

研究終了報告書

「道管液のペプチドミクス・プロテオミクスを用いた地下部-地上部間の相互作用の探索とそのメカニズムの解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：岡本 暁

1. 研究のねらい

植物は根、茎、葉、子実などの異なる性質を持つ複数の器官により構成されている。主根によって構成される地下部と葉や茎などにより構成される地上部はそれぞれ土壌と大気という大きく異なる環境下にあり、それぞれが異なる生物的・非生物的なストレスを受けている。植物が個体全体として効率的な生命活動や生産活動を行うには、個体のおかれた環境に応じた器官同士のバランスのとれた成長や栄養の分配を行う必要がある。そのためには器官同士のコミュニケーションが欠かせない。これまでにいくつかの植物ホルモンが器官間の情報伝達を担うことが知られていたが、それに加えて近年、根粒形成の全身制御、窒素応答、乾燥ストレス応答において、根から地上部への情報伝達に分泌型ペプチドが関与することが明らかにされている。しかしその一方で根に影響を与える要因は他にも数多くある。それらの情報を地上部に伝えたり全身的な応答を誘導したりするためにはより多くの器官間のシグナル伝達機構を備える必要があると考えられるが、その有無も含めて未解明な部分が多い。

代表者はこれまでに低分子のペプチドを含めた道管液のプロテオームの手法を独自に検討してきた。この手法により屋内の単一環境で育てたダイズの道管液から複数の内生の分泌型ペプチドを同定することに成功している。そこで本課題では地下部から地上部へのコミュニケーションに関する新たな分子機構を見出すことを目的として、屋外の様々な条件下で栽培したダイズ・トマトから道管液を採取し、それらのペプチドーム・プロテオーム解析を行う。さらにそれを足掛かりとして、地下部と地上部の相互作用に関する新たな分子機構を捉え、農作物を全身的に制御するための基盤技術の開発につなげる。

2. 研究成果

(1) 概要

屋外において異なる非生物的ストレス、生物的ストレスを与えたダイズ、トマトの道管液からそれぞれ 1,605、1,238 個のタンパク(ペプチドを含む)を同定した。それらのうちの分泌型タンパクの占める割合はそれぞれ 48.8%、50.8% であり、ダイズやトマトの全タンパクに占める分泌型タンパクの割合(それぞれ 8.6%、5.4%)と比べてかなり高いことがわかった。それらのタンパクの中には根で主に発現するものも含まれており、そのようなタンパクは根から地上部へ長距離移行したものである可能性が高い。さらに、ダイズの道管液からは 13 個、トマトからは 6 個の分泌型ペプチドを見出すことに成功した。ダイズとトマトの道管液から同定された分泌型ペプチドの間には相同性の高いものもあり、両者の間で共通する役割を担う可能性が考えられる。

ダイズ道管液から同定した分泌型ペプチドのうちの一つ(ここでは Xylem associated peptide-A (GmXAP-A) とする)をコードする遺伝子は光合成産物の欠乏する条件に対して

応答を示すことがわかった。また、別のペプチド(ここでは GmXAP-B とする)は土壤水分の低下や傷害に対して発現応答することがわかった。なお、シロイヌナズナにおける XAP-A のホモログに着目した解析では XAP-A は根から葉に対して光合成産物を要求するシグナル因子として機能することを明らかにしている。本研究では XAP-A 以外にも道管液から多数の分泌型ペプチド、タンパクを同定しており、潜在的な器官間情報伝達機構が複数存在する可能性がある。

(2) 詳細

研究テーマ A: 多様な土壌環境下における道管液の網羅的な解析

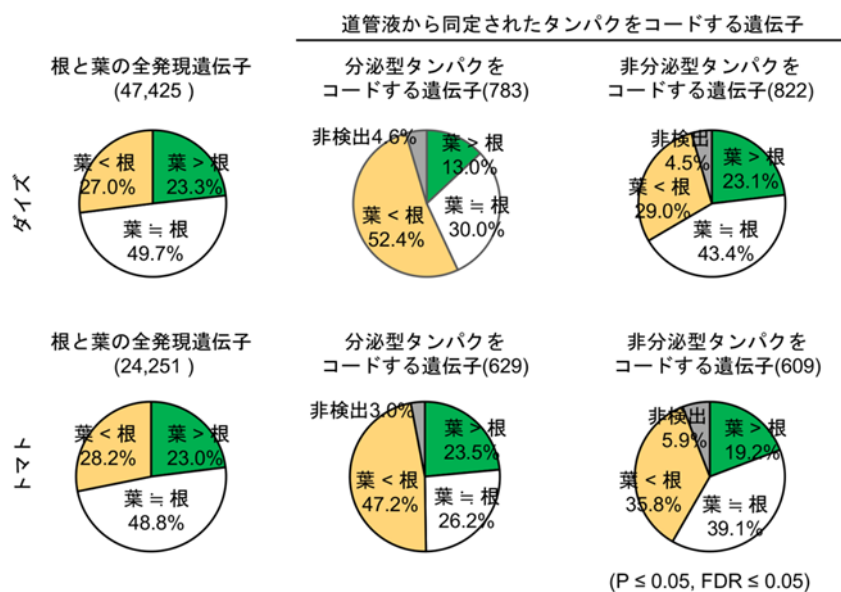
研究テーマ B: 共生、寄生時の宿主植物の道管液の網羅的な解析

研究計画の時点では研究テーマ A と B をそれぞれ非生物的なストレス、生物的なストレスとして区別していたが、道管液の解析などはまとめて行なったため、両者を合わせて記載する。

屋外で異なる非生物的ストレス(低窒素、低リン、低カリウム、50mM NaCl、冠水、低 pH)を与えたダイズおよびトマト、または生物的ストレス(ダイズ: 根粒菌の接種、トマト: 寄生植物の感染)を与えた植物体から道管液を採取した。夏期の厳しい環境下で行ったせいか、50mM NaCl、冠水、低 pH 処理したダイズ、トマトからはほとんど道管液を採取できなかった。一方、残りの処理区ではダイズは約 50 ml、トマトは約 100 ml ずつの道管液を採取することができた。これらの道管液を代表者が独自に検討を重ねた手法を用いて精製し、プロテオーム解析を行った。質量分析を用いたプロテオーム解析は基礎生物学研究所の牧野技術職員の協力を得て行った。その結果、ダイズでは 1,605 個、トマトでは 1,238 個のタンパク(またはペプチド)を同定することに成功した。またそれらのうち、分泌型タンパクであると予測されたものはダイズでは 783 個、トマトでは 629 個だった。それらが道管液から同定した全タンパクに占める割合は

それぞれ 48.8%, 50.8%であり、ダイズとトマトの全タンパクデータベースに占める分泌型タンパクの割合はそれぞれ 8.6%, 5.4%であることから、道管液には分泌型タンパクがかなり高い割合で存在することがわかった。さらに、同時に上記の条件のダイズ、トマトの根と

道管液から同定されたタンパクの発現パターンを根と葉のトランスクリプトームデータをもとに分類した。



葉をサンプリングしトランスクリプトームを行い、その結果をもとに道管液から同定されたタンパクの DEG 解析を行った。すると分泌型タンパクの半分近くは主に根で発現するものであることがわかった。このことから多数のタンパクやペプチドが根から地上部へ長距離移行する可能性が考えられた。トランスクリプトーム解析は理化学研究所 市橋チーム、中部大学 鈴木博士の協力を得て行った。

上記のプロテオーム解析では、ダイズからは 13 個、トマトからは 6 個の分泌型ペプチドを同定している。ダイズとトマトの道管液から同定された分泌型ペプチドの間には相同性の高いものもあり、それらは両者の間で共通する役割を担う可能性が考えられる。また、根から地上部への情報伝達を行う新たなシグナル因子を見出すべく、これらの分泌型ペプチド (Xylem sap associated peptide, XAP) をコードする遺伝子について、様々な環境条件における発現変動を調べたところ、*GmXAP-A* が光合成産物の欠乏する条件で、*GmXAP-B* が傷害に対して発現応答することがわかった。

なお、根と葉の相関性をトランスクリプトームレベルで検出するために市橋さきがけ研究者の協力を得てネットワーク解析などを試みた。しかし根と葉の遺伝子発現における相関性を見出すためには当初準備したデータ数では不十分であることが途中で判明するなど、*in silico* 解析に不慣れであることが原因で計画に遅れが生じている。現在はデータを追加して再度解析を試みている。

研究テーマ C: XAP (Xylem associated peptide) を介した地上部-地下部の間の長距離シグナル伝達機構の解析

ダイズ道管液から同定された分泌型ペプチドのうちの一つである *GmXAP-A* は、暗処理や本葉の切除など、光合成産物が欠乏するような条件において根や胚軸などで発現量が著しく上昇する。そこでダイズにおける機能を解明するために、毛状根形質転換法を用いて *GmXAP-A* を根で過剰発現させることを試みた。しかし、*A. rhizogenes* を感染させ毛状根を誘導しただけで *GmXAP-A* は発現応答してしまい、この手法で *GmXAP-A* の機能を調べることは難しいことがわかった。一方、*GmXAP-A* のホモログはシロイヌナズナ、ミヤコグサにも複数存在することがわかっている。それらの中から、暗処理など光合成産物の欠乏するような条件に応答するものを見出しており、*GmXAP-A* の光合成産物の欠乏への応答は他の植物種でも保存されていることが考えられる。さらに、シロイヌナズナを用いた解析ではそのホモログペプチドは根から葉に対して光合成産物を要求するシグナルとして機能することを見出している。今後は再度ダイズやダイコンなど有用作物を用いて *GmXAP-A* の効果について検証を行う。

GmXAP-B は土壌の水分含量の低下に応答することを見出していたが、その後の解析から、*GmXAP-B* の発現量はダイズを傷害処理することによっても上昇することから、乾燥応答というよりも乾燥によって引き起こされる根へのダメージによって誘導される可能性が考えられた。この可能性も踏まえて、*GmXAP-B* やそのシロイヌナズナにおけるホモログに着目した解析を行っている。

3. 今後の展開

ダイズ、トマトの道管液の網羅的な解析で多数のタンパク、ペプチドが同定された。その約半

数は分泌型タンパク、ペプチドであり、トランスクリプトームのデータからも根から地上部へ移行する可能性があるものが多数存在することがわかった。現在のところ、XAP-A、XAP-B が特定の条件に対して応答することを見出しており、これらは情報伝達因子として機能する可能性が考えられる。これらのペプチドについてはモデル植物を用いた機能解析に加えて、ダイズなどの有用作物にもたらず効果についても検証する必要がある。

一方、道管液から同定された分泌型ペプチドやタンパクの大多数の機能は未だに明らかでない。それらの中にはダイズとトマトの間で相同性の高いペプチドや複数の Lipid transfer protein (LTP)も含まれる。LTP は 100 アミノ酸前後の小さいタンパクであるが、これまでに器官間コミュニケーションを介した全身獲得抵抗性に関わることが明らかにされている DIR1 も LTP の一種である。今後は LTP も含めて根から地上部への情報伝達に関わる可能性のある因子の機能に関する解析を行い、新たな根から地上部への情報伝達機構の発見につなげたい。

なお、道管液では非分泌型のタンパクも同定された。道管液は茎を切断してその切り口から滲出する液を採取するため、その切り口からタンパクがコンタミする可能性は否定できない。その一方で近年、ヒトなどの動物では非分泌型性のタンパクや RNA などが分泌小胞に包まれて血液などを介して離れた組織や器官に運ばれることが明らかにされている。分泌小胞は植物にも存在することが既に報告されていることを考えると、道管液から同定された非分泌型タンパクの中にもそのように長距離移行するものが存在する可能性がある。根から地上部への情報伝達を網羅的に捉える上で、この可能性についても検証する必要がある。

4. 自己評価

本研究課題では①道管液の網羅的な解析、②長距離情報伝達因子として機能するペプチド候補の探索、③候補ペプチドの機能の解析を計画した。①については代表者がこれまでに独自に検討を重ねてきた道管液の解析法を用いることでダイズ、トマトともに多数の分泌型ペプチド、タンパクを同定することができた。道管液の採取は切断した茎から滲出してくる液を採取するため、全てが道管由来のものであるとは言えないが、トランスクリプトームデータと組み合わせることでそれらのペプチドやタンパクが根に由来する可能性があるかどうかを効率的に検証することができた。理科や生物の授業では道管は根が土壌から吸収した水や無機塩を輸送する経路として扱われることが多いが、多数のペプチドやタンパクも含み、器官間の情報伝達経路としても機能し得ることを示すことができた。

②では、光合成産物の欠乏や傷害という特定の刺激に応答するペプチド遺伝子を見出すことができた。しかし一方で、本研究課題では「植物が本来備えているであろう根と地上部の器官間コミュニケーションを網羅的に捉える」ことを目標とし、それゆえに特定の現象や環境ストレスに焦点を絞ったサンプリングは行わずに、様々な条件で植物を栽培し、道管液のプロテオーム、根と葉のトランスクリプトーム解析を行った。しかし予想に反してそれらの条件に応答するものがあまり見つからなかった。また、特定の現象に絞らなかったがゆえに簡単な条件分け(処理の有無)を行ったのみで、踏み込んだ条件分け(処理後の経時変化、処理の強弱など)を行うことができなかった。例えば、光合成産物の欠乏など、特定の現象に絞って、詳細なデータを積み重ねた方が、機能性の因子の絞り込みや、その後の詳細な解析を効率的に行えたかもしれない。また、市橋さきがけ研究者の協力を得て根と葉のトランスクリプトームデータをもとにネットワーク解析などを行うことで根と葉の遺伝子発現における相関性を見出したり、根と葉と結び

つける因子の候補の絞り込みを行ったりすることに取り組んだ。現時点では、候補となる因子を見いだすに至っていないものの、自らバイオインフォマティクス技術を使った大量データの解析に取り組んだ経験は、これまでの自身の研究キャリアでは得難く貴重なものであり、今後の研究の幅を広げるものであると確信している。複数の研究者の協力によって研究期間全体を通して多くのプロテオーム、トランスクリプトームデータを得ることができており、さきがけ研究期間終了後も、それらのデータの解析を引き続き行うことで、今後も根と地上部の相互作用の探索を続けたい。

③では、GmXAP-A のシロイヌナズナにおけるホモログに着目した解析により、根から葉に対して光合成産物を要求するシグナルとして機能することを明らかにした。本来ならば短期間で結果を得ることができる毛状根形質転換法を用いて、ダイズでもその効果を確認することを計画していた。しかし毛状根の誘導自体が GmXAP-A の発現を誘導してしまったため、この手法を用いたダイズでの評価ができなかった。また、GmXAP-A、GmXAP-B 以外の他のペプチドや多数のタンパクについては機能の解明につながるヒントは得るに至っていない。

研究開始直後に助教に採用されたことにより、当初想定していたものから代表者の置かれた環境が大きく変わった。代表者自身と1名の技術補佐員で実験をおこなったが、初めて15回の講義を担当したり、学部生の卒業研究を指導したりするなど大学教員として職務を果たしながら研究に取り組んだため、十分に時間を確保することを困難に感じることもあった。自身の研究環境に則した研究計画の立案と実行が今後の課題である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Satoru Okamoto, Azusa Kawasaki, Yumiko Makino, Takashi Ishida, Shinichiro Sawa, “Long-distance mobile peptides maintain root sucrose level and root growth”, 第61回日本植物生理学会年会、2021年3月、島根大学(zoomで開催、シンポジウムで発表)
2. Shibata Tomoya, Okamoto Satoru, “Functional analysis of soybean xylem sap associated peptide XAP10”, KAAB International Symposium 2021, 2021年1月、新潟大学(zoomで開催)
3. Satoru Okamoto “Exhaustive analysis of small proteins and peptides in xylem sap”, International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers, 2019年12月、浜松
4. Satoru Okamoto, Syungo Kobori, Azusa Kawasaki, Kie Kumaishi, Yumiko Makino, Takamasa Suzuki, Yasunori Ichihashi, “A study of root-to-shoot long-distance mobile peptides”, International Workshop on Plant Nutritional Responses 2019, 2019年12月、名古屋大学(招待講演)

5. 岡本 暁、「ペプチドを介した根から地上部への長距離コミュニケーション」、第 60 回新潟生化学懇話会、2019 年 7 月、新潟大学(招待講演)