

貯蔵たん白質の細胞内輸送と成熟化の機構の解析

西村いくこ*・嶋田知生・黒柳美和・山田健志

基礎生物学研究所細胞生物学研究系

Vacuolar Sorting Machinery and Processing Mechanism for Storage Proteins

Ikuko HARA-NISHIMURA, Tomoo SHIMADA, Miwa KUROYANAGI and Kenji YAMADA

Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444-8585

ABSTRACT

Novel vesicles that accumulate large amounts of proprotein precursors of storage proteins were purified from developing pumpkin seeds and were designated precursor-accumulating (PAC) vesicles. The PAC vesicles mediate the transport of the precursor of a major storage protein (pro2S albumin) to protein-storage vacuoles in the developing seeds. We characterized two homologous proteins from PAC vesicles, a 72-kDa protein (PV72) and an 82-kDa protein (PV82). PV72 and PV82 showed an ability to bind to peptides derived from both an internal propeptide and a C-terminal peptide of pro2S albumin. PV72 was predicted to be a type I integral membrane protein with epidermal growth factor (EGF)-like motifs. These results suggest that PV72 and PV82 are potential sorting receptors for 2S albumin to protein-storage vacuoles. In the next step, we characterized a 100-kDa component (PV100) of the vesicles. Isolated cDNA for PV100 encoded a 97, 310-Da protein that was composed of a hydrophobic signal peptide and the following three domains: an 11-kDa Cys-rich domain with four CxxxC motifs (C, Cys), a 34-kDa Arg/Glu-rich domain composed of six homologous repeats, and a 50-kDa vicilin-like domain. Molecular characterization showed that two Cys-rich peptides, three Arg/Glu-rich peptides and the vicilin-like protein were produced by cleaving Asn-Gln bonds of PV100 by vacuolar processing enzyme (VPE) and that all these proteins had a pyroglutamate at their NH₂ terminus. Our findings suggested that VPE was responsible for cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor, PV100, to produce multiple seed proteins in the vacuoles of seed cells. *Soy Protein Research, Japan* 1, 6-12, 1998.

Key words : PAC vesicles, vacuolar sorting receptor, developing seeds, storage protein, 2S albumin, vacuolar processing enzyme

重要な食糧源のひとつである種子の貯蔵たん白質は、

登熟期の種子細胞の粗面小胞体で合成され、液胞へ輸送されて蓄積される¹⁻³⁾。種子の細胞に見出される液胞は、葉や茎などの栄養器官の細胞に存在する分解型の

*〒444-8585 岡崎市明大寺町西郷中 38

液胞 (LV; lytic vacuoles) とは区別され、たん白質蓄積型 (PSV; protein-storage vacuoles) と呼ばれている。粗面小胞体で合成されたたん白質はどのようにしてたん白質蓄積型液胞へ運ばれるのであろうか？ 液胞たん白質の選別輸送の機構を解析することは、種子の改良を目指す上で重要な課題となる。必須アミノ酸含量の高い改変貯蔵たん白質遺伝子を導入した形質転換体を作製する場合、細胞内で発現されたたん白質が正しく液胞へ輸送され、蓄積されなければならない。

著者らは、カボチャ貯蔵たん白質の細胞内輸送に関与する小胞を見出し、PAC (precursor-accumulating) 小胞と命名した⁴⁾。PAC 小胞は直径 300 ~ 500 nm の小胞で、動物のリソソームたん白質や酵母の液胞たん白質の輸送に関わっていることが知られている coated vesicles (直径 50 ~ 70 nm) とは明らかに異なる⁴⁾。種子の貯蔵たん白質の細胞内輸送には、独特の経路が使われていることが示されつつある^{4,5)}。PAC 小胞は、貯蔵たん白質の前駆体を多量に含んでおり、これらの前駆体をたん白質蓄積型液胞へ効率良く輸送する^{6,7)}。このことは、PAC 小胞には貯蔵たん白質を液胞へ選別輸送するための装置が存在することを示唆している。この装置の同定を目的として、著者らは、登熟期の種子より PAC 小胞の単離に成功し、その構成成分の解析を行った。

上記の研究の結果明らかになってきた次の 2 点：(1) 種子貯蔵たん白質の細胞内選別輸送に関わる PAC 小胞とその膜に局在する種子たん白質前駆体の選別レセプター、(2) 一つの種子たん白質前駆体から複数の成熟型たん白質を生成する新規の成熟化機構について述べる。

方 法

PAC 小胞の単離と 72/82 kDa たん白質の解析⁸⁾

開花後 22 ~ 28 日目のカボチャの子葉 (約 10 ~ 20 g) を抽出液 (20 mM sodium pyrophosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.3 M mannitol) で破碎後遠心 (3,000 g, 15 分) する。この上清を再び遠心 (8,000 g, 20 分) し、沈殿画分を 1 mL の溶液 (10 mM Hepes-KOH, pH 7.2, 1 mM EDTA, 0.3 M mannitol) に混ぜ、28% パーコールの上に重層して、パーコールの自己密度勾配遠心 (40,000 g, 30 分) により、PAC 小胞を精製した^{4,9)}。単離小胞は、電子顕微鏡観察および指標酵素活性測定により他のオルガネラや細胞基質成分の混在がないことを確かめた⁴⁾。

単離 PAC 小胞を SDS 電気泳動後、72 kDa と 82 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列を決定し、それぞれを

PV72 と PV82 と命名した⁸⁾。PV72 のアミノ酸配列を基に、登熟カボチャ子葉の cDNA ライブラリーより PV72 をコードしている cDNA を単離し、構造解析を行った。**2S アルブミン前駆体由来のペプチドに対する PV72/82 の結合活性の測定⁸⁾**

カボチャの主要貯蔵たん白質の一つ 2S アルブミンに注目し、そのプロペプチド領域と C 末端領域のペプチドを合成し、これをリガンドとするアフィニティカラムを作製した (2 mL of a bed volume of Aminolink gels; Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)。上記のペプチドの各アミノ酸残基に変異を入れたものを合成して、同様のカラムを作製した。分解型液胞たん白質の選別輸送シグナルとして知られているオオムギのアリユーレインの NPIR 配列を含むプロペプチドも合成し、同様の実験に使用した。

一方、登熟カボチャ子葉よりミクロソーム画分を遠心分画により調製し¹⁰⁾、超音波処理後、膜画分を遠心 (100,000 g, 60 分) で沈澱させた。この膜画分より、PV72/82 を 1% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS) と 10% (v/v) glycerol を含む溶液で可溶化する。この抽出液を PV72/82 の粗抽出液として、上記のアフィニティカラムにかけ、カラムを洗浄後にリガンドに用いたペプチドで溶出した。**PAC 小胞の 100 kDa たん白質の解析 PV100¹¹⁾**

PAC 小胞の主要構成成分の一つ 100 kDa のバンド (PV100) の N 末端アミノ酸配列を決定し、この配列を基に PV100 の cDNA を単離した。cDNA の構造解析を行った。

結果と考察

PAC 小胞の膜たん白質 PV72 の構造

Fig. 1 は単離精製した PAC 小胞の SDS 電気泳動パターンの高分子量領域である。PAC 小胞は、種子貯蔵たん白質 11S グロブリンの前駆体プログロブリン (pG) のほか、PV72/PV82 や PV100 (後述) を含んでいることが分かる。PV72 と PV82 の N 末端アミノ酸配列はそれぞれ、RFVVEKNSLKVITYPDSIKGVYEXAIGNFG VPEYGGTMT と XFVVEKNSLRVTSPERIRGT と決定され、両者は互いに類似していた。Fig. 2 は、単離された PV72 の cDNA から推定された一次構造とシロイヌナズナより単離されたホモログ (AtELP)¹²⁾ との構造比較である。PV72 と AtELP はアミノ酸レベルで 74% の相同性を示した。PV72 前駆体は N 末端に疎水性のシグナルペプチドを持っている。PV72 の構造の特徴は、(1) 成熟型の PV72 分子の C 末端領域に膜貫通ドメイン

