

1. 麦類穂発芽耐性研究と技術開発の展開方向

1-1 種子アブシジン酸感受性機構の研究動向

東北農業研究センター・作物機能開発部・品質評価研究室 中村 信吾

1. はじめに

小麦穂発芽抵抗性は、種子の休眠性が大きな要因となっていると考えられる。そのため、種子休眠の遺伝的メカニズムが、明らかになれば、合理的な組み合わせを考えたより迅速な穂発芽抵抗性育種が可能になると考えることができる。しかし、残念ながら、種子休眠のメカニズムの全貌は、いまだ明らかになっていない。だが、これまでの研究から、植物ホルモンのアブシジン酸が、種子休眠の形成や維持に重要な働きをしていることが明らかになってきている。小麦においても、種子休眠性と胚のアブシジン酸感受性との密接な関係が示されてきた(Walker-Simmons, 1987)。この種子のアブシジン酸感受性機構についての遺伝子レベルでの研究は、アラビドプシスのアブシジン酸感受性突然変異体やトウモロコシの胎生発芽突然変異体の分子遺伝学的な解析により、90年代初めから、次々と遺伝子が、単離・同定され研究が急速に発展している。こうした、種子のアブシジン酸感受性遺伝子としては、これまでに、トウモロコシから、VP1 遺伝子が (McCarty et al., 1991)、アラビドプシスからは、ABI1,2,3,4,5 および ERA1 等の遺伝子が単離されている (Leung et al., 1994; Leung et al., 1997; Giraudat et al., 1992; Finkelstein et al., 1998; Finkelstein et al., 2000; Cutler, 1996 [表1])

表1. アブシジン酸感受性関連遺伝子

ABI1	脱リン酸化酵素	1994年
ABI2	脱リン酸化酵素	1997年
ABI3/VP1	B3 転写因子	1992・1991年
ABI4	AP2 転写因子	1998年
ABI5	bZip 転写因子	2000年
ERA1	farnesyl transferase	1996年

トウモロコシの胎生発芽変異体から単離された VP1 遺伝子は、アラビドプシスの ABI3 遺伝子と相同遺伝子の関係にあり、両因子は、B3 ドメインをもつ転写因子であることが明らかになっている。また、ABI1,2 遺伝子は、脱リン酸化酵素、ABI4 遺伝子は、AP2 ドメインを持つ転写因子を、ABI5 遺伝子は、b Zip ドメインを持つ転写因子を、ERA1 は、farnesyl transferase という酵素のベーターサブユニットをコードしていることが明らかになってきている。アブシジン酸感受性機構の研究は、現在も、日進月歩で進んでいるので、今後も新たな遺伝子が次々と明らかになり、アブシジン酸感受性機構や種子休眠の仕組みの全貌が徐々に明らかになっていくと思われる。こうした成果をとりいれながら研究を進めてい

けば、小麦種子休眠の仕組みもしたいに解明されていくだろう。ここでは、これら遺伝子の最近の主な話題を4つ紹介し、さらに今後の研究動向についての考えも述べてみたい。

2. アブシジン酸感受性に関わる遺伝子研究の最近の話題

(1) ABI3,4,5 遺伝子の機能について

当初は、種子特異的に働いていると考えられてきた ABI3,4,5 遺伝子であるが、どうも、それだけではないのではないかという証拠が最近明らかになってきている。

ABI3 遺伝子の発現をレポーター遺伝子である GUS 遺伝子を用いて検討したところ、植物体の休眠芽等においても、ABI3 遺伝子が発現していることが明らかになってきた (Rohde et al., 1999)。このことから、ABI3 遺伝子は、単に種子の登熟や休眠過程のみだけではなく、細胞の分化や分裂の抑制に広く関わっている遺伝子なのではないかと考えられるようになってきている。

ABI5 遺伝子は、その相同遺伝子が、植物体の方からも、酵母のワンハイブリッド法を用いて、アブシジン酸応答配列と相互作用するタンパクとして単離されている (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000)。アラビドプシスでは、ABI5 遺伝子は、いまのところ、9 種ものファミリーを形成しているだろうと考えられている。

グルコースやシュクロース耐性の原因遺伝子の単離を試みていた複数のグループが、その原因遺伝子の一つが、ABI4 遺伝子であることを明らかにしている (Laby et al., 2000; Huijser et al., 2000; Arenas-Huertero et al., 2000)、また、耐塩性の突然変異体の原因遺伝子の一つとしても、同定されている (Quesada et al., 2000)。このことから、ABI4 遺伝子は、種子のアブシジン酸感受性だけではなく、芽の成長時の、ストレス応答性反応にもかかわっているだろうと考えられるようになってきている。

(2) VP1/ABI3 と相互作用する因子の発見

ABI5 と ABI3 が、相互作用して、遺伝子発現を制御しているだろうということが、最近明らかになった。まず、三重大の服部らのグループが、イネの VP1 遺伝子と相互作用する bZip ドメインをもつ転写因子 TRAB1 を、酵母の 2 ハイブリッド法で単離した (Hobo et al., 1999)。以前から、VP1 遺伝子は、プロモーター配列と直接相互作用せず、何らかの転写因子との相互作用を介して機能しているのではないかという仮説がたてられていたが、これで、その因子が、同定されたことになった。ところが、面白いことに、この TRAB1 は、アラビドプシスから単離された同じ bZip 型のドメインをもつ ABI5 転写因子と高い相同性を示した。そこで、アラビドプシスの ABI5 遺伝子と ABI3 遺伝子間の相互作用が検討されたところ、この両転写因子間に相互作用があることが明らかになってきている (Nakamura et al., 2001)。これで、アラビドプシスからアブシジン酸非感受性突然変異遺伝子として単離された遺伝子のうちの、二つの転写因子の働きが結びつけられることになった。今後は、どのような遺伝子が、これら ABI5 と ABI3 両転写因子により、転写調節をうけ働いているのが、解明されていくと考えられる。

(3) 種子のアブシジン酸感受性とエチレン感受性

さらに、種子のアブシジン酸情報伝達系に関わる遺伝子を明らかにしようと、優性に変異形質があら

われるアブシジン酸非感受性突然変異体 *abi1* を利用して、アブシジン酸感受性程度が、さらに非感受性、または、感受性に戻った突然変異体をスクリーニングして、原因となる遺伝子が明らかにされている。そうしたところ、新たなアブシジン酸感受性に関わる遺伝子は、以前にエチレン感受性突然変異体から単離された、*EIN2* や *CTR1* 等であることが明らかになった (Beaudoin et al., 2000, Ghassemian et al., 2000)。Ein2 やエチレン受容体 ETR に変異がはいりエチレン非感受性となった突然変異体は、種子のアブシジン酸感受性が増し、深い休眠性を示した。また、逆に、CTR 遺伝子に変異が入り、エチレンの指令が常にオンになっているような突然変異体では、アブシジン酸感受性が、鈍くなることが示された。このことは、エチレン感受性変異も、種子のアブシジン酸感受性や休眠性にまた影響を与えていることを示しており、今後種子休眠機構を研究する上で、エチレン感受性についても、考慮に入れた研究を進めていく必要があると思われる。

(4) VP1/ABI3 の完熟種子中の発現量と種子休眠性の関係

カラスムギで、イギリスの Bristol 大学の Holdsworth 教授らにより、最初に、完熟種子胚中の VP1 遺伝子の発現量と種子休眠性の程度に正の相関があることが報告され、VP1 遺伝子が、種子休眠を維持するために働いているのではないかとということが提案されている (Jones et al., 1997)。最近、ソルガムと、アイスプラントにおいても、VP1 遺伝子の発現量と、種子休眠性や、アブシジン酸感受性との関係を裏付ける論文が発表された (Fukuhara and Bohnert, 2000; Carrari et al., 2001)。ソルガムにおいては、VP1 遺伝子の発現量と、種子のアブシジン酸感受性の関係が、また、アイスプラントでは、VP1 遺伝子の発現量と種子の休眠性との関係が示されている。また、筆者らが、小麦において、VP1 遺伝子の完熟種子胚中の発現量と、休眠性について検討をおこなったところ、確かに、休眠性の強い品種、ミナミノコムギと、休眠性の弱い品種、東山 18 号において、VP1 遺伝子の発現量に差が見られ、休眠性の強いミナミノコムギの方が、VP1 遺伝子の発現量が、多いという結果をえている (Nakamura and Toyama, 2001)。こうしたことなどから、小麦においても、VP1 遺伝子の発現が、種子の休眠性およびアブシジン酸の感受性になんらかの関係があると考えている。今後は、VP1 遺伝子の完熟種子胚中の発現と、発芽抑制が直接関係しているのかどうかなどの検討が必要だと思われる。

3. アブシジン酸情報伝達系の今後の研究動向

アブシジン酸情報伝達系の研究では、90 年代初頭あたりから盛んになったポジショナルクローニング法などの新たな方法で突然変異体の原因遺伝子を単離することにより、今まで知られていなかったアブシジン酸情報伝達系関連の遺伝子が次々と単離・同定され、研究が進展してきた。この方法は、今後も続けられ、新たな遺伝子の単離が進むと考えられるが、単純なスクリーニング方法で単離できる突然変異体は、すでに大部分単離されてしまっているのではないかと考えられ、今後は、突然変異体スクリーニング方法の工夫が、重要になってくると考えられる。

そうした状況の中、昨年 12 月には、ついにアラビドプシスの全ゲノム配列が決定され、約 3 万弱の遺伝子が、ゲノム上にあるのではないかと予測されている。今後は、このゲノム情報を利用した、遺伝子の機能の解析が順次進んでいくと思われ、その中で、アブシジン酸情報伝達系に関わる新たな遺伝子

も発見されていくと思われる。また、マイクロアレー等を使った、遺伝子発現の研究や、酵母の2ハイブリッド法をもちいた、タンパク相互間ネットワークの探索等も盛んになっていくと考えられる。これらの方法により、これまで単離されてきた転写因子等が、どのような遺伝子の発現を制御しているかが解明され、また、その制御に関わるこれまで知られていない因子が明らかになってくるものと考えられる。これらのことにより、アブシジン酸情報伝達系のネットワークの詳細が、今後急速に解明されていくのではないであろうか。そういった流れの中で、休眠現象についても、より詳細なメカニズムが明らかになってくると思われる。こうした成果をとりいれ、利用することにより、小麦の種子休眠機構の解明も進んでいくと思う。

また、種子休眠の QTL 解析も進展している。これまでに休眠形質の QTL 解析は、イネ (Lin et al., 1998), 大麦 (Han et al., 1999), 小麦 (Osa et al., 2001) 等で、行われ多数の遺伝子座が同定されている。その中で、少数の寄与率の高い遺伝子座が存在することも明らかになっている。現在、イネゲノム計画が、進行中で、ここ数年のうちに、全塩基配列が明らかになってくると思われるので、QTL 解析からの遺伝子の単離も、イネに関しては、現実的なものになってくると思われる。QTL 解析から遺伝子単離へのアプローチによって、休眠性を強く支配している遺伝子が、明らかになってくれば、これまでと違った、新しい角度からの、休眠現象の研究が進んでいくのではないかと思われる。大麦と小麦については、そのゲノムサイズの巨大さから、現段階では、DNA マーカーによる遺伝子単離は、容易ではないと考えられるが、しかし、遺伝子解析技術は、急速に進歩していることから、今後、イネゲノムの成果を用いたイネ科作物のシンテニーを利用した遺伝子単離技術の開発等により、これら作物においても、マーカー遺伝子からの遺伝子単離が可能になっていく可能性も十分あると思われ、研究の進展が待たれる。

