

## 種子たん白質の合成・蓄積に関与する液胞プロセッシング 酵素

VACUOLAR PROCESSING ENZYME RESPONSIBLE FOR  
PROTEIN PROCESSING OF VARIOUS SEED PROTEINS

西村い・くこ (基礎生物学研究所・細胞生物学研究系)

Ikuko HARA-NISHIMURA

Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki  
444

### ABSTRACT

Proprotein precursors of seed proteins are transported from endoplasmic reticulum to the dense vesicles, and then targeted to the vacuoles, where they are processed proteolytically to their mature forms by a vacuolar processing enzyme. However, the processing mechanism in plant vacuoles is very obscure. We purified a vacuolar processing enzyme from castor bean endosperm and characterized the enzymatic properties. The pH optimum for the purified vacuolar processing enzyme was at 5.5, coinciding with the pH of the vacuolar sap. The result supports the localization of the enzyme in vacuoles of maturing seeds. Characterization of the purified processing enzyme showed that a single enzyme is responsible for processing many vacuolar proteins with a large variability of molecular structure. How can it recognize the numerous variety of processing sites? Analyses of hydropathy and surface probability of precursor of 2S albumin, one of major seed proteins, revealed that post-translational processing occurs at C-terminal side of two asparagine residues which are located in the hydrophilic regions. These findings suggest that a vacuolar processing enzyme can recognize exposed asparagine residues on the molecular surface of precursor protein and cleave the peptide bond on the C-terminal side of each asparagine residue to produce mature protein in the vacuoles. We also examined the distribution of the enzyme in different tissues of various plants. The processing enzyme was found in cotyledons of pumpkin and soybean, as well as in endosperm of castor bean and rice, and low-level processing activity was also detected in leaves of spinach. These results suggest that the proprotein-processing machinery is widely distributed in vacuoles of various plant tissues. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 122-126, 1993.

様々な植物種子が食糧として生産され、種子貯蔵たん白質は貴重な栄養源となっている。種子たん白質は、植物の生活環から見ればほんの一時期に、しかも子葉あるいは胚乳といった限られた組織にのみ多量に合成・蓄積される。この時期の盛んなたん白質合成の機構を把握することは、分子育種によって改変たん白質

を設計する際に必須である。

種子たん白質の蓄積部位であるプロテインボディは種子の登熟期に液胞より形成され、そして種子発芽期には再び液胞へと変換していくオルガネラである<sup>1-3)</sup>。プロテインボディに含まれる多くの種子たん白質はいずれもプレプロ型前駆体として粗面小胞体で合成さ

れ<sup>4,5)</sup>、会合<sup>5)</sup>やジスルフィド結合の形成<sup>6)</sup>などの修飾を受けた後、プロ型前駆体となる。次いでこのプロ型前駆体たん白質は液胞内でプロセスされて成熟型たん白質となる<sup>5,7-9)</sup>。様々な種子たん白質の cDNA が単離され、その塩基配列から前駆体の 1 次構造が明らかになるにおよんで、ほとんどの種子たん白質が翻訳後にプロ型前駆体から成熟型たん白質へ変換することが分かってきた。しかしこのプロセスの機構の詳細はほとんど知られていなかったが、これまでにヒマ種子胚乳より液胞プロセシング酵素の単離に成功し、1 種類の酵素が様々な種子たん白質の前駆体のプロセスに関与していることを見出した<sup>10,11)</sup>。種子たん白質の前駆体はプロセスを受けることにより、性質が大きく変化する。即ち、液胞プロセシング酵素は種子に蓄積される様々なたん白質の性質を左右する重要な酵素とみなすことができる。ここでは、この液胞プロセシング酵素について最近得られた結果を報告する。

## 材料と方法

### 材料

名古屋大学農学部附属農場で栽培されたカボチャとイネ、および基礎生物学研究所の温室で栽培されたヒマとダイズより登熟中期の種子を採取して用いた。トウモロコシおよびハウレンソウ葉は市販のものを用いた。各組織よりの粗抽出液について下記の方法でプロセシング酵素活性を測定した。

