# 大豆種子貯蔵たん白質の液胞選別輸送シグナルとレセプターとの相互作用の解析

丸山伸之*・内海　成

京都大学大学院農学研究科

# Analysis of Interactions between Vacuolar Sorting Determinants of Soybean Seed Storage Proteins and Receptors

Nobuyuki MARUYAMA and Shigeru UTSUMI

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

## ABSTRACT

*Glycine max* homologs of VSR and RMR were cloned from mRNA of soybean developing seeds. We constructed insect cell expression systems for their luminal domains (GmVSR and GmRMR) and examined an interaction between vacuolar sorting determinants of soybean seed storage proteins and their luminal domains. Glutathione *S*-transferase fused to 7S α' or 11S A1aB1b C-terminal 10 residues (GST+α'CT10 or GST+A1aB1bCT10) interacted with GmVSR. Kinetic analysis exhibited that GmVSR has a high affinity with GST+α'CT10 or GST+A1aB1bCT10 sufficient to function as a VSD. On the other hand, an addition of six glycine residues at the C-terminus of GST+α'CT10 or GST+A1aB1bCT10 abolished the interaction. GmVSR did not interact with recombinant A3B4 and recombinant A1aB1b fused to six glycine residues at its C-terminus expressed in *E. coli* (ProA3B4 and ProA1aB1b+6G), whereas it could bind to recombinant A1aB1b (ProA1aB1b). These results suggest that GmVSR can interact with ctVSD, but not ssVSD and psVSD. On the other hand, GmRMR did not interact with all types of VSD. Therefore, molecules except VSR and RMR might exist as receptors for ssVSD and psVSD. Further, we examined the interaction between GmVSR and ctVSD in detail. GST fused to C-terminal three residues of 7S α' (GST+GAFY) had a low affinity with GmVSR, whereas GST fused to C-terminal four residues (GST+RAFY) had a high affinity. However, GST fused to three residues within C-terminal four residues (GST+RGFY, GST+RAGY and GST+RAFG) except C-terminal three residues (GST+GAFY) exhibited a high affinity with GmVSR. These results suggest that a basic residue in addition to a hydrophobic residue can contribute to the interaction between ctVSD

*〒611-0011　宇治市五ヶ庄官有地

and GmVSR. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 51-55, 2008.

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

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．種子貯蔵たん白質は，自身の持つ選別輸送シグナル（Vacuolar sorting determinant，VSD）がレセプターに認識されることにより，液胞へ輸送される．植物の液胞たん白質のVSDは，NPIRL（アミノ酸一文字表記）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）に分類されている．我々は，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（7S）のC末端10残基にVSDが存在することを明らかにするとともに，ctVSDとssVSDと両タイプのシグナルが共存していることを示した[1~3]．一方，大豆11Sグロブリン（11S）を欠失した大豆系統を利用して11Sの選別輸送シグナルの解析を行い，主要なサブユニットのひとつであるA1aB1bおよびA3B4にはpsVSDが存在すること，さらにA1aB1bにはctVSDも存在することを明らかにした[4]．

アラビドプシスの遺伝子欠失体の解析と葉肉細胞のプロトプラストを用いた解析などから，Vacuolar sorting receptor（VSR）とReceptor homology region transmembrane domain ring H2 protein（RMR）と呼ばれる2種類の膜たん白質がたん白質貯蔵液胞への選別輸送シグナルに対するレセプターの候補として考えられている[5~8]．しかし，実際にどちらのレセプターが種子細胞内でどの型の選別輸送シグナルの認識に機能しているのかは明確になっていない．本研究では，レセプターによる大豆種子貯蔵たん白質の選別輸送シグナル認識機構を解明するために，VSRおよびRMRの大豆ホモログと，7Sおよび11Sの選別輸送シグナルとの相互作用について解析を行った．

## 方　　法

### 大豆VSRおよびRMRのクローニング

大豆およびミヤコグサのEST情報を基に，アラビドプシスVSRおよびRMRの大豆ホモログに対するプライマーを設計し，大豆登熟期種子より調製したmRNAを用いてRT-PCRにより両者のcDNAをクローニングした．

### 組み換え型大豆VSRおよびRMRの調製

クローニングした大豆VSRおよびRMRのcDNAを用いて，両者の内腔領域（シグナルが結合する領域）のC末端にヒスチジンタグを付加した組み換えたん白質（GmVSRおよびGmRMR）に対する昆虫細胞発現系を構築し，ヒスチジンタグに対するアフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した．

### プルダウンアッセイ法

11S A1aB1bおよび7S α'のC末端10残基とグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合たん白質（GST＋A1aB1bCT10，GST＋α'CT10）を結合させたグルタチオンセファロースとGmVSRとを混合し，0.15 M塩化ナトリウムを含むHEPES緩衝液で洗浄後，SDS-PAGEでGmVSRとグルタチオンセファロースとの結合を解析した．11S A1aB1bおよび7S α'のC末端10残基に6残基のグリシン残基を付加したものとグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合たん白質（GST＋A1aB1bCT10＋6G，GST＋α'CT10＋6G）とGmVSRとの相互作用についても同様に解析した．

### 表面プラズモン共鳴測定による相互作用の解析

センサーチップCM5にGmVSRおよびGmRMRを結合させ，表面プラズモン共鳴測定装置BIACORE2000（BIACORE社）を用いて，GST＋A1aB1bCT10，GST＋α'CT10，GST＋A1aB1bCT10＋6G，GST＋α'CT10＋6Gとの相互作用を解析した．大腸菌発現系を用いて11S A1aB1b，11S A1aB1bのC末端に6個のグリシン残基を付加したもの，11S A3B4（ProA1aB1b，ProA1aB1b＋6G，ProA3B4）を調製し，それらとGmVSRおよびGmRMRとの相互作用について解析した．

## 結 果 と 考 察

### GmVSRはctVSDと結合する

7S α'および11S A1aB1bのC末端10残基とGSTとの融合たん白質（GST-α'CT10およびGST-A1aB1bCT10）とGmVSRとの相互作用を，グルタチオンセファロースを用いたプルダウンアッセイ法により解析した（Fig. 1）．グルタチオンセファロースの洗浄後（Fig. 1，lane W），GmVSRはGST-α'CT10およびGST-A1aB1bCT10とともに回収されたことから（Fig. 1，lane B），GmVSRは7S

α'および11S A1aB1bのC末端10残基と相互作用することが示唆された．一方，両者のC末端に6残基のグリシン残基を付加したもの（GST＋α'CT10＋6GおよびGST＋A1aB1b＋6G）との結合はほとんど見られなかった．大豆種子において，7S α'のC末端部に存在するssVSDは6残基のグリシン残基を付加してもVSDとして機能する[3]．このことから，GmVSRが7S α'のssVSDを認識せずに，7S α'および11S A1aB1bのctVSDを認識することを示唆している．

さらに，表面プラズモン共鳴測定装置を用いて両者の相互作用を解析した．GmVSRをセンサーチップに固定し，GST-α'CT10（Fig. 2A）およびGST-A1aB1bCT10（Fig. 2B）との親和性を解析したところ，両者ともに50～150 nMの平衡定数を示し，GmVSRがctVSDに対するレセプターとして機能しうる高い親和性をもつことが示された．また，両者のC末端に6残基のグリシン残基を付加したものでは（GST＋α'CT10＋6GおよびGST＋A1aB1b＋6G），プロダウンアッセイ法での結果と同様にGmVSRとは結合がみられなくなった（Figs. 2A，B）．さらに，大腸菌発現系により調製した11S A1aB1b（ProA1aB1b），11S A1aB1bのC末端に6残基のグリシンを付加したもの（ProA1aB1b＋6G），11S A3B4（ProA3B4）とGmVSRと結合を解析したところ，ProA1aB1bとは高い親和性を示したが，ProA1aB1b＋6GおよびProA3B4とは結合しなかった（Fig. 3）．11S A3B4は11S A1aB1bのctVSDに相同する配列が存在せず，C末端部ではプロリン残基のみが分子表面に露出しており，ctVSDは存在せずにpsVSDが液胞輸送に機能している[4]．そのため，GmVSRはssVSDおよびpsVSDとは親和性を示さないが，ctVSDと高い親和性を示すと考えられる．

**GmRMRは全てのVSDと結合しない**

表面プラズモン共鳴測定により，GmRMRと7Sおよび11Sとの相互作用を解析した．GmRMRはGmVSRとは異なり，GST＋α'CT10およびGST＋A1aB1bCT10と

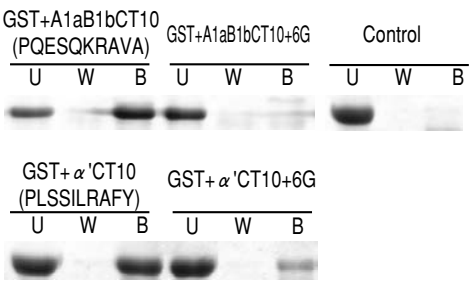


Fig. 1. GST pulldown assay for GmVSR. Purified GmVSR were incubated with GST fused to C-terminal peptides bound to glutathione resin. GST+A1aB1bCT10, GST fused to 11S A1aB1b C-terminal 10 residues; GST+α'CT10, GST fused to 7S α' C-terminal 10 residues; GST+A1aB1bCT10+6G, GST fused to 11S A1aB1b C-terminal 10 residues and six glycine residues; GST+α'CT10+6G, GST fused to 7S α' C-terminal 10 residues and six glycine residues; Control, GST. U, Unbound fraction; W, Washed fraction; B, Bound fraction.

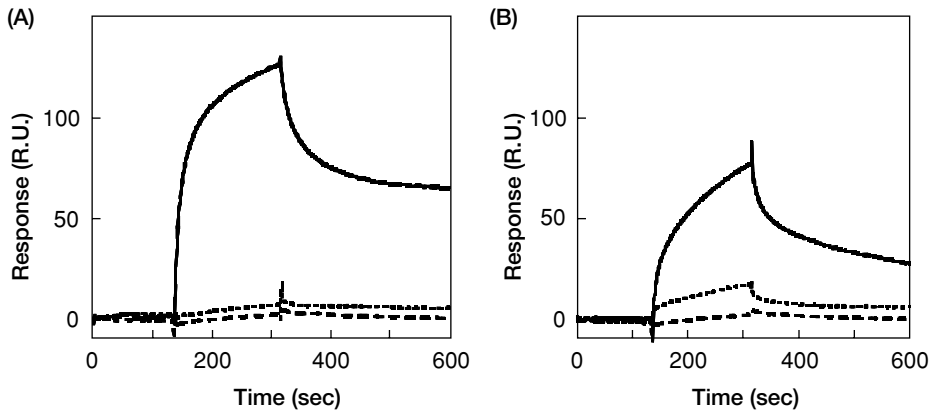


Fig. 2. Surface plasmon resonance sensorgrams for interactions of GmVSR with GST fused to C-terminal peptide of 7S or 11S. (A) GST+A1aB1bCT10 (solid line), GST+A1aB1bCT10+6G (dotted line) and control (dashed line). (B) GST+α'CT10 (solid line), GST+α'CT10+6G (dotted line) and control (dashed line).

ほとんど結合しなかった（Fig. 4A）．さらに，ProA1aB1b，ProA1aB1b＋6G，ProA3B4との相互作用を解析したところ，GST＋α'CT10およびGST＋A1aB1bCT10と同様に，顕著な相互作用は観察されなかった（Fig. 4B）．

**GmVSRとctVSDとの相互作用には塩基性残基が寄与できる**

7S α'のC末端部の配列をもちいて，GmVSRとctVSDとの相互作用に寄与する残基について解析した（Table 1）．C末端4残基とGSTとの融合たん白質（GST＋RAFY）は高い親和性を示した．GST＋RAFYのC末端4残基の一部をグリシン残基に置換すると，7S α'のC末端3残基以下（GST＋GAFY，GST＋GGFY，GST＋GGGY）では低い親和性しか示さなかった．さらに，C末端4残基中の3残基の様々な組み合わせ（GST＋RGFY，GST＋RAGY，GST＋RAFG）についてGmVSRとの結合を解析したところ，高い親和性がみられたが，C末端4残基中の2残基では低い親和性を示した．以上の結果から，GmVSRとのctVSDとの相互作用に，疎水性残基に加えて，塩基性残基が寄与できることが示唆された．

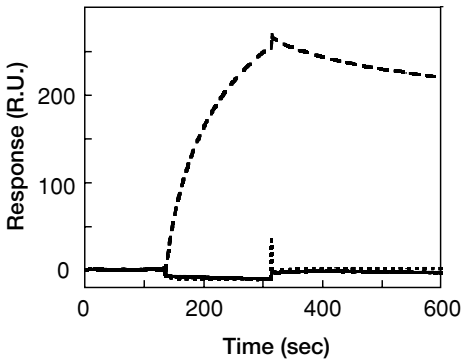


Fig. 3. Surface plasmon resonance sensorgrams for interactions of GmVSR with Pro11S. ProA1aB1b (dashed line), ProA1aB1b+6G (solid line) and ProA3B4 (dotted line).

