

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580207

研究課題名（和文） アマモ場造成を目指したアマモの種子発芽の研究

研究課題名（英文） Study of seed germination in eelgrass for recovery of seagrass meadows

研究代表者

塩田 肇 (SHIOTA HAJIME)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：40315825

研究成果の概要（和文）：アマモ場造成の基礎となるアマモの種子発芽メカニズムについて、生理・遺伝子のレベルで研究を行った。アマモの種子発芽は、低温、低塩濃度、低浸透圧などで促進され、中でも低浸透圧が最も優先的に作用した。植物ホルモンとしては、アブシシン酸とジベレリンが作用したが、作用する時期は陸生植物とは異なった。種子発芽時に発現する遺伝子が87種類単離された。研究成果を応用し、種子発芽を抑えて1年以上保存できる種子保存法を提唱した。

研究成果の概要（英文）：For recovery of seagrass meadow, seed germination mechanism in eelgrass was studied at physiological and genetic level. The seed germination was promoted under low temperature, low salinity, or hypoosmolality, and affected by phytohormones, abscisic acid and gibberellin. Eighty-seven genes expressed during seed germination were isolated and characterized. The seed preservation method was proposed, and it could store seeds more than one year suppressing germination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：水圏環境・保全、アマモ場、種子発芽、植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

アマモ場は魚介類の生活と繁殖の場となる。50年程前までは日本の浅海には多くのアマモ場が存在していたが、埋め立てや水質汚染のため大部分が失われた。近年、水産資源保護や自然環境保全の観点から、各地でアマモ場造成が進められている。しかし、その基礎となるアマモの生物学的知見は十分とは

言えない。

この15年程の間に、陸生の種子植物では膨大な生物学的知見が蓄積された。しかし、海生の種子植物であるアマモでは、このような植物生理学的・分子生物学的研究はほとんど行われておらず、陸生植物で得られた研究成果も十分に活用されていない。そこで、アマモの生理メカニズム、特に種子の休眠と発

芽のメカニズムに着目し、研究を進めてきた。これまでの研究により、漠然としていた開花後日数と種子発達の関係を明らかにし、形態的・生理的特徴から種子発達過程や種子発芽過程を規定した。また、温度、塩濃度、浸透圧が発芽に影響することも明らかになった。一方で、植物ホルモンの反応性や遺伝子の発現が、陸生植物とアマモでは必ずしも一致しないことも示された。これらのことから、アマモ種子には、陸生植物の種子とは異なる生理メカニズムが存在する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究ではアマモの種子発芽の生理メカニズムの解明を目的とする。まず、種子発芽にどのような環境要因や植物ホルモンが影響するのかを、植物生理学的手法で解析する。続いて、種子発芽時にどのような遺伝子が発現するのかを探索し、これらの遺伝子の発現様式と機能を解析する。これらの結果を陸生植物での研究成果と比較して、アマモの種子発芽の生理メカニズムを明らかにする。

さらに、安全で効果的なアマモ場造成を実現するため、本研究で得られる成果を応用して、科学的知識に裏付けされた種子管理技術の開発にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) 種子発芽に影響する環境要因の解析

アマモ成熟種子を、さまざまな環境要因で処理し、これらが発芽に与える影響を植物生理学的に解析した。環境要因としては、塩濃度、浸透圧、温度、酸素濃度、光（日長、波長）、振動を対象とした。種子発芽は、すでに規定されていた三段階（Phase I, Phase II, Phase III）を指標に評価された。

アマモ種子は、横須賀市走水のアマモ場から種子を採取された。開花約30日目の未熟種子を採取し、神奈川県水産技術センターの大型水槽内で成熟させて用いた。

(2) 種子発芽に影響する植物ホルモンの解析

アマモ成熟種子を、さまざまな植物ホルモンで処理し、これらが発芽に与える影響を植物生理学的に解析した。植物ホルモンとしては、陸生植物で種子発芽を抑制するアブシシン酸、種子発芽を促進するジベレリン、エチレンを対象とした。また、発芽だけでなく、発芽後の成長における影響についても解析した。種子発芽は、すでに規定されていた三段階を指標に評価された。

(3) 種子発芽時に発現する遺伝子の探索

アマモの種子発芽時に発現する遺伝子を網羅的に検出するため、サブトラクション法による発現遺伝子の濃縮を行った。サブトラ

クション法では、発芽種子のcDNAライブラリーから休眠種子のcDNAライブラリーを差し引いて、双方に共通する遺伝子を取り除き、種子発芽時に発現する遺伝子のみを効果的に濃縮した。

