモおよびヘテロ3量体が存在しているため, 分子種レベルでの構造・加工特性相関の解析に必要な単一の分子種を大豆種子より調製するのは非常に困難である。我々は, 近年開発された β -コングリシニンのサブユニット組成に変異を持つ大豆品種は, 一般的な品種より含有する分子種が非常に少ないという点に着眼した。そして, 変異を持つ大豆品種から各ホモ3量体を調製し, それらの構造的特徴および加工特性を解析した³⁾。さらに, それらの特性と, 大腸菌発現系により調製した各組み換え型ホモ3量体の特性とを比較, 解析することにより, 各サブユニットのコア領域, エクステンション領域および糖鎖の, 構造的特徴と加工特性に対する役割を明らかにした¹⁻³⁾。さらに, より詳細に β -コングリシニンの構造・加工特性相関を解明するためには, ヘテロ3量体についても解析することが望まれる。そこで本研究では, α 欠失および α' 欠失大豆より, 4種類のヘテロ3量体を調製し, それらの構造的特徴と加工特性を解析した。

方 法

ヘテロ3量体の調製

α 欠失および α' 欠失大豆より β -コングリシニン画分を調製した。そして, α および α' ホモ3量体と同様の方法により³⁾, 4種類のヘテロ3量体を精製した。2つの α サブユニットと一つの β サブユニットより成るヘテロ3量体を $\alpha 2\beta 1$ と表記した。他のホモおよびヘテロ3量体についても同様に表記した。

たん白質量

たん白質の定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとして, プロテインアッセイ ラピッドキット ワコー(和光純薬製)によって行った。

溶解性

0.5 M 塩化ナトリウムを含む10 mM リン酸緩衝液, pH 7.6に溶解したサンプル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を調整した後, 4℃で20時間静置した。静置後, 17,000 $\times g$ 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。**表面疎水性**

ホモおよびヘテロ3量体の表面疎水性は, フェニルセファロースおよびブチルセファロースを用いた疎水性カラムクロマトグラフィーにより解析した。サンプルを2.3 M 硫酸アンモニウムおよび0.4 M 塩化ナトリウムを含む35 mM リン酸緩衝液, pH 7.6に透析し, 同緩衝液で平衡化したカラムに供した。硫酸アンモニウムのグラジエント(2.3 ~ 0 M/80分, 0.25 mL/分)により溶出した。

熱安定性

マイクロキヤル社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, 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)に溶解した各ヘテロ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。

加熱会合性

緩衝液Aに溶解した各ヘテロ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(ワイアットテクノロジー社)によって決定した。

乳化性

緩衝液Aに溶解した各ヘテロ3量体(0.5 mg/mL) 1.5 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。

結果と考察

溶解性

ホモ3量体は, イオン強度0.5では調べたすべてのpHにおいて可溶性であり, イオン強度0.08では, $\alpha 3$ と $\alpha' 3$ はpH5付近のみ, そして, $\beta 3$ はpH 4.8 ~ 8.5において不溶性を示す³⁾。イオン強度0.5においては, 全てのヘテロ3量体($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha' 2\beta 1$, $\alpha' 1\beta 2$)が, ホモ3量体と同様にpHによらず可溶性であった。一方, イオン強度0.08では, $\alpha 2\beta 1$ と $\alpha 1\beta 2$ はそれぞれpH 4.8 ~ 5.4およびpH 4.8 ~ 5.7において不溶性を示した(Fig. 1A)。また, α' および β サブユニットより成るヘテロ3量体も同様の傾向を示した(Fig. 1B)。すなわち, β サブユニットを一つ含むヘテロ3

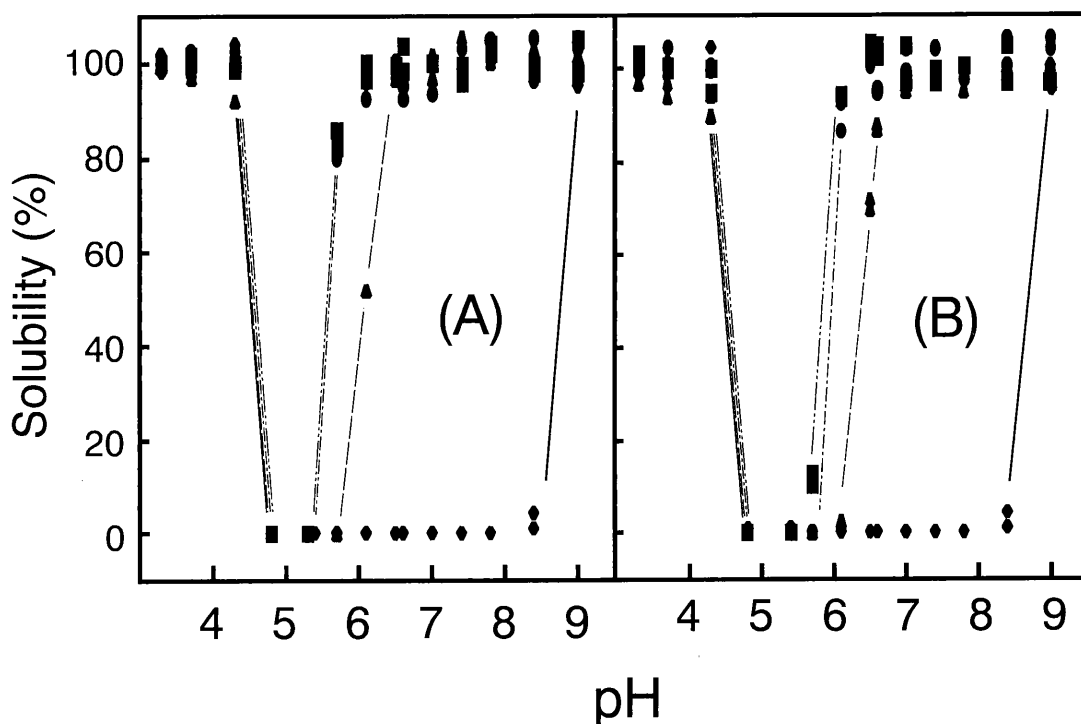


Fig. 1. Dependency of the solubility of β -conglycinin heterotrimers composed of the α and β subunits (A) and of the α' and β subunits (B) on pH at ionic strength 0.08 compared with those of the homotrimers³⁾. Solubilities of $\alpha 3$ and $\alpha' 3$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha' 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ and $\alpha' 1\beta 2$, and $\beta 3$ are shown by dashed and double-dotted line with squares, dashed and single-dotted line with circles, dashed line with triangles, and solid line with rhombi, respectively.

量体は $\alpha 3$ や $\alpha' 3$ と非常に近い溶解性を示し、 β サブユニットを2つ含むものは $\beta 3$ よりも $\alpha 3$ や $\alpha' 3$ にかなり近い溶解性を示した。

表面疎水性

各ヘテロ3量体の表面疎水性を、ブチル基およびフェニル基を持つ疎水性カラムを用いて解析した (Table 1)。両カラムにおいて、 $\alpha 3$ および $\alpha' 3$ は $\beta 3$ よりも表面疎水性が高いと判定された。そして、 α および β サブユニットより成るヘテロ3量体は $\alpha 3$ と $\beta 3$ の間の表面疎水性を示し、その順序は $\alpha 3 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 1\beta 2 > \beta 3$ であった。また、 α' および β サブユニットより成るヘテロ3量体の表面疎水性の順序も同様に $\alpha' 3 > \alpha' 2\beta 1 > \alpha' 1\beta 2 > \beta 3$ であった。すなわち、

α および α' サブユニットをより多く含んでいるヘテロ3量体は、表面疎水性がより高いことが明らかとなった。一方、 α を含む分子種と α' を含む分子種の表面疎水性を比較すると、フェニルセファロースでは差はなかったが、ブチルセファロースでは差があり、 α を含む分子種の方が表面疎水性が少し高いと判定された。

熱安定性

ヘテロ3量体の示差走査熱量測定の結果を Fig. 2 に示した。 $\alpha 2\beta 1$ は78.5℃ に単一のピークを、そして $\alpha 1\beta 2$ は82.5℃ の主要なピークとともに78.5℃ のマイナーなピークを示した。ホモ3量体の変性温度と比較すると³⁾、 $\alpha 1\beta 2$ のマイナーピークと $\alpha 2\beta 1$ は、 $\alpha 3$

Table 1. Elution times of the homo- and heterotrimers on hydrophobic chromatography

Columns	Elution times (min)						
	$\alpha 3$	$\alpha' 3$	$\alpha 2\beta 1$	$\alpha' 2\beta 1$	$\alpha 1\beta 2$	$\alpha' 1\beta 2$	$\beta 3$
Butyl Sepharose	48.6	47.9	47.1	45.9	43.8	43.0	38.2
Phenyl Sepharose	69.2	69.2	67.3	67.3	64.7	64.3	56.7

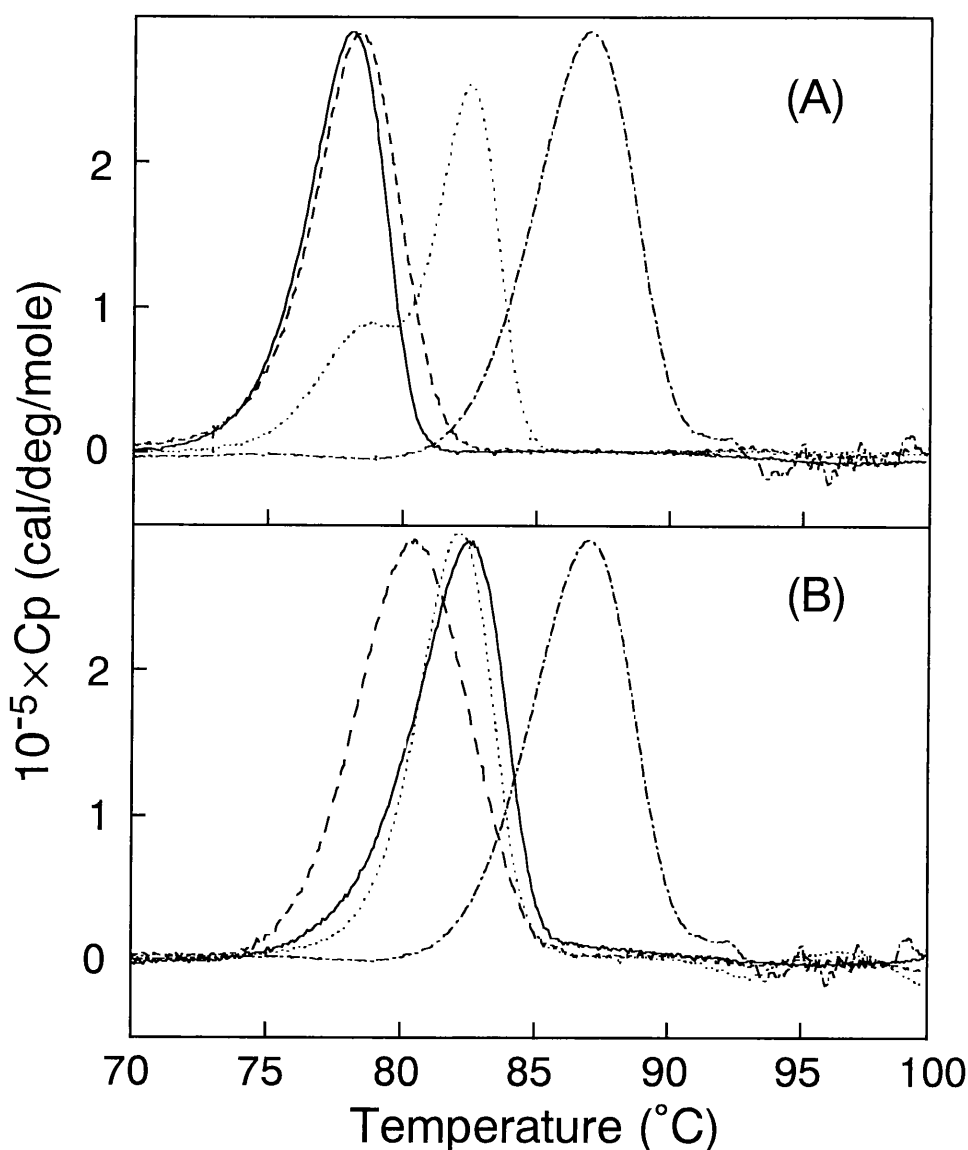


Fig. 2. DSC scans of β -conglycinin heterotrimers composed of the α and β subunits (A) and of the α' and β subunits (B) compared with those of the homotrimers³⁾. Profiles of $\alpha 3$ and $\alpha' 