

種子タンパク質の高品質化に関する食糧分子細胞生物学的研究

丸山伸之 (京都大学大学院農学研究科)

marunobu@kais.kyoto-u.ac.jp

ダイズ種子タンパク質の立体構造を決定し、構造・加工特性相関を分子レベルで解明するとともに、それらの種子細胞内におけるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送を規定する構造要因を同定した。これらの知見を基にして、21世紀の食糧問題に対処しうる新規な食糧素材となる、様々な用途に適した加工特性と任意の生理機能を併せもつダイズ種子タンパク質を設計し、作物種子で生産するシステムの基盤を確立した。

はじめに

食源性疾患の増大、高齢社会の到来、そして食糧の不足に対処する方策を確立することが、食品タンパク質科学者に課せられている最も大きな使命の一つである。このような21世紀の食糧問題に対処するために、脂質代謝改善能を持つダイズ種子タンパク質をモデルタンパク質として、高品質化した食糧タンパク質素材の設計及びその生産システムの開発を目的とする研究を食糧分子細胞生物学的に展開した。

種子タンパク質の構造・加工特性相関に関する分子食糧学的研究

ダイズ種子タンパク質は β -コングリシニンおよびグリシニンを主要成分としており、おのおのが固有の優れた加工特性をもつ。両タンパク質共に複数のサブユニットからなる多量体構造をとっているために、一般的な系統のダイズ種子からサブユニット組成の単一な分子種を調製することは難しく、サブユニットレベルでの加工特性の解析はほとんど進展していなかった。そこで、すべての構成サブユニットに対する大腸菌発現系を構築するとともに、サブユニット種に欠損のある系統の種子を利用して、単一サブユニットよりなる分子種および限定的なサブユニット組成の分子種を調製し、両タンパク質の構造・加工特性相関をサブユニットレベルで解析した。

β -コングリシニンは、 β 、 β' 、 β'' の3種類のサブユニットから構成されている。 β は3種類のサブユニット間で共通のコア領域のみから構成されているが、 β' 及び β'' は、そのN末端にエクステンション領域をもつ。また、3種類のサブユニット共に糖タンパク質であり、 β と β' には2ヶ所に、 β'' には1ヶ所に糖鎖が付加している。大腸菌発現系を利用して調製した β 、 β' 、 β'' の組換え型ホモ3量体及びエクステンション領域を持たない β コアと β' コア、そしてサブユニット種に欠損のある系統を利用して調製した天然型ホモ及びヘテロ3量体の特性(熱安定性、表面疎水性、溶解性、乳化性、加熱会合性)を解析、比較した。組換え型ホモ3量体は天然型ホモ3量体と同じ構造をもつこと¹⁻³⁾、熱安定性はサブユニット間で互いに異なる($\beta < \beta' < \beta''$)¹⁻³⁾が、糖鎖の影響を受けないこと¹⁻³⁾、溶解性、乳化性、加熱会合性はエクステンション領域をもたない β よりもエクステンション領域をもつ β' の方が優れていること²⁾、そして糖鎖はイオン強度0.08における溶解性、 β の乳化性、 β' の加熱会合性に影響すること³⁾が明らかとなった。また、ヘテロ3量体の特性の解析から⁴⁾、あるいは β' をより多く含むヘテロ3量体ほど、より高い表面疎水性を示すこと、各ヘテロ3量体の熱安定性は、熱安定性の低いサブユニットの影響を強く受けていること、あるいは β' を含むヘテロ3量体のイオン強度0.08における溶解性は、おのおの β あるいは β'' のホモ3量体の溶解性と非常に類似していることなどが明らかとなった。さらに、 β と β' のコア領域の立体構造をX線結晶構造解析により決定し、両構造を比較することにより^{5,6)}、両者の熱安定性の違いに複数の要因(分子内のキャビティー、単量体間に存在する電荷を持つアミノ酸残基のクラスター、溶媒接触面の疎水性、ループ領域の長さ、プロリン残基の数など)が影響していることを明らかにした。

