

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05602

研究課題名(和文) イネの稈や葉鞘における出穂後のデンプン分解に係わる遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the genes involving in starch remobilization in rice culms and leaf sheaths during the post-heading stage

研究代表者

平野 達也 (Hirano, Tatsuya)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：30319313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネの稈や葉鞘などの茎部に出穂期までに蓄積したデンプンは、出穂後に分解され、コメの登熟に必要な炭水化物の一部として利用される。 α -アミラーゼをコードするOsBAM2とOsBAM5が同時に発現抑制された系統では、稈や葉鞘のデンプン含量が出穂期以降に一時的に大きく増加した。また、インド型多収品種タカナリでは、 α -アミラーゼをコードするRAmy2Aの発現抑制により出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の低下が大きく遅れ、さらに登熟歩合も有意に低下した。以上のことから、これら遺伝子は出穂後の稈や葉鞘におけるデンプン分解において重要な役割を担っていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の人口増加を支える食料の安定供給が求められることから、世界中で主食として利用されるイネの収量性向上は重要な課題である。そのため、イネでは穂のサイズを大きくするなど、収穫部位であるシンクの容量を増大させる取り組みが多く行われてきた。一方、増大したシンクを満たすための同化産物の供給能力、すなわちソース機能の増強もまた収量性向上には不可欠である。本研究では、出穂期までにイネの稈や葉鞘に貯蔵されたデンプンの分解に働く予想される遺伝子の機能について解析を進めた。このデンプンの分解により生じた糖はイネの登熟に利用されることから、本研究の成果はイネ登熟に対するソース機能向上を達成する重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Starch is accumulated at a high level in culms and leaf sheaths prior to the heading stage and remobilized for grain filling after heading in rice. In the double knockdown lines of OsBAM2 and OsBAM5 encoding α -amylase isoforms, starch content temporarily increased in the culms and leaf sheaths after heading. In Takanari, a high-yielding indica cultivar, the repressed expression of RAmy2A encoding α -amylases resulted in the significant delay of starch remobilization in the leaf sheaths after heading and the significant decrease in grain filling ratio. These results suggest that OsBAM2, OsBAM5 and RAmy2A play an important role in the starch remobilization at the post-heading stage in rice culms and leaf sheaths.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 稈と葉鞘 デンプン分解 非構造的炭水化物 α -アミラーゼ α -アミラーゼ

1. 研究開始当初の背景

重要な主食用穀物であるイネでは、世界的な需要の増加や日本における飼料用などへの用途拡大に対応するため、シンクである穂のサイズ、すなわち一穂粒数が大きく増加した品種の育成が活発に進められている。また、一穂粒数の増加やコメ粒形の拡大に関与する遺伝子も多く同定され、イネのシンク容量増大に向けた成果が多く得られている。一方、増大したシンクの要求を満たすには、通常よりも多くの同化産物をシンクである子実へ供給しなければならない。よって、一穂粒数の増加などシンク容量の増大が達成されたイネ品種の収量を確実に安定させるためには、それに見合った同化産物の供給能力、つまりソース機能の増強が求められる。

イネ子実の登熟に対するソースとしては、出穂後の葉身において新たに同化された同化産物(出穂後同化産物)と、出穂期までに稈や葉鞘に蓄積された同化産物(出穂前蓄積同化産物)の2つがある。そのうち、後者は「非構造性炭水化物(Non-Structural Carbohydrate; NSC)」と呼ばれ、登熟した子実中に貯蔵される炭水化物の約30%の供給源となり¹⁾、その供給が不足すると登熟歩合の悪化をもたらす場合があると指摘されている²⁾。以上のことから、稈および葉鞘におけるNSCのほとんどを占めるデンプンの出穂期までの蓄積に係わる仕組みを明らかにすること、および稈および葉鞘における出穂後のデンプン分解とそれに続く糖転流の仕組みを明らかにすることが、登熟に対するソース機能が増強された品種の開発における重要な課題である。そのうち、稈や葉鞘における出穂期までのデンプン合成に係わる生理・生化学的解析は比較的多く行われており、関与する酵素をコードするアイソジーンも解明されている³⁾。一方、稈や葉鞘における出穂後のデンプン分解と糖転流に関する研究報告は限られており、いまだに未解明な点が多く残されている。

本研究の研究代表者は、イネ葉鞘や稈における出穂後のデンプン分解に関与する遺伝子を同定し、その働きを明らかにするため、デンプンの加水分解酵素である α -アミラーゼならびに β -アミラーゼに着目して研究を進めてきた。その結果、イネゲノム上に存在する9つの β -アミラーゼアイソジーンのうち、少なくとも*OsBAM2*、*OsBAM3*、*OsBAM4*、*OsBAM5*および*OsBAM9*の5つはプラスチド局在型アイソフォームをコードしていることを明らかにしてきた⁴⁾(一部は未発表)。また、葉鞘において、出穂後のデンプン含量が減少する時期には*OsBAM2*と*OsBAM3*のmRNA量が大きく増加し、それぞれを過剰発現させた系統では、出穂期における稈や葉鞘のデンプン蓄積量が著しく低下すること⁵⁾、さらに、*OsBAM2*もしくは*OsBAM3*の発現抑制系統では、非形質転換体と比較して、出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の変化に明確な違いが認められない⁶⁾が、それら2つを同時に発現抑制させた系統では、出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の低下が抑制されることを明らかにしている(未発表)。一方、 β -アミラーゼに関しては、 β -アミラーゼをコードする10個のアイソジーンのうち、出穂期前後の葉鞘においては*RAmy2A*と*RAmy3C*の2つの発現レベルが高いことを明らかにし⁶⁾、さらに、出穂後の葉鞘においてデンプン含量が速やかに減少するインド型多収品種タカナリでは、そのときに*RAmy2A*のmRNA量が日本晴と比較して著しく増加することも示している⁶⁾。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえて、以下の項目を目的として本研究課題を実施した。

- (1) *OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* など葉鞘での発現レベルが高い β -アミラーゼアイソジーンの葉鞘や稈における機能をさらに詳細に解明する。
- (2) β -アミラーゼをコードする*RAmy2A*の出穂後の葉鞘における機能を、*RAmy2A*の発現レベルが高いタカナリを用いて解析する。
- (3) 穂のサイズや登熟特性が異なる多様なイネ品種を用いて、出穂後の稈や葉鞘におけるデンプン含量の減少速度の違いを明らかにし、その違いと関連のあるデンプン代謝関連遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *OsBAM2* および *OsBAM5* の二重発現抑制系統における表現型解析

RNAi法によってすでに作出済みである*OsBAM2*・*OsBAM5*発現抑制系統(*BAM2&5* KD #2-2と#2-17)、*OsBAM2*発現抑制系統(*BAM2* KD #6-2)、*OsBAM5*発現抑制系統(*OsBAM5* KD #3-3)および日本晴の非形質転換体(WT)をP1P対応閉鎖系温室で生育させ、出穂期、出穂10日後および出穂20日後に主稈の第3葉鞘および第3節間を採取し、-80℃で凍結保存した。採取した葉鞘と節間のデンプン含量を定量し、さらにそれらから調製した全RNAをもとに合成したcDNAを鋳型として、*OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の mRNA 量を定量 RT-PCR により解析した。さらに、出穂後45日目に各系統4個体からすべての穂を採取し、それらの収量構成要素を調査した。

(2) *OsBAM9* 発現抑制系統の作出とその表現型解析

イネにおけるRNAi誘導用バイナリーベクターであるpANDA vector⁷⁾に*OsBAM9* cDNA配列の一部を挿入し、RNAiを誘発するトリガー配列とし、pANDA-BAM9 vectorを構築した。

Agrobacterium tumefaciens EHA105 株に上記の構築したベクターを導入し、イネ（品種：日本晴）の種子胚盤から誘導したカルスにその *Agrobacterium* を感染させることで形質転換を行った。ハイグロマイシンを含む選択培地上に形質転換後のカルスを置き、耐性カルスから再分化を誘導して、ベクターが導入された T0 世代の形質転換体を得た。再分化個体から調製したゲノム DNA を鋳型として、選択マーカー遺伝子と RNAi トリガーのリンカー配列に特異的なプライマーを用いた PCR によりベクターの導入を確認した。

ベクターの導入が確認できた T0 世代の形質転換体を P1P 対応閉鎖系温室で育成し、T1 種子を収穫した。さらに、T1 種子を系統ごとにハイグロマイシンを含む MS 培地で生育させ、耐性個体を閉鎖系温室で育成して、出穂期に止葉の一つ下の第 2 葉身を採取した。採取した葉身から調製した全 RNA をもとに合成した cDNA を鋳型として、RT-PCR により *OsBAM9* の転写レベルを解析した。さらに、*OsBAM9* の発現レベルの低下が確認された T1 系統から T2 種子を採種した。

OsBAM9 発現抑制系統の T2 世代 (*OsBAM9* KD #1-2 および #2-5) ならびに日本晴の非形質転換体 (WT) を P1P 対応閉鎖系温室で生育させ、1 週間ごとに葉齢、草丈および茎数の変化を測定した。また、出穂期および出穂 15 日後に主稈の第 3 葉鞘および第 3 節間を採取し、それらのデンプン含量を定量した。さらに、それら試料から全 RNA を調製し、cDNA を合成して、*OsBAM9* の発現レベルを半定量 RT-PCR により解析した。出穂 45 日後には各系統 5 個体からすべての穂を採取し、収量構成要素を調査した。

(3) 多収イネ品種タカナリにおける *RAmy2A* の発現抑制が茎部デンプン蓄積と収量構成要素に及ぼす影響の解析

RNAi 法によってすでに作出済みであるタカナリを原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統 (*RAmy2A* KD #7-10 および #7-13) ならびにタカナリの非形質転換体 (WT) を P1P 対応閉鎖系温室で生育させ、出穂期、出穂 10 日後および 20 日後に主稈の第 3 葉鞘と第 3 節間を採取した。採取した葉鞘と節間のデンプン含量を定量し、さらにそれらから調製した全 RNA をもとに合成した cDNA を鋳型として、定量 RT-PCR により *RAmy2A* の発現レベルを解析した。また、出穂 45 日後に各系統 5 個体からすべての穂を採取し、収量構成要素を調査した。

(4) 穂のサイズと登熟特性が異なるイネ品種の葉鞘における出穂後のデンプン含量の変化とデンプン代謝関連酵素遺伝子の発現との関係

標準的な日本型品種の日本晴と一穂穎花数が多く、多収のインド型品種タカナリの苗を育成し、1/5000 a ワグネルポットに移植して、屋外で栽培した。止葉展開期、出穂期、出穂後 7、14、21 および 42 日後に主稈の第 3 葉鞘を採取し、さらにそれらを上部、中央部および基部に 3 等分して、それぞれの生体重を測定後に別々に液体窒素で凍結し、保存した。また、同時に主稈の穂を採取し、通風乾燥機において 80 °C で 5 日間乾燥させた後に、乾物重を測定した。採取した第 3 葉鞘各部位のデンプン、スクロースおよびヘキソース含量を定量し、さらに、止葉展開期から出穂 14 日後までの第 3 葉鞘基部から全 RNA を調製し、cDNA を合成して、デンプン代謝関連酵素遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) *OsBAM2* および *OsBAM5* の二重発現抑制系統における表現型解析

BAM2 KD #6-2 および *BAM5* KD #3-3 の第 3 葉鞘におけるデンプン含量は、出穂期から出穂 20 日後にかけて WT とほぼ同程度に推移した。また、第 3 節間では、*BAM5* KD #3-3 のデンプン含量が出穂 10 日後に WT よりも多くなる傾向があったものの、WT と *BAM2* KD #6-2、*BAM5* KD #3-3 のデンプン含量の変化には大きな違いはなかった。一方、*OsBAM2* と *OsBAM5* の 2 つの -アミラーゼアイソジーンを同時に発現抑制した 2 系統では、*BAM2&5* KD #2-2 の第 3 葉鞘および第 3 節間のデンプン含量が出穂 10 日後に他の系統よりも著しく増加し、*BAM2&5* KD #2-17 では、出穂 10 から 20 日後にかけて第 3 葉鞘と第 3 節間のデンプン含量が多く維持されていた。以上の結果から、*OsBAM2* と *OsBAM5* のそれぞれ単独の発現抑制は、少なくとも出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の変化には大きな影響を及ぼさないことが示された。しかし、*OsBAM2* と *OsBAM5* が同時に発現抑制されることで、葉鞘と節間のデンプン含量が過剰となる表現型を示すことから、*OsBAM2* と *OsBAM5* はともに出穂後の稈や葉鞘のデンプン分解に機能し、それぞれが補完的に作用している可能性が示唆された。

OsBAM2&5 KD #2-2 と #2-17 の収量構成要素を調査した結果、それら二重発現抑制系統の一穂穎花数と登熟歩合は、WT や *BAM2* KD #6-2、*BAM5* KD #3-3 と比較して、必ずしも低いわけではなかった。日本晴のような通常のシンクサイズの穂を有する品種では、葉鞘や節間のデンプン分解が遅延しても、収量構成要素には大きな影響がないのかもしれない。ただ、これら -アミラーゼアイソジーンが穎果胚乳でのデンプン蓄積に直接的に作用することで、一穂穎花数や登熟歩合に対して影響を及ぼすことも考えられることから、さらに詳細な解析が必要である。

