

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14656

研究課題名（和文）ペプチドホルモンの実用化を目指した園芸科学的基礎研究

研究課題名（英文）Studies on practical application of plant peptide hormones in horticultural science

研究代表者

鉄村 琢哉（Tetsumura, Takuya）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00227498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：ペプチドホルモンの1つであるCLE25をカキ‘平核無’シュートの発根処理時以降および発根処理10日目以降に処理すると、根が細くなるだけでなく、根長も減少することがわかり、特に後者の処理方法が影響の大きいことを明らかにした。そして、根が細くなった原因は、皮層細胞の分裂が抑制された結果であることも明らかにした。一方、ブドウ‘ピノノワール’シュートへのCLE25の処理は根長の減少のみ観察された。しかし、‘平核無’および‘ピノノワール’の茎頂への処理は、明らかな影響が認められなかった。一方、CLE14の処理はシロイヌナズナの根の伸長阻害だけでなく、根毛数増加に影響を及ぼしたことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：CLE25, a member of CLE peptide family, was added to the root-inducing medium and found to inhibit growth of ‘Hiratanenashi’ persimmon root. The treatment after the formation of root primordia was more effective than that at the start of the root induction. Microscopic observations revealed that the cell division of the cortical tissue in the treated roots was inhibited so that the roots were thinner. The root-inducing medium with CLE25 inhibited elongation of roots of ‘Pino Noir’ grape, whereas the roots did not become thin. CLE25 treatments to shoot apical meristems of ‘Hiratanenashi’ and ‘Pino Noir’ had no effect on their growth. As for CLE14, another plant peptide hormone, the treatment to Arabidopsis seedlings reduced in primary root length and induced excess root hair formation.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 ペプチドホルモン メリステム 植物組織培養 園芸科学

1. 研究開始当初の背景

最近ではジベレリンなどの植物ホルモン以外にもブラシノステロイドやジャスモン酸などが植物ホルモンと似た作用を示すことがわかり、その一部はすでに植物成長調節剤として農業現場で利用されている。さらに、ここ数年、花成ホルモンとしての FT タンパク質の研究は急速に進み、実用化を目指した研究も精力的に行われている。

インスリンに代表されるペプチドホルモンは一般的な(動物)ホルモンであるが、近年、高等植物においても比較的短鎖の分泌型生理活性ペプチドを介した細胞間情報伝達系の存在が次々と明らかになってきており、植物ペプチドホルモン(以下、ペプチドホルモン)として注目を浴びている。1990年代より数々のペプチドホルモンが発見され、その構造、受容体、そして生理機能が解明され、15 を超える生理活性ペプチドが発見されている。現在、基礎的研究で得られた成果を元に応用的研究への方向性は示されているものの具体的な成果は得られていない。

そこで我々の研究グループは挑戦的萌芽研究『メリステム形成制御に関わるペプチドホルモンの園芸的利用の可能性を探る』(平成24~26年度)により、シロイヌナズナを含む多くの植物種に見いだされている CLE ペプチドファミリーの1つである CLE25 を試験管内のカキやブドウの根に処理し、その効果を確認した(引用文献)。また、ブドウには CLE ペプチド関連遺伝子が数種類存在し、様々な組織で発現していることも明らかにした(引用文献)。しかし、CLE25 を具体的にどの組織に対してどの時期に処理すれば効果が高くなるのかなど、詳細な部分まで調査しておらず、園芸作物に対する実用化のためにはさらなる実験・調査が必要な段階である。

今まで採択された科学研究費にもペプチドホルモンをテーマとした研究課題は数多くあるが、『植物生理・分子』や『特定領域研究』の分野であり、農学分野での採択課題は我々のみであった。それは農学的観点からの実験では結果を得にくく、予備実験の段階で挫折したものだと思う。我々も最初は、ペプチドホルモンの処理方法、処理部位、処理濃度に関して試行錯誤し、確証のあるデータを得るのに2年以上必要であった。ペプチドホルモン研究第一人者からの適切なサジェスチョン(CLE ペプチドファミリーが外生処理により初めて効果の認められたペプチドホルモンであることなど)や最新情報を得ることにより、『CLE25 ペプチドホルモンがカキ根端メリステムに影響を及ぼす』ことを明らかにすることができた。