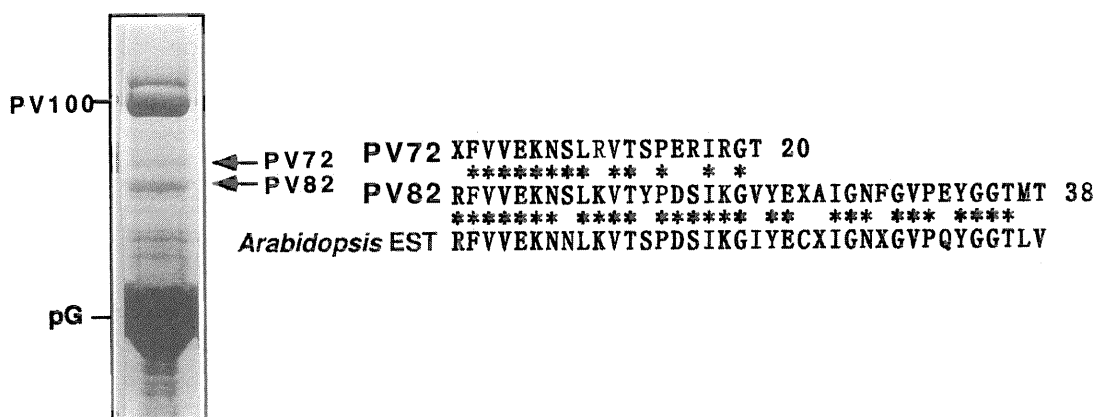


Fig. 1. Protein components of the PAC vesicles. The PAC vesicles (100 μ g) were subjected to SDS-PAGE (8% acrylamide) and then to staining with CBB to detect PV72 and PV82. Comparison of N-terminal amino acid sequences of PV82 (20 residues) and PV72 (38 residues) with the sequence of an *Arabidopsis* EST clone (EMBL accession number Z38123). PV100 indicates an 100-kDa major protein of PAC vesicles. pG represents proglobulin, a proprotein precursor of 11S globulin.

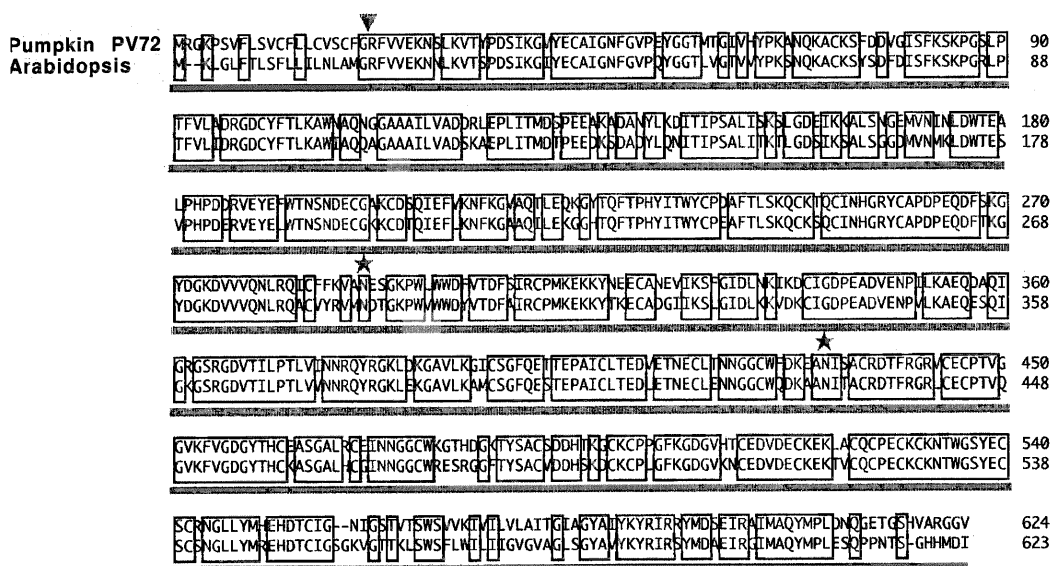


Fig. 2. Alignment of pumpkin PV72 with *Arabidopsis* homolog (AtELP) and structural characterization of PV72. A possible site of signal peptide cleavage is indicated by an arrowhead. Three EGF-like motifs are numbered (starting at positions 413, 466 and 514). Two possible glycosylation sites are indicated by asterisks.

