

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18553

研究課題名(和文)炭素源の欠乏に関連して発現誘導される長距離移行性分泌型ペプチドの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a long-distance mobile peptide that responds to stress treatments

研究代表者

岡本 暁 (Okamoto, Satoru)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：10582421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズより同定したペプチドPEX1の機能を解明するためにシロイヌナズナの3つのホモログ (AtPEX1a, AtPEX1b, AtPEX1c) に着目して、それらの機能を解析することを計画した。AtPEX1a, b, c ノックアウト変異体における解析ではそれぞれ単独の変異では表現型が見られなかったが、AtPEX1a, b二重変異体では、葉に蓄積するデンプンの量が野生型よりも有意に増加していた。しかし、その一方でAtPEX1a, bの過剰発現体では野生型と比べてデンプンの蓄積量に変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：To reveal the biological function of soybean PEX1, I focused on the homologues of PEX1 in Arabidopsis, AtPEX1a, AtPEX1b and AtPEX1c, and planned to conduct functional analysis of AtPEX1s. Although single mutation in AtPEX1a, b, c did not show any detectable phenotypes, AtPEX1a, b double mutant significantly accumulated starch in their shoots. On the other hand, overexpression of AtPEX1a or b did not affect shoot starch accumulation.

研究分野：植物生理学

キーワード：ペプチド シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでにダイズから同定されたペプチドのうちの一つ (PEX1) をコードする遺伝子は炭素源が欠乏するような条件に発現応答することを見出していた。また、シロイヌナズナのデータベースよりシロイヌナズナにおける推定オルソログ遺伝子を3つ見出していた (*AtPEX1a, b, c*)、それらがコードする前駆体タンパクに含まれる成熟型ペプチドとなると推測される領域のアミノ酸配列は研究代表者がダイズから同定した成熟型 PEX1 ペプチドと高い保存性を示すことに加えて、それらの遺伝子の発現パターンも PEX1 と類似していた。

2. 研究の目的

本研究では PEX1 の機能を解明することを目的とした。その際に研究を迅速に進めたり形質転換体を用いた解析を効率的に行ったりするために、ダイズと比べて植物体のサイズが小さく、研究のリソースが整備されているシロイヌナズナを用いて、そのホモログ (*AtPEX1a, b, c*) に関して解析を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) *AtPEX1* の発現解析

AtPEX1a, b, c の機能に関する情報を得るためにこれらの遺伝子の発現変動を調べた。光合成産物の蓄積や生合成、消費は1日を通して行われることから、長日、短日条件下において、*AtPEX1* 遺伝子の発現量の日周変動を調べた。また、培地中の窒素栄養条件によって光合成産物の蓄積が影響を受けることが知られている。そこで異なる窒素栄養条件における *AtPEX1* 遺伝子の発現量の変化を調べた。

(2) *AtPEX1* ノックアウト変異体の解析

AtPEX1a, b, c の機能を解析するにはそれらの loss-of-function 系統が必要である。そこで *AtPEX1a, b, c* ノックアウト変異体を用いて、地上部および根に含まれる光合成産物の量に着目して表現型の解析を行った。さらに、これらの変異体の多重変異体を作成し、その表現型解析も行った。光合成産物 (デンプン) の含量の測定には、研究開始当初はヨウ素デンプン反応を用いたが、結果が安定しなかったため、後に正確な評価を行うためにグルコースオキシダーゼ法を用いることでデンプン、糖 (グルコース、フルクトース) の定量を行なった。

(3) *AtPEX1* 過剰発現体の解析

AtPEX1 の機能を解析するために、35S promoter を用いた *AtPEX1a, b* 過剰発現系統を作成し、地上部および根に含まれる光合成産物の量に着目して表現型解析を行った。さらにエストロゲン誘導性プロモーターを用いて、*AtPEX1a, b* 過剰発現系統を作成し、

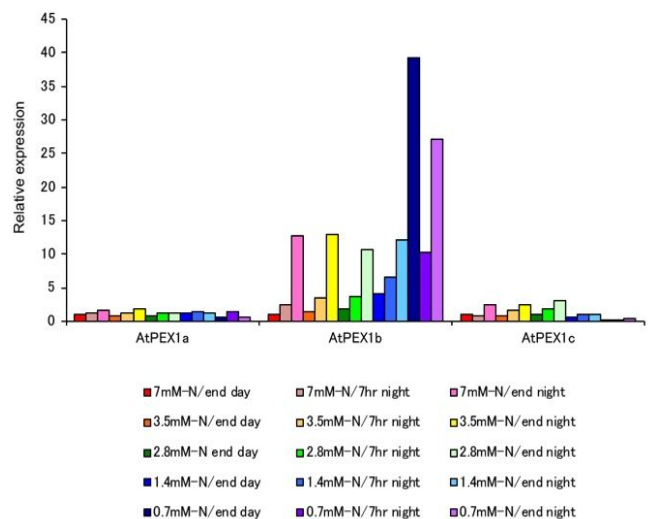
表現型解析を行った。光合成産物の含量の測定にはグルコースオキシダーゼ法を用いた。

