

## 論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 26 年度博士課程進学

氏名 橋田 庸一

指導教員名 東京大学大学院教授 石川 幸男

論文題目 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

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。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、デンプンの合成や転流、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。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。このように、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。

ショ糖リン酸合成酵素 (sucrose phosphate synthase, SPS) 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、フルクトース 6-リン酸と UDP グルコースからショ糖 6-リン酸を合成する反応を触媒する。シロイヌナズナやバレイショ、トマトといった葉に主にデンプンを蓄積する‘デンプン葉’植物の解析から、SPS は葉におけるショ糖とデンプンの間の炭素分配の制御を通じて作物の生育や収量形成に重要な役割を果たすと考えられてきた。一方、イネやオオムギ、コムギのように葉に

ショ糖を主に蓄積する‘糖葉’植物における SPS に関する知見はデンプン葉と比較して少ない。そこで本研究は SPS に着目し、イネの 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における SPS の役割を明らかにし、糖・デンプン代謝制御機構の改変によるイネ育種に資する知見を得ることを目的とした。

## 1. *OsSPS1* の受精器官における機能解析

イネの SPS をコードする 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イネ(日本晴)突然変異系統の解析を行った。しかし、これらの *Tos17* 突然変異系統には *Tos17* 挿入ホモ個体、すなわち *OsSPS1* のノックアウト(KO)個体が存在しなかった。その原因を明らかにするため、*Tos17* 挿入ヘテロ個体の後代の遺伝子型を調べたところ、野生型(WT)、*Tos17* 挿入ヘテロ、*Tos17* 挿入ホモでおよそ 1:1:0 に分離した。このことから、*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す可能性が示唆された。次に、SPS1 突然変異系統のヘテロ個体と SPS1 突然変異系統の原品種である日本晴を用いて正逆交雑を行ったところ、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 F<sub>1</sub> 個体では、WT 個体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、ヘテロ個体が花粉親の F<sub>1</sub> 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。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。

開花前の葯における遺伝子発現解析と *OsSPS1* のプロモーター-GUS 系統の解析から、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ることが明らかとなった。さらに、*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 とヘテロの成熟花粉割合と花粉発芽率を比較した。その結果、成熟花粉割合は WT とヘテロで有意な差は見られなかった一方、花粉発芽率は WT と比較してヘテロで約 2 分の 1 に低下していた。以上の結果から、*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。

## 2. 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 KO 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* がノックダウン (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。

まず、*OsSPS1* のイントロンに *Tos17* が挿入された突然変異系統の中から、WT と比較して *Tos17* 挿入ホモ個体の活性が有意に低下した SPS1-KD 系統を 2 系統 (KD-1、KD-2) 選抜した。また、*OsSPS1* の発現を RNAi 法により抑制した RNAi 系統を作出した。これらの系統を人工気象室で栽培したところ、葉身の最大 SPS 活性が WT の 60-71% に低下した。一方、葉身の糖・デンプン濃度および初期生育に差は見られなかった。次に、SPS1-KD 系統を 2015 年と 2016 年の 2 ヶ年水田圃場で栽培した。KD の最大 SPS 活性は WT の 44-59% に低下した。また、KD で葉身のデンプン濃度が高い傾向が見られた。一方、生育、乾物生産および収量を比較したが WT と KD の間に差は見られなかった。以上の結果から、*OsSPS1* が葉身における主要な SPS アイソジーンであることが示された。また、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。葉身の最大 SPS 活性については、*sps1* は WT と比較して 54% に、*sps1/sps11* は WT と比較して 16% に低下した。葉身の糖・デンプン濃度については、*sps1* と WT に有意な差は見られなかった。一方、*sps1/sps11* は WT と比較して葉身のデンプン濃度が有意に高かった。ショ糖、単糖濃度に有意な差は見られなかった。草丈および茎数についても有意な差は見られなかった。以上の結果から、最大 SPS 活性が 84% 低下すると、葉身の糖・デンプン濃度には影響を及ぼすが生育には影響を及ぼさないことが明らかとなった。‘デンプン葉’植物であるシロイヌナズナにおいて、葉の SPS 活性が WT の約 30% に低下した変異体では生育阻害が見られることから、ショ糖合成における SPS の寄与が‘糖葉’植物と‘デンプン葉’植物で異なっており、‘糖葉’植物であるイネのソース葉において SPS はショ糖合成の律速要因とはなっていない可能性が示唆された。

### 3. SPS の環境応答に関する解析

これまでの研究から、植物は日長、光強度、温度、栄養条件、CO<sub>2</sub> 濃度といった環境要因に応じた糖・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示唆されている。そこで、SPS 活性が WT と比較して 44-65% に低下しているが通常条件では生育に

差が見られない SPS1-KD 系統を日長、光強度、低温、CO<sub>2</sub> 濃度を変えた条件で栽培し、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。

KD-2 を短日条件、強光条件、連続光条件において栽培し、幼植物の生育および葉身の糖・デンプン濃度を比較したが、WT と KD の間に差は見られなかった。このことから、これらの条件では SPS 活性の低下がイネの生育および糖・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。

次に、通常条件で生育させた播種後 14 日の KD-2 に光条件は変えずに 12°C の低温処理を行い、低温処理による葉身 SPS 活性、SPS 遺伝子発現および糖・デンプン濃度を比較した。WT において 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。また、低温処理による SPS 活性化率の上昇も見られなかった。低温処理 24 時間後には主にショ糖、デンプン濃度の増加がみられ、120 時間後にかけてはショ糖、デンプン濃度の増加に加え、単糖濃度の増加が見られた。一方、WT と KD の差は限定的であった。以上の結果から、イネはコムギやシロイヌナズナとは異なり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ことが明らかとなった。また、低温処理による糖・デンプン濃度の上昇は低温による転流の阻害が原因と考えられた。

SPS 活性の低下が高 CO<sub>2</sub> 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、SPS1-KD 系統を圃場条件下で外気より 200 ppm 高い CO<sub>2</sub> 濃度に制御できる FACE 実験施設で栽培した。大気 CO<sub>2</sub> 濃度条件の Ambient 区と 200 ppm 高い CO<sub>2</sub> 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 の葉身の糖・デンプン濃度および生育、乾物生産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 CO<sub>2</sub> 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。このことは、イネのソース葉において SPS はショ糖合成の律速要因とはなっていないという仮説を支持している。

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 CO<sub>2</sub> 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。