

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05758

研究課題名（和文）植物の亜鉛恒常性維持に寄与するペプチドと受容体の機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of peptides and receptors that contribute to zinc homeostasis in plants

研究代表者

深尾 陽一郎（Fukao, Yoichiro）

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：80432590

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）：本研究で対象とした5種類のDEFLペプチドは、亜鉛欠乏時に上昇すること、主に根において発現量が多いこと、転写因子bZIP19によって発現制御されることが示された。次にペプチドの変異体は亜鉛欠乏だけではなく様々な培地上で根が長くなる表現型を示した。細胞内局在解析からは、ペプチドが細胞壁に局在する事が示され、また原子間力顕微鏡を用いた解析からは変異体の細胞壁強度が弱まっていることが示された。変異体の根の伸長領域における細胞長が長くなっていることから、当該ペプチドは、細胞壁に局在し、細胞の長さを制御する機能を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究対象としたペプチドは、一般的なプロテオーム解析において同定されるほど発現量が多いが、その機能は全く不明であった。野生型シロイヌナズナは、亜鉛欠乏のような環境下では個体を大きくしても栄養を獲得できないことから、生長を抑制することで必要以上にエネルギー消費しないようにしていると予想される。一方、当該ペプチドのシロイヌナズナ変異体ではその制御が効かず亜鉛欠乏培地でも根がなった。また細胞内局在解析からペプチドが細胞壁に局在していることや、変異体の細胞壁強度が弱くなっていたことから、ペプチドは細胞の長さを制御する機能をもつことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The five DEFL peptides targeted in this study were shown to be upregulated upon zinc deficiency, expressed mainly in roots, and regulated by the transcription factor bZIP19. The peptide mutants then showed a phenotype of longer roots on various media as well as zinc deficiency. Subcellular localization analysis showed that the peptide localized to the cell wall, and atomic force microscopy analysis showed that the cell wall strength of the mutant was weakened. The cell length in the root elongation region of the mutant was increased, suggesting that the peptide localizes to the cell wall and functions to control cell length.

研究分野：植物栄養学

キーワード：亜鉛欠乏 ペプチド シロイヌナズナ 細胞壁

1. 研究開始当初の背景

本研究では、亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根において極めて多量に発現し、ミネラル恒常性維持への関与が知られていないシステインリッチ型ペプチドである Defensin-like family proteins (DEFL) の機能解明に取り組む。研究代表者は研究開始以前に、シロイヌナズナの根から調製したタンパク質を用いて行った相対定量解析 (iTRAQ 解析) を行ったところ、3種類のペプチドが亜鉛欠乏時に発現量が上昇するペプチドとして同定された (Inaba et al., *Plant J.*, 2015)。さらにその後の研究から、これらペプチドは亜鉛欠乏時に mRNA およびタンパク質発現が上昇し、他のミネラル欠乏には応答しない特徴をもつことから、植物の根が亜鉛欠乏を感知した時に特異的に機能するペプチドであると考えられた。また T-DNA 挿入変異体の表現型解析を行ったが、植物の生育や細胞内亜鉛濃度に明確な差は見られなかった。この結果から他のペプチドが機能相補していることが想定されたものの、BLAST 検索では配列相同性の高いペプチドは発見されなかった。そこでパラログス遺伝子を探索すると、これら3種類のペプチドは、システイン 6~8 箇所の位置が高度に保存された7種類のペプチドからなるファミリーを形成している可能性が示唆された。近年、植物のミネラル恒常性維持に寄与するペプチドが発見されているが、これらはすべて翻訳後に切断と修飾を受けるペプチドであり、翻訳後修飾を受けないシステインリッチ型ペプチドの関与は知られていない。そこで本研究では、7種類のペプチドとその受容体が亜鉛欠乏時に果たす機能の解明に取り組む。

