

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02174

研究課題名(和文) イネ子実の登熟に対するソース機能増強を目指した茎部蓄積デンプンの分解機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of starch degradation in the stems for an enhancement of source function to rice grain filling.

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) 8,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネ子実の登熟に必要な炭水化物の一部は、茎部に蓄積したデンプンなどの非構造的炭水化物からもたらされる。本研究では、出穂後の茎部デンプン分解に関与すると示唆される3つの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の解析を進め、それらの発現における組織特異性および糖や植物ホルモンに対する応答性の違いを明らかにした。また、OsBAM2とOsBAM5の二重発現抑制システムでは出穂後の茎部デンプン分解が大きく低下することを見出した。インド型品種IR64由来の第6染色体上に存在する茎部デンプン分解性を正に制御する遺伝子の単離に向けて遺伝子連鎖解析を進め、その候補領域が第6染色体上の3.93 Mbの間にあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コメの需要は世界的に増加傾向であることからその収量性を向上させることは重要な課題である。穂のサイズが大きく、一穂穎花数が多いといったシンクサイズの増大は収量性向上には必要であるが、そのシンクを十分に満たすための同化産物の供給に関わるソース機能の充実に求められている。そこで本研究ではイネにおけるソース機能の向上に関わる知見を得るために研究を進め、出穂期までのイネ茎部に蓄積したデンプン分解に関与する $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の機能の違いを明らかにした。また、インディカ品種由来の高いデンプン分解性を制御する遺伝子の単離に近づく成果も得られた。

研究成果の概要(英文)：Carbon sources for rice grain filling depend in part on non-structural carbohydrates (NSCs) stored temporarily in stems (leaf sheaths and culms). Three  $\alpha$ -amylase genes, OsBAM2, OsBAM3 and OsBAM5, have been suggested to participate in the starch degradation in stems during the post-heading stage. In the present study, we characterized the tissue specificity and the response to sugar and plant hormones in the genes expression of OsBAM2, OsBAM3 and OsBAM5. The double-knockdown of OsBAM2 and OsBAM5 expression resulted in the repression of starch remobilization in stems during the post-heading stage. In addition, we performed the genetic linkage analysis to identify a gene, which positively regulate the starch remobilization in stems, on the sixth chromosome derived from indica rice cultivar IR64. As the result, the candidate gene are suggested to exist among 3.93 Mb region on the sixth chromosome.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 茎部 デンプン分解  $\alpha$ -アミラーゼ  $\alpha$ -アミラーゼ 染色体断片置換系統群 遺伝子連鎖解析

## 1. 研究開始当初の背景

アジアにおいて主食用穀物として利用されてきたコメの需要は世界的に増加傾向にある。また、日本では、低価格で安定した供給が求められる飼料用や中食・外食向けのコメの需要が増加している。以上のようなコメの需要増に対応するためには、イネの収量性向上が不可欠である。その目標を達成するために、シンクである穂のサイズ、すなわち一穂穎花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、一穂穎花数の増加やコメ粒形の拡大に關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ては多くの成果が得られている。一方、増大したシンクの要求を満たすには、通常の品種以上に多くの同化産物がシンクである子実へと供給されなければならない。よって、一穂穎花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不可欠である。

イネ子実の登熟に対するソースには、出穂後の葉身において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(以下、「茎部」)に蓄積されていた同化産物(出穂前蓄積同化産物)の2つがある。そのうち後者は「非構造的炭水化物(Non-Structural Carbohydrate; NSC)」と呼ばれ、その多くはデンプンであり、そのデンプンが出穂後に分解され、ショ糖の形で穂に転流されることで、子実中に貯蔵される炭水化物の10~30%が供給されると考えられている<sup>1)</sup>。また、その供給が不足すると登熟歩合が悪化することが報告されている<sup>2)</sup>。したがって、茎部における出穂期までのデンプン蓄積に關わる制御機構、および出穂後のデンプン分解とそれに続く糖転流の過程を明らかにすることは、イネ子実の登熟に対するソース機能の増強という課題を解決するために必要な課題である。それらの課題の中で、茎部における出穂期までのデンプン合成に關わる生理・生化学的な解析は比較的多く行われており、關与する酵素をコードするアイソジーンもほぼ解明されている<sup>3)</sup>。一方、茎部における出穂後のデンプン分解と糖転流に關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、イネにおける収量性向上を達成する上でこの課題のひとつとなっている。

## 2. 研究の目的

本科研費課題の研究代表者らは、イネ茎部における出穂後のデンプン分解過程に關与する遺伝子を明らかにするため、デンプンの加水分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼと $\beta$ -アミラーゼに着目して研究を進めてきた。その結果、出穂後の茎部におけるデンプン分解には、イネゲノム上に存在する9つの $\beta$ -アミラーゼ遺伝子のうち、プラスチド局在型アイソフォームをコードする*OsBAM2*および*OsBAM3*の少なくとも2つの遺伝子が關与することを明らかにした<sup>4, 5)</sup>。また、同じくプラスチド局在型アイソフォームをコードする*OsBAM5*<sup>6)</sup>もまた出穂後の葉鞘において発現が高いことも見出している(未発表)。さらに、飼料用として用いられるインド型超多収品種タカナリでは、出穂後の葉鞘において急激なデンプン分解が生じるが、その時期に $\beta$ -アミラーゼをコードする遺伝子のひとつである*RAmy2A*の発現が急激に増加する<sup>7)</sup>。そこで、タカナリを原品種とした*RAmy2A*発現抑制系統を作出し、その表現型を解析した結果、出穂後の茎部におけるデンプン分解が遅延し、登熟歩合が低下することが示された(日本作物学会第246回・249回講演会にて発表済み)。

インド型イネ品種は出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の減少が日本型イネ品種よりも速やかに生じる。この原因遺伝子を同定するために、日本型品種の日本晴における染色体領域の一部がインド型品種のカサラスに置換されている染色体断片置換系統群(CSSLs)を用いた解析を進め、第6染色体上に存在すると予想される出穂後の葉鞘のデンプン含量低下を促進させるインド型品種由来の遺伝子が存在することが示唆された<sup>8)</sup>。

以上のような成果を踏まえて、本科研費課題では以下のことを目的として研究を進めた。

(1) *OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の葉鞘でのデンプン分解における機能の違いを明らかにするため、これら遺伝子の発現に關する組織レベルの特異性および糖や植物ホルモンに対する応答性の違いを解析した。また、各遺伝子プロモーターとGUSレポーター遺伝子の発現コンストラクトを導入した形質転換イネを用いて、*OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の発現における組織特異性を解析した。さらに、*OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* に關する二重発現抑制系統や三重発現抑制系統の作出を進め、それらの表現型を比較した。以上から、3つの $\beta$ -アミラーゼアイソジーンのデンプン分解における機能分担の解明を目指した。

(2) 日本型標準品種の日本晴の葉鞘では、*RAmy2A*の発現レベルが多収品種のタカナリほど高くないことから、*RAmy2A*はデンプン分解に大きな役割を担っていない可能性がある。そこで、日本晴を原品種とした*RAmy2A*発現抑制系統を作出し、その表現型解析を進めた。また、タカナリを原品種とした*RAmy2A*発現抑制系統において明らかにしてきた表現型が、出穂後の葉身における光合成能力の低下が一因となっている可能性を調査した。

(3) 第6染色体上に存在すると予想される出穂後の葉鞘におけるデンプン分解に關わるインド型品種由来の原因遺伝子を同定するため、インド型品種のIR64と日本型品種のコシヒカリの

間で作出された CSSLs から、解析に用いる系統の育成を進めた。さらに、それら系統を用いて遺伝子型と表現型の連鎖解析を行い、マップベースクローニングによる原因遺伝子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

