

# 植物ペプチドホルモンの進化多様性を解明する ドライとウェットの真の融合研究

原田 隆平<sup>\*1</sup> 篠原 秀文<sup>\*2</sup>

## Investigating the Evolutionary Diversity of Plant Peptide Hormones Using a Combination of Dry and Wet Approaches

Ryuhei HARADA<sup>\*1</sup> and Hidefumi SHINOHARA<sup>\*2</sup>

Cell-to-cell communication in plants is a fundamental mechanism for their development and growth. In recent years, secreted peptide hormones and their receptors have emerged as key regulators of diverse processes. Understanding the evolutionary diversity of plant peptide hormones could enable novel strategies for crop improvement and help address global food and environmental challenges. Optimizing molecular dynamics simulations for plant peptide–receptor interactions may accelerate plant peptide research beyond conventional biochemical approaches. Using the evolutionarily conserved peptide hormone RGF as a model, we demonstrated that its function differs among plant species. Cross-species application experiments revealed no cross-activity, and RGF binds exclusively to cognate receptors within the same species. Furthermore, *in silico* modeling of plant peptide–receptor pairs enabled the prediction of binding affinities and the identification of key amino acid residues that influence the interaction. Our hybrid approach provides a powerful framework for understanding the co-evolution of peptides and receptors and for accelerating functional analysis of plant peptide signaling systems.

### 1. 背景

植物の細胞間コミュニケーションは、正常な発生や生育に重要な根源的なしくみである。近年、細胞外分泌型のペプチドホルモンとその受容体を介した情報伝達系が注目を集めている。シロイヌナズナを用いた研究から、細胞の増殖、窒素飢餓の伝達、根の拡散障壁形成、ストレス応答と成長のバランス維持など、植物ペプチドホルモンが成長にポジティブな機能を有することが知られており<sup>1)</sup>、ペプチドホルモンの理解をより深めることで、ペプチドホルモンを応用した新しい成長調節を可能にし、昨今の食糧問題や環境問題への貢献に繋がる可能性がある。しかしながら現状では、シロイヌナズナ以外の多様な植物で機能未知ペプチドが多数残されており、特に形質転換ができない植物では、分子遺伝学の適用が困難で、機能解明が難しい。また受容体の探索やペプチド-受容体相互作用の解析は未だ煩雑な生化学手法が必要で、研究が滞る要因となっている。

分子動力学シミュレーションは、リガンド-受容体相互作用を含めた生体内反応の予測に有用である。酵素による基質変換やドラックの作用機序など、様々な生体内反応を計算可能であるが、植物のペプチドホルモンと受容体への応用は未だなされていない。植物ペプチド-受容体ペア解析に計算モデルを最適化できれば、生化学によらないペプチド-受容体相互作用のアフィニティー予測や、分子遺伝学によらない機能未知ペプチドの *in silico* 受容体スクリーニングなどが可能となり、植物ペプチド研究の更なる推進が期待できる。本スカラー共同研究では、植物ペプチドホルモンの更なる機能解明に向けたドライとウェットの真の融合研究を実施する。具体的には、進化的に離れた植物種間で保存されているペプチドホルモン RGF (図1) をモデルとし、生理学・生化学解析と計算科学を駆使した RGF の機能解明を行う。



図1 進化的に離れた植物種間で保存されているペプチドホルモン RGF.

