

平成30年6月6日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18567

研究課題名(和文)リン欠乏に応答した長距離シグナル制御因子の探索と解析

研究課題名(英文)The exploration of regulators for the long-distance signaling in response to phosphate-starvation

研究代表者

田畑 亮 (Tabata, Ryo)

名古屋大学・PhD登龍門推進室(農)・特任講師

研究者番号：30712294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのSplit-root 培養法を用いたリンおよび鉄欠乏培養時のトランスクリプトーム解析から、植物の根の一部がリンや鉄欠乏を感知すると、全身的な情報伝達制御を介して、局所的なリンおよび鉄欠乏を相補するような遺伝子発現変動により、地上部の成長を一定に保つようなシステムが働くことを明らかにした。また、長距離シグナルに関わることが期待される幾つかのペプチド候補因子を単離することができた。

さらに、リン欠乏時におけるトマト道管液を用いたLC-MS解析から約500種のタンパク質を同定した。この中から、リン欠乏時に発現が上昇するいくつかの分泌型タンパク質を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The results of split-root culture indicated that, when some roots recognize Phosphate or Fe-starvation, a long-distance signaling is initiated in the portion of the root directly experiencing Phosphate or Fe-starvation. Then, this information transmit to another roots through "root-to-shoot-to-root" pathway. A series of genes that involved in Phosphate or Fe uptake and metabolism are concomitantly induced on the other side of the roots to compensate for the local Phosphate or Fe-deficiency.

We also identified several mobile signal candidates for long-distance signaling in response to Phosphate or Fe-starvation through the transcriptome analysis and proteome analysis using the xylem sap of Tomato.

研究分野：植物分子生物学 植物栄養学

キーワード：長距離シグナル 無機栄養欠乏ストレス 植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

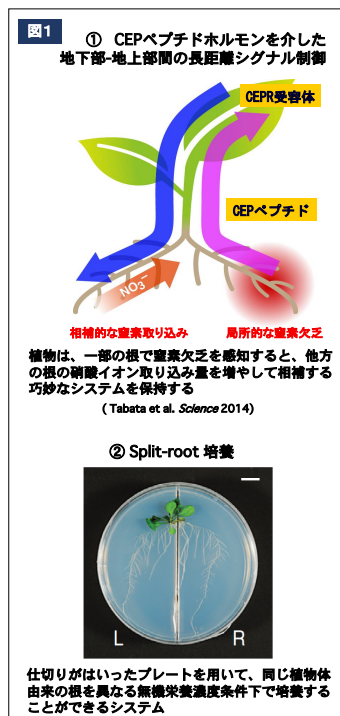
動物が中枢神経系による一元的な情報処理によって個体統御をおこなうのに対して、植物は、各細胞が自律性を保持し局所的に応答するとともに、道管や篩管液の維管束系を介した全身的な情報伝達を発達させ、それらの総体として個体全体を統御するシステムを進化させてきた。

一方で、これまで無機栄養欠乏応答の研究においては、シロイヌナズナやイネを用いた遺伝学的なアプローチ等により、それぞれの無機元素に対する輸送体や代謝遺伝子、あるいはそれらの因子の発現量を制御する情報伝達因子群が多数同定されてきた。しかし、これらの変異体解析から解明された分子メカニズムは、その殆どが根における局所的な栄養取り込み制御に関するものであった。また、多くの実験は、均一な無機栄養濃度条件での培地(根圏環境)下で実施されたものであり、植物が本来保持している不均一な土壤環境へ適応するためのシステムを捉え切れていなかった。つまり、植物が外環境変化に応答して個体全体の恒常性維持するために持つ「地下部-地上部間の情報交換」システムや、それらの仕組みを使った「土壤栄養環境の不均一性への適応戦略」は理解が限定的であった。

## 2. 研究の目的

植物は様々な土壤環境ストレスに順応するため、維管束系を利用した全身的な情報伝達機構を発達させてきた。しかしながら、これらの植物の長距離シグナルを担う分子はほとんど明らかになっていなかった。申請者はこれまで、土壤中の不均一に存在する硝酸イオンを効率良く吸収するための“根-葉-根”間の長距離シグナル伝達がペプチドホルモン CEP を介して行われる事を明らかにした(図 1-①)。

そこで本研究では、植物の土壤中のリン欠乏を中心に、または鉄欠乏に応答した根-葉-根間の長距離シグナルを担う移動性分子の探索や、その制御機構の解析



によって、植物特有の長距離シグナル伝達機構の解明を目的とする。

本研究では、申請者によって明らかになった窒素欠乏に応答した長距離シグナルの結果を基盤として、植物が持つ不均一な土壤環境への適応システム理解へ迫るため、土壤中の不均一栄養環境を模倣した Split-root 培養法(図 1-②)を利用する。これによって、リンや鉄欠乏に応答した移動性シグナル分子および制御因子を単離し、根-葉-根間の長距離シグナル伝達機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、Split-root 培養法を用いた、リン欠乏および鉄欠乏処理時におけるトランスクリプトーム解析や、リン欠乏および鉄欠乏時の道管液をもちいた nano-LC-MS 解析により直接的な移動性シグナル分子の同定をおこない、リンや鉄の長距離シグナルを介した取り込み制御機構を明らかにする。また、遺伝学的なアプローチも併用して、リンや鉄取り込み制御にかかわるトランスポーターの発現量変動を指標に変異体スクリーニングを行い、新たなシグナル制御因子の単離を目指す。

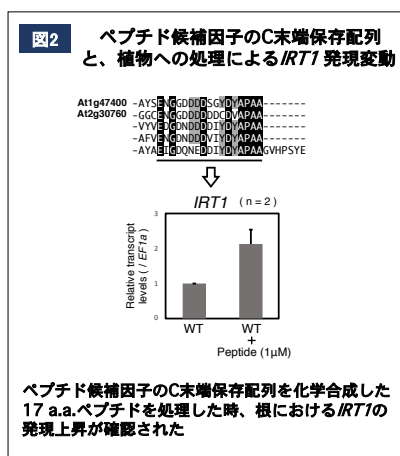
## 4. 研究成果

シロイヌナズナの Split-root 培養法を用いたリン欠乏および鉄欠乏培養によって、植物の根の一部がリンや鉄欠乏を感知すると、全身的な情報伝達制御を介して、局所的なリン欠乏を相補するような遺伝子発現変動により、地上部の成長を一定に保つようなシステムが働くことを明らかになった。つまり、Split-root リンおよび鉄欠乏培養により、一部の根がリンおよび鉄欠乏にさらされても、地上部の生育は、十分にリンや鉄が存在する培地下で生育させた時と変わらなかった。同時に、Split-root リンおよび鉄欠乏培養をおこない、qPCR 解析による遺伝子発現変動解析をおこなったところ、欠乏区とは反対の、周辺に十分な栄養がある根において相補的な取り込み制御がみられた(トランスポーターの発現上昇)。この結果は、植物には、無機栄養が存在している根において積極的に取り込むシステムが存在していることを示唆している。

また、Split-root リンおよび鉄欠乏培養時のトランスクリプトーム解析から、網羅的な遺伝子発現変動を明らかにすることができた。植物は、一部の根がリンおよび鉄欠乏にさらされても、周囲に十分なリンや鉄が存在する根において積極的にトランスポーター遺伝子の発現を上昇させるだけではなく、各無機栄養の代謝に関わる遺伝子も連動して発現上昇させていることがわかった。そして、

ペプチド候補因子や、分泌型タンパク質など、長距離シグナルに関わることが期待される幾つかの因子を抽出した。現在、これら候補因子の変異体をもちいたリン欠乏および鉄欠乏応答マーカー遺伝子の発現変動について解析中である。鉄欠乏に応答したペプチド候補因子の1つには、ファミリー内で保存されているC末端領域のアミノ酸17残基を化学合成して植物に処理したところ、鉄のトランスポーター遺伝子 *IRT1* の発現上昇を引き起こす候補因子も見つかっている (図2)。

現在、この因子は変異体や過剰発現体を用いて、接ぎ木により葉から根、あるいは根から葉への移動性分子であるかどうか検証をおこなっている。



また、道管液をもちいた nano-LC-MS 解析により直接的な移動性シグナル分子の同定を目的として、シロイヌナズナを用いた根圧を利用した胚軸切断による道管液の採集の条件検討をおこなった。しかしながら、シロイヌナズナの道管液をもちいた nano-LC-MS 解析では網羅的なタンパク質の同定は困難であったため、トマト道管液を用いた解析を進めた。リン欠乏時におけるトマト道管液を用いた nano-LC-MS 解析から約 500 種のタンパク質を同定した。この中から、リン欠乏時に発現が上昇するいくつかの分泌型タンパク質を見出した。これらの移動性タンパク質候補因子を中心に、リン欠乏時の長距離シグナルとの関連性について解析を進めている。

リンや鉄取り込み制御にかかわるトランスポーターの発現量変動を指標にした変異体スクリーニングに関しては、スクリーニングの条件検討に時間を要したため、当初予定していたスクリーニングまでは実施できなかった。しかし、リン欠乏応答については *Ph1;8 pro::LUC* ライン、鉄に関しては *IRT1 pro::LUC* ラインを完成することができた。今後はこれらの形質転換体を用いた網羅的なスクリーニングが可能である。

## 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 3 件)

1. #Ohkubo, Y., #Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M. Matsubayashi, Y. #Equally contributed. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. (2017) *Nature Plants*, 3: 17029. (査読あり)
2. Okamoto, S., Tabata, R., Matsubayashi, Y. Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. (2016) *Curr Opin Plant Biol.*, 34: 35-40. (査読あり)
3. Tong, W., Imai, A., Tabata, R., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Yamada, M., Hasebe, M., Sawa, S., Motose, H., Takahashi, T. Polyamine Resistance Is Increased by Mutations in a Nitrate Transporter Gene *NRT1.3 (AtNPF6.4)* in *Arabidopsis thaliana*. (2016) *Front Plant Sci.*, 7: 834. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. Kumiko Ikuta, Takushi Hachiya, Takehiro Kamiya, Hitoshi Sakakibara, Ryo Tabata. Long-distance signaling in response to Fe-starvation. Taiwan-Japan Plant Biology 2017 年 11 月 (台北)
2. Kumiko Ikuta, Takushi Hachiya, Hitoshi Sakakibara, Ryo Tabata. Long-distance signaling in response to Fe-starvation. 第 58 回日本植物生理学回 2017 年 3 月 (鹿児島)
3. Kumiko Ikuta, Ryo Tabata, Yoshikatsu Matsubayashi, Hitoshi Sakakibara. Long-distance signaling in response to Fe-starvation. 第 2 回植物の栄養研究会 2016 年 9 月 (名古屋)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~ck/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田畑 亮 (TABATA Ryo)

名古屋大学・生命農学研究科/高等研究院・

特任講師

研究者番号：30712294

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

神谷 岳洋 (KAMIYA Takehiro)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40579439