

研究種目： 特定領域研究  
研究期間： 2007 ~ 2012  
課題番号： 19060010  
研究課題名（和文） 分泌因子および受容体キナーゼを介した情報伝達機構

研究課題名（英文） Identification of ligand-receptor pairs in plants

#### 研究代表者

松林 嘉克 (Matsubayashi Yoshikatsu)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：00313974

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：ペプチドホルモン・受容体・翻訳後修飾・シロイヌナズナ

#### 1. 研究計画の概要

分泌型ペプチドおよび特異的受容体を介した情報伝達は、多細胞生物の形態形成における細胞間情報伝達に必須のメカニズムであるが、植物ではその研究例は依然として少ない。本研究では、*in silico* 遺伝子スクリーニングによる新規ペプチドホルモン候補遺伝子の探索や分泌型ペプチドミクス、LRR 型受容体キナーゼを網羅的に発現した受容体ライブラリの構築などを組み合わせて新たなペプチドホルモンやその受容体を同定する。これらの解析から得られる分子群を基軸として、植物の形態形成を支える新たな情報統御系の発見を目指す。

#### 2. 研究の進捗状況

(1) 受容体細胞外領域固定化ビーズを用いて、蛍光ラベルしたリガンドを用いてリガンド-受容体相互作用をリアルタイムにモニターしたり、分泌型ペプチドのプールである細胞培養液から対応するリガンドを1段階で精製・同定できることを示した。

(2) ペプチドミクスの手法を用いて、シロイヌナズナ細胞培養液中に新しい硫酸化ペプチド PSY1 を同定した。PSY1 は全身的な細胞増殖活性の制御に関与することを示した。

(3) シロイヌナズナ培養細胞由来マイクロソーム画分より、硫酸化ペプチドホルモンの生産に必須な翻訳後修飾酵素であるチロシン硫酸化酵素の精製・同定に成功した。T-DNA 挿入遺伝子破壊株の解析を行なった結果、根端メリステムにおける細胞分裂活性および細胞伸長活性の顕著な低下、植物体全体の矮小化、維管束分化の不全などが観察された。

(4) シロイヌナズナの水中培養 (submerged culture) 系では、分泌型ペプチドが培養液中に拡散することに着目し、翻訳後修飾や限定分解 (プロセッシング) を伴って分泌される短鎖ペプチドの成熟型構造を同定する方法論を確立した。次に、翻訳後修飾やプロセッシングを受ける可能性のあるペプチド群の候補を、既知配列のモチーフを参考にしてシロイヌナズナのゲノムデータベースより *in silico* 抽出し、それらの実際の成熟型構造を上記の手法により決定するという戦略で、CEP1 など複数の短鎖翻訳後修飾ペプチド群を見出した。これらは有力なペプチドホルモン候補である。

(5) シロイヌナズナの水中培養系を用いて、CLV3 過剰発現株のアポプラストに存在するペプチドを詳細に解析したところ、従来提唱されていた 12 アミノ酸ペプチドは検出されず、アラビノース糖鎖の付加した 13 アミノ酸グリコペプチドが検出された。このグリコペプチドは、*clv3-2* 変異株の相補活性や CLV1 結合活性において、12 アミノ酸ペプチドよりも数十倍強いことが明らかとなった。

#### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

PSY1 や CEP1 など複数のペプチドホルモンおよびその候補を同定し、CLV3 など重要なペプチドホルモンの成熟型構造の決定および受容体結合の証明にも成功した。また、今後新しいペプチドホルモンを同定していくための技術的基盤の確立を行なうことができた。研究は、おおむね順調に進展している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

ゲノムデータベースより *in silico* 抽出し、成熟型構造も確定している短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモン候補群について、重点的に機能解析と受容体の同定作業を進める。また、グリコペプチド群の機能解析や放射ラベリ化に必須となるアラビノース糖鎖部分の立体構造の確定と化学合成経路の確立を目指す。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件) すべて査読有り

(1) Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 106: 15067-15072

(2) Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. ***Nature Chem Biol*** 5: 578-580

(3) Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y. (2008) *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. ***Science*** 319: 294

(4) Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y. (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 104: 18333-18338

(5) Shinohara, H. and Matsubayashi, Y. (2007) Functional immobilization of plant receptor-like kinase onto microbeads towards receptor array construction and receptor-based ligand fishing. ***Plant J*** 52: 175-184

〔学会発表〕(計 31 件)

(1) 松林嘉克 ペプチドリガンド-受容体ペアの解析から探る植物のかたちづくり  
第 82 回日本生化学会大会トップラナーズ  
レクチャー (神戸) 2009 年 12 月

(2) Matsubayashi, Y., Ohyama, K., Ogawa, M. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. Japan-Korea Symposium - Plant Growth and Signal Transduction. (Yokohama, Japan) 2008 年 10 月

(3) Matsubayashi Y. Physiological functions of two structurally distinct tyrosine-sulfated peptides in *Arabidopsis* growth and development. 18th International Conference on Arabidopsis

Research. (Beijing, China) 2007 年 7 月

〔図書〕(計 3 件)

(1) 松林嘉克 (2010) 第 9 章 ペプチドホルモン.

新しい植物ホルモンの科学(講談社) 154-168

(2) 松林嘉克 (2009) ペプチドリガンド-受容体ペアの解析から探る植物のかたちづくり.

蛋白質核酸酵素, 1 月号

(3) 松林嘉克, 篠原秀文 (2008) リガンド-受容体ペアの解析から探る植物の細胞間シグナリング.

化学と生物, 46: 588-590