

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580409

研究課題名（和文）液胞型多糖蓄積形質転換イネのバイオマス増加効果の生理学的解析

研究課題名（英文）Physiological analysis of potential of fructan-accumulating transgenic rice for biomass material

研究代表者

吉田みどり（YOSHIDA MIDORI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター

寒地作物研究領域・主任研究員

研究者番号：00355455

研究成果の概要（和文）：イネでは、低温耐処理中に穂ばらみ期の幼穂においてスクロースの量が低下することが分かった。この現象に、低温下での葉鞘におけるスクロース転流遺伝子の発現の抑制、葉身、葉鞘でのショ糖分解に関わる遺伝子発現の減少が関与する結果が得られた。低温下での糖の供給の変化が稔実に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。コムギ 1-SST 導入形質転換イネでは、蓄積されたフルクタン分解及び低温下でも働く導入 1-SST がフルクタン合成中に生成する単糖により糖供給不足を補足するため、低温耐性が向上すると推察される。

研究成果の概要（英文）：We investigated changes in the expression levels of genes related to sucrose metabolism and transport in tissues of booting-stage rice exposed to a chilling temperature. Decrease in sucrose content in primitive panicles of rice was observed at 12°C. The gene expression analysis suggested that expression levels of OsSUT and OsSUS, OsINV might be related to changes in sucrose metabolism and partitioning in rice plants under a cold condition. Contents of glucose and fructose were higher in sink tissues. The contents were also higher in fructan-accumulated rice than in non-transgenic rice. These results might be due to the release of monosaccharides during induced fructan synthesis or degradation in transgenic rice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：バイオマス、糖代謝、フルクタン、イネ

1. 研究開始当初の背景

(1) 水田稲作では米の生産調整を余儀なくされており、減反面積は 96 万 ha に達する。一方で、国内の家畜飼料はその多くを輸入に

依存しているが、口蹄疫等の伝染性病害の発生などの海外飼料の問題が噴出し国内自給率を上げることが重要課題となって以降、双方の打開策として飼料米の開発が進められ

てきた。輸入飼料価格の高騰をうけて、飼料イネの栽培普及はさらに必要性を増している。この流れと相まって、昨今のバイオエタノール生産推進の中で、稲わらからバイオエタノールを生産する技術が提唱され、稲の非食部のエタノール化資材利用が注目されている。飼料イネ、バイオエタノール生産用稲により適したイネ品種の開発により、減反による転換畑および休耕田におけるこれらの生産拡大が期待される。

(2) 研究代表者を中心としたグループでは、主にコムギの蓄積多糖であるフルクタン耐凍性・雪腐病抵抗性の研究の過程で、コムギからフルクタン合成に関わる酵素遺伝子を単離した (Kawakami & Yoshida, B. B. B. 2002, *Planta* 2005)。このフルクタン合成酵素遺伝子の分子育種応用研究の1つとして、我々は光合成産物をデンプンとして葉緑体に蓄積するイネにコムギのフルクタン合成酵素遺伝子を導入し、液胞にも多糖 (フルクタン) を蓄積する形質転換体を作成して、このイネの飼料イネとしての素材評価を行った (科研費 17-18 年度)。このイネの開発目的は、もともと寒地型イネ科牧草の主要蓄積糖であるフルクタンには、家畜の嗜好性や胃の環境を改善する効果があるため、これらをイネに蓄積させて、イネの飼料価値を向上させることにあった。素材評価の結果、当初の目的以外に、フルクタン蓄積イネは非形質転換体とほぼ同等の成長を示すにもかかわらず、葉における可溶性糖含量が著しく増加しており、一方で一部系統の葉の予備実験でデンプンおよび細胞壁量に変化がない結果を得た (Kawakami, Sato & Yoshida, *J. Exp. Bot.* 2008, 18 年度科研費報告書)。さらにその後の研究により、イネの鞘、茎組織においてもこの可溶性糖の増加が確認されている (Kawakami, Sato & Yoshida, 2009)。このことから、フルクタン蓄積形質転換イネはフルクタン蓄積による飼料価値向上だけではなく、炭酸固定物増加能がある有用バイオエタノール生産イネ素材としての可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題は、フルクタンを液胞に蓄積するイネ形質転換体のバイオマス利用評価および、液胞に糖を蓄積することが光合成同化能や糖の分配に与える影響を遺伝子発現レベルで解析し、炭酸固定物増加の機構解明に取り組む。

