

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770056

研究課題名（和文） 乾燥ストレスシグナルを制御する低分子ペプチドの解析

研究課題名（英文） Analysis of functional small peptide regulating drought stress signaling

研究代表者

高橋 史憲 (TAKAHASHI FUMINORI)

独立行政法人理化学研究所・バイオマス研究基盤チーム・研究員

研究者番号：00462698

研究成果の概要（和文）：

本研究課題で、我々は浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出される低分子ペプチドを同定することに成功した。この候補ペプチドは、根や葉の維管束柔組織で発現している。また形質転換植物体を用いた解析から、候補ペプチドは乾燥ストレスで発現上昇する NCED3 の発現を抑制し、気孔の閉鎖や乾燥ストレスに対する感受性を制御する。以上の結果は、乾燥ストレスシグナルを制御する低分子ペプチドを同定しただけでなく、ストレスシグナルを組織間で伝達する移動性シグナル伝達経路の存在を発見した成果でもある。

研究成果の概要（英文）：

We isolated functional peptide released outside the cell under drought stress. This peptide localizes vascular parenchyma tissue, and regulates the expression of NCED3. This biological activity leads both the stomatal closure and enhance of stress tolerant toward drought stress condition. These results indicate this peptide regulates early sensing of environmental stress, and shed the light on the long distance signaling transfer remote tissue under stress condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、植物ホルモン、生物活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

我々は植物の環境応答機構とシグナル伝達に着目した研究を行っている。乾燥ストレスで合成されるアブシジン酸 (ABA) は、葉の維管束柔組織で多く合成される。しかし、植物はどのように乾燥ストレスを感受し、維管束柔組織での ABA 合成を促しているのかは、全く分かっていない。これまでの知見から、乾燥ストレス耐性獲得に関わる重要な機能遺伝子は、茎や葉の維管束や、維管束柔組織で発現しているものが多いことから、乾燥ストレスの初期シグナルは、導管・師管液

中に存在するタンパク質がシグナルを伝達していると考えられる。一方、植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) は、植物の環境応答の要であり、乾燥ストレスや塩ストレスなどの様々な応答機構の司令塔として重要な物質である。我々は、これまでにこの ABA によるシグナル伝達機構を解析し、ABA 合成に重要な役割を果たすキー酵素 NCED3 遺伝子の同定と機能解析を行った。また、SnRK2 と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素と PP2C と呼ばれるタンパク質脱リン酸化酵素が協調してシグナル伝達を制御する仕組みを明

らかにした。以上の結果によって、重要な植物ホルモンであるABAのシグナル伝達機構を世界で初めて明らかにした。しかし、乾燥ストレスを感受してからABA合成を開始させる初期シグナル伝達は、今まで全く解析されていない。

## 2. 研究の目的

植物は、乾燥や塩ストレスなどを根で感受する。このシグナルは地上部へと伝達され、ストレス耐性遺伝子を発現させ、成長や代謝に関わる遺伝子を抑制する。特に植物ホルモンのABAは葉で合成され、乾燥や塩ストレスなどの防御応答の司令塔として必須であり、農業的にも重要なホルモンといえる。したがって、乾燥ストレスの受容からABA合成を促進する初期のシグナルを解析することは、乾燥耐性のメカニズムを理解するのにとても重要である。しかし、乾燥ストレスを根で受容し、葉でABAを合成するNCED3の発現をオンにするシグナル伝達の詳細は明らかではない。本研究では、ストレス応答において、根と地上部の細胞間コミュニケーションを制御する移動性のシグナル伝達因子を同定し、その機能解析を行う。特に、ABA合成のキー酵素となるNCED3遺伝子の発現を指標にして、ペプチドシグナルによる乾燥ストレスにおけるNCED3の発現制御のメカニズムを詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

乾燥ストレス応答遺伝子は、茎や葉の維管束や、維管束柔組織で発現しているものが多いことから、ペプチドは導管・師管液中に放出され、ストレスシグナルを伝達していると考えられる。本実験では、植物の葉と根の両方の細胞の性質を持ち、液体培養することで増殖するシロイヌナズナT87培養細胞を用いる。T87培養細胞に、乾燥ストレスと同じ作用がある塩や浸透圧ストレスを処理する。ストレス処理前後の培養液を凍結乾燥にて濃縮した後、陰イオン交換カラム、逆相クロマトグラフィーで分画する。カラムは、まず始めに一般的なC18カラムを使用する。その後の解析結果によっては、塩基性・酸性用カラムを用いて抽出分画を広げることも可能である。次に、CとNに同位体を入れたペプチド標品を指標にMALDI TOF-MSを用いた質量分析解析を行い、ペプチドが分画されたフラクションを同定する。検出しにくい場合は、MS-MSやプロテインシーケンサーを用いて測定する。また、アミノ酸・タンパク質などの夾雑物がひどい場合は、T87培養細胞の培養

液成分の検討も計画に入れておく。無処理の対照区を用いて比較解析を行うことで、ストレス依存的に細胞外に蓄積されるペプチドを定量する。

ペプチドの遺伝子破壊変異体、過剰発現植物体を作成する。標的とするペプチドは遺伝子全長も短かく、遺伝子破壊変異体は得られない。RNAiを用いたノックダウン植物体の準備も行う。過剰発現植物体に関しても恒常的発現型だけでなく、誘導系ベクターを用いて過剰発現させるラインも作成する。得られた形質転換植物体を用いて、気孔の閉鎖への関与を測定する。測定にはスンプ法を用いて気孔閉鎖を可視化させ、実寸の直径を測定して比較する。その他に、蒸散量測定装置を用いて葉からの蒸散量を数値化したりと、様々な測定方法で検証する。さらに、植物体にペプチドを吸収させ気孔の閉鎖を測定することで、ペプチドの気孔の閉鎖に与える影響をより迅速に解析する。またABAは種子の休眠に関与し、ABA含有培地に播種すると通常の種子は発芽出来なくなる。そこで、ペプチドを含有した培地に種子を播種しNCED3を発現させることでABA蓄積を促し、ABA処理と同様に休眠誘導の生理活性があるかを測定する。さらに候補ペプチドがNCED3の発現を制御している場合、ABA蓄積量も変化していることが考えられる。理化学研究所などで行っているホルモノーム解析を行うことで、内在性のペプチド量に依存したABAの蓄積量の変化を解析する。

また、ペプチドの、茎や葉の維管束や、維管束柔組織での発現をトランスジェニック植物体を用いて観察する。観察にはGUS染色法や蛍光顕微鏡を用いたGFP蛍光を指標に植物体での発現部位・組織の特定を行う。さらに形質転換植物体を用いてマイクロアレイ解析を行い、ペプチドが制御するストレス応答遺伝子群を網羅的に解析する。比較対象としてシロイヌナズナのnced3遺伝子破壊変異体を利用する。nced3変異体ではABAシグナルが停止しているため、ペプチド変異体と比較することで、NCED3の上流シグナルが明らかになる事が期待される。さらに、様々なABA非感受性変異体を用いトランスクリプトーム解析を行い、それらのデータを統合的に解析する事によって、ペプチドによる新しいシグナル制御因子や伝達系が見つかる可能性がある。また、形質転換植物体に対して乾燥や塩、浸透圧ストレス処理を行い、表現系としての耐性評価を行う事で、細胞内遺伝子発現と生理応答をリンクさせて解析を行う。ABA合成のキー酵素であるNCED3は、

乾燥・浸透圧ストレス誘導性である。しかし、約 3 kbp あるプロモーター領域のどの部分が、重要なシス領域であるのか全く分かっていない。これまでのストレス誘導性に関わるシスモチーフの分布を参考に作製した、様々な長さを持つ NCED3 プロモーター-GUS/GFP 植物体を用いて、合成したペプチドを根から吸収させる。その後、地上部をサンプリングし、GUS/GFP の発現を測定することで、ペプチドシグナルが、NCED3 プロモーターのどの領域を制御するかを同定する。また、トランスジェニック植物体だけでなく、プロトプラストを用いたトランジェントアッセイを行うことで、より迅速に重要シス領域の絞り込みを行えると期待できる。

