

日本応用糖質科学会 2020 年度大会 (第 69 回)・応用糖質科学シンポジウム

一般講演・シンポジウム講演要旨

イネの栄養器官で発現する澱粉粒結合型スターチシンターゼ (GBSS) II の機能解析

¹秋田県大・生物資源, ²東大院・農学生命, ³神戸大院・資源生命

○高橋陽希¹, 森田隆太郎², 三浦聡子¹, クロフツ尚子¹, 青木直大², 深山浩³, 藤田直子¹

【背景・目的】多くの植物は葉のような栄養器官で昼間に光合成を行い、葉緑体に澱粉を蓄積するが、夜間はこれを分解して成長等のためのエネルギー源として用いる。生殖成長に移行すると、栄養器官の澱粉は分解されてショ糖として貯蔵器官まで転流され、そこで澱粉が再合成される。我々は、これまで、イネ胚乳の澱粉生合成の研究を行ってきたが、そのほとんどが胚乳で強い発現のある酵素が対象であった。これらの酵素の変異体はほぼ単離され、変異体と野生型の澱粉構造や性質の違いから、各酵素の機能を明確にしてきた。一方、栄養器官で強い発現のある酵素の変異体は、例えば、スターチシンターゼ (SS) IIIb の変異体 (*ss3b*) は既に得られていたが、胚乳澱粉の構造は野生型とほとんど変化がなく、その機能は不明のままであった。一方、*ss3b* の葉鞘や葉身澱粉の構造を調べると、野生型のアミロペクチンと比べて、DP37 以上の長鎖が減少していたことから、SS IIIb は、機能としては胚乳で強い発現のある SS IIIa に相当し、栄養器官のアミロペクチンの長鎖伸長に関与していることが明らかになった (森田ら、2019 年度本学会一般講演)。しかし、栄養器官で強い発現のある酵素の研究は、胚乳と比べるとほとんど行われておらず、その機能解明もなされていない。栄養器官での澱粉生合成関連酵素の機能解明が進むことで、イネ植物体全体の澱粉生合成の全容解明、飼料用イネの開発、光合成産物を収量増加につなげる研究に貢献すると思われる。

澱粉粒結合型スターチシンターゼ (GBSS) I は、胚乳澱粉のアミロース合成に関与し、この酵素の変異体 (*gbss1* あるいは *waxy*) は、胚乳澱粉が糯性を示すが、GBSS II というもう一つのアイソザイムは、主として栄養器官で発現していることが分かっている (Rice XPro)。しかし、これまで GBSS II の変異体は得られていなかったため、その機能は、不明のままであった。本研究では、栄養器官で強い発現のある GBSS II の変異体を作成し、その葉鞘や葉身澱粉の性質を調べ、GBSS II の機能を明確にすることを目的とした。

【材料・方法】日本晴の GBSS II をコードする遺伝子を CRISPR-Cas9 法を用いて欠損させたところ、変異個所が異なる 2 系統 (*gbss2-5-2* および *gbss2-12-2*) の植物体を得られた。*gbss2-5-2* は、標的配列中にチミン 1 塩基が挿入されており、*gbss2-12-2* は標的配列の上流の 60 塩基が標的配列に重複挿入されていた。これらの変異を野生型と見分けるための分子マーカーを構築し、M₂ 種子の幼苗から DNA を抽出し、ホモ個体を選抜した後、組換え体温室で栽培した。天気の良い日の夕方に採取した葉鞘を液体窒素で凍結し、粉碎機で粉碎し抽出バッファーを加えて混合し、100 μm から 15 μm の 4 種類のメッシュで順番に濾した。遠心分離で沈殿を集め、抽出バッファーで再懸濁液したものを Percoll 溶液に重層し、遠心分離した。沈殿を SDS を含むバッファーと蒸留水で洗浄した後、減圧乾燥させた。得られた葉鞘澱粉は、ゲルろ過法による見かけのアミロース含量の測定に用いた。

【結果・考察】精製した葉鞘澱粉をヨウ素で染めると、日本晴の葉鞘澱粉より赤い色調であった。澱粉ヨウ素複合体の最大吸収波長を調べると、日本晴が 587 nm であるのに対し、*gbss2-5-2* が 543 nm、*gbss2-12-2* が 540 nm と明らかに低かった。そこで、葉鞘澱粉をイソアミラーゼで枝切りし、Toyo-Pearl HW55S-HW50S x 3 カラムを用いてゲルろ過法で分離したところ、日本晴の葉鞘澱粉の見かけのアミロース含量が 20.5% であるのに対し、*gbss2-5-2* が 1.4%、*gbss2-12-2* が 2.1% と、著しく低い値を示した。以上のように、CRISPR-Cas9 法で得た *gbss2* の 2 系統の葉鞘澱粉のアミロース含量はゼロに近いことが明らかになり、イネの GBSS II は、葉鞘澱粉のアミロース合成に関与していることが示唆された。

Functional analyses of starch granule-bound starch synthase II (GBSSII) expressed in vegetative organs of rice.