

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15137

研究課題名（和文）光合成産物の欠乏に应答する長距離移行性ペプチドを介したシグナル伝達機構の研究

研究課題名（英文）A study about signaling system of carbon-deficient responsive peptide

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：光合成器官である成熟葉から根や子実などへの光合成産物の分配は植物個体の成長や作物の収量形成を考える上で重要である。研究代表者はこれまでにシロイヌナズナの根において光合成産物の欠乏に应答するペプチドAXLを見出し、過剰発現体とノックアウトシステムを用いた解析からAXLは根におけるスクロースの増加を引き起こすことを見出している。しかしながら、AXLペプチドがどのように根のスクロース含量の増加に関与するかは不明である。そこで本研究ではAXLの下流で機能する因子を探索した。その結果、AXLはスクロース輸送体SUC2の活性を制御することで根へのスクロースの転流を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも成熟葉から根などの非光合成器官へのスクロースの転流にはSUC2スクロース輸送体が重要な役割を果たしていることが知られていた。しかしながら、成熟葉から根などへ輸送するスクロースの量がどのように制御されるかは不明であった。本研究では根において光合成産物の欠乏に应答するAXLが成熟葉におけるSUC2輸送体を制御することで根に転流されるスクロースの量を制御することを示唆する結果を得た。光合成産物の分配は作物の成長や収量形成においても極めて重要であり、今後本研究で得た知見を応用することで、光合成産物の分配を制御することができれば、例えば根菜類の収量の改善などにつながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Carbon allocation between photosynthesizing leaves and non-photosynthesizing organs is quite important for growth and yield formation in crops. Recently I identified carbon-deficient responsive peptide gene, AXL, and found that it positively regulates root sucrose content. However, it remains elusive how AXL controls root sucrose level. Here I found that the expression amount of Sucrose-proton symporter 2 (SUC2) in mature leaves was diminished in axl septuple mutant and the root genotype of AXL genes contributes to the transcriptional activation of SUC2. These findings suggest that AXL controls root sucrose level via SUC2 in mature leaves.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：器官間情報伝達 シンクソース 分泌型ペプチド 光合成産物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物個体は根、茎、葉、果実などの異なる性質を持つ複数の器官により構成されている。そのため個体全体が周囲の環境に適応したり効率的に生産活動を行ったりするには、器官同士で物質や情報の交換を行うことが必要である。植物は光合成により炭素を固定し、それを光合成(ソース)器官である葉から非光合成(シンク)器官である根、果実などへと分配する。これまでシンク器官やソース器官における光合成産物の代謝や輸送については詳細な研究が行われてきた。その一方で、両者の間でそれらを積極的に制御するような長距離シグナル伝達が行われるかどうかはこれまで明らかにされていない。

これに対し、研究代表者はこれまでにダイズ道管液から同定した分泌型ペプチドをコードする遺伝子 *XAP* およびそのシロイヌナズナにおけるホモログ (*Arabidopsis XAP-like, AXL*) の根における発現量が暗処理などの光合成産物の欠乏するような条件下において著しく上昇することを見出した。その一方でスクロースを与えるとその発現応答は抑制された。なお、シロイヌナズナでは *AXL* のホモログが7個存在し、そのうちの *AXL1, 2* が光合成産物の欠乏する条件に対して応答した。さらに、*GmXAP* 遺伝子をダイズの根で過剰発現させると本葉におけるデンブンの蓄積が検出されなくなることを見出した。また、シロイヌナズナを用いて *AXL1* 過剰発現体および CRISPR-Cas9 によるノックアウトシステムを作成し、それらの表現型の解析に取り組んでいた。しかしながらその一方で、*AXL* シグナル伝達系が光合成産物の代謝や輸送にどのように関わるか、どのような因子が *AXL* の影響を受けるか、は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

上述のように研究代表者は根から地上部へ長距離移行する *XAP* ペプチドは葉における光合成産物の代謝や輸送に作用する可能性を見出していた。そこで本研究ではシロイヌナズナを用いて *AXL* シグナル伝達系に関わる因子やその作用点を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) *AXL1* 過剰発現システムの抑制変異体のスクリーニングを行うことで *AXL* シグナル伝達に関わる因子を単離する

ダイズでは *XAP* を過剰発現させると本葉のデンブンの消失が観察されており、シロイヌナズナでも同様の表現型が期待できる。そこで *AXL1* 過剰発現システムの種子を EMS 処理し、本葉におけるデンブンの消失に着目して復帰変異体のスクリーニングを行う。スクリーニングにより得られた系統はマッピングと次世代シーケンサーを併用した解析により原因遺伝子を同定する。

(2) *AXL* の影響を受ける遺伝子を探索して *AXL* シグナル伝達経路に関与する因子を同定する

申請者の保有する *AXL1* 過剰発現システムとノックアウトシステムを用いて RNA sequence を行う。発現量の変化が観察された遺伝子について *AXL* との関連について詳細な解析を行う。

