

機関番号：25502

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007~2010

課題番号：19580110

研究課題名 (和文) イネ胚乳に見いだされた新規プロテインジスルフィドイソメラーゼの生理機能の解明

研究課題名 (英文) Physiological role of a novel protein disulfide isomerase present in rice endosperm tissue

研究代表者

小川 雅広 (OGAWA MASAHIRO)

山口県立大学・共通教育機構・教授

研究者番号：10160772

研究成果の概要 (和文) : イネ胚乳で見出された分子サイズが 40kDa の新規プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI2;3) の生理機能が明らかになった。植物種子に存在する主要な PDI1;1 の生理機能は、11S グロブリンを代表とする貯蔵タンパク質の合成時に形成される分子内 S-S 結合を触媒することである。一方、新規 PDI2;3 は、分子内 S-S 結合形成に対して触媒作用はほとんどなく、分子間 S-S 結合形成を触媒していることが分かった。イネ胚乳には 11S グロブリン類似タンパク質である酸可溶性のグルテリンとアルコール可溶性のプロラミンが存在しているが、両タンパク質とも S-S 結合を形成してそれらの構造を維持している。グルテリンは、PDI1;1 の作用で分子内 S-S 結合形成後、液胞に輸送され、成熟型となる。一方、プロラミンは、小胞体内でプロラミン同士で分子間 S-S 結合を形成し、プロラミン凝集体を形成し、小胞体内にプロテインボデイとなる。これらプロラミン分子間の S-S 結合形成に作用するのが、新規 PDI2;3 であることが判明した。

研究成果の概要 (英文) : It was elucidated that a novel PDI2;3 with 40 kDa apparent molecular size plays a physiological role for inter-molecular S-S bond formation in rice endosperm tissue. Generally 11S globulin has intramolecular S-S bonding which is catalysed by PDI1;1 with 60 kDa apparent molecular size. However PDI2;3 with small 40 kDa apparent molecular size does not function as intramolecular S-S bond forming enzyme. In rice endosperm tissue there are two types of storage proteins such as acid-soluble glutelin and alcohol-soluble prolamins. It has been well known that an intramolecular S-S bonding of proglutelin is formed before being transported into vacuole. However it has not been known how prolamins aggregate are formed and are accumulated in ER lumen to form PBI. Finally PDI2;3 functions as an enzyme to form intermolecular S-S bond between prolamins polypeptides and which become prolamins aggregate to form PBI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：イネ胚乳 PDI 突然変異 MNU 分子シャペロン RNAi 組換え体  
プロテインボデイ

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

イネは種子貯蔵タンパク質として 11S グロブリン様の酸可溶性タンパク質であるグルテリンとアルコール溶液可溶性タンパク質であるプロラミンの両方を有し、他の穀類とは異なる特徴を持っている。グルテリンは液胞内に蓄積され、Protein Body II (PBII) を形成し、また、プロラミンは小胞体内に蓄積され PBI を形成し、それぞれ別々の細胞小器官に蓄積されている。グルテリン分子は、57kDa グルテリン前駆体ポリペプチドとして合成され、直ちに小胞体内で分子内ジスルフィド結合を形成し、前駆体のまま小胞体から出てゴルジ体を経由して液胞に輸送され、液胞内で酸性と塩基性のサブユニットに解裂されて成熟型のグルテリン分子となる。一方、プロラミンも同様に小胞体上で合成されるが、小胞体内腔においてプロラミン分子同士が分子間 S-S 結合を形成し、プロラミン分子凝集体を形成し、そのまま小胞体内に蓄積され、PBI を形成する。このようにグルテリンとプロラミンは、同じ小胞体上で合成され、小胞体内腔に一時的に存在するけれども両者が互いにジスルフィド結合することが決してなく、両分子が小胞体内で会合しない。それぞれの分子がそれぞれの蓄積部位に集積されるためには互いに分別する機構が存在すると考えられる。

申請者らはイネ種子グルテリンとプロラミンに関する突然変異体を選抜し、特にグルテリン前駆体を多量に蓄積した 8 種類の 57H 変異体 (*esp2*, *Glup1*, *glup2*, *glup3*, *glup4*, *Glup5*, *glup6*, *glup7*) を選抜した。そしてグルテリンとプロラミンの小胞体内で分別される機構を解明するために 57H 変異体の遺伝学的特性と生化学的特性を明らかにした。その結果、57H 変異体は、遺伝的発現順序に従って 4 つのクラスの変異に分類されることが判明した。それらの中で遺伝学的発現順位において一番上位に分類されるクラス 1 変異 (*esp2*) を同定した。そこで *esp2* 変異体の特性を調査した結果、*esp2* 変異体では分子サイズ 60kDa の PDI1;1 遺伝子が発現されていないことが明らかになった。さらに *Esp2* 遺伝子が 60kDa PDI1;1 の構造遺伝子であることが解明された。*esp2* 変異体では PDI 活性がないことも明らかにされた。さらに *esp2* 変異体の PB の形態を調べたところプロラミンを蓄積する PBI が存在せず、その代りにプロラミン分子とグルテリン前駆体分子がジスルフィド結合した凝集体が、変異型 PB を形成して存在していることが分かった。従って *esp2* 変異体の胚乳では PDI1;1 が機能していないため、グルテリンとプロラミンの正常な 3 次元構造形成が阻害され、その結果、分子内ジスルフィド結合形成ができなくなっ

