

シロイヌナズナの種子における極限環境耐性の発現機構

田中佐季¹, 本瀬宏康¹, 小野文久², 山下雅道³, 三枝誠行¹ (1: 岡山大・理, 2: 岡山理科大学, 3: JAXA)

Resistibility of plant seeds of *Arabidopsis thaliana* against extreme conditions

S. Tanaka¹, H. Motose¹, F. Ono², M. Yamashita³, M. Saigusa¹. [1: Okayama Univ., 2: Okayama Rika Univ., 3: JAXA]

Abstract: The seeds of plants represent a dormant stage of plant life cycle and show strong resistance to environmental stresses such as desiccation and low temperature. In this study, we examined resistance and sensitivity of seeds to tremendous level of pressure. Seeds of *Arabidopsis thaliana* were exposed to ultrahigh pressure (7.5GPa) and seed germination and post-germination were investigated. We found that ultrahigh pressure treatment of seeds for 30 minutes to 2 hours inhibited seed germination and suppressed the growth of shoots and roots after germination. The ultrahigh pressure treatment for 5 hours and 24 hours completely inhibited seed germination. Morphological analysis of non-germinated seeds demonstrated that cells of embryos treated with ultrahigh pressure were almost identical to that of non-treated embryos. In addition, a germination-promoting hormone gibberellic acid did not overcome the inhibition of seed germination by the ultrahigh pressure treatment. To investigate the effect of ultrahigh pressure on cell division, we used transgenic *Arabidopsis* expressing β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene under the control of *CYCLIN B1;1* promoter (*CYCB1;1-GUS*). The *CYCB1;1-GUS* seedlings germinated after ultrahigh pressure treatment did not show any *GUS* activity in root meristem and shoot meristem. Taken together, our results suggest that ultrahigh pressure strongly suppresses cell division in meristems and inhibit seed germination and post-germination growth in *A. thaliana*.

背景と目的

地球上には砂漠や深海のような極限的な環境が存在する。生物の中にはこうした極限的環境に耐性を持つ種類がいる。動物では、オニクマムシ (*Milnesium tardigradum*) の「樽」が高圧に耐性を示すことが知られている。植物の場合には、種子に強い乾燥耐性があることが知られているが、それ以外の極限環境である高圧にも強い耐性を示すのかまだわかっていない。そこで本研究では、近年モデル植物として広く利用されているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子を 7.5GPa の高圧に曝露し、種子の発芽や発芽後の生長、遺伝子発現にどのような影響があらわれるかを明らかにすることを目的とし研究を行った。

材料と方法

実験にはシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. の Col-0 系統を野生型として用いた。植物は 22°C 恒明条件で生育させ、寒天培地での生育には MS 栄養塩類 (pH5.8), 3% ショ糖, 0.8% 寒天培地を使用した。

7.5GPa 高圧実験では、微小カプセル内にシロイヌナズナ種子を封入し、ハイロフィライトに固定したものを高圧力発生装置キュービックアンビルプレスにて加圧した。高圧をかける際にはカプセル形状維持のため、フッ素系不活性液体フロリナート (C₈F₁₈) を注入した。フロリナートに 1 週間漬けたサンプル

の発芽率と差がなかったため、フロリナートによる影響はない。7.5GPa に到達した時点から 15min, 30min, 1h, 2h, 5h, 24h の 6 つの条件で加圧した種子を、滅菌後、寒天培地に播種し、4°C 暗所にて低温処理後、22°C で生育した。

結果

・発芽と発芽後の加圧効果

7.5GPa (7 万 5 千気圧) は地球上であらわすと水深 750km に相当する超高压である。高圧力発生装置に設置し 7.5GPa に到達した時点から 15min・30min・1h・2h・5h・24h の 6 つの条件で加圧した種子を、寒天培地に播いて育成した。加圧種子の発芽と発芽後の生育に及ぼす影響を明らかにするため、発芽率 (Fig. 1) と根の伸長 (Fig. 2) に注目し検討した。発芽については、コントロールが 2 日目で 93% 発芽したことに比べ、加圧種子は発芽まで 4~6 日かかった。また、14 日目では、15min 45.2%, 30min 71.4%, 1h 80%, 2h 59.1% であり、いずれもコントロールと比較して低い発芽率であった。5h または 24h 加圧した種子については 14 日を経過した後も発芽がみられることはなかった。発芽後の生長についても、コントロールと比較すると生長の速度も遅く非常に小さい。(Fig. 3) 特に根の伸長に注目して比較をした結果、加圧した種子は播種から 14 日経過した時点で、最長でも 2mm 程度にしか伸長せず、生長が阻害されていることがわかった。また、本葉の出現もな

かった。

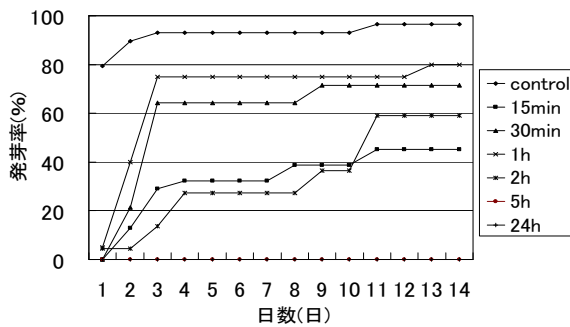


Figure 1. 7.5GPa 加圧の発芽率に及ぼす影響.

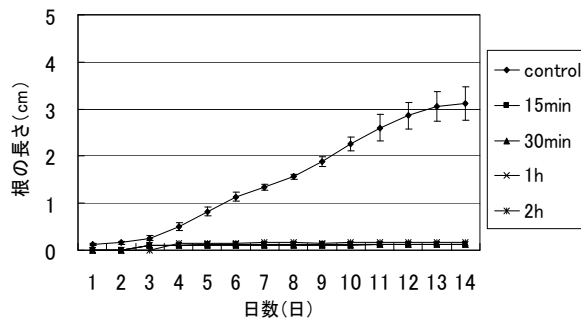


Figure 2. 7.5GPa加圧の根伸長に及ぼす影響.

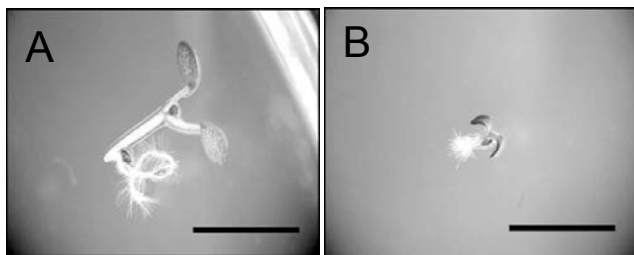


Figure 3. シロイヌナズナの芽生え7日目 (A) コントロール (B) 7.5GPa・1h 加圧処理後、発芽した個体。(Scale bar=3mm)

・未発芽種子の観察

次に、超高压処理によって発芽が抑制される原因を探るため、細胞構造に対する影響を、透明化サンプルの観察とパラフィン切片の観察により調べた。実験には寒天培地に播種後1週間生育させたものの中から、発芽しなかった種子を使用した。1時間または2時間超高压で処理した際の未発芽種子を透明化し観察した結果、種子の形状は保たれており、それぞれの細胞についても潰れている箇所はないことがわかった。また、パラフィン切片による観察の結果、細胞壁も保たれており、細胞の破壊はみられなかった。

・ジベレリンによる加圧後の生長阻害に対する効果

種子の発芽に必要な植物ホルモンであるジベレリンが、加圧による発芽阻害、発芽後の生長阻害を回復させるか否か検討するため、ジベレリン (GA₃) を添加した寒天培地に加圧種子を播種し、発芽と発芽

後の生長を調べた。GA₃を加えないものと加えたもので、発芽率、根の伸長ともに差は見られなかった。

・細胞分裂に及ぼす影響の解析

加圧種子の発芽後の生長が抑制されることから、細胞分裂に及ぼす影響を調べるため、M期で特異的に活性化するサイクリン B1;1 プロモーターの下流で GUS レポーター遺伝子を発現する形質転換体 (サイクリン B1;1-GUS 植物) による遺伝子発現解析を行った (Fig. 4)。GUS (β -glucuronidase) は β -グルクロニド結合を加水分解する大腸菌の酵素であり、レポーター遺伝子として用いられている。サイクリン B1;1-GUS 遺伝子を導入されたシロイヌナズナ種子を加圧・生育し、GUS染色を行った。結果、茎頂分裂組織と根端分裂組織について、コントロールでは斑点状のシグナルが検出されたが、1h, 2hの加圧種子についてはともに活性が見られなかった。

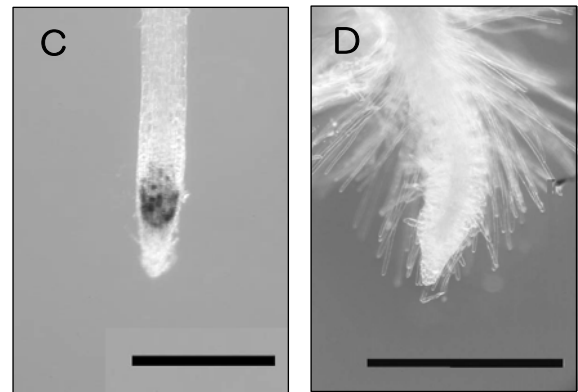


Figure 4. サイクリン B1;1 GUS活性の検出 (C) コントロールの根端 (D) 7.5GPa・1h 加圧処理後、発芽した植物の根端 (Scale bar=1mm)

・変異体と倍数体に及ぼす影響

超高压処理による生育阻害の原因を探るため、変異体や倍数体についての高圧耐性を検討した。種皮形成や表皮細胞の分化に異常を示す *glabra2* (*gl2*) 変異体と4倍体種子を用いて発芽と発芽後の生長を観察した。また、これまでの結果をふまえて *gl2* 変異体と4倍体の高圧処理については1h・2hの条件に絞り実施した。*gl2* 変異体では発芽率・発芽後の生長ともに野生型とほぼ同じ程度に抑制され、高圧力に対してより高い感受性を示すことはなかった。4倍体については、播種から7日目の時点で発芽率はコントロール 100%, 1h 77.8%, 2h 52.9%, という結果であり、2倍体野生型とほぼ同程度に抑制された。そして、発芽後の生長については根伸長の平均がコントロール 1.52cm, 1h 1.32cm, 2h 0.28cm であり、野生型より高い耐性を示した。2倍体野生型と *gl2* 変異体では7~10日目で枯死している個体が見られたが、4倍体については7日目で枯死している個体はみられず、葉や根の旺盛な生育が観察された。

考察

7. 5GPa の高圧処理を施した種子は、発芽と発芽後の生長が阻害されるという結果が得られた。野生型と *gl2* 変異体について加圧種子は発芽後の生長が悪く、発芽した種子についても子葉・幼根が出現した後 7~10日 で生長が停止し細胞が枯死した。透明化と組織切片を用いた未発芽種子の細胞・組織レベルでの観察から、加圧時の細胞や組織の損傷が認められなかったため、細胞や組織構造への影響よりも機能的な部分での効果が種子の発芽や発芽後の生長を阻害していると考えられる。

また、植物ホルモンを添加することにより、超高圧処理による発芽と発芽後の生長阻害が回復することを期待し、ジベレリン(GA₃)添加による生育を行ったが、ジベレリンによる発芽、根の伸長に対する回復効果は認められなかった。このことから、加圧による生長阻害は、外的なジベレリン投与では回復することができない、発芽や生長に必須の過程への影響によることが考えられる。

M期で特異的に活性化するサイクリンB1;1プロモーターの下流で GUS レポーター遺伝子を発現する形質転換体 (サイクリン B1;1-GUS) による遺伝子発現解析の結果、加圧種子の芽生えにはサイクリン B1;1-GUS活性が検出されなかった。このことから発芽と発芽後の生長に不可欠な茎頂分裂組織と根端分裂組織における細胞分裂が起こっていないことがわかった。超高圧が茎頂分裂組織と根端分裂組織に多大な影響を与えたことが考えられる。今後は、植物の形態形成に不可欠な分裂組織に対する超高圧の効果を分子や細胞レベルで明らかにし、超高圧に耐性を示す植物の作成を試みる。