

植物の成長を制御するグリコペプチドホルモン群

松 林 嘉 克

近年、高等植物において、比較的短鎖の分泌型ペプチドを介した細胞間情報伝達機構の存在が次々と明らかになってきた。植物の成長は脂溶性低分子の植物ホルモンによりすべて制御されるという考え方は過去のものとなり、こうした特異的な機能を持つペプチドホルモン群が脚光を浴びている。分泌型ペプチドホルモンにしばしば観察される翻訳後修飾は、それらの受容体結合活性や生理機能に決定的な影響を与えることが多いが、最近、ヒドロキシプロリン残基がアラビノシル化修飾を受けたグリコペプチドが複数発見され、植物特有の翻訳後修飾として注目を集めている。茎頂メリステムにおける幹細胞群の運命決定を担うペプチドホルモンである CLV3 など、広がりつつあるグリコペプチドホルモンの世界について概説する。

1. はじめに

この10年ほどの間に、高等植物における比較的短鎖の分泌型ペプチドを介した細胞間情報伝達機構の存在が次々と明らかになりつつある。植物の成長は脂溶性低分子の植物ホルモンによりすべて制御されるという考え方は過去のものとなり、こうした特異的な機能を持つ分泌型生理活性ペプチドを「植物のペプチドホルモン」と総称することに、十分なコンセンサスが得られている状況である。シロイヌナズナゲノムには分泌型ペプチドをコードすると予想される遺伝子群がまだ多数存在しており、それらの中からペプチドホルモンを探す試みも国内外で繰り返されている。

植物の分泌型ペプチドホルモンは、動物のそれと同様に、N末端側に存在する分泌型シグナル配列の働きにより、小胞体およびゴルジ体を経由して細胞外へ分泌される。この過程でシグナル配列は切断されるが、残ったペプチド鎖については、様々な翻訳後修飾やプロテアーゼによ

るプロセッシングを受けて10アミノ酸程度となってから分泌されるものと、分子内ジスルフィド結合の形成を経て比較的長鎖のまま（部分的にプロセッシングを受けるものもある）分泌されるものの2種類に大別することができる。ここではそれらの構造的特徴に基づいて、前者を短鎖翻訳後修飾ペプチド、後者をシステインリッチペプチドと呼ぶことにする（図1）。いずれの場合も、最終的に活性型として分泌されるペプチドは成熟型ペプチドと呼ばれ、その構造は受容体結合活性や生理機能を決定づけている。

筆者らは、特に前者の短鎖翻訳後修飾ペプチドについて研究を行っており、これまでにチロシンの硫酸化とヒドロキシプロリンのアラビノシル化が、植物における主要な翻訳後修飾であることを見出してきた。チロシンの硫酸化は、動物のガストリンやコレシストキニンなどにも見られる翻訳後修飾であるが、ヒドロキシプロリンのアラビノシル化は植物にユニークなものである。本稿では、特にアラビノシル化ペプチドホルモン（表1）について、研究の歴史と最近の話題、今後の展望を述べたい。

2. 植物におけるグリコペプチドホルモン

NtHypSys

高等植物において、グリコペプチドが生理活性ペプチドとして同定された例は、2001年にタバコ植物体から単離された hydroxyproline-rich glycopeptide systemin (NtHypSys) I

名古屋大学大学院生命農学研究科（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

Glycopeptide hormones regulating plant growth and development

Yoshikatsu Matsubayashi (Graduate School of Bio-Agricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan)

