

J. Technology and Education, Vol.26, No.1, pp.17–22 (2019)

研究論文

## シロイヌナズナ種子に対する非対称交流電界の発芽促進効果

高山 勝己<sup>\*1</sup>, 松野 敏英<sup>1</sup>, 上島 晃智<sup>1</sup>, 木村 峻<sup>1</sup>, 田中 良和<sup>2</sup>, 川本 昂<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 福井工業高等専門学校 物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

\*takayama@fukui-nct.ac.jp

<sup>2</sup> 若狭湾エネルギー研究センター 生物資源研究室 (〒914-0192 福井県敦賀市長谷 64-52-1)

<sup>3</sup> 株式会社ナノ・ブレイン (〒916-0061 福井県鯖江市平井町 57-5-13)

## EFFECT OF ASYMMETRICAL ALTERNATING CURRENT ELECTRIC FIELD ON GERMINATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* SEEDS

Katsumi TAKAYAMA<sup>\*1</sup>, Toshihide MATSUNO<sup>1</sup>, Akinori UEJIMA<sup>1</sup>,  
Shun KIMURA<sup>1</sup>, Yoshikazu TANAKA<sup>2</sup> and Subaru KAWAMOTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Biology Engineering, Fukui National College of Technology  
(Geshi-cho, Sabae-shi, Fukui 916-8507, Japan)

<sup>2</sup> Biology Group, The Wakasa Wan Energy Research Center (Nagatani, Tsuruga-shi, Fukui 914-0192, Japan)

<sup>3</sup> Nano-Brain Co., Ltd (Hirai-cho, Sabae-shi, Fukui 916-0061, Japan)

(Received January 11, 2019; Accepted February 10, 2019)

### Abstract

The effect of asymmetrical alternating current electric field (AACEF) on the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds was investigated in this study. AACEF experiments were carried out using a peak value ratio of 3 : 1 (positive voltage : negative voltage), a maximum positive electric field strength of 1,000 V/cm, and a constant frequency of 60 Hz. The seed samples of *A. thaliana* were exposed to the electric field for 10 days after sowing and were maintained in the light at 25°C for the experimental period. Seed germination was counted daily for 10 days. Total RNA from the seeds was extracted on the first, fifth, and eighth days after sowing. Gene expressions of *GA20-oxidase 1 (GA20ox1)*, *GA-INSENSITIVE (GAI)*, *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (NCED3)*, *Abcisic acid 8'-hydroxylase 2 (CYP707A2)*, and 18S ribosomal RNA (used as a housekeeping gene) were analyzed by quantitative real-time PCR. AACEF had no obvious effect on the expression levels of target genes. The germination percentage and the germination rate of the seeds exposed to AACEF were significantly increased from those of the control (without AACEF).

**Keywords:** Asymmetrical alternating current electric field, *Arabidopsis thaliana*, Germination

## 1. はじめに

近年、温度、光、害虫による食害作用、塩、乾燥（水分）などの様々な環境ストレスに対する植物応答に関心が持たれている。Marino と Becker の総説では、100 Hz 以下の低周波電界や電場が生物（さまざまな動物や植物さらには細胞レベル）に与える影響について報告している[1]。Krawiec らは、二十日大根種子に対して 50 Hz での低周波電場（30 および 60 mT）を一定時間印加することで、種子の発芽能が有意に向上することを報告している[2]。また Takimoto らは、シロイヌナズナ種子に対する極低周波電場（400 mT）の発芽促進効果を実証している[3]。Mo らは、大豆に対する電場の効果として発芽速度および発芽率を検討し、いずれも増加することを報告している[4]。Takaki らは、しいたけの子実体形成促進に対するパルス高電界印加の効果について研究を行い、電気刺激（50 kV, 50 回）によって収量が約 2 倍に増加することを報告している[5]。さらに、カイワレ大根種子に対して数秒間の放電印加を行うと種子の発芽促進、小松菜およびレタスの生育促進が報告されている[6, 7]。Dymek らは、大麦種子に対するパルス電界印加の効果を調べ、幼根伸張の減少およびデンプン内肺乳中の  $\alpha$ -アミラーゼ蓄積低下を明らかにしている[8]。Gandhare らは、トマト種子に対して電界、マイクロ波およびコロナ放電を用いて発芽促進効果を検討し、電界の印加が最も簡便かつ効果的な手法であることを報告している[9]。Piras らは、正と負の電界を用いた極性の影響を検討し、正電界印加がマツ種子の発芽を促進することを報告している[10, 11]。

