

大豆たん白質の高次構造を形成するたん白質群の解析

裏出令子*

京都大学大学院農学研究科

Proteins Catalyzing Folding of Seed Storage Proteins of Soybean

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 become folded with the formation of inner molecular disulfide bonds with the aid of protein disulfide isomerase (PDI) and related proteins, which are characterized by thioredoxin motifs within the primary structure. However, identification and characterization of plant PDI family proteins have hardly been performed and thus their physiological roles remain unknown. Previously, we isolated cDNA clones of soybean PDI family proteins, GmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3a and GmPDIL-3b, and detected their expression in soybean cotyledons. In this study, it was shown that all of them are distributed in the ER lumen in cotyledon cells. GmPDIS-1 and GmPDIS-2 were shown to be colocalized with storage proteins in protein storage vacuoles in addition to the ER. Data obtained in co-immunoprecipitation and cross-linking experiments suggested that GmPDIS-1, GmPDIM, GmPDIL-1 and GmPDIL-2 are associated with proglycinin, a precursor of the seed-storage protein glycinin, in the cotyledons. In addition, the association of GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2 and BiP with β -conglycinin α' was found. From these results, it was suggested that PDI family proteins act not only as oxidoreductases for the formation of disulfide bonds, but also as molecular chaperones for the folding of seed storage proteins. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 6-11, 2007.

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⁾。生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と種子貯蔵たん白質との相互作用を解析した。

方 法

材 料

大豆 (*Glycine max* L. Merrill. cv. Jack.) は5 Lのポットを用いてグリーンソイルに播種し、25℃で栽培した。光条件は、24時間を1サイクルとして光照射期16時間、暗期8時間とした。抗PDIファミリーウサギ血清および抗BiPモルモット血清はリコンビナントたん白質を抗原として作製した。

大豆子葉細胞オルガネラの分画

すべての操作は4℃で行った。登熟過程にある未熟な大豆子葉を5 mmol/L $MgCl_2$ あるいは5 mmol/L EDTAを含む100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8/10 mmol/L KCl/12% (wt/vol) sucrose溶液 (buffer A) 中で、ダンスホモゲナイザーを用いて破碎した。破碎液は1,000 × gで10分遠心し、上清を21, 28, 35, 42, 49, 56% (wt/wt) sucrose/buffer Aから構成されるシヨ糖密度勾配上に重層し100,000 × g, 2時間の超遠心を行った。この際、 $MgCl_2$ 入りのbuffer A中で破碎したサンプルは $MgCl_2$ 入りのシヨ糖密度勾配液に、EDTA入りのbuffer Aで破碎したサンプルはEDTA入りのシヨ糖密度勾配液に供した。遠心後、遠心チューブ下から1 mLずつ溶液を採取し各フラクションについてウエスタンブロッティングを行った。

ミクロソーム画分のProteinase K処理

オルガネラ分画の場合と同様、大豆子葉を20 mmol/L sodium pyrophosphate buffer, pH 7.5/0.3 mol/L mannitol (buffer B) 中で破碎し、超遠心処理により沈殿 (ミクロソーム) と上清 (サイトゾル) に分離した。ミクロソームはbuffer Bに再懸濁した。再

懸濁液を0.5 mg/mL proteinase Kで5分間4℃で消化した。この際、膜を破壊するサンプルは1% SDSを添加した。消化反応は10% trichloroacetic acid添加により停止させ、ウエスタンブロッティングでPDIファミリーおよびBiPを検出した。

大豆子葉の組織免疫染色

大豆子葉を3×3×1 mm角に切り、2% formaldehyde/0.1% glutaraldehydeで2時間室温で固定した。固定した切片は、ethanolで脱水後樹脂に包埋した。樹脂切片をミクロトームで作製し免疫蛍光染色後、MRC-1024共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (Bio-Rad Laboratories) により観察した。

免疫沈降実験

大豆子葉を^[35S]メチオニンで代謝的に標識し、ミクロソームを調製した。この際に、buffer Bにたん白質架橋剤1 mg/mL DSPを添加した。ミクロソームの溶解液からPDIあるいはBiPを免疫沈降させ、protein-A Sepharose beadsを用いて沈降物を回収した。免疫沈降物から抗グリシニン酸性サブユニット血清あるいは抗β-コングリシニンα'血清を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物をSDS-PAGEで分離し、ゲル中の放射標識たん白質をフルオログラフィーにより検出した。

