

50

助成番号 0050

大豆タンパク質の溶解性および加工特性に対する塩の効果の精密解析

助成研究者：内海 成 (京都大学 食糧科学研究所)
 共同研究者：安達 基泰 (京都大学 食糧科学研究所)
 丸山 伸之 (京都大学 食糧科学研究所)

大豆タンパク質は 7S グロブリン (7S) と 11S グロブリン (11S) を主要成分としているが、両成分の溶解性、熱安定性や加工特性は塩濃度の影響を強く受けることが知られている。7S は α 、 α' 、 β の三種、11S グロブリンはグループ I (G1、G2、G3) とグループ II (G4、G5) の五種より構成されている。したがって、大豆タンパク質の溶解性や加工特性に対する塩の効果を精密に解析するためには、各構成サブユニットについて解析する必要がある。しかし、大豆種子中には、構成サブユニットがランダムに組み合わさった種々の分子種が存在しており、単一サブユニット分子種を単離することは困難である。我々は、限定的なサブユニット組成の 7S や 11S を含む変異大豆を利用することによって、糖タンパク質である 7S の単一サブユニット分子種 (ホモ三量体： $\alpha 3$ (α の三量体であり、以下同様に名付けた)、 $\alpha'3$ 、 $\beta 3$) と単一サブユニット組成の分子種 (ヘテロ三量体： $\alpha 2\beta 1$ (二個の α と一個の β より成る三量体であり、以下同様に名付けた)、 $\alpha 1\beta 2$ 、 $\alpha'2\beta 1$ 、 $\alpha'1\beta 2$) を、11S のグループ I のみより成る分子種群 (グループ I) とグループ II のみより成る分子種群 (グループ II) を調製した。また、cDNA の大腸菌発現系を利用して 7S の非糖鎖付加型の $\beta 3$ および 11S のグループ I に属する G1 サブユニットのプロ型の (G1) 3 を調製した。そして、両グロブリンの溶解性と 11S の熱安定性を分子種間で比較した。

7S の各ホモ三量体は、 $\mu=0.5$ においては全ての pH で可溶性であったが、 $\mu=0.08$ では、 $\beta 3$ は $\alpha 3$ と $\alpha'3$ に比べて不溶性範囲が極めて広がった。ヘテロ三量体はいずれも $\alpha 3$ や $\alpha'3$ と類似していた。これらのことより、7S の溶解性には、 α や α' に存在し、 β に存在していないエクステンション領域が大きく寄与することが判明した。一方、11S は 7S とは全く異なる挙動を示し、 $\mu=0.5$ では酸性側で溶解性が低下すること、特にグループ II の低下が顕著であること、 $\mu=0.08$ では pH4-7.5 の範囲で等電点沈殿するが、pH 範囲がグループで異なることが判明した。また、組み換え型 $\beta 3$ と (G1) 3 は構造的に多くの共通性を持つが、低イオン強度下における溶解性は全く異なっていた。我々が解明した 11S の G1 と G5そして 7S の β の立体構造から明らかになった疎水性領域や荷電残基の分布の仕方から、これらの違いを考察した。

11S の熱安定性は、イオン強度 0.5 においてはサブユニットのグループによらずほぼ一定であった。しかし、イオン強度が、0.1、0.01 と低下すると熱変性温度は大きく低下した。その程度は、グループ I の方が顕著であり、11S は両グループの中間的な値を示し、7S ではヘテロ分子の熱安定性は熱安定性の低いサブユニットによって決まるのとは異なっていた。このような差には、サブユニット間相互作用の質が関与していると考えられた。

15

助成番号 0050

大豆タンパク質の溶解性および加工特性に対する塩の効果の精密解析

助成研究者：内海 成 (京都大学 食糧科学研究所)

共同研究者：安達 基泰 (京都大学 食糧科学研究所)

丸山 伸之 (京都大学 食糧科学研究所)