近年の遺伝子解析技術の急速な進歩は、それまでの植物生理学的な研究成果の上に、遺伝子による分子レベルでの具体的な実像を与えることを可能とし、植物の複雑な仕組みの遺伝子レベルでの理解が、急速に進んできている。今後は、アラビドプシスやイネその他作物のゲノム解析の結果を利用した新たな解析手法の進歩により、その研究のスピードはさらに加速するものと考えられる。その中で、種子のアブシジン酸感受性や休眠の遺伝子レベルでの基礎的な理解も深り、小麦等の作物への応用も進展していくものと考えている。

引用文献

- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, and Leon P, 2000. Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of Plant vegetative development by sugar. *Gene & Development* 14: 2085-2096.
- Beaudoin N., Serizet C., Gosti E, and Giraudat. J., 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Carrari F, Petrez-Flores L., Lijavetzky D., Enciso S., Sanchez R., Bebech-Arnold R. and Iusem N., 2001. Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize vp1. Its potential involvement in pre-harvest sprouting resistance. *Plant Mol. Biol* 45: 631-640.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J. and Kim S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* 275: 1723-1730.

- Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D., Cooney S. and McCourt P., 1996. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Science* 273: 1239-1241.
- Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. and Goodman H.M., 1998. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10:1043-1054.
- Finkelstein R. R. and Lynch T.J., 2000. The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.
- Fukuhara T. and Bohnert H.J. 2000. The expression of a VP-1-like gene and seed dormancy in *Mesembryanthemum crystallinum* Genes Genet. Syst. 75: 203-209.
- Ghassemian M., Nambara E., Cutler S., Kwaide H., Kamiya Y. and McCourt P, 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F , Goodman H.M., 1992. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.
- Han F., Ullrich S.E., Clancy J.A. and Romagosa I., 1999. Inheritance and fine mapping of a major barley seed dormancy QTL. *Plant Science* 143: 113-118.
- Hobo T., Kowiyama Y., and Hattori T., 1999. A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*96: 15348-15353.
- Huijser C, A. Kortstee A., Pego J., Weisbeek P., Wisman E. and Smeekens S., 2000. The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* 23: 577-585.
- Jones H.D., Peters N.C.B., Holdsworth M.J., 1997. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *The Plant Journal* 12: 911-920.
- Laby R.J., Kincaid M.S., Kim D., and Gibson S.I., 2000. The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* 23: 587-596.
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.-C., Guerrier D., Cheddor F. and Giraudat J., 1994. Arabidopsis ABA-response gene ABI1: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.
- Leung J., Merlot S. and Giraudat J., 1997. The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in Abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771.
- Lin S.Y. Sasaki T. and Yano M., 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 96: 997-1003.
- McCarty D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V., Lazar M. and Vasil I. K., 1991. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcription activator. *Cell* 66: 895-905.
- Nakamura S. and Toyama T. 2001. Isolation of aVP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *J. Exp. Botany* 52:875-876.
- Nakamura S., Lynch T.J. and Finkelstein R.R., 2001. Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J.* 26: 627-635.
- 長学・加藤清明・三浦秀穂：コムギ 3A 染色体上の種子休眠性に関する QTL マッピング。育種学会第 99 回講演会，育種学研究 3（別冊 1）：229（2001）
- Quesada V., Ponce M.R. and Micol J. L., 2000. Genetic analysis of Salt-tolerant mutants in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 154: 421-.
- Rohde A., Montagu M.V., Boerjan, W. 1999. The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3 (ABI3) gene is expressed during vegetative quiescence processes in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 22: 261-270.

- Uno Y., Furuhiro T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:11632-11637.
- Walker-Simmons M.. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology* 84: 61-66.