

博士論文番号：0281025

タバコにおけるペルオキシダーゼの小胞輸送機構

松井 健史

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座

(新名 惇彦 教授)

平成17年1月6日提出

所属 (主指導教員)	植物代謝調節学講座 (新名 惇彦 教授)		
氏名	松井 健史	提出	平成 17 年 1 月 6 日
題目	タバコにおけるペルオキシダーゼの小胞輸送機構		

【背景および目的】

遺伝子操作技術の進歩に伴い、有用遺伝子を植物で発現させることが可能になった。遺伝子発現を行う際、転写、翻訳レベルでの調節が必要であるのはもちろんのこと、生産したタンパク質の細胞内局在を制御する技術も重要である。特に、活性の発現において真核生物特有の N-結合型糖鎖の付加などの翻訳後修飾が必要であるタンパク質は、小胞輸送経路を用いて発現させることが必要である。西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイム C(HRPC)は、ウェスタン解析や ELISA 法を初め様々な検出反応に汎用される有用酵素である。当研究室では、HRPC をコードする遺伝子; *prxC1a* を単離した。*prxC1a* の推定アミノ酸配列は Welinder らが報告した HRPC のアミノ酸配列に一致した。また N 末端(N-terminal propeptide; NTPP)と C 末端(CTPP)に翻訳後に切除されるプロペプチドが存在することが明らかになったが、これらのプロペプチドの機能は明らかにされていない。本研究では、これらのプロペプチドが HRPC1a の細胞内局在性および、酵素成熟において果たす役割を調べた。

【結果】

第一章では、各プロペプチドが細胞内局在、酵素成熟において果たす役割を調べた。まず、緑色蛍光タンパク質 EGFP をレポーターとした局在解析を行った。NTPP を融合した N-G, NTPP および CTPP を融合した N-G-C 遺伝子を作製し、CaMV 35S プロモーターに連結した。アグロバクテリウム法により各融合遺伝子をタバコ培養細胞 BY2(*Nicotiana tabacum* cv. BY2) に導入した。得られた形質転換体における蛍光観察を行ったところ、コントロールの EGFP 導入株では核および細胞質に蛍光シグナルが観察された。N-G 導入細胞では、核周辺の小胞体と思われる領域に蛍光が見られ、また細胞外への EGFP タンパク質の分泌が確認された。N-G-C 導入細胞では、小胞体および細胞の大部分を占める液胞内に蛍光が見られた。このことから、NTPP は小胞体へのタンパク質移行のためのシグナルペプチド、CTPP は液胞局在化シグナルであることが明らかになった。つぎに、プロペプチド領域を欠いた HRPC1a 遺伝子を作製した。NTPP, CTPP 両方を有する N-C1a-C, NTPP のみを有する N-C1a, CTPP のみを有する C1a-C および成熟型領域のみをコードする mC1a を BY2 細胞に導入した。N-C1a-C 導入細胞において、液胞に活性型 HRPC1a が蓄積し、N-C1a

導入細胞では細胞外への HRP C1a の分泌が確認された。一方、C1a-C および mC1a 導入細胞では活性型 HRP C1a の蓄積は認められなかった。一方で、異種タンパク質(β -D-glucan exohydrolase および 38 kDa peroxidase)由来のシグナルペプチドを成熟型 HRP C1a コード領域に融合した場合、活性型 HRP C1a の分泌が確認され、シグナルペプチドにより小胞輸送経路に送り込まれることが HRP C1a の酵素成熟に必要であることがわかった。また、翻訳エンハンサーを利用して、HRP C1a の高蓄積を試みた。タバコ由来アルコール脱水素酵素遺伝子の 5'非翻訳領域(*NtADH* 5'UTR) をシグナルペプチド置換型 HRP C1a に連結して BY2 細胞に導入した。*NtADH* 5'UTR を付加した系統は付加しない系統よりも HRP C1a を高蓄積する傾向が見られた。また、*NtADH* 5'UTR の付加によって mRNA 蓄積量あたりの HRP C1a 蓄積量は、10 倍程度まで上昇した。プロペプチドの機能解析、シグナルペプチドの置換、*NtADH* 5'UTR の評価はタバコ植物体を宿主としても行い、BY2 細胞と同様の結果が得られた。

第二章では、CTPP による液胞輸送機構に関する解析を行った。植物細胞には機能や形態の異なる液胞が少なくとも二種類(lytic vacuole; LV および protein storage vacuole; PSV)存在する。LV への輸送シグナルの研究は進んでおり、プロペプチド中の Asn-Pro-Ile-Arg モチーフを受容体が認識して仕分けが行われることが知られている。一方、PSV への輸送はタンパク質の C 末端プロペプチドがシグナルとして機能することが知られているが、その制御機構は未知の部分が多い。C 末端プロペプチドが液胞局在化シグナルとして機能するという報告例は多数あるが、そのアミノ酸の長さは数アミノ酸から 30 アミノ酸と多様であり、またコンセンサスモチーフも見つかっていない。HRP C1a の CTPP は PSV への輸送シグナルであることが予想され、第一章で構築した HRP C1a 発現系を利用して、液胞局在化シグナルとして機能するための CTPP のアミノ酸配列および構造の法則性を調べた。まず、HRP C1a の PSV 局在性を確認した。BY2 細胞では LV と PSV の区別が不明瞭であるため、免疫電顕法により西洋ワサビ組織における局在解析を行い、HRP C1a は PSV に局在することを確認した。さらに、BY2 細胞において CTPP の機能領域解析を行った。植物の PSV 局在性タンパク質は一般に 15 アミノ酸程度の CTPP を有しているが、C 末端数アミノ酸の配列が比較的似ていることがわかった。そこで、HRP C1a CTPP15 アミノ酸(C15 配列)のうち C 末端側 6 アミノ酸(C6 配列)を HRP C1a の C 末端に融合し、BY2 細胞へ導入した。その結果、C6 配列だけでも液胞輸送能が確認され、一方 N 末端側の 10 アミノ酸(N10 配列)のみでは液胞輸送能は認められなかった。また既知の PSV 輸送シグナルはその C 末端に Gly 残基を付加することで、液胞輸送能が損なわれることが知られているが、C6 配列の液胞輸送活性は Gly 2 残基を付加することで損なわれた。一方で、全長 CTPP の C 末端に Gly2 残基を付加しても液胞輸送能は損なわれなかった。全長 CTPP は両親媒性 α -ヘリックス構造をとる可能性があり、この二次構造が重要である可能性が考えられた。そこで、両親媒性 α -ヘリックス構造をとることが知られているマウス由来カルボキシペプチダーゼ E の C 末端プロペプチド領域を HRP C1a に融合して BY2 細胞に導入したところ、液胞輸送が見られた。これらの結果から、C6 配列に加えて、C15 配列から構成される二次構造が HRP C1a CTPP による液胞局在化において重要であると考えられる。

略語.....	4
緒論.....	5
第一章 HRP C1a に存在するプロペチドの機能解析	
1.1 序論.....	9
1.2 材料と方法.....	11
1.3 結果.....	22
1.4 考察.....	48
第二章 液胞輸送に重要な CTPP のドメイン解析	
2.1 序論.....	54
2.2 材料と方法.....	57
2.3 結果.....	62
2.4 考察.....	91
総括.....	100
謝辞.....	101
参考文献.....	102

略 語

BA	6-benzyladenine
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
BY2	Bright Yellow 2
CaMV 35S	cauliflower mosaic virus 35S
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HRP	horseradish peroxidase
IEF	isoelectric focusing
kDa	kilodalton
LS	Linsmaire and Skoog
MOPS	2-(<i>N</i> -morpholio) propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige and Skoog
NAA	α -naphthaleneacetic acid
NPT-II	neomycin phosphotransferase-II
PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelectric point
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluorid
PRX	ClassIII peroxidase
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	sodium chloride-sodium citrate buffer
Tris	tris(hydroxymethyl) methylglycine

緒 論

今日の遺伝子組換え技術の進歩に伴い、基本的にはどのような植物種にも目的の遺伝子を導入することができ、代謝経路の改変や有用タンパク質の高蓄積が試みられている。除草剤耐性作物(Shah et al., 1986)、昆虫の食害に強い植物、長寿命のトマト(Hamilton et al., 1995)やオレイン酸含量の増加したダイズ(Kinney, 1996)、デカフェコーヒー(Ogita et al., 2003)や青いバラなど、従来の育種方法では作出が困難、不可能であった植物が作出され、それらのうちいくつかはすでに市場に出回っている。植物は工業生産の場としても注目されており、アミノ酸やプラスチックを植物に生産させる時代が来ると考えられる。生産コスト面でも、植物を用いた原料合成は化学合成よりも安価になる可能性がある。植物は太陽光、二酸化炭素および少しの無機塩類があれば生育することができる。また一度作製した遺伝子組換え植物(植物工場)は種の形で保存、輸送し生産規模の拡大を容易に行うことが可能である。また近年、植物を用いた環境浄化、ファイトレメディエーションも注目されている。植物の働きにより土壌、水系の環境汚染物質を分解または吸収し、汚染環境の修復を図るという方法である。高濃度の汚染地域では土壌の入れ替えや化学的な中和が有効であるが、特に広範囲に低濃度の汚染がある場合は、時間はかかるものの、植物による汚染除去が有効な手段になる。

しかしながら、遺伝子組換え植物に目的の形質をうまく発現させることは依然容易ではない。良い遺伝子を選択し導入することはもちろんのこと、導入遺伝子の機能を最大限発揮させるための技術(転写・翻訳・細胞内局在化の制御技術)が必要となる。まず転写段階においては、最適なプロモーターの選択が重要である。最もよく使用されているのは、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA 遺伝子のプロモーターであり、多くの植物種において構成的に高発現することが報告されている。しかしながら導入遺伝子に応じて、器官・組織特異的、発達段階特異的、塩ストレスなどの外部刺激応答性プロモーターを選択して用いなければならない場合もある(Yoshida and Shinmyo, 2000)。また、転写後の翻訳レベルを制御することも重要な課題である。5'非翻訳領域などの翻訳効率調節エレメントを使い分けることにより mRNA あたりのペプチド翻訳量を調節することが可能である。導入遺伝子から生産されるタンパク質自体の高蓄積が望まれる場合(医薬品としての抗体やワクチンなど)は翻訳量を最大限上昇させ

ることが必要であり、一方で代謝経路の改変のために酵素遺伝子を導入するような場合は、目的酵素の翻訳量を適正な範囲に抑え、代謝攪乱による生育障害が起きないように調節しなければならない。

植物における外来遺伝子発現において、転写、翻訳の制御を行うと同時に翻訳後のタンパク質の局在を制御することも重要なファクターである。一つのターゲットオルガネラとして葉緑体が挙げられる(Daniell, 1999)。葉緑体には多くの二次代謝経路が存在し、代謝改変のターゲットとして重要である。葉緑体ゲノムへ遺伝子導入すると、多コピーの環状 DNA から転写されるため、一般に高レベルの mRNA 生成が期待でき、さらに葉緑体は花粉細胞には取り込まれないため、野外栽培における遺伝子拡散を抑える上でも有効である。また葉緑体は外来タンパク質の蓄積許容量が非常に多いことが知られている。しかし一方で、タンパク質の機能発現において糖鎖付加などの翻訳後修飾が必要となる場合は、生産タンパク質を小胞輸送経路へと送り込むことも重要な有効手段となる。

真核生物の小胞体へのタンパク質輸送は、N 末端に存在するシグナルペプチドによって仲介される(reviewed by Nicchitta, 2002)。シグナルペプチドは細胞質において受容体と結合し、翻訳複合体が粗面小胞体に移行する。ペプチド鎖は翻訳伸長反応に伴って、トランスロコンから小胞体内腔にとりこまれ、フォールディングが行われる。これまでに、ワクチン、抗体やその他の有用酵素などが、植物小胞輸送経路を用いて生産可能であることが報告されている(reviewed by Conrad and Fiedler, 1998)。また、局在化シグナルを用いて輸送先の制御を行うことも重要である。植物細胞において、一旦小胞体に入ったタンパク質のデフォルト輸送経路は細胞外分泌である(Denecke et al., 1990)。つまり、小胞体、ゴルジ体、液胞などへの特別な局在化シグナルを持たないタンパク質は細胞外へ分泌される。一般に、小胞体残留シグナル(-KDEL, -HDEL 配列)の利用により、組換えタンパク質の生産量が増加するといわれている(Schouten et al., 1996; Stöger et al., 2000; Haq et al., 1995)。小胞体は植物細胞内に縦横に張り巡らされており、タンパク質の貯蔵能力の高い細胞内小器官である。同時に組換えタンパク質の量だけではなく質の上昇、つまり抗体であれば抗原に対する結合能力を有する抗体の割合が上昇することが報告されている。小胞体内にはタンパク質のフォールディングに参与するシャペロンタンパク質が存在する。抗体などの複雑な三次元構造を有するタンパク質は、翻訳後に正しく折りたたまれることが機能発現において重要であるが、小胞体に残留することで正しい折りたたみが促進さ

れ、その結果活性型タンパク質の割合が上昇すると考えられている(revised by Conrad and Fiedler, 1998)。

また、液胞は毒性タンパク質を蓄積する区画として適していると考えられる。アビジンは細胞質で発現させると毒性を示し、アビジンを蓄積する形質転換体は得られないが、小胞輸送を制御して液胞へ送り込むことで、植物体内に蓄積させることに成功した例がある(Murray et al., 2002)。液胞へのタンパク質輸送法としては、可溶性タンパク質に液胞局在化シグナルを付加する以外にも膜アンカーの利用が報告されている(Jiang and Sun, 2002)。

遺伝子組換え植物による環境浄化(ファイトレメディエーション)においても、導入酵素タンパク質の局在化制御が重要である。これまでに水銀耐性細菌由来の水銀代謝酵素 *merA* および *merB* 遺伝子を共発現させることで、水銀耐性の強いシロイヌナズナ植物体が生産されている(Bizily et al., 2000)。また MerB タンパク質を小胞輸送経路に送り込み、小胞体残留型および細胞壁型の MerB 形質転換体を作成した結果、細胞質型の場合と比べ MerB 比活性が 10~70 倍に上昇した(Bizily et al., 2003)。有機水銀はイオン化しているため、細胞壁・細胞膜が障害となり細胞内へ取り込まれにくく、MerB を細胞外や細胞膜系に局在化させることが効果的であったと考えられる。

本研究では、西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイム C1(HRP C)の小胞輸送に関する解析を行った。HRP C はウェスタン解析や ELISA 法を始め、様々な検出反応に汎用される有用酵素である。また比較的安価で入手可能であるため、植物ペルオキシダーゼの生理作用を知るためのモデル酵素として試験管内実験に汎用され、リグニン、スベリンやオーキシンなど様々な植物由来の化合物を酸化することが明らかにされている。当研究室では、HRP C をコードする遺伝子を単離しており、その推定アミノ酸配列の解析結果から HRP C は N 末端および C 末端に翻訳後に切除されるプロペプチドを有することが明らかになっている(Fujiyama et al., 1988, 1990)。植物ペルオキシダーゼは小胞輸送経路の一区画である、アポプラストもしくは液胞に存在することが知られているが、各プロペプチドの小胞輸送制御における機能は未知である。そこで第一章では、前駆体型 HRP C1a に存在する N 末端プロペプチド(N-terminal propeptide; NTPP) および C 末端プロペプチド(CTPP)が細胞内局在性において果たす役割を解析した。その結果、NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチド、CTPP は液胞局在化シグナルとして機能することを示した。また、活性型 HRP C1a が生成するために

は、シグナルペプチドにより小胞輸送経路へ送り込まれることが必要であることがわかった。さらに、翻訳エンハンサーを用いることで HRP C1a の蓄積量を増加させられることがわかった。第二章では、CTPP による液胞輸送機構について解析した。現在、多くのタンパク質の C 末端プロペプチドが液胞局在化シグナルとして機能することが報告されているが、シグナルとして機能するためのアミノ酸配列の法則や、そのシグナルと相互作用する因子の有無については明らかにされていない。そこで、第一章で構築した HRP C1a 発現系を利用して液胞局在化シグナルとして機能するための CTPP のアミノ酸配列、構造の必要条件について調べた。その結果、CTPP の 15 アミノ酸のうち、C 末端の 6 アミノ酸だけでも液胞輸送能を示した。一方で、全長 CTPP の二次構造（両親媒性 α -ヘリックス構造）が重要であることを示唆する結果も得られた。

本研究で明らかにした知見をもとに、植物細胞における HRP C の大量生産系を構築することが可能である。シグナルペプチドや液胞局在化シグナルは、他の有用タンパク質の細胞外分泌生産や液胞高蓄積系に応用可能であり、有用遺伝子組み換え植物の作出に役立つと考えられる。また、細胞内局在性という観点から植物ペルオキシダーゼの生理作用を考える上で重要な知見を得ることができた。

第1章 HRP C1a に存在するプロペプチドの機能解析

1.1 序 論

ペルオキシダーゼは過酸化水素を還元すると同時に他の基質を酸化する酵素の総称である。その研究の歴史は19世紀にまで遡り、1855年 Schönbein は過酸化水素を用いてグアイヤコールなどの基質を酸化する酵素を発見した。また1898年に Linossier が膿からこの酵素を単離した際、初めて 'peroxidase' という名称を用いた (reviewed by Azedevo et al., 2003)。現在では、ペルオキシダーゼは動物、植物、微生物に広く分布することがわかっている。植物ペルオキシダーゼは三つのクラスに分類されており、Class I; アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX, EC 1.11.1.11)、Class II; マンガンペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.13) および Class III; グアイヤコールペルオキシダーゼ (PRX, EC 1.11.1.7) が存在する。PRX は大きな遺伝子ファミリーを形成しており、ゲノム解読の結果、シロイヌナズナには 73、イネには 138 の遺伝子が存在することが明らかになっている。PRX は植物体内において、二次細胞壁でのリグニンやスベリンの重合 (Espelie et al., 1985; Whetten et al., 1998)、オーキシンの代謝 (Lagrimini et al., 1997)、病原菌抵抗性 (Hilaire et al., 2001; Takahama and Hirota, 2000)、アルカロイドの重合 (Sottomayor and Barcelo, 2003) や耐塩性 (Amaya et al., 1999)、エチレン合成など (Acosta et al., 1991)、様々な生理作用に関与すると考えられている。PRX のなかで、西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイム C (HRP C) が最もよく研究されている。HRP C は非常に安定で、反応の比活性が非常に高いことから、ウェスタン解析や ELISA 法を初め様々な検出反応に古くから用いられている。また、比較的安価で入手可能であるため、PRX の生理作用を知るためのモデル酵素として試験管内実験に汎用されている。近年では、HRP C がオーキシンを酸化する際に細胞毒性を示す活性酸素種が生成されることを利用して、癌治療に用いる試みが始まっている (Greco et al., 2001)。さらに、HRP C は基質特性が低く、様々なフェノール系化合物を酸化重合、分解することから、環境ホルモンを初めとした環境汚染物質浄化への利用も試みられている (Coyle et al., 1999; Sakuyama et al., 2003)。1979年には Welinder が HRP C の精製酵素を用いて、アミノ酸の一次配列を決定した (Welinder, 1979)。X線構造解析から HRP C の立体構造も明らかにされており、主として α -ヘリックスから構成されている (Gajhede et al., 1997)。HRP C の活性アミノ酸部位も詳細に調べられ、ヘム結合部位、カルシウム結合部位や基質結合部位などが明らかになっている (Gajhede et al., 1997; Henriksen et al., 1998)。当研究室において、西洋ワサビ PRX の cDNA (*prxC1a*, *prxC2*, *prxC1c*) およびゲノム DNA (*prxC1a*, *prxC1b*, *prxC1c*, *prxC2*, *prxC3*) が単離された (Fujiyama et al., 1988, 1990)。これらのうち、*prxC1a* の推定アミノ酸配列が

Welinder らによって報告された HRP C のアミノ酸配列と一致した。また N 末端と C 末端に翻訳後に切除されるプロペプチド領域(N-terminal propeptide; NTPP および CTPP と表記する)が存在することが明らかになったが、これらプロペプチドの機能は明らかにされていない。

植物細胞には、小胞体から始まる小胞輸送経路が存在し、タンパク質や脂質の輸送が行われている。小胞体は細胞内で最大の表面積を占めるオルガネラであり、分泌タンパク質の輸送以外にもストレス抵抗性やエチレンシグナル伝達など様々な生理作用を担っている(Matsushima et al., 2002; Gao et al., 2003)。タンパク質に疎水性アミノ酸クラスター(シグナルペプチド)が存在すると、受容体に認識され翻訳複合体は小胞体膜上へターゲティングされる。粗面小胞体で合成されたタンパク質は、正しく折りたたまれた後、ゴルジ体へ輸送され、細胞外(アポプラスト)もしくは液胞へ輸送される。また、種子貯蔵タンパク質など、小胞体から直接液胞へ輸送される経路も知られている(Hara-Nishimura et al., 1998)。植物を含む真核生物において、可溶性タンパク質のデフォルト小胞輸送経路は細胞外分泌である(Denecke et al., 1990)。小胞体に送り込まれたタンパク質が小胞体やゴルジ体に残留するためや、液胞へ輸送されるためには特別な局在化シグナルが必要となる。小胞体残留シグナルとして、タンパク質の C 末端に存在する-KDEL もしくは -HDEL 配列が知られている。ほ乳類細胞において、植物液胞に相当するリソソームへのタンパク質輸送には N-結合型糖鎖がシグナルとして機能することが知られている(Helenius and Aebi, 2001)。しかし植物液胞への輸送の場合は、N-結合型糖鎖がシグナルとして機能するという報告はなく、前駆体タンパク質のプロペプチド領域により輸送が仲介される。HRP C1a は小胞体特有の翻訳後修飾である N-結合型糖鎖をもつタンパク質であるため、小胞輸送経路を経由していることが予想される。しかし、実際の HRP C1a の細胞内局在性やその輸送経路は明らかにされていない。また NTPP および CTPP の、HRP C1a 局在化制御における機能は未知である。

そこで本章では、各プロペプチドが HRP C1a の局在化および酵素成熟において果たす役割を調べた。その結果、NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチド、CTPP は小胞輸送経路に入ったタンパク質を液胞へ輸送するための局在化シグナルであることがわかった。また、HRP C1a の酵素成熟(活性化)において、シグナルペプチドの働きにより小胞輸送経路に送り込まれることが重要であることも明らかになった。さらに、翻訳エンハンサーの利用により、HRP C1a の蓄積量を増加させることができた。本研究で明らかにした知見をもとに、植物細胞における HRP C の大量生産系を構築することが可能である。シグナルペプチドや液胞局在化シグナルは、他の有用タンパク質の細胞外分泌生産や液胞高蓄積系に応用可能であり、有用遺伝子組換え植物の作出に役立つと考えられる。

1.2 材料と方法

1.2.1 使用植物

研究材料は、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (BY2)) とタバコ植物体 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Habana SR1) を用いた。

1.2.2 使用菌株とプラスミド

遺伝子構築の際の大腸菌宿主として、*Escherichia coli* DH5 α (*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*($r_k^-m_k^+$), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*) を使用した。

アグロバクテリウムは、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood et al., 1993) を用いた。

遺伝子構築を行うためのベクターとして、pBluescriptII SK⁻ (Stratagene 社) および pUC19 (Messing, 1983)、pUC118(宝酒造)を用いた。EGFP 融合遺伝子作製のために、pEGFP (Clontech 社)を用いた。形質転換タバコ植物および形質転換タバコ培養細胞作製のためのバイナリーベクターとして、pMSH1, 2 (Kawasaki et al., 1999) からハイグロマイシン耐性遺伝子を除いた pMS1, 2 を用いた。

1.2.3 培地および培養条件

タバコ培養細胞は、Nagata らの方法(Nagata et al., 1992) に従って培養した。培地は LS 培地(Linsmaire and Skoog, 1965) 中の KH₂PO₄ を 370 mg/l、thiamine HCl を 1 mg/l に改変し、sucrose (3%) および 2,4-D を 0.2 mg/l 添加した改変 LS 培地を用いた。培養は 27°C で、130 rpm の攪拌速度、暗所下で行った(BR-3000, TAITEC 社)。平板培地には、3 g/l のゲランガムを加えた。

タバコ植物体の培養は、MS 無機塩 (Murashige and Skoog, 1962) にビタミン (Myo-inositol 100 mg/l, thiamine-HCl 10 mg/l, pyridoxal hydrochloride 1.0 mg/l, Nicotinic acid 1.0 mg/l) および sucrose(3%)を添加して用いた。平板培地には、3 g/l のゲランガムを加えた。栽培は、25°C で 16 時間暗期および 8 時間明期で行った。

大腸菌の培養は、LB 培地(Bacto-tryptone 10 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 19 g/l) を使用し、37°C で行った。平板培地には、15 g/l の精製寒天末を加え、オートクレーブ後、必要に応じてろ過滅菌した抗生物質(アンピシリン 100 mg/l、カナマイシン 50 mg/l) を添加した。

アグロバクテリウムの培養は、LB 培地を使用し、28°C で行った。また平板培地には、15 g/l の精製寒天末を加え、オートクレーブ後必要に応じて、濾過滅菌したカナマイシン(50 mg/l)を添加した。

1.2.4 大腸菌の形質転換

Inoue らの方法(Inoue et al., 1990)に従い行った。大腸菌のシングルコロニーを白金耳を用いて 5 ml の LB 培地に植菌し、37°C で一晩培養した。この培養液を坂口フラスコに入れた 200 ml の SOB 培地(Bacto-triptone 20 g/l, Bacto-yeast extract 5 g/l, NaCl 0.58 g/l, KCl 0.19 g/l, オートクレーブ後濾過滅菌した 1M MgSO₄, 1M MgCl₂ を 1l に対して 10 ml ずつ添加) に植菌し、660 nm における濁度が 0.4-0.8 になるまで 25°C、200 rpm で振盪培養した。培養液を氷中で 5 分間冷却後、遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4°C; BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌した。氷冷しておいた TB buffer(10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6.7)を 67 ml 加えて、ピペットで穏やかに懸濁した後、10 分間氷冷した。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4°C; BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌し、氷冷した TB buffer を 16 ml 加えて穏やかに懸濁した。1.2 ml の DMSO をゆっくり添加し、混和した後 10 分間氷冷した。1.5 ml 微小遠心管に 100 µl ずつ分注し、ただちに液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

コンピテントセルを氷中で融解後、DNA 溶液(1-20 µl)を加え、30 分間氷中に静置した。42°C、30 秒間の熱処理を行い、氷中に 2 分間静置した後 400 µl の SOC 培地(glucose 20 mM を含む SOB 培地)を加え、37°C で一時間培養した。菌体を適当な抗生物質を含む LB 寒天培地に広げ、37°C で一晩、静置培養した。

1.2.5 プラスミド DNA の少量調製

プラスミド調製用キット、Mag Extractor(TOYOBO)を用い、添付のプロトコールに従い調製を行った。

1.2.6 アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム単一コロニーを 5 ml の YEB 培地(Bacto-peptone 5 g/l, Beef extract 5 g/l, Yeast extract 1 g/l, sucrose 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l)に植菌し、28°C で 1 晩振盪培養した。この培養液を、500 ml の YEP 培地に植菌し、600 nm における濁度が 0.5 になるまで 28°C で振盪培養した。培養液を遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4°C ;BECKMAN JLA-10,500 ローター)により集菌して上清を捨て、菌体を洗浄するため 500 ml の滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4°C; BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌して上清を捨てた。この操作を 2 回繰り返した後、沈殿に 20 ml の冷却した滅菌 10% glycerol を加えて懸濁した。ナルゲンチューブに移し遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4°C BECKMAN JLA-10,500 ローター) により集菌して上清を捨てた。沈殿に 3 ml の冷却した滅菌 10% Glycerol を加えて懸濁し、40 µl ずつ 1.5 ml 微小遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから -80°C で保存した。

コンピテントセルを氷中で解凍後、1~2 μ l の DNA 溶液を加え、氷令した 2 mm キュベットに移した。エレクトロポレーター (BIO RAD、Gene Pulser) により電気パルス (2.5 KV、25 μ F、400 Ω) を与え、DNA を導入した。1 ml の SOC 培地を加え、28°C で 1 時間振盪培養した後、スピンドウンして上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、30°C で 2 晩培養した。

1.2.7 タバコ培養細胞の形質転換

BY2 細胞の形質転換は、An (An,1985)の方法に従って行った。カナマイシン 100 mg/l を含む 5 ml の LB 培地で 28°C、2 晩培養したアグロバテリウム培養液 100 μ l と、培養 4 日目のタバコ培養細胞懸濁液 5~10 ml をシャーレに入れてよく混ぜ、25°C で 2 晩、暗所下で静置して共存培養した。アグロバクテリウムを除くため、シャーレの中の培養液を 15 ml の遠心管に移して遠心(1000 rpm, 5 分, 4°C; BECKMAN GS-6KR centrifuge)し、上清を取り除いた。新しい改変 LS 培地を入れて遠心分離 (1000 rpm, 5 分, 4°C; BECKMAN GS-6KR centrifuge)し、細胞を洗浄した。この操作を 4 回繰り返し、アグロバクテリウムを除いた培養細胞をカナマイシン 100 mg/l の入った改変 LS 寒天培地にまき、25°C で暗黒下に静置して培養した。約 2-3 週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。カナマイシン 100 mg/l を加えた改変 LS 培地 30 ml に移し、継代培養を行った。

1.2.8 タバコ植物体の形質転換

形質転換タバコの作成は Rogers らの方法 (Rogers et al., 1986)により行った。無菌タバコの葉部を、葉脈を含まないように 1×1 cm 程度の大きさに切り取り、滅菌水が入ったシャーレに葉の裏面が上になるように置き、100 mg/l のカナマイシンを含む LB 培地で 2 晩培養したアグロバクテリウム懸濁液をシャーレに注いで 3~5 分間浸した。葉片を取り出し、余分な菌液を滅菌キムタオルで拭き取り、カルス形成培地に置床して 25°C で培養した。2~3 日後、アグロバクテリウムが培地上で見ることができるようになったら、葉片を 50 ml チューブに移し、滅菌水で 5 回洗浄した後、カルス形成培地 (カナマイシン 100 mg/l 、カルベニシリン 250 mg/l を含む)に置床し、1~2 週間 25°C で培養した。葉片が最初に比べて丸まり、表面に凹凸が生じたら、シュート形成培地 (カナマイシン 100 mg/l、カルベニシリン 250 mg/l を含む)に移した。さらに 4~6 週間後、茎葉部の発達したシュートを切り取ってルート形成培地 (カナマイシン 100 mg/l、カルベニシリン 250 mg/l を含む)に移し、発根が見られるまで 25°C で培養した。植物体がある程度の大きさに成長したものを鉢植えにした。

1.2.9 ノザン解析

ATA 法による RNA の抽出

細胞を液体窒素で冷しながら乳鉢で摩砕し、1.3 ml の抽出緩衝液(50 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% SDS, 2 mM ATA, 2% TINS, 12.8 mM 2-メルカプトエタノール)の入った 2 ml 容の微小遠心管に入れた。よく懸濁した後、3 mM KCl を 182 μ l 加えて混合した。氷上に 15 分放置した後、遠心分離(8000 rpm, 5 分, 4°C)し、上清を新しい 2 ml 容の微小遠心管に移し、600 μ l の 10 M LiCl を加え、氷上で 30 min 以上放置した。遠心分離(15000 rpm, 20 分, 4°C)し、沈殿を 390 μ l の滅菌水に溶解し、フェノールクロロホルム抽出を 2 回、クロロホルム抽出を 1 回行った。イソプロパノール沈殿を行い、沈殿を 8 μ l の滅菌水で溶解した。

ホルマリンアガロース RNA 変性ゲル電気泳動

79 ml の無菌水に 1.5 g のアガロース、5 ml の 20×MOPS buffer(0.4 M MOPS, 100 mM Sodium acetate, 10 mM EDTA pH 7.0)を加え、ゲルを溶解した後、16 ml のホルマリンを加えて混合しゲルを作製した。20 μ g の RNA を使用し、1 μ l の 20×MOPS、3 μ l のホルマリン、10 μ l のホルムアミド、1 μ l のエチジウムブロマイド(500 mg/ml)を混合し、65°C で 15 分間熱処理し、氷中で急冷した。1/5 量の Gel-Loading buffer を加えた後、1×MOPS buffer 中、46 V で 1 時間、その後 92 V で 2 時間、定電圧で電気泳動した。

プロットティング

20×SSC(3 M NaCl, 0.3 M tri-Sodium citrate dihydrate)を満たしたプロットティング装置をセットし、電気泳動で分離した RNA をナイロンメンブレン(HybondTM-N+; Amersham) にトランスファーした。プロットティングは約 16 時間行い、終了後軽く風乾してから紫外線照射によって DNA を固定した(GS Gene LinkerTM UV Chamber; BIO-RAD)。

プローブの調製

タバコ細胞内での 導入遺伝子の発現を検討するノザン解析には、*prxCl α* 遺伝子の全長約 1100 bp、*EGFP* 遺伝子の全長約 740 bp をプローブとして用いた。また、対照プローブとして、タバコの *ACT1* 遺伝子を用いた。プローブのラベリングは、TaKaRa 社の Bca BESTTM Labeling Kit を用いて行った。まず、1.5 mL 遠心管に鋳型 DNA 25 ng および Random Primer 液 1 μ l を加えた後、滅菌水を加えて 7 μ l にした反応液を調製し、95°C、3 分間加熱後、氷中で急冷した。これに

10×buffer, dNTPs を各 1.25 μ l、(α -32 P) dCTP (1.85 MBq, 50 mCi)を 2.5 μ l 加えた後、滅菌水を加えて 12.5 μ l にし、Bca BESTTM DNA Polymerase を 1 μ l 加え、55 で 10 分間保温した後、95°C で 10 分間加熱し、氷中で急冷してハイブリダイゼーションプロブ溶液とした。

ハイブリダイゼーション

メンブレンをいれたフィルムバックに、メンブレン 1cm² あたり 150 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液(250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% w/v BSA, 50% v/v formamide, 7% w/v SDS, 250 mM Na₂HPO₄ pH 7.2)を入れた。これに調整したプロブ溶液を加え、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

洗浄と感光

ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリバックからメンブレンを出し洗浄用のトレイに移した。0.1% SDS を含む 2×SSC(300 mM NaCl, 30 mM tri-Sodium citrate dihydrate)を用いて、室温で 15 分間洗浄後、65°C で 15 分間メンブレンを洗浄した。約 48 時間オートラジオグラフィを行い、シグナルを検出した。

1.2.10 細胞からのタンパク質調製

タバコ細胞からのタンパク質の抽出

BY2 細胞および、タバコ植物体を、液体窒素で冷やしながら乳鉢で粉末状にし、等量のタンパク抽出緩衝液(1 mM PMSF, 1 mM DTT, 137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4)に懸濁した。30 秒間ボルテックスした後、氷上に 30 秒間静置を 5 回繰り返す、細胞懸濁液をよく攪拌した。2,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心し、細胞壁画分を沈殿させ、上清を回収した。次に、15,000 rpm, 4°C で 20 分間遠心した。上清を可溶性タンパク質画分とした。また、沈殿を適量のタンパク抽出緩衝液に懸濁し、膜タンパク質画分とした。

硫酸沈澱

乳鉢ですりつぶして粉末状にした硫酸アンモニウムを、氷で冷やしながら、前述の細胞内可溶性タンパク質画分に少しずつ加え、60% 飽和になるようにした(サンプル溶液 10 ml あたり 3.9 g)。氷上で数時間静置した後、12,000rpm, 4°C で 30 分間遠心した(BECKMAN JA-20 ローター)。沈澱に適量の 5 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 4°C)を加えタンパク質を溶解した後、5 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 4°C)に対して透析を行い、これを 60% 飽和画分とした。さらに、上清に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウム(サンプル溶液 10 ml あたり 1.43 g)を加えた後同様の操作を行い、80% 飽和画分 (80% saturation fraction) を得た。また、BY-2 細胞をろ過

して除いた液体培地に、80%飽和の硫酸アンモニウム(培地 10 ml あたり 5.61 g)を加え、硫酸沈澱を行い培地中の分泌タンパク質を回収した。

タンパク質濃度の定量

Bradford の方法(Bradford, 1976)に従った。適当量の水で希釈したタンパク質溶液 10 μ l とタンパク質定量試薬 500 μ l を 48 ウェルプレートに入れてよく混合し、Abs 595 nm を測定した。Bovine Serum Albumin(BSA)を用いて検量線を作成し、これよりサンプルのタンパク質濃度を求めた。

タンパク質定量試薬: Coomassie Brilliant Blue 50 mg, 95% Ethanol 25 ml, 85% (w/v) Phosphoric acid 50 ml を滅菌蒸留水で 500 ml にメスアップした後、濾紙で二回濾過した。また、使用直前に必要量のみ再度濾過した。