を有するタイプI型の膜たん白質であること、(2)この膜貫通ドメインを境にして短い細胞基質ドメインと大きな小胞内ドメインに分かれること、(3)後者のドメインにはシステイン含量の高い epidermal growth factor (EGF) 様モチーフが3回繰り返していることである。

上記の構造の特徴はエンドウの BP-80¹³⁾にもみられる。BP-80は、分解型液胞に局在するシステインプロテイナーゼであるアリューレインの液胞輸送シグナルである NPIR 配列と結合することが既に報告されている¹⁴⁾。Fig. 3は、NPIR 配列を含むアリューレインのプロペプチド (PAP) をリガンドとするアフィニティカラムに PV72/82 が特異的に結合し、溶出されてくるパターンを示している。これにより、PV72/82 も液胞たん白質の選別輸送のレセプターである可能性が示唆された。

しかしながら、PAC 小胞は、分解型液胞たん白質のための輸送小胞ではない。PAC 小胞は、内部に種子貯蔵たん白質の前駆体を多量に蓄積しており、これらを液胞へ輸送する^{3,4,6,7)}。次のステップとして、PV72/82 がこれらの貯蔵たん白質の選別輸送のためのレセプターとして機能するか否かを調べた。

PV72/82 は 2S アルブミン前駆体由来のプロペプチドに結合する

2S アルブミンは、前駆体プロ 2S アルブミンとして合成の場である粗面小胞体からたん白質蓄積型液胞へ輸送される。プロ 2S アルブミンは N 末端領域、中間領域と C 末端領域にプロペプチドを持ち、これらのペプ

チドは液胞内で除去されて成熟型の 2S アルブミンとなることが知られている¹⁵⁾。カボチャ 2S アルブミン³⁾の N 末端プロペプチド (2S-N)、中間プロペプチド (2S-I) および C 末端ペプチド (2S-C) の 3 種類のペプチドの各々をリガンドとするアフィニティカラムに PV72/82 の粗抽出液をかけた。その結果、2S-I と 2S-C に特異的に結合することが分かった (Fig. 4)。次に、2S-I と 2S-C の一部の残基をグリシンに変えた変異ペプチドをリガンドとしてアフィニティクロマトを行った結果、2S-I の RRE 配列と 2S-C の NSPL 配列が PV72/82 との結合に必須であることが分かった。以上の結果から、PV72/82 が、たん白質蓄積型液胞への種子たん白質の選別輸送に関わっていることが明らかになった。

PAC 小胞の構成成分 PV100 の構造解析

PAC 小胞によって様々な種子たん白質が前駆体の形で液胞へ輸送される^{3,4)}。これらのたん白質の多くは液胞内に局在している液胞プロセシング酵素の働きで成熟型に変換する¹⁶⁻²²⁾。PV100 もやはり液胞プロセシング酵素によって成熟型に変換する種子たん白質の前駆体であったが、興味深いことに、PV100 はプロセスされることによって、複数の種子たん白質を生じることが分かった¹¹⁾。Fig. 5 は、PV100 の構造を示している。PV100 は、N 末端のシグナルペプチドの後に、システイン残基に富む 11 kDa の C ドメイン、アルギニンとグルタミン酸に富む 34 kDa の RE ドメイン、そして最後に 50 kDa のビシリン様領域からなっている。C ドメイ

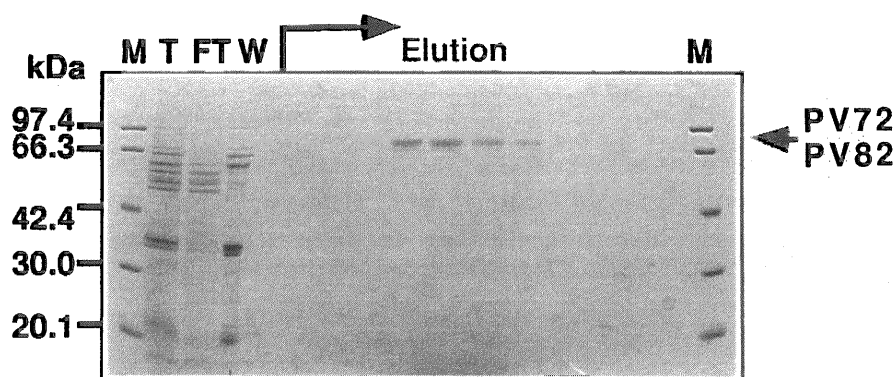


Fig. 3. Affinity chromatographic analysis of PV72/82 showing binding to a vacuolar targeting sequence of barley aleurain (proaleurain peptide, PAP). CHAPS extract containing the microsome membrane was applied to the proaleurain column. After washing with CHAPS buffer containing 500 mM NaCl, bound proteins were eluted by the addition of the same peptide in CHAPS buffer. Each of CHAPS extract (T), unbound fraction (FT) and wash fraction (W), and each eluted fraction were subjected to SDS-PAGE followed by CBB staining. M, molecular mass markers. Both PV72 and PV82 are indicated by an arrow.

