

大豆プロテオリピド- アポたん白質とオレオシンの分子構造的相関性

鈴木美葉子・中村朋之・岡井直子・小川智久・村本光二*

東北大学大学院農学研究科

Structural Relationship between Proteolipid-apoproteins and Oleosins of Soybean

Miyoko SUZUKI, Tomoyuki NAKAMURA, Naoko OKAI, Tomohisa OGAWA
and Koji MURAMOTO

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555

ABSTRACT

A proteolipid was prepared from defatted soybean meals by successive extraction with chloroform-methanol (2:1) and 0.73% NaCl. The lipid moiety was removed from the proteolipid by ethanol-diethyl ether (3:1) to give apoproteins. SDS-PAGE of the apoproteins showed a major band with an apparent molecular mass of 18 k. The hydrophobic apoprotein 18 k was purified by preparative SDS-PAGE. Oleosins of different molecular masses, ranging from 18 to 34 kDa, were prepared from soybean oil bodies by successive extraction and centrifugation, and then purified by preparative SDS-PAGE. Structural comparison of apoprotein 18 k and oleosin 18 k showed that they were distinct protein molecules. A new procedure for the separation of hydrophobic proteins was also proposed by using gel filtration and reversed-phase HPLC under denatured and reduced conditions. *Soy Protein Research, Japan* 4, 27-32, 2001.

Key words : soybean proteolipid, oleosin, apoprotein, hydrophobic protein

脱脂大豆粉に含まれる分子量約 100 万のプロテオリピドは、35%のたん白質、40%の脂質および 20%の糖質から構成され、脂質の主成分は糖脂質とリン脂質である。プロテオリピドをエタノール-エーテル混液で脱脂すると非常に疎水性の強いアポたん白質が得られる¹⁾。一方、油糧種子にはトリグリセリドを蓄えるオイルボディーが存在し、その表面をオレオシンと呼ばれるたん白質が覆って高度に安定化している²⁾。大豆

オレオシンには分子量 24 k と 18 k のものが知られ、しばしばオレオシンと挙動をともにする 34 k たん白質はアレルゲンの 1 つとして同定されている³⁾。

本研究では、大豆において脂質成分との相互作用を担う疎水性たん白質の役割を明らかにすることを目指し、プロテオリピドおよびオイルボディーから非常に疎水性が強く、取扱いが困難なアポたん白質およびオレオシンの分離精製を検討すること、そして両者に共通して存在する 18 k たん白質の分子構造を比較することを目的にした。

*〒 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

方 法

プロテオリピド-アポたん白質の調製

ヘキサンで脱脂した大豆粉（ミヤギシロメ）（100 g）に1 Lのクロロホルム-メタノール混液（2:1, v/v）を加え、5℃で3時間攪拌抽出した。抽出液を分液ロートに移し、1/2容の0.17% NaCl水溶液を加えて30分間振とうした。これを室温で一晩静置後、水層とクロロホルム層の間にフラッフを得た。クロロホルム-水混液（1:1, v/v）を用い、クロロホルム層が透明になるまでフラッフを洗浄した。フラッフとして得たプロテオリピドに含まれる脂質をエタノール-エーテル混液（3:1, v/v）3 mLで3回、攪拌抽出後、凍結乾燥してアポたん白質を得た。

オレオシンの調製

24時間吸水させた全粒大豆（ミヤギシロメ）から種皮と胚を取り除き、子葉を得た。この子葉100 gを0.1 M Tris-HCl (pH 8.6) (THB) 200 mLとともにホモジナイズし、そのろ液を遠心分離（10,000 × g, 20分間）した。液面に生成したオイルボディ-パッドを0.5 M NaClを含むTHBに懸濁して遠心分離した。パッドを0.1 M 炭酸水素ナトリウムに懸濁して、0℃で30分間インキュベートした。遠心分離して得たパッドを過剰のアセトン（0℃）で処理してトリグリセリドを除いた後、空気乾燥してオレオシンを得た。

分取用電気泳動システムによる疎水性たん白質の精製

ディスクプレパラティブ電気泳動装置（NA-1800型、日本エイドウ）を用いて還元カルボキサミドメチル化した疎水性たん白質（アポタンパク質40 mg、オレオシン10 mg）の分離を行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル内を泳動（50 V定電圧）させて分離したたん白質をゲルの底面から連続的にキャピラリーガラス管を通して0.5 mLずつフラクションコレクターで分取した。15%分離ゲル（42 mL）と4%濃縮ゲル（8 mL）はLaemmliの方法に従って作成した。

