

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月2日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780093

研究課題名（和文）種子タンパク質の貯蔵液胞への選別輸送を決定する新規レセプターの同定

研究課題名（英文）Identification of vacuolar sorting receptor for seed storage proteins

研究代表者

丸山 伸之 (MARUYAMA NOBUYUKI)

京都大学大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90303908

研究成果の概要（和文）：

植物の種子には貯蔵タンパク質を蓄積するタンパク質貯蔵型液胞が存在し、タンパク質貯蔵型液胞への輸送には貯蔵タンパク質のもつ選別輸送シグナルが関与している。そして、選別輸送シグナルは、配列特異的、C末端型、高次構造型に分類されている。配列特異的およびC末端型シグナルに対するレセプターとして VSR という分子が同定されているが、高次構造型の選別輸送シグナルに対するレセプターについては全く明らかになっていない。本研究において、表面プラズモン共鳴測定により高次構造型シグナルをもつダイズグリシニン A3B4 サブユニットは VSR により認識されないことを示すとともに、ダイズ登熟期種子より調製した膜画分より A3B4 サブユニットを結合させたアフィニティーカラムに結合する分子についても取得した。

研究成果の概要（英文）：

Plant seeds contain protein storage vacuoles and proteins sorted to the protein storage vacuoles possess sorting determinants. They are classified into three types: the sequence-specific, the C-terminal, and the physical structure vacuolar sorting determinant. VSR was identified as a receptor for the sequence-specific and C-terminal vacuolar sorting determinants. However, the receptor for the physical structure sorting determinant remains unclear. In the study, we elucidated that soybean glycinin A3B4 subunit containing the physical structure sorting determinant does not bind the VSR by means of surface plasmon resonance measurement. Further, we obtained several proteins which interact with soybean glycinin A3B4 subunit in the membrane fraction of soybean developing seeds on the affinity column.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：種子、貯蔵タンパク質、液胞、選別輸送シグナル、レセプター、高次構造、ダイズ、物質生産

1. 研究開始当初の背景

| 植物細胞の液胞には、動物細胞のリソソーム

に相当するプロテアーゼを多く含む分解型液胞と発芽時の栄養分となる貯蔵タンパク質や害虫に対する防御タンパク質を蓄積するタンパク質貯蔵型液胞が存在している。登熟期の種子は、発芽期の栄養源となる種子タンパク質を大量にタンパク質貯蔵型液胞に蓄積するため、タンパク質貯蔵型液胞への輸送機構の研究におけるモデル組織となる。今までにタンパク質貯蔵型液胞への選別輸送シグナルとして、C末端型、配列特異型、高次構造型の3種類が報告されている。シロイヌナズナを用いた解析により、C末端型および配列特異型シグナルに対するレセプターとしてVSRと呼ばれる膜タンパク質が報告されている。ダイズ種子は11Sグロブリン(グリシニン)および7Sグロブリン(コングリシニン)を主要な種子貯蔵タンパク質として含有している。我々は、これまでに種子細胞を用いて種子の選別輸送シグナルを短時間で解析するアッセイシステムを構築し(Plant J., 2003, 34, 647-659)、グリシニンにC末端型と高次構造型の選別輸送シグナルが存在していることを明らかにした(Plant Cell, 2006, 18, 1253-1273)。さらに、ダイズ登熟期種子よりVSRのcDNAをクローニングし、コングリシニンおよびグリシニンのもつC末端型シグナルがVSRと相互作用することを示した。一方、グリシニンのもつ高次構造型シグナルについては、その性質やシグナルに対するレセプターなど明らかになっていない。

2. 研究の目的

タンパク質貯蔵型液胞への輸送集積機構を明らかにすることを目的として、高次構造型シグナルのみをもつグリシニンのA3B4サブユニットをレポータータンパク質としてタンパク質貯蔵型液胞への輸送機構を調べるとともに、高次構造型シグナルに対するレセプターの探索を試みた。

3. 研究の方法

(1) 高次構造型シグナルとVSRとの相互作用の解析

組換え型ダイズVSRとA3B4サブユニットとの相互作用を解析した。昆虫細胞発現系を用いてVSRの内腔領域(シグナルが結合する領域)のC末端にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質をヒスチジンタグに対するアフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。一方、A3B4サブユニットについては大腸菌発現系を構築し、イオン交換クロマトグラフィーなどを用いて組換え型タンパク質を調製した。センサーチップに組換え型ダイズVSRを結合させ表面プラズモン共鳴装置を用いてA3B4サブユニットとの相互作用を解析した。

(2) 高次構造型シグナルによるタンパク質

貯蔵型液胞への輸送における種子貯蔵タンパク質間の相互作用の寄与の解析

高次構造型シグナルが機能するために貯蔵タンパク質間の相互作用が寄与する可能性が指摘されている。一般的な品種では多くの貯蔵タンパク質が存在するとともにC末端型シグナルをもつグリシニンの分子種も存在する。そのため、A3B4サブユニットのみをグリシニンのサブユニットとしてもつシステムを用いてグリシニンの他のサブユニットとA3B4サブユニットとの相互作用がない場合にA3B4サブユニットが液胞に輸送されるのかを電子顕微鏡観察により詳細に解析した。

