

生理活性ペプチド生産のためのダイズ種子の熱ストレス応答機構の解明

藤 原 圭 吾

京都大学大学院農学研究科 修士課程

小 林 泰 則

京都大学農学部

丸 山 伸 之

京都大学大学院農学研究科 准教授

緒 言

21 世紀の食糧問題の一つとして、生活習慣病に代表される食源性疾患の増大が挙げられる。この問題に対処するには、生活習慣の改善とともに生活習慣病改善効果のある生理活性物質を積極的に摂取することが必要であると考えられる。哺乳類由来のペプチドにおいてそのような生理機能性をもつペプチドは見つかってきているが、それを生産する手段として植物を利用することが着目されている。動物や動物の培養細胞を用いて生産する場合に比べて、病原体混入の危険性が極めて低い、そして生産コストが低いという 2 つの大きな利点があることが主要な要因となっている。種子は、植物の器官の中で最もタンパク質含量が多い。また、乾燥状態においても、タンパク質を安定に保持することができるので、貯蔵や輸送にコストがかからないため、植物でタンパク質やペプチドを生産するための理想的な植物組織である。すでに我々はダイズおよびイネ種子に生活習慣病改善効果のあるペプチドを種子タンパク質をキャリアーとして種子に蓄積させることに成功している。このような種子から簡便にペプチドやタンパク質を抽出および精製することが出来れば、より安価に生活習慣病改善効果をもつペプチドを生産することが可能となる。

ダイズなどの豆類種子に含まれる Bg7S(塩基性 7S グロブリン)は、50 ~ 60 °C の湯浴に乾燥種子を浸漬すると、新たに合成され、湯浴中に放出される^{1,2)}。しかも Bg7S が放出されるタンパク質の主要成分となっている。したがって、Bg7S が湯浴処理により種子外へ放出される機構を解明して、制御することができれば、生活習慣病改善効果のあるペプチドを蓄積した種子から、それらを簡便に精製することが可能になる。そこで、本研究では Bg7S の湯浴処理に対する分子応答機構を解明し、種子外へのタンパク質放出機構を、植物種子における生活習慣病改善効果をもつペプチド生産に利用することを目的として行う。

実験方法

1. ダイズ種子の湯浴処理によるサンプル調製

アルミホイルで遮光したファルコンチューブにダイズ種子 (5g ; 品種エンレイ、ペキン、タマホマレ、IOM) と buffer (0.05M リン酸緩衝液、pH8.0、0.2M NaCl) を加えて密封した後、各温度条件 (10 °C、25 °C、50 °C) においてウォーターバスで一定時間 (1 ~ 16 時間) 振とうした。湯浴処理後、チューブから buffer と種子を分けて解析に用いた。すぐに解析に用いない場合には、buffer を別のチューブに移し液体窒素で凍結後ディープフリーザーにて保存した。buffer を回収した後、種子はチューブ内に入れたまま蒸留水で 2 回洗浄した後に液体窒素で凍結しディープフリーザーにて保存した。

2. 湯浴処理後溶液の分析

湯浴処理中、1、2、4、6、8、12、16 時間経過時にチューブから buffer を 100 μ l 採取し遠心した (15000rpm、4 °C、5 分)。遠心後上清についてタンパク質定量用キット (和光純薬工業製) を用いてタンパク質濃度を定量した。さらに SDS-PAGE により buffer 中のタンパク質を解析した。

3. 湯浴処理後種子中タンパク質の分析

湯浴処理後に凍結保存しておいた種子をミルで破碎し細かい粉末にしてからヘキサンとアセトンを用いて脱脂した。脱脂ダイズ粉末 (30mg) を 1.5ml チューブに入れ、SDS を含む buffer (500 μ l) を加え抽出した。遠心した後 (15000rpm、4 °C、5 分)、得られた上清のタンパク質濃度を定量した後、SDS-PAGE による分離を行った。さらに、抗 Bg 7 S 血清を使用したウエスタンブロットを行った。

4. 乾燥種子及び湯浴処理後種子の透過型電子顕微鏡観察

ダイズ種子 (タマホマレ乾燥種子、タマホマレ湯浴処理後種子) を 0.5 ~ 1.0mm の立方体となるようにメスで切り出した。切り出したサンプルを 2ml チューブに入れ固定液 (3%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタル

アルデヒド、0.1M NaPi pH7.2) で洗浄した後、新しい固定液を 2ml 加えた。チューブを氷上に挿し、15 分×6 回 vacuum infiltration した。固定液を新しいものに換えて 4℃で 5 時間静置した。Buffer(0.1M NaPi、pH7.2) で 2 回洗浄後新しい buffer を 2ml 加えた。30 分後 buffer を新しいものに交換し、これを 3 回繰り返してから 4℃で一晩静置した。