1. 研究目的

大豆タンパク質は植物性タンパク質の中では優れた加工特性（種々の加工食品の製造を可能とする性質）を持っている。しかも、人の血清コレステロール値を低下させるという健康維持・増進機能も持っており¹⁾、食源性疾患患者数の増大と高齢化社会の到来、そして人口増大と環境悪化に伴う食糧不足という21世紀の複雑な食糧問題に対処するうえで重要な食品素材である。大豆タンパク質は7S グロブリンと11S グロブリンを主要成分としている²⁾。グロブリンは水に不溶性であり、その溶解に塩の存在を必要とする。また、タンパク質の熱安定性は塩濃度によって大きく変化する。すなわち塩は、大豆タンパク質の溶解性、熱安定性、ひいては加工特性に大きな影響を及ぼす。これらのことは、7S および 11S グロブリンに関して確認されている。しかし、両グロブリンとも複数のサブユニットから構成されており、各サブユニットの遺伝子の塩基配列から演繹されるアミノ酸配列から推定される等電点や疎水性度が互いに異なっていることが知られている。したがって、大豆タンパク質の溶解性、熱安定性や加工特性に対する塩の効果を精密に理解するためには、各構成サブユニットについて解析する必要がある。

7S グロブリンは三量体構造を持ち、 α 、 α' 、 β の三種のサブユニットから構成されている²⁾。各サブユニットは糖タンパク質である。 β は、三種のサブユニット間で一次構造の相同性の高いコア領域のみから構成されているが、 α と α' はN末端側に、負荷電残基に富み強い親水性の性質を持つエクステンション領域を持っている²⁾。一方、11S グロブリンは六量体構造を持ち、G1、G2、G3、G4、G5の五種のサブユニットから構成されている²⁾。各サブユニットは一次構造の相同性からグループ I (G1、G2、G3) とグループ II (G4、G5) に分類される。グループ I のサブユニットよりもグループ II のもののほうが等電点が低いという特徴がある。大豆種子中には、これらのタンパク質は、各サブユニットがランダムに組み合わさった種々の分子種として存在している。したがって、各分子種を単離して特性を解析することが望まれるが、あまりに多くの分子種が存在するために困難である。

微生物発現系を利用すると、単一サブユニットからなるホモの分子種を容易に調製することができる。我々は、大腸菌発現系を利用して、7S グロブリンの各サブユニットの

非糖鎖付加型ホモ三量体を調製し、それらの溶解性や熱安定性を調べた³⁾。その結果、各ホモ三量体の溶解性や熱安定性の塩濃度依存性を明らかにするとともに、糖鎖は溶解性に影響するが、熱安定性には影響しないことを示唆した。

最近、7S グロブリンに関して α 欠失、 α' 欠失、 $\alpha\alpha'$ 欠失、11S グロブリンに関してグループ I 欠失、グループ II 欠失大豆が農水省の研究者によって作出されている^{4,6)}。これらを利用すると、7S グロブリンの天然型のホモ三量体や単一サブユニット組成のヘテロ三量体、そして限定的なサブユニット組成を持つ 11S グロブリンを容易に調製できる。そこで、本研究では、そのような分子種を調製し、溶解性や熱安定性に対する塩の効果を解析した。さらに、等電点、二次、三次、四次構造が互いに類似している β と G1 の組み換え型ホモ三量体の溶解性を比較した。

2. 研究方法

2.1 7S グロブリンのホモ三量体および単一サブユニット組成ヘテロ三量体の調製

α 欠失大豆より、 α' と β より成る二種のヘテロ三量体 ($\alpha'2\beta1$ 、二個の α' と一個の β より成る分子種であり、以下同様に名付けた; $\alpha'1\beta2$) と α' のホモ三量体 ($\alpha'3$) を、 α' 欠失大豆より $\alpha3$ 、 $\alpha2\beta1$ 、 $\alpha1\beta2$ を硫酸分画とモノQカラムクロマトグラフィーによって、 $\alpha\alpha'$ 欠失大豆より $\beta3$ を硫酸分画によって、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にほぼ均一に精製した。

2.2 11S グロブリンの限定的なサブユニット組成を持つ分子種の調製

グループ I 欠失大豆より、グループ II のみから成る 11S グロブリンを、グループ II 欠失大豆より、グループ I のみから成る 11S グロブリンを冷沈と硫酸分画によって、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にほぼ均一に精製した。

2.3 α 、 α' 、 β および G1 の組み換え型ホモ三量体の調製

既に構築していた大腸菌発現系を利用して、 $\alpha3$ 、 $\alpha'3$ 、 $\beta3$ および(G1) 3 を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的にほぼ均一に精製した^{7,8)}。

2.4 溶解性

0.5 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 7.6 に溶解した各タンパク質標品に種々の緩衝液を添加することによって、イオン強度を 7S と 11S グロブリンの場合は 0.5 と 0.08 に、そして pH を 3-9 あるいは 2-9 に調製し、4°C で 20 時間放置した。17,000g で 15 分間遠心分離することによって、生じた沈殿を除去した。得た上清のタンパク質を定量し、用いたタンパク質量に対する割合から溶解度を算出した。組み換え型 $\beta3$ および (G1) 3 の場合、イオン強度 0.5 および 0.08 における pH 依存性、そして pH 7.6 におけるイオン強度

依存性を同様に測定した。

2.5 熱安定性

0.4 M NaCl を含む 35 mM リン酸緩衝液、pH 7.6 (イオン強度=0.5)、35 mM リン酸緩衝液、pH 7.6 (イオン強度=0.1) および 3.5 mM リン酸緩衝液、pH 7.6 (イオン強度=0.01) に溶解した各 11S グロブリン標品の示差走査熱量測定をマイクロキャリ社 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。

3. 結果と考察

3.1 溶解性に対する塩の効果

3.1.1 7S グロブリン

7S グロブリンの各種均一サブユニット組成分子種の溶解性の pH 依存性に対する塩の効果調べた。イオン強度 0.5 においては、全ての分子種が調べた pH 範囲で可溶性であった。イオン強度 0.08 においては、 $\beta 3$ は pH4.8–8.5 と広範囲で不溶性であったのに対し、 $\alpha 3$ は pH4.8–5.3、 $\alpha'3$ は pH4.8–5.5 の狭い範囲でのみ不溶性であった (Fig. 1)。アミノ酸組成に基づく等電点は、 α は 4.73、 α' は 5.07、 β は 5.59 であり、あまり大差はない。したがって、イオン強度 0.08 における各サブユニットの溶解性の pH 依存性の挙動の違いは、 α と α' が β よりもグルタミン酸に富むことに基づいていると考えられる。一方、糖鎖を持たない組み換え型のもの³⁾と比較すると、いずれのホモ三量体においても、糖鎖を持つ天然型の方が不溶性の pH 範囲が狭かった。すなわち、糖鎖はイオン強度 0.08 における溶解性を増大させることが明らかとなった。

ヘテロ三量体の溶解性も同様に調べた。ホモ分子種と同様に、イオン強度 0.5 においては全てが可溶性であり、イオン強度 0.08 においては等電点沈殿を示した。イオン強度 0.08 における挙動をホモ分子種のものと比較するために、結果を同時に示した (Fig. 2)。 $\alpha 2\beta 1$ と $\alpha' 2\beta 1$ は、各々 $\alpha 3$ と $\alpha' 3$ に非常に近いパターンを示した。これらよりも、 $\alpha 1\beta 2$ と $\alpha' 1\beta 2$ の不溶性の範囲は少し酸性側に広がったが、それでも、 $\beta 3$ よりも、 $\alpha 3$ や $\alpha' 3$ に近いパターンであった。したがって、7S グロブリンの低イオン強度下における溶解性に対して、エクステンション領域を持つ α や α' の存在が大きく寄与することが明らかとなった。

3.1.2 11S グロブリン

11S グロブリンの、グループ I のみより成る、グループ II のみより成る、そして両グループを含む分子種について、その溶解性の pH 依存性に対する塩の効果調べた (Fig. 3)。イオン強度 0.5 においては、グループ I とグループ II の両方を含む分子種 (11S) とグループ I は pH4.5 以下において溶解性が徐々に低下し、pH2 においては約 20%であった。グ

グループ II は全く異なった挙動を示し、pH5.4 以下で大きく溶解性が低下し、pH3-4 で極小であった。一方、イオン強度 0.08 においては、いずれの標品も等電点沈殿の挙動を示し、pH4-7.5 の間において、グループ II は酸性側、グループ I は塩基性側にずれ、11S は両者の中間的挙動を示した。すなわち、両グループが共存すると、イオン強度 0.5 では溶解性の高いグループの性質に支配され、イオン強度 0.08 では平均的になる。荷電を持つアミノ酸の数からすると、グループ I のサブユニットの中にグループ II のサブユニットよりも酸性度が高いものがある。また、11S の各サブユニットは負荷電残基と親水性残基に富む超可変領域を持っているが、グループ II の超可変領域の方が大きく、より負荷電残基に富んでいる。我々は、グループ I の(G1)3 とグループ II の(G5)3 の立体構造を決定することに成功している^{9,10)}。そこで、これらの立体構造に基づいて分子表面の疎水性残基の分布の仕方を比較した。分子表面に露出する疎水性領域は G5 の方が G1 より多い (Fig. 4)。したがって、グループ I と II の溶解性の違いには、このような分子表面の荷電残基の露出度と分布の仕方、そして疎水性領域の露出の仕方が関わっていると考えられる。

