

大豆 β -コングリシニンの液胞選別輸送シグナル構造

丸山伸之^{*1}・種田あずさ¹・西澤けいと²・内海 成¹

¹京都大学大学院農学研究科 ²北海道農業研究センター

Structural Features of Vacuolar Sorting Determinants of Soybean β -conglycinin

Nobuyuki MARUYAMA¹, Azusa OITA¹, Keito NISHIZAWA² and Shigeru UTSUMI¹

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

²National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Sapporo 062-8555

ABSTRACT

We previously reported that the 10 residues C-terminal (α' : PLSSILRAFY, β : PFPSILGALY) of β -conglycinin contains a vacuolar sorting determinant (VSD). VSDs identified so far are classified into C-terminal VSDs (ctVSD) and sequence specific VSDs (ssVSD). In this study, we studied the characteristics of the VSDs of β -conglycinin in detail. First, we examined whether a partial sequence of the 10 residues C-terminal of the α' subunit works as a VSD. Both the 4 residues N-terminal and the 6 residues C-terminal of the 10 residues C-terminal of α' worked as a VSD. Since the addition of contiguous Gly residues at the C-terminus inhibits the function of a ctVSD, the effect of the addition of six contiguous Gly residues was examined. The 6 residues C-terminal lost the function of a VSD by the addition of Gly, whereas the 10 residues C-terminal worked as a VSD despite the addition of Gly. Furthermore, the 10 residues C-terminal worked as a VSD at the N-terminus of the reporter protein. These results suggest that the 10 residues C-terminal contains an ssVSD. The deletion and mutation experiments showed that Ile and Leu within the 10 residues C-terminal (these residues are indicated in bold: PLSSILRAFY) are functionally important to an ssVSD. On the other hand, only three amino acids (AFY) of the C-terminal could work as a ctVSD. Thus, the 10 residues C-terminal might contain a ctVSD and an ssVSD. Finally, we examined the structural features of the ctVSD. Systematic mutation analyses showed that the existence of two residues having relatively large side chains within the 4 residues C-terminal are important for the function of the ctVSD. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 19-23, 2005.

Key words : Vacuolar sorting determinant, β -Conglycinin, seed storage protein

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

植物の液胞には、登熟期種子などに存在するたん白質貯蔵液胞 (Protein storage vacuole: PSV) や葉肉細胞などに見られる分解型液胞など、複数種の液胞が存在している。現在までに同定されている植物の液胞への選別輸送シグナル (Vacuolar sorting determinant: VSD) は、主に配列特異的シグナル (ssVSD) とC末端型シグナル (ctVSD) に分類される。ssVSDはNPRL (アミノ一文字表記) 様のモチーフを持ち、たん白質中のどこに位置していても機能するシグナルである。一方、ctVSDはC末端に位置し、比較的疎水性アミノ酸に富むという特徴を持つが、配列や長さは様々であり、共通する配列は見出されていない。

種子貯蔵たん白質は、登熟期に大量に生合成され、自身の持つVSDが受容体に認識されることにより、PSV輸送される。我々は、大豆登熟期種子を用いて種子貯蔵たん白質のVSDを解析するシステムを開発し、大豆種子貯蔵たん白質の主要構成成分の一つである β -コングリシニンのC末端10残基にVSDが存在することを明らかにしている^{1,2)}。本研究では、そのC末端10残基中にssVSDとctVSDが共存していることを明らかにするとともに、ctVSDが機能するための構造要因を解析した。

方 法

大豆登熟期子葉における一過的発現

登熟期的大豆種子を莢から取り出し、70%エタノールで表面を滅菌した。滅菌水でリンスした後、半分に切り、子葉部分をMS寒天培地上に置いた。1~2 μ gのプラスミドDNAを金粒子 (1 μ m) にコーティングし、Biolistic PDS-1,000/He (Bio-rad Hercules, CA) を用いて、ボンバードメント法を行った。ターゲットまでの距離9 cm, ヘリウムガスの圧力1,100 psiの条件で行い、遺伝子導入後、25℃暗所で24~30時間培養した。

共焦点レーザー顕微鏡観察

大豆子葉から、薄片 (1 mm以下) を作成し、落射型蛍光顕微鏡を用いて緑色蛍光たん白質 (Green fluorescent protein: GFP) の蛍光を発する細胞を特定した後、MRC-1024共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-rad, Hercules, CA) により観察した。

結果と考察

C末端10残基の一部分でもVSDとして機能する

β -コングリシニンは、 α 、 α' および β の3種類のサブユニットから構成されている。我々は、既に α' および β のC末端10残基 (α' : PLSSILRAFY, β : PFPSILGALY) にPSVへの必要十分なVSDが存在することを明らかにした^{1,2)}。また、C末端6残基を欠失させた α' および β をアラビドプシス種子で発現させたところ、PSVに輸送された。このことは、C末端10残基中のN末端側4残基 (α' : PLSS, β : PFPS) だけでもVSDとして必要十分に機能する可能性を示唆している。そこで、 α' および β のC末端10残基中のN末端側4残基がGFPをPSVへ輸送できるかを、大豆登熟期子葉を用いて解析したところ、両配列を付加したGFPはPSVに運ばれた (Fig. 1a, b)。次に、C末端6残基のみ (α' : ILRAFY, β : ILGALY) でもVSDとして機能するのかを解析した。 α' あるいは β のC末端6残基をGFPのC末端に付加したものは共にPSVに輸送された (Fig. 1c, d)。これらのことはC末端10残基中の一部分でもVSDとして機能するのに十分であることを示している。

C末端10残基にctVSDとssVSDが共存する

オオムギレクチンやジャガイモ20KDaたん白質のctVSDはGlyをそのC末端に付加することにより、VSDとしての機能が失われることが知られている^{3,4)}。ssVSDはたん白質中のどの位置においても機能するが、ctVSDはC末端部においてのみ機能する。そこで、

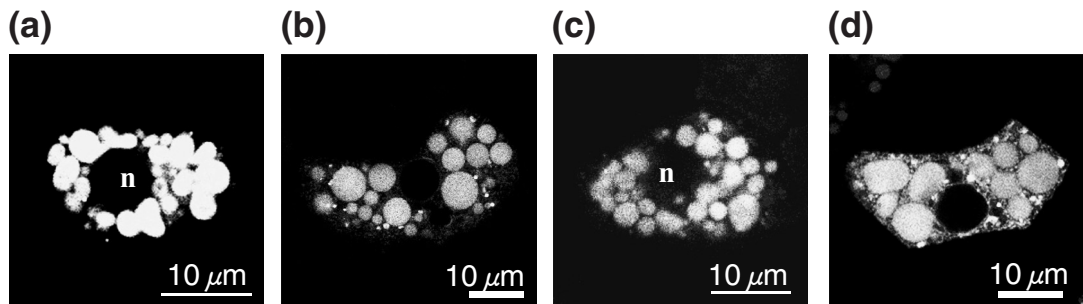


Fig. 1. Localization of GFP with the partial sequences of the C-terminal 10 amino acids of α' or β . (a) GFP-PLSS, (b) GFP-PFPS, (c) GFP-ILRAFY, (d) GFP-ILGALY.

α' のC末端6残基および10残基のC末端に6残基のGlyを付加したものをGFPに融合し、それらのPSV輸送について解析した。C末端6残基の場合にはGlyの付加によりPSV輸送が阻害され、多くは細胞外に分泌されたが、C末端10残基の場合にはGlyを付加しても完全にPSVへ輸送された (Fig. 2a, b)。さらに α' のC末端10残基をGFPのN末端部に付加した場合にも、GFPはPSVへ輸送された (Fig. 2c)。これらの結果から、 α' のC末端10残基にはssVSDが含まれていることが示唆された。

ssVSD中の重要な残基

ssVSDが含まれる領域を調べるために、 α' のC末端10残基 (PLSSILRAFY) のC末端から1残基ずつアミノ酸を欠損させたものにGlyを6残基付加した配列が

VSDとして機能するのかを解析した。C末端部のYおよびFYを欠損させたものは、PSVへ輸送された (Fig. 3b, c)。一方、AFY, RAFYを欠損させた配列では、一部はPSVへ輸送されたものの、細胞外にも分泌された (Fig. 3d, e)。LRAFYを欠損させたものは、PSVへは全く輸送されなかった (Fig. 3f)。これらのことから、ssVSDの必須残基はPLSSILRA中に存在すると考えられた。さらに、それらの配列を1残基ずつGlyに置換したものにGlyを6残基付加した配列をGFPのC末端に付加し、それらのPSV輸送を解析したところ、C末端10残基中の中央に位置するIleおよびLeuをGlyに置換したものはPSVへは輸送されずに細胞外に分泌され (Fig. 4e, f)、それらのN末端側のSerをGlyに置換し

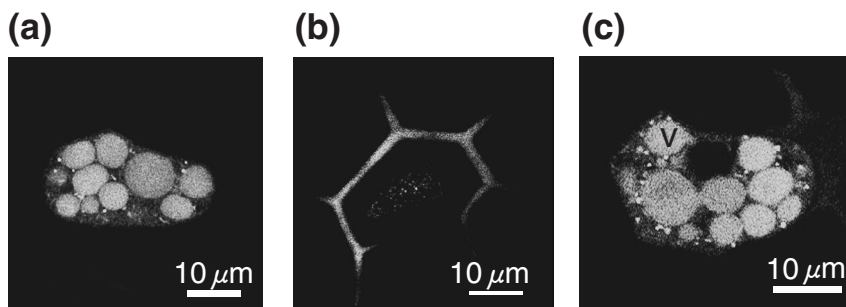


Fig. 2. Localization of GFP with the C-terminal peptide and six contiguous glycine residues. (a) GFP-PLSSILRAFY-GGGGGG, (b) GFP-ILRAFY-GGGGGG, (c) PLSSILRAFY-GFP.

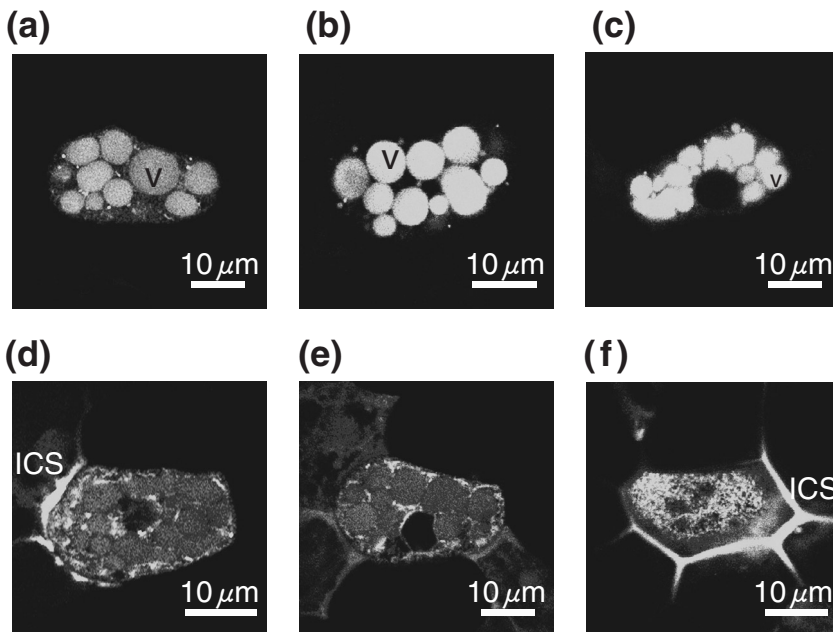


Fig. 3. Localization of GFP with the deleted C-terminal peptide. (a) GFP-PLSSILRAFY, (b) GFP-PLSSILRAF, (c) GFP-PLSSILRA, (d) GFP-PLSSILR, (e) GFP-PLSSIL, (f) GFP-PLSSI.

