

平成 21 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19570051

研究課題名（和文）シロイヌナズナ種子吸水初期応答の研究

研究課題名（英文） Studies on early imbibition responses in Arabidopsis seeds

研究代表者 南原 英司 (NANBARA EIJI)

独立行政法人理化学研究所・生長制御研究グループ・客員主管研究員

研究者番号：90271626

研究成果の概要：

種子吸水時の分子メカニズムにかんする研究をおこなった。種子吸水と発芽／休眠の過程を区別するために、シロイヌナズナの休眠性が高い種子 (Cvi 系統) と低い系統 (Col 系統) の比較解析をおこなった。マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、Cvi 系統でも Col 系統でも吸水後 3 時間で顕著な遺伝子発現変動を見いだした。また、シクロヘキシミドを用いた研究から、これら遺伝子発現は、種子に蓄えられた転写因子によることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：「基礎生物学」・「植物分子生物・生理学」

キーワード：種子、吸水、シロイヌナズナ、マイクロアレイ、遺伝子発現、植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

種子が吸水することによって、様々な生物反応が活性化される。最近のゲノム研究の進展に伴い、種子発芽の分子メカニズムはよく理解されてきたが、種子吸水後極初期の生物反応についてはほとんど分子レベルで理解されていない。

2. 研究の目的

本研究は、ゲノム研究のツールが揃っているシロイヌナズナ種子を用いて、遺伝子発現解析、および、ホルモン代謝に関する研究をお

こなない、これまでそのメカニズムが明らかでなかった種子吸水の分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの種子休眠性が高い Cvi 系統と休眠性が低い Col 系統を用いて、マイクロアレイ解析、ホルモン分析をおこなった。乾燥種子を吸水させ、0, 15 min, 30 min, 1 時間、3 時間吸水させた種子を解析した。マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の ATH1 GenomeArray を用いた。また、ホルモン分析

は Agilent 社の液体クロマトグラフィー：質量分析装置を用いておこなった。また、種子発芽に異常をきたした変異株を用いて同様の解析をおこなった。

4. 研究成果

種子生理を理解する上で、種子吸水から休眠、もしくは発芽に移行する分子メカニズムを理解する上で吸水応答は重要なプロセスである。

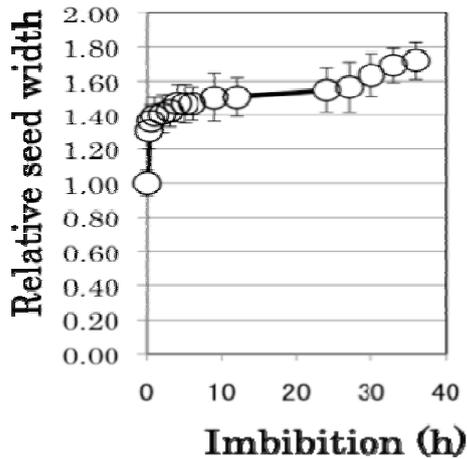


図1 Col 系統の種子吸水

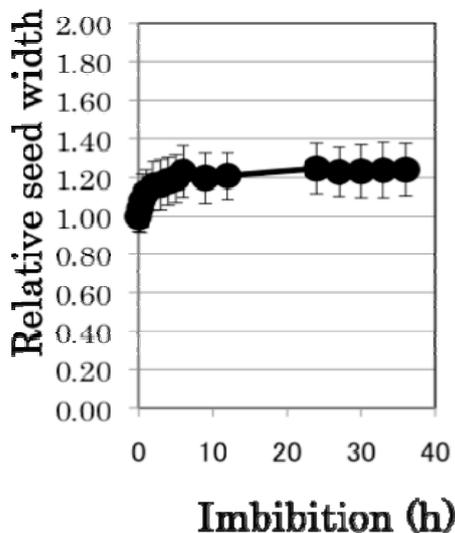


図2 Cvi 系統の種子吸水

まず、種子吸水の経時変化を観察した。Col 種子 (図1) も Cvi 種子 (図2) も、吸水開始直後から吸水に伴う種子の膨張が観察された。共に、吸水3時間でこの膨張は観察されなくなった。また、Col 種子のほうが Cvi 種子と比べてより急激な膨張をする事が明らかとなった。

吸水直後の遺伝子発現

Col 種子と Cvi 種子を用いてマイクロアレイ解析をおこなった。ともに、15分、30分吸水種子では少数の mRNA レベルが減少していたものの、約 22000 種類の mRNA レベルは大きな変動は見られなかった。それに対して、1時間吸水した Col 種子では2個の遺伝子が up-regulate していた。この事から、Col 種子では新規の転写は1時間目から始まる事が予想された。一方、1時間吸水した Cvi 種子では up-regulate した遺伝子は見いだされなかった。

それに対して、3時間吸水種子は Col も Cvi もそれぞれ、約 1000 個の遺伝子が up-regulate、また、約 1000 個の遺伝子が down-regulate していた。

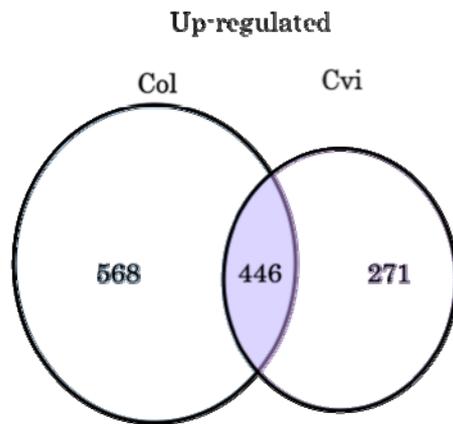


図3 吸水3時間で up-regulated している遺伝子群。

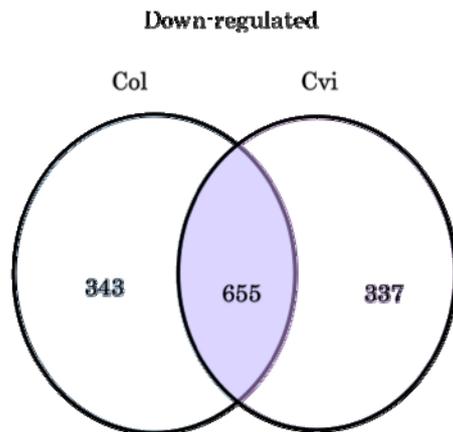


図4 吸水3時間で down-regulate している遺伝子群。

図3と図4に3時間吸水種子で up-regulate していた遺伝子群と down-regulate していた遺伝子群の系統間で

の重なりを示した。ともに、吸水によって mRNA 量の変動する遺伝子群は、Col/Cvi で共通に変動する遺伝子群と Col 特徴的、Cvi 特徴的な遺伝子群に分類された。この結果から、種子吸水によって誘導される遺伝子群の調節系には、種子休眠の程度に影響されない共通なメカニズムと休眠性（もしくは系統間）に固有の調節系があることが明らかとなった。

Col/Cvi 系統で共通に up-regulate されている遺伝子には、エネルギー代謝の遺伝子群が有意に多く含まれていた。また、これら遺伝子には多くの転写因子が含まれており、その中には種子発芽/休眠の調節因子である ABI4 が含まれた。また、ABI4 は種子吸水後に下流の調節因子である CH01 転写因子の遺伝子発現を活性化する事も見いだした。

Col/Cvi 系統共通に up-regulate される遺伝子には種子の主要な ABA 代謝酵素である CYP707A2 遺伝子が含まれていた。実際に、Col 系統でも Cvi 系統でも ABA 量は吸水後ともに減少した。ABA 量の低下は吸水 2-3 時間目から見られ、これは、CYP707A2 が誘導される時間と一致する。他の植物ホルモンの量を調べた所、オーキシンである IAA と JA 量は吸水 1 時間ですでに有意に変化していた。これらのことは、ABA 量の低下は吸水後に誘導される CYP707A2 によって引き起こされるのに対して、IAA や JA では種子に保存された酵素によって吸水後の量の変動が引き起こされていることによると考えられた。

一方、Col 特徴的に up-regulate する遺伝子群は Gene Ontology を調べた所、有意にタンパク質合成関連遺伝子群が濃縮されていた。以前に、Col 系統種子のマイクロアレイ解析から、24 時間吸水種子では有意にタンパク質合成遺伝子群が濃縮されている事、また、このタンパク質合成関連遺伝子群の転写活性化には TCP14 転写因子が関与している事を報告している。実際に、Col 系統の種子では TCP14 遺伝子が吸水 3 時間から活性化されており、この活性化は Cvi 系統種子では見られなかった。これらの結果から、以前に報告していた TCP14 を介したタンパク質合成関連遺伝子の活性化は Col 系統に特徴的で、吸水後 3 時間目から誘導される事を意味している。

さらに、吸水初期の遺伝子発現が乾燥種子に貯蔵されている転写因子によるのか、吸水後に新輝合成された転写因子によるのかを評価するために、シクロヘキシミド処理を施した種子を用いて同様の遺伝子発現解析をおこなった。シクロヘキシミドはタンパク質合成阻害剤であり、乾燥種子に蓄えられた転写装置で吸水応答遺伝子群の発現が調節されているのであればシクロヘキシミド処理によって、遺伝子発現が影響を受けない事が

予想された。CYP707A2 の遺伝子発現を始めとする多くの吸水誘導遺伝子の誘導はシクロヘキシミド処理を施した場合も誘導された。それに対して、吸水後に mRNA 量が減少する遺伝子群の 1 つの ABI2 遺伝子についてはシクロヘキシミド処理によって、down-regulation が抑制された。この結果は、種子吸水後の ABI2 遺伝子発現は主に新規合成された転写因子によって調節されている事を示している。

本研究によって、これまで分子メカニズムが示されていなかった種子の初期吸水応答のメカニズムの一端が明らかとなった。種子吸水応答は、乾燥種子が新規タンパク質合成を開始して、後の、発芽および休眠誘導をする上で必須の現象である。これら吸水応答遺伝子群は、種子の活力を調べる、また、種子の品質管理の上で重要なマーカー遺伝子になる事が期待される。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 立松圭、Jeremy Preston、菅野裕理、藤茂雄、川上直人、神谷勇治、南原英司 シロイヌナズナ種子吸水時の遺伝子発現解析
2008. 日本植物生理学会年会 (札幌)

② Mitsuhiro Kimura, Jeremy Preston, Kiyoshi Tatematsu, Yuri Kanno, Shigeo Toh, Naoto Kawakami, Yuji Kamiy, and Eiji Nambara. COMPARATIVE STUDIES ON NON-DORMANT COL AND DORMANT CVI SEEDS: COMMON AND POLYMORPHIC REGULATIONS ON MOLECULAR MECHANISM OF SEED IMBIBITION IN ARABIDOPSIS. International meeting on Arabidopsis research. July 2008, Montreal, Canada

③ Mitsuhiro Kimura and Eiji Nambara. STUDIES ON IMBIBITION-INDUCED GENE EXPRESSION IN DORMANT AND NON-DORMANT ARABIDOPSIS SEEDS: THE EFFECT OF

CYCLOHEXIMIDE ON EARLY INDUCTION OF GENE
EXPRESSION. 4th International workshop on
plant dormancy. June 2009. Fargo, ND, US

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南原 英司 (NANBARA EIJI)
独立行政法人理化学研究所・生長制御研究
グループ・客員主管研究員
研究者番号：90271626

(2) 研究分担者

立松 圭 (TATEMATSU KIYOSHI)
独立行政法人理化学研究所・適応制御研究
チーム・研究員
研究者番号：00373324