4. 研究成果

(1) *AtPEX1* の発現解析

まず、長日条件 (16hour light/ 8 hour dark) において、*AtPEX1a, b* の発現変動を調べた。その結果一日を通して大きな発現変化はみられなかった。次に、短日条件 (10 hour light/ 14hour dark) において発現の変化を調べたところ、*AtPEX1a* の発現は夜の終わりに発現量がピークに達することがわかった。このことから、*AtPEX1a* は短日条件下において機能を発揮する可能性が考えられた。また、低窒素条件下では植物は葉にデンプンを蓄積することが知られている。そこで短日環境において異なる5つの窒素栄養条件で育てたシロイヌナズナの根において *AtPEX1a, b, c* の発現量を調べた。その結果 *AtPEX1b* は上記と同様に夜の終わりに発現量が上昇することに加えて、低窒素条件下において発現量が上昇する傾向にあることがわかった (図1)。

なお、0.7 mM KNO₃ 条件下で育てたシロイヌナズナは *AtPEX1b* の発現量は高いものの、植物体が小さく生育の遅延が見られ、アントシアニンの蓄積も見られかなりストレスを受けていると考えられたことから、この条件下では以降の表現型解析は行わないこととした。



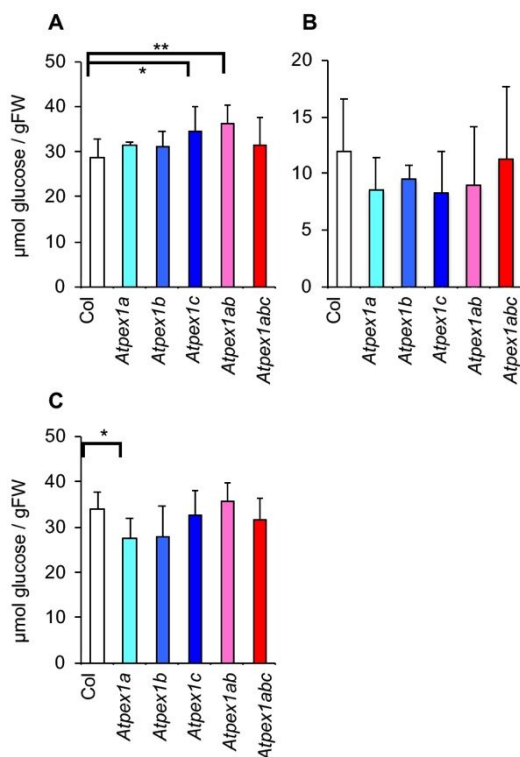
(図1) 異なる窒素条件下における *AtPEX1* 遺伝子の発現応答

シロイヌナズナは短日条件 (10hr day/ 14hr night) において、7, 3.5, 2.8, 1.4, 0.7 mM KNO₃ 環境下で育てた。'end day'は昼の終わり。'7hr night'は夜の開始から7時間経過した時点。'end night'は夜の終わり (夜の開始から14時間経過)。n=2。

(2) *AtPEX1* ノックアウト変異体の解析

他の研究報告においてシロイヌナズナの地上部に蓄積するデンプンをヨウ素デンプン反応で評価した例があり、操作が簡便であるため、研究開始当初はこの手法を用いて評価を行うことを試みた。しかし、生育条件をいくつか検討しても野生型においても、染色結果が安定せず、葉が濃い紫色に染色されることもあれば、同じ条件で再度生育させても薄く赤褐色にしか染色されないこともあった。そこで、より正確に評価をすることができるグルコースオキシダーゼ法によりデンプン・糖含量を評価することとした。この手法は時間を要するものの、デンプンや糖の量を数値化できる。また、この手法を用いて野生型におけるデンプン含量を測定したところ、得られた値は比較的安定した。

AtPEX1a,b,c それぞれにノックアウト変異体について、地上部におけるデンプンの蓄積を調べたところ、有意な差は見られなかった。そこで次に *AtPEX1a,b,c* の二重変異体、三重変異体を作成して解析を行ったところ、*AtPEX1a,b* 二重変異体では野生型と比べて地上部で有意にデンプンを蓄積することがわかった(図2)。その一方で、*AtPEX1a,b,c* 三重変異体ではデンプンの蓄積には有意な差は見られなかった。*AtPEX1a,b,c* 三重変異体は野生型と比べて植物体自体がやや小さく、成長が良くなかったため、それがデンプンの蓄積量に影響を与えてしまったのかも見れない。



(図2) *Atpex1* 変異体におけるデンプン、糖の含量の測定
(A) 地上部におけるデンプンの含量。(B) 地上部におけるスクロースとグルコースの含量。(C) 根におけるスクロースとグルコースの含量。KNO₃: 7mM, PFD: 210 µmol/m²s,

n=3, * P < 0.05, **P < 0.01

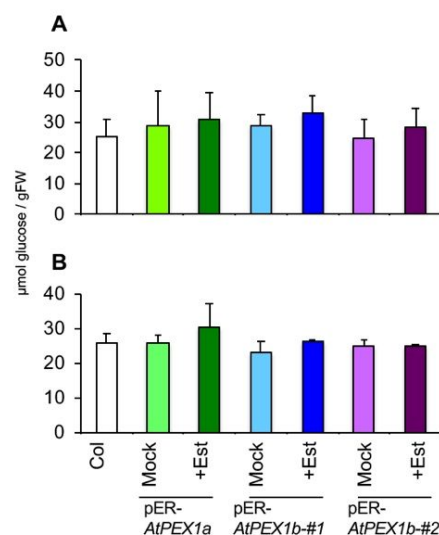
また、地上部では *AtPEX1a,b* 二重変異体、*AtPEX1a,b,c* 三重変異体は野生型と比べて糖 (Glucose, Sucrose) の含量が低い傾向にあったが、有意差は検出されなかった。根においても野生型と比べて糖の含量に差は見られなかった。

なお、この表現型解析は3つ窒素条件下 (KNO₃: 7, 2.8, 1.4 mM) および3つの光条件下 (光量子束密度 (PFD): 400, 210, 130 µmol/m²s) で行なったが、いずれも同じ傾向を示した。

(3) *AtPEX1* 過剰発現体の解析

AtPEX1 の gain-of-function の表現型を解析するために 35S プロモーターを用いて *AtPEX1a,b* 過剰発現体を作成した。それぞれの過剰発現体は野生型と比べて花成が遅れる傾向を示したものの、地上部や根におけるデンプンや糖の蓄積には有意な差は見られなかった。

次に恒常的に発現させるよりも一過的に過剰発現させることで表現型が顕著になる可能性を考え、エストロゲン誘導性プロモーターを用いてエストロゲン誘導性 *AtPEX1a,b* 過剰発現体を作成した。しかし、エストロゲンを添加することで一過的に *AtPEX1a,b* を発現誘導しても地上部や根におけるデンプンや糖の含量にはエストロゲンを処理しなかったものと比べて有意な差は見られなかった(図3)。なお、これらの過剰発現体において、*AtPEX1a,b* の発現量を確認したところ、それぞれの過剰発現体において、*AtPEX1a* はおよそ50倍、*AtPEX1b* はおよそ1000倍発現量が上昇していた。



(図3) *Atpex1* 過剰発現体におけるデンプン、糖の含量の測定
(A) 地上部におけるデンプンの含量。(B) 根におけるスクロースとグルコースの含量。Mock: エストロゲン非処理、+Est: エストロ

ゲンを添加 (24 時間), n=3。KNO₃: 7mM, PFD: 210 μmol/m²s, n=3, * P < 0.05,

本研究では主に AtPEX1 に着目してシロイヌナズナを用いた解析を行なった。AtPEX1 の loss-of-function の二重変異体では地上部において野生型より多くデンプンを蓄積することがわかったものの、根や地上部における糖の含量には差が見られなかった。その理由として、(1)シロイヌナズナでは PEX1 の影響が観察しにくい、(2)PEX1 の機能は研究代表者が想定していたものとは異なる、などの可能性が考えられる。同じ植物といってもシロイヌナズナとダイズでは植物体の大きさや光合成活性など異なる点も多いため、今後はダイズを用いた解析を行うとともに、PEX1 は想定とは異なる機能を持つ可能性を踏まえた解析を行うことが必要と考えられる。そのためにはまず、PEX1 が炭素源の欠乏以外にどのような条件に発現応答するかなどを調べるべきだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Okamoto S, Tabata R, Matsubayashi Y. (2016) Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 34: 35-40.
(査読あり)
2. Okamoto S*, Suzuki T, Kawaguchi M, Higashiyama T, Matsubayashi Y. (2015) A comprehensive strategy to identify long-distance mobile peptides in xylem sap. *The Plant Journal* 84: 611-620.
(査読あり)
(*Corresponding author も務めた。)

[学会発表](計 4 件)

1. Okamoto S, Suzuki T, Kawaguchi M, Higashiyama T, Matsubayashi Y., “Long-distance mobile peptides in xylem sap (#126)”, Cold Spring Harbor Asia, Latest Advances in Plant Development & Environmental Response, Awaji (Japan), 2016, December.
2. 岡本暁、鈴木孝征、川口正代司、東山哲也、松林嘉克 “ダイズ道管液における長距離移行性ペプチドの探索 (PF-033) ”、第 57 回日本植物生理学会年会、盛岡、2016 年 3 月
3. 岡本暁、鈴木孝征、川口正代司、東山哲

也、松林嘉克 “ダイズ道管液における長距離移行性ペプチドの探索 (#83) ”、植物化学調節学会第 50 回大会、東京、2015 年 10 月

4. Okamoto S, Suzuki T, Kawaguchi M, Higashiyama T, Matsubayashi Y., “Long-distance mobile peptides in xylem sap”, 3rd European Workshop on Peptide Signalling and Activity in Plants, Ghent (Belgium), 2015, September.

[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.agr.niigata-u.ac.jp/~crop_sci/
(研究代表者が所属する研究室の Web ページ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 暁 (OKAMOTO, Satoru)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 10582421