

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

西村 いくこ

(京都大学大学院理学研究科 教授)

「種子蛋白質の量的・質的向上を目指した分子育種」

1. 研究実施の概要

世界的な人口増加による食糧難の時代に備えて、作物の生産向上が緊急の課題の一つとなっている。特に、コメや豆類をはじめとする様々な植物の種子はタンパク質、脂質、糖質などを貯蔵しており、私達の貴重な食糧源であり、また家畜飼料としても重要な資源である。これまでに種子の貯蔵タンパク質を改変し、より高品質のタンパク質を含む作物を創出するための試みが多数なされている。このような分子育種を行う際には、有用物質の遺伝子をただ導入するというのではなく、導入した遺伝子産物を安定な形で細胞内に大量に蓄積させることが重要な鍵となる。このための技術基盤として、植物が本来持っている“タンパク質の合成の場から蓄積の場への大量輸送・集積の分子機構”の解明が必須である。本研究課題では、植物の特性を理解し、それを十分に生かして量的向上と質的向上の両面から種子の高付加価値化を達成するための基盤作りの一環としての研究を行う。

(1) 量的向上を目指して：登熟期の種子の細胞で大量に合成される貯蔵タンパク質の輸送機構の解明とそれに関わる因子の同定を目的とした。これまでに私達は、小胞体から派生する小胞(PAC小胞と命名)を介した新規の細胞内輸送機構の存在を明らかにしてきた。このPAC小胞に見いだした膜タンパク質PV72の機能を明らかにする目的で、シロイヌナズナのホモログ(AtVSRと命名)の遺伝子破壊株(*atvsr1*)の解析を行った。その結果、AtVSR1は貯蔵タンパク質の液胞への選別輸送レセプターであることが証明された。この成果は、貯蔵タンパク質のレセプター依存的な集積機構の存在を初めて示した点で評価される。今後、選別輸送レセプターを中心とした貯蔵タンパク質の合成・集積の分子機構が明らかになると考えられる。

(2) 質的向上を目指して：分子育種においては、質的な向上なくしては種子の高付加価値化はあり得ない。これまでに、様々な液胞タンパク質の成熟化に関与する酵素を発見し、液胞プロセッシング酵素(VPE)と命名した。シロイヌナズナの3種類のVPE遺伝子を破壊すると、種子タンパク質の成熟化が完全に阻害されることが明らかになった。VPEを鍵酵素とする液胞プロセッシング系は種子タンパク質の機能発現を制御していることが分かった。今後は、VPEの発現抑制によって、種子の持つ有害物質を無毒化し、質的な向上を計ることを目指す。VPEの発現を抑制しても、種子タンパク質自体は前駆体のまま蓄積するため、

栄養価が低下することはない点を特記しておきたい。

2. 研究実施内容

(1) 研究目的

分子育種の技術基盤として、植物が本来持っている“タンパク質の合成の場から蓄積の場への大量輸送・集積の分子機構”の解明が必須である。植物の特性を理解し、それを十分に生かして量的向上と質的向上の両面から種子の高付加価値化を達成するための基盤作りを行うことが本研究課題の目的である。貯蔵タンパク質の集積に関わる未知の因子の同定を行い、効率よい種子タンパク質の大量輸送システムを駆動している有用遺伝子群を単離する。また、種子タンパク質の成熟化機構を人為的にモジュレートすることにより、種子の栄養価を損なわずに、アレルゲンやプロテアーゼインヒビターなどの種子が持っている有害貯蔵物質の無毒化を目指す。

(2) 研究の方法と結論

量的向上を目指した研究：

貯蔵タンパク質の細胞内輸送のための新規のPAC小胞依存経路を明らかにする目的で膜タンパク質PV72の機能解析を行った。PV72は主要な貯蔵タンパク質の前駆体と親和性を持ち、両者の結合・解離はカルシウムの濃度によって制御されていることなどin vitroの解析結果から、PV72が貯蔵タンパク質の液胞への選別輸送レセプターである可能性が浮上してきた(図1)。この点をin vivoで証明するためにシロイヌナズナの変異体を用いた解析を行った。

シロイヌナズナにはPV72のホモログをAtVSR (Vacuolar Sorting Receptor of *Arabidopsis thaliana*)と命名した。この遺伝子破壊株をT-DNAタグラインから選抜し、それぞれの種子に蓄積している貯蔵タンパク質の存在形態を調べたところ、AtVSR1遺伝子の欠損変異体の種子は貯蔵タンパク質の前駆体を蓄積していることが分かった。この変異体の種子の細胞間隙は肥大化し、そこに貯蔵タンパク質が蓄積していた(図2)。この結果は、AtVSR1が、登熟期の種子細胞内の小胞体で合成された貯蔵タンパク質の前駆体を正しくタンパク質蓄積型液胞へ選別して輸送させるためのレセプターであることを示している。貯蔵タンパク質の細胞内輸送がレセプター依存的事であることの初めての証明となった(Shimada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 16095-16100, 2003)。

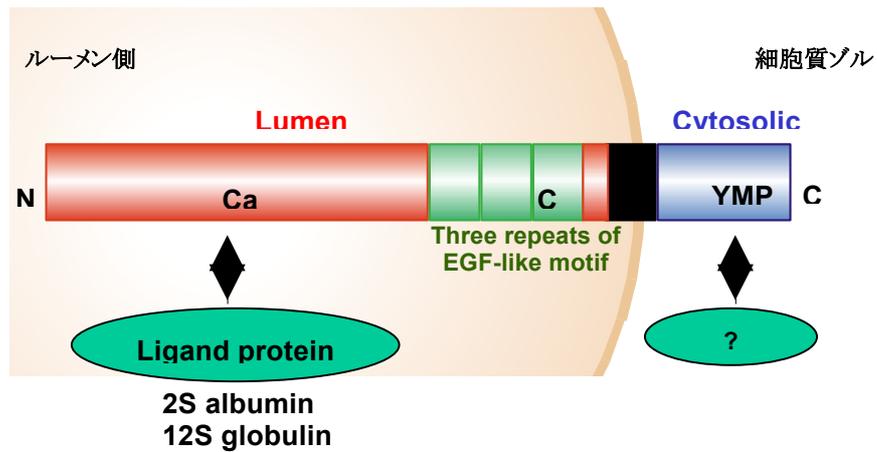


図1. 液胞選別輸送レセプターの分子構造

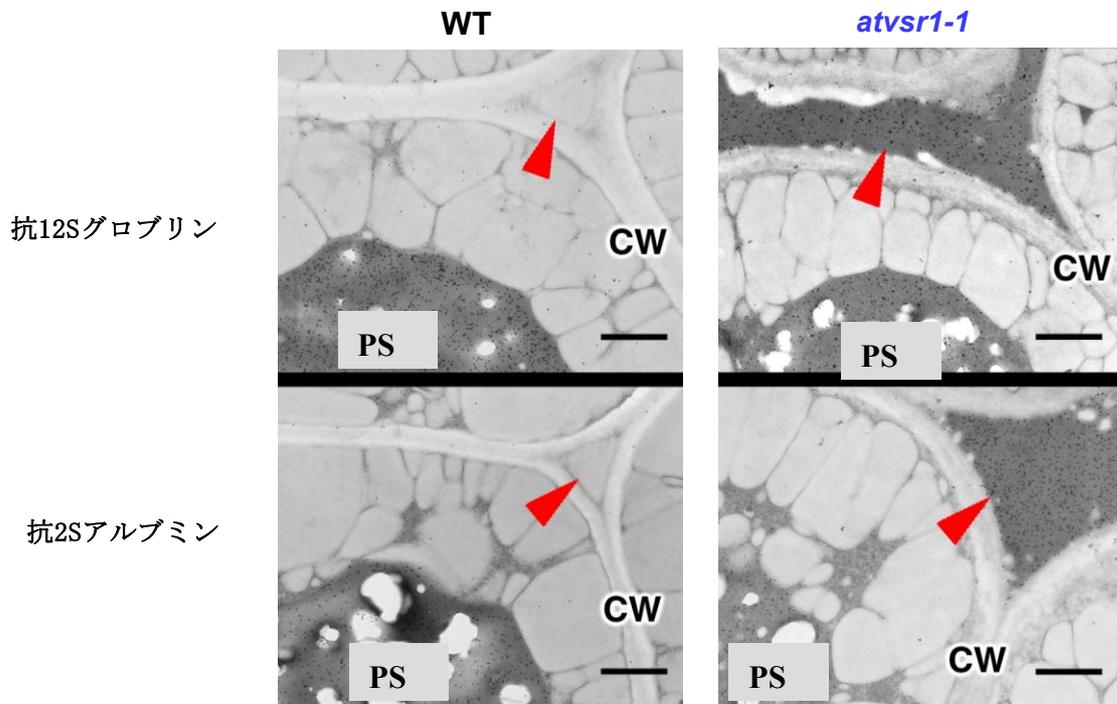


図2. シロイヌナズナの野生型 (WT) と液胞選別輸送レセプターAtVSR1欠損変異体 (*atvsr1-1*) の乾燥種子の免疫電子顕微鏡像. 主要貯蔵タンパク質12Sグロブリン (上) と2Sアルブミン (下) の特異抗体を用いた. PSV, タンパク質蓄積型液胞; CW, 細胞壁. *atvsr1-1*では, 細胞間隙に誤って貯蔵タンパク質が分泌されている (矢頭).

質的向上を目指した研究:

貯蔵タンパク質を含む種子タンパク質は, 小胞体でプロ型前駆体として合成され, 上記の経路でタンパク質蓄積型液胞へ輸送された後に, 限定的なペプチド結合の切断 (プロセッシング) を受けて成熟型に変換される. 私たちは生化学的な解析からプロセッシングに関わる

新規のシステインプロテアーゼを初めて見出し、液胞プロセッシング酵素（VPE）と命名した。VPE自身も不活性なプロ型前駆体として合成され自己触媒的に成熟化し活性化することから、VPEが液胞内のプロセッシングカスケードの最上位に位置することが示唆される。貯蔵タンパク質のプロセッシングにおけるVPEの役割を *in vivo*で証明した。シロイヌナズナのVPE遺伝子欠損変異体では、種子タンパク質の成熟化が完全に阻害されることが明らかになった。VPEを鍵酵素とする液胞プロセッシング系は種子タンパク質の機能発現を制御していることが証明された (Shimada et al., *J. Biol. Chem.*, 278, 32292-32299, 2003)。

3. 研究実施体制

西村グループ

- ① 研究分担グループ長：西村いくこ（京都大学大学院理学研究科・教授）
- ② 研究項目：種子タンパク質の量的・質的向上を目指した研究の全般

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（2003年の原著論文）発表

- Shimada, T., K. Fuji, K. Tamura, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100, 16095-16100.
