

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19074

研究課題名（和文）化学・ゲノム科学的手法による植物の新規ペプチドシグナリング解明

研究課題名（英文）Development of Genomics and Chemical approach for the novel plant peptide signaling

研究代表者

田畑 亮（Tabata, Ryo）

名古屋大学・生命農学研究科・特任講師

研究者番号：30712294

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、化学・ゲノム科学的手法によって、新規のペプチドシグナリング解明を目指した。まず、トマトの維管束液を用いたペプチドミクス解析により、器官間移動性ペプチド候補分子として、Solcy01g109900.2.1を含む硫酸化ペプチドの同定に成功した。また、シロイヌナズナのDNA修復因子の変異体背景でゲノム編集を用いることで一気に多重破壊株を作出する方法を確立し、低酸素ストレス応答に關与する新たなシステインリッチペプチドを見出した。今後は、微小接ぎ木解析やイメージング解析によって、これらのペプチドの器官間移動性を検証するとともに、ストレス応答におけるペプチドシグナリング解明を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の新規ペプチド分子の発見は、植物の細胞間・器官間シグナルの解明へ向けた手がかりであり、環境変動に適應する植物の巧みな生存戦略を理解するうえで非常に重要である。また、ストレス応答を制御するペプチド分子を活用することができれば、分解され無害なアミノ酸に還るペプチドを利用して、ストレス耐性を強化することが期待され、効率的な作物栽培のための基盤技術創成に繋がると考えられる。また、植物の根と葉のコミュニケーションを制御可能なペプチド分子を見出し、活用することができれば、「葉」にペプチドを塗布することで「根」でのストレス応答を向上させるなど、新しい栽培制御技術の創出にもつなげることができる。

研究成果の概要（英文）：Small secreted peptides are important for plant development and environmental stress response. It is estimated that more than 1000 potential secreted peptides exist in Arabidopsis genome, however, so far only very few have been functionally characterized because of the difficulty in elucidating their mature peptide structures and gene redundancy. In this study, I identified the tomato tyrosine-sulfated peptide through a xylem sap peptidomics approach. In addition, I also performed genomics approach (CRISPR/Cas9 genome-editing technique in the ku70 or ligase4-deficient mutant background) and found novel cysteine-rich peptides are essential for Hypoxic stress Response. These analyses may pave the way for understanding the novel plant peptide signaling.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：植物 ペプチド 短鎖翻訳後修飾型ペプチド システインリッチペプチド 環境ストレス応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、植物は、ペプチド分子による器官間シグナル伝達機構を介して、個体のホメオスタシスを維持していることが明らかになりつつある。しかしながら、ゲノム情報より、植物は約 1000 個の分泌型ペプチド遺伝子を保持している事が予想されているが、機能解明された因子は全体のわずか数%にも満たない。これは、植物の生理活性ペプチドが、動物のように明確なプロセッシング機構が明らかにされていないため、「実際に成熟型構造を決定しなければ配列から機能的な構造を推測することが難しい点」や「遺伝子クラスターによる重複性の問題によって機能解析が難しい点」などに起因する。植物が持つ機能未知の分泌型ペプチドの中には、環境ストレス応答における器官間シグナル伝達に必須の因子が、さらに多数存在しているのではないかと期待されている。

### 2. 研究の目的

脳や神経系に相当する器官を持たない植物は、維管束を介して「根と葉」の間の器官間コミュニケーションの仕組みを発達させ、個体を統御するシステムを進化させてきた。近年、植物は低分子化合物(オーキシンやサイトカイニン等)のみならず、ペプチド分子による器官間シグナル伝達機構を介して個体のホメオスタシスを維持している事が明らかになってきた。しかしながら、ゲノム情報より、植物は約 1000 個の分泌型ペプチド遺伝子を保持している事が予想されているが、機能解明された因子は全体のわずか数%にも満たない。植物が持つ機能未知の分泌型ペプチドの中には、環境ストレス応答における器官間シグナル伝達に必須の因子が、さらに多数存在しているのではないかと期待されている。

