

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688015

研究課題名(和文) 気孔密度制御に着目した機能性植物作出のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic studies on the control mechanisms of stomatal density.

## 研究代表者

近藤 竜彦 (Kondo, Tatsuhiko)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：30362289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの気孔密度を調節するペプチドホルモンであるstomagenの作用機構を明らかにするために、その受容体の同定を目指したが、最終的に同定には至らず、他の研究者によりその受容体が同定された。また、シロイヌナズナに比較的近いハクサイでもstomagenの機能が保存されていることを明らかにした。化学合成でしか供給できなかったstomagenを低コストで大量調整する方法について検討し、Brevibacillusを用いた分泌発現系を確立した。さらに、stomagenの作用は、分子中央部の部分ペプチドでも発現することを明らかにした。この部分ペプチドは気孔密度調節剤のリードとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：Stomagen is a plant peptide hormone that controls stomatal density in Arabidopsis epidermis. We have tried to identify stomagen receptor to clarify the mode of action of the hormone by photo-affinity labeling using chemically synthesized probe, but we could not have achieved. Recently, another research group have identified the receptor. The function of stomagen was conserved in Chinese cabbage (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). So far, stomagen was supplied by chemical synthesis that causes high cost. We developed a new and simple method for stomagen production using *Brevibacillus* secretory expression system. In addition, the structure-activity relationship revealed that a small peptide at the central part of the peptide was able to mimic the stomagen function. The peptide will be a potential lead of agricultural agents that can increase stomatal density of agricultural crops, and consequently the biomass and/or yield may improve.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物ペプチドホルモン 気孔 stomagen

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 気孔は全ての植物の表皮に保存されている2ないし4個の細胞からなる器官であり、外部環境の変化に応答して、光合成や呼吸、蒸散の際のガス交換の効率を調節している。数時間から数日の短期の環境変化に対しては気孔開閉の調節が主要であるが、季節変動などの長期の変化に対しては、植物は気孔密度を変化させて適応することが知られている。気孔分化は植物表皮で起こるために観察しやすく、不等分裂や細胞の運命決定など興味深い事象を含むことから盛んに研究され、この過程に関与する遺伝子が複数同定されていた。その中で、ロイシンリッチリピート型の受容体様タンパク質が同定されていたことからそのリガンドに注目が集まっていた。

(2) 研究代表者を含む研究グループにより、先行研究から気孔密度を低下させるペプチドホルモン前駆体をコードすることが示された epidermal patterning factor (EPF) ファミリーに属する *STOMAGEN* 遺伝子を過剰発現すると、他のファミリー遺伝子とは逆に気孔密度が上昇することが明らかにされた。さらに、シロイヌナズナの細胞間抽出液から、この遺伝子由来分子内に3対のジスルフィド結合を有する45残基のペプチドホルモン stomagen が同定された。化学合成した stomagen は低濃度でシロイヌナズナの気孔密度を上昇させる活性を示したことから、生体内で生理活性を示す成熟型ペプチドホルモンであることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

(1) stomagen の作用機構を明らかにするために、光反応性プローブを調製し、光アフィニティラベル法を用いてその受容体を探索し同定する。

(2) シロイヌナズナには stomagen に加えて10個のEPFファミリー遺伝子が存在し、そのうち *EPF1*、*EPF2* はシロイヌナズナで過剰発現すると stomagen とは逆に気孔密度を低下させることが報告されている。そこで、まず多くの高等植物のゲノムデータベースからEPFファミリー遺伝子を探索し、その保存性について明らかにする。さらに、それらの遺伝子由来すると予想される生理活性ペプチドを化学合成もしくは組換えタンパク質として調製し、その機能が保存されているのかについても検討する。

(3) これまでの研究では、stomagen は化学合成によって供給されてきた。しかし、化学合成はスケールを大きくすればするほど高コストとなることが問題である。そこで、stomagen および他のEPFファミリーペプチドを組換えタンパク質として安価かつ簡便に調製する方法を確立する。さらに、確立し

た手法を利用して、これらのタンパク質の構造活性相関についても研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) stomagen 受容体をラベルするための光反応性プローブとしては、UV 励起によってカルベンを生じるジアジリンを分子内にもつロイシンアナログである photo-Leucine を Fmoc 化し、Fmoc 法による固相合成の際に stomagen に導入する。さらに、N 末端に蛍光基 (Alexa488) を導入することによって、目的タンパク質を検出する。市販の抗 Alexa488 抗体を用いて目的タンパク質を精製して酵素消化を行い、MALDI-TOFMS を用いたフィンガープリント法により目的タンパク質を同定する。

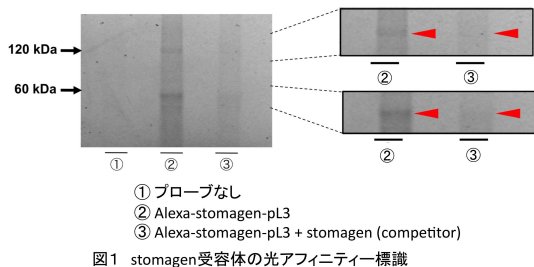
(2) すでに公開されている植物ゲノムデータベースに対して、stomagen および他の EPF ファミリー遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列をクエリーとしたホモロジー検索を行い、シロイヌナズナ以外の高等植物においてこれらの遺伝子の保存性について明らかにする。さらに、シロイヌナズナに比較的近縁なハクサイやダイズなどの stomagen を合成してそれぞれの植物体に処理し、気孔密度の変化を観察することでその機能の保存性についても検討する。

(3) 大腸菌で一般に用いられている発現ベクターを利用して、タグ付きタンパク質として stomagen および EPF ファミリー遺伝子由来のペプチドを発現し、その機能をシロイヌナズナを用いた生物検定によって検証する。

## 4. 研究成果

(1) stomagen 分子中のアミノ酸を photo-Leucine へ3カ所置換し、さらに N 末端に Alexa-488 を導入したプローブ (Alexa-stomagen-pL3) を用いて、目的タンパク質のラベル法について種々検討した。stomagen が高発現していることがわかっている幼口ゼット葉を直接ラベルしても、ラベルされた目的タンパク質を検出することができなかったが、葉長 1mm に満たない口ゼット葉の表皮をピンセットで剥離してラベルを行うことで、SDS-PAGE 上で約 60kDa および約 120kDa のラベルタンパク質由来する蛍光バンドを検出することに成功した (図1)。そこで、この目的タンパク質を抗 Alexa-488 抗体を用いて精製し、酵素消化、MALDI-TOFMS 解析を行ったが、同定に必要な情報は得られなかった。この原因は、出発原料が微小な幼葉から剥離した表皮であるために、同定に十分な量の目的タンパク質が得られない点にあると予想された。そこで、この問題を解決するために、ボルテックスや超音波などの物理的処理により幼葉から葉肉細胞を除いて表皮を得る方法や、植物体が大きく stomagen に応答する (後述) ハクサイから表皮を調製

するなど、出発原料のスケールアップについて種々検討を行ったが、最終的に目的タンパク質を同定するには至らず、2015年にLee J. S.らにより stomagen 受容体が同定され Nature 誌に報告された。



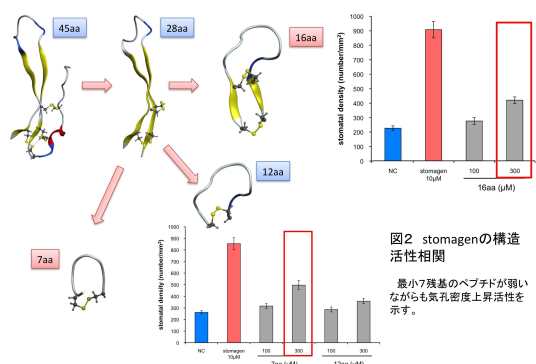
(2) シロイヌナズナのゲノム上には stomagen を含む 11 個の EPF ファミリー遺伝子が存在する。そのうち機能が明らかにされているのは気孔密度を上昇させる stomagen と、逆に気孔密度を低下させる EPF1、EPF2 の 3 個だけであった。そこで EPF ファミリーのうち EPF-Like(EPFL)5 について、stomagen と同様の方法で化学合成し、その生理活性についてシロイヌナズナで検討した結果、EPF1 と同様の気孔密度低下活性を示すことが明らかになった。

また、植物ゲノムのデータベース検索の結果、EPF ファミリー遺伝子はシダ植物以降の全ての高等植物で保存されていることが明らかになった。特にシロイヌナズナに近縁なアブラナ科に属するハクサイでは、stomagen 前駆体アミノ酸配列のうち成熟型 stomagen に相当する部分はシロイヌナズナのものと同じで一致していた。そこで、ハクサイに対して stomagen を処理した結果、stomagen はハクサイに対しても気孔密度上昇活性を示すことが明らかになった。また、分子系統学的にハクサイより離れているダイズ stomagen も 45 残基のうち 43 残基が一致していた。そこでダイズ stomagen を化学合成してシロイヌナズナで生理活性を検討したところ、シロイヌナズナ stomagen と同等の生理活性を示したことからダイズでもその機能が保存されていることが期待された。そこでダイズにダイズ stomagen を処理する方法を検討し、その生理活性について検討したが、有意な気孔密度上昇活性は観察されなかった。一方で、ダイズアポプラスト液を採取し、そこに含まれるであろうダイズ stomagen を抗 stomagen 抗体を用いて精製した結果、ダイズ stomagen に由来するシグナルを MALDI-TOFMS で検出することに成功した。これらの結果は、ダイズにおいても stomagen がシロイヌナズナと同様に 45 残基の成熟型構造として機能しているが、外部からペプチドを処理する際には、ペプチドが機能する植物体内へ効率よく浸透させる手法の確立が必要であることを示唆している。

(3) stomagen および EPF1、EPF2 について、

その成熟型ペプチドに相当する約 50 残基のペプチドを大腸菌を用いて発現させた。その結果、EPF1、EPF2 については組換えタンパク質を得られ、精製後、タグを切断して成熟型ペプチドを得ることに成功した。シロイヌナズナを用いてその生理活性を検討した結果、遺伝子を過剰発現させた場合と同様の気孔密度低下活性を示した。一方で、stomagen については、複数のタグを用いて発現条件を検討したが、発現タンパク質が大腸菌に対して毒性を示すためか発現には成功しなかった。そこで、発現産物の毒性を回避するために、*Brevibacillus* を用いた分泌発現系を利用した発現を試みた。その結果、stomagen と EPF1 については、組換え体の培養上清にペプチドの生産を確認することができた。培地について検討を行った結果、主に植物実験に用いられる化学合成培地 (Gamborg's B5 培地) にアミノ酸カクテルを添加した培地で培養した際に、他の培地に比べて高い収量が得られた。また、この培地を用いた場合には、逆相樹脂に吸着するような成分が培養上清中にほとんど含まれないため、逆相樹脂を用いた簡単な精製により、目的ペプチドを精製することが可能になった。この発見によりペプチドの大量かつ低コストな生産が可能になり、ペプチドを大量に必要とする長期投与実験、植物体が大きい農業用作物への処理などが可能になった。

また、*Brevibacillus* 発現系を利用し、アラニン置換した一連の stomagen 誘導体を調製した。その生理活性を検討し、分子中央部のループのさらに中央部分が活性発現に重要であることを明らかにした。さらに、stomagen の分子中央部のループ部分を模して設計した 28 残基、16 残基、12 残基、7 残基のペプチドを設計してその生理活性を調べたところ、28 残基のペプチドは天然物と同等の生理活性を示した。また、16 残基、7 残基の誘導体は天然物よりもかなり弱いものの生理活性を示したことから、特に 7 残基のペプチドについては今後より詳細な構造活性相関研究を行うことで、将来的に気孔密度を調節することで植物バイオマスや収穫量を増加させることのできる薬剤の開発へつながるのではないかと考えている。



(3) stomagen および EPF1、EPF2 について、

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 3件)

(1) Tomoko Niwa, Tatsuhiko Kondo, Michi Nishizawa, Ryoko Kajita, Tatsuo Kakimoto, Sumie Ishiguro “EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE5 peptide represses stomatal development by inhibiting meristemoid maintenance in *Arabidopsis thaliana*.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, **77(6)**, 1287-95 【査読 有】

(2) Pawan Kumar Jewaria, Toshiaki Hara, Hirokazu Tanaka, Tatsuhiko Kondo, Shigeyuki Betsuyaku, Shinichiro Sawa, Youji Sakagami, Saburo Aimoto, Tatsuo Kakimoto “Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level.” *Plant Cell Physiol.*, 2013, **54(8)**, 1253-62 【査読 有】

(3) 近藤竜彦、柿本辰男、坂神洋次「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 【査読 無】

〔学会発表〕(計 8件)

(1) 平林智美, 杉田大河, 鋒山真由美, 近藤竜彦, 村上一馬, 入江一浩, 柿本辰男, 坂神洋次「気孔形成を調節するペプチドホルモンの機能解析」植物化学調節学会 46 回大会, 2011.11 (宇都宮)

(2) 杉田大河, 平林智美, 鋒山真由美, 近藤竜彦, 柿本辰男, 坂神洋次「シロイヌナズナの気孔形成を制御するペプチドホルモンの構造活性相関」日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012.3 (京都)

(3) 杉田大河, 近藤竜彦「気孔形成に関与する新規ペプチド性因子の探索」日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3 (仙台)

(4) 西澤美智, 村上一馬, 入江一浩, 近藤竜彦, 坂神洋次「気孔分化を調節する stomagen の普遍性に関する研究」天然物化学談話会, 2013.7 (大津)

(5) 西澤美智, 村上一馬, 入江一浩, 近藤竜彦, 坂神洋次「気孔分化を調節する stomagen の普遍性に関する研究」日本農芸化学会中部支部第 168 回例会, 2013.10 (名古屋)

(6) 近藤竜彦「植物の気孔分化を制御するペプチドホルモンに関する研究」キラル分子科学研究会, 2014.3 (熊本)

(7) 西澤美智, 村上一馬, 入江一浩, 近藤竜彦, 坂神洋次「気孔分化を調節する stomagen

の普遍性に関する研究」日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3 (東京)

(8) 能瀬遥、根岸佑香里、近藤竜彦、小鹿一「*Brevibacillus* を用いた植物ペプチドホルモンの効率的生産」日本農芸化学会中部支部・関西支部合同大会, 2015.9 (富山)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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・講師  
研究者番号：30362289