

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05528

研究課題名(和文) イネの器官サイズを制御する3量体Gタンパク質の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of heterotrimeric G protein regulating organ size in rice

研究代表者

岩崎 行玄 (Iwasaki, Yukimoto)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：20193732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネ3量体Gタンパク質複合体を構成するコアサブユニット遺伝子は7種類である(、、、1～5)。本研究は、サブユニットをコードする遺伝子の変異体が示す表現型の特色を、タンパク質レベルで解析した。G₃ヌル変異体(GS3)は、G₃がないので、ダイマーが形成できず、自由なG₃が増えたことによりGシグナリングが活性化し、種子形が大きくなると考えた。G₃部分欠失変異体(Mi)は、細胞膜上に、大量の変異型G₃タンパク質が蓄積し、この大量の変異G₃と大量のG₃による、大量のG₃ダイマーで、G₃は3量体を形成し(抑制型)、Gタンパク質シグナリングが抑制されている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ3量体Gタンパク質複合体を構成するコアサブユニット遺伝子は、、、、1～5の合計7種類である。、、3、4の機能解析を行い、、3、4が、収量を増大に寄与する仕組みを明らかにした。具体的には、G₃遺伝子の恒常的活性型遺伝子(Q223L)とG₃部分欠失型遺伝子(GS3)は、細胞数を増やすことで、大粒を結実した。G₄遺伝子の部分欠失遺伝子(Dn1-1)は、種子数を増やした。加えてG₃遺伝子の恒常的活性型(Q223L)は、病原菌の感染に対する抵抗性を増大した。以上の結果、Gタンパク質の研究は、農業振興に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：There are seven core subunit genes that make up the rice heterotrimeric G protein complex (、、、1-5). In this study, we analyzed the phenotypic features exhibited by mutants of the genes encoding the subunits at the protein level. The G₃ null mutant (GS3), which lacks G₃ and thus cannot form a G₃ dimer, is thought to have a larger seed shape due to the increased free G₃, which activates G signaling; the G₃ partial deletion mutant (Mi) accumulates a large amount of mutant G₃ protein on the plasma membrane, and this excess of mutant G₃ and excess G₃ results in the formation of a large G₃ G forms a trimeric structure (inhibitory) with a large amount of G₃ dimers due to excess mutant G₃ and excess G₃, indicating that G protein signaling may be suppressed.

研究分野：植物生化学

キーワード：3量体Gタンパク質 器官形成 イネ プロテオミクス 種子 免疫沈降

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物界の3量体Gタンパク質研究の第1期は、1990年、Maらが、分子生物学を用いて、シロイヌナズナから、動物3量体Gタンパク質を構成する3つのサブユニット遺伝子(、)、のホモログ・オルソログの単離で幕を開けた。動物は、約17種類の、5種類の、約11種類の遺伝子を、酵母は、1種類の、1種類の、1種類の遺伝子を有する。動物ホモログで探索を進めた結果、現在までに、シロイヌナズナでは、1種類の、1種類の、3種類の、イネでは、1種類の、1種類の、5種類の遺伝子が単離された。遺伝子単離後は、遺伝学的手法を用いて、これらの遺伝子の発現抑制個体、過剰発現個体、ノックアウト個体を作成し、表現型解析が行われた。

植物3量体タンパク質研究の第2期は、Y2H等を駆使して、パスウェイ解析が始まった。3量体Gタンパク質サブユニットをBaitとし、Preyとして効果器や受容体の単離を目指す、網羅的解析が進められた。さらに、これら研究は、同定された効果器候補や受容体候補遺伝子の発現抑制個体や過剰発現個体を解析し、3量体Gタンパク質サブユニット遺伝子の発現抑制個体や過剰発現個体との類似性が議論された。特にむつかしさを感じているのは、GとG遺伝子欠失変異体が矮性を示すのに対し、個別に、効果器や受容体候補の遺伝子改変植物を作成しても、矮性を示さない点で、パスウェイ解析のむつかしさを感じている。そこで、さらに1歩踏みこんだY2Hとして、同定された効果器候補や受容体候補をBaitとし、新たな相互作用因子の探索も進んだ。最終的には、受容体や効果器の候補は、50種類を超えたが、これが、真に、植物体で、Gタンパク質シグナリングに座上しているか、答えられていない。私は、Y2Hで同定されたものの意味付けは、別のアプローチ、例えばin vivoの証明が必要であろうと感じている。

