

立体構造に立脚した種子タンパク質の分子食品科学的研究

丸山伸之

京都大学大学院農学研究科 准教授

はじめに

世界的な人口増加や気象の変化などからの食糧不足への対応が急務となっている。食糧が不足した時に、その不足が最も深刻になるのはタンパク質である。作物の種子はタンパク質含量が高く、タンパク質源として重要であり、その多くは種子貯蔵タンパク質とよばれるタンパク質群である。食糧としてのタンパク質を実質的に増産する方法として、食品加工特性を改良することによって種子貯蔵タンパク質の用途を広げることや、低利用あるいは未利用の種子貯蔵タンパク質の利用価値を見出すことにより、利用しうる作物種を拡大することなどがあげられる。そのためには作物種子に含まれる貯蔵タンパク質の食品加工特性を詳細に理解する必要がある。それらの性質がどのような分子構造に基づいているのかを明らかにすることにより、種子貯蔵タンパク質を最適用途に有効利用することが可能となる。また、種子貯蔵タンパク質はアレルギーと報告されているものが多いが、アレルギーに関わる構造については不明な点が多い。安全にそれらの用途を拡大するために、種子貯蔵タンパク質のアレルギー性を分子構造から理解することが望まれている。

一方、食品タンパク質が消化された後に生じるペプチドに人間の健康の維持・増進に役立つ生理機能性を備えているものがあることが明らかになってきた。そのような生理機能性ペプチドを積極的に摂取することによりヒトの健康が増進され、疾病予防ができる。生理機能性をもつタンパク質を分子設計して様々な機能性をもつ新奇な食素材を開発し利用することが、より高度な疾病予防に役立つ。また、コストが安いことや安全性が高いことから植物を利用して医薬品を生産する技術の開発が行われている。特に、植物種子は乾燥して備蓄することが可能であるために生産の場としてのメリットが高い。したがって、植物種子を利用した機能性をもつ新奇な食素材の生産システムを開発することにより、機能性をもつ

新奇な食素材を安価に大量に生産できる。

本研究では、種子貯蔵タンパク質の加工特性やアレルギー性などの食品として性質について解析するとともに、立体構造に基づいて構造と特性との関係を明らかにすることを試みた。また、疾病予防に役立つ生理活性ペプチドを高含有する種子貯蔵タンパク質を分子設計するとともに、ダイズやイネなどの作物種子で生産するための基盤研究を行った。以上の成果について概説する。

種子タンパク質の分子構造と食品特性相関の解明

多くの作物は 11S グロブリンおよび 7S グロブリンを主要な種子貯蔵タンパク質としており、おのおのが固有の優れた加工特性をもつ¹⁾。両タンパク質共に複数のサブユニットからなる多量体構造をとっているために、一般的な品種の種子からサブユニット組成の単一な分子種を調製することは難しく、サブユニットごとの加工特性については十分な知見が得られていなかった。そこで、遺伝子工学的に調製した組換え型タンパク質や貯蔵タンパク質の組成に変異をもつ育種材料を用いて 7S グロブリンおよび 11S グロブリンの特性について明らかにすることを計画した。まず、研究材料として広く食品素材に利用されているダイズのグロブリンを用いた。ダイズ 7S グロブリンの 3 種のサブユニットには各サブユニットに共通のコア領域のみからなるものと、その N 末端部にエクステンション領域をもつものがある (図 1)。また、全てのサブユニットには糖鎖が付加される。一方、11S グロブリンは、プロ型として生合成され、その後プロセッシングを受けることにより酸性鎖と塩基性鎖に切断され、それに伴い構造変化をすることにより成熟型となる。大腸菌は糖鎖を付加できず、プロセッシング酵素をもたないため、大腸菌発現系を利用することにより糖鎖をもたない 7S グロブリンとプロ型の 11S グロブリンが得られる。そこで、大腸菌発現系により 7S グロブリンや 11S グロブリンの各サブユニットの組換え型を調製する

