

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010 年度

課題番号：20380010

研究課題名（和文） イネの転流を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms for regulating the translocation of carbon and nitrogen in rice

研究代表者：青木 直大（AOKI NAOHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教 研究者番号：70466811

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、イネにおける転流の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。葉身の SPS 活性が異なる準同質遺伝子イネ系統を用いて、葉身 SPS 活性が炭素・窒素の分配に及ぼす影響を調べた。その結果、SPS 活性が高い系統では転流が促進されることが明らかとなった。よって、ソース組織における SPS 活性は同化産物の転流を制御する一因子であることが分かった。また、シンク組織とソース組織、およびシンク維管束とソース維管束との間での遺伝子発現パターンにおける違いを、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、シンクまたはソースで特異的に遺伝子のリストを得た。これらの遺伝子リストは、イネの同化産物転流の分子機構の解明する上で重要な知見になるだろう。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to elucidate regulatory mechanisms for the translocation of assimilates in rice at the molecular level. By using near-isogenic rice lines that possess different activity of sucrose-phosphate synthase (SPS) in source leaves, we examined the effects of SPS activity on the allocation of carbon and nitrogen. The results indicated that in a high-SPS line, the translocation of assimilates from source leaves to sink tissues was accelerated. Thus, SPS activity in source tissues will be a regulatory factor for translocation of assimilates. Besides, we compared source tissues and sink tissues, or source vasculature and sink vasculature, in terms of gene expression patterns by using microarrays. As results, lists of “sink-” or “source-specific” genes were obtained. These gene lists would be very important information in order to elucidate molecular mechanisms of assimilate translocation in rice plants.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：食用作物

1. 研究開始当初の背景  
イネはわが国において最も重要な作物であ

り、また世界的な主要穀物である。地球の人口は 2050 年には 90 億人に達すると予想さ

れ、それを養うだけの食料の確保が重要な課題である。しかし、砂漠化の進行や塩害などで既存農地の荒廃が進む一方、新たな農耕地の拡大はほとんど望めない。したがって、将来的な食料の確保にはイネの生産性および収量の向上が必須である。

作物の生産性を高め収量を向上させるための生理・生態学的研究は、農学研究の中心的課題として数多くなされてきた。その際、収量形成を考える重要な視点として、シンク器官（イネの穂やジャガイモの塊茎などの貯蔵器官）と、ソース器官（光合成によって炭酸固定を行う緑葉などの同化器官）とに役割を分け、両者をつなぐ転流経路を含めてそれらの相互作用から解析するものがある（大杉 2003, 2006）。イネの生産性をシンク・ソース関係で考えると、栄養成長の段階では同化産物のほとんどが新しい葉や根を作るために使われるが、生殖生長期・登熟期になると穂（穎果）への分配が増大する。この時期の穂につく穎果は巨大なシンクであるが、一穂内でも着生の位置によって炭水化物蓄積のパターンが異なり、シンクとしての能力に差があることが知られている（Kato 1986）。このとき、シンクである穎果へ貯蔵物質を供給するソースには2つあり、1つは出穂前に一時的に炭水化物・タンパク質を蓄えた稈・葉鞘であり、もう1つは出穂後の光合成産物を供給する成熟葉である。すなわち稈・葉鞘は、出穂前は一時的なシンクとして機能し、出穂期を境にシンクからソースに転換するため、これらの組織への乾物分配率は一時的に増加した後減少する。また、イネを高窒素条件で栽培すると茎葉への炭水化物分配が高まることが広く知られている。このように、イネのシンク・ソース関係は多様かつダイナミックであり、両者の相互作用を解析・評価する際には、シンクとソースを明確にしながらか検討する必要がある。本研究開始までの研究では、光合成速度、関係する酵素活性および遺伝子発現、同化産物量の変動、乾物分配率などを指標に用いてシンクまたはソースの機能、および両者の相互作用が解析されてきた。しかしながら、ソースからシンクへの同化産物の輸送、すなわち転流は、ソースにおける転流物質の合成→篩部輸送→シンクにおける転流物質の分解・代謝、であることから代謝および代謝物の「フロー（流れ）」として考える必要があるが、その解析の難しさから研究が遅れていた。

イネにおける主要な転流物質はショ糖である。ソース葉の光合成細胞で合成されたショ糖は、維管束篩部の篩管へ輸送（ローディング）された後、篩管を通過してシンクへと転流され、シンクにおいて篩管から維管束外へ輸送（アンローディング）される。イネの篩部における同化産物の移動経路については、細

胞間の原形質連絡の頻度（長南ら、1980, 1981, 1984, 1985）や蛍光色素を用いたトレーサー実験（Scofield et al. 2006, 2007）などの形態学的解析にとどまっており、ショ糖などの同化産物が実際にどのような経路でローディングおよびアンローディングされるのかは明らかではない。イネの篩部輸送においては、篩管の原形質膜に存在するショ糖トランスポーター（OsSUT1）が篩管へのショ糖の濃縮、および篩管内の物質輸送に重要な役割を果たしていると考えられている（Hirose et al. 1997, Aoki et al. 2003、廣瀬、青木 2003、Scofield et al. 2006, 2007）。

しかしながら、OsSUT1 遺伝子はソース器官でもシンク器官でも発現しており、また、イネのゲノムには SUT1 以外にも 4 種類のショ糖トランスポーター遺伝子が存在し、それぞれがイネの転流においてどのように貢献しているのか未だに不明である。さらに、篩部輸送にはショ糖以外の物質、例えばアミノ酸などの窒素同化産物および  $K^+$ 、 $Na^+$  等の無機イオンの輸送も重要であると考えられているが、イネのシンク・ソース関係にもとづいたアミノ酸や無機イオンの篩部輸送については今のところ全く不明である。

近年、イネのゲノム学の急速な進歩に伴って、イネゲノム塩基配列情報、染色体断片置換系統（CSSL）や遺伝子破壊系統などの研究素材、トランスクリプトームやメタボロームなどの網羅的解析技術、が利用可能になってきている。また、遺伝子発現解析においては、葉や根などの組織切片から任意の細胞群や微小領域のみを正確に単離するレーザーマイクロダイセクション法（LMD 法）の開発により、微小な組織または細胞特異的な情報を得ることが可能になってきている。

本課題の応募時において、東京大学・作物学研究室（青木、大杉）では、ショ糖合成の鍵酵素である SPS1 遺伝子に関する 2 つの特徴ある研究素材を有していた。1 つは富山県農業試験場で育成されたコシヒカリ/カサラスの準同質系統（NIL）で、コシヒカリの SPS1 を含む領域（およそ 2Mb）がカサラスに置き換わったもので、このコシヒカリ/カサラス SPS1-NIL は、コシヒカリに比べて葉身の SPS 活性が高く、分けつ数が増加する傾向が見られていた。もう 1 つは、農業生物資源研究所で育成された Tos17 レトロトランスポゾンによって SPS1 が破壊されている系統で、この SPS1-Tos17 は日本晴（対照品種）に比べて葉身の SPS 活性が低く、分けつ数が低下する傾向が見られていた。これらの結果から、ソース葉の SPS 活性の増減はショ糖の合成・供給量に影響を及ぼし、結果として分けつ（シンク）の分化・生長に影響が出ている可能性が考えられ、SPS1-NIL や SPS1-Tos17 はイネにおける同化産物の

転流の制御機構を考える上で非常に興味深い材料であった。また、当研究室では、LMD法によってイネの根を表層系と中心柱・皮層に分けた上でマイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、表層系で特異的に発現している遺伝子を多数見つけていた。加えて、同位体質量分析計（同位体 MS）やキャピラリー電気泳動／質量分析計（CE-MS/MS）を有していたため、これらの分析装置と安定同位体（ $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ ）を用いたラベル&トレーサー実験を組み合わせることによって、炭素・窒素の分配を代謝物レベルで解析し、「転流」の実体である「代謝物フロー」を定量的に考察することが出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、本研究では、イネの生産性に関わるシンクとソースの関係、および両者の相互作用を考慮に入れた上で、①ソースからのシンクへの代謝物のフローを $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$ ・トレーサー実験と質量分析計（同位体 MS、CM-MS/MS）を組み合わせることで定量的に解析すると同時に、②両器官それぞれの篩部で特異的に発現する遺伝子を LMD／マイクロアレイ法を用いた網羅的解析により特定し、さらに、③代謝フローおよび遺伝子発現解析の結果を合わせて考察することによって、イネの生産性を考える上で重要な転流機能を代謝レベルおよび分子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、ソース器官（光合成葉など）とシンク器官（穂など）の間の同化産物の輸送、すなわち転流を制御する代謝レベル・分子レベルでの知見を得るために、3つの視点から研究を行った。すなわち、①部位別・組織別の炭素・窒素含量や収量構成要素などの作物学的指標を用いてソース・シンク関係を明確にした上で、②安定同位体を用いて炭素・窒素のフロー（転流）を測定し、さらに③ソース器官、シンク器官それぞれの篩部における遺伝子発現を網羅的に解析した。供試材料には以下の4品種（系統）を用いた。

- ・コシヒカリ／カサラス SPS1-NIL 系統（SPS 活性がコシヒカリより高い）
- ・コシヒカリ（対照品種）
- ・日本晴 SPS1-Tos17 系統（SPS 活性が日本晴より低い）
- ・日本晴（対照品種）

### ①作物学的解析

上記の4品種（系統）を東京大学農学生命科学研究科附属農場の圃場にて栽培し、以下の項目について測定した。

- ・栽培期間を通じた草丈、分けつ数、および SPS 活性（葉身、葉鞘など）の推移

- ・生殖生長期における葉身、稈・葉鞘、穂の乾物重、炭素・窒素含量、の推移
- ・収量および収量構成要素

### ②安定同位体を用いたメタボローム解析

SPS-NIL、コシヒカリ、日本晴を用いて、東京大学農学部の温室内にてポットおよび水耕で栽培し、 $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$ ・トレーサー実験を次のような手順で行い、メタボローム解析への応用を試みる。(1)ポットおよび水耕で栽培した栄養生長期のイネを用いて、 $^{13}\text{CO}_2$ を葉身から、 $^{15}\text{NH}_4$ を根から与える。(2)葉身、葉鞘（茎）、根を経時的・経日的にサンプリングする。(4)  $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$ 量を同位体 MS で測定した。

または  $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$  でラベルされた中間代謝物を CE-MS/MS で定量解析した。

### ③遺伝子発現解析

中央農業総合センター（北陸研究センター）にて標準品種（日本晴）を通常の栽培条件下で生育させ、シンク組織（未熟葉、出穂前葉鞘など）およびソース組織（成熟葉、出穂後葉鞘など）から RNA を抽出し、マイクロアレイ実験に用いた。また、同様の組織サンプルについて LMD 法によって篩部のみを切り出し、RNA 抽出した後、マイクロアレイ実験に用いた。マイクロアレイはアジレント社の  $4\times 44\text{k}$ -イネ・DNA オリゴマイクロアレイを用い、シンク組織または篩部の RNA から合成した cRNA を Cy5 で、ソース組織および篩部の RNA から合成した cRNA を Cy3 でラベルし、2色法にてシンクとソースとの間の遺伝子発現の違いを網羅的に解析した。4反復のマイクロアレイのデータをもとに、シンクとソースの間で発現量に2倍以上の違いが見られた遺伝子のリストを作成した。

## 4. 研究成果

(1) コシヒカリ／カサラス SPS1-NIL 系統（SPS 活性がコシヒカリより高い）および対照系統（コシヒカリ）を水田圃場にて栽培し、生育、乾物生産および収量厚生素素について両者を比較したところ、3年間を通して同様の結果が得られた。すなわち、SPS1-NIL ではコシヒカリに比べて、栄養成長期から幼穂形成期にかけての葉身 SPS 活性が高く、また、一穂粒数が増えることが明らかとなった。このような複数年に渡る栽培試験の結果から、SPS1-NIL の生産生理的特性が明らかになり、SPS1-NIL はコシヒカリに比べて、栄養成長期から幼穂形成期にかけての乾物生産（ソース能）が高くなっている可能性が示唆された。また、SPS1-NIL 系統と対照系統（コシヒカリ）をポット栽培し、穂孕み期に  $^{13}\text{CO}_2$  付与実験を行い、葉身から穂への  $^{13}\text{C}$  の転流速度や分配率を両系統間で比較したところ、SPS1-NIL はコシヒカリに比べ

て、13C の穂への分配率が高く、葉身から穂への同化産物の転流速度が高くなっていることが明らかとなった。以上の結果は、原著論文として発表する予定である（投稿準備中）。

(2) SPS1-Tos17 系統については、初年度は対照品種（日本晴）に比べて茎数がやや少なくなる傾向が見られた。しかしながら、2年目には両者の間に差が見られなかったことから、本研究における実験材料としては不相当であると判断した。

(3) 15N を用いたトレーサー実験については、水耕栽培した栄養成長期のイネ（日本晴）を用いて、メタボローム解析への応用を試みた。その結果、ソース（葉身）とシンク（根）における代謝フローの特徴が明らかになった。現在、このシステムを用いて SPS-NIL 系統の解析を行っているところである。残念ながら本研究の実施期間中には成果は得られなかったが、引き続き実験を進める予定である。

(4) シンク組織およびソース組織で発現する遺伝子を探索するために、栄養成長期の未熟葉身（シンク）と成熟葉身（ソース）、また出穂 9 日前の葉鞘（シンク）と出穂後 9 日後の葉鞘（ソース）から RNA を抽出し、44k-イネ・マイクロアレイを用いて両組織間の遺伝子発現の違いを網羅的に解析した。その結果、シンク葉身/葉鞘での発現量がソース葉身/葉鞘の 3 倍以上すなわちシンク組織で発現の高い遺伝子（633 個）、また逆に 1/3 以下すなわちソース組織で発現の高い遺伝子（369 個）がリストアップされた。このような「葉身と葉鞘で共通する遺伝子リスト」には、組織の発達段階や代謝生理に関係なく、ソース組織およびシンク組織で特異的に発現している遺伝子が多く含まれると考えられる。なお、以上の結果は、日本作物学会第 10 回講演会で発表された。

また、標準品種（日本晴）を通常の栽培条件下で生育させ、栄養成長期の成熟葉（ソース）と未熟葉（シンク）をサンプリングし、それぞれの組織サンプルについて、LMD 法による維管束の切り出しおよび RNA 抽出を行った。得られた RNA サンプルを用いてソース維管束とシンク維管束の間の遺伝子発現における違いを、44k-イネ・マイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果、シンク維管束での発現量がソース維管束の 2 倍以上すなわちシンクで発現の高い遺伝子（52 個）、また逆に 1/2 以下すなわちソースで発現の高い遺伝子（89 個）がリストアップされた。これらの遺伝子は、ソース組織においては同化産物のローディング経路に、シンク組織においてはアンローディング経路に関与することが予想される。なお、以上の結果は、前年度までに得られた葉身および葉鞘

（全組織）における「シンクまたはソース特異的遺伝子」のリストと合わせて比較・考察し、原著論文として発表する予定である（投稿準備中）。

(5) 本研究によって、イネの葉身における SPS 活性が、ソースからシンクへの同化産物の移動（転流）を制御する一因子である可能性が示唆された。多くの植物においてショ糖が主な転流糖であることから、SPS 活性と転流の関係は古くから指摘されてきたが、実際に SPS 活性が高いと（SPS-NIL では）13C の転流が促進されることやシンクサイズ（粒数）が大きくなることを示したことは大きな成果であると考えられる。また、シンク組織とソース組織、およびシンク維管束とソース維管束との間で遺伝子発現パターンを比較することによって得られた「シンクまたはソース特異的遺伝子」は、それらの転流経路における機能や SPS-NIL 系統における発現パターンなど、今後の展開に期待が持てる。

## 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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

1) 青木直大, 廣瀬竜郎, 大杉立 (2009) イネのシンクまたはソース組織で特異的に発現する遺伝子の探索. 日本作物学会第 228 回講演会, 静岡県コンベンションアーツセンター, 2009 年 9 月. 講演番号 P-40, 日本作物学会紀事 78 (別 2) : 262-263.

〔図書〕（計 3 件）

1) 青木直大, 大杉立 (2010) 同化産物の転流と蓄積(1)代謝とシンク・ソース関係. 作物学用語事典, 日本作物学会編, pp. 158-159, 農山漁村文化協会.

2) 廣瀬竜郎, 青木直大 (2010) 同化産物の転流と蓄積(2)転流・輸送. 作物学用語事典, 日本作物学会編, pp. 160-161, 農山漁村文化協会.

3) 廣瀬竜郎 (2010) 同化産物の転流と蓄積(3)蓄積. 作物学用語事典, 日本作物学会編, pp.162-163, 農山漁村文化協会.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 直大 (AOKI NAOHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助

教

研究者番号：70466811

(2) 研究分担者

大杉 立 (OHSUGI RYU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40343107

廣瀬 竜郎 (HIROSE TATSURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・中央農業総合研究センター・主任研究員

研究者番号：90355579