- (1) 第 5 葉期まで生育した日本型イネ品種日本晴を糖飢餓状態とするために暗所に 48 時間置き、その後、第 4 葉身を切除して、2 cm の長さの葉切片を作成した。作成した葉切片を 175 mM スクロース、グルコースもしくはマンニトールを含む溶液、あるいは蒸留水に浮かべて、暗所で 12 時間培養した後、葉切片を採取した。採取した葉切片から全 RNA を抽出し、cDNA を合成して、それを鋳型として *OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の発現を定量 RT-PCR により解析した。また、同様の葉切片を 175 mM スクロースもしくは蒸留水に浮かべ、さらに 10  $\mu$ M のジベレリンもしくはブラシノステロイドを添加して、暗所で 12 時間培養後、同様に *OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の発現を定量 RT-PCR により解析した。
- (2) *OsBAM2*、*OsBAM3* もしくは *OsBAM5* のプロモーター領域約 3000 bp の下流に *GUS* レポーター遺伝子をつなげた発現コンストラクトを導入したイネを育成し、様々な生育段階で器官別に *GUS* 染色を行い、各遺伝子の発現における器官・組織特異性を解析した。
- (3) *OsBAM3* と *OsBAM5* の 2 つの遺伝子が同時に発現抑制された系統を育成するために、RNAi 誘導用のベクターを構築し、アグロバクテリウム法により日本型イネ品種の日本晴の種子胚から誘導したカルスに導入した。そこからベクターが導入されたカルスを選抜し、植物体を再生させ、形質転換個体を育成し、さらに、その自殖第 1 世代 (T1 世代) において *OsBAM3* と *OsBAM5* の発現が抑制された系統を選抜した。
- (4) すでに作出済みの *OsBAM2*・*OsBAM5* 二重発現抑制系統ならびに *OsBAM2*・*OsBAM3*・*OsBAM5* の三重発現抑制系統を栽培し、出穂期から登熟期にかけて主稈の第 3 葉鞘および第 3 節間を採取して、デンプン含量の変化を野生型日本晴と比較した。また、成熟期に穂を採取し、収量構成要素を調査した。
- (5) 日本晴を原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統を栽培し、出穂期から登熟期にかけて主稈の第 3 葉鞘および第 3 節間を採取して、デンプン含量の変化を野生型日本晴と比較した。また、成熟期に穂を採取し、収量構成要素を調査した。
- (6) タカナリを原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統を栽培し、止葉展開期から出穂 20 日後にかけて主稈止葉葉身の光合成速度を光合成速度高速測定装置 (MIC-100、マサイターナショナル) により測定した。また、測定後の止葉葉身を採取し、そのデンプン含量を定量した。
- (7) コシヒカリと IR64 の間で作出されたコシヒカリを遺伝的背景にもつ CSSLs の中で、第 6 染色体の一部が IR64 由来の染色体に置換されている SL2020 および SL2021 は、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解性が高い。そこで、SL2021 とコシヒカリを交配して得た F<sub>1</sub> 種子を播種して育成し、その F<sub>2</sub> 種子を獲得すると同時に、連鎖解析を行うための DNA マーカーを整備した。その翌年には、獲得した F<sub>2</sub> 世代 120 系統を附属農場水田に展開し、それらの表現型と遺伝子型を解析した。さらに、F<sub>2</sub> 雑種集団において、染色体が置換されている候補領域内において組換えが生じ、それがホモ型に固定された組換え自殖系統群 (RILs) を選抜し、葉鞘のヨウ素染色および酵素法でのデンプン定量によりデンプン分解性を解析した。また、これら RILs における収量構成要素や子実形、玄米品質についても調査した。

### 4. 研究成果

- (1) 葉切片における *OsBAM2* および *OsBAM5* の発現はスクロースもしくはグルコースの添加により抑制され、糖飢餓状態において誘導された (図 1)。それに対して、*OsBAM3* の発現量はスクロースもしくはグルコースの添加により増加した。以上のことから、*OsBAM2* および *OsBAM5* と *OsBAM3* では糖に対する応答性がまったく逆であることが明らかになった。

糖飢餓状態の葉切片に対してジベレリンもしくはブラシノステロイドを添加し、各  $\beta$ -アミラーゼ遺伝子の発現量を解析した。その結果、両植物ホルモンの添加により、*OsBAM2* の発現量は増加したのに対して、*OsBAM5* の発現量は逆に低下した。また、*OsBAM3* の発現はブラシノステロイドの添加により誘導された。

以上の結果から、いずれもプラスチド局在型で出穂後の葉鞘や節間において発現レベルが高い 3 つの  $\beta$ -アミラーゼ遺伝子、*OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* は、糖や植物ホルモンに対して全く異なる発現制御の仕組みを有していることが示唆された。

- (2) *GUS* 染色の結果、*OsBAM2* は出穂期以降の葉鞘における葉肉細胞に加えて、冠根における側根発生部位や稈

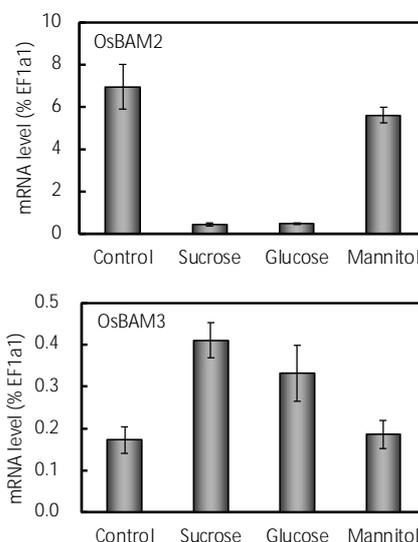


図 1. *OsBAM2* と *OsBAM3* の発現に及ぼす糖処理の影響

の節における発根帯で発現が確認された。一方、*OsBAM3* は根端や葉鞘の葉沈部など重力を感知する部位、ならびに発芽種子の胚盤や葉鞘における維管束鞘細胞周辺で強く発現していた。以上のことから、*OsBAM2* は根の発生過程において何らかの機能を有している可能性が示唆された。また、*OsBAM3* は糖輸送に関わる組織や重力感知において何らかの役割を担っていることが考えられた。

(3) *OsBAM3* と *OsBAM5* の 2 つの  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が同時に発現抑制された系統を作出するために、アグロバクテリウム法により RNAi を誘導するベクターをイネ品種日本晴の種子胚から誘導したカルスに導入した。カルスを選抜培地に移し、さらに再分化培地においてイネ植物体を再生させた後、PCR により導入したベクターの存在を確認した。ベクターの導入が確認できた耐性カルス由来の再生個体を鉢上げし、最終的に独立した 31 の T1 系統を得ることができた。続いて、T1 種子 10 系統を播種して、植物体を生育させ、実際に *OsBAM3* と *OsBAM5* の発現が抑制された数系統を得ることができた。

(4) *OsBAM2* および *OsBAM5* の二重発現抑制系統では、出穂期以降の葉鞘および節間におけるデンプン含量の減少が抑制され、一時的にデンプンが過剰に蓄積する表現型を示した(図2)。一方、*OsBAM2* もしくは *OsBAM5* 単独の発現抑制系統は、野生型の非組換え個体とほぼ同様のデンプン含量の変化を示した。以上のことから、*OsBAM2* と *OsBAM5* はそれぞれ出穂後の葉鞘のデンプン分解において機能しており、その 2 つの機能を低下させることでデンプン分解が大きく抑制されることが示唆された。また、これら系統の収量構成要素を調査したところ、*OsBAM2* と *OsBAM5* 二重発現抑制系統の一穂穎花数、登熟歩合および一粒重のいずれも野生型の非組換え個体との間に有意差はなかった。よって、茎部におけるデンプン分解の抑制により、茎部から穂への糖転流が抑制されていると考えられるものの、それは収量に関わる形質を低下させるほどの影響はなかったことが示された。

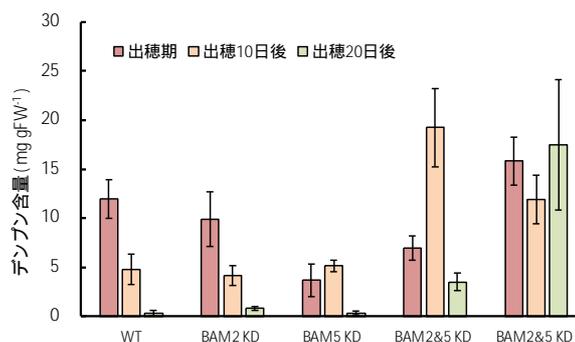


図2. *OsBAM2*・*OsBAM5* 二重発現抑制系統の第3葉鞘における出穂期以降のデンプン含量の変化

*OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* 三重発現抑制系統では、出穂期以降の第3葉鞘のデンプン含量の変化において野生型非組換え個体と大きな違いがなかった。一方、野生型非組換え個体と比較して、三重発現抑制系統の一穂穎花数は少ない傾向があり、さらに第1節間長と第2節間長が有意に短く、登熟初期の穂の乾物重も有意に軽かった。よって、3つの  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現抑制により出穂期以降の茎部デンプン分解に大きな影響は生じないが、穎花の発達や節間伸長といった出穂前から出穂期にかけて決定される形質に  $\alpha$ -アミラーゼによるデンプン分解が直接あるいは間接的に関与しているのかもしれない。この点は今後さらに検証する必要がある。

(5) インド型多収品種のタカナリでは、標準的な日本型品種の日本晴と比較して、出穂期以降の葉鞘において *RAmy2A* の発現が著しく上昇する<sup>7)</sup>。また、タカナリにおける *RAmy2A* の発現抑制では、茎部のデンプン分解が抑制され、一時的にデンプンが葉鞘や節間に蓄積する表現型を示し、その結果、登熟歩合が大きく低下することを研究代表者らは明らかにしている(日本作物学会第246回・249回講演会にて発表済み)。そこで、日本晴での *RAmy2A* の発現抑制が、茎部デンプン分解に及ぼす影響を解析した結果、*RAmy2A* 発現抑制における葉鞘および節間のデンプン含量は、出穂10から20日後にかけて野生型非組換え個体よりも減少しないことがわかった。よって、タカナリほどではないが、日本晴においても出穂後の茎部デンプン分解に *RAmy2A* が関与することが示唆される。また、*RAmy2A* 発現抑制系統の登熟歩合は野生型よりも低くなる傾向も確認された。

