

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19380014

研究課題名(和文) 発芽の鍵を握るラジカルスカベンジャーの機能解析と応用

研究課題名(英文) Application and analysis of function of radical scavenger in crop seed germination

研究代表者

井上 眞理 (IWAYA-INOUE MARI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：60091394

研究成果の概要：

イネ科およびマメ科作物の子実の成熟および発芽過程について主に活性酸素およびラジカルスカベンジャーの機能に注目して調べた。吸水後のコムギおよびオオムギ種子のアリユーロン細胞で生成される H_2O_2 は、抗酸化物質であるアスコルビン酸により消去されることを明らかにした。また、子実の登熟過程において、穂発芽抵抗性のコムギ“農林 61 号”は、ラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸による発芽抑制効果が登熟後期の開花 28 日目から顕著となり、 H_2O_2 を消去するカタラーゼ活性が著しく高くなった。さらに、コムギのアスコルビン酸散布処理は、いずれの登熟ステージにおいても有効な穂発芽抑制物質となることが示された。デンプン種子だけでなく、油糧種子の成熟や発芽過程についても基礎的な知見を得た。ラッカセイでは、 H_2O_2 処理により 90%以上の発芽率を示し、対照区に比べ著しく改善された。含水率は子葉および下胚軸ともに吸水に伴い漸増したが、下胚軸の増大は顕著だった。水の動態を示す T_2 は、下胚軸では吸水 1 日後から 5 日目まで漸増し自由水が出現した。乾燥子実への H_2O_2 処理により下胚軸および幼根においてエチレン生成が 3 倍となることが明らかになった。そこで、エチレン応答性遺伝子群の発現を正に制御する転写因子抗 GmEin3 抗体によるイムノプロットを行った結果、 H_2O_2 処理によりラッカセイの下胚軸および幼根に明瞭な交差シグナルが早い時期から検出された。また、ダイズ種子の成熟過程の子実の成熟過程における含水率の変化とオートファジー関連遺伝子である ATG8 ファミリーとの関係にも着目し、GmATG8i は含水率の低下に伴い開花 28 日目からその発現程度が低くなることも合わせて報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2008 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：作物生理学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：コムギ、穂発芽、自由水、過酸化水素、アスコルビン酸、ラッカセイ、エチレン

1. 研究開始当初の背景

種子の発芽は、作物栽培や雑草防除の重要な問題であるにもかかわらず、その機構については未知の部分を残している。種子発芽は、一般にジベレリン (GA) とアブシジン酸 (ABA) のバランスで決まるとされている。休眠覚醒後のイネ科種子に ABA を与えると発芽を強く阻害する。しかし、休眠中の種子と休眠覚醒した種子の ABA 含量に差は認められないため、未知の発芽阻害物質が存在する可能性が高いとされている。GA が発芽を促進することはよく知られた事実であるが、過酸化水素 (H_2O_2) で処理をしてもムギ類の発芽率は著しく向上する。 H_2O_2 は活性酸素の一種であり、大腸菌などの原核生物、動物、植物などの真核生物に至るまで普遍的に存在しており、生体に傷害を与える物質としても知られている。一方で、植物は巧妙に活性酸素を感知し、ストレス応答のシグナルとして利用している (Karpinski et al. 1999)。発芽における H_2O_2 による促進効果は、不均化で生じる酸素が原因であることを否定する報告があることから (Ogawa et al. 2001)、申請者らは、発芽時における抗酸化物質の機能について調査した。その結果、コムギ種子はアスコルビン酸 (AsA) 処理により発芽が著しく抑制されることを明らかにした (Ishibashi and Iwaya-Inoue 2006)。

発芽現象で農業上の問題となっているイネ科作物の穂発芽は雨天や低温などで引き起こされ、収穫前に穂上で種子が一斉に発芽し、特にコムギでは深刻な打撃を受ける。わが国は穂発芽を起こしやすい条件に曝されており、小麦品質劣化の原因ともなっている。穂発芽耐性には種子の休眠性が深く関わっており、登熟期間の温度など気象条件により影響されるため正確な検定は容易ではない (Yanagisawa 2001)。本研究では、発芽および登熟過程を調べる方法として、水の物性の指標となる核磁気共鳴 (NMR) 法にも着目し、非破壊的方法によるインタクトな試料を対象とする。これまで、植物のもつ水の物性に関する一連の研

究から (Iwaya-Inoue and Nonami 2003)、イネの穂発芽特性の異なる系統を材料に、横緩和時間 (T_2) をパラメーターとして水の水分動態が有効であることを示した (Ishibashi et al. 2005)。さらに、イネ穂の温度ストレスによる影響について 25MHz NMR による早期診断法として、NMR 緩和時間は登熟過程の穂のストレス傷害の「危険日」を診断する指標となることを示した (Funaba et al. 2006)。

2. 研究の目的

発芽の要因には植物ホルモンの寄与が大きいが、必ずしも植物ホルモンの制御だけでは種子発芽の全容を説明できない。発芽促進には、過酸化水素 (H_2O_2) 処理が有効であることから (Ogawa et al. 2001)、その消去系であるアスコルビン酸 (AsA) は、発芽を抑制することが想定された。一方で、発芽後 48 時間では胚や胚乳において AsA 含量が増加することから、発芽後に必須な物質であることが報告されている (Tommansi et al. 2001)。ジベレリン応答性遺伝子発現の実験系としてアリュウロン細胞プロトプラストが広く利用されているが、活性酸素による発芽促進の機構は未だ不明な点を多く残している。

本申請では、イネ科およびマメ科種子を用い、種子の発芽・休眠に及ぼすアスコルビン酸をはじめとした活性酸素消去系 (ラジカルスカベンジャー) の影響について、非破壊的に水の分子動態を観測する。さらに、登熟過程および発芽過程におけるラジカルスカベンジャーの役割を種子の個体・組織・細胞および分子レベルで明らかにすることを目的とする。また、 H_2O_2 により誘導されるエチレン応答とについての検討を行う。

3. 研究の方法

(1)コムギ子実の水の動態とラジカルスカベンジャー関連遺伝子発現レベルとの関係
材料 コムギ (*Triticum aestivum* L.) 穂発芽特性の異なる品種) の成熟種子
方法

発芽率および水の動態との関係について検討する。種子の水の動態解析は¹H-NMRにより行い、ラジカルスカベンジャー処理による成熟種子の自由水成分と結合水成分の割合の変化を求める。

発芽時の活性酸素生成の有無の解析を行い、組織化学的に生成部位の特定を行う。

発芽時の種子のアスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) の発現レベルを調査する。

(2) マメ科子実の発芽過程の水の動態と活性酸素によるエチレンの誘導

材料 ラッカセイ *Arachis hypogaea* L. 「サウザンクロス」の種子

方法

発芽率および水の動態との関係について

¹H-NMR 法により行う。

乾燥子実および発芽過程の種子の組織化学的観察を行う。

活性酸素処理による Ein3 (エチレン受容体) の誘導を調査する。

詳細な方法については以下の研究成果に記載する。

4. 研究成果

コムギの登熟過程および成熟子実に対するラジカルスカベンジャーの発芽抑制効果

コムギ (*Triticum aestivum* L.) cv. シロガネコムギの成熟種子を蒸留水(DW)、200mM アスコルビン酸(AsA)溶液で24時間浸漬後、1、3、5、7日間の風乾期間を設定し、DWで20、7日間、暗所で発芽試験を行った。コムギ成熟子実の発芽率に及ぼすアスコルビン酸浸漬処理の結果、1、3、5、7日間いずれの場合も風乾後に著しい発芽抑制を示した。

このことからアスコルビン酸で種子を一度吸水させた場合、乾燥後の子実の発芽率は回復しないことが明らかとなり、アスコルビン酸による発芽抑制には持続性があることが示された。

さらに、登熟中のコムギの穂発芽に及ぼすアスコルビン酸散布処理の影響をみるために、1/5000a ワグネルポットで栽培した開花後28~35、35~42、42~49日の穂に200mM アスコルビン酸(展着剤と混合)を直接散布し、

散布した週の最終日と開花後56日目にそれぞれ穂を収穫して穂発芽率を調査した。その結果、アスコルビン酸を散布した週の最終日に穂を収穫した実験区においては、開花後35~42、42~49日に散布処理を行った区においてコントロールよりもアスコルビン酸処理区で穂発芽率は有意に抑制された。開花後56日目に収穫を行った実験区でも同様に、開花後28~35、35~42、42~49日に散布処理を行ったすべての区においてアスコルビン酸処理により穂発芽率は抑制された。

以上のことから、登熟過程の子実および成熟子実に対するアスコルビン酸処理は発芽を抑制することが明らかとなり、いずれの登熟ステージにおいてもアスコルビン酸は有効な穂発芽抑制物質となることが示された。

コムギの登熟過程における穂発芽特性の異なる2品種におけるラジカルスカベンジャーの消長と遺伝子発現

AsAと穂発芽特性の関係について穂発芽特性が異なる品種(易:シロガネコムギ、難:農林61号)を用いて、AsA含量、ラジカルスカベンジャーとして働くAPX, DHAR, CAT活性および遺伝子発現について調査した。

