

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22298

研究課題名(和文) 脱脂ダイズタンパク質を利用した新バイオマス素材の創製

研究課題名(英文) Creation of new biomass materials using defatted soy protein

研究代表者

山田 哲也 (Yamada, Tetsuya)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：70374618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズタンパク質を利用して新たなバイオマス素材を創成するため、脱脂ダイズを用いてホルムアルデヒドの架橋を介してバイオプラスチックの試作を行った。加えて、酵素処理を行うことでバイオプラスチックの構造が大きく損なわれることを確認した。

従来のタンパク質組成から大きく逸脱したダイズ材料を作製するため、RNAiの技術を利用してダイズ種子に含まれる主要なタンパク質である7Sおよび11Sグロブリンのノックダウンを試みた。作製した形質転換ダイズの完熟種子においてタンパク質の分析を行ったところ、対象個体と比べ形質転換ダイズ種子では7Sおよび11Sグロブリンタンパク質の蓄積が大きく低下していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の社会事情において化石燃料から合成されるプラスチックの代替として新素材の開発が世界的に求められている。そこで、年間2億トン以上産生される搾油後の脱脂ダイズタンパク質を用いた新バイオマスプラスチックの開発研究を提案した。ダイズ種子には様々なタンパク質を含むことから加工の方法によって多様な物性をもつバイオマスプラスチックができることが期待される。そのため本研究を通して適切な材料の検討を行った。また、脱脂ダイズを用いて生分解性のプラスチックが試作できたことにより、化石燃料の代替としての期待度を大きく前進させた。

研究成果の概要(英文)：In order to create a new biomass material from defatted soybean protein, a prototype bioplastic was fabricated using defatted soybean via the formaldehyde cross-linking. In addition, it was confirmed that the structure of bioplastic was significantly impaired by enzymatic treatment.

To create a soybean material deviating from the conventional protein composition in soybean, we attempted to knock down 7S and 11S globulin subunit genes, which are major protein genes in mature soybean seeds, using RNA interference (RNAi) technology. Protein analysis of the transgenic soybean seeds revealed that the accumulation of 7S and 11S globulin proteins was greatly reduced in the transgenic soybean plants compared to the conventional soybean plants.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：脱脂ダイズ タンパク質 アミノ酸 プラスチック 生分解性 7S グロブリン 11S グロブリン RNAi

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の社会事情において化石燃料から合成されるプラスチックの代替として新素材の開発が世界的に求められている。代替として期待される一つがバイオマスプラスチックである。植物組織に由来するセルロースはその代表的な素材である。セルロースの水酸基に様々な官能基を導入することでプラスチック化が可能になる。また、タンパク質もプラスチックの材料になり得る。このように、バイオマス素材の可能性は無限にある。ペプチド結合やエステル結合は多糖のグリコシド結合と比べ自然界で生分解を受けやすいと考えられている。そのため、タンパク質を用いたバイオマスプラスチックは極めて環境にやさしい素材である。一方、タンパク質を用いたバイオマスプラスチックはタンパク質の精製に時間とコストがかかる、多糖と比較すると分子量が小さく、アミノ酸組成により性質が異なる、分子量の小さいタンパク質は多量の架橋剤を必要とするなどの欠点もある。これらの欠点を解決できるタンパク質素材または改善できる方法があるならば、優れたバイオマスプラスチックが創製できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、年間2億トン以上産生される搾油後の脱脂ダイズタンパク質を用いた新バイオマスプラスチックの開発研究を行うことにある。タンパク質含量の多い脱脂ダイズは精製することなく材料として用いることが可能で、プラスチック創製に関するコストを大幅に下げることができ、先述した欠点を容易に解決できる。プラスチックの強度や性質は、タンパク質の分子量や構成されるアミノ酸組成に大きく影響される。そのため、分子量サイズやアミノ酸組成の異なるダイズタンパク質が存在するならば、先述の欠点が解決できる。ダイズタンパク質には複数のタンパク質が混在するため、アミノ基やカルボキシ基など多様な架橋可能な官能基がある。そのため、標的とするアミノ酸を介してタンパク質間に分子架橋を導入できるテクニックがあるならば、先述の欠点を解決できる。そこで、本研究は、脱脂ダイズからのバイオマスプラスチックのプロトタイプを試作するとともに物性の評価を行った。加えて、ダイズタンパク質の組成を大きく変えることでプラスチックの物性へ与える影響を精査する目的で、RNAiの技術を介してダイズの主要な貯蔵タンパク質を欠失させた系統の作出を試みた。さらに、作出されるダイズ系統においてタンパク質およびアミノ酸組成を解析し、これらの質的および量的な変化を把握し、ダイズ由来のバイオマスプラスチックへ与える影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 通常のタンパク質組成を有するダイズからのバイオマスプラスチックの試作と評価

通常のタンパク質組成を持つダイズから脱脂ダイズを用意し、架橋剤として使用するホルムアルデヒド(HCHO)水溶液に24時間浸漬した後、純水で洗浄し風乾した。架橋剤のHCHO水溶液の濃度を0.2% - 37%の間で変化させてバイオプラスチックを試作した。さらに、試作したそれらの素材の力学的強度、水安定性、膨潤性を評価した。また、タンパク質分解酵素・プロナーゼ(EC 3.4.24.4)を用い、試作したバイオプラスチックの生分解試験を行った。生分解性はプロナーゼ溶液に浸漬する前後の重量変化から評価した。

(2) RNAiを介したタンパク質組成を大きく改変したダイズの作出とその解析

ダイズ種子における主要な貯蔵タンパク質7Sグロブリンおよび11Sグロブリンに関する各種サブユニット遺伝子においてそれぞれ共通配列をもとにRNAiベクターの構築を行った(Fig.1)。さらに、このベクターをアグロバクテリウムへ形質転換した。一晚滅菌水に浸漬したダイズ種子に由来する子葉節を外植片に用い、ダイズの形質転換実験を行った。さらに、作出されたダイズ形質転換個体において自殖を繰り返し、導入遺伝子の固定化を図った。導入遺伝子を固定化した系統を7S-11S-RNAi1および7S-11S-RNAi2と名付けその後の分析を行った。対象とする遺伝子の発現をリアルタイムPCR分析で定量した。また、SDS-PAGEによるタンパク質の質的な変化を評価した。さらに、アミノ酸分析機による遊離および加水分解したアミノ酸の分離・定量解析を行った。

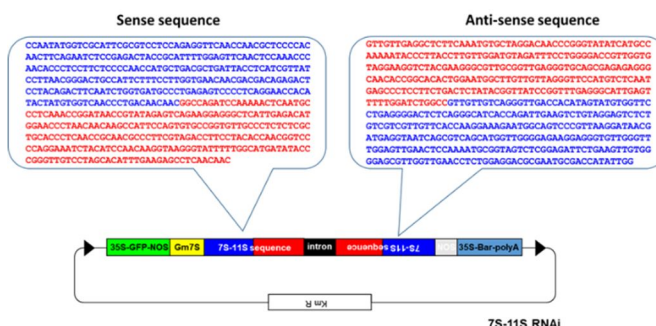


Fig. 1. Expression vector of soybean transformation.

4. 研究成果

(1) 通常のタンパク質組成を有するダイズからのバイオマスプラスチックの試作と評価

一般的なタンパク質含量と組成を示すダイズを用い、プレスおよびヘキササン処理することで油脂を取り除いた脱脂ダイズを準備し、HCHO による架橋を行ったところバイオマスプラスチックの作製に成功した。さらに、様々な HCHO 濃度で作製したバイオマスプラスチックの曲げ強度を評価したところ曲げ強度は HCHO 濃度とともに増加し、1% で最大値を示した後、徐々に減少した (Fig. 2)。

さらに、作製したバイオマスプラスチックの IR スペクトルを測定したところ、HCHO 溶液に浸漬することにより $1,000\text{ cm}^{-1}$ 付近に C-N 伸縮振動に由来するシグナルが現れた (Fig. 3)。この結果、大豆タンパク質中のリシンのアミノ基やアルギニンのグアニジノ基と HCHO とがメチレン架橋を形成することが示唆された。また、このメチレン架橋の形成が水安定性および曲げ強度の増加に影響を与えていることも示唆された。

さらに、1% の HCHO 条件で作製したバイオマスプラスチックをプロナーゼ溶液に浸漬することで重量変化からその生分解性を評価した。その結果、Fig. 4 に示すようにバイオマスプラスチックの生分解試験の結果を示した。プロナーゼ量 1 unit mL^{-1} で生分解を試みたところ、6 日間で約 15% の生分解が見られた。そこで、酵素量を増やし、 10 units mL^{-1} で行ったところ、生分解は増加し、6 日間で 35% 以上の値を示した。この結果、バイオプラスチックは生分解性を有していることが示唆された。

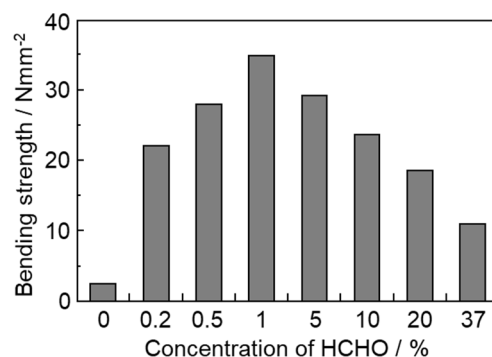


Fig. 2. Bending strength of bioplastic using soy protein. The bending strength was expressed by an average of 5 measurements.

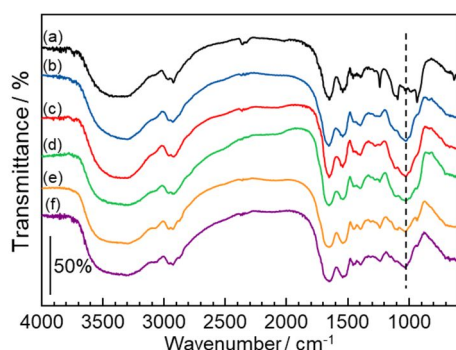


Fig. 3. IR spectra of bioplastic using soy protein. The incubation times into HCHO solution are (a) 0 h, (b) 1 h, (c) 3 h, (d) 6 h, (e) 12 h, and (f) 24 h.

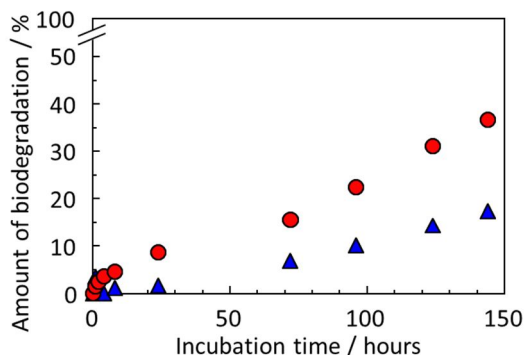


Fig. 4. Biodegradation of bioplastic which was prepared in a 1% aqueous HCHO solution. The concentrations of the pronase are (▲) 1 unit mL^{-1} and (●) 10 units mL^{-1} .

(2) RNAi を介したタンパク質組成を大きく改変したダイズの作出とその解析

RNAi ベクターを有するアグロバクテリウムを外植片へ感染させることにより、独立した 5 つの T_0 個体を得ることができた。これらの中から、自殖により世代を進めることで導入遺伝子を遺伝的に固定化した 2 つの系統 (7S-11S-RNAi1 および 7S-11S-RNAi2) を確立した。これらの系統において詳細な解析を進めた。

対象とする遺伝子の発現解析を行ったところ、多くの遺伝子において有意に対象個体よりも遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった (Fig. 5)。一方、Gy4 などの遺伝子は発現量に大きな変化は認められなかった (Fig. 5)。この点については、RNAi ベクターに利用した共通配列における相同性を比較したところ、Gy4 遺伝子は Gy1 や Gy2 遺伝子に比べ相同性が低く、標的遺伝子へのノックダウンの効果は RNAi ベクターとの相同性を反映する結果となった。

続いて、7S-11S-RNAi1 および 7S-11S-RNAi2 の完熟種子におけるタンパク質の量的および質的な変化について評価を行った。その結果、7S グロブリンの α , α' および β サブユニットタンパク質、ならびに 11S プロブリンの A1 および B1, B2, B4 サブユニットタンパク質の蓄積が大きく低下していることが明らかとなった (Fig. 6)。これらの結果は、RNAi の効果によって多くのサブユニットをコードする遺伝子の発現が抑制されることによって、それらの翻訳産物の蓄積が大きく低下したことを示唆している。

これらの系統においてアミノ酸分析を行ったところ、7S-11S-RNAi1 および 7S-11S-RNAi2 系統は対象個体に比べ、遊離のアミノ酸含量が 4~5 倍程度上昇していることが明らかとなった。中でも、アルギニンの濃度が 10 倍以上上昇するなどアミノ酸の種類によってその増加程度が異なる

ることが明らかになった。加えて、タンパク質を構成するアミノ酸の評価も行うため塩酸加水分解後のアミノ酸分析を行った。その結果、アルギニンの濃度が上昇していることが明らかとなった。

以上のことから、7S および 11S グロブリンのサブユニットの遺伝子を RNAi でノックダウンすることによって種子におけるタンパク質の組成が大きく変化することに加え、アミノ酸組成も変化することが明らかとなった。本材料は通常のタンパク質組成を有するダイズとは明確に区別できる組成を持つことから、本ダイズの脱脂サンプルから作製したバイオマスプラスチックの物性が研究(1)で作製したバイオマスプラスチックのものとは大きく異なることが期待される。

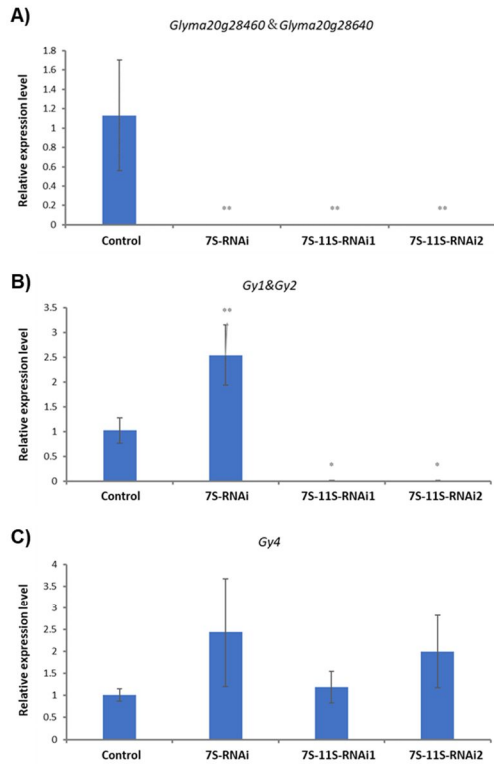


Fig. 5. Gene expression level of 7S and 11S globulin subunit genes. A) β -subunit gene of 7S globulin. B) *Gy1* and *Gy2* subunit gene of 11S globulin. C) *Gy4* gene of 11S globulin.

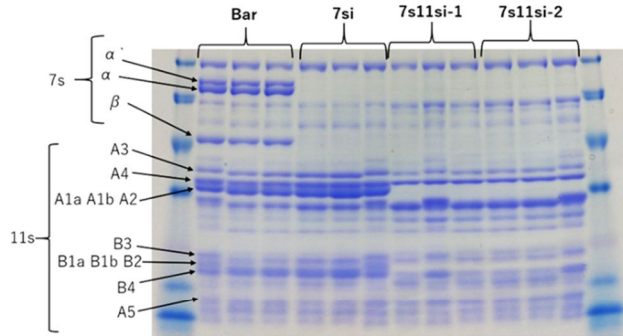


Fig. 6. SDS-PAGE of mature seeds.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Masanori, Morimitsu Sakura, Hosono Eiji, Yamada Tetsuya	4. 巻 149
2. 論文標題 Preparation of bioplastic using soy protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masanori, Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, Ridaicho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan	4. 巻 16
2. 論文標題 Anhydrous Proton Conduction of Soy Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Electrochemical Science	6. 最初と最後の頁 151046 ~ 151046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20964/2021.01.74	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masanori, Kawamura Midori, Yamada Tetsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Preparation of bioplastic consisting of salmon milt DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11482-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 真路 (Yamada Masanori) (80443901)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------