



# アブシジン酸に着目した根寄生植物ストライガの養水分収奪機構の解明

藤岡, 聖

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7527号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007527>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士学位論文

アブシジン酸に着目した  
根寄生植物ストライガの養水分収奪機構の解明

平成 31 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

藤岡 聖

## 目次

第1章 緒論	1-3
第2章 <i>Striga hermonthica</i> の ABA 生合成および ABA 感受性の解析	4-15
2-1. 背景	
2-2. 方法	
2-3. 結果	
2-4. 考察	
第3章 <i>Striga hermonthica</i> の ABA 受容機構に関わるタンパク質の解析	16-43
3-1. 背景	
3-2. 方法	
3-3. 結果	
3-4. 考察	
第4章 ShPP2C1 の PYL 相互作用低下に関わるアミノ酸残基の解析	44-54
4-1. 背景	
4-2. 方法	
4-3. 結果	
4-4. 考察	
第5章 <i>Striga hermonthica</i> の ABA が宿主植物に与える影響の解析	55-66
5-1. 背景	
5-2. 方法	
5-3. 結果	
5-4. 考察	
第6章 総合考察	67-68
参考文献	69-73
摘要	74
謝辞	76

## 略語一覽

ABA:	Abscisic acid
ABI1:	ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1
AHG:	ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION
AtPYL:	<i>Arabidopsis thaliana</i> PYL protein
AtPYR1:	<i>Arabidopsis thaliana</i> PYRABACTIN RESISTANCE 1
EtOH:	Ethanol
HAB:	HYPERSENSITIVE TO ABA
HAI:	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C
Infected sorghum:	Sorghum plants infected with <i>S. hermonthica</i>
LC-MS/MS:	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
MeOH:	Methanol
MYC:	MYC Proto-Oncogene - BHLH Transcription Factor
NAA:	1-Naphthaleneacetic acid
PA:	Phaseic acid
PP2C:	Phosphatase Type 2 C
PYL:	PYRABACTIN RESISTANCE 1 LIKE
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ShPP2C:	<i>Striga hermonthica</i> PP2C protein
ShPYL:	<i>Striga hermonthica</i> PYL protein
SnRK2:	SNF1-related protein kinase 2
Uninfected sorghum:	Sorghum plants uninfected with <i>S. hermonthica</i>

## 第1章 緒論

寄生植物は他の植物に付着し、宿主の水分や同化産物を利用することで生育する植物群を指す。中でもシソ目 (*Lamiales*) ハマウツボ科 (*Orobanchaceae*) に属する植物はそのほとんどが植物の根に寄生する能力を持つが、宿主となる植物への栄養依存性については植物種ごとに異なっている。*Rhinanthus* 属、*Phtheirospermum* 属などは葉緑体によって光合成をおこない、寄生能力を持ちながら宿主から独立して生育することが出来る。一方で *Orobanche* 属、*Phelipanche* 属、*Aeginetia* 属などはクロロフィルを欠損しており、植物体の生長発達には宿主からの同化産物の供給を必要とする<sup>1,2</sup>。

中でも *Striga hermonthica* はハマウツボ科 *Striga* 属の根寄生植物であり、イネ科作物を宿主とする雑草である。*S. hermonthica* の寄生は宿主の生長と種子生産を低減させることから、スーダンをはじめとするサハラ砂漠以南の地域を中心に農業生産を大きく阻害する要因となっている。*S. hermonthica* による農業被害は年間 10 億ドルと試算されており<sup>3</sup>、有効な防除法の開発が望まれている。

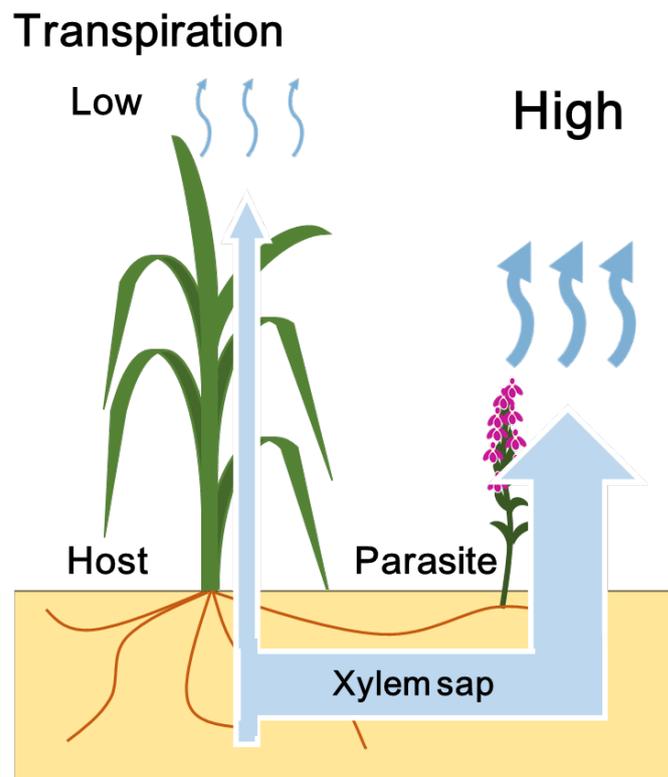
*S. hermonthica* は自分の根に吸器と呼ばれる器官を用いて宿主の根に結合し、宿主から水分および同化産物（養水分）を収奪する<sup>4</sup>。*Striga* 属植物は *Rhinanthus* 属、*Phtheirospermum* 属植物と同様にクロロフィルを持つが、光合成によって自身の生育に必要な量の 7 割程度の炭素同化産物しか生産できない<sup>5</sup>。その為、*Striga* 属植物の生存には宿主からの同化産物の供給を必要とする。ハマウツボ科植物は宿主との結合様式と宿主から水分や無機養分、同化産物（以下、養水分と呼ぶ）の収奪機構によって大きく二つのグループに分類される。一つは *Phelipanche* 属や *Orobanche* 属植物を始めとする篩管と道管の両方が宿主と結合するグループである<sup>6</sup>。ハマウツボ科の *Phelipanche aegyptiaca* を用いた研究により、このグループの植物種では篩管を介して宿主からの養水分を収奪しており<sup>7</sup>、Mannitol の蓄積によって発生する浸透圧を利用して養水分の移動を引き起こしていると考えられている<sup>8,9</sup>。もう一つは *Striga* 属、*Rhinanthus* 属、*Phtheirospermum* 属などの宿主と道管のみが結合しているグループである<sup>10-12</sup>。維管束植物は葉から蒸散を行うことで、地下部と地上部の水分勾配を形成し、根で吸収した水を地上部へ吸い上げる。*S. hermonthica* や *Striga asiatica*, *Rhinanthus minor* は気孔の数が多く、蒸散速度が常に宿主よりも高い<sup>12-14</sup>。また *S. hermonthica* の地上部に袋をかぶせて蒸散を物理的に抑制することで宿主根との結合部における水分勾配が低下する<sup>15</sup>。以上の結果から、*Striga* 属や *Rhinanthus* 属を始めとする道管結合型の寄生植物は宿主を上回る蒸散によって水分勾配を形成し、養水分収奪していると予想されている (Fig. 1)。

乾燥条件下において、一般的な植物は水分の過剰な消費を防ぐために葉の気孔を閉鎖し蒸散を抑制する。しかし *S. hermonthica* は乾燥した地域に生育するにもかかわらず高い気孔開度と蒸散速度を維持している。さらにポットを用いた試験により *S. hermonthica* が土壤水分含量を低下させても宿主よりも高い蒸散を維持できることが示されている<sup>16</sup>。これにより

*S. hermonthica* は厳しい乾燥条件において宿主との蒸散の差を広げ、養水分収奪機構を維持していると考えられる。しかし *S. hermonthica* がどのように乾燥に応答した蒸散低下を回避しているのかについて、これまで明確な結論は出ていない。一方で宿主では *S. hermonthica* の感染によって気孔が閉鎖し、蒸散速度が低下する<sup>9,14</sup>。この寄生に伴う宿主の蒸散低下も *S. hermonthica* との蒸散の差を拡大させる要因となり、養水分収奪の維持に重要であると考えられる<sup>16</sup>が、そのメカニズムについてはいまだに解明されていない。

Abcisic acid (ABA) は植物の乾燥応答において働く主要な植物ホルモンである。相対湿度や土壌水分含量の低下に応答して、植物は ABA を多量に生合成する。ABA は気孔閉鎖や様々な転写因子の発現を誘導し、植物の乾燥耐性を増加させる<sup>18</sup>。灌水や湿度の上昇によって乾燥ストレスが取り除かれると植物は ABA を Phaseic acid (PA) へ代謝不活性化し、蒸散を回復させる<sup>19,20</sup>。また ABA は種子の休眠と発芽阻害に関わる。植物種子は蓄積した ABA によって発芽が抑制されているが、発芽に適した温湿度条件で ABA を PA へ代謝することで発芽に至る<sup>21</sup>。ABA による気孔閉鎖誘導と種子発芽抑制には 3 種類のタンパク質から構成される受容機構が重要である<sup>22,23</sup>。ABA 非存在下では、Group-A Protein phosphatase type 2 C (PP2C) が Subclass III SNF1-related protein kinases 2 (SnRK2) を脱リン酸化することで ABA 情報伝達経路を抑制している。ABA 濃度の増加に伴い ABA 受容体である PYRABACTIN RESISTANCE 1 LIKE (PYL) が活性化すると、PYL-ABA 複合体は PP2C へ結合しその機能を阻害する<sup>24,25</sup>。これにより SnRK2 は機能を回復し、下流の転写因子やイオンチャネルを活性化する<sup>26</sup>。分子系統解析の結果から、このような ABA 受容機構は植物の陸上進出に伴い獲得されており、現在の陸上植物に広く共通していると考えられている<sup>27</sup>。

以上の背景から本研究では *S. hermonthica* の養水分収奪戦略の解明を目的とし、*S. hermonthica* と宿主植物の蒸散の差を生み出す 2 つの現象について ABA に着目した解析を行った。本論文の第 2 章では *S. hermonthica* の栽培系を確立し、*S. hermonthica* の ABA 生合成能力と ABA 感受性を検証した結果を示した。これにより *S. hermonthica* は ABA 生合成能を持つ一方で、ABA に対してほとんど応答しないことが見出された。ABA 感受性の欠損は *S. hermonthica* の蒸散低下の回避に寄与していると考えられる。そこで第 3 章では *S. hermonthica* の ABA 受容機構に関わる遺伝子を単離し、そのタンパク質機能を解析した。その結果、*S. hermonthica* では PP2C の一つ (ShPP2C1) が ABA 存在下でも PYL によって制御されないことが明らかになり、ABA 非感受性の原因因子であることが強く示唆された。さらに第 4 章では ShPP2C1 のアミノ酸配列を比較し、PYL との相互作用の低下の原因となるアミノ酸残基の同定を試みた。第 5 章では *S. hermonthica* が生産する ABA が *S. hermonthica* の寄生に伴う宿主の蒸散低下に関与していると考え、その検証を行った。最後に第 6 章にてこれらの研究結果を総合して考察することで *S. hermonthica* の養水分収奪における ABA 生合成及び受容機構の役割について論じた。さらに本研究で得られた知見を元に *S. hermonthica* の養水分収奪機構の進化過程の仮説および *S. hermonthica* 新規防除法に関する提案を示した。



**Figure 1.** Hypothetical model of the water flows from the host to xylem feeding parasite. The transpiration gap between *S. hermonthica* and its host plants is presumed to accelerate translocation of water and nutrients to the parasite.

## 第2章 *Striga hermonthica* の ABA 生合成および ABA 感受性の解析

### 2-1. 背景

*S. hermonthica* は湿潤条件よりも乾燥した環境で旺盛に生育する植物であり、宿主植物と比較して常に高い蒸散速度を維持している<sup>13</sup>。ポットを用いた実験において、*S. hermonthica* は土壌水分含量を低下させても宿主より高い蒸散速度を維持できることが示されている<sup>16</sup>。これは短期的な乾燥ストレスに対しても *S. hermonthica* の蒸散はほとんど応答しないことを示している。植物は土壌乾燥や大気相対湿度の低下で、植物ホルモンである ABA を生合成し、蒸散を抑制する。また ABA は種子の発芽阻害と休眠誘導を促す。*S. hermonthica* を含むいくつかのハマウツボ科寄生植物は発芽の際にストリゴラクトン (SL) を必要とするが、*P. ramosa* では SL 処理による発芽に伴って ABA 量の減少が認められ、外部からの ABA 処理によって SL 誘導性の発芽が抑制される<sup>28</sup>。このことから SL 要求性をもつ寄生植物種子の発芽も ABA によって制御されることが示唆される。これまで宿主植物に寄生している *S. hermonthica* の葉には多量の ABA が蓄積されていることが報告されているが<sup>29</sup>、*S. hermonthica* が ABA 生合成能を持つかどうかは明らかになっていない。そこでいくつかの *S. hermonthica* 植物体の栽培系を作出し、その ABA 生合成能力について検証した。次に作出した *S. hermonthica* を用いて気孔における ABA 応答について観察した。また *S. hermonthica* の ABA 感受性をより多面的に検証するため、種子発芽における ABA 応答について観察した。

### 2-2. 材料と方法

#### 2-2-1. 試薬

合成 SL アナログである GR24 はナイメヘン大学の Zwanenberg 教授より分与された。(–)-S-ABA は(有)バル企画 禿泰雄博士から供与頂いた。*d*<sub>6</sub>-ABA は ICON 社から購入した。PA は ABA を基質とした酵素変換によって合成した。

#### 2-2-2. 植物材料

*S. hermonthica* の種子はスーダン科学技術大学の Babiker 教授より供与頂いた。*O. minor* 種子は神奈川県横浜市でアカクローバーに寄生した個体から採取した。*Striga gesnerioides* の種子は、国際熱帯農業研究所の村中聡博士より供与頂いた。*Orobancha crenata* の種子は、エジプト農業研究センターの Walid 博士より供与頂いた。*P. aegyptiaca* の種子はヘブライ大学の Goldwasser 博士より供与頂いた。寄生植物種子は約 0.4% (v/v) Tween 20 水溶液で洗浄した後、有効塩素濃度 0.75% に調製した次亜塩素酸溶液で 3 分間滅菌した。次亜塩素酸を滅菌水でよく洗い流した後、吸引濾過器で十分に乾燥させた。乾燥した種子をガラスバイアルへ移し、暗所室温で保存した。ソルガム (*Sorghum bicolor* cv. Abu 70) の種子はスーダン科学技術大学の Babiker 教授より供与頂いた。シロイヌナズナ種子 (*Colombia-0*) は INPLANTA INNOVATION INC. より購入した。

### 2-2-3. ライゾトロンを用いたソルガムと *S. hermonthica* の栽培

滅菌された  $\phi 90$  mm 深型プラスチックシャーレに同径の普通ろ紙を敷き、滅菌水で十分に浸潤させた。ソルガム種子を並べ、暗所 28°C で 24 時間インキュベートした。発芽種子を明期 16 時間、暗期 8 時間、28°C の人工気象器内で水道水を用いて栽培した。 $\phi 150$  mm プラスチックシャーレにロックウールを詰めた後、同径のガラス繊維ろ紙を重ね、ライゾトロンを作成した。このライゾトロンに水耕 4 日目のソルガムの幼苗を移植し、28°C の人工気象器内で栽培した。その後 2~3 日おきに十分な量の 25% Hoagland 水耕液<sup>30</sup>を与えた。

*S. hermonthica* 種子は  $\phi 90$  mm プラスチックシャーレに同径のガラス繊維ろ紙を敷き、滅菌水で適度に浸潤させた。ここに *S. hermonthica* 種子を撒きパラフィルムで密封した後、暗所 30°C でインキュベートした（コンディショニング処理）。コンディショニング処理開始 7 日後に 3  $\mu$ M GR24 水溶液 500  $\mu$ L を処理し、インキュベートを行った（発芽処理）。

ライゾトロン移植後 2 日目のソルガムの根部に発芽処理 18 時間~20 時間後の *S. hermonthica* 種子を 20 粒接種した。接種後 3 週目にライゾトロンあたり一個体の *S. hermonthica* を残し、その他の個体をすべて取り除いた。

### 2-2-4. 宿主に依存しない *S. hermonthica* 個体の作成と乾燥ストレス試験

宿主に依存しない *S. hermonthica* 個体（独立培養個体）を作出するため、無菌条件下における栄養培地を用いた栽培を行った。使用する器具はすべてオートクレーブおよび UV 照射による滅菌を行い、操作はクリーンベンチで行った。50 倍希釈した塩素系製剤の入った試験管に洗浄済みの *S. hermonthica* 種子を 5 mg 程度入れた。試験管の口をパラフィルムで密閉し、2 分 30 秒転倒混和した。試験管の内容物を 4 つ折りにしたガラス繊維ろ紙を乗せた漏斗へ速やかに流し、通過液を 500 mL 容三角フラスコで受けた。滅菌水約 250 mL をゆっくりと注いで種子に残った洗剤を取り除いた。ピンセットを用いてろ紙に残った種子を  $\phi 10$  mm の滅菌ガラス繊維ろ紙のディスク一枚につき 5 粒ずつ並べ、 $\phi 90$  mm 深型シャーレ上で適度に湿潤させたガラス繊維ろ紙へ重ねた。シャーレをパラフィルムで密封した後、コンディショニング処理を行った。コンディショニング開始後 7 日目に 3  $\mu$ M GR24 水溶液をディスク当たり 20  $\mu$ L 投与した。発芽処理一日後、種子をディスクごと  $\phi 90$  mm 深型シャーレ上の 2% (v/v) sucrose、0.3% (v/v) ゲランガムを含む 1/2 MS 培地へ移し、28°C、暗所で 1 週間インキュベートした。地上部の分化が確認できた個体をディスクごと新しい培地へ移植し、明所 28°C で生育させた。1 週間後に個体をディスクから新しい培地へ移し、その後も 1 週間ごとに新しい培地へ植え継いだ。播種 3 週間後の個体を外部の湿度に順化させるため、シリコン栓で封をした長試験管 ( $\phi 20$  mm  $\times$  15 mm) の 1/2 MS 培地に植え継いだ。

*S. hermonthica* 独立培養個体を培地から取り出すことで、乾燥処理試験を行った。培地を取り除いた *S. hermonthica* 個体について、重量を測定した後に  $\phi 90$  mm 深型シャーレに並べ明所 30°C、相対湿度 55- 65% の人工気象器内で静置した。乾燥処理開始直後と 30 分後、60

分後に個体をサンプリングし液体窒素で凍結させた。サンプリングした植物体は化合物の抽出まで-80℃で保存した。各条件において独立した3個体を用いて実験を行い、平均値と標準偏差を算出した。

#### 2-2-5. 植物葉の蒸散速度の測定

*S. hermonthica* の接種4週間後のソルガム (Infected sorghum) と *S. hermonthica*、および同週齢の寄生を受けていないソルガム (Uninfected sorghum) の蒸散速度の測定を行った。植物体は測定前に相対湿度 55- 65%、明所 28℃の測定環境で2時間以上順化させた。蒸散速度の測定は AP4 ポロメーター (Delta T Devices, UK) を用い、最上位展開葉の中央部から先端を対象とした。蒸散速度を測定した直後に葉を ABA 濃度の測定用にサンプリングし液体窒素で凍結した。各条件において独立した3個体を用いて実験を行い、平均値と標準偏差を算出した。

#### 2-2-6. 植物体に含まれる ABA および PA の抽出

液体窒素中で凍結粉砕した植物サンプルへ新鮮重の4倍量の MeOH を加えた。さらに内部標準として  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  *d*<sub>6</sub>-ABA 水溶液を 10  $\mu\text{L}$  加えた。ボルテックスミキサーで十分に攪拌し室温で5分間遠心分離した。上清の MeOH を回収した後、残渣に新しい MeOH を加え再び抽出を行った。この操作を合計3回繰り返し、植物サンプル新鮮重の12倍の MeOH 抽出物を得た。抽出液をエバポレーターで濃縮乾固した。残渣を 1N 水酸化カリウム水溶液によって pH 10 に調製した水およびヘキサンに懸濁し、15 mL フェルコンチューブへ洗いこんだ。液液分配により水相からヘキサン可溶成分を取り除いた。必要に応じて室温で10分間遠心分離し、液相を分離させた。この操作をヘキサン抽出液が十分に透明になるまで繰り返した。ヘキサン相を取り除いた水相に 1 N 塩酸水溶液を一滴加え、液性を酸性にした。液液分配により水相から酢酸エチル溶解物を抽出し、この操作を酢酸エチル層が十分に透明になるまで繰り返した。酢酸エチル抽出物を回収し、濃縮乾固した。残渣を MeOH 100  $\mu\text{L}$  に溶解させた後、水 900  $\mu\text{L}$  を加えて 10% (v/v) MeOH 溶液に調製した。

#### 2-2-7. 固相抽出カラムを用いた植物抽出物の精製

精製には固相抽出カラムである Oasis HLB cartridge (1 cc, 30 mg, Waters, USA) を用い、加圧することで溶媒を排出した。初めにカラムを MeOH 1 mL で洗浄し、10% (v/v) MeOH 1 mL で平衡化させた。カラムにサンプル全量を 1 mL ずつ導入し、10% (v/v) MeOH 1 mL で不純物を洗い流した。続いて 0.1% (v/v) ギ酸を含む 80% (v/v) EtOH 1 mL で溶出した。溶出画分を濃縮乾固し 150  $\mu\text{L}$  の MeOH に溶解させた。この溶液を WHATMAN 0.2  $\mu\text{m}$  PTTE filter でろ過した後、LC-MS 分析用サンプルチューブ (Waters, USA) へ移した。

#### 2-2-8. LC-MS/MS による ABA および PA の分析と定量

化合物の分析には LC-MS/MS (Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometer; Waters, USA) を用いた。LC および MS 条件は以下に示すように行った。ABA、*d*<sub>6</sub>-ABA、PA の標品の保持時間と比較することでそれぞれのピークに含まれる化合物を同定した。*d*<sub>6</sub>-ABA を用いた内部標準法により ABA 濃度の定量を行い、サンプル新鮮重あたりの ABA 濃度を算出した。また PA は PA 標準品を用いて m/z 279 > 179 のピークエリアから絶対検量線を作成することでサンプル新鮮重あたりの PA 濃度を算出した。各条件において独立した 3 個体を用いて実験を行い、得られた分析値から平均値と標準偏差を算出した。

#### LC 条件

カラム: YMC-UltraHT Hydrosphere C18 100 × 2.0 mm、30°C

溶媒: 30% (v/v) (0-2 min)、30-60% (v/v) (2-12 min)、100% (v/v) (12-16 min) MeOH (0.1% (v/v) ギ酸)

流速: 0.2 mL min<sup>-1</sup>

#### MS 条件

ESI negative mode

Capillary (kV) : 2.8

Source temperature (°C) : 120

Desolvation temperature (°C) : 350

Cone gas flow (liter h<sup>-1</sup>) : 50

Desolvation gas flow (liter h<sup>-1</sup>) : 550

Collision energy (eV) : 20

MRM transition (m/z) : 279 > 179 (PA)、263.2 > 153 (ABA)、269.2 > 159 (*d*<sub>6</sub>-ABA)

#### 2-2-9. 気孔の ABA 感受性試験

ABA を EtOH に溶解し 378 mM (500 μg mL<sup>-1</sup>) ストック溶液を調製した。この溶液を EtOH と精製水で希釈し 1.89 mM および 0.189 mM ABA 水溶液 (0.5% (v/v) EtOH) を調製した。植物材料には Uninfected sorghum、*S. hermonthica* 接種後 4 週目の Infected sorghum および *S. hermonthica* を用いた。植物体は測定前に相対湿度 55- 65% (v/v)、明所 28°C の測定環境で 2 時間以上順化させ、その後 2 時間毎に蒸散速度の測定を行った。2 回目の測定の直後 ABA 水溶液 3 mL を植物地上部に噴霧し、引き続き 6 時間後まで同様に蒸散速度の測定を行った。それぞれの実験条件につき、独立した 3 つのライゾトロンで生育した植物体を用いて測定を行い、平均値と標準偏差を算出した。

#### 2-2-10. 寄生植物種子に含まれる ABA・PA の抽出および精製

*S. hermonthica* および *O. minor* 種子に含まれる ABA および PA を定量するため、それぞれの種子について以下のようなコンディショニング処理および発芽処理を行った。洗浄後の寄生植物種子 10 mg を 2 mL 容ボールミル用マイクロチューブに測りとった。100% (v/v) EtOH 500  $\mu$ L を加え振とうし、種子の表面を滅菌した。5 分間の遠心分離によって種子を沈殿させ、上清の 100% (v/v) EtOH を取り除いた。種子を滅菌水 500  $\mu$ L で 4 回洗浄し、最後に 20  $\mu$ L 容ピペットマンで十分に水を取り除いた。チューブをパラフィルムで密閉し、それぞれの種子に適した温度と時間でコンディショニング処理を行った。コンディショニング処理開始後 GR24 水溶液 500  $\mu$ L を処理し 5 分間振とうした。5 分間の遠心分離によって種子を沈殿させ、ピペットマンで適度に上清を取り除いた。パラフィルムで密閉し、コンディショニング処理と同じ条件下で発芽を誘導した。*S. hermonthica* 種子は 8 日間のコンディショニング処理を行い、1.0  $\mu$ M GR24 によって 1 日間発芽処理を行った。*O. minor* 種子は 7 日間のコンディショニング処理を行い、3.0  $\mu$ M GR24 によって 4 日間発芽処理を行った。種子はマイクロチューブ内にジルコニウムボールを入れた後、液体窒素に浸漬し凍結させることでサンプリングした。

凍結した種子をボールミルによって破碎した。MeOH 500  $\mu$ L を加えボルテックスミキサーで十分に攪拌し、5 分間の遠心分離によって沈殿と MeOH 抽出液に分けた。マイクロチューブ 5 本分 (乾燥種子 50 mg 分) の MeOH 抽出液を 1 つの 25 mL ナスフラスコに回収した。この操作を合計 4 回繰り返し、MeOH 抽出液を得た。エバポレーターで濃縮乾固し、次の抽出操作まで室温で保管した。精製の直前にナスフラスコに内部標準として *d*<sub>6</sub>-ABA 水溶液を 10  $\mu$ L 加えた。ABA の精製と分析は 2-2-6~8 に記す通り行った。得られた定量結果からコンディショニング前の種子乾燥重量あたりの化合物量を算出した。それぞれの条件に付き、独立した 5 つの抽出液を用いて実験を行い平均値と標準偏差を算出した。

#### 2-2-11. ABA による植物種子発芽阻害試験

寄生植物種子の発芽に対する ABA の影響を調べるために、以下のように発芽試験を行った。 $\phi$ 90 mm プラスチックシャーレに  $\phi$ 90 mm の滅菌ガラス繊維ろ紙を敷き、滅菌水で十分に湿潤させた。その上に  $\phi$ 10 mm の滅菌ガラス繊維ろ紙のディスクを敷き詰め、1 つのディスクにつき約 50 粒の寄生植物種子を播種した。パラフィルムでシャーレを密封し、暗所のインキュベーターでコンディショニング処理を行った。コンディショニング処理後、種子の乗ったディスクを  $\phi$ 90 mm プラスチックシャーレに並べ、ABA 水溶液 10  $\mu$ L と発芽刺激物質を含む水溶液 10  $\mu$ L を混合して処理した。シャーレ内の乾燥を防ぐため 4 つ折りにした  $\phi$ 30 mm 普通ろ紙を滅菌水で十分に湿潤させ、シャーレの中央に置いた。シャーレをパラフィルムで密封し、暗所のインキュベーターで発芽処理を行った。植物種子毎のコンディショニングおよび発芽処理は Table 2 に示した条件で行った。発芽処理後ディスク一枚当たりの発芽率をカウントした。一条件に付き独立した 5 枚のディスクの発芽率を用いて平均値と標準偏差を算出した。

シロイヌナズナ種子の発芽に対する ABA の影響を調べるために、以下のように発芽試験を行った。φ90 mm プラスチックシャーレに同径の滅菌ガラス繊維ろ紙を敷き、滅菌水で十分に湿潤させた。その上に φ10 mm の滅菌ガラス繊維ろ紙のディスクを敷き詰めた。1つのディスクにつきシロイヌナズナ種子約 50 粒を播種した。パラフィルムでシャーレを密封し、暗所 4°C で低温処理を行った。低温処理後 2 日目の種子が乗ったディスクを φ90 mm プラスチックシャーレに並べ、ABA 水溶液 10 μL と滅菌水 10 μL を混合して処理した。シャーレ内の乾燥を防ぐため 4 つ折りにした φ30 mm 普通ろ紙を滅菌水で十分に湿潤させ、シャーレの中央に置いた。シャーレをパラフィルムで密封し、暗所、25°C で発芽処理を行った。発芽処理後 1 日目の種子についてディスク一枚当たりの発芽率をカウントした。一条件につき独立した 5 枚のディスクの発芽率を用いて平均値と標準偏差を算出した。