1.2.11 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli の方法(Laemmli, 1970)に従った。下記の分離ゲル(189 mM Tris-HCl (pH8.8), 0.1% SDS, 10% (w/v) Acrylamide, 0.267% (w/v) bis-acrylamide を適当量の APS と TEMED で重合)と濃縮ゲル(125 mM Tris-HCl (pH6.8), 0.1% SDS, 3.75% (w/v) Acrylamide, 0.1% (w/v)bis- acrylamide を適当量の APS と TEMED で重合)を用いてゲルを作製した。試料に等量の SDS-sample buffer(4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0.05%(w/v) bromophenol blue, 300 mM β -mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8)を加え、95°C で 2 分間熱変性させた試料をゲルにアプライした。電気泳動は恒温式ミニゲルスラブ電気泳動装置(日本エイドー社)を用い、SDS-running buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)中で行った。BPB が濃縮ゲル内にあるときはゲル一枚あたり 10 mA で、色素が分離ゲルに入ってから 25 mA で、定電流で電気泳動した。

1.2.13 等電点電気泳動

BIO-RAD のモデル 111 ミニセルを用いて行った。PAGE ゲルサポートフィルムの疎水面をガラスプレートに密着させた後、キャストプレートにのせた。モノマー-アンフォライト溶液(2.75 ml dH₂O, 1.0 ml 24.25%(w/v) acrylamide-0.75% (w/v) bis, 1.0 ml 25% glycerol, 0.25 ml 40% Bio-Lyte 3/10 Ampholyte(BIO-RAD, catalog No. 163-1112))および触媒溶液(27.5 μ l 10%(w/v) ammonium persulfate, 25 μ l 0.1% (w/v) riboflavin-5'-phosphate, 1.5 μ l TEMED)を混合し、サポートフィルムとキャストプレートのすき間に流し込み、蛍光灯の下 45 分間重合させた。作製したゲルに試料および、IEF スタンダード(BIO-RAD, catalog No. 161-0310)を塗布した。泳動槽の電極を蒸留水で湿らせ、ゲル面を下にしてセットした。定電圧で、100 V-10 分間、200 V-10 分間、450 V-40

分間泳動した。

1.2.14 4-chloro-1-naphthol によるペルオキシダーゼ活性染色

染色用 A 液(50 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl)と染色用 B 液(0.3% (w/v) 4-chloro-1-naphthol, 0.1% (w/v) H₂O₂, 85% (v/v) methanol)を 4:1 の割合で混合し活性染色溶液とした。等電点電気泳動後のゲルを活性染色液に浸し、室温で軽く振とうした。バンドを確認後、蒸留水ですすぎ、乾燥させた。

1.2.15 化学発光によるペルオキシダーゼの検出

Amersham 社の enhanced chemiluminescence (ECL) plus western blotting detection system を用いて HRP C1a を検出した。化学発光用試薬に等電点電気泳動ゲルを浸した後、X 線フィルムに感光させるか、もしくはルミノイメージアナライザー(LAS-3000, Fujifilm 社)を用いてシグナルを検出した。HRP C1a を定量する場合は、HRP C (SIGMA 社, Type IV) の希釈系列を作製し、サンプルと共に等電点電気泳動ゲルで分離した。スタンダード HRP C1a のシグナル強度をもとに作成した検量線を用いて、サンプル中の HRP C1a 量を算出した。

1.2.16 アポプラスト液の回収

西洋ワサビの葉柄もしくは、タバコ形質転換体の葉を約 0.5 cm² に切り分け、蒸留水で切り口を洗った。50 ml 遠心管にタンパク質抽出緩衝液(25 mM KH₂PO₄ pH 6.0 at 20°C)と植物体片を入れ、減圧処理によって緩衝液をアポプラストへ浸透させた。植物片の余分な水分を除去した後、50 ml 遠心管にセットしたロート(核酸精製用カラム QIAGEN-tip 500 Cat No.10063 のイオン交換樹脂を取り除いたものをロートとして用いた)にのせ、20°C、2000×g で 5 分間遠心し、アポプラスト液を回収した。

細胞質および葉緑体に存在する酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性測定を行い、回収したアポプラスト液への細胞内サンプルの混入を評価した。A 液(50 mM glucose-6-phosphate)を 200 µl, B 液(5 mM NADP)を 200 µl, C 液(50 mM MgCl₂, 100 mM Hepes pH 7.6)を 400 µl およびタンパク質サンプルを 200 µl 混和し、反応を開始した。分光光度計(U-3210, HITACHI 社)を用いて、340 nm における吸光度変化を測定した。

1.2.17 プロトプラストの調製

BY2 細胞からのプロトプラスト調製

培養 4 日目の BY2 細胞を 50 ml 遠心管に移し、1,000 rpm, 室温で 5 分間遠心し、細胞を回収した。培地を捨て、50 ml の 0.4 M mannitol を加え、1,000 rpm, 室

温で5分間遠心し、細胞を洗浄した。上清を捨て、プロトプラスト用酵素液[0.1% pectlyase Y23(Kikkoman 社), 4% cellulase RS(Yakult Honsha), 0.4 M mannitol pH 5.5 を0.45 µm フィルター(MILLEX HA filter unit, MILLIPORE 社)で濾過滅菌]を加えた。25°Cのウォーターバス内で2~3時間、軽く振盪した。顕微鏡下で細胞がプロトプラスト化されていることを確認した後、800 rpm、室温で3分間遠心し、上清を捨てた。0.4 M mannitol を加え、800 rpm、室温で3分間遠心し、プロトプラストを洗浄した。

タバコ植物体からのプロトプラストの調製

タバコ植物体の葉を回収し、0.5~1 cm 角に切り分けた。プロトプラスト用酵素液[1% cellulase RS(Yakult Honsha), 0.25% Macerozyme R-10(Yakult Honsha), 0.4 M mannitol, 8 mM CaCl₂, 5 mM MES-KOH pH 5.6]を加え、25°Cで2~3時間、軽く振盪した。顕微鏡下で細胞がプロトプラスト化されていることを確認した後、ナイロンメッシュ(40 µm Cell strainer, BD Falcon 社)400 rpm、室温で3分間遠心し、上清を捨てた。0.4 M mannitol を加え、400 rpm、室温で3分間遠心し、プロトプラストを洗浄した。

1.2.18 液胞の調製

遠心管内に Ficoll 溶液 A(15% Ficoll, 0.6 M mannitol, 20 mM Hepes, pH 7.7)、Ficoll 溶液 B(12% Ficoll, 0.6 M mannitol, 20 mM Hepes, pH 7.7) をおよび 0.4 M mannitol に懸濁されたプロトプラスト液を重層した。28,000 rpm、4°Cで2時間遠心した(BECKMAN SW28 ローター)。Ficoll 溶液 B と 0.4 M mannitol の境界に存在する液胞を回収した。単離した液胞を顕微鏡を用いて確認した。また、液胞マーカー酵素である、 α -mannosidase 活性を測定した。タンパク質サンプル 800 µl に、200 µl の基質溶液(2 mM p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside, 200 mM sodium acetate, pH 4.6) を添加し、400 nm における吸光度変化をモニターした。

1.2.19 遺伝子構築

EGFP と各プロペプチド融合遺伝子の作製

NTPP, CTPP に加えてそれぞれ 10 アミノ酸を余分に含む領域(N 末領域: Met1~Ser40、C 末領域: Leu329~Met353)を EGFP に融合した(Fig.1-2B)。プライマーとして、C1a-F と C1a-NTPP-R、C1a-CTPP-F と C1a-R を用いて PCR を行い、それぞれ N 末領域、C 末領域をコードする DNA 断片を増幅した(Table 1-1)。N 末領域の Ser40 のコドン、tca を tcc に置換して *Nco*I 部位を導入し、pEGFP(Clontech 社)の *Kpn*I-*Nco*I のギャップに導入した。C 末領域の Leu329 のコドン、ttg を ctt に置換し、*Hind*III 部位を導入した。また、EGFP-F と

EGFP-HindIII-R プライマーを用いて PCR を行い、EGFP の停止コドン を削除すると同時に *HindIII* 部位を付加し、この断片を C 末端領域の断片と融合した。N 末領域および C 末領域を EGFP に融合した N-G-C、N 末領域のみを融合した N-G、C 末領域のみを融合した G-C を作製した。これらの断片を、バイナリーベクター-pMS(Fig.1-2A)(Kawasaki らによって作製された pMSH のハイグロマイシン耐性遺伝子を除去 ; Kawasaki et al., 1999)の *KpnI-SpeI* ギャップにサブクローニングし、CaMV 35S プロモーターに連結した。

プロペプチドを欠失した HRP C1a 遺伝子の作製

N-C1a-C、N-C1a、C1a-C および mC1a(Fig.1-2C)をコードする DNA 断片を、それぞれに必要な組み合わせのプライマーを用いて PCR で作製した(Table 1-1, Fig. 2A)。PCR 産物を pUC118 にクローニングし、シーケンスを確認した。*KpnI* および *SpeI* で断片を切り出し、pMS の *KpnI-SpeI* ギャップにサブクローニングし、CaMV 35S プロモーターに連結した。

シグナルペプチド置換型 HRP C1a 遺伝子の作製

Nicotiana tabacum beta-D-glucan exohydrolase (ACCESSION:AB017502)および *N. tabacum* cationic peroxidase isozyme 38k のシグナルペプチドをコードする DNA は、タバコゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅した。それぞれのプライマーセット(β -D SP-F \times β -D SP-R および 38 k SP-F \times 38 k SP-R)を用い、5'側に *KpnI* 部位、3'側に *HincII* 部位を付加した。また、C1a-HincII-F および mC1a-R プライマーを用いて PCR を行い、C1a 成熟領域の 5'側に *HincII* 部位を付加した。*HincII* 部位を用いてシグナルペプチド領域と C1a 成熟領域を連結した後、pMS にサブクローニングし、CaMV 35S プロモーターに連結した(Fig.1-2C)。

NtADH 5'UTR の付加

NtADH 5'UTR-F プライマーと *NtADH* 5'UTR-R プライマーを用い、ADH NF ベクター(Sato et al., 2004)を鋳型として PCR を行い、*NtADH* 5'UTR 断片を増幅した。また、 β -D-NsiI-F プライマーもしくは 38 k-NsiI-F プライマーと mC1a-R プライマー、を用いて PCR を行い、シグナルペプチド置換型 HRP C1a 遺伝子の 5'側に *NsiI* 部位を導入した。*NtADH* 5'UTR とシグナルペプチド改変型 C1a を、*NsiI* 部位を用いて連結した後 pMS にサブクローニングし、CaMV 35S プロモーターに連結した(Fig.1-2C)。

NtADH-38 kSP-C1a-C の構築

N-C1a-C と 38 k SP-C1a を、C1a の成熟領域中にある *SphI* 部位を用いて組み

換えた。*NtADH* 5'UTR に連結した後、バイナリーベクター-pMS の CaMV 35S プロモーターの下流にサブクローニングした(Fig.1-2C)。

Table 1-1 Oligo nucleotides used in this study.

oligo nucleotides	sequences	R.E. site
EGFP-F	<u>CGGTACCGGT</u> CGCCACCATG	KpnI
EGFP-HindIII-R	GAAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC	HindIII
Cla-F	<u>GGGTACCATGC</u> ATTTCTTCTTCTTCTAC	KpnI
Cla-R	CACTAGTCACATAGAGCTAACAAAGTCAAC	SpeI
mCla-F	<u>GGGTACCATG</u> CAACTTACCCCTACCTTCAT	KpnI
mCla-R	CACTAGTCAAGAGTTGGAGTTCACCACCCT	SpeI
Cla-NTPP-R	<u>GCCATGG</u> AATTGTCGTAGAAGGTAGGGTA	NcoI
Cla-CTPP-F	GAAGCTTAATTGTAGGGTGGTGAATCC	HindIII
Cla-HincII-F	<u>GTTAA</u> CCCTACCTTCTACGACAATTCATG	HincII
β -D SP-F	<u>GGGTACCAT</u> GGGGAGAATGTCAATACCCA	KpnI
β -D SP-R	<u>GGTTAA</u> CTGTCCTTCTGCTACCACTGCCCA	HincII
β -D-NsiI-F	<u>GATGCAT</u> GGGGAGAATGTCAATACCCATG	NsiI
38 k SP-F	<u>GGTACCAT</u> GAGAACTGCTCAATTACTGCTA	KpnI
38 k SP-R	<u>GTTAA</u> CTGTCCTGCACCCGAAACTCCACA	HincII
38 k-NsiI-F	<u>GATGCAT</u> GAGAACTGCTCAATTACTGCTA	NsiI
NtADH 5'UTR-F	<u>TCTAGAT</u> ATTTAACTCAGTATTCAGAAACAAC	XbaI
NtADH 5'UTR-R	<u>GATGCAT</u> TTATTTTCTTGATTTCTTCCAC	NsiI
Cla-CTPP-Gly-R	CACTAGTCATCCCATAGAGCTAACAAAGTC	SpeI
Cla-CTPP-GlyGly-R	GACTAGTCATCCTCCCATAGAGCTAACAAA	SpeI
Cla-NsiI-R	GTCA <u>TGCAT</u> GAGTTGGAGTTCACCACCCTA	NsiI
ClaN10-F	CTACTCCATGATATGGTGGAGGTGTTGAC	
ClaN10-R	GTCAAACGACCTCCACCATATCATGGAGTAG	
ClaC6-F	GACTTTGTTAGCTCTATG	
ClaC6-R	CATAGAGCTAACAAAGTC	
ClaC6-GGR	TCCTCCCATAGAGCTAACAAAGTC	
ClaC-Pro-F	CCTGACTTTGTTAGCTCTATGTGA	
ClaC-Pro-R	GACCTCCACCATATCATGGAGTAG	
BLC-F	GTTTTGCTGAAGCTATTGCTGCTAATTCT	
BLC-R	TTCAGCAACCAAAGTAGAATTAGCAGCAAT	
BLC-GR	ACCTTCAGCAACCAAAGTAGAATTAGC	
BLC-GGR	ACCACCTTCAGCAACCAAAGTAGAATTAGC	
CPEC-F	GAAGAAGAAAAGGAAGAATTGATGGAATGG	
CPEC-R	CATCATCTTCCACCATTCCATCAATTCTTC	
CPEC-GGR	<u>ACTAGT</u> CAACCCACCCATCATCTTCCACCA	SpeI

R.E. site; restriction enzyme site included in the oligo nucleotides (underlined)

1.3 結果

1.3.1 EGFP をレポーターとした NTPP、CTPP の機能解析

HRP C1a は N 末端および C 末端に翻訳後に切除されるプロペプチドが存在する (Fig. 1-1A; Fujiyama et al., 1988)。HRP C1a は N-結合型糖鎖を持つが (Fig 1-1A; Welinder, 1979)、糖鎖付加は小胞体において行われる。真核生物において小胞体内へのタンパク質移行は N 末端のシグナルペプチドによって仲介される。NTPP は疎水性アミノ酸のクラスターを形成し (Fig. 1-1B)、またタンパク質の局在予測ソフト (PSORT, <http://psort.nibb.ac.jp/>) による解析では、小胞体移行のためのシグナルペプチドとして機能するという予測結果が得られた。一方、CTPP は液胞局在化シグナルである可能性が高い。植物細胞のペルオキシダーゼ (PRX) には、液胞型アイソザイムおよびアポプラスト型アイソザイムが存在する。前者は NTPP および CTPP を有する前駆体タンパク質として遺伝子にコードされているのに対して、後者の遺伝子は NTPP のみを有する (Hiraga et al., 2001)。

まず初めに、EGFP (enhanced green fluorescent protein) をレポーターとして、HRP C1a のプロペプチドが細胞内局在性において果たす役割を調べた。NTPP、CTPP を EGFP に融合した N-G-C、N-G および G-C をコードする遺伝子を作製し (Fig.1-2B)、それぞれをバイナリーベクター pMS (Fig. 1-2A) ヘサブクローニングし、CaMV 35S プロモーターの支配下に連結した。アグロバクテリウム法によって、タバコ培養細胞 BY2 (*Nicotiana tabacum* cv. BY2) に導入した。薬剤耐性で選抜した各 5 クローンからノザン解析によって 2 クローンずつ EGFP 遺伝子の mRNA を高蓄積するクローンを選抜し、液体培地に移した (Fig.1-3)。またコントロールとして、当研究室で用いられていた EGFP 導入 BY2 株を参照した。各クローンの細胞を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。プロペプチドを付加しない EGFP/BY2 では、核および細胞質に蛍光が観察された (Fig.1-4A)。N-G/BY2 では、核周辺の小胞体と思われる領域に蛍光が観察された (Fig.1-4E)。N-G-C/BY2 では小胞体および細胞の大部分を占める液胞に強い蛍光が観察され (Fig.1-4C)、単離した液胞中にも蛍光が観察された (Fig.1-5)。また抗 GFP 抗体を用いたウェスタン解析を行った結果、細胞画分に EGFP、N-G-C および N-G 導入 BY2 において EGFP の蓄積が認められ、培地画分では N-G 導入 BY2 においてのみ EGFP が検出された (データ非掲載)。CTPP のみを付加した G-C を導入した BY2 では、mRNA の蓄積は認められたが、EGFP 蛍光およびウェスタン解析による EGFP タンパク質の蓄積は認められなかった (データ非掲載)。以上の結果より、NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチド、CTPP は小胞輸送経路に入ったタンパク質を液胞へ局在化させるためのシグナルであることがわかった。

1.3.2 BY2 におけるプロペプチド欠失型 HRP C1a の発現

プロペプチドを欠失することによる、HRP C1a の局在の変化、酵素成熟に対する影響を調べるため、プロペプチドを欠失した HRP C1a 遺伝子を作製した (Fig. 1-2C)。N-C1a-C、N-C1a、C1a-C および mC1a をコードする遺伝子を CaMV 35S プロモーターにそれぞれ連結し、BY2 細胞へ導入した。カナマイシン耐性を有する各 4 クローンから、ノザン解析によって導入遺伝子の mRNA を高蓄積するクローンを選抜し (N-C1a-C #2, #3; N-C1a #2, #3; C1a-C #3, #4; mC1a #2, #3)、液体培地で継代培養を行った (Fig. 1-6A)。各クローンの細胞 (細胞壁を含む) 可溶性タンパク質を調製し (以後、細胞内画分と記述) 等電点電気泳動 (Isoelectric focusing, IEF) および 4-クロロ-1-ナフトールを用いた活性染色を行った。その結果、N-C1a-C および N-C1a 導入 BY2 において活性型 HRP C1a の蓄積が認められたが、C1a-C および mC1a 導入 BY2 では認められなかった (Fig. 1-6B)。N-C1a-C および N-C1a 導入細胞で見られた HRP C1a の等電点は天然の HRP C1a と同じ、 $pI = 7.8$ であった。

EGFP をレポーターとした局在解析の結果から、N-C1a-C は液胞、N-C1a は細胞外に存在することが予想された。液体培養を行った BY2 の細胞画分および培地画分からタンパク質サンプルを調製した。HRP C1a は硫酸アンモニウム 60% 飽和から 80% 飽和の間に沈殿することが知られているため (勝矢 修士論文 1996 年)、BY2 培養上清を用いてこの画分を調製し、培地画分とした。各サンプルを IEF に供した後、活性染色を行った。N-C1a 導入 BY2 においては細胞画分、培地画分の両方に HRP C1a が検出された。一方、N-C1a-C 導入 BY2 細胞では細胞画分に HRP C1a が検出されたが、培地中への分泌は確認されなかった (Fig. 1-7A,B)。次に、BY2 細胞からプロトプラストおよび液胞を調製し (Fig. 1-8A,B)、各画分のタンパク質を IEF で分離した後、化学発光による HRP C1a の検出を行った。N-C1a-C 発現 BY2 において、HRP C1a は液胞内に存在した (Fig. 1-8C)。一方、N-C1a 発現 BY2 では、プロトプラスト中に HRP C1a は存在しておらず (Fig. 1-8D)、Fig. 1-7 で細胞画分に検出された HRP C1a は細胞壁に存在すると考えられる。

これらの結果は、EGFP をレポーターとしたプロペプチドの機能解析結果と一致し、NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチドであり、CTPP は液胞局在化シグナルであることが裏付けられた。また、HRP C1a の酵素成熟 (活性化) において、シグナルペプチドにより小胞輸送経路へ送り込まれることが必要であることがわかった。

1.3.3 タバコ植物体におけるプロペプチド欠失型 HRP C1a の発現

N-C1a-C、N-C1a、C1a-C および mC1a をアグロバクテリウム法によりタバコ

植物体(*Nicotiana tabacum*, cv. SR1) に導入した。得られたカナマイシン耐性再生植物体の葉から可溶性タンパク質を調製し、IEF および 4-クロロ-1-ナフトールによる活性染色を行った。N-C1a-C および N-C1a 導入植物体では、活性を有する HRP C1a の蓄積が確認された(Fig. 1-9)。C1a-C および mC1a 導入植物体では、BY2 細胞を宿主とした場合と同様、mRNA は蓄積するものの、HRP C1a タンパク質を蓄積するクローンは得られなかった(データ非掲載)。次に、葉細胞における HRP C1a の局在解析を行った。各形質転換体の種を取得し、T0 世代において HRP C1a の蓄積が同程度であった N-C1a-C #10 および N-C1a #2 由来の T1 植物体の葉からアポプラスト液および細胞内液を調製した。その結果、HRP C1a は N-C1a-C 導入植物体では細胞内にのみ存在し、N-C1a 導入植物体では主にアポプラスト液中に存在していた(Fig.1-10)。また、形質転換体からプロトプラストおよび液胞を調製し(Fig. 1-11A,B)、解析を行った。BY2 細胞と同様、N-C1a-C 導入植物体において HRP C1a は液胞内に存在し、N-C1a 導入植物体ではプロトプラスト(細胞内)に HRP C1a はほとんど検出されなかった(Fig.1-11D)。

以上の結果から、BY2 と同様タバコ植物体においても NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチド、CTPP は液胞局在化シグナルとして機能し、HRP C1a が活性を有する酵素として存在するためには NTPP が必要であることがわかった。

1.3.4 異種タンパク質由来シグナルペプチドを用いた HRP C1a の分泌生産

NTPP は小胞体移行のためのシグナルペプチド(以後 SP と表記する)として機能することがわかり、また SP を欠く HRP C1a 遺伝子を発現した場合、活性型 HRP C1a の蓄積が認められなかった。そこで、SP であれば異種タンパク質由来のものでも機能し、活性型 HRP C1a の分泌を行うことができるかを検証した。BY2 細胞の培養液中に高分泌されているタンパク質、 β -D-glucan exohydrolase および 38 kDa peroxidase (Okushima et al., 2000)の SP を成熟型 HRP C1a の N 末端に融合した(Fig.1-1C)。C1aSP-C1a(=N-C1a)、 β DSP-C1a および 38kSP-C1a を CaMV 35S プロモーターに連結し、アグロバクテリウム法により BY2 細胞に導入した。得られたカナマイシン耐性カルスから可溶性タンパク質を調製し、IEF および 4-クロロ-1-ナフトールを用いた活性染色を行った。いずれのシグナルペプチドを用いた場合も HRP C1a を蓄積するクローンが得られた(データは示さない)。各 2 クローンを液体培地に移し、一週間ごとに継代培養を行った。BY2 の細胞および培地からタンパク質を調製し、IEF および化学発光による HRP C1a の検出を行った。3 種類のシグナルとも、細胞画分および培地に HRP C1a が検出された(Fig.1-12A)。また、 β DSP を用いた場合の HRP C1a の等電点は天然の HRP C1a と同じであったが、38kSP を用いた場合は少し塩基性にシフトしていた。

また、シグナルペプチド置換型 HRP C1a をタバコ植物体に導入した。鉢上げしたカナマイシン耐性再生固体の葉から可溶性タンパク質を調製し、IEF および 4-クロロ-1-ナフトールを用いた活性染色を行った。βDSP および 38kSP 両方において活性型 HRP C1a の蓄積が確認された(Fig. 1-12B)。38kSP を用いた場合、生産された HRP C1a の等電点は塩基性にシフトしており、BY2 を宿主とした場合と同じ等電気点であった。

以上の結果から、異種タンパク質由来のものであってもシグナルペプチドを N 末端に付加することで HRP C1a の生産が可能であることが示された。

1.3.5 翻訳エンハンサー ; *NtADH* 5'UTR を用いた HRP C1a の高生産

HRP C1a は有用タンパク質であるため、植物細胞における高生産を行うことは非常に魅力的なテーマである。また、HRP C1a の発現レベルを上昇させることで、CTPP による液胞輸送機構を調べるための有用な解析系が構築できると考えられる。そこで、当研究室において研究が進んでいる翻訳エンハンサーの利用により、HRP C1a 発現量を上昇させることを試みた。タバコアルコール脱水素酵素遺伝子の 5' 非翻訳領域 (*NtADH* 5'UTR) は翻訳エンハンサーとして機能し、安定的タバコ植物形質転換体において、レポータータンパク質;GUS の mRNA あたりのタンパク質生産量を 20 ~ 40 倍に上昇させる(Sato et al, 2004)。*NtADH* 5'UTR(91 bp) をシグナルペプチド置換型 HRP C1a 遺伝子の 5' 側に組み込んだ(Fig. 1-2C)。まず、BY2 細胞を宿主として *NtADH* 5'UTR の評価を行った。βDSP-C1a, *NtADH*-βDSP-C1a, 38kSP-C1a および *NtADH*-38kSP-C1a を CaMV 35S プロモーターに連結し、アグロバクテリウム法により BY2 に導入した。得られたカナマイシン耐性カルスから無作為に数クローンを選び、HRP C1a の蓄積量を測定した。その結果、βDSP, 38kSP のどちらを用いた場合も、*NtADH* 5'UTR を付加した場合の方が HRP C1a を高蓄積する傾向があった(Fig. 1-13A,B)。また、*NtADH* 5'UTR による効果が転写後レベルであるかを調べるため、β-D SP-C1a および *NtADH*-β-D SP-C1a の各 5 クローンについてノザン解析を行った(Fig. 1-15A)。*NtADH* 5'UTR を付加した場合は、HRP C1a タンパク質蓄積量は多いにもかかわらず、mRNA 蓄積量は少ない傾向にあった。また、バイオイメージアナライザー(BAS2500, Fuji Photo Film 社)を用いて mRNA 蓄積量を定量した。HRP C1a 活性および mRNA レベルを、βDSP-C1a #9 の値をもとに相対値で表し、mRNA あたりの HRP C1a 活性(Rel. HRP C1a/mRNA)を算出した。その結果、*NtADH* 5'UTR の付加によって mRNA あたりの HRP C1a 生産量は 3 ~ 14 倍上昇することが明らかになった(Table 1-2)。

また、形質転換タバコ植物体においても *NtADH* の効果を調べた。βDSP-C1a および *NtADH*-βDSP-C1a をアグロバクテリウム法によりタバコ植物体に導入

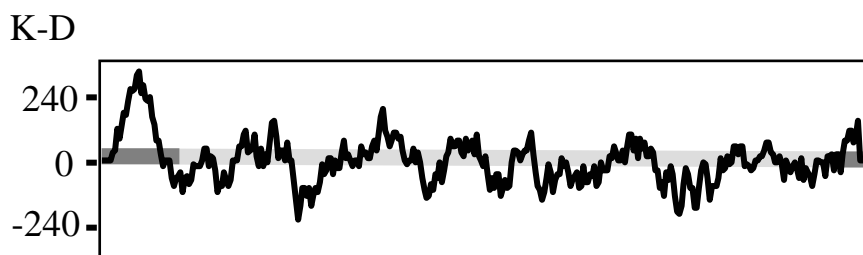
した。得られたカナマイシン耐性再生固体を鉢上げしてしばらく生育させた後、葉から可溶性タンパク質を調製し、IEF および 4-クロロ-1-ナフトールを用いて活性染色を行った(Fig. 1-14)。 *NtADH* 5'UTR を付加した方が HRP C1a を高蓄積する傾向が認められた。また、T0 植物から採取し種を蒔き、得られた T1 植物を用いてノザン解析(Fig. 1-15B) および HRP C1a の蓄積量の測定を行った。 *NtADH* 5'UTR を付加することで、mRNA あたりの HRP C1a 蓄積量が最大で9倍程度上昇することがわかった(Table 1-3)。

1.3.6 小胞体移行シグナルペプチドの種類は液胞輸送には影響を与えない

西洋ワサビおよびシロイヌナズナ PRX には CTPP を有するアイソザイムと持たないアイソザイムが存在する。それらのシグナルペプチド(NTPP) の配列を比較したところ、CTPP を有する PRX シグナルペプチドの N 末端部分には Ser 残基のクラスターが見られた(Table 1-4)。これらのことから、CTPP による液胞輸送とシグナルペプチドの構造に何らかの関係がある可能性が考えられた。そこで、アポラスト型の 38 kDa PRX のシグナルペプチド(38kSP)と CTPP を有する HRP C1a 遺伝子を作製し(Fig.1-2C)、液胞に HRP C1a が輸送されるかを調べた。等電点電気泳動および活性染色を行ってカナマイシン耐性カルスを選抜し、HRP C1a 発現クローンを液体培地に移した。生成した HRP C1a の等電点は、38kSP-C1a の場合と同じであり、天然のものより塩基性であった。BY2 細胞の培養上清および液胞サンプルを調製し、解析した。その結果、液胞への HRP C1a 輸送が確認された(Fig.1-17A)。また、細胞内および培地中の HRP C1a を定量した。 *NtADH* 5'UTR の利用により、濃縮操作を行わなくても培地中に分泌される微量の HRP C1a を検出することができた。その結果、N-C1a-C 導入 BY2 では 98% 以上、38kSP-C1a-C 導入 BY2 では 95% 以上の HRP C1a が細胞内に保持されることがわかった(データ非掲載)。これらの結果は、独立した 2 クローンの形質転換 BY2 において確かめられた。このことから、シグナルペプチド上の Ser クラスターは液胞輸送とは無関係であり、一旦小胞輸送経路に入りさえすれば CTPP は N 末端シグナルペプチドとは単独の機能により液胞輸送を仲介することがわかった。

A**NTPP (N-terminal propeptide)**

MHFSSSTLF TCITLIPLVC LILHASLSDA QLTPTFYDNS CPNVSNIVRD **Y** 50
 TIVNELRSDP RIAASILRLH FHDCFVNGCD ASILLDNTTS **Y** FRTEKDAFGN 100
 ANSARGFPVI DRMKAAVESA CPRTVSCADL LTIAAQQSVT LAGGPSWRVP 150
 LGRRDSLQAF LDLANANLPA PFFTLPQLKD SFRNVGLNRS **Y** SDLVALSGGH 200
 TFGKNQCRFI **Y** MDRLYNFSNT **Y** GLPDPTLNNT YLQTLRGLCP **Y** LNGNLSALVD 250
 FDLRTPTIFD NKYYVNLEEQ KGLIQSDQEL **Y** FSSPNATDTI **Y** PLVRSFANST 300
 QTFFNAFVEA MDRMGNITPL TGTQGQIRLN CRVVSNS **LL HDMVEVDFV SSM** 353

CTPP(C-terminal propeptide)**B****Fig. 1-1. HRP C1a is translated as preprotein containing propeptides at N- and C-termini.**

(A) Amino acid sequences of HRP C1a. N-terminal propeptide(NTPP) and C-terminal propeptide(CTPP) are written with boldface and underlined. N-linked glycans are attached to asparagine residues indicated by **Y** (Welinder, 1979).

(B) Hydropathy plots of HRP C1a precursor protein. The K-D plots were performed according to the method of Kyte and Doolittle (1982). Dark gray regions on the lateral bar represent NTPP and CTPP.

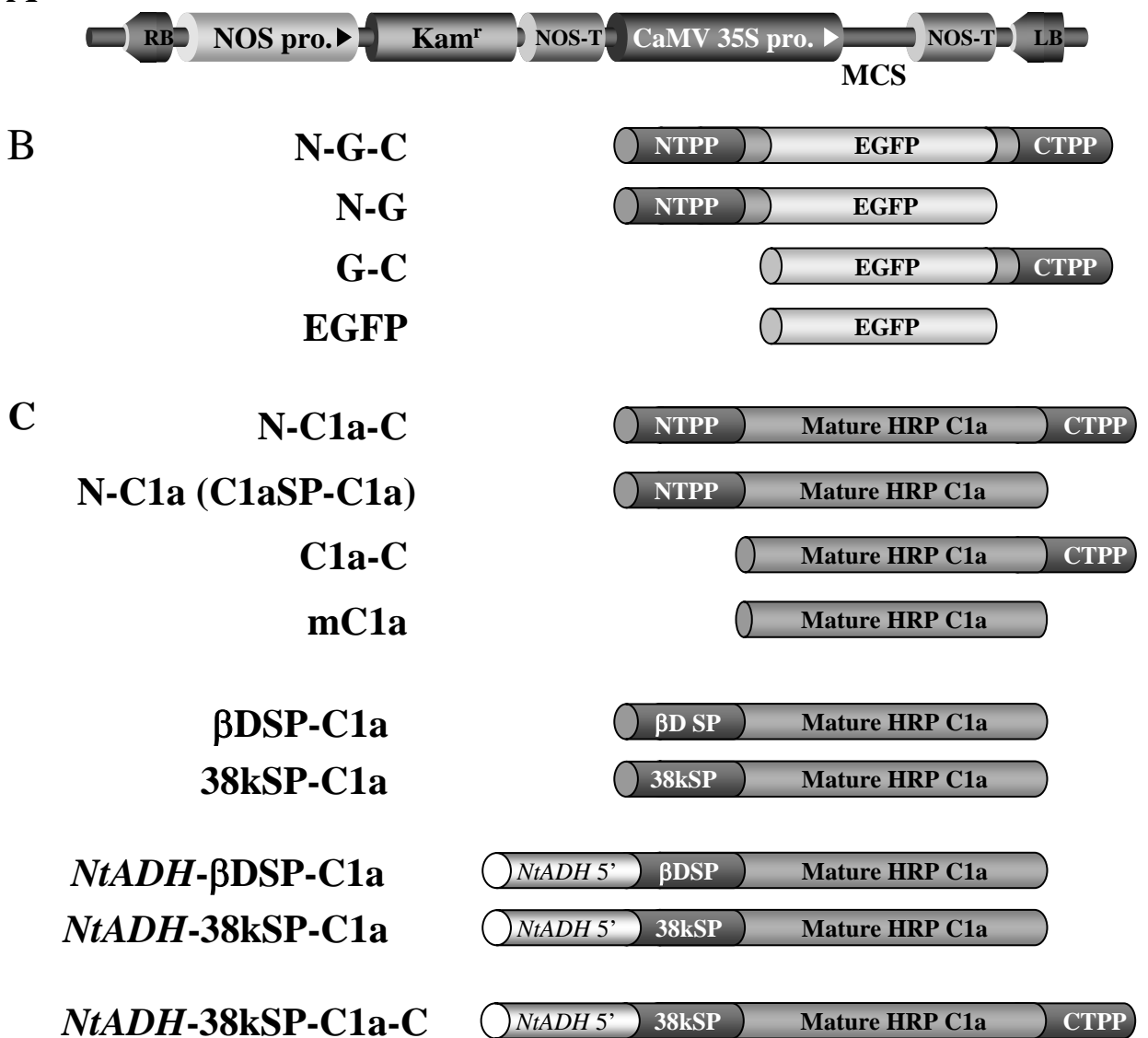


Fig. 1-2. Construction of various protein coding genes introduced into tobacco cells.

(A) Structure of the binary vector:pMS. NOS pro: promoter of *nopaline synthase* gene, Kam^r; kanamycin resistant gene(*neomycin-phosphotransferase*), NOS-T; transcription terminator of *nopaline synthase* gene, CaMV 35S pro.; promoter of cauliflower mosaic virus 35S RNA gene, MCS; multi cloning site

(B) N-G-C is a fusion protein of EGFP with an N-terminal attachment of 40 amino acid residues including NTPP and a C-terminal attachment of 26 amino acid residues including CTPP. N-G is a fusion protein of EGFP with only the N-terminal NTPP attachment. G-C is a fusion protein of EGFP with only the C-terminal CTPP attachment.

(C) N-C1a-C is the precursor protein of HRP C1a. N-C1a and C1a-C are modified precursor proteins made by the deletion of CTPP or NTPP, respectively. mC1a is the mature protein region of HRP C1a. Signal peptide(SP) derived from other proteins(β-D-glucan exohydrolase and 38 kDa peroxidase) are fused to the mature region of HRP C1a. The translational enhancer; *NtADH* 5'UTR was inserted upstream of βDSP-C1a, 38kSP-C1a and 38kSP-C1a-C.

