

遺伝子工学による大豆タンパク質の高品質化

京都大学食糧科学研究所 内海 成

食品タンパク質が具えることが望ましい性質として、安全性、栄養性、嗜好性、機能特性、生理活性、そして経済性がある。これらの性質を兼ね具え、しかも優れた性質のものが高品質な食品タンパク質である。生理活性はいわゆる機能性食品としての性質であるが、食品タンパク質が人体内で実際にそのような性質を示すかどうかは不明であるので、具えていなければならないというものではない。

高品質化の材料として、演者らは主に、大豆タンパク質を取り上げている。なぜ大豆かというと、まず、大豆タンパク質は安価である。しかも、栄養性、機能特性とも植物性タンパク質の中で、優れているほうである。また、大豆は植物であるから、植物性脂質を含んでおり、成人病の原因となる動物性脂質を含んでいない。そればかりか、大豆タンパク質は、ウサギやラットなどでは血中コレステロール値を低下させることも知られている。このように、大豆タンパク質は優れた性質を兼ね具えている。しかし、動物性タンパク質と比べると、栄養性、機能特性とも見劣りがする。従って、利用性の高い食品素材という観点からすると、栄養性、機能特性を改善するという高品質化が要求されている。

食品タンパク質の栄養性や機能特性を改善し、高品質化を成し遂げるためには、まず、標的タンパク質の構造的特徴や機能特性発現機構を明らかにしなければならない。そして、構造と機能特性との相関関係を解明し、それを踏まえて、栄養性、機能特性の改善という高品質化を図る必要がある。演者らはこの高品質化を遺伝子工学によって成し遂げようとしている。ここでは、構造と機能特性との相関関係の解析については割愛させていただき、大豆タンパク質の遺伝子工学による高品質化について述べる。

1. 大豆グリシニンcDNAの微生物細胞における大量発現系の確立

タンパク質工学的に高品質化を達成するためには、まず標的タンパク質に対する遺伝子を手入手する必要がある。そして、機能特性発現機構と構造との相関性、構造形成との関係、さらには遺伝子の塩基配列を踏まえて高品質なタンパク質を分子設計し、それに対する改変遺伝子を作製しなければならない。次いで、改変遺伝子を植物体へ戻す前に、改変遺伝子がコードする改変タンパク質が本来の構造を形成し、期待通りの性質を示すかどうかを評価することが重要となる。この評価のためには、改変遺伝子の大量発現系を確立することが必要である。筆者らは迅速さの観点から微生物細胞（大腸菌、酵母）での大量発現系の確立を図ることにした。

演者は大豆タンパク質のうち、栄養性、機能特性ともより優れているグリシニンに焦点をしばって研究を進めている。グリシニンは6 コのサブユニットから構成されている。各サブユニットはポリソーム上で、シグナルペプチドに始まりA鎖、B鎖と続く一本鎖のプレプログリシニンとして生合成される。翻訳と同時

にERへ移行する際に、シグナルペプチドがプロセッシングを受けプログリシニンとなる。このものはERの中で3量体として存在する。ERからプロテインボディへ移行する際に、A鎖とB鎖の間がプロセッシングを受け成熟型になり、6量体として蓄積する。

このようなグリシニンのcDNAの大腸菌における発現系の確立を、*trc* プロモーターを持つ発現プラスミドpKK233-2を利用して試みた。シグナルペプチド部を5残基以上コードするcDNAからは、発現タンパク質を検出できなかったが、シグナルペプチド部を3残基以下だけ含むもの、さらに、N末端部を1~11残基欠失したものをコードするcDNAからは発現タンパク質が検出された。これは、シグナルペプチド部が5残基以上存在すると、その疎水性のために発現タンパク質の折りたたみが阻害され、プロテオリシスを受け易くなるためである。つまり、大腸菌での発現にはシグナルペプチド部を除去することが必須であった。そして、発現条件を種々検討することにより全菌体タンパク質当たり約20%という大量発現系を確立することに成功した。しかも、発現タンパク質は可溶性であった。また、発現タンパク質はプロ型であった。

*PH05*を持つpAM82を利用して、酵母における発現系の確立も図った。酵母では、大腸菌とは異なりプレプロ型をコードするcDNAからも発現した。発現タンパク質からシグナルペプチド部が大豆におけるのと全く同じ位置で切斷され、菌体内にプロ型で蓄積していた。また、発現のレベルは全菌体タンパク質当たり約5%と、酵母としては高いものであった。しかし、発現タンパク質は不溶性であった。そこで、以下の実験には大腸菌の系を用いた。