私どもも、この時流の中で研究に着手し、第1期で、イネ3量体Gタンパク質を構成する遺伝子を単離し、発現抑制個体、過剰発現個体、ノックアウト個体の表現型解析を行った。この時期は、アメリカがシロイヌナズナで分野を先導し、私どもは、イネで後追いする形であった。さて、遺伝子単離のめどがつく頃、イネ3量体Gタンパク質を構成するGサブユニット遺伝子の**恒常的活性型変異(QL)**は大粒を結実することを見出し、イネ3量体Gタンパク質研究は、食糧増産に向けて、重要な立ち位置を獲得した。この着眼点は、シロイヌナズナからは提案されていない。当時、私の問題意識は、ほとんどの植物研究者は、自身の植物材料で、3量体Gタンパク質自身の局在場所、存在量、複合体の構成などを見ていない点で、大きな弱点と思っていた。動物の3量体Gタンパク質研究は、酵素複合体の精製から始まっている。そこで、イネの7つのコアサブユニット(、1、2、3、4、5)に対する特異抗体を調整するとともに、7つのコアサブユニットに対する融合タンパク質を大腸菌にて合成後、精製し、定量用のスタンダードを準備した。加えて、共同研究等により、イネ3量体Gタンパク質のコアサブユニット遺伝子に対する変異体、過剰発現個体、発現抑制個体を準備し、タンパク質レベルでの研究を進める道具を備えた。

2. 研究の目的

3量体Gタンパク質に関しては、植物分野の研究者は、遺伝子、遺伝学が得意で、生体膜、酵素複合体というような観点からの分析が少ない。私は、イネ3量体Gタンパク質のコアサブユニットに関して、全てのサブユニット抗体を準備するとともに、サブユニット遺伝子変異体を収集してきた。本申請課題では、G3に焦点を置き、下記の目標を設定した。

本研究目的は、Gサブユニット遺伝子の恒常的活性型変異(QL)とG3サブユニット遺伝子のnull変異(GS3)が大粒を結実するメカニズムは同じか否かを、タンパク質レベルで解明する。加えて、Gサブユニット遺伝子欠失変異体(d1)とG3サブユニット遺伝子の部分欠失変異体(Mi)が短粒を結実するメカニズムは同じか否かを、タンパク質レベルで解明することとした。

3. 研究の方法

植物材料は、T65(野生型)、GS3(G3ヌル変異体)、Mi(G3Cis変異体、G3の部分欠失変異体)およびd1(G3ヌル変異体)を用いた。花組織に着目し、上記4種類のイネより、おのおの粗ミクロソーム画分を調製後、水性2層分配法により細胞膜画分を調製した。実験スケールは、将来、免疫沈降実験を視野に入れ、毎回、必ず、細胞膜300μgタンパク質を出発とした。イネ3量体Gタンパク質複合体を構成する7種類のコアサブユニットの融合タンパク質(Trx-tag)を大腸菌にて合成後、アフィニティ精製し、これを抗原として、特異抗体を調整した。さらに、7種類のコアサブユニットの融合タンパク質(GST-tag)を大腸菌にて合成後、ゲル切り出し法で精製し、定量用の検量線とした。各変異体の細胞膜画分、および免疫沈降産物は、特異抗体を用いたWBで定量した。定量結果は、WBで得られたngを、分子量で除することにより、

mol で表記した。

4. 研究成果

植物材料は、4種類のイネ、T65(野生型)、GS3(G₃ヌル変異体)、Mi(G₃Cis変異体、G₃の部分欠失変異体)、d1(ヌル変異体)を用いた。各変異体からの細胞膜、抗G抗体での免疫沈降産物、抗G抗体での免疫沈降産物を準備した。検量線を用いたWB法で、7種類のコアサブユニットを定量した。

