

---

# 大豆タンパク質をリン酸化できる ポリリン酸依存プロテインキナーゼの開発

京都大学農学研究科食品生物科学専攻・助教 河井 重幸

---

## ■ 目的

栄養価に優れ、様々な食品機能を有する良好な食品素材である大豆タンパク質のリン酸化技術は、大豆タンパク質の機能改善や用途拡大にとって重要な技術である。これまで、大豆タンパク質の化学的リン酸化法および酵素によるリン酸化法が報告されていた。しかし、前者は安全性の面で、後者は高価な ATP を必要とするなどの面で問題があった。ポリリン酸はリン酸の重合体であり、ATP よりもはるかに安価である。もし、ポリリン酸依存プロテインキナーゼ(タンパク質リン酸化酵素)による大豆タンパク質のリン酸化が可能になれば、ポリリン酸を利用した安全・安価で産業化が可能な大豆タンパク質のリン酸化が可能になる。本研究では、ポリリン酸依存プロテインキナーゼの開発を試みた。

## ■ 方法

プロテインキナーゼ活性は Phos-tag を用いた系により測定した。基質大豆タンパク質として「おいしい無調整豆乳(紀文)大豆固形分 8%以上」を使用した。市販の ATP 依存 cAMP 依存プロテインキナーゼ触媒サブユニット(PKA)として、マウス由来組換え PKA(NEB)を使用した。PknA の発現のために、人工合成した PknA 遺伝子断片を pMAL-c2 ベクター(NEB)に挿入した。PKA の発現には、pET-15b PKA Cat(マウス由来 PKA 遺伝子が発現ベクター pET-15b に挿入、addgene 社から入手)を用いた。PknA と PKA とともに発現の宿主には大腸菌を用いた。

## ■ 結果および考察

最適な大豆タンパク質量を決定し、市販 PKA を用いて ATP(終濃度 5mM)によるリン酸化(キナーゼ)反応を実施し、反応液を Phos-tag 含有 SDS-PAGE で分析したところ大豆タンパク質の明瞭なバンドシフトが観察された。すなわち、大豆タンパク質の酵素的リン酸化を Phos-tag で簡便に検出することにはじめて成功した。なお、市販 PKA によるポリリン酸依存大豆タンパク質リン酸化反応は観察されなかった。PKA のグラム陽性細菌のホモログ PknA の発現系を構築し、精製 PknA を得たが、ATP/ポリリン酸依存大豆タンパク質キナーゼおよび同 Myelin basic protein(PknA 本来の基質)リン酸化活性は検出できなかった。そこで、PKA の発現系を構築し、PKA を精製した。本 PKA を用いた ATP 依存の大豆タンパク質リン酸化反応を確認した。本 PKA にポリリン酸利用能を付与するために、立体構造既知のブタ PKA-MnAMP-PNP 複合体を参照し、Glu-170 および Glu-127 を Ala に置換したが、得られた置換酵素は ATP およびポリリン酸依存大豆タンパク質リン酸化活性を示さなかった。

## ■ 結語

本研究では、Phos-tag を用いた市販 PKA による ATP 依存の大豆タンパク質リン酸化の検出系を構築した。また、市販ではなく発現させて精製した PKA を用いた大豆タンパク質リン酸化検出系も構築することができた。今回試みたマウス PKA の Glu-170 および Glu-127 の Ala への置換では本 PKA にポリリン酸利用能を付与することはできなかったが、今後はハイスルーブット法による変異導入等による PKA へのポリリン酸利用能の付与による、大豆タンパク質をリン酸化できるポリリン酸依存プロテインキナーゼの開発が可能になると期待された。