

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15825

研究課題名(和文) イネの葉におけるショ糖合成の制限要因の解明

研究課題名(英文) A study of limiting factors for sucrose synthesis in rice leaves

研究代表者

橋田 庸一 (Hashida, Yoichi)

高崎健康福祉大学・農学部・助教

研究者番号：00802886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネの葉におけるショ糖合成の真の制限要因の解明を目的とし、ショ糖リン酸合成酵素(SPS)の5つの遺伝子の多重変異体を様々な環境条件で解析した。その結果、これまでの変異体の解析から葉身で主要に働くとされてきた2つのSPS遺伝子よりも、それ以外の3遺伝子が葉からの転流に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。ショ糖合成の真の制限要因を明らかにするためには、SPS遺伝子の生理的分業について詳細に解析する必要があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の葉におけるショ糖合成は、転流効率の制御を通じて作物の生産性に重要な役割を果たしている。本研究によりイネの葉におけるショ糖合成能の制限要因について、これまで想定されてきたSPS遺伝子よりもむしろ別のSPS遺伝子のほうが重要な可能性が示唆された。本研究で得られた知見をもとにイネの葉のショ糖合成能の向上にむけた研究が進むことで、ショ糖合成をターゲットとしたイネの品種改良、ひいては生産性の向上につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：To reveal limiting factor for sucrose synthesis in rice leaves, we characterized multiple mutants of 5 genes encoding sucrose phosphate synthase (SPS) under different environmental conditions. Our results suggest that 3 SPS genes play more important role in translocation from rice leaves than 2 SPS genes which has believed to play a major role in rice leaves. Our results highlight the importance of elucidating differences in physiological function of each SPS gene.

研究分野：作物生理学

キーワード：イネ 糖代謝 ショ糖合成 SPS cFBPase ゲノム編集

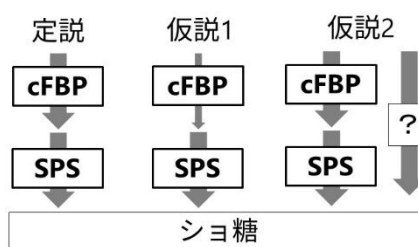
1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加に伴う食料需要の増大や、日本における飼料用などのイネ多用途利用の推進に対応するため、イネの収量ポテンシャルの向上は重要な課題である。イネにおいて、葉で光合成によって同化された炭素はシヨ糖として他器官に転流し、植物体の成長や子実の生産に利用される。シヨ糖合成能は転流効率に関わるとされる (Braun et al., 2013)。そのため、イネのシヨ糖合成制御の最適化は、転流効率の向上を通じてイネの収量増加に貢献すると考えられる。一方で、その知見の不足から、シヨ糖合成能をターゲットとしたイネの遺伝的改良には至っていない。

植物の葉におけるシヨ糖合成は、シヨ糖リン酸合成酵素 (SPS) が触媒する反応によって行われる。これまでの研究から、SPS はシヨ糖合成系の制御において重要な役割を果たすと考えられてきた。実際、葉の SPS 酵素活性が野生型の 30% に低下したシロイヌナズナの SPS 変異体の生育は大きく阻害される (Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015)。しかし、申請者のこれまでの研究から、葉身の SPS 活性が野生型の 16% に低下したイネの SPS 変異体が野生型と同様の栄養成長を示すことが明らかとなった。この結果から、シロイヌナズナとは異なり、イネでは SPS が葉におけるシヨ糖合成の制限要因とはなっていない可能性が示唆された (Hashida et al., 2016)。

2. 研究の目的

本研究では、イネの葉におけるシヨ糖合成の真の制限要因を明らかにするため、シヨ糖合成経路の SPS よりも上流の酵素である細胞質型フルクトース-1,6-ビスリン酸フォスファターゼ (cFBP) がシヨ糖合成の制限要因である、cFBP と SPS を介する経路以外にもシヨ糖合成経路が存在する、という2つの仮説の検証を目的とし (図1) SPS および cFBP 遺伝子の変異体の作出、探索および解析を行った。



(矢印の太さは反応速度、四角は酵素を示す)

