

# 食品タンパク質の改質と遺伝子工学

京都大学 食糧科学研究所 食糧設計利用部門新食糧設計分野 内海 成

## はじめに

植物性食品タンパク質（大豆、米、小麦など）のアレルゲン性を低減化する方法として、物理的・化学的処理、酵素による分解、 $\gamma$ 線照射による突然変異の誘発と育種、そして遺伝子工学的手法などがある。本講演では、遺伝子工学的手法に焦点を合わせる。

## 1. 遺伝子工学によるアレルゲン性低減化

遺伝子工学的にアレルゲン性を低減化する方法には、①アレルゲンタンパク質遺伝子を破壊する、②その発現を抑える、③アレルゲンタンパク質のエピトープを改造する、がある。アレルゲンタンパク質が、その生物にとって不必要なものである場合には、①や②の方法を採用することができる。特に①の方法ではアレルゲンタンパク質の発現を完全に抑えることが可能となるので望ましいが、まだ具体的な成功例はない。しかし、ノックアウトマウスを得る手法と同様にして作出することが可能と考えられるので、将来有望であろう。②の方法では、アンチセンスRNA法が採用されることが多いが、この方法では、発現を100%抑制することは不可能である。しかし、それでも効果がある場合には有効な方法であり、名大グループによって低アレルゲン米の開発に利用されている。

アレルゲンタンパク質が、その生物にとって不可欠なものである場合には、①や②の方法を採用することはできず、③の方法を採用する必要がある。また、その生物にとって不可欠でなくても人間が食糧として利用する上で、有用な性質を持っている場合にも適用すべき方法である。徳島大の小川らは、大豆のアレルゲンタンパク質として、第2番目にメジャーなものとして、大豆タンパク質の主要成分の1つである $\beta$ -コングリシニンの $\alpha$ サブユニットを指摘している。 $\beta$ -コングリシニンは $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ の3種のサブユニットより構成されているが、 $\alpha$ サブユニットが最も栄養性が優れており、しかも各サブユニットの加工特性に対する寄与は互いに異なっている。したがって、 $\alpha$ サブユニットを欠失させることは、その大豆の利用性を制限することになるので、③の方法を適用することが望ましいことになる。しかし、 $\alpha$ サブユニットの欠失が、むしろ好ましい特性を付与することになるならば、新しい用途の開発につながることになる。 $\gamma$ 線照射によって、 $\alpha$ サブユニット欠失大豆が作出されているが、この場合、相対的にグリシニンの含量が増大している。

一方、外国においては、 $\beta$ -コングリシニンとならぶ大豆タンパク質の主要成分であるグリシニンがアレルゲンとして同定されている。日本では、大豆アレルギーの原因タンパク質と判定されていないので、この差が何に起因するのかということに興味深い。グリシニンは、 $\beta$ -コングリシニンよりも栄養性が優れており、しかも多くのシステイン残基を持っており、加熱ゲル化性などの加工特性に対しては特に重要な成分である。したがって、グリシニンの場合にも③の方法の適用が望まれる。 $\gamma$ 線照射によって、グリシニン欠失大豆が作出されているが、この場合、 $\beta$ -コングリシニン量が増大せず、タンパク質量が著しく低下している。

## II. 改質グリシニンの分子設計と評価

グリシニンや $\beta$ -コングリシニンのような貯蔵タンパク質は、登熟期の種子においてのみ特異的かつ大量に生合成され、プロテインボディに蓄積する。したがって、エピトープ構造の改造の結果、グリシニンや $\beta$ -コングリシニン本来の構造の形成能が損なわれてプロテインボディに大量に蓄積できなくなってしまう。つまり、これらの貯蔵タンパク質がどのような改造を許容するかを知ることが重要となる。筆者らは、アレルギー性を遺伝子工学的に低減化する研究には未だ着手していない。しかし、グリシニンに改造を施すことによって栄養性や加工特性を改質するという研究を行っている。このような研究の考え方及び手法には、アレルギー性の低減化法と共通性があるので、ここに紹介する。

