

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程入学
氏名 寺内 かえで
指導教官名 阿部 啓子

論文題目

大豆のアスパラギン酸プロテイナーゼの同定

および植物生理学的機能の解析

アスパラギン酸プロテイナーゼ(AP)(EC3.4.23)は動物、微生物、ウイルス、植物において広く存在する酵素である。植物 AP は酵素学的には2つのアスパラギン酸残基を活性部位とし、至適 pH を酸性域にもち、ペプスタチンにより活性阻害されるなど、すべての AP に共通な性質を有しているが、一次構造的には約 100 アミノ酸残基からなる植物特異的挿入配列(PSI)を有する特徴がある。現在までに大麦の *phytepsin*、コメの *oryzasin*、チョウセンアザミの一種であるカルドンの *cardosin*、シロイヌナズナの AP など多数の植物 AP がクローニングされ、しかも単一植物には複数の AP が存在することが報告されている。植物 AP の多くは種子において見いだされたことから、AP の機能については種子生理学的な研究が行なわれてきた。しかし詳細な解析は少なく、*phytepsin* や *oryzasin* などについて貯蔵タンパク質のプロセッシングを行なうことが *in vitro* で示されたのみである。一方、種子以外の AP の機能として、*cardosinA* は花粉認識への関与、トマト AP は傷害応答、ユリ科やアブラナ科の AP は植物体の老化への関与などが報告されている。このように、植物に存在する複数の AP がどのような機能を持つのか、そして、それらの機能が特異的なのかなどはよくわかっていない。

大豆は栄養学的に優良な植物性タンパク資源であると同時に、食品学的にも興味ある化学的・物理的特性を持つことから、古くから食品素材として活用されてきた。しかし、種子中での大豆タンパク質の貯蔵、分解などの制御に関わることが予想される AP につ

いては、分子生物学的な研究が全くなされていない。本研究は大豆 AP のクローニングおよび発現解析を行ない、大豆 AP の植物生理学的機能を解明することを目的とした。

1. 大豆アスパラギン酸プロテイナーゼの同定

植物 AP でアミノ酸配列の高度に存されている部分について、当研究室で同定されたコメの AP である *oryzasin1* の塩基配列からプライマーを作成し、RT-PCR、3'-RACE および 5'-RACE により 2 種類の大豆 AP のクローン (*soyAP1*、*soyAP2*) を単離した。*soyAP1* は 514 アミノ酸残基、*soyAP2* は 508 アミノ酸残基からなり、いずれも植物特有の PSI 配列を有していた。*soyAP1* は *soyAP2* と 55% のアミノ酸同一性を有し、ササゲ AP とは 87% のアミノ酸同一性を示した。*soyAP2* はウツボカズラ APs やトマト AP などに最も近く 63%~65% のアミノ酸同一性を示した。近年、整備された EST データベースを検索したところ、大豆には *soyAP1* および *soyAP2* を含め、合計 5 種類の AP が存在することが示唆された。

2. 大豆アスパラギン酸プロテイナーゼの発現解析

2-1 組織レベルでの発現解析

大豆 AP の発現する時期および部位をノーザン解析によりしらべた。*soyAP1* は登熟後期の種子や完熟種子で強い発現が観察されたが、様々な発育段階の葉、茎、根、花では発現がほとんど認められなかった。一方、*soyAP2* は播種から 5 日目、10 日目、2 週目、3 週目の植物体の子葉、葉、根および茎、花などの組織において発現したが、*soyAP1* の発現する完熟種子では発現が認められなかった。これらの結果から、*soyAP1* と *soyAP2* は発現する組織や時期が全く異なることが判明した。

発芽過程は種子内の生理環境が最も大きく変化することから、特に発芽の初期過程を詳細に検討した。*soyAP1* は吸水後 8 時間まで高い発現レベルを示し、以降急速に低下した。一方、*soyAP2* は吸水後 8 時間まではほとんど発現していないが、24 時間以降に急激に発現量が増した。このように *soyAP1* と *soyAP2* は発芽種子においても対照的な発現パターンを示した。

2-2 細胞レベルでの発現解析

種子における *soyAP1* と *soyAP2* の発現パターンが大きく異なることから、2 つの AP の種子における発現に着目した。細胞レベルでの知見を得るため、室温で 48 時間吸水させた種子の組織（胚軸、根の先端）（図 1）において、*soyAP1* と *soyAP2* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) により解析した。