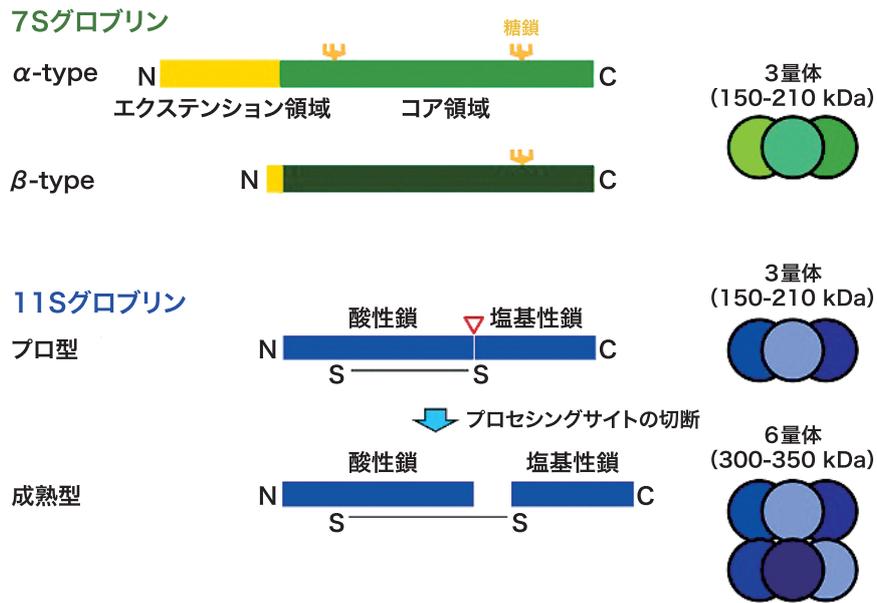


図1 種子貯蔵タンパク質グロブリンについて

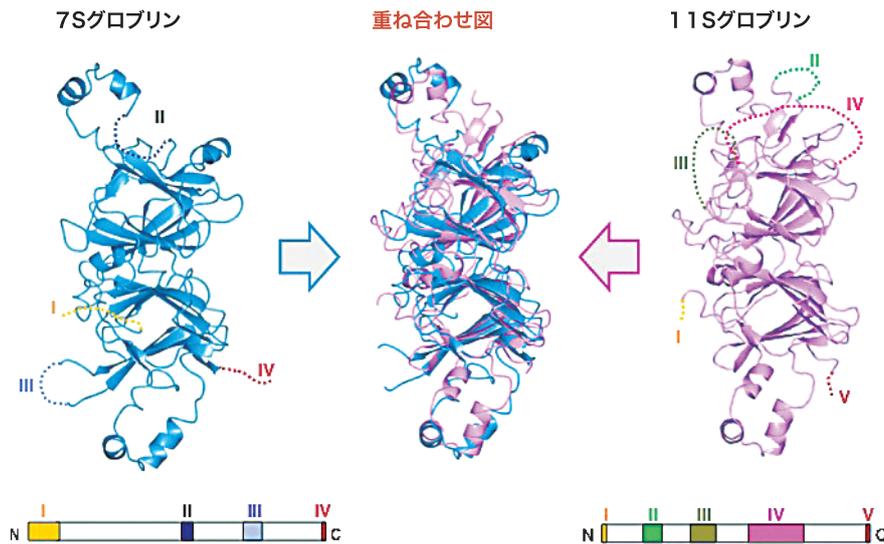


図2 7Sおよび11Sグロブリンの立体構造比較

とともにタンパク質工学的に部分的に改変したものも調製し、これらの特性を比較した。さらに、育種的に作成された一部のサブユニットを欠損するダイズ品種も利用し、多様なサブユニット組成をもつ成熟型の分子種についても調製し、それらの特性についても比較した。これらの解析から、7Sグロブリンに関して、1) エクステンション領域は溶解性と乳化性を高めること、2) 糖鎖は溶解性を高めるが、加熱時の会合を阻害すること、3) 熱安定性はコア領域の安定性によって決まることなどを明らかにした。また、11Sグロブリンに関して、成熟

型の乳化性は酸性鎖のC末端部に存在する可変領域の長さによって決まるが、その他の特性は、成熟型、プロ型とも各サブユニットに固有であることを明らかにした²⁻⁸⁾。さらに、同様の解析を様々な作物の7Sおよび11Sグロブリンに行なうとともに、X線結晶構造解析により立体構造を決定し(図2)、乳化性と密接に関係する表面疎水性は分子表面の疎水性残基の分布状態のみによっては決まらない可能性が高いこと、加熱によるゲル化性と密接に関係する熱安定性は多くの要因が複合的に影響している可能性が高いことなどを示した⁹⁻¹⁴⁾。さ

らに、改変したダイズ 11S グロブリンを設計し、それらの乳化物を評価することにより、フレキシビリティーの高いドメインをダイズ 11S グロブリンに付与することにより、乳化安定性が格段に高くなることを見出した。

一方、種子貯蔵タンパク質のアレルゲン性を明らかにするために、コムギ、ピーナッツ、ダイズなどの主要な種子貯蔵タンパク質の組換え型タンパク質を調製し、それらを用いてアレルゲン性について患者血清を用いて解析し、アレルゲン性の高い種子貯蔵タンパク質を明らかにした¹⁵⁻¹⁷⁾。さらに、構造決定したピーナッツの主要なアレルゲンである 7S グロブリンの立体構造を用いて患者血清に含まれるアレルギー症状に関与する抗体 (IgE 抗体) との結合領域の構造について分析し、3 量体から単量体に解離することにより多くのエピトープが露出することを示した¹⁸⁾ (図 3)。現在、IgE 抗体に認識される種子貯蔵タンパク質の構造についての一般性についても解析を進めている。

種子貯蔵タンパク質の立体構造を利用した疾病を予防する食品素材の開発

疾病予防に役立つ生理活性ペプチドを種子で安定に蓄積させることにより新奇な食素材を開発するために、種子貯蔵タンパク質をキャリアーとして生産する方法の構

築を試みた。そのために、まず、種子貯蔵タンパク質が合成される小胞体から、蓄積される部位であるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送シグナルを同定し、それらの機能を損なうことなく生理活性ペプチドを導入する必要がある。植物の液胞として、種子などの貯蔵器官に主に存在するタンパク質貯蔵液胞以外にも、葉などに存在する、分解酵素が多く含まれる分解型液胞があるが、両液胞への輸送機構の相違点は明確にはなっていない。そこで、7S グロブリンの各種変異型サブユニットを、7S グロブリンと同種のタンパク質をほとんど含有していないシロイヌナズナの種子で発現させ、それらの免疫電子顕微鏡観察を行い、7S グロブリンの C 末端 10 残基に選別輸送シグナルが存在することを明らかにした¹⁹⁾。登熟期種子でレポータータンパク質 (緑色蛍光タンパク質; GFP) を一過的に発現させる選別輸送シグナルの解析システムを開発し、それらの C 末端 10 残基がダイズ種子中においても選別輸送シグナルとして機能することを証明した。さらに、11S グロブリンを欠失したダイズ系統の登熟期種子を解析システムに利用して、11S グロブリンの主要なサブユニットの選別輸送シグナルについても解析し、C 末端部が選別輸送シグナルとして重要なサブユニットが多いことを明らかにした²⁰⁾。以上の成果より種子細胞を用いる独自の解析システムを利用して