大豆タンパク質はヒトの血清コレステロール値を低下させる機能を持っているが、これはグリシニンの特性に基づいていると考えられている。したがって、グリシニンの栄養性や加工特性を改質して動物性タンパク質に匹敵するものにすることができると、理想的な食品タンパク質の開発につながる。そこで、筆者らは、グリシニンを研究材料として取り挙げている。

グリシニン本来の構造の形成能を損なうことなく改造を施すためにはまず、グリシニンのどの部位が改造を許容するか、ということが問題となる。筆者が本研究を始めた頃は高次構造に関する知見はほとんどなかった。そこで、種々の種子に存在しているグリシニンと類似したタンパク質間での可変領域に着目した(図 1-A)。可変領域は構造の形成や保持に余り重要な働きをしていないと考えられるので、ある程度の改造を許容するであろう。

どのような改造を施せば食品機能を改質できるであろうか、ということが次に問題となる。栄養性を改質するためには、大豆タンパク質の制限アミノ酸であるメチオニンの含量を強化する、あるいは消化性を改善すればよい。筆者は、より簡便なメチオニン含量の強化という方法を採用した。加工特性の改質法は、構造と加工特性との相関関係から得られる。筆者がサブユニットレベルで解明した相関関係から、加工特性のうち加熱ゲル化性は構造の不安定化や遊離のSH基の数とトポロジーの変化によって、乳化性は構造の不安定化や疎水性度の強化によって改質できると推定された。このような改造許容部位及び改質法を踏まえて改質グリシニンを分子設計することになる。

各可変領域は強い親水性の性質を持っているので、各領域を欠失させることによって分子全体の疎水性度を強化することができる。そこで、各可変領域を欠失させた $\Delta I$ 、 $\Delta II$ 、 $\Delta III$ 、 $\Delta IV$ 、 $\Delta V$  36および $\Delta V 8$ を分子設計した(図 1-B)。

大豆タンパク質の制限アミノ酸はメチオニンである。メチオニンは疎水性であるので、複数のメチオニンが連続したオリゴペプチドを親水性の性質を持つ可変領域に挿入すると、その部位の構造的特徴が部分的に損なわれて構造が不安定化するとともに疎水性度が強化されることになる。そこで、第IVあるいは第V可変領域にテトラメチオニンを挿入したIV+4Met およびV+4Metを分子設計した(図 1-C)。

グリシニンサブユニットには2個のS-S結合が同定されている。Ala11bサブユニットではCys12-Cys45 およびCys88-Cys298である。これらのS-S結合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と、構造を不安定化できるとともに、遊離のSH基の数とトポロジーを変えることができる。そこで、Cys12をグリシンに置換したGly12、Cys88をセリンに置換したSer88、両者とも置換したGly12Ser88を分子設計した(図 1-D)。

第IV可変領域にはグルタミン酸が8残基とアスパラギン酸が1残基、合計9残基の酸性アミノ酸が連続している領域がある。この領域の静電的性質を変換すると、大豆タンパク質が弱酸性領域で加工特性を発現しにくいという欠点を改良できることになる。そこで、この領域を部分的に欠失させたIV( $\Delta$ Glu)、他のアミノ酸に置換したIV(Lys)、IV(Gln)およびIV(Met)を分子設計した。

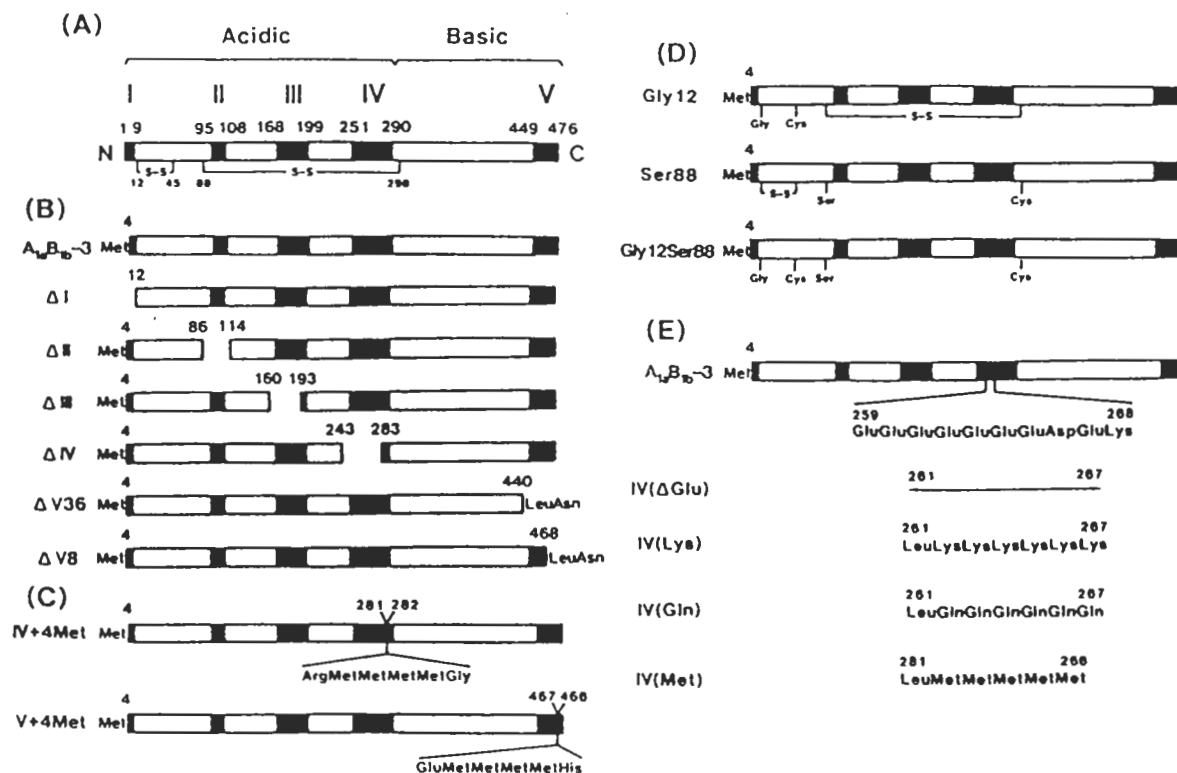


図1. (A) グリシニンの保存領域と可変領域。可変領域をI~Vと名づけ、N末端からの残基数で示した。□：保存領域；■：可変領域。(B) 可変領域の欠失。(C) テトラメチオニンの挿入。(D) S-S結合の欠失。(E) 酸性アミノ酸領域の欠失あるいは置換。

これらの改質グリシニンが本来の構造を構築できるかどうか、また、期待通りの性質を示すかどうかを調べるために、それらの発現系を構築しなければならない。筆者は、グリシニンAlaB1bサブユニットのN末端部3残基を欠失したAlaB1b-3(図1-B)を大腸菌で、全菌体タンパク質の20%にまで発現させることに成功していた。また、この発現タンパク質は成熟型へのプロセッシングを受けずにプロ型であるが、成熟型と2次構造上区別できない構造を形成しており、しかもグリシニンに固有の加工特性を同様に示すことを確認していた。そこで、AlaB1b-3に対する発現プラスミドを基本として、各改質プログリシニンに対する発現プラスミドを構築した。

筆者は、改質プログリシニンが大腸菌中で可溶性の状態に大量に発現し、しかも3量体に分子集合しているならば、プログリシニン本来の構造形成能を持つと判断できることを見出した。そこで、図1の各改質プログリシニンについてこれらの点を調べたところ、 $\Delta$ I、 $\Delta$ V8、IV+4Met、V+4Met、Gly12、Ser88、Gly12Ser88、IV( $\Delta$ Glu)、IV(Lys)、IV(Gln)、IV(Met)の11種はプログリシニン本来の構造を形成できると判定された。次に、こ

