

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450116

研究課題名(和文)植物の細胞生死を制御するジスルフィド産生系の分子機構

研究課題名(英文)Generation and transfer of disulphide bonds in plant cells

研究代表者

恩田 弥生 (Yayoi, Onda)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70368463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：登熟胚乳細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成は貯蔵タンパク質群の選別輸送・蓄積に必須であり、種子発達・発芽の基盤を構築する。本研究では、イネ(*Oryza sativa*)胚乳細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成と過酸化水素産生の制御機構を明らかにすることを目的とした。ER01/PDIジスルフィド産生・伝達系の駆動・制御機構を解明し、一方、QSOXジスルフィド産生・伝達系の存在を見出した。

研究成果の概要(英文)：In the developing endosperm cells of rice (*Oryza sativa*), disulphide bonds enable redox control of protein packaging into the protein storage organelles, thus providing nutritional reserves for the next generation. In this study, we aimed at unravelling the mechanisms that modulate the redox pathways for disulphide bond formation, which generate hydrogen peroxide as a by-product. The pathways for disulphide bond formation require de novo disulphide-generating enzyme (e.g. ER01) and disulphide carrier protein (e.g. PDI) in the endosperm cells of rice. A potential function of the QSOX family member, which catalyses both de novo disulphide generation and disulphide transfer, is discussed.

研究分野：植物生化学・分子細胞生物学

キーワード：植物 酵素 ジスルフィド結合

1. 研究開始当初の背景

タンパク質ジスルフィド結合(システイン[Cys]残基間共有結合)はタンパク質の立体構造や機能を決定する重要な化学結合であり、小胞体において形成される。ジスルフィド結合形成は一連の酸化還元反応により駆動され、ジスルフィド産生酵素とジスルフィド伝達酵素を必要とする。まず、ジスルフィド産生酵素が酸素分子等の酸化力を利用してジスルフィド結合を新規に産生し、次に、ジスルフィド伝達酵素がチオール-ジスルフィド交換反応により基質分子にジスルフィド結合を導入する。

研究代表者らはこれまでにイネ(*Oryza sativa*)胚乳細胞における ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1) を介した酸化還元経路の存在を見出した (Onda et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。ヒト ERO1 とは異なり、イネ ERO1 はアミノ末端膜貫通領域依存的に小胞体膜に局在化する。ERO1 はジスルフィド産生酵素の一つであり(2つのシステイン残基ペアと補酵素フラビンアデニンジヌクレオチドを有する)、新規ジスルフィド結合の産生とジスルフィド伝達酵素 PDI (Protein Disulphide Isomerase) 分子種へのジスルフィド伝達・分配を司る。ERO1/PDI ジスルフィド産生・伝達系の破綻が胚乳の細胞生死に影響を与えることがわかってきた。

イネ登熟胚乳細胞において小胞体は膨満構造を示し、タンパク質ジスルフィド結合形成が過酸化水素の産生を伴うことを見出した (Onda et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。その一つの分子機構が ERO1/PDI ジスルフィド産生・伝達系である。基質分子のシステイン残基側鎖スルフヒドリル基から PDI へと伝達された電子は ERO1 を介して酸素分子に伝達され、結果、副産物として過酸化水素が発生すると考えられる。過酸化水素は活性酸素種の一つであり、細胞のシグナルメッセンジャーとして重要な機能を有する一方、タンパク質・核酸・脂質に重大な傷害を与える。細胞機能・発達・生存にとってタンパク質ジスルフィド結合形成の駆動が極めて重要であると同時に、ジスルフィド結合形成に伴う過酸化水素発生の時間的・空間的制御が必須となる。

2. 研究の目的

本研究では植物細胞、特に胚乳細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成と過酸化水素産生の制御機構を明らかにすることを目的とした。種子発達過程においてイネ胚乳細胞は物理化学的に多様なタンパク質群を活発に生合

成しタンパク質貯蔵オルガネラに輸送・蓄積する。このタンパク質選別輸送・蓄積にはジスルフィド結合形成が必須であることから、イネ胚乳細胞は優れたモデル実験系を提供する。一連の酸化還元反応の中で、本研究ではジスルフィド伝達反応を触媒するチオール-ジスルフィド酸化還元酵素 PDI と、ジスルフィド産生反応及びジスルフィド伝達反応を触媒するスルフヒドリル酸化酵素 QSOX (Quiescin Sulfhydryl Oxidase) ファミリーメンバーの機能に着目した。胚乳細胞におけるジスルフィド産生・伝達系の駆動・制御とジスルフィド分配・還元の機構解明は小胞体環境の構築・維持と種子の発達・発芽の理解に大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1) PDI の機能解析

イネ PDI 分子種の大腸菌組換えタンパク質発現系を構築し精製標品を得た。グルタチオン (GSH; 1 mM, 2 mM, 4 mM) 及びグルタチオンジスルフィド (GSSG; 0.2 mM) 存在下、PDI のジスルフィド還元能を解析した。この際、基質タンパク質としてインスリンを用い、ジスルフィド結合還元反応のカイネティクスを解析した。

PDI 1;1 (AK068268) のシステイン残基ペア (Cys69-X-X-Cys72 及び Cys414-X-X-Cys417) 部位特異的変異体を作製した。

Cys69Ala/Cys72Ala 及び Cys414Ala/Cys417Ala 置換変異型 PDI 1;1 の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質を発現する形質転換イネ系統をアグロバクテリウム法により作製し、選抜した。各形質転換植物系統の登熟種子切片を蛍光試薬ローダミンにより染色処理し、胚乳細胞の顕微鏡解析を行った。

(2) QSOX の機能解析

イネ QSOX (AK121660) の GFP 融合タンパク質と β -TIP (AK11931, 液胞由来タンパク質顆粒[後述]局在タンパク質) の DsRed (赤色蛍光タンパク質) 融合タンパク質を共発現する形質転換イネ系統を作製・選抜した。

胚乳特異的プロモータ制御下、RNA 干渉法によりイネ QSOX を発現抑制した。形質転換イネ系統の登熟種子切片を蛍光試薬ローダミンにより染色処理し、胚乳細胞の顕微鏡解析を行った。完熟種子の全タンパク質を還元・非還元条件下で抽出し、貯蔵タンパク質の組成・蓄積を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。QSOX 発現抑制は免疫ブロット(抗イネ QSOX 抗体)により確認した。

4. 研究成果

(1)PDI を介したジスルフィド伝達・還元系種子の発達と発芽に伴い、貯蔵タンパク質は酸化・還元を受けその構造・特性は大きく変化する。種子発達段階においてジスルフィド結合の形成(システイン残基スルフヒドリル基の酸化)はタンパク質の効率的な蓄積を可能とし、発芽段階においてジスルフィド結合の還元は窒素・硫黄供給を可能とする。

イネゲノムは少なくとも約 20 の PDI ファミリーメンバーを有する。同一胚乳細胞において PDI 1;1(ヒト PDI のオルソログ)と PDI 2;3(ヒト P5 のオルソログ)は異なる細胞内局在を示す。PDI 1;1 は小胞体内腔に、一方、PDI 2;3 は小胞体由来タンパク質顆粒(後述)に局在する(Onda et al., *Plant Cell*, 2011)。種子発達段階において活発に合成された新生ポリペプチド鎖(スルフヒドリル基、還元型)は小胞体においてジスルフィド結合(酸化型)を獲得後小胞体からタンパク質貯蔵オルガネラへと局在化することから、小胞体の酸化還元状態は著しく変動する。小胞体酸化還元環境を構築・維持する因子の一つがグルタチオンである。グルタチオン及びグルタチオンジスルフィド存在下、ジスルフィド結合還元反応のカイネティクスを解析した。その結果、イネ PDI 分子種の中で PDI 1;1 は最も高いジスルフィド伝達能と最も高いジスルフィド還元能を示し、PDI 1;1 のジスルフィド還元能はグルタチオン濃度に依存して増加した。

イネ PDI 1;1 は 4 つのチオレドキシシン様ドメインから構成され、アミノ末端側及びカルボキシル末端側チオレドキシシン様ドメインはそれぞれシステイン残基ペア(Cys69-X-X-Cys72 及び Cys414-X-X-Cys417)を有する。Cys69Ala/Cys72Ala 置換変異型及び Cys414Ala/Cys417Ala 置換変異型 PDI 1;1 を発現する形質転換植物系統を作製・選抜し、胚乳細胞におけるジスルフィド結合形成への影響を調べた。登熟種子切片の顕微鏡解析を行った結果、野生型胚乳細胞では 2 種のタンパク質貯蔵オルガネラ(小胞体由来タンパク質顆粒[直径 1-2 μm]及び液胞由来タンパク質顆粒[直径 3-4 μm])が発達するのに対し、変異型胚乳細胞では小胞体における異常なタンパク質凝集体の形成とタンパク質貯蔵オルガネラの発達阻害が観察された。プログレルリン及びプロラミンは主要なイネ種子貯蔵タンパク質である。プログレルリン(親水性ポリペプチド)は小胞体において分子内ジスルフィド結合を獲得後、液胞由来タンパク質顆粒へ輸送され成熟型グルテリン(酸性・塩

