

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07690

研究課題名(和文)低温ストレス応答に関与する機能性ペプチドの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of functional peptides involved in the cold stress response

研究代表者

中南 健太郎 (Nakaminami, Kentaro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40513403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 主要な環境ストレスの一つである低温ストレスに対する植物の応答・適応メカニズムの解明は、農作物の生育範囲拡大や生長促進・収量増につながる重要な研究である。本研究は、低温ストレス耐性及び、越冬後の生長再開に関与する新規機能性ペプチドを同定することを目的とする。さらに、同定したペプチドを人工合成し、添加試験によりペプチドの機能解析を行うものである。

天然物であるペプチドは化学肥料などより比較的安全であるため、本研究による新規機能性ペプチドの発見は、農作物の低温耐性を強化する新しい農法の開発に貢献できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドはアミノ酸がいくつか結合している天然物であり、様々な機能を有することから現在では、医療や食品などにも利用されている。化学合成された薬品と比較して安全性が高いため、製品などに応用されやすい。本研究は、植物の低温ストレス耐性を強化する機能性ペプチドの発見と機能解析を目的としており、新たなペプチドの発見により、冷害などで生育不良を起こす作物の改善や、冬季間の加温されたハウス栽培での作物の生育促進など、ペプチドを利用した新規農法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)： In order to understand the response and adaptation mechanisms of plants to low temperature stress, which is one of the major environmental stresses, is an important study that will lead to the expansion of the growing area and increase in growth and yield of crops. The aim of this study was to identify novel functional peptides involved in cold stress tolerance and the resumption of growth after overwintering. In addition, to analyze the function of the identified peptides, treatment test of artificial synthesis peptides to plants and evaluates cold stress tolerance.

Since natural peptides are relatively safer than chemical fertilizers, the discovery of novel functional peptides in this study is expected to contribute to the development of new farming methods to enhance cold stress tolerance in crops.

研究分野：農学

キーワード：低温ストレス シロイヌナズナ 機能性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

植物の低温ストレス応答に関する研究は古くから行われており、低温ストレス適応現象の理解は、農作物の生育範囲の拡大だけでなく生長促進や収量増につながると期待される。特に、シロイヌナズナなどの越冬性植物においては、低温馴化 (Cold acclimation, CA) と呼ばれる秋の凍らない程度の低温を感知し、耐凍性を獲得することが知られている。越冬後、植物は春の温かさを感知し、脱馴化 (Deacclimation, DA) と呼ばれる過程で耐凍性を解除し、生長を再開させる (図1)。このように植物は越冬の準備を行い、越冬後、再び生長を再開させるといふ、季節を感知するプログラムされた能力を備えている。このメカニズムを理解するためには、様々な生理活性を引き起こす要因となる遺伝子、タンパク質のプログラムされた発現制御及びその機能解析が重要である。

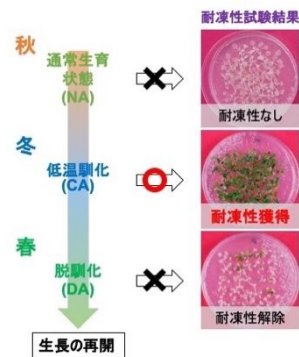


図1. 越冬植物の低温馴化(CA)と脱馴化(DA)
シロイヌナズナは低温馴化過程で耐凍性を獲得し、
脱馴化過程で耐凍性を解除し、生長を再開させる。

一方で、ペプチドホルモンや機能性ペプチドは生理活性を持つ重要な物質として、近年、動植物を問わず研究され、今後の展開が非常に注目されている。ペプチドをコードする遺伝子はその短さから遺伝子として同定が難しく、これまで研究が進んでいなかった。しかし、最近の申請者等の研究でシロイヌナズナから 8000 遺伝子もの新規ペプチドをコードする短い遺伝子 (sORF) が発見された (引用文献 1)。さらに申請者等は、これら新規 sORF の発現解析及び、その詳細な機能解析から、環境ストレスのうち、乾燥、高温、高塩ストレス耐性に関与する機能性ペプチドの候補を見出した (図2)。しかしながら、低温ストレス応答に関しては、十分な解析ができておらず、未だ候補を見いだせていなかった。

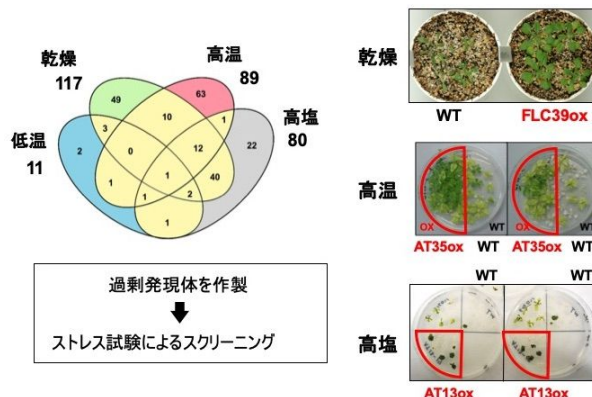


図2. 環境ストレスに応答するペプチド遺伝子とストレス耐性を示す候補
短時間 (2 時間, 6 時間処理) の乾燥, 高温, 高塩, 低温ストレスで 4 倍以上に発現の上昇するペプチド遺伝子 (左) と、その過剰発現体を用いたスクリーニングにより見出した乾燥, 高温, 高塩耐性を示す候補 (右)。

そこで、本研究では、経時的な低温馴化処理サンプル (CA) と脱馴化処理サンプル (DA) を未馴化処理サンプル (NA) と比較したマイクロアレイによる発現解析を行い、耐凍性獲得に関与する低温馴化 (CA) で特異的に誘導される sORF と、生長再開に関与する脱馴化 (DA) で特異的に誘導される sORF 及びペプチドを同定する。

(引用文献) 1. Hanada, K. et al., (2013) Proc Natl Acad Sci U S A 110(6): 2395-2400.

2. 研究の目的

本研究では、低温ストレス応答に関与する機能性ペプチドの同定を行う。様々な活性を有する機能性ペプチドは、動物だけでなく植物においても生長・発達に関与するものが同定され、申請者らの研究からも低温以外の環境ストレス応答に関与するものが幾つか発見されている。低温ストレス応答においても、機能性ペプチドが関与する応答メカニズムが存在する可能性が高い。研究背景の項目で述べた通り、越冬性植物は低温馴化過程 (CA) で耐凍性を獲得する、いわゆる準備するステップと、越冬後に脱馴化 (DA) により耐凍性を解除し、生長を再開させるステップの 2 つのプログラムされた過程によって低温ストレスに応答・適応する (図3)。本研究では、これら CA, DA サンプルを用いたペプチド遺伝子 (sORF) の発現解析により、CA 特異的発現パターンを示す耐凍性獲得に関与するもの、その後の DA 特異的発現パターンを示す生長や発達に関与するペプチドに大別する。この発現パターン解析から選抜した sORF の過剰発現体・欠損変異体を作成し、その表現型解析により機能性ペプチドをスクリーニングする。さらに、その詳細な機能は人工合成したペプチドの添加試験により確認する。

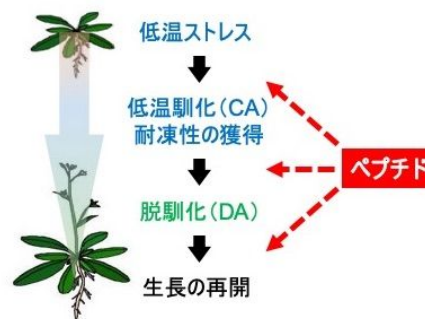


図3. 低温ストレス応答と機能性ペプチド
機能性ペプチドは耐凍性の獲得, 脱馴化後の生長再開に機能すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、植物の低温ストレス応答に関与する機能性ペプチドの同定を行うため、以下の解析を行った。

(1) マイクロアレイによるペプチドをコードする遺伝子 (sORF) の発現解析

2週間生育したシロイヌナズナの未処理 (22), 低温馴化 (CA) 処理 (2), 脱馴化 (DA) 処理 (22) したサンプルを使用し、マイクロアレイはペプチドをコードする sORF を含むカスタムマイクロアレイを使用した。

(2) 低温耐性、生長再開に関するペプチドの過剰発現体・欠損変異体の作出 (申請当初)

マイクロアレイの sORF 発現解析により、上位 20 遺伝子を選抜し、過剰発現体・欠損変異体を作成する。

(3) 過剰発現体・欠損変異体を用いたスクリーニング (申請当初)

CA 特異的遺伝子については過剰発現体を用い、耐凍性試験によりスクリーニングを行い、野生型植物と比較して耐凍性を示すものを同定する。

DA 特異的遺伝子については、欠損/抑制変異体を用い、野生型と比較して通常条件での生育が異常を示すもの、または、低温馴化、脱馴化過程における生育・発達が遅くなるまたは、異常を示すものをスクリーニングする。

申請当初は、(2) 過剰発現体・欠損変異体の作出及び、(3) そのスクリーニングを行う予定であったが、マイクロアレイにより同定された候補が少なかったため、候補ペプチドを人工合成しその添加によるテストを行うこととした。これは、以前の研究において、高発現誘導の候補が表現型を示したことから、ペプチド遺伝子の過剰発現体で表現型を示したもののうち半数においてペプチド処理により表現型の再現が出来なかった経緯があり、人工合成ペプチドを用いたスクリーニングに変更した (詳細は 4. 研究成果の項目で示す)。

(4) 人工合成したペプチド添加試験による機能解析

スクリーニングにより見出したペプチドの機能を確認するために、人工合成したペプチドの添加試験を行った。機能性ペプチドの平均の長さは 100 アミノ酸程度であるが、全長を一度に合成し添加するのは難しい。そこで、30 アミノ酸程度のペプチドを互いにオーバーラップするようにして合成し、添加試験を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイによるペプチドをコードする遺伝子 (sORF) の発現解析

2週間生育したシロイヌナズナの未処理 (NA, 22), 低温馴化 (CA) 処理 (2, 1, 7日), 脱馴化 (DA) 処理 (22, 6, 24時間) した 5 点のサンプルを、低温ストレス応答時に発現誘導されるペプチドをコードする遺伝子 (sORF) を含むカスタムマイクロアレイを使用し解析した。ヒートマップ (図 4) に示すように、未処理サンプル (NA) と比較して 4 倍以上に発現が上昇した sORF は 28 遺伝子見出され、低温ストレス初期の 1 日目 (CA1d) では 18 遺伝子、低温ストレス後期の 7 日目 (CA7d) では 13 遺伝子、脱馴化時 (DA6h, 1d) では 3 遺伝子 (オーバーラップを含む) であった。この結果は、以前の研究である短期間の低温ストレス処理 (CA2h, 10h, (2,10時間処理)) で見出された 11 個の遺伝子と比較して、3 倍近く誘導された遺伝子数が多くなっており、長期間の処理が植物の低温ストレス応答を解析する上で適切であったことが示唆された。しかし、他の環境ストレス (乾燥, 高温, 高塩はおよそ 80 遺伝子ずつ) と比較すると誘導される遺伝子数が少なく、低温ストレス時に機能しているペプチドは少ない可能性が考えられた。

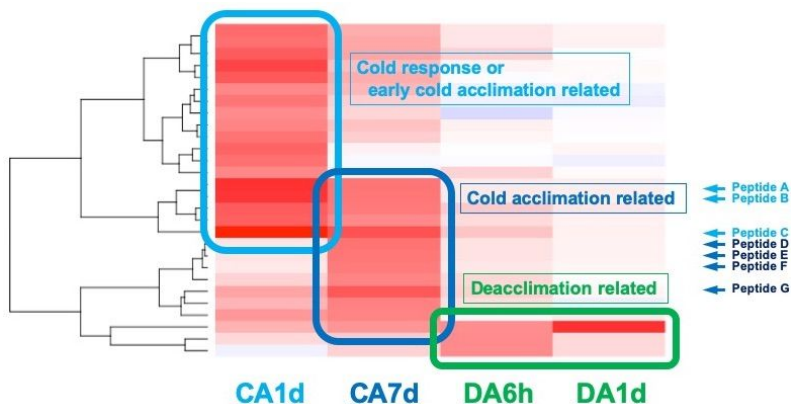


図 4. 低温馴化、脱馴化過程における sORF の発現解析
未処理 (NA) 条件と比較して、低温処理 (CA) または脱馴化処理 (DA) の少なくとも 1 つの条件において 4 倍以上に上昇していた 28 個の sORF 遺伝子。発現誘導が高いものを赤で、低いものを青で示している。ペプチド A-G は低温誘導性の発現の高いものから選抜した。

