

種子タンパク質の溶解性に対する塩の効果の精密解析

内海 成、安達基泰、丸山伸之
京都大学大学院農学研究科

多くの種子は貯蔵タンパク質として7Sおよび11Sグロブリンを主要成分としている。各グロブリンは、植物種間でアミノ酸配列の類似性を示すが、溶解性は画一的ではない。種子貯蔵タンパク質を食品利用するうえで、溶解性は基本となる性質である。したがって、種々の種子の7Sグロブリンと11Sグロブリンについて溶解性に対する塩の効果を精密に解析することが望まれる。そこで、マングビーン7Sグロブリン、ナタネ11Sグロブリン、ダイズ11Sグロブリンについて大腸菌発現系を活用してイオン強度0.5および0.08における溶解性のpH依存性を精密に解析した。

マングビーン7Sグロブリンの8SAサブユニットを大腸菌で発現させ、調製した野性型7Sグロブリンの溶解性を野性型ダイズ7Sグロブリンのものと比較した。8SAサブユニットは、ダイズ7Sグロブリンの β サブユニットタイプであり、アミノ酸配列に66%の同一性があるが、イオン強度0.08における溶解性は全く異なっていた。すなわち、マングビーンのものでは中性近辺で可溶性であったが、ダイズのものでは不溶性であった。この違いは、アミノ酸組成では説明できないが、両タンパク質の立体構造から、荷電アミノ酸の分布の違いによって説明できることを示した。

一般的に、11Sグロブリンには5ヶ所の可変領域がある。N末端側から数えて4番目の第IV可変領域には負電荷を持つアミノ酸が多数存在している。また、その長さがサブユニットによって異なり、A1aB1bのものは42アミノ酸より成るが、A3B4のものは70アミノ酸より成る。一方、ダイズ7Sグロブリンの α と α' サブユニットは β が持たないエクステンション領域をN末端部に持っており、 α' のものは142アミノ酸より成り、負電荷アミノ酸を豊富に含んでいる。そこで、ナタネ11SグロブリンのBCN1サブユニットおよびダイズ11SグロブリンのA1aB1bサブユニットの野性型に加えて、A1aB1bあるいはA3B4の第IV可変領域、あるいは α' のエクステンション領域を可変領域あるいはC末端に挿入、付加あるいは置換した種々の変異型を調製することによって解析した。その結果、ダイズ11Sグロブリンとナタネ11Sグロブリンはイオン強度0.5において全く異なる挙動を示すが、各変異型は野性型と同じ挙動を示すこと、イオン強度0.08においては、両グロブリンは比較的類似した挙動を示すこと、そして、各変異型の溶解性は、アミノ酸組成の影響を受けるが、荷電アミノ酸に富む配列が挿入、付加あるいは置換された位置の影響も受けることを見出した。

種子貯蔵タンパク質の溶解性に対する塩の効果には、アミノ酸組成ばかりでなく、分子表面における荷電アミノ酸の分布の仕方も大きく影響することが明らかとなった。今後、各タンパク質の立体構造の解明が望まれる。

15

助成番号 0246

種子タンパク質の溶解性に対する塩の効果の精密解析

内海 成（京都大学大学院農学研究科）

丸山伸之（京都大学大学院農学研究科）

安達基泰（京都大学大学院農学研究科）

1. 研究目的

Carroll と Hamilton は多くの種子タンパク質がヒトの血清コレステロール値低下能を持つことを報告している¹⁾。したがって、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 世紀における複雑な食糧問題を解決するために、種子タンパク質の高度利用化が望まれる。ダイズタンパク質は豆科種子タンパク質の中では最も広く利用されている。しかし、それでも利用性は低く、製油残滓中には多くのタンパク質が含まれているにもかかわらず、そのほとんどが飼料あるいは肥料として利用されているのみである。これらのタンパク質の利用性を高くするためには、種子タンパク質の構造・加工特性相関を解明する必要がある。種子タンパク質の加工特性は溶解性と密接な関係にある。種子タンパク質は一般的にグロブリンであり、その溶解に塩の存在を必要とする。すなわち、塩濃度は種子タンパク質の溶解性に大きな影響を及ぼす。

我々は、ダイズタンパク質の主要成分である 7S と 11S グロブリンの溶解性と加工特性に対する塩の効果を検査する研究を行って来た。両グロブリンはマルチサブユニットタンパク質であるので、各グロブリンのホモサブユニット分子種あるいは限定的なサブユニット組成の分子種などを調製して精密に解析し、一定の成果を挙げることができた²⁾。その結果、タンパク質の利用性を拡大するためには他の種子タンパク質に対しても解析を進め、個々のタンパク質の溶解性に対する塩の効果をはっきりさせる必要性を感じた。そこで、以下の研究を計画した。すなわち、マングビーン 7S グロブリン、ナタネ 11S グロブリン、ダイズ 11S グロブリンの野性型および改変型を調製する。そして、それらの溶解性に対する塩の効果と比較、解析することによって、種子タンパク質の溶解性に対する塩の効果を検明する。

2. 研究方法

2.1 天然および組換え型マングビーン 7S グロブリンの調製

マングビーンより、天然の 7S グロブリンを硫酸分画、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィー³⁾によって精製した。