3$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha' 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ and $\alpha' 1\beta 2$, and $\beta 3$ are shown by solid line, dashed line, dotted line and dashed and single-dotted line, respectively.

と非常に近似した値を示し、 $\alpha 1\beta 2$ の主要なピークは $\alpha 3$ と $\beta 3$ の中間的な値であった。一方、 $\alpha' 2\beta 1$ は $\alpha' 3$ よりもわずかに低い、 $\alpha' 1\beta 2$ は $\alpha' 3$ と同一の変性温度を示した。これらの結果は、ヘテロ3量体中のそれぞれのサブユニットの変性温度に対する寄与は等価ではないこと、そして、ヘテロ3量体の変性温度は、変性温度の低いサブユニットの影響を強く受けることを示している。つまり、変性温度の低いサブユニットが変性すると、3量体構造が壊れるとともに、残りの部分も

変性すると考えられる。しかし、 $\alpha 1\beta 2$ と $\alpha' 2\beta 1$ は、他のホモおよびヘテロ3量体とは異なる挙動を示している。このような分子種による挙動の違いは、ヘテロ3量体形成に関わるサブユニット間の相互作用がヘテロ3量体のサブユニットの構成によって異なることを示唆しているのかもしれない。

加熱会合性

pH 7.6, イオン強度 0.5 におけるヘテロ3量体の加熱会合性をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで解析し

