

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07400

研究課題名(和文) イネ種子の発芽調節におけるエチレンシグナル伝達系のレドックス制御

研究課題名(英文) Redox regulation of ethylene signal transduction pathway involved in the regulation of seed germination in rice

研究代表者

森田 重人 (Morita, Shigeto)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20295637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： グルタレドキシン(GRX)はタンパク質のレドックス制御を通して様々な生体プロセスの調節に機能している。筆者は先行研究で、イネ GRXアイソフォームの1つであるOsGRXC2;2がイネの発芽調節に関与していることを明らかにした。本研究では、過剰発現システムと発現抑制システムを用いて、OsGRXC2;2の発芽調節における役割を解析した。その結果、OsGRXC2;2は植物ホルモンであるエチレンとアブシジン酸を介して種子休眠と発芽を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の種子休眠と発芽は、作物の育一な発芽や初期生長や、穀類種子の穂発芽に関わることから農業上重要な問題である。主要穀物であるイネは、コムギ、オオムギ等のイネ科主要穀物のモデルでもある。本研究の成果は、イネにおいてOsGRXC2;2による新規な発芽調節機構を明らかにし、穀類の種子生理の理解に貢献するものである。また一部の酒米品種やコムギ、オオムギにおいては穂発芽が問題となっていることから、本研究の成果はそれらの休眠性・穂発芽耐性の向上に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)： Glutaredoxins (GRXs) function in the regulation of various cellular processes through redox regulation of proteins. In a previous study, I have found that a rice GRX isoform, OsGRXC2;2, is involved in the regulation of seed germination in rice. In this study, I examined the regulatory role of OsGRXC2;2 in germination using its overexpressing and knock-down lines. The results suggest that OsGRXC2;2 regulates seed dormancy and germination through phytohormones, ethylene and abscisic acid.

研究分野：農芸化学

キーワード：種子 発芽 休眠 エチレン イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の種子形成と発芽の過程は、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA)、ジベレリンやエチレンなどによって調節されている [1, 2]。ABA は種子形成時に蓄積して種子を休眠させ、発芽を抑制する。また多くの双子葉植物において、エチレンは種子休眠を解除し発芽を促進させる役割を持つ。作物の栽培において、種子休眠は穀物種子の穂発芽の抑制や収穫後の種子の保存性に関わる重要な形質である。また発芽とその後の初期生長は農作物の収量に影響することから、休眠・発芽調節機構の解明は農業上重要な研究テーマである。

これまでにモデル植物シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究から、ABA による休眠・発芽の調節機構が解明されている [1]。しかしながら、イネ、コムギ、トウモロコシなどの主要穀物は単子葉植物であり、双子葉植物であるシロイヌナズナと種子の形態・構造や発芽様式が大きく異なるため、シロイヌナズナで得られた知見をそのまま適用できるとは限らない。またエチレンによる発芽調節は、イネを初めとする穀物種子では未解明である。このように種子の休眠・発芽調節機構に関して穀物では不明な点が多いのが現状である。

上記の背景のもと、筆者は主要穀物であるイネにおいて発芽調節機構に関する研究を進めている。筆者は先行研究で、タンパク質の S-S 結合を還元する酵素グルタレドキシニン (GRX) がイネ種子に多量に蓄積していることに着目した。GRX はタンパク質のレドックス制御に関与し、様々な生体プロセスの調節に機能している [3]。これまでに筆者は、イネ種子で多量に発現している GRX アイソフォーム *OsGRXC2;2* について、過剰発現系統の作出・解析を行い、*OsGRXC2;2* が発芽抑制に機能していることを明らかにした (図 1) [4]。また *OsGRXC2;2* によって調節を受けるタンパク質を探索するために、酵母 two-hybrid スクリーニングを行った結果、*OsGRXC2;2* の相互作用タンパク質の候補としてエチレン受容体 *OsERS1* を発見した [5]。

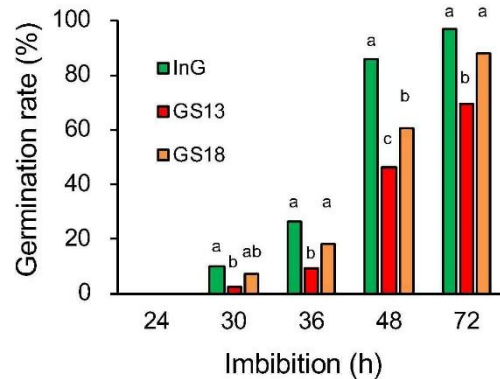


図 1. *OsGRXC2;2* 過剰発現系統における発芽抑制。過剰発現系統 (GS13、GS18) とコントロール系統 (InG) の完熟種子を吸水させ、発芽率を記録した。データは各系統 150 粒の結果を示す。異なる英文字は系統間に有意差があることを示す ($p < 0.05$, Tukey 法)。

2. 研究の目的

上記の先行研究により、*OsGRXC2;2* がイネ種子の発芽調節に働いていることが示唆された。また *OsGRXC2;2* が *OsERS1* の酸化還元を通して発芽を調節している可能性が示され、*OsGRXC2;2* による発芽調節にエチレンが関与していることが示唆された。本研究はこの可能性を検討し、エチレンによるイネの発芽調節機構を解明することを目的とした。具体的には、以下の 3 点について実験を行った。

(1) *OsGRXC2;2* と *OsERS1* の相互作用を確認する。(2) *OsGRXC2;2* 過剰発現系統および発現抑制系統を用いた解析により、*OsGRXC2;2* とエチレンとの関連を明らかにする。(3) *OsERS1* 変異体系統を作出し、種子休眠・発芽における機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) *OsGRXC2;2* と *OsERS1* の相互作用の解析

OsERS1 と *OsGRXC2;2* がイネ細胞内で相互作用することを確認するために、BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法による相互作用の検出を試みた。*OsERS1* と *OsGRXC2;2* のコード領域の断片をそれぞれ黄色蛍光タンパク質 (YFP) の部分配列に連結し、各タンパク質と YFP 部分断片との融合タンパク質の発現コンストラクトを作製した。イネ懸濁培養細胞からプロトプラストを調製し、これらのコンストラクトを共導入して融合タンパク質を一過的に発現させ、蛍光顕微鏡で YFP の蛍光を観察した。

(2) *OsGRXC2;2* 過剰発現系統および発現抑制系統を用いた解析

筆者は先行研究において、*OsGRXC2;2* を過剰発現するイネと、RNAi により発現抑制したイネを作出している。これらの系統を用いて次の実験を行った。

エチレン処理条件における発芽試験 *OsGRXC2;2* 過剰発現系統とコントロール系統の種子を、エチレン前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) の存在下で 28 暗所で発芽させた。吸水 36 時間後の発芽率を測定し、系統間で比較した。

登熟種子における遺伝子発現解析 *OsGRXC2;2* 過剰発現系統、発現抑制系統と、それぞれの

コントロール系統から開花後 10 日目または 14 日目の登熟種子を採取し total RNA を調製した。得られた RNA を用いて、種子休眠の誘導に關する *OsABI3* 遺伝子、*Sdr4* 遺伝子の発現量を、定量的 RT-PCR により調査した。

ABA 含量の測定 *OsGRXC2;2* 過剰発現系統とコントロール系統から開花後 14 日目の登熟種子を採取し、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて ABA 含量を測定した。

(3) *OsERS1* 変異体系統の作出と解析

ゲノム編集による変異体系統の作出 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により *OsERS1* の変異体イネを作出した。*OsERS1* のコード領域に変異を導入するようコンストラクトを作製し、アグロバクテリウム法によりイネに導入した。得られた系統において、シークエンスにより変異導入を確認し、*OsERS1* がノックアウトされたホモ変異体系統を選抜した。また変異が導入されなかった非変異体系統を、コントロールとして用いた。

休眠性の調査 *OsERS1* 変異体系統と非変異体系統から開花後 42 日目の完熟種子 (休眠種子) を採取し、休眠性を調査した。採取後直ちに種子を播種し 28 暗所で発芽させ、7 日後の発芽率を調査した。

発芽および初期生長の調査 変異体系統と非変異体系統の種子を播種し、ACC の存在下で 28 暗所で発芽・生育させた。吸水後 48 時間までの発芽状況を記録した。また吸水後 7 日目の芽生えのシュートの長さを測定した。

芽生えにおける遺伝子発現解析 変異体系統と非変異体系統の種子を播種し、ACC の非存在下で 28 暗所で発芽させた。吸水後 3 日目の個体を ACC で 48 時間処理し、シュートを採取して total RNA を調製した。得られた RNA を用いて、エチレン応答性遺伝子 *OsERF63*、*OsERF73* の発現量を、定量的 RT-PCR により調査した。

4. 研究成果

(1) *OsGRXC2;2* と *OsERS1* の相互作用の解析

OsERS1 がイネ細胞内で *OsGRXC2;2* と相互作用することを BiFC 法により確認するため、両タンパク質と YFP 部分断片の融合タンパク質をイネプロトプラストで発現させたが、相互作用を示す明確な YFP 蛍光は観察されなかった。各タンパク質の発現量が十分でなかった可能性や、*OsERS1* が膜タンパク質であることが原因として考えられることから、今後コンストラクトの改良が必要と考えられる。

(2) *OsGRXC2;2* 過剰発現系統および発現抑制系統を用いた解析

OsGRXC2;2 による発芽調節機構を明らかにするため、過剰発現系統および発現抑制系統を用いて、以下の解析を行った。

エチレンは植物において発芽を促進することが知られている。*OsGRXC2;2* による発芽調節とエチレンとの関連を調べるため、*OsGRXC2;2* 過剰発現系統の種子をエチレン前駆体である ACC で処理し、発芽試験を行った。その結果、過剰発現系統ではコントロール系統に比べ、エチレンによる発芽の促進が低下していた(図 2)。これにより *OsGRXC2;2* はエチレンの作用を通して発芽を調節していることが示唆された。

OsGRXC2;2 は登熟種子と完熟種子で多量に蓄積していることから [6]、登熟期における役割が示唆されている。イネでは、ABA による休眠誘導因子として *OsABI3* や *Sdr4* が知られている [7]。そこで *OsGRXC2;2* 過剰発現系統と抑制系統の登熟種子において、休眠関連遺伝子 *OsABI3*、*Sdr4* の発現を調査した。その結果、過剰発現系統ではそれらの発現が上昇し、発現抑制系統では、発現が低下していた (図 3)。

また過剰発現系統で休眠関連遺伝子の発現上昇が見られたことから、同系統の登熟種子において ABA 含量を測定した。その結果、過剰発現系統ではコントロール系統に比べ ABA 含量が高か

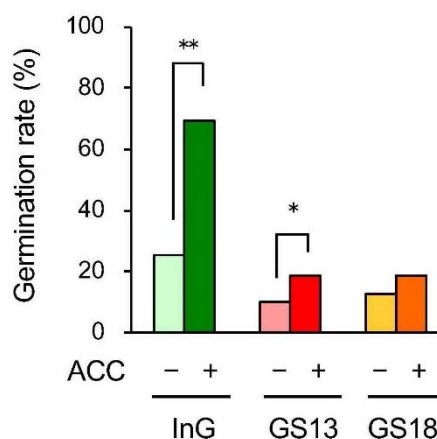


図 2. *OsGRXC2;2* 過剰発現系統におけるエチレンの発芽促進効果の低下。過剰発現系統 (GS13、GS18) とコントロール系統 (InG) の完熟種子を 100 μ M ACC の存在下で発芽させた。データは、各処理区 150 粒の発芽率を示す。* は有意差があることを示す (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$, t -検定)

った。以上の結果から、*OsGRXC2;2* は ABA を介して種子休眠を調節することで、発芽を抑制していることが示唆された。

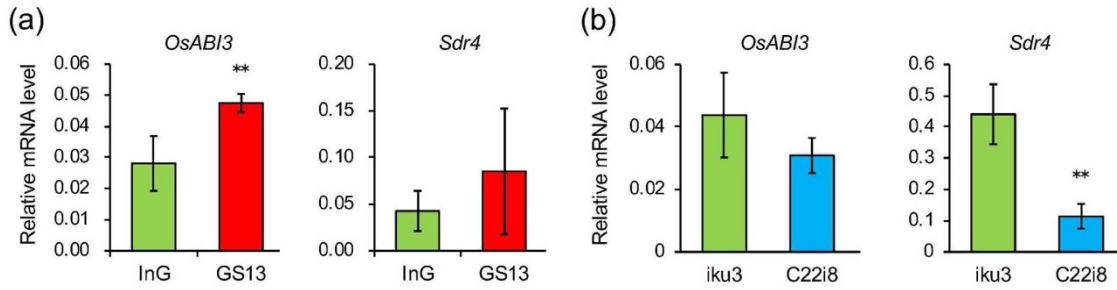


図3. *OsGRXC2;2* 過剰発現系統 (a) および発現抑制系統 (b) における休眠関連遺伝子の発現。(a) 過剰発現系統 (GS13) とコントロール系統 (InG) の開花後 14 日目の登熟種子および、(b) 発現抑制系統 (C22i8) とコントロール系統 (iku3) の開花後 10 日目の登熟種子を採取し、定量的 RT-PCR に用いた。データは平均 ± 標準偏差 (n=3-4) を示す。* は有意差があることを示す (**, $p < 0.01$, t -検定)。

(3) *OsERS1* 変異体系統の作出と解析

OsERS1 の種子休眠・発芽における機能を解析するために、ゲノム編集技術を用いて *OsERS1* 変異体系統を作出し、以下の解析を行った。

CRISPR/Cas9 システムを用いて *OsERS1* のコード領域の 5'-末端付近に変異を導入した形質転換イネを作出した。得られた形質転換体 (T_0 世代) のシークエンスにより、標的部位に変異が導入されていることを確認し、ノックアウト変異体系統を選抜した。 T_1 世代を育成してホモ変異個体を選抜し、得られた T_2 種子を用いて以下の解析を行った。

OsERS1 変異体系統の完熟直後の種子を発芽させ休眠性を調査したところ、変異体全 3 系統のうち、1 系統 (N41 系統) で発芽率の低下が見られ、休眠性が上昇している可能性が示された (図 4)。しかし他の 2 系統では発芽率の低下は見られなかったことから、休眠性の上昇は *OsERS1* の変異とは直接関係しないことが示唆された。そこで N41 系統については、新規な休眠性変異体の候補として、今後解析を行うこととした。

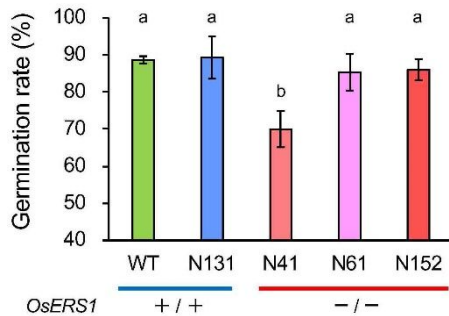


図4. *OsERS1* 変異体系統の種子休眠性。変異体系統 (N41, N61, N152) と非変異体系統 (N131)、および野生型 (WT) の開花後 42 日目の完熟種子を採取して発芽試験を行い、吸水後 7 日目の発芽率を記録した。データは平均 ± 標準偏差 (n=3) を示す。異なる英文字は有意差を示す ($p < 0.05$, Tukey 法)。

OsERS1 の変異によって、発芽や初期生長に影響が見られるかどうかを調査するため、変異体の種子を播種し、発芽試験を行った。その結果、変異体系統はいずれも非変異体系統と比べて発芽特性に差は見られなかった。エチレンレセプターはイネに 5 個存在することから、単独のレセプターのノックアウトでは発芽に影響が出なかったと考えられる。今後、*OsERS1* の過剰発現系統を作出し、発芽における機能を解析する必要がある。

また変異体系統における芽生えの初期生長を調査した。その結果、ACC 処理条件、無処理条件のいずれにおいても、変異体ではコントロール系統に比べシュートの伸長が促進されていた (図 5)。この結果から、*OsERS1* はシュートの伸長抑制に機能していることが示唆された。

エチレンはイネシュートの伸長を促進する。またエチレンレセプターはエチレン応答の負の調節因子であることが知られている。そこでエチレン応答の指標として、エチレン応答性遺伝子 *OsERF63*、*OsERF73* の発現を調査し、*OsERS1* 変異体においてエチレン応答が変化しているかどうか検討した。その結果、いずれの遺伝子も変異体では発現上昇していたことから、*OsERS1* 変異体ではエチレン応答の上昇により、シュートの伸長が促進されていることが示唆された。

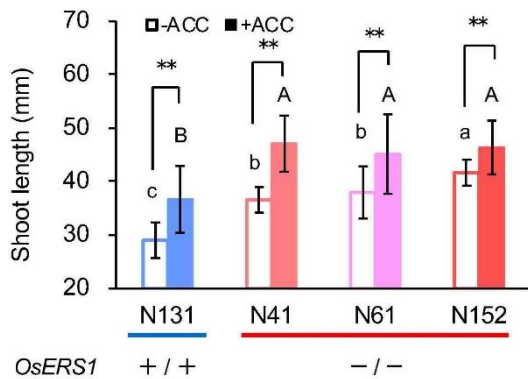


図 5. *OsERS1* 変異体系統の芽生えにおけるシュートの伸長促進。変異体系統 (N41、N61、N152) と非変異体系統 (N131) の完熟種子を無処理または 100 μ M ACC 処理条件下で発芽させ、吸水後 7 日目のシュートの長さを測定した。データは平均 \pm 標準偏差 (n=27-30) を示す。異なる英文字は系統間の有意差を示す ($p < 0.05$, Tukey 法)。* は ACC 処理区と非処理区との有意差を示す (**: $p < 0.01$, t -検定)

(4) まとめと今後の展望

本研究の結果から、*OsGRXC2;2* がエチレンや ABA を介して種子休眠と発芽を調節していることが明らかとなった。発芽時には、*OsGRXC2;2* はエチレンの発芽促進作用を阻害することで発芽抑制に機能していると考えられる。また *OsGRXC2;2* 過剰発現系統の登熟種子で ABA 含量の上昇と ABA の下流で働いている休眠関連遺伝子の発現が上昇していたことから、*OsGRXC2;2* は登熟期の ABA 合成に影響を与えていると考えられる。

本研究では当初 *OsERS1* が *OsGRXC2;2* の標的タンパク質であるとの仮説を立てたが、残念ながらそれを検証することは出来なかった。一方、本研究で *OsGRXC2;2* とエチレンの関連が示されたことから、今後 *OsGRXC2;2* の標的タンパク質を同定することで、イネでは未解明であるエチレンによる休眠・発芽調節機構が明らかになると期待される。

また本研究で、*OsERS1* はシュートの伸長調節に機能していることが示唆された。これによりエチレンによる伸長促進の機構に関する知見が得られた。また *OsERS1* の変異を初期生長の促進に応用できる可能性が示された。*OsERS1* が種子休眠と発芽に関与しているかどうかは不明なままであるが、本研究で作出された N41 系統は休眠性が上昇した新規変異体である可能性があり、今後解析を進めることで新たな休眠調節因子が同定されると期待される。

< 引用文献 >

1. Graeber et al., *Plant, Cell and Environment* (2012) 35: 1769–1786.
2. Erwann et al., *Frontiers in Plant Science* (2013) 4: 63. DOI: 10.3389/fpls.2013.00063
3. Rouhier et al., *Journal of Experimental Botany* (2006) 57: 1685-1696.
4. 森田ら、日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集 (2013) 講演番号 2A44p01.
5. 中村ら、日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会講演要旨集 (2016) p40、講演番号 A-p04.
6. Morita et al., *Planta* (2015) 242:1195–1206.
7. Sugimoto et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2010) 107: 5792–5797.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigeto Morita, Yuki Yamashita, Masayoshi Fujiki, Rie Todaka, Yuri Nishikawa, Ayaka Hosoki, Chisato Yabe, Jun'ichi Nakamura, Kazuyoshi Kawamura, I Nengah Suwastika, Masa H. Sato, Takehiro Masumura, Yasunari Ogihara, Kunisuke Tanaka, Shigeru Satoh	4. 巻 242
2. 論文標題 Expression of a rice glutaredoxin in aleurone layers of developing and mature seeds: subcellular localization and possible functions in antioxidant defense	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 1195-1206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI 10.1007/s00425-015-2354-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田重人、谷袖希、増村威宏
2. 発表標題 エチレンレセプター変異体イネにおける初期生長の促進
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田重人、中村淳一、足立聖佳、増村威宏、佐藤茂
2. 発表標題 イネグルタレドキシシンOsGRXC2;2による種子休眠と発芽の調節
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田重人、足立哲、中村淳一、足立聖佳、増村威宏、佐藤茂
2. 発表標題 イネグルタレドキシシンOsGRXC2;2による発芽と初期生長の抑制
3. 学会等名 第57回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shigeto Morita (Edited by Mirza Hasanuzzaman, Masayuki Fujita, Jiban Krishna Biswas, Kamrun Nahar)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Woodhead Publishing	5. 総ページ数 11
3. 書名 Engineering of abiotic stress tolerance by modulating antioxidant defense systems. In "Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----