

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 16 年度博士課程入学

氏名 田村倫子
指導教員 阿部啓子

植物シグナルペプチドペプチダーゼの部位特異的発現 および細胞内機能の検証

アスパラギン酸プロテアーゼ (AP) は EC3.4.23 に属するエンド型の酸性プロテアーゼであり、活性中心に 2 つのアスパラギン酸残基を持ち、微生物から植物、動物に幅広く存在する。植物においては細胞質や液胞に存在する AP が中心に研究され、発芽期の貯蔵タンパク質の分解や形態形成に関わることが示されてきた(Terauchi *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2006)。しかし生体内には上記のような AP 以外にも膜結合型の AP が存在する。哺乳類からは複数膜貫通型の AP としてアルツハイマー病に関連するプレセニリンやシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) が単離されている。SPP は小胞体膜に存在し、シグナルペプチドにより切断された後のシグナルペプチドを基質とする。その機能はヒトやマウスの哺乳類、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュで解明されている。ヒト SPP は免疫に関与し、major histocompatibility complex (MHC) クラス I 分子のシグナルペプチドを切り出す。切り出された断片は細胞膜に提示され“自己”であることを主張するという、生命活動に重要かつ必須の働きを担っている。ショウジョウバエの SPP は幼虫の発生に必須であり、ゼブラフィッシュの SPP は中枢神経システムに関与することが示唆された。また、膜内でペプチドを切断するという酵素活性のほかにも、ヒトサイトメガロウイルスの糖タンパク質に結合し、heavy chane の小胞体からの移動に関わるなど、シャペロン様の機能も示された。

SPP のホモログも各生物種に複数見つかり、機能が検討されつつある。例えばヒト SPP ホモログの 1 つ SPPL2a はエンドソームに存在し、腫瘍壊死因子を膜内で切断する。ゼブラフィッシュの SPP ホモログの 1 つ zSPPL2 は活性部位に変異を持たせることで尾静脈の肥大を起こす。このように SPP やそのホモログの働きは、種特異的のものが多く SPP を有する生物に共通する機能は提示されてはいないが、いずれも病症や発生という生命の根幹に関連する重要な働きを担っている。

植物においても推定一次構造から動物 SPP と相同性のある分子の存在が確認されてい

る。しかしながら、その同定や生理機能については全く検討されていない。そこで全ゲノム配列が解読されたシロイヌナズナを用いて SPP およびそのホモログの組織における発現と細胞内局在を検証し、植物 SPP の生体内における生理機能の解明を目指した。

1. シロイヌナズナ SPP の同定

シロイヌナズナ SPP (AtSPP) は、ヒト SPP と推定一次構造に相同性のある分子としてデータベース上のみで存在していた。ヒト SPP との相同性は 39% で 2 箇所が存在する活性部位を含んだ膜内領域の配列 (YD および GXGD) とカルボキシ末端の PAL モチーフとに高い相同性を有していた。ヒト SPP はカルボキシ末端が cytosol 側に存在し、アミノ末端が小胞体内腔に存在する 9 回膜貫通型の構造を持つことが示されている。シロイヌナズナ・データベースを検索した結果、AtSPP に相同性を持つ 5 つのホモログ AtSPPL1, AtSPPL2, AtSPPL3, AtSPPL4, AtSPPL5 の存在が示唆された。いずれの分子も触媒に関わる YD および GXGD の配列が保存されており、膜貫通領域を推測させる疎水性部位が複数箇所存在した。これらの分子で系統樹を作製するとヒト SPP、AtSPP と同じ枝に AtSPPL3 が存在した。ヒト SPP は 377 アミノ酸残基から成り、AtSPP および AtSPPL3 もそれぞれ 345, 373 アミノ酸残基から成る。残りの 4 つのホモログは別のクラスターを形成し、アミノ基末端の ER 内腔に存在すると推測される領域が 160 アミノ酸残基程度 長く存在することが分かった。