Peptide	Sequence	Binding
2S-N	YRTTITTTVEEENRQGRE	-
2S-I	SRDVLQMRGIENPWRREG	+
2S-I/4G	-----GGGG---	+
2S-I/3G	-----GGG-	-
2S-C	KARNLPSMCGIRPQRCDF	+
2S-C/4G	---GGGG-----	-
PAP	SSSSFADSNPIRPVTDRAASTY	+

Fig. 4. Essential elements in the 2S albumin propeptides for PV72/82 binding. An internal propeptide (2S-I) and C-terminal peptide (2S-C) of pro2S albumin can bind to PV72/82, as well as a propeptide of barley aleurain. An NPIR sequence has been shown to be a vacuolar targeting signal of aleurain. We substituted the NPWR of the 2S-I peptide with GGGG to produce the 2S-I/4G peptide and prepared a 2S-I/4G affinity column. Unexpectedly, PV72/82 specifically bound to the mutated peptide. When the RRE sequence of the 2S-I peptide was substituted with GGG to produce the 2S-I/3G peptide, PV72/82 could not bind to the mutated peptide. We also substituted the NLPS of the 2S-C peptide with GGGG to produce a 2S-C/4G peptide. The NLPS sequence was essential for PV72/82 binding to the 2S-C peptide.

ンやREドメインは、種子内ではさらにプロセスされることが分かった。Fig. 5には、液胞プロセシング酵素がプロセスする部位と、それによって生じるたん白質を図示している。この図からも分かるとおり、PV100の一次構造上にはNQ（アスパラギン-グルタミン）配列が多数存在する。アスパラギンに対して特異性を持つ液胞プロセシング酵素はこの配列を認識して、アスパラギン残基のカルボニル基側を切断する^{23,24}。その結果生じたN末端のグルタミン残基は、液胞内の酸性条件下でピログルタミン酸に環化する。N末端にピログルタミン酸を持つ低分子量のたん白質は液胞内に存在するアミノペプチダーゼなどの酵素に対して抵抗性を持つため、分解されずに存在するものと思われる。

ビシリンは主要な種子たん白質として多くの種子にみられるが、PV100のような前駆体構造を持つものはこれまでに知られていない。PV100のように一つの前駆体たん白質から複数の種子たん白質を生じさせる液胞内のプロセシングの機構は非常に面白い。

液胞プロセシング酵素は、種子の貯蔵たん白質の成熟化に関与する酵素として見出された酵素であるが、栄養器官型ホモログが最近新たに見つかった²⁵。栄養器官における分解型液胞においても、たん白質蓄積型液胞と同様のプロセシング系が機能していると考えられる。

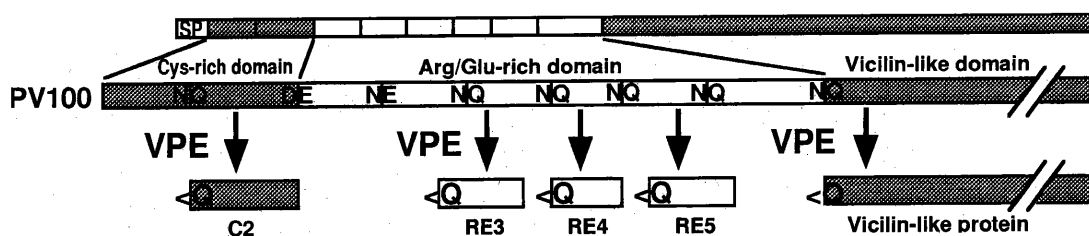


Fig. 5. A hypothetical mechanism for the VPE-mediated cleavage at Asn-Gln bonds to produce multiple seed proteins. PV100 precursor was composed of a hydrophobic signal peptide and the following three domains: an 11-kDa Cys-rich domain with four CxxxC motifs (C, Cys), a 34-kDa Arg/Glu-rich domain composed of six homologous repeats, and a 50-kDa vicilin-like domain. Two Cys-rich peptides, three Arg/Glu-rich peptides and the vicilin-like protein were produced by cleaving Asn-Gln bonds of PV100 and that all these proteins had a pyroglutamate at their NH₂ terminus. Vacuolar processing enzyme (VPE) is responsible for maturation of multiple seed proteins by cleaving Asn-Gln bonds of the PV100.