ソルガム種子の発芽に対する ABA の影響を調べるために、以下のように発芽試験を行った。φ90 mm プラスチックシャーレに同径の滅菌ガラス繊維ろ紙を敷き、滅菌水で十分に湿潤させた。さらに ABA 水溶液 を 1 シャーレにつき 1 mL 処理した。その上にソルガム種子約 20 粒を播種した。パラフィルムでシャーレを密封し、暗所 30°C で発芽処理を行った。発芽処理後 1 日目の種子についてシャーレ一枚当たりの発芽率をカウントした。一条件につき独立した 3 枚のシャーレの発芽率を用いて平均値と標準偏差を算出した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. *S. hermonthica* の ABA 生合成および蒸散速度

ライゾトロンを用いて 4 週間生育させることで葉が十分に展開した *S. hermonthica* を作出した (Fig. 2-1a)。蒸散速度を測定した結果、Infected sorghum の蒸散速度は Uninfected sorghum の約 20% まで低下していた。一方で *S. hermonthica* の蒸散速度は Uninfected sorghum の 10 倍、Infected sorghum の 40 倍高かった (Fig. 2-1b)。葉の中の ABA 濃度を比較すると Infected sorghum は Uninfected sorghum よりも ABA 量が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。一方で *S. hermonthica* の葉に含まれる ABA 量は Uninfected sorghum および Infected sorghum の約 10 倍高かった (Fig. 2-1c)。スーダンの野外条件で生育させた *S. hermonthica* についても宿主より高濃度の ABA を蓄積しており、その量はライゾトロンで生育させた個体の約 5 倍高かった (Fig. 2-1d, e)。

*S. hermonthica* の ABA 生合成能を検証するため、植物に寄生させずに生育させた *S. hermonthica* 独立培養個体を作成した (Fig. 2-1f)。*S. hermonthica* 独立培養個体は寄生個体と同様に ABA を蓄積していた。さらに独立培養個体を培地から取り出し乾燥ストレスを与えた結果、時間経過とともに ABA 蓄積量が 2.5 倍まで増加することが観察された (Fig. 2-1g)。このことから *S. hermonthica* は宿主に依存せず乾燥に応答して ABA を生合成することが明らかになった。

### 2-3-2. ABA に対する *S. hermonthica* の気孔応答

*S. hermonthica* の気孔の ABA 感受性を検証するため、ライゾトロンで生育させた植物体に対して ABA を処理し、蒸散速度の変化を測定した。Uninfected sorghum の蒸散速度は ABA 処理 2 時間後から著しく低下した。Infected sorghum の蒸散速度は Uninfected sorghum よりも低かったものの、ABA 処理 2 時間後から ABA 濃度依存的に低下した。一方で *S. hermonthica* の蒸散速度は ABA 処理 6 時間後まで高い蒸散速度を維持し、ABA 処理による有意な低下は認められなかった (Fig. 2-2)。このことから *S. hermonthica* の蒸散は ABA 処理に対して応答しないことが明らかになった。

### 2-3-3. *S. hermonthica* の種子における ABA 感受性および ABA 蓄積量の変化

*S. hermonthica* の ABA 感受性についてさらに検証するため、*S. hermonthica* を含めた 5 種類のハマウツボ科植物およびシロイヌナズナ、ソルガムの種子の発芽に対する ABA 処理の影響を調べた。その結果 *Orobanche minor*, *Orobanche crenata*, *P. aegyptiaca*, シロイヌナズナ、ソルガムの種子は ABA 処理濃度に依存して発芽率が低下した。一方で *S. hermonthica* の種子は 100  $\mu$ M ABA 処理時でも 80%以上の発芽率を維持していた。加えて、*Striga gesnerioides* の種子についても ABA 処理による発芽率の低下が認められなかった (Fig. 2-3a)。

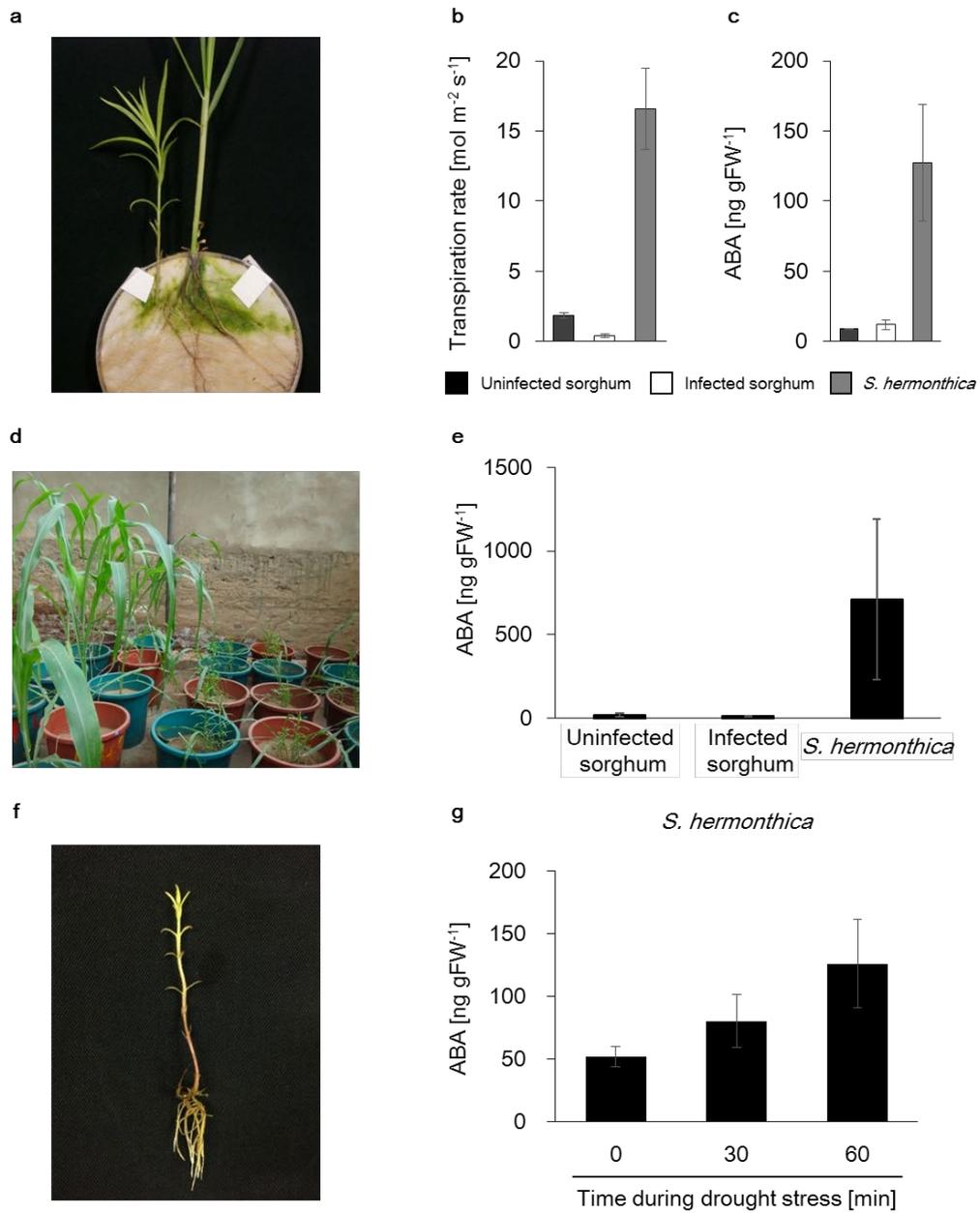
寄生植物の発芽率は発芽刺激物質の濃度に依存して変化する。そこで GR24 処理濃度が ABA 感受性へ与える影響を調べた。*O. minor* の発芽は GR24 処理濃度の増加に依存して発芽率が増加したが、100  $\mu$ M ABA 処理によって完全に抑制された。一方で *S. hermonthica* の発芽も GR24 処理濃度に依存して発芽率が増加した。しかしすべての GR24 処理濃度において、ABA 処理は *S. hermonthica* の発芽に影響しなかった (Fig. 2-3b, c)。発芽の過程に伴う種子の ABA 量の変化を観察すると、*O. minor* 種子の ABA 量はコンディショニング処理と GR24 処理によって 10%まで低下した (Fig. 2-3d)。一方でコンディショニング処理前の *S. hermonthica* 種子の ABA 量はコンディショニング処理前の *O. minor* 種子の 10%であり、コンディショニング処理によって変化しなかった。しかし GR24 処理によって発芽を誘導すると *S. hermonthica* 種子の ABA 量は 10 倍近く増加した (Fig. 2-3e)。

## 2-4. 考察

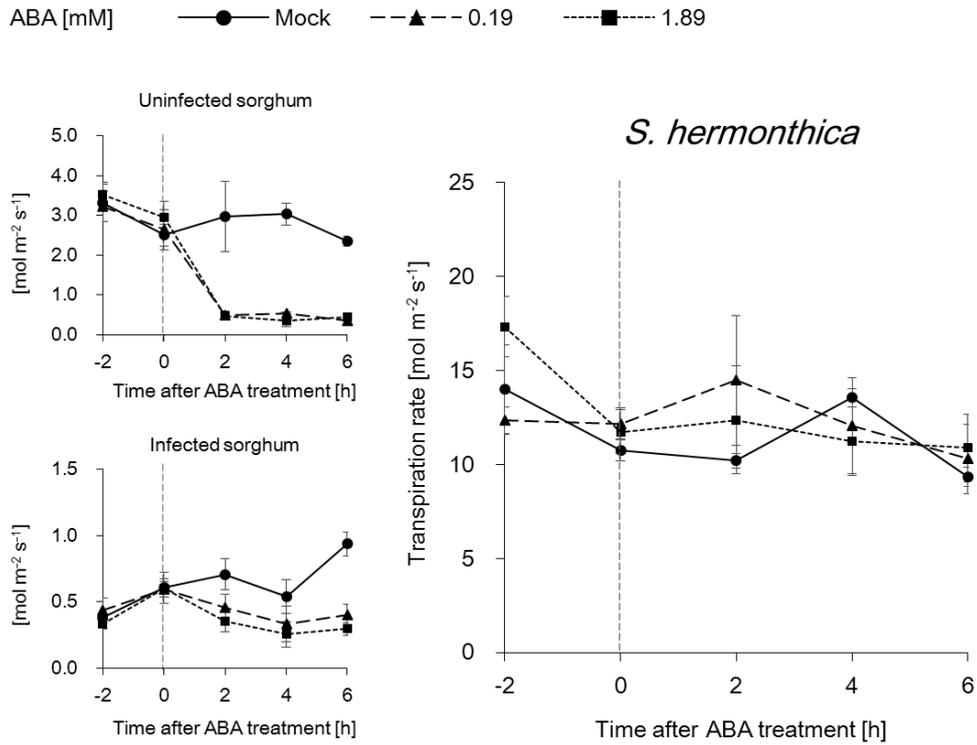
アフリカの野外環境で行われた先行研究では、*S. hermonthica* は蒸散速度が高い一方でその地上部に多量の ABA が蓄積していることが報告されており<sup>13,16</sup>、本研究においてもスーダンの環境で生育した *S. hermonthica* の葉に高濃度の ABA が蓄積していることを確認した。さらに人工気象器内で生育させた *S. hermonthica* の蒸散速度と ABA 量は野外環境と同様の傾向を示すことが明らかになった。スーダンの野外環境で生育した個体は人工気象器内で生育させた個体と比較して ABA をより蓄積しており、野外環境の乾燥ストレスによって ABA の蓄積が促進されたと考えられる。そこで *S. hermonthica* の独立培養個体を用いて乾燥ストレス負荷試験を行った結果、ABA 量が増加した。以上のことから *S. hermonthica* は乾燥に応答して ABA を生合成することが判明した。

一方で *S. hermonthica* に対する ABA 処理は蒸散速度に影響を与えなかった。本実験で処理した ABA 溶液の濃度は *S. hermonthica* の葉の内生濃度の約 400 倍および 4000 倍であり、ABA 応答を引き起こすために十分であると考えられる。加えて *S. hermonthica* の種子発芽は GR24 の濃度に依存したが、ABA 処理による発芽率の変化は認められなかった。以上の結果から *S. hermonthica* は ABA を生合成できるが感受性が低下していることで乾燥条件下でも蒸散が低下しないと結論付けた。ABA 受容に関わる遺伝子の欠損や変異は ABA 処理による気孔閉鎖や種子阻害に影響を与える<sup>23,24,31</sup>。*S. hermonthica* は種子発芽と気孔の両方が ABA に応答しなかったことから、ABA 受容および情報伝達機構に異常を持つことが強く示唆された。

*S. hermonthica* と同様に *S. gesnerioides* の種子発芽が ABA によって阻害されなかった一方で、*O. minor*、*O. crenata*、*P. aegyptiaca* の発芽は ABA によって阻害された。また *S. hermonthica* 種子はコンディショニング処理によって ABA 量が変わらなかったことに対し、*O. minor* 種子はコンディショニング処理および発芽処理によって ABA 量の減少が認められた。このことから *Striga* 属植物の種子発芽制御に ABA が関与しない一方で、*Phelipanche* 属、*Orobanch* 属植物の種子発芽は ABA に制御されることが示唆された。またハマウツボ科寄生植物で宿主から独立して生育できる *R. minor* は葉における ABA 応答性が低いことが報告されている<sup>12</sup>。これらの結果からハマウツボ科では植物ごとに ABA 感受性が異なっていることがわかる。ABA 応答を示した *Orobanch* 属、*Phelipanche* 属植物は篩管結合型の寄生植物であり<sup>7</sup>、Mannitol の蓄積による浸透圧差が養水分収奪を引き起こしていると考えられている<sup>8</sup>。一方で *Striga* 属や *Rhinanthus* 属植物はどちらも道管結合型の寄生植物である。これらの植物にとって ABA 感受性の低下は蒸散流を利用した養水分収奪にとって有利な形質であると考えられる。このことから、ABA 感受性の低下は道管結合型のハマウツボ科寄生植物の養水分収奪機構に伴って獲得された性質であることが示唆される。

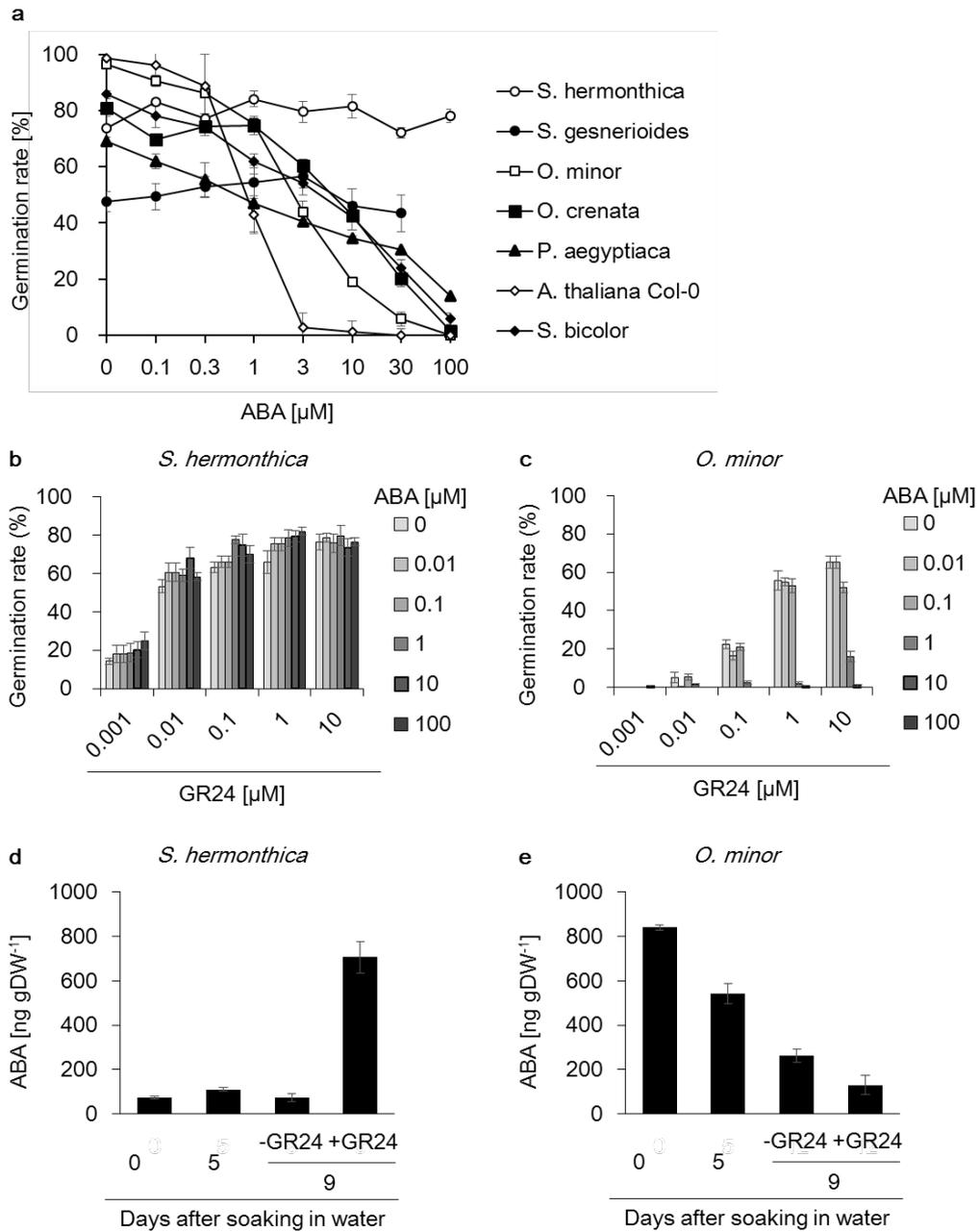


**Figure 2-1.** (a) Photograph of *S. hermonthica* parasitizing sorghum roots in a rhizotron system. (b) Transpiration rate and (c) ABA concentration of leaves grown in a rhizotron. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants). (d) Photograph and (e) ABA accumulation of sorghum and *S. hermonthica* parasitizing sorghum roots growing in open-air environment in Sudan. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants). (f) Photograph of *S. hermonthica* independent from the host growing on 1/2 MS medium. (g) The change of ABA levels in independent *S. hermonthica* during drought stress. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 2-2.**

Changes in transpiration rate of leaves from uninfected sorghum, infected sorghum and *S. hermonthica* after spraying each plant with 1.89 mM ABA (squares), 0.19 mM ABA (triangles), or 0.5% EtOH (circles). Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 2-3.**

(a) The effect of ABA treatment on germination of different plants spices. Each of plant seeds was treated with ABA solution at induction of germination. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=5$  biologically independent experiments). (b), (c) Effects of ABA treatment on *S. hermonthica* or *O. minor* germination triggered by GR24. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=5$  biologically independent experiments). (d), (e) Changes in ABA content of seeds from preconditioning to germination. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=5$  biologically independent experiments).

**Table 2.** Conditions for germination in each parasitic plant seeds.

Species	Conditioning [day]	Germination [day]	Temp. [°C]	Germination stimulants	conc. [ $\mu$ M]
<i>S. hermonthica</i>	8	1	30	GR24	1.0
<i>S. gesnerioides</i>	12	2	28	4-hydroxy-GR24	1.0
<i>O. minor</i>	6	5	25	GR24	3.0
<i>O. crenata</i>	6	3	25	GR24	3.0
<i>P. aegyptiaca</i>	6	5	25	GR24	3.0

## 第3章 *Striga hermonthica* の ABA 受容機構に関わるタンパク質の解析

### 3-1. 背景

第2章の結果から *S. hermonthica* は ABA 感受性が著しく低下していることが明らかになった。これまでの研究で植物の主たる ABA 応答メカニズムとして、相互作用にする3種類のタンパク質が構成する ABA 受容機構が明らかになっている (Fig. 3-1)<sup>22</sup>。ABA 非存在下では Group-A 型 PP2C は幅広い ABA 応答に関わる正の調節因子である SnRK2 ファミリータンパク質の機能を阻害することで ABA 情報伝達経路を抑制している。その PP2C による機能阻害は SnRK2 の自己活性化に関わるセリン (Ser) 残基を脱リン酸化することで発揮される<sup>32</sup>。一方で組織内の ABA 濃度が増加すると ABA 受容体である PYL が ABA を受容する<sup>24</sup>。この時 PYL のゲートループおよびラッチループと呼ばれる2つの構造が ABA の受容とともに変化し、Ser 残基がタンパク質表面に突出する<sup>33</sup>。この PYL-ABA 複合体は PP2C の SnRK2 脱リン酸化活性部位と結合することでその機能を不活化する<sup>25</sup>。PP2C から解放された SnRK2 は自身の Ser 残基をリン酸化することで活性化し、さらに下流の転写因子やイオンチャネルを活性化する<sup>26</sup>。これらの遺伝子の変異体解析の結果から、ABA による種子発芽と気孔の制御において PYL による ABA の受容から SnRK2 の活性化までの機構が共通している事がわかっている<sup>34-36</sup>。またシロイヌナズナには14種類の PYL (AtPYR1, AtPYL1~13) が存在しており、PYL 遺伝子群は機能の大部分が重複しているため、気孔と種子の完全な ABA 非感受性表現型は6重欠損変異体においてのみ観察される<sup>31</sup>。一方でシロイヌナズナには9種類の Group A 型 PP2C が存在しているが、植物体は一種の Group A 型 PP2C に対して PYL-ABA 複合体との結合能を欠失するような変異が導入されることで ABA 非感受性を示す<sup>24,37</sup>。そこで ABA 感受性欠損の原因として PYL と PP2C の相互作用に着目し、*S. hermonthica* の PYL (ShPYL) と PP2C (ShPP2C) のタンパク質機能の解析を行った。

### 3-2. 方法

#### 3-2-1. RNA-seq 解析とトランスクリプトームデータベースの作成

ソルガムに寄生した *S. hermonthica* および *S. hermonthica* 独立培養個体の組織 (約 50 mg) から Total RNA を抽出した。Total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いてプロトコールに従い抽出、精製を行った。RNA の純度は BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) を用いて評価した。得られた RNA 10 µg から Illumina TruSeq Prep Kit v2 (Illumina, USA) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA からショートリードの配列情報 (100 bp, pair-end) を Hiseq1000 および Hiseq1500 を用いて解析した。すべてのリードを CLC Genomics Workbench ver. 7 (CLC Bio, Japan) でアセンブリした。作成するコンテイングの最小の長さは 350 bp とし、アダプター配列を取り除いたショートリードをつなぎ合わせ、配列解析が不十分なリードは取り除いた。

### 3-2-2. *ShPYL* 遺伝子の探索とクローニングと系統解析

BLAST 検索を用いて *ShPYL* 候補遺伝子を探索した。候補配列の検索は、*AtPYR1* および *AtPYL1-13* のアミノ酸配列をクエリー配列として、本研究で構築した *S. hermonthica* のトランスクリプトームデータベースおよび Parasitic Plant Genome Project<sup>38</sup> を対象に行った。得られた各コンティグ配列情報から ORF 領域を抽出し、クローニング用プライマーを設計した。*S. hermonthica* の独立個体地上部と種子から得られた RNA に由来する cDNA を用いて PCR によって候補配列を増幅した。得られた増幅産物は pMD20-T (TAKARA BIO Inc., Japan) に挿入し、サンガーシーケンスによって配列情報を決定した。得られた *PYL* 候補遺伝子をアミノ酸配列に翻訳し、シロイヌナズナの *PYL* ファミリータンパク質と共に ClustalW software を用いてアライメント解析を行った。作成したアライメントデータを用いて Neighbor-Joining method により各配列の系統樹を作製した。系統樹の各ノードについて Bootstrap 値 (100 replicates) を算出した。

### 3-2-3. *ShPP2C* 遺伝子の探索とクローニングと系統解析

BLAST 検索を用いて *ShPP2C* 候補遺伝子を探索した。候補配列の検索は、シロイヌナズナ由来の Group A 型 *PP2C* のアミノ酸配列をクエリー配列として、本研究で構築した *S. hermonthica* のトランスクリプトームデータベースおよび Parasitic Plant Genome Project<sup>38</sup> を対象に行った。得られた各コンティグ配列情報から ORF 領域を抽出し、クローニング用プライマーを設計した。*S. hermonthica* の独立個体地上部と種子から得られた RNA に由来する cDNA を用いて PCR によって候補配列を増幅した。得られた増幅産物は pMD20-T (TAKARA BIO Inc., Japan) に挿入し、サンガーシーケンスによって配列情報を決定した。得られた *PP2C* 候補遺伝子をアミノ酸配列に翻訳し、シロイヌナズナの Group A, B, F 型 *PP2C* ファミリータンパク質と共に ClustalW software を用いてアライメント解析を行った。作成したアライメントデータを用いて Neighbor-Joining method により各配列の系統樹を作製した。系統樹の各ノードについて Bootstrap 値 (100 replicates) を算出した。

### 3-2-4. *PYL* 組み換えタンパク質の発現

pMAL2c のマルチクローニングサイトの C 末側に 6 個の His 残基を付け加えたベクター (pMAL2cHis6) および pET28 へ *AtPYR1*、*AtPYL2*、*AtPYL6*、*AtPYL9* の各 cDNA が挿入されたベクターコンストラクトは宇都宮大学岡本昌憲博士から供与いただいた。

*ShPYL1-8* の各 cDNA を pMAL2cHis6 へ挿入したベクターコンストラクトを BL21 (DE3) pLysS (Promega, USA) へ形質転換し、組み換え体を  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  アンピシリン LB プレートで選抜した。また *AtPYR1*、*AtPYL2*、*AtPYL6*、*AtPYL9* の各 cDNA が挿入された pET28 ベクターコンストラクトを BL21 (DE3) pLysS へ形質転換し、組み換え体を  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  カナマイシン LB プレートで選抜した。

得られた組み換え体コロニーをそれぞれの選抜マーカーに適合する抗生物質を加えた LB

培地 2 mL へ植菌した。18 時間後に菌液を抗生物質入り TB 培地 200 mL へ混合し、OD 値が 0.5 程度になるまで 30°C、180 rpm で振とう培養した。その後 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside が終濃度 0.3 mM になるように加え、15°C、180 rpm でタンパク質の発現を誘導した。16 時間後に菌液を回収し、遠心分離 (4°C、1,890 xg) で集菌した。得られた菌体を 10 mM imidazole Buffer A (pH 8.0) 5 mL によって懸濁した。菌体は分注し精製まで 80°C で凍結保存した。

菌体を 2 度の凍結融解とソニケーションによって破碎し、破碎液を 4°C、27,000 xg で 15 分間遠心分離した。得られた上清を 10 mM imidazole Buffer A (pH 8.0) で平衡化した Ni-NTA ビーズ 400  $\mu$ L を充てんしたポリプロピレンカラムに通した。30 mM imidazole Buffer A (pH 8.0) 12 mL でカラムを洗浄した後、250 mM imidazole Buffer A (pH 8.0) 400  $\mu$ L で 5 回溶出した。各溶出液のタンパク質濃度を Bradford 法によって定量し、最もタンパク質濃度が高い画分を回収した。菌体、破碎後の沈殿、上清および精製画分を SDS-PAGE に供することで目的タンパク質の発現と精製後の純度を確認した。

回収したタンパク質溶液を精製水で洗浄した Dialysis Membrane (Wako, Japan) へ封入し、タンパク溶液に対して 1000 倍量の TBS buffer で一晩透析した。得られたタンパク溶液に終濃度が 20% になるようにグリセロールを加えた後、濃度を測定した。タンパク質溶液の濃度は 20% グリセロール TBS buffer を用いて適宜調整し、実験に用いた

### 3-2-5. PP2C 組み換えタンパク質の発現

*ABI1* および *ShPP2C1-4* の各 cDNA を pGEX4T-1 (GE healthcare, USA) へ挿入した。このベクターコンストラクトを BL21 (DE3) pLysS へ形質転換し、組み換え体を 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> アンピシリン LB プレートで選抜した。

得られた組み換え体コロニーを 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> アンピシリン LB 培地 15 mL へ植菌した。18 時間後に菌液を抗生物質入り TB 培地 800 mL へ混合し、OD 値が 0.5 程度になるまで 30°C、180 rpm で振とう培養した。その後 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside と MnCl<sub>2</sub> 水溶液をそれぞれ終濃度 0.3 mM、4 mM になるように加え、15°C、180 rpm でタンパク質の発現を誘導した。16 時間後に菌液を回収し、遠心分離 (4°C、1,890 xg) で集菌した。得られた菌体を 10 mM MnCl<sub>2</sub> TBS buffer (pH 7.4) 10 mL によって懸濁した。菌体をソニケーションによって破碎し、破碎液を 4°C、27,000 xg で 15 分間遠心分離した。得られた上清を Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare, USA) 1 mL を充てんし、10 mM MnCl<sub>2</sub> TBS buffer (pH 7.4) 30 mL で平衡化したポリプロピレンカラムに通した。10 mM MnCl<sub>2</sub> TBS buffer (pH 7.4) 30 mL でカラム吸着物を洗浄した後、Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM reduced glutathione, pH 8.0) 1 mL で 5 回溶出した。各溶出液について、*p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) に対する脱リン酸化反応によって酵素活性 (反応組成は Table. 3-1, 3-2 に記す) を、Bradford 法によってタンパク質濃度を定量し、最もタンパク質濃度が高い画分を回収した。菌体、破碎後の沈殿、上清および精製画分を SDS-PAGE に供することで目的タンパク質の発現と精製後の純