(1) 解析結果

細胞膜画分のサブユニット定量。T65、GS3、Mi、d1の細胞膜で、コアサブユニットを定量した。以下、細胞膜300μg中のmol数(pmol)を示す。G₁、G₂、G₃サブユニットは、4品種とも、変異遺伝子産物以外は、およそ同じで、G₁が15(d1だけはヌルのためゼロ)、G₂が85(d1だけは70)、G₃が8.0(d1だけは14)、G₄が1.3であった。G₄サブユニットとG₅サブユニットは、検出限界以下であった。

G₃サブユニットは、T65、GS3、Mi、d1、それぞれ、WTが7、GS3はヌル変異体、Miは32(G₃Cis変異型タンパク質)、d1が7であった。Mi(G₃Cis変異体)におけるG₃Cis変異型タンパク質の蓄積量が極めて多いことが明らかになった。

抗G抗体を用いて免疫沈降。T65、GS3、Miの細胞膜(300μg)を可能化し、抗G抗体を用いて免疫沈降を行い、その産物を解析した。単位は、pmol。なお、d1はG₁がないため、免疫沈降実験を行っていない。3つの品種で、変異遺伝子産物以外は、およそ同じで、G₁が4.0、G₂が4.5、G₃が0.2、G₄が0.02であった。G₄サブユニットとG₅サブユニットは、検出限界以下であった。

G₃サブユニットは、T65が0、GS3がヌルのためゼロ、Miが0.66であった。Mi(G₃Cis変異体)において、G₃Cis変異型タンパク質は、若干、G₁と共沈することが明らかになった。

抗G抗体を用いて免疫沈降。T65、GS3、Miの細胞膜(300μg)を可能化し、抗G抗体を用いて免疫沈降を行い、その産物を解析した。単位は、pmol。4つの品種で、4品種とも、変異遺伝子産物以外は、およそ同じで、G₁は1.5(d1だけはヌルのためゼロ)、G₂は6.7、G₃は0.09、G₄は0.01、であった。G₄サブユニットとG₅サブユニットは、検出限界以下であった。G₃サブユニットは、それぞれ、T65が0、GS3がヌルのため0、Miが1.32であった。Mi(G₃Cis変異体)において、G₃Cis変異型タンパク質は、若干、G₁と共沈することが明らかになった。

(2) 考察

昨年度、野生型イネの細胞膜上には、過剰のG₁サブユニットが蓄積していることを見出し、本年度、抗G抗体で免疫沈降産物を解析すると、G₁サブユニットとG₂サブユニットは、1:1であった。Y2Hでは、G₁サブユニットとG₂サブユニットは、相互作用しないので、免疫沈降実験の結果は、両者を結ぶアンカータンパク質が存在することを示唆した。

細胞膜(300μg)を出発とした、抗G₁の免疫沈降実験を行った。下記、数値は、全てpmol。免疫沈降産物のG₁~G₅の総和は、T65は0.13、GS3は0.1、Miは0.75、d1はヌルのため沈殿産物なしであった。免疫沈降したG₁の量、4.0 pmol(上記の結果参照)に比べて、沈降したG₁

サブユニットの総量は極めて小さかった。この結果は、G₁サブユニットは、複合体から乖離しやすいことを示している。抗G₁における免疫沈降産物のG₁~G₅の総和は、T65が0.1、GS3が0.1、Miが1.4、d1が0.2であった。免疫沈降したG₁の量、6.7 pmol、に比べて、Mi以外は、G₁サブユニットの総量は極めて小さかった。この結果は、G₁サブユニットは、ダイマーから乖離しやすいことを示している。動物や酵母においては、G₁とG₂サブユニットは強固なダイマーを形成しているとされていると考えられているので、この結果は、イネ独特の特性であろう。加えて、Miは、一定量の変異型タンパク質(G₃Cis型タンパク質)が抗G₁と沈降してくるので、この変異タンパク質は、G₁との親和性が高いと予想した。

G₃は、花組織での主要なG₃である。GS3変異体は、G₃遺伝子のヌル変異体なので、全生活環のどこでも、G₃は存在しない。この変異体の、花組織での、全サブユニット定量を行うことで、以下の結論に至った。GS3変異体の花組織では、G₃タンパク質は野生型と同等量が細胞膜に蓄積していたが、主要なG₃がないので、G₃ダイマーが形成できない。よって、結果として、3量体が形成されないため、自由なG₃が増え、この抑制を受けないG₁の働きにより、G₁タンパク質シグナリングが活性化され、細胞数が増加する。細胞数の増加で、種子形が増大した。サポートデータとして、GS3の花組織でのG₃の蓄積は、野生型と同等であることを確認した。次に、G₁サブユニット遺伝子の恒常的活性型変異(QL)は、223番目のQがLに置換

した変異体で、動物の知見によれば、ダイマーが結合できない特性をもつ（なお、植物で、QLがダイマーに結合するか否かの実験はなされていない）。このため、動物の知見に従えば、QLは、ダイマーが形成できず、自由なG（QL）としてふるまい、この抑制を受けないG（QL）の働きにより、Gタンパク質シグナリングが活性化され、細胞数が増加し、結果として、種子形の増大が考えられた。

Mi（G 3部分欠失変異体）は、300 μgの細胞膜上で、G が17、G が85、Miが31であった。単位はpmpI。この結果は、大量の変異型タンパク質は大量のG とダイマーが結合でき、その結果、G との3量体が形成され、抑制型を示し、Gタンパク質シグナリングが抑制され、短粒を示すと考えた。次に、G サブユニット遺伝子欠失変異体（d1）は、G がないので、Gタンパク質シグナリングが稼働せず、短粒を示すと考えた。

総合考察として、変異体の解析から、イネの場合、3量体Gタンパク質シグナリングを稼働させるには、G の生合成（蓄積量）が最重要で、その結果、ダイマーの量が決まり、G の量で、G の機能抑制が生じる可能性がある。本研究により、イネでは、3量体Gタンパク質シグナリングの制御は、G の量が、重要な要因である可能性が示された。植物3量体Gタンパク質を、細胞膜を単離して、分析する研究は、私ども以外ではないので、私どもの結果がリファレンスになるう。

動物3量体Gタンパク質は、器官発生、生命体の恒常性維持、学習や記憶などを制御する。特に、動物3量体共役受容体(GPCR)の機能解明は、創薬の標的である。一方、高等植物3量体Gタンパク質シグナリングの研究は、主に、シロイヌナズナを材料に、遺伝学的研究が進められているが、出口の重要性は、私どもを含むイネを材料とした研究から提示され、イネ3量体Gタンパク質は、収量の増大と病原菌感染の抵抗性の向上に關与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chaya G., Segami S., Fujita M., Morinaka Y., Iwasaki Y., Miura K	4. 巻 11
2. 論文標題 OsGGC2, G subunit of heterotrimeric G protein, regulates plant height by functionally overlapping with DEP1 in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11030422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chaya G., Segami S., Fujita M., Morinaka Y., Iwasaki Y., and Miura K.	4. 巻 11
2. 論文標題 OsGGC2, G subunit of heterotrimeric G-protein, regulates plant height by functionally overlapping with DEP1 in rice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11030422	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川岳斗、茶谷弦輝、瀬上修平、岩崎行玄、三浦孝太郎
2. 発表標題 イネ短粒変異体srs2、srs6の遺伝解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茶谷弦輝、瀬上修平、藤田萌香、森中洋一、三浦孝太郎、岩崎行玄
2. 発表標題 イネヘテロ3量体Gタンパク質 5サブユニットはDEP1と冗長的に草丈を制御する
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------