

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22313

研究課題名（和文）共生菌の感染を促進させる植物由来ペプチドの網羅的探索

研究課題名（英文）Exhaustive search to identify plant peptides promoting symbiotic effects

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：共生では、お互いの生長のバランスが必要になるため、植物体は、共生菌が必要な状況か、共生菌の不必要な状況か、を共生菌に伝達する分子メカニズムが存在すると考えられる。そこで、細胞外に分泌しているペプチドを人工的に構築し、共生する糸状菌の形態を変化させる一つのペプチドを見出した。これがCt菌の共生誘導を示すかを明らかにするために、候補のペプチドをコードする遺伝子を過剰に発現させる形質転換体とその遺伝子発現を抑制させる形質転換体を構築し、Ct菌に感染させ野生型と形質転換体の生長速度を比較した。その結果、ペプチドを過剰に発現している形質転換体では、野生型よりも生長を促進させる傾向が高いことが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物自身が、共生菌を増加してほしい状況か、細胞を抑制してほしい状況か、を伝達する分子メカニズムが存在するはずである。分子メカニズムを明らかにできた際には、植物共生菌を人為的にコントロールした農法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Since symbiosis requires a balance of growth with each other, it is considered that plants have a molecular mechanism that transmits to symbiotic fungi whether they need symbiotic fungi or not. Here, we found a peptide that artificially constructs a peptide secreted extracellularly and changes the morphology of symbiotic filamentous fungi. In order to clarify whether this indicates symbiotic induction of symbiotic fungus, we constructed a transformant that overexpresses the gene encoding the candidate peptide and a transformant that suppresses the gene expression, and infects Ct bacteria. The growth rates of wild-type and transformants were compared. As a result, it was found that the transformants overexpressing the peptide tended to promote the growth more than the wild type.

研究分野：ゲノム生物

キーワード：シロイヌナズナ 共生

1. 研究開始当初の背景

世界中の人口爆発に対応するために、リンや窒素化合物を含む化学肥料を耕作適地に投入し続け、食料の生産性を上昇させる農法をおこなってきた。しかし、大量投入した結果、土壌表面に塩類が集積し、作物の栽培ができなくなっている農地が世界中に存在する。この方法を現存する栽培適地の農場だけで推進しても、世界の人口爆発に対応できる食料生産ができないことが明らかになってきた。食料生産量を上昇させるためには、作物の栽培に適さない場所でも栽培が可能な農法（大量な化学肥料を必要としない農法）の開発が必要とされている。一つの方法としては、植物共生菌を上手に利用する農法が挙げられている。



図 1 シロイヌナズナと共生菌との関係

植物の根は、生育に必要な水や養分を土から吸収する大事な役割を果たしている。それらの養分は、植物自身によって吸収するだけでなく、植物の根に共生している様々な微生物によって、土の中の養分である窒素やリンを微生物独自の方法で吸収し、それを植物に供給している。一方、根からは植物の光合成産物である糖類などの炭素化合物が共生菌へ供給される。このように、共生菌と植物は、お互いに養分を供給しあって助け合う文字通り「共生」関係にある(図1)。このような共生菌は、ほぼ全ての植物に存在していると考えられている。共生では、どちらか一方の生物種が繁栄することは許されず、生長のバランスが必要になる。例えば、共生菌が植物の根で過剰に増殖すると、炭素化合物が共生菌で消費されてしまい、植物が栄養不足になる。一方で、共生菌が減少すると、窒素やリンが欠乏している土壌では植物の栄養不足になる。そのため、植物自身が、共生菌を増加してほしい状況か、細胞を抑制してほしい状況か、を伝達する分子メカニズムが存在するはずである。分子メカニズムを明らかにできた際には、植物共生菌を人為的にコントロールした農法に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

多細胞生物では、個体として調和の取れた活動を営むために、細胞と細胞のコミュニケーションが重要になる。多細胞生物の外部や内部に起こった情報は、刺激を受けた特定の細胞で合成されたホルモンが、情報シグナルとして細胞外に分泌され、別の細胞で、その刺激情報を伝える。さらに、多くの多細胞生物は、一種のみでは生きていくのではなく、多数の微生物と共生している。そのため、細胞間のシグナル伝達は、同一種の異なる細胞間のシグナルだけでなく、異なる生物種間にも存在する可能性が高い。植物と糸状菌の関係は深く、植物が陸上進出するためには、植物と糸状菌が共生を行うことで陸上進出を成し遂げられたと考えられている。しかしながら、寄生および共生を促進させるシグナル伝達物質は一つ(ストリゴラクトン)しか見だせていない。しかしながら、一つの物質で異種間の複雑な情報交換を行うことは困難である。本研究では、このような情報シグナル因子を新規に同定するために、植物のモデル生物であるシロイヌナズナと、共生関係を示す *Colletotrichum tofieldiae* (Ct 菌) に着目する。

近年、植物の共生菌と植物間では、様々なペプチドが異生物種間のシグナル伝達様物質として役割を果たすことを示唆する結果を得られている。そこで、本研究では、植物の短い遺伝子にコードされる分泌性ペプチドに着目する。しかしながら、分泌性ペプチドの多くがコードされている短い遺伝子は、偽陽性が高くなることから、遺伝子として登録されていない傾向がある。そこで、申請者は、未同定のペプチド性遺伝子を推定する情報解析の方法を構築し(Hanada et al., Bioinformatics, 2009) 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(Hanada et al., Genome Research, 2007)。そこで、これらのリソースを用いて、Ct 菌との共生を促進させるペプチドを発見することを目指す。

3. 研究の方法

(ア) 候補ペプチドをコードする遺伝子の探索

シロイヌナズナの葉の細胞外液(アポプラスト)から 122 個のペプチドをコードする短い遺伝子(既知の短い遺伝子 37 個、新規の短い遺伝子 85 個)を単離した。さらに、防御反応および形態形成にも関わるサリチル酸およびジャスモン酸を植物体に添加し、これらに反応し細胞外に分泌したペプチドの同定を以下のように試みた。3 週齢のシロイヌナズナを準備し、サリチル酸ナトリウム、あるいは、ジャスモン酸メチルを 500 μ M の濃度で 150mL をスプレーで噴霧し、36 時間後に、導管液および師管液の採取を行った。その導管液および師管液に存在する分泌ペプチドを LC-MS/MS 解析で網羅的に同定した。同時に、サリチル酸あるいはジャスモン酸に誘導される遺伝子を同定するために、シロイヌナズナの植物体から RNA を抽出し、花田がデザインした Agilent のカスタムマイクロアレイによって全遺伝子の発現強度を推定した。そ

の結果、サリチル酸あるいはジャスモン酸に誘導され、導管液あるいは師管液に分泌されている 142 個の 120 アミノ酸残基以内の短い遺伝子を見出した。

(イ) 生理活性ペプチドの探索

既知の生理活性ペプチドは、翻訳後に植物内で断片化を受け、10 残基程度のアミノ酸からなる活性型として機能する。そこで、1 遺伝子がコードするペプチドにつき、5 残基のアミノ酸が重なる 20 残基の断片化ペプチドを人工的に合成した。そのため、142 + 122 個の短い遺伝子配列を基に、322 個のペプチドの人工合成を行った。Mathur medium で 1 週間培養した Ct 菌から、胞子を 1.0×10^5 spores/ml になるように調整し、50 μ M に調整した各ペプチドを入れて、1 週間培養し、Ct 菌の形態変化を顕微鏡で観察した。

(ウ) 形質転換体作製

発現抑制体の作製には、遺伝子サイレンサーの前駆体である ath-miR159a を使用した。この ath-miR159a (Rhoades et al., 2002) のターゲット配列を先行研究にて見出されたペプチドをコードする遺伝子のコーディング配列に置き換えた人工 DNA を設計した。人工 DNA の配列は表 6 に示す。GeneArt Strings DNA Fragments and Libraries (Thermo Fisher Scientific) に外注した。これを過剰発現プロモーターが組み込まれた Basta 耐性遺伝子をもつプラスミドベクターである pBST1 (Matsushita., 2011) に In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて導入した。miRNA が組み込まれた pBST1 をヒートショック法によりアグロバクテリウムに導入を行い、Floral Dipping 法 (S. Clough et al., 1998) を用いてアグロバクテリウムをシロイヌナズナに感染させた。

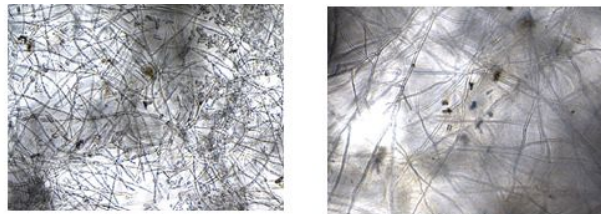
(エ) 植物体での Ct 菌感染実験

リンの濃度を 25 μ M、625 μ M に調整した MS 培地に培地の温度が 50 以下の状態で胞子濃度を一定 (1×10^5 spores/ml) に調整した Ct 菌の胞子懸濁液を培地に対して 1:10 の割合で加えた。同様にコントロールである菌なし用の培地には milliQ を培地に対して 1:10 の割合で加えた。それぞれの培地に 7 日齢のシロイヌナズナを 1 つのプレートに 5 つずつ移植し、2~3 週間後に、植物体の生育を観察した。

4. 研究成果

● ペプチド添加実験の結果

ペプチドを添加したことによる異常な菌の形態変化が起きるかを調べるために、322 種類のペプチド添加実験を共生関係を示す Ct 菌に対して行った。その結果、異常な菌糸伸長を示す一つのペプチドを見出した(図 2)。抗菌活性が強い添加物を加えると、糸状菌は異常な数の分岐を示すが、まったく、菌糸が伸びずに死滅する。



Control ペプチド添加
図 2. ペプチドを添加した Ct 菌の形態変化

一方、菌糸は通常では、分岐を引き起こし、植物体に侵入するが、このペプチドは、植物体への侵入を妨げているものの、糸状菌の成長を衰退させているとは考えられなかった。そのため、このペプチドが、共生効果を加えると考えられた。

● 形質転換体での感染実験

共生関係を示す Ct 菌に形態異常を引き起こすペプチドをコードする遺伝子の過剰発現体と発現抑制体に低リン条件と高リン条件で生育させ、Ct 菌を感染させることで、成長促進が野生型と比較して促進しているかを調べた。その結果、低リン条件で生育させた場合のみで、過剰発現体の形質転換体で共生関係を促進することを示唆する結果を得た。しかし、この遺伝子が共生効果に影響するかを明確にするためには、様々な条件で共生効果を調べる必要があると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Pingyu, Yao Shaolun, Kosami Ken ichi, Guo Ting, Li Jing, Zhang Yuanyuan, Fukao Yoichiro, Kaneko Kawano Takako, Zhang Heng, She Yi Min, Wang Pengcheng, Xing Weiman, Hanada Kousuke, Liu Renyi, Kawano Yoji	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics and proteomics based screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 415 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbi.13208	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 Ezoe Akihiro, Shirai Kazumasa, Hanada Kousuke	4. 巻 38
2. 論文標題 Degree of Functional Divergence in Duplicates Is Associated with Distinct Roles in Plant Evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msaa302	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 Higuchi-Takeuchi Mieko, Kondo Takayuki, Shimizu Minami, Kim You-Wang, Shinozaki Kazuo, Hanada Kousuke	4. 巻 104
2. 論文標題 Effect of small coding genes on the circadian rhythms under elevated CO2 conditions in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01023-w	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 FuminoriTakahashi, KousukeHanada, TakayukiKondo, KazuoShinozaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2019.05.011	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 Kazumasa Shirai, Kousuke Hanada	4. 巻 10
2. 論文標題 Contribution of Functional Divergence through Copy Number Variations to the Inter-species and Intra-species Diversity in Specialized Metabolites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01567	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	柘植 尚志 (Tsuge Takashi) (30192644)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	

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