図1 イネの葉のシヨ糖合成制御機構

定説：SPSもcFBPも制限要因

→先行研究で否定

仮説1：cFBPが制限要因

仮説2：新奇シヨ糖合成経路が存在

3. 研究の方法

(1) SPS 二重変異体の解析

申請者はこれまでにイネの5つのSPS遺伝子 (*OsSPS1*, *OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8*, *OsSPS11*) のうち葉で主要な働きをされるとされる *OsSPS1* がノックダウン (Hashida et al., 2016)、*OsSPS11* がノックアウトされた二重変異体を作成した。二重変異体と野生型、2遺伝子のうち片方のみが変異型の計4系統を日長12時間、明期30、暗期25の強光条件 (900 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ 、PPFD) と一般的な条件 (200 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ 、PPFD) でそれぞれ3週間栽培し、生育の比較を行った。

(2) CRISPR/Cas9 システムを用いた SPS 多重変異体の作出

CRISPR/Cas9 システムを用いて SPS 多重変異体の作出を行った。5つの SPS 遺伝子 (*OsSPS1*, *OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8*, *OsSPS11*) 全て、あるいはその一部をターゲットとしたコンストラクトを作成し (Mikami et al., 2015)、アグロバクテリウム法 (Toki et al., 2006) によりイネ品種「日本晴」へ導入した。得られた再分化個体から DNA を抽出し、ターゲット部位の塩基配列をシーケンスすることにより変異を調査した。得られた個体を人工気象器 (日長12時間、明期30、暗期25、光強度200 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ あるいは40 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ (PPFD)) で栽培し、生育を評価した。

(3) cFBP1 遺伝子ノックダウン系統の探索

Tos17 突然変異系統群 (Miyao et al., 2003) の中から cFBP をコードする cFBP1 遺伝子のイントロン、あるいは UTR に *Tos17* が挿入された系統 (農研機構より分譲) を高崎健康福祉大学附属農場 (高崎市) の水田で栽培し、cFBP1 遺伝子がノックダウンされた系統のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 葉身で主に働くとされる2遺伝子の *OsSPS1* がノックダウン、*OsSPS11* がノックアウトされた変異体を強光条件および弱光条件で栽培したが、生育に大きな差は見られなかった。

(2) *OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8* の3遺伝子について、単独、二重、三重欠損変異体をそれぞれ複数個体作出した。単独変異体、二重変異体は野生型と同程度の生育を示したが、三重変異体は矮性であった。三重変異体を光強度が40 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ (PPFD) の弱光条件で栽培したところ、野生型よりも矮性ではあったが、野生型と同様の葉色を維持したまま生育可能であった。一方、一般的な条件 (200 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ 、PPFD) では葉が黄化し極端な矮性を示した。この傾向は、cFBP をコード

する遺伝子のうち葉で主に働く遺伝子である *cFBP1* がノックアウトされた変異体が弱光下では生育可能なことと同様であった。光強度に応じて生育阻害の程度が変化することから、3 遺伝子は光合成速度に応じた葉からの炭素転流の制御に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

(3) *cFBP1* 遺伝子ノックダウンシステムを探索するため、Tos17 系統 9 系統を栽培し、野生型と変異体で比較したが、*cFBP1* がノックダウンされた系統は得られなかった。今後 RNA-i 系統などの作出を通じて、*cFBP1* 遺伝子のノックダウンシステムを作出、解析する予定である。

以上より、葉身で主に働くとされてきた 2 つの SPS 遺伝子 (*OsSPS1*, *OsSPS11*) ではなく、それ以外の 3 遺伝子 (*OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8*) が葉からの炭素転流に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この結果は SPS がイネの葉におけるショ糖合成の制限要因とはならないという研究開始当初の仮説と一致しない。この原因として、葉全体ではなく葉における特定の部位・器官、あるいは葉以外の器官において 3 遺伝子が重要な役割を果たしており、その結果として葉からの炭素転流、生育に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今後イネの葉におけるショ糖合成の真の制限要因を明らかにするためには、*cFBP* や新規ショ糖合成経路の存在の検証に加えて SPS 遺伝子の生理的分業について詳細に解析する必要があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 橋田庸一	4. 巻 4(7)
2. 論文標題 イネの葉におけるショ糖合成制御機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 51-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 橋田庸一	4. 巻 4(13)
2. 論文標題 イネの葉におけるショ糖合成制御機構の解明（再掲）	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 66-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoichi Hashida, Ayumi Tezuka, Mari Kamitani, Makoto Kashima, Yuko Kurita, Atsushi J. Nagano
2. 発表標題 Comparative Analysis of Sugar Metabolism in Rice Leaves under Field and Controlled Environments
3. 学会等名 10th Asian Crop Science Association Conference（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------