

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580018

研究課題名（和文）出穂後のイネ葉鞘におけるデンプン代謝の制御と登熟との関係

研究課題名（英文）Relationship between regulation of starch metabolism in leaf sheaths at the post-heading stage and grain filling in rice

研究代表者

平野 達也（HIRANO TATSUYA）

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30319313

研究成果の概要（和文）：

イネは出穂期までに茎部である葉鞘などに多くのデンプンを蓄積し、それをコメの登熟に利用している。よって、出穂期以降の葉鞘におけるデンプン分解に関わる仕組みを解明することは、コメの収量を向上させるために必要な課題である。本研究では、デンプンを蓄積する細胞小器官であるプラスチドに局在するデンプン分解酵素として、OsBAM2 と OsBAM3 という 2 つの β -アミラーゼを同定した。また、それらをコードする遺伝子が出穂期以降の葉鞘のデンプン分解に重要な役割を担っている可能性が高いことを示した。

研究成果の概要（英文）：

Rice leaf sheaths accumulate transiently starch, which is degraded after the heading and utilized for the grain filling. Therefore, elucidation of the mechanism of starch remobilization at the post-heading stage in leaf sheaths is important for improving the rice grain yield. In this study, we identified two beta-amylases, OsBAM2 and OsBAM3, as plastid-targeted starch-metabolizing enzymes. In addition, our results raise the possibility that *OsBAM2* and *OsBAM3* genes may have an important role in the starch remobilization in leaf sheaths at the post-heading stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：イネ・デンプン・デンプン分解関連酵素・ β -アミラーゼ・葉鞘

1. 研究開始当初の背景

人口増加や用途拡大に伴う世界的なコメの需要増加を満たしていくためには、イネの収量性を向上させることが不可欠である。その目標を達成するためのアプローチの一つとして、穂のサイズを増大させ、一穂に着生

する粒数を多くすることが挙げられる。しかし、そのようなシンクサイズの増大に対して登熟を満たすための炭水化物量を充実させなければ、登熟歩合が低下し、結果的に多収品種のポテンシャルを十分に発揮させることができなくなってしまうことが考えられ

る。よって、超多収を目指したイネ品種を有効に活用していくためには、ソース機能の増強が不可欠である。

2. 研究の目的

イネ穎果の登熟のためのソースとしては、出穂後に葉身において新たに同化された炭水化物（出穂後同化産物）および出穂前までに茎葉部（稈および葉鞘）に蓄積された炭水化物（出穂前蓄積同化産物）の2つがある。このうち後者は登熟した穎果胚乳中に蓄積する炭水化物の約30%を占めると報告されており、その供給が不十分であると、登熟初期に必要な炭水化物が不足し、登熟歩合の悪化をもたらす場合がある。よって、出穂前蓄積同化産物である稈および葉鞘におけるデンプン蓄積量を増加させること、ならびに出穂後の稈および葉鞘におけるデンプン分解とそれに続く糖転流活性を増加させることが、登熟に必要なソース機能を増強するために必要な課題として考えられる。このうち、出穂期における稈や葉鞘でのデンプン蓄積に関わる生理・生化学的な研究は比較的多く行われてきたが、一方で、出穂期以降の稈や葉鞘におけるデンプン分解に関する研究はほとんど行われておらず、その仕組みはまったく不明である。

シロイヌナズナでは、葉緑体に蓄積したデンプンの分解において葉緑体局在型 β -アミラーゼが重要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで、本科研費課題では、出穂期以降のイネ葉鞘におけるデンプン分解制御機構を明らかにすることを目的として、イネにおいて機能が解明されていない葉緑体局在型 β -アミラーゼに着目して、その機能ならびに葉鞘におけるデンプン分解との関係について解析を進めた。また、 β -アミラーゼ以外のデンプン分解に関連していると予想される遺伝子のアノテーション情報をイネゲノムデータベースから得て、出穂期および登熟期のイネ葉鞘におけるそれらの転写レベルと炭水化物含量との関係を調査した。

3. 研究の方法

(1) イネ β -アミラーゼ遺伝子のアノテーション情報および系統樹解析

イネゲノムデータベース (Rice TOGO Browser; <http://agri-trait.dna.affrc.go.jp/>)

上において β -アミラーゼをコードすると予想される遺伝子を検索し、9つの遺伝子、*OsBAM1*~*OsBAM9*のアノテーション情報を得た。それらの推定アミノ酸配列のアライメントをもとにして、neighbor-joining methodによりPhylogenetic treeを作成した。

(2) イネ β -アミラーゼ遺伝子の発現解析
OsBAM1~*OsBAM9*の9つの遺伝子に対する特異的プライマーを用い、イネの各器官から抽出・調製した全RNAをもとに合成したcDNAを鋳型として半定量的RT-PCRを行った。また、屋外でポット栽培した日本型イネ品種の「日本晴」から、出穂期から登熟期にかけて主稈の第3葉鞘を採取し、全RNAを調製した。その全RNAからcDNAを合成し、それらを鋳型として定量RT-PCRを行った。

(3) イネ葉鞘における炭水化物含量の定量
イネ品種の「日本晴」を屋外でポット栽培し、出穂期から登熟期にかけて、主稈の第3葉鞘を採取した。採取した葉鞘を80%エタノール中で磨砕し、可溶性と不溶性画分に分けた後、可用性画分を用いて各種糖含量を、不溶性画分を用いてデンプン含量を定量した。

(4) *OsBAM2* および *OsBAM3* の大腸菌組換えタンパク質を用いた解析

葉緑体移行シグナルペプチドをN末端に有し、出穂期の葉鞘において転写レベルが高かった*OsBAM2*と*OsBAM3*に関して、それらが実際に β -アミラーゼとして機能しているかどうかを明らかにするため、*OsBAM2*と*OsBAM3*のN末端シグナルペプチドを除いたHis-tag融合組換えタンパク質を大腸菌においてそれぞれ発現させた。それら大腸菌から可溶性タンパク質画分を調製し、その画分に含まれる β -アミラーゼ活性をBetamyl-3 Kit (Megazyme 社製)により測定した。

(5) *OsBAM2* と *OsBAM3* の細胞内局在性
*OsBAM2*ならびに*OsBAM3*のC末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が融合したキメラタンパク質を発現させるベクターを構築した。そのベクターをパーティクルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入し、一過的に発現したGFP融合*OsBAM2*と*OsBAM3*を蛍光顕微鏡により観察した。なお、プラスチド局在の指標として、プラスチドに局在することが明らかに

されている AtRecA に DeRed2 を融合したキメラタンパク質, AtRecA-DeRed2 (Imaizumi-Anraku ら, Nature 433: 527-531 (2005)) を用いた。

(6) *OsBAM2* および *OsBAM3* の発現抑制 (ノックダウン) 系統の作出と解析

OsBAM2 と *OsBAM3* の機能解析を進めるため, RNAi 法によりそれぞれの発現レベルが抑制されたイネ系統を作出するためのベクター, pANDA-BAM2 と pANDA-BAM3 を構築した。なお, pANDA ベクター (Miki and Shimamoto, Plant Cell Physiol. 45:490-495 (2004)) は奈良先端科学技術大学院大学の島本教授から分譲していただいた。

構築した pANDA-BAM2 および pANDA-BAM3 をイネ品種のササニシキから誘導したカルスにアグロバクテリウム法により導入し, 得られたハイグロマイシン耐性カルスから再分化個体を得た。それら再分化個体を生育させ, 最終的に T2 世代の種子を得た。T2 世代の中で導入遺伝子がホモ接合体である系統を選抜し, それらを用いて遺伝子転写レベルの解析およびデンプン含量の定量を行った。

(7) β -アミラーゼ以外のデンプン分解関連酵素遺伝子における発現解析

α -アミラーゼをコードする *RAmy2A* および *RAmy3C* 遺伝子の第3葉鞘における転写レベルを, 出穂期から登熟期にかけて定量 RT-PCR により解析した。

また, イネゲノムデータベース上から α -グルカンリン酸化酵素ならびにマルトーストランスポーターをコードすると予想される遺伝子, *OsGWD1* および *OsMEX1* のアノテーション情報を得た。それらの特異的プライマーを用いて, 日本型イネ品種の「日本晴」およびインド型多収イネ品種の「タカナリ」の第3葉鞘における *OsGWD1* と *OsMEX1* の転写レベルを, 出穂期から登熟期にかけて定量 RT-PCR により解析した。

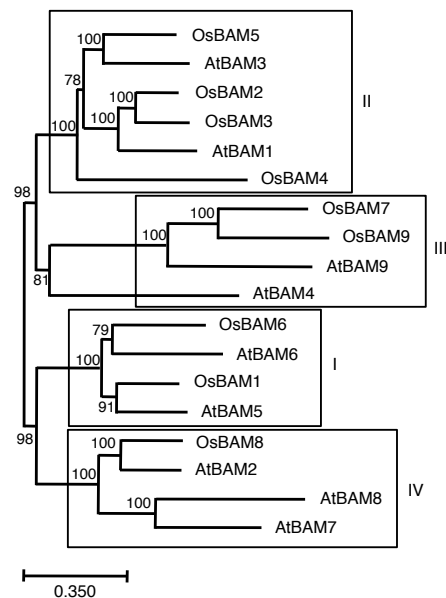
4. 研究成果

(1) イネ β -アミラーゼ遺伝子ファミリーの構成と各器官における発現の特徴

イネゲノムデータベース上を検索した結果, β -アミラーゼをコードすると予想される遺伝子として 10 個のアノテーション情報が得られた。しかし, そのうちの一つは, ORF

のサイズが明らかに他の遺伝子ならびに今まで植物で報告されている β -アミラーゼ遺伝子と異なった。よって, それ以外の 9 つの遺伝子を *OsBAM1*~*OsBAM9* と名付けた。

OsBAM1~*OsBAM9* の推定アミノ酸配列において, N 末端シグナルペプチドの有無を解析した結果, *OsBAM1* および *OsBAM7* を除く 7 つの β -アミラーゼアイソフォームの N 末端にプラスチド移行シグナルペプチドが存在すると推定された。また, 系統樹解析を行った結果, シロイヌナズナにおいて葉のデンプン分解に関与するプラスチド局在型 β -アミラーゼである AtBAM3 (Lao et al., Plant J. 20: 519-527 (1999)) と同じサブファミリーに *OsBAM2*, *OsBAM3*, *OsBAM4* および *OsBAM5* が属することがわかった (第1図)。

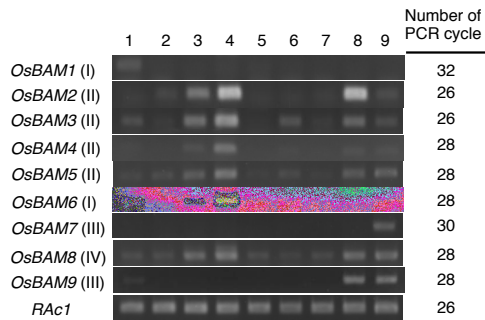


第1図. イネおよびシロイヌナズナにおける β -アミラーゼ遺伝子の全長推定アミノ酸配列に関する系統樹解析。

I~IVは, シロイヌナズナの β -アミラーゼアイソフォームにおいて分類されている4つのサブファミリー (Fulton et al. Plant Cell 20: 1040-1058 (2008)) を示す。

その翻訳産物がプラスチド移行シグナルペプチドをもたないと推定された *OsBAM1* は発芽種子において, *OsBAM7* は登熟中の穎果において特異的に発現していた (第2図)。一方, それ以外の β -アミラーゼ遺伝子の中で, サブファミリーIIに属する *OsBAM2*, *OsBAM3*, *OsBAM4* および *OsBAM5* は葉身, 葉鞘ならびに出穂後の節間などにおいて発現していることがわかった。特に, *OsBAM2* と *OsBAM3* はそ

これらの器官における発現レベルが高かった。以上の結果から、本研究では、*OsBAM2* と *OsBAM3* を中心に、葉鞘におけるデンプン分解における機能解析を進めることとした。



