

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on processing and function of CLE peptides in *Arabidopsis thaliana*.
(シロイヌナズナにおける CLE ペプチドのプロセッシングと機能の研究)

氏名 玉置 貴之

<序>

植物は細胞間の情報伝達を介して、高度に秩序だった組織を作り出す。このような細胞間情報伝達を担う因子として、低分子分泌ペプチドである CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related (CLE)ペプチドが近年明らかになってきた。CLE ペプチドは茎頂・維管束・根端の3つのメリステムにおいて、受容体の Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK)とその下流で機能する WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX)転写因子を介して、幹細胞の分化と分裂の制御に機能している。しかし、CLE ペプチドが翻訳されてから成熟するまでの過程、受容体から WOX 転写因子へのシグナル伝達、WOX 転写因子による下流遺伝子の制御など、CLE ペプチドの作用機構については不明な点が多く存在する。本研究ではこれらの課題のうち、CLE ペプチドの成熟過程の解析と、WOX 下流因子の探索を行うことで、CLE ペプチドの機能の全体像を理解することを目的とした。

<結果と考察>

CLE ペプチドのプロセッシング機構の解析

CLE 遺伝子はおおよそ 100 アミノ酸残基からなる低分子分泌ペプチドをコードしている。このペプチドは N 末端にシグナルペプチド、C 末端側にファミリー内で保存された領域である CLE ドメインを持っている。CLE ペプチドは植物体内において翻訳後にプロセッシングを受けて、CLE ドメインに対応する 12/13 アミノ酸残基からなる成熟ペプチドとして機能すると考えられている。しかし CLE ペプチドのプロセッシング機構の詳細についてはこれまでほとんど明らかになっていない。ここでは Zn^{2+} カルボキシペプチダーゼをコードすると推測され、先行の遺伝学的研究によって CLE ペプチドのプロセッシングへの関与が示唆されている SUPPRESSOR OF *LLP1* 1 (SOL1)について、遺伝学、生化学、細胞生物学を用いて、その詳細な機能解析を行った。

1. *soll* 変異体の CLE ペプチド感受性の解析

SOL1 が CLE ペプチドのプロセッシングに関わっているならば、成熟ペプチドに対しては感受性を示す

一方で、*CLE* 遺伝子の発現誘導には非感受性を示すと予測された。そこで、*SOL1* が *CLE* ペプチドのプロセッシングに関わりうるかどうかを明らかにするため、*soll* 変異体と野生型シロイヌナズナを用いて、成熟 *CLE* ペプチドを投与したときと全長 *CLE* 遺伝子を発現させたときの感受性の違いを比較した。*CLE* ペプチドとしては、最もよく研究されているものの一つである *CLV3* と先行研究で *SOL1* によるプロセッシングを受けることが示唆された *CLE19* ペプチドに関して解析を行った。植物に直接投与した *CLV3* と *CLE19* ペプチドはシロイヌナズナの根の伸長を阻害したが、*soll* 変異体でも野生型と同様に根の伸長を阻害した(図 1)。同様に、*CLV3* 遺伝子を発現誘導した時にも野生型と *soll* 変異体ともに、根の伸長が阻害された(図 2a, b)。ところが、*CLE19* 遺伝子を発現誘導したときには、野生型の根の伸長は阻害されたものの、*soll* 変異体では伸長が阻害されなかった (図 2c, d)。この結果から、*SOL1* は *CLE19* ペプチドの成熟に関わる働きをすると推測された。

2. *SOL1* の酵素活性と植物体内での役割

動物の *SOL1* ホモログはポリペプチドの C 末端のアルギニンまたはリシンを除去する活性を持つことが知られている。このことから *SOL1* も同様の活性を持ち、*CLE19* や *CLE21* など C 末端にアルギニンまたはリシンをもつ *CLE* ペプチド前駆体のプロセッシングに関わるのではないかと予測された。そこで、*SOL1* の酵素活性を明らかにするために、*SOL1* タンパク質を *Nicotiana benthamiana* 中で一過的に発現させたのちに単離・精製した。精製 *SOL1* は *CLE19* および *CLE21* ペプチド前駆体の C 末端アルギニンとリシンに対してプロセッシング活性を示した(図 3)。このことから *SOL1* が *CLE19* を含む C 末端にアルギニンまたはリシンを持つ複数の *CLE* ペプチド前駆体のプロセッシングに関わるということが強く示唆された。さらに、*SOL1* による *CLE19* プロセッシングが植物体内でも起こるかを明らかにするためにアルギニンを最初から除去した *CLE19* (*CLE19ΔR*) 遺伝子を作成し、シロイヌナズナ内で発現誘導した。その結果、全長 *CLE19* 遺伝子の場合と異なり、*soll-101* 変異体においても野生型と同様に根の伸長阻害が起きた (図 4)。この結果から *SOL1* は *CLE19* の C 末端アルギニンの除去に働いていて、*CLE19* ペプチドの生成に必須であることが明らかとなった。

次に、*SOL1* によるプロセッシングが細胞内または細胞外のどこで起きるのかを明らかにするために *SOL1-YFP* の細胞内局在を観察した。*SOL1-YFP* は細胞内でエンドソームのマーカールとよく共局在した(図 5)。この結果から *SOL1* がエンドソームに局在し、*CLE19* タンパク質のプロセッシングに関わるということが示唆された。糖鎖付加と N 末端プロセッシングに関する先行研究の結果と今回得られた結果を合わせ、図 6 のモデルを提唱する。*CLE19* タンパク質は小胞体、ゴルジ体を経由して、エンドソームで *SOL1* による C 末端のプロセッシングを受ける。その後、細胞外へ分泌され N 末端のプロセッシングを受けて成熟ペプチドになると考えられる。

CLE ペプチドの下流因子の解析

植物メリステムにおいて *CLE* シグナルの下流では *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) ファミリーの転写因子が幹細胞の未分化状態の維持と増殖に機能する。維管束では、*TDIF* (*CLE41/44* ペプチド) とその受容体の *TDR* の下流で、*WOX4* 依存的に維管束幹細胞の増殖が促進される。しかし、*WOX4* の下流で幹細胞の増殖に機能する標的遺伝子についてはこれまで明らかになっていなかった。そこで、*WOX4* による維管束幹細胞の増殖機構を明らかにするため、*WOX4* の標的遺伝子の網羅的な探索を行った。また、*WOX* ファミリーの中で最も解析の進んでいる *WUS* と *WOX4* の間で標的遺伝子の比較をすることで、*CLE* シグナルの下流に存在する *WOX* ファミリーに共通の機能とそれぞれに特異的な機能を明らかにすることを目指した。今回の解析には均質なサンプルを大量に得られ、発現誘導の同調性の高いシロイヌナズナ培養細胞を用いた。

まず、エストロゲン誘導プロモーターの下流で *WOX4-ECFP* と *WUS-ECFP* を発現するシロイヌナズ

ナ培養細胞を形質転換によって作出し、エストロゲン処理によって導入遺伝子の発現誘導が起こることを確認した(図 7)。次に、この培養細胞を用いて *WOX4*、*WUS* を発現誘導し、これら転写因子により速やかに発現が変化する遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に調査した。その結果、共に幹細胞の分裂に関与する転写因子であるにもかかわらず、多くのターゲット候補遺伝子は異なるものであった(図 8)。この結果は、維管束メリステムと茎頂メリステムでは、その分裂活性維持機構に大きな違いがあることを示唆した。*WOX4* 特異的なターゲット候補遺伝子の中には、多くの興味深い遺伝子が含まれたが、中でもエチレンシグナル伝達に関わると予測される遺伝子が複数存在し、*WOX4* がエチレンシグナル伝達経路を介して維管束幹細胞の増殖に関わっている可能性があるかと推測された(表 1)。