サブトラクション法で濃縮されたcDNAライブラリーから遺伝子を単離し、遺伝子配列を解読した。遺伝子配列情報を、陸生植物の遺伝子データベースやアマモのESTデータベースの情報と比較して、遺伝子産物の生理機能を類推した。さらに、種子発芽過程で発現解析（リアルタイムRT-PCR法）を行い、その発現様式から種子発芽で中心的に作用する遺伝子の絞り込みを行った。

また、種子成熟時に発現する遺伝子と種子休眠時に発現する遺伝子についても、サブトラクション法やcDNAライブラリーからの直接クローニングで単離し、同様の方法で解析を行った。

(4) 種子発芽に作用する遺伝子の機能解析

(3)で単離されたアマモ遺伝子について、定量的RT-PCR法（リアルタイムPCR法）やin situハイブリダイゼーション法によって、さまざまなストレス条件下や組織レベルでの発現解析を行った。また、4種類の遺伝子について、遺伝子組換え大腸菌や遺伝子組換え植物（シロイヌナズナ）を作製し、遺伝子産物の生理的な機能について解析した。

(5) アマモ場造成での種子管理技術の開発

アマモの種子発芽に効果のある環境要因や植物ホルモンを応用して、種子保存の実用的な方法の開発を試みた。特に、高い浸透圧条件下で種子発芽を抑制して保存する方法を検討した。

4. 研究成果

(1) 種子発芽に影響する環境要因の解析

アマモの種子発芽における環境要因の影響を植物生理学的に解析した。種子発芽は、その過程を三段階に分け、総合的に評価された。

塩濃度については、低塩濃度の場合に種子発芽過程全般が促進された。浸透圧については、低浸透圧の場合に種子発芽過程前半が促進された。温度については、低温で種子発芽過程全般が促進されたが、その効果よりも塩濃度の効果の方が大きかった。これらの結果から、種子発芽は低温で誘導される機構と、低浸透圧で誘導される機構とがあり、低浸透圧が優先的であることが明らかになった。

酸素濃度については、高酸素濃度の場合に第一葉の形成が促進され、低酸素濃度の場合に幼葉鞘の伸長が促進された。振動については、振動がある場合に種子発芽過程全般が促進された。日長については、24時間連続暗の

場合に幼葉鞘の伸長(Phase II)が促進され、第一葉の形成(Phase III)が抑制された(図1)。これらの結果は、海底の砂泥中で発芽した場合に、酸素や光を求めて幼葉鞘を速く伸長させる機構が存在することを示している。また、赤色光、青色光、遠赤外光に対して、幼葉鞘が特徴的な反応を示したことから、幼葉鞘の伸長には光受容体が関与することが示唆された。

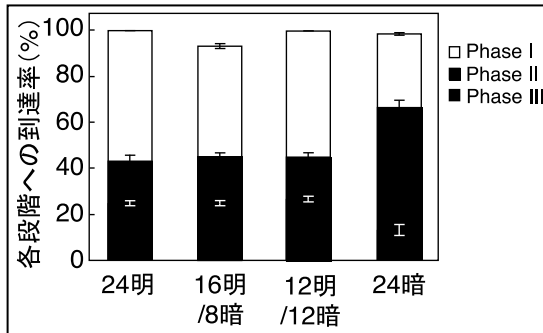


図1 日長が種子発芽に与える影響

(2) 種子発芽に影響する植物ホルモンの解析
アマモの種子発芽とその後の成長における植物ホルモンの影響を植物生理学的に解析した。種子発芽過程を三段階に分け、総合的に評価した。

アブシシン酸は、種子発芽過程前半の幼葉鞘の伸長に抑制効果を示すことが明らかになった。一方、ジベレリンは、種子発芽過程前半には効果を示さなかったが、後半の第一葉の伸長に促進効果を示した。また、エチレンは、種子発芽過程全般において効果を示さなかった。

これらの結果から、種子発芽過程前半にはアブシシン酸が、後半にはジベレリンが関与することが明らかになった。両ホルモンの関与は、陸生植物の事例と似ているが、植物ホルモンが作用する時期が異なるため、アマモには特殊な植物ホルモン応答機構が存在する可能性がある。

(3) 種子発芽時に発現する遺伝子の探索

アマモの種子発芽時に発現する遺伝子を、サブトラクション法により網羅的に検出・解析した。

種子発芽時に発現するアマモ遺伝子として87クローンが単離・同定された。代謝に関連する遺伝子が22種類、生体防御やストレス応答に関連する遺伝子が11種類、輸送に関連する遺伝子が8種類、転写に関連する遺伝子が8種類、タンパク質合成に関連する遺伝子が6種類、シグナル伝達に関連する遺伝子が3種類、タンパク質分解に関連する遺伝子が2種類、その他の機能に関連する遺伝子が17種類、機能不明の遺伝子が10種類と確定した。これらの中には、アルコール脱水素酵素、熱ショックタンパク質、グルタミン