マングビーン 7S グロブリンの主要サブユニットである 8SA の cDNA を cDNA ライブラリーからクローニングし、その大腸菌発現系を構築した。発現タンパク質を硫酸分画、陰

イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。

2.2 野性型および改変型の組換え型ナタネ 11S グロブリンの調製

ナタネ 11S グロブリン (cruciferin) の主要サブユニットの一つである BNC1 の cDNA を RT-PCR 法によってクローニングし、その大腸菌発現系を構築した。クルシフェリンの第 II 可変領域を除去した Cru Δ II、第 IV 可変領域をダイズ 11S グロブリン A1aB1b あるいは A3B4 のものと入れ換えた CruA1aIV と CruA3IV、C 末端部にダイズ 7S グロブリン α' のエクステンション領域あるいは A1aB1b の第 IV 可変領域を付加した CruC α' 、CruCA1aIV を設計し (Fig.1)、それらに対する大腸菌発現プラスミドを構築した。発現タンパク質を硫酸分画、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製した。

2.3 野性型および改変型の組換え型ダイズ 11S グロブリンの調製

ダイズ 11S グロブリン A1aB1b の第 IV 可変領域あるいは C 末端部にダイズ 7S グロブリン α' のエクステンション領域を挿入あるいは付加した A1a α' B1b と A1aB1b α' 、第 IV 可変領域を第 II、第 III 可変領域に挿入した A1aBb II と A1aB1b III、そして C 末端部に付加した A1aB1bC を設計し (Fig. 2)、それらに対する大腸菌発現プラスミドを構築した。発現タンパク質を硫酸分画、疎水性カラムクロマトグラフィーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製した。

2.4 溶解性

0.5M NaCl を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH7.6) 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 pH を 3-9 あるいは 2-9 に、また必要に応じて NaCl を添加することによってイオン強度を 0.5 あるいは 0.08 に調整し、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量を定量し、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。

3. 結果と考察

3.1 天然および野性型の組換え型マングビーン 7S グロブリンの溶解性

マングビーンから調製した天然の 7S グロブリン (天然 M7S) と組換え型のマングビーン 7S グロブリン (組換え型 M7S) の溶解性の pH 依存性をイオン強度 0.5 と 0.08 で測定した (Fig.3)。天然 M7S、組換え型 M7S とともに、イオン強度 0.5 においては pH によらず可溶性であったが、イオン強度 0.08 では、pH4.4-6.4 の間で等電点沈殿し、不溶性であった。可溶性の pH 範囲は、天然 M7S の方が組換え型 M7S より少し広がった。ダイズ 7S グロブリン (S7S) の場合、 α 、 α' 、 β のいずれのサブユニットとも、糖鎖を持つ天然のものの方が、持たない組換え型よりも可溶性の pH 範囲が広く、糖鎖が溶解性に正の効果を持つことを、我々は明らかにしている⁴⁾。しかし、天然 M7S は複数のサブユニット種の混合物であるこ

とを考慮すると、組換え型 M7S は持たず、天然 M7S が持つ糖鎖の効果であるのかどうかは断定できない。

M7S の一次構造は S7S の 3 種のサブユニットのうち、 β に類似している。ところが、S7S β は、イオン強度 0.08 においては pH4.5-8.5 で不溶性であり、不溶性の pH 範囲が極めて広い⁴⁾。アミノ酸組成は溶解性に関わると考えられるので、M7S8SA と S7S β のアミノ酸組成を比較した (Table 1)。両者で差はあまりなく、溶解性の違いをアミノ酸組成の差では説明できない。我々は、S7S β ⁵⁾ と M7S8SA⁶⁾ の立体構造を決定していたので、疎水性アミノ酸と荷電アミノ酸の分子表面における分布を比較した。疎水性アミノ酸の分布には差はなかったが、荷電アミノ酸の分布には顕著な差が見られた (Fig.4)。すなわち、M7S8SA では、荷電アミノ酸の分布が分子の両側ともにランダムであるが、S7S β では、局在性が見られ、しかも分子の両側で特異的であり、互いに引き付け合えるように分布している。このような荷電アミノ酸の分布の違いがイオン強度 0.08 における pH6.4-8.5 における溶解性の違いの原因となっていると考えられる。

3.2 野性型の組換え型ナタネ 11S グロブリンの溶解性

ナタネ 11S グロブリン (cruciferin) の BNC1 サブユニットの組換え型である Cru とダイズ 11S グロブリンの A1aB1b サブユニットの組換え型である A1aB1b の溶解性の pH 依存性をイオン強度 0.5 と 0.08 で測定した (Fig.5,6)。イオン強度 0.5 において、A1aB1b は全ての pH で可溶性であったが、Cru は pH5 以下で溶解性が大きく低下した。イオン強度 0.08 においては、A1aB1b は pH5.2-7.2 の間で、特に pH5.2-6.6 の間で溶解性が低かったのに対して、Cru は、pH4-6 の間で低い傾向を示したが、A1aB1b よりも高い溶解性を示した。