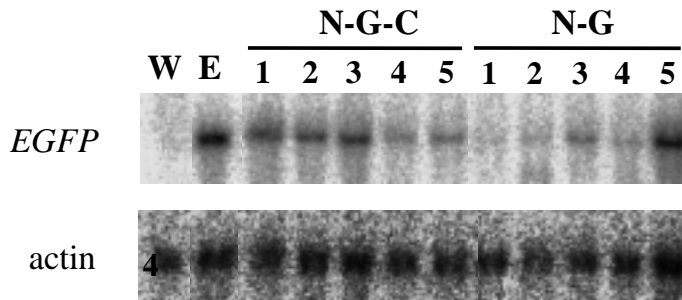


Fig. 1-3. Accumulation of mRNA of various EGFP genes in transgenic BY2 cells. mRNAs were prepared from nontransformed WT BY2 (W) and transgenic BY2 cells with genes encoding EGFP (E), NGC and NG. Gel blot made from 20 μ g of RNA was hybridized with 32 P-labeled DNA fragments of EGFP, with actin probe added as a loading control. 5 independent clones are analyzed.

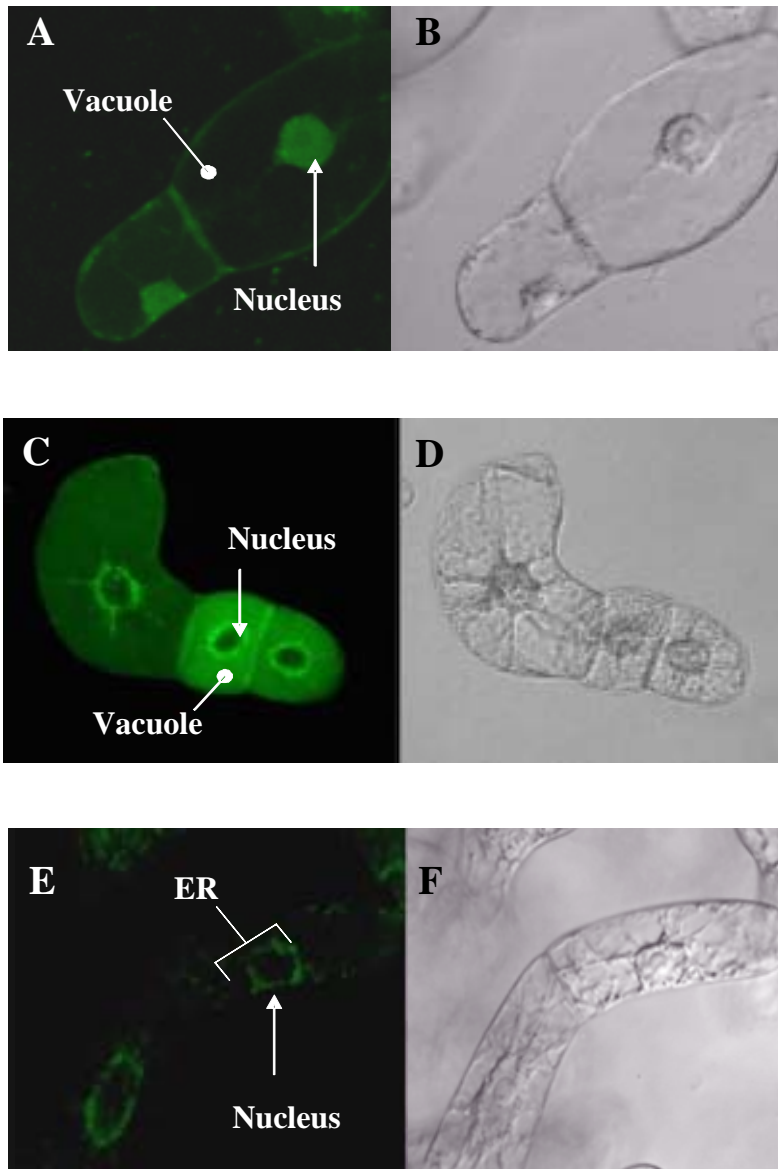


Fig. 1-4. Intracellular localization of EGFP in transgenic BY2 cells.

BY2 cells expressing EGFP (A and B), N-G-C (C and D), and N-G (E and F) were inspected by laser-scanning confocal microscopy (LSM510, Carl Zeiss). A, C, and E are fluorescence images, and B, D, and F are bright field images.

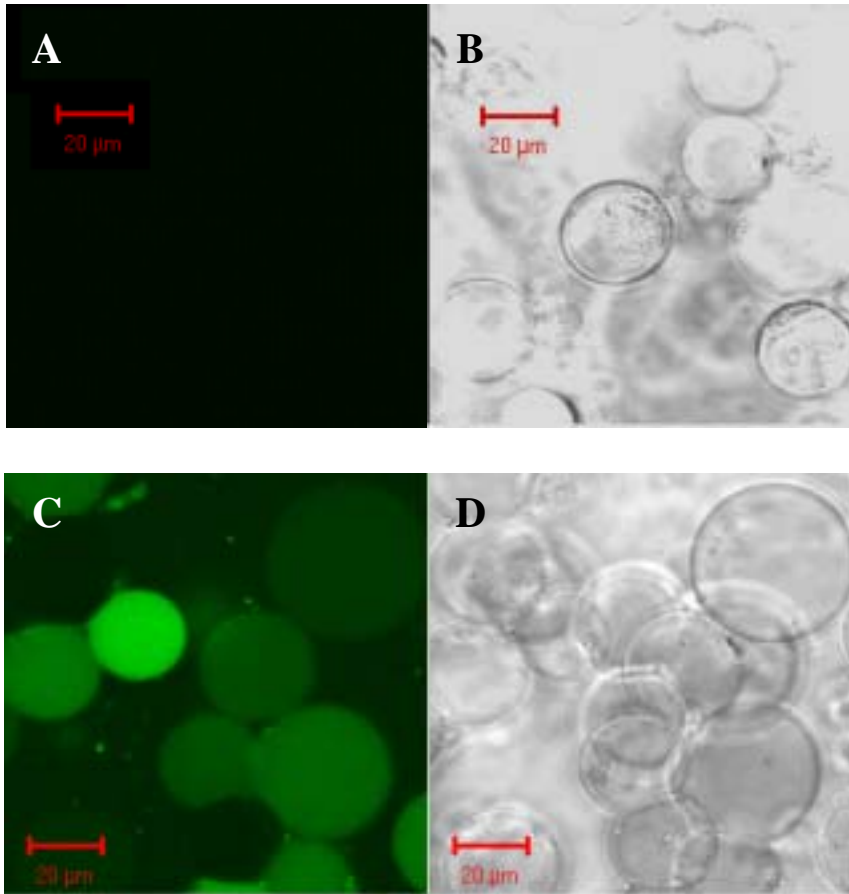


Fig. 1-5. Accumulation of EGFP in the vacuole of BY2 cells expressing N-G-C gene. Vacuoles were isolated from cells transformed with empty vector (A,B as negative control) or N-G-C gene (C,D) and inspected under laser-scanning confocal microscopy (LSM510, Carl Zeiss). A and C are fluorescence images, and B and D are bright field images.

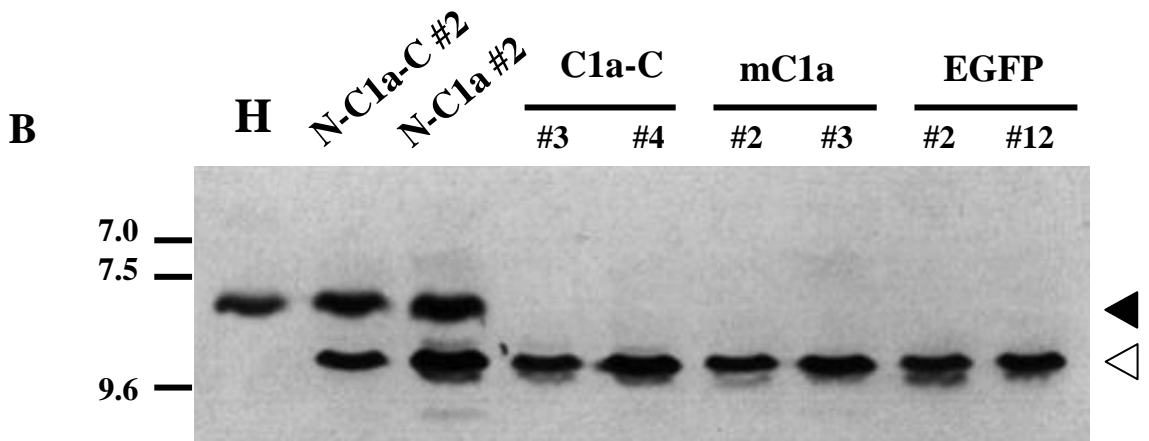
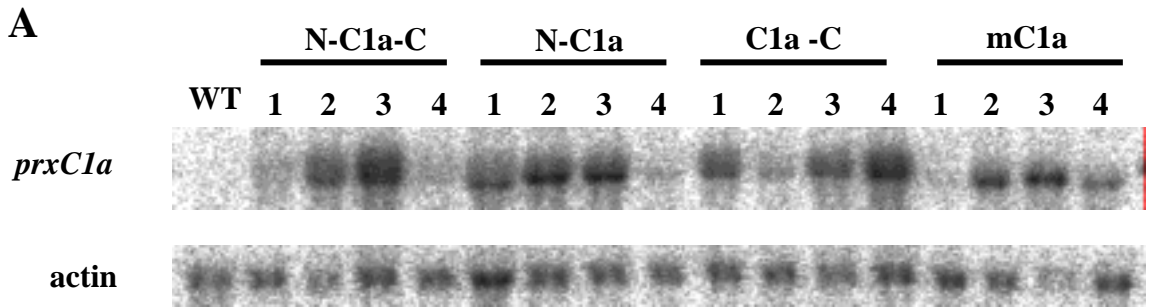


Fig. 1-6. Expression of modified HRP C1a genes in transgenic BY2 cells.

(A) Accumulation of HRP C1a precursor and HRP C1a-derivative mRNA. RNAs were prepared from four independent clones of transgenic BY2 cells harboring each transgene. 20 μ g of RNA was charged in each lane, electrophoresed, and hybridized with 32 P-labeled *prxC1a* DNA fragments. Actin is included as a loading control.

(B) Accumulation of active HRP C1a proteins.

Total soluble proteins(4 μ g) were prepared from BY2 cells and subjected to IEF and subsequent activity staining for peroxidase with 4-chloro-1-naphthol. Solid and open arrowhead indicate the HRP C1a and endogenous tobacco peroxidase, respectively.

H:HRP C1a (SIGMA, Type I)

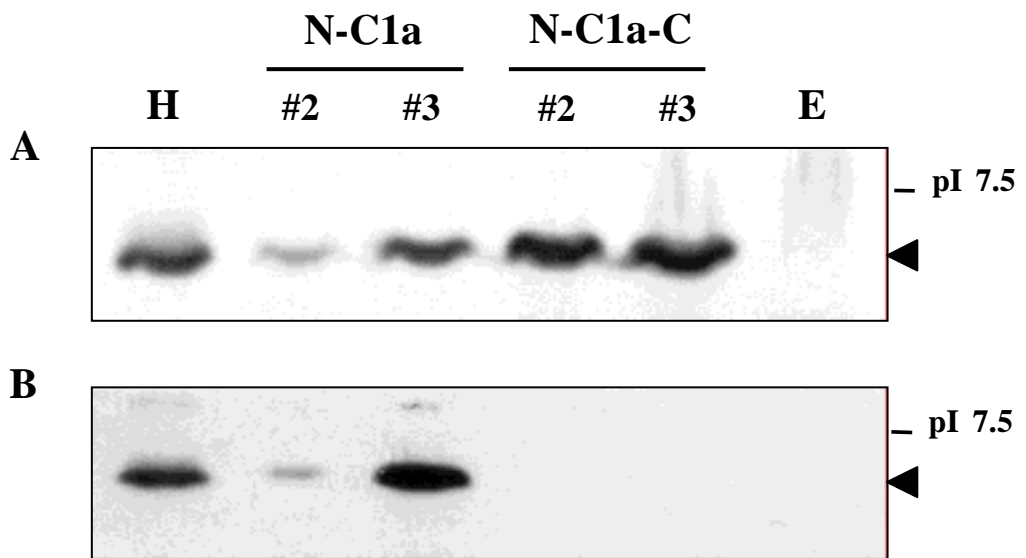


Fig. 1-7. Analysis of cellular and culture medium fractions by activity staining for peroxidase.

Protein samples prepared from cells (2 µg, A) or culture medium (0.04 µg, B). Proteins were analyzed by isoelectric focusing and activity staining with 4-chloro-1-naphthol. The clone numbers listed correspond to those from Fig. 1-6A. Commercial HRP C (Type I, SIGMA) was loaded in lane H. Solid triangle indicates HRP C1a.

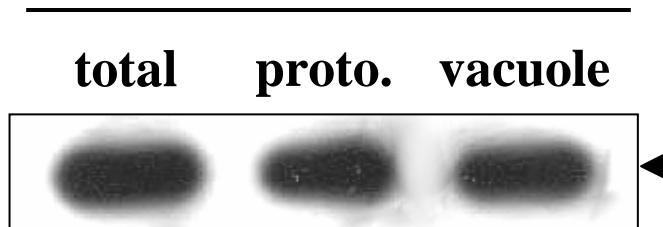
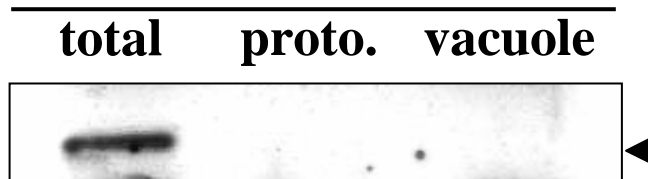
A**B****C****N-C1a-C****D****N-C1a**

Fig. 1-8. Vacuole isolation from transgenic BY2 cells.

Protoplasts(A) and vacuoles(B) were prepared from BY2 cells expressing N-C1a-C or N-C1a. Soluble proteins from each fraction were separated by isoelectric focussing. HRP C1a was detected with ECL detection system. Solid triangle indicates HRP C1a.

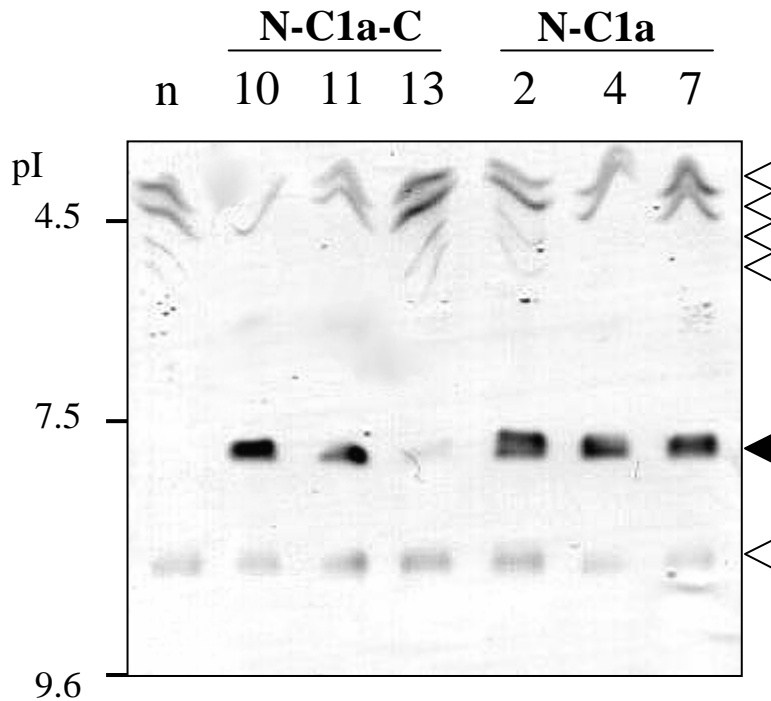


Fig. 1-9. Expression of N-HRP C1a-C and N-HRP C1a in transgenic tobacco leaves.

Protein samples were prepared from kanamycin resistant T0 plants and subjected to isoelectric focusing and subsequent activity staining for peroxidase with 4-chloro-1-naphthol . The clone number is indicated above each lane. n; plants for negative control transformed with the empty vector. Solid and open arrowhead indicate the HRP C1a and endogenous peroxidase, respectively.

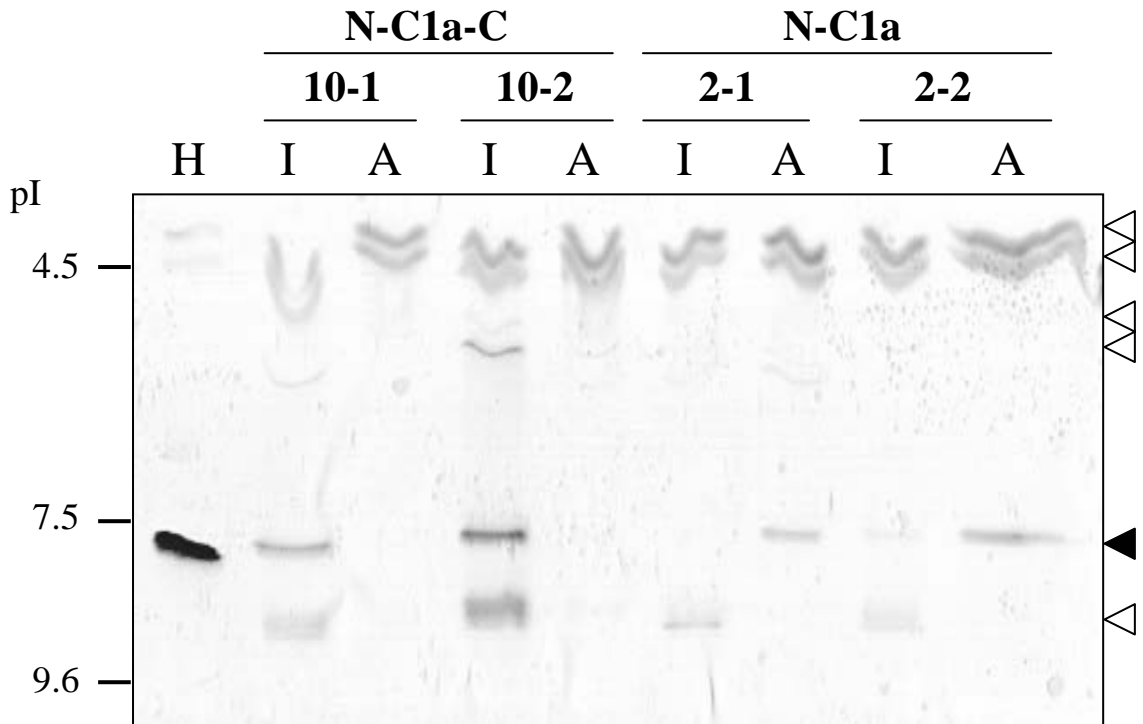


Fig. 1-10. Analyses of peroxidases in intracellular and apoplast fractions.

Two progeny plants of over-expressor in Fig. 1-9 (#10 of N-HRP C1a-C and #2 of N-HRP C1a) are used for the localization analysis. Intracellular protein samples(I) and apoplast protein samples(A) were loaded in each lane. Solid and open arrowhead indicate the HRP C1a and endogenous peroxidase isoenzymes, respectively. H; HRP C1a as a positive control (Type I, SIGMA)

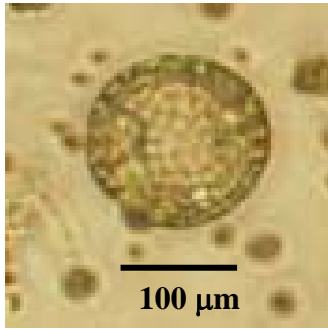
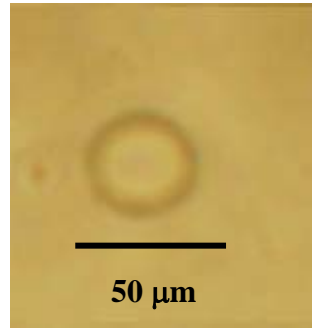
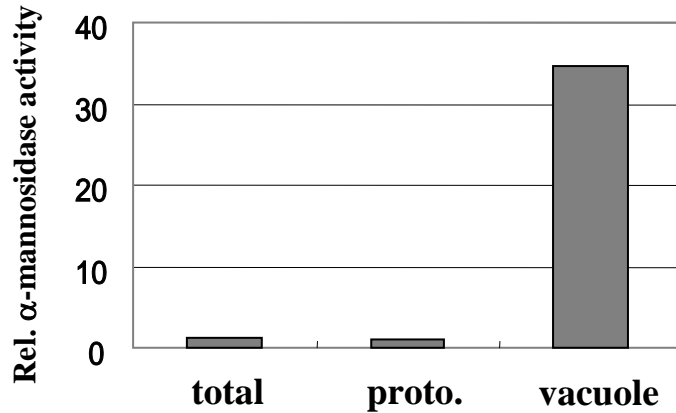
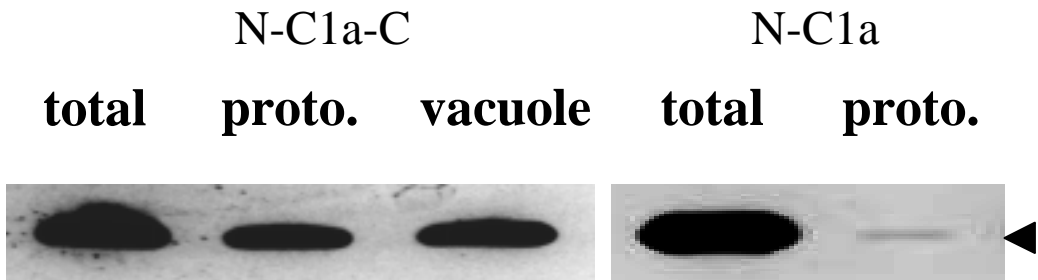
A**B****C****D**

Fig. 1-11. Analysis of peroxidases in protoplast and vacuole.

(A) Protoplasts were isolated from leaves of transgenic tobacco plants.

(B) Vacuoles were prepared from protoplasts by ultracentrifugation.

(C) Vacuole marker enzyme, α -mannosidase activity was measured. Relative specific activity to the activity of total cellular fraction is shown.

(D) Soluble proteins from each fraction were separated by isoelectric focussing.

HRP C1a was detected with ECL detection system.

Solid triangle indicates HRP C1a.

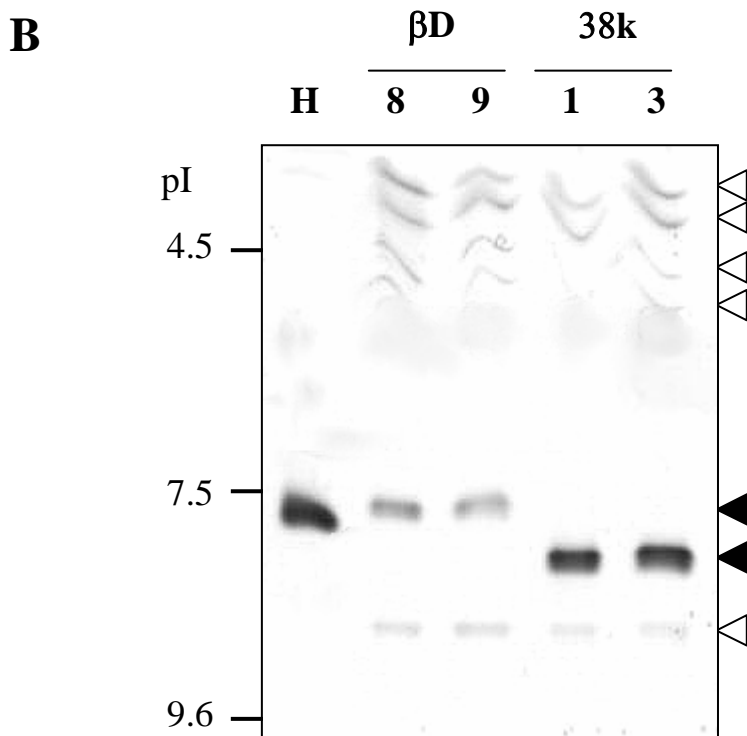
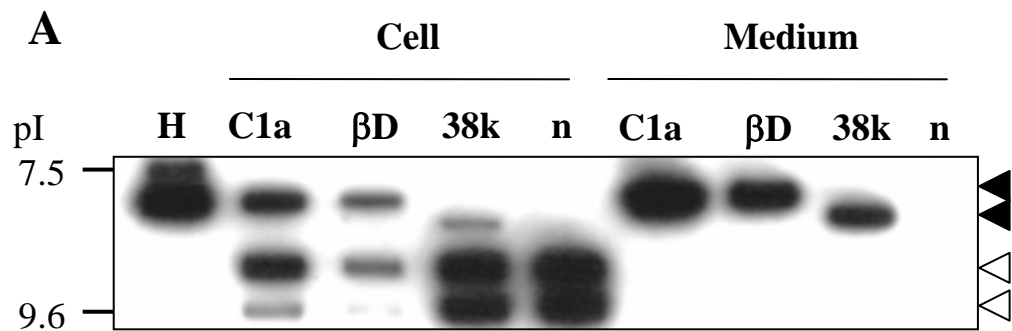


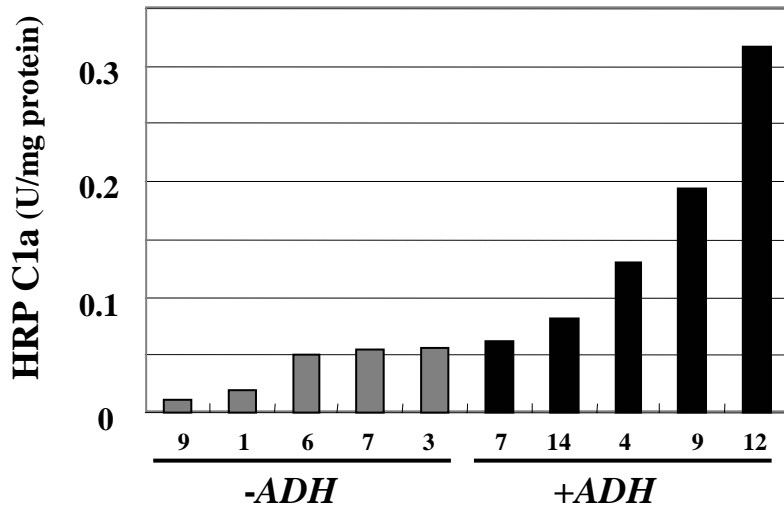
Fig. 1-12. Production of HRP C1a with signal peptides derived from other secretory proteins.

(A) HRP C1a was expressed with foreign signal peptides in tobacco cultured cells. Protein samples were prepared from cells or culture medium of each transformant. After isoelectric focusing, peroxidases were detected with ECL system. C1a; C1aSP-C1a, which is the same as N-C1a, β D; β DSP-HRP C1a, 38k; 38kSP-HRP C1a, n; plants for negative control expressing EGFP.

(B) HRP C1a was expressed with foreign signal peptides in tobacco plants. Protein samples were prepared from leaves of each transgenic plants. After isoelectric focusing, peroxidase was detected with 4-chloro-1-naphthol.

Filled triangles and open triangles represent HRP C1a and endogenous peroxidase isozymes, respectively. HRP C1a (Type IV, Sigma) was loaded as a positive control in lane H.

A



B

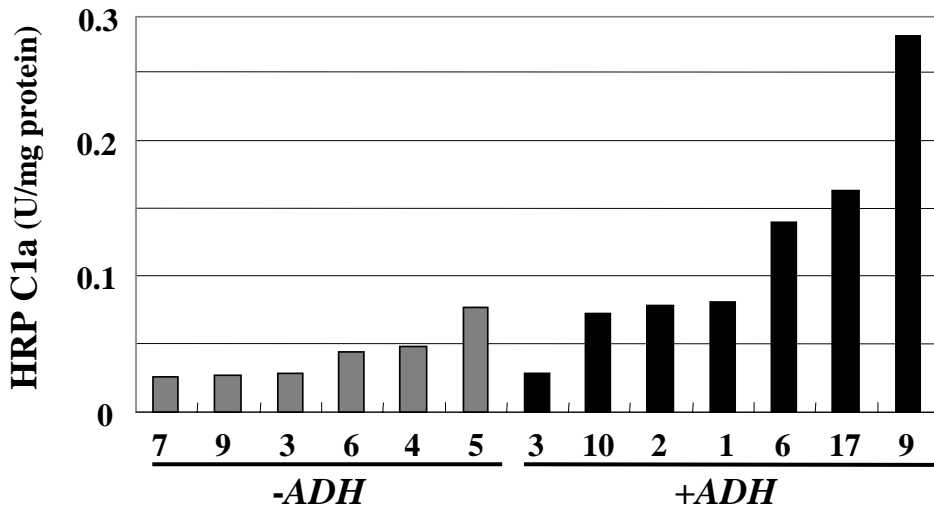


Fig. 1-13. Use of *NtADH* 5'UTR for the production of HRP C1a in BY2 cells.

HRP C1a genes with or without *NtADH* 5' UTR was introduced into nuclear genome. Two type of signal peptides were used, β DSP (A) or 38kSP (B). The HRP C1a activity of randomly selected kanamycin-resistant calluses was measured. The clone number is shown below each bar.

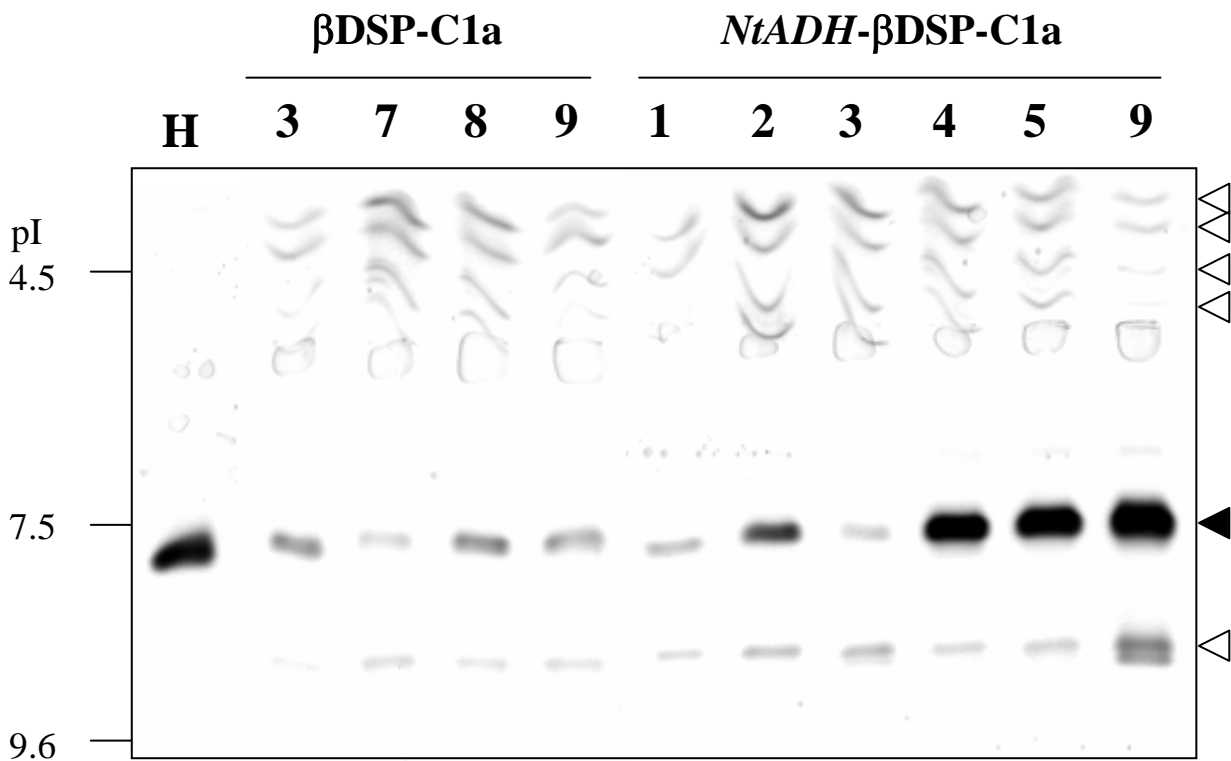


Fig. 1-14. Use of *NtADH* 5'UTR for the production of HRP C1a in tobacco leaves. Proteins prepared from leaves of primary transformants (T0) were separated by isoelectric focusing. IEF gels were stained for peroxidase activity with 4-chloro-1-naphthol. Filled triangle and open triangles represent HRP C1a and endogenous peroxidase isozymes, respectively. The clone number is shown above each lane. HRP C1a (Type I, Sigma) is loaded in lane H as a positive control.

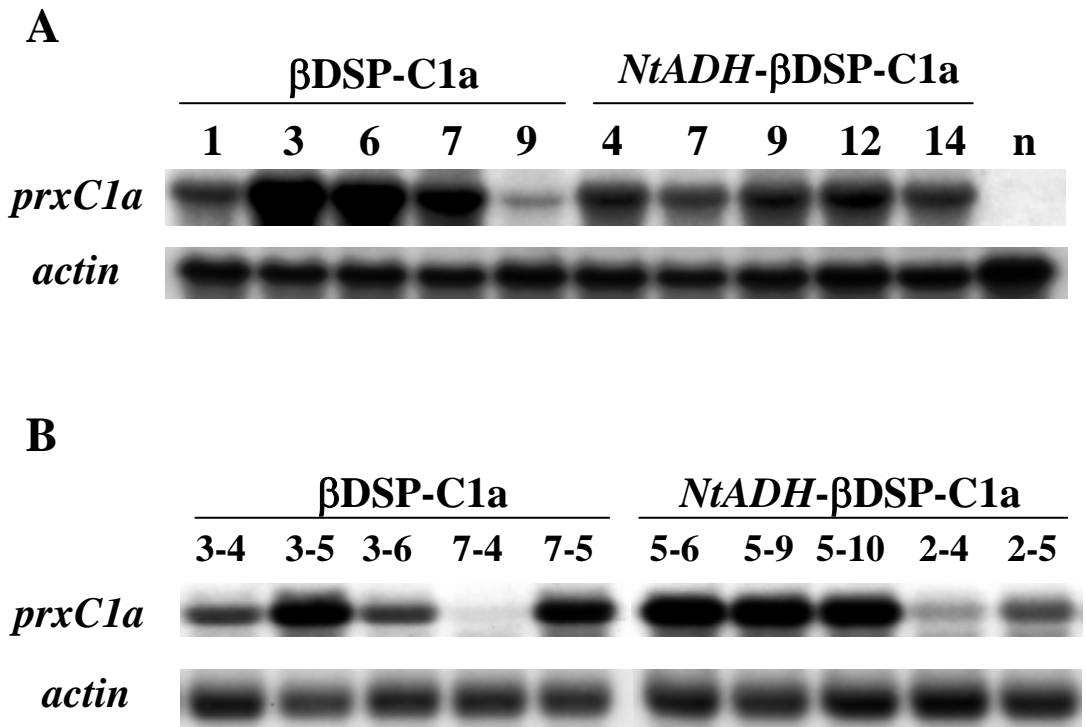


Fig. 1-15. RNA gel blot analysis of peroxidase in BY2 cells and tobacco plants. Total RNAs were extracted from transgenic BY2 cells (A) or leaves of transgenic tobacco plants(B). Northern blot with 20 μ g of total RNA loaded per lane was hybridized with a *prxC1a* probe or *Actin* gene probe as an internal control. Each clone number is shown above the lane.

Table 1-2. Effect of the *NtADH* 5'-UTR on translational efficiency in BY2 cells.

	β DSP-C1a					<i>NtADH</i> - β DSP-C1a				
	1	3	6	7	9	4	7	9	12	14
HRP C1a activity (U/mg protein)	0.020	0.056	0.050	0.054	0.011	0.13	0.062	0.20	0.32	0.081
Rel. HRP C1a activity	1.8	5.1	4.5	4.9	1	12	5.6	18	28	7.3
Rel. mRNA level	1.8	7.3	6.3	4.4	1	2.2	1.9	2.3	2.0	2.0
Rel. HRP C1a/mRNA	1.0	0.7	0.7	1.1	1	5.2	2.9	7.7	14	3.7

HRP C1a activity (U/mg protein) was measured in transgenic BY2 cells. Relative HRP C1a activities and relative mRNA levels were calculated based on the value of β DSP-C1a #9. Relative HRP C1a/mRNA was calculated as the ratio of relative HRP C1a activity to relative mRNA level.

Table 1-3. Effect of the *NtADH* 5'-UTR on translational efficiency in leaves of tobacco plants.

