

# 変異大豆を利用する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 Glycinin by Using Mutant Cultivars

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

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

### ABSTRACT

We purified four mutant glycinins composed of only group I subunits (group I), only group II subunits (group II), only A3B4 subunit (A3B4) and only A5A4B3 subunit (A5A4B3) from mutant soybean cultivars, and compared their structural features and physicochemical functions with those of the wild glycinin (11S) from var. Shirotsurunoko. Thermal stabilities of groups I and II were similar to each other, although that of A3B4 was significantly lower than the others. The order of surface hydrophobicities determined by hydrophobic column chromatography was group I < 11S < A5A4B3 < group II < A3B4. Solubility of 11S was an arithmetic mean of those of groups I and II at low ionic strength (0.08), but that was determined by group I at high ionic strength ( $\mu = 0.5$ ). Solubility of group II was determined by A5A4B3 at both ionic strengths. The order of emulsifying abilities was group I < 11S < A3B4 < group II < A5A4B3. This order did not correlate with those of thermal stabilities and surface hydrophobicities of glycinin species. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 21-25, 2002.

Key words : glycinin, emulsifying ability, surface hydrophobicity, solubility, subunit species, soybean

大豆たん白質は血清コレステロール値を低下させるなどのヒトの健康維持・増進に役立つ機能を備えており、高齢化社会を迎えた今日、その用途の拡大が望まれる。このためには、大豆たん白質の加工特性と構造と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成分の一つである $\beta$ -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析を進め、サブユニットレベルでほぼ解明した<sup>1,5)</sup>。今回、もう一つの主要成分であるグリシニンに関して解析を行った。

グリシニンは6量体構造をもち、グループI (AlaB1b, A1bB2, A2B1a) とグループII (A3B4, A5A4B3) の

\*〒611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

2 グループ5種を構成サブユニットとしている。アミノ酸配列の同一性が、グループ内で80%、グループ間で40%ある<sup>6)</sup>。大豆種子中には、これらのサブユニットがランダムに組み合わさった数多くの分子種が存在しており、構造・加工特性相関をサブユニットレベルで解析するために必要な、単一サブユニット分子種や限定的なサブユニット組成をもつ分子種を普通の大豆種子より調製することは不可能である。しかし、近年開発されたグループIのみ、グループIIのみ、A3B4のみ、A5A4B3のみからなるグリシニンを含む変異大豆<sup>7)</sup>を利用すると、そのような分子種を調製することができる。

そこで本研究では、上記4種の変異大豆よりグリシニンを精製し、構造的特徴として熱安定性と表面疎水性を、加工特性と関連する性質として溶解性と乳化性を測定し、比較することによって、グリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関を解析した。

## 方 法

### サブユニット組成の異なるグリシニンの精製

グリシニンのサブユニットとしてグループIのみ、グループIIのみ、A3B4のみ、A5A4B3のみをもつ変異大豆より、長野らの方法<sup>8)</sup>によってグリシニン画分を調製し、さらに硫酸分画を行うことによって、グループIのみより成るグリシニン（グループI）、グループIIのみより成るグリシニン（グループII）、A3B4のみより成るグリシニン（A3B4）とA5A4B3のみより成るグリシニン（A5A4B3）および普通品種のシロツルノコより全サブユニットを含むグリシニン（11S）をほぼ均一に精製した。

### 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。

### 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、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）に溶解した各グリシニン標品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°C/分で行った。

### 表面疎水性

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。

### 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に溶解した各グリシニン標品（0.8 mg/mL）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°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。

### 乳化性

緩衝液Aに溶解した各グリシニン標品（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

### 熱安定性

イオン強度0.5における示差走査熱量測定の結果をFig. 1に示した。A3B4は少し安定性が低かった（87.2°C）が、他の標品は、A3B4サブユニットを含むものでも極めて安定であった（92.9~95.0°C）。β-コングリシニンの場合、複数のサブユニットより成るヘテロ分子種の熱安定性は、基本的に、熱安定性の低いサブユニット種によって決まる<sup>1,2)</sup>が、グリシニンの場合にはそうではないことが判明した。

グループIは他のグリシニン標品と同様の約95°Cのピークの他に77°Cのピークを与えた。グリシニンには低イオン強度下で3量体に解離する分子種があり、3量体は熱安定性が低いことを我々は見出ししている<sup>9)</sup>。このことからすると、変性温度の低いピークは解離した3量体に由来すると考えるのが妥当である。グループIIと11Sはともにワンピークを与えた。したがって、グループIIのサブユニットの存在がグリシニンを非解離性にすると考えられる。一方、グループIの与えるピークはともにブロードであった。ピークのシャープさにもグループIIのサブユニットの存在が関わっていると考えられる。

### 表面疎水性

各グリシニン標品の表面疎水性をブチル基あるいはフェニル基をもつ疎水性カラムを用いて解析した

(Table 1). 両カラムの結果は全く同じであり、グループ I < 11S < A5A4B3 < グループ II < A3B4 であり、A3B4の表面疎水性が最も高かった。グループ I と II から成る 11S は両者の中間の値を、A3B4 と A5A4B3 より成るグループ II も両者の中間の値を与えた。このことは、複数のサブユニットより成る分子種の表面疎水性は、各構成サブユニットの表面疎水性の相加平均的になることを意味している。

$\beta$ -コングリシニンの構成サブユニットの表面疎水性は  $\beta < \alpha' < \alpha$  の順である<sup>3,4)</sup>が、 $\beta$ の表面疎水性はグループ I よりも低く、 $\alpha$ の表面疎水性は、グループ II と A3B4 の中間であった。

### 溶解性

各グリシニン標品の溶解性の pH 依存性をイオン強度 0.5 と 0.08 において測定した (Fig. 2)。イオン強度 0.5 においては、グループ I の方がグループ II よりも溶解性が高く、pH 5 ~ 9 では完全に可溶性であり、pH 5 以下では pH とともに徐々に低下した。グループ II は pH 5 ~ 9 では完全に可溶性であるが、pH 5 以下では急激に低下し、pH 3 付近ではほぼ不溶性となった。A5A4B3 はグループ II と類似したパターンを示し、A3B4 はこれらよりも可溶性の pH 範囲が広がった。これに対し、11S はグループ I と全く同じパターンを示した。

イオン強度 0.08 においては、11S、グループ I、グループ II、A3B4、A5A4B3 ともおよそ pH 4 ~ 7 の間で等電点沈澱を示した。その pH 範囲は標品によ

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

Columns	Elution times (min)				
	Group I	11S	A5A4B3	Group II	A3B4
Butyl Sepharose	39.9	43.4	43.9	48.3	52.5
Phenyl Sepharose	57.7	60.9	61.2	66.6	71.7

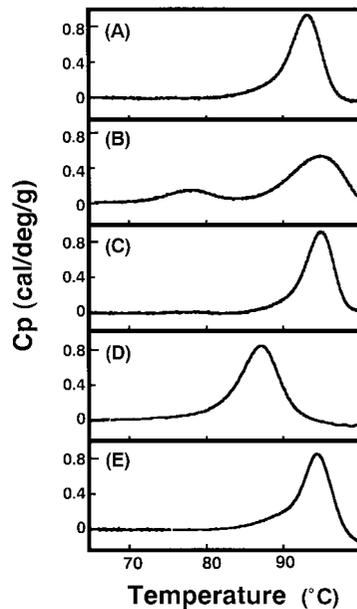


Fig. 1. DSC scans of glycinin species. (A) 11S. (B) Group I. (C) Group II. (D) A3B4. (E) A5A4B3.

