

ダイズ由来味覚関連たん白質の探索および解析

井深章子*・舩江亜実・佐藤紗知

山形大学理学部物質生命化学科

Search and Analysis of Taste-related Proteins from Soybean

Akiko IBUKA*, Ami MOMIE and Sachi SATO

Department of Material and Biological Chemistry, Faculty of Science, Yamagata University,
Yamagata 990-8560

ABSTRACT

Miraculin is a taste-modifying protein that acts to convert sour stimuli to sweet perceptions. To date, several sweet proteins (thaumatin, monellin, mabinlin, pentadin, and brazzein) and two taste-modifying proteins (miraculin and neoculin) have been isolated and studied. Though most of them, including miraculin, are from tropical or semitropical plants, many miraculin-like proteins (MLPs) are known to exist in a wide range of agricultural plants, such as soybean, tobacco, and grape. In this study, a gene that encodes a miraculin-like protein from soybean (SoyMLP) was cloned. Its deduced amino acid sequence was 44% identical to that of miraculin. Subsequent construction of expression vectors resulted in the successful expression of recombinant SoyMLP both in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Recombinant SoyMLP secreted by *P. pastoris* was purified with cation-exchange liquid chromatography, and the purified protein was observed as a single band by Coomassie blue staining SDS-PAGE. The results of size-exclusion chromatography analysis indicated that SoyMLP existed as a monomer, while miraculin was reported to form a homodimer. Preliminary sensory tests showed that recombinant SoyMLP had no detectable taste-modifying activity. A cysteine residue was introduced to SoyMLP by site-directed mutagenesis, to construct dimeric SoyMLP with taste-modifying activity. But the result of size-exclusion chromatography indicated that the mutant SoyMLP (SoyMLP-Cin) still existed as monomer. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 37-41, 2014.

Key words : miraculin, taste-modifying activity, miraculin-like protein, trypsin inhibitor

*〒990-8560 山形市小白川町1-4-12

人が感じる味のうち、甘味は嗜好される味の代表格である。しかし、スクロースなどの糖質の過剰摂取は肥満、糖尿病、虫歯といった疾病の原因となる。そのため糖質以外の低カロリー甘味料の探索・開発が行われており、甘味を有するたん白質（甘味たん白質）もその候補の1つである。たん白質は一般に無味であるが、甘味たん白質は複数発見されており、一部は既に甘味料として実用化が認められている^{1,2)}。また、甘味たん白質に加え、味覚修飾たん白質（酸味を甘味に変換する活性を有するたん白質）も同定されている³⁾。食品では酸味と甘味の両方を付与することも多く、これらも甘味料としての応用が期待される。

味覚修飾活性たん白質はミラクリンとネオクリンの2種類が知られており、特にミラクリンは長期間にわたって研究されている。現在までに複数の研究グループがミラクリンの大量生産を試みており、レタス・トマトなどの植物、大腸菌での発現が報告されている^{4~6)}。大腸菌でのミラクリンの大量発現系は、分子レベルでのミラクリンの味覚修飾機構の解析につながるものが期待されるが、大腸菌で生産したミラクリン分子は安定性が低いと報告されている。

ミラクリンの一次構造（アミノ酸配列）はKunitz型トリプシンインヒビター（たん白質分解酵素トリプシンを阻害するたん白質）と高い相同性を有する⁷⁾。トリプシンインヒビターの性質・構造は詳細に研究されているが、味覚との関連は着目されていない。また、ミラクリンと相同性を示す“ミラクリン類似たん白質”と呼ばれるたん白質も数多く知られており、これらもKunitz型トリプシンインヒビターのスーパーファミリーに分類される⁷⁾。興味深いことに、既知の甘味関連たん白質の殆どは熱帯～亜熱帯植物に由来するが、ミラクリン類似たん白質は日本で栽培されるダイズ等の植物に大量に含まれており、ダイズ中において何らかの味を呈している可能性も考えられる。本研究では、ダイズに含まれるミラクリン類似たん白質を対象として、このたん白質のクローニングと組み換えたん白質発現系の構築を行い、味覚修飾活性の確認を行った。

