

Polypeptide Compositions and NH₂-terminal Amino Acid Sequences of Proteins in Foxtail and Proso millets

Keiko KOHAMA*, Takashi NAGASAWA** and Naoyuki NISHIZAWA**

*Iwate Industrial Research Institute; Morioka, Iwate 020-0852, Japan and United Graduate School of Agric. Sci., Iwate Univ.;

**Department of Bioscience and Technology, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

Seed protein of foxtail and proso millets were fractionated into polypeptides that were analyzed for their major protein, prolamin, and NH₂-terminal amino acid sequences of proteins were determined. The proteins extracted from foxtail and proso millet were 64.1 and 80.0% prolamin, respectively. Polypeptides of prolamins were reclassified into two groups. Major polypeptides of 27-19 kDa were rich in leucine and alanine, whereas the 17-14 kDa polypeptides were rich in methionine and cysteine. Glutelin-like proteins that were extracted with reduced reagent were high in proline content and the major polypeptides were 17 and 20 kDa respectively. NH₂-terminal amino acid sequences showed that the major polypeptides of prolamin were homologous to α -zein and glutelin-like protein containing Pro-Pro-Pro sequence like repetitive sequence of γ -zein. Although the prolamin consisted of a similar subunit as zein, polypeptides with various pI values were found among them.

Keywords: millet, prolamins, polypeptide composition, NH₂-terminal amino acid sequence; homology

アワ (Foxtail millet) 及びキビ (Proso millet) 種子タンパク質のポリペプチド構成とN末端配列

小浜恵子*、長澤孝志**、西澤直行**

本研究ではHDLコレステロール代謝に影響を与えるアワとキビ種子タンパク質の構造について検討した。主成分であるプロラミン画分のポリペプチドは、19から27 kDaのLeu及びAla高含量のものと14から17 kDaのMet及びCys含量の多いものに分類された。19-27 kDaのポリペプチドのN末端配列は α -ゼインと相同性を有しており、ホモオリゴマー構造をとることが示唆された。更に還元剤の存在下で水溶性であるグルテリン様のポリペプチドはPro含量が高く、 γ -ゼイン様のProの繰り返し配列を有していた。アワ、キビのプロラミンでは含有するポリペプチドの数や等電点に相違が認められたがゼインのサブユニットとの共通性が見られた。

* 岩手県工業技術センター

** 岩手大学農学部応用生物学科

[再録]

Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(11), 1921-1926, 1999

2 実験方法

添付したpaper原稿の部分を参照願いたい。

3 結果と現在までの経過

和文要約の部分に述べたような結果が得られている。アワとキビの主な貯蔵タンパク質の構成ポリペプチドを分画し、アミノ酸組成と他の穀類タンパク質との比較を行った。ポリペプチド組成はトウモロコシの貯蔵タンパク zein (ゼイン) に似ていた。しかし、トウモロコシにおいてはHDLの上昇効果は報告されていない。

アワ、キビのポリペプチドについて分画・解析した例はほとんどなく現在、添付したように paper にまとめている。投稿先は Journal of Agricultural Food Chemistry (アメリカの雑誌) を想定、現在は native の方による英文の校正前なのでまだ完成ではない。

さらに、県北農研センターで栽培された品種についてタンパク質の抽出を実施している。今後県北農研センターで県内の雑穀の分類を進める、とのことであり抽出法を教えて欲しいとの話が進行中である。

4 今後の計画

以上のことから、paper の新規性を守るため、今回は報告書への掲載を見合わせたい。

今年度は分画した成分の何がHDL上昇効果を有しているのかを調べていく予定である。また、HDL上昇以外の生理活性も有している可能性(抗ガン性)もできたのでどの程度有望が見極める。農研センターへの技術協力は現在のデータを提供する方向で進めたい。

表1 変異株のPGA生産性

菌株	生成PGA量 (mg/ml)
<i>B.natto</i> M	6.0
M- 17	7.0
M- 21	7.0

図1 PGAの分子量の測定

またLB液体培地で37℃24時間培養時の培養上清のGGT活性は親株よりもM-17、M-21ともに高かった(表2)。M株とM-21をLB培地及びLBGN培地で培養したときのgrowthと培養上清のGGT活性の経時変化を図2に示した。またこのときの24時間後、54時間後の相対粘度とGGT活性はM-21の方が高かった(表3)。