	β DSP-C1a					<i>NtADH</i> - β DSP-C1a				
	3-4	3-5	3-6	7-4	7-5	5-6	5-9	5-10	2-4	2-5
HRP C1a activity (U/mg protein)	0.83	2.1	0.67	0.43	4.1	16	23	14	2.0	2.0
Rel. HRP C1a activity	0.4	1	0.3	0.2	1.9	7.8	11	6.4	0.9	1.0
Rel. mRNA level	0.5	1	0.5	0.3	0.8	1.5	1.2	1.2	0.5	0.6
Rel. HRP C1a/mRNA	0.8	1	0.7	0.7	2.3	5.1	9.3	5.6	1.9	1.6

HRP C1a activity (U/g protein) was measured in transgenic tobacco plants. Relative HRP C1a activities and relative mRNA levels were calculated based on the value of β DSP-C1a #9. Relative HRP C1a/mRNA was calculated as the ratio of relative HRP C1a activity to relative mRNA level.

Table 1-4 Amino acid sequences of N-terminal signal peptides of PRXs.

PRX	Signal peptide	CTPP
HRP C1a	MHF SSSS TLFTCITLIPLVCLILHAS LS SDA	+
HRP C2	MH SSSS LIKLGFLLLLLLN VS LSHA	+
HRP N	MKTQTKVMGGHVLLTVFTLCMLC S AVRA	-
ARP Ca	MQF SSSS ITS S FTWTVLITVGCMLC S AF S SDA	+
ARP Cb	MHF SSSS T SS TWTILITLGCLMLHAS LS SAA	+
ARP Ea	MGF S PS F S C SAIGALILGCLLLQ S NSNA	+
ATP N	MKTQTKVMGGHVLLTVFTLCMLC S GVRA	-
ATP 1a	MGGKGVMMVAILFLWAL S AT S EAVTE	-
ATP 2a	MANAKPFCLLGFFCLLLQLF S IFHIGNG	-
ATP 3a	MGRGYNLLFVLVTFVLVVAVTAQGNRG S NSGGG	-
ATP 5a	MDHKM S MYLFV S YLAIFTLFFKGFV S SFP S SGYN	-
ATP 6a	MAK S LNILIAAL S LIAF S PFCLC S KAYG S GG	-
ATP 7a	MTQLNIAVVVVVTVLIGMLR S SEA	-
ATP 8a	MEKNT S QTIF S NFFLLLLL S SCV S A	-
ATP 10a	MARF S LVVVVTL S LAI S MFPD T TTA	-
ATP 11a	MAIKNILALVVLL S VVGV S VVAIP	-
ATP 12a	MAA S KRLVV S CLFLVLLFAQAN S Q S Q	-
ATP 13a	MMKGAKF S SLLVLF S FIFPIAFA	-
38 kDa PRX	MRTAQLLLL S FLVFL S IVVCGV S GAG	-

Signal peptides of horseradish (HRPs), *Arabidopsis*(ARPs and ATPs) and tobacco(38 kDa) peroxidases are listed. Ser residues are written in bold face. Presence(+) or absence (-) of the CTPP in each PRX isozyme is also indicated in the third column.

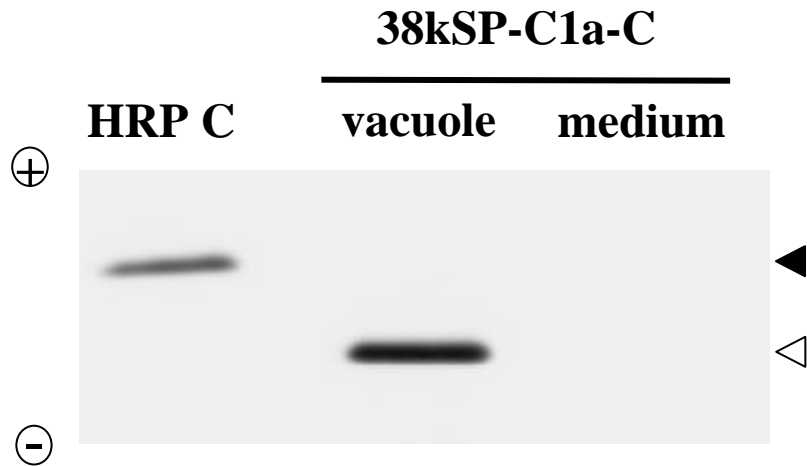


Fig.1-17. CTPP mediates vacuolar sorting independent of the type of signal peptide at N-terminus.

Transformants screened by IEF and subsequent activity staining for PRX were transferred to liquid culture. Samples were prepared from medium and vacuole of BY2 expressing 38kSP-C1a-C and analyzed. Solid arrowhead indicates HRP C1a(Type IV, Sigma) and open arrowhead indicates HRP C1a with higher pI value produced by BY2 transformant.

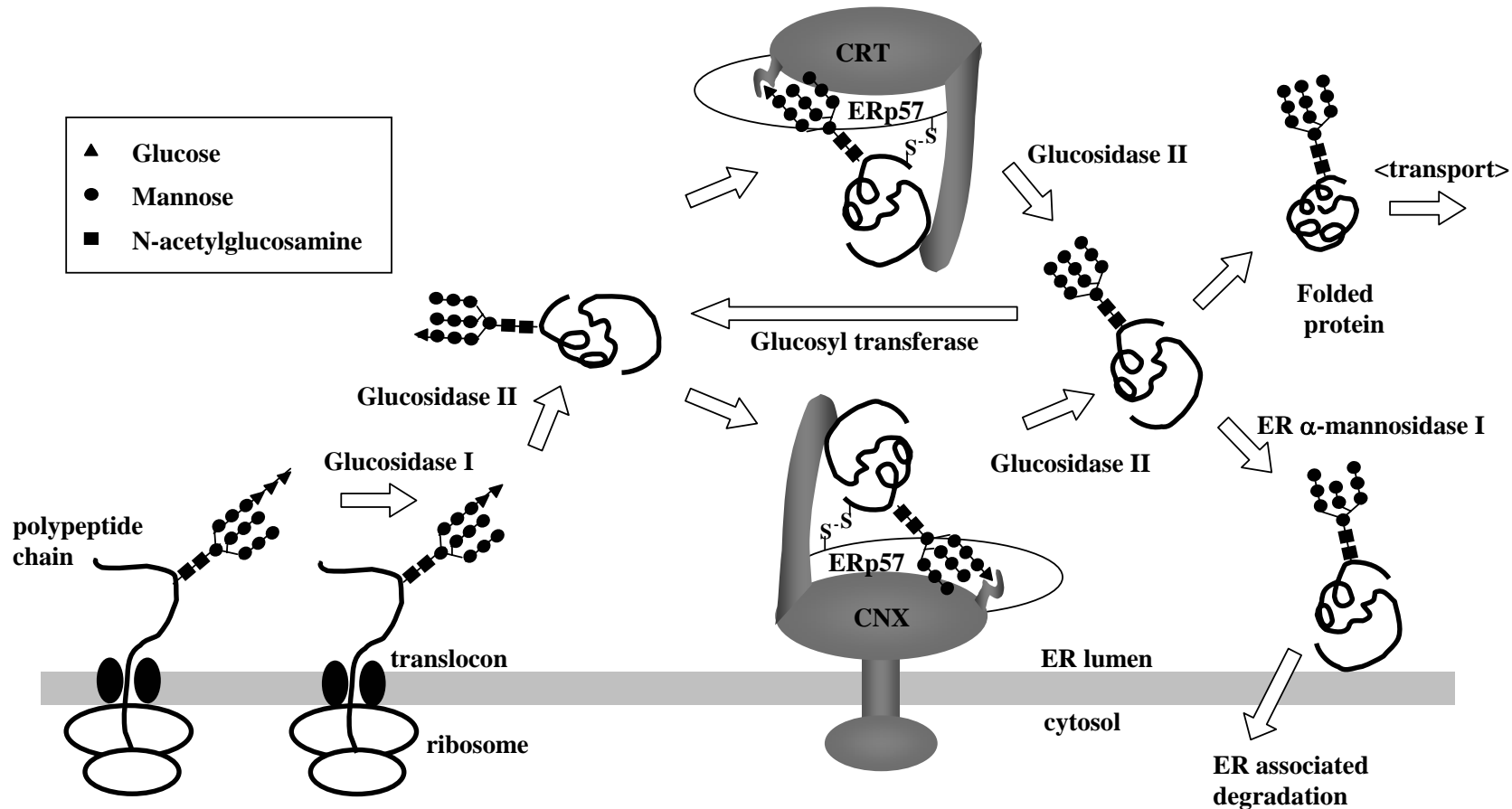


Fig. 1-18 The calnexin-calreticulin cycle in mammalian cells.

When two of the glucoses in the N-linked core glycans have been trimmed away by glucosidases I and II, the nascent or newly synthesized glycoproteins bind to calnexin (CNX) and/or calreticulin (CRT), two homologous ER lectins specific for monoglucosylated core oligosaccharides. The protein is thereby exposed to another folding factor, ERp57, a thiol oxidoreductase that binds to both CNX and CRT. If the glycoproteins have cysteines, the formation of disulfide bonds is catalyzed through the formation of transient S-S bonds with ERp57. When remaining third glucose residue is trimmed by glucosidase II, the complex dissociates. If the glycoprotein is not folded at this time, the oligosaccharides are reglucosylated by glucosyl transferase, and the protein reassociates with lectins. The cycle is repeated until the protein is either folded or degraded. ER α -mannosidase removes single α -1,2-linked mannose residue. Resulting Man8 structure serves as the signal needed for ERAD.

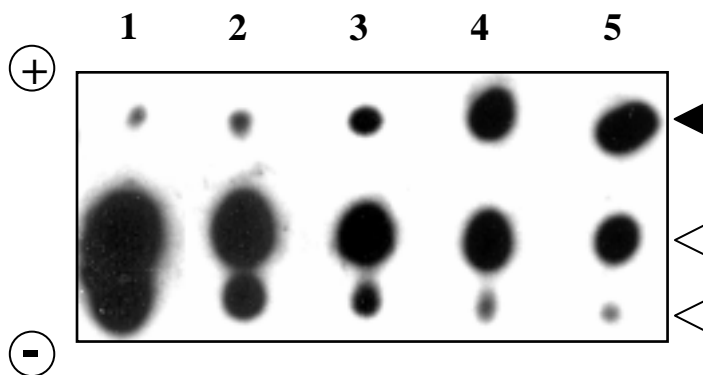


Fig. 1-19. The level of endogenous PRXs negatively correlates with the level of HRP C1a accumulation.

BY2 transformants with β DSP-C1a gene were analyzed by IEF and ECL detection. 5 clones are arranged in the order corresponding to the level of HRP C1a accumulation. Solid and open arrowhead indicate the HRP C1a and endogenous peroxidase isoenzymes, respectively. The direction of the electrodes are indicated by + and - .

1.4 考察

1.4.1 HRP C1a 生産における小胞輸送経路の重要性

植物体 PRX にはアポプラスト型アイソザイムおよび液胞型アイソザイムが存在する(Hiraga et al., 2001)。どちらに局在化する場合も、PRX は一旦小胞体内腔にとりこまれ、小胞輸送により目的地へ輸送されると考えられている。アポプラスト型および液胞型 PRX 遺伝子の推定アミノ酸配列には、いずれも N 末端に疎水性のアミノ酸領域が存在し、いわゆるシグナルペプチドの役割を果たすと予想される。本研究では、HRP C1a の NTPP がシグナルペプチドとしての機能を有することを明らかにした。シグナルペプチドは細胞質において受容体と結合し、翻訳複合体が粗面小胞体に移行する(reviewed by Nicchitta, 2002)。ペプチド鎖は翻訳伸長反応に伴って、トランスロコンから小胞体内腔にとりこまれ、フォールディングが行われる。また、シグナルペプチドは HRP C1a の酵素成熟において非常に重要な役割を果たすことが明らかになった。NTPP を欠失した C1a-C および mC1a を導入した BY2 においては活性を有する酵素として生成しない(Fig. 1-6B)。またウェスタン解析の結果、HRP C1a タンパク質の蓄積が認められなかった(データ非掲載)。細胞質において合成された HRP C1a タンパク質が、フォールディングがうまくいかないために分解を受けたと考えている。一方で、異種タンパク質由来のシグナルペプチドを成熟酵素領域の N 末端に融合した場合に活性型 HRP C1a が生産された(Fig.1-12A,B)。シグナルペプチドを用いて小胞輸送経路に送り込むことで活性型 HRP C1a の生産が可能であることは、昆虫、酵母、ほ乳類細胞などの他の真核生物を宿主とした発現系においても報告されている(Hartmann and Ortiz, 1992; Morawski et al., 2000; Greco et al., 2000)。また類似した現象が原核生物である大腸菌でも観察されている。当研究室において *prxC1a* 遺伝子が単離された際、大腸菌による HRP C1a の大量生産が試みられた。しかし HRP C1a は不溶化してインクルージョンボディーを形成し、活性を有する酵素は得られなかった(藤山和仁 博士論文、1990)。一方で、大腸菌においてもペリプラズムへの移行のためのシグナルペプチドを融合することで、活性型 HRP C1a が得られることが報告されている(Lin et al., 1999)。これは、ペリプラズムに存在する protein disulfide isomerase (PDI) によって S-S 結合形成が促進された結果であると考えられている。

HRP C1a は 1 分子あたり 8 個の N-結合型糖鎖、4 箇所の分子内ジスルフィド結合、2 分子のカルシウムおよび 1 分子のヘムを含み(Welinder, 1979)、タンパク質の機能発現のためには非常に複雑な翻訳後修飾が必要である。真核生物の小胞体にはシャペロ

ンタンパク質(BiP、PDI、カルネキシンやカルレティキュリン等)が存在し、タンパク質のフォールディングおよび活性化を促進する。PDI は HRP C1a のジスルフィド結合の形成において重要であると考えられる。また、ほ乳類細胞のミエロペルオキシダーゼやチロペルオキシダーゼは、小胞体においてカルレティキュリン(calreticulin; CRT)とカルネキシン(calnexin; CNX)の働きによりヘムを付加されることが知られており(Fayadat et al., 1999; Arnljots and Olsson, 1987; Nauseef et al., 1995)、植物 PRX へのヘム導入にもこれらシャペロンが関与することが予想される。さらに、小胞体において付加される N-結合型糖鎖も HRP C1a の活性化において重要であると考えられる。翻訳中のペプチド鎖に Asn-X-Ser/Thr (X はプロリンとアスパラギン酸以外のアミノ酸)という一次配列が存在すると、アスパラギンに糖鎖が付加される(Kornfeld, 1985)。分泌タンパク質の N-結合型糖鎖には様々な役割があると考えられている。糖鎖は大きな構造物であるため、プロテアーゼの接近を阻み、タンパク質の安定性を高める。また、糖鎖がタンパク質の活性(酵素活性等)に関与するという例もあるが、これは HRP C1a には当てはまらない。西洋ワサビから精製した HRP C1a から糖鎖を除去しても酵素活性の低下は見られない(Tams and Welinder, 1998)。一方で、糖鎖を除去した HRP C1a は熱安定性が低下することが報告されており(Tams and Welinder, 1998)、親水性の糖鎖がタンパク質表面を覆うことで、HRP C1a の立体構造が熱力学的に安定化されると考えられる。

N-結合型糖鎖は完成後のタンパク質の安定性を高めるだけでなく、タンパク質のフォールディング段階でも重要な役割を担う。近年、ほ乳類細胞の研究から、CNX-CRT サイクルと呼ばれる反応により糖タンパク質の品質管理が行われていることが示された(Fig. 1-18)。CNX は小胞体ルーメンの、CRT は小胞体膜のタンパク質である。両者とも糖鎖に結合するレクチン活性を持ち、糖タンパク質のフォールディングを助けるシャペロンとして働く(Helenius *et al.*, 2001)。小胞体において最初に付加されるのは、Glc3Man9GlcNAc2 という構造の、前駆体糖鎖であるが、小胞体内腔に存在する glucosidase により末端のグルコース 2 分子が切除される。Glc1Man9GlcNAc2 という糖鎖構造を持つタンパク質は CNX もしくは CRT と結合する。CNX および CRT は、ジスルフィドイソメラーゼである ERp57 というタンパク質と協調してジスルフィド結合を生成し、タンパク質のフォールディング反応を促進する。CNX/CRT と解離したタンパク質の糖鎖は、さらにグルコースが切除され(Glc0)Man9GlcNAc2 構造になる。糖タンパク質が正常なコンフォメーションをとっていれば、ER を出て下流の輸送経路へと送られるが、正常でなければ glucosyl transferase によりグルコースが 1 分子付

加され、再び Glc1Man9GlcNAc2 構造をもつ。これにより再び CNX/CRT と結合し、フォールディングが試みられる。このような CNX-CRT サイクルによりフォールディングの確実性が高められるが、それでも折り畳まれないタンパク質は ER-associated degradation (ERAD)によって細胞質に運び出され分解される(Plempner *et al.*, 1999)。また、ERAD の誘導に側鎖のマンノースが関与すると言われている(Su, 1993)。ER α -mannosidase I によりマンノースの切除が行われ、Glc0-3Man8GlcNAc2 という構造の糖鎖ができるが、Man8 構造が ERAD 誘導に必要なシグナルになる。ER α -mannosidase I は比較的ゆっくり作用するため、新規合成された糖タンパク質がフォールディングされるための時間的猶予が与えられるが、長時間経過してもうまくフォールディングされないタンパク質は Man8 構造(分解シグナル)を提示することになり、ERAD により分解される(Helenius *et al.*, 1994)。

HRP C1a 以外にも、有用外来タンパク質(有用酵素、抗体、ワクチン等)を植物の小胞輸送経路に送りこむことで、生産性が向上した例がある。ヒト由来ラクトアルブミンや(1,3-1,4)- β -グルカナーゼ、ワクチンとしてのコレラ毒素Bサブユニットや一本鎖抗体を発現させた研究では、目的タンパク質にシグナルペプチドを付加し小胞輸送経路に送り込むことによって、細胞質に蓄積させた場合よりもタンパク質蓄積量が増加することが報告されている(Takase and Hagiwara, 1998; Horvath *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Fiedler and Conrad, 1995)。また、付加するシグナルペプチドの違いとタンパク質生産の関係を調べた研究として、原核生物由来のシグナルペプチドよりも、植物由来のシグナルを用いた方が、植物細胞におけるタンパク質生産量が上昇することが報告されている(Lund and Dunsmuir, 1992; Fecker *et al.*, 1996)。一方で、抗体生産を行う場合など、ほ乳類由来のシグナルペプチドをそのまま使用することがあるが、植物細胞においてもほ乳類タンパク質のシグナルペプチドが機能することも報告されている(Schouten *et al.*, 1996; Vaquero *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 1995)。真核生物由来のシグナルペプチドは種を超えても比較的機能を発揮する可能性もある。

1.4.2 翻訳エンハンサーの効果について

植物細胞において外来遺伝子を発現させる場合、翻訳量効率の調節も重要になる。代謝経路の改変のために酵素遺伝子を導入する場合、大きな代謝攪乱が起こらないように翻訳量を抑える必要があり、また組み換えタンパク質の大量生産を行う場合などは翻訳効率を最大限上昇されることが必要である。植物細胞において翻訳エンハンサーとして機能するエレメントがいくつか報告されている。Gallie ら(1987)はタバコ

モザイクウイルス由来の 5'UTR (Ω 配列)が、タバコ葉肉細胞プロトプラスト、アフリカツメガエル卵母細胞および大腸菌においてレポーター遺伝子の翻訳エンハンサーとして機能することを示した。また、 Ω 配列による翻訳上昇には mRNA 中の 5'キャップ構造が必要でないことが示されている。またタバコ植物およびイネにおいて、一過的遺伝子発現と安定的形質転換体のどちらでも、 Ω 配列が翻訳エンハンサーとして機能することが報告されている(Mitsuhara et al., 1996)。植物細胞において翻訳エンハンサーとして機能する 5'UTR は、ウイルス由来の配列がほとんどであるが、植物遺伝子の 5'UTR が翻訳エンハンサーとして機能するという報告もある。*Nicotiana sylvestris* 由来 *psaDb* 遺伝子の 5'UTR(23 bp) やシロイヌナズナ由来の熱ショックタンパク質(HSP)遺伝子の 5' UTR はレポータータンパク質の発現を翻訳レベルで上昇させる(Yamamoto et al., 1995; Dansako et al., 2003)。また、トマトの *lat52* 遺伝子や、タバコの *ntp303* 遺伝子の 5'UTR は花粉管の伸長時期特異的に翻訳エンハンサーとして機能する(Bate et al., 1996; Hulzink et al., 2002)。

タバコ由来アルコール脱水素酵素遺伝子(*NtADH*)は、BY2 細胞の増殖停止期に活性化される遺伝子として単離された(Nagaya et al., 2000)。*NtADH* プロモーターは培養細胞および植物体根で強く転写を行うため、高転写プロモーターとして利用価値が高い。またその 5'非翻訳領域(5'UTR) は翻訳エンハンサーとして機能することが明らかになっている。*NtADH* 5'UTR は GUS タンパク質をレポーターとして用いた場合、一過的遺伝子発現実験においては、タバコ培養細胞 BY2 で 130 倍、シロイヌナズナ培養細胞 T87 で 76 倍の翻訳効率上昇効果が認められる。一方、単子葉植物であるイネの培養細胞における一過的遺伝子発現では、翻訳効率上昇は認められなかった。また、安定的タバコ形質転換体を用いた解析では、20~40 倍の翻訳効率の上昇が確認されている(Sato et al., 2004)。HRP C1a の生産において、BY2 細胞とタバコ植物体の葉のどちらにおいても *NtADH* 5'UTR による翻訳効率の上昇が確認された。また、タバコ植物体の根においても *NtADH* 5'UTR を用いることで HRP C1a 生産量が上昇する傾向が見られている(データ非掲載)。今回用いたシグナルペプチドと翻訳エンハンサーによる発現カセットは他の有用タンパク質の分泌生産においても応用可能である。実際、*NtADH* 5'UTR と β DSP もしくは 38kSP を白色腐朽菌由来の MnPRX に連結し、BY2 細胞に導入したところ、活性を有する MnPRX の生産を行うことができた(データ非掲載)。

NtADH 5'UTR の利用により HRP C1a の生産性向上を行うことができた。しかしながら、その効果は最大 10 倍程度であり、GUS タンパク質をレポーターとした場合よ

りは翻訳効率に与える影響は小さかった。ひとつの原因として、タンパク質の翻訳方法の違いが考えられる。GUS は細胞質タンパク質であるが、HRP C1a は分泌タンパク質であり、いわゆる粗面小胞体の膜上で翻訳される。翻訳開始および伸長機構に違いがあるために、*NtADH* 5'UTR の効果に差が生じる可能性がある。また翻訳後修飾速度が HRP C1a 蓄積を制限する可能性も考えられる。BY2 細胞においては、*NtADH* 5'UTR を融合した構築を導入した場合、得られた形質転換クローンにおける *HRP C1a* mRNA 量が減少する傾向が見られ(Fig.1-15A, Table 1-2)、翻訳効率の上昇の割には HRP C1a の蓄積量は増加しなかった(Table 1-2)。さらに、HRP C1a を高発現するクローンほど、内在性 PRX の蓄積量が減少する傾向が見られた(Fig.1-19)。この原因として様々な可能性が考えられるが、ひとつに HRP C1a と内在性 PRX がヘムの取り込みを競合する事が考えられた。黒麹菌や酵母においてヘムタンパク質の大量生産を行う場合、培地にヘムを添加することで目的タンパク質の蓄積量を増加させられることが報告されている(Fowler et al., 1993; Weber et al., 1992; Conesa et al., 2000; Conesa et al., 2002)。本研究においても HRP C1a を高発現する BY2 を、ヘムを添加した改変 LS 培地を用いて培養したが、HRP C1a および内在性タバコ PRX の蓄積量の増加は認められなかった(データ非掲載)。また、小胞体シャペロンの共発現がヘムタンパク質の生産において効果的であることが報告されている。黒麹菌によるマンガンペルオキシダーゼ(MnPRX)分泌生産において、シャペロンである CNX を共発現することで、ヘム添加なしでもヘム添加時と同程度まで MnPRX 蓄積レベルを高められることが報告されている(Conesa et al., 2002)。これは、CNX の働きで MnPRX へのヘムの取り込み効率が上昇した結果だと考えられている。同時に、BiP を共発現すると逆効果であることも報告されている。一方で、黒麹菌における甘味タンパク質(非ヘムタンパク質)のタウマチン分泌生産においては、BiP の共発現が効果的である(Lombrana et al., 2004)。酵母細胞において、一本鎖抗体の生産を行う際には、BiP および PDI を共発現することで、生産量の増加が認められている(Shusta et al., 1998)。また昆虫細胞においても、CRT や CNX を過剰発現することで、目的タンパク質の生産量および質の向上が報告されている(Zhang et al., 2003; Higgins et al., 2003; Fourneau et al., 2004)。現在、各種小胞体シャペロンタンパク質を過剰発現する BY2 細胞を作製しており、これらの細胞を宿主として用いることで、HRP C1a 生産性の向上が期待される。

1.4.3 CTPP は液胞局在化シグナルとして機能する

植物細胞には酵母や哺乳類と同様、小胞体やゴルジ体からなる小胞輸送経路が存在

する。また、植物に特徴的なオルガネラとして細胞体積の大部分を占める液胞がある。植物液胞には大きく分けて2種類が知られており、一方は酵母の液胞や哺乳類のリソソームと同様の機能を有する分解性液胞 (Lytic Vacuole, LV) であり、他方は特に種子やイモの塊茎に見られるような貯蔵を行う、タンパク質貯蔵液胞 (Protein Storage Vacuole, PSV) である。小胞体内腔にとりこまれ、折りたたまれたタンパク質は小胞輸送経路中を輸送されるが、他の真核生物と同様に小胞輸送のデフォルト経路は細胞外分泌である(Denecke et al., 1990)。つまり、小胞輸送経路に入ったタンパク質が特定のオルガネラに保持、輸送されるためには特別な局在化シグナルが必要となり、局在化シグナルを持たないタンパク質は細胞外へ運ばれる。HRP C1a のCTPPはタバコ培養細胞およびタバコ植物体において液胞局在化シグナルとして機能した。液胞輸送にはN末端のシグナルペプチドの種類は影響せず、一旦小胞輸送経路に送り込まれた後は、CTPP単独の作用により液胞局在化が行われることもわかった。また、CTPPを欠失することでHRP C1aの細胞外分泌が確認された。液胞局在型グルカナーゼやキチナーゼもC末端に液胞局在化シグナルを有するが、HRP C1aと同様にCTPPの欠失により細胞外へ分泌されることが報告されている(Neuhaus et al., 1994; Melchers et al., 1993)。現在、多くのタンパク質のC末端プロペプチドが液胞局在化シグナルとして機能することが報告されているが、シグナルとして機能するためのアミノ酸配列の法則や、そのシグナルと相互作用する因子の有無については明らかにされていない。そこで第二章では、第一章で構築したHRP C1a発現系を利用して液胞局在化シグナルとして機能するためのCTPPのアミノ酸配列、構造の必要条件について調べる。

第2章 液胞輸送に必要な CTPP のドメイン解析

2.1 序論

植物細胞において液胞は、細胞の体積の約 80%を占める大きな区画である。液胞は細胞質のイオン恒常性を維持するのに重要であるほか、代謝産物の蓄積や様々な加水分解反応を行う場である。近年では、重力屈性においても液胞が重要な役割を担うことが示されている。植物には、加水分解性液胞(lytic vacuole; LV)、タンパク質貯蔵液胞(protein storage vacuole; PSV) など2種類以上の液胞が認められる。LV 内腔は強酸性で加水分解酵素などを多く含む。PSV は種子や根端の細胞で発達している(Paris et al., 1996)。とくに種子においては、貯蔵タンパク質を長期間保存するために、PSV はプロテインボディーへと変化する(Muntz et al., 1998)。また、通常の栄養組織の細胞では LV と PSV が融合して巨大な中央液胞(central vacuole; CV)を形成する事も報告されている(Fig. 2-1)。

植物の液胞はほ乳類のリソソームに相当する。ほ乳類リソソームへのタンパク質の輸送には N-結合型糖鎖が関与している (Kornfeld et al., 1990)。リソソームタンパク質は、cis-Golgi で糖鎖末端のマノースに GlcNAc-phosphate を付加される。さらに GlcNAc が切除され、mannose-6-phosphate が末端に露出する。これがシグナルとなり、受容体と結合し、小胞に詰め込まれてリソソームへと輸送される。一方、植物や酵母において糖鎖が液胞輸送シグナルとして機能するという報告はなく、液胞タンパク質のプロペプチド領域がシグナルとして機能する(Valls et al., 1987)。植物細胞においては、タイプの異なる液胞への局在化シグナルが独立に存在し、LV への輸送には配列特異的液胞局在化シグナル(sequence specific vacuolar sorting determinant; ssVSD)が、PSV への輸送は C 末端依存的液胞局在化シグナル(C-terminal VSD; ctVSD)がそれぞれ関与する(Neuhaus et al., 1998)。

ssVSD をもつタンパク質に、サツマイモの貯蔵タンパク質・スポラミンや、オオムギのシステインプロテアーゼであるアリューレインが知られている(Matsuoka et al., 1991; Holwerda et al., 1992)。スポラミン とアリューレインの N 末端プロペプチドには Asn-Pro-Ile-Arg というモチーフが存在し、この部位に変異を導入するとシグナルとして機能しなくなる(Nakamura et al., 1993; Holwerda et al., 1992)。ssVSD はタンパク質の N 末端だけでなく C 末端やタンパク質の途中に位置するときでも、タンパク質の表面に露出していればシグナルとして機能する(Koide et al., 1997)。ssVSD 型タンパク質はゴルジ体からクラスリン被覆小胞(Clathrin coated vesicle ; CCV)に詰め込まれ、液胞へ輸送される(Hohl et al., 1996)。また、ssVSD 受容体タンパク質、BP-80(エンドウマメ)、BP-72(パンブキン)、AtELP(シロイヌナズナ)、がクラスリン被覆小胞画分から単離さ

れている(Paris et al., 1997; Shimada et al., 1997; Ahmed et al., 1997)。これら受容体はいずれも Type I 型の膜タンパク質であり、細胞質ドメインにはクラスリン被服に結合するためのモチーフ、Tyr-X-X-Ø(疎水性アミノ酸)、が存在する。BP-80 は ssVSD (オオムギのアリュレーイン、サツマイモのスボラミン、ブラジルナッツの 2S アルブミン由来)には結合するが、オオムギのレクチン由来の ctVSD には結合しない(Kirsch et al., 1994)。また、中性 pH では ssVSD と受容体が結合するが、酸性 pH のもとでは親和性が低下することが明らかになっており(Ahmed et al., 2000)、中性に近い pH のゴルジ体内腔で ssVSD と受容体が結合し、LV 手前の酸性区画である液胞前駆体(prevacuolar compartment; PVC)に到達すると受容体は ssVSD タンパク質を放出すると考えられている。また ssVSD 型輸送機構は、酵母における液胞輸送機構と同様であることが示された(Humair et al., 2001)。酵母の液胞輸送シグナル受容体の突然変異株では、液胞タンパク質 CPY は分泌されるが、BP-80 を発現させると液胞への局在性が回復した。また、ssVSD 型液胞タンパク質であるオオムギのアリュレーインを酵母に導入すると液胞へ輸送される。

ctVSD をもつタンパク質に、PR-1、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ、オスモチンなどのいわゆる PR タンパク質や(Dixon et al.,1991; Sticher et al.,1992; Neuhaus et al., 1991; Melchers et al., 1993)、ポリアミンオキシダーゼ、貯蔵タンパク質がある(Cervelli et al., 2004, Frigerio et al., 1998)。PRX も PR タンパク質に分類され、HRP C1a の CTPP は ctVSD として機能すると予想される。ctVSD 型輸送はイノシトール-3-リン酸キナーゼ阻害剤であるウォルトマニンにより阻害されるのに対し、ssVSD 輸送は阻害されないことが報告されている (Matsuoka et al., 1995)。また形態学的には、ctVSD タンパク質は電子密度の高い、高密度小胞(Dense vesicle; DV)により輸送されることが知られている (Fig.2-1) (Neuhaus et al., 1998)。Hinz ら(1999) は、エンドウマメの子葉から精製した DV には、PSV マーカーである α -TIP が濃縮されているが、ssVSD レセプターである BP-80 は存在しないことを示した。これらの知見から、ssVSD タンパク質と ctVSD タンパク質は異なる輸送経路を辿ると考えられている。ctVSD の長さは数アミノ酸から 30 アミノ酸残基と多様であり、シグナル間のコンセンサスアミノ酸配列は認められず、またその受容体も単離されていない(Neuhaus et al., 1998)。すなわち、ctVSD が液胞局在化シグナルとして機能するためのアミノ酸配列の法則性や、ctVSD が相互作用する因子については全く未知である。

本章では、HRP C1a を ctVSD 型液胞タンパク質のモデルとして用い、液胞輸送過程における C 末端プロペプチドの機能領域限定および二次構造の重要性について解析した。まず、西洋ワサビにおける HRP C1a の局在解析を行い、PSV に HRP C1a が局在化することを示した。また、一章で構築した BY2 細胞を宿主として用いた HRP C1a 発現系を応用して、液胞局在化シグナルとして機能するために必要な CTPP のドメインを解析した。15 アミノ酸のうち、C 末端側の 6 アミノ酸だけでも液胞輸送が仲

介された。一方で、全長 CTPP が両親媒性 α -ヘリックス構造をとることも液胞輸送において重要であることを示唆する結果を得た。

2.2 材料と方法

2.2.1 使用植物

西洋サワビ(*Armoracia rusticana*) とタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2)を用いた。

2.2.2 抗体

HRP Cl_a タンパク質(Type IV, SIGMA) を抗原タンパク質とし、マウスを用いて抗血清を作製した。抗血清の作製は、北海道システムサイエンス社に依頼した。

2.2.3 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後のゲルを Transfer buffer(48 mM Tris-HCl (pH8.3), 39 mM Glycine, 20% methanol)中で 15 分間平衡化した後、エレクトロトランスファー装置(日本エイドー、NA-1512)を用いて Transfer buffer 中で 1 mA/cm² の定電流にて 45 分間通電し、タンパク質を PVDF メンブレン(Hybond-P; Amersham 社)上にプロットした。ブロッティング後のメンブレンを Blocking buffer (25 mM Tris-HCl (pH8.0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 0.05% Tween20, 3% Skim milk)に浸して 1 時間ブロッキングを行った。メンブレンを、一次抗体を加えた 10 ml の Blocking buffer に浸し、室温で 1 時間(もしくは 4°C で一晩)反応させた。メンブレンを Blocking buffer で 5 分間 3 回洗浄後、2 次抗体を加えた 10 ml の Blocking buffer に浸し、室温時間反応させた。TBST(25 mM Tris-HCl (pH8.0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween20)で 5 分間 3 回洗浄後、アルカリフォスファターゼ発色溶液[15 ml AP buffer (100 mM Tris-HCL (pH9.5), 100 mM KCL, 0.05% Tween20), 100 μl NBT 溶液(5% (w/v) 4-nitro blur tetrazolium chloride, 70% (v/v) dimethylformamide), 50 μl BCIP 溶液(5% (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-indyl-phosphate in dimethylformamide)]に浸しシグナルが検出されるまで反応させ、最後にメンブレンを蒸留水で洗浄した。

2.2.4 免疫蛍光法

凍結ブロックの作製

西洋ワサビ組織(葉柄, 塊根)を両刃カミソリで長さ 5 mm 程度に切り、十分量の 4% パラホルムアルデヒド固定液の入った試料ビンに入れ、デシケーターで減圧し、1 時間程度固定した。固定後 0.1 M PBS で 3 回(各 10 分間)洗浄した。次に、5% ショ糖添加 0.1M PBS と 20% ショ糖添加 0.1 M PBS の比が 2:1、1:1、1:2 の混合液に順に 30 分間、室温で浸漬し、組織中の水分をショ糖添加 PBS で置換した。さらに 20% ショ糖添加 0.1 M PBS に 1 時間以上浸漬した後、20% ショ糖添加 0.1 M PBS と OCT

compound (Tissue-tek 社) の比が 2:1 の混合液を一晩以上 (4°C) 浸透させた。アルミホイルでカップを作り、その中にサンプルと OCT compound を入れて液体窒素で凍結した。

凍結切片の作製

クリオスタット(HM500+0M, ミクローム社)を用いて 10 μm の厚さの凍結切片を作製し、APS コート付きのスライドガラスに貼り付けた。作製した凍結切片を載せたスライドガラスは-80°C で保存した。

