

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05605

研究課題名(和文)窒素追肥に应答するアミラーゼ遺伝子群の機能解明と育種素材利用

研究課題名(英文)Functional analysis and application of nitrogen fertilizer-responsive rice amylases

研究代表者

黒田 昌治 (Kuroda, Masaharu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：30355581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：窒素追肥、それに应答して発現が上昇する3つのアミラーゼ遺伝子(Amy3E, BAMY3, BAMY5)、デンプン構造形成の3者の関係性解明を目指した。その結果、追肥によってデンプンの鎖長分布が変化することを明らかにしたが、デンプン粒の外観構造に変化は見られなかった。機能検証に向けた遺伝子改変系統として、(1)ゲノム編集により上記遺伝子を多重破壊した系統、(2)胚乳特異的にBAMY3、BAMY5を過剰発現する系統、(3)9つのBAMY遺伝子のプロモーター領域とGUSを融合させて遺伝子導入した系統、を作出した。これらの系統では、コメの外観に顕著な変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素追肥によってコメ胚乳デンプンの鎖長分布が変化することを初めて明らかにした。一方で、デンプン粒の状態には明確な追肥の影響は見られなかった。鎖長分布を変化させる原因遺伝子として想定された3つの窒素应答性アミラーゼ(Amy3E, BAMY3, BAMY5)を中心に、様々な遺伝子改変系統群を作出した。研究期間中に原因遺伝子の特定まで至らなかったが、上記の遺伝子改変系統群を比較解析することで、コメデンプン集積機構と品質特性に果たすアミラーゼ群の新たな機能が明らかになり、新規デンプン特性を持つ品種開発に向けた基盤的知見が得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We tried to reveal the relationship among nitrogen fertilizer, nitrogen-induced rice amylase genes (Amy3E, BAM3Y, and BAMY5), and starch structure. The chain length distribution (CLD) of amylopectin branches changed by nitrogen fertilizer, whereas the appearance of starch granule did not change. For direct approach to gene function, various gene-modified rice lines were developed; i.e., (1) multiple knockout lines of above 3 amylases using genome editing, (2) transgenic lines harboring endosperm specific overexpression constructs of BAMY3 and BAMY5, (3) transgenic lines harboring chimeric constructs of GUS marker gene and promoter region derived from each 9 BAMY gene. There are no remarkable changes in grain appearance of above gene-modified rice lines.

研究分野：植物分子生物学、植物生理学、作物学

キーワード：コメ 品質 窒素肥料 アミラーゼ デンプン 遺伝子発現 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出穂期の窒素追肥は、コメの増収をもたらす一方で食味や加工特性を低下させることから、農業生産向上には両者の負の相関を解消する必要がある。しかし、これまでの栽培学的研究や食品科学研究では、具体的な鍵遺伝子の定時に至っていなかった。

我々は、窒素追肥に応答した アミラーゼ 3 および 5、アミラーゼ 3E といったデンプン分解酵素の発現亢進を初めて明らかにした。この結果は、窒素追肥による粘り等のコメ加工特性の低下要因が、窒素応答型アミラーゼによるデンプン鎖の分解にある可能性を示唆している。上記の 3 遺伝子、とりわけ アミラーゼ群については、具体的な機能解明研究の事例に乏しく、胚乳のデンプン集積や品質特性に果たす役割は不明であった。種子の主要な栄養成分であるデンプンが集積する種子登熟期において、なぜ分解酵素の誘導が起きるのか、その生理学的意義を学術的に解明することは、作物の生産性向上・品質安定化の基盤的知見となる。

2. 研究の目的

本研究では、出穂期窒素追肥によるデンプン変化を詳細に解析するとともに、追肥に応答する機能不明アミラーゼ群との関係性を明らかにする。これまで未解明であった個別のアミラーゼとデンプン構造の関係性を解明することにより、生産環境の変化による品質変動を抑える方法論を見出す。さらに、アミラーゼ遺伝子の選択的破壊することにより、デンプン構造が微細改変されたような育種素材の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 窒素追肥による完熟種子アミラーゼ活性・デンプン構造の変動解析

野外圃場または人工気象機で塩安を使用した出穂期窒素追肥栽培試験 (Midorikawa K. et.al., PLOS ONE 2014) を行い、追肥がデンプン全般に与える影響を包括的に解明する。具体的な方法としては、可溶性・不溶性デンプンの測定は EnzyChrom Starch Assay Kit (BioAssay Systems)、アミロースの割合は Amylose/Amylopectin Assay Kit (Megazyme) で行った。デンプン鎖長については、ヨウ素染色法 (Nakamura S. et.al., Biosci. Biochem. Biotechnol. 2014) または HPAEC-PAD 法 (Nakata M. Plant Biotechnol. J. 2017) により評価した。

(2) アミラーゼ 3 および 5 (BAMY3、BAMY5) アミラーゼ 3E (Amy3E) の遺伝子破壊系統および過剰発現系統の作出と特性解析

窒素追肥により発現亢進が起きることを確認している上記の 3 遺伝子について、ゲノム編集および遺伝子組換えにより発現を改変して、小課題(1)と同様に表現形質の変化を解析する。また、透過電顕および抗体染色による組織科学的解析により、胚乳内での局在部位の精密同定とデンプン粒の直接的観察を行う。具体的には、独自に開発した多重改変用 CRISPR ゲノム編集ベクター pZNH2GTR (論文未発表) を用いて、3 遺伝子同時破壊ベクターを構築して導入した。標的とする遺伝子内部の場所は 2 通りの組み合わせを準備した。過剰発現については、10kDa プロラミンプロモーター下に BAMY3 または BAMY5 を連結して導入した。BAMY3 および BAMY5 を認識する抗体の作成を試みるとともに、研究協力者である増村教授 (京都府立大) の支援を受けて、透過電顕による胚乳細胞内部の観察を行った。

(3) アミラーゼ (BAMY1-9) 群の発現部位および窒素応答性の解析

ゲノム上で存在が予測された アミラーゼ群 (BAMY) 9 遺伝子について、開始メチオニンの上流 2kbp を発現調節プロモーター領域とみなして グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結して導入し、GUS 活性の染色検出により発現時期と部位の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 野外圃場での 3 年間に渡る栽培試験では、いずれの年も塩安追肥区で種子窒素含有量が約 20% 増加した。人工気象機の栽培試験では、しばしば稔実率が低くなることが問題となったが、稔実率 85% 以上の場合では追肥区で種子窒素含有量が約 60% 増加した。いずれの場合も完熟種子での アミラーゼ活性は非常に弱く、解析を断念した。標準区に比較して追肥区では、可溶性デンプンの量が有意に増加し、不溶性デンプンの量が有意に減少した (図 1a)。アミロース含有率は有意差が見られなかった (図 1b)。デンプン鎖長に関しては、ヨード染色法では重合度 12 以下のものが有意に増加し、37 以上のものが有意に減少した (図 1c,d)。一方で HPAEC-PAD 法では、重合度 9-17 のものが減少する結果となった (図 1e)。ヨード染色法と HPAEC-PAD 法での結果は一見すると矛盾しており、現状では整合性ある仮説を見いだせていない。しかし、HPAEC-PAD 法では直接的にデンプン鎖をクロマトグラフィー分析しており、デンプンが尿素に溶解しにくくなる age 変異体では重合度 15 以下の鎖の比率が低下するとの報告があることから (Nakata 2017、前出)、窒素追肥によって重合度の低いデンプン鎖が減少し、溶解しにくくなることによ

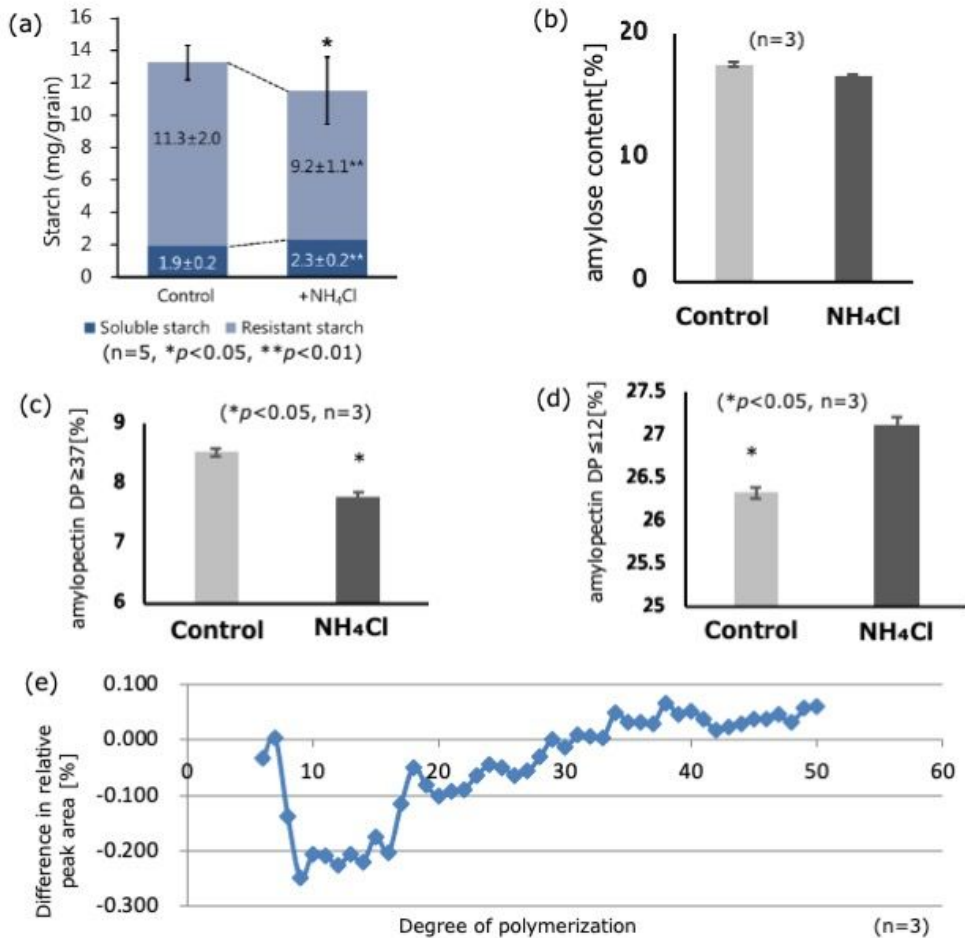


図1 各種分析によるデンプン構造への追肥の影響解析（人工気象機栽培の収穫種子を使用）
 (a)不溶性・可溶性デンプン (b)アミロース含有割合 (c) 重合度37以上のデンプン鎖の割合（ヨード染色法） (d) 重合度12以下のデンプン鎖の割合（ヨード染色法）
 (e) HPAEC-PAD法によるデンプン鎖長分布の差異解析（追肥区から標準区を引き算する）

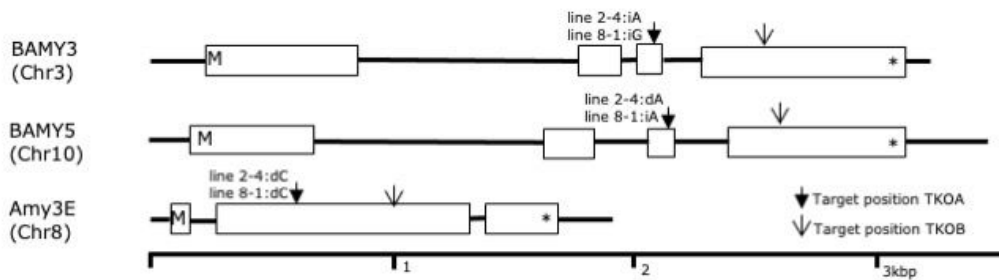


図2 ゲノム編集によるアミラーゼ3重破壊システムの概略図

って食味等に影響する可能性が高いと考えている。次項(2)で作出したアミラーゼ改変系統で、同様にデンプン鎖長を分析すれば、結論が得られると考えられる。

(2)図2に示すような2つの標的部位を設定してCRISPRゲノム編集による多重破壊を試みた。標的部位Aに関しては、独立な8系統についてT1世代植物を5株ずつ合計40株のゲノム解析を行い、6系統でホモ3重変異体が見られるという高率でゲノム編集に成功した。このうち、フレームシフト等により3遺伝子欠損になったと想定されるものは3系統あったが、そのうち1系統は非常に稔実率が低く次世代種子がほとんど得られなかった。図2に示した2系統(2-4、8-1)については相応量の次世代種子が収穫できたため、さらにこれらを1世代進めて種子を増殖した。過剰発現体については、BAMY遺伝子領域のGC含量が非常に高いため、長い断片のPCR増幅が困難であることがわかった。そこで、コドン进行调整してGC含量を低めた形で全長を人工合成して遺伝子導入にこぎつけた。ゲノム編集体の解析においてもGC含量の問題で編集部位近辺を特異的に増幅できるプライマーの設定に手間取ったり、増幅効率が低かったりといった問題に直面した。

特異的抗体については2回作成を試みたが、反応性の高い抗体を得ることができなかった。人工気象機栽培の完熟種子について透過電顕により胚乳デンプン粒を観察したが、標準区と追肥

区で明確な差は見出せず、いずれでも亀の甲状の充実したデンプン粒が見られた。

(3)BAMY 遺伝子群の上流域についても GC 含量の問題で長い断片の PCR 増幅が困難であった。使用する酵素の種類を検討するとともに、分割増幅してつなぎ合わせる等の対応策をとってベクターを構築したため、作出に時間を要し、具体的な形質評価に至らなかった。

(4)総合考察

窒素追肥によってコメ胚乳デンプンの鎖長分布が変化することを初めて明らかにした。鎖長構造の変化がデンプン特性に影響を与えることによって食味等の品質低下を引き起こす、という流れが最も可能性が高い仮説と考えられるが、研究期間内に決定的な結論を得ることができなかった。また、追肥による変化の度合いは突然変異体等の場合に比べてかなり小さいため、分析試料を多く準備しつつ分析反復数を増やす必要がある。結果を得るのに手間と時間がかかる点は、今後同様のアプローチで研究を行う際に注意する必要がある。

遺伝子実験に関しては、ゲノム編集による遺伝子破壊体の作出が予想以上にうまく進み、3重変異体をすんなり得ることができた。今後、多数の BAMY 遺伝子の機能解析のための遺伝子改変系統は速やかに作出できると考えられる。さらに、アミラーゼ遺伝子とデンプン構造形成の関係性が解明されれば、特定遺伝子の選択的破壊による育種素材化も迅速に行えるので、今後の研究展開にかなり期待が持てる結果となった。一方で、高 GC 含量に由来する PCR 増幅障害は全く予想しておらず、教訓として今後の研究に生かしたい。一連の遺伝子改変体を揃えるところまでは到達できたので、これらを活用して研究を発展させる予定である。

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 1件）

1. 著者名 Midorikawa Keiko, Kuroda Masaharu, Yamashita Haruyuki, Tamura Tomoko, Abe Keiko, Asakura Tomiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Oryza sativa Brittle Culm 1-like 6 modulates -glucan levels in the endosperm cell wall	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田昌治
2. 発表標題 多様な作物のゲノム編集研究に活用できる人工気象機を用いた簡便高密度水耕栽培法
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井孝一朗、黒田昌治、緑川景子、阿部啓子、朝倉富子
2. 発表標題 窒素施肥がイネ種子のデンプン組成に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019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	朝倉 富子 (Asakura Tomato) (20259013)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	増村 威宏 (Masumura Takehiro) (50254321)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302)	

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