

## イネ signal peptidase 遺伝子のクローニングと発現特性

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野  
岡 文香

**【背景と目的】** 植物や藻類で見られるプラスチドは、葉緑体やアミロプラストなど多様な形態をとり、光合成やデンプンの貯蔵を行っている。一方、ミトコンドリアは全ての真核生物に存在し、クエン酸回路や電子伝達系を介して ATP を生産する呼吸の場である。細胞にとって重要な両オルガネラで機能する多くのタンパク質は、核にコードされている。そのため移行シグナルを有した N 末端伸長型の前駆体タンパク質として細胞質で合成された後、目的のオルガネラへ運ばれる。輸送された前駆体タンパク質は、signal peptidase (SPase) と呼ばれるプロテアーゼによって移行シグナルが切断され、成熟タンパク質となる。この SPase は、正常なタンパク質輸送とフォールディングに不可欠であり、オルガネラ分化にも重要な役割を担うものと考えられる。しかしながら、植物における SPase に関する知見は非常に少ない。本研究では、植物体内でのタンパク質輸送に関与する SPase の同定と機能解明を目的とした。

**【方法】** イネデータベースから、両オルガネラへの移行シグナルを持つと推測される 2 種の SPase (SP1, SP2) が見いだされた。これらのクローニングを行い、一次構造解析を行った。また、両 SPase の大腸菌組換えタンパク質の調製ならびに基質特異性の解析を試みた。発現特性の解析では、半定量 PCR により各器官(葉身、葉鞘および種子)における発現量の比較を行った。さらに、両 SPase と GFP との融合遺伝子をタマネギ上皮細胞へ導入し、一過的な GFP 蛍光を観察することによって細胞内局在性を解析した。

**【結果】** SP1 および SP2 は、ペプチダーゼドメイン以外の N 末領域の相同性は低く、基質特異性などの機能が異なると推測された。本研究では、SP1 の大腸菌発現酵素の部分精製に成功したものの、酵素活性を示さなかったため、基質特異性は明らかにできなかった。発現特性の解析から、SP1 および SP2 は特に葉身および葉鞘といった光合成器官で発現量が高く、種子では発現量が低いことが明らかとなった。さらに、種子における SP1 の転写産物には、葉身における SP1 転写産物には観察されない、イントロンの部分配列の挿入が起こることがわかった。細胞内局在性解析の結果、SP1 はミトコンドリア局在型であることが明らかとなった。

**【考察及び結論】** 本研究では両 SPase の酵素化学的解析には至らなかった。しかしながら細胞内局在性の解析から、SP1 はミトコンドリアに局在している mitochondrial processing peptidase (MPP) であると考えられた。MPP はヘテロ二量体 ( $\alpha$ -MPP,  $\beta$ -MPP) を形成していることが明らかにされており、SP1 とのアミノ酸配列の類似性を調べたところ、SP1 は  $\alpha$ -MPP であると推定された。MPP は二量体を形成して初めてそのプロテアーゼ活性を示すため、本実験で得られた組換え SP1 単独では活性を示さなかったと考えられた。また本研究において初めて、SP1 遺伝子の選択的スプライシングによる発現抑制の可能性を示した。半定量 PCR の結果と合わせて、SP1 はタンパク質レベルで種子中にはほとんど存在しないと考えられ、器官特異的な発現特性が示された。