

異種細胞での発現系を用いたサツマイモ液胞タンパク質 スボラミンの細胞内輸送機構の解析

○松岡 健、服部 東穂、中村 研三 (名大・農・生化)

サツマイモ塊根の貯蔵タンパク質スボラミンは液胞内に蓄積している。スボラミンは膜結合型ポリソーム上でN-末端に成熟型にない37アミノ酸よりなる配列をもった前駆体として合成される。この extra-peptide のうち signal peptide 部分はN-末端側21個のアミノ酸だけであり、それに続く荷電アミノ酸に富んだ16アミノ酸の領域は、ERから液胞に至る過程で中間体から post-translational に除去されると推定される。この前駆体の構造は、動物リソゾームや、酵母液胞に局在する酵素蛋白質のプレプロ型前駆体のそれと類似している。このプロ領域は、加水分解酵素を不活性型に保つ機能を持つ他に、タンパク質をリソゾームや液胞へ特異的に輸送する機能も併せもつと推定されており、スボラミン前駆体の extra-peptide領域が、液胞局在化の為の情報を担っている可能性が考えられる。本研究では、スボラミン前駆体のプロセッシングと液胞への輸送機構を解析する手段として異種細胞での発現系を用いた。

【方法及び結果】 スボラミン cDNA を酵母発現ベクター YEp51 の *Gal10* Promoter 下流に挿入し、*S. cerevisiae* AH22 株へ導入した。ガラクトースによってその発現を誘導したが、スボラミンの発現は検出できなかった。この cDNA インサートの5'末端にはその合成時に付加された約30個の(dG)鎖をもち、これがスボラミンの発現を阻害している可能性が考えられた。実際、この(dG)鎖と5'-非翻訳領域の一部を削ったプラズミド(YpSAD16)によってAH22株中でスボラミンを発現させることができた。酵母で発現したスボラミンはすべて細胞中に存在し、培地中やペリプラズムには分泌されなかった。細胞中に存在するスボラミンを Western blotting によって解析すると、数本のバンドが検出され前駆体のままの大きさのものが最も多かった。このことは、スボラミン前駆体の signal peptide は動物や大腸菌の signal peptidase では効率よく切断されるという結果にもかかわらず、酵母では効率よく切断されないことを示唆している。前駆体の他に、signal peptide だけが除去された中間体、それに中間体よりは小さいが成熟型よりもやや大きな数本のバンドも検出された。この細胞より粗液胞画分を調整したところこれらのバンドのうち、中間体よりさらにプロセスされた数本のバンドが濃縮されていた。酵母の液胞タンパク質のプレプロ型前駆体のプロ領域の切断除去は液胞で起こり、この切断が欠損した *S. cerevisiae* *pep4* 変異株ではプロ型が液胞に蓄積することが知られている。YpSAD16 を *pep4* 株に導入し、発現したスボラミンを解析したところ、AH22株でみられた中間体よりも小さなバンドはすべて消失し、前駆体と中間体のみが検出された。これらの結果は、酵母細胞内で発現したスボラミン前駆体の少なくとも一部は、液胞へ輸送されている事を示唆している。

この他、大腸菌におけるスボラミン前駆体のプロセッシングに関する結果も併せて報告したい。