方 法

ミラクリン類似たん白質遺伝子のクローニング

平成25年7月初旬に山形県農業総合研究センターよりダイズの葉および実、山形県園芸試験場より3品種のブドウの葉および実の供与を受けた。RNeasy plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて各試料からtotal RNAを抽出し、First-strand cDNA Synthesis Kit (GEヘル

ルスケア) を用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、データベースに登録された配列情報をもとにPCR法により目的遺伝子を増幅した。

大腸菌を宿主とした発現系構築

大腸菌では、発現ベクターとしてpET28a (Novagen) とpColdI (タカラバイオ) の2種類を用いた。pET28aを用いた発現系構築は以下のように行った。クローニングで得られた遺伝子の成熟たん白質N末端に相当する部分に制限酵素NdeI、終始コドン後にBamHI切断部位を導入し、pET28aのマルチクローニングサイトに挿入してpET28a-SoyMLPΔssを得た。このプラスミドを大腸菌株BL21 (DE3) pLysSに導入し、目的たん白質の発現を試みた。pColdIを用いた発現系構築も同様に行い、作成した発現プラスミドpColdI-SoyMLPΔssを大腸菌株BL21に導入した。

酵母を宿主とした発現系構築

クローニングした遺伝子を酵母の発現ベクターpPICZα C (Life Technologies) に挿入し、分泌たん白質としての発現系を構築した。発現ベクター構築には大腸菌株DH5aを用い、酵母*Pichia pastoris* competent cell (Invitrogen) を用いて形質転換を行った。

組み換えたん白質の精製

酵母の発現系で培地中に分泌されたSoyMLPは以下の方法で精製した。培養液中の菌体を遠心により除去し、得られた培地に80%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加して目的たん白質を沈殿させた。遠心により回収した沈殿に50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えて溶解し、PD-10カラム (GEヘルスケア) を用いて脱塩した。脱塩した試料は、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した陽イオン交換レジン (CM-TOYOPEARL 650M) に添加し、0-500 mM NaClの直線濃度勾配で溶出した。たん白質の分子量は、Superdex 75 5/150 GL (GEヘルスケア) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した。

味覚修飾活性の予備的官能検査

官能検査には、上記の方法で精製したのち約1 mg/mLに濃縮したSoyMLPを使用した。5名のパネラーによりミラクリンの官能検査と同様の方法で実施した⁶⁾。

トリプシン阻害活性の測定

測定に用いるブタ膵臓由来トリプシン、ダイズ由来トリプシンインヒビターはナカライテスク、基質

*N*α-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) はシグマアルドリッチより購入し、既報に従って測定を行った⁸⁾。

ミラクリン型へのアミノ酸残基置換

PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用い、SoyMLPの一部のアミノ酸残基をミラクリン型に置換した変異体を作製した。変異型SoyMLPの発現および精製は、野生型SoyMLPと同じ方法で行った。

結果と考察

ダイズの葉・実からは十分量のtotal RNAが得られ、cDNAの合成および目的遺伝子の増幅に成功した。クローニングされた遺伝子の塩基配列より、ダイズ由来ミラクリン類似たん白質 (Soybean miraculin-like protein, SoyMLP) の全長 (シグナル配列を含む) は209アミノ酸、分子量は約23 kDaと推定された。このアミノ酸配列は、データベースに既に登録されている機能が同定されていないたん白質 (UniProt登録番号: C6TLR5) と一致した。

この遺伝子をシグナル配列解析プログラムSignalIPで解析した結果、N末端側26アミノ酸残基はシグナル配列であると推定された。成熟SoyMLPアミノ酸配列はミラクリンや他の種由来のMLPと高い相同性を示し、ミラクリンとは44%のアミノ酸が一致した (Fig. 1)。

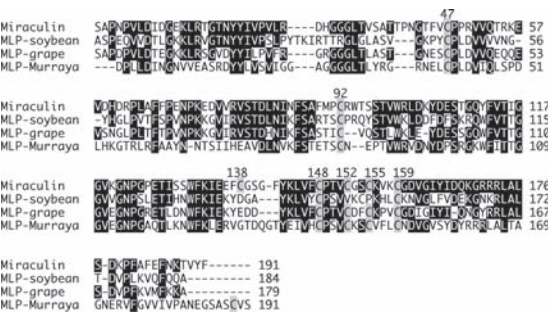


Fig. 1. Alignment of amino acid sequences between miraculin and several MLPs. From the top, amino acid sequence of miraculin (UniProt accession number: C5NU63), SoyMLP cloned in this study, MLP from grape (A5AXN3), MLP from *Murraya koenigii* (D2YW43, PDB accession number: 3IIR). ClustalW ver.2.1 was used for this alignment. Cystein residues are shown in grey, and residue numbers are indicated for the cysteine residues of miraculin that form disulfide bonds.

次に、大腸菌・酵母を宿主とした成熟SoyMLPの発現系構築を行った。大腸菌の発現プラスミドベクター pET28aに遺伝子を挿入したpET28a-SoyMLPΔssで大腸菌株BL21 (DE3) pLysSを形質転換し発現を確認したところ、発現したたん白質は主に不溶性画分に確認された。培養温度やIPTG濃度を変えても結果は同じであった (データは省略)。大腸菌コールドショック遺伝子cspAのプロモータ配列を利用したpColdIを用い、このベクターにSoyMLP遺伝子を挿入した発現ベクター pColdI-SoyMLPΔssで大腸菌株BL21を形質転換したところ、目的たん白質に相当するバンドが可溶性画分に確認された (Fig. 2A)。酵母を宿主とした発現系においても、目的たん白質の培地中への分泌が確認された (Fig. 2B)。以下の精製および分析には酵母で産生したSoyMLPを用いた。

酵母の発現系で培地中に分泌されたSoyMLPは、硫酸アンモニウム沈殿および陽イオン交換カラムを用いた液体クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGEで単一バンドとして確認された (Fig. 2B)。200 mLの液体培養から約5 mgの精製標品が得られた。

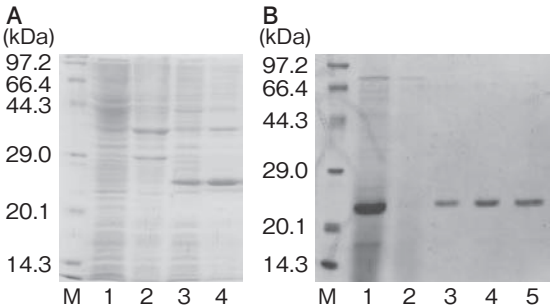


Fig. 2. Expression and purification of recombinant SoyMLP. Panel A, expression of SoMLP with pColdI vector in *E. coli* BL21. Lane M: Molecular weight marker, lane 1: soluble fraction of *E. coli* BL21 (without expression vector), lane 2: insoluble fraction of *E. coli* BL21, lane 3: soluble fraction of BL21 that expresses SoyMLP, lane 4: insoluble fraction of BL21 expressing SoyMLP. Panel B, Expression and purification of SoyMLP with yeast *Pichia pastoris*. Lane M: molecular weight marker, lane 1: medium fraction before purification, lane 2: flow-through of cation-exchange column, lane 3-5: fractions containing SoyMLP eluted from cation-exchange column.

精製したSoyMLPを使って予備実験的な官能検査により味覚修飾活性の有無を調べたが、味覚修飾活性は測定されなかった。また、SoyMLPはトリプシンインヒビターたん白質と一次構造で相同性を示すことから、SoyMLPのトリプシン阻害活性を測定した。その結果、市販のトリプシンインヒビターが阻害活性を示す濃度の10倍以上のモル濃度においても、SoyMLPはトリプシン阻害活性を示さなかった（データは省略）。

ミラクリンの味覚修飾活性には二量体形成が重要であると報告されている⁶⁾。ミラクリンの二量体形成において、サブユニット間でジスルフィド結合を形成するシステイン残基Cys138は、SoyMLPを含むミラクリン類似たん白質では保存されていない（Fig. 1）。そこで、この位置にシステイン残基を導入したSoyMLP変異体（SoyMLP-Cin）を作製し、発現・精製を試みた。精製は野生型SoyMLPと同様の方法で行った。精製たん白質はゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量を解析した。二量体を形成した場合は約11.1 mL、単量体の場合は12.5 mLにピークが現れると推定されたが、SoyMLP-Cinの溶出位置は12.5 mL付近で野生型SoyMLPに近く、二量体は形成されていないと判断された（Fig. 3）。

