

# 植物細胞の分化を担う液胞プロセッシング系の分子機構

(課題番号 12304049)

平成12年度～平成14年度

科学研究費補助金 ( 基盤研究 (A)(2) )

研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 西村いくこ

(京都大学大学院理学研究科)

京 都 大 学 図 書



9810056150

附 属 図 書 館

# 植物細胞の分化を担う液胞プロセッシング系の分子機構

(課題番号 1 2 3 0 4 0 4 9)

平成12年度～平成14年度

科学研究費補助金 ( 基盤研究 (A)(2) )

研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 西村いくこ

(京都大学大学院理学研究科)

## はしがき

高等植物の分化の特徴は細胞の柔軟性にあり、これを支えているのが可逆的なオルガネラの変換能力である。中でも液胞は植物の生長・分化の過程や環境の変化に応じて大きく変動するオルガネラである。液胞の分化は、植物の細胞分化や細胞死に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

1975 年に Matile が、植物の液胞は動物細胞のリソソームに相当するオルガネラであるという説を提唱して以来、液胞は細胞社会が産み出す不要成分の分解の場であると考えられるようになった。しかし、これとはまったく逆の機能を持つ液胞が存在する。登熟期の種子の液胞がそれで、粗面小胞体で合成される多量の貯蔵タンパク質を蓄積する。このことから、緑葉のような栄養器官の液胞を分解型液胞あるいは栄養器官型液胞、種子などの貯蔵器官の液胞をタンパク質蓄積型液胞とよび、互いを区別している。このような液胞の機能分化を支えている 1 つが、粗面小胞体から派生してくるコンパートメントである。粗面小胞体で合成されたタンパク質を効率良くあるいは合理的な方法で液胞へ輸送する役割を担っている。私たちは、登熟種子細胞で貯蔵タンパク質の多量輸送にかかわる装置として発見された PAC 小胞と、ストレスや障害による細胞死を支えていると考えられる ER ボディについて多くの知見を示している。

多くの可溶性液胞タンパク質は細胞内の粗面小胞体で前駆体の形で合成され、液胞へと輸送される。液胞内には、様々な機能分子が前駆体として運び込まれてくるため、これらの分子を成熟型分子に変換するための機構、液胞プロセッシング系が存在する。この液胞プロセッシング系に中心的な役割を果たしているのが、液胞プロセッシング酵素 (VPE: Vacuolar Processing Enzyme) である。VPE は種子タンパク質の成熟化に関わる酵素として 1991 年に私たちが発見、命名したものである。その後、VPE が様々な液胞タンパク質の成熟化や活性化に関与していることを示してきた。現在、VPE ホモログは種々の植物より単離され

ており、植物に普遍的に存在することが示されている。それらは、貯蔵器官に発現するものと栄養器官に発現するものに分かれ、それぞれの器官に特有の液胞において使い分けがされていることが示唆される。

植物細胞が老化やストレスにより死に向かうとき、栄養器官型の VPE が誘導される。高等植物は、発生の過程や感染防御の過程で一部の細胞を死に至らせる能力を備えているが、そのような過程でも栄養器官型の VPE が誘導される。VPE は動物細胞のプログラム細胞死に関わる Caspase-1 様活性を示すこと、タバコモザイクウイルス (TMV) に感染したタバコ葉の過敏感反応死の極初期において VPE が機能することが分かってきた。

細胞が機能的な分子変換を図ろうとするとき、あるいは細胞死に向かうときには、不要になった細胞内成分を積極的に分解していくことが必須となる。この際の速やかな分解には液胞が重要な役割を果たしている。そのほか、過敏感反応死の際に誘導される抗菌性 (PR: Pathogenesis-related) タンパク質や様々な生体防御因子の集積という機能も兼ね備えている。このように高等植物の液胞は、植物の成長段階や環境に応じて分化するオルガネラとしてとらえることができる。特記すべきことは、液胞の機能転換が起こる時期や組織において、VPE が強く発現している点である。本研究では、液胞プロセッシング系の解明を中心に、植物細胞の分化・転換を支えている液胞の機能発現の分子機構を明らかにすることを目指した。

## 研究期間

平成12年度～平成14年度（3年間）

## 研究組織

研究代表者：西村いくこ（京都大学大学院理学研究科）

## 交付決定額

|        |        |    |
|--------|--------|----|
| 平成12年度 | 20,500 | 千円 |
| 平成13年度 | 14,500 | 千円 |
| 平成14年度 | 5,800  | 千円 |
| 計      | 40,800 | 千円 |

## 研究発表

### (1) 学会誌など

- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. **Plant Cell Physiol.** 41, 993-1001.
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. and Matsubara, H. (2000). Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from Indigo plants. **Plant Cell Physiol.** 41, 218-225.
- Mitsuhashi, N., Hayashi, Y., Koumoto, Y., Shimada, T., Fukasawa-Akada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2001). A novel membrane protein that is transported to protein-storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. **Plant Cell** 13, 2361-2372.
- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiol.** 127, 1626-1634.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2001). A Proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol.** 42, 894-899.
- Koumoto, Y., Shimada, T., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2001). Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol. Chem.** 276, 29688-29694.
- Hayashi, Y., Hayashi, M., Hayashi, H., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2001). Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana* ped1 mutant. **Protoplasma** 218, 83-94.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Rondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C. and Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. **Development**, 4681-4689.
- Tamura, K., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I. and Imai, H. (2001). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. **Plant Cell Physiol.** 42, 1274-1281.
- Minamikawa, T., Toyooka, K., Okamoto, T., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2001). Degradation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. **Protoplasma** 218, 144-153.
- Watanabe, E., Shimada, T., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2002). Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72

- with a prpeptide of 2S albumin. **J. Biol. Chem.** 277, 8708-8715.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Kondo, M., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2002). An ER-Derived Structure that Is Induced under Stress Conditions in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, 130, 1807-1814.
- Kuroyanagi, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2002). Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. **Plant Cell Physiol.** 43, 143-151.
- Shimada, T., Watanabe, E., Tamura, K., Hayashi, Y., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2002). A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). **Plant Cell Physiol.** 43, 1086-1095.
- Hayashi, H., Bellis, L.D., Kato, A., Hayashi, Y., Nito, K., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2002). Molecular characterization of an Arabidopsis acyl CoA synthetase localized on glyoxysomal membranes. **Plant Physiol.**, 130: 2019-2026.
- Kimura, Y., Matsuo, S., Tsurusaki, S., Kimura, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. (2002). Subcellular localization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase and high-mannose type free N-glycans in plant cell. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1570: 38-46.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. **Plant J.**, 33, 493-502.
- Shirahama-Noda, K., Yamamoto, A., Sugihara, K., Hashimoto, N., Asano, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003). Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, in press.
- Tamura, K., Shimada, T., Ono, E., Tanaka, Y., Nagatani, A., Higashi, S., Watanabe, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003). Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. **Plant J.**, in press
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003). The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in Arabidopsis. **Plant Cell Physiol.**, in press.

## (2) 国際会議における発表 ;

- Hara-Nishimura, I., T. Shimada, K. Yamada, M. Hayashi and M. Nishimura: PAC vesicle-mediated transport and vacuolar processing for precursors of seed storage proteins. **Keynote Speech of 6th International Congress on Plant Molecular Biology**, Quebec, Canada, June 2000. (招待講演)
- Hara-Nishimura, I.: Transport and processing of vacuolar proteins in plants. **The third workshop on Plant Endomembranes**, Heidelberg, Germany, Sept. 2000. (招待講

演)

- Nishimura, M. and I. Hara-Nishimura: PAC vesicles mediate transport of storage proteins to protein storage vacuoles in pumpkin and Arabidopsis. **International Symposium "Cell Biology"**, Pohang, Korea, Jan. 2000. (招待講演)
- Yamada, K., M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Autocatalytic activation of vacuolar processing enzyme responsible for maturation of vacuolar proteins. **6th International Congress on Plant Molecular Biology**, Quebec, Canada, June 2000.
- Shimada, T., Mitsuhashi, N., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.: A transport pathway for vacuolar proteins in plant cells. **The 2000 Japan-Korea Joint Symposium of Plant Science**, Shizuoka, Japan, July 2000.
- Yamada, K., M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: A Vacuolar Processing System for Maturation of a Lytic Enzyme during Leaf Senescence. **The 2000 Japan-Korea Joint Symposium of Plant Science**, Shizuoka, Japan, July 2000.
- Yamada, K., Mitsuhashi, N., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.: GFP with an endoplasmic reticulum retention signal is transported to vacuoles to be degraded in response to sucrose starvation. **Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists**, June 2001, Wisconsin, USA
- Hara-Nishimura, I., R. Matsushima, K. Yamada, E. Watanabe, T. Shimada, Y. Hayashi and M. Nishimura: ER-derived organelles in higher plants. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)
- Shimada, T., E. Watanabe, Y. Hayashi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: PV72 functions as a sorting receptor for pro2S albumin in pumpkin seeds. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)
- Nishimura, M., N. Mitsuhashi and I. Hara-Nishimura: PAC-vesicle mediated transport of storage proteins and membrane proteins to protein storage vacuoles. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan. (招待講演)
- Kuroyanagi, M., K. Yamada, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Activation mechanism of vacuolar processing enzyme. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan.
- Matsushima, R., Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: The ER-derived organelle localized in the epidermal cells of Arabidopsis. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan.
- Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Calcium-mediated association of a sorting receptor (PV72) and a storage protein. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan.

- Yamada, K., N. Mitsuhashi, T. Shimada, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Sucrose starvation induced degradation of ER-resident proteins in vacuoles of BY-2 cells. **Plant endomembranes: Biogenesis, traffic and dynamics**, Oct. 2001 Shonan, Japan.
- Hayashi, M., C. Namba, M. Kondo, I. Hara-Nishimura and M. Nishimura: Compartmentalization of seed storage proteins into precursor-accumulating (PAC) vesicles. International Meeting Metabolomix, Dec. 2001, Japan. (招待講演)
- Matsushima, R., K. Yamada, T. Shimada and I. Hara-Nishimura: A novel ER-derived organelle that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. **Plant Biology 2002**, August 2002, Colorado, USA.
- Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. **Plant Biology 2002**, August 2002, Colorado, USA.
- Hara-Nishimura, I., Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, and M. Nishimura: Calcium-mediated association of a propeptide of 2S albumin with a putative vacuolar sorting receptor PV72 found in the membrane of the PAC vesicles. **Minisymposium "Membrane Trafficking" Plant Biology 2002**, August 2002, Colorado, USA. (招待講演)
- Matsushima, R., M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: A novel ER-derived structure, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis thaliana*. **International Symposium of Plant Molecular Biology**, June 2003, Barcelona, Spain.
- Nishimura, M., N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi and I. Hara-Nishimura: vacuolar processing enzyme functions in the early process of TMV-induced hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Minisymposium "Plant Pathogen/Symbiont Interactions" Plant Biology 2003**, July 2003, Hawaii, USA. (招待講演)
- Hara-Nishimura, I., S. Nakaune and K. Yamada: differentiation of vacuolar processing enzymes in seeds: roles in formation of seed coats and maturation of storage proteins. **Minisymposium "Seed Biology" Plant Biology 2003**, July 2003, Hawaii, USA. (招待講演)
- Shimada, T., K. Fuji, L. Li, M. Kataoka, K. Yamada, M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Transport and processing of seed storage proteins in higher plants. **Plant Biology 2003**, July 2003, Hawaii, USA.
- Tamura, T. Shimada, K., E. Ono, Y. Tanaka, A. Nagatani, and I. Hara-Nishimura: Light-induced degradation of green fluorescent protein that is expressed in the vacuoles of higher plants. **Plant Biology 2003**, July 2003, Hawaii, USA.
- Nakaune, S., K. Yamada and I. Hara-Nishimura: A novel vacuolar processing enzyme functions in seed coat formation at the early stage of seed development. **Plant Biology 2003**, July 2003, Hawaii, USA.
- Fukao, Y., M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Proteomic analysis of the peroxisomal

- proteins in cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Matsushima, R., M. Kondo, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: The ER body, a novel ER-derived compartment, accumulating a b-glucosidase with an ER retention signal in *Arabidopsis*. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Involvement of vacuolar processing enzyme in TMV-induced hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Yamada, K., M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: E64d, an inhibitor of papain family proteases, inhibits endocytosis and degradation of plasma membrane proteins in BY-2 cells and *Arabidopsis* root cells. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Kuroyanagi, M., M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Activation of vacuolar processing enzyme of *Arabidopsis* by auto-catalytic removal of the C-terminal propeptide as an auto-inhibitory domain. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Kumamaru, T., Y. Uemura, Y. Takemoto, M. Ogawa, I. Hara-Nishimura and H. Satoh: Rice mutant *glup3* greatly accumulated the glutelin precursor in protein storage vacuole. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.
- Watanabe, E., T. Shimada, K. Tamura, R. Matsushima, Y. Koumoto, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura: Ectopic expression of an ER-localized form of PV72, a seed-specific vacuolar sorting receptor, in *Arabidopsis* leaves. **Plant Biology** 2003, July 2003, Hawaii, USA.

### (3) 総説

- Hara-Nishimura, I. and M. Maeshima: Vacuolar processing enzymes and aquaporins. In **Vacuolar Compartments**, edited by A. D. G. Robinson and J. C. Rogers (Schfield Academic Press, London, UK, 2000) pp. 20-42.
- 西村いくこ：高等植物の液胞と細胞内膜系の機能分化．蛋白質・核酸・酵素「植物の形づくり・遺伝子から見た分子メカニズム」岡田清孝，町田恭則，島本功，福田裕穂，中村研三編（共立出版，東京，2002年）pp. 1753-1759.
- 西村いくこ：図解 植物細胞の内膜系の多様性・ダイナミクス．細胞工学別冊，植物細胞工学シリーズ17「植物オルガネラの分化と多様性・細胞内の輸送系から高次機能へ」西村いくこ，中野明彦，佐藤直樹監修（秀潤社，東京，2002年）pp. 9-17.
- 嶋田知生，西村いくこ：液胞輸送経路の多様性を支える小胞体由来のコンパートメントの分化．細胞工学別冊，植物細胞工学シリーズ17「植物オルガネラの分化と多様性・細胞内の輸送系から高次機能へ」西村いくこ，中野明彦，佐藤直樹監修（秀潤社，東京，2002年）pp. 34-41.

嶋田知生, 西村いくこ: 液胞. 現代植物生理学講座 1 「植物細胞」, 西村幹夫  
編 (朝倉書店, 東京, 2002 年) pp. 87-96.

Hara-Nishimura, I.: Asparaginyl endopeptidase. In **Handbook of Proteolytic Enzymes**,  
edited by A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner (Academic Press, London,  
UK, 2003) in press.