そこで本研究では、環境ストレスに応答した器官間シグナル伝達機構と、それを支える器官間移動性のペプチド分子に着目して、化学的・ゲノム科学の研究アプローチによって、ストレス応答に必須の新規ペプチド分子探索に挑戦する。そして、ペプチド分子の振る舞いを理解することで、器官間コミュニケーションを介した新しい生命現象の仕組み解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 維管束液を用いた新規の器官間移動性分泌型ペプチドの探索：我々の研究成果から、植物ではペプチドが維管束内を移動して、窒素欠乏などストレス応答を制御していることが明らかになってきた (Tabata et al, *Science* 2014 など)。そこで、様々なストレス条件下で生育させたトマトより採集した維管束液からタンパク質抽出を行い、nano LC-MS によるペプチドミクス解析を行うことで、維管束液中に含まれる生理活性物質であるペプチド分子を網羅的に直接同定する。

(2) 分泌ペプチドの多重破壊株作成によるストレス応答に必須ペプチド探索：植物のゲノムにおいて、染色体上の 1 箇所にタンデムリピートを形成することが多く、遺伝的重複の問題によって機能解析を難しくしている。そこで、申請者が開発したシロイヌナズナを用いた DNA 修復因子の変異体背景で CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いる手法 (Tandem cluster 破壊法) によって、ゲノムに大きな欠失を引き起こすことで、一気に多重破壊株の作成を行う。

植物の環境ストレス応答に必須のペプチド分子が同定された際には、その成熟型構造を元に、ペプチドを化学合成していく。化学合成ペプチドを処理し、ストレス耐性が付与されるか検証して、器官間シグナルへの寄与を明らかにする。また、Micro-Grafting デバイスによる接ぎ木実験によって候補ペプチド因子の器官間移動性を検証する。これらの解析から、植物ペプチドシグナリングの発見を目指す。

### 4. 研究成果

まず、ペプチドミクス解析系を確立させるために、トマト水耕培養の生育環境から、大量の維管束(道管)液を採集して、オルトクロロフェノール抽出法によりタンパク質抽出をおこない、アセトン沈殿をかけた後ゲル濾過カラムで分画して nano LC-MS 解析する事で分泌ペプチドを探索した。その結果、器官間移動性ペプチド候補分子として、トマト Solcy01g109900.2.1 を含む複数の硫酸化ペプチドの同定に成功した。

シロイヌナズナを用いた DNA 修復因子の変異体背景で CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いる手法 (Tandem cluster 破壊法) によって、鉄欠乏で発現誘導されるシステインリッチペプチドの三重破壊株の作成に成功した。野生型と比較して、システインリッチペプチド三重破壊体の地上部では、鉄欠乏応答性転写因子の発現量が変動していた。しかしシステインリッチペプチド三重破壊体では、Split-root 鉄欠乏処理実験における鉄吸収関連遺伝子の相補的な発現制御は正常にみられた。また、ICP-MS 解析より、システインリッチペプチド三重破壊体の地上部の鉄含量は野生型と差が見られなかった。一方で、システインリッチペプチド三重破壊体で mRNA 発現量が低下している遺伝子群について GO 解析を実施したところ「低酸素ストレス」に関与する GO term がエンリッチされていた。実際に、三重破壊体では冠水実験による生存率の低下が観察された。今後は、これらのシステインリッチペプチドの解析を通して、「鉄欠乏ストレス」と「低

酸素ストレス」の関連性を明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Negi Juntaro, Obata Tomoki, Nishimura Sakura, Song Boseok, Yamagaki Sho, Ono Yuhei, Okabe Makoto, Hoshino Natsumi, Fukatsu Kohei, Tabata Ryo, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Yamada Masashi, Hasebe Mitsuyasu, Sawa Shinichiro, Kinoshita Toshinori, Nishida Ikuo, Iba Koh	4. 巻 115
2. 論文標題 PECT1, a rate limiting enzyme in phosphatidylethanolamine biosynthesis, is involved in the regulation of stomatal movement in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 563-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.16245	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 Huang Chaokun, Kurotani Ken-ichi, Tabata Ryo, Mitsuda Nobutaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Notaguchi Michitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotiana benthamiana XYLEM CYSTEINE PROTEASE genes facilitate tracheary element formation in interfamily grafting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 uhad072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhad072	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 Sotta Naoyuki, Sakamoto Takuya, Kamiya Takehiro, Tabata Ryo, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Yamada Masashi, Hasebe Mitsuyasu, Sawa Shinichiro, Fujiwara Toru	4. 巻 14
2. 論文標題 NAC103 mutation alleviates DNA damage in an Arabidopsis thaliana mutant sensitive to excess boron	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1099816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1099816	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 Kurotani Ken-ichi, Kawakatsu Yaichi, Kikkawa Masahiro, Tabata Ryo, Kurihara Daisuke, Honda Hiroyuki, Shimizu Kazunori, Notaguchi Michitaka	4. 巻 135
2. 論文標題 Analysis of plasmodesmata permeability using cultured tobacco BY-2 cells entrapped in microfluidic chips	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 693-701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01406-8	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 Ryo Tabata, Takehiro Kamiya, Shunpei Imoto, Hana Tamura, Michika Tabata, Tasuku Hirayama, Hironaka Tsukagoshi, Keitaro Tanoi, Takamasa Suzuki, Takushi Hachiya, Hitoshi Sakakibara	4. 巻 63
2. 論文標題 Systemic Regulation of Iron Acquisition by Arabidopsis in Environments with Heterogeneous Iron Distributions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 842-854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac049	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 Kazunori Shimizu, Yaichi Kawakatsu, Ken-ichi Kurotani, Masahiro Kikkawa, Ryo Tabata, Daisuke Kurihara, Hiroyuki Honda, Michitaka Notaguchi	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of microfluidic chip for entrapping tobacco BY-2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0266982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0266982	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 Misato Kawai, Ryo Tabata, Miwa Ohashi, Haruno Honda, Takehiro Kamiya, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Shunsuke Oishi, Satoru Okamoto, Takushi Hachiya, Hitoshi Sakakibara	4. 巻 188
2. 論文標題 Regulation of ammonium acquisition and use in <i>Oryza longistaminata</i> ramets under nitrogen source heterogeneity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2364-2376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiac025	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8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Huang Chaokun, Kurotani Ken-ichi, Tabata Ryo, Mitsuda Nobutaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Notaguchi Michitaka
2. 発表標題 Understanding the role of de novo tracheary elements in <i>Nicotiana</i> interfamily grafting
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田畑亮、神谷岳洋、井本駿平、木羽隆敏、榊原均
2. 発表標題 シロイヌナズナIMA/FEPを介した器官間シグナルによる鉄吸収制御
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田畑亮
2. 発表標題 植物の器官間シグナル伝達を介した鉄吸収制御
3. 学会等名 第255回遺伝子機能解析部門セミナー 島根大学（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田畑亮
2. 発表標題 シロイヌナズナ器官間シグナリングを介した「鉄」吸収制御
3. 学会等名 植物の栄養研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田畑亮、井本駿平、田村花、神谷岳洋、木羽隆敏、榊原均
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける器官間シグナル伝達を介した鉄吸収制御
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chaokun Huang, Michitaka Notaguchi, Kenichi Kurotani, Yaichi Kawakatsu, Ryo Tabata
2. 発表標題 Regeneration of tracheary elements facilitate scion growth upon N. benthamiana interfamily grafting
3. 学会等名 第85回 日本植物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒谷賢一, 田畑亮, 川勝弥一, 杉田亮平, 岡安浩次, 田野井慶太郎, 野田口理孝
2. 発表標題 接木後の組織修復におけるオートファジー誘導の発見
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chaokun Huang, Kenichi Kurotani, Ryo Tabata, Michitaka Notaguchi
2. 発表標題 Xylem formation enhances scion growth of Nicotiana interfamily grafting
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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