高等植物の液胞へのレセプター依存的な選別輸送機構

Receptor-Dependent Vacuolar Sorting Mechanism in Higher Plants

(日本植物生理学会推薦)

研究代表者 京都大学大学院理学研究科

西村いくこ

Kyoto University, Graduate School of Science

Ikuko Hara-Nishimura

共同研究者

京都大学大学院理学研究科

嶋田 知生

Kyoto University, Graduate School of Science

Tomoo Shimada

京都大学大学院理学研究科

山田 健志

Kyoto University, Graduate School of Science

Kenji Yamada

研究目的

登熟期の種子は多量の種子タンパク質を粗面小胞体で合成し、タンパク質蓄積型の液胞に蓄積する. 私達は、種子タンパク質の細胞内輸送に関わる新規の小胞を発見し、PAC 小胞 (Precursor-accumulating vesicles) と命名した. PAC 小胞は直径約 300-500 nmで、既知の被覆小胞に比べて非常に大きい. 一般的に、粗面小胞体で合成されたタンパク質はゴルジ体へ運ばれた後に選別され、液胞(動物細胞ではリソソーム)へ輸送されるか細胞外へ分泌されるとされている. しかし PAC 小胞を介するタンパク質の輸送経路は、ゴルジ体を経由しないという点で全く新しい輸送系からなる. 大量のタンパク質を効率よく液胞へ輸送する系として植物種子が獲得してきた機構と考えられる. 本研究課題では、この新規の経路を中心としたタンパク質の集積・輸送のための分子機構の解明を目指した.

登熟期の種子から得られた精製度の高い PAC 小胞標品からユニークな構造

The seeds of higher plants accumulate large quantities of storage protein. During seed maturation, storage protein precursors synthesized on rough endoplasmic reticulum are sorted to protein storage vacuoles, where they are converted into the mature forms and accumulated. Previous attempts to determine the sorting machinery for storage proteins have not been successful. Here we show that a type I membrane protein, AtVSR1/AtELP, of Arabidopsis functions as a sorting receptor for storage proteins. The atvsr1 mutant mis-sorts storage proteins by secreting them from cells, resulting in an enlarged and electron-dense extracellular space in the seeds. atvsr1 seeds have distorted cells and smaller protein storage vacuoles than do wild-type seeds. The atvsr1 seeds abnormally accumulate the precursors of two major storage proteins, 12S globulin and 2S albumin, together with the mature forms of these proteins. AtVSR1 was found to bind to the C-terminal peptide of 12S globulin in a Ca²⁺-dependent manner. These findings demonstrate a receptor-mediated transport of seed storage proteins to protein storage vacuoles in higher plants.

を持った膜タンパク質を見出し、PV72 と命名した.本研究では、PV72 の貯蔵タンパク質の選別輸送レセプターとしての機能を分子レベルで明らかにし、PAC小胞による新規の輸送システムの実体を明らかにすることを目標とした.これまでに、貯蔵タンパク質のレセプターに関する報告は皆無であり、PV72のホモログは酵母や動物には見出されていないことから、細胞内タンパク質輸送機構の研究に新展開が期待される.

研究経過

PV72 の特異抗体を用いた解析から、PV72 は登熟期の種子に特異的に発現し、 栄養器官には発現していないことが分かった。また、高圧凍結・凍結置換法 を用いた免疫電子顕微鏡観察より、PV72 が貯蔵タンパク質の前駆体を多量に 含む PAC 小胞の膜上に存在することを明らかにした。この結果は、PV72 が種 子貯蔵タンパク質の細胞内輸送と深く関連していることを示している。

PV72 は、EGF (Epidermal growth factor) 様配列を含む約 60 kD のルーメンドメイン,膜貫通ドメイン,細胞質ドメインの3つのドメインから構成されている。PV72 のルーメンドメインは小胞内腔でリガンドとの結合・解離を担い,一方,細胞質ドメインは小胞の出芽やターゲットオルガネラへの融合に関与していると考えられる。そこで、PV72 のルーメンドメイン及びその EGF 様配列欠失変異体を昆虫細胞で大量発現させ、貯蔵タンパク質 2S albumin 前駆体由来のペプチドとの結合・解離様式を生体分子間相互作用解析装置及びアフィニティカラムクロマトグラフィで詳細に解析した。その結果、生体内で PV72 が貯蔵タンパク質のレセプターとして機能するのに十分な親和性を示すことが分かった。

上記の PV72 と 2S albumin 前駆体由来のペプチドとの結合・解離がカルシ

ウムイオンよって制御されていることを示すことができた.一般的に、細胞内の選別輸送レセプターとリガンドとの結合・解離はコンパートメントのpHに依存していると言われていたが、今回の成果は、pHの非依存生を示すとともに、カルシウムによる新規の制御系の存在を明らかにするものである.

一方, PV72 の細胞質側のチロシンモチーフにはアダプチンを介してクラスリンが結合する可能性が示唆されたが, 特異抗体を用いた解析では, PV72 の細胞質側の同モチーフにはアダプチンやクラスリンは結合していないことが分かった. 即ち, PV72 を介した選別輸送には既知のものとは異なる機構が働いていると考えられる.

PV72 の細胞内での機能を明らかにする目的で、PV72 のルーメンドメインに 小胞体残留シグナルを付加した融合タンパク質を大量発現させた形質転換シロイヌナズナを作製した.このシロイヌナズナの葉の細胞では、小胞体内に 液胞タンパク質の前駆体を蓄積することが分かった.即ち、PV72 は液胞タンパク質の前駆体を小胞体から液胞へ輸送するという働きを持つことが明らかになった.

PV72 の生理機能を in vivo で証明する目的で、全ゲノム配列が決定されているシロイヌナズナを用いた逆遺伝学的手法を取り入れた。シロイヌナズナには PV72 のホモログが 7 種類存在していた。(これらの遺伝子を AtVSR1~7 と命名した)。これらの遺伝子に T-DNA が挿入された変異体の選抜を行い、7種類の AtVSR 遺伝子破壊株を得た。それらの AtVSR 欠損変異体の種子貯蔵タンパク質の分子種を調べたところ、AtVSR1 欠損株の種子のみが貯蔵タンパク質の前駆体を細胞外に蓄積していた。この結果は、AtVSR1 が登熟期の種子の細胞において貯蔵タンパク質の前駆体を液胞へ選別輸送するためのレセプターであることが示している。以上の結果から、PAC 小胞より見出した膜タンパク質 PV72 が液胞輸送レセプターとして機能していることが証明された。

考察

本研究の動機は、種子貯蔵タンパク質の液胞への輸送に関わる PAC 小胞の発見であった。この PAC 小胞依存的なタンパク質の輸送経路はこれまでに知られている液胞輸送経路とは全く異なるシステムである点で非常に興味深い。 PAC 小胞 (Precursor-accumulating vesicles) は、その名前の通り、貯蔵タンパク質の前駆体分子を多量に蓄積している小胞であるが、その膜上に、貯蔵タンパク質 2S albumin 前駆体と親和性を示す膜タンパク質を見出したことが、本研究の端緒となっている。本研究では、この膜タンパク質の選別輸送レセプターとしての機能を分子レベルで明らかにし、PAC 小胞による新規の輸送システムの実体を明らかにすることができた。

高等植物の種子は、限られた時期に、限られた種類の貯蔵タンパク質を多量に合成し、タンパク質蓄積型の液胞に蓄積する。液胞タンパク質の細胞内輸送機構の研究はこれまでにも盛んになされてきたが、従来の研究は酵母の液胞タンパク質や動物のリソソームタンパク質の輸送系などのアナロジーから進められてきたものが殆どである。貯蔵タンパク質の輸送レセプターの報告は本研究が最初である。今回のレセプターの研究は、植物細胞の選別輸送システムの解明のための重要な鍵となる。PAC小胞依存的な輸送システムは、大量のタンパク質を効率よく液胞へ輸送する系として高等植物種子が獲得してきた機構と考えられる。この新規の液胞選別輸送システムの全貌を分子レベルで解く鍵が本研究によって得られた。

研究発表

口頭発表

- 渡辺悦子,嶋田知生,黒柳美和,田村謙太郎,西村幹夫,西村いくこ:液胞 輸送レセプターPV72の過剰発現シロイヌナズナの解析.日本植物生理学 会年会,岡山,2002年3月
- 片岡未裕希,嶋田知生,山田健志,西村幹夫,西村いくこ:種子貯蔵タンパク質のプロセシングに異常を示すシロイヌナズナ変異体の解析.日本植物生理学会年会、岡山、2002年3月
- 西村いくこ、嶋田知生、松島良:高等植物の細胞内膜系の機能分化、日本植物学会大会シンポジウム "細胞の中を観て生存戦略を探る"、京都、2002年9月(オーガナイザー)
- 嶋田知生,李立新,河本恭子,近藤真紀,西村幹夫,西村いくこ:種子貯蔵 タンパク質の前駆体を蓄積するシロイヌナズナ変異体の単離と解析,日 本植物学会大会,京都,2002年9月
- 国士健太郎,嶋田知生,近藤真紀,西村幹夫,西村いくこ:液胞タンパク質 の選別輸送に関わるレセプターの遺伝子破壊株の解析,日本植物学会大 会,京都,2002年9月
- 林博士,河本恭子,嶋田知生,林誠,西村幹夫,西村いくこ:小胞体由来の 新規輸送小胞の単離とプロテオーム解析.日本植物学会大会,京都,2002 年9月
- 西村いくこ,嶋田知生,松島良:細胞内膜系の分化と多様性,日本分子生物 学会ワークショップ,横浜,2002年12月(招待講演)
- Hara-Nishimura, I., R. Matsushima, K. Yamada, E. Watanabe, T. Shimada, Y. Hayashi and M. Nishimura: ER-derived organelles in higher plants. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)

- Shimada, T., E. Watanabe, Y. Hayashi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: PV72 functions as a sorting receptor for pro2S albumin in pumpkin seeds. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)
- Nishimura, M., N. Mitsuhashi and I. Hara-Nishimura: PAC-vesicle mediated transport of storage proteins and membrane proteins to protein storage vacuoles.

 Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)
- Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Calcium-mediated association of a sorting receptor (PV72) and a storage protein. Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics, Oct. 2001 Shonan, Japan.
- Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. **Plant Biology 2002**, August 2002, Colorado, USA.
- Hara-Nishimura, I., Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, and M. Nishimura:
 Calcium-mediated association of a propeptide of 2S albumin with a putative vacuolar sorting receptor PV72 found in the membrane of the PAC vesicles.

 Minisymposium "Membrane Trafficking" Plant Biology 2002, August 2002, Colorado, USA. (招待講演)

誌上発表

Mitsuhashi, N., Y. Hayashi, Y. Koumoto, T. Shimada, T. Fukasawa-Akada, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2001) A novel membrane protein that is transported to protein-storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles.
 Plant Cell, 13, 2361-2372.

- Yamada, K., R. Matsushima, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2001) A
 slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles
 of senescing Arabidopsis leaves. Plant Physiol., 127, 1626-1634.
- Kuroyanagi, M., M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2002) Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. Plant Cell Physiol., 43, 143-151.
- 4. Shimada, T., E. Watanabe, K. Tamura, Y. Hayashi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2002) A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). Plant Cell Physiol., 43, 1086-1095.
- 5 Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2002) Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. J. Biol. Chem., 277, 8708-8715.
- 6. Shimada, T., K. Yamada, M. Kataoka, S. Nakaune, Y. Koumoto, M. Kuroyanagi, S. Tabata, T. Kato, K. Shinozaki, M. Seki, M. Kobayashi, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem., 278, 32292-32299.