3-3 変異株を用いた納豆の試作と評価

製品のナットウキナーゼ活性 (Tyr 1nmol/mgprotein・min を 1 U とした) 相対粘度、アンモニア濃度を表 4 に示した。官能検査では M-17 が一番粘りが感じられた。アンモニア量には差異が認められなかったが M-2 の香りが良く思われた。M-21 は菌の被りが均一ではなく、外観としては好ましくなかった。

4 考 察

納豆は健康食品として注目を集めており今後も需要が増すものと考えられ、多様なニーズに合わせた製品開発が必要である。今回、ナットウキナーゼ高生産株を取得したが親株と特に遜色ない試作品ができた。むしろ香り

表 2 L B 培地培養上清のGGT活性

菌 株	GGT 活性 (mU/ml)
<i>B.natto</i> M	160.0
M- 17	211.0
M- 21	265.8

表 3 L B G N 培地培養上清の相対粘度とGGT活性

菌 株	相対粘度		GGT 活性 (mU/ml)	
	24hr	54hr	24hr	54hr
<i>B.natto</i> M	1.6	2.0	69.7	107.0
M- 21	2.7	3.0	104.6	221.5

図 2 菌株の増殖とGGT活性の発現

がよかったが、使用した大豆「鈴の音」は発酵時間がほかの大豆より長く必要との製造業者の意見もあることから、プロテアーゼ活性の高い M-2 が適したとも考えられる。ほかの大豆での試作もする必要がある。また粘性については好みがあると考えれ、商品イメージによって調節が可能であればバラエティに富んだものが得られると思われる。PGA の生成経路については *B. Anthracis* においてプラスミド上に粘質物の生産に係わる遺伝子が存在しているとの報告があり⁸⁾、納豆菌については生産

表 4 試作納豆の分析値

菌 株	ナットウキナーゼ 活性 (U)	相対粘度	アンモニア量 (%)
M	6.2	2.5	0.2
M- 2	13.0	2.5	0.2
M- 17	6.2	2.9	0.2
M- 21	4.5	2.7	0.2

に係わる遺伝子としてはコンピテンシィに關与する遺伝子の破壊によって生産性がなくなるとの報告⁹⁾がある。PGA を合成する枯草菌は GGT 活性が高いことが知られているが¹⁰⁾、GGT の PGA 生産における役割を直接証明した例はない。図 2 及び表 3 に示したように GGT は定常期以降に培地中に分泌されており、グルタミン酸ナトリウムを添加した L B G N 培地すなわち PGA 生産培地においては L B 培地より分泌されるのが遅く、PGA の培地への分泌にともなって分泌されてくる。変異株は PGA 生産が GGT 活性が高いことによって生産性が高いのではなく、早期から PGA が培地中に分泌されてきているのではないかと推察している。GGT 活性が高い理由としては菌体外酵素の調節変異が考えられるが、ほかの主な菌体外酵素としてプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性を調べたところ、差がなかった(データ未発表)。最近 *B.subtilis* の GGT 遺伝子がクローニングされ¹¹⁾、カタボライトリプレッションを受けることが報告されており今回取得した変異株 M-21、M-17 について調べたところ、親株よりも GGT 活性が強く阻害された¹²⁾。

この点については遺伝子レベルで現在検討中である。
また図1に見られるように変異株とのあいだに分子量的な差はないが構成アミノ酸のDL比についてはまだ検討していないので今後の課題である。

5 結 語

納豆菌の変異処理によって高ナットウキナーゼ生産株とPGA生産変異株を取得した。PGA生産変異株はGGT活性が親株よりも高く、PGAが速く培地中に分泌されると推察された。取得した変異株で納豆を試作したところ、高ナットウキナーゼ活性株は親株と遜色なくPGA生産変異株は相対粘度がわずかに高かった。

文 献

- 1) 須見洋行：醸造協会誌, **85**, 518 (1990)
- 2) 江崎ら：日本食品工業学会誌： **37**, 474 (1990)
- 3) M.Kimura: *Poultry Science* **65**, 1217 (1986)
- 4) H.Itokawaetal.: *Chem. Pharm.Bull.*, **42**, 604 (1994)
- 5) 小寺ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, 281 (1997)
- 6) E.Ichisima, Y.Takeda, K.Taira and M.Takenouhi: *Biochim.Biophys.Acta*, **869**, 178 (1986)
- 7) 藤井ら：日本農芸化学会誌, **37**, 407 (1963)
- 8) I.Uchidaetal.,: *Molecular Microbiology*, **9**, 487 (1993)
- 9) 永井ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, 67 (1997)
- 10) A.Aumayr, T.Hara and S. Ueda: *J.Gen.Microbiol.*, **27**, 115 (1981)
- 11) K. Xu and M. A. Strauch: *J.Bacteriol.*, **178**, 4319 (1996)
- 12) 小浜ほか：日本食品科学工学会大会講演要旨集, 149 (1997)

細胞外プロテアーゼによる消化が最も重要であるとは考えられるが、細胞内プロテアーゼが発酵中にどのような役割を果たしているのか興味もたれる。

最近、一島らは好アルカリ性の *Bacillus* 属から、pH 12 で高い活性を有する細胞内プロテアーゼの遺伝子をクローニングし、その性質について検討しているが⁹⁾、今回クローニングした細胞内プロテアーゼと非常に似ており、C末側8残基が長いこと、4アミノ酸が異なる他は全く同一であった。Kinema の菌株は pH10 で生育不能であることから、アミノ酸の相違がアルカリ耐性の性質の差であると推察される。

4 結 語

Bacillus subtilis kinema から細胞内プロテアーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。331アミノ酸から構成されており、*Bacillus subtilis* ISP- I 及び *Bacillus polymixia* の細胞内プロテアーゼと高い相同性を示した。また、Alkalophilic *Bacillus* sp. の細胞内プロテアーゼと12アミノ酸の相違しかないことから、アルカリ耐性の細胞内プロテアーゼとの性質の相違について今後検討する必要がある。

本研究を実施するに当たり、キネマの菌株を分譲、併せてご指導ご助言していただいた東北大学農学部一島英治教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 須見洋行：醸造協会誌, 85, 518 (1990)
- 2) 小浜恵子：岩手工技セ研報, 2, 83 (1995)
- 3) Maniatis, T. et al.: Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- 4) Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)
- 5) Koido Y. et al.: *J. Bacteriol.*, 167, 110 (1986)
- 6) Takekawa S. et al.: *J. Bacteriol.*, 173, 6820 (1991)
- 7) Sastry K. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 153, 511 (1983)

上段：

中段：

下段：

図 3 細胞内プロテアーゼのアミノ酸相同性

4 考 察

Bacillus 属の生産する菌体内プロテアーゼは、孢子形成期に活性が認められることから、遺伝子レベルでの活性調節機構と、孢子形成過程との関連について検討され、ISP- I の制御機構については多くの報告がある。ISP- I は、他の不要タンパクを分解し、孢子の特異的タンパクの新生に必要とも言われていたが、孢子形成に必須ではないとの報告が有力である。他の細胞内プロテアーゼ ISP- II なども孢子形成には関連しているが必須ではない⁷⁾。孢子形成期の細胞内プロテアーゼの生理的役割については、今後の報告が待たれるところである⁸⁾。食品製造、納豆製造におけるプロテアーゼの役割は、

- 8)村尾澤夫：日本農芸化学会誌, 65, 56. (1991)
 9)YamagataYandIchishimaE. : *Curr.Microbiol.*, 30, 357
 (1995)

図1 キネマから精製したセリンプロテアーゼの
 SDS-PAGE電気泳動

- レーン1：分子量マーカー
 レーン2：精製蛋白質
 レーン3：キネマ培養液の上澄

単一のバンドとして検出され、分子量約 30,000 であつた (subtilisin kinema)。既に精製、クローニングされている *Bacillus natto* のセリンプロテアーゼ (ナットウキナーゼ) subtilisin NAT⁶⁾ と同様である。

