

## 審査の結果の要旨

氏名 橋田 庸一

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、夜間の転流等に利用される。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バイオマス生産・収量の向上や環境ストレス耐性の付与が期待されている。ショ糖リン酸合成酵素 (SPS) は植物葉におけるショ糖合成の鍵酵素として知られている。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つの遺伝子の受精器官における機能を検討したところ、葯においては *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。また、*OsSPS1* 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を検討したところ、成熟花粉割合は野生型 (WT) と *OsSPS1* が半分ノックアウト (KO) されたヘテロ個体で有意な差は見られなかった一方、花粉発芽率はヘテロ個体で約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

*Tos17* 挿入突然変異系統から *OsSPS1* がノックダウン (KD) された系統 (SPS1-KD 系統) を選抜し、また、RNAi 系統の作出および CRISPR/Cas9 システムを用いた SPS 遺伝子 KO 系統の作出を行い、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、SPS1-KD 系統 (KD-1、KD-2) および RNAi 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% に低下したが、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 系統を水田

圃場で栽培したところ、KD の最大 SPS 活性は WT の 44-59%に低下したが、生育、乾物生産および収量に差は見られなかった。以上の結果から、*OsSPS1* は葉身における主要な SPS アイソジーンであるが、最大 56% SPS 活性が低下しても糖代謝への影響は限定的で、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。

SPS 活性がさらに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* と葉身で比較的発現が高い *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 活性は、*sps1* は WT と比較して 54%に、*sps1/sps11* は 16%に低下した。葉身の糖・デンプン濃度は、*sps1* と WT に有意な差は見られなかったが、*sps1/sps11* は葉身のデンプン濃度が有意に高かった。しかし、草丈および莖数については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、葉身のデンプン濃度は上昇するが生育には影響しないことが明らかとなった。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、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

植物は日長、温度など様々な環境要因に応じて糖・デンプン代謝を変化させているが、その際に SPS が重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、SPS 活性が WT と比較して 44-65%に低下している *SPS1-KD* 系統 (KD-2) を短日、強光、連続光、低温および高 CO<sub>2</sub> 濃度条件において栽培し、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。以上から、短日、強光、連続光、低温、高 CO<sub>2</sub> といった SPS が重要な役割を果たしていると考えられる様々な条件においても *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、2. で示された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た。また、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当てはまらないことが示された。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。

これらの研究成果は、学術上・応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。