

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02428

研究課題名(和文) 変異体を用いたイネ茎における糖・デンプン蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of sugar and starch accumulation mechanism in rice stems using mutants

研究代表者

大杉 立(OHSUGI, Ryu)

東京農業大学・その他部局等・教授

研究者番号：40343107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：稲わらを家畜飼料やバイオエタノール原料に用いる際に鍵となる「茎部高糖性形質」(茎部におけるショ糖・ブドウ糖・果糖の蓄積能力)に着目して研究を進めた。主要な研究成果は以下の2点である。茎部のデンプン蓄積能を抑制することによって、生育に負の影響を与えずに茎部高糖性を向上させることが可能であることを実証し、既存の飼料用水稲品種に比べて茎部高糖性に優れた系統を育成した。ショ糖分解に関わる液胞型インベルターゼの生理機能解析を通して、この酵素が、イネ体における光合成産物の分配、特に幼穂への分配に深く関与し、穎果のサイズを決める重要な因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、生育や子実収量に負の影響を与えずにイネ茎部の糖質及び脂質の組成や蓄積量を改変することが可能であることが、モデル品種「日本晴」のみならず実用品種「リーフスター」や「たちすずか」で実証された。これらの実用品種は既存品種のなかでは比較的ショ糖を高蓄積することが知られているが、これらを超える「高糖性」系統の作出に成功したことは、今後の飼料・エネルギー用新品種の育種を大きく前進させ、稲藁や水田の有効利用、再生可能エネルギーの供給向上への貢献が期待される。また、ショ糖の分解に関わる酵素がイネの子実サイズの決定に深く関与することが示されたことは、今後の多収品種育成に資する重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focused on a 'high stem-sugar trait' (ability to accumulate sucrose, glucose and fructose in the stem), which is the key to using rice straw as livestock feed and bioethanol feedstock. The two main results are as follows. (1) We demonstrated that the high stem-sugar trait can be improved by inhibiting the starch accumulation in the stems, without negative effects on growth, and then established several lines that is superior to existing forage rice varieties with regard to the trait. (2) Through biochemical and physiological analyses on vacuolar invertase, which is involved in sucrose degradation, we have shown that this enzyme is an important factor in controlling the distribution of photosynthetic products in the rice plant, especially to the young panicles, to determine the size of grain.

研究分野：作物分子生理学

キーワード：ショ糖代謝 イネの多用途利用 イネ茎部 突然変異体 ショ糖転流

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炭素資源の効率的利用による低炭素社会の実現および原発依存度を下げた代替エネルギー供給力の増強に向けて、サトウキビ、スイートソルガム、トウモロコシなどを利用したバイオエネルギーが再生可能エネルギーとして注目されている。一方、今後人口の減少・高齢化などによるコメ消費の減少でわが国の水田における食用イネ生産は更に減少し、一層の余剰水田の増加が予想されている。余剰水田を有効活用し、炭素資源の効率的利用を図るためには、水田に適応しているイネの多用途利用(バイオエタノール用、飼料用)が最善策であり、現在、そのための品種改良と栽培の拡大が進められている。

しかしながら、バイオエタノールの原料となるセルロースやデンプンはアルコール発酵に利用できる糖に変換するコストがかかり、一部利用されている稲わらも同様である。また、飼料であるホールクロップサイレージ(WCS)用イネにおいては、好適な発酵特性や栄養価の面でショ糖や単糖などの含有率が高いことが望ましい。このような観点から、茎葉部のバイオマスが多く、かつ、糖含有率が高いイネがこれらの用途の素材としての利用価値が高い。

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類(ショ糖、ブドウ糖、果糖)からなる非構造性炭水化物(NSC)として葉や茎部(葉鞘および稈)に蓄積する。このため、茎葉部NSCの遺伝的改変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WCS用品種の育種研究は地上部バイオマスの増大に主眼が置かれており、NSCの蓄積量やデンプン・糖類の組成の改変にまで踏み込んだ育種は行われていない。その背景にはNSCの蓄積や組成を決める生理機構や、それらの改変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た。

デンプンや糖の合成・分解は植物体のどの部位でも起こる生化学的現象であるが、当研究グループによる長年の研究成果から、「デンプン・糖の量や組成を、茎部と穂(胚乳)で独立に制御できる」可能性が示されていた。本研究は、この独自のアイデアに基づいて提案された。

### 2. 研究の目的

イネのバイオエタノール用、飼料用など多用途利用を大きく前進させるために、本研究では、イネの茎部のショ糖の代謝・蓄積機構を解明し、ショ糖の高蓄積に関わる鍵因子を特定するとともに、イネの多用途利用に資する遺伝資源を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、イネ茎部におけるNSCの合成・分配・蓄積に関する突然変異体を水田圃場にて栽培し、出穂期以降の茎部におけるデンプンおよび可溶性糖の蓄積パターンを中心に解析した。

