

大豆たん白質のフォールディングとジスルフィド結合形成を司る たん白質群の探索

裏出令子*

京都大学大学院農学研究科

Proteins Catalyzing the Formation of Disulfide Bonds for Correct Folding of Seed Storage Proteins in the Endoplasmic Reticulum of Soybean Cotyledon

Reiko URADE

Graduate School of Agriculture, Kyoto University Uji 611-0011

ABSTRACT

Soybean storage proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER). Many proteins synthesized in the ER are folded accompanying the formation of inner molecular disulfide bonds with the aid of protein disulfide isomerase (PDI) and the related proteins, which are characterized by thioredoxin motifs within the primary structure. However, the identification and characterization of plant PDI family proteins have hardly been performed and their physiological roles remain unknown. In this study, we isolated ten kinds of cDNA clones of soybean PDI family proteins. We succeeded in the construction of *E. coli* protein expression systems for GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3a and GmPDIL-3b. Their domain structures were analyzed by peptide mapping of the recombinant proteins with trypsin and V8 proteinase. GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1 and GmPDIL-2 were shown to accelerate the oxidative refolding of reduced and denatured ribonuclease A. GmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2 and GmPDIL-3b were detected in cotyledons, leaves, stems, roots and flowers on Western blotting. GmPDIS-1, GmPDIM, GmPDIL-1 and GmPDIL-3b were increased in cotyledons, when glycinin was accumulated during the development of seeds. This regulation was unlikely to be transcriptional, since the expression of their mRNAs did not vary with their levels. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 36-41, 2006.

Key words : soybean, endoplasmic reticulum, glycinin, molecular chaperone, protein disulfide isomerase

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

大豆種子貯蔵たん白質は子葉細胞の粗面小胞体で合成され、たん白質貯蔵液胞 (PSV) に輸送され集積する¹⁾。合成直後の種子貯蔵たん白質は、小胞体内腔で分子内ジスルフィド結合形成や糖鎖修飾を受け、折り畳まれて (フォールディング) 高次構造が形成される。このような高次構造形成は、ジスルフィド結合形成および糖鎖修飾を触媒する酵素や分子シャペロンによって効率的に行われていると予想されているが、その詳細は不明である。本研究では、大豆種子貯蔵たん白質の小胞体における高次構造形成の分子機構を明らかにすることを目的に、大豆小胞体においてフォールディングおよびジスルフィド結合形成を担う酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI)²⁾およびそのファミリーの遺伝子をクローニングし、それらのたん白質化学的、酵素学的性質および登熟種子における発現について解析した。

方 法

材 料

大豆 (*Glycine max* L. Merrill. cv. Jack.) は5Lのポットを用いてグリーンソイルに播種し、25°Cで栽培した。光条件は、24時間を1サイクルとして照射期16時間、暗期8時間とした。

PDIファミリー遺伝子のクローニング

大豆若葉からRNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて抽出したtotal RNAを鋳型として、遺伝子特異配列プライマーおよびオリゴdTを用いて逆転写PCRによりGmPDS-1, GmPDIS-2, GmPDIL-1, およびGmPDIL-2のcDNAをクローニングした。GmPDIM, GmPDIL-3a, GmPDIL-3b, GmPDIQ-1aおよびGmPDIQ-1bのcDNAはSMART RACE cDNA Amplification kit (クロンテック社) を用いて5'-RACEおよび3'-RACEにより、クローニングした。cDNAの塩基配列は、fluorescence dideoxy chain termination法によりシークエンスした。

大腸菌発現系の構築とリコンビナントたん白質の発現・精製

クローニングしたPDIファミリーのcDNAからPCRにより増幅したDNA断片を大腸菌発現ベクターpET-46 Ek/LIC (Novagene社) のLIC部位にサブクローニングすることにより、発現用プラスミドを構築した。発現プラスミドは大腸菌BL21 (DE3) にトランスフォームし、IPTG誘導によりリコンビナントたん白質を大量発現させた。発現たん白質のN末端ヒスチジンタグを利用して、His-Bindカラムにより大腸菌抽出液からリコンビナントたん白質を精製した。その後、

G3000SWゲル濾過カラムクロマトグラフィーによりリコンビナントたん白質を純化した。

酸化のフォールディング活性測定

リコンビナントたん白質のPDI活性として、還元変性させたリボヌクレアーゼA (RNase A) をフォールディングさせ、正しいジスルフィド結合を導入する活性を、変性により失活していたRNaseの活性回復速度として測定した³⁾。

ドメイン構造解析

純化したリコンビナントたん白質を、トリプシンあるいはV8プロテアーゼで限定分解し、生成したペプチド断片のN末端アミノ酸配列分析とMALDI TOF Mass分析により切断点をマッピングした。今までにドメイン構造が報告されている動物PDIファミリーの一次構造との相同性とペプチドマッピング情報から、各大豆PDIファミリーのドメイン構造を推定した。

抗体作製とウエスタンブロッティング

純化したリコンビナントたん白質をウサギに皮内注射し、抗血清を作製した。試料たん白質はSDS-PAGEにより分離後、PVDF膜にブロッティングした。各抗血清を一次抗体とし、ペルオキシダーゼをコンジュゲートした抗IgG抗血清を二次抗体として化学発光法により目的たん白質を検出した。

mRNAの定量

各遺伝子のmRNA量は、遺伝子の特異配列プライマーを用いたリアルタイムRT-PCRにより定量した。

結果と考察

大豆PDIファミリー遺伝子のクローニング

本研究で大豆PDIファミリーたん白質のcDNAを10種類クローニングした (Fig. 1)。クローニングに際し、シロイヌナズナゲノムデータベースからPDIファミリーと予想される遺伝子を選択し、これらと相同性のある大豆ESTの塩基配列情報をデータベースから抽出した。それらの塩基配列情報からプライマーをデザインし、RT-PCR, 5'RACEおよび3'RACEにより、葉のmRNAから全長cDNAをクローニングした。クローニングした大豆PDIファミリー遺伝子は、それらがコードするたん白質の一次構造から、GmPDIS (1a, 1b, 2の3種), GmPDIM (1種), GmPDIL (1, 2, 3a, 3bの4種), GmPDIQ (1a, 1bの2種) の4グループに分類した。このうち、GmPDISは植物に特有のPDIファミリーで、N末端側にチオレドキシンと相同性の高い配列が2個タンデムに並び、C末端側には動物のERp29⁴⁾のC末端ドメインと相同性の高い配列が存在

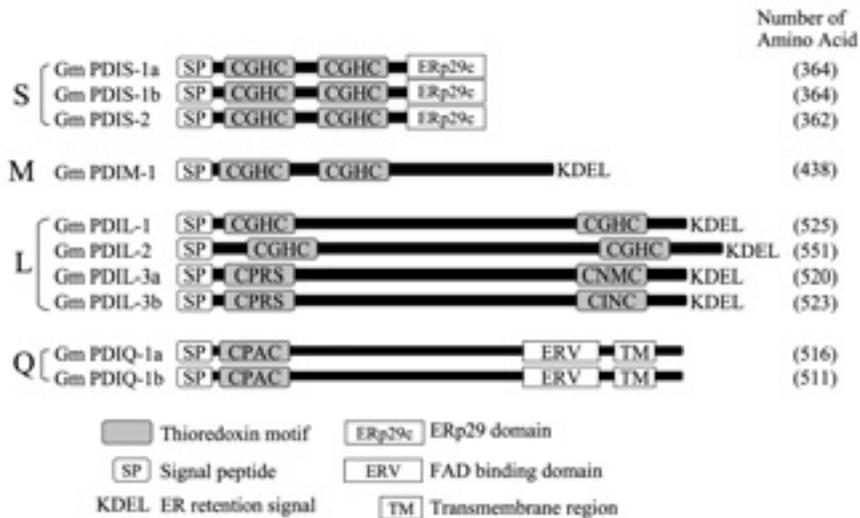


Fig. 1. Schematic structures of cloned soybean PDI family.

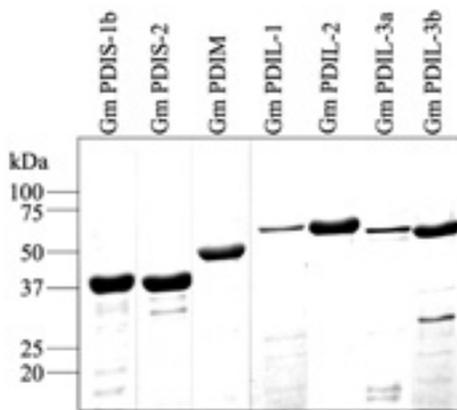


Fig. 2. Purification of recombinant soybean PDI family proteins. The recombinant protein expressed in *E. coli* was purified by His-bind column chromatography followed by gel filtration column chromatography. Proteins in each effluent were separated on 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

していた。GmPDIMはGmPDISと類似しているがC末端領域が異なる。GmPDIL-1とGmPDIL-2は他の真核生物のPDIと配列および全体構造が最も類似しており、植物のPDIオーソログと考えられる。GmPDIL-3aおよび3bも植物に特有のたん白質であり、2個のチオレドキシモチーフの活性中心は他のファミリーと異なり活性に必須のCGHCモチーフが変則配列(CPRS, CNMC, CINC)になっていた。GmPDIQ-1aと

GmPDIQ-1bは一個の変則型チオレドキシモチーフ(活性中心がCPAC)とFAD結合ドメイン(ERV)を有する膜結合型と推定される構造を有していた。本たん白質は、動物のFAD-dependent sulfhydryl oxidase, quiescinのオーソログと推定される。

リコンビナントPDIファミリーたん白質の発現系の確立

シグナル配列を除き、N末端にヒスチジンタグを融合させたリコンビナントたん白質の発現用プラスミドを構築し、大腸菌で大量発現させた。10種の遺伝子のうち7種類(GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL3a, GmPDIL-3b)の発現に成功した(Fig. 2)。以下の研究はこれらのPDIファミリーについて行った。発現したたん白質はすべてゲル濾過カラムクロマトグラフィー上でモノマーたん白質として挙動した。これらのうち、GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2に酸化的フォルディング活性が検出された。しかし、変則型の活性中心を持つGmPDIL-3aおよびGmPDIL-3bには活性が検出されず、未知の生理機能を有すると考えられる(Fig. 3)。

大豆PDIファミリーのドメイン構造の解析

一次構造の相同性解析とリコンビナントたん白質のペプチドマッピングにより、各PDIファミリーのドメイン構造を推定した(Fig. 4)。GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3bについて、チオレドキシ様ドメインの前後に切断点がマッピングされ、これらが独立したドメインであることが示された。

大豆PDIファミリーの組織分布と種子登熟過程における子葉での発現量の変動

ウエスタンブロッティングにより、子葉、葉、茎、根、花芽でGmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3bの発現が検出された (Fig. 5)。また、GmPDIL-3b抗体と強く交差する

75 kDaの未知のたん白質が子葉でのみ検出された。本たん白質の正体について現在検討中である。検出されたPDIファミリーのこのような普遍的な組織分布は、これらが細胞にとって基本的な生理機能を果たしていることを示唆している。一方、登熟過程の子葉での量的変動パターンはPDIファミリーによって異なり、

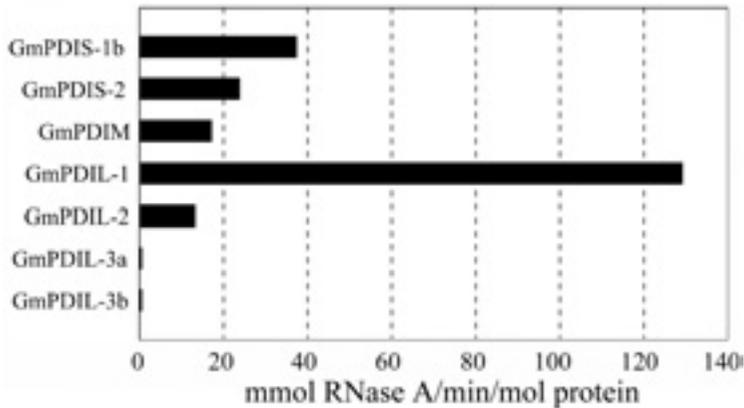


Fig. 3. Oxidative refolding of reduced and denatured RNase A caused by recombinant soybean PDI family proteins.

