

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05957

研究課題名(和文)長距離シグナリングを介した変動環境への適応機構

研究課題名(英文)Response mechanisms to a fluctuating environment through long-distance signaling

研究代表者

松林 嘉克(Matsubayashi, Yoshikatsu)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：00313974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 79,400,000円

研究成果の概要(和文)：自然界では、土壌中の窒素栄養は均一に存在するとは限らないため、植物は一部の根で窒素欠乏を感知すると、他の根で相補的に取り込みを促進するしくみ、「全体的窒素要求シグナリング」を進化させてきた。本研究では、窒素欠乏時に根で発現するペプチドホルモンCEP、葉の維管束でCEPを認識する受容体CEPR1、およびその下流で根に移行するCEPD1/2が全体的窒素要求シグナリングの主要なコンポーネントであることを見出した。また、葉の窒素需要に応じた硝酸取り込みを制御するCEPDL2や、長距離シグナリングを支える根の維管束系の拡散障壁として機能するカスパリー線の形成に必要な新規ペプチドホルモンCIFを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、全体的窒素要求シグナリングの主要コンポーネントを見出したが、この発見は、植物が局所的環境受容と長距離シグナル伝達との統御に独自のメカニズムを進化させていることを示すものである。また、「維管束は単なる水や栄養の通り道ではなく、組織間を結ぶ情報伝達の場」であり、「気孔からの水分の蒸発によってできる蒸散流が、長距離シグナルの増幅や維管束内での情報伝達に重要な役割を果たしている」など、これまでの理解を覆すような新たな概念を確立した。

研究成果の概要(英文)：Nitrogen (N) is an essential macronutrient that plays a crucial role throughout plant development, but soil nitrate availability fluctuates temporally and spatially. We identified that N starvation-induced peptide CEP acts as a root-derived ascending N-demand signal. CEP is recognized in the shoot by CEP receptor, that leads to the production of non-secreted polypeptide, CEPD. CEPD acts as a descending signal to the root and ultimately upregulates nitrate transporter NRT2.1 gene in the roots. Thus, CEP induced on one side of the roots by local N starvation is able to mediate upregulation of NRT2.1 in the distant part of the roots. In addition to this, plants modulate the efficiency of root N acquisition in response to shoot N demand by CEPD-like 2, which is upregulated in the leaf vasculature in response to decreased shoot N status. Our findings provide new insights into the molecular basis of plant adaptation to a dynamically fluctuating N environment.

研究分野：植物分子・生理学

キーワード：ペプチドホルモン シロイヌナズナ 窒素代謝 受容体キナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界では、土壌中の窒素栄養分は極めて不均一に存在する。そのため、植物は一部の根で窒素欠乏を感知した時に、他の根で相補的により多くの窒素を取り込むしくみ(全身的窒素要求シグナリング)を備えていることが45年ほど前に指摘された。その後、複数の研究グループがそのメカニズムの解明を目指して研究を進めたが、その本質的なしくみは全く分かっていなかった。我々は、窒素欠乏を感知した根で分泌型ペプチド CEP が発現誘導され、これが道管を通過して地上部に移行し、葉で LRR 型受容体キナーゼである CEP 受容体 (CEPR1) に認識されることが、全身的窒素要求シグナリングの根幹となっていることを初めて見出した (*Science* 2014)。この発見は、植物が局所的環境受容と長距離シグナル伝達との統御に独自のメカニズムを進化させていることを示しており、シグナル輸送経路としての維管束の役割や、駆動力としての蒸散流との関連性を含め、新しい研究領域の存在を確信させるものである。

2. 研究の目的

本研究では、根から葉に移行した CEP が受容体に認識された後に、葉でつくられて篩管を通過して根に移行すると想定される2次シグナルの解明を中心として進めながら、いかにして根における局所的な環境刺激が葉で統御され、最終的に植物体全体に伝達されていくかを明らかにする。具体的には、維管束細胞特異的なトランスクリプトームや変異体スクリーニングと、リン酸化プロテオミクスなどの生化学的手法とを組み合わせ、全身的窒素要求シグナリングに関わる分子群を網羅的に同定し、基本的な情報伝達の流れを明らかにしていく。

3. 研究の方法

葉の師部で発現する CEP 受容体の下流でつくられて根に再移行すると想定される2次シグナルを解明するため、CEP 処理した植物体および CEP 受容体欠損株の葉から師部を含む維管束組織のみを取り出し、CEP 応答する遺伝子群をマイクロアレイで選び出す。得られた候補遺伝子群の中から、過剰発現株の根において硝酸取り込み輸送体の発現が上昇しているものを探していく。また、葉における気孔からの水分の蒸発によってできる蒸散流が、どのようにシグナルの濃縮や維管束内での情報伝達に関与しているか解析する。蛍光ラベル CEP を化学合成し、これを培地に加えて根から吸収させ、葉の維管束内でのどの程度濃縮され、どのように道管側から篩管側へ移行するかを蛍光顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) CEP 受容体下流で葉から根へ篩管内を移行する長距離シグナル CEPD の同定

CEP 受容体は、葉の維管束の師部側で発現することがわかっている。そこで、葉において CEP 受容体の下流で誘導され篩管を通過して葉から根へ移行すると想定される2次シグナルの探索のため、葉から維管束組織のみを取り出し、CEP 依存的に発現変動する遺伝子群をマイクロアレイで抽出した。さらにこれらの中から、過剰発現した時に根の硝酸取り込み輸送体遺伝子 *NRT2.1* の発現を上昇させるものを探索した結果、約100アミノ酸からなる2つの非分泌型ポリペプチドを同定した。これらを CEP DOWNSTREAM 1 (CEPD1) および CEPD2 と命名した。CEPD1 および CEPD2 の2重欠損株では、*NRT2.1* の発現が顕著に低下し、片側の根が窒素欠乏の時においても他方の根で相補的な *NRT2.1* 発現が誘導されることはなかった。CEPD1 および CEPD2 は、葉の師部で CEP 依存的に発現誘導されるが、根では全く遺伝子発現していない。しかし、GFP-CEPD1 を用いてタンパク質レベルで解析すると、根の師管で明瞭なシグナルが検出され、さらに接木実験でも接木面を超えて根へ移行した。このことから、CEPD1 および CEPD2 は葉から根へ長距離移行するシグナルであることが確かめられた。片側の根を窒素欠乏、もう片側を窒素十分とした場合、CEPD1 および CEPD2 は、両者の根へ非選択的に移行するが、窒素十分の根だけで *NRT2.1* の発現が誘導された。植物の根は葉から伝えられる窒素欠乏情報と外環境の窒素の有無を照らし合わせて、*NRT2.1* の発現を上昇させるか否かを判断していることも明らかとなった(図1)(*Nature Plants* 2017)。

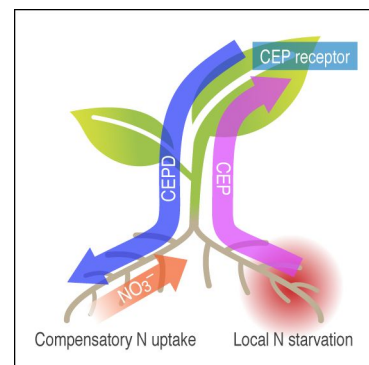


図1.CEP-CEPR-CEPDを介した全身的窒素要求シグナリング

(2) 全身的窒素要求シグナリングが葉を介する必然性

リガンドの CEP は道管を通過して葉へ輸送される一方、受容体の CEPR1 は師管で発現しているため、葉において CEP は道管側から師管側へ移行して受容される必要がある。そこで、Alexa488 で蛍光標識した CEP1 を根から与え、葉の維管束でどのように局在しているのか観察したところ、Alexa488-CEP1 が葉脈の末端で濃縮され、道管から師管へと拡散している様子が観察された(図2)。この結果から、道管液中のペプチド濃度は1nMにも満たないごく低濃度であるが、葉脈の末端で蒸散によって十分に受容体を活性化できる濃度まで濃縮され、蒸散流に乗って道管から師管側へと拡散していることが示された。CEPR1 が発現している師管は道管よりも葉の下側(裏側)に位置しているが、葉の裏側は表側よりも気孔が多いため蒸散量も多

くなる。その結果、蒸散流は葉の表側から裏側、つまり道管から篩管側へと動くことで、濃縮された CEP は篩管へと拡散している。以上の結果から、根に由来するシグナルは道管中を移行する際に大過剰の水で希釈されてしまうが、これを葉における蒸散を利用して受容体を活性化できる濃度にまで濃縮することで、植物は直距離シグナリングを実現しており、これが全身的窒素要求シグナリングが葉を介する理由であると結論づけた。植物はシンプルな器官を最大限に利用して巧みな環境応答を行なっている（図 2）。

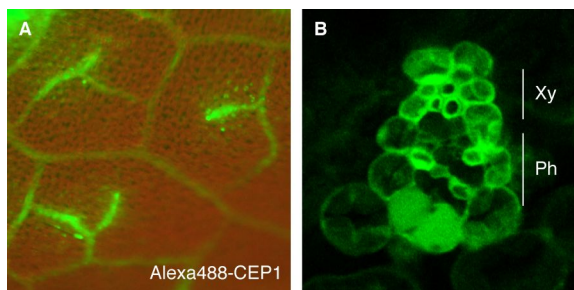


図 2. 蒸散による根由来 Alexa488-CEP1 の葉脈における濃縮と篩管方向への拡散

(3) 葉の窒素需要を根に伝える新規長距離移行シグナル CEPDL2 の発見

植物では根の窒素状況に加えて、葉自身の窒素需要によっても根の窒素吸収が制御されていることが 20 年ほど前から指摘されてきたが、そのメカニズムは明らかではなかった。シロイヌナズナには CEPD と配列が類似したポリペプチドが 21 種類あり、そのうちの 2 種類は特に類似性が高い。我々は、これらのひとつ CEPDL2 が葉の窒素需要を根に伝える長距離移行シグナルの本体であることを見出した。CEPDL2 は高親和性硝酸輸送体である *NRT2.1* や *NRT2.2* に加えて、道管への硝酸の積み込みに関わる *NRT1.5* の発現を誘導し、硝酸の取り込みと地上部への輸送を活性化する。CEPDL2 は主に葉の篩部において発現するが、根を切除した地上部に対する窒素欠乏処理で発現が誘導されたことから、葉自身の窒素欠乏状態に直接応答している。葉の篩部で発現した GFP-CEPDL2 は根へ移行し、その蛍光は根の表皮細胞の核にも検出された。CEPDL2 の欠損株を CRISPR/CAS9 で作製したところ、硝酸取り込み活性の顕著な低下が観察された。硝酸欠乏と十分の中間的な濃度である 3 mM の条件で欠損株を生育させると、播種後 14 日目程度までは野生株と比較して生育に違いは見られなかったが、生育後期の 21 日目になると、新たに展開する葉が小さくなるなど地上部のサイズの減少が観察された。これは、急激に地上部のバイオマスが増加する栄養生長後期に地上部の窒素需要が増大することを反映していると考えられる。実際、この時期には地上部で CEPDL2 の発現量が増加する。さらに根の窒素欠乏を他の根に伝える過程に関わる CEPD1/2 と葉の窒素需要を根に伝える CEPDL2 の両方を欠損する植物では、培地中の硝酸濃度に関わらず顕著な硝酸取り込み活性の低下と植物体の著しい矮小化が観察された。一連の CEPD1/2 および CEPDL2 の解析から、根における硝酸取り込みの制御には、葉に由来する長距離シグナルが主要な役割を担っていることが結論づけられた。すなわち、植物は根の窒素環境と葉の窒素需要を長距離シグナリングによって統御し、根から吸収する硝酸量を巧みに調節している（図 3）（*Nature Commun.* 2020）。

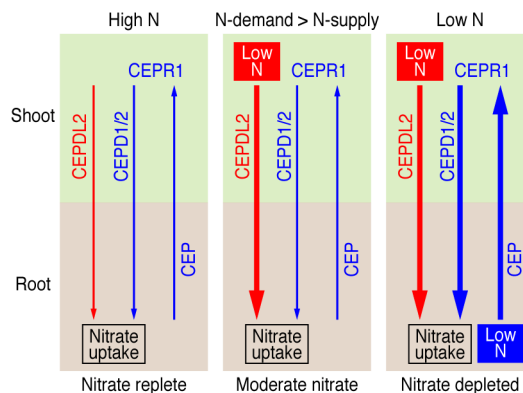


図 3. CEPDL2 と CEPD1/2 を介した硝酸取り込みの全身的制御

(4) カスパリー線の形成に必要なペプチドホルモン CIF の発見

ペプチドシグナルの中には、翻訳後修飾とプロセッシングを経て 10 から 20 アミノ酸程度の成熟型ペプチドとして分泌されるグループ（短鎖翻訳後修飾ペプチド）が多く存在する。それらの前駆体ペプチド配列にはいくつかの構造的特徴があるため、ゲノム情報に基づいたスクリーニングが可能になりつつある。このことに着目して見出したペプチドのひとつが、根の拡散障壁であるカスパリー線の形成に必要であることを明らかにした。Caspasian strip Integrity Factor (CIF) と命名した 21 アミノ酸のチロシン硫酸化ペプチドは、根の中心柱で発現し、内皮細胞で発現する受容体 GSO1/SGN3 に結合する。CIF を欠損する植物は、根のカスパリー線の連続性が失われるが、CIF を培地に加えると 6 時間程度で連続性が回復した（図 4）。CIF を欠損する植物では、カスパリー線の形成が異常になり、濃度勾配依存的に外界からイオンが道管に流入または道管から流出するため、至適栄養イオン濃度以外では成長が阻害されることが明らかとなった（*Science* 2017）。

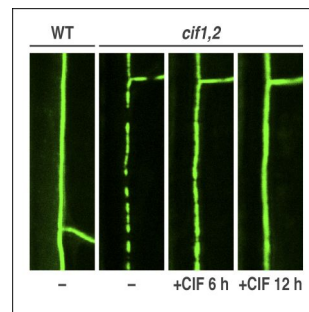


図 4. CASP1-GFP で可視化した CIF 欠損株における不連続なカスパリー線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ryosuke Ota, Yuri Ohkubo, Yasuko Yamashita, Mari Ogawa-Ohnishi, Yoshikatsu Matsubayashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Shoot-to-root mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate uptake in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14440-8	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 -
1. 著者名 Nakayama T, Shinohara H, Tanaka M, Baba K, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y.	4. 巻 355
2. 論文標題 A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 284-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aai9057	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 H, Mori A, Yasue N, Sumida K, Matsubayashi Y.	4. 巻 113
2. 論文標題 Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in Arabidopsis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 3897-3902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1522639113	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 Ohkubo Y., Tanaka M., Tabata R., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 17029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/nplants.2017.29	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18件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 15件）

1. 発表者名 Matsubayashi Y.
2. 発表標題 Long-distance peptide signaling involved in systemic regulation of nitrogen acquisition
3. 学会等名 23rd International Conference on Plant Growth Substances (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsubayashi Y.
2. 発表標題 Long distance peptide signaling mediating nitrogen homeostasis
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Plant Cell and Development Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsubayashi Y.
2. 発表標題 Root-to-shoot and shoot-to-root long-distance mobile peptides mediate systemic regulation of nitrogen acquisition
3. 学会等名 Keystone Symposia, Plant Signaling: Molecular Pathways and Network Integration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsubayashi Y.
2. 発表標題 Identification of novel peptide hormones in plants
3. 学会等名 The 22nd International Plant Growth Substances Association (IPGSA) conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Matsubayashi Y.
2. 発表標題 Identification of novel peptide ligand-receptor pairs in plants
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Latest Advances in Plant Development & Environmental Responses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 ホームページ
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/>

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	望田 啓子 (桑田啓子) (Kuwata Keiko) (70624352)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教 (13901)	