

## 《農芸化学奨励賞》

種子タンパク質に関する食糧科学・細胞生物学的研究と  
食源性疾患を予防する作物への展開

京都大学大学院農学研究科農学専攻 准教授 丸山 伸之

## はじめに

先進国における生活習慣病などの食源性疾患の増大が 21 世紀の重要な食糧問題となっている。多様な生理機能性をもつタンパク質を分子設計し、世界の主要作物に蓄積させることにより、新たな生理機能性をもつ作物を開発することが、有効な解決策の一つであると考えている。本研究では、優れた生理機能性および加工特性をもつダイズ種子タンパク質をモデルタンパク質として、構造・加工特性相関を分子レベルで明らかにするとともに、種子細胞における種子タンパク質の蓄積部位であるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送を決定する構造因子（選別輸送シグナル）を同定した。これらの成果をもとに、構造形成、加工特性、細胞内輸送をすべて損なうことなく、生理機能性を新たに導入した種子タンパク質を分子設計し、作物で蓄積させることにより、食源性疾患を予防する作物をテララーメイドに開発する基盤を確立した（図 1）。

## 1. 種子タンパク質の構造・加工特性相関の解明

ダイズ種子タンパク質はグリシニン（11S グロブリン）および $\beta$ -コングリシニン（7S グロブリン）を主要成分としており、おのおのが固有の優れた加工特性をもつ。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、一般的な系統のダイズ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、サブユニットレベルでの加工特性の解析はほとんど進展していなかった。そこで、すべての構成サブユニットに対する大腸菌発現系を構築するとともに、サブユニット種に欠損のある系統の種子を利用して、単一サブユニットよりなる分子種および限定的なサブユニット組成の分子種を調製し、両タンパク質の構造・加工特性相関をサブユニットレベルで解析するとともに、 $\beta$ -コングリシニンについては X 線結晶構造解析により立体構造を決定し、分子レベルでの解析に深化させた。以下に、 $\beta$ -コングリシニンに関して得られた知見について概説する。

$\beta$ -コングリシニンは $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ の 3 種類のサブユニットから構成されている。 $\beta$ は 3 種類のサブユニット間で共通のコア領域のみから構成されているが、 $\alpha$ および $\alpha'$ は、その N 末端にエク

ステンション領域をもつ。また、3 種類のサブユニット共に糖タンパク質であり、 $\alpha$ と $\alpha'$ には 2 カ所に、 $\beta$ には 1 カ所に糖鎖が付加している。大腸菌発現系を利用して調製した $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ の組換え型ホモ 3 量体およびエクステンション領域をもたない $\alpha$ コアと $\alpha'$ コア、そしてサブユニット種に欠損のある系統を利用して調製した天然型ホモおよびヘテロ 3 量体の特性（熱安定性、表面疎水性、溶解性、乳化性、加熱会合性）を解析、比較した。熱安定性はサブユニット間で互いに異なるが、糖鎖の影響を受けないこと、溶解性、乳化性、加熱会合性はエクステンション領域をもたない $\beta$ よりもエクステンション領域をもつ $\alpha$ や $\alpha'$ のほうが優れていること、そして糖鎖はイオン強度 0.08 における溶解性、 $\beta$ の乳化性、 $\alpha$ と $\alpha'$ の加熱会合性に影響することなどを明らかにした。さらに、 $\beta$ と $\alpha'$ のコア領域の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、両者の熱安定性の違いに複数の要因（分子内のキャビティーのサイズ、溶媒接触面の疎水性領域、ループ領域の長さ、プロリン残基の数など）が影響していることを示した。他の植物種の 7S グロブリンの立体構造データを含めた比較解析から、キャビティーのサイズの寄与が最も大きいことを明らかにした。

## 2. 種子タンパク質の貯蔵液胞への選別輸送シグナルと輸送経路

生理機能性を導入した種子タンパク質を種子で安定に蓄積させるためには、種子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機能性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、 $\beta$ -コングリシニンの各種変異型サブユニットを、 $\beta$ -コングリシニ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った。 $\alpha'$ および $\beta$ は、シロイヌナズナの種子においてもタンパク質貯蔵液胞へ輸送されたが、共に C 末端 10 残基を欠失させると、細胞外に分泌さ

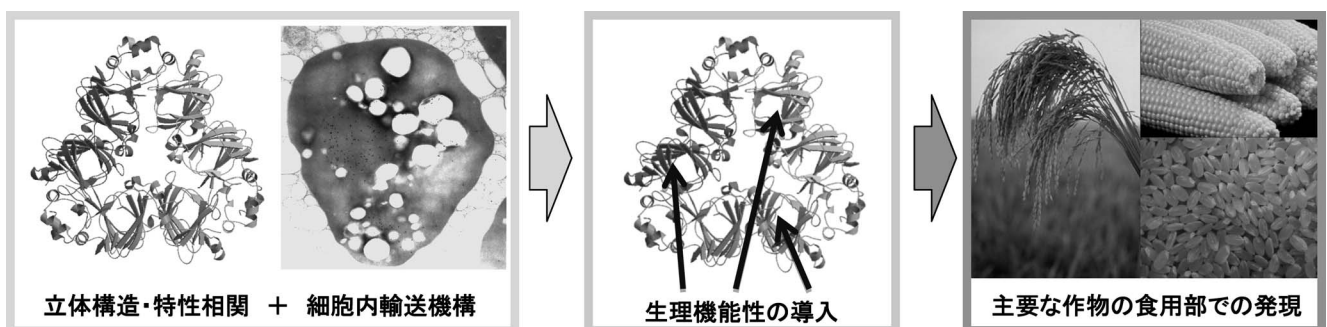


図 1 種子タンパク質に関する食糧科学・細胞生物学的研究と食源性疾患を予防する作物への展開

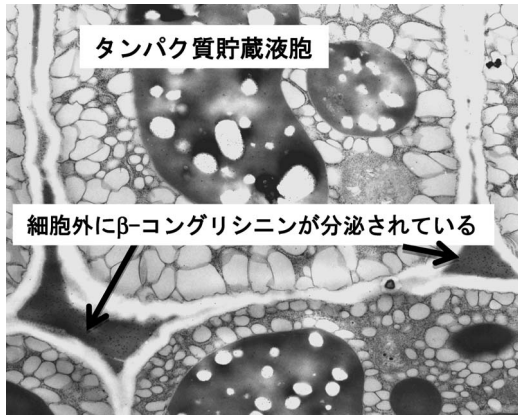


図2 C末端部10残基を欠失させたβ-コングリシニンを発現するシロイヌナズナ種子の電子顕微鏡図

れた。このことから、α'およびβのC末端10残基に選別輸送シグナルが存在することが示唆された(図2)。

さらに、ダイズ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(図3)、α'およびβ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。今まで報告されている植物の液胞への選別輸送シグナルは、NPIRL(アミノ酸一文字表記)様のモチーフをもつ配列特異型、C末端部に位置することが重要であり、配列の共通性はないC末端型、高次構造により形成される高次構造型の3種類に分類されているが、上記解析システムを用いてα'のC末端10残基には配列特異型およびC末端型シグナルが相隣り合った特徴的な構造をしていることを明らかにした。さらに、グリシニ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、グリシニ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末端型シグナルをもつサブユニットとまたないサブユニットが存在することを明らかにした。さらに、グリシニンのタンパク質貯蔵液胞への輸送に高次構造型シグナルも寄与している可能性が示唆された。以上のように、種子細胞を用いる独自の解析システムを利用して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。

一方、種子細胞において小胞体からゴルジ体を經由せずにタンパク質貯蔵液胞へ輸送される経路の存在が示唆されていたが、その形成機構については全く不明であった。限定的なサブユニット組成をもつダイズ系統を利用して、種子タンパク質組成と小胞体由来の構造体形成との相関について定量的に解析し、表面疎水性の高いグリシニンのグループIに属するサブユニットの存在比率が高くなると小胞体由来の構造体の検出頻度が高くなること、構造体が数多く形成されると登熟過程が進んでも液胞に運ばれずに、細胞質中に蓄積することを明らかにした。さらに、会合体を形成しやすい赤色蛍光タンパク質をゴルジ体の選別輸送シグナルに付加すると、ゴルジ体には輸送されずに、新たに小胞体由来の構造体を形成することを見いだした。このことから会合体形成が小胞体由来の構造体形成のトリガーとなることを示した。

### 3. 食源性疾患を予防する作物への展開

種子タンパク質に新たな生理機能性の導入を行う際に、構造形成能を損なわないようにする必要がある。そこで、β-コン

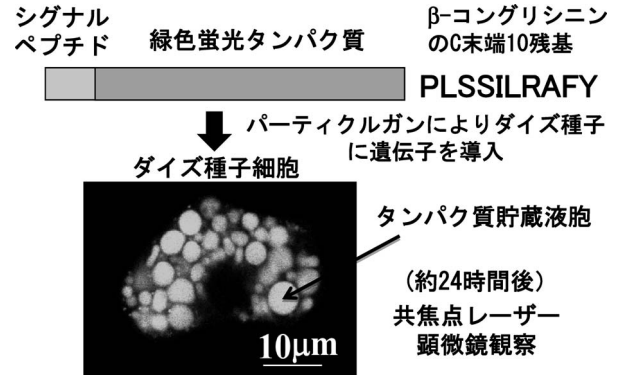


図3 種子細胞を用いた選別輸送シグナルの解析システム

リシニンの立体構造データを用いて、構造形成能およびタンパク質貯蔵液胞への被選別輸送能を損なわずに、免疫賦活活性をもつ配列の導入を試みた。分子モデリングにより、構造形成可能であると判定された活性配列導入型を大腸菌発現系で調製し、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。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。これらの結果は、タンパク質工学的に種子タンパク質の生理機能を強化するうえで、立体構造データを用いることが非常に有効であることを示している。

### おわりに

構造形成、加工特性、細胞内輸送をすべて損なうことなく、生理機能性を導入した種子タンパク質を分子設計し、作物で蓄積させることにより、食源性疾患を予防する作物を開発する基盤の構築を行ってきた。今後、食糧タンパク質の構造と生理機能性との相関を詳細に解明することにより、より高度な種子タンパク質の機能改変が可能になると予想される。また、作物をシステムバイオロジー的に理解することが、食糧問題を解決するために必須であると考えている。構造生物学、タンパク質工学、分子生物学、細胞生物学、育種学、バイオインフォマティクスなどの分野の手法を複合的に用いて、食糧問題を解決していきたい。

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京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野において行われたものです。研究を進めるにあたり、恩師である内海成先生には、大学院在籍時から終始絶え間ないご指導、ご鞭撻を賜りました。残念ながら昨年12月に亡くなられ、本受賞を直接お伝えすることはできませんでしたが、心より御礼申し上げますとともに、ご冥福をお祈り申し上げます。また、京都大学大学院農学研究科 三上文三先生、吉川正明先生、松村康生先生には本研究の実験の支援だけでなく、終始温かい励ましの言葉を賜りましたことを心より御礼申し上げます。農業生物資源研究所 高岩文雄博士および北海道農業研究センター 石本政男博士には、共同研究者として本研究の推進に多大な協力を賜りましたことを深く感謝いたします。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京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野の卒業生、在校生、技術補佐員など

の多くの方々との共同研究であり，特に西澤けいと博士，丸山如江博士，森 剛志博士，本山貴康博士，福田貴子博士には本研究に大きく貢献してくださいましたことを深く感謝申し上げます。

ます。最後に本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長 山本憲二先生ならびにご支援賜った諸先生方に心より御礼申し上げます。