

塩ストレス耐性を強化する ペプチド性遺伝子

Plant peptides inducing salinity stress tolerance

こんどう たかゆき なかみなみ けんたろう
近藤 隆之¹⁾・**中南 健太郎**²⁾
はなだ こうすけ
花田 耕介³⁾

- 1) 九州工業大学大学院 情報工学研究院
2) 理化学研究所 環境資源科学研究センター 研究員
3) 九州工業大学大学院 情報工学研究院 教授



近藤 隆之 Takayuki Kondo
2013~14年 広島大学大学院生物圏
科学研究科博士課程前期
修了
15年 広島大学大学院 生物圏科学
研究科博士課程後期 修了
17年 九州工業大学情報工学部
生命化学情報工学科
研究職員
専門分野：植物の植物生理学。未
登録であった遺伝子の機能解析を
行っている。

Keywords : ペプチドホルモン, 短い遺伝子, 環境ストレス耐性, 細胞外分泌

Abstract : 約 10 年間にモデル生物であるシロイヌナズナを中心に、数多くのホルモン様ペプチドが見出され、植物ホルモンと同様の方法で生理学的効果を正確に調節する機能を持つことが明らかになった。さらに、近年、見出されたホルモン様ペプチドの多くが、生物・非生物ストレスのシグナル伝達に大きく関与することが見出されつつある。本研究では、代表的な非生物ストレスの塩ストレスに着目し、短い遺伝子を過剰発現させた形質転換体のスクリーニングから塩耐性を強化するホルモン様ペプチドを見出した研究を紹介する。興味深いことに、短い遺伝子によってコードされるペプチド断片を人工合成し、植物体に添加することが、過剰発現体と同じ効果を引き起こすことを見出した。このように、ペプチドを添加することで生理活性を見出せるという方法は、非モデル生物である作物種で、新たにホルモン様モデルを探索する場合に、有効な方法になると考えられた。

はじめに

短いコーディング遺伝子によってコードされるペプチドは、細胞から分泌され、他の細胞に移動して機能する。この様な分泌ペプチドは、植物ホルモンと似た役割を担っており、植物の発育に不可欠であることが、近年の研究で明らかにされてきた¹⁾。

これまでに報告されたホルモン様ペプチドの多くは、モデル生物のシロイヌナズナで見出され、植物の生育や発達を調節する役割

を持つことが明らかとなっている。形態形成にかかわるホルモン様ペプチドは、細胞増殖に関連する成長因子である PhytoSulfoKine (PSK)、根の成長を調節する因子である Rapid Alkalinization Factor (RALF) や C-terminally Encoded Peptide (CEP)、幹細胞の分化に関連する CLavata3/Embryo surrounding region-related (CLE)、花の器官脱離や側根形成に関わる Inflorescence Deficient in Abscission (IDA) などが同定されている。興味深いことに、研究が進むに従って、PSK：免疫応答・傷

Takayuki Kondo¹⁾・Kentaro Nakaminami²⁾・Kosuke Hanada³⁾ : 1) Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology 2) Research Scientist, Center for Sustainable Resource Science, RIKEN 3) Professor, Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology

害応答, RALF: 免疫応答, CEP: 硝酸塩欠乏シグナル, CLE: 生物・非生物ストレス, IDA: 生物・非生物ストレスなど, 形態形成に関わるとされていたペプチドが生物あるいは非生物ストレス条件下でのシグナル伝達においても機

能することが知られてきた。また, 植物免疫を活性化させる Plant Elicitor Peptide (PEP1), CEP の下流で硝酸塩欠乏シグナルに関わる CEP Downstream (CEPD), および, 水分欠乏を地上に連絡する CLE25 のように, ストレス条

表 形態形成および生物・非生物ストレス応答に関わる分泌ペプチド

名称	形態形成	生物・非生物ストレス応答
Rapid Alkalinization Factor (RALF)	根の細胞伸長、根粒形成の抑制 花粉管伸長の抑制	免疫応答
	Murphy E. and De Smet I. (2014) Trends Plant Sci., 19(10):664-71	Stegmann M. <i>et al.</i> (2017) Science, 355(6322):287-289
CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED (CLE) family	メリステム維持、根毛形成 根の原生師部	生物・非生物ストレス
	Fletcher J.C. (2020) Trends Plant Sci. 25(10):1005-1016	Wang G. <i>et al.</i> (2016) Front. Plant Sci. 6:1211
CLE25		乾燥耐性
		Takahashi F. <i>et al.</i> (2018) Nature 556:235-238
INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA)/ IDA LIKE (IDL)	花の器官脱離、側根形成	生物・非生物ストレス
	Kumpf R.P. <i>et al.</i> (2013) PNAS 110 (13):5235-5240	Vie A.K. <i>et al.</i> (2015) J. Exp. Bot. 66(17):5351-5365
Phytosulfokine (PSK)	根の伸長、胚軸伸長	免疫応答、傷害応答
	Stührwoldt N. <i>et al.</i> (2011) PLoS ONE 6(6):e21054. Kutschmar A. <i>et al.</i> (2009) New Phytol. 181: 820-831	Sauter M. (2015) J. Exp. Bot. 66(17):5161-5169 Loivamäki M. <i>et al.</i> (2010) Physiol. Plant. 139(4):348-357
Plant peptide containing sulfated tyrosine (PSY)	根の伸長領域における細胞の膨張、分化	免疫応答、傷害応答
	Amano Y. <i>et al.</i> (2007) PNAS 104(46):18333-18338	Mosher S. <i>et al.</i> (2013) Plant J. 73(3):469-482 Amano Y. <i>et al.</i> (2007) PNAS 104(46):18333-18338
C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP)	根の形態形成	硝酸塩欠乏シグナル
	Ohya K. <i>et al.</i> (2008) Plant J. 55:152-160	Ohkubo Y. <i>et al.</i> (2017) Nat. Plants 20(39):17029
CEP DOWNSTREAM (CEPD)		硝酸塩欠乏シグナル
		Ohkubo Y. <i>et al.</i> (2017) Nat. Plants 20(39):17029
FE-UPTAKE-INDUCING PEPTIDE (FEP)/ IRON MAN (IMA)		鉄欠乏シグナル
		Hirayama T. <i>et al.</i> (2018) Plant Cell Physiol. 59(9):1739-1752 Grillet L. <i>et al.</i> (2018) Nat. Plants 4(11):953-963
PAMP-INDUCED SECRETED PEPTIDE (PIP)/PIP LIKE (PIPL)		生物・非生物ストレス
		Hou S. <i>et al.</i> (2014) PLoS Pathog. 10(9): e1004331
<i>Arabidopsis thaliana</i> Plant elicitor peptides (AtPEP)		免疫応答
		Huffaker A. <i>et al.</i> (2006) PNAS 103(26):10098-10103

件下での機能解析から見出されてきたものもある (表)²⁸⁾。

植物の形態形成にかかわるものは、通常条件下で生育した際に表現形質が変化することから、比較的容易に見出すことが可能であるため、先行して数多くのホルモン様ペプチドが同定されてきたのかもしれない。一方で、ストレス条件下でのシグナル伝達に機能するホルモン様ペプチドを見出すためには形質転換体をストレス条件下で生育する必要があるため、容易に見出すことはできない。そのため、未だ見出されていない様々なストレスのシグナル伝達に関係するホルモン様ペプチドが、モデル生物であるシロイヌナズナにおいても数多く存在している可能性がある。さらに、見出されたホルモン様ペプチドの多くは、通常の遺伝子と比べても保存性が少ないことが明らかとされている¹⁾。それにも関わらず、系統特異的に遺伝子重複をおこし、遺伝子毎に異なる機能を持つものが多い。そのため、植物毎の系統特異的な機能を強化する役目を担っていると推測される。

1. 塩耐性を強化する分泌ペプチドのスクリーニング

筆者らは、非生物ストレス条件の中でも、代表的なストレスである塩ストレスに着目し、塩ストレス条件下でのシグナル伝達に関与するホルモン様ペプチドを見出すことを目指した⁹⁾。はじめに、塩ストレス条件下でのシロイヌナズナにおいて、120 アミノ酸以下のタンパク質をコードする短い遺伝子の発現変動をマイクロアレイ解析によって調べた。その結果、81 個の短い遺伝子の発現が塩ストレスに応答して4倍以上誘導されていた。塩ストレスにより発現が

誘導された短い遺伝子がどのような遺伝子であるかを詳細に調べたところ、19 個の短い遺伝子は酵素、転写因子、熱ショックリポタンパク質などの機能が明らかなものであった。そこで、機能が分かっていない残りの 62 個の遺伝子の中で、無作為に 17 個の短い遺伝子を選択し機能解析に着手した。これらの 17 個の短い遺伝子が、耐塩性に不可欠な役割を果たすかどうかを調べるために、これらの遺伝子を過剰発現する形質転換体 (ox) を構築し、それぞれの形質転換体を塩ストレス条件下で生育させた。その結果、13 個の小さなコーディング遺伝子の過剰発現体において、2 つ以上の系統で、野生型よりも 2 倍以上高い生存率を示した。13 個の中でも、AT5-ox, AT12-ox, AT13-ox, および AT23-ox 植物の T3 系統では一次根の長さが野生型よりも 1.5 倍以上長くなっていた。これらの 4 個の遺伝子は、初めに行ったマイクロアレイ解析でも、他の 13 個よりも塩ストレスに応答してより高いレベルで誘導されているものであった (P value = 0.0003)。

2. 植物の塩ストレスでの AtPROPEP3/AT13 の誘導

過剰発現により塩ストレス耐性の強化をもたらした 4 個の短い遺伝子の中で、塩ストレスに対する最も高い発現誘導率 (> 100 倍) を示した AT13 に着目してさらなる解析を実施した。

AT13 は、植物免疫を活性化させる PEP1 をコードする AtPROPEP1 のパラログとしてアノテーションされており、AtPROPEP3 という名前が付けられている¹⁰⁾。そのため、植物免疫を活性化させる機能を持っていると考えられていたが、塩ストレス耐性に関連する機能は知られていなかった。シロイヌナズナには

AtPROPEP1 のパラログが AtPROPEP3 を含めて 7 個存在しており, AtPROPEP2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 という名前が付けられている¹⁰⁾。そして, これらの遺伝子のいずれにおいても, 塩ストレスに関連した機能を有すとは考えられていなかった。そこで, AtPROPEP 遺伝子ファミリーメンバーの中で, 塩ストレス耐性に関わるものがあるかを, 定量的 RT-PCR 法を用いて詳細に調べた。その結果, AtPROPEP3/AT13 の発現が, 他のどのファミリーメンバーよりも塩ストレスにより誘導される遺伝子であることが明らかとなった。

3. 植物の塩ストレス耐性を強化する AT13-5 ペプチド

AtPROPEP 遺伝子ファミリーに属する短い遺伝子にコードされるペプチドは, 翻訳後に細胞外に分泌しホルモン様ペプチドとして機能すると考えられていた。そこで, AT13 にコード

されるペプチドの一次構造に基づいて人工的に合成した合成ペプチドを植物に添加することで, AT13ox で観察されるものと同様の表現型を得ることができるかを調べた。その結果, AT13 にコードされるペプチドの C 末端の 30 アミノ酸を人工合成したペプチド (AT13-5pep) を添加した時のみに, 塩耐性を強化することが明らかとなった (図 1)。さらに, AT13-5pep の植物への添加により生じる影響が, AT13ox で生じる影響と同様のものであるかを調べるために, AT13-5pep 処理によって引き起こされる全遺伝子の発現誘導と, AT13ox で引き起こされる全遺伝子の発現誘導をマイクロアレイ解析で確かめた。その結果, ペプチド処理と過剰発現で, 類似した遺伝子が発現誘導されていることが明らかとなった ($r = 0.65$, P 値 = 2.0×10^{-21} , 図 2)。しかしながら, ペプチド処理および過剰発現に誘導されている遺伝子群は, 典型的な塩または非生物学的ストレス応答性遺伝子は存在せず, 未知の塩ストレス誘導性遺伝子

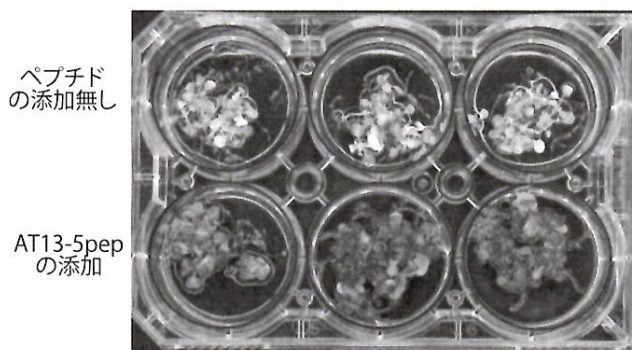
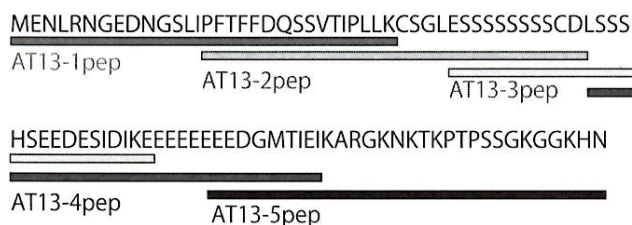


図 1 AtPROPEP3/AT13 にコードされる部分ペプチド (AT13-5pep) が誘導する耐塩性効果

AtPROPEP3/AT13 にコードされる 5 種類の人工ペプチド (AT13-1pep, AT13-2pep, AT13-3pep, AT13-4pep, AT13-5pep) を構築した。それらの人工ペプチドを, 150mM の NaCl が入っている MS 培地に, 1 μ M の濃度で添加した所, AT13-5pep を添加した時のみに, 植物に塩耐性を上昇させた。

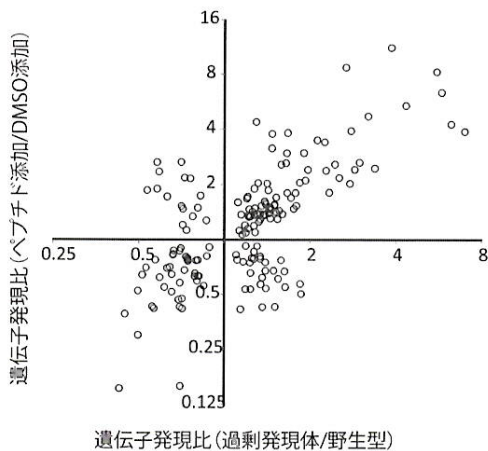


図2 AT13-5pep で処理された植物と AtPROPEP3 / AT13 を過剰に発現させた形質転換体での遺伝子発現の比較

AtPROPEP3/AT13-ox (過剰発現体) および AT13-5pep を処理した植物の遺伝子発現比の対数値をプロットした。垂直および水平プロットは、AtPROPEP3/AT13-ox および AT13-5 ペプチド処理した植物における遺伝子発現変動を示す。

が AtPROPEP3/AT13 によって制御されていることが示唆された。

続いて、AtPROPEP3/AT13 の発現量を減少させた RNAi 体を用いた塩ストレス試験では、RNAi 体は塩に対して強い感受性を示し、野生型よりも塩耐性を失っていることを明らかとした。興味深いことに、RNAi 体に AT13-5pep を処理すると、塩耐性を相補することが可能である。この結果は、AtPROPEP3/AT13 が塩ストレス耐性の誘導に不可欠であるだけでなく、AT13-5pep が塩ストレス耐性を強化する原因因子であることを意味している。

4. 塩ストレス応答と免疫応答での共通の経路

AtPROPEP 遺伝子ファミリーに属するペプチド (AtPROPEP1 ~ 8) は、2つの膜貫

通型受容体キナーゼタンパク質 (PEPR1 および PEPR2) と相互作用することで、免疫応答におけるシグナル伝達物質として機能することが知られている¹⁰⁾。AtPROPEP3/AT13 にコードされるペプチドが、塩耐性でも同様に、PEPR1 あるいは PEPR2 と相互作用することでシグナルを伝達しているかは興味深い。そこで、初めに、PEPR1 あるいは PEPR2 を欠損させた形質転換体 *pepr1* および *pepr2*、さらには、PEPR1 と 2 を両方欠損させた形質転換体 *pepr1/pepr2* の塩ストレス耐性を調べた。その結果、3 個の変異体は野生型と比較して強い塩感受性を示した。つまり、PEPR1 および PEPR2 の二つの遺伝子は、塩ストレス耐性を示すために必要な遺伝子であることを意味する。次に、それぞれの変異体に AT13-5 pep を処理し、塩耐性を獲得できるかを調べた。その結果、*pepr2* の変異体のみが塩ストレス耐性を示し、*pepr1* と二重変異体は、塩ストレスに対する感受性を示した。この結果は、AtPROPEP3/AT13 にコードされるペプチドが、PEPR1 と相互作用を示すことで、塩ストレス耐性を強化することを示している。このように、本研究では、AtPep3/AT13 ペプチドが植物の塩耐性に関わっていることを示した。それだけでなく、免疫強化と塩耐性ストレスは、クロストークしており、そのクロストークを担う因子が AtPROPEP3/AT13 にコードされる C 末端のペプチドであることを明らかにした。

おわりに

今後、ホルモン様ペプチドを作物種で利用するためには、生物系ストレスあるいは非生物ストレス耐性をコントロールするようなホルモン様ペプチドを見出すが必要になる。しかし、

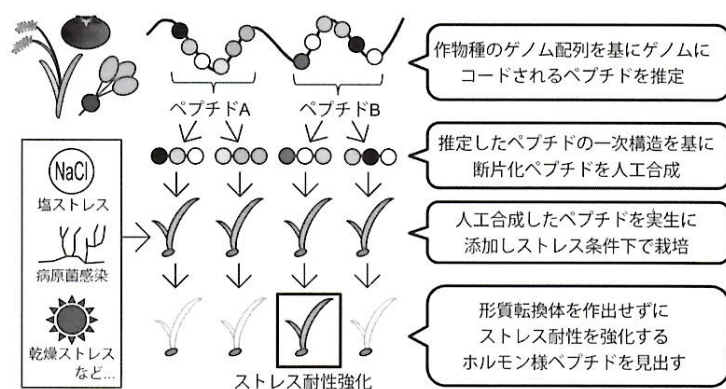


図3 ペプチド添加試験でストレス耐性を強化するホルモン様ペプチドを見出す方法のイメージ図

生物種間で保存性も少なく、通常生育のみでは容易に表現形質が変化しないホルモン様ペプチドを作物種で見出すことができるだろうか？ まだ、見出されていないホルモン様ペプチドを作物種で探索するには、どのようにすればいいのであろうか？ 本研究は、一つのヒントとなる研究成果をモデル生物種のシロイヌナズナで示したと考えている。

ヒントとは、ホルモン様ペプチドは、人工合成したペプチドを植物体に添加することで、植物の生理活性を変化させることである。つまり、ホルモン様ペプチドをコードしているペプチドを網羅的に人工合成し、その人工合成したペプチドを植物に添加することで、新奇のホルモン様ペプチドを見いだす戦略がある（図3）。この現象を利用して、様々なストレス耐性を示すホルモン様ペプチドを作物種で同定できれば、有用な遺伝子を形質転換体をつくらずに確定できる可能性もあると考えている。

文 献

- 1) Takahashi F., Hanada K., Kondo T. *et al.* (2019): *Current Opinion in Plant Biology* 51:88-95.
- 2) Sauter M. (2015): *Journal of Experimental Botany* 66 (17): 5161-5169.
- 3) Stegmann M., Monaghan J., Smakowska-Luzan E. *et al.* (2017): *Science* 355 (6322): 287-289.
- 4) Ohkubo Y., Tanaka M., Tabata R. *et al.* (2017): *Nature Plants* 20 (39): 17029.
- 5) Wang G., Zhang G. and Wu M., (2016): *Frontiers in Plant Science* 6:1211.
- 6) Takahashi F. Suzuki T., Osakabe Y. *et al.* (2018): *Nature* 556:235-238.
- 7) Vie A.K., Najafi J., Liu B. *et al.* (2015): *Journal of Experimental Botany* 66 (17): 5351-5365.
- 8) Huffaker A., Pearce G. and Ryan C.A. (2006): *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26): 10098-10103.
- 9) Nakaminami K., Okamoto M., Higuchi-Takeuchi M. *et al.* (2018): *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115 (22), 5810-5815.
- 10) Bartels S., Lori M., Mbengue M. *et al.* (2013): *Journal of Experimental Botany* 64:5309-5321.