

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18780013

研究課題名（和文） 出穂期から登熟期のイネの稈における炭水化物の動態

研究課題名（英文） Changes in carbohydrate of rice leaf sheaths and culms during heading and grain-filling period.

研究代表者

平野 達也 (Hirano Tatsuya)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30319313

研究成果の概要：イネの登熟には、出穂期までに葉鞘や稈（茎部）に蓄積していた出穂前蓄積炭水化物が重要な役割を担っている。出穂前蓄積炭水化物である葉鞘に蓄積したデンプンが出穂後に分解し、ショ糖の形に変換されてからイネ穎果（コメ）へと転流する仕組みを解明するため、葉のデンプン分解に関わっている酵素であるβアミラーゼに着目して研究を進めた。イネのβアミラーゼ遺伝子はゲノム上に9つ（*OsBMY1-9*）存在する。そのうち、シロイヌナズナの葉においてデンプン分解に関わっていることが明らかにされている *AtBAM3* 遺伝子と同じグループに属する *OsBMY2* と *9* が、出穂後のデンプン分解が著しいインド型品種の *Johna* の葉鞘において、デンプン分解が活発に生じている時期にその発現量が多かった。よって、*OsBMY2* と *9* は出穂後のイネ葉鞘におけるデンプン分解に関与している可能性が高いと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	150,000	2,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：イネ、稈および葉鞘、デンプン、β-アミラーゼ、ショ糖リン酸合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

アジア地域において重要な作物であるイネの生産性向上は、今後の食糧供給およびバイオマス利用のために達成すべき課題である。現在までの研究で、出穂期までに稈および葉鞘に蓄積され、その後の登熟の進行とともに穎果へと転流されていく炭水化物（出穂前蓄積炭水化物）が、イネ穎果の登熟に必要な炭水化物の20～40%を占めることが報告されている。そしてその蓄積量は、穎果の登

熟歩合に影響を及ぼすことが指摘されている。また、最近の穂重型多収イネ品種の開発に伴って、その収量ポテンシャルを活かすために、出穂前蓄積炭水化物の蓄積とその後の利用における制御機構を解明することが注目されている。

## 2. 研究の目的

出穂前蓄積同化産物の多くは、葉鞘および稈に蓄積するデンプンである。よって、今ま

での関連した研究では、葉鞘でのデンプンの量的な変化と、それを制御するデンプン合成関連酵素の活性および遺伝子発現について扱ったものが多い。一方、葉鞘および稈に蓄積されたデンプンは分解されて、さらにショ糖となって穎果へと転流されるため、出穂後の葉鞘および稈におけるデンプン分解およびショ糖合成の制御機構を理解することもまた重要である。しかし、それらに関する研究は現在のところ非常に少ない。

そこで本研究では、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解の制御機構を明らかにすることを旨として、他の植物において葉に一時的に蓄積されたデンプンの分解に関与していることが明らかとなっている $\beta$ -アミラーゼに着目し、その解析を進めた。また、葉鞘におけるショ糖合成の調節機構を解明するため、ショ糖リン酸合成酵素遺伝子についても解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 葉鞘における炭水化物含量の定量

日本型イネ品種の日本晴とインド型イネ品種の Johna を用いて実験を行った。出穂期を挟んで収穫期にかけて、止葉から数えて3番目の葉鞘(第3葉鞘)を採取した。そして、そのデンプン、スクロースおよびヘキソース含量を定量した。

#### (2) イネ $\beta$ -アミラーゼ遺伝子ファミリーの検索と機能推定

$\beta$ -アミラーゼと予想される遺伝子の塩基配列を得るために、イネアノテーションデータベース(RAP-DB)およびイネ完全長 cDNA データベースを検索した。さらに、それによって得られた配列の推定アミノ酸配列とシロイヌナズナで明らかにされている9つの $\beta$ -アミラーゼアイソフォーム遺伝子(*BAMI-9*)の推定アミノ酸配列との間で、Neighbor Joining 法により分子系統樹解析を行った。

#### (3) イネ各部位における $\beta$ -アミラーゼ遺伝子の発現解析

様々なイネ部位を採取し、全 RNA を調製した後に cDNA を合成した。それらを鋳型として、各 $\beta$ -アミラーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、半定量的 RT-PCR 解析を行った。

#### (4) イネ葉鞘における $\beta$ -アミラーゼ遺伝子の発現解析

(1) で炭水化物の定量を行ったものと同時に採取した試料から全 RNA を調製し、cDNA を合成した。それらを鋳型として、各 $\beta$ -アミラーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、半定量的 RT-PCR 解析を行った。

#### (5) OsBMY1 および 2 の特異抗体の作製

OsBMY1 および 2 のタンパク質レベルでの発現解析を進めるため、それぞれの配列特異的なペプチドを抗原としてポリクローナル抗体をシグマアルドリッチジャパン社に依頼して作製した。そしてそれらの抗体の特異性を、大腸菌で発現させた OsBMY1 および 2 の組換えタンパク質を用いて確認した。

#### (6) 大腸菌での組換えタンパク質発現用ベクターの構築および大腸菌での発現確認

OsBMY1 および 2 が $\beta$ -アミラーゼとして機能することを確認するため、大腸菌での組換えタンパク質発現用ベクターを、Champion™ pET Directional TOPO Expression Kits (Invitrogen 社製)を用いて構築した。それらベクターを大腸菌 BL21 (Star) DE3 株 (Invitrogen 社製)に導入し、10 ml の LB-Broth (50  $\mu$ g/ml カルベニシリン含む)中で、37°Cで一晩振とう培養を行った。次の日に、培養液のうち 500  $\mu$ l を新しい 10 ml の LB-Broth (50  $\mu$ g/ml カルベニシリン含む)中に加えて、37°Cで振とう培養を開始した。培養液の OD600 値が 0.5 に達したところで、終濃度が 1 mM となるように培養液に IPTG を加えて、さらに 37°Cで 6 時間振とう培養し、組換えタンパク質の発現が誘導された大腸菌を回収した。

#### (7) ショ糖リン酸合成酵素遺伝子の発現解析

日本型品種の日本晴と穂重型多収品種のタカナリを栽培し、出穂期から登熟期にかけてそれらの第3葉鞘を採取した。そこから全 RNA を調製し、cDNA を合成した。それらを鋳型として、5つのショ糖リン酸合成酵素遺伝子(*OsSPS1-5*)に特異的なプライマーを用いて、半定量的 RT-PCR 解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 日本晴と Johna における葉鞘の炭水化物含量の変化

日本晴の第3葉鞘におけるデンプン含量は、出穂9日前(第14葉期)から7日前(14.5葉期)にかけて増加し、その後も高い値を維持した(図1)。そして、出穂12日後から20日後にかけてその含量は減少したが、24日後にかけて再び増加した。一方、Johna のデンプン含量は出穂10日前(14.5葉期)に最大となり、出穂期にかけて減少した。その後、その含量はいったん増加したが、再び出穂4日後から16日後にかけて急激に減少した。Johna では、出穂10日前からスクロース含量が増加し始め、出穂4日後に最大値に達した。その後、その含量は徐々に減少した。

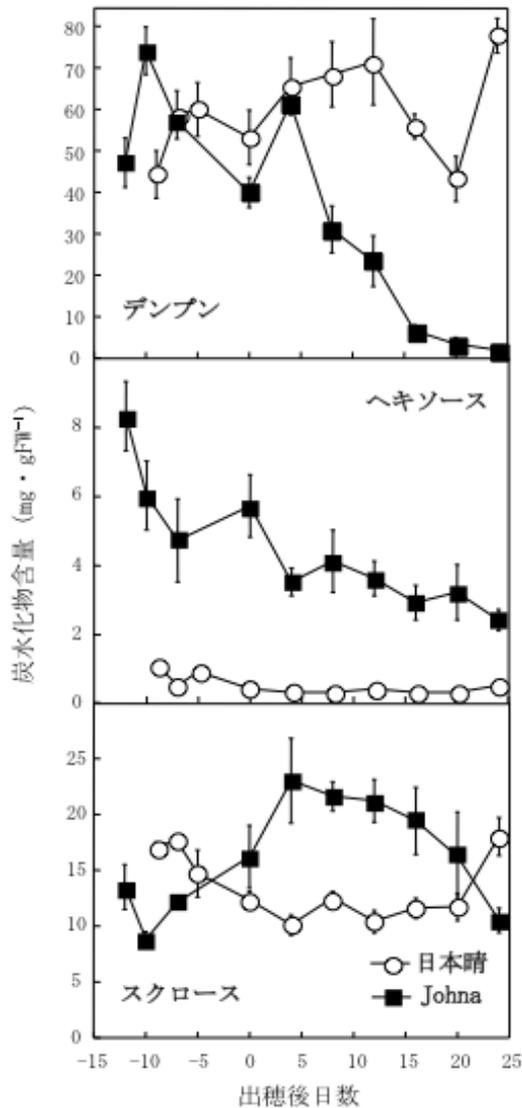


図1. 第3葉鞘における炭水化物含量の変化

(2) イネβ-アミラーゼ遺伝子ファミリーの構成

イネアノテーションデータベースを検索した結果、β-アミラーゼと予想される配列がイネゲノム上に9つあることが判明した。それらをOsBMY1-9と命名し、その推定アミノ酸配列に関して、シロイヌナズナのβ-アミラーゼ遺伝子ファミリー(BAM1-9)の推定アミノ酸配列との間で分子系統樹解析を行った(図2)。

シロイヌナズナでは、BAM3(CT-BMY)が、葉に一時的に蓄積したデンプンの分解に関与していることが報告されている。今回の解析から、OsBMY1、2、4および9がそれと同じサブファミリーに属することがわかった。また、それぞれのβ-アミラーゼタンパク質のN末端に葉緑体移行シグナルが存在するかどうかを解析した結果、OsBMY5および7の2つ

には、シグナル配列が存在しないことが予想された。

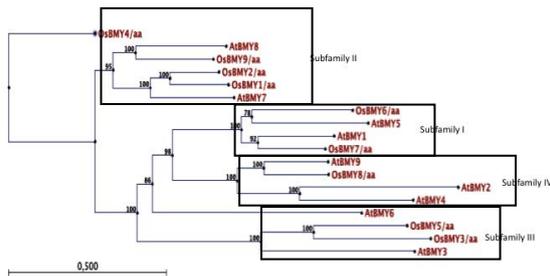


図2. イネとシロイヌナズナのβ-アミラーゼ遺伝子ファミリーの分子系統樹解析

(3) イネ各部位におけるβ-アミラーゼ遺伝子の発現解析

イネ植物体の様々な生育ステージにおいて、様々な部位を採取し、そこから調製したcDNAを鋳型として半定量的RT-PCR解析を行った。OsBMY1は、発芽種子、葉鞘、葉身、幼穂、伸長中節間、出穂後節間および登熟中の穎果で転写が確認された(図3)。OsBMY2、OsBMY3、OsBMY5およびOsBMY6の転写は部位特異性が高く、特に、OsBMY2は葉身および出穂後節間において、OsBMY6は葉身において高く発現していた。OsBMY4はOsBMY1と同様の器官で転写が確認されたが、その転写量はOsBMY1よりも低いことが予想された。OsBMY8と9は調査したすべての部位で発現しており、一方OsBMY7はすべての部位で発現が確認されなかった。

以上の系統樹解析ならびに部位別の発現解析の結果から、葉身および出穂後節間で特異的に発現が高かったOsBMY2が、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解に関わる可能性が高いβ-アミラーゼ遺伝子の候補として考

