

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780017

研究課題名(和文)種子休眠調節の分子機構：グルコシル化経路によるアブシジン酸不活性化機構の解明

研究課題名(英文)Molecular regulation of dormancy cycling: abscisic acid catabolism regulated by conjugation pathway

研究代表者

今泉 智通 (Imaizumi, Toshiyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター生産体系研究領域・研究員

研究者番号：10509235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水田雑草コナギを用いて、野外における休眠サイクルと植物ホルモン・遺伝子発現の季節変動の関係を調査した。植物ホルモンの内生量には明瞭な季節変動は見られず、その内生量は野外での休眠サイクル調節に関与しないことが示唆された。また、埋土種子における遺伝子発現は発芽試験で推定される休眠サイクルより大きく変動し、季節変動だけでなく埋土年数の影響も受けることを示し、休眠サイクルを調節する候補遺伝子を単離した。

研究成果の概要(英文)：Using simultaneous analysis of different classes of phytohormones and comprehensive transcriptome analysis over the dormancy cycle of *Monochoria vaginalis* seeds in the field, we investigated the molecular regulation of dormancy cycling. Phytohormone contents within seeds showed less seasonal changes and were not linked to the dormancy cycling. Transcriptome analysis identified candidate genes involved in dormancy cycling and the transcriptome dynamics were linked to not only seasonal changes but also seed age.

研究分野：雑草学

キーワード：種子休眠 休眠サイクル

1. 研究開始当初の背景

種子植物の生育場所は「種子の発芽」というただ1回のイベントで決定されるため、適切な「時期」と「場所」で発芽することが種子植物の生存に極めて重要である。適切な「時期」と「場所」を選択する生存戦略は、種子の「休眠と発芽」を環境に応じて巧みに調節することで可能となる。すなわち、埋土種子が季節変動に応答し休眠状態を調節する休眠サイクルを持つため適切な「時期」の選択が可能となり、生育に適した環境に応答し発芽するため適切な場所の選択が可能となる。雑草防除の面では、種子の「休眠と発芽」を制御することで除草しやすい時期と場所に発芽させることが可能になるため、雑草種子の「休眠と発芽」の調節機構を解明することは、効果的な雑草防除の実現に向けて重要な知見となる。

種子の休眠と発芽の調節には、内生アブシジン酸量と内生ジベレリン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、アブシジン酸とジベレリン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ている。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、種子休眠と発芽を調節する分子機構が解明され始めている。しかし、野外での休眠状態と植物ホルモンの関係や休眠サイクル調節の分子メカニズムなど、野外での休眠調節に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では水田一年生雑草コナギを材料とし、水田環境下に埋土後、2年間隔月回収したコナギ種子を供試し、(1) 休眠サイクルと植物ホルモン内生量の季節変動の関係、(2) 休眠サイクルとトランスクリプトームの季節変動の関係を明らかにすることで、コナギにおける野外での休眠サイク

ルに参与する遺伝子特定を試みることを全体的目的とする。

(1) 休眠サイクルと植物ホルモン内生量の季節変動の関係

コナギでは、低温湿潤処理による休眠覚醒の際、種子中のアブシジン酸内生量が減少しグルコシル化経路によるアブシジン酸代謝産物が増加する。そこで本研究では、「コナギ種子の休眠調節にはグルコシル化経路によるアブシジン酸の不活性化が参与する」という仮説の検証を中心に、休眠サイクルと植物ホルモン内生量の季節変動の関係を明らかにすることを1点目の具体的目的とする。

(2) 休眠サイクルとトランスクリプトームの季節変動の関係

種子休眠の調節において、植物ホルモン調節に直接関与する遺伝子以外にも重要な役割を持っていることが明らかにされており、例えばシロイヌナズナでは、機能未知の DELAY OF GERMINATION (DOG1) 遺伝子が種子休眠調節の主要 QTLであることがわかっている。休眠調節における植物ホルモン調節遺伝子以外の関与を明らかにするため、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により休眠サイクルとトランスクリプトームの季節変動の関係を明らかにすることが本研究の2点目の具体的目的である。

3. 研究の方法

(1) コナギ種子用のマイクロアレイ開発

コナギ種子の遺伝子発現を網羅的に解析するマイクロアレイを作成するため、塩基配列情報を IonPGM シーケンサー (LifeTechnologies 社) を用いて取得した。まず、コナギ種子からの RNA 抽出条

件を検討し、IonPGMシーケンサーによる解読およびマイクロアレイ解析が可能な純度および収量を確保した RNA 抽出法を確立した。次に、野外から回収した種子のうち、最も休眠の浅い種子と休眠の深い種子から RNA を抽出し、転写産物の塩基配列を IonPGMシーケンサーを用いて解読し、得られた配列情報から遺伝子配列と予測されるものを抽出し、マイクロアレイを作成した。

(2) 埋土種子トランスクリプトームの季節変動

水田環境下から隔月回収した2年分のコナギ種子から RNA を抽出し、マイクロアレイによりその遺伝子発現を網羅的に解析した。マイクロアレイは、Agilent 4 x 44k アレイ（プローブ数 42,378）を用いた。

(3) 埋土種子における植物ホルモン内生量の季節変動

(2)と同一環境から回収したコナギ種子を用いて、植物ホルモン内生量の季節変動を調査した。植物ホルモン内生量の定量は、文部科学省最先端研究基盤事業「植物科学最先端研究拠点ネットワーク」の研究支援を受け、理化学研究所にて、サイトカイニン・オーキシン・ジベレリン・アブシジン酸・サリチル酸・ジャスモン酸について行った。

4. 研究成果

(1) 植物ホルモン内生量の季節変動

野外から回収した種子における植物ホルモンを測定した結果、アブシジン酸やジベレリンなど、種子休眠・発芽を調節するとされる植物ホルモンの内生量に季節変動は見られず、休眠サイクルとの関係は認められなかった。他の植物ホルモンに関しても、休眠サイクルとの明瞭な関係は見られなかったことから、植物ホルモンの内生量は野

外での休眠サイクル調節に関与しないことが示唆された。

(2) 埋土種子トランスクリプトームの季節変動

遺伝子発現と休眠サイクルの関係に関しては、本課題では、コナギ種子の遺伝子発現を網羅的に定量するマイクロアレイを開発した。本マイクロアレイを用いて埋土種子トランスクリプトームの季節変動を調査したところ、埋土前の一次休眠種子、埋土1年目に最も深い休眠状態にあった二次休眠種子、埋土2年目に最も深い休眠状態にあった二次休眠種子はそれぞれ異なる遺伝子発現パターンを示した。また休眠覚醒種子についても、埋土1年目に最も休眠覚醒していると推定された種子の遺伝子発現パターンは、他の休眠覚醒種子と大きく異なる遺伝子発現パターンを示した。これらの結果から、埋土種子の休眠状態は、発芽試験で推定されるより大きな季節変動をしており、また、季節変動だけでなく埋土年数の影響も受けると考えられた。埋土年数の影響を受ける遺伝子のひとつとして種子貯蔵タンパク質をコードする CRUCIFERIN があり、埋土年数とともにその発現量は減少した。また、植物ホルモン内生量測定の結果と同様、遺伝子発現解析の結果においても、グルコシル化経路によるアブシジン酸不活性化遺伝子を含め、植物ホルモンの生合成・不活性化関連の遺伝子の発現量に明瞭な季節変化は見られなかった。これは、(1)で明らかとなった植物ホルモン内生量が野外での休眠サイクル調節に関与しないことを支持する結果である。マイクロアレイ解析の結果から、Late Embryogenesis Abundant や S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase をコードする遺伝子と相同性の高い配列にお

いて休眠サイクルとの強い相関が抽出され、本種における休眠サイクルの調節遺伝子の候補と考えられた。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけ・インパクトと今後の展望

本研究で得られた休眠サイクルと植物ホルモン・トランスクリプトームの季節変動の関係に関する成果は、野外における休眠サイクルの調節遺伝子を提示する数少ない研究例である。また本研究では2年間における季節変動を明らかにしており、その成果として埋土年数とともに発現量が減少する遺伝子の存在を示した。このように埋土種子の長期にわたる遺伝子発現変動を明らかにした研究は他になく、休眠調節のみならず埋土種子の寿命に影響する要因を明らかにする上でも重要な成果であると考えられる。

今後は休眠サイクル調節の候補遺伝子と考えられた遺伝子の詳細な機能解析を行うとともに、種子寿命への関与が示唆される遺伝子を中心に埋土種子の齢と休眠サイクル・種子寿命の関係を明らかにする研究に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)

[学会発表] (計 4 件)

① 今泉智通、コナギ埋土種子におけるトランスクリプトームの季節変動と休眠サイクルの関係、日本雑草学会、2014年3月29日～2014年3月30日、法政大学(東京都小金井市)

② 今泉智通・内野彰、コナギ埋土種子における休眠状態と遺伝子発現プロファイルの季節変動、種生物学会シンポジウム、2013

年11月30日～2013年12月1日、別府市ふれあい広場サザンクロス(大分県別府市)

③ 今泉智通・渡邊寛明・浅井元朗、Effects of excessive soil moisture on seedling emergence of upland weeds、European Weed Research Society Symposium、2013年6月25日～2013年6月28日、Samsun(Turkey)

④ 今泉智通・渡邊寛明・浅井元朗、種子休眠と環境の交互作用：過湿条件が夏畑雑草種子の出芽動態に与える影響、日本雑草学会、2013年4月13日～2013年4月14日、京都大学(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 智通 (IMAIZUMI Toshiyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター生産体系研究領域・研究員

研究者番号： 10509235

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし