

# 大豆グリシニンの液胞選別輸送シグナルの構造

丸山伸之\*・内海 成

京都大学大学院農学研究科

## Structural Features of Vacuolar Sorting Determinants of Soybean Glycinin

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University Uji 611-0011

### ABSTRACT

The sorting determinants of glycinin, a soybean 11S globulin, which mediates protein targeting to the protein storage vacuole (PSV), were investigated in maturing soybean cotyledons by transient expression assays. A C-terminal stretch of 10 amino acids of AlaB1b, a glycinin group I subunit, was sufficient to direct green fluorescent protein (GFP) to the PSV. This peptide may correspond to a C-terminal vacuolar sorting determinant (ctVSD). Since functional inhibition of this putative ctVSD of AlaB1b did not block PSV sorting of AlaB1b, we used the three-dimensional structure of AlaB1b to identify candidates for a sequence-specific determinant (ssVSD). We found that the sequence downstream of disordered region 4 could direct GFP to the PSV and that Ile297 is critical for sorting. However, functional inhibition of the ctVSD, combined with the Ile297Gly mutation did not abolish vacuolar sorting of AlaB1b, suggesting that AlaB1b has the sorting determinant which does not belong in ctVSD and ssVSD in addition to ctVSD. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 24-29, 2006.

Key words : glycinin, protein storage vacuole, vacuolar sorting determinant

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栄養分となる貯蔵たん白質や害虫などに対する防御たん白質などを蓄積するたん白質貯蔵液胞とがある。分解型液胞への輸送機構に関する研究はかなり進展しているが、たん白質貯蔵液胞への輸送機構に関しては不明な点が多

く残されている。また、登熟期の種子は、発芽期の栄養源となる種子貯蔵たん白質を大量にたん白質貯蔵液胞に蓄積するため、たん白質貯蔵液胞輸送の研究における格好のモデル組織である。

液胞たん白質は、自身の持つ選別輸送シグナル (Vacuolar sorting determinant, VSD) が受容体に認識されることにより、液胞へ輸送される。現在までに同定されている液胞たん白質のVSDは、NP1RL (アミノ

\*〒611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

酸一文字表記) 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配列特異的シグナル (ssVSD) と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るC末端型シグナル (ctVSD)、高次構造により形成されるシグナル (psVSD) に分類される。いくつかの種子貯蔵たん白質の選別輸送シグナルが葉肉細胞を用いて解析されており、インゲンマメの7SグロブリンであるファゼオリンにはctVSD<sup>1)</sup>、ヒマ種子2Sアル

ブミンにはssVSD<sup>2)</sup>が存在していると報告されている。

我々は、より正確に種子貯蔵たん白質の選別輸送シグナルを解析するために、様々な配列を融合させた蛍光たん白質を、登熟期大豆種子に一過的に発現させ、その局在性を解析するシステムを構築し、大豆7SグロブリンのC末端10残基にVSDが存在することを明らかにした<sup>3)</sup>。一方、11SグロブリンのVSDについてはあまり詳細な解析が行われておらず、ソラマメの11Sグロブリン (レグミン) においてpsVSDの存在が示唆され

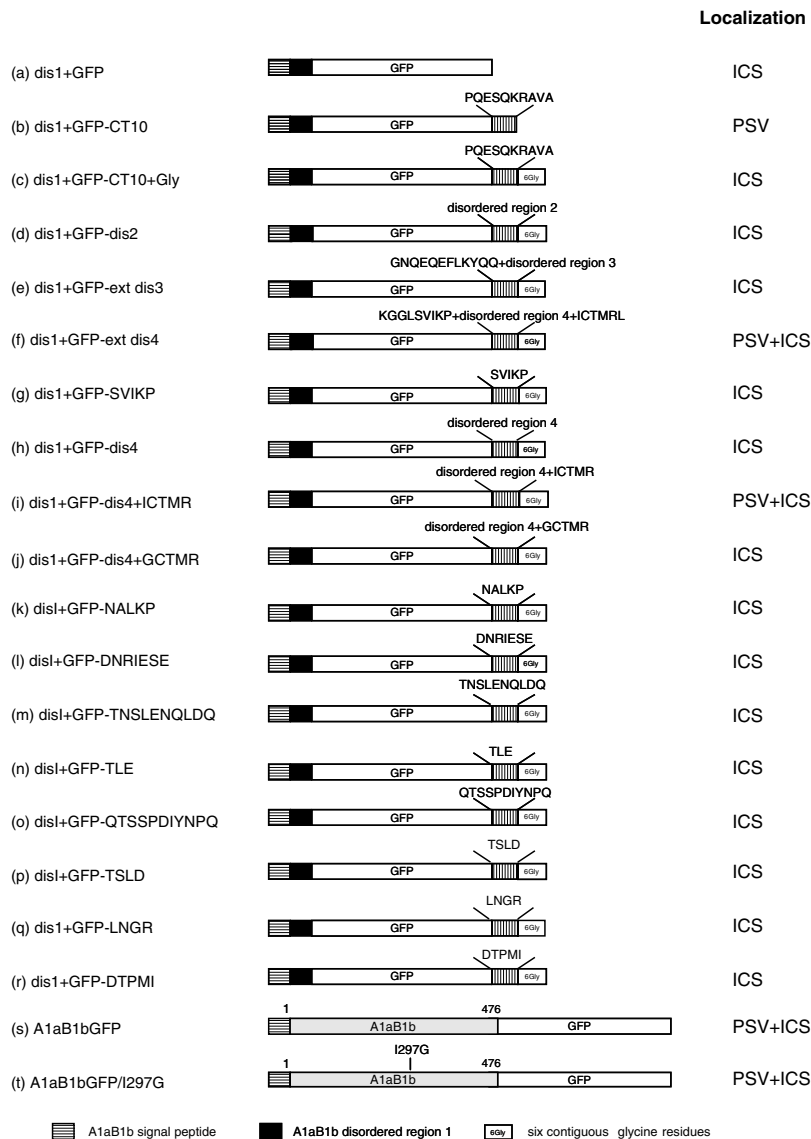


Fig. 1. Schematic diagram of the constructs used in this study and the localization of each reporter protein after transient expression in soybean cotyledons. When the reporter proteins were secreted to the intercellular space, we observed fluorescence in the reticular structure reminiscent of the ER in addition to the intercellular space.

ているのみである<sup>4)</sup>。一方、現在様々な種子貯蔵たん白質を欠失したダイズ系統が開発されている<sup>5,6)</sup>。そこで、大豆11Sグロブリン（グリシニン）を欠失している大豆種子を、我々の開発した解析システムに利用して、グリシニンの主要なサブユニットであるA1aB1bのVSDの同定を行った。

## 方 法

### 大豆登熟期種子における一過的発現

グリシニンを欠失した登熟期の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  $\mu$ gのプラスミドDNAを金粒子（1  $\mu$ m）にコーティングし、Biolistic PDS-1000/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、B5寒天培地上に移し、25℃暗所で24~30時間培養した。

### 共焦点レーザー顕微鏡観察

大豆種子から、薄切片（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）の蛍光を示す細胞を特定した後、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

### A1aB1bのC末端10残基はctVSDとして機能する

A1aB1bのC末端10残基（PQESQKRAVA）は、分子表面に位置している<sup>7)</sup>。そこで、A1aB1bのC末端10残基のPSVへの輸送能について検討した。まず、A1aB1bのシグナルペプチドとA1aB1bのN末端9残基をGFPに付加したところ（dis1+GFP, Fig. 1a）、PSVへは輸送されずに、細胞外に分泌された（Fig. 2A）。次に、dis1+GFPのC末端にA1aB1bのC末端10残基を付加したところ（dis1+GFP-CT10, Fig. 1b）、dis1+GFP-CT10はPSVに輸送されたが（Fig. 2B）、さらに、そのC末端に6個のグリシン残基を付加すると（dis1+GFP-CT10+Gly, Fig. 1c）、PSVへの輸送は阻害され、細胞外に分泌された（Fig. 2C）。ctVSDのC末端に複数のグリシン残基を付加することにより、その機能を失うことが報告されているため<sup>8)</sup>、A1aB1bのC末端10残基はctVSDとして機能することが示唆された。

### A1aB1bにctVSD以外のシグナルが存在する

A1aB1bのPSV輸送に対するC末端部の必要性について検討した。一般的な系統の大豆種子にVSDを欠失させたA1aB1bを発現させても、内在性のVSDを持つグリシニンと会合体（グリシニンはPSVへ輸送されるまで、3量体構造をとる）を形成するために、PSVへ輸

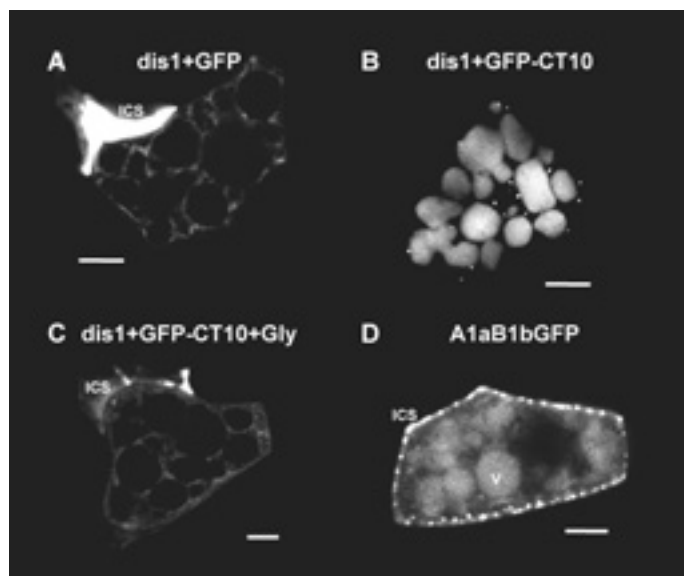


Fig. 2. Localization of reporter proteins fused to the C-terminal region or the whole sequence of A1aB1b. Confocal images of maturing soybean cotyledon cells expressing (A) dis1+GFP, (B) dis1+GFP-CT10, (C) dis1+GFP-CT10+Gly, and (D) A1aB1bGFP. V, PSV; ICS, intercellular space. Bars, 10  $\mu$ m.

送されてしまう。一方、グリシニンを欠失した系統が現在開発されているが、この系統のPSVへの輸送システムは一般的な系統のものと同様であることを既に免疫電子顕微鏡観察により明らかにしている<sup>9)</sup>。そこで、AlaB1bのC末端にGFPを付加したもの（AlaB1bGFP, Fig. 1s) を、グリシニンを欠失した系統の種子で発現させ、その局在性を解析した。ctVSDはC末端に位置することが必須であることから、AlaB1bのC末端にGFPを融合させることによりctVSDの機能を失うと予

想される。しかし、AlaB1bGFPは、細胞外とともにPSVにも検出された (Fig. 2D)。以上より、AlaB1bのC末端10残基はPSVへの輸送に重要であるが、C末端部以外にもVSDとして機能する領域があることが示唆された。

#### A1aB1bには複数のシグナルが存在する

AlaB1bには立体構造上非常に揺らぎの大きいdisordered領域1～5が存在する (Fig. 3)<sup>7)</sup>。VSDとして機能するC末端10残基はdisordered領域5を含んで

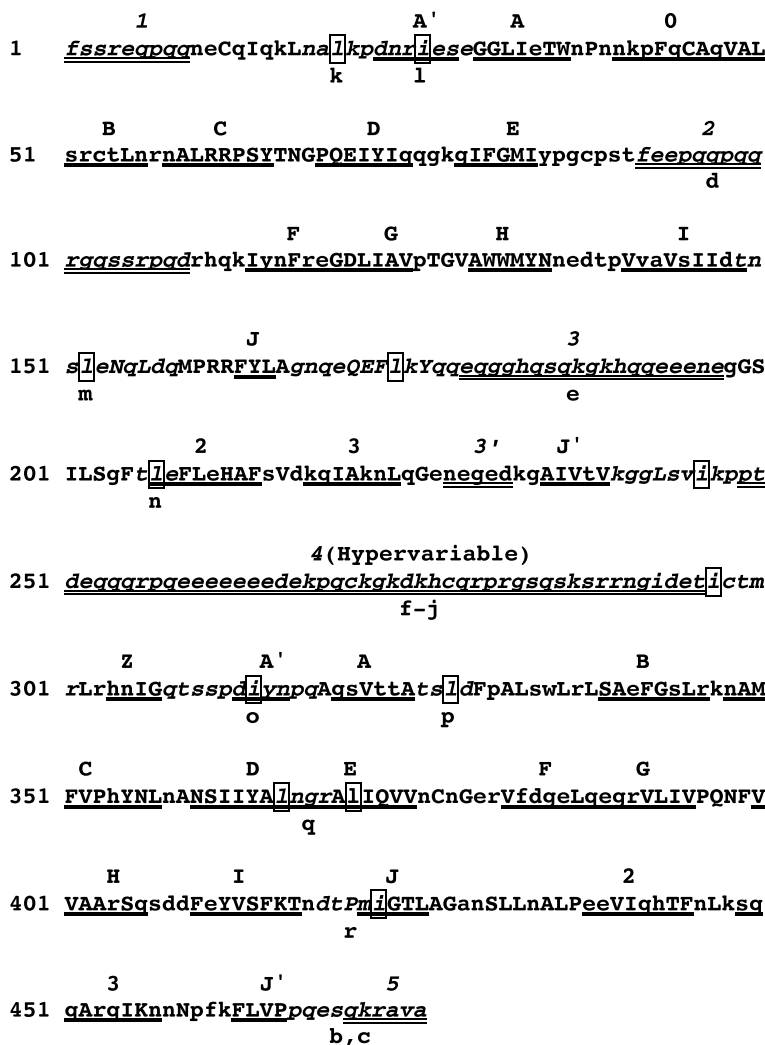


Fig. 3. Residues of AlaB1b positioned on the molecular surface determined by the program Joy. Large and small capitals in the sequence of AlaB1b indicate the residues buried inside the molecule and positioned on the molecular surface, respectively. Italicized numbers above double underlined sequences indicate six disordered regions. Letters and numbers above single underlined sequences show  $\beta$ -sheets and helices, respectively. Lowercase letters underneath the sequence show the related constructs shown in Fig. 1 (italicized letters indicate the regions examined by the transient assay). Boxed letters indicate Leu or Ile residues positioned on the molecular surface.

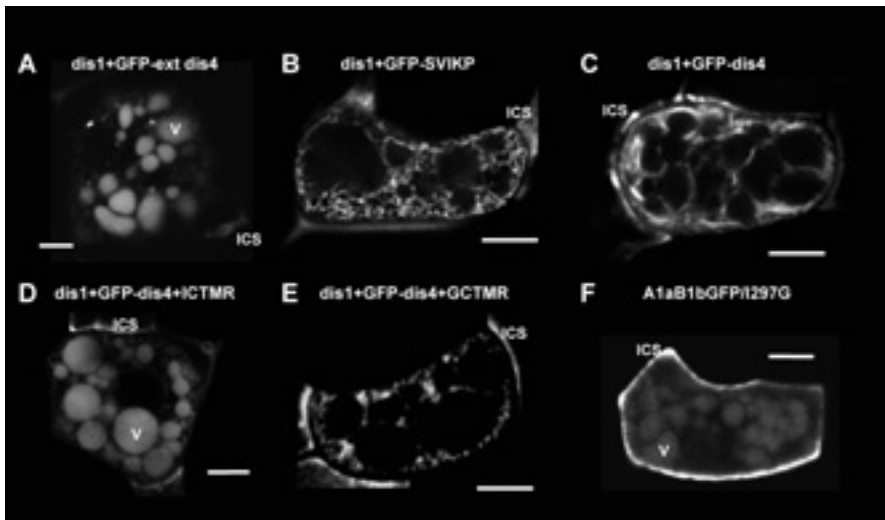


Fig. 4. Localization of reporter proteins fused to the internal peptides of A1aB1b or mutated A1aB1b. Confocal images of maturing soybean cotyledon cells expressing (A) dis1+GFP-ext dis4, (B) dis1+GFP-SVIKP, (C) dis1+GFP-dis4, (D) dis1+GFP-dis4+ICTMR, (E) dis1+GFP-dis4+GCTMR, and (F) A1aB1bGFP/I297G. V, PSV; ICS, intercellular space. Bars, 10  $\mu$ m.

いる。また、すべてのdisordered領域は分子表面に位置しており、レセプターと容易に相互作用しうするため、VSDの候補領域の一つとして挙げられる。既にdisordered領域1にはVSDが存在していないことを明らかにしているため (Fig. 2A), disordered領域2～4にVSDが存在するかを解析した。一方、タバコ培養細胞を用いて、サツマイモ スポラミンのssVSDに含まれるNPIRLモチーフのシグナルとしての必須配列が解析されており<sup>10)</sup>、モチーフ中のイソロイシン残基はロイシン残基にしか置換できないことが報告されている。そこで、A1aB1bの立体構造データを用いてssVSDの候補と考えられる分子表面に位置している12個のイソロイシン残基およびロイシン残基を特定した (Fig. 3)。その中の371番目のロイシン残基の両側のアミノ酸の側鎖は分子内部に位置している。そこで、disordered領域2～4とともに、371番目のロイシン残基を除いた11個の分子表面に位置しているロイシンあるいはイソロイシン残基についてVSDとしての機能を調べた (Fig. 1)。それらがctVSDとして機能する可能性を除くために、すべてのコンストラクトのC末端には6個のグリシン残基を付加した。ほとんどのコンストラクトでは、レポーターたん白質はPSVには輸送されずに細胞外に分泌されたが (Fig. 1), disordered領域4と近接する領域 (disordered領域4のNおよびC末端側に位置するSVIKPおよびICTMRL) をレポ-

ーターたん白質に付加したもの (dis1+GFP-ext dis4, Fig. 1f) を発現させると、細胞外ともにPSVにも観察された (Fig. 4A)。さらに、SVIKPのみ (dis1+GFP-SVIKP, Fig. 1g), disordered領域4のみ (dis1+GFP-dis4, Fig. 1h), disordered領域4および ICTMR (dis1+GFP-dis4+ICTMR, Fig. 1i) をそれぞれレポーターたん白質に付加して解析したところ、dis1+GFP-SVIKPおよびdis1+GFP-dis4は細胞外に分泌されたが (Figs. 4B and C), dis1+GFP-dis4+ICTMRは細胞外とともにPSVにも検出された (Fig. 4D)。そして、dis1+GFP-dis4+ICTMRの付加した配列中の分子表面に位置しているイソロイシン残基をグリシン残基に置換することにより (dis1+GFP-dis4+GCTMR; Fig. 1j), PSVへは輸送されなくなった (Fig. 4E)。さらに、A1aB1bGFP中のdisordered領域4近傍のPSVへの輸送に重要であったイソロイシン残基をグリシン残基に置換したもの (Fig. 1t, A1aB1bGFP/I297G) を、グリシニンが欠失した大豆登熟期種子で発現させたところ、A1aB1bGFPと同様に細胞外とPSV両方に蛍光が検出された (Fig. 4F)。以上の結果から、disordered領域4近傍の領域はssVSDとして機能しうが、その領域のPSV輸送への役割は低く、ctVSDおよびssVSD両者に属さないタイプのVSDがA1aB1bに存在していることが示唆された。

## 要 約

A1aB1bのC末端10残基はレポーターたん白質（GFP）をPSVへ輸送した。A1aB1bのC末端10残基のC末端に6個のグリシン残基を付加したものでは、GFPはPSVへは輸送されずに細胞外に分泌されたことから、A1aB1bのC末端部はctVSDとして機能していることが示唆された。一方、A1aB1bのctVSDの機能を欠失させるために、そのC末端にGFPを融合させ（A1aB1bGFP）、グリシニン欠失した種子で発現させると、細胞外とともにPSVにも蛍光が観察された。立体構造データを利用し、C末端部以外に位置するssVSDの候補領域を特定し、それらがVSDとして機能しうののかを網羅的に解析したところ、disordered領域4近傍にssVSDとして機能する領域があることを見出した。しかし、この領域のssVSDとしての機能を欠失させても、A1aB1bGFPのPSVへの輸送は完全には阻害されなかった。以上の結果から、A1aB1bにはctVSDに加えて、ctVSDおよびssVSD両者に属さないタイプのVSDが存在することが示唆された、

## 文 献

- 1) Frigerio L, de Virgilio M, Prada A, Faoro F and Vitale A (1998): Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell*, **10**, 1031-1042.
- 2) Brown JC, Jolliffe NA, Frigerio L and Roberts LM (2003): Sequence-specific, Golgi-dependent vacuolar targeting of castor bean 2S albumin. *Plant J*, **36**, 711-719.
- 3) Nishizawa K, Maruyama N, Satoh R, Fuchikami Y, Higasa T and Utsumi S (2003): A C-terminal sequence of soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *Plant J*, **34**, 647-659.
- 4) Saalbach G, Jung R, Kunze G, Saalbach I, Adler K and Müntz K (1991): Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell*, **3**, 695-708.
- 5) Takahashi M, Uematsu Y, Kashiwaba K, Yagasaki K, Hajika M, Matsunaga R, Komatsu K and Ishimoto M (2003): Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta*, **217**, 577-586.
- 6) Yagasaki K, Takagi T, Sasaki M and Kitamura K (1997): Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J Agric Food Chem*, **45**, 656-660.
- 7) Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B and Utsumi S (2001): Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol*, **305**, 291-305.
- 8) 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.
- 9) Mori T, Maruyama N, Nishizawa K, Higasa T, Yagasaki K, Ishimoto M and Utsumi S (2004): The composition of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum determines the transport pathways of soybean seed storage proteins. *Plant J*, **40**, 238-249.
- 10) Matsuoka K and Nakamura K (1999): Large alkyl side-chains of isoleucine and leucine in the NP1RL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol Biol*, **41**, 825-835.