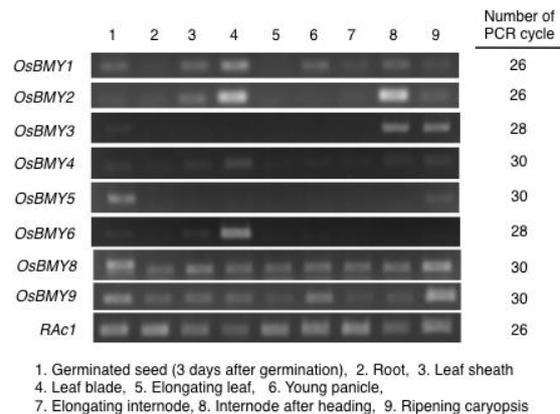


図3. イネ各部位におけるβ-アミラーゼ遺伝子のRT-PCR解析

えられた。

#### (4) 日本晴と Johna の葉鞘における *OsBMY* 遺伝子の発現解析

炭水化物含量を測定した試料と同時に採取した試料から全 RNA を調製し、そこから合成した cDNA を鋳型として、*OsBMY1*、2、4 および 9 に関して半定量的 RT-PCR 解析を行った。*OsBMY4* の転写量は非常に少なく、PCR のサイクル数を 32 にすると、転写が確認された。また生育時期による差は小さかった(データは示さず)。*OsBMY1* の転写には、両品種ともに、出穂前から出穂 24 日後にかけて劇的な変化がなかった(図 4)。一方、*OsBMY2* および 9 に関しては、Johna において、出穂期以降に転写量が増加し、*OsBMY2* では出穂 12 日後まで、*OsBMY9* では出穂 8 日後まで転写量が高く推移した。以上の結果から、*OsBMY1*、2 および 9 は、出穂期以降のイネ葉鞘におけるデンプン代謝に対して何らかの役割を演じていることが考えられた。また、特にインド型品種の出穂期以降のデンプン分解には、*OsBMY2* および 9 が関与している可能性が考えられた。

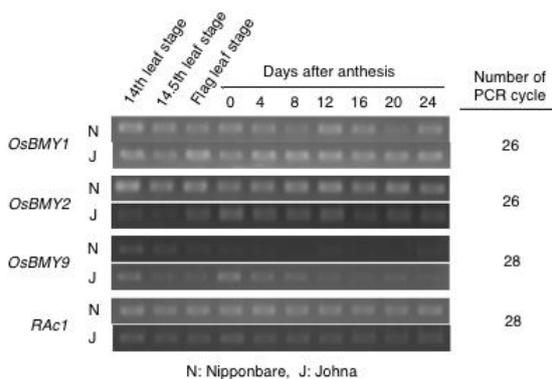


図 4. 日本晴および Johna の第 3 葉鞘における *OsBMY1*、2 および 9 遺伝子の発現解析

#### (5) *OsBMY1* および 2 のウェスタンブロット解析に向けた抗体の作製

*OsBMY1* および 2 の推定アミノ酸配列から、葉緑体移行シグナルを除く部位で、他の配列との特異性が高く、また抗体認識部位として適切な領域を検索した。そしてそのペプチドを抗原としたそれぞれの特異的ポリクローナル抗体を、シグマアルドリッチジャパン社において作製した。*OsBMY1* および 2 の大腸菌発現組換えタンパク質に対する上記抗体の反応性を確認したところ、それぞれが特異的に抗原として認識した(データは示さず)。

#### (6) 大腸菌における組換え *OsBMY1* および 2 タンパク質発現用ベクターの構築と大腸菌での発現

大腸菌での組換え *OsBMY1* および 2 タンパク質発現用の pET100-BMY1 および pET100-BMY2 ベクターを構築した。これら 2 つのベクターには、ともに葉緑体移行シグナルペプチドと予想される配列領域を除いた。構築したベクターの配列は、BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) と ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて確認した。

それら大腸菌に導入し、組換えタンパク質の発現を誘導したところ、予想されるサイズのタンパク質が発現していることが、SDS-PAGE によって確認された。また、それぞれの特異抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、*OsBMY1* および 2 の組換えタンパク質であることが確認された(データは示さず)。

#### (7) 穂重型多収品種タカナリの葉鞘における出穂期以降の炭水化物含量の変化とショ糖リン酸合成酵素遺伝子の発現解析

穂重型多収のインド型品種であるタカナリは、一穂穎果数が著しく多いにもかかわらず、登熟歩合があまり低下しない品種として知られている。そこで、このタカナリの登熟における優れた特性のもたらすソース側の要因を解析するため、日本晴とタカナリの第 3 葉鞘を出穂期前から登熟期にかけて採取した。そして、そのデンプン、スクロースおよびヘキソース含量を定量した。

日本晴では、出穂 8 から 12 日目にかけて葉鞘のデンプン含量が低下したものの、その後再びその含量は増加し、出穂 24 日後でもデンプン含量は多かった(図 5)。一方、タカナリのデンプンおよびスクロース含量は、出穂 4 日後から 12 日後にかけて急激に減少し、出穂 12 日後にはデンプンが第 3 葉鞘にほとんど残っていなかった。よって、タカナリは日本晴と比べて、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解およびそれに伴うショ糖の転流活性が高いことが示唆された。

イネのショ糖リン酸合成酵素遺伝子ファミリーは 5 つのアイソフォーム遺伝子 (*OsSPS1-5*) から構成されている。これら遺伝子の発現を、それぞれの特異的プライマーを用いて半定量的 RT-PCR 法により、上記の第 3 葉鞘において調査した。*OsSPS2* および 3 の発現は第 3 葉鞘において確認できなかった。*OsSPS1*、4 および 5 の発現量は出穂後に増加する傾向にあり、特に *OsSPS5* の発現量は、両品種ともに出穂後に急激に増加した(図 6)。しかし、両品種間での発現量には大きな差はなかった。

