

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658018

研究課題名(和文) 水湿生植物のアブシジン酸不活性化経路選択による嫌気環境適応機構の解明研究

研究課題名(英文) The alternative of ABA degradation pathways as a key process on adaptation of hygrophytes to anaerobic environments

研究代表者

吉岡 俊人 (Yoshioka, Toshihito)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：10240243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナや畑地雑草など乾性地に生育する中生植物の種子発芽は、酸化経路を通じたアブシジン酸(ABA)代謝不活性化によって誘導される。しかし、水田雑草など嫌気環境に生育する湿生植物については不明であった。ABA代謝物の定量分析、ABA8'-水酸化酵素遺伝子の発現解析、本酵素の阻害剤であるバクロプロトラゾールを添加した種子発芽検定により、湿生植物の種子発芽に必要なABA内生量の低下は、反応に酸素を必要としない配糖体化経路を通じて起こることが明らかになった。種子発芽は植物生活史の最初の過程であることから、ABA代謝不活性化経路選択は、湿生植物の低酸素環境適応に関する重要な進化的機構だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Echinochloa plants have differentiated upland and paddy ecotypes. In paddy ecotype seeds, abscisic acid (ABA) decreased under both anaerobic and aerobic conditions, in association with the air germination. ABA is degraded via an oxidation pathway and/or a glucose conjugation pathway in which oxygen is not required for its reaction. The ABA glucose conjugates increased in the germinating paddy ecotype seeds. In contrast, dihydrophaseic acid, a major catabolite in the oxidation pathway, accumulated in the upland ecotype seeds. Conclusively, it appeared that seeds of the upland ecotype decrease endogenous ABA by the oxidative degradation and those of the paddy ecotype by the conjugative degradation. Similar phenomena, shown in the Echinochloa ecotypes, were observed in all hygrophytes and mesophytes used in this study. We thus propose that the alternative of ABA degradation pathways is a key factor with which hygrophytes adapted to anaerobic environments, which resulted from flooding.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：植物ホルモン 低酸素環境適応 アブシジン酸 代謝不活性化経路 湿生植物 ヒエ属 嫌気発芽 生活史進化

1. 研究開始当初の背景

(1) 水田環境は、湛水(冠水)条件で特徴づけられ、湛水条件とは、多くの場合、植物生理学的には嫌気条件と同義である。水田雑草の種子が嫌気条件下でも発芽する現象(嫌気発芽)はすでに初期の雑草研究で知られており(Morinaga 1926、片岡・金 1978)、発芽中種子の嫌気呼吸によるエネルギー獲得機構も明らかとなっている(Yamasue et al. 1989、Kennedy et al. 1992)。しかし、水田雑草生活史の最初の一步である嫌気発芽を誘導する‘きっかけ’が何であるかはいまだ不明である。

(2) アブシジン酸(ABA)は種子発芽の抑制に働く植物ホルモンである。レタスやシロイヌナズナの種子発芽制御に関する研究(Yoshioka et al. 1998、Gonai 2004、Kushiro et al. 2004)によって、種子発芽誘導の‘きっかけ’がABA内生量の低下にあり、ABA内生量の低下は酸化経路を通じたABA不活性化によって起こることが確実になっている。ABA不活性化酸化経路における鍵酵素のABA8'-水酸化酵素は、チトクロームP450が関与する酸素添加酵素である(Cutler et al. 1997)。つまり、畑地状態の水分環境(好気条件)で生育する中生植物であるレタスやシロイヌナズナの種子では、ABA不活性化の進行に酸素が必須となる。

(3)しかし、水田雑草など嫌気環境に生育する水湿生植物の種子中のABAがどのように不活性化されるかについては不明である。ABAは、酸化経路以外に、配糖体化経路を通じても不活性化される。配糖体化経路での反応は酸素を必要としない。

2. 研究の目的

(1) 日本のヒエ属野生植物にはタイヌビエ、ヒメタイヌビエ、イヌビエ、ヒメイヌビエの2種3変種がある。このうち、タイヌビエとヒメタイヌビエは水田に生育する湿生植物であり、ヒメイヌビエは畑地などの乾性地に生育する中生植物である。またイヌビエは、水田型(湿生型)と畑地型(中生型)の生態型に分化している。

