

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18687003
 研究課題名(和文) 翻訳後修飾に着目した分泌型ペプチドミクス
 研究課題名(英文) Secreted peptidomics focused on posttranslational modifications

研究代表者
 松林 嘉克 (Matsubayashi Yoshikatsu)
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
 研究者番号：00313974

研究成果の概要：植物のかたちづくりには様々な内生のペプチドホルモンが関与している。本研究では、*in silico* および生化学的解析を統合して、翻訳後修飾ペプチドホルモン候補を探索し、その生理機能解析を行なった。その結果、複数の新規ペプチドホルモン候補を見出すことに成功した。また、翻訳後修飾のひとつであるチロシン硫酸化酵素の精製とクローニングを行ない、その遺伝子破壊株が様々な成長異常を示すことを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
総計	23,100,000	6,930,000	30,030,000

研究分野：生物学

科研究費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：分泌型ペプチド、ペプチドホルモン、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

分泌型ペプチドおよび特異的受容体を介した情報伝達は、多細胞生物の形態形成における細胞間情報伝達に必須のメカニズムであるが、植物ではその報告例は依然として少ない。遺伝子重複や翻訳後修飾の関与など、遺伝学的アプローチだけでは解明が困難なこの課題に対し、生化学的なアプローチを導入して、新しい分泌型ペプチドホルモン群を同定し、その機能解析を行なう必要性が高まっていた。

2. 研究の目的

エネルギーコストの高い特殊な翻訳後修

飾やプロセッシングを経て生産されるペプチド群には、重要な生理的機能が付与されている可能性が高いという予測のもと、本研究では、*in silico* および生化学的解析を統合して、翻訳後修飾ペプチドを探索し、その生理機能解析を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

LC-MS による分泌型ペプチドミクスおよび *in silico* 遺伝子スクリーニングを組み合わせ、翻訳後修飾ペプチドを探索し、同定されたものについて個々に機能解析を行なった。チロシン硫酸化酵素の精製では、既知の硫酸化ペプチドの硫酸化モチーフ配列を固

定化したカラムを用いて、アフィニティー精製を行なった。

4. 研究成果

(1) 高等植物における生理活性ペプチド研究の黎明期に同定された分子のひとつに *phytosulfokine* (PSK) がある。PSK は、細胞増殖を正に制御する分泌型ペプチドであるが、構造的見地から興味深いのは、約 80 アミノ酸からなる前駆体ペプチド群の C 末端付近にある保存配列内のチロシン残基が硫酸化修飾を受け、さらにプロセシング酵素により限定分解され、最終的に 5 アミノ酸となって細胞外に分泌される点である。この過程には少なくとも 2 種類の酵素、チロシン硫酸化酵素とプロセシング酵素が関与し、これら以外にも硫酸基の供与基質が必要であるなど、通常のペプチドと比較すればかなりコストのかかる経路を経ている。それにも関わらず、このペプチドが進化の過程で淘汰されることなく保存されてきたのは、そのコストを上回るメリットがあったためと考えられる。ならば、このような翻訳後修飾ペプチドには、コストに見合うだけの生理活性が付与されている可能性が高いのではないかと予想した。この可能性を検討するため、我々は、シロイヌナズナ懸濁細胞培養液中に新しい硫酸化ペプチドを探索する試みを行なった。硫酸イオンには、陰イオン交換体に他の陰イオンよりも特に強く吸着される性質（水和イオン半径と電荷によって決まるイオン選択性）があり、この性質を用いると陰イオン交換クロマトグラフィーによって硫酸化ペプチドをその他のペプチドから分離することができる。そこで、フェノール抽出によるペプチド抽出と陰イオン交換クロマトグラフィーとを併用して、シロイヌナズナ細胞懸濁培養液から硫酸化ペプチドを濃縮し、さらに、硫酸化ペプチド特異的なフラグメントパターンを指標とした LC-MS 解析を行なったところ、新しい 18 アミノ酸硫酸化ペプチド PSY1 を同定することに成功した。PSY1 は、1 残基の硫酸化チロシンの他、2 残基のヒドロキシプロリンを含んでおり、片方のヒドロキシプロリンには 3 残基のアラビノース糖鎖が付加するなど複雑な構造をしている。PSY1 は、75 アミノ酸前駆体の C 末端付近にある保存配列部分に由来するプロセシング依存型ペプチドであり、3 遺伝子からなるファミリーを形成していた。様々な解析の結果、PSY1 は PSK とオーバーラップした経路で全身的な細胞増殖活性の調節に関与していることが明らかになり、翻訳後修飾ペプチドには生理機能が付与されているという予想は裏づけられた (*PNAS* 誌に掲載)。

(2) PSK や PSY1 などのペプチドホルモンの生産に重要な翻訳後修飾酵素であるチロシ

ン硫酸化酵素 (TPST) の精製を行ない、PSY1 前駆体ペプチドの硫酸化モチーフ周辺のペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて、シロイヌナズナ培養細胞由来ミクロソーム画分より、62 kD の type I 膜タンパク質 (C 末端付近に膜貫通領域を持つ) の精製・同定に成功した。AtTPST は、ゴルジ体に局在しており、植物体全体で発現していた。非常に興味深いことに、動物の TPST と AtTPST は同じ基質 (PAPS) を用いてチロシン硫酸化を行なうにもかかわらず、互いに全く配列類似性がない。このことは、植物 TPST は動物のそれとは独立して収斂進化を遂げたことを意味しており、分子進化の点で興味深い。AtTPST 遺伝子を破壊したシロイヌナズナ植物体では、全身的な矮小化、維管束の形成不全、early senescence などの表現型が表われた。特に根では、根端の細胞分裂活性が顕著に低下し、細胞列にも乱れが生じるため、主根、側根ともに成長が非常に抑制された。PSK や PSY1 などの硫酸化ペプチドホルモンの外的投与による相補効果は限定的であったことから、植物の成長に重要な硫酸化ペプチドがまだ他にも存在する可能性が高い (*PNAS* 誌に掲載)。

(3) アポプラストに存在するペプチド群を解析するには、2 つの大きな課題をクリアしなければならない。ひとつは高純度のアポプラスト液をいかにして得るか、もうひとつはアポプラスト液からいかにして様々な二次代謝産物を除き、ペプチドのみを取り出すかである。そこで我々は、シロイヌナズナを過湿条件下で培養した際にしばしば観察されるガラス化という現象に着目した。ガラス化とは、過湿により組織表面のクチクラ層が失われ、細胞間隙に水が浸入して葉が半透明化することを指すが、この時浸入した水にはアポプラスト成分が高純度で抽出されている。そこで、シロイヌナズナを直接液体培地中に播種し、水中で培養することにより積極的にガラス化させると、植物体の細胞間隙から拡散してくるアポプラスト成分を培地中に回収することができることが明らかになった。また、培地から様々な二次代謝産物を除去しペプチド成分のみを取り出すには、オルトクロロフェノール抽出とアセトン沈殿が効果的であることを見出した。こうして得られたサンプルを HPLC や LC-MS で解析すると、極めて高純度でアポプラスト由来の分泌型ペプチドが検出されることを確認した。

次に、翻訳後修飾やプロセシングを受ける可能性のあるペプチド群の候補を、既知配列のモチーフを参考にしてシロイヌナズナのゲノムデータベースより *in silico* 抽出することを試みた。PSK や PSY1、CLV3/CLE などの短鎖翻訳後修飾ペプチドホルモンの前駆体配列を見ると、いずれも遺伝子重複によりフ

ファミリーを形成しているが、全長にわたってシステイン残基が極めて少なく、また実際にリガンドとして分泌される部分はC末端付近に存在する保存配列に由来し、それ以外の部分の配列にはほとんど共通性は見られないという特徴がある。分子進化の過程において、最終的にプロセッシングで削られてしまう配列部分には多様な変異が蓄積したものと考えられる。そこで、分泌型シグナルペプチドを持つペプチドの中で、分子内のシステイン残基の数が少ないものを選び出し、さらにC末端付近に保存配列を持つファミリーをスクリーニングすれば、ペプチドホルモン候補が絞り込めると考えた。実際に、TAIR7に公開されている31,835 ORFsについて解析してみると、プロセッシング依存型のペプチドに典型的な70から110アミノ酸の範囲の分泌型ペプチドは全部で557個であるが、システイン残基が5個以下のものは179個に絞られる。これらのうち、69個はPSKやPSY1の前駆体ペプチドをはじめ、CLV3/CLE, RALF, IDAなど、主要なペプチド性リガンドやそのホモログであるが、残り110個は機能未知ペプチドであり、その中にはC末端付近に保存配列を持つ新しいファミリーも含まれることが明らかとなった。このファミリーのひとつであるAt1g47485遺伝子に由来するペプチドの過剰発現株のアポプラスト成分の解析を行なったところ、ヒドロキシプロリン残基を含む15アミノ酸ペプチドであることが示された。この成熟型ペプチドは、前駆体ペプチド群のC末端付近の保存配列に由来していたことから、CEP1 (C-terminally encoded peptide 1) と名付けた。合成CEP1ペプチドをシロイヌナズナに与えたり、遺伝子を過剰発現すると、根の成長が顕著に抑制されることが明らかになった。これは主として根端メリステム領域における細胞分裂が抑制されることに起因する。CEP1遺伝子は、根の側根原基のみ発現しており、そのホモログも根のみ発現が確認されていることを考慮すると、根形成に何らかの形で関与するペプチドシグナルである可能性が高い (*Plant J* 誌に掲載、一部未発表)。

