

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291057

研究課題名(和文)植物の背丈伸長を制御するペプチドリガンド-受容体ペアのシグナル伝達と特異性の解析

研究課題名(英文)Signal transduction and specificity of peptide ligand-receptor pairs specifying plant growth

研究代表者

鳥居 啓子 (TORII, KEIKO)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・客員教授

研究者番号：60506103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、分子発生遺伝学手法とペプチド合成技術を用いて、EPFファミリーペプチドホルモンとERECTAファミリー受容体の、植物の発生と成長への役割と作用機序に迫ることである。研究期間を通じ、プロモータースワップ法とペプチド合成によるシロイヌナズナEPF/EPFLファミリー間の機能相補性と特異性の解析を試みた。さらには、EPFL2は、ERECTAファミリー受容体に直接結合するリガンドとして働き、植物ホルモンオーキシンのフィードバック介して葉の鋸歯形成を制御することを明らかにした。さらに、ERECTAファミリー受容体は、植物の木質バイオマス生産のタイミングを調節することを示した。

研究成果の概要(英文)：This proposal aims at understanding the mechanism of signal discrimination and further unraveling the function of orphan EPFL peptides during Arabidopsis development. Using the promoter swapping approach, we learned that the sub-family of EPF/EPFL peptides have shared and specific activities. We further revealed that EPFL2-ERECTA-family ligand-receptor pair is required for leaf margin morphogenesis. Furthermore, we demonstrated that a negative feedback circuitry between auxin and EPFL2 signaling promotes leaf teeth growth by maintaining the auxin maxima throughout the dynamic process of leaf expansion. During secondary growth, ERECTA-family ensure the timing of wood tissue expansion, a process mediated by GA. Our work reveals that EPF/EPFL-ERECTA-family ligand-receptor pairs control specific developmental programs through interaction with phytohormones, and that restricted expression of peptide ligands in part contribute to signal specificity.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：植物 発生分化 ペプチドホルモン 受容体キナーゼ シグナル伝達 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物細胞は細胞壁に覆われているため、植物の発生と分化は細胞移動を介さずに起こる。多細胞体である高等植物の発生過程において、異なった細胞層がどのように協調することにより組織器官を形成していくのか、その細胞間のコミュニケーションの実体とメカニズムの解明は、植物発生学の大きな課題である。

近年、シグナル実体として分泌性ペプチドと受容体キナーゼの重要性が認識されてきたが、そのシグナル伝達メカニズムには不明な点が多い。シロイヌナズナの **ERECTA** ファミリー受容体キナーゼ (**ERECTA**, **ERL1**, **ERL2**) は、植物の成長、背丈伸張、気孔パターン形成、生殖器官分化など多くの局面で重要な役割を持つ。それぞれの組織器官において、これら受容体キナーゼが受け取る細胞間シグナルの実態についてはわかっていない。

気孔の発生とパターン形成における **ERECTA** ファミリー受容体キナーゼの機能に関しては、代表者の過去の研究から多くの事柄が明らかになっている。気孔の発生過程において、**ERECTA** は **EPIDERMAL PATTERNING FACTOR2 (EPF2)** と呼ばれる、分泌性ペプチドを受容し、初期気孔系譜を抑制する。一方、**EPF-LIKE4 (EPFL4)** と **EPFL6** は、同じ **ERECTA** 受容体に結合することにより、植物の背丈伸張を制御する。シロイヌナズナには11の **EPF** ファミリーペプチドが存在するが、すべての機能がわかっていないわけではない。

2. 研究の目的

多細胞体である植物の生長と分化には、細胞間の密なコミュニケーションが必要である。近年、シグナル実体として分泌性ペプチドと受容体キナーゼの重要性が認識

されてきたが、そのシグナル伝達メカニズムには不明な点が多い。本研究では、生化学、分子発生遺伝学、そして最新ペプチド合成法技術などを駆使して、ペプチドリガンドと受容体による植物の発生と成長制御を明らかにするとともに、リガンド-受容体ペアの細胞組織特異的作用機作に迫る。

3. 研究の方法

3A: プロモータースワップ法とペプチド合成による **EPF** ファミリーペプチドの機能解析

EPF ファミリーペプチドリガンドは、広く発現する **ERECTA** 受容体を介して、表皮における気孔系譜と隣接細胞との協調による気孔の密度と分布の制御、そして内皮と篩部とのコミュニケーションによる背丈の伸長という、どちらも植物の生長と生存に必須な発生現象を担うことが解ってきた。これらの発生現象におけるリガンド-受容体ペアの生体内での特異性を明らかにするため、ペアの組み合わせを変えて内皮-篩部に発現させ効果を調べる。

3B: 機能未知な **EPFL** ペプチドの植物発生における役割の解析

シロイヌナズナには11の **EPF/EPFL** ファミリー遺伝子が存在するが、6遺伝子の機能はわかっていない。ノックアウト突然変異体の遺伝学のお呼び表現型解析やゲノム編集によるノックアウト作成を行い、**EPFL** ペプチドの発現部位、植物体における機能、そして対応する受容体を明らかにする。

3C: **EPF/EPFL** ペプチドによる **ERECTA** リン酸化の解析

ERECTA 受容体は、細胞内部のキナーゼ部位を介して、外部環境から受け取った **EPF/EPFL** シグナルを細胞内へ伝達すると考えられるが、その生化学的メカニズムは未だわかっていな

い。ERECTA-YFP 融合タンパク質を発現するシロイヌナズナに EPF/EPFL ペプチドを添加したのち、免疫沈降を行い、質量分析装置を用いて ERECTA キナーゼ部位のリン酸化パターンを解析する。

4. 研究成果

4A: EPF ファミリーペプチドの機能解析

プロモータースワップ法により、EPF/EPFL ファミリーを気孔系譜および茎の内皮に発現させ、その効果を調べた。その結果、気孔系譜を制御する EPF ペプチドと茎の伸長を制御する EPFL ペプチドサブファミリー間での機能的特異性がわかってきた。しかしながら、形質転換のライン間での表現型のばらつきなどを解析する必要がある。

4B: EPFL2-ERECTA ファミリーとオーキシンのフィードバック制御による葉の鋸歯の成長

機能未知な EPFL ファミリーのうち、トランスポゾン挿入による欠失変異体が取られた *EPFL2* 遺伝子について詳細な機能解析を行った。*EPFL2* は、ERECTA ファミリー受容体(ERf)に直接結合するリガンドとして働き、葉の鋸歯形成を促進することが解った。鋸歯の形成には植物ホルモン・オーキシンが必須であり、オーキシンは鋸歯原基の先端部に蓄積することが知られている。さらなる解

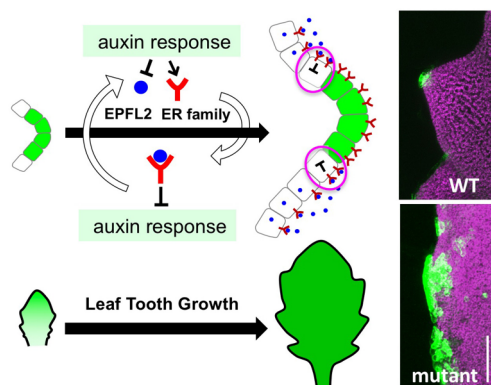


図1: EPFL2 ペプチドシグナルとオーキシンとのフィードバックによる鋸歯の形成

析から、EPFL2-ERf ペプチドホルモン伝達経路とオーキシン経路は負のフィードバックにより互いを抑制し、その結果、鋸歯原基の先端部にて突起をつくるよう細胞増殖が起こることが明らかとなった(図1)。この結果は、低分子ホルモンオーキシンとペプチドシグナル伝達経路の相互作用により、植物の形態形成が行われることを明確に示すものである。

4C: ERECTA ファミリー受容体による維管束二次成長の制御

ERECTA ファミリー受容体は幅広い組織に発現し、発生分化の多様な側面を制御する。ERECTA と ERL1 は、胚軸の二次成長(肥大成長)のタイミングと木部組織の分化を制御することを突き止めた(図2)。このタイミングの制御には、開花を促進する植物ホルモンであるジベレリンとの相互作用が関わっていることも分かった。

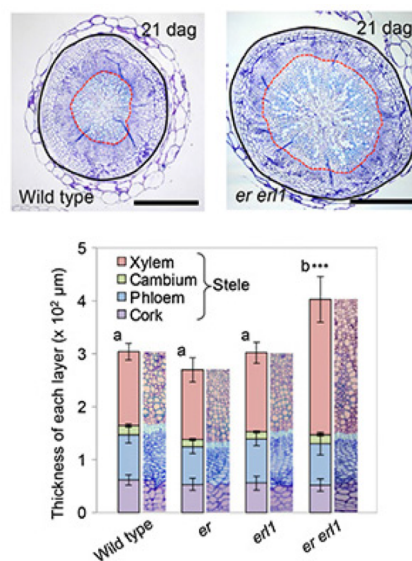


図2: ERECTA と ERL1 による木部肥大成長の抑制

4D: 機能未知の EPFL ペプチドの解析に向けたゲノム編集

未だ機能がわからないシロイヌナズナの4つの EPFL ペプチドの機能を明らかにする第一歩として、CRISPR/Cas9 のシステムを用いたゲノム編集によるこれら EPFL ペプチド遺伝

子の欠失変異体の作成を試みた。

4E: ERECTA受容体の自己リン酸化パターン

質量分析法を用いて、シロイヌナズナ植物体に EPFL ペプチド処理の有無における ERECTA 受容体キナーゼの自己リン酸化部位の解析を試みた。現在まで、ペプチドにより誘導されるリン酸化部位の確実な同定には至っていない。しかしながら、キナーゼ活性を制御する自己リン酸化部位が同定することができた。

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 9 件)

1. Hirakawa, Y., Shinohara, H., Matsubayashi, Y., *Torii, K.U., *Uchida, N. (2017) Cryptic bioactivity capacitated by synthetic hybrid peptide. *Nature Communications* 8: 14318
2. Tameshige, T., Ikematsu, S., *Torii, K.U. and *Uchida, N. (2017) Stem development through vascular tissues – EPFL-ERECTA family signaling that bounces in and out of the phloem. *J. Exp. Bot.* 8: 45-53 (Invited Review)
3. Ikematsu, S., Tasaka, M., *Torii, K.U. and *Uchida, N. (2017) ERECTA-family receptor genes prevent excessive progression of radial growth and premature initiation of fiber differentiation in the Arabidopsis hypocotyl vasculature. *New Phytol.* 213: 1697-1709
4. Tameshige, T., Okamoto, S., Tasaka, M., *Torii, K.U. and *Uchida, N. (2016). Impact of erecta mutation on leaf serration differs between Arabidopsis accessions. *Plant Sig Behav.* 11: e1261231
5. Tameshige, T., Okamoto, S., Lee, J.S., Aida, M., Tasaka, M., *Torii, K.U. and *Uchida, N.

(2016) A Secreted Peptide and its Receptors Specifying the Auxin Response Pattern during Leaf Margin Morphogenesis. *Current Biology* 26: 2478-2485.

6. 平川有宇樹、池松朱夏、打田直行、鳥居啓子 (2016) 植物の形を調節するペプチドホルモン。現代化学 543: 26-29 (Review, cover)



7. Nemhauser, J.L. and *Torii, K.U. (2016). Plant synthetic biology for molecular engineering of signaling and development. *Nature Plants* 2: e16010 (Review)
8. Tameshige, T., Hirakawa, Y., Torii, K.U., Uchida, N. (2015) Cell walls as a stage for intercellular communication regulating shoot meristem development. *Front Plant Sci* 6: e324 (Review)
9. *Torii, K.U. (2015) Stomatal Differentiation: the beginning and the end. *Current Opinion in Plant Biology* 28: 16-22. (Review, cover)



[学会発表] (計 10 件)

すべて招待講演

1. Torii, K.U. Manipulating peptide signaling in plant development. **WPI Symposium, Institute of Transformative Biomolecules (ITbM)**, Nagoya University, December 12-13, 2016
2. Torii, K.U. **1. 1st CRC1101 Symposium, Molecular encoding of specificity in plant processes.** Univ. Tübingen and Heidelberg, Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany, April 4-6, 2016
3. Torii, K.U. Regulatory Circuitry Initiative 2-Dimensional Stomatal Patterning in the

- Plant Epidermis. **BMB2015** (joint Biochemistry and Molecular Biology Societies Conference), Kobe, Japan, Dec 1, 2015 (Invited Symposium Speaker)
4. Torii, K.U. Genome-Scale Mapping of Regulatory DNA Elements During Initiation, Amplification, and Differentiation of Stomatal Cell Lineages. **Cold Spring Harbor Asia Meeting “Plant Epigenetics and Development”**. Suzhou, China, June 8-12, 2015 (Invited Keynote Speaker)
5. Torii, K.U. Patterning Plant Epidermis: Cell Fate and Communication. **Japanese Society of Developmental Biologists, Annual Conference**. Tsukuba, Japan, June2-5, 2015 (Invited Plenary Speaker)
6. Torii, K.U. Stomatal Patterning and Differentiation: ~Signaling Mechanism and Environmental Interface. **Power to Overcome Environment** Special Symposium. March 13, 2015, Tokyo, Japan (Invited Symposium Speaker)
7. Torii, K.U. Mix-and-Match: Receptor Kinase Complexes in Stomatal Development. **Keystone Meeting “Plant Receptor Kinases”** Taos, NM, Feb 9-13, 2015 (Invited Speaker)
8. Torii, K.U. Receptor Kinase Specificity and Integration in Stomatal Patterning. **Gordon Research Conference**, Plant Development. July 20-25, 2014. Holderness, NH (invited speaker)
9. Torii, K.U. Stomatal Patterning, Communicate, Fate, and Decision Making. **ICAR2014 (International Conference of Arabidopsis Research 2014)**, Plenary talk at Vegetative Development section. July 28-August 1. Vancouver, BC, Canada (invited speaker)

10. Torii, K.U. Two-Dimensional Spatial Patterning in the Plant Epidermis. **Annual Japanese Society of Developmental Biology Conference** (invited speaker; scheduled) May 27-30, 2014. Nagoya, Aichi, Japan

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 2 件)

1. 名称 : Plant Growth Regulator
発明者 : Keiko U. Torii, Naoyuki Uchida, Hiroe Kato, Ayato Sato, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara, and Azraa Ziadi.
権利者 : Natoya University and HHMI/Univ. Washington
種類 : US-Provisional Patent Application
番号 : 62/260064:
出願年月日 : July 8, 2016
国内外の別 : 国外

2. 名称 : Plant Growth Regulator and Engineered Receptor
発明者 : Keiko U. Torii, Naoyuki Uchida, Rie Iwasaki, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara
権利者 : Natoya University and HHMI/Univ. Washington
種類 : US-Provisional Patent Application
番号 : 62/468642:
出願年月日 : March 8, 2016
国内外の別 : 国外

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/en/members/k-torii/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
鳥居 啓子 (Keiko U. Torii)
名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
客員教授
研究者番号 : 60506103

(2) 研究分担者 ()

(3) 連携研究者
打田 直行 (Naoyuki Uchida)
名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
特任准教授
研究者番号 : 40467692