### 液胞プロセシング酵素の精製および酵素活性測定法

ヒマ種子より単離したプロテインボディ中には主要種子たん白質 11S globulin の前駆体(proglobulin)を成熟型たん白質に変換する活性が存在する。そこでヒマ種子よりプロテインボディをグリセロール法<sup>12)</sup>によって単離し、その可溶性画分を精製の出発材料とし、既報の方法<sup>9)</sup>に従って液胞プロセシング酵素を精製した。プロセス活性測定のためには主要種子たん白質 11S globulin の前駆体<sup>13)</sup>のプロセシング部位を含む 10 残基のアミノ酸からなるペプチドを合成して基質として用いた。このペプチドの配列は Ser-Glu-Ser-Glu-Asn-Gly-Leu-Glu-Glu-Thr である。プロセス酵素はこのペプチドをアスパラギン残基の C 末端側で切断する<sup>10)</sup>。反応液の組成は Fig. 1 の説明中に記した。反応後のペプチド分解産物は HPLC あるいはキャピラリー電気泳動で定量した。1  $\mu$ mole の合成ペプチドを 1 分間に切断する活性を 1 unit とした。

### 種子たん白質前駆体のプロセス部位の解析

主要種子たん白質の 1 つである 2S albumin cDNA を登熟カボチャ種子のライブラリーよりイムノスクリ

ーニング法で単離した。その全塩基配列より 2S albumin 前駆体のアミノ酸配列を推定した。この 1 次構造を基にしてハイドロパシー解析とサーフィスプロバビリティ解析を行った。一方、成熟型 2S albumin の N 末端アミノ酸配列を自動シーケンサーにより決定し、この配列から前駆体のプロセスの部位を推定した。

## 結果と考察

ヒマ種子プロテインボディより単離精製した液胞プロセシング酵素は 37 kDa のチオール型プロテアーゼ

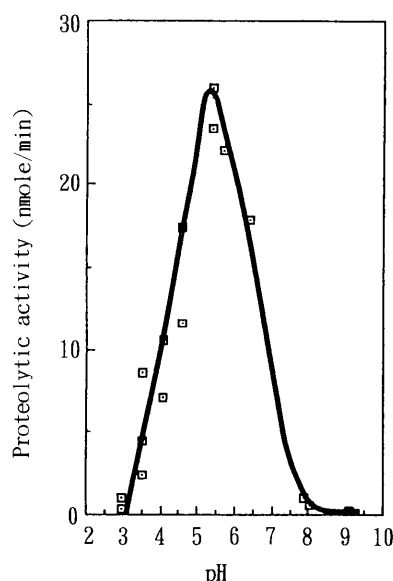


Fig. 1. Optimum pH of vacuolar processing enzyme purified from castor bean endosperm. Decapeptide substrate for vacuolar processing enzyme was synthesized with a peptide synthesizer. Its sequence was derived from the sequence around the processing site of the proglobulin, which is a proprotein precursor of 11S globulin, a major protein in pumpkin seed. A reaction mixture containing the purified enzyme and 5 nmole of the decapeptide substrate in 10  $\mu$ L of 0.1 mM EDTA and 0.1 M various buffer solutions; Na-acetate buffer (pH 3.0 to 5.0), citrate-phosphate buffer (pH 5.5 to 7.0) and Tris-HCl buffer (pH 7.5 to 9.5). This was incubated for 1 to 30 min at 37  $^{\circ}$ C and followed by HPLC analysis.

で、比活性は約 2 units/mg たん白質であった。既報<sup>10)</sup>のとおりこの酵素は主要種子たん白質 11S globulin のみならず他の種子たん白質の前駆体をもプロセスし、成熟型に変換した。プロセシング活性の至適 pH は液胞の内部 pH に近い 5.5 という値を示した (Fig. 1)。以前、登熟カボチャ種子より単離した液胞に pro-globulin をプロセスする活性を見出したが<sup>7)</sup>、今回の結果はプロ型前駆体たん白質のプロセシングが実際に液胞内で起こっていることをさらに裏付けるものである。

主要種子たん白質 11S globulin は不溶性でプロテインボディ内でクリスタロイドを形成している<sup>12)</sup>。一方、2S albumin は可溶性で液胞内マトリックスに局在している。このように性質や局在性の異なる液胞たん白質の前駆体が 1 種類の酵素によってプロセスされ成熟型に変換する<sup>10)</sup>。それでは、この酵素はどのような基質認識機構を持っているのであろうか。様々な種子たん白質のペプチド鎖上のプロセシングの部位を調べ

てみると、いずれの場合もアスパラギン残基の C 末端側で切断が起こっていることが判った<sup>10)</sup>。2S albumin を取り上げプロセシングについて解析を加えてみた (Fig. 2)。カボチャ pro2S albumin には 4 つのアスパラギン残基が存在した。成熟型 2S albumin の N 末端アミノ酸配列から、プロセシングに関与しているのは N35 と N74 の 2 つのアスパラギン残基であることが判った。pro2S albumin には他にもう 2 つのアスパラギン残基が存在する。これらがプロセシングに関与しないのは何故か？ 2S albumin 前駆体配列のハイドロパシープロットおよびサーフィスプロバビリティーをみると、プロセシング部位の 2 つの残基は共に非常に親水性の高い領域に存在していることが判る。一方プロセシングに関与しないアスパラギン残基の 1 つ N127 は疎水性領域にあり、分子の内部に存在していると考えられる。残る 1 つ N92 は 4 個のシステイン残基に囲まれているが、これらのシステイン残基は、2S albumin と類似性がある  $\alpha$ -アミラーゼインヒビタ

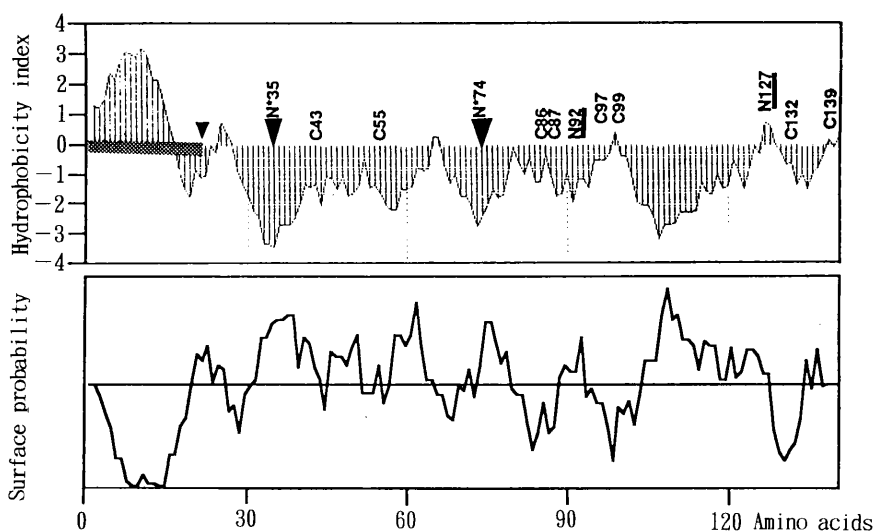


Fig. 2. Vacuolar processing occurs on the C-terminal side of two asparagine residues in hydrophilic regions of the pro2S albumin molecule. Analyses of hydropathy and surface probability of the primary sequence of prepro2S albumin were performed. The mean hydrophobicity index was computed with a window of 11 residues. The small triangle indicates the cleavage site of the signal peptide. The two large triangles indicate the vacuolar processing sites. All asparagine and cysteine residues are indicated as N and C with their respective positions. Two asparagine residues, 35 and 74, with asterisks are located at the vacuolar processing sites. Asparagine residues 92 and 127 are not involved in the processing.

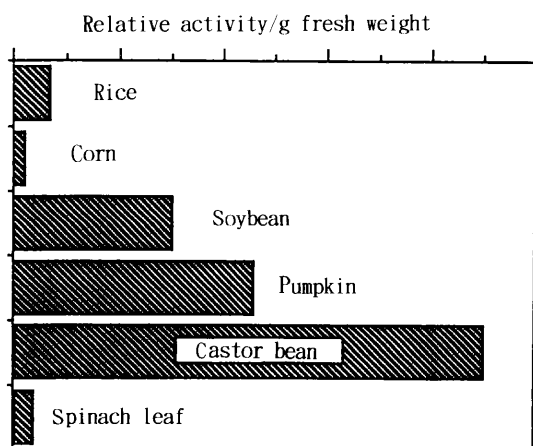


Fig. 3. Distribution of vacuolar processing enzyme in various plants. The activity of the vacuolar processing enzyme in storage tissues of maturing seeds from rice, corn, soybean, pumpkin and castor bean and in non-storage tissues of mature leaves from spinach is shown. Vacuolar processing enzyme activity was assayed with a synthetic decapeptide as substrate. The products of the reaction were analyzed by capillary electrophoresis.

