

液胞プロセシング酵素の活性化機構

平岩 呂子・西村 いくこ*

基礎生物学研究所細胞生物学研究系

Activation Mechanism for the Vacuolar Processing Enzyme

Nagako HIRAIWA and Ikuko HARA-NISHIMURA

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

ABSTRACT

Vacuolar processing enzyme (VPE) responsible for maturation of various vacuolar proteins belongs to a novel cysteine proteinase family. To explore the active site of VPE and the activation mechanism for VPE, we expressed mutant VPEs in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. VPE homologues have cysteine residues and histidine residues in the conserved region of the polypeptides. We substituted each of these residues, Cys83, Cys222, Cys255, Cys269 and His180, by a glycine residue to make mutant VPEs. These mutant VPE genes were introduced to *pep4* strain of yeast and expressed the respective VPEs. We found that a wild VPE could complement the maturation of carboxypeptidase Y (CPY) instead of proteinase A (*PEP4* gene product) in the transformant of *pep4* strain. Thus, we used the maturation of CPY for *in vivo* assay of VPE activity. The mutant VPEs of C255G and C269G had the activity to produce mature CPY, while the mutant VPEs of C83G, C222G and H180G had no activity. The result indicates that Cys83, Cys222 and His180 are the essential amino acid for the VPE activity. In the next step, to clarify the activation mechanism of VPE, we examined whether the conversion of proVPE into mature VPE was occurred in these transformants with mutant VPEs. The transformants expressing inactive VPE mutants, C83G, C222G and H180G, accumulated proVPE, but not mature VPEs, although the conversion of proVPE into mature VPE was observed in the transformants expressing active mutant VPEs, C255G and C269G. These findings suggest that an inactive VPE precursor is converted to an active VPE by self-catalytic proteolysis within the vacuoles. Thus, it is likely that VPE itself might regulate maturation and activation of various vacuolar proteins in the plant vacuoles. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 4-9, 1997.

Key words: asparaginyl endopeptidase, cysteine proteinase, vacuolar proteins, vacuolar processing enzyme (VPE), yeast

種子たん白質は登熟種子細胞の粗面小胞体で前駆体

として合成され、液胞へ輸送された後に成熟型に変わる¹⁻³⁾。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 (Vacuolar Processing

*〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38

Enzyme, VPE) と命名した^{4,5)}。その後、VPE ホモログの存在はヒマ、大豆⁶⁾といった植物種子のみならず、動物細胞⁷⁾からも示されている。構造解析の結果、VPE は新規のシステインプロテイナーゼファミリーを形成していることが分かってきた。また、本酵素のホモログの3種類の遺伝子がアラビドプシスから単離され、その発現様式から、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に分かれることが明らかになってきている^{8,9)}。

VPE 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のみを認識して、そのカルボニル基側を切断するアスパラギンルエンドペプチダーゼである。アスパラギン残基特異的な切断を受けることによって植物のプロテイナーゼインヒビターが活性発現すること¹⁰⁾や、動物のカテプシンB, D, Hの成熟化にもアスパラギン残基特異的な切断が必要であることが知られている^{11,12)}。種子たん白質の成熟化を行う酵素として見つかった本酵素が生物界一般でたん白質の最終的な構造を決定する鍵酵素となって役割を果たしていることが予想される。

ヒマ VPE の前駆体は、シグナルペプチドとN末端側及びC末端側にプロ領域を持つプレプロ型前駆体として合成されると考えられる。大腸菌を用いた発現系により、前駆体からシグナル部分が除かれたプロ型前駆体は活性を持たず、C末端側のプロ領域を除くことにより活性発現することが示された¹³⁾。このことから、本酵素は不活性型前駆体として合成され、プロペプチドの除去が本酵素の活性化に必要であると考えられた¹⁴⁾。本研究では VPE の活性化機構の解明を目指している。ここでは、活性型の VPE を蓄積できる発現系として確立できた酵母細胞を用いた解析の結果を報告する。

方 法

変異型 VPE の酵母細胞内での発現

ヒマ VPE の Cys83, Cys222, Cys255, Cys269, His180 を Gly に変えたコンストラクトを site-directed mutagenesis system (Mutan-Express Km, Takara, Shiga, Japan) を使って作製した。