(2) *OsBAM9* 発現抑制系統の作出とその表現型解析

OsBAM9 はプラスチド局在型 -アミラーゼアイソフォームをコードし、稈や葉鞘での発現量が比較的多いことがわかっている（未発表）。しかし、出穂後の稈や葉鞘でのデンプン分解において *OsBAM9* がどのような役割をもつのかはわかっていない。*OsBAM9* KD #1-2 および #2-5 におい

て、出穂期以降の第3葉鞘と第3節間のデンプン含量の減少が、WTよりも抑制される傾向が確認された。しかし、2つの系統間で、*OsBAM9*の発現抑制の程度にはあまり違いがないにもかかわらず、デンプン含量の変化には差があった。したがって、*OsBAM9*が出穂期以降の稈や葉鞘のデンプン分解において果たす役割については、さらなる解析が必要である。

(3) 多収イネ品種タカナリにおける*RAmy2A*の発現抑制が茎部デンプン蓄積と収量構成要素に及ぼす影響の解析

タカナリの非形質転換体では、出穂期から出穂10日後にかけて第3葉鞘と第3節間のデンプン含量が急激に減少した(図1)。それに対して、第3葉鞘および第3節間において*RAmy2A*の発現が著しく低下している*RAmy2A* KD #7-10および#7-13では、出穂10日後の第3葉鞘および第3節間のデンプン含量の低下が抑制され、その後、出穂10から20日後にかけてデンプン含量が大きく低下した。以上の結果から、*RAmy2A*はタカナリの葉鞘と節間における出穂後のデンプン分解に関与し、その発現抑制はデンプン含量の低下の遅延をもたらすことが明らかになった。

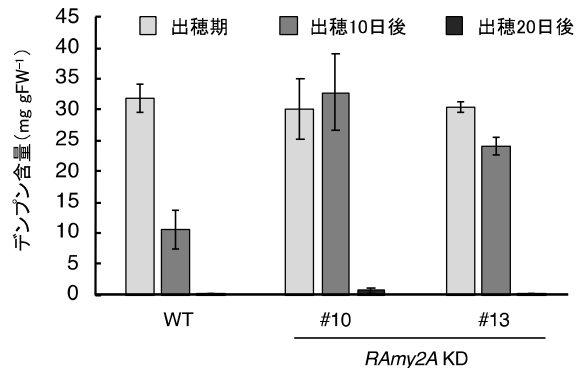


図1. 第3節間におけるデンプン含量の変化

RAmy2A KD #7-10および#7-13の収量構成

要素を調査した結果、非形質転換体と比べて、有意差はないものの一穂穎花数はわずかに多くなる傾向があった。しかし、それらの登熟歩合は非形質転換体よりも有意に低下した。出穂期までに稈や葉鞘に蓄積するNSCが不足すると、登熟歩合の低下を招くことが報告されている²⁾。以上のことから、*RAmy2A*の発現抑制による稈や葉鞘でのデンプン分解の遅延は、少なくとも多収品種タカナリにおける登熟歩合の低下をもたらすことが示唆される。

(4) 穂のサイズと登熟特性が異なるイネ品種の葉鞘における出穂後のデンプン含量の変化とデンプン代謝関連酵素遺伝子の発現との関係

出穂期の第3葉鞘におけるデンプン蓄積量は、日本晴とタカナリともに上部が少なく、基部が多い傾向があった。また、日本晴の基部では出穂期から出穂21日後にかけてデンプン含量が徐々に低下したのに対して、タカナリの基部のデンプン含量は止葉展開期から出穂7日後にかけて徐々に低下してから、出穂14日後にかけて急激に低下し、ほぼゼロとなった(図2)。また、日本晴の第3葉鞘基部のスクロース含量は出穂期以降大きな変化がなかったのに対して、タカナリのスクロース含量は出穂7から42日後にかけて低下した。よって、多収品種タカナリでは、出穂期までに葉鞘に蓄積したNSCを出穂後に効率的に分解・転流させており、そのような品種間の違いは葉鞘基部で最も顕著に認められることがわかった。

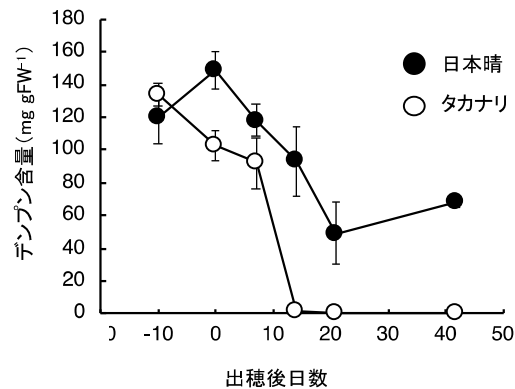


図2. 第3葉鞘基部におけるデンプン含量の変化

葉鞘基部においてデンプン合成と分解に関わる遺伝子の発現解析を行った。その結果、デンプン合成経路の律速酵素であるADP-グルコースピロホスホリラーゼをコードする遺伝子のうち、葉鞘において機能することが明らかにされている*OsAGPL1*^{3, 8)}の発現量は、日本晴とタカナリともに止葉展開期において最も多かったが、タカナリの発現量はその後急激に減少したのに対して、日本晴では出穂7日後まで発現量が比較的多かった。また、Sugimuraら⁶⁾がすでに報告しているように、タカナリでは*RAmy2A*の発現量が出穂期から出穂7日後にかけて急激に増加したのに対して、日本晴ではその増加程度は少なかった。さらに、タカナリでは、デンプン粒の1,4-グルカン鎖のリン酸化に関与する-グルカンリン酸化酵素をコードする*OsGWD1*⁹⁾の発現量が、止葉展開期と出穂期において日本晴よりも著しく多いことが明らかになった。シロイヌナズナでは、-グルカンリン酸化酵素によるグルカン鎖のリン酸化は、その後の-アミラーゼによるデンプン分解を促す効果があると報告されている¹⁰⁾。以上のことから、タカナリの葉鞘基部においてデンプン含量の減少が日本晴よりも急速に進むのは、*RAmy2A*の発現量が多いことに加えて、出穂期前から*OsGWD1*の発現が高く誘導され、その結果、-アミラーゼによるデンプン分解が効率的に作用することも原因の1つである可能性が示唆される。さらに、タカナリでは、出穂期以降にデンプン合成活性が急激に低下することもまた、出穂後の葉鞘における著しいデンプン含量の低下に貢献していると考えられる。

<引用文献>

- 1) Cock, J.H. and Yoshida, S. (1972) Accumulation of ¹⁴C-labelled carbohydrate before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. Jpn. J. Crop Sci. 41: 226-234.
- 2) 翁仁憲ら (1982) 水稻の子実生産に関する物質生産的研究. 第1報 出穂期前に貯蔵された炭水化物および出穂後の乾物生産が子実生産に及ぼす影響. 日作紀 51: 500-509.
- 3) Hirose, T. et al. (2006) Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. Physiol. Plant. 128: 425-435.
- 4) Hirano et al. (2011) Identification of two plastid-targeted α-amylases in rice. Plant Prod. Sci. 14: 318-324.
- 5) Hirano, T. et al. (2016) Two α-amylase genes, *OsBAM2* and *OsBAM3*, are involved in starch remobilization in rice leaf sheaths. Plant Prod. Sci. 19: 291-299.
- 6) Sugimura, Y. et al. (2015) Involvement of α-amylase genes in starch degradation in rice leaf sheath at the post-heading stage. Plant Prod. Sci. 18: 277-283.
- 7) Miki, D. and Shimamoto, K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. Plant Cell Physiol. 45: 490-495.
- 8) Okamura, M. et al. (2013) Starch reduction in rice stems due to a lack of *OsAGPL1* or *OsAPL3* decreases grain yield under low irradiance during ripening and modifies plant architecture. Func. Plant Biol. 40: 1137-1146.
- 9) Hirose, T. et al. (2013) Disruption of a rice gene for α-glucan water dikinase, *OsGWD1*, leads to hyperaccumulation of starch in leaves but exhibits limited effects on growth. Front. Plant Sci. 4: 147
- 10) Edner, C., et al. (2007) Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial α-amylases. Plant Physiol. 145: 17-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平野達也	4. 巻 4
2. 論文標題 イネ茎部における出穂後のデンプン分解制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 574-575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野達也、杉村優有、平野美奈子、道山弘康
2. 発表標題 - アミラーゼ遺伝子、RAmy2Aに関する高収量イネ品種タカナリの発現抑制系統における収量構成要素の解析
3. 学会等名 日本作物学会第249回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野達也・西脇利恵・杉村優有・平野美奈子・道山弘康
2. 発表標題 多収イネ品種タカナリにおける -アミラーゼ遺伝子、RAmy2Aの発現抑制系統の作出とその表現型解析
3. 学会等名 日本作物学会第246回講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------