Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-23

イネ栄養器官におけるデンプン合成制御メカニズムに関する研究

森田，隆太郎

(Degree)
博士（農学）

(Date of Degree)
2017-03-25

(Date of Publication)
2019-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6943号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006943

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博士論文

イネ栄養器官におけるデンプン合成制御メカニズムに関する研究

平成 **29** 年 **2** 月

神戸大学大学院農学研究科

森田　隆太郎

目次

緒論 1

第 1 章　高 CO_2 条件下で発現促進されるイネの新規な遺伝子 *CO_2 Responsive CCT Protein* (*CRCT*) の機能解析 8

材料と方法 9

結果 22

考察 61

摘要 66

第 2 章　高 CO_2 条件下で発現促進される *CRCT* の発現量が高 CO_2 条件下におけるイネの光合成と生育に与える影響の解析 67

材料と方法 68

結果 72

考察 84

摘要 88

第 3 章　CRCT がデンプン生合成関連酵素の発現とデンプンの構造に及ぼす効果 90

材料と方法 91

結果 96

考察 113

摘要 119

第 4 章　CRCT が稲わらを用いたバイオエタノール生産効率に及ぼす効果 121

材料と方法 122

結果 125

考察 134

摘要 137

謝辞 138

略語一覧

5-HMF: 5-hydroxymethylfurfural，ヒドロキシメチルフルフラール

ADP-Glc: ADP-glucose, ADP-グルコース

AGPL1: adp-glucose pyrophosphorylase large subunit1, ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit1

AGPL3: adp-glucose pyrophosphorylase large subunit3, ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit3

AGPS1: adp-glucose pyrophosphorylase small subunit1, ADP-グルコースピロホスホリラーゼ small subunit1

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

BE: branching enzyme，枝作り酵素

BEI: branching enzymeI，枝作り酵素 I

BEIIa: branching enzymeIIa，枝作り酵素 IIa

BEIIb: branching enzymeIIb，枝作り酵素 IIb

BPB: bromo phenol blue，ブロモフェノールブルー

CBB: coomassie brilliant blue，クマシーブリリアントブルー

CCT: CONSTANS, CONSTANS-like, and Time of Chlorophyll a/b Binding Protein Expression1

CRCT: $\underline{C}O_2$ $\underline{R}$esponsive $\underline{C}\underline{C}\underline{T}$ Protein

DBE: debranching enzyme，枝切り酵素

DDT: dithiothreitol，ジチオレイトール

DP: degree of polymerization，グルコースの重合度

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

FACE: Free Air CO_2 Enrichment

GBSS: granule bound starch synthase，顆粒結合型デンプン合成酵素

GBSSI: granule bound starch synthase I，顆粒結合型デンプン合成酵素 I

GBSSII: granule bound starch synthase II，顆粒結合型デンプン合成酵素 II

GPT1: glucose-6-phosphate transporter1，グルコース-6-リン酸輸送体 1

GPT2: glucose-6-phosphate transporter2，グルコース-6-リン酸輸送体 2

GWD: glucan, wter dikinase

ISA1: isoamylase1，イソアミラーゼ 1

ISA: isoamylase, イソアミラーゼ

LPA: loose plant architecture

PROG1: PROSTRATE GROWTH 1

PUL: pullanase, プルラナーゼ

Pho1: α-glucan phosphorylase, α-グルカンホスホリラーゼ

PWD: phosphoglucan, water dikinase

Rubisco: Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ

SDS: sodium dodecyl sulfate, ラウリン酸ナトリウム

SS: starch synthase, デンプン合成酵素

SSI: starch synthase I, デンプン合成酵素 I

SSIIa: starch synthase IIa, デンプン合成酵素 IIa

SSIIb: starch synthase IIb, デンプン合成酵素 IIb

SSIIIa: starch synthase IIIa, デンプン合成酵素 IIIa

SSIIIb: starch synthase IIIb, デンプン合成酵素 IIIb

TAC1: tiller angel control 1

TOC1: time of chlorophyll a/b binding protein expression1

緒論

大気 CO_2 濃度は産業革命以降上昇し続けており，2015 年 12 月には有史以降初めて月別全大気二酸化炭素濃度が 400 ppm を超えた．2013 年 9 月には気候変動に関する政府間パネル (IPCC) 第 36 回総会がスウェーデンのストックホルムで開催され，そこで審議された IPCC 第 5 次評価報告書第 1 作業部会報告書（自然科学的根拠）では，気候システムの温暖化は疑う余地がなく，人間活動が 20 世紀半ば以降に観測された温暖化の主要因であった可能性が極めて高いことが報告された．同時に 1750 年以降の大気 CO_2 濃度の増加は, 地球のエネルギー収支の不均衡に最も大きく寄与していることも報告された．世界各国政府，様々な国際機関のもと CO_2 排出量削減のための政策がとられているが，今後とも大気 CO_2 濃度の上昇は疑うことなく進むと考えられている．また，現在世界人口は 73 億人を超え，国際連合によると 2050 年までに 97 億人に増えると予想されている．これらを踏まえると，増え続ける食料需要を満たすためには，大気 CO_2 濃度の増加による気候変動環境下で食糧増加を達成しなければならない．

植物の活動は気候変動に大きな影響を受け，さらにそれは地球環境に大きな影響を与える．そのため大気 CO_2 濃度の上昇が植物の生育にどのような影響を与えるかについて，数多くの研究がなされてきた (Ainsworth and Long, 2005; Terashima et al., 2014)．一般的に，高 CO_2 条件下で植物を育成すると草丈，茎の直径，分枝数，葉数が増加する (Ainsworth and Long, 2005; Cheng et al., 2009)．高 CO_2 条件下における代謝の変化としては，光合成速度の上昇，デンプンの蓄積量の増加が起こることが多くの C_3 植物で観察されている (Ainsworth and Long, 2005)．全体として，大気 CO_2 濃度の上昇は，ほとんどの C_3 植物において光合成の促進，生育や収量の増加をもたらす．しかしながら植物は長期間高 CO_2 条件に曝されると，しばしば光合成速度の低下 (光合成のダウンレギュレーション) が起きる．このため，高 CO_2 条件下での収量増加は予想されていたよりも小さくなる．その原因は直接的な CO_2 への応答ではなく，光合成産物の過剰蓄積や Rubisco 含量や葉内窒素含量の低下などの二次的な応答だと考えられている (Makino and Mae, 1999; Ainsworth and Long, 2005)．しかしながら，ジャガイモやハツカダイコンといった光合成産物の大きなシンク器官を持つ植物種では光合成のダウンレギュレーションが

起こりにくいことが報告されている (Sage et al., 1989; Usuda and Shimogawa, 1998). つまり，高 CO_2 応答は植物種によって異なり，生育，収量の促進効果も種に依存する．言い換えれば, 植物種によってはより高度に高 CO_2 条件に適応できるポテンシャルを持っていると考えられる．よって，作物の高 CO_2 応答の改良は食糧増産のための重要な育種ターゲットの 1 つであると言える．

イネは世界人口の約半数が主食とする重要な作物の 1 つであると同時に, 単子葉類のゲノム解析において重要なモデル植物でもある．イネを高 CO_2 条件下で育成すると，個々の葉の葉面積に影響は少ないが, 分げつ数が増加するため株全体の葉面積と穂数が増加する (Imai, 1995)．また高 CO_2 条件下では葉面積当たりの光合成速度の上昇が起こるため乾物重の増加が起きる (Rowland-Bamford et al., 1991; Baker et al., 1996). Hasegawa et al. (2013) によると Free Air CO_2 Enrichment (FACE) 実験下におけるイネの収量増加の程度は 3-36%であり，品種によって異なることを報告している．その収量増加の程度が品種によって異なるのは, 品種によって光合成のダウンレギュレーションの程度が異なるためと考えられる. イネにおける高 CO_2 条件下での光合成のダウンレギュレーションは葉面積あたりの窒素含量が低下するために起こると考えられている (Makino and Mae, 1999)．イネでは葉鞘が光合成産物のシンク器官として機能するため，葉身の光合成産物含量は比較的少ない. そのため窒素含量の低下は光合成産物の蓄積によるものではないと考えられる．しかしながら，これまで葉鞘のシンク能力が光合成のダウンレギュレーションを含む，葉身の光合成に与える影響は明らかにされてこなかった.

高 CO_2 条件下では光合成速度の上昇，光呼吸の抑制，呼吸の促進など，様々な代謝の変化が起きる (Leakey et al., 2009a, Leakey et al., 2009b). そのため植物の高 CO_2 応答には様々なシグナル伝達経路が関わっていると考えられている. 高 CO_2 条件で育成した植物の葉で起こる光合成産物の蓄積量の増加は，糖応答性の遺伝子の発現に影響を与える．ヘキソキナーゼ依存的シグナル伝達経路は最も解析の進んでいる糖シグナル伝達経路で，光合成に関わる遺伝子の発現を抑制する (Jang and Sheen, 1994; Jang and Sheen, 1997). イネでは 10 個のヘキソキナーゼが特定されている (Cho et al., 2008). そのうち，OsHKX5 と OsHKX6 はグルコースセンサーとして機能しているとしていると考えられている (Cho et al., 2009)．ヘキソキナーゼ以外には，SnRK1 が糖欠乏に応答して多くの

遺伝子の発現を調節していることが知られている (Baena-González and Sheen, 2008). また SnRK1 は，スクロースリン酸合成酵素や硝酸還元酵素のような一次代謝に関わる鍵酵素の活性調節にも働いている (Halford et al., 2003). 葉緑体や細胞質の酸化還元状態も糖応答性遺伝子の発現調節シグナルとして働く (Oswald et al., 2001). 高 CO_2 条件下の光合成速度の上昇は，葉内の無機リン酸レベルを減少させる場合がある (Sharkey, 1985). そのため無機リン酸応答性遺伝子の発現を制御する *PHR1* や *SIZ1* も植物の高 CO_2 応答に関わっている可能性がある (Rubio et al., 2012; Miura et al., 2005). 炭素 (糖) と窒素のバランス (C/N バランス) もまた光合成や窒素同化に関わる遺伝子の発現調節に関わる重要なシグナルである (Oliveira and Coruzzi, 1999; Martin et al., 2002). Dof 転写因子 (Yanagisawa et al., 2004) や PII-like タンパク質 (Hsieh et al., 1998; Ferrario-Méry et al., 2005) ，グルタミン受容体 (Kang et al., 2003) や CND/ATL31 ユビキチンリガーゼ (Sato et al., 2009) は植物の C/N バランスを感知し，炭素や窒素代謝を調節しているため，植物の高 CO_2 応答に関わる可能性がある．このように植物の高 CO_2 応答は糖だけではなく，酸化還元，無機リン酸，窒素，そしてそれらの相互作用といった様々なシグナル伝達経路が関わる複雑な応答である．しかしながら，それらのシグナル伝達経路がどのように, そしてどの程度実際の植物の高 CO_2 応答に関わっているかはほとんどわかっておらず, 植物の高 CO_2 応答の分子メカニズムは多くの解決されていない疑問が残っている.

高 CO_2 条件下で育成した植物で起こる生育や光合成速度の促進は, 窒素条件に影響を受けることが知られている (Stitt and Krapp, 1999). 窒素が不足している条件下では光合成や生育の促進は小さくなり，十分な条件下では光合成や生育の促進は大きくなる (Stitt and Krapp, 1999). また葉鞘におけるデンプン蓄積も同様に窒素条件による影響を受け，窒素が十分にある条件下ではデンプンの蓄積量は減少し，窒素が欠乏している条件下ではデンプン蓄積量は増加する (Hirano et al., 2005). 先行研究により，本研究室では高 CO_2 条件下で発現変化する機能未知な遺伝子を多数特定した (Fukayama et al., 2009). それらの遺伝子の中で，高 CO_2 条件下で発現促進され，窒素施肥量が多くなるにつれて発現が低下するという特徴を持った新規な CCT ドメインタンパク質遺伝子 *CO_2 responsive CCT Protein* (*CRCT*) を同定した．植物において，CCT ドメインタンパク質は花芽形成, 概日リズム，光応答シグナル経路に関わることが知られている (Putterill

et al., 1995; Strayer et al., 2000; Kaczorowski and Quail, 2003). さらに近年の研究により, CONSTANS や TOC1 (Time of Chlorophyll a/b Binding Protein Expression1) といった CCT ドメインタンパク質の CCT ドメインは DNA 結合ドメインとして機能すること, そしてそれらは転写因子である可能性が報告された (Tiwari et al., 2010; Gendron et al., 2012). 以上のことから, CRCT はイネの高 CO_2 応答に関わる転写調節因子である可能性が高いと予測された.

デンプンは植物の光合成反応により合成される貯蔵物質であり, 高 CO_2 条件下で蓄積が促進されることから植物の高 CO_2 応答において重要な物質である. また, デンプンは食料として利用される他, 工業的にも利用される非常に有用な物質である. デンプンは α-グルコースの重合体であるアミロースとアミロペクチンから構成される. アミロースは α-グルコースが α-1,4 グルコシド結合により連なり, グルコースの重合度 (DP) は数千にもなる直鎖状の巨大分子である (Hizukuri, 1995). アミロペクチンは直鎖状の α-1,4 グルコシド鎖と α-1,6 グルコシド結合による枝分かれからなり, 直鎖部分と枝分かれが局在することでクラスター構造を取っている (French, 1972). クラスターを構成するグルコース直鎖は, A 鎖, B 鎖, C 鎖の 3 つの単位鎖に分類される (Hizukuri, 1986). A 鎖はその鎖上に分岐を持たない比較的短い鎖である. B 鎖はその鎖上に他の単位鎖が α-1, 6 グルコシド結合により結合した分岐を持つ鎖である. C 鎖は還元末端をもつ鎖であり, 1 つのアミロペクチン分子に 1 つだけ存在する. アミロペクチンの隣接するクラスター同士は, タンデム状に連結し, 繰り返しと拡がりを持ちながら巨大分子を形成する. また, アミロペクチンのクラスター内部は結晶性の高い領域と結晶性が低い領域の 2 つの領域に分かれており, アミロースは非結晶領域に存在すると考えられている (Santelia and Zeeman, 2011). このようにデンプンは半結晶構造を取り, 水に不溶性となるため, 細胞内の浸透圧に影響を与えることなく, 光合成により合成したグルコースをデンプンとして大量に蓄積できる.

デンプンは主に ADP-グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase), デンプン合成酵素 (SS), 枝作り酵素 (BE), 枝切り酵素 (DBE)によって触媒される反応により生合成される (Pfister and Zeeman, 2016). AGPase はグルコース-1-リン酸 (G-1-P)と ATP を反応基質とし, デンプン合成酵素の基質である ADP-グルコースを合成する反応を触媒する. SS

は ADP-グルコースを α-1,4 グルカン鎖の非還元末端の 4 位の炭素に付加することによって，α-1,4 グルカン鎖を伸長する反応を触媒する．BE は α-1,4 グルカン鎖の非還元末端から一定のグルコース鎖を別のグルコース鎖の 6 位の炭素に転移させ，α-1,6 グリコシド結合を生成する反応を触媒する．DBE は不適切な部位に合成された枝分かれ部分の α-1-6 グルコシド結合を加水分解し，アミロペクチンをトリミングする．これらの酵素が協調的に働くことによってデンプンは規則性の高い半結晶構造となる. イネの胚乳では変異体を用いた解析によりデンプン生合成メカニズムの実態が明らかにされつつあり，アミロペクチン合成には SS と BE が中心的な役割を果たすことが知られている (Fujita, 2014)．イネ胚乳では 3 つの SS 遺伝子，デンプン合成酵素 I (SSI), デンプン合成酵素 IIa (SSIIa), デンプン合成酵素 IIIa (SSIIIa)と 2 つの BE 遺伝子枝作り酵素 I (BEI), 枝作り酵素 (BEIIb)が主に機能している．SSI は DP 6-7 の短いグルカン鎖を DP8-12 に伸長し (Fujita et al., 2006), SSIIa は DP6-12 のグルカン鎖を伸長し DP13-24 の A 鎖と B 鎖を合成する (Nakamura et al., 2005)．さらに SSIIIa は幅広い長さの鎖を伸長し，長い B 鎖を合成する (Fujita et al., 2007)．また， BEI は非還元末端から DP10-12 の α-1-4 グルカン鎖を半結晶領域に転移しアミロペクチンの B 鎖の形成，すなわちアミロペクチンクラスター基部の分岐を形成する役割を担っている (Satoh et al., 2003)．BEIIb は DP6-7 の短い α-1-4 グルカン鎖を半結晶領域に転移し，アミロペクチンの A 鎖を合成する (Nishi et al., 2001)．一方でアミロースはデンプン粒結合型デンプン合成酵素 (GBSS) によってのみ合成され, イネ胚乳では GBSSI がその機能を担っている (Wang et al., 1990). 以上のようにイネにおけるデンプンの合成メカニズムは胚乳で詳細に研究されている．

胚乳における貯蔵デンプンの合成メカニズムに比べ, イネ葉身や葉鞘といった栄養器官における同化デンプンの合成メカニズムはほとんど明らかにされていない．しかし，栄養器官に蓄積されたデンプンは夜間に分解され，シンク器官に転流されたり，夜間のエネルギー源となることが知られている (Stitt and Zeeman, 2012)．さらに，イネの葉鞘や稈からなる茎葉部は栄養成長期における光合成産物の一時的な貯蔵器官として機能していることが知られており, 一時的に蓄えられたデンプンは生殖成長期に胚乳に再転流され，最終収量の約 30%を担うことが報告されている (Cook and Yoshida, 1972)．このように栄養器官におけるデンプン蓄積はイネの生長や収量を考える上で非常に重要な

形質である．また，栄養器官におけるデンプン合成は光合成産物量のみならず，栄養条件，光条件，温度条件にも影響を受ける．それらの要因は転写制御，翻訳後制御，タンパク質複合体の形成や酵素の酸化還元制御といったデンプン合成の様々な段階に影響を与える (Fukayama et al., 2011; D'Hulst et al., 2015; Suzuki et al., 2015; Ma et al., 2016)．しかしながら，それらの変化がデンプンの構造に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない．

CO_2 排出量を減らし，大気 CO_2 濃度の上昇を食い止めるためには石油化学工業から脱却し，植物バイオマスを利用する天然資源化学工業への移行が必要不可欠である．近年，特に注目されているのがバイオ燃料である (Kim and Dale, 2004)．バイオ燃料は植物の光合成反応により大気中から固定された CO_2 から成るため，カーボンニュートラルの観点から CO_2 濃度の増加の抑制に大きく貢献できるとされている．しかしながら，現在バイオエタノール生産に使われるトウモロコシ，サトウキビ，コムギ，キャッサバは食料としても重要な作物である．これらの原料のバイオエタノール生産への利用は食料供給との競合が起こり，2007-2008 年の世界食料価格危機を引き起こした原因の一つであるとされている．それを考慮すると，今後のバイオエタノール生産には食料と競合しないバイオマスの利用が求められている．イネは世界中で栽培され，その生産量はトウモロコシ，コムギついで世界で 3 番目に多い．イネの種子は食料として利用されるが，稲わらは農業残渣として扱われ，その生産量は全世界で 7 億トンを超える (Kim and Dale, 2004)．さらに，稲わらにはデンプンやセルロースといったバイオエタノール生産に利用できる多糖類を含むことから，稲わらを利用したバイオエタノール生産が注目されている．デンプンやセルロースをエタノール発酵に利用する際には，微生物が発酵可能な単糖に加水分解する必要がある．デンプンは比較的分解されやすく，容易にエタノール発酵に利用できる．セルロースを利用するためにはセルラーゼによる加水分解が必要であるが，ヘミセルロースやリグニンと強固な細胞壁を形成しているためセルロースの酵素反応性は低い．よって，セルロースを利用する際には，細胞壁構造を破壊し酵素反応性を上げるために前処理が必要不可欠である．そのようなバイオマスの前処理方法には様々な方法があり，希硫酸処理法，水熱処理法，水酸化ナトリウム処理などが開発されている (Alvira et al., 2010).

バイオエタノール生産効率を高めるためには, バイオエタノールの生産プロセスの改良だけではなく植物の改良も非常に効果的である．イネ科草本で見られる *Brown midrib* 変異体は，中肋が茶色になる表現型を示すリグニン生合成系の欠損変異体である．この表現型を示すトウモロコシやソルガムの変異体は消化性が優れるため古くから飼料として利用されており, 近年はバイオエタノール生産にも利用されている (Vermerris et al., 2007)．また，Ookawa et al. (2014) が開発したリーフスターは，リグニンモノマーの生合成の初発反応を触媒する cinnamyl-alcohol dehydrogenase に自然変異が起きているためリグニン含量が少なく，バイオエタノール生産に有望な品種である．また遺伝子工学的に植物を改良した報告もあり，Fu et al. (2010) はスイッチグラスのリグニン合成経路の遺伝子 caffeic acid 3-O- methyltransferase の発現を RNAi 法により減少させると，セルロースの糖化効率が増加することを報告している．しかし，これらの報告はセルロースの糖化効率を高めるためにリグニン含量を減少させたものであり, より糖化効率の高いデンプンの含量の改良を目指した報告はほとんどない.

以上のことを考えると, 将来的な高 CO_2 環境における農業生産の増大並びに環境問題の解決に栄養器官におけるデンプン蓄積メカニズムの解明が道を開く可能性が考えられる.

第 1 章では *CRCT* の発現解析や *CRCT* 形質転換イネを用いた生理機能解析を行い, CRCT がイネの栄養成長期におけるシンク器官である葉鞘において, デンプン合成関連遺伝子の発現を制御するマスター遺伝子であり, デンプン蓄積量を決定する遺伝子であることを報告する． 第 2 章では第 1 章で述べたように，葉鞘のデンプン合成能力が高い *CRCT* 高発現形質転換イネ，低い *CRCT* 発現抑制形質転換イネを大気 CO_2 条件と高 CO_2 条件で育成し，葉鞘のデンプン合成能力がイネの光合成や生育に与える効果を報告する．第 3 章では，CRCT によるイネ葉鞘におけるデンプン合成制御メカニズムをタンパク質レベルで解析し，それがデンプンの構造に与える影響を報告する．第 4 章では，稲わらにデンプンが高蓄積している *CRCT* 高発現形質転換イネを用いて，CRCT がバイオエタノール生産効率に与える効果について報告する.

第 1 章

高 CO_2 条件下で発現促進されるイネの新規な遺伝子 *CO_2 Responsive CCT Protein* (*CRCT*) の機能解析

CRCT は第 5 染色体に存在し，エキソン 4 個，イントロン 3 個で構成される遺伝子であり，308 アミノ酸残基のタンパク質をコードしている (杉野, 2009). CRCT は TOC1, Zinc Finger Protein Expression in Inflorescence Meristem Like (ZML)，CONSTANS といった他の代表的な CCT ドメインタンパク質とは異なり，ジンクフィンガードメインを持たないことがわかっている (杉野，2009). また，*CRCT* のオーソログ遺伝子はソルガム (*Sorghum bicolor* L.) やブドウ (*Vitis vinifera* L.) などにも存在することから，CRCT は植物に広く保存されていると考えられる (杉野，2009). *CRCT* はグルコースやスクロースといった光合成産物によって発現促進され, 様々な器官の維管束で発現することが報告されている (杉野，2011). さらに，*CRCT* 高発現形質転換イネと *CRCT* 発現抑制形質転換イネを用いた *CRCT* の機能解析では，*CRCT* の発現量はイネの生育に大きな影響を与えないこと，*CRCT* の発現量は葉身における遺伝子の発現量に大きな影響を与えないことがわかっている (杉野，2011). 以上のように，CRCT は高 CO_2 の効果により高くなった光合成活性を維管束で感受し，発現促進される遺伝子であると推察されているが，その機能の詳細は明らかにされていない.

本章では CRCT の機能を明らかにするため，*CRCT* の発現解析や *CRCT* 形質転換イネを用いた生理解析を行った.

材料と方法

1-1　GFP を用いた CRCT タンパク質の細胞内局在性の解析

1-1-1　プラスミドのコンストラクション

全長 CRCT-GFP (FL-CRCT-GFP) と CCT ドメイン-GFP (CCT-GFP) の 2 つのコンストラクトを作成した．まず，FL-CRCT-GFP のコンストラクションでは， pBI-Act1-OsCCT プラスミド (杉野，2011) をテンプレートとしプライマー (表 1) を用いて PCR 法によって全長 *CRCT* を増幅させた．PCR 産物はエタノール沈殿法と QIA quick PCR Purification kit (QIAGEN) を利用して精製し，これをインサートとした．pHT-Ⅱプラスミドを *Nco* Ⅰで制限酵素処理し，T_4DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs) を用いて切断末端をブラント化した．さらに *Sal*1 で処理し，*Sal*1 により制限酵素処理したインサートとライゲーションした．これを FL-CRCT-GFP とした．CCT-GFP のコンストラクトの作成においても，pBI-Act1-OsCCT プラスミドをテンプレートとした．CRCT の C 末端にある CCT ドメインのみを含む DNA 断片が得られるようにプライマーを設計し (表 1)，CCT ドメインを含む領域を PCR 法にて増幅した．PCR 産物をインサートとし FL-CRCT-GFP の場合と同様の処理を行ってライゲーションした．

1-1-2　シークエンス及びプラスミドの複製

ライゲーション後の組換えプラスミドを Competent Cell Top10 (Invitrogen) にトランスフォーメーションした．大腸菌溶液を LB 寒天培地 (カルベニシリン 50 μg mL^{-1}) に植菌し 37°C で 1 晩培養した．発生したコロニーについて QuickTaq (TOYOBO) を用いてコロニーPCR を行った．得られた PCR 産物について Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてサイクルシークエンス反応にかけ，シークエンスサンプルを作出した. サイクルシークエンス反応に用いたプライマーは 2 つのコンストラクトとも 5’-35S-700 と sGFP-R1 を用いた．塩基配列は Genetic analyzer AB2310 (ABI)を用いて決定した. 目的の配列を含むコロニーを LB 液体培地 (カルベニシリン 50μg mL^{-1}) に移植して 37°C で 1 晩振とう培養した．翌日大腸菌溶液を QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した．

1-1-3　植物材料の準備

GFP の蛍光観察にはタマネギの表皮細胞を用いた. タマネギはスーパーマーケットで購入した．0.7%アガープレートに約 1 cm^2 角に切ったタマネギを並べた.

1-1-4　パーティクルガンによる遺伝子導入

5 分間ボルテックスし再懸濁した金属粒子ストック (マイクロキャリアパッケージ 1.0μ 金粒子; Bio-Rad) から，3 mg (50 μL) の金属粒子をとり，5 μg のプラスミドと，終濃度で 1 M の $CaCl_2$ と 16 mM のスペルミジンを加え，2〜3 分間ボルテックスした．1 分間静置して微粒子を沈殿させた後，12,000 g，20°C で 5 分間遠心し，上澄みを除去した．沈殿を 140 μL の 70%エタノールと 100%エタノールで洗浄した後，48 μL の 100%エタノールを加え低速でボルテックスし，沈殿を再懸濁した．この微粒子を 6 μL ずつマイクロキャリアの中心に載せ，パーティクルデリバリーシステム (PDS-1000/He; BIO-RAD) を用いてタマネギ表皮細胞にプラスミドを導入した．1 つのコンストラクトにつき 0.7%アガープレート 2 枚，1 枚のプレートにつき 2 回ずつ打ち込んだ. その後プレートは暗所に 1 晩おいた.

1-1-5　GFP 蛍光，DAPI 染色の観察

タマネギの表皮のみを剥ぎ取り, スライドグラスに空気を逃しながら平らになるように載せその上に DAPI 染色液を 20 μL 滴下した．その上に気泡が入らないようカバーガラスをかけ，蛍光顕微鏡 (BX51; OLYMPUS) で GFP 蛍光と DAPI 染色を観察しデジタルカメラ (DS-Fi1; Nikon) で撮影した.

1-2　*CRCT* の発現解析

1-2-1　*CRCT* の発現の高 CO_2 応答 (材料の育成)

日本型水稲日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) を供試材料とした．完熟種子を，界面活性剤 Tween 20 を 1 滴加えた次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度 1%) で約 30 分間，スターラーでゆっくり撹拌しながら滅菌した．水道水で十分洗浄した後，ビーカーに 1 cm ほどの水を入れ，30°C で 1-2 日置き催芽させた．鳩胸状になった種子

を育苗培養土 (くみあい粒状培土; 揖斐川工業) が入った株まきポットに播き，光強度と CO_2 濃度を制御できる人工気象器 (NC-350HC-INSS;日本医科器械製作所) 内で育成した．栽培条件は明期 14 h で気温 30°C，暗期は 10 h で気温 23°C とし 1 日を通して湿度は 70%に設定した．大気 CO_2 条件下で日本晴を 4.8 葉齢まで育成し、そのまま大気 CO_2 条件 (380 ppm) で育成する実験区と高 CO_2 条件 (1000 ppm) で育成する実験区に分けることで CO_2 処理を開始した．処理開始日を 0 日目とし，処理開始後 1，2，4 日目に第 4 葉葉身より上位に展開している葉身を 3 個体からサンプリングし，これを 1 反復とした．

1-2-2　*CRCT* の発現の日変化 (材料の育成)

日本晴を供試材料として 1-2-1 の方法で予措し，人工気象器 (NC-350HC-INSS;日本医科器械製作所) 内で 5.0 葉齢まで育成した． 3 時間おきに，展開している葉身全てを 3 個体からサンプリングし，これを 1 反復とした．

1-2-3　RNA の抽出と精製

RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて，RNA の抽出と精製を行った．凍結保存しておいたサンプル葉を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて破砕し，サンプル 100 mg に対して 1%メルカプトエタノールを加えた RLT 溶液を加えボルテックスをかけた．15,000 rpm で 5 分間遠心分離し，上澄みを QIAshredder に移し，再度 15,000 rpm で 2 分間遠心分離した．QIAshredder 通過液を 450 µL 新しいチューブに移し，225 µL の 100%エタノールを添加してよく混合した．すべてのサンプルを RNeasy mini spin column にのせ，13,000 rpm で 1 分間遠心分離し，通過液を捨てた．700 µL の RW1 洗浄液を RNeasy mini spin column に添加し，13,000 rpm で 1 分間遠心分離し，通過液を捨てた．500 µL の RPE 溶液を添加して，13,000 rpm で 1 分間遠心分離して，通過液を捨てた．この操作を 2 回繰り返した後，カラムを新しいチューブにセットし RNase free water 45 µL を添加し，8,000 rpm で 1 分間遠心分離し，トータル RNA を溶出させた．なお，遠心分離にはすべて MX-105 (TOMY) を用いた．

1-2-4　DNase 処理

DNase 処理は Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (Nippon Gene) を用いた．抽出した RNA 溶液から RNA を 2.0 μg 取り，1/5×Deoxyribonuclease (RT Grade) を 0.5 μl, 10×DNase (RT Grade) Buffer II を 2.5 μl 加え RNase free water で全量を 25 μl とした. 37°C に加温したヒートブロックで 15 分間加温処理した後, Stop Solution を 2.5 μL 加え, 70°C で 10 分間加温して酵素を失活させた.

1-2-5　cDNA の合成

Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて, cDNA を合成した. 1.5 mL チューブに 50 μM Oligo dT Primer を 1 μL，10 mM dNTP Mixture を 1 μL，DNase 処理済みの RNA を 4 μL 取り，RNase free water を加えて全量を 10 μL にした．65°C で 5 分間インキュベートし，その後 2 分間氷冷した．さらに 5×Buffer を 4 μL，RNase inhibitor を 0.5 μL，Prime Script RTase を 1 μL，RNase free water を 4.5 μL 加え 42°C で 1 時間反応させ，cDNA を合成した．反応後に 70°C で 15 分間加熱し逆転写酵素の失活を行った．サンプルに 30 μL の TE を加えて全量を 50 μL とした後に-80°C で保存した.

1-2-6 リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

CRCT について，遺伝子特異的プライマー (表 1) を用いてリアルタイム PCR 反応を行い，遺伝子発現を定量的に解析した．リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq GC (TaKaRa) を用いた．また反応には Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いた．リアルタイム PCR 用チューブに H_2O 9.5 μL，2×SYBR Permix Ex Taq GC 12.5 μL, 10 μL Forword Primer，10 μL Reverse Primer，Template cDNA 2 μL を加え，PCR 反応を行った．内部コントロールとして，*Actin* の発現解析も行った．Ct 値は 2nd Derivative Maximum 法により算出し，相対定量の計算は ΔΔCt 法により行った.

1-3　*CRCT* の発現の C/N 応答

1-3-1　材料の育成

日本晴の種子を次亜塩素酸ナトリウムで殺菌し，30°C で 2 日間無菌発芽させた．鳩

胸状になった種子を，グルコース (450 mM) と硝酸アンモニウム (30 mM) の添加，または添加していない改変 MS 培地 (糖，窒素，MS vitamins を添加しない) で 5 日間育成することにより C/N 処理を行った．栽培条件は明期 14 h で気温 30°C，暗期は 10 h で気温 23°C とした．

1-3-2 生長解析

C/N 処理を行った植物体から胚乳を取り除き，シュート長，新鮮重を測定した．測定が終わったサンプルは素早く液体窒素で凍結させ，クロロフィル含量と遺伝子発現の解析に用いた．

1-3-3 クロロフィル含量の測定

凍結させておいたサンプルを乳鉢と乳棒で磨砕し，粉末を 15 mL のファルコンチューブに回収した．乳鉢と乳棒は 1 mL のアセトンで洗い，溶液をファルコンチューブに移した．この作業を 3 回繰り返した．冷蔵庫の中に 1 日置いて色素を抽出した．沈殿が白いことを確認し，5 分間 11,900 g で遠心分離した．得られた上澄みは分光光度計 (UV-1800; SHIMADZU) を用いて，750 nm，663.6 nm，646.6 nm の吸光度を測定し，Porra et al. (1989) の方法によりクロロフィル含量を算出した．

1-3-4 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

1-2 の方法で，サンプルから RNA の抽出と精製を行い，cDNA を合成した．合成した cDNA を鋳型として，QuickTaq (TOYOBO) を用いて，PCR 反応を行った．アガロースゲルで 5 μL の PCR 産物を電気泳動し (泳動バッファー；1 ×TAE)，プリントグラフ (AE-6911FXFD; ATTA) で紫外線照射することにより PCR 産物を確認した

1-4 *CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネを用いた発現解析

1-4-1 材料の育成

本研究室で作出した *CRCT* プロモーター:*GUS* 形質転換イネ (杉野, 2011) を用いた．1-2 の方法で育成した後， 4.8 葉齢期になった個体を以下の実験に用いた．

1-4-2　株元の GUS 染色

CRCT プロモーター：*GUS* 形質転換イネの株元約 1 cm を切断し，根も取り除いた．株元を縦断したサンプルを 2 mL マイクロチューブに入れ，GUS 染色液 (0.5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta delta-glucuronic acid, 0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, 45 mM NaH_2PO_4, 0.05% (w/v) Triton X-100, pH7.0) に浸しながら 30 分間アスピレーターで脱気した．1 晩 37°C でインキュベートし染色した．固定液 (5% (v/v) ホルムアルデヒド) で 10 分間振とうしながら固定した後 70%エタノールで 1 日脱色した．また株元約 1 cm を横に 6 等分したサンプルは 96 穴プレートに入れて同様に染色した．サンプルは実体顕微鏡 (SZX9; OLYMPUS) で観察してデジタルカメラ (Ds-Fi1; Nikon) を用いて画像を撮影した．

1-5　*CRCT* 形質転換イネを用いた生理解析

1-5-1　材料の育成

杉野 (2011) が作出した *CRCT* 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制イネ，非形質転換イネ (日本晴) を解析に用いた．イネは 1-2 の方法で播種し，育成した．またマイクロアレイ解析に用いた *CRCT* 形質転換イネは農学部ファイトトロン内で育成した．

1-5-2　可溶性糖とデンプン含量の解析

6.5 葉齢のイネから第 5 葉の葉鞘と第 6 葉の葉身をサンプリングし，新鮮重を測定後，速やかに液体窒素で凍結した．凍結したサンプルを液体窒素中で，乳鉢と乳棒を用いて粉砕した．粉末に 80% (v/v) エタノールを 2 mL 加え，先切りした 1 mL チップを使って 15 mL のファルコンチューブに移した．乳棒と乳鉢を 2 mL のエタノールで洗い，溶液をファルコンチューブに移した．この作業を 2 回繰り返した．10,000 g で遠心分離し，上澄みを 50 mL のナス型フラスコに移した．沈殿に 80% エタノールを加え，ボルテックスで撹拌し，遠心分離した．この上澄みを 50 mL のナス型フラスコに移した．この作業を 2 回繰り返した．ファルコンチューブに残った沈殿はアスピレーターを用いて乾燥させ，デンプン含量の測定に用いた．ナス型フラスコに入った溶液はロータリーエバポレーターを用いて乾固しないように濃縮した．濃縮液を 15 mL ファルコンチューブ

に移し，ナス型フラスコを超純水で洗った．洗浄液はファルコンチューブに回収し，超純水で全量を 5 mL とした．クロロホルムを 5 mL 加え，ボルテックスで撹拌した後，10,000 g で遠心分離し上澄みを可溶性糖含量の測定に用いた．デンプン含量測定用に乾燥させておいた沈殿に濃塩酸を 0.2 mL，DMSO を 0.8 mL 加えボルテックスで撹拌し，60°C で 30 分間加温した. 1 mL 超純水を加え, pH を 4.5 に合わせ, 全量を 4 mL とした．その溶液を 10,000 g で遠心分離し，得られた上澄みをデンプン含量の測定に用いた．グルコース，フルクトース，スクロース含量の測定には ENZYTEC D-Glc/D-Flc/D-Suc kit (r-biopharm) を，デンプン含量の測定には ENZYTEC starch kit (r-biopharm) をそれぞれ用いた．

1-5-3　*CRCT* 形質転換イネの各部位のデンプン蓄積の観察

6.5 葉齢のイネから第 5 葉の葉鞘と第 6 葉の葉身をサンプリングし，100%エタノールで一晩脱色した．1 時間蒸留水に浸した後，1%ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で組織中のデンプンを染色した．栄養生長期の個体から根，生殖生長期の個体から稈と穎花をそれぞれサンプリングし，同様の方法で染色した．

1-5-4　葉身や葉鞘の細胞内のデンプン粒の観察

デンプン粒の観察は Ishikawa et al. (2011) の方法で行った．5.0 葉齢の *CRCT* 形質転換イネから第 3 葉鞘と第 4 葉身をサンプリングし, FAA 固定液 (5% (v/v) ホルムアルデヒド, 5% (v/v) 酢酸，63% (v/v) エタノール) で固定した．固定したサンプルを 70，80，90，95，99.8，100% (v/v) エタノールで 1 時間ごと処理し，50%テクノビット溶液 (エタノール：テクノビット＝１：１) で処理し，2 日間冷蔵庫で保存した．次に 100%テクノビット溶液で処理し，2 日間冷蔵庫で保存した．この処理をさらに 1 回行った．サンプルを 2 mL の包埋液 (テクノビット 1.875 mL，hardener 0.125 mL) で包埋した．ミクロトームで薄切片を作製し，0.5% (w/v) ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した．作製したプレポラートを光学顕微鏡 (SZX9; OLYMPUS) で観察し，デジタルカメラ (Ds-Fi1; Nikon) を用いて撮影した．

1-5-5　マイクロアレイ解析による遺伝子発現の網羅的解析

1-2 の方法で *CRCT* 形質転換イネを 6.5 葉齢まで育成し，第 5 葉の葉鞘をサンプリングし，1-2 の方法で全 RNA を抽出，精製した．以下の実験は農業生物資源研究所マイクロアレイ解析室において行った．抽出，精製した全 RNA より，Low RNA Input Linear Amplification Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いて Cyanine-3 または Cyanine-5 でラベリングして cRNA を作製した．全 RNA サンプル (400 ng) に，Spike-in RNA 1 μL, T7 Promoter Primer 0.6 μL, Nuclease Free water を加えた．混合液中の RNA を 65°C, 10 分間の処理で熱変性させ，氷水で 5 分間急冷した．次に，あらかじめ 65°C に温めておいた 5×First Stand Buffer 2.0 μL, 0.1 M DTT 1.0 μL, 10 mM dNTP Mix 0.5 μL, NMLV-RT 0.5 μL, RNaseOUT 0.25 μL を加え，40°C 2 時間恒温槽でインキュベーションした．その後，その混合液を 65°C, 15 分間処理し，氷水で 5 分間急冷した．Cyanine-3 または Cyanine-5 でラベルされた CTP をそれぞれ 10 mM 加え, Nuclease-free water 7.65 μL, 4×Transcription Buffer 10 μL，0.1 M DTT 3.0 μL，NTP Mix 4.0 μL，50% PEG 3.2 μL，RNaseOUT 0.25 μL, Inorganic Pyrophosphatase 0.3 μL，T7 RNA Polymerase 0.4 μL を混合しスピンダウンした後, 遮光下で 40°C 2 時間恒温槽でインキュベートした. ラベル化された cRNA は, RNase Plant Mini kit (QUIAGEN)で精製した．次に，ハイブリダイゼーション溶液を作成した．Cyanine-3 ラベル化 cRNA, Cyanine-5 ラベル化 cRNA 各 825 ng, 10×Blocking Agent 11 μL, Nuclease-free water を混合し，25×Fragmentation buffer 2.5 μL を加えトータル 55.0 μL に調整した. 充分にボルテックスした後, 遮光下で 60°C 30 分でインキュベーションした．2 分間の急冷後 2×GE buffer 55.0 μL を加え，ピペットで緩やかに混合しハイブリダイゼーション液とした．作成したハイブリダイゼーション溶液を 44k Rice Oligo Microarray slide (Agilent Technologies) へ充填して，65°C, 17 時間, 10 rpm でハイブリダイゼーションした．ハイブリダイゼーション後，スライドを洗浄し，Cyanine-3 と Cyanine-5 の蛍光シグナルを DNA microarray scanner (Agilent Technologies)で検出した．得られたシグナルを Feature Extraction software (Agilent Technologies)で数値化した．

1-5-6　リアルタイム PCR による遺伝子発現の解析

1-5-5 と同様に育成した *CRCT* 形質転換イネの葉鞘から 1-2 の方法で全 RNA の抽出，

精製し cDNA を合成した. リアルタイム PCR は 1-2 の方法で行った. リアルタイム PCR に用いたプライマーは表 1 に示す.

1-6　ウエスタンブロット解析

1-6-1　材料の育成

1-2 の方法で育成した 6.5 葉齢の *CRCT* 形質転換イネから第 5 葉の葉鞘と第 6 葉の葉身をサンプリングし，速やかに液体窒素で凍結した.

1-6-2　タンパク質抽出

乳鉢に石英砂を加え，乳棒と共に冷蔵庫で冷却した．乳鉢に 2.0 mL の抽出バッファー (50 mM Hepes-KOH，5 mM $MgCl_2$，1 mM EDTA-Na_2，10% (w/v) Glycerol，5% (w/v) Insoluble PVP，5 mM DTT，0.01 mM leupeptin) を加え，氷上で乳鉢と乳棒を用いて磨砕した．1.5 mL チューブに磨砕液を 1 mL ほど移し，15,000 rpm，4°C で 5 分間遠心分離した．上澄みを新しいチューブに回収した.

1-6-3　可溶性タンパク質濃度の測定

可溶性タンパク質濃度は Bradford (1976) の方法に従い測定した. 2 mL チューブに 1.5 mL の Bradford 液 (0.01% (w/v) CBB G-250，5% (v/v) エタノール 8.5% (v/v) リン酸) を分注し，それぞれに可溶性タンパク質抽出液を 10 µL ずつ加えた. また標準として，0，0.5，1.0，1.5，2.0 mg mL^{-1} の Bovine serum albumine 溶液をそれぞれ 10 µL 加えたものを用いた．2~3 回反転し撹拌した後，マイクロプレートリーダー (iMark^{TM}; BIO-RAD) により吸光度 (OD 595 nm) を測定した．標準 BSA の吸光度から検量線を作成し，可溶性タンパク質濃度を計算した.

1-6-4　SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従って行った．ゲル濃度は，分離ゲル 10%，濃縮ゲル 5%とした．タンパク質の抽出液に，5×サンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0.002% (w/v) BPB, pH6.8) を 4:1 の割合で加え，100°C

で 3 分間煮沸した. ゲルの各レーンに 6.4 μg タンパク質を含むサンプル溶液をアプライし，70V で 30 分間，その後 110V で約 90 分間 (BPB が適当な位置に来るまで) 電気泳動を行った.

1-6-5　ウエスタンブロット

SDS-PAGE 後のゲルを, TGM 溶液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3) に浸した．Hypond-P (GE ヘルスケア) を 10 秒間メタノールに浸し，素早く使用する面を下にして超純水に入れて 5 分間振盪し，さらに TGM 溶液で 10 分間振盪した. セミドライブロッティング装置 (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell; BIO-RAD) を用いて，ゲル中のタンパク質を Hypond-P に転写した．ブロッティングは，10V で 2 時間通電することにより行った. ブロッティング後の Hypond-P は, TBS-T (20 mM Tris, 120 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20) で洗浄した後，ブロッキングバッファー (2% スキムミルク in TBS-T) で 2 時間振盪した. TBS-T で軽く洗浄した後, 抗 AGPase 抗体 (Agrisera) を TBS-T で 5000 倍に希釈した溶液中で 1 時間振盪した．TBS-T で洗浄した後，50000 倍に希釈した 2 次抗体 (Alkaline Phosphatase-conjugated affiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)) 中で 1 時間振盪した．TBS-T で軽く洗浄した後，Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア) の検出薬 A，B を 1:1 の割合で混合した溶液をブロットした面にのせ，5 分間おいた．X 線フィルムカセットにブロット面を上してメンブレンを置き，X 線フィルムに露光した．X 線フィルムの現像にはレンドール・レンフィクス (FUJIFILM) を使用した.

1-6-6　液体高速クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS)

SDS-PAGE ゲルから目的のバンドを切りだし，解析に用いるまで-80°C で保存した. LC-MS 解析は神戸大学研究基盤センターに依頼した.

1-7-1　*CRCT* 形質転換イネの開帳性と重力屈性の解析

1-7-1　材料の育成

1-2 の方法で育苗したイネを，農学部ファイトトロン内で育成した.

1-7-2　株の開帳性の測定

収穫期の *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの第 3 葉の分げつと主稈との間の角度をデジタルレベル角度計 (MJ-1; 佐藤商事) を用いて測定した．収穫後の *CRCT* 形質転換イネの葉鞘を取り除き，株の形態を観察した．

1-7-3　株元の遺伝子発現解析

1-2 の方法で *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネを 4.8 葉齢まで育成し，昼 (PM12:00) と夜 (AM0:00) に株元約 1 cm をサンプリングし, 1-2 の方法でリアルタイム PCR 法による発現解析を行った．リアルタイム PCR 解析に用いたプライマーは表 1 に示す．

1-7-4　*CRCT* 形質転換イネの幼苗期の重力応答性の解析

1-2 の方法で *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネを農学部ファイトトロン内で 5.0 葉齢まで育成した．*CRCT* 形質転換イネを株まきポットごと垂直にし，水平方向に対するシュートの角度を測定した．測定にはデジタルレベル角度計 (MJ-1; 佐藤商事) を用いた．5 日間，25°C，暗条件で育成し，暗処理開始後 3 日目，5 日目に水平方向に対するシュートの角度を測定した．

1-7-5　*CRCT* 形質転換イネの実生の重力応答性の解析

籾すりをして選別した *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの玄米を 50 mL ファルコンチューブに入れて，30 秒間 70%エタノールに浸した．2 倍希釈した次亜塩素酸ナトリウムに界面活性剤 Tween 20 を数滴加えた滅菌用溶液に玄米を浸し，シェーカーで 15 分間振盪した．この操作を 2 回繰り返した．クリーンベンチ内で，滅菌水で玄米を 5 回洗浄した後，滅菌したろ紙上で種子の水分を吸収させた．オートクレーブ済みの寒天培地に胚が上になるように置床し，グロースチャンバー (28°C，暗条件) で 5 日間育成した．その後，個体を水平にして 1 日育成しシュートの屈曲を観察した．

表 1. 本研究で用いたプライマー.

Primer name	Primer sequence (5’ → 3’)
CRCT-GFP 融合タンパク質の作出	
CCT-GFP F1+Sal1	CGCGTCGACTCCATGTACGCCGCCATGT
CCT-GFP R1+G×4	CCTCCTCCTCCCTTCCTTGGCTTGAGCAAGTCG
CCT-GFP F2+Sal1	GCGCGTCGACATGGGAGCTAGCACCCCTCGA
5’-35S-700	GATGTGATATCTCCACTGACGTAA
sGFP-R1	GTTTACGTCGCCGTCCAGCT
CRCT の発現解析	
CRCT-F1	GATCCAGTTGCAGCAGCCA
CRCT-R1	AGAGGACGAGCTGCCAGTGA
Actin-F1	GCAACTGGGATGATATGGAGAA
Actin-R1	TACAGTGTCTGGATTGGAGG
開帳性関連遺伝子	
LAZY-F1	ACTGGATCAAGACTGATGCCGAC
LAZY-R1	ACAGCACATTCAAGCCCTTC
TAC1-F1	ACGTCAAAGCCGCTGAAGG
TAC1-R1	AGCATTATGCAGTGACAGG
LPA1-F1	GCGTATGTATGTAAAGCAAG
LPA1-R1	GAAACGACCTACGAAACTAC
デンプン合成関連遺伝子	
OsAGPL1-F1	GGTTGGAAGGAACGTGGTCA
OsAGPL1-R1	TGCAGGTTCAGGGTTCAGAG
OsAGPL3-F1	TGCGAGGATAGGGAAGAATG
OsAGPL3-R1	TTCTGGTTGGATAAGGGAGG
OsAGPS1-F1	CCAAGAAGCTTCAAGGGAGAG
OsAGPS1-R1	TGCAGAGCTTGGTGAACTGG
OsSSI-F1	ACAAGTCCTCTTGGGAGGGT
OsSSI-R1	CTGGTTCCCTTTCCATGTAG
OsSSIIb-F1	TAGGAGCAACGGTGGAAGTGA
OsSSIIb-R1	GTGAACGTGAGTACGTGACCAAT

OsSSIIIb-F1	ATTCCGCTCGCAAGAACTGA
OsSSIIIb-R1	CAACCGCAGGATAACGGAAA
GBSSII-F1	CCGGCATTCCAAGAAATGG
GBSSII-R1	ACTTCTGAGCTCGCCACCGG
OsBEI-F1	TGGCCATGGAAGAGTTGGC
OsBEI-R1	CAGAAGCAACTGCTCCACC
OsBEIIa-F1	GCCAATGCCAGGAAGATGA
OsBEIIa-R1	GCGCAACATAGGATGGGTTT
OsPho1-F1	CCAGCTACATTGAATGCCAG
OsPho1-R1	CTAGTGCTTGCCTTGCCTGT
OsISA1-F1	TGCTCAGCTACTCCTCCATCATC
OsISA1-R1	AGGACCGCACAACTTCAACATA
OsPUL-F1	ACCTTTCTTCCATGCTGG
OsPUL-R1	CAAAGGTCTGAAAGATGGG
OsGPT1-F1	GCATAAGCTTCTGCTGCACCTGA
OsGPT1-R1	CATCCATGGCCCTGAACATTACC
OsGPT2-F1	CCGTCATTGTCGCCTCCATC
OsGPT2-R1	CGAGCACCGAGTCGCGACTT

プライマーに付加した配列には，下線を引いた.