変異 DNA 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 (*Saccharomyces cerevisiae*) に導入した。酵母は PEP4 株 (YW23-5A; MATa leu2 ura3-52) 及び 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。細胞の増殖が定常状態に達した時に、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。

細胞抽出液の調製とイムノブロット解析

形質転換酵母細胞をガラスビーズで破碎し、SDS サンプルバッファーで可溶化したものを SDS-PAGE にかけて、次いで GVHP 膜にブロットした。一次抗体としてはヒマ VPE 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。

In vivo 及び in vitro でのヒマ VPE の活性測定法

In vivo での VPE の活性の指標として、イムノブロット法により pep4 株の形質転換酵母細胞から成熟型の carboxypeptidase Y の検出を行った。一次抗体として carboxypeptidase Y に特異的な抗体を2,000分の1希釈で用いた。

In vitro での VPE の活性測定のための基質は、11S globulin の前駆体のプロセッシング部位を含む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

酵母細胞内での変異 VPE の発現

VPE は新規のシステインプロテイナーゼファミリーを形成していることが示されており、Fig. 1 で示したように VPE ホモログ間で保存性の高い Cys 残基及び His 残基のうちいずれかが活性中心であることが予想される。

VPE の活性中心について調べるため、Fig. 1 で示した5つの Cys 残基及び His 残基 (Cys83, His180, Cys222, Cys255 and Cys269) を Gly 残基に変えた変異 VPE を pep4 株に導入し発現させた。合成ペプチドを基質とした in vitro での活性測定の結果、Cys255, Cys269 をそれぞれ変えた変異 VPE を導入した形質転換体から活性が検出された。これに対して、

Cys83, Cys222, His180 を変えた各形質転換体からは活性が検出されなかった。

形質転換酵母細胞内での VPE による carboxypeptidase Y の成熟化

酵母液胞内プロテイナーゼの 1 つ carboxypeptidase Y 前駆体はアスパラギン残基の C 末端側のペ

プチド結合の切断を受けて成熟型に変換することが知られている。Fig. 2 は各酵母細胞を酵母液胞内プロテイナーゼの 1 つ carboxypeptidase Y に特異的な抗体でイムノプロットしたものである。Carboxypeptidase Y は proteinase A に依存して成熟化することが知られており、*PEP4* 株では成熟型が検出されるのに対し

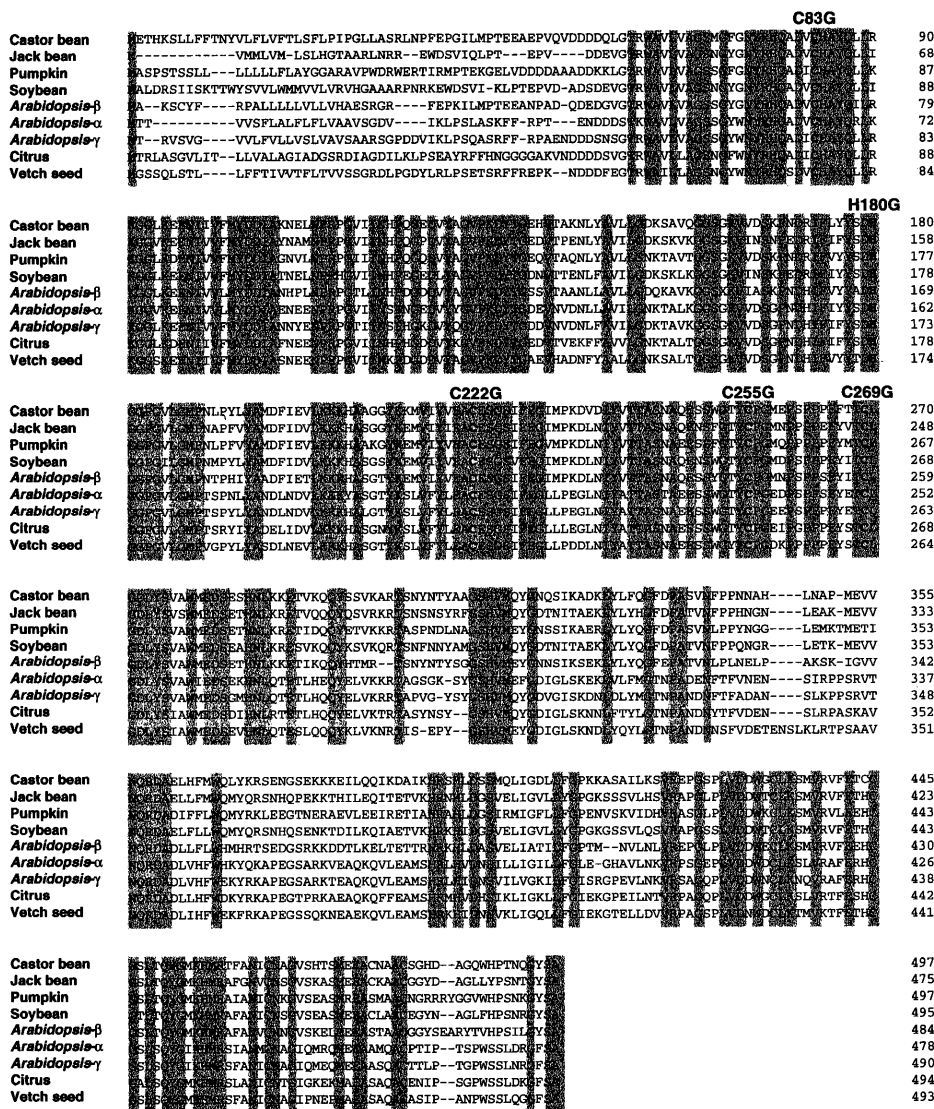


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of VPE homologues. The primary sequences of castor bean VPE (Hara-Nishimura *et al.*¹³⁾), soybean VPE (Shimada *et al.*⁶⁾), jack bean legumain (Takeda *et al.*¹⁵⁾), pumpkin VPE (personal communication), *Arabidopsis* α -VPE, β -VPE, γ -VPE (Kinoshita *et al.*^{8,9)}), citrus vacuolar processing protease (Alonso *et al.*¹⁶⁾), vetch seed proteinase B (Becker *et al.*¹⁷⁾) are aligned using a program of GeneWorks (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA). Shaded residues indicate homologous amino acids. Each residue of Cys83, Cys222, Cys255, Cys269 and His180 (indicated by bold) was substituted by a glycine residue to make mutant VPEs, C83G, C222G, C255G, C269G and H180G, respectively.

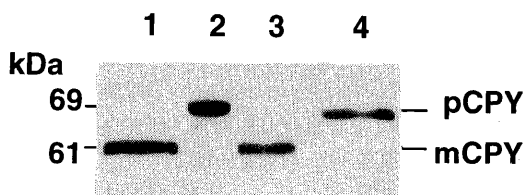


Fig. 2. *In vivo* processing of pCPY to make mature form in proteinase A-deficient strain transformed with pYES2-*ppVPE*. Non-transformants of wild-type (*PEP4*) strain (lane 1), proteinase A-deficient (*pep4*) strain (lane 2), the *pep4* transformants with pYES2-*ppVPE* (lane 3) and with pYES2 (lane 4) were subjected to SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis with CPY-specific antibodies. pCPY and mCPY indicate CPY precursor and mature CPY, respectively.

て、*pep4* 株では前駆体が検出される。これに対して VPE を導入した形質転換酵母細胞では *pep4* 株であるに関わらず、成熟型の carboxypeptidase Y が検出された。この結果から酵母に導入した VPE が carboxypeptidase Y の成熟化に対する proteinase A の機能を相補することが分かった。

変異 VPE の活性型への変換

Fig. 2 の結果から carboxypeptidase Y の成熟化が VPE の *in vivo* の活性の指標となることが分かった。そこで Fig. 3 では変異 VPE を導入した形質転換細胞における carboxypeptidase Y の成熟化を見た。In vitro の活性測定の結果を支持するように、Cys83, Cys222, His180 それぞれを変えた変異 VPE を導入した形質転換体からは成熟型 carboxypeptidase Y は検出されなかった。このことから Cys83, Cys222, His180 の3つのアミノ酸残基が活性発現に必要であることが考えられた。

