

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14421

研究課題名（和文）ホルモン様ペプチドのシグナル解明のための基盤研究

研究課題名（英文）Scientific research to reveal signaling pathway of hormone-like peptides

研究代表者

花田 耕介（Hanada, Kousuke）

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

研究者番号：50462718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：短い遺伝子が細胞外に分泌するペプチドをコードしている場合には、そのペプチドを人工的に合成、植物体に投与し、過剰発現体と同じ生理活性を再現している。本研究では、短い遺伝子にコードされるペプチドをも網羅的に構築し、そのペプチドを植物に添加した。その結果、顕著な生理活性を示す2個のペプチドに着目し、塩耐性を示す分泌型ペプチドをコードする見時遺伝子を発見した。

研究成果の概要（英文）：Some of secreted peptides encoded by small coding genes tend to be hormone-like functions. The artificial peptides induced the same physiological effects in plants. Here we identified peptides encoded by small coding genes in apoplast fluids of plants. After synthesizing such the peptides, we treated those peptides to plants. Two peptides significantly induced the physiological effects. The physiological effects were associated with salt tolerance.

研究分野：ゲノム生物

キーワード：植物 シロイヌナズナ ペプチド 短い遺伝子

1. 研究開始当初の背景

植物において短い遺伝子がコードする分泌性のペプチドは、ホルモン様の機能(細胞から分泌され細胞間のシグナル伝達を行い植物の生理活性に重要な役割)を示すものとして着目され始めている。しかし、短い遺伝子は、遺伝子として同定されていない傾向にあり、網羅的な探索が円滑に進まない技術的課題が挙げられている。

申請者は短い遺伝子を推定することに特化した方法を開発し、植物のモデル生物種であるシロイヌナズナで、多数の短い遺伝子を新規に同定することに成功した(Hanada et al. Genome Research 2007, Hanada et al. Bioinformatics 2010)。その後、生物系特定産業技術研究支援センター等の外部資金を代表者として獲得し、様々な発生段階および環境ストレス条件下で発現している短い遺伝子を同定した。発現が確認された遺伝子の中でも、複数の植物種で保存性が高い遺伝子を約 1000 個選抜し、過剰発現体を構築した。その結果、現在までに、形態形成の異常(Hanada et al. PNAS 2013)あるいはストレス(乾燥、高温、高塩)耐性を示す約 100 個の短い遺伝子を見出している。これらの中から、細胞外に分泌される 20 個の遺伝子に着目した。その遺伝子がコードするペプチドを人工的に合成し、シロイヌナズナの植物体に投与すると過剰発現体と同様の生理活性を付加できることを明らかにした。

2. 研究の目的

既知のホルモン様ペプチドは植物体に投与することによって、各遺伝子の過剰発現体が引き起こす生理活性を再構築することが可能であることが明らかになっている。ホルモン様ペプチドであるなら、低濃度でも生理活性を付与するため、この 20 個のペプチドを対象に低濃度ペプチド添加実験を行った。さらに、低濃度で生理活性を引き起こす短い遺伝子の過剰発現体を作製し、表現型解析を行うことで、生体内で生産されたペプチドが引き起こす生理活性が、断片ペプチド添加によって引き起こされたものと同様であるか調べた。

3. 研究の方法

ペプチド添加実験

使用した断片ペプチドは、遺伝子にコードされるアミノ酸配列のうち、シグナル配列を除いた領域を 20 アミノ酸に断片化、5 アミノ酸を前後のペプチドとかぶせて合成している。それを DMSO (Dimethyl sulfoxide) に溶かした。これを以下、断片ペプチドと表記する。植物の生育は、殺菌した種子を 2 日間 4℃にて低温処理をした後、長日条件(LD: 明期 16 時間 / 暗期 8 時間、64 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、22℃)で生育した。1/2×MS 培地(0.6%寒天を含む)に、培地の断片ペプチド濃度がおおよそ 100 μM になるように断片ペプチドを添加し、その培地にシロイヌナズナの種子 5、6 個播き育成した。人工気象器(CLE-303; TOMY)内で 7 日間育成した。

低濃度ペプチド添加の際は、培地の断片ペプチド濃度が、100 μM 、50 μM 、10 μM 、5 μM 、1 μM 、100 nM、10 nM になるように断片ペプチドを添加した。その培地にシロイヌナズナの種子 5、6 個播き育成した。人工気象器(CLE-303; TOMY)内で 14 日間育成した。

過剰発現体の作製

過剰発現体は、花田ら(2013)によって作製された方法を利用し、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター×2、ハイグロマイシン耐性遺伝子とカナマイシン耐性をもつバイナリーベクター(pMDC32 M. Curtis et al., 2003)に目的の遺伝子配列を導入し、プラスミドを構築した。構築したプラスミドをアグリバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens GV3101 株)に導入した。アグロバクテリウムを Floral dip 法(S. Clough et al., 1998)で植物に感染させ、その種子を取り T1 世代とした。今回の研究では T2 世代を表現型解析に使用している。

4. 研究成果

ペプチド添加実験

ホルモン様ペプチドは、低濃度添加することでその生理活性を付与できると考えられる。そこで、本研究でホルモン様ペプチドの候補として選出された、20 個の短い遺伝子にコードされる断片ペプチドを用い、低濃度断片ペプチド添加実験を行った。その結果、1 個の短い遺伝子にコードされる断片ペプチドで、初期成長時の形態形成に、発芽しない、白色化、矮小化などの影響が見られた。

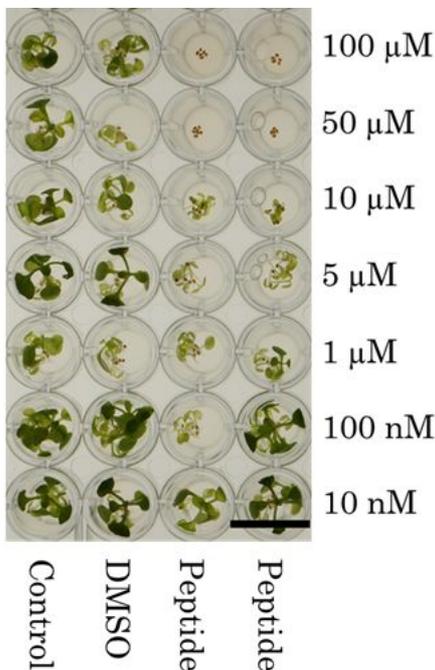
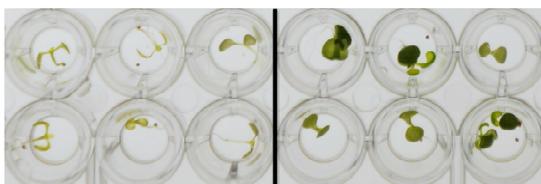


図1 ペプチド添加試験の結果

図1に一例を示したが、100 μM 、50 μM の時は未発芽で、10 μM 、5 μM のときは矮小化の表現型が観察された。添加実験の結果、ホルモン様ペプチド候補が絞れた。このペプチドは、ペプチド作製を委託している企業をSIGMA から PH-Japan (<http://phjapan.jp/>) に変更し、再現性の確認を試みて、再現性がとれた。



Vector Control

過剰発現体

図2 .塩ストレス条件下での生育

過剰発現体による表現型解析

断片ペプチド添加で影響が見られた、1個の短い遺伝子の過剰発現体 (Hanada et al., 2013) を用い表現型解析を行った。その結果、過剰発現体が作製されている3系統以上で、ペプチド添加と同様な表現型を示した(図2)。特にこれらのペプチド性遺伝子は、高塩ストレス環境で発現していることから、ストレス耐性を示すかを確認した。その結果、

ペプチドを添加した時も、過剰発現の時も、強い塩ストレスを付加させることを明らかとした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

鳥居怜平、**金有王**、樋口美栄子、大林祝、岡本昌憲、清水みなみ、吉積毅、中南健太郎、仁志蘭子、関原明、篠崎一雄、松井南、**花田耕介** 「植物における新規ホルモン様ペプチドの探索」 2017年3月16-18日 植物性学会、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

鳥居怜平、**金有王**、樋口美栄子、大林祝、岡本昌憲、清水みなみ、吉積毅、中南健太郎、仁志蘭子、関原明、篠崎一雄、松井南、**花田耕介** 「植物における新規ホルモン様ペプチドの探索」 2016年12月10-11日 中国支部育種談話会、岡山大学(岡山県倉敷市)

鳥居怜平、**金有王**、樋口美栄子、大林祝、岡本昌憲、清水みなみ、吉積毅、中南健太郎、仁志蘭子、関原明、篠崎一雄、松井南、**花田耕介** 「植物における新規ホルモン様ペプチドの探索」 2016年12月3日 生物工学九州支部大会、九州工業大学(福岡県飯塚市)

鳥居怜平、**金有王**、樋口美栄子、大林祝、岡本昌憲、清水みなみ、吉積毅、中南健太郎、仁志蘭子、関原明、篠崎一雄、松井南、**花田耕介** 「植物における新規ホルモン様ペプチドの探索」 2015年12月19-20日 中国支部育種談話会、岡山大学(岡山県岡山市)

金有王、樋口美栄子、大林祝、岡本昌憲、清水みなみ、吉積毅、中南健太郎、仁志蘭子、篠崎一雄、関原明、松井南、**花田耕介** 形態形成に関わる新規の短い遺伝子にコードされるペプチドの機能解析、2015年12月19-20日 中国支部育種談話会、岡山大学(岡山県岡山市)

花田 耕介, 網羅的な植物ゲノム解析から生理活性シグナル遺伝子の探索, 生命科学分野開拓とスーパーコンピュータ「京」のシンポジウム, 2015年12月17日、九州大学(福岡県福岡市)

Hanada K. Peptides encoded by small genes hidden in plant genomes show essential functions. Technische University Munchen, Munchen (Germany) 2015年9月5日

Hanada K. Functional analysis of small genes hidden in plant genomes. 3rd European Workshop on Peptide Signalling and Activity in Plants. Ghent University, Ghent (Belgium) 2015年9月3日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.kyutech.ac.jp/~kohanada/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

花田 耕介 (HANADA KOUSUKE)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究
アカデミー・准教授

研究者番号: 50462718

(2)研究分担者

金 有王 (Kim You-wang)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究
アカデミー・研究員

研究者番号: 90739541

(3)連携研究者

-

(4)研究協力者

-