



## 植物ペプチドホルモンに関する生物有機化学的研究

名古屋大学大学院生命農学研究科 助教 近藤 竜彦

### はじめに

インスリンなどに代表される動物のペプチドホルモンの研究はその歴史も古く、分野も多岐にわたっており、現在では細胞分化、発生、器官形成から恒常性、個体行動にいたるまで様々な事象の制御にペプチドホルモンが不可欠の役割を果たしていることが知られている。一方で、植物においてはジベレリンやオーキシンなど低分子有機化合物が形態形成や生長に重要な役割を果たしていることが古くから知られ、研究も先行していた。そのため、1990年代にいくつかの先駆的な研究があるものの、植物のペプチドホルモンに関して注目している研究者は比較的少なかった。ところが、2000年のシロイヌナズナのゲノム解読により、ペプチドホルモンの前駆体(N末端に分泌シグナルを持つ低分子タンパク質)をコードしている遺伝子が植物のゲノム上に数百というオーダーで存在することが明らかになるに至り、この分野は多くの研究者の注目を集めることになった。このような背景から、植物におけるペプチドホルモンの多くは、最初に前駆体遺伝子が同定され、そのアミノ酸配列が明らかにされる。その後、その遺伝子の発現解析、欠損または過剰発現体の表現型等から対応するホルモンの機能が推定されるというポストゲノムのアプローチが必然的に研究の主流となっていった。しかし、ペプチドホルモンの機能やその受容機構、情報伝達経路などを詳細に解析するためには、生理活性を示す成熟型ホルモンの同定が必須である。ペプチドホルモンを従来の方法で精製、同定しようとすると、その物性や生理活性に合わせた精製法や生物検定法を確立する必要があり、分子生物学のように一般化されたプロトコルが適用しにくい分野である。そのため、私がこの分野に関わることになった2004年頃には、この「成熟型ペプチドの同定」という段階が植物のペプチドホルモン研究のボトルネックとなっているように感じられた。そこで、様々な手法や工夫を取り入れることによって、成熟型ペプチドの同定を目的とした研究に取り組むこととなった。以下にその研究概要について述べる。

### 1. 精製対象としての植物ペプチドホルモン

生物検定を指標とした精製によって生理活性物質を単離、同定するという天然物化学的な手法を植物ペプチドホルモンに適用した場合の、精製対象としての植物ペプチドホルモンの特徴について考える。ペプチドホルモンは動物でも同様だが一般的に低濃度で作用するために生産量が少ない。これは、特に植物体が小さいシロイヌナズナを用いる場合に特に留意する必要がある。その上、分解酵素に対しても脆弱であり抽出には注意が必要である。この「量的問題」が最も響いてくるのが、試料を大量に消費する生物検定の段階である。つまり、生物検定をいかに高感度化、小スケール化できるか、または生物検定に代替する手法を導入できるかという点が最重要検討項目であると言っても過言ではない。次節以降に実際の研究例について述べるが、どちらもこ

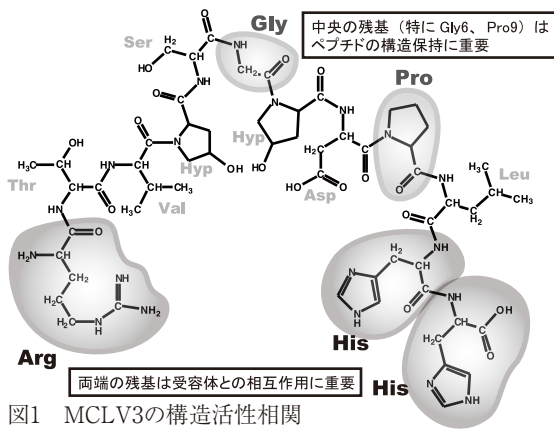
の点に関する工夫が成熟型ホルモンの同定に至る鍵であったと考えている。

### 2. 植物の茎頂分裂組織の幹細胞数を制御するMCLV3

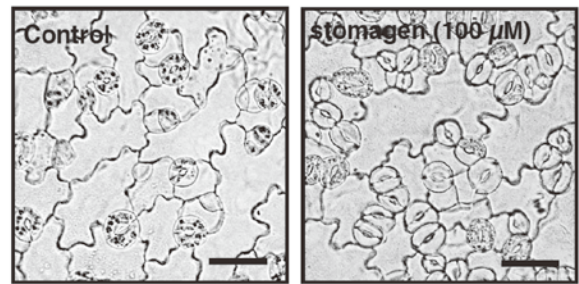
植物のペプチドホルモンを単離同定する手法について検討するために、まずモデルとして研究対象とする前駆体遺伝子を選定することにした。植物の地上部に形成される葉や花などの組織は、茎頂に存在する分裂組織の中心に存在する一群の未分化細胞(幹細胞)が分化して生じた原基が成長することによって形成される。この茎頂分裂組織中に維持されている幹細胞の数は、植物の組織数や成長速度を決める重要な因子であり、厳密な制御機構が存在すると考えられていた。茎頂分裂組織の機能に変化の生じた変異株とそれに対応する原因遺伝子が複数同定されていたが、その中でも*CLAVATA3 (CLV3)*遺伝子に関する解析が進んでいた。*CLV3*は幹細胞で特異的に発現する遺伝子で、幹細胞数を負に制御するペプチドホルモンの前駆体をコードしていると考えられていたが、成熟型構造は不明であった。そこで、この植物地上部の形態形成の根幹で機能する*CLV3*遺伝子を研究対象とすることにした。

当初、この遺伝子を過剰発現させた植物体を凍結破碎して抽出、粗精製しペプチドの検出を行うなどの予備実験を行っていたが、芳しい成果は得られていなかった。この時期に、化学と生物誌に掲載されていた「新規生理活性ペプチドの新しい探索法」という記事に出会った。この記事では、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を測定することにより、その器官から分泌される成熟型ペプチドを直接検出、同定するという驚くべき手法が紹介されていた。この手法を植物に適用できれば、前段で述べた量的問題や生物検定の問題もスキップして直接成熟型ペプチドを同定できるはずである。そこで生体材料や切片の調製法、測定条件など様々な検討を行い、最終的に、*CLV3*遺伝子を過剰発現させたカルスから調整した凍結切片にレーザーを照射してMALDI-TOFMSを測定することにより、*CLV3*前駆体のC末端付近に存在する保存領域(CLEモチーフ)に由来し、2カ所のプロリン残基が水酸化された生理活性ペプチドを検出、同定することに成功し、MCLV3と命名した。化学合成したMCLV3はシロイヌナズナの茎頂分裂組織や根端分裂組織に対して幹細胞数を減少させるという生理活性を示した。

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、トリチウム標識したMCLV3を利用したハイスループットな受容体結合アッセイ系を確立することができた。そこで、MCLV3の類縁ペプチドを多数化学合成し、茎頂および根端に対する生理活性と受容体結合能を網羅的に評価する構造活性相関研究を展開した。その結果から、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を明らかにした(図1)。



気孔への細胞分化を調節しているのか、また植物の気孔密度を調節することで農業生産性の向上が可能なのかという点に興味を持ち研究を進めている。



### 3. 植物表皮細胞の気孔分化を誘導するstomagen

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機能している。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も知られている。また、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いることから、多くの研究者の興味を集めている。

大阪大学大学院理学研究科教授の柿本先生のグループの研究から、この気孔形成過程において表皮細胞が気孔へ分化することを促進するペプチドホルモンの前駆体遺伝子が同定された。そこで、この遺伝子 (*STOMAGEN*) に由来する成熟型ペプチドホルモンの同定を目的とした共同研究を行った。

まず、*STOMAGEN* 遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナ植物体からアポプラスト（細胞間隙）液を効率良く抽出する方法を確立し、精製出発原料として非常に夾雑物の少ない抽出液を得ることができた。次に問題となったのが、前段で述べた生物検定である。生物検定のみを指標とする通常の生理活性物質の精製とは異なり、この *STOMAGEN* の研究においては前駆体のアミノ酸配列という重要な情報が先に明らかになっている。この点を最大限に活用し、配列情報をもとにして抗ペプチド抗体を作製し、生物検定の代わりにこの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。最終的に2段階のHPLC精製を含む3段階の精製によって、この遺伝子に由来する45アミノ酸残基からなる生理活性ペプチドstomagenを単離、同定することに成功した。また、京都大学大学院農学研究科教授の入江、村上両先生の協力をいただき、長鎖ペプチド合成によりstomagenを化学合成することができた。その後、合成ペプチドを用いた詳細な構造解析により、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ファミリーの他のペプチドの合成と機能解析にも取り組み、化学合成したペプチドを用いた共同研究によりその作用機構を明らかにした。

現在は、stomagenおよびその類縁ペプチドを化学合成および組換えタンパク質として得る手法を確立し、詳細な構造活性相関について明らかにすることで、この同じペプチドファミリーに属するペプチド群がどのように特異的な受容体に認識され、

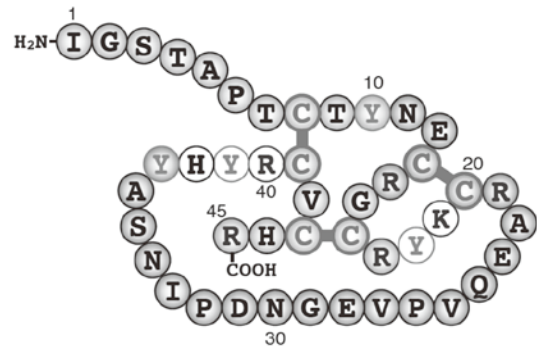


図2 stomagenの生理活性(上)とその構造(下)

謝辞 本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科生理活性物質化学研究分野において行われたものです。この研究の機会を与您にいただくとともに、日々ご指導ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科教授であられた故・坂神洋次先生に謹んで心よりの感謝を申し上げます。また、現在同研究室でご指導いただいている小鹿一先生、中川優先生にも感謝いたします。本研究を通じて植物ペプチドホルモンという興味深い分野に飛び込んでいく機会をいただき、共同研究を通じて多くのご協力、ご助言をいただきました大阪大学大学院理学研究科教授 柿本辰男先生、同助教 高田忍先生、ペプチドの合成や取り扱いについて多くの貴重なご助言をいただき研究にも多大なご協力をいただきました京都大学大学院農学研究科教授 入江一浩先生、同准教授 村上一馬先生に深く感謝申し上げます。さらに、共同研究を通じて多くのご助言とご協力をいただきました東京大学大学院理学系研究科教授 福田裕穂先生ならびに現熊本大学大学院自然科学研究科教授 澤進一郎先生に感謝いたします。本研究の展開に際してご協力いただきました名古屋大学大学院生命農学研究科准教授 石黒澄衛先生、丹羽智子博士、同理学研究科助教 金岡雅浩先生にも心よりの感謝を申し上げます。また、本研究に参加し、多くの時間と労力を捧げてくれた名古屋大学大学院生命農学研究科生理活性物質化学研究分野の修了生、院生、そして機器分析を中心に多大なサポートをいただいた技術職員の皆様に深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・堀尾文彦先生(名古屋大学大学院生命農学研究科教授)ならびにご支援を賜りました農芸化学会中部支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。