

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658286

研究課題名(和文)植物液胞への選別輸送の鍵分子である受容体の新奇な分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanism on the novel plant vacuolar sorting

研究代表者

丸山 伸之(MARUYAMA, NOBUYUKI)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90303908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：植物における特徴的な細胞内小器官である液胞は、種子の発芽の際の栄養源となる貯蔵タンパク質の蓄積などの機能をもつ。11Sグロブリンは多くの植物の種子に存在する貯蔵タンパク質であり、ダイズでは複数のサブユニットにより構成される。本研究では、主要な貯蔵タンパク質を欠失したダイズ系統に高次構造型シグナルをもつとされるA3B4サブユニットを発現させ、A3B4サブユニット単独でタンパク質貯蔵液胞に輸送されることを明らかにした。また、一次構造型シグナル依存的な輸送経路に関わる分子についても解析を行うとともに、それに対する受容体の結晶を作成し、データ収集を行った。

研究成果の概要(英文)：Plant vacuoles have many functions including a reservation of seed storage proteins. It is suggested that two types of vacuolar sorting signals, primary structure- or physical structure-types exist in soybean seed storage proteins. In the study, we analyzed the sorting mechanism of soybean seed storage protein. We developed transgenic soybean lines accumulating A3B4 subunit alone as 11S globulin, elucidating that physical structure-type sorting signal works in soybean seeds. On the other hand, we prepared crystals of soybean vacuolar sorting receptor with the primary structure-type sorting signal and collected their X-ray diffraction data.

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

### 1. 研究開始当初の背景

植物における特徴的な細胞内小器官である液胞は、種子の発芽の際の栄養源となる貯蔵タンパク質の蓄積などの機能をもつ。液胞へ運ばれるタンパク質は、自身のもつ選別輸送シグナルが受容体に認識されることにより選択的に輸送される。我々は、種子細胞を用いて貯蔵タンパク質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、そのシステムを用いて一次構造の性質により機能するタイプ（一次構造型シグナル）と高次構造により形成されるタイプの選別輸送シグナル（高次構造型シグナル）をもつ貯蔵タンパク質が存在することを示唆するデータを得ていた。

### 2. 研究の目的

ダイズの11Sグロブリンは複数のサブユニットにより構成され、アミノ酸配列の相当性から2つのグループに分類されている。グループ1に属するA1aB1bサブユニットのC末端10残基は一次構造型シグナルとして機能する。一方、グループ2に属するA3B4サブユニットは、A1aB1bサブユニットのC末端10残基に対応する配列は存在していないが、ダイズ種子においてタンパク質貯蔵液胞へ輸送され、高次構造による選別輸送シグナルが存在している可能性が示唆されている。一次構造型シグナルであるA1aB1bサブユニットのC末端10残基に対して、Vacuolar sorting receptor (VSR) という分子が受容体として機能しているが、高次構造型シグナルに対する受容体は未解明である。また、酵母や動物細胞では液胞や分解を担うリソソームへの選別輸送に機能している受容体とVSRとの間に1次構造の相同性は見られず、その立体構造についても不明である。本研究では、A1aB1bおよびA3B4サブユニットを用いて、種子におけるタンパク質貯蔵液胞への選別輸送機構を解析するとともに、受容体の高次構造の解析を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電子顕微鏡観察

ダイズ種子を固定液(3%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒド、0.1M NaPi pH7.2)によって固定した。緩衝液で洗浄後、エタノールで脱水した後、LR white樹脂に置換した。樹脂が浸透したのち、サンプルをビームカプセルに移し、紫外線照射装置で重合させた。重合したサンプルをトリミングし、ミクロトームで超薄切片を作製した。抗A3B4サブユニット抗体、15 nm金粒子標識ゴート由来抗ウサギ二次抗体で免疫標識した。酢酸ウラニルと硝酸鉛で電子染色した後、透過型電子顕微鏡観察を行った。

#### (2) 会合体の評価

ゲル濾過クロマトグラフィーにより、種子抽出液を分離し、A3B4サブユニットの会合体形成について解析した。

#### (3) 結晶構造解析

ドメイン欠失型ダイズVSRを昆虫細胞発現系で調製し、一次構造型シグナルを認識する最少ドメインを確定した。さらに、改変型VSRを大量調製し、その結晶の作成に成功した。放射光施設(SPring-8, 兵庫県)において結晶データ測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 高次構造型シグナルをもつ貯蔵タンパク質の輸送集積

主要なダイズの貯蔵タンパク質である11Sおよび7Sグロブリンを両方ともに欠損したダイズ系統を用いて、A3B4サブユニットを発現するダイズを作成した(農業生物資源研究所との共同研究)。複数の系統の種子のタンパク質を電気泳動により分析し、A3B4サブユニットがダイズ種子に蓄積していることを確認した(Figure 1)。世代を促進し、固定系統においても安定してA3B4サブユニットは蓄積していた。形質転換体の種子よりタンパク質を抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより会合状態を評価したところ、成熟型と予想される位置に溶出した。さらに、種子の電子顕微鏡観察を行った。A3B4サブユニットに対する特異的抗体を用いて、A3B4サブユニットがタンパク質貯蔵液胞へ輸送されることを示した。この結果により、高次構造シグナルのみをもつ種子貯蔵タンパク質が液胞へ輸送されることが示された。

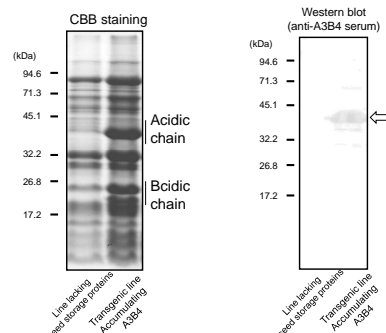


Figure 1 Accumulation of A3B4 subunit in transgenic soybean lines

#### (2) 一次構造型選別輸送シグナルをもつ11Sグロブリンの液胞輸送の解析

A1aB1bサブユニットのC末端10残基に一次構造型の選別輸送シグナルが存在することを明らかにしている(Plant Cell, 2006, 18, 1253-1273)。緑色蛍光タンパク質にC末端10残基を付加したもの(GFP-CT10)を、登熟期のダイズ種子において発現させると、緑色蛍光タンパク質が液胞へ輸送されることから、この解析方法を一次構造型の選別輸送シグナル依存的な液胞輸送の解析に用いることが可能である。そこで、一次構造型の選別輸送シグナル依存的な液胞輸送経路に対するRab5 GTPaseの関与について種子を用いて解析した。野生型あるいはドミナントネガティブ型のRab5をGFP-CT10と共発現させたとき

る、Rab5 の野生型との共発現では GFP-CT10 の液胞輸送が阻害されなかったが、ドミナントネガティブ型の共発現により、液胞への輸送が阻害され、細胞外に分泌された。

### (3) ダイズ VSR の立体構造解析

これまで、A1ab1b サブユニットの一次構造型シグナルをダイズ VSR (GmVSR) の内腔側領域が認識することを明らかにしている。本研究において、構造解析可能な結晶の作成を行った。VSR は液胞タンパク質の選別輸送シグナルと結合する内腔側の膜貫通領域付近に増殖因子様モチーフ (EGF-like motif) を 3 つタンデムにもち、増殖因子様モチーフが 1 つのみ存在していれば選別輸送シグナルと結合できる。この性質に着目し、分子サイズを小さくし結晶化能が改善されることを期待して、EGF-like motif を部分的に欠損させた VSR を調製し、C 末端型の選別輸送シグナルに対する合成ペプチドとの複合体について、結晶条件を探索し、3-5 の分解能をもつ結晶の調製に成功するとともに、データを取得した。

### 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) Morimoto S, Tomohiro T, Maruyama N, Hatanaka Y.

Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid identification of ligand-binding sites within protein.

Chemical Communications (2013)

49,1811-1813

査読有

DOI: 10.1039/c3cc38594a.

2) Shutov AD, Rudakova AS, Rudakov SV, Kakhovskaya IA, Schallau AA, Wilson KA, Maruyama N.

Degradation of -conglycinin -homotrimer by papain: independent occurrence of limited and extensive proteolysis

Biosci. Biotechnol. Biochem. (2013) 77, 2082-2086

査読有

DOI:10.1271/bbb.130440

3) Maruyama N, Fujiwara K, Yokoyama K, Cerrone C, Hasegawa H, Takagi K, Nishizawa K, Uki Y, Kawarabayashi T, Shouji M, Ishimoto M, Terakawa T.

Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds

J. Biosci. Bioeng. (2014) in press

査読有

[学会発表](計3件)

1) 森本 正大, 友廣 岳則, 丸山 伸之, 畑中 保丸

発蛍光性光クロスリンカーを用いたタンパク質基質結合部位の効率的解析

第7回ケミカルバイオロジー学会年会

京都大学(京都市)(2012)

2) 丸山 伸之, 横山 和典, 藤原 圭吾, 澤田 真千子, 長谷川 久和, 内海 成, 石本 政男, 寺川 輝彦

ダイズ種子における種子貯蔵タンパク質をキャリアーとする生理活性ペプチドの蓄積挙動

2012年度日本農芸化学会関西支部大会

(第476回講演会)

京都学園大学(亀岡市)(2012)

3) 丸山 伸之, 奥田 英子, 寺川 輝彦, 石本 政男

ダイズ 11S グロブリンの種子貯蔵液胞への輸送解析

日本農芸化学会 2013 年度大会

明治大学(川崎市)(2014)

[招待講演](計3件)

1) 丸山 伸之

ダイズ種子タンパク質の構造と品質

第6回ダイズ研究会

佐賀大学(佐賀市)(2012)

2) 丸山 伸之

種子貯蔵タンパク質を利用した疾病を予防する作物の開発

第12回けいはんな地区植物科学懇談会

奈良先端大学院大学(生駒市)(2012)

3) 丸山 伸之

立体構造に立脚した種子タンパク質の分子食品学的研究

第2回 三島海雲学術賞受賞講演

東京会館(東京都)(2013)

[図書](計1件)

1) 丸山 伸之, 石本 政男, 長谷川 久和  
種子貯蔵タンパク質を利用したバイオ医薬品の生産

バイオサイエンスとインダストリー

(2013) 71(2)118-123

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hinshitsusekai.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