本研究ではダイズ由来ミラクリン類似たん白質SoyMLPの味覚修飾活性の有無を調べることを目的として、SoyMLP遺伝子のクローニング、大量発現系の

構築、精製方法の確立を行った。精製SoyMLPで味覚修飾活性が確認できなかったため、一部のアミノ酸をミラクリン型に置換することでSoyMLPの二量体化・味覚修飾活性の付与を試みたが、成功には至らなかった。SoyMLPとミラクリンのアミノ酸配列の相同性は44%であり、部位特異的なアミノ酸数残基の置換でSoyMLPにミラクリンの性質を付与することは難しいと考えられる。今後は、立体構造モデリングの結果も参考にしながら、ミラクリンとSoyMLPのキメラたん白質の作成を行い、ミラクリンの味覚修飾活性に重要なアミノ酸残基・領域を明らかにしたいと考えている。

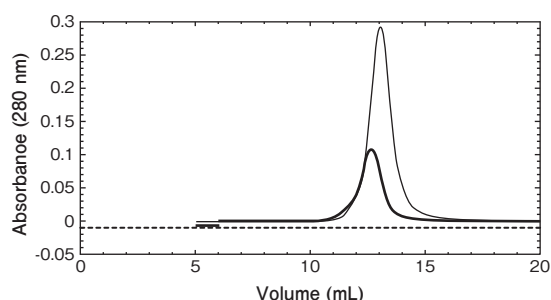


Fig. 3. Size-exclusion chromatography with Superdex 75 5/150 GL column. Thin line indicates the elution of wild-type SoyMLP, and thick line shows the elution of SoyMLP-Cin.

要 約

本研究ではダイズ由来ミラクリン類似たん白質SoyMLPのクローニングおよび組み換えたん白質発現・精製に成功した。大腸菌を宿主とした場合、pET発現系ではたん白質が不溶性画分に確認され、培地や培養温度等の条件を変えてもたん白質の可溶化は見られなかった。一方、pCold発現系ではたん白質が可溶性画分に確認され、pColdベクターのほうがSoyMLPの発現に適していることが明らかになった。このたん白質を精製し、味覚修飾活性とトリプシン阻害活性を測定したが、どちらも確認できなかった。また、SoyMLPに味覚修飾活性を付与することを目的として、システイン残基導入による二量体化を試みたが、システイン残基付近の部位特異的なアミノ酸置換では二量体化は起こらないことが判明した。

文 献

- 1) Behrens M, Meyerhof W, Hellfritsch C and Hofmann T (2011): Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 2220-2242.
- 2) Faus I (2000): Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl microbio biotechnol*, **53**, 145-151.
- 3) Kant R (2005): Sweet proteins-potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J*, **4**: 5.
- 4) Hirai T, Fukukawa G, Kakuta H, Fukuda N and Ezura H (2010): Production of recombinant miraculin using transgenic tomatoes in a closed cultivation system. *J Agric Food Chem*, **58**, 6096-6101.
- 5) Hirai T, Shohael AM, Kim YW, Yano M and Ezura H (2011): Ubiquitin promoter-terminator cassette promotes genetically stable expression of the taste-modifying protein miraculin in transgenic lettuce. *Plant Cell Rep*, **30**, 2255-2265.
- 6) Matsuyama T, Satoh M, Nakata R, Aoyama T and Inoue H (2009): Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*. *J Biochem*, **145**, 445-450.
- 7) Selvakumar P, Gahloth D, Tomar PP, Sharma N and Sharma AK (2011): Molecular evolution of miraculin-like proteins in soybean Kunitz superfamily. *J Mol Evol*, **73**, 369-379.
- 8) Zhao R, Dai H, Qiu S, Li T, He Y, Ma Y, Chen Z, Wu Y, Li W and Cao Z (2011): SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PloS one*, **6** e27548.