第2図. 各器官におけるβ-アミラーゼ遺伝子の発現解析。

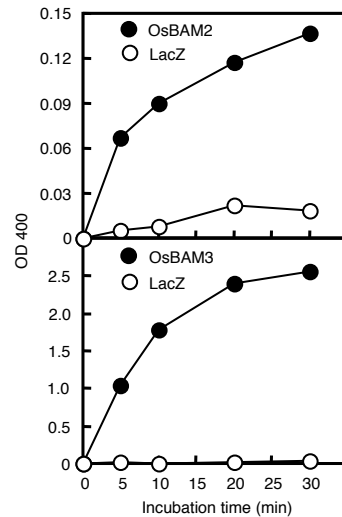
(1) 発芽種子, (2) 根, (3) 葉鞘, (4) 葉身, (5) 伸長葉, (6) 幼穂, (7) 伸長中節間, (8) 出穂後節間, (9) 登熟中穎果

(2) *OsBAM2* と *OsBAM3* の大腸菌組換えタンパク質におけるβ-アミラーゼ活性の解析

OsBAM2 と *OsBAM3* 遺伝子がコードするタンパク質が実際にβ-アミラーゼとして機能するかどうかは不明である。そこで、それらのN末端シグナルペプチドを除いたHis-tag融合組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、その大腸菌から可溶性画分を調製し、β-アミラーゼ活性を測定した。*OsBAM2* および *OsBAM3* 組換えタンパク質はともにβ-アミラーゼ活性を有することが明らかになり(第3図)、*OsBAM2* と *OsBAM3* はイネにおいてβ-アミラーゼとして機能していることが示された。

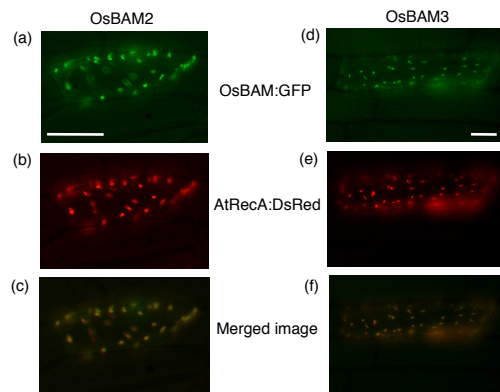
(3) *OsBAM2* と *OsBAM3* の細胞内局在性

β-アミラーゼ活性を有することが明らかになった *OsBAM2* と *OsBAM3* の細胞内局在性を明らかにするため、*OsBAM2* と *OsBAM3* のC末端にGFPを融合したキメラタンパク質をタマネギ表皮細胞に導入した。一過性発現したキメラタンパク質を蛍光顕微鏡で観察した結果、*OsBAM2*:GFP および *OsBAM3*:GFP はプラスチドで発現していた(第4図)。よって、*OsBAM2* と *OsBAM3* はともにプラスチドに局在するタンパク質であることが明らかになった。以上の結果は、*OsBAM2* と *OsBAM3* がプラスチドに一時的に蓄積されたデンプンの分解に関与している可能性が高いことを示している。



第3図. *OsBAM2* および *OsBAM3* の His-tag 融合タンパク質を発現している大腸菌から調製した可溶性画分におけるβ-アミラーゼ活性の測定。

活性測定はBetamyl-3 Kit (Megazyme 社製)を用いて行った。コントロールとして、LacZを発現している大腸菌から調製した可溶性画分を用いた。



第4図. *OsBAM2* と *OsBAM3* の細胞内局在性の解析。

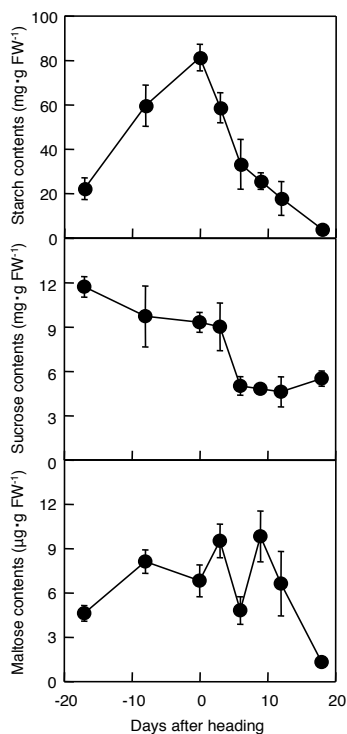
OsBAM2 と *OsBAM3* のC末端にGFPを融合したキメラタンパク質を発現するベクターをタマネギ表皮細胞にパーティクルガンにより導入し、その一過性発現を蛍光顕微鏡で観察した。プラスチドに局在することが示されているAtRecA (Imaizumi-Anraku et al. Nature 433: 527-531 (2005)) をコントロールとして用いた。

(4) イネ葉鞘におけるデンプン含量とβ-アミラーゼ遺伝子の転写レベルの経時変化

イネ品種「日本晴」の第3葉鞘におけるデンプン含量は、出穂期に最大に達したのちに出穂6日後にかけて急激に減少した(第5図)。このときの *OsBAM2* の転写レベルは、出穂期から出穂3日後にかけてわずかに増加した後、出穂6日後にかけて減少したが、再び出穂9日後にかけて急激に増加した(第6図)。一方、*OsBAM3* の転写レベルは出穂前の

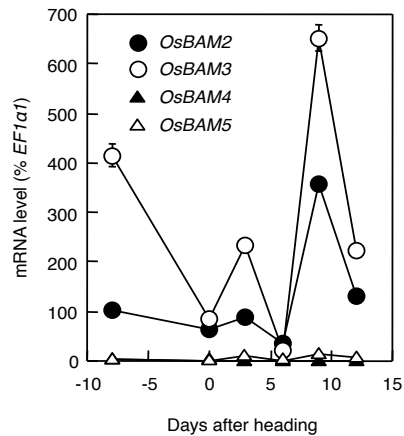
止葉展開期において高く、その後出穂期にかけて減少したが、出穂3日後に再び増加した。さらに、その後出穂6日後にかけて減少したが、再度出穂9日後にかけて急激に増加した。*OsBAM2* と *OsBAM3* と同じサブファミリーに属する *OsBAM4* と *OsBAM5* の転写レベルは、*OsBAM2* と *OsBAM3* の二つと比べて著しく低かった。以上の結果から、出穂期から登熟期にかけての葉鞘では、*OsBAM2* と *OsBAM3* の転写レベルの変動は激しいが、それら2つが少なくとも主要なβ-アミラーゼ遺伝子であることがわかった。

さらに、第3葉鞘における *OsBAM2* および *OsBAM3* の転写レベルが増加した出穂3および9日後にはマルトース含量もまた増加した。以上のことから、出穂後の葉鞘における急激なデンプン含量の低下には、*OsBAM2* と *OsBAM3* によるデンプン分解が大きな役割を果たしている可能性が示唆される。



第5図. 第3葉鞘におけるデンプン、スクロースおよびマルトース含量の変化

ポット栽培した日本晴の主稈止葉を第1葉としたときの第3葉の葉鞘を採取し、デンプン、スクロースおよびマルトース含量を定量した。



第6図. 第3葉鞘におけるβ-アミラーゼ遺伝子の転写レベルの変化

OsBAM2, *OsBAM3*, *OsBAM4* および *OsBAM5* の特異的プライマーを用いて、リアルタイム RT-PCR により転写レベルを解析した。絶対定量を行うための検量線作成用スタンダードとしてそれぞれの遺伝子の ORF が含まれるベクターを用い、データは *OsEF1α1* 遺伝子に対する相対値で示した。

(5) *OsBAM2* および *OsBAM3* 遺伝子のノックダウン系統の作出と解析

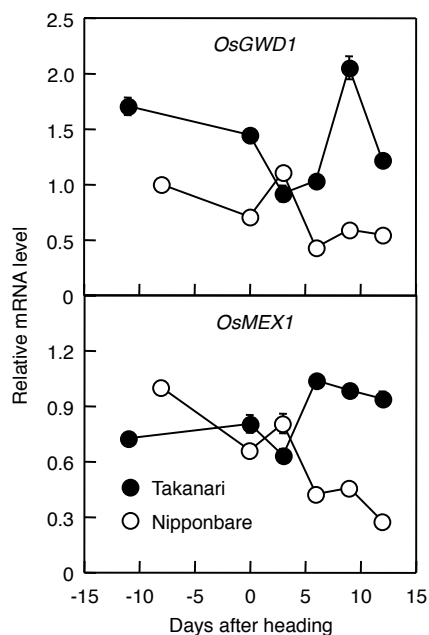
OsBAM2 と *OsBAM3* の発現レベルが抑制された形質転換イネの作出を進め、T2 世代において、野生型イネと比較して実際に発現レベルが抑制された系統がそれぞれ2および1系統得られた。それらの系統を生育させ、出穂期ならびに出穂20日後の第3葉鞘におけるデンプン含量を解析した。その結果、*OsBAM2* および *OsBAM3* ノックダウン系統ともに、野生型よりもデンプン含量の低下が抑制されていなかった。よって、現在は *OsBAM2* および *OsBAM3* ノックダウン系統におけるデンプン含量の変化をより詳細に解析すること、*OsBAM2* と *OsBAM3* の2つが同時にノックダウンされた系統を作出して、その表現型を解析することを進めている。

(6) β-アミラーゼ以外のデンプン分解関連酵素遺伝子の発現解析

α-アミラーゼをコードする遺伝子のうち、葉鞘において発現が認められる *RAmy2A* および *RAmy3C* について、出穂期から登熟期にかけての第3葉鞘において転写レベルを解析した。*RAmy2A* 遺伝子の転写レベルは出穂期から出穂3日後にかけていったん減少したが、その後出穂12日後にかけて徐々に増加した。*RAmy2A* 遺伝子は出穂後の節間においても転写レベルが高いことから、出穂後の茎葉部におけるデンプン分解に *RAmy2A* 遺伝子もまた

重要な役割に担っているのかもしれない。

インド型の超多収イネ品種である「タカナリ」は出穂期以降の葉鞘においてデンプン分解が非常に速やかに生じることがわかっている。そこで、「タカナリ」と通常の日本型品種である「日本晴」において、出穂期以降のデンプン含量の変化とデンプン分解関連酵素遺伝子の発現との関係を調査した。その結果、タカナリでは *OsBAM3* と *RAmy2A* 遺伝子の発現レベルが日本晴よりも高いことが示された。また、 α -グルカンリン酸化酵素ならびにマルトーストランスポーターをコードすると予想される遺伝子、*OsGWD1* および *OsMEX1* についても、出穂期以降に特にタカナリの発現レベルが日本晴よりも高いことがわかった(第7図)。タカナリの非常に速やかなデンプン分解は、これら酵素の働きが強いことからもたらされているのかもしれない。



第7図. 日本晴とタカナリの第3葉鞘における *OsGWD1* と *OsMEX1* 遺伝子の発現解析
 α -グルカンリン酸化酵素 (*OsGWD1*) とマルトーストランスポーター (*OsMEX1*) をコードすると予想される遺伝子の転写レベルを、出穂期前後の第3葉鞘においてリアルタイム RT-PCR により解析した。

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2件)

① Hirano, T., Takahashi, Y., Fukayama, H. and Michiyama, H. (2011) Identification of two plastid-targeted β -amylases in rice. *Plant Prod. Sci.* 14: 318-342, 査読有り

② 平野達也・太田千尋 (2011) 超多収イネ品種の葉鞘におけるデンプン代謝関連酵素遺伝子の発現解析, 名城大学総合研究所紀要 16: 105-108, 査読無し

[学会発表] (計2件)

① 平野達也・尾子正宏・原昂史・道山弘康 (2010) 多収性イネ品種の葉鞘における出穂後のデンプンおよびショ糖代謝関連酵素遺伝子の発現解析, 日本作物学会第230回講演会, 2010年9月5日, 札幌.

② 高橋悠介・道山弘康・平野達也 (2009) 登熟期間中の葉鞘における β -アミラーゼ遺伝子の発現解析, 日本作物学会第228回講演会, 2009年9月30日, 静岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 達也 (HIRANO TATSUYA)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号: 30319313

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

寺内 良平 (TERAUCHI RYOHEI)
(財) 岩手生物工学研究センター・
生命科学部・研究部長
研究者番号: 50236981