

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05501

研究課題名（和文）オートファジーによるイネ種子登熟過程の α -アミラーゼ発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of alpha-amylase expression by autophagy during rice seed ripening

研究代表者

花俣 繁（Hanamata, Shigeru）

神奈川大学・付置研究所・客員研究員

研究者番号：00712639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：イネの胚乳内での澱粉合成にオートファジーが重要な役割を果たす。本研究では、高温ストレスとオートファジーの欠損で誘導される α -アミラーゼの発現制御機構についての洞察を深めた。Osatg7では澱粉分解経路が開花初期から活性化されていた。 α -アミラーゼのプロモーター上には様々なストレス誘導性転写因子の結合配列が存在した。転写産物の網羅的解析から高温ストレスとオートファジーの機能欠損で様々な転写因子群が上方制御されることが判明した。また、最終的な玄米白濁度と登熟中の種子の α -アミラーゼ活性には正の相関があった。これらの結果を利用して将来的に種子の完熟前に玄米の白濁具合を予測する技術の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネの種子発芽時の澱粉分解は α -アミラーゼの発現により制御される。一方で、種子登熟過程における α -アミラーゼの発現制御機構は未解明であった。本研究では、 α -アミラーゼを含む、澱粉分解関連因子のプロモーター領域にトランスクリプトーム解析により同定した転写因子群が結合することで α -アミラーゼの転写が活性化される可能性を提示し、オートファジーはこれらの発現を抑制することで正常な澱粉合成に寄与することを明らかにした。玄米白濁具合と発達中の種子の α -アミラーゼ活性には正の相関があったことから、 α -アミラーゼの活性を指標とすることで、種子収穫前に一等米比率を予測する技術の開発に転用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Autophagy plays an important role in starch synthesis in rice endosperm. In this study, we gained deeper insight into the mechanism of α -amylase expression regulation induced by high-temperature stress and autophagy deficiency. In Osatg7, the starch degradation pathway was activated from the early flowering stage. The α -amylase promoter contained binding sequences for various stress-inducible transcription factors. Comprehensive transcript analysis revealed that various transcription factor groups were upregulated by high-temperature stress and autophagy deficiency. Additionally, there was a positive correlation between the final brown rice opacity and α -amylase activity in developing seeds. These results are expected to be used in the development of technology to predict the degree of brown rice opacity before the seeds are fully ripe in the future.

研究分野：ライフサイエンス、植物分子、生理科学

キーワード：イネ オートファジー 澱粉代謝 胚乳 遺伝子発現制御 α -アミラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の異常気象により日本を含むアジア諸国において玄米外観品質の低下が多発しており、とくに高温障害米の発生メカニズムの理解と耐性品種の開発が重要視されている。登熟期の平均気温の上昇はイネ胚乳内において澱粉代謝経路の乱れを生み、透明性のない白濁米を形成する。澱粉分解酵素の一つである α -アミラーゼの過剰発現は白濁米の形成を促進し、その発現抑制が白濁米形成を抑制するため、高温誘導性 α -アミラーゼの発現制御が高温障害米の形成を抑制する鍵となる可能性が示唆されていた。

(2) 穀物イネの種子発芽時には、胚乳内に蓄えられた澱粉が分解され、発芽・幼苗の成長のためのエネルギー源として利用される。この際の α -アミラーゼの発現は、植物ホルモンや澱粉分解産物により制御される。一方で、種子登熟過程における α -アミラーゼの発現制御機構は未解明であった。

(3) 応募者は、イネのオートファジー機能欠損変異株 *Osatg7* を単離し、花粉発達にオートファジーが重要であることを発見した (Kurusu, Koyano, Hanamata et al., 2013)。*Osatg7* 変異体は圃場栽培条件下で僅かに稔実したが、その種子の殆どが白濁し、 α -アミラーゼが高蓄積していた (Sera, Hanamata et al., 2019)。詳細な解析から、*Osatg7* では高温登熟過程で起こる澱粉代謝経路のバランス異常が玄米周縁部にかけて生じていることが判明した。すなわち、通常の種子発達過程においてオートファジーによる α -アミラーゼの発現抑制機構が存在することが考えられた。*Osatg7* 変異体を α -アミラーゼ発現機構が亢進している種子として利用し、高温に曝された野生型株で見られる α -アミラーゼの発現を転写・細胞内局在レベルで解明することで、高温登熟障害米の発生メカニズムの解明に繋がると着想した。

