

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：23401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712001

研究課題名(和文) イネの農業形質を制御するヘテロ3量体Gタンパク質のサブユニット間相互作用の解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of interaction of heterotrimeric G-proteins in rice.

研究代表者

三浦 孝太郎 (MIURA, Kotaro)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：70571561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロ3量体Gタンパク質は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットで構成され、イネでは種子サイズ、種子数、草丈など重要な農業形質を制御している。5つのサブユニットの内、一つはGS3遺伝子で、種子サイズを促進し、一つはDEP1で種子数と草丈を制御する事が知られている。また、 $\delta$  サブユニットは草丈、種子長、穂型質を制御する事が知られている。本研究課題では、イネヘテロ3量体Gタンパク質のシグナル伝達経路を解明する事を目的に、変異体および形質転換体を用いて遺伝解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Heterotrimeric G-proteins are consisted of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits, regulating important agronomic traits including grain size, grain number, and dwarfism in rice. Of five subunits in rice, one is the GS3 gene, which promotes grain size, and the another one is the DEP1 gene, which promotes grain number and defines semi-dwarfism.  $\delta$  subunit regulates grain size, grain number and plant height. In this study, we performed genetic analysis using mutants and transgenic plants of heterotrimeric G-protein genes to clarify its mechanism of signal transduction.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ヘテロ3量体Gタンパク イネ

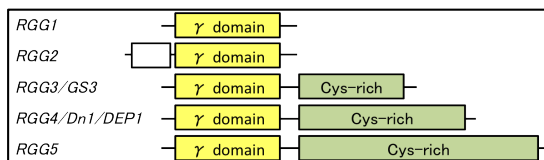
1. 研究開始当初の背景

**(1) 農業上重要な形質を制御する2つの遺伝子が、3量体Gタンパク質サブユニットであった。**

イネの収量を決定する重要な QTL として、これまでに GS3 遺伝子(種子を大きくする事で収量増)と Dn1/DEP1 遺伝子(穂の枝分かれを促進することで種子数を増加し収量増)が単離された(Fan et al.2006 Theor. Appl. Genet., Huang et al. 2009 Nat. genet.)。これら2つの遺伝子の間には相同性があり、ホモログの関係にある事が以前より指摘されていたが、最近のシロイヌナズナの研究により、この2つの遺伝子がヘテロ3量体Gタンパク質サブユニットのオルソログであることが示された(Thung et al.2012 J. Plant Physiol.)。

**(2) ヘテロ3量体Gタンパク質シグナル伝達の概要**

このシグナル伝達は動物で詳細に研究されており、サブユニット、サブユニット、サブユニットが細胞膜の細胞質側に局在し、相互作用するモデルが提唱されている。サブユニットがGTPと結合していると活性化状態となり、単独でエフェクタータンパク質(E1)と相互作用する。サブユニットとサブユニットは2量体を形成してとは別のエフェクタータンパク質(E2)と相互作用する。サブユニットと結合しているGTPが脱リン酸化され、GDPに変化するとサブユニットは、サブユニットと結合し、ヘテロ3量体を形成して不活性化状態になる。イネには、1つのサブユニット(RGA1)、1つのサブユニット(RGB1)、5つのサブユニット(RGG1, RGG2, RGG3, RGG4, RGG5)、計5つのサブユニットが存在すると考えられている(Botella 2012 Trends. Plant Sci.)



**(3) イネ と サブユニット**

これまでのイネ3量体Gタンパク質研究では、RGA1欠損変異体 dwarf1 (d1)が、矮性・短く丸みを帯びた種子(短粒)・穂の枝分かれ(枝梗)の微増といった表現型を示すことが示された(Fujisawa et al.1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)。このRGA1の恒常的活性型遺伝子を導入したイネでは種子の大型化が見られ、農業上有用な遺伝子であることも示された(Oki et al.2005 Plant Cell Physiol.)。また、RGB1の遺伝子抑制システムは、矮性・ラミナジョイントの褐変化・種子の小型化の表現型を示すことが明らかとなったが、この表現型はd1変異体との類似点は少なかった(Utsunomiya et al. 2011 Plant J.)。

**(4) イネ サブユニット**

は、特徴的な100アミノ酸からなるドメインを持つ。RGG1は全長がドメインで占められ、RGG2はN末端に機能未知の50アミノ酸を持ち、その後にドメインを持つ。RGG3-RGG5は、N末端にドメインを持ち、C末端にシステインリッチ領域を持つ。これら5つのイネサブユニット遺伝子の内、RGG3はイネの種子長を制御するQTLとして単離されたGS3、RGG4はイネの枝梗数を制御するQTLとして単離されたDn1/DEP1であった(Fan et al.2006 Theor. Appl. Genet., Huang et al. 2009 Nat. genet.)。RGG3/GS3は、ドメインに変異が生じた機能欠損型変異で種子長が伸長し、収量を増加することが示された。短粒表現型を示す minute (mi)変異体の原因遺伝子が、RGG3/GS3遺伝子のシステインリッチ領域を欠損した機能獲得型変異であることも示された(Takano-Kai et al. 2013 Breed. Sci.)。RGG4/Dn1/DEP1は、システインリッチ領域が欠損した機能獲得型変異で枝梗を増加し収量を増加することが示された(Huang et al. 2009 Nat. genet.)。

**(5) イネ サブユニットとサブユニットの機能解析における準備状況**

d1変異体は、矮性(55%減少)・短粒(33%減少)・枝梗の微増(5%増加)という表現型を示す。イネの5つの遺伝子(RGG1-RGG5)の機能解析を試みている過程で、RGG1遺伝子とRGG2遺伝子の過剰発現体は、d1変異体と酷似した半矮性表現型を示すことを見出した。

日本型イネ背景の rgg3/gs3 変異体は、RGG3/GS3遺伝子のドメインに終止コドンが生じた機能欠損型変異であり、野生型よりも種子長が30%増加した。この表現型は、RGA1の恒常的活性型変異を導入した形質に酷似していた。RGG3のシステインリッチ領域に変異が生じた機能獲得型変異である minute(mi)変異体は、草丈は18%減少し、種子長は36%減少し、枝梗は20%減少した。Rgg3/mi変異体の種子長の減少は、d1変異体の種子長の減少(33%減少)と酷似した。

RGG4のシステインリッチ領域に変異が生じた機能獲得型変異体である Dn1-3は、草丈は31%減少し、枝梗は30%増加した。種子長には差がなかった。このDn1-3変異体の表現型は、一見d1変異体の表現型とは一致しないが、Rgg3/mi変異体とRgg4/Dn1-3変異体の草丈、種子長、枝梗数の各表現型の増減割合を合算するとd1変異体の形態的特徴にほぼ一致する。これらの形質調査より、d1変異体の表現型は、RGG3とRGG4の機能獲得型二重変異の表現型で説明できると推測した。

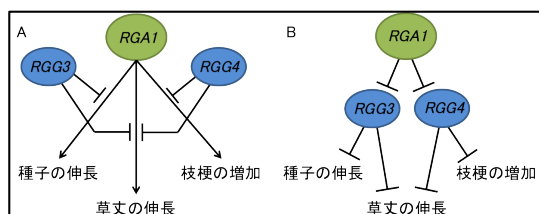
2. 研究の目的

RGG1とRGG2の過剰発現がd1変異体様の矮性表現型を示した事と、RGG3/GS3とRGG4/Dn1/DEP1の機能獲得型変異体がd1

変異体に近づくことから推測して、*RGA1* の機能欠損型変異(*d1*)とサブユニットのシステインリッチ領域が失われることが同義であると考へた。この事から、2つの遺伝学的モデルを想定した。

**モデルA:** *RGA1* は草丈、種子長、枝梗数に関する正の制御因子であり、*RGG3* と *RGG4* はドメインを介して *RGA1* の機能を阻害する。システインリッチ領域はドメインの機能を弱める。

**モデルB:** *RGG3* は草丈と種子長の負の制御因子、*RGG4* は草丈と枝梗数の負の制御因子であり、それぞれドメインにより制御を行う。*RGA1* は、システインリッチ領域を介して *RGG3* と *RGG4* の機能を抑制する。



本研究課題では、これらのモデルのどちらが正しいかを証明するために *d1* 変異体と、各サブユニット変異体との二重変異体、三重変異体を作成し、遺伝学的証明を行う。また、サブユニットタンパク質がどのように相互作用しているかを決定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

上記の2つのモデルの内、どちらが正しいか、また、各サブユニットがどのようにタンパク質相互作用を行っているかを詳細に明らかにするために以下の実験を行った。

#### (1) 各サブユニット遺伝子変異体の遺伝学的解析

これまでに、*d1* 変異体の矮性・短粒・短穂・穂の枝分かれ微増といった表現型を *RGG3* と *RGG4* の機能獲得型変異の複合的な表現型で説明でき、*D1* の恒常的活性型タンパク質の形質転換体(*D1QL*)が *RGG3* の機能欠損型表現型と一致する事を示した。これらを遺伝学的に証明するために、以下の組み合わせの多重変異体を作成し、表現型を調査した。

- ・ *d1 rgg3 (gs3)*、*d1 Rgg3 (mi)*、*d1 Rgg4 (Dn1/DEP1)*、*d1 Rgg3 Rgg4*

#### (2) 形質転換による各サブユニット遺伝子の過剰発現及び発現抑制個体の作出

これまでに、*RGG1* 遺伝子と *RGG2* 遺伝子野過剰発現体が *d1* 変異体に類似した矮性表現型を示す事を見出しているが、穂や種子の表現型、*RGG3-5* 過剰発現体の表現型は明らか

になっていない。本課題では、*RGG1-5* の過剰発現体、遺伝子抑制個体の草丈、穂、種子の表現型について解析し、*d1* 変異体との表現型の類似点を調査し、*RGG1-5* 各遺伝子の役割について解析した。

#### (3) 酵母 Two ハイブリッド法による、*RGA1*、*RGB1*、*RGG1-5* タンパクの相互作用部位の決定

これまでに、*d1* 変異体、*RGG3*、*RGG4* の変異体、*RGG1* の過剰発現体、恒常的活性型 *RGA1* の解析より、*RGA1* タンパク質と *RGG3*、*RGG4* タンパク質の相互作用が *d1* 変異体に見られる形質に重要であると推測している。この仮説を証明するために、*RGA1*、*RGB1*、*RGG1-5* タンパク質の酵母 Two ハイブリッド法による相互作用実験を行った。

#### (4) *RGG1-5* タンパク質の特異的抗体を用いたタンパク質局在実験

*RGG1-5* タンパク質が、イネの植物体内でどのような挙動を示しているのかを各タンパク質の特異的抗体を作出した。

## 4. 研究成果

#### (1) 各サブユニット遺伝子変異体の遺伝学的解析

*d1* 変異体と、*RGG3*、*RGG4* の変異体を交配した二重・三重変異体を用いて遺伝解析を行った。*d1 rgg3* 二重変異体では、*d1* の短粒表現形が、*rgg3* の長粒表現型を完全に打ち消し、*d1* 変異体と全く同じ種子長となった。このことから、種子長に関しては *d1* 変異が *rgg3* 変異に対して完全に遺伝的上位であることが示された。*d1 Rgg3* 二重変異体では、*d1* と *Rgg3* の両変異体が示す短粒表現型と全く相同な短粒表現型となり、*d1* と *Rgg3* は同一のシグナル伝達経路で作用する事が示された。これら2つの結果から、種子長に関しては、*D1* が主にシグナル伝達を制御し、その *D1* の効果を *RGG3* が制御するモデルを考案した。また、*d1 Rgg4* 二重変異体の結果では、*d1* 変異体の持つ草丈が50%に短くなる矮性効果が *Rgg4* の草丈を80%に短くする効果を完全に打ち消し、*d1* 変異体と同様の草丈となった。この事から、草丈に関しては *d1* が完全に *Rgg4* に対して遺伝的上位である事が示された。また、穂の形態についても完全に *d1* が *Rgg4* に対して遺伝的上位であった。*d1 Rgg3 Rgg4* 三重変異体の表現型は、*d1* 変異体の表現型と完全に一致しており、*d1* 遺伝子が完全に遺伝的上位であることに矛盾しなかった。

#### (2) 形質転換による各サブユニット遺伝子の過剰発現及び発現抑制個体の作出

*RGG1* の過剰発現体を用いた観察では、矮性になり、*d1* に類似した表現型が観察された。また、*RGG1* の発現抑制個体では、茎が細くなり、倒伏しやすくなる表現型が確認された。*RGG2* の過剰発現体を用いた観察では、草丈が若干低下した他、ラミナジョイントや穂軸が褐変

化するなど、サブユニットの発現抑制個体の表現型に類似した表現型が観察された。*RGG4* の発現抑制個体では、僅かに矮性になる事が確認でき、*RGG5* の発現抑制個体でも、類似の矮性が確認できた。

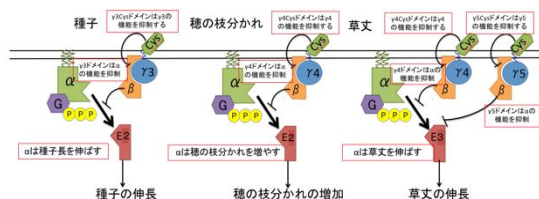
(3) 酵母 Two ハイブリッド法及び Three ハイブリッド法による、RGA1、RGB1、RGG1~5 タンパクの相互作用部位の決定

酵母 Two ハイブリッド法を用いたタンパク質相互作用実験の結果、RGB1 が RGA1 および RGG1、RGG2、RGG3、RGG4 と相互作用出来ることが示され、RGG1、RGG2、RGG3、RGG4 との相互作用には ドメインが重要であることが明らかになった。また、RGG4 はシステインリッチ領域で、ホモダイマーを形成する可能性が示された。

(4) RGG1~5 タンパク質の特異的抗体を用いたタンパク質局在実験

RGG1~5 タンパク質の特異的抗体を作成した結果、RGG1、RGG2、RGG3、RGG4 については作成に成功したが、RGG5 は得意抗体の作成に至らなかった。RGG1、RGG2、RGG3、RGG4 は細胞膜に局在することが示された。

(1) ~ (4) の結果から総合して、イネヘテロ3量体 G タンパク質のシグナル伝達は、種子長、草丈、穂形質に関して RGA1 が主に制御しており、種子長に関しては RGG3 がドメインを介して RGA1 の活性を抑制し、RGG3 の抑制活性をシステインリッチ領域でさらに抑制している、草丈に関しては RGG4 と RGG5 がドメインを介して RGA1 の活性を抑制し、それぞれのシステインリッチ領域でさらに抑制している、穂型質に関しては RGG4 がドメインを介して RGA1 の活性を抑制し、この抑制活性をシステインリッチ領域で抑制する。というモデルを構築した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Segami S., Takehara K., Yamamoto T., Kido S., Kondo S., Iwasaki Y., Miura K. Overexpression of *SRS5* improves grain size of brassinosteroid-related dwarf mutants in rice (*Oryza sativa* L.) *Breed. Sci.* 67, 393-397 (2017) 査読有り DOI: 10.1270/jsbbs.16198

2. Urano D., Miura K., Wu Q., Iwasaki Y., Jackson D., Jones A. M. Plant Morphology of Heterotrimeric G protein Mutants. *Plant Cell Physiol.* 57, 437-445. (2016) 査読有り DOI: 10.1093/pcp/pcw002

[学会発表](計 16 件)

1. 西山明希、松田さくら、茶谷弦輝、伊藤貴文、三浦孝太郎、岩崎行玄  
イネ3量体 G タンパク質  $\gamma_3$  サブユニットの同定  
日本育種学会第133回講演会(九州大学 2018年3月25-26日)

2. 松田さくら、西山明希、茶谷弦輝、伊藤貴文、三浦孝太郎、岩崎行玄  
イネ3量体 G タンパク質  $\gamma_4$  サブユニットの同定  
日本育種学会第133回講演会(九州大学 2018年3月25-26日)

3. 茶谷弦輝、西山明希、松田さくら、伊藤貴文、三浦孝太郎、岩崎行玄  
イネ3量体 G タンパク質  $\gamma_5$  サブユニット変異体の表現型の評価  
日本育種学会第133回講演会(九州大学 2018年3月25-26日)

4. 近藤沙紀、瀬上修平、山本竜也、竹原佳那、岩崎行玄、三浦孝太郎  
イネヘテロ3量体 G タンパク質変異体の遺伝解析  
日本育種学会第131回講演会(名古屋大学 2017年3月29-30日)

5. 岸 優花、坂井 優衣、松永 侑子、伊藤 貴文、日弁 隆雄、瀬上 修平、三浦 孝太郎、岩崎 行玄  
イネ3量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットの存在比率の解析  
日本育種学会第131回講演会(名古屋大学 2017年3月29-30日)

6. 岸優花、坂井優衣、伊藤貴文、日弁隆雄、瀬上修平、三浦孝太郎、岩崎行玄  
イネ3量体 G タンパク質 1 と 2 サブユニットの発現様式の解析  
日本育種学会 第129回講演会 2016 (横浜市立大学 2016年3月21-22日)

7. 坂井優衣、岸優花、伊藤貴文、日弁隆雄、瀬上修平、三浦孝太郎、岩崎行玄  
質量分析法を用いたイネ3量体 G タンパク質 1 ~ 5 サブユニットの同定

- 日本育種学会 第 129 会講演会 2016  
(横浜市立大学 2016 年 3 月 21-22 日)
8. 瀬上修平、北野英己、**三浦孝太郎**、岩崎行玄  
BR シグナル伝達とは独立にイネの種子形を制御する *SRS5* 遺伝子の利用  
日本育種学会 第 129 会講演会 2016  
(横浜市立大学 2016 年 3 月 21-22 日)
9. 藤田萌香、杉田伊澄、瀬上修平、**三浦孝太郎**、岩崎行玄  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質 2 サブユニットの機能解析  
日本育種学会 第 129 会講演会 2016  
(横浜市立大学 2016 年 3 月 21-22 日)
10. **三浦孝太郎**  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質の遺伝学  
遺伝学研究所研究会 「イネ分子遺伝学の周縁」(国立遺伝学研究所 2015 年 10 月 9-10 日)
11. 瀬上修平、**三浦孝太郎**、岩崎行玄  
イネの短粒変異体は、外穎の細胞数の減少か細胞長の減少で区別できる  
日本育種学会 第 128 会講演会 2016  
(新潟大学 2015 年 9 月 11-12 日)
12. **三浦孝太郎**、瀬上修平、杉田伊澄、中村麻由美、高牟禮逸朗、岩崎行玄  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質関連変異体の収集と表現型の解析  
日本育種学会 第 127 会講演会 2015  
(玉川大学 2015 年 3 月 21-22 日)
13. 瀬上修平、**三浦孝太郎**、杉田伊澄、中村麻由美、高牟禮逸朗、岩崎行玄  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質 3、4 サブユニット変異体の遺伝解析  
日本育種学会 第 127 会講演会 2015  
(玉川大学 2015 年 3 月 21-22 日)
14. 杉田伊澄、瀬上修平、**三浦孝太郎**、中村麻由美、岩崎行玄  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質 1、2 サブユニット発現抑制個体の遺伝解析  
日本育種学会 第 127 会講演会 2015  
(玉川大学 2015 年 3 月 21-22 日)
15. **三浦孝太郎**、瀬上修平、杉田伊澄、中村麻由美、岩崎行玄  
イネヘテロ 3 量体 G タンパク質を遺伝学で紐解く 2014 年遺伝学研究所研究
- 会 「イネ分子遺伝学への期待」  
(国立遺伝学研究所 2014 年 10 月 17-18 日)
16. **三浦孝太郎**  
イネ種子形制御遺伝子の遺伝解析  
北陸植物学会インターキャンパスセミナー in Fukui (福井県立大学 2014 年 6 月 28 日)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://biotech.fpu.ac.jp/5f/riceteam.htm>  
|  
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
三浦 孝太郎 (KOTARO, Miura)  
福井県立大学・生物資源学部・准教授  
研究者番号: 70571561