抗体処理

凍結切片を常温に戻した後、1% Triton X を含む Superblock Blocking Buffer for PBS (PIERCE 社) で 1 日以上ブロッキング及び浸透化処理を行った。その後、マウス由来抗 HRP C1a 抗を一晩反応させ、PBST(0.05% Tween 20 in 0.1 M PBS)で 3 回 (各 10 分間) 洗浄した。さらに二次抗体(ウサギ由来 Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probe 社))を、一晩反応させた後、PBST で 3 回(各 10 分間)洗浄し、ベクターシールド(Vector Laboratories 社)で封入した。共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

免疫蛍光観察

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss 社)を用いて、蛍光観察を行った。

2.2.5 免疫電子顕微鏡観察

固定

西洋ワサビ組織を厚さ 1 mm 以下に細切し、固定液 (4% paraformaldehyde, 0.7% glutaraldehyde in 50 mM PBS pH 7.2)の入った試料ビンに入れた。デシケーターで減圧浸透した後、4°C で 1 時間静置し、固定を行った。50 mM PBS で 5 回 (各 10 分間) 洗浄した後、4°C で一晩、遮光して静置した。

脱水

後固定の後、蒸留水で 3 回 (各 10 分間、氷上) 洗浄した。次に、25% エタノール溶液中に 2 時間 (4°C)、60% エタノール溶液中に 2 時間 (-30°C)、80% エタノール溶液中に 2 時間 (-30°C)、99%エタノール溶液中に一晩 (-30°C) 浸漬し、脱水を行なった。さらに室温に 30 分間置いた後、100% エタノールで 3 回 (室温、各 20 分間)脱水した。

中間溶媒による置換

置換剤としてプロピレンオキシドを用いた。100% エタノールで脱水した後、100% エタノールとプロピレンオキシドの比が 2:1 の混合液に 20 分間 (室温)、1:2

の混合液に 20 分間 (室温)、プロピレンオキサイドに 1 時間 (室温) 浸漬させて、置換操作を行った。

樹脂包埋

プロピレンオキサイドと LR White 樹脂(0.1 g 2-ethoxy-2-phenyl-acetophenone in 20 ml LR White (LONDON RESIN COMPANY LIMITED))の比が 2:1、1:1、1:2 の混合液を順に置き換え、室温で各 1 時間振盪した。LR White 樹脂にサンプルを浸漬し、2 時間、室温で振盪した。さらに新しい LR White 樹脂にサンプルを沈め、2 時間振盪した後、UV 重合機(TUV-100, 堂阪 EM 社)を用いて 48 時間置重合反応を行った。

超薄切片の作製

組織を包埋した樹脂ブロックを、ガラスナイフで目的の試料位置まで面出しした。片刃カミソリを用いて、組織片周辺の樹脂をトリミングした。ミクロトーム (Leica S/FC S)を用いて、ダイヤモンドナイフで厚さ 80~90 nm の超薄切片を作製し、電顕観察用グリッド(日新 EM 社)に載せた。

抗体処理

切片の付着面を下にしてグリッドを 3% H₂O₂ に浮かせ、3 分間エッチング処理を行った。蒸留水で 3 回 (各 5 分間) 洗浄した後、5% BSA 添加 superbloc blocking buffer を用いて 37°C、10 分間ブロッキング反応を行った。次に、シャーレの上にパラフィルムを敷いて一次抗体を滴下し、その溶液中にグリッドを沈ませ、37°C で一時間静置した。PBST で 3 回洗浄 (各 5 分間、室温)した。二次抗体処理を、室温で一時間行った。PBST で 2 回洗浄した後、蒸留水で 1 回洗浄 (各 5 分間) した。

一次抗体 : マウス由来抗 HRP C1a 抗血清、200 倍希釈

ラビット由来抗 δ -TIP 抗体、8.0 μ g/ml で使用

二次抗体 : 金コロイド標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体(粒径,15 nm)

(British BioCell International, Ltd)、75 倍希釈

金コロイド標識ヤギ抗ラビット IgG 二次抗体(粒径,15 nm)

(British BioCell International, Ltd.), 75 倍希釈で使用

電子染色

シャーレの底にパラフィルムを敷き、その上に酢酸ウラニル染色液(1% 酢酸ウラン)を滴下し、切片を載せたグリッドを静かに液面に浮かせ暗黒下、室温で約 10~20 分間染色した。ピンセットを用いてグリッドを水洗した後、余分なグリッドの水を濾

紙で吸い取った。次に鉛染色液を用いて、35°C で約 15 分間、鉛染色を行なった。染色後水洗し、濾紙で水を吸い取り乾燥させた。

鉛染色液: 1.33 g の硝酸鉛および 1.76 g のクエン酸ナトリウム (2 水塩) を蒸留水 30 ml に溶解した後、1 N NaOH 8 ml を添加した。全量 50 ml になるように蒸留水を加えた。乾かした後、電子染色を行い透過型電子顕微鏡 (TEM、日立 H-7100) で観察した。

写真現像

フィルムを水に 1 分間浸した後、現像液に浸漬し、30 秒ごとに攪拌しながら 4 分間反応させた。次に停止液に 2 分間程度浸した後、定着液に 10 分間フィルムを浸漬した。定着反応後、水で洗浄した。

2.2.6 HRP C1a の細胞外分泌割合の測定

形質転換 BY2 細胞を、改変 LS 培地を用いて暗所 27°C で振盪培養し、培養 5 日目の細胞および培地を解析に用いた。フィルターホルダー (NALGENE 社) を用いて細胞と培地を分離し、細胞の湿重量 (g) および培地容積 (ml) を測定した。細胞のうち 3 g を 50 ml 遠心管に測りとり、2 ml の 10×緩衝液 (10 mM DTT, 10 mM PMSF, 100 mM KH₂PO₄ pH 6.0) を添加後、超純粋で 20 ml にメスアップした。遠心管を氷で冷却しながら超音波破碎機 (ASTRASON MODEL XL2020, 和研薬株式会社) を用いて細胞を破碎した。細胞破碎液のうち、1 ml を 1.5 ml 微小遠心管に移し、15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心した。上清を回収し、細胞画分サンプルとした。培養上清 500 μl に 2×緩衝液 (2 mM DTT, 2 mM PMSF, 20 mM KH₂PO₄ pH 6.0) を 500 μl 添加し、15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心した。上清を回収し、培地画分サンプルとした。細胞画分および培地画分サンプルを 1×緩衝液 (1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM KH₂PO₄ pH 6.0) を用いて適当に希釈した後、等電点電気泳動を行い、HRP C1a の定量を行った (第一章材料と方法、1.2.15 参照)。細胞画分 (C) および培地画分 (M) に含まれる細胞湿重量当たりの HRP C1a 量を求め、細胞外分泌割合、 $M/(C+M) \times 100(\%)$ 、を算出した。

2.2.7 遺伝子構築

CTPP へのアミノ酸置換導入

C1a-CTPP-Gly-R もしくは C1a-CTPP-GlyGly-R プライマーおよび C1a-F プライマーを用いて PCR を行い、CTPP の C 末端に Gly 残基を 2 個付加し、C1aC+GG を作製した (Fig. 2-14)。その他の CTPP 置換に関しては、以下のように行った。C1a-F および C1a-NsiI-R をプライマーとして用い、C1a 成熟領域の下流に NsiI 部位を導入した。この断片を pUC118 にサブクローニングして塩基配列を確認した。NsiI カット、T4 DNA ポリメラーゼによる末端の平滑化を行った後、アルカリフォスファターゼを用

いて脱リン酸化を行い、各 CTPP 断片を導入するためのベクターとした。C1aN10, C1aC6, C1aC6+GG, BLC, BLC+GG, CPEC をコードする断片は必要な組み合わせのオリゴヌクレオチド(Table 1-1)をアニーリング後、T4 ポリメラーゼによって伸長反応を行い、末端の平滑化およびリン酸化を行った後、前述のベクターに導入した。V347P もしくは V347P+GG の作製は、C1aC(=N-C1a-C)もしくは C1aC+GG がクローニングされている pUC118 を鋳型にし、C1aC-Pro-F および C1a-Pro-R プライマーを用いて PCR を行った。増幅された全長ベクター断片の末端を平滑化し、セルフライゲーションを行った。CPEC+GG の作製は、CPEC を鋳型として用い、C1a-F および CPEC-GGR プライマーを用いて PCR を行った。これらの遺伝子は *NtADH* 5' UTR に連結した後、バイナリーベクター-pMS の CaMV 35S プロモーターの下流にサブクローニングした。

2.3 結果

2.3.1 西洋ワサビ組織における HRP C1a の発現解析

第一章では、タバコ培養細胞 BY2 およびタバコ植物体において、CTPP が液胞局在化シグナルとして機能することを示した。植物細胞には、タンパク質貯蔵液胞 (PSV) および加水分解性液胞 (LV)の二種類に加え、これらの液胞が融合した中央液胞 (CV) が存在する。BY2 細胞には融合型の CV のみが存在し、PSV と LV の明瞭な区画化が行われていない。CTPP がどちらの液胞への輸送シグナルかを知るため、西洋ワサビ組織における、HRP C1a の局在解析を行った。

まず、HRP C1a が高蓄積する器官を調べた。塊根、若根、葉柄および葉身(Fig. 2-2) から可溶性タンパク質を調製し、等電点電気泳動および活性染色を行った(Fig. 2-3 A)。その結果、すべての器官で HRP C1a の蓄積が認められ、特に塊根と葉柄において高蓄積していることがわかった。また、各器官から調製したサンプルを用いて、SDS-PAGE およびマウス由来 HRP C1a 抗血清を用いたウェスタン解析を行った(Fig. 2-3 B)。その結果、活性染色の結果と同様、すべての器官において HRP C1a タンパク質の蓄積が認められ、塊根および葉柄では特に高蓄積していた。また、この抗 HRP C1a 抗血清は、西洋ワサビタンパク質への非特異的結合が見られなかったため、以下の免疫組織学的解析において有効であると判断した。

2.3.2 西洋ワサビ組織における HRP C1a の局在解析

細胞分画によって、HRP C1a の液胞局在性を確認した。HRP C1a が高蓄積する、葉柄からプロトプラストおよび液胞を調製したところ、HRP C1a は主として液胞内画分に検出された(Fig.2-4 C)。次に、葉柄からアポプラスト液を調製した。その結果、HRP C1a の一部はアポプラストにも存在することが明らかになった(Fig.2-5 A)。また、そのシグナル強度をもとにアポプラストに存在する割合を見積もったところ 5% 程度であった。

2.3.3 免疫組織学的手法を用いた HRP C1a の局在解析

まず、葉柄における HRP C1a の局在解析を行った。葉柄において HRP C1a のシグナルは葉柄組織全体で検出された(Fig. 2-6 A)。特に、維管束周辺において高蓄積が見られた。そこで、維管束周辺の細胞における HRP C1a の局在を詳細に解析した。HRP C1a の局在化パターンとして以下の 3 タイプが見られた。第一のパターンとして、導管付近の細胞において、大きな液胞に HRP C1a が存在した(Fig.2-7A,C)。この液胞では、液胞膜の内側に接する電子密度の高い凝集体に HRP C1a が存在した(Fig. 2-7D,E)。第二のパターンとして、中央液胞とは別に、直径 5 μm 程度の小さな液胞内に強いシ

グナルが観察された(Fig. 2-8 A,C)。また、第三のパターンとして、中央液胞の内部に存在する、電子密度の高い凝集体に HRP C1a が存在した(Fig. 2-9 A,C)。

次に、塊根における局在解析を行った。免疫蛍光観察の結果、三つの特徴的なパターンが観察された。第一のパターンとして、HRP C1a を蓄積する一層の細胞層が見られた (Fig. 2-10A, arrow head)。これらの細胞では、液胞膜に HRP C1a が存在した(Fig. 2-11A)。また第二のパターンとして、塊根組織中に点在する、細胞の大部分を占める大きな液胞に HRP C1a が高蓄積していた(Fig. 2-10, Fig. 2-11 A, C)。このような液胞内には、電子密度の高い凝集体が観察され、貯蔵物質が蓄えられていることが予想された。また、第三のパターンとして、液胞内ではなく細胞壁にも HRP C1a の蓄積が見られ、リグニンやスベリンの蓄積により肥大化した、導管の二次細胞壁に HRP C1a が蓄積していた(Fig. 2-12)。以上の結果より、西洋ワサビ組織において HRP C1a は液胞内の高電子密度の凝集体中に存在し、特に塊根においては貯蔵のために特殊化した液胞に存在することがわかった。

また、貯蔵液胞のマーカーである δ -TIP 抗体を用い、HRP C1a が存在する液胞が貯蔵タイプであることを確認した。葉柄の細胞は大きな液胞で占められている。その液胞の種類として電子密度の高い内容物を含む液胞と内容物があまり含まれない液胞の二種類が見られた(Fig. 2-13A)。HRP C1a および δ -TIP はともに、電子密度の高い内容物を含む液胞に存在し(Fig. 2-13B)、内容物を含まない液胞には存在しなかった。このことから、HRP C1a は貯蔵型の液胞に蓄積されることが確認された。

2.3.4 CTPP の機能領域の限定

植物細胞において、加水分解性液胞 (LV) への輸送は配列特異的液胞局在化シグナル(ssVSD)、タンパク質貯蔵液胞(PSV) への輸送は C 末端依存的液胞局在化シグナル(ctVSD)によって仲介される。西洋ワサビ組織において HRP C1a はタンパク質貯蔵タイプと思われる液胞に存在した。また予備的な結果ではあるが、免疫組織学的手法により HRP C1a とタンパク質貯蔵型液胞のマーカータンパク質である δ -TIP(δ -tonoplast intrinsic protein, 水チャネル)が同じ液胞に共存することを確認している。これらの結果から、CTPP は ctVSD として機能すると考えられる。植物液胞タンパク質のプロペプチドが ctVSD として機能するという報告は多数あるが、ctVSD の長さは数アミノ酸 ~ 20 アミノ酸残基程度と多様であり、コンセンサス配列も見出されていない(Fig.2-14)。しかし、HRP C1a を含むいくつかの CTPP については C 末端の 5 アミノ酸が比較的似ていることがわかった。そこで、液胞輸送におけるこの数アミノ酸の重要性を調べた。この数アミノ酸を欠失した、CTPP 前半の 10 アミノ酸残基(N10 配列)、C 末端の 6 アミノ酸残基(C6 配列)および CTPP(C15 配列)をそれぞれ、HRP C1a に融合した(Fig.2-15)。CaMV 35S プロモーターおよび *NtADH* 5'UTR に連結し、アグロバ

クテリウム法により BY2 細胞に導入した。等電点電気泳動および活性染色を行い、選抜したクローンを液体培地に移した。各構築について 2 クローンずつの細胞(細胞壁を含む)および培地中の HRP C1a 量を測定し、細胞外に分泌された HRP C1a の割合を算出した。植物小胞輸送のデフォルト経路は細胞外分泌であり、液胞輸送は積極的な過程である。そのため C 末端に融合したペプチドが液胞局在化シグナルとして機能しない場合、HRP C1a は細胞外分泌されることになる。結果、C15 および C6 配列を用いた場合、主として細胞画分に HRP C1a が存在したが、N10 配列を付加した場合ほとんどの HRP C1a は細胞外へ分泌された(Fig. 2-16A)。また各クローンの培地および液胞サンプルを調製し、等電点電気泳動を行った。C15 および C6 配列を付加した場合、HRP C1a は液胞に蓄積したが、N10 配列を付加した場合は細胞外への分泌が確認された(Fig. 2-16B)。これらの結果から、C 末端 6 アミノ酸残基だけでも液胞輸送が仲介されることがわかった。また、N 末側の 10 アミノ酸残基のみでは液胞輸送は行われなかったことが明らかになった。

2.3.3 液胞局在化シグナルへの Gly 残基の付加

ctVSD による輸送機構の詳細は明らかにされていないが、C 末端に Gly 残基を付加することで輸送能が損なわれることが知られている(Dombrowski et al., 1993)。そこで、C15 および C6 配列が Gly 付加の影響を受けるかを調べた。また、Gly 付加により輸送能が損なわれることが報告されている、大麦レクチンの C 末端プロペプチド (barley lectin CTPP; BLC と表記)をコントロールとして参照した。各ペプチド(C15, C15+GG, C6, C6+GG, BLC, BLC+GG)を融合した HRP C1a 遺伝子を作製し、BY2 細胞に導入した(Fig.2-15)。各 2 クローンを選抜し、液体培地に移した。細胞画分および培地中の HRP C1a 量を測定し、分泌された HRP C1a の割合を算出した(Fig.2-17A)。BLC は HRP C1a に融合した場合も液胞局在化シグナルとして機能し、また Gly 付加によりその機能は損なわれた(Fig.2-17A,B)。C6 は典型的な ctVSD として機能し、Gly 付加による輸送能の障害が確認されたが、一方 C15 については Gly 付加による影響を受けず C15+GG 配列によっても液胞輸送が認められた(Fig.2-17A,B)。

C6+GG 付加 HRP C1a 導入 BY2 において、生産された HRP C1a の等電点は酸性側にシフトしていた(Fig.2-17B)。C6 の場合、細胞内の HRP C1a は主として天然 HRP C1a と同じ pI 値であった。培地サンプルにおいては、低希釈倍率では HRP C1a が検出可能であり、その pI は天然 HRP C1a より低い値を示した(Fig.2-18)。C6 配列には酸性アミノ酸が含まれ、プロペプチドが切除されずに残っている HRP C1a が、天然のものより酸性側に検出されたと考えている。

以上の結果より、BY2 における液胞輸送において C6 配列は典型的な ctVSD として機能し、Gly 残基付加によって機能が損なわれた。一方で、全長 CTPP(C15 配列)は Gly 残基付加の影響が見られず、N 末側 10 アミノ酸にも何らかの機能があることが

示唆された。

2.3.4 C15 配列の二次構造の重要性

Gly 付加実験の結果から、CTPP の前半部分も液胞輸送において何らかの機能を有していることが示唆された。N10 配列単独では液胞輸送能を持たないため、C6 と共存する時に機能を発現すると考えられる。ひとつの可能性として、C6 と推定上の受容体の親和性を高める働きを有することが考えられる。また別の可能性として、全長 CTPP の二次構造が液胞輸送において重要な機能を有することが考えられた。C15 配列は酸性アミノ酸を含む親水性面と疎水性面から構成される“両親媒性 α -ヘリックス”構造をとる可能性がある(Fig.2-19A)。両親媒性 α -ヘリックスは大腸菌からほ乳類にいたるまで様々な生物において見つかっており、共通の性質として、酸性環境下で脂質膜と直接結合することが知られている。大麦レクチンの CTPP はこのような二次構造をとらないと考えられ(Fig.2-19B)、BLC と C15 への Gly 残基付加の効果の差異は CTPP の二次構造の違いにより生じる可能性がある。また、ラットのカルボキシペプチダーゼ E(carboxypeptidase E;CPE)の C 末端プロペプチドは脂質と結合することで小胞輸送のシグナルとして機能することが報告されている(Fig.2-19C) (Fricker et al., 1990)。

そこで、C15 配列の二次構造の重要性について検証した。347 番目の Val 残基を二次構造の破壊作用を有する Pro 残基に置換した V347P、および C15+GG 配列にさらに Pro 置換を導入した V347P+GG 配列を HRP C1a に融合した(Fig. 2-15)。カナマイシン耐性カルスから、等電点電気泳動により選抜したクローンを液体培地に移した。細胞画分および培地中の HRP C1a 量を測定し、分泌された HRP C1a の割合を算出した(Fig.2-20)。HRP C1a の細胞外分泌割合は、V347P 配列を付加した場合は 2.7% 程度であるのに対し、V347P+GG 配列を付加した場合は 18% 程度であった。V347P 配列を付加した場合、C6 配列が完全な形で残っており Pro 残基導入の効果が小さいと考えられる。一方で Gly 残基の付加により C6 配列による液胞輸送が損なわれている V347P+GG 配列を付加した場合は、C15 配列の二次構造破壊により液胞輸送活性の顕著な低下が認められたと考えられる。

次に、両親媒性 α -ヘリックス構造をとることが報告されている CPE の C 末端プロペプチド(CPEC)によって植物液胞への輸送が仲介されるかを調べた。CPEC を HRP C1a に融合し、BY2 細胞に導入した(Fig. 2-15)。カナマイシン耐性カルスから、等電点電気泳動により選抜した各 2 クローンを液体培地に移した。細胞画分および培地中の HRP C1a 量を測定し、分泌された HRP C1a の割合を算出した(Fig.2-21A)。その結果、CPEC 付加 HRP C1a 導入 BY2 において培地中に分泌された HRP C1a の割合は 6% 程度であり、大部分の HRP C1a は細胞内に保持されていた。また培地および液胞からタンパク質サンプルを調製し、解析した。主として液胞画分に HRP C1a シグ

ナルが検出された。また、培地サンプルにおいても低希釈倍率では HRP C1a が検出された(Fig. 2-21B)。液胞画分の HRP C1a は天然 HRP C1a と同じ等電点を有するものがほとんどであったが、酸性側にシフトした等電点を有する HRP C1a も存在した。培地画分においては、HRP C1a の等電点はさらに酸性側にシフトしていた。

以上の結果より、酸性アミノ酸を含む両親媒性 α -ヘリックス構造を持つペプチド鎖が BY2 細胞において液胞局在化シグナルとして機能し得ることがわかった。

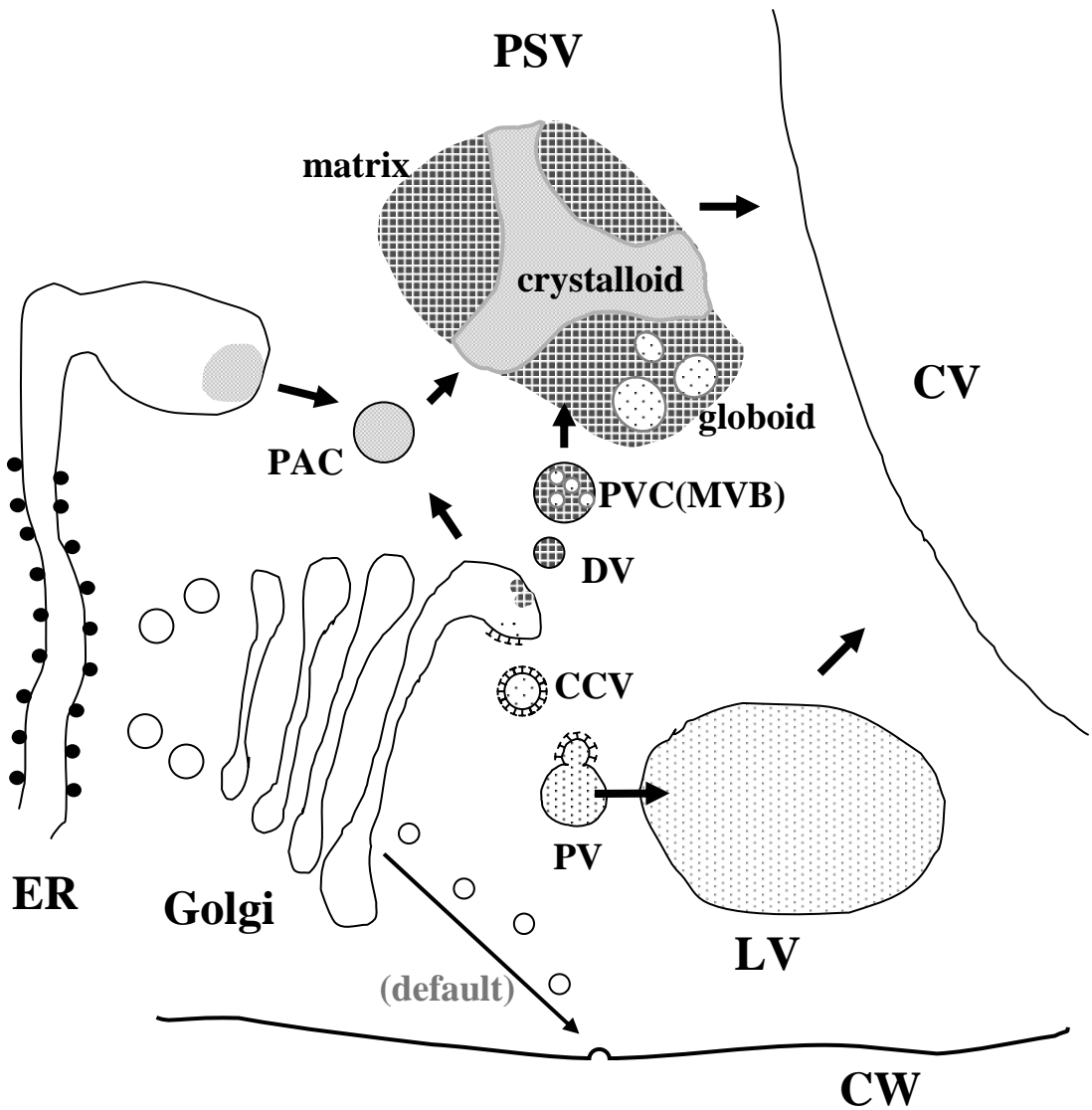
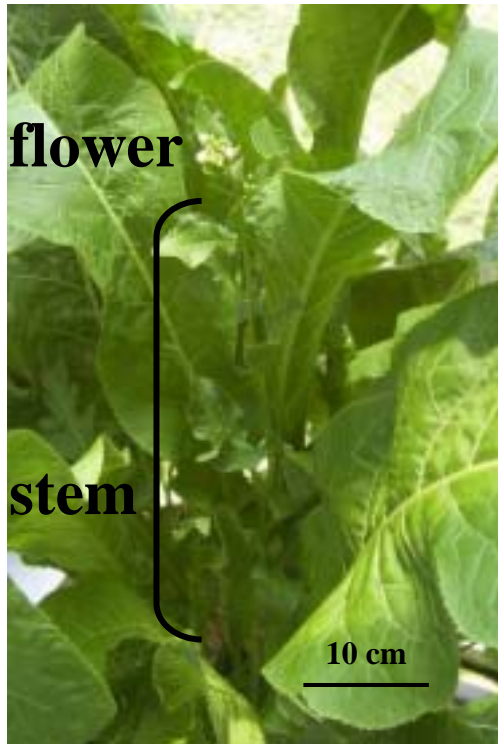
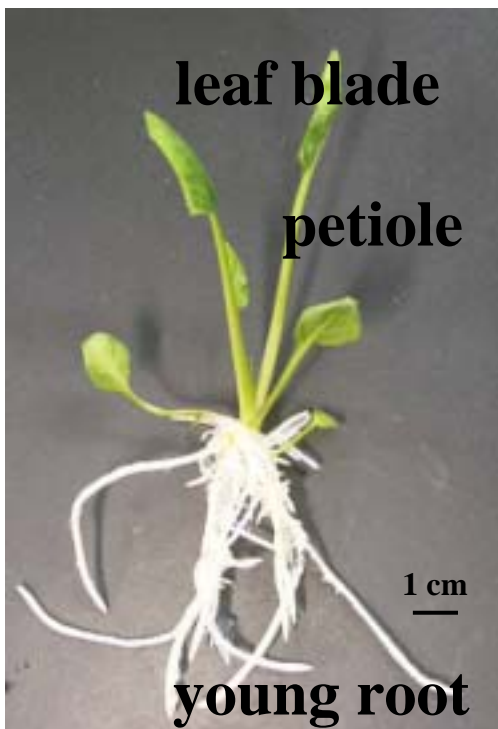


Fig.2-1 The plant secretory and vacuolar systems.

Indicated are endoplasmic reticulum(ER), Golgi, Cell wall(CW), protein storage vacuole(PSV), lytic vacuole(LV) and central vacuole(CV). PSV matrix proteins were transported from the Golgi via dense vesicle(DV) and multi-vesiculated body(MVB) as a prevacuolar compartment PVC) (Robinson et al.,2000; Jiang et al., 2002).PSV crystalloid originated from the ER via precursor accumulating (PAC) vesicle (Hara-Nishimura et al.,1998). Proteins of lytic vacuole(LV) are bound by sorting receptor in the Golgi, packed into clathrin coated vesicle(CCV) and transported to the LV by way of lytic prevacuolar compartment (PV)(Paris et al., 1997).In vegetative tissues and cultured cells, PSV and LV fuse to make large central vacuole. The secretion into the CW is default pathway for the soluble secretory proteins in plant cells.

A**B****C****Fig.2-2 Morphology of horseradish plant.**

Horseradish root tuber (B) purchased from a super market was grown in a green house (A). Horseradish bear white flowers with a good smell at the top of stem in early summer in Japan (A). Horseradish plants regenerated from leaf blade was also grown up on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) in germ-free culture pots (C).

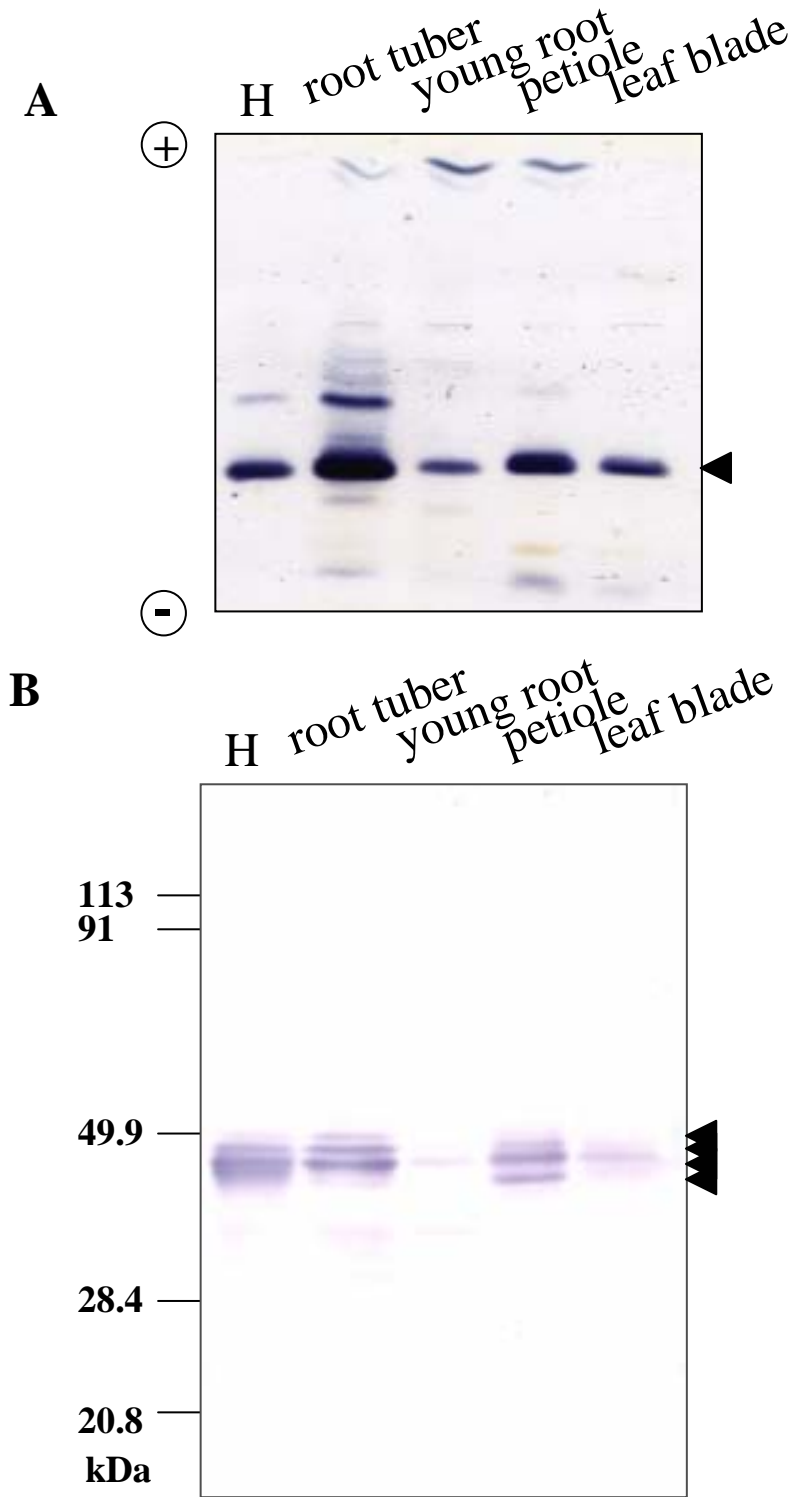


Fig. 2-3. HRP C1a accumulation in horseradish organs.

Protein samples were prepared from horseradish root tuber, young root, petiole and leaf blade. The sample was analyzed by IEF and activity staining with 4-chloro-1-naphtole (A), or by SDS-PAGE and subsequent western blotting with anti-HRP C1a antiserum (B). As a standard marker, HRP C (Type IV, SIGMA) was loaded in lane H. Signals for HRP C1a are marked with triangles.

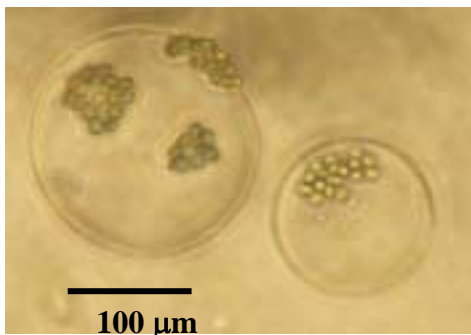
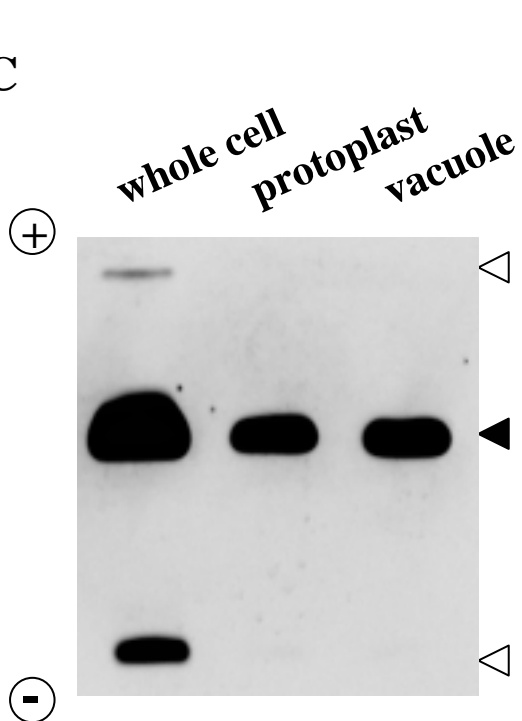
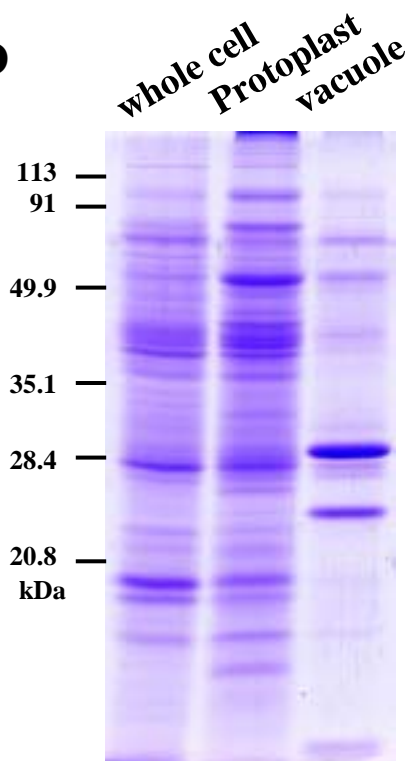
A**B****C****D**

Fig. 2-4. Vacuole isolation from horseradish petiole.

(A) Protoplasts were isolated from petiole of horseradish plants.

(B) Vacuoles were prepared from protoplasts by ultracentrifugation.

(C) Protein samples of each fraction were separated by IEF and peroxidases were detected by ECL detection system. Filled triangle and open triangles indicate HRP C1a and other peroxidase isoenzymes, respectively. The direction of the electrodes are indicated by + and - .

(D) Protein profile in each fraction. Proteins of whole cell, protoplast and vacuole were separated by SDS-PAGE, and the gel was stained with CBB.

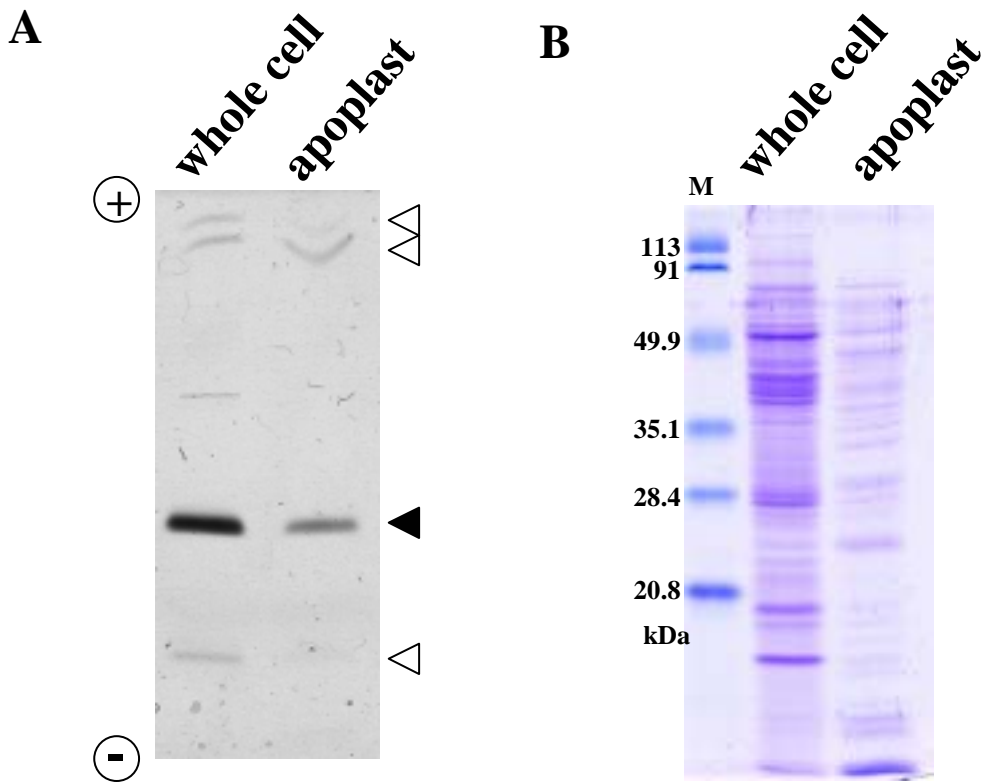


Fig. 2-5. Apoplast sap collection from horseradish petiole.

(A) Whole cell fraction and apoplast sap fraction was prepared and analysed by IEF and activity staining for peroxidase with 4-chloro-1-naphthol. The direction of the electrodes are indicated by + and - .

(B) Proteins in each fraction were separated by SDS-PAGE and the gel was stained with CBB.

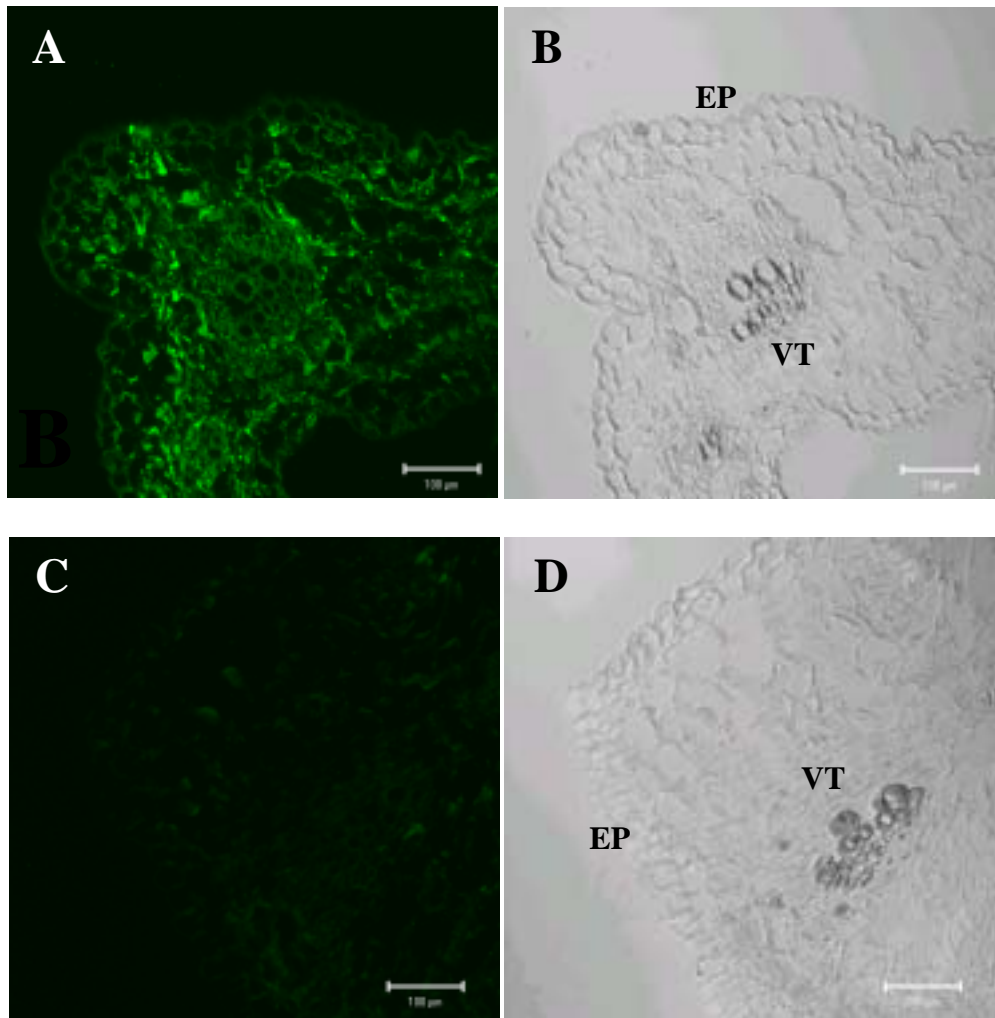


Fig. 2-6 Immunofluorescent staining of horseradish petiole with anti-HRP C1a antiserum.

Horseradish petiole was fixed with paraformaldehyde and embedded in OCT compound (Tissue-tek). 10 µm-slice of sections were prepared using microtome. The section was treated with anti-HRP C1a antiserum and subsequent Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibodies (A). As a negative control, the section was treated only with the secondary antibodies (C). Each section was inspected under confocal fluorescent microscope (LSM510 META, Carl Zeiss). (B) and (D) are bright-field images. EP; epidermis, VT; vascular tissues. Scale bars represent 100 µm.

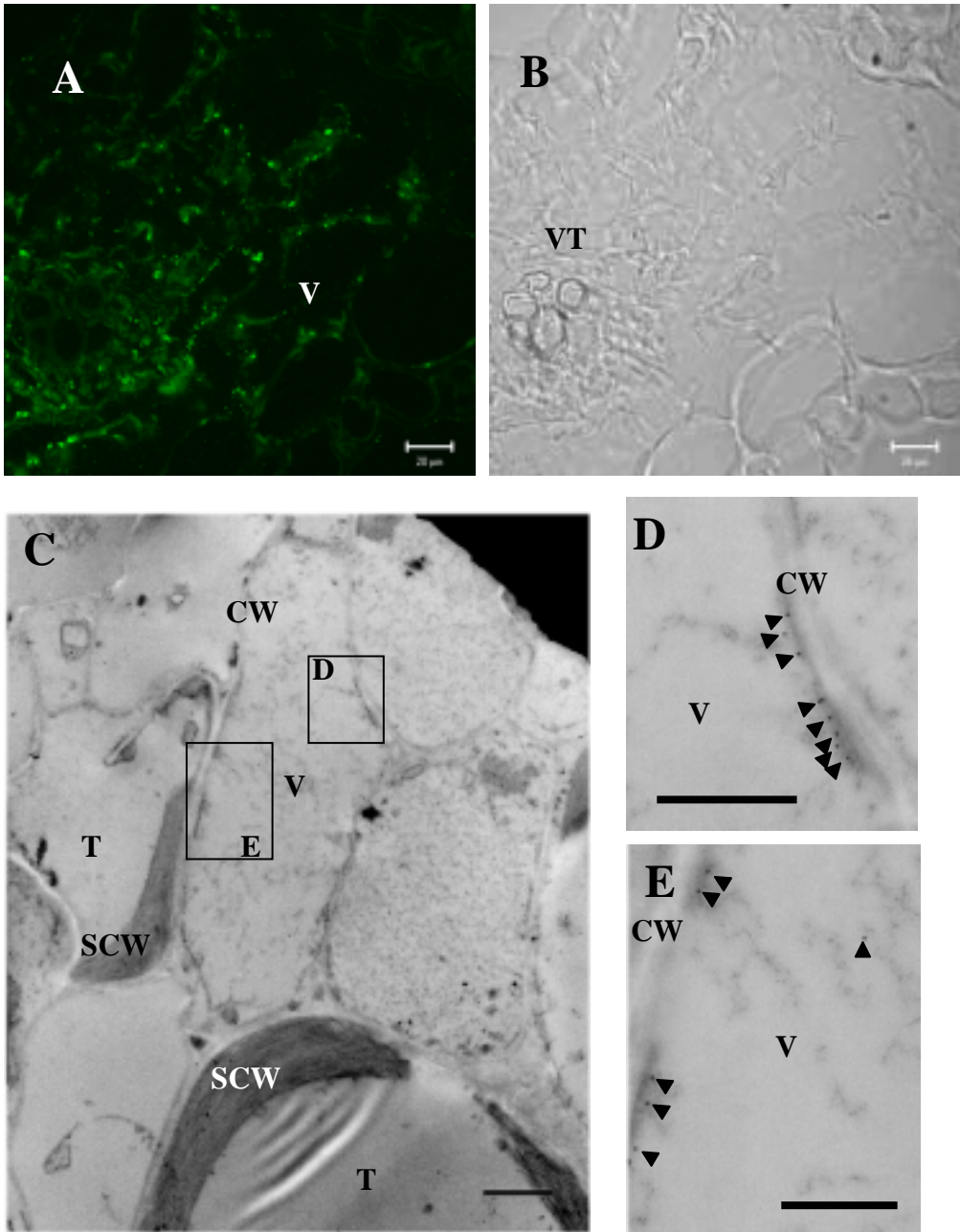


Fig. 2-7 HRP C1a exist on inner surface of large vacuole in petiole.

Immuno-fluorescent staining (A) and immuno-gold staining (C,D) of HRP C1a. V; vacuoles, CW; cell wall, SCW; thick secondary cell wall of trachea, T; trachea tube. (D) and (E) Image of close up of the region indicated by square in (C). Scale bars in (A) and (B) represent 5 μm . Scale bars in (C) , (D) and (E) represent 2 μm . Arrow heads indicate signals for HRP C1a.

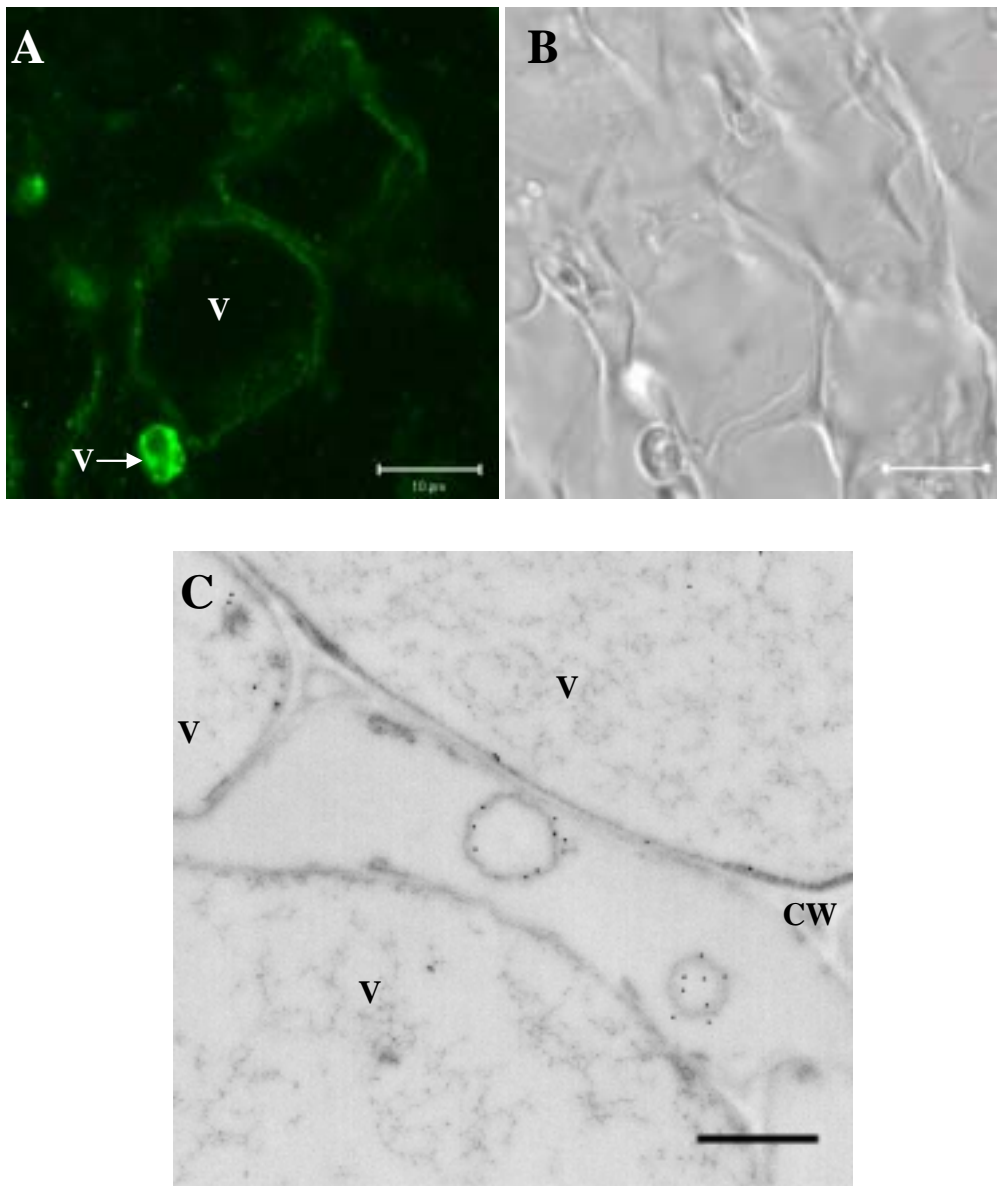


Fig. 2-8 HRP C1a exists in small vacuoles in petiole.

For the immuno-fluorescent staining (A), sections were prepared as mentioned in Fig. 2-6. For the immuno-gold staining (C), the section was prepared as follows. Horseradish petiole was cutted, fixed with glutaraldehyde for primary fixation and with OsO_4 for second fixation. Fixed tissues were embedded in LR white. Tissues were sliced into sections of about 80 nm thick using ultra microtome. Sections were treated with anti-HRP C1a antiserum and subsequent gold-labelled anti-mouse IgG antibodies. After electron stain with uranium and plumbum, the section was inspected under transmission electron microscope (H-7100, HITACHI). V; vacuoles, CW; cell wall. Scale bars in (A) and (B) represent 10 μm . Scale bar in (C) represents 1 μm .

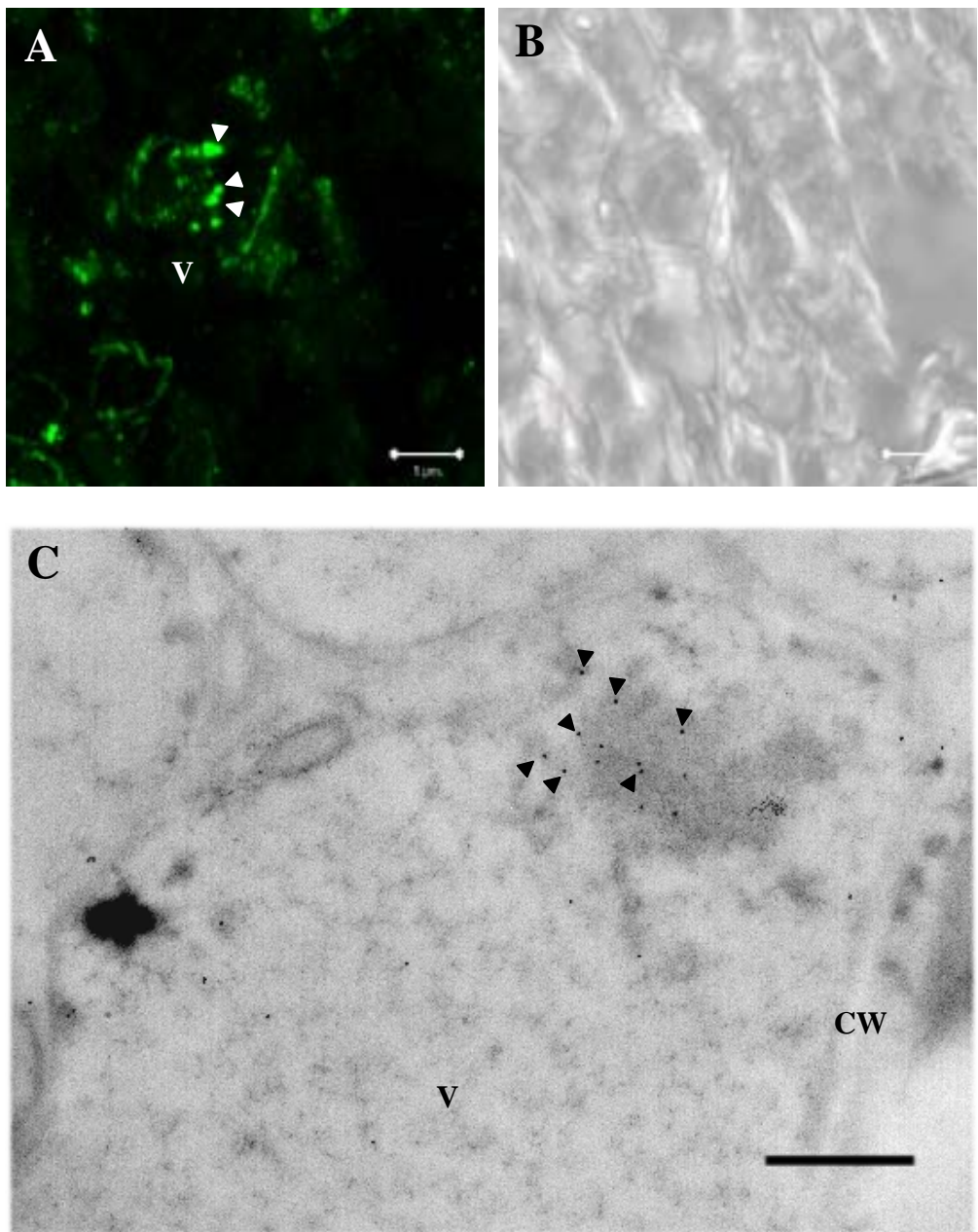


Fig. 2-9 HRP C1a forms aggregates in large vacuoles in petiole.

Immuno-fluorescent staining (A) and immuno-gold staining (C) of HRP C1a. V; vacuoles, CW; cell wall. Scale bars in (A) and (B) represent 5 μm. Scale bar in (C) represents 1 μm. HRP C1a is included in aggregates in the central vacuole (arrow head).

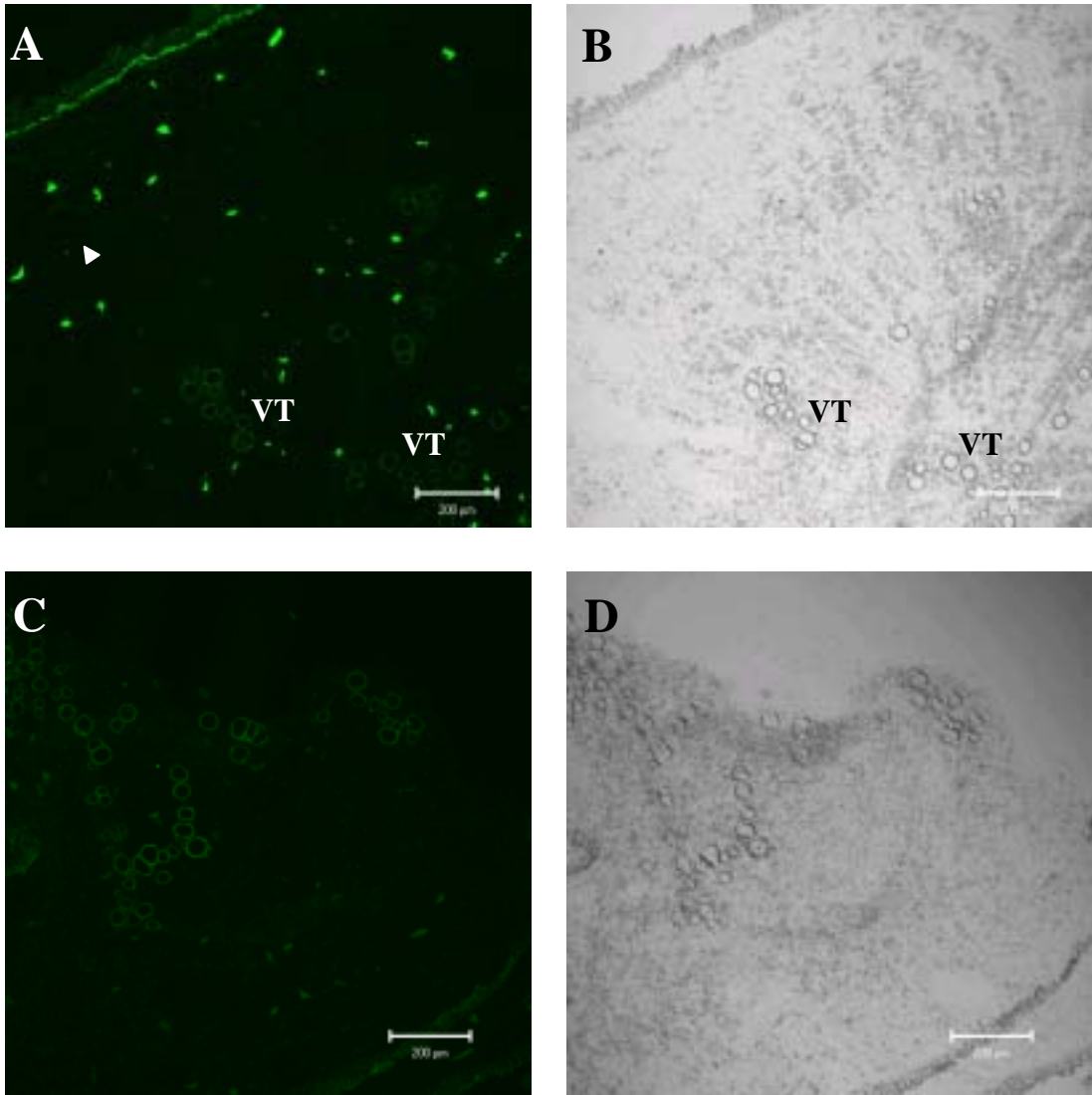


Fig. 2-10 Immunofluorescent staining of horseradish root tuber with anti-HRP C1a antiserum.

Horseradish petiole was fixed with paraformaldehyde and embedded in OCT compound (Tissue-tek). 10 µm-slice of sections were prepared using microtome. The section was treated with anti-HRP C1a antiserum and subsequent Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibodies (A). Signals for HRP C1a were dotted all over root tuber. In addition to that, HRP C1a existed in the cells at the outermost layer of endodermis. As a negative control, the section was treated only with the secondary antibodies (C). Each section was inspected under confocal fluorescent microscope (LSM510 META, Carl Zeiss). (B) and (D) are bright-field images. VT; vascular tissues. Scale bars represent 200 µm.

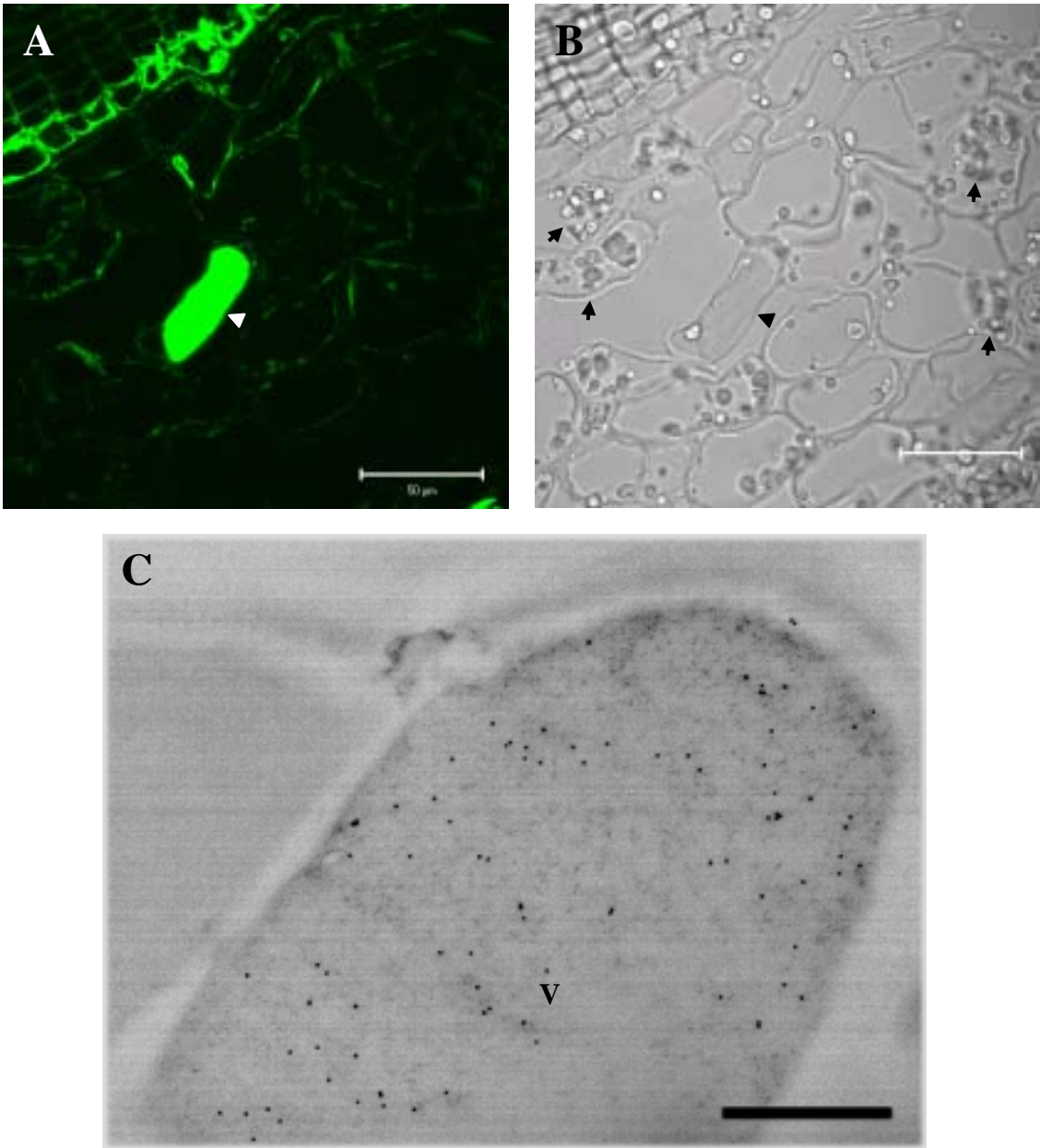


Fig. 2-11 HRP C1a is highly accumulated in a particular kind of cells I root tuber. Immuno-fluorescent staining (A) and immuno-gold staining (C) of HRP C1a. V; vacuoles, CW; cell wall. Scale bars in (A) and (B) represent 50 μm . Scale bar in (C) represents 1 μm . HRP C1a is highly accumulated in the vacuole of a particular kind of cells with little starch granules (arrow head in A and B, and C). Other cells without HRP C1a signals contain many starch granules (arrows).

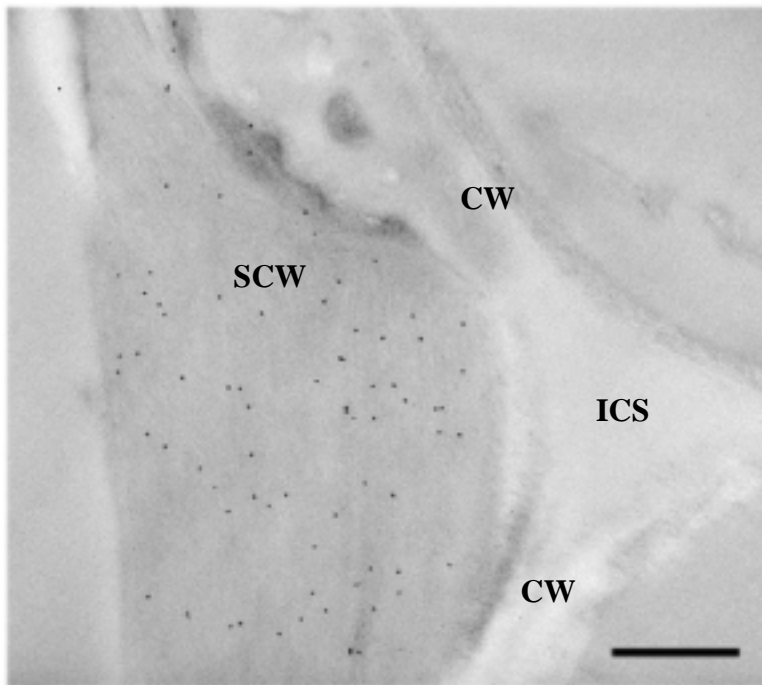


Fig. 2-12 HRP C1a exists at thick secondary cell wall in root tuber.

Immuno-gold staining of root tuber tracheary element with anti-HTP C1a antiserum. V; vacuoles, SCW; thick secondary cell wall, CW; thin cell wall, ICS; intercellular space. Scale bar represents 1 μm .

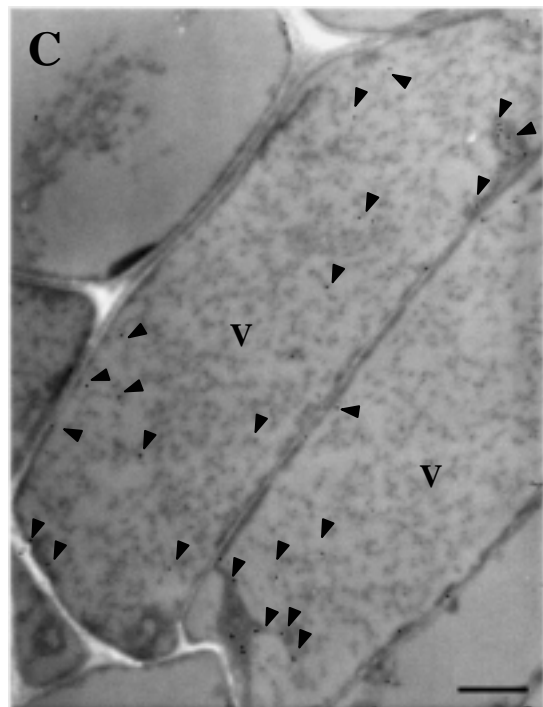
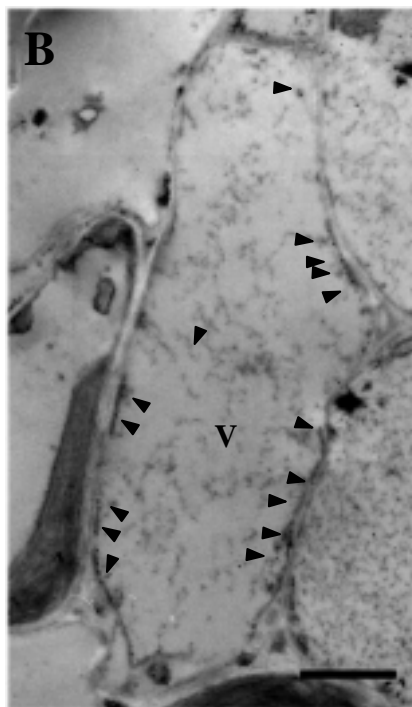
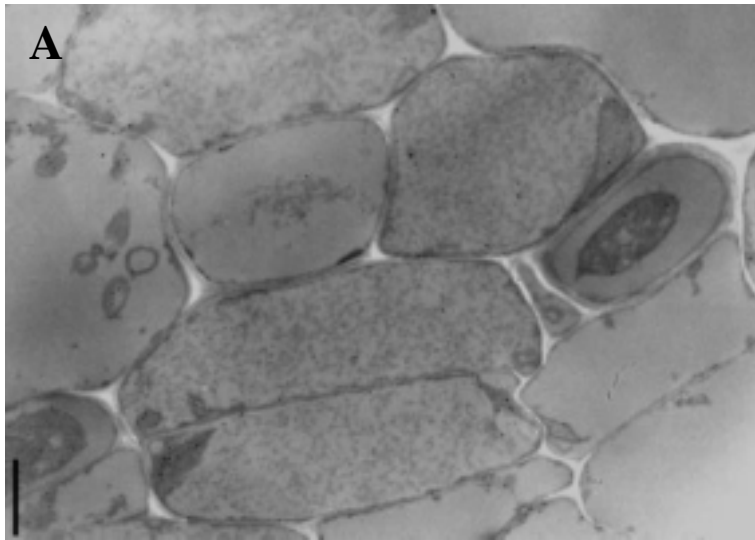


Fig. 2-13 Vacuole containing HRP C1a is PSV

The morphology of cells in horseradish petiole(A). Cells contain large vacuole with or without electron-dense aggregates in it. Immuno-gold staining of HRP C1a(B) and δ -TIP, a marker protein for PSV(C). HRP C1a and δ -TIP existed in the vacuole containing electron-dense aggregates. V; vacuoles. Scale bar in (A) represents 5 μ m. Scale bars in (B) and (C) represent 2 μ m.

HRP C1a	LLHDMVEVVD DFVSSM
chitinase (tobacco)	NGLLVDTM
β-1,3-glucanase (tobacco)	VSGGVWDS SVETNATAS LVSEM
lectin (barley)	VFAEAIAANSTLVAE
PR-1b (tobacco)	GDLEEQHPFDSKLE LP TDV
polyamine oxidase (barley)	DELKAEAK
AP24 (tobacco)	QAHPNF PLEMPGS SDEVAK
phaseolin (common bean)	AFVY
defencin (tomato)	VFDKISSEVKATLGEEAKTLSEVVLEEEIMME

Fig. 2-14 ctVSDs in plant cells.

C-terminal propeptide of many plant vacuolar proteins are reported to act as the ctVSD. The length of ctVSDs varies from a few amino acids to about 20 amino acid residues. The consensus amino acid sequences have not found in ctVSDs. The sequence of last 5 amino acids has a similarity in certain degree among some ctVSDs including the CTPP of HRP C1a (marked with a square). Tobacco chitinase (Neuhaus et al., 1991), tobacco β -1,3-glucanase (Melchers et al., 1993), barley lectin (Bednarek et al., 1990), tobacco PR-1b (Dixon et al., 1991), barley polyamine oxidase (Cervelli et al., 2004), tobacco AP24 (Melchers et al., 1993), common bean phaseolin (Frigerio et al., 1998), tomato defencin (Lay et al., 2003).



C15	NSNS	LLHDMVEVVDFVSSM
N10	NSNS	LLHDMVEVVD
C6	NSNS	*****DFVSSM
C15+GG	NSNS	LLHDMVEVVDFVSSMGG
C6+GG	NSNS	*****DFVSSMGG
V347P	NSNS	LLHDMVEVPDFVSSM
V347P+GG	NSNS	LLHDMVEVPDFVSSMGG
BLC	NSNS	VFAEAIAANSTLVAE
BLC+GG	NSNS	VFAEAIAANSTLVAEGG
CPEC	NSNS	EEEKEELMEWWKMM

Fig. 2-15 Modification of the CTPP.

N-terminally located 10 amino acids(N10) or C-terminally located 6 amino acids(C6) of the CTPP was added to mature HRP C1a. To see peptides functions as a typical ctVSD, two Gly residues were added to the C-terminal of the C6 and C15. As the control CTPP whose vacuolar sorting function is disrupted by the Gly addition, CTPP of barley lectin(Dombrowski et al., 1993) was fused to HRP C1a. For the disruption of the secondary structure of the CTPP, Val347 was replaced with Pro residue(V347P, V347P+GG). The CTPP of rat carboxypeptidase E, which forms amphipathic helix to interact with the lipid membrane, was used(CPEC). These genes were placed under the control of CaMV 35 S promoter and translational enhancer, *NtADH* 5' UTR. C1aSP; signal peptide of HRP C1a which is the same as NTPP described in chapter 1.

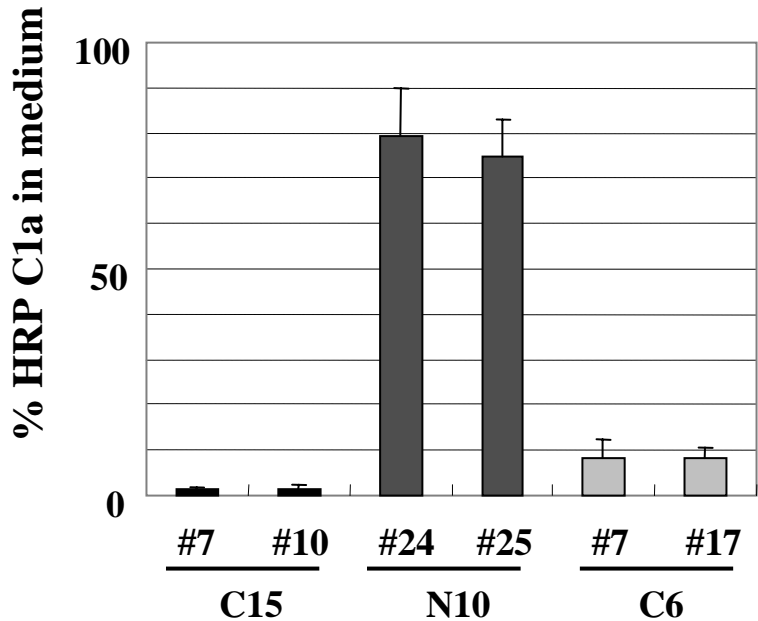
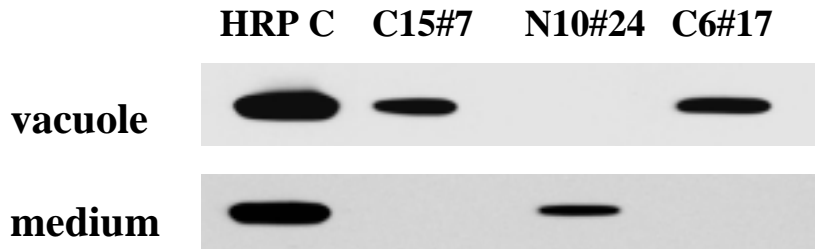
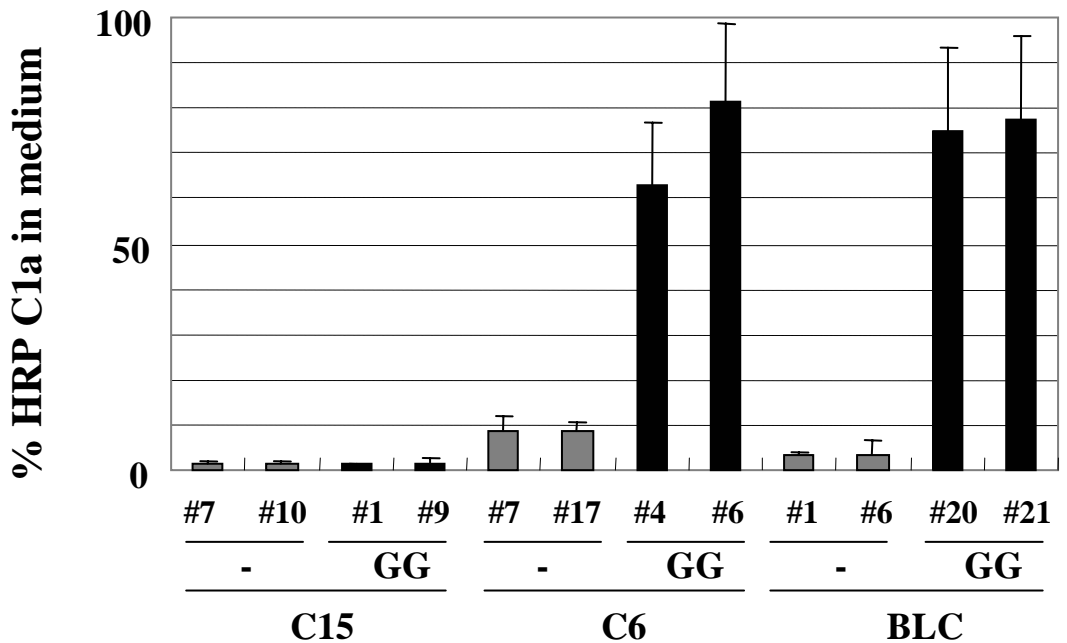
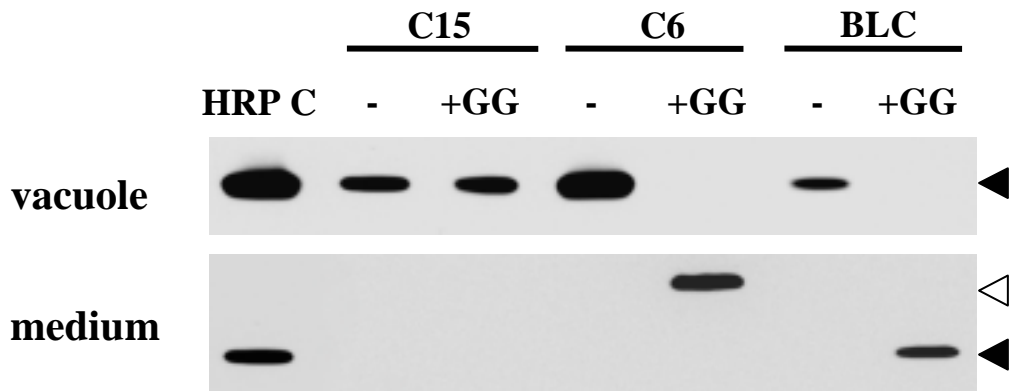
A**B**

Fig.2-16 C-terminal 6 amino acid residues of the CTPP act as the vacuolar sorting determinant.

BY2 cells expressing HRP C1a gene with modified CTPPs as shown in Fig.2-15. were analyzed. (A) Proportion of HRP C1a in medium. The amount of HRP C1a in medium and cell (including cell wall) were quantified and the percent of HRP C1a in medium was calculated. Two lines of transformants were analyzed for each construct.

(B) Vacuole sample and medium sample were prepared from each transformant and analyzed by IEF and ECL detection of HRP C1a. HRP C1a (Type IV, Sigma) was loaded as a standard marker.

A**B****Fig.2-17 C6, but not C15, is a typical ctVSD.**

Function of typical ctVSD is known to be abolished by the addition of Gly residue to its C-terminal. Two residues of Gly were added to C15, C6 and BLC (CTPP of barley lectin, typical ctVSD).

(A) Proportion of HRP C1a in medium. The amount of HRP C1a in medium and cell (including cell wall) were quantified and the percent of HRP C1a in medium was calculated. Two lines of transformants were analyzed for each construct.

(B) Vacuole sample and medium sample were prepared from each transformant and analyzed by IEF and ECL detection of HRP C1a. HRP C1a (Type IV, Sigma) was loaded as a standard marker. Solid arrowhead indicates the HRP C1a. Open arrowhead indicates HRP C1a with lower pI value.

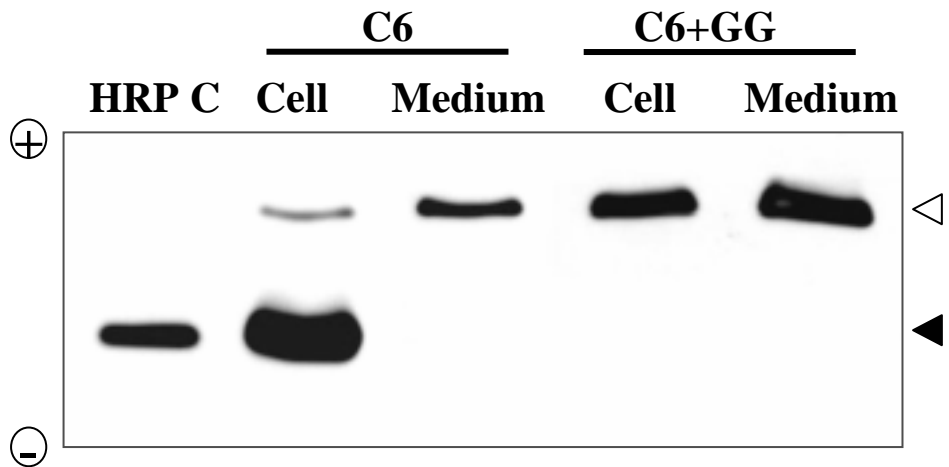
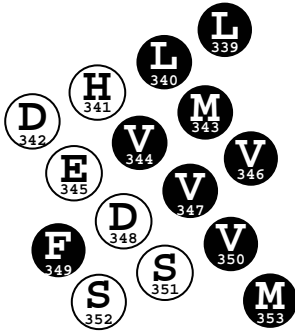
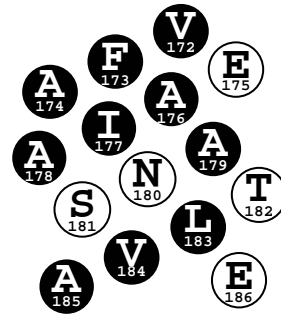


Fig.2-18 HRP C1a with lower pI value was detected when C6 and C6+GG were expressed. Samples prepared from medium and cell (including cell wall) were by IEF and ECL detection of HRP C1a. HRP C1a (Type IV, Sigma) was loaded as a positive control. Solid arrowhead indicates the HRP C1a. Open arrowhead indicates HRP C1a with lower pI value. The direction of electrodes are indicated by + or -.

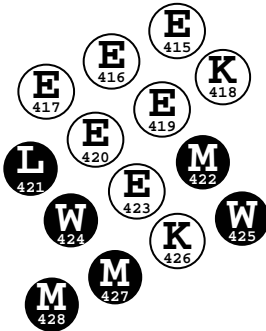
A



B



C



D

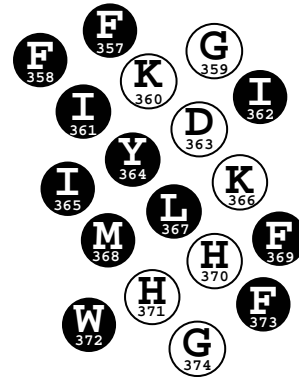


Fig.2-19 HRP C1a CTPP, but not barley lectin CTPP, can be folded into amphipathic helix. C-terminal propeptides of HRP C1a(A), barley lectin (B) (Bednarek et al., 1990), rat carboxypeptidase E (C) (Fricker et al., 1990) and *E.coli* penicillin-binding protein 5 (D) (Phoenix and Pratt, 1990) are shown. Lipophilic amino acid residues are indicated in white character with filled black circle, and hydrophilic amino acid residues are indicated in black character with open circle. CTPP of carboxypeptidase E and penicillin-binding protein 5 are reported to interact directly with lipid membrane in low pH.

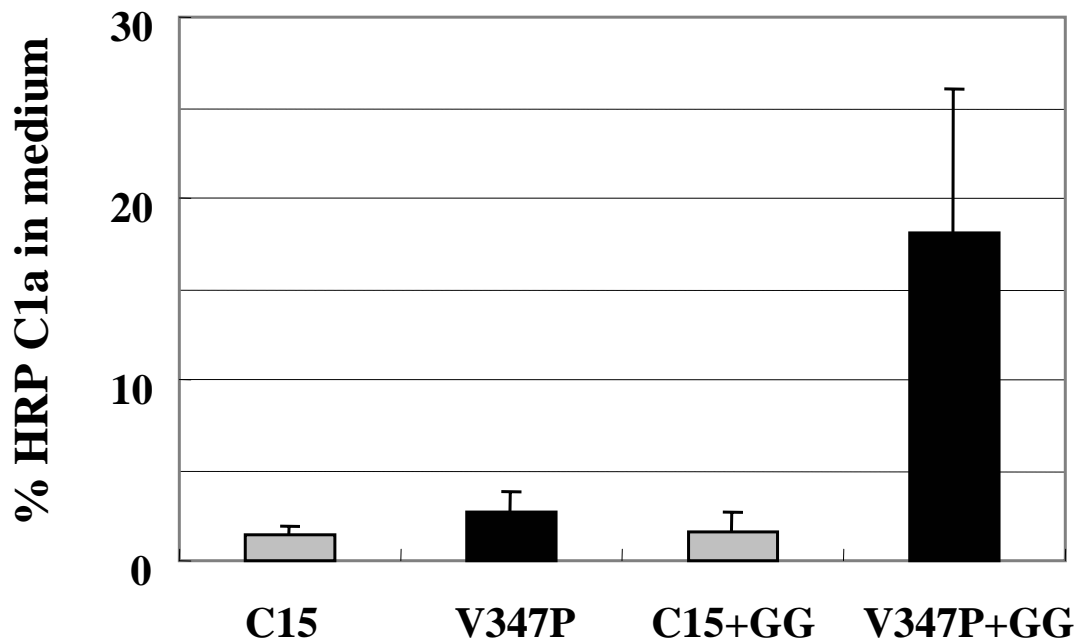


Fig.2-20 The effect of the helix-breaking by Pro insertion.

BY2 cells expressing HRP C1a gene with modified CTPPs as shown in Fig.2-15. were analyzed. The amount of HRP C1a in medium and cell (including cell wall) were quantified and the percent of HRP C1a in medium was calculated.

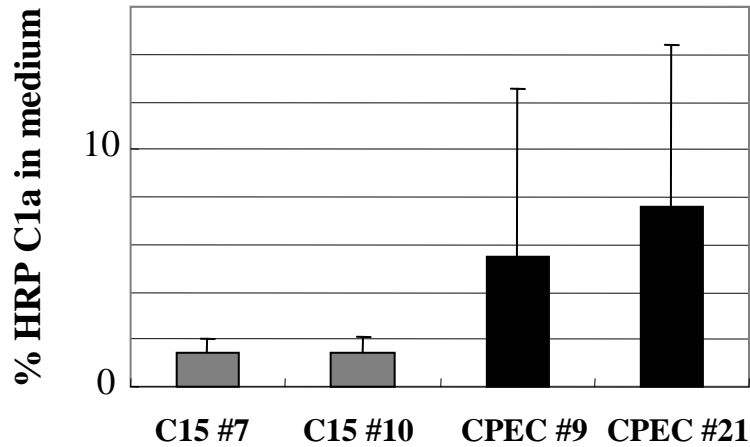
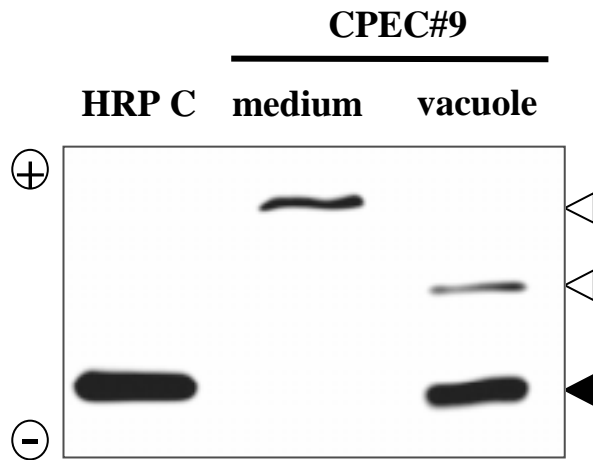
A**B**

Fig.2-21 Amphipathic helix derived from C-terminal propeptide of CPE acted as VSD.

(A) Proportion of HRP C1a in medium. The amount of HRP C1a in medium and cell (including cell wall) were quantified and the percent of HRP C1a in medium was calculated. Two lines of transformants were analyzed for each construct.

Sample were prepared from medium, protoplast and vacuole of BY2 cells expressing HRP (B) C1a with CTPP of carboxypeptidase E. Proteins were separated by IEF and ECL detection of HRP C1a. HRP C1a (Type IV, Sigma) was loaded as a standard marker. Solid arrowhead indicates the HRP C1a. Open arrowhead indicates HRP C1a with lower pI value. The direction of electrodes are indicated by + or -.

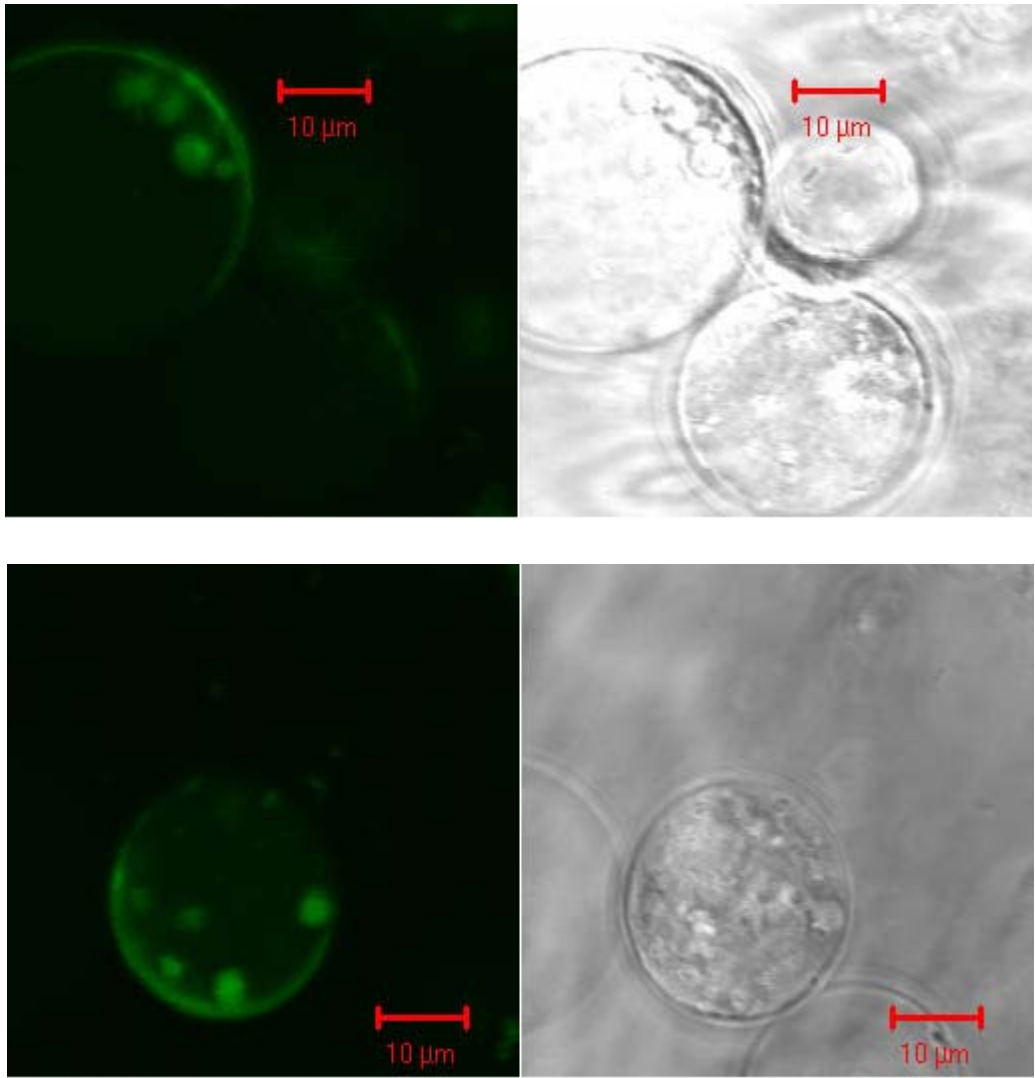


Fig. 2-23 Small vesicles are observed in the central vacuole.

Vacuoles were prepared from BY2 cells expressing N-G-C(Fig.1-2). In addition to the vacuole with green fluorescence throughout it, the vacuole containing small green vesicles was observed. A and C are fluorescence images, B and D are bright field images.

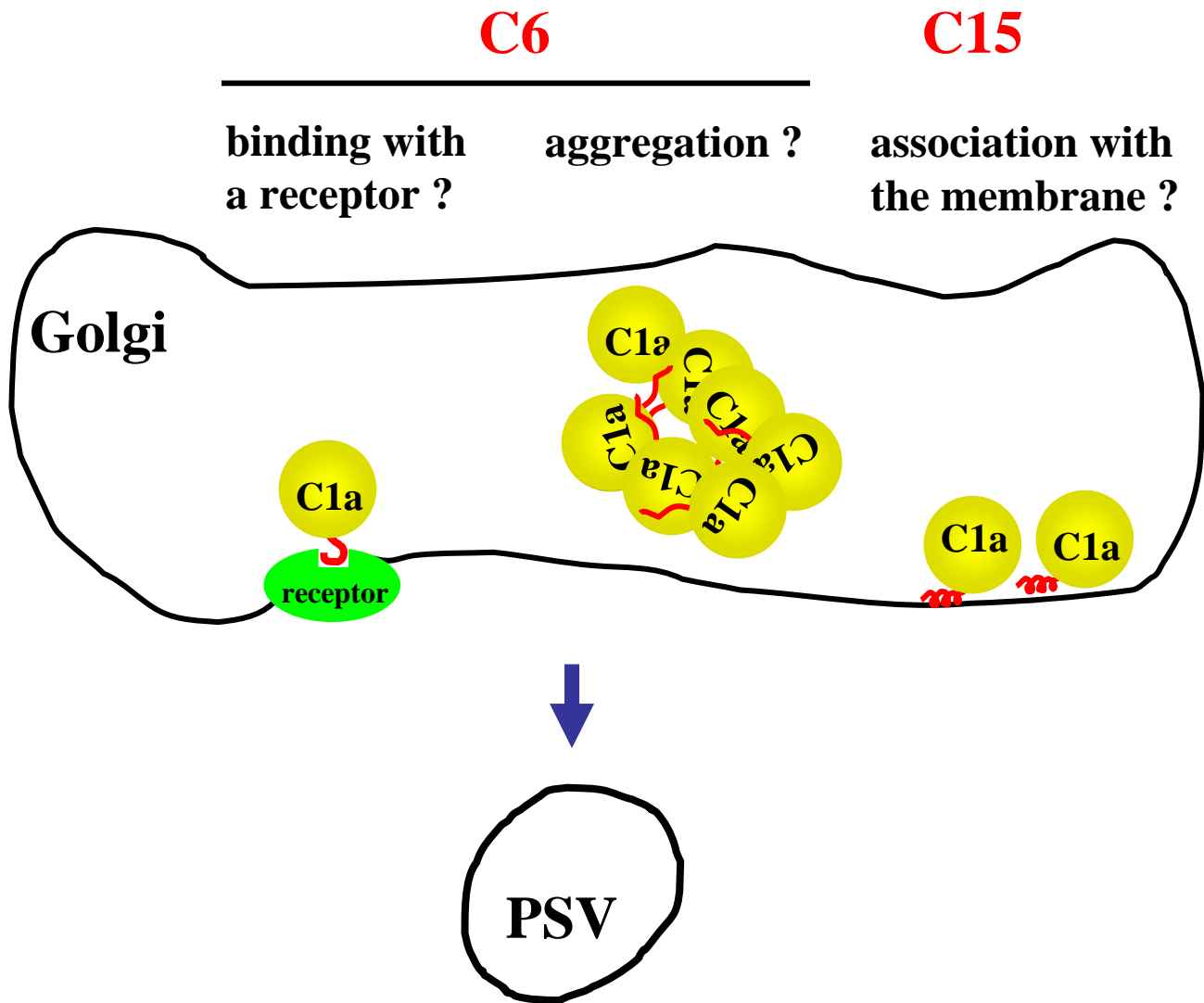


Fig. 2-24 The model of vacuolar sorting mediated by C6 or C15.

Two types of vacuolar sorting determinants will be included in the CTPP of HRP C1a. One is C6, 6 amino acids at C-terminus of the CTPP, whose vacuolar sorting ability is abolished by the addition of Gly residues to its C-terminus. C6 may associate with the hypothetical receptor or mediate self aggregation in the Golgi complex. The other is C15 that can be folded into amphipathic α -helix to interact with the lipid membrane.

2.4 考 察

2.4.1 西洋ワサビ組織における HRP C1a の局在

細胞分画により、西洋ワサビ組織において HRP C1a は主として液胞に存在し、葉柄では数パーセントはアポプラストにも存在することが明らかになった。また免疫組織学的な解析からも、HRP C1a は液胞およびアポプラストに存在することが確認された。葉柄および塊根において、液胞の HRP C1a は液胞膜の内側に接して存在した。液胞膜の内側に接して PRX が存在することは、ニチニチソウ、ルピナス、ブドウやトマトの未成熟果実などで報告されている(Sottomayor and Barcelo, 2003; Pedreno *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 2002)。HRP C1a を含む液胞 PRX の多くは塩基性アイソザイムであり、酸性のリン脂質とイオンの結合することが考えられる。液胞内において、HRP C1a は電子密度の高い凝集体中に存在した。また、塊根においては、凝集体がぎっしり詰め込まれた、大きな液胞内に HRP C1a が高蓄積した(Fig. 2-11)。また、これらの液胞には貯蔵液胞のマーカータンパク質である δ -TIP が存在した(Fig.2-13C)。これらの結果から、HRP C1a が存在する液胞はタンパク質貯蔵型の液胞であると考えられる。CTPP を有するオオムギの PRX、BP2 は種子のタンパク質貯蔵液胞に存在することが免疫電顕法によって示されている(Theilade *et al.*, 1993)。タンパク質貯蔵液胞(protein storage vacuole; PSV) は種子において発達しており、非常に複雑な構造を持つオルガネラである。PSV は Matrix, Crystalloid, Globoid cavity から構成される(Fig.2-1)。Matrix や Crystalloid は可溶性タンパク質から構成され、Globoid cavity はフィチン酸やシュウ酸塩の結晶を含むと考えられている。また、マメ科植物の種子 PSV には Crystalloid は含まれない(Weber and Neumann, 1980)。Matrix と Crystalloid のタンパク質組成は異なると考えられており、タバコ種子でマメの貯蔵タンパク質であるファゼオリンやフィトヘマグルチニンを発現させると PSV matrix に局在化するが(Sturm and Chrispeels, 1988)、トウモロコシのゼインを発現した場合は PSV crystalloid へ輸送される(Hoffman *et al.*, 1987)。Crystalloid を含む PSV を形成する種子には、precursor accumulating vesicle(PAC 小胞)と呼ばれる輸送小胞が存在し、小胞体から直接 crystalloid への輸送を仲介していると考えられている(Hara-Nishimura *et al.*, 1998)。一方、matrix へのタンパク質輸送は、ゴルジ体経路で行われる。ゴルジ体において PSV タンパク質の凝集が起こり、電子密度の高い dense vesicle(DV)を形成し出芽する。DV は次に PSV 前駆体(prevacuolar compartment; PVC)にとりこまれ、内部に多くの小胞を取り込んだ多胞体(multivesicular body; MVB)を形成する(Fig. 2-1)。最終的にこの MVB が PSV に融合し、内容物がとりこまれると考えられている(Robinson *et al.*, 1998)。種子細胞以外でも、通常の栄養器官において直径 2~5 μm 程度の PSV が

中央液胞とは独立して存在することが観察されている(Park et al., 2004)。西洋ワサビ葉柄において、中央液胞とは独立した直径 5 μm 程度の小さな液胞に HRP C1a が存在した(Fig.2-8)。これらの液胞は、PSV であることが予想され、現在 PSV マーカータンパク質との共局在解析を行っている。また塊根において HRP C1a は、点在する特定の細胞内の大きな液胞に高蓄積していた(Fig.2-11)。HRP C1a の細胞内輸送機構に加えて、このような特殊な細胞種が形成される機構も非常に興味深い。

HRP C1a の液胞局在性と、N-結合型糖鎖の構造には密接な関係がある。HRP C1a は 1 分子あたり 8 箇所という非常に多くの N-結合型糖鎖を有している。現在データベースに登録されているアポプラスト型および液胞型 PRX の N-結合型糖鎖付加部位(Asn-X-Thr/Ser モチーフ)の数を比較した。アポプラスト型(CTPP 無し)PRX には一分子あたり 2.5 ± 1.9 箇所(N=140)、CTPP 型 PRX には 7.0 ± 2.9 箇所(N=69)の糖鎖付加シグナルが存在した。一般に N-結合型糖鎖の付加によりタンパク質の安定性が高められると言われているが、液胞内で安定的に保持されるために CTPP 型 PRX アイソザイムには多くの糖鎖が付加されることが推測される。また、N-結合型糖鎖の修飾状態を知ることも液胞への局在化経路を理解する上で重要である。小胞体においてアスパラギン残基に付加されるのは、Glc3Man9GlcNAc2 という構造の糖鎖であるが、小胞輸送経路を経るうちに糖残基の切除・再付加が行われる。これらの反応を触媒するのは、糖転移酵素という一群の酵素であり、特定の反応を触媒する糖転移酵素が小胞輸送系の特定の画分に存在する。したがって、小胞体・ゴルジ体・液胞や細胞外などの区画に存在するタンパク質は、輸送過程で特有の糖鎖修飾を受け、それぞれの区画に特徴的な糖鎖構造を持つことになる (Lerouge *et al.*,1998)。西洋ワサビから精製した HRP C1a の糖鎖構造解析が行われ、主に(Xyl)Man3(Fuc)GlcNAc2 という構造を持つことが報告されている(Takahashi *et al.*, 1998)(Fig. 2-22)。この糖鎖は paucimannosidic-type に分類され、植物細胞の液胞に局在するタンパク質に特徴的な糖鎖構造である。HRP C1a 以外でも、オオムギの BP1、ダイズの SBP などの CTPP 型 PRX の糖鎖構造が調べられ、いずれも paucimannosidic-type 糖鎖を持つことが報告されている(Johansson *et al.*,1992; Gray *et al.*,1996)。一方、スノキ (*Vaccinium myrtillus* L.、ツツジ目) のアポプラスト型 PRX(VMPxC1) は細胞外タンパク質に特有の糖鎖構造である、complex-type 糖鎖を持つことが報告されている (Melo *et al.*, 1997)。さらに paucimannosidic-type 糖鎖には、ゴルジ体特有の糖鎖修飾である、 $\beta(1,2)$ -xylose および $\alpha(1,3)$ -fucose の付加が行われている。

このことから、西洋ワサビ組織において HRP C1a はゴルジ体経由で液胞へ輸送されていることが示唆される。一方、種子の液胞輸送においては、ゴルジ体を經由せず小胞体から直接液胞へ貯蔵タンパク質が輸送される経路も知られている(Fig.2-1)。実際、ダイズ種子の貯蔵タンパク質の多くは $\beta(1,2)$ -xylose および $\alpha(1,3)$ -fucose の付加が見られない high mannose-type 糖鎖を有している (Kimura *et al.*, 1997)(Fig. 2-22)。このように、糖鎖構造を調べることで、小胞輸送経路の推定を行うことができる。本研究において BY2 細胞で生産した液胞局在型 HRP C1a の糖鎖構造解析を、大阪大学生物工学国際交流センターの藤山和仁助教授と共同で行った。その結果、天然の西洋ワサビ由来 HRP C1a と同様、(Xyl)Man3(Fuc)GlcNAc2 が主な構造であることがわかった(データ非掲載)。このことから、BY2 細胞においても HRP C1a はゴルジ体を經由して液胞へ輸送されると考えられる。

2.4.2 HRP C1a CTPP による液胞局在化機構

近年、タンパク質の小胞輸送にはフォスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol; PI)のシグナルが重要な働きを担うことが主として酵母やほ乳類細胞で明らかになってきた。PI シグナルとして、外部刺激により脂質から切り取られた PI がセカンドメッセンジャーとして機能することが有名であるが、一方で脂質に結合した状態のイノシトールのリン酸化状態がその脂質膜の"identity"を決定することが示されている(reviewed by Odorizzi *et al.*, 2000)。イノシトールは 6 つの水酸基を有しており、各水酸基のリン酸化パターンの違いにより理論的には $2^6=64$ 通りのシグナルを提示することが可能である。輸送小胞とそのターゲット膜は、PI リン酸を指標として相手の膜を正しく認識し、融合する。例として、酵母においてゴルジ体から出芽する小胞が PI4 リン酸(PI4P)を提示する場合、その小胞は形質膜と融合し内容物は細胞外へ分泌される。一方、ほ乳類や酵母において多胞体の形成には PI3P が重要であり(Gillooly *et al.*, 2000; Fernandez-Borja *et al.*, 1999)、PI3P を含む輸送小胞はエンドソーム/多胞体の内部に取り込まれた後、液胞へ輸送される。今のところ、PI3P が多胞体の形成過程でどのような役割を担うかは明らかにされていない。植物 PSV のタンパク質輸送においても PI3P が重要であることが明らかになりつつある。オオムギのレクチン(ctVSD を持つ)とサツマイモのスポラミン(ssVSD を持つ)を共発現する BY2 細胞に PI3-kinase 阻害剤であるウォルトマニン进行处理すると、レクチンは液胞へ輸送されずに細胞外へ分泌されるが、スポラミンは液胞へ輸送される(Matsuoka *et al.*, 1995)。タバコキチナーゼの ctVSD 融合 GFP を発現するタバコ植物体にウォルトマニン进行处理すると、液胞への輸送が見られなくなる(Di

Sansebastiano *et al.*, 1998)。また、BY2 細胞において多胞体が液胞前駆体 (prevacuolar compartment; PVC) として機能するが、ウォルトマニン処理によって多胞体の巨大化および内部の小胞の消失が起こることが報告されている (Tse *et al.*, 2004)。Kim らは、植物細胞における PI3P の動態を観察するため、PI3P 結合ドメイン (endosome binding domain; EBD) と GFP の融合タンパク質をシロイヌナズナプロトプラストで発現させた (Kim *et al.*, 2001)。その結果、GFP 蛍光はゴルジ体から出芽した小胞に観察された後、その小胞は中央液胞の内腔に取り込まれた。本研究においても、NTPP-EGFP-CTPP 融合タンパク質を発現する BY2 の蛍光観察では、中央液胞全体に GFP 蛍光が観察されたと同時に (Fig.1-4, 1-5)、GFP 蛍光を有する小胞が中央液胞内に取り込まれる現象も観察された (Fig. 2-23)。HRP C1a CTPP による液胞輸送過程に PI3P および多胞体が関与するかは興味深い問題であり、今後検証する必要がある。

植物液胞輸送において、pH もまた重要な役割を持つ。真核生物の小胞輸送経路において、小胞体、ゴルジ、液胞前区画へと進むに従い、内腔 pH の低下が認められ、ゴルジ体では内腔の pH が 5.7 程度まで低下する。pH 勾配を壊す薬剤 (モネンシン、パフィロマイシン) を処理すると、ssVSD 型、ctVSD 型のどちらのタイプの液胞タンパク質も、液胞へ輸送されずに細胞外分泌が確認される (Matsuoka *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1998)。ssVSD 型シグナルについては、その受容体との結合が pH によって制御されている。中性に近い pH のゴルジ体内腔において ssVSD と受容体が結合し、LV 手前の酸性区画である液胞前駆体 (prevacuolar compartment; PVC) に到達すると受容体は ssVSD タンパク質を放出すると考えられている (Ahmed *et al.*, 2000)。一方で、ctVSD 型液胞輸送において、内腔の酸性化がどのような影響を及ぼすかということは非常に重要な問題である。ctVSD の受容体は現在のところ未知であるが、ctVSD 受容体が存在し、そのような受容体と ctVSD の結合が pH による制御を受ける可能性がある (Fig.2-24)。また、ctVSD 型液胞タンパク質の凝集が pH により制御される可能性もある。ctVSD 型貯蔵タンパク質はゴルジ体のシス面において会合を開始する (Hohl *et al.*, 1996)。また、Robinson らはモネンシンをエンドウマメの子葉に処理すると多胞体 (MVB) における貯蔵タンパク質の会合度合いが低下することを示している (Robinson *et al.*, 1998)。このような知見から、PSV への輸送とタンパク質の会合は密接な関係にあると考えられる。西洋ワサビ葉柄の液胞において、HRP C1a は電子密度の高い凝集体の中に存在した (Fig.2-7, 2-9, 2-11)。このことから、HRP C1a の液胞輸送においてもタンパク質の凝集が重要であることが示唆され、ctVSD (HRP C1a の C6 配列) が凝集過程に関与するかを検証することが重要である。内腔の酸性化はまた、液胞タンパク質と脂質膜との結合を制御する可能性がある。エンドウマメのレギュミン前駆体は疎水性の強いタンパク質

であり膜結合能を有するのに対して、成熟型レギュミンは膜結合能を持たない(Hinz et al., 1997)。また、タバコキチナーゼの抗 ctVSD 抗体を用いた解析では、ctVSD を有する前駆体は膜画分に検出されるが、ctVSD が切除された成熟型は可溶性画分に検出される(Freydl et al., 1995)。本研究では HRP C1a の C6 配列に加えて、全長 CTPP(C15 配列)から構成される両親媒性 α -ヘリックス構造が液胞輸送において重要であることを示唆する結果を得た。アグルチニン A(小麦)、レクチン(イネ)、 β -1,3-グルカナーゼ(タバコ)の CTPP も両親媒性 α -ヘリックス構造をとることが予想されている(Wilkins and Raikhel, 1989)。酸性アミノ酸含む親水性面と疎水性面から成る両親媒性 α -ヘリックスは、ウィルス、大腸菌からヒトに至るまで様々な生物のタンパク質中(主に C 末端領域)に見つかっており、その共通の性質として“酸性環境下で脂質二重層と直接結合する”ということが知られている(Fricker et al., 1990; Phoenix and Pratt, 1990)。一般に、酸性アミノ酸を含むポリペプチドはアルカリ性および中性環境下ではランダムコイルを形成するが、pH の低下に伴い α -ヘリックス構造が安定化され、これにより脂質と結合可能になると考えられている。

ほ乳類細胞には、このような両親媒性 α -ヘリックス構造が小胞輸送のシグナルとして機能する例が存在する。リソソームタンパク質であるサポシンは、マンノース 6 リン酸とは別経路を辿り、サポシンドメインと呼ばれる両親媒性 α -ヘリックス構造を介してリソソームへ輸送されることが明らかになった(Ham, 2003)。さらに、オオムギの液胞タンパク質であるアスパラギンプロテアーゼ:phytepsin はサポシンドメイン様の構造を有し、このドメインは植物細胞において液胞局在化シグナルとして機能することが明らかにされている(Kervinen et al., 1999; Törmäkangas et al., 2001)。また、ほ乳類細胞には調節性分泌経路と呼ばれる分泌経路が存在する。この経路では、一旦小胞内に蓄積したインスリン等のペプチドホルモンが、細胞外からの刺激に应答して分泌される。ラット由来カルボキシペプチダーゼ E(carboxypeptidase E; CPE)は調節性分泌経路において、ペプチドホルモンを分泌小胞へ詰め込むための受容体として機能する。CPE の C 末端プロペプチドが小胞輸送経路内腔の pH 低下に伴って両親媒性 α -ヘリックス構造を形成し(Fig.2-19C)、脂質と結合することで、CPE が調節性分泌経路へ送り込まれる(Dhanvantari et al., 2002)。CPE はまた、酸性環境下ではインスリンと会合体を形成することが知られており(Rindler, 1998)、調節性分泌経路において pH の低下はタンパク質の会合および脂質との結合という二つの局面に関与すると考えられる。ほ乳類調節性分泌経路は、クラスリン被覆を持たない、電子密度の高いタンパク質凝集体の核を持つ小胞により輸送が行われるという点で、植物の PSV 輸送過程とよく似ている。CPE の C 末端プロペプチドを融合した HRP C1a が BY2 細胞において液胞へ輸送された(Fig. 2-21)。また、C15+GG 配列

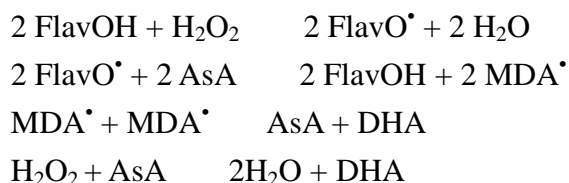
に、二次構造を破壊する Pro 残基を導入した場合、液胞輸送割合の低下が認められた(Fig.2-20)。これらの結果から、C15 配列の二次構造の重要性が示唆され、PSV 輸送過程において pH 依存的な膜結合ドメインがシグナルとして機能することが考えられる(Fig.2-24)。

2.4.3 局在性から考えられる HRP C1a の生理機能

PRX は植物体内において主として、二次細胞壁でのリグニンやスベリンの重合を行うと考えられている (Whetten *et al.*, 1998; Espelie *et al.*, 1986)。PRX の標準的な peroxidative cycle では、過酸化水素が還元されると同時に、リグニンやスベリンをはじめとした様々なフェノール系化合物が酸化(重合)される。PRX はまた hydroxylic cycle により、活性酸素種(ROS)の生成を行うことが知られている(reviewed by Passardi *et al.*, 2004)。このようなサイクルにより PRX は IAA もしくは NADPH と O₂ を用いて過酸化水素を生成し、リグニンモノマーであるコニフェリルアルコールを酸化重合できることが報告されている(Ferrer *et al.*, 1990)。PRX はまた、オーキシンの代謝 (Lagrimini *et al.*, 1997)、病原菌抵抗性 (Hllaire *et al.*, 1999; Takahama and Hirota, 2000)、アルカロイドの重合(Sottomayor and Barcelo, 2003)や耐塩性 (Amaya *et al.*, 1999)、エチレン合成など、様々な生理作用に関与すると考えられている。これらの知見は *in vitro* の酵素学的解析、PRX の発現プロファイル、PRX の過剰発現体や発現抑制植物の解析などから得られている。しかしながら、PRX の基質特異性は低い事や、植物体内に多くのアイソザイムが存在することなどから、個々のアイソザイムに特有の生理機能を定義することは難しい。試験管内で起こる反応が生体内でも起こり得るかということを考えるとき、ひとつの大きな問題として適切な環境下で、PRX とその基質が共存するか、ということが挙げられる。HRP C1a は植物における PRX の生理作用を知るためのモデル酵素として汎用され、リグニンを初め、オーキシン、アスコルビン酸、エチレン前駆体 ACC、サリチル酸などを酸化することが試験管内実験により確認されている。これらの *in vitro* のデータと HRP C1a の生理作用と結びつけるためには、細胞内局在性を考慮することが重要である。

HRP C1a はアスコルビン酸(AsA)を基質として用いることが可能であり、液胞内において HRP C1a が AsA の代謝を行う可能性がある。HRP C1a を高発現するポプラ植物体葉およびポプラ培養細胞は、*p*-chloromercuribenzoate(アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)阻害剤)に非感受性のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性が増加すると同時に、過酸化水素抵抗性の上昇が認められている(Kawaoka *et al.*, 2003)。AsA は植物細胞内において酸化ストレスの緩和や、シグナル分子として重要な働きを担っている(reviewed by Smirnov, 2000)。HRP C による AsA の酸化はフラボノイドなどのフェノール系化合物が共存下で促進され

ることが知られている(Yamasaki et al., 1998)。これは下式に示すように、peroxidative cycle により生じたフラボノイドのラジカルが効率的に AsA から電子を奪うためだと考えられている。



このような *in vitro* の実験結果をもとに、APX-アスコルビン酸系以外に、液胞 PRX による活性酸素消去系モデルが提唱されている(Yamasaki et al., 1997)。液胞内のフラボノイドが PRX により酸化され、その後 AsA により非酵素的に還元される。AsA の酸化で生じた DHA は細胞質に輸送された後、DHA 還元酵素によって AsA に再生される。このような一連の反応が組み合わされれば過酸化水素消去系として機能することが可能になる。AsA を基質として用いて膜を介した電子伝達を行う Cytochrome b561 や、NADH を用いて MDA[•]の還元を行う MDHAR が、原形質膜に加えて液胞膜にも存在することや(Griesen et al., 2004; Shimaoka et al., 2004; Preger et al., 2004)、全 AsA の約 20% は液胞内に存在することから(Rautenkranz et al., 1994)、液胞は AsA の代謝の場として重要な働きを担う可能性が強く示唆される。また HRP C1a を含む塩基性 PRX は液胞膜の内側に接して存在することで、cytochrome b561 などの AsA 代謝関連膜タンパク質と多酵素複合体を形成する可能性も考えられる。

HRP C1a は植物ホルモンであるオーキシンの酸化活性を有する。オーキシンの作用のひとつとして、細胞伸長の促進が挙げられる。HRP C1a を高発現するタバコ、ポプラでは、生育促進効果が見られ、どちらの宿主を用いた場合も、茎の細胞の縦方向への伸長増加が認められている(Kawaoka et al., 1994; 2003)。オーキシンによる細胞伸長において、ヒドロキシラジカル(OH[•]) の生成が不可欠であるが(Schopfer et al., 2001)、*in vitro* 反応系において HRP C は”hydroxylic cycle”によって O₂ を用いてオーキシンを酸化すると同時に OH[•] を生成する(Gazaryan et al., 1996)。OH[•] は細胞壁多糖を切断して弛緩させ、細胞伸長を促進すると考えられている (Schweikert et al., 2000)。O₂ の非存在下ではオーキシンによる細胞伸長が起こらないことや (Ray and Ruesink, 1962)、トウモロコシの子葉鞘に PRX 阻害剤処理を行うと、オーキシンによる OH[•] 生成および細胞伸長が抑制されるという *in vivo* 実験のデータも加味すると (Schopfer et al., 2002) PRX がオーキシンによる細胞伸長を仲介する可能性がある。OH[•] は膜透過性が無く、細胞壁多糖の切断を行うためには細胞外での OH[•] 生成が必要であるが、興味深いことに

CTPPを持たないPRXよりCTPPを持つ液胞型PRXの方が一般にIAA酸化作用が強いことが知られている(Van den Berg *et al.*, 1983, Gazaryan *et al.*, 1996)。西洋ワサビ組織において5%程度のHRP C1aはアポプラストにも存在した。ズッキーニのAPRXやアルファルファのMsPRX1BおよびMsPRX1Cなども、CTPPを有するにも関わらず細胞外への分泌が確認されている(Carpin *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2004)。これらの知見から、液胞型PRXの一部は、液胞へ輸送された後もしくは液胞を経由せずに細胞外へ分泌され、オーキシンによる細胞伸長促進を仲介する可能性がある。

本研究で、塊根の導管二次細胞壁にHRP C1aのシグナルが検出された(Fig.2-12)。導管は、プログラム細胞死によって内容物を失った導管細胞が縦に連結されて構成された管である。導管壁には、リグニンやスベリンなどの疎水性フェノール物質が大量に蓄積した、分厚い二次細胞壁が形成される。導管の形成過程は、ヒヤクニチソウ(*Zinnia elegance* L.)を用いて詳細に解析されている(revised by Fukuda, 2000)。ヒヤクニチソウ葉の柔組織から調製した細胞を植物ホルモン処理するにより、導管への分化を同調的に誘導することができる。この誘導系では、誘導開始6時間後に液胞膜の崩壊が見られ、このタイミングは二次細胞壁肥大の開始時間に一致する(Kuriyama, 1999)。二次細胞壁の肥大化は、液胞の崩壊後も数時間持続する。西洋ワサビ塊根の導管壁に見られたHRP C1aは、このような細胞死の過程により放出され、二次細胞壁の形成に関与することが示唆される。

植物液胞は害虫や病原菌耐性と深く関係している。液胞にはアルカロイドなどの抗菌物質とともに、PR(感染時特異的)タンパク質が蓄積される。これまでに14種類(PR-1~PR-14)のPRタンパク質が分類されており、PRXはPR-9に分類されている。PRタンパク質は遺伝子ファミリーを形成しているが、いずれのPRタンパク質にも細胞外型アイソザイム遺伝子(ctVSDを持たない)と液胞型アイソザイム遺伝子(ctVSDを有する)が存在する。細胞外型の多くは酸性アイソザイム、液胞型アイソザイムは塩基性アイソザイムであることが多い。近年、液胞型(ctVSDを有する)PRタンパク質が、病原菌に応答して細胞外へ分泌されるという知見が得られている。液胞型PRXであるインゲンマメのFBP1は病原菌の侵入部位をめぐって細胞外分泌されることが示されている(Brown *et al.*, 1998, Blee *et al.*, 2001)。Ndimbaらは、シロイヌナズナ培養細胞の細胞壁タンパク質のプロテオーム解析を行い、液胞型キチナーゼがエリシターに応答して細胞外へ分泌されることを報告した(Ndimba *et al.*, 2003)。タバコ培養細胞においても、液胞特有の修飾を受けたキチナーゼの細胞外分泌が報告されている(Kunze *et al.*, 1998)。また興味深いことに、組換えタンパク質による*in vitro*での病原菌増殖抑制効果を調べたところ、一般に液胞型キチナーゼおよびグルカナーゼは、

各アポプラスト型アイソザイムよりも高い抗菌性を発揮することが示されている(Sela-Buurlage *et al.*, 1993)。

植物 PSV への輸送は多胞体を経由するが、ほ乳類細胞において多胞体はリソソームへの輸送を中継するだけでなく、内容タンパク質を細胞外へ分泌することも知られている。このような小胞は“secretory lysosome (分泌リソソーム),” と呼ばれ、その働きのひとつに病原感染部位への抗菌タンパク質 (defensin や azurocidin 等) の分泌が挙げられる(reviwed by Blott and Griffiths, 2002)。植物細胞においても、ほ乳類細胞の secretory lysosome を介する分泌と同様の機構が存在し、ctVSD が病原菌感染応答性の分泌シグナルとして機能することも予想される。今後、液胞への輸送に加えて、細胞外分泌制御という観点からも ctVSD を研究することで、HRP Cl_a の生理機能や、ctVSD 型液胞局在化シグナルをより深く理解できると考えられる。

総括

近代工業化による環境破壊や、食料不足に伴い、植物バイオテクノロジーを利用した有用植物の作出が期待されている。植物細胞を用いた物質生産、なかでもタンパク質の生産技術の発展が望まれ、そのための基盤技術として、小胞輸送経路の制御技術（小胞輸送工学）の確立が重要である。

本研究では、BY2細胞における、HRP C1aの小胞輸送研究を行った。第一章では、HRP C1a前駆体中に存在するN末端(NTPP)およびC末端プロペプチド(CTPP)の機能解析を行った。NTPPは小胞輸送経路の入り口である小胞体へタンパク質を送り込むためのシグナルペプチドとして機能し、CTPPは小胞輸送経路に入ったタンパク質を液胞へ局在化させるためのシグナルであることを明らかにした。また、HRP C1aが活性型へと成熟するためには、シグナルペプチドの作用により小胞輸送経路に送り込まれることが必要であることがわかった。これらの知見は、有用酵素であるHRP C1aの大量生産を行う上で重要であると同時に、他の有用タンパク質生産にも応用可能である。

第二章では、まず西洋ワサビ組織におけるHRP C1aの局在解析を行った。HRP C1aは貯蔵器官である塊根において、タンパク質貯蔵型液胞に存在した。またHRP C1aの蓄積パターンは、現在までに報告のある器官、組織特異的なタンパク質発現とは異なっており、皮相組織中でも特定の細胞種にのみ高蓄積していた。HRP C1aの細胞内輸送制御機構の解析に加えて、このような細胞特異的発現機構を研究することで、外来有用タンパク質高蓄積(貯蔵)のための器官として西洋ワサビ塊根を利用することが可能になると考えられる。また局在解析により得られた知見は、HRP C1aの生理作用を理解する上で重要であると考えられる。液胞輸送に重要なHRP CTPPのアミノ酸配列の解析では、C末端側の6アミノ酸(C6)だけでも液胞輸送が仲介されることがわかった。一方で、C6とは独立に、全長CTPP(C15)から形成される両親媒性 α -ヘリックス構造も液胞輸送において重要であることを示唆する結果が得られた。今後、各シグナルの“作用点”を明らかにすることが重要である。C6に関しては、HRP C1aの自己会合の促進や、受容体の存在の有無について検証する必要がある。C15については、脂質膜との結合性を評価する必要がある。また、既知の両親媒性 α -ヘリックスと同様に、pHによるCTPPの構造変化が見られるかを調べる必要がある。またHRP C1aの元々の宿主である西洋ワサビ植物体における、C6およびC15による液胞輸送機構の解析を行うことも重要である。それにより、C6とC15それぞれのシグナルの機能を生理条件に近い環境下で解析できると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり終始御指導、御鞭撻を賜りました新名惇彦教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、直接懇切なる御指導を賜りました、吉田和哉助教授、仲山英樹助手に厚く御礼申し上げます。

本研究に対して適切な御助言と御配慮を頂いた、関根政実助手、加藤晃助手に謹んで感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、等電点電気泳動の手法をはじめ、多くの有益な御助言を賜りました、大阪大学生物工学国際交流センターの藤山和仁助教授に厚く御礼申し上げます。

免疫組織学的手法について、適切な御助言ならびに御指導を賜りました、岩野恵助手、竹村光一氏、高橋咲都紀氏(奈良先端科学技術大学院大学)に厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、プラスミドを供与して下さった島本功教授(奈良先端科学技術大学院大学)に厚く御礼申し上げます。液胞マーカートンパク質、TIP の抗体を供与して下さった、Rogers 博士(ワシントン州立大学)に厚く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として協力いただきました、志澤暢子氏、堀満千子氏、田林綾子氏に心より感謝します。耐塩性植物および環境浄化植物の分子育種を目指した研究の共同研究者である与那嶺育子博士、菅原満男氏、平良安聡氏を始め、御協力いただきました植物代謝調節学講座の皆様に感謝いたします。

最後に、精神的、経済的に支えて頂いた、家族に感謝します。

参考文献

- Acosta M, Casas JL, Arnao MB, Sabater F** (1991) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a substrate of peroxidase: conditions for oxygen consumption, hydroperoxide generation and ethylene production. *Biochim Biophys Acta.* **1077**:273-80.
- Ahmed SU, Bar-Peled M, Raikhel NV** (1997) Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol.* **114**: 325-336
- Ahmed SU, Rojo E, Kovaleva V, Venkataraman S, Dombrowski JE, Matsuoka K, Raikhel NV** (2000) The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol.* **149**: 1335-1344
- Amaya I, Botella MA, de la Calle M, Medina MI, Heredia A, Bressan RA, Hasegawa PM, Quesada MA, Valpuesta V** (1999) Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* **457**: 80-84
- An G** (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **79**: 568-570
- Andrews J, Adams SR, Burton KS, Evered CE** (2002) Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J. Exp. Bot.* **53**: 2185-2191
- Arnljots K, Olsson I** (1987) Myeloperoxidase precursors incorporate heme. *J. Biol. Chem.* **262**: 10430-10433
- Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DM, Vojinovic V, Cabral JM, Fonseca LP** (2003) Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **9**: 199-247
- Bate N, Spurr C, Foster GD, Twell D** (1996) Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* **10**: 613-623
- Bednarek SY, Wilkins TA, Dombrowski JE, Raikhel NV** (1990) A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* **2**: 1145-1155
- Bizily SP, Kim T, Kandasamy MK, Meagher RB** (2003) Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants. *Plant Physiol.* **131**: 463-471

- Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB** (2000) Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat. Biotechnol.* **18**: 213-217
- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR, Bolwell GP** (2001) Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol. Biol.* **47**: 607-620
- Blott EJ, Griffiths GM**, Secretory Lysosomes (2002) *Nature reviews* **3**:122-131
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP**, Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J.* **15**: 333-343
- Carpin S, Crevecoeur M, Greppin H, Penel C** (1999) Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol.* **120**: 799-810
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**: 3285-3303
- Cervelli M, Di Caro O, Di Penta A, Angelini R, Federico R, Vitale A, Mariottini P** (2004) A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J.* **40**: 410-418
- Conesa A, Jeenes D, Archer DB, van den Hondel CA, Punt PJ** (2002) Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 846-851
- Conesa A, van den Hondel CA, Punt PJ** (2000) Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3016-3023
- Conrad U, Fiedler U** (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.* **38**:101-109
- Coyle C, Duggan P, Godinho M** (1999) The development of a phytoremediation technique for the detoxification of soils contaminated with phenolic compounds using horseradish peroxidase (*Armoracia rusticana*): preliminary results. *Int. J. Phytoremediation* **1**: 189-202

- Daniell H** (1999) New tools for chloroplast genetic engineering. *Nat Biotechnol* **17**: 855-856
- Dansako T, Kato K, Sato J, Sekine M, Yoshida K, Shinmyo A** (2003) 5'-untranslated region of the HSP 18.2 gene contributes to efficient translation in plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* **95**: 52-58
- Denecke J, Botterman J, Deblaere R** (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* **2**: 51-59
- Dhanvantari S, Arnautova I, Snell CR, Steinbach PJ, Hammond K, Caputo GA, London E, Loh YP**, Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granule via a C-terminal transmembrane insertion. (2002) *Biochemistry* **41**:52-60
- Di Sansebastiano GP, Paris N, Marc-Martin S, Neuhaus JM** (1998) Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J.* **15**: 449-457
- Dixon DC, Cutt JR, Klessig DF** (1991) Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J.* **10**: 1317-1324
- Dombrowski JE, Schroeder MR, Bednarek SY, Raikhel NV** (1993) Determination of the functional elements within the vacuolar targeting signal of barley lectin. *Plant Cell* **5**: 587-596
- Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL** (1999) Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J. Biol. Chem.* **274**: 10533-10538
- Fecker LF, Kaufmann A, Commandeur U, Commandeur J, Koenig R, Burgermeister W** (1996) Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* **32**: 979-986
- Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, Neefjes J** (1999) Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr. Biol.* **9**: 55-58
- Ferrer MA, Pedreno MA, Munoz R, Barcelo AR** (1990) Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. *FEBS Lett* **276**: 127-130
- Fiedler U, Conrad U** (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology (NY)* **13**: 1090-1093

- Fourneau JM, Cohen H, van Endert PM** (2004) A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells. *J. Immunol. Methods* **285**: 253-264
- Fowler T, Rey MW, Vaha-Vahe P, Power SD, Berka RM** (1993) The catR gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol. Microbiol.* **9**: 989-998
- Freydl E, Meins J, F., Boller T, Neuhaus JM** (1995) Kinetics of prolyl hydroxylation, intracellular transport and C-terminal processing of the tobacco vacuolar chitinase. *Planta* **197**: 250-256
- Fricker LD, Das B, Angeletti RH** (1990) Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10). *J. Biol. Chem.* **265**: 2476-2482
- Frigerio L, de Virgilio M, Prada A, Faoro F, Vitale A** (1998) Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. *Plant Cell* **10**: 1031-1042
- Fujiyama K, Takemura H, Shibayama S, Kobayashi K, Choi JK, Shinmyo A, Takano M, Yamada Y, Okada H** (1988) Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur. J. Biochem.* **173**: 681-687
- Fujiyama K, Takemura H, Shinmyo A, Okada H, Takano M** (1990) Genomic DNA structure of two new horseradish-peroxidase-encoding genes. *Gene* **89**: 163-169
- Fukuda H** (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**: 245-253
- Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL** (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 1032-1038
- Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TM** (1987) A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8693-8711
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE** (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J. Biol. Chem.* **278**: 34725-34732
- Gazaryan IG, Lagrimini LM, Ashby GA, Thorneley RN** (1996) Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochem. J.* **313 (Pt 3)**: 841-847

- Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H** (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 4577-4588
- Gray JS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R** (1996) The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* **6**: 23-32
- Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU** (2001) Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. *Mol. Cancer. Ther.* **1**: 151-160
- Griesen D, Su D, Berczi A, Asard H** (2004) Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. *Plant Physiol.* **134**: 726-734
- Ham D** (2003) Structural requirements for lysosomal targeting of the prosaposin precursor protein. *Cell Biology International* **27**: 675-687
- Hamilton AJ, Fray RG, Grierson D** (1995) Sense and antisense inactivation of fruit ripening genes in tomato. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **197**:77-89
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ** (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* **268**: 714-716
- Hara-Nishimura II, Shimada T, Hatano K, Takeuchi Y, Nishimura M** (1998) Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**: 825-836
- Hartmann C, Ortiz de Montellano PR** (1992) Baculovirus expression and characterization of catalytically active horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 61-72
- Helenius A** (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **5**: 253-265
- Helenius A, Aebi M** (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Henriksen A, Schuller DJ, Meno K, Welinder KG, Smith AT, Gajhede M** (1998) Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry* **37**: 8054-8060
- Higgins MK, Demir M, Tate CG** (2003) Calnexin co-expression and the use of weaker promoters increase the expression of correctly assembled Shaker potassium channel in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1610**: 124-132
- Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor JM, Guikema JA, Leach JE** (2001) Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant Microbe Interact* **14**:

1411-1419

Hinman RL, Lang J (1965) Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry* **10**: 144-158

Hinz G, Hillmer S, Baumer M, Hohl II (1999) Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* **11**: 1509-1524

Hinz G, Menze A, Hohl I, Vaux D (1997) Isolation of prolegumin from developing pea seeds: its binding to endomembranes and assembly into prolegumin hexamers in the protein storage vacuole. *J. Exp. Bot.* **48**: 139-149

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**: 462-468

Hoffman LM, Donaldson DD, Bookland R, Rashka K, Herman EM (1987) Synthesis and protein deposition of maize 15 kDa zein in transgenic tobacco seeds. *EMBO J.* **6**: 3213-3221

Hohl I, Robinson DG, Chrispeels MJ, Hinz G (1996) Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell Sci.* **109 (Pt 10)**: 2539-2550

Holwerda BC, Padgett HS, Rogers JC (1992) Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell* **4**: 307-318

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**: 208-218

Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, Okita T, Kannangara CG, von Wettstein D (2000) The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1914-1919

Hulzink RJ, de Groot PF, Croes AF, Quaedvlieg W, Twell D, Wullems GJ, Van Herpen MM (2002) The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiol.* **129**: 342-353

Humair D, Felipe DH, Neuhaus JM, Paris N, (2001) Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **13**: 781-792

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

Jauh GY, Fischer AM, Grimes HD, Ryan Jr CA, Rogers JC (1998) δ -Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. **95**:12995-12999

Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**:1867-1882

- Jiang L, Sun SS** (2002) Membrane anchors for vacuolar targeting: application in plant bioreactors. *Trends Biotechnol.* **20**: 99-102
- Jiang L, Phillips TE, Rogers SW, Rogers JC** (2000) Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *J. Cell Biol.* **150**:755-769
- Johansson A, Rasmussen SK, Harthill JE, Welinder KG** (1992) cDNA, amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP 1. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1151-1161
- Kawaoka A, Kawamoto T, Ohta H, Sekine M, Takano M, Shinmyo A** (1994) Growth-stimulation of tobacco plant introduced the horseradish peroxidase gene *prxCla*. *Plant Cell Reports* **13**: 149-154
- Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A, Ebinuma H** (2003) Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiol.* **132**: 1177-1185
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K** (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10922-10926
- Kervinen J, Tobin GJ, Costa J, Waugh DS, Wlodawer A, Zdanov A**, (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *EMBO J.* **18**:3947-3955
- Kim DH, Eu YJ, Yoo CM, Kim YW, Pih KT, Jin JB, Kim SJ, Stenmark H, Hwang I** (2001) Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell* **13**: 287-301
- Kimura Y, Ohno A, Takagi S** (1997) Structural analysis of N-glycans of storage glycoproteins in soybean (*Glycine max.* L) seed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1866-1871
- Kinny AJ** (1996) Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J. Food Lipids* **3**:273-292
- Kirsch T, Paris N, Butler JM, Beevers L, Rogers JC** (1994) Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3403-3407
- Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H** (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 8013-8018
- Koide Y, Hirano H, Matsuoka K, Nakamura K** (1997) The N-terminal propeptide of the precursor to sporamin acts as a vacuole-targeting signal even at the C-terminus of

- the mature part in tobacco cells. *Plant Physiol.* **114**: 863-870
- Kornfeld R, Kornfeld S** (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-664
- Kornfeld S** (1990) Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 367-374
- Kunze I, Kunze G, Broker M, Manteuffel R, Meins F, Jr, Muntz K** (1998) Evidence for secretion of vacuolar alpha-mannosidase, class I chitinase, and class I beta-1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells. *Planta* **205**: 92-99
- Kuriyama H** (1999) Loss of tonoplast integrity programmed in tracheary element differentiation. *Plant Physiol.* **121**: 763-774
- Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lagrimini LM, Joly RJ, Dunlap JR, Liu TT** (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol.* **33**: 887-895
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA** (2003) Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol.* **131**: 1283-1293
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L** (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**: 31-48
- Lombrana M, Moralejo FJ, Pinto R, Martin JF** (2004) Modulation of *Aspergillus awamori* thaumatin secretion by modification of *bipA* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5145-5152
- Lund P, Dunsmuir P** (1992) A plant signal sequence enhances the secretion of bacterial ChiA in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **18**: 47-53
- Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T** (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**: 716-719
- Matsuoka K, Bassham DC, Raikhel NV, Nakamura K** (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J. Cell Biol.* **130**: 1307-1318
- Matsuoka K, Higuchi T, Maeshima M, Nakamura K** (1997) A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* **9**: 533-546
- Matsuoka K, Nakamura K** (1991) Propeptide of a precursor to a plant vacuolar

- protein required for vacuolar targeting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 834-838
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. Plant Physiol. **130**: 1807-1814
- Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Van Roekel JS, Pen J, van den Elzen PJ, Cornelissen BJ** (1993) Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. Plant Mol. Biol. **21**: 583-593
- Melo NS, Nimtz M, Conradt HS, Fevereiro PS, Costa J** (1997) Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.). FEBS Lett. **415**: 186-191
- Messing J** (1983) New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. **101**: 20-78
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y** (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Plant Cell Physiol. **37**: 49-59
- Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer RL** (1993) Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 5939-5943
- Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH** (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. Protein Eng. **13**: 377-384
- Moriyasu Y, Hattori M, Jauh GY, Rogers JC** (2003) Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. Plant Cell Physiol. **44**: 795-802
- Muntz K** (1998) Deposition of storage proteins. Plant Mol. Biol. **38**: 77-99
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant **18**: 473-497
- Murray C, Sutherland PW, Phung MM, Lester MT, Marshall RK, Christeller JT** (2002) Expression of biotin-binding proteins, avidin and streptavidin, in plant tissues using plant vacuolar targeting sequences. Transgenic Res. **11**: 199-214
- Nagata T, Nemoto Y, Hasegawa S** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the "Hela" cell in the cell biology of higher plants. Int. Rev. Cytol. **132**: 1-30
- Nagaya S, Nakai Y, Kato K, Sekine M, Yoshida K, Shinmyo A** (2000) Isolation of growth-phase-specific promoters from cultured tobacco cells. J. Biosci. Bioeng. **89**:

231-235

Nakamura K, Matsuoka K (1993) Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant Physiol.* **101**: 1-5

Nauseef WM, McCormick SJ, Clark RA (1995) Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **270**: 4741-4747

Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ, Slabas AR (2003) Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* **3**: 1047-1059

Neuhaus JM, Pietrzak M, Boller T (1994) Mutation analysis of the C-terminal vacuolar targeting peptide of tobacco chitinase: low specificity of the sorting system, and gradual transition between intracellular retention and secretion into the extracellular space. *Plant J.* **5**: 45-54

Neuhaus JM, Rogers JC (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**: 127-144

Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Jr, Boller T (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10362-10366

Nicchitta CV. (2002) A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Curr Opin Cell Biol.* **14**:412-6.

Odorizzi G, Babst M, Emr SD (2000) Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 229-235

Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Producing decaffeinated coffee plants. *Nature.* **423**:823

Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **42**: 479-488

Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beevers L, Phillips TE, Rogers JC (1997) Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol.* **115**: 29-39

Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**: 563-572

Park M, Kim SJ, Vitale A, Hwang I (2004) Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. *Plant Physiol.* **134**: 625-639

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**: 534-540

- Pedreno MA, Bernal AM, Calderon AA, Ferrer MA, Lopezserano M, Merino decacere F, Munoz R, Ros Barcelo A** (1993) A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in vitaceae, solanaceae and leguminoseae. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* : 307-314
- Phoenix DA, Pratt JM** (1990) pH-induced insertion of the amphiphilic alpha-helical anchor of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. *Eur. J. Biochem.* **190**: 365-369
- Plempner RK, Wolf DH** (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 266-270
- Preger V, Scagliarini S, Pupillo P, Trost P** (2004) Identification of an ascorbate-dependent cytochrome b of the tonoplast membrane sharing biochemical features with members of the cytochrome b561 family. *Planta*, on line first
- Rautenkranz A, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ** (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiol.* **106**: 187-193
- Ray PM, Ruesink AW** (1962) Kinetic experiments on the nature of the growth mechanism in oat coleoptile cells. *Devel. Biol.* **4**: 377-397
- Rindler MJ**, (1998) Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *J. Biol. Chem.* **273**: 31180-31185
- Roberts E, Kolattukudy PE** (1989) Molecular cloning, nucleotide sequence, and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 223-232
- Robinson DG, Rogers JC, Hinz G** (2000) Post-Golgi, prevacuolar compartments. *Annu. Plant Rev.* **5**: 270-298
- Rogers SG, Hoesch RB, Fraley RT** (1986) Gene transfer in plant : Production of transformed plant using Ti plasmid vectors. *Meth. Enzymol.* **118**: 627-640
- Sakuyama H, Endo Y, Fujimoto K, Hatano Y** (2003) Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 227-231
- Sato J, Kato K, Shinmyo A** (2003) The 5'-untranslated region of the tobacco *alcohol dehydrogenase* gene functions as effective translational enhancer in plant. *J. Biosci. Bioeng.* **95**: 52-58
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahry G, Wagner A** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* **214**: 821-828
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GA, Borst-Vreessen AW, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J** (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain

antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **30**: 781-793

Schweikert C, Liskay A, Schopfer P (2000) Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* **53**: 565-570

Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, Van Den Elzen, P., Cornelissen B (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* **101**: 857-863

Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GH, Winter JA, Tumer NE, Horonaka CM, **Sanders PR, Gasser CS, Aykent S, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT** (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* **233**:478-481

Shimada T, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1997) A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1414-1420

Shimaoka T, Ohnishi M, Sazuka T, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Shimazaki K, Maeshima M, Yokota A, Tomizawa K, Mimura T (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 672-683

Shusta EV, Raines RT, Pluckthun A, Wittrup KD (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **16**: 773-777

Smirnoff N (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 229-235

Sottomayor M, Ros Barcelo A (2003) Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. *Protoplasma* **222**: 97-105

Sticher L, Hofsteenge J, Milani A, Neuhaus JM, Meins F, Jr (1992) Vacuolar chitinases of tobacco: a new class of hydroxyproline-containing proteins. *Science* **257**: 655-657

Stoger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* **42**: 583-590

Sturm A, Chrispeels MJ (1988) Correct glycosylation, Golgi-processing, and targeting to protein bodies of the vacuolar protein phytohemagglutinin in transgenic tobacco. *Planta* **175**: 170-183

Takahama U, Hirota S (2000) Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on

browning of onion scales. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1021-1029

Takahashi N, Lee KB, Nakagawa H, Tsukamoto Y, Masuda K, Lee YC (1998) New N-glycans in horseradish peroxidase. *Anal. Biochem.* **255**: 183-187

Takahashi S (1990) Conformation of membrane fusion-active 20-residue peptides with or without lipid bilayers. Implication of α -helix formation for membrane fusion. *Biochemistry* **29**: 6257-6264

Takase K, Hagiwara K (1998) Expression of human alpha-lactalbumin in transgenic tobacco. *J. Biochem. (Tokyo)* **123**: 440-444

Tams JW, Welinder KG (1998) Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Lett.* **421**: 234-236

Theilade B, Rasmussen SK (1992) Structure and chromosomal localization of the gene encoding barley seed peroxidase BP 2A. *Gene* **118**: 261-266

Theilade B, Rasmussen SK, Rosenkrands I, Frøkiær H, Hejgaard J, Theilade J, Pihakaski-Maunsbach K, Maunsbach AB (1993) Subcellular localization of barley grain peroxidase BP 2 by immuno-electron microscopy. *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology* 321-324

Törmäkangas K, Hadlington JL, Pimpl P, Hillmer S, Brandizzi F, Teeri TH, Denecke J, (2001) A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **13**: 2021-2032

Tse YC, Mo B, Hillmer S, Zhao M, Lo SW, Robinson DG, Jiang L (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* **16**: 672-693

Valls LA, Hunter CP, Rothman JH, Stevens TH (1987) Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* **48**: 887-897

Van den Berg BM, Chibbar RN, Van Huystee RB (1983) A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from *Petunia*. *Plant Cell Rep.* **2**: 304-307

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11128-11133

Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ, Fang RX (2001) Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 490-494

Watson BS, Lei Z, Dixon RA, Summer L, Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* **65**: 1709-1720

- Weber E, Neumann D** (1980) Protein bodies, storage organelles in plant seeds. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **175**: 279-306
- Weber JM, Ponti CG, Kappeli O, Reiser J** (1992) Factors affecting homologous overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 alpha-demethylase gene. *Yeast* **8**: 519-533
- Welinder KG** (1979) Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* **96**: 483-502
- Whetten RW, MacKay JJ, Sederoff RR** (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 585-609
- Wilkins TA, Raikhel NV** (1989) Expression of rice lectin is governed by two temporally and spatially regulated mRNAs in developing embryos. *Plant Cell* **1**: 541-549
- Yamamoto YY, Tsuji H, Obokata J** (1995) 5'-Leader of a photosystem I gene in *Nicotiana glauca*, *psaDb*, contains a translational enhancer. *J. Biol. Chem.* **270**: 12466-12470
- Yamasaki H, Grace SC** (1998) EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS Lett.* **422**: 377-380
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol* **115**: 1405-1412
- Yoshida K, Shinmyo A** (2000) Transgene expression system in plant, a Natural Bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 353-362
- Zhang L, Wu G, Tate CG, Lookene A, Olivecrona G** (2003) Calreticulin promotes folding/dimerization of human lipoprotein lipase expressed in insect cells (sf21). *J. Biol. Chem.* **278**: 29344-29351
- 勝矢建** 西洋ワサビ C1a ペルオキシダーゼの生長促進効果と酵素の性質 大阪大学 修士論文 (1996)
- 藤山和仁** 西洋ワサビペルオキシダーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現 大阪大学 博士論文 (1990)