

## 活性酸素によるムギ類の種子休眠・発芽制御機構の解明

石橋勇志（九州大学大学院農学研究院）

品質の優れたムギ類の増産が求められる中、穂発芽は極めて重要な農業形質である。特に、収穫期が多雨・多湿となる日本のムギ類の栽培では、穂発芽の被害が多発する。これまで、穂発芽に関連が深い種子休眠・発芽制御機構の研究は、植物ホルモンによる制御に加え、ゲノム情報を駆使した種子休眠関連遺伝子の同定および機能解明が進められている。しかしながら、依然として穂発芽問題の解決には至っておらず、さらなる種子休眠の制御機構の解明が不可欠である。本研究は、吸水後の種子内の酸化・還元状態により種子休眠・発芽が制御されるという新概念「Oxidative window」に着目し、新しい種子休眠・発芽（穂発芽）機構の解明を目指して進められたものであり、その研究業績の内容は以下に要約される。

### 1. 種子内の活性酸素が発芽に及ぼす影響

活性酸素種 (ROS) は過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) などの酸化力が強い物質のことであり、植物において、光合成、脂質代謝、ストレス応答などの様々な過程で生じている。これらは DNA の損傷、生体膜脂質の過酸化、酵素の活性阻害などを引き起こすため、生体内において毒であるという認識が強い。しかしながら、種子発芽においては、ROS (特に  $H_2O_2$ ) は休眠打破物質として働き、発芽を促進することが知られており利用されていた。その発芽促進の理由として、酸素分圧の上昇による呼吸活性の促進等が報告されているが、呼吸阻害剤の KCN が種子休眠打破を行うことも報告されており、その詳細な発芽促進メカニズムは明らかとされていなかった。そこで、まずオオムギ種子において、吸水後の活性酸素種生成の有無とその局在について調査した。その結果、オオムギ種子は吸水後、速やかに胚およびアリューロン細胞において、 $H_2O_2$  および  $O_2^-$  を生成することを明らかにした (業績 3)。この結果は、オオムギ種子は生体内で毒として認識されている ROS を、吸水後、積極的に生成することを示唆した。さらに、コムギの穂発芽耐性品種は登熟過程において種子内の抗酸化能力が高く (業績 2)、抗酸化物質は、コムギ種子の発芽を著しく抑制することから (業績 1)、吸水後、積極的に生成される ROS は種子休眠・発芽を制御するために必要なシグナル因子であることが示唆された。

### 2. 種子の発芽制御機構における活性酸素種と植物ホルモンの関連

種子は吸水後、胚、アリューロン細胞および胚軸において積極的に ROS を生成するが、栄養貯蔵器官である胚乳や子葉において ROS の生成は確認されない。そこで、石橋氏はオオムギ種子の胚とアリューロン細胞における ROS の役割について調査した。

オオムギ種子において、ROS ( $O_2^-$ ) を生成する NADPH oxidase の遺伝子発現は、吸水後、胚とアリューロン細胞において確認された。さらに NADPH oxidase 阻害剤は、吸水後の ROS 含量を低下させ、発芽を著しく抑制させた (業績 3)。阻害剤を用いた実験から、吸水後、NADPH oxidase によって生成された ROS は、胚においてジベレリン (GA) 合成遺伝子の発現を促進させ GA 含量を調節することを明らかにした。さらに、その GA がアリューロン細胞において、NADPH oxidase の遺伝子発現およびカルシウムを介した酵素活性を上昇させることで ROS 含量を促進し、発芽にとって重要な  $\alpha$ -アミラーゼの誘導を調節することを明らかにした (業績 6)。また、発芽を負に制御し、種子休眠において重要な役割を担うアブシジン酸 (ABA) は、胚およびアリューロン細胞において NADPH oxidase の酵素活性を抑制し ROS 含量を低下させることで、発芽抑制に関わることが示唆された (業績 6)。

アリューロン細胞において、ROS はプログラム細胞死 (Program Cell Death) を引き起こし、そのプログラム細胞死は GA によって促進、ABA によって抑制されることが報告されている。アリューロン細胞における ROS の生成は、GA により促進、ABA により抑制されることから、GA により生成される ROS はプログラム細胞死に関与すると考えられていた。しかしながら、オオムギにおいて GA シグナルを負に制御する DELLA タンパク質の変異体である *sh1c* のアリューロン細胞では、GA は ROS 生成を促進するものの、プログラム細胞死は促進しなかった。この結果は、アリューロン細胞におけるプログラム細胞死の誘導は、GA シグナルによって制御されており、GA によって生成される ROS は、プログラム細胞死に直接関与しないことを示唆した (業績 5)。これまで、アリューロン細胞における  $\alpha$ -アミラーゼ誘導に関する研究の歴史は古く、GA と ABA シグナルのクロストークに関する複雑なメカニズムも明らかとなっている。そこで、アリューロン細胞における  $\alpha$ -アミラーゼ誘導に関して、GA、ABA および ROS の関連性について調査した。その結果、アリューロン細胞において、ROS は DELLA タンパク質の分解には直接には関与せず、ABA シグナルの活性化因子 HvPKABA を介した HvGAmYb の抑制を解除することで、 $\alpha$ -アミラーゼの誘導を促進させることを明らかにした (業績 4)。

以上のように、活性酸素による種子発芽制御について、主に植物ホルモンとの関連から調査した石橋氏の一連の研究は、これまでの包括的な理解であるジベレリンとアブシジン酸による種子発芽制御において、活性酸素という新しい制御因子の役割を明らかにしたものであり、今後さらなる発展が期待される。よって、作物学会研究奨励賞を授与するに値する研究業績と評価する。

### 研究業績

1. Ishibashi, Y. and Iwaya-Inoue, M. 2006. Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. *Plant Production Science* 9: 172-175.
2. Ishibashi, Y., Yamamoto, K., Tawaratsumida, T., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. 2008. Hydrogen peroxide scavenging regulates germination ability during wheat (*Triticum aestivum* L.) seed maturation. *Plant Signaling and Behavior* 3: 183-188.
3. Ishibashi, T., Tawaratsumida, T., Zheng, S.H., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. 2010. NADPH Oxidases act as key enzyme on germination and seedling growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Production Science* 13: 43-50.
4. Ishibashi, Y., Tawaratsumida, T., Kondo, K., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Zheng, S.H., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. 2012. Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. *Plant Physiology* 158: 1705-1714.
5. Aoki, N., Ishibashi, Y., Kai, K., Tomokiyo, R., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. 2014. Programmed cell death in barley aleurone cells is not directly stimulated by reactive oxygen species produced in response to gibberellin. *Journal of Plant Physiology* 171: 615-618.
6. Ishibashi, Y., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Kai, K., Yuasa, T., Hanada, A., Yamaguchi, S. and Iwaya-Inoue, M. 2015. A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination. *PLoS ONE*, e0143173.