

大豆野生種 “ツルマメ” の貯蔵たん白質の特性解析と活用

丸山伸之^{*1}・福田貴子¹・島本義也²・金澤 章²・内海 成¹

¹京都大学大学院農学研究科 ²北海道大学大学院農学研究科

Characterization of Seed Storage Proteins of Wild Soybean for Application of Breeding

Nobuyuki MARUYAMA¹, Takako FUKUDA¹, Yoshiya SHIMAMOTO²,
Akira KANAZAWA² and Shigeru UTSUMI¹

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

²Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

ABSTRACT

Both soybean (*Glycine max*) and wild soybean (*Glycine soja*) storage proteins are composed of two major components, β -conglycinin (7S) and glycinin (11S). We detected electrophoretic variants of the α' subunit of β -conglycinin and the A3 and A4 polypeptides of glycinin of wild soybean storage proteins on SDS-PAGE and designated them as small α' , small A3, and large A4. Their N-terminal sequences were identical to normal ones. We isolated cDNAs of small α' , small A3, and large A4 by RT-PCR and sequenced them. Their sequences indicated a deletion of 24 amino acids in small α' , a deletion of 4 amino acids in a small A3 and substitutions of 2 amino acids in large A4 in comparison with the sequences of normal subunits of wild soybean. This deletion and substitution probably causes the difference in the mobility on SDS-PAGE. Furthermore, we analyzed the solubility, emulsifying ability, and thermal stability, of 7S from lines containing small α' , and the 11S from lines containing small A3 or large A4. Solubility and emulsifying ability of all samples were very similar to those of normal wild soybean, but the denaturation-starting temperatures of 11S from lines containing small A3 or large A4 were about 4°C lower than that of 11S of normal wild soybean. This characteristic is valuable for lowering the cost of food production from soybean proteins by heating. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 20-25, 2004.

Key words : wild soybean, seed storage protein, β -conglycinin, glycinin

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

大豆たん白質は溶解性、乳化性やゲル化性などの加工特性に優れており、様々な食品に利用されている。これは、その主要成分である7Sグロブリン (β -コングリシニン：3種類のサブユニット (α , α' , β) より成る) と11Sグロブリン(グリシニン：5種類のサブユニット (A1aB1b, A1bB2, A2B1a, A3B4, A5A4B3) より成る) の性質に基づいている。大豆の祖先種であると言われているツルマメは、大豆と同様に7Sと11Sを主要な成分としている。しかし、ツルマメは大豆に比べて変異に富むことが知られている。また、大豆と交配することができる。したがって、大豆には見られない優れた特性を持つツルマメを見出せると、その形質を導入することによって大豆の品種改良を行うことができる。そこで本研究では、多数の系統のツルマメについて貯蔵たん白質のサブユニット分析を行い、大豆では見られないサブユニット種のスクリーニングを行うとともに、見出した変異サブユニット種の特性と構造について解析した。

方 法

ツルマメの変異サブユニットの検索

390系統のツルマメの完熟種子に10 mMメルカプトエタノール, 1 mM EDTA, 0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ を含むTris緩衝液, pH 8.0を加え、室温で2時間攪拌した後、遠心分離により上清を回収し、抽出液として用いた。抽出液をSDS-PAGEに供し、変異サブユニットの検索を行った。

N末端アミノ酸配列の解析

SDS-PAGEゲル中のバンドからたん白質をSDS緩衝液により抽出し、Prosorbカートリッジ (Applied Biosystems) を用いて、PVDF膜にブロッティングした。さらに、Procise492プロテインシーケンサー (Applied Biosystems) により、N末端アミノ酸配列を決定した。

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。

β -コングリシニンおよびグリシニンの調製

β -コングリシニン画分およびグリシニン画分の調製は長野らの方法¹⁾に準じて行った。さらに、グリシニンは硫酸アンモニウム画分 (45~65%飽和) によりほぼ均一に精製した。

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×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。

乳化性

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) に溶解したたん白質溶液 (1.0 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。

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カロリメーターを用いて、緩衝液Aに溶解したたん白質溶液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。

