

ダイズ種子貯蔵タンパク質超高次構造体の形成機構の解明と 新規食品素材としての応用

京都大学大学院農学研究科・教授 裏出 令子

■ 目的

ダイズ種子の主要なタンパク質である β -コングリシニンとグリシニンは種子貯蔵タンパク質であり、ダイズ子葉細胞の粗面小胞体で生合成され小胞体内腔で立体構造が形成された後、細胞内輸送によりタンパク質貯蔵液胞(PSV)に輸送・蓄積される。最近私たちは、 β -コングリシニンがジスルフィド結合に依存した超高次構造体としても存在することを見いだした。従来の食品用ダイズタンパク質の分離操作では還元剤が使用されているため、生産されているダイズタンパク質には超高次構造体は存在せず、その食品加工特性は未知である。本研究では超高次構造体の新しい食品素材としての利用を目指して、構造およびその形成に関わる機構および超高次構造体を維持した β -コングリシニンの単離法を検討することを目的とした。

■ 方法

ダイズ(*G. max*, cv Jack)の未熟子葉あるいは種子を液体窒素中で凍結し SK ミルにより粉碎した粉から、N-エチルマレイミドを含有する Tris / HCl 緩衝液でタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は電気泳動により分離後、抗 β -コングリシニンプロペプチド抗体、抗グリシニン酸性鎖抗体あるいは抗 β -コングリシニン α' 抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。グリシニンの複合体の解析では、1次元目を Blue Native PAGE で2次元目を非還元条件での SDS-PAGE で分離し抗グリシニン抗体を用いたウエスタンブロット分析を行った。

■ 結果および考察

超高次構造体の形成に関わる β -コングリシニンのサブユニットを同定し、超高次構造体を支えるジスルフィド結合の形成が生合成後のどの段階で形成されているかを明らかにするために、前駆体型 β -コングリシニンに対する抗体などを用いたウエスタンブロット分析を行った。その結果、 α および α' サブユニットが前駆体型の段階で特定のシステイン残基を用いて α あるいは α' 同士および P34 と分子間ジスルフィド結合を形成することが明らかとなった。また、野生型ダイズと β -コングリシニンノックダウンダイズのグリシニン複合体を Blue Native PAGE 法を用いて解析することにより、グリシニンと β -コングリシニンが非共有結合により複合体を形成していることを見いだした。そのサイズからグリシニンの6量体と分子間ジスルフィド結合を形成していない β -コングリシニンの6量体とが会合した複合体であると推定された。このような種子貯蔵タンパク質の細胞内での会合体形成は、貯蔵タンパク質の細胞内輸送および集積に重要であると考えられる。また、グリシニンと β -コングリシニンの高分子複合体は還元剤により解離することから、ダイズタンパク質の工業的な分画工程において還元剤を添加すると β -コングリシニンとグリシニンの分離が改善される理由が判明した。さらに、 β -コングリシニンの超高次構造体を新規な食品素材として利用するために、ジスルフィド結合を切断せずに β -コングリシニンを単離する方法を検討した。その結果、還元剤を入れずに抽出した総タンパク質からまず pH 6.0 でグリシニンおよびグリシニンと β -コングリシニンの高分子複合体を沈殿させた後、pH を 4.8 に調整することによりグリシニンがほとんど混在しない超高次構造体の β -コングリシニンを回収できることを明らかにした。

■ 結語

本研究により、ダイズ子葉細胞では種子貯蔵タンパク質が多様な会合体を形成することが明らかになった。このような多様な会合体の存在は、ダイズタンパク質の単離などを行う際の不具合の原因になっていると同時に、未知の食品加工特性を持つ素材としての可能性を包含している。今後は、新規なタンパク質素材として超高次構造体の加工特性を検討したい。