
ダイズ種子主要貯蔵タンパク質の分子レベルに おける構造・品質関連に関する研究

(研究課題番号 12460058)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者 内海 成

(京都大学大学院農学研究科)

ダイズ種子主要貯蔵タンパク質の分子レベルに おける構造・品質相関に関する研究

(研究課題番号 12460058)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者 内海 成

(京都大学大学院農学研究科)

は し が き

食源性疾患の増大、高齢化社会の到来、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1つであり、食品タンパク質の高品質化と高度利用法の開発が望まれている。そのブレークスルーとなるのが食品タンパク質の加工特性や健康維持・増進性などの品質と構造との関係を分子レベルで解明することである。ダイズ、コムギ、卵や牛乳のタンパク質は各々に独特の加工特性を備えており、特徴的な加工食品の製造に利用される。これらの加工特性は各食品タンパク質の各構成成分に固有の構造的特徴に基づいて発現される。しかも、一次構造が類似していても、加工特性の異なるものが多い。

ダイズタンパク質は、加熱ゲル化性、乳化性、組織化性などの加工特性を持っている。また、血清コレステロール値低下能などの健康維持・増進に役立つ機能も持っている。しかも脱脂ダイズタンパク質は世界で1年間に約6,000万トン生産されている。したがって、ダイズタンパク質は頭書の研究に適した素材である。ダイズタンパク質は、グリシニン（6量体、分子量約32万）と β -コングリシニン（3量体、分子量約18万）を主要成分としている。構成サブユニットとして、グリシニンには5種（A1aB1b、A1bB2、A2B1a、A3B4、A5A4B3）、 β -コングリシニンには3種（ α 、 α' 、 β ）が同定されている。筆者は、熱安定性、表面疎水性などの構造的特徴や加工特性がグリシニンと β -コングリシニン間ばかりでなくサブユニット間でも互いに異なること、そしてグリシニンのA1aB1bとA3B4、ならびに β -コングリシニンの β のX線結晶構造解析を行い両タンパク質間の一次構造上の相同性は15%しかないが、立体構造は極似していることを見出し出していた。一方、グリシニンの血清コレステロール値低下能に胆汁酸結合能が関わっているが、胆汁酸結合能はサブユニットによって異なっていることが、名古屋大学の牧野らによって報告されていた。

そこで本研究では、グリシニンや β -コングリシニンの加工特性、健康維持・増進性の品質と構造との関係を分子レベルで解明することを目的として、次の四つの観点から研究を進めた：①グリシニンと β -コングリシニンの構成サブユニットのうち立体構造が未解明のもののX線結晶構造解析を進める；②グリシニンと β -コングリシニンの構造・加工特性相関をサブユニットレベルで解明する；③グリシニンの血清コレステロール値低下能に重要な働きをしている領域を明らかにする；④以上の成果に基づいて、グリシニンと β -コングリシニンの構造・品質相関をタンパク質工学の手法を用いて分子レベルで解明する。その結果、以下の成果が得られた。

①：立体構造が未解明のグリシニンA1bB2、A2B1a、A5A4B3、 β -コングリシニン α コア、 α' コアのうち、グリシニンA2B1a、 β -コングリシニン α' コアに

関しては良質の結晶が得られ、スプリング 8 で回折データを測定した。 α' コアの立体構造は決定し（口答発表：4）、A2B1a については解析を進めている。 β -コングリシニン α コアに関しては、結晶は得られたが、質が少し劣るため、良質化を進めている。グリシニン A1bB2、A5A4B3 に関しては、cDNA をクローニングし、大腸菌発現系と精製系を確立した。また、グリシニン A1aB1b と β -コングリシニン β については論文発表するとともに、構造面からの総説も発表した（学会誌等：1,4,5,6）。

