

ヒヤクニチソウ葉肉細胞からの管状要素分化過程で 発現するプロテアーゼの研究

著者	南 淳
号	39
学位授与番号	1072
URL	http://hdl.handle.net/10097/38402

氏名・(本籍)	みなみ 南	あつし 淳
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	理第1072号	
学位授与年月日	平成8年3月6日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
最終学歴	平成6年3月 東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻退学	
学位論文題目	ヒヤクニチソウ葉肉細胞からの管状要素分化過程で発現するプロテアーゼの研究	
論文審査委員	(主査) 教授 四釜慶治	
		教授 福田裕穂 (東京大学)
		助教授 石澤公明

論 文 目 次

序論

- 第一章 ヒヤクニチソウ管状要素分化過程でのタンパク質分解活性の解析
- 第二章 ヒヤクニチソウ管状要素分化に伴って発現するシステインプロテアーゼの解析
- 第三章 ヒヤクニチソウ・システインプロテアーゼ遺伝子の単離と発現の解析
- 第四章 ヒヤクニチソウ管状要素分化に伴って発現するアミノペプチダーゼの解析
- まとめと展望

論文内容要旨

序論

ヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans* L.) の単離葉肉細胞をオーキシシンとサイトカイニン存在下で培養すると、高頻度で同調的に管状要素への分化が誘導される。本博士論文では、この実験系を高等植物におけるプログラム細胞死のモデルシステムと考え、管状要素分化の自己分解過程におけるプロテアーゼの発現について解析した。

第一章 ヒヤクニチソウ管状要素分化過程でのタンパク質分解活性の解析

第一章の研究ではヘモグロビン、ゼラチンを基質に用いてプロテアーゼの解析を行った。分化誘導培地 (D培地) で培養したヒヤクニチソウ細胞の粗酵素抽出液の全プロテアーゼ活性は、対照培地 (C培地) で培養した細胞のものに比べ、特に酸性で高いことがわかった。この活性は単離直後の細胞にはあまり含まれておらず、細胞をD培地中で培養することにより培養48時間目から、培養68時間目にかけて急激に増大した。この時期は液胞の崩壊前の管状要素が形成され始める時期にあたる。これらのことにより、ある種の酸性でヘモグロビンを分解するプロテアーゼが管状要素分化の自己分解に先立って、特異的に発現することが考えられた。ゼラチンを基質に用いた活性染色により2つのプロテアーゼ、プロテアーゼ I、II が同定された。この2つのプロテアーゼは単離直後の細胞と培養24時間目の細胞には発現せず、培養48時間目から108時間目にかけて発現した。特に、プロテアーゼ I の発現は培養60、72時間目に強く、培養84時間目、108時間目には減少した。また、プロテアーゼ I が100時間C培地で培養した細胞で少量発現する以外に、プロテアーゼは I、II はC培地で培養した細胞では発現しなかった。このことから、このプロテアーゼ I、II は管状要素の自己分解にともなって発現することが考えられた。一方、ヘモグロビンを基質に用いた活性染色で同定されたプロテアーゼ III、IV は分化に関わりなく恒常的に発現するプロテアーゼであると考えられた。

第二章 ヒヤクニチソウ管状要素分化に伴って発現するシステインプロテアーゼの解析

第二章ではエンドペプチダーゼを対象として、人工基質を用いた解析を行った。ヒヤクニチソウ培養細胞のBz (ベンゾイル) Arg-MCA(7-メチル-4-クマリルアミド) に対する分解活性 (pH 7 と10) はジチオスレイトール (DTT) 添加によって影響されず、フェニルメチルスルフォニル・フルオリド (PMSF) によって阻害されなかった。一方、pH 5 と pH 7 でのZ (カルボベンズオキシ) -Phe-Arg-MCAの分解活性はDTTによって促進され、PMSFによって抑えられた。このことにより、ヒヤクニチソウ培養細胞中には異なる性質を持つエンドペプチダーゼが混在していることが示された。pH 5 でのZ-Phe-Arg-MCA分解活性は単離直後の葉肉細胞にはほとんど検出されず、単離した細胞をD培地中で培養した時のみ、しかも、培養60時間目に一過的に上昇した。この上昇はD培地中での管状要素数の急激な増加と一致した。活性は、急激な増加に続いて培養60時間目以降に急激に減少したが、この活性の減少は管状要素の成熟にともなっていると推論された。以上の結果より、pH 5 でのZ-Phe-Arg-MCA分解活性が管状要素の自己分解に先立って一過的に

発現することが示された。

次に、この活性を担うプロテアーゼを一連のカラムクロマトグラフィーにより、420倍まで部分精製した。このプロテアーゼはE-64で阻害され、DTTにより活性化されることから、システインプロテアーゼであることがわかった。ゲル濾過によって推定された分子量は30kDaであった。

第三章 ヒャクニチソウ・システインプロテアーゼ遺伝子の単離と発現の解析

第三章の研究では管状要素分化に特異的に発現するシステインプロテアーゼをコードする遺伝子を単離することを目的として、分子生物学的な解析を行った。オリゴヌクレオチドプローブを用いたPCRにより、分化しているヒャクニチソウ細胞のcDNAからシステインプロテアーゼをコードする遺伝子断片を増幅し、ZCP1とZCP2をクローニングした。さらにこのクローンをプローブとして用いて、ヒャクニチソウcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、完全長のcDNA、ZCP4が単離された。ZCP1、ZCP2、ZCP4の塩基配列を決定し、解析したところ、他の植物システインプロテアーゼ遺伝子と高いホモロジーを持っており、触媒に関係する重要なアミノ酸残基が保存されていることがわかった。ZCP1、ZCP2、ZCP4 および Ya and Varner (1993) によってヒャクニチソウから単離されたp48h-17の塩基配列を比較し、ZCP2はZCP4の一部に相当し、ZCP1はp48h-17の一部に相当すると結論した。また、ZCP4とp48h-17とは全コード領域において、90%の塩基配列およびアミノ酸配列が一致した。アミノ酸配列上の特徴から、ZCP4は小胞体膜上のリボソームで翻訳され、ゴジル体で修飾され、おそらく液胞に輸送され、活性化されたシステインプロテアーゼになることが予想された。これらの結果から、ヒャクニチソウの管状要素分化過程で非常に良く似た2種類のシステインプロテアーゼ遺伝子ZCP4 (ZCP2) とp48h-17 (ZCP1) が発現していると考えられた。また、ZCP4をプローブとして用いてサザン解析をした結果、ZCPはゲノム中に少数のコピー数で存在することが示唆された。

次にZCP1、ZCP2をプローブとしてRNAプロット解析を行ったところ、分化誘導条件で培養した細胞にのみ1本のハイブリダイゼーションシグナルがみられた。このシグナルは、培養開始時から36時間目までには検出されず、48時間目に現れ、60時間目にピークになった後、減少した。このように、ZCPmRNAは管状要素形成に伴って一過的に発現することが示され、プロテアーゼ活性が転写レベルで制御されていることが示唆された。また、発現のパターン、酸素の性質からZ-Phe-Arg-MCAを分解するシステインプロテアーゼとZCP4がコードしているシステインプロテアーゼは同一である可能性が高いと考えられた。これは自己分解に関するプロテアーゼの活性が転写レベルで制御されていることを意味する。

第四章 ヒャクニチソウ管状要素分化に伴って発現するアミノペプチダーゼの解析

第四章の研究ではアミノペプチダーゼを解析した。D培地中で細胞を培養すると、Phe-MCAを分解するアミノペプチダーゼ活性は培養48時間目までに約2倍に増大し、その後も高い水準が維持された。一方、CN培地で細胞を培養したときには、この活性は培養48時間目以降減少した。また、Pheアミノペプチダーゼ活性はN-エチルマレイミド (NEM) により阻害された。このPheアミノペプチダーゼ活性はpH7.5に至適pHがあり、酸性では分解活性は示さなかった。この結果及び、

活性の増大が速い時期に起こることから、Pheアミノペプチダーゼは液胞の崩壊後の自己分解には働いてはいないと考えられた。Leuアミノペプチダーゼ、Metアミノペプチダーゼの活性も弱いながら、Pheアミノペプチダーゼと似た性質、活性変動を示し、Phe-MCAに特異性が高く、Leu-MCA、Met-MCAも分解する同一のアミノペプチダーゼが管状要素分化に関連して発現する可能性が示唆された。

D培地中で培養した細胞では60時間目に小さなAlaアミノペプチダーゼ活性のピークがみられた。この活性の阻害剤への感受性は、単離直後の細胞ともCN培地の細胞の活性とも異なっていた。したがって、Ala-MCAを分解するアミノペプチダーゼが分化に特異的に、ごく一過的に発現する可能性が考えられた。

まとめと展望

本研究により、ヒヤクニチソウ管状要素分化において、自己分解に先立って、基質特異性、反応特異性の異なる多くのプロテアーゼが誘導されることが示された。管状要素分化では自己分解の初期に液胞が崩壊する。Z-Phe-Arg-MCAを分解するシステインプロテアーゼ、プロテアーゼ I、II 等のエンドペプチダーゼさらにヘモグロビン分解活性など酸性でアクティブなプロテアーゼは液胞に蓄積され、崩壊後、細胞質に出て、協同してタンパク質分解を行うと考えられた。そのうち、Z-Phe-Arg-MCAを分解するシステインプロテアーゼの活性は転写レベルで調節されていることが示唆された。このように、自己分解は遺伝子の発現を必要とする積極的なプロセスであることが示された。一方、Pheアミノペプチダーゼ、Alaアミノペプチダーゼは、自己分解に先立って活性が上昇するが、全体としてのタンパク質の分解ではなく、細胞質内における特殊なタンパク質分解など管状要素分化のこれまで知られていない局面での役割があると予想された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒヤクニチソウ単離葉肉細胞の管状要素分化を高等植物におけるプログラム細胞死のモデルシステムと考え、管状要素分化過程でのプロテアーゼの発現を解析することにより、プログラム細胞死の仕組みに迫ることを目的として行ったものである。

著者は、まず、ヒヤクニチソウ管状要素分化過程でのタンパク質分解活性の解析を試み、酸性でのヘモグロビン分解活性が管状要素分化の自己分解過程に先立って上昇することを明らかにした。また、ゼラチンを基質として用いた活性染色により、2種類のプロテアーゼが、分化細胞に特異的に現れることを明らかにした。

プロテアーゼの解析をさらに進めるために、様々な人工基質を用いたエンドペプチダーゼの解析を行い、pH5でのPhe-Arg-MCA分解活性が分化細胞特異的に出現することを明らかにした。そして、この活性の発現の時期は、自己分解の直前に当たり、この分解活性が自己分解に関連していることが強く示唆された。次に、この活性を担うプロテアーゼの精製を試み、420倍まで部分精製した。このプロテアーゼはE-64で阻害され、DDTにより活性化されることから、システインプロテアーゼであることが分かり、分子量も約30kDと推定された。

続いて、分化特異的に発現するシステインプロテアーゼ遺伝子の単離をPCRを用いて試み、ZCP1、ZCP2と名付けたシステインプロテアーゼcDNA断片の単離に成功した。これらのmRNAの発現は、分化特異的であり、しかも自己分解直前に一過的に発現した。これをもとにヒヤクニチソウcDNAライブラリーをスクリーニングし、完全長のシステインプロテアーゼクローンZCP4を単離した。この遺伝子の予想されるアミノ酸配列と既知のシステインプロテアーゼの比較から、この遺伝子のコードするタンパク質は、粗面小胞体で作られ、液胞に輸送されると推定された。

最後に、ヒヤクニチソウ管状要素分化に伴って発現するアミノペプチダーゼの解析を人工基質を用いて行い、様々なアミノペプチダーゼが分化培地で培養した細胞内で高い活性をもつことを明らかにした。

ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、南淳提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。