<まとめ>

本研究により、これまで未知であった CLE ペプチドの成熟機構の一端が明らかになった。*WOX4* の下流因子についても有力な手がかりが得られ、今後の詳細な解析によって CLE ペプチドの機能の共通性と特異性についてさらに理解が進むことが期待される。

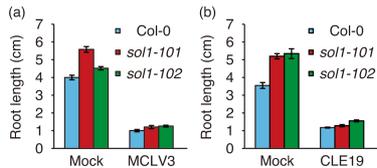


図1 CLE ペプチドの主根の伸長への影響
(a) MCLV3 ペプチド処理。(b) CLE19 ペプチド処理。どちらのペプチドによっても主根の伸長が阻害された。n=9-11 パー: ±SEM

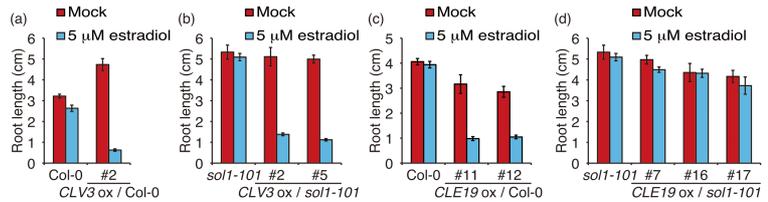


図2 *CLV3*, *CLE19* 遺伝子を発現誘導した時の主根の伸長への影響
(a, b) *CLV3* 遺伝子。(c, d) *CLE19* 遺伝子。*sol1-101* は *CLE19* 遺伝子に対して非感受性を示した。n=9~11 パー: ±SEM

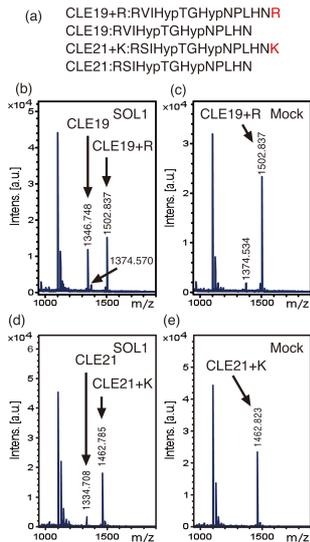


図3 SOL1 の酵素活性
CLE ペプチドと精製 SOL1 を反応させ、MALDI-TOF MS で検出した。(a) 基質ペプチドとそのプロセッシング産物のアミノ酸配列。(b-e) 精製 SOL1 または Mock 抽出物と基質ペプチドの反応産物の検出ピーク。SOL1 を加えたサンプルでのみプロセッシング産物が検出された。

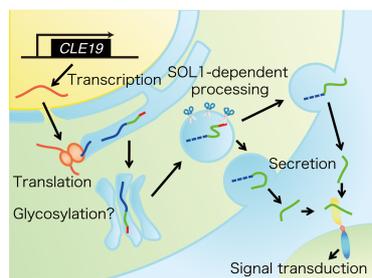


図6 CLE19 成熟機構のモデル図
CLE19 は転写、翻訳後にエンドソームで SOL1 による C 末端のプロセッシングを受けると考えられる。糖鎖修飾を受けるかどうかは不明であるが、受けるとすればこれまでの知見からゴルジ体であると推測される。N 末端のプロセッシングに関しては先行研究からは細胞外への分泌後に起こることが示唆されているが詳細は不明である。

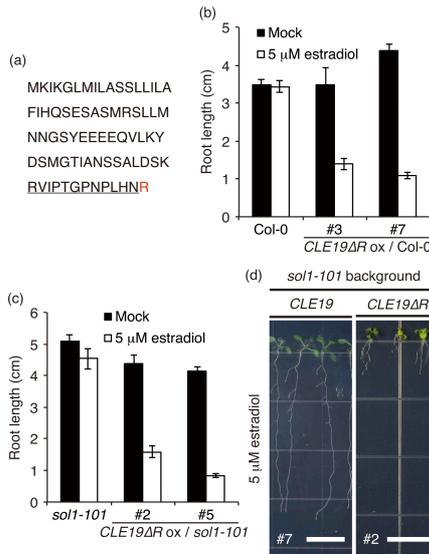


図4 C 末端アルギニンを除去した *CLE19ΔR* 遺伝子の主根の伸長への影響
(a) CLE19 前駆体のアミノ酸配列。(b) 野生型。(c) *sol1-101* 変異体。n=9~11 パー: ±SEM (d) *CLE19ΔR* は *sol1-101* 変異体の主根の伸長を阻害する。スケールバーは 1 cm。

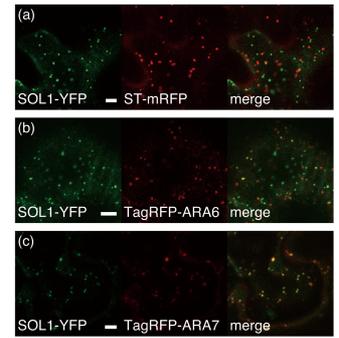


図5 SOL1-YFP の細胞内局在
(a) *SOL1-YFP* と *ST-mRFP* (ゴルジ体マーカー) との共発現。(b) *SOL1-YFP* と *TagRFP-ARA6* (エンドソームマーカー) との共発現。(c) *SOL1-YFP* と *TagRFP-ARA7* (エンドソームマーカー) との共発現。スケールバーは 50 μm。

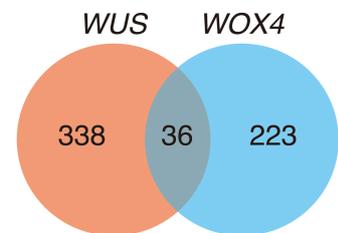


図8 マイクロアレイ解析の結果
WOX4 と WUS それぞれに特異的に発現が変動する遺伝子と共通に変動する遺伝子が得られ、WOX4 と WUS はそれぞれに特有の機能と共通の機能を持つことが示唆された。

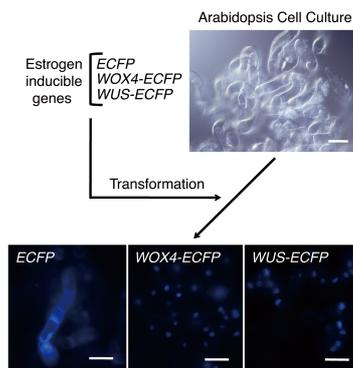


図7 *WOX4-ECFP*, *WUS-ECFP* をもつシロイヌナズナ培養細胞系の確立
シロイヌナズナ培養細胞にエストロゲン誘導系の *WOX4-ECFP*, *WUS-ECFP*, *ECFP* を形質転換した。ECFP は細胞質全体に局在したのに対し、WOX4 と WUS は核局在を示した。スケールバーは 50 μm。

表1 WOX4下流候補遺伝子とその発現変動量の例

Short description in TAIR10	log ₂ (fold change)
MIR165/MIR165A	-1.09
DOF zinc finger protein 2 (DOF2)	1.01
ERF domain protein 12 (ERF12)	0.86
indole-3-acetic acid inducible 31 (IAA31)	-0.61
CLAVATA3/ESR-RELATED 21 (CLE21)	-0.54
homeobox protein 40 (HB40)	-0.53
TCP family transcription factor	0.52
ethylene-responsive nuclear protein / ethylene-regulated nuclear protein (ERT2)	0.52
homeobox protein 2 (HB-2)	0.49
ethylene responsive element binding factor 4 (ERF4)	0.38

ここには今回得られた候補遺伝子のうち主に転写制御に関わるものを記載した。ERF12, ERF4, ERT2 はエチレンシグナルに関わると予測される。