グリシニンは、A1aB1b、A1aB2、A2B1a、A3B4、A5A4B3の5種のサブユニットにより構成されている。これ

らのサブユニットはアミノ酸配列の類似性からグループ I (A1aB1b、A1aB2、A2B1a) とグループ II (A3B4、A5A4B3) に分類される。限定的なサブユニット組成のグリシニンを含む系統のサイズから、グループ I のみ、グループ II のみ、A3B4 のみ、A5A4B3 のみから成るグリシニンを、普通品種のシロツルノコから全サブユニットを含むグリシニン(11S)を調製し、それらの特性(熱安定性、表面疎水性、溶解性、乳化性)を解析、比較した⁷⁾。A3B4 の熱変性温度は他のサブユニットに比べて6~8 低いが、グループ I と II の熱変性温度に差はないこと、疎水性カラムクロマトグラフィーによって測定した表面疎水性はグループ I < 11S < A5A4B3 < グループ II < A3B4 であること、11S の溶解性は低イオン強度下ではグループ I と II の平均になるが、高イオン強度下ではグループ I に従うこと、ところがグループ II の溶解性は低イオン強度下でも高イオン強度下でも A5A4B3 に従うこと、乳化性は、グループ I < 11S < A3B4 < グループ II < A5A4B3 であり、熱安定性や表面疎水性と相関しないことが明らかとなった。また、大腸菌発現系を利用して、プロ型グリシニン(グリシニンは種子中の蓄積部位であるタンパク質貯蔵液胞でプロセシングを受け、3 量体のプロ型から 6 量体の成熟型となる)の特性を解析するとともに、成熟型グリシニンの特性と比較することにより、プロ型から成熟型への構造変換により特性が大きく変化することを明らかにした⁸⁾。

種子タンパク質の貯蔵液胞への選別輸送シグナルに関する分子細胞生物学的研究

高品質化した種子タンパク質を種子で大量に、そして安定に蓄積させるためには、種子タンパク質が蓄積されるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送を規定する構造要因(選別輸送シグナル)を同定し、それらの機能を損なうことなく高品質化する必要がある。植物の液胞として、種子などの貯蔵器官に主に存在するタンパク質貯蔵液胞以外にも、葉などに存在する、分解酵素が多く含まれる分解型液胞があるが、両液胞への輸送機構の相違点は明確にはなっていない。そのような状況であるにもかかわらず、種子タンパク質の選別輸送シグナルに関する従来の解析の多くは、簡便さのゆえに、分解型液胞をもつ葉の組織や両液胞の区別がはっきりしない培養細胞を用いて行われていた。より正確な解析を行うためには種子で解析する必要があると考え、 β -コングリシニンの各種変異型サブユニットを、 β -コングリシニンと同種のタンパク質を含有していないアラビドプシスの種子で発現させ、それらの免疫電子顕微鏡観察を行った。'及び' は、アラビドプシスの種子においてもタンパク質貯蔵液胞へ輸送されたが、共に C 末端 10 残基を欠失させると、細胞外に分泌された(図 1)。このことから、'及び' の C 末端 10 残基に選別輸送シグナルが存在することが示唆された^{9,10)}。

さらに、サイズ登熟期種子でレポータータンパク質(緑色蛍光タンパク質、GFP)を一過的に発現させる選別輸送シグナルの解析システム(トランジェントアッセイシステム)を開発し、

'及び' の C 末端 10 残基がサイズ種子中でも選別輸送シグナルとして機能することを証明した^{9,10)}。また、今まで報告されている植物の液胞への選別輸送シグナルは、NP1RL(アミノ酸一文字表記)様のモチーフをもつ配列特異型、C 末端部に位置することが重要であり、配列の共通性はない C 末端型、高次構造により形成される高次構造型の 3 種類に分類されているが、

'の C 末端 10 残基には配列特異型及び C 末端型シグナルが相隣り合った特徴的な構造をしていることを明らかにした¹¹⁾。

グリシニンを欠失したサイズ系統の登熟期種子をトランジェントアッセイシステムに利用して、グリシニンの主要なサブユニットである A1aB1b の選別輸送シグナルについても解析した¹²⁾。構造上、分子表面に露出している A1aB1b の C 末端 10 残基は、GFP をタンパク質貯蔵液胞へ輸送した(図 2-B)。A1aB1b の C 末端 10 残基の C

