

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07276

研究課題名(和文) イネ茎葉部におけるデンプン分解制御に関わる遺伝子の機能およびその品種間差異の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of the genes involved in starch degradation in rice leaves and stems and their varietal differences.

研究代表者

平野 達也 (Hirano, Tatsuya)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：30319313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネ茎葉部に出穂期までに蓄積されたデンプンは出穂後に分解され、登熟に利用される。本研究では、 α -アミラーゼアイソジーンであるOsBAM2とOsBAM3両遺伝子の発現抑制により、出穂後の葉鞘でのデンプン含量低下が抑制されることがわかった。別のアイソジーンのOsBAM5はプラスチド局在型アイソフォームをコードし、その発現抑制は出穂後の葉鞘で過剰なデンプン蓄積をもたらした。また、上記3つのアイソジーンに関する三重発現抑制システムを作出した。さらに、超多収品種タカナリの葉鞘において発現レベルが高い α -アミラーゼアイソジーンであるRAmy2Aの発現抑制システムを、タカナリを原品種として作出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Starch accumulated in rice stems and leaves before heading is degraded at the post-heading stage and utilized for the grain filling. In the present study, the repressed expression of both OsBAM2 and OsBAM3 encoding the α -amylase isoforms inhibited the decrease in starch content in the leaf sheaths at the post-heading stage. The transient expression of chimeric protein with GFP indicated that the other α -amylase isogene, OsBAM5, encode plastid-targeted protein. In addition, the repression of OsBAM5 expression caused excess accumulation of starch in the leaf sheaths after heading. Triple knockdown lines for OsBAM2, OsBAM3 and OsBAM5 were generated in Nipponbare. Furthermore, the knockdown lines of RAmy2A, an α -amylase isogene, which is highly expressed in the leaf sheaths of high yield variety Takanari, were successfully generated in Takanari.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 葉鞘 デンプン分解 α -アミラーゼ α -アミラーゼ

1. 研究開始当初の背景

イネの食料としての需要増加や食用以外への用途拡大により、様々な多収イネ品種が日本を含めて世界中で育成されている。それらの多くはシンクである穂のサイズ、つまり一穂穎花数が大きく増加した品種であるため、増大したシンクを十分に満たすためには、通常の品種以上に多くの同化産物が登熟のために供給されなければならない。よって、潜在的な多収品種における収量を安定させるためには、増加したシンクサイズに対応できるだけのソース機能の増強が不可欠である。

イネ穎果の登熟におけるソースとしては、出穂後の葉身において新たに同化された炭水化物と、出穂期までに稈や葉鞘に蓄積されたデンプンなどの非構造的炭水化物 (Non-Structural Carbohydrate; NSC) の2つがある。そのうち後者は登熟穎果中に貯蔵された炭水化物の約30%の供給源となり¹⁾、その供給が不足すると登熟歩合の悪化をもたらす場合があると指摘されている²⁾。以上のことから、稈および葉鞘におけるNSCのほとんどを占めるデンプンの出穂期までの蓄積量を増加させること、ならびに出穂後の稈および葉鞘におけるデンプン分解とそれに続く糖転流活性を増加させることが、登熟に必要なソース機能を増強するために必要な課題として考えられる。このうち、稈や葉鞘におけるデンプン蓄積に関する生理生化学的な研究は比較的多く実施されており、デンプン合成に関与する酵素のアイソジーンが詳細に明らかにされている³⁾。しかし、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解過程に関連する研究は非常に少なく、その過程に関与するアイソジーンはまだほとんど明らかにされていない。

モデル植物であるシロイヌナズナでは、葉におけるデンプン分解に α -アミラーゼが重要な役割を担っていることが報告されている⁴⁾。そこで、私は、出穂後のイネ葉鞘でのデンプン分解における α -アミラーゼの役割を明らかにすることを目的として研究を進め、イネゲノム上にアノテーションされている9つの α -アミラーゼと予想される遺伝子のうち、少なくとも*OsBAM2*および*OsBAM3*遺伝子がコードするアイソフォームはともにプラスチドに局在し、それらの大腸菌組換えタンパク質は実際に α -アミラーゼ活性を有することを明らかにした⁵⁾。さらに*OsBAM2*と*OsBAM3*の機能解析を進めるため、それぞれの過剰発現系統と発現抑制系統を作出し、その表現型解析を進めてきた。その結果、*OsBAM2*もしくは*OsBAM3*の過剰発現系統では出穂期における葉鞘のデンプン蓄積量が非形質転換体と比較して著しく低下すること、一方で、*OsBAM2*もしくは*OsBAM3*の発現抑制系統における葉鞘のデンプン含量には非形質転換体と比べて大きな違いがないことを明らかにした⁶⁾。また、種子発芽時の胚乳でのデンプ

ン分解における機能が詳細に解析されている α -アミラーゼの葉鞘における遺伝子発現を調査し、 α -アミラーゼアイソジーンのひとつである*RAmy2A*の発現が出穂後の葉鞘において増加し、特にその程度は超多収品種のタカナリにおいて顕著であることを明らかにしている⁷⁾。

2. 研究の目的

以上のような背景と成果から、出穂後のイネ茎葉部におけるデンプン分解には*OsBAM2*や*OsBAM3*をはじめとするいくつかの α -アミラーゼ遺伝子が関与すると考えられるが、それらが協調的に作用してデンプン分解を制御している可能性が示唆される。また、日本晴とタカナリなど、品種の違いによってデンプン分解の制御機構が異なることも予想される。そこで本課題では、イネ茎葉部におけるデンプン分解の仕組みとその品種間における多様性を明らかにするため、葉鞘において発現レベルが高い*OsBAM2*、*OsBAM3*および*OsBAM5*に関して複数の遺伝子が同時に発現抑制された系統の作出を進め、それらの表現型を解析する。また、*OsBAM2*と*OsBAM3*の両アイソフォームはプラスチド局在であることを明らかにしているが、それ以外の α -アミラーゼアイソフォームに関して細胞内局在性を調査する。さらに、インド型超多収品種のタカナリでは、前述のように*RAmy2A*の発現レベルが出穂後の葉鞘で顕著に増加することから、*RAmy2A*がタカナリ葉鞘におけるデンプン分解に果たす役割を解明するため、タカナリを原品種とした*RAmy2A*発現抑制系統の作出を目指す。

3. 研究の方法

(1) *OsBAM5*の発現抑制が葉鞘のデンプン含量に及ぼす影響の解析

RNAi法によってすでに作出済みである*OsBAM5*発現抑制系統(*BAM5* KD #3-1と#3-3)を閉鎖系グロースチャンバーで生育させ、止葉展開期、出穂7日後および出穂21日後に主稈の第3葉鞘および第4節間を採取した。採取した葉鞘と節間におけるデンプン含量を解析し、さらにそれらから調製した全RNAをもとに合成したcDNAを鋳型として、*OsBAM5* mRNA量を定量RT-PCRにより解析した。

(2) *OsBAM2*および*OsBAM3*二重発現抑制系統における表現型解析

RNAi法によってすでに作出済みである*OsBAM2*・*OsBAM3*発現抑制系統(*BAM2&3* KD #1-1と#1-3)を閉鎖系グロースチャンバーで生育させ、止葉展開期、出穂7日後および出穂21日後に主稈の第3葉鞘および第4節間を採取した。採取した葉鞘と節間におけるデンプン含量を解析し、さらにそれらから調製した全RNAをもとに合成したcDNAを鋳型として、*OsBAM2*と*OsBAM3* mRNA量を定量RT-PCRにより解析した。

(3) *OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* 三重発現抑制系統、ならびに *OsBAM2* および *OsBAM5* 二重発現抑制系統の作出

イネにおける RNAi 誘導用バイナリーベクターである pANDA vector⁸⁾に *OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* の RNAi を誘発するトリガー配列を並列させて組み込んだ pANDA-BAM2・3・5 vector を構築した。また、同じく *OsBAM2* と *OsBAM5* のトリガー配列を並列させて組み込んだ pANDA-BAM2・5 vector を構築した。

Agrobacterium tumefaciens EHA105 株もしくは LBA4404 株に上記の構築したベクターを導入し、イネ(品種:日本晴)の種子胚盤から誘導したカルスにその *Agrobacterium* を感染させることで形質転換を行った。カルスはハイグロマイシンを含む選択培地上で育成し、耐性カルスから再分化を誘導して、ベクターが導入された T0 世代の形質転換体を得た。なお、再分化個体から調製したゲノム DNA を鋳型として、選択マーカー遺伝子と RNAi トリガーのリンカー配列に特異的なプライマーを用いた PCR によりベクターの導入を確認した。

ベクターの導入が確認できた T0 世代の形質転換体を閉鎖系グロースチャンバーで育成し、出穂・登熟後の T1 種子を収穫した。さらに T1 種子を系統ごとにハイグロマイシンを含む MS 培地で生育させ、耐性個体を閉鎖系グロースチャンバーで育成して、出穂期に止葉の一つ下の第 2 葉身を採取した。採取した葉身から調製した全 RNA をもとに合成した cDNA を鋳型として RT-PCR により *OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* の転写レベルを解析した。