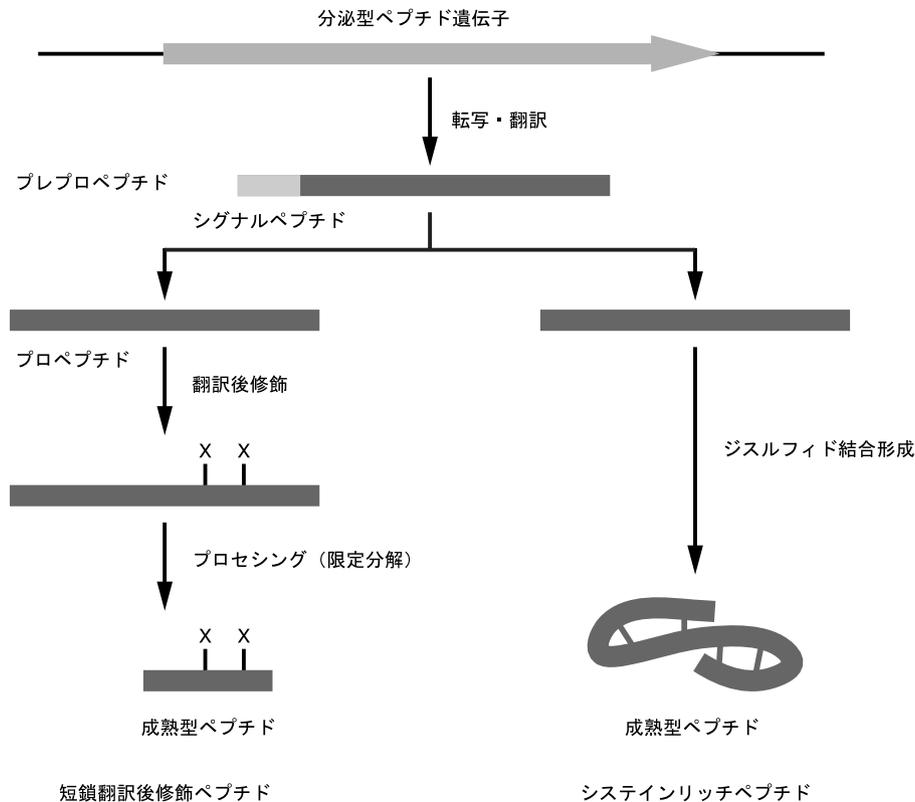


図1 植物ペプチドホルモンの構造的特徴による分類

短鎖翻訳後修飾ペプチドは、プレプロ体として翻訳され、分泌型シグナル配列が切断されてプロペチドとなり、様々な翻訳後修飾を受けた後、プロセッシング酵素による限定分解により比較的短鎖の成熟型ペプチドが切り出されて分泌される。システインリッチペプチドは、分泌型シグナル配列が切断された後に、偶数個存在する Cys 残基間で分子内ジスルフィド結合を形成し、分泌される。システインリッチ領域以外の部分が一部プロセッシングされるものも存在する。

表1 これまでに見出されたグリコペプチドホルモンの構造と機能

ペプチド名称	成熟型アミノ酸配列	前駆体配列長 (aa)	機能
NtHypSys I	RGANLPP*P*SP*ASSP*P*SKE + 糖鎖	165	ナス科における傷害応答遺伝子群の発現誘導
NtHypSys II	NRKPLSP*P*SP*KPADGQRP + 糖鎖	165	ナス科における傷害応答遺伝子群の発現誘導
PSY1	DY(SO ₃ H)GDPSANPKHDPGV[(L-Ara) ₃]P*P*S	75	細胞増殖の制御
CLV3	RTVP*SG[(L-Ara) ₃]P*DPLHHH	96	茎頂分裂組織の形成制御
CLE2	RLSP*GG[(L-Ara) ₃]P*DPQHH	75	未解明

翻訳後修飾を受けたアミノ酸残基は、硫酸化チロシンを Y(SO₃H)で、ヒドロキシプロリンを P*で、それぞれ表記した。[(L-Ara)₃]P*は L-アラビノースが3残基付加したヒドロキシプロリン残基を示す(糖鎖をアミノ酸の前に書くのは IUPAC の表記法指針による)。