②サブユニット組成に変異を持つグリシニンや β -コングリシニンを含有する変異ダイズより、単一サブユニットより成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、それらの構造的特徴と加工特性を解析した。その結果、 β -コングリシニンについては、サブユニットレベルにおける構造・加工特性相関をほぼ解明でき（学会誌等：2,3,7,9,10,11,15；口答発表：1,3,8,9,13）グリシニンについても深く解析できた（学会誌等：3,9,14,15；口答発表：9,12,13,15）。特筆すべき成果は、グリシニンと β -コングリシニンが共通祖先に由来するが加工特性と構造、特に熱安定性や表面疎水性との関わり方が互いに異なることを見い出したことである。

③ダイズタンパク質の血清コレステロール値低下能に対して、グリシニンの胆汁酸結合性が大きく関わっていると考えられている。名古屋大学の牧野らは、ダイズタンパク質をトリプシン消化した時に生じるペプチドのうち、グリシニンの A1aB1b と A2B1a に由来するものが胆汁酸結合性を示すことを報告していた。そこで、A1aB1b について大腸菌発現系を駆使することによって、A1aB1b の胆汁酸結合性に最も疎水性の高いペプチド配列（VAWWMY）が強く関わっていることを確認した（学会誌等：12；口答発表：5,11）。これを利用してグリシニンなどの胆汁酸結合能を強化することが可能であることも確認した。

④グリシニンと β -コングリシニンの立体構造およびサブユニットレベルでの構造・加工特性相関に基づいてタンパク質工学的に解析し、構造・加工特性相関の分子レベルでの理解を深めた（学会誌等：8,13；口答発表：2,6,7,10,14）。

今後、これらの成果を踏まえて、他の種子タンパク質についても解析し、より一般的な構造・加工特性相関を解明することが望まれる。

研究組織

研究代表者：内海 成（京都大学大学院農学研究科 教授）

研究分担者：安達基泰（京都大学大学院農学研究科 助手）

丸山伸之（京都大学大学院農学研究科 助手）

研究経費

平成 12 年度	7,000 千円
平成 13 年度	2,200 千円
平成 14 年度	2,300 千円
総 計	11,500 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) 安達基泰、丸山伸之、三上文三、内海 成：大豆たん白質の分子構造と高機能化設計. 食品工業、**43** (9/30), 53-58 (2000).
- 2) 丸山伸之、内海 成：変異大豆を利用する β -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析. 大豆たん白質研究、**3**, 12-17 (2000)
- 3) 内海 成、丸山伸之：ダイズタンパク質を基本とする新規食品添加物の開発. 三栄源食品化学研究振興財団研究成果報告書、173-180 (2000)
- 4) Adachi, M., Takenaka, Y., Gidamis, A.B., Mikami, B. and Utsumi, S.: Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J. Mol. Biol.*, **305**, 291-305 (2001)
- 5) Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Okuda, E., Nakagawa, S., Mikami, B. and Utsumi, S.: Crystal structure of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3595-3604 (2001)
- 6) 直井如江、内海 成：種子貯蔵タンパク質の分子進化とストレス応答マメ類のグロブリン、ムギ類の germin などの一次構造上に見いだされた cupin モチーフ. 化学と生物、**39**, 212-213 (2001)
- 7) 丸山伸之、内海 成：変異大豆を利用する β -コングリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関の解明. 大豆たん白質研究、**4**, 19-26 (2001)
- 8) 内海 成、安達基泰：ダイズグリシニンの構造安定性とジスルフィド結合. 杉山産業化学研究所年報、61-70 (2001)
- 9) 内海 成、丸山伸之：ダイズタンパク質を基本とする新規食品添加物の開発.
三栄源食品化学研究振興財団研究成果報告書、105-112 (2001)
- 10) Maruyama, N., Mohamad Ramlan, M. S., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., Nakagawa, S. and Utsumi, S.: 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 (2002)

