

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL
STUDIES ON DORMANCY
IN *Agrostis capillaris* L. cv. HIGHLAND

(ベントグラス *Agrostis capillaris* L. ハイランドの
休眠に関する生理学のおよび分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

多年生牧草は低温や乾燥等の生存に不適當な環境条件を乗り切るために休眠芽を形成すると考えられている。休眠芽の形成や休眠芽に含まれる栄養分が不十分になると次年度の牧草の生産量が落ちる。このように牧草において休眠芽の形成機構を調べることは農業上重要な問題である。

牧場の多年生の優勢植物であるコモンベントグラス *Agrostis capillaris* L. cv. Highland の無菌培養系を用い、糖やアブシジン酸 (ABA) が休眠芽形成に及ぼす影響について調べた。無菌種子を5週間23℃16時間日長で培養した植物体を、根の付け根から0.7~1 cm のところで葉身を切除し、その株の基部をベンチルアデニン 1 mg/lを含むMS培地で4週間培養、分けつさせた後、6週間種々の条件下で休眠芽の誘導をさせた、形成した芽が伸長するかどうか調べ、休眠を確認した。

一般に乾燥ストレスにより植物ホルモンであるABAが誘導されると考えられている。浸透圧調整剤としてスクロースとマニトールを用いて乾燥ストレスが成長や休眠芽形成におよぼす影響を調べた。スクロースの濃度が0.26 Mまで増加させると植物体の成長は促進される。一方0.44 M以上の濃度では成長は停止するが、休眠芽の形成が増加した。

マニトールにより植物体の分けつは促進されたが、休眠芽の形成は起こらず、生重や乾重は減少した。このことから、休眠芽の形成は乾燥ストレス及び浸透圧の上昇だけによるものではないと考えられる。

植物が最も良く成長した0.26 Mのスクロースを含む培地にABAを添加し、その影響を観察すると、ABAは植物の成長を抑え、休眠芽の形成を促した。休眠芽形成を最も促進した 10^{-4} MのABAを培地に添加し、スクロースの濃度を変化させると植物体の成長はスクロースの濃度に関係なく停止したが、休眠芽形成の誘導は0.26 Mのスクロースを加えたときのみ促進された。従って、休眠芽形成はスクロースとABAの相互作用によって起きると考えられる。

休眠芽形成の誘導により多年生の牧草の主要な貯蔵物質であるフラクタンがどのように変化するかを調べた。植物体の基部のフラクタン含量を測定した結果、スークロースの濃度を高めると総フラクタン含量と高分子のフラクタンの増加が見られた。高濃度スークロースで誘導した休眠芽と基部のフラクタン含量は基部よりも休眠芽に多く含まれていたが、高分子フラクタンの量には差がなく低分子フラクタン含量が増加していた。さらにABAにより形成された休眠芽には基部の約2倍のフラクタンが含まれていた。

低分子フラクタンを調べるためにTLCに80%エタノール溶液フラクタンを展開したところ、低分子のフラクタンであるネオケストース、ケストースやネストースなどが休眠芽に見られた。このように、休眠芽では休眠していない芽と異なったフラクタン構成を示した。休眠芽誘導条件下に形成した休眠芽は、いかなる人工気象条件(温度、日長)でも萌芽しなかったが、長日条件下 10^{-4} MのACC(1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid)を含む0.26 M スークロース添加培地中に培養したときのみ萌芽した。

休眠芽誘導を行った株の基部及び形成した休眠芽には16 kDaの蛋白質の明瞭な増加が見られた。この蛋白質は種子形成時に発現するLEA (late embryogenesis abundant) 蛋白質のひとつであるデハイドリン (dehydrin) 蛋白質と考えられる。

休眠芽誘導条件下で特異的な発現を示す遺伝子を検出するために、休眠誘導区(高濃度スークロース・ABA)、ABA添加区ならびにコントロールからRNAを抽出し、ディファレンシャルディスプレイを行った。3個のアンカープライマーと20個のアービタリープライマーを組み合わせ、休眠誘導区にのみ強く発現が見られたバンドを回収しクローニングを行った。得られたクローンのシーケンスと塩基配列の相同性検索の結果、ABAやストレスで誘導される遺伝子 3クローン、ヒートショック蛋白質 3クローン、耐凍結糖蛋白質 1クローンなどの他、未知の遺伝子15クローンを検出した。

休眠芽と種子休眠との関連を調べるため、種子休眠に関与する以下の3種の遺伝子の休眠芽形成過程での発現について検討した。デハイドリン遺伝子は休眠芽形成中の組織よりRNAを抽出し、RT-PCRを行なった。増幅されたDNA断片をクローニングし、a18クローンを得た。a18は禾本科のデハイドリン遺伝子と高い相同性を示し、これらの遺伝子に特徴的なリジンリッチの配列を含んでいた。VP1 (VIVIPAROUS) 遺伝子はトウモロコシの穂発芽突然変異株の一つとして発見された。ベントグラスの実生よりゲノムDNAを抽出しPCRを行いVP1-likeクローンを得た。さらに休眠と高い関連性が指摘されているアンチオキシダント蛋白質のペルオキシレドキシン(peroxiredoxin)遺伝子の発現の検討を行った。これら3種の遺伝子は休眠芽誘導条件下で発現し、8週間後の休眠芽において高い発現が確認された。また休眠芽のACCによる休眠打破に伴い消長した。このことはこれらの遺伝子が休眠芽形成に重要な役割を行っていると考えられ、休眠芽形成過程に種子休眠と同様な機構が働いていることが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎
副 査 教 授 中 嶋 博
副 査 教 授 岩 間 和 人
副 査 助 教 授 幸 田 泰 則

学 位 論 文 題 名

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL STUDIES ON DORMANCY IN *Agrostis capillaris* L. cv. HIGHLAND

(ベントグラス *Agrostis capillaris* L. ハイランドの
休眠に関する生理学のおよび分子生物学的研究)

本論文は、図28、表10、引用文献196を含み、6章からなる総頁数131の英文論文である。別に参考文献6編が添えられている。

本論文は、多年生牧草が凍結や乾燥等の生存に不適当な環境条件を乗り切るために休眠芽を形成すると考え、その生理学的機作の解明を試みている。休眠芽の形成や休眠芽に含まれる栄養分が不十分になると次年度の牧草の生産量が落ちる。このように牧草において休眠芽の形成機構を調べることは農業上重要な問題である。

(1) コモンベントグラス *Agrostis capillaris* L. cv. Highlandの無菌培養系を確立した。無菌種子を5週間23℃16時間日長で培養した植物体を、根の付け根から0.7~1 cmのところを葉身を切除し、その株の基部をベンチルアデニン 1 mg/lを含むMS培地で4週間培養、分げつさせた後、形成した芽が伸長するかどうか調べ、休眠を確認した。

(2) 一般に乾燥ストレスにより植物ホルモンであるアブシジン酸が誘導されることが考えられている。浸透圧調整剤としてスークロースとマニトールを用いて乾燥ストレスが成長や休眠芽形成におよぼす影響を調べた。スークロースの濃度が0.26 Mまで増加させると植物体の成長は促進される。しかし0.44 M以上の濃度では成長は停止するが、休眠芽の形成が増加した。マニトールは植物体の分げつを促進するが、休眠芽の形成は起こらず、生重や乾重は減少した。このことから、休眠芽の形成は乾燥ストレス及び浸透圧の上昇だけによるものではないと考えられる。

(3) 植物の成長はアブシジン酸によって抑えられるが、休眠芽形成の誘導はアブシジン酸と0.26 Mのスークロースを加えたときのみ促進された。従って、休眠芽形成はスーク

ロースとアブシジン酸の相互作用によって起きると考えられる。休眠芽誘導条件で形成した休眠芽は、いかなる人工気象条件（温度、日長）でも萌芽しなかったが、長日条件下で 10^{-4} M の ACC (1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid) を含む 0.26 M スークロース添加培地中に培養したときのみ萌芽した。

(4) 休眠芽の誘導により多年生の牧草の主要な貯蔵物質であるフラクタン含量を測定した結果、スークロースの度を高めると総フラクタン含量と高分子のフラクタンの蓄積が見られた。しかし萌芽に伴って急激に減少している。このように、休眠芽では萌芽と異なったフラクタン構成で、ネオケストース、ケストースやネストースなどが顕著である。

(5) 休眠芽誘導を行った株の基部及び形成した休眠芽には 16 kDa の蛋白質の明瞭な増加が見られた。この蛋白質は種子形成時に発現するデハイドリン (dehydrin) 蛋白質と考えられる。また休眠芽誘導条件下で特異的な発現を示す遺伝子を検出するために、ディファレンシャルディスプレイを行った。得られた特異的クローンの塩基配列の相同性の検索の結果、3クローンのアブシジン酸やストレスで誘導される遺伝子、3クローンのヒートショック蛋白質、および耐凍結糖蛋白質クローンなどの他、未知の遺伝子 15クローンを検出した。

(6) 休眠芽と種子休眠との関連を調べるため、種子休眠に関与する以下の3種の遺伝子の休眠芽形成過程での発現について検討した。分離した a18 は禾本科のデハイドリン遺伝子と高い相同性を示し、これらの遺伝子に特徴的なリジンリッチの配列を含んでいた。VP1 (VIVIPAROS) はトウモロコシの穂発芽突然変異株の一つとして発見された遺伝子であるが、ベントグラスの実生よりゲノムDNAを抽出しPCRを行いVP1-likeクローンを得た。さらに休眠と高い関連性が指摘されているアンチオキシダント蛋白質のペルオキシレドキシン(Peroxiredoxin) 遺伝子の発現の検討を行った。これら3種の遺伝子は休眠芽誘導条件下で発現し、8週間後の休眠芽において高い発現が確認された。また休眠芽のACCによる休眠打破に伴い消失した。このことはこれらの遺伝子が休眠芽形成に重要な役割を行っていると考えられ、休眠芽形成過程には種子休眠と同様な機構が働いていることが示唆される。この成果は、学術的にも高く評価されるとともに、禾本科牧草の培養や品種改良技術の発展に寄与するところが極めて大きい。よって、審査員一同は、最終試験の結果とあわせて、本論文の提出者ジャムサラン ウンダルマーは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認めた。