

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06705

研究課題名(和文)植物ペプチドホルモンRGFとその受容体を介した根の継続的な成長機構の解明

研究課題名(英文)Study on plant peptide hormone RGF and its receptor-mediated root growth

研究代表者

篠原 秀文(Hidefumi, Shinohara)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：40547022

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)：ペプチドホルモンRGFとその受容体のペアは、PLTタンパク質の濃度勾配を調節することで、根端メリステム活性を維持するが、RGF認識後の情報伝達経路の詳細は不明のままであった。我々はRGFによるPLTタンパク質の濃度勾配制御機構解明のため、RGF非依存的にPLTタンパク質の濃度勾配を調節する化合物の同定とそのターゲット因子の探索を行った。化合物スクリーニングによりRGF非依存的にPLTタンパク質の濃度勾配を回復させる化合物を2種類同定し、また活性型ビオチン化合物誘導体を作製と相互作用因子のプルダウン解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RGFは根端の細胞分裂活性の促進することができる唯一のペプチドホルモンであるため、植物調節剤としての応用も期待されるが、ペプチドホルモンは分解を受けやすく、フィールドでの使用に不向きである。本研究で得られた化合物は、RGFによる根端メリステム活性維持機構の解明に貢献するのみならず、根端の分裂活性を自在に制御する調節剤開発の礎になる可能性を秘めているといえる。

研究成果の概要(英文)：The peptide hormone RGF and its receptor pair maintain root meristem activity by regulating the concentration gradient of PLT protein, but the details of the signaling pathway after RGF recognition remain unclear. To elucidate the mechanism of PLT protein concentration gradient regulation by RGF, we identified compounds that modulate the PLT protein concentration gradient in an RGF-independent manner and explored their target factors. We identified two compounds that restore the PLT protein concentration gradient in an RGF-independent manner by chemical compound screening. We also prepared active biotinylated compound derivatives and performed pull-down analysis of interaction factors.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物 ペプチドホルモン 根端メリステム 受容体キナーゼ リガンド-受容体ペア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物の根は自身を支え、土壌から水分や栄養素を取り込む機能をもつ器官である。根は先端側から地上部側に向かって順に、分裂活性の低い幹細胞様の領域、細胞分裂が盛んな領域、そして細胞を伸長させる領域をもち、これらの領域のバランスを保つことで継続的な成長を可能にしている (Fig. 1A)。このバランスは転写因子 PLETHORA (PLT) タンパク質により決定される。PLT タンパク質は先端側から地上部側に向かって濃度勾配をつくって存在し、濃度が高いところでは幹細胞様の領域に、濃度が中程度のところは細胞分裂が活性化される分裂領域に、濃度が下がるに従って細胞伸長が促進される伸長領域になることが示されているが、濃度勾配形成・維持機構は不明な点が多い。申請者は根端で特異的に発現するペプチドホルモン Root meristem Growth Factor (RGF, Fig. 1B) と、それを直接相互作用する受容体を同定した。RGF 受容体の変異体中では PTL タンパク質の濃度勾配が失われ、RGF の情報伝達経路が PLT タンパク質の濃度勾配を正に制御することを示した (Fig. 1C)。しかし RGF 受容体から PLT タンパク質の濃度勾配の制御に至るまでの情報伝達経路については明らかになっていない。RGF による PLT タンパク質の濃度勾配の制御機構を明らかにすれば、根の継続的な成長メカニズムを解明できるのではないかと考えた。

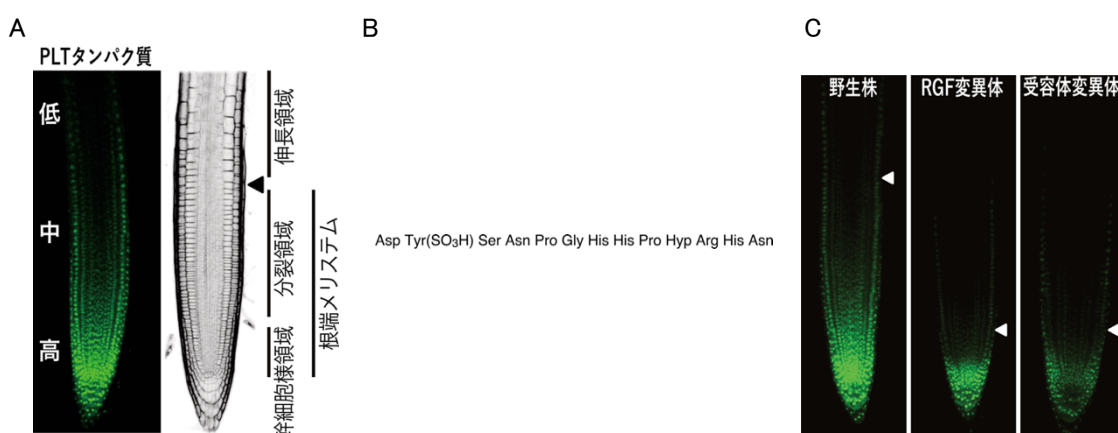


Figure. 1 A、転写因子 PLETHORA の濃度勾配と根端細胞の運命決定、B、RGF の成熟型構造、C、RGF 変異体および RGF 受容体における PLT タンパク質の分布

2. 研究の目的

植物ペプチドホルモン RGF と受容体のペアが、どのような仕組みで PLT タンパク質の濃度勾配を形成、維持し、根の継続的な成長を可能にしているのか明らかにすることを目的とし、研究を遂行した。先行研究より、RGF 添加後約 2 時間で PLT タンパク質量の増加が認められること、また PLT 遺伝子の転写量は変化しないことが示されている。このことは RGF による PLT タンパク質量の制御が、遺伝子の転写を介さない翻訳後レベルで行われることを示唆するものであり、情報伝達解明には変異体スクリーニングなどの遺伝学的解析の適用が困難であると考えられた。そこで、RGF 受容体から PLT タンパク質量の調節を行う経路に存在する因子をターゲットとした、低分子化合物ライブラリーによる化合物スクリーニングを行い、RGF による PLT タンパク質量の制御過程に作用する化合物の同定、および化合物のターゲット因子の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) 化合物スクリーニングによる PLT タンパク質の濃度勾配を回復させる化合物の同定
名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所より譲渡いただいた ITbM 化合物ライブラリー、および理研より譲渡いただいたケミカルライブラリー-NPDepo パイロットライブラリーの 2 種類のケミカルライブラリー計約 16,000 化合物を、GFP 融合 PLT2 (PLT2-GFP) を発現させた RGF 受容体欠損株に投与した。その後蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下で根端の観察を行い、PLT2-GFP の濃度勾配が変化した化合物をピックアップした。

(2) 化合物 A01 および A05 の構造活性相関解析
スクリーニングにより単離した化合物 A01 および A05 について、基本炭素骨格が同様な構造で、かつ側鎖構造にバリエーションを有する化合物を理研より譲渡いただいた。A01 の構造類縁体 21 種類、および A05 の構造類縁体 21 種類を、それぞれ PLT2-GFP を発現させた RGF 受容体欠損株に投与した。その後蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下で、根端における PLT2-GFP の濃度勾配の変化を観察した。

(3) ターゲット因子探索のためのビオチン基導入 A05 の合成と活性評価
スクリーニングにより単離した化合物 A05 のターゲット因子の同定のため、化合物のビオチン化を行った。構造活性相関研究で明らかとなった活性に影響しない側鎖にビオチン基を導入し、PLT2-GFP を発現させた RGF 受容体欠損株に投与し、根端における PLT2-GFP の濃度勾配の変化を観察した。

(4) プルダウン法によるビオチン化 A05 を用いたターゲット探索
活性を維持したままビオチン化 A05 を用いて、A05 と相互作用するターゲット因子の探索を行った。シロイヌナズナ根の抽出液に対してビオチン化 A05 を加えてインキュベートした後、アビジンビースを加えてプルダウンを行った。沈殿画分のプロテオミクス解析を行い、ビオチン化 A05 と相互作用する因子候補を探索した。

4. 研究成果

(1) 化合物スクリーニングによる PLT タンパク質の濃度勾配を回復させる化合物の同定
化合物スクリーニングにより、通常、RGF 受容体欠損株中では失われている PLT2 タンパク質の濃度勾配を回復させる活性をもつ化合物を複数得た。このうち回復活性の強かった化合物 A01 および A05 (Fig. 2A) は、炭素骨格が類似しており、独立のスクリーニングで同定された 2 つの化合物の構造が類似であったことから、A01 および A05 が PLT タンパク質の濃度勾配形成に作用する有力な化合物である。A05 は投与後 2 時間から PLT2 タンパク質の濃度勾配を回復させ、これは RGF を投与した場合の PLT2 タンパク質の濃度勾配変化と同程度の速さであった。また A05 は濃度依存的に PLT2 タンパク質の濃度勾配を回復させた (Fig. 2B)。

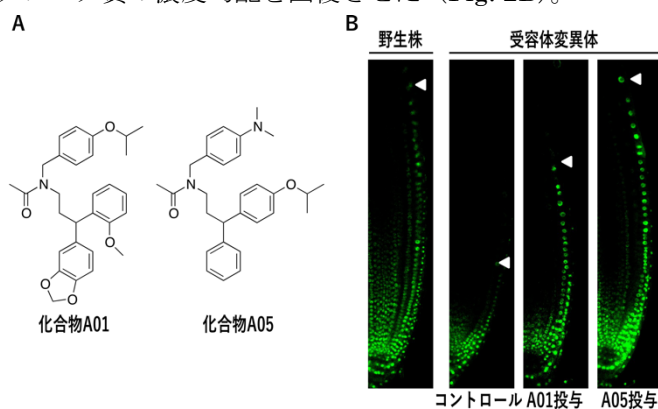


Figure. 2 A、A01 および A05 を投与した場合の RGF 受容体変異体中での PLT タンパク質の分布、B、A01 および A05 を投与した場合の RGF 受容体変異体中での PLT タンパク質の分布

(2) 化合物 A01 および A05 の構造活性相関解析
PLT タンパク質の濃度勾配回復活性を示した類縁体の構造を比較したところ、A01 および A05 双方の化合物中のアミド結合末端の炭素鎖が伸長しても、活性に影響がないことが示された (Fig. 3A-C)。

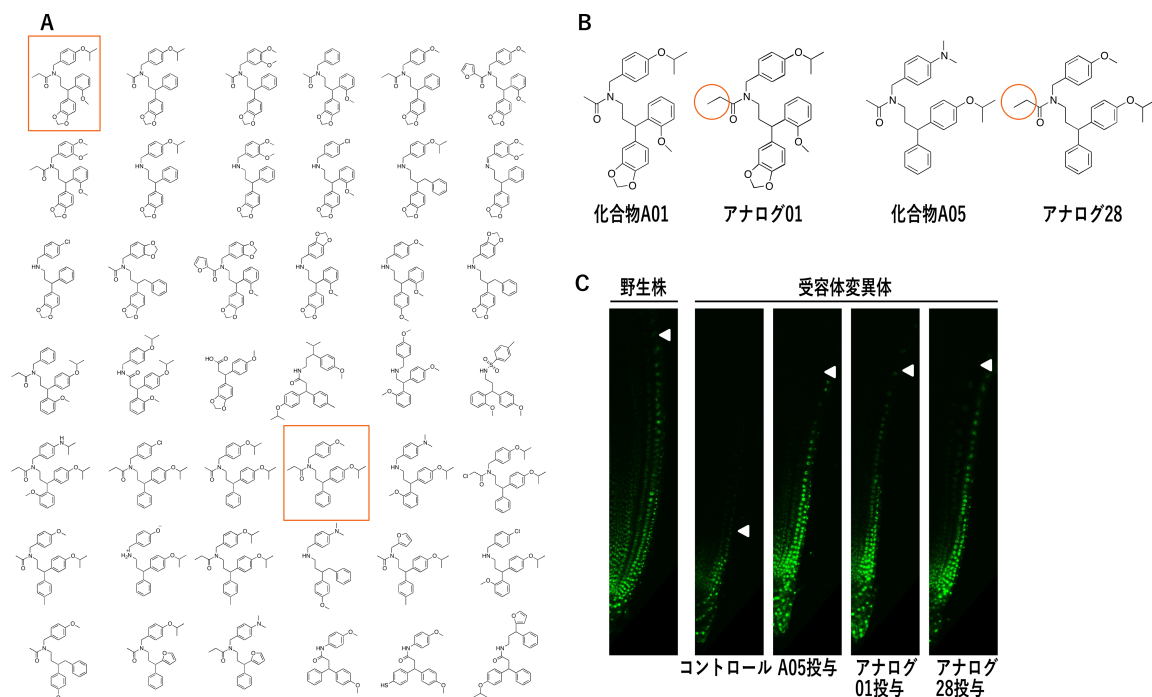


Figure. 3 A、化合物 A01 および A05 の類縁体. 特に活性を示した化合物を赤枠で示す。B、活性を示した類縁体 (アナログ 01 およびアナログ 28) の構造。C、アナログ 01 およびアナログ 28 を投与した場合の RGF 受容体変異体中での PLT タンパク質の分布。

(3) ターゲット因子探索のためのビオチン基導入 A05 の合成と活性評価
炭素鎖の伸長が活性に影響がないことが示された、化合物 A05 のアミド結合末端の側鎖をターゲットとし、スペーサー分子を挟んだビオチン基を導入したビオチン化 A05 を合成した (Fig. 4A)。合成したビオチン化 A05 を GFP 融合 PLT2 発現 RGF 受容体欠損株に投与し、根端を観察した。その結果、ビオチン化 A05 も PLT2 タンパク質の濃度勾配を回復させる活性を維持していた (Fig. 4B)。

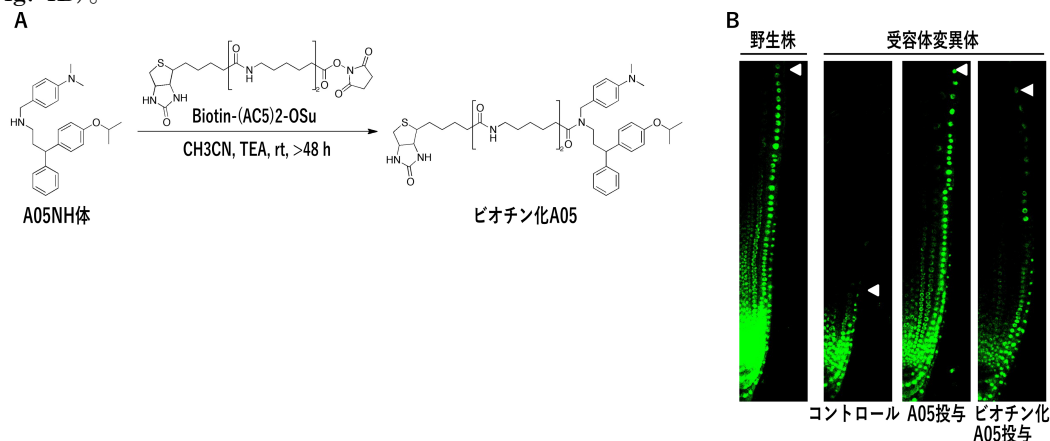


Figure. 4 A、ビオチン化 A05 の合成スキーム。B、ビオチン化 A05 を投与した場合の RGF 受容体変異体中での PLT タンパク質の分布。

(4) ビオチン化 A05 を用いたターゲット探索
ビオチン化 A05 によるプルダウン解析の結果、十数種のタンパク質が同定され、化合物 A05 のターゲット候補である可能性が示された。今後、より詳細な結合解析や因子の変異体の解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinohara Hidefumi	4. 巻 142
2. 論文標題 Root meristem growth factor RGF, a sulfated peptide hormone in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170556 ~ 170556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2021.170556	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 Shinohara Hidefumi、Matsubayashi Yoshikatsu	4. 巻 78
2. 論文標題 Identification of Receptors of Plant Peptide Hormones by Photoaffinity Labeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 713 ~ 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5059/yukigoseikyokaishi.78.713	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 Shinohara Hidefumi、Yasue Naoko、Onuki Tetsuo、Kondoh Yasumitsu、Yoshida Minoru、Matsubayashi Yoshikatsu	4. 巻 2
2. 論文標題 Screening and identification of a non-peptide antagonist for the peptide hormone receptor in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0307-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原秀文、林陽子、桑田啓子、山岡尚平、松林嘉克
2. 発表標題 葉状体の分岐を制御するゼニゴケペプチドホルモン - 受容体ペアの同定
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原秀文
2. 発表標題 植物ペプチドホルモンの受容体を見つけ出す
3. 学会等名 応用化学セミナーミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原秀文, 安江奈緒子, 大貫哲男, 近藤恭光, 吉田稔, 松林嘉克
2. 発表標題 ペプチドホルモン受容体に対する非ペプチド性アンタゴニストの創成
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島 健、佐藤 ちひろ、門松 健治、加藤 晃一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 306
3. 書名 糖鎖生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井県立大学 生物資源学部 分子生物学研究領域 植物分子機能学分野 篠原グループ https://www.s.fpu.ac.jp/shino/index/ 名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻 細胞間シグナル研究グループ https://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/index.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------