

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840111

研究課題名(和文)根端メリステムの活性制御を行うペプチドホルモンRGF受容体の探索

研究課題名(英文)Identification of LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor

研究代表者

篠原 秀文(Shinohara, Hidefumi)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：40547022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの根端領域で発現しているRGFペプチドは根端メリステム活性を制御しているが、どのように情報伝達が行われているかは不明で、受容体の同定は必要不可欠であった。申請者は受容体発現ライブラリーを用いた網羅的結合実験の結果から、RGFペプチドを直接結合する受容体キナーゼを3つ見出した。RGF受容体の3重変異体は根端分裂組織が縮小し、また外的に投与したRGFペプチドに非感受性であった。3重変異体中ではPLETHORAタンパク質のグラディエントが失われており、根端で発現するRGFペプチドが、3つのRGF受容体に直接認識されることで根端分裂組織の維持を行っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A peptide hormone, root meristem growth factor (RGF), regulates root meristem development through the PLETHORA stem cell transcription factor pathway, but it remains to be uncovered how extracellular RGF signals are transduced to the nucleus. We identified, using a receptor kinase expression library and photoaffinity labeling, three receptor kinases that directly interact with RGF peptides in Arabidopsis. The triple rgfr mutant was insensitive to externally applied RGF peptide and displayed a short root phenotype accompanied by a considerable decrease in meristematic cell number. In addition, PLT1 and PLT2 protein gradients, observed as a gradual gradient decreasing toward the elongation zone from the stem cell area in wild type, steeply declined at the root tip in the triple mutant. Our results strongly suggest that RGFRs mediate the transformation of an RGF peptide gradient into a PLT protein gradient in the meristem, thereby acting as key regulators of root meristem development.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物 ペプチドホルモン 受容体キナーゼ 根端メリステム 硫酸化ペプチド

1. 研究開始当初の背景

RGF はシロイヌナズナ根の静止中心やコルメラ細胞付近で特異的に発現する硫酸化ペプチドホルモンである。静止中心付近の細胞から分泌されアポプラストを拡散した RGF ペプチドは、根の幹細胞領域を最大として濃度勾配を形成する (*Science*, **329** 1065-1067 (2010)). RGF ペプチド遺伝子の変異体では根端メリステムが減少する表現型を示すことから、根端メリステムの維持に重要な役割を果たしていることが示されていた。また分泌された RGF ペプチドは、PLETHORA (PLT) タンパク質の安定化を促進する働きがあることが示されている。根の形態形成のマスター転写因子 PLETHORA タンパク質は、根端の幹細胞様領域を最大としてそこから基部側にゆるやかに減少する発現パターンを示す。この PLT タンパク質の濃度勾配が根のパターン形成に重要な役割を果たしている。すなわち、PLT の発現レベルが高いところでは幹細胞性が維持されるが、中程度の領域では細胞分裂が活性化され、発現レベルが下がるにしたがって細胞分化が促進される (*Cell* **109** 109-120 (2004), *Nature* **449** 1053-1057 (2007)). RGF ペプチドの存在する場所では PLT タンパク質が安定化されることが示唆されており、RGF ペプチドの濃度勾配が、PLT タンパク質の濃度勾配を決定し、それぞれの領域のバランスが保たれることで正常な根の形態形成が維持されていることが示唆されている。

2. 研究の目的

RGF は分泌型のペプチドホルモンであり、細胞膜を透過することができない。そのため細胞膜上に存在している受容体が RGF を認識、結合することで情報伝達を行っていることが考えられる。しかし RGF を介した情報伝達に関与する因子は、受容体を含めて未同定である。特に RGF ペプチド受容体の同定は、ペプチドホルモンを介した植物細胞間シグナルと、根端細胞の分化運命決定を繋げる最も初期の反応の決定につながり、RGF ペプチドの PLT タンパク質制御を介した根の幹細胞の維持および根端メリステム活性の調節機構解明のために不可欠である。そこで本研究では RGF ペプチドの受容体の同定を通じて、RGF ペプチドと受容体のペアを介した根端メリステムの維持機構を解明することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

