

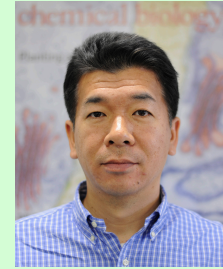
ペプチドシグナルを介した植物成長の分子機構

Molecular dissection of peptide signaling in plants

課題番号：18H05274

松林 嘉克（MATSUBAYASHI, YOSHIKATSU）

名古屋大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

植物の成長制御に関わる新しい分子群として、ペプチドシグナルに注目が集まっている。本研究では、ペプチドホルモン前駆体配列のドメイン構造や、受容体への選択的結合、維管束を介した長距離移行など、分子としての特性に着目して新規シグナルの探索とその作用メカニズムの解析を進め、植物成長における予想外のしくみや見過ごされていた現象の発見を目指す。

研究分野：植物分子生理学

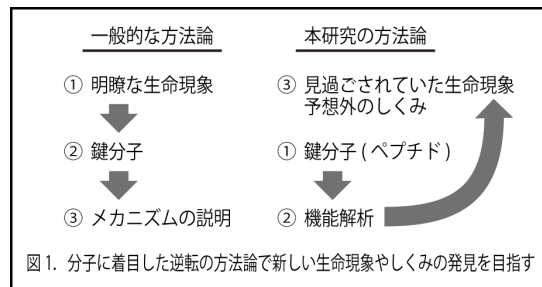
キーワード：ペプチドホルモン、受容体、シロイヌナズナ、長距離シグナリング

1. 研究開始当初の背景

植物の成長制御に関わる新しい分子群として、ペプチドシグナルに注目が集まっている。分泌型ペプチドホルモンに加えて、植物病原菌由来の外生ペプチドが植物の病害抵抗性の誘導に寄与する例や、非分泌型ペプチドが篩管内を長距離移行して情報を伝える事例なども明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では、最初に生命現象に着目する生物学の一般的手法とは手順とは逆に、まずペプチド分子の側に着目し、機能解析を経て最終的にしくみや現象の説明を目指している。この独自の手法により、従来の手法では見過ごされていた植物成長のしくみや環境応答機構の解明を目指している（図1）。



3. 研究の方法

① *In silico* スクリーニングによる分泌型ペプチドホルモン探索：シロイヌナズナのゲノムデータベースを用いて候補ペプチドを選定し、成熟型ペプチドの構造を LC-MS/MS で決

定した後、受容体発現ライブラリに対して結合実験を行ない、リガンド-受容体ペアを決定する。その後、発現パターンや受容体欠損株の表現型解析を行ない、機能解明を進めていく。

② 受容体固定化ビーズを用いたリガンドフイッシング：受容体を固定化したカラムに、リガンドを含むサンプルを流して、リガンドを選択的に釣り上げる。植物病原菌をシロイヌナズナ培養細胞と液体共培養した培養液からのエリシターペプチドの同定を目指す。

③ 長距離移行性の非分泌型ペプチドシグナル探索：組織特異的マイクロアレイデータから、長距離移行ペプチドシグナル候補として篩部特異的発現を示す非分泌型ペプチド群を得る。これらについて、過剰発現株の作製や多重変異株の表現型解析、相互作用因子群の同定などを通して、機能解明を進める。

4. これまでの成果

葉の窒素需要を根に伝える新規長距離移行シグナル CEPDL2 の発見

植物では、葉自身の窒素需要によって、根の窒素吸収が制御されていることが古くから指摘されてきたが、その分子実体は明らかではなかった。シロイヌナズナには篩管移行性長距離シグナル CEPD1/2 と配列が類似したポリペプチドが 21 種類あるが、その多くが葉の篩部特異的な発現を示すなど、篩管移行性シグナルの条件を満たしていた。我々は、これらのひとつ CEPDL2 が、長年の謎であった葉の窒素需要を根に伝える長距離移行シグナルの本体であることを突き止めた。

CEPDL2 は高親和性硝酸トランスポーターである *NRT2.1* や *NRT2.2* に加えて、木部への硝酸の積み込みに関わる *NRT1.5* の発現を誘導し、硝酸の取り込みと地上部への輸送を活性化させる。CEPDL2 は主に葉の篩部において発現し、根の皮層や表皮細胞にまで長距離移行する。

CEPDL2 の欠損株を CRISPR/CAS9 で作製したところ、硝酸取り込み活性の顕著な低下が観察された。また、生育後期になると新たに展開する葉が小さくなるなど地上部のサイズの減少が観察された。これは、急激に地上部のバイオマスが増加する栄養生長後期に地上部の窒素需要が増大することを示している。実際、この時期には地上部で CEPDL2 の発現量が増加した。

さらに、根の窒素欠乏を他の根に伝える過程に関わる *CEPD1/2* と葉の窒素需要を根に伝える *CEPDL2* の両方を欠損する植物では、顕著な硝酸取り込み活性の低下と植物体の著しい矮小化が観察された。一連の *CEPD1/2* および *CEPDL2* の解析から、根における硝酸取り込みが、根圏の窒素状態と葉の窒素需要の双方によって巧妙に制御されていることが明らかになった (*Nature Commun.* 2020) (図 2)。

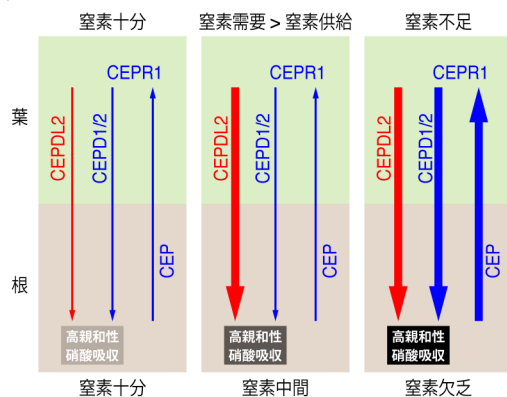


図 2. 根と葉の窒素状況に応じた硝酸取り込みの全身制御

すなわち、根も葉も窒素十分状態の時には葉の窒素需要を伝える CEPDL2 および根の窒素状態を伝える CEPD1/2 のいずれも基底状態であるが (図 2 左)、葉の窒素需要が根からの供給を超える場合には、CEPDL2 を介して根に窒素を要求する (図 2 中央)。一方、根が窒素欠乏になると CEP 経路が活性化されてその受容体 CEPR1 の下流で CEPD1/2 が誘導され、葉も窒素不足の場合には、CEPDL2 も活性化されて根に強く窒素を要求する (図 2 右)。

ペプチドホルモン受容体アンタゴニストの創成

本研究は、当初の研究計画には記載していなかったが、受容体固定化ビーズと蛍光ラベルリガンドを利用したハイスループットなリガンド結合アッセイ系を用いると、大規模

なリガンド結合アッセイが可能になることに着目して、ペプチドホルモン受容体アンタゴニストの探索を行なった。茎頂や根においてペプチドホルモン CLE の受容に関わる BAM1 をモデルとしてスクリーニングを行なったところ、約 3 万種類の低分子化合物ライブラリーから NPD12704 をアンタゴニストとして同定することに成功した。NPD12704 は BAM1 のもうひとつのリガンドである CLV3 の結合も阻害でき、植物体に与えると BAM1 の欠損と類似した効果を示すことが確かめられた。 (*Commun Biol.* 2019)。

5. 今後の計画

引き続き、3 つの研究項目について研究を進めるが、一連のペプチドシグナルを研究する過程で、タンパク質群のリン酸化レベルの変動を高精度で定量的に検出するための定量リン酸化プロテオーム解析系や、共免疫沈降による CEPDL2 などの短いポリペプチドのターゲット探索系が確立できている。これらを技術基盤として、より効率的な研究展開を目指す。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- (1) Ota R, Ohkubo Y, Yamashita Y, Ogawa-Ohnishi M, and *Matsubayashi Y Shoot-to-root mobile CEPD-like 2 integrates shoot nitrogen status to systemically regulate nitrate uptake in *Arabidopsis*. *Nature Commun.* 11, 641 (2020)
- (2) Shinohara H, Yasue N, Onuki T, Kondoh Y, Yoshida M and *Matsubayashi Y Screening and identification of a non-peptide antagonist for the peptide hormone receptor in *Arabidopsis*. *Commun Biol.* 2, 61 (2019)
- (3) Toyokura K, Goh T, Shinohara H, Shinoda A, Kondo Y, Okamoto Y, Uehara T, Fujimoto K, Okushima Y, Ikeyama Y, Nakajima K, Mimura T, Tasaka M, Matsubayashi Y, *Fukaki H. Lateral inhibition by a peptide hormone-receptor cascade during *Arabidopsis* lateral root founder cell formation. *Dev Cell* 48, 64-75 (2019) 他 2 報
- (4) 国際植物生長調節物質会議 (IPGSA) シルバーメダル (2019)
- (5) 井上學術賞 (2019)
- (6) 読売テクノフォーラム・ゴールドメダル賞 (2019)

7. ホームページ等

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