要 約

種子貯蔵たん白質は細胞内の粗面小胞体で合成された後に、たん白質蓄積型液胞に輸送され、蓄積される。液胞への貯蔵たん白質の選別輸送に関わる PAC 小胞の解析から、膜たん白質 PV72/82 が主要な貯蔵たん白質 2S アルブミンのプロペプチドと特異的に結合することが分かった。即ち、PV72/82 は 2S アルブミンの選別輸送レセプターとして機能していることが強く示唆された。ついで、PAC 小胞の主要構成成分の一つ PV100 の構造解析から、液胞内のプロセシングの新規の機構が明らかになった。即ち、PV100 は、一次構造上に Asn-Gln 配列を複数持つが、この部位でプロセスされることにより複数の種子たん白質を生じる。これらの種子たん白質はいずれも N 末端にピログルタミン酸を有することが分かった。

文 献

- 1) Akazawa T and Hara-Nishimura I (1985): Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Annu 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, Shimada T, Hatano K, Takeuchi Y and Nishimura M (1998): Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell*, **10**, 825-836.
- 5) Levanony H, Rubin R, Altschuler Y and Galili G (1992): Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J Cell Biol*, **119**, 1117-1128.
- 6) 西村いくこ (1993): 液胞タンパク質前駆体のための輸送ベシクルとプロセシング. 植物細胞工学, **5**, 348-356.
- 7) 西村いくこ (1995): 種子タンパク質の合成と集積. (1) 前駆体の細胞内輸送と液胞内でのプロセシング. 種子のバイオサイエンス. 種子生理生化学研究会, 学会出版センター, pp. 65-70.
- 8) Shimada T, Kuroyanagi M, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1997): A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol*, **38**, 1414-1420.
- 9) 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.
- 10) Hatano K, Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1997): A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol*, **38**, 344-351.
- 11) Yamada K, Shimada T, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1998): Multiple seed proteins are produced by cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor by vacuolar processing enzyme., submitted.
- 12) Ahmed SU, Bar-Peled M and Raikhel NV (1997): Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol*, **114**, 325-336.
- 13) Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beevers L, Philips TE and Rogers JC (1997): Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol*, **115**, 29-39.
- 14) Kirsch T, Paris N, Butler JM, Beevers L and Rogers JC (1994): Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 3403-3407.
- 15) Saalbach G, Rosso M and Schumann U (1996): The vacuolar targeting signal of the 2S albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal propeptide as an essential element. *Plant Physiol*, **112**, 975-985.
- 16) Hara-Nishimura I and Nishimura M (1987): Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*,

85, 440-445.

- 17) Hara-Nishimura I, Takeuchi Y and Nishimura M (1993b): Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell*, **5**, 1651-1659.
- 18) 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.
- 19) Hiraiwa N, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1997): Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J*, **12**, 819-829.
- 20) 西村いくこ (1995): 液胞プロセシング酵素—液胞における前駆体タンパク質のプロセシング—. 生化学, **67**, 372-377.
- 21) 西村いくこ, 平岩呂子(1996): 種子タンパク質の成熟化のためのカスケード機構の解析. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 1-5.
- 22) 平岩呂子, 西村いくこ (1997): 種子タンパク質の成熟化機構の解析. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 4-9.
- 23) Hiraiwa N, Takeuchi Y, Nishimura M and Hara-Nishimura I (1993): A vacuolar processing enzyme in maturing and germinating seeds: Its distribution and associated changes during development. *Plant Cell Physiol*, **34**, 1197-1204.
- 24) 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.
- 25) Hara-Nishimura I, Kinoshita T, Hiraiwa N and Nishimura M (1998): Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J Plant Physiol*, **152**, 668-674.