(2) また、水溶性多糖であるフルクタンは植物の耐凍性や耐乾性との関係が報告されている。コムギのフルクタン合成酵素遺伝子を

導入してフルクタン蓄積能を付与又は向上したイネ形質転換体で耐凍性が向上する。耐凍性や耐乾性においてフルクタンは浸透圧調整や膜保護に働くと考えられているが、低温感受性植物への低温耐性向上機構は明かではない。イネ形質転換体を用いて低温耐性向上に対する糖蓄積の効果及び生理機構変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 育成方法

I 22 系統 (コムギのフルクタン合成酵素、sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase [1-SST] 遺伝子導入ゆきひかり) と原品種をガラス温室 (26°C/19°C : 太陽光) で穂ばらみ期まで生育し、12°C低温処理し (ガラス温室 : 太陽光)、再度 26°C/19°C 環境下に戻した。低温処理前、中、後の止葉1葉前の成熟葉の葉身とその葉鞘、止葉葉鞘および幼穂の各組織をサンプリングした。

(2) 可溶性糖含量測定

サンプリング組織は糖抽出まで-80°C凍結状態で保存した。得られた組織 1 g を細かく裁断し、生重量の5-10倍量の熱水蒸留水 (内部標準として 1mg/ml のプロピレングリコールを含む) で 1 時間煮沸し、抽出液を 0.45 μm のフィルターで濾過した。各種糖含量は RI 検出を用いた HPLC で測定した。カラムは Shodex KS802 と KS803 を連結したものを扱い、カラム温度 50°C、移動相を水とし 0.8 ml/min で分離し、フルクトース、グルコース、スクロース、フルクタン量に分け測定した。

(3) RNA 抽出と Real-time PCR による遺伝子発現解析

RNeasy Plant Mini kit (Qiagen USA, Valencia, CA) 用いイネからの RNA 抽出を行った。抽出した RNA 1 μg を DNase 処理した後、Oligo-dT₂₀ プライマーを用いて SuperScript III (Invitrogen) で逆転写し cDNA を合成した。RNA 5 ng 相当の cDNA をテンプレートとし、7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) と SYBR Premix Ex Taq (TAKARA BIO Inc.) によって mRNA 発現解析を行った。ポリユビキチン遺伝子及び解析遺伝子を pGEM-T easy vector にクローニングし、いくつかの希釈系列にておいて増幅し検量線を作成した。増殖曲線から得られた Ct 値を検量線に基づいて定量した後、ポリユビキチン遺伝子を内性標準遺伝子として用い規格化した。

解析遺伝は、Sucrose transporter 遺伝子群 (*OsSUT1-5*)、Sucrose synthase 遺伝子群 (*OsSus1-6*)、Invertase 遺伝子群 (8 遺伝子)、Monosaccharide transporter 遺伝子群

(*OsMST3-5, 7, 8*)、Sucrose phosphate synthase (*OsSPS1-5*) の 5 遺伝子群。

4. 研究成果

(1) まず、イネの各組織の糖含量の低温応答を原品種と形質転換イネで解析した。低温処理によって穂ばらみ期のイネでは、ソース葉である止葉の 1 葉前の葉身やその葉鞘ではショ糖含量の急激な増加が見られ、シンク組織の幼穂では逆に低温下でショ糖が減少した。イネは元来フルクタンを合成しないが、導入した 1-SST はスクロースを基質としてフルクタンを合成するため、形質転換体では低温処理のスクロース増加に従って、葉身および葉鞘のフルクタン含量が増加した。また、フルクタンは液胞に蓄積されるが、スクロース含量の高い組織では蓄積可溶糖のなかで最も含量が多くなった (図 1)。

(2) 穂ばらみ期イネの低温処理中のシンク、ソース組織においてスクロース転流・代謝遺伝子群の mRNA 量の変化を解析したところ、遺伝子によって低温応答は異なった(データ省略)。その中で、発現量も高く、機能が明かなスクロース転流遺伝子の *OsSUT1*、スクロース分解遺伝子の *OsSus2*、*OsVINVI* の変化は低温処理中のソース葉の葉身又は葉鞘で低下した (図 2)。これらの変化はソース組織での低温処理によるスクロース含量の増加と幼穂でのスクロースの減少の要因に関与すると考えられた。

