

タンパク質性甘味料の構造と機能の解析

山形大学理学部・准教授 井深 章子

■ 目的

タンパク質は一般に無味である場合が多いが、卵白リゾチーム、亜熱帯植物由来のモネリン、ソーマチンなど甘味を有するタンパク質(甘味タンパク質)の存在が知られている。また、酸味を甘味に変換する性質を持つ味覚修飾タンパク質と呼ばれるタンパク質も存在する。ミラクリンは西アフリカ原産ミラクルフルーツ由来の味覚修飾タンパク質であるが、味覚修飾作用の分子メカニズムはまだわかっていない。本研究では、ミラクリンに相同性の高いタンパク質の解析を行い、そのアミノ酸配列をミラクリンに近づけていくことで、味覚修飾活性に関与するアミノ酸残基の同定を行い、タンパク質が「甘味」を呈するのに必要な構造的特徴を解明することを目的としている。

■ 方法

タンパク質および核酸データベースを対象として、ミラクリン類似タンパク質を BLAST で検索した。得られた結果を基に実験対象とする植物を選択した。植物試料から全 RNA を抽出し cDNA を合成し、これを鋳型として PCR 増幅した DNA 断片の塩基配列を確認した。クローニングしたミラクリン類似タンパク質遺伝子の両末端に制限酵素切断部位を導入し、この遺伝子を pET9a および pET28a に挿入してタンパク質の生産を SDS-PAGE で確認した。

■ 結果および考察

【ミラクリン類似タンパク質の検索と対象植物の選択】

ミラクリンに似た配列のタンパク質を BLAST で検索した結果、ポプラ、シロイヌナズナ、タバコ、ダイズ、ブドウなどがあげられた。本研究では身近な農業植物であるダイズとブドウにミラクリン類似タンパク質遺伝子が存在することに注目した。

【クローニング】

ダイズの実、葉、ブドウの実、葉からそれぞれ RNA 抽出を試みた。ダイズの実、葉からは RNA 抽出することができたが、ブドウの実、葉からの抽出はうまくいかなかった。抽出したダイズの葉と実から cDNA を合成し DNA 断片を増幅した。この塩基配列を解析した結果、データバンクに登録されたダイズ由来のミラクリン類似タンパク質と塩基配列は 2 箇所異なる部位があったが、アミノ酸配列は完全に一致し、用いたダイズの中にこのタンパク質をコードする遺伝子が含まれていることが確認できた。

【大腸菌における発現】

大腸菌 BL21(DE3)pLysS を宿主として pET 発現系を構築し、タンパク質の発現を SDS-PAGE で確認した。目的タンパクは約 23kDa である。発現プラスミドで大腸菌を形質転換したが、SDS-PAGE では発現は確認できなかった。

■ 結語

甘味関連タンパク質は、熱帯あるいは亜熱帯の植物由来のものが大部分であるが、それらの類似タンパク質は日本で一般に栽培される植物にも存在する。本研究ではミラクリン類似タンパク質のクローニングおよびタンパク質発現・解析を行うことで、タンパク質における甘味発現機構を解明することを目指している。

本研究ではダイズのミラクリン類似タンパク質遺伝子のクローニングに成功した。しかし、このタンパク質の大腸菌での発現は確認できなかった。今後は宿主を大腸菌から酵母へ変更し、大量発現系を確立した上で今後の解析を進めたい。ブドウについては RNA 抽出において実験が頓挫しており、これはブドウのポリフェノール含量が高いことによると考えられる。RNA 抽出方法を工夫し、ブドウのミラクリン類似タンパク質についても同様の実験を進める予定である。