

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658032

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) Possible use of plant peptide hormones regulating meristem development in horticulture

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：茎頂メリステムの形成制御に関わるペプチドホルモンであるCLV3よりも活性の高いCLE25を果樹組織培養体に処理した。CLE25を含む培地で成長したカキの根が細くなることがわかったので、根の切片を鏡検したところ、皮層の細胞数が減少していた。しかし、ブドウの根に対してはCLE25の発達抑制効果が認められたものの根は細くならなかった。また、ブドウにおいて5つのCLV3様遺伝子を発見した。これらの遺伝子は培養体のほとんどすべての組織で発現していたが、そのレベルは遺伝子毎に異なっており、それぞれの遺伝子がそれぞれの組織で異なる役割を果たしているものと推察された。

研究成果の概要(英文)：CLE25, whose activity is higher than CLV3, a plant peptide hormone regulating development of the shoot apical meristem, was used in tissue culture of fruit trees. The roots from Japanese persimmon shoots growing in the medium supplemented with CLE25 were found to become thin, and the microscopic observation on the roots revealed that the number of cells in cortical layer decreased. However, the roots from grape shoots treated with CLE25 did not become thin, although their growth was inhibited by CLE25. We identified five CLV3-like genes from grape. Expression analyses showed that the five grape CLV3-like genes are expressed in leaves, stems, roots and axillary buds with significant differences in their levels of expression. The differential expression suggests that they play different roles in different organs and developmental stages.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 メリステム ペプチドホルモン 果樹 組織培養 根

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンとしてジベレリン、オーキシン、サイトカイニン、アブシシン酸、そしてエチレンが知られており、実際の園芸現場で広く使用されている。またブラシノステロイド、ジャスモン酸、サリチル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利用されている。さらに、ここ数年、花成ホルモン（フロリゲン）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。

一方、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、現在では15を超える生理活性ペプチドが発見されている。

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システム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。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。

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は形態形成の制御に深く関わることが明らかになってきていると同時に、CLE 遺伝子群は様々な組織で発現が確認されている。その CLE ペプチドファミリーの1つである CLV3 は、ヒドロキシプリン残基の1つに L-アラビノースが3残基付加した13アミノ酸糖ペプチドであり、茎頂メリステムの形成制御に関わることが確かめられている。またこのペプチドは人工合成が可能であり、その添加は CLV3 遺伝子の過剰発現と同様の効果を示し、茎頂および根端分裂組織の縮小が観察され、合成ペプチドが *in vivo* で本来の機能を持ちうることも示されている。

一方、最近発見された RGF (root meristem growth factor) ペプチドホルモンは、根の幹細胞の維持や細胞分裂活性を制御していることが示されたが、RGF の発現はオーキシンの影響をあまり受けない上、RGF を生産できないシロイヌナズナ変異株の根端におけるオーキシン分布も野生株とあまり変わらないことも明らかにされた。よって、これまで根の成長は極性輸送によって形成される根端のオーキシン濃度勾配を前提として考察

されてきたが、RGF が「ニッチシグナル」として根のパターニングに重要な役割を担っていることを示されたことになる。すなわち、RGF はオーキシンとは独立して(あるいはある程度の距離をおいて)機能していることが示されたわけである。この例で示されるように、ペプチドホルモンは、従来の植物ホルモンのみでは説明不可能な現象かつ細胞分化や分裂組織の形態制御等の重要な役割をコントロールしている可能性は高く、その利用は農業技術の発展に欠かせないものとなるだろう。

ところで遺伝子組換え作物は、品種改良、食料増産に有効であるにもかかわらず、世界各国で法的に制限を受け、あるいは反対運動により実用化が困難な状況である。ペプチドホルモンは遺伝子組換えの問題とも無縁で、また作用した後は土壤中で分解されると考えられる。本研究によりペプチドホルモンを農業分野へ利用できるようになれば、より安全性の高い栽培技術の革新が期待できる。

前述したとおり、ペプチドホルモンの研究は分子生物学的な解明が非常に進んでいる分野でもあり、その分野と共同で研究を進めていけば、研究の進展も早いことが予想される。CLE ペプチドの解明を行っている東京大学福田教授らのグループは「(CLE ペプチド類)の研究から得られる知見は、ダイズの生産性増大、イネなどの穀類の生産性増大、作物の病害感染防御、窒素代謝制御など、作物機能向上への様々な応用が期待される。」とイノベーション創出基礎的研究推進事業計画書で述べている通り、本研究で得られる知見は幅広い方面へ応用されるであろう。

2. 研究の目的

人工合成したものを植物に直接投与し、その効果を初めて確認できたペプチドホルモンである CLV3 などを用い、ペプチドホルモンが園芸的に利用可能かどうか、すなわち園芸作物に対して効果があるかどうかを確認することを本研究の主目的とする。CLV3 を用いた前述の実験では10nMほどの超低濃度で作用を確認することができたが、合成ペプチドは非常に高価であるため、その効果を確実に明らかにするためには、環境条件を揃え植物体の成長を制御できる *in vitro* で検証することが近道であると考えられる。また、人工合成品は非常に高価であることも理由の1つと考えられるが、今までペプチドホルモンを使った園芸科学的実験は行われていない。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。新規性の非常に高い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一歩となるであろう。

園芸科学の分野において、本研究はペプチドホルモンを取り扱う時点で、斬新なアイデアを持っているものであり、『挑戦的』萌

芽研究の趣旨に沿った内容の実験を行うこととなる。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、農学系分野での採択課題は見当たらない。その理由として、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つになると考えている。

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。基礎的研究は、研究設備やスタッフの充実した大学や研究所で精力的に行うべきだと考えるが、農学という産業と深いつながりのある学問に関しては、その産業と結びつきの深い大学がチャレンジすべきだと考えており、将来的にはペプチドホルモンによる(園芸産業の盛んな宮崎の)地域活性化にチャレンジしたいと考えている。

3. 研究の方法

本実験は3本柱よりなっており、それぞれのスペシャリストが精度の高い実験を行うと同時に連携を密にしてお互いの実験結果をスムーズにフィードバックできるようにする。

(1)果樹の組織培養：今までの実験に使用してきたカキやブルーベリーのみでなく、マンゴー、ヒュウガナツ等の宮崎特産果樹、さらに(2)の実験と連動するためにブドウの組織培養体(シュート、カルス等)を用い、これらの組織に対してペプチドホルモンが何らかの影響を及ぼすか否かを実証するための実験を行う。

(2)遺伝子の探索および発現解析：全ゲノムの解読が終了している果樹であるブドウを用い、シロイヌナズナから得られているデータを基に実験を行う。

(3)総合アドバイザー：CLV3 ペプチドホルモン研究の第一人者が、本研究の基盤となる実験を行うだけでなく、最新情報を入手し、その結果等を(1)および(2)の実験に対してフィードバックし、本研究が成功するよう導く。

4. 研究成果

実験1年目、茎頂メリステムの形成制御に関わるCLV3をin vitroの果樹培養体(カキ、

ヒュウガナツ、マンゴー等)に外生処理することによりその反応を調査しようとしたが、総合アドバイザーよりCLV3よりもCLE25の方が活性が高いという情報を得て、まずCLE25を用いて実験を開始した。シロイヌナズナ等で得られたデータを参考にして濃度を100nMに設定し、培養体に外生的に処理(培地添加あるいは直接滴下)した。カキやマンゴーの腋芽に滴下すると枯れるものが多かったが、それはCLE25の影響かどうかは判別できなかった。一方、ヒュウガナツのカルスをCLE25添加培地で培養しても無添加培地地区との差は観察されなかった。そこで、濃度を1 μ Mに高め、ヒュウガナツのカルスの成長や不定芽分化に及ぼす影響を調査したが、無処理区と比較して、カルスに外見上の変化は見られなかった。

一方、ペプチドホルモン関連遺伝子の探索を、ブドウ‘ピノ・ノワール’を用いて行ったところ、5つのCLV3オースログ遺伝子が見つかり、そのうちの4つがCLEドメインを持っていた。これらの遺伝子はブドウ培養体のほとんどすべての組織で発現していたが、根で強く発現するものと茎で強く発現するものの2グループに分類でき、ブドウにおけるCLV3様ペプチドが異なる役割で植物体内で働いているものと推察された。

実験2年目は、オーキシン(IBA)高濃度瞬間浸漬発根処理を行ったカキ‘平核無’シュートを発根培地に植え付け発根実験を行ったが、発根処理時よりCLE25処理(発根培地へのCLE25 1 μ M添加)を行う場合と根原体形成後の発根処理10日目以降にCLE25処理を行う場合の2つの処理区を設けた。CLE25無処理区と比較して、10日目以降の処理区において、発根率の低下が認められ、根長が短くなり、根が細くなるという現象が観察された。なお、発根処理時のCLE25処理は、両者の中間値であった。これらの結果はCLV3が茎頂メリステムの縮小をもたらすこととの関連性を示していると考えられたため、凍結切片を作成し、根の横断面を鏡検したところ、10日目以降の処理区の根は皮層細胞の分裂が抑えられていることがわかった。これにより、CLE25は、皮層始原細胞が皮層と内皮を作る並層分裂を抑制することが示唆された。

一方、実験1年目でCLV3のオースログ遺伝子の存在が確認されたブドウ‘ピノ・ノワール’のシュートを常法に従いオーキシン(NAA)を添加した培地に植え付け発根処理し、カキ‘平核無’と同様の2つのCLE25処理区を設けたところ、両処理区とも発根率の低下は観察されなかったが、根の発達抑制され、根重が低下した。また、根の発達が抑制されたことによるシュート発生率の低下が生じ、シュート伸長も抑制されていた。それらの傾向は10日目以降の処理区において顕著であり、カキとほぼ同様の結果であった。しかし、カキのように根が細くなる現象は観察

されなかった。そこで、根の凍結切片を作成し、横断面を鏡検したところ、カキ根のような皮層細胞数の減少は認められなかった。これは高濃度オーキシンをシュート基部に処理した後にオーキシンプリーへの培地に植えるカキの発根処理方法とは異なり、低濃度のオーキシンを培地に添加するというブドウの発根処理方法、すなわち培地中のオーキシンが CLE25 の皮層始原細胞の並層分裂抑制効果を打ち消したものだと考えられた。

実験 3 年目は、ブルーベリーシュートを用い、カキやブドウと同様の実験を行ったが、無処理区のシュートも発根しなかったので、根の発達に及ぼす CLE25 の影響を調査することはできなかった。

一方、CLV3 そのものを使用し、CLE25 と同じ処理を「平核無」シュートに行ったところ、CLE25 と同様の結果、すなわち、発根率の低下と根の伸長抑制、そして根が細くなるという全く同じ現象が観察された。そこで、根の凍結切片を作成し、横断面を鏡検したところ、CLE25 処理根と同じ皮層細胞数の減少を確認できた。

以上より、CLV3/CLE ペプチドファミリーは園芸作物においてもその成長に影響を及ぼすことが明らかになった。その作用は限定的であり、高濃度では成長抑制効果が認められたので、今後はコスト、安定性、そして環境に対する影響も確認しながら、実用的な成長抑制剤としての可能性を探るよう研究を進めるべきだと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takuya Tetsumura, Possible use of plant peptide hormone in horticulture、Combined Proceedings International Plant Propagators' Society、査読無、Vol. 63、2014、375-376

Rumi Tominaga-Wada, Yuka Nukumizu, Takuji Wada, Shinichiro Sawa, and Takuya Tetsumura, *CLAVATA3*-like genes are differentially expressed in grape vine (*Vitis vinifera*) tissues、Journal of Plant Physiology、査読有、Vol. 170、2013、1379 - 1383、DOI:10.1016/j.jplph.2013.04.013

〔学会発表〕(計 3 件)

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、園芸学会平成 26 年度秋季大会、2014 年 9 月 27 日～29 日、佐賀大学本庄キャンパス

T. Tetsumura, Sakota, T., Nagano, H., Izaka, S. Nguyen, T.M.H., Tamura, S., Ishimura, S., Honsho, C.、Plant regeneration from nodal explants of

'Irwin' mango seedlings、29th International Horticultural Congress、2014 年 8 月 17 日～22 日、Brisbane、Australia

鉄村 琢哉、植物ペプチドホルモンの園芸的利用の可能性、国際植物増殖者会議日本支部第 20 回岐阜大会、2013 年 10 月 19～20 日、大垣フォーラムホテル

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・講師

研究者番号：20373334

澤 進一郎 (SAWA Shinichiro)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：00315748