

平成30年4月6日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07279

研究課題名（和文）米品質を制御する α -アミラーゼ遺伝子およびその転写調節因子の特定

研究課題名（英文）Characterization of rice alpha-amylase genes governing grain quality and screening for transcription factors regulating their expression.

研究代表者

山川 博幹（Yamakawa, Hiromoto）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：10370537

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：登熟期の高温が米の外観品質を損ねるイネ高温登熟障害では、高温に遭遇した登熟途中種子の胚乳で α -アミラーゼAmy1A、Amy3C、およびAmy3D遺伝子が発現し、蓄積したデンプンを糖に分解することで、乳白粒の発生が助長される。また、転写調節因子bZIP61は、Amy3Cプロモーターの胚乳発現を規定するシス領域に結合し、その過剰発現によって乳白粒を生じたことから、米品質を制御する新規の転写調節因子と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Exposure of ripening rice caryopses to high temperature impairs their grain filling and produces low-quality chalky grains through imperfect filling with storage starch. Spatial expression pattern of starch-lytic α -amylase genes in the developing seeds as well as changes in grain appearance by ectopic overexpression of each of the genes revealed that expression of Amy1A, Amy3C and Amy3D was induced in the developing endosperm by the elevated temperature and that those isoforms degraded storage starch to produce the chalky grains. Screening of a yeast one-hybrid library consisting of rice transcription factors with a cis region in the Amy3C promoter identified bZIP61 as a candidate in regulation of its expression. Since overexpression of bZIP61 generated chalky grains, it would be a novel gene controlling grain quality.

研究分野：米の品質に関わる遺伝子の機能解明と品質改変のためのイネ育種素材開発

キーワード：イネ 高温登熟 乳白粒 胚乳 α -アミラーゼ プロモーター 転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の温暖化によって、わが国の水稻生産では高温登熟障害が問題となっており、生産現場ではその解決が望まれている。登熟期に高温に遭遇すると、胚乳部分が白く濁って見える乳白粒が多く発生し、検査等級が低下するため、その発生要因の究明が求められている。

(2) 胚乳の白濁化は高温で胚乳デンプンの充填が不十分となることが原因であり、デンプン分解酵素 α -アミラーゼが高温で活性化されることが、デンプン蓄積を妨げる一因と考えられている。これまでに、イネの8個の α -アミラーゼ遺伝子の発現を一斉に抑制することで、乳白粒の発生が低減することが明らかにされたが (Hakata *et al.*, 2012)、それらのうち、いずれの遺伝子が胚乳の白濁化に関わっているかは、不明である。

2. 研究の目的

(1) イネの各々の α -アミラーゼ遺伝子の登熟期種子での発現部位と、登熟期胚乳での発現が玄米の外観品質に及ぼす影響を個別に調べることで、登熟期の高温による乳白粒の発生に関与する α -アミラーゼ遺伝子を特定する。

(2) 乳白粒の発生に関与する α -アミラーゼ遺伝子の転写調節因子を特定し、胚乳組織における発現誘導機構を解明することで、高温登熟耐性イネ開発のための基盤的知見を収集する。

3. 研究の方法

(1) α -アミラーゼ遺伝子胚乳過剰発現イネの解析：イネゲノムに存在する8個の α -アミラーゼ遺伝子 (*Amy1A*, *Amy1C*, *Amy2A*, *Amy3A*, *Amy3B*, *Amy3C*, *Amy3D*, および *Amy3E*) をそれぞれ胚乳貯蔵タンパク質 10kD プロラミン遺伝子プロモーターに連結したキメラ遺伝子をイネカルスに導入し、胚乳特異的発現過剰組換えイネを作出した。形質転換当代および次世代以降で登熟期種子における導入遺伝子発現と α -アミラーゼ活性を調査するとともに、完熟玄米の外観およびデンプン粒形態を観察した。

(2) α -アミラーゼ遺伝子プロモーターレポーター遺伝子導入イネの解析：各 α -アミラーゼ遺伝子について翻訳開始点より上流の2kbのプロモーター領域を取得し、それぞれに β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入した組換えイネを作出した。形質転換当代および次世代以降で登熟期種子における発現部位を組織化学染色で調査した。

(3) 登熟期胚乳での発現を規定するプロモーター *cis* 領域の特定：*Amy1A*, *Amy3C*, およ

び *Amy3D* について、それぞれプロモーター領域を5'上流側より200bpずつ短縮した、-1,000bp、-800bp、-600bp、-400bp、-200bpプロモーター-*GUS* レポーター遺伝子を作成し、(2)と同様にイネへ導入して登熟期胚乳等の各組織におけるプロモーター活性の有無を評価した。

(4) 酵母ワンハイブリッドスクリーニングによる α -アミラーゼ遺伝子プロモーター結合転写調節因子の特定：*Amy1A* (-200~0bp)、*Amy3C* (-200~0bp)、および *Amy3D* (-600~-400bp) の *cis* 領域をそれぞれ連結した bait ベクターを用いて、産業技術総合研究所で整備されたイネ転写調節因子ライブラリー (Mitsuda *et al.*, 2010) を prey として酵母ワンハイブリッドスクリーニングを行い、胚乳発現 *cis* 領域に結合する転写調節因子遺伝子を探索した。

(5) 転写調節因子の機能検証：登熟期の胚乳で発現が認められる転写調節因子遺伝子 (*IDEF1*, *LFL1*, *bZIP81*, *bZIP30*, *bZIP61*, *NAC37*, *PCF6*, *Trihelix*, および *Zz*) について、過剰発現イネを作出し、玄米外観を観察するとともに、登熟期胚乳における α -アミラーゼ遺伝子の発現状況を調査した。

4. 研究成果

(1) α -アミラーゼ遺伝子胚乳過剰発現イネの解析：いずれの α -アミラーゼ遺伝子を導入した系統においても、形質転換当代および導入遺伝子が固定した次世代以降で、導入遺伝子を強発現する複数の系統が得られた。*Amy1A*, *Amy1C*, *Amy2A*, *Amy3A*, *Amy3B*, *Amy3C*, および *Amy3D* をそれぞれ強発現する種子は高い α -アミラーゼ活性が認められ、激しい乳白粒となり (図1)、胚乳デンプン粒の分解痕跡が観察された。また、胚乳のデンプン蓄積量の減少に伴って、グルコース、マルトース、スクロース、マルトトリオース、マルトテトラオースが蓄積した。一方、*Amy3E* を強発現する種子は同様に高い α -アミラーゼ活性は認められたが、玄米の外観は通常の透明な整粒となり、デンプン粒の分解痕も認められなかった。

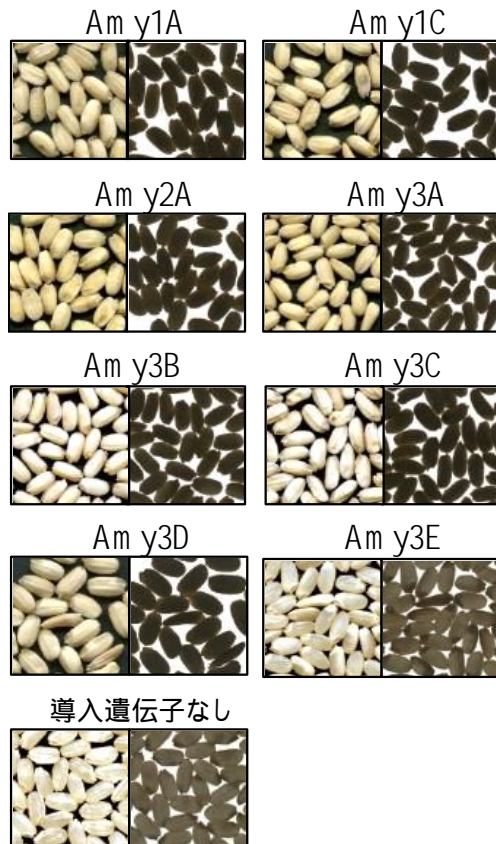


図1 乳熟期胚乳における α -アミラーゼ遺伝子過剰発現による玄米外観の変化
各 α -アミラーゼ遺伝子をそれぞれ登熟期の胚乳で過剰発現した完熟玄米について、反射光（左写真）および透過光（右写真）で撮影した玄米外観を示す。すべて平温条件（昼温 25 / 夜温 20 ）で登熟した。

(2) α -アミラーゼ遺伝子プロモーターレポーター遺伝子導入イネの解析：登熟期の高温によって、*Amy2A* を除くすべての α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター活性が胚盤周辺で上昇した。それに加えて *Amy1A*、*Amy3C*、*Amy3D* は、それぞれ胚乳の背側半分、中心部から背側にかけて、腹側糊粉層付近においても発現が誘導され、発現部位が胚乳白濁部位と一致した（図2）。一方、*Amy3E* は胚盤周辺領域でのみ高い活性が認められた。

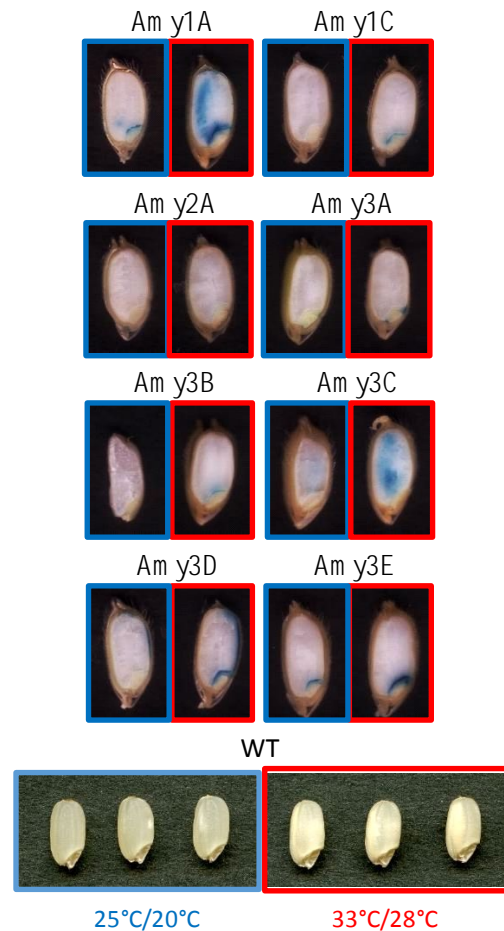


図2 乳熟期の種子における α -アミラーゼ遺伝子の発現部位
各遺伝子について、2-kb プロモーター：*GUS* レポーター遺伝子を導入した組換えイネを作成し、平温（昼温 25 / 夜温 20 ）および高温条件（同 33 / 28 ）で登熟させた。遺伝子が発現している箇所は、青色に染色される。完熟玄米（日本晴 WT）の玄米外観も示す。

(1)と(2)の結果から、高温に遭遇した登熟途中の種子において、*Amy1A*、*Amy3C*、*Amy3D* が胚乳で強く発現し、蓄積デンプンを分解することが、乳白粒の発生を助長する要因と考えられた。このことから、これらの遺伝子が働かなくなった変異イネ等を探索し、利用することによって、乳白粒が発生しにくい高温登熟耐性イネを開発できる可能性が示唆された。

(3) 登熟期胚乳での発現を規定する *cis* 領域の特定：*Amy1A* および *Amy3C* では -200bp プロモーターで胚乳の背側および中心部に転写活性が認められたが、*Amy3D* では -600bp プロモーターで胚乳周辺部に見られたプロモーター活性が -400bp プロモーターでは消失した。このことから *Amy1A* および *Amy3C* では -200 ~ 0bp の領域に、*Amy3D* では -600 ~ -400bp の領域に、胚乳での発現に関わる *cis* 領域が存在すると考えられた。

(4) 酵母ワンハイブリッドスクリーニングによる α -アミラーゼ遺伝子プロモーター結合転写調節因子の特定: *Amy1A*, *Amy3C*, および *Amy3D* の上記 cis 領域を用いたスクリーニングによって、下記の通り bZIP 型および ABI3/VP1 型等の転写因子が同定された。

Amy1A: *LFL2*, *IDEF1*, *bZIP81*, *bZIP30*
Amy3C: *LFL1*, *LFL2*, *IDEF1*, *bZIP61*, *bZIP30*,
NF-YC4, *NAC37*, *PCF6*, *Trihelix*, *Zz*
Amy3D: *PLT9*, *PCF6*

(5) 転写調節因子の機能検証: *bZIP61* の N 末端短縮型転写産物および同転写産物に VP16 タグを付加したものの過剰発現で、乳白粒を生じた (図 3)。しかしながら、 α -アミラーゼ遺伝子群に対する転写活性化能は弱かった。このことから、*bZIP61* は α -アミラーゼ以外の遺伝子の制御にも関わり、乳白粒を生じることが示唆された。

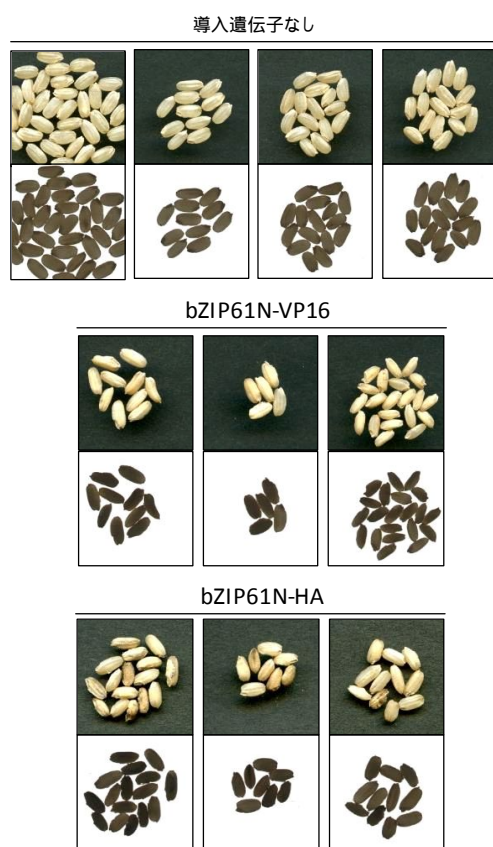


図 3 乳熟期胚乳における *bZIP61* の N 末端短縮型転写産物の過剰発現による玄米外観の変化

bZIP61 の N 末端短縮型転写産物および同転写産物に VP16 タグを付加したものをそれぞれ登熟期胚乳で過剰発現した完熟玄米について、反射光 (上写真) および透過光 (下写真) で撮影した玄米外観を示す。すべて平温条件 (昼温 25 / 夜温 20) で登熟した。

< 引用文献 >

Hakata M, Kuroda M, Miyashita T,

Yamaguchi T, Kojima M, Sakakibara H, Mitsui T, Yamakawa H (2012) Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol. J.* 10: 1110-1117

Mitsuda N, Ikeda M, Takada S, Takiguchi Y, Kondou Y, Yoshizumi T, Fujita M, Shinozaki K, Matsui M, Ohme-Takagi M (2010) Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 51: 2145-2151

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Nakata M, Miyashita T, Kimura R, Nakata Y, Takagi H, Kuroda M, Yamaguchi T, Umemoto T, Yamakawa H (2018) MutMapPlus identified novel mutant alleles of a rice starch branching enzyme IIb gene for fine-tuning of cooked rice texture. *Plant Biotechnol. J.* 16: 111-123, 査読有, DOI: 10.1111/pbi.12753

Nakata M, Fukamatsu Y, Miyashita T, Hakata M, Kimura R, Nakata Y, Kuroda M, Yamaguchi T, Yamakawa H (2017) High temperature-induced expression of rice α -amylases in developing endosperm produces chalky grains. *Front. Plant Sci.* 8: 2089, 査読有, DOI: 10.3389/fpls.2017.02089

Yamakawa H, Hirai-Kimura R, Nakata Y, Nakata M, Kuroda M, Yamaguchi T (2017) An activity-staining method on filtration paper enables high-throughput screening of temperature-sensitive and inactive mutations of rice α -amylase for improvement of rice grain quality. *Plant Cell Physiol.* 58: 658-667, 査読有, DOI: 10.1093/pcp/pcx030

Mitsui T, Yamakawa H, Kobata T (2016) Molecular physiological aspects of chalking mechanism in rice grains under high-temperature stress. *Plant Prod. Sci.* 19: 22-29, 査読有, DOI: 10.1080/1343943X.2015.1128112

[学会発表] (計 19 件)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、独自のベクターと高密度水耕栽培法を活用したゲノム編集によるコメ品質関連遺伝子の多重改変、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.3.29、名城大学 (愛知県名古屋市)

中田克、宮下朋美、羽方誠、黒田昌治、山口武志、山川博幹、登熟期高温による玄米可溶性糖の増加はデンプン分解に由来する、第 58 回日本植物生理学会年会、

2018.3.16、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
黒田昌治、山口知哉、山川博幹、新規なゲノム編集ベクターと作物の高密度水耕栽培法を利用したコメ品質関連遺伝子多重改変の試み、日本ゲノム編集学会第2回大会、2017.6.29、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、ゲノム編集と簡便高密度水耕栽培法を利用したコメ品質関連遺伝子多重改変の試み、日本育種学会第132回講演会、2017.10.8、岩手大学(岩手県盛岡市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、独自のベクターと高密度水耕栽培法を活用したコメ品質改良のためのゲノム編集研究、第40回日本分子生物学会年会、2017.12.7、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

山川博幹、平井理恵子、中田百理子、中田克、山口武志、黒田昌治、米品質向上のための高温感受性および不活性型 -アミラーゼ変異の探索、第57回日本植物生理学会年会、2016.3.18、岩手大学(岩手県盛岡市)

中田克、宮下朋美、羽方誠、黒田昌治、山口武志、山川博幹、-アミラーゼ遺伝子過剰発現イネにおける玄米品質、第57回日本植物生理学会年会、2016.3.18、岩手大学(岩手県盛岡市)

山口武志、黒田昌治、山川博幹、中田克、イネの高温登熟障害に関わる活性酸素消去系遺伝子、第57回日本植物生理学会年会、2016.3.18、岩手大学(岩手県盛岡市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、池永幸子、遺伝子多重改変に対応したイネ用の新規ゲノム編集ベクターおよびインキュベーターを用いた簡便な高密度水耕栽培法、日本農芸化学会2016年度大会、2016.3.30、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、ゲノム編集を利用したアミラーゼ遺伝子多重改変によるイネの高温登熟性改良の試み、日本育種学会第130回講演会、2016.9.25、鳥取大学(鳥取県鳥取市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、新規なゲノム編集ベクターと作物の高密度水耕栽培法を利用したイネの高温登熟性改良の試み、日本ゲノム編集学会第1回大会、2016.9.6、広島国際会議場(広島県広島市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、新規なゲノム編集ベクターと作物の高密度水耕栽培法を利用したコメ品質改良の試み、第39回日本分子生物学会年会、2016.12.1、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

黒田昌治、山口知哉、山川博幹、池永幸子、イネ用の新規ゲノム編集ベクターの評価およびインキュベーターを用いた作物の簡便な高密度水耕栽培法、日本育種学会第128回講演会、2015.9.12、新潟大学(新潟県新潟市)

山口知哉、山川博幹、黒田昌治、イネ用新規ゲノム編集ベクターを利用した高温登熟性改良の試み、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)、2015.12.1、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/ricqualitylab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 博幹 (YAMAKAWA, hiromoto)

農研機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：10370537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

光田 展隆 (MITSUDA, nobutaka)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80450667

(4) 研究協力者

なし