

大豆たん白質への新しい生理機能の導入に関する基礎研究

吉川正明*・山田優子・的場伸行・内海 成・丸山伸之・大西邦彦

京都大学大学院 農学研究科

Study on Introducing New Physiological Function into Soy Protein by Genetic Engineering

Masaaki YOSHIKAWA, Yuko YAMADA, Nobuyuki MATOBA,
Shigeru UTSUMI, Nobuyuki MARUYAMA and Kunihiko ONISHI

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

ABSTRACT

RPLKPW is a highly potent anti-hypertensive peptide obtained by replacing four amino acid residues in ovokinin (2-7) (RADHPF) that is a vasorelaxing peptide isolated from a chymotryptic digest of ovalbumin. In previous study, RPLKPW sequence was introduced into three homologous sites in soybean β -conglycinin α' subunit by site-directed mutagenesis and the mutated α' subunit expressed in *Escherichia coli* exerted an anti-hypertensive effect in spontaneously hypertensive rats at a dose of 10 mg/kg (per os). In this study, we found that RPLKPW was released from only one site among three RPLKPW-sites by *in vitro* digestion experiment with model peptides around RPLKPW-sites of modified α' subunit. In order to release RPLKPW efficiently, we optimized amino residues around individual RPLKPW-sites. The yields of RPLKPW from 3 RPLKPW-sites were increased markedly. Furthermore, we introduced fourth RPLKPW sequence to the α' subunit. The minimum effective dose of α' subunit containing four RPLKPW was 2.5 mg/kg, about one-fourth of that of modified α' subunit that we previously reported. The anti-hypertensive activity of α' subunit containing four RPLKPW was larger than ovalbumin by about eight hundred times. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 26-30, 2002.

Key words: ovalbumin, anti-hypertensive peptide, soybean β -conglycinin, spontaneously hypertensive rat, site-directed mutagenesis

遺伝子改変による作物の増産は21世紀の世界の食糧

問題を解決する上で重要な位置を占めている。初期の遺伝子改変作物の目標が除草剤耐性や殺虫性など、専ら生産性の向上に関わるものであり、消費者への直接

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

メリットがなかったことから、消費者の猛烈な反発を浴びたことは遺伝子改変作物の健全な発展にとって不幸なことであった。本研究では消費者のメリットに繋がる新たな生体調節機能、血圧降下作用を遺伝子改変によって大豆たん白質に付加することを目指したものである。

以前に卵白アルブミンのキモトリプシン消化物から単離した動脈弛緩・血圧降下ペプチドOvokinin(2-7)(RADHPF)は高血圧自然発症ラット(SHR)に対し10 mg/kgの経口投与で血圧降下作用を示すが、4個のアミノ酸残基を置換することによって元のペプチドの1/100に相当する0.1 mg/kgの投与で有効なRPLKPWを得た¹⁻³⁾。本ペプチドを大豆 β -conglycinin α' subunit中に存在する3カ所の類縁配列に遺伝子の部位特異的変異によって導入し、大腸菌で生産することによって10 mg/kgの経口投与で投与後4時間目に血圧降下作用を示す改変 β -conglycinin α' subunit(以下改変 α')が得られた⁴⁾。これは卵白アルブミンよりおよそ200倍強い血圧降下作用を持つことになる。しかし、RPLKPWや改変 α' の最小有効投与量および分子量から計算すると改変 α' が体内で消化を受けた時、導入したRPLKPWの1/4~1/3量だけが実際に切り出され、血圧降下作用に寄与したと考えられる。そこで今回の研究では改変 α' が体内で消化を受けた時、導入したRPLKPWが効率よく切り出されるように再設計を行うと伴に、RPLKPW導入部位を3つから4つに増やすことで改変 α' の血圧降下作用をさらに強化しようと試みた。

方 法

モデルペプチド合成

β -conglycinin α' subunit中のRPLKPWを導入した部位周辺に相当するアミノ酸配列を持つ14~22残基のペプチドをFmoc法に従って合成し、実験に用いた。

モデルペプチドの*in vitro*プロテアーゼ消化実験によるRPLKPWの派生効率の算出

*in vivo*での消化をシミュレートするためにモデルペプチドをペプシン(pH 2.0, 37°C, 5 h, E/S=1/100)、およびパンクレアチン(pH 8.0, 37°C, 5 h, E/S=1/20)で消化させた後、その消化物をHPLCに供しRPLKPWの派生効率をクロマトグラムのピーク面積より算出した。

β -conglycinin α' subunitへのRPLKPW導入および、大腸菌による発現

β -conglycinin α' subunit中に存在するRPLKPW類縁配列部位、計4カ所に市販キットの遺伝子の部位特異的変異誘発を用いてRPLKPWを導入した。この変異

を導入した改変 α' subunitのcDNAをコードするプラスミドを発現菌HMS174(DE3)に形質転換し、IPTG誘導下で改変 α' subunitを発現させた。

RPLKPW導入改変 α' subunitの精製

発現させた大腸菌を破碎した後、可溶性画分を回収し硫酸分画(30%~50%)を行った。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーに供し精製した。

血圧降下作用

サンプルを30%卵黄を含む生理食塩水に溶解させ⁵⁾、16~22週齢の高血圧自然発症ラット(以下SHR)雄に経口投与し、投与後0 h, 2 h, 4 h, 6 h後の血圧を無加温型非観血式血圧計MK-2000(室町機械)を用いて測定した。コントロールには変異を導入していないnativeな α' を大腸菌で発現、精製し実験に用いた。

結 果

*in vitro*プロテアーゼ消化実験によるモデルペプチドからのRPLKPWの派生効率

前回、設計した改変 α' subunit(3RPLKPW- α')の3カ所のRPLKPW導入部位周辺に相当する14~15残基のモデルペプチド(Site A(1), B(1)およびC(1))をプロテアーゼで消化したところ、Site CのみからRPLKPWが派生し、その派生効率は改変 α' 1 molあたり0.35 molと計算された。改変 α' 1 molあたり3 molのRPLKPWを導入したため、この*in vitro*の条件下では理論値のおよそ12%のRPLKPWしか派生していないことになり、上述の最小有効投与量から計算された*in vivo*での派生効率より低い値となった。そこでRPLKPWがほとんど派生してこないと考えられるSite A, Bに関してRPLKPWの前後数残基を置換したモデルペプチドを合成し、改変 α' からのRPLKPWの派生効率を高めるための最適化を試みた(Table 1)。

派生効率を改善するための再設計

まずSite Aに関してRPLKPWのN末端2残基前とC末端1残基後のArgをGlnに置換したモデルペプチド(Site A(2))を合成し、消化したところRPLKPWの派生効率は0.01 molから0.36 molへと飛躍的に上昇した。同様にSite Bに関してもRPLKPWのN末端1残基前をTrpに置換しキモトリプシンで認識切断されるように設計していたところをArgに再置換しトリプシンで認識切断されるようにした(Site B(2))。これによりRPLKPWの派生効率を<0.01 molから0.42 molへと高めることができた。結果として最初から高回収率を示したSite Cを模倣してRPLKPWのN末端1残基前を

Table 1. Improvement of yield of RPLKPW after pepsin-pancreatin digestion by optimizing amino residues around RPLKPW-sites

	Model peptides	RPLKPW-yield (mol / mol model peptide digest)
Site A	¹¹ QIPRP RPQH PERER ²⁴	
	(1) QIPRR RPLKPW RER	0.01
	(2) QIPQR RPLKPW QER	0.36
Site B	³⁶ GEQPRPFPFP RPRQPHQEEE ⁵⁵	
	(1) PFPFW RPLKPW QEEE	<0.01
	(2) PFPFR RPLKPW QEEE	0.42
	(3) GEQR RPLKPW RPRQPHQEEE	0.20
	(4) GEQR RPLKPWRPLKPW QEEE	0.07
	(5) GEQR RPLKPWQRPLKPW QEEE	1.07
Site C	⁸¹ EREHPRPHQPHQKEE ⁹⁵	
	(1) EREHR RPLKPW QKEE	0.35

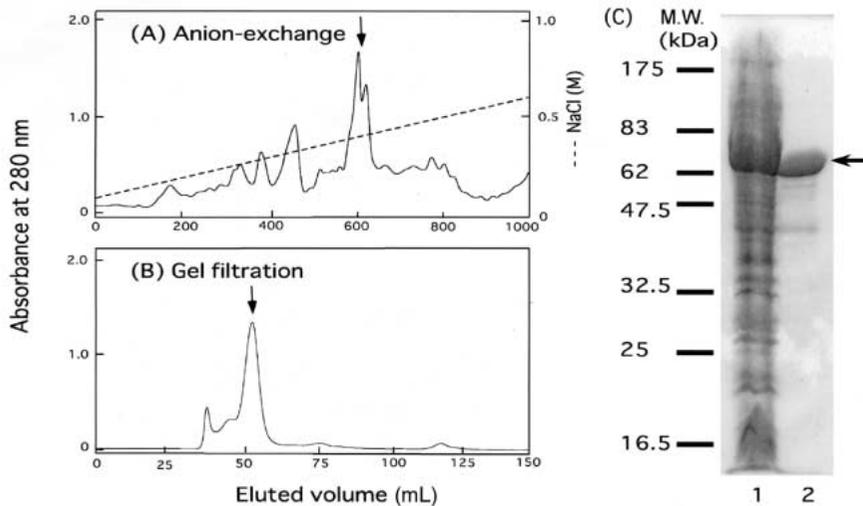


Fig. 1. Purification of 3RPLKPW- α' subunits (new) expressed in *E. coli* by anion-exchange HPLC on a Q sepharose column (A) and gel filtration HPLC on a Sephacryl HR (B). Fractions containing the 3RPLKPW- α' subunit (new) are indicated by arrows. SDS-PAGE analysis (C): Lane 1, Total *E. coli* proteins; Lane 2, purified 3RPLKPW- α' subunits (new).

Arg, C 末端 1 残基後をGlnに設計することでSite A, B に関しても高回収率を得ることに成功した. これらの再設計を施した新改変 α' (3RPLKPW- α' (new)) は 1 mol あたり消化後, 1.13 mol (0.36+0.42+0.35) の RPLKPW が派生してくると計算され, 再設計により 3 カ所の導入部位のすべてから RPLKPW が派生すると考えられた.

4 カ所目の RPLKPW 導入

さらなる強化設計として 4 カ所目の RPLKPW 配列導入を試みた. 4 カ所目を導入する部位として Site B の直前に RPFPPF という類縁配列が存在しているため, まずこの部位だけを RPLKPW に置換したモデルペプチド (Site B (3)) を消化したところ 0.20 mol の RPLKPW

が派生した. 次に 2 つの RPLKPW をタンデムに繋いだ配列を持つモデルペプチド (Site B (4)) を消化したところ, この配列には 2 つの RPLKPW 配列が含まれるにもかかわらず, 結果は意外にも 0.07 mol と低い派生効率であった. そこでこれら 2 つの RPLKPW 配列の間にスペーサーとして Gln-Arg を挿入したモデルペプチド (Site B (5)) を合成し, 消化したところ 1.07 mol という非常に高い派生効率を示した. この配列を採用した 4 分子 RPLKPW 導入改変 α' (4RPLKPW- α') は 1 mol あたりおよそ 1.78 mol (0.36+1.07+0.35), の RPLKPW が派生すると計算され再設計により 4 カ所の導入部位のすべてから RPLKPW が派生すると考えられた.

再設計後の改変 α' の血圧降下作用

以上のように2種類の新改変 α' を大腸菌にて発現させ、精製後 (Fig. 1), SHRに経口投与した. RPLKPWの派生効率を高める再設計を施した3RPLKPW- α' (new) は再設計以前のものの最小有効投与量の半分に相当する5.0 mg/kgで投与後4時間目に血圧降下が見られた.

次に4カ所目のPRLKPWを導入した4RPLKPW- α' をSHRに経口投与したところ, 以前のものの1/4に相当する2.5 mg/kgの用量で投与後4時間目に有意な血圧降下作用を示した. これよりRPLKPW導入改変 α' の血圧降下作用をおよそ4倍, 強化できたということが言える (Table 2). また卵白アルブミンと比較すると, およそ800倍強い血圧降下作用を持つ改変 β -conglycinin α' subunitが得られたことになる.

考 察

遺伝子改変技術を用いて生理活性ペプチドを食品たん白質中に導入することは, 多様な高機能を持つ食品を創出するうえで有効な手段である. 導入する生理活性ペプチドをその配列とhomologousな部位に移植することで, その改変したたん白質のfolding, 高次構造, 局在性, 生産性, アレルゲン性などの変化を最小限に抑えることが期待できる.

本研究では改変 α' が体内で消化を受けた時, 導入したRPLKPWが効率よくプロテアーゼによって認識, 切断され易いようにその前後数残基を検討したが, そのためにモデルペプチドによる*in vitro*消化実験を行った. 部位特異的変異によって酵素などの活性を有するたん白質を設計する場合には, 変異を導入する度に改変たん白質を発現させ, その活性を検討するのが通常である. これは酵素活性にはその高次構造が重要な因子となるからである. しかし, 生理活性ペプチドを導入した改変たん白質の場合, その活性は高次構造よりもむしろその1次構造に起因するところが大きいいため, 改変部位近傍のモデルペプチドを用いた消化実験によって, 最適なアミノ酸配列を選定することができる. これは本研究の目的を達するうえで迅速かつ効率的な方法と言える.

要 約

RPLKPWは卵白アルブミン由来の動脈弛緩ペプチド, ovokinin (2-7) (RADHPF)のアミノ酸残基を置換して得られた強力な血圧降下ペプチドである. 我々は以前このRPLKPWを3分子導入し大腸菌で発現することによって, 10 mg/kgの経口投与で高血圧自然発症ラット (SHR) に対して血圧降

Table 2. Anti-hypertensive activities of genetically modified β -conglycinin α' subunits

	Introduced RPLKPW	RPLKPW- yield ¹	Minimal effective dose (mg/kg) ²	Relative activity
Native α'	0	—	—	—
3RPLKPW- α'	3	0.35	10	1
3RPLKPW- α' (new)	3	1.13	5.0	2
4RPLKPW- α'	4	1.78	2.5	4

¹ mol/mol RPLKPW- α' digest after pepsin-pancreatin digestion.

² in SHR after oral administration.

また, すべての導入部位においてRPLKPWのN末端1残基前をArg, C末端1残基後をGlnに設計したことによってRPLKPWの派生効率を高めることができた. RPLKPWをタンデムに繋いだ配列にスペーサーとしてGln-Argを挿入したこともこの法則に従ったものである. トリプシンやキモトリプシンによる切断部位の認識にはその切断部位のN末側アミノ酸残基が重要であるが, 今回の研究ではTrp-Arg bondよりTrp-Gln bondの方が切断効率がよく, 切断部位のC末側アミノ酸残基の重要性も示唆された. これにはC末側アミノ酸残基の立体障害や電荷などが関係すると考えられる. またTrp-Arg bondよりArg-Arg bondのほうが切断効率が高かったことから, 設計時の切断プロテアーゼを選択する場合, できるかぎり消化管内で大量に存在するプロテアーゼ (今回の場合, キモトリプシンよりトリプシン) を選択することが望ましいと考えられる.

よって, 生理活性ペプチドを食品たん白質に導入する際, そのペプチドとhomologousな部位を選出, 導入し, まず大腸菌等で生産させ, その活性が最大限に引き出されるように検討した後, 植物体で生産させることが着実な手順と考えられる. 本研究においても今後はこの4分子のRPLKPW導入改変 α' subunitを大腸菌ではなく植物体, ダイズやイネで発現させ, その血圧降下作用および安全性について検討する予定である.

下作用を示す改変 β -conglycinin α' subunitを得てきた。本研究ではRPLKPW導入部位周辺のアミノ酸配列に相当する14~22残基のモデルペプチドを合成し、ペプシンおよびパンクレアチンによる *in vitro* の消化実験を行ったところ、3カ所中1カ所のみからRPLKPWが切り出されてくることが分かった。そこで改変 α' が体内で消化を受けた時、導入したRPLKPWが効率よく切り出されるにすべくその導入部位前後数残基の最適化を行ったところ、改変 α' に存在する3カ所すべての導入部位からRPLKPWが効率よく切り出された。またRPLKPW導入部位を3つから4つに増やすことで改変 α' の血圧降下作用をより強化すべく試みたところ、最終的に以前のもののおよそ1/4量に相当する2.5 mg/kgの経口投与で有意な血圧降下作用を示す改変 α' subunitを得ることができた。これは卵白アルブミンと比較しておよそ800倍強い血圧降下作用を持つことになる。

文 献

- 1) Matoba N, Usui H, Fujita H and Yoshikawa M (1999) : A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett*, **452**, 181-184.
- 2) Matoba N, Yamada Y, Usui H, Nakagiri R and Yoshikawa M (2001) : Designing potent derivatives of ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 736-739.
- 3) Yamada Y, Matoba N, Usui H, Onishi K and Yoshikawa M (2002) : Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin (2-7). *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1213-1217.
- 4) Matoba N, Doyama N, Yamada Y, Maruyama N, Utsumi S and Yoshikawa M (2001) : Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *FEBS Lett*, **497**, 50-54.
- 5) Fujita H, Sasaki R and Yoshikawa M (1995) : Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl choline. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 2344-2345.