

氏 名 山 田 健 志

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第411号

学位授与の日付 平成11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 液胞の機能分子の活性発現に関する液胞プロセッシング系の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 大隅 良典
教 授 西村 幹夫
教 授 飯田 滋
教 授 中村 研三（名古屋大学）

論文内容の要旨

高等植物の液胞は、膨圧の維持、代謝産物の蓄積、細胞内成分の分解、貯蔵タンパク質及び生体防御タンパク質の蓄積という種々の機能を果たす。この機能の発現のため、植物には2種類の液胞（タンパク貯蔵型液胞と分解型液胞）が存在し、それぞれに特異的な酵素や分子装置が使い分けられている。

液胞プロセッシング酵素（VPE）はヒマの種子貯蔵タンパク質の前駆体を成熟型に変換する酵素として発見された。この酵素は、新規のシステインプロテアーゼで、アスパラギン及びアスパラギン酸残基を特異的に認識して切断するエンドペプチダーゼであることが示されている。その後、種々の植物よりVPEのホモログが単離されるにつれて、VPEには貯蔵組織型と栄養組織型に分けられることが明らかになった。さらに、ヒト、マウスなどの動物細胞よりVPEのホモログが単離され、液胞プロセッシングの系が広く存在する可能性が示唆されている。そこで、本研究では、貯蔵組織および栄養組織のVPEの標的分子に注目し、そのプロセッシング様式を解明するとともに各々の組織の液胞プロセッシング系を分子レベルで明らかにすることを旨とした。

貯蔵組織のVPEの標的分子である種子タンパク質は細胞内の粗面小胞体で合成され、直径が300 nmの輸送小胞であるPAC小胞を経て液胞に輸送される。PAC小胞の構成成分であるおよそ100 kDaのタンパク質であるPV100のcDNAクローニングよりPV100はシステインが特徴的に配置されているC_{xxxx}Cモチーフを4つ持つCys領域、親水性のアミノ酸であるアルギニン、グルタミン、グルタミン酸に富むRE領域、種子貯蔵タンパク質であるビシリン領域から構成されていることが明らかになった。また、プロテインボディに含まれるタンパク質の解析により、PV100のそれぞれの領域が翻訳後に50 kDaのビシリンと5-10 kDaのCys領域及びRE領域由来の小さなペプチドにVPEによりプロセッシングされることが明らかになった。Cys領域由来のC2にはトリプシンインヒビター活性が見られたが、C2の前駆体であるPV100にはトリプシンインヒビター活性が見られなかった。この結果はプロセッシングを受けることによってC2の機能が発現することを示しており、VPEが種子の液胞タンパク質の機能発現を制御していることを初めて示すものであった。

栄養組織におけるVPEの標的分子はこれまでに明らかにされていない。そこで、プロテアーゼ活性の高い栄養組織の液胞におけるタンパク質の液胞プロセッシング系にVPEがどの様に関与しているかを検討した。シロイヌナズナを用いて葉の傷害や老化によるVPEのmRNAが増えることが示されていたが、タンパク質レベルでも栄養組織のVPEが急激に増加することが明らかになった。また、シロイヌナズナの γ VPEを酵母に発現させたところ、貯蔵組織のVPEと同様にアスパラギン特異的なエンドペプチダーゼであることが確認された。キウイのパパイン型システインプロテアーゼであるアクチニジンのC末端はアスパラギン残基でプロセッシングされ、活性化することが知られている。乾燥ストレスで誘導されてくるシロイヌナズナのRD21Aとアクチニジンの一次アミノ酸配列の比較により、RD21Aもアスパラギン残基の後ろでプロセッシングされると考えられた。実際に、RD21Aタンパク質の蓄積が葉の老化に伴って上昇してくること、 γ VPEが乾燥ストレスで誘導されてくることから、 γ VPEがRD21Aをプロセッシングし活性化することが考えら

れ、プロテアーゼ活性の高い栄養組織の液胞においても VPE がプロセッシングに関わっていることが示唆された。

VPE は液胞の機能タンパク質の成熟化に関与し、ひいては液胞の機能発現を担う。そこで、VPE の発現調節機構を解析することによりこれまで明らかになっていなかった液胞の機能変換を明らかにすることができると考えた。種々の条件を試したところ、葉が傷害を受けたとき、 γ VPE の発現がおよそ 12 時間後から誘導されることが明らかになり、液胞が活発に働いていることが示唆された。また、傷害を受けたときに誘導されるプロテアーゼインヒビターやリポキシゲナーゼなどの液胞タンパク質がジャスモン酸により誘導されることが知られているが、 γ VPE はジャスモン酸に反応しなかった。このことは、傷害による新たな遺伝子発現の制御が行われていることを示唆していた。

以上のように、本研究では VPE が種々のタンパク質の活性型への変換に必要であることが明らかになった。また、傷害における γ VPE の発現は既知のシグナル伝達の解析に新たな知見を加えるものと期待される。

論文の審査結果の要旨

高等植物の液胞は、タンパク貯蔵型液胞と分解型液胞の2種が存在し、それぞれに特異的な分子装置が使い分けられている。申請者は、液胞プロセシング酵素 (Vacuolar Processing Enzyme; VPE) が貯蔵組織型と栄養組織型に分けられることに着目し、それぞれの液胞での VPE の役割について解析した。

まず、貯蔵組織型 VPE の基質を明らかにするため、輸送小胞に多量に蓄積している前駆体タンパク質, PV100 に注目し、その cDNA クローニングから PV100 が三つの領域 (Cys 領域, RE 領域, ビシリン領域) から構成されていることを示した。また、タンパク質貯蔵型液胞に含まれるタンパク質の解析や *in vitro* のプロセシング実験から、PV100 が翻訳後に貯蔵組織型 VPE によりプロセシングされ、種子貯蔵タンパク質として知られる 50 kDa のビシリンと、11 kDa の Cys 領域及び RE 領域由来の 5-10 kDa の小さなペプチドに変換することを明らかにした。さらに、PV100 から由来した Cys 領域にトリプシンインヒビター活性があること、その前駆体である PV100 にはトリプシンインヒビター活性が見られないことを見出し、トリプシンの阻害活性の発現には VPE によるプロセシングが必要なことを示した。これは、VPE が液胞タンパク質の機能発現に直接関わっていることを初めて示すものである。

次に、栄養組織型の VPE に注目し、シロイヌナズナの γ VPE を用いた実験から、この VPE が分解型液胞に局在すること及び栄養組織の老化に伴い、急激に増加することを明らかにした。さらに、酵母で γ VPE を発現させることにより、 γ VPE がアスパラギン残基特異的なエンドペプチダーゼ活性をもつことを示し、栄養組織の液胞において γ VPE が液胞タンパク質プロセシングの機能を持っていることを証明した。

以上のように、本研究は、貯蔵組織の液胞における PV100 の成熟型へのプロセシングの解析、栄養組織 VPE の機能の解析などから、VPE が種々のタンパク質の活性型への変換を担う液胞機能発現の鍵酵素であることを強く示唆したものであり、その中でも、液胞のタンパク質として、PV100 の様に機能的に異なるタンパク質が、一つのプロ型前駆体として合成されることを初めて明らかにした成果は特筆に値する。これらの成果の一部は、既に J. Biol. Chem. 誌に掲載が予定されている。本研究は、貯蔵組織型および栄養組織型の VPE がそれぞれタンパク貯蔵型液胞と分解型液胞の機能発現を担っていることを明らかにし、液胞の機能発現におけるプロセシング系の重要性を示したものであり、学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

また、審査委員会は山田健志氏の提出した提出論文の内容及びその周辺領域について、試問を行った。発表内容は明快であり、高く評価された。試問の結果、山田氏は本人の行った研究に関する知識を充分有しているとともに、周辺領域も理解していると判定された。この結果、審査委員一致して、山田氏が学位授与に足る学識と能力をもつと判定した。

尚、英語の能力に関しては、本論文を主たる内容とする掲載論文が一流国際誌に受理されている事実から判断して、博士として充分であると判定した。