疎水性たん白質の分析

プロテオリピド-アポたん白質とオレオシンの分子量をSDS-PAGE（4～20%グラジエントゲル）とMALDI-TOF質量分析計で測定した。SDS-PAGEでたん白質を分離した後、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜に電気転写した。PVDF膜を蒸留水で十分に洗浄後、6 M 塩酸-1%フェノール溶液を加え、110℃で22時間加水分解した。生成したアミノ酸をダブシルクロライドで誘導化し、逆相分配系HPLCを用いて分析した。N末端アミノ酸配列分析を気相プロテ

インシーケンサーで行った。

ペプチドマップの作成

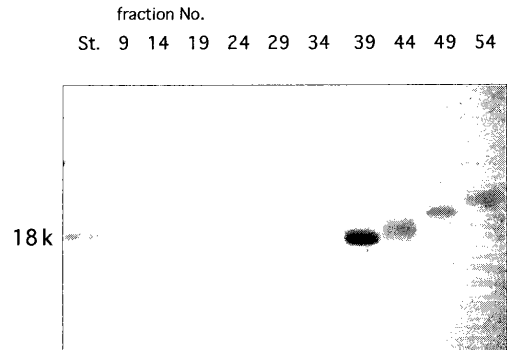
分取用電気泳動システムによって分離・分取後、遠心限外濾過濃縮したアポたん白質とオレオシンにリシルエンドペプチダーゼまたはV8プロテアーゼ（和光純薬）10 μgを加え（酵素/基質=1/100）、37℃で16時間消化させた。消化液を逆相分配系HPLCで分離した。

結果と考察

アポたん白質とオレオシンの調製

脱脂大豆粉から得たプロテオリピドのアポたん白質

A



B

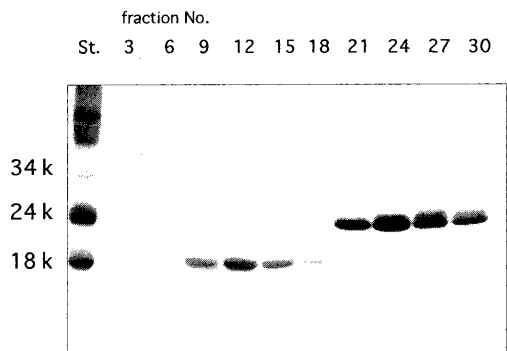


Fig. 1. SDS-PAGE of apoproteins and oleosins isolated by preparative SDS-PAGE. (A) Apoproteins were isolated from soybean proteolipids and subjected to preparative SDS-PAGE. Each fraction (0.5 mL) eluted from the bottom of the preparative gel was analyzed by SDS-PAGE. St: Starting materials. (B) Oleosins were isolated from oil bodies and subjected to preparative SDS-PAGE as described.

と脂質の構成比は、約 1:1 であり、脱脂大豆粉 100 g から平均 62 mg の粗アポたん白質を得た。SDS-PAGE で分離したアポたん白質は、疎水性が強いために通常の染色方法では検出が困難であった。そのため蛍光試薬 FITC で標識したアポたん白質を SDS-PAGE で分析したところ、アポたん白質の主要成分の分子量は 18 k であり、微量成分の分子量は 26 k, 23 k, 16 k, 14 k であった。MALDI-TOF 質量分析計では分子イオ

ンピークは検出できなかった。遠心分離で液面に生成したオイルボディーパッドは、若干黄色を帯び、ピンセットでつまめるほどの堅さであった。大豆の子葉 100 g から粗オレオシンが 78 mg 得られ、大豆においてはアポたん白質よりも高含量を示した。

疎水性たん白質精製法の検討

アポたん白質とオレオシンは非常に疎水性が強く、通常の方法での可溶化とクロマトグラフィーが困難で

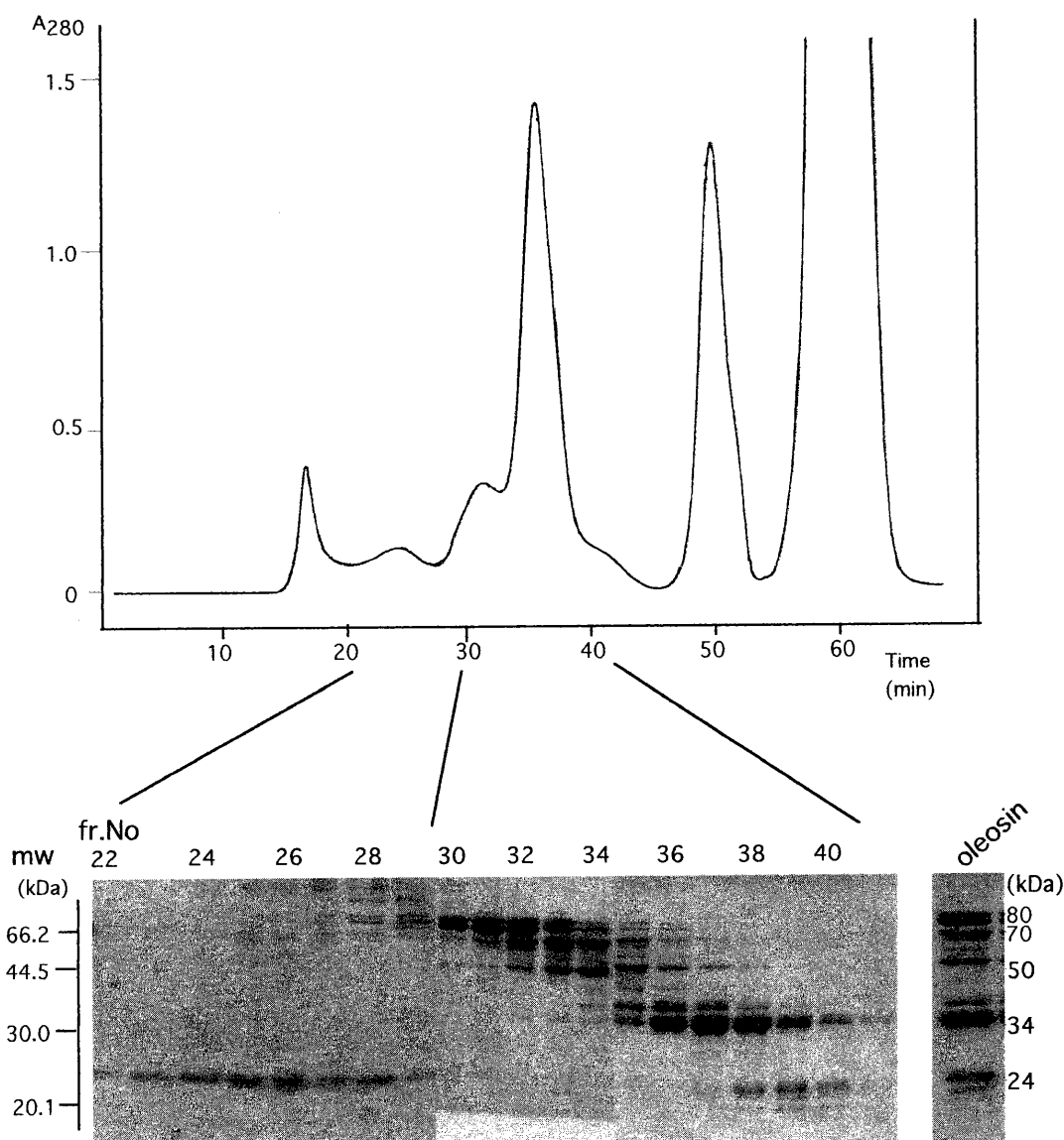


Fig. 2. Gel filtration HPLC of S-carboxamidomethylated oleosins under denaturing conditions. The oleosin sample was dissolved in 5 M urea/2 M thiourea/10 mM DTT/10 mM EDTA/50 mM THB (pH 8) and separated on Superdex 200 HR 30/10 equilibrated with 8 M urea/0.2 M NaCl/10 mM DTT/50 mM THB (pH 8) at a flow rate of 0.4 mL/min. The separation was assessed by SDS-PAGE as shown in the bottom panel.

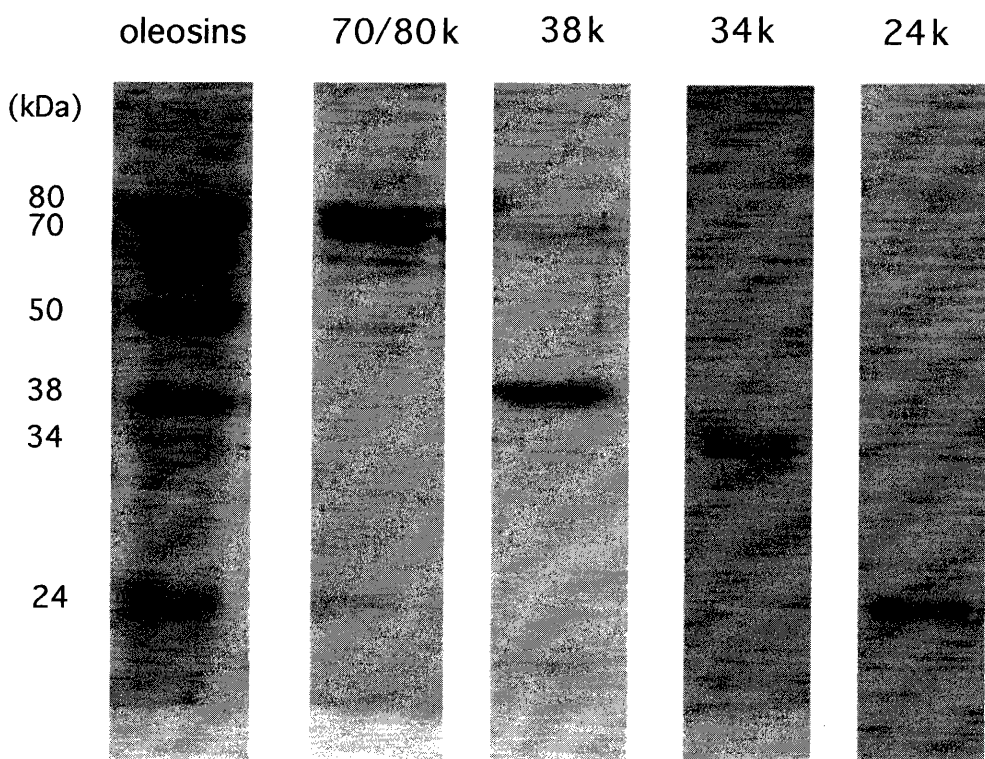


Fig. 3. SDS-PAGE of oleosins purified by successive use of gel filtration HPLC and reversed-phase HPLC.

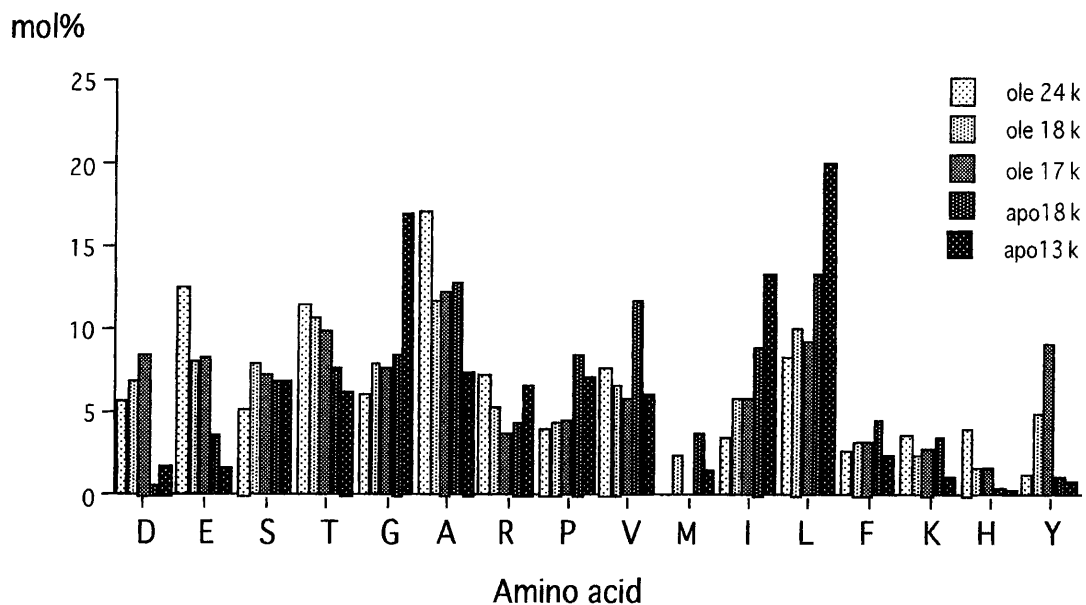


Fig. 4. Amino acid compositions of isolated apoproteins and oleosins. The amino acid analysis was performed by the precolumn labeling method using DABS-Cl. ole, oleosins; apo, apoproteins.

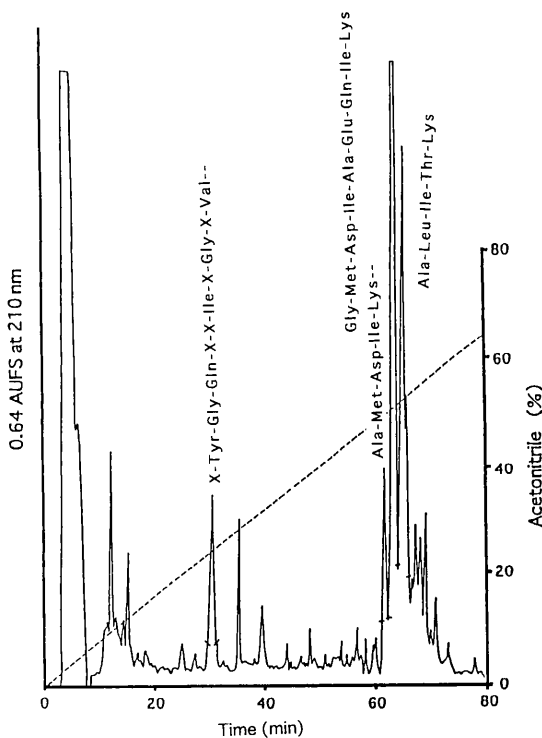


Fig. 5. Peptide map of apoprotein 18 k digested with lysine endopeptidase. Each separated peptide was subjected to N-terminal sequencing and the obtained sequence is shown at the peptide peak. Reversed-phase HPLC was performed on a TSK gel ODS 120T column ($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$) eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA at a flow-rate of 1.0 mL/min.

あった。例えばアポたん白質を Triton X-100 や SDS で可溶化して、イオン交換やゲルろ過クロマトグラフィーを試みたが、分離が不十分であり、回収率も低かった。

これらの方法に比べ、分取用ゲル電気泳動システムは優れた結果を示した。SDS-PAGE (4 ~ 20% グラジエントゲル) を用いて分取したアポたん白質とオレオシンを分析したところ、アポたん白質では 18 k たん白質のみが検出され、オレオシンでは 24 k と 18 k が高純度で回収できた (Fig. 1)。

本研究ではさらに処理量を増やし、効率を高めるために以下の方法を検討した。粗オレオシン画分を還元カルボキサミドメチル化後、5 M 尿素、2 M チオ尿素、50 mM DTT、10 mM EDTA を含む 50 mM THB (pH 8.0) に溶解し、 50°C で 30 分間インキュベートした。これを 7 M 尿素、0.2 M NaCl、10 mM DTT を含む

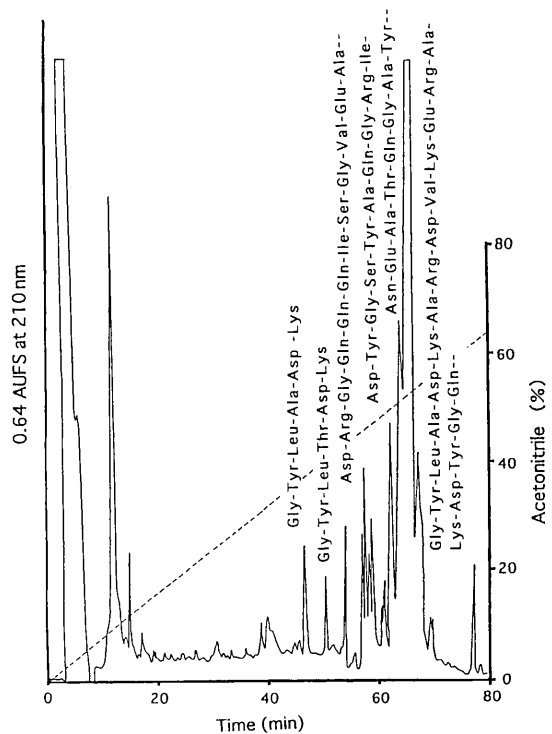


Fig. 6. Peptide map of oleosin 18 k digested with lysine endopeptidase. Experimental conditions were the same as in Fig. 5.

50 mM THB (pH 8.0) で平衡化した Superdex 200 ($1 \times 30\ \text{cm}$) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにかけた (Fig. 2)。24 k, 80 k, 70 k, 50 k, 34 k の構成たん白質が順次溶出された。次にこれらを、8 M 尿素および 75% イソプロパノール-15% *n*-ブタノール-10% 水を溶出溶媒として、Wakosil C4 200 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$) カラムを用いる逆相分配系 HPLC で精製した (Fig. 3)。本法は、非常に疎水性の高いたん白質の効率的単離精製法として有効であった。

アミノ酸組成

アポたん白質 18 k と 13 k とともに大豆グロブリンとは全く異なるアミノ酸組成を示した (Fig. 4)。両アポたん白質は Ala, Val, Leu, Ile などの疎水性アミノ酸を多く含み、それぞれ 32% と 47% を占めた。オレオシンでも疎水性アミノ酸含有量が高かったが、アポたん白質よりも疎水性アミノ酸は少なく (34%)、酸性アミノ酸含量が高かった。電気泳動では非常に近い 2 つのバンドとして現れているオレオシン 18 k と 17 k にはアミノ酸組成にほとんど差がみられなかった。

アミノ酸配列分析

アポたん白質のすべての N 末端アミノ酸は Ala であ

った。しかし主要アポたん白質 18 k の N 末端はブロックされていた。また、オレオシン 18 k の N 末端もブロックされていたので、両者の分子構造をペプチドマップで比較した (Figs. 5, 6)。分取用電気泳動システムで得られたアポたん白質とオレオシンの 18 k たん白質をリシルエンドペプチダーゼで消化した。両者のペプチドマップは異なり、得られたペプチド断片のアミノ酸配列分析からも相同性は検出できなかった。ペプチドのアミノ酸配列の相同性を FASTA データベースで検索した。アポたん白質から得られたペプチド断片には、オレオシンとの相同性はみつからなかった。一方、大豆オレオシン 18 k からのペプチド断片

(DRGQQQISGVEA, GYLADKARDVKERAK-DYGQ) には、シロイヌナズナ、ナタネ、トウモロコシ、ヒマワリ、大豆 24 k オレオシンとの相同性がみられた。これらのペプチドは、TAG と水の界面にある親水性領域に局在しており、高度に保存されている中央部の疎水領域に由来するペプチド断片を得ることができなかった。18 k オレオシンは、大豆 24 k オレオシンではなく、シロイヌナズナオレオシンにより高い相同性を示した。なお V8 プロテアーゼによる酵素消化ではアポたん白質、オレオシン 18 k ともに消化されなかった。

要 約

大豆のプロテオリピドおよびオイルボディーから、調製用ゲル電気泳動によってアポたん白質 18 k とオレオシン 18 k を単離精製した。これらは、ともに疎水性が非常に高く、膜たん白質特有のアミノ酸配列を保有していた。これらのたん白質の分子構造には相同性がみられず、両者は疎水的相互作用により脂質と会合し、親水性環境の中で脂質を安定化させている。しかし、アポたん白質は、オレオシンよりもさらに疎水性が高く、局在と機能はオレオシンとは異なると考えられる。本研究で示した高濃度変性剤存在下におけるゲルろ過および逆相分配系 HPLC は、疎水性たん白質の単離精製法として有効性を発揮した。

文 献

- 1) Miura M, Yamauchi F, Ogawa Y and Shibasaki K (1982): Isolation and characterization of a proteolipid in defatted soybean meals. *Agric Biol Chem*, **46**, 1631-1637.
- 2) Huang AH (1996): Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol*, **110**, 1055-1061.
- 3) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y-L, Hirano H and Nishikawa K (1993): Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30k, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.