

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02509

研究課題名（和文）新規鉄欠乏応答調節短鎖ペプチドFEP1を起点とした植物鉄恒常性制御機構の解明

研究課題名（英文）Dissection of iron deficiency response involving novel short peptide FEP1.

研究代表者

平山 隆志（Hirayama, Takashi）

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：10228819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：植物は土壌から生物にとって必須の鉄を効率よく吸収できるが、ヒトを含め多くの生物は生存維持に必要な鉄を植物に依存している。植物の鉄ホメオスタシスは多くの研究により、鉄輸送担体やその遺伝子発現を担う転写因子などが同定され理解が進んだが、組織間の鉄輸送や情報交換については未だ不明な点が多い。本課題研究では、独自に発見した短鎖ペプチドFEP1の鉄欠乏応答における機能の解明を目的に、その機能欠損変異株、異所発現形質転換体、維管束植物祖先であるシダ植物でのFEP1様遺伝子の解析を通して、FEP1は維管束組織で重要な役割を持つこと、細胞間を移動して機能する可能性があること、などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FEP/IMAペプチドの鉄欠乏応答制御における分子機構の理解は進んだが、組織間鉄輸送における生理機能、さらにその機能における短鎖ペプチドの必然性については、不明な点が多い。本課題研究では、fep1変異の詳細な解析からFEP1が細胞・組織間鉄輸送において重要な役割を持つことを明示した。この知見は、鉄応答機構の理解を推進し、また農作物の鉄吸収の制御を可能にする技術の開発などの応用展開も期待される。また、ミトコンドリアmRNAのpolyA付加制御に関わる因子の変異ags2を同定した。AGS2の研究によりミトコンドリア機能制御に関する多くの知見の獲得が期待される。

研究成果の概要（英文）：Plants efficiently absorb essential iron from the soil, a critical resource on which many organisms, including humans, depend for survival. While significant progress has been made in understanding plant iron homeostasis, identifying iron transporters and transcription factors regulating their gene expression, there remain many unknowns regarding inter-tissue iron transport and communication. This research project aims to elucidate the function of a novel short peptide, FEP1, in iron deficiency response. Through the analysis of FEP1 loss-of-function mutants, ectopic expression transformants, and the study of FEP1-like genes in ferns, the ancestors of vascular plants, we have demonstrated that FEP1 plays an important role in vascular tissues and may function by moving between cells.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：鉄欠乏応答 短鎖ペプチド シロイヌナズナ 網羅的遺伝子発現解析 シダ植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は生物に必須の元素で、ヘムや鉄硫黄クラスターとして膨大な数の酸化還元反応、酸素の捕捉・運搬などに利用されている。ヒトを含め従属栄養生物は鉄の摂取を主に土中から鉄を吸収できる植物に依存している。鉄は土壌中に豊富に含まれるが、中性またはアルカリ性土壌では生物に利用困難な不溶性の三価鉄となる。世界の耕地面積の約 30%を占めるアルカリ土壌では鉄欠乏が主要な生育阻害要因で、作物の生産性や品質に大きな影響を及ぼしている。そのため植物の鉄欠乏応答機構の理解とその知見を活用した最適化手法の確立が求められている。それまでの研究から、植物の鉄の吸収機構には Strategy I と Strategy II があり、双子葉植物は前者を単子葉植物は後者を、またイネは例外的に二つの機構を併せ持つ。Strategy I 型植物は、不溶性三価鉄を根の細胞膜にある還元酵素 (FR2) で二価鉄に還元し二価鉄輸送体 (IRT1) により取り込む。Strategy II 型植物は、ムギネ酸などのキレート物質を根から放出し、鉄-錯体輸送体 (YS1) により植物体内に取り込む。取り込まれた鉄は、クエン酸やニコチアミンなどの錯体の形で細胞・組織間を輸送される。鉄は必須元素だがその過剰は有毒なため、鉄吸収・輸送に関わる因子は土壌や組織の鉄含有量に沿って厳密に制御される必要がある。鉄欠乏状況のシロイヌナズナでは、転写因子 FIT と bHLH38, 39 などの複合体が IRT1 や FR2 など鉄吸収や輸送に関わる遺伝子群の発現を増加する一方、E3 リガーゼの BTS が ILR3 や bHLH115 などの転写因子の分解を促すことで鉄吸収輸送関連遺伝子群の発現を抑制し鉄の恒常性を保つと考えられている。これまでの研究から植物の鉄吸収単体の働きやそれらの遺伝子発現制御ネットワークの理解は進んできたが、鉄の過不足を認識する分子メカニズムと組織間での鉄欠乏に関する情報交換機構などの実態は不明である。これらの理解は作物の鉄吸収能の改善や、鉄分が豊富な作物の作出に必須な知見である。

