

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 1 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（S）
 研究期間：2007～2012
 課題番号：19677001
 研究課題名（和文）CLEペプチドをモデルとした植物モルフォゲンの進化と作用機構に関する研究
 研究課題名（英文）Analysis for evolution of plant morphogen, CLE as a model peptide.
 研究代表者
 澤 進一郎（SAWA SHINICHIRO）
 熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
 研究者番号：00315748

研究成果の概要（和文）：本研究では、シロイヌナズナの分裂組織を研究材料として、植物の幹細胞の活性を制御するペプチドホルモンの分子機構の解明を目指した。分子遺伝学的解析を展開した結果、まず、42 の *clv2* エンハンサー突然変異体を単離してきた。これら全ての候補突然変異体のゲノムシーケンスを解読した。その結果、三量体 G-protein タンパク質を単離した。また、その他にも多数の新規シグナル因子を単離出来た。

研究成果の概要（英文）：One of the CLE family member, CLAVATA3 (CLV3) peptides consist of 12 or 13 amino acids that regulate shoot apical meristem function in a non-cell-autonomous fashion. We isolated many CLE peptide resistant mutants, and we reported that RPK2 functions to transmit the CLV3 peptide signal as a receptor (Kinoshita et al., 2010). Recently, we have sequenced whole genome of the 47 CLE peptide resistant mutants, and identified causal mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,900,000	5,670,000	24,570,000
2008年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2009年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
2010年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
2011年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
総計	88,300,000	26,490,000	114,790,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物生理・分子

キーワード：植物分子 形態形成

1. 研究開始当初の背景

植物は、器官を切除して培養することや、分化全能性をひきだすことが容易であることから、いかにも各器官、組織、細胞が自律分散的に生きているように見える。しかし、中枢神経系を持つ動物の

ような中央管理型の生命形態ではないにもかかわらず、各器官（細胞）の間では確実に情報のやりとりを行っていて、個体としての統一性を保っている。それでは、どのようにして各器官（細胞）の間で情報のやりとりを行っているのか。ま

た、各細胞は、細胞自身の位置情報や、環境、発生プログラムをどのように認識して自分自身を分化させ“個体”を形作っているのか。現在までに動物の空間認識には拡散性の物質がモルフォゲンとして重要な機能を持つことがよく知られている。しかし植物ではモルフォゲンは同定されておらず、唯一の候補として植物ホルモンであるオーキシンがあげられているのみである。本研究ではこのモルフォゲンを想定した空間認識機構の解析を試み、その分子基盤の構築を目指した。

2. 研究の目的

分裂組織は、植物のどこにでも形成されるわけではなく、遺伝的に制御された時空間的組織や、傷などによる外的環境要因により構築・維持されている。シロイヌナズナの茎頂分裂組織は、CLV3 蛋白質がリガンドとして細胞非自律的に機能し、CLV1, 2 蛋白質がそれを受容し、分裂組織のサイズを縮小するように調節することが示唆されている。しかし、植物のその微細な空間認識機構などは全く明らかとなっていない。その鍵の一つとなるのが、CLV3 がどのような実体を持ち、どのような空間移動様式をとるかという点であると考えられる。我々は、植物組織から直接ペプチドの構造を推定できる *in situ* MULDI-TOF-MS 法を開発し、12 アミノ酸からなり、特徴的な修飾をうけた CLV3 ペプチドが植物組織に存在することを同定した (Kondo et al., Science, 2006)。また、このペプチドは人工合成が可能であり、この修飾を受けた人工合成ペプチド添加により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している。

植物の形態形成機構において、細胞間シグナルと考えられるペプチドリガンド、受容体、及び下流因子の一部が同定されている唯一の系であるシロイヌナズナの CLV シグナル伝達系は、我々の解析によりこの CLV3 の分子実体が明らかになったことをふまえると、高等植物の複雑な 3 次元の空間認識機構を解明する上で、特に細胞間でのシグナル分子の移動という側面に関する解析において最適の実験系であると考えられる。また、我々はこの CLV シグナル伝達系が根端分裂組織のサイズの調節にも応用可能である上、様々な植物種において共通して存在し、機能していることも示唆している (Ito et al., Science, 2006)。本研究では、この知見を元に、どのようにこのシグナル因子が作られるのか、どのように細胞間や受容後のシグナル伝達が行われているのか、その分子実体を明らかにすると共に、分子挙動を理解することも目指した。さらに、CLE 遺伝子はシロイヌナズナゲノム上に 31 種類存在することから、シロイヌナズナの中でも CLE 遺伝子群が機能的な分化をしていることが予想された。また、この CLE 遺伝子群は、ヒメツリガネゴケゲノム上にも多数存在することが分かっていた (Sawa et al., Chem. Res. 2006)。そこで、シロイヌナズナにおける CLE 遺伝子群の機能的多様性を解析すると同時に、ヒメツリガネゴケをはじめとして、単子葉植物であるイネや、ミヤコグサ等様々な植物種を利用して、合成ペプチド添加実験を行うことで、CLE ペプチドのモルフォゲンとしての作用機構だけでなく、そのモルフォゲンシステムの進化過程や意義をも視野に入れた包括的な解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、CLV3 ペプチドの関与する細胞間シグナル伝達機構において、CLV3 ペプチドがモルフォゲンとして機能することを想定し、CLV3 ペプチドの合成・修飾・移動・受容・受容後のシグナルと CLV3 ペプチドの機能様式を総合的に解析する。同時に、CLE ペプチドの持つ機能的多様性や進化的な意義に関する知見も得たいと考えており、その目的のために、以下のような7種類の解析を行いたいと考えている。

A; CLV3 ペプチドの移動様式の解明 (院生平川、UC Riverside Reddy 博士)

19年度; CLV3 のペプチドの生体内での挙動について、時系列を追って詳細に観察する。まず、抗体作成による茎頂分裂組織付近での3次元的な分布の観察を行う。さらに、我々は、12 アミノ酸が CLV3 の本体であることを突き止めているので、活性のある CLV3-Tag 融合遺伝子の作成が可能となった。Tag として、パルスチェイスが可能である Lumio-Tag や PAGFP を使うことで、細胞間(細胞内)の移動がより詳細に時系列にそって追跡できると考えている。既に作成した CLV3 promoter-PAGFP (or Lumio tag) 形質転換体を用いて、CLV3 の拡散性を確認し、茎頂分裂組織周辺での CLV3 の移動、蓄積等の挙動を観察する。20年度-; CLV3 がモルフォゲンとして機能している可能性を考慮しているので、CLV3 の分布域における濃度変化、濃度勾配、移動速度、代謝速度等細胞間移動に関する事象に関して 19 年度に引き続き詳細に観察し、その影響範囲、効果、機能効率を特定する。

B; CLV3 下流因子の探索 (院生木下、研究補助中島)

19年度; モルフォゲンの定義として、もう一つ大事なポイントは、異なったモルフォゲン(リガンド) 閾値濃度に応じた異なった遺伝子発現調節を行うという点である。現在 CLV3

により、CLV3 遺伝子自身の発現が抑制され、WUS 遺伝子発現も制御を受けることが示唆されている。また、実際、我々の合成ペプチドを添加することで、これらの遺伝子発現が減少することも見いだしている。CLV3 と WUS は丁度その発現領域が空間的に隣り合い、重なり合う領域が少ないことが知られている。このことは、より濃い濃度では CLV3 の発現が、より低濃度では WUS の発現が調節されることを示唆している。CLV3 ペプチドを茎頂部や、本来発現しない葉等へ塗布することで、この2遺伝子の発現を濃度に応じて調節できれば、CLV3 はモルフォゲンとしての性質を満たすことができる。CLV3 や WUS の発現をモニターできる形質転換体も既に得ているので、準備は整ってきている。