ーの2次構造から類推してジスルフィド結合している可能性が高い。即ち、このアスパラギン残基は酵素にとって近接し難い環境に存在していると考えられる。以上の結果より、プロセッシング酵素は基質の分子表面に露出しているアスパラギン残基を認識し、そのC末端側のペプチド結合を切断するという機構が考えられる。

これまでにヒマおよびカボチャ種子に液胞プロセッシング酵素の活性を見出しているが、主要な食糧源の1つとなっているダイズやイネにも同様のプロセッシング活性があるか調べた(Fig. 3)。その結果、ダイズやイネの貯蔵組織にもプロセッシングの活性が認められた。この活性は 11S globulin ファミリーに入っているイネのグルテリンやダイズの主要貯蔵たん白質グリシニンのプロセッシングにも関与していると考えられる。カボチャ 11S globulin の前駆体 proglobulin は 3 量体であるがプロセスされることにより、不溶性の 6 量体の 11S globulin となり結晶構造体となる。即ち、プロセッシング酵素により貯蔵たん白質が高密度に蓄積されることになると考えられる。またカボチャトリプシンインヒビターの前駆体はプロセッシングを受けて初めてインヒビター活性を現す。このように種子のたん白質の

構造と機能の発現の鍵となる液胞プロセッシング酵素の分子レベルの解析が必須である。

## 文 献

- 1) 西村いくこ(1990): 種子たん白質の蓄積と液胞. *Plant Science Tomorrow*, No. 2, 6-7.
- 2) Hara-Nishimura I, Hayashi M, Nishimura M and Akazawa T (1987): Biogenesis of protein bodies by budding from vacuoles in developing pumpkin cotyledons. *Protoplasma*, **136**, 49-55.
- 3) Hara I and Matsubara H (1980): Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin VII. Immunofluorescent study on protein bodies in ungerminated and germinating cotyledon cells. *Plant Cell Physiol*, **21**, 247-254.
- 4) Akazawa T and Hara-Nishimura I (1985): Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Ann Rev Plant Physiol*, **36**, 441-472.
- 5) Hara-Nishimura I, Nishimura M and Akazawa T (1985): Biosynthesis and intracellular transport of 11S globulin in developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*, **77**, 747-752.
- 6) Hara-Nishimura I (1987): Introduction of disulfide bond in proglobulin molecules during the 11S globulin biosynthesis in endoplasmic reticulum of developing pumpkin cotyledons. *Agric Biol Chem*, **61**, 2007-2008.
- 7) Hara-Nishimura I and Nishimura M (1987): Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*, **85**, 440-445.
- 8) Hayashi M, Akazawa T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1988): Effect of monensin on intracellular transport and post-translational processing of pumpkin 11S globulin precursor in developing cotyledons. *FEBS Lett*, **238**, 197-200.
- 9) Fukasawa T, Hara-Nishimura I and Nishimura M (1988): Biosynthesis, intracellular transport and post-translational processing of proglobulin in developing castor bean endosperm. *Plant Cell Physiol*, **29**, 339-345.
- 10) Hara-Nishimura I, Inoue K and Nishimura M (1991): A unique vacuolar processing enzyme

responsible for conversion of several pro-protein precursors into the mature forms. *FEBS Lett*, **294**, 89-93.

- 11) 西村いくこ(1993): 液胞たん白質の輸送小胞と液胞内におけるプロセッシング. バイオサイエンスとインダストリー, **50**, 35-38.
- 12) Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H and Akazawa T (1982): Suborganellar

localization of proteinase catalyzing the limited hydrolysis of pumpkin globulin. *Plant Physiol*, **70**, 699-703.

- 13) Hayashi M, Mori H, Nishimura M, Akazawa T and Hara-Nishimura I (1988): Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for pumpkin 11S globulin  $\beta$  subunit. *Eur J Biochem*, **172**, 627-632.