結果

高 CO_2 条件下で顕著に発現誘導される遺伝子 *CRCT* について，機能解析を行った．CRCT と同様に CCT ドメインをもつ TOC1 や CONSTANS は転写因子として働き，それらの CCT ドメインが核移行シグナルとして機能している (Tiwari et al., 2010; Gendron et al., 2012)．そこで，CRCT の細胞内局在性を明らかにするため CRCT のコード領域全長と GFP の融合タンパク質 (FL-CRCT-GFP) をタマネギ表皮細胞で発現させ，GFP 蛍光を観察した (図 1)．FL-CRCT-GFP を発現させた場合，GFP の蛍光と核特異的な DAPI の蛍光が一致していた．さらに CRCT の CCT ドメインが核移行シグナルとして機能するかを明らかにするために，CRCT の CCT ドメインと GFP を融合させたタンパク質 (CCT-GFP) を用いて同様の解析を行った (図 1)．その結果，FL-CRCT-GFP の結果と同様に GFP の蛍光と DAPI の蛍光が一致した．これらの結果から，CRCT は核に局在し，CRCT の CCT ドメインは核移行シグナルとして機能することが示唆された．

次に *CRCT* の発現特異性を明らかにするために，リアルタイム PCR 法による *CRCT* の発現の CO_2 応答性の解析を行なった (図 2A)．生育 CO_2 濃度を増加させた処理後，1 日目までは *CRCT* の発現量に対する CO_2 の効果は認められなかった．しかしながら CO_2 処理後 2 日目以降は，高 CO_2 条件下で育成した方が大気 CO_2 条件下で育成した場合よりも *CRCT* の発現量が有意に高くなった．次に大気 CO_2 条件下での *CRCT* の発現の日変化を解析した (図 2B)．*CRCT* の発現は明期に移行してから上昇し，明期の終わりに最も高くなった．暗期に入ると発現は徐々に減少し，暗期の終わりに発現は最も低くなった．杉野 (2011) の結果より，*CRCT* の発現はグルコースやスクロースといった糖によって促進されることがわかっている．一般的に，植物の糖に対する応答は窒素条件，つまり C/N バランスの影響を受けることが知られている (Krapp and Stitt, 1999)．そこでグルコース濃度と硝酸アンモニウム濃度を変えた 4 処理区でイネ実生を 5 日間育成した (図 3A)．これらの処理区におけるグルコース濃度は植物にとって過剰であり，グルコースが単独で添加されるとシュート長，新鮮重，クロロフィル含量の低下といった生育阻害が認められた (図 3B)．一方，グルコースに加えて硝酸アンモニウムが添加される

と生育阻害が緩和された (図 3B). 糖による生育阻害は窒素によって緩和されることが知られており，この実験系により *CRCT* の発現の C/N 応答が評価できるものと考えられた. そこで, 次にそれらの C/N 条件下で育成したイネのシュートを用いて RT-PCR 法により *CRCT* の発現解析を行った (図 3C). *CRCT* の発現のグルコースによる促進は, 窒素によって抑制されることがわかった. 以上の結果から *CRCT* の発現は細胞の光合成産物含量によって促進されるが, その発現促進の程度は窒素含量によっても制御されることがわかった.

杉野 (2011) は *CRCT* 高発現形質転換イネと *CRCT* 発現抑制形質転換イネを作出し, *CRCT* の発現量がイネの生育に与える影響を解析した．その結果，分げつ数は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ少ない傾向があり，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは増加する傾向があることを報告している. しかし, 全般的に判断すると *CRCT* の発現量はイネの生育に大きな影響を与えないと結論づけている．しかしながら，もっとも顕著な形態的影響として *CRCT* 高発現形質転換イネでは株が大きく開くことがわかった (図 4A，B)．5.0 葉齢の *CRCT* 形質転換イネの株元 1 cm を用いて，イネの分げつ角度に関係する遺伝子 *LAZY1*，*Tiller Angle Control 1* (*TAC1*)，*Loose Plant Archtecture 1* (*LPA1*) の発現解析を行った (図 4C)．しかしながら *CRCT* の発現量は，これらの遺伝子の発現に影響を与えていなかった．*CRCT* は様々な器官の維管束で発現することが報告されているが, イネの株もとで発現しているかは明らかとなっていない (杉野, 2011). そこで，*CRCT プロモーター:GUS* 形質転換イネの株元 1 cm を用いて，株元における *CRCT* の発現を解析した (図 5). 杉野 (2011) は組織の GUS 染色は 2 日間行なっていたが, 株もとでは 2 時間で十分に染色されたことから株もとでの *CRCT* の発現が非常に高いことが示唆された．これらの結果から，CRCT はイネの生育に大きな影響を与えないが，*CRCT* の発現量により分げつ数と株の開帳性が変化することがわかった.

CRCT は他の CCT ドメインタンパク質と同様に転写調節因子であることが考えられる (図 1)．杉野 (2011) は *CRCT* 形質転換イネの葉身を用いてマイクロアレイ解析を行い，*CRCT* の発現量が他の遺伝子の発現に及ぼす効果を解析した．主な一次代謝に関わる遺伝子については，*CRCT* の発現量がそれらの発現にほとんど影響を与えていなかった (杉野，2011)．また，デンプン合成に関わる遺伝子について着目すると，*CRCT* 発現

抑制形質転換イネでは非形質転換イネに比べ *AGPL1* (*ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit 1*) や *GPT2* (*グルコース-6-リン酸輸送体 2*) の発現量が大きく低下していた (図 6; 表 2). 一方で, *CRCT* 高発現形質転換イネではそれらの遺伝子の発現量は非形質転換イネと違いはなかった. それらの結果から, *CRCT* の発現量は葉身の遺伝子発現に大きな影響を与えないが, 一部のデンプン合成関連遺伝子の発現には影響を与える可能性が考えられた.

植物を高 CO_2 条件下で育成した場合, 植物種に共通した応答の一つはデンプン含量の増加であり, イネの場合は特に栄養成長期の光合成産物のシンク器官である葉鞘のデンプン含量が増加する (Nakano et al., 1997; Ainsworth and Long, 2005). また, 葉鞘のデンプン含量増加の程度は窒素条件に左右されることが報告されている (Nakano et al., 1997). さらに, *CRCT* の発現と同様にデンプン合成に関わる *SS* や *AGPL1* の発現は高 CO_2 条件下で発現が促進されることが報告されている (Fukayama et al., 2009). *CRCT* 発現抑制形質転換イネで大きく発現が減少していた *AGPL1* の欠損変異体では, 葉鞘のデンプン蓄積量が野生型に比べ大きく減少し, 分げつ数が増加する (Okamura et al., 2013). さらに, 分げつの開帳性も変化することが報告されている (Okamura et al., 2015). それらの報告とこれまでの結果から, *CRCT* は高 CO_2 や糖に応答して葉鞘のデンプン合成に関わる可能性が推察された. そこで初めに, *CRCT* 形質転換イネの葉身と葉鞘における可溶性糖含量とデンプン含量の解析を行った (図 7). *CRCT* 高発現形質転換イネの葉身におけるグルコース含量, フルクトース含量, スクロース含量は, 形質転換イネよりも減少していた (図 7A). 一方, *CRCT* 発現抑制形質転換イネの可溶性糖含量は非形質転換イネと有意なさは認められなかった (図 7A). デンプン含量は *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは非形質転換イネに比べ, 有意に減少していた. 葉鞘におけるグルコース含量とフルクトース含量は非常に低く, また非形質転換イネと *CRCT* 形質転換イネとの間に差異は認められなかった (図 7B). しかしながらスクロース含量は *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に減少していた. 最も明確な違いはデンプン含量であり, *CRCT* 高発現形質転換イネのデンプン含量は非形質転換イネより顕著に高く, *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低かった (図 7B). このデンプン含量の変化が重要と考え, さらに *CRCT* 高発現形質転換イネ, *CRCT* 発現抑制形質転換イネをそれぞれ 3 系統追加し, 葉鞘における

CRCT の発現量とデンプン含量の関係を解析した (図 8). 全ての *CRCT* 高発現形質転換イネのデンプン含量は非形質転換イネのデンプン含量よりも高く，*CRCT* 発現抑制形質転換イネのデンプン含量は低かった (図 8A). また，*CRCT* 形質転換イネにおける *CRCT* の発現量とデンプン含量の間には非常に高い正の相関が認められた (図 8B). *CRCT* 形質転換イネの葉身, 葉鞘, 頴花, 稈, 根をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した (図 9). 葉身については, 非形質転換イネと *CRCT* 高発現形質転換イネで同程度に染色が認められたが，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉身はほとんど染色されなかった (図 9A). 一方，葉鞘については，*CRCT* 高発現形質転換イネでは葉鞘全体が青紫色に染まったが，*CRCT* 発現抑制形質転換イネではほとんど染色されなかった (図 9A). 葉鞘と同様に，*CRCT* 高発現形質転換イネの頴花や稈は全体が染色され，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの稈は全く染色されなかった. また，根では *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの間に差は認められなかった (図 9B). 次に葉鞘と葉身の横断切片を作出し，細胞内におけるデンプン粒の蓄積を光学顕微鏡で観察した (図 10). 非形質転換イネや *CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘ではデンプン粒の蓄積が貯蔵柔細胞で観察されたが，*CRCT* 発現抑制形質転換イネではデンプン粒がほとんど確認できなかった (図 10A). 葉身については, 非形質転換イネと *CRCT* 発現抑制形質転換イネではデンプン粒は全く観察されなかったが，*CRCT* 高発現形質転換イネでは，中肋の通気腔付近の柔細胞にデンプン粒が観察された (図 10B). それらの結果より，*CRCT* の発現量は葉鞘の柔組織におけるデンプン蓄積に大きな影響を与えることが明らかとなった.

CRCT が葉鞘のデンプン蓄積を制御するメカニズムを明らかにするためには，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘における遺伝子の発現変化を網羅的に解析する必要があると考え，マイクロアレイ解析を行った (図 11). 図 11A と表 3 にはデンプン合成に関わる遺伝子の結果を，図 11B と表 4 にはデンプン分解に関わる遺伝子の結果を示す. デンプン合成に関わる多くの遺伝子は *CRCT* 高発現形質転換イネで発現促進され，*CRCT* 発現抑制形質転換イネで発現抑制された (図 11A). 特に *AGPL1*，*AGPS1* (*ADP-グルコースピロホスホリラーゼsmall subunit1*)，*BEI*，*PUL* (*プルラナーゼ*)，*Pho1* (*α-グルカンホスホリラーゼ1*)の発現変化は 2 倍以上であり, 5%水準での有意差が認められた (表 3). 一方，デンプン分解に関わる多くの遺伝子は発現変化していなかった (図 11B，表 4). 次にリ

アルタイム PCR 法によるマイクロアレイ解析の結果の再現性の確認を行った (図 11C, D). マイクロアレイ解析で発現変化が大きかった *AGPS1*, *AGPL1*, *Pho1*, *BE1* の発現はやはり *CRCT* 高発現形質転換イネで高く, *CRCT* 発現抑制形質転換イネで低かった (図 11C). デンプン合成に関わる遺伝子のうち, 主に葉鞘で発現している *SSI*, *GBSSII* (*顆粒結合型デンプン合成酵素 II*), *BEIIa*, *GPT2* についてもリアルタイム PCR 法による発現解析を行った (図 11D). *BEIIa*, *SSI*, *GBSSII* の発現は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネとの間に差は認められなかったが, *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは有意に減少していた. また, *GPT2* の発現は *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に増加し, *CRCT* 発現抑制形質転換イネで減少した. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘からタンパク質を抽出し, 抗 AGPase 特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った (図 12A). 葉鞘における AGPase の発現量は大サブユニットと小サブユニットいずれも明らかに *CRCT* 高発現形質転換イネで高くなり, *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは減少した. また葉鞘から抽出したタンパク質を用いた SDS-PAGE の結果, *CRCT* 高発現形質転換イネにおいてのみ分子量約 120 kDa 付近に未知なバンドが認められた (図 12B). この未知なバンドを高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) で解析し, MASCOT search でタンパク質の同定を行った. その結果, 分子量約 120 kDa 付近の未知なバンドは Pho1 であると同定された (図 12C). それらの結果から, CRCT は葉鞘においてデンプン合成関連酵素の発現を制御することでデンプン蓄積量に大きな影響を与えることがわかった.

CRCT 高発現形質転換イネのマイクロアレイ解析の結果, 発現が有意に増加した遺伝子と減少した遺伝子のうち, シグナル強度の平均値が 10 以上である上位 50 遺伝子をそれぞれ表 5 と表 6 に示した. また *CRCT* 発現抑制形質転換イネのマイクロアレイ解析の結果, 発現が有意に増加した遺伝子と減少した遺伝子のうち, 発現変化が大きかったもの上位 50 遺伝子につてもそれぞれ表 7 と表 8 に示した. *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に発現促進された上位 50 遺伝子の多くは機能が未知なものであった (表 5). *OsAGPL1* と *OsAGPS1* の発現変化はそれぞれ 68 番目と 98 番目であった (data not shown). 同様に *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に発現抑制された上位 50 遺伝子の多くは機能が未知なものであったが, その中には, ジベレリン合成に関わる *Ent-kaurene oxidase* や

収量に関わる *OsmiR397b* が含まれていた (表 6). *CRCT* 発現抑制形質転換イネで有意に発現促進された遺伝子の多くも機能未知であった (表 7). しかし *CRCT* 発現抑制形質転換イネで有意に発現抑制された遺伝子には, *OsAGPL1*, *OsAGPS1*, *Pho1*, *BEI*, *GBSSI* (*顆粒結合型デンプン合成酵素 I*), *PUL* など多くのデンプン合成に関わる遺伝子やリグニン合成に関わる *Caffeic acid 3-O-methyltransferase* が含まれていた (表 8). またこれらの遺伝子のうち，機能未知な遺伝子 Os12g0117700，Cytochrome P450 family protein である Os10g0524700 と Cold acclimation protein COR413-TM1 (Os05g0566800) は *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に発現促進され，*CRCT* 発現抑制形質転換イネで有意に発現抑制されていた．一方，TPR モチーフ (tetratricopetide repeat motif) を持つ機能未知な遺伝子 Os08g0481000 は *CRCT* 高発現形質転換イネで有意に発現抑制され, *CRCT* 発現抑制形質転換イネで有意に発現促進されていた．また発現変化は顕著ではなかったが，TPR モチーフを持ち, CRCT と同様に高 CO_2 条件下において発現促進される遺伝子 Os06g0606700 の発現も変化していた．以上の結果から，*CRCT* の発現量は主にデンプン合成関連遺伝子の発現に影響を与えるが, 他にも様々な遺伝子の発現に影響を及ぼすことがわかった.

葉鞘にデンプンが蓄積しない *agpl1* 欠損変異体では重力感受に関わるデンプン粒が欠損するために重力感受性が低下し, 開帳性が増加したと考えられている (Okamura et al., 2015). そこで *CRCT* 高発現形質転換イネで見られた開帳性の増加が重力感受性の変化によるものかを明らかにするため，*CRCT* 形質転換イネの重力応答性試験を行った (図 13). イネを株まきポットで通常通り育成し，5.0 葉齢となった時点で株まきポットを重力に対して垂直にし，5 日間暗条件に置いた (図 13A). 処理後 3 日目には *CRCT* 発現抑制形質転換イネの屈曲角度は非形質転換イネに比べ大きくなり，*CRCT* 高発現形質転換イネでは逆に小さくなった (図 13B). 処理後 5 日目ではその系統間の差異が大きくなった．さらにイネ実生を寒天培地に置床し 5 日間育成した後，暗条件で同様に重力屈性試験を行い 24 時間後に観察した (図 13C). 非形質転換イネや *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは重力屈性が認められたが，*CRCT* 高発現形質転換イネでは全く重力屈性が認められなかった．これらの結果から，*CRCT* 高発現形質転換イネでは重力感受性が低下したため，株の開帳度が増加したと考えられた.

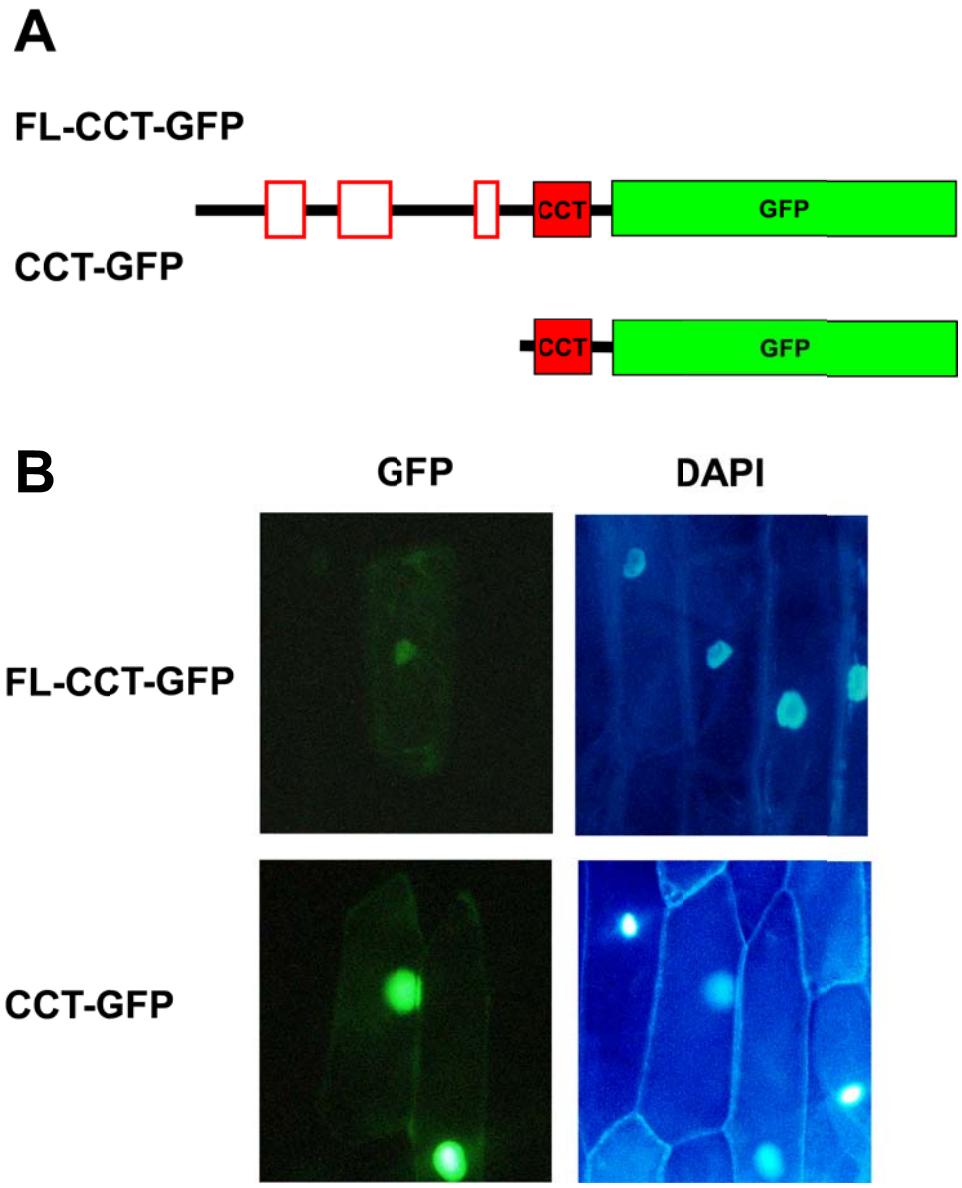


図 1．GFP を用いた CRCT の細胞内局在性の解析．

A，プラスミドのコンストラクト図．FL-CCT-GFP は CRCT のコード領域全長と GFP，CCT-GFP は CRCT の CCT ドメインと GFP を繋げたコンストラクトを示す．これらのコンストラクトをパーティクルガン法によりタマネギ表皮細胞に導入した．B，蛍光顕微鏡を用いた GFP と DAPI の蛍光観察．DAPI 染色法では核が特異的に染色される．

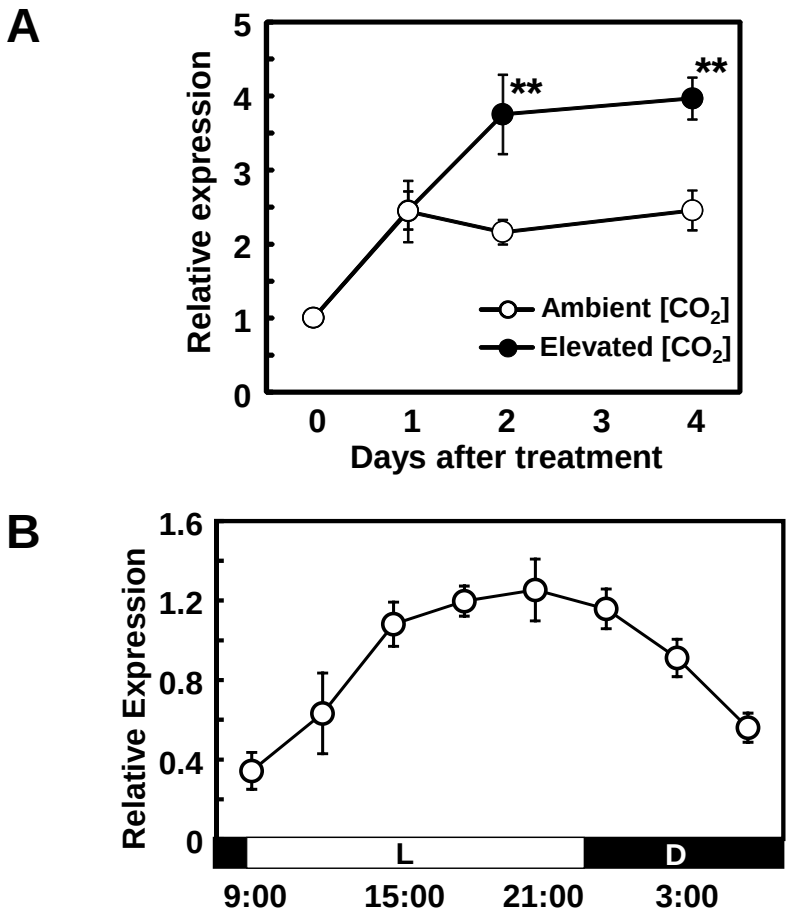


図 2．*CRCT* の発現解析.

A，*CRCT* の発現の CO_2 応答性．大気 CO_2 条件下で日本晴を 4.8 葉齢まで育成し、大気 CO_2 条件 (38 Pa) と高 CO_2 条件 (100 Pa) に移して処理を開始した．処理開始日を 0 日目とし，処理開始後 1，2，4 日目に第 4 葉葉身より上位に展開している葉身をサンプリングし，リアルタイム PCR 法により発現解析を行った．T 検定により p 値を算出した．**は 1%水準で，大気条件で育成した場合との間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4). B， *CRCT* の発現の日変化．大気 CO_2 条件下でイネを 5.0 葉齢まで育成し，全ての葉身をサンプリングしリアルタイム PCR 法により解析に用いた．データは平均値と標準偏差を示す (n=4).

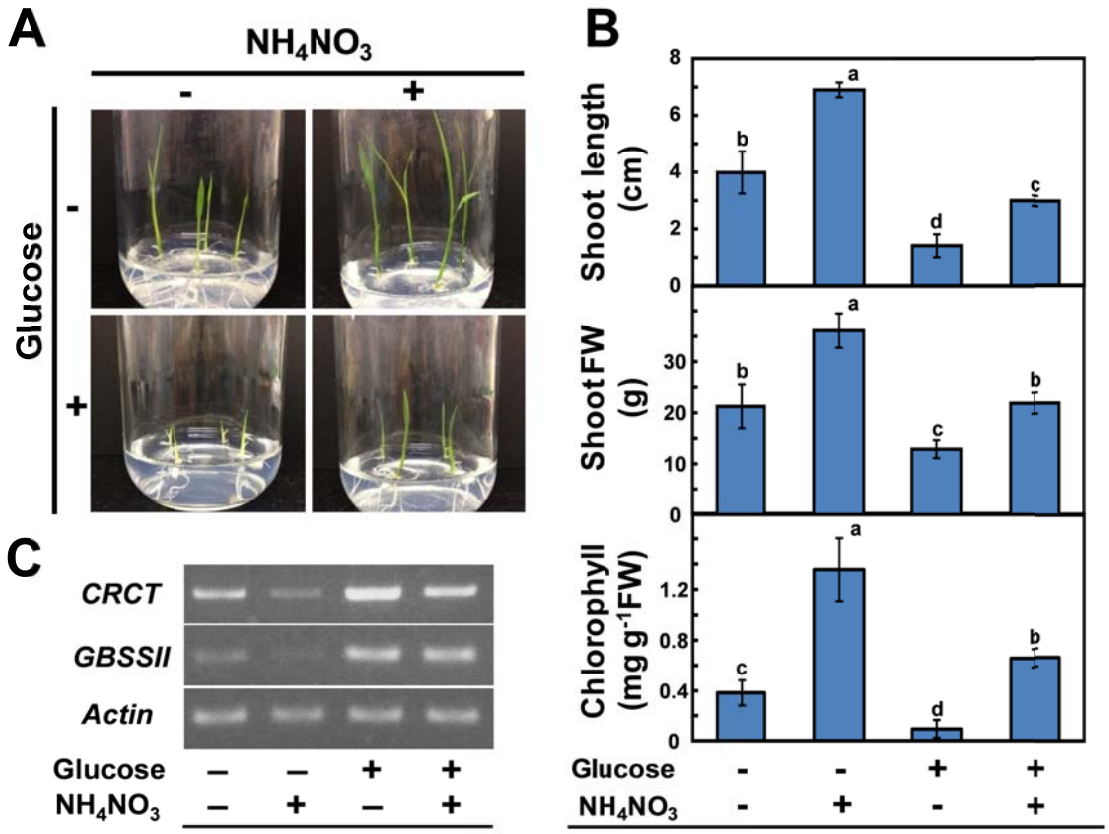


図 3．*CRCT* の発現の C/N 応答.

A，C/N 処理を行ったイネ．無菌発芽させた日本晴の実生をグルコース (450 mM) と硝酸アンモニウム (30 mM) を添加, または添加していない改変 MS 培地で 5 日間育成した. B, C/N 処理を行ったイネの生育とクロロフィル含量．播種後 5 日目に草丈，シュートの新鮮重，クロロフィル含量を測定した．異なるアルファベットは Turkey 法による多重検定において 5%水準での有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4)．C, *CRCT* の発現の C/N 応答性の解析．C/N 処理を行ったイネから RNA を抽出し，RT-PCR 法により発現解析を行った．*Actin* は内部コントロールとして，*GBSSII* は糖処理のコントロールとして解析を行った.

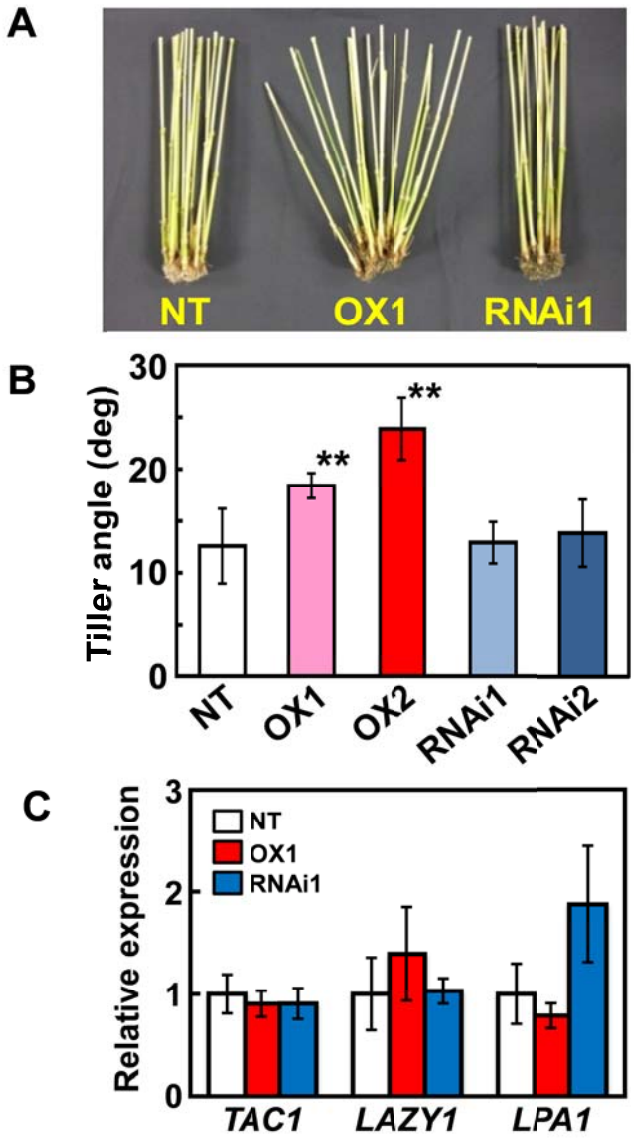


図 4．*CRCT* 形質転換イネと株の開帳性.

A，収穫期の株の形態．B，播種後 60 日目の主稈と第 3 葉分げつとの間の角度．C, *CRCT* 形質転換イネの株元における開帳性関連遺伝子の発現のリアルタイム PCR 解析．開帳性に関係することが知られている *TAC1*，*LAZY1*，*LPA1* について解析を行った．T 検定により p 値を算出した．**は 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す. データは平均値と標準偏差を示す (n=4). NT, 非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi1 と RNAi2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

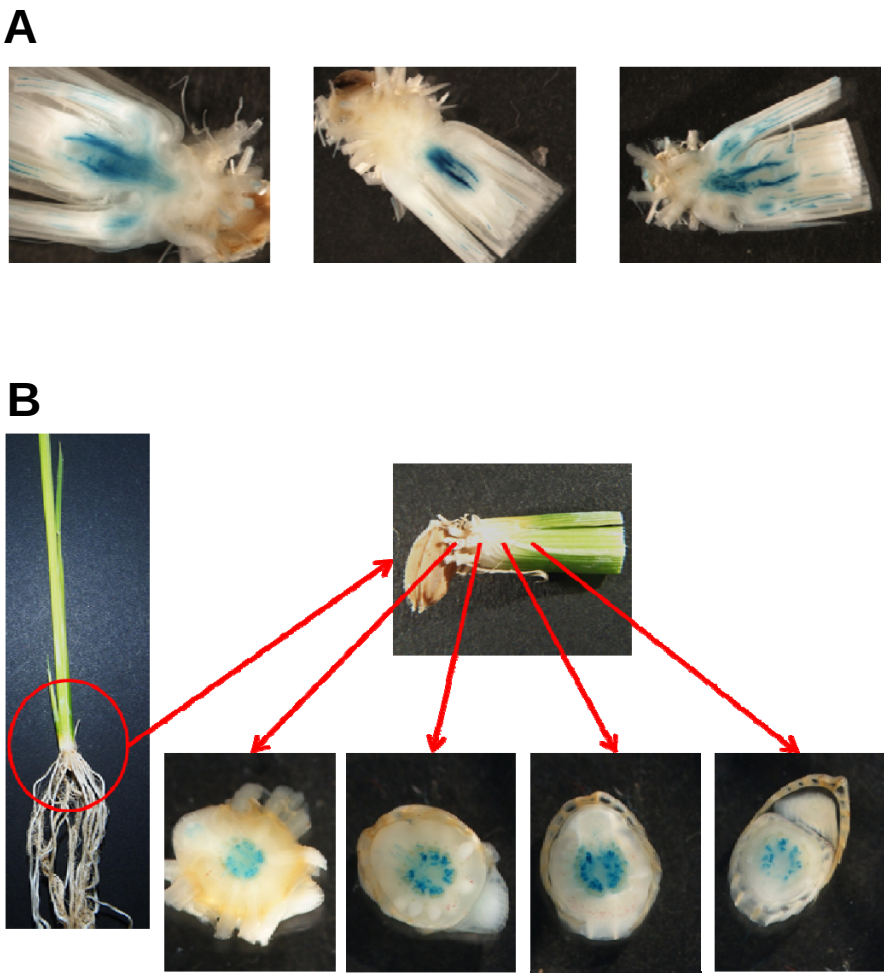


図 5.　*CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネを用いた株元における *CRCT* の発現解析.

A，*CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネの株元の縦断面．*CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネの株元約 1 cm を縦に切断し，GUS 染色した．個体により多少発現場所に違いが認められた．B，*CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネの株元の横断面．*CRCT* プロモーター：*GUS* 形質転換イネの株元約 1 cm を 6 等分に横断し GUS 染色した．そのうち GUS 染色が観察された先端から 4 つを示す.

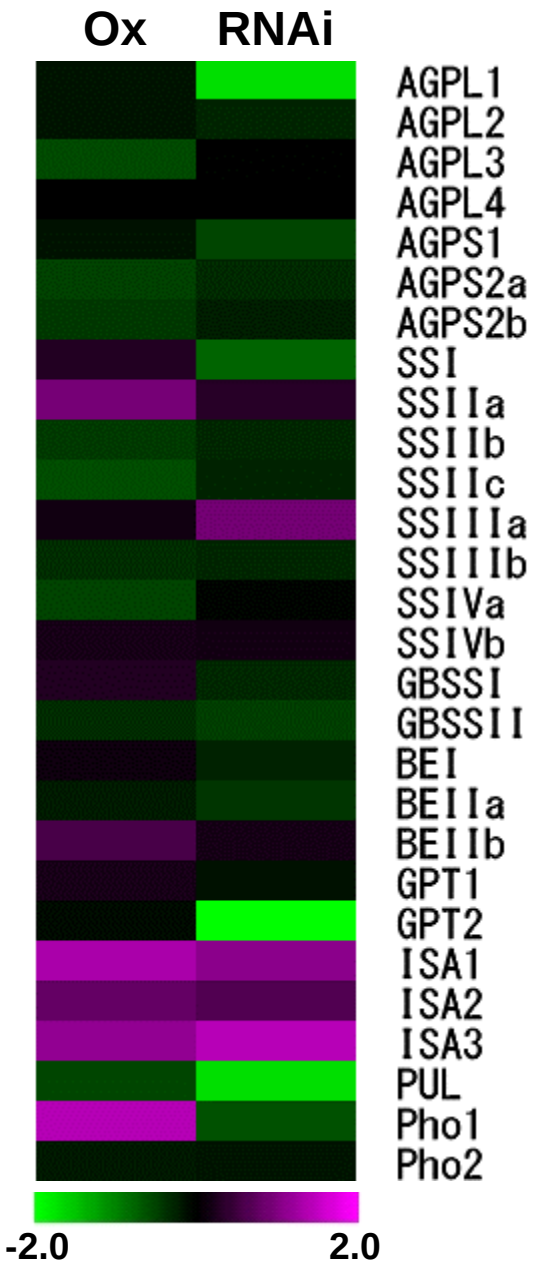


図 6. *CRCT* 形質転換イネの葉身におけるデンプン合成関連遺伝子の発現変化.
各遺伝子の発現レベルは，非形質転換イネに対する log2 値で示した．左が高発現形質転換イネ，右が *CRCT* 発現抑制形質転換イネについての結果である．杉野 (2011) のデータを元に図を作成した．Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