2. 研究の目的

本研究は、通常生育条件下で高温障害を受けた状態を模倣したような *Osatg7* の性質に着目し、高温登熟種子と *Osatg7* との比較解析により α -アミラーゼの発現制御を含む、玄米白濁化に関与する経路の抽出を試みる。高温登熟と *Osatg7* 白濁種子の形成過程における α -アミラーゼを含む澱粉代謝関連酵素の発現・局在部位、発現に関与すると推定される転写因子群、オートファジーを介したタンパク質代謝 (分解) との時空間的な相互関係について明らかにする。

(1) 高温登熟種子と *Osatg7* 登熟種子の変動遺伝子群について転写関連因子と澱粉代謝関連酵素の発現ネットワークの構築により α -アミラーゼ発現制御因子を同定、(2) 高温登熟種子のタンパク質代謝 (分解) の変化と、オートファジー欠損によるそのパターン変化を解析し、種子登熟におけるオートファジーの寄与を解明、(3) 高温登熟種子と *Osatg7* 登熟種子の α -アミラーゼの発現・局在部位と澱粉集積異常部位のバイオイメージングによる比較解析から両者の空間的関連性を解明する。

得られた基礎的知見をコシヒカリに代表されるジャポニカ品種の欠点である高温感受性という問題に対して、耐性品種の開発に活用する基盤を構築し、異常気象等による収量、品質の低下を予測し、防除する技術を開発することを目指す。

3. 研究の方法

新潟大学・刈羽村先端農業バイオ研究センターのバイオトロン群、東京理科大学、神奈川大学のバイオトロンおよび国立遺伝学研究所の実験圃場を利用してイネを栽培し、解析を実施した。

(1) 高温と *Osatg7* 登熟種子の転写産物をマイクロアレイ/RNA-seq により解析し、遺伝子発現ネットワークを構築。発達段階の異なる種子から転写産物を抽出し、胚乳発達ステージ毎における転写関連因子および澱粉代謝関連酵素の発現を網羅的に検証。

(2) 登熟期に胚乳で発現するプロテアーゼ活性を検出することを目的に、プロテアーゼ認識配列を含む円順列変異体 GFP を利用したプロテアーゼセンサーを構築し、タバコ葉において過敏細胞死で誘導されるプロテアーゼ活性の変化を検証。

(3) 登熟胚乳における α -アミラーゼの発現・局在部位のイメージングについては、 α -アミラーゼ可視化形質転換イネ系統 (*Amy1A*, *Amy1C*, *Amy3D* プロモーター::*GUS* および *Amy1A*, *Amy1C*, *Amy3D* プロモーター::*Amy1A*, *Amy1C*, *Amy3D* ゲノム::*GFP*) を導入した形質転換イネと α -アミラーゼの蛍光基質を用いて、高温登熟、オートファジー欠損による α -アミラーゼの発現・局在を時空間的に検証。

4. 研究成果

(1) オートファジー機能欠損による α -アミラーゼの発現に対する温度の影響を評価するため、温度制御可能なバイオトロン群を利用し、開花後に高温ストレスを与えて生育させた。*Osatg7* における玄米の白濁化は開花後の温度が強く影響し、温度依存的に白濁度が増大した (図 1 左)。特異的抗体を用いた WB により完熟種子における α -アミラーゼの量を評価した。オートファジー機能欠損変異体 *Osatg7* は通常生育条件下 (昼/夜温度 26/23) で玄米中の α -アミラーゼの発現を

上昇させ α -アミラーゼの発現誘導が野生型と比較して、より低温にシフトした(図1右)。すなわち、オートファジー変異体では野生型と比較して温度に対して感受性となり、通常生育条件下での温度でさえも温度ストレスとして認識していること、オートファジーが直接的または間接的に α -アミラーゼの発現を伴う玄米白濁化の抑制に寄与することが確認された。

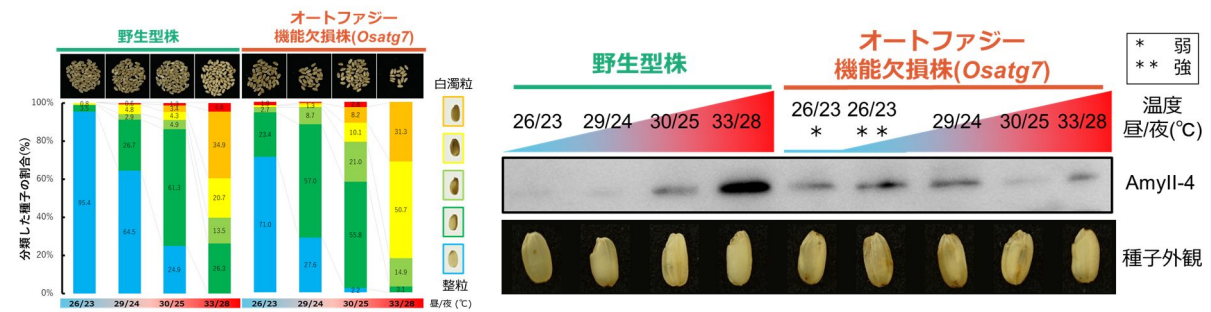


図1：開花後の温度による玄米白濁化(左)と α -アミラーゼの発現(右)に対するオートファジー欠損の影響。Osatg7では温度による白濁化が野生型と比較して亢進し、より低温条件において α -アミラーゼの発現が誘導された。

(2) 登熟期の様々なストレス(高温, 強光高CO₂)及びオートファジーの機能欠損が α -アミラーゼの発現に与える影響を解析するため、ストレス処理時の転写産物(新潟大学農学部三ツ井研究室・未公開データ)とオートファジー変異体の胚乳転写産物のマイクロアレイ・RNA-seqデータ(本研究)との比較解析を行い、 α -アミラーゼの発現上昇を伴う様々な条件下で共通して発現が上方制御される転写因子群を抽出した(図2左)。イネ α -アミラーゼのプロモーター上にはストレス誘導性転写因子の結合配列が多数存在し、ストレス条件下での α -アミラーゼの発現制御に關与する可能性が示された(図2右)。

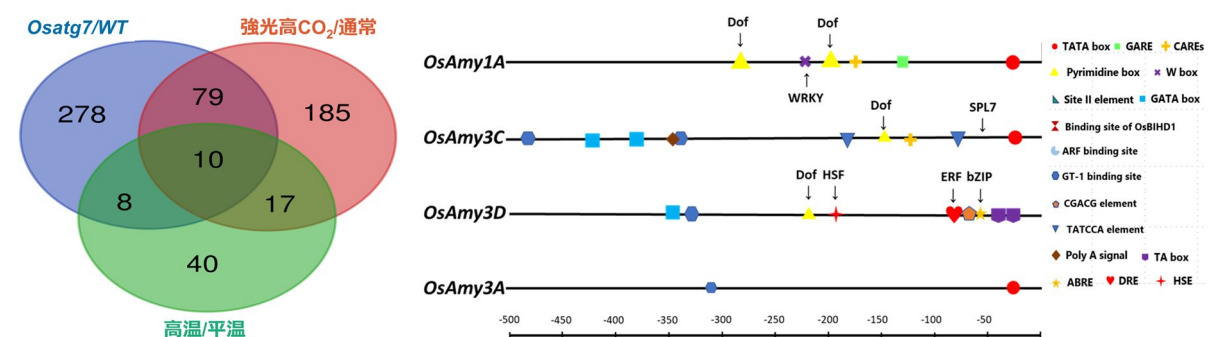


図2：様々なストレスとオートファジー機能欠損により登熟期の胚乳において発現上昇した転写因子群(左)と α -アミラーゼプロモーター上に存在するそれらの予測結合配列の位置(右)。

(3) 網羅的トランスクリプトミクスにより、種子発達時のオートファジーが α -アミラーゼを含む澱粉代謝系遺伝子ネットワークに与える影響を解析し、変異体における α -アミラーゼの発現が種子発達の初期段階から起こることを明らかにした。

(4) 当初計画していたオートファジー機能欠損変異体バックグラウンド下でアミラーゼの発現部位と細胞内局在解析を行うための遺伝子組換えイネの作出については、形質転換を行ったものの、遺伝子組換えイネを取り扱える閉鎖系温室環境下では Osatg7 の強い不稔性の為、種子稔実に至らなかった。そこで栽培環境の違いが Osatg7 変異体の種子稔実に与える影響について詳細に調査し、日長を屋外条件と一致させた閉鎖系温室と圃場環境で栽培した。その結果、オートファジー機能欠損変異体の種子稔実には日長の長さ以外に未知の環境要因が必要であると結論付けた。

イネの種子登熟過程に胚乳内で効率よく正常な澱粉合成を行なう過程でオートファジーが重要な役割を果たすこと、オートファジー機能欠損変異体では澱粉代謝経路が開花後の登熟期の初期段階から分解方向に偏り、種子が白濁化すること、 α -アミラーゼを含む、澱粉分解関連因子のプロモーター領域にトランスクリプトームにより同定した転写因子群が結合しうることを解明した。また、最終的な玄米白濁度と登熟中の種子の α -アミラーゼ活性には正の相関があることも判明した。これらの結果から、登熟種子中の α -アミラーゼの発現と活性化を指標とすることで、将来的には種子の完熟前に玄米の白濁具合を予測する技術の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 花俣 繁, 町田 大輔, 手塚 紘夢, 齋藤 誠志, 齋藤 輝, 麻生 将史, 瀬良 ゆり, 金古堅太郎, BASLAM Marouane, AYCAN Murat, 来須 孝光, 朽津 和幸, 三ツ井 敏明
2. 発表標題 オートファジーはイネ種子登熟時の高温ストレスで誘導される白濁粒の形成を緩和する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花俣繁, 町田大輔, 手塚紘夢, 齋藤誠志, 齋藤輝, 麻生将史, 瀬良ゆり, 金古堅太郎, BASLAM Marouane, AYCAN Murat, 来須孝光, 朽津和幸, 三ツ井敏明
2. 発表標題 イネの種子登熟期のストレスによる米の品質低下と品質制御におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花俣繁、来須孝光、三ツ井敏明、朽津和幸
2. 発表標題 遺伝子コード型プロテアーゼセンサーの開発と植物のプログラム細胞死および オートファジーエンドポイントのプロテアーゼ活性のイメージング
3. 学会等名 第31回バイオイメーキング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花俣繁
2. 発表標題 植物のオートファジー動態のin vivoイメージング・定量的モニタリング法の開発と穀物イネの花粉発達・種子登熟・コメの品質管理におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 第31回バイオイメーキング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 町田大輔, 花俣繁, 齋藤輝, 金古堅太郎, Marouane BASLAM, Murat AYCAN, 来須孝光, 朽津和幸, 三ツ井敏明
2. 発表標題 高温ストレス下のイネ種子稔実および種子成熟におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会 (第70回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira SAITO, Shigeru HANAMATA, Daisuke MACHIDA, Toshiaki MITSUI
2. 発表標題 Analyzing the effects of overexpression of OsATG5 and OsATG7 on autophagy dynamics and fluxes in rice
3. 学会等名 7th International Symposium on Strategies for Sustainability in Food Production, Agriculture and the Environment 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke MACHIDA, Shigeru HANAMATA, Akira SAITO, Kentaro KANEKO, Murat AYCAN, Marouane BASLAM, Toshiaki MITSUI
2. 発表標題 Autophagic mechanisms that modulate starch metabolism regulation and ROS-mediated stress in rice response to heat stress
3. 学会等名 7th International Symposium on Strategies for Sustainability in Food Production, Agriculture and the Environment 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromu TEZUKA, Shigeru HANAMATA, Masashi SAITO, Daisuke MACHIDA, Marouane BASLAM, Toshiaki MITSUI
2. 発表標題 Analysis of α -amylase expression profile in rice seeds under stresses: New insight into the involvement of α -Amylases in the formation of heat-induced grain Chalkiness
3. 学会等名 7th International Symposium on Strategies for Sustainability in Food Production, Agriculture and the Environment 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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	朽津 和幸 (KUCHITSU Kazuyuki) (50211884)	東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授 (32660)	生理学的解析, イメージング解析

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