
種子貯蔵タンパク質の分子レベルに おける構造・加工特性相関に関する研究

(研究課題番号 15380092)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 内海 成

京都大学大学院農学研究科教授

種子貯蔵タンパク質の分子レベルに
おける構造・加工特性相関に関する研究

(研究課題番号 15380092)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 内海 成

京都大学大学院農学研究科教授

は し が き

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する方策を確立することが、21 世紀の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。食糧の基本である植物はコレステロールを含有していない。したがって、植物タンパク質の高度利用法の開発が望まれる。そのブレークスルーの一つとなるのが植物タンパク質の構造と加工特性との相関を分子レベルで解明することである。

種子は、タンパク質を乾燥重量当たり 10–40% 含んでおり、植物性タンパク質の中で量的に特に重要なタンパク質である。コムギやトウモロコシなどの穀類を除く多くの植物の種子は、7S グロブリン(7S) および／あるいは 11S グロブリン(11S) を主要貯蔵タンパク質としている。7S は 3 量体構造、11S は 6 量体構造をもつ。起源が異なっても 7S 間および 11S 間で 35–90% のアミノ酸配列の類似性がある。2002 年までに立体構造が解明されたのは、7S ではインゲンマメファゼオリン、タチナタマメカナバリンと申請者らが決定したダイズ 7S β 、11S としては申請者らが決定したダイズ 11SA1aB1b と A3B4 である。これらの結果から、起源が異なっても、またアミノ酸配列の類似性が低くても、7S 間、11S 間で立体構造は極めて類似していることが判明している。また、7S と 11S 間では、アミノ酸配列の類似性は低く 15% ほどであるが、局部的に類似性が高い領域があり、共通祖先に由来していると考えられていた。立体構造の解明はこのことを実証した。このように、種々の種子の 7S 間、11S 間、7S と 11S 間に構造的共通性がある。しかし、我々は、異なる起源間ではもとより、同じ植物に由来するものであってもサブユニットによって特性が異なることを明らかにしている。すなわち、我々は、ダイズの 7S と 11S の加工特性に関して解析を進め、これらの加工特性は互いに、また、構成サブユニットによって大きく異なることを見い出すとともに、その構造・加工特性相関を分子レベルで部分的に明らかにした。さらに、最近、マングビーンの 7S およびナタネの 11S の加工特性を解析したところ、ダイズの 7S の構造・加工特性相関およびダイズの 11S の構造・加工特性相関が、これらに当てはまらないことを見い出した。このことは種子タンパク質の構造・加工特性相関を分子レベルで解明するためには、種々の種子の貯蔵タンパク質について系統だって解析し、その結果を総合的に評価する必要があることを意味している。

本研究では、種子の 7S と 11S に関して構造・加工特性相関を分子レベルで解明することを目的として、次の 4 つの観点から研究を進めた: ①ダイズの 7S と 11S の構成サブユニットのうち、立体構造が未解明のものも含め、できるだけ多くの種子の 7S と 11S の立体構造を解明する; ②各タンパク質標品のタンパク質化学的特性と加工特性を、構造に影響しうる種々の外部環境下 (pH、イオン種、イオン強度) において測定する; ③各タンパク質標品の立体構造に基づく分子表面における疎水性残基、親

水性残基の分布、さらには分子内部における cavity の大きさや荷電残基の有無、イオン結合など、加工特性と密接に関連する性質と種々の条件下における加工特性の測定結果を比較検討する。その結果、以下の成果が得られた。

①ダイズ 11S の構成サブユニットのうち、A2B1a の立体構造を解明するとともに、11SA3B4 および 7S α' コアについては、論文としてまとめた(原著論文:1, 3)。また、アズキ 7S、マングビーン 7S およびカボチャ 11S の立体構造を決定した(学会発表:10, 13)。さらに、エンドウ 11S、ダイズ 11SA1bB2, A5A4B3 については結晶が得られたが、質が少し劣っていたため、改良を進めている。一方、ダイズ 11SA1aB1b については部位特異的変異によってジスルフィド結合を欠損させた変異型の立体構造を解明し、ジスルフィド結合の欠損は立体構造にほとんど変化をもたらさないことを見い出した(原著論文:2)。

