

種子を利用した有用物質生産系に関わる  
ダイズタンパク質の研究

藤原 圭吾

2014



## 目次

緒論 .....	1
第一章　ダイズにおける生理機能性ペプチド挿入型グリシニンの解析 .....	10
第二章　ダイズ登熟種子で発現するプロテアーゼ GMCP3 の解析 .....	22
第三章　ダイズ basic 7S globulin の湯浴溶出機構の解析 .....	43
総括 .....	58
謝辞 .....	60
論文目録 .....	61

## 略語

A $\beta$	amyloid- $\beta$
Ac-YVAD-MCA	acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amide-4-methylcoumaryl
AMC	7-amide-4-methylcoumarin
AP	aspartic proteinase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
Bg7S	basic 7S globulin
BMGY	buffered glycerol-complex medium
BMMY	buffered methanol-complex medium
Boc-VLK-MCA	t-butyloxycarbonyl-Val-Leu-Lys-7-amide-4-methylcoumaryl
BSA	bovine serum albumin
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
DAF	days after flowering
DAI	days after imbibition
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PNGase F	peptide: <i>N</i> -glycosidase F
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered saline
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VPE	vacuolar processing enzyme
YPDS	yeast extract peptone dextrose medium with sorbitol
Z-AAN-MCA	benzyloxycarbonyl-Ala-Ala-Asn-7-amide-4-methylcoumaryl
Z-FR-MCA	benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amide-4-methylcoumaryl

## 緒論

タンパク質には、抗体やワクチンや成長ホルモンなどの医療用タンパク質・ペプチドや、食品加工・工業用の酵素のように産業的な価値がある機能を果たすものがある。これらの有用タンパク質の生産手法は、かつては微生物や動植物などの生体材料から分離・精製が行われてきたが、近年では微生物・哺乳動物細胞を用いた組換え型タンパク質の大量生産技術が発展している。近年、産業的タンパク質の市場規模は拡大しており、今後はより低コストで高効率なタンパク質の大量生産技術の確立が望まれる。

植物を用いて組換え型の医療用タンパク質を生産する技術が研究されている [1,2]。これは、微生物や哺乳動物細胞を用いたタンパク質発現系と比較して植物を用いた発現系には以下のような利点があるためである。まず、植物は従来の農業技術で栽培できるために、特殊な培養装置が必要でなく、経済面で非常に有利である。また、植物は真核生物であり、抗体のような複数ドメインを持つ構造が複雑なタンパク質をフォールディングする能力が高く、タンパク質複合体を形成することができる。そして、医療用タンパク質に混入してはいけない哺乳類動物に対する病原体が植物には感染しないため、安全性が高い。さらに、植物の種子を有用タンパク質の蓄積部位として用いると、生合成された有用タンパク質を即座に単離する必要がなく、そのまま常温で安定して保存し遠隔地へ輸送できる。これらの利点を生かすため、植物種子を用いて、抗体、ワクチン、生理機能性ペプチドなどの生産が試みられている [3,4]。

ダイズは無胚乳種子であり、植物種子の中でもタンパク質含量が極めて高く、乾燥重量に対して 35-40%のタンパク質を蓄積する。且つダイズは生産量が高いため有用タンパク質の発現ツールとして適しており、近年利用されている [5-7]。ダイズ種子で有用タンパク質の高生産を目指す場合、二つの方策が考えられる。その一つ目は、元来ダイズ種子に高蓄積している種子貯蔵タンパク質を遺伝子組換え技術により改変し、高品質化することである。種子貯蔵タンパク質は、発芽時に分解され窒素供給源として用いられるために登熟種子で高発現し種子に蓄積しているタンパク質である。特に主要な種子貯蔵タンパク質は 11S globulin (グリシニン) および 7S globulin ( $\beta$ -コングリシニン) であり、それぞれ種子タンパク質の約 30%と約 20%を占める [8]。これらの種子貯蔵タンパク質の蓄積機構を応用できると、有用タンパク質の高生産・高蓄積が可能になると考えられる。ただし、種子貯蔵タンパク質は子葉細胞内に蓄積するため、精製する場合には種子を構成するその他のタンパク質や細胞内に豊富に存在する脂質から有用タンパク質を分離する必要がある。この問題を軽減できる二つ目の方策として、有用タンパク質を細胞外に分泌させて蓄積させ、種子外へ高純度で溶出させる手法を考えた。ダイズ種子の細胞外

に蓄積するタンパク質である basic 7S globulin (Bg7S) は、ダイズ種子をそのまま約 50 °C の溶液に浸漬する湯浴処理を行うと溶液中に溶出し [9], 溶出したタンパク質の約 70%を占めることがある。その溶出機序を応用できると、有用タンパク質を高純度で種子外へ溶出させる発現系が構築できると期待される。これらの二つの方策によるダイズ種子を用いたタンパク質発現系を実現するためには、種子貯蔵タンパク質のグリシニンや  $\beta$ -コングリシニンおよび Bg7S の構造形成・品質管理・輸送および蓄積を理解し応用することが肝要である。

グリシニンは 5 種のサブユニットにより構成される六量体の種子貯蔵タンパク質である [10]。5 種のサブユニットは 2 グループに分類される (group I: A1aB1b, A2B1a, A1bB2; group II: A3B4, A5A4B3)。グリシニンはシグナル配列を含むプレプロタンパク質として粗面小胞体で生合成される。続いてシグナル配列が共翻訳的に除去されて、ヘテロ三量体のプロ型グリシニンを形成する。その後プロ型グリシニンはタンパク質貯蔵液胞へ選別輸送され、アスパラギン-グリシニン残基間で vacuolar processing enzyme (VPE) によりプロセッシングされ、ジスルフィド結合により架橋された酸性鎖 (約 30–35 kDa) と塩基性鎖 (約 20 kDa) にわかれる。VPE によりプロセッシングされることでグリシニンの立体構造が変化し、分子会合を起こして六量体の成熟型を形成する [11]。A1aB1b のプロ型 (ホモ三量体) と A3B4 の成熟型 (ホモ六量体) の立体構造が解明されており、単量体の構造はコアドメインに 2 つの  $\beta$ -barrel と 2 つの extended helix domains で構成される [12,13]。それぞれの立体構造から構造可変領域が見いだされており、A1aB1b については 5 つの可変領域がある。可変領域は定まった構造をとらないため、アミノ酸配列の変換を比較的許容すると考えられる。したがって、有用ペプチドの挿入部位として可変領域が適していると考えられる。また、もう一つのダイズ主要種子貯蔵タンパク質である  $\beta$ -コングリシニンは 3 種のサブユニット ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ) で構成される三量体の貯蔵タンパク質である [10]。 $\beta$ -コングリシニンもシグナル配列を有し、粗面小胞体で生合成されてヘテロ三量体を形成し、タンパク質貯蔵液胞へと輸送される。また、 $\alpha$  と  $\alpha'$  サブユニットはシグナル配列と成熟型領域の間にプロペプチド領域を持つ。 $\alpha$  と  $\alpha'$  サブユニットのプロペプチドは液胞へ輸送されたのちにプロテアーゼによって除去されると考えられている。プロセッシングされる位置は、リシン-バリン残基間であるが、そのプロセッシングを担うプロテアーゼは不明である。 $\alpha$  と  $\alpha'$  サブユニットはさらに、全サブユニットに共通するコア領域の N 末端側に extension 領域を持つ。 $\beta$ -コングリシニンの  $\beta$  サブユニットは立体構造が解明されており [14]、 $\alpha$  と  $\alpha'$  サブユニットの extension 領域は分子表面に露出していると考えられ、A1aB1b の可変領域と同様に有用ペプチドの挿入に適していると考えられている [15]。

種子貯蔵タンパク質が蓄積するタンパク質貯蔵液胞には、種子貯蔵タンパク質の成熟化に関わるプロテアーゼが局在する。登熟種子の液胞プロテアーゼとして、VPEs が報告されている。VPEs はシロイヌナズナ、イネ、ヒマ、ダイズを含む種々の植物種の種子で発現が確認されており、グリシニンを含む 11S globulin やその他の種子貯蔵タンパク質のプロセッシングを担う [16,17]。シロイヌナズナの VPE は  $\alpha$  VPE,  $\beta$  VPE,  $\gamma$  VPE,  $\delta$  VPE の 4 遺伝子が存在し、 $\alpha/\gamma$  VPE は栄養組織、 $\beta$  VPE は種子の子葉、 $\delta$  VPE は種皮で主に発現するが、種子貯蔵タンパク質のプロセッシングにおいては  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  VPE が機能的に重複することが示されている [16]。また、栄養組織で発現する  $\gamma$  VPE は植物のプログラム細胞死において重要な役割を果たす [18]。ダイズにおいては *soybean VPE1 (sVPE1)* の cDNA が種子から得られ、タンパク質貯蔵液胞から sVPE1 が検出されることが示されている [19]。VPE はシグナル配列を含むプレプロプロテアーゼとして生合成され、プロ型の VPE は N 末端と C 末端の両末端にプロドメインを持ち、C 末端側のプロドメインが分子内のペプチダーゼ活性を抑制しており、酸性条件下でプロドメインの切断による自己活性化を示す [20]。VPE はヒトの legumain と同様にシステインプロテアーゼの C13 ファミリーに属する。これらの基質特異性は共通しており、主に酸性条件下でアスパラギン残基の C 末端側のペプチド結合を切断する。また、legumain はより低い酸性条件下でアスパラギン酸残基の C 末端側を切断することが示されており [21]、植物の VPE もアスパラギン酸残基の C 末端側を切断することがわかっている [20]。legumain の立体構造が近年解明され、カスパーゼ様の構造をとることが明らかとなった [22]。また、VPE とともに phytepsin-like aspartic proteinases (APs) もオオムギやシロイヌナズナ、ダイズを含む種々の植物種子で発現するプロテアーゼであり、A1 ファミリーのアスパラギン酸プロテアーゼに属する [23]。シロイヌナズナには *AtAP A1*, *AtAP A2*, *AtAP A3* の 3 遺伝子が存在し、それぞれ異なる発現動態を示す [24]。シロイヌナズナにおいては VPE とともに 2S napin を切断すると考えられており [17]、*AtAP A1* と  $\beta$ -VPE が液胞前区画から液胞において貯蔵タンパク質のプロセッシングを行うと考えられている [25]。ダイズにおいても複数の AP 遺伝子が存在し、*soyAP1* と *soyAP2* が異なる発現動態を示し、*soyAP1* と *soyAP2* は液胞へ輸送されることが実証されている [26,27]。APs はシグナル配列を含む一本鎖のプレプロプロテアーゼとして生合成され、ジスルフィド結合により架橋された重鎖と軽鎖で構成される成熟型プロテアーゼになる [23]。組換え型 *AtAP A1* は自己活性化により 32 kDa の重鎖と 16 kDa の軽鎖になることが明らかになっている [28]。APs の基質特異性としては、疎水性アミノ酸残基間あるいは疎水性アミノ酸残基の C 末端側を切断する傾向が明らかとなっている [23]。さらに、C13 ファミリーの VPE や A1 ファミリーの APs 以外のプロテアーゼとし

て、C1 ファミリーに属するシステインプロテアーゼと推定される遺伝子が登熟種子で発現することが数種の植物で示されている。C1 ファミリーに属すると推定されるダイズの *GMCP3* は登熟種子で発現が上昇し、発芽後に減少することが mRNA レベルで示されている [29]。ヤハズエンドウ (*Vicia sativa*) の *VsCPR4* も同様の発現動態を示すことがタンパク質レベルでわかっており、液胞由来のプロテインボディに局在することが示されている [30]。VsCPR4 は、乾燥種子の吸水直後に貯蔵タンパク質の分解を開始する役割を果たすと考えられている。また、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の *PvCP4* も登熟種子で発現し、登熟期に増加するアブシジン酸により *PvCP4* の発現が制御されることが実証されている [31]。これらの *GMCP3*, *VsCPR4*, *PvCP4* のアミノ酸配列は相同性が高いことが示されているが [32]、プロテアーゼ活性や登熟種子における生理的役割は不明である。これらの C1 ファミリーに属するプロテアーゼは、パパイン様のシステインプロテアーゼである。一般的にパパイン様のプロテアーゼはシグナル配列を含むプレプロプロテアーゼとして粗面小胞体で合成される [33]。シグナル配列が除去されたプロプロテアーゼは、N 末端側のプロドメインと C 末端側のプロテアーゼドメインから構成される。プロドメインはプロプロテアーゼの立体構造を安定させるとともに分子内のプロテアーゼ活性を抑制する機能を持つことがわかっており、プロセシング機構によりプロ領域が除去されることで成熟型プロテアーゼとなる [34]。成熟型のプロテアーゼはパパインフォールドと呼ばれる構造をとる。パパインフォールドは 3 つの  $\alpha$ -ヘリックスからなる left domain と  $\beta$ -バレルのある right domain で構成され、活性中心のシステイン残基およびヒスチジン残基が存在する活性部位 (active site cleft) が形成される [35]。タンパク質貯蔵液胞において有用タンパク質を大量蓄積させる場合、登熟種子で発現し液胞に存在するプロテアーゼは問題となり得るため、VPEs や APs およびその他のプロテアーゼの活性の理解は重要である。

basic 7S globulin (Bg7S) は、ダイズ種子の子葉細胞に蓄積し、グリシニンや  $\beta$ -コングリシニンと異なり細胞外に存在するタンパク質である [36]。Bg7S はシグナル配列を含むプレプロ型 Bg7S として粗面小胞体で生合成され分泌される。シグナル配列が除去されたプロ型 Bg7S はセリン-セリン残基間でプロセシングされ、ジスルフィド結合により架橋された  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖により構成される成熟型 Bg7S となる [37,38]。成熟型の Bg7S は四量体を形成し、その立体構造が近年解明された [39,40]。Bg7S をコードする遺伝子はダイズゲノム上に、*Bg7S1* (GenBank accession no. BAA03681; Phytozome Glyma03g39940) と *Bg7S2* (BAB91077, Glyma19g42490) の 2 遺伝子があり、アミノ酸配列で相同性 94%を示す。Bg7S はアミノ酸配列からアスパラギン酸プロテアーゼに由来すると推定されているが、



プロテアーゼ活性中心を失っている。また、トマトの xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase (XEGIP) のホモログタンパク質として考えられているが、endo- $\beta$ -glucanase に対する阻害活性が検出されておらず、依然として生理的役割は未知である [40]。Bg7S は、ダイズ種子の湯浴処理により新規に生合成されて溶出する [9,41]。Bg7S1 遺伝子の上流配列には熱誘導性シスエレメントである熱ショックエレメント様の配列が存在することがわかっている [38]。アズキやルピン等の種子からも、湯浴処理により Bg7S のホモログタンパク質が溶出することがわかっている [42,43]。しかし、湯浴溶出の経路や理由は不明である。

上述のような植物細胞の内在性タンパク質の理解に伴い、有用タンパク質発現系への応用が試みられている。例えば、種子貯蔵タンパク質をキャリアタンパク質として利用し、有用ペプチドを種子で蓄積させる研究がなされている。有用ペプチドはそれ単独で種子に蓄積させようとするとう分解されやすい。この分解は小胞体におけるタンパク質の品質管理機構によるものと考えられている [44]。一方で、キャリアタンパク質を用い、その配列内に有用ペプチド配列を挿入して発現させると安定して種子に蓄積することがわかっている。特にキャリアタンパク質として種子貯蔵タンパク質を用いると、構造形成・選別輸送・安定性の面で有効であると考えられる。そのように有用ペプチドを貯蔵タンパク質の可変領域に挿入し、ダイズやイネで蓄積させた例がある [45-47]。また、種子貯蔵タンパク質を欠失した種子は外来タンパク質を蓄積しやすいことがシロイヌナズナ、イネ、ダイズなどで明らかになっている [48-50]。そのため、外来タンパク質を高蓄積させるためのダイズ品種として、種子貯蔵タンパク質のグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンの全サブユニットを欠失した系統である QF2 や、QF2 の形質転換効率を改善した JQ が作出された [51,52]。また、植物培養細胞を用いて組換え型タンパク質を安定して発現させるために、C1 ファミリーに属するプロテアーゼや APs を含む内在性プロテアーゼの発現を抑制した BY-2 細胞系が作出され、実際に発現した抗体の分解が抑制されることが示された [53]。

ダイズ種子による有用タンパク質発現系において高蓄積を達成するためには、上記のような種子貯蔵タンパク質をはじめとするタンパク質、あるいはその蓄積に影響するプロテアーゼの活性などの基礎的な理解がさらに必要である。本研究は、ダイズ種子を用いたタンパク質発現系の基盤確立に貢献するため、ダイズ種子タンパク質に対する研究を行った。まず第一章では、アルツハイマー病に対するワクチンペプチドをモデルペプチドとし、そのペプチド配列を挿入したグリシニンを発現するダイズを作出し、*in vivo*でのグリシニンの蓄積に対する影響を分析した。続いて第二章では、タンパク質貯蔵液胞において有用タンパク質の蓄積に影響を与え得る新規な登熟種子の液胞プロテアーゼに対する研究を行った。

第三章では、ダイズ種子から有用タンパク質を特異的に溶出させる発現系の構築を目指し、その基盤となり得るタンパク質 Bg7S の湯浴溶出機構および溶出に関わる形質に対する研究を行った。

## 引用文献

1. Daniell H, Singh ND, Mason H & Streatfield SJ (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* **14**, 669–679.
2. Orzáez D, Granell A & Blázquez MA (2009) Manufacturing antibodies in the plant cell. *Biotechnol J* **4**, 1712–1724.
3. Khan I, Twyman RM, Arcalis E & Stoger E (2012) Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins. *Biotechnol J* **7**, 1099–1108.
4. Wakasa Y & Takaiwa F (2013) The use of rice seeds to produce human pharmaceuticals for oral therapy. *Biotechnol J* **8**, 1133–1143.
5. Cunha NB, Murad AM, Cipriano TM, Araújo ACG, Aragão FJL, Leite A, Vianna GR, McPhee TR, Souza GHMF, Waters MJ & Rech EL (2011) Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* **20**, 811–826.
6. Cunha NB, Murad AM, Ramos GL, Maranhão AQ, Brígido MM, Araújo ACG, Lacorte C, Aragão FJL, Covas DT, Fontes AM, Souza GHMF, Vianna GR & Rech EL (2011) Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* **20**, 841–855.
7. Moravec T, Schmidt MA, Herman EM & Woodford-Thomas T (2007) Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* **25**, 1647–1657.
8. Iwabuchi S & Yamauchi F (1987) Determination of glycinin and  $\beta$ -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J Agric Food Chem* **35**, 200–205.
9. Hirano H, Kagawa H & Okubo K (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* **31**, 731–735.
10. Utsumi, S., Matsumura, Y. & Mori, T. (1997) Structure-function relationships of soy proteins. In *Food proteins and their applications* (Damodaran, S. & Paraf, A., eds), pp. 257–291, Marcel Dekker, New York.
11. Jung R, Scott MP, Nam YW, Beaman TW, Bassüner R, Saalbach I, Müntz K & Nielsen NC (1998) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell* **10**, 343–357.
12. Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B & Utsumi S (2001) Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol* **305**, 291–305.
13. Adachi M, Kanamori J, Masuda T, Yagasaki K, Kitamura K, Mikami B & Utsumi S (2003) Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homo-hexamer. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 7395–7400.
14. Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, Yagasaki K, Kohno M, Takenaka Y, Okuda E, Nakagawa S, Mikami B & Utsumi S (2001) Crystal structures of recombinant and native soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$  homotrimers. *Eur J Biochem* **268**, 3595–3604.
15. Maruyama N, Maruyama Y, Tsuruki T, Okuda E, Yoshikawa M & Utsumi S (2003) Creation of soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$

- with strong phagocytosis-stimulating activity. *Biochim Biophys Acta* **1648**, 99–104.
16. Hara-Nishimura I, Shimada T, Hiraiwa N & Nishimura M (1995) Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol* **145**, 632–640.
  17. Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 32292–32299.
  18. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M & Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 404–408.
  19. Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M & Hara-Nishimura I (1994) Vacuolar processing enzyme of soybean that converts proproteins to the corresponding mature forms. *Plant Cell Physiol* **35**, 713–718.
  20. Kuroyanagi M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol* **43**, 143–151.
  21. Dall E & Brandstetter H (2012) Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 24–31.
  22. Dall E & Brandstetter H (2013) Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**, 10940–10945.
  23. Jukka K, Alexander W & Alexander Z (2004) Phytapsin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds), pp. 77–84. Elsevier Academic Press, London.
  24. Chen X, Pfeil JE & Gal S (2002) The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed. *Eur J Biochem* **269**, 4675–4684.
  25. Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R & Staehelin LA (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* **18**, 2567–2581.
  26. Terauchi K, Asakura T, Nishizawa NK, Matsumoto I & Abe K (2004) Characterization of the genes for two soybean aspartic proteinases and analysis of their different tissue-dependent expression. *Planta* **218**, 947–957.
  27. Terauchi K, Asakura T, Ueda H, Tamura T, Tamura K, Matsumoto I, Misaka T, Hara-Nishimura I & Abe K (2006) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J Plant Physiol* **163**, 856–862.
  28. Mazonra-Manzano MA & Yada RY (2008) Expression and characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **69**, 2439–2448.
  29. Nong VH, Becker C & Müntz K (1995) cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 435–438.
  30. Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A & Tiedemann J (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* **52**, 1741–1752.
  31. Yamauchi D (2007) Hormonal regulation of the expression of cysteine proteinase genes in germinated cotyledons of common bean seeds. *Plant Biotechnol* **24**, 231–235.
  32. Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Alonso DL & García-Maroto F (2010) A distinct subfamily of papain-like

- cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J Plant Physiol* **167**, 1101–1108.
33. Beers EP, Jones AM & Dickerman AW (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**, 43–58.
  34. Wiederanders B (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol* **50**, 691–713.
  35. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B & Turk D (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 68–88.
  36. Nishizawa N, Mori S, Watanabe Y & Hirano H (1994) Ultrastructural localization of the basic 7S globulin in soybean (*Glycine max*) cotyledons. *Plant Cell Physiol* **35**, 1079–1085.
  37. Kagawa H & Hirano H (1989) Sequence of a cDNA encoding soybean basic 7S globulin. *Nucleic Acids Res* **17**, 8868.
  38. Watanabe Y & Hirano H (1994) Nucleotide sequence of the basic 7S globulin gene from soybean. *Plant Physiol* **105**, 1019–1020.
  39. Yamauchi F, Sato K & Yamagishi T (1984) Isolation and partial characterization of a salt-extractable globulin from soybean seeds. *Agric Biol Chem* **48**, 645–650.
  40. Yoshizawa T, Shimizu T, Yamabe M, Taichi M, Nishiuchi Y, Shichijo N, Unzai S, Hirano H, Sato M & Hashimoto H (2011) Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- $\beta$ -glucanase. *FEBS J* **278**, 1944–1954.
  41. Kagawa H, Hirano H, Tomotake M & Kikuchi F (1993) A seed protein induced by heat treatment in soybean (*Glycine max* (L.)). *Food Chem* **48**, 159–163.
  42. Hirano H, Kagawa H & Okubo K (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* **31**, 731–735.
  43. Duranti M, Scarafoni A, Gius C, Negri A & Faoro F (1994) Heat-induced synthesis and tunicamycin-sensitive secretion of the putative storage glycoprotein conglutin  $\gamma$  from mature lupin seeds. *Eur J Biochem* **222**, 387–393.
  44. Takaiwa F (2005) Health-promoting transgenic rice suppressing life-related disease and type-I allergy. In *Rice is life: scientific perspectives for the 21st century* (Toriyama K, Heong KL & Hardy B, eds), pp 102–105. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, and Tsukuba (Japan): Japan International Research Center for Agricultural Sciences.
  45. Cabanos C, Ekkyo A, Amari Y, Kato N, Kuroda M, Nagaoka S, Takaiwa F, Utsumi S & Maruyama N (2013) High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. *Transgenic Res* **22**, 621–629.
  46. Nishizawa K, Kita A, Doi C, Yamada Y, Ohinata K, Yoshikawa M & Ishimoto M (2008) Accumulation of the bioactive peptides, novokinin, LPYPR and rubiscolin, in seeds of genetically modified soybean. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 3301–3305.
  47. Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T & Takaiwa F (2013) Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotechnol J* **11**, 66–76.

48. Tada Y, Utsumi S & Takaiwa F (2003) Foreign gene products can be enhanced by introduction into low storage protein mutants. *Plant Biotechnol J* **1**, 411–422.
49. Goossens A, Van Montagu M & Angenon G (1999) Co-introduction of an antisense gene for an endogenous seed storage protein can increase expression of a transgene in *Arabidopsis thaliana* seeds. *FEBS Lett* **456**, 160–164.
50. Schmidt MA & Herman EM (2008) Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation. *Plant Biotechnol J* **6**, 832–842.
51. Takahashi M, Uematsu Y, Kashiwaba K, Yagasaki K, Hajika M, Matsunaga R, Komatsu K & 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.
52. Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayama M & Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep* **26**, 439–447.
53. Mandal MK, Fischer R, Schillberg S & Schiermeyer A (2014) Inhibition of protease activity by antisense RNA improves recombinant protein production in *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2 (BY-2) suspension cells. *Biotechnol J* (Epub ahead of print)

## 第一章 ダイズにおける生理機能性ペプチド挿入型グリシニンの解析

本研究では、ダイズ種子を用いた有用タンパク質の発現系として二つの方策をたてた。その一つ目は、種子に元来高蓄積する種子貯蔵タンパク質を改変し、有用タンパク質として発現させる方法であり、有用タンパク質の大量生産が見込まれる。ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質は 11S globulin のグリニンである。グリシニンのサブユニットの一つである A1aB1b の可変領域はアミノ酸配列の変異を比較的許容する領域であると推測され、生理機能性ペプチドやペプチドワクチンなどの有用ペプチドを挿入する部位として適すると考えられる。

認知症の 60-80% を占めるとされるアルツハイマー病は原因が特定されていないが、脳内でアミロイドβペプチド (Aβ) が凝集して老人斑として沈着し、神経細胞の死滅にいたることから、アルツハイマー病の原因は Aβ であるというアミロイド仮説が有力になっている。老人斑の形成は Aβ に対する能動免疫・受動免疫により阻害されるため、アルツハイマー病の防止には免疫療法が期待されている [1]。また、Aβ の主要なエピトープ (FRHDSGY; Fig. 1A) がワクチンペプチドとして機能する可能性があり、このワクチンペプチドを認識する抗体を用いた受動免疫による Aβ の蓄積の減少がアルツハイマー病モデルマウスにおいて報告されている [2]。

本章では、モデルペプチドとしてアルツハイマー病ワクチンペプチド (FRHDSGY) を A1aB1b の可変領域に挿入した。このペプチド挿入型 A1aB1b をダイズの登熟種子特異的に発現させ、A1aB1b 可変領域への有用ペプチドの挿入が A1aB1b の *in vivo* での蓄積挙動にどのように影響するかを分析した。

### 材料および方法

#### コンストラクト作製およびダイズの形質転換

ペプチド挿入型 A1aB1b のコード配列は、Nishizawa ら [3] および Prak と Utsumi [4] の手順で作製した。コンストラクトは 3 種類作製し、A1aB1b の可変領域 II, III, IV に、タンデムに 3 配列の FRHDSGY を挿入し、それぞれ A1aB1bM2, A1aB1bM3, A1aB1bM4 とした。また、ペプチドを挿入していない A1aB1b の発現カセットを作製し、A1aB1bWT とした。種子特異的な発現を制御するグリシニンプロモーターとターミネーターをコンストラクトに用いた。作製したプラスミドを用いて、ウィスカー超音波法 [5] あるいはボンバードメント法 [6] によりダイズ (*Glycine max* [L] Merrill, cv. JQ) を形質転換した。

## 抗体

抗 A1aB1b 抗体, 抗ペプチド (FRHDSGY) 抗体, 抗 BiP 抗体はウサギに免疫して得たものを用いた.

