

# 種子たん白質の成熟化のためのカスケード機構の解析

西村いくこ\*・平岩呂子

基礎生物学研究所細胞生物学研究系

## A Cascade Mechanism Responsible for Maturation of Seed Proteins

Ikuko HARA-NISHIMURA and Nagako HIRAIWA

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

### ABSTRACT

Vacuolar processing enzymes (VPE) are responsible for maturation of various seed proteins such as glycinins in soybean. The processing enzymes belong to a novel cysteine proteinases with molecular mass of 39 kDa for soybean and 37 kDa for castor bean. Molecular characterization reveals that the enzyme is synthesized on rough endoplasmic reticulum as an inactive precursor with a larger molecular mass. The precursor is transported to vacuoles via dense vesicles together with proproteins of seed proteins and is converted into an active enzyme, after arriving at the vacuoles. This suggests that a cascade of processing is involved in maturation of seed proteins. To examine the mechanism of activation of VPE, we expressed a precursor to castor bean VPE in a *pep4* strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Two VPE proteins with 59 kDa and 46 kDa were detected in the vacuoles of the transformant. They were glycosylated in the yeast cells, although VPE is not glycosylated in plant cells in spite of the presence of two N-linked glycosylation sites. During the growth of the transformant, the level of the 59-kDa VPE increased slightly until a rapid decrease occurred after 9 h. By contrast, the 46-kDa VPE appeared simultaneously with the disappearance of the 59-kDa VPE. Vacuolar processing activity increased with the accumulation of the 46-kDa VPE, but not of the 59-kDa VPE. The specific activity of the 46-kDa VPE was a similar level to that of VPE in plant cells. These findings suggest that an inactive VPE precursor synthesized on the endoplasmic reticulum is transported to the vacuoles in the yeast cells and then processed to make an active VPE by self-catalytic proteolysis within the vacuoles. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 1-5, 1996.

Key words : asparaginyl endopeptidase, cysteine proteinase, seed protein, vacuolar processing enzyme, yeast

---

\*〒444 岡崎市明大寺町字西郷中 38

大豆をはじめとする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。この時期の盛んな種子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。

種子たん白質は登熟種子細胞での粗面小胞体で前駆体として合成され、デンスベシクルにより液胞へ輸送された後に成熟型に変換する<sup>1-3)</sup>。著者らは、種子たん白質の成熟化に関与する酵素を液胞プロセシング酵素と命名したが<sup>4,5)</sup>、この酵素は種子たん白質の最終的な構造を決定する鍵となっている。液胞プロセシング酵素は、たん白質前駆体の分子表面に露出しているアスパラギン残基を認識して、そのカルボニル基側を切断する酵素である。最近、アラビドプシスから3種類の本酵素のホモログの遺伝子が単離され、その構造解析と発現様式から、液胞プロセシング酵素は新規のシステインプロテイナーゼのファミリーを形成していることが分かってきた。さらに、このファミリーは、種子や花粉に局在する酵素群と葉や茎などの栄養器官に局在する酵素群の2つのサブファミリーに分かれることが明らかになってきている<sup>6,7)</sup>。

液胞プロセシング酵素は粗面小胞体で合成され、種子たん白質の前駆体と共にデンスベシクルを経て液胞へ輸送されるが<sup>8)</sup>、デンスベシクル内では種子たん白質の成熟化は起こらない。これは、ベシクル内の本酵素が不活性型であることを示唆している。大豆より精製した液胞プロセシング酵素は39 kDaであるが、cDNAを単離して構造解析を行ったところ55 kDaの前駆体をコードしていた<sup>9)</sup>。これより、不活性型の前駆体として合成された本酵素は液胞へ輸送された後に活性型となり、種子たん白質の成熟化に関与すると考えられた<sup>10,11)</sup>。即ち、種子たん白質の成熟化にはプロセシングのカスケード機構が働いていると考えられる。本研究ではこのカスケードの機構の解明を目指している。

## 方 法

### 形質転換酵母の作製と細胞抽出液の調製

ヒマ液胞プロセシング酵素前駆体のcDNAインサートをGAL1プロモーターの制御が可能な発現ベクターpYES2 (Invitrogen, USA)につなぎ酵母に導入した。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は *PEP4* 株 (YW23-5A; MATa leu2 ura3-52) および *pep4* 株

(YW7-6D; MATa leu2 ura3-52 pep4-3)の2種類を用いた。

酵母細胞のための培地はSC mediumにcasamino acid (2%), adenine sulfate (20 mg/L), tryptophan (20 mg/L), leucine (30 mg/L), histidine (20 mg/L)及び2% raffinoseを加えたものを用いた。細胞の増殖がstationary phaseに達した時に、培地に2% glucose (SC-glucose medium)あるいは5% galactose (SC-galactose medium)を加え、一定時間の後に遠心で細胞を集めた。

### イムノブロット解析

酵母細胞をガラスビーズで破碎した後、SDSサンブルバッファーで可溶化したものをSDS-PAGEにかけ、次いでGVHP膜にブロットした。一次抗体としてはヒマ液胞プロセシング酵素に特異的な抗体を1,000分の1希釈で用い、二次抗体としてhorseradish peroxidase-conjugated antibodies raised in goat against rabbit IgG (Cappel, West Chester, PA, USA)を用いた。検出にはECL kit (Amersham Japan, Tokyo)を使用した。

### ヒマ液胞プロセシング酵素の精製及び酵素活性測定法

ヒマ種子よりプロテインボディをグリセロール法によって単離し、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。

プロセシング活性測定のための基質は、11S globulinの前駆体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 (Ser-Glu-Ser-Glu-Asn-Gly-Leu-Glu-Glu-Thr)を用いた。37°Cで0.5~2時間反応させ、反応後のペプチド分解産物はキャピラリー電気泳動で解析した。

## 結 果 と 考 察

### 酵母細胞における液胞プロセシング酵素 (VPE) の発現

ガラクトースで発現誘導した形質転換酵母細胞の抽出液をイムノブロットで解析した結果、*PEP4* 株、*pep4* 株共に液胞プロセシング酵素の発現がみられた。形質転換酵母の細胞分画の結果、液胞プロセシング酵素は酵母細胞の液胞に局在していることが分かった。*PEP4* 遺伝子でコードされているproteinase Aは酵母の様々な液胞内プロテイナーゼの活性化に関与しているといわれており、一般にproteinase A株の方が発現産物が安定であるとされているが、液胞プロセシング酵素はproteinase Aの有無に関わらず安定に酵

母細胞で発現していることが確認された。

酵母細胞内で発現している VPE は 59 kDa で、ヒマ種子の VPE 前駆体 proVPE の 53 kDa より 6 kDa 大きい。ヒマ種子より精製した酵素は糖鎖を持たないが、cDNA から予想される proVPE には 2 カ所の糖鎖付加サイトが存在する。酵母で発現した 59-kDa VPE は N-glycosidase F 処理によって 53-kDa VPE に変換することから、酵母細胞内で合成された proVPE には糖鎖付加が起こっていることが明らかになった。

酵母細胞内での液胞プロセシング酵素 (VPE) の成熟化とそれに伴う活性化

Fig. 1 は、形質転換酵母をガラクトース培地に移した後、経時的に細胞を集め発現産物をイムノブロットで調べたものである。ガラクトースによる発現誘導後 1 時間で 59 kDa の proVPE が検出され、その減少に伴って、46 kDa の VPE が出現し蓄積していくのが観察された。この結果は、59-kDa proVPE が経時的に 46 kDa の成熟型 VPE に変換していること

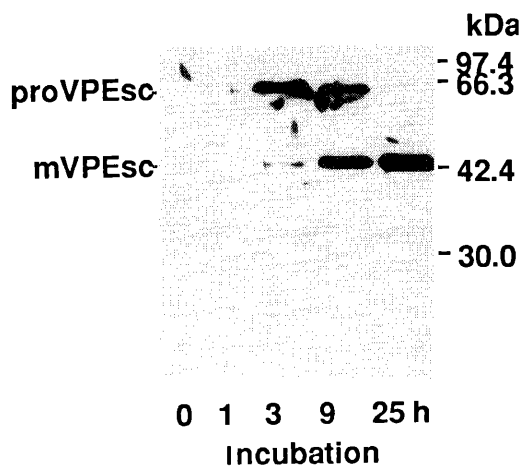


Fig. 1. Conversion of a 59-kDa VPE precursor (proVPEsc) to a 46-kDa VPE (mVPEsc) in the *pep4* transformant during incubation in the SC-galactose medium. The *pep4* cells transformed with pYES2-*ppVPE* were grown in the SC-galactose medium for 1 to 25 h. The cells were harvested at the time indicated. Total proteins (10  $\mu$ g) of the cells were subjected to SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis with VPE-specific antibodies. proVPEsc and mVPEsc indicate the 59-kDa VPE precursor and the 46-kDa mature VPE, respectively. The molecular mass of each marker protein is given on the right in kDa.

を示唆している。

次いで培養時間に伴う液胞プロセシング酵素活性の変化を追った結果を Fig. 2 に示した。この経時的な活性の上昇は、Fig. 1 の 46-kDa VPE の量的な上昇と一致した。この結果は、59-kDa proVPE は不活性型の前駆体で培養時間の経過に伴って 46-kDa VPE の活性型に変換していることを示している。即ち、酵母細胞内でも、登熟期の種子細胞内と同様の活性化を伴った VPE 分子の成熟化が起こっていると考えられる。

この VPE の成熟化は *PEP4* 株のみならず *pep4* 株でも同様に起こった。pep4 株は酵母の液胞内のプロテイナーゼ活性が極端に低くなっていることから、59-kDa proVPE から 46-kDa VPE への変換は自己限定分解による可能性が強く示唆された。

酵母細胞内で発現した液胞プロセシング酵素 (VPE) の比活性の検討

形質転換酵母で発現した成熟型 46-kDa VPE の比活性をヒマ種子プロテインボディの液胞プロセシング

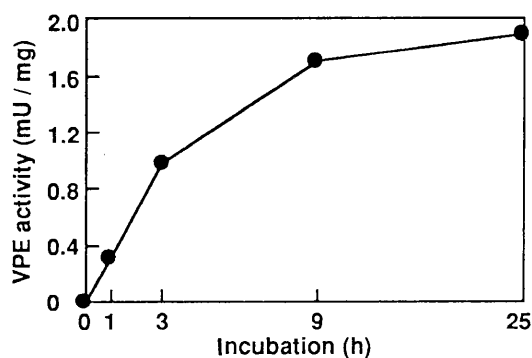


Fig. 2. Increase in the level of the vacuolar processing enzyme activity in the transformant cells during incubation in the SC-galactose medium. The *pep4* cells transformed with pYES2-*ppVPE* were grown in the SC-galactose medium for 1 to 25 h. Vacuolar processing enzyme activity was assayed with a synthetic decapeptide as substrate. The products of the reaction were analyzed by capillary electrophoresis. The units of enzymatic activity are defined in the text.

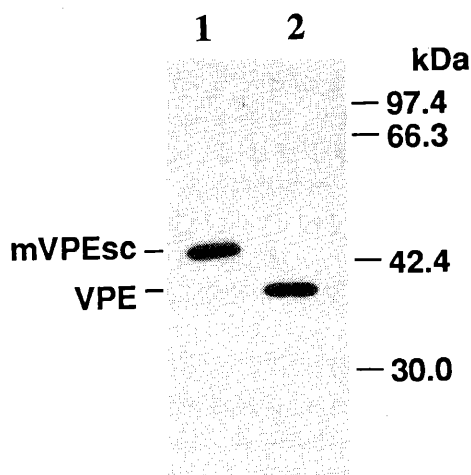


Fig. 3. Comparison of the specific activity of VPE (mVPEsc) in the transformant cells with that of VPE(VPE) from castor bean endosperm. VPEs were prepared either from the *pep4* cells transformed with pYES2-*ppVPE* or from the protein bodies isolated from dry seeds of castor bean. The cell lysate of the transformant with 0.04 munit of VPE activity (lane 1) and the soluble fraction of the protein bodies with 0.04 munit of VPE activity (lane 2) were subjected to SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis with VPE-specific antibodies.

酵素の比活性と比較した。Fig. 3は、酵母及び精製液胞プロセシング酵素各0.04 mUをSDS-PAGE後イムノプロットした結果を示している。酵母での活性型46-kDa VPEとヒマ種子の精製37-kDa VPEのプロット上のシグナルはほぼ同程度であったことから、発現産物46-kDa VPEの持つ比活性はヒマ種子の酵素の比活性（約2 unit/mg protein）に匹敵することが明らかになった。

液胞内における液胞プロセシング酵素の活性化機構と種子たん白質の成熟化のためのカスケード機構

酵母細胞内で発現した液胞プロセシング酵素の前駆体は糖鎖の付加が起こるなど植物細胞とは異なるたん

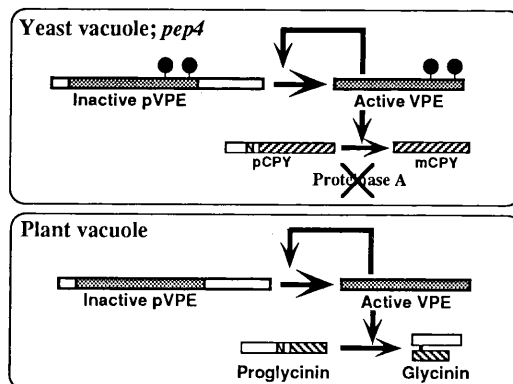


Fig. 4. A hypothesis of a cascade mechanism for maturation of vacuolar proteins in yeast and plant cells. An inactive VPE precursor synthesized on the endoplasmic reticulum is transported to the vacuoles and then processed to make an active VPE by self-catalytic proteolysis within the vacuoles. The active VPE is responsible for maturation of vacuolar proteins.

白質の修飾機構が働いてはいるが、植物細胞と同様に液胞へ細胞内輸送されて、成熟化と活性化が起こる (Fig. 4)。この活性化は、液胞内の多くのプロテイナーゼ活性が低下している *pep4* 株 (proteinase A 欠損株) でも観察されることから、自己限定分解によるプロペプチドの除去が活性化を引き起こしていることが分かった。この結果は、植物の種子細胞内でも液胞へ輸送されてきた液胞プロセシング酵素の前駆体が同様の機構で活性化され、この活性型酵素がグリシニンをはじめとする各種の種子たん白質の前駆体のプロセシング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 (Fig. 4)。

## 要 約

種子たん白質は細胞内の粗面小胞体で前駆体として合成された後に、液胞内で液胞プロセシング酵素の働きにより成熟型に変換する。本研究の目的は、種子たん白質の成熟化に関するプロセシングのカスケード機構の解明である。液胞プロセシング酵素（非糖たん白質）の全長をコードする遺伝子を酵母 (*pep4* 変異株: proteinase A 欠損株) 細胞内で発現させると、糖

鎖を付加した不活性型前駆体として合成された後、活性を持った成熟型（糖たん白質）に変換した。この成熟型の発現酵素は植物体から精製した酵素と同レベルの比活性を示した。このことから下記の3点が示唆された。1) 液胞プロセシング酵素の成熟化は活性化をとまう。2) 液胞プロセシング酵素の成熟化は自己消化による可能性が大きい。3) 糖鎖の有無は酵素活性に影響しない。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Hara-Nishimura I, Takeuchi Y, Inoue K and Nishimura M (1993): Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *Plant J*, **4**, 793-800.
- 4) Hara-Nishimura I and Nishimura M (1987): Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*, **85**, 440-445.
- 5) Hara-Nishimura I, Inoue K and Nishimura M (1991): A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett*, **294**, 89-93.
- 6) Kinoshita T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1995): Homologues of a vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **29**, 81-89.
- 7) Kinoshita T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1995): The sequence and expression of the  $\gamma$ -VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **36**, 1555-1562.
- 8) Hiraiwa N, Takeuchi Y, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1993): A vacuolar processing enzyme in maturing and germinating seed: Its distribution and associated changes during development. *Plant Cell Physiol*, **34**, 1197-1204.
- 9) Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1994): Vacuolar processing enzyme of soybean that converts proprotein to the corresponding mature forms. *Plant Cell Physiol*, **35**, 713-718.
- 10) Hara-Nishimura I, Shimada T, Hiraiwa N and Nishimura M (1995): Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol*, **145**, 632-640.
- 11) Hara-Nishimura I, Takeuchi Y and Nishimura M (1993): Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell*, **5**, 1651-1659.