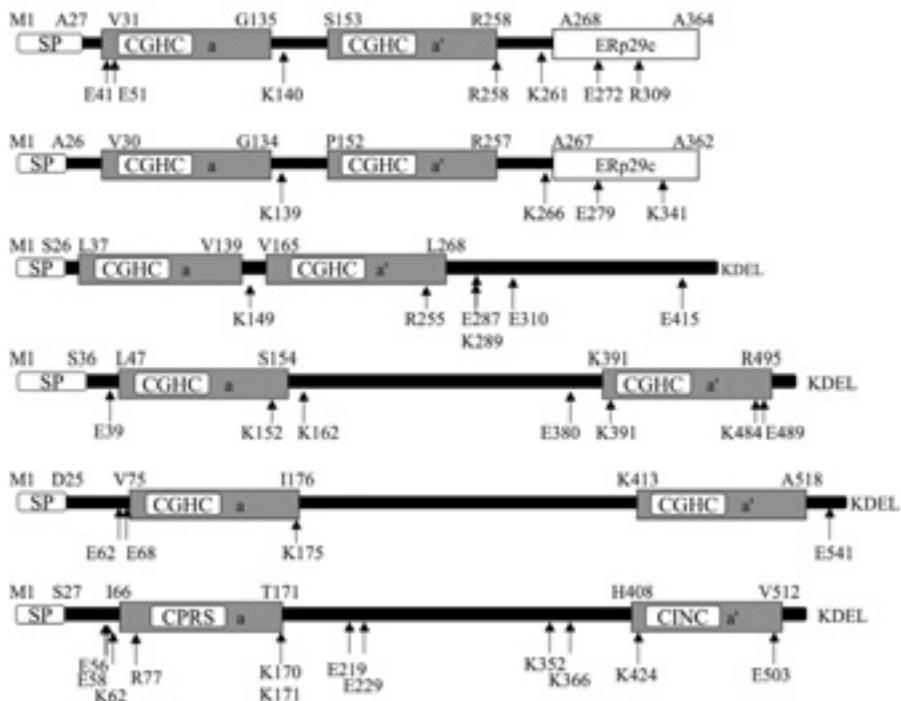


Fig. 4. Schematic representation of cleaved sites on soybean PDI family proteins by limited proteolysis. The boxes indicate the domain boundaries predicted using NCBI conserved domain search. a and a' represent a putative thioredoxin domain. ERp29c indicates the domain similar to C-terminal domain of animal ERp29. The arrows indicate the sites cleaved by digestion with trypsin (K or R) or V8 proteinase (E).

GmPDIS-1, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-3bおよびGmPDIL-3類似の未知たん白質がグリシニンの合成時期と重なって増加することが明らかとなった (Fig. 6). 従って、種子貯蔵たん白質のうち特にグリシニンの高次構造形成にこれらのPDIファミリーが動員される可能性が高い。同時期に、小胞体の普遍的分子シャペロ

ンであるBiP[®]も増加しており、BiPと複数のPDIファミリーとの協調作業のもとでグリシニンの高次構造形成が行われると推定される。一方、これらのたん白質の量は必ずしもそれらのmRNAの量と連動しておらず (Fig. 7)、登熟のこの時期には転写によらない発現量の調節機構が働いている可能性が示唆された。

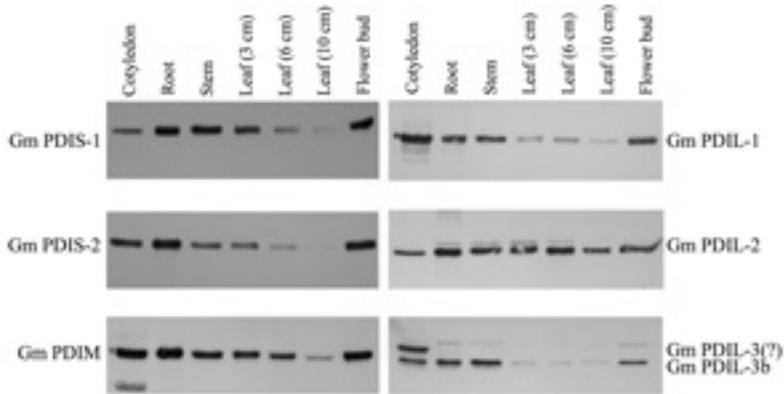


Fig. 5. Tissue distribution of soybean PDI family proteins. Proteins from cotyledons, roots, stems, leaves and flower buds were separated by SDS-PAGE and blotted on a PVDF membrane. Each PDI family protein was immunostained.

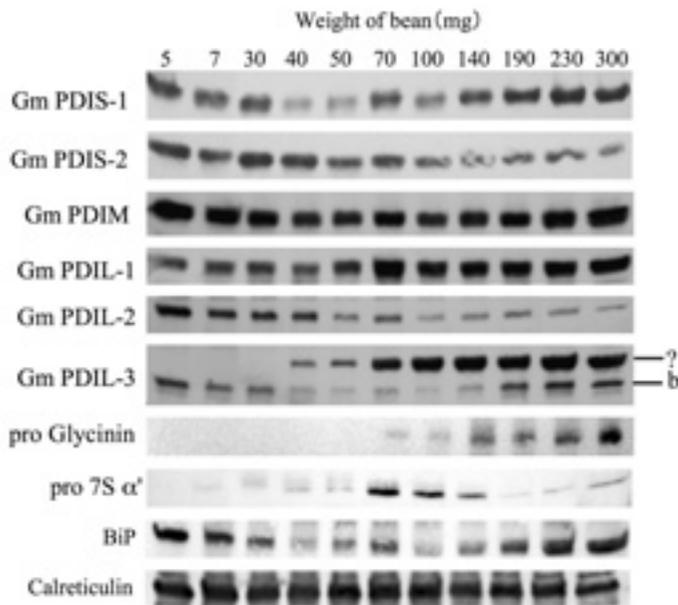


Fig. 6. Expressions of soybean PDI family proteins in soybean cotyledons during the maturation of seeds. Thirty-five μ g of proteins extracted from cotyledons was separated on 10 % SDS-PAGE gel and immunostained with the antiserum specific to GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3b, glycinin acidic subunits (pro glycinin), pro-sequence of β -conglycinin α' subunit (pro 7S- α'), BiP or calreticulin. Pro glycinin was a 53 kDa band on the blot.

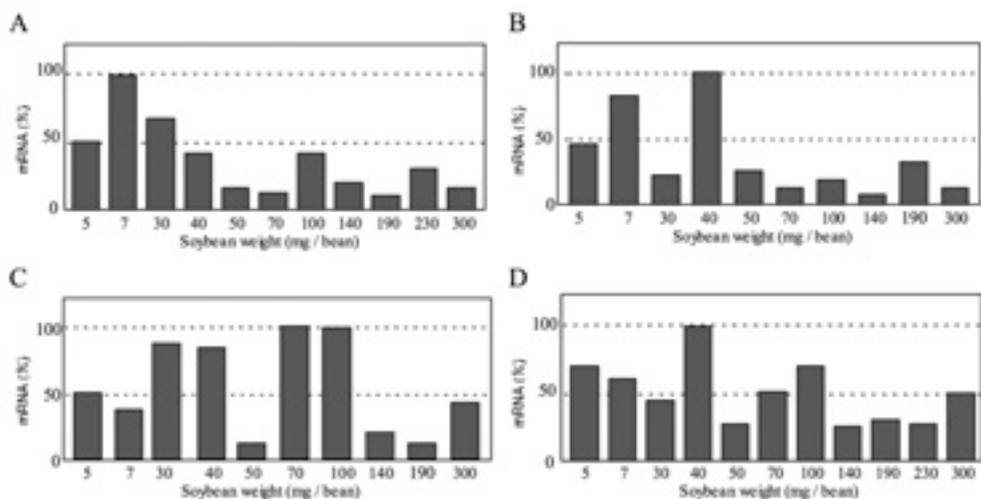


Fig. 7. Expression of mRNA of GmPDIS-1 (A), GmPDIM (B), GmPDIL-1 (C) and BiP (D) in cotyledons during the maturation of seeds. Each mRNA was quantified by real time RT-PCR. Values are calculated as a percent against the highest value obtained during the maturation.

要 約

大豆のPDIファミリー遺伝子を10種類クローニングし、そのうち7種 (GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3a, GmPDIL-3b) について大腸菌発現系を確立した。大量発現させたりコンピナントたん白質のペプチドマッピングにより、ドメイン構造を解析した。GmPDIS-1b, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1およびGmPDIL-2はPDI活性を有することを明らかにした。7種のPDIファミリーが大豆の子葉、葉、莖、根、花芽に発現していることを示した。さらに、登熟期の子葉において貯蔵たん白質グリシニンの生合成量と連動してGmPDIS-1b, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-3bおよびGmPDIL-3bと免疫交差性がある未知たん白質が増加することを見いだした。このようなたん白質レベルでの増加はmRNA量とは対応しておらず、転写以外の機構でこれらのPDIファミリーたん白質の発現量が調節されていることが示唆された。

文 献

- 1) Nielsen NC and Nam Y-W (1999): Soybean globulins. In: Seed Proteins. Shewry PR and Casey R, eds., Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp. 285-313.
- 2) Freedman RB, Hirst TR and Tuite MF (1994): Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, **19**, 331-336.
- 3) Lyles MM and Gilbert HF (1991): Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry*, **30**, 613-619.
- 4) Mkrtchian S, Fang C, Hellman U and Ingelman-Sundberg M (1998): A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29. *Eur J Biochem*, **251**, 304-313.
- 5) Flynn GC, Pohl J, Flocco MT and Rothman JE (1991): Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, **353**, 726-730.