②サブユニット構成に変異をもつダイズ 11S や 7S を含有する変異ダイズから調製した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、ダイズ 11S の 5 種のサブユニットの cDNA の大腸菌発現系を構築して調製したプロ型ホモ分子種、ダイズ野生種ツルマメの多くの系統を検索して見い出した特殊なサブユニット種を含有する分子種、マングビーンおよびアズキ 7S の天然型と組換え型、ダイズ 7S と 11S およびナタネ 11S の改造型、これらの構造的特徴と加工特性を解析した。その結果、ダイズ 11S の各構成サブユニットは固有の性質をもつこと(原著論文:9); ダイズ 11S の乳化性に対して、超可変領域の長さが関わること(原著論文:9); ダイズ 11S の天然型とプロ型とでは性質が大きく異なること(原著論文:10); ダイズ 7S のゲル化に対する構成サブユニットの寄与の仕方は一様ではないこと(原著論文:6); 可変領域におけるアミノ酸配列のわずかな違いが熱安定性に影響すること(原著論文:11); 糖鎖は低イオン強度下中性近辺における溶解性を高めること(学会発表:13); 7S の低イオン強度下における凝集には分子表面の静電ポテンシャル分布が関わること(学会発表:13); ナタネ 11S は他の種子 11S とは異なる特性をもつこと(原著論文:4, 8); ダイズ 11S は SH 基を導入すると加熱ゲル化性が改善されること(原著論文:7); ダイズ 11S, ナタネ 11S, ダイズ 7S のいずれも、その C 末端部にダイズ 7S α' のエクステンション領域を付加すると乳化安定性が極めて高くなること(原著論文:12)を見い出した。

③種子タンパク質の構造と加工特性の相関の一般則として、糖鎖は低イオン強度下における溶解性を高めること; 7S の低イオン強度下中性近辺の凝集性に関して分子表面の静電ポテンシャルの分布が重要な働きをすること; 7S, 11S とともにその C 末端部が極性アミノ酸に富み、かつ自由度が高いほど高度な乳化安定性を示すこと。

本研究で行った解析をさらに多くの種子タンパク質に適用することによって、種子貯蔵タンパク質の構造・加工特性相関の、より広い一般則を解明できると期待できる。

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：丸山伸之(京都大学大学院農学研究科 助手)

研究経費

平成 15 年度 7,500 千円

平成 16 年度 3,600 千円

平成 17 年度 3,900 千円

総 計 15,000 千円

研究発表

(1)原著論文

1) Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B. and Utsumi, S.: Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7395-7400 (2003).

2) Adachi, M., Okuda, E., Kaneda, Y., Hashimoto, A., Shutov, A. D., Becker, C., Muntz, K. and Utsumi, S.: Crystal structures and structural stabilities of the disulfide-deficient soybean proglycinin mutants C12G and C88S. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4633-4639 (2003).

3) Maruyama, Y., Maruyama, N., Mikami, B. and Utsumi, S.: Structure of the core region of the soybean β -conglycinin α' subunit. *Acta Cryst.*, D60, 289-297 (2004).

4) Tandang, M.R.G., Adachi, M. and Utsumi, S.: Cloning and expression of rapeseed procruciferin in *Escherichia coli* and crystallization of the purified recombinant protein. *Biotechnol. Lett.*, 26, 385-391 (2004).

5) Bernardo, A.E.N., Garcia, R.N., Adachi, M., Angeles, J.G.C., Kaga, A., Ishimoto, M., Utsumi, S. and Tecson-Mendoza, E.M.: 8S globulin of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: Cloning and characterization of its cDNA isoforms, expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization of the major recombinant 8S isoform. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2552-2560 (2004).

6) Mohamad Ramlan, M.S., Maruyama, N., Takahashi, K., Yagasaki, K., Higasa, T., Matsumura, Y. and Utsumi, S.: Gelling properties of soybean β -conglycinin having different subunit compositions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1091-1096 (2004).

7) Adachi, M., Ho, C. and Utsumi, S.: The effects of designed sulfhydryl groups and disulfide bonds into soybean proglycinin on its structural stability and heat-induced gelation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5717-5723 (2004).

8) Tandang, M.R.G., Adachi, M., Inui, N., Maruyama, N. and Utsumi, S.: The effects of protein engineering of rapeseed procruciferin on its physicochemical and functional properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6810-6817 (2004).

9) Maruyama, N., Prak, K., Motoyama, S., Choi, S.K., Yagasaki, K., Ishimoto, M. and Utsumi, S.: Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8197-8201 (2004).

10) Prak, K., Nakatani, K., Katsube-Tanaka, T., Adachi, M., Maruyama, N. and Utsumi, S.: Structure-function relationship of soybean proglycinins at subunit levels. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3650-3657 (2005).

11) Fukuda, T., Maruyama, N., Kanazawa, A., Abe, J., Shimamoto, Y., Hiemori, M., Tsuji, H., Tanisaka, T. and Utsumi, S.: Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean *Glycine soja* storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3658-3665 (2005).

12) Tandang, M. R. G., Atsuta, N., Adachi, M., Maruyama, N. and Utsumi, S.: Evaluation of solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure by protein engineering. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8736-8744 (2005).

(2) 著書・総説

1) Maruyama, N., Mendoza E., Maruyama, Y., Adachi, M. and Utsumi, S.: Molecular design of soy proteins for enhanced food quality. In *Food Biotechnology: Second*

edition. ed. by K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin, pp.649-674, CRC Press LCL (2005).

2) 福田貴子、木村愛子、丸山伸之、内海 成: 豆科種子貯蔵タンパク質の構造・加工特性相関 FFI ジャーナル、210、1039-1047 (2005).

(3) 学会発表

1) 本山志織、藤岡美樹、丸山伸之、内海 成 : 種々の種子貯蔵タンパク質の食品機能と関連する特性の比較. 日本農芸化学会 2004 年度大会 平成 16 年 3 月 28 日-3 月 31 日 (広島)

2) 福田貴子、丸山伸之、島本義也、金澤 章、阿部 純、谷坂隆俊、内海 成 : ダイズ野生種ツルマメ変異系統貯蔵タンパク質の特性の決定要因. 日本農芸化学会 2004 年度大会 平成 16 年 3 月 28 日-3 月 31 日 (広島)

3) Prak, K., Nakatani, N., Maruyama, N. and Utsumi, S. : Structure-function relationships of soybean recombinant proglycinins. 日本農芸化学会 2004 年度大会 平成 16 年 3 月 28 日-3 月 31 日 (広島)

4) Utsumi, S. : Engineering the protein functionality of soybean seed proteins based on their three dimensional structures. 2004 年 5 月 15 日-5 月 19 日 (ドイツ, マイスドルフ)

5) Fukuda, T., Maruyama, N. and Utsumi, S. : Analysis of wild soybean [*Glycine soja*] seed storage proteins for developing soybean with improved functions. 2004 年 5 月 15 日-5 月 19 日 (ドイツ, マイスドルフ)

6) 中谷和代、Krisna Prak、丸山伸之、内海 成 : ダイズプログリシニンの加工特性のたんぱく質工学的改良. 日本農芸化学会関西支部第 438 回講演会 平成 17 年 2 月 5 日 (京都)

7) 福田貴子、藤岡美樹、丸山伸之、内海 成 : アズキ貯蔵タンパク質の特性解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会 平成 17 年 3 月 28 日-3 月 30 日 (札幌)

8) 菅原聡恵、福田貴子、丸山伸之、内海 成 : バンバラマメ種子貯蔵タンパク質の特性解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会 平成 17 年 3 月 28 日-3 月 30 日 (札幌)

9) 内海 成、Krisna Prak、福田貴子、木村愛子、菅原聡恵、伊藤貴文、丸山伸之、三上文三 : 大豆たん白質の構造と加工特性. 日本農芸化学会 2006 年度大会 平成 18 年 3 月 25 日-3 月 28 日 (京都)

10) 伊藤貴文、福田貴子、三上文三、内海 成 : カボチャ種子貯蔵タンパク質 11S グロブリン前駆体の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2006 年度大会 平成 18 年 3 月 25 日-3 月 28 日 (京都)

11) 菅原聡恵、福田貴子、丸山伸之、内海 成 : バンバラマメ種子貯蔵タンパク質の特性解析-2. 日本農芸化学会 2006 年度大会 平成 18 年 3 月 25 日-3 月 30 日 (京都)

12) 木村愛子、福田貴子、Krisna, Prak、丸山伸之、内海 成 : インゲンマメ 7S グロブリンの優れた特性を決定する要因. 日本農芸化学会 2006 年度大会 平成 18 年 3 月 25 日-3 月 30 日 (京都)

13) 福田貴子、丸山伸之、伊藤貴文、三上文三、内海 成 : アズキ 7S グロブリンの特性と構造. 日本農芸化学会 2006 年度大会 平成 18 年 3 月 25 日-3 月 30 日 (京都)