

植物空腹・指令シグナル分子の機能解明と 高機能性成長調整剤の開発

重 田 育 照^{*1} 田 畑 亮^{*2}

Functional Analysis of Plant Hunger/Command Signals and Development of High-performance Growth Regulators

Yasuteru SHIGETA^{*1} and Ryo TABATA^{*2}

Small secreted peptides are important for plant development and environmental stress response. It is estimated that more than 1000 potential secreted peptides exist in Arabidopsis genome, however, so far only very few have been functionally characterized because of the difficulty in mature protein synthesis and gene redundancy. In this study, I identified the importance of IMA peptide in the iron-deficiency response. In addition, I also performed genomics approach (CRISPR/Cas9 genome-editing technique) and found novel cysteine-rich peptides are essential for iron-deficiency stress response. These analyses may pave the way for understanding the novel plant peptide signaling.

1. 研究背景と目的

大地に根を張り、自ら動くことのできない植物は、限られた場所で生育に必要な 14 種類のミネラル（栄養）を土壌から吸収し成長する。植物は脳や神経を持たない代わりに、体中に張り巡らされた維管束を利用し、根と葉のコミュニケーションによって様々な環境ストレスに柔軟に適応する力を備えている。しかし、土壌の栄養が欠乏し、ストレスを感じた時に「植物はどのように空腹を感知し、栄養吸収を促すことで成長を維持しているのか？」は、ほとんど解明されていない。申請者の田畑はこれまで、15 アミノ酸から成る CEP ペプチドが、土壌中の窒素欠乏情報を「根から葉」へと移動し伝える「空腹シグナル」として機能することを証明してきた（図 1 左）。さらに、葉における CEP 受容体および「指令シグナル CEPD」の同定に成功し、根と葉のコミュニケーションによる窒素吸収量調節機構の全貌を明らかにしてきた（図 1 左）。加えて、「鉄」の欠乏ストレスについても、葉と根のコミュニケーションを担い、「指令シグナル」として働く中分子ペプチドの IRON MAN (IMA) を見出し（図 1 右）、中分子ペプチド IMA による植物の鉄吸収量調節機構の解明への端緒をつかみつめる。本研究は、植物の土壌環境ストレス適応戦略について、根から空腹を伝える「空腹シグナル」と根へ栄養吸収を促す「指令シグナル」の 2 つに注目し（図 1）、植物ストレス応答を分子から個体レベルで包括的に理解し、制御する、新しい学問（研究領域）を創成する。さらに、筑波大学 重田育照教授との共同研究を通して、植物の空腹・指令シグナルについて「植物栄養学・有機合成化学・情報生物物理学」の融合という新たなアプローチから、最小限の肥料による安全で効率的な植物栽培を可能とする新たな植物ペプチド資材開発に挑戦する。

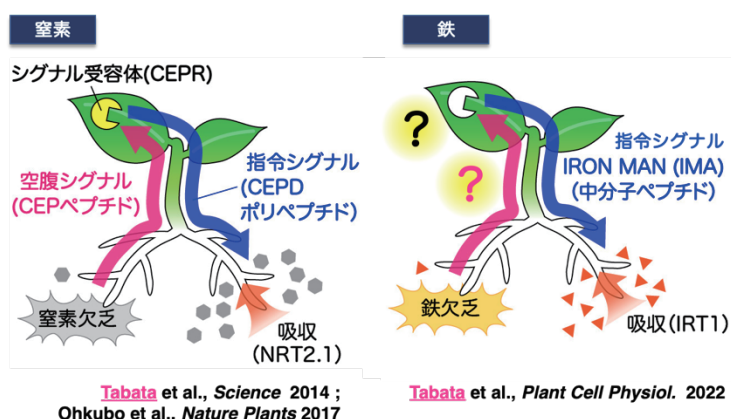


図 1 栄養吸収制御に必須の植物空腹・指令シグナルの発見。

2. 鉄欠乏ストレス応答性「指令シグナル」の機能解析

Split-root「鉄」欠乏培養法によるシロイヌナズナ時系列RNA-seq解析から、「葉から根」へ移動して「根」における鉄吸収を促進する指令シグナル候補分子として中分子ペプチドIRON MAN (IMA) を単離してきた。IMA八重変異体 (ima8x)

2024年3月21日 受理

^{*1}筑波大学計算科学研究センター

^{*2}名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻

では、不均一な鉄欠乏に応答した鉄吸収関連遺伝子の相補的な mRNA 発現上昇制御が完全に阻害されていた。シロイヌナズナ接木実験により、この *ima8x* における不均一鉄欠乏環境での相補的な遺伝子発現制御の不全は、*ima8x* の地上部を野生型に置き換えることで回復した。加えて、*ima8x* に対して *IMA1* と *IMA3* を回復させた *ima6x* 変異体では、不均一な鉄欠乏での相補的な遺伝子発現応答が野生型と同様のレベルにまで回復した。したがって、鉄関連遺伝子の相補的発現制御には、シロイヌナズナが持つ 8 個の *IMA* ペプチドのうち、特に *IMA1* と *IMA3* が重要であることが明らかとなった。

3. 鉄欠乏ストレス応答性「分泌型システインリッチペプチド」の機能解析

ゲノム編集によって鉄欠乏応答性ペプチドの三重破壊株の作成に成功した。野生型と比較して、*crp* 三重破壊体の地上部では、*IMA* を含む鉄欠乏応答性転写因子の発現量が変動していた。しかし *crp* 三重破壊体では、Split-root 鉄欠乏処理実験における鉄吸収関連遺伝子の相補的な発現制御は正常にみられた。また、ICP-MS 解析より、*crp* 三重破壊体の地上部の鉄含量は野生型と差が見られなかった。一方で、*crp* 三重破壊体で発現量が低下している遺伝子群について GO 解析を実施したところ「低酸素ストレス」に関与する GO term がエンリッチされていた (図 2)。実際に、三重破壊体では冠水実験による生存率の低下が観察された。今後は、*CRP* を軸として、「鉄欠乏ストレス」と「低酸素ストレス」の関連性を明らかにする必要がある。

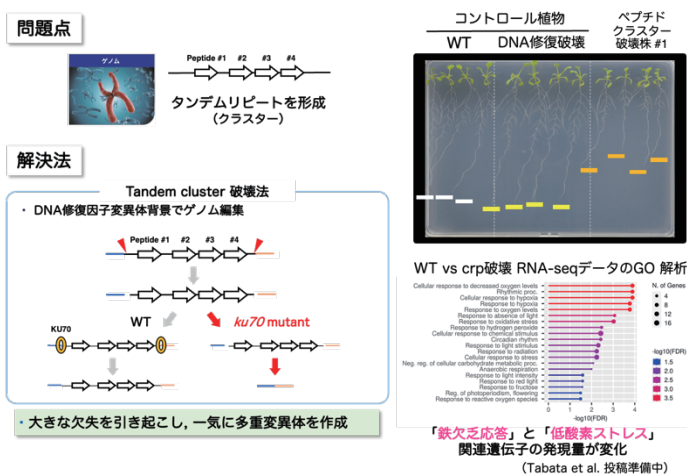


図2 CRPペプチドの機能解析。

4. 栄養欠乏ストレス応答に関わる空腹・指令シグナルの探索

細胞外に放出されて機能する中分子 (分泌型) ペプチドは、空腹・指令シグナルの良い候補分子である。名古屋大学 ITbM 大石俊輔博士との共同研究を通して、中分子ペプチドの部分構造を抽出し、再構築 (KAHA ライゲーション) することで、機能を保持する環状ペプチドのライブラリ開発を進め、様々な栄養欠乏応答に関与する中分子ペプチドを探索した。現在、明確に栄養欠乏応答に関わる中分子ペプチドは見出せていない。一方で、*RALF* ペプチド遺伝子の 1 つについて過剰発現体を作出すると、野生型と比較して著しい成長阻害が観察され、RNA-seq 解析からエチレンや防御応答に関与する遺伝子群の発現量が上昇していた。アミノ酸配列の相似性が高く機能が類似していると考えられる *RALF* ペプチドについて機能欠損させた三重変異体を作出して RNA-seq 解析を行った。大きな遺伝子発現変動はなかったものの、いくつかの防御応答関連遺伝子の発現量減少が見られ、反対に「鉄」吸収に関わる遺伝子群の発現量が増加していた、また遺伝学的解析により、ある受容体型キナーゼが *RALF* ペプチドの受容体候補であることが明らかとなった。

5. 今後の展望

IMA がどのようにして「葉から根」へ移動するかイメージング解析を実施する。また、葉から根へと移動してきた *IMA* が、どのように鉄輸送体 *IRT1* の転写を活性化するか明らかにするため、質量分析装置を用いた解析により、指令シグナルと細胞内シグナル伝達を繋ぐハブとなる新規分子同定を試み、その制御メカニズムを解明する。また、「分泌型システインリッチペプチド *CRP*」が、どのように低酸素ストレス応答に関与しているか明らかにする。引き続き、環状ペプチドを用いたスクリーニングにより、様々な栄養欠乏応答に関与する中分子ペプチドを探索するとともに、*RALF* ペプチドの具体的な機能を明らかにしていく。そして、これらペプチド分子のアミノ酸改変・化学修飾により高機能化を目指す。

6. 謝辞

本研究は公益財団法人豊田理化学研究所の研究助成により遂行されたものであり、ご支援に心から感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Y. Munei, et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **71** (2023) 9528-9537.
- 2) R. Tabata, *Frontiers in Plant Science*, **14** (2023) 1107405.
- 3) R. Tabata, et al., *Plant Cell Physiology*, **63** (2022) 842-854.
- 4) R. Tabata, et al., *Science*, **346** (2014) 343-346.