

平成21年5月7日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19780088

研究課題名（和文） 植物の幹細胞が生産する新規ペプチドホルモンの生合成研究

研究課題名（英文） Studies on the biosynthesis of a novel peptide hormone produced by plant stem cells.

研究代表者

近藤 竜彦 (KONDO TATSUHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：30362289

研究成果の概要:葉や花などの植物の地上部分の組織は、茎頂に存在する一群の幹細胞が増殖、分化することによって形成される。12残基からなるペプチドホルモンMCLV3は、この幹細胞の数を制御することが知られているが、その生産調節機構については明らかになっていない。本研究では非常に生産量の少ないMCLV3を抽出、定量する手法を確立するとともに、MCLV3の前駆体をコードした遺伝子を過剰に発現したカルスが生産するMCLV3を精製し検出、定量することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ペプチドホルモン、CLV3、茎頂分裂組織、幹細胞、生合成

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の茎頂分裂組織の幹細胞で発現するCLV3遺伝子は植物地上部の形態形成の根幹となる茎頂分裂組織中の幹細胞数を制御するペプチド性因子の前駆体をコードしていると考えられていた。申請者らは2006年に、CLV3遺伝子はを過剰発現したカルスの凍結切片を作成し、その表面を直接MALDI-TOF MSで分析するin situ MALDI-TOF MSという手法を確立し、このCLV3に由来する情報伝達因子が12残基からなる修飾ペプチドであることを示し、MCLV3と命名した。

MCLV3は、シロイヌナズナの根に対して10nMという非常に低濃度で伸長阻害活性を示す生理活性ペプチドであり、1μMの濃度で添加すると、茎頂分裂組織が消失するというCLV3過剰発現株と同様の表現型を誘導したことから、MCLV3がCLV3遺伝子に由来する生理活性ペプチドの化学的本体であると結論した。

(2) MCLV3はCLV3遺伝子のC末端付近に存在するCLEモチーフと呼ばれる相同配列に由来する。MCLV3の発見と時を同じくし

て、別の研究グループがヒヤクニチソウの仮導管分化を抑制するペプチド性因子として **TDIF** というペプチドを同定した。このペプチドも **TDIF** 前駆体の **CLE** モチーフに由来し、**MCLV3** と同様に 4 残基目と 7 残基目のプロリン残基が水酸化された 12 残基のペプチドであったことから、**CLE** モチーフに由来する生理活性ペプチド (**CLE** ペプチド) に注目が集まった。遺伝学的解析から、**CLE** モチーフを持つ遺伝子は植物に広く分布しており、シロイヌナズナおよびイネのゲノム上には 31 および 44 個の **CLE** 遺伝子がコードされていることが明らかになっており、未同定の **CLE** ペプチドの植物体内での役割に興味を持たれていた。

(3) しかし一方で、植物のペプチドホルモンは一般に生産量が少なく、その物性や分解酵素などに対する安定性の低さから精製が困難であることが知られていた。したがって、植物体が生産する微量なペプチドを精製、同定することはかなり困難な作業であり、**CLE** ペプチドの解析のためには、より簡便な精製、同定、定量の手法の確立が必要であると考えられていた。

2. 研究の目的

(1) 我々は、研究当初の背景の項で述べたように、**CLV3** 過剰発現カルスの凍結切片から **MCLV3** を同定したことから、まずこの **CLV3** 過剰発現カルスが生産する **MCLV3** の量を定量する手法について検討した。微量のペプチドを定量するという目的を考慮して、一般にペプチドの検出感度が非常に高いことが知られる **MALDI-TOF** 型質量分析機を用いた定量法を確立することを試みた。

(2) 我々は、**CLV3** 過剰発現カルスを用いた研究から、このカルスが生産する **MCLV3** の生産量が培養条件、特に培地中の植物ホルモン濃度によって変化する可能性が高いという予備的結果を得ていたことから、確立した **MCLV3** の微量定量法を用いて、培地中に加えた植物ホルモンの濃度と **MCLV3** の生産量の関係を明らかにすることを目的とした。

(3) また、**MCLV3** 生産条件と非生産条件が明らかになった場合には、両条件で培養したカルスにおける遺伝子の転写プロファイルと比較することによって、**CLV3** 前駆体タンパク質から **MCLV3** へのプロセッシングに関与する遺伝子を同定すること目的とした。

3. 研究の方法

(1) **MCLV3** の微量定量法の検討

MALDI-TOF MS は 1 fmol 以下の **MCLV3** を検出できるという高感度を誇るが、定量性が非常に低い。カルスが生産する **MCLV3** 量は極微量であることが予想されたため、**MALDI-TOF MS** の定量性の低さという弱点を試料に加える内部標準を工夫することによって補い、高感度の微量定量法の確立を試みた。

