

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月17日現在

翻訳後修飾ペプチドを介した植物形態形成の分子機構
Molecular dissection of plant development and
cell-to-cell signaling mediated by posttranslationally
modified peptides



課題番号：25221105

松林 嘉克 (MATSUBAYASHI YOSHIKATSU)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究の概要

植物のゲノムには数多くの分泌型ペプチドや受容体キナーゼが見出されるが、機能が明らかなのはごく一部である。本研究では、特に翻訳後修飾ペプチドに着目し、新規ペプチドシグナルの探索や受容機構、翻訳後修飾メカニズムの解析を基軸として、植物の形態形成や環境応答における新しい細胞間情報伝達系の発見を目指す。

研究分野：基礎生物学・植物分子生理学

キーワード：翻訳後修飾、ペプチドホルモン、形態形成、リガンド、受容体、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナゲノムに見出される35,176個の全ORFから、鎖長50–150アミノ酸で細胞外分泌シグナル配列を持つペプチドをコードするものを探すと、1,086個ものORFがヒットする。国内外で、この中から新しいペプチドシグナルを探索する試みが行なわれているが、機能が解明されたのはまだ5%に満たない。一方で、植物においてこれまでに見出された分泌型ペプチドシグナルの過半数は、我々が発見したRGFなどを含めて全長が10から20アミノ酸程度で何らかの翻訳後修飾を伴ったペプチド（短鎖翻訳後修飾ペプチド）である。翻訳後修飾ペプチドの生合成には、通常のペプチドよりも高いエネルギーコストが必要であるが、それにも関わらず翻訳後修飾というしくみが進化的に保存されてきたのは、コストを上回る生理的メリットがあったからであろう。まだ未発見の短鎖翻訳後修飾ペプチド群の中に、植物の形態形成や環境応答に関わる重要な分子群が残されている可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナを材料として、(a) 新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナルを探索し、(b) 受容体の解明など当該ペプチドシグナルが関与する情報伝達系を明らかにするとともに、(c) 翻訳後修飾酵素の同定やプロセッシング機構の解明を進める。新しい細胞間シグナルの発見は、新しいしくみの発見へとつながり、植物の形態形成や環境応答機構の理解に大きく貢献する。

3. 研究の方法

(a) 新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナルの探索

シロイヌナズナタンパク質データベースを用いた *in silico* スクリーニングにより見出した、新規短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナル候補群について、成熟型構造の決定と機能解析を進める。また、翻訳後修飾酵素の欠損株の表現型を手がかりにペプチドシグナル候補群の生理機能推定を行なう。

(b) 受容体の解明

シロイヌナズナ受容体キナーゼを個々にタバコ培養細胞で発現させ、膜画分を回収してライブラリー化する。この発現ライブラリーと放射性ラベルペプチドを用いて、直接的結合を指標に受容体を同定する。機能未知ペプチドであっても受容体は同定できるので、受容体欠損株の解析からリガンド側の機能解明を進めることもできる。

(c) 翻訳後修飾やプロセッシング機構の解明

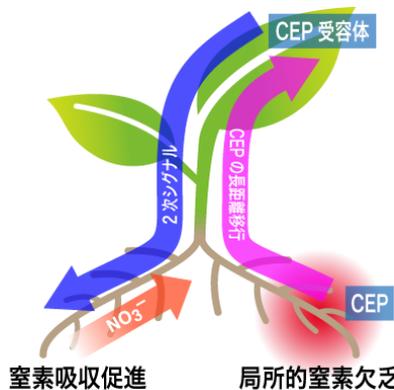
Hyp 残基へのアラビノース転位酵素の精製を行なう。また、プロセッシングに必要なアミノ酸残基を変異導入によって決定する。

4. これまでの成果

(a) 窒素吸収制御に関わる長距離移行ペプチド CEP とその受容体 CEPR の発見 (Science 2014)