2026年3月1日 受理

豊田理研スカラー共同研究 Phase1

<sup>\*1</sup>筑波大学・計算科学研究センター・生命科学部

<sup>\*2</sup>福井県立大学・生物資源学部・生物資源学科

## 2. 植物種間で機能分化したペプチドホルモン RGF の機能解析

RGF はシロイヌナズナから同定され、根端で特異的に発現し、根端の細胞分裂活性を促進する活性をもち<sup>2)</sup>、同じく根端に発現する RGF 受容体に直接結合して情報伝達を行う<sup>3)</sup>、根の正常な成長に重要なペプチドホルモンである。RGF は植物に広く保存されているが、近年、コケ植物にも RGF 遺伝子が保存されていることが明らかになった<sup>4)</sup>。シロイヌナズナ RGF とゼニゴケ RGF は、成熟方配列が類似しているが (図1)、根をもたないゼニゴケにおける RGF の機能は不明であった。そこでゼニゴケ RGF の機能解析を目的として、以下の解析を進めた。①ゼニゴケ RGF 遺伝子 *MpRGF*、およびその受容体 *MpRGFR* 遺伝子のノックアウト株、*Mprgf* および *Mprgfr* を作出し、表現型解析を行った。その結果、双方のノックアウト株は、野生型と比較して、葉状体の周縁部が波打ち、分枝数が減少する異常を示し (図2)、ゼニゴケ RGF は葉状体の正常な形態形成に関与することが示された。②合成したゼニゴケ RGF をゼニゴケ野生株に投与し、表現型解析を行った。その結果、葉状体の著しい湾曲が生じた (図3B)。③シロイヌナズナ RGF とゼニゴケ RGF を、互いの植物体に投与し、表現型解析を行った。その結果、シロイヌナズナ RGF はゼニゴケに対して葉状体を湾曲させる活性を示さず、またゼニゴケ RGF はシロイヌナズナの根端の細胞分裂を促進しなかった (図3AB)。このことは、RGF が植物の進化の過程で機能分化し、根をもつ維管束植物では根の細胞分裂活性に、値を持たないコケ植物では葉状体の形態形成に、それぞれ機能し、植物間の交差活性をもたないことを示唆した。

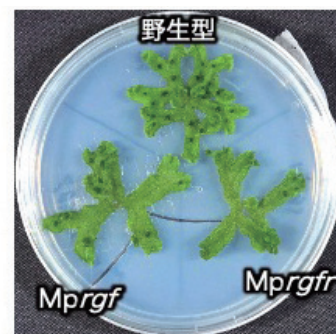


図2 ゼニゴケ RGF および RGF 受容体変異体。

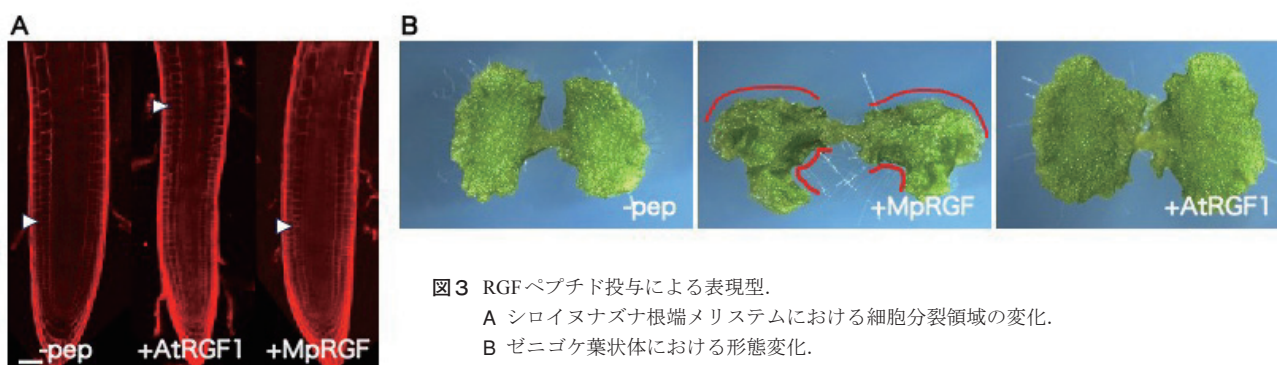


図3 RGF ペプチド投与による表現型。

- A シロイヌナズナ根端メリステムにおける細胞分裂領域の変化。  
B ゼニゴケ葉状体における形態変化。

④ゼニゴケ RGF とその受容体をとの直接的な結合を確認した。放射性標識した光反応性ゼニゴケ RGF ペプチドを合成し、タバコ培養細胞 BY-2 で発現させたタグ融合ゼニゴケ RGF 受容体に対してフォトアフィニティーラベリングを行い、SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーを行うことで、結合の有無を評価した。その結果、タグ融合ゼニゴケ RGF 受容体に由来するバンドが検出され、直接的な結合が示された (図4)。このバンドは、過剰量の未標識ゼニゴケ RGF の存在下で競合阻害により消失し、特異的な結合であることも示された。一方、過剰量の未標識シロイヌナズナ RGF を加えても、バンドは完全には消失せず、ゼニゴケ受容体にシロイヌナズナ RGF は結合しないことが示された。シロイヌナズナ RGF とその受容体のペアにゼニゴケ RGF を加えた場合も、同様にバンドは完全には消失せず、シロイヌナズナ受容体にゼニゴケ RGF は結合しないことも示された (図4)。これらの結果から、植物種間で交差活性を示さない機能分化が、受容体へのアフィニティーの強弱に起因することを示した。

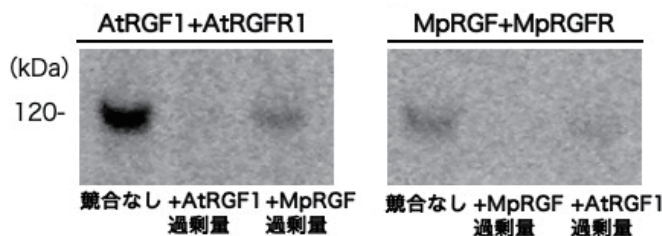


図4 フォトアフィニティーラベリングによる RGF と受容体の結合解析。

## 3. 分子動力学シミュレーションによる RGF と受容体の相互作用モデリング

植物のペプチドホルモンと受容体の相互作用における分子動力学シミュレーションのシステム構築を目的として、シロイヌナズナおよびゼニゴケの RGF とその受容体をモデルとし、モデリング条件の最適化を行った。①シロイヌナズナ RGF、AtRGF1 と受容体 AtRGFR1 とのペアの初期構造を、実験報告のあるシロイヌナズナ RGF とその受容体の共結晶構造 (PDB ID: 5HYX)<sup>5)</sup> に基づきモデリングした。ゼニゴケ RGF、MpRGF とその受容体 MpRGFR とのペアの初期構造は、AtRGF1

とAtRGFR1とのペアの実験構造を鋳型とし、ホモロジーモデリング (SWISS-MODEL) に基づき作成した。さらに、ペプチドについては、5HYXに含まれるAtRGF1を参照にして側鎖のみ編集し、MpRGFを作成した。その結果、シロイヌナズナとゼニゴケの双方のペアが、類似したリガンド結合様式により相互作用することが示された。またAtRGF1とMpRGFでは、ペプチドのN末端付近の構造が変化しており、相互作用の変化や機能分化に影響している可能性が示唆された (図5AB)。②AtRGF1-AtRGFR1, MpRGF-MpRGFR双方の複合体初期構造について、150 mM NaCl水溶液中に配置し、エネルギー最小化と加熱後、定圧定温条件で300 nsのMDを実行した。最終的に、300 nsの最終100 nsの原子座標トラジェクトリを用い、MMPBSA法<sup>6)</sup>に基づきペプチドと受容体の結合自由エネルギーを計算した。その結果、双方が同様の結合自由エネルギーを示し、シロイヌナズナ、ゼニゴケのペアが双方とも同様のアフィニティーでペプチド-受容体ペアを形成することが示唆された。③計算された結合自由エネルギーを残基レベルに分割することで、ペプチドと受容体の結合に重要な役割を果たしている残基を推定した。その結果、ペプチドと受容体、双方のアミノ酸残基において、結合を強める方向にはたらく残基、弱める方向にはたらく残基が推定された (図5CD)。

#### 4. まとめと将来展望

植物種間で保存されているペプチドホルモンRGFをモデルとして用いることで、種間で異なる機能をもつこと、他の種へ投与しても機能せず、交差活性がないこと、同種の受容体にのみ結合することを示し、進化の過程で、ペプチドと受容体との結合アフィニティーを変化させ、機能分化してきたことを明らかにした。また*in silico*モデリングで、植物ペプチド-受容体ペアのモデリングによる結合アフィニティーの算出と、結合に影響するアミノ酸残基の予測を可能にした。計算科学の予測を生理学・生化学解析で実測・確認した今回の成果は、植物ペプチドホルモン研究におけるドライとウェットの融合研究のフロンティアといえる。またペプチドの結合に影響する残基の推定は、既知情報をベースに計算を行うAIを用いた解析では導き出すことができない、本アプローチ独自のものである。今後は、結合に影響すると予想された残基の置換や非天然アミノ酸の導入し、ペプチドの人工進化を狙う。ドライ解析とウェット解析を組み合わせることでアフィニティー変化を確認しながら、従来にもより活性の高いペプチドや、複数の種に機能するマルチファンクショナルペプチドの作出に挑む。受容体の方もアミノ酸置換によるアフィニティー変化、機能改変に挑戦し、多能性を付与したペプチド-受容体ペアを創出し、将来的な応用研究の足がかりとする。

#### REFERENCES

- 1) Matsubayashi, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **94** (2018) 59-74.
- 2) Matsuzaki, *et al.*, *Science*, **329** (2010) 1065-1067.
- 3) Shinohara, *et al.*, *PNAS*, **113** (2016) 3897-3902.
- 4) Furumizu and Sawa, *Front. Plant Sci.*, **12** (2021) 703012.
- 5) Song, *et al.*, *Cell Res.*, **26** (2016) 674-685.
- 6) Kumari, *et al.*, *J. Chem. Inf. Mod.*, **54** (2014) 1951-1962.

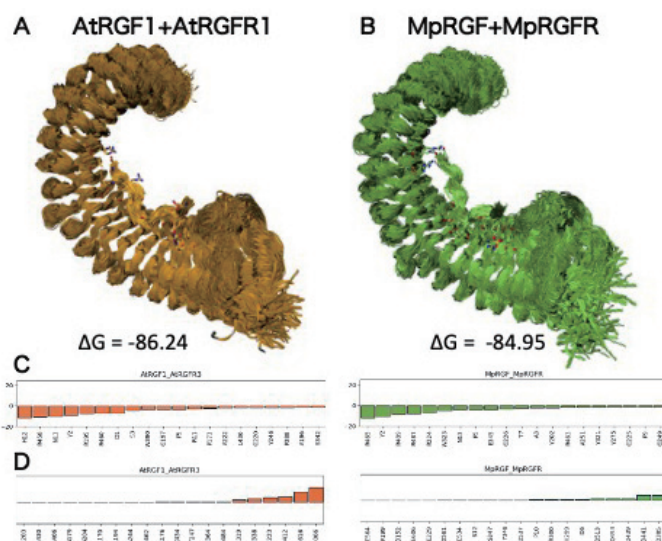


図5 シロイヌナズナおよびゼニゴケのRGF-受容体ペアのモデリング。  
 A 5HYXに基づくシロイヌナズナAtRGF1-AtRGFR1のモデリングとMMPBSA法により算出された結合自由エネルギー。  
 B ホモロジーモデリングによるゼニゴケMpRGF-MpRGFRのモデリングとMMPBSA法により算出された結合自由エネルギー。  
 C ペプチドと受容体の結合を強めると予想されたアミノ酸残基。  
 D ペプチドと受容体の結合を弱めると予想されたアミノ酸残基。