このような溶解性の違いにアミノ酸組成が関与している可能性を探るために、Cru と A1aB1b のアミノ酸組成を比較した (Table 2,3)。多くのアミノ酸の組成は類似しているが、一部のアミノ酸で顕著な差が見られる。すなわち、A1aB1b に比べ Cru では、Glu と Lys の含量が 55%、Asn の含量が 75%ほどであり、Gln が 115%、Gly が 140%である。また、アミノ酸配列の同一性は高くなく、36.5%しかない。3.1 で記した 7S の場合を考慮すると、Glu と Lys の含量の差に加えて、荷電アミノ酸や疎水性アミノ酸の分子表面における分布の仕方も関与する可能性があるが Cru の立体構造が未解明であるために、詳細は不明である。Cru の立体構造の解明が待たれる。

3.3 改変型の組換え型ナタネ 11S グロブリンおよびダイズ 11S グロブリンの溶解性

一般的に、11S グロブリンには 5ヶ所の変換領域がある。ナタネ 11S グロブリンでは、N 末端から数えて 2 番目の第 II 変換領域が最も長く (Fig.1)、Gly と Gln に富んでいる。また、ダイズ 11S グロブリンの第 IV 変換領域は変換領域の中で最も長く (Fig. 2)、負電荷を持つアミノ酸に富んでいるが、ナタネ 11S グロブリンのものは短く負電荷アミノ酸の含量も少ない。ダイズ 11S グロブリンのサブユニットのうち A3B4 のものは長く、70 アミノ酸より成るが、A1aB1b のものは 42 アミノ酸より成る。一方、ダイズ 7S グロブリンの α サブユニ

ットはそのN末端部に141アミノ酸より成り負電荷アミノ酸に富むエクステンション領域と呼ばれる領域を持っている。我々はエクステンション領域が、ダイズ7Sグロブリンの溶解性に大きく寄与することを既に明らかにしている⁹⁾。そこで、ナタネ11Sグロブリンの第II可変領域を欠失させたCru Δ II、第IV可変領域をA1aB1bあるいはA3B4のものに入れ換えたCruA1aIVとCruA3IV、C末端にA1aB1bの第IV可変領域あるいは α' のエクステンション領域を連結したCruCA1aIVと、CruC α' を調製した(Fig.1)。ナタネ11Sグロブリンの場合と同様にダイズ11Sグロブリンの改変型、すなわちA1aB1bの第IV可変領域あるいはC末端にダイズ7Sグロブリン α' のエクステンション領域を挿入あるいは付加したA1a α' B1bとA1aB1b α' 、A1aB1bの第II、第III可変領域あるいは、C末端にA1aB1bの第IV可変領域を挿入あるいは付加したA1aB1bIIとA1aB1bIII、そしてA1aB1bCを調製した(Fig.2)。ナタネ11Sグロブリンとダイズ11Sグロブリンの改変型のアミノ酸組成をTable2と3に示した。

ナタネ11Sグロブリンの改変型の溶解性のpH依存性をイオン強度0.5と0.08において測定した(Fig.5)。イオン強度0.5においては、全ての改変型が野性型とほぼ同じパターンを与えた。一方、イオン強度0.08においては、各サンプルが独特のパターンを与えた。CruA1aIVとCruCA1aIVは野性型と類似したパターンを与えたが、最も低い溶解性を示すpHがpH4からpH5-5.5にずれた。これは、A1aB1bの第IV可変領域と置換される、あるいはそれがC末端に付加されることによって、荷電アミノ酸が18残基増え、低イオン強度下ではpHの影響を受け易くなったためと考えられる。しかし、挿入あるいは付加される位置によって効果が少し異なると考えられる。 Δ IIは、野性型に比べpH7以下での溶解性が低下し、pH4-6.5の間ではほぼ不溶性となった。この低下は、主に、親水性の性質を持つGlnの数が大きく低下したためと考えられる。CruA3IVとCruC α' では、溶解性の低いpH範囲が狭くなり、特にCruC α' はナタネ11Sグロブリンの改変型の中で最もシャープな等電点沈殿のパターンを与えた。CruA1aIV、CruCA1aIV、CruA3IV、CruC α' の順に荷電アミノ酸数、特にGluの数が増大している。したがって、明瞭な等電点沈殿のパターンを与えることに対して、荷電アミノ酸数とバランスが大きく関わると考えられる。

ダイズ11Sグロブリンの改変型の溶解性のpH依存性をイオン強度0.5と0.08において測定した(Fig.7)。イオン強度0.5においては、全ての改変型が野性型と同様に全てのpHで可溶性であった。一方、イオン強度0.08においては、各サンプルが独特のパターンを与えた。A1aB1bの第IV可変領域を位置を変えて挿入あるいは付加したA1aB1bII、A1aB1bIII、A1aB1bCは同じアミノ酸組成を持つが、互いに異なるパターンを与え、荷電アミノ酸の数が増えたにもかかわらず不溶性のpHの範囲は広がった。特に、A1aB1bIIはpH8においても不溶性であった。一方、ダイズ7Sグロブリン α' サブユニットのエクステンション領域を挿入したA1a α' B1bと付加したA1aB1b α' も同じアミノ酸組成を持ち、互いに異なるパターンを与えたが、不溶性のpH範囲は狭くなった。特に、A1a α' B1bがシャープ

なパターンを与えた。これらの結果は、低イオン強度における溶解性の pH 依存性は、アミノ酸組成の影響を強く受けるが、荷電残基の局在性も大きく関与することを示している。

4. 結論

種子貯蔵タンパク質である 7S グロブリンと 11S グロブリンの溶解性には、アミノ酸組成だけでなく、荷電アミノ酸の分子表面における分布の仕方も関与することが判明した。したがって、種子貯蔵タンパク質の溶解性に対する塩の効果を完全に解明するためには、個々のタンパク質の立体構造を解明する必要がある。

5. 引用文献

1. Carrol, K. K. and Hamilton, R.M.G (1975) Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J. Food Sci.*, 40, 18–23.
2. 内海 成、安達基泰、丸山伸之 (2002) 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. ソルトサイエンス研究財団平成 12 年度助成研究報告集医学・食品科学編, 211–217.
3. Mendoza, E.M.T., Adachi, M., Bernardo, A. E. N. and Utsumi, S. (2001). Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] globulins: Purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1552–1558.
4. Maruyama, N., Mohamad Ramlan, M. S., 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 β -conglycinin homotrimers. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 139–144.
5. 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.
6. 安達基泰、Roberta Garcia, Evelyn Mae Tecson Mendoza、三上文三、内海 成 (2003). 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集, 221.

Table 1. Amino acid compositions of mungbean 7S globulin 8SA subunit and soybean 7S globulin β subunit.

Amino acid	Mungbean	Soybean
Ala	22	22
Arg	24	29
Asn	31	33
Asp	21	21
Cys	0	0
Gln	36	33
Glu	39	37
Gly	22	18
His	8	8
Ile	24	26
Leu	37	42
Lys	27	21
Met	4	0
Phe	27	28
Pro	19	21
Ser	31	31
Thr	12	10
Trp	3	0
Tyr	8	12
Val	28	24

Table 3. Amino acid compositions of soybean 11S globulin A1aB1b subunit and its modified versions.

Amino acid	A1aB1b	A1a α 'B1b A1aB1b α '	A1aB1b II A1aB1b III A1aB1bC
Ala	27	27	27
Arg	27	38	32
Asn	37	37	37
Asp	17	23	20
Cys	8	9	10
Gln	48	66	55
Glu	41	88	50
Gly	35	43	37
His	8	21	9
Ile	26	27	26
Leu	33	33	33
Lys	24	35	29
Met	6	6	6
Phe	20	22	20
Pro	29	43	33
Ser	32	38	35
Thr	20	20	21
Trp	4	6	4
Tyr	11	11	11
Val	23	24	23

Table 2. Amino acid compositions of rape 11S globulin BNC1 subunit and its modified versions.

Amino Acid	Cru	Cru Δ II	CruA1aIV	CruA3IV	CruC α	CruCA1aIV
Ala	30	30	30	30	30	30
Arg	28	27	31	34	39	34
Asn	28	28	28	28	28	28
Asp	20	18	23	30	26	23
Cys	5	5	7	6	6	7
Gln	55	34	60	61	73	62
Glu	23	22	30	37	70	33
Gly	48	34	50	51	56	50
His	10	9	11	13	23	11
Ile	22	22	22	22	23	22
Leu	37	37	36	36	37	38
Lys	13	13	18	15	24	18
Met	3	3	3	3	3	3
Phe	20	17	20	20	22	20
Pro	26	24	28	35	40	30
Ser	31	27	33	33	37	34
Thr	19	19	20	21	19	20
Trp	5	5	5	6	7	5
Tyr	10	10	10	12	10	10
Val	33	32	32	32	34	33

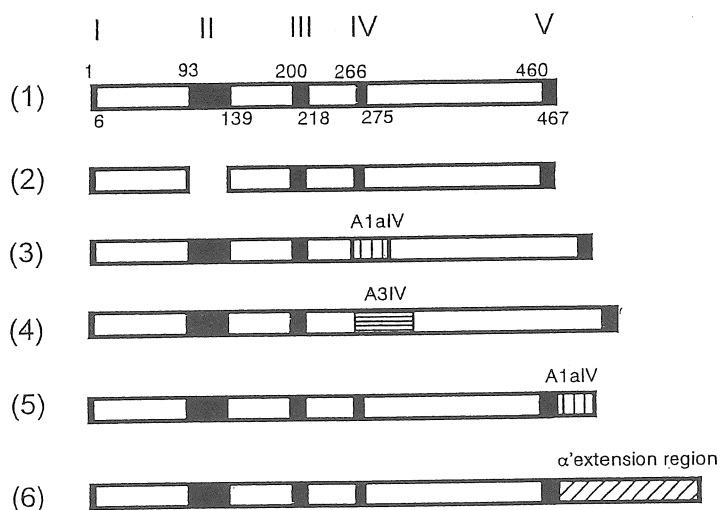


Fig.1. Construct of the wild-type and modified rape 11S globulin BNC1 subunits. (1) Cru; (2) Cru Δ II; (3) CruA1aIV; (4)CruA3IV; (5) CruCA1aIV; (6)CruC α' . Black and open areas are variable and conserved regions, respectively. The number of the residues from the N-terminus for the variable regions (I - V) are shown.

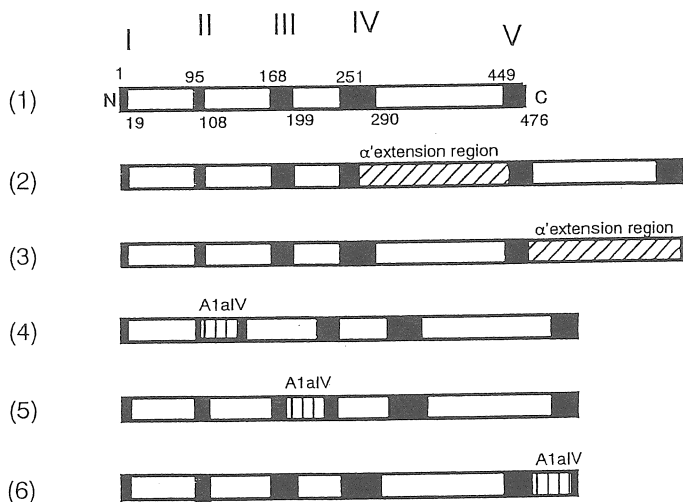


Fig. 2. Construct of the wild-type and modified soybean 11S globulin A1aB1b subunits. (1) A1aB1b; (2) A1a α' B1b; (3) A1aB1b α' ; (4) A1aB1b II; (5) A1aB1b III; (6)A1aB1bC. Black and open areas are variable and conserved regions, respectively. The number of the residues from the N-terminus for the variable regions (I - V) are shown

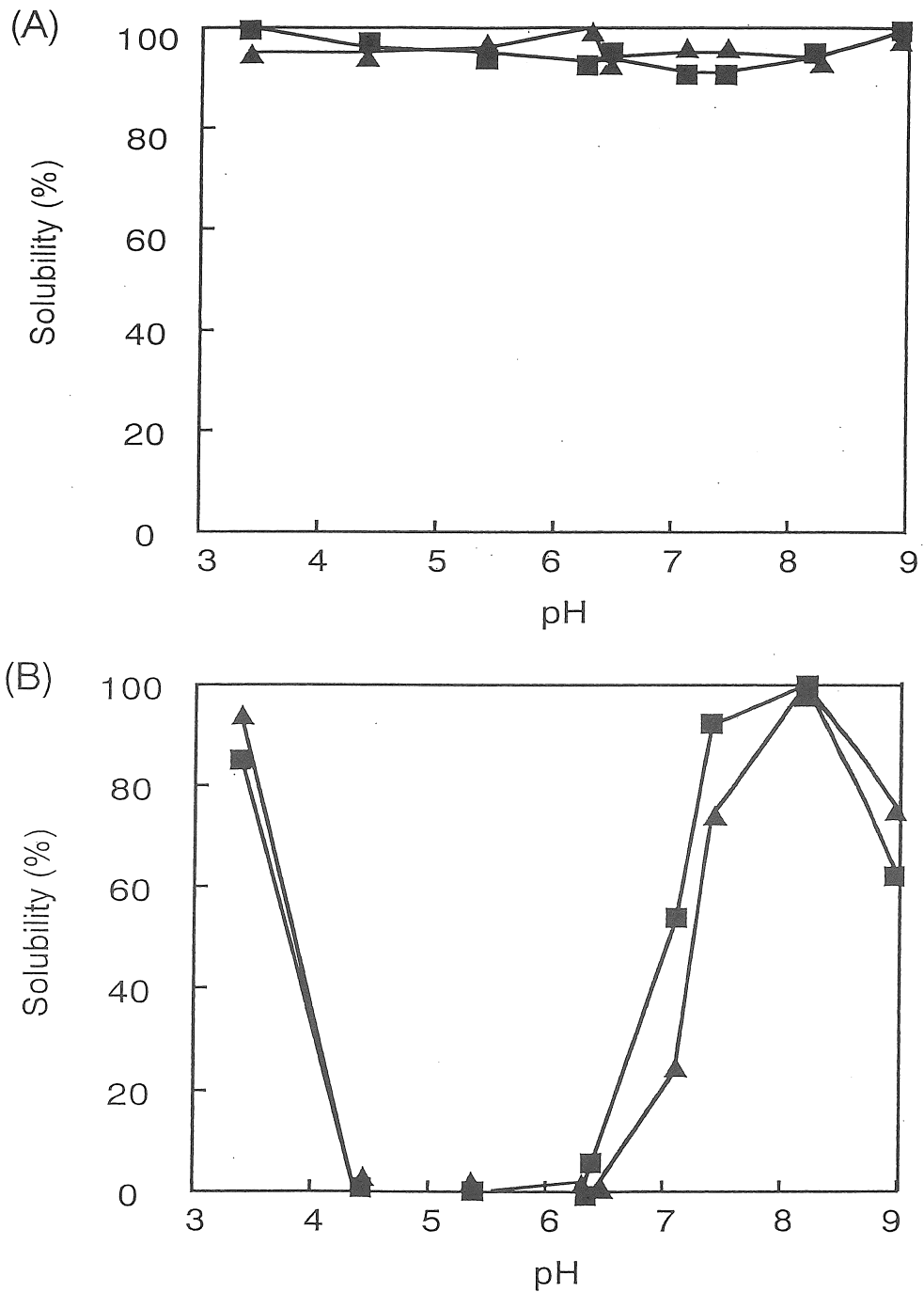


Fig. 3. pH dependence of the solubility of the native and the recombinant mungbean 7S globulins at ionic strengths 0.5 (A) and 0.08 (B).