シロガネコムギと農林61号はそれぞれ21DAP(days after pollination)と35DAPに発芽し、登熟過程における発芽率はシロガネコムギの方が高かった。休眠打破処理した種子(半切種子)は両品種共に28DAP以降100%発芽し、両品種間に有意な差は得られなかった(図1A)。

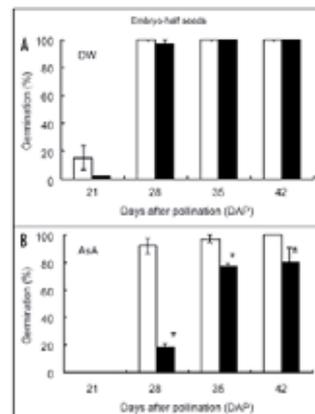


図1 登熟中のコムギ(シロガネコムギ、農林61号)半切種子におけるAsA浸漬処理による発芽率の推移(白、シロガネコムギ;黒、農林61号)

AsA処理はシロガネコムギでは、その抑制効果はほとんど確認されなかったが、農林61

号では 28~42DAP まで有意に抑制効果を示し、特に 28DAP で抑制率が高かった(図 1B)。以上の結果から、アスコルビン酸に対する感受性は 2 品種間で異なり、穂発芽性と一致することが明らかとなった。

登熟過程におけるアスコルビン酸の含量は、シロガネコムギでは 21DAP で最も高く、登熟後期には確認されなかったが、農林 61 号では登熟後期まで確認された(図 2)。

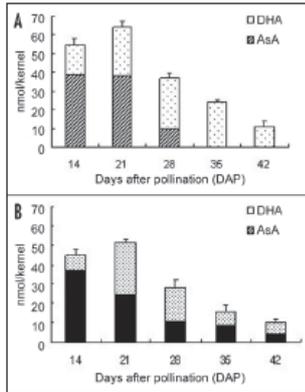


図 2 登熟中のコムギ子実のアスコルビン酸 (AsA) 含量およびデヒドロアスコルビン酸 (DHA) 含量の推移. A, シロガネコムギ; B, 農林 61 号

アスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX) 活性は 2 品種間で有意な差は見られなかった(図 3A)。

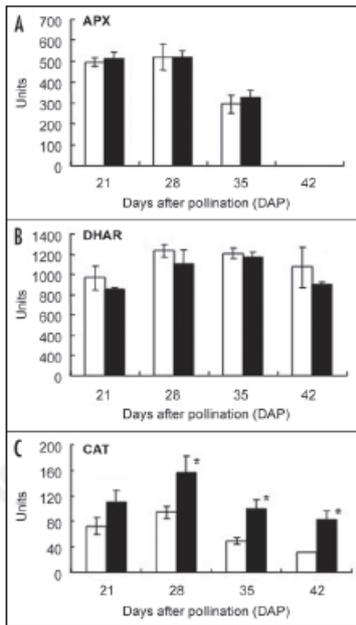


Figure 3. Antioxidant enzymes in Shirogane-Komugi and Norin61 seeds during development and maturation processes. (A) APX (ascorbate peroxidase), (B) DHAR (dehydroascorbate reductase), (C) CAT (catalase). White bars indicate Shirogane-Komugi and black bars indicate Norin61. The reported values are the means and S.D. of five replications. 1 unit = 1 nmol ascorbate oxidized min⁻¹ kernal⁻¹ [APX]; 1 nmol DHA reduced min⁻¹ kernal⁻¹ [DHAR]; 1 nmol H₂O₂ eliminated min⁻¹ kernal⁻¹. An asterisk indicates statistical significance at the 5% level (Student's *t*-test).

図 3 登熟中のコムギ子実のラジカスカベンジャー活性の推移. A, アスコルビン酸ペルオキシターゼ (APX); B, デヒドロアスコルビン酸リダクターゼ (DHAR); C, カタラーゼ (CAT) 白, シロガネコムギ; 黒, 農林 61 号

しかし、登熟過程におけるカタラーゼ (CAT) 活性はシロガネコムギに比べて農林 61 号で高く、特に 28DAP において著しく高かった(図 3C)。CAT は mRNA レベルでも同様に農林 61 号において高いことを確認した(図 4)。

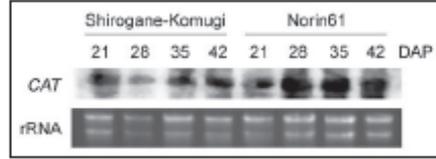


Figure 4. Northern blots of CAT gene expression in Shirogane-Komugi and Norin61 seeds during development and maturation processes.

図 4 登熟中のコムギ (シロガネコムギ、農林 61 号) の CAT 遺伝子発現の推移

以上の結果から、農林 61 号はシロガネコムギに比べ抗酸化能力が高いことが明らかとなり、登熟過程の抗酸化能力と穂発芽性との関係を明らかにした。

ラッカセイ子実の活性酸素処理によるエチレンシグナルの活性化の誘導

マメ科もやしの生産には、発芽率の高さと胚軸長の斉一性が求められる。本研究ではラッカセイもやし生産のための溶液処理法を検討し、まず子実の発芽過程について、水分動態と貯蔵物質である脂質の変化に着目し解析した(淵上ら 2009)。胚軸長と屈曲の制御に過酸化水素(H₂O₂)が有効であったことから、イムノプロットによりエチレン受容に関わるタンパク質レベルの誘導を解析し、その生理的意義について考察した。

ラッカセイ子実は、H₂O₂ 処理により 90% 以上の発芽率を示し、対照区に比べ著しく改善された。ムギ類では発芽促進に H₂O₂ が有効であったが(Ishibashi et al. 2008)、マメ科子実にも同様であることが確かめられた。含水率は子葉および下胚軸ともに吸水に伴い漸増したが、下胚軸の増大は顕著だった。T₂ は、乾燥子実の子葉では 1ms 程度の低い値を示したが、吸水 1 日後で約 100ms まで急激に延長し、その後は約 80ms 前後で推移した。下胚軸の T₂ は、乾燥子実では 1 ms 程度であったが、吸水 1 日後から 5 日目まで漸増し最終的には子葉よりも高い値を示した。胚軸と異なり、子葉の T₂ 二成分と含水率には正の相関は見られなかった。また、乾燥子実の子葉では隙間なく存在していた脂肪粒は、吸水 7 日目後には分

解され小さくなることを確認した。一方、胚軸では、乾燥子実と吸水処理 1 日後には脂肪粒が分布していたが、7 日後には脂肪粒の局在は見られなかった(淵上ら 2009)。

さらに、 H_2O_2 処理区では、エチレン生成が 3 倍となることが明らかになった(図 5A)。抗 GmEin3 抗体によるイムノプロットにより、蒸留水(コントロール区)では弱いシグナルしか検出されなかった。これに対し、 H_2O_2 処理により、明瞭な交差シグナルが処理 1 日後、3 日後に 70kDa 付近に検出された(図 5B)。

以上のことから、ラッカセイ子実の発芽や胚軸の制御には、エチレンシグナルの活性化を示す Ein3 タンパク質が関与していることが示唆された。

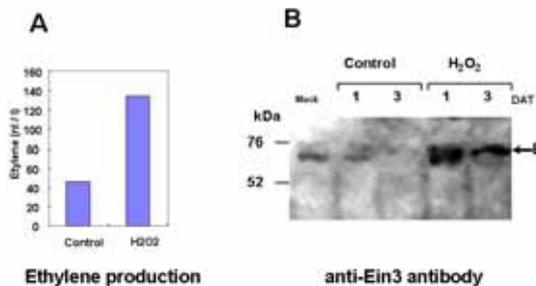


図5 ラッカセイ子実の発芽に伴うエチレン生成とその受容体の検出。A, エチレン含量; B, エチレン受容体 Ein3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Yamauchi, T., M. Imamura, M. Arimura, M. Maeshima, R. Matsunaga, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Water status related to aquaporins in cowpea plants exposed to drought stress, *Cryobiol. Cryotechnol.*, 53(2), 87-93, 2007, 査読有

Tawaratsumida, T., K. Yamamoto, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue, Effect of low temperature, plant hormones and ascorbic acid on wheat germination phenomena, *Cryobiol. Cryotechnol.*, 53(2), 133-138, 2007, 査読有

Ishibashi, Y., K. Yamamoto, T. Tawaratsumida, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Hydrogen peroxide scavenging regulates germination ability during wheat (*Triticum aestivum* L.)

seed maturation, *Plant Sign. Behav.*, 3, 183-188, 2008, 査読有

Imamura, M., T. Yuasa, T. Takahashi, N. Nakamura, Nang Myint Phyu Sin Htwe, S. H. Zheng, K. Shimazaki, M. Iwaya-Inoue, Isolation and characterization of a cDNA coding cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) calcineurin B-like protein interacting protein kinase, VuCIPK1, *Plant Biotechnol.* 25, 437-445, 2008, 査読有

井上眞理, $^1\text{H-NMR}$ による作物の温度応答モニタリング法、*日本作物学会紀事*, 77, 527-532, 2008, 査読有

Tanaka, K., E. Takeda, R. Onishi, M. Funaba, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue, Water status of thermal stress-resistant rice seeds, *Cryobiol. Cryotechnol.*, 54(2), 129-134, 2008, 査読有

Nang Myint Phyu Sin Htwe, H. Tanigawa, Y. Ishibashi, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Relationship of water content and dry weight to autophagy-related gene expression in maturing seeds of soybean, *Cryobiol. Cryotechnol.*, 54(2), 135-142, 2008, 査読有

Ishiba, S., T. Yuasa, M. Nakata, Y.

Takahashi, A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor repression of shoot growth in response to gibberellins, *Plant Cell*, 20(12), 3273-3288, 2008, 査読有

[学会発表](計15件)

武田恵理子、船場貢、岩浪賢司、伊佐磨美、石橋勇志、井上眞理、イネの登熟過程における温度ストレスが子実の形態形成に及ぼす水分生理的要因、*日本植物学会九州支部会*、2007.05.08、福岡女子大学

依積田智也、山本康平、石橋勇志、井上眞理、コムギの登熟過程の発芽現象における低温とアスコルビン酸の拮抗作用、*低温生物工学会大会*、2007.07.23、東京海洋大学
今村雅和、山内崇、古屋忠彦、湯淺高志、井上眞理、ササゲの気孔閉鎖と ABA 合成関連遺伝子の発現と関係について、*日本作物学会*、2007.09.09.26、金沢大学

田中浩平、大西亮樹、武田恵理子、井上

眞理、水稲登熟初期の高温ストレスに対する籾の水分動態、日本作物学会、008.03.27、札幌コンベンションセンター
船場貢、武田恵理子、石橋勇志、井上眞理、登熟過程における「にこまる」と「ヒノヒカリ」籾の温度ストレス応答の差異、日本作物学会、008.03.27、札幌コンベンションセンター

Ishibashi, Y., K. Yamamoto, T.

Tawaratsumida, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Relationship between H₂O₂ scavenging and germination ability during wheat (*Triticum aestivum* L.), The 5th Int. Crop Science Congress., 2008.04.13, Jeju, Korea

Tawaratsumida, T., K. Yamamoto, Y. Ishibashi and M. Iwaya-Inoue, The influence on germination in wheat seeds treated by plant hormones, ascorbic acid and temperatures in relation to water status, The 5th Int. Crop Science Congress., 2008.04.13, Jeju, Korea

Tanaka, K., E. Takeda, R. Onishi, Y. Ishibashi, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Influences of heat stress on rice plants characterized by induction of heat shock proteins in relation to water status, The 5th Int. Crop Science Congress., 2008.04.13, Jeju, Korea

Ishibashi, Y., T. Tawaratsumida, K.

Kondou, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Role of hydrogen peroxide produced in aleurone cell on germination process, The 9th ISSS Conference on Seed Biology., 2008.06.11, The University of Warmia and Mazury Olsztyn, Poland

Tawaratsumida, T., K. Kondou, Y. Ishibashi, T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in promoting the germination of barley seeds, The 9th ISSS Conference on Seed Biology., 2008.06.11, The University of Warmia and Mazury Olsztyn, Poland

久松美咲、谷川宏行、石橋勇志、湯浅高志、井上眞理、ダイズとインゲンマメの発芽過程における水分動態と組織化学的特性、日本作物学会、2008.09.24、神戸大学

山本康平、俵積田智也、石橋勇志、湯浅高志、井上眞理、コムギの登熟過程および成

熟子実に対するアスコルビン酸の発芽抑制効果、日本作物学会、2008.09.24、神戸大学

Nang Myint Phyu Sin Htwe, T. Yuasa, Y. Hashiguchi, M. Fuchigami and M. Iwaya-Inoue, Starvation stress activates autophagy-related genes and ethylene signaling in soybean seedling, Japan-Korea Int. Symposium, 2008.11.12, Chungnam natn. Univ., Daejeon, Korea

Imamura, M., T. Yuasa and M. Iwaya-Inoue, Hydraulic properties of drought-resistant cowpea plants, Japan-Korea Int. Symposium, 2008.11.12, Chungnam natn. Univ., Daejeon, Korea

淵上茉莉子、石橋勇志、湯浅高志、井上眞理、ラッカセイ子実の発芽時の吸水パターンと中性脂質の分解との関係、日本作物学会、2009.03.28、つくば国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001701/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 眞理 (IWAYA-INOUE MARI)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：60091394

(2)研究分担者

湯浅 高志 (YUASA TAKASHI)
九州大学・農学研究院・准教授
研究者番号：40312269

(3)連携研究者

なし