度を確認した。

回収したタンパク質溶液を精製水で洗浄した Dialysis Membrane (Wako, Japan) へ封入し、タンパク溶液に対して 1000 倍量の 10 mM MnCl<sub>2</sub> TBS buffer (pH 7.4) で一晩透析した。得られたタンパク質溶液に終濃度が 20%になるようにグリセロールを加えた後、濃度を測定した。タンパク質溶液の濃度は 20%グリセロール 10 mM MnCl<sub>2</sub> TBS buffer (pH 7.4) を用いて適宜調整し、実験まで-80°Cで凍結保存した。

### 3-2-6. PP2C 活性測定試験

終濃度 100 nM の PP2C, 300 nM の ABA 受容体および ABA を含む反応溶液 80 μL をプレートリーダー上に調製した。ABA DMSO 溶液は終濃度 0, 0.1, 1.0, 10, 50, 100, 1000, 10,000, 50,000 nM となるように添加した。また ABA 受容体を加えない場合は終濃度が 300 nM となるように BSA を添加した (Table 3-3)。その後、5 mM の 4-methylumbelliferyl phosphate (4MUP; Thermo Fisher Scientific) を含む基質溶液 20 μL (Table 3-4) を添加した。直ちにマイクロプレートリーダー (Corona Electric, Japan) によって 335 nm の励起光に対する 460 nm の蛍光強度を、反応直後から 270 秒間、90 秒ごと測定した。各条件において 270 秒間での蛍光強度の増加量を算出した。すべての値は、用いた PP2C 毎に、ABA 受容体を加えない場合での蛍光強度の増加量を 100 とした時の相対活性へと変換した。また下記に示す式を用いて 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

$$IC_{50} [nM] = (50 - A_n) * (C_n - C_{n+1}) / (A_n - A_{n+1}) + C_n$$

A<sub>n</sub>: 50%相対活性 [%]

C: ABA 濃度 [nM]

n: 50%以上かつ最も 50%に近い相対活性値を示した反応系

n+1: n の次に ABA 濃度が高い反応系

すべての酵素反応条件において 3 つの異なる反応溶液を用いて実験を行い、相対活性値へ変換した後、平均値と標準偏差を算出した。

### 3-2-7. 定量 PCR による *ShPYL* および *ShPP2C* 発現量解析

2-2-3.に示すように *S. hermonthica* 種子 50 mg をコンディショニング処理した。コンディショニング処理後 7 日目に 1 μM GR24 または精製水を 3 mL 処理し一晩インキュベートした。コンディショニング処理後 5 日目、7 日目、9 日目の種子および GR24 によって発芽が誘導された実生をそれぞれ回収し、RNA の抽出まで-80°Cで凍結保存した。また 2-2-3.および 2-2-9.に示すように *S. hermonthica* の 4 週齢寄生個体の作出と植物体への ABA 処理を行った。処理 2 時間後に最上位展開葉を約 50 mg 回収し、RNA の抽出まで-80°Cで凍結保存した。*S. hermonthica* の種子および葉の組織から RNeasy Plant Mini Kit. Total RNA (Qiagen,

Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA ( $> 10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) を鋳型に ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Japan) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA 溶液を鋳型にした RNA 量が  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  となるように希釈した。また *ShPP2C* および *ShPYL* 発現用ベクターコンストラクトを TE buffer を用いて希釈し、 $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-19} \text{ M}$  の検量線溶液を調製した。*ShUBQ* の検量線溶液には ShUQB qPCR プライマー (Table 3-2) による増幅断片を pMD19 (TAKARA Bio Inc., Japan) へ導入したベクターコンストラクトを用いた。

PCR 反応には GeneAce SYBR qPCR Mix  $\alpha$  No ROX (Nippon Gene, Japan) を用い、LightCycler Nano system (Roche, Swiss) によって増幅と検出を行った。PCR 反応は  $95^\circ\text{C}$  10 分間の後、3 step amplification ( $95^\circ\text{C}$  10 秒間、 $60^\circ\text{C}$  10 秒間、 $72^\circ\text{C}$  15 秒間) を 45 サイクル行うことで発現量解析を行い、 $95^\circ\text{C}$  30 秒間でプレインキュベートした後、 $60^\circ\text{C}$  から  $95^\circ\text{C}$  まで  $0.1^\circ\text{C s}^{-1}$  で温度を上げながら融解曲線解析を行った。Cq 値の算出には LightCycler Nano software ver. 1.1 (Roche, Swiss) を用いた。検量線溶液の解析結果から各遺伝子の検量線を作成し、各 cDNA 溶液中の転写産物量を算出した。すべての実験条件において 3 つの異なる cDNA を用いて実験を行い、転写産物量へ変換した後、平均値と標準偏差を算出した。解析に用いたプライマーは Table 3-2 に示した。

### 3-2-8. 植物材料

シロイヌナズナ ABA 感受性欠損変異体である *abil-1c* の種子は岡山大学平山隆志教授から供与された。

### 3-2-9. シロイヌナズナの形質転換

*ShPP2C1*、*ShPP2C3*、*ABII* を *ABII* 由来のプロモーター制御下で発現させるため、*ABII* の転写開始点、*4xMYC*、導入する PP2C 配列および 3'-UTR 領域をシロイヌナズナのゲノム DNA および PP2C 発現用ベクターを鋳型として PCR によって増幅した。PCR による各断片の増幅には以下に示すプライマーを用いた。下線部で示した配列はバックボーンベクターである pMD99 へ導入するための領域を示している；

*ABII* promoter

Fwd: 5'-TCTAGAGGATCCCCGGGTACGGCCCTCTAAGAGCCTTTTAATGCCTA-3'

Rev: 5'-TAACGGTAAAGATTTGATCTTTTTCTCTGGTTGTG-3'

*4xMYC*

Fwd: 5'-AGATCAAATCTTTACCGTTAATGAGCAACGGTGAACAAAAGCTA-3'

Rev: 5'-GAATCCGGGGATCCACGGCTACCGTTCAAGTCTTCCTCG-3'

*PP2Cs* in pGEX-4T-1

Fwd: 5'-GAACGGTAGCCGTGGATCCCCGGAATTC-3'

Rev: 5'-CCTCTCTGCCGCGCCGCTCGAGTCGAC-3'

ABI 3'-UTR

Fwd: 5'-GTCGACTCGAGCGGCCGCGGCAGAGAGGGTCCTTTTTCTTAATT-3'

Rev: 5'-GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGATTCCCCCACTTGCTAACTAGA-3'

これらの PCR 産物を KpnI と SpeI で制限酵素処理によって開裂させた pMD99 に Gibson Assembly Master Mix (New England BioLabs, USA) を用いて導入した。

作成したベクターコンストラクトを *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 に対してエレクトロポレーション法によって形質転換した。この *A. tumefaciens* をフローラルディップ法によって野生型のシロイヌナズナ (*Col-0*) へ感染させた。T1 形質転換体を  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ハイグロマイシンおよび  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  を含む寒天培地で選抜した。それぞれの形質転換体について自家交配によってホモ体になったおおよそ 18 系統の T3 を用いて生化学的解析を行った。

### 3-2-10. 種子発芽阻害試験

シロイヌナズナ種子を 20% (v/v) NaClO, Tween 20 を含む溶液で 10 分間滅菌した後、滅菌水で 4 回洗浄した。滅菌した種子を 0.1% 寒天溶液に懸濁し、各濃度の ABA を含む 1/2 MS 固形培地 (0.75% 寒天, 0.5% sucrose) へ播種した。種子は暗所 4°C で 4 日間置いた後、明所 22°C へ移動させた。明所へ移動させた 4 日後に発芽種子の様子を観察し、写真を撮影した。すべての実験条件において 3 つの異なる系統の形質転換体を用いて実験を行い、代表的な一つの結果を示した。

### 3-2-11. 形質転換体の ABA 処理に伴う遺伝子発現変動

Plant Total RNA purification kit (GMBiolab, Taiwan) を用いて 10 日齢のシロイヌナズナから total RNA を抽出した。Total RNA  $2 \mu\text{g}$  から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Japan) を用い LightCycler 96 system (Roche, Swiss) によって増幅と検出を行った。PCR 反応は 95°C 10 分間の後、2 step amplification (95°C 10 秒間、60°C 10 秒間) を 40 サイクル行うことで発現量解析を行い、95°C 1 分間でプレインキュベートした後、60°C から 95°C まで  $0.1^\circ\text{C s}^{-1}$  で温度を上げながら融解曲線解析を行った。Cq 値の算出には LightCycler Nano software ver. 1.1 を用いた。検量線溶液の解析結果から各遺伝子の検量線を作成し、各 cDNA 溶液中の転写産物量を算出した。すべての実験条件において 3 つの異なる cDNA を用いて実験を行い、転写産物量へ変換した後、平均値と標準偏差を算出した。解析に用いたプライマーは Table 3-2 に示した。

### 3-2-12. サーマルイメージングによる葉温の測定

土を詰めたポットを用いてシロイヌナズナを明所 14 時間、暗所 10 時間、温度 22°C で 4

週間生育させた。明所 22℃, 相対湿度 60%の環境下における植物の葉の表面を RS00SR-S サーマルイメージカメラ (Nippon Avionics Co., Ltd., Japan) を用いて撮影した。葉の表面温度は InfReC Analyzer NS9500 Standard software (Nippon Avionics Co., Ltd., Japan) を用いて解析した。すべての実験条件において 5 つの異なる系統の形質転換体を用いて実験を行い、代表する一つの結果を示した。

### 3-2-13. 形質転換体に対する乾燥ストレス試験

2 週齢のシロイヌナズナを 75 g の湿潤した土 (プロミックス: バーミキュライト = 1:1) を詰めたポットへ移植し、明所 14 時間、暗所 10 時間、温度 22℃で 2 週間生育させた。灌水を 7 日間停止させることで乾燥ストレスを与えた後、灌水を行った。灌水 5 日後に植物の様子を撮影した。すべての実験条件において 5 つの異なる系統の形質転換体を用いて実験を行い、代表する一つの結果を示した。

### 3-2-14. SWISS MODEL を用いた ShPYL6 の推定立体構造の構築

ShPYL6 の推定立体構造は AtPYL1 の結晶構造 (PDB ID; 3jrs\_A)<sup>39</sup> を鋳型として、SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)<sup>40-44</sup> を用いて構築した。タンパク質立体構造の観察および解析には PyMOL 2.2 を用いた。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. ShPYL のアミノ酸配列の解析

*S. hermonthica* の組織に由来する RNA から 8 つの *ShPYL* 遺伝子を単離した。ShPYL の機能を推定する為にシロイヌナズナの PYL ファミリータンパク質とのアミノ酸配列の比較および系統解析を行った。シロイヌナズナの PYL ファミリータンパク質には ABA 非存在下で二量体を形成するもの (二量体型; AtPYR1, AtPYL1-3) と単量体で存在するもの (単量体型; AtPYL4-13) が存在し、系統的に二量体型 PYL は単一のクレードを形成する。この二つの受容体タイプは ABA や PP2C に対する親和性が異なり、ABA に対する様々な生理応答を制御していると考えられている<sup>45-47</sup>。アミノ酸配列の系統解析の結果、*S. hermonthica* から単離した 8 種類の PYL タンパク質の内、ShPYL1 と ShPYL2 が二量体型、ShPYL3-8 が単量体型の AtPYL タンパク質とクレードを形成した (Fig. 3-2)。加えて ShPYL1,2 は PYR1 において二量体の形成に関わる His60 が保存されていることから二量体型 PYL タンパク質であることが示唆された (Fig. 3-3)。

AtPYL1 のラッチループ上に存在する His142 とゲートループ上に存在する Pro115 は ABA との相互作用しそれぞれのループの立体構造を大きく変化させることで、PP2C との結合能の増加に関与する<sup>48</sup>。加えてリガンドポケット内の Phe88、Val110、Val193 は疎水性相互作用によって ABA を固定する<sup>49</sup>。一方で ABA の受容に伴う構造変化によってゲートループ上の Ser112 は分子表面へ突出し、PP2C の Glu148、Gly180 と相互作用する<sup>33,45,48,49</sup>。まずはリ

ガンド結合ポケットにおいて ABA と相互作用するアミノ酸残基に着目すると、ShPYL6 を除くすべての受容体においてこれらのアミノ酸残基が保存されていた。ShPYL6 では AtPYL1 において ABA と相互作用する His142 がグルタミン (Gln99)、Val110 がロイシン (Leu67)、Val193 がメチオニン (Met146) となっていた。一方で PP2C との相互作用に関わる残基について着目すると ShPYL6 を除くすべての受容体が必要なアミノ酸残基を保存していた。しかし ShPYL6 は AtPYL1 において PP2C と相互作用する Pro115 は保存されていた一方で、Ser112 がスレオニン (Thr69) に変化していた (Fig. 3-3)。

### 3-3-2. ShPYL の PP2C 活性阻害機能の解析

シロイヌナズナ由来の PYL (AtPYR1, AtPYL2, AtPYL6, AtPYL9) 存在下における ABA 濃度の変化に伴う ABI1 の脱リン酸化活性の変化を測定した。その結果、それぞれの PYL タンパク質を混合した場合に ABI1 の活性は ABA 濃度に依存して低下し、それぞれの受容体に対する IC<sub>50</sub> 値は先行研究<sup>c</sup>と同程度の値を示した (Fig. 3-4a, c)。本実験系を用いて ShPYL1-8 の PP2C 阻害能力を検証した結果、ShPYL6 を除く 7 つの ShPYL は ABA の濃度依存的に ABI1 の脱リン酸化活性を阻害した (Fig. 3-4b)。IC<sub>50</sub> 値は ShPYL3 と ShPYL7 が 1 nM 以下、ShPYL2, 5, 8 が 10~100 nM, ShPYL1, 4 が 100 nM~1 μM の濃度域に収まった (Fig. 3-4c)。このことからこれらの 7 つの ShPYL は ABA 受容体として PP2C の活性を阻害する機能を持つと考えられる。一方で ShPYL6 は ABA 非依存的に ABI1 の活性を完全に阻害した (Fig. 3-4b)。

### 3-3-3. *S. hermonthica* 種子および葉における ShPYL の発現量

種子発芽過程における ShPYL 遺伝子間での発現量を比較すると、主に ShPYL1, 3, 4 が高く、ShPYL2, 5, 7 は低かった。種子発芽過程における各遺伝子の発現量の変化に着目すると、ShPYL1, 3, 4 は発芽過程において増加傾向を示した一方で、ShPYL6, 7 は発芽前の種子でのみ発現していることが分かった (Fig. 3-5a)。葉における ShPYL 遺伝子間での発現量を比較すると、主に ShPYL2, 3, 4, 5 が高く発現していた。ABA の処理は各 ShPYL 遺伝子の発現量に影響を与えなかった (Fig. 3-5b)。

### 3-3-4. ShPP2C ファミリータンパク質のアミノ酸配列の解析

*S. hermonthica* の組織に由来する RNA から 4 つの ShPP2C 遺伝子を単離した。ShPP2C1-4 についてシロイヌナズナの Group A, B, F 型 PP2C タンパク質群と共に系統解析を行った (Fig. 3-6)。その結果、ShPP2C1 から 4 はすべて Group A に含まれることが明らかになった。このことからこれら 4 種類の ShPP2C は ABA 情報伝達経路に関与することが示唆された。ShPP2C1, 2, 3 は ABI1, 2, HYPERSENSITIVE TO ABA (HAB) 1, 2 と同じクレードに存在しており、ABA に対する種子発芽と気孔応答の両方に関与することが示唆された<sup>50</sup>。一方で

ShPP2C4 は ABA HYPERSENSITIVE GRMINATION (AHG) 1,3、HIGHLY ABA-INDUCED PP2C (HAI) 1,2,3 と同じクレードを形成していた。これらの遺伝子の欠損は種子発芽における ABA 応答性を低下させる一方で気孔応答には影響しない<sup>51,52</sup>。このことから ShPP2C4 は気孔の ABA 応答には関与しないことが示唆された。

これら 4 種類のアミノ酸配列を AtPP2C group A ファミリータンパク質と比較したところ (Fig. 3-7)、ShPP2C1-4 は PYL タンパク質と相互作用に関わるアミノ酸残基 (ABI1; Glu142, Gly180, Ile298, Trp300, Arg304) および脱リン酸化活性に必要な金属イオン配位に関わるアミノ酸残基 (ABI1; Gly177, Asp178, Asp347, Asp413) をすべて保存していた<sup>39,49</sup>。一方で ShPP2C1 は金属イオン配位に関わるアミノ酸残基をすべて保存していたが、ABI1 において PYL の相互作用に関わる Ile298 に相当するアミノ酸残基がメチオニン (Met312) になっていることが明らかになった。

### 3-3-5. ShPP2C の機能解析

PYL タンパク質存在下における ShPP2C1-4 の脱リン酸化活性を測定した。その結果、ShPP2C2-4 は PYL タンパク質存在下で ABA 濃度依存的に脱リン酸化活性が低下した。一方で AtPYL9 を除くすべての PYL 存在下で、50,000 nM ABA 添加した場合においても ShPP2C1 は 50%以上の脱リン酸化活性を維持しており、IC<sub>50</sub> 値が算出されなかった (Fig. 3-8a, b, Fig. 3-9)。特に AtPYR1、AtPYL2 および ShPYL1、2、4、6、7 存在下では ABA 濃度の変化に伴う ShPP2C1 の活性の変化は認められなかった。また ShPYL6 の濃度依存的な ShPP2C1 の脱リン酸化活性の変化を調べた結果、0.03 μM~3 μM の濃度域で ShPP2C1 の活性を 80%まで抑制したが、それ以上の活性阻害は認められなかった (Fig. 3-10)。一方で以下の受容体存在下では ABA 濃度依存的に脱リン酸化活性に変化が認められた。ShPYL3 存在下では ABA 濃度が 50~100 nM の間で ShPP2C1 の脱リン酸化活性の著しい低下が認められ、全体としてシグモイド様の変化が認められた。AtPYL9 と ShPYL8 存在下では ShPP2C1 の脱リン酸化活性は ABA 依存的に緩やかな脱リン酸化活性の低下が認められた。ShPYL5 存在下において ShPP2C1 の脱リン酸化活性は、0.1~100 nM ABA で一様に低下したのに対し、100~50,000 nM ABA 存在下ではむしろ増加した。

### 3-3-6. *S. hermonthica* 種子および葉における ShPP2C の発現量解析

ShPP2C1-4 の植物体における機能を推定する為に種子と葉における発現量を定量し、比較した。種子発芽過程における ShPP2C 遺伝子間での発現量を比較すると、ShPP2C1 が最も高く発現していることが明らかになった。各遺伝子の発現量の変化に着目すると、ShPP2C1-3 は種子の発芽に伴い発現量が増加したのに対し、ShPP2C4 は発芽とともに発現量が低下した (Fig. 3-11a)。

葉における ShPYL ファミリー遺伝子間での発現量を比較すると、0.5% EtOH 溶液を処理した場合では ShPP2C1 が最も高く発現していた。一方で ABA 処理によって ShPP2C2、

*ShPP2C4* の発現量は *ShPP2C1* と同等まで増加した (Fig. 3-11b)。

### 3-3-7. *ShPP2C1* の植物体内における機能の解析

*ShPP2C1* が植物体に与える影響を明らかにするため、*ShPP2C1* および *ABI1*, *ShPP2C3* を野生型 (WT) のシロイヌナズナへ導入した。ABA 存在下における発芽について検証した結果、WT は 0.5  $\mu$ M 以上の ABA 存在下で発芽が完全に抑制された一方で、ABA 非感受性変異体である *abil-1c* は 2.5  $\mu$ M ABA 存在下でも発芽が維持された。*ABI1* 導入株および *ShPP2C3* 導入株は ABA 存在下で発芽が阻害された。一方で *ShPP2C1* 導入株は ABA 存在下でも発芽がほとんど阻害されず、*abil-1c* と同様の表現型を示した (Fig. 3-12a)。ABA 応答した遺伝子の発現変動を観察するため、ABA 応答遺伝子である *RD29A* の発現量を定量した。WT および *ABI1* 導入株の幼苗は ABA 処理に反応して *RD29A* の発現が誘導された。一方で *abil-1c* では ABA 処理に対して WT ほどの *RD29A* の発現誘導は認められなかった。*ShPP2C1* 導入株についても ABA 処理時の *RD29A* 遺伝子の発現量が WT と比較して低く、*abil-1c* と同等まで低下していた (Fig. 3-12b)。植物体での蒸散の様子を観察するため、4 週齢の WT, *abil-1c*, *ABI1* 導入株および *ShPP2C1* 導入株の葉温を測定した。その結果 WT および *ABI1* 導入株と比較して、*ShPP2C1* 導入株の葉温は低く、*abil-1c* と同程度であった (Fig. 3-12c)。このことから、*ShPP2C1* 導入株は WT, *ABI1* と比較して活発に蒸散していることが示唆された。またこれらの植物の乾燥耐性を観察した結果、WT と *ABI1* 導入株は乾燥ストレス後に灌水によって復帰したが、*ShPP2C1* 導入株は *abil-1c* と同様に 7 日間の乾燥ストレスによって枯死した (Fig. 3-12d)。*ABI1* 導入株はすべての生理学的解析において WT と変化が認められなかったことから、PYL の制御を受ける PP2C の導入は植物体の ABA 感受性に影響を与えないことが示された。その一方で *ShPP2C1* 導入株では種子 ABA 感受性の低下、ABA に対する遺伝子の発現応答の低下および蒸散の活性化が引き起こされたことから、*ShPP2C1* は植物体内で ABA 感受性を低下させる機能を持つことが示された。

### 3-4. 考察

*ShPYL1-8* の系統解析によって、8 種類の *ShPYL* タンパク質の内、*ShPYL1* と *ShPYL2* が二量体型、*ShPYL3-8* が単量体型の *AtPYL* タンパク質とクレードを形成した。二量体型 *PYL* の一部を活性化するアゴニストは気孔閉鎖を誘導することから、二量体型 *PYL* は気孔応答に寄与することが示唆されている<sup>47</sup>。また *S. hermonthica* の葉では *ShPYL2-5* が発現していた。以上のことから、*ShPYL1, 2* が気孔において機能する可能性が示唆される。

*S. hermonthica* から見出した 8 種類の *PYL* タンパク質はすべて PP2C 阻害作用を有していた。また *ShPYL6* を除く 7 種類の *PYL* タンパク質は ABA 依存的に *ABI1* の脱リン酸化活性を阻害したことから、ABA 受容体としての機能を持つことが示された。一方で *ShPYL6* は ABA 非依存的に *ABI1* の脱リン酸化活性を阻害した。ABA 依存的に PP2C 阻害活性を示す *AtPYL1* では ABA が結合することで Ser112 が ABA によってポケット外へ押し出され

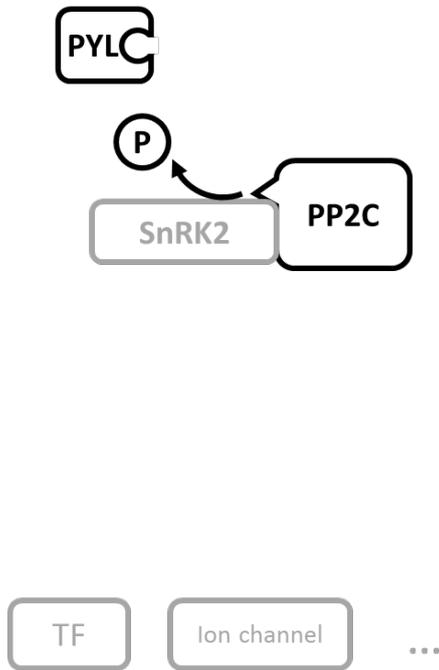
トループの反転とポケット入口の閉鎖を誘導する。同時に His142 が ABA のシクロヘキサン環の疎水性相互作用に誘引されることでラッチループを反転させ、ゲートループを抑え込む。これによって PYL のポケット外に向いた Ser112 が PP2C と相互作用し、PP2C の活性を阻害する<sup>33</sup>。一方で、AtPYL10 は ABA 非依存的に PP2C の活性を阻害することが知られている。AtPYL10 ではゲートループ領域に存在する Leu79 (AtPYL1: Val110) がポケット内の Ile59, Leu159 の側鎖と疎水性相互作用を形成することで、ゲートループを閉鎖型で安定していると考えられている<sup>53</sup>。ShPYL6 のアミノ酸配列を AtPYL1 および AtPYL10 と比較すると、AtPYL1 の Val110 に対応する残基が Leu67、ポケット内に存在する Val193 が Met146 となっていた。これにより ShPYL6 は Leu67 がポケット内の Ile47, Met146 との疎水性相互作用を形成し AtPYL10 と同様の機構で閉鎖型の構造を取っていると考えられる。SWISS MODEL を用いたモデリングの結果 (Fig. 3-13) から、ShPYL6 のリガンドポケットは AtPYL1 と比較してかさ高い疎水性側鎖を持つ Leu67, Gln99, Met146 によって小さくなっていた。さらに ShPYL6 では AtPYL2 の Ser112 (AtPYL10; Ser81) がよりかさ高い Thr 69 となっている。これらの結果から、ShPYL6 のリガンドポケットが小さくなったことで ABA との親和性が低下する一方で、かさ高い Thr69 がポケット外へ反転しやすくなっていることが示唆される。これにより ShPYL6 は ABA 非存在下でも閉鎖型構造を取るために、ABA 非依存的な PP2C 阻害機能を発現していると考えられた。

*S. hermonthica* から見出した 4 種類の Group A 型 PP2C はすべて脱リン酸化活性を持っていた。ShPP2C2-4 は PYL によって ABA 依存的に脱リン酸化活性が抑制された。その一方で ShPP2C1 の脱リン酸化活性は ShPYL1-8 によって低下させられなかった。このことから ShPP2C1 は PYL との相互作用が低下しており、ABA 存在下でも PYL による制御を受けないことが示された。さらに *ABI1* のネイティブプロモーターである *4xMYC* 制御下で *ShPP2C1* を発現させたシロイヌナズナの WT 植物は ABA 非感受性と活発な蒸散を示した。このことは ShPP2C1 が ABA の存在下でもシロイヌナズナの ABA 情報伝達経路を抑制していることを示している。シロイヌナズナの ABA 非感受性変異体である *ABA insensitive 1-1 (abi1-1)*, *ABA insensitive 2-1 (abi2-1)* は Group A サブファミリーに属する PP2C である *ABI1* および *ABI2* にアミノ酸置換変異を持つ (それぞれの変異タンパク質を *ABI1*<sup>G180D</sup>, *AtABI2*<sup>G168D</sup> と呼ぶ)<sup>37,54</sup>。このアミノ酸残基が変異した PP2C は PYL タンパク質との親和性が大きく低下している一方で、*SnRK2* に対する親和性は維持されている<sup>45,46,49</sup>。その為、ABA 存在下で他の PP2C の活性が抑制される中、脱リン酸化活性を維持している *ABI1*<sup>G180D</sup> および *AtABI2*<sup>G168D</sup> が *SnRK2* を阻害し ABA 情報伝達経路を負に制御すると考えられる<sup>24</sup>。また *abi1*, *abi2* は優性形質であるが、種子や葉における *ABI1*, *ABI2* の相対発現量はシロイヌナズナに 9 種類存在する Group A PP2C 遺伝子群全体の 10~20%に過ぎない<sup>55</sup>。このことから、他の正常な PP2C の存在にもかかわらず、PYL との相互作用を引き起こすような PP2C は種子発芽や気孔の制御における ABA 非感受性表現型を引き起こすと考えられる。*S. hermonthica* において *ShPP2C1* の相対発現量はコンディショニング処理後 7 日目の *S. hermonthica* 種子およ

び *S. hermonthica* の葉のどちらにおいても約 75%であった。これらの知見は ShPP2C1 が、ABI1<sup>G180D</sup> や AtABI2<sup>G168D</sup> と同様に、*S. hermonthica* の種子と葉における ABA 感受性の欠損を引き起こす可能性を支持している。以上の結果によって、*ShPP2C1* が *S. hermonthica* において ABA 非感受性の原因遺伝子であると考えられる (Fig. 3-14)。

一方で ShPP2C2-4 は PYL によってその活性が制御されており、ABA 情報伝達を制御する機能が保存されていた。これにより ShPP2C2-4 が ABA 情報伝達の調節因子としての役割を持つことが示唆される。ABA 処理は *S. hermonthica* の種子発芽や蒸散に影響を与えなかったが、ShPP2C4 の発現量を誘導した。また *abil-1c* および *ShPP2C1* 導入株では ABA 処理によって、WT と比較するとわずかであるが、*RD29A* の発現量が上昇した。これらの結果から、*S. hermonthica* は遺伝子発現レベルでは ABA に対して応答しており、その応答に ShPP2C2-4 が関与している可能性が考えられる。

