

令和元年5月30日現在

機関番号：32663

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14840

研究課題名(和文) TGW6変異体を用いた新規デンプン蓄積制御機構の解明と高温登熟障害対策への応用

研究課題名(英文) The Effect of Loss of TGW6 on Starch Accumulation and Translocation in Rice

研究代表者

廣津 直樹 (Hirotsu, Naoki)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：40584389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：機能喪失型TGW6をもつ準同質遺伝子系統[NIL(TGW6)]やインドール酢酸(IAA)阻害剤処理したイネでは、最上位葉から2葉位下の葉鞘にデンプンを蓄積することを明らかにした。このとき、デンプン合成関連遺伝子の発現は増加し、デンプン分解酵素遺伝子の発現は減少していたことから、IAAは遺伝子発現の制御を通じてデンプン蓄積を抑制する作用をもつ可能性を示した。また、NIL(TGW6)において蓄積したデンプンは、収穫期までに稈を経て穂まで転流されることを明らかにした。NIL(TGW6)のデンプン蓄積はソース能を向上させ、登熟歩合や整粒割合を増加させると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにIAAとデンプン代謝の明確な関わりは報告されておらず、本研究を起点としてこれらの関係が明らかにされていくものと期待される。また、NIL(TGW6)はデンプン蓄積によるソース能の向上により、基部未熟粒などの未熟粒の発生を抑えて整粒割合を増加させる特性をもつことが示唆されたため、例えば高温登熟障害などの改善に機能喪失型TGW6が応用されるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：NIL(TGW6), near-isogenic line carrying Kasalath type (loss of function) chromosome around TGW6 gene in Koshihikari background were used in this study. NIL(TGW6) accumulated starch in lower leaf sheath compared with Koshihikari. The expression level of genes related starch synthesis were up-regulated and starch degradation were down-regulated in NIL(TGW6). Similarly, IAA inhibitor treated Koshihikari significantly increased starch contents in lower leaf sheath, and showed similar gene expression as NIL(TGW6). It is considered that IAA involves in starch degradation in the lower leaf sheath of rice. By field trial, NIL(TGW6) significantly increased perfect grain ratio than Koshihikari. The starch accumulated in NIL(TGW6) by the heading stage was translocated to panicle via culm by the Maturity stage. It is suggested that the higher supply capacity of carbohydrate could be kept demand of carbohydrates during the ripening stage and reduced the immature grains.

研究分野：作物生理学

キーワード：イネ オーキシン デンプン蓄積 登熟

1. 研究開始当初の背景

イネの収量は、穂数、粒数、粒重等のシンクサイズと光合成速度等のソース能によって決定される。シンク・ソースの関係は、蓄積された炭水化物の栄養成長組織から玄米への転流を調節し、登熟や玄米収量を増加させるために極めて重要な要因である。シンクサイズに關与する遺伝子は粒数に關与するもの (*Gn1a*; Ashikari et al. 2005, *DEP1*; Huan et al. 2009, *WFP*; Miura et al. 2010) や粒徑に關与するもの (*qSW5*; Shomura et al. 2008, *GS3*; Takano-Kai et al. 2011, *GW2*; Song et al. 2007) 等多数報告されているが、その一方でソース能の拡大に關与する遺伝子はほとんど見つかっていない。その内の1つである *NAL1* は機能喪失することで光合成速度 (Takai et al. 2013) や受光態勢 (Hirotsu et al. 2017) を改善させることが報告されている。出穂前に蓄積された炭水化物は出穂後、葉や稈といった栄養組織から穂へと転流される。一般に、全収量の約30%は出穂前の蓄積炭水化物に依存していると言われているが (Cook and Yoshida et al. 1972)、出穂前の炭水化物の蓄積に關する遺伝子は特定されていない。

通常、植物は日にデンプンを合成・蓄積する。そして、蓄積したデンプンを夜に分解し、代謝および成長のための炭素資源として利用している。イネの場合は光合成産物の大部分をショ糖として蓄積し、その一部をデンプンとして蓄積する。これに關して、蓄積したデンプンは成長のための炭素資源ではなく、主に穂へ充填するために使用されることが報告されている (Okamura et al. 2016)。このことから、出穂前のデンプン蓄積の増加は、イネの収量を増加させる上で非常に重要な要因であると考えられる。また、デンプンの合成・分解は、複数の酵素および調節遺伝子の作用を含む高度に調節されたプロセスである (Li et al. 2007)。葉にデンプンを蓄積する変異体としては、 α -glucan water dikinase をコードする *OsGWD1* が欠損している *LSE1* が存在するが、この変異体は栄養成長には影響しないものの穂数や収量が大きく減少してしまうことが報告されている (Hirose et al. 2013)。他にも、 β -amylase をコードする *OsBAM2* や *OsBAM3* の2つの遺伝子が葉鞘でのデンプン代謝に關与していることが分かっているが (Hirano et al. 2016)、*OsBAM2*、*OsBAM3* を発現抑制した変異体では葉のデンプン蓄積の有意な低下は見られないこと、同じ β -amylase をコードする *OsBAM5* の発現抑制をした変異体では出穂期以降の葉鞘においてデンプンが過剰に蓄積することが報告されている (杉村ら. 2017)。

これまでの研究から、インディカ型イネであるカサラスから粒重を増加させる遺伝子として *TGW6* 遺伝子が特定されている (Ishimaru et al. 2013)。この *TGW6* は開花2日後の子房で多く発現し、indole-3-acetic acid (IAA) -glucose hydrolase をコードしている遺伝子で、カサラスでは1塩基欠損によりその機能が失われている。この機能喪失型 (カサラス型) *TGW6* を導入した準同質遺伝子系統 (NIL) では IAA-glucose の分解抑制により IAA 供給が低下することにより、胚乳細胞数が増加して粒長が伸び、粒重が増加する。加えて、*TGW6* の機能喪失は出穂前のデンプン蓄積量を増加させており、ソース能も向上していることで結果的に収量が増加すると考えられている。このことから、IAA は葉でのデンプン合成を抑制する、またはデンプン分解を促進するなどデンプン代謝に何らかの作用をもつ可能性が示唆されるが、これまでに IAA とデンプン代謝の明確な関わりは報告されていない。

さらに、蓄積したデンプンが登熟に利用されるのか、調査は行われていない。*TGW6* 機能喪失によるソース能の増加により、登熟歩合や玄米外観品質の向上が期待されるが、さらなる検証が必要である。

2. 研究の目的

IAA にデンプン蓄積を抑制する作用があるのならば、機能型の *TGW6* を持つイネに外部から IAA 阻害剤処理をすれば葉のデンプン含有量が増加する可能性がある。薬剤処理によるデンプン蓄積の制御が可能であれば、遺伝子操作によらない収量改善策としての展開も考えられる。本研究では機能喪失型 *TGW6* によりデンプンが蓄積するメカニズムを明らかにすることを目的に、NIL(*TGW6*)や IAA 阻害剤処理によるデンプン蓄積の変化やデンプン代謝関連遺伝子の発現変化を調べる。さらに、コシヒカリおよび NIL(*TGW6*)の出穂期前後のデンプン転流を解析し、ソース能の増加が玄米外観品質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

コシヒカリ (*Oryza sativa* L. cv. Koshihikari) とコシヒカリの *TGW6* 遺伝子周辺 4.33 Mb をカサラス型染色体に置換した準同質遺伝子系統 [NIL(*TGW6*)] を使用した。ガラス温室で4週間生育させたイネを実験に用いた。サンプルは最上位完全展開葉を Top、1葉位下の葉を-1L、2葉位下を-2L として分割し、それぞれ葉身と葉鞘に分けて凍結保存した。それぞれの部位におけるデンプン含有量および遺伝子発現量を測定した。また、2週間初期生育させたイネに IAA 阻害剤を処理したイネも同様にサンプルとして用いた。

デンプン転流と外観品質の調査については、群馬県邑楽郡板倉町の圃場にて標準的栽培法に従って栽培したコシヒカリおよび NIL(*TGW6*)を用いた。圃場で生育したコシヒカリおよび NIL(*TGW6*)を幼穂形成期、出穂期、登熟期に株ごとにサンプリングし、主幹3本を穂と稈、上位葉から下位葉までを葉身(LB)葉鞘(LS)に分けた後に乾燥させ、粉碎サンプルのデンプン含量をど酵素法にて定量した。収穫後実験室内で乾燥させた穂を脱穀、脱粒した後、穀粒判別機 (RGQ120A、サタケ) を用いて玄米の外観品質 (整粒、乳白粒、基部未熟粒、腹白未熟粒、白死米、胴割粒、その他未熟粒) を測定した。

4. 研究成果

コシヒカリおよび NIL(*TGW6*)を葉位別に分けてデンプン含有量測定を行った結果、NIL(*TGW6*)は-2 LS にコシヒカリと比較して多くのデンプンを蓄積していた(図1)。-2 LS におけるデンプン含有量の日変化を調べた結果、デンプン含有量が最大になるのはコシヒカリ、NIL(*TGW6*)共に夕方であり、NIL(*TGW6*)はどの時間帯においてもコシヒカリよりも有意に多くのデンプンを蓄積していた。このとき-2 LS におけるデンプン代謝関連酵素の遺伝子発現を調べたところ、NIL(*TGW6*)における *AGPL1*、*AGPS1*、*GPT2* の3種のデンプン合成関連遺伝子の発現は一部の時間帯でコシヒカリよりも増加していた。一方で、デンプン分解酵素 β -amylase をコードする *OsBAM2*、*OsBAM3*、*OsBAM5* の3種の遺伝子の発現は、NIL(*TGW6*)で深夜の時間帯にコシヒカリよりも大きく減少していた。以上のようにNIL(*TGW6*)では、デンプン合成が亢進し、分解が抑制される方向にデンプン代謝関連遺伝子の発現が変化しており、これがNIL(*TGW6*)における葉へのデンプン蓄積をもたらした要因であると考えられた。

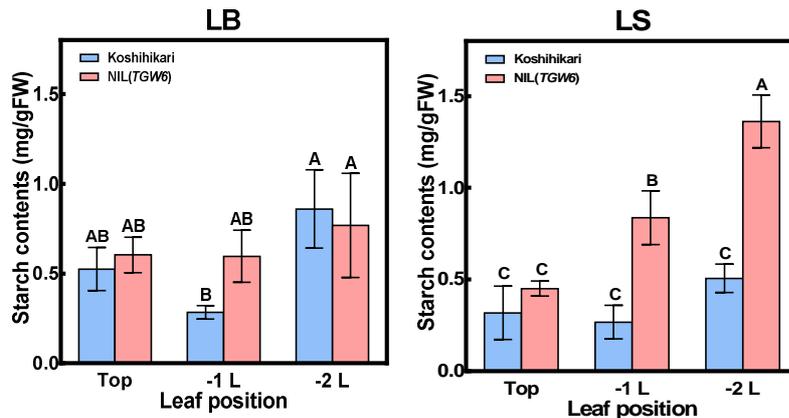


図1 コシヒカリおよび NIL(*TGW6*)における葉位別のデンプン含量

IAA 阻害剤を処理したコシヒカリにおいても、-2 LS のデンプン含有量が NIL(*TGW6*)と同程度まで有意に増加することを明らかにした(図2)。このとき、*AGPL1* および *AGPS1* の発現が有意に増加し、また、*OsBAM5* の発現は有意に減少していた。このことから、IAA はデンプン合成を抑制および分解を促進することによってデンプン代謝を調節している可能性が示唆された。IAA 阻害によるデンプン代謝関連遺伝子発現の変化が NIL(*TGW6*)におけるデンプン代謝関連遺伝子発現の変化と類似していたことから、NIL(*TGW6*)における葉へのデンプン蓄積の増加は *TGW6* 機能喪失による IAA 供給の低下により引き起こされたと考えられた。

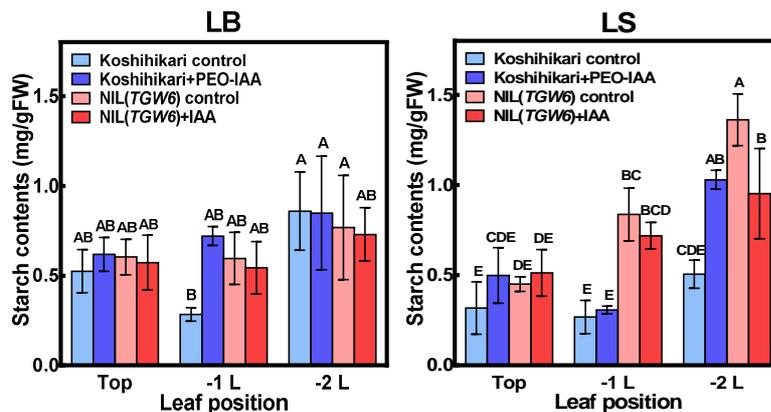


図2 コシヒカリおよび NIL(*TGW6*)に IAA 阻害剤および IAA をそれぞれ処理したときのデンプン含量

圃場栽培実験の結果、NIL(*TGW6*)は栽培年度によらず、また登熟期間中の気温によらず、コシヒカリよりも常に登熟歩合および整粒割合を増加させていた(図3)。この整粒割合の増加は、主に基部未熟粒の発生を抑えることによるものであった。次に、蓄積したデンプンが葉鞘や稈を經由して穂へ蓄積される過程を追跡するため、植物体部位ごとのデンプン含量を各生育ステージにおいて調査した。幼穂形成期～出穂期、出穂期～登熟期の区間における各部位のデンプン変化量を計算したところ、NIL(*TGW6*)では幼穂形成期～出穂期区間に葉鞘から稈へのデンプン転流が増加していた(図4)。また、出穂期～収穫期区間でも稈から穂へのデンプン転流増加が見られた。以上のことから、NIL(*TGW6*)において出穂期までに蓄積したデンプンは、収穫期までに稈を経て穂まで転流されることが明らかとなった。これにより、NIL(*TGW6*)では、ソース能の向上により登熟期間中にデンプン供給能を高く維持し、基部未熟粒などの未熟粒の発生

を抑えて整粒割合を増加させる特性をもつことが示唆された。

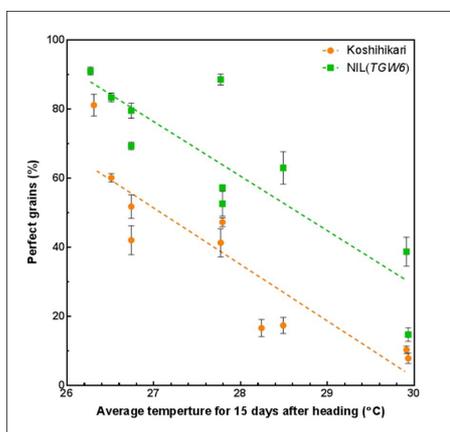


図3 コシヒカリおよびNIL(TGW6)における登熟期間中の日平均気温と整粒割合の関係

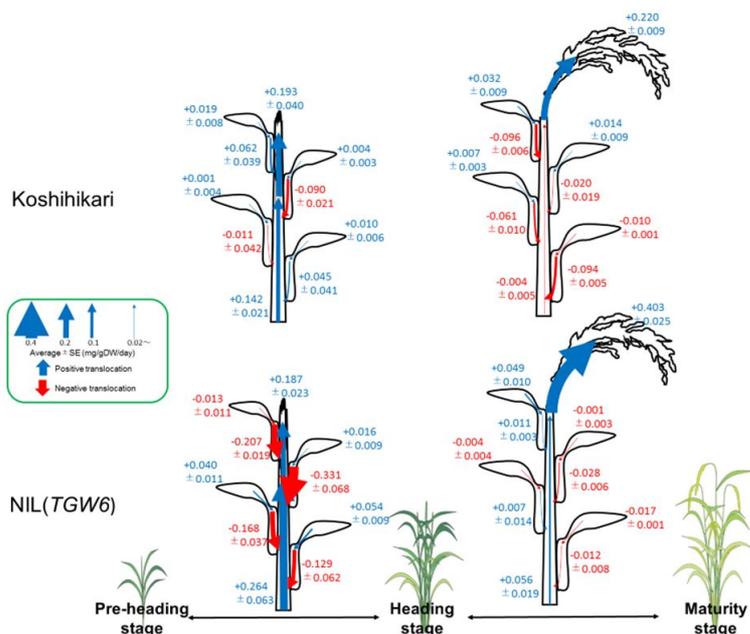


図4 幼穂形成期～出穂期および出穂期～登熟期の区間における各部位のデンプン変化量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Naoki Hirotsu, Kazuhiro Ujiie, Ishara Perera, Ayano Iri, Takayuki Kashiwagi & Ken Ishimaru. Partial loss-of-function of NAL1 alters canopy photosynthesis by changing the contribution of upper and lower canopy leaves in rice. Scientific Reports (2017) 7, 15958.

〔学会発表〕(計4件)

Noguchi M, Shimizu J, Sugisaki F, Ishimaru K, Hirotsu N. “Effect of loss of *TGW6* on starch translocation and grain filling” (IRRC-01134, 5th International Rice Congress, Singapore, 17th October 2018)

Kawawa S, Ishimaru K, Hirotsu N. “The Effect of IAA Inhibitor on Starch Accumulation in Rice Leaves” (IRRC-0110, 5th International Rice Congress, Singapore, 17th October 2018)

野口雅弘、清水順平、杉崎文哉、石丸健、廣津直樹 “機能喪失型 *TGW6* によるデンプン転流の変化と登熟障害耐性への影響” (第245回日本作物学会講演会、宇都宮市、2018年3月)

川和 信一郎、石丸 健、廣津 直樹 “機能喪失型 *TGW6* における葉へのデンプン蓄積メカニズムの解析” (第244回日本作物学会講演会、岐阜市、2017年9月)

〔図書〕(計1件)

Saman Seneweera, Kiruba Shankari Arun-Chinnappa, Naoki Hirotsu. Chapter 06: Scope, Options

and Approaches to Climate Change. p119-130, *In Food Security and Climate Change*, Ed Shyam Singh Yadav, Robert Redden, Wiley-Blackwell, (2019)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~hirotsu/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。