たものはPSVへの輸送効率が低下した (Fig. 4d). さらに, C末端10残基中のssVSDとしての必須残基の一つであるIleをGlyに置換したもの (PLSSGLRAFY: 太字は変異を入れたアミノ酸) をGFPのN末端に付加したところ, PSVへ輸送されず細胞外へ分泌された. これらのことから, C末端10残基中の中央に位置するIleおよびLeuがssVSDとして機能するために重要な残基であり, それらのN末端側のSerは受容体にIleやLeuが認識されるのに補助的な役割を果たしていると考えられた. しかし, IleおよびLeuを含むC末端6残基はssVSDとして機能できないことから, IleとLeuだけではssVSDとしての機能に十分ではないと考えられる. またC末端10残基のN末端側から2残基目のLeuをGlyに置換したところ, PSV輸送も, 細胞外への分泌も顕著には起こっておらず, 主に小胞体において蛍光が観察された. このLeuもssVSDとしての機能に寄与している可能性が高いものの, 中央に位置するIleやLeuとは異なった役割を持つと考えられる.

ctVSDの構造的特徴について

ctVSDの必須構造について検討した. まず, ctVSDとして機能する最短の配列を調べた. LRAFY, RAFY, AFYをGFPのC末端に付加したものは, 全てPSVに輸送されたのに対して, FYを付加したものはPSVには輸送されずに細胞外に分泌された. さらに, 複数の

GlyをこれらのC末端部に付加して, VSDの機能に対する影響を調べたところ, RAFY, AFY共に, 2残基のGlyの付加ではGFPはPSVへ輸送されたが, 3残基以上のGlyを付加すると, GFPは細胞外へ分泌され, VSDの機能を消失した (Table 1).

C末端部6残基 (ILRAFY) の一部をGlyに置換し, VSDとして機能するかどうかを解析したところ, 6残基中の3残基をGlyに置換したIGRGFGがVSDとして機能した. そして, IGRGFG中のIleおよびArgをGlyに置換したところ, IGGGFGおよびGGGGFGはVSDとして機能しなかったが, GGRGFGはVSDとして機能した (Table 1). さらに, GGRGFGのArgを様々なアミノ酸に置換し, それらがVSDとして機能するかどうかを調べた (Table 1). 酸性アミノ酸であるGluあるいはAspに置換したものはVSDの機能を失うかあるいは弱くなったが, LysおよびThrに置換したものは, VSDとして機能した. 一方, SerおよびAlaに置換したものは, GFPは完全にはPSVに輸送されずに, 一部は細胞外に分泌された. 以上の結果から, ctVSDとして機能するためには, C末端4残基中に少なくとも2残基のある程度の大きさの側鎖を持つアミノ酸が存在していることが必要であること, そしてそのアミノ酸の性質もVSDとしての機能に影響すると考えられた.

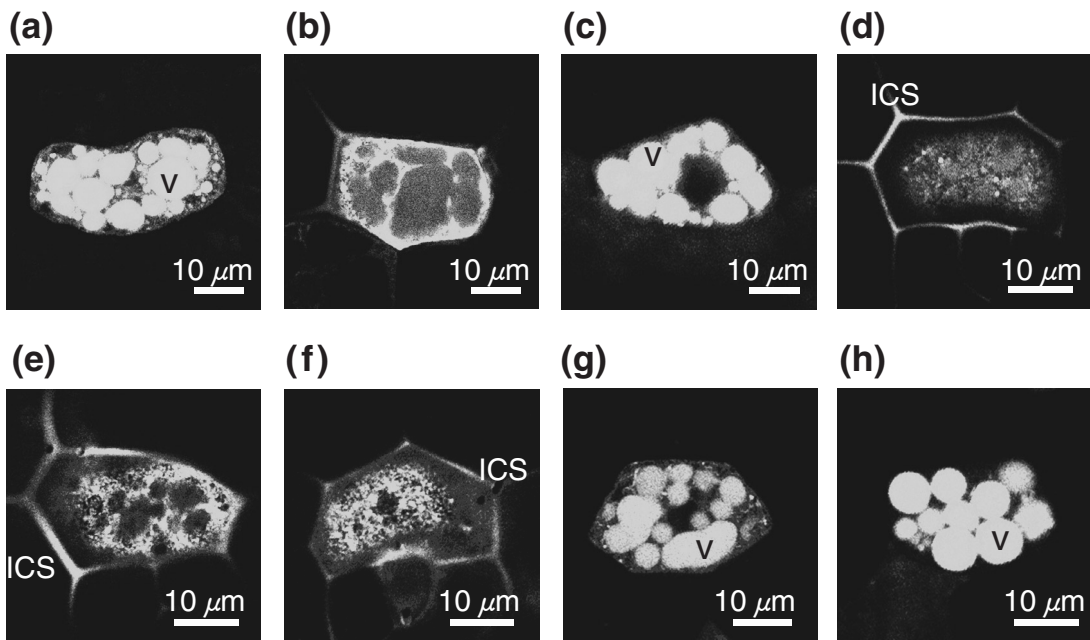


Fig. 4. Localization of GFP with the mutated C-terminal peptide. (a) GFP-GLSSILRAFY, (b) GFP-PGSSILRAFY, (c) GFP-PLGSILRAFY, (d) GFP-PLSGILRAFY, (e) GFP-PLSSGLRAFY, (f) GFP-PLSSIGRAFY, (g) GFP-PLSSILGAFY, (h) GFP-PLSSILRGFY.

Table 1. Summary of localizations of GFP fused with mutated C-terminal peptide

Appended Sequence at the C-terminus of GFP	*PSV	*ICS	Appended Sequence at the C-terminus of GFP	PSV	ICS
AFYGG	++		IGRGFG	++	
RAFYGG	++		IGGGFG		++
AFYGGG		++	GGGGFG		++
RAFYGGG		++	GGRGFG	++	
LRAFYGGG		++	GGKGFG	++	
AFYGGGG		++	GGVGFG	++	
RAFYGGGG		++	GGTGFG	++	
LRAFYGGGG		++	GGSGFG	++	+
LRAFYGGGGG		++	GGAGFG	+	++
			GGDGFG	+	++
			GGEGFG		++

*PSV, Protein storage vacuole; ICS, Intercellular space

要 約

大豆登熟期子葉を用いて，大豆 β -コングリシニンのC末端10残基中に存在する液胞選別輸送シグナル（VSD）の構造を詳細に解析した．C末端10残基には配列特異的シグナル（ssVSD）とC末端型シグナル（ctVSD）が共存していることが明らかとなった．さらに，C末端部の配列をシステムティックに置換したコンストラクトの解析から，ctVSDとして機能するためには，C末端部にある程度のサイズの側鎖を持つアミノ酸がC末端4残基中に少なくとも2残基含まれることが必要であることや，それらの側鎖の性質がVSDとしての機能に影響することが明らかとなった．

文 献

- 1) Nishizawa K, Maruyama N, Satoh R, Fuchikami Y, Higasa T and Utsumi S (2003): A C-terminal sequence of soybean β -conglycinin α' subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *Plant J.*, **34**, 647-659.
- 2) Nishizawa K, Maruyama N, Satoh R, Higasa T and Utsumi S (2004): A vacuolar sorting determinant of soybean β -conglycinin β subunit resides in a C-terminal sequence. *Plant Sci.*, **167**, 937-947.
- 3) Koide Y, Hirano H, Matsuoka K and Nakamura K (1997): The N-terminal propeptide of the precursor to sporamin acts as a vacuole-targeting signal even at the C terminus of the mature part in tobacco cells. *Plant Physiol.*, **114**, 863-870.
- 4) Dombrowski JE, Schroeder MR, Bednarek SY and Raikhel NV (1993): Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell*, **5**, 587-596.