

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19208002

研究課題名（和文） イネのアミロプラストエンジニアリングに関する基礎的研究

研究課題名（英文） Toward the amyloplast engineering in rice

研究代表者

佐藤 光 (SATO HIKARU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70128031

研究成果の概要（和文）：

MNU 処理は90%以上がGC→ATへの塩基置換変異であった。変異率は1kbp当たり6～9で、3,000系統程度の変異ライブラリーを確立できれば、イネゲノム中の全ての遺伝子の変異を網羅できる可能性が示された。新たな変異探索法を確立し、*PHO1*や*FLO2*など新たな遺伝子を単離・同定できた。これらの変異を用いたプロファイリング解析は、システムティックな遺伝子資源の開発と新奇コメ澱粉の論理的育種法の確立に極めて有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

More than 90% of mutations were GC to AT transition in the treatment of fertilized egg cells with MNU. The mutation frequency on the MNU treatment was 6 to 9 bases per 1kb, and thus if about three thousand mutant line is established, it will be expected that they cover at least four mutations for each of genes in rice genome, that is, they are the saturation mutant library. We established the effective screening methods using TILLING combined with the MNU mutant library and SDS-PAGE with modified extraction buffer, and some of key novel genes involving in starch biosynthesis and amyloplast engineering like as *PHO1* and *FLO2* were isolated and characterized by these methods. The profiling using the mutants induced by MNU treatment is effective to the systematic development of the novel genetic resources for starch and to the establishment of designed breeding method for novel starch properties in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：イネ、アミロプラスト、突然変異、OMICS、澱粉、澱粉生合成酵素、サチュレーション
 ミュータジェネシス、バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

澱粉は人類のエネルギー源として最も重要な物質である。一方、澱粉は今後肥満や糖尿病予防等の機能性食品素材として、性食品素材として、また、生分解性プラスチックと共に包接性などグルコースポリマーの有する特性から抗菌性フィルムや液晶フィルムなど澱粉ナノテクを利用した工業製品開発や脱石油化学素材への展開、さらには、燃料電池や環境保全型エネルギーなどバイオマスとして広く活用が期待されている。従って、植物の澱粉合成・蓄積過程をバイオテクノロジーによって制御・利用する技術は、将来最も有望な開拓研究分野と考えられる。それにもかかわらず、どの教科書にも澱粉の分子構造や合成代謝について正確で詳しい記述が見当たらない。このことは、澱粉合成システムに関する我々の知識がいかに不十分であるかを物語っている。しかし、最近世界各地で重要な基礎情報が集積され、バイオテクノロジーによる澱粉合成制御法の開発競争が始まっている。我国には植物の澱粉合成に関する遺伝学的・分子生物学的研究への取り組みが少なく、将来この分野で大きく遅れをとる恐れがある。

2. 研究の目的

本研究は、澱粉生合成・集積の場であるアミロプラストのOMICSエンジニアリングによるシステムティックな澱粉の改変と効率的集積を目的として、アミロプラスト機能に関わる遺伝子の網羅的基礎データを得ることである。

本研究では、イネの最も主要な利用成分である胚乳澱粉の細胞内生合成・集積系について、①アミロプラスト関連遺伝子のサチュレーションミュータジェネシス、②アミロプラスト機能に関わる遺伝子の検索とプロファイリング並びに変異遺伝子の単離・同定、③関連タンパク質の発現プロファイルと変異タンパク質の同定・単離、④変異体澱粉の理化学特性解析、⑤形質転換体を用いた遺伝子機能の解明と新規澱粉系統の作製を行う。これら一連の研究を統合し、遺伝子の発現及び機能に関する情報を解析するバイオインフォマティクスを用いて形質発現のための遺伝子制御システムに関する情報を整理化し、積極的に形質をデザインするシステムティックな遺伝子資源の開発と新奇コメ澱粉の論理的育種法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 澱粉生合成関連遺伝子のサチュレーション

ミュータジェネシス

・MNU受精卵処理による澱粉生合成関連遺伝子変異の作製;胚乳変異2,500系統の登熟種子のNative-PAGE及びSDS-PAGE分析により、酵素タンパク質レベルでの変異の検出を行った。さらに、日本型水稻品種「台中65号」(T65)及び「金南風」のMNU受精卵処理M2より、目視及びSDS-PAGE分析により変異の選抜を行うと共に、新たなM2の育成及びMNU処理を行った。さらに、TILLING(Targeting Induced Local Lesions IN Genome)法を用いて、MNU受精卵処理による変異率の推定と誘発変異の特性を解析した。

(2) 変異体を用いた澱粉生合成関連遺伝子の生物情報学的解析

遺伝子の発現プロファイルと変異遺伝子の単離・同定;マイクロアレイシステムを利用して変異体 cDNA のトランスクリプトオーム解析を行い、澱粉生合成に関わる遺伝子の検索と同定、遺伝子相互作用の解明、並びに変異体遺伝子の単離を行った。

(3) 関連タンパク質の特定と相互作用情報の収集

①アミロプラスト単離法の確立

澱粉生合成関連酵素の細胞内局在解析には、アミロプラストの単離法の確立が不可欠である。乳熟中期の登熟種子を用いた予備的な研究から、0.4Mショ糖密度勾配遠心法及び8Mソルビトールを用いた遠心分離法がintactなアミロプラスト単離に有効であることが示された。本結果を基にショ糖密度勾配遠心条件、特に不連続ショ糖密度勾配における最も効率的回収ができるショ糖及びソルビトールの重層条件について検討する。さらに、材料となる種子の登熟時期、保存法も、効率的回収に大きく影響することから、採種時期及び採種条件について検討した。

②アミロプラスト構成成分分画法の確立と澱粉生合成関連酵素の細胞内局在解析

アミロプラストは、大別してアミロプラスト膜画分、ストロマ画分及び澱粉画分の3画分に大別できる。それぞれの画分の回収に、細胞破碎法と遠心分離法を組み合わせ、各各文の回収に最適条件の検討を行い、効率的な手法の開発を行った。即ち、SDS-PAGE/I、IEF/SDS-PAGE、Native-PAGE/CBB 染色法、Native-PAGE=CBB/IEF など、各種の電気泳動法や高速液体クロマト法によりアミロプラスト局在タンパク質の分画・分離を行った。

(4) 変異体貯蔵炭水化物の物理化学的特性

遺伝子資源の開発には遺伝子によって影響を受ける最終的産物に関する情報の充実が不可欠である。そこで、単離した変異体胚乳澱粉の粘弾性や糊化特性等、理化学的特性

について評価を行った。アミロース量や澱粉及び糖含有率等の澱粉化学的特性については、分光光度計を用いて分光学的に解析した。アミロペクチン鎖長構造に関しては、キャピラリー電気泳動法並びに陰イオン交換クロマトグラフを用いて解析した。澱粉の熱糊化特性の測定には示差糊化熱量計(DSC)を、また、澱粉の粘弾性の測定にはラピッドビスコアライザー(RVA)を用いて行った。

(5) 形質転換体を用いた遺伝子機能の解明と新規澱粉系統の作製

元品種への戻し交配による同質遺伝子系統や変異体相互交配による2重変異系統の作製、多収型改良品種への交配を行った。一部の形質について、形質転換体の作製を進めた。

4. 研究成果

(1) 澱粉生合成関連遺伝子のサチュレーションミュータジェネシス

TILLING分析の結果、本MNU処理でも動物細胞や微生物と同じく90%以上がGCからAT型への塩基置換変異で、塩基転換変異は極めて稀であった。一方、遺伝子座当たりの変異率は10kbp当たり6~9で安定していた。さらに、変異部位はゲノム内(遺伝子間)及び遺伝子内にほぼ均質に分布し、大きな偏りは認められなかった。この結果から、本処理によって極めて高い確率で変異を得られること、3,000系統程度の変異ライブラリーを確立できれば、ほぼ全ての遺伝子に関する変異を網羅できる可能性が示された(Suzuki et al. 2008)。さらに、台中65号及び金南風のMNU受精卵処理後代のTILLING解析により、大よそ500M2集団を解析することにより全ての遺伝子について1個のナンセンス変異が得られることが示された(Satoh et al., 2010)。MNU受精卵処理により胚乳変異について2,000系統以上、形態形質について6,000以上の変異系統を作製・維持していることから、本変異プールは、イネゲノム中に含まれる全ての遺伝子について少なくとも10個以上の変異を含むことが予想されるサチュレーションミュータントライブラリーであることが示唆された(Satoh et al., 2011)。この結果に基づき水稻品種「金南風」及び「T65」のMNU受精卵処理を行い、外観形質に基づく変異体の作製と収集を進め、500系統以上の変異系統を新たに加えることが出来た。