一方、植物学ではペプチドホルモンが植物ホルモンの1グループとして認められているものの、農学では未だ認められていないという違いが農学分野での研究が進まない点として挙げられる。それは植物体内に存在する

シグナル伝達物質は植物ホルモンであるという植物学的な考え方と一般性や特異性のない物質は植物ホルモンとして認めないという農学的な考え方の違いがあるからであろう。しかし、ジャスモン酸のように植物ホルモンとして正式に認められなくてもその作用機作に有用性が認められれば、その物質が誘導体などを含め植物成長調節剤(植調剤)として実用化されている例はあり、ペプチドホルモンもその様な物質の1つになると想定できる。

また、ペプチドホルモンの研究が実用化レベルで進まないのは、人工合成品は非常に高価であることも理由の1つと考えられる。しかし、ペプチドホルモンの利用が実用的に有益であることがわかれば、低価格で合成される化学的手法が開発されることは容易に想像できる。一方、今まで数名の農学系研究者がペプチドホルモンに関する応用研究を行ったという情報は得ているが、どれも効果が無かったというものであった。理学と農学の研究グループによる本研究を、ペプチドホルモンの農業分野への実用化への第1歩とした。

2. 研究の目的

すでに *in vitro* においてカキやブドウで効果の認められた CLE ペプチドを用いた実験を中心に、実用化を目指した処理および調査を行う。得られたデータを解析し、それを元に植物成長抑制剤としての利用可能性を探るための圃場試験を行う。また、新規ペプチドホルモンに関しては、環境条件を揃え植物体の成長を制御できる *in vitro* での検証を行い、基礎的知見を得る。

従来の植物ホルモンは、比較的広範囲に組織を移動し、互いに関与しながら生理機能を発揮するが、ペプチドホルモンは特異的な機能を担っているものが多く、その作用も限定的である。それ故、ペプチドホルモンの研究はモデル植物であるシロイヌナズナの変異系統およびその回復系統を利用した遺伝子の探査、受容体を含めた情報伝達系の解析、翻訳後修飾やプロセッシングに関する基礎的研究が中心である。しかし、このことは、従来の植物ホルモンではコントロールできなかった作用(影響)を、ペプチドホルモン処理により可能となることを示している。しかも、作用点の特異的であるということは、従来の植物ホルモンでは不可能、あるいは適用しにくかったケミカルコントロールが可能になることを示している。例えば、ジベレリン酸は天然の植物ホルモンであると同時に、農業現場で広く使われている植調剤でもある。果樹の生理落果防止剤として農薬登録されているが、ジベレリンは花芽分化や果実肥大にも影響するので、その使用は限定的である。ペプチドホルモンが植調剤として利用可能となった場合はこのような本来の目的とは異なった影響を避けることができるかも

しない。

宮崎大学は、(動物)ペプチドホルモンの研究で有名だが、これからは(植物)ペプチドホルモンの研究でも優位性を示せるような成果を出したいと考えている。そして最終目標は、ペプチドホルモンによる(園芸産業の盛んな宮崎の)地域活性化・地方創生へのチャレンジである。

3. 研究の方法

カキの試験管内発根における CLE25 および CLV3 の影響について調査を行う。今までの調査により、カキミクロシュートの発根処理時の CLE25 1 μ M 処理は、根の成長に影響のあることがわかっているが、その最適処理時期については明らかにされていない。そこで、いくつかの処理区を設け実験を行う。その効果を検証するため、またどの組織に影響を及ぼしているのかを確認するため、根の凍結切片を作成し、組織および細胞の状態を観察する。CLE25 は CLE ペプチドファミリーの中でも、糖鎖修飾無しに効果の高いことが認められており、一連の実験で使用してきた。一方、CLV3 は茎頂メリステムに未分化な細胞群が過剰に蓄積しているシロイヌナズナ突然変異株 *clavata3* を用いて解析が行われ発見されたペプチドホルモンであり、CLE ペプチドファミリーの中で最も研究が進んでいる(引用文献)。この CLV3 も CLE25 と同様に処理し、その影響について同様に調査する。

ブドウの発根培地への CLE25 1 μ M 添加による根の成長抑制効果はすでに確認済みであるが、カキとは異なり、皮層分裂の抑制は認められなかった。これはブドウの発根培地には NAA 0.5 μ M が添加されており、常にこの合成オーキシンが根に作用している状態であるからだと推察している。そして、この結果は NAA が CLE25 の効果の一部を打ち消している可能性を示しており、実用化を目指す際にはその障壁、あるいは逆に既存の植調剤との混用促進効果が期待されるため、確実にその影響を明らかにする必要がある。よって、オーキシンを培地に添加せずに発根させる処理(高濃度瞬間浸漬処理)を行い、根の凍結切片を作成し、組織および細胞の状態を観察する。

さらに、これらの果樹ミクロシュートなどを用いて CLE25 の茎頂(メリステム)への処理を行い、その反応を調査する。また、開花中のブドウ樹に CLE25 を処理し、果実への影響を調査し、CLE25 の成長抑制効果が、着果促進・果実品質改善に結びつくかどうか調査する。ブドウ、特に4倍体ブドウを日本で栽培すると栄養成長が強く、成長過多となり着果が阻害され、果実品質が低下する傾向にあるため、植調剤(植物成長抑制剤)が販売され、栽培現場で広く利用されている。CLE25 の実用化のための基礎的データを収集する目的で本実験を行う。

一方、最新の植物科学研究から得られた情

報を元に、CLE25 や CLV3 以外のペプチドホルモンを利用した園芸科学的研究に結びつく実験を行う。

4. 研究成果

カキ‘平核無’シュートの発根処理時以降および根原体形成後の発根処理 10 日目以降の CLE25 1 μ M 処理により、根長の減少および根が細くなる現象を確認できた。また、特に後者の処理の方が影響の大きかったことも明らかにした。一方、根の凍結切片の観察により、CLE25 1 μ M 処理による皮層細胞分裂の抑制を確認した。さらに同様の結果が CLV3 処理でも認められ、組織観察により皮層細胞分裂への影響も確認できた。

ブドウ‘ピノワール’の根端メリステムに対する CLE25 処理に関しては、発根処理に用いる NAA の影響が大きく、また複雑であることがわかったので、その影響を出来るだけ小さくする処理方法、すなわち同じ合成オーキシンである IBA の高濃度処理方法に変更し実験を行った。その結果、CLE25 1 μ M 処理が、根の伸長を抑制することを確認できた。そして、根の横断面の顕微鏡観察を行ったところ、サンプリング直後の CLE25 処理区の根は細くなっていたが、凍結切片観察時は、処理区の根は太くなっていた。これは、凍結切片作成時の高張液処理が影響しているものと考えられ、CLE25 が細胞壁に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。しかし、カキの根で見られたような皮層細胞数の減少は観察出来なかった。

カキ‘平核無’シュートの茎頂に対し、CLE25 1 μ M を種々の方法(培地上に置床、培地中に埋没、2 層培地での培養、液体振盪培養)で処理したが、その影響は観察出来なかった。シュート成長を促進するために培地に添加した植物成長調節物質の影響の方が大きかったのが原因だと考え、試験管内のシュートを発根させ、鉢土にポット植えた小植物体に対し、1 μ M の CLE25 を含んだラノリンを茎頂(腋芽)に直接塗布し、その成長を調査した。しかし、発生したシュートの長さ、葉数、葉重等に無処理区との違いは見られなかった。

一方、‘ピノワール’腋芽への CLE25 の処理も行った。植物成長調節物質を含まない培地で成長中のシュートの腋芽に 1 μ M の CLE25 を含むラノリンを塗布処理したが、処理芽からシュートは発生しなかった。そこで、処理芽に着生している葉を取り除き萌芽を促したが、処理芽以外の無処理の腋芽からシュートが発生した。よって、処理するシュートを1芽に調整し、その芽に処理を行った。しかし、ラノリン塗布により萌芽は抑制され、発生したシュートに CLE25 の影響は見られなかった。

ブドウ‘クイーンニーナ’樹を用いて開花直前に、1 μ M の CLE25 水溶液を枝葉全体に散布した。処理により枝の伸長は抑制される傾

向にあったが、対照区と比較して収穫果の糖度、粒重、房重等、果実品質への影響は見られなかった。そこで、枝の伸長をコントロールする摘心処理の方法を変え、翌年も引き続き処理したものの、前年と同様、枝の伸長は抑制される傾向にあるものの、果実品質への影響は明瞭ではなかった。

CLE25 と同じ CLE ペプチドファミリーの 1 つである CLE14 をシロイヌナズナの根に処理したところ、伸長阻害および根毛数増加を確認し、今後のペプチドホルモンの実用的研究の進展が期待された。

<引用文献>

鉄村 琢哉、大迫 祐太郎、石村 修司、本勝 千歳、本杉 日野、澤 進一郎、和田 拓治、富永 るみ、果樹の試験管内根成長に及ぼす CLE25 ペプチドの影響、園芸学研究、13 巻 (別冊 2) 2014、145

Rumi Tominaga-Wada、Yuka Nukumizu、Takuji Wada、Shinichiro Sawa、Takuya Tetsumura、*CLAVATA3*-like genes are differentially expressed in grape vine (*Vitis vinifera*) tissues、Journal of Plant Physiology、170、2013、1379 - 1383

Jennifer C. Fletcher¹、Ulrike Brand、Mark P. Running、Rüdiger Simon、Elliot M. Meyerowitz¹、Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems、Science、283、1999、1911 - 1914

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Naoto Hayashi、Takuya Tetsumura、Shinichiro Sawa、Takuji Wada、Rumi Tominaga-Wada、CLE14 peptide signaling in *Arabidopsis* root hair cell fate determination、Plant Biotechnology、査読有、35、2018、17-22
DOI:10.5511/plantbiotechnology.18.0122a

T. Tetsumura、Y. Osako、S. Ishimura、C. Honsho、S. Sawa、T. Wada、R. Tominaga、Effects of CLE peptides on growth of in vitro roots and shoots of persimmon、Acta Horticulturae、査読有、1195、2018、93-97
DOI:10.17660/ActaHortic.2018.1195.16

[学会発表](計 3 件)

林 直人、鉄村 琢哉、澤 進一郎、和田 拓治、富永 るみ、ペプチドホルモン CLE14 がシロイヌナズナの根毛形成機構に及ぼす影響、日本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会、2018

Tetsumura T.、Osako Y.、Ishimura S.、Honsho C.、Sawa S.、Wada T.、Tominaga R.、Effects of CLE peptides on growth of in vitro roots and shoots of persimmon、VI International Symposium on Persimmon、2017

Reira Suzuki、Morihiro Oota、Chie Shimaoka、Sinichiro Sawa、SOL1 and other peptidases are responsible for CLE peptide processing mechanisms、22nd International conference on plant growth substances、2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

鉄村 琢哉 (TETSUMURA Takuya)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号：00227498

(2)研究分担者

富永 るみ (TOMINAGA Rumi)
広島大学・生物圏科学研究科・准教授
研究者番号：20373334

澤 進一郎 (SAWA Sinichiro)
熊本大学・大学院先端科学研究部 (理)・教授
研究者番号：00315748