2. シロイヌナズナ SPP の組織における発現の解析

乾燥種子・根・葉・茎・花序・サヤにおける AtSPP とそのホモログの mRNA 発現を RT-PCR により検証したところ、AtSPP をはじめ、すべての分子が花序を中心にほとんどの組織で発現していた。そこで、AtSPP とそのホモログがいつ、どの細胞に強く発現するのかを *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。

吸水種子における AtSPP の発現を追跡するため吸水前 (乾燥種子)、および吸水後 16、32、40、48、56 時間の種子を用いた。40 時間では発芽している種子は無く、48 時間では 3 割ほどの種子が発芽していた。AtSPP の発現は吸水後 40 時間から検出された。発現部位は特異的で、幼根の表皮細胞の一部とメリステムと呼ばれ発芽後は一般に茎頂と呼ばれる部位に見られた。幼根において発現が見られた部分は、細胞分裂および細胞伸長の盛んな領域で、その中には embryonic root と呼ばれる根毛を形成する領域も含まれていた。またメリステムは一生を通して未分化能を保持し、植物体の地上部組織のすべての原基になる細胞が存在する部位である。AtSPP ホモログの AtSPPL2 および AtSPPL3 は AtSPP と同じ組織に明瞭な発現が検出された。これらのことから AtSPP やそのホモログは形態形成あるいは細胞の分裂・分化の盛んな細胞で発現し、機能することが示唆された。

吸水種子のメリステムにおける強い発現に着目し、抽苔して茎が伸びた植物の茎頂における発現も検討した。茎頂は、幹細胞を生む茎頂分裂組織、これを取り巻くように位置して葉原基を生じる周辺領域、周辺領域の下部に位置して茎の中心組織を生じる細胞

分裂の盛んな髄状領域と、構成パターンが明確である。AtSPP の発現は茎頂分裂組織を含む茎頂の上部に観察された。一方、AtSPPL2 および AtSPPL3 の発現は髄状領域に観察された。このことから AtSPP の機能として未分化能の維持あるいは細胞の分化分裂に関する機構への関与が示唆された。一方で AtSPPL2 および AtSPPL3 は茎形成に関与し細胞増殖が盛んな領域で機能することが示唆された。

3. シロイヌナズナ SPP の細胞内局在の解析

茎頂の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、AtSPP とそのホモログは異なる機能を有することが示唆された。よってこれらの分子の細胞内局在を知ることは生体内における機能をさらに追究できるだけでなく、プロテアーゼとして機能する場合、基質の追跡にも有益であると考えられた。そこでまず GFP をレポーターとしてシロイヌナズナ培養細胞 ('Deep' cells) に AtSPP あるいはそのホモログを一過的に発現させることで細胞内局在を比較した。AtSPP のカルボキシ末端あるいはアミノ末端に GFP を付加したものを、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下と NOS ターミネーターの間に挿入して、AtSPP-GFP および GFP-AtSPP(データは示さない) を作製した。AtSPP のホモログはカルボキシ末端に GFP を付加したもの (AtSPPL3-GFP など) のみ同様に作製した。また GFP のカルボキシ末端に小胞体輸送シグナル (HDEL) を付加したもの (GFP-HDEL) も作製した。その結果、AtSPP-GFP は GFP-HDEL と同様に、小胞体局在を示す網目状に蛍光が観察された(図-A, B)。対比的に AtSPPL2 および AtSPPL3 遺伝子はどちらもドット状に GFP 蛍光が観察された(図-C)。このドットは FM4-64 のシグナルと重なったため、AtSPPL2 および L3 はエンドソームに局在することが明らかとなった。

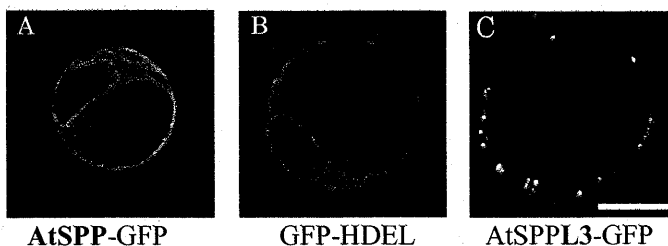


図 培養細胞に GFP 融合タンパク質を発現させたときに観察される蛍光
Bar: 10 μ m

次に、AtSPP タンパク質の細胞内局在を抗 AtSPP 抗体を用いて調べた。'Deep' cells の粗膜画分を EDTA 存在下または非存在下において 15-45% (w/w) のショ糖密度で遠心分離した。23 の画分に分画し、このうち一部をウエスタン分析に供した。免疫反応は抗 AtSPP 抗体および小胞体分子シャペロン BiP の抗体を用いた。抗 AtSPP 抗体を用いると、EDTA 非存在下の場合、9-13 レーンを中心に 6-16 レーンにクロスするバンドが観察された。一方 EDTA 存在下の場合、リボソームは小胞体から離れ、小胞体画分はショ糖密度の低い画分に移動する。実際には 17-19 レーンを中心に 12-19 レーンにクロスするバンドが観察された。また、BiP の抗体を用いると、EDTA 非存在下の場合、8-10 レーンを中心に 4-12 レーンにクロスするバンドが観察された。EDTA 存在下では、クロ

スするバンドは糖の密度が低い方にシフトし 16-18 レーンを中心に 8-19 レーンに観察された。このことから AtSPP タンパク質の細胞内局在は小胞体であることが確認された。

以上の実験から AtSPP およびそのホモログの機能を推定した。植物細胞の小胞体は動物のそれと同様、リボソームで合成されたタンパク質を内腔へ取り込みシャペロンによってフォールディングしてゴルジ膜に送り出す機能を持つ。小胞体に局在する AtSPP がプロテアーゼとして機能する場合、ヒト SPP と同様にタンパク質本体から切り出されたシグナルペプチドを基質として切断する可能性が考えられる。一方、植物細胞のエンドソームは主にエンドサイトーシス由来のタンパク質を受け取る。植物のエンドサイトーシスは根毛の形成のような細胞成長やホルモンの極性移動に重要であるとされている。AtSPPL2 や AtSPPL3 が膜に存在して機能する場合、エンドサイトーシスで取り込まれた分子の輸送に関与するか、あるいは膜内でプロテアーゼとして機能する可能性が考えられる。

まとめ

本研究ではデータベースでの存在に過ぎなかったシロイヌナズナのシグナルペプチドペプチダーゼ AtSPP とそのホモログ AtSPPL2、AtSPPL3 の発現を実際に認め、解析した。発芽において、AtSPP やそのホモログは根の表皮の一部やメリステムに発現し、細胞増殖の高い組織で機能することが示唆された。抽苔した茎頂において、AtSPP は茎頂分裂組織を含む組織に発現していたのに対し、AtSPPL2 および AtSPPL3 は茎形成に関与する髄状領域に発現していた。さらに各分子の細胞内局在も、AtSPP が小胞体であるのに対し、AtSPPL2 および AtSPPL3 はエンドソームに局在していた。このような組織および細胞内での局在の違いから、AtSPP とそのホモログがプロテアーゼとして活性を持つ場合、同じ分子の成熟過程の異なる段階をプロセッシングしているというよりはむしろ、異なる基質が対象であると考察した。現在 AtSPPL2 および AtSPPL3 のノックアウト株を作製中である。今後これらを用いることで植物 SPP のホモログがどのような遺伝子に影響するかを DNA マイクロアレイ解析などにより検討することができる。さらに、AtSPP やそのホモログの基質を追究することで、植物における SPP の生理的機能についての理解が一層深まると期待される。

発表論文

Terauchi, K., Asakura, T., Ueda, H., Tamura, T., Tamura, K., Matsumoto, I., Misaka, T., Hara-Nishimura, I., and Abe, K. (2006) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAPI and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J Plant Physiol* 163, 856-862.

Tamura, T., Terauchi, K., Kiyosaki, T., Asakura, T., Funaki, J., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. (2006) Differential expression of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. *J Plant Physiol*, (in press)