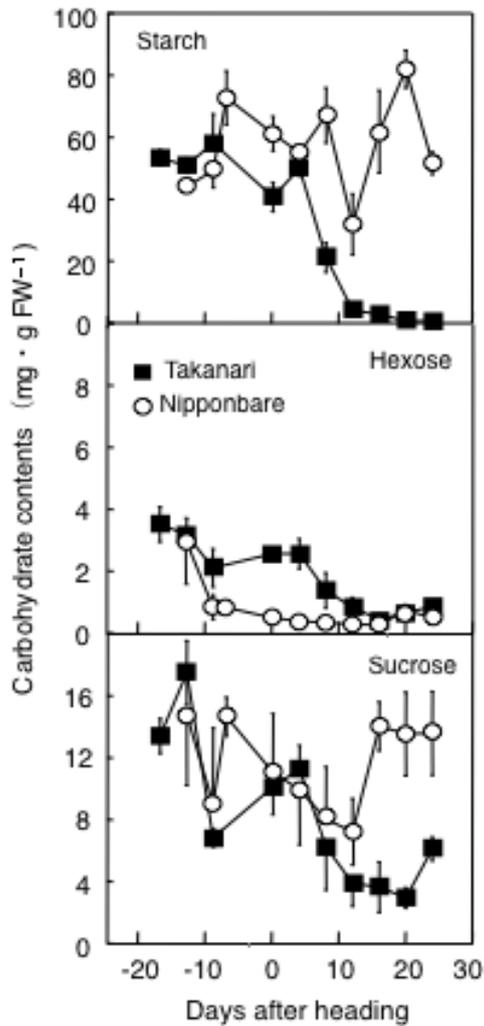


図5. 日本晴とタカナリの第3葉鞘における炭水化物含量の変化

以上の結果から、ショ糖リン酸合成酵素の転写レベルが高いことが、タカナリの葉鞘における出穂後のショ糖転流の活性化をもたらしているわけではないことがわかった。

#### 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)

[学会発表] (計2件)

- ①高橋悠介・藤原真紀・道山弘康・平野達也  
登熟期間中のイネ葉鞘におけるデンプン分解とβ-アミラーゼとの関係. 日本作物学会第226回講演会, 2008年9月24日, 神戸大学農学部
- ②Hirano, T., Y. Takahashi, M. Fujiwara, E. Yamazaki, S. Fujita and H. Michiyama.

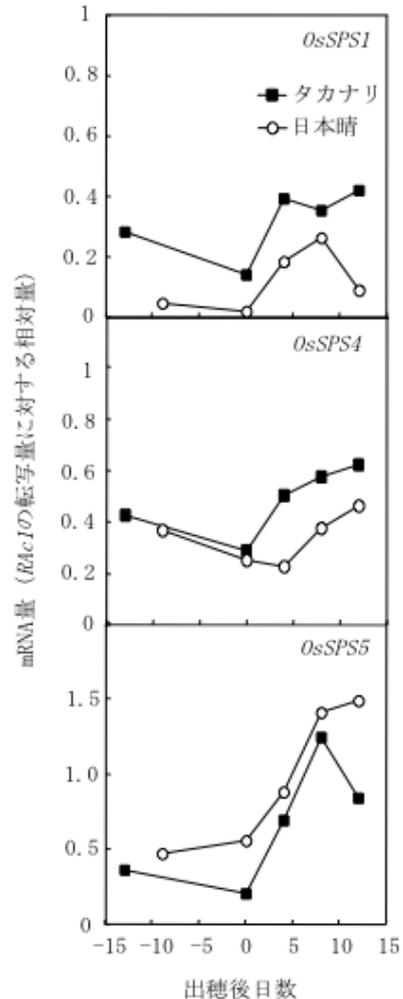


図6. 日本晴とタカナリの第3葉鞘におけるショ糖リン酸合成酵素遺伝子の発現解析

The relationship between beta-amylase and starch degradation in rice leaf sheath after heading. 5th International Crop Science Congress, April 13-18, 2008, Jeju, Korea.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 達也 (Hirano Tatsuya)  
名城大学・農学部・准教授  
研究者番号: 30319313