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

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2024-03-27
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 大谷,真彦
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/0002000354

２０２３年度　農学研究科

博士学位請求論文（要旨）

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

生命科学専攻
大谷　真彦

１　問題意識と目的

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。作物生産において、種子の休眠は生産効率や収量、種子の品質を大きく左右する重要な農業形質である。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。

近年、穀類の系統間で休眠性に違いもたらす自然変異の原因遺伝子として、*MKK3*が同定された。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、休眠の制御において、MKK3がどのようなシグナルを受け、どのような仕組みで発芽を制御しているかは不明である。種子の発芽は内的な休眠性と外的な環境要因の組合せで決定される。夏型あるいは冬型一年生草本の種子では、休眠の低下（後熟）に伴って発芽可能な温度範囲が低温側あるいは高温側に拡大することにより、生育に不適な時期の発芽を抑え、春または秋の発芽が可能となっている。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。しかし、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、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。

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、MAPKカスケードに着目した。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る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合せたアプローチを展開した。

２　構成及び各章の要約

本論文は、第一章「緒論」、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」、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」、第五章「総合考察」の、全五章から構成される。これら各章の要約を以下に示す。

第一章　緒論

植物の適応形態である種子の特性およびその重要性を、野生植物における生物学的観点と、人類が利用する作物学的観点から概説した。また、発芽制御の分子メカニズムや植物の温度応答に関わるこれまでの知見と課題を整理し、本研究に至る経緯を説明した。

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* 機能喪失突然変異体（*mkk3*）を単離し、収穫直後の種子と後熟種子の温度反応性を調べたところ、いずれにおいても発芽可能な温度範囲が、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、種子における MKK3 の役割は発芽可能な温度範囲を一定の幅に保つことが主要であり、成熟直後の種子では、結果的に休眠性の制御に関わると考えられた。

MKK3 との相互作用が示唆されている *MEKK* ファミリーに属する *MAPKKK* の発現を調べたところ、発芽過程の種子では *MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現が誘導され、常温で吸水した成熟直後の種子や、高温で発芽が阻害された後熟種子では、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*）の後熟種子では、*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。一方、成熟直後の種子では、種子発達過程で発現する *MAPKKK21* を含む三重変異体種子で、明確な変異形質が認められた。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、*MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現は休眠性と環境の温度による制御を受け、MKK3 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。また、成熟直後の種子の発芽の温度範囲には、種子発達過程における MKK3-MAPK カスケードの作用が寄与すると考えられた。

MKK3 の制御を受けることが示唆されている C グループ *MPK* の単一および多重変異体の解析から、*MPK7* の機能喪失を含む多重変異体種子では、成熟直後および後熟後において、発芽可能な温度範囲が狭まっていることが示された。一方、*MPK7* に変異を持たない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、発芽の温度反応性の制御には *MPK7* が主要に働き、C グループの 4 つの *MPK* が機能的に重複し、発芽可能な温度範囲を一定の幅に保つ機能を果たすと考えられた。

これらのリン酸化酵素がカスケードを構成して機能することを明らかにするため、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、*MAPKKK* あるいは *MKK3* の機能喪失の影響を調べた。常温で吸水し、発芽過程にある後熟種子では、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、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、高温で発芽阻害を受けた後熟種子では、吸水後 12～24 時間の MPK7 活性化が消失していた。また、この活性化のピークは、*MAPKKK19* と *MAPKKK20* の発現のピークと時間的に一致していた。さらに、*mkk3*、*mapkkk19/20* 種子では、MPK7 の活性化がほとんど認められなかった。したがって、MKK3-MAPK カスケードは MAPKKK19/20-MKK3-MPK1/2/7/14 により構成され、種子発芽の温度反応に重要な役割を果たしていると考えられた。

種子において、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。ABA 欠損変異体、GA 欠損変異体および ABA 生合成阻害剤を用いた解析から、*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。また、*MAPKKK20* 過剰発現体を用いた遺伝子発現解析から、MKK3-MAPK カスケードは ABA 合成を抑制するとともに、ABA の分解と GA の生合成を促進することにより、発芽を正に制御することが示唆された。

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

MKK3-MAPK カスケードがリン酸化するターゲットタンパク質を探索し、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。乾燥種子、吸水 3 時間および 24 時間後の種子を用いた比較解析により、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。このうち、野生型と変異体でリン酸化の程度が 2 倍以上有意に異なるペプチドは 238 種、さらに *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は 94 種であった。この 94 種のペプチドを持つ 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。

リン酸化候補タンパク質について、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 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 が濃縮されていた。種子発芽において、吸水初期の RNA 代謝は重要

な役割を持つと考えられており、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 リン酸化モチーフ（S/T-P）がリン酸化され、既知の MPK 結合モチーフ（D-site）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。このうち 3 種のリン酸化タンパク質は 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る。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因子のリン酸化制御を介して発芽を制御する可能性が考えられた。

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

ABA 情報伝達経路における負の制御因子である 9 種の PP2C 型脱リン酸化酵素が発芽の温度反応性に寄与する可能性を明らかにするため、機能喪失変異体を用いて発芽の温度反応性を解析した。成熟直後の種子の常温による発芽抑制、つまり休眠性には、休眠の主要制御因子、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条件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関わると考えられた。このため、PP2C は SnRK2 の活性制御を介して ABA の作用を抑制し、発芽の温度反応性の制御に関わることが示唆された。PP2C と MKK3-MAPK カスケードの関連は不明であり、今後明らかにすべき課題と考えている。

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。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と期待している。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。