

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780014

研究課題名(和文)ダイズ種子発芽機構における活性酸素シグナルの網羅的解析

研究課題名(英文)Global analysis of reactive oxygen species signal in soybean seed germination

研究代表者

石橋 勇志(Ishibashi, Yushi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50611571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの種子発芽における活性酸素の役割について調査した。ダイズの種子発芽は、抗酸化物質により著しく抑制された。吸水後、活性酸素は胚軸において生成され、エチレンの生合成に関与することが示唆され、エチレン応答性遺伝子およびタンパク質の発現が、抗酸化物質により抑制された。さらに、活性酸素により誘導されたエチレンは、幼根の細胞数ではなく細胞面積を調節することで、ダイズの種子発芽を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of reactive oxygen species (ROS) in soybean seed germination. Germination of soybean seed was suppressed by antioxidant. ROS was induced in hypocotyl after imbibition and produced the ethylene. Antioxidant suppressed the expression of ethylene signal related genes. Moreover, the ethylene produced by ROS promoted soybean seed germination by regulation of cell area in hypocotyl.

研究分野：作物学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：活性酸素シグナル 発芽 ダイズ

### 1. 研究開始当初の背景

種子の発芽は、農業上の重要な問題であるとともに、誰もが容易に目にすることができるとも関わらず未だ未解明な部分を残した神秘的な生命現象である。これまで種子発芽研究は多くの植物で行われてきたが、主要作物であるマメ科作物の種子発芽の理解は同じく主要作物であるイネ科作物に比べて著しく遅れている。特にマメ科作物の中でもダイズは世界的に重要な作物でありながら、その発芽メカニズムは未解明の部分が多い。我が国のダイズ栽培において最も問題となるのが「湿害」である。この「湿害」には、発芽・出芽時の被害と出芽後の被害にわけることができるが、我が国のダイズ播種適期は梅雨と重なることが多く、発芽・出芽時の湿害対策が急務である。

### 2. 研究の目的

近年、ダイズのゲノム配列が明らかになり、集積されたダイズ EST・ゲノム情報のデータベースとバイオインフォマティクス手法による遺伝子機能予測と発現調節ネットワークの予想が可能になっている。本研究では、種子発芽メカニズムの新しい概念である「活性酸素による種子発芽制御」に焦点を当て、ダイズ発芽機構に関して生理学および分子生物学的な解析を行うことで、新規なダイズ種子発芽メカニズムを明らかにし、その知見を利用したダイズの出芽・苗立ち安定化技術への提案を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究はダイズの出芽・苗立ち安定化を目指した、ダイズ種子発芽メカニズムを活性酸素制御の視点から解明することを目的とする。実験手法としては、生理学的、分子生物学的、形態学的手法を用いて研究を行う。まず、「ダイズ種子発芽における活性酸素の役割」について調査する。イネ科種子は吸水後、

胚とアリューロン細胞で活性酸素を生成することが知られているが、ダイズ種子では吸水後の活性酸素生成部位は不明であり、まず始めに、活性酸素の生成部位の特定を行う。具体的には吸水後にDABおよびNBT染色を行うことで、ダイズ種子の活性酸素の生成部位を特定する。また、申請者は、予備的な実験により抗酸化物質(N-アセチルシステイン、NAC)による発芽抑制効果を確認しており、更に他の抗酸化物質等による発芽率を詳細に調査する。次に、「活性酸素の生成に関わる因子および活性酸素の下流で働く因子の特定」を植物ホルモン関連遺伝子から調査する。ダイズ全ゲノムデータベース(Phytozome)を利用して、関連遺伝子のクローニングを行う。候補タンパク質には多数のアイソザイムが存在することが予想されるため、すべての発芽関連候補遺伝子についてRT-PCRを行うことにより、候補遺伝子を絞り、クローニングを行う。クローニングされた遺伝子について、過酸化水素処理や抗酸化物質処理後のサンプルからRNAを抽出後、リアルタイムPCRにて候補遺伝子の発現解析を行う。最も影響の大きい遺伝子については、得意的な抗体を作成し、タンパク質の定量もあわせて行う。

### 4. 研究成果

種子発芽メカニズムは、モデル植物であるアラビドプシスやイネにおいて、多数の報告が存在し、植物ホルモンであるジベレリンやアブシジン酸のクロストークを中心に理解されている。近年、この植物ホルモンに加えて、種子発芽メカニズムにおいて活性酸素(ROS)が重要な役割をになっていることが明らかとなってきた。そこで、本研究ではダイズの種子発芽と活性酸素の関係について調査した。ダイズ種子発芽は、過酸化水素処理(活性酸素)により促進し、抗酸化物質処理により抑制した。抗酸化物質に過酸化水素

を加えると、発芽率が回復することから、ダイズの種子発芽において、活性酸素が重要な役割をもつことが示された。次に、活性酸素の発生部位の探索を DAB 染色により行った。その結果、ダイズ種子は吸水後、子葉ではなく幼根において活性酸素を生成した。活性酸素の下流で働く植物ホルモンを網羅的に解析したところ、エチレンの関与が示された。そこで、エチレン含量を測定したところ、抗酸化物質処理によって発芽時のエチレン生成が抑制されることが明らかとなった。さらに、エチレン生合成遺伝子の発現は過酸化水素処理で促進され、抗酸化物質処理により抑制された。エチレンシグナルで働く EIN3 抗体を作成後イムノブロットを行い、抗酸化物質処理による EIN3 の抑制を確認した。次に、活性酸素により誘導されたエチレンが、幼根の細胞形態に与える影響について調査した。抗酸化物質処理では幼根の細胞数に変化はなかったが、細胞面積が小さくなっていた。更に、エチレン誘導剤であるエテホンに抗酸化物質と同時に処理したところ、細胞面積が回復した。以上の結果から、ダイズの種子発芽機構において、活性酸素は不可欠であり、そのメカニズムはエチレンシグナルを介した幼根の細胞肥大であると結論づけた。

#### 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 2 件)

Ishibashi, Y., Koda, Y., Zheng, S.H., Yuasa, T. Iwaya-Inoue, M. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species, *Ann. Bot.* 2013. 111. 95-102.

Aoki, N., Ishibashi, Y., Kai, K., Tomokiyo, R., Yuasa, T. Iwaya-Inoue, M. Programmed cell death in barley aleurone cells is not

directly stimulated by reactive oxygen species produced in response to gibberellin. *J. Plant Physiol.* 2014. 171. 615-618.

[学会発表] (計 5 件)

石橋勇志、幸田夕夏、湯浅高志、井上眞理. ダイズ種子発芽における活性酸素の役割. 日本植物分子細胞生物学会. 2012. 8. 3. 奈良先端科学技術大学. 生駒市.

石橋勇志. 活性酸素シグナルによるダイズの種子発芽制御およびストレス軽減効果. 第 6 回 ダイズ研究会. 2012. 9. 20. 佐賀大学. 佐賀市.

青木希、石橋勇志、坂本将次、甲斐恭平、湯浅高志、井上眞理. オオムギ種子の休眠・発芽機構における活性酸素の役割. 日本作物学会. 2012. 9. 10. 東北大学. 仙台市.

石橋勇志、幸田夕夏、湯浅高志、井上眞理. 活性酸素によって誘導されるエチレンはダイズの種子発芽を制御する. 日本作物学会. 2013. 9. 10. 鹿児島大学. 鹿児島市.

長内克真、田島大地、石橋勇志、湯浅高志、井上眞理. ダイズ種子へのパクロブトラゾール処理が収量に与える影響. 日本作物学会. 鹿児島大学. 鹿児島市.

有吉優里、石橋勇志、長内克真、糸山晴香、有尾誠介、湯浅高志、井上眞理. ダイズの莢形成とブラシノステロイドの関係. 日本作物学会. 鹿児島大学. 鹿児島市.

[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

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/sakumotsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋勇志 (Yushi Ishibashi)

研究者番号：50611571