

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21422

研究課題名（和文）植物における機能未知の分泌型ペプチド性シグナル群の機能解明を目指した萌芽的戦略

研究課題名（英文）A strategy to elucidate unknown functions of plant secreted peptides.

研究代表者

打田 直行（Uchida, Naoyuki）

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：40467692

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）：本研究では、植物の機能未知分泌ペプチドの中から新機能を持つ因子を同定し、その機能や発現部位とそれらの環境依存性を特定することを目指した。各種のデータベースから細胞種特異的な発現パターンを示すと推定された分泌ペプチドを約80個選び、変異体コレクションを整備した。類似遺伝子が存在する場合には多重変異体も作成した。これら変異体群をいくつかの培養条件で栽培し、表現型を示すものを選抜した。興味深い表現型を示した因子の発現パターンの解析も行なった。その結果、通常は目立った表現型を示さないものの、自身の発現に関わるストレスに晒された時のみ変異体に表現型があらわれるような因子を複数同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物の発生や環境応答などに関わる内在性の新重要シグナルの発見は、それ以前までの制御モデルの改訂や大きな見直しにつながることから、その分野の発展の大きな節目となることが多く、新シグナル分子の機能の発見1つ1つが新しい研究展開・研究転換の萌芽的起点となる。とりわけ、環境応答に関わるシグナル経路は、気候変動などにより変動する環境下でも生存できる植物種や農作物種の創出にも貢献できる可能性もあり、今後の活用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to identify secreted peptides with novel functions in plants and determine their functions and expression patterns. We also studied the dependence of their actions on environmental changes. We selected approximately 80 peptide genes presumed to show cell type-specific expression patterns using various databases and developed a collection of their mutants. We generated high-order-multiple mutants when redundant genes seemed present in the genome. These mutants were grown under several conditions and screened for their phenotypes. We also analyzed the expression patterns of the selected factors that exhibited interesting phenotypes. As a result, we identified several secreted peptides that do not show apparent mutant phenotypes under normal conditions but exhibit interesting phenotypes only when the mutants are exposed to stresses related to their expression control.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：分泌ペプチド 変異体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過去の動物の研究でも植物の研究でもそうであったが、多細胞生物の発生や環境応答などに関わる内在性の新シグナル分子が1つ発見され、その機能に迫る最初のきっかけさえ報告されると、それを皮切りにその関連事象の解明が世界中で始まる。新重要シグナルの発見は、往々にして、それ以前までの制御モデルの改訂や大きな見直しにつながることから、その分野の発展の大きな節目となることも多い。すなわち、新シグナル分子の機能の発見1つ1つが新しい研究展開・研究転換の萌芽の起点となる。

各シグナル分子には、その分子を特異的に受容する受容体が存在するので、新シグナル発見の次は受容体同定も重要となるが、シグナル分子さえ見つかれば、受容体は遺伝学や生化学を駆使して同定できるケースが多い。シグナルと受容体がともに同定されると、シグナル生成細胞と受容体発現細胞の特定により、どの細胞とどの細胞の間で連絡が取られているかが判明し、多細胞生物における様々な現象の調節機構を空間的に理解する上で重要な知見になる。

植物において細胞間コミュニケーションの解明例は未だ限定的である。研究が進んでいるシロイヌナズナを例にすると、分泌ペプチドをコードする遺伝子の推定数は800を超えるが、そのほとんどが機能未知である。また、約600と推定される受容体遺伝子のうちで機能が解明された数も限定的である。すなわち、植物では、未だに無数の細胞間コミュニケーションが未解明のままとなっていると想像できる。そのなかでも、環境応答で働くなど、特定の環境下でしかその変異体が表現型を示さないような分泌ペプチドの同定は著しく滞っており、各種の環境応答における重要シグナルの発信元になる細胞が不明なままになっているケースが多いのが現状である。逆の考え方をすれば、様々な環境応答においてその各々で働く分泌ペプチドを同定し、その発現の部位や環境応答性を解析すれば、各環境応答においてシグナル発信細胞を特定できる期待がある。

