種子発芽の温度応答を制御するMAPキナーゼ経路の同定と機能解析

明治大学大学院農学研究科

2023 年度

博士学位請求論文

（要約）

種子発芽の温度応答を制御する MAP キナーゼ経路の同定と機能解析

Identification and functional analysis of mitogen-activated protein kinase pathway in seed germination response to temperature

学位請求者　生命科学専攻

大谷　真彦

● 本論の構成および目次

● 各章の要約

第一章　緒論

植物は、胚発生の途中で一度成長を止め、温度や水分などのストレスに強い耐性を持つ「種子」を生産する。母体から散布された種子は休眠を持つことにより、生育に不適な環境を種子の状態で乗り越え、生育に適した季節に成長を再開することができる（Baskin and Baskin 2014）。休眠は、発芽に適した環境が整っていても発芽しない生理状態と定義される。休眠のタイプはその特徴から、「形態的休眠」、「生理的休眠」、「物理的休眠」、「形態的生理的休眠」、「物理的生理的休眠」の 5 つのクラスに分類される（Baskin and Baskin 2014）。このうち、「生理的休眠」は植物ホルモンを含む生理的な要因により、種皮や胚乳などの胚を取り囲む組織の抑止力と胚の成長力のバランスによって生じ、シロイヌナズナなどの草本種子やイネ、ムギ類など広範な植物で認められる（Baskin and Baskin 2014）。

生理的休眠は、「深くない生理的休眠」、「中間的生理的休眠」、「深い生理的休眠」の 3 つのクラスに分類される。「深くない生理的休眠」を持つ種子は、休眠性の低下（後熟）に伴って発芽可能な温度範囲が拡大することが、発芽の季節の決定に重要な役割を果たす（Vegis 1964; Baskin and Baskin 2014）。例えば、冬型一年草本は、種子が散布される春は発芽の温度範囲の上限が環境温度を下回るために発芽せず、後熟に伴って発芽の温度範囲が高温側へ拡大し、その上限温度が環境温度を上回る秋に発芽することができる。逆に、夏型一年草本は、種子を散布される秋は発芽の温度範囲の下限が環境温度を上回るために発芽せず、後熟に伴って発芽の温度範囲が低温側へ拡大し、その下限温度が環境温度を下回る春に発芽することができる（Baskin and Baskin 2014）。このように、種子の休眠性は発芽の温度応答システムによって支えられている。種子発芽の温度応答システムにおいて、高温は ABA 合成を誘導するとともに、GA 合成を抑制することで発芽を阻害することが知られるが（Toh *et al.*, 2008; Argyris *et al.*, 2008）、種子が温度を感知して発芽を制御する仕組みの理解はごく一部に留まっており、特に後熟の過程で種子の温度反応性が変化する仕組みは不明である。

種子は人類および動物にとって、栄養豊富で保存の利く貴重な食糧である。種子の休眠は、不揃いな発芽の原因となり生産効率の低下をもたらし、収穫前の発芽（穂発芽）は、デンプンなどの種子貯蔵物質の分解を誘導し、種子の収量や品質低下をもたらす。現在、世界人口

の増加に対する食糧の安定供給と、気候変動に対応した持続可能な農業生産は人類共通の課題となっており、植物にとって重要な休眠・発芽のメカニズムを理解することは、人類にとっても大変重要である。

種子の休眠・発芽は複数の量的遺伝子座（QTL）によって制御される量的形質である。休眠を制御する遺伝因子は突然変異体を用いた遺伝学的解析により、シロイヌナズナをはじめとして多くの植物種で同定されてきた（Nonogaki *et al.*, 2014）。ゲノム解析技術の発展に伴って、異なる休眠性や発芽形質を示す野生型や品種間に存在する自然変異 (QTL) に着目した遺伝解析が発展し、突然変異体を用いた解析では見出されなかった休眠・発芽制御の分子メカニズムが示された。近年、コムギとオオムギの品種間に休眠性の違いをもたらす自然変異の原因遺伝子として *Mitogen-activated protein kinase kinase 3* (*MKK3*)が同定され、栽培化の過程で *MKK3* が休眠・発芽を制御するために重要な役割を担っていることが示された（Torada *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2016）。MKK3 は真核生物で広く保存された細胞内情報伝達経路である MAP キナーゼカスケード（MAPK カスケード）を構成する因子の一つである。しかし、MKK3 が穀類以外の植物の休眠・発芽制御に関わるかどうかは不明であり、また、どのようなシグナルを受け、どのような仕組みで休眠・発芽を制御しているかは不明である。

種子の休眠性は発芽の温度応答システムによって制御されること、MAPK カスケードには、外界の環境を細胞内へと伝える役割をもつことから、MKK3 を介した MAPK カスケード経路（MKK3-MAPK カスケード）は、種子発芽の制御における温度受容とその情報伝達経路に存在するミッシングリング解明のための格好のターゲットであると考えられた。そこで本研究では、種子発芽の温度応答を制御する分子メカニズムの解明を目的とし、発芽の温度応答システムにおける MKK3-MAPK カスケードの機能解析を行った。MKK3-MAPK カスケードの全貌と活性制御機構を明らかにするため、冬型一年生草本として知られ、遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナを材料とし、分子遺伝学的解析と生化学的解析を組み合わせたアプローチを展開した。

第二章　種子発芽の温度応答制御における MAPK カスケードの機能

シロイヌナズナの *MKK3* はコムギ･オオムギの *MKK3* と最も高い相同性を示すことから、シロイヌナズナの *MKK3* 機能喪失突然変異体（*mkk3*）を単離し、収穫直後の種子の常温おける発芽、つまり休眠性を調べたところ、*mkk3* 変異体種子は強い休眠性を示した。このことから、MKK3 は単子葉植物であるコムギ・オオムギだけでなく、進化的に離れた真正双子葉植物であるシロイヌナズナの休眠・発芽の制御にも関わることが示された。*mkk3* の収穫直後の種子と後熟種子の発芽を調べたところ、いずれの時期でも発芽の温度範囲が野生型と比較して狭まっていることが明らかとなった。このため、シロイヌナズナ種子において、MKK3 は発芽の温度範囲を確保する役割を持つことが考えられ、*mkk3* 種子の強い休眠性は、発芽の温度範囲が狭まったことによってもたらされたと考えられた。

次に、MKK3 を活性化し、発芽の制御に関わる MAPKKK の探索と同定を行った。シロイ

ヌナズナにおいて 80 の *MAPKKK* が同定されているが (Jonak *et al.*, 2002) 、MKK3 とのタンパク質間の相互作用が示唆されていたのは、MEKK ファミリーに属するクレード III *MAPKKK* であった（Colcombet *et al.*, 2016）。また、これらの *MAPKKK* を介した MAPK カスケードの活性は *MAPKKK* の発現制御と相関することが示されていた (Danquah *et al.*, 2015; Sözen *et al.*, 2020) 。そこで、種子における *MAPKKK* の発現をマイクロアレイやリアルタイム PCR によって調べたところ、発芽過程の種子では *MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現が誘導され、成熟直後の種子が発芽しない常温（26〜28 ℃）や、後熟種子の発芽が高温阻害を受ける条件（34 ℃）では、発現が強く抑制されることを見出した。*MAPKKK19* と *MAPKKK20* の機能が失われた二重変異体（*mapkkk19/20*）を単離し、発芽の温度反応性を調べたところ、後熟種子では *mkk3* と同様、発芽可能な温度範囲が狭まっていることが明らかとなった。さらに、*MAPKKK20* 過剰発現種子では、発芽可能な温度範囲が拡大した。したがって、発芽の温度反応性の制御には、*MAPKKK19* と *MAPKKK20* が機能的な重複を持ち、発芽の温度範囲を確保する働きを担うと考えられた。また、*MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現は休眠性と環境の温度による制御を受けることから、MKK3-MAPK カスケードの活性化にはこれら 2 つの遺伝子の発現制御が重要であると考えられた。一方、成熟直後の種子では、種子の成熟過程で発現が誘導される *MAPKKK21* を含む三重変異体種子（*mapkkk19/20/21*）で、明確な変異形質が認められた。このため、成熟直後の種子の発芽の温度範囲の制御には、種子発達過程において顕著に発現する *MAPKKK* も、MKK3-MAPK カスケードの活性制御に寄与すると考えられた。

シロイヌナズナゲノムには少なくとも 20 の *MPK* が同定されており、アミノ酸配列の相同性より、Clade-A〜D の 4 つのグループに分類されている (Ichimura *et al.*, 2002) 。このうち、MKK3 とのリン酸化レベルでの相互作用が明確に示されているのは、C グループ MPK に属する MPK1, MPK2, MPK7, MPK14 である (Takahashi *et al.*, 2007, 2011; Danquah *et al.*, 2015; Dóczi *et al.*, 2007) 。これら C グループ MPK が発芽に関わることを検証するために、*MPK* の単一および多重変異体を単離し、発芽の温度反応性を解析した。単一遺伝子の機能喪失変異体のうち、*mpk7* のみがやや発芽しにくい形質を示した。また、*mpk7* を含む多重変異体種子は、成熟直後の種子および後熟種子において、*mpk7* 種子よりもさらに発芽可能な温度範囲が狭まっていることが見出された。一方、*MPK7* に変異を持たない *mpk1/2/14* 三重変異体種子は野生型とほぼ同様な発芽形質を示した。したがって、MKK3-MAPK カスケードによる発芽の温度反応性の制御には C グループの 4 つの *MPK* のうち *MPK7* が主要に働き、発芽可能な温度範囲を確保する機能を果たすと考えられた。

MKK3-MAPK カスケードの活性が発芽の温度反応性に応じて制御されることを生化学的に検証するため、MPK7 のリン酸化活性を指標とし、休眠状態と吸水温度の効果を調べた。常温で吸水し、発芽過程にある野生型の後熟種子では、吸水後 3 時間と 12〜24 時間に MPK7 の活性化が認められた。一方、休眠性を示す成熟直後の種子ではいずれのタイミングでも活性化が認められず、高温による発芽阻害を受けた後熟種子では、吸水後 12〜24 時間の MPK7 活性が消失していた。また、この活性化のパターンは、*MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現の

パターンと一致していた。さらに、*MAPKKK* あるいは *MKK3* の機能喪失が MPK7 のリン酸化活性に与える影響を調べたところ、*mkk3* および *mapkkk19/20* 種子では、MPK7 の活性化がほとんど認められなかった。このため、MKK3-MAPK カスケードは MAPKKK19/20-MKK3-MPK1/2/7/14 により構成され、その活性は種子の休眠状態に依存した温度による *MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現制御を介して制御されることで、種子発芽の温度応答に重要な役割を果たしていると考えられた。

種子発芽の制御において、吸水時の高温は発芽抑制ホルモンであるアブシシン酸（ABA）内生量を高め、発芽誘導に働くジベレリン（GA）合成を抑制することにより発芽を抑制する（Toh *et al.*, 2008; Argyris *et al.*, 2008）。MAPK カスケードが ABA や GA による制御を受ける可能性を検討するため、ABA 欠損変異体や ABA 生合成阻害剤（フルリドン）を用いた発現解析を行ったところ、*MAPKKK19* および *MAPKKK20* の発現は吸水中に新たに合成される ABA による影響を受けないことが示された。また GA 欠損変異体を用いた発現解析から、*MAPKKK19* および *MAPKKK20* の発現は GA による影響を受けないことが示された。このため、*MAPKKK19* および *MAPKKK20* の発現は ABA や GA によって直接的に制御されるのではなく、未知の温度情報伝達経路と後熟シグナルにより制御されると考えられた。

MAPK カスケードが ABA と GA の代謝に関わる可能性を検討するため、*MAPKKK20* 過剰発現体種子を用いた発現解析を行った。ABA 合成の律速段階を担う NCED をコードする遺伝子のうち、*NCED2, 5, 9* は高温阻害条件で発現が上昇し、発芽阻害をもたらす ABA 合成に働く (Toh *et al.*, 2008) 。また、ABA 分解酵素をコードする *CYP707A1, CYP707A2, CYP707A3* の発現は発芽過程で誘導され、種子の ABA 分解を介して発芽誘導に働く (Kushiro *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006) 。*MAPKKK20* 過剰発現体種子では、野生型種子よりも ABA 合成酵素遺伝子（*NCED2, 5, 9*）の発現が抑制され、ABA 分解酵素遺伝子（*CYP707A1, A2, A3*）の発現が誘導された。したがって、MAPK カスケードは ABA 合成を抑制し、分解を促進することにより種子の ABA レベルを減少させ、発芽を促進すると考えられた。

