

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580027

研究課題名(和文) 登熟期間中のイネ葉鞘におけるデンプン分解関連酵素遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis for the genes encoding starch degrading enzymes in rice leaf sheaths during the grain-filling stage

研究代表者

平野 達也 (Hirano, Tatsuya)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：30319313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネ葉鞘における出穂後のデンプン分解制御機構の解明のため、 α -および β -アミラーゼ遺伝子ファミリーを構成する各遺伝子の機能解析を進めた。多収品種タカナリでは、 β -アミラーゼ遺伝子のRAmy2Aの発現が出穂後の葉鞘において急激に上昇し、それが急激なデンプン分解をもたらす要因のひとつと示唆された。 β -アミラーゼ遺伝子のOsBAM2もしくはOsBAM3の過剰発現は葉鞘のデンプン含量を著しく低下させるが、それらの発現抑制は葉鞘におけるデンプン含量を有意に増加させることはなかった。また、OsBAM5の発現は夜間の葉身において著しく高く、その発現抑制は葉身にデンプンを過剰に蓄積させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The function of some genes constituting α -amylase and β -amylase gene families was investigated to elucidate the mechanisms of starch degradation in rice leaf sheaths during the post-heading stage. In heavy-panicle cultivars, Takanari, the transcription level of RAmy2A, one of β -amylase genes, rapidly increased after heading in leaf sheaths, which may be one of the factors that cause the rapid degradation of starch in the leaf sheaths of Takanari. Overexpression of OsBAM2 or OsBAM3, the β -amylase genes, markedly reduced the starch level in leaf sheaths. However, the transcriptional repression of OsBAM2 or OsBAM3 did not significantly increase the starch accumulation in leaf sheaths at heading stage. The transcription level of OsBAM5 was enhanced during the night in leaf blades. Furthermore, the transcriptional repression of OsBAM5 resulted in the excess of starch accumulation in leaf blades.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 葉鞘 デンプン分解 α -アミラーゼ β -アミラーゼ 非構造型炭水化物

1. 研究開始当初の背景

イネの増収を達成するためにはシンクである穂のサイズ、すなわち一穂穎果数を増加させる必要がある。近年、日本では飼料用など多用途米の開発のために、一穂穎果数の多い超多収品種がいくつか育成されている。一方で、超多収品種の増大したシンクを十分に満たすためには、通常の品種以上に多くの同化産物が登熟に供給されなければならない。そのため、一穂穎果数が著しく増加すると穎果当たりの供給同化産物の不足から登熟歩合が低下し、収量が不安定になる場合がある。よって、超多収を目指したイネ品種を有効に活用していくためには、増加したシンクサイズに対応できるような物質生産力、すなわちソース機能の増強が不可欠である。

イネ穎果の登熟に対するソースとしては、出穂後に葉身において新たに同化された炭水化物(出穂後同化産物)および出穂前までに茎葉部(稈および葉鞘)に蓄積された炭水化物(出穂前蓄積同化産物)の2つがある。このうち後者は登熟した穎果胚乳中に蓄積された炭水化物の約30%を占めると報告されており、その供給が不十分であると、登熟初期に必要な炭水化物が不足し、登熟歩合の悪化をもたらす場合がある。よって、出穂前蓄積同化産物である稈および葉鞘におけるデンプン蓄積量を増加させること、ならびに出穂後の稈および葉鞘におけるデンプン分解とそれに続く糖転流活性を増加させることが、登熟に必要なソース機能を増強するために必要な課題として考えられる。このうち、稈や葉鞘におけるデンプン合成に関する酵素を扱った研究は比較的多い。しかし一方で、出穂後のデンプン分解に関連する研究は、出穂期直後の葉鞘において α -アミラーゼの活性が高まることが示された報告(Ishimaruら(2004) *Plant Physiol Biochem*, 42: 855-860)などに限られている。