(2)そこで本研究の目的は、ヒエ属植物の水田型と畑地型の種子発芽がそれぞれ配糖体化経路と酸化経路を通じたABA不活性化経路選択によって誘導されるかどうか、水田雑草(水湿生植物)と畑地雑草(中生植物)の生育環境(湛水状態・嫌気条件と畑水分状態・好気条件)への適応要因としてABA不活性化経路選択に一般性があるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ABA不活性化経路検定法(パクロボトラゾール添加系)の確立

パクロボトラゾール(PBZ)はチトクロームP450が関与する酸素添加酵素反応の阻害剤である。ABA不活性化酸化経路の鍵酵素ABA8'-水酸化酵素は酸素添加酵素であるので、PBZ存在下で種子発芽試験することで、発芽誘導に関わるABA代謝不活性化が配糖体化経路によるか酸化経路によるかを推定できると考えられる。

しかし発芽促進にはたらく植物ホルモンであるジベレリン(GA)の生合成系中でカウレン~カウレノールの反応も酸素添加酵素によって触媒される。

そこで、PBZとGAを様々な濃度の組み合わせた培地でヒメイヌビエ(中生型)とヒメタイヌビエ(湿生型)種子の発芽を調べ、PBZ添加系がABA不活性化経路検定法として成立するかどうかを検証した。

(2) ABA不活性化経路選択の一般性

様々な水田雑草(水湿生植物)と畑地雑草(中生植物)の種子発芽をPBZ添加系によって調査し、ABA不活性化経路選択に一般性があるかどうかを検証した。

(3) ABA代謝物の分析

ABAの酸化的不活性化経路での末端代謝産物は、ファゼイン酸およびジヒドロファゼイン酸であり、配糖体化不活性化経路では、ABAグルコシルエステルおよびABAグルコシドである(図1)。したがって、これらの物質の増加量比からABAが不活性化される経路を推定できる。

そこで、嫌気条件と好気条件に置床したイヌビエ水田型と畑地型の種子サンプルからABA関連物質を抽出、精製し、GC/MSによってABAファゼイン酸、ジヒドロファゼイン酸、ABAグルコシルエステル、ABAグルコシドを定量した。

(4) ABA8'-水酸化酵素遺伝子の解析

イネのABA8'-水酸化酵素遺伝子CYP707Aの塩基配列を参考にして設計したプライマーを用いて、イヌビエ種子から得たcDNAをPCR増幅した。増幅産物をpGEM-T Easy Vector SystemsでTAクローニングし、19クローンからプラスミドを抽出して、インサートをシーケンシングした。これらの塩基配列情報をBlastにかけて類似遺伝子を検索し、類縁性を求めた。

嫌気条件と好気条件に置床したイヌビエ水田型と畑地型の種子サンプルからRNAを抽出後、cDNAとし、リアルタイムPCRを用いてイヌビエABA8'-水酸化酵素遺伝子の発現を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 結果

低酸素の湛水条件では、湿生型ヒエ（イヌビエ水田型、タイヌビエ、ヒメタイヌビエ）種子は発芽したが、中生型ヒエ（イヌビエ畑地型、ヒメイヌビエ）種子は発芽できず、好気条件では両型とも発芽した（図2）。

湿生型ヒエ（イヌビエ水田型）は、空気中でも窒素中でも種子発芽した。その発芽前に、種子中のABAは減少し、配糖体化経路の代謝産物であるABAグルコシルエステルとABAグルコシドが蓄積した（図3）。中生型ヒエ（イヌビエ畑地型）は、窒素中では種子発芽せず、ABA内生量が変化しなかった。種子発芽の起こった空気中では、ABAが減少し、酸化経路の代謝産物であるジヒドロファゼイン酸が蓄積した。

好気条件において、中生型ヒエ（ヒメイヌビエ）ではPBZ 10 μM 添加により種子発芽が阻害され始め、300 μM 添加では発芽率が6%となった。一方、湿生型ヒエ（ヒメタイヌビエ）種子は300 μM のPBZで発芽阻害されなかった（図4A）。PBZ 300 μM による種子発芽阻害は、湿生型ヒエでは0.2 mMのGA₃添加で完全に回復したが、中生型ヒエでは4 mMのGA₃添加によっても回復しなかった（図4B）。

イヌビエ種子から得られた3種類の遺伝子を得た。これらはイネABA8'-水酸化酵素遺伝子 *OsCYP707A1* ~ 3 との塩基配列が64~91%一致していることから、イヌビエのABA8'-水酸化酵素遺伝子であると考え、*EcCYP707A1*、*EcCYP707A2*、*EcCYP707A3* とした。イヌビエ種子では*EcCYP707A1*の発現量が大きく、*EcCYP707A2*、*EcCYP707A3*の発現はわずかに認められるのみであった。*EcCYP707A1*の有意な発現上昇は、畑地型ヒエ種子を好気条件でインキュベーションしたときのみ認められた（図5）。