シロイヌナズナは、1) ゲノムサイズが小さい、2) 1 世代が約 2 ヶ月の短期間、3) 屋内での栽培が容易、4) 多数の種子がとれる、5) 自家不和合性を持たない、6) 形質転換が容易などのモデル植物としての多くの利点を備えている。シロイヌナズナは、アブラナ科シロイヌナズナ属の 1 年草であり、2000 年に植物として初めて全ゲノム解読が終了した。このゲノムサイズは 1.3 億塩基対、遺伝子数は約 26,000 個であり、顕花植物では最小の部類である。

様々な環境ストレスが植物の成長段階に与える影響に関する研究は植物生理学の分野である。例えば、植物種子

の休眠と発芽は、植物ホルモンであるアブシジン酸（Abscisic acid, ABA）およびジベレリン（Gibberellin, GA）の内生量が関与している。種子の休眠から発芽への移行は、ABA による発芽抑制（休眠維持）および GA による発芽促進（休眠解除）の制御を受けている。シロイヌナズナ種子の光発芽では、赤色光（600~700 nm）/遠赤色光（700~750 nm）感受性フィトクロムタンパク質の構造変換が種子の GA および ABA の内生量を調節して、光発芽（休眠と発芽）を制御している[12, 13]。

本研究では、シロイヌナズナにおける GA および ABA の生合成、分解および抑制に関わる酵素をコードする 4 つの遺伝子として、*GA20-oxidase 1* (*GA20ox1*), *GA-INSENSITIVE* (*GAI*), *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3* (*NCED3*) および *Abscisic acid 8'-hydroxylase 2* (*CYP707A2*) に着目した。これらの遺伝子による発芽制御機構は図 1 に示した。これらの遺伝子は以下のような役割を持つ。シロイヌナズナにおける GA 生合成経路は、まず、ゲラニルゲラニルニリン酸（Geranylgeranyl diphosphate, GGPP）から GA<sub>12</sub> (GA 前駆体) が生合成される。続いて、GA<sub>20-oxidase</sub> によって GA<sub>12</sub> から活性型 GA が生合成される。GA<sub>20-oxidase</sub> をコードする遺伝子は 5 つ (*GA20ox1*~*GA20ox5*) 存在しており、*GA20-oxidase 1* (*GA20ox1*) は初期段階を触媒する。活性型 GA は発芽促進（休眠解除）を行う。また、この活性型 GA の応答を抑制する一群のタンパク質は DELLA 因子である。DELLA 因子は、植物特異的な転写制御因子であり、N 末端側のアミノ酸配列（D-E-L-L-A 配列および V-H-Y-N-P 配列）がコア領域として高度に保存されている。この DELLA 因子をコードする遺伝子は 5 つ (*GA-INSENSITIVE* (*GAI*), *REPRESSOR OF gal-3* (*RGA*), *RGA-LIKE 1* (*RGL1*), *RGL2*, *RGL3*) 存在する[16-18]。一方、ABA 生合成経路は、まず、GGPP からカロテノイドが生合成される。続いて、ABA 合成系の律速酵素である *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3* (*NCED3*) によってカロテノイドからキサントキシシン（ABA 前駆体）が生合成され、その後 ABA が生合成される。ABA は発芽抑制（休眠維持）を行う。また、ABA を不活性化する酵素は *Abscisic acid 8'-hydroxylase* である。この酵素をコードする遺伝子は 4 つ

(CYP707A1~CYP707A4)存在しており[14,15], CYP707A2はABAの主要な不活性化酵素である。

本研究では,シロイヌナズナ種子の発芽に及ぼす電界印加の影響を明らかにした。種子に電界を印加するために非対称交流電界装置を製作した。この非対称交流電界の印加の有無における種子の発芽数および発芽速度を調査した。さらに,種子の休眠と発芽は,GAおよびABAの内生量に起因するため,GAおよびABAの生合成などに関わる4つの酵素遺伝子の発現量を定量リアルタイムPCR法によって解析した。

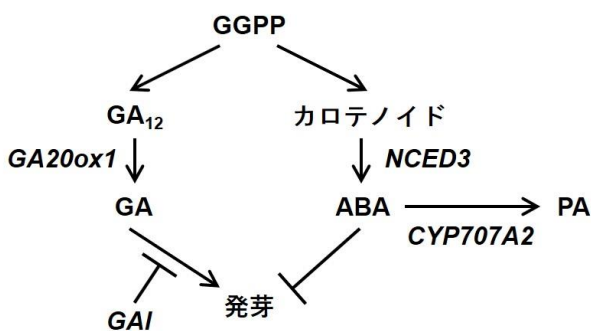


図1 シロイヌナズナ種子の発芽制御機構  
Geranylgeranyl diphosphate (GGPP), GA20-oxidase 1 (GA20ox1), GA-INSENSITIVE (GAI), 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (NCED3), Abscisic acid 8'-hydroxylase 2 (CYP707A2)およびファゼイン酸 (PA)。

## 2. 方法

### 2. 1. 種子に対する非対称交流電界の印加

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Columbia株)の種子を用いて非対称交流電界の印加が種子発芽に及ぼす効果を検証した。種子に非対称交流電界を印加するための装置を製作し,図2のように種子に電界を印加した。本装置の構成は以下に記載した。本装置は,2枚のステンレス製の電極板(縦30cm×横20cm×厚さ1mm)を上下に平行して5cmの間隔で設置した。本装置は,25°Cのキューベーター内に設置するために,このような構成にした。この電極板に正負の絶対値が異なる(正電圧と負電圧の波高値比率が3:1である)非対称交流電界を印加した。最大正電界強度は1000V/cmを用いて,印加した交流電圧の周波数は60Hzを用いた。本研究では,我々の最初の試みとして,正電圧と負電圧の波高値比率は3:1に設定し,周波

数は福井県(西日本地域)の周波数を用いた。シロイヌナズナの種子は以下のように準備した。シロイヌナズナの種子(50粒)を1.5mLマイクロチューブに入れ,種子に水分を吸収させるために適量の蒸留水を加えて軽く攪拌した。5枚のシャーレ内にろ紙を置き,2mLの蒸留水をそれぞれのろ紙に添加した。このろ紙上に種子を10粒ずつ播種し,5枚のシャーレ(種子数は10粒/枚×5枚=50粒/5枚である)を準備した。この5枚のシャーレを電界印加装置の下部の電極板上に置いた。図2のように透明なプラスチック容器内に本装置およびシャーレを収納し,このプラスチック容器内に種子の乾燥を防ぐために水を入れたビーカーを置いた。このプラスチック容器は照明機能を備えたインキュベーター(25°C,連続光照射)内に設置した。種子に対する非対称交流電界の印加は,このインキュベーター内において播種後10日間連続して実施した。

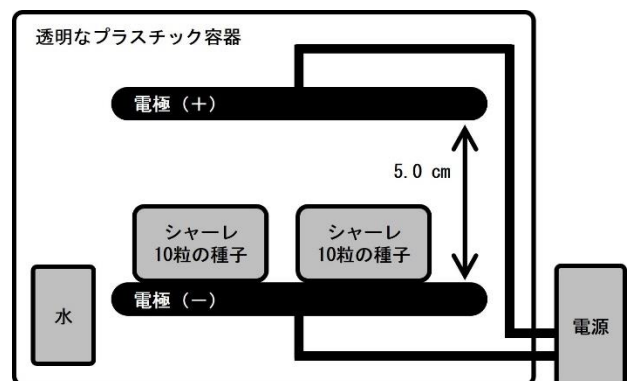


図2 非対称交流電界装置の模式図

### 2. 2. 種子の発芽数および発芽速度

非対称交流電界の印加の有無におけるシロイヌナズナの種子の発芽数は,播種後10日間において毎日調査した。本研究では,種皮の裂開が生じた種子を発芽とした。種子の発芽率は,播種後10日目における種子の発芽数に基づいて算出した。非対称交流電界の印加が及ぼす発芽の影響は一般化線形モデル[13]を用いて解析した。

### 2. 3. 遺伝子の発現量の比較

シロイヌナズナ種子の発芽は,ABA(発芽抑制,休眠維持)およびGA(発芽促進,休眠解除)の内生量に起因す

表 1 本研究で使用したプライマー

遺伝子名	プライマー名	配列 (5'→3')
CYP707A2	CYP707A2-F	ATGGGGTTGCCTTACATCGG
	CYP707A2-R	AGCCGCCTCTGGACTACTTA
NCED3	NCED3-F	CCTGAGACTTTAGGCCACGG
	NCED3-R	AAGTCAACCTCGAAGCAGGG
GA20ox1	GA20ox1-F	ACCGAGAGAGCTTTTGGACA
	GA20ox1-R	ATGGGTTTGGTGAGCCAATCT
GAI	GAI-F	TGGCTTGTGATGGACCTGAC
	GAI-R	AATATGTGCAGCCGCAAACC
18S rRNA	18S rRNA-F	GTATGGTCGCAAGGCTGAA
	18S rRNA-R	AAGTTTCCCGTGTGAGTC

ることが知られている。本研究では、シロイヌナズナ種子の GA および ABA の生合成、分解および抑制に関わる酵素をコードする遺伝子として *GA20ox1*, *GAI*, *NCED3* および *CYP707A2* (図 1) を用いた。さらに、細胞内での遺伝子発現量が一定であるハウスキーピング遺伝子として 18S リボソーム RNA (18S rRNA) を用いた。この 18S rRNA (ハウスキーピング遺伝子) の発現量を基準にして、他の遺伝子発現量を算出した。シロイヌナズナ種子に対する非対称交流電界印加の有無におけるこれらの遺伝子の発現量は、定量リアルタイム PCR 法によって評価した。種子からの total RNA の抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて添付の説明書に記載の方法に従った。この total RNA の抽出は、電界を印加した種子および印加していない種子において、播種後 1, 5 および 8 日目に無作為に選んだ 10 粒の種子 (1 枚のシャーレ内にある 10 粒の種子) を用いた。抽出した total RNA の品質の確認は、Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) および Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて添付の説明書に記載の方法に従った。RNA の品質は、RNA の分解の進行度合いを 1.0~10.0 の数値で表した RNA Integrity Number (RIN) によって定量的に評価した。RIN > 7.0 は RNA の分解が進行しておらず、RIN < 7.0 は RNA の分解が進行している。この抽出した total RNA から cDNA を合成するために、PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit (TaKaRa) を添付の説明書に記載の方法に従って用いた。定量リアルタイム PCR 法は、インターカラーターとして SYBR Green I を

用いている SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (TaKaRa), 鋳型 DNA として cDNA, および標的遺伝子を増幅するためのプライマー対を用いた (表 1)。

表 2 シロイヌナズナ種子の発芽数および発芽率

播種後 の日数 (日)	電界の印加なし		電界の印加あり	
	発芽数 (粒)	発芽率 (%) *	発芽数 (粒)	発芽率 (%) *
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	2	11
6	8	40	15	79
7	13	65	18	95
8	14	70	19	100
9	20	100	19	100
10	20	100	19	100

\* 播種後 10 日目における種子の発芽数から計算した。

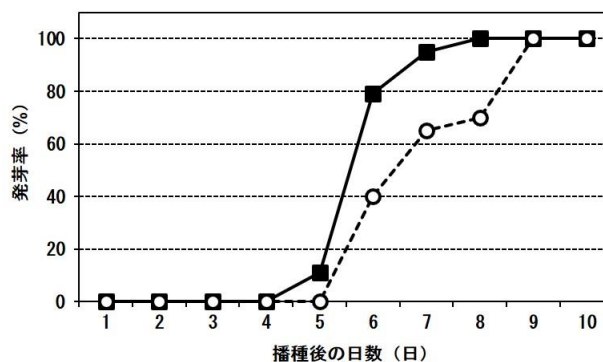


図 3 発芽率の経時変化

電界を印加した種子 (■) および電界を印加していない種子 (○) の発芽率を示す。発芽率は、播種後 10 日目における種子の発芽数に基づいて計算した。

### 3. 結果および考察

#### 3. 1. 種子の発芽数および発芽速度

シロイヌナズナの種子の発芽に与える非対称交流電界の印加の影響を検証した。非対称交流電界の印加の有無における種子の累計発芽数および発芽率は、播種後 10 日間において毎日調査した (表 2 および図 3)。その結果、播種後 5~8 日目の発芽率は、電界を印加していない種子よりも電界を印加した種子が常に高い発芽率を示した。播種

後 5 日目の発芽率は、電界を印加した種子が 11% (2/19) であり、電界を印加していない種子が 0% (0/20) であった。さらに、播種後 8 日目の発芽率は、電界を印加した種子が 100% (19/19) であり、電界を印加していない種子が 70% (14/20) であった (表 2 および図 3)。これは、電界の印加によって発芽に要する日数が短くなったことを示している。この播種後 8 日目の発芽率について、一般化線形モデル[13]を用いて解析したところ、p 値が 0.05 以下となりこの両者に有意差が認められた。この結果から、非対称交流電界の印加によってシロイヌナズナ種子の発芽が有意に促進すること (発芽促進) が明らかになった。このように、播種後 5~8 日目での発芽数は、電界を印加した種子が明らかに高い発芽数であった。次に、播種後 10 日目での最終的な累計発芽数を比較すると、電界を印加した種子は 50 粒のうち 19 粒であり、電界を印加していない種子は 50 粒のうち 20 粒であった。すなわち、播種後 10 日目での最終的な累計発芽数は、電界印加の有無で同程度であった。これらの結果から、電界の印加によってシロイヌナズナ種子の発芽は促進しており、さらに、この電界の印加が種子の発芽に悪影響を与えない (種子発芽を抑制しない) ことが明らかになった。

### 3. 2. 遺伝子の発現量の比較

本研究では、定量リアルタイム PCR 法を用いて、GA および ABA の生合成などに関わる 4 つの酵素遺伝子 (*GA20ox1*, *GAI*, *NCED3* および *CYP707A2*) およびハウスキーピング遺伝子として 18S rRNA の発現量を解析した。非対称交流電界の印加の有無において播種後 1, 5 および 8 日目の種子から抽出した total RNA の品質は、Agilent 2100 bioanalyzer を用いて RIN 値によって評価した。抽出したすべての total RNA の RIN 値は 7.0~9.0 の範囲であり、これらの RNA の分解が進行していないことを確認した。定量リアルタイム PCR 法は、total RNA から合成した cDNA を鋳型として用いて、標的遺伝子の発現量を解析した。得られたそれぞれの遺伝子の発現量を比較するために、細胞内での遺伝子発現量が一定であるハウスキーピング遺伝子 18S rRNA の発現量を 1.00 として他の 4 つの遺伝

子の相対的な発現量を求めた (図 4)。その結果、4 つの遺伝子 (*GA20ox1*, *GAI*, *NCED3* および *CYP707A2*) の相対的な発現量は、非対称交流電界の印加の有無において同程度であり、有意な差は認められなかった。

本研究では、我々の最初の試みとして、4 つの遺伝子 (*GA20ox1*, *GAI*, *NCED3* および *CYP707A2*) を対象に研究を実施した。同様に、正電圧と負電圧の波高値比率 (3 : 1) および周波数 (60 Hz) を設定した。その結果、シロイヌナズナ種子の発芽は、期待したように、電界の印加によって発芽の促進が認められた。一方、本研究で対象とした 4 つの遺伝子の発現量は、有意な差が認められなかった。今後は、シロイヌナズナ種子の遺伝子発現量に与える電界印加の影響を明らかにするために、発芽に関与する他の遺伝子も対象にすると共に、種子の採取および遺伝子分析の方法の検討に取り組む。

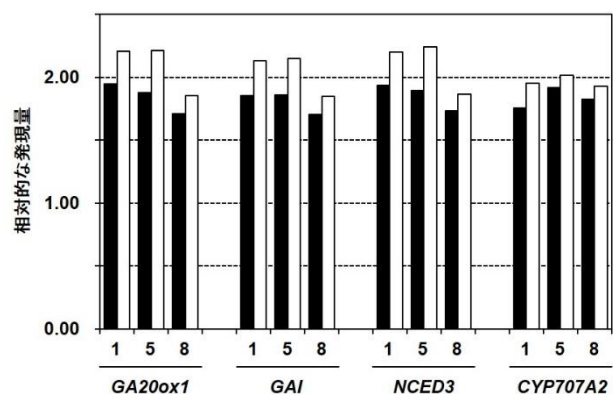


図 4 遺伝子の相対的な発現量  
電界を印加した種子 (■) および電界を印加していない種子 (□) での播種後 1, 5 および 8 日目における 4 つの遺伝子 (*GA20ox1*, *GAI*, *NCED3* および *CYP707A2*) の発現量を示す。細胞内での遺伝子発現量が一定であるハウスキーピング遺伝子 18S rRNA の発現量を 1.00 として他の 4 つの遺伝子の相対的な発現量を示す。

### 4. 引用文献

- [1] A. A. Marino and R. O. Becker, Biological Effects of Extremely Low Frequency Electric and Magnetic Fields: A Review, *Physiological Chemistry and Physics*, Vol.9, No.2, pp.131-147 (1977)
- [2] M. Krawiec, K. Kornarzyński, S. Palonka, M. Kaplan, P. Baryła and P. Kiczorowski, Does the Magnetic Field Improve the Quality of Radish Seeds?, *ACTA Scientiarum*

- Polonorum Hortorum Cultus*, Vol.12, No.6, pp.93-102 (2013)
- [3] K. Takimoto, H. Yaguchi and J. Miyakoshi, Extremely Low Frequency Magnetic Fields Suppress the Reduction of Germination Rate of *Arabidopsis thaliana* Seeds Kept in Saturated Humidity, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.65, No.11, pp.2552-2554 (2001)
- [4] W. Mo, Z. Zhang, Y. Liu, G. Zhai, Y. Jiang and R. He, Effects of a Hypogeomagnetic Field on Gravitropism and Germination in Soybean, *Advances in Space Research*, Vol.47, No.9, pp.1616-1621 (2011)
- [5] K. Takaki, R. Yamaguchi, T. Kusaka, H. Kofujita, K. Takahashi, Y. Sakamoto, M. Narimatsu and K. Nagane, Effects of Pulse Voltage Stimulation on Fruit Body Formation in *Lentinula Edodes* Cultivation, *International Journal of Plasma Environmental Science & Technology*, Vol.4, No.2, pp.108-112 (2010)
- [6] K. Takaki, Agricultural and Food Processing Applications of High-Voltage and Plasma Technologies, *Journal of the Heat Transfer Society of Japan*, Vol.51, No.216, pp.64-69 (2012)
- [7] N. Hayashi, S. Ihara, K. Kadowaki, K. Takaki, D. Wang and R. Nishimura, Enhancement of Yield of Harvest using Plasma and Pulsed Power, *Journal of Plasma and Fusion Research*, Vol.90, No.9, pp.541-546 (2014)
- [8] K. Dymek, P. Dejmek, V. Panarese, A. A. Vicente, L. Wadsö, C. Finnie and F. G. Galindo, Effect of Pulsed Electric Field on the Germination of Barley Seeds, *LWT - Food Science and Technology*, Vol.47, No.1, pp.161-166 (2012)
- [9] W. Z. Gandhare and M. S. Patwardhan, A New Approach of Electric Field Adoption for Germination Improvement, *Journal of Power and Energy Engineering*, Vol.2, No.4, pp.13-18 (2014)
- [10] Z. Gui, A. Piras, L. Qiao, K. Gui and B. Wang, Improving Germination of Seeds Soaked GA3 by Electrostatic Field Treatment, *International Journal of Recent Technology and Engineering*, Vol.2, No.1, pp.133-136 (2013)
- [11] A. Piras, Z. Gui, L. Qiao, K. Gui and Y. Fan, Effect of Negative Electrostatic Field Treatment on Germination of Seeds Soaked GA3, *International Journal of Soft Computing and Engineering*, Vol.3, No.3, pp.191-194, (2013)
- [12] 豊増知伸, 光発芽のホルモン制御, 日本農芸化学会, 化学と生物, Vol.44, No.9, pp.596-602 (2006)
- [13] 吉岡俊人および清和研二 (編集), 発芽生物学—種子発芽の生理・生態・分子機構, 種生物学研究, 第 32 号, 文一総合出版 (2009)
- [14] T. Kushiro, M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi, S. Kitamura, T. Asami, N. Hirai, T. Koshiba, Y. Kamiya and E. Nambara, The *Arabidopsis* Cytochrome P450 CYP707A Encodes ABA 8'-Hydroxylases: Key Enzymes in ABA Catabolism, *The EMBO Journal*, Vol.23, No.7, pp.1647-1656 (2004)
- [15] S. Saito, N. Hirai, C. Matsumoto, H. Ohigashi, D. Ohta, K. Sakata and M. Mizutani, Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid, *Plant Physiology*, Vol.134, No.4, pp.1439-1449 (2004)
- [16] L. D. Pysh, J. W. Wysocka-Diller, C. Camilleri, D. Bouchez and P. N. Benfey, The GRAS Gene Family in Arabidopsis: Sequence Characterization and Basic Expression Analysis of the SCARECROW-LIKE Genes, *The Plant journal*, Vol.18, No.1, pp.111-119 (1999)
- [17] A. Dill, S. G. Thomas, J. Hu, C. M. Steber, T. P. Sun, The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation, *The Plant cell*, Vol.16, No.6, pp.1392-1405 (2004)
- [18] C. M. Fleet and T. P. Sun, A DELLAcate Balance: The Role of Gibberellin in Plant Morphogenesis, *Current Opinion in Plant Biology*, Vol.8, No.1, pp.77-85 (2005)