

平成22年6月1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880034  
 研究課題名（和文） オーソログアプローチによる雑草種子の休眠・発芽を不斉一にする遺伝的要因の解明  
 研究課題名（英文） Molecular genetic basis of weed seed dormancy and germination

研究代表者  
 今泉 智通 (IMAIZUMI TOSHIYUKI)  
 (独) 農研機構・中央農研・雑草バイオタイプ・総合防除研究チーム・契約研究員  
 研究者番号：10509235

研究成果の概要（和文）：アブシジン酸(ABA)とジベレリン(GA)は、種子の休眠や発芽を調節する重要な植物ホルモンである。コナギ (*Monochoria vaginalis*) 種子の休眠状態と種子中の内生ホルモン量の関係を調べるため、ABA と GA、そして ABA の代謝産物のコナギ種子中の内生量を一斉に定量する方法を確立した。この手法を用いて、休眠覚醒時の ABA の不活性化経路を特定した。そして、内生 ABA 量調節の遺伝的機構を明らかにするため、ABA の生合成および不活性化に関与する遺伝子の全長鎖を決定した。

研究成果の概要（英文）：Abscisic acid (ABA) and gibberellins (GAs) are well known to be involved in dormancy and germination control. To determine the molecular mechanism of seed dormancy in *Monochoria vaginalis*, a simultaneous analysis of ABA, GA and metabolites of ABA was established. We revealed a pathway of ABA catabolism playing a predominant role in seed dormancy of *M. vaginalis* using this method. *NCED* genes and *ABA-GT* genes which confer ABA biosynthesis or catabolism were isolated.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：雑草学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：種子休眠、発芽

## 1. 研究開始当初の背景

発生の不斉一性は、雑草の持つ重要な特性であり、雑草防除を困難にしてきた最大の要因でもある。雑草種子に特徴的なことは、作

物とは異なり休眠性があることである。そのため、雑草の発生の不斉一性は、休眠状態の不斉一性と発芽に対する環境応答の不斉一性が主要因となっている。さらに、休眠状態

および発芽応答の不斉一性は、個々の種子の遺伝的変異と個々の種子がおかれた環境の両方の影響を受ける。したがって、雑草の発生の不斉一性を解明するためには、「休眠状態と発芽応答の不斉一性は、遺伝的要因と環境要因からどのように影響を受けるのか？」という問いに答えることが不可欠である。しかしこれまでの研究は、生態学的な観点から環境要因に着目したものが中心であった。

種子の休眠と発芽の調節には、内生アブシジン酸 (ABA) 量と内生ジベレリン (GA) 量のバランスが重要な役割を果たすことが知られており、近年、ABA と GA の生合成と不活性化の鍵となる酵素遺伝子が明らかになった。こうした研究はシロイヌナズナなどのモデル植物を材料に進められている。本研究では、これらモデル植物の知見を活用し、雑草種子における発生の不斉一性を制御する遺伝的要因の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

発生の不斉一性を制御する遺伝的要因の解明をするため、(1) 休眠種子および非休眠種子における内生 ABA 量の違いを明らかにし、(2) ABA の生合成および不活性化に関与する遺伝子の決定し、(3) 休眠状態の季節変化を明らかにした。

### (1) 種子中の ABA 量の定量

ABA は、種子の休眠状態の維持や発芽の阻害など、種子の休眠および発芽を調節する重要な植物ホルモンである。したがって、休眠覚醒の課程で種子中の ABA が不活性化され、その内生量が低下すると考えられる。ABA の不活性化経路は、ABA がファゼイン酸 (PA)、ジヒドロファゼイン酸 (DPA) へと代謝される水酸化経路と、ABA グリコシルエステル (ABA-GE) へと代謝される配糖体化経路がある (図 1)。



図1. ABAの不活性化経路

休眠覚醒にどちらの経路が重要であるか明らかにすることは、休眠を調節する遺伝子を特定する上でも不可欠な情報となる。そこで、休眠種子と非休眠種子の ABA 量ならびにその代謝産物量を量り、休眠覚醒に関与する ABA の不活性化経路を特定した。