#### 4. 研究成果

水分ストレスシグナルに関与する低分子ペプチドを探索する目的で、シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた実験系を立ち上げた。まず、質量分析解析の条件に適応するように、試料の分離や培地成分の検討、粗抽出溶液の検討を行った。更に、イオン交換カラムを用いた精製後、308 のフラクションに分離し、低分子ペプチドが抽出される分画を探索した。更に、T87 培養細胞に水分ストレスの一種であるマンニトールを用いた浸透圧処理を行い、培養液中に放出される低分子ペプチドについてマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOF/MS) を用いて探索した。その結果、T87 培養細胞培養液から低分子ペプチドを粗抽出する条件として、アセトニトリルの濃度を 5%–10% とするのが最適であることが分かった。また、通常の培養液成分では多数のアミノ酸類、ビタミン類が混入しており、質量分析解析に不向きであることが明らかとなったので、培養液成分の条件検討を行った。アミノ酸源として添加していたカザミノ酸とビタミン類をぬいた培地を作製し、質量分析解析を行ったところ、感度が上昇することが明らかとなった。更に、T87 培養細胞に水分ストレスの一種であるマンニトールを用いた浸透圧処理を行った後の培養液を、MALDI-TOF/MS を用いて解析した結果、分画 No. 73 と分画 No. 81 の抽出液の中に、機能性ペプチドとして予測される遺伝子の相同性遺伝子を検出することに成功した。得られた候補遺伝子群のなかの一遺伝子に関しては、得られた抽出画分についてタンデム質量分析計 (MS/MS) を用いた詳細な解析を行うことで、目的遺伝子であることを確認した。網羅的なゲノム解析から、得られた候補ペプチドには約 30 の相同性ペ

プチドが存在していることが明らかになった。そこで、候補ペプチドを含むこれらペプチド群に関して、*in vitro* 合成ペプチドを作製し、植物体に投与することで、ペプチドの生理活性および機能を、遺伝子発現解析を中心に解析した。水溶液に可溶化させたペプチドを根から吸収させ、4 時間後に葉のみを回収し、RNA を抽出してストレス応答性遺伝子の発現、特に ABA 合成酵素である NCED3 の発現を解析した。また、この候補遺伝子の相同遺伝子がシロイヌナズナ中に 33 遺伝子存在することを調査し、これらすべての遺伝子の合成ペプチドを作製し、同様に生理活性を評価した。その結果、候補遺伝子を含む、合計 4 つのペプチドに、NCED3 の発現を上昇させる生理活性があることを明らかにした。次に NCED3 への発現活性が *in vitro* で確認できた 4 つの候補ペプチドに関して、過剰発現体と遺伝子破壊変異体を作成し、植物体内での生理活性を解析した。その結果、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法を用いた実験で同定した候補ペプチド 1 のみが、植物体内でも NCED3 の発現を制御することが明らかになった。このことから、以下の実験では、候補ペプチド 1 に着目して実験を行った。つぎに遺伝子破壊変異体を用いて、マイクロアレイ解析を行った。乾燥ストレスを 4 時間処理し、葉のみから RNA を抽出し、ペプチドで制御される遺伝子群の絞り込みを行った。対象として *nced3* 遺伝子破壊変異体も、同様に処理を行い、遺伝子発現の比較を行った。その結果、候補ペプチドで発現が制御される遺伝子の大半は、乾燥ストレスや浸透圧ストレスで制御される遺伝子群であることが明らかになった。また *nced3* 遺伝子破壊変異体を用いた解析データとの比較から、候補ペプチドは、NCED3 が制御する遺伝子群の約半分の遺伝子を同様に制御していることが明らかになった。また、これら遺伝子破壊変異体に加えて、候補ペプチドの過剰発現体、*nced3* 遺伝子破壊変異体との多重変異体も作成し、乾燥ストレスを処理した時の、水の蒸散量を重量測定法を用いて解析した。その結果、候補ペプチド変異体は、コントロールに比べて、早く水分が失われ、乾燥ストレスで制御される気孔の閉鎖が機能不全になっていることが明らかになった。一方、ペプチド過剰発現体は、水分蒸散の遅延が起り、ストレスに耐性を示した。また、*nced3* 変異体とペプチド過剰発現の多重変異体は、*nced3* 変異体と同様に、早く水分が失われたことから、候補ペプチドは NCED3 の上流に存在し、気孔の閉鎖を制御していることが明らかに

なった。また、これら形質転換植物を土植えし、乾燥ストレスに対する耐性評価を行った。その結果、候補ペプチド変異体は、nced3 変異体と同様に、乾燥ストレスに感受性を示すことが明らかとなった。またプロモーター GUS 植物体を用いて、候補ペプチドの組織発現部位を解析した結果、根や葉の維管束柔組織で発現していることが明らかになった。維管束柔組織では、NCED3 をはじめとする乾燥ストレス誘導性遺伝子が多数発現している組織であることと、これまでに得られた実験結果から、候補ペプチドは、乾燥ストレス依存的に細胞外へ放出され、NCED3 の発現を制御する因子であることが証明された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 史憲 (TAKAHASHI FUMINORI)

独立行政法人理化学研究所・バイオマス研究

基盤チーム・研究員

研究者番号：00462698

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし