

博士論文

イネのショ糖リン酸合成酵素 (SPS) に関する生産生理学的研究

橋田 庸一

目次

略語	1
序章 緒言	4
第一章 <i>OsSPS1</i> の受精器官における機能解析	
1. 緒言	13
2. 材料および方法	14
3. 結果	18
4. 考察	21
第二章 葉身の SPS 活性が低下した SPS 遺伝子に関する変異体の作出と機能解析	
1. 緒言	30
2. 材料および方法	31
3. 結果	38
4. 考察	43
第三章 SPS の環境応答に関する解析	
1. 緒言	80
2. 材料および方法	82
3. 結果	85
4. 考察	89
終章 総合考察	108
摘要	117
謝辞	120
引用文献	121

略語

AGPase: ADP glucose pyrophosphorylase、ADP グルコースピロホスホリラーゼ

BAM: β -amylase、 β -アミラーゼ

BSA: bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン

CalS: callose synthase、カロース合成酵素

CelS: cellulose synthase、セルロース合成酵素

CWIN: cell wall invertase、細胞壁型インベルターゼ

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat、集まって規則的に間を空けて配置された短い回文配列の繰り返し

Cas9: CRISPR-associated endonuclease 9、CRISPR 関連エンドヌクレアーゼ 9

CIN: cytosolic invertase、細胞質型インベルターゼ

DTT: dithiothreitol、ジチオトレイトール

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid、エチレンジアミン四酢酸

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid、グリコールエーテルジアミン四酢酸

FACE: free air CO₂ enrichment、開放系大気 CO₂ 増加

F6P: fructose 6-phosphate、フルクトース 6-リン酸

FBPase: fructose 1,6-bisphosphatase、フルクトース 1,6-ビスフォスファターゼ

FBP: fructose 1,6-bisphosphate、フルクトース 1,6-ビスリン酸

F26BP: fructose 2,6-bisphosphatase、フルクトース 2,6-ビスリン酸

G1P: glucose 1-phosphate、グルコース 1-リン酸

G6P: glucose 6-phosphate、グルコース 6-リン酸

G6PDH: glucose 6-phosphate dehydrogenase、グルコース 6-リン酸脱水素酵素

pGlcT: glucose translocator、グルコーストランスポーター

GUS: β -glucuronidase、 β -グルクロニダーゼ

GWD: α -glucan, water dikinase、 α -グルカン, 水ジキナーゼ

HK: hexokinase、ヘキソキナーゼ

Hexose-P: hexose phosphate、ヘキソースリン酸

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタン-1-スルホン酸

ISA: isoamylase、イソアミラーゼ

KD: knockdown、ノックダウン

KO: knockout、ノックアウト

MST: monosaccharide transporter、単糖トランスポーター

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸

PAM: protospacer adjacent motif、プロトスペーサー隣接モチーフ

PCR: polymerase chain reaction、ポリメラーゼ チェーン反応

PEP: phosphoenolpyruvate、ホスホエノールピルビン酸

Pi: inorganic phosphate、無機リン酸

PPi: pyrophosphate、ピロリン酸

PGI: phosphoglucoisomerase、ホスホグルコイソメラーゼ

PGM: phosphoglucomutase、ホスホグルコムターゼ

PPFD: photosynthetic photon flux density、光合成光量子束密度

PVPP: polyvinylpyrrolidone、ポリビニルポリピロリドン

PWD: phosphoglucan, water dikinase、ホスホグルカン, 水ジキナーゼ

RT-PCR: reverse transcriptional polymerase chain reaction、逆転写 PCR

RNAi: RNA interference、RNAi 干渉

RuBP: ribulose 1,6-bisphosphate、リブロース 1,6-ビスリン酸

S6P: sucrose 6-phosphate、シヨ糖 6-リン酸

SPP: sucrose phosphate phosphatase、シヨ糖リン酸フォスファターゼ

SPS: sucrose phosphate synthase、シヨ糖リン酸合成酵素

SUS: sucrose synthase、スクロースシンターゼ

SUT: sucrose transporter、シヨ糖トランスポーター

TST: tonoplast sugar transporter、液胞膜局在型糖トランスポーター、

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane、トリスヒドロキシメチルアミノメタン

TPP: trehalose 6-phosphate phosphatase、トレハロース 6-リン酸フォスファターゼ

TPS: trehalose 6-phosphate synthase、トレハロース 6-リン酸合成酵素

Triose-P: triose phosphate、トリオースリン酸

TPT: triose phosphate/phosphate translocator、トリオースリン酸/リン酸トランスロケーター

UDP: uridine diphosphate、ウリジン二リン酸

UDPG: uridine diphosphate-glucose、UDP グルコース

UGPase: uridine diphosphate-glucose pyrophosphorylase、UDP グルコースピロホスホリラーゼ

VIN: Vacuolar invertase、液胞型インベルターゼ

WT: Wild type、野生型

序章 緒言

1. イネにおける収量増加の重要性と気候変動への対応の必要性

2016年現在、世界の人口は73億人を超え、2050年までには97億人に達すると予測されている(United Nations, 2015)。人類はこれまで、人口に比例して増加する食料需要に対して耕地面積の増加と作物の生産性を向上させることにより対応してきた。しかしながら、耕地面積の増加はもはや望めないと考えられており、今後食料を増産するためには単位面積当たりの作物の生産性、すなわち収量の向上が必要と考えられる(Godfray et al., 2010)。イネ(*Oryza sativa*)は世界の主要穀物の1つであり、2013年には年間7億4千万トンが生産されている。これは穀物の中ではトウモロコシの10億2千万トンに次ぐ生産量である(FAO, 2016)。それゆえ、単位面積当たりのイネの生産性を向上させる取り組みは人類にとって喫緊の課題であると言える。

このように作物の生産性のさらなる増加が求められている中、近年の気候変動が作物生産に負の影響を及ぼす可能性が示唆されている。地球の二酸化炭素(CO₂)濃度は上昇を続けており、それに伴う気温の上昇や気候の不安定化は、人類が適切な対策を取らない限り進行し続けると考えられている(IPCC, 2014)。実際、世界では高温不稔による収量低下が問題となっているほか、高温による白未熟粒の増加によるイネの品質低下が問題となっている(Ishimaru et al., 2016)。また、CO₂濃度の上昇も玄米品質に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている(Usui et al., 2014)。また一方で、中国や韓国、日本におけるコメの一大産地である北海道や東北地方では低温による障害が依然として問題となっている(Zhang et al., 2014; Shimono et al., 2016)。このように、高温、低温、CO₂濃度の上昇といった環境変化に対応するためには、それらに対する作物の応答を理解するとともに、対応できる新たな栽培技術の開発、品種育成が必要である。

2. イネの糖・デンプン代謝の改変による新品種育成の可能性

イネにおいて、ソース葉で光合成によって同化された炭素はショ糖として他器官に転流し、植物体の成長や子実の生産に利用される。また、一部の光合成産物は日中デンプンやショ糖としてソース葉に蓄積され、夜間の葉の呼吸や転流に利用される (Stitt and Zeeman, 2012)。ショ糖やデンプンの合成および転流は光合成による炭素固定の下流に位置し、光合成と密接にかかわっていることから、ショ糖、デンプンの合成および転流、すなわち糖・デンプン代謝を改変することで、イネのソース能の向上およびそれに基づくバイオマス生産・収量の向上が可能と考えられる (Braun et al., 2014)。加えて、イネを含めた様々な作物において、糖・デンプン代謝の改変が環境ストレス耐性の付与または増強に有用である可能性が示されている (Ruan et al., 2014)。例えば、イネにおいてデンプン分解に関わる α -アミラーゼをコードする遺伝子の発現を低下させることで、高温条件における乳白粒の割合を低下させ、玄米品質を向上させられることが明らかとなっている (Hakata et al., 2012)。また、イネのショ糖分解を行う細胞壁型インベルターゼ (CWIN) をコードする *OsINV4* は花粉の低温不稔耐性に関与しているほか、高温不稔耐性にも関与する可能性が示唆されている (Oliver et al., 2005; Li et al., 2015)。

このように、糖・デンプン代謝の改変がイネの収量増大、品質向上および環境ストレス耐性向上に有用と考えられている一方で、イネの糖・デンプン代謝制御機構については依然として不明な点が多い。その理由の一つとして、植物の糖・デンプン代謝に関する研究に主に用いられてきたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とイネとでは、糖・デンプン代謝について異なる点が多いことが挙げられる。もっとも明らかな違いは葉に蓄積する炭水化物の形態である。植物には、イネ、コムギ (*Triticum aestivum*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) のように葉に主にショ糖を蓄積するものと、ダイズ (*Glycine max*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、シロイヌナズナのように葉に主にデンプンを蓄積するものが存在する。これらはそれぞれ‘糖葉’植物、‘デンプン葉’植物と呼ばれ、その違いは以前から知られていたが (Stitt et al., 1987)、その違いを決定する要因については今も明らかになっていない。‘糖葉’植物と‘デンプン葉’植物の違いは、糖代謝関連遺伝子の変異体の解析においても

見られる。例えば、デンプン分解に関わる α -glucan, water dikinase をコードする *GWD* の欠損変異体を用いた実験では、シロイヌナズナやミヤコグサ (*Lotus japonicus*) といった‘デンプン葉’植物では葉にデンプンが過剰蓄積し生育の阻害が見られる一方 (Caspar et al., 1991; Vriet et al., 2010)、『糖葉’植物であるイネでは葉にデンプンが過剰蓄積しても栄養成長の阻害が見られないことが明らかとなっている (Hirose et al., 2013)。このような違いは‘糖葉’植物と‘デンプン葉’植物の糖・デンプン代謝機構の違いを反映していると考えられる。

以上のように、イネの糖・デンプン代謝の改変は今後のイネ育種における有望なターゲットであるが、イネの糖・デンプン代謝制御機構については不明な点も多く、さらなる研究が必要となっている。

3. 植物のショ糖合成を制御するショ糖リン酸合成酵素 (SPS)

ショ糖リン酸合成酵素 (Sucrose phosphate synthase, SPS, EC.2.4.1.14) は植物の葉におけるショ糖合成の鍵酵素として知られており、植物の炭素分配に重要な役割を果たすと考えられてきた (図 A)。SPS はフルクトース 6-リン酸 (F6P) と UDP グルコース (UDPG) からショ糖 6-リン酸 (S6P) を合成する反応を触媒している。合成された S6P はただちにショ糖リン酸フォスファターゼ (SPP) によりショ糖へと変換される。そのため、SPS と SPP によるショ糖合成は実質的に不可逆な反応と考えられている (MacRae and Lunn, 2006)。SPS のアイソザイムの中にはグルコース 6-リン酸 (G6P) による活性化、無機リン酸 (Pi) による阻害というアロステリックな制御を受けるものや、可逆的なリン酸化/脱リン酸化によって制御されるものが存在する (Huber and Huber, 1996; Volkert et al., 2014)。

SPS の活性が葉のショ糖、デンプン濃度 (Huber and Israel 1982; Huber, 1983)、葉からの炭素の転流速度 (Huber, 1985)、植物の成長速度 (Rocher et al., 1989) と正または負の高い相関をしめすことから、SPS は植物の葉におけるショ糖とデンプンの間の炭素分配や植物の生育に重要な役割を果たすと考えられてきた。また、トマト (*Solanum lycopersicum*) (Galtier et al., 1993; Murchie et al., 1999)、シロイヌナズナ (Signora et al., 1998)、バレイショ (*Solanum tuberosum*) (Tobias et al., 1999)、

タバコ (Baxter et al., 2003) といった‘デンプン’葉植物の SPS 過剰発現系統では、SPS 活性が葉のショ糖/デンプン比と高い相関を示すことが明らかとなっている。加えて、SPS の過剰発現により SPS 活性が上昇したトマト (Laporte et al., 2001) とバレイショ (Ishimaru et al., 2008) では圃場レベルでの収量増加が見られた。このことは SPS が作物の収量においても重要であり、SPS が作物の生産性向上のためのターゲットとなり得ることを示している。

また、植物において SPS は複数の遺伝子 (アイソジーン) によってコードされており、分子系統樹解析から双子葉植物では 3 グループ (A,B,C) に、単子葉植物では 4 グループ (A,B,C,D) に分類される (Castleden et al., 2004, 図 B)。いくつかの植物種における発現解析から SPS アイソジーン の発現は時間的、空間的に異なった、しかし部分的には重なった発現パターンを示すことが明らかとなっている (Castleden et al., 2004; Chen et al., 2005a; Lutfiyya et al., 2007; Sun et al., 2011a; Okamura et al., 2011; Volkert et al., 2014)。例えば、タバコの SPS をコードする 3 つのアイソジーンのうち、*NtSPSA* と *NtSPSC* は主に葉で発現する一方、*NtSPSB* はおもに生殖器官で発現することが知られている。また、RNAi により SPS 遺伝子をノックダウン (KD) した系統の解析から、*NtSPSC* が夜間の葉からシンク器官への転流のためのショ糖合成に重要な役割を果たすことが明らかとなっている (Chen et al., 2005a)。シロイヌナズナでは、ノックアウト (KO) 変異体の解析から 4 つのアイソジーンのうち *AtSPSA1* と *AtSPSC* が葉におけるショ糖合成に主要な働きをしている一方、*AtSPSA2* と *AtSPSB* は葉におけるショ糖合成にあまり寄与していないことが明らかとなっている (Sun et al., 2011a; Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015)。また、タバコと同様にシロイヌナズナにおいても *AtSPSA1* と *AtSPSC* の両方が KO された二重変異体では夜間のデンプン分解産物からショ糖が合成される経路が阻害されていた (Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015)。これらの解析から、SPS によるショ糖合成は日中に加え夜間においても重要であると考えられている。

4. イネの SPS に関する先行研究

イネでは葉身の SPS 活性の上昇/低下がショ糖/デンプン比におよぼす影響について繰り返し解析が行われてきているが、結果が一致していない。Ono et al. (1999a) はトウモロコシの SPS 遺伝子をイネに導入し、過剰発現系統とコサプレッション系統を作出した。これらの系統の解析から、葉の SPS 活性とショ糖/デンプン比との間に有意な正の相関があることを示した。一方で、Ono et al. (1999a) と一部同じ系統を用いた別の解析では SPS 過剰発現系統におけるショ糖/デンプン比の上昇は見られず (Ono et al., 2003)、他の系統を用いた解析でも SPS 過剰発現系統におけるショ糖/デンプン比の上昇は見られなかった (Takahashi et al., 2000; Ishimaru et al., 2004)。SPS 活性の低下とショ糖/デンプン比の関係性について解析を行った研究は上記のコサプレッション系統の解析 (Ono et al., 1999a, 1999b) 以外には存在しないが、Hirose et al. (2012) が RNAi 法により作出した SPS 遺伝子発現抑制系統で葉身のショ糖/デンプン比が低下したことを報告している。イネにおいて SPS は 5 つの遺伝子 (*OsSPS1* (B ファミリー)、*OsSPS2* (D ファミリー)、*OsSPS6* (D ファミリー)、*OsSPS8* (A ファミリー)、*OsSPS11* (C ファミリー)) によってコードされており (図 B)、*OsSPS1* がソース葉において主要な役割を果たすと考えられている (Okamura et al., 2011)。これまでの研究から *OsSPS1* が草丈 (Ishimaru et al., 2004; Hirose et al., 2012; Hashida et al., 2013) および一穂粒数 (Hashida et al., 2013) の制御に関与する可能性が示唆されている。

以上のようにイネにおいても SPS が生育や葉身のショ糖/デンプン比の制御に関与する可能性が示唆されている。一方で、SPS 活性の低下がイネの糖・デンプン代謝や生育に及ぼす影響に関する解析や、SPS の各アイソジーンに着目した生理機能解析はまだほとんど行われておらず、イネの SPS に関する理解は断片的である。

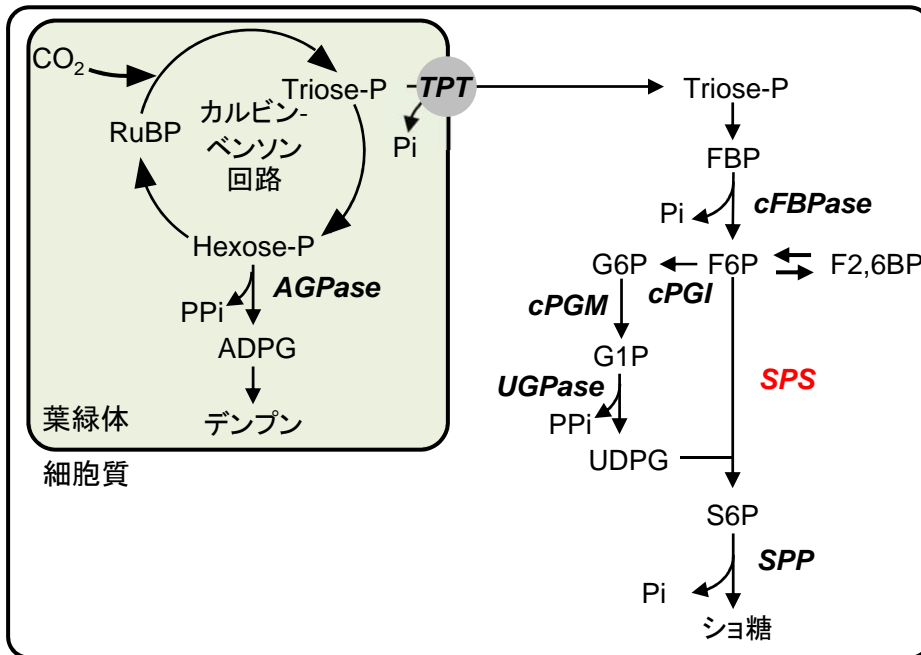
5. 本研究の目的と概要

このような背景のもと、本研究はイネの生産性向上と気候変動下におけるイネ生産の安定化に資する知見を得ることを目指して行った。その際に、イネの糖代謝、とくにショ糖合成に着目し、そ

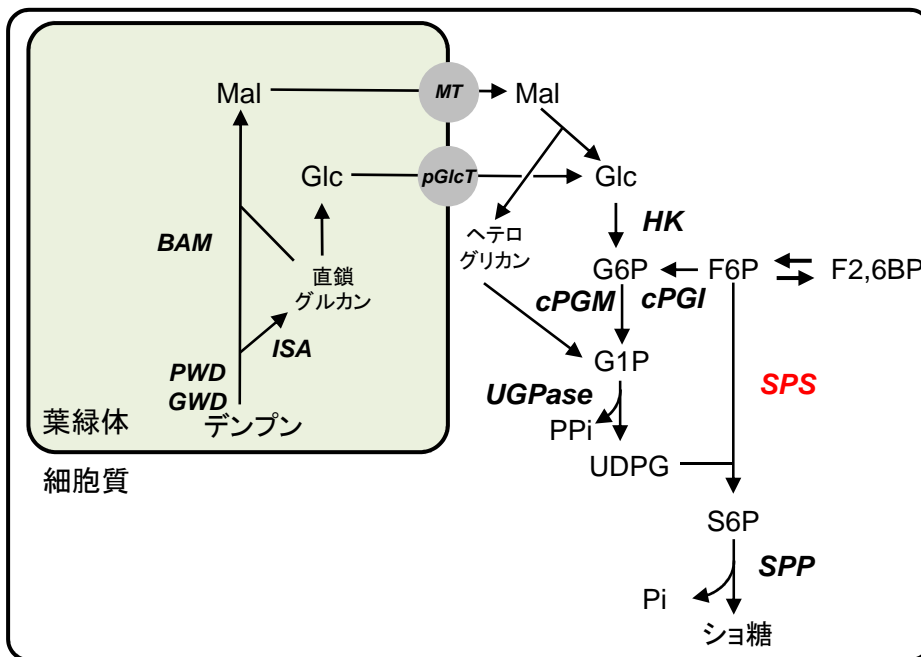
の制御機構を明らかにすることを目的として行った。この目的を達成するため、イネのショ糖合成における鍵酵素として知られる SPS、特に SPS をコードする遺伝子のうちの 1 つである *OsSPS1* に着目し、以下のような解析を行った。

第一章では突然変異系統の解析から、*OsSPS1* が花粉発芽に重要な役割を果たしていることを明らかにした。第二章では *OsSPS1* の KD 系統および CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した SPS 遺伝子の KO 系統の解析から、葉の SPS 活性と糖代謝、生育との関係について詳細に検討した。第三章では *OsSPS1* の KD 系統を様々な環境で栽培し、イネの環境応答におけるショ糖合成の役割について検討した。終章では総合考察として、イネにおける SPS の制御機構の特徴について他植物との比較から考察するとともに、イネのショ糖合成制御機構について新たな可能性を検討した。

日中

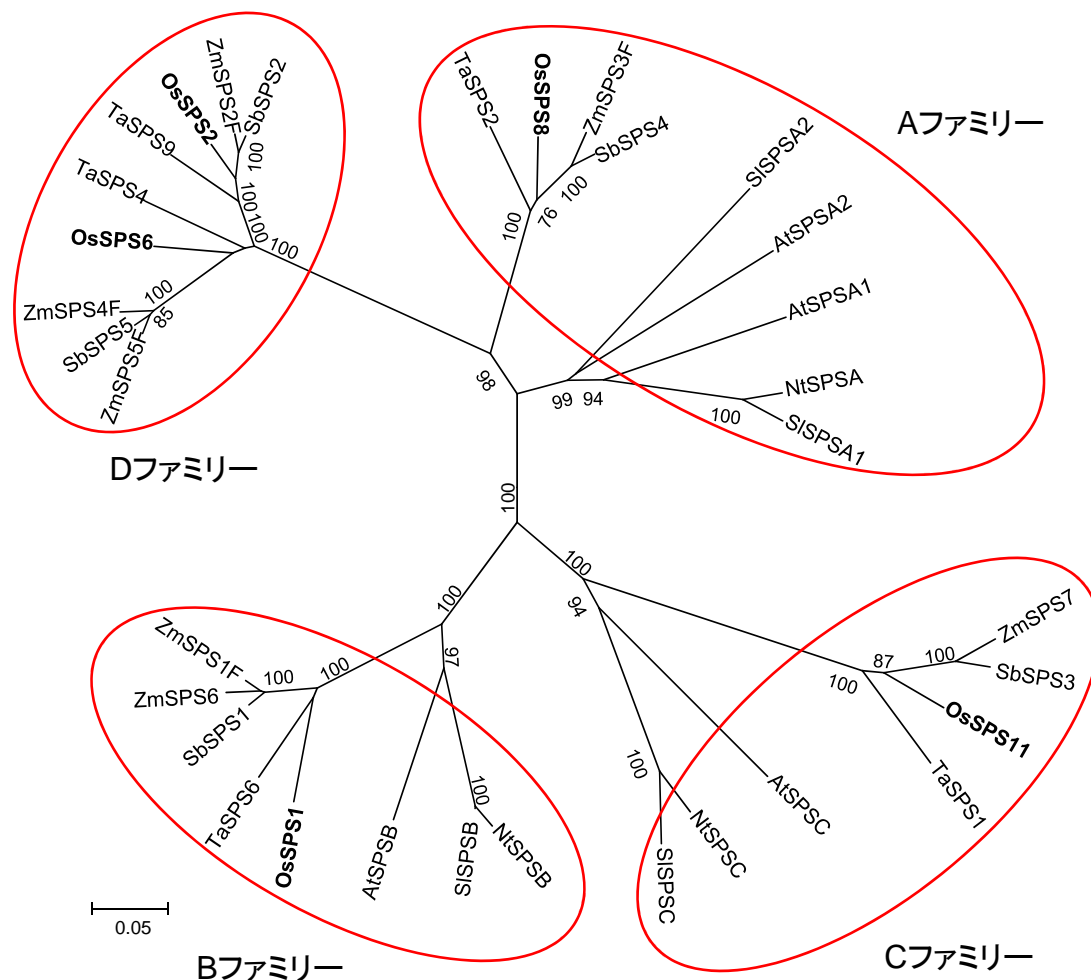


夜間



図A 日中のイネソブ葉における日中と夜間のショ糖合成経路。日中はトリオースリン酸の形で炭素が細胞質に供給される。その後FBPaseを主とする反応により糖リン酸が合成され、SPSとSPPによるショ糖合成に利用される。一方、夜間はデンプン分解産物であるブドウ糖、マルトース、あるいはヘキソースリン酸が細胞質に供給され、SPSとSPPによるショ糖合成に利用される。酵素、輸送体は太字イタリック体で示す。(次ページに続く)

(図A続き)代謝産物:ADPG;ADPグルコース、FBP;フルクトース1,6-ビスリン酸、F6P;フルクトース6-リン酸、Glc;グルコース、G6P;グルコース6-リン酸、G1P;グルコース1-リン酸、Hexose-P;ヘキソースリン酸、Mal;マルトース、Pi;無機リン酸、PPi;ピロリン酸、RuBP;リブロース1,6-ビスリン酸、S6P;シヨ糖6-リン酸、Triose-P;トリオースリン酸、UDPG;UDPグルコース。酵素および輸送体:AGPase;ADPグルコースピロホスホリラーゼ、BAM; β -アミラーゼ、cFBPase;細胞質型フルクトース1,6-ビスリン酸フォスファターゼ、pGlcT;グルコーストランスロケーター、GWD; α -グルカン、水ジキナーゼ、ISA;イゾアミラーゼ、MT;マルトーストランスロケーター、cPGI;細胞質型ホスホグルコイソメラーゼ、cPGM;細胞質型ホスホグルコムターゼ、PWD;ホスホグルカン、水ジキナーゼ、SPP;シヨ糖リン酸フォスファターゼ、SPS;シヨ糖リン酸合成酵素、TPT;トリオースリン酸/リン酸トランスロケーター、UGPase;UDPグルコースピロホスホリラーゼ。



図B 植物のSPS遺伝子ファミリーの分子系統樹。アミノ酸配列から無根の近隣結合法でMEGA6 (Tamura et al., 2013)を用いて作成した。イネ(*Os*)、シロイヌナズナ(*At*)、タバコ(*Nt*)、トマト(*Sl*)、ソルガム(*Sb*)、コムギ(*Ta*)、トウモロコシ(*Zm*)の遺伝子を用いた(括弧内は遺伝子名の頭から2文字を示す)。Castleden et al. (2004)による遺伝子ファミリーの分類を示す。ブートストラップ法の反復回数は500回とし、70%以上のブートストラップ値を示す。イネのSPS遺伝子を太字で示す。以下の遺伝子のアミノ酸配列はGenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)における以下のAccession No.を用いた:*AtSPSA1*, AAK64015; *AtSPSA2*, CAC03459; *AtSPSB*, AAF40445; *AtSPSC*, AAC62812; *NiSPSA*, AF194022; *NiSPSB*, DQ213015; *NiSPSC*, DQ213014; *SISPSA1*, BAB18136; *SISPSA2*, AFD64637; *SISPSB*, AFD64638; *SbSPS1*, EES04111; *SbSPS2*, ACX94229; *SbSPS4*, EES19952; *ZmSPS1F*, AFW84161; *ZmSPS2F*, AFW70480; *ZmSPS3F*, AFW61933; *ZmSPS4F*, AFW87299; *ZmSPS5F*, AFW76202; *ZmSPS6*, DAA56138; *ZmSPS7*, AFW60527。イネ(*OsSPS1*, *OsSPS2*, *OsSPS6*, *OsSPS8*, *OsSPS11*)およびコムギ(*TaSPS1*, *TaSPS2*, *TaSPS4*, *TaSPS6*, *TaSPS9*)のアミノ酸配列はCastleden et al. (2004)に記載されたものを用いた。*SISPSC*はSol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>)におけるSolyc11g045110.1の塩基配列からアミノ酸配列を得た。*SbSPS3*と*SbSPS5*はそれぞれMOROKOSHI (<http://sorghum.riken.jp/morokoshi/Home.html>)におけるSobic.005G089600とSobic.010G205100の塩基配列からアミノ酸配列を得た。

第一章 *OsSPS1* の受精器官における機能解析

1-1 緒言

イネの5つのアイソジーンのうち、ソース葉で主要な働きをされると考えられている *OsSPS1* の機能を明らかにするため、*Tos17* レトロトランスポゾンが *OsSPS1* のエキソンに挿入された突然変異系統の解析を行った。しかし、複数の *Tos17* 突然変異系統において *Tos17* 挿入ホモ個体、すなわち *OsSPS1* の KO 個体を得ることができなかった。*Tos17* 挿入ヘテロ個体の後代の遺伝子型の分離比、および *OsSPS1* が花粉で発現しているという先行研究から (Chavez-Barcenas et al., 2000)、*OsSPS1* が受精に関与している可能性が示唆された。また、*OsSPS1* は SPS 遺伝子ファミリーの B ファミリーに分類されるが、オオムギ、コムギ、タバコの B ファミリーに属する遺伝子も葯あるいは花粉で発現することが明らかとなっている (Castleden et al., 2004; Chen et al., 2005a)。そこで、本章では *OsSPS1* のエキソンに *Tos17* が挿入された系統および *OsSPS1* のプロモーター-GUS 系統を用いて、*OsSPS1* の受精器官における機能解析を行った。

本章ではまず *Tos17* 挿入ヘテロ個体の後代の遺伝子型の分離比を確認した。次に、正逆交雑を行い、*OsSPS1* が KO された雄性器官、あるいは雌性器官が正常に機能しているかどうか調べた。また、リアルタイム RT-PCR 法により葯および花粉における SPS アイソジーン遺伝子発現量を測定するとともに、*OsSPS1* のプロモーター-GUS 系統を用いて、穎花における *OsSPS1* の発現部位を明らかにした。これらの解析から、花粉が正常に機能する上で *OsSPS1* が重要な役割を果たしていることが明らかとなったため、成熟花粉割合および花粉発芽率を計測し、*OsSPS1* が花粉のどの生育ステージにおいて重要であるか検討した。以上の結果から、花粉におけるショ糖合成の意義について考察した。

1-2 材料および方法

1-2-1 供試材料

蒞の SPS 遺伝子ファミリーの発現解析には、ジャポニカイネ品種「日本晴」(*Oriza sativa* ssp. japonica cv. Nipponbare)を用いた。突然変異系統は *Tos17* レトロトランスポゾンが *OsSPS1* のエキソンに挿入された 4 系統 (NC2767、ND3060、NE4049、NG5525) を用いた。これらの突然変異系統は独立行政法人農業生物資源研究所 (現国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) が作成した Rice *Tos17* Insertion Mutant Database (<http://tos.nias.affrc.go.jp/>) に由来し、その原品種は「日本晴」である (Miyao et al., 2003)。4 系統はそれぞれ第 12、第 4、第 11、第 1 エキシオンに *Tos17* レトロトランスポゾンが挿入された系統である (図 1-1)。

1-2-2 栽培

イネの栽培は東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構 (東京都西東京市、北緯 35 度 44 分、東経 139 度 32 分、高度 58 m、以下東大生態調和農学機構) にて行った。基肥として複合燐加安 (N:P₂O₅:K₂O = 12:16:18) を 10 a あたり 50 kg 施肥した。2012 年は 4 月 27 日に播種しビニールハウス内で水稻育苗用培土を用いて育苗した苗を 5 月 25 日に移植した。1 株 1 本植えとし、栽植密度は畝間 30 cm、株間 15 cm とした。

正逆交雑、成熟花粉割合と花粉発芽率の測定に用いた材料は人工気象室において、水稻育苗用培土を入れた 0.6 L プラスチックポットを用いて栽培した。明期 30°C・12 時間/暗期 23°C・12 時間とし、光強度 (photosynthetic photon flux density, PPF) は最大 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。

1-2-3 遺伝子型の決定

数十 mg の幼苗期のイネ葉身をマルチビーズショッカー (安井器械、大阪) で破碎した後、抽出バッファー (1 M KCl, 100 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 10 mM EDTA) を 300 μl 加え、ボルテックスで

攪拌した。70°C の恒温装置に 1 時間置いた後、2000 ×g、常温で 15 分間遠心した。2-プロパノール 100 μl に上清 100 μl を加え、ピペッティングで攪拌した後、2000 ×g、4°C で 30 分間遠心し、沈殿を得た。上清を捨てた後、氷冷した 70% (v/v) エタノール 150 μl を加え、2000 ×g、4°C で 5 分間遠心した。上清を捨てた後、常温で 2 時間程度風乾した沈殿を 10 μl の蒸留水に溶かして、PCR 法による遺伝子型解析に用いた。PCR 法には Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ、滋賀)、および表 1-1 に示したプライマーセットを用いた。PCR 法の温度条件は 94°C 60 秒、94°C 30 秒・58°C 90 秒・72°C 90 秒を 35 サイクル、72°C 10 分とした。

1-2-4 正逆交雑

日本晴を種子親、SPS1 突然変異系統 3 系統 (NC2767、ND3060、NG5525) のヘテロ個体を花粉親、およびその逆の組み合わせでの交配を行った。F₁ 個体の幼植物の葉身から DNA を抽出し、遺伝子型を PCR 法により判別した。

1-2-5 一穂粒数および登熟歩合の測定

一穂粒数および登熟歩合の測定は以下の手順で行った。株ごとに穂数[本]を数えた後、脱穀し比重 1.06 の食塩水で塩水選した。その後、浮いた非稔実粒数[個]と沈んだ稔実粒数[個]をそれぞれ数え、それらの和から総粒数[個]を算出した。以下の式 (1-1)、(1-2) をもとに一穂粒数と登熟歩合を算出した。

$$\text{式(1-1) 一穂粒数[個 本}^{-1}\text{]} = \text{総粒数[個]} / \text{穂数[本]}$$

$$\text{式(1-2) 登熟歩合[\%]} = \text{稔実粒数[個]} / \text{総粒数[個]} \times 100$$

1-2-6 mRNA 量の定量

mRNA 量の定量はリアルタイム逆転写 PCR 法により行った。出穂期の日本晴の穂から開花 1-3

日前の穎花をサンプリングし、氷上で葯を回収した後、測定まで-80°C で保管した。穎花の開花日は穎花における葯の位置をもとに判定した。液体窒素を用いて葯を粉碎した後、RNeasy Mini kit (QIAGEN Japan、東京)を用いて全 RNA を抽出した。RNA から SuperScript III reverse-transcriptase (Life Technologies Japan、東京)を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ)、および Smart Cycler II system (Cepheid, CA, USA)を用いてリアルタイム PCR を行った。用いたプライマーの配列を表 1-2 に示した。各遺伝子の mRNA 量は、イネの各組織において恒常的に発現することが明らかとなっている *RUBIQ1* (Os06g0681400)を内部標準遺伝子として標準化した (Wang et al., 2000)。具体的には、リアルタイム逆転写 PCR によって得られた各遺伝子の Ct 値と *RUBIQ1* の Ct 値の差から、式 (1-3) によって *RUBIQ1* の発現量を 100 とした時の相対 mRNA 量を算出した。

$$\text{式(1-3) 相対 mRNA 量 (\% RUBIQ1)} = 2^{\{Ct(RUBIQ1) - Ct(Target)\}} \times 100$$

(Ct(*RUBIQ1*)は *RUBIQ1* の Ct 値、Ct(Target)は対象遺伝子の Ct 値とする)

1-2-7 プロモーター-GUS 系統の解析

OsSPS1 に関するプロモーター-GUS 系統の作出は以下の手順で行った。まず、*OsSPS1* のプロモーター領域を含む転写開始点の 2415 bp 上流から 6 bp 下流までの領域を「日本晴」の DNA から PCR 法により増幅した。PCR には PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ)を用いた。GUS 遺伝子と NOS ターミネーターは pBI121 プラスミド (GenBank Accession No.: AF485783) から同様の方法で増幅した。用いたプライマーの配列を表 1-3 に示した。得られた DNA 断片を Multisite Gateway Technology (Life Technologies Japan)を用いて pIG-R4R3 ベクター (Yonekura et al., 2013) に導入した。このように作成したコンストラクトを、Yonekura et al. (2013)と同様の方法でアグロバクテリウム (EHA101)を介した形質転換によってイネ (日本晴) に導入した。解析には T2 世代以降の植物を用いた。

以上のように作出された *OsSPS1* のプロモーター-GUS 系統の開花前の穎花をサンプリングした。穎花は X-gluc solution (100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH = 7.0), 0.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.5 mM $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$, 0.3% (v/v) TritonX-100, 20% (v/v) メタノール, 2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide cyclohexylamine salt) に 37°C 暗所で 1 晩つけ置くことにより染色した。染色した穎花を実体顕微鏡 (SZX10, Olympus, 東京) を用いて観察した。

1-2-8 成熟花粉割合の測定

成熟花粉割合の測定は以下の手順で行った。SPS1 突然変異系統の開花前日の穎果をサンプリングし、ただちに 50% (v/v) エタノールで固定した後、常温で保存した。葯から花粉を取出し、花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した後、実体顕微鏡 (SZX10) 下で青紫色に呈色した花粉と呈色が見られなかった花粉をそれぞれ計数し、呈色した花粉の割合を算出した。

1-2-9 花粉発芽率の測定

花粉発芽率は、Kariya (1989) の方法に従い、人口培地上での花粉発芽を調査することにより行った。SPS1 突然変異系統の開花直後の穎花をサンプリングし、直径 4.5 cm のペトリ皿に入った人工培地 (20% (w/v) ショ糖、1 mM H_3BO_3 、1% agar) 上でやさしく穎花を振ることにより花粉を集めた。20°C で 20 分間培養後、花粉をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、光学顕微鏡 (BX50, Olympus) 下で観察することにより発芽した花粉を計数した。なお、本研究で用いた系統の原品種である「日本晴」は Kariya (1989) が用いた品種と異なるため、培養時のショ糖濃度および培養時間については、予備実験により日本晴に最適な条件を確立した。

1-2-10 統計処理

統計処理は、t 検定および χ^2 検定を Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いて行った。

1-3 結果

1-3-1 SPS1 突然変異系統の遺伝子型

*Tos17*レトロトランスポゾンが *OsSPS1* のエキソンに挿入された 4 系統の SPS1 突然変異系統について、最初に分譲を受けた種子各 20 粒には *Tos17* 挿入ホモ個体が存在しなかった。そのため、各系統のヘテロ個体から得られた後代の遺伝子型を調べた。その結果 4 系統とも *Tos17* 挿入ホモ個体は存在せず、野生型(WT)と *Tos17* 挿入ヘテロ(以下ヘテロ)個体の分離比は 1:1 となった(表 1-4)。本研究で用いた 4 系統はそれぞれ *OsSPS1* の異なる部位に *Tos17* が挿入されていることから(図 1-1)、*Tos17* 挿入ホモ個体が存在しない原因は *Tos17* の挿入により *OsSPS1* が KO されたためと考えられた。また、WT、ヘテロ、*Tos17* 挿入ホモの個体数の分離比が 1:1:0 であることから、*OsSPS1* の KO が雄性器官、あるいは雌性器官の機能障害をもたらしたと考えられた。もし、*OsSPS1* の KO が雌性器官に影響を与える場合、穎花の形成に影響が出ることで一穂粒数が約 2 分の 1 に低下する、あるいはヘテロ個体の登熟歩合が野生型の約 2 分の 1 になることが予想された。しかしながら、WT とヘテロ個体の一穂粒数に有意な差は見られず、登熟歩合については NG5525 でヘテロが有意に低かったものの、2 分の 1 までは低下しなかった(表 1-5)。以上の結果から、*OsSPS1* の KO が雌性器官ではなく雄性器官の機能障害をもたらすことが示唆された。

1-3-2 正逆交雑

OsSPS1 が KO された雄性器官および雌性器官が機能しているか否かを明らかにするため、日本晴を種子親、SPS1 突然変異系統のヘテロ個体を花粉親、およびその逆の組み合わせで交配を行い、F₁ 個体の遺伝子型を調査した。その結果、SPS1 突然変異系統のヘテロ個体が種子親、日本晴が花粉親の F₁ 個体では WT とヘテロ個体がおよそ 1:1 に分離した。一方、日本晴が種子親、SPS1 突然変異系統のヘテロ個体が花粉親の F₁ 個体では WT 個体のみ存在し、ヘテロ個体は存在しなかった(表 1-6)。このことから、*OsSPS1* が KO されても雌性器官は正常に機能するが、花粉

は機能しないことが明らかとなった。

1-3-3 穎花における SPS アイソジーンの発現解析

開花 1-3 日前の穎花の葯における SPS アイソジーンの遺伝子発現解析をリアルタイム逆転写 PCR 法により行ったところ、5 つの SPS 遺伝子のうち *OsSPS1* のみ発現が見られた(図 1-2A)。リアルタイム PCR 後の熱垂離曲線の解析から *OsSPS11* の転写産物も増幅されたと考えられたが、PCR を 40 サイクル行ってもその遺伝子発現量は検出限界以下であった。以上のことから、葯においては SPS アイソジーンのうち *OsSPS1* が支配的に働いていることが明らかとなった。

穎花における *OsSPS1* の発現時期、部位を明らかにするため、*OsSPS1* のプロモーター-GUS 系統の解析を行った。プロモーター-GUS 系統では開花前の穎花における葯に染色が確認された一方(図 1-2 C-E)、コントロールである日本晴では染色は確認されなかった(図 1-2B)。図 1-2 C-E の穎花はそれぞれ開花 5-3、3-2、1 日前の穎花と考えられるが、GUS 染色は開花 5-3 日前の葯で既に見られ、開花が近づくにつれ染色が濃くなった。一方同時期のめしべでは GUS 染色は確認されなかった(図 1-2 C-E)。開花後開裂した葯と葯に残った花粉を観察した結果、葯壁には染色は見られず、花粉のみに染色がみられた(図 1-2 F, G)。このことから、葯における染色は花粉によるものと考えられた。*OsSPS1* の花粉における発現は先行研究により既に明らかとなっていたが(Chavez-Barcenas et al., 2000)、以上の解析から *OsSPS1* は開花前の穎花において花粉特異的に発現していることが明らかとなった。

1-3-4 成熟花粉割合および花粉発芽率の測定

OsSPS1 の KO が花粉成熟、発芽のどのステージに影響を及ぼしているのか明らかにするため、SPS1 突然変異系統の WT とヘテロ個体の成熟花粉割合と花粉発芽率を比較した。成熟花粉割合については、WT とヘテロ個体で有意な差は見られなかった(表 1-7)。一方、花粉発芽率については、3 系統とも WT と比較してヘテロ個体が約 2 分の 1 に低下していた(表 1-7)。このことから、

OsSPSI の KO は花粉におけるデンプン蓄積には影響を及ぼさないが、*OsSPSI* が KO された花粉は発芽できないことが明らかとなった。

1-4 考察

1-4-1 花粉発芽における SPS の重要性

本章の解析から *OsSPSI* は花粉の成熟には必須ではないが、花粉発芽には必須であることが明らかとなった(表 1-7)。このことは、SPS によるショ糖合成が花粉発芽に重要な役割を果たすことを示唆している。花粉発芽にショ糖が重要であることは、ショ糖トランスポーター (Sucrose Transporter, SUT) によるショ糖の取り込みが花粉発芽に重要な役割を果たすという結果と一致している (Sivitz et al., 2008; Hirose et al., 2010)。また、デンプン分解に関与する *glucan water dikinase* が欠損したトマトの *legwd* 変異体における花粉発芽の阻害の原因として花粉におけるショ糖を含む可溶性糖類濃度の低下が示唆されている (Nashilevitz et al., 2009)。このことから花粉発芽におけるショ糖の重要性はイネに限らないと考えられる。

また、薬の発現解析およびプロモーター-GUS 系統の解析から、イネの花粉では SPS アイソジェンのうち *OsSPSI* が主要な役割を果たしていることが明らかとなった(図 1-2)。この結果はイネの花粉において *OsSPSI* が発現しているという先行研究の結果と一致するとともに (Chavez-Barcenas et al., 2000)、他の植物の B ファミリーに属する SPS 遺伝子が薬あるいは花粉において発現するという研究結果とも一致している (Castleden et al., 2004; Chen et al., 2005a)。一方で、シロイヌナズナでは B ファミリーに属する *AtSPSB* の KO によって不稔はおこらず (Sun et al., 2011a)、この点はイネと異なっている。このような差が生じる原因としては、シロイヌナズナでは *AtSPSB* 以外の遺伝子も花粉で働いている可能性が考えられる。また、生育はしないもののシロイヌナズナの 4 つの SPS 遺伝子すべてが KO された 4 重変異体の種子が存在することから、シロイヌナズナでは SPS が花粉の発芽、あるいは受精において必須ではない可能性もある (Bahaji et al., 2015)。

また、プロモーター-GUS 系統による解析から *OsSPSI* は開花 3-5 日前の未熟花粉で既に発現していることが明らかとなった(図 1-2C)。このことから、*OsSPSI* は正常なデンプン蓄積には必須ではない一方で(表 1-7)、花粉の生存能力あるいは発芽能力に重要な役割を果たしている可能性も否

定できない。実際、花粉のショ糖が花粉の寿命や乾燥耐性に重要な役割を果たすという報告がある(Speranza et al., 1997)。本研究では、*OsSPSI* が破壊された花粉が通常に成熟しているか否かはヨード染色によって調べたため、花粉は少なくともデンプン蓄積が停止するまでは生存していると考えられる。しかし、デンプン蓄積の完了後に花粉が死に至る可能性も否定できない。

1-4-2 花粉発芽時の糖代謝メカニズム

花粉発芽時の糖代謝メカニズムには不明な点が多いが、ショ糖の役割として2つ挙げられる(図1-3)。1つはショ糖が浸透圧調整物質として働き、花粉の発芽に必要な膨圧の維持に貢献するというものである。花粉における糖濃度についてはいくつかの種で報告がある。例えば、イネの花粉において、デンプン蓄積期のショ糖濃度はブドウ糖や果糖よりも低いことが明らかとなっている(Kong et al., 2007)。しかし、発芽した花粉における糖濃度を測定した例は見られず、ショ糖が浸透圧調整物質としての役割を果たしているかは不明である。

もう1つは、伸長花粉における細胞壁合成の基質としてショ糖が必要な可能性である。発芽後、花粉管は急速に伸長するが、その際細胞壁が適切に作られることが必要とされる(Hepler et al., 2013)。Persia et al.(2008)は、タバコの花粉管において細胞質に加え細胞膜や細胞壁に局在するスクロースシンターゼ(SUS)のアイソフォームを特定した。SUSはショ糖を分解し果糖とUDPグルコースを生成する反応を触媒する酵素である。Persia et al.(2008)は、SUSが細胞壁の成分であるセルロースやカロース合成の基質としてUDPグルコースを供給しているという説を主張した。この説に沿う形で、SPSによるショ糖合成がSUSの基質としてのショ糖供給に寄与している可能性がある。実際、細胞膜や細胞壁に局在するSUSが細胞壁合成に関与するという報告はタバコ以外の植物においても存在する(Fujii et al., 2010; Brill et al., 2011)。一方で、Barratt et al. (2009)はシロイヌナズナのSUS変異体および細胞質型インベルターゼ(CIN)変異体の解析からSUSは細胞壁合成には必須でないとし、インベルターゼによるショ糖分解によって生成された単糖からUDPグルコーススピロホスホリラーゼ(UGPase)による反応を経てUDPグルコースが合成される経路が細胞壁合成

に重要な役割を果たすとしている。このように、細胞壁合成における SUS の関与については現在も議論が行われており、細胞壁合成に SUS が重要か否かは植物種、あるいは組織によって異なっている可能性もある。イネでは、出穂前に急速に伸長する稈において SUS をコードする *OsSUS1* の発現が高く、SUS がその際の細胞壁合成に関与している可能性が示唆されている (Hirose et al., 2008)。一方で、これまでのところイネの SUS に関する変異体の解析は行われていないため、イネの細胞壁合成に SUS によるショ糖分解が重要な役割を果たしているかどうかは現時点では不明である。

もう一つの残された疑問は、SUT によるショ糖の取り込みと SPS によるショ糖合成の関係である。前節で述べたように、SUT によるショ糖の取り込みが花粉の発芽に必須であることがイネやシロイヌナズナを用いた解析から明らかとなっている (Sivitz et al., 2008; Hirose et al., 2010)。花粉発芽率を測定した培地には 20% (w/v) のショ糖が含まれていることから、*OsSPS1* が KO された花粉においても SUT によるショ糖の取り込みは行われていると考えられる。そのため、なぜ SUT によるショ糖の取り込みが SPS によるショ糖合成の欠失を補うことができないかという疑問が残る。この原因は現時点では不明であるが、生存能力の維持、発芽、花粉管伸長といった各生育ステージにおける寄与が SUT と SPS で異なることが原因となる可能性がある。また、SUT によって取り込まれたショ糖はただちに SUS による UDP グルコースの供給に利用される一方、SPS によって合成されたショ糖は花粉管の膨圧の維持に利用されるといった、同じショ糖でも利用のされ方に違いがある可能性も否定できない。

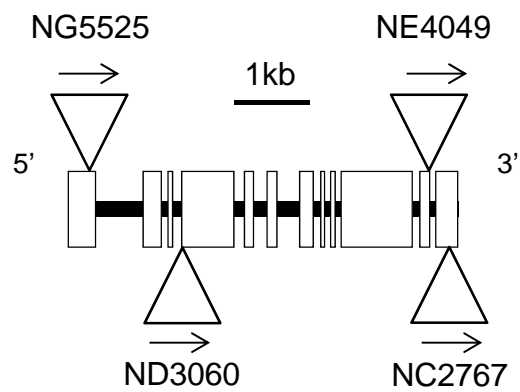


図1-1 本研究で用いた*Tos17*挿入系統の*OsSPS1*における*Tos17*挿入位置。*OsSPS1*のエキソンとイントロンをそれぞれ白箱と黒棒で示す。各系統の*Tos17*挿入位置および挿入方向はそれぞれ三角と矢印で示す。

表1-1 *Tos17*挿入系統の遺伝子型決定に用いたプライマーの配列

系統	Sequence
NC2767	L: GGAGACTTCATCAAGCTGGC R: GACACCGATCACGAGGAGAT
ND3060	L: AGCTCCAGTCCACTTCAGGA R: CAGCAAGACACTCCCATGAA
NE4049	L: GCTGGCACTCCTGATTCTTC R: AGCGCCCTGCATTCTACTTA
NG5525	L: ATGCATGCCTGCTTCTTCTT R: GCTTTGCCCTTTTCCTCTCT
<i>Tos17</i> ^a	CGAGAGCATCATCGTTACATCTTCT

^a*Tos17*はすべての系統に共通で用いた。

表1-2 第一章におけるリアルタイム逆転写PCR法に用いたプライマーの配列

遺伝子名	Gene code ^a	プライマー配列 (5'-3')
<i>OsSPS1</i>	Os01g0919400	L: AGGTCACAAGCACTCAGGTATC R: GCACGCATGATCTCATCGG
<i>OsSPS2</i>	Os02g0184400	L: CAGGCACTAAGGTACTTGTG R: GTGGTATGCAAGCTAGAAGG
<i>OsSPS6</i>	Os06g0643800	L: CGGTCTAAGGCTCTAAGGT R: GCTGTCTTTGTATCGTCCAC
<i>OsSPS8</i>	Os08g0301500	L: CTATTAGGAGGCGTGCAACAAGA R: GCTTATTGGTGCCGTGTGAG
<i>OsSPS11</i>	Os11g0236100	L: GGATCGACCTGTCCAAGGTG R: GCAAGAACAGCATCAAGCAAC
<i>RUBIQ1</i>	Os06g0681400	L: GGAGCTGCTGCTGTTCTTGG R: CACAATGAAAACGGGACACGA

^aRice Annotation Project Database <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>におけるGene codeを示す。

表1-3 プロモーターGUS系統作出に用いたプライマーの配列

プライマー名	配列	目的
<i>OsSPS1</i> pro-F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGATGTGA- ACCCTGAGCGAGCTTAGATGCATAG	<i>OsSPS1</i> のプロモーター領域 の増幅
<i>OsSPS1</i> pro-R	GGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGCGCCAT- CTCTCGATCAGCCGATGCTCTC	
GUS-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAT- GTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCG	GUS遺伝子の増幅
GUS-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCA- TTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGTTTTTC	
Tnos-F	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGATCGTT- CAAACATTTGGCAATAAAG	NOSターミネーターの増幅
Tnos-R	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCCCGATCT- AGTAACATAGATGACAC	

表1-4 SPS1突然変異系統のヘテロ個体後代の遺伝子型の分離

系統名	遺伝子型			P(χ^2)
	OsSPS1+/+	OsSPS1+/-	OsSPS1-/-	
NC2767	165	185	0	0.285
ND3060	76	83	0	0.580
NE4049	87	76	0	0.389
NG5525	84	76	0	0.527
計	412	420	0	0.781

OsSPS1+/+はOsSPS1がTos17挿入のない野生型であること、OsSPS1+/-はOsSPS1がTos17挿入についてヘテロであること、OsSPS1-/-はTos17挿入ホモであることを示す。P(χ^2)は+/+と+/-の個体数の比が1:1と仮定したときの χ^2 検定のp値を示す。

表1-5 SPS1突然変異系統の一穂粒数および登熟歩合

系統名	遺伝子型	一穂粒数	登熟歩合
NC2767	OsSPS1+/+	92.9 ± 3.6	78.6 ± 1.7
	OsSPS1+/-	88.2 ± 3.7 ns	75.2 ± 1.1 ns
NG5525	OsSPS1+/+	79.2 ± 2.5	82.6 ± 1.7
	OsSPS1+/-	84.7 ± 2.8 ns	76.9 ± 1.1 **

遺伝子型の表記は表1-4と同様。値は平均値±標準誤差を示す(n=8)。**はt検定において1%水準で有意差があることを、nsは5%水準で有意差がないことを示す。

表1-6 SPS1突然変異系統の正逆交雑における遺伝子型の分離

種子親	花粉親	F ₁ 個体数	F ₁ 個体の 遺伝子型		P(χ^2)
			OsSPS1+/+	OsSPS1+/-	
日本晴 (OsSPS1+/+)	NC2767 (OsSPS1+/-)	31	31	0	<0.001
	ND3060 (OsSPS1+/-)	46	46	0	<0.001
	NG5525 (OsSPS1+/-)	33	33	0	<0.001
	計	110	110	0	<0.001
NC2767 (OsSPS1+/-)	日本晴 (OsSPS1+/+)	28	16	12	0.45
ND3060 (OsSPS1+/-)		14	7	7	1.00
NG5525 (OsSPS1+/-)		33	15	18	0.60
	計	75	38	37	0.91

遺伝子型の表記は表1-4と同様。P(χ^2)はOsSPS1+/+とOsSPS1+/-の個体数の比が1:1と仮定したときの χ^2 検定のp値を示す。

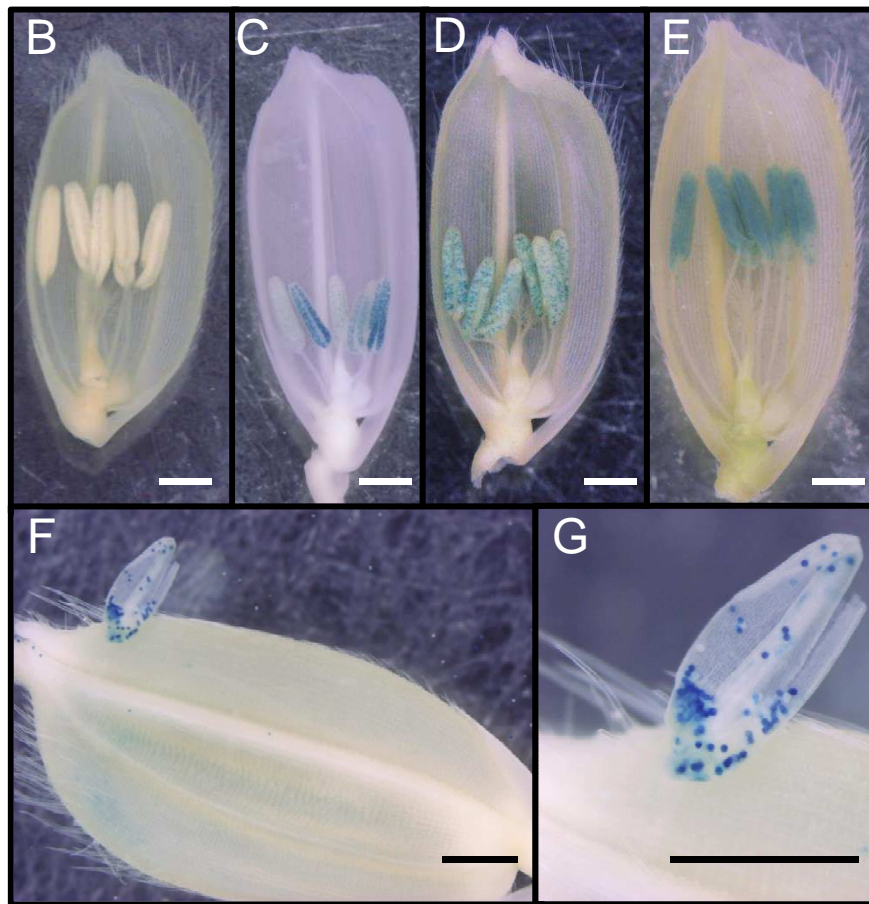
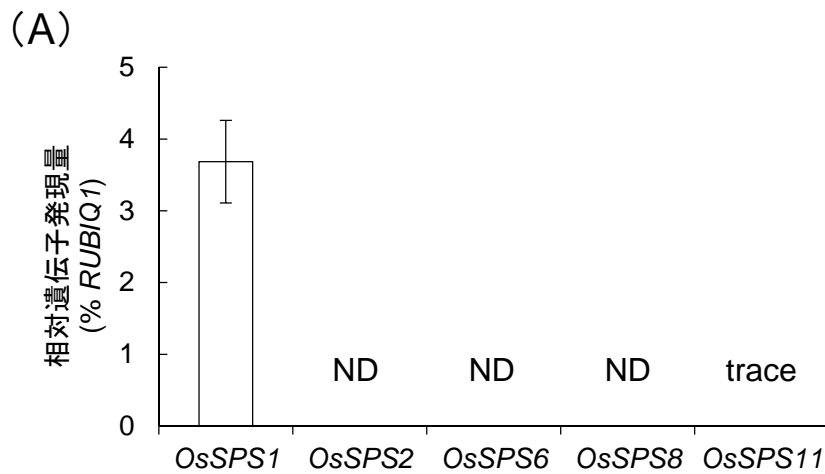


図1-2 イネの葯および穎花におけるSPSアイソジーンの発現解析。(A) 開花1-3日前のイネ (日本晴)の葯におけるSPSアイソジーンの遺伝子発現量。各遺伝子の発現量はRUBI_{Q1}で標準化している。値は平均値±標準誤差を示す(n=3)。NDとtraceはそれぞれ「検出できない」、「検出できるが定量するには発現量が低すぎる」を意味する(詳細は結果を参照)。(B-G) GUS染色したイネの穎花。(B) GUS染色した日本晴(コントロール)の穎花(C-E) *OsSPS1*のプロモーターGUS系統の開花前の穎花(F, G) *OsSPS1*のプロモーターGUS系統の開花後の穎果(GはFの一部を拡大したもの)。図中のバーは1mmを示す。

表1-7 SPS1突然変異系統の成熟花粉割合および花粉発芽率

	遺伝子型	稔実花粉割合 (%)	花粉発芽率(%)
NC2767	OsSPS1+/+	84.4±7.2	79.3±2.9
	OsSPS1+/-	85.9±3.1 ns	42.9±5.4 ***
NE4049	OsSPS1+/+	86.8±3.6	84.6±3.9
	OsSPS1+/-	87.4±3.3 ns	41.4±4.3 ***
NG5525	OsSPS1+/+	92.1±1.0	84.7±5.5
	OsSPS1+/-	92.0±2.4 ns	36.9±4.8 ***

遺伝子型の表記は表1-4と同様。***はt検定において0.1%水準で有意差があることを、nsは5%水準で有意差がないことを示す。値は平均値±標準偏差を示す(n=6-9(成熟花粉割合)、n=5-10(花粉発芽率))。

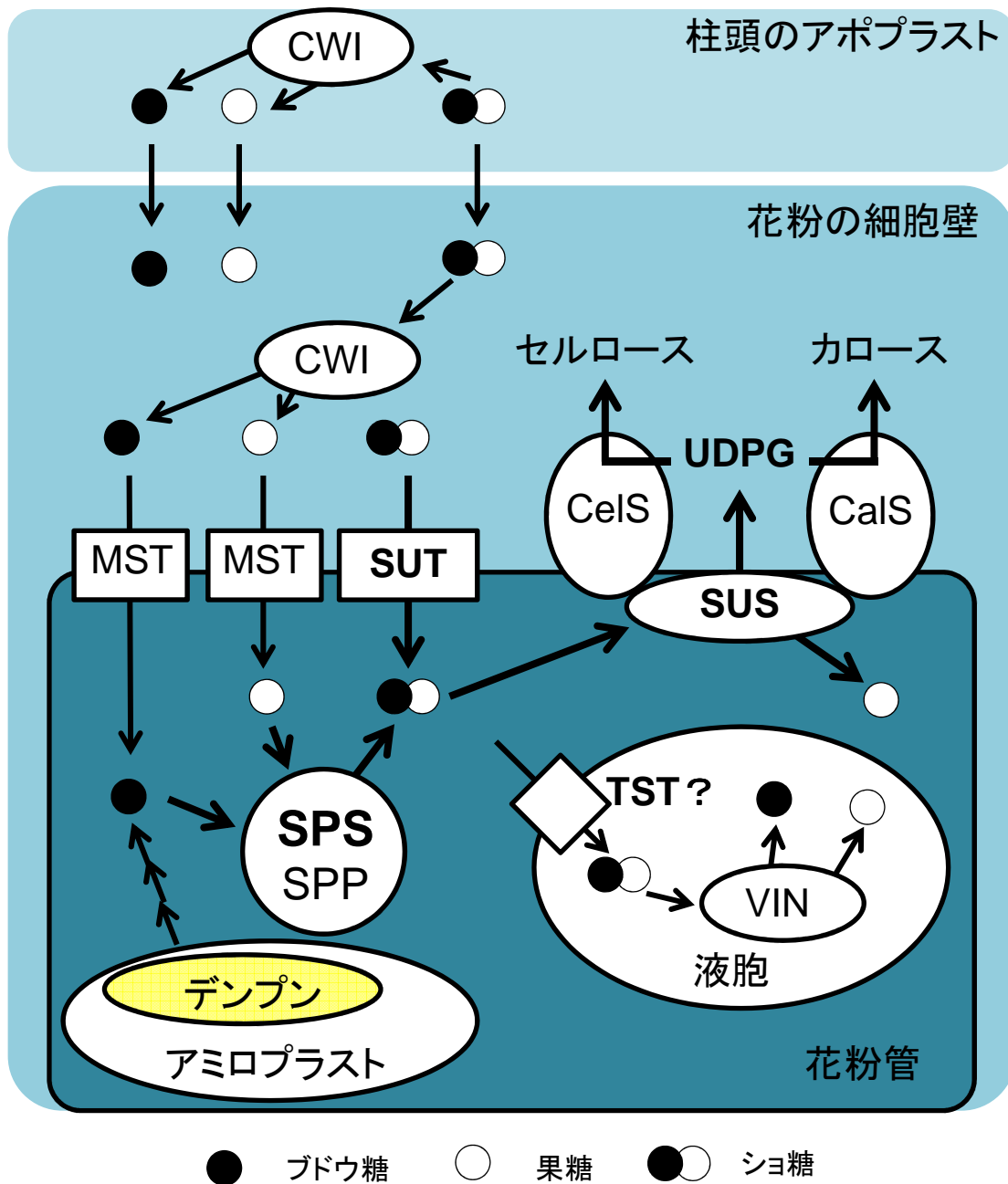


図1-3 花粉管における糖代謝経路モデル (Persia et al. (2008)を元に作成)。CalS; カロース合成酵素、CelS; セルロース合成酵素、CWI; 細胞壁型インベルターゼ、MST; 単糖トランスポーター、SPP; ショ糖リン酸フォスファターゼ、SPS; ショ糖リン酸合成酵素、SUS; スクロースシンターゼ、SUT; ショ糖トランスポーター、TST; 液胞膜局在型糖トランスポーター、UDPG; UDPグルコース、VIN; 液胞型インベルターゼ。

第二章 葉身の SPS 活性が低下した SPS 遺伝子に関する変異体の作出と機能解析

2-1 緒言

第一章の結果にあるように、*OsSPS1* が破壊された花粉は発芽することができないため、*OsSPS1* の KO 系統を *Tos17* 突然変異系統から得ることはできなかった。そこで本章では SPS 活性が低下したイネ系統の解析を行うため、*Tos17* 突然変異系統から *OsSPS1* が KD された系統を選抜し、さらに RNAi 系統の作出および CRISPR/Cas9 システムを用いた SPS 遺伝子 KO 系統の作出を行った。これらの系統を用いて SPS 活性の低下がイネの生育および糖・デンプン代謝に及ぼす影響を検討した。

遺伝子のイントロンへの塩基の挿入によりその遺伝子の発現が KD する例が知られているため (Varagona et al., 1992)、本章ではまず *OsSPS1* のイントロンに *Tos17* が挿入された系統に着目し、WT 個体と比較して *Tos17* 挿入ホモ個体の葉身の SPS 活性が有意に低下した SPS1-KD 系統を 2 系統選抜した。また、RNAi 法を用いて *OsSPS1* の発現が抑制された系統を作出した。これらの系統を人工気象室で栽培し、栄養成長期の葉身における SPS 活性、遺伝子発現量、糖・デンプン濃度を測定するとともに、生育の比較を行った。また、SPS1-KD 系統を水田圃場で 2 ヶ年栽培し、SPS 活性の低下がイネの圃場レベルでの生育、乾物生産、収量におよぼす影響を検討した。

CRISPR/Cas9 システムでは T0 世代で KO 系統の作出が可能のため、*OsSPS1* のように受精に重要な役割を果たしている遺伝子の解析に有効である (Endo et al., 2015)。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて *OsSPS1* の KO 系統 (*sps1*) および *OsSPS1* と *OsSPS11* が同時に KO されたダブルノックアウト (WKO) 系統 (*sps1/sps11*) を作出した。これらの系統についても同様に SPS 活性、糖・デンプン濃度を測定するとともに、生育の比較を行った。

2-2 材料および方法

2-2-1 供試材料

葉身の SPS 活性が低下した SPS1-KD 系統の選抜にあたり、まず *Tos17* レトロトランスポゾンが *OsSPS1* のイントロンに挿入された系統を Rice *Tos17* Insertion Mutant Database (Miyao et al., 2003) より探索し、6 系統について種子の分譲を受けた。得られた各系統について、分譲を受けた 20 粒の *OsSPS1* の遺伝子型は *Tos17* 挿入ホモ、ヘテロ、WT が混ざった状態であるため、PCR 法により *OsSPS1* について *Tos17* 挿入ホモの個体と WT の個体を選抜した。次に、葉身の SPS 活性を *Tos17* 挿入ホモと WT 個体で比較し、WT と比較して *Tos17* 挿入ホモ個体の SPS 活性が有意に低下した系統 (ND3010、ND7875、以下 KD-1、KD-2) を選抜した。これらの系統はそれぞれ第 4 イントロン、第 8 イントロンに *Tos17* が挿入されている (図 2-1A)。

RNAi 系統の作出にあたり、図 2-1B に示すコンストラクトを作成した。まず、*OsSPS1* の 297 bp の cDNA 断片を「日本晴」の幼植物の葉身から抽出した DNA を用いて PCR 法により増幅した。PCR には Prime Star GXL (タカラバイオ株式会社) を用いた。設計に用いたプライマーは表 2-1 に示した。つぎに、cDNA 断片を RNAi vector pANDA (Miki and Shimamoto, 2004) に Gateway LR Reaction (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて導入した。完成したコンストラクトを、アグロバクテリウム (EHA105) を介した形質転換 (Toki et al., 2006) によりイネ (日本晴) に導入した。得られた 10 系統以上の中から、T₁ 世代の幼植物の葉身の *OsSPS1* の発現が低かった 2 系統 (#1、#5) をその後の解析に用いた。解析には T₃ 世代の植物を用い、対照系統としてそれぞれの RNAi 系統と同じ T₁ 世代の植物由来でコンストラクトが導入されていない *azygous* 系統を用いた。以下、各系統の RNAi 系統を RNAi-1、RNAi-5、*azygous* 系統を WT と呼ぶ。

CRISPR/Cas9 システムを用いて *OsSPS1* が KO された単独変異体 (以下 *sps1*) と *OsSPS1* と *OsSPS11* が KO された二重変異体 (以下 *sps1/sps11*) を作出した (図 2-2)。 *sps1* の作出にあたり、*OsSPS1* の第 12 エキソンの 20 bp を guide RNA の標的配列とした。 *sps1/sps11* の作出にあたり、

OsSPS1 の第 1 エキソンの 20 bp を guide RNA の標的配列とした。この配列と 2 塩基異なる配列が *OsSPS11* の第 1 エキソンに存在し、この配列も guide RNA の標的配列となる。*sps1* と *sps1/sps11* それぞれについて、pZH_OsU6gRNA_MM Cas9 vector (Mikami et al., 2015) を用いて形質転換用のコンストラクトを設計した。設計に用いたプライマーは表 2-2 に示した。完成したコンストラクトを、アグロバクテリウム (EHA105) を介した形質転換 (Toki et al., 2006) によりイネ (日本晴) に導入した。

2-2-2 遺伝子型の決定

DNA の抽出は第一章で示した方法と同様の方法で行った。*Tos17* 突然変異系統の遺伝子型の決定は PCR 法によりおこなった。PCR には Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用い、反応液には各系統のプライマーセットを加え、温度条件は 94°C 60 秒、94°C 30 秒・58°C 90 秒・72°C 90 秒を 35 サイクル、72°C 10 分とした。RNAi 系統のコンストラクトの導入確認は、PCR 法によりおこなった。PCR には TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用い、反応液にはプライマーセットを加え、温度条件は 98°C 10 秒、98°C 10 秒・55°C 30 秒・72°C 60 秒を 35 サイクル、72°C 3 分とした。CRISPR/Cas9 システムで作出した系統の遺伝子型は、guide RNA の標的配列周辺の塩基配列をシーケンスすることにより決定した。まず、各標的配列周辺を PCR 法により増幅した。PCR には PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ) を用いた。PCR 産物を EXOSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて精製した。精製した PCR 産物の塩基配列をシーケンサー (ABI3730xl あるいは ABI3130xl, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて読みとった。以上の解析に用いたプライマーを表 2-1, 2-2, 2-3 に示した。

2-2-3 人工気象室における栽培、生育調査、サンプリング

OsSPS1 ノックダウン系統と RNAi 系統の栽培は人工気象室内で行い、明期 27°C、14 時間、暗期 22°C、10 時間とし、光強度 (PPFD) は 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。種子は 2.5% (v/v) の次亜塩素酸

ナトリウム溶液で消毒した後、30°C の水に暗所で 3 日浸け催芽した。発芽した種子は育苗用培土（イセキ農機、東京）を入れたシードリングケースに播種した。生育調査とサンプリングは播種後 20 日に行った。草丈は土の表面から葉身の先端までとした。乾物重の測定には地上部全体をサンプリングし、80°C の乾燥機で1週間以上乾燥させた後、行った。また、最上位完全展開葉葉身をサンプリングした後、液体窒素でただちに凍らせ、使用するまで-70°C で保管した。

sps1 と *sps1/sps11* の栽培は、再分化した植物を育苗用培土で満たしたプラスチック容器に移植し、明期 27°C、14 時間、暗期 22°C、10 時間、光強度 (PPFD) 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で栽培した。遺伝子型を決定した後、植物を育苗用培土で満たした 0.8 L ポットに移植し、明期 27°C、14 時間、暗期 22°C、10 時間、光強度 (PPFD) 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で栽培した。移植日および移植後 32 日に草丈と茎数を測定した。また、最上位完全展開葉をサンプリングした後、液体窒素でただちに凍結させ、使用するまで-70°C で保管した。

2-2-4 SPS 活性の測定

測定は Okamura et al. (2011) の方法をもとに、UDPG と F6P からの UDP の生成量を定量することで行った。UDP の定量は Pyruvate Kinase と Lactate Dehydrogenase の添加により減少する NADH の量を、分光光度計により測定することで行った。酵素活性は基質濃度が十分な条件下での最大活性および基質が制限された条件下での制限活性を測定し、可溶性タンパク質ベースで算出した。

イネ葉身をマルチビーズショッカー（安井器械）によって凍結粉砕した後に約 100 mg 量り取った後、サンプル 100 mg に対して抽出バッファー 800 μl の比になるよう抽出バッファー（50 mM HEPES-KOH pH = 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 5 $\mu\text{l/ml}$ Protease Inhibitor Cocktail (P9599, SIGMA, St.Louis, MO, USA), 0.5% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) TritonX-100, 0.2% (w/v) PVPP) を加えた。よく攪拌した後 11300 $\times g$ 、4°C で 5 分間遠心した。上清の一部をタンパク質濃度測定用にとっておき、残りの上清を Sephadex G-25 を詰めたカラムに通し、260 $\times g$ 、4°C

で 1 分間遠心して脱塩処理した。脱塩処理後の溶液(以下抽出液)の一部をタンパク質濃度測定用にとっておき、残りを反応に用いた。

反応は 1 サンプルにつき Positive と Blank の 2 種類を設けた。Positive について、反応液 80 μ l に抽出液 20 μ l を加え攪拌後、30°C の恒温水槽で 10 分間反応させた。反応液は最大活性測定用 (50 mM Hepes-KOH pH = 7.5, 10 mM MgCl₂, 8 mM F6P, 27.6 mM G6P, 50 mM UDPG) と制限活性測定用 (50 mM Hepes-KOH pH = 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.8 mM F6P, 2.76 mM G6P, 10 mM UDPG, 2 mM K₂HPO₄) をそれぞれの測定に用いた。反応後 1.2 M HClO₄ を 100 μ l 加えて攪拌し反応を停止させた後、15 分間氷中に静置した。Blank については、Positive と同じ反応液 80 μ l に 1.2 M HClO₄ 100 μ l を加え、その後抽出サンプル 20 μ l を加えて攪拌し、15 分氷中に静置した。その後 Positive, Blank とともに 2.0 M KHCO₃ 65 μ l を加え中和した。攪拌後、氷上に約 30 分間静置した。その後、17600 \times g、4°C で 10 分間遠心し、上清を吸光度の測定に用いた。

Assay mixture (50 mM Hepes-KOH pH = 7.5, 40 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0.25 mM NADH, 2 mM PEP) 160 μ l に上清 40 μ l を加え、分光光度計 (Viento XS、大日本住友製薬、大阪) で 340 nm の吸光度を測定した。Pyruvate Kinase 1.0 μ l, Lactate Dehydrogenase 1.0 μ l を加え、再び吸光度を測定し、吸光度の変化量を求めた。測定は 1 サンプルにつき Positive と Blank のそれぞれについて、各サンプル 2 反復行った。

可溶性タンパク質濃度の測定は分光光度計 (Viento XS、大日本住友製薬株式会社、大阪) を用いて、Bradford 法 (Bradford, 1976) により行った。すなわち、Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (#500-0006, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を 5 倍希釈した溶液 200 μ l にサンプル 10 μ l を加え、攪拌した後 25°C で 5 分静置した。その後、595 nm の吸光度を測定した。サンプルの測定と同時に 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml BSA 溶液についても同様の操作を行い、吸光度と可溶性タンパク質濃度の検量線を作成した。検量線を用いて、各サンプルのタンパク質濃度を算出した。

Positive と Blank それぞれで得られた吸光度の変化量の差から試料中で 10 分間に生成した UDP を定量した。これを 1 時間当たりの反応量に直し、脱塩処理前後の可溶性タンパク質含量か

ら算出した希釈率をかけ、サンプル中の可溶性タンパク質あたりの値を SPS 酵素活性 ($\mu\text{mol/h/mg}$ total soluble protein) とした。

2-2-5 遺伝子発現量の測定

マルチビーズショッカー (安井器械) によって凍結粉砕したサンプル約 50 mg から RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を抽出した。RNA から PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いて逆転写を行い、得られた一本鎖 cDNA と SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) および ABI7300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子の転写量は第一章と同様の方法で *RUBIQ1* により標準化した (Wang et al., 2000)。用いたプライマーの配列を表 2-4 に示した。

2-2-6 糖・デンプン濃度の測定

糖・デンプン濃度の定量は Okamura et al. (2016) の方法をもとに、マルチビーズショッカー (安井器械) によって凍結粉砕したサンプルから可溶性糖類 (ショ糖・ブドウ糖・果糖) およびデンプンを抽出し、F-kit (ジェイ・ケイ・インターナショナル、東京) を用いて定量することにより行った。

凍結状態にすりつぶしたサンプル約 20–40 mg に 80% (v/v) エタノール 800 μl を加えて攪拌した後、80°C に 10 分間静置した。その後 11300 $\times g$ 、常温で 5 分間遠心し、上清と沈殿に分けた。沈殿には 80% (v/v) エタノール 700 μl を加えてこの操作をもう一度行った。二度の遠心分離で得られた上清は遠心エバポレーターでエタノールを除去した後 500 μl の蒸留水を加え、可溶性糖濃度分析用の試料とした。また沈殿は風乾によりエタノールを除去した後 1000 μl の蒸留水を加えて攪拌し、その後 105°C で 2 時間以上放置することでデンプンを糊化し、デンプン濃度分析用の試料とした。

抽出した試料中の糖・デンプン濃度定量は F-kit (#716251、#716260) を用い、その測定操作法に従って行った。可溶性糖類濃度試料を用いてショ糖・ブドウ糖・果糖を定量した。ブドウ糖濃度は

ヘキシキナーゼと G6PDH を加えることで生じる NADPH の増加量を、分光光度計(Viento XS)を用いて測定することにより定量した。ショ糖と果糖の濃度はそれぞれ β -フルクトシダーゼとホスホグルコイソメラーゼ (PGI) を添加することでブドウ糖に転換して定量した。同様にデンプン濃度は、pH = 4.5 の 50 mM 酢酸バッファーにグルコアミラーゼ (東洋紡、東京) を加え 50 U mL^{-1} とした溶液をデンプン濃度分析用の試料に $200 \mu\text{l}$ 加え、 40°C 、4 時間以上振とうすることによりデンプンをブドウ糖に分解した後、ブドウ糖を定量した。

2-2-7 圃場試験における栽培、生育調査、サンプリング

SPS1-KD 系統の圃場試験は、東大生態調和農学機構内の水田圃場にて 2015 年と 2016 年の 2 ヶ年行った。同機構内における各年次の 7 日間ごとの日平均気温と全天日射量を図 2-5 に示した。2015 年は 5 月 28 日に、2016 年は 5 月 26 日に播種後約 1 か月の苗を移植した。1 株 1 本植えとし、栽植密度は畝間 30 cm、株間 15 cm とした。2015 年は 1 区画 $1.8 \text{ m} \times 2.4 \text{ m}$ 、2016 年は 1 区画 $1.8 \text{ m} \times 2.1 \text{ m}$ で両年とも各系統 3 反復設けた。基肥として複合磷加安 (N:P₂O₅:K₂O=12:16:18) を 10 a あたり 50 kg 施肥した。

生育調査は移植後約 1 か月後から約 2 週間ごとに穂ぞろい期まで行った。草丈および茎数を測定した。栄養成長期に葉身および葉鞘のサンプリングを表 2-5 で示す日に行った。ただし、2015 年の葉身のサンプリングについては、7 月 13 日に行った。葉身は最上位完全展開葉を、葉鞘はその 1 枚下の葉の葉鞘をサンプリングし、ドライアイス、あるいは液体窒素で凍結した。その後、酵素活性、糖・デンプン濃度、遺伝子発現の測定に用いるまで -70°C で保存した。地上部のサンプリングは栄養成長期 (移植後約 6 週)、出穂期、乳熟期 (出穂後約 10 日)、登熟中期、収穫期の 5 回、表 2-5 に示す日に行った。地上部を地際で刈った後、穂、葉身、稈および葉鞘に分け (栄養成長期は葉身と葉鞘・基部の 2 部位)、 80°C の乾燥機で 1 週間以上乾燥させた後、乾物重を測定した。これとは別に収穫期に地上部を地際で刈り、1 週間以上風乾させたのち、穂を収量および収量構成要素の計測に用いた。

2-2-8 収量および収量構成要素

収量構成要素の調査は以下の手順で行った。株ごとの穂数を測定した後、脱穀し比重 1.06 の食塩水で塩水選した。浮いた籾数と沈んだ稔実籾数をそれぞれ数え、それらの和から総籾数を算出した。稔実籾を 1 週間程度風乾させた後、総籾重を測定した。これらを用いて各収量構成要素および籾収量を以下の式(2-1)～(2-4)により得た(式(2-1)、(2-2)はそれぞれ式(1-1)、(1-2)と同じ)。なお、収量は株ごとの収量を単位面積当たりの収量に換算し、その値で統計処理を行った。

$$\text{式(2-1) 一穂籾数[個 本}^{-1}\text{]} = \text{総籾数[個]} / \text{穂数[本]}$$

$$\text{式(2-2) 登熟歩合[\%]} = \text{稔実籾数[個]} / \text{総籾数[個]} \times 100$$

$$\text{式(2-3) 籾千粒重(g)} = \text{総籾重[g]} / \text{稔実籾数[個]} \times 1000$$

$$\text{式(2-4) 籾収量(g/m}^2\text{)} = \text{総籾重[g]} \times 22.1(\text{栽植密度})[\text{株/m}^2]$$

2-2-9 統計処理

統計処理は、t 検定および分散分析を Excel 2010(Microsoft)およびエクセル統計 2012(株式会社社会情報サービス、東京)を用いて行った。

2-3 結果

2-3-1 SPS1-KD 系統と RNAi 系統における SPS 活性と SPS アイソジーンの発現解析

人工気象室で栽培した播種後 20 日の SPS1-KD 系統の明期開始 7 時間後における葉身の SPS 活性と遺伝子発現量を測定した。KD-1 と KD-2 では WT と比較して KD の最大 SPS 活性がそれぞれ 65%、60%に低下した(図 2-6 A, B)。活性化状態の SPS の活性を選択的に測定する SPS 制限活性についても、最大活性と同様に WT と比較して KD で有意に低下した(図 2-6 A, B)。制限活性を最大活性で割ることによって活性化状態の SPS の割合を示す活性化率を算出したが、WT と KD で有意な差は見られなかった(KD-1: WT, $39.9 \pm 1.3\%$; KD, $39.8 \pm 2.8\%$; KD-2: WT, $39.9 \pm 1.3\%$; KD, $36.8 \pm 4.2\%$)。SPS1-KD 系統の SPS 活性の低下が *OsSPS1* の遺伝子発現の低下によるものかどうか明らかにするため、葉身における 5 つの SPS アイソジーンの遺伝子発現量を測定した。KD-1 と KD-2 の *OsSPS1* の遺伝子発現は野生型と比較してそれぞれ 11%、1%に低下した(図 2-6 C, D)。他の SPS アイソジーンの遺伝子発現量は WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 2-6 C, D)。このことは、SPS1-KD 系統における *OsSPS1* の発現低下が他の SPS アイソジーンによって補償されなかったことを示唆していた。

人工気象室で栽培した播種後 20 日の RNAi 系統の葉身の SPS 活性と遺伝子発現量を測定した。RNAi-1 と RNAi-5 では WT と比較して最大 SPS 活性がそれぞれ 65%、71%に低下した(図 2-7 A, B)。SPS 制限活性についても、最大活性と同様に両 RNAi 系統とも WT と比較して有意に低下した(図 2-7 A, B)。WT と KD の活性化率に有意な差は見られなかった(RNAi-1: WT, $36.9 \pm 1.3\%$; RNAi, $36.4 \pm 1.6\%$; RNAi-5: WT, $38.7 \pm 1.2\%$; RNAi, $34.4 \pm 1.9\%$)。RNAi-1 と RNAi-5 の *OsSPS1* の遺伝子発現は WT と比較してそれぞれ 42%、18%に低下した(図 2-7 C, D)。他の SPS アイソジーンの遺伝子発現量は WT と RNAi の間に有意な差は見られなかった(図 2-7 C, D)。このことは、RNAi 系統における *OsSPS1* の発現低下が他の SPS アイソジーンによって補償されなかったことを示唆していた。以上の結果から、RNAi 系統における SPS 活性の低下程度は KD-1 と同程度であり、

KD-2 ほどは低下していないことが示唆された。

2-3-2 SPS1-KD と RNAi 系統の葉身における糖・デンプン濃度と SPS 活性との相関

SPS 活性の低下がイネの炭素分配に及ぼす影響を明らかにするため、SPS1-KD 系統と RNAi 系統の葉身における糖・デンプン濃度の時間変化を調べた(図 2-8)。KD-1 の明期開始 14 時間後におけるデンプン濃度の減少と、KD-2 の明期開始時におけるブドウ糖濃度と果糖濃度の上昇を除き、WT と KD の糖・デンプン濃度に有意な差は見られなかった。RNAi 系統とその野生型の糖・デンプン濃度に有意な差は見られなかった。明期開始 7 時間後のサンプルを用いて、イネの葉身における SPS 活性と糖・デンプン濃度の間に相関関係があるか調べた。デンプン濃度、ショ糖濃度、ショ糖/デンプン比のいずれも最大 SPS 活性と相関関係は見られなかった(図 2-9 A-C)。制限活性と糖・デンプン濃度の相関関係を解析した場合も同様の結果が得られた(図 2-9 D-F)。

2-3-3 SPS1-KD と RNAi 系統の初期生育と乾物生産

SPS 活性の低下がイネの初期生育におよぼす影響を明らかにするため、人工気象室で栽培した播種後 20 日の SPS1-KD 系統と RNAi 系統の草丈と地上部乾物重を測定した。SPS1-KD 系統では WT と KD の草丈、地上部乾物重に有意な差は見られなかった。RNAi 系統においても WT と RNAi の草丈、地上部乾物重に有意な差は見られなかった(表 2-6)。

2-3-4 SPS1-KD 系統の水田圃場における糖・デンプン代謝と生育・乾物生産・収量

葉身における SPS 活性の低下が水田圃場における生育、乾物生産、収量に及ぼす影響を明らかにするため、2015 年と 2016 年の 2 ヶ年水田圃場にて SPS1-KD 系統を栽培し、解析を行った。栄養成長期の葉身における SPS 活性については、2 ヶ年とも WT と比較して KD で有意に低かった。KD の最大 SPS 活性はそれぞれの WT と比較して KD-1 では 57-59%、KD-2 では 44-51% だった(図 2-10 A, B, E, F)。制限活性については 2015 年のみ測定したが、最大活性と同様の傾向を

示した(図 2-10 C, D)。活性化率についても WT と KD との間に有意な差は見られなかった(KD-1: WT, $40.8 \pm 3.2\%$; KD, $40.2 \pm 7.9\%$; KD-2: WT, $30.3 \pm 1.7\%$; KD, $36.2 \pm 3.5\%$)。葉身における糖・デンプン濃度について、2015 年は 10 時のみ、2016 年は 10 時と 16 時に測定した(図 2-11, 2-12)。2015 年について、KD-1 のデンプンおよびショ糖濃度が KD で有意に高く、果糖濃度が KD で有意に低かった(図 2-11A)。一方で KD-2 については WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 2-11B)。2016 年について、KD-2 の 16 時においてブドウ糖濃度が KD で有意に低かったが、それ以外は WT と KD の間に有意な差は見られなかった。ただし、両系統とも KD においてデンプン濃度が高い傾向が見られた(図 2-12)。

10 時のサンプルから得られたデータを用いて、イネの葉身における SPS 活性と糖・デンプン濃度に相関関係があるか調べた。2015 年においては、最大 SPS 活性とショ糖/デンプン比の間に有意な正の相関が見られ、最大 SPS 活性とデンプン濃度についても有意ではないものの負の相関が見られた(図 2-13 A-C)。制限 SPS 活性とショ糖/デンプン比の間に有意な正の相関が見られ、制限 SPS 活性とデンプン濃度の間にも有意な負の相関が見られた(図 2-13 D-F)。2016 年のデータで同様の解析を行ったところ最大 SPS 活性とデンプン濃度、ショ糖濃度、ショ糖/デンプン比の間に有意な相関は見られなかった(図 2-14)。

栄養成長期におけるシンク器官である葉鞘の糖・デンプン濃度を比較したところ、2015 年では KD-1 において WT と比較して KD のショ糖濃度が有意に低かったが、KD-2 ではそのような傾向は見られなかった(図 2-15 A, B)。2016 年では両系統とも WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 2-15 C, D)。

SPS1-KD の草丈・茎数について、2015 年の KD-1 において草丈が WT よりも KD で有意に高い測定日が 2 日あったが、その他については 2 ヶ年とも WT と KD との間に有意な差は見られなかった(図 2-16)。栄養成長期における地上部乾物重を比較したところ、KD-1、KD-2 とも WT との間に有意な差は見られなかった。両系統の WT、KD とも 2015 年と比較して 2016 年の乾物重が低く、有意な年次間差が見られた(表 2-7, 2-8)。また、出穂期から収穫期までの地上部乾物重の推移を

比較したところ、乾物重は全体的に 2016 年で高く、多くの部位、時期において有意な年次間差が見られた(図 2-17, 表 2-9 ~ 2-16)。一方で、系統間差が見られたのは KD-2 の登熟中期における葉身のみであり、その他に有意な系統間差は見られなかった(表 2-9 ~ 2-16)。収量および収量構成要素について 2 ヶ年で比較すると、両系統とも 2016 年で籾収量が有意に高く、穂数、一穂籾数、籾千粒重の有意な増加がその原因となっていた。KD-1、KD-2 とも WT と KD の間に有意な系統間差は見られなかった。KD-1 については、一穂籾数、籾千粒重、籾収量で年次と系統の有意な交互作用が見られた一方、KD-2 では有意な交互作用は見られなかった(表 2-17, 2-18)。

2-3-5 CRISPR/Cas9 システムにより作出した *sps1* 変異体と *sps1/sps11* 変異体の解析

前節までの結果から、SPS1-KD では最大 56% SPS 活性が低下しているにもかかわらず、糖代謝への影響は限定的であり、乾物生産や収量には影響が見られないことが明らかとなった。そこで、SPS1-KD 系統よりもさらに SPS 活性が低下した系統を得るために、*OsSPS1* を KO した単独変異体 (*sps1*) と *OsSPS1* と *OsSPS11* を KO した二重変異体 (*sps1/sps11*) を、CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した。再分化した植物体の遺伝子型は各遺伝子の CRISPR/Cas9 の標的配列付近の配列を野生型の配列と比較することにより確認した。各 KO 個体は異なる変異を持っていたが、すべての変異がフレームシフト変異であると考えられた(図 2-3, 2-4)。そのため、すべての KO 個体を欠失変異体とみなし、それぞれの個体のサンプルの測定から得られた結果をまとめて解析した。*sps1* および *sps1/sps11* は不稔だったため、これらの系統の種子を得ることができなかった。このことは、*OsSPS1* が花粉の稔性に必須であるという第一章の結果と一致していた。そのため、本章では再分化当代(T0 世代)の植物体を用いて解析を行った。再分化した植物体の中には変異が導入されていない個体が存在したため、そのような個体を WT として用いた。以下、*sps1* の WT を SPS1-WT、*sps1/sps11* の WT を SPS1/SPS11-WT と呼ぶ。

sps1 と *sps1/sps11* の葉身における SPS 活性と糖・デンプン濃度を野生型と比較した。*sps1* と *sps1/sps11* の最大 SPS 活性は WT と比較してそれぞれ 54%、16%に低下した。制限 SPS 活性につ

いても最大 SPS 活性と同様に WT と比較して有意に低下していた(図 2-18 A, B)。活性化率については、*sps1*、*sps1/sps11* とそれぞれの WT の間に有意な差は見られなかった(SPS1-WT, $20.3 \pm 1.8\%$; *sps1*, $20.0 \pm 7.1\%$; SPS1/SPS11-WT, $39.4 \pm 2.9\%$; *sps1/sps11*, $33.4 \pm 11.6\%$)。 *sps1* と WT の葉身における糖・デンプン濃度に有意な差は見られなかった(図 2-18C)。一方、*sps1/sps11* のデンプン濃度は WT と比較して有意に高かった。ショ糖と単糖濃度については WT と比較して有意な差は見られなかった(図 2-18D)。 *sps1*、*sps1/sps11* とそれぞれの WT の最大 SPS 活性とデンプン濃度に有意な負の相関が見られた(図 2-19A)。一方、ショ糖濃度とショ糖/デンプン比については最大 SPS 活性と有意な相関は見られなかった(図 2-19 B, C)。制限活性と糖・デンプン濃度の相関関係を解析した場合も同様の結果が得られた(図 2-19 D-F)。

sps1、*sps1/sps11* とそれぞれの野生型の栄養成長期における草丈と茎数を比較した。草丈について *sps1*、*sps1/sps11* とそれぞれの WT の間に有意な差は見られなかった。*sps1* と *sps1/sps11* における茎数はそれぞれの WT と比較してそれぞれ 83%と 85%に低下したが、有意な差ではなかった。(表 2-19)。

2-4 考察

2-4-1 *OsSPS1* は葉身における主要な SPS アイソジーンである

本章の解析で用いた SPS 遺伝子に関する変異体とその SPS 活性の低下程度をまとめて示した (表 2-20)。本研究で用いた SPS に関する KD および KO 系統はそれぞれの WT と比較すると最大 SPS 活性が 29–84% 低下していた。SPS1-KD 系統、RNAi 系統と *sps1* における SPS 活性の低下程度から、ソース葉において *OsSPS1* が 5 つの SPS アイソジーンの中で主要な働きをしており、最大 SPS 活性の 40–55% を担っていることが示唆された。ただし、SPS1-KD 系統の SPS 活性の低下程度が播種後 3 週のイネと水田圃場における移植後 6 週のイネで異なっているように (図 2-6 A, B, 2-10 A, B)、*OsSPS1* の全 SPS 活性に対する寄与の割合は生育ステージによって異なると考えられる。このことは各 SPS アイソジーンの発現が生育ステージによって異なっていることを反映している (Okamura et al., 2011)。また、*sps1* と *sps1/sps11* の活性の比較から *OsSPS11* は活性の 30% 程度を担っている可能性が示唆された (図 2-18B)。このことは、*OsSPS11* は葉身で強く発現するという発現解析の結果と一致している (Okamura et al., 2011)。

2-4-2 SPS1-KD 系統における *OsSPS1* 遺伝子発現低下の原因

SPS1-KD 系統において、*OsSPS1* のイントロンへの *Tos17* の挿入は *OsSPS1* の発現低下、そして SPS 活性の低下をもたらした (図 2-6)。これまで、*Tos17* 挿入による突然変異の誘発は KO 系統の作出方法として用いられてきたが (Miyao et al., 2003)、本研究から KD 系統の作出方法としても有用である可能性が示された。イントロンへの塩基の挿入、あるいは欠失が未成熟 mRNA のスプライシングに影響し、その結果遺伝子発現に影響する例が知られており (Sun et al., 2011b)、SPS1-KD 系統における遺伝子発現の低下も同様のメカニズムによる可能性がある。また、SPS1-KD 系統のうち遺伝子発現の低下程度の大きい KD-2 ではヘテロ個体の後代の遺伝子型は、WT:ヘテロ:*Tos17*挿入ホモ = 1:2:1 に分離した (10:20:14, $p = 0.58$ (χ^2 検定))。このことは、*OsSPS1* の葉身にお

ける遺伝子発現が大きく低下しているにも関わらず、花粉が正常に機能していることを示している。同様の例として、トウモロコシ (*Zea mays*) の Granule-bound starch synthase (GBSS) をコードする *Wx* 遺伝子がある。*Wx* 遺伝子のイントロンにレトロトランスポゾンが挿入した変異体では胚乳における遺伝子発現は抑制されたが花粉は正常に機能していた (Varagona et al., 1992)。Varagona et al. (1992) は、この変異体における胚乳と花粉の間の遺伝子発現低下の違いは組織間におけるスプライシングパターンの違いによるものであると考えており、*SPS1-KD* 系統において花粉が正常に機能していることは同様のメカニズムで説明できるかもしれない。今後、*SPS1-KD* 系統の花粉における *SPS* アイソジーンが発現解析や様々な部位における *OsSPS1* のスプライシングパターンの解析を行うことで、イントロンへのレトロトランスポゾンへの *Tos17* の挿入が *OsSPS1* の遺伝子発現の抑制をもたらすメカニズムの解明が期待される。

2-4-3 CRISPR/Cas9 システムによる変異体作出の有用性

近年、CRISPR/Cas9 システムが植物の遺伝子を KO する方法として普及しつつある (Mikami et al., 2015; Endo et al., 2015; Khatodia et al., 2016)。CRISPR/Cas9 システムは T0 世代で目的遺伝子の KO 個体を得られることから、特に *OsSPS1* のように生殖成長に必須な遺伝子の栄養成長における生理機能を解析するのに適している。本研究と同様に種子の稔性に必須な遺伝子の機能解析に CRISPR/Cas9 システムを利用した例は少ないが (Lee et al., 2016)、このような利用法は今後さらに広がっていくと考えられる。また、*sps1/sps11* では 1 つのコンストラクトで *OsSPS1* と *OsSPS11* の 2 遺伝子を同時に KO することに成功した (図 2-3, 2-4, 2-18)。本研究は、*SPS* のように特に標的遺伝子がアイソジーンを持つ際に CRISPR/Cas9 システムによる複数遺伝子の KO 変異体の作出が有用であることを改めて示したといえる (Endo et al., 2015)。

2-4-4 葉身における SPS 活性とショ糖/デンプン比の関係

これまでの‘デンプン葉’植物を用いた解析から葉身 SPS 活性と炭素分配の簡易的な指標であるショ糖/デンプン比の正の相関関係が示されてきた (Galtier et al., 1993; Signora et al., 1998; Murchie et al., 1999; Tobias et al., 1999; Baxter et al., 2003)。一方、‘糖葉’植物であるイネでは正の相関関係が見られるという結果がある一方で見られないこともあり、その原因として葉身における SPS 活性とショ糖/デンプン比の関係は生育条件、生育ステージ、サンプリング時刻による影響を受けることが挙げられていた (Ono et al., 1999a; Takahashi et al., 2000; Ono et al., 2003; Ishimaru et al., 2004)。

SPS 活性の低下程度の異なる系統を用いた本章の結果からも、葉身における SPS 活性とショ糖/デンプン比の関係は生育条件、生育ステージ、サンプリング時刻による影響を受けることが示唆された。イネの葉身における糖・デンプン濃度は生育条件によって異なっており、特に水田圃場のように常に環境が変化する条件ではその傾向は強かった (図 2-8, 2-11, 2-12)。本研究において、水田圃場で栽培したイネの葉身の糖・デンプン濃度の値は同時期、同時刻にサンプリングしたにもかかわらず 2015 年と 2016 年で大きく異なっていた (図 2-11, 2-12)。播種後 20 日の SPS1-KD 系統と RNAi 系統の解析では SPS 活性の低下による葉身の糖・デンプン濃度への影響は見られず (図 2-8)、SPS 活性とショ糖/デンプン比に有意な相関は見られなかった (図 2-9)。一方で、水田圃場で栽培した KD-1 と KD-2 の栄養成長期の葉身では 2 ヶ年とも KD でデンプン濃度の高い傾向が認められ、2015 年においては最大 SPS 活性とショ糖/デンプン比に有意な正の相関が見られた (図 2-11~2-13)。このことから、先行研究と同様、条件次第では SPS 活性とショ糖/デンプン比に正の相関が見られることが明らかとなった。本研究で最大 SPS 活性とショ糖/デンプン比に正の相関が見られた水田圃場では光条件が不安定であり、一時的に強光条件になることがある。この時、強光によりカルビン-ベンソン回路からの炭素供給が通常よりも上昇し、ショ糖やデンプンの合成量も増加すると考えられる。実際、コムギにおいても光強度の上昇による光合成速度の上昇に応じて短期的に SPS 活性が上昇することが知られている (Trevanion et al., 2004)。KD では、ショ糖合成能が低下し

ているため、余剰分の炭素がデンプンに分配された可能性がある。この仮説については第三章の解析をもとに更に検討する。

一方で、葉身の最大 SPS 活性が 84% 低下した *sps1/sps11* においてデンプン濃度の顕著な増加によるショ糖/デンプン比の低下が見られた(図 2-18D)。ただし、*sps1* を合わせて解析した結果では最大 SPS 活性とショ糖/デンプン比に有意な相関が見られなかった(図 2-19C)。これは、*OsSPS1* の KO による SPS 活性の低下が葉身の糖・デンプン濃度に影響を与えなかったことが原因である(図 2-18C)。このことは、最大 SPS 活性とショ糖/デンプン比の相関関係が常に成り立っているわけではなく、*sps1/sps11* のような変異体において糖・デンプン代謝に変化が生じた結果見られる関係性であることを示唆している。また、‘デンプン葉’植物であるシロイヌナズナのアクセッション 129 系統を用いて網羅的に代謝産物と酵素活性を比較した解析においても、SPS 活性とショ糖、デンプン濃度に相関関係は見られていない(Sulpice et al., 2010)。このことから、デンプン葉においても SPS 活性とショ糖/デンプン比の相関関係が常に成り立っているわけではなく、過剰発現体あるいは変異体において糖・デンプン代謝に変化が生じた結果見られる関係性である可能性が高い。以上の結果から、イネにおいて SPS 活性が約 50% 低下しても葉身のショ糖/デンプン比への影響は限定的だが、84% 低下すると葉身のショ糖/デンプン比に影響を与えることが示唆された。

ただし、本研究の解析からは *sps1/sps11* において 84% の活性の低下が葉身デンプン濃度の上昇をもたらしたのか、あるいは単に *OsSPS11* の KO が葉身デンプン濃度の上昇低下をもたらしたのかは明らかではない。*OsSPS1* と *OsSPS11* ではその発現制御機構は異なっており(Okamura et al., 2011; Yonekura et al., 2013)、*OsSPS11* の SPS 活性への寄与が *OsSPS1* よりも低くても *OsSPS11* の KO がショ糖/デンプン比に影響を及ぼす可能性はある。実際、そのような例がタバコの SPS に関する解析において見られる。タバコの SPS をコードする *NtSPSA* と *NtSPSC* の発現抑制系統について、両者の葉における最大 SPS 活性の低下は同程度であったにもかかわらず、*NtSPSC* の発現抑制系統でのみ葉のデンプン濃度の増加が見られた。また、夜間のデンプン分解産物であるマルトースが *NtSPSC* の発現抑制系統でのみ葉に過剰蓄積していたことから、*NtSPSC* が葉における夜間のシ

糖合成に重要な役割を果たす遺伝子である可能性が示唆されている(Chen et al., 2005a)。この点については今後 *OsSPS11* に着目した解析から明らかになると考える。

2-4-5 葉身 SPS 活性の低下がイネの生育、乾物生産および収量に及ぼす影響

SPS1-KD 系統と RNAi 系統の解析から SPS 活性が 50% 低下しても生育、乾物生産、収量形成に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これまでイネの生育と SPS 活性の関係性についてはいくつか解析が行われており、草丈 (Ishimaru et al., 2004; Hirose et al., 2012; Hashida et al., 2013)、一穂粒数 (Hashida et al., 2013) の制御に関与する可能性が示唆されていたが、本研究の結果はこれらの研究とは必ずしも一致していない。Hirose et al. (2012) による *OsSPS1* の遺伝子発現を化学物質誘導性の RNAi コンストラクトでノックダウンした系統の解析では、イネの幼植物の草丈が減少し、葉身のショ糖/デンプン比が低下した (Hirose et al., 2012)。本研究では標的部位が同じ RNAi コンストラクトを用いて RNAi 系統を作出したが、草丈や葉身のショ糖/デンプン比の低下は見られなかった (図 2-8, 表 2-6)。その原因として、RNAi コンストラクトにおけるプロモーターの違いが挙げられる。本研究ではトウモロコシのユビキチン由来のプロモーターを使用したのに対し (図 2-2)、Hirose et al. (2012) は化学物質誘導性プロモーターを使用していた。また、植物の生育時期と生育条件の違いによる可能性もある。Hirose et al. (2012) ではムラシゲ・スクーグ培地上で温度制御された自然光の温室で植物を栽培したが、本研究では人工気象室で土耕栽培した。加えて、Hirose et al. (2012) は播種後 7 日の植物を計測したのに対し、本研究では播種後 20 日の植物を調査した。Hirose et al. (2012) においては SPS 活性の測定は行われていないため、活性の低下程度がその原因であるかは不明である。

OsSPS1 が草丈の制御に関与する可能性は、SPS 活性が上昇したイネを解析した先行研究からも示唆されている (Ishimaru et al., 2004; Hashida et al., 2013)。しかし、本研究では SPS 活性が低下したイネのみを用いて解析を行っているため、これらの結果と必ずしも矛盾するものではない。

また、ジャポニカ型水稻品種コシヒカリを遺伝的背景とし、*OsSPS1* 近傍がインディカ型水稻品種 Kasalath 型に置換された準同質遺伝子系統である NIL-SPS1 の解析から、*OsSPS1* が二次枝梗数を正に制御する遺伝子である可能性が示唆されている (Hashida et al., 2013)。一方で、SPS1-KD 系統において一穂粒数の低下は見られなかった (表 2-17, 2-18)。この矛盾についても、本研究では SPS 活性が低下したイネのみを用いて解析を行っているため、本研究の解析から結論を出すことはできない。Hashida et al. (2013) の解析で用いられた NIL-SPS1 は *OsSPS1* のみが Kasalath 型に置換された系統ではなく、*OsSPS1* 近傍に加え第 10 染色体にも約 5.6Mb の Kasalath 型領域を持っている。そのため、*OsSPS1* が一穂粒数を制御することが完全に示されたわけではなく、第 10 染色体がコシヒカリ型に置き換わった系統の作成や、NIL-SPS1 における *OsSPS1* の発現を抑制した系統の解析がその証明には必要である。

2-4-6 ‘デンプン’ 葉植物との比較

SPS 活性が 84% 低下した *sps1/sps11* では、葉身のデンプン濃度の増加が見られたが、生育については野生型と有意な差は見られなかった (図 2-18、表 2-19)。この結果はシロイヌナズナの変異体における解析と異なっている。シロイヌナズナの *AtSPS1A* と *AtSPSC* の二重変異体では SPS 活性が野生型と比較して約 30% に低下し、葉身へのデンプンの過剰蓄積と生育阻害が見られた。デンプンに加え葉にデンプン分解産物であるマルトースが過剰蓄積していたことから、生育阻害の原因の一つは夜間のデンプン分解産物の転流が阻害されたことによることが示唆された (Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015)。このような生育への影響の違いは‘糖葉’植物であるイネと‘デンプン葉’植物であるシロイヌナズナの代謝の違いを反映している可能性がある。‘デンプン葉’植物であるシロイヌナズナの生育は夜間のデンプン分解産物の転流に大きく依存するが (Stitt and Zeeman, 2012)、‘糖葉’植物であるイネの生育は夜間のデンプン分解産物の転流にあまり依存しない (Rosti et al., 2007; Lee et al., 2008, 2014, Hirose et al., 2013; Okamura et al., 2017)。そのため、シロイヌナズナでは夜間のデンプン分解産物の転流が阻害された結果生育阻害が見られた一方で、

イネでは仮に夜間のデンプン分解が阻害されても正常な生育は阻害されないと考えられる。また、逆に日中のデンプン合成と夜間のデンプン分解が WT よりも *sps1/sps11* で高く、その結果 *sps1/sps11* では日中の転流減少分を夜間のデンプン分解産物の転流で補った可能性も否定できない。他の可能性としては SPS が日中のイネの葉におけるショ糖合成の律速要因となっていないことである。この可能性については総合考察において詳細に述べる。

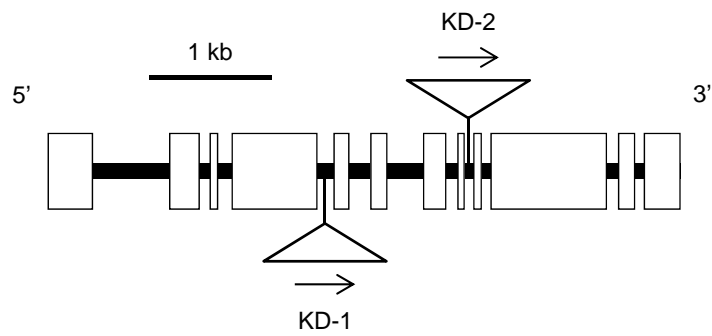


図2-1 SPS1-KD系統の*OsSPS1*における*Tos17*挿入位置。エクソンとイントロンはそれぞれ白箱と黒棒で示す。各系統の*Tos17*挿入位置および挿入方向はそれぞれ三角と矢印で示す。

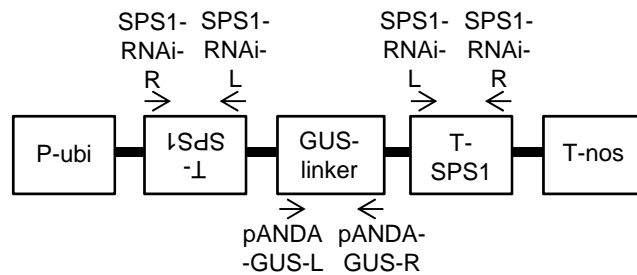


図2-2 *OsSPS1*のRNAi系統作出に用いたコンストラクト。コンストラクト作成およびコンストラクト導入確認に用いたプライマー名およびその向きを合わせて示す。P-ubiはトウモロコシ由来ユビキチンプロモーターを、T-SPS1は*OsSPS1*のcDNA断片を、T-nosはNOSターミネーターを示す。

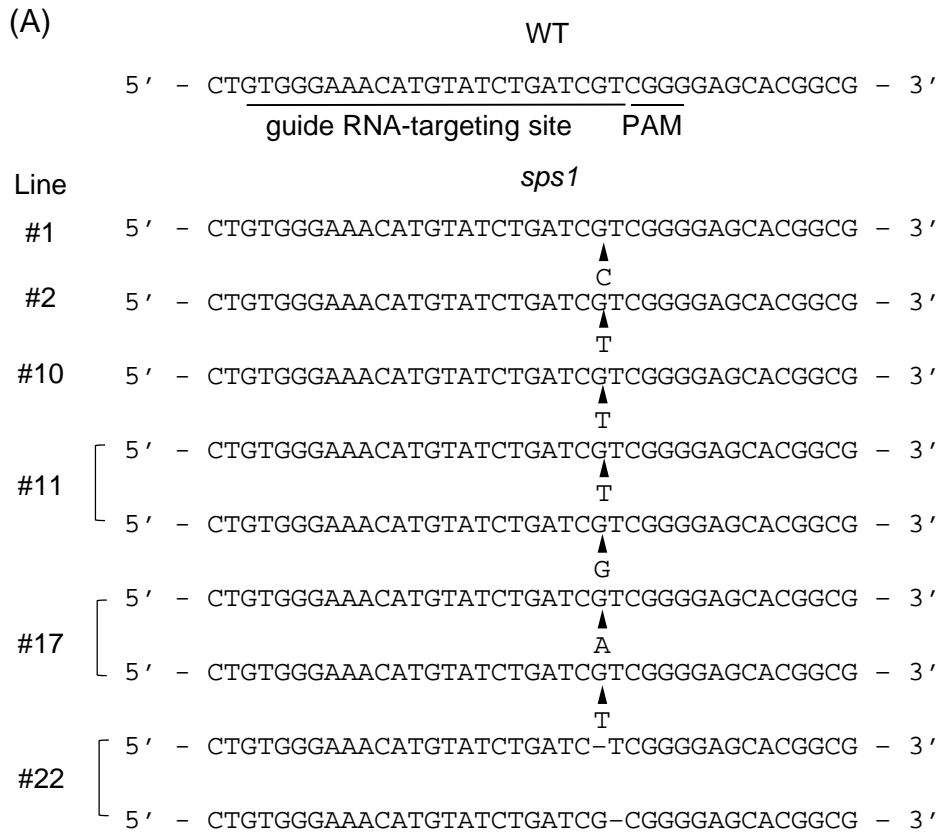


図2-3 CRISPR/Cas9システムを用いて作出した*sps1*における変異。WTと*sps1*の各個体における guide RNA-targeting siteとPAM配列を含む*OsSPS1*の塩基配列を示す。系統で配列が1つしかないものは、二つのアレルで同じ変異が生じたことを示す。矢印とダッシュはそれぞれ塩基の挿入と欠失を示す。

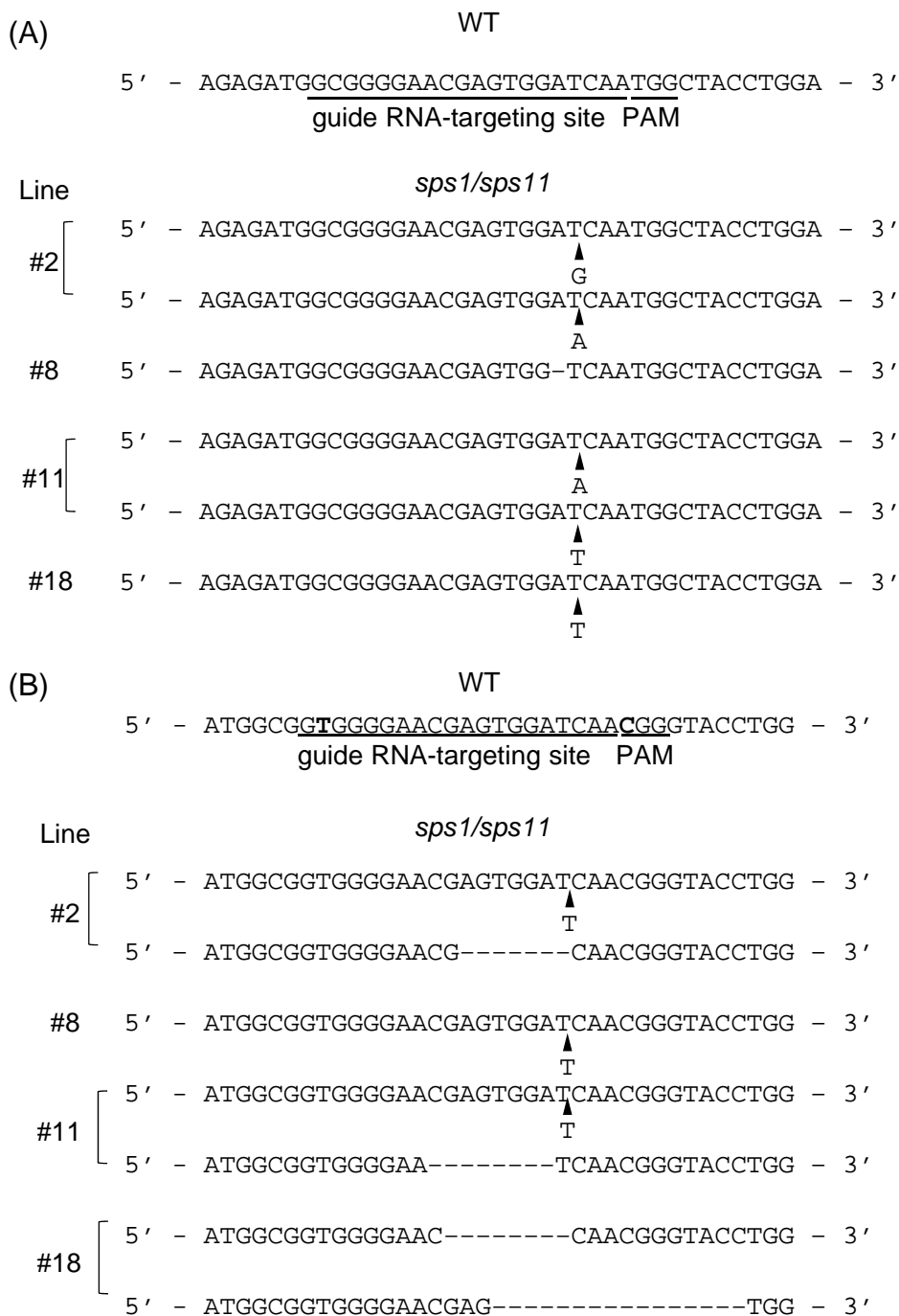


図2-4 CRISPR/Cas9システムを用いて作出した*sps1/sps11*における変異。野生型と*sps1/sps11*変異体の各個体におけるguide RNA-targeting siteとPAM配列を含む(A) *OsSPS1*と(B) *OsSPS11*の塩基配列を示す。系統で配列が1つしかないものは、二つのアレルで同じ変異が生じたことを示す。矢印とダッシュはそれぞれ塩基の挿入と欠失を示す。*OsSPS11*のターゲット配列におけるミスマッチ塩基はWTの配列に太字で示す。

表2-1 RNAi系統の作出、コンストラクトの導入確認に用いたプライマーの配列

プライマー名	プライマーの配列(5'-3')
pANDA-GUS-L	CATGAAGATGCGGACTTACG
pANDA-GUS-R	ATCCACGCCGTATTCGG
SPS1-RNAi-L	ACCAGGATAGCCGGATGC
SPS1-RNAi-R	GTTCATGGCACCCGGAGGT

表2-2 CRISPR/Cas9系統の作出、遺伝子型の確認に用いたプライマーの配列

用途	系統(遺伝子)	プライマーの配列(5'-3')
コンストラクトの作出	<i>sps1</i>	L: GTTGAACATGTATCTGATCGTCG
		R: AAACCGACGATCAGATACATGTTT
	<i>sps1/sps11</i>	L: GTTGGTGGGGAACGAGTGGATCAA
		R: AAACCTTGATCCACTCGTTCCCCAC
遺伝子型の確認	<i>sps1</i>	L: ATAAGGTCCGTACAGCGCC
		R: ATCGGCCTTCAGATCACCCCT
		シーケンス: CGAGGTCACAAGCACTCAGG
	<i>sps1/sps11</i> (<i>OsSPS1</i>)	L: TGATTTGATCGGTTCCGCCA
		R: TTTCTCGCGAGGTGCCAGAT
		シーケンス: ACGAAGTAGTGCGTCGGATT
<i>sps1/sps11</i> (<i>OsSPS11</i>)	L: CGCCGACGCATAATCTAATCTG	
	R: GAGGTTGGAAGGCAGCATCC	
	シーケンス: GCCGCCGATTAGTGAACAAC	

表2-3 SPS1-KD系統の遺伝子型決定に用いたプライマーの配列

系統名	プライマーの配列(5'-3')
KD-1	L: CGGTCATTCACCTTGGGAGGA
	R: AAGAGGAAATCCAGAAACCCAACC
KD-2	L: AGCCGCAGCCTAAATAAATGC
	R: ACCCTGATCGAGGTCTTCTCA
<i>Tos17^a</i>	CGAGAGCATCATCGGTTACATCTTCT

^a*Tos17*は両系統に共通で用いた。

表2-4 第二章におけるリアルタイム逆転写PCR法に用いたプライマーの配列

遺伝子名	Gene code ^a	プライマー配列 (5'-3')
<i>OsSPS1</i>	Os01g0919400	L: GCCAGTGGCATGTAAATTGGTT R: GAGACTTCATCAAGCTGGCAC
<i>OsSPS2</i>	Os02g0184400	L: ACAGAATCCATACTGTCAGG R: GGATGCAGAGTTTGTGTGTG
<i>OsSPS6</i>	Os06g0643800	L: ATGGCAAATCGGCATCTCCATC R: GACACCAAGCCCCCATCTGTT
<i>OsSPS8</i>	Os08g0301500	L: GTTCCTAACCAAGTCCATGC R: CCAATAAGCTTTGCACCCTG
<i>OsSPS11</i>	Os11g0236100	L: ACCGGAACCTCTACATCGTG R: AACTCCACCGCGTACTTCAC
<i>RUBIQ1</i>	Os06g0681400	L: GGAGCTGCTGCTGTTCTTGG R: CACAATGAAAACGGGACACGA

^aRice Annotation Project Database <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>におけるGene codeを示す。

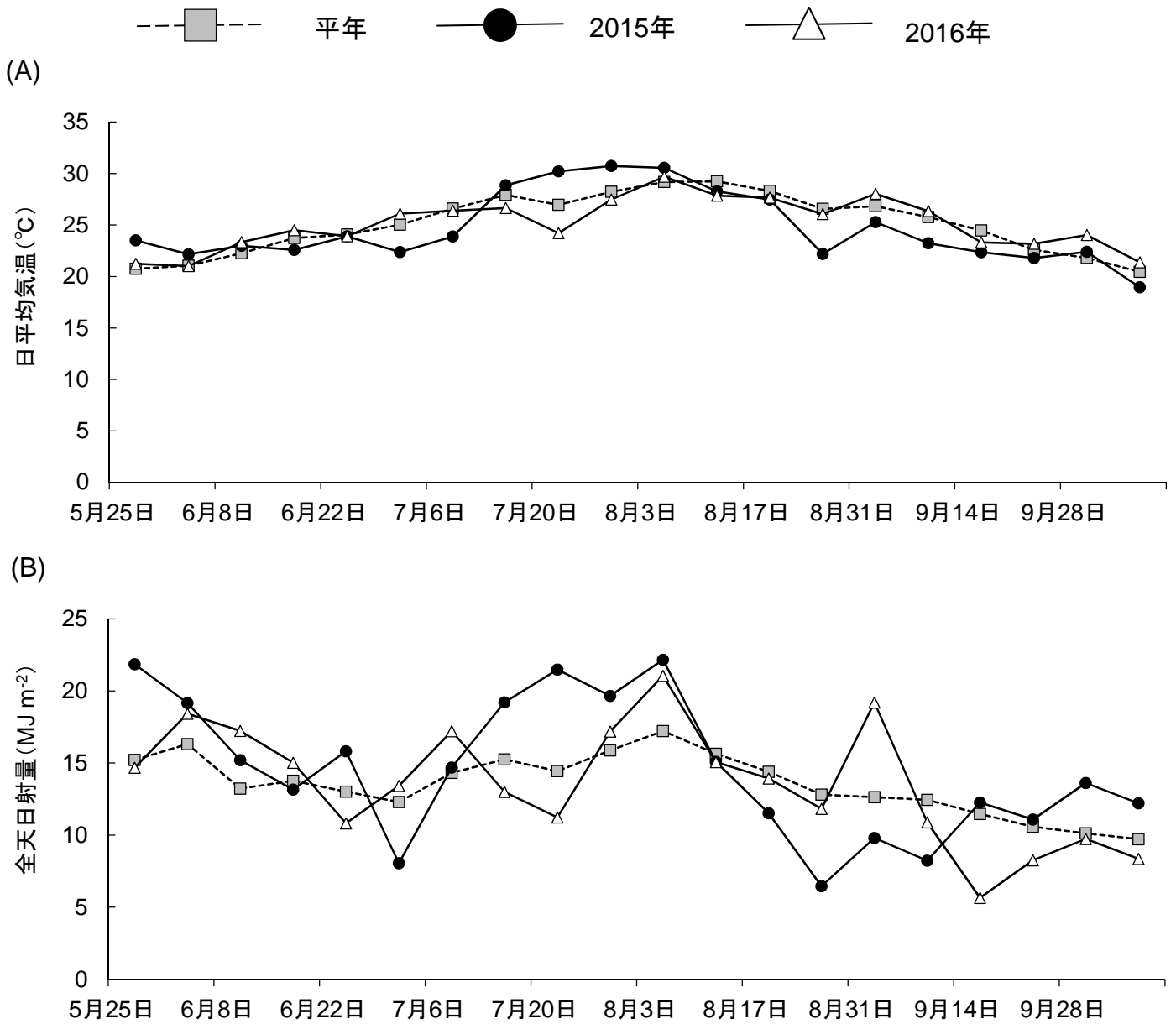


図2-5 東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構(東京都西東京市)における7日間ごとの日平均気温と全天日射量。値は7日間の平均値を示す。(A)日平均気温、(B)全天日射量。平年は2007年から2016年までの10年間の平均値を示す。

表2-5 圃場試験における移植日、出穂日およびサンプリング日

	移植日	サンプリング日	出穂日	サンプリング日			
		栄養成長期 ^a		出穂期 ^b	乳熟期 ^b	登熟中期 ^b	収穫期 ^b
2015年	5/28	7/8(41)	8/19	8/19(0)	8/31(12)	9/12(24)	9/30(42)
2016年	5/25	7/6(42)	8/24	8/26(2)	9/5(12)	9/15(22)	10/4(41)

KD-1とKD-2ですべて同日だった。^aカッコ内の数字は移植日からの日数を示す。^bカッコ内の数字は出穂日からの日数を示す。

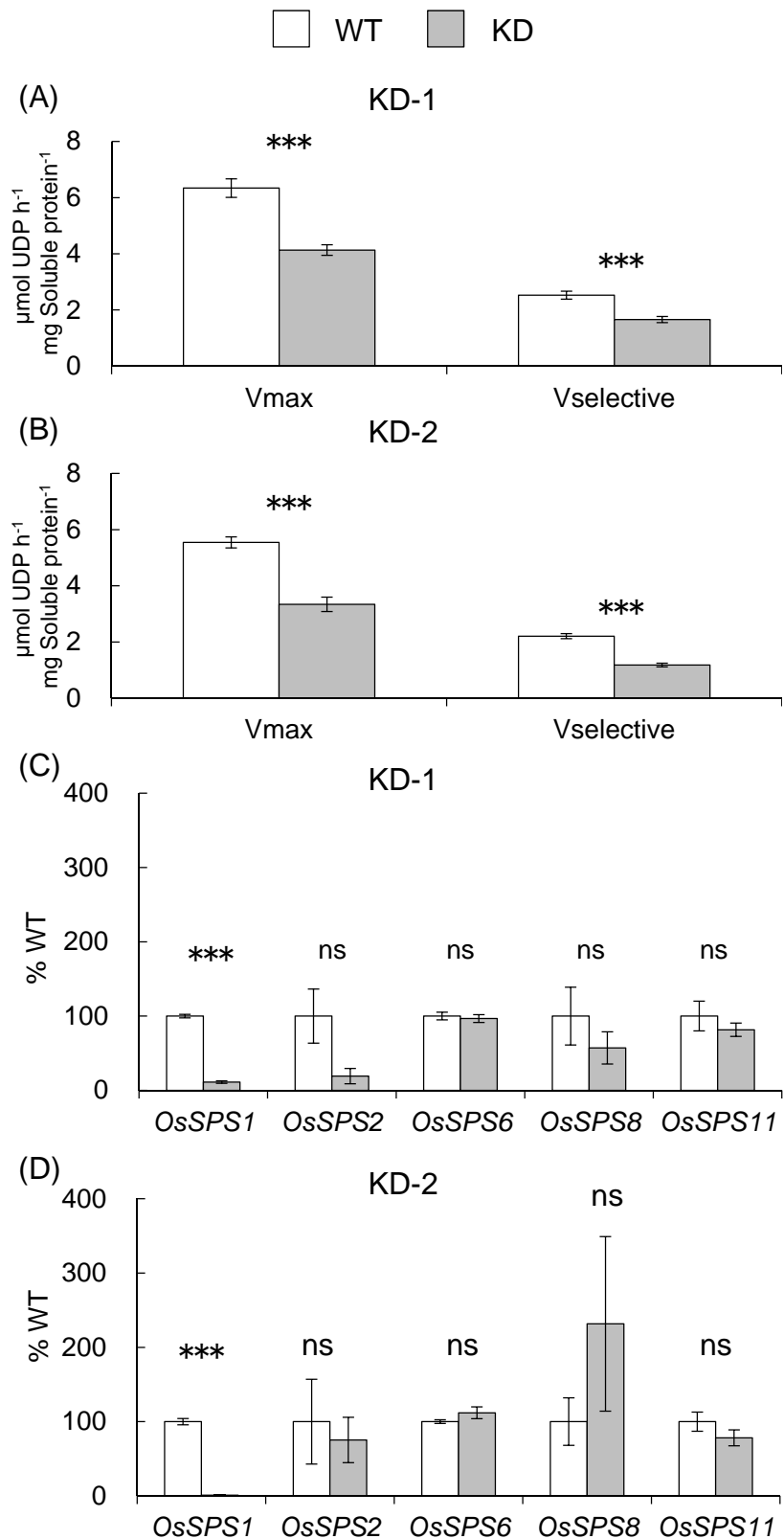


図2-6 SPS1-KD系統におけるSPS活性とSPSアイソジーンの遺伝子発現。(A, C)KD-1と(B, D)KD-2における(A, B)SPSの最大活性(V_{max})と制限活性($V_{\text{selective}}$) ($n=6$)、(C, D)SPSアイソジーンの相対遺伝子発現量 ($n=4$)。最上位完全展開葉身を明期開始後7時間後にサンプリングした。3個体の葉身をまとめてサンプリングし、各測定に用いた。各遺伝子の相対発現量はユビキチン遺伝子(*RUB1Q1*)で標準化した上で、WTに対する相対値として示した。データは平均値±標準誤差を示す。***はt検定において0.1%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

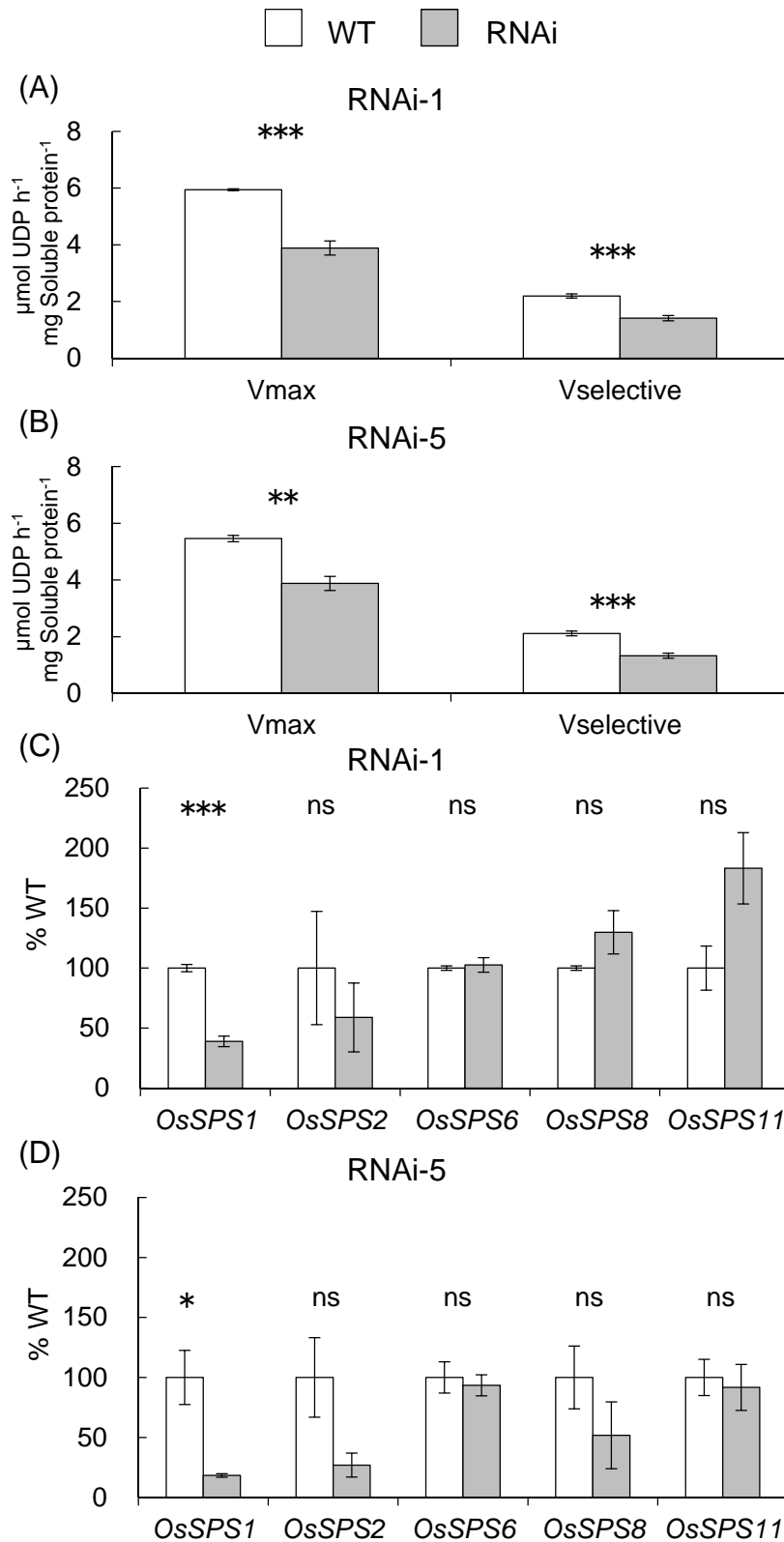


図2-7 RNAi系統におけるSPS活性とSPSアイソジーン遺伝子発現。(A, C)RNAi-1と(B, D)RNAi-5における(A, B)SPSの最大活性と制限活性(n=6)(C, D)SPSアイソジーン遺伝子の相対遺伝子発現量(n=4)。最上位完全展開葉葉身を明期開始後7時間後にサンプリングした。3個体の葉身をまとめてサンプリングし、各測定に用いた。各遺伝子の相対発現量はユビキチン遺伝子(*RUBIQ1*)で標準化したうえで、WTに対する相対値として示した。データは平均値±標準誤差で示す。***、**、*はt検定においてそれぞれ0.1%、1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

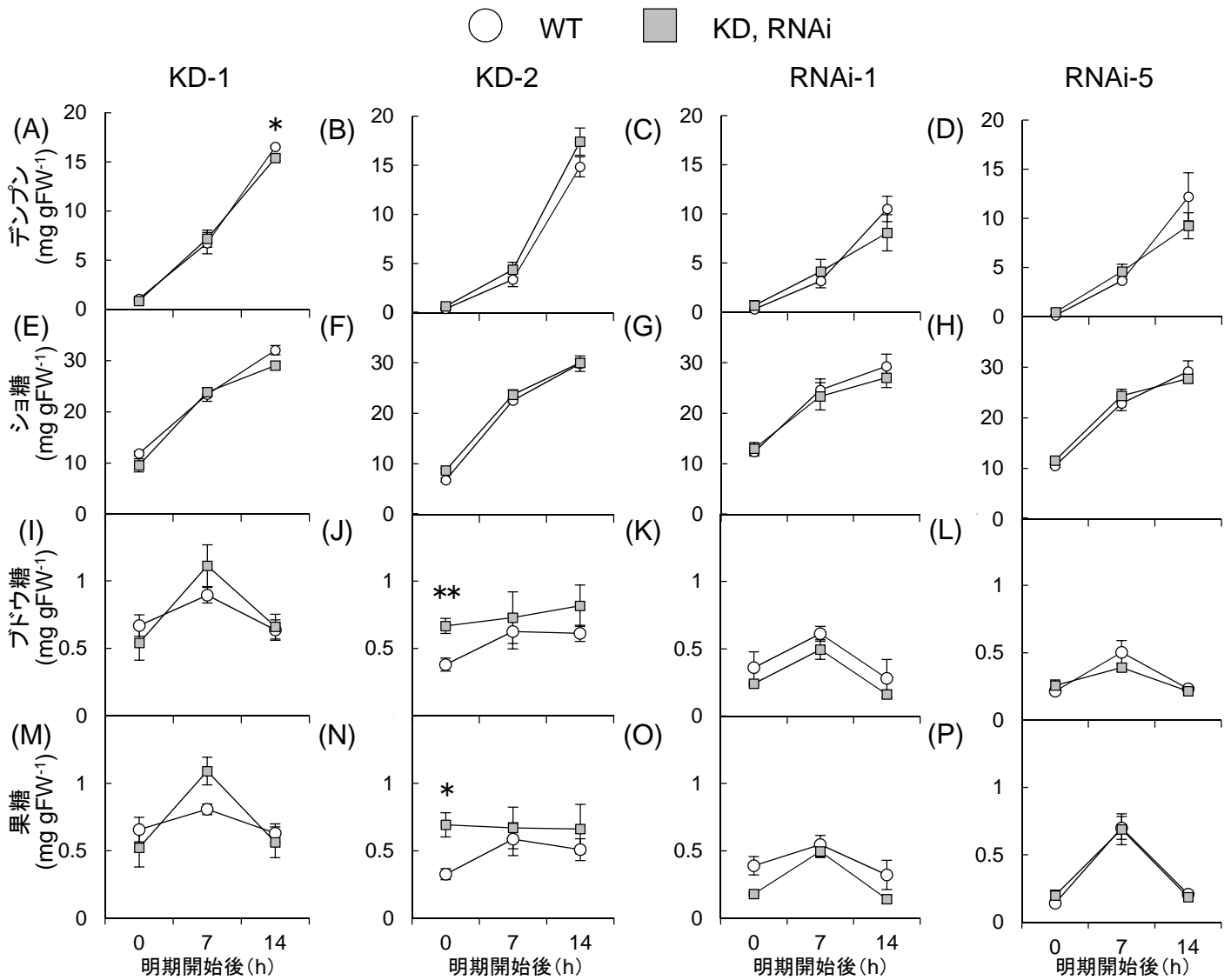


図2-8 SPS1-KD系統とRNAi系統の葉身における糖・デンプン濃度。(A, E, I, M) KD-1 (B, F, J, N) KD-2 (C, G, K, O) RNAi-1 (D, H, L, P) RNAi-5の明期開始後0、7、14時間後の葉身における(A-D)デンプン(E-H)ショ糖(I-L)ブドウ糖(M-P)果糖濃度。データは平均値±標準誤差を示す。*はt検定において5%水準で有意差があることを示す。

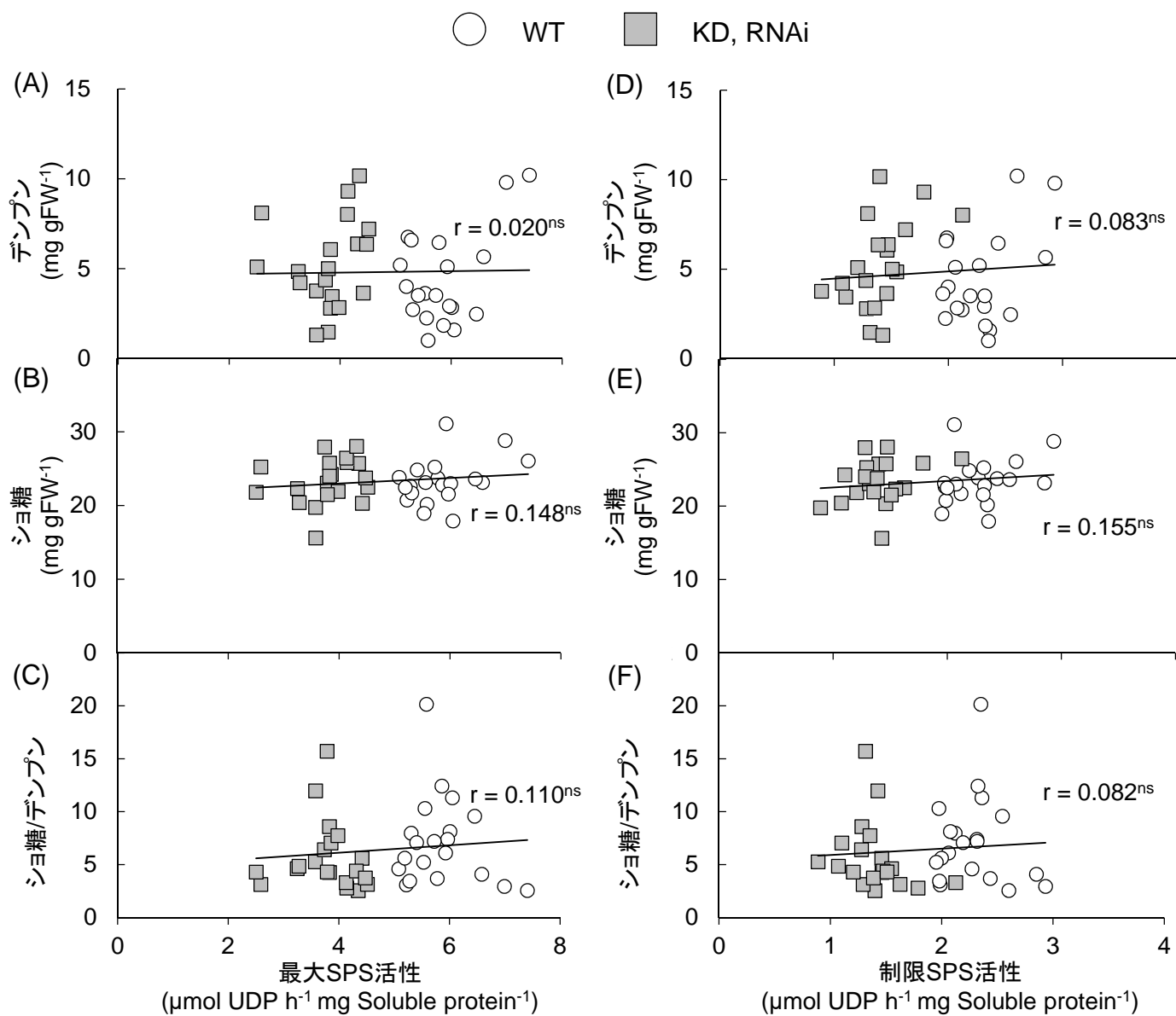


図2-9 SPS1-KD系統とRNAi系統の葉身におけるSPS活性とショ糖、デンプン濃度との相関。(A-C)最大SPS活性、(D-F)制限SPS活性と(A, D)デンプン濃度(B, E)ショ糖濃度(C, F)ショ糖/デンプン比の相関関係を示す。SPS活性とショ糖・デンプン濃度は同じサンプルを用いて測定した。 r はピアソンの積率相関係数を示す。nsは無相関検定において5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-6 SPS1-KD系統およびRNAi系統の草丈および地上部全乾物重

系統名	遺伝子型	草丈(cm)	地上部全乾物重(mg)
KD-1	WT	49.9 ± 0.6	464.5 ± 13.8
	KD	49.1 ± 0.8	450.9 ± 20.5
		ns	ns
KD-2	WT	48.2 ± 0.7	486.3 ± 15.5
	KD	48.2 ± 0.3	477.1 ± 27.0
		ns	ns
RNAi-1	WT	49.4 ± 0.8	505.9 ± 24.9
	RNAi	48.5 ± 0.8	530.4 ± 21.3
		ns	ns
RNAi-5	WT	46.9 ± 0.6	416.1 ± 16.1
	RNAi	47.0 ± 0.5	429.3 ± 18.6
		ns	ns

データは平均値±標準誤差で示す。nsはt検定において5%水準で有意差がなかったことを示す。

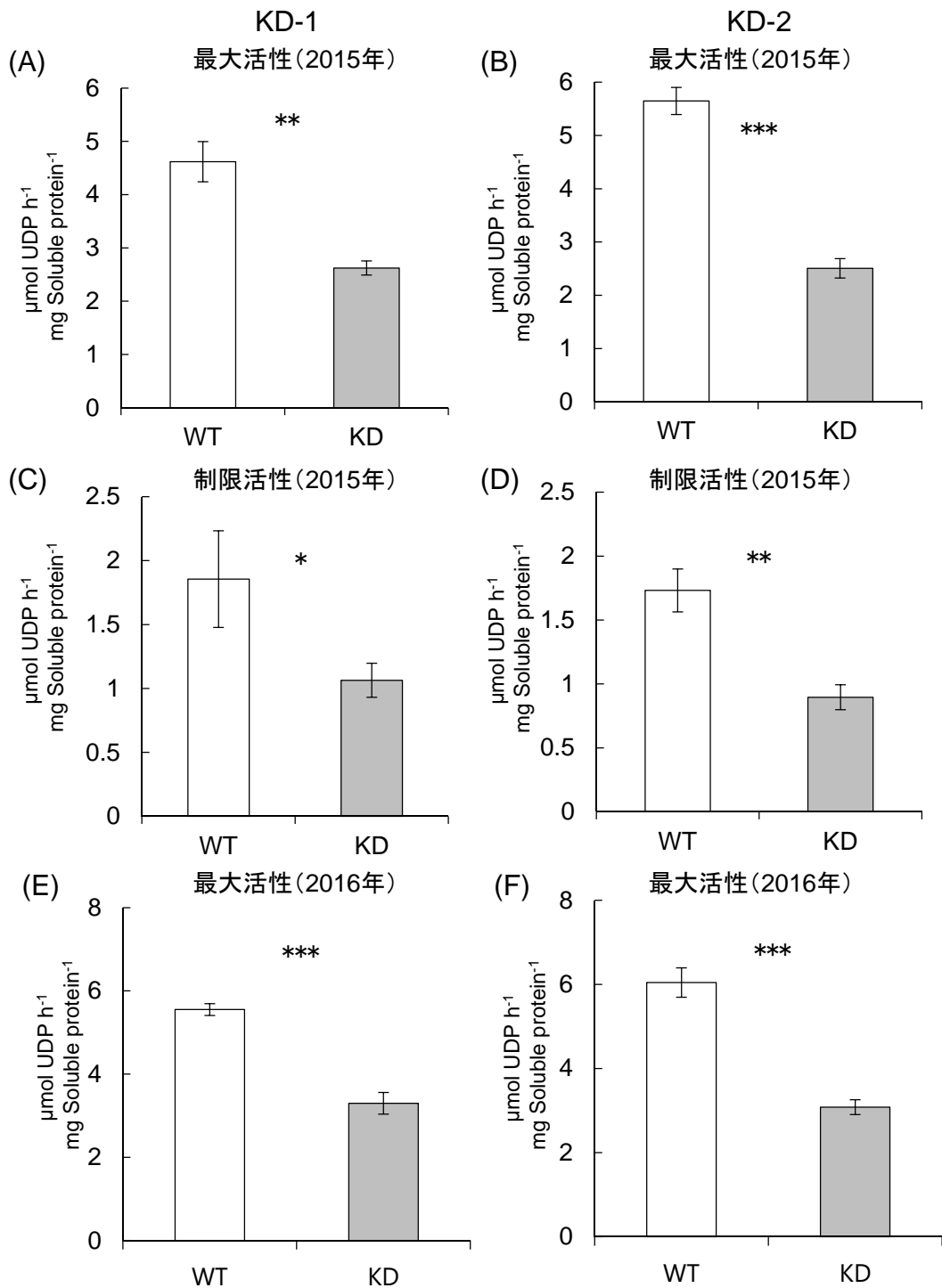


図2-10 圃場試験におけるSPS1-KDの栄養成長期の葉身SPS活性(2015, 2016年)。(A, C, E)KD-1 (B, D, F)KD-2の (A, B)最大活性(2015年)、(C, D)制限活性(2015年)、(E,F)最大活性(2016年)。データは平均値±標準誤差を示す。***、**、*はそれぞれ検定において0.1%、1%、5%水準で有意差があったことを示す。

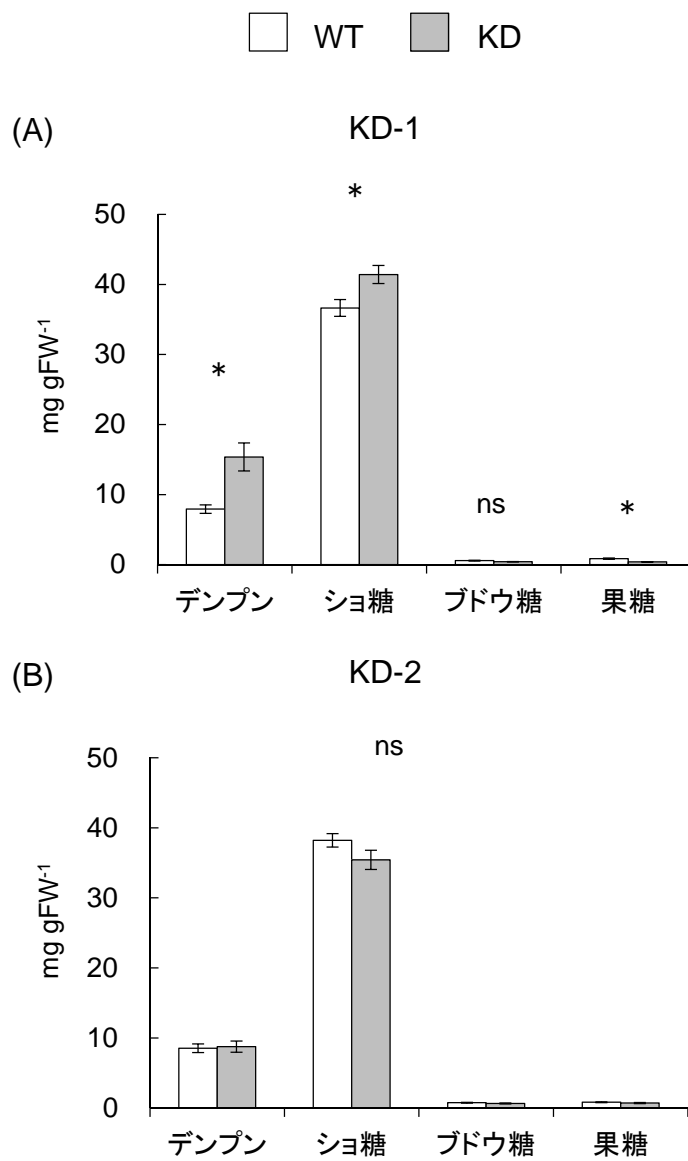


図2-11 圃場試験におけるSPS1-KDの栄養成長期の葉身糖・デンプン濃度(2015年)。(A)KD-1、(B)KD-2の10時における糖・デンプン濃度を示す。データは平均値±標準誤差を示す(n=5, 6)。*はt検定において5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

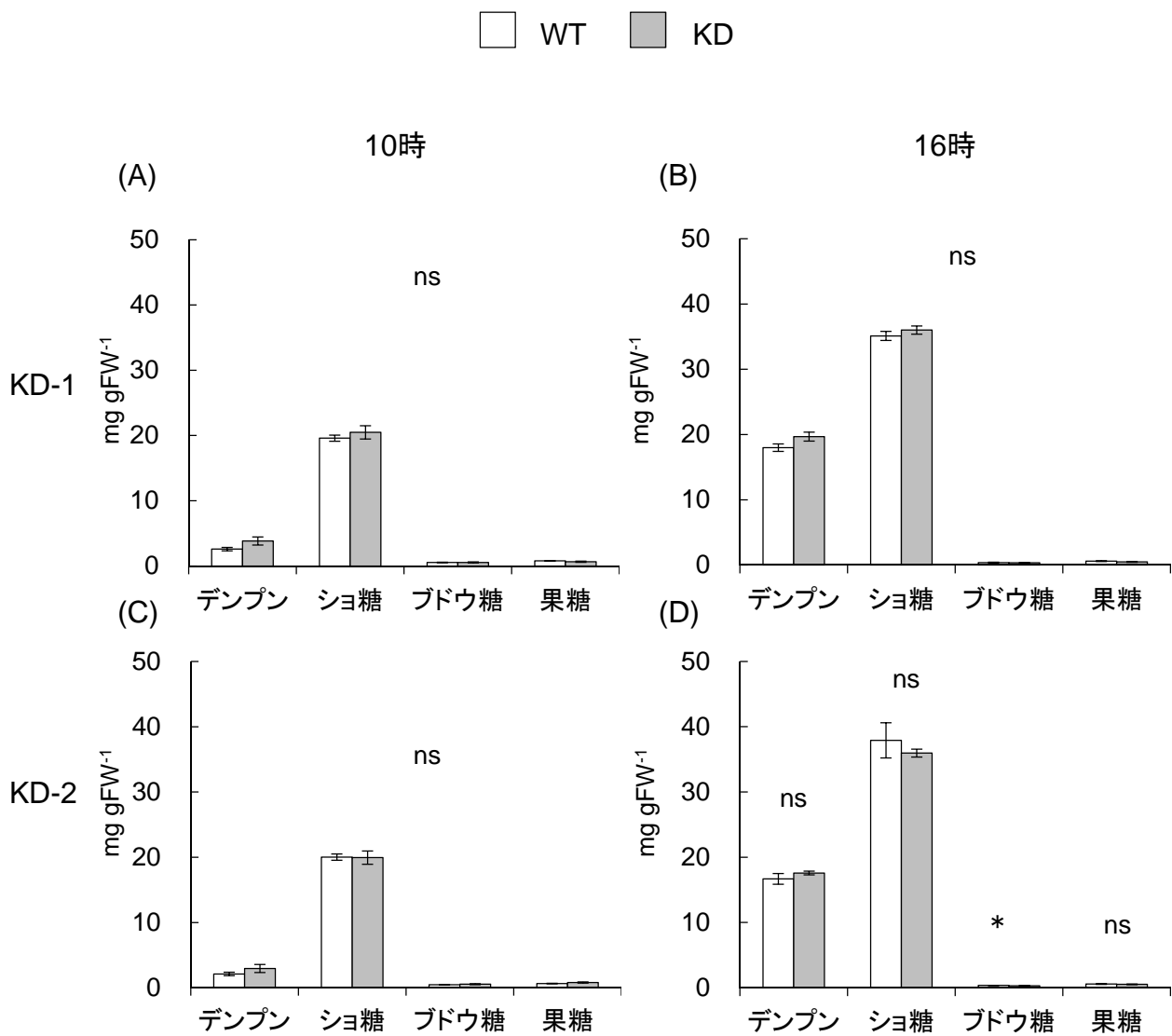


図2-12 圃場試験におけるSPS1-KD系統の栄養成長期の葉身糖・デンプン濃度(2016年)。(A, B)KD-1、(C, D)KD-2の(A, C)10時、(B, D)16時における糖・デンプン濃度。データは平均値±標準誤差を示す(n=6)。*はt検定において5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

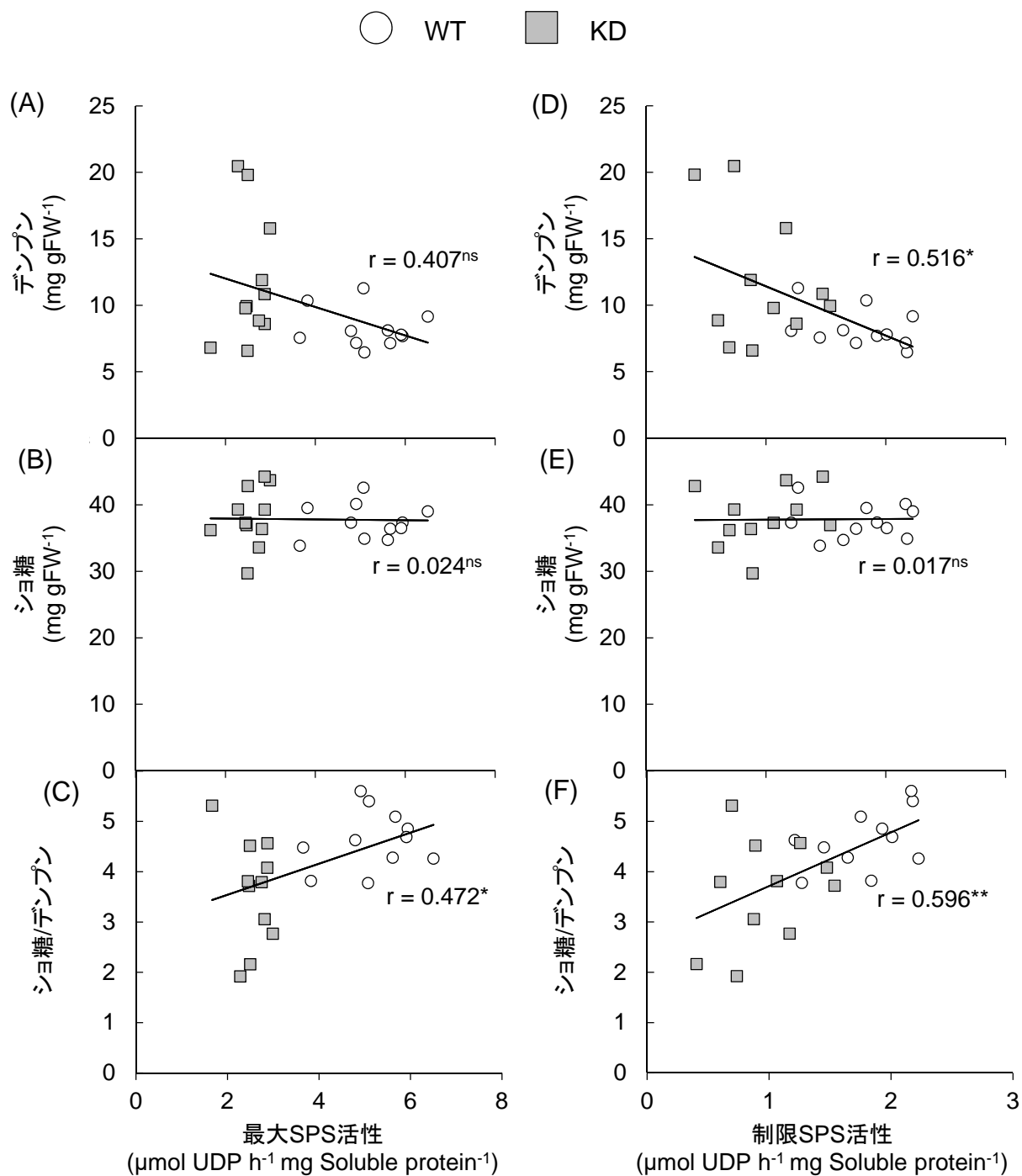


図2-13 圃場試験におけるSPS1-KD系統の葉身SPS活性とショ糖、デンプン含量との相関(2015年)。(A-C)最大SPS活性、(D-F)制限SPS活性と(A, D)デンプン濃度(B, E)ショ糖濃度(C, F)ショ糖/デンプン比を示す。SPS活性とショ糖・デンプン濃度は同じサンプルを用いて測定した。rはピアソンの積率相関係数を示す。**, *は無相関検定においてそれぞれ1%、5%水準で有意差があったことを、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

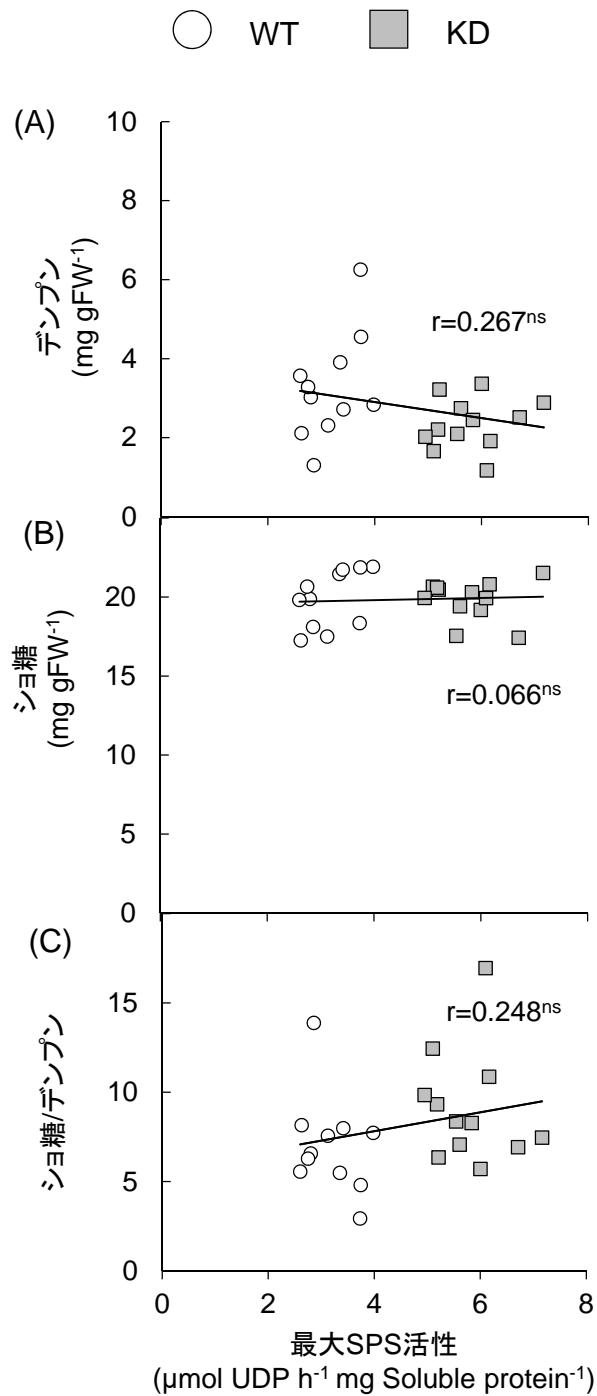


図2-14 圃場試験におけるSPS1-KD系統の葉身SPS活性とショ糖、デンプン含量との相関(2016年)。最大SPS活性と(A)デンプン濃度(B)ショ糖濃度(C)ショ糖/デンプン比を示す。最大SPS活性とショ糖・デンプン濃度は同じサンプルを用いて測定した。rはピアソンの積率相関係数を示す。*は無相関検定において5%水準で有意差があったことを、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

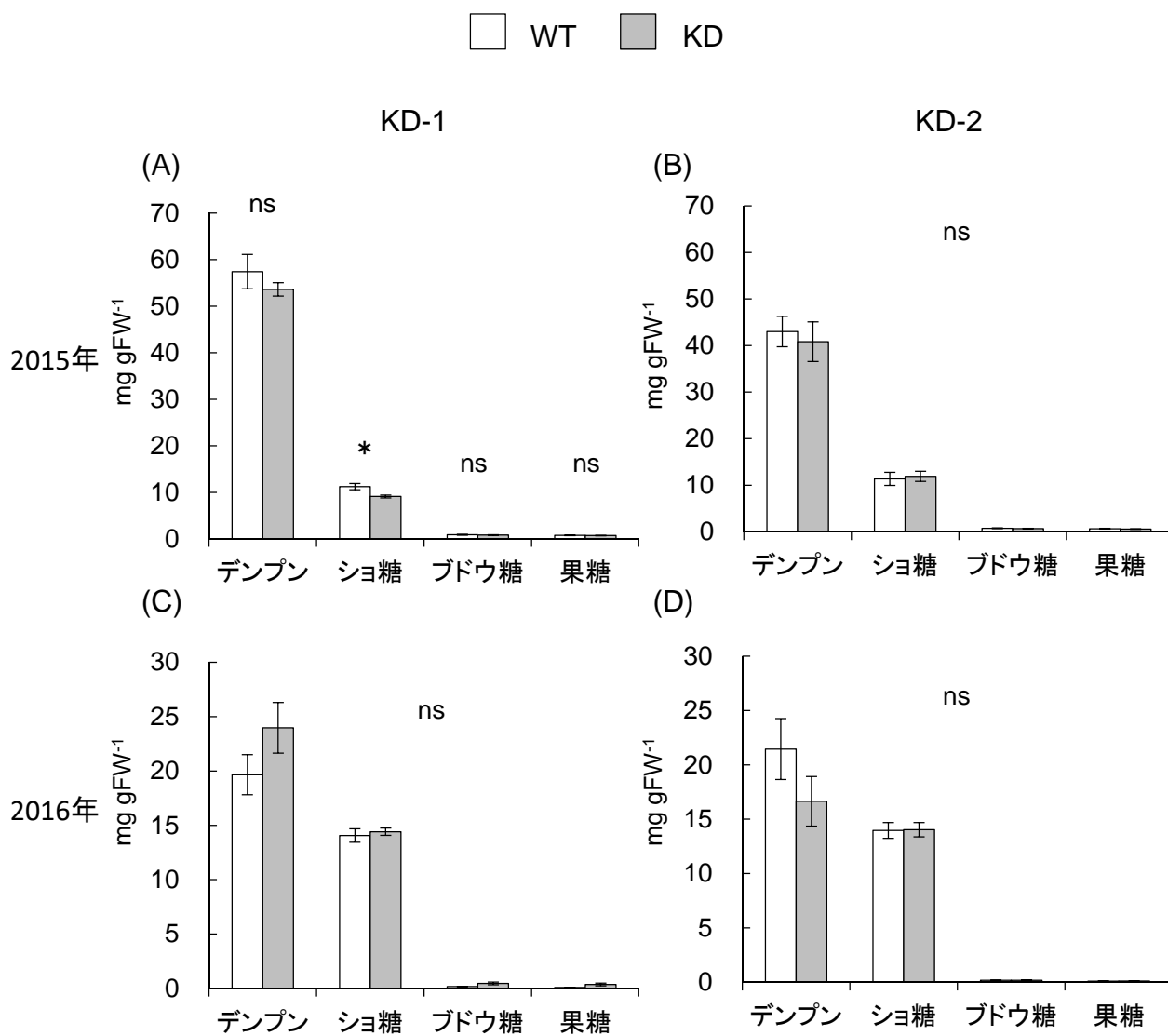


図2-15 圃場試験におけるSPS1-KDの栄養成長期の葉鞘の糖・デンプン濃度(2015, 2016年)。(A, B) 2015年、(C, D) 2016年の(A, C) KD-1、(B, D) KD-2の糖・デンプン濃度。データは平均値±標準誤差を示す(n=6)。*はt検定において5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

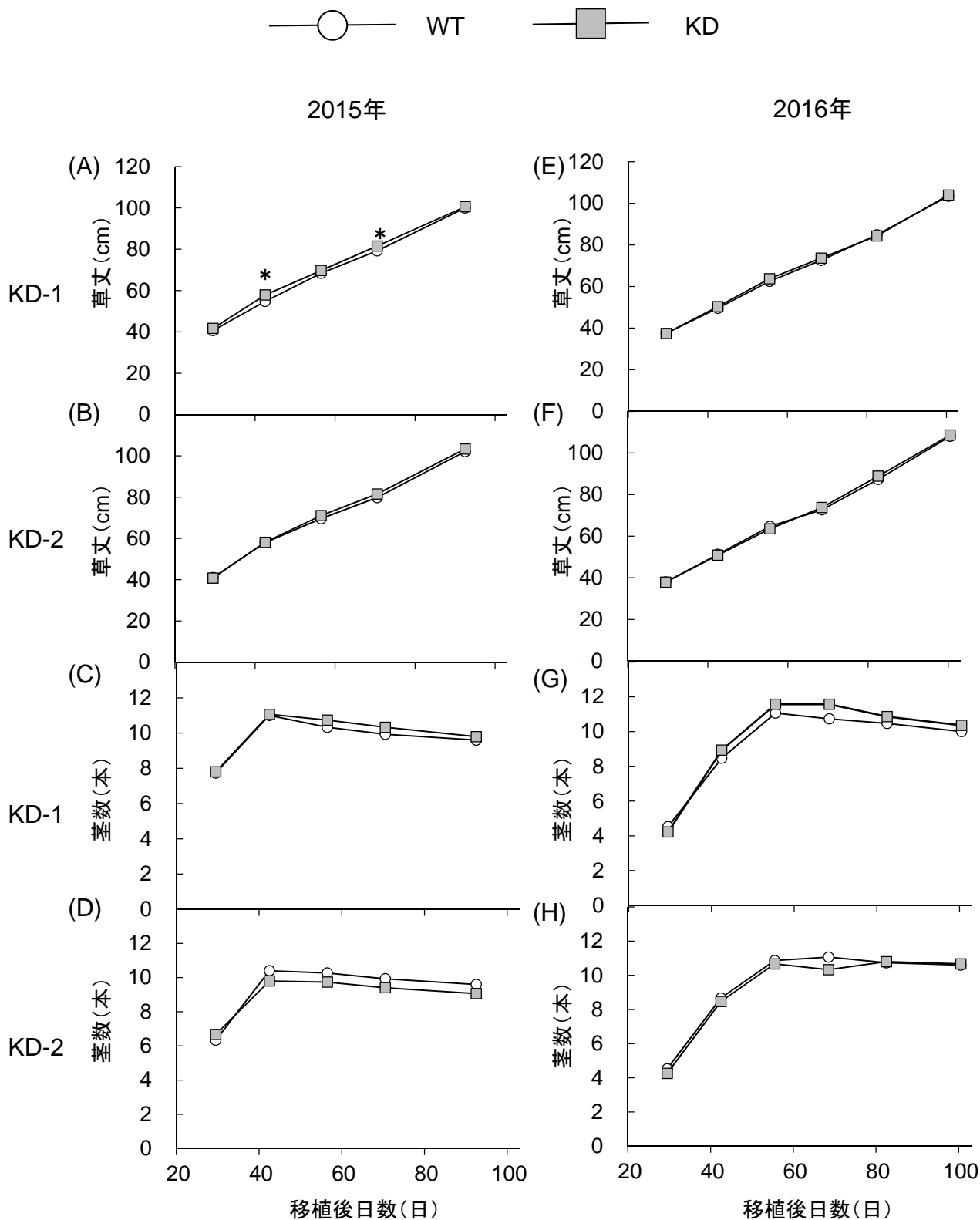


図2-16 SPS1-KD系統の圃場試験における草丈・茎数(2015、2016年)。(A-D)2015年、(E-H)2016年の(A, C, E, G)KD-1(B, D, F, H)KD-2における(A, B, E, F)草丈(n=14-15)と(C, D, G, H)茎数(n=14-15)。*はt検定において5%水準で有意差があったことを示す。

表2-7 圃場試験におけるKD-1の地上部乾物重(栄養成長期)

年次	系統	葉身(g)	葉鞘(g)	地上部全体(g)
2015	WT	2.47 ± 0.15	1.60 ± 0.12	4.07 ± 0.26
	KD	2.46 ± 0.15	1.72 ± 0.16	4.17 ± 0.30
2016	WT	1.37 ± 0.14	1.02 ± 0.12	2.40 ± 0.25
	KD	1.53 ± 0.12	1.14 ± 0.13	2.67 ± 0.24
分散分析	年次	***	***	***
	系統	ns	ns	ns
	年次 × 系統	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=8-9)。**は分散分析において1%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-8 圃場試験におけるKD-2の地上部乾物重(栄養成長期)

年次	系統	葉身(g)	葉鞘(g)	地上部全体(g)
2015	WT	2.36 ± 0.18	1.38 ± 0.14	3.75 ± 0.31
	KD	2.34 ± 0.07	1.25 ± 0.09	3.59 ± 0.15
2016	WT	1.49 ± 0.12	0.92 ± 0.08	2.41 ± 0.18
	KD	1.65 ± 0.10	1.08 ± 0.06	2.73 ± 0.17
分散分析	年次	***	**	***
	系統	ns	ns	ns
	年次 × 系統	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差で示す(n=8-9)。**は分散分析において1%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差が見られなかったことを示す。

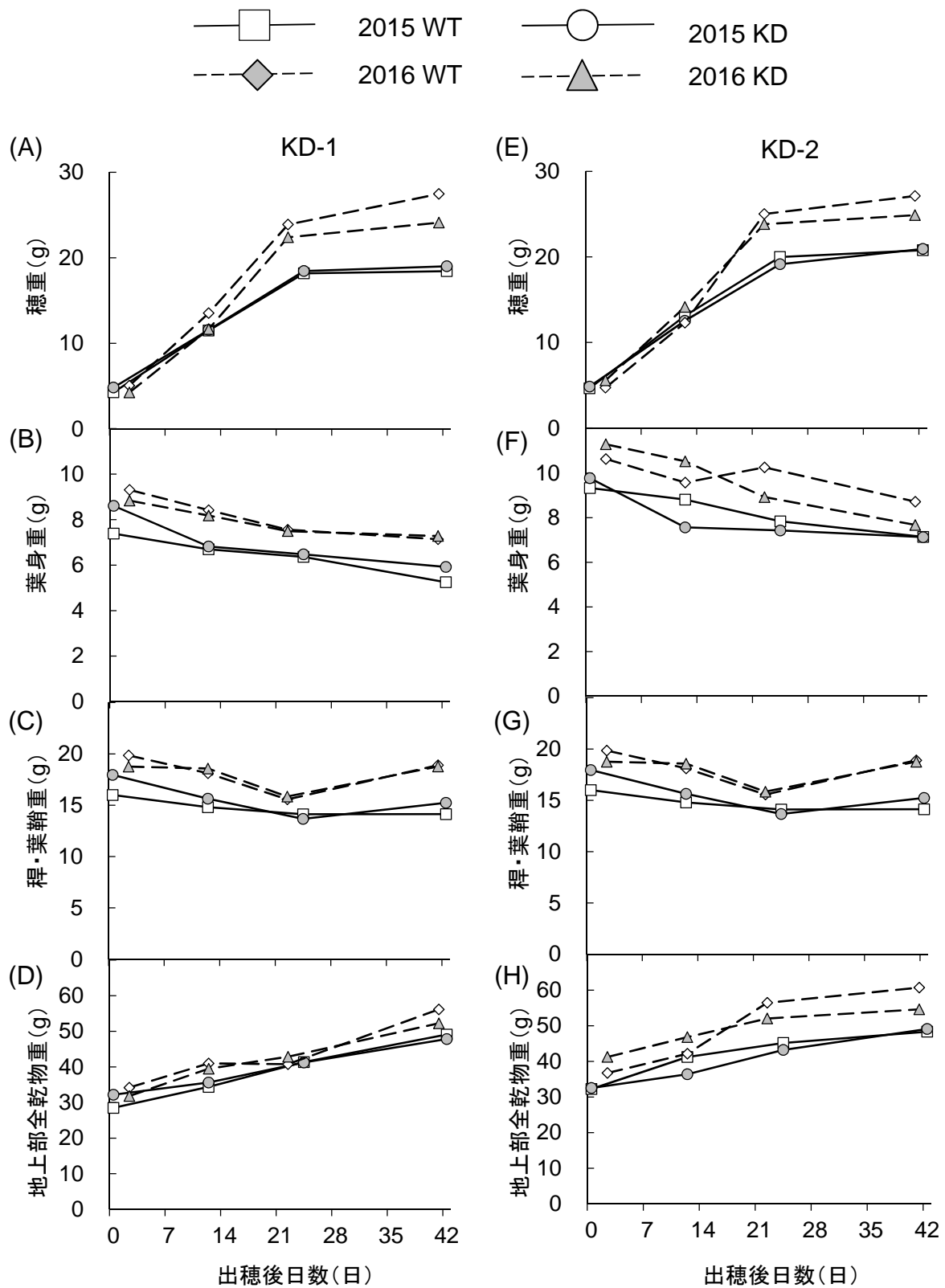


図2-17 圃場試験におけるSPS1-KD系統の出穂期から収穫期までの乾物重の推移(2015年、2016年)。(A-D)KD-1 (E-H)KD-2の(A, E)穂重(B, F)葉身重(C, G)稈、葉鞘重(D, H)地上部全乾物重。

表2-9 圃場試験におけるKD-1の穂重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	4.3 ± 0.3	11.5 ± 0.9	18.2 ± 0.7	18.4 ± 0.7
	KD	4.8 ± 0.1	11.6 ± 0.7	18.4 ± 0.6	19.0 ± 0.8
2016	WT	5.1 ± 0.3	13.5 ± 0.8	23.9 ± 2.4	27.5 ± 2.4
	KD	4.3 ± 0.3	11.7 ± 1.0	22.4 ± 2.1	24.1 ± 1.9
2ヶ年 平均値	WT	4.7	12.5	21.0	23.0
	KD	4.5	11.6	20.4	21.6
分散分析	年次	ns	ns	**	***
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	**	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。***、**は分散分析においてそれぞれ0.1%、1%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-10 圃場試験におけるKD-2の穂重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	4.6 ± 0.2	13.1 ± 0.6	20.0 ± 1.0	20.8 ± 1.1
	KD	4.8 ± 0.4	12.5 ± 1.0	19.1 ± 0.8	20.9 ± 1.5
2016	WT	4.7 ± 0.3	12.3 ± 0.9	25.0 ± 0.9	27.1 ± 2.8
	KD	5.6 ± 0.3	14.2 ± 0.6	23.8 ± 1.3	24.9 ± 2.2
2ヶ年 平均値	WT	4.7	12.7	22.5	24.0
	KD	5.2	13.3	21.5	22.9
分散分析	年次	ns	ns	***	*
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	ns	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-11 圃場試験におけるKD-1の葉身重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	7.4 ± 0.4	6.7 ± 0.3	6.4 ± 0.2	5.2 ± 0.3
	KD	8.6 ± 0.3	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.1	5.9 ± 0.2
2016	WT	9.3 ± 0.5	8.4 ± 0.4	7.6 ± 0.6	7.1 ± 0.7
	KD	8.8 ± 0.5	8.2 ± 0.7	7.5 ± 0.5	7.3 ± 0.7
2ヶ年 平均値	WT	8.3	7.6	7.0	6.2
	KD	8.7	7.5	7.0	6.6
分散分析	年次	*	**	**	**
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次 × 系統	ns	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。**、*は分散分析においてそれぞれ1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-12 圃場試験におけるKD-2の葉身重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	9.3 ± 0.2	8.8 ± 0.5	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.3
	KD	9.8 ± 0.6	7.6 ± 0.3	7.4 ± 0.3	7.1 ± 0.4
2016	WT	10.6 ± 0.5	9.6 ± 0.5	10.3 ± 0.5	8.7 ± 0.7
	KD	11.3 ± 0.7	10.5 ± 0.4	8.9 ± 0.5	7.7 ± 0.5
2ヶ年 平均値	WT	10.0	9.2	9.1	7.9
	KD	10.5	9.1	8.2	7.4
分散分析	年次	*	**	***	*
	系統	ns	ns	*	ns
	年次 × 系統	ns	*	ns	ns

データは平均値±標準誤差で示す(n=9)。***、**、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、1%、5%水準で有意差があったこと、nsは有意差がなかったことを示す。

表2-13 圃場試験におけるKD-1の稈・葉鞘重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	16.0 ± 1.0	14.8 ± 0.5	14.1 ± 0.5	14.1 ± 0.7
	KD	18.0 ± 0.5	15.6 ± 0.7	13.7 ± 0.3	15.2 ± 0.7
2016	WT	19.9 ± 1.0	18.1 ± 0.7	15.6 ± 0.9	18.9 ± 1.5
	KD	18.8 ± 1.0	18.6 ± 1.4	15.9 ± 1.3	18.8 ± 1.8
2ヶ年 平均値	WT	17.9	16.5	14.8	16.5
	KD	18.4	17.1	14.8	17.0
分散分析	年次	*	**	*	**
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	ns	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。**、*は分散分析においてそれぞれ1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-14 圃場試験におけるKD-2の稈・葉鞘重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	17.7 ± 0.6	18.5 ± 1.2	15.2 ± 0.7	17.5 ± 0.7
	KD	17.2 ± 0.9	15.3 ± 0.9	14.8 ± 0.6	18.3 ± 0.6
2016	WT	20.6 ± 1.2	19.5 ± 1.1	19.5 ± 1.0	21.2 ± 1.6
	KD	23.7 ± 1.2	19.1 ± 2.5	17.9 ± 1.0	19.1 ± 1.1
2ヶ年 平均値	WT	19.2	19.0	17.4	19.4
	KD	20.5	18.3	16.3	18.7
分散分析	年次	***	**	ns	*
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	ns	*	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。***、**、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-15 圃場試験におけるKD-1の地上部乾物重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	28.5 ± 1.6	34.4 ± 1.7	41.3 ± 1.3	49.1 ± 3.8
	KD	32.2 ± 0.9	35.6 ± 1.7	41.2 ± 1.2	47.8 ± 3.8
2016	WT	34.2 ± 1.7	41.0 ± 1.7	40.8 ± 1.5	56.2 ± 4.7
	KD	31.9 ± 1.8	39.5 ± 2.6	42.9 ± 1.7	52.3 ± 4.1
2ヶ年 平均値	WT	31.4	37.7	45.2	48.5
	KD	32.0	37.6	44.5	47.6
分散分析	年次	ns	*	*	**
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	ns	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。**、*は分散分析においてそれぞれ1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-16 圃場試験におけるKD-2の地上部乾物重の推移

年次	系統	出穂期(g)	乳熟期(g)	登熟中期(g)	収穫期(g)
2015	WT	32.2 ± 0.9	41.3 ± 2.2	45.2 ± 1.7	48.3 ± 2.1
	KD	32.5 ± 1.9	36.4 ± 2.0	43.2 ± 1.7	49.1 ± 2.1
2016	WT	36.8 ± 2.0	42.2 ± 2.6	56.5 ± 2.3	60.8 ± 5.1
	KD	41.3 ± 2.2	46.8 ± 1.9	52.1 ± 2.7	54.6 ± 3.9
2ヶ年 平均値	WT	34.5	41.7	50.8	54.5
	KD	36.9	41.6	47.6	51.9
分散分析	年次	ns	*	***	*
	系統	ns	ns	ns	ns
	年次×系統	ns	*	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-17 圃場試験におけるKD-1の収量および収量構成要素(2015, 2016年)

年次	系統	穂数 (plant ⁻¹)	一穂粒数	登熟歩合 (%)	粒千粒重 (g)	粒収量 (g m ⁻²)
2015	WT	8.2 ± 0.2	93.1 ± 2.2	79.2 ± 1.8	26.3 ± 0.2	351.0 ± 14.2
	KD	8.4 ± 0.1	100.2 ± 2.6	81.6 ± 0.9	25.9 ± 0.2	394.9 ± 7.6
2016	WT	9.4 ± 0.2	115.5 ± 3.1	82.9 ± 1.6	27.1 ± 0.2	545.5 ± 24.9
	KD	9.0 ± 0.4	109.8 ± 2.4	80.5 ± 2.3	28.0 ± 0.3	492.4 ± 18.6
2ヶ年 平均値	WT	8.7	102.7	80.8	26.6	434.3
	KD	8.7	104.4	81.1	26.8	436.7
分散分析	年次	***	***	ns	***	***
	系統	ns	ns	ns	ns	ns
	年次 × 系統	ns	*	ns	**	**

データは平均値±標準誤差を示す(2015年;n=9、2016年;n=12)。***、**、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-18 圃場試験におけるKD-2の収量および収量構成要素(2015, 2016年)

年次	系統	穂数 (plant ⁻¹)	一穂粒数	登熟歩合 (%)	粒千粒重 (g)	粒収量 (g m ⁻²)
2015	WT	8.9 ± 0.2	106.0 ± 2.4	84.4 ± 1.3	25.5 ± 0.1	449.7 ± 11.1
	KD	8.9 ± 0.2	104.3 ± 3.8	84.6 ± 1.0	25.8 ± 0.1	449.1 ± 16.4
2016	WT	10.9 ± 0.5	111.9 ± 2.7	75.8 ± 1.9	26.6 ± 0.3	546.1 ± 35.0
	KD	11.1 ± 0.4	113.9 ± 3.8	77.9 ± 2.4	26.8 ± 0.1	584.5 ± 24.5
2ヶ年 平均値	WT	9.7	108.7	80.7	26.0	488.2
	KD	9.9	107.5	81.9	26.2	506.4
分散分析	年次	***	*	***	***	***
	系統	ns	ns	ns	ns	ns
	年次 × 系統	ns	ns	ns	ns	ns

データは平均値±標準誤差を示す(n=9)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

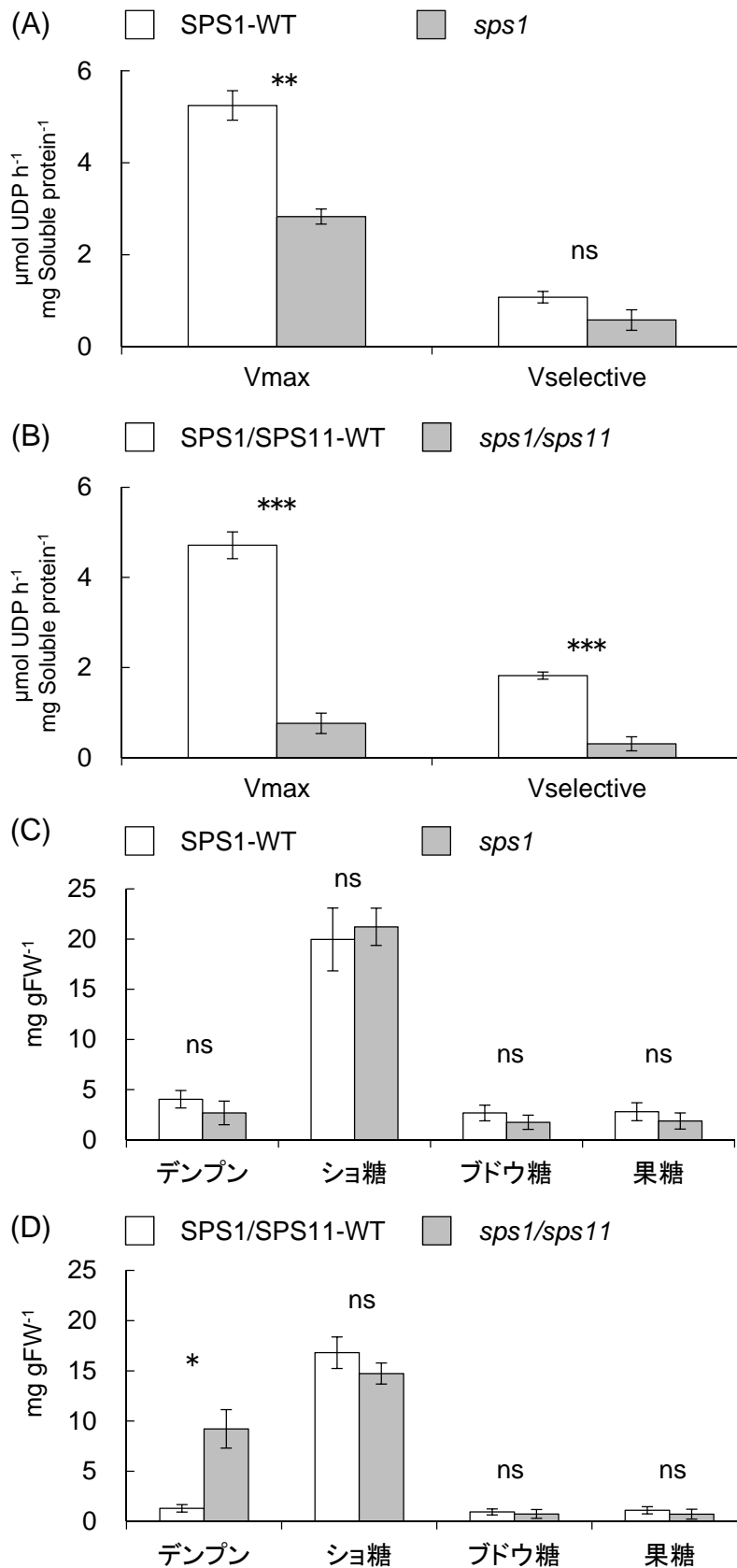


図2-18 *sps1*と*sps1/sps11*変異体の葉身におけるSPS活性と糖・デンプン濃度。(A, C) *sps1*、(B, D) *sps1/sps11*の葉身における(A, B) SPS最大活性と制限活性(C, D)糖・デンプン濃度。最上位完全展開葉身を明期開始後7時間後にサンプリングした。データは平均値±標準誤差を示す(n=4-6)。***、**、*はそれぞれt検定において0.1%、1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

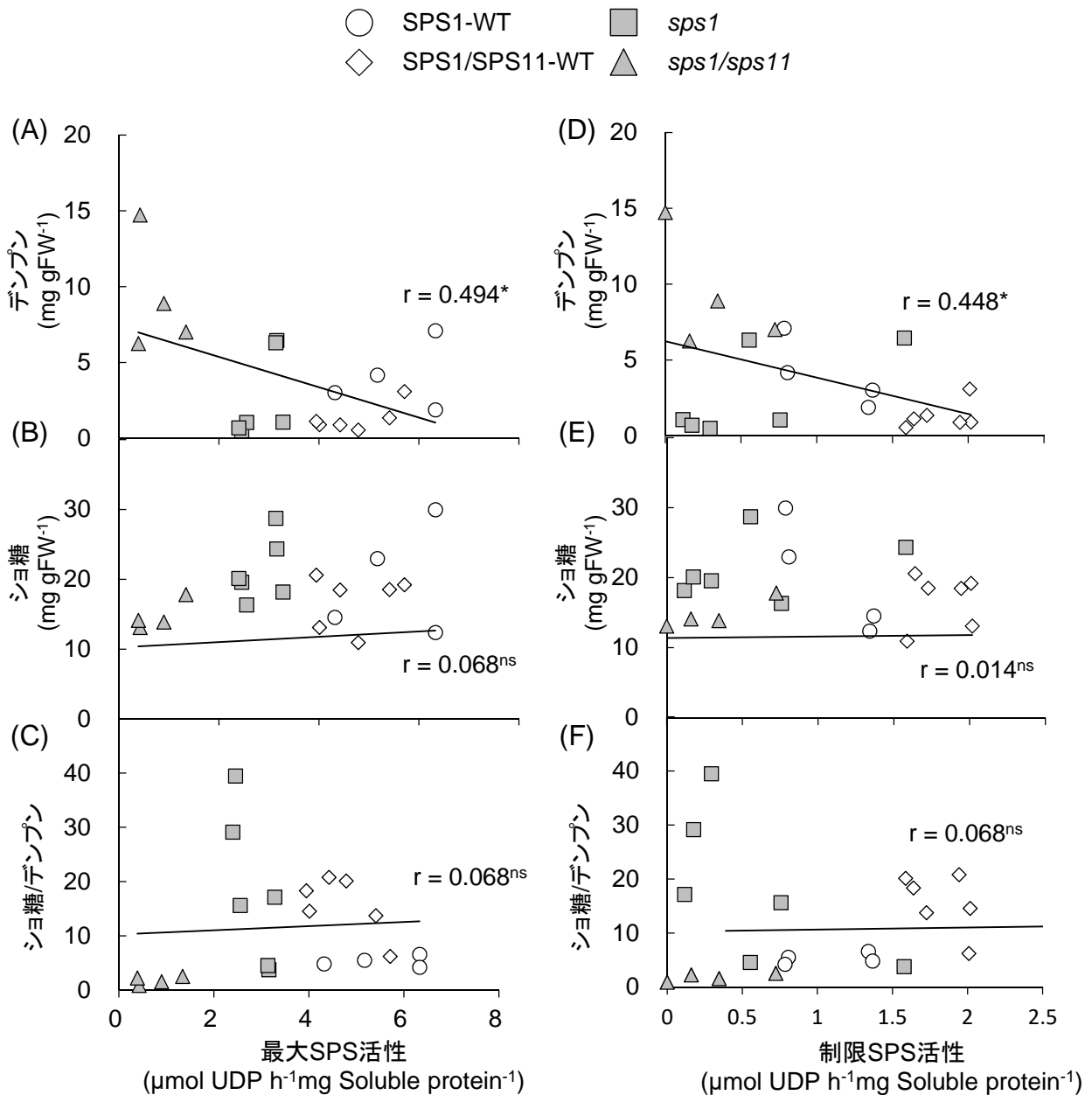


図2-19 *sps1*と*sps1/sps11*の葉身におけるSPS活性とショ糖、デンプン含量との相関。(A-C)最大SPS活性、(D-F)制限SPS活性と(A, D)デンプン濃度(B, E)ショ糖濃度(C, F)ショ糖/デンプン比を示す。最大SPS活性とショ糖・デンプン濃度は同じサンプルを用いて測定した。rはピアソンの積率相関係数を示す。*は無相関検定5%において5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-19 *sps1*および*sps1/sps11*の成長解析

系統	草丈(cm)		茎数(本)	
	移植後日数			
	0日	32日	0日	32日
SPS1-WT	45.1 ± 1.0	79.8 ± 2.1	4.3 ± 0.3	20.3 ± 1.3
<i>sps1</i>	42.0 ± 1.7	78.0 ± 1.6	3.8 ± 0.3	16.8 ± 1.7
	ns	ns	ns	ns
SPS1/SPS11-WT	49.0 ± 1.4	87.9 ± 2.8	4.2 ± 0.3	16.5 ± 1.2
<i>sps1/sps11</i>	47.8 ± 1.7	85.3 ± 3.8	4.0 ± 0.4	14.0 ± 0.9
	ns	ns	ns	ns

nsはt検定において5%水準で有意差がなかったことを示す。

表2-20 本章の解析で用いたSPS遺伝子に関する変異体とそのSPS活性の低下程度

系統名	作出方法	変異	最大活性(%WT)
KD-1	<i>Tos17</i> 突然変異体	<i>OsSPS1</i> ノックダウン	54-65
KD-2	<i>Tos17</i> 突然変異体	<i>OsSPS1</i> ノックダウン	44-60
RNAi-1	RNAi法	<i>OsSPS1</i> ノックダウン	65
RNAi-5	RNAi法	<i>OsSPS1</i> ノックダウン	71
<i>sps1</i>	CRISPR/Cas9 システム	<i>OsSPS1</i> ノックアウト	54
<i>sps1/sps11</i>	CRISPR/Cas9 システム	<i>OsSPS1</i> , <i>OsSPS11</i> ダブルノックアウト	16

第三章 SPS の環境応答に関する解析

3-1 緒言

植物は日長、光強度、温度、栄養条件、CO₂濃度といった環境要因に応じて糖・デンプン代謝を変化させている。植物が日長や光強度に応じて糖・デンプン代謝を変化させることはよく知られており、特にシロイヌナズナにおいては日中のデンプン蓄積と夜間のデンプン分解を制御することで生育環境に対して生育を最適化していることが明らかになっている(Stitt and Zeeman, 2012; Pilkington et al., 2015)。また、‘デンプン葉’植物の糖・デンプン代謝関連変異体では生育阻害の程度が日長によって変わる例があることから(Caspar et al., 1985; Lin et al., 1988; Huber and Hanson, 1992; Ragel et al., 2013)、糖・デンプン代謝と日長との関連は強いと考えられる。イネにおける同様の解析は少ないが、短日条件で葉身における日中のデンプン蓄積量および夜間のデンプン分解量(ターンオーバー)が増加することが知られている(Okamura et al., 2017)。また、第二章の解析から水田圃場では SPS 活性が低下したイネはデンプンへの炭素分配を増大させている可能性が示唆され、この要因の一つとして水田圃場における強光が考えられた。以上のことから、ショ糖合成制御に対する SPS の寄与が日長や光条件によって変わる可能性が考えられる。

植物は低温に応答して適合溶質である糖を葉に蓄積するが、この際、ホウレンソウ(*Spinacia oleracea*)では SPS 活性が上昇することが知られている(Guy et al., 1992)。また、植物の中には一定期間弱い低温ストレスを受けた後、より強い低温ストレスに対して耐性を獲得する低温順化(cold acclimation)という機構を持つものが存在するが、低温順化した植物では最大 SPS 活性、あるいは活性化率を増加させることによりショ糖合成能を増加させていることが知られている(Savitch et al., 1997; Strand et al., 1999)。近年、イネの幼植物においてもムギ類やシロイヌナズナと同様に一定期間低温を受けることで低温耐性を獲得する低温順化が存在することが明らかになってきた(Nakamura et al., 2011; Ahamed et al., 2012; 提箸・佐藤, 2014, 2015)。提箸・佐藤(2014, 2015)

は播種後 10 日の幼植物において 12°C 5 日の処理により植物体全体のショ糖濃度が処理前の 10 倍近く上昇するとともに、その処理を行ったイネが処理を行っていないイネよりも圃場レベルで旺盛な生育を示したことを報告している。一方で、イネにおける低温順化のメカニズムや低温による糖代謝の変化、またそれらにおける SPS の寄与については明らかとなっていない。

C₃ 植物において CO₂ 濃度の上昇は光合成速度の上昇をもたらすが、この際通常よりも葉にデンプンを多く蓄積することが知られている (Nakano et al., 1997)。このことは、高 CO₂ による糖・デンプン代謝の変化を示しており、実際イネでは高 CO₂ に応じて葉身 SPS 活性を上昇させることが明らかとなっている (Seneweera et al., 1995; Hussain et al., 1999; Ono et al., 2003)。また、高 CO₂ に応じて *OsSPS1* の遺伝子発現が上昇することが明らかになっており、高 CO₂ に対する SPS 活性の上昇は遺伝子発現レベルで調節されている可能性が示唆されている (Aoki et al., 2003)。また、SPS の過剰発現により最大 SPS 活性が約 12.5 倍に上昇したイネでは、高 CO₂ 条件下において葉身のデンプン蓄積が抑制されるとともに葉身からの炭素の転流効率が上昇した (Ono et al., 2003)。以上の結果から、高 CO₂ 条件下での糖・デンプン代謝に SPS が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

以上のように、イネは生育時の環境条件に応じて糖・デンプン代謝を変化させており、その変化に SPS が重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、本章では SPS 活性が 35–56% 低下している一方、通常的环境条件では生育に差が見られない SPS1-KD 系統を日長、光強度、栄養条件を変えて栽培し、生育に差の出る条件が存在するかどうか検討した。また、低温、高 CO₂ 条件下における SPS 活性、糖・デンプン濃度、遺伝子発現の解析から、これらの環境に対する SPS の応答を検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 日長、光強度を変えた栽培

材料として第二章で用いた KD-2 を用いた。短日、連続光条件での栽培は人工気象室(光強度 $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (PPFD))で行った。短日条件は明期 8 時間、 27°C 、暗期 16 時間、 22°C とした。連続光条件は明期 24 時間、 27°C とした。強光・高温条件での栽培は人工気象室(光強度 $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (PPFD))で行った。明期 14 時間、 32°C 、暗期 10 時間、 23°C とした。いずれもシードリングケースに各 8 粒播種した。短日条件、強光条件は播種 28 日後に、連続光条件は播種後 20 日後に草丈、茎数を計測するとともに地上部全体をサンプリングし、 80°C の乾燥器で 1 週間以上乾燥させた後地上部乾物重を測定した。短日条件、強光条件は播種 28 日後の明期の開始時と終了時に、連続光条件では播種後 20 日に 1 回最上位完全展開葉葉身をサンプリングし、糖・デンプン濃度の測定に用いた。

3-2-2 低温処理試験

材料として第二章で用いた KD-2 を用いた。シードリングケースに各 8 粒播種した。人工気象室(明期 14 時間、 27°C 、暗期 10 時間、 22°C 、光強度 $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (PPFD))にて栽培した播種後 14 日の 4 葉期のイネを明期開始 7 時間後に 12°C に設定した人工気象室(光強度 $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (PPFD))に移した。明期、暗期の時間設定はもとの人工気象室と同じとした。24 時間後に第 4 葉葉身を 3 個体まとめてサンプリングし、遺伝子発現量、SPS 活性の測定に用いた。同様のサンプリングを 120 時間後にも行った。また、第 4 葉葉身を 1 個体からサンプリングし、糖・デンプン濃度の測定に用いた。同様のサンプリングを 113、120、127 時間後にも行った。低温処理およびサンプリングのタイムスケジュールを図 3-1 にまとめて示した。比較対象として同様の条件で栽培した播種後 17 日(4.5 葉期)のイネを用いた。明期開始 7 時間後に第 4 葉葉身を 3 個体まとめてサンプリングし、遺伝子発現量、SPS 活性、糖デンプン濃度の測定に用いた。

3-2-3 Free-Air-CO₂-Enrichment (FACE) 試験

FACE 試験は茨城県つくばみらい市のつくばみらい FACE 試験施設で 2015 年に行った。同施設の 2015 年における 7 日間ごとの日平均気温と全天日射量を図 3-2 に示した。材料として第二章で用いた KD-1 および KD-2 を用いた。区画は大気中の CO₂ 条件である Ambient 区と大気中の CO₂ 濃度より 200 ppm 高い CO₂ 濃度に調整された FACE 区を各 4 区画設定した (Hasegawa et al., 2013)。基肥としてリンを 4.36 g/m²、カリウムを 8 g/m²、窒素を 8 g/m² (尿素; 2 g/m²、緩効性肥料 2 種類 (type LP100 (ジェイカムアグリ、東京); 4 g/m², type LP140 (ジェイカムアグリ), 2 g/m²)) 施肥した。4 月 28 日にセルトレイに 1 セル 3 粒播種し育成した苗を 5 月 29 日に水田に移植した。1 株 3 本植えとし、栽植密度は畝間 30 cm、株間 15 cm とした。各系統とも 1 区画 3 列 × 6 個体とした。移植後 2 週間後から約 2 週間に 1 回、草丈は出穂期まで計 6 回、茎数は幼穂形成期まで計 4 回計測した。栄養成長期のサンプルとして、7 月 8 日の午前中に最上位完全展開葉葉身をサンプリングし液体窒素で凍結した後、SPS 活性、遺伝子発現、糖・デンプン濃度の測定に用いた。ただし、Ambient 区については WT と KD とも 1 区画のみ 7 月 10 日にサンプリングを行った。収穫期に地上部全体をサンプリングし、穂と茎葉部に分けて 80°C の乾燥器で 1 週間以上乾燥させた後乾物重を測定した。

3-2-4 SPS 活性、遺伝子発現、糖・デンプン濃度、クロロフィル濃度の測定

SPS 活性、遺伝子発現、糖・デンプン濃度の測定は第二章と同様の方法で行った。ただし、リアルタイム逆転写 PCR における *OsSPS2* と *OsSPS8* のプライマーは、第二章で用いたものに代えて以下のものを用いた: *OsSPS2-L*, 5'-TGGTCAAGTGGCTTATCCCAAG-3'; *OsSPS2-R*, 5'-GCAAACCATTCATAGCAGCCTCT-3'; *OsSPS8-L*, 5'-CCCCAAGCACCATAAGCAATC-3'; *OsSPS8-R*, 5'-TAAGCAGCAGCCTCAATCAAG-3'。

クロロフィル濃度の測定は SPS 活性測定用のサンプルを一部用いて Porra et al. (1989) をもとに行った。SPS 活性測定用サンプル約 100 mg に、100 mg に対し 800 μl の割合で抽出バッファーを

加えてよくボルテックスした後、50 μ l を取り 950 μ l の 84.2%アセトンに加え、暗所で 1 時間以上攪拌した。その後 17600 \times g、4°C で 5 分間遠心し、上清を吸光度測定に用いた。646.6 nm、663.6 nm、750.0 nm の吸光度(それぞれ Abs 646.6、Abs 663.6、Abs 750.0)を、分光光度計 (DU-800、ベックマン、東京)を用いて測定した。得られた吸光度から以下の 3-1 式をもとに上清中のクロロフィル濃度を算出した後、葉身中のクロロフィル濃度に変換した。

$$\text{式 3-1 } \text{Chl(a+b)}(\mu\text{g/ml}) = 17.76 \times (\text{Abs } 646.6 - \text{Abs } 750.0) + 7.34 \times (\text{Abs } 663.6 - \text{Abs } 750.0)$$

3-2-5 統計処理

統計処理は、t 検定および分散分析を Excel 2010 (Microsoft) およびエクセル統計 2012 (株式会社社会情報サービス)を用いて行った。

3-3 結果

3-3-1 日長、光条件を変えた栽培

通常の生育条件では生育および葉身の糖デンプン濃度に大きな差がみられない SPS1-KD 系統と RNAi 系統のうち、最も活性の低下程度の大きい KD-2 を日長、光強度の異なる条件で栽培し、糖・デンプン濃度と生育を比較した。日長 8 時間の短日条件において、日中のショ糖およびデンプンの蓄積は第二章の播種後 20 日のイネと比較して増加傾向にあったが、WT と KD の間に有意差は見られなかった(図 2-8, 3-3)。草丈と地上部乾物重についても WT と KD の間に有意な差は見られなかった(表 3-1)。1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (PPFD) の強光条件、明期 24 時間の連続光における葉身の糖・デンプン濃度および草丈、地上部乾物重についても、WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 3-3、表 3-1)。

3-3-2 低温処理試験

イネの低温応答における糖代謝の変化とその変化における SPS の役割を明らかにするため、通常の生育条件(14L/10D、27/22°C)で 14 日間生育させた 4 葉期の KD-2 を提箸・佐藤(2014、2015)と同様に 12°C で 5 日間低温処理し、低温処理による変化を WT と KD で比較した。低温処理の間、日長と光条件は通常条件のまま維持した。低温処理 24 時間後で葉身のクロロフィル濃度は有意に低下し、120 時間後にはさらに低下した。また、WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 3-4A)。可溶性タンパク質濃度については低温処理 24 時間後では変化が見られなかったが、120 時間後には有意に低下した。WT と KD の間に有意な差は見られなかった(図 3-4B)。低温処理 24 時間後ではタンパク質ベースの最大 SPS 活性は WT、KD とも有意に低下した(図 3-5A)。新鮮重ベースでも同様の傾向が見られた(図 3-5B)。低温処理 120 時間後のタンパク質ベースの最大 SPS 活性は WT では処理前と比較して有意な差は見られなかった一方、KD では有意な低下が見られた(図 3-5A)。新鮮重ベースで見ると WT、KD とも有意に低下していた(図 3-5B)。制限活性に

ついて、タンパク質ベース、新鮮重ベースとも WT と KD で低温処理 24 時間後に制限活性が有意に低下した。低温処理 120 時間後においても処理前と比較して WT では有意に低下したが、KD では低下したもののその差は有意ではなかった(図 3-5 C, D)。処理前と比較して低温処理 24 時間後に活性化率が低下する傾向が見られたが、処理前と低温処理 120 時間後は同程度であった。WT と KD の活性化率に有意な差はなかった(図 3-5E)。

WT を用いて低温処理による SPS 遺伝子の発現変化を調べた(図 3-6A)。顕著な変化を示したのは *OsSPS1* で、低温処理 24 時間後に処理前と比較して 6.9 倍に増加した。120 時間後は処理前と比較して 2.8 倍だった。次に大きな変化を示したのは *OsSPS11* であり、24 時間後には処理前と比較して 2.5 倍増加した。一方、120 時間後には処理前と比較して 22% と 24 時間後から大きく低下した。他の 3 つの SPS 遺伝子については、発現変化は最大 2 倍程度と大きな変化は見られなかった。処理前、24 時間後、120 時間後とも、*OsSPS1* の発現が WT と比較して KD で大きく低下している一方、他の 4 つの SPS 遺伝子については処理前の *OsSPS6* を除いて WT と KD に間で違いは見られなかった(図 3-6 B-D)。

一方で、低温処理によって葉身の糖・デンプン濃度が増加した。24 時間の低温処理によって主に増加したのはデンプンとショ糖であり、ブドウ糖、果糖濃度の増加は限定的だった。低温処理 24 時間後の糖・デンプン濃度に WT と KD で有意な差は見られなかった(図 3-7 A-D)。24 時間後から 120 時間後にかけて、デンプンは更に 2 倍近く増加したがショ糖の増加はわずかだった。また、ブドウ糖、果糖の濃度が顕著に増加した(図 3-7 A-D)。120 時間後のショ糖濃度は WT と比較して KD で有意に低かったが、デンプン、ブドウ糖、果糖濃度に WT と KD で有意な差は見られなかった(図 3-7 A-D)。低温処理 5 日目の明期開始時、7 時間後、明期終了時にあたる 113 時間後、120 時間後、127 時間後の糖・デンプン濃度を測定することで、低温処理 5 日目の糖・デンプン濃度の日中変化を調べた。通常の生育条件ではイネの葉身におけるデンプン、ショ糖濃度は明期の開始から終了にかけて上昇するが(図 2-8)、低温処理 5 日目のイネではデンプン、ショ糖濃度はほとんど日変化を示さなかった(図 3-7 E, F)。一方、通常の生育条件では大きな日変化を示さないブドウ

糖、果糖については、低温処理5日目のイネでは明期の開始から終了にかけて上昇する傾向を示した(図 3-7 G, H)。低温処理5日目における糖・デンプン濃度の日変化に WT と KD で違いは見られなかった(図 3-7 E-H)。

3-3-3 FACE 試験

SPS 活性の低下が高 CO₂ 濃度条件におけるイネの糖代謝および生育におよぼす影響を明らかにするため、KD-1 および KD-2 を圃場条件下で外気より 200 ppm 高い CO₂ 濃度に制御できるつくばみらい FACE 実験施設(Hasegawa et al., 2013)で栽培した。葉身における SPS 活性についてみると、KD-1、KD-2 とも両 CO₂ 条件下で WT と比較して KD の最大 SPS 活性が有意に低かった。WT、KD とも Ambient 区と FACE 区の間に有意な差は見られなかった(図 3-8 A, B)。制限活性については、KD-1 では最大活性と同様の傾向を示し、その結果活性化率に有意な差は見られなかった(図 3-8 C, E)。一方、KD-2 では Ambient 区における WT の制限活性が KD よりも低かった(図 3-8D)。また、Ambient 区の WT における活性化率が他の処理区、系統よりも有意に低かった(図 3-8F)。葉身の SPS 遺伝子の発現を比較したところ、KD-1、KD-2 ともいずれの CO₂ 条件下でも *OsSPS1* については WT と比較して KD で低いという第二章と同様の結果であった(図 2-6, 3-9)。一方、高 CO₂ による *OsSPS1* の遺伝子発現の変化は見られなかった。他の4つの SPS 遺伝子については処理間、系統間で有意な差は見られなかった(図 3-9)。葉身における糖・デンプン濃度を比較したところ、FACE 処理によりデンプン濃度が上昇する傾向が見られた(図 3-10 A, E)。一方で、KD-2 のブドウ糖を除き系統間、CO₂ 処理間で有意な差は見られなかった(図 3-10)。

草丈および茎数の推移を比較した(図 3-11)。草丈については、KD-1 では移植後 28 日から 88 日まで WT と比較して KD で有意に高かった。CO₂ による効果は移植後 70 日で見られ、FACE 区で有意に高かった。移植後 70 日では CO₂ 処理と遺伝子型に有意な交互作用が見られた(表 3-2)。KD-2 では移植後 14 日では WT が有意に高かった一方、移植後 56 日、70 日後では KD が有意に高かった。CO₂ による効果は移植後 56 日、88 日で見られ、どちらも Ambient が高かった(表 3-4)。

茎数については、KD-1、KD-2ともWTとKDの間に有意差は見られず、CO₂濃度による効果も見られなかった(表 3-3, 3-5)。乾物重について比較したところ、KD-1、KD-2ともFACE区において穂重が有意に高かった。茎葉重についてはKD-2においてWTと比較してKDで有意に低く、またAmbient区と比較してFACE区で有意に低かった。地上部乾物重については有意な系統間差、CO₂処理間差は見られなかった(表 3-6, 3-7)。

3-4 考察

3-4-1 日長、光条件による糖・デンプン代謝の変化とSPSの関連

本章の解析から、短日条件、強光条件、連続光条件においても、KD-2のWTとKDの間に生育および糖・デンプン代謝の違いは見られなかった。短日条件におけるデンプンのターンオーバーはWTで約24 mg/gFWだったが、これは第二章の幼植物を用いた解析におけるターンオーバー(WTで約15 mg/gFW)より約1.5倍多いものの、夜間における単位時間あたりのデンプン分解量で考えると約1.1倍とその差は小さくなる(図2-8, 3-3 A, B)。そのため、夜間のデンプン分解産物の転流に求められるショ糖合成速度は長日条件と短日条件でほぼ同程度であると考えられ、このことが短日条件においても糖・デンプン濃度に差が見られなかった原因となっている可能性がある。

強光条件、連続光条件における葉身の糖・デンプン濃度についても、WTとKDの間に差は見られなかった(図3-2 C-E)。このことから、本研究における強光条件、連続光条件においても*OsSPS1*のノックダウンによるSPS活性の低下は糖・デンプン代謝に影響を及ぼさないことが示唆された。また、糖・デンプン濃度は通常条件や圃場条件よりも低い傾向にあることから(図2-8, 2-11, 2-12, 3-2 C-E)、水田圃場における葉身の糖・デンプン濃度は光強度だけでなく様々な要因による影響を受けていることが推察された。また、本章では播種後20日、あるいは28日の植物を用いたが、水田圃場における栄養成長期のサンプルとは生育ステージが異なっており、そのことが影響している可能性がある。いずれにしても、本実験から水田圃場におけるKDの高い葉身デンプン濃度(図2-11, 2-12)を説明することはできなかった。

以上のように、日長、光条件を変えて栽培を行ってもKD-2のWTとKDの糖・デンプン代謝、生育に差は見られなかった。この結果は、第二章で述べたSPSがイネの葉におけるショ糖合成を律速していないという考え方を支持している。今後、同様の解析をよりSPS活性が減少した*sps1/sps1l*を材料として行うことで日長、光強度とイネの糖・デンプン代謝の関係性に関する詳細な知見が得られると考えられる。

3-4-2 低温処理による糖・デンプン代謝の変化と SPS との関連性

低温処理 24 時間後に *OsSPSI* の遺伝子発現が大きく上昇したにも関わらず、最大 SPS 活性は低下していた(図 3-5, 3-6A)。処理前の KD における SPS 活性の低さから考えると、この時期のイネにおいても *OsSPSI* は葉身における主要なアイソジーンといえる(図 3-5, 3-6)。また、他の SPS 遺伝子の発現は *OsSPSI* ほど大きく変動していない(図 3-6)。このことから、*OsSPSI* の発現上昇が SPS 活性に反映されないのは不自然であり、*OsSPSI* の転写は行われている一方その後のタンパク質合成が行われていないといったように、低温により転写後の制御に変化が生じている可能性が示唆された。通常条件においても *OsSPSI* のプロモーター活性、葉身の遺伝子発現と最大 SPS 活性の日変化は一致しておらず、mRNA およびタンパク質の合成および分解による複雑な制御機構の存在が示唆されている(Okamura et al., 2011; Yonekura et al., 2013)。低温処理によりそのような制御機構に変化が生じた結果、遺伝子発現と SPS 活性の矛盾が生じたのかもしれない。

これまでの研究と同様、低温処理により葉身のショ糖・単糖濃度が上昇したが、加えてデンプン濃度の上昇も見られた(図 3-7)。低温処理 24 時間後はデンプン、ショ糖濃度が主に増加しており、単糖の増加は見られなかった一方、低温処理後 120 時間後にかけて単糖濃度が大きく増加した。コムギでは、低温順化しない品種においても低温による SPS の活性化率の上昇が見られたが(Savitch et al., 1997)、イネにおいては低温処理により活性化率は上昇せず、むしろ 24 時間後にかけて低下していた(図 3-5E)。このことから、コムギとは異なりイネは低温に応じてショ糖合成を活性化するという応答を示さないと考えられた。また、120 時間後の葉身ショ糖濃度が KD で有意に低かったもののその差はわずかであることから、イネの低温応答に SPS が積極的に関与している可能性は低い(図 3-7B)。そのため、低温処理による葉身のショ糖・デンプン濃度の上昇は転流の低下による蓄積と考えるのが妥当である。一方で、低温処理 24 時間後から 120 時間後にかけての単糖濃度の上昇は、低温に対する積極的な応答の可能性がある。この単糖濃度の上昇が細胞質におけるものか、あるいは液胞におけるものかは明らかではないが、細胞質型インベルターゼ(CIN)、

あるいは液胞型インベルターゼ(VIN)によってショ糖を分解することで、積極的に適合溶質を増加させているのかもしれない。

本研究では、12°C、5日の低温処理後の低温順化能について比較を行っていないため、低温順化とSPSとの関係については不明であるものの、低温による糖代謝の変化の一端が明らかとなった。イネの低温順化については根におけるアクアポリンが関与しているという報告や(Ahamed et al., 2012)、トレハロースの蓄積が関与しているという報告があるものの(Nakamura et al., 2011)、詳細はほとんど明らかとなっていない。今後、糖・デンプン代謝の視点からさらなる解析が行われることが期待される。

3-4-3 高CO₂処理による糖・デンプン代謝の変化とSPSとの関連性

これまでの研究から、高CO₂に応じてイネはSPS活性およびSPSの遺伝子発現を上昇させると考えられてきた(Seneweera et al., 1995; Hussain et al., 1999; Aoki et al., 2003; Ono et al., 2003)。しかし、本研究では予想に反し高CO₂によるSPS活性、遺伝子発現の有意な上昇は見られなかった(図3-8、3-9)。この原因として、本研究における高CO₂処理がAmbient区+200ppmと先行研究における+300–650ppmより低かったことが挙げられる。実際、先行研究においても+650ppmによって最大SPS活性が約2倍に上昇した一方(Ono et al., 2003)、+330ppmの条件における最大SPS活性の上昇は12%と限定的であり(Hussain et al., 1999)、高CO₂によるSPS活性の上昇はCO₂条件によってかなり異なることが推察される。また、本研究はこれまでの人工気象室における試験とは異なり圃場条件で高CO₂処理を行うFACE施設における実験だったことから、圃場条件では高CO₂によるSPS活性の上昇はさらに鈍くなるのかもしれない。高CO₂は短期的には光合成速度の上昇をもたらすが、植物を長期間高CO₂に曝すと光合成速度が低下するダウンレギュレーションという現象が知られている。この際、シロイヌナズナではSPS活性の低下が見られており(Signora et al., 1998)、本研究において同様の現象が起きた可能性も否定できない。ただし、本研究でサンプリングを行ったのは栄養成長期であり、FACE施設を用いた先行研究においては同時期には光合

成のダウンレギュレーションは見られなかったことから(Shimono et al., 2009)、本研究において光合成のダウンレギュレーションが起こっていた可能性は低いと考えられる。また、高 CO₂により WT、KD ともデンプン濃度が上昇する傾向にあったが、WT と KD で有意な差が見られなかった(図 3-10)。このことから、200 ppm の CO₂ 濃度上昇に伴い糖・デンプン代謝に若干の変化は生じているものの、その変化に SPS は寄与していないと考えられる。

草丈、茎数についても WT と KD で一貫した差は見られず(表 3-3 ~ 3-6)、収穫期の乾物重についても Ambient 区、FACE 区とも WT と KD で同程度であったことから(表 3-7, 3-8)、CO₂ 濃度を 200 ppm 上昇させた条件においても SPS 活性の低下はイネの生育、乾物生産に大きな影響を及ぼさないと考えられる。ただし、本研究で用いた SPS1-KD 系統(原品種日本晴)は高 CO₂ による乾物重の増加はほとんど見られない系統であるが(表 3-7, 3-8)、CO₂ 濃度上昇に対する乾物生産の応答には品種間差があることが知られている(Ziska et al., 1996; Hasegawa et al., 2013)。そのため、今後 CO₂ 濃度の上昇による乾物生産の増加程度が高い「タカナリ」(Hasegawa et al., 2013)のようなイネ品種を用いた解析を行うことで異なる結果が得られるかもしれない。

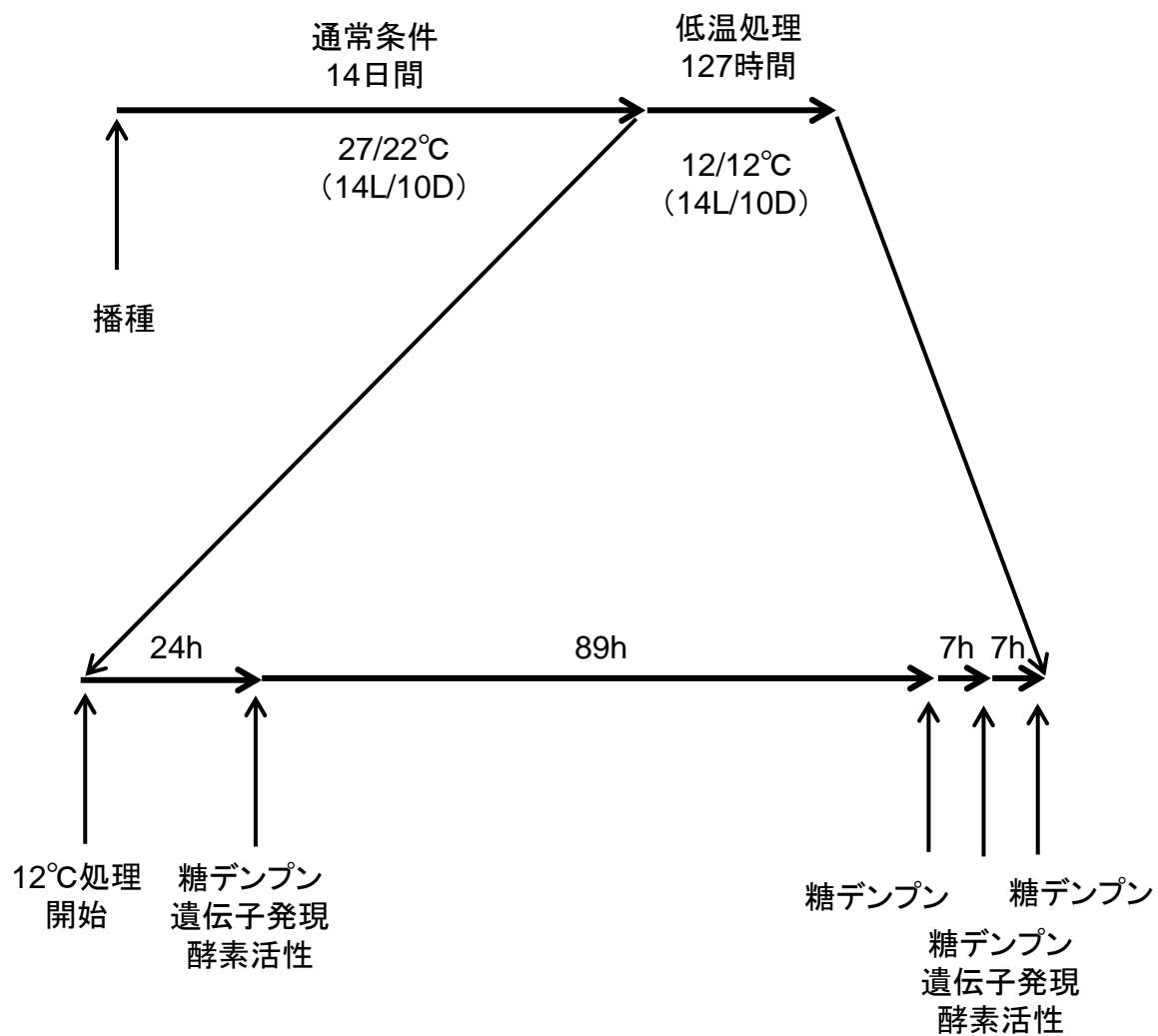


図3-1 低温処理実験におけるサンプリングの流れ。低温処理開始、および遺伝子発現、酵素活性測定用のサンプリングは明期開始7時間後に行った。

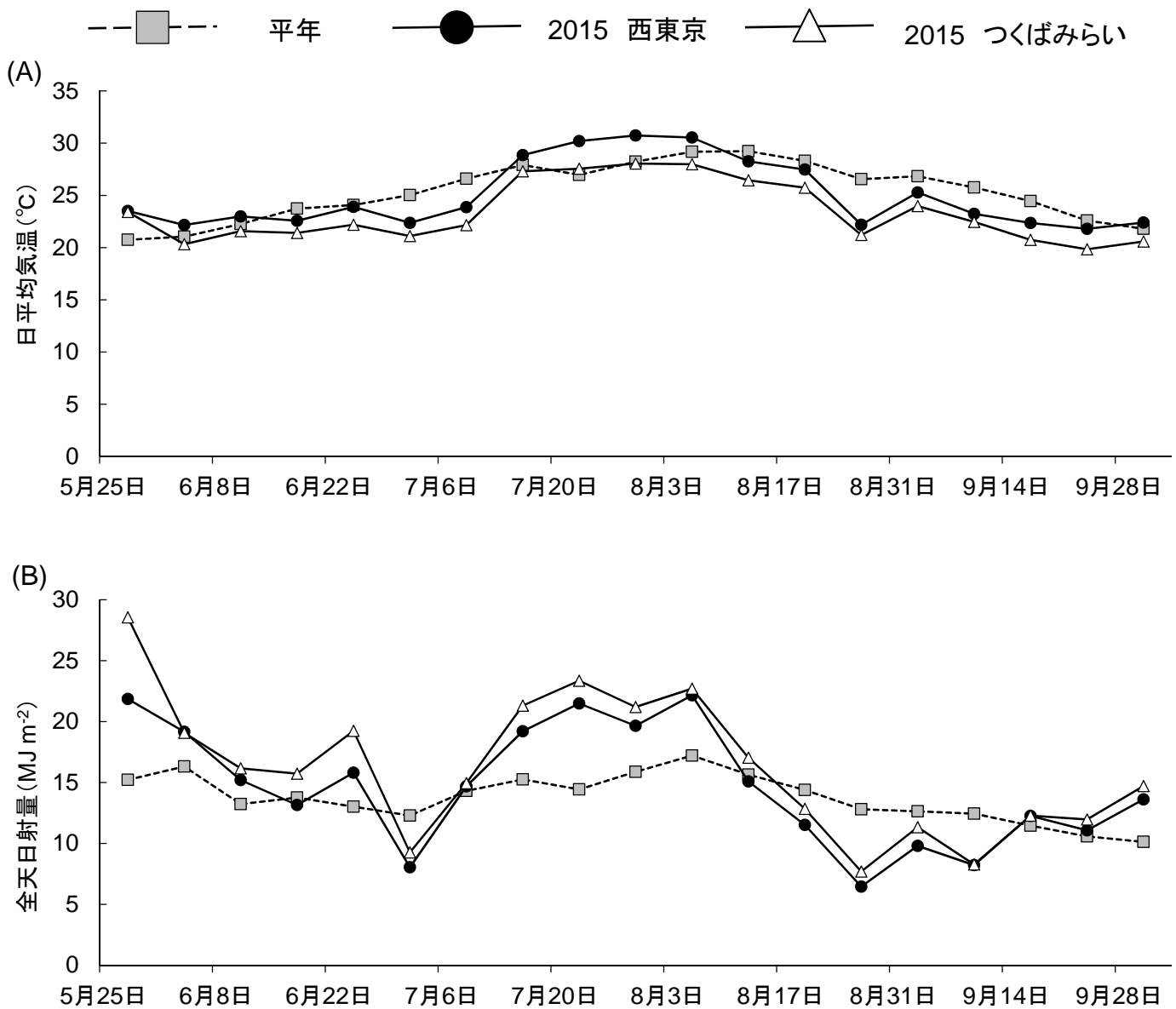


図3-2 FACE実験施設(茨城県つくばみらい市)における7日間ごとの日平均気温と全天日射量。(A)日平均気温(B)全天日射量。値は7日間の平均値を示す。比較のため東大生態調和農学機構(東京都西東京市)における平年値と2015年の値(図2-5と同じ)を合わせて示した。

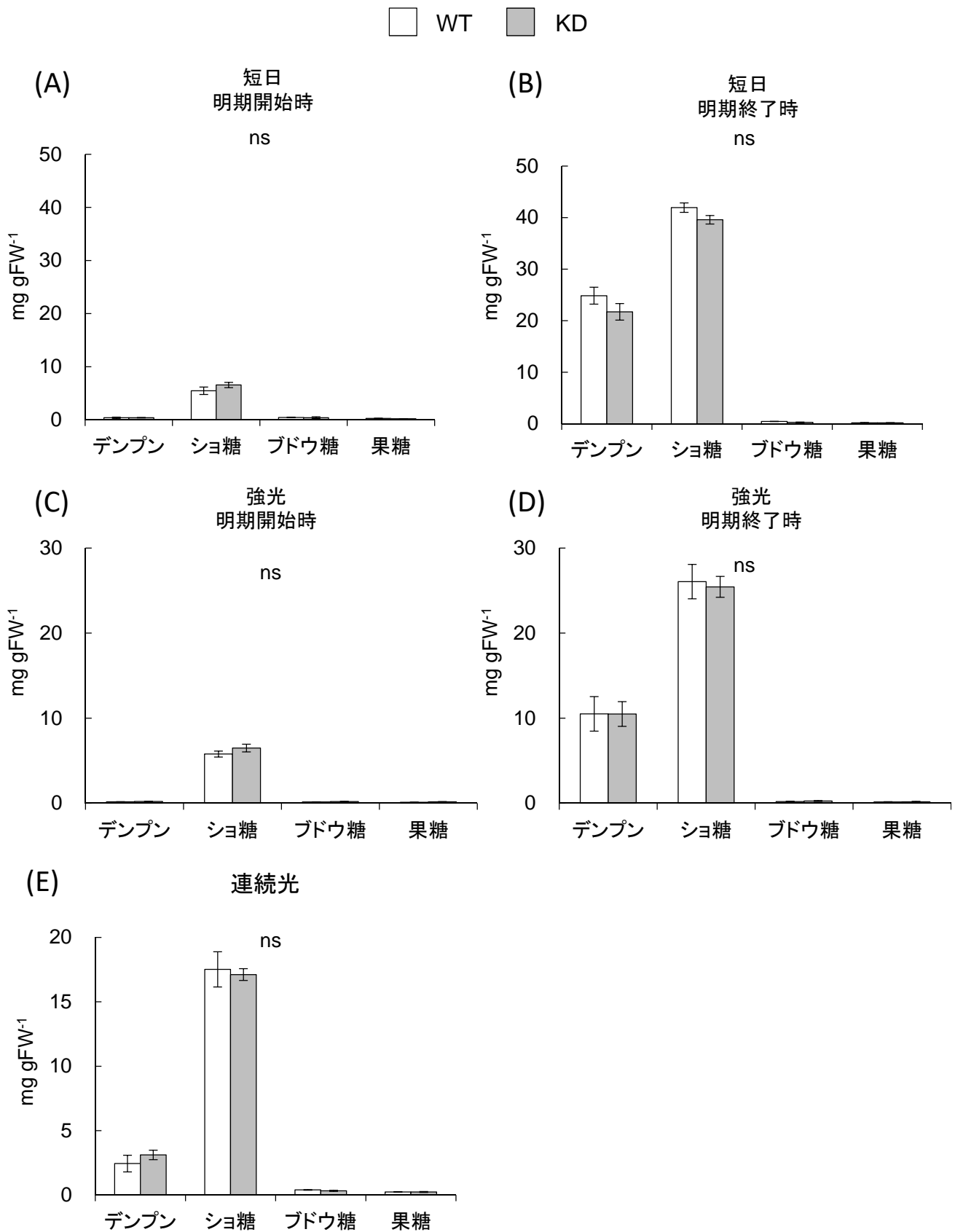


図3-3 短日、強光、連続光条件におけるKD-2の葉身の糖・デンプン濃度。(A, B)短日条件(C, D)強光条件の(A, C)明期開始時、(B, D)明期終了時、(E)連続光条件。データは平均値±標準誤差を示す(n=4)。nsはt検定において5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-1 KD-2の様々な環境条件における生育

栽培条件	遺伝子型	草丈	地上部全乾物重
対照	WT	48.2 ± 0.7	486.3 ± 15.5
	KD	48.2 ± 0.3 ns	477.1 ± 27.0 ns
短日	WT	47.1 ± 0.6	199.8 ± 6.9
	KD	47.1 ± 0.9 ns	190.6 ± 6.8 ns
強光・高温	WT	47.5 ± 1.0	1651.9 ± 127.0
	KD	49.7 ± 1.4 ns	1671.2 ± 108.3 ns
連続光	WT	40.4 ± 0.2	357.2 ± 14.9
	KD	40.8 ± 0.7 ns	383.0 ± 15.5 ns

対照は第2章における解析結果(表2-6)と同じデータである。データは平均値 ± 標準誤差を示す(n=12(連続光、強光)、n=9(短日))。nsはt検定において5%水準で有意差がないことを示す。

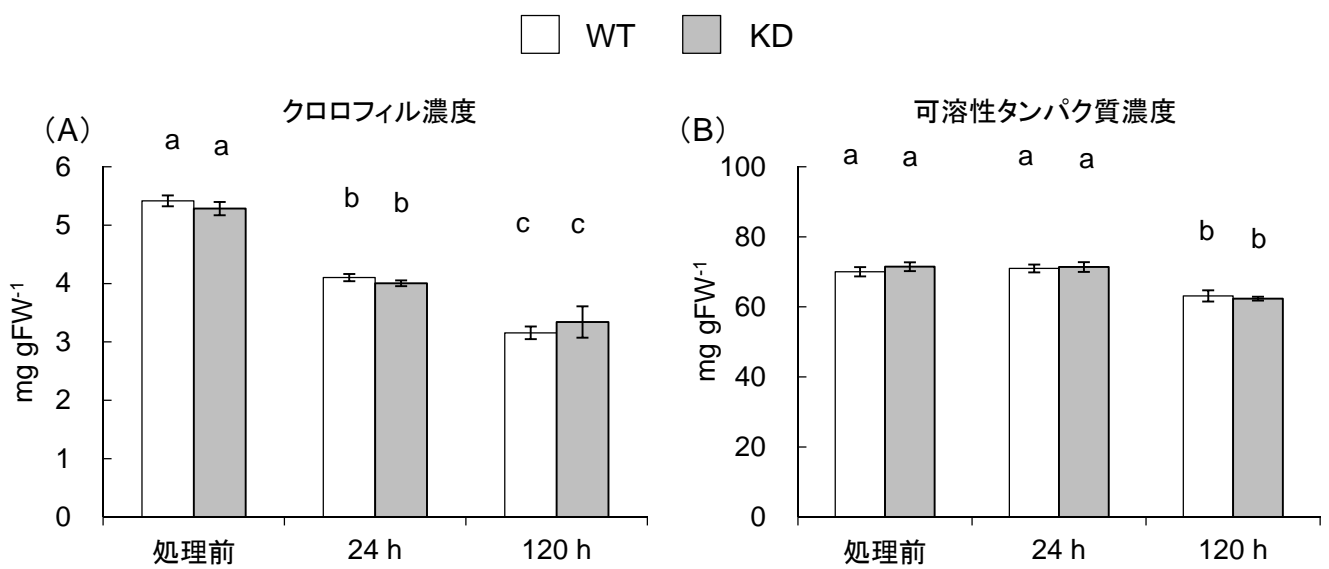


図3-4 低温処理によるKD-2の葉身のクロロフィル濃度、可溶性タンパク質濃度の変化。(A)クロロフィル濃度(B)可溶性タンパク質濃度。値は平均値±標準誤差を示す(n=3-4)。同じアルファベットを含むものは分散分析後の多重比較において5%水準で有意差がないことを示す。

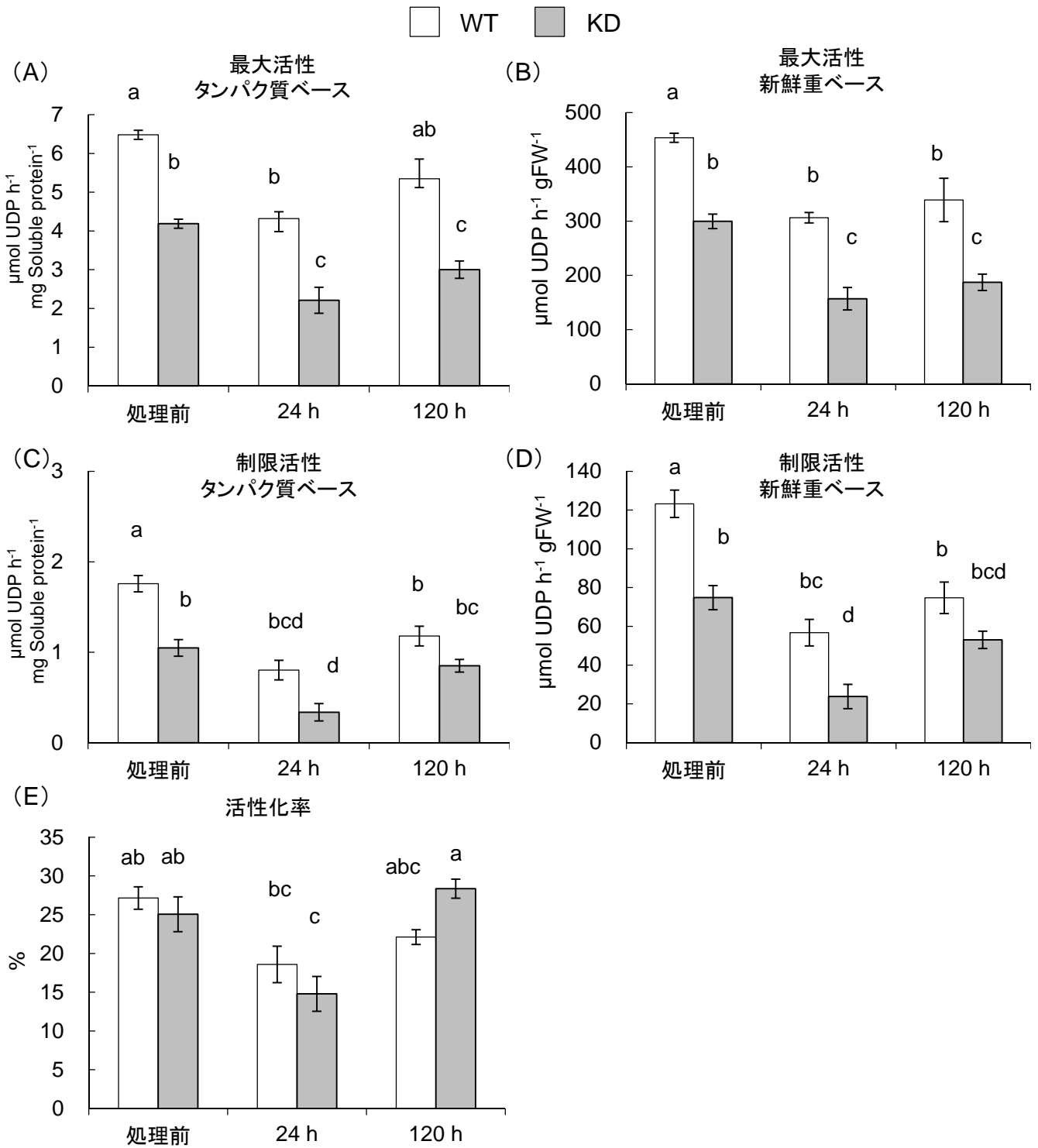


図3-5 低温処理によるKD-2の葉身のSPS活性の変化。(A, C)可溶性タンパク質ベース、(B, D)新鮮重ベースの(A, B)最大活性、(C, D)制限活性、(E)活性化率。値は平均値±標準誤差を示す(n=3-4)。同じアルファベットを含むものは分散分析後の多重比較において5%水準で有意差がないことを示す。

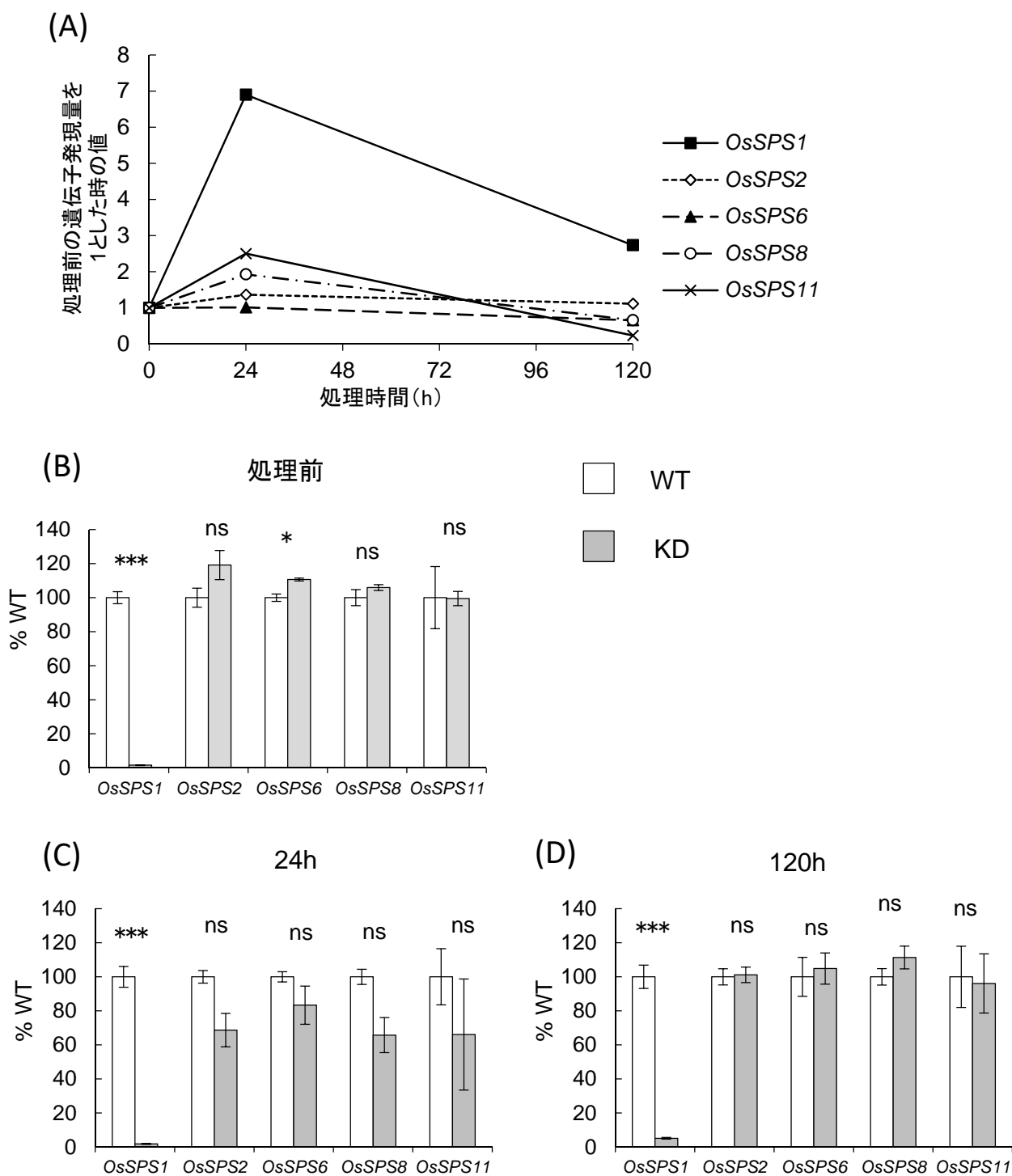


図3-6 低温処理実験におけるSPS遺伝子の発現の推移。(A) KD-2のWTにおけるSPS遺伝子の発現の推移。処理前(0h)を1とした時の値を示す。(B) 処理前、(C) 低温処理24時間後、(D) 低温処理120時間後におけるKD-2のWTとKDのSPS遺伝子発現の比較。WTを100とした時の相対値(%)を示す。値は平均値±標準誤差を示す(n=3-4)。***、*はそれぞれ検定において0.1%、5%水準で有意差があったことを、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

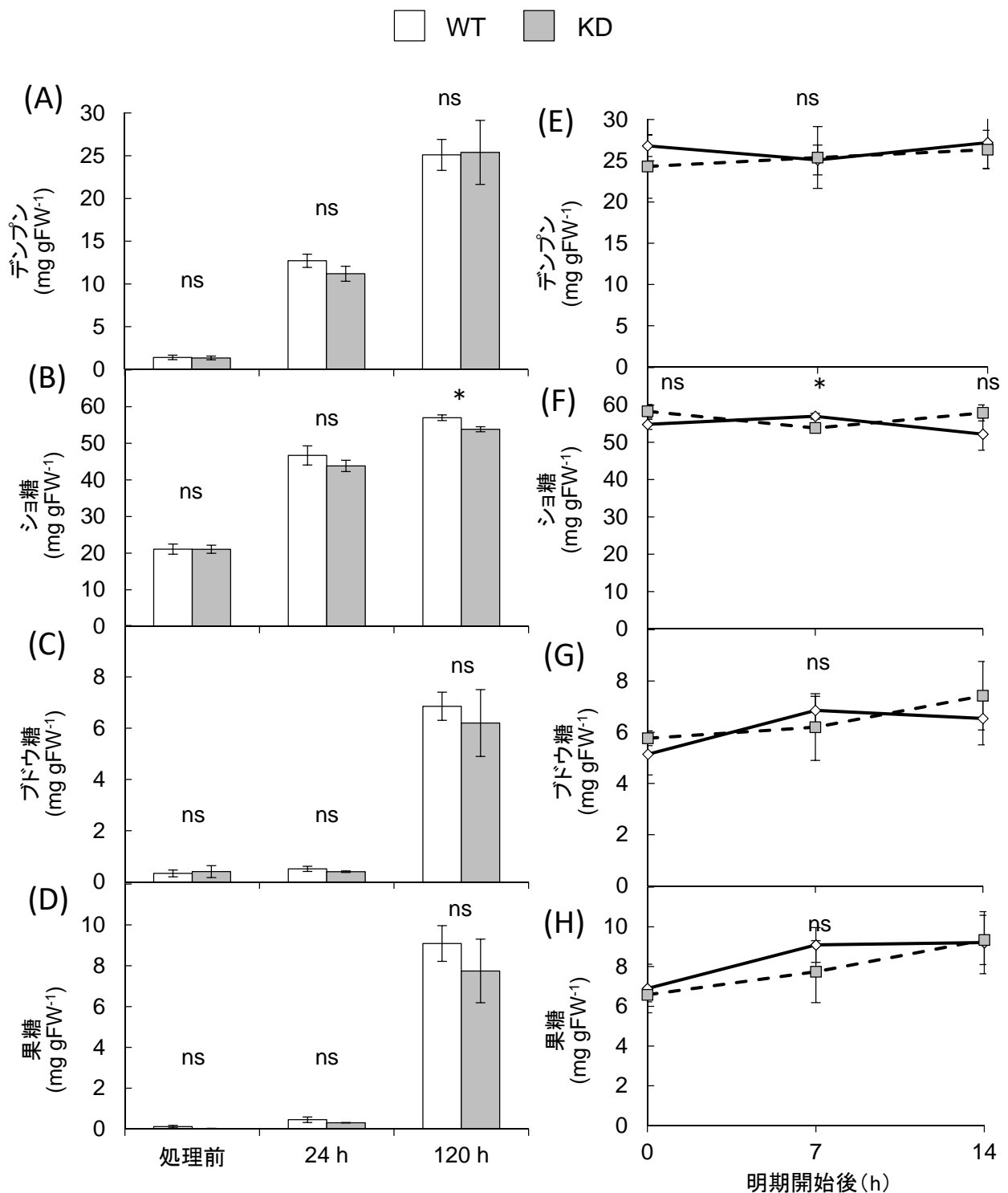


図3-7 低温処理実験におけるKD-2の葉身の糖・デンプン濃度の推移。処理前、24時間後、120時間後の(A)デンプン、(B)ショ糖、(C)ブドウ糖、(D)果糖濃度。低温処理5日目の明期開始から明期終わりまでの(E)デンプン、(F)ショ糖、(G)ブドウ糖、(H)果糖濃度の推移。値は平均値±標準誤差を示す(n=4)。*はt検定において5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

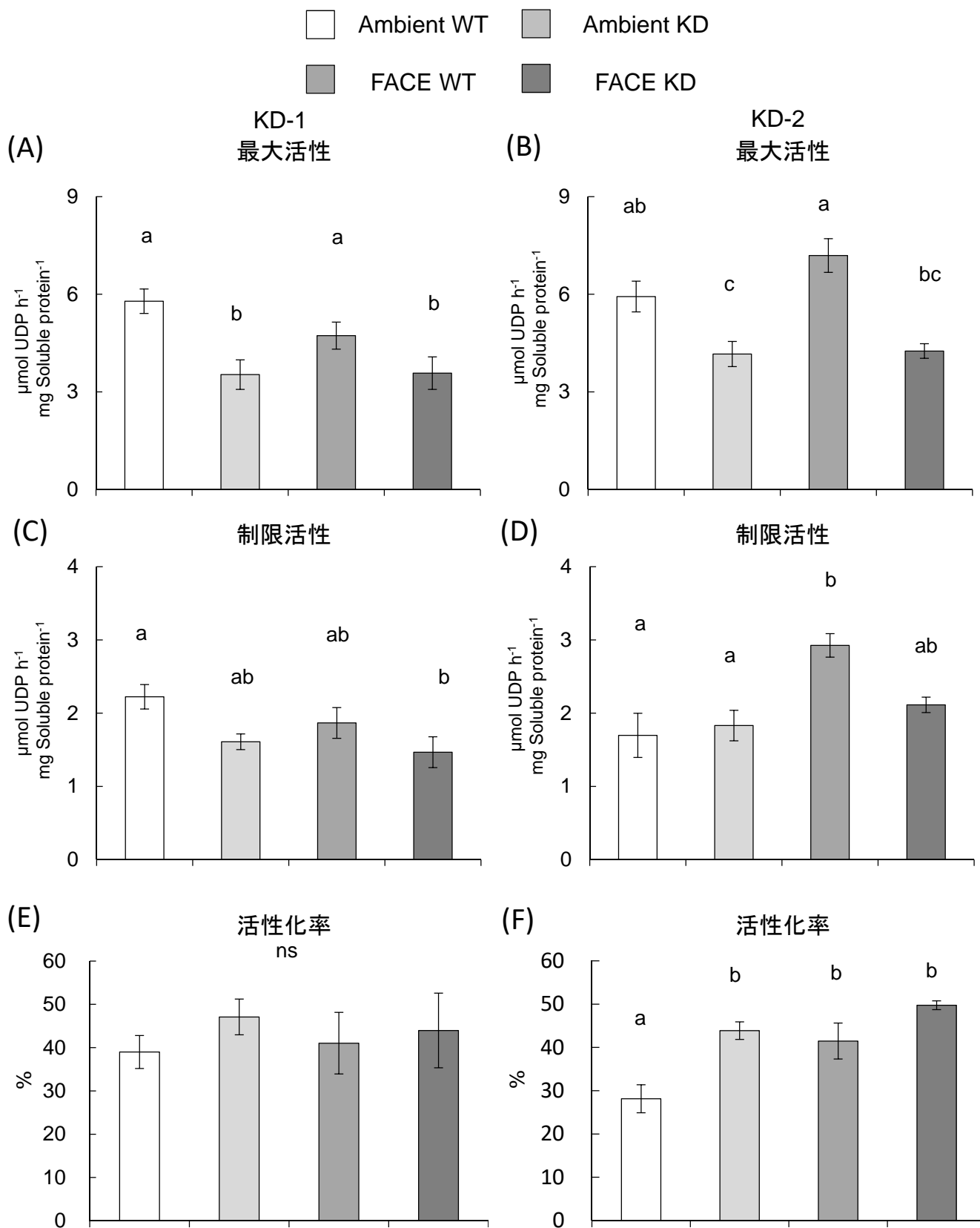


図3-8 FACE試験におけるSPS1-KD系統の葉身SPS活性。(A, C, E)KD-1、(B, D, F)KD-2の(A, B)最大活性(C, D)制限活性(E, F)活性化率。値は平均値±標準誤差を示す(n=4)。nsは分散分析の結果、5%水準で有意差がないことを示す。同じアルファベットを含むものは分散分析後の多重比較(Tukey法)において5%水準の有意差がないことを示す。

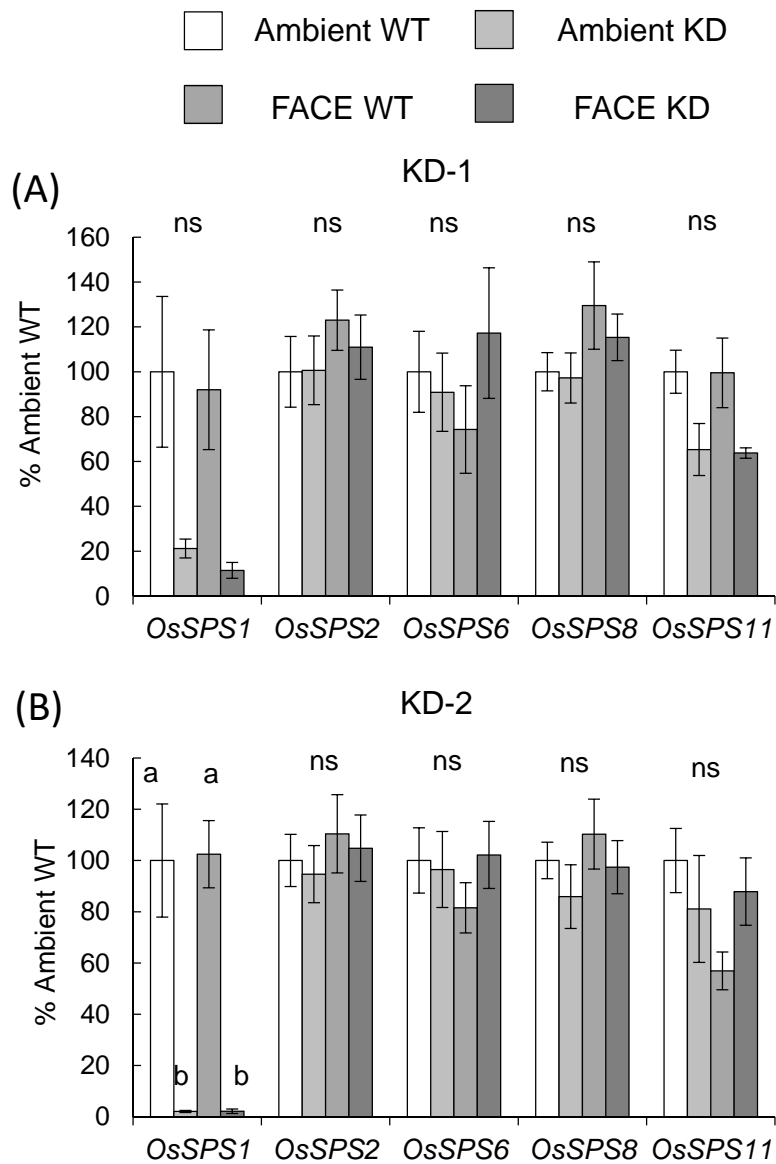


図3-9 FACE試験におけるSPS1-KD系統の葉身のSPS遺伝子発現。(A)KD-1、(B)KD-2。各遺伝子の相対発現量はユビキチン遺伝子(*RUBIQ1*)で標準化したうえで、Ambient区のWTに対する相対値として示した。データは平均値±標準誤差を示す(n=4)。nsは分散分析の結果、5%水準で有意差がないことを示す。同じアルファベットを含むものは分散分析後の多重比較(Tukey法)において5%水準の有意差がないことを示す。

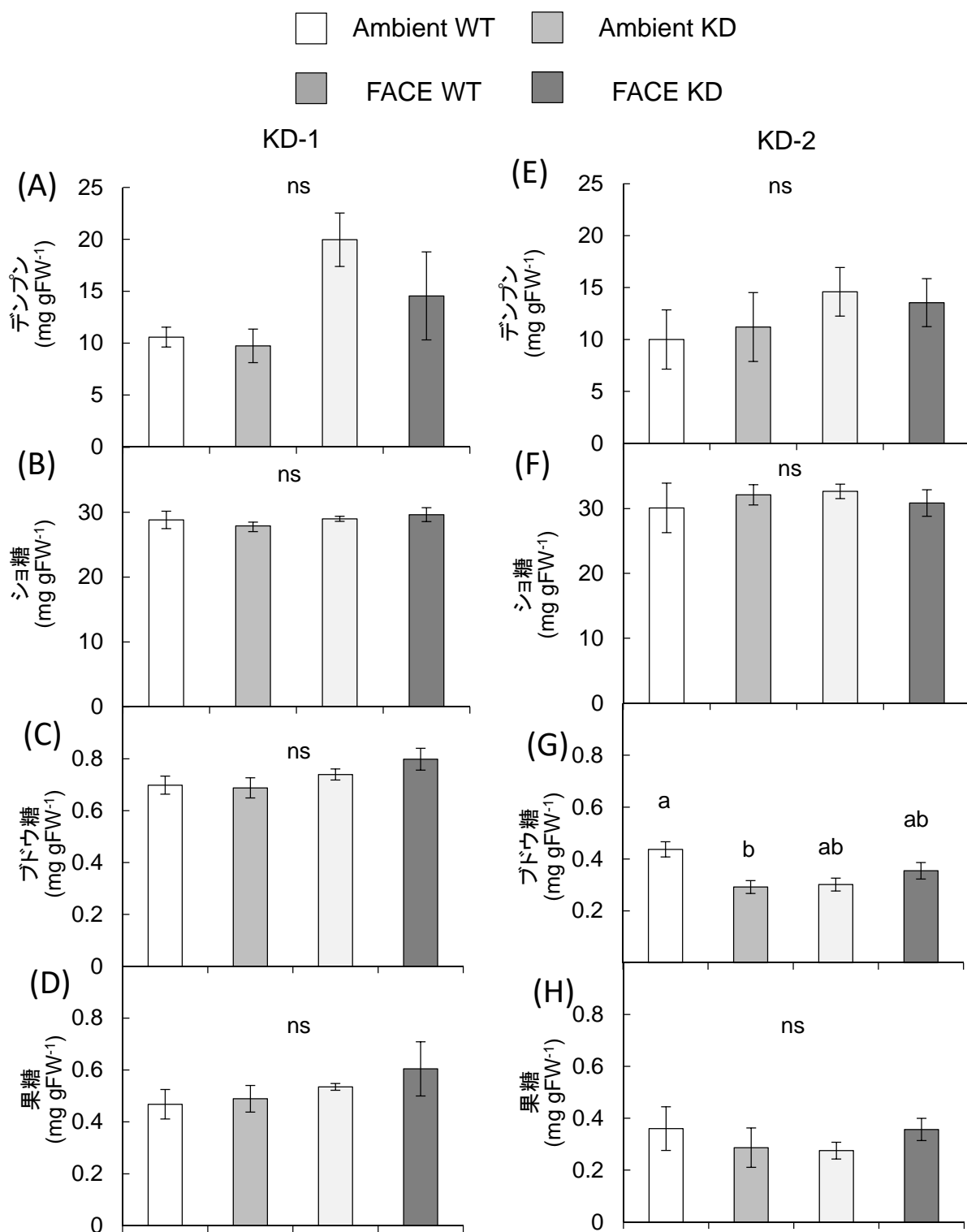


図3-10 FACE実験におけるKD-1およびKD-2の葉身糖・デンプン濃度。(A-D)KD-1、(E-H)KD-2における(A, E)デンプン濃度(B, F)ショ糖濃度(C, G)ブドウ糖濃度(D, H)果糖濃度。値は平均値±標準誤差を示す(n=4)。異なるアルファベットは分散分析後の多重比較(Tukey法)において5%の有意差があることを、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

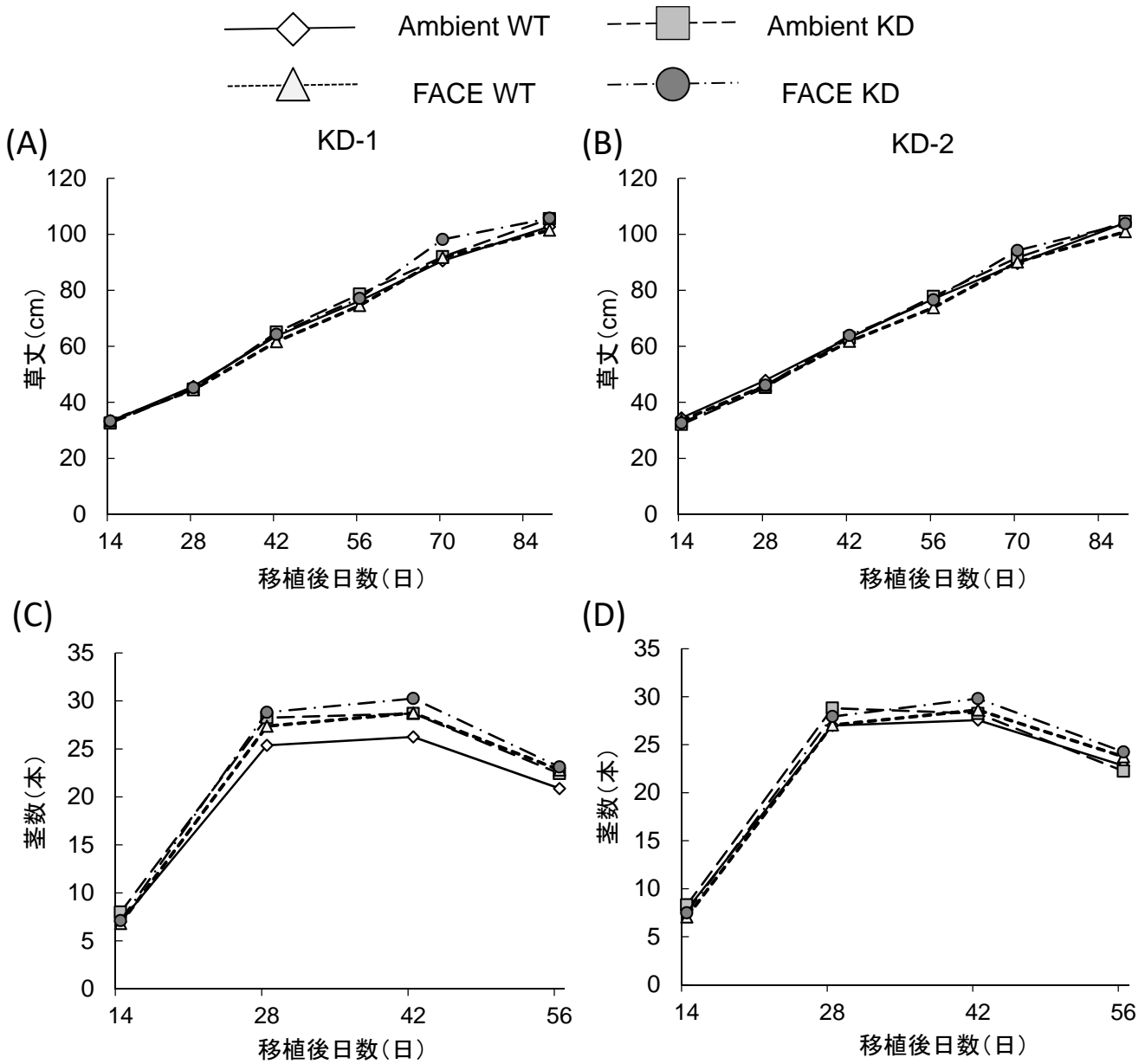


図3-11 FACE実験におけるKD-1およびKD-2の草丈および茎数。(A, C) KD-1および(B, D) KD-2の(A, B) 草丈(C, D) 茎数。値は平均値で示す(n=16)。

表3-2 FACE実験におけるKD-1の草丈と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	移植後日数(日)					
		14	28	42	56	70	88
Ambient	WT	33.1 ± 0.4	45.7 ± 0.5	63.7 ± 0.5	76.2 ± 0.7	90.6 ± 0.8	102.8 ± 0.6
	KD	32.6 ± 0.3	44.7 ± 0.4	65.1 ± 0.9	78.6 ± 0.9	92.0 ± 1.1	105.6 ± 0.8
FACE	WT	33.4 ± 0.4	44.5 ± 0.5	61.7 ± 0.9	74.6 ± 0.8	91.8 ± 0.9	101.5 ± 1.1
	KD	33.3 ± 0.4	45.3 ± 0.7	64.3 ± 1.4	77.1 ± 1.3	98.2 ± 1.6	105.8 ± 1.5
分散分析	CO ₂ 条件	ns	ns	ns	ns	**	ns
	系統	ns	ns	*	*	**	**
	CO ₂ 条件 × 系統	ns	ns	ns	ns	*	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=16)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-3 FACE実験におけるKD-1の茎数と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	移植後日数(日)			
		14	28	42	56
Ambient	WT	7.0 ± 0.3	25.4 ± 1.0	26.3 ± 1.1	20.9 ± 0.4
	KD	8.0 ± 0.4	28.3 ± 1.3	28.7 ± 1.2	22.4 ± 0.9
FACE	WT	6.8 ± 0.4	27.4 ± 1.1	28.8 ± 1.2	22.8 ± 0.6
	KD	7.1 ± 0.5	28.8 ± 1.8	30.3 ± 1.5	23.1 ± 1.3
分散分析	CO ₂ 条件	ns	ns	ns	ns
	系統	ns	ns	ns	ns
	CO ₂ 条件 × 系統	ns	ns	ns	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=16)。nsは分散分析において5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-4 FACE実験におけるKD-2の草丈と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	移植後日数(日)					
		14	28	42	56	70	88
Ambient	WT	34.4 ± 0.5	47.9 ± 0.4	63.1 ± 0.3	76.9 ± 0.6	89.6 ± 0.6	104.1 ± 0.5
	KD	32.1 ± 0.3	45.3 ± 0.5	63.0 ± 0.4	77.8 ± 0.7	91.7 ± 0.6	104.6 ± 0.7
FACE	WT	33.6 ± 0.6	46.1 ± 0.8	61.8 ± 1.1	73.8 ± 1.0	90.1 ± 1.1	100.9 ± 1.0
	KD	32.6 ± 0.2	46.1 ± 0.7	63.9 ± 1.1	76.6 ± 1.1	94.3 ± 0.8	103.8 ± 1.1
分散分析	CO ₂ 条件	ns	ns	ns	*	ns	*
	系統	***	ns	ns	*	***	ns
	CO ₂ 条件 × 系統	ns	*	ns	ns	ns	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=16)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-5 FACE実験におけるKD-2の茎数と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	移植後日数(日)			
		14	28	42	56
Ambient	WT	7.8 ± 0.6	27.0 ± 1.1	27.6 ± 1.1	22.8 ± 0.8
	KD	8.3 ± 0.4	28.8 ± 0.7	28.3 ± 0.7	22.3 ± 0.7
FACE	WT	7.1 ± 0.5	27.1 ± 1.2	28.6 ± 1.2	23.8 ± 1.0
	KD	7.5 ± 0.4	27.9 ± 1.1	29.8 ± 1.1	24.3 ± 1.0
分散分析	CO ₂ 条件	ns	ns	ns	ns
	系統	ns	ns	ns	ns
	CO ₂ 条件 × 系統	ns	ns	ns	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=16)。nsは分散分析において5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-6 FACE実験のKD-1の乾物重と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	穂重(g)	茎葉重(g)	地上部乾物重(g)
Ambient	WT	19.7 ± 1.1	31.9 ± 1.2	51.7 ± 1.6
	KD	18.5 ± 1.7	31.0 ± 1.2	49.5 ± 1.7
FACE	WT	22.0 ± 2.0	30.2 ± 0.6	52.2 ± 1.9
	KD	23.9 ± 1.8	33.0 ± 2.3	57.0 ± 3.9
分散分析	系統	ns	ns	ns
	CO ₂ 条件	*	ns	ns
	系統 × CO ₂	ns	ns	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=8)。*は分散分析においてそれぞれ5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

表3-7 FACE実験のKD-2の乾物重と分散分析の結果

CO ₂ 条件	系統	穂重(g)	茎葉重(g)	地上部乾物重(g)
Ambient	WT	21.4 ± 1.1	37.5 ± 1.0	58.9 ± 1.6
	KD	20.8 ± 0.6	31.6 ± 0.9	52.4 ± 1.3
FACE	WT	27.7 ± 1.5	31.3 ± 2.0	59.0 ± 3.4
	KD	26.5 ± 1.0	30.2 ± 2.2	56.8 ± 2.6
分散分析	系統	ns	*	ns
	CO ₂ 条件	***	*	ns
	系統 × CO ₂	ns	ns	ns

値は平均値±標準誤差を示す(n=8)。***、*は分散分析においてそれぞれ0.1%、5%水準で有意差があったこと、nsは5%水準で有意差がなかったことを示す。

1. SPS 遺伝子ファミリーに着目したショ糖合成制御機構の植物間比較

本研究では 5 つの SPS 遺伝子のうち、主に *OsSPS1* に着目して解析を行った。第一章の解析から、SPS 遺伝子の中では *OsSPS1* が花粉において支配的に働いており、花粉の発芽に必須であることが明らかとなった。また、第二章の解析から、*OsSPS1* は葉身で主に働くアイソジーンであることが明らかになった。加えて、*OsSPS1* と *OsSPS11* の二重変異体の解析から、*OsSPS11* は *OsSPS1* に次いで葉身で主に働くアイソジーンであることが推察された。*OsSPS1* は B ファミリーに属する遺伝子であるが、コムギ、トウモロコシ、タバコ、シロイヌナズナといった植物においても B ファミリーの遺伝子が生殖器官で働くことが知られており (Chávez-Bárcenas et al., 2000; Castleden et al., 2004; Chen et al., 2005a; Lutfiyya et al., 2007; Sun et al., 2011a; Okamura et al., 2011; Volkert et al., 2014)、生殖器官で働くことは B ファミリーの遺伝子に共通した特徴である可能性が示唆される。一方、シロイヌナズナとタバコでは葉身で主に働くのは A ファミリーと C ファミリーに属する遺伝子であり、B ファミリーの遺伝子の寄与はほとんどない点はイネと異なっている。他の植物について見てみると、トウモロコシでは B ファミリーに属する遺伝子が葉身で主に発現している一方、コムギやオムギでは C ファミリーに属する遺伝子が葉身で主に発現していると考えられている (Castleden et al., 2004; Lutfiyya et al., 2007)。このように、葉身で主要な働きをしていると考えられる遺伝子がどのファミリーに属するかは種間で異なっている可能性が高い。ただし、変異体を用いた解析が行われたイネ、シロイヌナズナ、タバコ以外については発現解析が行われたのみであるため、主に発現していると考えられている遺伝子が本当に葉身の SPS 活性の多くを担っているかどうかは明らかではない。

第三章の解析から、低温によって葉身における *OsSPS1* の発現が誘導されることが明らかとなった。低温により SPS 活性が上昇するという報告は多くある (Savitch et al., 1997, 2000; Strand et al., 1999)。一方、遺伝子発現レベルでの制御に関する報告は少ないが、トウモロコシの発現解析から

Bファミリーに属する *ZmSPS6* の発現が低温処理により誘導されることが明らかになっている他、シロイヌナズナでは *AtSPSA1*、*AtSPSC* のタンパク質含量が低温処理により増大することが明らかになっている (Sun et al., 2011a)。これらの遺伝子はいずれも葉身において主要な役割を果たすと考えられている遺伝子であることから、遺伝子ファミリーごとに機能が保存されているというよりは葉身における主要な SPS 遺伝子の発現を上昇させることで低温に対応してショ糖合成を盛んにしようとしている可能性が高い。

第二章で述べたように、*sps1/sps11* における葉身のデンプン蓄積は *OsSPS1* と *OsSPS11* の両方が KO されたことによるとは限らず、単に *OsSPS11* が KO されたことにより夜間のショ糖合成が阻害された影響の可能性もある。この場合、*OsSPS1* は夜間のショ糖合成には寄与しておらず、*OsSPS11* が夜間のショ糖合成に重要な役割を果たしているというような、アイソフォーム間での機能の違いがタバコと同様に存在する可能性がある (Chen et al., 2005a)。SPS は光による制御を受けることが知られており、イネの場合日中では SPS の活性化率が高い一方、夜間では活性化率が低い。これは、SPS タンパクにおける特定のセリンのリン酸化/脱リン酸化により制御されると考えられている。明期ではセリン残基が脱リン酸化され、正のエフェクターである G6P との親和性が高くなり、負のエフェクターである Pi に対する感受性が低くなることで酵素が活性化する一方、暗期ではセリン残基がリン酸化され、G6P との親和性が低くなり Pi に対する感受性が高くなることで酵素が不活性化する (Huber and Huber, 1996)。脱リン酸化には type2A protein フォスファターゼや Kelch-type フォスファターゼ (BSL2) が、リン酸化には SnRK1、CDPK といったキナーゼが関与していることが示唆されている (Winter and Huber, 2000; Wu et al., 2014)。近年、シロイヌナズナの SPS 遺伝子を酵母で発現させることで得られた SPS タンパクの解析から、Bファミリーに属する *AtSPSB* タンパク質が G6P や Pi による制御を強く受ける一方で他の遺伝子についてはこのようなアロステリックな制御をほとんど受けないことが明らかになった (Volkert et al., 2014)。このようなアイソフォーム間の違いがイネにおいても同様に存在すれば、Bファミリーに属する *OsSPS1* タンパク質がアロステリックな制御を受けるため夜間に不活性化する一方、Cファミリーに属する *OsSPS11* タンパク質がアロステリック

な制御を受けないため夜間も活性化状態にある可能性がある。本研究の解析では夜間における SPS 活性の測定は行っていないが、上記の仮説が正しいとすると、*OsSPS1* が KD あるいは KO された変異体において夜間の制限活性については WT とほとんど差が見られない可能性があり、*OsSPS1* の KD、KO 変異体の葉身中の糖・デンプン濃度に差が見られないことを説明し得る。また、*sps1/sps11* でデンプン濃度の上昇がみられたのは、夜間のアロステリックな阻害を受けない *OsSPS11* が KO されているためと解釈できる。

また、上記の仮説によれば *OsSPS1* が主要な働きをするイネの葉身では SPS はアロステリックな制御に大きく影響されるのに対し、*AtSPSB* が葉における主要なアイソフォームではないシロイヌナズナの葉では SPS はアロステリックな制御をほとんど受けないと考えられる。実際、イネの SPS の活性化率は日中に高く夜間に低いという変化を示すのに対し、シロイヌナズナでは活性化率は昼夜でほぼ一定であり (Huber et al., 1989; Okamura et al., 2011)、この仮説を支持している。また、限られた種の解析ではあるが、デンプン葉では SPS の活性化率が昼夜でほぼ一定である一方、糖葉では SPS の活性化率が日中に高く夜間に低いことが明らかとなっている (Huber et al., 1989)。このことは‘糖葉’植物と‘デンプン葉’植物の違いを良く説明しているように思われる。すなわち、‘デンプン葉’植物では夜間デンプン分解産物を SPS による反応でショ糖に変換した上で転流する必要があるため、夜間もショ糖合成能が維持されなければならない。一方、日中に蓄積したショ糖を転流させればよい‘糖葉’植物では夜間ショ糖合成能を高く維持する必要がない (Huber et al., 1989; Lunn and Furbank, 1999)。このような違いは、葉身で主要な働きをしている SPS アイソフォームが‘糖葉’植物ではアロステリックな制御を強く受ける一方、‘デンプン葉’植物では受けないという差を反映している可能性がある。

ただし、*AtSPSB* タンパク質のみが G6P や Pi による制御を強く受けるという *in vitro* での解析結果が *in vivo* でも同様に成り立つかは明らかではない (Volkert et al., 2014)。また、光によるリン酸化/脱リン酸化の制御に関わるモチーフ配列は A、B、C ファミリーの遺伝子で共通に持っている (MacRae and Lunn, 2006)。SPS 遺伝子の N 末端側がアロステリックな制御に重要であるという報告

はあるものの (Sawitri et al., 2016)、アイソフォーム間でのアロステリックな制御の違いがどのように決定されているかは現時点では明らかでない。今後さまざまな植物において SPS の遺伝子レベルでの制御、タンパク質レベルでの制御に関する解析が行われることによって、植物のショ糖合成の複雑な制御機構への理解が進むことに期待したい。

2. イネにおける SPS の役割

第一章の結果から SPS によるショ糖合成が花粉の発芽に必須であることが明らかとなった。ソース葉における糖・デンプン代謝と比較すると花粉における糖・デンプン代謝に関する研究は少なく、依然として不明な点が多い。一方、花粉における正常な糖・デンプン代謝が稔性の維持には必須であり、花粉の糖・デンプン代謝に関する知見が深まることで、低温不稔や高温不稔といった問題を解決する糸口が見つかる可能性がある。本研究で得られた知見はその基盤となるものである。

第二章および第三章では、人工気象室や水田圃場で栽培したほか、短日条件、強光条件、連続光条件、高 CO₂ 条件、といった様々な条件で SPS 活性が低下した系統を解析した。しかし、いずれの条件においても WT と変異体で有意な生育の差は見られなかった。このことから、イネの生育および本研究で検証した環境応答における SPS の役割は限定的であるといえる。ただし、本研究で用いた材料の中で SPS 活性が最も低い *sps1/sps11* については、1 つの生育条件のみしか比較を行っていない。そのため、今後第二章で行ったような解析が *sps1/sps11* においても行われることで、*sps1/sps11* において生育が低下する条件が明らかになるかもしれない。ただし、仮にそのような条件が明らかになったとしても、最大活性が 85% 低下しているのにもかかわらずその生育に影響が見られないことから考えると、イネにおいては SPS が日中のショ糖合成を律速する鍵酵素であるという従来の考え方は当てはまらない可能性が高い。

また、本研究では第一章で花粉に着目したのを除きソース葉以外の SPS の役割について検討していないが、SPS はソース葉以外の多くの器官で働いている (Okamura et al., 2011)。そのため、本研究で用いた変異体においてはソース葉以外の器官においても SPS 活性が低下していると考えら

れる。イネにおける SPS の役割を解明するためには、今後ソース葉以外の器官におけるショ糖合成についても解析を進める必要がある。ただし、各 SPS アイソジーンは複数の器官で働いていることから (Okamura et al., 2011)、SPS の役割を器官ごとに分けて考えるのは容易ではない。

3. イネにおけるショ糖合成制御機構と新規ショ糖合成経路の存在の可能性

前節で述べたように、本研究からイネにおいては SPS が日中のショ糖合成を律速する鍵酵素であるという従来の考え方が当てはまらない可能性が強く示唆された。そこで本節では SPS 以外のショ糖合成を制御し得る要因について考察することで、今後のイネショ糖合成制御機構に関する研究への展望を示したい。

ショ糖合成は、SPS によって合成された S6P が SPP によってショ糖に変換されることで行われる (図 A)。また、SPS と SPP は複合体として働いている可能性が示唆されている (Echeverria et al., 1997; Lunn and MacRae, 2003; Maloney et al., 2015)。このように、SPP はショ糖合成に直接関与する酵素であるにもかかわらず SPP がショ糖合成を制御する要因とは考えられてこなかった理由は、SPP 活性が SPS 活性と比較して非常に高く、ショ糖合成を律速し得ないと考えられてきたためである (Hawker and Smith, 1984)。この説は近年見直され、組織によっては SPP の活性は SPS に対して過剰には存在しないと考えられている (Lunn et al., 2000)。しかし、タバコの SPP 発現抑制システムの解析から、これまでと同様 SPP のショ糖合成制御への貢献はほとんどないとされている (Chen et al., 2005b)。ただし、このことがイネ、あるいは他の植物でも同様に成り立つかは明らかではなく、変異体を用いた解析などによって検証されるべきである。

これまでの様々な植物を用いた解析から日中の葉におけるショ糖合成は主に細胞質型フルクトース 1,6-ビスフォスファターゼ (cFBPase) と SPS によって制御されていると考えられてきた (MacRae and Lunn, 2006)。cFBPase はフルクトース 1, 6-ビスリン酸 (FBP) から F6P を合成する酵素であり (図 A)、日中トリオースリン酸の形でカルビン-ベンソン回路から細胞質に供給された炭素を単糖リン酸に変換することで SPS と SPP によるショ糖合成の基質を供給する働きを持つ。イネでは cFBPase は

2つの遺伝子(*OscFBP1*、*OscFBP2*)によってコードされており、そのうち *OscFBP1* が葉身のほか多くの器官で支配的に働いている。*OscFBP1* の KO 変異体では明らかな生育阻害が見られることから、cFBPase のショ糖合成における重要性が示唆される(Lee et al., 2008; Koumoto et al., 2013)。そのため、SPS によるショ糖合成ではなく cFBPase によるショ糖合成の基質供給がイネのショ糖合成制御にとってより重要である可能性がある。ただし、cFBPase はフルクトース 2, 6-ビスリン酸 (F26BP) によって負に制御されることが知られており、F26BP 自体も様々な要因によって制御されることから *in vivo* での活性制御は複雑である(Stitt, 1990)。なお、夜間ではカルビン-ベンソン回路からのトリオースリン酸の供給がないため、cFBPase によるショ糖合成の基質供給は実質的に行われないと考えられている。そのため、cFBPase は夜間のショ糖合成を制御する要因とはならない。

また、ショ糖合成の基質である糖リン酸の代謝経路がショ糖合成に重要な役割を果たしていると考えられる。夜間のデンプン分解産物は主にマルトースやブドウ糖といった形で葉緑体から細胞質へと輸送される(Stitt and Zeeman, 2012、図 A)。SPS の基質である UDP グルコースは細胞質型ホスホグルコムターゼ(cPGM)の働きにより G6P から G1P に変換された後、UDP グルコースピロホスホリラーゼ(UGPase)によって G1P から合成される。またもう一つの基質である F6P は細胞質型ホスホグルイソメラーゼ(cPGI)により G6P から生成される(図 A)。この経路は、日中においては cFBPase によって合成された F6P から UDP グルコースを合成する経路として働いている。従来、これらの反応はショ糖合成の制御には重要な役割を果たしていないと考えられてきた(Lytochenko et al., 2002)。しかし、近年安定性同位体である ^{13}C 標識を利用したタバコにおける ^{13}C メタボローム解析から、G1P における ^{13}C 標識の増加速度が他の糖リン酸と比較して遅く、G6P から G1P への変換、すなわち PGM による反応がショ糖合成系を律速している可能性が示唆された(Hasunuma et al., 2010)。同様の現象はシロイヌナズナを用いた ^{13}C メタボローム解析においても確認された(Szeczowka et al., 2013)。しかし、その後のシロイヌナズナの cPGM 活性がほぼ失われた cPGM 遺伝子発現抑制システムの解析では、cPGM がシロイヌナズナの正常な生育に必須であることは確かなものの、発現抑制システムで葉のショ糖合成能が低下していることは確かめられなかった(Malinova et

al., 2014)。以上のように cPGM がシヨ糖合成制御において重要な役割を果たしているかどうかは現時点では不明であるが、イネにおいても同様の解析が行われることで、シヨ糖合成の制御機構に関する新たな知見が得られると考えられる。

もう一つの可能性は、SPS と SPP による反応以外にシヨ糖合成経路が存在することである(図 4-1)。シヨ糖合成反応を触媒する酵素として SUS がある。SUS は *in vitro* では UDP グルコースと果糖からシヨ糖を合成する反応とシヨ糖を分解して UDP グルコースと果糖を生成する両方向の反応を触媒するが、これまでの研究から植物の葉において SUS はシヨ糖を分解する方向に働くと考えられている。特に、シロイヌナズナでは SUS および SPS の変異体の解析から SUS はシヨ糖合成方向には働いていないと考えられている (Barrat et al., 2009; Bahaji et al., 2015)。シロイヌナズナの *AtSPSA1* と *AtSPSC* の二重変異体では葉における UDP グルコースおよび果糖の濃度が上昇することが知られているが (Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015)、イネの *sps1/sps11* で同様に UDP グルコースと果糖の濃度が上昇した場合、SUS の触媒する反応がシヨ糖を基質とするシヨ糖分解から UDP グルコースと果糖を基質とするシヨ糖合成に変わる可能性が考えられる。あるいは、そもそもイネにおいては通常条件においても SUS がシヨ糖合成反応を触媒している可能性も否定できない。これらの可能性については、SPS 遺伝子に関する変異体の解析のみで示すのは難しく、少なくとも SUS 遺伝子に関する変異体の解析が必須であるが、これまでのところイネの SUS 変異体の報告はない。

酵素の中には複数の反応を触媒するものが存在する。たとえば、UGPase は G1P から UDP グルコースを生成する反応を触媒する酵素であるが、G1P に加えガラクトース 1-リン酸も基質として利用可能であることが示されている (Kleczkowski et al., 2011)。SPS と類似した反応を触媒する酵素としてトレハロース 6-リン酸合成酵素 (TPS) がある。TPS は G6P と UDP グルコースを基質としてトレハロース 6-リン酸を合成する反応を触媒する酵素であり (図 4-1)、近年の解析から糖シグナルに重要な役割を果たす可能性が示唆されている (Figuroa and Lunn, 2016)。この TPS が UGPase の場合と同様に G6P ではなく F6P を基質として S6P の合成に寄与している可能性も否定できない。ただし、

イネに限らず植物の TPS に関する酵素学的な性質については明らかになっていない (Figueroa and Lunn, 2016)。

以上のように、様々な酵素がイネのショ糖合成制御において重要な役割を果たす可能性があり、SPS・SPP 以外の新規ショ糖合成経路が存在する可能性もある。一方で、それらの酵素に着目した解析がイネではほとんど行われていない。今後、SPS に関する解析と合わせてこれらの酵素に着目した解析が行われることで、イネのショ糖合成を制御する因子が明らかになることが期待される。また、そのような解析から得られた知見は、将来の糖・デンプン代謝の改変によるイネ育種に貢献するに違いない。

4. 結論

以上、本研究により、*OsSPS1* が花粉の発芽に必須であることが示され、花粉における糖代謝の一端が明らかとなった。また、イネのソース葉におけるショ糖合成を担う SPS の遺伝子レベルでの制御機構や低温、高 CO₂ といった環境への応答の一端が明らかとなった。さらに、SPS が植物のソース葉におけるショ糖合成の律速要因であるというこれまでの定説がイネでは異なることが示された。本研究で得られた知見をもとに、イネのショ糖合成制御機構に関する理解がさらに進み、ひいては糖・デンプン代謝経路の改変により生産性や環境ストレス耐性が向上した新品種の作出に繋がることを期待される。

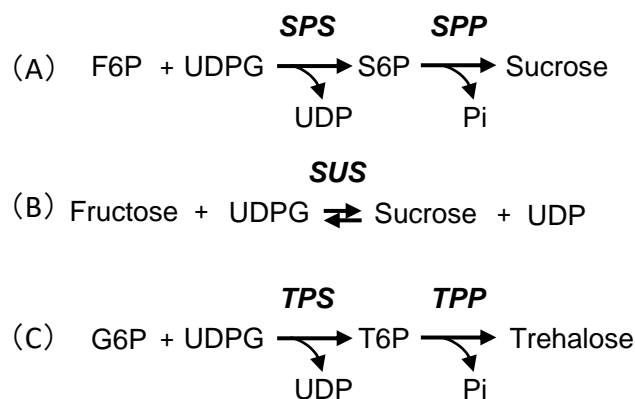


図4-1 イネ葉身でショ糖合成を行う可能性がある反応系。(A) SPSとSPPによる反応。(B) SUSによる反応。*in vitro*ではSUSはショ糖合成方向の反応も触媒することができるため、イネの葉においてはショ糖合成を担っている可能性がある。(C) TPSとTPPによる反応。本来はトレハロース合成系であるが、TPSがG6P以外にもF6Pを基質とすることでショ糖合成を担う可能性がある。代謝産物：F6P；フルクトース6-リン酸、G6P；グルコース6-リン酸、Pi；無機リン酸、S6P；ショ糖6-リン酸、T6P；トレハロース6-リン酸、UDPG；UDPグルコース。酵素：SPP；ショ糖リン酸フォスファターゼ、SPS；ショ糖リン酸合成酵素、SUS；スクロースシンターゼ、TPP；トレハロース6-リン酸フォスファターゼ、TPS；トレハロース6-リン酸合成酵素。

摘要

イネの糖・デンプン代謝機構の解明はイネの収量増大や環境ストレス耐性向上を目指す上で有用な知見を与えうる。そこで本研究はショ糖合成経路の鍵酵素として知られているショ糖リン酸合成酵素 (Sucrose phosphate synthase, SPS) に着目し、SPS をコードする遺伝子に関する変異体の解析から、イネのショ糖合成制御機構を明らかにすることを目的とした。以下に本研究により得られた成果の概略を示す。

第一章 *OsSPS1* の受精器官における機能解析

本章では、イネの SPS 遺伝子をコードする *OsSPS1* に *Tos17* レトロトランスポゾンが挿入された *SPS1* 突然変異系統の解析から、*OsSPS1* の受精器官における役割について検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- *SPS1* 突然変異系統では *Tos17* 挿入ホモ個体が存在せず、*Tos17* 挿入ヘテロ (以下ヘテロ) 個体の後代の遺伝子型は野生型 (WT)、ヘテロ、*Tos17* 挿入ホモで 1:1:0 に分離した。
- *SPS1* 突然変異系統のヘテロ個体が種子親、日本晴が花粉親の F₁ 個体では WT とヘテロ個体がおおよそ 1:1 に分離した。一方、日本晴が種子親、*SPS1-KO* のヘテロ個体が花粉親の F₁ 個体では WT 個体のみ存在し、ヘテロ個体は存在しなかった。
- 葯においては SPS アイソジーンのうち *OsSPS1* が支配的に働いており、*OsSPS1* は開花前の穎花において花粉特異的に発現していた。
- 成熟花粉割合は WT とヘテロ個体で有意な差は見られなかった一方、花粉発芽率は WT 個体と比較してヘテロ個体で約 2 分の 1 に低下していた。

以上から、イネの花粉では SPS アイソジーンのうち *OsSPS1* が主要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、*OsSPS1* は花粉の成熟には必須ではないが、花粉発芽には必須であることが明らかとなった。

第二章 葉身の SPS 活性が低下した SPS 遺伝子に関する変異体の作出と機能解析

OsSPS1 が破壊された花粉は発芽することができないため、*OsSPS1* のノックアウト(KO)系統を *Tos17* 突然変異系統から得ることはできなかった。そこで本章では SPS 活性が低下したイネ系統の解析を行うため、*Tos17* 突然変異系統から *OsSPS1* ノックダウン(KD)系統を選抜し、さらに RNAi 系統の作出、CRISPR-Cas9 システムを用いた SPS 遺伝子 KO 系統の作出を行った。これらの系統を用いて SPS 活性の低下がイネの生育および糖・デンプン代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

・*OsSPS1* が KD および KO された変異体では葉身の最大 SPS 活性が WT の 44-71% に低下したが、葉身の糖・デンプン濃度および生育、乾物生産、収量に差は見られなかった。

・*OsSPS1* および *OsSPS11* がノックアウトされた二重欠損変異体では葉身の最大 SPS 活性が WT の 16% に低下し、葉身におけるデンプン濃度が WT と比較して有意に高くなったが、生育に差は見られなかった。

以上から、*OsSPS1* が葉身において主要な SPS アイソジーンであることが明らかとなった。また、SPS はイネのソース葉におけるショ糖合成の律速要因とはなっていない可能性が強く示唆された。

第三章 SPS の環境応答に関する解析

本章では SPS 活性が WT と比較して 44–65% に低下している一方、通常条件では生育に差が見られない SPS1-KD 系統を短日、強光、連続光、低温、高 CO₂ 条件で栽培し、これらの環境における SPS の応答および生育への寄与について検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 短日条件、強光条件、連続光条件において、WT と KD の幼植物の生育および葉身糖・デンプン濃度に差は見られなかった。
- 24 時間の低温処理により *OsSPS1* の遺伝子発現は大きく上昇したが、SPS 活性は上昇せず、むしろ処理前よりも低くなった。
- 大気 CO₂ 濃度条件の Ambient 区と 200 ppm 高い CO₂ 濃度の FACE 区を比較して SPS 活性および遺伝子発現に差は見られず、WT と KD の葉身糖・デンプン濃度および生育にも差は見られなかった。

以上から、短日、強光、連続光、低温、高 CO₂ といった条件においても *OsSPS1* のノックダウンによる SPS 活性の低下は生育および糖・デンプン代謝に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上、本研究により、*OsSPS1* が花粉の発芽に必須であることが示され、花粉における糖代謝の一端が明らかとなった。また、イネのソース葉におけるショ糖合成を担う SPS の遺伝子レベルでの制御機構や低温、高 CO₂ といった環境への応答の一端が明らかとなった。さらに、SPS が植物のソース葉におけるショ糖合成の律速要因であるというこれまでの定説がイネでは異なることが示された。本研究で得られた知見をもとに、イネのショ糖合成制御機構に関する理解がさらに進み、ひいては糖・デンプン代謝経路の改変により生産性や環境ストレス耐性が向上した新品種の作出に繋がることが期待される。

謝辞

本研究は東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 作物学研究室において遂行されたものです。本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、指導教員の労を取って下さった同専攻 応用昆虫学研究室 教授 石川幸男博士、本研究の遂行および本論文の執筆にあたりご指導、ご助言を賜りました作物学研究室 特任教授 大杉立博士、研究計画立案から実験手法、論文執筆に至るまで数多くのご指導、ご助言を賜りました作物学研究室 助教 青木直大博士、在職中、数多くのご助言を賜りました作物学研究室 前准教授 山岸徹博士(現 帝京平成大学 健康メディカル学部)、本研究科の委託准教授として実験手法の指導および研究に関する数多くのご助言を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構) 中央農業研究センター 廣瀬竜郎博士、実験手法の指導および研究に関する数多くのご助言を賜りました作物学研究室 岡村昌樹博士(現 農研機構 次世代作物開発研究センター)に深く感謝申し上げます。また、イネの形質転換体の作出にあたりご協力を賜りました同研究科 生産・環境生物学専攻 育種学研究室 助教 桧原健一郎博士、同研究科 生圏システム学専攻 保全生態学研究室 准教授 吉田薫博士、同研究室 臼井祐人氏、供試材料の栽培管理にあたりご協力を賜りました同研究科附属生態調和農学機構 技術部、CRISPR/Cas9 コンストラクトを分譲して頂きました農研機構 生物機能利用研究部門 遠藤真咲博士、横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科 三上雅史氏、つくばみらい FACE 実験施設における圃場試験およびサンプリングにあたりご協力を賜りました独立行政法人農業環境技術研究所(現 農研機構 農業環境変動研究センター) 氏家和浩博士(現 島根大学 生物資源科学部)、長谷川利拓博士(現 農研機構 東北農業研究センター)、酒井英光博士(現 農研機構 農業環境変動研究センター)に深く感謝申し上げます。最後に、圃場試験を始めとする多くの実験にあたりご協力を賜るとともに、研究室生活を支えて下さった作物学研究室の諸先輩および学生諸兄に深く感謝申し上げます。

引用文献

- Ahamed, A., Murai-Hatano, M., Ishikawa-Sakurai, J., Hayashi, H., Kawamura, Y., Uemura, M. (2012). Cold stress-induced acclimation in rice is mediated by root-specific aquaporins. *Plant and Cell Physiology*, 53, 1445–1456.
- Aoki, N., Ono, K., Sasaki, H., Seneweera, S., Sakai, H., Kobayashi, K., Ishimaru, K. (2003). Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic carbon metabolism in flag-leaf blades of rice before and after heading. *Plant Production Science*, 6, 52–58.
- Bahaji, A., Baroja-Fernandez, E., Ricarte-Bermejo, A., Sanchez-Lopez, A. M., Munoz, F. J., Romero, J. M., Ruiz, M. T., Baslam, M., Almagro, G., Sesma, M. T., Pozueta-Romero, J. (2015). Characterization of multiple SPS knockout mutants reveals redundant functions of the four *Arabidopsis* sucrose phosphate synthase isoforms in plant viability, and strongly indicates that enhanced respiration and accelerated starch turnover can alleviate the blockage of sucrose biosynthesis. *Plant Science*, 238, 135–147.
- Barratt, D., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Feil, R., Simpson, C., Maule, A., Smith, A. (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13124–13129.
- Baxter, C. J., Foyer, C. H., Turner, J., Rolfe, S. A., Quick, W. P. (2003). Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1813–1820.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Braun, D., Wang, L., Ruan, Y. (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1713–1735.
- Brill, E., van Thournout, M., White, R., Llewellyn, D., Campbell, P., Engelen, S., Ruan, Y., Arioli, T., Furbank, R. (2011) A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber. *Plant Physiology*, 157, 40–54.
- Caspar, T., Huber, S., Somerville, C. (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology*, 79, 11–17.
- Caspar, T., Lin, T., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., Somerville, C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology*, 95, 1181–1188.
- Castleden, C. K., Aoki, N., Gillespie, V. J., MacRae, E. A., Quick, W. P., Buchner, P., Foyer, C. H., Furbank, R. T., Lunn, J. E. (2004). Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology*, 135, 1753–1764.
- Chavez-Barcenas, A., Valdez-Alarcon, J., Martinez-Trujillo, M., Chen, L., Xoconostle-Cazares, B., Lucas, W., Herrera-Estrella, L. (2000). Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiology*, 124, 641–653.
- Chen, S., Hajirezaei, M., Bornke, F. (2005a). Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology*, 139, 1163–1174.
- Chen, S., Hajirezaei, M., Peisker, M., Tschiersch, H., Sonnewald, U., Bornke, F. (2005b). Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta*, 221, 479–492.

- Echeverria, E., Salvucci, M. E., Gonzalez, P., Paris, G., Salerno, G. (1997). Physical and kinetic evidence for an association between sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. *Plant Physiology*, *115*, 223–227.
- Endo, M., Mikami, M., Toki, S. (2015). Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant and Cell Physiology*, *56*, 41–47.
- FAO (2016). FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/E> (2016 年閲覧)
- Figueroa, C. M. and Lunn, J. E. (2016). A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant physiology*, *172*, 7–27.
- Fujii, S., Hayashi, T., Mizuno, K. (2010). Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery. *Plant and Cell Physiology*, *51*, 294–301.
- Galtier, N., Foyer, C. H., Huber, J., Voelker, T. A., Huber, S. C. (1993). Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*lyopersicon esculentum* var. UC82B). *Plant Physiology*, *101*, 535–543.
- Godfray, H., Beddington, J., Crute, I., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S., Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, *327*, 812–818.
- Guy, C., Huber, J., Huber, S. (1992). Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low-temperature. *Plant Physiology*, *100*, 502–508.
- Hakata, M., Kuroda, M., Miyashita, T., Yamaguchi, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Mitsui, T., Yamakawa, H. (2012). Suppression of alpha-amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnology Journal*, *10*, 1110–1117.

- Hasegawa, T., Sakai, H., Tokida, T., Nakamura, H., Zhu, C., Usui, Y., Yoshimoto, M., Fukuoka, M., Wakatsuki, H., Katayanagi, N., Matsunami, T., Kaneta, Y., Sato, T., Takakai, F., Sameshima, R., Okada, M., Mae, T., Makino, A. (2013). Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan. *Functional Plant Biology*, *40*, 148–159.
- Hashida, Y., Aoki, N., Kawanishi, H., Okamura, M., Ebitani, T., Hirose, T., Yamagishi, T., Ohsugi, R. (2013). A near isogenic line of rice carrying chromosome segments containing *OsSPSI* of Kasalath in the genetic background of Koshihikari produces an increased spikelet number per panicle. *Field Crops Research*, *149*, 56–62.
- Hasunuma, T., Harada, K., Miyazawa, S., Kondo, A., Fukusaki, E., Miyake, C. (2010). Metabolic turnover analysis by a combination of *in vivo* ¹³C labelling from ¹³CO₂ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C₃ photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of Experimental Botany*, *61*, 1041–1051.
- Hawker, J., Smith, G. (1984). Occurrence of sucrose phosphatase in vascular and non-vascular plants. *Phytochemistry*, *23*, 245–249.
- Hepler, P., Rounds, C., Winship, L. (2013). Control of cell wall extensibility during pollen tube growth. *Molecular Plant*, *6*, 998–1017.
- Hirose, T., Aoki, N., Harada, Y., Okamura, M., Hashida, Y., Ohsugi, R., Miyao, A., Hirochika, H., Terao, T. (2013). Disruption of a rice gene for alpha-glucan water dikinase, *OsGWD1*, leads to hyperaccumulation of starch in leaves but exhibits limited effects on growth. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 9.
- Hirose, T., Mizutani, R., Mitsui, T., Terao, T. (2012). A chemically inducible gene expression system and its application to inducible gene suppression in rice. *Plant Production Science*, *15*, 73–78.
- Hirose, T., Scofield, G., Terao, T. (2008). An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. *Plant Science*, *174*, 534–543.

- Hirose, T., Zhang, Z., Miyao, A., Hirochika, H., Ohsugi, R., Terao, T. (2010). Disruption of a gene for rice sucrose transporter, *OsSUT1*, impairs pollen function but pollen maturation is unaffected. *Journal of Experimental Botany*, *61*, 3639–3646.
- Huber, S., Hanson, K. (1992). Carbon partitioning and growth of a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology*, *99*, 1449–1454.
- Huber, S., Nielsen, T., Huber, J., Pharr, D. (1989). Variation among species in light activation of sucrose-phosphate synthase. *Plant and Cell Physiology*, *30*, 277–285.
- Huber, S. C. (1983). Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon in leaves. *Plant Physiology*, *71*, 818–821.
- Huber, S. C., Huber, J. L. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *47*, 431–444.
- Huber, S. C., Israel, D. W. (1982). Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max merr*) leaves. *Plant Physiology*, *69*, 691–696.
- Huber, S. C., Kerr, P. S., Rufty, T. W. (1985). Diurnal changes in sucrose phosphate synthase activity in leaves. *Physiologia Plantarum*, *64*, 81–87.
- Hussain, M., Allen, L., Bowes, G. (1999). Up-regulation of sucrose phosphate synthase in rice grown under elevated CO₂ and temperature. *Photosynthesis Research*, *60*, 199–208.
- IPCC (2014). Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Core Writing Team, Pachauri, R. K., Meyer, L. A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Ishimaru, K., Hirotsu, N., Kashiwagi, T., Macloka, Y., Nagasuga, K., Ono, K., Ohsugi, R. (2008). Overexpression of a maize SPS gene improves yield characters of potato under field conditions. *Plant Production Science*, *11*, 104–107.

- Ishimaru, K., Ono, K., Kashiwagi, T. (2004). Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta*, 218, 388–395.
- Ishimaru, T., Hirabayashi, H., Sasaki, K., Ye, C., Kobayashi, A. (2016). Breeding efforts to mitigate damage by heat stress to spikelet sterility and grain quality. *Plant Production Science*, 19, 12–21.
- Kariya, K. (1989). Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. 3. Establishment of a method of *in vitro* pollen germination. *Japanese Journal of Crop Science*, 58, 96–102.
- Kleczkowski, L., Decker, D., Wilczynska, M. (2011). UDP-sugar pyrophosphorylase: A new old mechanism for sugar activation. *Plant Physiology*, 156, 3–10.
- Kong, J., Li, Z., Tan, Y., Wan, C., Li, S., Zhu, Y. (2007). Different gene expression patterns of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of rice. *Physiologia Plantarum*, 130, 136–147.
- Koumoto, T., Shimada, H., Kusano, H., She, K. C., Iwamoto, M., Takano, M. (2013). Rice monoculm mutation *moc2*, which inhibits outgrowth of the second tillers, is ascribed to lack of a fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Biotechnology*, 30, 47–56.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., Tuteja, N. (2016). The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops. *Frontiers in Plant Science*, 7, 506.
- Laporte, M. M., Galagan, J. A., Prasch, A. L., Vanderveer, P. J., Hanson, D. T., Shewmaker, C. K., Sharkey, T. D. (2001). Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 212, 817–822.
- Lee, S. K., Eom, J. S., Voll, L. M., Prasch, C. M., Park, Y. I., Hahn, T. R., Ha, S. H., An, G., Jeon, J. S. (2014). Analysis of a triose phosphate/phosphate translocator-deficient mutant reveals a limited capacity for starch synthesis in rice leaves. *Molecular Plant*, 7, 1705–1708.

- Lee, S. K., Eom, J. S., Hwang, S. K., Shin, D., An, G., Okita, T. W., Jeon, J. S. (2016). Plastidic phosphoglucomutase and ADP-glucose pyrophosphorylase mutants impair starch synthesis in rice pollen grains and cause male sterility. *Journal of Experimental Botany*, *67*, 5557–5569.
- Lee, S. K., Jeon, J. S., Bornke, F., Voll, L., Cho, J. I., Goh, C. H., Jeong, S. W., Park, Y. I., Kim, S. J., Choi, S. B., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., Cho, M. H., Bhoo, S. H., Sonnewald, U., Hahn, T. R. (2008). Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell and Environment*, *31*, 1851–1863.
- Li, X., Lawas, L., Malo, R., Glaubitz, U., Erban, A., Mauleon, R., Heuer, S., Zuther, E., Kopka, J., Hinch, D., Jagadish, K. (2015). Metabolic and transcriptomic signatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress. *Plant Cell and Environment*, *38*, 2171–2192.
- Lin, T., Caspar, T., Somerville, C., Preiss, J. (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynck lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology*, *86*, 1131–1135.
- Lunn, J., Furbank, R. (1999). Sucrose biosynthesis in C₄ plants. *New Phytologist*, *143*, 221–237.
- Lunn, J., Ashton, A., Hatch, M., Heldt, H. (2000). Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6^F-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 12914–12919.
- Lunn, J., MacRae, E. (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*, 208–214.
- Lutfiyya, L. L., Xu, N. F., D'Ordine, R. L., Morrell, J. A., Miller, P. W., Duff, S. M. G. (2007). Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *Journal of Plant Physiology*, *164*, 923–933.

- Lytovchenko, A., Sweetlove, L., Pauly, M., Fernie, A. (2002). The influence of cytosolic phosphoglucomutase on photosynthetic carbohydrate metabolism. *Planta*, 215, 1013–1021.
- MacRae, E. A., Lunn, J. E. (2006). Control of sucrose biosynthesis, in: Plaxton, W. C., McManus, M. T. (Eds.), *Advances in Plant Research*, 22, Blackwell, 234–257.
- Malinova, I., Kunz, H., Alseekh, S., Herbst, K., Fernie, A., Gierth, M., Fettke, J. (2014). Reduction of the cytosolic phosphoglucomutase in *Arabidopsis* reveals impact on plant growth, seed and root development, and carbohydrate partitioning. *Plos One*, 9, 11.
- Maloney, V. J., Park, J. Y., Unda, F., Mansfield, S. D. (2015). Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact *in planta* and promote plant growth and biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 66, 4383–4394.
- Mikami, M., Toki, S., Endo, M. (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 88, 561–572.
- Miki, D., Shimamoto, K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45, 490–495.
- Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S., Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K., Hirochika, H. (2003). Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 15, 1771–1780.
- Murchie, E. H., Sarrobert, C., Contard, P., Betsche, T., Foyer, C. H., Galtier, N. (1999). Overexpression of sucrose-phosphate synthase in tomato plants grown with CO₂ enrichment leads to decreased foliar carbohydrate accumulation relative to untransformed controls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 251–260.

- Nakamura, J., Yuasa, T., Huong, T., Harano, K., Tanaka, S., Iwata, T., Phan, T., Iwaya-Inoue, M. (2011). Rice homologs of inducer of CBF expression (*OsICE*) are involved in cold acclimation. *Plant Biotechnology*, 28, 303–309.
- Nakano, H., Makino, A., Mae, T. (1997). The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology*, 115, 191–198.
- Nashilevitz, S., Melamed-Bessudo, C., Aharoni, A., Kossmann, J., Wolf, S., Levy, A. (2009). The *legwd* mutant uncovers the role of starch phosphorylation in pollen development and germination in tomato. *Plant Journal*, 57, 1–13.
- Okamura, M., Aoki, N., Hirose, T., Yonekura, M., Ohto, C., Ohsugi, R. (2011). Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Science*, 181, 159–166.
- Okamura, M., Hashida, Y., Hirose, T., Ohsugi, R., Aoki, N. (2016). A simple method for squeezing juice from rice stems and its use in the high-throughput analysis of sugar content in rice stems. *Plant Production Science*, 19, 309–314.
- Okamura, M., Hirose, T., Hashida, Y., Ohsugi, R., Aoki, N. (2017). Suppression of starch accumulation in “sugar leaves” of rice affects plant productivity under field conditions. *Plant Production Science*, in press.
- Oliver, S., Van Dongen, J., Alfred, S., Mamun, E., Zhao, X., Saini, H., Fernandes, S., Blanchard, C., Sutton, B., Geigenberger, P., Dennis, E., Dolferus, R. (2005). Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene *OSINV4* is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant Cell and Environment*, 28, 1534–1551.

- Ono, K., Ishimaru, K., Aoki, N., Takahashi, S., Ozawa, K., Ohkawa, Y., Ohsugi, R. (1999a). Characterization of a maize sucrose-phosphate synthase protein and its effect on carbon partitioning in transgenic rice plants. *Plant Production Science*, 2, 172–177.
- Ono, K., Ishimaru, K., Aoki, N., Ohsugi, R. (1999b). Transgenic rice with low sucrose-phosphate synthase activities retain more soluble protein and chlorophyll during flag leaf senescence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 949–953.
- Ono, K., Sasaki, H., Hara, T., Kobayashi, K., Ishimaru, K. (2003). Changes in photosynthetic activity and export of carbon by overexpressing a maize sucrose-phosphate synthase gene under elevated CO₂ in transgenic rice. *Plant Production Science*, 6, 281–286.
- Persia, D., Cai, G., Del Casino, C., Faleri, C., Willemsse, M., Cresti, M. (2008). Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes. *Plant Physiology*, 147, 1603–1618.
- Pilkington, S., Encke, B., Krohn, N., Hohne, M., Stitt, M., Pyl, E. (2015). Relationship between starch degradation and carbon demand for maintenance and growth in *Arabidopsis thaliana* in different irradiance and temperature regimes. *Plant Cell and Environment*, 38, 157–171.
- Porra, R., Thompson, W., Kriedemann, P. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with 4 different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384–394.
- Ragel, P., Streb, S., Feil, R., Sahrawy, M., Annunziata, M., Lunn, J., Zeeman, S., Merida, A. (2013). Loss of starch granule initiation has a deleterious effect on the growth of *Arabidopsis* plants due to an accumulation of ADP-glucose. *Plant Physiology*, 163, 75–85.
- Rocher, J. P., Prioul, J. L., Lecharny, A., Reyss, A., Joussaume, M. (1989). Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P-synthase and glucose pyrophosphorylase in maize plants of differing growth-rate. *Plant Physiology*, 89, 416–420.

- Rosti, S., Fahy, B., Denyer, K. (2007). A mutant of rice lacking the leaf large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase has drastically reduced leaf starch content but grows normally. *Functional Plant Biology*, 34, 480–489.
- Ruan, Y., Merchant, S. (2014). Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 33–67.
- 提箸祥幸, 佐藤裕 (2014). イネの低温順化現象における代謝産物の解析, 日本作物学会紀事 83 (別 2):63.
- 提箸祥幸, 佐藤裕 (2015). 低温順化处理によるイネ幼苗の低温耐性強化方法の検討, 日本作物学会紀事 84(別 2):24.
- Savitch, L. V., Gray, G. R., Huner, N. P. A. (1997). Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta*, 201, 18–26.
- Sawitri, W. D., Narita, H., Ishizaka-Ikeda, E., Sugiharto, B., Hase, T., Nakagawa, A. (2016). Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: an importance of the N-terminal domain for an allosteric regulatory property. *The Journal of Biochemistry*, 159, 599–607.
- Seneweera, S., Basra, A., Barlow, E., Conroy, J. (1995). Diurnal regulation of leaf blade elongation in rice by CO₂. Is it related to sucrose-phosphate synthase activity. *Plant Physiology*, 108, 1471–1477.
- Shimono, H., Okada, M., Yamakawa, Y., Nakamura, H., Kobayashi, K., Hasegawa, T. (2009). Genotypic variation in rice yield enhancement by elevated CO₂ relates to growth before heading, and not to maturity group. *Journal of Experimental Botany*, 60, 523–532.

- Shimono, H., Abe, A., Aoki, N., Koumoto, T., Sato, M., Yokoi, S., Kuroda, E., Endo, T., Saeki, K., Nagano, K. (2016). Combining mapping of physiological quantitative trait loci and transcriptome for cold tolerance for counteracting male sterility induced by low temperatures during reproductive stage in rice. *Physiologia Plantarum*, *157*, 175–192.
- Signora, L., Galtier, N., Skot, L., Lucas, H., Foyer, C. H. (1998). Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO₂ enrichment. *Journal of Experimental Botany*, *49*, 669–680.
- Sivitz, A., Reinders, A., Ward, J. (2008). *Arabidopsis* sucrose transporter *AtSUC1* is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, *147*, 92–100.
- Speranza, A., Calzoni, G., Pacini, E. (1997). Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, *10*, 110–115.
- Stitt, M., Huber, S., Kerr, P. (1987). Control of photosynthetic sucrose formation, in: Hatch, M. D., Boardmann, N. K. (Eds.), *The Biochemistry of Plants*, *10*, Academic Press, 327–409.
- Stitt, M. (1990). Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *41*, 153–185.
- Stitt, M., Zeeman, S. C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*, 282–292.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestrom, P., Stitt, M. (1999). Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, *119*, 1387–1397.

- Sulpice, R., Trenkamp, S., Steinfath, M., Usadel, B., Gibon, Y., Witucka-Wall, H., Pyl, E., Tschoep, H., Steinhauser, M., Guenther, M., Hoehne, M., Rohwer, J., Altmann, T., Fernie, A., Stitt, M. (2010). Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of *Arabidopsis* accessions. *Plant Cell*, *22*, 2872–2893.
- Sun, J. D., Zhang, J. S., Larue, C. T., Huber, S. C. (2011a). Decrease in leaf sucrose synthesis leads to increased leaf starch turnover and decreased RuBP regeneration-limited photosynthesis but not Rubisco-limited photosynthesis in *Arabidopsis* null mutants of *SPSA1*. *Plant Cell and Environment*, *34*, 592–604.
- Sun, Y. W., He, Z. H., Ma, W. J., Xia, X. C. (2011b). Alternative splicing in the coding region of *Ppo-A1* directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & Integrative Genomics*, *11*, 85–93.
- Szecowka, M., Heise, R., Tohge, T., Nunes-Nesi, A., Vosloh, D., Huege, J., Feil, R., Lunn, J., Nikoloski, Z., Stitt, M., Fernie, A., Arrivault, S. (2013). Metabolic fluxes in an illuminated *Arabidopsis* rosette. *Plant Cell*, *25*, 694–714.
- Takahashi, S., Ono, K., Ugaki, M., Ishimaru, K., Aoki, N., Ohsugi, R. (2000). Ser162-dependent inactivation of overproduced sucrose-phosphate synthase protein of maize leaf in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, *41*, 977–981.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 2725–2729.
- Tobias, D. J., Hirose, T., Ishimaru, K., Ishige, T., Ohkawa, Y., Kano-Murakami, Y., Matsuoka, M., Ohsugi, R. (1999). Elevated sucrose-phosphate synthase activity in source leaves of potato plants transformed with the maize SPS gene. *Plant Production Science*, *2*, 92–99.

- Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., Tanaka, H. (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant Journal*, *47*, 969–976.
- Trevanion, S. J., Castleden, C. K., Foyer, C. H., Furbank, R. T., Quick, W. P., Lunn, J. E. (2004). Regulation of sucrose-phosphate synthase in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Functional Plant Biology*, *31*, 685–695.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World population prospects: The 2015 revision, key findings and advance tables. Working paper No. ESA/P/WP.241.
- Usui, Y., Sakai, H., Tokida, T., Nakamura, H., Nakagawa, H., Hasegawa, T. (2014). Heat-tolerant rice cultivars retain grain appearance quality under free-air CO₂ enrichment. *Rice*, *7*, 6.
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L. M., Voll, H., Schiessl, I., Hofmann, J., Schneider, S., Bornke, F. (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 5217–5229.
- Varagona, M. J., Purugganan, M., Wessler, S. R. (1992) Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize *waxy* gene. *Plant Cell*, *4*, 811–820.
- Vriet, C., Welham, T., Brachmann, A., Pike, M., Pike, J., Perry, J., Parniske, M., Sato, S., Tabata, S., Smith, A., Wang, T. (2010). A suite of *Lotus japonicus* starch mutants reveals both conserved and novel features of starch metabolism. *Plant Physiology*, *154*, 643–655.
- Wang, J. L., Jiang, J. D., Oard, J. H. (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, *156*, 201–211.

- Winter, H., Huber, S. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 253–289.
- Wu, X., Sklodowski, K., Encke, B., Schulze, W. (2014). A kinase-phosphatase signaling module with BSK8 and BSL2 involved in regulation of sucrose-phosphate synthase. *Journal of Proteome Research*, 13, 3397–3409.
- Yonekura, M., Aoki, N., Hirose, T., Onai, K., Ishiura, M., Okamura, M., Ohsugi, R., Ohto, C. (2013) The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, *OsSPS1* and *OsSPS11*, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose. *Frontiers in Plant Science*, 4, 31.
- Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., Hong, Y., Wang, Z. (2014). Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice*, 7, 24.
- Ziska, L., Manalo, P., Ordonez, R. (1996). Intraspecific variation in the response of rice (*Oryza sativa* L) to increased CO₂ and temperature: Growth and yield response of 17 cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1353–1359.