Table 1. Affinity of GmVSR with 7S α' C-terminal peptides

| Molecule | $K_d$ | Molecule | $K_d$ |
|---|---|---|---|
| GST+RAFY | 58 nM | GST+RGFY | 146 nM |
| GST+GAFY | >1 μM | GST+RAGY | 173 nM |
| GST+GGFY | >1 μM | GST+RAFG | 141 nM |
| GST+GGGY | >1 μM | GST+RGFG | >1 μM |
| | | GST+RGGY | >1 μM |
| | | GST+GAFG | >1 μM |

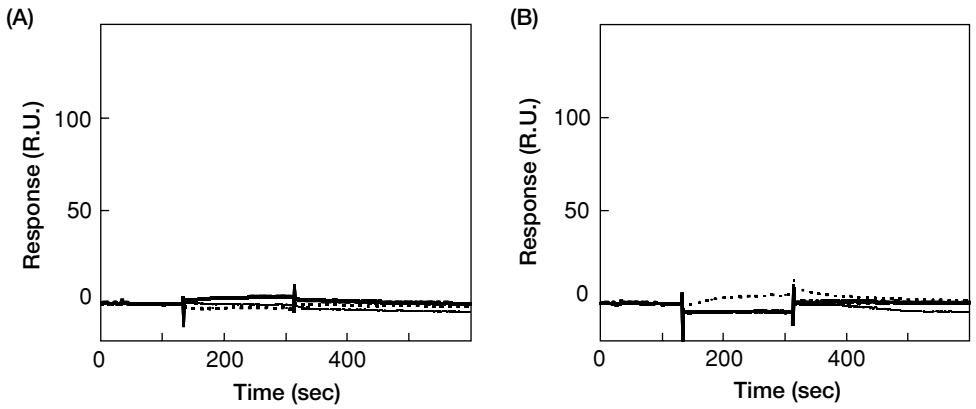


Fig. 4. Surface plasmon resonance sensorgrams for interactions of GmRMR with 7S and 11S. (A) GST+α'CT10 (bold line), GST+A1aB1bCT10 (thin line) and Control (dotted line). (B) ProA1aB1b (dotted line), ProA1aB1b+6G (thin line) and ProA3B4 (bold line).

## 要　　約

大豆登熟期種子よりVSRおよびRMRの大豆ホモログをクローニングし，両者の内腔領域の組み換えたん白質（GmVSRおよびGmRMR）と大豆種子貯蔵たん白質の選別輸送シグナルとの相互作用を解析した．グルタチオンセファロースを用いたプルダウンアッセイ法により，7S α'および11S A1aB1bのC末端10残基とGmVSRとが相互作用することが示唆された．表面プラズモン共鳴測定により，その相互作用はレセプターとして機能しうる高い親和性をもつことが明らかとなった．C末端10残基に6残基のグリシン残基を付加することにより，7S α'および11S A1aB1bのC末端10残基とGmVSRとの相互作用はほとんど見られなくなったこと，GmVSRと11S A3B4とは相互作用しないことから，GmVSRはctVSDと相互作用するが，ssVSDおよびpsVSDとは相互作用しないと考えられた．一方，GmRMRはすべてのタイプのVSDと相互作用をしめさず，psVSDおよびssVSDを認識するVSR，RMR以外の分子が存在する可能性が示唆された．さらに，7S α'のC末端部の配列をもとに，ctVSDとGmVSRとの相互作用を詳細に解析した．疎水性残基のみよりなるC末端3残基では親和性を示さなかったが，疎水性残基とともに塩基性残基が存在するC末端4残基中の3残基では高い親和性を示した．以上のことから，塩基性残基が両者の相互作用に寄与しうることが示唆された．


## 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) Nishizawa K, Maruyama N and Utsumi S (2006): The C-terminal region of α' subunit of soybean β-conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Mol Biol*, **62**, 111-125.
4) Maruyama N, Leong MC, Tatsuhara M, Sawada M, Ishimoto M and Utsumi S (2006): Multiple vacuolar sorting determinant exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell*, **18**, 1253-1273.
5) Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M and Hara-Nishimura I (2003): Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 16095-16100.
6) Park M, Lee D, Lee GJ and Hwang I (2005): AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol*, **170**, 757-767.
7) Park JH, Oufattole M and Rogers JC (2006): Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Sci*, **172**, 728-745.
8) Hinz G, Colanesi S, Hillmer S, Rogers JC and Robinson DG (2007): Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing *Arabidopsis* embryos. *Traffic*, **9**, 1452-1464.