

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22576

研究課題名(和文) イネの栄養器官におけるアミロース合成機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Granule-bound starch synthase II expressed in the vegetative organs of rice

研究代表者

森田 隆太郎 (Morita, ryutaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：30866075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイネの栄養器官における澱粉合成機構の解明を目指し、主に葉身や葉鞘で発現し澱粉の成分の1つで直鎖状分子であるアミロース合成を担うと考えられている澱粉粒結合型澱粉合成酵素(GBSS)IIの機能欠損変異体を用いて、生理解析を行なった。その結果、GBSSIIは葉身・葉鞘・根におけるアミロース合成を担う重要な酵素であることが明らかとなった。しかしながら機能欠損変異体の葉身・葉鞘の澱粉蓄積量は野生型と差異がなかった。さらに機能欠損変異体の生育や収量は野生型と有意な差はなかった。このことから、栄養器官におけるアミロース合成は光合成産物の効率的な蓄積やイネの生育には重要ではないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで解明されていなかったイネ栄養器官におけるアミロース合成機構の一端が明らかとなった。現在農業残差の多用途利用が検討されており、稲わらは飼料やバイオ燃料原料として注目を集めている。本研究で用いたgbss2機能欠損変異体の稲わらに蓄積する澱粉の詳細な物理化学的な性質の解析と従来の澱粉蓄積量を増加させる技術を組み合わせることで、多用途利用に適した澱粉が蓄積した新品種の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Amylose is a linear molecule that is a component of the starch. Amylose is biosynthesized by granule-bound starch synthase (GBSS), and two GBSS isozymes, the endosperm-type GBSSI and the vegetative organ-type GBSSII, are encoded in the rice genome. In this study, we analyzed the function of GBSSII of rice using gbss2 knockout mutants. We found that the amylose content in the leaf blades and leaf sheaths of the gbss2 mutants was dramatically reduced, indicating that GBSSII plays a vital role in amylose biosynthesis in the vegetative organs of rice. However, starch content in the leaf blade and leaf sheath of the gbss2 mutants was not different from that of the wild type. Furthermore, the growth and yield of gbss2 mutant were not significantly different from those of the wild type. This indicates that amylose synthesis in the vegetative organs of rice is not essential for the efficient accumulation of photosynthates and the growth of rice plants.

研究分野：作物生理学

キーワード：アミロース合成 澱粉粒結合型澱粉合成酵素 イネ 澱粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネの胚乳に蓄積する澱粉は発芽時の重要なエネルギー源であると同時に、我々人類の主要なカロリー源である。このためイネでは可食部である胚乳に着目し、澱粉生合成機構が研究されてきたが、葉身や葉鞘といった栄養器官における澱粉生合成機構は解析されてこなかった。申請者はこれまでの研究により器官ごとに蓄積する澱粉粒の大きさやアミロース/アミロペクチン比・アミロペクチンの分子量といった澱粉の分子構造が異なることを明らかにした (Morita et al. 2019, PCP, 57; 2334-2341)。しかしながら、胚乳における澱粉生合成機構は解明されつつあるが、その他の器官における澱粉生合成機構は解析されておらず、器官ごとに澱粉が作り分けられるメカニズムは明らかとなっていない。また、器官ごとに澱粉の生理的役割は異なるが、器官ごとに澱粉が作り分けられる生理学的な意義は不明である。

澱粉の主成分の1つである直鎖状分子アミロースは澱粉粒結合型澱粉合成酵素 (GBSS) により合成される。イネには2種類のGBSSアイソフォームが存在し、胚乳で働くGBSSIの機能欠損イネは「もちイネ」として知られ、「ジャポニカイネ」では自然変異により遺伝子の発現量が低下するためインディカイネよりもアミロース含量が低下する。GBSSIは花粉においても発現していることが知られているが、葉身・葉鞘・根ではGBSSIはほとんど発現しておらず、もう1つのアイソフォームGBSSIIが発現していることが報告されている。そこで本研究では *gbss2* 機能欠損イネを用いて生理解析を行い、栄養器官における澱粉生合成機構と、アミロース蓄積の生理学的な意義の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究ではイネの葉身・葉鞘・根におけるアミロース生合成機構とアミロース蓄積が澱粉代謝に及ぼす効果の解明を目指し、イネをはじめ他のイネ科穀類でも単離されていない葉で発現する澱粉粒結合型澱粉合成酵素のアイソフォームGBSSIIの機能欠損変異体 (*gbss2*) を作出し、その生理解析や生育・収量調査を行う。また、GBSSIとGBSSIIの組み換え酵素を作成し、酵素特性の差異を明らかにする。

3. 研究の方法

1. CRISPR-Cas9法により作出したGBSSII欠損変異体(*gbss2*)のGBSSIIタンパク質の解析

日本型水稻品種日本晴 (*Oryza sativa* L.) を背景に、CRISPR-Cas9法により作出した形質転換イネの配列は既に解析しているが、タンパク質レベルでの発現解析は行っていない。GBSSは澱粉に強く結合するため、葉鞘から精製した澱粉からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEによりタンパク質を電気泳動した後、銀染色法でバンドを確認した。野生型でのみ見られたバンドを切り出し、MS解析を行い、タンパク質を同定した。

