

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25年 6月 3日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380017

研究課題名（和文） イネの葉中デンプン過剰蓄積変異体を用いた光合成産物の転流・代謝機構の解明

研究課題名（英文） Gene mapping and physiological characterization of leaf starch excess mutants of rice

研究代表者

廣瀬 竜郎（HIROSE TATSURO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター作物開発研究領域・主任研究員

研究者番号：90355579

研究成果の概要（和文）：イネにおける光合成産物の転流・代謝機構を解明するために、葉身にデンプンを高いレベルで蓄積する5系統の突然変異系統を用いて、それらの原因遺伝子の単離と生理機能の解析を行った。その結果、1系統についてはデンプン分解酵素のひとつである α -glucan water dikinase をコードする遺伝子の機能欠損が原因であることがわかった。他の系統についても原因遺伝子の座乗染部位や生理形質が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanisms of sugar translocation and metabolism, five lines of rice mutant that accumulate high levels of leaf starch were characterized. In one mutant line named LSE1, disruption of a gene for glucan water dikinase was revealed to be a responsible gene. Gene mapping and physiological characterization were done also in other four mutant lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：植物分子生理学・作物学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：イネ、遺伝子、デンプン、転流、突然変異体

1. 研究開始当初の背景

作物の経済収量の向上戦略を考えると、光合成の場であるソース葉から子実などの可食部への光合成産物の輸送効率、すなわち転流効率の向上が重要であることは論を待たない。そのため、今日まで多くの作物で転流効率の律速因子について研究が行われ、近年の分子生物学的研究手法の発展とあいまって着実な成果をあげている。たとえば、光合成炭素固定産物の転流形態はほとんどの

作物でショ糖であること、ダイズなどいくつかの作物では葉におけるショ糖合成が転流の律速因子となり得ること、またその際、ショ糖リン酸合成酵素（SPS）の活性がショ糖合成活性と密接に関わること、ショ糖が転流の場である篩部に入るときにはショ糖トランスポーター（SUT）によるエネルギー依存的な膜輸送がきわめて重要であり、バレイショやトウモロコシではSUT遺伝子の発現抑制もしくは遺伝子破壊により収量や成長速度

の著しい低下がおきること、などが次々と解明されてきた。しかし一方で、これらの成果がイネやコムギなどの世界的な主要作物に必ずしもあてはまらないことが明らかになってきた。たとえば、ショ糖合成のキーエンザイムである SPS をバレイショで高発現させると生長や収量に促進的に働くことが確かめられたが、イネではその効果は顕著ではなかった。また、イネのショ糖トランスポーター遺伝子のひとつである OsSUT1 の発現抑制系統では、バレイショやタバコで観察されたようなソース葉からの糖転流の抑制はみられなかった。こうしたことから私たちは、イネの糖転流機構はまだ未知の部分が多く、その制御要因を明らかにするためには、イネ自身を使って一から調べなくてはならないという結論に至った。そこで本課題では、そのための方法として私たちが独自に単離した葉にデンプンを過剰に蓄積する突然変異系統を用いて研究を進めた。

2. 研究の目的

多くの高等植物では、何らかの理由で転流が抑制されると、過剰の光合成産物をデンプンとして葉に蓄積することが知られている。バレイショなどでも前述の SPS 活性の低下や SUT 機能の抑制によっても葉にデンプンが蓄積する。したがって、転流を制御する遺伝子が突然変異によって破壊されたイネがあれば、その原因遺伝子を明らかにすることで転流の制御要因を突き止められると着想した。そこで、平成 18 年度および 19 年度にイネ(原品種「日本晴」)のレトロトランスポゾン (Tos17) 挿入変異系統群を中苗期まで育成し、ヨード染色によって葉身のデンプン蓄積の有無を調べる選抜を行い、6377 系統から 5 系統の有望系統を得た。これらの系統についてさらに調べた結果、いずれも顕著なデンプン蓄積が再現性よく認められ、その形質には明確な遺伝性があることが確認できた。一方、サザン解析の結果、これらの変異はいずれもレトロトランスポゾン (Tos17) ではタグされていないことがわかった。そこで本課題では、デンプン過剰蓄積変異系統の原因遺伝子をマップベースクローニングによって特定するとともに、変異系統の生理特性を詳細に調べることによりイネの糖転流の律速要因の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では上記 5 系統のデンプン過剰蓄積変異系統(表 1)を用いて、イネの転流機構とその制御要因の解明するために、各変異系統と日印交雑品種「タカナリ」との交配後代を用いたマップベースクローニングによる原因遺伝子の特定を行う一方、安定同位体トレーサーや各種の生理・生化学的手法を用い

た変異系統の転流および関連する生理機能の解析を行った。

表 1 デンプン過剰蓄積変異系統

系統	蓄積部位	生長	登熟
LSE1	全体	良	正常
LSE2a		不良	不良
LSE2b	成熟葉	不良	不良
LSE2c		不良	枯死
LSE3	伸長葉	やや不良	やや不良

4. 研究成果

(1) LSE1 系統

遺伝子マッピングにより、LSE1 の原因遺伝子候補として α -glucan water dikinase (GWD) をコードする OsGWD1 (Os06g0498400) が見つかった。解析を進めた結果、LSE1 系統の OsGWD1 遺伝子は全長約 11kbp のうち 3.4kbp に及ぶ欠失があり、その結果、コード領域の 1/3 以上を欠いた異常な転写産物が生じていることがわかった。さらに、LSE1 系統に正常型の OsGWD1 遺伝子を導入した遺伝子組換え個体では葉中デンプンの過剰蓄積は起こらなくなり、一方、正常型個体の OsGWD1 を RNAi によって機能抑制すると葉中デンプンの過剰蓄積が再現された。これらから、LSE1 の原因遺伝子が OsGWD1 であることが確認された(図 1)。GWD 遺伝子の機能欠損変異体の報告例は、これまでに双子葉植物で 3 例知られており、いずれも葉中デンプンの可溶蓄積が生じる。したがって、LSE1 は単子葉植物としては世界で初めての報告例である。また、双子葉植物の GWD 変異体の研究結果から、GWD が葉中デンプンの分解系で重要な役割を果たすと考えられている。LSE1 の解析結果は、この葉中デンプン分解のメカニズムが双子葉、単子葉を問わず、高等植物に普遍的に存在することを示唆している。

生理解析の結果、LSE1 の葉身中デンプン含量は昼夜を通じて正常型の 10 倍以上の高いレベルである一方、ショ糖含量には正常型と

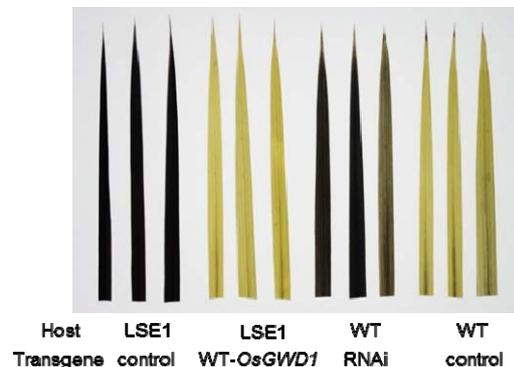


図 1 LSE1 の相補試験および正常型の OsGWD1 抑制試験(成熟葉身をヨード染色したもの)

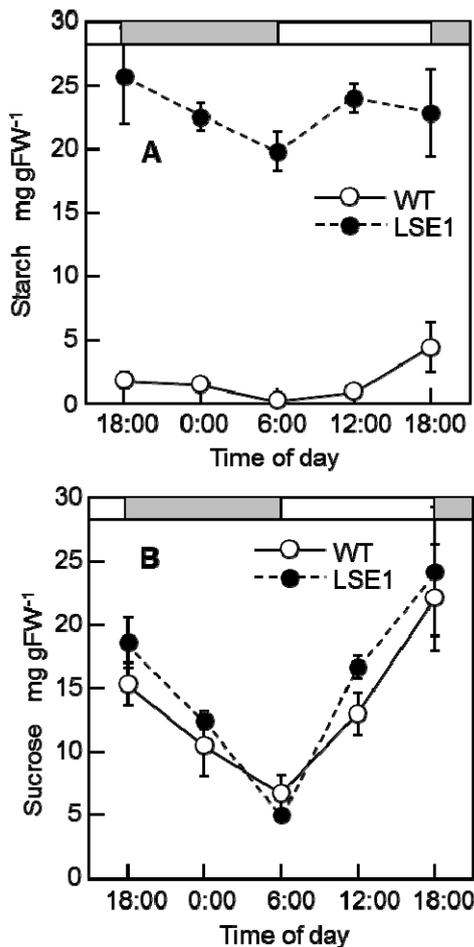


図2 成熟葉身中のデンプン(A)およびショ糖(B)の日変化(白丸:正常型、黒丸:LSE1)

差がなかった(図2)。また、LSE1は生育初期の乾重増加や出葉速度において正常系統と差がなく、個葉光合成速度や¹³C同化産物の葉身からの転流速度にも両者に差が見られなかった。一方、収量形質では穂数、登熟歩合、粒重においてLSE1が正常系統よりも劣っており、結果的に30%程度の減収となった。この原因としては、稈・葉鞘における出穂前蓄積炭水化物代謝に対するGWD1変異の影響が示唆されたが、今後さらに解明を進める必要がある。

ところで、これまでに報告されたGWDの変異系統はいずれも顕著な生育阻害が観察されており、同じGWDの変異でありながら生長・収量への影響が限定的なLSE1とは明確な差異がみられる。これまでの報告例であるアラビドプシス、ミヤコグサ、トマトのいずれも葉中のショ糖/デンプン比がイネよりも著しく小さい(=デンプンが相対的に多い)。このことをあわせて考えると、GWDを介した葉中デンプン分解経路は高等植物に普遍的に存在すると考えられる一方、葉中デンプンの生理的重要性は種によって大きく異なることが本研究によって示唆された。

(2) LSE2a、LSE2b および LSE2c

遺伝子マッピングおよび遺伝解析の結果、LSE2aと2bは同一の1遺伝子の劣勢変異によるものと推定された。また、両変異系統がTos17変異体作出における兄弟系統であることから、両変異系統は全く同じ変異を共有している可能性が高いと考えられた。そこで主としてLSE2bを用いてさらに遺伝子マッピングを進め、第8染色体の60cM付近に原因遺伝子が座乗していることを突き止めた。

LSE2aおよびLSE2bの両系統は、正常系統に比べて生育が非常に悪いが、貧弱ながらも出穂して少数の種子をつけた。生理解析の結果、両系統の成熟葉身にはデンプンばかりでなくショ糖も高濃度に蓄積しており、LSE1とは明らかに異なっていた。

一方、LSE2c系統も1遺伝子劣勢変異に起因すると推測された。遺伝子マッピングの結果、この原因遺伝子は第3染色体の138cM付近に座乗することがわかった。しかし、LSE2c変異体は全て第5葉期頃には枯死してしまい、ホモ個体を用いた詳細な生理解析ができなかった。

(3) LSE3 系統

LSE3変異体は生育が緩慢で、正常個体に比べて生長・収量に関連する諸形質が大きく劣るものの、出穂・登熟することができた。LSE3と「タカナリ」の交配後代において、LSE3表現型の出現率は1:5程度となり、1遺伝子変異で想定される1:3よりも小さかった。一方、遺伝子マッピングの結果、第11染色体102cM近傍に原因遺伝子が存在するとわかった。したがって、LSE3変異は1遺伝子の作用に起因する可能性が高いが、その変異は後代の遺伝分離を歪める何らかの作用をもつことが示唆された。

(4) まとめ

以上述べたように、本研究によって葉中デンプン過剰蓄積変異体LSE1が、単子葉植物としては世界で初めてのGWD遺伝子の変異体であることが明らかになり、また葉中デンプンの生理的な意義について新たな知見を得ることが出来た。一方、当初の目的である糖転流に限って言えば、GWDの機能阻害の影響は限定的であった。その点では、他のLSE変異系統がより有望な解析材料であると判断された。本研究期間内ではそれらの原因遺伝子の特定には至らなかったが、今後もさらに研究を進めてまいりたい。

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1件)

① Tatsuro Hirose, Naohiro Aoki, Yusuke Harada, Masaki Okamura, Yoichi Hashida,

Ryu Ohsugi, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika, Tomio Terao Disruption of a rice gene for α -glucan water dikinase, OsGWD1, leads to hyperaccumulation of starch in leaves but exhibits limited effects on growth. *Frontiers in Plant Science*, 査読有, Vol.4, 2013, 143, doi:10.3389/fpls.2013.00147

[学会発表] (計2件)

- ① 廣瀬竜郎、原田祐介、青木直大、大杉立、宮尾安藝雄、廣近洋彦、寺尾富夫 イネ葉中デンプン過剰蓄積変異体の生理機能解析と原因遺伝子の単離 日本作物学会第233回講演会(東京都府中市)、2012年3月30日、講演会要旨・資料集 p167-168
- ② 原田祐介、廣瀬竜郎、寺尾富夫、宮尾安藝雄、廣近洋彦、青木直大、大杉立 イネ葉中デンプン過剰蓄積変異体の生理特性の解析 日本作物学会第231回講演会(神奈川県厚木市)、2011年3月31日、講演会要旨・資料集 p178-179

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 竜郎 (HIROSE TATSURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター作物開発研究領域・主任研究員

研究者番号：90355579

(2) 研究分担者

大杉 立 (OHSUGI RYU)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40343107

青木 直大 (AOKI NAOHIRO)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70466811