(6) タカナリを原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統では、出穂期以降の葉鞘および節間におけるデンプン分解が抑制され、一時的に葉鞘と節間にデンプンが多く蓄積する。しかし、止葉葉身のデンプン含量の変化を止葉展開期から出穂20日後にかけて調査した結果、野生型非組換え個体とほぼ同様であった。よって、*RAmy2A* の発現抑制は葉身のデンプン含量には影響を及ぼさないことが明らかになった。さらに、止葉展開期以降の止葉葉身の光合成速度を測定したところ、野生型非組換え個体とほぼ同様の光合成速度を示した。以上の結果から、タカナリにおける *RAmy2A* 発現抑制系統において認められる登熟歩合の低下は、出穂期以降の葉身における光合成能力とは関係なく、茎部におけるデンプン分解の遅延が主な原因となっておりと考えられる。

(7) SL2021 がもつ IR64 由来のデンプン分解性を正に制御する遺伝子の単離を目的として、

SL2021 とコシヒカリの交配により作出した F<sub>2</sub> 雑種集団 120 個体と作出した DNA マーカーにより遺伝子連鎖解析を実施した。その結果、その遺伝子の候補領域を第 6 染色体上の 7.46 Mb の範囲に短縮することに成功した。

続いて、上記 F<sub>2</sub> 雑種集団の中から DNA マーカーを用いて 6 系統の RILs を選抜した。これら RILs を用いて、出穂期から出穂 20 日後にかけての第 3 葉鞘におけるデンプン含量の変化率を表現型として遺伝子連鎖解析を行った結果、IR64 由来のデンプン分解性を制御する原因遺伝子は第 6 染色体上の 3.93 Mb の範囲内に存在することが示された。また、SL2021 では子実の長径がコシヒカリと比べて有意に長く、子実重も有意に重いことが新たに見出された。しかし、それら形質と葉鞘のデンプン分解率とは有意な相関がなく、おそらく別の遺伝子によって制御されていると考えられた。一方、SL2021 とコシヒカリにおいて玄米における乳白面積の割合を調査した結果、SL2021 では有意に低下していた。よって、葉鞘における高いデンプン分解性は白未熟粒の発生を低下させ、玄米品質の向上に貢献するかもしれない。イネの登熟期における高温が白未熟粒の発生を増大させることが日本各地で問題となっていることから、今後は茎部デンプン分解性と玄米品質との関係を詳細に調査する必要がある。

#### < 引用文献 >

- 1) Cock, J.H. and Yoshida, S. (1972) Accumulation of <sup>14</sup>C-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  $\beta$ -amylases in rice. *Plant Prod. Sci.* 14: 318-324.
- 5) Hirano, T. et al. (2016) Two  $\beta$ -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. (2023) The relationship between  $\beta$ -amylase and the degradation of starch temporarily stored in rice leaf blades. *Biosci. Biotech. Biochem.* 87: 736-741.
- 7) Sugimura, Y. et al. (2015) Involvement of  $\alpha$ -amylase genes in starch degradation in rice leaf sheath at the post-heading stage. *Plant Prod. Sci.* 18: 277-283.
- 8) 平野達也ら (2012) インド型イネ品種の葉鞘における出穂後のデンプン分解に関わる染色体領域の解析 . *日作紀* 81 ( 別 2 ): 162-163.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sugimura Yu, Fukayama Hiroshi, Michiyama Hiroyasu, Hirano Tatsuya	4. 巻 87
2. 論文標題 The relationship between $\alpha$ -amylase and the degradation of starch temporarily stored in rice leaf blades	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 736 ~ 741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad052	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤蓮、黒川裕介、平野達也
2. 発表標題 イネ葉鞘における出穂後のデンプン分解を制御する遺伝子の単離に向けた表現型解析と遺伝子連鎖解析
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野達也・杉村優有・平野美奈子・黒川裕介
2. 発表標題 イネ $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、OsBAM2とOsBAM3の発現特性の解析
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤蓮、千種瑞生、藤谷里玖、黒川裕介、平野達也
2. 発表標題 雄性不稔化によるシンク能の除去が出穂後のイネ葉鞘におけるデンプン分解性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本作物学会第257回講演会
4. 発表年 2024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
研究 分 担 者	黒川 裕介  (Kurokawa Yusuke)  (60851798)	名城大学・農学部・助教   (33919)	

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
---------	---------