2. 研究の目的

申請者らは、新規鉄欠乏応答関連因子 FEP1 を同定し世界で初めて報告した。FEP1 遺伝子は鉄欠乏に応答し活性化され、47 残基のペプチドをコードする。植物細胞内での FEP1 の発現は、bHLH38, 39 など鉄欠乏応答主要転写因子群の遺伝子発現を誘導することから、鉄の認識に近い位置で機能している可能性がある。また、ゲノム編集技術で作成した *fep1* 欠損変異株の解析や FEP1 とその下流遺伝子の発現解析から、FEP1 は細胞・組織間の遠距離情報伝達を含む個体全体の鉄ホメオスタシスに関わることが示されている。近年、短鎖ペプチドが形態形成や環境応答における遠距離情報交換で重要な役割を持つことが明らかになっているが、これまで鉄欠乏応答に関わる短鎖ペプチドは見つかっていなかった。また、FEP1 のような分泌シグナルがない短鎖ペプチドは、研究の歴史が浅くほとんどその作用機作は未解明である。FEP1 の研究から、未解明の個体レベルの鉄応答統御機構解明への突破口が開かれると期待できる。

3. 研究の方法

(1) FEP1 結合因子候補の特性解析

FEP1 の機能を明らかにする目的で、相互作用因子の探索を試みた。GFP 遺伝子の挿入場所により活性のある FEP1-GFP 結合遺伝子と不活性の FEP1-GFP 結合遺伝子それぞれを、*fep1-1* に導入した形質転換体を作成した。これらを鉄欠乏状況で栽培し GFP 抗体を用いた共沈実験を行い比較することで FEP1 結合因子候補を複数得た。これらの結合因子候補と FEP1 との結合様式を、酵母 Y2H 実験により検証し、次に alpha-screen 実験により詳細に結合様式を分析することを計画した。また、鉄欠乏応答で機能するとされている因子 (bHLH39, FIT, BTS, bHLH115 など) について FEP1 との相互作用を並行して調査することにした。確定された FEP1 結合因子については、その分子機能を配列情報から推定するとともに、プロトプラスト、酵母菌を用いた分子生物学的、生化学的解析、FEP1 結合因子の破壊株を取得し機能解析を行うこととした。これらの解析から、FEP1 の分子機能の解明を目指した。

(2) 鉄欠乏応答変異株および、FEP1 応答変異株の分離・解析

恒常的に鉄欠乏応答を示す独自分離した変異株 *ahg2-1* に、bHLH39 プロモーターを利用したレポーター遺伝子を導入した形質転換体を基盤にレポーター遺伝子の発現が低下した変異株を探索し、2 つの変異株候補を得ていた。これらの変異株の原因遺伝子をゲノム配列解析によって特定し、その遺伝子の発現分析、タンパク質の機能解析、遺伝子の破壊株を用いた生理学的な実験や分子生物学的な実験などを行う。また、遺伝子産物の細胞内局在、FEP1 を含めた既知の因子との相互作用について調査する。これらの実験の遂行により、鉄欠乏の認識も含め FEP1 遺伝子の制御機構および FEP1 の作用機作の解明・理解につながる関連重要因子の同定を目指した。

(3) *fep1* 変異株および誘導性 FEP1 形質転換株の網羅的転写物解析

fep1 機能欠損変異株およびエストロゲン誘導性 FEP1 発現株を対象を用いて、鉄の有無の条件下で地上部と根で網羅的転写物解析を行い *fep1* 変異や一過的 FEP1 の発現がゲノム上遺伝子の発現にどのように影響するかを明らかにすることを目指した。共発現解析などのデータ解析により、FEP1 が関わる新規鉄輸送経路の発見を目指した。

(4) FEP1 ペプチドの移動解析

fep1 変異株は地上部でのみ鉄欠乏が表れるが、根から地上部への鉄輸送に欠陥を持つ *frd3* 変異株とは異なる表現型を示す。この結果は、*fep1* 変異株では地上部の鉄欠乏情報が根に伝えられない、つまり FEP1 が鉄欠乏の遠距離情報伝達を含む個体レベルの鉄ホメオスタシスに関わるこ

とを示唆している。そこで、FT などの様々な組織特異的発現遺伝子のプロモータに接続した活性型 FEP1-GFP 遺伝子を *sep1* 変異株に導入し、相補能を調査することで、FEP1 が組織または細胞間を移動するかどうかを検証する。

(5) FEP1 類似遺伝子の系統進化解析

網羅的転写物解析等の結果から、FEP1 は維管束組織で重要な役割を担っている可能性が示唆された。そこで、植物の進化と FEP1 類似遺伝子の出現を検討することで FEP1 の機能について知見が得られると考え、公的データベースを対象に FEP1 類似遺伝子の詳細な探索を行ったところ、維管束組織を持たないコケでは見つからなかったが維管束組織を持つシダ植物には存在することがわかった。そこで、シダ植物において、どのような鉄欠乏応答遺伝子制御ネットワークが構築されているかを調査するために、網羅的転写物解析を行うことにした。

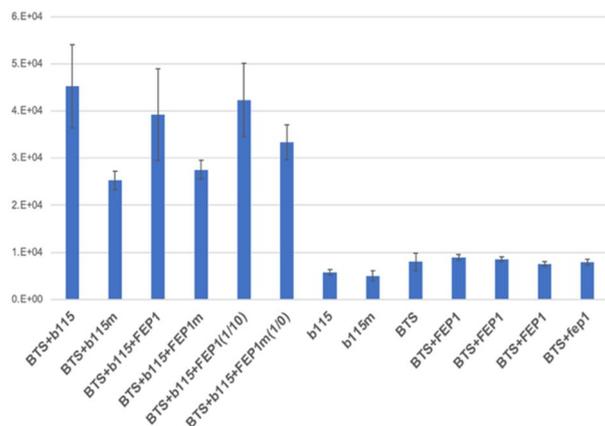
4. 研究成果

(1) FEP1 結合因子候補の特性解析

短鎖ペプチドは、通常他のタンパク質と結合しその分子情報を伝達し機能する。そこで本研究では FEP1 と相互作用するタンパク質を同定し解析する。*sep1* 変異を相補する活性型の FEP1-GFP 結合遺伝子と GFP の結合場所により不活性となった FEP1-GFP 結合遺伝子を構築し、これらの形質転換体を作成した。これらを鉄欠乏状態で栽培し、GFP 抗体を用いた共沈実験を行い比較することで FEP1 結合因子候補を複数得た。これらの結合因子候補と FEP1 との結合様式を、酵母 Y2H 実験で調査したが、いずれも結合は確認できず、相互作用は非常に弱いと考えられた。

一方、2021 年に Kim らにより、FEP1/IMA3 は BTS と結合し BTS による bHLH115 等の転写因子の分解を阻害することが報告された。そこで、これらの結合活性を Alpha-Screen により調査した。その結果、BTS は bHLH115 と結合すること、その結合が bHLH115 の C 末端の配列の変異で低下することが確認できた。しかし、BTS と FEP1 との結合、BTS と bHLH115 の結合の FEP1 の阻害は確認できなかった(右図)。酵母 Y2H 実験も Alpha-Screen 実験も人工的環境での分析なので、その結果の差についての説明はいくらでも可能であるが、Kim 等によって提唱された分子機構には検証の余地が十分にあると考えられた。

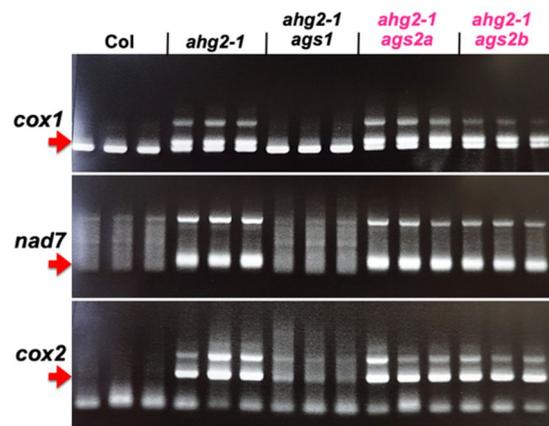
Kim が提唱するモデルに関して、後述するように *sep1-1* の詳細な表現型や網羅的遺伝子発現プロファイルも矛盾すると思われる結果が得られた。そこで、BTS 結合に必要と言われている FEP1 の C 末端に変異を持つ *sep1A47V* 遺伝子を *sep1-1* 変異株に導入し、相補できるかどうかを検討した。その結果、*sep1A47V* は *sep1-1* 変異の恒常的鉄欠乏の表現型を相補できないことが判明した。つまり、Kim らのモデルは少なくとも部分的には正しいことが裏付けられた。



図：AlphaScreenによるFEP1, BTS, bHLH115の相互作用実験
b115: bHLH115, b115m: bHLH115Cter変異, FEP1m: FEP1Cter変異,
sep1: ネガティブコントロール, 1/10: 1/10希釈量を使用。
n=3, error barはSD.

(2) 鉄欠乏応答変異株および、FEP1 応答変異株の分離・解析

多様なストレス関連の表現型を持つ *ahg2* 変異を背景に、鉄欠乏応答プロモーターを利用したレポーター遺伝子を指標にした変異株探索により、2系統の変異を獲得した。これらは、同じ変異処理系統群に属していたが、複数の鉄欠乏応答遺伝子の発現解析から、異なる表現型を確認したため、異なる変異と考えられた。それぞれバッククロス後の F3 系統群を対象に、変異型と野生型をそれぞれ複数個体、全ゲノム配列を解読し、変異遺伝子を特定することができた。その結果、異なると思われた変異は、同じ変異であることが判明した。原因遺伝子は、驚くべきことに SUV3 と呼ばれるミトコンドリアに局在する RNA helicase と類似のタンパク質をコードしていた。ヒトや酵母の SUV3 はミトコンドリア mRNA の品質管理に関わる重要因子として認知されている。*ahg2* 変異は、ミトコンドリア mRNA の poly(A) 除去を担う因子で、これも mRNA の品質管理に関わると考えられており、得られた変異は、鉄欠乏応答経路の変異ではなくその上流にあるミトコ



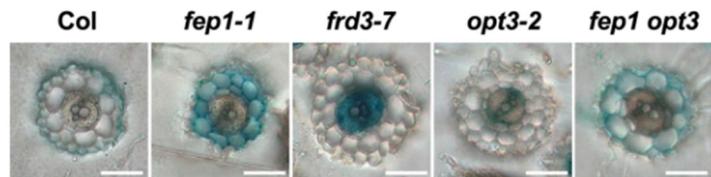
ミトコンドリア mRNA の poly(A) 付加状況：矢印のバンドが poly(A) 付加を示す。*ahg2* で認められるバンドは *ags1* の共存により消失するが、*ags2* ではそれが見られない。

ンドリアの機能制御に関わる因子であると考えられ、*ags2* (*ahg2 suppressor 2*)と命名した。

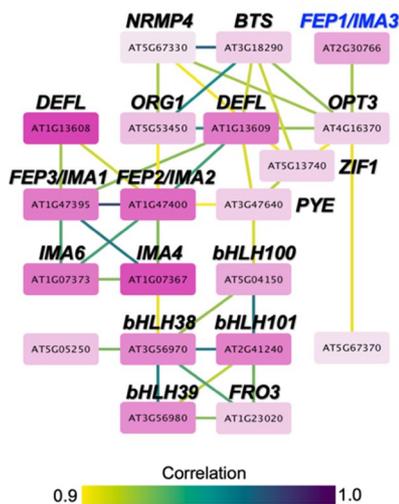
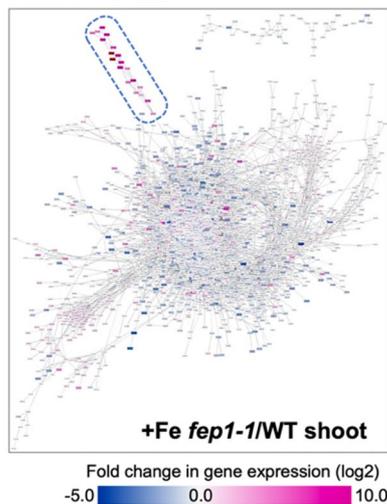
ags2 が得られたことは驚きであった。その理由は、*ahg2* の抑制変異を探索した以前の研究で多くの候補変異が獲得したが、解析できた 10 個ほどの変異はすべて *AGS1* と名付けた遺伝子の変異であったので、他の遺伝子の変異は得られないと考えていた。今回の研究でも、まず *AGS1* 遺伝子座を調査し *AGS1* の変異ではないことを確認していた。さらに興味深いことに、*ags2* は *ahg2* の表現型の原因と考えられていた polyA 鎖を持つミトコンドリア mRNA の蓄積を抑制しないことが判明した (*ags1* はこれをほぼ完全に抑制する)。これらの結果から *AGS2* は、polyA 付加 mRNA とミトコンドリア機能または細胞ストレス応答との関係の間で機能しており、*AGS2* の解析により今まで未解明であった植物ミトコンドリア mRNA の品質管理機構の解明の糸口を提供すると期待される。現在、この変異株について新たな研究プロジェクトを推進中である。

(3) *fep1* 変異株および誘導性 *FEP1* 形質転換株の網羅的転写物解析

個体または組織レベルの *FEP1* の機能の解明に向けて、*FEP1* の機能欠損または機能増加がどのような影響を及ぼすかを網羅的転写物解析により明らかにすることを試みた。機能欠損として *fep1-1* 変異株、機能増加としてエストロゲン処理により *FEP1* 遺伝子を誘導発現する形質転換系統を用い、鉄環境への応答を含め、解析を行った。その結果、*fep1-1* 変異では、興味深いことに鉄欠乏に反応して発現する遺伝子群の一部が活性化されていることが、わかった。地上部と根での比較、機能欠損変異と遺伝子誘導系統との比較など詳細なデータ解析により、*fep1-1* 変異では維管束組織で特異的に鉄欠乏状態になっていることが判明し、*FEP1* は維管束における鉄環境の維持に関与していることが示された。また、意外にも、*fep1-1* 変異では維管束組織が鉄欠乏状態になっているにも関わらず鉄の吸収に関わる *IRT1* など遺伝子が発現されていないこと、鉄が表皮からは吸収されているにもかかわらず内皮の外側に蓄積されるこれまで知られていない特異的な表現型を持つことが判明した。さらに、*FEP1* の発現組織と機能すると予測される組織の違いも確定された。これらの結果から、*FEP1* は細胞間または組織間の情報交換に関わっていることが示唆された。これらの結果は、Okada et al, Plant Cell Env. 2022, DOI10.1111/pce.14424 に報告された。



図： *fep1* および鉄輸送異常変異株の主根における鉄の蓄積状況
Perl's法による鉄の組織染色。主根の横断面切片画像。Colは野生株。バーは50 μmを示す。



図： *FEP1* 遺伝子ネットワーク

左図：網羅的遺伝子発現解析結果から、*fep1-1* により影響を受ける遺伝子のネットワーク図。点線で囲われ部分に変異株で得意的に影響を受ける遺伝子ネットワーク。右図：*FEP1* 遺伝子ネットワークの拡大図。鉄欠乏応答遺伝子が多く含まれるが、実際に鉄吸収に関わる *IRT1*, *FRO2* は含まれていない。

(4) *FEP1* ペプチドの移動解析

個体レベルの鉄恒常性には、鉄を多く必要とする葉と鉄を土壌から吸収する組織間の情報交換が必要と考えられる。植物における組織間の情報交換には植物ホルモンやペプチドホルモンが一般的であることから、*FEP1* や類似ペプチドはその有力候補と考えられている。一方で、*FEP1* にはペプチドホルモンに通常見られる分泌シグナルが無い為、ペプチドホルモンとしての機能については疑問がある。そこで、*FEP1* の組織間や細胞間の移動を補足することを試みた。まず、活性がある GFP 結合 *FEP1* が発現場所とは異なる場所で見いだせるかを検討した。その結果、*FEP1* 遺伝子は、師管付近の播細胞と思われる組織で発現が認められるが、タンパク質レベルでは内皮組織でも検出された。内皮組織では *FEP1* により制御を受ける *bHLH39* 遺伝子の発現が認められ、*FEP1* の機能の面からも矛盾がない。また、上述のように、*fep1-1* 変異では内皮の外側で鉄の吸収が滞っていることを考慮にいれると、内皮における *FEP1* の機能が鉄吸収と輸送において重要な役割を担っていると考えられる。次に、様々な組織特異的なプロモーターに *FEP1*-GFP を結合し、それが *fep1-1* の表現型 (ここでは根での *FRO2*, *IRT1* の発現) を相補するかどうかを調査した。葉組織特異的なプロモーター (*CAB3*, *FT*) を用いた場合は、相補は認められなかった。また、師管

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okada Satoshi, Lei Gui J., Yamaji Naoki, Huang Sheng, Ma Jian F., Mochida Keiichi, Hirayama Takashi	4. 巻 45
2. 論文標題 FE UPTAKE INDUCING PEPTIDE1 maintains Fe translocation by controlling Fe deficiency response genes in the vascular tissue of Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 3322 ~ 3337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14424	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 該当する

1. 著者名 Hirayama Takashi, Mochida Keiichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Plant Hormonomics: A Key Tool for Deep Physiological Phenotyping to Improve Crop Productivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1826 ~ 1839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac067	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 -

1. 著者名 Takashi Hirayama	4. 巻 22
2. 論文標題 PARN-like Proteins Regulate Gene Expression in Land Plant Mitochondria by Modulating mRNA Polyadenylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910776	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山隆志, 金俊植, 持田恵一
2. 発表標題 ミトコンドリアにおけるポリA 付加 mRNA の蓄積の影響を抑制するシロイヌナズナの変異について
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aleksandr Sorokin, Takashi Hirayama
2. 発表標題 Diversity of FEP/IMA genes across higher plants.
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruko Kaita, June-Sik Kim, Akihito Mamiya, Munetaka Sugiyama, Keiichi Mochida, Takashi Hirayama
2. 発表標題 Analysis of AGS2 RNA helicase implicated in the post-transcriptional regulation of mitochondria mRNA
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学 資源植物科学研究所 環境応答機構研究グループ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/ers/index-j.html 岡山大学資源植物科学研究所環境応答機構研究グループ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/ers/index-j.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
研究分担者	馬 建鋒 (Ma Kenpou) (80260389)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	横正 健剛 (Yokosho Kengo) (50790622)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	削除：2021年8月20日

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