(3) *AXL* シグナル伝達系と植物ホルモンの関連について調べる

これまで道管を介して長距離移行するペプチド (CLE-RS2, CEP) は維管束で発現する受容体に認識される。*AXL* もそのような組織で認識されるとした場合、デンブンの消失は葉全体で起こることを考えると、維管束から葉全体へ広がる何らかの二次シグナルが必要である。また、サイトカニンやアブシジン酸は光合成産物の蓄積や代謝にも関連することが知られている。そこで、*XAP* シグナル伝達経路と植物ホルモンとの関わりを検証するために *AXL* の過剰発現システムとノックアウトシステムを用いてホルモンの一斉解析を行い、*AXL* と関連を持つ植物ホルモンを探索する。

### 4. 研究成果

(1) *AXL1* 過剰発現システムの抑制変異体のスクリーニングを行うことで *AXL* シグナル伝達に関わる因子を単離する

研究開始当初、ダイズでは *XAP* を過剰発現させると本葉のデンブンの消失が観察されており、シロイヌナズナでも同様の表現型が観察されることが期待された。本葉におけるデンブンはヨウ素デンブリン反応を用いることで簡便かつ大量に観察できることから、この手法を用いることで大量の個体のスクリーニングが可能であると考えていた。しかし、*AXL1* 過剰発現体およびノックアウト変異体では葉のデンブリン含量に有意な変化は観察されなかった。そのため、ヨウ素デンブリン反応を用いた抑制変異体のスクリーニングは中止せざるを得なくなった。なお、*AXL1* 過剰発現体および *ax11-7* ノックアウト変異体を用いた解析から *AXL* は根におけるスクロース含量を正に制御することがわかった。

(2) *AXL* の影響を受ける遺伝子を探索して *AXL* シグナル伝達経路に関与する因子を同定する

*AXL* の影響を受ける因子を探索することを目的として、*AXL1* 過剰発現体および *ax11ax12* 二重変異体を用いて根と地上部における RNA-sequence 解析を行った。その結果、地上部において、多数のアブシジン酸応答性の遺伝子の発現量が変動していることがわかった。

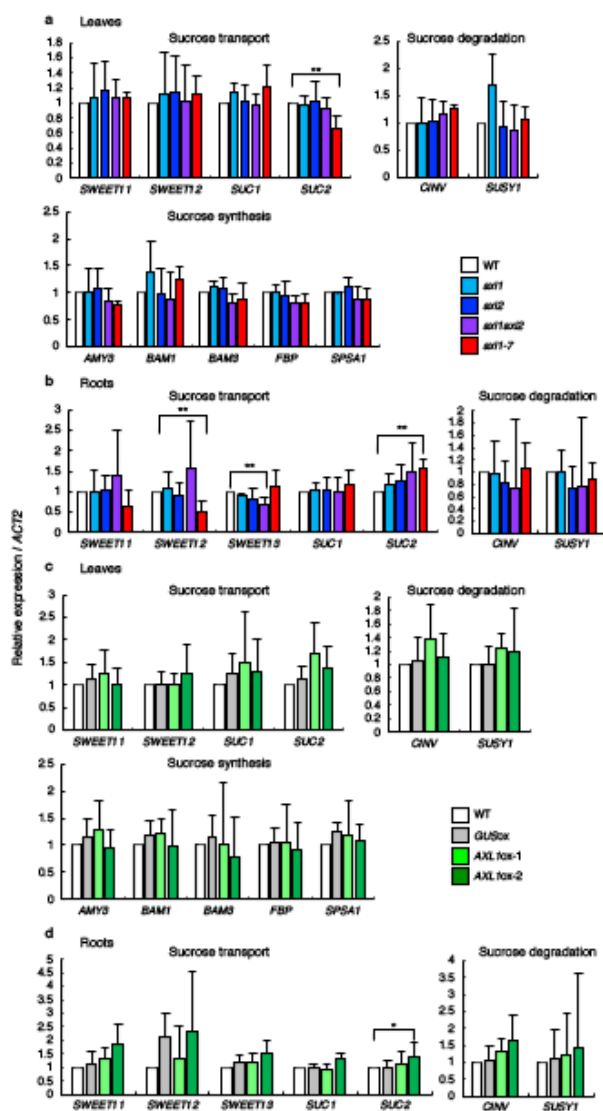
*AXL1* 過剰発現体および *ax11-7* ノックアウト変異体を用いた表現型解析から *AXL* は根における

スクロース含量を正に制御することがわかったことから、*AXL1* 過剰発現体および *ax11-7* ノックアウト変異体を用いて成熟葉および根において、スクロースの輸送、合成、分解に関わる因子の qPCR 解析を行った (図 1)。その結果、*ax11-7* ノックアウト変異体の成熟葉において、スクロースの転流において主要な役割を果たす Sucrose-proton symporter 2 (*SUC2*) 輸送体をコードする遺伝子の発現量が 6 割程度に有意に減少していることがわかった。一方、*AXL1* 過剰発現体の成熟葉では *SUC2* の発現量の有意な変化はみられなかった。Xu et al. (2020) により *SUC2* 活性の制御は、負の制御は遺伝子の転写レベルで、正の制御はタンパク質への翻訳後レベル (リン酸化、ユビキチン修飾) で制御されることが報告されている。そのため、*AXL1* 過剰発現体における *SUC2* の評価はタンパク量の定量などにより行う必要があると考えている。なお、*ax11ax12* 二重変異体や *ax11-7* 七重変異体の根では *SUC2* や *SWEET12, 13* の発現量が変化していたが、*ax11ax12* 二重変異体と *ax11-7* 七重変異体の間で発現変動が見られた遺伝子が異なることや、根におけるスクロースの積み下ろしは主にシンプラストを介して行われる (スクロース輸送体を介さない) と考えられていることから、これらの発現変動が根のスクロース含量の変化にどの程度貢献するのかどうかはわからない。なお、*suc2* 変異体は植物体の成長が著しく抑制され、かなりドラスティックな表現型を示す。そのため *AXL1* 過剰発現体や *ax11-7* 七重変異体と *suc2* 変異体の多重変異体の表現型を観察して *suc2* 変異体とのその差異を評価することは難しいと考え、行わなかった。

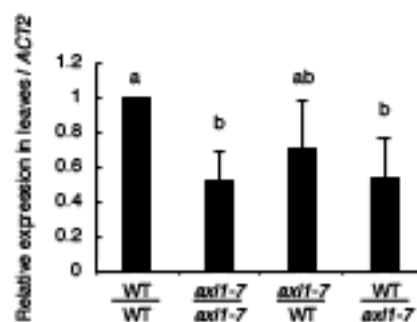
また、*ax11-7* 七重変異体を用いた接木実験では成熟葉の *SUC2* の発現量は根の *AXL1-7* の遺伝型に影響を受けることを明らかにした (図 2)。また、*suc2* や *sweet11, 12* などのスクロースの輸送体の変異体では野生型と比べて根の伸長が抑制されており、それはスクロースの添加によって回復することが知られている。そこで *ax11-7* 七重変異体を用いて根の伸長とスクロース添加の効果を調べたところ、スクロース輸送体の変異体と同様に、スクロースの添加に依存的に根の伸長が回復することを明らかにした。また、研究代表者はシロイヌナズナ道管液から *AXL2* ペプチドを検出していることから、*AXL* ペプチドは *XAP* と同様に根から地上部へ長距離移行するものであると言える。

以上の結果から、根において光合成産物の欠乏にตอบสนองする *AXL* は成熟葉における *SUC2* 輸送体を介して根へのスクロースの転流を制御することが強く示唆された。これまでに成熟葉 (ソース) からスクロースの転流には *SUC2* が重要な役割を果たしていることが知られていた。しかし、成熟葉から根などのシンク器官へ輸送されるスクロースの量がどのように制御されるかは不明であった。本研究では光合成産物の欠乏に対して根でตอบสนองするペプチド性の長距離シグナルが成熟葉の *SUC2* に作用することで転流されるスクロース量を制御する可能性を示すものである。今後この仕組みを根菜類に应用することで収量の上昇が期待できる。

### (3) *AXL* シグナル伝達系と植物ホルモンの関連



(図 1) スクロースの輸送、合成、分解に関わる主要遺伝子の発現解析



野生型と *ax11-7* 七重変異体を用いた接木実験

AXL1 過剰発現体および *ax11ax12* 二重変異体を用いた RNA-sequence 解析の結果から、地上部ではアブシジン酸含量が変化することが予想された。そこで AXL1 過剰発現体、*ax11ax12* 二重変異体および *ax11-7* 七重変異体を用いてホルモン解析を行った。しかしながら、アブシジン酸を含めて有意な変化を示した植物ホルモンは見られなかった。このため、AXL はアブシジン酸そのものよりもアブシジン酸応答経路の一部を介して、情報伝達を行うことが考えられた。

また、シロイヌナズナにアブシジン酸を添加してデンプン、糖の含量を測定したところ、地上部におけるグルコース、スクロース含量は上昇したが、根におけるグルコース、スクロース含量には変化が見られなかった。これらの結果から、AXL による SUC2 を介した根におけるスクロースの正の制御にはアブシジン酸およびそのシグナル伝達経路は関与しない可能性が考えられた。

本研究では AXL シグナル伝達経路の作用点は SUC2 であることを示すことができた。一方、複数のアブシジン酸応答性遺伝子が AXL の影響を受けることを見出したものの、このこととスクロースの輸送、代謝との関連は依然として不明であり、この部分を解明することは今後の課題の一つである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本暁
2. 発表標題 ペプチドを介した根から地上部への長距離コミュニケーション
3. 学会等名 第60回新潟生化学懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Okamoto
2. 発表標題 A study of root-to-shoot long-distance mobile peptides
3. 学会等名 International Workshop on Plant Nutritional Responses 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Okamoto, Yumiko Makino, Kie Kumaishi, Azusa Kawasaki, Takamasa Suzuki, Yasunori Ichihashi
2. 発表標題 Comprehensive analysis of small proteins and peptides in xylem sap
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020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