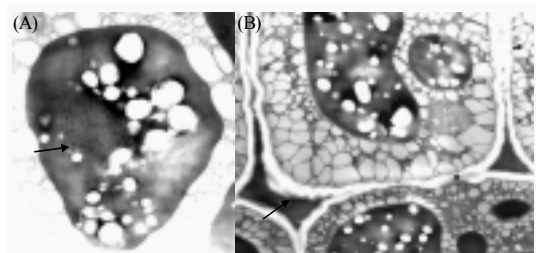


図 1. β -コングリシニンを発現させたアラビドプシス種子の電子顕微鏡観察
(A) β -コングリシニン α'
種子中のタンパク質貯蔵液胞の内部の特定の領域(矢印)に α' が集積している(1次抗体に抗 α' 抗体、2次抗体に金粒子を結合させたものを使用しており、 α' が集積している領域に金粒子が結合している。)
(B) β -コングリシニン α' の C 末端 10 残基を欠失させたもの
タンパク質貯蔵液胞には金粒子が結合していない。細胞間の領域(矢印)に、タンパク質が蓄積している様子が観察され、その領域に金粒子が結合している。つまり、C 末端 10 残基を欠失させることにより、 α' が細胞外に分泌された。

末端に6個のグリシン残基を付加したものでは、GFPはタンパク質貯蔵液胞へは輸送されずに細胞外に分泌されたことから、A1aB1bのC末端部はC末端型シグナルとして機能していることが示唆された(図2-C)。

一方、A1aB1bのC末端型シグナルの機能を欠失させるために、そのC末端にGFPを融合させ(A1aB1bGFP)、グリシニンを欠失した種子で発現させると、細胞外とともにタンパク質貯蔵液胞にも蛍光が観察された

(図2-D)。立体構造データを利用し、C末端部以外に位置する配列特異型シグナルの候補領域を特定し、それらがシグナルとして機能しうるのかを網羅的に解析したところ、disordered領域4近傍に配列特異型シグナルとして機能する領域があることを見出した(図2-E)。

しかし、この領域の配列特異型シグナルとしての機能を欠失させても、A1aB1bGFPのタンパク質貯蔵液胞への輸送は完全には阻害されなかった(図2-F)。以上の結果から、A1aB1bにはC末端型シグナル及び配列特異型シグナルに加えて、高次構造により形成されるシグナルも存在することが示唆された。

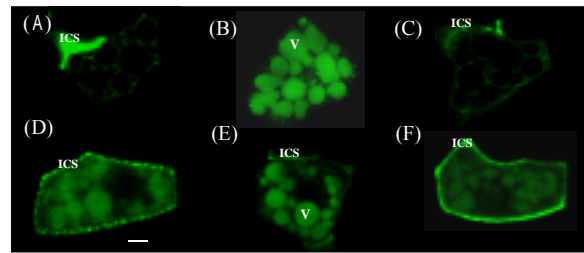


図2. トランジェントアッセイによるグリシニンの選別輸送シグナルの解析
(A) GFP
(B) GFPにA1aB1b C末端10残基を融合させたもの
(C) GFPにA1aB1b C末端10残基とグリシン6残基を融合させたもの
(D) GFPにA1aB1bを融合させたもの
(E) GFPにdisordered領域4を融合させたもの
(F) GFPにdisordered領域4のシグナルとしての機能を欠失させたA1aB1bを融合させたもの
ICS, 細胞外; V, タンパク質貯蔵液胞

高品質化した種子タンパク質の生産システムの開発に関する分子農業的研究

種子タンパク質に新たな生理機能や優れた加工特性を付与して高品質化を行う際に、高次構造形成能を損なわないようにする必要がある。そこで、決定したβ-コングリシニンの立体構造データを用いて、高次構造形成能及びタンパク質貯蔵液胞への被選別輸送能を損なわずに、免疫賦活活性をもつ配列への置換を試みた¹³⁾。分子モデリングにより、高次構造形成可能であると判定された配列に置換した改造を大腸菌発現系で調製し、線結晶構造解析を行い、種子から得られるものと同様の高次構造を形成していることを確認した¹³⁾(図3)。また、改造は期待通りの生理活性を示した。さらに、改造をイネ種子において発現させ、改造がタンパク質貯蔵液胞に非改造型と同様のレベルで蓄積できることを示した。これらの結果は、タンパク質工学的に種子貯蔵タンパク質の生理機能および加工特性を強化する上で、立体構造データを用いることが非常に有効であることを示唆している。

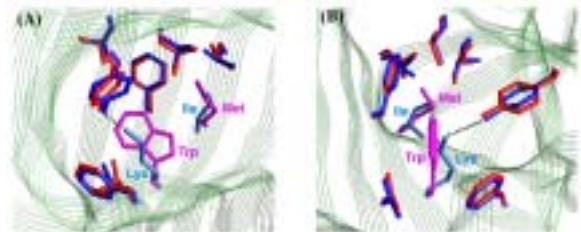


図3. 免疫賦活活性を導入したβ-コングリシニンと野生型の立体構造比較
野生型のI122とK124の側鎖と、免疫賦活活性を導入するために置換したI122とW124の側鎖は、それぞれ水色とマゼンダ色で示している。野生型及び免疫賦活活性導入型の他のアミノ酸は、それぞれ青色と赤色で示している。免疫賦活活性を導入することによる立体構造に対する影響はほとんど見られない。(B)は(A)を90°回転した方向から見たもの。

以上のように、高品質化した食糧タンパク質を分子設計し、それらを食糧素材として作物種子で生産するシステムの基盤を確立した。

謝辞

本研究は、京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学研究室で行われたものです。本研究を遂行するに当たり、終始格別のご指導とご高配を頂きました京都大学大学院農学研究科 内海成教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究にご助言、ご協力頂いた京都大学 三上文三教授、吉川正明教授、北海道農業研究センター 石本政男博士に心からお礼申し上げます。本研究は、品質設計開発学研究室の学生諸氏、非常勤職員の協力により得られたものであり、深く感謝申し上げます。本農学進歩賞にご推薦くださいました京都大学大学院農学研究科長 矢澤進教授にお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 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 structure features. *Eur. J. Biochem.* 258:854-862.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Maruyama N., Mohamad Ramlan M.S., 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.
- 5) 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 β homotrimers. *Eur. J. Biochem.* 268:3595-3604.
- 6) Maruyama Y., Maruyama N., Mikami B. and Utsumi, S. (2004) Structure of the core region of the soybean β -conglycinin α' subunit. *Acta Crysta.* D60:289-297.
- 7) 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.
- 8) Prak K., Nakatani K., Katsube-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.
- 9) Nishizawa K., Maruyama N., Satoh R., Fuchikami Y., Higasa T. and Utsumi S. (2003) A C-terminal sequence of soybean β -conglycinin α' subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *Plant J.* 34:647-659.
- 10) Nishizawa K., Maruyama N., Satoh R., Higasa T. and Utsumi S. (2004) A vacuolar sorting determinant of soybean β -conglycinin β subunit resides in a C-terminal sequence. *Plant Sci.* 167:937-947.
- 11) Nishizawa K., Maruyama N. and Utsumi S.
The C-terminal region of α' subunit of soybean β -conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Mol. Biol.* published online (2006)
- 12) Maruyama N., Ching Mun L., Tatsuhara M., Sawada M., Ishimoto M. and Utsumi S. (2006) Multiple vacuolar sorting determinants exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell* 18:1253-1273.
- 13) Maruyama N., Maruyama Y., Tsuruki T., Okuda E., Yoshikawa M. and Utsumi S. (2003) Creation of soybean β -conglycinin β with strong phagocytosis-stimulating activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1648:99-104.

Molecular and Cell Biological Food Studies on Quality Design of Seed Proteins

Nobuyuki Maruyama (Kyoto University, Graduate School of Agriculture)
marunobu@kais.kyoto-u.ac.jp