たグルテリン前駆体分子が、プロラミン分子とランダムに分子間ジスルフィド結合を形成するにいたり、変異型 PB が形成されたと結論した。従ってイネ胚乳では PDI1;1 による分子内ジスルフィド結合形成過程は、グルテリン前駆体の液胞への輸送蓄積のための必須過程であると結論した。

申請者らは、*esp2* 変異体が、PDI1;1 を欠損しているにもかかわらず、その生育は野生型とほぼ同じで、しかも正常に種子形成もできることから PDI1;1 に代わる PDI 様の酵素が存在する可能性が考えられたので調査した。その結果、PDI1;1 とホモロジーがなく、分子サイズが 40kDa と小さく、PDI に特異的に存在する CXXC モチーフを二ヶ所有し、C 末端には小胞体局在配列の NDEL を持っている新規 PDI が胚乳で発現していることを発見し、それが PDI2;3 であることが判明した。野生型イネ胚乳の全 PDI 活性の 60%が、PDI1;1 が、40%が新規 PDI から由来していることも判明した。従って野生型イネ胚乳における PDI には少なくとも 2 種類以上存在し、貯蔵タンパク質の S-S 結合形成に重要な機能を果たしていると考えられる。

PDI1;1 が欠損したイネ突然変異体 *esp2* の胚乳には、分子サイズが 40kDa の新規 PDI (PDI2;3) が、多量に発現して、PDI 活性の 90%以上をしめていることが判明した。これらのことからイネ胚乳においては、PDI1;1 がグルテリン前駆体などの分子内 S-S 結合形成に機能し、一方、新規 PDI (PDI2;3) の生理機能は、分子間 S-S 結合形成を触媒する事ではないかと考えられた。

イネプロラミンは、3 種類のシステインを有する分子と、システインを持たない分子が、凝集体を形成し、PBI を形成している。システインを有するプロラミン分子は、分子間 S-S 結合によって会合体を形成していると考えられる。そのプロラミン会合体を形成する際には 10kDa プロラミンが、PBI の中心部に先ず凝集し、それから他の分子が会合すると考えられている。従って 10kDa プロラミンが PBI 形成において先ずプロラミン凝集体のコア形成に重要な働きをしており、その際、10kDa プロラミン S-S 結合形成が、引き金となると思われる。しかし、その S-S 結合形成を触媒する酵素については不明である。

そこで本研究では新規 PDI (PDI2;3) のイネ胚乳における貯蔵タンパク質の合成蓄積にどのような機能を果たしているのかを明らかにすることが研究目的である。

## 2. 研究の目的

新規 PDI のイネ胚乳における貯蔵タンパク質の合成蓄積に対してどのような生理機能を果たしているのかを解明するため、以下 3

点に絞って研究目的を絞って研究を遂行する。

(1) 新規 PDI, PDI2;3 に関するイネ突然変異体を選抜し、選抜した変異体における貯蔵タンパク質の合成蓄積、特にプロテインボデイ (PB) 形成にどのような変化を引き起こすのかについて検討し、PDI2;3 の生理機能を突き止める。

(2) 10kDa プロラミン分子と PDI2;3 の RNAi 組換え体を作成し、その組換え体において生じる胚乳の PB 形成について免疫細胞化学的手法を用いて特に PB 形成の変化しているかどうかについて検討し、10kDa プロラミン分子の PBI 形成における機能と PDI2;3 の生理機能を明らかにする。

(3) PDI2;3 が、胚乳細胞の小胞体のどこに局在するのかについて検討し、PDI2;3 の生理機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 新規 PDI, PDI2;3 に関する突然変異体の選抜：MNU 処理によって得られた変異体から ELISA 法による選抜と Tilling 法による選抜 ELISA 法：完熟種子からタンパク質を抽出して PDI2;3 に対する抗体によって検出する。Tilling 法：約 1000 系統の突然変異体の成長期の葉から DNA を調製し、その DNA を用いて PDI2;3 に特異的なプライマーを使った PCR によって増幅した DNA に対して制限酵素 CEL1 を作用させ、その後電気泳動によって一塩基置換変異系統を選抜する。

(2) 10kDa プロラミン分子の合成蓄積と PDI2;3 の機能を低下させた RNAi 組換え体の作製：10kDa プロラミンの RNAi プラスミドは、次のようにして作製した。まず 10kDa プロラミンの完全長 cDNA クロー (AK108254) の 429bp (Asp-41 to stop codon) を用いてインバーテッドリピートを作製した。これに  $\alpha$ -グロブリンプロモーターと Nopaline synthase ターミネーターを付加し、hygromycin phosphotransferase 遺伝子を含むバイナリーベクター法を用いてイネ品種「ゆきひかり」に形質転換した。RNAi 形質転換体は、ハイグロマイシンで選抜した。10kDa プロラミンの RNAi 形質転換体では、転写された RNA がヘヤピン構造となり RNAi ターゲット遺伝子となり、10kDa プロラミン遺伝子は結果的に発現されないため 10kDa プロラミンが合成蓄積されないと予想される。

PDI2;3 に対する RNAi 形質転換体も同様の方法で作成し、PDI2;3 の活性がほとんどなくなった組換え体を作成した。

(3) PDI2, 3 に関する胚乳細胞内局在部位：  
① ショ糖密度勾配超遠心分離法：イネ登熟期種子をすりつぶし、ろ過後、ろ液を低速遠心分離機で、プロテインボデイ画分を分離し、その画分をショ糖密度勾配超遠心分離に供

し、胚乳の細胞内器官を重量別に分離した。それぞれの分離画分を SDS-PAGE で分離後、ウエスタンブロット法で PDI2;3 がどの画分に存在するかを調べた。

② 蛍光色素結合遺伝子組換え体の発現部位：PDI1;1 の遺伝子に *Discosoma species* の赤色蛍光タンパク質 (DsRed-Monomer) を融合させ、また、PDI2;3 には、黄色の蛍光色素を融合させたキメラ遺伝子を同時に発現させ、それらの細胞内局在を調べた。

③ 高圧急速凍結固定法：イネ登熟種子を高圧急速凍結装置を用いて凍結固定した。こうして固定した試料を常法どおり包埋し、超薄切片を作成し、PDI1;1 と PDI2;3 の抗体を用いて免疫染色を行って両者の細胞内局在を調べた。

### 4. 研究成果

(1) ELISA 法を用いた PDI2;3 に関する突然変異体の選抜では、はっきりとした PDI2;3 が欠損した変異体を見出すことができなかった。

そこで新規 PDI に関する突然変異体の選抜をするために改良 Tilling 法を用いて PDI2;3 に関する一塩基置換変異系統を選抜した。その結果、2 系統の候補変異体を得られた。そこでこれらの変異体のホモ個体を育成した。

これらのホモ個体を用いてこれらの系統の貯蔵タンパク質の組成、PB, 特にプロラミン PB の形状について電子顕微鏡観察を行った。その結果、タンパク質組成に関しては大きな変化は見られなかった。一方、PB の形状についてはやはり電子顕微鏡レベルでの PB の構造に大きな変化は観察されなかった。

そこでグルテリン、プロラミン、そしてグロブリンに関する免疫染色を行ってこれらタンパク質の分布に関する違いがないか調べた。その結果、グルテリンとプロラミンの分布には大きな変化は見られなかった。しかし、グロブリンの分布に違いが観察された。野生型では、グロブリンは PBII の周辺部に偏在するけれどもこれらの系統ではグロブリンは偏在せず PB 内に均一に分布していた。そこでこのことを免疫電子顕微鏡で確認したところグロブリンは PBII 内に均一に分布していることが確認された。

PDI2;3 の変異によってグロブリンの PBII 内における存在状態が変わったのはなぜかについては現在検討中である。

(2) 10kDa プロラミン RNAi 形質転換体と PDI2;3 に関する RNAi 形質転換体の作成が成功し、それぞれ 1 系統の候補組換え体を得られた。まず、10kDa プロラミン分子の欠損によって胚乳におけるプロテインボデイ形成にどのような変化が起こっているかを調べた。その結果、PBII 形成には影響はなかった。一方、プロラミンを集積する PBI の形態に変化

が見られた。すなわち野生型では 10kDa プロラミンは PBI の中心に局在するが、形質転換体では、中心に分布せず、PBI 全体に分布する蛍光が見られた。また PBI 全体の構造が脆弱化していることが観察された。このことか 10kDa プロラミンが、PBI 形成において PBI のコア形成に重要な働きをしていることが確認された。

PDI2;3 に関する RNAi では、PDI1;1 は正常レベルまで発現されていたが、PDI2;3 タンパク質は、免疫反応レベルでほとんどないことがわかった。そこで PDI2;3 タンパク質の欠損によって胚乳におけるプロテインボディ形成にどのような変化が起こっているかを調べた。その結果、プロラミンを集積する小胞体型 PBI の形態に変化が見られた。さらに、プロラミン分子のうちシステイン残基の多い 10kDa プロラミンが、PBI の中心に分布せず、PBI 全体に分布する蛍光が見られた。従って PDI2;3 の欠損によって PBI 形成に対して支障が出ることが予想された。

(3)PDI2;3 の局在部位を明らかにするため登熟種子胚乳から細胞器官を超遠心分離法で分画し、PDI2, 3 がどの各分にくるのかを調査した。その結果、PDI2;3 が、PBI 画分に存在している可能性があることが示唆された。

さらに、PDI2;3 遺伝子に蛍光色素を結合させた遺伝子組換え体を作成し、その合成遺伝子の胚乳における発現部位について調査した。その結果、PDI2;3 が、プロラミン PB 周辺に局在している可能性があることが判明した。

高圧急速凍結法で固定包埋した登熟種子を用いて PDI2;3 の胚乳細胞内の分布を調べた。しかし、この方法で PDI2;3 を固定できているはずであったが、野生型において PDI2;3 の存在を示すシグナルを見出すことができなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nagamine, A., H. Matsusaka, T. Ushijima, Y. Kawagoe, M. Ogawa, T. W. Okita, and T. Kumamaru.  
A Role for the Cysteine-Rich 10 kDa Prolamin in Protein Body I Formation in Rice. *Plant Cell Physiology*, 査読有, (2011) (印刷中).
- ② Yayoi Onda, A. Nagamine, M. Sakurai, T. Kumamaru, M. Ogawa, and Y. Kawagoe  
Distinct Role of PDI and P5 Sulphydryl Oxidoreductases in Multiple Pathways for Oxidation of Structurally Diverse Storage Proteins in Rice. *Plant Cell*, 査読有, 13, 1-14 (2011).

- ③ Mio Satoh-Cruz, A. J. Crofts, Y. Takemoto-Kuno, A. Sugino, H. Washida, N. Crofts, T. W. Okita, M. Ogawa, H. Satoh and T. Kumamaru.  
Protein Disulfide Isomerase Like 1-1 Participates in the Maturation of Proglutelin Within the Endoplasmic Reticulum in Rice Endosperm. *Plant Cell Physiology*, 査読有, 51, (2010) 1581-1593.
- ④ Yuka Ueda, M. Satoh-Cruz, H. Matsusaka, Y. Takemoto-Kuno, M. Fukuda, T. W. Okita, M. Ogawa, H. Satoh and T. Kumamaru  
Gene-gene Interactions between Mutants that Accumulate Abnormally High Amounts of Proglutelin in Rice Seed. *Breeding Science*, 査読有, 60, (2010) 568-574.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nagamine, A. The Role of Cystein-rich Prolamines for the Formation of Prolamin Protein Body in Rice. *Plant Biology* 2009. 7. 18-22 Hawaii
- ② 長嶺愛 イネプロラミン PB の核構造形成における 10kDa プロラミンの役割 日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ③ 恩田弥生 イネ種子貯蔵タンパク質のジスルフィド結合形成の電子伝達系の可視化から見たタンパク質分別輸送・集積の分子機構 日本植物生理学会 2008. 3. 22 北海道
- ④ 熊丸敏博 イネグルテリンの細胞内輸送と蓄積を制御する遺伝的メカニズム 2008. 3. 22 北海道
- ⑤ 恩田弥生 イネ種子貯蔵タンパク質の分別輸送・蓄積における PDI1;1 および PDI2;3 の機能解析 日本農芸化学会 2008. 3. 29 名古屋

[図書] (計 2 件)

- ① 熊丸敏博、小川雅広、佐藤光、T. W. Okita  
種子の科学とバイオテクノロジー (原田久也監修)「イネ種子貯蔵タンパク質集積の遺伝制御機構」(2009).
- ② Kumamaru, T., Ogawa, M., Satoh, H. and Okita, T. W. *Plant Cell Monographs* (8) Odd-Arne Olsen (ed.): Endosperm. "Protein Body Biogenesis in Cereal Endosperm" Springer-Verlag Heidelberg (2007).

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
小川雅広 (OGAWA MASAHIRO)

山口県立大学・共通教育機構・教授  
研究者番号：10160772

(2) 研究分担者

熊丸敏博 (KUMAMARU TOSHIHIRO)  
九州大学大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：00284555