(4) シロイヌナズナの茎頂メリステムで発現している分泌型ペプチドCLV3と受容体型キナーゼCLV1は、幹細胞の増殖と分化を調節するリガンド-受容体ペアである。CLV3は、CLEファミリーと呼ばれるC端付近に保存領域を持つペプチドファミリーに属しているが、様々な状況証拠から、この保存領域に由来する12アミノ酸ペプチドがCLV3やその他のCLEペプチドの成熟型ペプチドであると考えられていた。しかしながら、合成12アミノ酸CLV3ペプチドをCLV3欠損株の茎頂に高濃度で投与しても変異を完全には相補できないことや、一部のCLEファミリーペ

プチドにおける合成ペプチド投与効果と遺伝子過剰発現解析結果の矛盾から、成熟型CLV3は単純な12アミノ酸ペプチドではない可能性が指摘されつつあった。我々は、シロイヌナズナを水中で培養すると、アポプラストに局在する分泌型ペプチドが培養液に拡散することに着目し、この系を用いて、CLV3過剰発現株のアポプラストに存在するペプチド群をnano-LC/MSを用いて詳細に解析した。その結果、従来提唱されていた12アミノ酸ペプチドは検出されず、アラビノースが β 1,2結合で付加した13アミノ酸グリコペプチドが検出されることを見出した。このグリコペプチドは、*clv3-2*変異株の相補活性やCLV1結合活性において、12アミノ酸ペプチドよりも数十倍強いことが明らかとなった。また、CLEファミリーのひとつCLE2についても同様の解析を行なった結果、成熟型ペプチドはアラビノシル化ペプチドであり、糖鎖が付加することでCLV1と高い親和性で相互作用できることを見出した。糖鎖の有無による結合定数の違いは約300倍であった。これらの結果は、CLEファミリーの多くがアラビノシル化ペプチドであり、アラビノース付加がリガンド-受容体相互作用に重要な役割を果たしていることを示唆している (*Nature Chem. Biol.* 誌に掲載)。

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8件) すべて査読有り

- (1) Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2009) Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15067-15072
- (2) Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chem Biol* 5: 578-580
- (3) Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y. (2008) *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319: 294
- (4) 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
- (5) Ohyama, K., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y. (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.* 55:152-160
- (6) Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H.,

Ogawa, M. and Matsubayashi, Y. (2007) Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18333-18338

(7) Shinohara, H., Ogawa, M., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y. (2007) Identification of ligand binding site of phyto-sulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 282: 124-131

(8) Shinohara, H. and Matsubayashi, Y. (2007) Functional immobilization of plant receptor-like kinase onto microbeads towards receptor array construction and receptor-based ligand fishing. *Plant J* 52: 175-184

〔学会発表〕 (計 25 件)

(1) Matsubayashi, Y., Ohyama, K., Ogawa, M. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. Japan-Korea Symposium - Plant Growth and Signal Transduction. (Yokohama, Japan) 2008 年 6 月 9~10 日

(2) Matsubayashi Y. Physiological functions of two structurally distinct tyrosine-sulfated peptides in *Arabidopsis* growth and development. 18th International Conference on Arabidopsis Research. (Beijing, China) 2007 年 7 月 20~23 日

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 松林嘉克 (2009) ペプチペプチドリガンド-受容体ペアの解析から探る植物のかたちづくり.

蛋白質核酸酵素, 1月号, 49-57, 秀潤社

(2) 松林嘉克, 篠原秀文 (2008) リガンド-受容体ペアの解析から探る植物の細胞間シグナリング.

化学と生物, 46: 588-590, 学会出版センター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~bioact/matsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松林 嘉克 (Matsubayashi Yoshikatsu)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：00313974