- 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.
- Shirahama-Noda, K., A. Yamamoto, K. Sugihara, N. Hashimoto, M. Asano, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2003) Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, 278, 33194-33199.
- Tamura, K., T. Shimada, E. Ono, Y. Tanaka, A. Nagatani, S. Higashi, M. Watanabe, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. **Plant J.**, 35, 545-555.
- Matsushima, R., M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis*. **Plant J.**, 33, 493-502.
- Matsushima, R., Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada, M. Nishimura and I.

Hara-Nishimura. (2003) The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol.**, 44, 661-666.

- Okamoto, T., T. Shimada, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura and T. Minamikawa. (2003) C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. **Plant Physiol.**, 132, 1892-1900.
- Fukao, Y., I. Hara-Nishimura and M. Nishimura. (2003) Novel peroxisomal protein kinase, PPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, 44, 689-696.
- Yamamoto, Y., M. Nishimura, I. Hara-Nishimura and T. Noguchi. (2003) Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, 44, 1192-1201.
- Hara-Nishimura, I. and R. Matsushima (2003) A novel wound-inducible compartment, ER body. **Current Opinion of Plant Science**, 6, 583-588.

(2) 特許出願

H1 5 年度特許出願件数 : 3 件 (CREST 研究期間累積件数 : 3 件)