### 2. 研究の目的

(1) 植物の機能未知分泌ペプチド群の中から、どの機能未知分泌ペプチドがどのような環境応答において重要な役割を果たすのか、を解析する。

(2) 着目した分泌ペプチドの発現レベルの発現部位、また、それらの環境応答性を解析することで、その環境応答においてシグナルを発信する細胞を特定する。

さらなる展望としては、着目した分泌ペプチドの受容体同定も想定するが、シグナル分子さえ見つかれば受容体同定は既存技術を駆使して達成できる例も多いので、萌芽研究である本研究の期間内の主目的には受容体同定までは含めず、上の2つを達成目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究で申請した期間内での目的は、機能未知分泌ペプチドの役割を数多く特定する、という萌芽的なものである。一方、将来展望としては受容体の同定も行い、どの細胞とどの細胞の間で情報がやり取りされているかの理解を達成することまでを期待している。この展望を見据えると、分泌ペプチドの生成細胞が特異的である方が情報発信細胞として分かりやすい。そこで、シロイヌナズナの多数の発現データベースを独自解析し(主にシロイヌナズナの発現データベースである eFP Browser と複数のシングルセル RNA-seq のデータベースを用いた)、特異的な細胞でのみ発現すると期待できる機能未知分泌ペプチドを抽出した。この解析を進めるにあたっては、研究代表者がこれまでに従事してきた経験を活用するために、分泌ペプチドの中でもシステインリッチ型と呼ばれる分泌ペプチド群を対象とした。

(2) 抽出した因子群に関しては、シロイヌナズナの機能欠失変異体の整備を進めた。基本的にはT-DNA挿入体を用いることとしたが、T-DNA挿入体を利用できないものに関してはCRISPR/Cas9を用いて変異を導入する計画を立てた。また、機能冗長的に働き得る類似因子が存在する場合にはそれらの多重変異体の確立も進めた。

(3) 整備した変異体群を通常の栽培条件に加えて様々な環境要因を変化させた条件でも栽培し、各条件で何らかの目に見える表現型を示す変異体を探索した。

(4) 変異体に表現型が現れた分泌ペプチドの中でも特に興味深いと判断したものに関しては、プロモーター活性を指標に発現解析を行うためのレポーターを導入した植物を作成した。特定の環境条件下のみ表現型が現れる遺伝子に関しては、対応する環境ストレスの有無の両条件下で比較解析を行い、着目した遺伝子を発現する部位に加えて、その発現レベルや発現部位の環境応答性を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 植物体の広範な部位で発現するのではなく特異的な細胞種や領域でのみ発現することが期待できる機能未知のシステインリッチ型の分泌ペプチドの候補として、85 個の遺伝子群を選抜した。

(2) 74 個の遺伝子に関しては、シロイヌナズナのリソースセンターである ABRC から T-DNA 挿入体を入手した。11 個の遺伝子に関しては、T-DNA 挿入体が存在しなかったため、CRISPR/Cas9 を用いて独自に機能欠失変異体を作成した。これら 85 個の遺伝子のうちで互いに配列の類似性が高い組み合わせとして 18 ペア (36 遺伝子) が存在した。そこで、これらの 18 ペアに関しては、機能冗長的に働くことを想定して二重変異体も作成した。

(3) 以上のように作成した変異体コレクションを用いて、通常条件下で栽培した時に興味深い表現型が見られるかを調べたところ、複数の遺伝子の変異体群で根の成長や形態の異常が生じた。また、通常条件下で栽培した時には変化が生じない場合であっても特定の環境下では表現型が現れる可能性も考え、今回整備した変異体コレクションを高塩条件、高温条件、低温条件、高浸透圧条件を中心とする様々な環境条件下で栽培したところ、これらの栽培条件下でも複数の遺伝子の変異体群で根の成長や形態の異常が生じた。

(4) (3) で異常が見られた変異体の中でも、特定の環境下でのみ表現型が現れるものを優先的に調べることにした。特に、互いに配列が類似し、機能冗長的に機能することが推定された #80 遺伝子と #81 遺伝子のペアに着目した解析は順調に進んだ。#80 遺伝子と #81 遺伝子のプロモーター活性を蛍光タンパク質の発現でモニターできる形質転換体をそれぞれ作成して観察したところ、#80 遺伝子と #81 遺伝子も通常時から根の組織の環境に接する最外部で発現していた。ストレス条件下では、発現する細胞の種類には変化は見られなかったものの、発現レベルが上昇していた。

(5) #80 遺伝子と #81 遺伝子の二重変異体の根の構造を詳細に観察すると、通常の栽培条件下では特に目立った異常は生じていなかった。一方で、この二重変異体をストレス条件下に晒したところ、通常は整然と並ぶ根の組織構造に異常が生じた。#80 遺伝子と #81 遺伝子のそれぞれの単独変異体に関しては、根の組織構造に異常が見られなかったことから、#80 遺伝子と #81 遺伝子は機能冗長的に機能すると考えられた。

(6) #80 遺伝子と #81 遺伝子の二重変異体で生じる異常をさらに具体的に詳細を解析するにあたり、根の形態形成で重要な役割を果たす例が多い植物ホルモンに着目した解析を行なった。その結果、この二重変異体ではストレス環境下において植物ホルモンの 1 つであるオーキシンの応答に異常が生じていることがわかった。ここまでの結果から、植物の根の構造はストレス環境下では秩序が失われる危険があるものの、そうした異常が生じないようにするための頑強性を担保するための仕組みが備わっていると考えられる。そして、#80 遺伝子と #81 遺伝子はそうしたストレス条件下においても整然とした根の構造を維持するために働く分泌ペプチドをコードしていると考えられる。また、この分泌ペプチドはオーキシンに対する応答が制御することを通じて根の構造維持の仕組みを調節する可能性が考えられる。

## 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 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto N, Pino Del Carpio D, Hofmann A, Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T, Uchida N, Torii KU, Colombo L, Groth G, Simon R	4. 巻 30
2. 論文標題 A peptide pair coordinates regular ovule initiation patterns with seed number and fruit size.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 4352-4361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.08.050	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 Hirakawa Y, Fujimoto T, Ishida S, Uchida N, Sawa S, Kiyosue T, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Bowman JL	4. 巻 30
2. 論文標題 Induction of Multichotomous Branching by CLAVATA Peptide in Marchantia polymorpha.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 3833-3840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.07.016	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 Nishimura K, Yamada R, Hagihara S, Iwasaki R, Uchida N, Kamura T, Takahashi K, Torii KU, Fukagawa T	4. 巻 48
2. 論文標題 A super sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 e105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa748	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 Nakashima Y, Kobayashi Y, Murao M, Kato R, Endo H, Higo A, Iwasaki R, Kojima M, Takebayashi Y, Sato A, Nomoto M, Sakakibara H, Tada Y, Itami K, Kimura S, Hagihara S, Torii KU, Uchida N	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of a pluripotency-inducing small compound, PLU, that induces callus formation via Heat Shock Protein 90-mediated activation of auxin signaling.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1099587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1099587	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 該当する

1. 著者名 Negoro S, Hirabayashi T, Iwasaki R, Torii KU, Uchida N	4. 巻 46
2. 論文標題 EPFL peptide signaling ensures robust self pollination success under cool temperature stress by aligning the length of the stamen and pistil.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Environ.	6. 最初と最後の頁 451-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14498	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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	テキサス大学			
ドイツ	ハインリッヒハイネ大学			
オーストラリア	モナシュ大学			