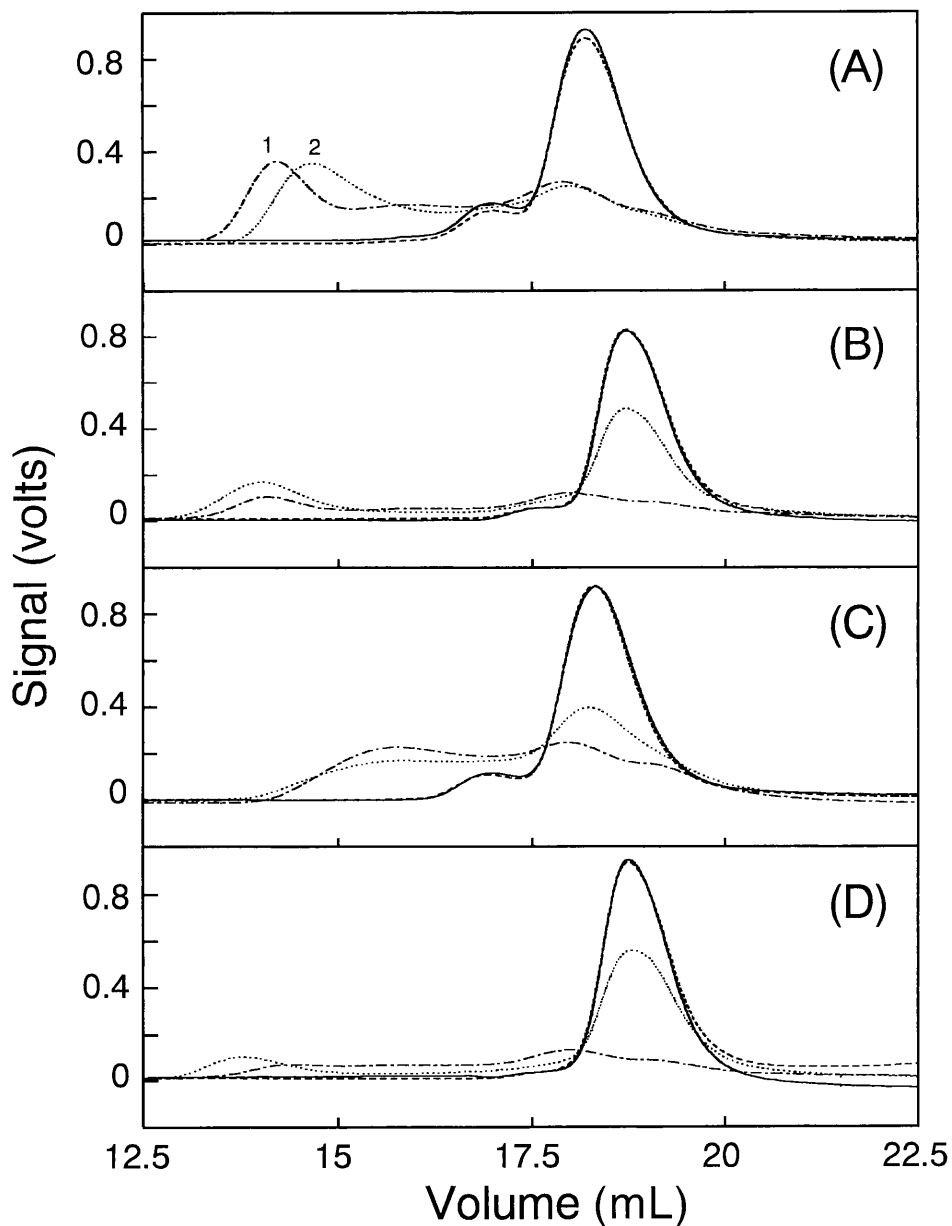


Fig. 3. Elution patterns of heat-treated β -conglycinin heterotrimers. $\alpha 2\beta 1$ (A), $\alpha 1\beta 2$ (B), $\alpha' 2\beta 1$ (C), $\alpha' 1\beta 2$ (D) were heated at 70°C (dashed line), 80°C (dotted line) and 90°C (dashed and single-dotted line). Nonheated samples were shown by solid line. Numbers indicate the peaks.

た (Fig. 3). $\alpha 2\beta 1$ は、 $\alpha 3$ と同様に 80°C 以上の加熱により可溶性の会合体を形成した。 $\alpha 3$ が 80°C 以上の加熱により、約 100 万から 200 万の分子量の会合体を形成したのに対し、 $\alpha 2\beta 1$ の会合体の分子量は大きく、200 万から 800 万であった。 また、 $\alpha 2\beta 1$ の可溶性会合体の量は $\alpha 3$ よりも多かった。 同様の傾向が $\alpha' 2\beta 1$ においても見られた。 つまり、ヘテロ 3 量体に

β サブユニットが一つ存在することにより、 $\alpha 3$ や $\alpha' 3$ よりもより多くの、そして、より大きな可溶性の会合体を形成することが明らかとなった。 一方、 $\alpha 1\beta 2$ および $\alpha' 1\beta 2$ では、80°C 以上の加熱により濁りを生じた。 そして、ゲル濾過クロマトグラフィーでは、可溶性の会合体はほとんど観察できなかった。 すなわち、 β サブユニットが二つ存在するヘテロ 3 量体は、 $\alpha 3$ や $\alpha' 3$

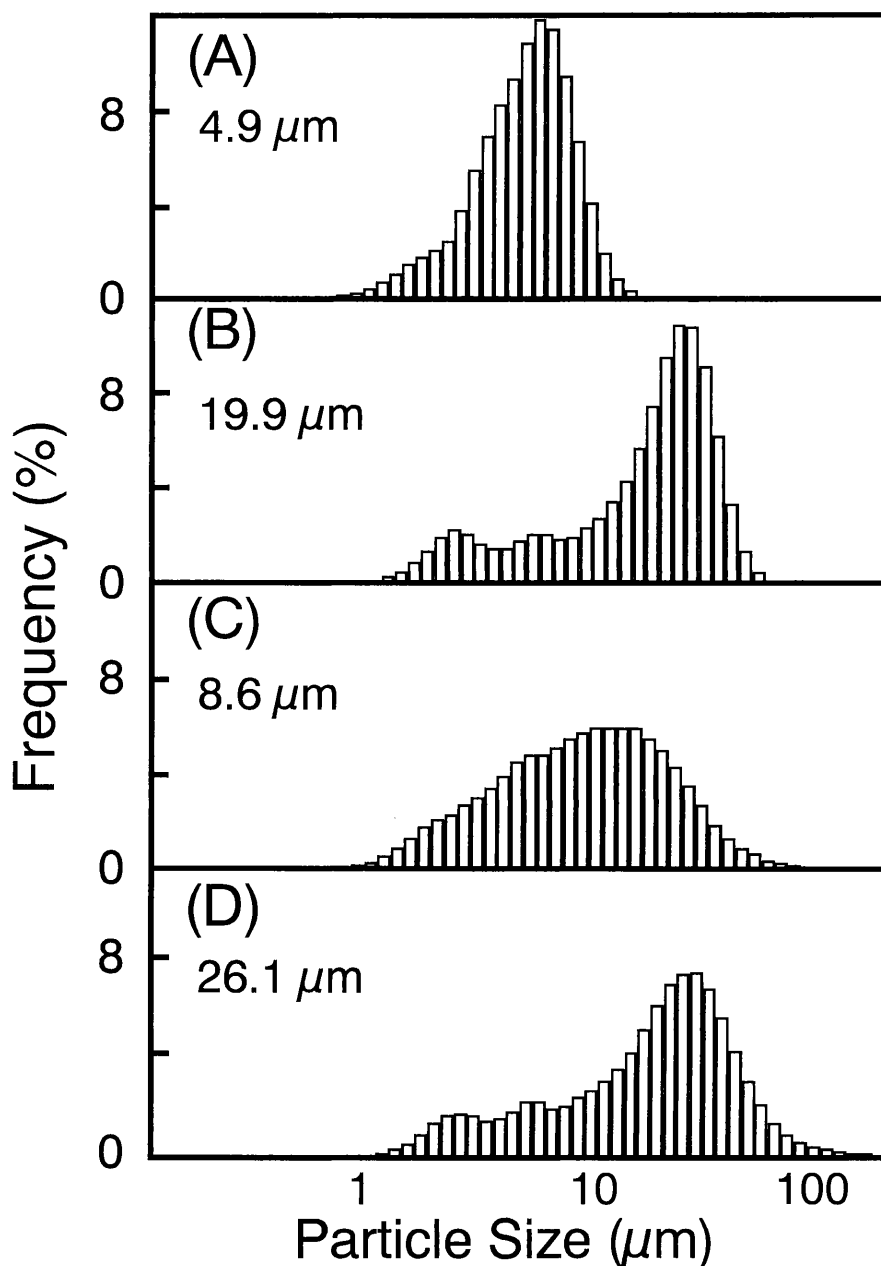


Fig. 4. Particle size distributions of emulsions from β -conglycinin heterotrimers. (A) $\alpha 2\beta 1$. (B) $\alpha 1\beta 2$. (C) $\alpha' 2\beta 1$. (D) $\alpha' 1\beta 2$.

よりも $\beta 3$ に近い性質を示すことが明らかとなった。

乳化性

エマルションの粒度分布を測定することにより、乳化性を評価した (Fig. 4)。ホモ 3 量体の粒子径³⁾と比較すると、 $\alpha 2\beta 1$ および $\alpha' 2\beta 1$ の粒子径は、それぞれ $\alpha 3$ や $\alpha' 3$ と近い値を示した。一方、 $\alpha 1\beta 2$ および

$\alpha' 1\beta 2$ は $\beta 3$ と近い値を示した。

さらに、乳化性と表面疎水性および構造安定性との相関を調べた (Fig. 5)。本研究に先立って、 α および α' サブユニットに存在するエクステンション領域が乳化性に大きく影響することを明らかにしている²⁾。そこで、エクステンション領域の数が同じ分子種に関して比較した。表面疎水性の比較には、プチルセファ

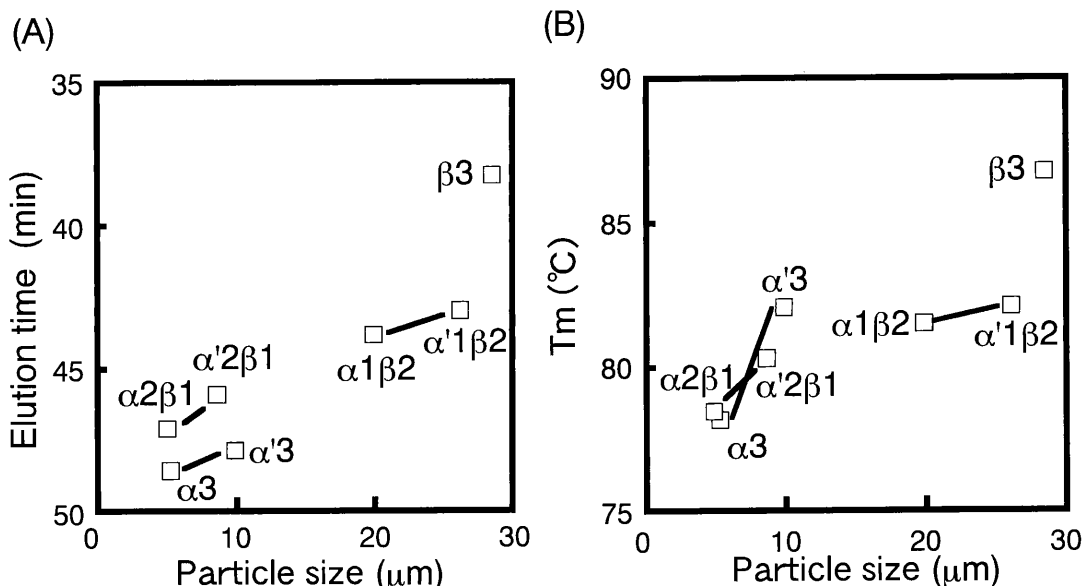


Fig. 5. Relationships between the emulsifying ability and the surface hydrophobicity (A) and between the emulsifying ability and the thermal stability (B). Molecular species having the same number of the extension region are linked by solid line. The surface hydrophobicity values are indicated by the elution time on a Butyl Sepharose column (from Table 1). The thermal stability of $\alpha 1 \beta 2$ is calculated from the t_m values and ratio of two peaks (from Fig. 2).

ロースカラムでの結果を用いた。その結果、疎水性がより高い分子種の方が (Fig. 5A), そして、変性温度がより低い分子種の方が (Fig. 5B), より高い乳化性を示す傾向があることが判明した。

我々の以前の報告²⁾と併せて考えると, β -コングリシニンの各分子種の乳化性は, エクステンション領域の数, 構造安定性および表面疎水性と相関していると考えられる。

要 約

α 欠失および α' 欠失大豆より, α と β あるいは α' と β より成る 4 種類のヘテロ 3 量体を調製し, それらの構造的特徴および加工特性を解析した。 α あるいは α' サブユニットをより多く含むヘテロ 3 量体ほど, より高い表面疎水性を示した。各ヘテロ 3 量体の熱安定性は, 熱安定性の低い方のサブユニットの影響を強く受けていた。 α あるいは α' サブユニットを含むヘテロ 3 量体のイオン強度 0.08 における溶解性は, おおの α あるいは α' サブユニットのホモ 3 量体と非常に類似していた。 β サブユニットを一つ含むヘテロ 3 量体の乳化性および加熱会合性は, α あるいは α' サブユニットのホモ 3 量体と非常に類似しているのに対し, β サブユニットを二つ含むヘテロ 3 量体の特性は, β サブユニットのホモ 3 量体のものと似ていた。さらに, エクステンション領域の数, 表面疎水性, 構造安定性が β -コングリシニンの各分子種の乳化性と相関していることが示唆された。

文 献

- 1) 丸山伸之, 内海 成 (1998) : 大豆 β -コングリシニンの構造・加工特性相関. 大豆たん白質研究, **1**, 19-24.
- 2) 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.
- 3) 丸山伸之, 内海 成 (2000) : 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. 大豆たん白質研究, **3**, 12-17.
- 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.