これらの改質プログリシニンの特性を調べるために、精製を試みた。Gly12Ser88以外のものは安定性が高く精製することができた。

まず、静電特性の改質をめざしたIV( $\Delta$ Glu)、IV(Lys)、IV(Gln)、IV(Met)の等電点を測定した。ノーマルなプログリシニンの等電点は5.6であったが、これら4種のは各々6.6、7.2、6.5、6.4であり、期待通りに静電特性が改質されていることが確認できた。

加工特性の改質を期待した $\Delta$ I、 $\Delta$ V8、IV+4Met、V+4Met、Gly12とSer88について、加熱ゲル化性や乳化性が改質されているかどうかを調べた。加熱ゲル化性に関しては $\Delta$ I、IV+4Met、V+4MetとSer88が、乳化性に関しては $\Delta$ V8とV+4Metがノーマルなグリシニンやプログリシニンよりも優れた性質を示した。このように、V+4Metという改質プログリシニンは栄養性が改質されていることに加えて、加熱ゲル化性も乳化性も優れていた。したがって、V+4Metは理想的な食品タンパク質素材であると言える。

### Ⅲ. 改質グリシニンの種子細胞における蓄積能

改質が成功したと言うためには、改質タンパク質が種子細胞でノーマルなものと同様の発現・蓄積挙動を示す必要がある。そこで、ノーマルなものとは比べて栄養性も加工特性も優れているIV+4MetとV+4Metについて解析を試みた。まず、米の主要なタンパク質であるグルテリンの遺伝子のプロモーターを利用して、タバコ種子における発現・蓄積挙動を解析した。その結果、ノーマルなものも改質型もともに、①タバコ種子に2～3%のレベルで発現する、②成熟型へのプロセッシングを受け6量体に分子集合する、③プロテインボディにターゲティングして蓄積する、ことが明らかとなった。つまり、ここで施した改造はグリシニン本来の構造形成や発現・蓄積を全く阻害しない。したがって、グリシニンの改質に成功したと言える。

### Ⅳ. プログリシニンのX線結晶構造解析

高次構造のデータなしにグリシニンを改質することに成功したが、より理論的な改質やエピトープ構造の改造のためには、高次構造に関するデータが必須である。タンパク質の高次構造を解析する上でX線結晶構造解析は最も強力な手段である。ところが、大豆から調製したグリシニンは分子種に複雑な多型性があるために結晶化が困難である。しかし、大腸菌で発現させたプログリシニンは単一の分子種より成るので結晶化が容易と考えられる。一方、ノーマルなプログリシニンやグリシニンよりも優れた、あるいは異なる加工特性を示す各改質プログリシニンの高次構造を解明しノーマルなものと比較することによって、グリシニンの構造と加工特性との相関を分子レベルで多面的に解析できる。その結果、高栄養性、高加工特性、高健康維持・増進性、低アレルギー性という理想的な食品機能を持つ大豆グリシニンの完全に理論的な分子設計が可能となる。そこで、ノーマルおよび改質プログリシニンの結晶化とX線結晶構造解析を試みた。

まず、ノーマルなプログリシニンの結晶化を種々の条件下における透析法及び蒸気拡散法によって試みた。その結果、0.1M pH7.6トリス塩酸緩衝液に対して4℃で透析することによってX線解析に供しうる質を持つ結晶を得ることに成功した。次いで、プログリシニン本来の構造を形成できると判定された $\Delta$ I、 $\Delta$ V8、IV+4Met、V+4Met、Gly12、Ser88、IV( $\Delta$ Glu)、IV(Lys)、IV(Gln)、IV(Met)の各改質プログリシニンの結晶化をトリス塩酸緩

