

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450032

研究課題名(和文) イネの花粉形成・成熟過程における糖輸送の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular dissection of sugar transport and uptake mechanisms during pollen maturation of rice

研究代表者

廣瀬 竜郎 (HIROSE, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター作物開発研究領域・上級研究員

研究者番号：90355579

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)：イネの花粉形成・成熟過程における糖輸送(雄蕊の葯組織からの糖放出と花粉表面での糖吸収)に着目し、その分子機構を明らかにすることを目指した。そのために、糖輸送体であるSweet タンパクのうち雄蕊で高発現する遺伝子OsSweet5 と、ショ糖トランスポーター遺伝子のうち花粉で高発現するOsSUT3 の遺伝子破壊システムもしくは遺伝子発現抑制システムを用いて、両輸送体の花粉での機能を調べた。その結果、OsSweet5は花粉の形成・成熟に必須ではない一方、OsSUT3は花粉成熟(デンプン蓄積)のための糖輸送に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism of sugar transport during pollen maturation in rice, gene functions of a sugar-effluxer OsSweet5 and a sucrose-uptake transporter OsSUT3 were examined because both genes were highly expressed in the stamen or pollen. While gene knock-out of OsSweet5 did not affect pollen maturation and no phenotypic change was observed, RNAi suppression of OsSUT3 inhibited starch accumulation in the pollen grains. These results suggest that, contrary to expectation from the gene expression pattern, OsSweet5 is not essential for pollen maturation, and that OsSUT3 has an essential role for uptaking sucrose from locular fluid as a substrate for starch synthesis.

研究分野：作物生産生理学

キーワード：イネ 花粉 糖輸送 糖代謝 遺伝子 デンプン ショ糖

1. 研究開始当初の背景

花粉はイネの諸器官のなかでも低温、高温などの環境ストレスに特に弱く、その機能が障害されると登熟歩合の低下を通じて収量に大きく影響する。そのため、花粉の形成・成熟機構の解明はイネのストレス耐性の向上に大きく資すると期待される。成熟した花粉の特徴として多量のデンプン蓄積があげられ、ヨード染色によるデンプンの検出が花粉成熟の指標として広く用いられている。一方、花粉はそれを内包する葯の組織との間に原形質のつながりがなく、物理的に隔離されて存在する(図1)。したがって、成熟過程の花粉は外部(葯室液)から成熟に必要な養分を取り込み、一方、葯組織(葯壁)は葯室内に養分を放出する必要がある。イネの光合成産物の転流形態はショ糖であり、花粉のデンプン蓄積においてはショ糖の輸送体が働いている可能性が高い。そこで本研究では、イネの花粉形成・成熟過程における糖輸送に注目し、そこで働く輸送体を明らかにし、糖輸送からみた花粉の形成・成熟の分子機構の解明を目指す。

花粉と葯との関係のように、物理的に隔離された器官間を多量の養分が移動する例は種子成熟においてもみられる。デンプン蓄積期のイネ種子の養分吸収については、筆者らの過去の研究により、糊粉層に発現するショ糖トランスポーターが親側組織から放出されたショ糖を吸収し、このショ糖が胚乳デンプンの合成に使われることがわかっている(文献 1-3)。したがって、花粉の場合でも同様にショ糖トランスポーターが関与している可能性がある。イネの5つのショ糖トランスポーター遺伝子(*OsSUT1*~*5*)のうち花粉で発現するものは*OsSUT1*と*OsSUT3*のみである(文献 4、図2)。*OsSUT1*が破壊されると、花粉発芽が障害されるが、デンプン蓄積などの花粉成熟には影響しない(文献 4)。したがって、残る一つである*OsSUT3*の花粉成熟への関与が強く疑われ、有望な研究ターゲットであると思われる。

一方、養分の放出を担う輸送体については、その存在が予測されながら長らく実体を特定で

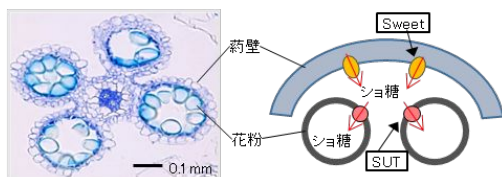


図1 予想される花粉成熟時の糖輸送経路と輸送体
葯壁組織と花粉とは隔離されており、Sweetによって葯室内に放出されたショ糖をSUTが花粉内に取り込む。

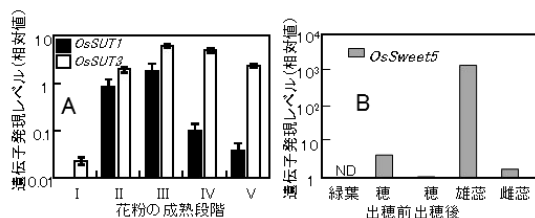


図2 イネのショ糖トランスポーター(SUT)とSweetの遺伝子発現
A: 花粉の成熟過程におけるSUT遺伝子の発現
*OsSUT1*および*OsSUT3*以外のSUT遺伝子は発現しない(文献4より改変)
B: *OsSweet5*の組織特異的発現
RNAseqデータベース(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)のデータより作図

きずにいた。ところが最近になって、シロイヌナズナのある一群のタンパク質が単糖やショ糖を輸送する新しいタイプの輸送体であることがわかり、Sweet タンパクと名付けられた(文献 5、6)。イネゲノム中にも Sweet タンパクをコードすると思われる遺伝子が 21 個存在し、多様な部位特異的発現を示すことから、花粉成熟を含む様々な生理過程に関与することが予想され、重要な研究ターゲットといえる。以上より、本研究ではイネの花粉形成・成熟過程における糖輸送の分子機構について、主として糖吸収側の *OsSUT3* と糖放出側の Sweet 遺伝子(特に *OsSweet5*(後述))に注目して解析を行った。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子発現データベースにおいて、ほぼ雄蕊特異的な高発現が見いだされている *OsSweet5*(図2)と、これまでの研究で花粉において高発現することがわかっている *OsSUT3* のそれぞれについて、遺伝子破壊系統の存在を用いて両遺伝子が花粉形成・成熟に果たす役割を明らかにする。また、ショ糖輸送にくわえて、花粉におけるショ糖代謝系(特に *OsSPS1* を中心にしたショ糖合成系)の役割についても遺伝子破壊系統を用いて解析する。

(2) *OsSUT3*、*OsSweet5* および *OsSPS1* の発現組織特異性、時期特異性や細胞内局在性を詳細に調べ、これら遺伝子の花粉形成・成熟における機能を考察する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊系統を用いた解析

OsSweet5 およびショ糖合成系酵素遺伝子 *OsSPS1* について、レトロトランスポゾン *Tos17* の挿入による遺伝子破壊系統を単離し、遺伝分離や収量形質および花粉稔性等の花粉の基本的な形質について調査を行った。

(2) 遺伝子発現抑制系統を用いた解析

OsSUT3 に関して、研究開始当初予定していた遺伝子破壊系統が利用できなかったため(後述)、RNAi による遺伝子発現抑制系統を作出して解析した。

(3) 遺伝子発現解析

定量 RT-PCR 法により各種遺伝子の発現解析を行った。必要に応じて、レーザーキャプチャマイクロダイセクション(LCM)を用いて形成・成熟過程を追いかけて花粉や葯組織を採種して RNA を抽出し、遺伝子発現解析に用いた。また、一部の遺伝子についてはプロモーター-GUS 解析による発現特異性の解析を行った。

(4) 花粉関連形質の解析

開花前日の穎花を 50%エタノールで固定し、ヨード染色により充実花粉率を計測した。花粉発芽率は、開花当日の穎花から採取した花粉を人工発芽培地に散布し、一定時間培養後に顕微鏡下で計測した。

4. 研究成果

(1) *OsSweet5* と花粉機能

イネゲノム中に 21 個存在する *Sweet* 遺伝子のうち、*OsSweet5* は唯一、発現データベース中で雄蕊でのほぼ特異的高発現が確認できる遺伝子である(図2)。また、本研究において、実際に雄蕊での *OsSweet5* の高発現を確認した。さらに本研究では、*Tos17* 遺伝子破壊系統群の 3D-PCR スクリーニングを行って、*OsSweet5* の遺伝子破壊系統を単離することができた。しかし、この遺伝子破壊系統の花粉形質を調査したところ、葯内の全花粉数や充実花粉割合に正常系統と差がなく、また、遺伝子破壊ヘテロ系統の後代分離比にも理論値と差がないことがわかった。このことから、*OsSweet5* は(少なくとも単独では)花粉機能に必須ではないことがわかった。

(2) *OsSUT3* と花粉機能

筆者らのこれまでの研究により、ショ糖トランスポーター遺伝子の一つである *OsSUT3* が花粉で高発現することがわかってきた。そこで、*Tos17* による *OsSUT3* の遺伝子破壊系統を上記と同様に探索した結果、1 系統の存在が確認でき、当初はその系統を用いて研究を進める予定であった。しかしながら、本研究のその後の調査で、それに相当する系統は実際の種子としては存在せず、DNA プール中のみ存在していることがわかった。この原因は、*Tos17* 系統の育成過程で、3D-PCR 用 DNA プールのもととなった種子と、実際に系統として増殖するために用いた種子とが異なることによると推測された。そこで、*OsSUT3* の花粉における機能を調べるために、新たに RNAi による同遺伝子の発現抑制系統を作出した。その結果、*OsSUT3* の遺伝子発現抑制系統では、ヨード染色による充実花粉割合が低下することが明らかになった(図3)。

(3) *OsSPS1* と花粉機能

本研究の過程で、ショ糖合成系酵素であるショ糖リン酸合成酵素をコードする *OsSPS1* の遺伝子破壊系統で、花粉機能の異常を示唆するデータが得られた。そこで、詳細な解析を行った結果、*OsSPS1* 破壊系統の遺伝子破壊ホモ系統は存在せず、その理由は同遺伝子が破壊されると花粉発芽が阻害されて花粉機能が失われるためであることがわかった。一方、同遺伝子が破壊されても、花粉のデンプン蓄積は正常に行われていた(表1)。また、イネゲノム中には5個のショ糖リン酸合成酵素遺伝子が存在するが、

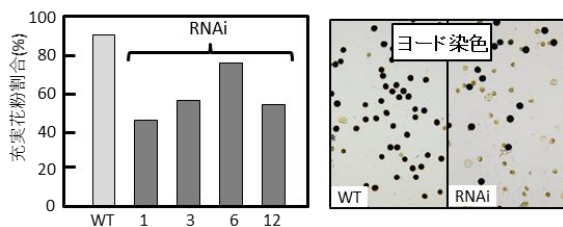


図3 *OsSUT3* の発現抑制が花粉のデンプン蓄積に与える影響
左: RNAi 系統の充実花粉割合(横軸数字は系統番号)
右: 正常系統(WT)とRNAi 系統の花粉のヨード染色像

表1 *OsSPS1* 遺伝子破壊ヘテロ系統の充実花粉割合と花粉発芽率

系統	遺伝子型	充実花粉割合 (%)	花粉発芽率 (%)
NC2767	<i>SPS1+/+</i>	84.4±7.2	79.3±2.9
	<i>SPS1+/-</i>	85.9±3.1 ns	42.9±5.4 * * *
NE4049	<i>SPS1+/+</i>	86.8±3.6	84.6±3.9
	<i>SPS1+/-</i>	87.4±3.3 ns	41.4±4.3 * * *
NG5525	<i>SPS1+/+</i>	92.1±1.0	84.7±5.5
	<i>SPS1+/-</i>	92.0±2.4 ns	36.9±4.8 * * *

ns: : p>0.05 * * * : p<0.001 (t検定)

花粉では *OsSPS1* 以外の発現がほとんどみられないこと、さらに、ショ糖合成にはショ糖リン酸合成酵素が必須と考えられていることから、花粉のデンプン蓄積にはショ糖合成は必須ではないが、正常な花粉発芽にはショ糖合成が必要であると推察された。

(4) まとめ

本研究の結果は以下のように要約できる。

Sweet タンパク遺伝子 *OsSweet5* は雄蕊で高発現するが、花粉形成・成熟に必要な糖を葯壁から葯室液に放出する必須の輸送体ではないことがわかった。なお、本研究の期間中に、イネの白葉枯れ病耐性遺伝子として同定され、その抑制が花粉稔性の低下につながる事が知られていた *Os8N3* が *Sweet* タンパク遺伝子 (*OsSweet11*) であることが報告された(文献7)。

ショ糖トランスポーター遺伝子 *OsSUT3* は花粉の成熟(デンプン蓄積)に必要なショ糖を葯室液から花粉内に取り込む輸送体であることがわかった。一方、花粉で高発現するもう一つのショ糖トランスポーター遺伝子である *OsSUT1* の破壊は花粉発芽に影響し、デンプン蓄積には影響しないことがわかってきた(文献4)。両遺伝子は同時に発現しているが、なぜ機能的に相補しないのかなど、今後の課題が残った。

ショ糖リン酸合成酵素遺伝子 *OsSPS1* は花粉発芽に必須であるが、花粉形成・成熟には必須ではないことがわかった。今後は、花粉発芽におけるショ糖の生理的役割を調べていく必要がある。

< 引用文献 >

- Ishimaru K et al. (2001) Plant Cell Physiol. 42: 1181-1185.
- Hirose T et al. (2002) Plant Cell Physiol. 43: 452-459.
- Scofield G et al. (2002) Funct. Plant Biol. 29: 815-826.
- Hirose T et al. (2010) J. Exp. Bot. 61:3639-3646.
- Chen LQ et al. (2010) Nature 468: 527-533.
- Chen LQ et al. (2012) Science 335: 207-211.
- Streubel J et al. (2013) New Phytol. 200: 808-819.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 1件)

Hirose T, Hashida Y, Aoki N, Okamura M, Yonekura M, Ohto C, Terao T, Ohsugi R
Analysis of gene-disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, *OsSPS1*, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination. *Plant Sci.* 225, 2014, pp102-106. (査読有)
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.018>

(学会発表) (計 1件)

橋田庸一、廣瀬竜郎、青木直大、米倉円佳、大音徳、寺尾富夫、大杉立 イネのショ糖リン酸合成酵素をコードする *OsSPS1* の破壊は花粉不稔を引き起こす 日本作物学会第 237 回講演会、2014 年 3 月 29 ~ 30 日 千葉大学(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 竜郎(HIROSE, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター作物開発研究領域・上級研究員

研究者番号: 90355579