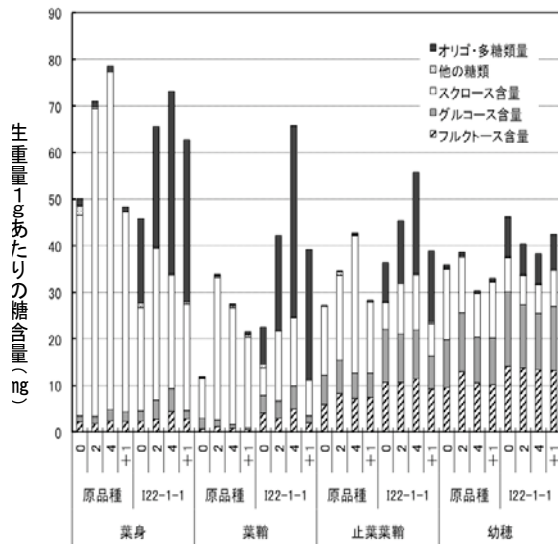


図1 穂ばらみ期に 12°C 処理した原品種(ゆきひかり)と形質転換体 (122-1-1)の止葉1枚手前の葉身・葉鞘と止葉の葉鞘及び幼穂の可溶性糖含量。

0, 2, 4: 低温処理日数, +1: 低温処理後常温に戻して1日後。

また、イネは元来フルクタンを蓄積しないが、イネの *OsVINVI* はフルクタン分解活性を持つ。葉身ではこの *OsVINVI* の発現が、形質転換体において低温処理下でも増加した (図 2)。

(3) *OsSPS1* を除く *OsSPSs* の発現量は、低温処理中のソース葉とその葉鞘で減少し、幼穂においては全ての *OsSPSs* の発現量が増加した。*OsSPSs* 発現量変化とショ糖蓄積量変化には相関がみられなかった (データ省略)。

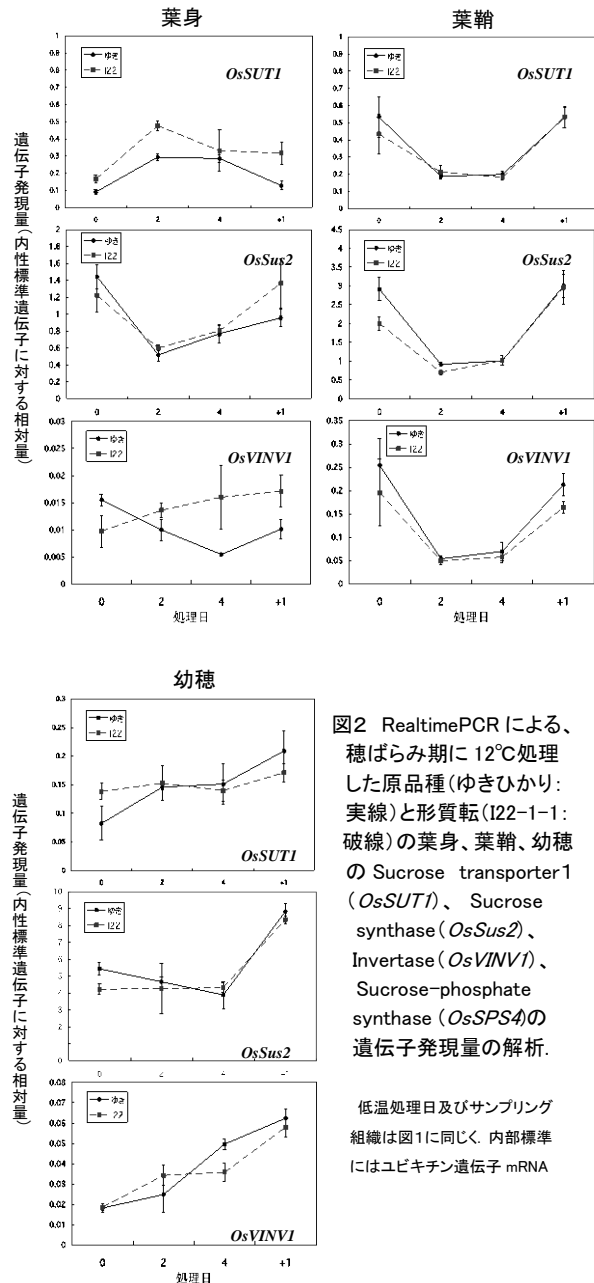


図2 RealtimePCRによる、穂ばらみ期に 12°C 処理した原品種(ゆきひかり: 実線)と形質転換体(122-1-1: 破線)の葉身、葉鞘、幼穂の Sucrose transporter1 (*OsSUT1*)、Sucrose synthase (*OsSus2*)、Invertase (*OsVINVI*)、Sucrose-phosphate synthase (*OsSPS4*)の遺伝子発現量の解析。

低温処理日及びサンプリング組織は図1に同じく、内部標準にはユビキチン遺伝子 mRNA

(4) スクロース転流・代謝遺伝子に関しては *OsVINVI* の葉身を除き、すべての遺伝子発現において、原品種とコムギ 1-SST 導入形質転換体 (I22) に差異は無かった。

(5) 単糖類はイネの組織のうち、シンク組織に向かうほど、その含量が増加したが、その含量はフルクタン蓄積形質転換体の方が高かった(図1)。単糖輸送遺伝子 *OsMSTs* の発現はソース葉や葉鞘では極めて低く、幼穂において5遺伝子とも発現が検出できた。幼穂では *OsMST3-5, 7* の発現において形質転換体の方が高い値を示した(図3)。

(6) これらの結果から、低温下でのスクロースの供給の変化が穂ばらみ期の幼穂に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。この際に、コムギ 1-SST 導入形質転換イネでは、蓄積されたフルクタンを *OsVIN1* が分解することによってフルクトースが生産される。また、導入されているコムギのフルクタン合成酵素 1-SST は低温下でも働くため、フルクタン合成中にグルコースを生成する。イネに新たに付加されたこの2つの経路により単糖供給不足を補足するため、フルクタン蓄積形質転換イネにおいて穂ばらみ期に低温耐性が向上する可能性があるかと推察される。

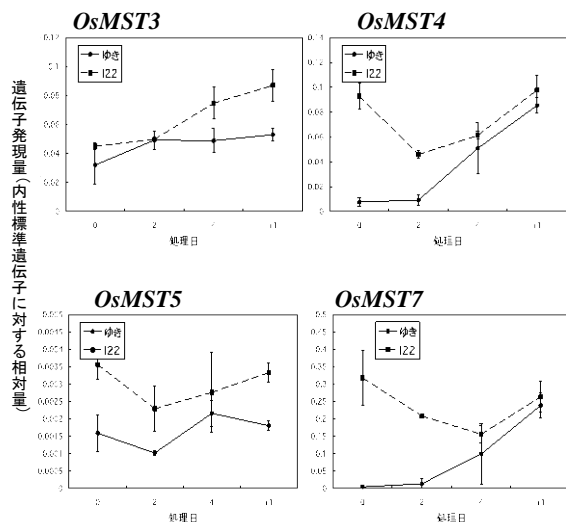


図3 RealtimePCRによる、穂ばらみ期に12°C処理した原品種(ゆきひかり:実線)と形質転換体(I22-1-1:破線)の幼穂における Monosaccharide transporter (*OsMST3, 4, 5, 7*) 遺伝子発現量の解析。

低温処理日及びサンプリング組織は図1に同じく、内部標準にはユビキチン遺伝子 mRNA 量を用いた。(n = 3)

(7) 参考文献

Kawakami, A. and Yoshida, M. Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 66: 2297-2305 (2002)

Kawakami, A. and Yoshida, M. Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, 21:1-15 (2005)

Kawakami, A. Sato, Y. and Yoshida, M. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J. Exp. Bot.*, 59(4) 793-802 (2008)

Kawakami, A. Sato, Y. and Yoshida, M. Growth and characteristics of fructan-accumulating transgenic rice: potential for utilization in forage. *Dynamic, Biochemistry, Procces Biotechnology and Molecular Biology*, vol. 3, Special Issue 1, 78-84 (2009)

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

① 吉田みどり、目黒文乃、穂ばらみ期に低温処理されたフルクタン合成酵素遺伝子 (*I-SST*) 導入イネ形質転換体における単糖タンパク質遺伝子の発現解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16日、京都

② 目黒文乃、吉田みどり、穂ばらみ期に低温処理されたフルクタン合成酵素遺伝子 (*I-SST*) 導入イネ形質転換体におけるショ糖合成酵素遺伝子の発現解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、仙台(震災により要旨発行成立)

③ 目黒文乃、吉田みどり、穂ばらみ期に低温処理されたフルクタン分解酵素遺伝子 (*I-SST*) 導入イネ形質転換体におけるショ糖合成酵素遺伝子の発現解析、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月19日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田みどり (YOSHIDA MIDORI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研究領域・主任研究員

研究者番号: 00355455