

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02420

研究課題名(和文)新規に同定された短い遺伝子にコードされるホルモン様ペプチドの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of hormone-like peptides encoded by novel small coding genes

研究代表者

花田 耕介 (Hanada, Kousuke)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：50462718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、多数の生物種のゲノムが決定されつつあるが、100アミノ酸以下のタンパク質をコードする短い遺伝子(ペプチド性遺伝子)の機能解析がほとんど進んでいない。本研究の目的は、分子機能が知られていないペプチド性遺伝子の新しい機構を明らかにすることである。申請者は、シロイヌナズナのゲノム上で、遺伝子が存在しないと考えられているゲノム領域に、多数のペプチド性遺伝子を推定した。その中で、過剰発現すると、ストレス耐性を示すものを見出した。そこで、機能的役割を明白にしやすいものに絞って、ペプチド性遺伝子が関わる生理活性シグナルと、その生理活性シグナルへ伝達する経路を明らかにすることを目標とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、ペプチド性遺伝子にコードされるペプチドが、新しい生理活性物質として、農業に利用するための基盤研究にもなる。これらのペプチドを利用すると、遺伝子組み換え技術を利用しない、新しい農業革命につながる可能性があり、応用研究への意義も高い。また、本研究は、植物だけでなく、全ての生物のゲノムに同定されずにいるペプチド性遺伝子の重要性を把握することに繋がる。ペプチド性遺伝子が、ヒトや動物への新しい治療薬として役に立つ可能性もあり、基礎的な意味でも本研究を推進する意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Currently, the genomes are determined in many species but molecular function of small coding genes (<100aa) tend not to have any molecular functions. We inferred a large number of candidates of small coding genes in the intergenic region of Arabidopsis thaliana. Some of novel small coding genes show stress tolerance on overexpressed transgenic plants. To clarify the physiological signals involved in such the genes, we try to examine molecular functions of novel small coding genes.

研究分野：ゲノム生物

キーワード：シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、多数の生物種のゲノムが決定されつつあるが、100 アミノ酸以下のタンパク質をコードする短い遺伝子(ペプチド性遺伝子)を正確に予測することが困難であるため、ペプチド性遺伝子の機能解析が進んでいない。ところが、近年、遺伝子がないとされていた領域に、ペプチド性遺伝子が存在し、生物にとって必須な機能を持つことが見出されている。そこで、申請者は、ペプチド性遺伝子を推定することに特化した方法を開発した。現在、この方法は、ペプチド性遺伝子を同定するために最も精度の高い方法であるという評価を受けている。この方法を用いて、申請者は、植物のモデル生物種であるシロイヌナズナで、約 8000 個のペプチド性遺伝子領域を予測した。さらに、シロイヌナズナの 20 カ所の組織および 22 個の環境条件でトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、3000-5000 個の短い遺伝子がなんらかの組織・環境条件で発現していることを明らかとした。この発現データを利用し、広範囲の組織において発現、あるいは、組織特異的、環境特異的に発現している、約 1000 個のペプチド性遺伝子に着目し、過剰発現体を構築した。その結果、約 10% (91/900) のペプチド性遺伝子で、異常な形態形成あるいはストレス耐性を示すものを見出した。異常な形態形成/ストレス耐性を示す割合は、既存の遺伝子を無作為に選び、過剰発現体を構築した場合(1.7%)に比べ、6 倍以上高い割合であることから、既知の遺伝子に比べても、形態形成/ストレス耐性に関わる遺伝子が多数存在することを示唆している。また、遺伝子として登録されているペプチド性遺伝子の中でも、7 割以上は遺伝子機能が予測されていないことが明らかとなっている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、ストレス耐性試験の内、乾燥耐性、高温耐性、塩耐性を過剰初体で調べているが、塩耐性を示すペプチド性遺伝子が 9 個と多かった塩ストレス耐性に着目し、塩ストレス耐性を示すペプチド性遺伝子が、どのように生理活性を引き起こすかを調べた。

3. 研究の方法

□塩ストレス耐性試験

9 個の塩ストレス耐性を示した過剰発現体は、200mM の濃度の NaCl を含む Murashige-Skoog 培地で生育させ、生存率を調べている。そこで、塩ストレス耐性を調べるために根の伸長により評価し、150mM の濃度の NaCl を含む Murashige-Skoog 培地で生育させ、塩ストレスに対する耐性を観察した。その結果、AT5、AT12、AT13、AT23 の四つの遺伝子を候補として同定した。

□AT13 遺伝子の塩ストレスによる反応

遺伝子候補になった四つの遺伝子は、いずれも塩ストレス環境下では発現変動が高い遺伝子であった。そこで、もっと発現変動が高い遺伝子である AT13 に絞って塩ストレス環境での発現変動を比較した。AT13 遺伝子は、既知の防御機構を推進する ProPEP ファミリーと高い相同性を持つ遺伝子であった。そのため、AT13 の発現変動と ProPEP ファミリーに属する遺伝子と比較した。

□ペプチド添加試験

ProPEP ファミリーに属するペプチド性遺伝子は、細胞外に分泌し、ホルモン様の機能を示し、ペプチド添加で生理活性を引き起こすことが知られている。そこで、AT13 ペプチドの断片化したものを人工的に構築し (SIGMA (<http://www.sigmaaldrich.com>) に発注した) それを植物に添加し、塩耐性を付与できるかを調べた。さらに、ペプチド添加によって塩耐性が付与させた植物体と、AT13 遺伝子を過剰に発現させた形質転換体のトランスクリプトーム解析を行い、ペプチド投与による発現変動と遺伝子を過剰に発現させたことによる発現変動が類似しているかを調べた。さらに、AT13 の発現を抑制させた形質転換体では、野生型と比べて塩耐性に感受性になるか、あるいはペプチドを添加することによって AT13 遺伝子の機能を相補できるかの確認を行った。

□AT13 のシグナル経路の探索

ProPEP ファミリーに属するペプチド性遺伝子は、PEPR1 あるいは PEPR1 の 2 つの膜貫通型 Kinase 遺伝子に結合して、シグナルを発動させていることが知られている。そこで、AT13 にコードされるペプチドがどちらに結合するかを調べるために、PEPR1 および PEPR2 のどちらかの遺伝子欠損体に添加し、塩ストレス耐性をペプチド添加によって付与されるかを調べ、AT13 によるシグナルが PEPR1 あるいは PEPR2 のどちらか介しているかを確認した。

4. 研究成果

塩ストレス耐性試験

9 個のペプチド性遺伝子を過剰発現させた形質転換体では、野生型植物よりも 2 倍以上高い生存率を示した。塩ストレス耐性におけるこれらのペプチド性遺伝子の効果をさらに評価するために、塩分ストレス条件下で過剰発現体のホモ体(T3 世代)で根の成長を評価した。その結果、AT5、AT12、AT13、および AT23 を過剰に発現させた形質転換体で、一次根の長さが WT 植物よりも 1.5 倍以上長いことを示した (P 値<0.05, 図 1)。トランスクリプトームデータでは、これらの 4 つの遺伝子が他の 9 個のペプチド性遺伝子よりも塩ストレスに応答して高いレベルの誘導を持っていることを示していた (P 値= 0.003)。そこで、4 つのペプチド性遺伝子の中で、塩ストレスに応答して最高の誘導 (> 100 倍) を示している AT13 に着目した。AT13 の過剰発

現体 (AT13-ox) と野生型植物 (WT) を比較する液体培養ベースの塩ストレス耐性 (150 mM NaCl) を実施すると、AT13-ox 植物は WT 植物よりも高い塩耐性を示した (図 2A)。さらに、AT13-ox および WT 植物のクロロフィル含量を測定すると、AT13-ox 植物のクロロフィル含量は WT 植物よりも有意に高いことが示された (図 2B)。14 日間にわたる WT および AT13-ox 植物の根の成長の経時的評価により、14 日目までに植物間の有意差も明らかになった (図 2C)。すなわち、AT13 がシロイヌナズナの塩分ストレス耐性に重要な役割を果たすという可能性が考えられた。

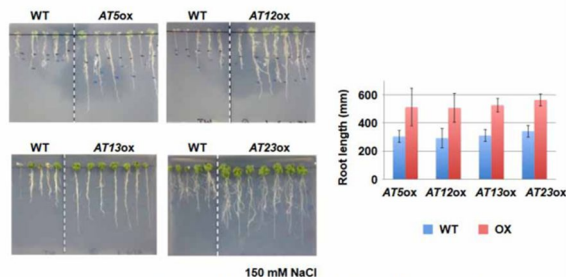


図 1. 野生型 (WT) と塩耐性を示す過剰発現体 (OX) の比較

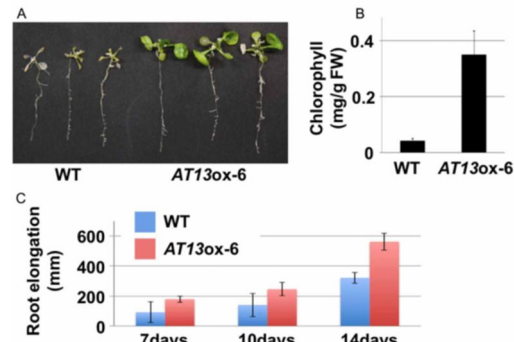


図 2. もっとも強い塩耐性を示した AT13 を過剰発現した形質転換体

AT13 遺伝子の塩ストレスによる反応

AT13 と高い相同性を示す AtPROPEP の遺伝子ファミリーにおいておも、塩ストレス下で誘導を受けているかを調べるために、qRT-PCR 法で、塩ストレス下での遺伝子誘導を調べました。その結果、AtPROPEP の遺伝子ファミリーの中で、AT13 が最も高い誘導を受けていることを明らかにしました (図 3)。この結果は、AT13 が塩分ストレス耐性の誘導に重要な役割を果たすという仮説を支持する。

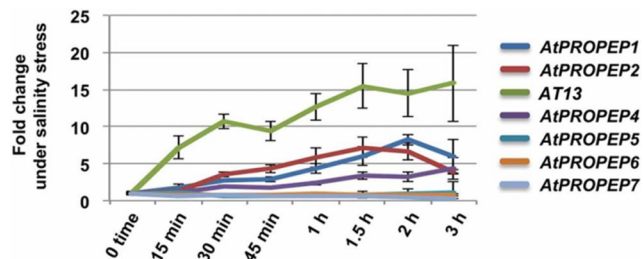


図 3. AtProPep の遺伝子ファミリーに属している AT13

ペプチド添加試験

AT13 によってコードされるペプチドが塩分ストレス耐性で機能的役割を果たすかどうかを判断するために、さまざまな合成ペプチドフラグメントを適用し、液体培養ベース下で塩耐性ストレスを評価しました。さまざまな合成ペプチドの構造を図 4A に示す。AT13 内の機能領域を特定するために、15 アミノ酸の重複領域を持つペプチドフラグメント (約 30 アミノ酸) を合成し、植物の処理に使用した。その結果、AT13-5 ペプチドフラグメントで処理した場合のみ、塩分ストレス耐性を示した (図 4B)。さらに、AT13-5 で処理した実生のクロロフィル含有量は、未処理の対照または他のペプチド断片で処理した実生よりも有意に高かった (図 4C)。



図 4. AT13 をコードしている断片化ペプチドの添加による塩耐性の強化

AT13 ペプチドで植物を処理すると、AT13-ox 植物で観察された表現型と同様の表現型が得られた。したがって、AT13-ox、AT13-5 ペプチド処理によって類似された遺伝子群が誘導されているかを調べた。その結果、アップレギュレートされた遺伝子とダウンレギュレートされた遺伝子の両方は、過剰発現植物およびペプチド処理植物で有意な線形相関を示し ($r = 0.65$, P 値 = 2.0×10^{-21})、両方の植物セットで同様の遺伝子セットが発現変動していることを明らかにした (図 5)。この結果は、AT13-5 ペプチド処理がゲノムレベルで AT13-ox と同様の効果を持つことを示している。

図 6 で示すように、AT13 の発現を抑制させた RNAi 植物は、125 mM NaCl 下で生育させると強い塩感受性の表現型を示す。そこで、合成 AT13-5 ペプチドを適用することにより AT13 RNAi 植物を相補する能力を調べた。その結果、RNAi 植物に 100 nM の AT13-5 ペプチドで処理すると、RNAi 植物の塩感受性表現型が相補され、これらの植物は非処理植物と比較して塩分ストレス耐性を示した (図 6)。この結果は、AT13 ペプチドが塩分ストレス耐性の誘導に不可欠であることを示している。

AT13 のシグナル経路の探索

AT13 ペプチドによる処理によって付与される塩ストレス耐性が、PEPR1 または-2 との同様の相互作用に依存しているかどうかを解明するために、単一または二重の遺伝子欠損体植物を使用して塩ストレス耐性を調べた。はじめに、PEPR1 および-2 で塩感受性を示すかを調べた。その結果、単一あるいは二重の遺伝子欠損体全てで、塩感受性を示した。そこで、AT13 ペプチドを 125 mM NaCl ストレス条件下でこれらの変異体に適用すると、PEPR2 単一変異体のみが塩分ストレス耐性を示し、pepr1 と二重変異体の両方が塩分ストレスに対する感受性を示した。これらの結果は、AT13 ペプチドと PEPR1 の間のシグナル経路が塩分ストレス耐性に重要な役割を果たすことを示している。したがって、塩分ストレス耐性は、AT13 ペプチドと PEPR1 の間の共有経路によって誘導されると考えられた。

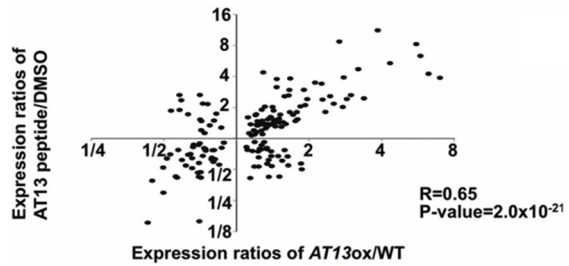


図5. 断片化ペプチドの添加は過剰発現と同じ発現パターンを引き起こす



図6. 断片化ペプチドの添加は発現抑制体を相補する

今後の展望

本研究では、過剰発現で生理活性を誘導するペプチド性遺伝子を見出した後、人工合成したペプチドを用いてペプチド添加試験を行い、塩耐性を誘導するペプチドの発見に至っている。このようなスクリーニング方法で、過剰発現で生理活性を示すペプチド性遺伝子の中から様々な生理活性を誘導されるペプチドを同定できると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryosuke Mega, Fumitaka Abe, June-Sik Kim, Yuuri Tsuboi, Keisuke Tanaka, Hisato Kobayashi, Yoichi Sakata, Kousuke Hanada, Hisashi Tsujimoto, Jun Kikuchi, Sean R. Cutler & Masanori Okamoto	4. 巻 5
2. 論文標題 Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 153-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0361-8	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 該当する

1. 著者名 Naito Tadasuke, Yasunaga Jun-ichirou, Mitobe Yuichi, Shirai Kazumasa, Sejima Hiroe, Ushirogawa Hiroshi, Tanaka Yuetsu, Nakamura Tatsufumi, Hanada Kousuke, Fujii Masahiro, Matsuoka Masao, Saito Mineki	4. 巻 15
2. 論文標題 Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12977-018-0454-x	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 Edet Offiong Ukpong, Kim June-Sik, Okamoto Masanori, Hanada Kousuke, Takeda Tomoyuki, Kishii Masahiro, Gorafi Yasir Serag Alnor, Tsujimoto Hisashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Efficient anchoring of alien chromosome segments introgressed into bread wheat by new Leymus racemosus genome-based markers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genetics	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12863-018-0603-1	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 該当する

1. 著者名 Nakaminami Kentaro, Okamoto Masanori, Higuchi-Takeuchi Mieko, Yoshizumi Takeshi, Yamaguchi Yube, Fukao Yoichiro, Shimizu Minami, Ohashi Chihiro, Tanaka Maho, Matsui Minami, Shinozaki Kazuo, Seki Motoaki, Hanada Kousuke	4. 巻 115
2. 論文標題 AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5810 ~ 5815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1719491115	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 Hanada Kousuke, Tezuka Ayumi, Nozawa Masafumi, Suzuki Yutaka, Sugano Sumio, Nagano Atsushi J, Ito Motomi, Morinaga Shin-Ichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Functional divergence of duplicate genes several million years after gene duplication in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 327 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsy005	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0件

〔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
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)	
研究分担者	LEE JAEMAN (Lee Jaeman) (50404083)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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