- 11) Maruyama, N., Mohamad Ramlan, M. S., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., Nakagawa, S. and Utsumi, S.: Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin heterotrimers. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4323-4326 (2002)
 - 12) Choi, S.K., Adachi, M. and Utsumi, S.: Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2395-2401 (2002)
 - 13) Utsumi, S., Maruyama, N., Satoh, R. and Adachi, M.: Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 284-288 (2002)
 - 14) 丸山伸之、内海 成: 変異大豆を利用するグリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関の解明. 大豆たん白質研究、**5**, 21-25 (2002)
 - 15) 内海 成、安達基泰、丸山伸之: 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研究成果報告集、211-216 (2002)
- (2) 口頭発表
- 1) 丸山伸之、内海 成: 変異大豆を利用する β -コングリシニンの構造・加工特性相関の解析. 不二たん白質研究振興財団第3回研究報告会 平成12年6月1日、2日(大阪)
 - 2) Utsumi, S.: What can be learned from the experience with transgenic soybean proteins with improved functional properties, such as gelation and emulsification properties, for other industrial proteins? Third International Symposium on Industrial Proteins, 2001年3月15日-16日(オランダ、ハーグ)
 - 3) 丸山伸之、モハマド ラムラン、矢ヶ崎和弘、高橋浩司、内海 成: ダイズコングリシニンの均一ヘテロ3量体の構造・加工特性相関. 日本農芸化学会2001年度大会 平成13年3月24日-3月27日(京都)
 - 4) 直井如江、丸山伸之、三上文三、内海 成: ダイズ β -コングリシニンの α' サブユニットのコア領域の結晶構造解析. 日本農芸化学会2001年度大会 平成13年3月24日-3月27日(京都)
 - 5) 崔 善江、安達基泰、内海 成: 大豆グリシニン酸性鎖および変異体の大腸菌での発現と胆汁酸結合の評価. 日本農芸化学会2001年度大会 平成13年3月24日-3月27日(京都)
 - 6) 奥田英子、安達基泰、三上文三、内海 成: プログリシニン A1aB1b 変異体 Y65L、Y355L および D157A の構造形成能と構造安定性. 日本農芸化学会2001年度大会 平成13年3月24日-3月27日(京都)

- 7) 何 純瑛、安達基泰、奥田英子、三上文三、内海 成：プログリシニン A1aB1b の新たな SS 結合の分子設計と構造安定性. 日本農芸化学会 2001 年度大会 平成 13 年 3 月 24 日-3 月 27 日 (京都)
- 8) 丸山伸之、内海 成：変異大豆を利用する β -コングリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関の解明. 不二たん白質研究振興財団第 4 回研究報告会 平成 13 年 5 月 24 日、25 日 (大阪)
- 9) 内海 成、安達基泰、丸山伸之：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助成研究発表会 平成 13 年 7 月 25 日 (東京)
- 10) 何 純瑛、安達基泰、奥田英子、内海 成：プログリシニンへの新たな SH 基、SS 結合の導入の構造安定性と加熱ゲルへの効果. 日本農芸化学会 2002 年度大会 平成 14 年 3 月 24 日-3 月 27 日 (仙台)
- 11) 崔 善江、安達基泰、内海 成：ダイズグリシニン酸性鎖 A1a の胆汁酸結合に重要な領域の探索. 日本農芸化学会 2002 年度大会 平成 14 年 3 月 24 日-3 月 27 日 (仙台)
- 12) 丸山伸之、内海 成：変異大豆を利用するグリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関の解明. 不二たん白質研究振興財団第 5 回研究報告会 平成 14 年 5 月 23 日、24 日 (大阪)
- 13) Utsumi, S.: Structure and physicochemical functions of soybean proteins. Functionality Symposium, 2002 年 9 月 4 日 (アメリカ、セントルイス)
- 14) 熱田奈美、安達基泰、Mary Rose Tandang、丸山伸之、内海 成：ダイズプログリシニンの改造許容性と乳化性の改善. 日本農芸化学会関西支部例会 平成 15 年 2 月 1 日 (京都)
- 15) 丸山伸之、Krisna Prak、坂 志織、古東潤子、澤田真千子、矢ヶ崎和弘、内海 成：変異大豆を利用するグリシニンのサブユニットレベルにおける構造・加工特性相関の解析. 日本農芸化学会 2003 年度大会 平成 15 年 3 月 31 日-4 月 3 日 (東京)