■, native M7S; ▲, recombinant M7S.

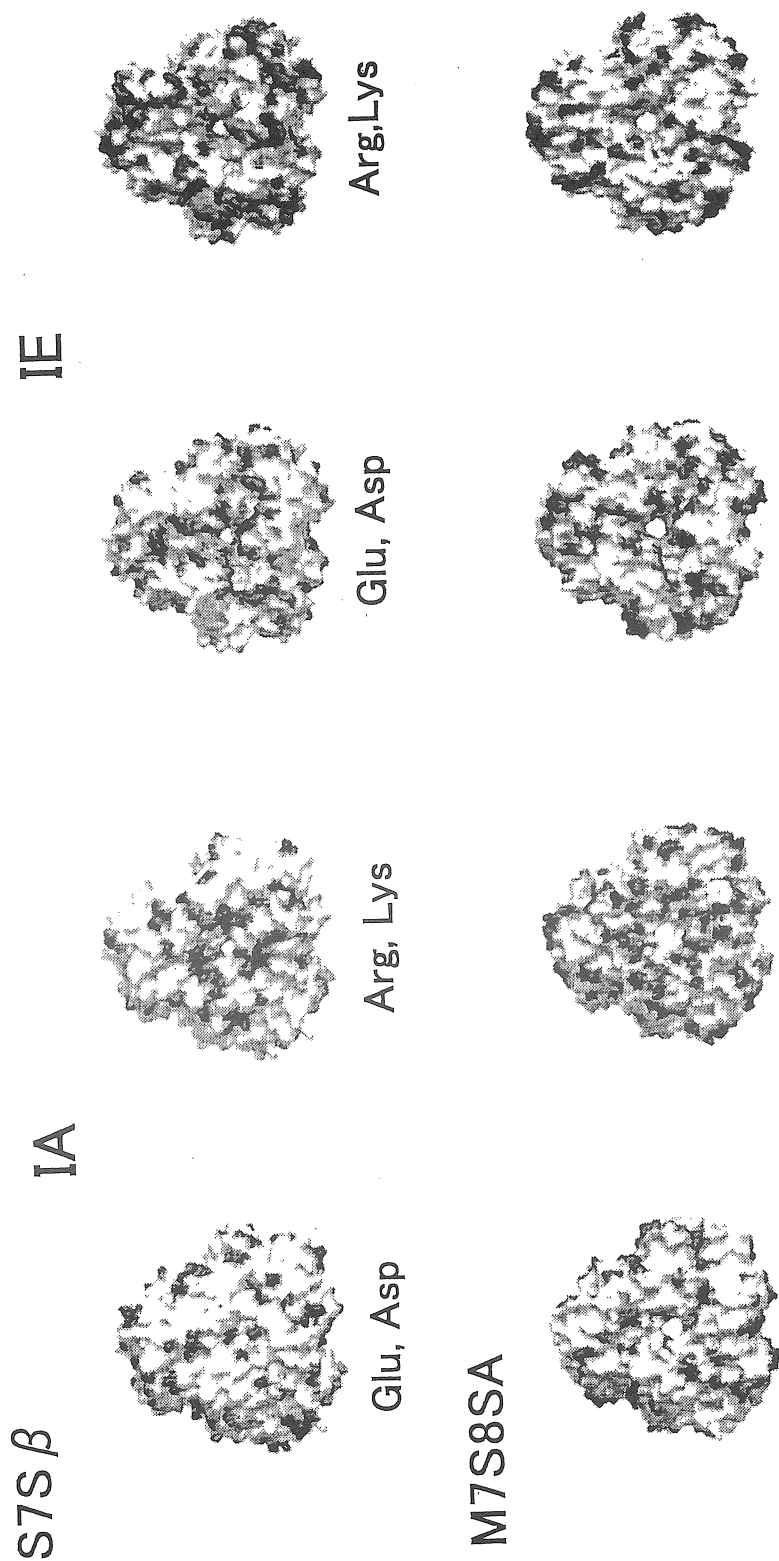


Fig. 4. Distribution of charged residues on the molecular surfaces of soybean 7S globulin β (S7S β) and mungbean 7S globulin 8SA (M7S8SA). Both surfaces are designated as IA and IE faces. Glu and Asp residues and Arg and Lys residues are separately shaded on each face.

