

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21437

研究課題名（和文）浸透圧応答性分泌ペプチド群によるストレス情報の共有メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the connected mechanism of stress information via secretory peptides in response to osmotic stress

研究代表者

高橋 史憲（Takahashi, Fuminori）

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・准教授

研究者番号：00462698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出される分泌ペプチド群を網羅的に同定し、その浸透圧ストレス応答におけるペプチド群によるストレス情報の共有メカニズムの解明を行った。その結果、ストレス依存的に修飾を受けるタンパク質またはペプチドの同定に成功した。さらに候補因子群の変異体を作成し、機能解析を行うことで、候補因子の絞り込みを行った。その結果、1つの候補因子変異体は浸透圧ストレス応答に弱い表現型を示すことを明らかにした。これらの結果は、ストレス情報の共有メカニズムを制御する重要な因子の同定に成功したことを示す成果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は、動物と異なり神経を持たないにもかかわらず、様々な器官で環境情報を感じ、環境ストレスに適応していることから、外界の環境変化を素早く認知し、植物個体全体で情報を共有・統合して、ストレス耐性を獲得するための器官間コミュニケーションシグナルが存在することが考えられる。本研究では、ストレス依存的に細胞外に放出される複数のペプチド分子群を同定し、植物体におけるその機能を明らかにした。これらの知見を活用することで、様々な変化する環境ストレスに対して、詳細に応答可能なストレス耐性作物の開発の一助を担う研究となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we comprehensively identified the secreted peptides that are released extracellularly in an osmotic stress-dependent manner, and elucidated the connected mechanism of stress information via the peptides in response to osmotic stress. As a result, we identified the proteins or peptides that are modified in a stress-dependent manner. We further narrowed down the candidate peptides by using the mutants of the candidate peptides and analyzed their functions in planta. The results revealed that one of the candidate peptides mutant exhibited a weak phenotype in osmotic stress response. These results indicate that we succeeded in identifying an important factor that regulates the connected mechanism of stress information under osmotic stress conditions.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：環境応答 ストレス ペプチド 長距離シグナル

1. 研究開始当初の背景

浸透圧ストレス応答は、乾燥ストレスなどで働く初期応答であり、根で感受した水分減少情報を、素早く地上部に伝達するストレス感受シグナルとして働く。このシグナルは、葉の維管束柔組織で作られる植物ホルモン「アブシジン酸 (ABA)」の合成をひき起こす。ABA は、植物の乾燥ストレス耐性獲得において重要なホルモンであり、気孔の閉鎖や、ストレス耐性遺伝子の発現制御など、様々な生理応答を導く。我々の研究室では、これまでに ABA によるシグナル伝達機構を解析し、乾燥ストレスでの ABA 合成に重要な役割を果たすキナーゼ *NCED3* 遺伝子の同定と機能解析を行ってきた (引用文献、)。 *NCED3* 遺伝子は、乾燥ストレスで発現量が増加する唯一の ABA 合成酵素である。 *nced3* 変異体は乾燥ストレスに弱く、 *NCED3* 過剰発現体は乾燥に強いことから、 *NCED3* の発現制御は、乾燥耐性の獲得において非常に重要なメカニズムである。

申請者は、浸透圧ストレス初期に CLE ペプチドが根から放出され葉に移動し、葉で受容体と会合した後、葉での *NCED3* 遺伝子の発現を上昇させ、ABA の蓄積や気孔の閉鎖、ストレス耐性の獲得を制御することを明らかにした (引用文献)。さらに複数のペプチド分子群がストレス依存的に細胞外に放出され、 *NCED3* の発現を制御する浸透圧ストレス応答に関わることを突き止めている。これらの研究結果は、離れた組織間で浸透圧ストレス情報を伝達・共有する、移動性分子群による複雑な器官間コミュニケーションネットワーク網が存在することを示している。

2. 研究の目的

植物は芽を出した場所から動かず生育するため、刻々と変化する自然環境をつぶさに認識しながら、劣悪環境に適応して生き抜いている。特に乾燥ストレス条件下では、土壤中と大気中の環境は全く異なるために、根と葉で乾燥ストレス条件をモニターし、離れた器官で密接に環境ストレス情報の交換を行っていると考えられる。なかでも浸透圧ストレス応答は、植物にとって重要な乾燥ストレス感知メカニズムである。申請者は、CLE ペプチド以外にも浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出されるペプチド群が存在し、一部の分泌ペプチドは、葉での *NCED3* の発現を制御する浸透圧ストレス応答に関わることを突き止めている。これらの結果は、植物には複数のペプチド群を使って離れた組織間で浸透圧ストレス情報を伝達・共有する、複雑な長距離シグナルネットワーク網が存在することを示唆する。

本研究では、浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出される分泌ペプチド群を、組織別に網羅的に同定し、それらの分子群制御を詳細に解析し、CLE ペプチドシグナルを基軸とした浸透圧ストレス応答におけるペプチド群による長距離シグナルを介したストレス情報の共有メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

1. 組織別に着目した、浸透圧ストレス依存的に分泌されるペプチド群の同定

申請者は先行研究において、シロイヌナズナ T87 培養細胞の培養液中から、 *NCED3* の発現を制御するストレス依存的な分泌ペプチドを同定しているが、ペプチドが分泌される組織の特定に時間がかかる。本課題では、液体培養によって細胞外アポプラスト領域を肥大化させたシロイヌナズナ植物体にストレス処理を行い、根と葉を分離し、アポプラストに分泌したペプチド群を nanoLC-MS/MS を用いて網羅的に同定し候補ペプチド群を拡充させる。また、同定した候補ペプチド群の合成ペプチドを作成し、 *NCED3* の発現制御に対するペプチド活性を指標にスクリーニングを行う。さらにプロリン水酸化やアラビノシル化などのアミノ酸修飾による活性調節に関しても MS/MS データを深く分析し、 *NCED3* への発現制御活性を評価する。

2. 単離ペプチド群の *NCED3* を介した ABA・乾燥応答における詳細な機能解析

申請者が単離している *NCED3* の発現を制御する新規ペプチドを中心として、プロモーター-GUS または GFP 植物を使った組織特異的なペプチド発現の解析や、CRISPR/Cas9 法を使ったペプチド遺伝子破壊変異体の作成、ペプチド変異体を使った乾燥および浸透圧ストレス耐性試験、ストレス依存的な *NCED3* の発現を介した ABA 蓄積量変化の測定、ABA 蓄積量変化に伴う気孔開閉異常の測定、変異体の接木植物を作成し、LC-MS/MS を使った移動ペプチドの検出、 *NCED3* の発現を制御する長距離シグナルを介した分子機構を解析する。

3. CLE ペプチドシグナルとの相互作用に着目したストレス情報の共有メカニズムの解析

単離ペプチドと CLE ペプチドシグナルとの相互作用の解析では、ペプチド変異体における、CLE ペプチド処理による *NCED3* 発現上昇の変化、CLE 変異体との接木や多重変異体を作成し、浸透圧ストレスシグナルにおける作用機序の上・下流関係、器官間コミュニケーションの連携性を *NCED3* の発現を指標に解析する。さらに本研究では、CLE - *NCED3* シグナルとは関わらないカルシウムなどの早い応答や、ABA 蓄積後の根や葉の形態形成に関わるペプチドも取得できる。G-CaMP3 植物体を使ったペプチドとカルシウムシグナルの可視化、ストレス依存的な根の生長抑制などの多角的な解析データを統合し、浸透圧ストレス応答におけるペプチド群による長距離シグナ

ルを介したストレス情報の共有メカニズムを解明する。

4. 研究成果

シロイヌナズナ培養細胞に浸透圧ストレス処理を行った後、培養液のみを回収して、脱塩、濃縮精製を行い、高分解能質量分析装置を用いて、浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出されるペプチドを網羅的に同定した。その結果、332のタンパク質またはペプチドを同定することに成功した。次に、浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出されたペプチド群のリストを用いてGO解析を行った(図1)。その結果、糖結合や抗酸化作用に関わる遺伝子群が有意に多く存在していることが示された。これらのタンパク質は主に細胞内で機能することが知られていることから、培養液には、細胞外に放出されるタンパク質だけでなく、細胞内で機能するタンパク質も含まれていることが分かった。一方、細胞間シグナル伝達に関わるタンパク質は修飾を受けることが知られていることから、タンパク質修飾に着目し再解析を行った。先に同定したペプチドのうち、酸化やトリアラビノシル化などの修飾を受けたペプチドを対象に、GO解析を行った結果、シグナル受容体結合やキナーゼアクティベーター活性に関わる遺伝子群が有意に多く存在していた。一般的に受容体は、細胞外に存在するリガンドが結合し、細胞質内のキナーゼドメインが活性化することで、細胞内シグナル伝達を制御する。またそのシグナル伝達にはタンパク質リン酸化酵素に関わることが知られている。したがってこれらの結果は、修飾を受けたペプチド群が、細胞間シグナル伝達に関わることを示唆する。以上の解析から、細胞外に放出されるタンパク質群の同定、および機能解析には修飾による絞り込みが有効であることが示され、ストレス情報の共有メカニズムを制御する重要な因子群の同定に成功したといえる。

次に候補ペプチドの絞り込みを行う目的で、ペプチド内アミノ酸配列へのタンパク質修飾に着目し、解析を行った。その結果アラビノシル化修飾を受けるペプチドを6つに絞ることに成功した。アラビノシル化修飾は、代表的なペプチド修飾の一つであり、シロイヌナズナでは茎頂分裂組織の分化、発達を制御するCLV3ペプチドにも見られる修飾である。アラビノシル化修飾を受けたCLV3は、ペプチド受容体との結合力が增加する。次に、更なる絞り込み条件として、ストレス応答性遺伝子発現解析を行い、最終的に候補ペプチドを1つに絞ることができた。そこで候補ペプチドの遺伝子破壊変異体を取得し、乾燥ストレス耐性試験を行った。その結果、コントロール植物と比較して、ペプチド変異体は乾燥ストレスに対して感受性を示すことを明らかにした。このことは候補ペプチドが乾燥・浸透圧ストレス応答に関わるペプチドであり、分泌性ペプチドによる新たなストレス情報伝達シグナルの基軸を同定することに成功したことを示している。次に、サーモカメラを用いて葉面温度を測定するし、気孔の開閉応答を解析した(図2)。その結果、候補ペプチド変異体ではストレス条件だけでなく、コントロール条件で既に気孔が開いており、蒸散量が高いことを明らかにした。このことは候補ペプチドが、環境条件をモニターし気孔の開閉を制御して、乾燥・浸透圧ストレス応答を制御する新たな制御因子であることを示している。さらに同定したペプチド配列のC末端側にT-DNAが挿入されている変異体も取得することができたため、この変異体を用いて乾燥ストレス耐性試験および蒸散量の測定を行った。その結果、この変異体ではストレスに弱い表現型や蒸散量がコントロール植物と同程度であることが明になった。このことは同定した配列が機能性ペプチドであることを示している。

次に目的ペプチド遺伝子の発現を制御するプロモーター領域を取得し、プロモーター-GUS植物体を作成し、ペプチド遺伝子の組織特異的発現を解析した。その結果、ペプチド遺伝子は根や葉の維管束、特に根の維管束で強く発現していることを明らかにした。この結果は、浸透圧ストレスを感受した根の維管束で機能することを示す。次にペプチド-GFP植物体を作成し、ペプチドの細胞内局在を解析した。その結果、目的ペプチドは細胞のゴルジ体や細胞膜に局在していることを明らかにした。ゴルジ体や細胞膜は、細胞内タンパク質を細胞外へ放出するエキソサイトーシス経路に関わるオルガネラであることが知られている。これらの研究結果を併せると、目的ペプチドは根の維管束からペプチドの細胞外放出に関わる制御機構に深く関わっていることを示唆する。ペプチド遺伝子の変異体は、乾燥ストレスに

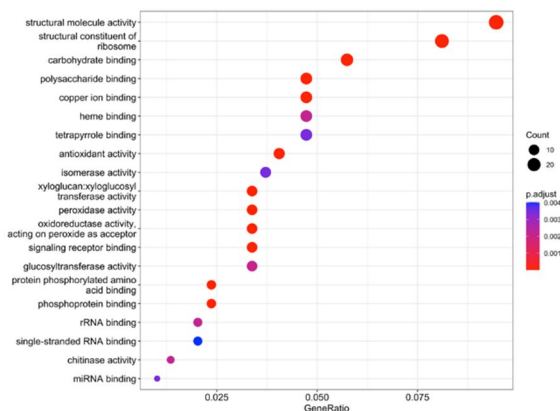


図1. 浸透圧ストレス依存的に細胞外に放出されるタンパク質またはペプチド群のGO解析
網羅的な機能類推解析から、糖結合や抗酸化作用に関わる遺伝子群が有意に多く存在していることが示された。

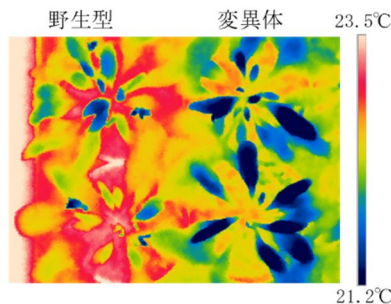


図2. 候補変異体での葉面温度解析
候補ペプチド変異体は、通常条件において気孔が開いており、野生型植物体を比較して、低い葉面温度を示した。

弱い表現型を示すことも明らかとしたことから、ストレス情報の共有メカニズムを制御する重要な因子の同定に成功したといえる。

<引用文献>

Iuchi S., et al., *Plant J.*, 27:325-333. 2001.

Behnam B., et al., *DNA Res.*, 20(4):315-324. 2013.

Takahashi F., et al., *Nature*, 556(7700):235-238. 2018.

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 2件）

1. 著者名 Soma F, Takahashi F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.	4. 巻 2462
2. 論文標題 Affinity Purification Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Identify Proteins Interacting with ABA Signaling Components.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 181-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2156-1_14.	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 Takahashi F.	4. 巻 2462
2. 論文標題 Use of Micrografting to Study the Role Played by Peptide Signals in ABA Biosynthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 101-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2156-1_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 -

1. 著者名 Bolortuya B, Kawabata S, Yamagami A, Davaapurev B0, Takahashi F, Inoue K, Kanatani A, Mochida K, Kumazawa M, Ifuku K, Jigjidsuren S, Battogtokh T, Udval G, Shinozaki K, Asami T, Batkhui J, Nakano T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of <i>Chloris virgata</i> , Which Shows the Fastest Germination and Growth in the Major Mongolian Grassland Plant.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 684987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.684987. eCollection 2021.	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 Yoshida T, Fernie AR, Shinozaki K, Takahashi F.	4. 巻 105
2. 論文標題 Long-distance stress and developmental signals associated with abscisic acid signaling in environmental responses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 477-488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15101. Epub 2020 Dec 19	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 Soma F, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10040756	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 朽津和幸, 西田えり佳, 北畑信隆, 並木健太郎, 舟橋汰樹, 遠矢龍平, 松本史織, 菊池宏樹, 前田健太郎, 中澤裕, 斉藤優歩, 中野正貴, 倉持幸司, 安部洋, 高橋史憲, 橋本研志
2. 発表標題 シロイヌナズナにジャスモン酸経路とサリチル酸経路の双方の活性化を誘導する新規化合物の作用機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田浩章, 竹内亜美, 朝日貴大, 大久保雪乃, 赤津優菜, 濱田香凜, 伊藤広輔, 浅野賢治, 野田高弘, 大沼万里子, 寺村浩, 田村浩二, 高橋史憲
2. 発表標題 ゲノム編集によるジャガイモのデンプン合成系遺伝子の変異体作出と塊茎形質の改変
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会大会(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内亜美, 浅野賢治, 野田高弘, 草野博彰, 大沼万里子, 高橋史憲, 田村浩二, 島田浩章
2. 発表標題 ジャガイモのアミロペクチン合成に関わるデンプン枝つけ酵素遺伝子欠損変異体の作出と形質の評価
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会大会(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋原雄樹, 橋本研志, 饗庭楽理, 井出寿美夏, 山下優音, 高川智弘, 高橋史憲, 朽津和幸
2. 発表標題 ゼニゴケ頂端分裂組織における細胞分裂・分化の制御におけるRboh によるROS 生成の役割
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝井順哉, 高橋亮輔, 杉本蒼, 中澤透子, 船守晴帆, 高橋史憲, 中道範人, 木下俊則, 篠崎一雄, 篠崎和子
2. 発表標題 シロイヌナズナのストレス応答性転写因子DREB2A の翻訳後制御に関わるプロテインキナーゼの解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田えり佳, 舟橋汰樹, 斉藤優歩, 中野正貴, 北畑信隆, 中澤裕, 並木健太郎, 中島麻希, 倉持幸司, 安部洋, 高橋史憲, 橋本研志, 朽津和幸
2. 発表標題 ジャスモン酸の蓄積を亢進する新規植物免疫活性化候補化合物の効果の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------