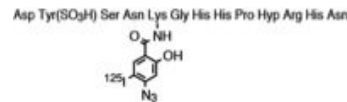
受容体発現ライブラリーを用いたフォトアフィニティーラベルによる網羅的結合解析によって、直接 RGF ペプチドを結合する受容体を見つけ出す。申請者らは先行研究として、細胞内キナーゼ領域をアフィニティータグに置換した植物受容体キナーゼをタバコ培養細胞 BY-2 株で過剰発現させることで、リガンド結合能を維持したまま安定的に発

現させる系を確立している (*Plant J.* **52**, 175-184 (2007)). この系を応用して、シロイヌナズナの受容体キナーゼ群を網羅的に発現させた受容体発現ライブラリーの作製と維持を進めている。この受容体発現ライブラリーに対して、光反応性 RGF ペプチドを用いたフォトアフィニティーラベルによる網羅的結合実験を行うことで、RGF を直接かつ特異的に結合する受容体を同定する。RGF を結合する受容体候補が見つかり次第、遺伝子破壊株の作製を行い、根の形態および RGF ペプチド応答能を確認する。

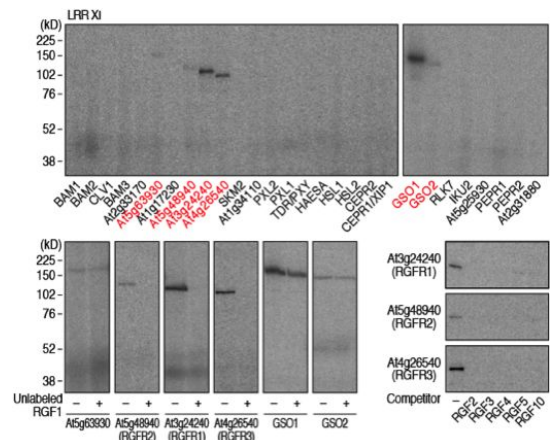
4. 研究成果

(1) フォトアフィニティーラベルに用いる光反応性 RGF ペプチドの作製のため、光反応基の導入可能部位を決定した。RGF ペプチドのアラニンスキャン解析を通じて、アミノ酸置換を行っても生理活性に影響を与えないアミノ酸残基を特定した。

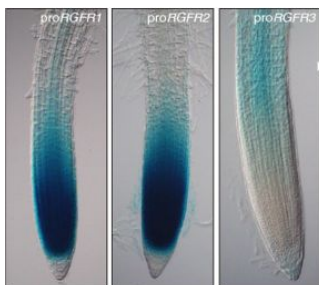
(2) 活性に影響を与えない部位のアミノ酸をリジン残基に置換し、側鎖アミノ基に光反応基であるアジドサリチル酸 (ASA)、および放射性標識の ¹²⁵I を導入した光反応性 RGF ペプチド、[¹²⁵I]ASA-RGF1 を作製した。[¹²⁵I]ASA-RGF1 はメリステムを伸長させる活性を維持していることを確認している。



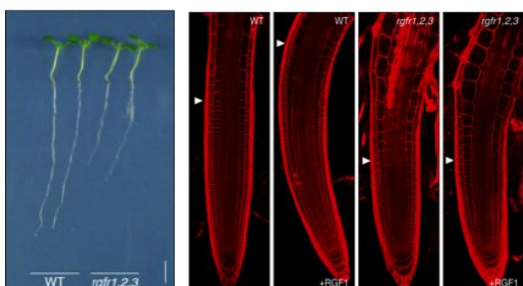
(3) シロイヌナズナの受容体発現ライブラリー約 90 種類に対して網羅的な結合実験を行った。SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィで検出を行った結果、RGF ペプチドを直接結合する受容体を 6 つ同定した。未標識 RGF ペプチドを用いた競合実験を行い、バンドが消失した、すなわち特異的な結合であることが確認された 3 つの受容体 (RGFR1 (At3g24240), RGFR2 (At5g48940), RGFR3 (At4g26540)) を同定した。



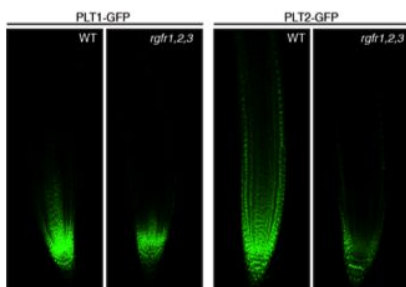
(4) プロモーター-GUS アッセイにより, 同定した3つの受容体遺伝子の発現部位を解析した. すべての受容体遺伝子は根での発現がみられ, 特に RGFR1 および RGFR2 は根端メリステム領域で強い発現が確認された.



(5) 受容体の機能を確認するため, 同定した受容体遺伝子の3重変異体 (*rgfr1,2,3*) を作製した. 表現型を観察したところ, 3重変異体では根端メリステムが縮小し, 根が短くなる表現型を示した. また3重変異体は外的に投与した RGF ペプチドに非感受性であったことから, この3つの受容体キナーゼが RGF ペプチドの受容体であることが示された.



(6) 受容体の変異体中での PLT タンパク質の分布パターンを観察するため, 受容体3重変異体に PLT1-GFP および PLT2-GFP を発現させ, 根端の観察を行った. その結果, 野生株では正常に形成されている PLT タンパク質の濃度勾配が, 3重変異体では失われていた. このことから根端で発現する RGF ペプチドが, 3つの RGF 受容体に直接認識されることで, PLT タンパク質の分布パターンを調節し, 根端分裂組織の維持を行っていることを示した.



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5件)

Shinohara H., Mori A., Yasue N., Sumida K. and Matsubayashi Y. (2016)
Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **113** 3897-3902
査読あり

Shinohara H. and Matsubayashi Y. (2015)
Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view
Plant J. **82** 328-336
査読あり

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H., Matsubayashi Y. (2014)
Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling.
Science **346** 343-346
査読あり

Okamoto S., Shinohara H., Mori T., Matsubayashi Y. and Kawaguchi M. (2013)
Root-Derived CLE Glycopeptides Control Nodulation by Direct Binding to HAR1 Receptor Kinase
Nature Communications **4**, 2191 DOI: 10.1038/ncomms3191
査読あり

Endo S., Shinohara H., Matsubayashi Y. and Fukuda H. (2013)
A Novel Pollen-Pistil Interaction Conferring High-Temperature Tolerance During Reproduction via CLE45 Signaling
Curr. Biol. **23**, 1670-1676
査読あり

[学会発表](計7件)

篠原秀文, 林陽子, 松林嘉克
RGF 情報伝達系の解明に向けたケミカルスクリーニング
第57回日本植物生理学会年会
2017年3月16-18日
鹿児島大学, 鹿児島

篠原秀文, 林陽子, 松林嘉克
根端メリステムの活性を制御するペプチドホルモン RGF の受容体の同定
植物化学調節学会第51回大会

2016年10月28-30日
高知大学，高知

Hidefumi Shinohara
Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view
3rd European Workshop on Peptide Signalling and Activity in Plants
2015年9月3-5日
Ghent, Belgium

篠原秀文
PCP論文賞
アラビノシル化 CLV3 の化学合成によって明らかになったペプチドシグナルにおける糖鎖修飾の生理的・構造的意義
第56回日本植物生理学会年会
2015年3月16-18日
東京農業大学，東京

篠原秀文，松林嘉克
受容体キナーゼ発現ライブラリーを応用したペプチドシグナル RGF 受容体の同定
日本植物学会第78回大会
2014年9月12-14日
明治大学，神奈川

篠原秀文，松林嘉克
受容体キナーゼ発現ライブラリーを用いた RGF 受容体の同定
第55回日本植物生理学会年会
2014年3月18-20日
富山大学，富山

篠原秀文，松林嘉克
アラビノシル化 CLV3 ペプチドは BAM1 に結合する
植物化学調節学会第48回大会
2013年10月30日-11月1日
新潟大学，新潟

〔図書〕(計1件)

松林嘉克，篠原秀文 (2015) CSJ カレントレビュー19 生物活性分子のケミカルバイオロジー「植物ペプチドホルモン受容体同定の新展開」化学同人 109-115

〔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
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~b2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
篠原 秀文 (SHINOHARA Hidefumi)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40547022

(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 ()