RT-PCR

全RNAをツルマメの登熟期種子からShirzadeganらの方法²⁾により調製し、RT-PCRに用いた。各貯蔵たん白質のcDNAはRNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 (Takara) を用いて調製した。まず、全RNAをポリAに対する相補鎖を含むプライマーによりcDNAに逆転写した。さらに、N末端部に対するプライマー (α' 小: GTGGA GGAAGAAGAAGAATGC, A3小: ATGGGGAAGCCC TTCTTCACTCTCTC, A4大: ATGGGGAAGCCCTT CACTCTCTCTC) とC末端部の相補鎖に対するプライマー (α' 小: CGCGGATCCATACTTATTCAGTAA AAAGCC, A3小: ATAGTTTAGCGGCCGCTTATGG GTTGACCAAAGGGCCGGAGTTTC, A4大: ATAGT TTAGCGGCCGCTTATGCGACTTTAACACGGGGTG AGC) によりPCRを行い、pBluescriptSK(-) (Stratagene) にクローニングし、Sangerらの方法³⁾によって塩基配列を決定した。

結果と考察

変異サブユニットの検索

変異サブユニットを含有するツルマメの系統をスクリーニングするために、大豆 (白鶴の子) およびツルマメ390系統の抽出液をSDS-PAGEに供した。多くの系統のツルマメのサブユニット組成は大豆のものと同様であったが、5系統について普通系統とは異なるバンドが見られた (Fig. 1)。 α , α' がなく、 β の上に新たな2本のバンドがあり、A鎖も普通系統のものと異なる系統 (lane 3), α' がなく、 α 近辺にバンドが2本

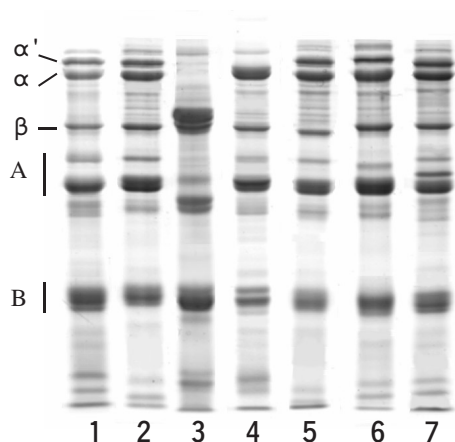


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of seed extracts of unique wild soybean cultivars. α' , α and β indicate subunits of β -conglycinin. A and B indicate acidic and basic polypeptides of glycinin, respectively. Lane 1, normal soybean line; Lane 2, normal wild soybean line; Lane 3, small $\alpha \cdot \alpha'$; Lane 4, small α' ; Lane 5, small β ; Lane 6, small A3; Lane 7, large A4.

ある系統 (lane 4), β がなく, 通常よりも少しサイズが小さいところにバンドがある系統 (lane 5), A3がなく, 通常よりも少しサイズが小さいところにバンドがある系統 (lane 6), 中間のサイズのA鎖のバンドがある系統 (lane 7) を見出した。そこで, これらのバンドを与えるたん白質のN末端アミノ酸配列を分析した。lane 3で見られる β の上の2本のバンドは α と α' が, 普通系統のものより移動度の早いバンドはA鎖が限定分解を受けたものに由来していた。また, lane 4における α よりも少し大きいバンドは α' と, lane 5における β より少しサイズが小さいバンドは β と, lane 6におけるA3よりも少し小さいバンドはA3と, lane 7における中間的サイズのA鎖のバンドはA4と, おのおの同じN末端アミノ酸配列を与えた。そこで, これらの系統を, $\alpha \cdot \alpha'$ 小 (lane 3), α' 小 (lane 4), β 小 (lane 5), A3小 (lane 6), A4大 (lane 7) と名付けた。このようなサブユニット種を持つ大豆は報告されていない⁴⁾。一方, 大豆では β の他に β 小を持つ系統は報告されているが, β 小のみを持つ系統は報告されていない。これらの変異系統のうち, 栽培によって多くの種子が得られた α' 小, A3小, A4大の各系統について完熟種子より7S画分あるいは11S画分を調製し, それぞれの性質を普通系統や大豆のものと比較した。

溶解性

イオン強度0.5および0.08の両条件下で溶解性のpH依存性を測定した (Fig. 2)。 α' 小より調製した7Sは

普通系統の7Sと同様にイオン強度0.5ではすべてのpHにおいて可溶性であったが, イオン強度0.08ではpH 5付近で完全に等電点沈殿した。一方, A3小, A4大より調製した11Sも普通系統の11Sと同様に, イオン強度0.5においてはpH 5以下で溶解性が低下し, イオン強度0.08ではpH 4~6.5付近で等電点沈殿した。すなわち, 溶解性には変異系統のものと普通系統のものとの間で差はなかった。

乳化性

イオン強度0.5と0.08の条件下での各サンプルの乳化物の粒度分布を測定し, その平均粒子径から乳化性の評価を行った (Fig. 3)。平均粒子径が小さいほど乳化性が優れていると判定される。7S, 11Sとも普通系統と変異系統のもので, イオン強度0.5および0.08の両条件下で, 粒度分布や平均粒子径に差はほとんど見られなかった。

熱安定性

イオン強度0.5における各サンプルの熱安定性を, 示差走査熱量測定によって調べた。7Sでは, 大豆, 普通系統, α' 小の系統共に変性温度, 変性曲線ともほぼ同じであった。一方, 11Sでは, A3小, A4大の系統は, 大豆や普通系統よりも約4℃低い温度で変性し始めた (Fig. 4)。このことは, より低い温度で加熱ゲルを形成できる可能性を示しており, 加工食品の製造コストの低減化につながる有用な形質と考えられる。

cDNAクローニングと塩基配列

SDS-PAGEでの移動度および熱安定性の違いの原因を調べるために, 各変異サブユニットのcDNAをクローニングし, 塩基配列を決定することによってアミノ酸配列を推定した。その結果, α' 小は α' のアミノ酸数が普通系統に比べて24残基少ないことが明らかになった (Fig. 5)。また, A3小では4残基の欠損が見られたのに対し, A4大ではアミノ酸置換が2箇所に見られたが, アミノ酸数に違いは見られなかった (Fig. 6)。このような差異がA3小やA4大の熱安定性およびSDS-PAGEでの移動度の違いに影響していると考えられたが, より詳細に原因を考察するため, 変異部位の高次構造上の位置を比較した (Fig. 6)。いずれの変異部位とも α -ヘリックスおよび β -シートを構成する部位ではなく, 分子表面のディスオーダー領域に位置していた。したがって, A3小, A4大ともに基本的な構造は普通系統のものと同じであるが, ディスオーダー領域における変異がサイズや熱安定性に違いを生じたと考えられた。

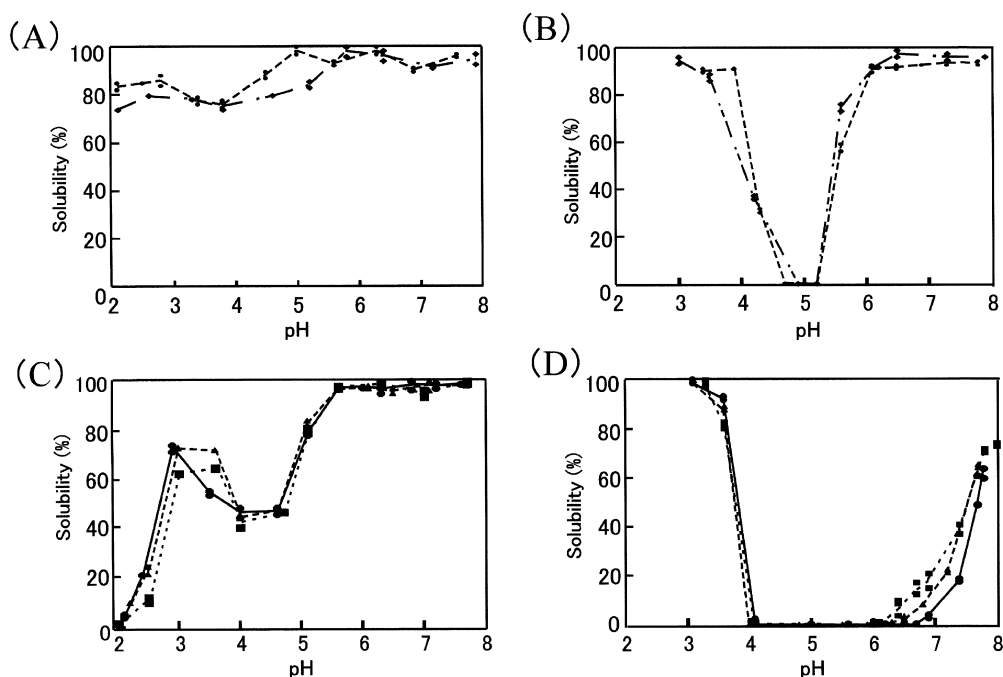


Fig. 2. pH dependence of solubility of wild soybean 7S and 11S. (A and B) 7Ss of normal line and small α' are shown by a dashed line with circles and a dashed and single-dotted line with square, respectively. (C and D) 11Ss of normal line, small A3 and large A4 are shown by a solid line with circles, a dotted-line with squares and a dashed line with triangles, respectively. (A and C) $\mu = 0.5$, (B and D) $\mu = 0.08$.

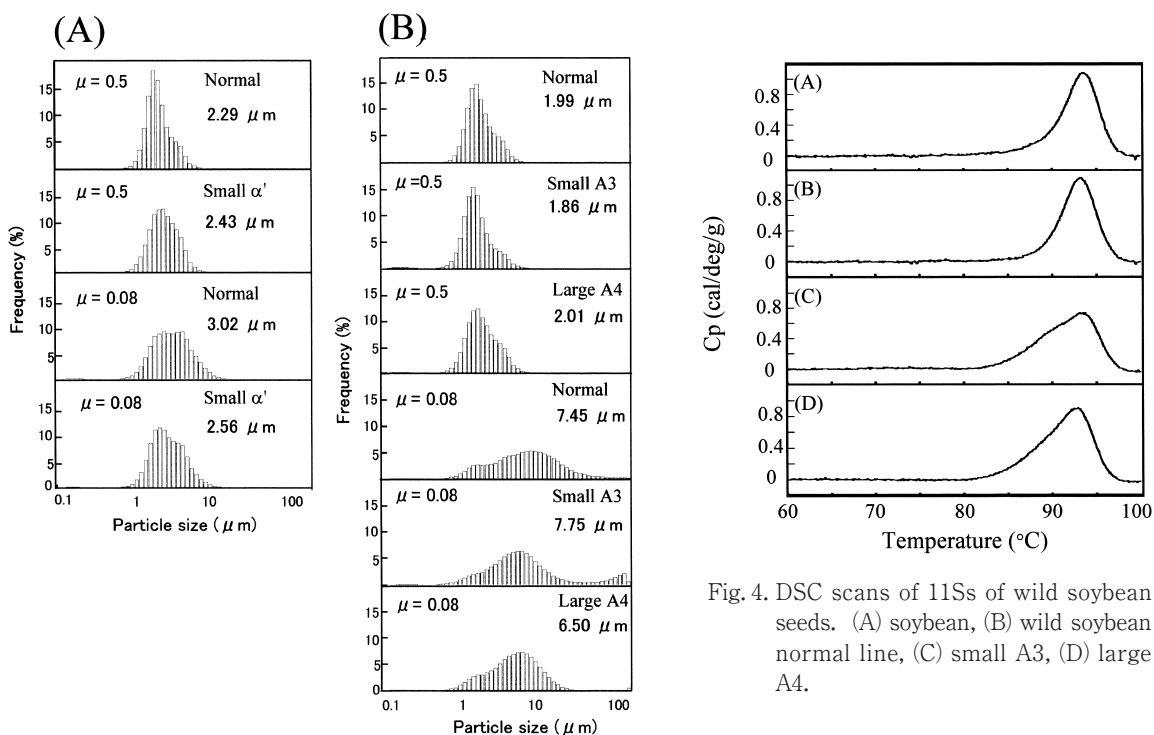


Fig. 3. Particle size distributions of emulsions from wild soybean 7S (A) and 11S (B).

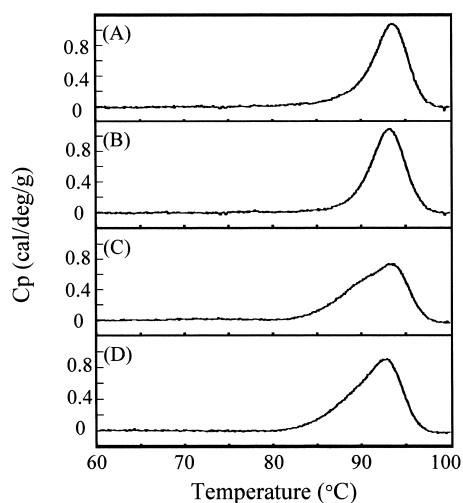


Fig. 4. DSC scans of 11Ss of wild soybean seeds. (A) soybean, (B) wild soybean normal line, (C) small A3, (D) large A4.

Soybean	1	VEEEEECEEGQIPRPRP--QHPERERQHQKEEEDGEQPRPFPPRPRQPHQEEEEQEKEEHWHRKEEKHGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEE----	95
Wild soybean	1	VEEEEECEEGQIPRPRPRQHPERERQHQKEEEDGEQPRPFPPRPRQPHQEEEEQEKEEHWHRKEEKHGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEQKHE	101
Small α'	1	VEEEEECEEGQIPRPRP--QHPERERQHQKEEEDGEQPRPFPPRPRQPHQEEEEQEKEE //////////////////// QDEREHPRPHQPHQKEE----	77
1			
Soybean	96	EKHEWQHKKQKHQKGESEEEEEEDQDEEDQDKESQSEGESQREPRHKNKNPFHNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSQLQLNLDYRILEFNSKP	196
Wild soybean	102	EKHEWQHKKQKHQKGESEEEEEEDQDEEDQDKESQSEGESQREPRHKNKNPFHNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSQLQLNLDYRILEFNSKP	202
Small α'	78	EKHEWQHKKQKHQKGESEEEEEEDQDEEDQDKESQSEGESQREPRHKNKNPFHNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSQLQLNLDYRILEFNSKP	178
2			
Soybean	197	NTLLPHHADADYLIVLNGTAILTLVNDDRDSYNLQSGDALRVPAGTYYVVPNDNENLRMITLAIPVNGKGRFESFFLSSTQAQSYLGQFSKNILE	297
Wild soybean	203	NTLLPHHADADYLIVLNGTAILTLVNDDRDSYNLQSGDALRVPAGTYYVVPNDNENLRMITLAIPVNGKGRFESFFLSSTQAQSYLGQFSKNILE	303
Small α'	179	NTLLPHHADADYLIVLNGTAILTLVNDDRDSYNLQSGDALRVPAGTYYVVPNDNENLRMITLAIPVNGKGRFESFFLSSTQAQSYLGQFSKNILE	279
3			
Soybean	298	ASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESVIVEISKQIRELSKHAHSSSRKTISSEDKPFNLRSDPIYSNKLGLFETPEKNPQLRDLDFVLSVD	398
Wild soybean	304	ASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESVIVEISKQIRELSKHAHSSSRKTISSEDKPFNLRSDPIYSNKLGLFETPEKNPQLRDLDFVLSVD	404
Small α'	280	ASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESVIVEISKQIRELSKHAHSSSRKTISSEDKPFNLRSDPIYSNKLGLFETPEKNPQLRDLDFVLSVD	380
4			
Soybean	399	MNEGALFLPHFNSKAIVLVINEGEANIELVGIKEQQQRRQQEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYVVVNATSDLNFFAFGINAENNRNFLAGSKDN	499
Wild soybean	405	MNEGALFLPHFNSKAIVLVINEGEANIELVGIKEQQQRRQQEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYVVVNATSDLNFFAFGINAENNRNFLAGSKDN	505
Small α'	381	MNEGALFLPHFNSKAIVLVINEGEANIELVGIKEQQQRRQQEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYVVVNATSDLNFFAFGINAENNRNFLAGSKDN	481
5			
Soybean	500	VISQIPSQVQELAFPGSAKDIEHLKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGLSSILRAFV	559
Wild soybean	506	VISQIPSQVQELAFPGSAKDIEHLKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGLSSILRALY	565
Small α'	482	VISQIPSQVQELAFPGSAKDIEHLKSQSESYFVDAQPQQKEEGNKGRKGLSSILRAFV	541

Fig. 5. Alignment of α' subunit sequences of soybean, wild soybean normal line and small α' . Bold and dotted lines indicate the extension region and disorder regions, respectively. The region indicated by the virgule is the deleted sequences in small α' in comparison with those of normal α' .

Soybean A3B4	1	ITSSKFNCOQLNNLNALEPD HRVES EG GL IETWNSOHPELQCA GV TVSKRTLNRN GLHLPSYSYP OM / IVDGKGA / GFAFGPQETFEKPOQSSRRGRSSQ--QQLQDSHAK / RHFW	119
Small A3 A3B4	1	ITSSKFNCOQLNNLNALEPD HRVES EG GL IETWNSOHPELQCA GV TVSKRTLNRN GLHLPSYSYP OM / IVDGKGA / GFAFGPQETFEKPOQSSRRGRSSQ--QQLQDSHAK / RHFW	119
Soybean A5A4B3	1	ISSKLNCOQLNNLNALEPD HRVES EG GL IOTWNSOHPELQCA GV TVSKTLNRN GLHLPSYSYP RM / IADGKGALGVA / PGOPETFEEPQEGSNRRGRSSQKQLQDSHAK / RHFW	120
Large A4 A5A4B3	1	ISSKLNCOQLNNLNALEPD HRVES EG GL IOTWNSOHPELQCA GV TVSKTLNRN GLHLPSYSYP RM / IADGKGALGVA / PGOPETFEEPQEGSNRRGRSSQKQLQDSHAK / RHFW	120
1			
Soybean A3B4	120	GDLVL / PPGVP YNTYNTGDEP VVA / SL DTSNFMNQLDQPRV FY LAGNPD I EHPETMQQQQQKSHGGRKQGGHQHQEQEE--GGSVLSGFS KHFLAQSFNTNEDIAEK LRSPDDERKQ / V	238
Small A3 A3B4	120	GDLVL / PPGVP YNTYNTGDEP VVA / SL DTSNFMNQLDQPRV FY LAGNPD I EHPETMQQQQQKSHGGRKQGGHQHQEQEE--GGSVLSGFS KHFLAQSFNTNEDIAEK LRSPDDERKQ / V	238
Soybean A5A4B3	121	GDLVL / PPGVP YNTYNTGDEP VVA / SL DTSNFMNQLDQPRV FY LAGNPD I EHPETMQQQQQKSHGGRKQGGHQHQEQEEGGSVLSGFS KHFLAQSFNTNEDIAEK LRSPDDERKQ / V	240
Large A4 A5A4B3	121	GDLVL / PPGVP YNTYNTGDEP VVA / SL DTSNFMNQLDQPRV FY LAGNPD I EHPETMQQQQQKSHGGRKQGGHQHQEQEEGGSVLSGFS KHFLAQSFNTNEDIAEK LRSPDDERKQ / V	240
2			
3			
Soybean A3B4	238	7 VEGGLSV / SPKWQEQ--EDEDEDEEYEQTPSPRRPSHGKHEDDEDEEDQPRPDHPQ ----- RPSRPEQEQPRGRGCQTRNGVEEN	325
Small A3 A3B4	238	7 VEGGLSV / SPKWQEQ--EDEDEEYEQTPSPRRPSHGKHEDDEDEEDQPRPDHPQ ----- RPSRPEQEQPRGRGCQTRNGVEEN	321
Soybean A5A4B3	241	7 VEGGLSV / SPKWQEQQDEDEDEDEDEDEQIPSHPPRRPSHGKREQDEDEDEDEKPRPSRPSQ GKREQDQDQDEDEDEDEQPRKSREWRSKKTQPRRPRQEPREPRGECQTRNGVEEN	360
Large A4 A5A4B3	241	7 VEGGLSV / SPKWQEQQDEDEDEDEDEDEQIPSHPPRRPSHGKREQDEDEDEDEKPRPSRPSQ GKREQDQDQDEDEDEDEQPRKSREWRSKKTQPRRPRQEPREPRGECQTRNGVEEN	360
3			
4			
Soybean A3B4	326	ICTLKL HEVIARPSRADFYNPKA GR / STLNSLTLPALRQF QL SAQYVYL YRNG / YSPHNNL.NAN.SV / IYTRGGKGRVRYV NCQGNVFDGELRRGQLLVYPQNVYAEQGGEGLEYYVFK	445
Small A3 A3B4	322	ICTLKL HEVIARPSRADFYNPKA GR / STLNSLTLPALRQF QL SAQYVYL YRNG / YSPHNNL.NAN.SV / IYTRGGKGRVRYV NCQGNVFDGELRRGQLLVYPQNVYAEQGGEGLEYYVFK	441
Soybean A5A4B3	361	ICTLKL HEVIARPSRADFYNPKA GR / STLNSLTLPALRQF QL SAQYVYL YKNG / YSPHNNL.NAN.SV / IYTRGGKGRVRYV NCQGNVFDGELRRGQLLVYPQNVYAEQGGEGFEY / VFK	480
Large A4 A5A4B3	361	ICTLKL HEVIARPSRADFYNPKA GR / STLNSLTLPALRQF QL SAQYVYL YKNG / YSPHNNL.NAN.SV / IYTRGGKGRVRYV NCQGNVFDGELRRGQLLVYPQNVYAEQGGEGFEY / VFK	480
5			
Soybean A3B4	446	THHNAVSSY / KDVFERA / IPSEVLNSY NLGQSQVRLQKY QGNSGPZ / VNP-----	
Small A3 A3B4	442	THHNAVSSY / KDVFERA / IPSEVLNSY NLGQSQVRLQKY QGNSGPZ / VNP-----	
Soybean A5A4B3	481	THHNAVSSY / KDVFERA / IPSEVLNSY NLGQSQVRLQKY EGNWGPZ / VPESQGGSPRVKVA	
Large A4 A5A4B3	481	THHNAVSSY / KDVFERA / IPSEVLNSY NLGQSQVRLQKY EGNWGPZ / VPESQGGSPRVKVA	

Fig. 6. Alignment of sequences of A3B4 and A5A4B3. Bold bars indicate variable regions. Italics and underline indicate β -sheet and α -helix, respectively. Box indicates deleted or substituted amino acids in comparison with those of normal subunits.

要 約

390系統のツルマメの分析から、大豆にはないサブユニット種を持つ系統、すなわち、 α' のサイズの小さいもの (α' 小), A3のサイズの小さいもの (A3小), A4のサイズの大きいもの (A4大) を含む系統を見出した。 α' 小の7S, A3小およびA4大の11Sの溶解性, 乳化性, 熱安定性について解析したところ, 3種の溶解性, 乳化性と α' 小の7Sの熱安定性には, 普通系統のツルマメのものとほとんど差が見られなかった。しかし, A3小, A4大の11Sの熱安定性は普通系統の11Sのものと異なり, 変性開始温度が約4℃低いことが明らかになった。普通系統のものと比べて α' 小はエクステンション領域でアミノ酸が24残基欠損, A3小およびA4大では数残基欠損あるいは置換しており, サイズや熱安定性の差の原因となっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944.
- 2) Shirzadegan M, Christie P and Seemann JR (1991): An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nuc Acids Res*, **19**, 6055.
- 3) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- 4) Maruyama N, Fukuda T, Saka S, Inui N, Kotoh J, Miyagawa M, Hayashi M, Sawada M, Moriyama T and Utsumi S (2003): Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry*, **64**, 701-708.