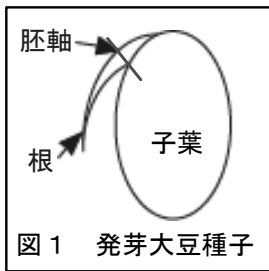


図1 発芽大豆種子

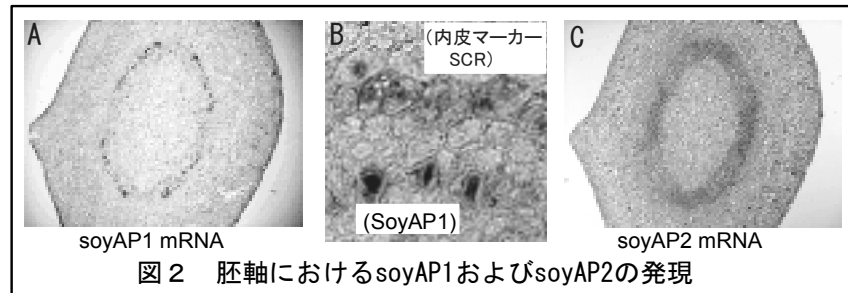


図2 胚軸におけるsoyAP1およびsoyAP2の発現

胚軸における発現

胚軸において、soyAP1 は中心柱と皮層の間の特定の細胞に強く発現していた (図 2A)。soyAP1 のこの発現部位を特定するために、胚軸の篩部で発現する acyl CoA oxidase (ACOX) を用いて ISH を行なった。その結果、soyAP1 は ACOX の発現細胞群の中に含まれることから、胚軸の篩部で発現していると判断した。さらに篩部内の発現細胞を特定するため、内皮特異的マーカーである転写因子 SCR を使用したところ、soyAP1 発現細胞は SCR 発現細胞の、2 層から数層内側に位置していた (図 2B)。しかも、発現細胞の形が篩管に特徴的な五角形の形態をしていることから、soyAP1 発現細胞は篩管細胞であると特定した。一方、soyAP2 は特定の細胞ではなく、中心柱と皮層の境界付近の何層かの細胞群に発現していた (図 2C)。

根の先端における発現

soyAP1 が篩管細胞に特異的に発現していることから、次に篩管・導管を含む維管束における soyAP1 の発現を解析した。特に、維管束の成熟過程に伴う soyAP1 の発現変化を観察した。根の維管束系は、一般に先端部は未成熟であり、先端から離れるに従って成熟する。未成熟な部分では篩管、導管は中空ではなく、成熟してはじめて中空となる。本研究では導管、篩管細胞ともにまだ中空となっていない部位 (根の先端からの距離が 1600 μ m まで) を用いて soyAP1 と soyAP2 について ISH を行なった。

維管束系が形成された初期段階 (根の先端から 380 μ m) では既に篩管細胞に soyAP1 の発現が認められた。やや上部においては、篩管細胞以外の細胞も含めた篩部全体でのシグナルが強くなった。さらに先端からの距離が離れるにつれ、篩部でのシグナルは狭い範囲へと収束し、1600 μ m では篩管細胞でのみシグナルが観察されるようになった。一方、導管における発現は、篩管細胞での発現が認められた部位 (380 μ m) より少し上部 (600 μ m) から観察されはじめた。篩部とは異なり導管を含む木部ではさらに上部になっても発現強度の変化は認められなかったが、さらに上部 (1600 μ m) の導管では未成熟であるにもかかわらず soyAP1 のシグナルは観察されなかった。このように、soyAP1 は未成熟な篩管と導管のいずれにおいても発現し、しかも維管束の成熟段階に伴って大きく発現様式を変えていくことが判明した。一方、soyAP2 は、根の先端からの距離が変わっても、胚軸同様、中心柱と皮層の境界部分の幅広い細胞群に発現した。

2-3 soyAP1 および soyAP2 の細胞内局在の解析

soyAP1 および soyAP2 の細胞内局在をしらべるため、蛍光タンパク質 GFP をレポーターとして、シロイヌナズナの根由来の培養細胞に一過的に発現させた。液胞に輸送されることが知られている、カボチャの 2S アルブミンの C 末端液胞シグナルを対照とした。soyAP1 または soyAP2 遺伝子は、対照と同様に、いずれも GFP 蛍光が液胞に蓄積しているのが観察され、大豆の細胞内では両者ともに液胞に輸送される可能性が強く示唆された。soyAP1 および soyAP2 の C 末端には大麦レクチンの液胞シグナル (VF₂AE₁AIA) と類似した配列 (soyAP1 : ⁵⁰⁸VG₂FADAA⁵¹⁴、soyAP2 : ⁵⁰²VG₂FAEAV⁵⁰⁸) が存在する。両者の液胞輸送が、これらのシグナル配列によるかについては今後検討する必要がある。また、phytepsin において、PSI を欠失させることによって液胞に輸送されず分泌されるとの報告があるが、soyAP1 および soyAP2 においても PSI が液胞への局在化に関与するかは興味深い。

総括

本研究では大豆から、soyAP1 および soyAP2 を単離し、それぞれ異なった生理機能を有している可能性を示した。soyAP1 は未成熟な篩管と導管に発現しており、成熟過程におけるこれらの細胞の自己分解に関与することが示唆された。Phytepsin においても維管束の成熟化への関与が示されていたが、本研究は、導管および篩管の成熟化機能を担う AP が植物に共通して存在することを明らかにし、植物 AP の 1 つの機能として“プログラムされた細胞死の一形態”を提唱するものである。soyAP2 は根、茎、花、葉など液胞が発達している組織で強い発現がみられること、また、実際に液胞に輸送されることから、液胞に存在するさまざまなタンパク質を分解する機能を有すると考えられた。

今後、soyAP1 および soyAP2 タンパク質の酵素学的な諸性質の解析を行ない、各々のターゲット分子の特定を行なうことにより、植物 AP の生理機能についての理解がさらに深まるであろう。また soyAP1 については、未成熟な篩管細胞や導管からタンパク質を単離し、soyAP1 の基質となるタンパク質を特定することにより、篩管細胞や導管の成熟化のプロセスにおける役割の解明が期待される。

発表論文 Terauchi, K., Asakura, T., Nishizawa, N. K., Matsumoto, I., Abe, K : . Characterization of the genes for two soybean aspartic proteinases and analysis of their different tissue-dependent expression. *Planta* (in press)