(4) *OsBAM5* および *OsBAM9* の細胞内局在性の解析

OsBAM2 と *OsBAM3* 以外に葉鞘において発現レベルが高い *OsBAM5* と *OsBAM9* がコードする各アイソフォームの細胞内局在性を明らかにするため、それぞれの推定アミノ酸配列の全長 545 および 525 アミノ酸残基のうち、それぞれ N 末端側から 502 および 524 アミノ酸残基に相当する cDNA 配列を PCR により増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) により GFP 発現ベクター⁹⁾に挿入して、sGFP がそれぞれの C 末端側に連結されたキメラタンパク質発現用の *OsBAM5*-sGFP ならびに *OsBAM9*-sGFP ベクターを構築した。構築したベクターをパーティクルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入し、蛍光顕微鏡により一過的な GFP の発現を観察した。なお、プラスチド局在のポジティブコントロールとして、AtrecA-DsRed¹⁰⁾ もまた上記ベクターと同時にタマネギ表皮細胞に導入した。

(5) タカナリを原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統の作出

RAmy2A の RNAi 誘導による発現抑制用ベク

ターである pANDA-*RAmy2A* vector が導入された *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を、N6D 培地上に無菌播種して 10 日間経過したタカナリ種子に感染させることで形質転換を行った。*Agrobacterium* の除菌と同時にカルスを誘導し、糖類としてマルトースを加えたハイグロマイシンを含む選択培地上で耐性カルスを選抜して、さらに再分化を誘導して、ベクターが導入された T0 世代の形質転換体を得た。

4. 研究成果

(1) *OsBAM5* の発現抑制が葉鞘のデンプン含量に及ぼす影響の解析

BAM5 KD #3-1 と #3-3 とともに、出穂 7 日後の第 3 葉鞘における *OsBAM5* mRNA 量は、日本晴の非形質転換体 (WT) と比べて、約 20% 程度にまで低下していた。よって、これら 2 つの系統では、RNAi の効果により *OsBAM5* の発現レベルが大きく低下していることが確認できた。第 3 葉鞘および第 4 節間におけるデンプン含量は、止葉展開期から出穂 7 日後にかけてすべての系統で増加し、また系統間の有意差は認められなかった。しかし、出穂 21 日後では、WT のデンプン含量は出穂 7 日後よりも大きく低下したのに対して、*BAM5* KD #3-1 と #3-3 のデンプン含量はほとんど変化せず、WT よりも有意に多かった。以上の結果から、*OsBAM5* は出穂期以降の葉鞘と節間におけるデンプン分解において重要な役割を担っていることが明らかになった。

(2) *OsBAM2* および *OsBAM3* 二重発現抑制系統における表現型解析

BAM2&3 KD #1-1 と #1-3 の両系統では、WT と比較して、出穂 7 日後の第 3 葉鞘における *OsBAM2* と *OsBAM3* mRNA 量が著しく低下していた。そこで、第 3 葉鞘と第 4 節間のデンプン含量を解析した結果、第 3 葉鞘において、出穂 7 日後のデンプン含量には系統間で有意差がなかったが、出穂 21 日後では *BAM2&3* KD #1-1 と #1-3 のデンプン含量が WT よりも有意に多かった。また、第 4 節間では、出穂 7 日後の *BAM2&3* KD #1-1 と #1-3 のデンプン含量は WT よりも多い傾向にあり、さらに出穂 21 日後では *BAM2&3* KD #1-1 と #1-3 のデンプン含量が WT よりも有意に多かった。一方で、*OsBAM2* もしくは *OsBAM3* 単独の発現抑制では、出穂後の葉鞘におけるデンプン含量には WT と比べて有意差が認められないことが明らかになっている⁶⁾。従って、*OsBAM2* と *OsBAM3* 両遺伝子の発現が低下することにより、出穂後の葉鞘および節間におけるデンプン分解が抑制され、デンプン含量の低下が遅延すると考えられた。

(3) *OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* 三重発現抑制系統、ならびに *OsBAM2* および *OsBAM5* 二重発現抑制系統の作出

ベクターの導入が確認できた *BAM2&3&5* KD

の 12 系統から得られた T1 種子を、ハイグロマイシンを含む MS 培地に播種し、耐性個体を生育させ、実際に *OsBAM2*, *OsBAM3* および *OsBAM5* の発現が RNAi により抑制されているかどうかを確認した。その結果、3 つの遺伝子すべての mRNA 量が顕著に低下していた系統として、5 つの系統が得られた。それらの T2 種子はすでに採種済みである。

BAM2&5 KD 系統に関しては、ベクターの導入が確認された 11 系統から T1 種子を採種し、ハイグロマイシンを含む MS 培地にそれらを播種して、耐性個体を生育させた。穂孕期に止葉の一つ下の葉身を採取し、さらに T2 種子を収穫済みであるため、今後は実際に *OsBAM2* と *OsBAM5* の発現が低下しているかどうかを確認し、表現型解析を行う予定である。

(4) *OsBAM5* および *OsBAM9* の細胞内局在性の解析

OsBAM5-sGFP ならびに *OsBAM9*-sGFP の融合タンパク質発現ベクターをパーティクルガンによりタマネギ表皮細胞に導入した結果、sGFP に基づく蛍光が葉緑体において観察された。よって、*OsBAM5* および *OsBAM9* はともに、*OsBAM2* と *OsBAM3* と同様に、プラスチド局在型アイソフォームをコードしていることが明らかになった。

(5) タカナリを原品種とした *RAmy2A* 発現抑制系統の作出

タカナリはインド型品種であることから、インド型品種に対して行われている形質転換法を参考に、*RAmy2A* に関する RNAi 誘導ベクターを導入し、形質転換を試みた。しかし、カルスの増殖効率および再分化率が非常に低く、形質転換体がほとんど得られなかった。そこで、アグロバクテリウムの感染方法、ならびに培地成分組成や再分化の手順を様々な検討し、最終的には形質転換効率を向上させることができた。

RAmy2A に関する RNAi 誘導ベクターの導入が確認できた再分化個体をポットで生育させ、13 系統の T1 種子を採種した。そのうち 6 系統に関して T1 植物体を育成し、出穂後の葉鞘における *RAmy2A* の発現レベルを解析した結果、2 系統において *RAmy2A* の発現が非形質転換体よりも低下していた。続いて、それらの表現型解析を T2 世代において試みたが、T2 植物体の出穂後の葉鞘では、*RAmy2A* の発現レベルが低下していなかった。そこで、最初に得られた 13 系統のうち、解析に供しなかった残りの 7 系統の T1 植物体を育成し、同様に *RAmy2A* の発現低下が認められた 2 系統を用いて表現型解析を行った。その結果、これら 2 系統では T2 植物体の葉鞘においても *RAmy2A* の発現低下が認められた。

<引用文献>

1) Cock, J.H. and Yoshida, S. (1972) Accumulation of ¹⁴C-labelled carbohydrate

before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. Jpn. J. Crop Sci. 41: 226-234.

2) 翁仁憲ら (1982) 水稻の子実生産に関する物質生産的研究。第 1 報 出穂期前に貯蔵された炭水化物および出穂後の乾物生産が子実生産に及ぼす影響。日作紀 51: 500-509。

3) Hirose, T. et al. (2006) Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. Physiol. Plant. 128: 425-435.

4) Fulton, D.C. et al. (2008) -amylase4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. Plant Cell 20: 1040-1058.

5) Hirano et al. (2011) Identification of two plastid-targeted -amylases in rice. Plant Prod. Sci. 14: 318-324.

6) Hirano, T. et al. (2016) Two -amylase genes, *OsBAM2* and *OsBAM3*, are involved in starch remobilization in rice leaf sheaths. Plant Prod. Sci. 19: 291-299.

7) Sugimura, Y. et al. (2015) Involvement of -amylase genes in starch degradation in rice leaf sheath at the post-heading stage. Plant Prod. Sci. 18: 277-283.

8) Miki, D. and Shimamoto, K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. Plant Cell Physiol. 45: 490-495.

9) Chiu, W. et al. (1996) Engineering GFP as a vital reporter in plants. Curr. Biol. 6: 325-330.

10) Imaizumi-Anraku, H. et al. (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. Nature 433: 527-531.

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 3 件)

1) Hirano, T., Higuchi, T., Hirano, M., Sugimura, Y. and Michiyama, H. (2016) Two -amylase genes, *OsBAM2* and *OsBAM3*, are involved in starch remobilization in rice leaf sheaths. Plant Prod. Sci. 19: 291-299. DOI:10.1080/1343943X.2016.1140008 (査読

あり)

2) 杉村優有・平野美奈子・道山弘康・平野達也(2016) -アミラーゼ遺伝子: *OsBAM5* の発現抑制がイネ幼植物体の生長およびデンプン含量に及ぼす影響. 名城大農学報 52: 1-9. (査読あり)

3) Sugimura, Y., Michiyama, H. and Hirano, T. (2015) Involvement of α -amylase genes in starch degradation in rice leaf sheath at the post-heading stage. Plant Prod. Sci. 18: 277-283. (査読あり)

[学会発表](計3件)

1) 平野達也・杉村優有・樋口貴之(2017) イネ葉鞘において出穂期以降のデンプン分解に關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「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～」, 平成29年3月30日、東京。(招待講演)

2) 樋口貴之・道山弘康・平野達也(2016) 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關係. 日本作物学会第242回講演会、平成28年9月11日、大津.

3) 杉村優有・平野美奈子・道山弘康・深山浩・平野達也(2015) -アミラーゼ遺伝子、*OsBAM5* の発現抑制系統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、平成27年9月6日、長野.

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 達也 (HIRANO, Tatsuya)

名城大学・農学部・教授

研究者番号: 30319313

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

なし