また、モルフォゲン同定に向けて、より沢山の遺伝子をマーカーとして用い、モルフォゲンとしての閾値濃度をより詳細に調査するためにも、CLV3 の下流因子の同定を行う。まず、CLV3 ペプチドを用いることで下流因子の遺伝学的探索が容易となる。CLV3 ペプチドは茎頂分裂組織を縮小させ致死性を与えるため、致死性の復帰突然変異体を単離すれば下流因子が同定できる。現在の所、CLV3 ペプチドに非感受性のサプレッサー突然変異体を既に多数単離しており、原因遺伝子として LRR 型受容体キナーゼや、WD-40 ドメインを持つようなシグナル伝達因子も単離している。20年度-; スクリーニングを進めると共に、CLV3 を添加することによる Gene Chip 解析により CLV3 により発現調節を受けうる因子を網羅的に解析する。それらの解析結果を基に、茎頂分裂組織において、mRNA in situ hybridization 法により全ての候補遺伝子の発現パターンを解析することで、候補遺伝子を絞りたいと考えている。今後、CLV シグナル伝達系の下流で機能する候補遺伝子の

数を増やし、包括的な CLV シグナル伝達系の解明を目指す。

C; ペプチド-受容体結合様式の解明 (ポスドク A (清水)、オリンパス合田)

19 年度; 現在までに CLV3 リガンド-受容体候補 (CLV1, CLV2) との直接の結合は示されていない。今回、我々はリガンドの分子実体を明らかにしていることから、この合成ペプチドを用いて直接の結合を示すと共に、20 年度以降には、これらの複合体の結晶化を進め、X 線構造解析等によって、三次元的な結合様式を特定する。結合を検出するためには、オリンパスの MF20 を用いる。蛍光強度分布解析法 (FIDA) を用いることで細胞膜分画と蛍光リガンドとの結合を検出する。受容体は糖鎖修飾を受けている可能性が高く、タバコ BY2 培養細胞で過剰発現させ材料を得る予定である。MF20 はハイスループットな手法である上、リガンド-受容体の 1:1 対応が検討出来るため、シロイヌナズナに存在する 26 種類全ての CLE をリガンドとして、それに対応する LRR 型受容体キナーゼを一つずつ検証し、CLE-LRR 受容体の組み合わせを網羅的に *in vitro* で解明する。さらに、*in vivo* でその組み合わせが確かな物かを分子遺伝学的解析で検証していく。

D; CLV3 ペプチダーゼの単離 (ポスドク B (未定)、研究補助中島)

19 年度; これまでに、ヒトや酵母などの様々なペプチドホルモンの生成過程で、未成熟な蛋白質がペプチドホルモンへと成熟する際にこのようなカルボキシペプチダーゼが関与することが示されている。それらのペプチダーゼ認識配列が CLE ペプチドにおいても保存されており、植物においてもそのような類似した機構が存在することが示唆された。本研究では、そのペプチダーゼの精製、単離を行い、遺伝子の特定を行うと共に、ペプチド

リガンドの生成・修飾に関する分子機構を明らかにする。CLV3-AMC 合成ペプチドを利用することで、CLV3 ペプチドの成熟過程において機能するペプチダーゼ活性を既に検出しており、この至適温度は 30 度前後であることも見いだしている。この活性を指標とし、当該ペプチダーゼの精製を試みる。20 年度-; AMC を用いた精製と平行し、活性阻害ペプチド (HEEL-FMK) カラムを用いた精製も試みる。精製が完了した場合、酵素としての性質・特性の解析及び生体内での機能解析を行う。特に、リガンドがターゲット付近でペプチダーゼによりスプライスされ活性化されることも想定しているので、空間的発現パターンに特に注意した解析を行う。

E; CLV3 を利用した葉序決定機構の解析 (院生井上、Kuhlmeier Univ. Berne)

19 年度; 本来、*clavata* 突然変異体は葉序に異常を示す突然変異体として単離されてきた。葉序 (回数) は極めて厳密に遺伝的に制御され、ヒボナッチ数列に従って、秩序だった位置に葉原基が形成されることが知られている。現在の所、分裂組織という三次元的な空間において、拡散性のシグナル因子が濃度勾配を作ることにより、次の葉原基形成の場を決定するということが言われているが、その分子実体は全く明らかにされていない。我々は、CLV3 ペプチドを野生型に添加した際に、この葉序が乱れることを示した (Kondo et al., Science, 2006)。この CLV3 ペプチドを用いて、分裂組織等に直接塗布したり、外科的な手術を行う手法を組み合わせ、分子マーカーなどでその後の分子ネットワークを検出すること等により、葉序 (回数) 決定に関する分子機構の解明を目指す。特に、オーキシン輸送に関わる PIN の配向は葉序に密接な関連があることから、PIN の配向を中心に CLV3 ペプチドの効果を検討する。20 年度-;

シロイヌナズナにおける検証ができた場合、Kuhlmeier 博士が過去に示してきたトマト茎頂等を材料とした解析を続け、葉序に関連する過去の知見の検証を行う。さらに、生育途中で葉序パターンの変化する植物において、CLV3 (CLE) 遺伝子発現パターンの変化の観察やペプチド塗布による葉序パターン変化の観察を通して、葉序パターン決定における CLV3 (CLE) ペプチドの機能解析を行う。

4. 研究成果

本研究では、合成 CLE ペプチドを用いて、ペプチド耐性を示すシロイヌナズナ突然変異体の網羅的単離を行っており、5 年間で、CLE ペプチド下流候補遺伝子として 8 遺伝子を同定した。

まず、42 の *clv2* エンハンサー突然変異体を単離してきた。これら全ての候補突然変異体のゲノムシーケンスを解読した。その結果、42 の候補のうち、14 突然変異体において、三量体 G-protein タンパク質の β サブユニット、*agb1* の遺伝子内に変異を検出した。また、 γ サブユニットの二重突然変異体、*agg1 agg2* も *clv2* の表現型を助長する事を示した。

また、42 の *clv2* エンハンサー突然変異体のうち、3 つの候補について、LRR-RLK をコードする *BAM1* 遺伝子内に変異が生じ、この *BAM1* は、根端分裂組織において、*RPK2* とヘテロダイマーを作って CLE シグナル伝達系の受容体として機能することが示唆された。さらに、そのほかユビキチンリガーゼ遺伝子、細胞質型キナーゼ遺伝子、受容体様遺伝子等が単離出来、ペプチドホルモンの分子機構について、多くの因子が、初めて、明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 32 件)

- ① Sawa, S. (2013) CLE peptide function in the SAM and CLE peptide evolution in the land plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* In press.
- ② Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu S., Yamaguchi K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and Sawa, S. (2013) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior.* 8. e22534
- ③ Replogle, A., Wang, J., Paolillo, V., Smeda, J., Kinoshita, A., Durbak, A., Tax, F., Wang, X., Sawa, S., and Mitchum, M. G. (2013) Synergistic Interaction of *CLAVATA1*, *CLAVATA2*, and *RECEPTOR-1 LIKE PROTEIN2 KINASE 2* in Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 26. 87-96
- ④ Yamada, M., and Sawa, S. (2012) The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16. 1-6.
- ⑤ Koyohara, S., and Sawa, S. (2012) The role of CLE peptides in *Arabidopsis* development and nematode parasitism. *Plant Cell Physiol.* 53. 1989-1999
- ⑥ Kiyohara, S., Fukunaga, H., and Sawa, S. Characteristics of the falling speed of Japanese orchid seeds. (2012) *International J. Biol.* 4. 10-12
- ⑦ Shimizu, N., Sawa, Y., and Sawa, S. Adaptation and evolution of seed shape on bleeding area in Japanese orchids. (2012) *International J. Biol.* 4. 47-53
- ⑧ Ejima, C, Uwatoko, T, Ngan, B. T., Honda, H., Shimizu, N., Kiyohara, S., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2012) SNPs of *CLAVATA* receptors in tomato, in a context of rootknot nematode infection. *Nematological Research.* 2. 35-40
- ⑨ Sawa, S. (2012) *CLAVATA3* regulates meristem size in *Arabidopsis*. *HANDBOOK OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES.* Ed. by A. J. Kastin, Elsevier, 1-4.
- ⑩ Betsuyaku S., Sawa, S., Yamada, M. (2011) The function of the CLE peptide in plant development and symbiosis. *The Arabidopsis Book.* 9. e0149
- ⑪ Kiyohara, S., Honda, H., Shimizu, N., Ejima, C., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2011) Tryptophan auxotroph mutants suppress the *superroot2* phenotypes,

modulating IAA biosynthesis in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior. 6. 1351-1355

⑫ Ejima, C., Kobayashi, Y., Honda, H., Shimizu, N., Kiyohara, S., Hamasaki, R., and Sawa, S. (2011) A Phalaenopsis variety with floral organs showing C class homeotic transformation and its revertant may enable Phalaenopsis as a potential molecular genetic material. Gene Genet. Sys. 86: 93-95

⑬ 福永裕一、阿部篤志、澤進一郎 (2011) ムロトムヨウラン(ラン科)を沖縄に記録する。分類 11. 151-154

⑭ Honda, H., Hamasaki, R., Ejima, C., Shimizu, N., Kiyohara, S. and Sawa, S. (2011) *MM31/EIR1* promotes lateral root formation in *Arabidopsis*. Plant Signaling & Behavior 6. 968-973

⑮ Sawa, S., and Tabata, R. (2011) RPK2 functions in diverged CLE signaling in plant. Plant Signaling & Behavior 6. 86-88.

⑯ Tabata, R. and Sawa, S. (2011) Diverse roles of CLE peptides in plant development and environmental response. Current Topics in Plant Biology 12. 35-40

⑰ Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S. (2011) Mitogen-Activated Protein Kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to the shoot apical meristem homeostasis. Plant Cell Physiol. 52. 14-29.

⑱ Replogle, A., Wang, J., Bleckmann, A., Hussey, R., S., Baum, T., J., Sawa, S., Davis, E., L., Wang, X., Simon, R., and Mitchum, M., G. (2010) Nematode CLE Signaling in Arabidopsis Requires CLAVATA2 and CORYNE. Plant J. 65. 430-440

⑲ Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G., J., Sato, S., Hayashi, S., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, K., Sawa, S., Fukuda, H., Kawaguchi, M. (2010) A receptor-like kinase, KLAVER, mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. Development 137. 4317-4325

⑳ Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., Sawa, S. (2010) RPK2/TOAD2 is an essential receptor-like kinase transmitting the CLV3 signalling in Arabidopsis. Development 137. 3911-3920

㉑ Sakaguchi, J., Itho, J., Ito, Y., Nakamura, Y., Fukuda, A., and Sawa, S. (2010) COE1, an LRR-RLK responsible for commissural vein pattern formation in rice. Plant J. 63. 405-416

㉒ Miwa, H., Tamaki, T., Fukuda, H., and Sawa, S. (2009) Evolution of CLE signaling. Plant Signaling & Behavior 4: 477-481.

㉓ Naramoto, S., Sawa, S., Koizumi, K., Uemura, T., Ueda, T., Friml, J., Nakano, A., and Fukuda, H. (2009) Phosphoinositide-dependent regulation of VAN3 ARF-GAP localization and activity essential for vascular tissue continuity in plant. Development 136:1529-38

㉔ Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S. (2009) Plant meristems: CLV3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. J. Plant Res. 122: 31-39.

㉕ Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H. (2008) Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 15208-15213.

㉖ Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S. (2008) The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling pathway in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 49: 1752-1757.

㉗ Sawa, S., Kinoshita, A., Betsuyaku, S., and Fukuda, H. (2008) A large family of genes that share homology with CLE domain in Arabidopsis and rice. Plant Signaling & Behavior. 3: 337-339

㉘ Fukunaga, H., Sawa, S. and Sawa, Y. (2008) A new form of *Lecanorchis kiusiana* (Orchidaceae) from Kochi, Japan. The Orchid Review. 116: 106-108

[学会発表] (計 25 件)

[図書] (計 12 件)

[その他]

JPR 論文賞 (日本植物学会) 受賞 2012 年
日本植物生理学会 2010 年
日本植物学会奨励賞受賞 2007 年
ホームページ

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~sawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤進一郎 (SAWA SHINICHIRO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 00315748

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし