

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0160

研究課題名（和文）オオムギ種子におけるmRNA選択的スプライシングパターンの網羅的解析（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of mRNA alternative splicing patterns in barley seeds (Fostering Joint International Research)

研究代表者

梅澤 泰史 (Umezawa, Taishi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70342756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,800,000円

渡航期間： 4ヶ月

研究成果の概要（和文）：オオムギをはじめとする穀物種子に見られる穂発芽は、可食部の減少や品質の低下を招くため、農業上大きな問題となっている。植物の種子が発芽するかどうかは、種子休眠の深さに左右される。オオムギの種子は、収穫直後は休眠が深い状態にあるが、後熟期間を経て休眠性が低下する。この休眠制御のメカニズムを調べるために、オーストラリアCSIROの研究者との共同研究を行った。CSIROで保管されていた休眠性の異なるオオムギ種子を用いて比較リン酸化プロテオーム解析やRNA-seq解析を行い、種子の内部で進行するシグナル伝達や遺伝子発現制御の実態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったオオムギ種子のリン酸化プロテオーム解析によって、オオムギ種子におけるリン酸化タンパク質のデータをこれまでない規模で収集することに成功した。したがって、種子休眠以外の様々な研究にも有用なデータとなることが期待される。また、これまで種子休眠の研究は遺伝子発現のレベルで行うことが多かったが、本研究ではRNA-seq解析のデータから選択的スプライシングを検出している点が特徴となっている。オオムギをはじめとする穀物種子の休眠性は、穂発芽等の農業上の問題に関わってくるため重要である。本研究によって、オオムギの種子休眠機構の理解が進めば、将来的に穂発芽の被害軽減につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Preharvest sprouting of cereals, like barley or wheat, is one of the most significant problems in agricultural production worldwide. In general, seed germination depends on seed dormancy, which is mainly regulated by a phytohormone abscisic acid (ABA). Barley seeds have a strong seed dormancy just after harvesting, but its dormancy level is gradually impaired during after-ripening process. In this project, we aim to understand what happens in barley seeds during after-ripening process, in collaboration with a research group of CSIRO, Australia. We performed comparative phosphoproteomic analysis and RNA-seq analysis using two barley seeds with different seed dormancy level, to display ABA signaling events and transcriptional regulation during after-ripening process.

研究分野：植物分子生物学

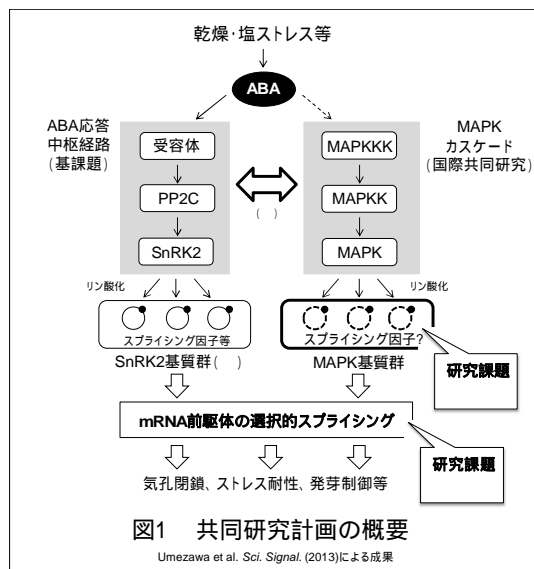
キーワード：オオムギ 種子休眠 後熟 アブシシン酸 選択的スプライシング プロテオーム リン酸化

1. 研究開始当初の背景

世界の主要作物の多くは、イネ、トウモロコシ、ムギなどの穀物に分類される。穀物種子にはデンプン等の炭水化物が豊富に含まれており、種子成熟に伴って乾燥種子となることで長期間貯蔵にも耐える性質を持つ。これらの穀物種子の持つ有益な特徴は、種子成熟に伴う様々な生理現象に支えられている。その中でも重要な生理現象として、種子の休眠があげられる。オオムギなどの穀物種子は、収穫直後は休眠が深く、その後の貯蔵期間を経て休眠が弱まる性質を持つ。この過程を「後熟」という。しかしながら、後熟過程において種子休眠が解除される仕組みはよくわかっていない。種子休眠は、植物ホルモンアブシシン酸 (ABA) による制御を受けるが、後熟過程において ABA が分解されるという報告がある。一方で、種子の ABA 応答が後熟過程において弱まる可能性も報告されていたが、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

植物ホルモンの一つであるアブシシン酸 (ABA) は、植物の環境応答と関わりが深く、別名ストレスホルモンといわれると同時に、種子の休眠を制御する主要因子であり、作物種子の品質を左右する重要なファクターとなっている。植物が ABA に応答するためには、特定の細胞内シグナル伝達経路が活性化し、情報が適切に伝えられなければならない。申請者らは、そのような ABA シグナル伝達系を明らかにすることを目指して研究を行っており、特にタンパク質のリン酸化に着目している。これまでに、シロイヌナズナで ABA シグナルによってリン酸化されるタンパク質を、リン酸化プロテオームと呼ばれる手法によって網羅的に同定することに成功した (Umezawa et al. 2013)。そのようなリン酸化タンパク質の中に、mRNA 前駆体の選択的スプライシングに関わる因子が複数見つかったことから、ABA シグナルによる選択的スプライシング制御を明らかにするための研究を提案し、本提案の基課題として採択された。この研究では、ABA シグナルの中経路と選択的スプライシング制御の関係を明らかにすることを目的としており、現在次世代シーケンサーによる RNA-Seq データを用いたスプライシングパターンの網羅的解析が進んでいる。一方、研究のインパクトを高めるためには、この現象がシロイヌナズナに限らず、作物を含む植物一般に見られることを証明したいと考えた。そこで、オオムギ種子における ABA 応答機構を明らかにするための共同研究をオーストラリアの研究者とともに実施することにした。



3. 研究の方法

オオムギ種子におけるリン酸化プロテオーム解析

本研究では、オーストラリア CSIRO の研究グループとオオムギ種子の休眠および ABA シグナル伝達に関する共同研究を進めた。まず、オオムギ種子におけるタンパク質のリン酸化ネットワークを明らかにするために、リン酸化プロテオーム解析を行った。材料としてオオムギ品種 Golden Promise の収穫直後の休眠種子と、後熟が進んで休眠性が低下した後熟種子の二種類を用いた。これらの材料は、いずれもオーストラリア CSIRO の研究室で毎年準備されており、現地でサンプル処理を行う必要があった。得られたサンプルからタンパク質を抽出し、リン酸化ペプチドを精製して、質量分析計を用いてリン酸化ペプチドの同定および定量を行った。

オオムギ種子における mRNA の選択的スプライシングパターンの網羅的解析

リン酸化プロテオーム解析と同じ材料を用いてオオムギ種子胚を単離し、RNA を抽出した。これを、オーストラリア国立大学が保有する次世代シーケンサー (illumina 社 Hi-seq3000) で解析した。得られたデータから、休眠種子と後熟種子でスプライシングパターンが変化している遺伝

子を検出した。

4. 研究成果

オオムギをはじめとする穀物種子に見られる穂発芽は、可食部の減少や品質の低下を招くため、農業上大きな問題となっている。植物の種子が発芽するかどうかは、種子休眠の深さに左右される。オオムギの種子は、収穫直後は休眠が深い状態（休眠種子）にあるが、後熟期間を経て休眠性が低下する（後熟種子）。現在のところ、後熟過程において休眠性が低下するメカニズムの詳細はわかっていないが、この部分を明らかにすることができれば、穀物種子の穂発芽を抑制したり、逆に発芽を揃えろといった農業的応用が期待できる。

オーストラリア CSIRO では、オオムギ品種 Golden Promise の休眠種子と後熟種子が年度ごとに保管されている。そこで、それぞれの種子を半分に切断し、吸水処理および ABA 処理を行った。半切種子を用いた理由は、事前に行った発芽試験によって、半切種子のほうが ABA 応答が明瞭であったためである（図 2）。