II. 大量発現系の遺伝子工学的研究への利用性

本大量発現系を遺伝子工学的研究に用いるためには、発現タンパク質がグリシニン本来の構造を形成すること、そして、グリシニンに固有の性質を示すことを確認する必要がある。そこで、発現タンパク質を大量に精製し、その構造および性質について調べた。

大腸菌での発現タンパク質は大豆のERにおけるのと同様に3量体に分子集合し、大豆のグリシニンとほぼ同じ二次構造をしていること、つまり、同様の構造を形成することが確認された。一方、グリシニンの基本的性質として、冷沈性とカルシウムによる沈澱性がある。また、食品機能特性として重要なものに、加熱ゲル化性と乳化性がある。発現タンパク質がこれらの性質を具えていることを確認した。これらのことは、遺伝子工学的改変を施こしたグリシニンの構造形成能、機能特性発現能の解析に大腸菌での発現系を利用できることを示している。

III. 大豆グリシニンの遺伝子工学的高品質化

高品質化を理論的に成し遂げるためには、どのような改変を施せば栄養性や機能特性を改善できるか、その改変のためにグリシニン本来の構造形成が損なわれないか、そしてそのような改変をいかに施こせばよいか、という3点が問題となる。栄養性を改善するためには、制限アミノ酸（メチオニン）の強化あるいは消

化性の改善を行えばよい。機能特性の改善法は構造と機能特性の相関関係から得られる。つまり、加熱ゲル化性の改善法として構造の不安定化、乳化性の改善法として構造の不安定化と疎水性度の強化を挙げることができる。一方、種々の種子グリシニン類似タンパク質の1次構造の比較から、保存領域と可変領域が提示されている。可変領域における改変は構造形成を阻害する可能性が低いと考えられるので、可変領域を改変可能部位と考えることができる。グリシニンは5ヶ所（I～V）の親水性アミノ酸に富む改変可能部位を持っている。改変を施す方法として①ドメイン交換、②合成DNAあるいは外来遺伝子の挿入、③特定領域の欠失・挿入、④部位特異的変異などがある。従って、これらの3点を踏まえて、高品質なグリシニンを分子設計すればよい。以下、演者らが実際に行っている改変を方法別に紹介する。

①ドメイン交換：グリシニンのメチオニン含量は、各サブユニットのA鎖、B鎖によって異なっている。従って、A鎖とB鎖を交換することにより、メチオニン含量を強化できる。②合成DNAの挿入：第一義的に栄養性を改善するために、複数のメチオニンからなるペプチドを改変可能部位に挿入する。この場合、親水性の領域に疎水性のクラスターが形成されることになるので、栄養性に加えて機能特性も同時に改善されることが期待できる。③特定領域の欠失：各改変可能部位を欠失させることによって、疎水性を強化するとともに、構造を不安定化すると考えられる。その結果、機能特性が改善されることが考えられる。④部位特異的変異：S-S結合の形成に関与しているシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換することによって、構造を不安定化できる。従って、機能特性の改善を図れる。

高品質化の成否は、改変タンパク質がグリシニン本来の構造形成能を持つかどうかにかかっている。改変していない発現タンパク質は大腸菌中で可溶性の状態で大量に発現し、しかも分子集合できる。一方、シグナルペプチド部を持つプレプログリシニンは、シグナルペプチド部の疎水性のために構造形成が阻害を受け、分解を受け易い。従って、構造形成に不都合な改変を施されたものは、大腸菌中で分解する、あるいは不溶化する、と考えられる。そこで、(1)大量発現する、(2)可溶性である、(3)分子集合する、の3点を正しい構造形成の基準とした。

演者らは、調製した改変遺伝子を大腸菌で発現させ、発現改変タンパク質の構造形成能および機能特性発現能の評価を進めている。すでに評価の終わったもののうち、第Iあるいは第V改変部位を欠失したもの、第IVあるいは第V改変部位にメチオニンを挿入したものは正しく構造形成をするとともに、期待通りに優れた機能特性を示すことを確認した。特に、第V改変部位にメチオニンを挿入したものは、栄養性に加えて、乳化性、加熱ゲル化性とも優れていた。

以上のように、グリシニンの構造的特徴とそれらの機能特性との相関関係を踏まえて理論的に改変グリシニンを分子設計し、グリシニンを高品質化することに成功した。ここに紹介した各改変法を組み合わせることによって、より高品質なグリシニンを創製することも可能であろう。