2. 研究の目的

亜鉛は植物において多くの酵素活性維持に必要なため、亜鉛欠乏環境で生育した植物は著しい生育阻害を示す。国際連合食糧農業機構によると、世界の耕地面積の約 50% が亜鉛欠乏状態にあるため、作物の収穫量減少や、亜鉛含有量の少ない作物を食することによるヒトの亜鉛欠乏が問題となっている。事実、発展途上国における死亡原因の第 5 位は亜鉛欠乏によるものである。しかし、植物の亜鉛恒常性維持機構については転写因子や亜鉛輸送体の解析が中心であり、その全体像を理解するには至っていない。また本研究で着目する植物分野のペプチド研究では、ペプチドが細胞から異なる細胞へと植物体内を移動し、植物の生長制御や形態形成に関わることが示されてきた。近年、窒素欠乏を感知した植物の根から CEP ペプチドが地上部へ移動し、CEP 受容体と結合すると窒素十分な根に二次シグナルを送る仕組みが発見され、元素の恒常性維持におけるペプチドの寄与が示された (Tabata et al., *Science*, 2014, Ohkubo et al., *Nature Plants*, 2017)。一方、本研究では CEP ペプチドとは構造的特徴が異なるシステインリッチ型ペプチドに着目する。既報のペプチドの多くは存在量が低く、細胞内で機能することの証明がしばしば困難であることから、特別な精製をかけなくても質量分析計で同定されるほど多量に存在するペプチドはユニークと言える。これらのペプチドは機能が全く解明されていないが、亜鉛欠乏時の根において極めて多量に蓄積することから、未知の亜鉛恒常性維持機構の解明が期待される。同時に、植物が各必須元素に対応するペプチドをシグナル因子として用いて恒常性を維持する機構の解明につながると考えている。

3. 研究の方法

本研究では上記した7種類のペプチドについて、機能解明に取り組む。このうち、シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体が入手できたものはホモラインを固定したが明確な表現型は得られていない。また一部のペプチドについては過剰発現体を作製したが、これらも明確な表現型は見られないことから、変異体の掛け合わせによる 2~3 重変異体の作製と、発現パターンや配列の類似性を参考にゲノム編集による複数遺伝子の発現抑制株を作製し、その表現型解析を行う。また GFP を融合した形質転換体を用いた免疫沈降実験によって相互作用タンパク質を同定する。候補タンパク質とペプチドとの相互作用を RFP タンパク質や BiFC による共同在解析により確認し、相互作用タンパク質の機能を詳細に解析するまでを本実験の目標とする。以下にそれぞれの実験の詳細を示す。

・表現型解析

シロイヌナズナ野生型 Col-0 を用いて、ペプチド 2 とペプチド 4 の 2 重変異体株およびペプチド 1、ペプチド 3、ペプチド 5 の 3 重変異体株をゲノム編集により作製する。なお、これら 5 種類は主に根で発現するため、ゲノム編集により 5 重変異体株の作製を進める。これとは別に、過剰発現体の作製およびプロモータ:GUS ラインの作製も行う。また主に葉で発現するペプチド 6 とペプチド 7 の変異株についてもゲノム編集株の作成に取り組む。植物体の表現型解析として、根の伸長や葉の新鮮重などを指標に亜鉛欠乏感受性を調べる。さらに、細胞内亜鉛濃度も ICP-MS により測定することで、目視だけでは判断できない影響についても調べる。

またシグナルペプチドを除いた成熟型ペプチドを化学合成し、生育培地へ投与することで野生型 Col-0、変異体またはゲノム編集株に亜鉛欠乏耐性を付与できるかを調べる。ペプチドは粗精製品を合成し、精製とリフォールディングを行うが、この過程がうまく行かない場合は粗精製品を植物体に投与する。

・細胞内局在解析

ペプチド2およびペプチド1の自己プロモータを含むゲノム配列とそのC末端にGFPを融合した配列(自己プロモータ:ペプチド-GFP)はすでにCol-0に形質転換しており、細胞膜または細胞外に局在する事、亜鉛欠乏時にGFP蛍光強度が強くなることを確認している。なお成熟型分泌ペプチドのC末端は切断されない事を質量分析により確認していることから、GFP融合タンパク質が切断を受けずに細胞外へと分泌されていることが示唆される。そこで、変異体に自己プロモータ:ペプチド-GFPを導入し、表現型の回復を含めて蛍光顕微鏡観察を行う。本解析では他の5種類のペプチドについても同様に解析する。

