

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14631

研究課題名(和文) イネにおける乾燥応答性遺伝子iclの農学的有用性

研究課題名(英文) Characterization of dehydration-inducible icl gene in rice

研究代表者

圓山 恭之進 (Maruyama, Kyonoshin)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：10425530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイネのIsocitrate lyase (icl) 遺伝子の欠損変異植物体と過剰発現植物体を用いてiclの機能解析を行った。icl遺伝子発現は乾燥環境下でABAによって制御されていることが示唆された。また、メタボローム解析は、iclは糖代謝に関係していることを示唆した。本研究によって、イネのiclは乾燥環境下の糖代謝における鍵酵素であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the functions of isocitrate lyase (icl) gene of rice using deficient mutants and overexpressors. Transcripts analysis indicated that icl gene expression was regulated by ABA under dehydration conditions. Metabolites analysis indicated that icl was involved in sugar metabolism. Our integrated analyses suggest that ICL is a key enzyme in sugar metabolism under dehydration conditions.

研究分野：植物分子生理

キーワード：icl ABA rice sugar

1. 研究開始当初の背景

乾燥環境下における代謝産物の研究は古くから行われ、糖、糖アルコール、アミノ酸等の蓄積量が増加することが報告されている。また、乾燥環境下で鍵酵素として働く代謝酵素遺伝子は、転写制御を受けていることも明らかになった。これまでに、研究担当者はイネを用いて乾燥環境に応答する代謝産物と遺伝子を質量分析装置とマイクロアレイで網羅的に同定した。さらに、オミックス解析で乾燥環境下において、重要な働きをされると考えられる代謝産物や鍵酵素遺伝子の候補の選抜を行った。この研究で単糖の蓄積とグリオキシル酸回路の遺伝子群の遺伝子発現に相関があることを明らかにした。

グリオキシル酸回路は植物や一部の微生物に特異な代謝経路である。植物体内のブドウ糖が減少すると、グリオキシル酸回路の代謝活性が上昇して、糖新生を経てブドウ糖が合成される。具体的には、酢酸や脂肪酸を材料にして、グリオキシソーム内のグリオキシル酸回路でコハク酸を生成される。次に、コハク酸はミトコンドリアに移行して、糖新生でブドウ糖が合成される。植物では脂肪性種子植物の発芽や老化において、グリオキシル回路が重要な働きをしていることが知られていたが、イネにおけるグリオキシル回路と糖代謝の詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、イネのグリオキシル酸回路の鍵酵素遺伝子（イソクエン酸リアーゼ：icl）の過剰発現体と欠損変異体を解析して、icl 遺伝子と糖代謝における役割及び icl 遺伝子とバイオマス生産との関連性を明らかにして、農学的有用性を考察する。

3. 研究の方法

(1) icl 遺伝子の ABA 応答

icl 遺伝子は、乾燥環境下で mRNA の蓄積量が増加する。icl 遺伝子の ABA 応答性を明らかにするために、イネ植物体を ABA 添加培養液で 2 4 時間生育した後、植物体から RNA を調製して、mRNA の蓄積量をリアルタイム PCR 法で分析する。

(2) 過剰発現体と欠損変異体の作出

icl 遺伝子とユビキチンプロモーターを結合した後、日本晴品種に導入して、icl 遺伝子過剰発現体を作成する。icl 遺伝子欠損変異体は Pohang University of Science and Technology で作成された T-DNA 挿入型の系統があり、対照と比較して、バイオマス量が減少することが示唆されていた。本研究では、過剰発現体と品種を合わせるために、CRISPR/Cas9 システムで icl 欠損変異体を作成する。さらに、icl 遺伝子がバイオマス量に与える影響を明らかにするために、icl 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体を培養土で、明期と暗期を各 1 2 時間として、2 週間生育して、草丈を比較する。

(3) 過剰発現体と欠損変異体の icl 遺伝子の mRNA の蓄積量と 1 次代謝産物量の解析

2 週間生育した icl 遺伝子過剰発現体と欠損変異体から RNA を調製して、icl 遺伝子の mRNA の蓄積量をリアルタイム PCR 法で分析する。乾燥処理後の過剰発現体と欠損変異体も同様に、icl 遺伝子の mRNA の蓄積量を分析する。また、通常条件下と乾燥環境下における過剰発現体と欠損変異体から代謝産物を抽出して、質量分析装置を用いて、1 次代謝産物を分析する。

4. 研究成果

(1) icl 遺伝子の ABA 誘導性

ABA 添加培養液で生育した植物体から調製した RNA を用いて、icl 遺伝子の mRNA 蓄積量を分析して、乾燥環境下における icl 遺伝子の mRNA の蓄積量と比較した結果、icl 遺伝子は ABA 誘導性遺伝子であることがわかった（図 1）。また、icl 遺伝子のプロモーター領域のシス因子を検索した結果、乾燥や ABA 応答に関与する既知のシス因子（ABRE、DRE、CE3 等）は存在しないことから、新規のシス因子で転写制御されていることが示唆された。

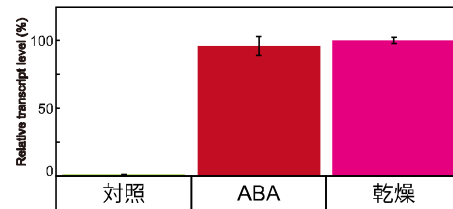


図 1. icl 遺伝子の ABA 誘導性

(2) 通常条件下の icl 遺伝子発現と草丈

通常条件下における icl 遺伝子過剰発現体と欠損変異体における icl 遺伝子の mRNA の蓄積量を分析した結果、過剰発現体では、顕著に icl 遺伝子の mRNA が蓄積し、欠損変異体では、icl 遺伝子の mRNA の蓄積は検出されなかった（図 2）。

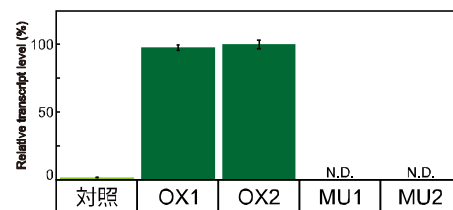


図 2. 通常条件下の icl 遺伝子の mRNA の蓄積

さらに、icl 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体の草丈を比較した。対照（日本晴）の平均草丈は 46.8 cm であった。一方、過剰発現体 OX1 は 49.5 cm、OX2 は 50.1 cm であり、有意に草丈が高いことがわかった。また、欠損変異体 MU1 は 41.6 cm、MU2 は 42.2 cm であり、有意に草丈が低いことがわかった。

この形質転換植物の解析から、通常条件下における icl 遺伝子の mRNA の蓄積と草丈は相関していることが明らかになり、icl 遺伝子の遺伝子発現はイネの初期成長に関与することが示唆された。

(3) 通常条件下の1次代謝物の蓄積

通常条件下における *icl* 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体におけるコハク酸とイソクエン酸の蓄積量を分析した。*icl* 遺伝子はイソクエン酸リアーゼをコードし、グリオキシソームに局在する。イソクエン酸リアーゼグリによって、イソクエン酸はコハク酸とグリオキシル酸に開裂する。*icl* 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 におけるコハク酸の蓄積量を対照と比較した結果、大きな差はなかった。一方、*icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるコハク酸の蓄積量を対照と比較した結果、顕著に減少した (図3)。

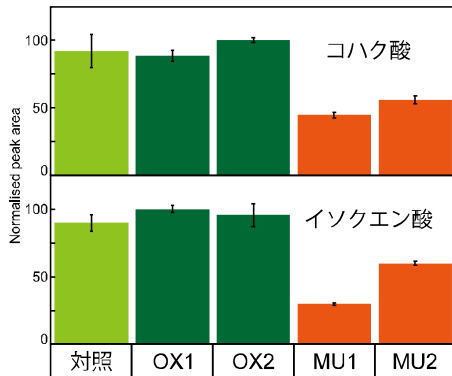


図3. 通常条件下のコハク酸とイソクエン酸

icl 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 におけるイソクエン酸の蓄積量は対照と比較して、大きな差はなかったが、*icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるイソクエン酸の蓄積量は対照と比較して、顕著に減少した (図3)。

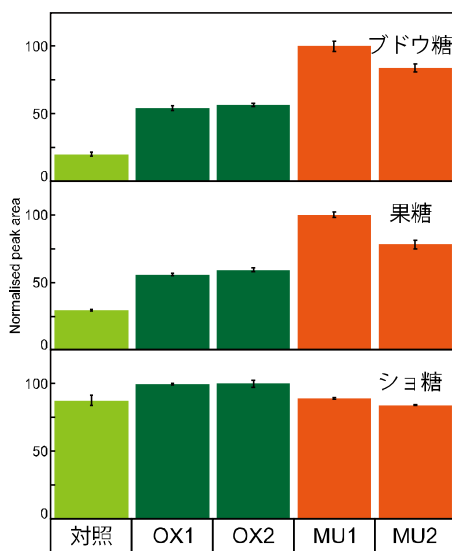


図4. 通常条件下の糖

次に、*icl* 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体におけるブドウ糖、果糖、ショ糖の蓄積量を分析した。*icl* 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 におけるブドウ糖の蓄積量を対照と比較した結果、顕著に増加していた。さらに、*icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるブドウ糖の蓄積量を分析した結果、*icl* 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 よりも顕著に増加した。果糖も同様に *icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 で最も蓄積していた。一方、*icl* 遺伝子過剰

発現体 OX1 と OX2 におけるショ糖の蓄積量を対照と比較した結果、大きな差はなく、*icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 も、大きな差はなかった (図4)。これらの解析から、*icl* 遺伝子は、ブドウ糖や果糖の蓄積量を制御していることが示唆された。

(4) 乾燥環境下の *icl* 遺伝子発現

乾燥環境下の *icl* 遺伝子過剰発現体と欠損変異体における *icl* 遺伝子の mRNA の蓄積量を分析した結果、過剰発現体では、乾燥処理後の対照より顕著に mRNA が蓄積し、欠損変異体では、mRNA の蓄積は検出されなかった (図5)。

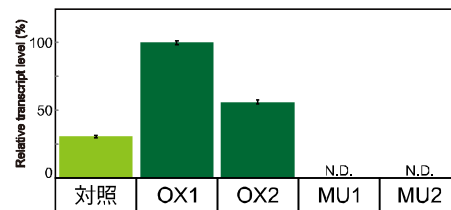


図5. 乾燥環境下の *icl* 遺伝子の mRNA の蓄積

(5) 乾燥環境下の1次代謝物の蓄積

乾燥環境下の *icl* 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体におけるコハク酸とイソクエン酸の蓄積量を分析した。*icl* 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 及び *icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるコハク酸の蓄積量を対照と比較して、増加した (図6)。

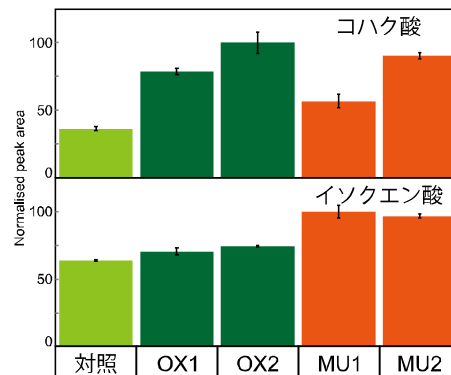


図6. 乾燥環境下のコハク酸とイソクエン酸

icl 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 におけるイソクエン酸の蓄積量は対照と比較して、大きな差はなかったが、*icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるイソクエン酸の蓄積量は対照と比較して、増加した (図6)。

次に、*icl* 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体におけるブドウ糖、果糖、ショ糖の蓄積量を分析した結果、*icl* 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 及び *icl* 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるブドウ糖、果糖、ショ糖の蓄積量を対照と比較した結果、大きな差はなかった (図7)。

これまでの解析から乾燥環境下におけるイネの *icl* 遺伝子の mRNA の蓄積量と単糖の蓄積量に正の相関があり、*icl* 遺伝子がコードするイソクエン酸リアーゼは、グリオキシル酸回路の代謝酵素であることから、*icl* 遺伝子は糖代謝に関与していることが、示唆されていた。本研究で *icl* 遺伝子の過剰発現体

の遺伝子発現と代謝産物の蓄積量を解析することによって、icl 遺伝子の mRNA の蓄積量の増加はブドウ糖や果糖の蓄積量の制御に関与していることが示唆された。また、icl 遺伝子の欠損変異体においてもブドウ糖や果糖の蓄積量が増加することから、コハク酸やイソクエン酸の蓄積量の減少はブドウ糖や果糖の蓄積量の増加に関与していることも示唆された。乾燥環境下の icl 遺伝子過剰発現体 OX1 と OX2 及び icl 遺伝子欠損変異体 MU1 と MU2 におけるブドウ糖、果糖、ショ糖の蓄積量を対照と比較して大きな差はなかったことは、乾燥環境下における糖の生合成には、糖新生以外の様々な代謝が関与していることが示唆される。また、icl 遺伝子の過剰発現体は対照より初期生育が良いことは、icl 遺伝子の農学的な価値は高いことも示唆される。今後、イネにおけるグリオキシル酸回路をより詳しく解析することは、代謝工学および農学的に重要であると考えられる。

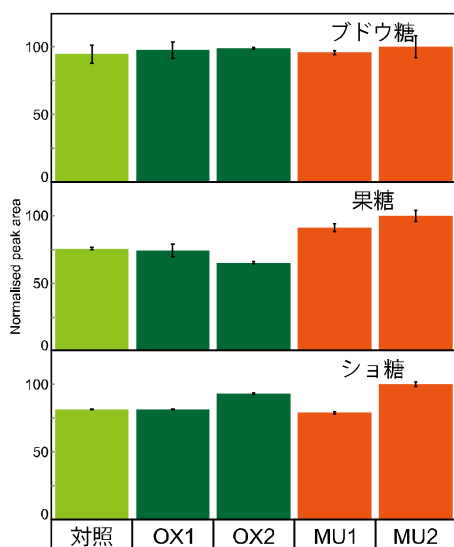


図 7. 乾燥環境下の糖

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

圓山 恭之進 (Maruyama Kyonoshin)
 国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：10425530

(2) 研究分担者

なし
 研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
 研究者番号：

(4) 研究協力者

なし