また、精製された酵素の活性は、セリンプロテアーゼ阻害剤である phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 10mM 存在下で完全に阻害された。得られた精製酵素の比活性は、Tyr 1mol/mg protein・sec を 1 Kat としたとき 40nKat であつた。

図2には、今回精製した酵素のN末端配列を解析した結果を示した。比較として *Bacillusnatto* の生産する subtilisin NAT、及び既に報告されている各種 *Bacillus* 属の生産する細胞外セリンプロテアーゼ subtilisin E⁸⁾、subtilisin amylosacchariticus¹⁰⁾、subtilisin BPN¹¹⁾、subtilisin Carlsberg¹²⁾ を示した。図2に示した通り、subtilisin NAT 等のプロセッシングを受けた後、細胞外に分泌された酵素の最初の 12 残基と全く同一であつた。

蛋白質の由来	N末からの番号	
Subtilisin Kinema	1	10
Subtilisin NAT	A	QSVPYGISQIK
Subtilisin E	A	QSVPYGISQIK
Amylosaccharitics	A	QSVPYGISQIK
Subtilisin BPN	A	QSVPYGVSQIK
Subtilisin Carlsberg	A	QTVPYGIPQIK

図2 キネマ及び関連細菌のセリンプロテアーゼの
 アミノ酸配列

4 考 察

Bacillus subtilis Kinema から今回精製した subtilisin kinema は、*Bacillus subtilis Natto* からのセリンプロテ

アーゼ Subtilisin NAT と分子量やN末のアミノ酸配列では同じであるが、其質特異性を検討しないと同一性について明確な評価はできない。特に、この *Bacillus subtilis* Kinema からは、今回精製した subtilisin kinema の他に 90kDa の分子量で等電点が 3.9 である細胞外セリンプロテアーゼが精製され、Bacillopeptidase F と相溶性が高いこと、等電点がこのように低いセリンプロテアーゼは例がないことが報告されている⁷⁾。

こうした点で、いわゆるナットウキナーゼと呼ばれている今回精製した細胞外酵素の基質特異性、フィブリン塊（血栓）溶解活性等の生理活性については今後検討することになっている。

5 結 語

Bacillus subtilis Kinema から今回精製した subtilisin kinema は、*Bacillus subtilis* Natto からの酵素などとともに subtilisin ファミリーに属するものであるが、subtilisin E などとは免疫的同一性などに差異が見られることより、基本的な構造特性による検討だけでは不十分であり、反応特性解析が今後の課題である。

本研究を実施するに当たり、キネマの菌株を分譲、併せて、ご指導ご助言していただいた農林水産省食品総合研究所新国浩一微生物研究室長に感謝いたします。

文 献

- 1) 小浜恵子：岩手工技セ研報, 2, 83 (1995)
- 2) 須見洋行：醸造協会誌, 85, 518 (1990)
- 3) 木内 幹, 鈴木英也：食品と科学, 33, 85 (1991)
- 4) E. Ichishima, Y. Takeda, K. Taira, and M. Takeuchi : *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 178 (1986)
- 5) M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- 6) V. K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 7) T. Nakamura, Y. Yamagata, and E. Ichishima: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1869 (1992)
- 8) T. Kato, Y. Yamagata, and E. Ichishima: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1166 (1992)
- 9) M. L. Stahland E. Ferrari: *J. Bacteriol.*, **158**, 411 (1984)
- 10) S. L. Wong, C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi : *Proc. Natrl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1184 (1984)
- 11) T. Yoshimoto, H. Oyama, T. Honda, H. Tone, T. Takeshita, T. Kamiyama, and D. Tsuru: *J. Biochem.*, **103**, 1060 (1988)
- 12) N. Vsantha, L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula: *J. Bactriol.*, **159**, 811 (1984)
- 13) M. Jacobs, M. Eliasson, M. Uhlen, and J. I. Flock, *Nucl. Acid. Res.*, **13**, 8913 (1985)