2. *gbss2*における葉身、葉鞘、根端の澱粉蓄積の解析

gbss2 を育成し、第7.5葉齢期に第7葉葉身と第6葉鞘をサンプリングして、100%エタノールで脱色し、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した。また28℃で、湿潤した濾紙上で3日間発芽させた種子の種子根の先端およそ1cmをサンプリングし、100%エタノールで1晩固定した。その後、葉身・葉鞘と同様の方法でヨウ素染色を行い、実体顕微鏡で観察した。さらに同条件で *gbss2* を育成して第8.6葉齢期に第8葉身と第7葉鞘をサンプリングし、酵素法により澱粉とスクロース含量を測定した。

3. *gbss2*の葉鞘澱粉の分子構造の解析

精製した葉鞘澱粉を用いてキャピラリー電気泳動法により、アミロペクチンの鎖長分布解析を行なった。また、葉鞘澱粉をイソアミラーゼで加水分解処理後、ゲル濾過カラムで分離し、アミロース含量を解析した。

4. *gbss2*の生育・収量調査

東京大学弥生キャンパス内にある隔離圃場で *gbss2* を育成した。完熟後に地上部と穂を収穫し、それぞれ80℃と50℃で3日間乾燥させた。その後、稲わら乾物重、穂数、穂重を測定した。

5. 組み換え酵素を用いたGBSSIとGBSSIIの酵素特性の比較

His-タグを用いて、GBSSIとGBSSIIの組み換え酵素を精製した。胚乳澱粉を用いて Starch binding assay を行い、GBSSIとGBSSIIの澱粉粒に対する結合能力の差異を解析した。

4. 研究成果

1. CRISPR-Cas9 法により作出した GBSSII 欠損変異体(*gbss2*)の GBSSII タンパク質の解析

本研究では CRISPR-Cas9 法により作出した *GBSSII* 遺伝子の第一エキソンに 1 塩基挿入された系統 *gbss2-#5-2* と 60 塩基挿入された系統 *gbss2-#12-2* を供試材料とした。配列情報から、これらの系統はそれぞれ 101 と 106 残基目に終止コドンが出現すると予想された。これらの精製葉鞘澱粉からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE の後、銀染色を行なった。その結果、およそ 60 kDa の位置に野生型でバンドが検出されたが、*gbss2* では検出されなかった。野生型でのみ検出されたバンドを切り出し、LC-MS-MS で解析したところ、GBSSII だと同定された。以上のことから、*gbss2* は変異が導入されたことにより正常な GBSSII タンパク質が発現しておらず、機能欠損変異体であると考えられた。

2. *gbss2* における葉身、葉鞘、根端の澱粉蓄積の解析

一般的に澱粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色すると青紫色に、アミロースが蓄積しない「もち澱粉」は赤紫色に呈色する。野生型や *gbss1* 機能欠損イネでは葉身、葉鞘、根端は青紫色に呈色したが、*gbss2* ではそれぞれの器官が赤褐色に呈色した(図 1)。また葉身・葉鞘の澱粉・スクロース蓄積量は野生型と有意な差はなかった。



3. *gbss2* の葉鞘澱粉の分子構造の解析

葉鞘澱粉の鎖長分布解析の結果、*gbss2* では野生型とアミロペクチンの鎖長分布パターンに大きな差がなかった。つまり、GBSSII は葉鞘のアミロペクチン合成に関与しないことが示された。アミロース含量は野生型では 14% ほどであったのに対し、*gbss2-5*、*gbss2-12* 共に 1% ほどと劇的に減少した。2. のヨウ素染色の結果を踏まえると、GBSSII は葉身や葉鞘のアミロース生合成の大部分を担うことが明らかとなった。一方で、アミロース生合成は光合成産物の蓄積能力には重要ではないことが示唆された。

4. *gbss2* の生育・収量調査

野生型と *gbss2* の間に稲わら乾燥重、穂数、穂重に有意な差はなかった。しかしながら、今後より相対成長速度や収量構成要素の解析など、より詳細な解析が必要である。

5. 組み換え酵素を用いた GBSSI と GBSSII の酵素特性の比較

His-GBSSI、His-GBSSII と胚乳澱粉をそれぞれインキュベートし、胚乳澱粉に結合した組み換え酵素を溶出した。その後、His タグ特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により結合した組み換え酵素量を解析した。しかしながら、His タグ特異的抗体の検出感度がよくなかった。そこで GBSSI のポリクローナル抗体を用いて再度ウエスタンブロット解析を行なうと、His-GBSSI は His-GBSSII よりも胚乳澱粉へ結合していた。しかしながら、GBSSI と GBSSII はアミノ酸配列の相同性が高いものの GBSSI ポリクローナル抗体への特異性は GBSSI と GBSSII で異なる可能性が高い。今後より詳細な解析を行うことで、GBSSI と GBSSII の酵素特性の違いを明らかにできるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 隆太郎, 高橋 陽希, 三浦 聡子, クロフツ 尚子, 深山 浩, 青木 直大, 藤田 直子
2. 発表標題 イネ栄養器官で発現する澱粉粒結合型澱粉合成酵素(GBSS)IIの機能解析
3. 学会等名 第251回日本作物学会講演会
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
---------	---------