### (2) ABA 調節遺伝子の決定

内生 ABA 量調節の遺伝的機構を明らかにするためには、まずアブシジン酸 (ABA) の生合成および不活性化に関与する遺伝子を決定する必要がある。そこで、ABA の生合成に関与する 9-*cis*-エポキシコロテノイドジオキシゲナーゼ (*NCED*) 遺伝子と、ABA の不活性化に関与するグルコシル化酵素 (*ABA-GT*) 遺伝子を決定した。

### (3) 休眠状態の季節変化

発生の不斉一性を制御する遺伝的要因を明らかにするためには、異なる休眠状態の種子を材料にし、それらの生理状態・遺伝子発現などを比較する必要がある。そこで、コナギ種子の休眠状態の季節変化を明らかにし、内生ホルモンの定量および発現解析に用いる材料の準備を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、水田の夏生雑草であるコナギ (*Monochoria vaginalis*) を材料として用いた。コナギは深い種子休眠を持ち、GA 処理により発芽が促進し ABA 阻害剤処理により休眠誘導が阻害されることがわかっている。このため、モデル植物で判明しつつある「ABA と GA による休眠・発芽の調節機構」と比較することが可能となる。

### (1) 種子中の ABA 量の定量

コナギ種子に休眠覚醒効果のある処理のひとつに低温湿潤処理がある (図 2)

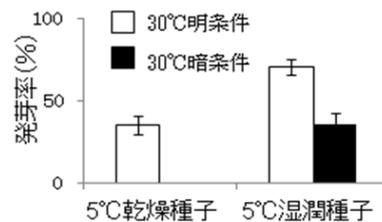


図2. 低温湿潤処理による休眠覚醒

そこで、5°C乾燥状態で保存してあるコナギ種子を用いて、低温 (5°C) 湿潤処理を行った種子と無処理の種子 (5°C乾燥種子) の ABA と ABA 代謝産物の内生量を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて定量した。

### (2) ABA 調節遺伝子の決定

*NCED* 遺伝子と *ABA-GT* 遺伝子の全長鎖を決定するため、他の植物の塩基配列情報を参考に各遺伝子の保存領域に PCR プライマーを設

計し、RT-PCR(reverse transcription-PCR)によりそれぞれの遺伝子断片を増幅した。そして、増幅した遺伝子断片の塩基配列をもとに、RACE法(rapid amplification of cDNA ends 法)により各遺伝子の全長鎖 cDNA を決定した。

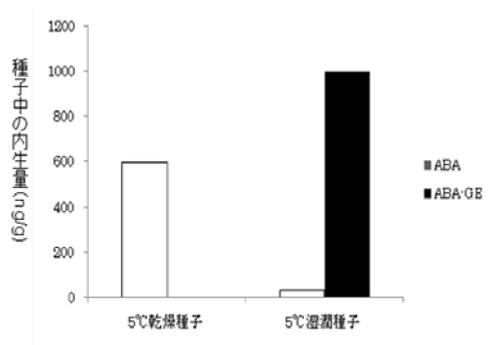
### (3) 休眠状態の季節変化

戸外土壌中に埋めたコナギ種子を2ヶ月に一度回収し、発芽試験に供試することで休眠状態の季節変化を明らかにした。また、発芽試験の供試種子とは別に、ホルモン分析ならびに発現解析用の種子も併せて回収した。環境条件の違いが休眠の季節変化に与える影響もあわせてみるため、水田条件ならびに畑条件(大豆)の戸外土壌中にコナギ種子を埋土した。

## 4. 研究成果

### (1) 種子中の ABA 量の定量

コナギ種子中の、ABA と GA1 および GA4、そして ABA の代謝産物である PA、DPA、ABA-GE の内生量を LC/MS/MS で一斉解析する方法を確立した。この方法を用いて、休眠種子(5°C 乾燥種子)と非休眠種子(5°C 湿潤種子)の内生ホルモン量を定量したところ、湿潤処理により内生 ABA 量が低下し、ABA-GE 量の増加が認められた(図3)。このことから、湿潤処理による休眠覚醒の過程で、配当体化経路により ABA が不活性化し種子中の内生 ABA 量が低下すると考えられる。このとき、PA・DPA の増加はなく、内生 ABA 量低下への水酸化経路の関与は認められなかった。



### (2) アブジジン酸調節遺伝子の決定

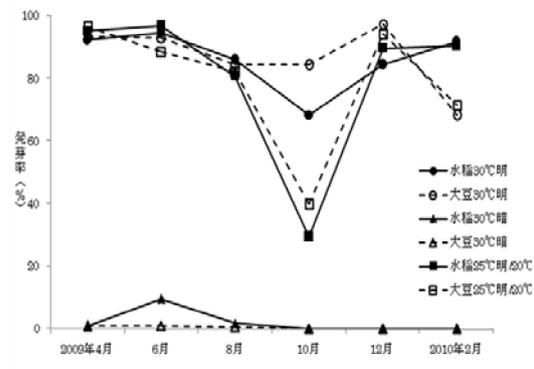
RACE 法を用いて遺伝子の全長鎖を決定するためには、比較的純度の高い RNA を抽出する必要がある。しかし、多くの植物において、種子中には多糖類やポリフェノールなどの不純物が多くあり、コナギ種子から RNA 抽出する場合もこれらの不純物の精製が必要となり、純度の高い RNA の抽出が困難であった。本研究では、多糖類やポリフェノールなどを

除去する前処理方法を確立すること、純度の高い RNA を抽出することを可能にした。この方法でコナギ種子中から抽出した RNA を用いて、ABA の生合成に関与する *NCED* 遺伝子と、配当体化経路による ABA の不活性化に関与する *ABA-GT* 遺伝子の部分領域を増幅、シーケンシングし、得られた部分配列情報をもとに RACE 法を用いて全長鎖 cDNA の塩基配列を決定した。

### (3) 休眠状態の季節変化

2ヶ月毎に回収したコナギ種子の発芽率は、10月に低くなった後、12月には再び高い発芽率を示した(図4)。このことから、コナギ種子は、秋に休眠が深くなった後、冬には速やかに休眠が覚醒するものと考えられる。また水田状態では、入水後の6月に休眠が浅くなる傾向が認められた(図4)。このことから、野外においても湿潤条件におかれることで、コナギ種子の休眠が浅くなる可能性が示唆された。

発芽試験に供試した種子とは別に、ホルモン分析ならびに遺伝子の発現解析に供試する種子も回収・保存してある。今後は、これらの種子を解析し、休眠状態の季節変化と種子中の内生ホルモン量や遺伝子発現の関係を明らかにすることで、発生の不斉一性を制御する遺伝的要因の解明へつながると期待される。



## 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)

[雑誌論文] (計4件)

① Imaizumi, T., G.X. Wang and T. Tominaga. 2008. Inheritance of sulfonyleurea resistance in *Monochoria vaginalis*. *Weed Research* 48: 448-45.

② Imaizumi T., G.X. Wang and T. Tominaga 2008 Pollination of chasmogamous flowers and effects of light and emergence time on

chasmogamy and cleistogamy in *Monochoria vaginalis*. *Weed Biology and Management*, 8: 260-266.

③稲垣栄洋・今泉智通・汪光熙・富永達 2008. 静岡県におけるスルホニルウレア系除草剤抵抗性コナギの分布. *雑草研究* 53: 123-127.

④Inagaki H., T. Imaizumi, G.X. Wang, T. Tominaga, K. Kato, H. Iyozumi, H. Nukui. 2009. Sulfonylurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* generate higher ultraweak photon emissions than the susceptible ones. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95: 117-120.

〔学会発表〕 (計 3 件)

①Imaizumi T., G.X. Wang, T. Ohsako and T. Tominaga. Oct., 2009. Molecular characterization and inheritance of sulfonylurea resistance in *Monochoria vaginalis*. The 1<sup>st</sup> China-Japan-Korea Workshop on Pesticide Science, Shanghai, China.

②今泉智通・尾形茂・内野彰. 2009年4月. イヌホタルイのスルホニルウレア系除草剤抵抗性集団における遺伝的多様性の集団間差異, 日本雑草学会, 倉敷.

③伊藤健二・今泉智通・内野彰. 2009年4月 鹿児島県の水田に発生した SU 抵抗性ウキアゼナに対する各種除草剤の効果 1, 日本雑草学会, 倉敷.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今泉 智通 (IMAIZUMI TOSHIYUKI)

農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター・契約研究員

研究者番号：10509235