固定したサンプルを 60%エタノールで 2 回洗浄した後、60%エタノールを 2ml 加えて 30 分静置した。エタノール濃度を 10%ずつ上げて (60%～90%)、同様の操作を繰り返した。なお 80%のみ氷上で行い、それ以外は常温静置した。99.5%エタノールで 1 時間静置を 3 回繰り返した後、LR white 樹脂：99.5%エタノール＝1：2、2：1 混合溶液でそれぞれ 6 時間から半日ほど静置した。LR white 樹脂に交換し 2 日間静置し、サンプルをビームカプセルに移し、紫外線照射器で重合させた。

重合したサンプルをトリミングし、薄切りしやすくした後ウルトラミクロトームで 70 nm ほどの薄さの切片に切った。切片はホルムバル膜を貼り付けたグリッドにのせ、抗 Bg7S 血清 (2500 倍希釈)、15 nm 金粒子標識ゴート由来抗ウサギ二次抗体 (25 倍希釈) で免疫標識した。酢酸ウラニルと硝酸鉛で電子染色した後、透過型電子顕微鏡で細胞内構造や Bg7S の細胞内局在の観察を行った。

結果及び考察

1. 湯浴処理溶液中タンパク質濃度の経時変化

湯浴処理における溶液中のタンパク質濃度の経時変化を分析した。4 品種すべてにおいて、湯浴処理温度が高いほど溶液のタンパク質濃度が高かった。品種間では、10℃、25℃、50℃のいずれの条件においてもタマホマレのタンパク質濃度が最も高く、ペキンが最も低かった。特に 50℃においては、タマホマレのタンパク質放出量は他品種に比べて非常に高かった。なおエンレイと IOM に関しては、10℃と 25℃においては IOM の方がタンパク質を多く放出しているが、50℃では 16 時間経過時でエンレイの方が多く放出していた。

2. 湯浴処理後溶液中タンパク質の分析

湯浴処理 16 時間後の溶液に含まれるタンパク質を SDS-PAGE に供した (図 1)。Bg7S はダイズ種子総タンパク質の約 3%を占めており、等電点が 9.05～9.26 のタンパク質で、 α 鎖 (27kDa) と β 鎖 (16kDa) のふたつのサブユニットから構成される³⁾。バンドの位置から、ペキン以外の 3 品種においては Bg7S を種子の外に放出している。また、10℃や 25℃においてペキン以外の 3 品種では Bg7S 以外にも比較的高分子量のタンパク質が存在するが、これらはその分子量から種子貯蔵タンパク質の 7S グロブリンと 11S グロブリンだと推測される。一方、ペキンにおいては Bg7S に対応するバンドははっきり