2. 研究の目的

モデル植物のシロイヌナズナでは、葉に蓄積したデンプンが夜間に分解される仕組みが詳細に解析されている(Zeemanら(2010) *Ann. Rev. Plant Biol.* 61: 209-234)。葉において著しいデンプン過剰蓄積の表現型を示す変異体の解析により、 β -グルカンリン酸化酵素(β -glucan, water dikinase; GWD)によるデンプン顆粒のリン酸化、ならびにそれに続く α -アミラーゼによるマルトース単位での α -1,4グルコシド結合の分解がシロイヌナズナの葉におけるデンプン分解に重

要な役割を担っていることが明らかにされている。そこで筆者は、イネゲノム上にアノテーションされている9つの α -アミラーゼ遺伝子の発現量を様々な器官で解析し、出穂後の葉鞘での発現レベルが高かった *OsBAM2* と *OsBAM3* 遺伝子について、その翻訳産物の解析を進めてきた。その結果、*OsBAM2* と *OsBAM3* はプラスチド局在型であること、その大腸菌組換えタンパク質は実際に α -アミラーゼ活性を有することを明らかにした(Hiranoら(2011) *Plant Prod. Sci.* 8: 122-130)。

そこで本研究では、*OsBAM2* と *OsBAM3* が茎葉部、特に出穂後の葉鞘におけるデンプン分解に果たす役割を明らかにするため、それらの過剰発現系統および発現抑制系統を用いて、その表現型の解析を進めた。さらに *OsBAM5* 遺伝子の発現は葉身において夜間に急激に増加し、その発現抑制系統は葉身においてデンプン過剰の表現型となることを示す。また、 α -アミラーゼ遺伝子のひとつである *RAmy2A* の働きを解明するため、出穂後の葉鞘におけるデンプン分解速度が異なる品種を用いて、*RAmy2A* の発現量を比較し、また *RAmy2A* の発現抑制が葉鞘のデンプン含量の変化に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) 葉鞘における α -アミラーゼ活性の測定および α -アミラーゼ遺伝子の発現解析

日本型品種の日本晴を屋外で生育させ、止葉展開期、出穂期、出穂3、6、12および24日後に主稈の第3葉鞘を採取した。採取した葉鞘のデンプンおよび糖含量を定量し、さらに、各遺伝子特異的プライマーを用いた定量RT-PCRにより、各 α -アミラーゼ遺伝子の転写レベルを解析した。

(2) *OsBAM2* および *OsBAM3* 遺伝子の発現抑制ならびに過剰発現系統の作出とその表現型解析

RNAi法により *OsBAM2* および *OsBAM3* 遺伝子の発現抑制系統を作出するため、Miki and Shimamoto((2004) *Plant Cell Physiol.* 45: 490-495)が開発したRNAi誘導用バイナリーベクターであるpANDA vectorに、*OsBAM2* もしくは *OsBAM3* のRNAiを誘発するトリガー配列をそれぞれ組み込んだpANDA-BAM2およびpANDA-BAM3ベクターを構築した。また、*OsBAM2* と *OsBAM3* の過剰発現系統を作出するため、イネ葉鞘から調製したcDNAを鋳型として、それぞれの全長cDNA配列をPCRによ

り増幅した。それら PCR 産物を精製し、トウモロコシユビキチンプロモーターの制御下でそれぞれが高発現される pBECKS-BAM2 および pBECKS-BAM3 ベクターを構築した。

Agrobacterium tumefaciens EHA105 株もしくは LBA4404 株に構築したベクターを導入し、イネ（品種：ササニシキ）の種子胚盤から誘導したカルスに *Agrobacterium* を感染させることで形質転換を行った。カルスはハイグロマイシンを含む選択培地上で育成し、耐性カルスから再分化を誘導して、ベクターが導入された T0 世代の形質転換体を得た。なお、再分化個体から調製したゲノム DNA を鋳型として、選択マーカー遺伝子と RNAi トリガーのリンカー配列に特異的なプライマーを用いた PCR によりベクターの導入を確認した。

OsBAM2 および *OsBAM3* の発現抑制ならびに過剰発現による表現型の解析には、各形質転換体の T2 世代の植物体を用いた。T2 世代の植物体をポットに移植して、昼温 32℃、夜温 25℃ に設定された 13 時間日長（最大光量子束密度：845 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）の P1P 対応人工光型グロースチャンバー内で生育させた。適切な時期に主稈の第 3 葉鞘を採取し、デンプン・糖含量、*OsBAM2* および *OsBAM3* の転写レベルならびに α -アミラーゼ活性を解析した。

(3) *OsBAM4* および *OsBAM5* の細胞内局在性の解析

OsBAM4 と *OsBAM5* 遺伝子に対する推定アミノ酸配列の全長 545 および 567 アミノ酸残基のうち、それぞれ N 末端側から 502 および 556 アミノ酸残基に相当する cDNA 配列を PCR により増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) により GFP 発現ベクター (Chiuら (1996) *Curr. Biol.* 6: 325-330) に挿入して、sGFP がそれぞれの C 末端側に連結されたキメラタンパク質発現用の *OsBAM4*-sGFP ならびに *OsBAM5*-sGFP ベクターを構築した。構築したベクターをパーティクルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入し、蛍光顕微鏡により一過的な GFP の発現を観察した。なお、プラスチド局在のポジティブコントロールとして、*AtrecA-DsRed2* (Imaizumi-Anrakuら (2005) *Nature* 433: 527-531) もまた上記ベクターと同時にタマネギ表皮細胞に導入した。

(4) 葉身におけるデンプン含量の日変化と α -アミラーゼ遺伝子の発現の関係

日本型イネ品種の日本晴を、昼温 28℃、夜温 23℃ に設定された 12 時間日長の人工光型

グロースチャンバー（最大光量子束密度：845 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で生育させ、止葉展開期に止葉を第 1 葉としたときの第 3 葉身を 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 および 6 時に経時的に採取した。採取した葉身は凍結保存し、その後、デンプンと糖含量を定量した。また、定量 RT-PCR により α -アミラーゼ遺伝子の転写レベルを解析した。

(5) *OsBAM5* 遺伝子の発現抑制システムの作出とその表現型解析

OsBAM5 の発現抑制システムを作出するため、*OsBAM5* の RNAi を誘導するトリガー配列を PCR により増幅し、pANDA vector に組み込んだ pANDA-BAM5 ベクターを構築した。構築したベクターを用いて、上記(2)に記載した方法によりイネ（品種：ササニシキ）の形質転換を実施した。得られた形質転換体の T2 世代を昼温 28℃、夜温 23℃ に設定された 12 時間日長の P1P 対応人工光型グロースチャンバー（最大光量子束密度：845 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で生育させ、止葉展開期に葉を第 1 葉としたときの第 3 葉身を 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 および 6 時に経時的に採取した。採取した葉のデンプンおよび糖含量を定量し、また半定量的 RT-PCR により *OsBAM2*、*OsBAM3* および *OsBAM5* の転写レベルを解析した。

(6) 葉鞘における α -アミラーゼ遺伝子の発現量の品種間差異

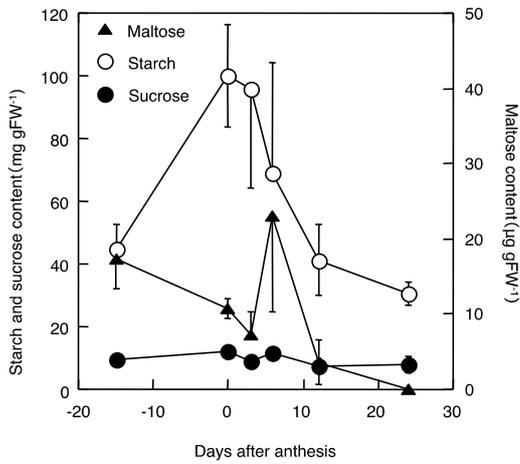
日本型品種の日本晴と出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の低下が速いインド型多収品種のタカナリを屋外で生育させ、出穂期以降に主稈の第 3 葉鞘を採取し、デンプンおよび糖含量を定量した。また、定量 RT-PCR により、葉鞘で発現が認められる α -アミラーゼ遺伝子である *RAmy2A* と *RAmy3C* の転写レベルを詳細に解析した。さらに、葉鞘における α -アミラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 葉鞘におけるデンプン含量の変化と α -アミラーゼ遺伝子の転写レベルとの関係

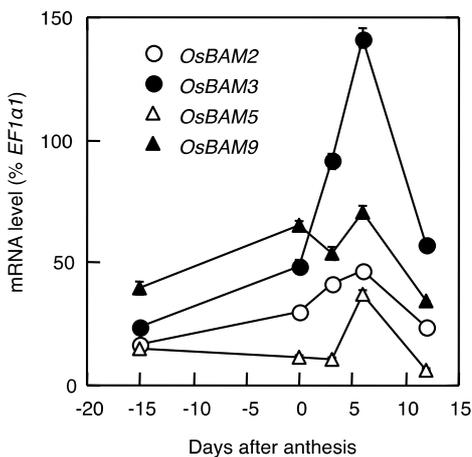
日本晴の葉鞘におけるデンプン含量は止葉展開期から出穂期にかけて増加し、出穂 3 日後から 12 日後にかけて急激に減少した（第 1 図）。スクロース含量は実験期間中にほぼ一定で推移し、マルトース含量は出穂 3 から 6 日後にかけて増加したが、再び出穂 12 日後にかけて減少した。

イネゲノム上にアノテーションされている 9 つの α -アミラーゼ遺伝子のうち、



第1図．日本晴の第3葉鞘におけるデンプン，スクロースおよびマルトース含量の変化．数値は3個体の平均，縦棒は標準誤差を示す．

OsBAM1 と *OsBAM7* は葉鞘における発現が認められない(Hiranoら(2011)*Plant Prod. Sci.* 8: 122-130). そこで，それら以外の7つの -アミラーゼ遺伝子の転写レベルを定量 RT-PCR により解析した．プラスチド局在型 -アミラーゼをコードしている *OsBAM2* と *OsBAM3* の転写レベルは出穂期から上昇し，デンプン含量が減少している出穂6日目に最大に達した(第2図)．特に，*OsBAM3* の転写レベルの増加が著しかった．よって，*OsBAM2* と *OsBAM3* ，中でも *OsBAM3* は葉鞘における出穂後のデンプン分解において重要な役割を担っている可能性が示唆される．また，*OsBAM5* と *OsBAM9* の転写レベルも出穂後の葉鞘において高いことが明らかになった．

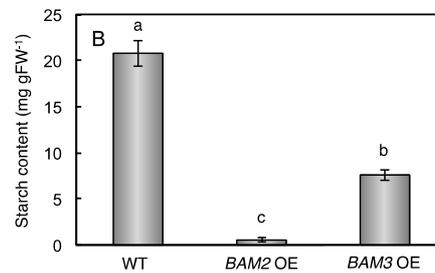


第2図．日本晴の第3葉鞘における *OsBAM2* ，*OsBAM3* ，*OsBAM5* および *OsBAM9* 遺伝子の転写レベルの変化

数値は内部標準遺伝子である *OsEF1* 1 の転写レベルに対する相対値を示す．また，数値は3反復の平均，縦棒は標準誤差を示す．

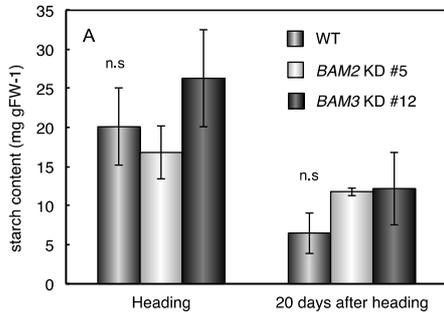
(2) *OsBAM2* および *OsBAM3* 遺伝子の機能解析

OsBAM2 過剰発現系統である *BAM2* OE では，出穂期の第3葉鞘における -アミラーゼ活性が，野生型ササニシキよりも有意差はないものの高い傾向にあり(データは掲載せず)，また出穂期の第3葉鞘におけるデンプン含量は野生型と比較して著しく低下した(第3図)．また，*OsBAM3* 過剰発現系統である *BAM3* OE でもまた，出穂期の第3葉鞘における -アミラーゼ活性が高くなる傾向にあり，出穂期の第3葉鞘におけるデンプン含量は，野生型よりも著しく低下した．以上の結果から，プラスチド局在型 -アミラーゼアイソフォームである *OsBAM2* と *OsBAM3* の過剰発現はイネ植物体茎葉部に一時的に蓄積されたデンプンの分解を促すことが明らかになった．



第3図 *OsBAM2* および *OsBAM3* 過剰発現系統の第3葉鞘における出穂期のデンプン含量．数値は3個体の平均，縦棒は標準誤差を示す．異なるアルファベット間の数値には5%水準で有意差があることを示す．

BAM2 KD #5 および *BAM3* KD #12 の第3葉鞘におけるデンプン含量は，出穂期と出穂20日後ともに野生型と比べて有意差がなかった(第4図)．また，出穂期における第3葉鞘の -アミラーゼ活性を測定したところ，*BAM2* KD #5 および *BAM3* KD #12 の活性はともに野生型と比較してわずかに低くなる傾向が認められたものの，有意差はなかった(データは掲載せず)．よって，*OsBAM2* ならびに *OsBAM3* それぞれ単独の発現抑制では，出穂期以降の葉鞘におけるデンプン含量には大きな影響は与えないことが明らかになった．その原因のひとつは，各発現抑制系統において発現抑制された -アミラーゼ遺伝子の機能を，他の -アミラーゼ遺伝子が十分に補うことができるためと考えられる．現在，*OsBAM2* と *OsBAM3* の2つが同時に発現抑制された系統の作出に成功しており，今後はその系統の表現型を解析する予定である．



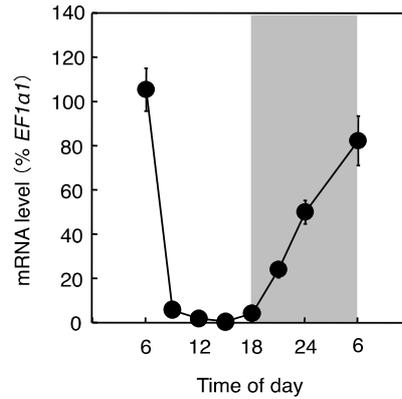
第4図. *OsBAM2* および *OsBAM3* 発現抑制系統における第3葉鞘のデンプン含量
 数値は3個体の平均, 縦棒は標準誤差を示す.
 n.s. は各系統間に有意差がないことを示す.

(3) *OsBAM4* と *OsBAM5* の細胞内局在性の解析
OsBAM4 と *OsBAM5* 遺伝子はともに葉鞘での発現が認められ, しかもそれらの推定アミノ酸配列に基づく系統樹解析では, *OsBAM2* および *OsBAM3* と同じファミリーに属することが推定されている(Hirano ら(2011) *Plant Prod. Sci.* 8: 122-130). これら2つのアイソフォームのC末端側に GFP を融合させたキメラタンパク質をタマネギ表皮細胞において一過性で発現させ, その発現パターンを蛍光顕微鏡で観察した結果, *OsBAM4* および *OsBAM5* ともにプラスチド局在型であることが明らかになった(データは掲載せず).

(4) 葉身におけるデンプン含量の日変化と -アミラーゼ遺伝子の発現との関係

葉身におけるデンプン分解に関与する酵素遺伝子を明らかにし, 葉鞘における出穂期以降のデンプン分解の仕組みと比較することを目的として, 葉身でのデンプン含量の日変化と -アミラーゼ遺伝子の発現との関係を詳細に解析した. 葉身におけるデンプン含量は朝9時から12時にかけて急激に増加し, その後21時まではほぼ一定に推移したが, 21時から翌朝6時にかけて急激に減少するという日変化を示した(データは掲載せず). そのときの各 -アミラーゼ遺伝子の転写レベルを定量 RT-PCR で解析した結果, *OsBAM2* と *OsBAM3* の転写のピークは朝9時であり, その後それらの転写量は12時にかけて低下した(データは掲載せず). さらに, デンプン含量がすでに減少しつつある夜の24時にかけて転写レベルは低いままで推移した. 一方, *OsBAM5* の転写レベルは朝6時に最大となり, その後9時にかけて急激に減少した(第5図). さらに, *OsBAM5* の転写レベルは18時から徐々に増加したことから, 葉身において

OsBAM5 の発現は夜間に著しく増加することが明らかになった. 以上の結果から, 葉身での21時以降に生じた急激なデンプン分解には, *OsBAM2* と *OsBAM3* よりもむしろ *OsBAM5* が最も密接に関与していることが示唆される.

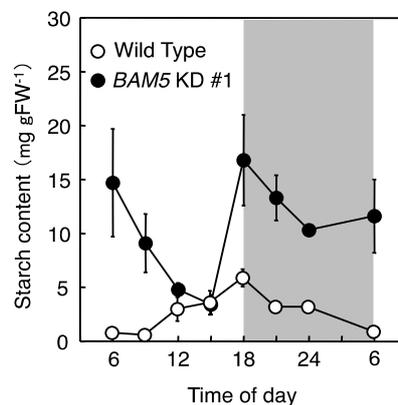


第5図. 葉身における *OsBAM5* の転写レベルの日変化.

数値は内部標準遺伝子である *OsEF1* 1 の転写レベルに対する相対値を示す. また, 数値は3反復の平均, 縦棒は標準誤差を示す.

(5) *OsBAM5* 発現抑制系統における表現型解析

OsBAM5 の発現抑制が葉身でのデンプン代謝に及ぼす影響を解析するため, *OsBAM5* の発現抑制系統 (*OsBAM5* KD #1) の表現型を解析した. *OsBAM5* KD #1 の葉身では, 夜間においても *OsBAM5* の転写レベルの上昇が起きず, また, 野生型と比較して, 草丈が有意に低く, 葉齢の進行が遅れる傾向にあった(データは掲載せず). さらに, 葉身におけるデンプン含量の日変化を解析した結果, *OsBAM5* KD #1 では朝6時においてもデンプンが著しく蓄積していることがわかった(第6図). また, そのデンプン含量は朝6時から12時にかけて徐々に減少したが, 再び15時から18時にかけて増加し, 夜間はほぼ一定に推移した.



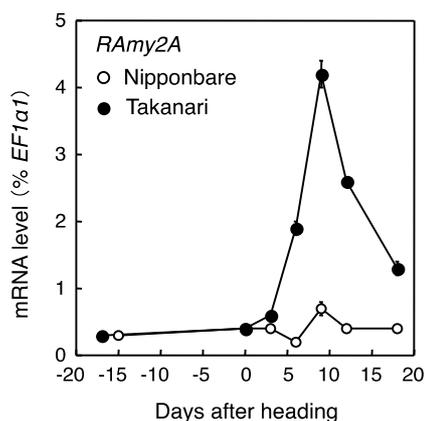
第6図. *OsBAM5* 発現抑制系統の葉身におけるデンプン含量の日変化
 数値は3個体の平均, 縦棒は標準誤差を示す.

以上のことから, *OsBAM5* は葉身における特に夜間に生じるデンプン分解に重要な役割を演じていることが明らかになった。

一方, 出穂期以降の葉鞘において *OsBAM5* の転写レベルは *OsBAM2* や *OsBAM3* と比べてかなり低いが, それは日中に採取した試料を用いた結果である。よって, 今後は, 葉鞘における *OsBAM5* の発現を昼夜で比較し, さらに *OsBAM5* 発現抑制系統での葉鞘におけるデンプン含量の変化を解析する予定である。

(6)インド型多収品種タカナリの葉鞘における出穂後のデンプン含量の変化と α -アミラーゼ遺伝子の発現との関係

インド型多収品種タカナリは, 出穂後の葉鞘におけるデンプン含量の減少が一般の日本型品種よりも速やかに生じる。その現象をもたらす要因を解析するため, 出穂期以降の葉鞘におけるデンプン含量の変化とデンプン分解関連酵素遺伝子の転写レベルを日本晴とタカナリで比較した。出穂後のデンプン含量が急激に減少している時期に, α -アミラーゼをコードする遺伝子のひとつである *RAmy2A* の転写レベルが, タカナリでは急激に増加した(第7図)。また, そのときのタカナリの α -アミラーゼ活性は日本晴よりも有意に高かった(データは記載せず)。以上の結果から, タカナリの葉鞘において生じる出穂後の速やかなデンプン分解には, 少なくとも *RAmy2A* の発現が増加することによってもたらされる α -アミラーゼ活性の増加が関与していることが示唆される。



第7図. 日本晴とタカナリの第3葉鞘における *RAmy2A* 遺伝子の転写レベルの変化。数値は内部標準遺伝子である *OsEF1α1* に対する相対値を示す。また, 数値は3反復の平均, 縦棒は標準誤差を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1) Sugimura, Y., Michiyama, H. and Hirano, T.

(2015) Involvement of α -amylase genes in starch degradation in rice leaf sheath at the post-heading stage. *Plant Prod. Sci.* 18 (in press), 査読有り

[学会発表](計6件)

- 1) 杉村優有・道山弘康・平野達也(2015)イネ葉身でのデンプン含量の日変化における α -アミラーゼの関与, 日本作物学会第239回講演会, 2015年3月27日, 藤沢。
- 2) Tatsuya Hirano, Yu Sugimura, Yusuke Kurokawa, Minako Hirano and Hiroyasu Michiyama (2014) A role of beta-amylase genes, *OsBAM2* and *OsBAM3*, in starch degradation in rice leaf sheaths at the post-heading stage. The 4th International Rice Congress, October 29, 2014, Bangkok, Thailand.
- 3) Yu Sugimura, Hiroyasu Michiyama and Tatsuya Hirano (2014) The relationship between diurnal changes in starch content and the expression levels of β -amylase genes in rice leaf blades. The 8th Asian Crop Science Association Conference, September 24, 2014, Hanoi, Vietnam.
- 4) 杉村優有・道山弘康・平野達也(2014)出穂後のイネ葉鞘におけるデンプン含量の変化とデンプン分解関連酵素遺伝子の発現との関係, 日本作物学会第237回講演会, 2014年3月30日, 千葉。
- 5) 平野達也・太田千尋・平野美奈子・道山弘康(2013)イネ茎葉部のデンプン代謝における α -アミラーゼ遺伝子, *OsBAM2* の役割, 日本作物学会第235回講演会, 2013年3月28日, 川崎。
- 6) 平野達也・栗木拓也・二村祥平・本田麻弓・道山弘康(2012)インド型イネ品種の葉鞘における出穂後のデンプン分解に関わる染色体領域の解析, 日本作物学会第234回講演会, 2012年9月11日, 仙台。

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 達也 (HIRANO TATSUYA)

名城大学・農学部・教授

研究者番号: 30319313

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし