

氏 名 平 岩 呂 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第278号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 高等植物の液胞タンパク質の成熟化機構に関する細胞生物学的研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 大隅 良典
教 授 飯田 滋
教 授 西村 幹夫
教 授 村田 紀夫

論文内容の要旨

植物の種子は、次世代の胚が生長するための栄養源としてタンパク質を大量に蓄えている。このタンパク質は種子の形成過程に合成され、細胞内の液胞に蓄積される。一般に植物の液胞は細胞内不要産物の分解の場と捉えられていることから考えると、この時期の種子細胞の液胞は極めて特殊な機能を持つといえる。当該研究室では、種子細胞の液胞に含まれる様々な種子タンパク質の生合成と細胞内輸送機構の解析を進めてきた。その結果、種子タンパク質がrERで前駆体として合成され、デンスベシクルによって液胞に送られることを示すと共に、液胞プロセシング酵素(VPE)によってプロセシングを受け、液胞内に蓄積することを明らかにした。種子タンパク質をはじめとした液胞タンパク質の成熟化は、一連の液胞タンパク質の生合成過程の最終段階で起こることから、液胞タンパク質の最終的な構造を決定する重要な現象と見ることが出来る。この液胞タンパク質の成熟化機構を理解するため以下の研究を遂行した。

液胞プロセシング酵素(VPE)の種子細胞内における局在及び様々な植物器官におけるVPE活性の検出

VPEはデンスベシクル中に含まれる種子タンパク質前駆体のプロセシングを行う酵素として見出された。ヒマ登熟種子細胞内のVPEの局在性について免疫電子顕微鏡観察及び細胞分画を行って調べたところ、VPEが液胞内の可溶性領域に局在していることが判り、種子細胞内の液胞で機能していることが明らかになった。VPEは前駆体タンパク質のアスパラギン残基のC末端側のプロセシングを行うが、これと同様のプロセシングが本葉や根といった栄養器官の液胞タンパク質の成熟化の過程でも起こることが知られている。VPEが種子いわゆる貯蔵器官だけでなく栄養器官で機能しているかどうかを検討するため、合成ペプチドを基質とした活性測定を行ったところ、VPE活性が様々な植物の栄養器官から検出された(報文1)。最近、シロイヌナズナから3種類の本酵素のホモログの遺伝子が単離され、それら発現様式についての解析から、貯蔵器官に局在する酵素群と栄養器官に局在する酵素群に分かれることが明らかになってきている。この結果も、貯蔵器官から見出されたVPEが栄養器官でも機能していることを支持している。

酵母を用いたVPEの活性発現機構についての解析

ヒマ種子の免疫電子顕微鏡観察によりVPEが液胞のみならずデンスベシクルにも局在することが判った。デンスベシクルは種子タンパク質前駆体を多量に蓄積しているが、単離したデンスベシクル内ではこれらの前駆体の成熟化は起こらない。この結果から、デンスベシクル内に局在するVPEは不活性型前駆体であると考えられた(報文1)。不活性型前駆体の存在はVPEのcDNAを用いた解析からも支持され、VPEの不活性型前駆体を活性型へ変換する活性発現が植物液胞内で生じることを示唆している。

VPEの活性発現機構について調べるため酵母細胞で本酵素の発現を行ったところ、酵母の液胞内で不活性なVPE前駆体が限定分解を受け、生じた発現産物がVPE活性を持つことが判った。酵母の液胞内プロテアーゼの1つであるカルボキシペプチダーゼY前駆体はアスパラギン残基のC末端側で切断を受け、成熟化することが知られている。酵母細胞内に発現させたVPEがこのカルボキシペプチダーゼY前駆体をもプロセスしたことから、酵母液胞内でもVPEが活性を持ち、機能していることが示された(報文2)。

VPEはそのcDNAを用いた解析からパパインに代表される既知のシステインプロテアーゼ群とは系統が異なる、新規のシステインプロテアーゼである。パパインの活性中心近傍のアミノ酸配列とVPEホモログ間のアミノ酸配列との比較から、ヒマVPEは開始メチオニンから83番目のシステイン残基及び180番目のヒスチジン残基を活性中心に持つことが予想される。そこでこれらのアミノ酸残基をグリシン残基に変えた変異タンパク質を発現させたところ、VPE前駆体が蓄積するのみで限定分解が起こらず、VPE活性も検出されなかった。このことから、酵母で発現させたVPEが液胞内で自己限定分解により活性化されていることが示唆された。

これらの結果は、植物の液胞内へ輸送されてきたVPEの前駆体が自己触媒的に活性化され、この活性型酵素が各種の液胞タンパク質の成熟化に関与しているというカスケード機構の存在を強く示唆している。ここで成功した酵母細胞での発現系を用いた解析により、VPEによる植物液胞タンパク質の成熟化現象の生理的役割について明らかになることが期待される。

アスパラギン酸プロテアーゼ(AP)の液胞タンパク質の成熟化への関与

酵母ではプロテイナーゼAがカルボキシペプチダーゼYをはじめとする液胞タンパク質の成熟化に関与していると考えられている。プロテイナーゼAや動物のカテプシンDと類似性を示すアスパラギン酸プロテアーゼ(AP)が植物液胞タンパク質の成熟化に関与しているかどうかを検討するため、ヒマ種子から48kDaのAPを精製した。精製酵素に対する抗体を調製し、その抗体を用いて細胞内の局在性及び種子の登熟期から発芽生長期における酵素量の変動を調べた。その結果、APはVPEと同様にヒマ種子細胞の液胞内に局在し、その酵素量が種子の登熟期には増加し、発芽生長期には減少することが判った。しかし、精製VPEがデンスベシクル内の複数の前駆体タンパク質をプロセスするのに対して、精製APによっては、どのタンパク質のプロセッシングも起こらなかった(報文3)。

種子タンパク質の1つである2Sアルブミンの前駆体は2つのアスパラギン残基のC末端側でVPEによるプロセッシングを受けることにより、2つのサブユニットに分かれる。成熟型2Sアルブミンの一次構造と前駆体のアミノ酸配列とを比較すると、2Sアルブミン前駆体は成熟型タンパク質には存在しないプロペプチドを持つことが判る。2Sアルブミンの成熟化の過程で、VPEによるプロセッシング後にこのようなプロペプチドの除去が必要となってくる。ここで精製したAPはシロイヌナズナ2Sアルブミンのプロペプチド断片を複数箇所切断する活性を持つことから、APがプロペプチドの分解除去を行っていると考えられた。以上のことから、液胞タンパク質前駆体は液胞内でVPEにより第一段階のプロセッシングを受け、更にAPによりプロペプチドの分解が触媒されることによって、成熟型に変換されることが示唆された。

審査結果の要旨

植物の液胞タンパク質前駆体のプロセッシングを司る酵素として、液胞プロセッシング酵素(VPE)が見出されてきている。液胞タンパク質の成熟化は、その最終的な機能発現機構であり、重要な現象と見ることができる。申請者は、液胞タンパク質の成熟化機構を分子レベルでの解明を目指し、以下の知見を得た。

(1) 酵母を用いたVPEの活性発現機構についての解析

VPEの活性発現機構について調べるため、酵母での発現を行った結果、酵母液胞内で不活性なVPE前駆体が限定分解を受け、生じた発現産物がVPE活性を持つことが判った。酵母の液胞内プロテアーゼの1つであるカルボキシペプチダーゼY(CPY)前駆体はPEP4遺伝子産物であるプロテイナーゼAによって活性発現することが知られているが、発現させたVPEがCPYの活性発現へのPEP4遺伝子産物の機能を相補することが示された。さらに活性中心と予想されるアミノ酸残基に変異を導入したVPEを発現させることによって、酵母で発現させたVPEが自己限定分解により活性化することを明らかにした。

これらの結果は、植物の液胞内でVPE前駆体が自己触媒的に活性化され、活性型酵素が各種の液胞タンパク質の成熟化に関与しているというカスケード機構の存在を初めて明らかにしたものである。更にVPEの開始メチオニンから83,222番目のシステイン残基及び180番目のヒスチジン残基が、活性発現に必要であることを証明した。

(2) アスパラギン酸プロテアーゼ(AP)の液胞タンパク質の成熟化への関与

液胞タンパク質前駆体のプロセッシングへの関与が示唆されているAPを精製し、精製APに対する特異抗体を用いた解析から、APはVPEと同様に液胞に局在し、その酵素量もVPEと同様に種子の登熟期に増加することが示唆された。しかし精製APは複数の前駆体タンパク質をプロセスせず、前駆体のプロセッシングを行うのはAPではなく、VPEであることを明らかにした。

シロイヌナズナ2Sアルブミンをはじめとした一部の液胞タンパク質は、VPEによるプロセッシング後にプロペプチドの除去を受けて成熟型になることが知られており、精製APは2Sアルブミンのプロペプチドを複数のサイトで切断した。この結果から、APがプロペプチドの分解除去を行っている可能性を示唆した。

これらの知見は、高等植物における液胞タンパク質の成熟化機構におけるVPEの活性発現機構、VPEとAPの役割分担を初めて明らかにしたもので、学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

また、審査委員会の発表に続く口述試験における質疑応答から、平岩呂子氏が専門分野である細胞生物学に関する十分な知識をもち、今後独立した研究者として研究を進めるに足る学力があると結論した。

英語に関する能力は、本論文は邦文で書かれているが、既に国際誌に1編の公表論文があり、現在2編の論文が投稿中である点を含め、十分な実力があると判断した。