酸脱水素酵素、液胞膜ATP合成酵素などが含まれていた。これらが、種子発芽時に嫌気呼吸やストレス応答、エネルギー代謝に関与すると考えられる。

これらの遺伝子について定量的RT-PCR法による発現解析を行い、発芽過程初期に発現が高いグループ(Type 1)、発芽過程中期に発現が高いグループ(Type 2)、発芽過程後期以降に発現が高いグループ(Type 3)、発芽過程に発現量に変化しないグループ(Type 4)に分類できた(図2)。これらのうち、Type 1とType 2の遺伝子が種子発芽に重要な役割をもつと考えられる。

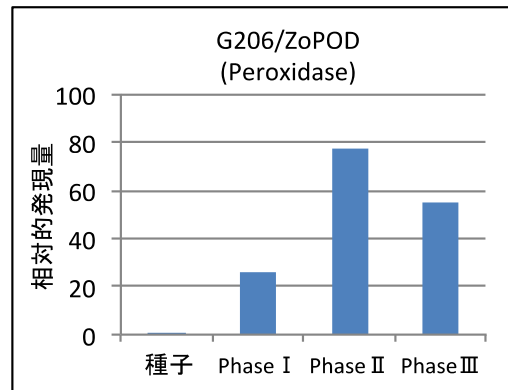


図2 種子発芽時の遺伝子発現 (Type 2)

同様に、種子成熟時に発現する遺伝子として23クローンが単離・同定された。これらの中には、ステロール結合タンパク質、カルシウム結合タンパク質、ブドウ糖6リン酸化酵素などが含まれていた。これらは、種子成熟時にエネルギー代謝やストレス応答に関与すると考えられる。

また、種子休眠時に発現する遺伝子として91クローンが単離された。これらの中には、種子貯蔵タンパク質、呼吸抑制に関連するタンパク質などが含まれていた。詳細については解析を継続している。

(3)で単離された遺伝子の発現様式から、それぞれの発芽段階を示す遺伝子マーカーを3遺伝子ずつ設定できた。

(4) 種子発芽に作用する遺伝子の機能解析

(3)で単離されたアマモ遺伝子のうち10遺伝子について、塩濃度、温度、水分の条件を変化させて発現を解析した。その結果、RCI2B型膜タンパク質が低塩濃度で、液胞膜ATP合成酵素が高塩濃度で発現増加した。Osmotin様タンパク質と熱ショックタンパク質が高塩濃度で、RCI2B型膜タンパク質が低温で発現増加した。液胞膜ATP合成酵素、RCI2B型膜タンパク質、水チャネルが、乾燥で発現増加した。このような遺伝子が機能することで、海水中での発芽・成長が可能になると考えられる。

また、2種類の水チャネルをコードする遺

伝子については in situ ハイブリダイゼーションで発現部位の特定を行った。幼葉鞘の表皮、維管束、葉の表皮で発現が確認され、水チャネルがアマモ植物体での水分調節に関与している可能性が示された。

また、4 遺伝子について遺伝子組換え体を作成して機能解析を行った。Osmotin 様タンパク質を組換えた大腸菌では、高塩濃度条件下での増殖が確認された。また、RCI2B 型膜タンパク質を組換えたシロイヌナズナでは、乾燥耐性の上昇が確認された。

(5) アマモ場造成での種子管理技術の開発

(1)の結果から、高塩濃度・高浸透圧によってアマモの種子発芽が抑制されることが明らかになった。そこで、塩濃度を通常海水レベルに維持し、浸透圧のみを高めた保存液を考案した。この保存液中でアマモ種子を保存 (4°C) したところ、発芽は完全に抑制された。また、保存 1, 3, 5, 9, 15, 17 ヶ月後の種子の発芽能力は高いレベルに維持されていた。このように、発芽を防いで少なくとも 17 ヶ月間は保存できる高浸透圧保存液を提唱できた。

本研究により、アマモの種子発芽に関する生理と、関連する遺伝子について、その一端が明らかになった。さらに、その結果を応用して、新しい種子管理法が提唱された。

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 3 件)

- ① 山田佳史、梁田健一、松澤篤史、田中一朗、塩田肇、Expression of foreign aquaporin genes in lily pollen protoplasts, *Plant Biotechnology*、査読有、Vol. 28、2011、509-514
DOI:http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.11.0922a
- ② 塩田肇、横浜におけるアマモ場再生プロジェクト、木原記念横浜生命科学振興財団ニューズレター、査読無、Vol. 28、2011、11-12
- ③ 塩田肇、松澤篤史、黒川圭太、杉本元気、米澤三晃、田中一朗、鎌田博、Nucleotide polymorphism in the carrot late embryogenesis abundant gene *DC8/ECP63*, *Scientia Horticulturae*、査読有、Vol. 125、2010、767-770
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.001

[学会発表] (計 16 件)

- ① 近藤果歩、梁田健一、松澤篤史、田中

一朗、塩田肇、Expression and functional analysis of plasma membrane aquaporin genes, *ZoPIP1;1* and *ZoPIP2;1* in eelgrass (*Zostera marina*)、第 16 回植物膜国際シンポジウム、2013 年 3 月 28 日、倉敷芸文館(倉敷市)

- ② 山田佳史、梁田健一、松澤篤史、田中一朗、塩田肇、Expression of foreign aquaporin genes in the lily pollen protoplast system、第 16 回植物膜国際シンポジウム、2013 年 3 月 28 日、倉敷芸文館(倉敷市)
- ③ 土橋昇平、板東由希子、高碩敏、塩田肇、海生種子植物アマモの種子発芽時に発現する遺伝子の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 23 日、岡山大学(岡山市)
- ④ 塩田肇、板東由希子、喜多尾朝恭、佐藤洗、宮田莉穂、海生種子植物アマモの種子発芽特性の解析、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 15 日、兵庫県立大学(姫路市)
- ⑤ 朝倉さくら子、松澤篤史、田中元気、菊池彰、鎌田博、田中一朗、塩田肇、ニンジン液胞膜アクアポリン遺伝子 *DcTIP3* の発現解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学(京都市)
- ⑥ 土橋昇平、宮田莉穂、板東由希子、高碩敏、塩田肇、海生種子植物アマモの種子発芽時に発現する遺伝子の探索、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 18 日、京都産業大学(京都市)
- ⑦ 梁田健一、板東由希子、田中一朗、塩田肇、アマモ原形質膜アクアポリン遺伝子の単離と発現解析、日本植物学会第 75 回大会、2011 年 9 月 18 日、東京大学(東京都)
- ⑧ 塩田肇、板東由希子、梁田健一、黒川圭太、田中一朗、Physiological analysis of seed development and germination in seagrass (*Zostera marina*)、第 18 回国際植物学会議、2011 年 7 月 23-30 日、メルボルン(オーストラリア)
- ⑨ 梁田健一、板東由希子、塩田肇、海生種子植物アマモにおける原形質膜アクアポリンの研究、第 3 回植物アクアポリン研究討論会、2011 年 6 月 3 日、倉敷芸文館(倉敷市)
- ⑩ 納富啓子、田中一朗、鎌田博、塩田肇、ニンジン不定胚における 2 種類の VP1/ABI3 の発現と機能の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 22 日、東北大学(仙台市)
- ⑪ 梁田健一、板東由希子、田中一朗、塩田肇、海生種子植物アマモにおける原形質膜アクアポリン遺伝子の単離と発現解

- 析、第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 22 日、東北大学 (仙台市)
- ⑫ 塩田肇、梁田健一、山田佳史、松澤篤史、田中一朗、花粉プロトプラストによる植物アクアポリンの機能解析法、第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会、2010 年 9 月 3 日、東北大学 (仙台市)
 - ⑬ 納富啓子、田中一朗、鎌田博、塩田肇、Expression and functional analysis of two kinds of the VP1/ABI3 factors in carrot embryogenesis、第 21 回シロイヌナズナ研究国際会議、2010 年 6 月 8 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 - ⑭ 朝倉さくら子、松澤篤史、田中一朗、鎌田博、塩田肇、Expression analysis of the aquaporin genes in carrot somatic embryogenesis、第 21 回シロイヌナズナ研究国際会議、2010 年 6 月 8 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 - ⑮ 梁田健一、山田佳史、松澤篤史、田中一朗、塩田肇、Lilly pollen protoplast system for functional analysis of plant aquaporins、第 21 回シロイヌナズナ研究国際会議、2010 年 6 月 8 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
 - ⑯ 塩田肇、高碩敏、高塚理之、田中一朗、鎌田博、Carrot somatic embryogenesis for analysis of desiccation tolerance and abscisic acid signal transduction、第 21 回シロイヌナズナ研究国際会議、2010 年 6 月 7 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

[図書] (計 1 件)

- ① 塩田肇、エンジンの形質転換プロトコール(田部井豊 編)、化学同人、2012、432 (234-240)

[その他]

- ① 塩田肇、生き物のゆりかご アマモ場再生への道のり、品川区区民大学入門講座、2012 年 2 月 27 日、品川区中小企業センター (東京都)
- ② 塩田肇、海に生きる植物たち 海藻と海草の話、グリーンキッズ 2010 夏、2010 年 8 月 11 日、八景島シーパラダイス (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 肇 (SHIOTA HAJIME)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：40315825