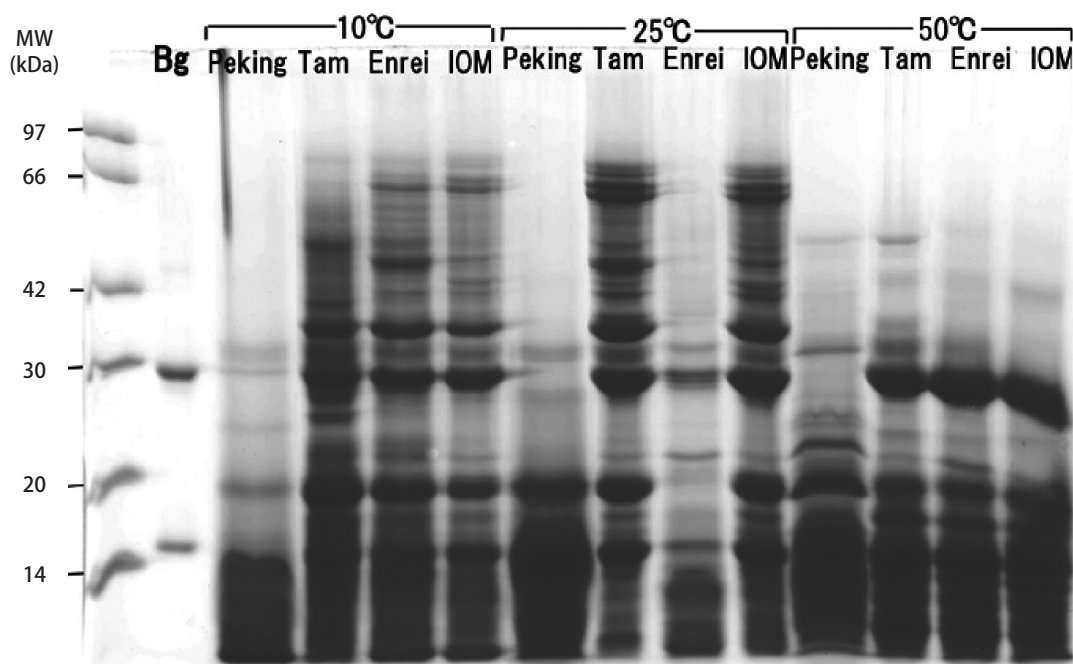


図 1 湯浴処理後溶液の SDS-PAGE

Bg, 精製 Bg7S; Peking, ペキン; Tam, タマホマレ; Enrei, エンレイ。

りとは確認できなかった。

3. 湯浴処理後種子中タンパク質の分析

湯浴処理後 (16 時間) の種子中タンパク質を SDS-PAGE に供した (図 2)。種子タンパク質の構成が品種間で差が見られた。しかし、乾燥種子と湯浴処理後の種子の違いや同一品種内での湯浴処理温度の違いによる種子内におけるタンパク質の変化は確認できなかった。また 4 品種すべてにおいて、乾燥種子と湯浴処理種子ともに Bg7S に対応するバンドは SDS-PAGE では明確には確認できなかったが、ウエスタンブロットでは、すべてのサンプルにおいて Bg7S が存在することが確認できた (図 3)。また、乾燥種子より湯浴処理後の種子の方が Bg7S の種子中における蓄積量が多いことがわかる。50℃だ

けでなく、10℃や 25℃で湯浴処理したサンプルにおいても乾燥種子と比べて Bg7S の蓄積量が多いことから、熱以外のストレスでも Bg7S の発現が誘導されていることが推測される。

4. 透過型電子顕微鏡による種子内部構造の観察

タマホマレの乾燥種子及び湯浴処理後種子の細胞内構造の電子顕微鏡観察を行った。乾燥種子 (図 4 左) と比較して湯浴処理 50℃の種子 (図 4 中) では、液胞などが融合し大きくなっている様子などがみられた。湯浴処理 10℃の種子 (図 4 右) では 50℃の種子と異なり、細胞内区画の大きな変化は観察されなかったが、細胞間隙に電子密度の濃い領域が形成されているのが観察された。このような細胞間隙は 50℃の種子においてもわず

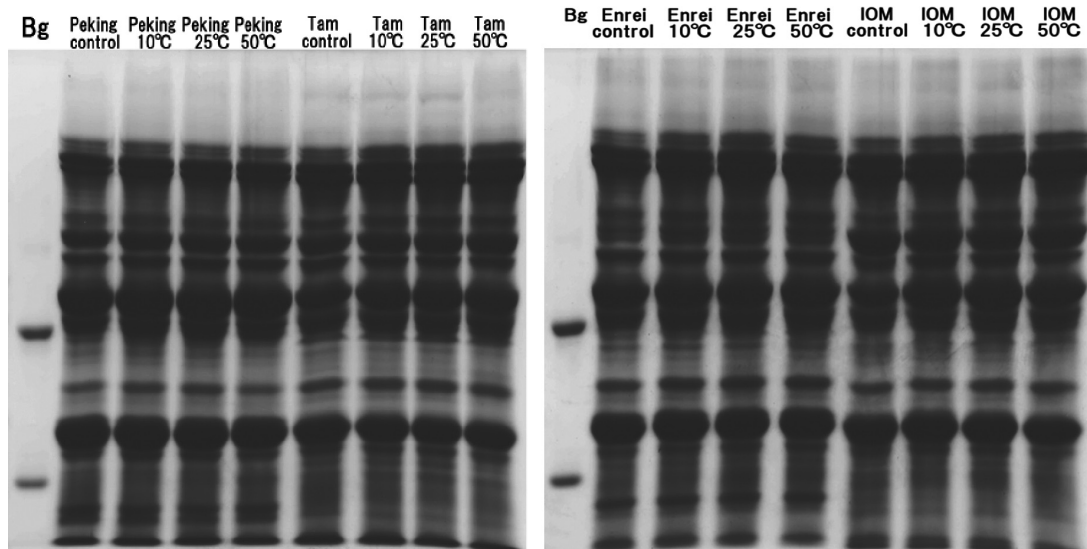


図 2 湯浴処理後種子中タンパク質の SDS-PAGE

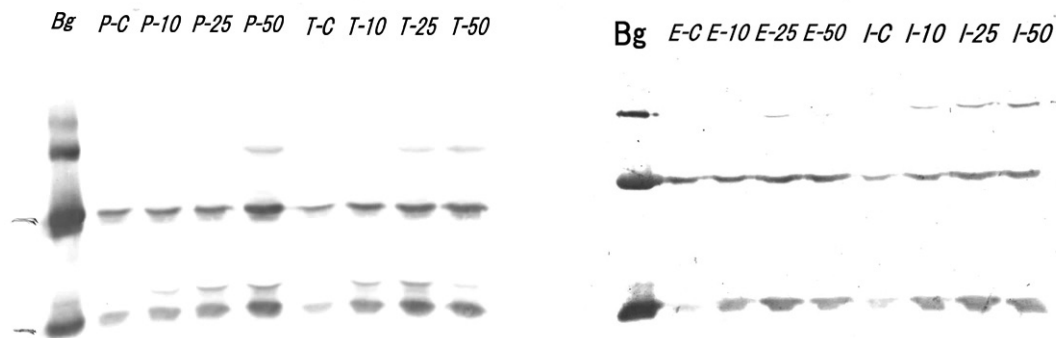


図 3 湯浴処理後種子中タンパク質の抗 Bg7S 抗体によるウエスタンブロット

Bg, 精製 Bg7S; P-C, ペキン乾燥種子; P-10, ペキン湯浴処理 10℃; P-25, ペキン湯浴処理 25℃; P-50, ペキン湯浴処理 50℃; T, タマホマレ; E, エンレイ; I, IOM.

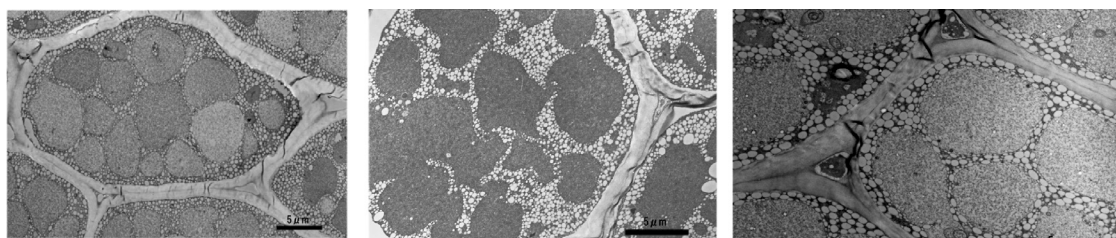


図 4 透過型電子顕微鏡により撮影したタマホマレ種子内部構造

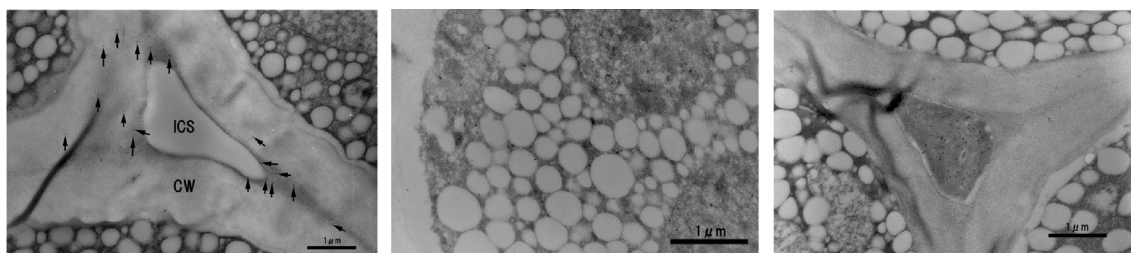


図 5 Bg7S の細胞内局在の観察 ICS, 細胞間隙; CW, 細胞壁

かながら観察された。

5. Bg7S の細胞内局在の観察

抗 Bg7S 血清により処理した切片の電子顕微鏡観察を行った。Bg7S は主に細胞壁の中層に局在していることが報告されているが⁴⁾、本研究においても乾燥種子で Bg7S が細胞壁に多く存在しているのが観察された(図 5 左 矢印)。湯浴処理 50°C の種子では Bg7S は細胞壁にはほとんどみられず、細胞内にまばらに存在していた(図 5 中)。一方、10°C で処理した種子では、細胞壁や細胞内に Bg7S はほとんどみられずに、細胞間隙にみられた電子密度の濃い領域にのみ局在しているのが観察された(図 5 右)。

要 約

4 品種のダイズ種子を用いて湯浴処理を行ったが、品種により Bg7S の放出量に大きな違いが見られた。細胞内構造を電子顕微鏡により詳細に解析することにより Bg7S が細胞間隙に分泌された後、種子外に放出してい

ることが示唆された。また、50°C で処理すると細胞内区画の構造が大きく変化しており、Bg7S の放出量も多くなるが、同時に細胞内構造が損なわれていくと考えられた。今後、さらに種子外への Bg7S の放出量の多い品種を見出すとともに、細胞内構造が損なわれない条件で、長時間 Bg7S を種子外に放出させることにより、より効率の良い生理活性ペプチドの生産が可能になると考えられる。

謝 辞

本研究に対し助成を頂きました財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) F. Yamauchi, et al., : *Agric. Biol. Chem.* **48**, 645-650, 1984.
- 2) H. Kagawa, et al., : *FEBS Lett.* **226**, 145-149, 1987.
- 3) Y. Watanabe, et al., : *Eur. J. Biochem.* **224**, 167-172, 1994.
- 4) NK. Nishizawa, et al., : *Plant Cell Physiol.* **35**, 1079-1085, 1994.