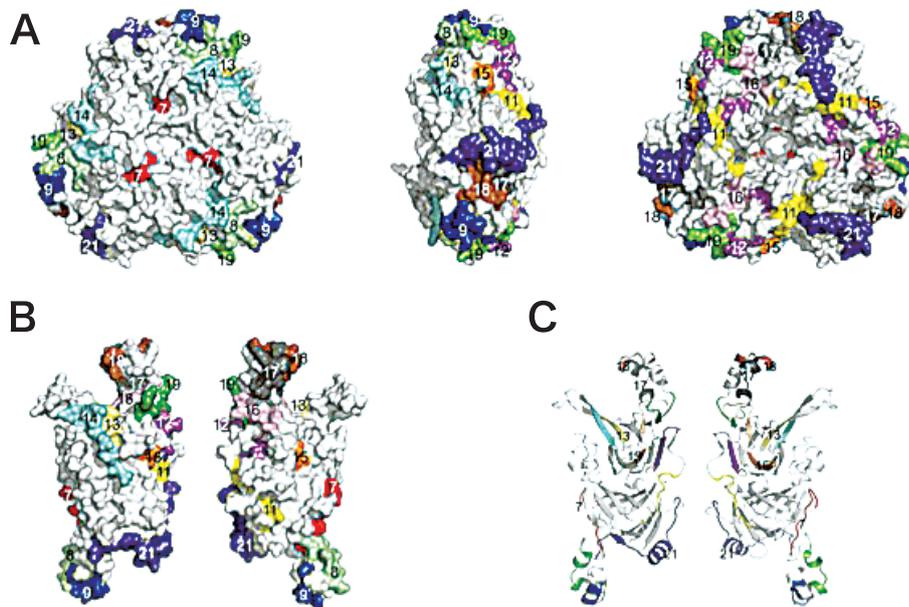


図 3 ピーナッツ 7S グロブリンの構造に対するエピトープの位置

数字の領域がエピトープを示している。
A: 3 量体 B: 単量体 C: 単量体リボン図。

解析を行うことにより、種子タンパク質の選別輸送シグナルの全体像を明らかにすることができた。そして、C末端部のシグナルを維持したまま種子貯蔵タンパク質に新たな生理機能性ペプチドを導入すると液胞への輸送は損なわれないと予想される。生理機能性ペプチドの導入により構造形成能についても損なわないようにする必要があるので、7Sおよび11Sグロブリンの立体構造データを利用して液胞への選別輸送を維持したまま免疫賦活活性などの生理機能性の導入を試みた。生理機能性をもつペプチド配列を導入する部位によっては、分子モデリングにより構造形成可能であると予想した活性をもつ配列に置換したグロブリン（導入型グロブリン）についてX線結晶構造解析を行い、種子から得られるものと同様の高次構造を形成していることを確認した²¹⁻²⁴⁾（図4）。さらに、導入型をイネ種子において発現させ、導入型がタンパク質貯蔵液胞に野生型と同様のレベルで蓄積できること、そして蓄積した導入型は期待どおりの生理活性をもつことを示した。さらにダイズ種子についても同様のアプローチで生理機能性をもつ導入型貯蔵タンパク質を種子に蓄積させることに成功している²⁵⁾。以上のように、種子貯蔵タンパク質の立体構造の情報を利用することにより、新奇な機能性をもつ分子を設計するとともに、それらを作物種子において蓄積および生産させることによって疾病を予防する食品素材を安価に大量に生

産できることを示した。今後、これらの成果を従来用いられてきた変異育種へ高度に利用することにより、食品成分の高機能化を可能にする新たな育種法が開発できると考えている。

おわりに

食品素材のニーズは、加工特性や栄養性等に加えて、生理機能性や安全性等など非常に多様である。これまで主要な種子タンパク質を対象として加工特性やアレルギー性に関して立体構造に立脚して研究を展開してきた。今後、研究対象とする構成成分の範囲を広げ、種子などの食品素材に含まれる微量タンパク質についても分子レベルで解析するとともに、食品素材の性質をシステムバイオロジー的にとらえ、どのような構成成分がどれくらいの比率で含有されることが多様なニーズに応えうる食品素材であるのかという点についても理解を深めることが重要であると考えている。

謝 辞

このたびは大変名誉ある三島海雲学術賞を授与していただき、公益財団法人三島海雲記念財団の今関博理事長、上野川修一選考委員長をはじめ関係各位の諸先生方に心より感謝申し上げます。また、本賞にご推薦くださいました京都大学大学院農学研究科長 遠藤隆教授にお礼申

