

氏 名 渡 邊 悦 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第614号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究所 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 Biochemical studies on PV72, a vacuolar sorting
receptor of higher plants

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 西村 いく子 (京都大学)

論文内容の要旨

In higher plants, there are two types of vacuoles: protein storage vacuoles, which accumulate seed storage proteins, and lytic vacuoles, which are analogous to lysosomes and vacuoles in mammals and yeast. Vacuolar proteins are synthesized at rough endoplasmic reticulum (rER) and transported to respective vacuoles. Unlike the transport of lytic proteins, the molecular mechanism of seed storage proteins is still unclear.

Precursor accumulating (PAC) vesicles that had accumulated large amounts of proprotein precursors of storage proteins were purified from maturing pumpkin seed. PV72, a type I membrane protein with three epidermal-growth factor (EGF)-like motifs, was found to be localized on the membranes of the PAC vesicles that accumulated precursors of various seed storage proteins. PV72 is composed of luminal domain, transmembrane domain, and cytoplasmic domain. The luminal domain contains three EGF-like motifs. The third EGF-like motif was a Ca^{2+} -binding type.

Vacuolar sorting receptors for seed storage proteins have not been found. To clarify the function of PV72 as a vacuolar sorting receptor for seed storage protein, they performed molecular studies on PV72. They found that the luminal domain of PV72 (rPV72) expressed in insect cells bound to proprotein precursor of 2S albumin in a Ca^{2+} -dependent manner. They analyzed the domain of PV72 by expressing modified PV72s, rPV72 Δ 3, rPV72 Δ 2,3, and rPV72 Δ 1,2,3 in insect cells. Then they examined, these modified PV72s with the internal propeptide (the 2S-I peptide) of pro2S albumin, a seed storage protein precursor, by affinity chromatography and surface plasmon resonance analysis. rPV72 specifically bound to the 2S-I peptide with a K_D value of 0.2 μM , which was low enough for it to function as a receptor.

Lytic type sorting receptors have been reported to bind to ligand in a pH-dependent manner. Thus they examined the possibility of pH as a regulation factor of interaction and clarified that the binding of Ca^{2+} stabilizes the receptor-ligand complex even at pH 4.0.

They focused on Ca^{2+} as the regulatory factor for the association and dissociation of PV72 with the ligand and clarified that PV72 bound to the ligand in a Ca^{2+} -dependent manner. Furthermore, they clarified that the EGF-like motifs modulated the Ca^{2+} -dependent conformational change of PV72 to form a functional pocket for the ligand binding. The association and dissociation of PV72 with the ligand is modulated by the Ca^{2+} concentration (EC_{50} value = 40 μM) rather than the environmental pH. The overall results suggested that PV72 functions as a sorting receptor for pro2S albumin and that Ca^{2+} regulates the sorting mechanism.

As described above, PV72 seemed to be a key molecule for intracellular transport of vacuolar proteins. Thus, they further characterized authentic PV72 and PV82 derived from pumpkin and found that PV72 and PV82 showed different characters. Further, they analyzed the binding of rAtELP that is reported as the sorting receptor for lytic protease. They found that rAtELP bound to the AtPAP peptide in a Ca^{2+} -dependent manner rather than pH. They demonstrated that Ca^{2+} is a key regulator for transport of vacuolar proteins in higher plants. The natural ligand of each receptor is not well known. BP-80 that had been reported as lytic-type sorting receptor bound both to the peptide derived from aleurain and to that from Brazil nuts 2Salbumin. PV72 which functions as storage protein type sorting receptor also bound both to the peptide derived from 2S albumin and to the peptide derived from aleurain. These results indicated these receptors had similar binding site and bound to various types of ligands including lytic protease and storage protein.

In contrast to well characterization *in vitro*, the demonstration for the *in vivo* function of vacuolar sorting

receptors has been poorly done. Then, I performed the *in vivo* demonstration of PV72 in Arabidopsis cells. However, the demonstration of the sorting to vacuoles by such receptor molecules has not been done in plant cells. To elucidate a physiological function of such putative vacuolar sorting receptor in plant cells, they produced transgenic Arabidopsis plants that expressed a fusion protein (PV72-HDEL) composed of the lumen domain of PV72 with a His-tag and an endoplasmic reticulum (ER)-retention signal, HDEL.