さらに、MNU変異系統の登熟種子胚乳についてNative-PAGE/CBB染色、並びにGS緩衝液抽出及び残差画分のSDS-PAGE分析及び活性染色による変異の探索・同定を行い、登熟過程初期に発現する酵素類を特異的に制御する変異を

始め、未同定のアミラーゼに関する活性減少変異など、新たな変異を作出できた。

(2) 変異体を用いた澱粉生合成関連遺伝子の生物情報学的解析

SS3変異EM790及びPH01変異EM755及びEM640の変異遺伝子を同定し、EM640では第10exonの4716にC→T変異が生じ、Glnが終止コドンへ変化、一方、EM790及びEM755ではそれぞれ第1及び第5-intronのsplice siteのGがAへ変異し、フレームシフトによる終止コドンの誘導が生じたものと考えられた。さらに、単離したPH01変異の詳細な解析から、澱粉生合成の初発反応にPH01を含め2種以上の酵素が関与すること、PH01は低温での初発反応に重要な役割を果たすことを明らかにした(Satoh et al. 2008)。さらに、PUL変異を単離し、本酵素がISA1の補助的役割を果たし、澱粉の結晶構造形成に関与することを示した(Fujita et al. 2009)。上記のようにTILLING分析でMNU受精卵処理では95%がGC→AT塩基置換型変異であることを報告したが(Suzuki et al. 2008)、*shr1*を含む幾つかの澱粉変異の解析も同様な結果を示した。加えて、MNU処理ではナンセンス変異が他の化学変異原より多発するが、その原因の一つはイントロンとエクソンの切断部位の塩基置換によりフレームシフト変異が生じ、停止コドンが誘導されることに起因することが明らかとなった。

fla2 変異はイネ種子胚乳登熟後期に発現する遺伝子の発現調節に関わると推察された(She et al., 2010)。変異体を用いたマイクロアレイ解析により、関連する遺伝子の発現量の増加や減少、あるいは変動しないものなどが認められ、変異とマイクロアレイ解析を組み合わせることで、関与する遺伝子の整列化が可能であることが示された。新たに*shr3* 遺伝子を同定した。*shr3*変異は澱粉蓄積量をAGPase変異同様に野生型の20%以下に減少させ、かつ、澱粉粒の発育不良を生じさせた。ポジショナルクローニングによりSHR3遺伝子は、ADP-Glc.のアミロプラストへの取り込みに関するNDP-Glu. トランスポーターをコードすることが明らかとなった。

澱粉合成の主要な基質であるADP-Glc. の合成に関わるAGPaseLSをコードする遺伝子の変異である*shr1*変異について24の複対立変異を作製した。澱粉蓄積を強く抑制する7系統について変異部位を解析したところ全て1塩基置換変異で、3つはナンセンス変異、残りの4つはミスセンス変異であった。変異タンパク質の構造解析の結果、4つのミスセンス変異は全てATP代謝にかかわる部位の変異であった。このことから、ミスセンス変異は遺伝子機能

の解析に極めて有効な変異であることが示された。MNU はGC→AT型塩基置換を特異的に誘発し、ナンセンス変異に加えミスセンス変異を多発ことから、本変異ライブラリーは遺伝子機能の解析、即ち、ファンクショナルゲノミクス並びにOMICS解析に有効な情報を提供すつと期待される。

(3) 澱粉生合成関連酵素の細胞内局在解析

登熟種子を用いて、stepwiseに重層した15%~65%ショ糖濃度勾配超遠心分離による胚乳細胞の分画を行い、細胞質、アミロプラストストロマ及び澱粉画分に分離後、SDS-PAGE、IEF及びウエスタン分析を行った。本解析により、各画分特有のタンパク質と澱粉生合成関連酵素の局在を明らかにできた。イオン強度の異なる溶媒を用い、登熟種子の可溶性・不溶性両画分のSDS-PAGE分析を行い、両画分に特有のタンパク質を特定した。変異ライブラリーについて登熟種子各画分のタンパク質分析を行い、68kDSSIを含む多様な変異を選抜できた。

本結果に基づき、登熟に伴う澱粉生合成酵素の変動を活性染色分析によって解析し、各酵素アイソザム間で活性ピーク時期が異なること、同一酵素に異なるアイソフォームが存在し、かつ、活性のピークが両者で異なることを明らかにした。一方、登熟中に、極小、小及び完熟型大粒のサイズの異なる3種の澱粉顆粒の存在と、前二者は登熟初期に、完熟型は糊熟期以降に認められることを見出した。即ち、イネ澱粉粒には胚乳登熟の極初期(受精翌日)から乳熟後期に認められる極めてサイズの小さい極小澱粉粒と、受精後4日目から糊熟期初期までに認められる小型の澱粉粒、並びに糊熟期初期から黄熟期に認められる大型の完熟型澱粉粒のサイズの異なる3種の澱粉が存在することが明らかとなった。其々澱粉構造が異なることから、胚乳澱粉の形成は3つの異なるシステムが働くことが示唆された。この結果から、イネ種子胚乳澱粉の合成は3つの異なる相に分けられること、各々の時期特異的な酵素及びアイソフォームの活性化が3種の澱粉粒の形成と密接に結びついていることが強く示唆された。事実*flo2*変異は登熟後期の遺伝子発現に関与することが明らかにされ (She et al. 2010b)、胚乳澱粉合成システムの時期特異的遺伝子発現と沿いの制御機構の存在が示された。

さらに、登熟時期との関係を解析し、登熟過程で発現するタンパク質の発現様式が異なること、即ち同一酵素でも可溶性画分と澱粉画分では発現の時期や様式が異なることをPDKを含む多数の酵素で確認し、これらは異なる機能を有していることが強く示唆された。

このことから、遺伝子間の発現制御に加え、オルタナティブスプライシングなど翻訳後修飾を含む遺伝子内の時間的8空間的発現制御機構の存在が示唆された。

(4) 澱粉変異の特性解析

可溶性デンプン合成酵素 SS3 変異の胚乳澱粉はアミロース含有率が有意に増加し、アミロペクチンは DP36 以下の長鎖と DP9 以下の短鎖が顕著に減少し、難糊化性を示した (Fujita et al. 2007)。DSC 熱糊化/ピーク分離ソフトウエア解析から、野生型ウルチ澱粉は低温糊化 (LTG : 50-70°C 糊化)、高温糊化 (HTG : 60-95°C 糊化) 及び極高温糊化 (EHTG : 80-120°C 糊化) の 3 画分から構成され、モチ澱粉は EHTG がほぼ消失し、本画分はアミロースに起因すると考えられた。一方、DP≤12 以下のアミロペクチン (AP) 短鎖の形成に関わる BEIIb を欠く *ae* 澱粉では LTG が、DP37 以上の長鎖形成に関わる BEI を欠く *sbe1* 澱粉では HTG が著しく減少した。このことから、LTG は AP の外層を形成する A 鎖画分、HTG は内層の骨格を形成する B 鎖画分と考えられ、AP 構造の変更は澱粉の糊化特性に極めて大きな変化を与えることが示された (佐藤 2011)。

(5) 形質転換体を用いた遺伝子機能の解明と新規澱粉系統の作製

AGPase を高発現する組換え体植物を用いた解析から、澱粉合成の制約は ADP-Glc 合成の下流の調節系にあり、本酵素の高発現は炭素などの上流の基質濃度の上昇を招くことを示した (Nagai et al. 2009)。また、野生型 *FLO2* 遺伝子は耐暑性に関与すること明らか (She et al. 2010a) にし、*flo2* 変異の形質転換体の過剰発現型は耐暑性を増加させることを示唆した (She et al. 2010b)。

「金南風」及び「台中 65 号」への戻し交配を積極的に進め、800 以上の組み合わせについてホモ型 F2 種子を得た。さらに、モチ変異系統との交配によるアミロースフリーを含め澱粉生合成酵素遺伝子変異間の交配を行い、2000 組み合わせ以上について 2 重変異種子を得た。

なお、研究成果として 5 つの特許申請を行うとともに、超硬質米 EM10 (胚乳特異的澱粉枝作り酵素 IIb: Starch Branching Enzyme IIb (BEIIb) 欠損変異、アミロペクチン短鎖を著しく減少し、レジスタントスターチ含量が 30% と一般米の 6 倍以上増加し、難消化性で血糖値上昇抑制効果を有する (佐藤 2011)) とアミロモチ (EM10 とは異なる EIIb 欠損変異 EM16 にアミロースを欠くモチ変異 EM21 を交配して得た 2 重変異である。高い血糖値抑制効果に加え、顕著な脂肪蓄積抑制効果を有する (Kubo et al., 2010)) を品種登録した。

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 18 件)

- ① 佐藤 光 米概観品質・食味研究の最前線 ―米澱粉変異の作製と利用― 農業及び園芸、86, 257-269 (2011)
- ② Satoh H., H. Matsusaka and T. Kumamaru. Use of *N*-methyl-*N*-nitrosourea treatment of fertilized egg cells for saturation mutagenesis of rice. *Breeding Science* 60:475-485 (2010)
- ③ She et al., 他 19 名中 19 番目 A novel factor *FLOURY ENDOSPERM2* is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *The Plant Cell* 22:3280-3294 (2010b)
- ④ S. Takahashi 他 5 名中 3 番目, Development of coenzyme Q10-enriched rice using sugary and shrunken mutants. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 74(1) 182-184 (2010) 査読有
- ⑤ K. C. She 他 5 名中 5 番目, Reduced rice grain production under high temperature stress is tightly correlated with ATP shortage during seed development. *Plant Biotech.*, :67-73 (2010a) 査読有
- ⑥ A. Kubo, 他 6 名中 6 番目 Structure, physical and digestive properties of starch from wx ae double mutant rice. *J. Agr. Food Chem.*, 58: 4463-4469 (2010) 査読有
- ⑦ Nagai S.Y. 他 6 名中 4 番目, Control of starch synthesis in cereals: metabolite analysis of transgenic rice expressing an upregulated cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds. *Plant Cell Physiology*, 50: 635-643(2009) 査読有
- ⑧ Suzuki T. 他 7 名中 4 番目 MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomics* 279: 213-223(2008) 査読有
- ⑨ Satoh H. 他 14 名中 1 番目 Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *The Plant Cell*, 20: 1833-1849 (2008) 査読有
- ⑩ A. Kubo 他 5 名中 5 番目, The use of

micro-beam X-ray diffraction for the characterization of starch crystal structure in rice mutant kernels of *waxy*, *amylose extender*, and *sugary1*. *Journal of Cereal Science* 47:92-97(2007) 査読有

- ⑩ Naoko Fujita 他 12 名中 8 番目, Characterization of SSIIIa-deficient Mutants of Rice (*Oryza sativa L.*). The Function of SSIIIa and Pleiotropic Effects by SSIIIa Deficiency in the Rice Endosperm. *Plant Physiol.* 144(NO.4) 2009-2023 (2007) 査読有

[学会発表] (計 38 件)

- ① Satoh H. (2010) Saturation mutant library in rice developed by MNU treatment of the fertilized egg cells. Internatl. Symp. "Frontiers of New Approaches to Starch Metabolism Dynamics" Akita,
- ② 佐藤 光 澱粉を熟知するために ―澱粉科学の基礎―日本応用糖質科学会ワークショップ "糖質科学の基礎と製品化の実際" 2010年5月27・28日横浜市、キリン横浜ビバレッジ
- ③ H. Satoh Saturation mutagenesis by MNU treatment in rice. CSS Seminar, Washington State Univ. USA (21 Oct. 2009)
- ④ H. Satoh Revealing the functions of genes involved in starch biosynthesis in non-photosynthetic organ by using rice mutant lines Starch Round Table 2007, 4-6 Oct. 2007, San Antonio, Texas, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

名称: EM10
発明者: 佐藤 光 他 2 名
権利者: 同上
種類: 種苗登録
番号: 品種登録出願 25228
出願年月日: 2010/9/29
国内外の別: 国内

名称: アミロモチ
発明者: 佐藤 光 他 5 名
権利者: 同上
種類: 種苗登録
番号: 品種登録出願 25244
出願年月日: 2010/9/29

国内外の別：国内

名称：硬質発芽穀類加工食品およびその製造法

発明者：大坪研一他 5 名

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2009-115164

出願年月日：2009/05/12

国内外の別：国内

名称：コエンザイム Q10 強化糖脂質突然変異植物体およびその製造方法

発明者：高橋咲子他 4 名

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2008-307569

出願年月日：2008/12/02

国内外の別：国内

名称：難消化性の米穀および難消化性デンプン

発明者：北村進一他 5 名

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2008-106146

出願年月日：2008/04/15

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞報道；西日本新聞社(2009, 1 月)他 2 点、

雑誌；週間農林（イネの機能性澱粉素材の開

発と米粉利用 1～3）2010, 1-3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 光 (SATO HIKARU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：7 0 1 2 8 0 3 1

(2) 研究分担者

久原 哲 (KUHARA SATORU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：0 0 1 5 3 3 2 0

麻生 陽一 (ASO YOICHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：1 0 1 1 7 0 5 4

熊丸 敏博 (KUMAMARU TOSHIHIRO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：0 0 2 8 4 5 5 5

(3) 連携研究者 なし