

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292009

研究課題名(和文) イネ茎部の非構造的炭水化物組成の遺伝的改変に向けた代謝制御因子の探索

研究課題名(英文) Towards genetic modification of non-structural carbohydrate composition in rice stems: Searching for regulatory factors in starch and sucrose metabolisms

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネの茎部(葉鞘・稈)における非構造的炭水化物(以下NSC；主にデンプンとショ糖)の蓄積量や組成の制御に深く関与する遺伝子の同定を試みた。主な成果として、(1)茎部NSC代謝に関わる遺伝子として、デンプン分解酵素 - アミラーゼBAM2、BAM3、イソアミラーゼISA3、ショ糖分解酵素のINV2を同定した。また、(2)茎部のNSC蓄積量および組成は穂の大きさ(シンク・サイズ)のみによって決定されるものではなく、(3)高NSC品種はそれぞれ特有のNSC蓄積メカニズムを有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we tried to identify genes to control the content and composition of non-structural carbohydrates (NSC; mainly starch and sucrose) in the stem of rice plant. As the main results, (1) we identified genes for carbohydrate-related enzymes that act in rice stems: BAM2 and BAM3 for beta-amylases and ISA3 for isoamylase, both of which are starch degrading enzymes, and INV2 for a vacuolar invertase, a sucrose degrading enzyme. Also, we found that (2) the amount and composition of NSC accumulated in the stems at harvest, cannot necessarily be determined by the size of panicle (sink size), and that (3) in the stems of high-NSC cultivars, there exists peculiar mechanism for accumulating high levels of NSC.

研究分野：作物生産生理学

キーワード：作物(イネ) 茎 非構造的炭水化物 デンプン ショ糖 アイソジーン

1. 研究開始当初の背景

イネはわが国において最も重要な作物であり、また世界的な主要穀物である。地球の人口は2050年には90億人に達すると予想され、それを養うだけの食料の確保が重要な課題である。一方でわが国では、今後人口の減少や高齢化などによる消費の減少により水田における主食用米生産は減少し、余剰水田の一層の増加が予想される。このような余剰水田を有効に活用しつつ、炭素資源の効率的利用を図るために、飼料用イネやバイオエタノール用イネの開発・栽培が進められている。また、世界的にみると、穂を収穫した後の茎葉部(稲藁)は農業残渣として廃棄される場合が多くその量は年間数億トンに上る。したがって、イネの多用途利用を考える上で、茎葉部、特に稲藁の乾物重の約8割を占める茎部(葉鞘および稈)の有効利用は喫緊かつ重要な課題である。

イネは穂(子実)にデンプンを蓄積する一方で、余剰な炭素をデンプンや可溶性糖(主にショ糖、ブドウ糖、果糖)として葉身や茎部に蓄積する。茎葉部に蓄積するデンプンや可溶性糖は非構造的炭水化物(Non-structural carbohydrate, NSC)と総称され、NSCの量や組成は品種または生育段階によって異なることが知られている。茎葉部のNSCの量や組成は、バイオエタノール用イネにおけるアルコール発酵の際の糖化効率や、飼料用イネ、特にホールクロップ・サイレージ用イネの発酵特性や栄養価を左右する。したがって、茎葉部NSCの量や質の遺伝的変化は多用途的利用価値の高い品種の開発・育成における重要なポイントである。しかしながら、現在までのホールクロップ・サイレージ用品種の育種研究は地上部バイオマスの増大に主眼がおかれており、NSCの蓄積量や組成の変化にまで踏み込んだ育種はほとんど行われていない。その背景には、NSCの蓄積量や組成を決める生理機構や、それらの変化に必要な分子マーカーが見つかっていないことがあげられる。

茎葉部におけるデンプンおよび可溶性糖の含有率は、デンプンと可溶性糖の大半を占めるショ糖の分配比によって決まると考えられる。本研究を開始した時点でイネにおけるデンプンやショ糖の合成・分解経路に関する研究は数多くあり、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ(AGP)、ショ糖リン酸合成酵素(SPS)、アミラーゼ(Ramy)など一部の関連酵素についてはアイソジーン(遺伝子ファミリー)の発現特性や生理機能分担についての理解も進みつつあった。しかしながら、それらは子実が中心で、茎部に限ってみるとデンプン・糖代謝に関する研究例は少なく、特にデンプンの分解経路については明らかになっていなかった。また、デンプンと糖の間の分配を制御するメカニズムに関する代謝および分子レベルでの研究例はなかった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて本研究では、イネの茎部におけるデンプン・可溶性糖の合成および分解経路に関わる酵素のアイソジーンを明らかにするとともに、NSCの蓄積量や組成の決定に深く関わる制御因子の探索・同定を目的とした。

3. 研究の方法

供試材料には、標準品種である「日本晴」の他、茎部のNSC含有率やデンプン/可溶性糖比の異なるイネ品種および突然変異系統を用いた。

「たちすずか」: 農研機構・近畿中国四国農業研究センターより分譲された。“極短穂”形質を有する。育成地における早晩性は極晩生。親品種(対照系統)である「クサノホシ」に比べて、収穫期のNSC濃度(特にショ糖濃度)が高い。

「たちあやか」: 農研機構・近畿中国四国農業研究センターより分譲された。“極短穂”形質を有する。育成地における早晩性は中生の早。親品種(対照系統)である「ホシアオバ」に比べて、収穫期のNSC濃度(特にショ糖濃度)が高い。

「リーフスター」: 既に市販されている飼料用水稲品種。草丈が高く分けつが少ない。“極短穂”形質は持たない。育成地(茨城県つくば市)における早晩性は極晩生。親品種(対照系統)である「コシヒカリ」に比べて、収穫期のNSC濃度が高い。可溶性糖濃度も高いが「たちすずか」のレベルには達しない。

「日本晴-極短穂変異体(SP1-K0)」: 農業生物資源研究所より分譲されたTos17レトロトランスポゾン挿入系統。Tos17の挿入によってShortPanic1遺伝子が破壊された系統。“極短穂”形質を有する。早晩性は中生(原品種と同程度)。

これらの品種・系統について、以下のように研究を進めた。

(1) 生育、穂形質、乾物生産・分配などの生理生態的特徴を確認した上で、茎部におけるNSCの蓄積パターンを詳細に解析した。

(2) NSCの合成および分解経路を酵素・遺伝子レベル(酵素活性、アイソジーンの遺伝子発現量)で解析した。青木(代表者)はショ糖合成系、廣瀬(分担者)はショ糖分解系およびデンプン合成系、平野(分担者)はデンプン分解系の酵素・輸送体に着目して研究を進めた。特に着目すべきと判断された遺伝子(候補遺伝子)については適宜、ノックアウト系統(およびそれらの遺伝子相補系統)、RNAi系統または過剰発現系統を作出し、それらの茎部におけるNSC蓄積パターンを中心に解析を行い、候補遺伝子の茎部における機能を検証した。

(3) 茎部における遺伝子発現パターンを網

羅的に解析し、NSC の量や組成の決定に深く関与する制御因子の探索・同定を試みた。

4. 研究成果

本研究で得られた主な成果を以下に列挙する。

(1) 「日本晴」を用いた茎部 NSC 関連酵素のアイソジーン解析から、 α -アミラーゼ遺伝子のうち *BAM2* および *BAM3* が、茎部におけるデンプン分解に関与していることが明らかになった。この成果によって、研究開始時点では不明な点が多かった茎部におけるデンプン分解経路の分子機構の理解が大きく前進したと言える。また、これまで茎葉部では測定が困難であった α -アミラーゼについて信頼度の高いアッセイ系を開発した。このアッセイ系は、今後、イネ以外の植物の茎葉部におけるデンプン蓄積の分子機構を明らかにする上で重要な手法になると思われる。

(2) 茎部で機能する遺伝子として新たに α -アミラーゼのアイソジーンである *BAM5*、デンプンのリン酸化に関わる グルカンホスホリラーゼの *PHO1* および *PHO2*、アミロペクチンの分解に関わるイソアミラーゼの *ISA3*、シヨ糖分解酵素の *INV2* が同定された。これにより、茎部 NSC 代謝の分子機構の理解が進んだと言える。

(3) 「たちすずか」、「たちあやか」と「日本晴 SP1-K0」の NSC 蓄積パターンを比較した結果、穂の大きさ(シンク・サイズ)は茎部の NSC 蓄積量を大きく左右するが、NSC の組成(デンプン/可溶性糖比)特にシヨ糖の含有率の決定にはシンク・サイズ以外の要因が関わることが明らかになった。このことは、「たちすずか」などの高糖性品種は「日本晴」などが持たない茎部特異的なシヨ糖蓄積メカニズムを有することを示しており、今後、高糖性品種を育成する上で重要な知見になる。

(4) 上記の品種の茎部における網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)から、デンプンまたはシヨ糖濃度の決定に深く関与すると思われる代謝酵素遺伝子、および転写因子などの発現制御遺伝子のリストを得た。このリストはイネ茎部における高 NSC 形質や高シヨ糖形質に関与している新規遺伝子を含んでいると考えられ、今後の研究の発展が期待される。

(5) 代表者および分担者がオーガナイザーとなり、他 4 名の研究者を招いて、日本作物学会第 243 回講演会にてミニシンポジウム「イネ茎部で働く遺伝子たち～稲藁の有効利用に向けたデンプン・糖代謝の遺伝的改変～」を開催した(2017 年 3 月 30 日)。平野(分担者)が本研究の成果の一部を発表した他、イネ茎部の NSC 代謝に関わる遺伝子発現制御などの基礎的な研究から、実際の品種育

成にいたるまで多岐にわたる内容であった。イネの多用途利用(イネ茎部の新たな有効利用)という出口を見据えて、それぞれの立場から活発な意見交換がされた様子から、多くの研究者がこの問題に高い関心を持っていることを再認識した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Tatsuro Hirose, Sakurako Kadoya, Yoichi Hashida, Masaki Okamura, Ryu Ohsugi, Naohiro Aoki, Mutation of the *SP1* gene is responsible for the small-panicle trait in the rice cultivar Tachisuzuka, but not necessarily for high sugar content in the stem, *Plant Production Science*, 査読有, Vol.20, 2017, pp.90-94, DOI:10.1080/1343943X.2016.1260484

Tatsuya Hirano, Takayuki Higuchi, Minako Hirano, Yu Sugimura, Hiroyasu Michiyama, Two α -amylase genes, *OsBAM2* and *OsBAM3*, are involved in starch remobilization in rice leaf sheaths, *Plant Production Science*, 査読有, Vol.19, 2016, pp.291-299, DOI:10.1080/1343943X.2016.114008

[学会発表](計 9 件)

平野 達也、杉村 優有、樋口 貴之、イネ葉鞘において出穂期以降のデンプン分解に関与する遺伝子の探索と機能解析、日本作物学会第 243 回講演会、ミニシンポジウム(5)「イネ茎部で働く遺伝子たち」、2017 年 3 月 30 日、東京大学(東京都文京区)

岡村 昌樹、廣瀬 竜郎、橋田 庸一、大杉 立、青木 直大、イネの茎部低デンプン変異体を利用した茎部炭水化物蓄積特性の解明、日本作物学会第 243 回講演会、ミニシンポジウム(5)「イネ茎部で働く遺伝子たち」、2017 年 3 月 30 日、東京大学(東京都文京区)

樋口 貴之、道山 弘康、平野 達也、イネ葉鞘におけるデンプン含量の変化と α -グルカンホスホリラーゼ活性との関係、日本作物学会第 242 回講演会、2016 年 9 月 11 日、龍谷大学(滋賀県大津市)

杉村 優有、平野 美奈子、道山 弘康、深山 浩、平野 達也、 α -アミラーゼ遺伝子、*OsBAM5* の発現抑制システムはイネ葉鞘においてデンプン過剰の表現型を示す、日本作物学会第 240 回講演会、2015 年 9 月 6 日、信州大学(長野県長野市)

橋田 庸一、廣瀬 竜郎、青木 直大、大杉 立、イネのシヨ糖リン酸合成酵素をコードする *OsSPS1* の発現が抑制された変異体の生理学的解析、日本作物学会第 240 回講演会、2015

年 9 月 6 日、信州大学（長野県長野市）

Shamitha Rao Morey, 廣瀬 竜郎, 青木 直大、大杉 立、Characterization of vacuolar invertase genes *OsINV2* and *OsINV3* in rice (*Oryza sativa* L.), 日本作物学会第 240 回講演会、2015 年 9 月 6 日、信州大学（長野県長野市）

杉村 優有、道山 弘康、平野 達也、イネ葉身でのデンプン含量の日変化におけるアミラーゼの関与、日本作物学会第 239 回講演会、2015 年 3 月 27 日、日本大学（神奈川県藤沢市）

太田黒 駿、青木 直大、岡村 昌樹、廣瀬 竜郎、大杉 立、茎部のデンプン合成が抑制されたイネ変異体の糖蓄積に関する研究、日本作物学会第 238 回講演会、2014 年 9 月 10 日、愛媛大学（愛媛県松山市）

辻本 翔大、青木 直大、廣瀬 竜郎、大杉 立、イネにおける *Isoamylase3* の欠損変異体の解析、日本作物学会第 238 回講演会、2014 年 9 月 10 日、愛媛大学（愛媛県松山市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ミニシンポジウム「イネ茎部で働く遺伝子たち～稲藁の有効利用に向けたデンプン・糖代謝の遺伝的改変～」を開催した。日本作物学会第 243 回講演会、2017 年 3 月 30 日、東京大学(東京都文京区) 講演要旨集 pp.245-250、https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jcsproc/243/0/_contents/-char/ja/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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： 7 0 4 6 6 8 1 1

(2) 研究分担者

廣瀬 竜郎 (HIROSE, Tatsuro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術研究機構・中央農業研究センター・上級研究員
研究者番号： 9 0 3 5 5 5 7 9

平野 達也 (HIRANO, Tatsuya)
名城大学・農学部・教授
研究者番号： 3 0 3 1 9 3 1 3