(2) 人工合成したペプチドのデザイン

発現解析で得られた低温ストレスで誘導される **sORF** は **28** 遺伝子で、申請当初想定していた候補ペプチド数より少なかった。これまでの研究において、高い発現誘導を示す遺伝子の過剰発現体がストレス試験により耐性を示しやすいこと、耐性を示した過剰発現体のうち半数のペプチドが活性を示さない傾向にあることがわかっている。本研究では **28** の候補のうち低温馴化に関係のあるペプチドが **25** で（残り **3** つは脱馴化関連）、そのうち発現誘導が高く、ペプチドとして機能している可能性が高いものはおよそ **6~8** ペプチドと予想された。そこで、当初は過剰発現体を作製し、スクリーニングする予定であったが、高発現誘導を示す **7** ペプチド（**図 4, Peptide A-G**）を候補として選抜し、ペプチドを人工合成、添加試験での低温ストレス耐性により機能解析を行うこととした。

人工合成したペプチドは **30** アミノ酸の断片がオーバーラップするように合成し、**30** アミノ酸以上のペプチドも全体がカバーできるように設計した（**図 5**）。合成したペプチドは溶媒に溶かし低温ストレス試験時に添加することで、その機能を解析した。ペプチド添加試験に使用した溶媒については（**6**）の項目で詳細を記述する。

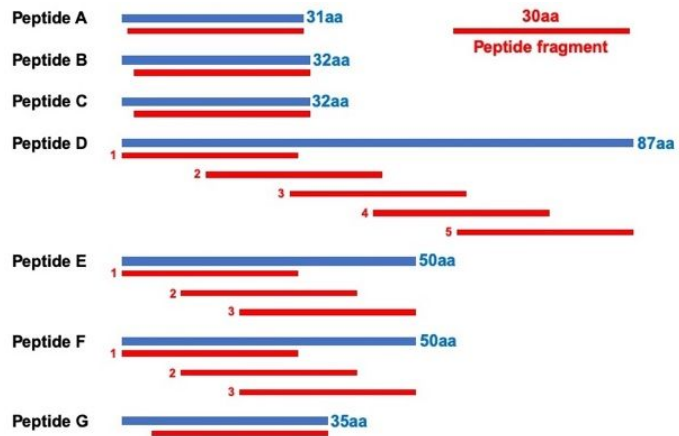


図 5. 人工合成したペプチドデザイン
青はペプチドの全長を示し、赤は人工合成したペプチドを示す。

(3) 人工合成したペプチド添加試験による低温誘導遺伝子の発現解析

人工合成したペプチドの添加が低温ストレス耐性に関与するかどうかの指標とするために、

COR15A, RD29A の **2** つの代表的な低温誘導性遺伝子がペプチド添加によりどのように発現するかを定量 **PCR** により解析した。ペプチド処理は **MS** 液体培地で **7** 日生育した植物に **1** 日間、または **3** 日間処理した。候補となる **7** ペプチド（計 **15** ペプチド断片）をコントロールである溶媒のみのジメチルスルホキシド（**DMSO**）処理と比較したところ、ペプチド **A, C, D, E, F, G** の **6** ペプチドにおいて低温誘導性遺伝子の発現が高くなっていった。特にペプチド **D** では両遺伝子の発現誘導が見られた（**図 6**）。この結果から、このペプチド **D** が低温耐性に機能を有するペプチドである可能性が示唆された。

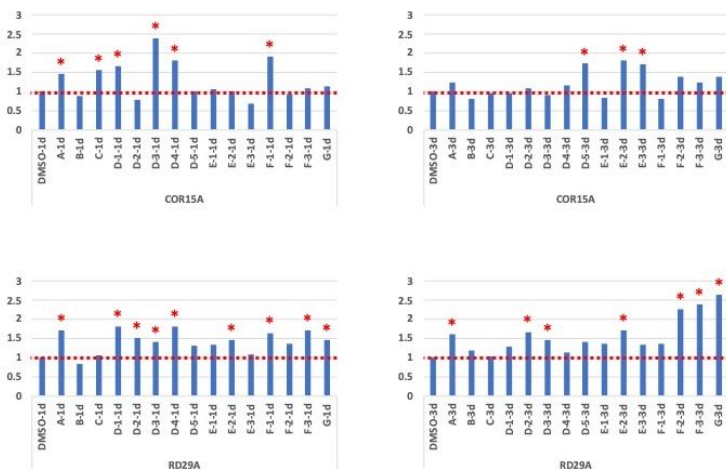


図 6. ペプチド処理における低温誘導性遺伝子(COR15A, RD29A)の発現解析
上段は COR15A, 下段は RD29A, 左はペプチド処理後 1 日目, 右はペプチド処理後 3 日目の発現をそれぞれ示す。

(4) 人工合成したペプチド添加試験による機能解析

本研究ではペプチド処理の効果を観察するために、耐凍性試験は **MS** 液体培地で生育させた植物を凍らせた後、ゆっくりと溶解し、通常条件下で生育し生存率を判断する方法で行った。ペプチドは **MS** 液体培地で **7** 日生育した植物に **3** 日間処理し、計 **10** 日間生育した植物を用いて耐凍性試験を行った。その結果、ペプチド **D-3** を添加した植物がコントロールと比較して高い耐性を示した（**図 7**）。これは（**3**）で示した低温誘導性遺伝子の発現解析結果とも一致するもので、このペプチド **D** が植物の低温耐性強化に重要な機能を有する可能性が高いことを示している。

NA freezing test -7 °C

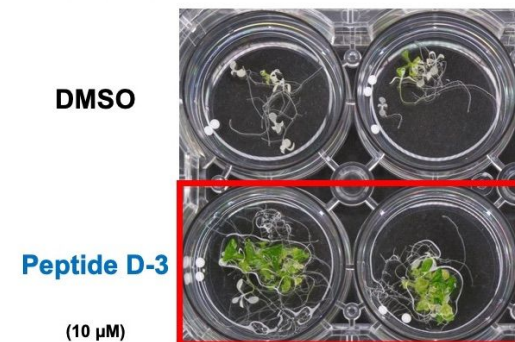


図 7. ペプチド D 処理は植物の低温耐性を強化した

る。しかし、本研究でペプチド溶解に使用した溶媒であるジメチルスルホキシド (**DMSO**) が植物細胞膜に影響を与える報告があり、**DMSO** の低温耐性への影響についても解析した ((6) 項目に記述)。

(5) 今後の研究

本研究では、低温ストレス耐性強化に機能する候補ペプチドを 1 つ同定することに成功した。現在、このペプチドをコードする遺伝子の欠損変異体を用いた解析を行っている。また、脱馴化過程に関与するペプチドとして 3 つの候補を見出した。このペプチドの解析も、現在、欠損変異体を用いた解析を行っている。

国内でもペプチドホルモンや機能性ペプチドの研究が盛んに行われており、本研究成果による貢献度も高いと考えられる。その中でも環境ストレス応答に関与する機能性ペプチドに関する報告は現在でも少ないため、本研究で得られた成果の世界的なインパクトは大きいと考えられる。

今後の研究では、このペプチドの植物における発現局在の解析や、受容体の同定、その後のシグナル伝達と低温耐性強化のメカニズムを明らかにしたいと考えている。

(6) 本研究から得られた新たな知見

本研究では、人工合成したペプチドの添加試験により低温ストレス耐性に機能する新規ペプチド候補を同定した。しかし、その過程でペプチド溶解に使用した溶媒であるジメチルスルホキシド (**DMSO**) が低温ストレス耐性に影響を与える報告があり (引用文献 2)、その詳細を解析した。

その報告によると **DMSO** 3% 処理で低温耐性を示すが、本研究では溶媒に使用した濃度は 0.1% であり影響は少ないと考えられた。低温耐性試験に影響を与える **DMSO** の濃度を解析したところ、本試験では 0.5% でも植物の低温耐性を強化することが明らかになった (図 8)。

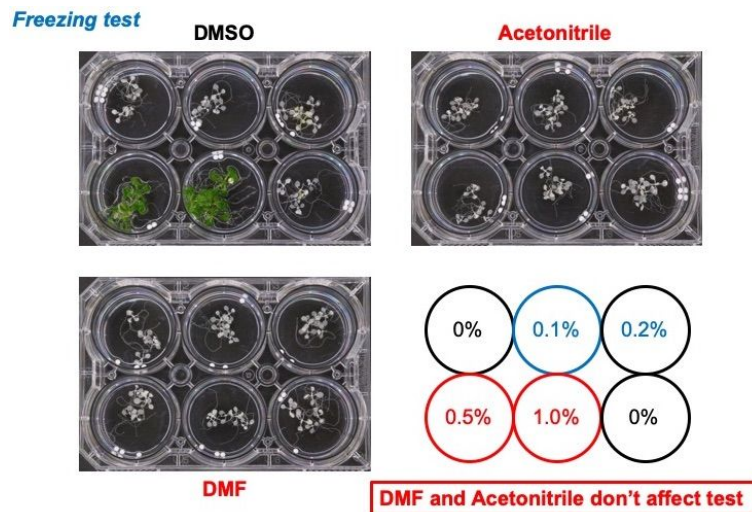


図 8. ペプチド溶解に使用した溶媒の低温耐性に与える影響
DMSO: ジメチルスルホキシド, DMF: ジメチルホルムアミド, アセトニトリルを異なる濃度で添加し、凍結試験を行った結果。右下の模式図に濃度を示す。

この結果は報告されている機能を示す濃度であると比較しても低いですが、本研究で見出されたペプチドの同定に **DMSO** が影響を示した可能性もあるため、他の溶媒を検討した。その結果、ジメチルホルムアミド (**DMF**)、アセトニトリルが 1% 添加でも低温耐性に影響がなく、本試験に適していることがわかった (図 8)。ペプチドの溶解を確認したところ、**DMF** がペプチドを溶解しやすく、試験に適していた。

そこで (4) で同定した候補について **DMF** を溶媒として用いたペプチド添加による低温耐性試験を行った。その結果、ペプチド **D** を添加した植物がコントロールと比較して高い耐性を示した (図 9)。DMF を使用した試験での結果からも、ペプチド **D** が低温耐性に機能する可能性が強く示された。

NA freezing test -6 °C

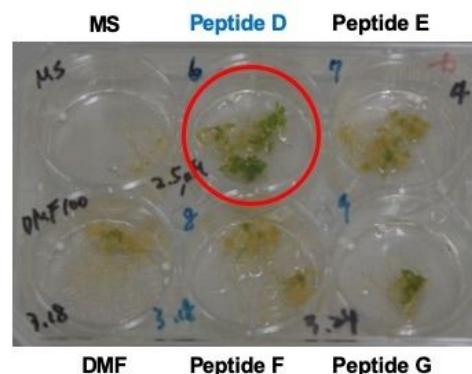


図 9. ペプチド D 添加は低温耐性を強化する
MS はコントロール, DMF は溶媒入りコントロールを示す

(引用文献) 2. Furuya, T. et al., (2014) FEBS Lett 588(11): 2025-2030.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakaminami Kentaro, Okamoto Masanori, Higuchi-Takeuchi Mieko, Yoshizumi Takeshi, Yamaguchi Yube, Fukao Yoichiro, Shimizu Minami, Ohashi Chihiro, Tanaka Maho, Matsui Minami, Shinozaki Kazuo, Seki Motoaki, Hanada Kousuke	4. 巻 115
2. 論文標題 AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5810 ~ 5815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1719491115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakaminami Kentaro, Seki Motoaki	4. 巻 1081
2. 論文標題 RNA Regulation in Plant Cold Stress Response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 23 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-1244-1_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Nakaminami, Motoaki Seki
2. 発表標題 Functional small peptide related to cold respons
3. 学会等名 11th International Plant Cold Hardiness Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中南 健太郎, 田中 真帆, 高橋 聡史, 松井 章浩, 武田 智之, 金 有王, 花田 耕介, 関 原明
2. 発表標題 Expression profile of small coding genes during cold acclimation and de-acclimation in plants
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----