衝液に対する透析法およびPEGを沈殿剤として用いる蒸気拡散法によって試みた。至適結晶化条件は改質の種類によって異なっていたが、いずれのものも結晶化した。これらのうち、 $\Delta I$ 、Gly12、Ser88とV+4MetはX線解析可能な結晶を与えた。そこで、ノーマルおよびこれらの結晶の予備的X線解析を行ったところ、表1に示したX線結晶学的データが得られた。つまり、ノーマル、 $\Delta I$ 、Gly12、Ser88は同じ晶系、空間群の結晶を与えたのに対し、V+4Metは全く異なる結晶を与えた。しかし、いずれの結晶とも、非対称単位当たりのプロトマーの数は3個であった。これらの結果は、各改質プログリシニンが互いに異なる構造的特性を持つが、いずれのものもプログリシニン本来の3量体構造を形成していることを示している。

グリシニンやプログリシニンと類似したタンパク質のX線結晶構造解析は過去には全く行われていないので、重原子同型置換法を用いてX線解析を進めた。その結果、構造を6Åのレベルで明らかにすることに成功し、プログリシニン3量体のディメンジョンが $93 \times 93 \times 36 \text{Å}$ であることを見出した。現在、高分解能での解析を進めている。

表1. 天然型および改変型プログリシニン結晶のX線結晶学的データ

Proglycinins	Maximum resolution (Å)	Crystal system	Space group	Unit cell dimensions (Å)			Density (g cm <sup>-3</sup> )	Protomer/asymmetric unit	V <sub>m</sub> (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )
				a	b	c			
Normal	2.9	tetragonal	P4 <sub>1</sub> /P4 <sub>3</sub>	115.2	115.2	147.1	1.16	3.17	3.05
$\Delta I$	3.5	tetragonal	P4 <sub>1</sub> /P4 <sub>3</sub>	115.9	115.9	145.1	1.16	3.25	3.12
Gly12	3.4	tetragonal	P4 <sub>1</sub> /P4 <sub>3</sub>	114.9	114.9	146.1	1.16	3.13	3.02
Ser88	3.0	tetragonal	P4 <sub>1</sub> /P4 <sub>3</sub>	114.3	114.3	145.7	1.16	3.09	2.98
V+4Met	4.1	monoclinic	P2	118.7	78.1	109.9	1.16	2.87	2.76

## V. $\beta$ -コングリシニンX線結晶構造解析と改質

$\beta$ -コングリシニンを構成する $\alpha$ 、 $\alpha'$ と $\beta$ サブユニットは互いに類似した1次構造をしている。特に、 $\alpha$ と $\alpha'$ の類似性は高い。しかし、 $\alpha$ サブユニットのみが高いアレルギー性を示す。この理由は、 $\alpha$ サブユニットのエピトープ部の構造とそれに対応する $\alpha'$ サブユニットの構造を比較することによって明らかとなるかも知れない。 $\beta$ -コングリシニンの結晶化としては、 $\beta$ サブユニットについて成功の報告があるが、X線解析に供し得るようなものではなかった。この原因も多型性にある。したがって、 $\beta$ -コングリシニンの結晶化のためにも微生物発現系を利用して均一分子種を調製することが望ましい。筆者らは、既に各サブユニットの大腸菌大量発現系を構築した。今後、結晶化と構造解析を進めていく。

## VI. 小麦のアレルゲンタンパク質

小麦のアレルゲンタンパク質として横浜市大の池澤らは塩可溶性成分を、東京学芸大の渡辺らはLMWグルテニンを同定している。筆者は、最近、小麦タンパク質の分子タンパク質化学的研究を開始した関係もあり、小麦のアレルゲン性低減化に興味を持っている。そこで、RAST法で小麦タンパク質にアレルギーを示す10人の患者の血清に関して解析したところ、10人全員が塩可溶性画分に強い反応性を示し、4～5人はグリアジンにも、5～6人はグルテニンにも反応性を示すことを確認した。一方、小麦タンパク質のうち、 $\alpha$ -グリアジン、 $\gamma$ -グリアジン、 $\omega$ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニンに関して、大腸菌大量発現系を構築した。また、塩可溶性のアレルゲンタンパク質の遺伝子も入手し、その発現系を構築する。これらを結晶化し、X線構造解析を行うことによって、小麦タンパク質のアレルゲン性の低減化を遺伝子工学的に成し遂げたい。