基性サブユニットから構成される)に変換される。一方、プロラミン(疎水性ポリペプチド)は小胞体において分子間ジスルフィド結合により重合し小胞体由来タンパク質顆粒を形成する。胚乳細胞において PDI 1;1 と PDI 2;3 は機能分業を示し、PDI 1;1 はプログレルリンの分子内ジスルフィド結合形成に、PDI 2;3 はプロラミンの分子間ジスルフィド結合形成に必須である。更に、PDI 1;1 と PDI 2;3 は協調的に機能し、例えば、PDI 1;1 依存的ジスルフィド伝達系は PDI 2;3 依存的ジスルフィド伝達系の機能・駆動に重要な役割を担うことが分かってきた。PDI 1;1 の高いジスルフィド伝達能とグルタチオン濃度依存的ジスルフィド還元能は正しいジスルフィド結合の形成と誤ったジスルフィド結合の還元を促進し、小胞体における酸化還元環境の構築・最適化とタンパク質品質の制御に重要な役割を果たすと考えられる。

(2)QSOX を介したジスルフィド産生・伝達系イネ胚乳細胞において ERO1 を介した酸化還元経路の破綻はタンパク質のミスフォールディングと異常凝集を促進することが分かってきた。

ERO1 ノックダウン細胞では正しいタンパク質ジスルフィド結合ではなく誤ったジスルフィド結合の形成が促進され、結果、異常な高分子タンパク質凝集の促進とタンパク質の選別輸送・蓄積の阻害が誘導される。PDI 1;1 ノックアウト細胞も同様の表現型を示す。イネ胚乳細胞においてジスルフィド産生・伝達は複数の経路により駆動され、ERO1/PDI 経路とは別の、より基質特異性の低い経路が存在する可能性が示唆される。その候補の一つが QSOX 経路である。

ERO1 とは異なり QSOX ファミリーメンバーはチオレドキシシン様ドメインと Erv1/ALR ドメイン(両ドメインはシステイン残基ペアを有する)から構成され、ジスルフィド産生能とジスルフィド伝達能の両者を示す。イネ QSOX (GFP 融合タンパク質)の細胞内局在を顕微鏡解析した結果、登熟胚乳細胞において GFP-QSOX は小胞体や小胞体以外のオルガネラに局在化する可能性が示唆された。次に、胚乳細胞における QSOX 発現抑制がジスルフィド結合形成に与える影響を調べた。野生型細胞とは異なり QSOX ノックダウン細胞では異常なタンパク質凝集体の形成が促進された。QSOX ノックダウン細胞の貯蔵タンパク質群は、還元・非還元条件下、野生型細胞のそれとは異なる組成及び特性を示した。本研究結果は、イネ胚乳細胞の小胞体やタンパク質貯蔵オルガネラにおいて ERO1/PDI 酸化還元系や別の経

路, 例えばその一つとして QSOX 酸化還元系, がジスルフィドの産生・伝達・分配と過酸化水素の産生を駆動・制御する可能性を提示する.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Onda, Y., Kobori, Y. Differential activity of rice protein disulfide isomerase family members for disulfide bond formation and reduction. *FEBS Open Bio* 4:730-734, 2014. (DOI: 10.1016/j.fob. 2014. 07. 007) [査読有]

[学会発表] (計 4 件)

- ① Onda, Y., Kawagoe, Y., Regulation of disulphide bonds by rice thiol-disulphide oxidoreductase PDIL1;1: application to food science, SEB (the Society for Experimental Biology) Prague 2015, プラハ(チェコ共和国), 2015 年 6 月 30 日. [招待講演]
- ② Onda, Y., Aihara, K., Kobori, Y., Differential activity of rice thiol-disulfide oxidoreductases for disulfide bond formation and reduction, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学(岡山・岡山), 2015 年 3 月 28 日.
- ③ Onda, Y., Redox system for disulfide bond formation in plant cells: protein packaging for the next generation, 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム "Toward in-depth understanding of the molecular basis of the cellular redox systems", 国立京都国際会館(京都・京都), 2014 年 10 月 18 日. [招待講演]
- ④ 恩田弥生, イネのタンパク質品質管理システム, 東北大学雨宮シンポジウム, 東北大学(宮城・仙台), 2014 年 6 月 11 日. [招待講演]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 弥生 (ONDA, Yayoi)

愛媛大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 70368463

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし