

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780101

研究課題名(和文)植物の蛋白質ジスルフィド結合形成ネットワークの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism for disulfide bond formation in plant cells

研究代表者

恩田 弥生(ONDA, Yayoi)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：70368463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：植物は種子貯蔵オルガネラを有し、多様なジスルフィドタンパク質群を大量かつ安定に蓄積する。本研究では植物細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成の制御機構を明らかにすることを目的とした。イネ胚乳細胞をモデル系として用い、タンパク質ジスルフィド結合の形成及び還元を効率よく促進するチオール-ジスルフィド酸化還元酵素を同定し、貯蔵オルガネラ発達制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plants have evolved specialized storage organelles to enable the stable accumulation of massive amounts of disulfide-rich reserve proteins in seeds. In this study, we aimed at unravelling the molecular mechanism for controlling the formation of protein disulfide bonds in plant cells. Using the rice endosperm as a model system, we identified thiol-disulfide oxidoreductases showing the high catalytic efficiency in disulfide bond formation and reduction and regulating the development of storage organelles.

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：植物 タンパク質 ジスルフィド結合 チオール-ジスルフィド酸化還元酵素 オルガネラ発達

1. 研究開始当初の背景

タンパク質ジスルフィド結合(二つのシステイン残基間共有結合)形成はタンパク質のフォールディング(折り畳み)の成功を左右し立体構造を決定する重要な反応である。同時に内的・外的環境ストレスの影響を最も受けやすい反応であり、ジスルフィド結合形成システムの構築が環境変動によるタンパク質の異常凝集を回避し細胞機能・生存を維持する上で一つの鍵となる。

種子植物は植物固有のタンパク質貯蔵オルガネラを進化させ、次世代への栄養供給システムを獲得した。日本人の主食であるコメは、登熟過程において物理化学的性質の大きく異なる貯蔵タンパク質群(グルテリン、プロラミン、 α グロブリン)を大量に合成し、最終的に二種のタンパク質貯蔵オルガネラ(液泡由来 PSV 及び小胞体由来 PB)に蓄積する。これら貯蔵タンパク質はジスルフィドを豊富に含み、ジスルフィド結合形成がタンパク質の大量かつ安定な分別蓄積に必須である。例えば、グルテリンや α グロブリンは分子内ジスルフィド結合を獲得後小胞体から PSV へと輸送・蓄積され、一方プロラミンは小胞体において分子間ジスルフィド結合を獲得し PB に集積する。

我々はこれまでにイネ ERO1 が小胞体膜に局在化し、種子貯蔵タンパク質のジスルフィド結合形成とタンパク質貯蔵オルガネラへの分別集積・輸送に重要な役割を果たすことを明らかにし、ERO1 を介したジスルフィド伝達経路が機能していることを見出した。ERO1 はフラビンアデニンジスクレオチドを補酵素として有するジスルフィド産生酵素であり、酸素分子から酸化力を引き抜き、ジスルフィド伝達酵素 PDI(プロテインジスルフィドイソメラーゼ)へと伝達する。PDI は活性部位システイン残基ペア(CxxC)を有するチオール-ジスルフィド酸化還元酵素であり、チオール-ジスルフィド交換反応により基質分子におけるジスルフィド結合形成を直接触媒することが可能である。高等植物は約 20 の PDI ファミリーメンバーを有する。我々はイネ(*Oryza sativa*) PDI1;1 と PDI2;3 が同一胚乳細胞において異なる局在を示し、PDI1;1 が小胞体内腔に分散するのに対し PDI2;3 は PB に局在化することを見出した。

2. 研究の目的

本研究では植物におけるタンパク質ジスルフィド結合形成制御ネットワークを明らかにすることを旨とし、チオール-ジスルフィド酸化還元酵素の一つである PDI に着目した。具体的には、研究材料としてイネを用い、種子において高発現を示す PDI 分子種(PDI1;1、PDI1;4、PDI2;3)について機能解析を行い、タンパク質ジスルフィ

ド結合形成制御ネットワークにおける役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 形質転換植物の作製及び共焦点レーザー顕微鏡解析

イネ PDI2;3(AK062254)の発現を RNAi 法により抑制し(*APS2b* プロモータ制御下)、かつ、PB マーカータンパク質 GFP-AB を発現する(*Glb* プロモータ制御)バイナリーベクターを構築した。GFP-AB はイネ α グロブリンの N 末端側領域(グリシン 21-グルタミン 111)をコードする DNA 断片を GFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子に融合し構築した。*PDI2;3* RNAi 及び *GFP-AB* バイナリーベクターを用い、アグロバクテリウム法により形質転換イネを作製した。形質転換イネ 10 系統について抗 PDI2;3 抗体によるウエスタン解析を行い、PDI2;3 発現が減少した 3 系統を選抜した。選抜系統の登熟種子(14DAF)切片をローダミン(タンパク質貯蔵オルガネラ標識蛍光色素)処理し、胚乳細胞の共焦点レーザー顕微鏡解析(488 nm 及び 543 nm)を行った。

(2) 酸化的タンパク質フォールディング及びタンパク質ジスルフィド結合還元解析

イネ PDI 分子種 PDI1;1(AK068268)、PDI1;4(AK071514)、PDI2;3(AK062254)、及び PDI1;1 のシステイン/アラニン置換体(C72A、C417A、C72/417A)について大腸菌組換えタンパク質発現系を構築した。各 PDI 分子種の精製標品を用い、PDI を介した酸化的タンパク質フォールディング(基質として還元変性 RNase を使用)とタンパク質ジスルフィド結合還元(基質としてインスリンを使用)のカイネティクスを解析した。

4. 研究成果

(1) イネ胚乳細胞における P5 型チオール-ジスルフィド酸化還元酵素の機能解析

PDI2;3 はヒト P5 のオルソログであり、緑藻、コケ、単子葉及び双子葉植物において広く保存されている。難溶性貯蔵タンパク質プロラミンは小胞体内腔において分子間ジスルフィド結合を獲得して PB に集積するが、興味深いことに PDI2;3 は PB に局在化することを見出した。本研究ではタンパク質ジスルフィド結合形成における PDI2;3 の機能を PB マーカータンパク質 GFP-AB を用いて解析した。プロラミンは多重遺伝子族を形成する。その中でシステインリッチプロラミン分子種は三つのコンセンサス配列、LxxC(領域 A)、CCxQL(領域 B)、及び PxxC(領域 C)を有し、分子間ジスルフィド結合形成に重要な役割を担う。 α グロブリンはプロラミンファミリーに保存され

たコンセンサス配列を有する親水性貯蔵タンパク質であるが、その領域 C を欠損した領域 AB (グリシン 21-グルタミン 111) はプロラミンと分子間ジスルフィド結合を形成し PB に集積する。PDI2;3 の発現抑制が GFP-AB の PB 集積に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡解析により調べた結果、野生型細胞では GFP-AB が PB に局在化するのに対し、PDI2;3 ノックダウン細胞では GFP-AB の多くが小胞体から PSV に輸送され、システイン/アラニン置換型 GFP-AB と同様の局在を示した。これらの結果より、PDI2;3 依存的なジスルフィドリレーがタンパク質分子間ジスルフィド結合形成を促進しタンパク質の小胞体内、特に PB への分別集積を制御する上で重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) イネ PDI 分子種の酸化的タンパク質フォールディングにおける機能解析

PDI1;1、PDI1;4、PDI2;3 はいずれも PDI に特徴的なシステイン残基ペアを二つ有するが、そのチオレドキシシン様ドメイン構造は異なる(PDI1;1 ドメイン構造 abb'a'、PDI1;4 ドメイン構造 cabb'a'、PDI2;3 ドメイン構造 aa'b)。これら PDI 分子種は異なる小胞体ストレス応答を示し、例えばタンパク質異常凝集を示す PDI1;1 ノックアウト細胞において PDI2;3 発現は上方制御されるのに対し PDI1;4 の発現量は野生型と同様であった。本研究では植物細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成の制御機構を明らかにすることを目的として、PDI 分子種のジスルフィド結合形成能及び還元能を比較解析した。PDI1;1、PDI1;4、及び PDI2;3 について組換えタンパク質の大腸菌発現系を構築し精製標品を得た。還元型及び酸化型グルタチオン存在下、還元変性 RNase を基質として酸化的フォールディングのカイネティクスを比較解析した結果、PDI1;1 が最も高いジスルフィド結合形成能を示した。更に、インスリンを基質としてジスルフィド結合還元のカイネティクスを比較解析した結果、PDI1;1 が極めて高いジスルフィド結合還元能を示すことを見出した。PDI1;1 は N 末端側及び C 末端側チオレドキシシン様活性ドメイン (a 及び a'ドメイン) にシステイン残基ペアを有する。システイン残基ペアのシステインをアラニンに置換した変異型 PDI1;1 (C72A、C417A、及び C72/417A) を作製・精製し、ジスルフィド結合還元のカイネティクスを野生型 PDI1;1 と比較解析した結果、PDI1;1 のジスルフィド結合還元能はシステイン残基に依存した。PDI1;1 ノックアウト細胞ではグルテリン前駆体が正しいジスルフィド結合を獲得できず異常なタンパク質凝集体を形成し、結果、PSV 及び PB の発達が阻害される。これらの結果より、植物細胞及

び貯蔵オルガネラの発達を支えるタンパク質ジスルフィド結合形成制御ネットワークにおいて、PDI1;1 がジスルフィド結合の形成及び還元を効率よく促進しタンパク質品質制御に重要な役割を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yayoi Onda, Kentaro Takahara, Hirofumi Uchimiya, Maki Kawai-Yamada. Effects of NAD kinase 2 overexpression on primary metabolite profiles in rice leaves under elevated carbon dioxide. *Plant Biology* (2013, *in press*) (10.1111/plb.12131) [査読有]
- ② Yayoi Onda. Oxidative protein-folding systems in plant cells. *International Journal of Cell Biology* (2013) 585431: 1-15 (10.1155/2013/585431) [査読有]
- ③ Yayoi Onda, Yasushi Kawagoe. P5-type sulfhydryl oxidoreductase promotes the sorting of proteins to protein body I in rice endosperm cells. *Plant Signaling & Behavior* (2013) 8:2, e23075, 1-4 (10.4161/psb.23075) [査読有]
- ④ Yayoi Onda, Yasushi Kawagoe. Oxidative protein folding: selective pressure for *prolamin* evolution in rice. *Plant Signaling & Behavior* (2011) 6:1966-1972 (10.4161/psb.6.12.17967) [査読有]

[学会発表] (計 8 件)

- ① Yayoi Onda, Atsuko Miyagi, Kentaro Takahara, Hirofumi Uchimiya, Maki Kawai-Yamada. NAD kinase overexpression promotes the biosynthesis of nitrogen-rich amino acids under elevated CO₂. 日本農芸化学会 2014 年度大会 (神奈川、2014 年 3 月 29 日)
- ② Yayoi Onda, Atsuko Miyagi, Hirofumi Uchimiya, Maki Kawai-Yamada. Effects of *NADK2* overexpression on nitrogen assimilation in rice leaves under elevated CO₂. Plant Transformation Technologies III (ウィーン、2014 年 2 月 12-15 日)
- ③ 刑部敬史、恩田弥生、姜振祥、平子理沙、内宮博文、川合真紀、シロイヌナズナ *NADK2* 過剰発現イネ植物体における生長特性、第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山、2013 年 3 月 23 日)

- ④ Yayoi Onda, Ai Nagamine, Toshihiro Kumamaru, Masahiro Ogawa, Yasushi Kawagoe. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. SEB (Society for Experimental Biology) Salzburg 2012 (ザルツブルグ、2012年7月1日)[招待講演]
- ⑤ 川越靖、恩田弥生、タンパク質酸化還元制御はイネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの分子進化に影響した、日本農芸化学会2012年度大会(京都、2012年3月24日)
- ⑥ Yayoi Onda, Ai Nagamine, Masahiro Ogawa, Yasushi Kawagoe. Redox network regulating the development and quality of seeds. Plant Growth, Nutrition & Environment Interactions(ウィーン、2012年2月20日)[招待講演]
- ⑦ 川越靖、恩田弥生、ジスルフィド架橋形成で発生する活性酸素はイネプロラミンの分子進化に影響した、第31回種子生理生化学研究年会(日光、2011年11月11日)
- ⑧ 川合真紀、高原健太郎、恩田弥生、内宮博文、細胞内還元カプールの改変による植物バイオマス制御、第29回日本植物細胞分子生物学会大会シンポジウム(福岡、2011年9月7日)[招待講演]

6. 研究組織

(1)研究代表者

恩田 弥生(ONDA, Yayoi)
山形大学・農学部・助教
研究者番号:70368463

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし