

発表番号 39 (0541)

種子タンパク質の溶解性に対する塩の効果を決める構造要因

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)

多くの種子が、塩可溶性のグロブリンを主要な貯蔵タンパク質としている。グロブリンは、分子サイズによって、7S グロブリン(7S)と 11S グロブリン(11S)に分類される。各グロブリンは、植物種間でアミノ酸配列の高い類似性を示すが、溶解性は画一的ではない。我々は、本研究に先立って、種々の種子の 7S と 11S を精製し、それらの溶解性の pH 依存性を同一条件で比較し、インゲンマメ 7S が、他のグロブリンが不溶性となる低イオン強度においても高い溶解性を示すことを見出ししていた。インゲンマメ 7S は、ダイズ 7S の α および α' サブユニットと同様に、サブユニットあたり 2 ヲ所に糖鎖が付加されている。2 ヲ所のうち 1 ヲ所は両 7S で互いに近い位置であるが、もう 1 ヲ所は互いに全く異なる位置である。そこで本研究では、インゲンマメ 7S の低イオン強度下における優れた溶解性が、このような糖鎖部にあるのか、あるいはタンパク質部にあるのかを解析した。

大腸菌は、糖鎖を付加できないので、インゲンマメ 7ScDNA の大腸菌発現系を構築すると糖鎖をもたないインゲンマメ 7S (組換え型インゲンマメ 7S) を調製できる。そこで、既報の塩基配列に基づいて、インゲンマメ登熟期種子より調製した mRNA を鋳型として RT-PCR を行うことによって、インゲンマメ 7ScDNA をクローニングした。

次いで、大腸菌直接発現ベクター pET-21d を用いて、大腸菌発現システムの構築を試みた。我々は、これまでに pET-21d を用いて、多くの種子 7S および 11S の大腸菌発現系の構築に成功していたが、インゲンマメ 7S の場合は成功しなかった。そこで pGEX-6P-1 を用いて、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質としての発現を行った。その結果、高いレベルでの発現が得られ、しかも本来の構造を形成していること、そしてグルタチオン S-トランスフェラーゼ部を切除できることを確認した。そこで、本発現システムを用いて、糖鎖をもたない組換え型インゲンマメ 7S を大量に調製し、その溶解性を糖鎖をもつ天然型のものと比較した。その結果、イオン強度 0.5 においては、組換え型も調べた全 pH 範囲で可溶性であったが、イオン強度 0.08 においては、組換え型は pH5-7 で不溶性であった。分子表面疎水性を疎水性カラムと比較すると、組換え型の方が天然型よりもかなり高かった。したがって、糖鎖が分子表面の疎水性度の高い領域をカバーすることによって、溶解性を高めていると推定された。事実、立体構造に基づいて分子表面の疎水性領域を図示すると、ファゼオリンの場合には、糖鎖付加部位近辺に疎水性の高い領域が位置しているが、ダイズ 7S の場合にはそのような領域はない。

助成番号 0541

種子タンパク質の溶解性に対する塩の効果を決定する構造要因

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)

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も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地球規模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種子タンパク質の中では最も良く利用されているが、それでも利用性は低い。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。加工特性発現の基本は溶解性である。種子タンパク質の主要成分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。グロブリンには、サイズによって 7S グロブリン(7S)と 11S グロブリン(11S)がある。本財団の御助成のもと、平成12年度において、ダイズ 7S(構成サブユニットとして α , α' , β がある)の溶解性と加工特性に対する塩の効果を精密に分析し、サブユニットレベルでの差異の構造的要因を明らかにした^{2,3)}。平成14年度においては、マングビーン 7S とダイズ 7S の低イオン強度、中性付近における溶解性の違いを構造から説明するとともに、ダイズ 11S の溶解性とサブユニット種相関を明らかにし^{4,5)}、さらにタンパク質工学的手法によって、11S の溶解性にはアミノ酸組成ばかりでなく、荷電アミノ酸の局在部位も重要な要因となることを見出した⁶⁾。これらの知見に基づいて、グロブリンの溶解性に対する塩の効果の一般則を見い出せると考えていたが、最近、インゲンマメ 7S がダイズ 7S などとは全く異なり、低イオン強度下においても中性から酸性 pH 域で可溶性であることを見出した。インゲンマメ 7S は、ダイズ 7S の α および α' サブユニットと同様に、サブユニットあたり 2 ヲ所で糖鎖が付加されている。2 ヲ所のうち 1 ヲ所は、ダイズ 7S とインゲンマメ 7S 間で互いに近い位置であるが、もう 1 ヲ所は互いに全く異なる位置である (Fig. 1)。そこで本研究では、インゲンマメ 7S の低イオン強度下における優れた溶解性が、このような糖鎖部にあるのか、あるいはタンパク質部にあるのかを解析することを目的とした。

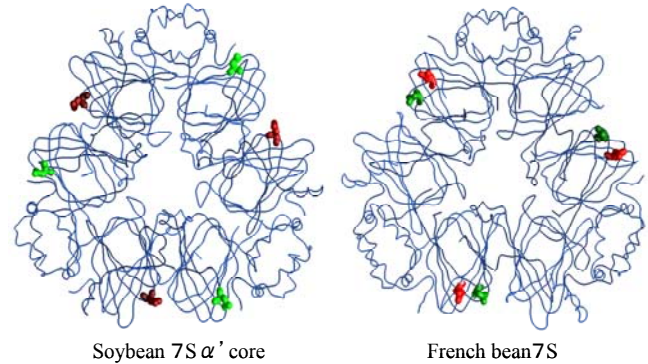


Fig. 1 Positions of carbohydrate moieties in soybean 7S α' core and French bean 7S.

Carbohydrate moieties are slower in colour. Blue line are main chains.

2. 研究方法

2.1 天然型および組換え型インゲンマメ 7S の調製

インゲンマメを粉砕、脱脂後、タンパク質を塩抽出し、7Sを硫酸分画およびセファクリル S-300 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによってほぼ均一に精製した。

インゲンマメの登熟期種子より mRNA を調製し、既報の塩基配列に基づいて作出したオリゴヌクレオチドをプライマーとして RT-PCR を行うことによって、インゲンマメ 7S の cDNA をクローニングした。この cDNA を大腸菌直接発現ベクター pET-21d に組み込み、発現プラスミド pE-PV7S を構築した。培養温度、培地、塩濃度などの条件を種々検討して、インゲンマメ 7S の可溶性での大量発現系を構築した。

グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合発現ベクター pGEX-6P-1 にインゲンマメ 7ScDNA を挿入し、発現プラスミド pG-PV7S を構築した。この発現プラスミドを含有する大腸菌 BL21 を 37°C で培養後、IPTG を添加して発現を誘導し、20°C で 24 時間培養した。集菌後、菌体を超音波破碎し、上清画分をグルタチオンのアフィニティーカラムに供し、吸着画分をグルタチオンによって溶出させた。溶出画分にプレジジョン酵素を働かせて、切り出されたインゲンマメ 7S をセファクリル S-200 ゲルろ過カラムおよびモノ Q 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供して、ほぼ均一に精製した。

2. 2 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 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。17,000 g 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測定し、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 組換え型インゲンマメ 7S の調製

クローニングしたインゲンマメ 7S の cDNA を発現ベクター pET-21d に組み込んだ発現プラスミド pE-PV7S を宿主大腸菌 BL21(DE3), HMS174(DE3), AD494(DE3) および Origami(DE3) に導入し、培養温度、培地、塩濃度などを種々に変化させて発現させたが、インゲンマメ 7S の発現レベルは極めて低かった。我々は、多くの種子タンパク質の大腸菌発現の経験があるが、そのノウハウを活用しても、高発現を得ることができなかった。したがって、インゲンマメ 7S を pET ベクターによって直接発現することは困難と考えた。そこで、pGEX-6P-1 を用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質としての生

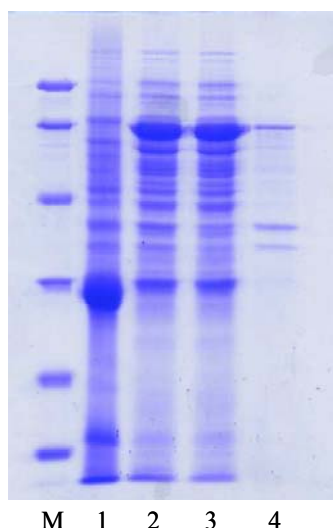


Fig. 2 SDS-PAGE of expressed proteins. Lane M, molecular size markers (94, 67, 43, 30, 20.1 and 14.4 kDa); Lane 1, total proteins from cells harboring pGEX-6P-1; lane 2, total proteins from cells harboring pG-PV7S; lane 3, soluble fraction after sonication of cells harboring pG-PV7S; lane 4, insoluble fraction after sonication of cells harboring pG-PV7S.

産を試みた。その結果、可溶性での高発現が得られた (Fig. 2) ので、グルタチオンのアフィニティーカラムによって融合タンパク質を精製し、プレジジョン酵素を働かせることによってグルタチオン S-トランスフェラーゼ部を切除した。次いで、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって、インゲンマメ 7S とグルタチオン S-トランスフェラーゼを分画し、さらに陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行うことによって、80% の purity に精製した。

3. 2 組換え型インゲンマメ 7S の構造

組換え型インゲンマメ 7S の上記ゲルろ過カラムにおける溶出時間は 124.6 分であった。一方、天然型インゲンマメ 7S の同じカラムでの溶出時間は 120.7 分であり、組換え型よりも少し早かった。天然型は糖鎖をもつことを考慮すると、組換え型も、天然型と同様に 3 量体を形成していると考えられる。

天然型と組換え型のインゲンマメ 7S の示差走査熱量測定をイオン強度 0.5 と 0.08 において行ったところ、両 7S ともほぼ同じ熱変性温度を与えた (Fig. 3)。

これらの事実は、組換え型インゲンマメ 7S が天然型インゲンマメ 7S と同様の構造を形成していることを示唆している。したがって、ここで構築した大腸菌発現系から得られる組換え型インゲンマメ 7S を天然型インゲンマメ 7S との特性比較に用いることができると判定できる。

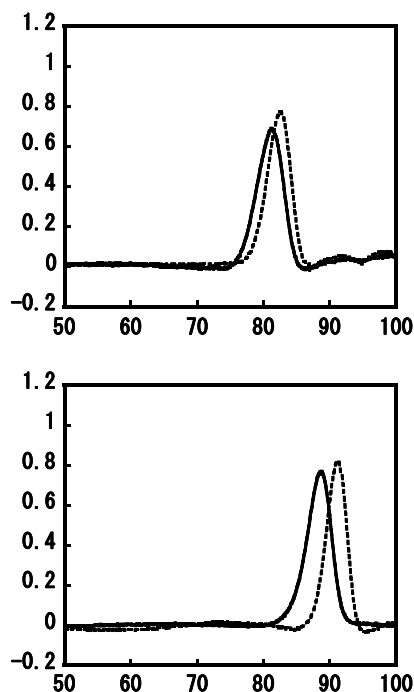


Fig. 3 DSC scans of native French bean 7S (solid line) compared with those of recombinant French bean 7S (dotted line). Ionic strength was 0.08 (A) and 0.5 (B).

3.3 天然型および組換え型インゲンマメ 7S の溶解性と表面疎水性

天然型および組換え型インゲンマメ 7S 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. 4)。天然型インゲンマメ 7S は両イオン強度下で、調べた pH 範囲において完全に可溶性であった。しかし、組換え型インゲンマメ 7S はイオン強度 0.5 においては完全に可溶性であったが、イオン強度 0.08 においては等電点沈殿を示し、pH 5-7 において不溶性であった。

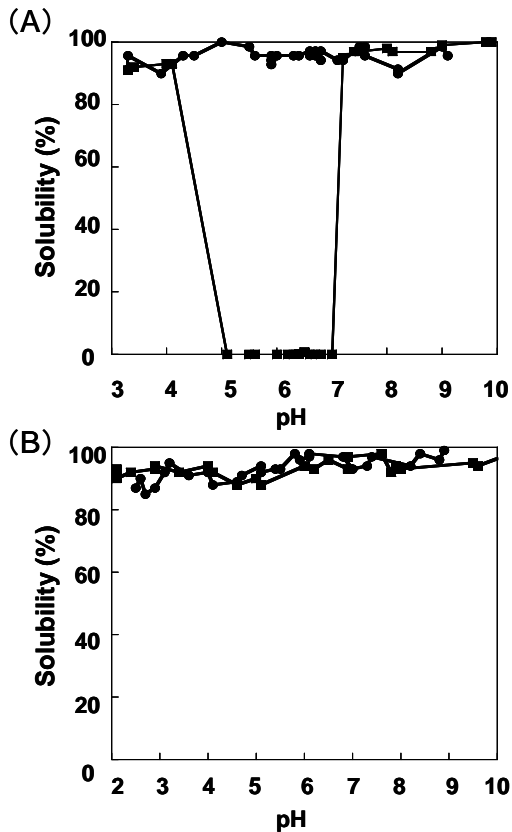


Fig. 4 pH dependence of the solubility of the native and recombinant French bean 7S at ionic strength 0.08 (A) and 0.5 (B). ●, native; ■, recombinant.

天然型および組換え型インゲンマメ 7S の表面疎水性を、ブチルセファロースカラムおよびフェニルセファロースカラムにおける溶出時間を測定することによって比較した。表面疎水性は、溶出時間が早ければ低い、遅ければ高いと判定できる。両カラムにおいて、天然型の方が組換え型よりも早く溶出した (Table 1)。すなわち、組換え型の方が天然型よりも表面疎水性が高い。糖鎖が分子表面の疎水性の高い領域を覆うために、天然型では表面疎水性が低くなるのであろうと考えられる。一方、ダイズ 7S の組換え型 β の表面疎水性をインゲンマメ 7S と同様にして測定すると、組換え型インゲンマメ 7S とほぼ同じ結果

を与えたので、両組換え型の表面疎水性の強さには差がないと考えられる。

Table 1 Elution times of the native and recombinant French bean 7S on hydrophobic column.

Columns	Elution time (min)	
	native	recombinant
Butyl Sepharose	36.5	59.4
Phenyl Sepharose	52.0	76.2

インゲンマメ 7S の立体構造は Lawrence らによって明らかにされており⁸⁾、ダイズ 7S β の立体構造は我々が決定している⁹⁾。これらの立体構造データに基づいて分子表面の疎水性残基の分布を糖鎖の位置に注目して比較した (Fig. 5)。その結果、ダイズ 7S β では糖鎖付加部位付近には大きな疎水性領域が存在しないが、インゲンマメ 7S では存在することが判明した。したがって、天然型インゲンマメ 7S では、糖鎖が、この大きな疎水性領域を覆い、その結果、分子表面の疎水性が低下し、低イオン強度下においても不溶化しにくくなると考えられた。

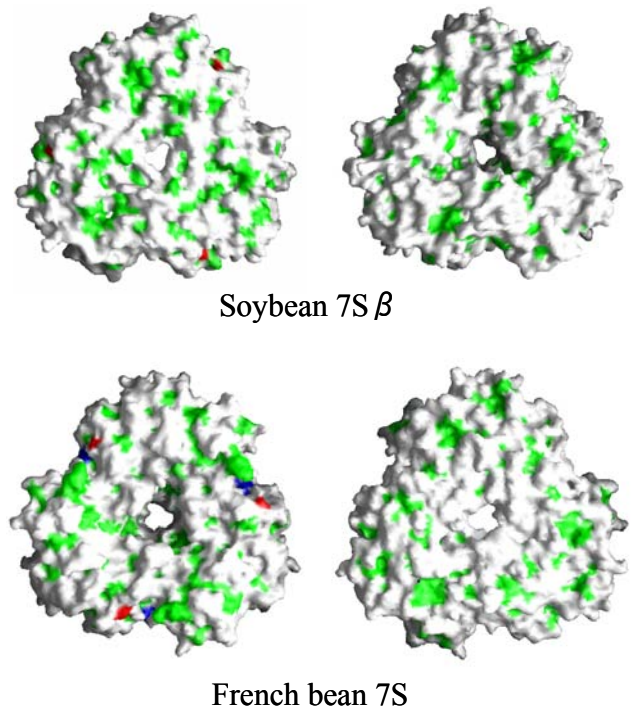


Fig. 5 Distribution of hydrophobic residues on the surfaces of soybean and French bean 7S.

The views are from both sides. Hydrophobic residues and carbohydrate moieties are shown in green, and red and blue, respectively.

4. 結論

インゲンマメ 7S グロブリンがイオン強度 0.08 においても等電点沈殿をしないのは、糖鎖が分子表面の大きな疎水性領域を覆っているためと考えられた。

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. Maruyama, N., Mohamad Ramlan, M. S., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N. 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.
3. Maruyama, N., Mohamed Salleh, M. R., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., Nakagawa, S. and Utsumi, S. (2002) Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin heterotrimers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4323-4326
4. Maruyama, N., Prak, K., Motoyama, S., Choi, S.-K., Yagasaki, K., Ishimoto, M. and Utsumi, S. (2004) Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8197-8201.
5. Prak, K.; Nakatani, K., Ktsube-Tanaka, T., Adachi, M., Maruyama, N. and Utsumi, S. (2005) Structure-function relationships of soybean proglycinins at subunit levels. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3650-3657.
6. Tandang, M. R. G., Atsuta, N., Maruyama, N., Adachi, M. and Utsumi, S. (2005) Evaluation of the solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure modified by protein engineering. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8736-8744.
7. Lawrence, M. C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R. J. and Colman, P. M. (1994) Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implication for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.*, 238, 748-776.
8. Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Okuda, E., Nakagawa, S., Mikami, B. and Utsumi, S. (2001) Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin homotrimers. *Eur. J. Biochem.*, 268, 3595-3604.

0541

Structural factors affecting salt-dependence of solubility of seed proteins

Shigeru Utsumi and Nobuyuki Maruyama
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Major storage proteins of many kinds of plant seeds are salt-soluble globulin. Globulins are classified into 7S and 11S globulins according to their sizes. Each globulin exhibits high amino acid sequence similarity among various plant species, but variable solubility. Prior to this study, we had compared pH-dependence of solubility of 7S and 11S purified from various seeds, and found that 7S from French bean exhibits excellent solubility at low ionic strength where the other 7S and 11S are insoluble. French bean 7S is glycosylated at two positions in analogy with soybean 7S α and α' . One of the two positions is close in both 7S, but the other is completely different. In this study, we studied which determines the excellent solubility of French bean 7S, protein or carbohydrate moieties.

We can prepare recombinant French bean 7S having no carbohydrate moiety (recombinant 7S) using *E. coli* expression system of its cDNA. So we cloned its cDNA by RT-PCR method based on reported nucleotide sequence, and attempted to construct *E. coli* expression system using direct expression vector pET-21d. However, we could not get expressed proteins from this system even though we have many experiences in constructing expression system using pET-21d. Then, we attempted to construct an expression system using fusion expression vector pGEX-6P-1 as a fusion protein with glutathione S-transferase, and succeeded in getting soluble expressed proteins at a high level. The recombinant 7S cleaved from a fusion protein formed a correct conformation. Solubility of the recombinant 7S was compared with that of the native 7S from French bean. At ionic strength 0.5, both 7Ss were completely soluble at any pHs examined. At ionic strength 0.08, the recombinant 7S was insoluble at pH 5-7 although the native 7S was completely soluble. Surface hydrophobicity of the recombinant 7S was much higher than that of the native 7S. These strongly suggest that the carbohydrate moiety cover regions with high hydrophobicity on the molecular surface, resulting in high solubility. In fact, the three dimensional structures demonstrate that regions with high hydrophobicity is located near the N-glycosylation site in French bean 7S but not in soybean 7S.