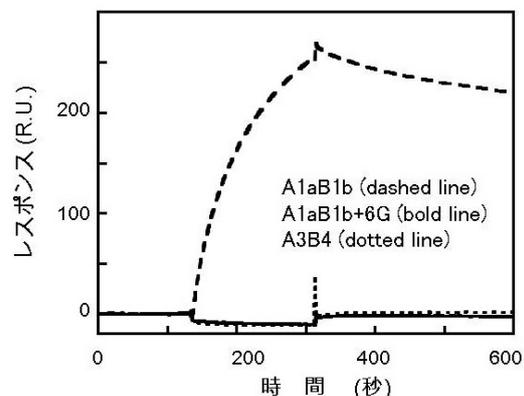
(3) 高次構造型シグナルに相互作用する分子の探索

A3B4サブユニットと相互作用する分子を登熟期種子から探索した。組換え型A3B4サブユニットを化学架橋によりセファロースを結合させたアフィニティーカラムを調製した。一方で、界面活性剤を含む緩衝液を用いた登熟期種子の抽出液を超遠心分離法により分画し、それらをアフィニティーカラムに供し、結合した分子を電気泳動で分離した。

4. 研究成果

(1) 高次構造型シグナルとVSRとの相互作用の検証

表面プラズモン共鳴測定装置を用いて組換え型ダイズVSRとA3B4サブユニットの相互作用を解析した。VSRはC末端型シグナルをもつグリシニンA1aB1bサブユニットとは高い親和性を示したが、A3B4サブユニットとは結合しなかった(下図)。A1aB1bサブユニットにC末端部のシグナルとしての機能を欠失させるため6残基のグリシンを付加した場合にもVSRとの相互作用は見られなかった。A3B4サブユニットはA1aB1bサブユニットのC末端部のシグナルに相同する配列が存在せず、C末端部はC末端のプロリン残基のみが分子表面に露出しているため、VSRはA3B4サブユニットのC末端部とは相互作用できないものと考えられた。



このことは高次構造型シグナルの認識に VSR は寄与しないことを示唆している。

(2) 高次構造型シグナルによるタンパク質貯蔵型液胞への輸送における種子貯蔵タンパク質間の相互作用の寄与の解析

A3B4 サブユニットのみをグリシニンのサブユニットとしてもつダイズ系統の登熟期種子を採取し、電子顕微鏡観察を行った。金粒子でラベルした A3B4 サブユニットに対する抗体で処理したところ主にタンパク質貯蔵型液胞が認識された。さらに、ゴルジ体に観察される電子密度の濃い領域が A3B4 サブユニットに対する抗体により認識された。このことから A3B4 サブユニットはゴルジ体経由でタンパク質貯蔵型液胞へ輸送され、レセプターもその経路上で機能していることが示唆された。解析に用いた系統には主要な貯蔵タンパク質であるコングリシニンが存在しているため、今後コングリシニンと A3B4 サブユニットとの相互作用が A3B4 サブユニットのタンパク質貯蔵型液胞への輸送に与える影響についても検討が必要である。

(3) 高次構造型シグナルに相互作用する分子の探索

ダイズ登熟期種子を用いて A3B4 サブユニットと相互作用する分子の同定を試みた。高次構造型シグナルと相互作用する分子を同定するために、組換え型 A3B4 サブユニットを結合させたアフィニティーカラムを作成した。作成したカラムを用いて、登熟期ダイズ種子より膜画分を調製し、それらに含まれる組換え型 A3B4 サブユニットと相互作用する分子の探索を行った。アフィニティーカラムに結合したタンパク質を溶出した画分から複数の分子を取得することに成功した。

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 3 件)

1) Maruyama N, Mikami B, Utsumi S. The development of transgenic crops to improve human health by advanced utilization of seed storage proteins.

Biosci Biotechnol Biochem. (2011) 75, 823-8. 総説

査読有

DOI:10.1271/bbb.100924

2) Tandang-Silvas MR, Tecson-Mendoza, EM, Mikami B, Utsumi S, Maruyama N.

Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties.

Annu. Rev. Food Sci. (2011) 2, 59-73.

総説

査読無

DOI: 10.1146/annurev-food-022510-133718

3) Tandang-Silvas MR, Fukuda T, Fukuda C, Prak K, Cabanos C, Kimura A, Itoh T, Mikami B, Utsumi S, Maruyama N. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. Biochim Biophys Acta. (2010) 1804, 1432-42.

査読有

DOI: 10.1146/annurev-food-022510-133718

[図書] (計 2 件)

1) 三上 文三、丸山 伸之、内海 成
第二節 グロブリンタンパク質 (一次・二次・三次構造)

大豆のすべて、サンエンスフォーラム (2009) p. 115-120.

査読無

2) 丸山 伸之、内海 成

マメ類種子のタンパク質生合成と蓄積
種子の科学とバイオサイエンス、学会出版センター (2009) p. 52-56.

査読無

[学会発表] (計 3 件)

1) Tandang-Silvas Mary Rose、木村 愛子、福田 貴子、Cabanos Cerrone、福田 知里、寺川 輝彦、石本 政男、三上 文三、内海 成、丸山 伸之

結晶構造比較による 11S グロブリンの保存性と多様性の解析

日本農芸化学会本大会 2010 年 3 月 28 日 東京大学 (東京都)

2) Nobuyuki Maruyama

Towards developing a system for improving physiological functions of crops for human health.

1st NIBB-MPIZ Joint Symposium, Koln, Germany (2009)

3) 丸山 伸之

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

日本農芸化学会近畿支部大会 農芸化学奨励賞受賞記念講演

2009 年 7 月 4 日 大阪府立大学 (大阪府堺市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hinshitsusekkei.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 伸之 (MARUYAMA NOBUYUKI)

京都大学大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90303908

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし