

《様式B》

研究テーマ	「植物ペプチドホルモンを利用した無機栄養吸収促進剤の開発」		
研究責任者	所属機関名	名古屋大学 大学院生命農学研究科	
	官職又は役職	特任講師	
	氏名	田畑 亮	メールアドレス tabaryo@agr.nagoya-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名	名古屋大学 工学部	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	清水 一憲	
共同研究者	所属機関名	農業・食品産業技術総合研究機構	
	官職又は役職	室長・調整監・技術支援センター長	
	氏名	今西 俊介	

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

本研究は、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を担うペプチドホルモン単離、ならびに長距離シグナル (ペプチド) を利用した無機栄養の効率的吸収を可能にする農業技術構築のための生物工学的研究である。

申請者はこれまで、土壤中の不均一な無機栄養環境を模倣した Split-root 培養法による解析によって、植物が窒素欠乏を認識した際に、道管液を介して根から葉に移動して、窒素取り込み活性を上昇させる CEP ペプチドホルモンの単離に成功している

(Tabata et al. *Science* 2014)。化学合成した CEP ペプチドは、アブラナ科植物に処理するだけで、窒素吸収能を向上させることができる。そこで、本研究では Split-root 培養法による局所的な無機栄養欠乏処理を利用したトランスクリプトーム解析によって、新たな移動性シグナル分子および制御因子を単離し、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。さらには、単離したペプチドの配列をもとに、ペプチドアレイ解析を実施し、より高活性、安定性を保持したペプチドの探索を行うことを目的とした。

まず、植物が土壌から吸収している 14 種類の無機栄養の中で、窒素と同様に根—葉

間の長距離シグナル伝達機構が働く無機栄養を調べたところ、「鉄」の吸収に関しても維管束を介した長距離シグナル伝達機構の存在が確認された。そこで、Split-root 鉄欠乏処理時の、根と葉における時系列トランスクリプトーム解析をおこなったところ、根―葉間の移動性因子として Defensin-like protein など分泌型ペプチドを含む5つの候補因子を単離できた。これら候補因子の1つである At1g47400 の過剰発現体では根が短くなるため、現在、鉄の過剰取り込みの可能性を検証している。

また、CEP ペプチドの研究から、植物の維管束液中には、長距離シグナル伝達を情報分子であるペプチドホルモンが移動していることがわかってきたため、様々な無機栄養欠乏ストレスを与えたトマトの道管液を採集し質量分析解析をおこなうことで、ペプチドを直接的に同定することを目指した。本実験から、これまでに植物で機能が明らかにされていない新規の硫酸化ペプチドを同定することができた。現在は、この硫酸化ペプチドの無機栄養欠乏応答における役割について解析を行っている。

最後に、データベース解析から、CEP ペプチドホルモンのイネのオルソログを探索したところ、イネのゲノムにおいても15個の遺伝子が存在することがわかった。そこで、ペプチドアレイに用いるため、イネのCEP ペプチドを合成した。

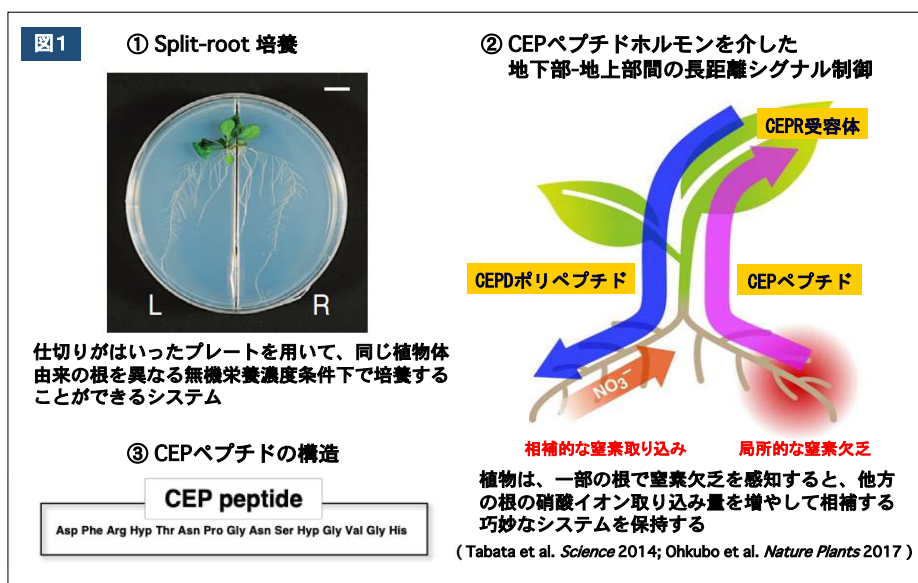
以上のように、本研究を通して、① 鉄欠乏応答性のペプチド因子、② 新規硫酸化ペプチド、③ 窒素吸収に関わることが推定されるイネのCEP ペプチドを見いだした。現在、ペプチドアレイをセットアップするとともに、それぞれのペプチドの無機栄養吸収に関する詳細な役割について解析を進めている。

ペプチド因子を利用した新高機能性肥料の創出の可能性については、現在、化学や農業関連の企業の研究者と議論している。ペプチドアレイを通して、無機栄養の高吸収活性を保持したペプチドをデザインできた際には、実際に農業の現場でも利用可能な、安価で、安定して大量に生産する技術確立についても検討していきたい。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4で、5 ページ以内)

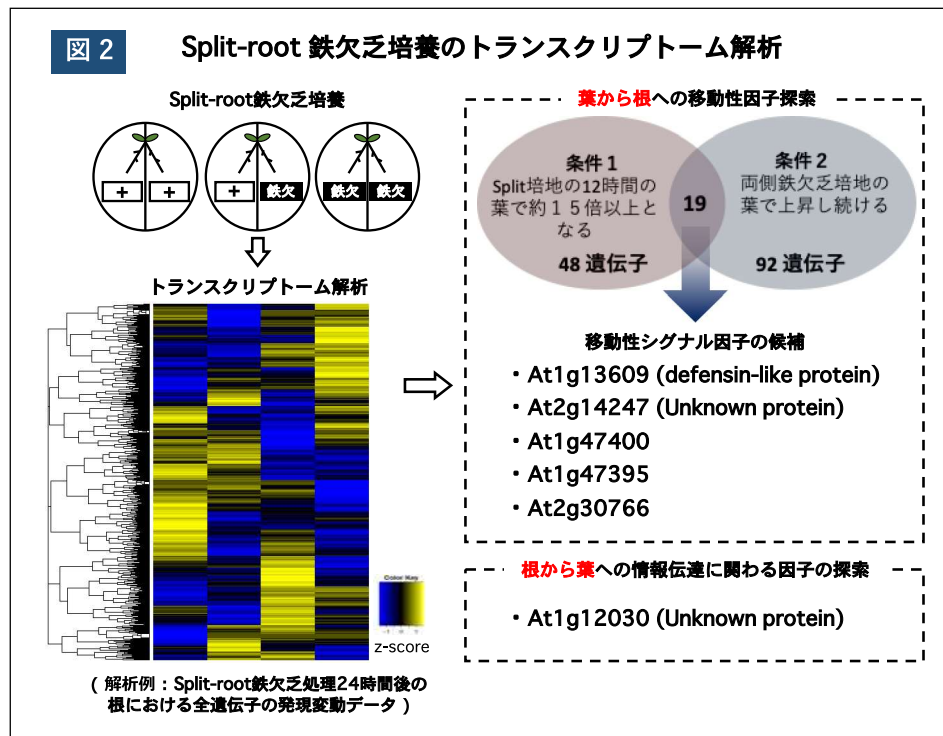
植物は、窒素を主に硝酸イオンとして吸収しているが、自然界において土壤中の硝酸イオン分布は極めて不均一である。そのため、植物は根の一部が局所的な窒素欠乏に陥ったとき、その情報を他の根に伝え、硝酸イオン吸収を相補的に促進させる仕組みを保持している(Gansel et al. *Plant J.* 2001)。しかしながら、これまで、この生命現象を説明しうる分子は明らかにされてこなかった。申請書は近年、土壤中の不均一な無機栄養環境を模倣した Split-root 培養法による解析 (図 1 ①) を通じて、根の一部が局所的な硝酸イオン欠乏を感知すると分泌型のペプチドホルモン CEP を産生し、それらが道管を移行して地上部の受容体 CEPR によって認識されることが引き金となり、その後、地上部から地下部へ移行する 2 次シグナル CEPD が生産され、周辺に十分な硝酸イオンがある根において積極的に硝酸イオントランスポーターの発現量を上昇させることを明らかにした (Tabata et al. *Science* 2014; Ohkubo et al. *Nature Plants* 2017) (図

1 ②, ③)。本研究では、このペプチド発見の結果を基盤として、植物の栄養吸収を促進する新規のペプチドを探索すると共に、さらに高機能性ペプチドの開発によって、新規生長調整剤の創成を目的とした。



まず、植物が土壌から吸収している 14 種類の無機栄養の中で、窒素と同様に根—葉間の長距離シグナル伝達機構が働く無機栄養を調べたところ、「鉄」の吸収に関しても維管束を介した長距離シグナル伝達機構の存在が確認された。そこで、シロイヌナズナの Split-root 鉄欠乏処理時の、根と葉における時系列トランスクリプトーム解析をおこなった。時系列トランスクリプトーム解析より、植物は一部の根で鉄欠乏を感知すると、24 時間をピークとして、周辺に鉄が十分に存在する根において、相補的に鉄

の取り込み・代謝を連動して活性化していることが明らかになった。また、時系列の発現変動データから、「葉から根」への移動が推定される因子として Defensin-like protein など分泌型ペプチドを含む5つの候補因子を単離でき



た。現在これら候補因子について、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いて、破壊株の作成をおこなったので鉄欠乏応答性の長距離シグナルにおける役割について検証している。一方、候補因子の1つである At1g47400 の過剰発現体では根が短くなる表現型が観察されたため、現在、鉄の過剰取り込みの可能性を検証している（鉄吸収向上活性があるかどうか検証）。現時点では、「根から葉」へ移動することが推定される候補ペプチドの単離には至っていないが、鉄欠乏区の根で特異的に発現上昇する遺伝子群の解析を通じて、At1g12030 の機能欠損変異体では、局所的な鉄欠乏に誘導される相補的な鉄イオントランスポーターの発現上昇が抑制されていた。したがって、機能未知遺伝子である At1g12030 が、鉄欠乏応答性の長距離シグナル伝達において、重要な役割を果たしていることが明らかになった。

また近年、ペプチドが維管束内を移動して、根粒形成や窒素欠乏応答を制御していることが明らかになってきた (Okamoto et al, *Nat Commun.* 2013; Tabata et al, *Science* 2014)。したがって、維管束液中を移動するペプチドの同定には、質量分析器を用いた直接的なタンパク質同定が重要であると考えられる。コントロール栽培条件と無機栄養欠乏条件下で生育させたトマトの道管液を集め、オルトクロロフェノール抽出とアセトン沈殿後、ゲル濾過カラムで分画し、低分子画分を LC-MS 解析を行ない、欠乏条件下で生育させたトマトの道管液で上昇するペプチド分子を探索した。その結果、

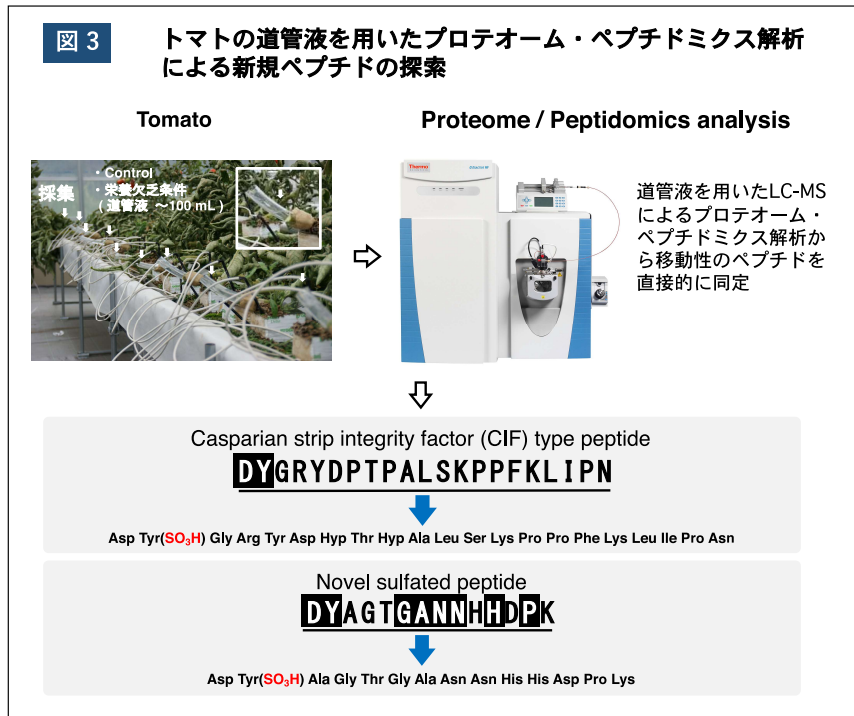
シロイヌナズナの研究から植物の根におけるキャスパリー線発達に重要な機能を持つ

CIF ペプチドと類似した配列の硫酸化ペプチドと、これまで植物において全く機能が明らかにされていない新規の硫酸化ペプチドの2種のペプチド同定に成功した。本実験から同定されたペプチド候補因子は、化学合成した後に植物体へ投与したり、過剰発現植物体作成によって、無機栄養欠乏長

距離シグナルの活性変化（取り込み活性の上昇）を指標に機能を検証していく予定である。

最後に、データベース解析から、CEP ペプチドホルモンのイネのオルソログを探索したところ、イネのゲノムにおいても15個の遺伝子が存在することがわかった。その中でも、窒素欠乏応答性のOsCEP9を選び出し、ペプチドアレイに用いるために、イネのCEPペプチドを合成した。シロイヌナズナが硝酸イオンを主に吸収するのは異なり、イネはアンモニウムイオンを主な窒素源として吸収している。同じCEPペプチドでありながら、吸収を促進するイオンの違いがあるのかどうかは生物学的にも興味深い点であり、現在検証中である。

以上のように、本研究を通して、①鉄欠乏応答性のペプチド因子、②新規硫酸化ペプチド、③窒素吸収に関わることが推定されるイネのCEPペプチドを見いだした。現在、ペプチドアレイをセットアップするとともに、それぞれのペプチドの無機栄養吸収に関する詳細な役割について解析を進めている。窒素吸収などを促進するペプチドは、必要最小限の肥料による効率的な作物栽培への基盤技術開発への展開が考えられ



る。また、鉄などのミネラル吸収促進ペプチドに関しては、我々ヒトで欠乏症が指摘されているため、ペプチド投与によって可食部にミネラルを多く蓄積させる技術開発が期待される。

ペプチド因子を利用した新高機能性肥料の創出の可能性については、現在、化学関連や農業関連の企業の研究者と議論している。ペプチドアレイを通して、無機栄養の高吸収活性を保持したペプチドをデザインできた際には、実際に農業の現場でも利用可能な、安価で、安定して大量に生産する技術確立についても検討していきたい。