The ectopic overexpression of PV72-HDEL induced the accumulation of a precursor of a cysteine proteinase, AtALEU, which contains a vacuolar targeting signal, NPIR, in the N-terminal propeptide, but not a precursor of another cysteine proteinase, RD21, which contains no NPIR sequence. Subcellular fractionation revealed that the AtALEU precursor was associated with PV72-HDEL in the ER of the transgenic plants. To clarify the interaction between the receptor and the ligand, they expressed the luminal domain of PV72 (rPV72) in the insect cells and analyzed their ability to bind the NPIR-containing propeptide of the AtALEU precursor by affinity chromatography and surface plasmon resonance. rPV72 bound to the propeptide with a K_D value of 0.1 μ M, which was low enough for it to function as a receptor. The association of rPV72 with the NPIR-containing propeptide was stabilized in the presence of 1 mM CaCl_2 . rPV72 bound to the ligand even at pH 4.0 in the presence of Ca^{2+} . Deletion of three repeats of EGF-like motifs of the luminal domain reduced the affinity (K_D value of 1.2 μ M) between the rPV72 Δ 1,2,3 and the propeptide. Overall results suggest that PV72 homolog(s) function as a sorting receptor for the NPIR-containing protease AtALEU to be transported to the lytic vacuoles and that the receptor-mediated transport is regulated by Ca^{2+} concentration rather than the environmental pH.

論文の審査結果の要旨

種子細胞中には、タンパク質蓄積型液胞が多量に存在する。既に貯蔵タンパク質のタンパク質蓄積型液胞への輸送に関わる小胞が単離され、Precursor accumulating (PAC) 小胞と命名されている。貯蔵タンパク質の輸送機構を解明するためには、輸送機構に関与する因子の分子レベルでの解析が不可欠である。種子タンパク質の液胞選別輸送レセプターは、まだ、発見されていないものの、その候補として PAC 小胞膜に局在するタンパク質、PV72、が同定されている。申請者は、(1) 今まで知られていなかった、種子タンパク質の輸送系にレセプターを介していることを証明し、また、その輸送系がカルシウムで制御されていることを解明した。(2) さらに、PV72 が生体内で液胞選別輸送レセプターとして機能することを初めて証明した。

(1) PV72 が種子タンパク質の選別輸送レセプターであることを証明するために、PV72 のルーメンドメイン (rPV72) の昆虫細胞での大量発現系を構築した。rPV72 が、プロ 2S アルブミンにカルシウム依存的に結合すること、PV72 に少なくとも2つのカルシウム結合部位があることを明らかにした。また、rPV72 の 2S アルブミン由来 2S-I ペプチドに対する解離定数を生体分子間相互作用解析装置 (BIACORE) を用いて調べたところ、 $0.2 \mu\text{M}$ であり、この値は PV72 が 2S アルブミンの液胞選別輸送レセプターとして機能するのに十分小さい値であった。さらに rPV72 のカルシウムに対する EC_{50} 値は、 $40 \mu\text{M}$ であることから、申請者は、PV72 のゴルジ体と PAC 小胞間のリサイクルはカルシウムにより制御されているとの仮説を提唱した。

(2) PV72 やそのホモログが、液胞選別輸送レセプターとして、機能するかを生体内で証明するために、ER 局在型 PV72-HDEL をアラビドプシスに大量発現させた。形質転換体では PV72-HDEL と共に、液胞輸送シグナル NPIR を持つ AtALEU のプロ型が蓄積していることを明らかにした。また、AtALEU のプロ型と PV72-HDEL が生体内でコンプレックスを形成していることを示した。さらに PV72-HDEL が、AtALEU の N 末端プロペプチドにレセプターとして働くのに十分な強さで結合していることを明らかにした。本研究は PV72 が生体内での、液胞選別輸送レセプターとして機能することを初めて証明したものであり、液胞へのタンパク質輸送を解明する上で、高く評価される。成果の一部は既に国際誌に 1 編発表されており、他 2 編が投稿されている。以上のことから審査員は全員一致して本論文は学位論文として十分な内容を含んでいると判定した。

専門領域及び関連領域に関する口述試験として(1)液胞タンパク質輸送における Ca イオンの役割(2)ゴルジ体の関与(3)PV72 のピアコアによる基質統合活性の特性等について質問した。申請者はこれらの質問に対して的確な返答をし、問題点も良く把握していることが確認された。この結果審査委員全員一致して渡邊悦子が博士の学位授与に足る学識と能力をもつと判定した。

博士論文は十分なレベルの英語で作成され、既に原著論文が一流専門誌に掲載されていることから英語の能力も十分であると判断した。