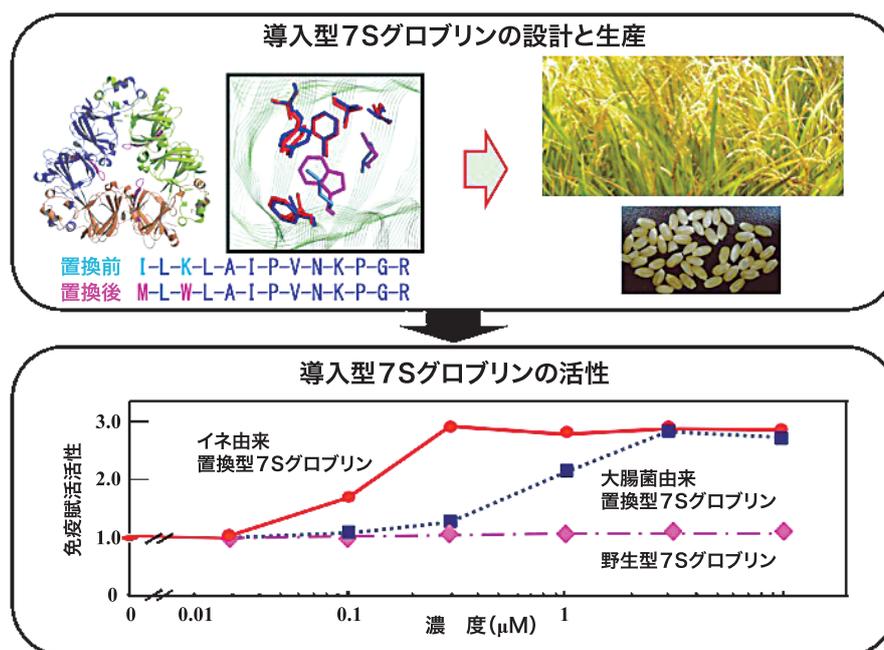


図4 分子内部をターゲットとした7Sグロブリンへの機能性ペプチドの導入

し上げます。

本研究は、京都大学食糧科学研究所新食糧設計分野および大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野で行われたものであります。本研究を遂行するに当たり、終始格別のご指導とご高配を頂きました京都大学大学院農学研究科 故内海成教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究にご助言、ご協力頂いた京都大学 三上文三教授、松村康生教授、奥本裕教授、吉川正明名誉教授、農業生物資源研究センター 高岩文雄博士、石本政男博士に心からお礼申し上げます。実験を遂行してくれた品質設計開発学研究室の学生諸氏、非常勤職員の方々、ご指導とご協力を賜りました大学をはじめとする研究機関、医療機関、民間企業の諸先生方と共同研究者の方々に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) M. R. Tandang-Silvas, et al, : *Annu. Review Food Sci.*, 2, 59-73, 2011.
- 2) N. Maruyama, et al, : *Eur. J. Biochem.*, 258, 854-862, 1998.
- 3) N. Maruyama, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5278-5284, 1999.
- 4) N. Maruyama, et al, : *JAOCS*, 79, 139-144, 2002.
- 5) N. Maruyama, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4323-4326, 2002.
- 6) N. Maruyama, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8197-8201, 2004.
- 7) M. S. Mohamad Ramlan, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1091-1096, 2004.
- 8) N. Maruyama, et al, : *Food Biotechnology-Second edition* (Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. eds) , pp. 649-674, CRC, 2005.
- 9) N. Maruyama, et al, : *Eur. J. Biochem.*, 268, 3595-3604, 2001.
- 10) Y. Maruyama, et al. : *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 289-297, 2004.
- 11) T. Fukuda, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4145-4153, 2008.
- 12) T. Fukuda, et al, : *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3667-3674, 2007.
- 13) M. R. Tandang-Silvas, et al, : *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 1432-1442, 2010.
- 14) M. R. Tandang-Silvas, et al, : *Food Chem.* 135, 819-826, 2012.
- 15) N. Maruyama, et al, : *Eur. J. Biochem.*, 255, 739-745, 1998.
- 16) C. Cabanos, et al. : *Protein Expr. Purif.*, 73, 36-45, 2010.
- 17) M. Ebisawa, et al, : *Pediatr. Allergy Immunol.*, 23, 573-581, 2012.
- 18) C. Cabanos, et al, : *Mol. Immunol.*, 49, 115-123, 2011.
- 19) K. Nishizawa, et al, : *Plant J.*, 34, 647-659, 2003.
- 20) N. Maruyama, et al, : *Plant Cell*, 18, 1253-1273, 2006.
- 21) K. Prak, et al, : *Peptides*, 27, 1179-86, 2006.
- 22) N. Maruyama, et al, : *Biochim. Biophys. Acta*, 1648, 99-104, 2003.
- 23) N. Maruyama, et al, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 823-8, 2011.
- 24) N. Maruyama, et al, : *Soybean - Applications and Technology* (Tzi-Bun Ng, ed) , pp. 243-254, Intech, 2011.
- 25) 丸山 伸之ほか：バイオサイエンスとインダストリー, 71,118~123, 2013.