## 種子タンパク質の総画分の抽出

乾燥種子の一部をメスで擦り取り, マルチビーズショッカー (MB501S; YASUI KIKAI, Osaka, Japan) を用いて破碎した. 乾燥種子粉末をヘキササンに 10 分間懸濁し, 遠心分離 ( $3,000 \times g$ , 5 分) を行うことで脱脂した. 脱脂処理を 4 回行って風乾し, 1 mg の脱脂種子粉末に, 20  $\mu$ L の 1  $\times$  SDS 溶液 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 2.5% (w/v) SDS] を加え, ボルテックスにより懸濁し (室温, 1 時間), 遠心分離 ( $12,000 \times g$ , 4  $^{\circ}$ C, 15 分) をして上清を回収した.

## 可溶性画分および不溶性画分の抽出

100 mg の脱脂種子粉末に緩衝液 A [35 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM (*p*-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride, 1.2  $\mu$ M leupeptin, 0.2  $\mu$ M pepstatin A, 0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$ ] を加えて懸濁し, 転倒混和によりタンパク質を抽出した (室温, 1 時間). その後, 遠心分離 ( $12,000 \times g$ , 4  $^{\circ}$ C, 15 分) を行い, 上清を可溶性画分とした. また, 沈殿を 1  $\times$  SDS buffer で溶解し, 同様に遠心分離した上清を不溶性画分とした.

## SDS-PAGE および Western blot 分析

SDS-PAGE は 11% ポリアクリルアミドゲルを用いた. タンパク質は CBB R-250 により染色した. Western blot 分析を行うために, SDS-PAGE を行った後, ニトロセルロース膜 (0.45  $\mu$ m; Schleicher and Schuell Inc., Dassel, Germany) へと転写した. 一次抗体は抗 A1aB1b 抗体あるいは抗ペプチド抗体を用い, 二次抗体はアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Promega, Madison, WI, USA) を用いた. 検出は NBT および BCIP (Promega) を用いた.

## ゲル濾過カラムクロマトグラフィー

可溶性画分を Hi-Prep 16/60 Sephacryl S-300 HR column (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) に供した. 溶媒は緩衝液 A を用い, 流速は 0.5 ml/min に設定した. 純度は SDS-PAGE により確認した. タンパク質濃度測定は Protein Assay Rapid Kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を利用し, 標準タンパク質は BSA を用いた.

## タンパク質分析

まず A1aB1bWT あるいはペプチド挿入型 A1aB1b をふくむ可溶性画分をトリクロロ酢酸により沈殿させて濃縮し, 2-D Quant kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質量を測定した. その後, タンパク質

サンプルを PVDF 膜にブロットし、プロテインシーケンサー Procise 492 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて N 末端配列を分析した。また、A1aB1bM3 の酸性鎖の分解産物を質量分析法により分析した。SDS-PAGE 上で A1aB1bM3 の酸性鎖に相当するバンドをトリプシンあるいは V8 プロテアーゼにより分解し、AXIMA Performance (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF MS) で分析した。

### 免疫電子顕微鏡観察法

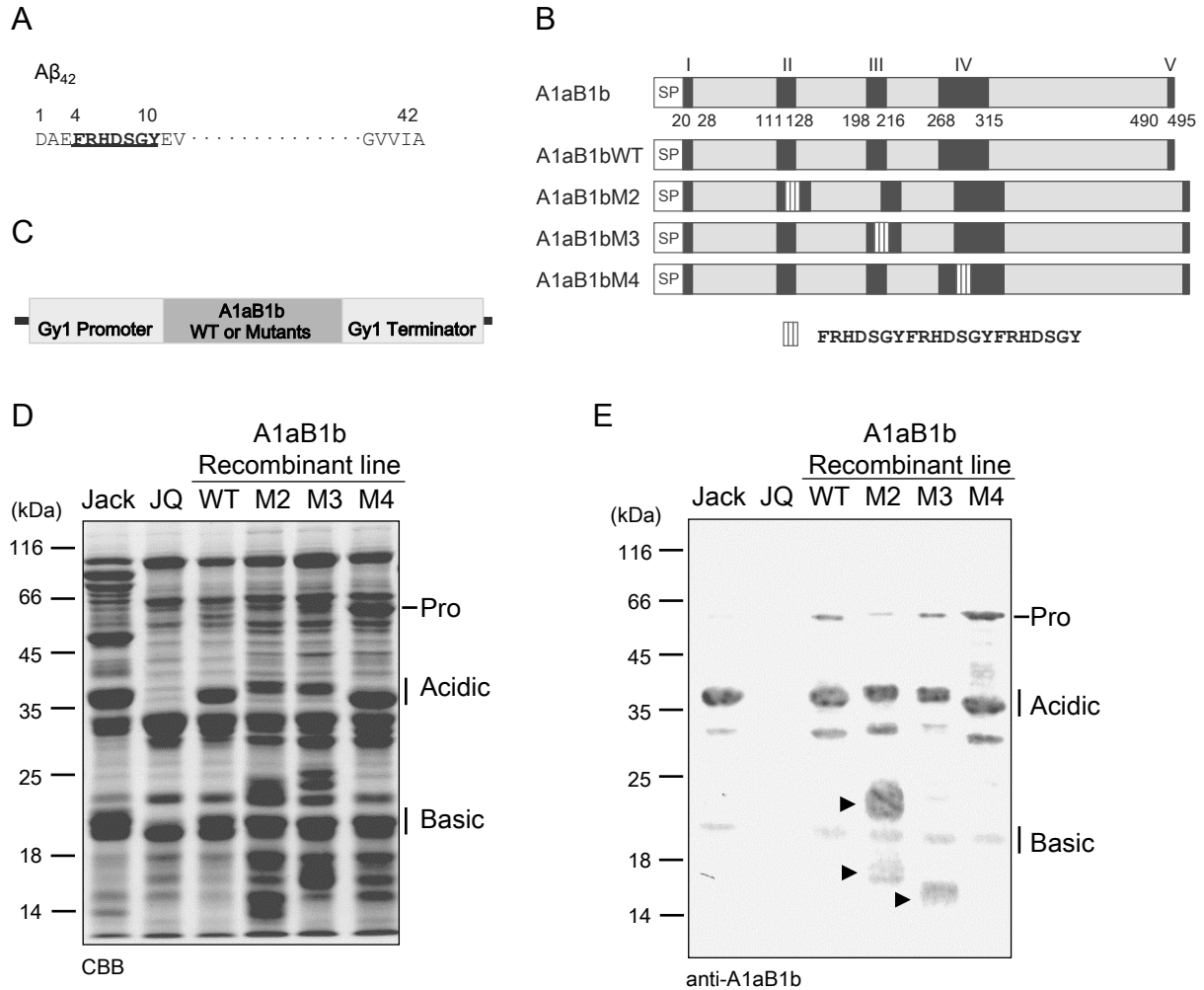
ダイズ乾燥種子を 1.0 mm に切断し、切片を固定液 [0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde] により固定した。固定後の切片を 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) で洗浄後、エタノール上昇系 [10% (v/v), 30%, 50%, 70% × three times, 90%, 99.9% × three times, 10 min for each wash] により脱水した。続いて LR-white (London Resin, Basingstoke, UK)/ethanol 1:2 (v/v) に 2-6 時間、LR-white/ethanol 2:1 (v/v) に 2-6 時間、100% LR-white に 2 日間浸して置換し、ビームカプセル (Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan) に入れて UV を照射 (4 °C, 2 日間) して包埋した。ウルトラミクロトームを用いて組織切片から 70 nm の超薄切片を作製し、金コロイド法による免疫電子顕微鏡観察を行った。1% (w/v) BSA-PBS によりブロッキングし、一次抗体 (抗 A1aBab 抗体, 抗ペプチド抗体, 抗 BiP 抗体) を結合させた (室温, 1 時間)。1% (w/v) BSA-PBS で洗浄後、15 nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (H+L, Auro Probe EM; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を結合させた (室温, 1 時間)。グリッドを PBS および蒸留水で洗浄後、4% (w/v) uranyl acetate および 80 mM lead nitrate により電子染色し、透過型電子顕微鏡 (model H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

## 結果および考察

### ダイズ品種 JQ 種子におけるペプチド挿入型 A1aB1b の蓄積

本研究で形質転換に用いたダイズ品種 JQ は Jack と QF2 の交配系統であり、種子貯蔵タンパク質のグリシニンと  $\beta$ -コングリシニンの全てのサブユニットを欠失した QF2 の形質転換能を改善した品種である [7]。JQ の種子タンパク質を抽出し、抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析を行った結果、A1aB1b は検出されないことが確認できた (Fig. 1E, lane JQ)。まず、A1aB1b をコードする遺伝子 (*Gyl*) のプロモーターを用いて、JQ の種子特異的にペプチドを挿入していない野生型 A1aB1b (A1aB1bWT) を発現させた。得られた T1 世代の乾燥種子からタンパク質を SDS 溶液により抽出し、SDS-PAGE およ





**Figure 1. ダイズ種子におけるペプチド挿入型 A1aB1b の発現.** (A)  $A\beta_{42}$  におけるワクチンペプチド ( $A\beta_{4-10}$ , FRHDSGY). (B) 野生型およびペプチド挿入型 A1aB1b の模式図. A1aB1b プレプロタンパク質における可変領域 (I-V) の位置, および A1aB1bWT と各ペプチド挿入型 A1aB1b (M2, M3, M4) におけるペプチド挿入部位を示す. SP はシグナル配列. (C) A1aB1b 発現カセットの模式図. A1aB1b をコードする *Gy1* 遺伝子 (Glyma03g32030) のプロモーターとターミネーターを用いた. (D, E) 野生型および各形質転換系統の乾燥種子におけるタンパク質の蓄積. ダイズ野生型 (Jack, JQ) および各形質転換系統 (A1aB1bWT, A1aB1bM2, A1aB1bM3, A1aB1bM4) の種子からタンパク質を抽出し, 等量のタンパク質を SDS-PAGE で分離し, CBB R-250 染色 (D) および抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析 (E) により検出した. A1aB1b のプロ型 (Pro), 酸性鎖 (Acidic), 塩基性鎖 (Basic), および酸性鎖の分解産物 (矢尻) を図中に示す.

び抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析を行った結果, Jack と同様に A1aB1bWT から酸性鎖 (A 鎖) と塩基性鎖 (B 鎖) が検出された (Fig. 1D, E; lane WT). また, プロセッシングされていないプロ型の A1aB1b が検出された. プロ型は, 普通品種の Jack においても少し検出された. 酸性鎖の下側に検出されたバンドはサブ酸性鎖であり, 普通品種の Jack から検出された.

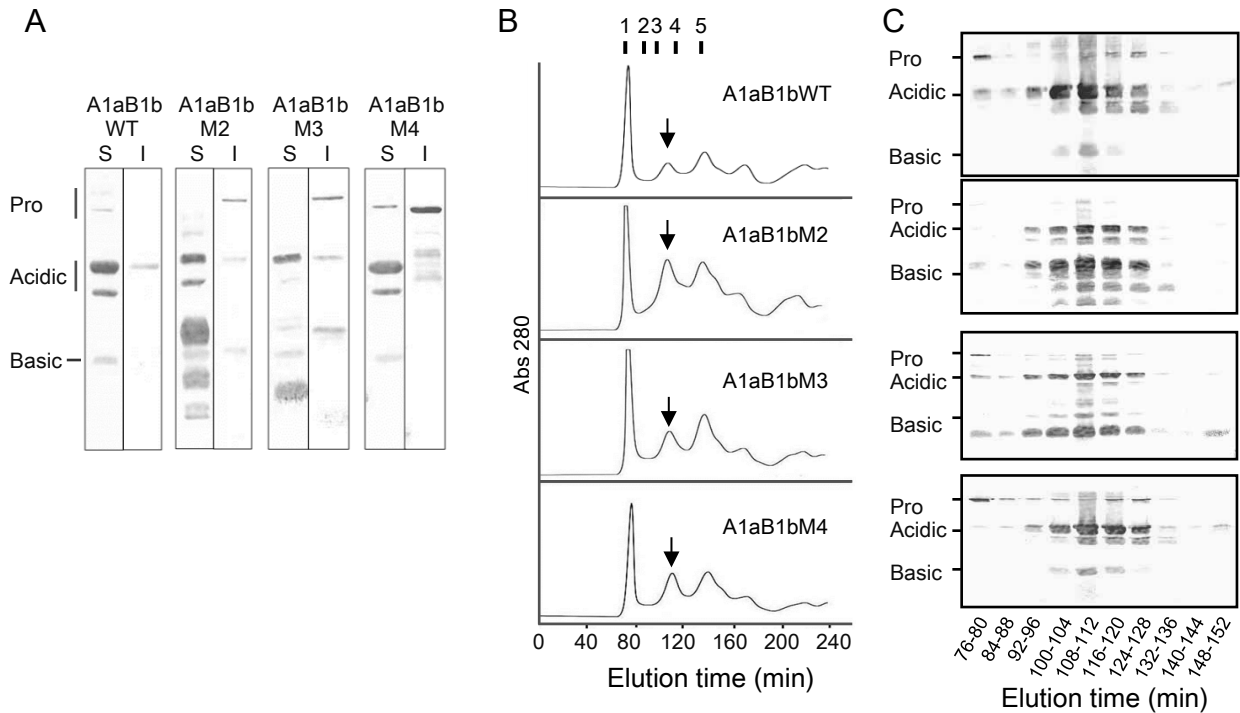
続いて A1aB1b の可変領域 II, III, IV にアルツハイマー病ワクチンペプチド (FRHDSGY) をタンデムに 3 配列ずつ挿入したペプチド挿入型 A1aB1b を作出し, それぞれ A1aB1bM2, A1aB1bM3,

A1aB1bM4とした (Fig. 1B). これらの各ペプチド挿入型 A1aB1b を JQ に導入して種子特異的に発現させ、種子抽出タンパク質を SDS-PAGE および抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析に供した。その結果、各ペプチド挿入型 A1aB1b を発現させた種子から A1aB1bWT と同様に酸性鎖と塩基性鎖が検出され、プロセッシングを受けて蓄積したことが明らかになった (Fig. 1D, E)。また、A1aB1b のプロ型が A1aB1bM2, A1aB1bM3, A1aB1bM4 で検出され、プロ型の蓄積量は A1aB1bM4 で多いことがわかった (Fig. 1E, Pro)。さらに、A1aB1bM2, A1aB1bM3 においては酸性鎖の分解物と考えられるバンドが検出された (Fig. 1E, 矢尻)。これらの結果、ペプチド挿入型 A1aB1b はダイズ品種 JQ の登熟種子で発現し、大部分はプロセッシングを受けて蓄積したことが明らかになった。また、一部のペプチド挿入型 A1aB1b が内在性プロテアーゼにより限定分解を受けることが示唆された。

形質転換系統における A1aB1b の最大蓄積量は、いくつかの独立系統で約 50 mg/g seed (種子タンパク質の 11.3%) となった。また、各ペプチド挿入型 A1aB1b の蓄積量は、いくつかの独立系統で A1aB1bWT と同レベルであった。本研究ではプロモーターに A1aB1b をコードする遺伝子 (*GyI*) のプロモーター配列を用い、種子貯蔵タンパク質を欠失した品種 JQ に蓄積させた。同様に種子貯蔵タンパク質を欠失したイネ種子が、外来タンパク質を高蓄積したことが報告されている [8,9]。種子貯蔵タンパク質を欠失していないダイズ種子を用いた外来タンパク質発現の事例では、例えば、一般的なブラジルダイズ品種 (BR-16) でヒトの coagulation factor IX や human growth hormone を  $\beta$ -コングリシニン  $\alpha$  サブユニットのプロモーターの制御下で発現させた結果、その蓄積量は可溶性タンパク質の 0.23–2.9% であったと報告されている [10,11]。また、ダイズ品種 Jack によるワクチンタンパク質の生産系として、大腸菌の heat labile toxin B サブユニットをグリシニンプロモーターの制御下で発現させた結果では、可溶性タンパク質の 2.4% の蓄積量であった [12]。したがって、本研究の結果蓄積したペプチド挿入型 A1aB1b の量は従来の有用タンパク質生産結果と比較して非常に高く、A1aB1b をキャリアータンパク質として用いて品種 JQ で有用タンパク質・ペプチドを生産する発現系は高生産を目指す上で非常に有利であると考えられる。

### ペプチド挿入型 A1aB1b の溶解性および会合状態の分析

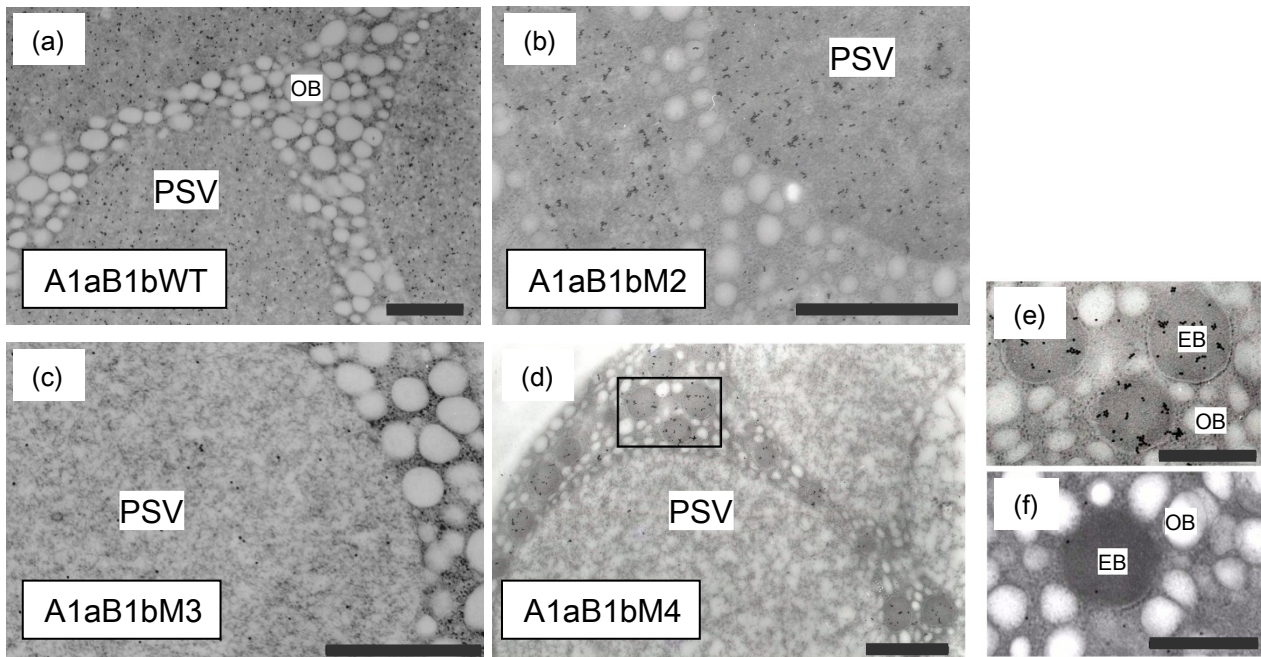
可変領域へのペプチドの挿入が A1aB1b の溶解性に対して影響を与えていないか分析するため、種子タンパク質を塩溶液可溶性画分と不溶性画分に分離し、抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析に供試し、ペプチド挿入型 A1aB1b の溶解性を評価した。まず A1aB1bWT のプロ型と酸性鎖・塩基性鎖は、大部分が可溶性画分から検出された (Fig. 2A)。同様に、ペプチド挿入型の A1aB1bM2, A1aB1bM3,



**Figure 2.** ペプチド挿入型 A1aB1b の溶解性および会合状態の分析. (A) 形質転換ダイズ種子におけるペプチド挿入型 A1aB1b の溶解性. 緩衝液でタンパク質を抽出し, 可溶性画分 (S) および不溶性画分 (I) に分離し, 抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析に供した. プロ型 (Pro), 酸性鎖 (Acidic), 塩基性鎖 (Basic)を示す. (B) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果. 番号は標準タンパク質の流出位置を示す: 1, Blue dextran (2,000 kDa); 2, thyroglobulin (669 kDa); 3, ferritin (440 kDa); 4, aldorase (158 kDa); 5, conalbumin (75 kDa). 矢印はペプチド挿入型 A1aB1b を含む画分を示す. (C) 抗 A1aB1b 抗体を用いたゲル濾過画分の Western blot 分析の結果. 上から A1aB1bWT, A1aB1bM2, A1aB1bM3, A1aB1bM4 の結果を示す. プロ型 (Pro), 酸性鎖 (Acidic), 塩基性鎖 (Basic)を示す.

A1aB1bM4 の酸性鎖・塩基性鎖は大部分が可溶性画分から検出された. 一方で, ペプチド挿入型のプロ型はほぼ不溶性を示した (Fig. 2A, Pro). ペプチド挿入型 A1aB1b のプロ型は A1aB1bWT のプロ型と異なり不溶性であったことから, 可変領域へのペプチドの挿入が A1aB1b プロ型の溶解性に影響したことが示唆された. しかし, ペプチド挿入型 A1aB1b の大部分はプロセッシングを受けて酸性鎖と塩基性鎖に開裂しており, それらは可溶性を示したことから, 可変領域へのペプチドの挿入は A1aB1b の溶解性へ大きな影響を与えなかったことが明らかになった.

続いて, A1aB1b の立体構造形成および分子会合に対してペプチド挿入の影響がないかを調べるため, 塩溶液可溶性画分をゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供し, A1aB1b の分子サイズを推定して会合状態を分析した (Fig. 2B). ゲル濾過カラムの溶出画分を, 抗 A1aB1b 抗体を用いた Western blot 分析に供した結果, A1aB1bWT の酸性鎖・塩基性鎖は約 110 分で溶出したことがわかり, この溶出時間は六量体の A1aB1b (約 320 kDa) に相当することが分子量スタンダードの溶出時間から推定された (Fig. 2B, C). また, 可溶性画分に含まれたペプチド挿入型の A1aB1bM2, A1aB1bM3, A1aB1bM4 の酸性鎖・



**Figure 3.** ペプチド挿入型 A1aB1b の細胞内局在. 乾燥種子における A1aB1bWT (A) およびペプチド挿入型 A1aB1b (B–D) の局在を, 抗 A1aB1b 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により観察した. A1aB1bM4 については抗 A1aB1b 抗体 (D, E) とともに抗 BiP 抗体 (F) による検出を行った. A1aB1bM4 の (E) は (D) の黒枠内の拡大図である. PSV はタンパク質貯蔵液胞, OB はオイルボディ, EB は ER 由来ボディを示す. スケールバーは 1.0  $\mu\text{m}$  (A–D) あるいは 0.5  $\mu\text{m}$  (E, F) を示す.

塩基性鎖は, A1aB1bWT と同様に約 110 分で溶出した (Fig. 2B, C). すなわち, プロセッシングを受けたペプチド挿入型 A1aB1b は六量体の成熟型を形成していることが示唆された. したがって, A1aB1b の可変領域 II, III, IV にアルツハイマー病ワクチンペプチドを挿入しても, A1aB1b の成熟化に影響を与えないことが明らかになった. 一方で, プロ型 A1aB1b はボイドボリュームに近い画分から検出された (Fig. 2C, lane 76–80). したがって, 可溶性画分に含まれる A1aB1b プロ型は凝集体を形成していると考えられた.

#### ダイズ種子におけるペプチド挿入型 A1aB1b の局在

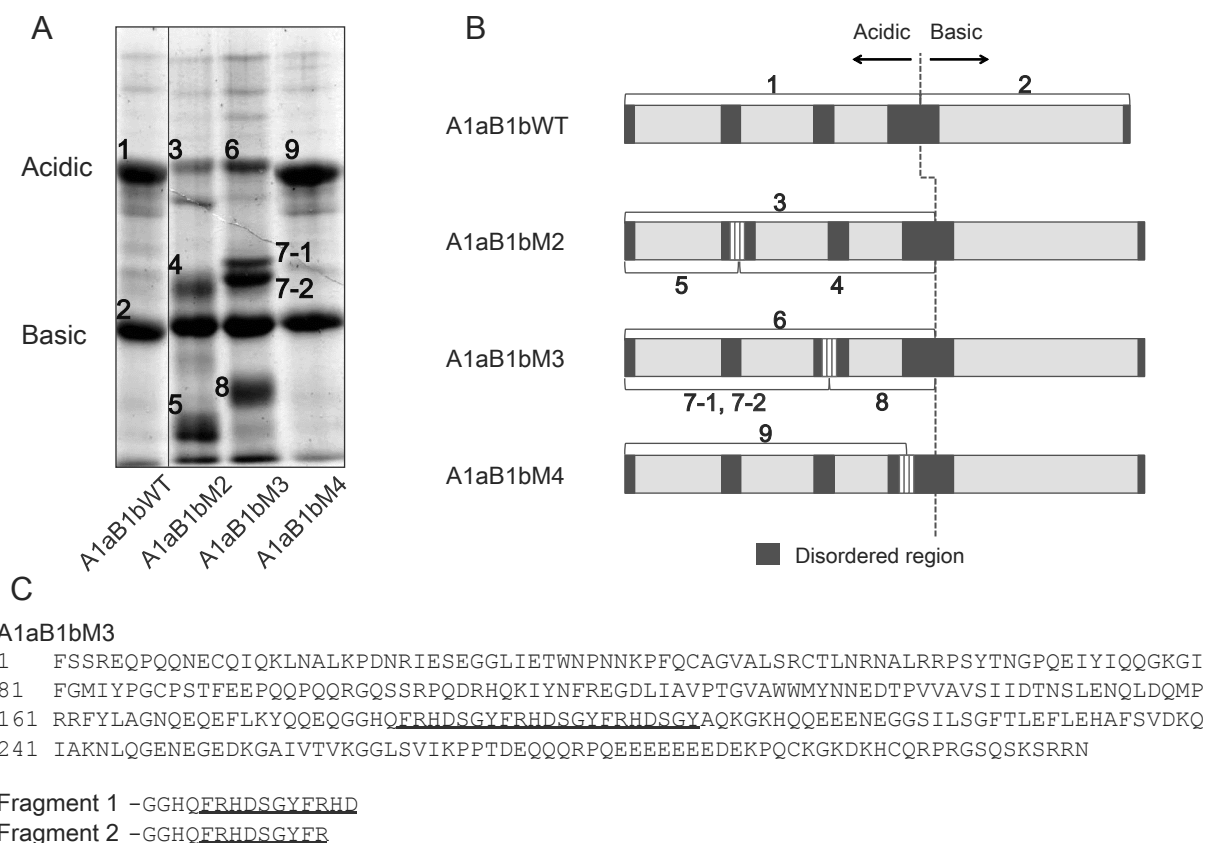
内在性のグリシニンタンパク質貯蔵液胞に蓄積する [13]. タンパク質貯蔵液胞への A1aB1b の選別輸送に, ペプチドの挿入が影響していないか確認するために, 乾燥種子の子葉細胞を化学固定し抗 A1aB1b 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法を行った (Fig. 3). A1aB1bWT の乾燥種子ではタンパク質貯蔵液胞に金粒子が検出された (Fig. 3A). 同様に, A1aB1bM2 と A1aB1bM3 の乾燥種子でも, 金粒子がタンパク質貯蔵液胞において検出された (Fig. 3B, C). A1aB1bM4 では, 主にタンパク質貯蔵液胞で金粒子が検出されたが, 細胞内の特徴的な高電子密度の構造体も金粒子で標識された (Fig. 3D, E). その特徴的な構造体の周囲からはリボソーム様構造が観察でき, 構造体の内部は小胞体のシャペロンタンパク質

である BiP に対する抗体でも標識されたため (Fig. 3F), この特徴的な構造体は小胞体由来の構造 (ER-body, EB) であることが示唆された. 前述の種子タンパク質の分析の結果において, A1aB1bM4 は不溶性のプロ型を他のコンストラクトと比較して多量に蓄積していた (Fig. 2A). したがって, A1aB1bM4 が小胞体において構造を形成したときに, その一部が不溶化したために輸送されず, 小胞体内でプロ型のまま蓄積して ER-body を形成したと考えられる. しかし, A1aB1bM4 においても金粒子の大部分はタンパク質貯蔵液胞に検出されたため, これらの免疫電子顕微鏡観察の結果から, ペプチド挿入型 A1aB1b の多くは適切にタンパク質貯蔵液胞へ選別輸送されたことが明らかとなり, A1aB1b 可変領域, 特に可変領域 II と III におけるペプチド挿入は, A1aB1b の細胞内局在に大きな影響を与えなかったことが示された.

### ペプチド挿入部位におけるペプチド挿入型 A1aB1b の切断

種子タンパク質の電気泳動および Western blot 分析を行った結果, 外来性の A1aB1bWT は大部分が酸性鎖と塩基性鎖で構成されていたが, ペプチド挿入型 A1aB1b においては酸性鎖と塩基性鎖以外に, 酸性鎖の分解物と推定されるバンドが検出された (Fig. 1E, 矢尻). プロテアーゼによる有用タンパク質の切断・分解はタンパク質発現系において問題である. したがって, これらのバンドの配列を同定し切断部位を推定するために, A1aB1b をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより粗精製し, A1aB1b を構成するバンドの N 末端配列分析を行った (Fig. 4). まず A1aB1bWT の主要な 2 バンド (Fig. 4A; バンド 1, 2) は N 末端配列が内在性 A1aB1b の酸性鎖と塩基性鎖と同一であり, それぞれ酸性鎖と塩基性鎖であることがわかった. 続いて, A1aB1bM2 のバンド 3, 4, 5 の N 末端配列分析を行った結果, バンド 3 とバンド 5 の N 末端配列が酸性鎖の配列と一致した. 一方でバンド 4 の N 末端の 1 残基目アミノ酸には, 挿入ペプチドに含まれる複数のアミノ酸が検出された. バンド 4 の分子サイズおよび抗 A1aB1b 抗体との反応性を考慮に入れると, バンド 4 は酸性鎖の分解産物であると考えられた. したがってこれらの N 末端配列の分析および電気泳動における移動度の結果から, A1aB1bM2 の酸性鎖 (バンド 3) がペプチド挿入部位において切断され, バンド 4 とバンド 5 が生じたと考えられた (Fig. 4A, B). 同様に, A1aB1bM3 と A1aB1bM4 の分解産物もそれぞれのペプチド挿入部位において切断されたことが示された.

ペプチド挿入型 A1aB1b の分解産物における有効なワクチンペプチドの残存を確かめるために, 可溶性画分の A1aB1bM3 をアフィニティー精製し, 得られたバンド 7-1 と 7-2 をまとめてトリプシンあるいは V8 プロテアーゼで消化し, 質量分析法により分析した結果, ワクチンペプチドの完全長が含まれるフ



**Figure 4.** ペプチド挿入型 A1aB1b の切断部位の分析. (A) ペプチド挿入型 A1aB1b のゲル濾過粗精製画分の SDS-PAGE パターン. 酸性鎖 (Acidic) と塩基性鎖 (Basic) および, N 末端配列分析に用いたバンド (1-9) を示す. (B) ペプチド挿入型 A1aB1b の模式図. 酸性鎖 (Acidic) と塩基性鎖 (Basic) のプロセッシング部位を点線で示す. 番号で示された領域が, A の番号のバンドに対応する. 黒色領域は可変領域を表す. (C) 推定される A1aB1bM3 の酸性鎖のアミノ酸配列. A のバンド 7 から質量分析法により検出されたフラグメントの C 末端配列を下に示す. 下線はワクチンペプチド配列を示す.

ラグメントが複数検出された (Fig. 4C). したがって, 一部の A1aB1bM3 はペプチド挿入部位でプロテアーゼにより切断されるが, その分解産物の中にはインタクトなワクチンペプチドを残存しているものがあることが明らかになった.

上述の結果の通り, アルツハイマー病ワクチンペプチド挿入型 A1aB1b の一部はペプチド挿入部位においてプロテアーゼにより切断されていた. ペプチド配列を挿入部位した A1aB1b の可変領域内は分子表面に露出しているため, プロテアーゼが認識可能な配列が存在する場合, 切断されやすいと考えられる. 今回, 可変領域に挿入したワクチンペプチドの配列は FRHDSGY で, このペプチド配列がタンデムに 3 配列挿入されており, この内部配列のペプチド結合を分解することが可能なプロテアーゼにより切断されたと考えられる. 登熟種子において種子貯蔵タンパク質に作用することが示唆されているプロテアーゼは, これまでに vacuolar processing enzymes (VPEs) と aspartic proteinase (APs) の 2 種類が報告されている. VPEs は種々の植物種の種子において発現し, 11S globulin をプロセッシングする

[14-17]. グリシニンは可変領域 IV に存在するアスパラギン-グリシン残基間 (Asn310-Gly311 in A1aB1b) で VPE によりプロセシングされる [7]. ダイズにおいても VPE の登熟種子における発現が確認されており, タンパク質貯蔵液胞から精製されたことからタンパク質貯蔵液胞に存在すると考えられる [18]. VPEs は基質特異性が高く, アスパラギン残基かアスパラギン酸残基の C 末端側のみで基質のペプチド結合を切断する [19-21]. アルツハイマー病ワクチンペプチドの FRHDSGY にはアスパラギン酸残基が含まれているため, その C 末端側で VPE により切断された可能性が考えられる. また, APs はシロイヌナズナにおいて, 種子貯蔵タンパク質のプロセシングに関与すると考えられている [15]. ダイズにおいては soyAP1 が登熟種子で特異的に発現し, 液胞に局在することが示されている [22,23]. APs は疎水性アミノ酸残基の C 末端側, 特に疎水性アミノ酸残基間で基質のペプチド結合を切断する傾向があり [24], シロイヌナズナの AtAP A1 はインスリン B 鎖を基質とし, ロイシン-チロシン残基間, フェニルアラニン-フェニルアラニン残基間, そしてフェニルアラニン-チロシン残基間で切断することが明らかとなっている [25]. 本研究で用いた FRHDSGY ワクチンペプチドにはチロシン-フェニルアラニン残基があるため, そのアミノ酸残基間で soyAP1 に切断された可能性も考えられる. あるいは, APs や VPEs 以外のプロテアーゼが関与している可能性も考えられる. これらのプロテアーゼ遺伝子の発現を抑制する, あるいは有用ペプチドの配列をプロテアーゼにより認識されない配列に改変する方法などにより, プロテアーゼによる有用タンパク質の切断を抑えることが出来ると考えられる.

第一章における研究をまとめると, アルツハイマー病ワクチンペプチドを挿入した A1aB1b をダイズ品種 JQ の種子特異的に発現させた. ペプチド挿入型 A1aB1b の蓄積量は種子タンパク質の約 11%であり, 高蓄積を達成した. また, 大部分のペプチド挿入型 A1aB1b は可溶性で六量体の成熟型を形成し, タンパク質貯蔵液胞に蓄積していたことから, A1aB1b の可変領域におけるペプチドの挿入は, *in vivo* において A1aB1b の立体構造形成・分子会合・選別輸送に大きな影響を与えなかったことが明らかになった. したがって, A1aB1b は有用ペプチドのキャリアータンパク質として有効であり, 多様な有用ペプチドの発現系への応用が期待できる.

## 引用文献

1. Lemere CA & Masliah E (2010) Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- $\beta$  immunotherapy? *Nat Rev Neurol* **6**, 108-119.
2. McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MHL, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HTJ, Przybylski M & St George-Hyslop P (2002)

Therapeutically effective antibodies against amyloid- $\beta$  peptide target amyloid- $\beta$  residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* **8**, 1263–1269.

3. Nishizawa K, Kita A, Doi C, Yamada Y, Ohinata K, Yoshikawa M & Ishimoto M (2008) Accumulation of the bioactive peptides, novokinin, LPYPR and rubiscolin, in seeds of genetically modified soybean. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 3301–3305.
4. Prak K & Utsumi S (2009) Production of a bioactive peptide (IIAEK) in *Escherichia coli* using soybean proglycinin A1ab1b as a carrier. *J Agric Food Chem* **57**, 3792–3799.
5. Terakawa T, Hasegawa H & Yamaguchi M (2005) Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breed Sci* **55**, 465–468.
6. Khalafalla MM, Rahman SM, El-Shemy H a., Nakamoto Y, Wakasa K & Ishimoto M (2005) Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP(S65T) expression in transformed soybean. *Breed Sci* **55**, 257–263.
7. Kita Y, Nishizawa K, Takahashi M, Kitayama M & Ishimoto M (2007) Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Rep* **26**, 439–447.
8. Tada Y, Utsumi S & Takaiwa F (2003) Foreign gene products can be enhanced by introduction into low storage protein mutants. *Plant Biotechnol J* **1**, 411–422.
9. Cabanos C, Ekyo A, Amari Y, Kato N, Kuroda M, Nagaoka S, Takaiwa F, Utsumi S & Maruyama N (2013) High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. *Transgenic Res* **22**, 621–629.
10. Cunha NB, Murad AM, Cipriano TM, Araújo ACG, Aragão FJL, Leite A, Vianna GR, McPhee TR, Souza GHMF, Waters MJ & Rech EL (2011) Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* **20**, 811–826.
11. Cunha NB, Murad AM, Ramos GL, Maranhão AQ, Brígido MM, Araújo ACG, Lacorte C, Aragão FJL, Covas DT, Fontes AM, Souza GHMF, Vianna GR & Rech EL (2011) Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res* **20**, 841–855.
12. Moravec T, Schmidt MA, Herman EM & Woodford-Thomas T (2007) Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* **25**, 1647–1657.
13. Maruyama N, Mun LC, Tatsuhara M, Sawada M, Ishimoto M & Utsumi S (2006) Multiple vacuolar sorting determinants exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell* **18**, 1253–1273.
14. Hara-Nishimura I, Shimada T, Hiraiwa N & Nishimura M (1995) Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol* **145**, 632–640.
15. Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 32292–32299.
16. Gruis D, Schulze J & Jung R (2004) Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme



family of cysteine proteases. *Plant Cell* **16**, 270–290.

17. Wang Y, Zhu S, Liu S, Jiang L, Chen L, Ren Y, Han X, Liu F, Ji S, Liu X & Wan J (2009) The vacuolar processing enzyme OsVPE1 is required for efficient glutelin processing in rice. *Plant J* **58**, 606–617.
18. Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M & Hara-Nishimura I (1994) Vacuolar processing enzyme of soybean that converts proproteins to the corresponding mature forms. *Plant Cell Physiol* **35**, 713–718.
19. Hiraiwa N, Nishimura M & Hara-Nishimura I (1999) Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Lett* **447**, 213–216.
20. Bosch M, Poulter NS, Perry RM, Wilkins KA & Franklin-Tong VE (2010) Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. *Plant Mol Biol* **74**, 381–393.
21. Dall E & Brandstetter H (2012) Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 24–31.
22. Terauchi K, Asakura T, Nishizawa NK, Matsumoto I & Abe K (2004) Characterization of the genes for two soybean aspartic proteinases and analysis of their different tissue-dependent expression. *Planta* **218**, 947–957.
23. Terauchi K, Asakura T, Ueda H, Tamura T, Tamura K, Matsumoto I, Misaka T, Hara-Nishimura I & Abe K (2006) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAPI and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J Plant Physiol* **163**, 856–862.
24. Jukka K, Alexander W & Alexander Z (2004) Phytepsin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds), pp. 77–84. Elsevier Academic Press, London.
25. Mazorra-Manzano MA, Tanaka T, Dee DR & Yada RY (2010) Structure-function characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **71**, 515–523.

## 第二章 ダイズ登熟種子で発現するプロテアーゼ GMCP3 の解析

プロテアーゼによる有用タンパク質の分解は、タンパク質発現系において問題となる。植物を用いた有用タンパク質発現系の技術基盤を固める上で、有用タンパク質の蓄積に影響を与え得るプロテアーゼに対する知見は重要である。しかし、ダイズ種子の登熟種子で発現する液胞プロテアーゼの理解は不足している。

ダイズの登熟種子で高発現し、タンパク質貯蔵液胞において種子貯蔵タンパク質や有用タンパク質を切断するプロテアーゼに対する理解を深めるため、本章では既知の登熟種子プロテアーゼと異なる基質特異性を持つ登熟種子プロテアーゼを探索し、その機能を分析した。

### 材料および方法

#### 植物

ダイズ (*Glycine max* [L.] Merrill. cv. Enrei) を京都大学農学研究科宇治地区のグリーンハウスで栽培した。ダイズ登熟種子は回収後、実験に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、種子をトレイ上で吸水させてグロースチャンバー ( $25^{\circ}\text{C}$ , 光照射 16 時間, 暗期 8 時間) 内で発芽させ、吸水から 1-6 日に子葉を回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 公開トランスクリプトームデータを用いた遺伝子発現解析

シロイヌナズナのプロテアーゼ遺伝子の ID はプロテアーゼのデータベース MEROPS (Release 9.5) [1] から取得した。レトロトランスポゾンのプロセシングエンドペプチダーゼ (Family A11) および重複する遺伝子を除き、得られた 670 遺伝子の登熟種子における発現レベルを、The Bio-Analytic Resource for Plant Biology (<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>) の Expression Browser [2] を活用して得た。使用したデータは Le らのものである [3]。

ダイズのプロテアーゼ遺伝子 ID は、Phytozome [4] に登録されているゲノム配列から、ツール Biomart [5] を活用して得た。アノテーション [proteolysis and peptidolysis (GO ID 0006508)] を基にプロテアーゼ遺伝子の ID を取得した。得られた 494 遺伝子の登熟種子における発現レベルを、ダイズデータベース Soybase (<http://www.soybase.org/>) のツール SoySeq からの取得した (Data type Normalized) [6]。活用したデータでは 42 day after flowering (DAF) においてグリシニン (*Gy1-Gy5*) と  $\beta$ -コングリシニン ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ) の高発現が示されたため、42 DAF において高発現しているプロテアー

ゼを探索した。また、ダイズの VPE 遺伝子の ID は、soybean vacuolar processing enzyme 1 (NP\_001236678.1) の配列をクエリーとして用いたダイズゲノムに対する Blast 検索を行うことで得た。得られた遺伝子群に含まれた GPI アンカートランスアミダーゼ遺伝子を排除し、配列内に活性中心のシステインとヒスチジン残基が保存されている遺伝子を抽出した。

### cDNA クローニング

本章で用いたプライマーは全て Table 1 に示す。ダイズから抽出した mRNA を基に得られた cDNA 混合液をテンプレートとし、プライマーNo.1 と No.2 を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことで GMCP3 のコード領域を増幅した。増幅産物を *Hind*III と *Not*I で切断し、同様の制限酵素で切断した pBluscript SK(-) ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) にライゲーションした。同様の手順で、プライマーNo.3 と No.4 を用い soyAPI のコード領域をクローニングした。また、sVPE1 をコードする完全長 cDNA (GMF02-10-I22) を Legume base (<http://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp>) から得た [7]。DNA 配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、DNA シーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) で分析した。cDNA 配列は全て、Phytozome から得られる遺伝子の配列と同一であることを確認した (*GMCP3*, Glyma10g35100.1; *sVPE1*, Glyma17g14680.1; *soyAPI*, Glyma17g01500.1)。また、*Pichia pastoris* による発現系に用いるために、コドン頻度が *Pichia* の使用頻度に最適化した GMCP3 の cDNA を合成した。

### 抗プロテアーゼ抗体の調製

GMCP3, sVPE1, soyAPI の cDNA をテンプレートとして、特異的プライマー(GMCP3, No.5 and No.6; sVPE1, No.7 and No. 8; soyAPI, No.9 and No.10) を用いた PCR を行い、各プロテアーゼの成熟型を含む領域 (GMCP3, Lys140–Tyr380; sVPE1, Glu56–Asp427; soyAPI, Thr74–Ala514) を増幅した。増幅産物には各プロテアーゼの成熟型領域の C 末端側に hexa histidine-tag (His-Tag) が付加された。PCR 産物を制限酵素 *Not*I で切断した。続いて、*Nco*I 処理後に T4-DNA ポリメラーゼで平滑末端化し、さらに *Not*I で切断した pET21d (Novagen, Darmstadt, Germany) を用意し、PCR 産物を挿入した。完成したプラスミド (pET21d-mGMCP3, pET21d-msVPE1, pET21d-msoyAPI) を用いて大腸菌 BL21 株 (Novagen) を形質転換した。得られた大腸菌 (BL21/mGMCP3, BL21/msVPE1, BL21/msoyAPI) を 300 mL の LB 培地で培養し (37 °C, -OD<sub>600</sub> = 0.5), 1 mM isopropyl β-D-1 thiogalacopyranoside を加えて発現を誘導してさらに培養した (37 °C, 一晚)。遠心分離 (6,760 × g for 15 min) により大腸菌

Table 1. 第二章で用いたプライマー配列

Plasmid	No.	Name	oligonucleotides
pBS-GMCP3-cDNA	1	cDNA-GMCP3_Fw	5'-TACAAGCTTAGACCGAGCTAGCTAGCTAGCAAG-3'
	2	cDNA-GMCP3_Rv	5'-AAGCGGCCGCTAATAAGAAGCATAATTCTTTGTAGG-3'
pBS-soyAP1-cDNA	3	cDNA-soyAP1_FW	5'-AAGAATTCGCGAATCTCTCTCCACGTATCG-3'
	4	cDNA-soyAP1_Rv	5'-AATCTAGAGGATCGCCATAGTCTGAGAAACGCT-3'
pET21d-mGMCP3	5	pET21-mGMCP3_FW	5'-CTGCCGAGAAATTTGATTGGAGAGAG-3'
	6	pET21-mGMCP3_Rv	5'-TGTCCGCGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGATAAGAAGCATAATTCTTTGTAGG-3'
pET21d-msVPE1	7	pET21-msVPE1_FW	5'-GAAGTGGGAACACGATGGGCGGTTC-3'
	8	pET21-msVPE1_Rv	5'-TGTCCGCGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGATCAACAAGGGACGAACCCAGGAG-3'
pET21d-msoyAP1	9	pET21-msoyAP1_FW	5'-ACTGAGGAAACCGATATTGTCCGG-3'
	10	pET21-msoyAP1_Rv	5'-TGTCCGCGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCAGCATCAGCAAATCCCACTC-3'
pPICZ $\alpha$ -GMCP3	11	pPICZ $\alpha$ -GMCP3_FW	5'-GCTGAATTCACACCACCACCACCACCACCGTTCCTACTGTTCAA-3'
	12	pPICZ $\alpha$ -GMCP3_Rv	5'-AAAGCGGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTAGGAAGCGTAGTTCCTAGTTG-3'
pPICZ $\alpha$ -sVPE1	13	pPICZ $\alpha$ -sVPE1_FW	5'-GCTGAATTCACACCACCACCACCAGGCCGAACCGGAAGGAGTG-3'
	14	pPICZ $\alpha$ -sVPE1_Rv	5'-CTGCCGCGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTAGCACTGTAGCCTCTGTTTG-3'

を集菌し、大腸菌破碎液 [10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9), 1 mM EDTA] で懸濁して超音波破碎を行った。破碎後に不溶性画分を回収し、封入体洗浄液 [10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9), 1 mM EDTA, 4% (w/v) Triton X-100] で洗浄し封入体を精製した。精製した封入体を封入体溶解液 [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 6 M guanidine-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol] により溶解し、タンパク質を Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) へ結合させた。洗浄液 [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 6 M urea, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol] によるカラムの洗浄後、溶出液 [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 6 M urea, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol] で結合タンパク質を溶出させた。精製した各プロテアーゼを用いてウサギを免疫し、各プロテアーゼに対する抗血清を得た (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

#### 酵母発現系に用いるコンストラクトの作製

コドンを用いて最適化した GMCP3 cDNA をテンプレートとして、プライマー-No. 11 と 12 を用いて PCR を行い、GMCP3 のプロプロテアーゼ (His28-Tyr380) をコードする配列を増幅した。増幅産物はコード配列の 5'側に *EcoRI* 認識サイトと His-tag コード配列が、3'側に His-tag コード配列・ストップコドン・*NotI* 認識サイトが付加された。増幅産物を *EcoRI* と *NotI* により切断し、同じ制限酵素で処理した pPICZ $\alpha$  A ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入した。完成したプラスミド pPICZ $\alpha$  A-GMCP3 (5-10  $\mu$ g) を *SacI* で直鎖化し、電圧ポレーション法 (200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 2 kV) で *Pichia pastoris* X-33 株 (Invitrogen) に導入した。形質転換された菌体を 500 mg/mL の Zeocin を含む YPDS 培地 [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose, 1 M sorbitol] で選抜し

(28 °C, 3–6 日間), X-33/GMCP3 を得た.

sVPE1 をコードする cDNA をテンプレートとしてプライマーNo. 13,14 を用いた PCR を行い, sVPE1 のプロテアーゼ (Arg33–Ala495) のコード配列を増幅した. 増幅産物を, GMCP3 と同じ手順で pPICZ  $\alpha$  A にサブクローニングした. 完成したプラスミド pPICZ  $\alpha$  A-sVPE1 (5–10  $\mu$ g) を用いて *Pichia pastoris* KM71H 株 (Invitrogen) に導入し, 形質転換された菌体 KM71H/sVPE1 を選抜した.

### ***Pichia pastoris* を用いたプロテアーゼ発現系の構築**

X-33/GMCP3 と KM71H/sVPE1 を, 2 mL BMGY 培地 [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6.0), 1.34% (w/v) yeast nitrogen base,  $4 \times 10^{-5}$ % (w/v) biotin, 1% (w/v) glycerol, 2% (w/v) casamino acids] で培養した (28 °C, 2 日間). 培養液を 300 mL の BMGY 培地に加えてさらに培養した (28 °C, 250 rpm, 一晚). 遠心分離 (1,500  $\times$  g, 室温, 5 分) により菌体を回収し, 1.2 L の BMMY 培地 [BMGY とほぼ同じ組成で, 1% (w/v) glycerol の代わりに 0.5% (v/v) のメタノールを含む] に懸濁してさらに培養した (18 °C, 250 rpm, 一晚). 遠心分離 (6,760  $\times$  g, 4 °C) により回収した培地上清を, 組換え型タンパク質の精製まで -80 °C で保存した.

### **組換え型プロテアーゼ の精製**

プロ型の GMCP3 は培地上清から Ni-sepharose 6 FF (GE Healthcare) カラムを用いて回収した. 培地上清を Ni-sepharose 6 FF に供試し, 洗浄液 [100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 150 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 30 mM imidazole] でカラムを洗浄後, 溶出液 [100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 150 mM NaCl, 500 mM imidazole] で溶出した. 溶出した GMCP3 は緩衝液 [50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA] で透析し (4 °C, 一晚), VIVASPIN 6 (MWCO 10,000; Sartorius, Göttingen, Germany) を用いて濃縮し, -80 °C で保存した.

プロ型の sVPE1 は培地上清から Ni-sepharose 6 FF とゲル濾過カラムにより精製した. 培地上清を Ni-sepharose 6 FF に供し, GMCP3 と同じ手順でカラムから溶出させた. 溶出画分を緩衝液 [10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.6), 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA] で透析し (4 °C, 一晚), VIVASPIN 6 (MWCO 10,000) で濃縮し, 同じ緩衝液で平衡化したゲル濾過カラム HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (流速 0.5 mL/min; GE-Healthcare) に供した. sVPE1 プロ型を含む画分を同様に濃縮し, -80 °C で保存した. また, 成熟型の sVPE1 は, 培地上清の Ni-sepharose 6 FF の素通り画分から HiLoad 26/60 Q-sepharose HP (GE Healthcare) を用いて精製した. 培地上清の

Ni-sepharose 6 FF の素通り画分に 80%飽和硫酸アンモニウムを加えタンパク質を沈殿させた (4 °C, 一晚). 沈殿を遠心分離 (25,000 × g, 4 °C, 30 分) により回収し, 緩衝液 [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA] で再溶解させた. 再溶解液を同じ緩衝液で透析し (4 °C, 一晚), 同緩衝液で平衡化した HiLoad 26/60 Q-sepharose に供し, 結合したタンパク質を塩濃度直線濃度勾配 (0.1–1 M NaCl を含む同じ緩衝液) で溶出させた. 溶出画分から成熟型 sVPE1 を含む画分を VIVASPIN 6 (MWCO 10,000) を用いて濃縮し, 緩衝液 [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptethanol, 1 mM EDTA] で平衡化した HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (流速0.5 mL/min) に供した. 成熟型 sVPE1 を含む画分を濃縮し–80 °C で保存した.

### GMCP3 の活性化

プロ型の GMCP3 (0.25 mg/mL) を活性化溶液 [100 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.0), 10 mM 2-mercaptethanol, 1 mM EDTA] に懸濁しプレインキュベートした (37 °C, 5 分間). sVPE1 の成熟型を 0.25 μM の終濃度で加え, インキュベートした (37 °C, 90 分). 処理開始から 30, 60, 90 分の時点で 1 μL の上清をとり, 活性測定溶液 [100 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5), 10 mM 2-mercaptethanol, 1 mM EDTA, 20 μM Boc-VLK-MCA (Peptide Institute, Osaka, Japan)] を用いて活性測定を行った. また, 処理開始から 15, 30, 60 分の時点で 1 μL の上清をとり, 11%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE および抗 GMCP3 抗体を用いた Western blot 分析に供した.

### 蛍光性ペプチド基質を用いた活性測定

20 μM の蛍光性ペプチド基質 (Boc-VLK-MCA, Z-FR-MCA, Z-AAN-MCA, Ac-YVAD-MCA; Peptide Institute) を含む反応液 [100 mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0–7.0), 10 mM 2-mercaptethanol, 1 mM EDTA] をプレインキュベートした (37 °C, 5 分). 成熟型 sVPE1 (10 nM) あるいは活性化処理後の GMCP3 を加えてインキュベート (37 °C, 60 分) し, 蛍光強度を蛍光分光高度計 (FP-750; Jasco, Tokyo, Japan) により測定した ( $\lambda_{ex} = 370$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm). AMC 標品 (Peptide Institute) の蛍光強度から得られた検量線を基に, AMC 濃度を算出した.

### 種子抽出タンパク質の Western blot 分析

ダイズの登熟種子および発芽子葉をマルチビーズショッカー (MB501S; YASUI KIKAI, Osaka, Japan) により破碎した. 100 mg の破碎種子に対して 500 μL の抽出溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol] を加えて懸濁し, 5 分間煮沸した. 遠

心分離後、10  $\mu$ g のタンパク質を 11%あるいは 13%のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供し、CBB R-250 による染色、あるいは Western blot 分析を行った。ブロットニングにはニトロセルロース膜 (0.45  $\mu$ m; Schleicher and Schuell Inc., Dassel, Germany)を用いた。ブロットニング後、ブロッッキング溶液 [Tris-buffered saline, 0.5% triton X-100, 5% (w/v)スキムミルク] でブロッッキングした (室温, 1 時間)。上記で調製した各プロテアーゼ特異的抗体を一次抗体として反応後 (4 °C, 一晚), アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Promega, Madison, WI, USA) を二次抗体として反応させた (室温, 1 時間)。検出は NBT および BCIP (Promega) を用いた。

### 糖鎖除去

Peptide:N-glycosidase F (PNGase F; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用い、精製した組換え型タンパク質およびダイズ種子抽出タンパク質から糖鎖を除去した。組換え型タンパク質は 5–10  $\mu$ g のタンパク質を Glycoprotein Denaturing Buffer [0.5% (w/v) SDS, 40 mM dithiothreitol] で懸濁し、10 分間煮沸した。室温に冷やし、脱糖鎖反応液 [50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 1% (v/v) NP-40] の条件で PNGase F を加え反応させた (37 °C, 一晚)。また、SDS を含む抽出液で抽出した登熟種子タンパク質 (5  $\mu$ g) を、タンパク質濃度が 1 mg/mL になるように脱糖鎖反応液で希釈し、PNGase F を加えて反応させた (37 °C, 一晚)。陰性対照実験では PNGase F の代わりに緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50% (v/v) glycerol] を加えた。反応産物を SDS-PAGE に供し CBB R-250 で検出した。

### 免疫電子顕微鏡観察法

登熟種子 (200 mg) を 1.0 mm に切断し、切片を固定液 [0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde] により固定した。固定後の切片を 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) で洗浄後、エタノール上昇系 [10% (v/v), 30%, 50%, 70%  $\times$  three times, 90%, 99.9%  $\times$  three times, 10 min for each wash] により脱水した。続いて LR-white (London Resin, Basingstoke, UK)/ethanol 1:2 (v/v) に 2–6 時間, LR-white/ethanol 2:1 (v/v) に 2–6 時間, 100% LR-white に 2 日間浸して置換し、ビームカプセル (Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan) に入れて UV を照射 (4 °C, 2 日間) して包埋した。ウルトラミクロトームを用いて組織切片から 70 nm の超薄切片を作製し、金コロイド法による免疫電子顕微鏡観察を行った。1% (w/v) BSA-PBS によりブロッッキングし、抗 GMCP3 抗血清を結合させた (室温, 1 時間)。1% (w/v) BSA-PBS で洗浄後、15 nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (H+L, Auro Probe EM; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を結合

Table 2. シロイヌナズナの登熟種子で発現するプロテアーゼ遺伝子

Gene ID	Panther annotation	Name or TAIR description	Mature Green stage embryo proper
At1g62290	ASPARTIC PROTEINASE-RELATED (PTHR13683:SF85)	AtAPA2	4899.6
At3g54940	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF42)	RD19D	4697.2
AtCg00670	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT (PTHR10381)	ClpP	4404.3
At1g62710	VACUOLAR PROCESSING ENZYME-RELATED (PTHR12000:SF2)	βVPE	4198.8
At1g11910	ASPARTIC PROTEINASE-RELATED (PTHR13683:SF85)	AtAPA1	2972.1
At3g12203	SERINE CARBOXYPEPTIDASE I (PLANTS) (PTHR11802:SF7)	SCPL17	2169.1
At4g27450	ASPARAGINE SYNTHETASE (PTHR11772)	Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs	2111.5
At1g53280	THIJ-RELATED (PTHR11019:SF4)	ATDJ1B	1558.2
At1g17430	HYDROLASE, ALPHA/BETA FOLD FAMILY PROTEIN (PTHR10992:SF163)	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1476.9
At1g09750	CHLOROPLAST NUCLEIOD DNA-BINDING-RELATED (PTHR13683:SF98)	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1269.9
At4g20850	TRIPTEIDYL-PEPTIDASE 2 (PTHR10795:SF2)	TPP2	1229.9
At1g52760	PHOSPHOLIPASE-RELATED	LYSOPL2	1208.7
At5g23540	26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 14 (PTHR10410:SF5)	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	1061.7
At1g52600	SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX CATALYTIC SUBUNIT SEC11C (PTHR10806:SF3)	Peptidase S24/S26A/S26B/S26C family protein	1005.0
At1g56450	PROTEASOME SUBUNIT BETA TYPE 4 (PTHR11599:SF5)	20S PROTEASOME BETA SUBUNIT G1	994.9
At4g11310 At4g11320	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	AtCP1 AtCP2	970.6
At4g36190	PROLYL CARBOXYPEPTIDASE LIKE (PTHR11010:SF2)	Serine carboxypeptidase S28 family protein	943.7
At5g43600	SUBFAMILY NOT NAMED (PTHR11014:SF19)	ATAAH-2	926.2
At1g02305	CATHEPSIN B (PTHR12411:SF16)	CTB15	803.2
At1g63770	AMINOPEPTIDASE (PTHR11533:SF8)	Peptidase M1 family protein	758.3

Table 3. ダイズの登熟種子で発現するプロテアーゼ遺伝子

Gene	Panther annotation	seed (42DAF)
Glyma08g12270	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	16100
Glyma10g35100	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	1110
Glyma06g42780	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	181
Glyma06g02500	SUBTILISIN-LIKE PROTEASE (PLANT) (PTHR10795:SF17)	115
Glyma17g37400	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF42)	104
Glyma17g17850	SUBTILISIN-LIKE PROTEASE (PLANT) (PTHR10795:SF17)	91
Glyma19g22730	LEUCINE AMINOPEPTIDASE-RELATED (PTHR11963)	71
Glyma06g03050	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF42)	64
Glyma15g19580	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF50)	62
Glyma17g14680	VACUOLAR PROCESSING ENZYME-RELATED (PTHR12000:SF2)	60
Glyma14g40670	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF42)	54
Glyma05g04230	VACUOLAR PROCESSING ENZYME-RELATED (PTHR12000:SF2)	49
Glyma12g03570	SUBTILISIN-LIKE PROTEASE (PLANT) (PTHR10795:SF17)	43
Glyma04g03020	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF42)	38
Glyma09g08100	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF50)	20
Glyma03g42440	SUBTILISIN-LIKE PROTEASE (PLANT) (PTHR10795:SF17)	20
Glyma17g35720	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	18
Glyma16g30190	TRIPTEIDYL-PEPTIDASE 2 (PTHR10795:SF2)	18
Glyma14g09440	CYSTEINE PROTEASE (PTHR12411:SF44)	17
Glyma17g34900	VACUOLAR PROCESSING ENZYME-RELATED (PTHR12000:SF2)	17

させた (室温, 1 時間). グリッドを PBS および蒸留水で洗浄後, 4% (w/v) uranyl acetate および 80 mM lead nitrate により電子染色し, 透過型電子顕微鏡 (model H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan)で観察した.

## 結果および考察

### トランスクリプトームデータの解析

シロイヌナズナとダイズの登熟種子において発現しているプロテアーゼ候補を, 公開されているトランスクリプトームデータを用いて探索した. まずシロイヌナズナのプロテアーゼとして推定される遺伝

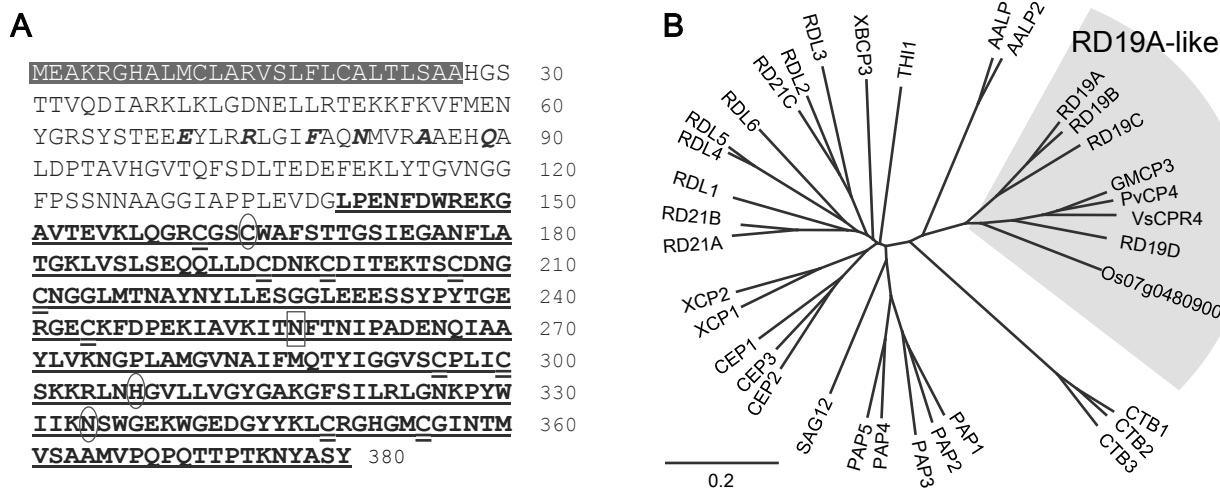


子 ID を MEROPS から取得した。Le らのトランスクリプトームデータ [3] を活用し、登熟種子の子葉 (embryo proper) で高発現しているプロテアーゼ遺伝子の候補を探索した。Table 2 に、シロイヌナズナの推定プロテアーゼ遺伝子の中で登熟種子における高発現が示唆された上位 20 遺伝子を示す。種子貯蔵タンパク質のプロセシング酵素として知られる VPE [ $\beta$ VPE (At1g62710)] と AP [*AtAP A1* (At1g11910), *AtAP A2* (At1g62290)] の高発現が示された。また、システインプロテアーゼの C1 ファミリーに属すると推定される *RD19D* (At3g54940) が VPE や AP と同様に登熟種子で高発現していることが示唆された。続いて Severin らのダイズのトランスクリプトームデータ [6] を活用し、ダイズ登熟種子 (42 day after flowering, DAF) におけるプロテアーゼ候補の遺伝子発現解析を行った。ダイズのプロテアーゼとして推定された遺伝子のうち、登熟種子で高発現していると推定された上位 20 遺伝子を Table 3 に示す。その結果、システインプロテアーゼの C1 ファミリーに属すると推定される遺伝子がシロイヌナズナに比べて多数発現している可能性が示された。その中で、特に発現が多いと示された Glyma08g12270 は P34/Gly m Bd 30K をコードする遺伝子であり、C1 ファミリーに属する遺伝子由来と推定されるがプロテアーゼ活性中心のシステイン残基が変異した非プロテアーゼタンパク質であった [8]。次に高発現の可能性が示された Glyma10g35100 遺伝子は NCBI の Blast で検索した結果、C1 ファミリーに属すると推定される *GMCP3* であった。C1 ファミリーに属するプロテアーゼは、一般的にアルギニン残基やリシン残基のカルボキシル基側で基質を切断する傾向が示されている [9]。したがって、*RD19D* や *GMCP3* の遺伝子産物はこれまでに既知の種子貯蔵タンパク質プロセシング酵素である VPEs や APs と異なる基質特異性を示すプロテアーゼである可能性が考えられた。

### GMCP3 アミノ酸配列

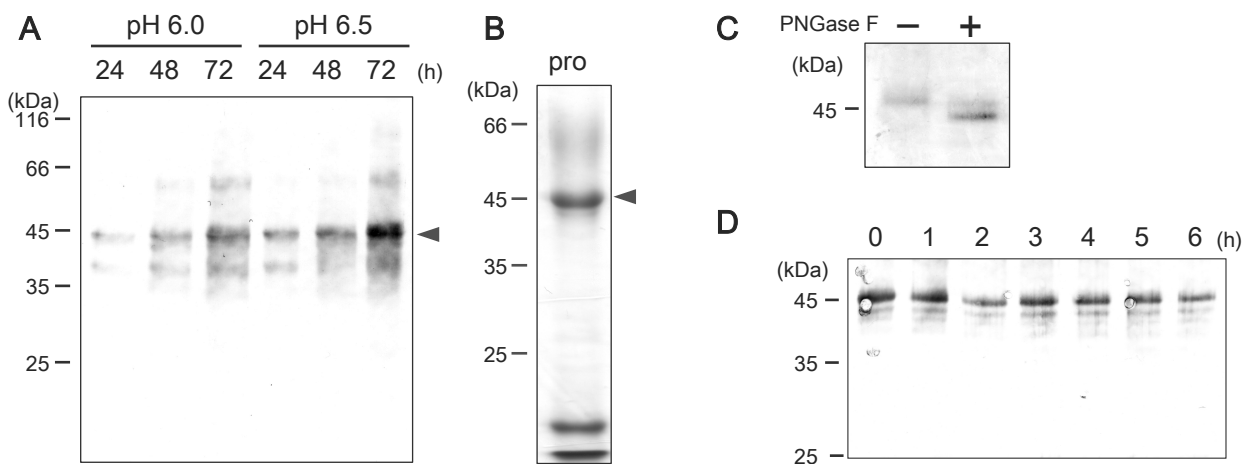
GMCP3 のアミノ酸配列を Fig. 1A に示す。GMCP3 のアミノ酸配列は N 末端側から、シグナル配列 (Met1-Ala27), プロ領域 (His28-Gly139), プロテアーゼ領域 (Leu140-Tyr380) と推定された。プロテアーゼ領域には活性中心のシステイン残基 (Cys164) とヒスチジン残基 (His307), および His307 のイミダゾール環を適切な配向に固定するアスパラギン残基 (Asn334) と推定されるアミノ酸残基が含まれた [10]。GMCP3 の分子サイズはアミノ酸配列からプロ型が 38.7 kDa, 成熟型が 26.4 kDa と推定された。GMCP3 はパパイノフォルド構造を形成することが、ヒトのカテプシン L プロ型およびカテプシン F 成熟型の立体構造をテンプレートとしたホモロジーモデリングにより示唆された (データ省略)。

近年、植物の C1 ファミリーに属する植物のプロテアーゼがシロイヌナズナのプロテアーゼ (31 遺伝子) を基に体系的に分類された [11]。GMCP3 とシロイヌナズナの C1 ファミリーに属するプロテアーゼ



**Figure 1. GMCP3 のアミノ酸配列および分子系統樹.** (A) GMCP3 (Glyma10g35100) のアミノ酸配列. 抗体の作製に用いた成熟型プロテアーゼ領域 (Leu140–Tyr380) を下線で示す. 活性中心のシステイン残基 (Cys164) とヒスチジン残基 (His307), およびアスパラギン残基 (Asn334) を円で, 推定糖鎖付加部位 (Asn257) を四角で表す. 灰色部は SignalP 4.0 で推定されたシグナル配列. また, 斜体太字のアミノ酸はプロ領域に含まれる ERFNAQ モチーフを示す. 二重下線は, ジスルフィド結合を構成するシステイン残基である. (B) C1 ファミリーに属するプロテアーゼのアミノ酸配列をアライメントし, 近隣結合法により系統樹を作成した. 用いた配列は以下である. *Arabidopsis thaliana* C1 proteases [8], Soybean GMCP3 (Glyma10g35100), *Phaseolus vulgaris* PvCP4 (Z99955.1), *Vicia sativa* VsCP4 (Z99172.1), *Oryza sativa* (Os07g0480900).

をコードする 31 遺伝子から推定されたアミノ酸配列をアライメントし分子系統樹を作成した結果, GMCP3 は RD19A グループ (サブファミリー7) に含まれた (Fig. 1B). ERFNAQ モチーフや, ジスルフィド結合を形成すると推定されるシステイン残基の数, そして推定糖鎖付加部位などの RD19A グループの特徴が GMCP3 の推定アミノ酸配列にみられた (Fig. 1A). また, GMCP3 のアミノ酸配列は RD19A グループの中でも RD19D と類似し, GMCP3 と RD19D のプロテアーゼ領域のアミノ酸配列相同性は 76%を示した. また, 登熟種子で発現するインゲンマメの PvCP4 (GenBank accession no. Z99955.1) [12], カラスノエンドウの VsCPR4 (Z99172.1) [13] も同じく RD19D に類似していた (Fig. 1B). RD19D, PvCP4, VsCPR4, GMCP3 の mRNA 量は全て, 種子の登熟期に発現が上昇することが過去に示されている [10–13]. また, イネのゲノム上からも RD19D のオーソログをコードすると推測される遺伝子 Os07g0480900 が見付き, 公開トランスクリプトームデータを用いた遺伝子発現解析の結果, 登熟種子で特異的に発現することが示された (データ省略). したがって, RD19D のオーソログプロテアーゼは多様な植物で高度に保存されていると考えられるが, これらの遺伝子産物の登熟種子における生理的役



**Figure 2. *Pichia pastoris* による組換え型 GMCP3 の発現.** (A) GMCP3 の分泌発現結果. X-33/GMCP3 を BMMY 培地で発現誘導し, 72 時間培養した. 抗 GMCP3 抗体を用いた Western blot 分析により培地上清中の GMCP3 を検出した. 矢尻は組換え型 GMCP3 のプロ型と推定されるバンドを示す. (B) 精製した組換え型 GMCP3 のプロ型 (矢尻) の CBB R-250 染色による SDS-PAGE 電気泳動像. 低分子側に見えるバンドは GMCP3 抗体が交差するため, 組換え型 GMCP3 の分解物と考えられる. (C) 糖鎖付加の検証. 精製した組換え型 GMCP3 のプロ型を PNGase F 処理し (+), SDS-PAGE に供し CBB R-250 による染色を行った. コントロールとして PNGase F 処理していない GMCP3 (-) を泳動した. (D) GMCP3 の自己活性化の有無の検証. 精製した GMCP3 プロ型を pH 4.2, 37 °C でインキュベートし, 上清を Western blot 分析に供した.

割は不明である. したがって, 本研究ではダイズの GMCP3 に着目した.

### 酵母 *Pichia pastoris* による組換え型 GMCP3 の発現

GMCP3 のプロテアーゼ活性を確認するために, メタノール資化性菌 *Pichia pastoris* を用いた発現系により組換え型 GMCP3 を調製した. *Pichia pastoris* を用いた分泌発現系は C1 ファミリーに属するプロテアーゼの発現系として推奨されており, 内在性のシステインプロテアーゼを発現せず, 分泌される他のタンパク質も少ない [14]. 分泌発現系を利用するために, 出芽酵母の  $\alpha$  因子のシグナル配列およびプロ領域からなる配列 ( $\alpha$  因子シグナル配列) が含まれる pPICZ  $\alpha$  ベクターを用いた. GMCP3 のプロプロテアーゼ配列の両末端に His-tag を付加し, その N 末端側に  $\alpha$  因子シグナル配列を融合し, X-33 株で発現させた. メタノールにより発現を誘導して培養し, 抗 GMCP3 抗体を用いた Western blot 分析により培地上清中への GMCP3 の分泌を確認した. その結果, プロ型と推定される約 46 kDa のバンドが培地上清から確認された (Fig. 2A). 発現誘導時の培養条件を, pH 6.0 から pH 6.5 に変更すると, 組換え型 GMCP3 の分泌量が上昇した. また, 培地上清中のペプチダーゼ活性を分析した結果, Z-FR-MCA に対するペプチダーゼ活性は検出されなかった (データ省略). これらの結果から, 組換え型 GMCP3 は可溶性で不活性のプロ型で発現し, 培地中に分泌されたと考えられた. 次に Ni カラムを用いた金属アフィニティー精製により, 組換え型 GMCP3 のプロプロテアーゼを精製した (Fig. 2B). 精製された組換え型

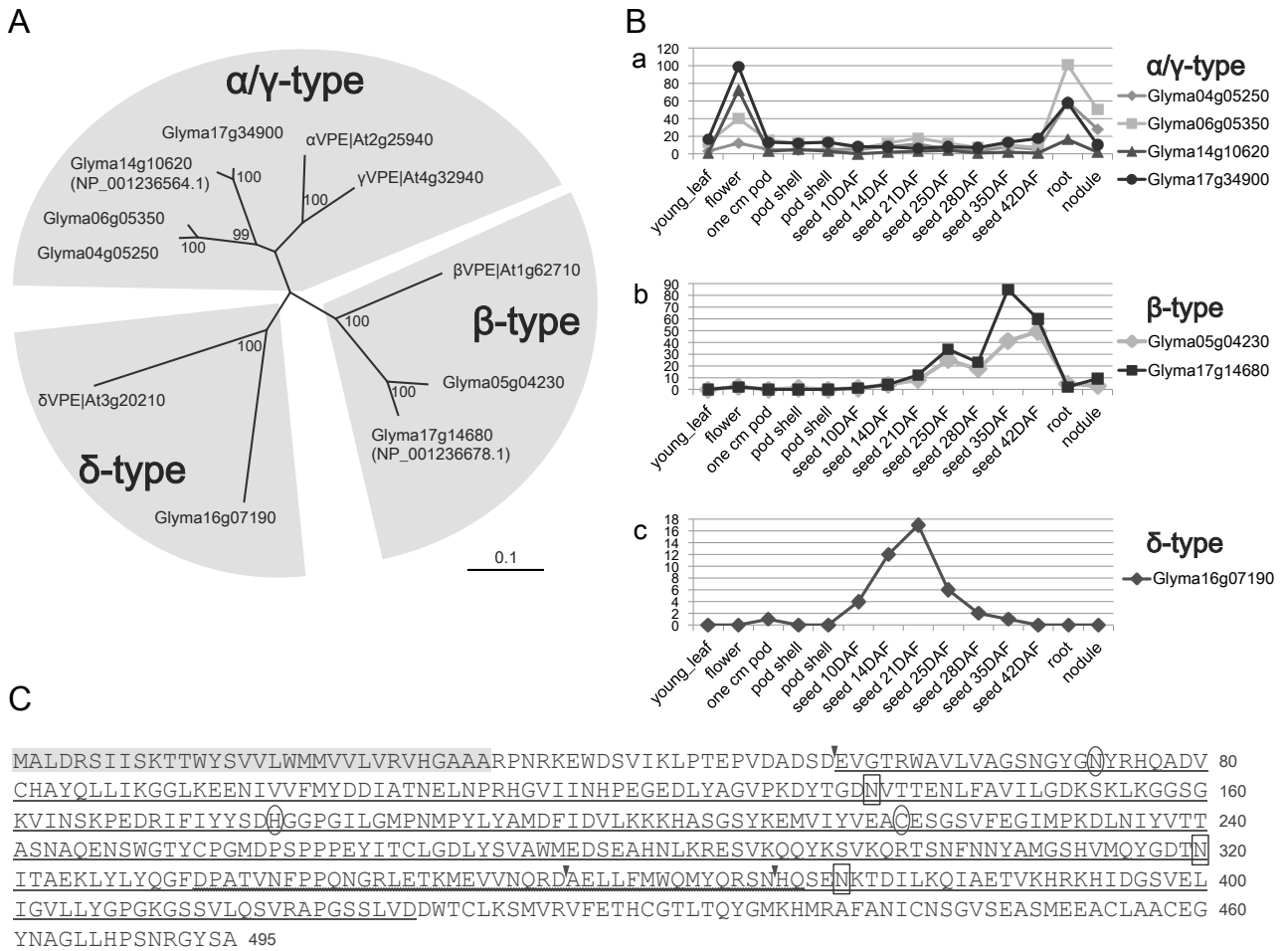
GMCP3 は約 46 kDa であり、両末端 His-tag を含むプロ型 GMCP3 のアミノ酸配列から予測される分子サイズ (41 kDa) よりも移動度が低かったことから、糖鎖が付加されている可能性が考えられた。PNGase F 処理を行うと組換え型 GMCP3 プロプロテアーゼの電気泳動における移動度が変化したことから、組換え型 GMCP3 の糖鎖付加が示された (Fig. 2C)。これらの結果から、*Pichia pastoris* で糖鎖が付加された不活性のプロ型組換え型として発現し培地中に分泌された GMCP3 が精製されたことが示された。

GMCP3 のペプチダーゼ活性を分析するため、不活性のプロ型 GMCP3 の活性化を試みた。パピンをはじめとする C1 ファミリーに属するプロテアーゼには、酸性条件下において自己活性化機構により活性化するものがいくつかある [15]。しかし、組換え型の GMCP3 プロ型を酸性条件下 (pH 4.0–6.0) でインキュベートしてもプロセッシングは起きず (Fig. 2D)、ペプチダーゼ活性は変化しなかった。したがって、GMCP3 はその他のプロテアーゼによりプロセッシングされて成熟化すると考えられた。ただし、一般的に C1 ファミリーに属するプロテアーゼの組換え型の活性化において効果的に使用される Pepsin による活性化は観察されなかった (データ省略) [14]。

### 酵母 *Pichia pastoris* による組換え型 sVPE1 の発現

GMCP3 の推定プロセッシング部位 (Gly139-Leu140) のプロ領域側にはアスパラギン酸残基 (Asn138) が存在する (Fig. 1A)。アスパラギン酸残基の C 末端側で基質を切断する VPE により、GMCP3 が Asn138 の C 末端側でプロセッシングされることを期待し、ダイズの登熟種子で発現する VPE の組換え型の調製を試みた。

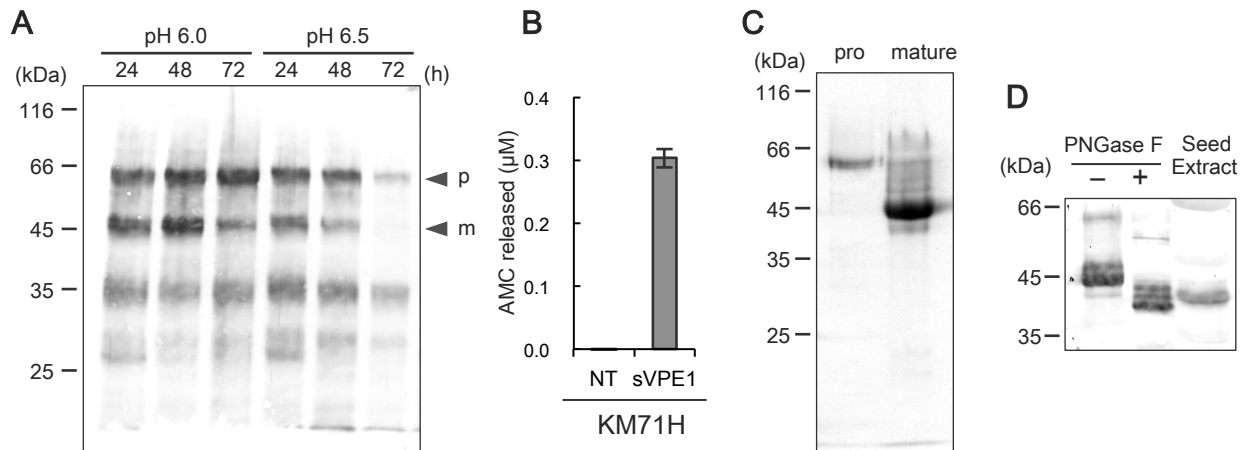
まず発現に用いる VPE 遺伝子を決定するためにダイズゲノムの Blast 検索を行った結果、VPE をコードすると推定される遺伝子が 7 遺伝子見つかった。シロイヌナズナには VPE 遺伝子が 4 遺伝子存在し ( $\alpha$  VPE, At2g25940;  $\beta$  VPE, At1g62710;  $\gamma$  VPE, At4g32940;  $\delta$  VPE, At3g20210)、それらは異なる発現動態を示す [16]。ダイズの推定 VPE 遺伝子から推定されたアミノ酸配列とシロイヌナズナ VPE のアミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成した結果、ダイズの推定 VPE はシロイヌナズナの VPE と同様に、 $\alpha/\gamma$  タイプ、 $\beta$  タイプ、 $\delta$  タイプに分類された (Fig. 3A)。これらのダイズ VPE 遺伝子は、公開されているトランスクリプトームデータを用いた遺伝子発現解析の結果、タイプ毎に異なる発現動態を示し、シロイヌナズナと同様に  $\beta$  タイプの VPE (Glyma05g04230, Glyma17g14680) が登熟種子特異的高発現していることが示唆された (Fig. 3B)。 $\beta$  タイプに分類されたダイズ VPE のうち、soybean VPE1 (sVPE1) として報告されている Glyma17g14680 の組換え型タンパク質を *Pichia pastoris* 発現系を用いて調製した [17]。C1 ファミリーに属するプロテアーゼと同様に VPE も *Pichia pastoris* を用いた



**Figure 3. サイズ VPE genes.** (A) 分子系統樹. シロイヌナズナとダイズの VPE 遺伝子のアミノ酸配列を ClustalW でアライメントし, 無根系統樹を近隣結合法により作成した. ブートストラップ値を各節に示す. (B) サイズ VPE の発現動態. Serven らの公開トランスクリプトームを用い, VPE の遺伝子発現解析を行った. α/γタイプ(a), βタイプ(b), δタイプ(c)に分けて示す. (C)sVPE1 (Glyma17g14680) のアミノ酸配列. 抗体作製に用いた領域を下線で示す. また, 波下線で Activation domain (Asp333-Gln373) を示す. 活性中心のシステイン残基 (Cys270) とヒスチジン残基 (His178), およびアスパラギン残基 (Asn73) を円で, 推定糖鎖付加部位 (Asn138, Asn320, Asn376) を四角で表す. 灰色部は SignalP 4.0 で推定されたシグナル配列. 矢尻は N 末端側プロ領域および C 末端側の推定プロセッシング部位 (Asp55, Asp357, Asn371 の C 末端側) である.

発現の成功例がある [18].

GMCP3 と同様に, 両末端に His-tag を付加した sVPE1 のプロプロテアーゼ配列を α 因子シグナル配列と融合し, KM71H 株で発現させた (Fig. 4). 抗 sVPE1 抗体を用いた Western blot 分析により, 培地上清中への組換え型 sVPE1 の分泌を確認した結果, 約 60 kDa と約 46 kDa のバンドが強く検出された (Fig. 4A). 両末端 His-tag を含む VPE のプロ型の分子サイズは, 53.5 kDa と推定された. また, 過去にダイズの液胞から精製された VPE1 の成熟型と推定されるバンドは 39 kDa とされる [17]. sVPE1 の配列には推定糖鎖付加部位が 3 カ所あり, 検出されたバンドはそれぞれ糖鎖で修飾されたプロ型



**Figure 4. *Pichia pastoris* による組換え型 sVPE1 の発現.** (A) sVPE1 の分泌発現. KM71H/sVPE1 を BMMY 培地で発現誘導し, 72 時間培養した. 培地上清中の sVPE1 を, 抗 sVPE1 抗体を用いた Western blot 分析により検出した. (B) sVPE1 発現培地中のペプチダーゼ活性. KM71H の非形質転換体 (NT) および sVPE1 発現株 (sVPE1) を BMMY 培地で発現誘導し, 24 時間後の培地上清 (10  $\mu$ L) 中の Z-AAN-MCA に対するペプチダーゼ活性を測定した. 1 時間の活性測定処理により遊離した AMC 濃度を示す. (C) 組換え型 sVPE1 のプロ型 (pro) および成熟型 (mature) の SDS-PAGE 電気泳動像. (D) 糖鎖付加の検証. 精製した成熟型 sVPE1 を PNGase F 処理し (+), 抗 sVPE1 抗体を用いた Western blot 分析に供した. コントロールとして PNGase F 処理していない sVPE1 (-), ダイズタンパク質抽出液 (Seed Extract) を供した.

(約 60 kDa) と成熟型 (約 45 kDa), そしてその他のバンドは分解物と推定された. 培養条件を pH 6.0 から pH 6.5 に変更すると, 分泌された組換え型 sVPE1 が顕著に分解された. これはおそらく中性条件で活性を持つ *Pichia* 細胞内因性のプロテアーゼによる分解であると考えられる. また, 組換え型 sVPE1 を発現する *Pichia* 酵母の培地上清のペプチダーゼ活性を分析した結果, 非形質転換体とは異なり, VPEs が一般的に切断する蛍光性ペプチド基質 Z-AAN-MCA に対するペプチダーゼ活性を示した (Fig. 4B). したがって組換え型 sVPE1 の成熟型プロテアーゼが活性を持つことが示唆された. 続いて, Ni カラムを用いて培地上清からプロ型と推定される約 60 kDa の sVPE1 が精製され (Fig. 4C), Ni カラムの素通り画分から陰イオン交換カラムを用いて成熟型と推定される約 45 kDa の sVPE1 が精製された (Fig. 4C). 精製した成熟型と推定される約 45 kDa の sVPE1 に PNGase F を作用させると電気泳動における移動度が変化したことにより, 糖鎖修飾が示された (Fig. 4D). 糖鎖を除去した約 45 kDa の組換え型 sVPE1 は, ダイズ内在性の sVPE1 よりも電気泳動における移動度が大きかったから, 成熟型の末端配列が少し異なる可能性が考えられる. これらの結果, *Pichia pastoris* を利用した発現系により組換え型の sVPE1 はプロテアーゼと成熟型プロテアーゼとして精製され, それらには糖鎖が付加されていることが示された.

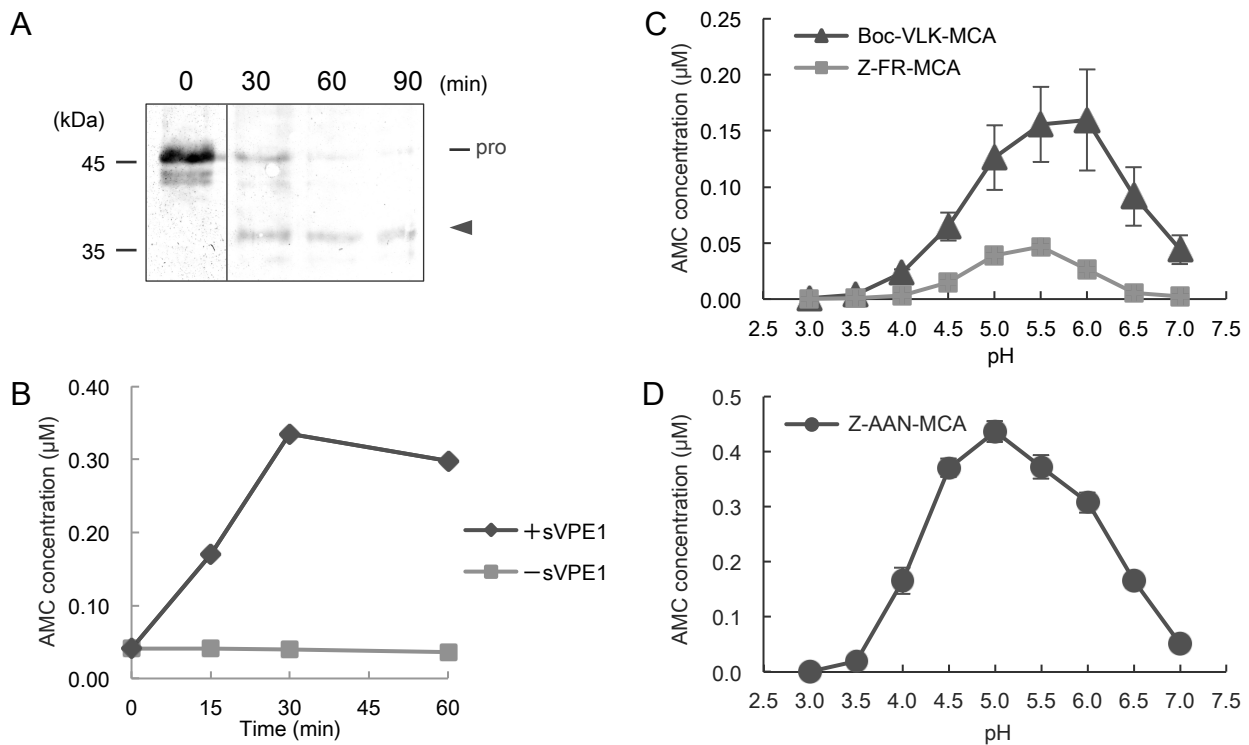
Pichia 酵母を用いたタンパク質発現系により、組換え型 sVPE1 は成熟型で分泌されたため、分泌過程で組換え型 sVPE1 は成熟化したと考察される。精製された組換え型 sVPE1 の成熟型プロテアーゼが Ni カラムに結合しなかったことは、両末端の His-tag を欠いており、両末端のプロドメインがプロセッシングにより除去されたことを示唆する。sVPE1 が属するシステインプロテアーゼの C13 ファミリーは酸性条件下で自己活性化する [19,20]。したがって、組換え型 sVPE1 も自己活性化を示したと考えられる。プロセッシング部位は、N 末端側がアスパラギン酸残基 (Asp55) の C 末端側であると考えられており [19]、C 末端基側はヒトの C13 ファミリーに属するプロテアーゼである legumain とのアミノ酸配列のアライメント結果から、Activation domain 内のアスパラギン酸残基 (Asp357) あるいはアスパラギン残基 (Asn371) の C 末端側であると考察される (Fig. 1C) [20]。

### 組換え型 GMCP3 プロプロテアーゼの活性化

sVPE1 による GMCP3 の活性化を検証するために、組換え型 GMCP3 のプロ型に成熟型 sVPE1 を作用させ、酸性条件下 (pH 5.0) で 30–60 分間インキュベートした。インキュベートした上清を、抗 GMCP3 抗体を用いた Western blot 分析に供した結果、プロ型 GMCP3 がプロセッシングされて約 35 kDa のバンドが検出された (Fig. 5A)。ただし、GMCP3 の成熟型はそのアミノ酸配列から 26.4 kDa であると推定されるため、期待されたアスパラギン酸残基 (Asp138) ではなく、より N 末端側のアスパラギン残基あるいはアスパラギン酸残基でプロセッシングされたと考えられる。プロセッシングされた GMCP3 のペプチダーゼ活性を分析するために、蛍光性ペプチド基質 Boc-VLK-MCA を用いたペプチダーゼ活性測定を行った。プロ型 GMCP3 を単独でインキュベートしても Boc-VLK-MCA に対する活性は上昇しなかったが、プロ型 GMCP3 に対して成熟型 sVPE1 を作用させるとインキュベート時間に応じて Boc-VLK-MCA に対するペプチダーゼ活性が上昇した (Fig. 5B)。sVPE1 単独では Boc-VLK-MCA を全く切断しなかったため、この基質に対するペプチダーゼ活性は GMCP3 の活性であることが示された。これらの結果から、*in vitro* において組換え型 GMCP3 は sVPE1 によりプロセッシングされ活性型 (中間型) になることが明らかになった。

### 組換え型 GMCP3 と sVPE1 のペプチダーゼ活性

組換え型の成熟型 sVPE1 および活性型 GMCP3 のペプチダーゼ活性を、蛍光性ペプチド基質を用いて分析した。GMCP3 の活性測定には Boc-VLK-MCA と、C1 ファミリーに属するプロテアーゼの活性測定において一般的に使用されるペプチド基質 Z-FR-MCA を用いた。その結果、sVPE1 により活性化された GMCP3 は、酸性条件下 (pH 5.0–6.0) で Boc-VLK-MCA と Z-FR-MCA の両方を切断した (Fig. 5C)。こ



これらのペプチド基質を組換え型 sVPE1 が全く切断しないことが確かめられた (データ省略). したがって, 組換え型 GMCP3

**Figure 5. 組換え型 GMCP3 の活性化およびペプチダーゼ活性の分析.** (A) Western blot 分析による活性化した GMCP3 の検出. 0.25 μM の sVPE1 による GMCP3 活性化処理を行い, 30, 60, 90 分後にサンプリングした上清を, 抗 GMCP3 抗体を用いた Western blot 分析に供した. プロ型 (pro) および活性化型と推定されるバンド (矢尻) を示す. (B) GMCP3 の sVPE1 による活性化. GMCP3 を sVPE1 とともに 37 °C でインキュベートし, 経時的に上清を採取し, pH 5.5 の条件で Boc-VLK-MCA に対するプロテアーゼ活性を測定した. (C) 活性化型 GMCP3 のペプチダーゼ活性. Boc-VLK-MCA および Z-FR-MCA に対するペプチダーゼ活性を測定した. (D) sVPE1 の Z-AAN-MCA に対するペプチダーゼ活性. (C) (D) はどちらも活性測定処理 1 時間あたりに産生された AMC 濃度で示す. Citrate-phosphate buffer (pH 3.0–7.0), 37 °C で 1 時間反応させた. 溶液中の AMC の濃度を, 標準 AMC を用いた検量線を用いて算出した. エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

は酸性条件下で基質のタンパク質をリシン残基やアルギニン残基の C 末端側で切断することが明らかになった. リシン残基やアルギニン残基の C 末端側で基質を切断する基質特異性は, 一般的な C1 ファミリーに属するプロテアーゼと共通する [9]. 成熟型 sVPE1 の活性測定には Z-AAN-MCA と, C14 ファミリーに属するヒトのカスパーゼ 1 とカスパーゼ 4 の基質である Ac-YVAD-MCA を用いた. 組換え型 sVPE1 は Z-AAN-MCA を酸性条件下で切断した (Fig. 5D). これらの結果から, 組換え型の GMCP3 と sVPE1 はともにペプチダーゼ活性を持ち, 至適 pH が植物の液胞条件と同じ酸性条件 (pH 5.0–6.0) であることが明らかとなった [21–23]. 一方で, 組換え型 sVPE1 は Ac-YVAD-MCA を全く切断しなかった (データ省略). シロイヌナズナの γ VPE および δ VPE は Ac-YVAD-MCA を認識可能である [24,25]. また,



ダイズの葉においても $\alpha/\gamma$ タイプのVPEの発現が確認されており、それらの発現量が葉の抽出液のAc-YVAD-MCAに対するペプチダーゼ活性と相関することが示されている [26]。したがって、 $\alpha/\gamma$ タイプや $\delta$ タイプのVPEと $\beta$ タイプのVPEとの間では、基質のアスパラギン酸残基の前後アミノ酸配列に対する特異性が異なる可能性が示唆された。

### ダイズ登熟種子および発芽期におけるGMCP3の発現

ダイズ種子におけるGMCP3の発現については、登熟種子における発現と、傷害ストレスや乾燥ストレス下での発現がmRNAレベルで報告されている [10,27]。登熟種子におけるGMCP3の発現をタンパク質レベルで確認するために、種子タンパク質を抽出してWestern blot分析を行い、既知のダイズ登熟種子プロテアーゼであるsVPE1およびsoyAP1と比較した(データ省略)。

まず、登熟種子におけるGMCP3の発現をタンパク質レベルで確認した。登熟種子からタンパク質を抽出しSDS-PAGEで貯蔵タンパク質の蓄積状況を調べた結果、 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha$ と $\alpha'$ サブユニットは50–200 mgの時期から高蓄積し、 $\beta$ サブユニットについては400 mgの時期から顕著な蓄積が観察された。また、グリシニンは特に100–200 mgの段階から蓄積量が増加した。続いて、各プロテアーゼに対する抗体を用いたWestern blot分析を行った。抗GMCP3抗体を用いた結果、約28 kDaと約30 kDaのバンドが強く検出された。アミノ酸配列から推定されるGMCP3のプロ型および成熟型の分子量は、それぞれ38.7 kDaと26.4 kDaである。したがって、約28 kDaの移動度を示すバンドが成熟型GMCP3であり、約30 kDaの移動度を示すバンドは中間型GMCP3であると推定された。また、プロ型と推定されるバンドは登熟初期(50 mg)の段階で検出された。GMCP3の成熟型は登熟初期から種子の発達期を通して乾燥種子に至るまで検出された。約30 kDaの中間型GMCP3のバンドは特に登熟中期(200–600 mg)において検出された。同様に抗sVPE1抗体と抗soyAP1抗体を用いたWestern blot分析を行った結果、sVPE1およびsoyAP1のタンパク質も同様に登熟種子で発現していることが確認できた。sVPE1は登熟種子、特に200–600 mgの登熟種子から顕著に検出された。バンドサイズは以前の報告にある通り約39 kDaであり、成熟型であると考えられた [17]。soyAP1は重鎖と軽鎖であると推定される二本鎖が検出された。特に軽鎖が強く検出されたが、本研究で調製した抗体の特徴によると推測される。soyAP1の軽鎖は登熟種子から乾燥種子を通して検出された。これらの結果、GMCP3は既知のプロセシング酵素であるsVPE1やsoyAP1とともに、種子登熟を通して発現していることがタンパク質レベルで確認できた。また、登熟種子においてGMCP3はプロセシングされて成熟型、あるいは中間型になっていることが示唆された。

上述の通り、GMCP3 は登熟種子でプロセッシングを受けて成熟化することが明らかになった。しかし *in vivo* における GMCP3 の活性化機構は不明である。植物プロテアーゼの *in vivo* における活性化機構は不明なケースが多い。活性化機構がわかっている例として、シロイヌナズナのサブチリジン様システインプロテアーゼである AtCPY は *in vivo* において  $\gamma$ VPE により成熟化することが示されている [28]。一方で、シロイヌナズナの葉で発現する主要なシステインプロテアーゼ (C1 ファミリー) である RD21A は自己活性化を示さず、VPE や AALP といった主要なプロテアーゼを欠失した植物体でも活性化することが示されており、RD21A をプロセッシングするプロテアーゼは不明である [29]。また、同様に C1 ファミリーに属する Aleurain も活性化に必要な内在性プロテアーゼが不明である [30]。GMCP3 を含むこれらのプロテアーゼの *in vivo* における活性化機構はさらなる研究が必要である。

C1 ファミリーに属するシステインプロテアーゼのいくつかは、ダイズを含む種々の植物種で発芽時に発現量が上昇し、貯蔵タンパク質の分解を担うと考えられている [31–33]。例えばダイズのプロテアーゼ G1 と G2 はそれぞれ活性のピークを吸水後 4 日目と 8 日目に示すことがわかっている [31]。発芽後の子葉における GMCP3, sVPE1, soyAP1 の発現を調べた。吸水後 1–6 日目の子葉からタンパク質を抽出し SDS-PAGE で分析した結果、貯蔵タンパク質の分解が観察された。続いて各プロテアーゼに対する抗体を用いた Western blot 分析を行った結果、GMCP3 と sVPE1 は発現量が上昇することなく減少し、吸水後 5 日目の子葉からは検出されなくなった。また soyAP1 は吸水 2 日目から重鎖と推定されるバンドが検出できなくなり、軽鎖と推定されるバンドは 3 日目で検出されなくなった。さらに 2 日目から 6 日目に至るまで軽鎖より分子サイズが小さなバンドが検出された。これらの結果から、GMCP3, sVPE1, soyAP1 の発芽期における発現動態は、発芽期に種子貯蔵タンパク質を分解するプロテアーゼ G1 および G2 の発現動態と異なることが明らかになった。また、登熟期と発芽期を通して、GMCP3 は既知の登熟種子液胞プロテアーゼ、特に sVPE1 と類似した発現動態を示すことが明らかになった。

GMCP3, sVPE1, soyAP1 はいずれもアミノ酸配列中に N 型糖鎖付加コンセンサス配列を有する。推定糖鎖付加部位は GMCP3 に一カ所 (Asn257), sVPE1 には三カ所 (Asn138, Asn320, Asn376), soyAP1 には重鎖に一カ所 (Asn144) と軽鎖に二カ所 (Asn405, Asn435) 存在する。これらのプロテアーゼが種子細胞内で糖鎖修飾されているかはこれまで確認されていない。これらのプロテアーゼの糖鎖修飾を調べるため、登熟種子から抽出したタンパク質をグリコシダーゼ PNGase F で処理し、各プロテアーゼに対する抗体を用いた Western blot 分析により検出して移動度の変化を確認した (データ省略)。PNGase F は N 型糖タンパク質の高マンノース型糖鎖、ハイブリッド型オリゴ糖鎖、複合型オリゴ糖鎖

の一番内側の N-アセチルグルコサミン残基とアスパラギン残基の間を切断する。したがってほぼ全ての N 型糖鎖を切断することができるが、植物や昆虫に特徴的な  $\alpha$ 1,3-結合コアフコース残基が存在する場合は N 型糖鎖を切断できない。登熟種子タンパク質に PNGase F を処理した結果、GMCP3, sVPE1, soyAPI の電気泳動における移動度に変化がなかった。PNGase F の活性は、高マンノース型の N 型糖鎖付加タンパク質である  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha/\alpha'$ サブユニットの移動度の変化で確認された。したがって、どのプロテアーゼにおいても PNGase F で切断可能な糖鎖は結合していないことが明らかになった。しかし、PNGase F で切断できない N 型糖鎖が各プロテアーゼに付加されている可能性は否定できない。例えば soyAPI のホモログタンパク質である phytepsin とカルドン (*Cynara cardunculus* L.) の cardosin A は、PNGase F により切断できない糖鎖で修飾されていることが示されている [34]。phytepsin は一カ所 (Asn399)、cardosin A は二カ所 (Asn139, Asn432) に糖鎖が付加される。soyAPI においても配列上類似した位置に糖鎖付加部位が保存されており、それらの配列に  $\alpha$ 1,3-結合コアフコース残基を含む糖鎖が存在するかもしれない。

#### ダイズ登熟種子における GMCP3 の細胞内局在

GMCP3 が登熟種子の液胞プロテアーゼであることを確認するため、透過型電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡法により GMCP3 の局在性を観察した。ダイズ登熟種子 (200 mg) のタンパク質貯蔵液胞において金粒子が検出された (データ省略)。したがって、GMCP3 は登熟種子のタンパク質貯蔵液胞に存在することが明らかになった。過去の報告で、sVPE1 はタンパク質貯蔵型液胞から精製された [17]。また、soyAPI も液胞に選別輸送されることが示されている [35]。したがって GMCP3 は登熟種子のタンパク質貯蔵液胞において、sVPE1 や soyAPI と同様に種子貯蔵タンパク質と共在すると考えられる。

第二章における研究の結果、GMCP3 がプロテアーゼ活性を有することを組換え型の GMCP3 を用いて実証した。また、GMCP3 は基質を塩基性アミノ酸残基の C 末端側で切断することが示された。さらに、GMCP3 はダイズの登熟種子で発現し、プロセッシングを受けて成熟化すること、そして登熟種子のタンパク質貯蔵液胞に存在することを明らかにした。したがって、GMCP3 は登熟種子のタンパク質貯蔵液胞において種子貯蔵タンパク質のプロセッシングや分解に関与すると推定され、外来の有用タンパク質の蓄積にも影響を与え得ると考えられる。

#### 引用文献

1. Rawlings ND, Barrett AJ & Bateman A (2012) *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and

inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**, D343–350.

2. Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E & Provart NJ (2005) The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant J* **43**, 153–163.
3. Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamuro JK, Harada JJ & Goldberg RB (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8063–8070.
4. Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N & Rokhsar DS (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**, D1178–1186.
5. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G & Kasprzyk A (2009) BioMart - biological queries made easy. *BMC Genomics* **10**, 22.
6. Severin AJ, Woody JL, Bolon Y-T, Joseph B, Diers BW, Farmer AD, Muehlbauer GJ, Nelson RT, Grant D, Specht JE, Graham MA, Cannon SB, May GD, Vance CP & Shoemaker RC (2010) RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome. *BMC Plant Biol* **10**, 160.
7. Umezawa T, Sakurai T, Totoki Y, Toyoda A, Seki M, Ishiwata A, Akiyama K, Kurotani A, Yoshida T, Mochida K, Kasuga M, Todaka D, Maruyama K, Nakashima K, Enju A, Mizukado S, Ahmed S, Yoshiwara K, Harada K, Tsubokura Y, Hayashi M, Sato S, Anai T, Ishimoto M, Funatsuki H, Teraishi M, Osaki M, Shinano T, Akashi R, Sakaki Y, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2008) Sequencing and analysis of approximately 40,000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res* **15**, 333–346.
8. Li Q-G & Zhang Y-M (2013) The origin and functional transition of *P34*. *Heredity* **110**, 259–266.
9. Choe Y, Leonetti F, Greenbaum DC, Lecaille F, Bogyo M, Brömme D, Ellman JA & Craik CS (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem* **281**, 12824–12832.
10. Nong VH, Becker C & Müntz K (1995) cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 435–438.
11. Richau KH, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya TC, Niessen S, Stüber K, Colby T, Overkleeft HS, Bogyo M & Van der Hoorn RAL (2012) Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol* **158**, 1583–1599.
12. Yamauchi D (2007) Hormonal regulation of the expression of cysteine proteinase genes in germinated cotyledons of common bean seeds. *Plant Biotechnol* **24**, 231–235.
13. Schlereth A, Standhardt D, Mock HP & Müntz K (2001) Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. *Planta* **212**, 718–727.
14. Brömme D, Nallaseth FS & Turk B (2004) Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods* **32**, 199–206.
15. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B & Turk D (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 68–88.

16. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M & Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 404–408.
17. Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M & Hara-Nishimura I (1994) Vacuolar processing enzyme of soybean that converts proproteins to the corresponding mature forms. *Plant Cell Physiol* **35**, 713–718.
18. Santos-Silva LK, Soares-Costa A, Gerald LTS, Meneghin SP & Henrique-Silva F (2012) Recombinant expression and biochemical characterization of sugarcane legumain. *Plant Physiol Biochem* **57**, 181–192.
19. Kuroyanagi M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol* **43**, 143–151.
20. Dall E & Brandstetter H (2012) Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 24–31.
21. Martinière A, Bassil E, Jublanc E, Alcon C, Reguera M, Sentenac H, Blumwald E & Paris N (2013) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and *Arabidopsis* reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell* **25**, 4028–4043.
22. Shen J, Zeng Y, Zhuang X, Sun L, Yao X, Pimpl P & Jiang L (2013) Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant* **6**, 1419–1437.
23. Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R & Staehelin LA (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in *Arabidopsis* embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell* **18**, 2567–2581.
24. Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**, 855–858.
25. Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2005) A vacuolar processing enzyme,  $\delta$ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* **17**, 876–887.
26. Carvalho HH, Silva PA, Mendes GC, Brustolini OJB, Pimenta MR, Gouveia BC, Valente MAS, Ramos HJO, Soares-Ramos JRL & Fontes EPB (2014) The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiol* **164**, 654–670.
27. Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Alonso DL & García-Maroto F (2010) A distinct subfamily of papain-like cysteine proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J Plant Physiol* **167**, 1101–1108.
28. Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V & Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7389–7394.
29. Gu C, Shabab M, Strasser R, Wolters PJ, Shindo T, Niemer M, Kaschani F, Mach L & van der Hoorn RAL (2012) Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **7**, e32422.
30. Holwerda BC, Galvin NJ, Baranski TJ & Rogers JC (1990) In vitro processing of aleurain, a barley vacuolar thiol protease. *Plant Cell* **2**, 1091–1106.
31. Wilson KA, Papastoitosis G, Hartl P & Tan-Wilson AL (1988) Survey of the proteolytic activities degrading the Kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germinating soybeans (*Glycine max*). *Plant Physiol* **88**, 355–360.
32. Asano M, Suzuki S, Kawai M, Miwa T & Shibai H (1999) Characterization of novel cysteine proteases from

- germinating cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *J Biochem* **126**, 296–301.
33. Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A & Tiedemann J (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* **52**, 1741–1752.
  34. Costa J, Ashford DA, Nimtz M, Bento I, Frazão C, Esteves CL, Faro CJ, Kervinen J, Pires E, Verissimo P, Wlodawer A & Carrondo MA (1997) The glycosylation of the aspartic proteinases from barley (*Hordeum vulgare* L.) and cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Eur J Biochem* **243**, 695–700.
  35. Terauchi K, Asakura T, Ueda H, Tamura T, Tamura K, Matsumoto I, Misaka T, Hara-Nishimura I & Abe K (2006) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J Plant Physiol* **3**, 856–862.

### 第三章　　ダイズ basic 7S globulin の湯浴溶出機構の解析

ダイズ種子を用いて有用タンパク質を大量生産する方策の一つ目として、種子貯蔵タンパク質を改変し、有用タンパク質としてタンパク質貯蔵液胞へ蓄積させる研究を第一章で行った。しかし一つ目の方策では、精製する際に種子に含まれるその他のタンパク質や脂質から有用タンパク質を分離する必要がある。したがって、本研究ではダイズ種子を用いた有用タンパク質の生産の二つ目の方策として、有用タンパク質を細胞外へと蓄積させ、高純度で種子外へと溶出させる発現系を考案した。その発現系の構築の基盤に成り得る、basic 7S globulin (Bg7S) の湯浴溶出現象に着目した。

ダイズ種子を約 50 °C の温水に浸漬する（湯浴処理とする）とタンパク質が溶液中に溶出し、その 50-70%を Bg7S が占める [1,2]。湯浴処理によって有用タンパク質を Bg7S のように高純度で溶出させることができれば、溶液中から有用タンパク質を簡易に精製できると考えられる。Bg7S は、ダイズ種子の登熟期に発現し、子葉細胞の細胞外へ蓄積するタンパク質である [3]。しかし、Bg7S の詳細な溶出機構は不明である。本章では、Bg7S の湯浴溶出機構に関する基礎的知見を得ることを目的とした研究を行った。

#### 材料および方法

##### 植物

ダイズ (*Glycine max*, [L.] Merrill) の品種ペキン、タマホマレ、エンレイ、non-GM IOM の乾燥種子を使用した。IOM はアメリカ Indiana, Ohio, Michigan 州で食用に生産されているダイズである [4]。本研究で使用したダイズ種子の平均サイズは、ペキンが 0.12 g/seed, タマホマレが 0.32 g/seed, エンレイが 0.30 g/seed, IOM が 0.15 g/seed だった。

##### 湯浴処理

25 mL の湯浴溶液 [50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 0.2 M NaCl] を温度調整し、各品種の乾燥種子 5 g を浸漬して遮光下で少し振盪ながら保温した (10 °C, 25 °C, 50 °C; 16 時間)。浸漬処理後の溶液を回収して容量を測定し、遠心分離 (25,000 × g, 4 °C, 15 分) を行って上清を回収した。処理後の種子は、蒸留水で洗浄後に -20 °C で保存した。

##### 抗 Bg7S 抗体の調製

Shutov ら [5] の方法を基にして湯浴処理後の溶液から Bg7S を精製した。500 mL の湯浴処理用液

[0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 0.1 M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>] を用いて, 100 g の IOM 乾燥種子を湯浴処理に供した (50 °C, 8 時間). 湯浴処理後の上清を遠心分離 (25,000 × g, 4 °C, 20 分) し, 上清を同じ緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム [26/60 HiTrap SP-sepharose column (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK)] に供し, 結合したタンパク質を直線濃度勾配 (0.1–0.5 M NaCl を含む同じ緩衝液) で溶出させた. Bg7S を含む画分を VIVASPIN 20 (MWCO 5,000; Sartorius, Göttingen, Germany) で限外濃縮してウサギに免疫し, 抗 Bg7S 抗体を調製した.

### 乾燥種子からの Bg7S 精製

Shutov ら [5] の方法を基にして乾燥種子から Bg7S を精製した. まず 20 g の乾燥種子を破碎し, 粉末を 200 mL のヘキサンで脱脂し, 風乾した. 脱脂ダイズ種子粉末を蒸留水で 3 回洗浄し, タンパク質を緩衝液 [0.1 M sodium acetate (pH 5.0), 0.1 M NaCl, 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>] で抽出した. 遠心分離 (25,000 × g, 室温, 20 分) 後, 上清を同じ緩衝液で平衡化した HiLoad 26/60 SP-sepharose HP カラム (GE Healthcare) に供した. 結合したタンパク質を直線濃度勾配 (0.1–0.5 M NaCl を含む同じ緩衝液) で溶出させ, Bg7S を含む画分を回収した.

### タンパク質分析

タンパク質の定量は Protein Assay Rapid Kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) または 2-D Quant Kit (GE-Healthcare) を利用し, BSA を標準タンパク質として用いて行った. デンシトメトリー解析には Image Quant TL (GE-Healthcare) を用いた.

湯浴処理後溶液中の Bg7S 濃度の分析は, SDS-PAGE により分離した Bg7S バンドの CBB 染色バンドのデンシトメトリー解析により行った. 湯浴処理後の上清を遠心分離 (12,000 × g, 4 °C, 20 分) し, 上清中のタンパク質を終濃度 25% (w/v) のトリクロロ酢酸により沈殿させた. 氷上で 30 分静置後, 沈殿を氷冷アセトンにより洗浄した. 沈殿を 1 × SDS 溶液 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.01% (w/v) bromophenol blue] で再溶解し, 6 μg のタンパク質を SDS-PAGE (12%ポリアクリルアミドゲル) に供した. SDS-PAGE 後にタンパク質を CBB R-250 で検出し, デンシトメトリー解析を行った. 全てのタンパク質の染色強度に対する Bg7S の染色強度の割合から, 溶液中のタンパク質濃度に対する Bg7S の割合を算出した. Bg7S のバンドは Bg7S に対する抗血清を用いた Western blot 分析により確認した. SDS-PAGE で分離後, タンパク質をニトロセルロース膜 (0.45 μm; Schleicher and Schuell Inc., Dassel, Germany) にブロッティングした. ブロッティング後のニトロセルロース膜をブロッッキング溶液 [Tris-buffered saline, 0.5% Triton X-100,



5% (w/v) スキムミルク] によりブロッキングした (室温, 1 時間). 抗 Bg7S 抗体を 1 次抗体として反応させ (室温, 1 時間), アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Promega, Madison, WI, USA) を二次抗体として反応させた (室温, 1 時間). 検出は NBT および BCIP (Promega) を用いた.

種子中の Bg7S 量は, 抗 Bg7S 抗体を用いた Western blot 分析により分析した. 乾燥種子および湯浴処理後の種子をマルチビーズショッカー (MB501S; YASUI KIKAI, Osaka, Japan) により破碎し, アセトンおよびヘキサンで脱脂した. タンパク質を破碎種子から 1 × SDS 溶液 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 2.5% (w/v) SDS] を用いて抽出した. 遠心分離 (20,000 × g, 15 分) した上清を 1 × SDS 溶液で希釈し, 7.5 μg のタンパク質を, 12%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供し, 抗 Bg7S 抗体を用いた Western blot 分析を行った. NBT/BCIP により検出した Bg7S のバンドのデンストメトリー解析を行い, 上述で定量した上清中の Bg7S の希釈系列を標準タンパク質として用いて作成した検量線を基に種子中の Bg7S 量を算出した.

#### N 末端配列分析

12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により Bg7S を分離し, PVDF メンブレンに転写した. プロテインシーケンサー Procise 492 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて, Bg7S α 鎖の N 末端配列を分析した. Bg7S 1 と Bg7S2 の N 末端配列はそれぞれ [VTPTK] と [VPIPQ] である [5].

#### 免疫電子顕微鏡法

乾燥種子および湯浴処理した種子を 1.0 mm に切断し, 切片を固定液 [0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.1% (v/v) glutaraldehyde] により固定した. 固定後の切片を 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) で洗浄後, エタノール上昇系 [10% (v/v), 30%, 50%, 70% × three times, 90%, 99.9% × three times, 10 min for each wash] により脱水した. 続いて LR-white (London Resin, Basingstoke, UK)/ethanol 1:2 (v/v) に 2–6 時間, LR-white/ethanol 2:1 (v/v) に 2–6 時間, 100% LR-white に 2 日間浸して置換し, ビームカプセル (Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan) に入れて UV を照射 (4 °C, 2 日間) して包埋した. ウルトラマイクロトームを用いて組織切片から 70 nm の超薄切片を作製し, 金コロイド法による免疫電子顕微鏡観察を行った. 1% (w/v) BSA-PBS によりブロッキングし, 一次抗体として抗 Bg7S 抗血清を結合させた (室温, 1 時間). 1% (w/v) BSA-PBS で洗浄後, 15 nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (H+L, Auro Probe EM; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を結合させた (室温, 1 時間). グリッドを PBS および蒸留水で洗

Table 1. 第三章で用いたプライマー配列

Name		oligonucleotides
Cloning		
Bg7S1	Bg7S1-For	5'-GGT <u>AAGCTT</u> TTGAAGACTCTTTATCATATATGTTCCGG-3'
	Bg7S1-Rev	5'-CC <u>TCTAGA</u> CATCATTTTTGAACGGGTAGAACAAC-3'
Bg7S2	Bg7S2-For	5'-TT <u>CCTCGAG</u> CAACTTAGCTAGTGTGATTGTCCGG-3'
	Bg7S2-Rev	5'-TTGGATCCTAGTGTGGTGTGGGGAATGGGGAC-3'
Sequencing		
Bg7S1	F_Bgl_prom2.4k	5'-GGATCCAATGTCTCTATCTTG-3'
	F_Bgl_prom1.9k	5'-CTTCTTGGAGACACAATAGATGG-3'
	F_Bgl_prom1.2k	5'-GGCGTGGTGGTAGATTATTTTAG-3'
	R_Bgl_prom0.4k	5'-TGAGCAGCTAGCTTGGCTTG-3'
	R_Bgl_prom1.7k	5'-GTAAAGGTGAAGCTACTCTAGC-3'
Bg7S2	F_BgII_prom2.4k	5'-CGGATCACTCAGTATCAAAA-3'
	F_BgII_prom1.8k	5'-CCAATTTAGTATGAAGTATCC-3'
	F_BgII_prom1.1k	5'-GTCTCTCTTTTTTGTTCGTC-3'
	F_BgII_prom0.5k	5'-AGTGTTTAGAACGCCACTTT-3'
	F_BgII_prom1.7k	5'-TTAAGGAGACGAATTGAAGC-3'
	R_BgII_prom2.4k	5'-TTTTGATACTGAGTGATCCG-3'
	R_BgII_prom1.8k	5'-ACATTCACCCGTTTGAATA-3'
	R_BgII_prom1.1k	5'-GACGAACAAAAAGAGAGAC-3'
	R_BgII_prom0.4k	5'-ATTTGTCCCCTCAACATAC-3'

浄後, 4% (w/v) uranyl acetate および 80 mM lead nitrate により電子染色し, 透過型電子顕微鏡 (model H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した.

### Tissue printing

Tissue printing は, Cassab と Varner の方法 [6] を基に行った. ニトロセルロース膜を 0.2 M CaCl<sub>2</sub> で 30 分処理し, 風乾した. 乾燥種子を半分にカットし蒸留水で 2 秒洗浄, キムワイプで余分な水分をふいてニトロセルロース膜に 10 秒押し付けた. また, -20 °C で保存していた湯浴処理後種子を同様にカットして洗浄後, 液体窒素で凍結させ, ニトロセルロース膜に 30 秒以上押し付けた. 5% スキムミルクを含む TBS-T を用いてブロッキング後 (室温, 1 時間), 一次抗体として抗 Bg7S 抗体を反応させ (室温, 1 時間), 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を反応させた (室温, 1 時間). 検出は NBT および BCIP を用いた.

### Bg7S 遺伝子上流配列のクローニングおよびシーケンス

ダイズ若葉から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてダイズのゲノム DNA を調製した. ゲノム DNA をテンプレートにし, 特異的プライマーを用いて Bg7S1 と Bg7S2 の遺伝子上流配列約 3,000 bp をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した. エンレイとタマホマレの Bg7S1 プロモーター領域の配列は PCR 産物をテンプレートとして同定した. その他の配列は pBluescript SK(-)

ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) にクローニングし、これをテンプレートとしての配列を同定した。DNA 配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、DNA シーケンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) で分析した。用いたプライマーはすべて table 1 に記す。

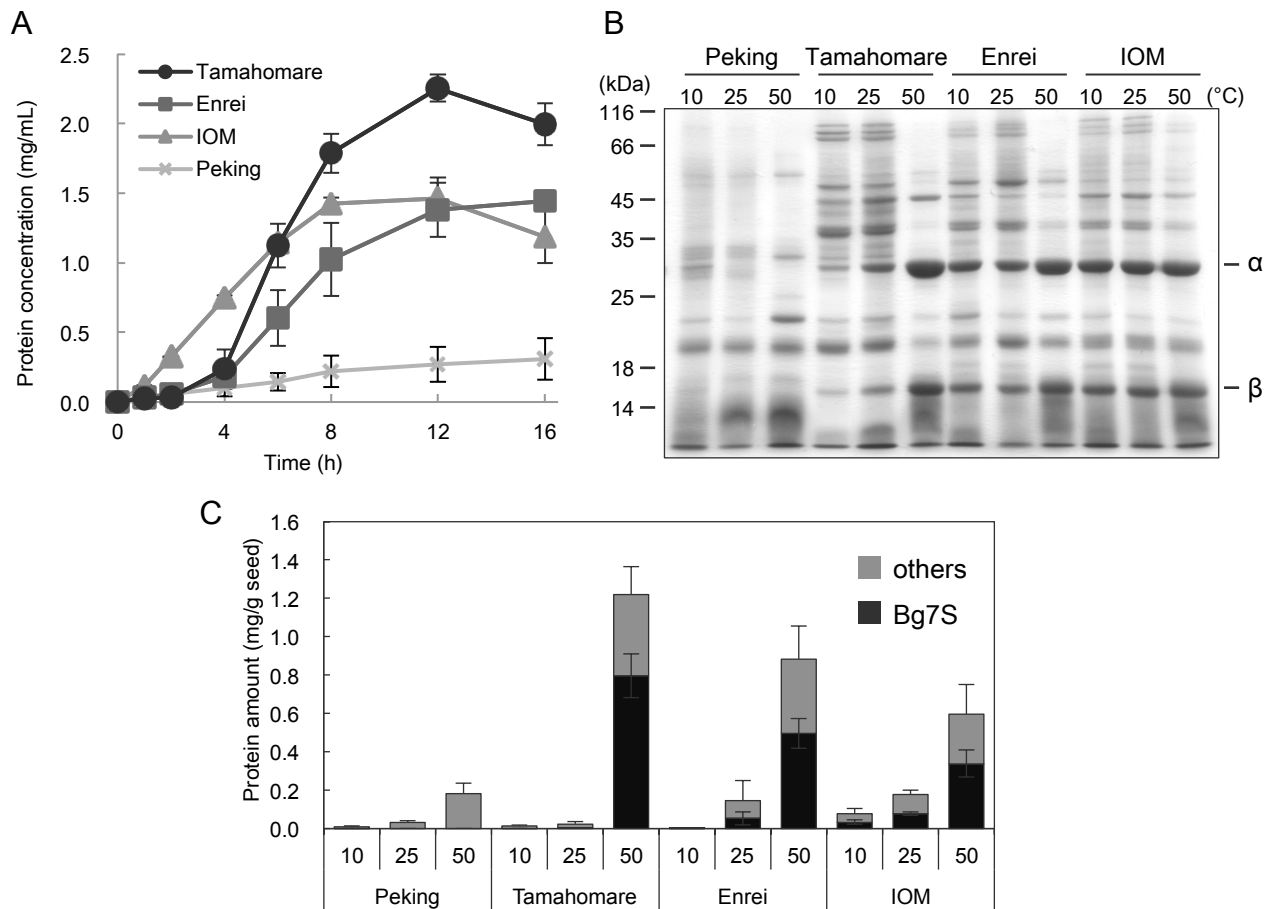
## 結果および考察

### 湯浴処理による Bg7S の溶出の品種間差

湯浴処理による Bg7S の溶出に影響するダイズ種子形質を知るために、湯浴処理下における Bg7S の溶出量と発現量を品種間で比較した。湯浴処理下でダイズ種子は熱ストレスと冠水ストレスにさらされると考えられるため、冠水抵抗性の異なる品種を選択した。弱冠水抵抗性の黄色品種タマホマレ、強冠水抵抗性の黄色品種エンレイ、極強冠水抵抗性の褐色品種ペキンである [7]。

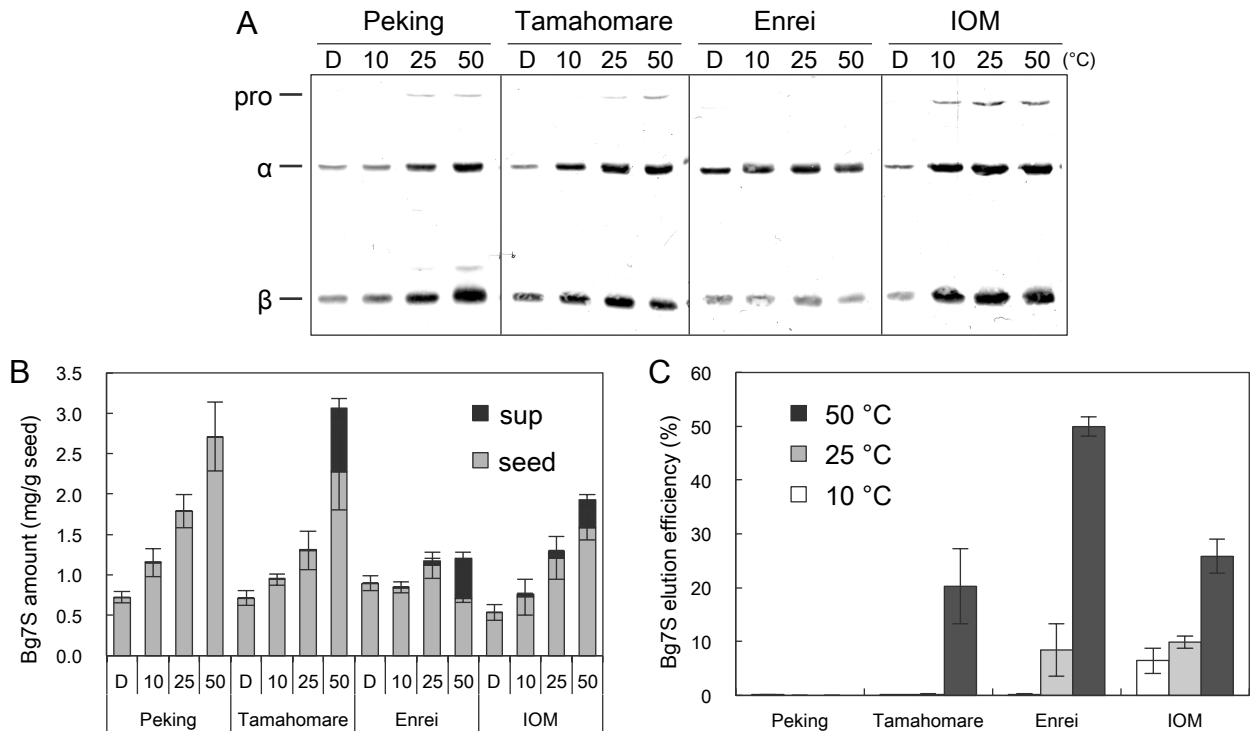
まず、16 時間の湯浴処理 (50 °C) を行い、種子から溶出したタンパク質量を経時的に定量した。タンパク質は 2-6 時間の湯浴処理で種子から溶出し始め、12-16 時間で溶出量が平衡に達する傾向がみられた (Fig. 1A)。16 時間の湯浴処理の結果、多量のタンパク質がタマホマレ、エンレイ、IOM の種子から溶出し、一方でペキン種子からのタンパク質溶出量は他品種と比較して少なかった。16 時間の浸漬処理 (10 °C, 25 °C, 50 °C) により溶出した溶液中タンパク質を SDS-PAGE で分離した結果 (Fig. 1B)、Bg7S の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を含む複数のバンドが検出された。特にタマホマレ、エンレイ、IOM を 50 °C で処理した場合に Bg7S のバンドが強く検出され、Bg7S が種子から溶出したことが示された (Fig 1B,  $\alpha$  and  $\beta$ )。SDS-PAGE の結果を基にデンストメトリー解析を行い、16 時間処理後の Bg7S の溶出量を定量した結果 (Fig. 1C)、Bg7S 溶出量はタマホマレで約 0.8 mg/g seed、エンレイと IOM で約 0.5 mg/g seed となった。一方、品種ペキンの種子からは Bg7S が全く溶出しなかった。湯浴処理により溶出した全タンパク質に対する Bg7S の割合は、タマホマレで 65%、エンレイで 56%、IOM で 57%、ペキンで 0%だった。また、タマホマレ、エンレイ、IOM では 10 °C および 25 °C と比較して 50 °C の湯浴処理で顕著に Bg7S が溶出した。これらの結果、Bg7S の溶出量には品種間差があることが明らかになった。特に品種タマホマレの Bg7S 溶出量が高いことが明らかとなった。

Bg7S の溶出量の品種間差が、Bg7S の発現量の差によるものか、あるいは Bg7S の溶出効率の差によるものかを確かめるために、湯浴処理後の Bg7S の発現量を分析し比較した。まず浸漬処理後の種子中に Bg7S が残存しているかを確かめるため、16 時間の浸漬処理 (10 °C, 25 °C, 50 °C) 後の種子からタ



**Figure 1. Bg7S 溶出量におけるダイズ品種間差.** (A) 50 °C の湯浴処理によるタンパク質溶出量の推移. 5 g の乾燥種子を湯浴処理に供した. 各時間における溶液中の総タンパク質量を定量した. エラーバーは標準誤差を示す (n=3). (B) 湯浴処理後の溶液中タンパク質の SDS-PAGE パターン. 各温度で 16 時間の処理後, 溶液中タンパク質 (5  $\mu$ g) を SDS-PAGE に供し, CBB R-250 により染色した. 12%ポリアクリルアミドゲルを用いた.  $\alpha$  は Bg7S  $\alpha$  鎖,  $\beta$  は Bg7S  $\beta$  鎖を示す. (C) 湯浴処理後の溶液中タンパク質量と Bg7S 量. 各温度で 16 時間の処理後の溶液中タンパク質量を示す. また, (B) の SDS-PAGE 結果からデンストメトリー解析により総タンパク質に対する Bg7S の割合を算出した (黒色領域). 1 g の種子から溶出した Bg7S 量をタンパク質量で示す. エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

タンパク質を抽出し, 抗 Bg7S 抗体を用いた Western blot 分析を行った. その結果, 湯浴処理後の種子タンパク質から Bg7S が検出された (Fig. 2A). Bg7S を溶出しなかった湯浴処理下後のペキンの種子からも Bg7S が検出された. また, 未処理の乾燥種子からも Bg7S が検出され, 湯浴処理後の種子からは未処理の種子と異なり Bg7S のプロ型が検出された (Fig. 2A, Pro). Bg7S のプロ型はペキンの湯浴処理後種子からも検出されたため, Bg7S を溶出しなかったペキンにおいても湯浴処理下で Bg7S が発現していることが示唆された. 一方で, Bg7S を溶出したエンレイの種子からは Bg7S のプロ型がほぼ検出されなかった. 続いて Western blot 分析の結果を基にデンストメトリー解析を行うことで湯浴処理後の種子中の Bg7S 量を定量し, Bg7S 溶出量 (Fig. 1C) と合計して処理後の Bg7S 発現量とし, 品種間で比較し



**Figure 2. 16 時間の湯浴処理後の Bg7S 発現量.** (A) 16 時間処理後の種子タンパク質の Western blot 分析の結果. 各温度で 16 時間処理後の種子からタンパク質を抽出し, 抗 Bg7S 抗体を用いた Western blot 分析を行った. Bg7S のプロ型 (pro) および  $\alpha$  鎖 ( $\alpha$ ) と  $\beta$  鎖 ( $\beta$ ) を示す. (B) 16 時間処理後の Bg7S 発現量. (A) の結果を基にデンストメトリー解析を行い種子中の Bg7S 量を定量した. 各温度で 16 時間処理後の Bg7S 溶出量 (黒色領域, Fig. 1 の C と等しい) と, 種子中 Bg7S 量 (灰色領域) を示す. 1 g の種子あたりの Bg7S 量で示す. エラーバーは標準誤差を示す (n=3). (C) Bg7S 溶出効率. 16 時間処理後の Bg7S 発現量に対する Bg7S 溶出量で示す. エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

た. その結果, ペキン, タマホマレ, IOM は処理温度に依存して Bg7S の発現量が増加した (Fig. 2B). 一方で, エンレイは乾燥種子で Bg7S を蓄積していたものの処理温度に依存的な発現量の増加を示さなかった. これらの結果から, 湯浴処理下における Bg7S の発現量には品種間差が存在することが明らかとなった. なお, 発現量は各品種の冠水抵抗性の強度とは相関が見られなかった. さらに, Bg7S の溶出効率はペキンで約 0%, タマホマレは約 20%, エンレイは約 50%, IOM は約 25%であった (Fig. 2C). したがって, Bg7S の溶出効率にも品種間差が存在することが示された. ここまでの結果から, 湯浴処理による Bg7S の溶出量には品種間差があり, Bg7S の発現量と溶出効率の影響を受けることが示唆された. 湯浴処理下における Bg7S 発現量が高かったタマホマレは, 発現量が低かったエンレイよりも多くの Bg7S を溶出した. 一方で, タマホマレと同様に湯浴処理下で Bg7S を多く発現したペキンは, 溶出効率が悪いために Bg7S を溶出しなかったと考えられた. したがって, これらの Bg7S の発現量と溶出効率の品種間差の要因を続けて分析した.

まず湯浴処理下における Bg7S の発現量の差の要因を調べる前に, Bg7S1 と Bg7S2 のどちらが湯浴処理下で多く発現し溶出するのかをタンパク質レベルで調べるため, 湯浴処理により溶出した Bg7S の N 末端配列を分析した. シグナル配列を除いた Bg7S1 と Bg7S2 アミノ酸配列で 94%の配列相同性を示すが,  $\alpha$ 鎖の N 末端配列はそれぞれ VTPTK と VPIPQ と異なるため区別できる [5]. タマホマレの乾燥種子から精製した Bg7S  $\alpha$ 鎖の N 末端配列をエドマン分解法により調べた結果, VTPTK と VPIPQ が混在していると考えられた. 一方で, 湯浴処理後に溶出した Bg7S の N 末端配列は VTPTK であり, Bg7S1 が多く溶出したことが示された. これらの結果, Bg7S1 と Bg7S2 の両方が登熟種子で発現して乾燥種子に蓄積するが, 湯浴処理下では主に Bg7S1 が発現し, 溶出することが示唆された.

### Bg7S のプロモーター配列の分析

湯浴処理下における Bg7S 発現は温度依存的であり, Bg7S は熱誘導性発現を示すと考えられる. Bg7S1 遺伝子上流配列には, 熱ショックエレメント様配列が存在すると報告されている. Bg7S 発現量の品種間差の要因を探るため, ペキン, タマホマレ, エンレイの Bg7S 遺伝子上流配列領域 (約 3000 塩基) の配列をそれぞれ決定し, 比較した. まず Bg7S1 遺伝子上流配列には過去の報告 [8] にある通り, 推定 TATA ボックスと推定 CAAT ボックスが存在し, perfect-type HSE 様配列が 3 配列存在した (Fig. 3). また, 熱誘導性発現を制御するシスエレメントと考えられている STRE 配列 (AGGGG or CCCCT) が 4 配列存在した [9-11]. さらに, 報告にある通り [12], 種子特異的な発現を制御するシスエレメントとして機能すると考えられる RY motif (CATGCA), ACGT motif (A-box, ACGTA; T-box, ACGTT; C-box, ACGTC; G-box, ACGTG), E-box (CANNTG) が存在した. 一方で, Bg7S2 遺伝子の遺伝子上流配列には, 推定 TATA 配列, HSE 様配列が 3 配列, STRE 配列が 5 配列, そして種子特異的な発現を制御するシスエレメント配列が存在した (Fig. 4). Bg7S2 遺伝子上流配列における HSE 様配列は, gap-type HSE が 1 配列, step-type 様 HSE が 1 配列, perfect HSE 様配列が 1 配列であった [13]. Bg7S 遺伝子上流配列を品種間で比較した結果, Bg7S1 と Bg7S2 の遺伝子上流配列はどちらもタマホマレとエンレイで一致した. したがって, 湯浴処理下でのタマホマレとエンレイの Bg7S 発現量の品種間差 (Fig. 2B) は, Bg7S 遺伝子上流の少なくとも 3000 塩基の配列が原因ではないことが明らかとなった. Bg7S 発現量の品種間差の要因が, 遺伝子上流配列の 3000 塩基以外の領域にあるのか, 上流配列と相互作用する転写因子などにあるのか, それとも転写後の翻訳などにあるのかは不明であり, 今後の課題となる. また, ペキンの Bg7S 遺伝子上流配列にはタマホマレやエンレイと異なる複数の変異が存在したが, 特徴的なシスエレメントにおける変異は見られなかった (Figs. 3, 4).

GTCAGACACGATACACAAGTTTTTTAAGACCGTTGGATATAACACACAATTAGTTAACGGTGCAGATCTCCAAAGTATAACAAAGCGAGAAAAGTATTTAA -2799

TAAAAA**A**CTGTATAGTGA<sup>G</sup>AAATGAACAATTCATGCTACTGGTTTCTGTTTTGTGT**AC**AGT**TT**AGATTCGATCCCATATGGTTGCATTTA--TTCAGTTA -2701  
G-box

ATGTTTAAATAGTACTATTTTTTTTCAGAAAGTTATGTTTAAATCGCACTTACTATGAT**T**TTATGTGATAGATTTTAAATGATTTTAAATATTTATTTATTTTGT -2601  
C

TACATTATATATAACATTTATTAGTA**A**CAAAAATAACACTTATATTTAACATTTATTTAGCCATGAAATATTACTTTAAGTATTTTACAAATATTTTTTTA -2501  
A

GAGAAAAACATTTTATATGGCCAAAGTTGATGATTTAGGGTAAGGTTTGATTA**C**TTTTTTATCTTTTAAATTTATTTATAGGTTTAAATTTGGTCTCTTT -2401

ATTTTTAAAAAGTTCAATTA**A**ATTCCTTAATTTTAAAAATAAAAGGGGA**C**CCAATGCTCT-----TTGGCTTTTGGG**T**CTATTTTA -2320  
STRE

ATTGATTACATGTAAT**C**GAATAGTTCCAGATTC**C**AGATGTTATTTTATGATTTTGGGCATGTTGTAATCGATTTTCATTA**A**AACTAAAATATAAGTTACAT -2220  
E-box

ACTAGAATAAGGATCGGATAATATGTTAGATGAGATTTAAATTAAGG-TTTTTTTT**G**CAAGATGAAGATTTTCACAAAGCA**A**GTTTGACCACAAATTA -2121  
T T A

AAATGGATGCTCT**G**CA**C**CGTAGCGTCAAACA**A**CTTTTTAAAAAGGTTTTTTCACAAAGGATTTTTTCTCAA**A**ATTTAAACATCGAAAGTAAGATAGAAG -2021  
T

CAACTAAGATAAAACAAG**G**TATAATAGAAGCTCGAGTAAAA**G**AAAAGATTTATATTGATTC**A**CTAAATCTCTTAATTTACCTTAGTTCTCTTCTTAAT -1921  
C G

CCTTGAAGGATTC**C**CACTCAAGTTTTTACACTACTAATTAATCC**T**TGCATATAACACATG**G**CGT**G**TA**A**CT**A**TAATGATCC**T**ATACATGACGTACATGGG -1821  
E-box E-box A-box

AGGAAATGACTTAT**C**GGTTGGATCTCCTTCTTGGAGACACAATAGATGGAATGAATAGGGGTTTGAAGATGCACATGTATAAAGATGTTCAACATATGTT -1721  
STRE E-box E-box

TATATTAG--GTGATTTTTCTT**G**AGTTTTATTAGGTATATTTTCAAAGAGTTTCTGATCAGAATAATTTAACTTTGAC----GCTAGAGTAGCTTCACCT -1627  
GT TTA

TTA**C**ATTT**A**TTGATAACATACTAATAACGAGTTAGTGTGATGTTTGTTTTGTATCATGATTTATTATTGTA**A**ATGTA**A**ATAAGTTAGATGCTCATTATG -1527  
E-box (Peking)

CTTTGCATAGTTGAACATTTATTAGATTATTTTATCAAA**C**AATCTC--ATATATATATTCATATGAATGGGAATTACAATAGTATA**A**GAATAAA**A**CTA -1429  
E-box T

ACATCTCATATATATTTTAAATAGAGATTAATTA**A**ATGTAATAATCCATTTTT**A**ATAATATAAAATTA**A**ATTA**A**ATA**A**CTATACATTA**A**AAATTTG -1329  
T C C C

ATTTTAA**A**ATTTTAGAAATTCATGATTTT**T**TTTTTTTACCAGAAAT**C**GTTAATATGTTTAA**A**ATATTACCAACTAATTTATA**A**ATTTTATTTTAAAG -1229  
A- T

CAATTAAGCATGTTTGATA**A**AAATATATATATGTTATA**A**AACTTTTTCAAAGTATA**A**AGTTGATGATGGCGTGGTGGTAGATTATTTTAGTTCTAGGTT -1129

CGAATGCAAGTTGGTTT**G**ACATTTAGCCTTATCTTTTTCTAACCA**A**AAATA**A**ATGTA**A**ATGGAAACCTTTAG**G**AAAA**A**AGAAATCA**A**AAATG**A**AA -1029  
G C

ACATCATCCGGTGGAGTCGAGAAGCCACACCC**C**CGTGACCCAA**C**AATATTA**A**AAATAAGAGTTTGCTCTACAGTAAATGCGATACTTTTTTATTCAATAC -929  
G-box

TTTTTCC**C**TT**C**T**A**AAAT**C**TT**G**AGATTTGCACCGTTAACTAATTAAGTGTATATCC**A**CGGTCCTAAA**A**AACTTGTGTACCGTGCCTCACATTTCAA -829

CTTTGCGCACCCTAGAAGCCGCTATGTTTAGGTTAGTGT**T**GC**A**CA**C**AGTTGAAGCGCATCACTCAGGAGGCTACTTGGTCTTGCTTTTGC**G**TCTTTTGT -729  
E-box

TCAATTTTTT**C**ACGTGATTTTGTGGTGAACACGCG**TACTTGAAC**TTATATA**A**ATACATA**A**ATTTTATAAGTTTCACTTCTTATATA**A**CTTCA**T**CA -629  
G-box

TGCATTTATAATTTT**G**ATGAATA**A**TAAGAGTTTGT**T**AAAA**A**ATATATATTTT**C**ATATAATATATAGGGTTTAGAATGCCAATTTT-AAAA**A**----- -536  
RY T GAATAA

AAAA**A**TA**A**AT  
-----AGAATA**A**AAATCGAAAA**A**ATGA**A**ATGTA**A**AA**A**ATTTGAGGGG**G**ACAA**A**TA**A**AAATG**A**AA**G**CTATATTT**A**AAATTTTCCATTAGATTTCT -446  
STRE A

ATTTTCTTAGTTAATATGAGCTAGCAGTTGGGAGATACACG**A**AAATGTCATG**A**AA**C**AGTTGCATGTAGGGAA**A**TTAATG**T**AGTAGAGGGATAGCA**A**GA -346  
E-box E-box

CA**A**AAATCC**A**AGCCAAGCTAGCTGCTC**A**CG**A**ACTCGATCC**A**CGTCC**T**TTACAGAGTTTCA**A**ACGGATG**A**AA**T**CTGCATGGC**A**TG**C**AACT**A**AG**C**AT -246  
C-box C-box CAAT-box RY

TGTTCTCAGCTGCCAAGTACCCCTCACCTCACCA**A**CCCTTGT**T**TTCTCC**C**ATTGCATGTT**A**ACT**C**AAGTTTATCCTTTCTT**G**CT**G**AA**A**TT**C** -146  
E-box STRE

**A**CAAGCCTCA**A**ACAGCTCGACGTCCA**A**CTTGTGACCAACCGGCC**A**AAAGAA**A**AGAGAATCTCATCC**T**TT**C**ACTTAGCC**A**CTTAAAGCTAGCC**A**AA -46  
C-box C-box CAAT-box

CGGTGATCTTTCTATATATTGATGCTCTTAACACA**C**CAACA**C**T**A**CC**A**T**T**CA**A**T**T**CA**A**ACCTTGCTCTATACTACAGTACACACTAG**A** +55  
TATA-box

**A**GAATA**A**ATC +64

Figure 3. *Bg7S1* 遺伝子上流配列. タマホマレの *Bg7S1* 遺伝子上流配列を示す. ペキンの配列における変異塩基を配列上側に示す. エンレイの配列はタマホマレのものと相同だった. 熱ショックエレメント様配列は太字斜体で示す.

CAACTTAGCTAGTGTGATTGTGCGGAAAGTAACACAAAAATGAGTGGAAAATTCAAAATTTGGTATAAGTTCCTCTTTTATATATACGTACTTTAA -2879  
A  
A-Box

TTCAAATTTTTCATATCAATTTCATTCTATCCAAGGACTTTAGATTTTTTGAATAAAAAAAAAAACCTAAAGTTGGGTAATCAGAGCCAAGCAGACA -2779

AACAAATAAAAACTAATGTGGTTCGGGTCGGCTATATATTTACGTCTCTTGACGAATTAATTAACCTAGTAGCTCACTTTTTAATACTTAATTAGTC -2679  
G-Box

TCATTAATTTTTCAGACTTGGATTATAGTCCGGTAGGTGTGTTTCGTAGTGGTACATTGAATGAGGTGATCCTAGCAATGTTTAAATTTTTGAGATTA -2579

AAACATTGATACCTACGGTAGGATGAAGGTCATTACTCTCTCTCTTAACCTCGATTGGATGTTTATTTTGGTATGTCAAAAAATCAAAATATTACTTAA -2479

AAGTCAAGACTAAGGAGGTTTTATAACAATCTCACCCCTTAATCCACCAAAATACTTTTTAAAGATAAAAATGTGTGGATCACTCAGTATCAAAATAG -2379  
STRE

ACAAAATTTGCAATGAGATTATGAGATAACCTTAATGATGAAGAAGATTGAGGTTGTAACAATTTTTATTGTTTCACATTCCACCAAAAAATAATTA -2279  
G

AAAACTAGCTTAATTGATTAATTTATAAAAAATATATATTAATTTTTTAAATGTTTATCTATTTTTATTTAATATATAAAAAATATTAATAAAAA -2179

TATATATTAGTATATAGTTAAACAATATCAATATACAATAAAATATTAACGTTATAAAAAACACCAAAATTTTTATGATGTATATATATTTTCATAT -2079  
T-Box

ACATGCATGAAGTTGTGTTTTTTTTATAAAATTTCTACTTCATAAAAATGTATTCTCATAAATTTTTATTTTATTTTAAATATATTTTATATTTCAA -1979  
RY

TTTTATATATTTTTAATTCAGGAAATTTGAACATAATCAAATAAGTTAATTTAAAAATATAAAAAACCTTCTTTAATGAATAAATAAGAAAAAA -TAAT -1880  
A

TTGAACATAAAATTTATCCAAACGGGTGAATGTTATTTGAAATTTCAAATGTTCTTTAAACATTTAAACATATTTTTACCAATTTAGTATGAAGTATC -1780  
E-Box

C T  
TATTGTTTTGTCAATAATTA-TTTTTTATGAAAAATTTGATTGATTAGTGAGATTTTTGCTTTGAATCATATTTTTTTATTTACAAAATTAATTTAT -1681

TTAAGGAGACGAATTGAAGCTTATTATCATTGGACAATTAACCTATTGATTGCAATAGTAAGGATATATGTCTGAGTAGTGAGTAGGTTCTTTTCTT -1581  
E-Box

GAAGAGAAATGAAGGATATTGATATATTGATCTATATTGGAGTTTATGCAATAATGCAATGAATGTTTAAACGGTGTGCGTTGGTCTGCATGACCCATA -1481

TCAACATAAGTGGTCCGTGAGGAATGTCCGCCAGAAGTGCAGAACCGTATGCAACCGTTGGCACATATACTACTGGGAGGACAGAGACGTTTCAGTAA -1381

ATGAATGAGAGGCTTGAGCTTGCAAAAGTTGGAGAAATTAATTAATATCATCTCTCAAATTTGGGTCAGTAGGTGTTTAGAGCAGCTGTTAAAT -1281  
T  
E-Box

ACATCAATATATAGATACAAGTTATCACTGATTATGTTTTCTACTCGTACATAAGATCGCCCTAGGCTTAAATACTTAAATTAGTTTAAATGGCTAACATG -1181

ACCGGAAGCCGACAGCTATTGACAAGATCATTACCATTTCCCGTCTCTCTTTTTTGTGCTAACGTTGGTTCGCTTTCTTCTTCTCAGATTACAACCA -1081  
G  
G-Box

AGTCCAAAATTTGTCATCGTCATCATCAAAATCACACCACCGTACCCTTATGCCTGCTCAATGCGAGTCTGCCATGGAGAGGGCGTTAATTGGATAAA -981

ACGTGAATTGAGCTGACATGTTAATTTAAATGATGTGGCGCTATTTTATCGTGGCACAAGGGAGGACACAGGAGATTTTCATCCATAAAAAGCAAAA -881  
G-Box

TCTTAGCAATACACTTTATTGACTGATATATAATTTAGTATTATTAATTTCTATTATTGTAATTAATAATTTTGACTATTATTATATATAGATGACCG -781  
G A T T  
E-Box (Peking)

TCAAACCTATGCTATATTTTCATGTGCATCACTCCAGTCACTTCTTTGGTCTTGGCTTTTGGTCTTTTGTAGAGGTGGTTTGGATATCAACATGCGTACG -681  
A T  
E-Box (Peking) E-Box G-Box

TGAAAGGATTCTAAACACACACTATACTTAGTTGAAACTTATTAATAAATTAACAAAAGTTTGTAGATTTCACCTTTCTGATACCATAGTACTTCAATTCATA -581

TTCAATGAATTTCAATTTTTAGTGAATAGTTTGTGAAAAATTTGTTTATATATAACAAAATAGACTAATATAGTGTTTAGAAGCCACTTTGTGGTTT -481

GAGAGCAATCGCACGTTGGGTAATGTTGAGGGGACAAAATAAAATAAATAATGAAGCCCATGATTGAAATTTCCCTTAGTAAATACATCAAAATCTCACC -381  
T-Box STRE

AAACCGTAGCATGTAGGAAATTAATGTAGTACAGGATATCAAGACAAAAATCCAAAGCCAAGCTAGCTAGTCACCAACAGCTACTCACGAACCTCCACA -281  
C

CGGCTCCTTACAGAATTACAAAGGATGAAGTCTGCATGCCATGCAACTAAAGCATTGTTCTCAGCTGCCAAGTACCCCTAACACTCACCAACCCCTTG -181  
RY E-Box STRE STRE

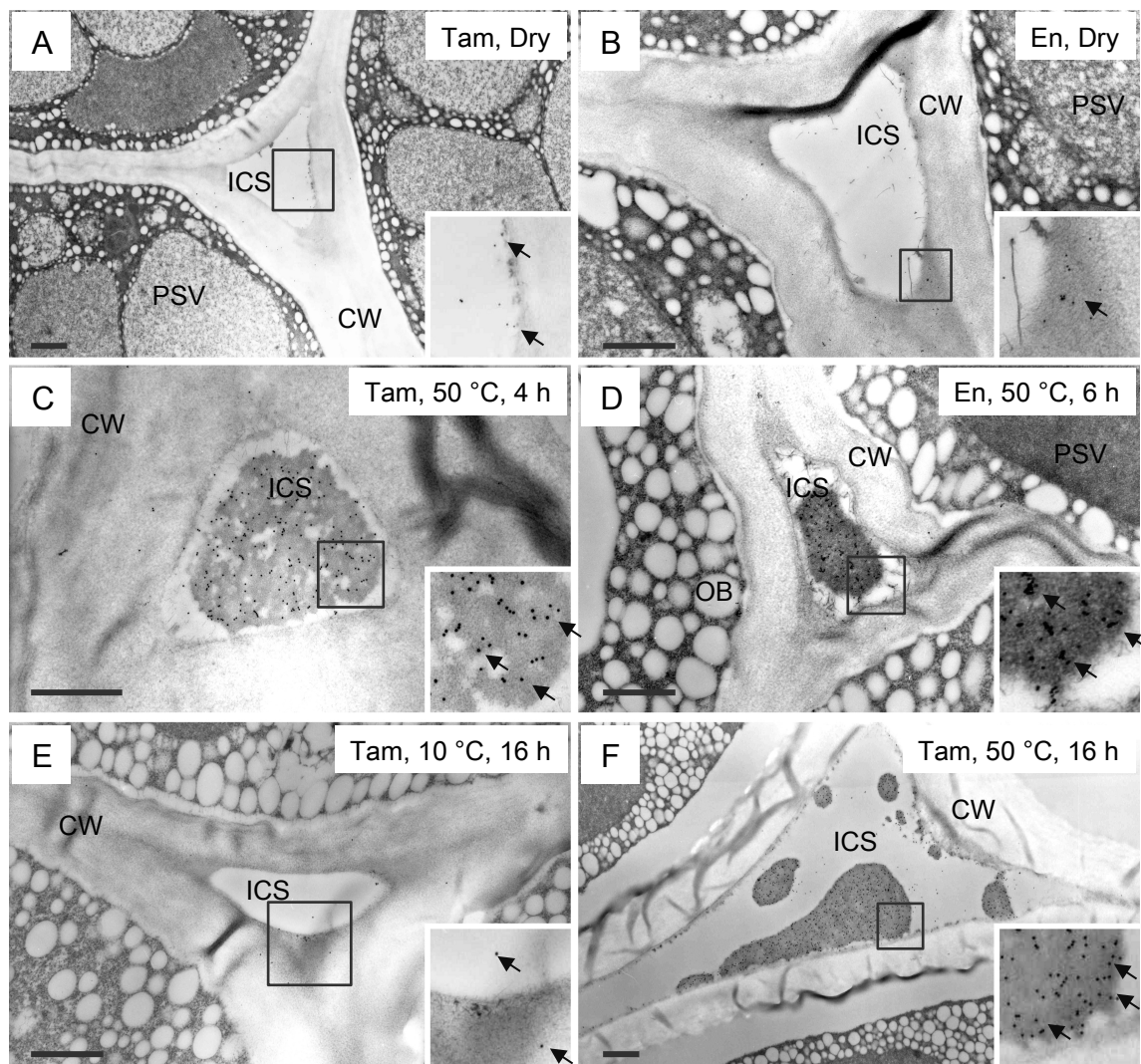
TTTTTCTCCCCGGTGCATGTTAACTCAAGTTTATCCTGCCTTTGCTTCTGGAATTTGGCTCTTTTACCAACACGTACGGCCAAAAAAGAGAAATCTCCC -81  
A-Box

TGCCACAGTGTACCACCCTTAGCCCTAATCAAAGCTAGCCAAACGGTATCTTCTATATATAGTAGCTCACTAACACTACCATTATTCATTCAAAC +20  
STRE TATA-Box

CTTTCTCTATACACACACACACACTAAGAATAATG +59

Figure 4. *Bg7S2* 遺伝子上流配列. タマホマレの *Bg7S2* 遺伝子上流配列を示す. ペキンの配列における変異塩基を配列上側に示す. エンレイの配列はタマホマレのものと相同だった. 熱ショックエレメント様配列は太字斜体で示す.





**Figure 5. 湯浴処理下における Bg7S の局在.** 各種子の子葉細胞を固定し、抗 Bg7S 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。(A) タマホマレ乾燥種子。(B) エンレイ乾燥種子。(C) 50 °C で 4 時間処理したタマホマレ。(D) 50 °C で 6 時間処理したエンレイの子葉細胞。(E) 10 °C で 16 時間処理したタマホマレの子葉細胞。(F) 50 °C で 16 時間処理したタマホマレの子葉細胞。ICS は細胞間隙、CW は細胞壁、PSV はタンパク質貯蔵液胞、OB はオイルボディを示す。黒枠で囲った領域を各図の右下に拡大した。矢印は金粒子 (15 nm) の位置を示す。スケールバーは 1  $\mu$ m を表す。

### 湯浴処理下の種子の電子顕微鏡観察

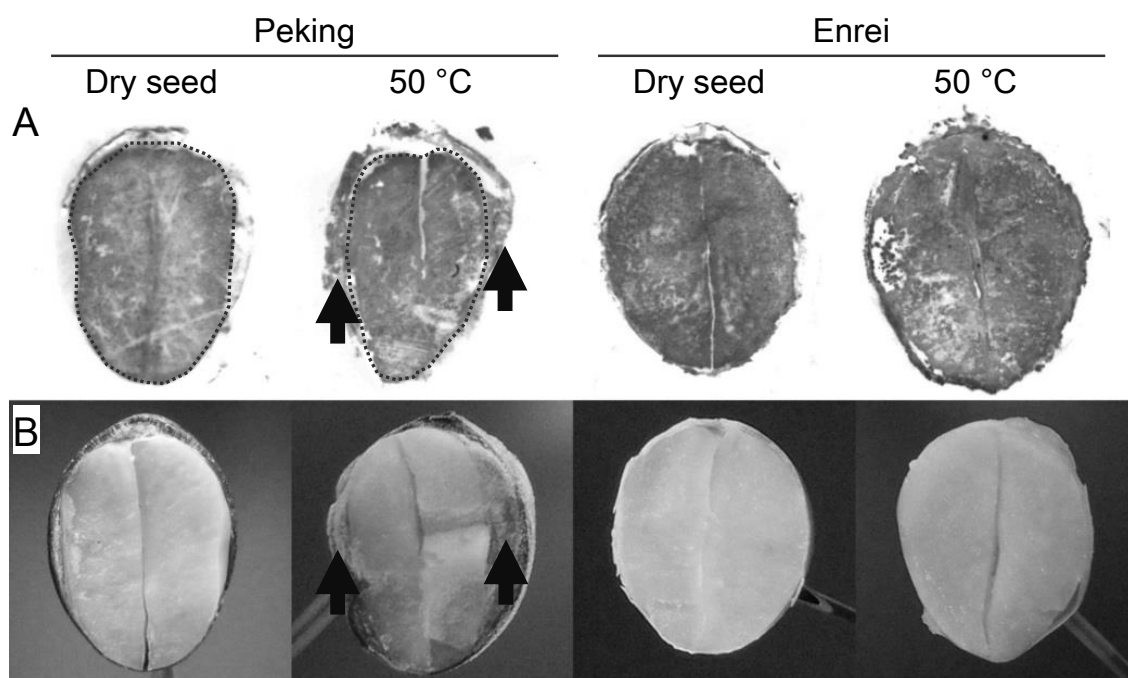
湯浴処理下で発現した Bg7S が種子外へと溶出する経路を確認するため、湯浴処理下の子葉を化学固定し、抗 Bg7S 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により Bg7S の局在を確認した。乾燥種子において、Bg7S は子葉の細胞膜あるいは細胞外の中層ラメラに局在すると考えられている [3]。50 °C で 4 時間の湯浴処理に供したタマホマレの子葉では、細胞間隙に高電子密度の領域が観察され、抗 Bg7S 抗体で標識された (Fig. 5C)。一方で、そのような抗 Bg7S 抗体により標識される細胞間隙の高電子密度領域は、未処理の乾燥種子および 10 °C で 16 時間浸漬処理したタマホマレの子葉から観察されなかった (Fig.

5A, E). 50 °C で 16 時間の湯浴処理に供した種子からも細胞間隙に Bg7S の蓄積が観察された (Fig. 5F). これらのタマホマレにおける観察結果は、エンレイにおいても類似していた (Fig. 5B, D). これらの結果から、湯浴処理下で Bg7S が細胞間隙において大量に蓄積することが明らかとなった。したがって、湯浴処理下で新規に生合成された Bg7S は、デフォルト経路により細胞外へと分泌されて細胞間隙に大量に蓄積し、ここから種子外へと溶出すると考えられる。Bg7S と同様に湯浴処理により溶出するタンパク質には hydrophobic protein と Bowman-Birk inhibitor が多いことがわかっており [2,14], hydrophobic protein は種皮表面に沈着するタンパク質であり [15], Bowman-Birk inhibitor はタンパク質貯蔵液胞だけでなく細胞外にも蓄積していることが示されている [16]. このように、湯浴処理下で多く溶出する主なタンパク質は細胞外あるいは種子表面に存在するタンパク質であると考えられる。

また、50 °C で 16 時間処理した細胞内ではタンパク質貯蔵型液胞が崩壊しており細胞膜が頻繁に収縮していた。近年の細胞死の分類において、細胞膜の収縮は植物のネクローシスタイプの細胞死の特徴とされており [17], 50 °C 処理による植物の細胞死は過去にも報告がある [18,19]. 50 °C で 16 時間の湯浴処理により種子の細胞死が生じることで、湯浴処理下における Bg7S の生合成は数時間で減少する可能性が考えられる。実際、湯浴処理によるタンパク質および Bg7S の溶出は 8-12 時間以降に上昇しなかった (Fig. 1A). また、50 °C で 16 時間の処理ではタンパク質貯蔵型液胞は崩壊していたが細胞膜は収縮したのみであり、細胞内タンパク質は漏出しにくいと考えられ、種子外に溶出したタンパク質において Bg7S が占める割合が高い結果となると考えられる。

### 種皮による Bg7S 溶出の阻害

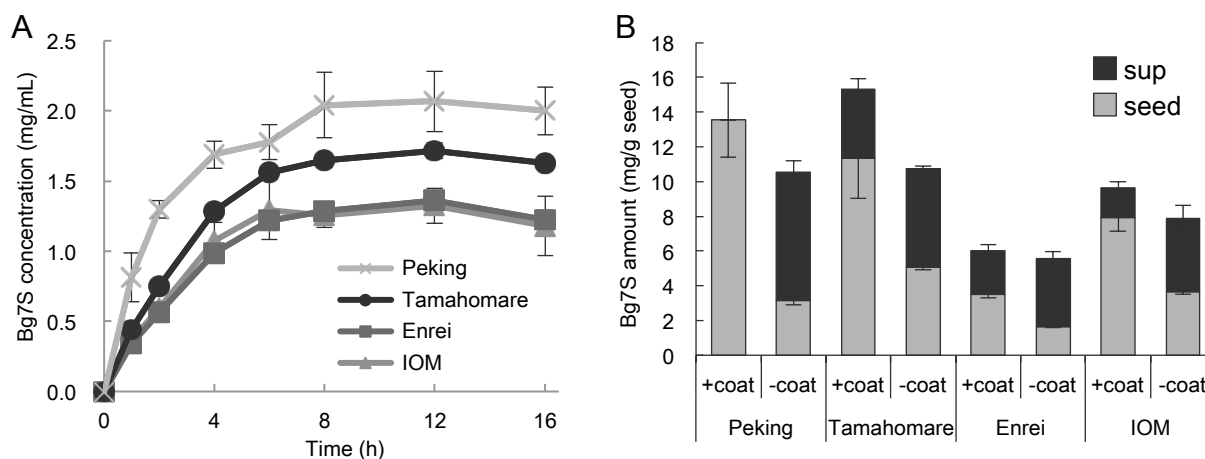
Bg7S は湯浴処理下で新規に生合成され、細胞外へと分泌されて細胞間隙に蓄積し、ここから種子外へと溶出すると考えられた (Fig. 5). この Bg7S の湯浴溶出経路において、溶出効率に品種間差があることがわかった (Fig. 2). 特に品種ペキンでは、湯浴処理下で Bg7S が高発現していたものの Bg7S が全く溶出しなかった。Bg7S の溶出効率の品種間差に影響する要因を特定するため、ペキンにおいて Bg7S の溶出を阻害する原因を調べた。まず、ペキンとエンレイの乾燥種子および湯浴処理後種子を切断して断面を観察すると、湯浴処理後のペキン種子はエンレイと異なり、子葉と種皮の間に多量の溶液が残留していた (Fig. 6B, 矢印). この断面をメンブレンに押し付け、Bg7S 抗体を用いた tissue print 分析を行った結果、子葉内だけでなく子葉と種皮間の溶液中に Bg7S が存在することがわかった (Fig. 6A). したがって、ペキン種子では子葉より外側まで Bg7S が溶出しているものの、種皮より外側まで Bg7S が溶出せず、種皮が Bg7S の溶出を阻害している可能性が示された。湯浴処理による Bg7S 溶出効



**Figure 6.** 湯浴処理後ダイズ種子の tissue printing の結果. (A) ペキンおよびエンレイの tissue printing の結果. 乾燥種子 (Dry seed) および 50 °C で 16 時間処理語の種子 (50 °C) を切断し, 切断面をニトロセルロースメンブレンに押しつけ, 抗 Bg7S 抗体を用いた免疫反応により検出した. (B) 切断面. 矢印は, 子葉と種皮の間に残留していた溶液を示す.

率に対する種皮の影響をさらに分析するために, 各品種の種皮を除去して子葉を湯浴処理に供した. その結果, 他の品種と同様にペキンから Bg7S が溶出した (Fig. 7A). また, 全ての品種において湯浴処理による Bg7S の溶出が早まった (Figs. 1A, 7A). 16 時間の湯浴処理後の Bg7S 発現量を定量した結果, 種皮が存在する場合と比べて種皮除去すると Bg7S 発現量が減少する傾向がみられた (Fig. 7B). しかし溶出効率は種皮の除去により上昇し, ペキンでは 0% から 70%, タマホマレでは 20% から 55%, エンレイでは 50% から 70%, IOM では 25% から 55% となった (Fig. 7B). したがって, 種皮は Bg7S の溶出効率を低下させる要因であることが明らかとなり, 特にペキンの種皮は顕著に Bg7S 溶出を阻害することが示された. また, Bg7S の溶出効率はペキンとエンレイで 70% であり, タマホマレと IOM で 55% だったことから, 子葉内の細胞間隙から子葉の外側への溶出過程においても溶出効率に品種間差があると考えられる.

第三章の研究の結果, 50 °C の湯浴処理により溶出される Bg7S は, 湯浴処理下で発現し細胞外へ分泌されて細胞間隙に蓄積し, 細胞間隙から種子外へと溶出するという溶出経路が示された. また, 湯浴処理による Bg7S の溶出量には品種間差が存在し, Bg7S の発現量および溶出効率においても品種間差があることが明らかになった. 湯浴処理下における Bg7S 発現量の品種間差の要因は, Bg7S 遺伝子上流



**Figure 7. 種皮除去下における Bg7S の溶出.** (A) 溶液中 Bg7S 濃度. 5 g の種子から種皮を除去し, 子葉を 50 °C の湯浴処理に供した. 溶液中のタンパク質濃度および SDS-PAGE 結果のデンストメトリー解析を基に, 溶液中の Bg7S 濃度を算出した. エラーバーは標準誤差を示す (n=3). (B) 16 時間処理後の Bg7S 量. 処理後の種子中 Bg7S を, Western blot 分析を基に測定した. 1 g の種子あたりの Bg7S 量で示す. エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

配列の少なくとも 3000 塩基にはないことがわかった. また, 種皮が Bg7S の溶出効率を低下させる要因であることが明らかとなり, 品種によっては Bg7S の溶出を完全に阻害することがわかった. これらの結果から, 湯浴処理による Bg7S の溶出機構を応用した有用タンパク質発現系のモデルは以下のように考えられる. まず, 登熟種子および湯浴処理下で目的タンパク質を高発現させ, 細胞外へ分泌させることで細胞間隙に大量蓄積させる. 続いて, 湯浴処理で目的タンパク質を種子外へと溶出させる. この発現系においては, Bg7S1 遺伝子上流配列を利用することで登熟種子と湯浴処理下の両方で有用タンパク質を発現させることができると考えられる. その場合, Bg7S 発現量が高い品種タマホマレの利用が適切となる. また, 細胞外へのタンパク質の分泌はデフォルト経路であり特殊なシグナル配列は不要であると考えられるため, 有用タンパク質を細胞外へ分泌させて細胞間隙に大量に蓄積させることができると, Bg7S と同様に湯浴処理により種子外へと溶出させることができると考えられる.

## 引用文献

1. Kagawa H, Hirano H, Tomotake M & Kikuchi F (1993) A seed protein induced by heat treatment in soybean (*Glycine max* (L.)). *Food Chem* **48**, 159–163.
2. Hirano H, Kagawa H & Okubo K (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* **31**, 731–735.
3. Nishizawa N, Mori S, Watanabe Y & Hirano H (1994) Ultrastructural localization of the basic 7S globulin in soybean (*Glycine max*) cotyledons. *Plant Cell Physiol* **35**, 1079–1085.

4. Hurburgh CR, Brumm TJ, Guinn JM & Hartwig RA (1990) Protein and oil patterns in U.S. and world soybean markets. *J Am Oil Chem Soc* **67**, 966–973.
5. Shutov AD, Prak K, Fukuda T, Rudakov S V, Rudakova AS, Tandang-Silvas MR, Fujiwara K, Mikami B, Utsumi S & Maruyama N (2010) Soybean basic 7S globulin: subunit heterogeneity and molecular evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1631–1634.
6. Cassab GI & Varner JE (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *J Cell Biol* **105**, 2581–2588.
7. Sayama T, Nakazaki T, Ishikawa G, Yagasaki K, Yamada N, Hirota N, Hirata K, Yoshikawa T, Saito H, Teraishi M, Okumoto Y, Tsukiyama T & Tanisaka T (2009) QTL analysis of seed-flooding tolerance in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Sci* **176**, 514–521.
8. Watanabe Y & Hirano H (1994) Nucleotide sequence of the basic 7S globulin gene from soybean. *Plant Physiol* **105**, 1019–1020.
9. Guo L, Chen S, Liu K, Liu Y, Ni L, Zhang K & Zhang L (2008) Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites *in vivo* revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**, 1306–1315.
10. Kobayashi N & McEntee K (1993) Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 248–256.
11. Ruis H & Schüller C (1995) Stress signaling in yeast. *Bioessays* **17**, 959–965.
12. Fauteux F & Strömvik MV (2009) Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in *Brassicaceae*, *Fabaceae* and *Poaceae*. *BMC Plant Biol* **9**, 126.
13. Yamamoto A, Mizukami Y & Sakurai H (2005) Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 11911–11919.
14. Palavalli MH, Natarajan SS, Wang TTY & Krishnan HB (2012) Imbibition of soybean seeds in warm water results in the release of copious amounts of Bowman-Birk protease inhibitor, a putative anticarcinogenic agent. *J Agric Food Chem* **60**, 3135–3143.
15. Gijzen M, Miller SS, Kuflu K, Buzzell RI & Miki BL (1999) Hydrophobic protein synthesized in the pod endocarp adheres to the seed surface. *Plant Physiol* **120**, 951–959.
16. Horisberger M & Tacchini-Vonlanthen M (1983) Ultrastructural localization of Bowman-Birk inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry* **77**, 313–321.
17. van Doorn WG, Beers EP, Dangel JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B & Bozhkov PV (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* **18**, 1241–1246.
18. McCabe PF, Levine A, Meijer P-J, Tapon NA & Pennell RI (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J* **12**, 267–280.
19. Egorova V, Lo Y & Dai H (2011) Programmed cell death induced by heat shock in mung bean seedlings. *Bot Stud* **52**, 73–78.

## 総括

本研究では、ダイズ種子による有用タンパク質の生産系として2つの方策を考えた。一つ目は種子貯蔵タンパク質を改変し、有用タンパク質としてタンパク質貯蔵液胞に高蓄積させる手法であり、もう一つは有用タンパク質を細胞外に蓄積させ、湯浴処理により高純度で種子外へと溶出させる手法である。これらの発現系の構築に向けた研究を行った。

## 第一章

ダイズ種子による有用タンパク質発現系の技術基盤確立を目指して、まず有用ペプチド配列を挿入したグリシニンを発現するダイズを作出し、*in vivo*でのグリシニンの蓄積に対するペプチド挿入の影響を分析した。種子貯蔵タンパク質の欠失したダイズ品種 JQ を遺伝子組み換え技術により形質転換し、アルツハイマー病ワクチンペプチドとして期待される FRHDSGY ペプチドを可変領域に挿入した A1aB1b を種子特異的に発現させた。その結果、ペプチド挿入型 A1aB1b は成熟型で高蓄積 (50 mg/seed) した。ペプチド挿入型 A1aB1b はプロセッシングされ、可溶性で六量体を形成したことが確認された。また免疫電子顕微法により、ペプチド挿入型 A1aB1b がタンパク質貯蔵型液胞に蓄積されたことがわかった。これらの結果から、A1aB1b の可変領域に対するペプチドの挿入は、*in vivo*における A1aB1b の立体構造形成、分子会合および液胞輸送に影響を与えないことを明らかにした。しかし、一部のペプチド挿入型 A1aB1b がペプチド挿入部位において内在性プロテアーゼにより切断されることが示された。

## 第二章

タンパク質貯蔵液胞における有用タンパク質の蓄積に影響を与え得る新規ダイズ登熟種子プロテアーゼを同定するため、公開トランスクリプトームデータを用いた遺伝子発現解析を行い、C1 ファミリーに属すると推定される GMCP3 に着目した。ピキア酵母による組換え型 GMCP3 と sVPE1 の発現系を確立し、GMCP3 が *in vitro* で sVPE1 により活性化されること、そして GMCP3 が液胞内と同じ pH 5.0–6.0 の酸性条件下において塩基性アミノ酸の C 末端側で基質のペプチド結合を切断するプロテアーゼ活性を示すことを明らかにした。また、GMCP3 がダイズ登熟種子で発現して成熟化していることを明らかにした。さらに、登熟種子において GMCP3 がタンパク質貯蔵型液胞に存在することを明らかにした。これらの結果から、GMCP3 はダイズ登熟種子で発現し、タンパク質貯蔵液胞において種子貯蔵

タンパク質のプロセッシングや分解に関与すると推定された。

### 第三章

Bg7S の湯浴溶出に関する知見を得るため、ダイズ 4 品種 (ペキン, タマホマレ, エンレイ, IOM) を用い, 湯浴処理下における Bg7S の溶出量を比較した。その結果, 溶出量はタマホマレで最も多く, ペキンは全く溶出しないことが明らかとなった。湯浴処理下における Bg7S 発現量にも品種間差があり, ペキンとタマホマレにおける発現量が高く, エンレイにおける発現量は低いことがわかった。湯浴処理下では Bg7S1 が主に発現していると考えられたが, Bg7S 遺伝子上流配列 (3000 塩基) はエンレイとタマホマレで同一であり, その配列内には Bg7S 発現量の品種間差の要因がないことがわかった。また, 免疫電子顕微鏡法により, Bg7S は湯浴処理下で細胞間隙に高蓄積しており, ペキンでは種皮の湯浴耐性により溶出が阻害されていることを明らかにした。以上の結果から, Bg7S は登熟種子および湯浴処理下で発現して細胞間隙に蓄積し, 湯浴処理により種子外へ溶出するものと考えられた。得られた結果を基にして, ダイズ種子を用いた新規なタンパク質分泌発現系のモデルを提案した。

## 謝辞

本研究を遂行する上でご指導、ご鞭撻とご援助をいただいた方々に感謝の意を表します。

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を多く賜りました、京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野の裏出令子教授に深甚の謝意を表します。きめ細やかな御指導をいただいたこと、また優しく励まして下さったことで、この論文を無事完成することができました。先生のご指導は、これからの研究生生活において大変重要な糧になるものと感じています。

同分野の丸山伸之准教授には、筆者が同分野へ配属されて以来、本研究の構想からデータ解析、論文作成に至るまで、終始かわらぬ懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました。研究に取り組む姿勢や研究の方向性等についての御助言を頂き、辛抱強く見守っていただきました。甚大なる感謝の意を表します。

また、同分野で本研究を遂行するに当たり、日々の研究だけでなく多くのご指導をしていただきました増田太郎助教には深く感謝しております。

研究発表の場においては、京都大学大学院農学研究科農学専攻の奥本裕教授、松村康生教授をはじめとする多くの先生方に貴重な御指導・御意見を賜りました。厚く御礼を申し上げます。また、奥本裕教授には本研究で用いたダイズ種子を提供していただき、重ねて感謝申し上げます。

北興化学工業株式会社の寺川輝彦博士および農業生物資源研究所ダイズゲノム育種研究ユニット長石本政男博士には、ダイズの形質転換において多大なるご支援とご助言を賜り、厚く御礼を申し上げます。

また、形質転換体の作成などに関して、京都大学生存圏研究所・京都大学生態学研究センターの持続可能生存圏開拓診断システムを利用させていただきました。厚く御礼を申し上げます。

また、京都大学大学院農学研究科の技官である村上博さん、南部優子さんには透過型電子顕微鏡の取り扱いにおいて多くのご指導とご厚意を頂き、大変大きな励みとなりました。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学開発学分野の豊田健二さんをはじめとする先輩・後輩の皆様には、研究に加え、日々の生活で多くのご指導・ご助言・励ましをいただき、深く感謝しております。

そして、故内海成教授には本研究の基となる多大な知見やアイデアを残していただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守りそして辛抱強く支援してくれた両親に深い感謝の意を表します。

本研究の遂行から論文の完成まで、皆様には多大なるご厚情を頂き、その感謝の念は到底言葉では書き尽くせませんが、まずはこの場を借りて謝辞を申し上げます。



## 論文目録

### *Original papers*

Maruyama N, Fujiwara K, Yokoyama K, Cabanos C, Hasegawa H, Takagi K, Nishizawa K, Uki Y, Kawarabayashi T, Shouji M, Ishimoto M & Terakawa T (2014) Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *J Biosci Bioeng* (in press)

Fujiwara K, Cabanos C, Toyota K, Kobayashi Y & Maruyama N (2014) Differential expression and elution behavior of basic 7S globulin among cultivars under hot water treatment of soybean seeds. *J Biosci Bioeng* **117**, 742–748.

### *Related papers*

Cabanos C, Kato N, Amari Y, Fujiwara K, Ohno T, Shimizu K, Goto T, Shimada M, Kuroda M, Masuda T, Takaiwa F, Utsumi S, Nagaoka S & Maruyama N (2014) Development of a novel transgenic rice with hypocholesterolemic activity via high-level accumulation of the  $\alpha'$  subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin. *Transgenic Res* **23**, 609–620.

Shutov AD, Prak K, Fukuda T, Rudakov S V, Rudakova AS, Tandang-Silvas MR, Fujiwara K, Mikami B, Utsumi S & Maruyama N (2010) Soybean basic 7S globulin: subunit heterogeneity and molecular evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1631–1634.

Journal of Bioscience and Bioengineering(JBB)に掲載された論考等の著作権は、日本生物工学会に帰属いたします。

出典

第一章

Journal of Bioscience and Bioengineering 誌

in press

DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.04.004

第三章

Journal of Bioscience and Bioengineering 誌

117 巻 6 号 742～748 ページ, 2014 年

DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.11.004