



- ・特任講師
- ・田畑 亮
- ・共同研究者
仲田 麻奈

2007年 名古屋大学 生命農学研究科 博士過程修了
2010年 東京大学&熊本大学 博士研究員
2013年 基礎生物学研究所&名古屋大学 博士研究員
2016年 名古屋大学 PhD 登龍門推進室 特任助教
2018年 名古屋大学 生命農学研究科 特任講師

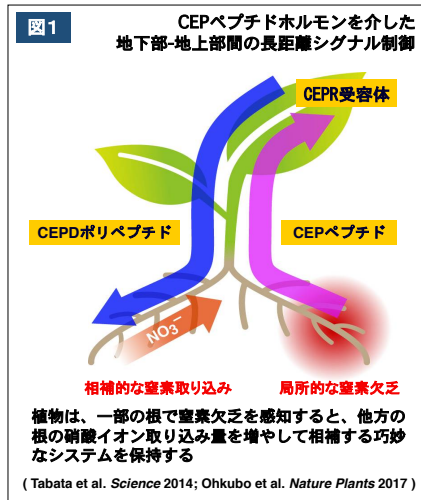
ペプチドを利用したイネの根系改変と土壤環境ストレス 耐性付与に関する研究

1. 研究の背景と目的

本研究の目的は、土壤中の不均一な無機栄養分布へ適応するために植物が持つ地下部—地上部間の長距離シグナル伝達機構の解明、ならびに長距離シグナル（ペプチド）を利用したイネの効率的な無機栄養取り込みを可能にする農業技術構築のための基礎研究である。

植物は17種類の無機栄養元素のうち14種を土壤から吸収して、生長に必要なタンパク質、生体成分などを作り出している。それぞれの無機栄養元素は土壤中に不均一に存在しているため、植物は本来、体内の元素濃度を一定に保つために個々の根において取り込み量を変化させるホメオスタシス機構を兼ね備えている。しかしながら、これまでの無機栄養に関する解析の多くは、均一な無機栄養濃度の培地条件下で、かつ、根における局所的な栄養取り込み制御機構に焦点が当てられたものばかりであった。この結果、不均一な無機栄養分布に適応して、植物が体内の栄養恒常性を維持するために持つ「地下部—地上部間の情報交換」システムは見逃されてきた。我々は、土壤中の不均一な栄養環境を模倣したSplit-root培養法を利用したシロイヌナズナの解析から、窒素取り込み活性を上昇される維管束移動性ペプチドホルモンCEPの単離に成功してきた (Tabata et al. *Science* 2014; 図1)。

そこで申請者は、Split-root 培養法を利用したトランスクリプトーム解析によって、新たに無機栄養欠乏



応答性の維管束移動性のペプチド分子を単離し、植物特有の長距離シグナル伝達機構における詳細な役割を明らかにする。さらに、窒素欠乏応答性のイネの CEP ペプチド因子オルソログや、本研究で新たに単離したペプチドの投与によって、イネの無機栄養の高吸収活性の付与を検討することを目指す。

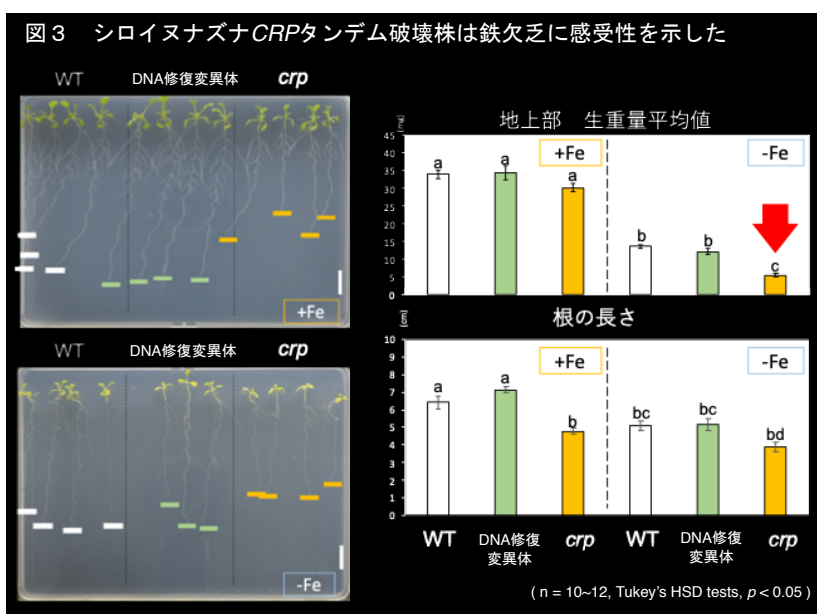
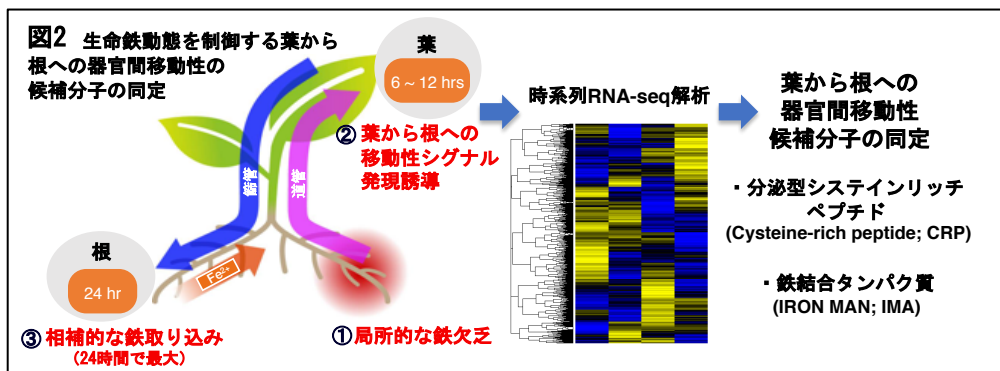
2. 研究方法

Split-root 培養法による無機栄養欠乏処理時の網羅的なトランスクリプトーム解析によって、新たなペプチド分子を探索する。特に、我々ヒトで欠乏症が指摘されている鉄や亜鉛について着目する。新規移動性ペプチド分子の単離によって、植物の無機欠乏応答性長距離シグナル伝達機構の解明を進めるとともに、ペプチドを利用した遺伝子組み替えを介さない、新規の植物生長調整剤開発を目指す。

また、窒素取り込み活性を活性化させる能力を持つ維管束移動性 CEP ペプチドは、イネゲノムにも複数種オルソログが存在することがわかっている。そこで、イネの CEP ペプチドを化学合成し、植物に投与することで、窒素吸収量向上効果を検証する。そして、イネの CEP ペプチドオルソログや、本研究で新規単離を目指す鉄欠乏応答性のペプチドの配列を元に、ペプチドアレイ解析を実施し、高機能性ペプチドをイネへ投与する事によって、少ない窒素施肥で一定の収量を担保したり、可食部に鉄を多く含むコメの栽培基盤技術の確立を目指す。

3. 結果と考察

植物は、土壌中の根の一部が局所的な窒素や鉄欠乏におちいった時、その情報を他の根に伝え、窒素および鉄吸収を相補的に促進させる仕組みを持つ。我々はこれまで、シロイヌナズナ Split-root 鉄欠乏培養法を用いた時系列トランスクリプトーム解析から、葉から根へ移動して鉄吸収を活性化する器官間移動性の候補ペプチド分子として「分泌型システインリッチペプチド (CRP)」と「鉄結合タンパク質 (IRON MAN; IMA)」を同定した (図2)。CRP は、ゲノム上で4 遺伝子がタンデムに存在していたため、DNA 修復関連変異体を用いた CRISPR/Cas9 の系を開発して (Tabata et al., 投稿準備中) ターゲットのゲノム領域に Large deletion を引き起こすことに成功した。また、この破壊株は鉄欠乏処理に感受性を示した (図3)。今後は、この破壊株を用いて Split-root 鉄欠乏処理による遺伝子発現変動解析を行う。IRONMAN (IMA) は、台湾 Academia Sinica の Schmidt 博士との共同研究を通して、多重変異体では Split-root 鉄欠乏処理による相補的な鉄イオントランスポーター (IRT1) の発現上昇が起こらないことを検証済みである。今後は、イネの IMA の鉄欠乏応答における重要性を検証していくとともに、鉄吸収を促進するペプチド資材としての可能性について解析を進めていく。



また、高機能性ペプチドをデザインするために、ペプチドアレイ解析によるアッセイ系のセットアップを実施した。窒素吸収を促進する CEP ペプチドをモデルケースとして、マルチウェルプレートを用いて培養したシロイヌナズナに対して、合成ペプチドを処理することで根における窒素トランスポーターの発現上昇を確認することができた。同様に、発芽後 2 週間水耕栽培したイネ栽培品種の日本晴の幼植物体に対して、化学合成したイネ Os CEP1 ペプチド $10 \mu\text{M}$ を水耕液に添加して、3 日後の根における窒素トランスポーター (*AMT1.2*) 発現量を qRT-PCR 解析したところ、約 2 倍の発現量増加が確認された。このように、植物体を用いたペプチドアレイ解析系を確立できたので、今後は上記の鉄欠乏応答に関与するペプチドや、窒素吸収促進能を持つ CEP ペプチドの高活性配列の探索を進めていく。

4. 要約

本研究では、Split-root 鉄欠乏培養法を用いた時系列トランスクリプトーム解析から、葉から根へ移動して鉄吸収を活性化する候補ペプチド分子の単離に成功した。また、ペプチドアレイ解析を用いて、植物の無機栄養輸送体の発現量変化を評価する系が確立された。今後は、網羅的なペプチドアレイ解析を実施し、高活性、安定性を保持したペプチドのデザインを行い、最終的に、実際に機能性ペプチドをイネへ投与する事によって、栄養吸収能を向上させたり、可食部に鉄を多く含むコメの栽培基盤技術の確立を目指す。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団ならびに財団関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

6. 研究成果および引用文献

1. Tsutsui, H., Yanagisawa, N., Kawakatsu, Y., Ikematsu, S., Sawai, Y., **Tabata, R.**, Arata, H., Higashiyama, T., Notaguchi, M. Micrografting device for testing environmental conditions for grafting and systemic signaling in Arabidopsis. (2020) *Plant J.* in press
2. #kurotani, K., #**Tabata, R.**, #Kawakatsu, Y., Sugita, R., Okayasu, K., Tanoi, K., Notaguchi, M. Autophagy is induced during plant grafting for wound healing. (2020) *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.14.949453>. #Equally contributed.
3. Notaguchi, M., kurotani, K., Sato, Y., **Tabata, R.**, Kawakatsu, Y., Okayasu, K., Sawai, Y., Okada, R., Asahina, M., Ichihashi, Y., Shirasu, K., Suzuki, T., Niwa, M., Higashiyama, T. Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by β -1,4-glucanases. (2020) *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.010744>.
4. Shikanai, Y., Yoshida, R., Hirano, T., Enomoto, Y., Li, B. Asada, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S. **Tabata, R.**, Sawa, S., Okada, H., Ohya, Y., Kamiya, T., Fujiwara, T. Callose synthesis suppresses cell death induced by low-calcium conditions in *Arabidopsis* leaves. (2020) *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.19.00874.
5. #Ohkubo, Y., #Tanaka, M., **Tabata, R.**, Ogawa-Ohnishi, M., Matsubayashi, Y. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. (2020) *Nature Plants* 3, 17029. #Equally contributed.
6. Okamoto, S., **Tabata, R.**, Matsubayashi, Y. Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. (2016) *Current Opinion in Plant Biology* 34, 35-40.
7. **Tabata, R.**, Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., Matsubayashi, Y. Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. (2014) *Science* 346, 343-346.

8. 田村 花, 田畑 亮 (名古屋大学) 鉄欠乏応答性の長距離シグナル伝達に関する時系列トランスクリプトーム解析. 第5回 植物の栄養研究会, 広島大学, 2019年9月
(ポスター賞受賞)
9. 田畑 亮 (名古屋大学) 根と葉の間の長距離シグナルによる栄養吸収制御.
第5回 植物の栄養研究会, 広島大学, 2019年9月 (招待講演)