

# 植物のペプチドホルモンに関する生物有機化学的研究

近藤 竜彦 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

kontatsu@agr.nagoya-u.ac.jp

植物の生長や形態形成、防御応答などの多くの生命現象には、オーキシン、ジベレリンなどに代表される低分子有機化合物、いわゆる「植物ホルモン」が重要な役割を果たしていることが古くから知られている。一方で、動物で盛んに研究されているペプチド性の情報伝達因子が植物体内でも機能しているのかという点について、本研究の開始時には研究例も少なく、ほとんど明らかになっていなかった。しかし、2000年のシロイヌナズナの全ゲノム解読の結果から、植物ゲノム上にはペプチドホルモン前駆体をコードすると予想される数百にのぼる遺伝子が存在することが明らかになった。本研究では、植物においてこれらの前駆体遺伝子産物がプロセッシングを受けて生成する成熟型ペプチドホルモンを単離同定し、その機能や構造活性相関を明らかにすることに焦点を当てた。

## はじめに

ペプチドホルモンは一般に、前駆体として遺伝子にコードされ、翻訳された前駆体ペプチドが修飾酵素により切断、修飾を受けることによって生理活性を示す成熟型ホルモンとなる。ペプチドホルモンの機能について生化学的な解析を行うためには、この成熟型ホルモンの構造を明らかにすることが必須であるが、その精製、同定の過程には、通常の高分子有機化合物と異なる困難がある。ペプチドホルモンは一般的に nM レベルの低濃度で作用するため、その生産量は非常に少なく、さらに分解酵素に感受性である。そのため、試料を大量に消費する「生物検定」を行うことが困難である。また、高極性のものが多く有機溶媒への転溶はできない。さらに、動物の場合と異なり、植物には内分泌腺のようなホルモンを生産、貯蔵する組織がないため、ホルモンを高濃度に含む精製出発原料を得ることは難しい。このような課題をどのように克服し、興味深い生理活性を示すペプチドホルモンの単離、同定に至るのかという精製戦略が本研究の重要な鍵を握る。

## 植物の幹細胞数を制御する *CLV3* 遺伝子に由来するペプチドホルモン

植物地上部の形態形成において、いわゆる成長点に存在する茎頂分裂組織 (Shoot Apical Meristem, SAM) は支配的な役割を果たしている。SAM の中心には一群の幹細胞が存在している。この幹細胞は自らの未分化状態を維持しながら分裂を繰り返し、葉や花などの器官原基へと細胞を供給している。この幹細胞の数は、植物の組織数や成長速度などを調節する重要な因子であり、厳密な制御機構が存在する。*clavata* 変異株と呼ばれる一連の変異株は、この幹細胞数の制御機構に障害が生じた結果、SAM が肥大化して野生型株よりも多くの葉や花が形成されるという表現型を示す (図 1)。このうち *CLV3* 遺伝子は 96 アミノ酸からなる低分子タンパク質をコードし、その N 末端には分泌シグナル配列を持っていることなどから、幹細胞数を負に制御するペプチドホルモン前駆体遺伝子であると



図 1 野生型株 (COL) と *clv3-2* 変異株の表現型

考えられていたが、その成熟型ホルモンの構造は不明であった。そこで、この遺伝子をモデルケースとして、植物ペプチドホルモンを単離同定する手法について検討することにした。

精製出発原料、抽出法、粗精製法などについて、様々な手法を検討する過程で、非常に興味深い手法について知る機会を得た。その手法とは、動物の内分泌器官の凍結切片に直接レーザーを照射して MALDI-TOFMS 測定を行うことにより、分泌されようとしている成熟型ペプチドを直接検出、同定するという手法である。この手法を植物に応用したいと考え、シロイヌナズナの *CLV3* 過剰発現株から調製したカルスを用いて、試料調製法やカルスの培養条件などを検討しながら MALDI-TOFMS 測定を繰り返した結果、カルスの凍結切片から目的のペプチドに由来するシグナルを検出することに成功した。MSMS 分析の結果から、検出されたペプチドは 12 アミノ酸からなり、分子内の 2 カ所のプロリン残基が水酸化されたペプチドであることが明らかになり、MCLV3 と命名した。

化学合成した MCLV3 をシロイヌナズナ野生型株に処理すると、SAM や根端分裂組織 (Root Apical Meristem, RAM) の幹細胞数が減少、消失して組織形成が停止するという、*CLV3* 過剰発現株と同様の表現型が確認されたことから、MCLV3 が植物体内で生理活性を示すことを証明することができた。しかし、MCLV3 は、RAM に対しては 10nM という低濃度で強い生理活性を示すのに対し、SAM に対して明確な生理活性を示すには 1 $\mu$ M という高濃度の処理が必要であった。当初、この原因は地上部組織にペプチドが浸透しにくいからだと考えていたが、その後の研究から MCLV3 よりも C 末端が 1 残基長く、水酸化されたプロリン残基の一つが糖鎖修飾を受けた成熟型ペプチドがシロイヌナズナ植物体から検出、同定され、現在ではこちらのペプチドが SAM において機能していると考えられている。

さらに、カリフラワー可食部から調製した膜画分中に MCLV3 と非常に特異的に結合する受容体タンパク質が存在することを明らかにし、これを利用したハイスループットな結合アッセイ系を確立した。また、MCLV3 の類縁ペプチドを多数化学合成し、シロイヌナズナを用いた生物検定とカリフラワーを用いた結合アッセイによって網羅的に評価し、受容体結合に必要な残基や、ペプチドの構造保持に必要な残基などを明らかにした。(図 2)

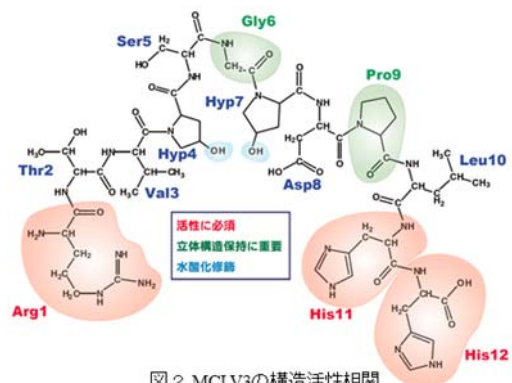


図 2 MCLV3の構造活性相関

## 気孔密度を調節するペプチドホルモン

植物の表皮上に存在する気孔は一对の孔辺細胞からなり、植物の光合成や呼吸、蒸散を行う際のガス交換の調節弁として重要な役割を果たしている。気孔数や密度は、湿度や二酸化炭素濃度などの様々な環境要因によって調節されており、逆に気孔密度は植物の光合成効率や乾燥耐性に大きな影響を与えることが知られている。形成された直後の葉原基は未分化な原表皮細胞に覆われており、そのうち一部の細胞が気孔系列細胞となり気孔分化過程に入る。気孔系列細胞は、複数回の不等分裂を行ったあと、楕円形の孔辺母細胞へと分化し、一度の等分裂を行って一对の孔辺細胞、すなわち気孔が形成される。このように、気孔の形成過程には表皮系幹細胞の運命決定と機能分化、不等分裂を介した表皮のパターン形成などの複雑な過程が含まれており、その一連の細胞分化の過程が表皮という非常に観察しやすい器官で起こるといふ点から、多くの研究者の興味を持ち盛んな研究が行われている。

大阪大学の柿本らにより、この気孔分化過程において重要な役割を果たす複数のペプチドホルモン前駆体遺伝子が発見され、共同研究の形でその成熟型ペプチドの単離同定に取り組むこととなった。

精製出発原料には、気孔形成を誘導する遺伝子

(*STOMAGEN*) を過剰発現したシロイヌナズナ植物体を用いることとした。成熟型ペプチドは細胞間隙（アポプラスト）へと分泌されるため、植物体からアポプラスト液を効率良く抽出する方法を確立した。次に問題となったのが、試料を大量に消費する生物検定をどうするかという点である。「はじめに」の項で述べたように、ペプチドホルモンの精製には多くの困難が伴うが、低分子化合物の精製にはない有利な点が一つ存在する。それは、モデル植物においてはすでにゲノムが解読されているため、精製前に前駆体のアミノ酸配列が明らかになっているという点である。そこで、前駆体の配列情報を元に抗ペプチド抗体を調製し、生物検定の代替として、ウェスタンブロッティングにおける抗ペプチド抗体に対する反応性を指標として成熟型ペプチドの精製を行うことにした。こうすることで、成熟型ペプチドの検出感度はウェスタンブロッティングの検出感度に依存することとなり、pmolオーダーで目的ペプチドを検出が可能になった。最終的に、この遺伝子に由来する生理活性ペプチドを単離し、詳細な構造解析の結果、45残基からなり、分子内に3対のジスルフィド結合を有することを明らかにした。このペプチドを *stomagen* と命名した。

また、長鎖ペプチド合成により *stomagen* を化学合成し、その構造を分子内の3対のジスルフィド結合様式も含めて明らかにした。さらに、*stomagen* が属するEPFファミリーペプチドの合成と機能解析にも取り組み、合成したペプチドを用いた共同研究によりEPFファミリーペプチドの作用機構を明らかにした。さらに、*stomagen* 受容体の同定に取り組み、光反応性アミノ酸を導入したプローブを化学合成シラベル実験を行うことで受容体候補タンパク質の検出に成功した。しかし、量的問題からその同定には至らず、本年の夏に別のグループが受容体同定についてNature誌で発表した。

このホルモンを利用して植物の気孔密度を制御し耐乾燥性または光合成能の高い機能性植物を開発するためには、詳細な構造活性相関研究が不可欠である。そこで *Brevibacillus* を用いた組換え *stomagen* の分泌生産について検討し、天然型と同様の構造と生理活性を示すペプチドの生産に成功した。この系を応用して、現在、*stomagen* および類縁ペプチドの詳細な構造活性相関研究を進めており、将来的には遺伝子編集技術と組み合わせることによって、ペプチドホルモンを介した植物の気孔密度調節技術の開発を目指している。

## おわりに

本研究で取り上げた *MCLV3* と *stomagen* には、ある共通点が存在する。それは、それぞれの前駆体をコードする遺伝子には、共通性の高い配列を有する「ファミリー遺伝子」が多数存在し、あらゆる組織で発現し、機能しているという点である。*CLV3* 遺伝子はC末端近傍にCLEモチーフと呼ばれる保存配列を有し、*MCLV3* はこの保存配列が切り出されて修飾を受けたものであった。このCLEモチーフを有する前駆体ペプチドをコードしている遺伝子は、シロイヌナズナゲノム上に30個以上、イネゲノム上には40個以上存在することが明らかになっている。その発現部位や発現時期は様々であり、植物の生長、形態形成の様々な場面において、それらの遺伝子に由来するペプチドホルモンの重要な

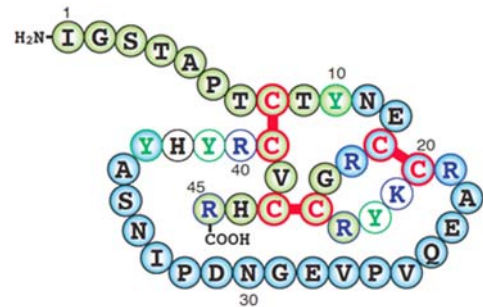


図3 *stomagen*の生理活性と成熟型ペプチドの構造

役割を果たしていることが報告されている。stomagen についても同様に、シロイヌナズナゲノム上に 10 個のファミリー遺伝子 (EPF ファミリー) が存在する。そのうち、EPF1、EPF2 については、stomagen とは反対に気孔分化を抑制する活性を示し、これらのペプチドホルモンが協奏的に機能することにより気孔密度が調節される機構が明らかになってきた。

植物ペプチドホルモンの研究は、近年非常に大きな展開を見せている。しかし、基礎生物学的な研究から得られた成果を実際の農業に活用するまでには、まだ多くの研究と時間を要すると考えられる。その大きな要因の一つとして、ペプチドホルモン自体を農薬や植物生長調節剤として利用するには、ペプチドの物性、コストなどの面から現実的ではないという問題が挙げられる。この問題をクリアするためには、より薬剤に適した低分子ミミック化合物の設計が必要であり、成熟型ペプチドの構造活性相関研究の成果がその分子的な基盤となっていくことを期待したい。

## 謝辞

本賞の受賞に当たっては、名古屋大学大学院生命農学研究科、川北一人研究科長よりご推薦をいただきました。本研究を遂行するにあたり、数多くの助言と叱咤激励をいただいた故 坂神洋次先生に心より感謝申し上げます。また、本研究を共同研究の形で支えていただいた柿本辰男先生 (大阪大学)、入江一浩先生 (京都大学)、福田裕穂先生 (東京大学)、澤進一郎先生 (熊本大学) に深く感謝します。さらに紙面の都合上全てを記すことはできませんが、研究に参加してくれた数多くの指導学生に深く感謝します。

## 引用文献

1. Tatsuhiko Kondo, Shinichiro Sawa, Atsuko Kinoshita, Satoko Mizuno, Tatsuo Kakimoto, Hiroo Fukuda, Youji Sakagami “A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis.” *Science*. **2006**, 313 (5788), 845-8
2. 近藤竜彦, 坂神洋次 (2007)「植物細胞の分化を調節するペプチド性植物ホルモン」*化学と生物*, 45(2), 78-80
3. Tatsuhiko Kondo, Touko Nakamura, Kenjiro Yokomine, Youji Sakagami “Dual assay for evaluating MCLV3 activity revealed the structure-activity relationship of CLE peptides.” *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **2008**, 377(1), 312-6
4. 近藤竜彦, 坂神洋次 (2008)「植物細胞の分化を調節するCLEペプチド」*植物の生長調節*, 43(1), 51-60
5. Tatsuhiko Kondo, Ryoko Kajita, Aya Miyazaki, Mayumi Hokoyama, Touko Nakamura-Miura, Satoko Mizuno, Yuichi Masuda, Kazuhiro Irie, Yuki Tanaka, Shinobu Takada, Tatsuo Kakimoto, Youji Sakagami “Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule” *Plant Cell Physiol.*, **2010**, 51(1), 1-8
6. Tatsuhiko Kondo, Kenjiro Yokomine, Aya Nakagawa, Youji Sakagami “Analogues of the *CLV3* Peptide: Synthesis and Structure-Activity Relationships Focused on Proline Residues” *Plant Cell Physiol.*, **2011**, 52(1), 30-36
7. 近藤竜彦, 柿本辰男, 坂神洋次 (2011)「気孔形成過程を調節するペプチドホルモン」*植物の生長調節*, **2011**, 46(2), 128-136

# Studies on bioorganic chemistry focusing on plant peptide hormones.

Tatsuhiko Kondo (Nagoya University, Graduate School of Bioagricultural Sciences)

kontatsu@agr.nagoya-u.ac.jp

## Abstract

A series of research was conducted to identify mature and bioactive plant peptide hormones derived from genes that encode their corresponding precursors, and to clarify their structure-activity relationship.

At the center of shoot apical meristems (SAM), stem cells in higher plants proliferate and supply new cells destined to become various organs while its undifferentiated state is maintained. The *CLV3* gene encodes a 96-amino-acid small protein with N-terminal signal peptide, indicating that its transcript will be processed to become a bioactive peptide that represses the size of SAM. Slices of *CLV3*-overexpressing calli were subjected to “*in situ* MALDI-TOFMS” experiments to identify a dodecapeptide in which two proline residues were hydroxylated. The peptide was designated as MCLV3. Chemically synthesized MCLV3 showed significant bioactivity against shoot and root meristems of *Arabidopsis*. A large series of peptides and their derivatives were synthesized and evaluated those bioactivity and receptor-binding aspects to clarify the structure-activity relationship, and the residues important for receptor binding and bioactivity were identified.

Stomata are leaf epidermal structures composed of a pair of specialized cells (guard cells) with a pore between them. The *STOMAGEN* gene encodes a small peptide with a putative secretory-signal sequence at its N-terminus and is expressed preferentially in mesophyll cells. The mature form of the bioactive peptide derived from the gene was purified from apoplastic extract of *Arabidopsis*, and identified as a 45-amino-acid peptide (stomagen) with three intra-molecular disulphide bonds.

These findings provide the structural basis for the future studies on the peptide hormones and those related (family) peptides to control the organization of plant organs, capacity of photosynthesis, and drought tolerance.

## Acknowledgement

I would like to express my deep gratitude to the late Prof. Youji Sakagami for his advises and supports. I appreciate the cooperation of Prof. Tatsuo Kakimoto, Prof. Kazuhiro Irie, Prof. Hiroo Fukuda, Prof. Shinichiro Sawa, and many other collaborators.

## References

1. Tatsuhiko Kondo, Shinichiro Sawa, Atsuko Kinoshita, Satoko Mizuno, Tatsuo Kakimoto, Hiroo Fukuda, Youji Sakagami “A plant peptide encoded by *CLV3* identified by *in situ* MALDI-TOF MS analysis.” *Science*. **2006**, 313 (5788), 845-8
2. Tatsuhiko Kondo, Ryoko Kajita, Aya Miyazaki, Mayumi Hokoyama, Touko Nakamura-Miura, Satoko Mizuno, Yuichi Masuda, Kazuhiro Irie, Yuki Tanaka, Shinobu Takada, Tatsuo Kakimoto, Youji Sakagami “Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule” *Plant Cell Physiol.*, **2010**, 51(1), 1-8
3. Tatsuhiko Kondo, Kenjiro Yokomine, Aya Nakagawa, Youji Sakagami “Analogues of the *CLV3* Peptide: Synthesis and Structure–Activity Relationships Focused on Proline Residues” *Plant Cell Physiol.*, **2011**, 52(1), 30-36