GA の生合成の律速段階を担う GA 3-酸化酵素をコードする *GA3ox1* と *GA3ox2* の発現は光によって誘導され、高温により抑制される (Toyomasu *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 2004; Toh *et al.*, 2008) 。*MAPKKK20* 過剰発現体種子では、*GA3ox1* と *GA3ox2* の発現が野生型種子よりも高く誘導された。したがって、MAPK カスケードは ABA レベルを減少させるとともに、GA 合成酵素の発現を誘導することにより、種子の GA レベルを増加させ、発芽を促進すると考えられた。本章における研究成果の大部分は、現在プレプリントとして公表している（Otani *et al.* 2024）。

第三章　発芽の温度応答を制御する MKK3-MAPK カスケードのリン酸化標的タンパク質の探索

第二章より、発芽制御に関わる MKK3-MAPK カスケード経路が明らかになったが、このカスケードがどのようなタンパク質をターゲットとし、発芽制御に関わるかは不明である。リン酸化標的タンパク質の探索手法にはリン酸化プロテオミクス、プロテインアレイ、酵母

ツーハイブリッド（Y2H）スクリーニングなどが用いられる。なかでも、リン酸化ペプチド濃縮法と高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）による定量ショットガンプロテオミクスを組み合わせた定量リン酸化プロテオミクス手法は、シグナル伝達経路を俯瞰する強力なツールである。植物における定量リン酸化プロテオミクス手法を用いたシグナル伝達経路の研究は、動物や微生物分野と比較して遅れをとっていたが、質量分析解析技術やリン酸化ペプチド濃縮技術の改良により着実に進歩している (Mergner *et al.*, 2020; Subba and Prasad, 2021; Yamashita and Umezawa, 2022) 。

MKK3-MAPK カスケードによってリン酸化が制御されるターゲットタンパク質（標的基質）を探索し、その機能解析を行うため、野生型と *mkk3* 種子のリン酸化プロテオームを解析した。その結果、乾燥種子、吸水 3 時間および 24 時間後の種子から全体で 152 種のリン酸化タンパク質、1,884 種のリン酸化ペプチドが同定された。野生型と *mkk3* 種子におけるリン酸化プロテオームを比較解析するため、野生型と変異体間でリン酸化の程度が 2 倍以上有意に異なるペプチドを選抜したところ、全体で 238 種見出された。このうち、MKK3 によってリン酸化されたペプチド、すなわち、*mkk3* 種子でリン酸化レベルが有意に低下したと判断されたペプチドを 94 種見出し、これらのペプチドを持つ 71 種のタンパク質を MKK3-MAPK カスケードの下流でリン酸化を受ける候補とした。このリン酸化候補タンパク質群について、Gene ontology（GO）解析を行ったところ、ABA 応答およびストレス応答に関わる GO を持つ遺伝子が有意に濃縮されていた。また、乾燥種子と吸水初期の種子では、RNA の代謝や翻訳など、転写後の遺伝子発現に関わる GO を持つ遺伝子が濃縮されていた。種子発芽において、吸水初期の RNA 代謝・翻訳は重要な役割を持つと考えられている（Bewley, 1997）。このため、MKK3-MAPK カスケードは発芽過程の後半（12〜24 時間後）だけでなく、発芽過程の初期に働くタンパク質のリン酸化を介して、発芽の制御に関わると考えられた。

MKK3-MAPK カスケードのリン酸化候補タンパク質のうち、一般的な MPK のリン酸化ターゲットモチーフである S/T-P がリン酸化され、既知の MPK 結合モチーフ（D-site : $[K/R]_{1-3}$-$(X)_{1–6}$-([L/I/V]-X-[L/I/V] (-X-[L/I/V]) , X は任意のアミノ酸残基）を持つタンパク質は 31 種であった。このうち、16 種のタンパク質をコードする遺伝子の機能喪失突然変異体を単離し、収穫直後の種子の発芽を解析したところ、発芽を誘導する働きをもつ遺伝子を 3 種、発芽を抑制する働きを持つ遺伝子を 2 種見出した。MKK3 は発芽を誘導する作用を持つため、発芽を誘導する働きを持つタンパク質は MKK3-MAPK カスケードによって活性化され、発芽促進作用を示すと考えられた。一方、発芽を抑制する働きを持つタンパク質は MKK3-MAPK カスケードによって不活化され、発芽を抑制する作用を失うと考えられた。また、発芽に関与するリン酸化タンパク質のうち 3 種は mRNA 結合タンパク質をコードし、転写後の mRNA の制御（RNA の代謝、翻訳など）に関わることが示唆されていた。したがって、MKK3-MAPK カスケードは、転写後の発現制御プロセスに関わるタンパク質のリン酸化を介して発芽を制御する可能性が考えられた。これらのタンパク質が、実際に C グループ MPK と相互作用してリン酸化をされるかは不明である。また、吸水の後期で MKK3-MAPK カス