- ABA



+ ABA

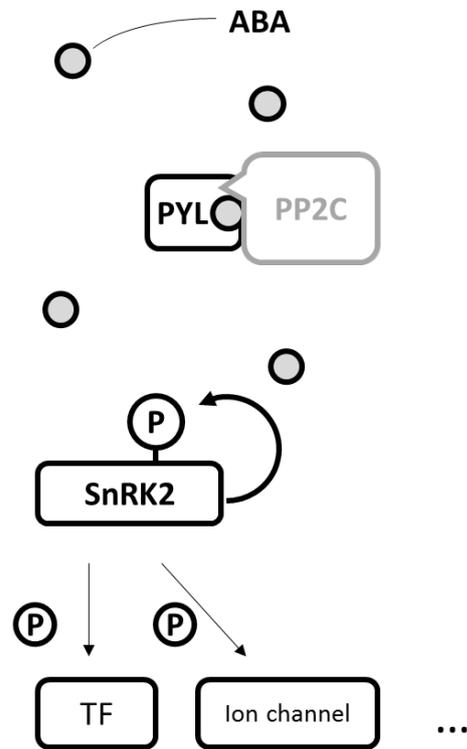
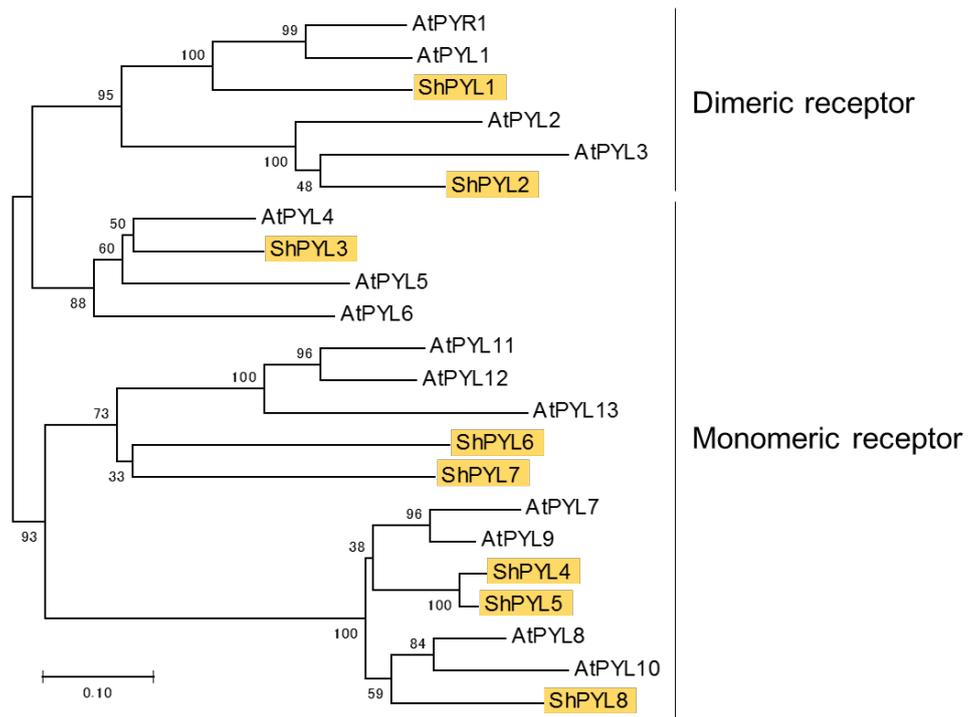
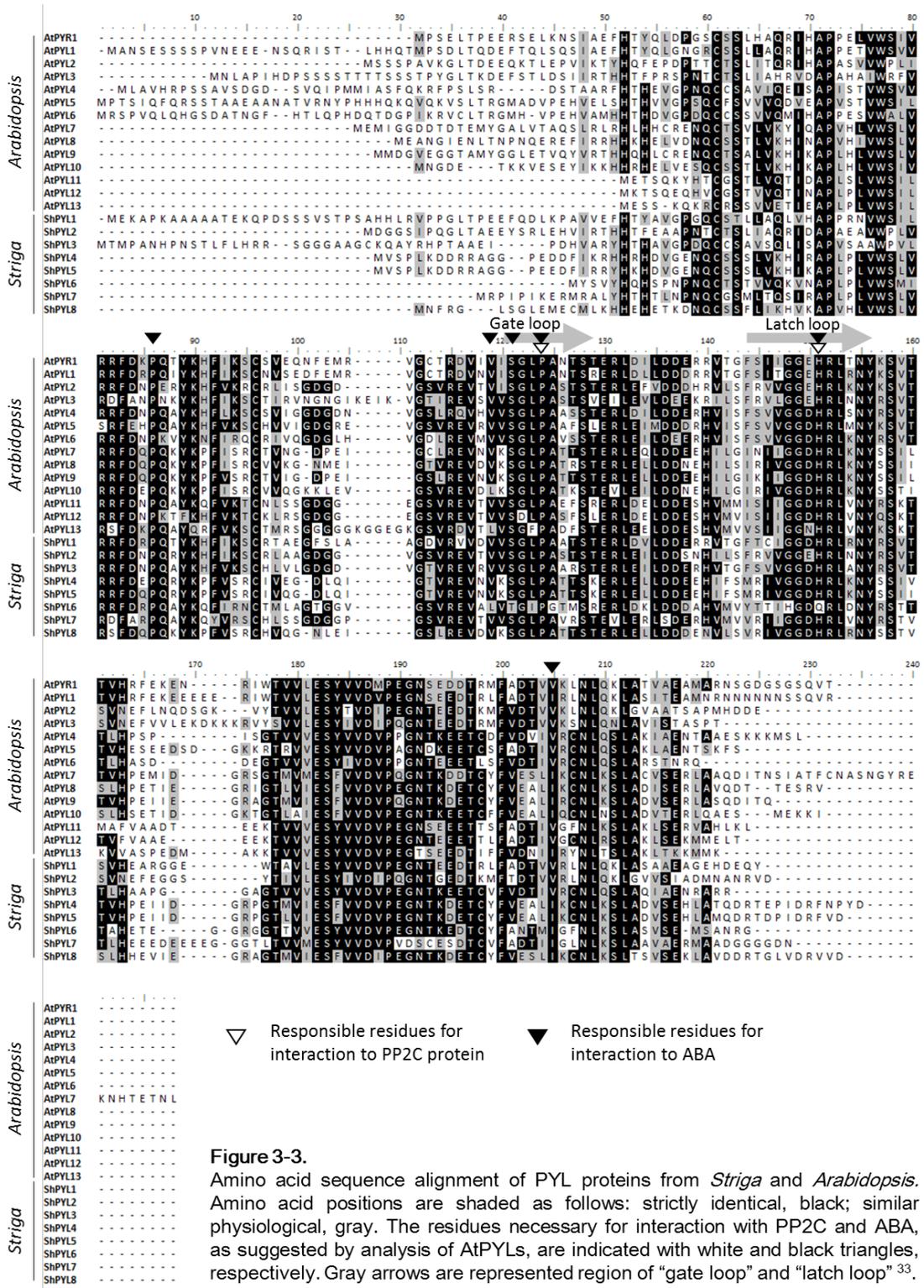


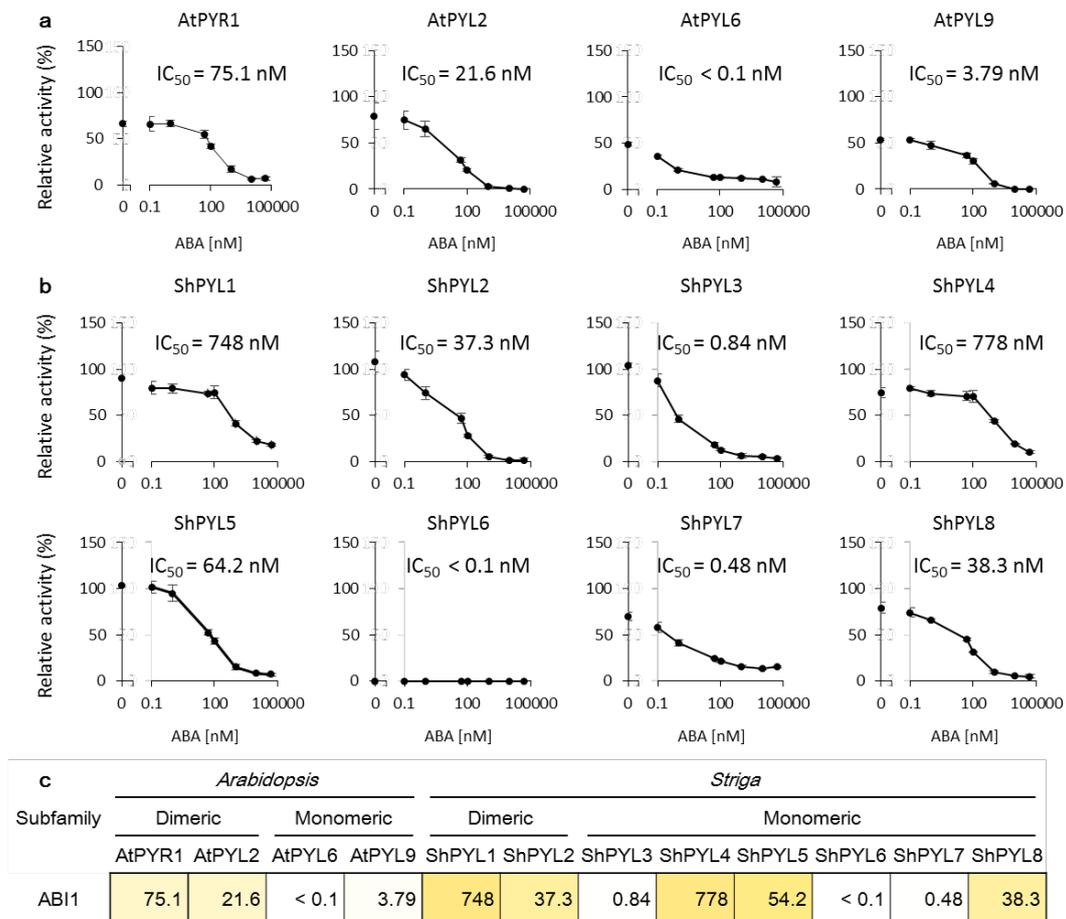
Figure 3-1. Proposed models of the major ABA signal pathway <sup>22</sup>.



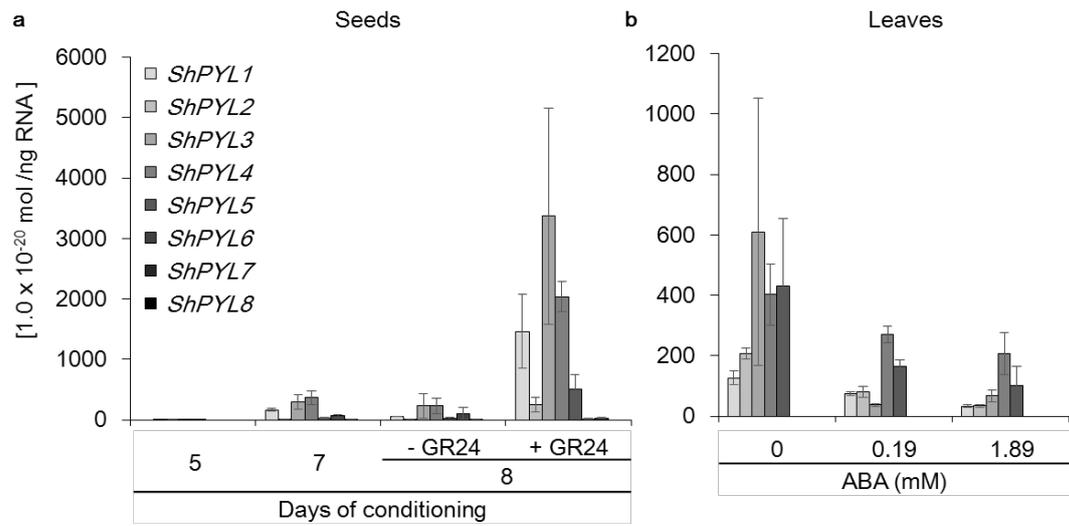
**Figure 3-2.** Phylogenetic tree of PYL proteins from *Striga* and *Arabidopsis*. ShPYLs are shown in orange. The phylogenetic tree is a neighbor-joining tree made using the MEGA 7.0.21 software. Bootstrap values of 100 replicates are indicated by each node.



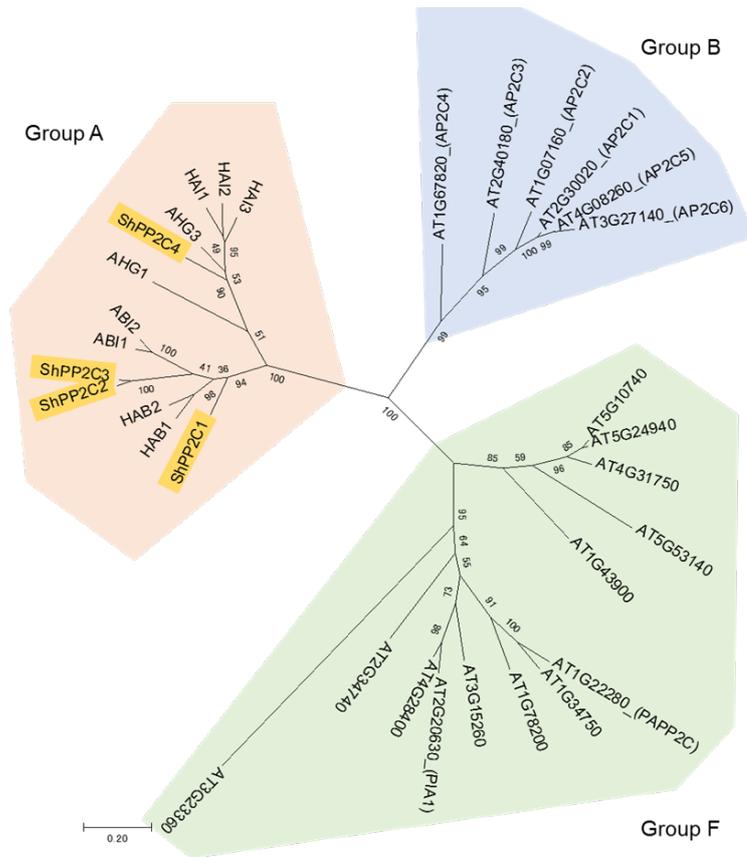
**Figure 3-3.** Amino acid sequence alignment of PYL proteins from *Striga* and *Arabidopsis*. Amino acid positions are shaded as follows: strictly identical, black; similar physiological, gray. The residues necessary for interaction with PP2C and ABA, as suggested by analysis of AtpPYLs, are indicated with white and black triangles, respectively. Gray arrows are represented region of "gate loop" and "latch loop"<sup>33</sup>.



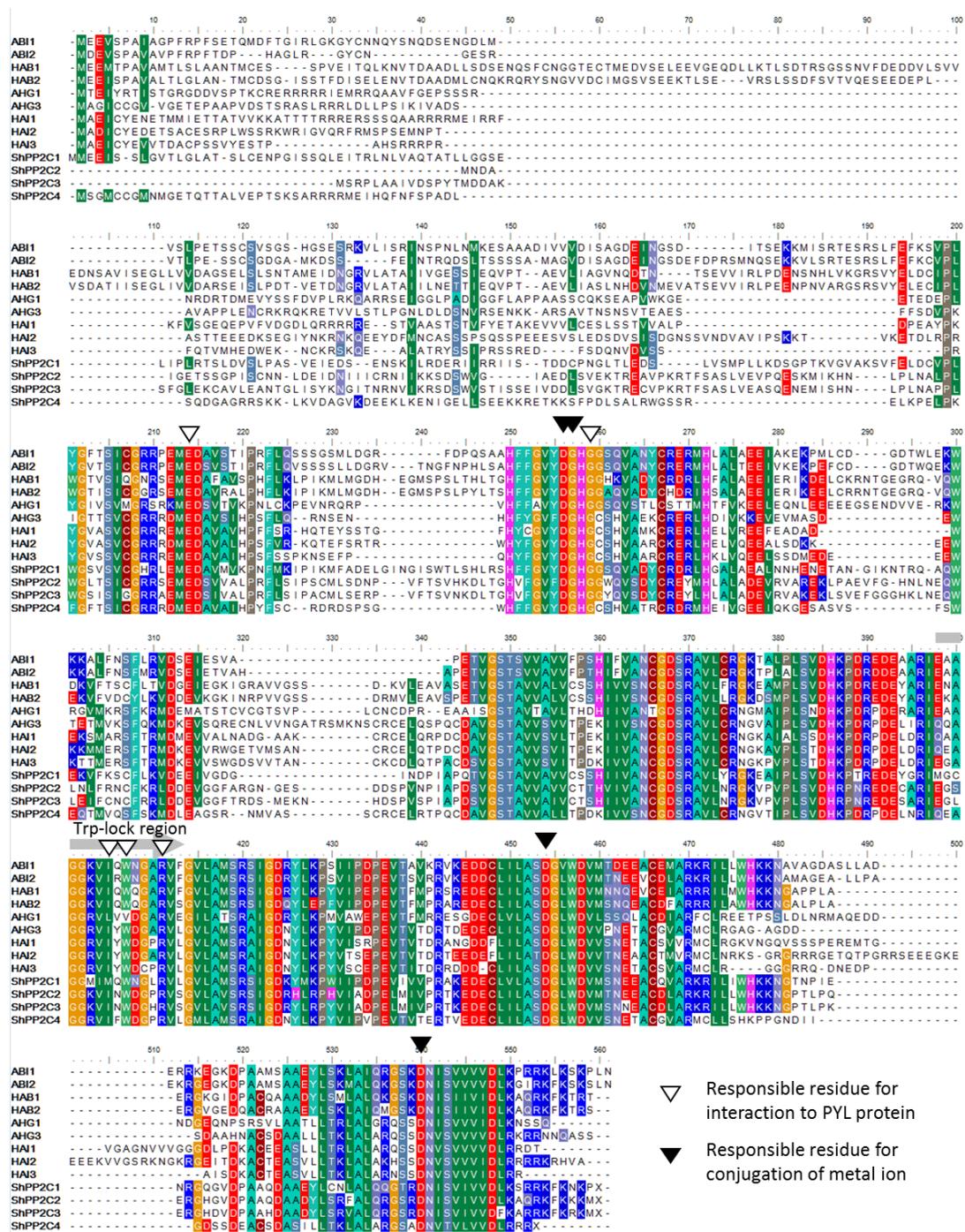
**Figure 3-4.** (a), (b) Dose-dependent inhibition of ABI1 phosphatase activity by PYLs and (c)  $IC_{50}$  values (nM) for ABA. Each reaction was conducted using 100 nM ABI1, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 50, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions and error bars represent S.D..



**Figure 3-5.** Expression levels of *ShPYL1-8* genes in (a) seeds and (b) leaves of *Striga* are provided as a bar graph, in which the vertical axis presents the number of transcript molecules of 1 ng RNA [ $1.0 \times 10^{-20}$  mol / ng RNA]. Numbers in the seed columns indicate days of conditioning; after 8 days of conditioning, the seeds were treated with 1.0  $\mu$ M GR24 for 24 h to induce germination or left untreated. The leaves were treated with ABA or 0.5% EtOH for 2 h. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 3-6.** Phylogenetic analysis of ShPP2Cs. Phylogenetic tree of ShPP2C1-4 constructed with amino acid sequences of AtPP2C group-A (red), group-B (blue), and group-F (green) proteins. ShPP2C proteins are shown in orange. The phylogenetic tree is a neighbor-joining tree made using the MEGA 7.0.21 software. Bootstrap values of 100 replicates are indicated by each node.

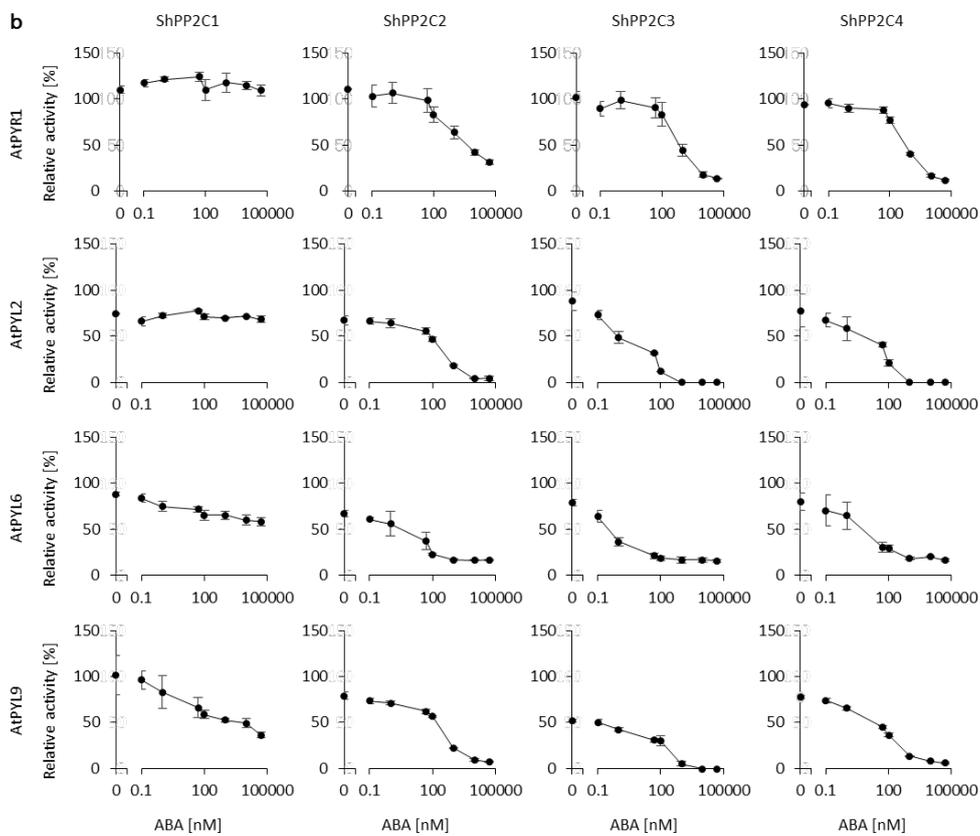


**Figure 3-7.** Amino acid sequence alignment of group-A PP2Cs from *Striga* and *Arabidopsis*. Amino acid positions similar physiologically are shaded. The residues necessary for interaction with PYL and conjugation of Metal ion for catalytic activity, as suggested by analysis of ABI1, are indicated with white and black triangles, respectively. Gray arrows are represented "Trp-lock region"<sup>55</sup>.

Subfamily	<i>Arabidopsis</i>				<i>Striga</i>							
	Dimeric		Monomeric		Dimeric				Monomeric			
	AtPYR1	AtPYL2	AtPYL6	AtPYL9	ShPYL1	ShPYL2	ShPYL3	ShPYL4	ShPYL5	ShPYL6	ShPYL7	ShPYL8
ShPP2C1	50000<	50000<	50000<	11357	50000<	50000<	50000<	50000<	50000<	50000<	50000<	50000<
ShPP2C2	6383	81.6	24.5	274	16145	326	17.9	25444	508	< 0.1	46.9	825
ShPP2C3	841	5.44	0.55	0.20	4688	33.6	0.26	4174	291	< 0.1	742	75.8
ShPP2C4	772	14.9	21.0	38.7	5337	25.6	0.22	4958	119	< 0.1	873	97.1

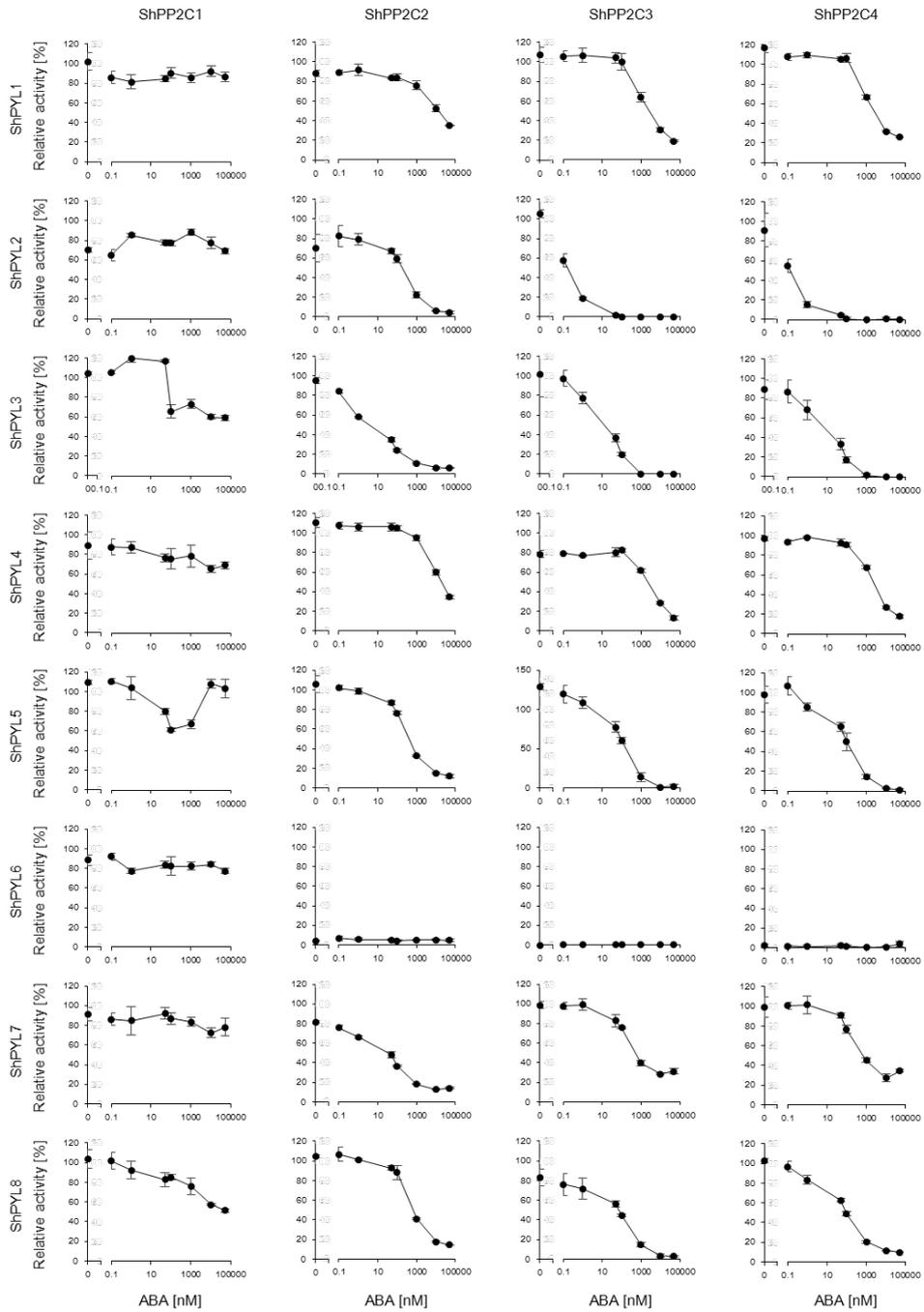
  

IC <sub>50</sub> [nM]	< 0.1	1	10	50	100	1000	10000	50000<



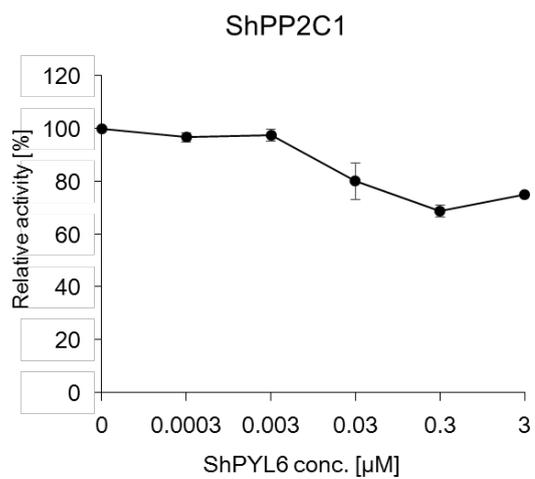
**Figure 3-8.**

**(a)** IC<sub>50</sub> values (nM) for ABA dose-dependent inhibition of ShPP2C phosphatase activity by PYLs. **(b)** Full ABA dose-response curves of each ShPP2C phosphatase activity under presence of AtPYLs. Each reaction was conducted using 100 nM ABI1, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 50, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions, and error bars represent S.D..



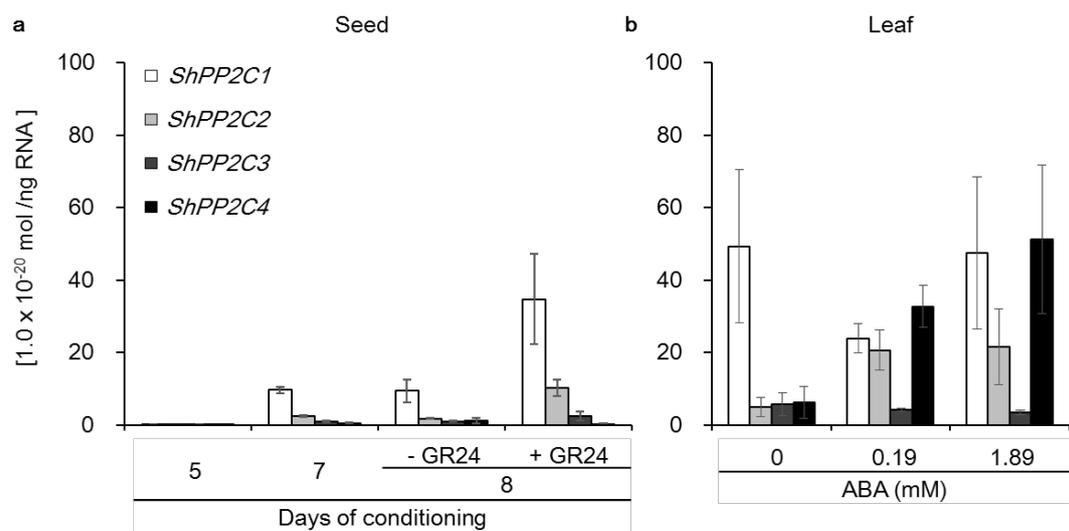
**Figure 3-9.**

Full ABA dose-response curves of each ShPP2C phosphatase activity under presence of AtPYLs. Each reaction was conducted using 100 nM ABI1, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 50, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions, and error bars represent S.D..