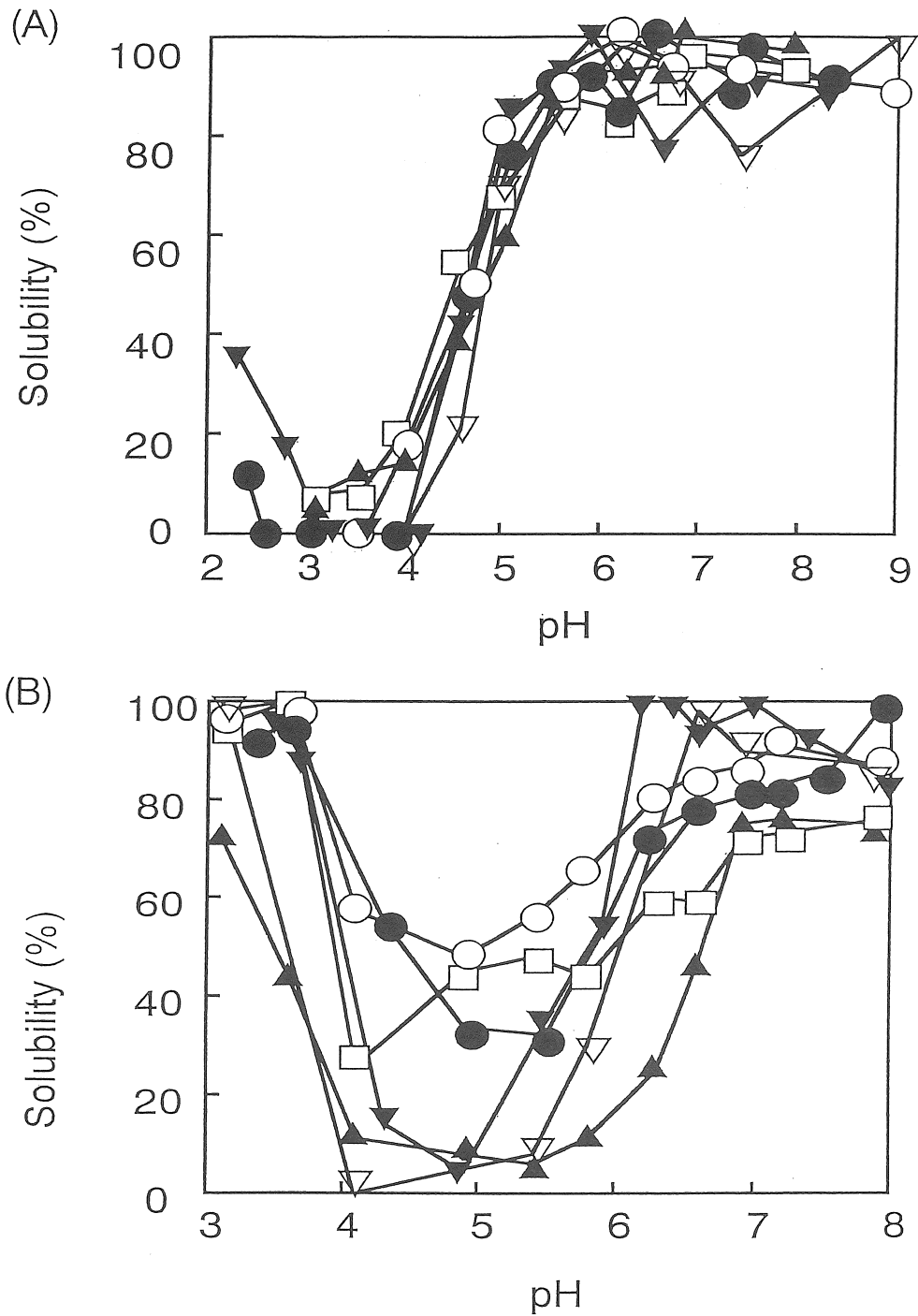


Fig. 5. pH dependence of the solubility of the recombinant wild-type and modified rape 11S globulins at ionic strengths 0.5 (A) and 0.08 (B).
 □, Cru; ○, CruA1aIV; ▽, CruA3IV; ▲, Cru Δ II; ●, CruCA1aIV; ▼, CruC α' .

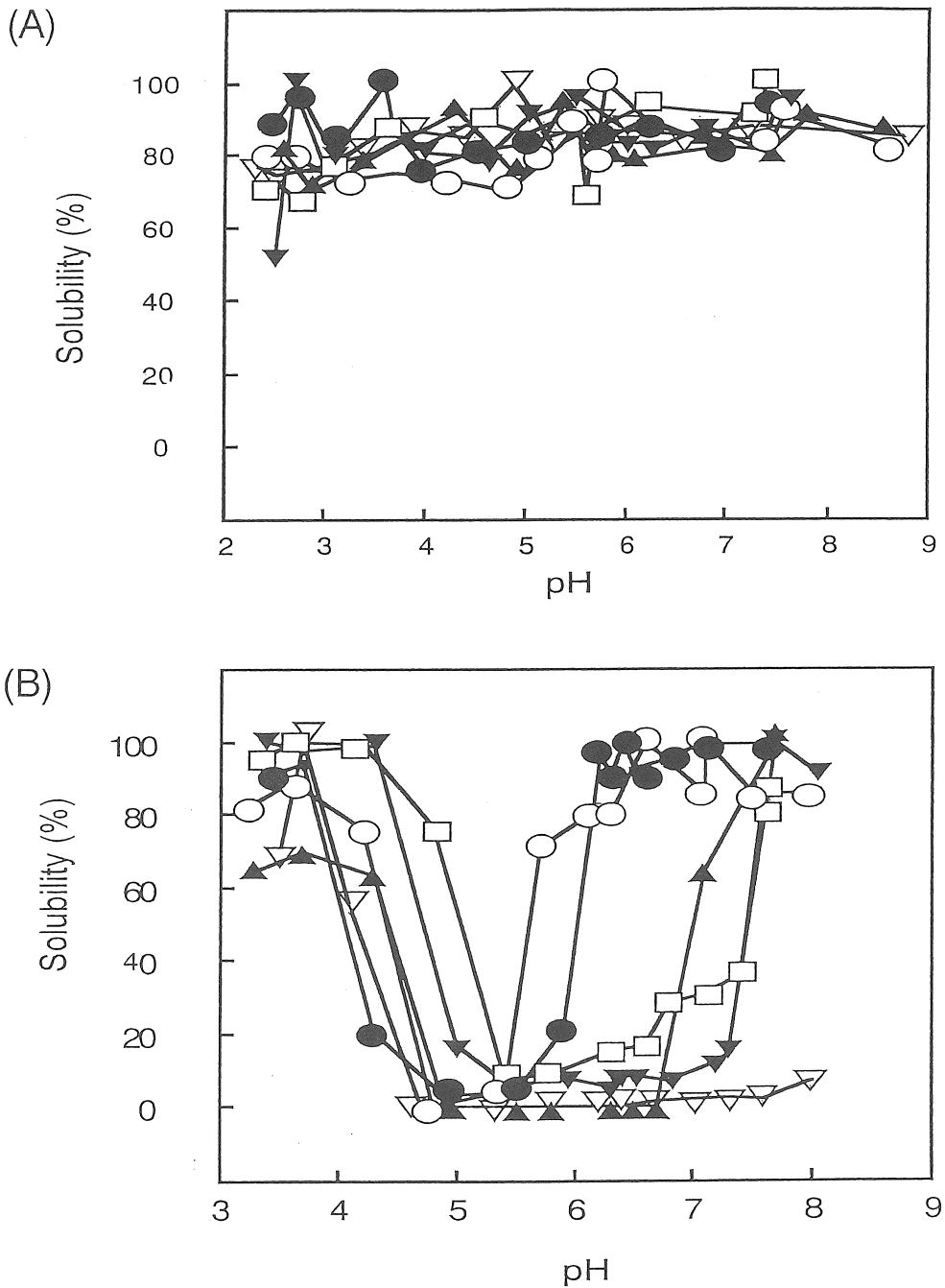


Fig. 6. pH dependence of the solubility of the recombinant wild-type and modified soybean 11S globulins at ionic strengths 0.5 (A) and 0.08 (B). □, A1aB1b; ▽, A1aB1b II; ▼, A1aB1b III; ▲, A1aB1b C; ○, A1a α' B1b; ●, A1aB1b α'.

Precise investigation of salt effect on solubility of seed storage proteins

Shigeru Utsumi, Motoyasu Adachi and Nobuyuki Maruyama

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Major storage proteins of many seeds are 7S and 11S globulins. Although each globulin shares similarity of amino acid sequence among plant species, their solubilities are not uniform. Solubility of seed proteins is one of the fundamental properties required for food usage. Therefore, it is desired to elucidate precisely the effects of salt on solubilities of 7S and 11S globulins. Then, we investigated solubility-pH dependence of mungbean 7S globulin and rapé and soybean 11S globulins at ionic strengths 0.5 and 0.08 using *Escherichia coli* expression system.

Solubility of recombinant wild-type mungbean 7S globulin 8SA subunit was compared with that of soybean 7S globulin β subunit. Although 8SA has structural similarity with β , their solubilities were quite different to each other at ionic strength 0.08. Thus, 8SA was soluble at pH6-8, but β was insoluble. We demonstrated that this difference is able to be explained by the distribution profile of charged residues on their molecular surfaces.

Generally, 11S globulins have five variable regions. The variable region IV is rich in negatively charged residues. The length of the variable region IV is different among subunits, and those of A1aB1b and A3B4 are composed of 42 and 70 residues. On the other hand, among α , α' and β subunits of soybean 7S globulin, α and α' have an extension region at their N terminus, which is rich in negatively charged residues. The extension region of α' is composed of 142 residues. Then, we prepared modified rapé 11S globulin BNC1 subunit and soybean 11S globulin A1aB1b subunit. The modifications were insertion, addition or replacement of the variable region IV of A1aB1b and A3B4 or α' extension region into or with the variable region II or III or the C terminus. The solubilities of the modified 11S globulins were compared with those of the wild-type. We obtained the following results: ① 11S globulins of mungbean and soybean exhibited different and similar profiles at ionic strengths 0.5 and 0.08, respectively; ② solubilities of modified versions at ionic strength 0.5 were similar to those of the wild-type; ③ solubilities of modified versions at ionic strength 0.08 were affected by the length and the position of the introduced hydrophobic peptides.

As a conclusion, the effect of salt on solubilities of seed storage proteins is affected by distribution profile of charged residues on molecular surfaces as well as amino acid compositions. Therefore, determination of the three dimensional structure of each protein is desired.