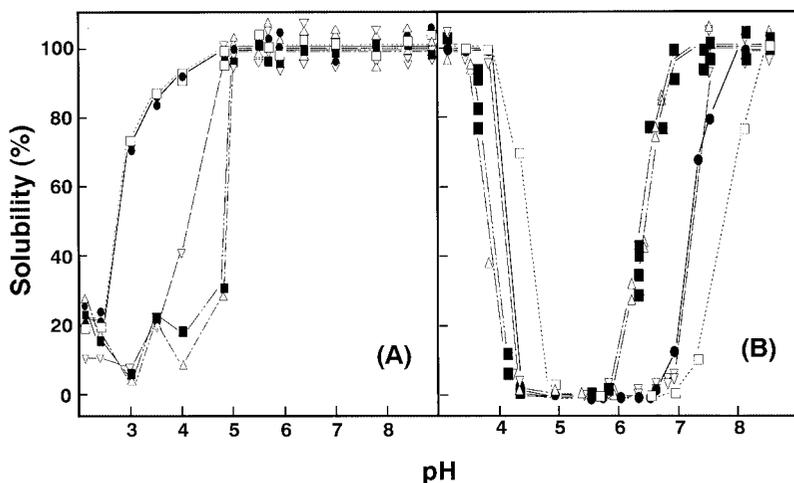


Fig. 2. Dependency of the solubility of glycinin species on pH at ionic strength 0.5 (A) and 0.08 (B). 11S, group I, group II, A3B4 and A5A4B3 are shown by solid line with closed circles, dotted line with open squares, dashed and double-dotted line with closed squares, dashed line with inverted triangles and dashed and single-dotted line with open triangles, respectively.

て異なり、グループIはより塩基性側、グループIIはより酸性側にかたよったパターンを示し、11Sは両グループの中間的なパターンを示した。ところが、グループIIはA5A4B3と全く同じパターンを示した。

11Sの溶解性はイオン強度0.5ではグループIに依存し、イオン強度0.08ではグループIとグループIIの中間であり、グループIIの溶解性はイオン強度0.5ではA5A4B3に依存し、イオン強度0.08ではA3B4とA5A4B3の中間であり、11SやグループIIの溶解性を決定する要因がイオン強度で異なることが明確となった。一方、 $\beta$ -コングリシニンは、イオン強度0.08ではグリシニンと同様に等電点沈澱を示すが、イオン強度0.5ではpH 3～9において完全に可溶性である。グリシニンと $\beta$ -コングリシニンは、アミノ酸配列の同一性は低いが、共通祖先に由来し、極めて類似した立体構造を形成している<sup>10, 11)</sup>ので、分子表面における荷電アミノ酸や疎水性アミノ酸の分布、局在性などが、溶解性の違いに関わっていると考えられる。これを分子レベルで説明するために、各サブユニットの立体構造の解明が待たれる。

#### 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. 3)。平均粒子サイズが小さい程、乳化性が優れていると判定できる。グループIよりもグループIIの方が高い乳化性を示し、11Sは両者の中間であった。また、A3B4よりもA5A4B3の方が少し高い乳化性を示し、グループIIは両者の中間であった。すなわち、A5A4B3の乳化性が最も優れていること、そして、ヘテロ分子種の場合、構成成分の乳化性の相加平均的になることが明らかとなった。

グリシニンの構成サブユニットには4～6カ所のディスオーダー領域がある (内海ら, 未発表)。このうち、最もサイズの大きなものは超可変領域と呼ばれるが、この領域は負荷電アミノ酸に富んでいる。しかし、その長さにサブユニット間で差があり、グループIのものよりもグループIIのものの方が長く、特にA5A4B3のものが長い。したがって、超可変領域の長さがグリシニンの乳化性に関わっていると考えられる。このことは、 $\beta$ -コングリシニンの乳化性にエク

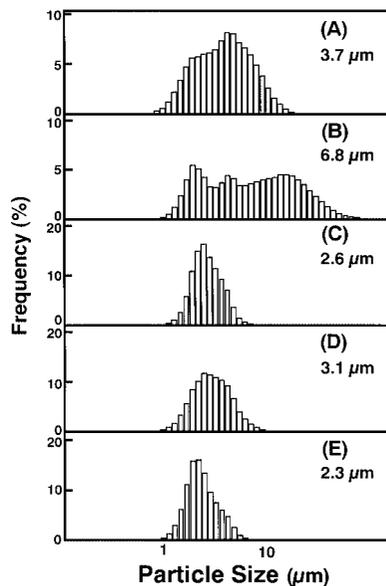


Fig. 3. Particle size distributions of emulsions from glycinin species. (A) 11S. (B) Group I. (C) Group II. (D) A3B4. (E) A5A4B3.

ステンション領域が関わっていること<sup>1, 2)</sup>と対応している。

たん白質が乳化性を発現するためには、油水界面で両者に親和性を示す必要がある。したがって、構造のフレキシビリティさおよび両親媒性は優れた乳化性の重要な要因である。熱安定性は構造のフレキシビリティさと、表面疎水性は両親媒性と密接に関係する性質である。 $\beta$ -コングリシニンの場合、各サブユニットのホモ分子種の乳化性は熱安定性および表面疎水性と相関する<sup>5)</sup>。しかし、グリシニンのサブユニットのうち、A3B4の熱安定性は最も低く (Fig. 1)、表面疎水性は最も高い (Table 1) にもかかわらず、乳化性はA5A4B3が優れており、A3B4はグループIIよりも低い。したがって、グリシニンと $\beta$ -コングリシニンの乳化性と構造との相関は、立体構造が似ているにもかかわらず、互いに異なると言える。この原因の解明のためにも個々のサブユニットの立体構造の解明が待たれる。

## 要 約

限定的なサブユニット組成のグリシニンを含む各種の変異大豆から、グループ I のみ、グループ II のみ、A3B4 のみ、A5A4B3 のみから成るグリシニンを、普通品種のシロツルノコから全サブユニットを含むグリシニン (11S) を調製し、その構造的特徴 (熱安定性、表面疎水性) と加工特性 (溶解性、乳化性) を比較することにより、構造・加工特性相関をサブユニットレベルで解析した。その結果、A3B4 の熱変性温度は他のサブユニットに比べて 6~8℃ 低い、グループ I と II の熱変性温度に差はないこと、疎水性カラムクロマトグラフィーによって測定した表面疎水性はグループ I < 11S < A5A4B3 < グループ II < A3B4 であること、11S の溶解性は低イオン強度下ではグループ I と II の平均になるが、高イオン強度下ではグループ I に従うこと、ところがグループ II の溶解性は低イオン強度下でも高イオン強度下でも A5A4B3 に従うこと、乳化性は、グループ I < 11S < A3B4 < グループ II < A5A4B3 であり、熱安定性や表面疎水性と相関しないことが明らかとなった。

## 文 献

- 丸山伸之, 内海 成 (1998): 大豆  $\beta$ -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.
- Maruyama N, Sato R, Wada Y, Matsumura Y, Goto H, Okuda E, Nakagawa S and Utsumi S (1999): Structure-physicochemical function relationships of soybean  $\beta$ -conglycinin constituent subunits. *J Agric Food Chem*, **47**, 5278-5284.
- 丸山伸之, 内海 成 (2000): 変異大豆を利用する  $\beta$ -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.
- Maruyama N, Mohamad Ramlan MS, Takahashi K, Yagasaki K, Goto H, Hontani N, Nakagawa S and Utsumi S (2002): The effect of the N-linked glycans on structural features and physicochemical functions of soybean  $\beta$ -conglycinin homotrimers. *J Am Oil Chem Soc*, **79**, 139-144.
- 丸山伸之, 内海 成 (2001): 変異大豆を利用する  $\beta$ -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. 大豆たん白質研究, **4**, 19-26.
- 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., Marcell Decker, New York, pp. 257-291.
- Yagasaki K, Takagi T, Sakai M and Kitamura K (1997): Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J Agric Food Chem*, **45**, 656-660.
- Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybean. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944.
- Utsumi S, Nakamura T, Harada H and Mori T (1987): Occurrence of dissociable and undissociable soybean glycinin. *Agric Biol Chem*, **51**, 2139-2144.
- Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B and Utsumi S (2001): Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol*, **305**, 291-305.
- Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, Yagasaki K, Kohno M, Takenaka Y, Okuda E, Nakagawa, S, Mikami B and Utsumi S (2001): Crystal structure of recombinant and native soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$  homotrimers. *Eur J Biochem*, **268**, 3595-3604.