(2) カルス培養上清およびカルス抽出液からの **MCLV3** 粗精製法の検討

MALDI-TOF MS において再現性良く **MCLV3** 由来のシグナルを検出するためには、試料中に含まれる塩やイオン化を阻害する夾雑物を取り除くために粗精製を行う必要がある。そこで、各種プレバックカラムや **HPLC** を用いて粗精製法の検討を行った。

(3) 培地中の植物ホルモン濃度と **MCLV3** 生産量の関係の解明

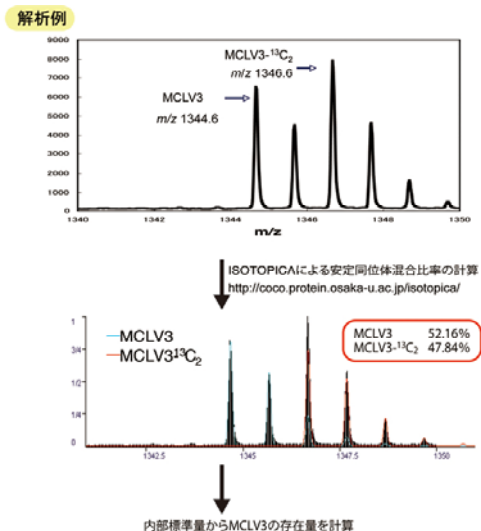
(1)、(2) で検討した粗精製法、微量定量法を用いて、オーキシン、サイトカイニン濃度を変化させた培地中で培養したカルスの培養上清およびカルス抽出液中に含まれる **MCLV3** の定量を行った。

4. 研究成果

(1) **MCLV3** の微量定量法の確立

MALDI-TOF MS を用いた定量法を確立するにあたり、複数の内部標準を用いた定量法を検討した。結果的に **MCLV3** のグリシン残基に 2 個の ^{13}C を導入した $^{13}\text{C}_2$ -**MCLV3** を内部標準として用い、同位体比解析ソフトである **ISOTOPICA** を用いて **MCLV3** と $^{13}\text{C}_2$ -**MCLV3** の比を計算することで、数 fmol 程度の非常に微量な **MCLV3** を定量することができるようになった。

[**ISOTOPICA** を用いた定量法]

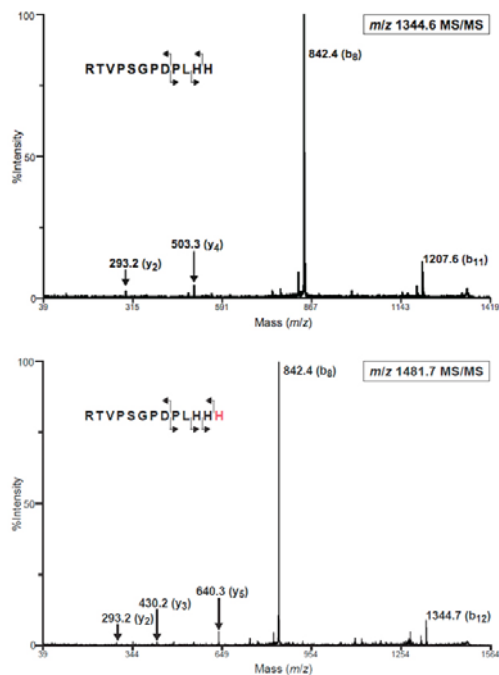


(2) カルス培養上清およびカルス抽出液からの MCLV3 粗精製法の確立

種々の精製法の精製効率や回収率を検討し、最終的に2段階のオープンカラムクロマトグラフィー（強陽イオン交換、逆相）と1段階の逆相 HPLC による精製により、カルス培養上清およびカルス抽出液から再現性良く MCLV3 を回収することができた。(1)で検討した内部標準 $[^{13}\text{C}_2]$ -MCLV3 を精製前の試料に加えることにより、試料中の MCLV3 の定量が可能になった。

また、精製法の検討の過程で、試料中には12残基の MCLV3 だけでなく、MCLV3 より C 末端側が1残基長い、13残基のペプチドが含まれていることが明らかになった。このペプチドは、シロイヌナズナの根に対して MCLV3 と同等の生理活性を有することから、MCLV3-H と命名し、 $[^{13}\text{C}_2]$ -MCLV3-H を合成して MCLV3 と同時に定量することにした。

[MCLV3 および MCLV3-H の MSMS スペクトル]

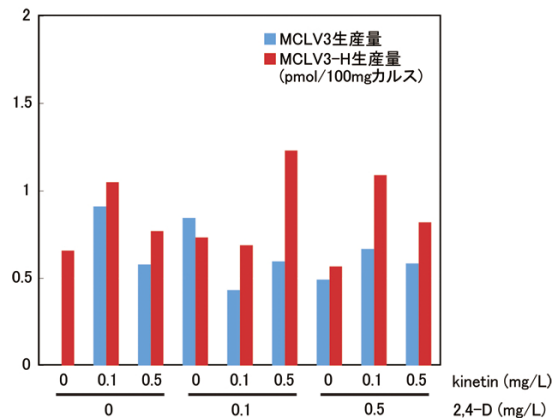


(3) 培地中の植物ホルモン濃度と MCLV3 および MCLV3-H の生産量の関係の解明

前段で確立した定量法を用い、様々なオーキシン、サイトカイニン濃度の培養液で液体振盪培養したカルスの培養上清およびカルス抽出液中の MCLV3 および MCLV3-H の生産量を定量した。その結果、カルス湿重量 100mg あたりのそれぞれのペプチドの生産量は 1pmol 程度であり、植物ホルモン濃度を変化させても大きくは変化しなかった。また、カルス抽出液に含まれる MCLV3 および

MCLV3-H は定量限界以下の量であった。

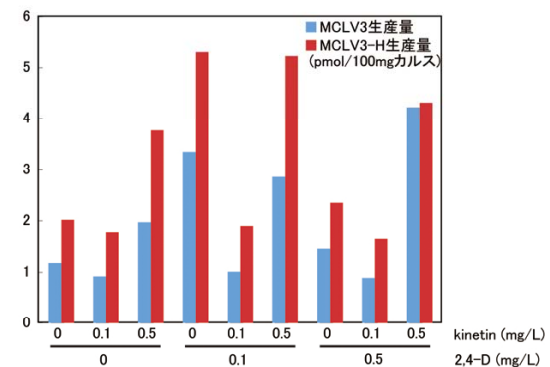
[培養上清中の MCLV3 量(暗黒条件)]



(4) 光条件と MCLV3 生産量の関係

前段ではカルスを暗黒条件で培養していたが、MCLV3 の生産条件を検討する過程でカルスを連続好条件で培養し、同様の実験を行ったところ、MCLV3 および MCLV3-H の生産量が飛躍的に増加し、カルス培養上清 3ml あたり 4~8pmol であった。しかし、培地中のホルモン濃度とこれらのペプチドの生産量に相関を見いだすことはできなかった。

[培養上清中の MCLV3 量(連続光条件)]



(5) 総括

これまでの結果から、当初の目的であった、明確な MCLV3 の生産条件と非生産条件を見いだすことはできなかったために、最終的な目標であった MCLV3 のプロセッシングに関与する遺伝子の同定を行うことはできなかった。

しかし、MCLV3 の微量定量研究の副産物として、カルスが12残基の MCLV3 の他に、もう1残基長い13残基の MCLV3-H を生産しているという新しい発見があった。今後、

新規 CLE ペプチドを研究する上で、12 残基のものだけではなく、13 残基のペプチドの存在も視野に入れる必要があると考えられる。また、新規 CLE ペプチドを抽出、精製、同定するにあたっては、本研究で確立した手法が有効であると考えられる。

本研究では植物ホルモン濃度と MCLV3 の生産量との間に明確な相関を見いだすことができなかつたが、暗黒条件下と連続好条件化で MCLV3 の生産量が大きく異なるという結果を得た。この結果は、カルスの MCLV3 生産が生育条件に影響を受けていることを示しており、本研究で確立した MCLV3 の微量定量法を用いてさらに別の培養条件（例えばジベレリンなど他の植物ホルモンの濃度など）の検討を進めることで、目的の培養条件を見いだすことができるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

(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 1 件)

- ① 近藤竜彦, 坂神洋次 「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, 2008, 査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① 近藤竜彦, 水野智子, 中村桐子, 坂神洋次 「シロイヌナズナカルスが生産する分泌ペプチドの in situ MALDI-TOF MS による同定」 日本農芸化学会 2008 年度大会, 名古屋, 2008 年 3 月 28 日
- ② Kondo T., Sawa S., Mizuno S., Fukuda H., and Sakagami Y., “Identification of the functional peptide of CLV3 by in situ MALDI-TOF MS analysis.” 19th Conference of International Plant Growth Substances Association, Puerto Vallarta, Mexico, Jul. 25, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 竜彦 (KONDO TATSUHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：30362289