・相互作用タンパク質同定

この解析では、7種類のペプチドに相互作用する受容体タンパク質の同定を試みる。通常および亜鉛欠乏条件下で生育した”自己プロモータ:ペプチド-GFP株”を用いて、亜鉛欠乏特異的にペプチドと結合するタンパク質をGFP抗体により免疫沈降し、質量分析計で同定する。擬陽性を減らす目的でGFPをFLAGタグに変えた形質転換体やタンパク質架橋剤を用いた実験も実施し、共通に同定されたタンパク質を解析候補とする。

以上、生化学的なアプローチでは、相互作用する受容体を得ることが困難な場合を想定し、ペプチド受容体として知られるロイシンリッチリピート型受容体キナーゼ(LRR-RK)のT-DNA挿入変異体を用いて亜鉛欠乏感受性株の取得を試みる。候補となる受容体の変異体における亜鉛濃度は、ICP-MSにより測定し、亜鉛恒常性維持に関わるものを選別する。

次にペプチドと受容体の共局在を調べるために、自己プロモータ制御下の各受容体の遺伝子と赤色蛍光タンパク質RFPの融合遺伝子を、7種類のペプチドについて作製した”自己プロモータ:ペプチド-GFP株”に導入する。またBiFCによる相互作用の確認も検討する。さらに受容体タンパク質の機能を詳細に調べるために、Col-0と変異体または作成したゲノム編集株を通常および亜鉛欠乏培地で生育し、根から調製したmRNAを用いて次世代シーケンサによるトランスクリプトーム解析を実施する。その結果から変異による影響で遺伝子発現が抑制されている輸送体や代謝経路を特定し、ペプチドとその受容体が担う機能を明らかにする。

以上の研究により、システインの位置が保存された7種類のペプチドの機能を解析し、植物における新奇の亜鉛恒常性維持機構に関する知見を得る。

4. 研究成果

本実験では、主に植物の生育培地として亜鉛欠乏培地:Zn0、通常培地:Basal、亜鉛十分培地:Zn10を用いた。

・系統樹解析と発現パターンによる分類

シロイヌナズナゲノム上においてDEFLと予測される284種類の遺伝子を取得し、系統樹を作成したところ、研究対象としている7種類のDEFL(ペプチド1~7)はファミリーを形成しており、さらにLUREやPDFといった既知のDEFLとは保存性が低いことが示された。これらペプチドの亜鉛濃度に対する応答性を調べるために、Zn0、Basal、Zn10培地でシロイヌナズナ野生型Col-0を生育し、根と地上部における遺伝子発現をリアルタイムPCRにより調べた。この結果、ペプチド1~5は主に根で発現し、亜鉛欠乏時に発現量が上昇することが示された。また地上部においても発現しており、同様に亜鉛欠乏時に発現量が上昇したが、根と比較して発現量が低かった。一方、ペプチド6とペプチド7は亜鉛濃度に依存して発現量が変化せず地上部において発現量が高いことが示された。そこでプロモータ領域を調べたところ、亜鉛輸送体の発現量を制御することが知られている転写因子bZIP19およびbZIP23が結合するシス配列ZDREモチーフがペプチド1~5には1箇所または2箇所存在しており、ペプチド6とペプチド7には存在しないことが明らかとなった。そこで、Col-0に加えて、*bzip19*変異体および*bzip23*変異体におけるペプチド2およびペプチド4の発現量を調べたところ、*bzip19*変異体では亜鉛欠乏時においても発現量が低いままであった。またCol-0、*bzip19*変異体および*bzip23*変異体にプロモータ:GUSを導入した形質転換体においても、*bzip19*変異体においてGUS染色されないか、弱く染色されていたことから、リアルタイムPCRの結果を支持する結果となった。ただし、ペプチド4のみプロモータ領域がクローニングできず、700bp程度のプロモータを用いたが機能しなかったことから、現在も作製できていない。以上のことから、これらペプチドはbZIP19転写因子によって発現量が制御されていることが示された。

・表現型解析

研究対象とするペプチド2およびペプチド4についてはシロイヌナズナにおけるT-DNA挿入による一重変異体は取得しており、またこれらの二重変異体と、ゲノム編集による変異導入により2ライン作製した。またペプチド1、ペプチド3、ペプチド5についてはT-DNA挿入による一重変異体を取得しており、3重変異体は作製途中である。この他、ゲノム編集による3重変異体や5重変異体の作製を引き続き行っている。また過剰発現体については5種類すべてのペプチドについて作成済みである。以上の実験ツールを用いて以下の実験を行った。

ペプチド2およびペプチド4について固定したシロイヌナズナT-DNA挿入変異体のホモラインは、Zn0、Basal、Zn10培地のすべてにおいて表現型を示さなかった。そこでこれら二重変異体を用いたところ、これら3種類の亜鉛濃度培地に加え、マグネシウムやマンガンなど他の元素欠乏培地においても根が長くなる表現型を示した。この表現型が正しいことを確認するため、ゲノム編集による二重変異体を作製したところ、同様に根が長くなる表現型を示したこと

から、ペプチド2およびペプチド4は根の伸長制御に関わる遺伝子である事が示唆された。またペプチド1、ペプチド3、ペプチド5のシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体についても明確な表現型は示さなかった。さらにペプチド1~5の過剰発現体も明確な表現型は示さなかった。これらの結果から、当該ペプチドが細胞伸長の制御に関わると考え、より明確な表現型を確認するためにペプチド2とペプチド4の T-DNA 挿入変異体および過剰発現体を暗所で生育したところ、変異体の胚軸は野生型 Col-0 よりも優位に伸びており、ペプチド4の過剰発現体は優位に短くなる事が示された。

次に二重変異体の根が長くなる原因を調べるために、根の伸長領域を顕微鏡観察した。安定した結果が得られなかったものの、二重変異体における根の伸長領域における長さが野生型 Col-0 よりも有意に長くなると結論づけている。

- ・細胞内局在解析

ペプチド2の自己プロモータによって制御されたペプチド2-GFPシロイヌナズナ形質転換体 (Col-0 背景) を作製し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、根の細胞膜または細胞壁に局在する事が示された。明確に判別ができなかったため、原形質分離を行ったところ、GFP 蛍光が細胞壁に観察されたことから細胞壁局在であると考えている。また前述したようにペプチド4についてはプロモータ領域がクローニングできなかったため観察することができなかった。過剰発現プロモータを用いた形質転換体も作製したが GFP 蛍光が凝集したため、細胞内局在解析には用いることができなかった。次にペプチドが細胞壁の強度に関わる可能性を考え、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて細胞壁強度の測定をしたところ、ペプチド2およびペプチド4の二重変異体では野生型 Col-0 よりも細胞壁強度が弱くなっていることが示唆されたことから、その結果として細胞が伸長し、根がなくなる表現型を示したと考えられた。

- ・相互作用タンパク質同定

ペプチドの相互作用タンパク質を同定するために免疫沈降実験を行ったが、ペプチド自身が同定されておらず、相互作用タンパク質の同定には至らなかった。さらに、ペプチド合成に取り組んだが、全長を合成することはできなかった。断片的なペプチドを合成して野生型 Col-0 に投与したが、明確な表現型は見られなかった。さらに、次世代シーケンサによる発現解析により亜鉛欠乏時に発現量が上昇することが確認された受容体などの遺伝子 (Nakayama et al., 2020) について T-DNA 挿入変異体を7種類解析したが、いずれも亜鉛欠乏に対する表現型は示さなかったことから、現時点でも相互作用タンパク質の同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakayama Sayuri, Sugano Shigeo S, Hirokawa Haruna, Mori Izumi C, Daimon Hiroyuki, Kimura Sachie, Fukao Yoichiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Manganese Treatment Alleviates Zinc Deficiency Symptoms in Arabidopsis Seedlings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa094	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoichiro Fukao
2. 発表標題 Zinc responsive defensin-like family proteins may have a role in root elongation
3. 学会等名 The 23rd international conference on Plant growth substances (IPGSA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 広川春菜、木村幸恵、菅野茂夫、中山沙由里、Michael Wrzaczek、深尾陽一郎
2. 発表標題 亜鉛欠乏したシロイヌナズナの根におけるROSの定量
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深尾陽一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナにおいて亜鉛欠乏応答するDefensin-like family proteinsの解析
3. 学会等名 植物の栄養研究会第6回交流会
4. 発表年 2021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
研究協力者	菅野 茂夫 (Shigeo Sugano)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------