結 果 と 考 察

大豆PDIファミリーの細胞内局在性

細胞ホモジネートのEDTAキレート処理によりGmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3aおよびGmPDIL-3bはが局在化しているオルガネラの密度が軽くなることから、粗面小胞体に局在化することが確認された (Fig. 1)。GmPDIS-1およびGmPDIS-2の場合は、大豆未熟子葉中のこれらのたん白質を免疫染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で観察した。登熟初期の子葉細胞では、GmPDIS-1およびGmPDIS-2は小胞体に局在化し、小胞体マーカーたん白質BiPと分布がオーバーラップしていた (Fig. 2C, D)。さらに、単離したマイクロソームをprotenase Kで処理してもいずれのPDIファミリーも分解耐性であったことから、すべてが小胞体内腔たん白質であることが明らかとなった (Fig. 3)。

登熟が進行し貯蔵たん白質を蓄積した子葉についてBiP, GmPDIS-1およびGmPDIS-2の免疫蛍光染色を行うと、これらのたん白質は小胞体以外にPSVにも存在することが明らかとなった (Fig. 4)。大豆子葉細胞では小胞体からグリシニンがゴルジ体を經由せずに輸送される経路が知られており、小胞体の内腔たん白質も

一緒に輸送される可能性が考えられる。このような小胞体分子シャペロンのPSV中での生理機能は不明である。
大豆PDIファミリーとプログリシニンとの会合

本研究で研究対象としたPDIファミリーは子葉細胞に高発現しており、小胞体内腔に局在化するたん白質であった。登熟過程の子葉細胞小胞体で最も大量に生

合成されるたん白質はグリシニンと β -コングリシニンである。このうち、グリシニンは小胞体内腔でのフォールディング過程で2カ所に分子内ジスルフィド結合が形成されることから、PDIファミリーがフォールディングに介在していることが予想された。そこで、一過性のたん白質間相互作用の有無を検討することによ

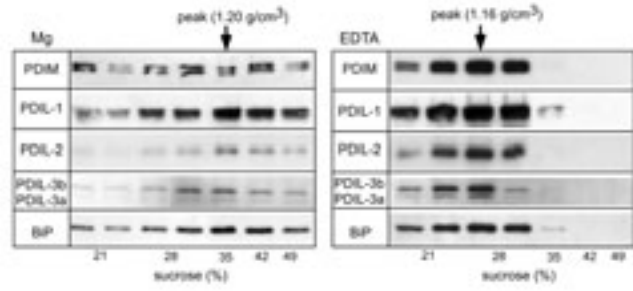


Fig. 1. Localization of PDIM, PDIL-1, PDIL-2, PDIL-3a and PDIL-3b in the ER of soybean cotyledons. Microsomes isolated from cotyledons (100-mg beans) were fractionated by ultracentrifugation on a sucrose gradient in the presence of $MgCl_2$ or EDTA as described under materials and methods. The proteins in each fraction were separated by 10% SDS-PAGE and immunostained with anti-PDIM serum, anti-PDIL-1 serum, anti-PDIL-2 serum, anti-PDIL-3 serum or anti-BiP serum.

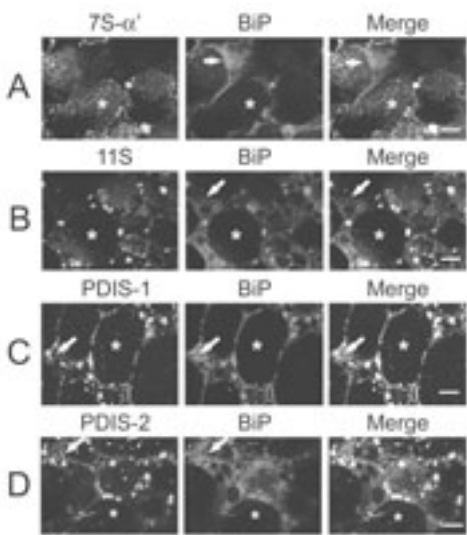


Fig. 2. Localization of PDIS-1 and PDIS-2 in the ER of soybean cotyledons at an early stage of seed development. Cotyledons (80-mg beans) were immunostained with a combination of anti- β -conglycinin α' (green) and anti-BiP serum (red) (A), anti-(glycinin acidic subunit) serum (green) and anti-BiP serum (red) (B), anti-PDIS-1 serum (green) and anti-BiP serum (red) (C), or anti-PDIS-2 serum (green) and anti-BiP serum (red) (D). Asterisks and arrows indicate PSVs and ER networks, respectively. Bars: 10 μm .

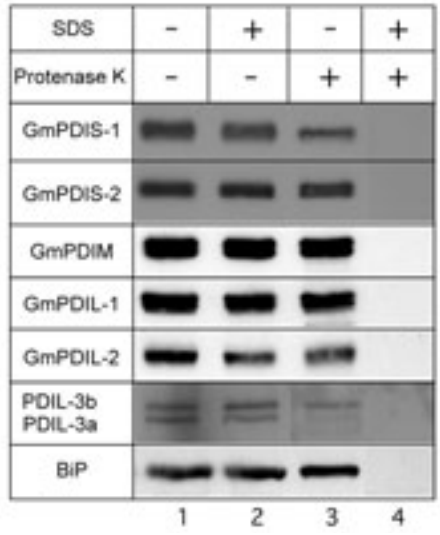


Fig. 3. Localization of PDI family proteins in the lumen of the ER. Microsomes isolated from cotyledons (100 mg-weight beans) were treated without (lanes 1 and 2) or with proteinase K (lanes 3 and 4) in the absence (lanes 1 and 3) or presence (lanes 2 and 4) of SDS at 4°C for 5 min. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE, blotted onto a PVDF membrane and then immunostained with specific antibodies against PDIS-1, PDIS-2, PDIM, PDIL-1, PDIL-2, PDIL-3 and BiP, respectively.

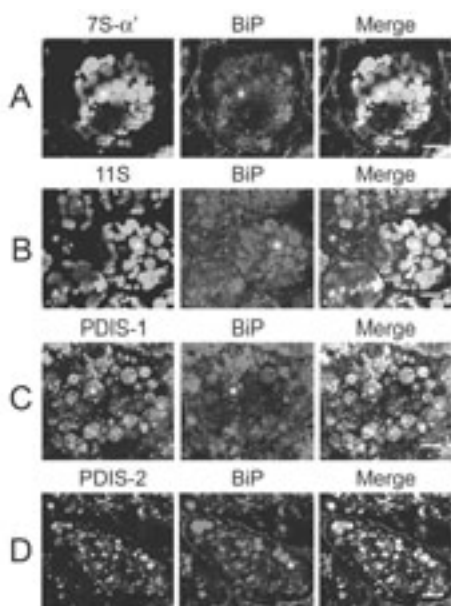


Fig. 4. PDIS-1 and PDIS-2 are localized in both the ER and PSV of soybean cotyledons at a late stage of seed development. Cotyledons (220 mg bean) were immunostained with a combination of anti- β -conglycinin α' serum (green) and anti-BiP serum (red) (A), anti-glycinin acidic subunit serum (green) and anti-BiP serum (red) (B), anti-PDIS-1 serum (green) and anti-BiP serum (red) (C), or anti-PDIS-2 serum (green) and anti-BiP serum (red) (D). Asterisks indicate PSVs. Bars: 10 μ m.

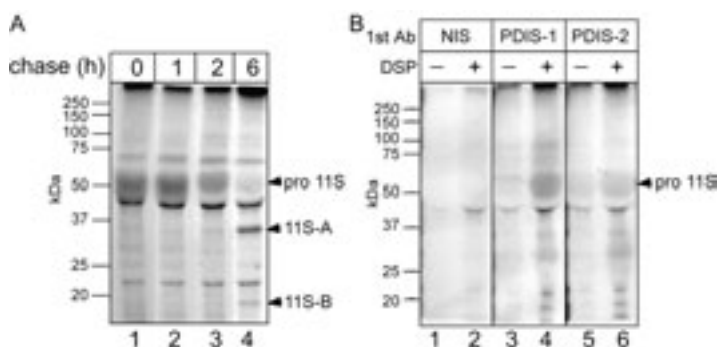


Fig. 5. Co-immunoprecipitation of PDIS-1 and proglycinin (pro 11S). (A) Time-dependent processing of proglycinin in the cotyledon. Cotyledons (150 mg beans) were labeled with a Pro-mix L- 35 S *in vitro* labeling mix for 15 min (lane 1) and then chased for 1 h (lane 2), 2 h (lane 3), or 6 h (lane 4) at 25°C. Extracts of the microsomes were subjected to immunoprecipitation with anti-glycinin acidic subunit serum. The proteins in the precipitate were separated by SDS-PAGE and detected by fluorography. Pro 11S, proglycinin; 11S-A, glycinin acidic subunits; 11S-B, glycinin basic subunits. (B) Co-immunoprecipitation experiments. Cotyledons were labeled with a Pro-mix L- 35 S *in vitro* labeling mix for 6 h. After labeling, microsomes were isolated and treated with (+) or without (-) DSP. Extracts of the microsomes were subjected to immunoprecipitation with non-immune serum (lanes 1 and 2), anti-PDIS-1 serum (lanes 3 and 4), or anti-PDIS-2 serum (lanes 5 and 6). The precipitates were treated with dithiothreitol and then subjected to second immunoprecipitation with anti-glycinin acidic subunit serum. The final precipitates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by fluorography.

り、いずれのPDIファミリーがグリシニンのフォールディングに機能しているかを明らかにした。子葉の新生たん白質を 35 Sメチオニンで1時間パルス標識するとグリシニンのうちプロセッシングを受ける前のプログリシニンだけが標識された。標識されたプログリシニンをチェイスすると経時的に酸性サブユニットと塩基性サブユニットにプロセッシングされた (Fig. 5A)。標識直後に会合しているたん白質をDSPで架橋したのち、各PDIファミリーに対する抗体で免疫沈降を行ったところ、GmPDIS-1およびGmPDIMがプログリシニンと共沈した (Fig. 5B, lane 4 and 6A, lane 4)。この結果は、小胞体内でこれらのPDIファミリーがプログリシニンと会合し、フォールディングを介助していることを示唆している。また、BiPとプログリシニンとの会合体も検出された (Fig. 6A lane 2)。さらに、小胞体内でのプログリシニンのフォールディング効率をdithiothreitol処理によって低下させた場合には、GmPDIL-1およびGmPDIL-2の会合も検出された。これらの結果から、プログリシニンのフォールディングには複数のPDIファミリーがBiPなどの分子シャペロンと共同しながら関わっていることが予想される。今後は、これらのたん白質から構成されるフォールディング複合体の解析や各分子シャペロン間相互作用、さらにはPDIファミリーの基質たん白質の構造特異性の解明が待たれる。

大豆PDIファミリーと β -コングリシニン α' との会合

糖たん白質であり、分子内ジスルフィド結合を持たない β -コングリシニンについても同様の免疫沈降実験を行った。その結果、GmPDIL-2が β -コングリシニン α' と共沈してくることが明らかとなった (Fig. 7A, lane 12)。さらに、 β -コングリシニン α' のフォールディング効率を低下させると予想されるツニカマイシンにより子葉を処理した場合には、GmPDIMおよび

GmPDIL-1と β -コングリシニン α' との会合も検出された (Fig. 7B, lanes 4, 6, 8)。すなわち、これらのPDIファミリーがジスルフィド形成酵素としてではなく分子シャペロンとしてジスルフィド形成を伴わないたん白質のフォールディングにも機能することが示唆された。リコンビナントたん白質には、*in vitro*での分子シャペロン活性があるという事実 (data not shown) もこれを強く支持している。

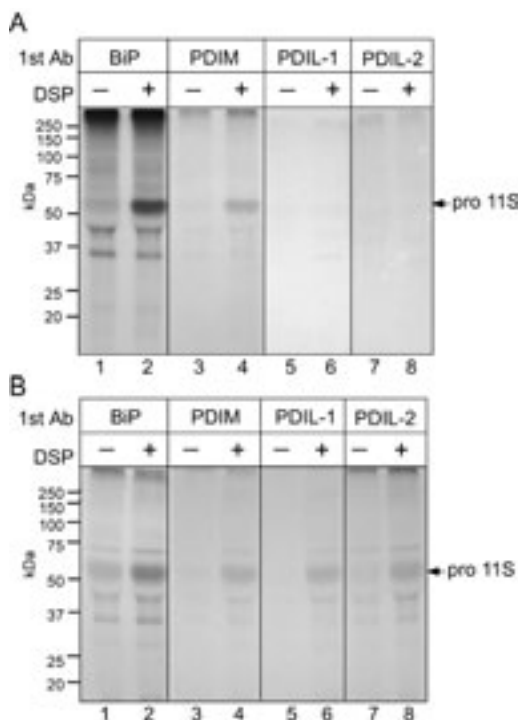


Fig. 6. Co-immunoprecipitation of PDIM, PDIL-1 or PDIL-2 and proglycinin (pro 11S). Cotyledons (150 mg) were pre-treated without (A) or with (B) dithiothreitol at 25°C for 3 h. Then, the cotyledons were labeled with a Pro-mix L-[³⁵S] *in vitro* labeling mix for 1 h. After labeling, microsomes were isolated and treated with (+) or without (-) DSP. Extracts of the microsomes were subjected to immunoprecipitation with anti-BiP serum (lanes 1 and 2), anti-GmPDIM serum (lanes 3 and 4), anti-PDIL-1 serum (lanes 5 and 6) or anti-PDIL-2 serum (lanes 7 and 8). The precipitates were treated with dithiothreitol and then subjected to second immunoprecipitation with anti-glycinin acidic subunit serum. The final precipitates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by fluorography.

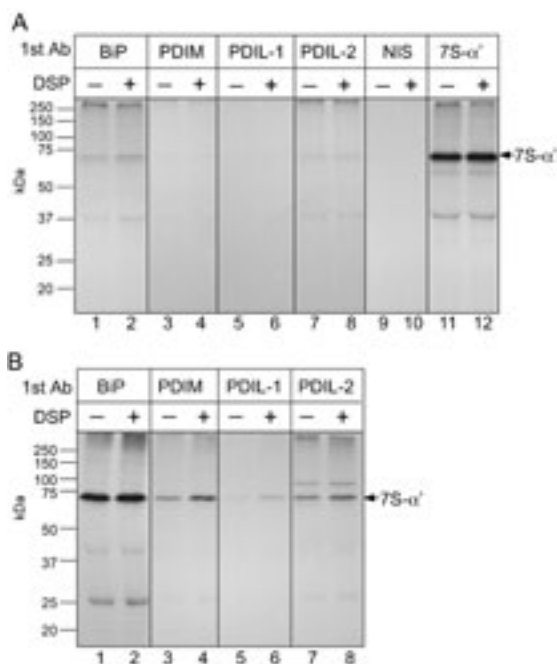


Fig. 7. Co-immunoprecipitation of PDIM, PDIL-1 or PDIL-2 and β -conglycinin α' . Cotyledons (100 mg) were pre-treated without (A) or with (B) tunicamycin at 25°C for 6 h. Then the cotyledons were labeled with a Pro-mix L-[³⁵S] *in vitro* labeling mix for 1 h. After labeling, microsomes were isolated and treated with (+) or without (-) DSP. Extracts of the microsomes were subjected to immunoprecipitation with anti-BiP serum (lanes 1 and 2), anti-GmPDIM serum (lanes 3 and 4), anti-PDIL-1 serum (lanes 5 and 6), anti-PDIL-2 serum (lanes 7 and 8), non-immuned serum (lanes 9 and 10) or anti- β -conglycinin α' (7S- α') (lanes 11 and 12). The precipitates were treated with dithiothreitol and then subjected to second immunoprecipitation with anti- β -conglycinin α' serum. The final precipitates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by fluorography.

要 約

筆者らが遺伝子をクローニングし同定した大豆PDIファミリー（GmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIL-3a, GmPDIL-3b）が、いずれも大豆子葉細胞の小胞体内腔に存在することを明らかにした。また、GmPDIS-1およびGmPDIS-2は貯蔵液胞にも貯蔵たん白質と共存することを明らかにした。たん白質の高次構造形成の際の分子シャペロンと基質たん白質との一過性の会合体を免疫沈降法により解析し、プログリシニンがGmPDIS-1, GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2およびBiPと会合することを明らかにした。また、GmPDIM, GmPDIL-1, GmPDIL-2およびBiPは β -コングリシニン α' とも会合することを見いだした。この結果から、PDIファミリーはジスルフィド結合形成を伴わないたん白質のフォールディングにも、分子シャペロンとして機能していることが示唆された。

文 献

- 1) Nielsen NC and Nam YW (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) Wadahama H, Kamauchi S, Ishimoto M, Kawata T and Urade R (2007): Protein disulfide isomerase family proteins involved in soybean protein biogenesis. *FEBS J*, **274**, 687-703.