3.1.3 組み換え型β3 および (G1)3

7S グロブリンのうち、エクステンション領域を持たないβは、11S グロブリンのプロ型 (A 鎖と B 鎖にプロセシングされていないもの) と多くの類似性を持つ。例えば、一次構造の類似性は 15%ほどであるが、二次、三次、四次構造は非常に類似している。また、アミノ酸組成から計算した等電点も近く、βは 5.59、G1 は 5.72 であり、その摘定曲線も極似している。しかし、大豆から調製したβ3 と 11S グロブリンは全く異なる挙動を示した (Fig. 1, 3)。この差異の構造的要因にアプローチするために、組み換え型 β3 と(G1)3 を調製し、その溶解性を比較した。

イオン強度 0.5 においては、両者とも、調べた pH 3.8-9.5 の範囲で可溶性であったが、イオン強度 0.08 においては、β3 は pH 4.7-10 において不溶性であったのに対し、(G1)3 は pH 5.8-6.8 においてのみ不溶性であった (Fig. 5)。また、pH 7.6 においては、(G1)3 はイオン強度 0.03-0.5 において可溶性であったのに対し、β3 は、イオン強度 0.23 以下では不溶性であった (Fig. 6)。

このような挙動の違いには、分子表面の疎水性残基や荷電残基の分布の仕方が関わっている可能性がある。我々は、β3 の立体構造を決定することにも成功している¹¹⁾。両タンパク質とも、三量体の片面で、疎水性度がより高くなっているが、これは(G1)3 において顕著である (Fig. 7)。しかし、(G1)3 においては、この面に、親水性残基に富む超可変領域が位置しており、疎水性相互作用による会合を阻害する可能性がある。また、反対面の疎水性は極めて低い。一方、β3 には、そのような大きな可変領域は存在しない。しかも、β3 の疎水性の低い面は、全体的な疎水性は低いが、大きな疎水性領域を持っている。このために、β3 の方が(G1)3 よりも疎水性相互作用によるランダムな会合をし易いのかも

知れない。このようなことが、 $\beta 3$ と(G1)3 の溶解性の違いの一因である可能性がある。

3.2 熱安定性

熱変性温度を示差走査熱量計によって測定することにより、タンパク質標品の熱安定性を評価した。本研究に先立って、7S グロブリンの組み換え型ホモ分子種に関して熱変性温度を種々の条件で測定し、大豆から調製した不均質な分子種と比較した結果、糖鎖は熱変性温度に影響しないことが判明していた⁹⁾ので、本研究では7S グロブリンに関しては測定しなかった。

11S グロブリンの、グループ I のみから成る分子種(グループ I)、グループ II のみから成る分子種(グループ II)、そしてグループ I とグループ II の両方を含む分子種(11S)の熱変性温度をイオン強度 0.5、0.1 および 0.01 で測定した(Fig. 8)。各分子種ともイオン強度 0.5 において非常に安定であり、変性温度は 92.9–95.0°C であった。ところが、イオン強度が低くなればなるほど、各分子種の変性温度が低下した。しかし、その程度は分子種によって異なっていた。グループ I の低下が最も顕著で、グループ II の低下は少なかった。また、11S はグループ I と II の中間的な挙動を示した。

グループ I と II から成る 11S が、グループ I と II の中間の挙動を示すということは、各グループの性質が平均化されることを意味している。7S グロブリンの場合、各サブユニットを含む分子種の特性は、基本的に、熱変性の低いサブユニットの特性に従う、という現象と対称的である。すなわち、7S グロブリンでは熱安定性の低いサブユニットが変性するとサブユニット間相互作用が壊れると考えられる。一方、11S グロブリンではサブユニット間相互作用によって、熱安定性の低いものは少し安定化すると考えられる。したがって、7S と 11S グロブリンは、非常に類似した立体構造を持つが、サブユニット間相互作用の質が互いに異なっていると考えられる。

4. 今後の課題

7S および 11S グロブリンの溶解性と熱安定性に対する各構成サブユニットの寄与が、等価でないことが明確となった。また、7S と 11S グロブリンは立体構造が極似しているが、熱安定性と密接に関係するサブユニット間相互作用の質が互いに異なっていることが明らかとなった。また、分子構造に基づいて 7S と 11S グロブリンの溶解性の違いを説明できたが、このような面からの考察を深化できる解析が求められる。

5. 引用文献

1. Kito, M., Moriyama, T., Kimura, Y. and Kambara, H. (1993) Changes in plasma lipid levels in young healthy volunteers by adding an extruder-cooked soy protein to conventional meals. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 354-355.

2. Utsumi, S., Matsumura, Y. and Mori, T. (1997) Structure-function relationships of soy proteins. In *Food Proteins and their Applications*, ed. by Damodaran, S. and Paraf, A., Dekker, pp. 257-291.
3. Maruyama, N., Sato, R., Wada, Y., Matsumura, Y., Goto, H., Okuda, E., Nakagawa, S. and Utsumi, S. (1999) Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5278-5284.
4. Takahashi, K., Banba, H., Kikuchi, A., Ito, M. and Nakamura, S. (1994) An induced mutant line lacking the α subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Breed. Sci.*, **44**, 65-66.
5. Takahashi, K., Mizuno, Y., Yumoto, S., Kitamura, K. and Nakamura, S. (1996) Inheritance of the α subunit deficiency of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) line induced by γ -ray irradiation. *Breed. Sci.*, **46**, 251-255.
6. 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.
7. Maruyama, N., Katsube, T., Wada, Y., Oh, M.H., Barba de la Rosa, A.P., Okuda, E., Nakagawa, S. and Utsumi, S. (1998) The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur. J. Biochem.*, **258**, 854-862.
8. Utsumi, S., Gidamis, A.B., Mikami, B. and Kito, M. (1993) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **233**, 177-178.
9. Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A.B., Mikami, B. and Utsumi, S. (2001) Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J. Mol. Biol.*, **305**, 291-305.
10. 増田太郎、安達基泰、三上文三、内海 成 (1999) ダイズプログリシニン A3B4 のX線結晶構造解析. 日本農芸化学会関西支部第408回講演会講演要旨集、p. 7.
11. 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 β -conglycinin β homotrimers. *Eur. J. Biochem.*, **268**, in press.

Precise investigation of salt effect on solubility and functional properties of soybean proteins

Shigeru Utsumi, Motoyasu Adachi and Nobuyuki Maruyama

Kyoto University, Research Institute for Food Science*

(* Graduate School of Agriculture from 2001 April)

Summary

Soybean proteins consist of two major components, 7S and 11S globulins. It is known that solubility, thermal stability and functional properties of both proteins are strongly affected by salt concentration. 7S and 11S globulins are composed of three subunits α , α' and β , and five subunits of group I (G1, G2, G3) and group II (G4, G5), respectively. Investigation of the salt effect on solubility, thermal stability and functional properties of each constituent subunit of these globulins is desired. It is almost impossible, however, to isolate molecular species with a single subunit composition from the normal soybean cultivars, since they contain many molecular species with random subunit compositions. We isolated 7S molecular species with a single subunit composition (homotrimer: α_3 , α'_3 , β_3 ; heterotrimer: $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha'_2\beta_1$, $\alpha'_1\beta_2$) and 11S molecular species composed of only subunits belonging to group I or II from mutant soybean cultivars lacking one or some subunits of them.

All homotrimers of 7S globulin exhibited isoelectric precipitation at $\mu=0.08$, although the insoluble pH ranges of α_3 and α'_3 were much narrower than that of β_3 . All heterotrimers examined here exhibited the phenomena similar to that of α_3 or α'_3 , indicating that the extension regions which exist in α and α' contribute profoundly to the solubility of 7S globulin. 11S species, especially group II, were insoluble at acidic pH at $\mu=0.5$ in contrast to 7S species which were soluble at any pH examined at $\mu=0.5$. At $\mu=0.08$ all species exhibited isoelectric precipitation, but the pH ranges are different between species. We discussed the reason why each species exhibits different properties, based on the distribution of hydrophobic regions and charged amino acids on their molecular surfaces.

Thermal stabilities of 11S species were almost constant at $\mu=0.5$ in spite of subunit groups, but they decreased dramatically with the decrease of ionic strength ($0.5 \rightarrow 0.1 \rightarrow 0.01$). The extent of the decrease of thermal stability group I species was bigger than that of group II species, and that of 11S containing both groups were intermediate of groups I and II, although the thermal stability of 7S heterotrimers was determined by the subunit with lower thermal stability. It was suggested that the quality of subunit interaction is different between 7S and 11S globulins.