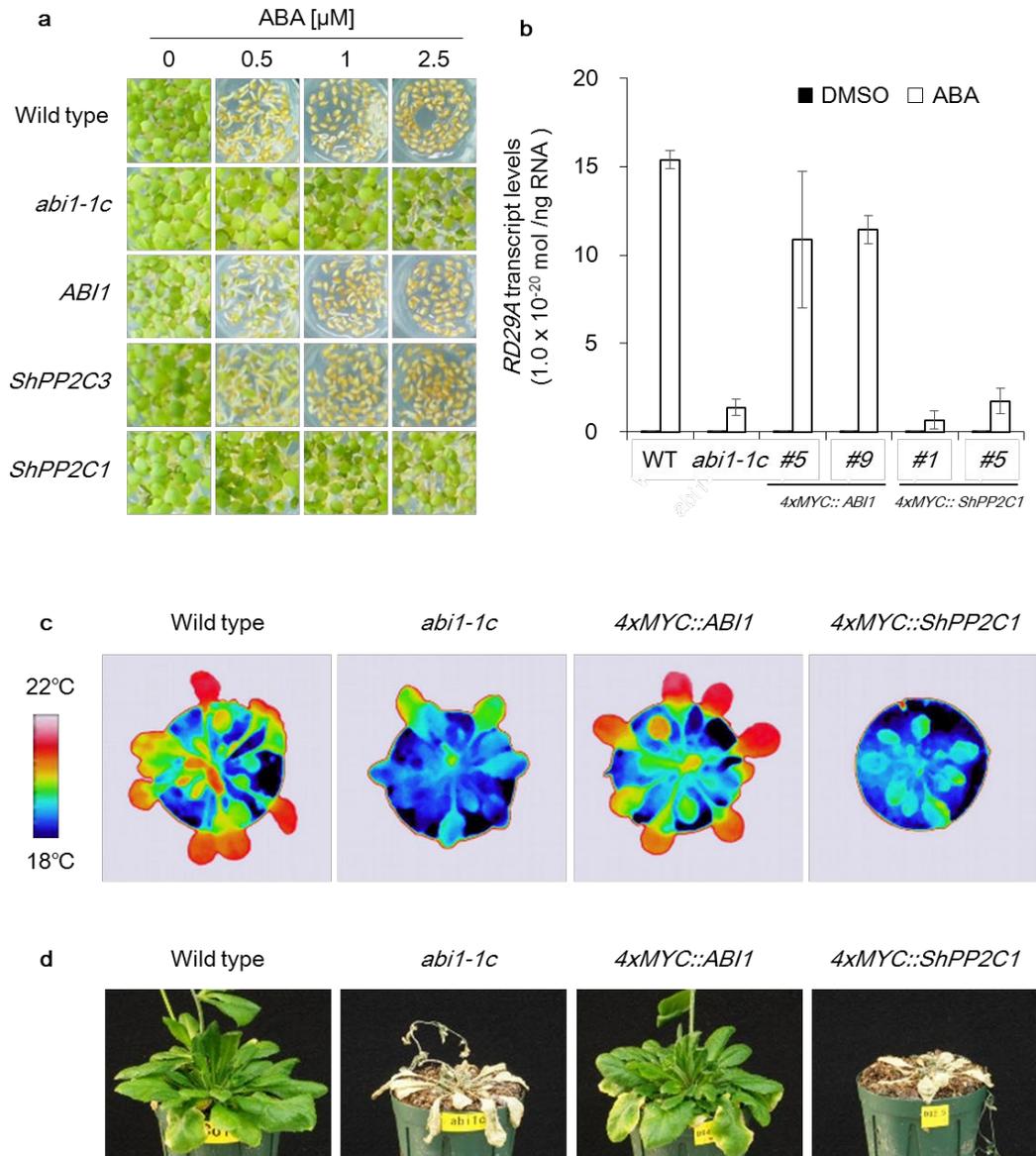


**Figure 3-10.**

ShPYL6 dose-response curve of each ShPP2C1 phosphatase activity. Each reaction was conducted using 100 nM ShPP2C1 and 0, 0.0003, 0.003, 0.03, 0.3 and 3  $\mu\text{M}$  ShPYL6. PP2C activity in the absence of ShPYL6 is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions. Error bars represent S.D..

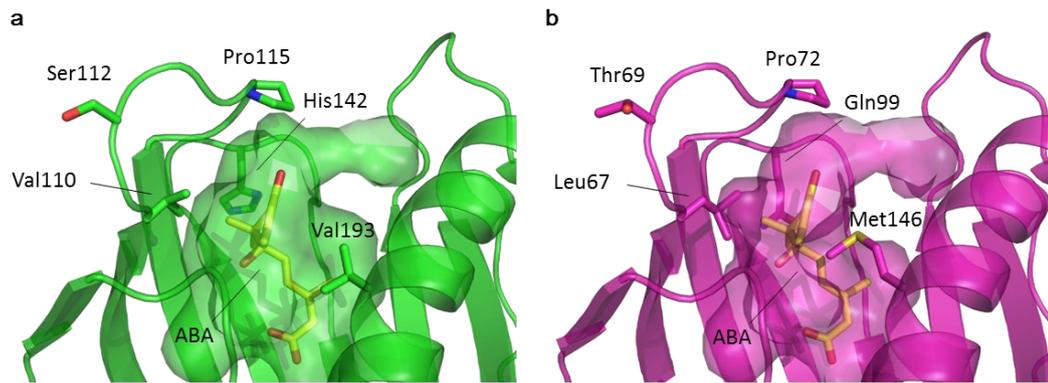


**Figure 3-11.** Expression levels of *ShPP2C1-4* genes in (a) seeds and (b) leaves of *Striga* are provided as a bar graph, in which the vertical axis presents the number of transcript molecules of 1 ng RNA [ $1.0 \times 10^{-20}$  mol / ng RNA]. Numbers in the seed columns indicate days of conditioning; after 8 days of conditioning, the seeds were treated with  $1.0 \mu\text{M}$  GR24 for 24 h to induce germination or left untreated. The leaves were treated with ABA or 0.5% EtOH for 2 h. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 3-12.**

Physiologic analysis of transgenic *Arabidopsis* transformants containing *ShPP2C1* genes fused to the sequence of the quadruple MYC promoters (4xMYC). (a) Germination test of wild-type, *abi1-1c*, and transgenic seeds after exposure to different concentrations of ABA. Representative photographs from three independent experiments with similar results are shown. (b) Expression levels of the ABA-inducible *RD29A* gene in transgenic *Arabidopsis* after chemical treatment. Ten-day-old seedlings were incubated on 25  $\mu$ M ABA solution for 6 h. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent leaves). (c) Thermal imaging of intact leaves of each genotype. (d) Representative photographs of each genotype after drought stress. In (c) and (d), representative images from 5 independent plants with similar results are shown.



**Figure 3-13.**

The molecular models depicting the ABA pocket (connolly surface) of **(a)** AtPYL1 structure (3jrs\_A) and **(b)** ShPYL6 predicted structure figured by ribbon diagram. ABA molecular and the residues responsible for ABA reception and were represented by stick model. ShPYL6 structure was predicted by the homology modelling platform, SWISS-MODEL using crystal structure of AtPYL1 (PDB code is 3jrs)<sup>39</sup> as template.

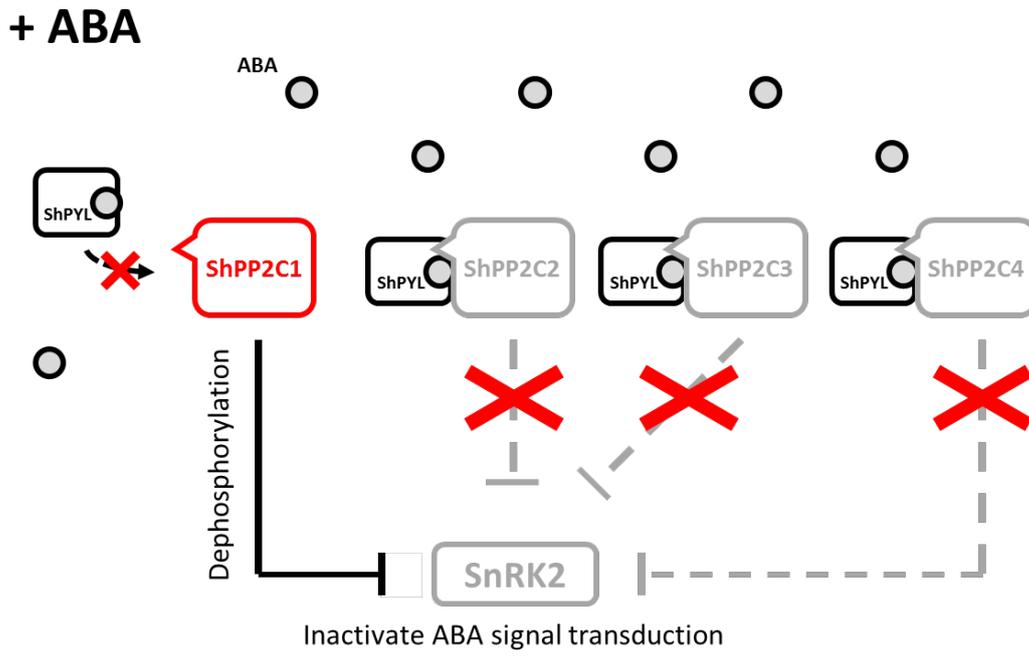


Figure 3-14.  
Hypothesized molecular model of ABA insensitive caused by ShPP2C1 in *S. hermonthica*.

**Table 3-1.** Composition of PP2C reaction solution for PP2C activity check

	vol. [ $\mu$ L]	final conc.
PP2C	5	unknown
10% BME	1	0.1%
1M $MnCl_2$	1	100 mM
MilliQ	73	
Reaction mix.	80	

**Table 3-2.** Composition of PP2C reaction substrate solution using  $p$ NPP

	vol. [ $\mu$ L]	final conc.
AcOH-K buffer (pH 7.4)	3.3	3 mM
KCl	6.6	6 mM
10% BSA	0.1	0.1%
$p$ NPP solution	10	5 mM
Substrate mix.	20	

**Table 3-3.** Composition of PP2C reaction solution for PYL-PP2C assay

	vol. [ $\mu$ L]	final conc.
2 $\mu$ M PP2C	5	0.1 $\mu$ M
15 $\mu$ M PYL	2	0.3 $\mu$ M
ABA in DMSO	1	0.1 – 50 $\mu$ M
10% BME	1	0.1%
1M $MnCl_2$	1	100 mM
MilliQ	60	
Reaction mix.	80	

**Table 3-4.** Composition of PP2C reaction solution using 4-MUP

	vol. [ $\mu$ L]	final conc.
AcOH-K buffer (pH 7.4)	3.3	3 mM
KCl	6.6	6 mM
10% BSA	0.1	0.1%
4-MUP solution	10	5 mM
Substrate mix.	20	

**Table 3-5.** Primers used realtime qPCR in this study

Primer name	Sequence
ShPP2C1 QPCR F	CAGGTTGCAGATTACTGTCGAG
ShPP2C1 QPCR R	CCTGCCTAGTGTCTTGATTCC
ShPP2C2 QPCR F	GCTGTGCCTAAGAGAACATTC
ShPP2C2 QPCR R	CTGACCTCCTCCACAAATAG
ShPP2C3 QPCR F	CATTTAGCATTAGCCGACG
ShPP2C3 QPCR R	GAGCCATTGCTCATTCAAC
ShPP2C4 QPCR F	CGCGATTACCCCTTACTTTAGC
ShPP2C4 QPCR R	CACGATCTCGTGCATCCTATC
ShPYL1 QPCR F	GAACTACCGTTCCGGTGACAAG
ShPYL1 QPCR R	GTTTCAGCCTCAGACTGTG
ShPYL2 QPCR F	GCTGAACAACCTACCGGTCG
ShPYL2 QPCR R	GACGGTGTCCGGTGAACATC
ShPYL3 QPCR F	CTTCGTCAAGAGCTGCCAC
ShPYL3 QPCR R	CTGAATCCTGTGACGTGGC
ShPYL4 QPCR F	CATCGATCGTCACAGTTCAC
ShPYL4 QPCR R	GAAGTAACACGTCTCGTCCTTG
ShPYL5 QPCR F	CAAGCCGTTCTGTGAGTAGG
ShPYL5 QPCR R	GTGCTCCTCGTCATCCAAC
ShPYL6 QPCR F	CGTACGTTGTGGATGTGC
ShPYL6 QPCR R	GATTAGCCGACATCTCGC
ShPYL7 QPCR F	CAATTACAGGTCGACTGTGACC
ShPYL7 QPCR R	GAGCCCAATTATCGTATCCG
ShPYL8 QPCR F	GGACCACAGGCTCAGAACTAC
ShPYL8 QPCR R	CGACTCGACAAAGTAGCACG
ShUBQ QPCR F	CATCCAGAAAGAGTCGACTTTG
ShUBQ QPCR R	CATAACATTTGCGGCAAATCA
AtRD29A QPCR F	CAAAGGTGTTTCCTGTCGTGTC
AtRD29A QPCR R	AATCGGTACATCTCTTTCTCTTCC
AtACT2 QPCR F	GAGCAGGAGATGGAAACCTCAAAG
AtACT2 QPCR R	CGATACCTGAGAACATAGTGGTTC

## 第4章 ShPP2C1のPYL相互作用低下に関わるアミノ酸残基の解析

### 4-1. 背景

第3章の結果から ShPP2C1 の脱リン酸化活性は PYL タンパク質によってほとんど阻害されないことが明らかになった。ゲートループ・ラッチループの構造が閉鎖型になった PYL は PP2C の脱リン酸化活性部位をふさぐことでその機能を阻害する<sup>25</sup>ことから、ShPP2C1 は PYL と相互作用しにくくなっていることが予想される。結晶構造解析と生化学的実験の結果から、PYL と PP2C の主な相互作用部位として2か所の領域が報告されている (Fig. 4-1a)<sup>39</sup>。一つ目は ABI1 の Glu142 および Gly180 を中心とするアミノ酸領域である。これらのアミノ酸残基は PYL のゲートループ領域が差し込まれるポケットに存在し、特に Glu142 は脱リン酸化酵素活性を担う残基として SnRK2 の不活性化に深く関与する<sup>25,56</sup> (Fig. 4-1b)。もう一つの領域は Trp300 を中心とするアミノ酸領域である。PYL-ABA-PP2C 複合体において Trp300 (Trp-lock) は PYL のゲートループと C 末端側の  $\alpha$ ヘリックス構造の隙間に差し込まれ、PYL タンパク質内に受容された ABA と水分子を介した水素結合ネットワークを形成する (Fig. 4-1c)。周辺の  $\beta$ シート構造を含む ABI1 の Ala291~Ala305 の領域は Trp-lock を支持すると共に、PYL の分子表面と直接相互作用する<sup>56</sup>。この領域の Ile298、Trp300、Arg304 へのアミノ酸変異導入が PYL との相互作用を著しく低下させることを報告されている<sup>39</sup>。そこでこれらの領域を中心として ShPP2C1 のアミノ酸配列をその他の PP2C と比較した。さらに ShPP2C1 から見出された特徴的なアミノ酸残基に着目し、これらのアミノ酸が PYL との相互作用および ABA 受容機構に与える影響について解析を行った。

### 4-2. 方法

#### 4-2-1. PP2C 発現ベクターに対する塩基置換変異の導入

3-2-3.の通りに ShPP2C1-4 のアミノ酸配列をシロイヌナズナの Group A 型 PP2C と比較した。見出された任意の1アミノ酸および3アミノ酸 (Fig. 4-2) へ置換変異を導入するため、PP2C 発現プラスミドベクターを鋳型とした PCR 反応によって行った。PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TAKATA BIO Inc., Japan) を用いて ABI1 および ShPP2C1 の発現用プラスミドベクターに対して塩基配列置換変異を導入した。得られたプラスミドベクターを DH5a へ導入し、50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  アンピシリンプレートで形質転換体を選抜した。一つのコロニーを LB 培地へ植菌し、37°C で 18 時間培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) を用いて導入したプラスミドベクターを抽出した。変異の導入はシーケンス解析によって確認した。続いて3アミノ酸置換変異を導入した PP2C (ABI1<sup>3 mutations</sup> および ShPP2C1<sup>3 mutations</sup>) のベクターを鋳型として1アミノ酸を PCR で導入し、DH5a でプラスミドをクローニングした。シーケンス解析によって変異の導入を確認した後、もう1アミノ酸を同様の方法で導入することで5アミノ酸の置換変異を導入した PP2C (ABI1<sup>5 mutations</sup> および ShPP2C1<sup>5 mutations</sup>) を作製した。

#### 4-2-2. PP2C 活性測定

得られたプラスミドベクターを用いて、3-2-6.に示すように組み換えタンパク質の作成し、3-2-7.に示すように PYL 存在下での脱リン酸化活性の測定を行った。

#### 4-2-3. ABI1<sup>5 mutations</sup> の植物体内での機能の解析

シロイヌナズナに対する ABI1<sup>5 mutations</sup> 遺伝子の導入および表現型の解析は 3-2-8. ~ 13.に示す通りに行った。

#### 4-3-5. SWISS MODEL を用いた PYL-PP2C 複合体の立体構造の比較

AtPYL1-ShPP2C1 複合体の推定立体構造は AtPYL1-ABI1 の結晶構造 (PDB ID; 3jrq)<sup>39</sup> を鋳型として、SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)<sup>40-44</sup> を用いて構築した。タンパク質立体構造の観察および解析には PyMOL 2.2 を用いた。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. ShPP2C1 の PYL 相互作用低下に関わる候補アミノ酸残基の探索

ShPP2C1 の PYL 相互作用性の低下に関わるアミノ酸を探索するため、ShPP2C1 を含む *S. hermonthica* およびシロイヌナズナの Group A PP2C のアミノ酸配列を比較した。ShPP2C1 は ABI1 における Glu142 および Gly180 を含む領域のアミノ酸残基が保存されていた。一方で Trp-lock 周辺の領域に着目した結果、Ile298 に相当するアミノ酸がメチオニン (Met312) となっていることが明らかになった。さらにその周辺の Ala293、Lys296、Val297、Ala303 の 4 つの保存性の高いアミノ酸残基がそれぞれシステイン (Cys307)、メチオニン (Met310)、イソロイシン (Ile311)、ロイシン (Leu317) となっていることが明らかになった (Fig. 3-7, Fig. 4-2)。

#### 4-3-2. ABI1 に対するアミノ酸変異の導入が PYL との相互作用に与える影響

ShPP2C1 に認められた 3 つのアミノ酸 (Met310、Ile311、Met312) が PYL との相互作用に与える影響を調べるため、ABI1 に 1 アミノ酸の置換変異を導入した 3 種類の組み換えタンパク質 (ABI1<sup>K296M</sup>、ABI1<sup>V297I</sup>、ABI1<sup>I298M</sup>) を作出し (Fig. 4-3a)、AtPYL2 または ShPYL2 存在下における ABA 濃度依存的な脱リン酸化活性を測定した。その結果、50 μM ABA 存在下で ABI1<sup>I298M</sup> の脱リン酸化活性は ABI1、ABI1<sup>K296M</sup> および ABI1<sup>V297I</sup> と比較して優位に高かった (Fig. 4-3b)。また ABI1<sup>I298M</sup> は ABI1 と比較して AtPYL2 存在下で約 60 倍、ShPYL2 存在下で約 50 倍高い IC<sub>50</sub> 値を示した (Fig. 4-2c)。さらに ABI1<sup>3 mutations</sup> および ABI1<sup>5 mutations</sup> では、ABI1<sup>I298M</sup> と比較して 50 μM ABA 存在下での脱リン酸化活性および IC<sub>50</sub> 値が増加した (Fig. 4-3b, c)。

ABI1<sup>3 mutations</sup> と ABI1<sup>5 mutations</sup> の脱リン酸化活性および IC<sub>50</sub> 値は実験に用いた 5 種類の PYL

タンパク質存在下で ABI1 より増加した (Fig. 4-4a, b)。ABA 非存在下において ABI1、ABI1<sup>3 mutations</sup> および ABI1<sup>5 mutations</sup> の脱リン酸化活性は AtPYL2、ShPYL1、ShPYL2 および ShPYL4 によって阻害されなかった。一方で ABA 非存在下において ABI1、ABI1<sup>3 mutations</sup> および ABI1<sup>5 mutations</sup> の脱リン酸化活性は AtPYL6 によって阻害されたが、ABI1 に比べて ABI1<sup>3 mutations</sup> および ABI1<sup>5 mutations</sup> は高い脱リン酸化活性を維持していた (Fig. 4-4a)。

#### 4-3-3. ABI1<sup>5 mutations</sup> の植物体内での機能の解析

ABI1<sup>5 mutations</sup> 遺伝子を導入したシロイヌナズナの種子は 2.5  $\mu$ M ABA 存在下でも *abil-1c* と同様に発芽した (Fig. 4-5a)。また WT と比較して ABI1<sup>5 mutations</sup> 導入株は ABA 処理によって RD29A 遺伝子の発現がほとんど誘導されなかった (Fig. 4-5b)。4 週齢の *AtABI1<sup>5 mutations</sup>* 導入株の葉温は WT よりも低く、*abil-1c* と同程度であったことから、WT と比較して蒸散が活性化していることが示唆された (Fig. 4-5c)。また ABI1<sup>5 mutations</sup> 導入株は *abil-1c* と同様に 7 日間の乾燥ストレスによって枯死し、その後の灌水によっても復帰しなかった (Fig. 4-5d)。

#### 4-3-4. ShPP2C1 に対するアミノ酸変異の導入が PYL との相互作用に与える影響

ShPP2C1 に対して 3 アミノ酸および 5 アミノ酸の置換変異を導入した組み換えタンパク質 (ShPP2C1<sup>3 mutations</sup>、ShPP2C1<sup>5 mutations</sup>) を作出し (Fig. 4-6a)、PYL 存在下における ABA 濃度依存的な脱リン酸化活性の変化を測定した。AtPYL2、ShPYL1 または ShPYL2 との組み合わせでは、アミノ酸置換変異体では 1  $\mu$ M 以上の ABA 存在下で脱リン酸化活性のわずかな低下が認められた。AtPYL6、ShPYL4 との組み合わせでは、アミノ酸置換変異の導入によって ABA 非存在下を含めた全 ABA 濃度域で脱リン酸化活性が低下し、IC<sub>50</sub> 値にも変化が認められた。一方でこれらの変異型 ShPP2C1 は 50  $\mu$ M ABA 存在下でも脱リン酸化活性を 40% 以上維持していた (Fig. 4-6b, c)。

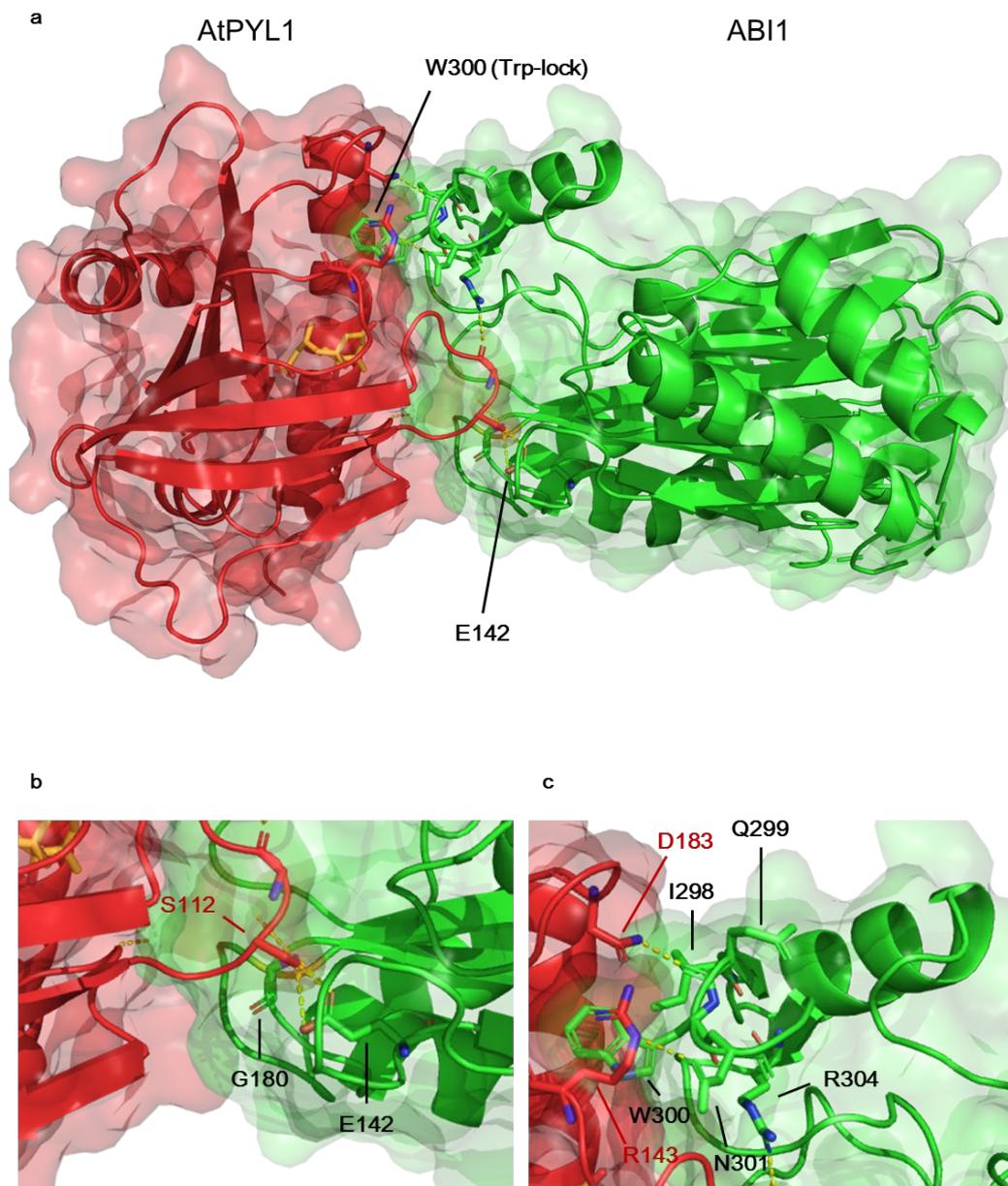
#### 4-4. 考察

本研究では ShPP2C1 における PYL 相互作用性低下の原因を明らかにするため、PYL との相互作用に特に重要であると報告されている脱リン酸化触媒部位および Trp-lock 周辺のアミノ酸残基を比較し、ShPP2C1 に特徴的な 5 つのアミノ酸を見出した。ABI1 への変異導入の結果から、今回着目した 5 つのアミノ酸の中でも Met312 が最も大きく PYL との相互作用へ影響することが明らかになった。ABI1 において Met312 に相当する Ile298 をアラニンに変異させる (ABI1<sup>I298A</sup>) と AtPYR1 との相互作用を低下させることが報告されており<sup>39</sup>、本研究の結果とよく一致している。さらに ABI1<sup>3 mutations</sup>、ABI1<sup>5 mutations</sup> は ABI1<sup>I298M</sup> と比較して PYL タンパク質からの阻害を受けにくくなった。ABI1 に対する K296M または V297I の変異導入は PYL との相互作用に影響しなかったが、I298M と合わせて導入した場合 (ABI1<sup>3 mutations</sup>、ABI1<sup>5 mutation</sup>) の PYL 相互作用性は ABI1<sup>I298M</sup> よりも低下した。このことから Ile298 を中心として、その他の 2 アミノ酸または 4 アミノ酸が複合的に PYL との相互作用を阻害

していることが考えられる。SWISS MODEL を用いた *ShPP2C1* の構造予想は Met312 および Met310 のアミノ酸残基が PYL との相互作用面に与える影響を推察できる (Fig. 4-7)。ABI1<sup>I298A</sup> は PYL と相互作用しにくくなることから<sup>39</sup>、Ile 298 の  $\gamma$  位のメチル基が形成する疎水性領域が PYL との相互作用に重要であることが示唆される。*ShPP2C1* の Met 312 は、かさ高くなった側鎖が PYL との立体障害により Ile 298 における  $\beta$  位のメチル基の方向へ向いている (Fig. 4-7a, b)。その為、Ile 298 の  $\gamma$  位のメチル基が形成していた疎水性領域が縮小しており、PYL との相互作用の低下を引き起こしていると考えられる (Fig. 4-7c, d)。さらに Met 312 の側鎖は Met 310 と協調的に PYL 相互作用表面に広い疎水性の領域を形成していた (Fig. 4-7c, d)。この疎水性領域が AtPYL1 の  $\alpha$  ヘリックス上の親水性アミノ酸と反発するために、PYL との相互作用が低下したと考えられる。

*ABI1*<sup>5 mutations</sup> 導入株は種子発芽、乾燥応答や遺伝子の発現応答において *abil-1c* と同等まで ABA 応答が低下していた。*In vitro* 試験においても *ABI1*<sup>5 mutations</sup> の AtPYL2 に対する IC<sub>50</sub> 値は ABI1 の約 50 倍まで増加したが、その脱リン酸化活性は 50  $\mu$ M ABA 存在下で約 40% まで阻害されており、PYL によって部分的に制御を受けていると考えられる。以上の結果はこの 5 つのアミノ酸変異の導入による ABI1 の PYL 相互作用性の部分的な低下でも、植物の ABA 感受性は著しく低下してしまうことを示している。

AtPYL2 存在下での *ABI1*<sup>5 mutations</sup> の IC<sub>50</sub> 値は ABI1 の 50 倍まで増加したが、その脱リン酸化活性は ABA 濃度に依存して低下していることから、*ShPP2C1* と比較して PYL との相互作用能力を維持していると考えられる。さらに今回着目した 5 つのアミノ酸を置換した *ShPP2C1* の脱リン酸化活性は野生型と比較して PYL によって阻害されたが、50  $\mu$ M ABA 存在下でも高い脱リン酸化活性を維持していた。この結果はこれら 5 アミノ酸以外に *ShPP2C1* の PYL 相互作用性の低下に関わるアミノ酸残基が存在することを示している。*ShPP2C1* では PYL との相互作用に関わるアミノ酸領域に対する選択圧が低下し、PYL 相互作用領域のアミノ酸が変異しやすくなっていると考えられる。その一方で ABA 感受性を低下させるような変異は *S. hermonthica* が厳しい乾燥地に適応する上で有利なものとして保存されてきたと予想される。今後、*ShPP2C1* のさらなる解析は、PP2C と PYL の相互作用に関わる新たなアミノ酸の同定や、*S. hermonthica* の乾燥地適応に関わる分子進化の解明に繋がることが期待される。



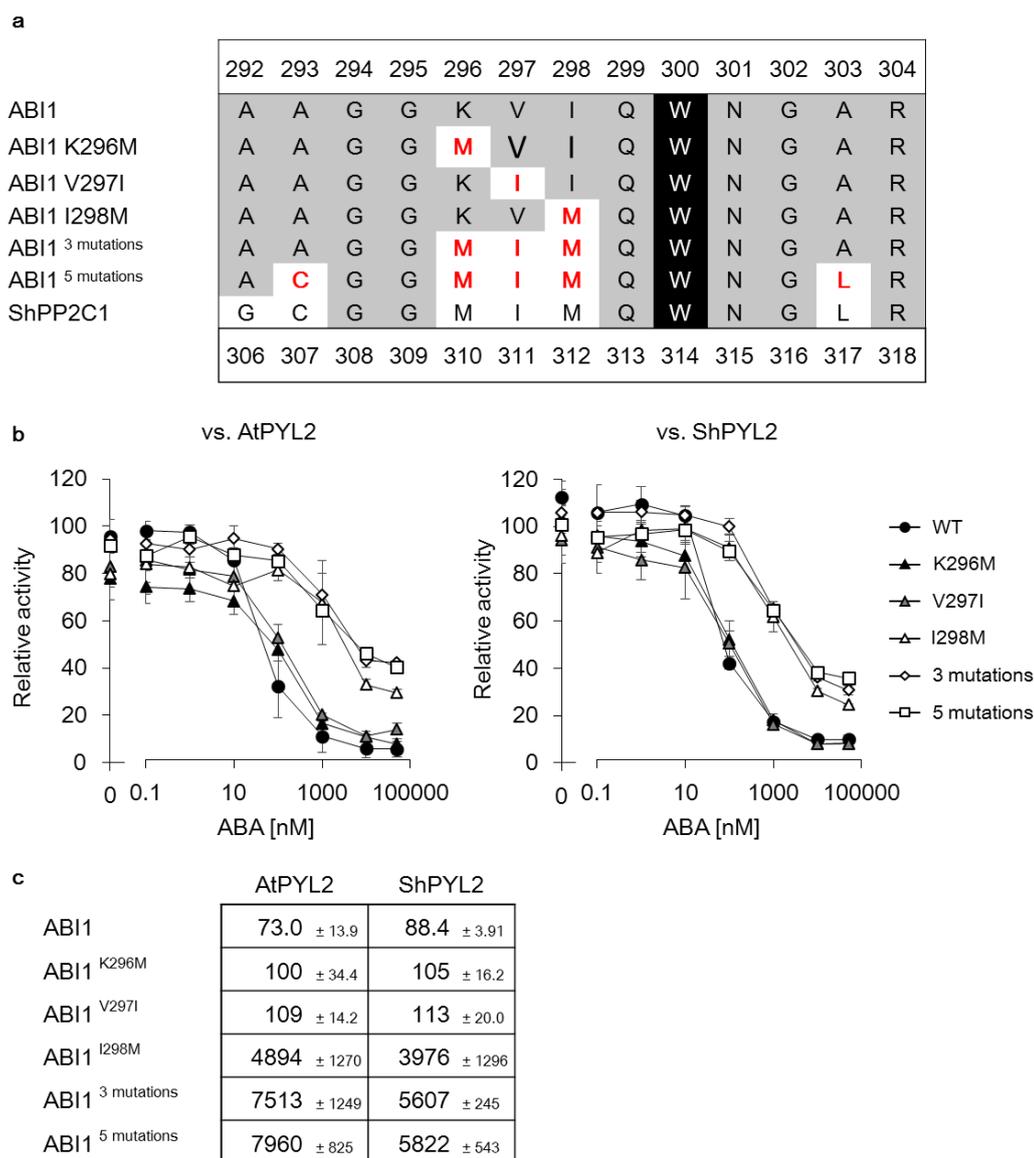
**Figure 4-1.**

(a) The overall structure model of the AtPYL1-ABI1 complex (PDB ID: 3jrj)<sup>39</sup> figured by ribbon diagram with molecular surface. AtPYL1 and AtABI1 colored red and green, respectively. The residues necessary for forming of AtPYL1-AtABI1 complex are represented by stick models<sup>39</sup>. Close view of the (b) interaction region with Ser112 on the gate loop of AtPYL1 and (c) Trp-lock region are shown.

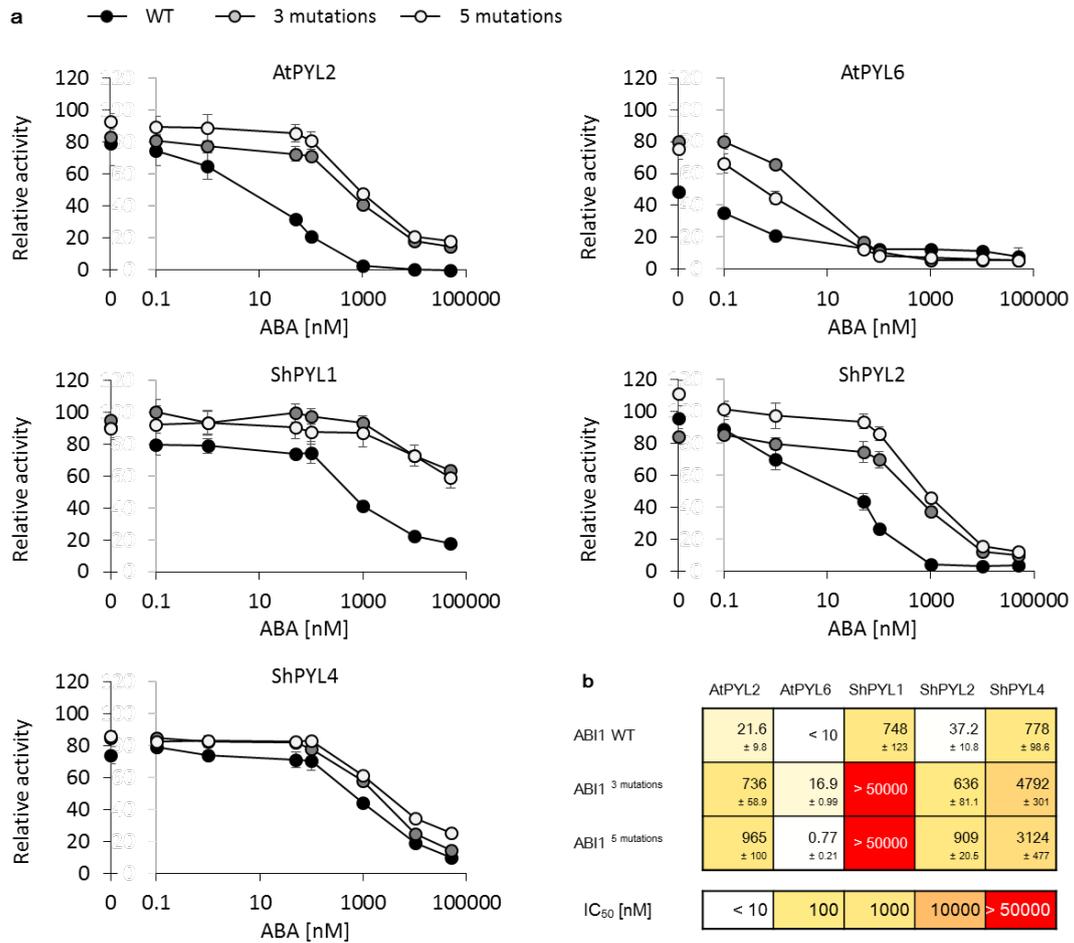
	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304
ABI1	A	A	G	G	K	V	I	Q	W	N	G	A	R
ABI2	A	A	G	G	K	V	I	R	W	N	G	A	R
HAB1	N	A	G	G	K	V	I	Q	W	Q	G	A	R
HAB2	K	A	G	G	K	V	I	Q	W	Q	G	A	R
AHG1	A	A	G	G	R	V	L	V	V	D	G	A	R
AHG3	Q	A	G	G	R	V	I	Y	W	D	G	A	R
HAI1	A	A	G	G	R	V	I	Y	W	D	G	P	R
HAI2	E	A	G	G	R	V	I	Y	W	D	G	A	R
HAI3	G	A	G	G	R	V	I	Y	W	D	C	P	R
ShPP2C1	G	C	G	G	M	I	M	Q	W	N	G	L	R
ShPP2C2	G	S	G	G	K	V	I	N	W	D	G	P	R
ShPP2C3	G	L	G	G	K	V	I	N	W	D	G	H	R
ShPP2C4	E	A	G	G	R	V	I	F	W	D	G	P	R

**Figure 4-2.**

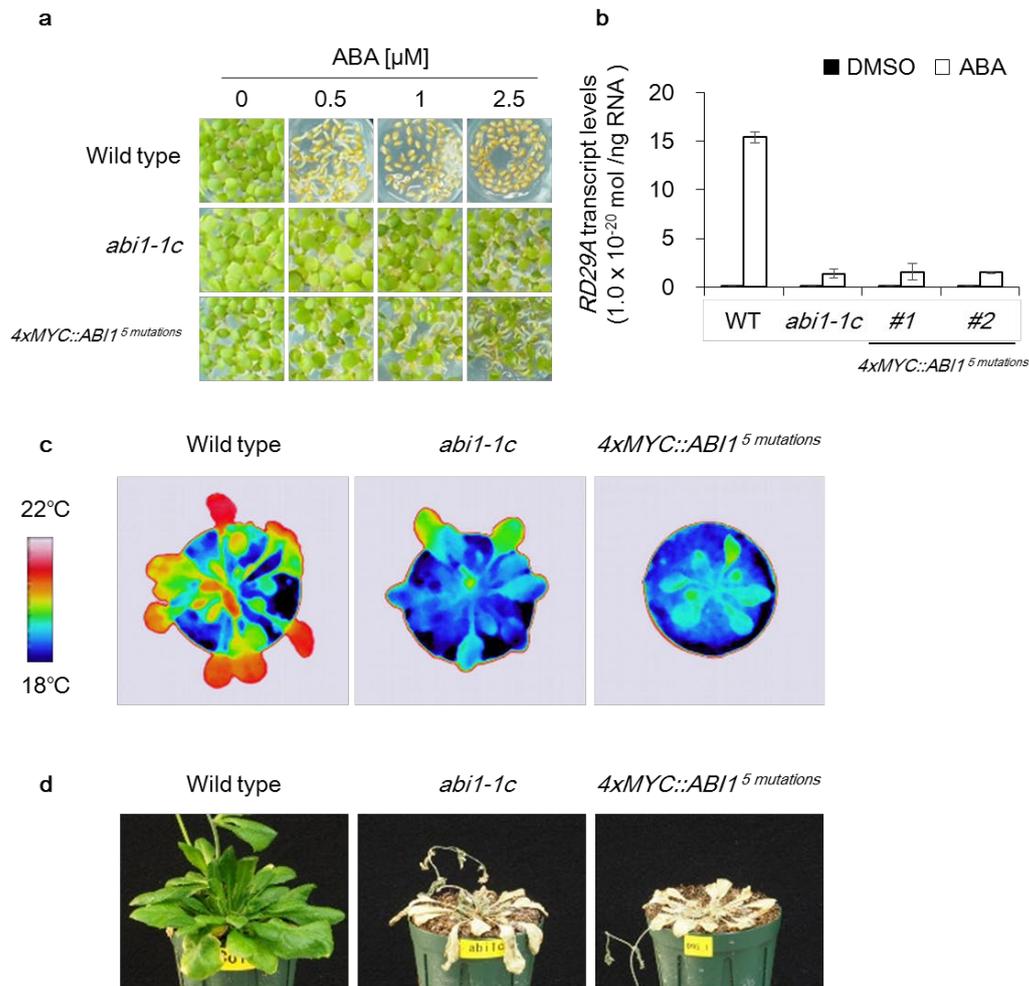
Amino acid sequence alignment of residues flanking the tryptophan conserved among group-A PP2Cs for *Arabidopsis* (ABI1, 2: ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1, 2, HAB1, 2:HYPERSENSITIVE TO ABA 1, 2, AHG1, 3: ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION1, 3, HAI1, 2, 3: HIGHLY ABA-INDUCED PP2C1, 2, 3) and *S. hermonthica* (ShPP2C1-4). Each corresponding residue for ABI1 from A292 to R304 is indicated. The tryptophan residue is indicated with black shading; other conserved residues are indicated with gray shading. A fully expanded alignment is shown in Figure 2-7.



**Figure 4-3.** (a) Amino acid sequence alignment flanking the tryptophan in of ABI1, mutated AtABI1s and ShPP2C1. Each corresponding residue for AtABI1 from A292 to R304 and for ShPP2C1 from G306 to 318 is indicated. The tryptophan residue is indicated with black shading; other conserved residues are indicated with gray shading. The substituted residues in ABI1 mutations are shown by red letters. (b) Full ABA dose-response curves and (c) IC<sub>50</sub> values (nM) of PP2C phosphatase activity under presence of AtPYL2 or ShPYL2. Each reaction was conducted using 100 nM ABI1, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions. Error bars represent S.D..

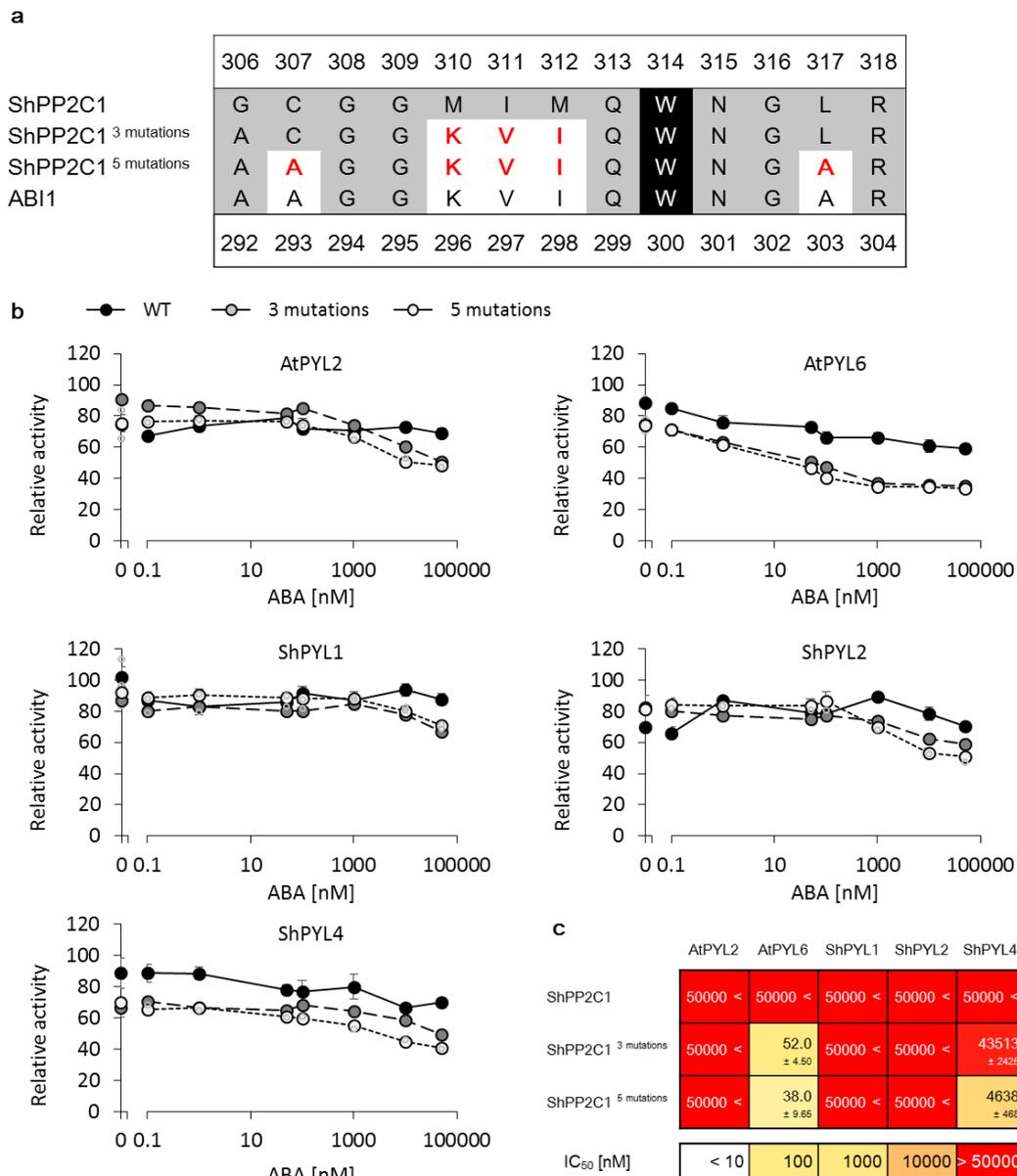


**Figure 4-4.** (a) Full ABA dose-response curves and (b) IC<sub>50</sub> values (nM) of PP2C phosphatase activity under presence of PYLs. Each reaction was conducted using 100 nM PP2C, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 50, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions. Error bars represent S.D..



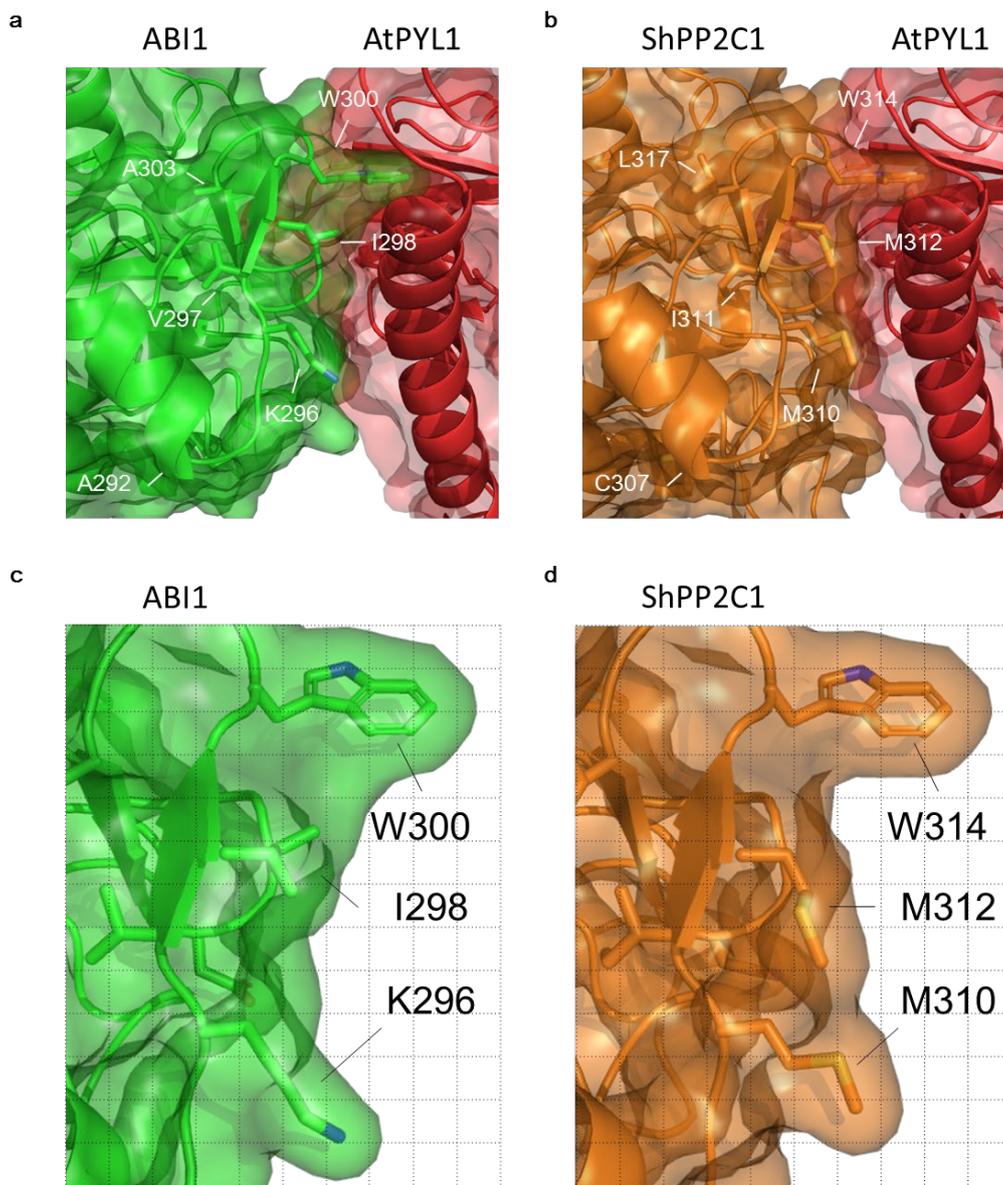
**Figure 4-5.**

Physiologic analysis of transgenic *Arabidopsis* transformants containing *ABI1<sup>5 mutations</sup>* genes fused to the sequence of the quadruple MYC promoters (4xMYC). **(a)** Germination test of wild-type, *abi1-1c*, and *ABI1<sup>5 mutations</sup>* transformants after exposure to different concentrations of ABA. Representative photographs from three independent experiments with similar results are shown. **(b)** Expression levels of the ABA-inducible *RD29A* gene in transgenic *Arabidopsis* after chemical treatment. Ten-day-old seedlings were incubated on 25  $\mu\text{M}$  ABA solution for 6 h. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent leaves). **(c)** Thermal imaging of intact leaves of each genotype. **(d)** Representative photographs of each genotype after drought stress. In **(c)** and **(d)**, representative images from 5 independent plants with similar results are shown.



**Figure 4-6.**

(a) Sequence alignment of conserved amino acid residues flanking the tryptophan conserved among group-A PP2Cs. Each corresponding residue for ShPP2C1 from G306 to 318 and for ABI1 from A292 to R304 is indicated. The tryptophan residue is indicated with black shading; other conserved residues are indicated with gray shading. The substituted residues in AtABI1 mutations are shown by red letters. (b) Full ABA dose-response curves and (c) IC<sub>50</sub> values (nM) of PP2C phosphatase activity under presence of PYLs. Each reaction was conducted using 100 nM ABI1, 300 nM receptor, and multiple concentrations of ABA. ABA was tested at 0, 0.1, 1, 50, 100, 1000, 10,000, and 50,000 nM. PP2C activity in the presence of 300 nM BSA instead of each ABA receptor is defined as 100%. Each value is the mean of three independent reactions. Error bars represent S.D..



**Figure 4-7.** Close views flanking the Trp-lock of PP2C-PYL complex figured by ribbon diagram with molecular surface. AtPYL1, ABI1 and ShPP2C1 was colored red, green and orange, respectively. **(a)** AtPYL1-AtABI1 complex (PDB ID is 3jrj)<sup>39</sup>. **(b)** Predicted structure of AtPYL1-ShPP2C1 complex constructed by the homology modelling platform, SWISS-MODEL using 3jrj as template. **(c)** AtABI1 structure flanking I298. **(d)** ShPP2C1 predicted structure flanking M312.

## 第5章 *Striga hermonthica* の ABA が宿主の蒸散へ与える影響の解析

### 5-1. 背景

*S. hermonthica* の寄生は宿主の気孔閉鎖を誘導し、蒸散速度や呼吸速度の低下を引き起こす<sup>13,14,29,57</sup>。*S. hermonthica* の寄生に伴う宿主の蒸散低下によって寄生植物との水分勾配は拡大し養水分の収奪が加速すると予想されるが、その原因は明らかになっていない。ここまでの結果から *S. hermonthica* は ABA に対しての感受性をほとんど持たないにも関わらず、*S. hermonthica* の種子と植物体は宿主に依存せず多量の ABA を蓄積していることが明らかになった。植物病原菌の中には植物ホルモン活性を持つ化合物を生産することで宿主の生長調節を攪乱し、病徴を示す例がいくつか報告されている ref<sup>58</sup>。また寄生植物であるアメリカネナシカズラ (*Cuscuta pentagona*) の感染に伴う宿主の生長阻害は ABA に由来することが報告されている<sup>59</sup>。他、ハマウツボ科のコシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) は植物ホルモンであるサイトカイニンを送り込み、宿主との結合部位の維管束の肥大を誘導し栄養収奪の効率を向上させていると考えられている<sup>10</sup>。*S. hermonthica* の感染は宿主の維管束液および葉における ABA 量の増加を引き起こす<sup>15,29</sup>。ことから、ABA が *S. hermonthica* の寄生に伴う蒸散低下の原因ではないかと考えた。そこでライゾトロンを用いて、*S. hermonthica* の寄生が宿主へ与える影響について解析を行った。さらに *S. hermonthica* 培養個体に安定同位体炭素で標識した ABA を蓄積させ、*S. hermonthica* に由来する ABA が宿主へ移動するか検証を試みた。また *S. hermonthica* の発芽種子を用いて結合部以外から ABA が移動し宿主へ影響する可能性について検証した。

### 5-2. 方法

#### 5-2-1. 試薬

<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-sucrose は Sigma-Aldrich (USA) より購入した。

#### 5-2-2. *S. hermonthica* の寄生がソルガムに与える影響の測定

ライゾトロンを用いたソルガム個体の作出および *S. hermonthica* の接種は 2-2-3. に示すように行った。*S. hermonthica* 発芽種子の接種 1 日後から 9 日後、および 16 日、23 日、30 日後にそれぞれ草丈と気孔コンダクタンスの測定を行った。気孔コンダクタンスの測定は 2-2-5. に示すように行い、その後に草丈を測定した。接種後 31 日目に *S. hermonthica* を取り除いたソルガムの地下部を約 1 g 回収した。根からロックウールを取り除いた後、回収した根の重量を測定した。根を液体窒素で凍結させたのち、乳鉢を用いて磨砕した。サンプル重量の約 10 倍量の MeOH を用いて乳鉢の内容物を懸濁し 50 mL ファルコンチューブへ回収した。内部標準として *d*<sub>6</sub>-ABA 水溶液を 10 μL 加えた。懸濁液を遠心分離し、上清を回収した。この作業を 3 度繰り返し、約 30 mL の抽出液を得た。この抽出液を 2-2. に示すように精製し、LC-MS による分析を行った。得られた定量結果から新鮮重量あたりの化合物量を算出

した。それぞれの実験は一条件につき独立した3つの植物体を用いて行った。

### 5-2-3. *S. hermonthica* の器官別の ABA 量の解析

接種後4週齢の *S. hermonthica* について、第一展開葉、茎部および寄生根の三つの器官を100~400 mg 回収した。回収した植物組織は2 mL 容破砕用マイクロチューブに回収しジルコニウムボールを加えた後液体窒素によって凍結した。それぞれの植物サンプルは抽出作業まで-80°Cで保存した。植物体からの化合物の抽出と精製、分析は2-2-6~8.に示すように行った。得られた定量結果から新鮮重量あたりの化合物量を算出した。それぞれの実験は一条件につき独立した3つの植物体を用いて行った。

### 5-2-4. *S. hermonthica* 培養根の作出

2-2-4.に示すように *S. hermonthica* 独立培養個体を作成した。独立培養個体の根の先端から約1 cm の部分を終濃度0.1 μM の1-Naphthaleneacetic acid (NAA) を含む2% sucrose B5培地へ移植した。これを暗所で振とう培養し、*S. hermonthica* 培養根を作成した。4週間ごとに根の先端を新しい培地へ移植することで継代した。*S. hermonthica* 培養根の先端5~10切片を2% <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-sucrose B5 培地へ移植した。これを暗所で振とう培養し <sup>13</sup>C ラベル化 *S. hermonthica* 培養根を作成した。培養器には三角フラスコを用い、培地量は培養器の1/4の体積とした。培養2週間後に培養根を回収し、2-2-6., 2-2-7.に示す通りに化合物を抽出および精製し、LC-MS/MS を用いて分析した。LC および MS 条件は以下に示す通りとした。

#### LC 条件

カラム: YMC-UltraHT Hydrosphere C18 100 × 2.0 mm、30°C

溶媒: 30% (v/v) (0-2 min)、30-60% (v/v) (2-12 min)、100% (v/v) (12-16 min) MeOH (0.1% (v/v) ギ酸)

流速: 0.2 mL/min

#### MS 条件

ESI negative mode

Capillary (kV) : 2.8

Source temperature (°C) : 120

Desolvation temperature (°C) : 350

Cone gas flow (liter h<sup>-1</sup>) : 50

Desolvation gas flow (liter h<sup>-1</sup>) : 550

Collision energy (eV) : 20

MRM transition (*m/z*) : 279 > 179 (PA)、294 > 147 (<sup>13</sup>C<sub>15</sub>-PA)、263.2 > 153 (ABA)、278 > 162 (<sup>13</sup>C<sub>15</sub>-ABA)

#### 5-2-5. 寄生した *S. hermonthica* 培養根からソルガムへの ABA の移動の検証

*S. hermonthica* 培養根継代後 3 週目の *S. hermonthica* 培養根を培地から取り出し蒸留水で表面を洗浄した。φ90 mm 普通ろ紙を同径のプラスチックシャーレのフタに敷き、吸器誘導作用を持つ 10 μM 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) 0.1% MeOH 水溶液を 3 mL 処理した。その上に *S. hermonthica* 培養根を静置し、シャーレを閉じてパラフィルムで密封をしたのち、暗所 30°C でインキュベートした。一日後に顕微鏡下で吸器の形成が認められた根切片 (Fig.5-2b) を選び出し、根端がソルガムの根に接触するようにライゾトロン上に移植した。1~2 日間程度明所 30°C で生育させたのち、ソルガムに対する *S. hermonthica* 培養根の寄生を観察した。

ソルガムの根を、*S. hermonthica* 培養根が結合した箇所、結合部より地上部側、寄生部より根端側の 3 つに分けて回収した。回収した根は液体窒素で凍結させ、化合物の抽出まで 80°C で保管した。またネガティブコントロールとして *S. hermonthica* 培養根を寄生させていないソルガムの根を回収した。植物サンプルから 2-2-7.、2-2-8. に示す通りに化合物の抽出および精製を行った。化合物の分析は LC-MS/MS を用い、5-2-4. と同様の条件で行った。

#### 5-2-6. *S. hermonthica* の種子および種子滲出物に含まれる ABA・PA 量の定量

φ90 mm プラスチックシャーレに同径の滅菌ガラス繊維ろ紙を敷き、滅菌水で十分に湿らせた。1 つのシャーレにつき約 100 mg の寄生植物種子を播種した。パラフィルムでシャーレを密封し、暗所 30°C で 7 日間コンディショニング処理を行った。コンディショニング処理後、種子が乗ったろ紙を取り出し、余分な水分を取り除いた。ろ紙をシャーレ上に戻し、1 μM GR24 溶液を 3 mL 処理した。シャーレをパラフィルムで密封し、暗所 30°C で発芽処理を行った。発芽処理後の種子をスパチュラでかきとり、2 mL 容破砕用マイクロチューブに回収した。シャーレに残った濾紙を滅菌水 3 mL で洗い、その洗浄液を種子滲出液として回収した。また種子の入ったチューブを 2 分間遠心分離し、上清を種子滲出液に加えた。回収した種子はジルコニウムボールを加えた後、液体窒素で凍結させた。ボールミルで種子を破砕した後、2-2-6~8. に示すように化合物の抽出・精製・分析を行った。一条件につき独立した 3 つのシャーレで発芽を誘導した種子を用いて実験し、定量値の平均値と標準偏差を算出した

#### 5-2-7. ソルガムの地下部に対する ABA 処理

φ90 mm のプラスチックシャーレに同径の滅菌ガラスろ紙を敷き、蒸留水で適度に湿潤させた。そこにソルガムの種子を播種し、パラフィルムで密封した後、暗所 30°C で一晩インキュベートした。発芽した種子を 3 日間水道水で育苗した後、一個体ずつ 50 mL ファルコンチューブに移植した。水耕液として 40% Long Ashton を用い、2 日に一回水耕液を取り換えた。水耕液に対して EtOH 濃度が 0.1%、ABA 濃度が 1 fM ~ 1 μM になるように、ABA

EtOH 溶液を加えた。ABA の投与は移植 2 日目（処理 0 日目）から始め、2 日に一度水耕液の交換の際に行った。2-2-5. に示すように第一展開葉の気孔コンダクタンスを測定し、その後草丈の測定を行った。一条件につき独立した 5 つの植物体を用いて実験を行い、その平均値と標準偏差を算出した。

### 5-3. 結果

#### 5-3-1. *S. hermonthica* の寄生が宿主の地上部の生長および蒸散速度に与える影響

Infected sorghum の草丈は Uninfected sorghum と比較して寄生後 8 日目から有意に低下し、その後寄生後 30 日目までに約 70% まで低下した (Fig. 5-1a)。一方で Infected sorghum の気孔コンダクタンスは Uninfected sorghum と比較して寄生後 3 日目から有意に低下し、30 日目までに約 50% まで低下した (Fig. 5-1b)。また寄生後 32 日目の Infected sorghum の地下部は Uninfected sorghum よりも高濃度の ABA・PA を蓄積していた (Fig. 5-1c)。

#### 5-3-2. *S. hermonthica* の組織別の ABA 蓄積量

*S. hermonthica* の寄生個体について、葉と茎に含まれる ABA 量が同程度であったことに對し、根には葉・茎と比較して 2.5 倍高い ABA が蓄積していた。ファゼイン酸 (PA) についても同様に根における蓄積量が最も高く、ABA 関連化合物は *S. hermonthica* の根に多く含まれることが明らかになった (Fig. 5-1d)。

#### 5-3-3. *S. hermonthica* 培養根のソルガムに対する寄生

*S. hermonthica* 独立培養個体の根を 0.1  $\mu\text{M}$  NAA を含む 2% sucrose B5 培地へ移植し暗所で 4 週間振とうすることで培養根を作出した (Fig. 5-2a)。この培養根を DMBQ 存在下へ移動させることで、1 日後に吸器のような形態に変化した (Fig. 5-2b)。この培養根をライゾトロソンのソルガムに接触させることで 3 日後までに吸器がソルガム根に付着し、瘤状に変化した。瘤状組織の形成を確認してから 21 日後に地上部の形成が認められたことから、寄生が確立している事が明らかになった (Fig. 5-2c)。

#### 5-3-4. $^{13}\text{C}$ ラベル化 *S. hermonthica* 培養根を用いた宿主への ABA の移動の検証

継代 4 週間後の *S. hermonthica* 培養根から ABA および PA が検出された (Fig. 5-3b, c)。続いてこの培養根を 0.1  $\mu\text{M}$  NAA を含む 2%  $^{13}\text{C}_{12}$ -sucrose B5 培地へ植え継ぎ、3 週間振とうした *S. hermonthica* 培養根の抽出液を分析した。その結果、ABA および PA が検出される MRM チャンネル (263.2 > 153 (ABA), 279 > 139 (PA)) では標品と一致する信号は検出されなかったが、ABA および PA の炭素がすべて  $^{13}\text{C}_{12}$ -sucrose で置換された場合に予想されるフラグメントを検出する MRM チャンネル (278.2 > 162 ( $^{13}\text{C}_{15}$ -ABA), 294 > 147 ( $^{13}\text{C}_{15}$ -PA)) において ABA および PA の標品と一致するピークが検出された (Fig. 5-3b-d)。これにより、2%  $^{13}\text{C}_{12}$ -sucrose B5 培地を用いて培養することで *S. hermonthica* 培養根中に  $^{13}\text{C}$  標識された ABA

および PA が蓄積することを確認した。

同様の方法で作出した *S. hermonthica* 培養根をソルガムの根に接種し、 $^{13}\text{C}$  標識された ABA の移動を検証した (Fig. 5-4a)。 $^{13}\text{C}$  ラベル *S. hermonthica* 培養根の抽出物および培地から  $^{13}\text{C}_{15}$ -ABA および  $^{13}\text{C}_{15}$ -PA を検出し、培養根由来の ABA および PA が  $^{13}\text{C}$  で標識されていることを確認した (Fig. 5-4b, c)。この培養根をソルガムの根に寄生させ、*S. hermonthica* 結合部およびその周辺の蓄積化合物を分析したが、ABA,  $^{13}\text{C}_{15}$ -ABA, PA,  $^{13}\text{C}_{15}$ -PA のすべてのチャンネルで標品と一致するピークは検出されなかった (Fig. 5-4d)。また同様に生育させた *S. hermonthica* に感染していないソルガムの根から ABA, PA と一致するピークは検出されなかった (Fig. 5-4e)。

### 5-3-5. *S. hermonthica* の種子発芽に伴う ABA 蓄積量および滲出量の変化

*S. hermonthica* の発芽過程における種子抽出液、滲出液中の ABA および PA を定量した。その結果、種子抽出液中の ABA 濃度は GR24 処理後 12 時間後から急激に増加することが明らかになった。また同様に種子滲出液中の ABA 濃度は GR24 処理後 24 時間で最大となり、種子抽出液中の約 4 倍に達した (Fig. 5-5a)。また種子抽出物、滲出液中の PA 濃度についても同様の結果が得られた (Fig. 5-5b)。

### 5-3-6. 地下部に対する ABA 処理が宿主の地上部の生長および蒸散速度に与える影響

ソルガムの草丈は ABA 終濃度が  $1\ \mu\text{M}$  の水耕液中で生育させた場合に処理 3 日目から有意に低下した。一方で ABA 濃度が  $1\ \text{nM}$  以下の場合では無処理の場合と比較して処理 8 日目まで草丈に有意に差は認められなかった (Fig. 5-6a, b)。ソルガムの気孔コンダクタンスは ABA 終濃度が  $1\ \mu\text{M}$  の水耕液で生育させた場合に処理 1 日目から有意に低下し、8 日目においてもその他の ABA 濃度を処理された場合と比較して有意に抑制されていた (Fig. 5-6c)。

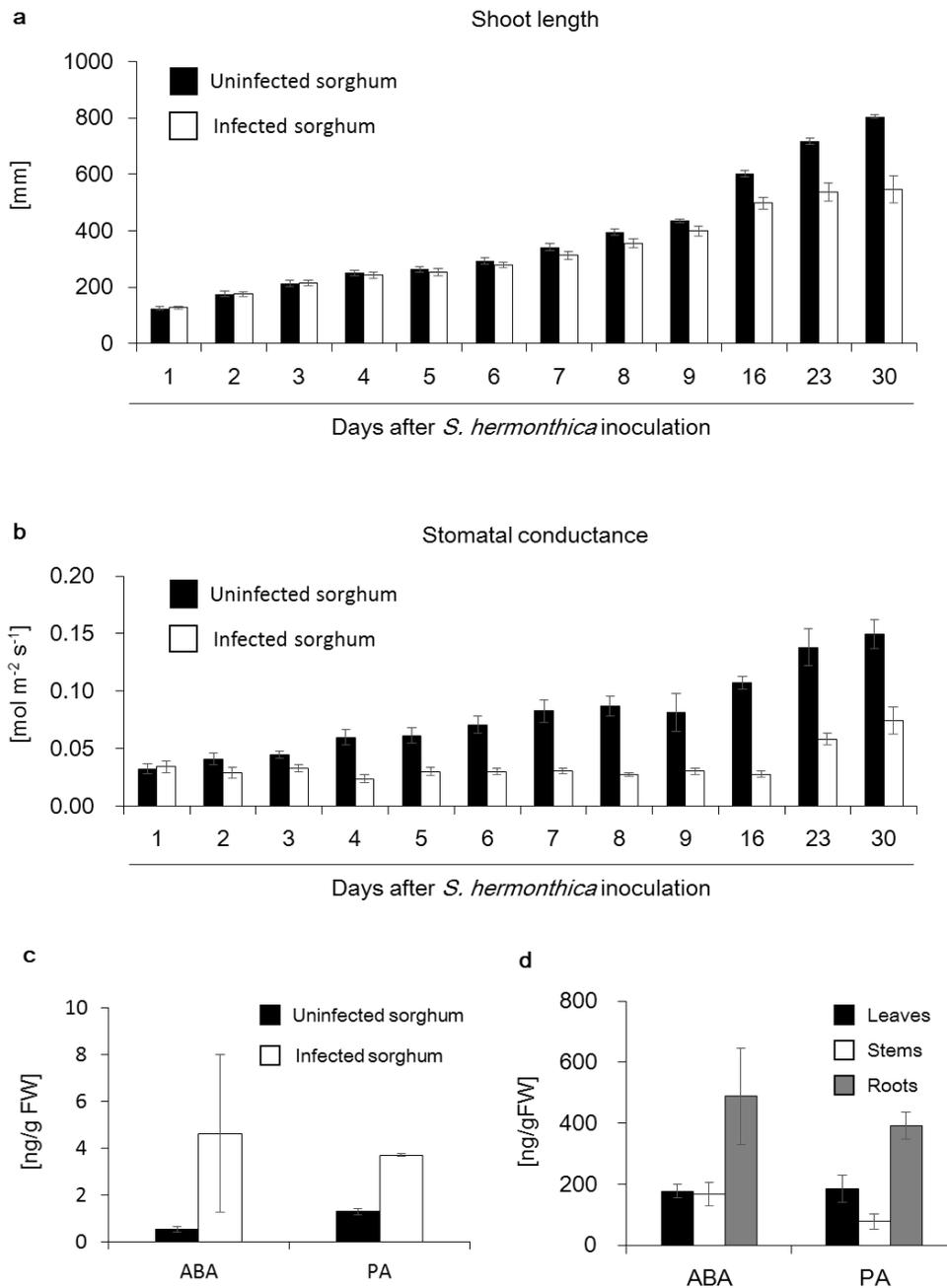
## 5-4. 考察

これまで *S. hermonthica* の寄生は宿主の蒸散の低下と ABA 量の増加を誘導することが報告されている<sup>13,29</sup>。本研究のライゾトロンを用いた実験系においても、*S. hermonthica* の寄生によるソルガムの蒸散低下とソルガムの根の ABA、PA 蓄積量の増加が観察された。*S. hermonthica* の根はソルガムの根と比較して 1000 倍高い濃度を蓄積しており、*S. hermonthica* の寄生に伴い ABA・PA が宿主へ移動していることが示唆された。また従来の *S. hermonthica* の感染に伴う宿主の蒸散低下や ABA 量の増加の研究には *S. hermonthica* が十分に生育した個体を用いられており、これらの原因として養水分収奪による水分ストレスが予想されてきた。本研究ではライゾトロンを用いることで *S. hermonthica* の寄生時期を制御し、ソルガムの蒸散が *S. hermonthica* の寄生後 3 日目から有意に低下することを見出した。この時点での *S. hermonthica* 個体の大きさは宿主と比べて非常に小さく、養水分収奪が宿主の水分スト

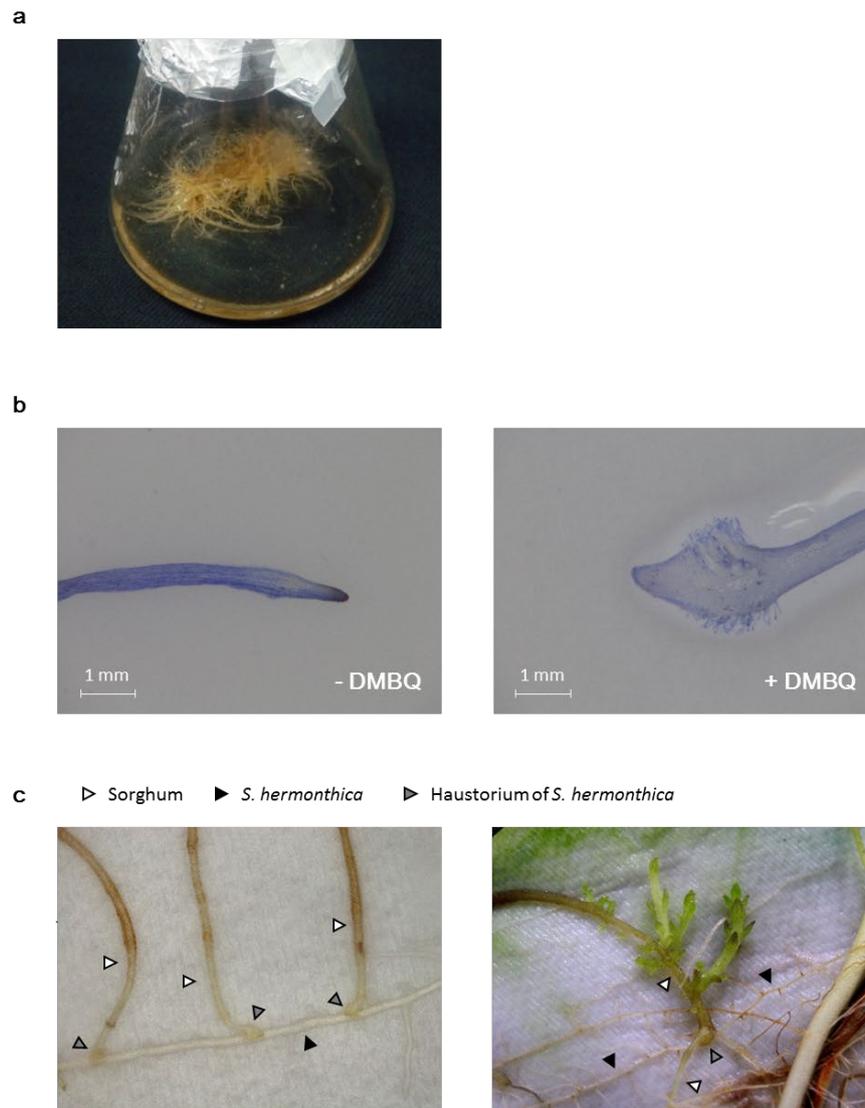
レスを引き起こすとは考えにくい。このことから *S. hermonthica* の寄生に伴う蒸散速度の低下は、水分ストレスとは異なる要因によって引き起こされることが示唆される。

そこで *S. hermonthica* から宿主への ABA の移動について検証するために、<sup>13</sup>C ラベル *S. hermonthica* 培養根の作出を試みた。その結果 <sup>13</sup>C-ラベル化された化合物を蓄積する *S. hermonthica* 培養物を作成し、炭素がすべて <sup>13</sup>C となった ABA を検出することが出来た。さらにこの培養根を宿主の根へ寄生させることに成功したが、ABA の移動を検証するには至らなかった。またソルガムの根から内生の ABA が検出されなかった。このことから本系を用いて寄生植物-宿主間の ABA の移動を検証するためには、実験系のスケールアップによる植物サンプル量の増加やより高効率な抽出分析系の確立が必要であると考えられる。

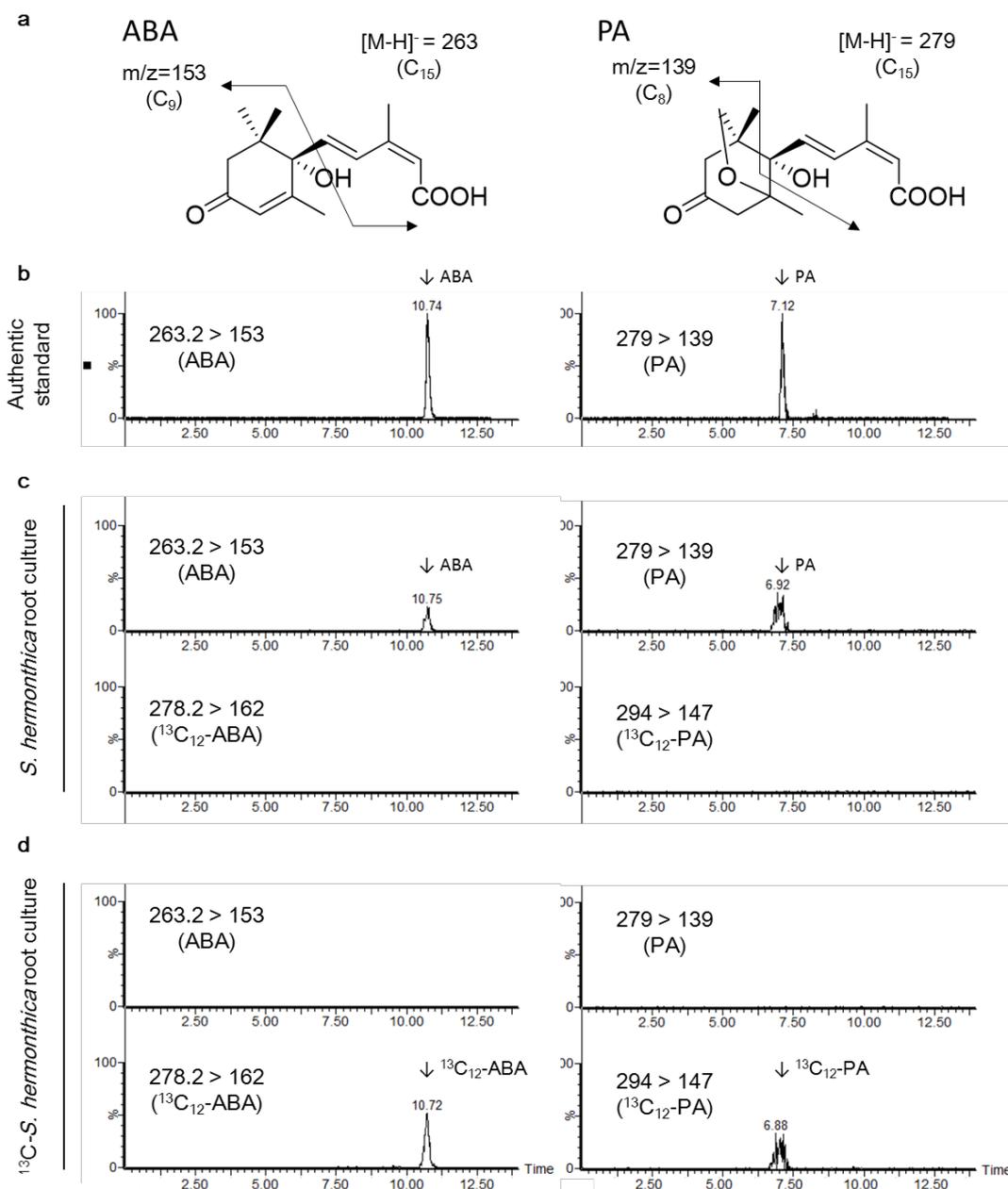
一方で *S. hermonthica* の発芽種子は幼根の出現とともに多量の ABA を放出することが明らかになった。*S. hermonthica* の種子は宿主の根滲出液を認識することで、宿主の根のごく近傍で発芽することから放出された ABA が宿主の根に対して影響すると考えられる。ソルガムの地下部に対する ABA 処理が地上部に与える影響を調べた結果、1 μM ABA を処理した 1 日後から気孔コンダクタンスの低下が認められ、3 日目には草丈の減少が認められた。このことから地下部への ABA 処理は地上部の生長および蒸散を負に制御することを確認した。以上の結果から *S. hermonthica* の寄生初期段階で認められる宿主の蒸散低下には *S. hermonthica* 種子に由来する ABA が関与している可能性が示唆された。



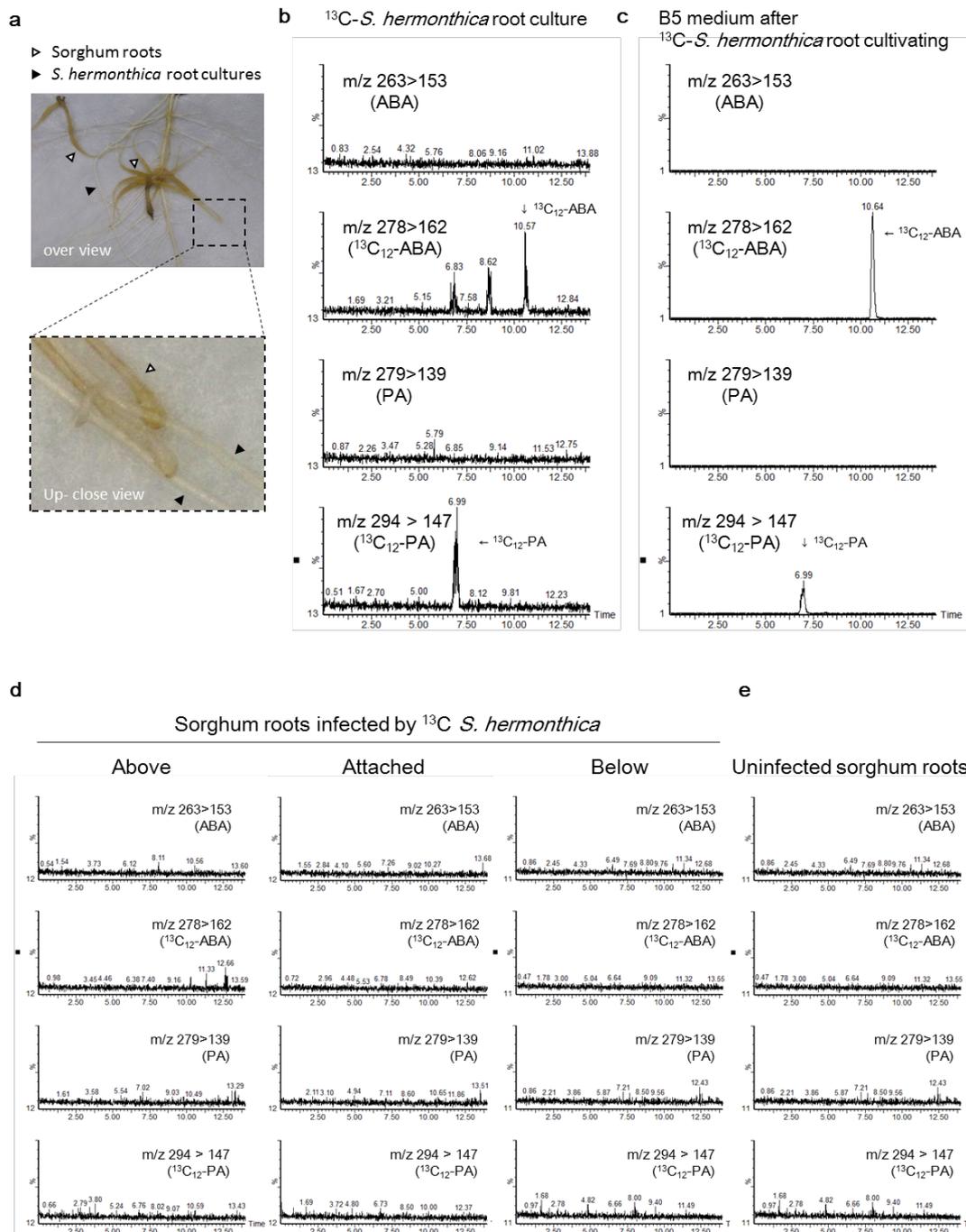
**Figure 5-1.** (a) (b) The effects of *S. hermonthica* infection on sorghum grown in a rhizotron. Each infected sorghum was inoculated 20 seedling of *S. hermonthica*. Data of shoot length and stomatal conductance are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants). (c) ABA and PA contents in roots of sorghum grown in a rhizotron at 32 days after *S. hermonthica* inoculation or not. (d) ABA and PA contents in leaves, stems and roots of *S. hermonthica* at 28 days after infection on sorghum grown in a rhizotron. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 5-2.** (a) Root culture of *S. hermonthica* growing in 2% sucrose 0.1  $\mu$ M NAA B5 liquid medium. (b) A tip of *S. hermonthica* root culture stained with crystal violet. Left panel, A root tip before DMBQ treatment. Right panel, A root tip forming haustorium by DMBQ. (c) *S. hermonthica* root cultures (white triangle) parasitized on sorghum roots (black triangle) with haustorium (gray triangle). Left panel, *S. hermonthica* roots at 2 days after inoculation on sorghum roots. Right panel, *S. hermonthica* root and shoots at 21 days after inoculation on sorghum roots.



**Figure 5-3.** (a) Structures and cleavage patterns of ABA and PA by electrospray. (b)-(d) Typical chromatograms (selected reaction monitoring) of ABA, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-ABA, PA and <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PA in *S. hermonthica* root culture by LC-MS/MS.



**Figure 5-4.** (a) Photograph of  $^{13}\text{C}$ -*S. hermonthica* root culture parasitized on sorghum roots. Black and white triangles indicate sorghum and *S. hermonthica*, respectively. (b)-(e) Typical chromatograms (selected reaction monitoring) of  $^{13}\text{C}$ -*S. hermonthica* root culture, and B5 medium after  $^{13}\text{C}$ -*S. hermonthica* root cultivating, sorghum root infected by  $^{13}\text{C}$ -*S. hermonthica* and uninfected sorghum roots by LC-MS/MS analysis.

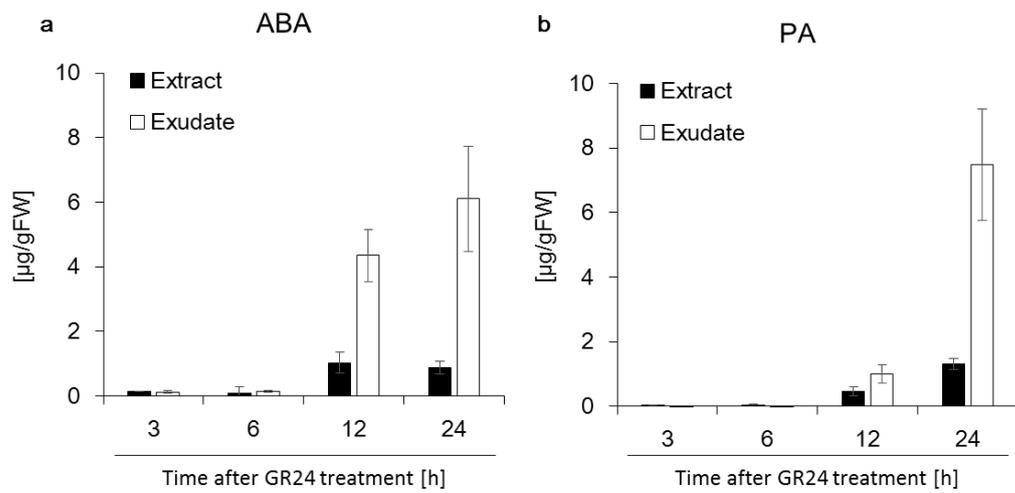
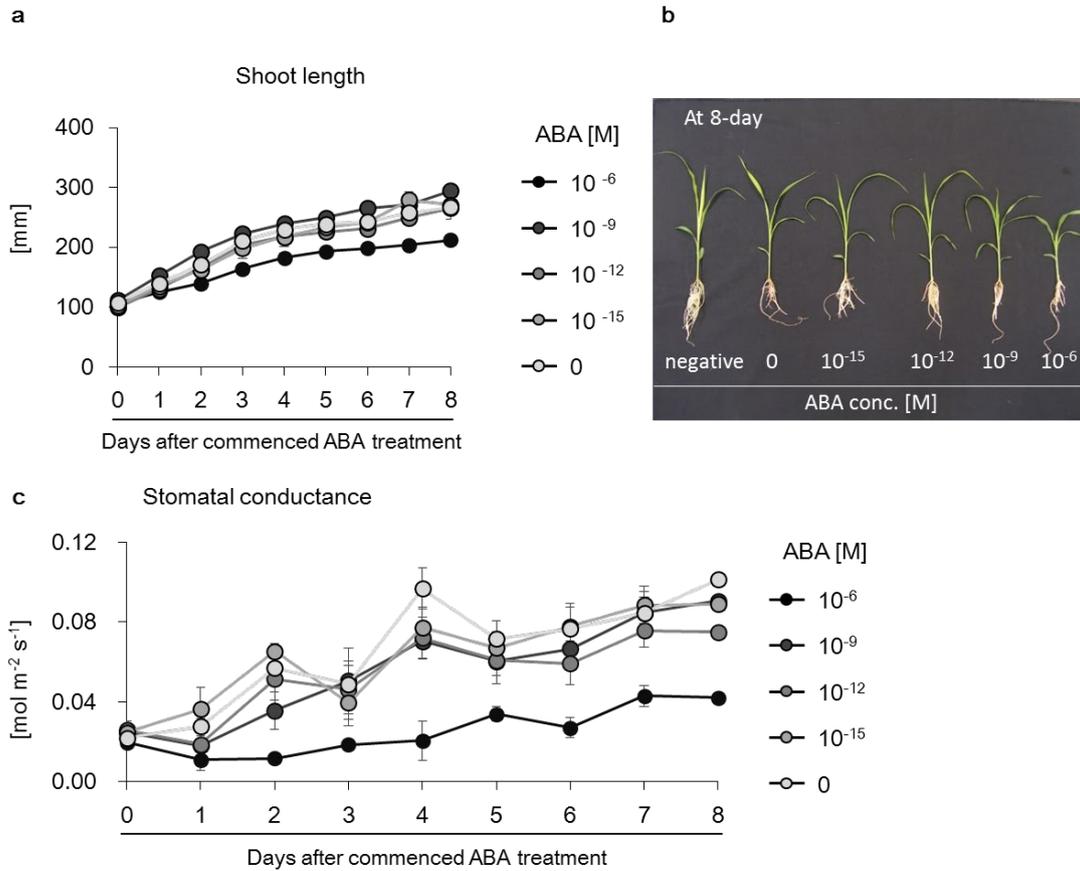


Figure 5-5. (a) ABA and (b) PA contents in extracts and exudates of *S. hermonthica* seeds and seedlings after GR24 treatments. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  biologically independent plants).



**Figure 5-6.** (a) Shoot length of sorghums grown under presence of multiple concentration ABA. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=5$  biologically independent plants). (b) Photograph of sorghums at 8 days after commenced ABA treatment. (c) Changes in stomatal conductance of sorghum grown under presence of multiple concentration ABA. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=5$  biologically independent plants).

## 第6章 総合考察

*Striga* 属や *Rhinanthus* 属などの道管結合型のハマウツボ科寄生植物は盛んな蒸散による水分勾配を利用して宿主から養水分を収奪すると考えられてきた<sup>12,14,60</sup>。中でも *S. hermonthica* の蒸散は短期的な乾燥ストレス下でほとんど低下しないことが知られていたが<sup>16</sup>、その分子メカニズムについては不明であった。本研究は *S. hermonthica* が植物ホルモンである ABA に対して感受性を持たず、その原因が ABA 情報伝達経路を構成する ShPP2C1 と名付けた脱リン酸化酵素にあることを見出した。過去にも *R. minor* やマメダオシ (*Cuscuta australis*) が ABA に対してあまり応答しないことが報告されているが、その分子機構を明らかにしたのは本研究が初めてである。

ShPP2C1 の脱リン酸化活性は *S. hermonthica* から見出した 8 種類の PYL すべてから阻害を受けなかった。さらにシロイヌナズナへの ShPP2C1 の導入は種子や植物体の ABA 感受性を低下させた。シロイヌナズナの *abi-2* は ABI1 の G180D の置換変異によって優性的な ABA 非感受性を示す<sup>54</sup>。ABI1<sup>G180D</sup> は PYL との相互作用を阻害することから<sup>24</sup>、PYL と相互作用を失った PP2C によって植物全体の ABA 感受性の低下が引き起こされると考えられている。実際に *ShPP2C1* は ABA 非感受性を示した葉およびコンディショニング後の種子で強く発現していた。以上の知見を総合すると *ShPP2C1* は *S. hermonthica* の ABA 非感受性の原因遺伝子であると考えられる。

この分子機構の解明と原因遺伝子の同定は、*S. hermonthica* の防除研究における新しいアプローチを与えると同時に、ハマウツボ科寄生植物の養水分収奪の進化に関して分子生物学的な研究を可能にしたと考えられる。*S. hermonthica* は農業上重要な寄生雑草であり、その防除方法の確立に向けて様々な生理生態学的研究が行われている。*S. hermonthica* は ABA 感受性が著しく低い一方で発芽種子から植物体まで自身の代謝能力を上回る多量の ABA を合成している。その為、ABA 感受性の回復は過剰に蓄積した ABA による生長調節の攪乱や養水分収奪機構の抑制を引き起こすと予想される。ShPP2C1 は *S. hermonthica* の ABA 感受性を負に調節する重要な因子であり、その防除法の確立における新たなターゲット分子となることが期待される。

ABA は蒸散調節や種子休眠など乾燥耐性の調節に重要な働きを持つ、植物普遍的な情報伝達物質である。陸上植物群の中で初期に分岐したゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) においても ABA 生合成遺伝子や情報伝達遺伝子はすべて維持されている<sup>27</sup>。このことは ABA による乾燥耐性調節機構の獲得が水分条件の変動する陸上への進出に重要であったことを示しており、ABA 情報伝達経路の異常は陸上植物にとって致命的であると予想される。一方で、寄生能力を持つ植物は宿主の水分を利用することで土壤水分の影響を受けにくく、ABA 情報伝達経路への変異が致命的ではない。それどころか蒸散が低下しなければ宿主との水分勾配は拡大し、水の獲得に有利に働く。本研究では *S. hermonthica* だけでなく *S. gesnerioides* の種子が ABA に応答しないことを見出した。さらに *R. minor* において ABA の

蓄積が認められ、気孔の ABA 感受性が低いことが報告されている<sup>12</sup>。このことから、*Striga* 属や *Rhinanthus* 属を始めとする道管結合型のハマウツボ科寄生植物において ABA 低感受性は共通した形質であり、養水分収奪能力の向上に寄与している可能性がある。*ShPP2C1* の配列解析はこの仮説を検証する上で重要な知見となる。また *R. minor* と比較して *S. hermonthica* の ABA 感受性が極端に低い。これは *S. hermonthica* が絶対寄生性であるために常に蒸散調節機構が必要ない中で、より厳しい乾燥地で高い蒸散を維持するために適応したの結果なのかもしれない。

*S. hermonthica* の発芽種子や植物体は宿主植物と比較して ABA を多量に合成、蓄積していた。*S. hermonthica* は乾燥に応答して ABA 生合成を行う一方で、感受性を欠損しているために高濃度の ABA を蓄積することが出来ると考えられる。しかし、*S. hermonthica* には ABA と共に PA が蓄積しており、自身の代謝能力を上回る量の ABA を生合成していることがわかる。植物病原菌である *Gibberella fujikuroi* は植物ホルモンであるジベレリン類を生産することでイネ馬鹿苗病を引き起こす<sup>61</sup>。また植物病原菌である *Pseudomonas syringae* は植物ホルモンであるジャスモン酸様活性を持つコロナチンを生産し、宿主の病害抵抗性を低下させる<sup>58</sup>。このような植物病原体による植物ホルモン活性化化合物の生産は宿主の生長調節や生理応答を攪乱し、自身の寄生確立や生存の成功に寄与していると考えられている。寄生植物においてもアメリカネナシカズラ (*C. pentagona*) が ABA によって宿主の生長阻害を引き起こすことや、コシオガマ (*P. japonicam*) がサイトカイニンによって宿主の形態変化を誘導することが報告されている。これまで *S. hermonthica* の寄生による宿主の ABA 量の増加と蒸散低下が観察されているが<sup>13,29</sup>、本研究では十分な灌水と湿度条件下で同様の結果が得られることを示した。*S. hermonthica* の感染は速やかに宿主の蒸散速度を低下させたことから、感染を受けた植物の蒸散低下には水分ストレスとは異なる要因が関わっていると考えられる。また本研究において *S. hermonthica* から宿主への ABA の移動を直接的に観察することは出来なかったが、*S. hermonthica* の種子は発芽に伴って多量の ABA を分泌していることを見出した。*S. hermonthica* の種子は宿主の根のごく近傍で発芽することから、寄生直前の宿主の根では局所的に ABA 濃度が上昇すると考えられる。地下部への ABA 処理は宿主の地上部へ影響することから、*S. hermonthica* の ABA が宿主へ影響を与えることが強く示唆された。今後、感染の初期に着目した宿主側の遺伝子応答や植物ホルモン量の変化を解析することによって、*S. hermonthica* の ABA を介した新たな寄生戦略が解明されると期待される。

## 参考文献

1. Press, M. C. Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasites: Trends in Ecology and Evolution. **4**, 258–263 (1989).
2. Yoshida, S., Wakatake, T. & Shirasu, K. A molecular view of survival strategies of root parasitic plants. *Japanese Soc. Chem. Regul. Plants* **49**, 66–73 (2014).
3. Ejeta, G. & Gressel, J. *Integrating New Technologies for Striga Control - Towards Ending the Witch-Hunt*. (WORLD SCIENTIFIC, 2007).
4. Okonkwo, S. N. C. Studies on *Striga senegalensis*. II. Translocation of C14-labelled photosynthate, urea-C14 and sulphur-35 between host and parasite. *Am. J. Bot.* **53**, 142–148 (1966).
5. Graves, J. D., Press, M. C. & Stewart, G. R. A carbon balance model of the sorghum - *Striga hermonthica* host - parasite association. *Plant. Cell Environ.* **12**, 101–107 (1989).
6. Dörr, I. & Kollmann, R. Symplasmic Sieve Element Continuity between *Orobanche* and its Host. *Bot. Acta* **108**, 47–55 (1995).
7. Hibberd, J. M., Quick, W. P., Press, M. C., Scholes, J. D. & Jeschke, W. D. Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell Environ.* **22**, 937–947 (1999).
8. Aly, R., Cholakh, H., Joel, D. M., Leibman, D., Steinitz, B., Zelcer, A., Naglis, A., Yarden, O. & Gal-On, A. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 487–498 (2009).
9. Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Véronési, C., Fer, A. & Thalouarn, P. Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiol. Plant.* **115**, 48–55 (2002).
10. Spallek, T., Melnyk, C. W., Wakatake, T., Zhang, J., Sakamoto, Y., Kiba, T., Yoshida, S., Matsunaga, S., Sakakibara, H. & Shirasu, K. Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 5283–5288 (2017).
11. Dörr, I. How *Striga* parasitizes its host: A TEM and SEM study. *Ann. Bot.* **79**, 463–472 (1997).
12. Jiang, F., Jeschke, W. D. & Hartung, W. Water flows in the parasitic association *Rhinanthus minor*/Hordeum vulgare. *J. Exp. Bot.* **54**, 1985–1993 (2003).
13. Frost, D. L., Gurney, A. L., Press, M. C. & Scholes, J. D. *Striga hermonthica* reduces photosynthesis in sorghum: The importance of stomatal limitations and a potential role for ABA? *Plant, Cell Environ.* **20**, 483–492 (1997).
14. Press, M. C., Tuohy, J. M. & Stewart, G. R. Gas Exchange Characteristics of the Sorghum-*Striga* Host-Parasite Association. *Plant Physiol.* **84**, 814–819 (1987).
15. Ackroyd, R. D. & Graves, J. D. The regulation of the water potential gradient in the host and

- parasite relationship between *Sorghum bicolor* and *Striga hermonthica*. *Ann. Bot.* **80**, 649–656 (1997).
16. Inoue, T., Yamauchi, Y., Eltayeb, A. H., Samejima, H., Babiker, A. G. T. & Sugimoto, Y. Gas exchange of root hemi-parasite *Striga hermonthica* and its host *Sorghum bicolor* under short-term soil water stress. *Biol. Plant.* **57**, 773–777 (2013).
  17. Press, M. C., Shah, N., Tuohy, J. M. & Stewart, G. R. Carbon Isotope Ratios Demonstrate Carbon Flux from C4 Host to C3 Parasite. *Plant Physiol.* **85**, 1143–1145 (1987).
  18. Zeevaart, J. A. D. & Creelman, R. A. Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 439–473 (1988).
  19. Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H. & Ohta, D. Arabidopsis CYP707As Encode ( 1 ) -Abscisic Acid 8'-Hydroxylase , a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid 1. *Plant Physiol.* **134**, 1439–1449 (2004).
  20. Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M. & Nambara, E. High Humidity Induces Abscisic Acid 8'-Hydroxylase in Stomata and Vasculature to Regulate Local and Systemic Abscisic Acid Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 825–834 (2008).
  21. Finkelstein, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arab. B.* **11**, e0166 (2013).
  22. Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. & Abrams, S. R. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 651–679 (2010).
  23. Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L. & Zhu, J. K. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**, 660–664 (2009).
  24. Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provar, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F. & Cutler, S. R. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068–1071 (2009).
  25. Soon, F. F., Ng, L. M., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H. E., Suino-Powell, K. M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M. J., Brunzelle, J. S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E. L., Cutler, S., Zhu, J. K., Griffin, P. R., Melcher, K. & Xu, H. E. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**, 85–88 (2012).
  26. Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1988–1993 (2006).
  27. Bowman, J. L. *et al.* Insights into Land Plant Evolution Garnered from the Marchantia polymorpha Genome. *Cell* **171**, 287–304.e15 (2017).
  28. Lechat, M.-M., Pouvreau, J.-B., Peron, T., Gauthier, M., Montiel, G., Veronesi, C., Todoroki, Y.,

- Le Bizec, B., Monteau, F., Macherel, D., Simier, P., Thoiron, S. & Delavault, P. PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *J. Exp. Bot.* **63**, 5311–5322 (2012).
29. Taylor, A., Martin, J. & Seel, W. Physiology of the parasitic association between maize and witchweed (*Striga hermonthica*): is ABA involved? *J. Exp. Bot.* **47**, 1057–1065 (1996).
  30. Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *Revis. ed. Calif. Agric. Exp. Station. Berkeley, Circ. 347* **347**, 347 (1938).
  31. Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G. W., Fernández, M. A., Holdsworth, M. J., Perez-Amador, M. A., Kollist, H. & Rodriguez, P. L. *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *Plant Cell* **24**, 2483–2496 (2012).
  32. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. & Shinozaki, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 17588–17593 (2009).
  33. Melcher, K., Ng, L. M., Zhou, X. E., Soon, F. F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., Park, S. Y., Weiner, J. J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J. J., Wang, Y., Li, J. J., Peterson, F. C., Jensen, D. R., Yong, E. L., Volkman, B. F., Cutler, S. R., Zhu, J. K. & Xu, H. E. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**, 602–608 (2009).
  34. Fujii, H. & Zhu, J.-K. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8380–8385 (2009).
  35. Nakashima, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.* **32**, 959–970 (2013).
  36. Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**, 2123–2132 (2009).
  37. Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P. C., Guerrier, D., Chedford, F. & Giraudat, J. *Arabidopsis* ABA response gene AB11: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**, 1448–1452 (1994).
  38. Yang, Z., Wafula, E. K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., Huang, K., Bandaranayake, P. C. G., Wu, B., Der, J. P., Clarke, C. R., Ralph, P. E., Landherr, L., Altman, N. S., Timko, M. P., Yoder, J. I., Westwood, J. H. & DePamphilis, C. W. Comparative transcriptome

- analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 767–790 (2015).
39. Miyazono, K. I., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H. J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K. S., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Tanokura, M. Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**, 609–614 (2009).
  40. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
  41. Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* **45**, D313–D319 (2017).
  42. Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **30**, S162–S173 (2009).
  43. Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343–350 (2011).
  44. Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L. & Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* **7**, 10480 (2017).
  45. Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I. & Getzoff, E. D. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326**, 1373–1379 (2009).
  46. Dupeux, F., Antoni, R., Betz, K., Santiago, J., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rubio, S., Park, S.-Y., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L. & Marquez, J. A. Modulation of Abscisic Acid Signaling in Vivo by an Engineered Receptor-Insensitive Protein Phosphatase Type 2C Allele. *Plant Physiol.* **156**, 106–116 (2011).
  47. Okamoto, M., Peterson, F. C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B. F. & Cutler, S. R. Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 12132–12137 (2013).
  48. Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L. & Márquez, J. A. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**, 665–668 (2009).
  49. Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J. & Yan, N. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1230–1236 (2009).
  50. Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J. I., Serrano, R. & Rodriguez, P. L.

- Enhancement of Abscisic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in Arabidopsis by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1 1[W]. (2006). doi:10.1104/pp.106.081018
51. Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K. & Hirayama, T. ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs 1[W]. (2006). doi:10.1104/pp.105.070128
  52. Bhaskara, G. B., Nguyen, T. T. & Verslues, P. E. Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* **160**, 379–95 (2012).
  53. Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J. Z., Wang, J., Yan, S. F. & Yan, N. The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. *Mol. Cell* **42**, 662–672 (2011).
  54. Leung, J., Merlot, S. & Giraudat, J. The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**, 759–71 (1997).
  55. Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D. & Penin, A. A. A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* **88**, 1058–1070 (2016).
  56. Weiner, J. J., Peterson, F. C., Volkman, B. F. & Cutler, S. R. Structural and functional insights into core ABA signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 495–502 (2010).
  57. Boukar, I., Hess, D. E. & Payne, W. A. Dynamics of Moisture, Nitrogen, and *Striga* Infestation on Pearl Millet Transpiration and Growth. *Agron. J.* **88**, 545 (1996).
  58. Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y. & Dong, X. Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host Microbe* **11**, 587–596 (2012).
  59. Kimura, Y., Takematsu, T., Konnait<sup>o</sup>, M. & Takeuchi, Y. (+)-abscisic acid and two compounds showing chlorophyll degradation activity in *cuscuta pentagona engelm.* *Agricultural and Biological Chemistry* **46**, 1071–1073 (1982).
  60. Světlíková, P., Hájek, T. & Těšitel, J. Water-stress physiology of *Rhinanthus alectorolophus*, a root-hemiparasitic plant. *PLoS One* **13**, e0200927 (2018).
  61. YABUTA & T. On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **14**, 1526 (1938).

## 摘要

根寄生植物 *Striga hermonthica* はイネ科の植物の根に寄生する。*S. hermonthica* の寄生は宿主植物の生長を抑制することから、生育地であるアフリカのサブサハラ地域における農業生産を大きく阻害する要因となっている。しかしながら *S. hermonthica* の有効な防除法はいまだ確立されていない。*S. hermonthica* は光合成能力に乏しく、その生育には宿主の養水分の収奪が不可欠である。*S. hermonthica* は葉から盛んに蒸散を行うことで、根の結合部から宿主の養水分を収奪すると考えられている。一般的に乾燥に対して植物は蒸散を抑制するが、しかし *S. hermonthica* は乾燥条件下でも蒸散がほとんど低下しない。一方で *S. hermonthica* の寄生は宿主植物の蒸散を大きく低下させる。この二つの現象によって宿主と *S. hermonthica* の間の蒸散速度が維持されていると考えられるが、そのメカニズムについては明らかになっていなかった。Abscisic acid (ABA) は植物の乾燥応答を調節する植物ホルモンであり、気孔閉鎖や種子の発芽阻害作用を持つ。以上の背景から、本研究では *S. hermonthica* の蒸散低下の回避および寄生による宿主の蒸散低下の誘導機構について、ABA に着目した解析を行った。

始めに *S. hermonthica* の ABA 生合成能について検証を行った。その結果、*S. hermonthica* は宿主に依存せずに ABA を生合成しており、宿主と比較して高濃度の ABA を蓄積していることが明らかになった。続いて ABA に対する *S. hermonthica* の応答を調べた結果、*S. hermonthica* は ABA の処理によって蒸散がほとんど低下せず、種子の発芽も阻害されなかった。以上の結果から *S. hermonthica* は ABA に対する感受性が著しく低下していることが明らかになった。

植物における ABA の情報伝達は以下に示す 3 つのタンパク質の相互作用によって行われる。ABA 非存在下では Group A 型 Protein phosphatase 2C (PP2C) がその酵素活性によって ABA 情報伝達の正の調節因子である SNF1 related protein kinase 2 (SnRK2) の機能を抑制している。ABA 受容体である PYRABACTIN RESISTANCE 1 LIKE (PYL) は ABA と結合することで活性化し、PP2C の酵素活性を阻害する。これにより SnRK2 は機能を回復し、ABA 情報伝達経路が活性化する。PYL-PP2C 相互作用の異常が植物体の ABA 感受性の著しい低下を引き起こす。そこで *S. hermonthica* の ABA 感受性異常を支える分子機構を明らかにするため、*S. hermonthica* から PYL および PP2C 遺伝子を単離し、それらのタンパク質機能を解析した。*S. hermonthica* の 8 種類の PYL (ShPYLs) の機能を *In vitro* で解析した結果、7 種類の ShPYL が ABA 濃度依存的に PP2C の脱リン酸化活性を阻害することが明らかになった。続いて *S. hermonthica* の 4 種類の Group A 型 PP2C (ShPP2C) の機能を検証した。その結果、ShPP2C2-4 は PYL の存在によって ABA の濃度依存的にその脱リン酸化活性が阻害された一方で、ShPP2C1 は ABA 存在下でも PYL によってその脱リン酸化活性がほとんど阻害されなかった。また発現量解析の結果から *ShPP2C1* は *S. hermonthica* の種子および葉において十分に発現していることが確認された。野生型のシロイヌナズナに *ShPP2C1* を導入すると、植物の ABA 感受性が著しく低下し蒸散が活性化した。以上の結果から *S.*

*hermonthica*において ShPYL は正常な機能を持つ一方で、ShPP2C1 の脱リン酸化活性が PYL-ABA 複合体から阻害を受けないために、ABA 情報伝達経路が常に負に制御されていると考えられた。

ShPP2C1 と PYL との相互作用の低下の原因を明らかにするため、アミノ酸配列の比較とアミノ酸置換導入による相互作用への影響を検証した。PP2C が PYL との相互作用に必要とされるアミノ酸領域であるトリプトファンロック (Trp-lock) 周辺の配列に着目した結果、ShPP2C1 に特徴的な 5 つのアミノ酸変異を見出した。これら 5 つのアミノ酸を ABI1 に導入した結果、野生型と比較して ABA、PYL 存在下での脱リン酸化活性が向上した。一方で ShPP2C1 におけるこれらのアミノ酸残基をシロイヌナズナ様に置換した (ShPP2C1<sup>5 mutations</sup>) 場合、高濃度の ABA、PYL 存在下での脱リン酸化活性が野生型よりも低下した。野生型のシロイヌナズナに対する ABI1<sup>5 mutations</sup> の導入は、植物の ABA 感受性を著しく低下させ蒸散の活性化を誘導した。以上の結果からこれら 5 つの残基が ShPP2C1 の PYL 相互作用能を低下させ、植物体の ABA 感受性の低下に寄与していることが明らかになった。しかし、ShPP2C1<sup>5 mutations</sup> は ABA、PYL 存在下で脱リン酸化活性を 60%程度維持しており、機能を完全に阻害されることはなかった。このことから ShPP2C1 の PYL 相互作用能のさらなる低下に対する未知のアミノ酸残基の関与が示唆された。

*S. hermonthica* は ShPP2C1 の異常によって ABA 感受性が著しく低下していることが明らかになった。その為、*S. hermonthica* に多量に蓄積した ABA は内生の生理活性物質とは異なる別の役割を持つことが示唆される。そこで *S. hermonthica* の寄生に伴う宿主の蒸散低下や生長抑制に ABA が関与すると考えた。ライゾトロンを用いることで *S. hermonthica* の寄生に伴う宿主の蒸散低下は寄生のごく初期から発生することを見出した。さらに *S. hermonthica* の種子は発芽とともに高濃度の ABA を分泌していた。*S. hermonthica* は宿主の根の分泌物に応答し根のごく近傍で発芽することから、発芽に伴って分泌される ABA が宿主に影響することが示唆された。

以上の結果から、*S. hermonthica* は ShPP2C1 が ABA 情報伝達経路を恒常的に抑制することで ABA 非感受性を示すことが明らかになった。このことから ShPP2C1 は *S. hermonthica* と宿主植物の間の蒸散差の維持に寄与する重要な遺伝子であると考えられる。さらに *S. hermonthica* は発芽とともに ABA を盛んに合成しており、これによって宿主の蒸散低下を誘導していることが示唆された。

## 謝辞

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻 植物機能化学研究室教授の杉本幸裕先生には指導教官として本研究に取り組む機会と研究遂行における多大なるご支援を戴きました。杉本先生には自然科学研究者としてあり方だけでなく、仕事への取り組み方についても多くのご指導を頂戴しました。六年間にも渡り、未熟な私を粘り強く指導して下さったことに甚大なる感謝の意を申し上げます。同研究室の准教授の水谷正治先生には本論文審査の副査としてだけでなく、日頃から研究における沢山の指導を戴きました。また学会等で度々頂いた学术交流の機会は長い研究生生活における励みとなりました。先生のお心遣いに深く感謝申し上げます。同専攻教授の宇野知秀先生には、本論文の執筆における副査として沢山の御助言を戴きましたこと、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたっては、宇都宮大学バイオサイエンス研究センターの岡本昌憲博士から多大なるご支援を頂きました。ストライガのABA情報伝達因子の生化学解析を行う上で実験サンプルの供与および実験技術の直接指導を戴き、雑誌投稿論文の執筆の際にも手厚いご支援を頂戴しました。先生の精力的な研究姿勢と取り組み方には大きな影響を受けました。先生からの多大なるご支援に心から甚謝の意を申し上げます。また生化学解析実験を行うにあたり、支援して頂いた鳥取大学乾燥地研究センターの安萍准教授、辻本壽教授および妻鹿良亮博士に厚く御礼申し上げます。

植物機能化学研究室での生活においては、研究指導にあたってくださった助教授の山内靖雄先生を始め、同研究室のスタッフの皆様、先輩、後輩方に支えていただきました。常日頃からのラボの皆様の温かい支援に感謝いたします。

最後に26年間、私を支えてくれた両親と兄に心よりの感謝を申し上げます。

2019年1月 藤岡 聖