および II が最初である¹⁾。外敵から逃げて身を守ることができない植物が独自に進化させた防御システムのひとつとして、傷害誘導性プロテアーゼインヒビターの生産がある。プロテアーゼインヒビターは植食性昆虫の消化器官に作用して虫を弱らせるため、被害の拡大をある程度防ぐ効果を示す。ナス科植物ではこのプロテアーゼインヒビターの生産が、傷害部位だけでなく傷害部位から離れた無傷の葉においても誘導されることが知られている。植物のこのような全身的(システミック)な防御反応は、傷害部位で誘導され、植物体全体へ移動して情報を伝達する物質の存

在を強く示唆することから、傷害応答遺伝子群の発現誘導活性を指標に誘導因子群の探索が進められていた。NtHypSys は、傷害時に発現し、傷害応答遺伝子群の発現を誘導する活性を持つことから、こうした植物の防御応答の初期過程に関与していると考えられている。ただし移行性があるかどうかは分かっていない。NtHypSys I および II は、いずれもヒドロキシプロリン(Hyp)残基を含む18アミノ酸ペプチドで、Hyp残基側鎖にそれぞれ9残基および6残基の糖鎖の修飾を受けている。なお、この論文では糖鎖について、質量分析で五炭糖(ペントース)であるこ

A



B

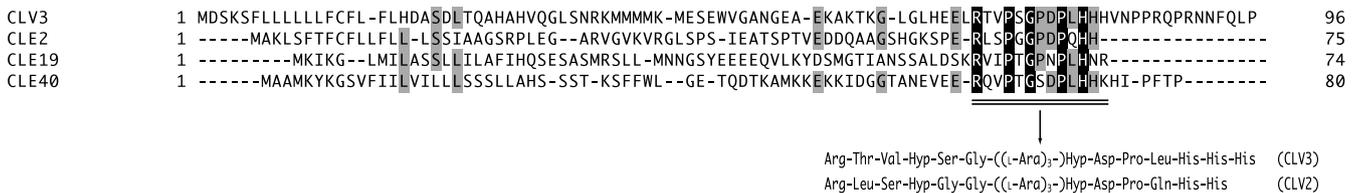


図2 PSY1 および CLV3/CLE ペプチド群の前駆体構造と成熟型ペプチド構造

(A) PSY1 およびその関連ペプチド群の前駆体構造と成熟型ペプチド構造. (B) CLV3/CLE ペプチド群の前駆体構造と成熟型ペプチド構造. CLE ペプチドについてはその一部のみを抜粋して示した. 黒色と灰色は保存アミノ酸を表わし, 下線部は成熟型ペプチドとして切り出される部分を示している. Hyp: ヒドロキシプロリン, Ara: アラビノース

とのみ言及し, 糖の種類については決定されなかった. この2種類のペプチドは, 165 アミノ酸前駆体ペプチド pro-HypSys 内の2箇所の領域に由来しており, 翻訳後修飾とプロセッシングを経て生成する. 糖鎖のない合成ペプチドは活性が1/1000程度にまで低下することから, 糖鎖部分は活性に決定的な役割を担っている.

3. PSY1

次に同定されたグリコペプチドは, 2007年に, 筆者らのグループが単離した PSY1 (plant peptide containing sulfated tyrosine 1) である²⁾. PSY1 は, シロイヌナズナ細胞培養液中に含まれるペプチド群を対象とした硫酸化ペプチドミクス解析により同定された18アミノ酸ペプチドであり, チロシン残基が硫酸化され, Hyp 残基に3個の糖が付加した複雑な構造をしている. この時初めて糖鎖組成解析が行われ, 構成糖がすべてL-アラビノースであることが明らかになった. PSY1 は, 75アミノ酸前駆体ペプチドの後半に存在する18アミノ酸領域が翻訳後修飾を受けた後, プロセッシングにより切り出されて分泌される (図2A).

シロイヌナズナには, PSY1 関連遺伝子は3種類存在するが, いずれも分裂組織を含め植物体全体において比較的高いレベルで発現している. PSY1 ペプチドを培養細胞に与えると, 数十 nM レベルの濃度で顕著な細胞増殖促進活性を示す. PSY1 遺伝子を過剰発現すると, 地上部・地下部ともに植物体の成長が促進されることから, 細胞増殖の正の制御因子であると考えられている. PSY1 の糖鎖もまた活性に重要であり, 糖鎖のない合成ペプチドは活性が1/100程度にまで低下する.

4. CLAVATA3

(1) 研究の歴史的背景

3番目の事例は, 筆者らのグループが最近成熟型ペプチドの同定に成功した CLAVATA3 (CLV3) であるが, 本題の前に研究の歴史的背景を説明しておく必要がある.

植物の地上部は, すべて茎頂分裂組織からつくり出される. この茎頂分裂組織の重要な機能のひとつは, 中心部の未分化な細胞を維持したまま, 周縁部の細胞を器官分化に向けて送り出し続けることにある. 茎頂分裂組織では, 未分化状態の維持と器官分化とのバランスを一定に保つメカニズムが存在しており, その解明を目指して古くから突然変異株を用いた遺伝学的な解析が行われてきた. *clavata1* (*clv1*) および *clavata3* (*clv3*) は, このバランスが失われた変異株として同定されたものであり, いずれも茎頂分裂組織に未分化な細胞群が過剰に蓄積して肥大化したドーム状の構造をつくることが知られている (図3を参照). 花器官をつくりだす花芽分裂組織の中心部も肥大化するため, 雌しべや萼がこん棒状 (club-like) になることが変異株の名前の由来になっている. 逆に CLV3 を過剰発現させると茎頂分裂組織は消失し, 成長は停止する.

原因遺伝子の解析の結果, CLV3 は96アミノ酸分泌型ポリペプチドを³⁾, CLV1 はロイシンリッチリピート (LRR) 型受容体キナーゼを⁴⁾, それぞれコードしていることが明らかとなった. シロイヌナズナの茎頂には, 表層に対して平行な2層の細胞層が観察され, この層を外衣, さらに内側の細胞群を内体と呼んでいるが, CLV3 は茎頂中心部の外衣で, CLV1 はそのすぐ下部の内体で特異的に発現していたことから, 両者が相互作用しながら茎頂分裂組

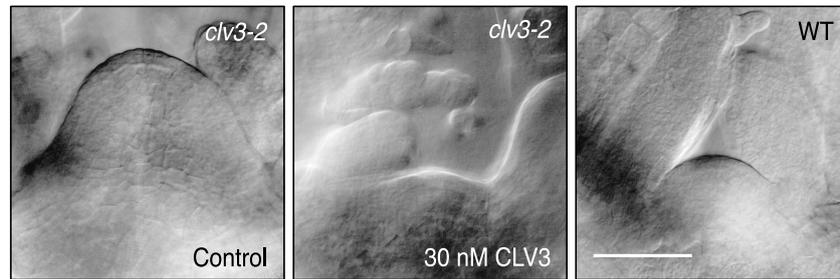


図3 CLV3糖ペプチドの生理活性

CLV3 遺伝子を欠損している *clv3-2* 株ではメリステムは肥大化してドーム状になるが、CLV3 糖ペプチドを与えると、30 nM でメリステムが野生型程度まで縮小する。

織の形成を制御していると考えられるようになった。CLV1 が活性化されると、その下流に存在し未分化な幹細胞群の増殖を促進する *WUSCHEL* (*WUS*) 遺伝子の発現が抑えられるため、分裂組織のサイズが小さくなる方向に制御される。一方、*WUS* の働きが弱くなると未知の細胞間シグナルによって *CLV3* の発現も抑えられ、*WUS* は抑制から解除される。このフィードバックループにより、茎頂分裂組織のサイズが一定の大きさに保たれると考えられている。

CLV3 は 96 アミノ酸分泌型ポリペプチドをコードしているが、その成熟型ペプチド構造は長らく謎であった。全長が細胞外にそのまま分泌されていると考えられていた時期もあったが、やがて *CLV3* に数多くのホモログが存在することが分かり、その中のいくつかは *CLV3* と機能的に等価であるものが見出されると、それらの構造的特徴から成熟型はかなり短鎖なのではないかと考えられるようになった。*CLV3* のホモログは *CLE* (*CLAVATA3/ESR-related*) ファミリーと呼ばれ、シロイヌナズナでは 31 種類（一部欠番があるので、*CLE46* まで存在する）見出されている。例えば *CLE40* は、*CLV3* プロモーターで発現させれば *CLV3* 変異株を相補するので、*CLV3* と機能的に等価であることが明らかとなっているが、両者のコードするポリペプチドを比較しても、類似性の高い部分は C 末端付近の 14 アミノ酸領域 (*CLE* ドメインと呼ばれる) のみである (図 2B)。そこで、*CLV3* における 14 アミノ酸領域のペプチドを合成してシロイヌナズナに与える実験が行われた結果、弱いながらも茎頂分裂組織のサイズを縮小させる効果があることが明らかとなった。このことは、この 14 アミノ酸領域と成熟型ペプチドとが構造的にある程度近似していることを意味する。

こうした背景の中、*CLV3* を過剰発現したカルス組織内に、*CLV3* の 96 アミノ酸ポリペプチドの一部に由来する 12 アミノ酸ペプチドが検出されるとの報告がなされた⁵⁾。この 12 アミノ酸ペプチドの三つの Pro 残基のうち二つはヒドロキシル化修飾を受けていた。このペプチドを高濃度

で植物体に与えると、*CLV3* 過剰発現に類似した茎頂分裂組織の縮小が観察されたことから、12 アミノ酸ペプチドが *CLV3* の活性本体であると提唱された。また、このペプチドは、やや弱いアフィニティーながら、*CLV1* 受容体キナーゼの細胞外領域に直接結合することも示された⁶⁾。

こうして一旦は解決したかに思われた *CLV3* の成熟型構造であったが、その構造はすべての研究者を納得させたわけではなかった。例えば、マメ科植物であるミヤコグサの根粒形成において、*LjCLE-RS1* および *LjCLE-RS2* と名付けられたペプチドが根粒数の調節に関与することが知られている。*LjCLE-RS1* および *LjCLE-RS2* は、根粒菌が分泌する根粒形成因子 *Nod* ファクターによって根で強く誘導され、他の根に根粒が作られるのを抑制するはたらきを持つ。このネガティブフィードバック機構により、植物体全体でつくられる根粒の総数が適切に調節されている。しかし、その当時考えられていた *CLV3* の成熟型構造に従って予想成熟型ペプチドを合成し、ミヤコグサの根に投与しても根粒形成の抑制効果は認められなかった⁷⁾。遺伝子レベルでは明瞭に活性が観察されるにも関わらず、合成ペプチドに活性がないのはなぜなのか、真の成熟型ペプチド構造の解明が必要であると思われた。

(2) *CLAVATA3* はアラビノシル化ペプチドである

分泌型ペプチドは、アポプラストと呼ばれる細胞間隙の中に拡散しているため、アポプラストに含まれるペプチド群を高精度で解析することができれば、様々なペプチドホルモンの成熟型ペプチド構造を容易に知ることができるはずである。しかし微小空間であるアポプラストに存在するペプチド群を解析するには、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植物特有の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。

ここで着目されたのは、シロイヌナズナを過湿条件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であ

る。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。実際、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できることが示された⁸⁾。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が明らかになった。オルトクロロフェノールは室温で液体状のフェノール誘導体であるが、フェノールよりも酸性度が高いため水素結合を形成しやすく、10残基程度のオリゴペプチドでも効率よく抽出することができる⁸⁾。

この新しい解析系を使うと、任意の分泌型ペプチド遺伝子に由来する成熟型ペプチドの構造を比較的容易に決定することができる。そこで、*CLV3* を過剰発現した植物体のアポプラストに存在するペプチドのプロファイルと、野生株のプロファイルとの比較が行われた結果、植物体内における *CLV3* の成熟型構造は、Hyp 残基のひとつに 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ることが明らかとなった⁹⁾ (図 2B)。 *CLV3* 遺伝子を欠損している *clv3-2* 株ではメリステムは肥大化してドーム状になるが、*CLV3* 糖ペプチドを与えると、30 nM 程度でメリステムが野生型程度まで縮小する (図 3)。これは、糖鎖がないものを与えた場合、同濃度では極めて活性が弱いのと対照的である。また、*CLV1* 受容体キナーゼに対する結合定数は、1.0 nM と算出され、糖鎖の有無で 30 倍程度の違いがあることが明らかとなった。アラビノース糖鎖の結合様式は直鎖 1,2 結合であり、立体は β 型であると推定されているが、糖鎖構造の確定は化学合成による確認を待つ必要があるだろう。

先に述べた LjCLE-RS1 および LjCLE-RS2 の構造は、シロイヌナズナにおける CLE ペプチド群のうち CLE2 と最も近い。実際、CLE2 の成熟型配列についても解析が行われた結果、CLE ドメインに含まれる 12 アミノ酸ペプチドにやはり L-アラビノースが 3 残基付加した糖ペプチドであることが示された⁹⁾。同様の手法で LjCLE-RS1 および LjCLE-RS2 の構造を確定し、化学合成ペプチドの供給が可能になれば、根粒形成の制御メカニズムの解明にもつながるだろう。

今後の展望

以上のようにアラビノシル化ペプチドホルモンの世界は急速に広がりつつある。ただし、ペプチドがアラビノシル化されるかどうかは、実際に生化学的な解析をしない限り確認は難しいのが現状である。また、上に示した

NtHypSys や PSY1, CLV3, CLE2 の配列からだけでは、アラビノシル化のコンセンサス配列を見出すことも難しい。さらに複雑なことに、同じ CLE ペプチドファミリーに属しながら、ヒヤクニチソウ培養細胞液から単離された木部分化抑制因子 TDIF は、アラビノシル化されておらず¹⁰⁾、受容体である TDR にも糖鎖がない状態のままかなりの高親和性で結合することが確かめられている¹¹⁾。このことは、プロリンリッチな短鎖翻訳後修飾ペプチドにおいても、アラビノシル化されるものとされないものがあることを意味している。

今後解明しなければならない課題は多いが、最も興味を持たれるのは、こうしたペプチドホルモンのアラビノシル化に関与する糖転位酵素の同定であろう。シロイヌナズナには 400 以上もの糖転位酵素が存在するが、Hyp 残基にアラビノースを転移する酵素は未だ同定されていない。バイオインフォマティクスによる遺伝子候補の絞り込みと、合成基質を利用した生化学的機能解析によって、この酵素を見つけ出すことができれば、それらの遺伝子破壊株の表現型は、背後に広がるアラビノシル化ペプチドの世界を如実に反映するはずである。そこから様々なアラビノシル化ペプチドを介した植物のかたちづくりのしくみが見えてくるに違いない。

文 献

- 1) Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., & Ryan, C.A. (2001) *Nature*, 411, 817-820.
- 2) Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M., & Matsubayashi, Y. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18333-18338.
- 3) Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., & Meyerowitz, E.M. (1999) *Science*, 283, 1911-1914.
- 4) Clark, S.E., Williams, R.W., & Meyerowitz, E.M. (1997) *Cell*, 89, 575-585.
- 5) Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., & Sakagami, Y. (2006) *Science*, 313, 845-848.
- 6) Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., & Matsubayashi, Y. (2008) *Science*, 319, 294.
- 7) Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., & Kawaguchi, M. (2009) Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.*, 50, 67-77.
- 8) Ohyama, K., Ogawa, M., & Matsubayashi, Y. (2008) *Plant J.*, 55, 152-160.
- 9) Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5, 578-580.
- 10) Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., & Fukuda, H. (2006) *Science*, 313, 842-845.
- 11) Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., & Fukuda, H. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 15208-15213.