#### (1) イネ茎葉部におけるショ糖代謝・転流機構の解明

イネの液胞型インベルターゼのアイソジーン(*OsINV2*および*OsINV3*)について、発現パターンを明らかにするとともに、遺伝子破壊系統(*INV2-KO*および*INV3-KO*)の生育、バイオマス生産、収量構成要素、茎葉部のショ糖、デンプンおよび関連代謝産物量を野生型と比較した。

新規の糖転流関連遺伝子を探索するため、転流機能の抑制に起因すると推測される葉中デンプン過剰蓄積変異体(LSE変異体)について、遺伝子マッピング等による原因遺伝子の同定を試みた。

#### (2) イネ茎部におけるデンプン・ショ糖の分配および蓄積機構の解明

既存の茎部高デンプン性飼料稲品種「リーフスター」もしくは茎部高糖性飼料稲品種「たちすずか」(Hashida et al. 2018)に対して、*OsAGPL1*遺伝子の機能欠損により茎部にデンプンをほとんど蓄積しない「日本晴」変異系統(*AGPL1-KO*; Okamura et al. 2013)を交配し、さらにそれぞれの親となった飼料稲品種を戻し交配した後代(BC1F2、F3、F4)を圃場展開し、*OsAGPL1*の遺伝子型と収穫期の茎部における糖・デンプン含量との関係を調べた。

*AGPL1-KO*と少分げつ性変異系統STN1(原品種:日本晴)との交配に由来する自殖後代系統からSTN1x*AGPL1-KO*個体を選抜し、茎部におけるデンプン・ショ糖の蓄積パターンを解析した。

#### (3) イネ茎中ショ糖蓄積変異体を用いた高糖性に関わる新規遺伝子の探索

エチルメタンスルホン酸処理によって突然変異を誘発した水稻品種「日本晴」の突然変異系統(M1世代)を水田圃場にて栽培し、茎部(葉鞘+稈)の搾汁液糖度(BRIX値)を指標にして「高ショ糖蓄積変異体」の選抜をした(Okamura et al. 2016)。

### 4. 研究成果

上記3課題から得られた成果は、それぞれ以下のように要約される。

#### (1) イネ茎葉部におけるショ糖代謝・転流機構の解明

液胞型インベルターゼ・アイソジーンの「日本晴」遺伝子破壊系統 (INV2-K0, INV3-K0) を多面的に解析した結果、両 K0 系統ともに収穫期の茎葉乾物重は野生型と同程度であった一方で、INV3-K0 でのみ穎花サイズ (長さ・幅) および粒重が小さくなることが明らかとなった (Morey et al. 2018, 2019)。また、播種後 2~3 週の幼植物の根系を解析したところ、INV3-K0 では野生型に比べて根の乾物重が有意に低下すること、および側根と根端のスクロース濃度が野生型に比べ大幅に増加する一方で、単糖 (ブドウ糖と果糖の和) 濃度は優位に減少することが明らかとなった。

INV2-K0 では、圃場試験において茎部の可溶性糖濃度が野生型に比べて高くなることが示されたため、INV2-K0 に野生型の INV2 遺伝子を導入した相補系統を作成し、P1 温室内のポット試験にて解析を進めたが、表現型の回復はみとめられなかった (Morey et al. 2019)。

以上のことから、液胞型インベルターゼが茎部における NSC 蓄積に果たす役割は限定的であるが、2 つの液胞型インベルターゼ遺伝子のうち *OsINV3* は、光合成産物の分配、特に幼穂への分配を制御し、穎果のシンク・サイズを決める重要な因子であると言える。

葉中デンプン過剰蓄積を示す LSE 変異体のうち、転流経路が阻害されていると予想されている LSE2 および LSE3 変異体 (Liang et al. 2016) について遺伝子マッピングおよび候補領域の DNA 配列の解析を進めた結果、それぞれの原因遺伝子を第 5 染および第 11 染色体上の一遺伝子に絞り込むことに成功した。

## (2) イネ茎部におけるデンプン・ショ糖の分配および蓄積機構の解明

「リーフスター」と AGPL1-K0 との交配に由来する戻し交雑系統 (LSL-BC1F2, F3, F4) および「たちすずか」と AGPL1-K0 との交配に由来する戻し交雑系統 (TSL-BC1F2, F3, F4) について、茎葉部におけるデンプン・ショ糖の蓄積パターンを親系統と比較した。その結果、親品種の如何に関わらず AGPL1 機能欠損個体では茎部デンプン含量がほぼゼロになるとともに、可溶性糖は正常型個体やヘテロ個体に比べて 2 倍程度に増加することが明らかとなった。したがって、*OsAGPL1* 遺伝子の機能欠損に起因する茎部高糖性形質の遺伝性が確認され、この形質が固定されたと考えられる系統が複数得られた。また、AGPL1 機能欠損個体では茎中の粗脂肪含有率が有意に増加することが明らかとなった。

「日本晴」少分げつ性変異系統 (STN1) と上記 AGPL1-K0 系統との交配後代 (F2) から STN1/AGPL1-K0 変異体 6 個体および STN1/AGPL1-WT 変異体 4 個体を選抜し、両者について収穫期の茎部における可溶性糖濃度を比較したところ、前者において可溶性糖濃度が高くなる傾向がみとめられたが、いずれの K0 個体も矮性であった。矮化の原因は未だ不明であるが、茎葉部におけるデンプン合成の抑制が成長に負の影響を及ぼす可能性があること示しており、今後の茎部高糖性品種の育成を考える上で重要な知見であると考えられる。

## (3) イネ茎中ショ糖蓄積変異体を用いた高糖性に関わる新規遺伝子の探索

「日本晴」突然変異系統 (M1 世代) 5000 個体から、出穂期以降の茎部の糖濃度 (搾汁液の BRIX 値) が野生型よりも高い「茎部高糖性形質」を有する 7 系統を選抜した。これらの自殖後代および一部の戻し交配系統 (BC1F3) について同様の解析を試みたところ、茎部高糖性形質は受け継がれていた一方で、いずれの系統についても著しい不稔が生じた。茎部における高糖性と不稔との因果関係は未だ不明であるが、用いる親系統によっては茎部高糖性形質が稔実率に負の影響を及ぼす可能性があること示しており、今後の茎部高糖性品種の育成を考える上で重要な知見であると考えられる。

## < 引用文献 >

- Hashida et al. (2018) *Plant Production Science* 21: 233-243.
- Liang et al. (2014) *Rice* 7: 32.
- Morey et al. (2018) *Rice* 11: 6.
- Morey et al. (2019) *Functional Plant Biology* 46: 777-785.
- Okamura et al. (2013) *Functional Plant Biology* 40: 1137-1146.
- Okamura et al. (2016) *Plant Production Science* 19: 309-314.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morey Shamitha R., Hirose Tatsuuro, Hashida Yoichi, Miyao Akio, Hirochika Hirohiko, Ohsugi Ryu, Yamagishi Junko, Aoki Naohiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Characterisation of a rice vacuolar invertase isoform, OsINV2, for growth and yield-related traits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Functional Plant Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1071/FP18291">https://doi.org/10.1071/FP18291</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morey SR, Hirose T, Hashida Y, Miyao A, Hirochika H, Ohsugi R, Yamagishi J, Aoki N	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic evidence for the role of a rice vacuolar invertase as a molecular sink strength determinant.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12284-018-0201-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura M, Hashida, Y, Hirose T, Ohsugi R, Aoki N	4. 巻 19
2. 論文標題 A simple method for squeezing juice from rice stems and its use in the high-throughput analysis of sugar content in rice stems	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Prod. Sci.	6. 最初と最後の頁 309,314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1343943X.2015.1128099	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 -
1. 著者名 Okamura M, Hirose T, Hashida Y, Ohsugi R, Aoki N	4. 巻 20
2. 論文標題 Suppression of starch accumulation in 'sugar leaves' of rice affects plant productivity under field conditions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Prod. Sci.	6. 最初と最後の頁 102,110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1343943X.2016.1259958	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 -

1. 著者名 Okamura M, Hashida, Y, Hirose T, Ohsugi R, Aoki N	4. 巻 19
2. 論文標題 A simple method for squeezing juice from rice stems and its use in the high-throughput analysis of sugar content in rice stems.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Prod. Sci.	6. 最初と最後の頁 1,6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2015.1128099.	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Morey SR, Hirose T, Ohsugi R, Yamagishi J, Aoki N
2. 発表標題 Role of a vacuolar invertase, OsINV3, in grain size determination of rice ( <i>Oryza sativa</i> L.).
3. 学会等名 日本作物学会第244回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shamitha Rao Morey, Tatsuro Hirose, Naohiro Aoki, Ryu Ohsugi
2. 発表標題 Characterization of vacuolar invertase genes OsINV2 and OsINV3 in rice ( <i>Oryza sativa</i> L.)
3. 学会等名 日本作物学会第240回講演会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 谷本 怜、廣瀬 竜郎、大杉 立、青木 直大
2. 発表標題 イネの葉中デンプン過剰蓄積変異体Ise3の生理生態的特性
3. 学会等名 日本作物学会第241回講演会
4. 発表年 2016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	青木 直大  (Aoki Naohiro)  (70466811)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授   (12601)	
研究 分担 者	廣瀬 竜郎  (Hirose Tatsuro)  (90355579)	高崎健康福祉大学・農学部・教授   (32305)	