PBZ添加による種子発芽阻害は、供試した中生型ヒエ（イヌビエ畑地型、ヒメイヌビエ京都系統、ヒメイヌビエ仙台系統）および中生植物（コハコベ、メヒシバ、チガヤ、レタス、シロイヌナズナ）の全てで認められた（図6、図7）。一方、供試した全ての湿生型ヒエ（イヌビエ水田型、ヒメタイヌビエ、タイヌビエ仙台系統、タイヌビエ京都系統、タイヌビエ鹿児島系統）および湿生植物（キカシグサ、コナギ）ではPBZ添加による種子発芽阻害が認められなかった。

(2) 考察

ABA代謝不活性化経路検定法（パクロブトラゾール添加系）の確立：好気条件において、湿生型ヒエの種子発芽がPBZ 300 μM までは影響を受けず、1000 μM 添加で阻害され、GA₃

0.2 mM添加でその阻害が回復したことから、PBZのGA合成抑制による発芽阻害は1000 μM の濃度になってはじめて現われると考えられる。一方、中生型ヒエの種子発芽がPBZ 10 μM から阻害されだしたことは、PBZのABA酸化代謝不活性化抑制による発芽阻害は低濃度で現われ、300 μM では十分にはたらくことを示している。したがって、PBA 300 μM 添加の実験系によって、ABA不活性化が酸化経路を通じて起こることが検定できると考えられる。GA合成阻害の影響を無視できるように、過剰量のGA₃をPBA 300 μM に加える系とすることで不活性化経路検定法とできる。

ABA代謝不活性化機構：湿生型ヒエ、中生型ヒエの種子とも、発芽前にABAがインキュベーション開始時の1/5程度に減少していたことから、ABA内生量の低下が発芽誘導の要因であると考えられる。中生型ヒエでは、ABA減少量と同等量のジヒドロファゼイン酸増加が認められたことから、ABAが酸化経路で代謝不活性化されたと推察される。

イヌビエABA8'-水酸化酵素遺伝子の定量的発現解析の結果より、種子の発芽誘導に機能する遺伝子は*EcCYP707A1*であると考えられる。好気条件におかれた中生型ヒエ種子では、吸水後、6~12時間で*EcCYP707A1*の発現が高まることで、ABA酸化経路の酵素活性が上昇すると思われる。

一方、湿生型ヒエでは、ABAグルコシルエステルとABAグルコシドがABA減少量に対応する量で蓄積していることは、ABAが配糖体化経路を通じて代謝不活性化されたことを意味する。つまり、低酸素環境に生育する湿生型ヒエは、酸素を必要としない配糖体化でABAを代謝不活性化する経路を選択したのだと推察される。

ABA代謝不活性化経路選択の一般性：供試した全ての植物で、PBZ添加によって中生型の種子発芽が阻害されたが、湿生型の種子発芽は阻害されなかったことから、中生型と湿生型のヒエで明らかになったABA代謝不活性化経路選択は、広い一般性があると考えられる。種子発芽は植物生活史の最初の重要な現象であることから、ABAの代謝不活性化経路選択は、湿生植物が低酸素環境に適応した進化的機構として重要だと思われる。

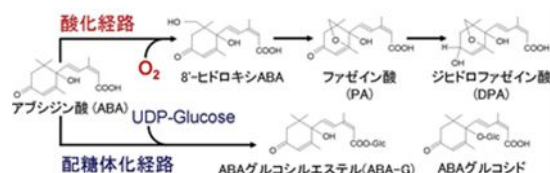


図1 アブシジン酸代謝不活性化経路

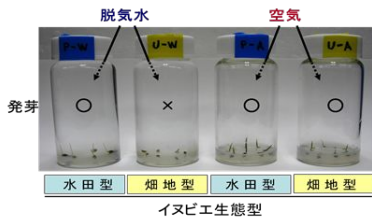


図2 湿生型ヒエの湛水(低酸素)条件での発芽

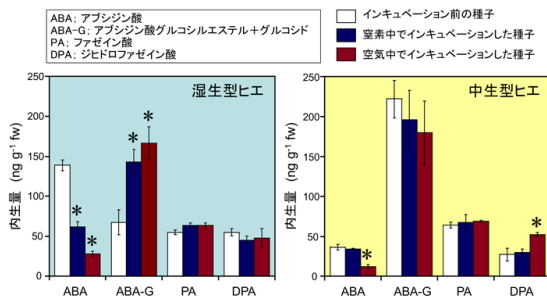


図3 窒素中と空気中での湿生型ヒエ(イヌビエ水田型)と中生型ヒエ(イヌビエ畑地型)種子のABA代謝不活性化物内生量

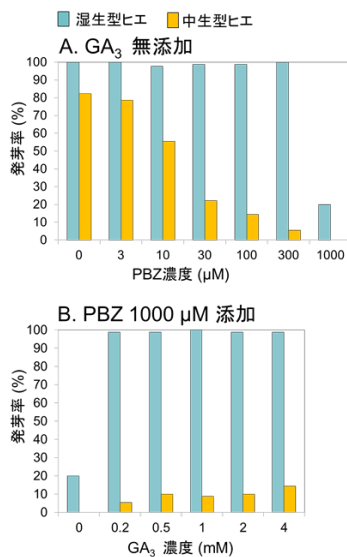


図4 PBZの湿生型ヒエ(ヒメタイヌビエ)に対する無影響とPBZによる中生型ヒエ(ヒメイヌビエ)の種子発芽阻害回復に対するGAの無影響

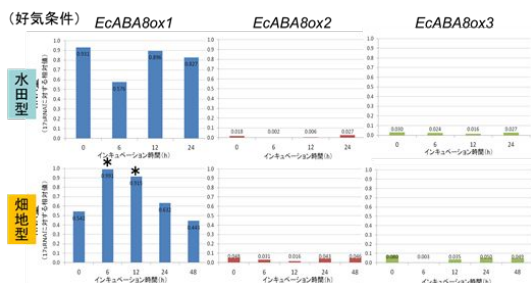


図5 イヌビエ ABA8'-水酸化酵素遺伝子の湿生型(イヌビエ水田型)と中生型(イヌビエ畑地型)ヒエ種子中での発現パターン。

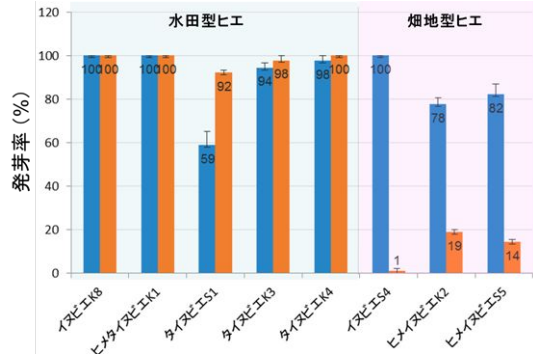


図6 湿生型と中生型ヒエの種子発芽に対するPBZの影響:青バー: PBZ 0 μM + GA₃ 0 mM、赤バー: PBZ 300 μM + GA₃ 2 mM。

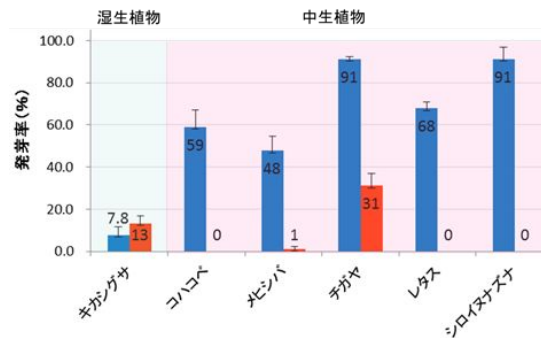


図7 湿生植物と中生植物の種子発芽に対するPBZの影響:青バー: PBZ 0 μM + GA₃ 0 mM、赤バー: PBZ 300 μM + GA₃ 2 mM

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

吉岡俊人・佐々木まな・森川知彦、水田および畑地由来ノビエ種子の発芽時酸素要求性とアブシジン酸代謝不活性化経路、北陸作物・育種学会第49回講演会、2012年7月14日、長岡市

吉岡俊人、湿生型および中生型ノビエのABA代謝不活性化経路選択による種子発芽制御、日本雑草学会第52回大会、2013年4月13日、京都市

〔図書〕(計1件)

吉岡俊人、農業生態系の生物多様性、吉岡編著、里地里山里海湖の生きもの学、福井県大学連携リーグ、9-28、2014

〔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

吉岡 俊人 (YOSHIOKA, Toshihito)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：10240243