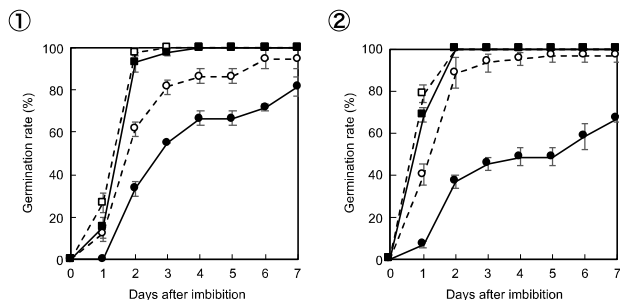


図2 オオムギ種子の発芽におけるABAの影響

①は全種子、②は半切種子の結果である。点線は無処理、実線はABA処理を示す。丸が休眠種子、四角が後熟種子である。

処理を行った半切種子から胚を取り出し、タンパク質を抽出した後、トリプシンによる消化、リン酸化ペプチドの濃縮過程を経て、質量分析計による解析を行った。この比較リン酸化プロテオーム解析により、オオムギ種子胚から 2000 種以上のリン酸化ペプチドを同定することに成功した（図 3）。また、休眠種子と後熟種子とでプロテオームデータを比較したところ、リン酸化されるタンパク質に有意な違いが認められ、特に休眠種子では植物ホルモンアブシシン酸（ABA）に応答してリン酸化されるタンパク質が多く検出された。一方、休眠種子ではそのようなタンパク質が認められず、ABA シグナル伝達が抑制されていることが示唆された。これらの成果は、2 篇の学術論文としてまとめた（Ishikawa et al. 2019a, 2019b）。

さらに、オオムギ種子胚から RNA を抽出し、オーストラリア国立大学の施設を利用して、illumina 社の HiSeq3000 次世代シーケンサーによって RNA-seq 解析を行った。得られたデータを、九州工業大学の花田耕介先生のグループの協力を得て解析し、mRNA の選択的スプライシングパターンを明らかにするために、エクソン-エクソン間のジャンクション部位を多数抽出した。現在、それぞれの種子のスプライシングヴァリエーションについて詳細な解析を進めているところである。

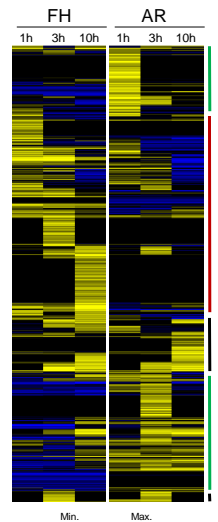


図3 オオムギ種子のリン酸化プロテオームデータの概要

オオムギ種子由来のリン酸化ペプチドの定量結果をもとにヒートマップを作成した。FHは休眠種子、ARは後熟種子の結果である。黄色はリン酸化レベルの上昇、青は低下を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinozawa Akihisa, Otake Ryoko, Takezawa Daisuke, Umezawa Taishi, Komatsu Kenji, Tanaka Keisuke, Amagai Anna, Ishikawa Shinnosuke, Hara Yurie, Kamisugi Yasuko, Cuming Andrew C., Hori Koichi, Ohta Hiroyuki, Takahashi Fuminori, Shinozaki Kazuo, Hayashi Takahisa, Taji Teruaki, Sakata Yoichi	4. 巻 2
2. 論文標題 SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0281-1	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa Shinnosuke, Barrero Jose, Takahashi Fuminori, Peck Scott, Gubler Frank, Shinozaki Kazuo, Umezawa Taishi	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparative Phosphoproteomic Analysis of Barley Embryos with Different Dormancy during Imbibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 451 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20020451	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 該当する
1. 著者名 Jahan Akida, Komatsu Kenji, Wakida-Sekiya Mai, Hiraide Mayuka, Tanaka Keisuke, Ohtake Rumi, Umezawa Taishi, Toriyama Tsukasa, Shinozawa Akihisa, Yotsui Izumi, Sakata Yoichi, Takezawa Daisuke	4. 巻 179
2. 論文標題 Archetypal Roles of an Abscisic Acid Receptor in Drought and Sugar Responses in Liverworts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00761	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 -
1. 著者名 Amagai Anna, Honda Yoshimasa, Ishikawa Shinnosuke, Hara Yurie, Kuwamura Mayuri, Shinozawa Akihisa, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi, Takezawa Daisuke, Sakata Yoichi, Shinozaki Kazuo, Umezawa Taishi	4. 巻 94
2. 論文標題 Phosphoproteomic profiling reveals ABA-responsive phosphosignaling pathways in <i>Physcomitrella patens</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 699 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13891	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 -

1. 著者名 Amagai, A., Honda, Y., Ishikawa, S., Hara, Y., Kuwamura, M., Shinozawa, A., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Takezawa, D., Sakata, Y., Shinozaki, K. and Umezawa, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Phosphoproteomic profiling reveals ABA-responsive phosphosignaling pathways in <i>Physcomitrella patens</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 699-708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/tpj.13891	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 -

1. 著者名 Yu, X., Ohtani, M., Kusano, M., Nishikubo, N., Uenoyama, M., Umezawa, T., Saito, K., Shinozaki, K. and Demura, T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Enhancement of abiotic stress tolerance in poplar by overexpression of key Arabidopsis stress response genes, <i>AtSRK2C</i> and <i>AtGoIS2</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Breeding	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11032-016-0618-0	査読の有無 無
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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Anna Amagai, Yoshimasa Honda, Yurie Hara, Shinnosuke Ishikawa, Mayuri Kuwamura, Akihisa Shinozawa, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Yoichi Sakata, Daisuke Takezawa, Fuminori Takahashi, Gubler Frank, Barrero Jose, Peck Scott, Kazuo Shinozaki, Taishi Umezawa
2. 発表標題 Understanding of ABA-dependent phosphosignaling pathways in land plants
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinnosuke Ishikawa, F.Takahashi, J.Barrero, H.Nakagami, T.Hirayama, S.Peck, F.Gubler, K.Shinozaki, T.Umezawa "
2. 発表標題 Comparative phosphoproteomic analysis of fresh and after-ripened barley seeds
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinnosuke Ishikawa, Jose Barrero, Fuminori Takahashi, Hirofumi Nakagami, Scott Peck, Frank Gubler, Kazuo Shinozaki, Taishi Umezawa
2. 発表標題 Comparative phosphoproteomic analysis reveals a decay of ABA signaling in barley grains during after-ripening
3. 学会等名 6th Plant Dormancy Symposium 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神山佳明、廣谷美咲、峯岸芙有子、野元美佳、多田安臣、坂田洋一、竹澤大輔、Scott Peck、梅澤泰史
2. 発表標題 Rafキナーゼ
3. 学会等名 植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡頌子、今村理世、能年義輝、岡部隆義、梅澤泰史
2. 発表標題 SnRK2活性
3. 学会等名 植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神山佳明、廣谷美咲、野元美佳、板谷知健、吉村亮、多田安臣、梅澤泰史
2. 発表標題 ABAシグナル伝達に関わるサブクラスIII SnRK2とMAPKKKの相互作用解析
3. 学会等名 日本植物生理学会第59回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yurie Hara, Shinnosuke Ishikawa, Anna Amagai, Mayuri Kuwamura, Fuminori Takahashi, Saho Mizukado, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Daisuke Takezawa, Yoichi Sakata, Kazuo Shinozaki, Taishi Umezawa
2. 発表標題 Comparative phosphoproteomic analysis of abscisic acid response mutant of <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 日本植物生理学会第59回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinnosuke Ishikawa, Fuminori Takahashi, Jose Barrero, Hirofumi Nakagami, Frank Gubler, Kazuo Shinozaki and Taishi Umezawa
2. 発表標題 "Comparative phosphoproteomic analysis of dormant and after-ripened seeds of barley "
3. 学会等名 日本植物生理学会第59回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神山佳明、廣谷美咲、野元美佳、板谷知健、吉村亮、多田安臣、梅澤泰史
2. 発表標題 subclass SnRK2と相互作用するMAPKKKの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川慎之祐, 高橋文憲, 水門佐保, Jose M. Barrero, 中神弘史, Frank Gubler, 篠崎一雄, 梅澤泰史
2. 発表標題 Comparative phosphoproteomic analysis of dormant and after-ripened seeds of barley
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 峯岸英有子、田村由貴、梅澤泰史
2. 発表標題 Functional analysis of putative substrates of ABA-activated SnRK2 protein kinase in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡頌子、佐藤花繪、今村理世、能年義輝、岡部隆義、梅澤泰史
2. 発表標題 化合物スクリーニングによるSnRK2プロテインキナーゼの活性調整剤の探索
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ホセ バレロ (Jose Barrero)	オーストラリア連邦科学産業研究機構・Agriculture・グループリーダー	