

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02925

研究課題名（和文）アブシジン酸による種子休眠を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional molecular mechanisms of seed dormancy mediated by abscisic acid

研究代表者

西村 宜之（Nishimura, Noriyuki）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：70405041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：アブシジン酸（ABA）応答に関わる種子休眠で重要な働きをするDOG1に注目し、DOG1の生理学的役割やその制御機構の解明を目指した。シロイヌナズナDOG1に相互作用する因子やDOG1の機能を抑制する因子の同定とその機能解析を行った。また、DOG1の生化学的解析も行い、DOG1が機能するために重要な新たな機能性アミノ酸残基の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DOG1は種子休眠で重要な役割を担うことが知られているが、DOG1の機能やその制御機構はほとんど明らかになっていない。本研究により、DOG1を介した種子休眠制御で働く新たな因子やDOG1の機能性アミノ酸残基の同定に成功し、種子休眠を制御する分子機構の理解が進むと期待される。得られた知見を利用することで、近年コムギなどの栽培で問題となっている穂発芽抑制を付与した作物の作出に寄与できると考えている。

研究成果の概要（英文）：DOG1 is one of important components of seed dormancy via abscisic acid (ABA) response. To elucidate the physiological role of DOG1 and its regulatory mechanisms, we identified and characterized novel components that interact with DOG1 and suppress the function of DOG1 in planta. We also performed biochemical analysis of DOG1 and succeeded in identifying new functional amino acid residues that are important for DOG1 function.

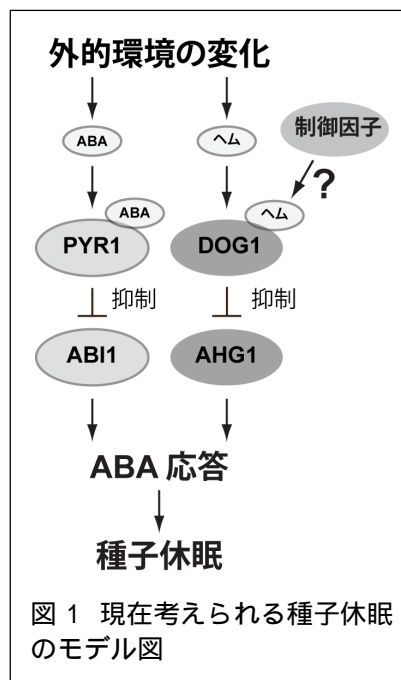
研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 プロテオーム 植物 アブシジン酸 種子休眠

### 1. 研究開始当初の背景

植物の種子は、発芽しても生きていけない環境では発芽せず、種子休眠といわれる“種子を発芽させない状態”を維持する。植物ホルモンの一つであるアブシジン酸 (ABA) は、この種子休眠において重要な役割を果たしており、コムギなどの重要な作物の栽培で問題になっている穂発芽性に深く関わっていることが知られている。

クラスターA に属するタンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C) は、種子休眠や ABA 応答で働く主要な負の制御因子として働き、ABI1 サブファミリー (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2) と AHG1 サブファミリー (AHG1, AHG3, HAI1, HAI2, HAI3) に分けることができる。研究代表者の西村らは、AHG1 に相互作用する因子として機能の詳細は分からないものの種子休眠で重要な働きをすると報告があった DOG1 の同定に成功した。また、DOG1 は AHG1 の PP2C 活性を抑制し、へムと呼ばれる二価の鉄原子とポリフェイリンで構成される錯体と結合することを見出し、ABI1 サブファミリーは ABA 受容体を介した経路、AHG1 サブファミリーは DOG1 を介した経路で働くことを発見した (図1)。しかし、DOG1 の機能やその制御機構はほとんど明らかになっていない。



### 2. 研究の目的

本研究では、PP2C を制御する DOG1 に注目し、DOG1 に結合するへムの生理的役割や DOG1 が機能するために必要な新たな因子の同定とその機能を分子レベルで明らかにし、種子休眠を制御する分子機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、以下の3つの研究を実施した。

#### (1) DOG1 に相互作用する因子の同定と機能解析

酵母ツーハイブリット法 (Y2H) を用い、DOG1 に相互作用する候補因子を3個同定していた。同定した候補因子について、タバコを用いた共沈免疫遠心法や pull down 法などにより真の相互作用因子であるかを検証する。また、同定した相互作用因子について、シロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体や過剰発現体を作成し、ABA による種子発芽の抑制などの表現型解析を行う。

#### (2) DOG1 の機能を抑制する因子の探索と機能解析

シロイヌナズナ YFP-DOG1 過剰発現体は対象区と比べ、低濃度の ABA 存在下で発芽や子葉の展開が遅くなる。これまでに、YFP-DOG1 過剰発現体に変異導入剤である EMS 処理を行い、その後代において、低濃度の ABA 存在下でも発芽することができる抑制 (サプレッサー) 変異体の単離に成功している。単離した抑制変異体のうち、新規 ABA 非感受性変異体の候補について、YFP-DOG1 過剰発現体との掛け合わせにより得た F2 種子を用い、低濃度の ABA 存在下で発芽可能な植物体からバルクで DNA を抽出し、次世代シーケンス解析により原因遺伝子の同定を試みる。同定した候補原因遺伝子について、候補原因遺伝子の機能を喪失させた YFP-DOG1 過剰発現体背景のゲノム編集系統や過剰発現体を作成し、ABA による種子発芽の抑制などの表現型解析を行う。また、DOG1 が制御する転写産物の全体像を明らかにするため、次世代シーケンスを用いた RNA-Seq 解析を行い、ABA 処理2日目での YFP-DOG1 過剰発現体と対象区での転写産物の違いを解析する。

#### (3) DOG1 の生化学的解析

DOG1 は AHG1 と相互作用し、DOG1 の 245 番目と 249 番目のヒスチジンがへムと結合することを見出していた。DOG1 の機能やその制御機構を明らかにするため、(2)の研究で同定した DOG1 の機能抑制に関わる人為的に導入した YFP-DOG1 遺伝子の DOG1 遺伝子領域に生じたアミノ酸置換変異について、大腸菌で発現させた変異 DOG1 リコンビナントタンパク質の性質やへムとの結合を可視・紫外線吸光スペクトルなどで解析する。また、変異 DOG1 タンパク質と AHG1 との相互作用をタバコを用いた共沈免疫遠心法で調査する。さらに、DOG1 タンパク質の立体構造解析も試み、DOG1 の原子レベルでの機能解明を目指す。

#### 4. 研究成果

##### (1) DOG1 に相互作用する因子の同定と機能解析

Y2H 法で同定した DOG1 に相互作用する候補因子 3 個について、タバコを用いた共沈免疫遠心法で相互作用を確認したところ、候補因子 2 は DOG1 との相互作用が認められた。一方、候補因子 1 はタバコの葉でタンパク質が十分に発現しないために評価できず、候補因子 3 は DOG1 との相互作用が見られなかった。そこで、候補因子 1 については、DOG1 と大腸菌内で共発現させたのち、アフィティーカラムで精製し、複合体形成の有無の確認も試みたが、タバコでの実験同様、候補因子 1 自身の発現が明確でなかったため相互作用の有無を評価するに至らなかった。候補因子 2 は、DOG1 の細胞内局在とは異なる部位でタンパク質が発現しているとの報告があったため、候補因子 1 について *in vitro*での相互作用を分析する AlphaScreen システムなどの方法で相互作用の検証を試みつつ、植物体での解析を進めることにした。

YFP を融合させた候補因子 1 を過剰に発現させた植物を作成し、ABA による種子発芽の抑制効果を調査したところ、YFP-候補因子 1 過剰発現体は強い ABA 高感受性を示した。これまでに候補因子 1 が種子での ABA 応答で働くとの報告はないため、候補因子 1 は DOG1 と共に ABA 応答で働く可能性が示唆された。そこで、候補因子 1 の機能を喪失した T-DNA 挿入変異体についても ABA による種子発芽の抑制効果を調査したところ、野生型と比べ顕著な差が認められなかった。候補因子 1 はシロイヌナズナ に 1 個ホモログが存在しており、そのホモログと DOG1 との相互作用を Y2H で確認したところ、弱い相互作用が認められた。現在、候補因子 1 とそのホモログの機能を喪失させた二重変異体を作成しており、完成次第、種子での ABA 応答などを検証し、候補因子 1 の ABA 応答における機能解明に迫る予定である。

##### (2) DOG1 の機能を抑制する因子の探索と機能解析

人為的に DOG1 を発現させた YFP-DOG1 過剰発現体に変異を導入し、この過剰発現体を示す形質を抑制する(サプレッサー)変異体のうち、新規 ABA 非感受性変異体と考えられるサプレッサー変異体について NGS 解析を行った。その結果、最終的にサプレッサー変異の原因となる候補遺伝子領域を 3 カ所検出することに成功した(図 2)。まずは、NGS 解析で同じ候補遺伝子領域を絞り込んだ *s14* と *s137* 変異体の解析を進めることにした。この 2 つの原因遺伝子は同じ遺伝子座である可能性が考えられたため、2 つの変異体で共通する遺伝子に変異が生じていないかを検証したところ、1 つの遺伝子でそれぞれ異なる部位にヌル変異が生じていることが分かった。この遺伝子が *S14/S137* の原因遺伝子であるかを検証するため、*S14/S137* 候補遺伝子の機能を喪失したゲノム編集システムを YFP-DOG1 過剰発現体背景で作出し、ABA による種子発芽の抑制効果を調べたところ、*s14* と *s137* 変異体と同様、YFP-DOG1 過剰発現体を示す ABA 高感受性の表現型を抑制する表現型を示した。現在、T-DNA 挿入変異体を用い、ゲノム編集システムと同様の効果が認められるか検証を行っている。また、YFP を融合させた YFP-*S14/S137* 過剰発現体の作出を試みたが、これまで用いたベクター系や手法では得られていない。このことは、この遺伝子には生育に影響を及ぼす生理機能があることが示唆され、特別な手法を検討する必要がある。一方、YFP-DOG1 過剰発現体と対象区での転写産物の違いを明らかにするため、NGS を用いた RNA-Seq 解析を行った。その解析結果から、*dog1* 変異体で転写制御を受けていると報告があったいくつかの遺伝子の発現に差が確認され、それらの遺伝子が DOG1 制御の直接的な標的であると示唆された。*s14* や *s137* 変異体でそれら遺伝子の発現様式に違いがあるかなどについて検証を進めている。

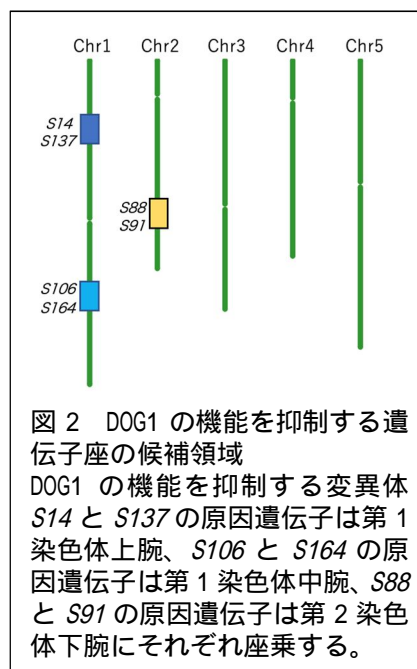


図 2 DOG1 の機能を抑制する遺伝子座の候補領域  
DOG1 の機能を抑制する変異体 *S14* と *S137* の原因遺伝子は第 1 染色体上腕、*S106* と *S164* の原因遺伝子は第 1 染色体中腕、*S88* と *S91* の原因遺伝子は第 2 染色体下腕にそれぞれ座乗する。

##### (3) DOG1 の生化学的解析

(2) の DOG1 の機能を抑制する因子の探索の過程で同定した DOG1 の機能抑制に関わる人為的に導入した *DOG1* 遺伝子の内部にアミノ酸置換変異が生じた 7 個(*M1*~*M7*)について解析を行った。*DOG1* にアミノ酸変異をそれぞれ導入した変異 *DOG1* リコンビナントタンパク質を精製し、Native-PAGE を行ったところ、*DOG1\_M3* と *DOG1\_M7* は野生型 *DOG1* の泳動パターンと明らかに異なり、この 2 つのアミノ酸残基は *DOG1* のダイマー化などに関わることが考えられた。このリコンビナントタンパク質を用いてヘム結合能を検証したところ、多くの変異 *DOG1* タンパク質は野生型 *DOG1* タンパク質と同等のヘム結合能を有していた。一方、変異 *DOG1* と *AHG1* との相互作用については、Native-PAGE で野生型 *DOG1* と泳動パターンが異なった *DOG1\_M3* が *AHG1* と相互作用しないことを見出した。さらに、*DOG1* の立体構造を明らかにするため、X 線結晶構造解析に必要な結晶化実験を進めた。

本研究により、新たな *DOG1* を介した種子休眠で働く新たな因子の同定や *DOG1* が機能するために必要な新たな機能性アミノ酸を見出すことに成功した。今後解析を進めることで、今回同定

した因子の人為的制御などにより、種子休眠の適切な制御による穂発芽抑制を付与した作物や発芽性を向上させた作物の開発に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 NISHIMURA Noriyuki、TSUCHIYA Wataru、HIRAYAMA Takashi、YAMAZAKI Toshimasa	4. 巻 57
2. 論文標題 New Mechanism of Abscisic Acid Signaling Cascade: Survival Strategy for Plants to Adapt to Growing Environmental Change	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 736 ~ 742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.57.736	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 -

1. 著者名 西村 宜之、杉本 和彦	4. 巻 56
2. 論文標題 アブシシン酸を介する種子休眠制御の分子機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 7 ~ 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18978/jsrnp.56.1_7	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriyuki Nishimura
2. 発表標題 A regulatory system of seed dormancy and germination regulated by abscisic acid signaling
3. 学会等名 6th ISSS Workshop on the molecular aspects of seed dormancy and germination（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究分担者	平山 隆志  (Hirayama Takashi)  (10228819)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授    (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	山崎 俊正  (Yamazaki Toshimasa)  (40360458)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分 析研究センター・所長・部門長    (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関