

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580019
 研究課題名（和文） 水稻茎葉部における炭水化物転流の分子機構の解明
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of the mobilization of carbohydrates accumulated in the stems of rice plants
 研究代表者
 廣瀬 竜郎（HIROSE TATSURO）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター・稲収量性研究
 北陸サブチーム・主任研究員
 研究者番号：90355579

研究成果の概要：イネの茎葉部（葉鞘および稈）のデンプン含量は、出穂前に上昇し、出穂後にピークとなり出穂後には低下する。この出穂後のデンプン含量の低下にともなって、デンプン分解系酵素である α -アミラーゼの酵素活性が上昇することがわかった。 α -アミラーゼ遺伝子はイネゲノム中に10個存在することが明らかになり、そのうち *Ramy2A* (Os6g0713800) ならびに *Ramy4A* (Os08g0473600) が葉鞘のデンプン分解に関与していると推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：アミラーゼ、遺伝子発現、イネ、デンプン、葉鞘

1. 研究開始当初の背景

水稻の茎葉部（葉鞘および稈）は同化産物の一時的貯蔵器官として、出穂前には多量のデンプンを蓄積し、出穂後にはこれを分解して登熟穎果に供給する。この出穂前の蓄積同化産物は収量成立に大きく寄与しており、全収量の30%程度にもおよぶ。また、出穂後に天候が不順な場合のバッファーとしての機能も指摘されている。茎葉部のデンプン蓄積に関する従来の研究は、デンプン合成系の機構解明を中心に行われてきた。しかしながら、蓄積されたデンプンの分解およびその後の再転流の分子機構については未解明であった。そこで本研究では水稻の茎葉デンプンの

分解とその転流について解明することを目指した。

2. 研究の目的

高等植物のデンプン分解にはアミラーゼやホスホリラーゼなどのいくつかの酵素が関与する可能性があり、水稻茎葉部のデンプン分解で働く酵素がそのうちのいずれであるか定かでない。そこで本研究では、出穂後の茎葉デンプンの分解に主に関与する酵素を明らかにし、さらにその酵素の複数であると予想される遺伝子のうち、どの遺伝子が関与しているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

イネ（品種：日本晴）を北陸研究センターの圃場にて慣行栽培したものを実験に用いた。

(2) 生理・生化学的解析

茎葉部のデンプン分解系、および糖代謝・転流系の酵素活性を中心とした生理機能の解析を行った。デンプン含量はアミログルコシダーゼ/ヘキソキナーゼ/グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼによる酵素法、 α -および β -アミラーゼ活性は BPNPG 法 (McCleaerly & Sheehan 1987)、ホスホリラーゼ活性は Nakamura et al. (1989)の方法によって測定した。

(3) 遺伝子群の検索と同定

上記によりその関与が推測された α -アミラーゼ遺伝子についてイネゲノム情報から検索・同定し、遺伝子ファミリーの全構成メンバーを明らかにした。これをもとに、Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>)を用いて各遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計した。

(4) 遺伝子発現の網羅解析

α -アミラーゼ遺伝子群の各遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法を用いて網羅的かつ定量的に解析した。イネの各部位から抽出した totalRNA を逆転写反応によって cDNA とした後、サイバーグリーン法によってリアルタイム PCR を行った。遺伝子発現レベルはユビキチン遺伝子 (*RUB1Q1*, Os06g0681400) の発現に対する相対値として算出した。組織からの totalRNA 抽出は CTAB 法によって行い、得られた totalRNA (5 μ g) を用いて逆転写反応を行って 1st strand cDNA を合成し、1 回のリアルタイム PCR につき 10ngRNA 相当量を鋳型として用いた。

4. 研究成果

(1) 出穂期の茎葉部のデンプン含量とアミラーゼ活性の消長

止め葉下の第 1 葉鞘のデンプン含量は、出穂前に上昇し、出穂後には低下した (図 1)。出穂にともなって α -アミラーゼ活性は出穂前の約 2 倍に上昇し、その後も比較的高いレベルを保った。それに対して、 β -アミラーゼ活性は出穂前から上昇し、出穂直前にピークとなりその後低下した (図 2)。また、ホスホリラーゼ活性は全期間を通じて低いレベルにあった (データは示さず)。以上より、葉鞘における出穂後のデンプン分解には α -アミラーゼが関与する可能性が高く、一方、 β -アミラーゼはデンプン含量の変化とよく似たパターンで推移することから、デンプン蓄積との関連が推測された (図 3)。

(2) イネゲノムにおける α -アミラーゼ遺

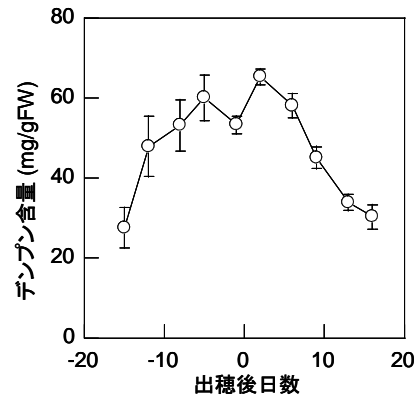


図1 出穂期の止め葉下第1葉鞘のデンプン含量の推移
エラーバーは標準誤差 (n=3-4)

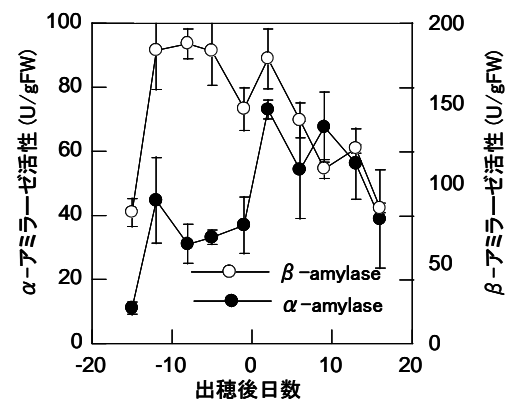


図2 出穂期の止め葉下第1葉鞘のアミラーゼ活性の推移
エラーバーは標準誤差 (n=3)

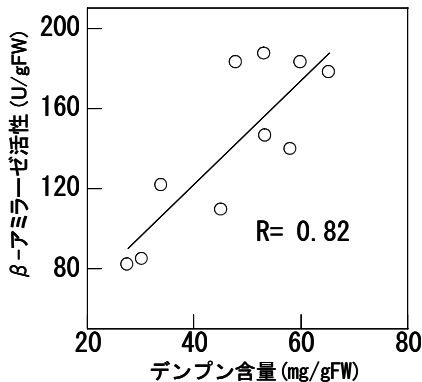


図3 出穂期の止め葉下第1葉鞘のデンプン含量と
 β -アミラーゼ活性との関係

伝子群の同定

前項で述べたように、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解酵素として α -アミラーゼの重要性が示唆された。そこで、 α -アミラーゼ活性とその遺伝子発現との関係を調べるために、まずイネゲノムにおける α -アミラーゼ遺伝子の探索と同定を行った。その結果、イネゲノム中には全部で10個の α -アミラーゼ遺伝子が存在することが明らかになった (表 1)。そのうち、Os08g0473600の遺伝子はこれまでに報告がない遺伝子であったので、本報告書において *Ramy4A* (仮称) と呼ぶことにする。

(3) α -アミラーゼ遺伝子群の発現解析

イネの α -アミラーゼをコードする10種類の遺伝子(α -アミラーゼ遺伝子群)について、各遺伝子の発現レベルを調べるため、リアルタイムPCR法のための遺伝子特異的なプライマーセットを設計した。これを用いて出穂前後の葉鞘を含む7種の組織での遺伝子発現レベルを調べた。結果を図4に示した。 α -アミラーゼの発現レベルは発芽種子において極めて高く、他の組織の100倍以上に達した。発芽種子では*Ramy1A*、*1C*および*3C*の発現レベルが非常に高く、この3遺伝子で α -アミラーゼ遺伝子群全体の発現レベルの85%以上を占めた。一方、発芽種子以外の組織では α -アミラーゼ遺伝子群の発現レベルは全体的に低かった。しかし、発芽種子での発現レベルが低い*Ramy4A*は他の組織では比較的高く、また発芽種子ではほとんど発現がみられない*Ramy2A*の発現が検出されるなどの特徴があった。出穂前後の葉鞘に注目すると、*Ramy2A*の発現レベルが出穂後に高まり、逆に*Ramy1A*の発現レベルは出穂後には著しく低下した。また、出穂前後を通じて、*Ramy4A*の発現レベルは他の遺伝子よりも高かったが、出穂後には出穂前に比べてやや低下した。結果として、 α -アミラーゼ遺伝子群全体としての発現レベルは出穂前後でほとんど変わらず、出穂後の α -アミラーゼ活性の上昇と傾向が一致しなかった。

(4) 考察

本研究の結果、イネ葉鞘における出穂後のデンプン分解には、 α -アミラーゼの活性上昇が関与していることが推測された。一方、 β -アミラーゼ活性には出穂後の活性上昇はみられず、デンプン含量のそれと高い相関を示した。したがって、 β -アミラーゼは出穂後の急激なデンプン分解よりも、むしろ全期間を通じたデンプン代謝に関わっていることが推測された。また、もう一つのデンプン分解酵素であるホスホリラーゼ活性は全期間を通じて低いレベルで、葉鞘のデンプン代謝における同酵素の寄与は比較的小さいと思われた。葉や茎などの緑色部のデンプン分解機構は、貯蔵器官のそれと比べて研究の遅れが著しい。そうしたなか、葉にデンプンを過剰に蓄積する*Arabidopsis*の変異体解析により、葉のデンプン分解における β -アミラーゼの重要性が指摘されている。一方、本研究では出穂後の葉鞘では α -アミラーゼの活性上昇が特徴的であった。*Arabidopsis*の葉はイネでは葉鞘ではなく葉身に相当すると考えられ、単純に比較することはできないが、以下に述べる遺伝子レベルの差異とともに、興味深い問題といえる。

ゲノムデータの解析の結果、イネの α -アミラーゼ遺伝子は10個存在することがわかった。イネと同様に全ゲノムデータの解析が

表1 イネの α -アミラーゼ遺伝子群

遺伝子名	染色体	RAP locus**
<i>RAmy1A</i>	2	Os02g0765600
<i>RAmy1B</i>	1	Os01g0357400
<i>RAmy1C</i>	2	Os02g0765300
<i>RAmy2A</i>	6	Os06g0713800
<i>RAmy3A</i>	9	Os09g0457400
<i>RAmy3B</i>	9	Os09g0457500
<i>RAmy3C</i>	9	Os09g0457800
<i>RAmy3D</i>	8	Os08g0473900
<i>RAmy3E</i>	8	Os08g0473600
<i>RAmy4A*</i>	1	Os01g0715400

* 仮称、** RAPデータベースにおける遺伝子座

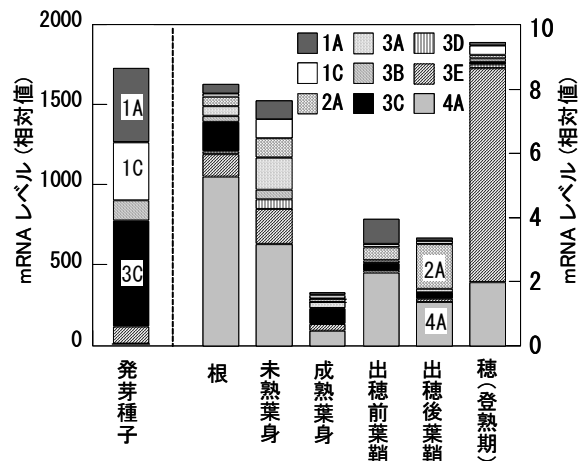


図4 α -アミラーゼ遺伝子群の組織特異的発現
発芽種子についてはスケールが異なる。また*Ramy1B*は発現が検出されなかった。凡例はRamy番号のみ記載した。

終わっている*Arabidopsis*では、 α -アミラーゼ遺伝子は3個存在するに過ぎないことと対照的である。この理由は不明だが、イネは胚乳や茎葉部などに多量のデンプンを蓄積するため、*Arabidopsis*に比べて代謝全体におけるデンプンの重要性がより高いことと関連しているのかも知れない。

次に発現特性の点から α -アミラーゼ遺伝子群を考える。まず、発芽種子における圧倒的な発現レベルに比べると、他の組織での α -アミラーゼの発現は非常に低いレベルにある。これは、酵素活性の点からも明らかである。発芽種子では*Ramy1A*、*1C*および*3C*が全体の発現レベルの85%以上を占めほか、*Ramy3B*と*3E*も発現していた。これに対して、他の組織では*Ramy4A*の発現が比較的高いことが特徴的であった。*Ramy4A*は本研究においてはじめて同定された遺伝子であり、その発現特性についての報告も過去には存在しない。*Ramy4A*がコードするタンパクは、既知のタンパクのなかではリンゴのプラスチド局在型の α -アミラーゼと最も相同性が高い。また、局在性予測の結果から*Ramy4A*タンパクも葉緑体に局在する可能性が高いことがわかった。発芽種子の胚乳は死んだ組織であ

り、デンプン粒はいわばむき出しの状態が存在する。一方、それ以外の生きた組織ではデンプンはプラスチックド（アミロプラストや葉緑体）に局在する。したがって、こうした組織でデンプン分解に与る酵素は、プラスチックドに移行・局在することが必要である。このことを考えると、プラスチックド局在型である可能性が高い *Ramy4A* が葉鞘をはじめとする発芽種子以外の組織で比較的高く発現していたことは合理的である。他方、*Ramy1A* をはじめ発芽種子で高発現していた α -アミラーゼ遺伝子も発芽種子以外の組織で発現していた。これらの遺伝子がコードする α -アミラーゼの局在性については必ずしも明らかではないが、最近、*Ramy1A* タンパクが小胞輸送によって葉緑体に運ばれることが報告されている。

出穂前後の葉鞘についてみると、 α -アミラーゼ遺伝子群全体としての発現レベルは出穂前後でほとんど変わらず、出穂後の α -アミラーゼ活性の上昇と傾向が一致しなかった。この原因はあきらかではないが、酵素活性の調節は多様であり、転写レベルだけでは説明できない例は多い。現在までのところ、アミラーゼ活性の *in vivo* での調節因子についての知見は少なく、特に発芽種子以外での研究例はほとんどない。この点については今後の課題として残されたといえる。一方、出穂後の *Ramy2A* の発現レベルの上昇は明らかであり、*Ramy2A* については転写レベルでの調節を含めてさらに調べる必要があるだろう。この際、本研究では十分なデータが得られなかったが、電気泳動と活性染色を組み合わせたアイソザイム分析などが有力な研究手法になると思われる。

以上述べたように、茎葉部などの緑色組織におけるデンプン分解機構については不明な点が非常に多く、その意味において本研究はきわめて新規性が高い。特に、緑色組織のデンプン分解について、*Arabidopsis* 以外の植物で調べた例は他にはなく、さらにイネでは *Arabidopsis* とは異なり α -アミラーゼの重要性が示唆されるなど、興味深い知見も得られた。しかしながら、従来の研究が発芽種子を中心に展開してきたこともあり、酵素活性の測定法をはじめとする様々な研究手法が、そのままでは緑色組織には適用できないこともわかった。さらに、イネの α -アミラーゼ遺伝子群は個々の遺伝子の塩基配列の類似度が非常に高く、特異性の高さで知られるリアルタイム PCR 法を用いても、相互の識別が困難な場合も多かった。本研究の多くの労力をこれらの問題の解決にあてる結果となったが、そこで得られた知見や技術を今後の研究に活かして、緑色組織のデンプン代謝についてさらに調べていきたい。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 竜郎 (HIROSE TATSURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター・稲収量性研究北陸サブチーム・主任研究員
研究者番号：90355579