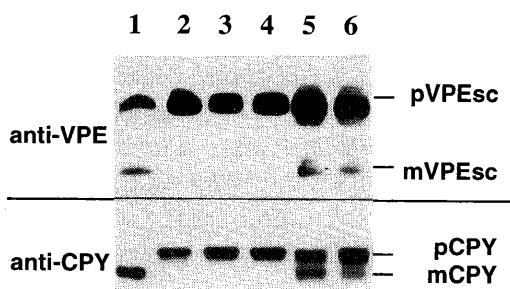


Fig. 3. Expression of five mutagenized pVPEs and their conversion into the mature forms. The *pep4* transformant with each of wild VPE (lane 1) and the five mutagenized VPEs (C83G, lane 2; H180G, lane 3; C222G, lane 4; C255G, lane 5; C269G, lane 6) was subjected to SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis with VPE-specific antibodies (anti-VPE, upper panel) and CPY-specific antibodies (anti-CPY, lower panel). pVPEsc and mVPEsc indicate VPEsc precursor and mature VPEsc. pCPY and mCPY indicate CPY precursor and mature CPY, respectively.

VPE の活性型への変換が自己触媒反応によって起こるなら、活性を持たない変異 VPE では活性型への変換が起こらないことが予想される。これについて調べるため、Fig. 3 では各変異 VPE を導入した形質転換細胞中の VPE 前駆体の活性型への変換を見た。Cys255, Cys269 を変えた変異 VPE を導入した各形質転換体からは活性型 VPE が検出されるのに対して、Cys83, Cys222, His180 を変えた変異 VPE を導入したものからは、活性型が検出されなかった。以上の結果から、VPE の活性化は自己限定分解によって引き起こされていることが分かった。

このことは、植物の種子細胞内でも液胞へ輸送されてきた VPE の前駆体が同様の機構で活性化され、この活性型酵素が各種の液胞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機構の存在を強く示唆している。

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、液胞プロセシング酵素の活性化機構の解明である。液胞プロセシング酵素の全長をコードする遺伝子を酵母(*pep4*; proteinase A 欠損株)細胞内で発現させると、液胞内プロテイナーゼの1つ carboxypeptidase Y の成熟化が見られた。細胞内で液胞プロセシング酵素は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に変換するが、この変換は Cys83, Cys222, His180 を Gly に変えた酵素では起こらなかった。このことから下記の2点が示唆された。1. 液胞プロセシング酵素は酵母 proteinase A の carboxypeptidase Y の成熟化に対する機能を相補する。2. 液胞プロセシング酵素の成熟化は自己触媒的に起こる。

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) 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.
- 7) Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C and Barrett AJ (1994): Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyln endopeptidase. *J Biol Chem*, **272**, 8090-8098.
- 8) 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.
- 9) Kinoshita T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1995): The sequence and expression of the γ -VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **36**, 1555-1562.
- 10) Pueyo JJ, Hunt DC, Chrispeels MJ (1993): Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. *Plant Physiol*, **101**, 1341-1348.
- 11) Takio K, Towatari T, Katunuma N, Teller DC, Titani K (1983): Homology of amino acid sequences of a rat liver cathepsins B and H with papain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 3666-3670.
- 12) Shewale JG and Tang J (1984): Amino acid sequence of porcine spleen cathepsin D. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 3703-3707.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Takeda O, Miura Y, Mitta M, Matsushita H, Kato I, Abe Y, Yokosawa H and Ishii S-I (1994) : Isolation and analysis of cDNA encoding a precursor of canavalia ensiformis asparaginyl endopeptidase (legumain). *J Biochem*, **116**, 541-546.
- 16) Alonso JM and Granell A (1995) : A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in Citrus fruit. *Plant Physiol*, **109**, 541-547.
- 17) Becker C, Shutov AD, Nong VH, Senyuk VI, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen NC and Mütz K (1995) : Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur J Biochem*, **228**, 456-462.