植物は地中から窒素を主に硝酸イオンとして吸収しているが、自然界での硝酸イオンの地中分布は、極めて不均一である。そのため、植物は根の一部が局所的な窒素欠乏になった時に、その情報を他の根に伝え、相補的

に硝酸イオン取り込みを促進させるしくみを持っている。しかし、systemic N-demand signaling と呼ばれるこの巧妙なしくみの分子メカニズムは解明されていなかった。我々は、ペプチドシグナル候補であった CEP ファミリーについて、受容体発現ライブラリーを用いて受容体を探索した結果、2 個の CEP 受容体を見出し、これらを欠損させると systemic N-demand signaling が失われることを見出した。根の一部が局所的な窒素欠乏を感知すると分泌型ペプチド CEP が生産され、道管を移行して地上部の受容体 CEPR に認識される。さらに 2 次シグナルが師管を介して根に移行し、離れた根での硝酸イオン取り込みを促進して、窒素不足を補填する。この発見は、変動する環境に対する植物のダイナミックな適応の一端を分子レベルで明らかにしたものとして大きく注目された。



(b) 根端メリステム形成を制御する RGF ペプチドの受容体 RGFR の同定 (PNAS 2016)

RGF ペプチドは根端の幹細胞領域で発現し、分泌されたペプチドが拡散して根端で濃度勾配を形成している。この濃度勾配に比例して転写因子 PLT が発現し、発現量に従って幹細胞領域・細胞分裂領域・細胞分化領域が決定されるが、その受容体は未同定であった。本研究で確立した受容体発現ライブラリーを用いて受容体を探索した結果、3 個の RGF 受容体が見出され、これらを欠損させると RGF 非感受性になるとともに根端メリステムの PLT 発現領域が極端に狭まり、幹細胞領域および細胞分裂領域が縮小して根が短くなることを示した。

(c) Hyp アラビノシル化酵素の同定 (Nature Chem. Biol. 2013)

翻訳後修飾のひとつであるアラビノース糖鎖の付加は、ペプチド骨格のコンフォメーション変化を通して、生理機能に大きな影響を与えている。シロイヌナズナ培養細胞由来の膜タンパク質画分から、基質ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを用いて、酵素を精製、同定することに成功した。欠損株の解析から、この修飾が植物の栄養成長と生殖成長のどちらにも重要であることが明らかとなった。

(d) 根粒数を制御する CLE-RS ペプチドの構造と受容体 (Nature Commun. 2013)

マメ科植物は根粒菌と共生して根粒を形成することにより空中窒素固定を行なっているが、根粒の数は植物側から厳密に調節されていることが知られている。この調節に関わる遺伝子として CLE-RS 遺伝子群が同定されていたが、成熟型構造が分かっていた。我々は、活性型 CLE-RS2 ペプチドは 13 アミノ酸からなるアラビノシル化されたグリコペプチドであることを明らかにした。また受容体キナーゼ HAR1 に直接結合することを証明した (基生研・川口正代司教授らと共同研究)。

5. 今後の計画

今後も、新しい短鎖翻訳後修飾ペプチドシグナルの探索と受容体の解明を基軸として、植物の形態形成や環境応答に関わる重要な細胞間情報伝達系の解明を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(1) Shinohara H., Mori A., Yasue N., Sumida K., *Matsubayashi Y.

Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*.

Proc. Natl Acad. Sci. USA (2016) in press

(2) Tabata R., Sumida K., Yoshii T., Ohyama K., Shinohara H., *Matsubayashi Y.

Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling.

Science 346, 343-346 (2014)

(3) Ogawa-Ohnishi M., Matsushita W., *Matsubayashi Y.

Identification of three hydroxyproline *O*-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*.

Nature Chem. Biol. 9, 726-730 (2013)

(4) Okamoto S., Shinohara H., Mori T., *Matsubayashi Y., *Kawaguchi, M.

Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase.

Nature Commun. 4, 2191 (2013)

他全 11 報

松林嘉克 第 12 回 (平成 27 年度) 日本学術振興会賞受賞

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/>