

## 微生物と植物のペプチド性因子に関する 生物有機化学的研究

Studies of Bioorganicchemistry on Microbial and Plant  
Peptide Factors

坂神 洋次 (Sakagami Youji)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授



### 研究の概要

枯草菌のクオラムセンシングフェロモン ComX の構造決定、構造活性相関、および特異な翻訳後修飾の普遍性に関する研究。前駆体遺伝子が明らかになっているが、実際に作用している化学構造が不明な植物ペプチドホルモンの化学構造を解明する研究

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ペプチド、翻訳後修飾、イソプレノイド、クオラムセンシング

### 1. 研究開始当初の背景

枯草菌 RO-E-2 株のクオラムセンシングフェロモン ComXRO-E-2 は、トリプトファン残基がイソプレノイドで修飾され  $\alpha$ -アミノ基が新たな 5 員環を形成するという特異な化学構造を有することを決定していた。植物の茎頂の成長を制御する CLV3 遺伝子がコードするペプチドの化学構造は不明であった。

### 2. 研究の目的

枯草菌の他株の ComX フェロモンの化学構造を決定し、構造活性相関を明らかにし、最終的にはトリプトファン残基がイソプレノイド化されたペプチド・タンパク質の普遍性を検証する。CLV3 遺伝子がコードするペプチドの化学構造を明らかにする。また遺伝子のみが知られていて、ペプチド構造が不明な植物ペプチドホルモンの構造を明らかにする。

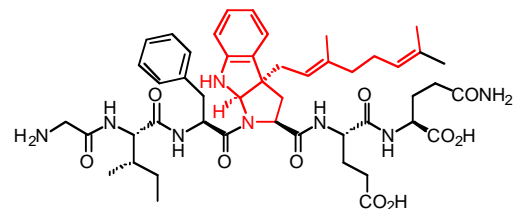
### 3. 研究の方法

他の菌株の ComX フェロモンの化学構造を合成化学的に確定した。ComXRO-E-2 の各残基をアラニンに置き換えた誘導体や、アミノ酸残基を欠落させた誘導体などを合成し、構造活性相関について検討した。イソプレノイド転移酵素 ComQ を過剰発現した菌の膜を使い、ComXRO-E-2 の *in vitro* 合成系を確立した。CLV3 遺伝子を過剰発現させたアラビドプシスよりカルスを誘導し、その切片を MALDI-TOFMS で直接分析し、合成的に構造を確認した。気孔分化形成に関与する遺伝子を過剰発現させたアラビドプシスを作成した。

### 4. これまでの成果

1) 枯草菌のペプチド性フェロモン ComX に関する研究

① ComXRO-E-2 の構造活性相関に関する研究 ComXRO-E-2 の構造は下図に示すようである。このトリプトファン残基以外の 5 残基のアラニンスキャンを行った結果、全てのペプチドが強弱の差はあるものの活性を示した。次にアミノ末端、カルボキシ末端からアミノ酸を一残基ずつ削除したペプチドを合成して活性を調べた。その結果、Phe-Trp\*(Ger)-Glu が活



H-Gly-Ile-Phe-Trp\*(Ger)-Glu-Gln-OH

性を示す最小単位であることが明らかになった。② ComXRO-H-1 の化学構造 Dubnau らは、質量分析の結果から ComXRO-E-2 と異なる側鎖を持つと報告していたが、ComXRO-H-1 もゲラニル側鎖を持つことを証明した。③ ComXRO-C-2 の構造決定 ComXRO-C-2 は、ファルネシル基により修飾されていることが予想されていた。我々は ComXRO-C-2 (Thr-Arg-Glu-Trp\*(Far)-Asp-Gly) を合成し、このフェロモンもトリプトファンが、3 環性の構造をとっていることを証明した。④ *in vitro* ゲラニル化に関する研究 ComXRO-E-2 の前駆体は、58 残基のアミノ酸からなり、そ

#### [4. これまでの成果 (続き)]

のカルボキシ末端の6残基がイソプレニル転移酵素である **ComQ** によりゲラニル化されて成熟フェロモンになる。前駆体配列を比較しても **ComQ** が認識すると思われる共通配列は見いだせなかった。そこで、58残基のペプチドを固相合成した。一方、**ComQ** を過剰発現している大腸菌から膜画分を粗酵素として調整した。前駆体、粗酵素、ゲラニルピロリン酸を反応させ、質量分析により解析し、ゲラニル化されたペプチドを検出した。

#### 2) 植物のペプチド性ホルモンに関する研究

①クラバタ 3(CLV3)成熟ペプチドの化学構造 CLV 遺伝子は、アラビドプシスの成長点が異常になる遺伝子として見つかかり、特に **CLV3** は 96 アミノ酸からなりそのアミノ末端にはシグナル配列が存在することから、ペプチドリガンドとして働いていると考えられていた。トウモロコシの **ESR** (*embryo-surrounding region protein*) 遺伝子は、分泌性のポリペプチドをコードしている。**CLV3** と **ESR** は、C末端付近の 14 アミノ酸配列について高い相同性が観察される。この 14 アミノ酸配列に相同性を持つ遺伝子は、アラビドプシスを始め多くの植物に存在し、この遺伝子ファミリーは **CLE** (**CLAVATA3/ESR related**) と名付けられた。しかしながら、**CLV3** および **CLE** から生じる成熟ペプチドの構造は不明であった。本研究では、まず **CLV3** を過剰発現したアラビドプシスからカルスを誘導し、カルスの培養液からペプチド精製を試みたが不首尾であった。しかし、カルスの薄層切片を調整しこれを試料として **MALDI-TOFMS** を測定したところ特異的なイオンを検出し、**MS-MS** によりペプチドのアミノ酸配列も決定できた。このペプチドを **MCLV3**(matured **CLV3**) と名付けた。**MCLV3** は、**CLE** モチーフ中の 12 残基からなるペプチドで 2 残基のヒドロキシプロリンを含むという特徴を持っている。②気孔の分化形成に関するペプチドホルモン 植物の気孔は、一細胞以上離れて形成され、その分化形成には何らかの因子が関与していることが示唆されていた。我々は気孔密度を上げる活性をもつ遺伝子がコードするペプチドについて研究し、この構造を特定した。このペプチドをアラビドプシスに投与すると、気孔密度が上がり気孔が隣り合って形成されることを観察している。気孔密度を上げることにより光合成能を上げ、作物収量の増加に応用されることが期待される。

#### 5. 今後の計画

トリプトファンがイソプレノイド化される共通配列を明らかにして、この翻訳後修飾の普遍性を検証する。気孔密度を上げるペプチドに続いて、気孔密度を下げるペプチドの化学構造を明らかにし、両ペプチドの生理的な役割を解明する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

**Kondo, T.**, Nakamura, T., Yokomine, K., **Sakagami, Y.** Dual assay for MCLV3 activity reveals structure-activity relationship of CLE peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 312-316 (2008)

Okada M., Yamaguchi H., Sato I., Tsuji F., Dubnau D., **Sakagami Y.** Chemical structure of posttranslational modification with a farnesyl group on tryptophan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 914-918 (2008)

近藤竜彦、坂神洋次 植物の分化を調節する CLE ペプチド 植物の生長調節、**43**, 51-60 (2008)

Ogawa, M., Shinohara, H., **Sakagami, Y.**, Matsubayashi, Y. Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, **319**, 294 (2008)

Okada M., Yamaguchi H., Sato I., Tsuji F., Qi J., Dubnau D., **Sakagami Y.** Acid labile ComX pheromone from *Bacillus mojavensis* RO-H-1 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1807-1810 (2007)

坂神洋次、岡田正弘 生物の密度と化学因子蛋白質核酸酵素、ケミカルバイオロジー、**52**, No. 13, 1673-1678 (2007)

Okada M., Yamaguchi H., Sato I., Cho S-J., Dubnau D., **Sakagami Y.** Structure-activity relationship studies on quorum sensing ComXRO-E-2 pheromone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 1705-1707 (2007)

岡田正弘、坂神洋次, ComX フェロモン構造決定における構造推定体および ComX フェロモンの合成 有機合成化学協会誌、**65**, 608-617 (2007)

Okada, M., Sato, I., Cho, S-J., D. Dubnau, D., Y. **Sakagami, Y.** Chemical synthesis of ComX pheromone and related peptides containing isoprenoidal tryptophan residues. *Tetrahedron*, **62**, 8907-8918 (2006)

近藤竜彦、坂神洋次, 植物細胞の分化を調節するペプチド性植物ホルモン 化学と生物、**45**, 78-80 (2007)

**Kondo, T.**, Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., **Sakagami, Y.** A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science*, **313**, 845-848 (2006)