ケードによってリン酸化されるタンパク質も未同定であり、今後明らかにすべき課題と考えている。

第四章　種子発芽の温度応答制御における脱リン酸化酵素の機能

第二章では、MKK3-MAPK カスケードは ABA の量的制御に関わるとともに、発芽の温度範囲の制御に関わることを示したが、ABA 情報伝達経路との関連は不明である。ABA 情報伝達経路において、グループ A PP2C ファミリーに属する 9 種の脱リン酸化酵素は ABA 作用の負の制御因子として働くことが知られている (Yoshida *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2019; Bhaskara *et al.*, 2019; Nishimura *et al.*, 2004)。ABI1 サブファミリーの 4 種の PP2C および AHG3 は、ABA 非存在下で subclass III SnRK2 を脱リン酸化することにより、ABA 作用を抑制する。ABA が結合した ABA 受容体、PYR/PYL/RCARs はこれらの PP2C と結合し、その脱リン酸化活性を抑制する (Umezawa *et al.*, 2009; Antoni *et al.*, 2013) 。一方、AHG3 を除く AHG1 サブファミリーの PP2C は、ABA 依存的な ABA 受容体との結合が認められない。このため、AHG1 サブファミリーの PP2C は ABI1 サブファミリーとは異なる制御を介して ABA の作用を制御していることが示唆されている (Nishimura *et al.*, 2018) 。最近、AHG1 と AHG3 が休眠のマスター制御因子である DOG1-ヘム複合体と相互作用することが報告され、DOG1 は ABA 受容体とは独立に PP2C 活性を抑制し、ABA の作用を高めることが示された (Nishimura *et al.*, 2018; Nee *et al.*, 2017)。しかし、これら PP2C 脱リン酸化酵素が発芽の温度反応性に寄与するかどうかは明確にされていない。

そこで、ABA の情報伝達を負に制御する 9 種の PP2C 型脱リン酸化酵素の機能喪失変異体を用いて発芽の温度反応性を解析したところ、成熟直後の種子の常温での発芽抑制、つまり休眠性には、DOG1 による PP2C 活性の抑制が主要な役割を持つと判断された。一方、後熟種子における高温および低温条件での発芽抑制には、ABA と DOG1 の両者による制御が働くと考えられた。MKK3-MAPK カスケードの活性化を抑制する脱リン酸化酵素の働きは、環境に応じて発芽を厳密に制御する上で重要な役割を持つと推測される。今後、PP2C と MKK-MAPK カスケードの関連を明らかにすることにより、休眠性の制御、温度による発芽制御のメカニズムがより明確になると考えている。

第五章　総合考察

本研究では、種子発芽の温度反応性の制御には、MKK3-MAPK カスケード経路が重要な役割を持つことを明らかにした。特に、温度と後熟の情報が、*MAPKKK* の発現を制御することにより MKK3-MAPK カスケード活性を制御し、発芽の制御に至ることを明らかにしたことは、大きな成果である。また、MKK3-MAPK カスケードによってリン酸化が制御されるタンパク質を網羅的に解析し、吸水初期の転写後遺伝子発現制御にタンパク質リン酸化の制御が働き、発芽に重要な役割を持つ可能性を示した。このため、今後は MKK3-MAPK カスケードや脱リン酸化酵素を介してリン酸化が制御されるタンパク質を探索し、さらにその分子機能を解析することにより、リン酸化カスケードによる温度に応答した発芽制御

の分子メカニズムを解明したいと考えている。MKK3-MAPK カスケードは発芽そのものには必須ではないが、休眠と発芽の制御に重要な役割を持つため、作物種子の穂発芽抑制や、発芽形質の改善を目的とした分子育種の重要なターゲットになるであろう。本研究の成果や今後得られる成果が、気候変動に対応した種子発芽の制御と作物生産に寄与することを期待している。

謝辞

本研究の遂行にあたり、以下に示す多くの方々の御助言・御助力を頂きました。深く感謝いたします。

◆ **明治大学農学部**
- 川上 直人 教授
- 吉本 光希 教授
- 高橋 直紀 准教授
- Iain Peter McTaggart 准教授

◆ **東京農工大学**
- 梅澤 泰史 教授
- 石川 慎之介 博士
- 山下 昂太 様

◆ **ホクレン農業協同組合連合会**
- 帋田 淳史 博士

◆ **農研機構**
- 杉本 和彦 博士

◆ **Institute of Plant Sciences Paris-Saclay**
- Jean Colcombet 博士
- Sarah Regnard 博士

◆ **香川大学**
- 市村 和也 教授
- 横田 航平 様

◆ **東京理科大学**
- 高橋 史憲 准教授

◆ **岡山大学**
- 平山 隆志 教授

◆ **トロント大学**
- 南原 英司 教授

◆ **京都大学**
- 山口 信次郎 教授

◆ **名城大学**
- 藤 茂雄 准教授

◆ **国立遺伝学研究所**
- 越水 静 博士

◆ **植物分子生理学研究室の修了生・卒業生・現役生の皆様（抜粋）**
- 東城 僚 様
- 鄭 李鵬 博士
- 大沼 夏樹 様
- 大森 涼葉 様
- 橘 夏希 様

以上

＜引用文献＞

- **Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G.A., Fernandez, M.A., De Winne, N., De Jaeger, G., Dietrich, D., Bennett, M.J. and Rodriguez, P.L.** (2013) PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 Plays an Important Role for the Regulation of Abscisic Acid Signaling in Root. *Plant Physiol.*, **161**, 931–941.
- **Argyris, J., Dahal, P., Hayashi, E., Still, D.W. and Bradford, K.J.** (2008) Genetic Variation for Lettuce Seed Thermoinhibition is Associated with Temperature-Sensitive Expression of Abscisic Acid, Gibberellin, and Ethylene Biosynthesis, Metabolism, and Response Genes. *Plant Physiol.*, **148**, 926–947.
- **Baskin, C. and Baskin, J.M.** (2014) Seeds (2nd Edition) : Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germination, Academic Press.
- **Bewley, J.D.** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, **9**, 1055–1066.
- **Bhaskara, G.B., Wong, M.M. and Verslues, P.E.** (2019) The flip side of phospho-signalling: Regulation of protein dephosphorylation and the protein phosphatase 2Cs. *Plant Cell Environ.*, **42**, 2913–2930.
- **Colcombet, J., Sözen, C. and Hirt, H.** (2016) Convergence of Multiple MAP3Ks on MKK3 Identifies a Set of Novel Stress MAPK Modules. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1941
- **Danquah, A., de Zélicourt, A., Boudsocq, M., Neubauer, J., Frei dit Frey, N., Leonhardt, N., Pateyron, S., Gwinner, F., Tamby, J.-P., Ortiz-Masia, D., Marcote, M.J., Hirt, H. and Colcombet, J.** (2015) Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **82**, 232–244.
- **Dóczi, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M. and Hirt, H.** (2007) The *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MKK3 Is Upstream of Group C Mitogen-Activated Protein Kinases and Participates in Pathogen Signaling. *Plant Cell*, **19**, 3266–3279.
- **Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., … Walker, J.C.** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.*, **7**, 301–308.
- **Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L. and Hirt, H.** (2002) Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 415–424.
- **Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Nambara, E.** (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.*, **23**, 1647–1656.
- **Mergner, J., Frejno, M., List, M., *et al.*** (2020) Mass-spectrometry-based draft of the *Arabidopsis* proteome. *Nature*, **579**, 409–414.
- **Nakamura, S., Pourkheirandish, M., Morishige, H., Kubo, Y., Nakamura, M., Ichimura, K., Seo, S., Kanamori, H., Wu, J., Ando, T., Hensel, G., Sameri, M., Stein, N., Sato, K., Matsumoto, T., Yano, M. and Komatsuda, T.** (2016) *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*

3 Regulates Seed Dormancy in Barley. *Curr. Biol.*, **26**, 775–781.

- **Nee, G., Kramer, K., Nakabayashi, K., Yuan, B., Xiang, Y., Miatton, E., Finkemeier, I. and Soppe, W.J.J.** (2017) DELAY OF GERMINATION1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nat. Commun.*, **8**, 72.
- **Nishimura, N., Yoshida, T., Murayama, M., Asami, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T.** (2004) Isolation and Characterization of Novel Mutants Affecting the Abscisic Acid Sensitivity of *Arabidopsis* Germination and Seedling Growth. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1485–1499.
- **Nishimura, N., Tsuchiya, W., Moresco, J. J., Hayashi, Y., Satoh, K., Kaiwa, N., Irisa, T., Kinoshita, T., Schroeder, J. I., Yates, J. R., Hirayama, T. and Yamazaki, T.** (2018) Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nat. Commun.*, **9**, 2132.
- **Nonogaki, H.** (2014) Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front. Plant Sci.*, **5**, 233.
- **Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. and Nambara, E.** (2006) CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **141**, 97–107.
- **Otani, M., Tojo, R., Regnard, S., Zheng, L., Hoshi, T., Ohmori, S., Tachibana, N., Sano, T., Koshimizu, S., Ichimura, K., Colcombet, J. and Kawakami, N.** (2024). The MKK3 MAPK cascade integrates temperature and after-ripening signals to modulate seed germination. bioRxiv (preprint).
- **Robert, N., Merlot, S., N'guyen, V., Boisson-Dernier, A. and Schroeder, J.I.** (2006) A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, **580**, 4691–4696.
- **Sözen, C., Schenk, S.T., Boudsocq, M., Chardin, C., Almeida-Trapp, M., Krapp, A., Hirt, H., Mithöfer, A. and Colcombet, J.** (2020) Wounding and Insect Feeding Trigger Two Independent MAPK Pathways with Distinct Regulation and Kinetics. *Plant Cell*, **32**, 1988–2003.
- **Subba, P. and Prasad, T.S.K.** (2021) Plant Phosphoproteomics: Known Knowns, Known Unknowns, and Unknown Unknowns of an Emerging Systems Science Frontier. *OMICS*, **25**, 750–769.
- **Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K. and Shinozaki, K.** (2011) Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **41**, 649–660.
- **Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2007) The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3-MPK6 Is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 805–818.
- **Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Nambara, E. and Kawakami, N.** (2008) High Temperature-Induced Abscisic Acid Biosynthesis

and Its Role in the Inhibition of Gibberellin Action in Arabidopsis Seeds. *Plant Physiol.*, **146**, 1368–1385.

- **Torada, A., Koike, M., Ogawa, T., Takenouchi, Y., Tadamura, K., Wu, J., Matsumoto, T., Kawaura, K. and Ogihara, Y.** (2016) A Causal Gene for Seed Dormancy on Wheat Chromosome 4A Encodes a MAP Kinase Kinase. *Curr. Biol.*, **26**, 782–787.
- **Toyomasu, T., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Inoue, Y. and Kamiya, Y.** (1998) Phytochrome Regulates Gibberellin Biosynthesis During Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiol.*, **118**, 1517–1523.
- **Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K.** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 17588–17593.
- **Vegis, A.** (1964) DORMANCY IN HIGHER PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **15**, 185–224.
- **Wong, M.M., Bhaskara, G.B., Wen, T.-N., Lin, W.-D., Nguyen, T.T., Chong, G.L. and Verslues, P.E.** (2019) Phosphoproteomics of *Arabidopsis* Highly ABA-Induced1 identifies AT-Hook-Like10 phosphorylation required for stress growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 2354–2363.
- **Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G.S., Kamiya, Y. and Sun Tai-ping** (1998) Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3β-Hydroxylase Genes in Germinating Arabidopsis Seeds. *Plant Cell*, **10**, 2115–2126.
- **Yamashita, K. and Umezawa, T.** (2022) Phosphoproteomic Approaches to Evaluate ABA Signaling. *Methods Mol. Biol.*, **2462**, 163–179.
- **Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S.** (2004) Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Plant Cell*, **16**, 367–378.
- **Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T.** (2006) *ABA-Hypersensitive Germination3* Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.*, **140**, 115–126.