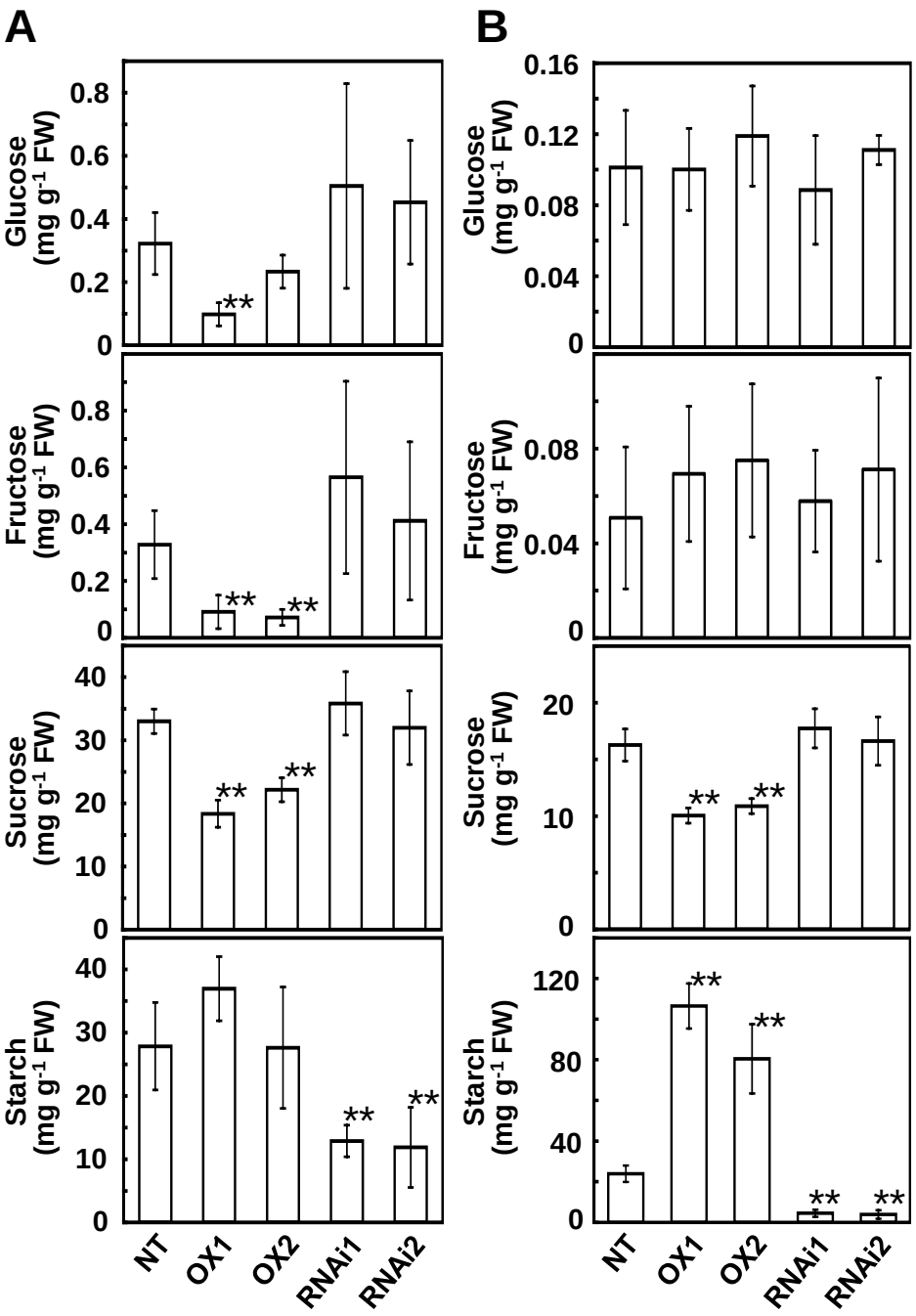


図 7.　*CRCT* 形質転換イネの可溶性糖とデンプン含量.

A，*CRCT* 形質転換イネの葉身の可溶性糖とデンプン含量．B，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘の可溶性糖とデンプン含量．6.5 葉齢のイネの第 6 葉葉身と第 5 葉葉鞘を明期の終わりにサンプリングし，グルコース，フルクトース，スクロース，デンプン含量を解析した．T 検定により p 値を算出した．**は 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す(n=5)．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi1 と RNAi2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

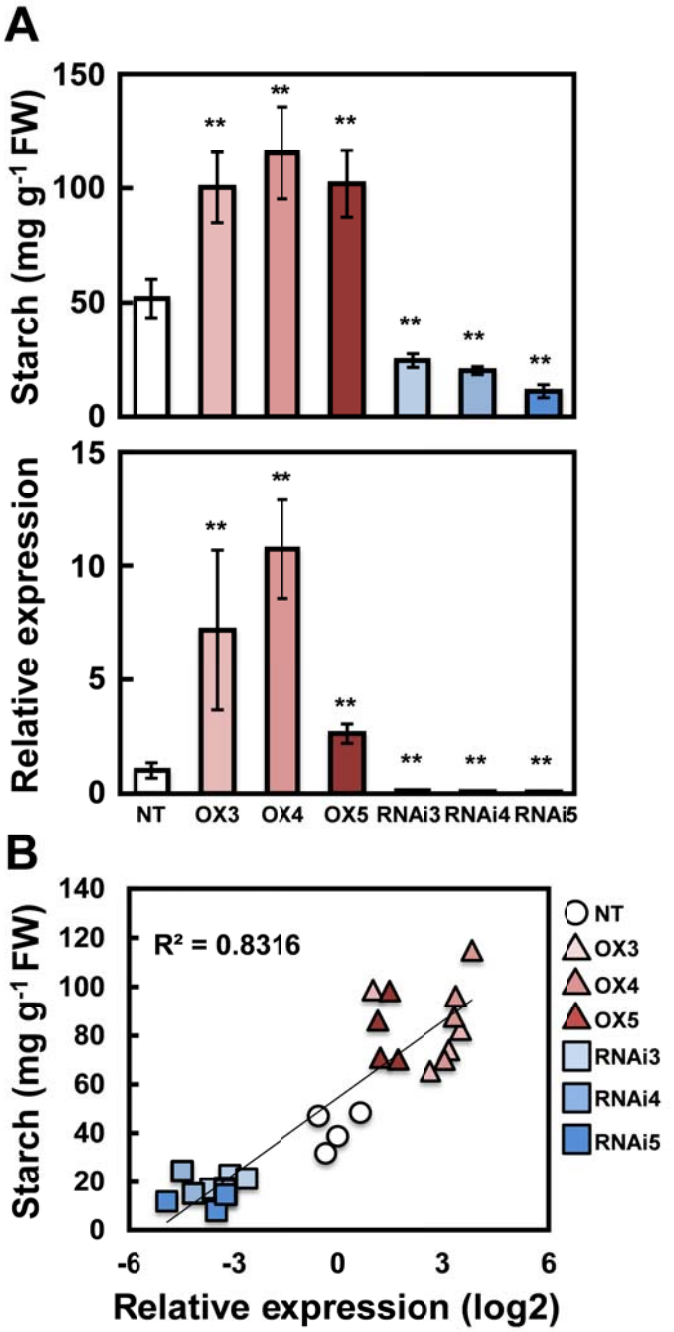


図 8.　*CRCT* の発現量とデンプン含量の関係.

A，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘のデンプン含量と *CRCT* の発現量．6.5 葉齢のイネの第 6 葉葉身と第 5 葉葉鞘を明期の終わりにサンプリングし，デンプン含量 (上) とリアルタイム PCR 法により *CRCT* の発現量 (下) を解析した．T 検定により p 値を算出した．**は 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．B，*CRCT* 形質転換イネにおけるデンプン含量と *CRCT* の発現量の関係．R^2 は決定係数を示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4). NT，非形質転換イネ; OX3 と OX4 と OX5，*CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi3 と RNAi4 と RNAi5，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

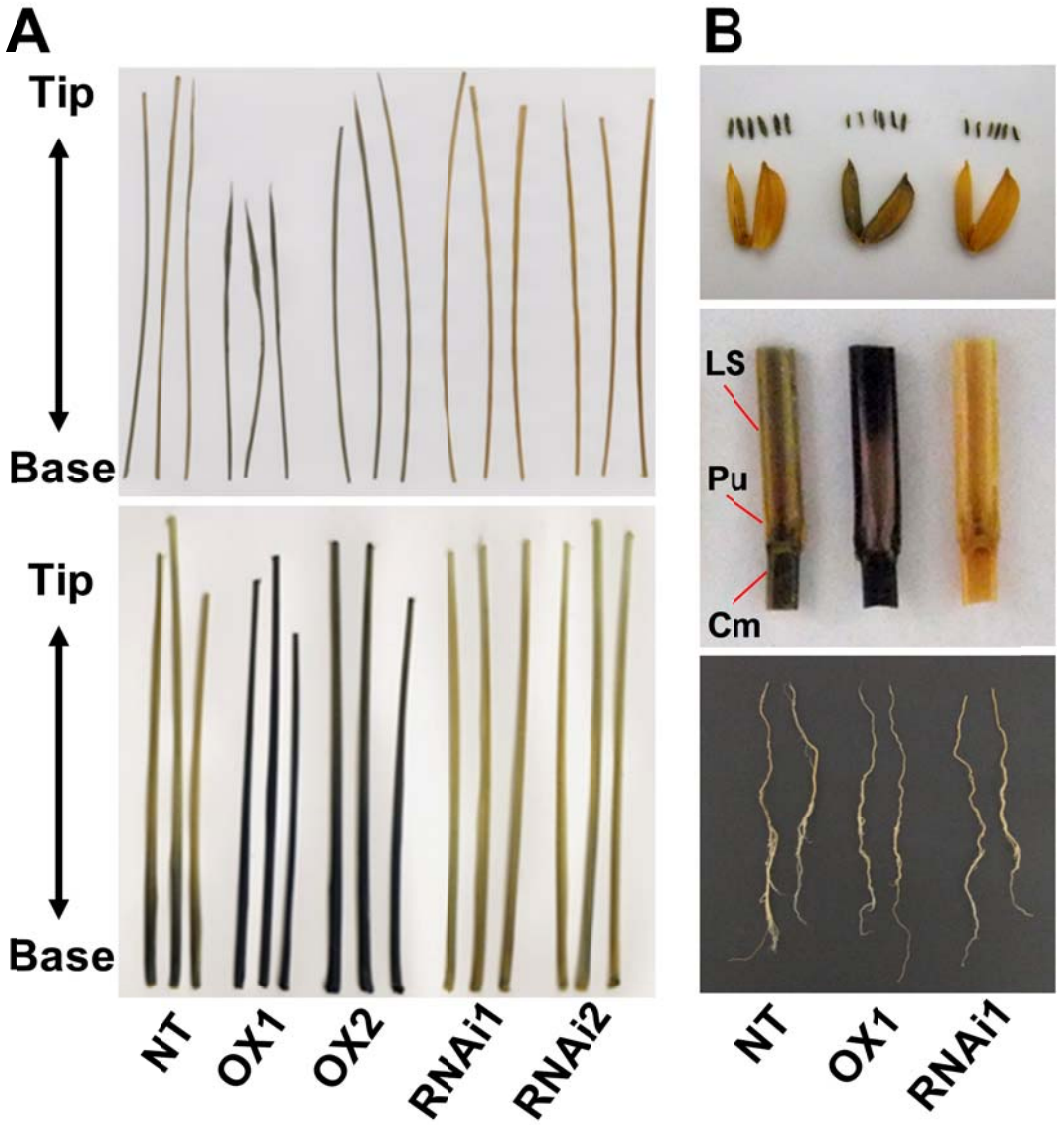


図 9.　ヨウ素デンプン反応による *CRCT* 形質転換イネの様々な組織のデンプン蓄積レベルの解析.

A，葉身と葉鞘 のデンプン蓄積．6.5 葉齢のイネの第 6 葉葉身 (上) と第 7 葉葉鞘 (下) を明期の終わりにサンプリングし，ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した．B，穎花と葯，稈，根のデンプン蓄積．開花期の穎花 (上)，出穂期の稈 (中)，幼苗期の根 (下) をヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した．LS，葉鞘; Pu，葉枕; Cm，稈．NT，非形質転換イネ．OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ．RNAi1 と RNAi2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

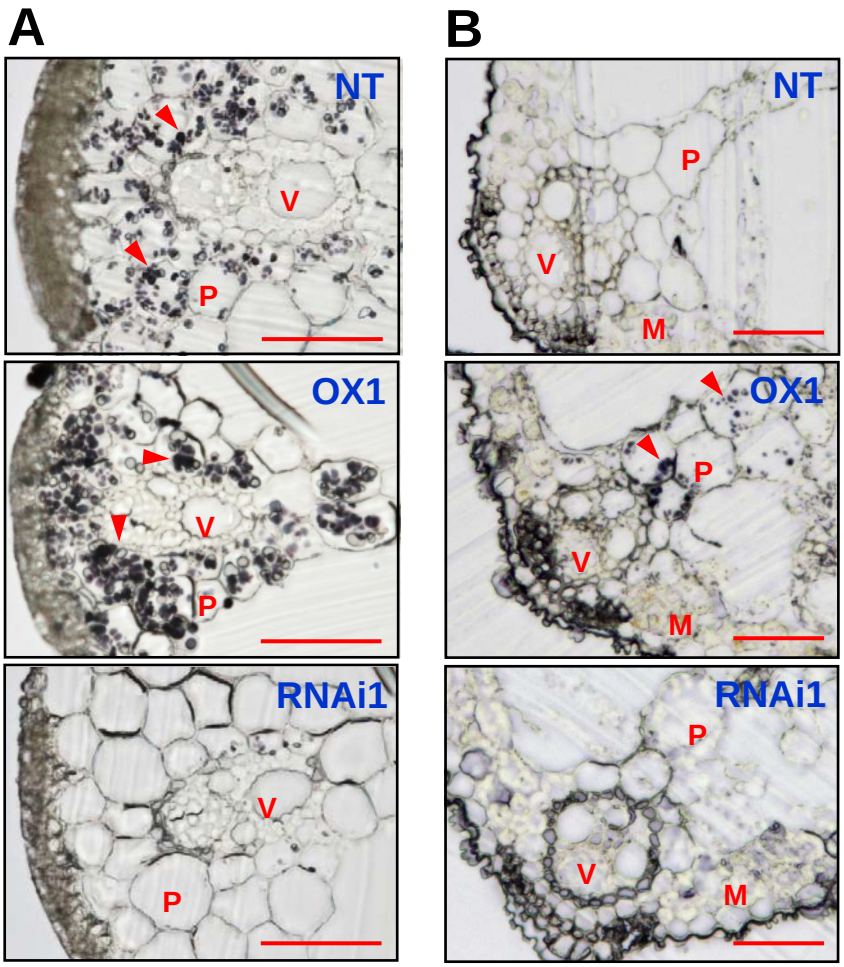


図 10.　*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身の横断面.

A，葉鞘の横断面．B，葉身の横断面．5.0 葉齢のイネの第 3 葉の葉鞘と第 4 葉の葉身をテクノビットで包埋し，ミクロトームにより薄切片を作成した．薄切片を 0.5% (w/v) ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し，光学顕微鏡で観察した．デンプン粒は矢印で示した．バーは 20 μm を示す．P，柔細胞; V，維管束; M，葉肉細胞．NT，非形質転換イネ; OX1，*CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

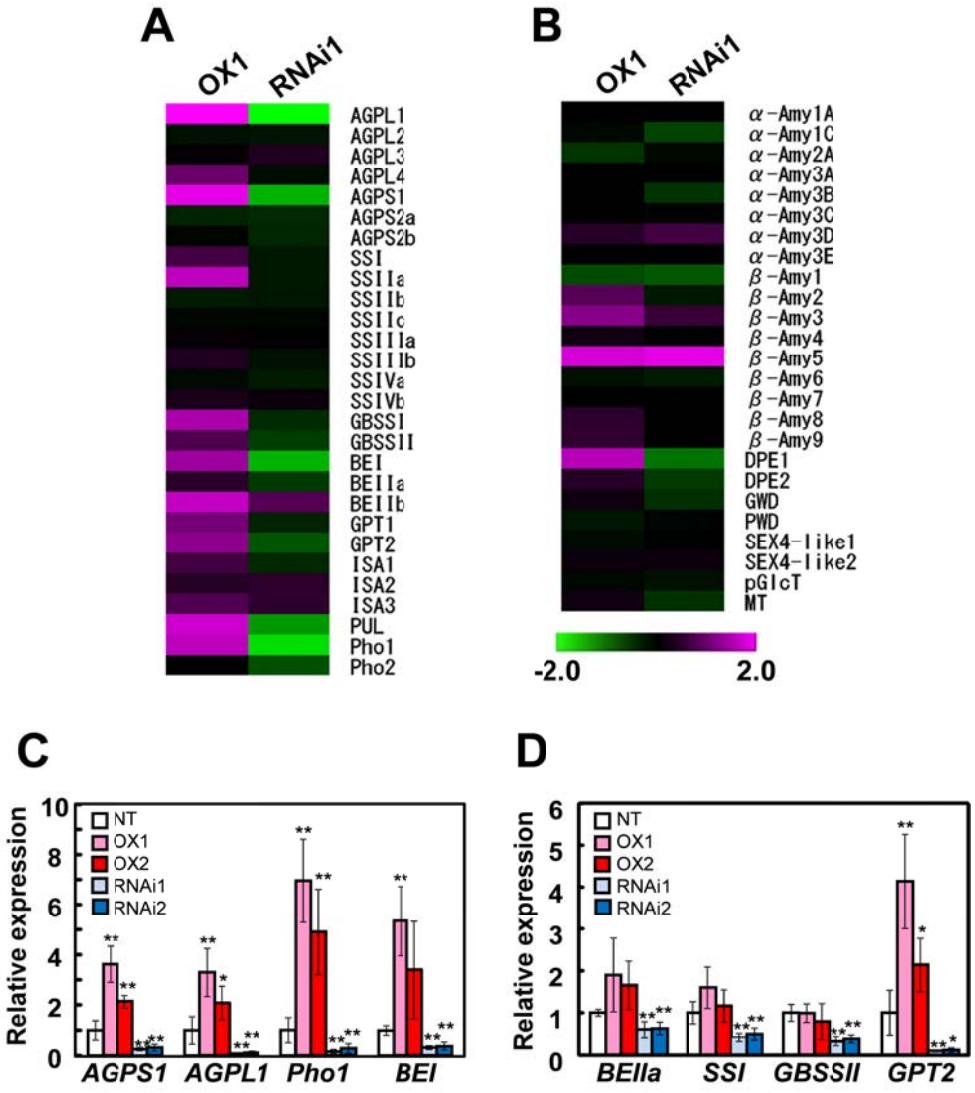


図 11. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘におけるデンプン合成・分解に関わる遺伝子の発現解析. A，デンプン合成関連遺伝子の発現変化．B，デンプン分解関連遺伝子の発現変化．各遺伝子の発現レベルはマイクロアレイにより解析し，非形質転換イネに対する $\log_2$ 値で示した．紫色は発現促進を，緑色は発現抑制を表している．ヒートマップは TIGR MeV 4.0 software を用いて作成した (Saeed et al., 2003) ． C，マイクロアレイ解析で特に発現が変化していたデンプン合成関連遺伝子の発現のリアルタイム PCR 法による解析．D，主に栄養器官で機能しているデンプン合成関連遺伝子のリアルタイム PCR 法に夜発現解析. T 検定により p 値を算出した．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4)．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi1 と RNAi2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

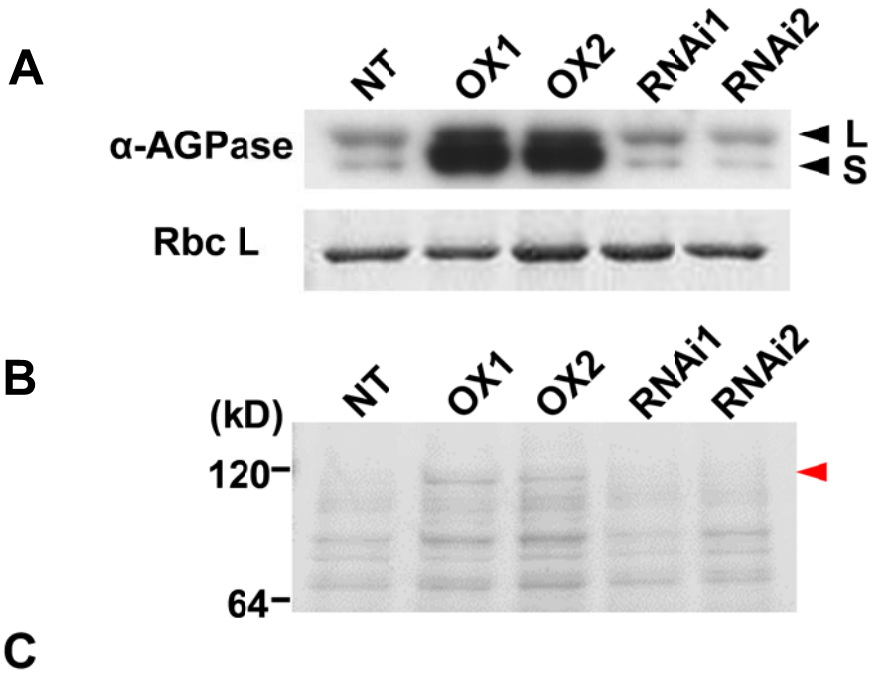


図 12.　*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘のタンパク質の発現解析.

A, AGPase のウエスタンブロット解析. シロイヌナズナ AGPase に対する抗体を用いて AGPase を検出した．CBB 染色による RbcL (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) は内部コントロールとして用いた．B，SDS-PAGE 解析．赤矢印は *CRCT* 高発現形質転換イネで発現が高い約 120 kDa の未知なバンドを示す．C，約 120 kDa のバンドの LC-MS 解析により同定された Pho1 のアミノ酸配列．バンドを SDS-PAGE ゲルから切り出し，LC-MS で解析し，MASCOT search で検索したどころ，Pho1 (Os03g0758100) であることが特定された．赤文字は MASCOT search で検出されたペプチドのアミノ酸配列を示し，そのカバー率は 10.3%であった．NT，非形質転換イネ．OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ．RNAi1 と RNAi2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

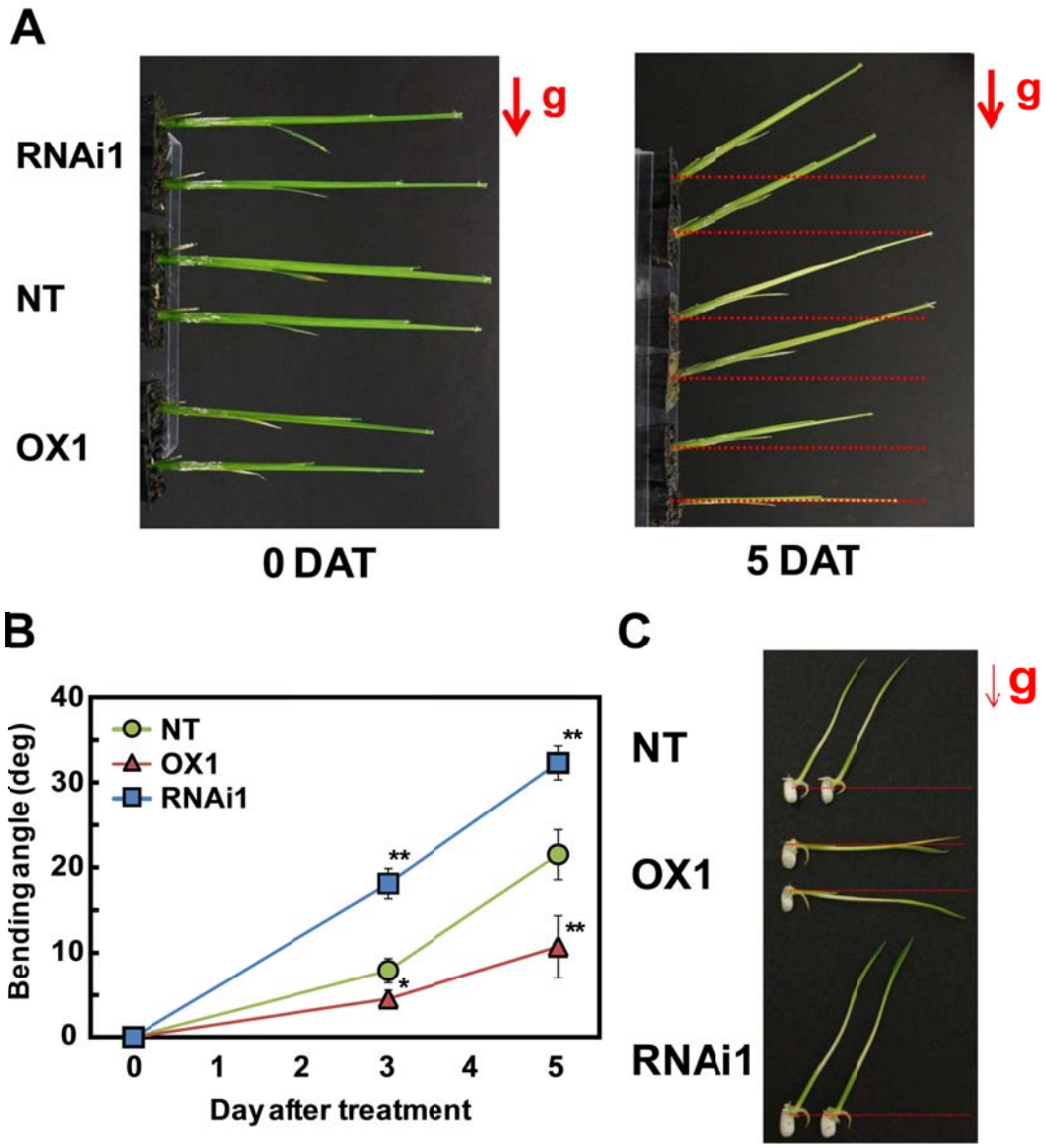


図 13.　*CRCT* 形質転換イネにおける重力応答性の解析.

A，*CRCT* 形質転換イネの幼苗の重力屈性解析．5.0 葉齢のイネを重力に対して垂直にし，重力応答性を解析した．処理前のイネ (左) と処理後 5 日目のイネ (右)．赤い点線は水平方向を，g は重力方向を示す．写真は葉身を切除して撮影した．B，水平方向に対する *CRCT* 形質転換イネの屈曲角度．T 検定により p 値を算出した．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4)．C，*CRCT* 形質転換イネの実生の重力屈性解析．*CRCT* 形質転換イネを寒天培地に置床し，5 日間育成した後重力屈性を解析した．赤い点線は水平方向を，g は重力方向を示す．　NT，非形質転換イネ; OX1, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi1, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

表 2．*CRCT* 形質転換イネの葉身を用いたマイクロアレイ解析のデンプン合成関連遺伝子の発現変化.

Gene name	RAP-ID	Probe name	Fold change		P-value	
			OX	RNAi	OX	RNAi
AGPL1	Os05g0580000	AK100910	0.89	0.30	0.589	0.001
AGPL2	Os01g0633100	AK071497	0.88	0.82	0.209	0.046
AGPL3	Os03g0735000	AK105092	0.67	0.99	0.106	0.895
AGPL4	Os07g0243200	D21272	1.00	1.00	0.163	0.001
AGPS1	Os09g0298200	AK073146	0.90	0.69	0.479	0.024
AGPS2a	Os08g0345800	AK071826	0.70	0.80	0.084	0.018
AGPS2b		AK103906	0.74	0.85	0.106	0.039
SSI	Os06g0160700	AK109458	1.21	0.58	0.738	0.001
SSIIa	Os06g0229800	AK101978	1.92	1.24	0.426	0.167
SSIIb	Os02g0744700	AK066446	0.73	0.81	0.073	0.564
SSIIc	Os10g0437600	AF383878	0.65	0.82	0.087	0.008
SSIIIa	Os08g0191500	AK061604	1.10	1.89	0.976	0.010
SSIIIb	Os04g0624600	AK059368	0.78	0.81	0.020	0.035
SSIVa	Os01g0720600	AK066808	0.69	0.97	0.005	0.547
SSIVb	Os05g0533600	AY373258	1.14	1.12	0.463	0.071
GBSSI	Os06g0133000	AK070431	1.21	0.80	0.866	0.100
GBSSII	Os07g0412100	AK067654	0.78	0.71	0.055	0.000
BEI	Os06g0726400	AK068920	1.09	0.83	0.402	0.002
BEIIa	Os04g0409200		0.86	0.75	0.162	0.003
BEIIb	Os02g0528200	D16201	1.49	1.14	0.005	0.485
ISA1	Os08g0520900	AB015615	2.55	2.14	0.226	0.154
ISA2	Os05g0393700		1.74	1.56	0.458	0.482
ISA3	Os09g0469400	AK106986	2.22	2.73	0.057	0.001
PUL	Os04g0164900	D50602	0.68	0.30	0.081	0.000
Pho1	Os03g0758100	AK063766	2.70	0.64	0.054	0.003
Pho2	Os01g0851700	AK105410	0.87	0.89	0.160	0.126

Gene name と RAP-ID は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．Fold change は *CRCT* 形質転換イネと非形

質転換イネの発現量の相対値を表す． *AGPS2a* と *AGPS2b* は *AGPS2* のオルタナティブスプライシングである．値は 4 反復の平均とした．P-value は T 検定にて求め，本研究では 0.005 以下の値を有意とした．杉野 (2011) の *CRCT* 形質転換イネの葉身を用いたマイクロアレイ解析の結果を引用した．

表 3. デンプン合成関連遺伝子の *CRCT* 形質転換イネの葉鞘を用いたマイクロアレイ解析の結果.

Gene name	RAP-ID	Probe name	Fold change		P-value	
			OX	RNAi	OX	RNAi
AGPL1	Os05g0580000	AK100910	4.35	0.18	0.001	0.000
AGPL2	Os01g0633100	AK071497	0.91	0.89	0.332	0.292
AGPL3	Os03g0735000	AK105092	1.04	1.20	0.944	0.229
AGPL4	Os07g0243200	D21272	1.80	0.92	0.562	0.361
AGPS1	Os09g0298200	AK073146	3.54	0.38	0.001	0.000
AGPS2a	Os08g0345800	AK071826	0.82	0.79	0.069	0.012
AGPS2b		AK103906	0.97	0.81	0.737	0.036
SSI	Os06g0160700	AK109458	1.45	0.88	0.014	0.114
SSIIa	Os06g0229800	AK101978	2.83	0.87	0.065	0.353
SSIIb	Os02g0744700	AK066446	0.86	0.88	0.095	0.065
SSIIc	Os10g0437600	AF383878	0.96	0.96	0.808	0.709
SSIIIa	Os08g0191500	AK061604	1.05	1.02	0.913	0.984
SSIIIb	Os04g0624600	AK059368	1.20	0.91	0.285	0.391
SSIVa	Os08g0345800	AK103906	0.97	0.81	0.737	0.036
SSIVb	Os05g0533600	AY373258	1.16	1.07	0.213	0.567
GBSSI	Os06g0133000	AK070431	2.58	0.79	0.008	0.223
GBSSII	Os07g0412100	AK067654	1.55	0.71	0.017	0.079
BEI	Os06g0726400	AK068920	2.37	0.38	0.017	0.000
BEIIa	Os04g0409200	AB023498	1.27	0.73	0.016	0.018
BEIIb	Os02g0528200	D16201	2.93	1.59	0.015	0.150
GPT1	Os08g0187800	AK060577	1.91	0.83	0.009	0.059
GPT2	Os07g0523600	AK059906	2.16	0.63	0.036	0.099
ISA1	Os08g0520900	AB015615	1.45	0.80	0.060	0.080
ISA2	Os05g0393700		1.24	1.29	0.543	0.557
ISA3	Os09g0469400	AK106986	1.56	1.30	0.293	0.323
PUL	Os04g0164900	D50602	3.05	0.43	0.035	0.000
Pho1	Os03g0758100	AK063766	2.82	0.30	0.001	0.000
Pho2	Os01g0851700	AK105410	1.02	0.64	0.970	0.002

Gene name と RAP-ID は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．Fold change は *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの発現量の相対値を表す． *AGPS2a* と *AGPS2b* は *AGPS2* のオルタナティブスプライシングである．値は 4 反復の平均とした．P-value は T 検定にて求め，本研究では 0.005 以下の値を有意とした．

表 4. デンプン分解関連遺伝子の *CRCT* 形質転換イネの葉鞘を用いたマイクロアレイ解析の結果.

Gene name	RAP-ID	Probe name	Fold change		P-value	
			OX	RNAi	OX	RNAi
α-Amy1A	Os02g0765600	AK101744	1.00	1.00	0.214	0.469
α-Amy1C	Os02g0765300	M81143	0.96	0.69	0.615	0.697
α-Amy2A	Os06g0713800	AK059671	0.75	0.94	0.045	0.709
α-Amy3A	Os09g0457400	AK063988	1.00	1.00	0.254	0.501
α-Amy3B	Os09g0457600	CI048168	1.00	0.76	0.313	0.357
α-Amy3C	Os09g0457800	AK101358	0.99	0.98	0.960	0.737
α-Amy3D	Os08g0473900	AK073487	1.25	1.45	0.937	0.824
α-Amy3E	Os08g0473600	AK064071	1.00	1.00	0.267	0.574
β-Amy1	Os07g0543300		0.66	0.61	0.366	0.085
β-Amy2	Os10g0465700	AK067249	1.61	0.87	0.463	0.295
β-Amy3	Os03g0141200	AK068968	2.11	1.37	0.024	0.555
β-Amy4	Os01g0236800	CI165105	1.11	0.98	0.193	0.683
β-Amy5	Os10g0565200	CI411567	3.22	3.53	0.738	0.121
β-Amy6	Os07g0543100		0.91	0.86	0.298	0.363
β-Amy7	Os07g0667100	CI278377	1.00	1.00	0.504	0.718
β-Amy8	Os09g0569200	AK070300	1.28	1.00	0.005	0.985
β-Amy9	Os03g0351300		1.31	0.99	0.329	0.863
DPE1	Os07g0627300	AK063426	1.23	1.26	0.033	0.001
DPE2	Os07g0662900	AK067082	1.25	0.72	0.122	0.008
GWD	Os06g0498400	AK058235	1.09	0.77	0.520	0.006
PWD	Os12g0297500	AK072331	0.88	0.97	0.050	0.617
SEX4-like1	Os11g0113100	AK072567	0.94	0.99	0.325	0.853
SEX4-like2	Os08g0379300	AK072357	1.09	1.08	0.395	0.562
pGlcT	Os01g0133400	AK065247	0.96	0.91	0.366	0.120
MT	Os04g0602400	AK071005	1.11	0.77	0.193	0.037

Gene name と RAP-ID は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．Fold change は *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの発現量の相対値を表す．値は 4 反復の平均とした．P-value は T 検

定にて求め，本研究では 0.005 以下の値を有意とした．

表 5. *CRCT* 高発現形質転換イネにおいて有意に発現促進された上位 50 遺伝子.

Rank	Discription	RAP-DB	Fold change	Signal ave	P-value
1	Hypothetical protein.	Os07g0511400	501.42	6896.13	0.005
2	Conserved hypothetical protein.	Os03g0115800	181.17	8154.87	0.001
3	Hypothetical protein.	Os06g0265100	134.73	522.10	0.001
4	Conserved hypothetical protein.	Os01g0692400	120.31	263.06	0.006
5	BURP domain containing protein.	Os10g0409400	86.34	4385.25	0.030
6	Conserved hypothetical protein.	Os07g0122000	60.49	741.52	0.006
7	Conserved hypothetical protein.	Os05g0296200	58.46	125.13	0.004
8	Conserved hypothetical protein.	Os01g0155800	56.28	16740.17	0.046
9	Hypothetical protein.	Os06g0579600	48.70	15018.20	0.039
10	Glycine-rich protein precursor.	Os07g0511100	47.53	655.96	0.002
11	ZIM domain containing protein.	Os07g0153000	21.44	134.79	0.001
12	Xylanase inhibitor protein I precursor.	Os07g0632000	20.59	441.35	0.044
13	Conserved hypothetical protein.	Os04g0677000	20.54	57.66	0.001
14	(No Hit)	Os05g0438300	20.49	116.89	0.002
15	Hypothetical protein.	Os06g0261300	19.79	200.50	0.000
16	Conserved hypothetical protein.	Os07g0442800	19.57	82.29	0.035
17	(No Hit)	Os11g0491900	18.56	48.03	0.003
18	Zn-finger, Dof type domain containing protein.	Os02g0252400	17.59	58.58	0.018

19	(No Hit)	Os04g0607800	16.45	49.26	0.002
20	Protein kinase domain containing protein.	Os11g0556400	15.27	36.83	0.017
21	Homeodomain-like containing protein.	Os11g0282700	14.37	45.39	0.004
22	Conserved hypothetical protein.	Os04g0387300	14.01	144.86	0.000
23	Conserved hypothetical protein.	Os04g0115200	12.39	86.36	0.032
24	(No Hit)	Os08g0213100	11.62	40.05	0.006
25	Conserved hypothetical protein.	Os05g0472600	10.74	79.48	0.006
26	Synaptojanin, N-terminal domain containing protein.	Os10g0390900	10.28	34.65	0.015
27	Conserved hypothetical protein.	Os06g0200800	10.22	39.20	0.023
28	(No Hit)	Os05g0211800	9.97	22.26	0.002
29	Vacuolar protein-sorting protein 45 homolog (AtVPS45).	Os02g0437800	9.82	60.39	0.023
30	(No Hit)	Os11g0636200	9.70	142.02	0.000
31	(No Hit)	Os05g0417400	9.54	21.31	0.005
32	Hypothetical protein.	Os12g0117700	9.27	252.34	0.006
33	Protein of unknown function DUF635 family protein.	Os01g0872900	9.10	95.82	0.003
34	Hypothetical protein.	Os05g0580100	8.68	44.08	0.009
35	Hypothetical protein.	Os12g0508400	8.48	66.74	0.007
36	Homeodomain-like containing protein.	Os01g0873000	8.42	39.76	0.006
37	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Os04g0397800	8.37	19.65	0.023

38	Cold acclimation protein COR413-TM1.	Os05g0566800	8.23	14655.81	0.015
39	Hypothetical protein.	Os06g0271400	8.15	177.12	0.022
40	2OG-Fe(II) oxygenase domain containing protein.	Os07g0103500	7.76	114.51	0.018
41	Hypothetical protein.	Os08g0441700	7.18	1397.42	0.005
42	Zn-finger, PMZ type domain containing protein.	Os07g0627100	6.58	80.08	0.030
43	(No Hit)	Os01g0225700	6.11	19.98	0.013
44	(No Hit)	Os08g0559800	5.93	18.06	0.001
45	Iron/ascorbate-dependent oxidoreductase.	Os02g0320800	5.85	21.30	0.000
46	Plant protein of unknown function family protein.	Os05g0130400	5.73	23.95	0.004
47	Conserved hypothetical protein.	Os03g0383100	5.46	14.67	0.028
48	Cytochrome P450 family protein.	Os10g0524700	5.40	1240.99	0.015
49	Protein of unknown function DUF6 domain containing protein.	Os04g0457300	5.37	94.51	0.024
50	(No Hit)	Os04g0330800	5.23	450.52	0.007

遺伝子番号は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘のマイクロアレイ解析において，Cyanine-3，Cyanine-5 のシグナル強度の平均値が 10 以上であり，P-value が 0.05 以下である遺伝子の中で発現促進された上位 50 遺伝子を示す．

表 6. *CRCT*高発現形質転換イネにおいて有意に発現抑制された上位 50 遺伝子.

Rank	Discription	RAP-DB	Fold change	Signal ave	P-value
1	Peptidase S10, serine carboxypeptidase family protein.	Os11g0461000	0.12	92.68	0.00
2	Hypothetical protein.	Os05g0227100	0.17	1569.43	0.00
3	Box protein (MADS box protein MADS1).	Os03g0215400	0.20	82.39	0.02
4	Hypothetical protein.	Os12g0406000	0.21	271.26	0.00
5	(No Hit)	Os03g0323700	0.21	42.34	0.02
6	Hypothetical protein.	Os02g0452900	0.22	13.14	0.01
7	Terpene synthase-like domain containing protein.	Os03g0348200	0.24	188.19	0.01
8	Beta-amyrin synthase.	Os11g0285000	0.25	63.52	0.00
9	SP3D.	Os01g0218500	0.25	59.99	0.00
10	MADS15 protein.	Os07g0108900	0.25	15.63	0.00
11	Acid phosphatase (Class B) family protein.	Os05g0191500	0.26	15.76	0.01
12	miRNA	osa-miR443	0.26	11.10	0.03
13	O-methyltransferase, family 2 domain containing protein.	Os04g0196200	0.28	11.90	0.01
14	Ent-kaurene oxidase (EC 1.14.13.78) (AtKO1) (Cytochrome P450 701A3).	Os06g0569500	0.28	47.98	0.00
15	4-coumarate--CoA ligase 2 (EC 6.2.1.12) (4CL 2) (4-coumaroyl-CoA synthase 2).	Os02g0697400	0.29	534.55	0.00
16	TPR-like domain containing protein.	Os08g0481000	0.29	29.18	0.00

17	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein.	Os07g0111900	0.30	76.22	0.00
18	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Os01g0735300	0.30	143.65	0.01
19	TPR-like domain containing protein.	Os06g0700100	0.30	11.10	0.00
20	Protein kinase domain containing protein.	Os09g0359500	0.30	10.72	0.02
21	Flavonoid 3'-monooxygenase (EC 1.14.13.21) (Flavonoid 3'-hydroxylase) (Cytochrome P450 75B2).	Os10g0320100	0.30	4962.07	0.00
22	Cytochrome P450 family protein.	Os06g0640500	0.30	144.38	0.00
23	Zeaxanthin cleavage oxygenase.	Os12g0435200	0.30	99.20	0.02
24	Lectin-like receptor kinase 7;2.	Os07g0130900	0.31	35.80	0.00
25	Disease resistance protein family protein.	Os06g0267900	0.31	253.28	0.01
26	MtN3 and saliva related transmembrane protein family protein.	Os09g0254600	0.31	10.42	0.01
27	Hypothetical protein.	Os07g0209500	0.31	18.19	0.00
28	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Os05g0527900	0.32	25.74	0.00

29	Conserved hypothetical protein.	Os01g0339500	0.32	26.94	0.01
30	Transcription factor, MADS-box domain containing protein.	Os03g0752800	0.32	70.04	0.00
31	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Os01g0647200	0.32	1371.01	0.01
32	Serine/threonine protein kinase family protein.	Os07g0131000	0.33	13.99	0.01
33	Cytochrome P450 family protein.	Os10g0440000	0.33	1155.09	0.00
34	miRNA	osa-miR397b	0.33	10.76	0.02
35	Isopenicillin N synthase family protein.	Os04g0522500	0.33	1483.42	0.02
36	Conserved hypothetical protein.	Os02g0587600	0.34	10.13	0.02
37	Retrotransposon gag protein family protein.	Os08g0315200	0.34	12.76	0.00
38	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.	Os03g0358800	0.34	11.25	0.00
39	GOS9 protein.	Os03g0399900	0.34	391.18	0.00
40	Anthocyaninless2.	Os08g0136100	0.35	13.29	0.02
41	Conserved hypothetical protein.	Os07g0170800	0.35	231.79	0.01
42	E-class P450, group I family protein.	Os08g0507100	0.35	19.60	0.02
43	OsPK4.	Os01g0206300	0.35	12.87	0.01
44	Calcium-dependent protein kinase, isoform 11 (EC 2.7.1.-) (CDPK 11).	Os04g0503200	0.35	40.51	0.00

45	(No Hit)	Os08g0470000	0.36	11.77	0.01
46	(No Hit)	Os01g0735400	0.36	110.44	0.00
47	Conserved hypothetical protein.	Os05g0569900	0.36	14.48	0.00
48	Conserved hypothetical protein.	Os05g0367200	0.37	132.25	0.01
49	Transcription factor MADS23.	Os08g0431900	0.37	12.69	0.00
50	Protein of unknown function DUF635 family protein.	Os12g0550700	0.37	11.92	0.01

遺伝子番号は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．CRCT 高発現形質転換イネの葉鞘のマイクロアレイ解析において，Cyanine-3，Cyanine-5 のシグナル強度の平均値が 10 以上であり，P-value が 0.05 以下である遺伝子の中で発現抑制された上位 50 遺伝子を示す.

表 7. *CRCT* 発現抑制形質転換イネにおいて有意に発現促進された上位 50 遺伝子.

Rank	Discription	RAP-DB	Fold change	Signal ave	P-value
1	Hypothetical protein.	Os07g0511400	689.86	6798.62	0.000
2	Conserved hypothetical protein.	Os03g0115800	211.87	4345.92	0.000
3	Conserved hypothetical protein.	Os10g0371600	166.94	3121.52	0.000
4	Hypothetical protein.	Os06g0265100	114.76	231.30	0.000
5	Conserved hypothetical protein.	Os01g0692400	112.31	187.29	0.000
6	Glycine-rich protein precursor.	Os07g0511100	75.47	553.50	0.001
7	Conserved hypothetical protein.	Os02g0772100	50.11	118.70	0.001
8	Conserved hypothetical protein.	Os07g0122000	41.09	351.54	0.000
9	Conserved hypothetical protein.	Os05g0296200	40.56	59.77	0.000
10	Zn-finger, Dof type domain containing protein.	Os02g0252400	19.30	41.30	0.003
11	Conserved hypothetical protein.	Os04g0677000	12.72	30.95	0.000
12	Nonaspanin (TM9SF) family protein.	Os08g0288400	10.67	17.54	0.048
13	Conserved hypothetical protein.	Os03g0383100	10.26	15.39	0.000
14	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Os04g0397800	10.17	16.33	0.001
15	Hypothetical protein.	Os06g0261300	9.93	89.51	0.000
16	Hypothetical protein.	Os11g0514800	9.48	22.49	0.017
17	Conserved hypothetical protein.	Os05g0124700	9.27	18.25	0.000

18	(No Hit)	Os08g0316400	8.52	2032.25	0.001
19	Conserved hypothetical protein.	Os07g0442800	8.40	29.44	0.003
20	(No Hit)	Os03g0446000	8.30	2066.08	0.002
21	(No Hit)	Os07g0229600	8.11	2060.17	0.002
22	Conserved hypothetical protein.	Os06g0273400	8.00	22.29	0.003
23	(No Hit)	Os04g0575900	7.99	2079.15	0.002
24	Conserved hypothetical protein.	Os04g0115200	7.62	30.34	0.002
25	Conserved hypothetical protein.	Os07g0573000	7.61	18.92	0.019
26	(No Hit)	Os02g0209900	7.59	11.79	0.002
27	Conserved hypothetical protein.	Os01g0210300	7.58	20.70	0.013
28	Peroxidase 1.	Os07g0639400	7.58	12.32	0.002
29	(No Hit)	Os01g0225700	7.47	18.72	0.001
30	miRNA	osa-miR169n	7.34	13.15	0.000
31	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor (RASI).	Os04g0526600	7.28	19.85	0.002
32	Legume lectin, beta domain containing protein.	Os04g0141400	7.13	12.07	0.019
33	Conserved hypothetical protein.	Os11g0579100	6.97	16.75	0.035
34	PR1a protein.	Os07g0124900	6.77	750.77	0.003
35	Xyloglucan 6-xylosyltransferase (EC 2.4.2.39) (AtXT1).	Os12g0149300	6.58	13.64	0.001
36	Hypothetical protein.	Os05g0330100	6.39	14.32	0.000

37	Oleosin Zm-I (Oleosin 16 kDa) (Lipid body-associated major protein) (Lipid body-associated protein L3).	Os04g0546500	6.39	13.85	0.004
38	Protein of unknown function DUF1264 family protein.	Os05g0569500	6.31	25.10	0.020
39	miRNA	osa-miR169f	6.29	22.41	0.035
40	GRF zinc finger domain containing protein.	Os03g0164200	6.27	10.50	0.002
41	Hypothetical protein.	Os05g0580100	6.23	12.13	0.034
42	Hypothetical protein.	Os04g0168300	6.12	10.64	0.000
43	Chalcone synthase J (EC 2.3.1.74) (Naringenin-chalcone synthase J).	Os05g0212900	6.04	15.05	0.040
44	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase domain containing protein.	Os06g0205800	5.89	12.98	0.003
45	(No Hit)	Os11g0491900	5.85	13.04	0.022
46	(No Hit)	Os04g0607800	5.67	12.49	0.021
47	Conserved hypothetical protein.	Os06g0200800	5.66	21.26	0.003
48	miRNA	osa-miR395e	5.54	11.92	0.003
49	Glycoside hydrolase, family 1 protein.	Os09g0511900	5.52	28.85	0.045
50	Allyl alcohol dehydrogenase.	Os12g0227400	5.52	10.45	0.048

遺伝子番号は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉鞘のマイクロアレイ解析において，Cyanine-3, Cyanine-5 のシグナル強度の平均値が 10 以上であり，P-value が 0.05 以下である遺伝子の中で発現促進された上位 50 遺伝子を示す.

表 8. *CRCT* 発現抑制形質転換イネにおいて有意に発現抑制された上位 50 遺伝子.

Rank	Discription	RAP-DB	Fold change	Signal ave	P-value
1	(No Hit)	Os03g0323700	0.09	27.95	0.000
2	Peptidase S10, serine carboxypeptidase family protein.	Os11g0461000	0.12	61.85	0.004
3	Pectinesterase family protein.	Os03g0399000	0.13	25.22	0.000
4	Heat shock protein 26.	Os03g0245800	0.14	453.61	0.037
5	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplast precursor (EC 2.7.7.27) (ADP-glucose synthase) (ADP-glucose pyrophosphorylase) (AGPASE S) (Alpha-D-glucose-1-phosphate adenyl transferase) (BEPL).	Os05g0580000	0.18	7855.33	0.000
6	Cytochrome P450 family protein.	Os10g0524700	0.21	178.49	0.000
7	CCT domain containing protein.	Os05g0595300	0.22	1562.09	0.000
8	Hypothetical protein.	Os12g0117700	0.25	23.68	0.036
9	Ankyrin repeat containing protein.	Os05g0124000	0.25	11.83	0.026
10	Retrotransposon gag protein family protein.	Os08g0315200	0.26	12.16	0.002
11	Hypothetical protein.	Os11g0294300	0.28	10.10	0.000
12	Alpha-1,4 glucan phosphorylase, L-1 isozyme, chloroplast precursor (EC 2.4.1.1) (Starch phosphorylase L-1).	Os03g0758100	0.30	7151.93	0.000
13	Hypothetical protein.	Os02g0452900	0.31	11.48	0.003

14	TPR-like domain containing protein.	Os08g0481000	0.31	23.78	0.001
15	Anthocyaninless2.	Os08g0136100	0.33	10.58	0.000
16	Terpene synthase-like domain containing protein.	Os04g0344100	0.33	228.65	0.018
17	Caffeic acid O-methyltransferase (EC 2.1.1.6).	Os04g0175600	0.35	535.17	0.004
18	Zn-finger, CCHC type domain containing protein.	Os06g0583500	0.36	106.39	0.000
19	Hypothetical protein.	Os10g0146300	0.36	10.42	0.003
20	Conserved hypothetical protein.	Os01g0339500	0.36	20.40	0.001
21	Conserved hypothetical protein.	Os09g0256700	0.36	34.58	0.005
22	Granule-bound starch synthase I, chloroplast precursor (EC 2.4.1.21) (GBSS I).	Os07g0412100	0.37	363.17	0.002
23	Hypothetical protein.	Os11g0626700	0.37	33.04	0.010
24	Zn-finger, CCHC type domain containing protein.	Os02g0552700	0.37	174.30	0.003
25	Branching enzyme-I precursor (Starch-branching enzyme I).	Os06g0726400	0.37	3188.19	0.000
26	S-adenosyl-L-methionine: beta-alanine N-methyltransferase (Fragment).	Os04g0176200	0.37	18.04	0.000
27	Hypothetical protein.	Os11g0692700	0.38	14.47	0.002
28	Non-protein coding transcript, unclassifiable transcript.	Os01g0261000	0.38	10.06	0.001
29	Conserved hypothetical protein.	Os01g0507400	0.38	15.80	0.001
30	Conserved hypothetical protein.	Os10g0445700	0.38	11.62	0.007
31	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit.	Os09g0298200	0.39	11693.51	0.000
32	Hypothetical protein.	Os06g0322400	0.40	21.54	0.009

33	Peptidase C1A, papain family protein.	Os09g0381400	0.40	10.53	0.001
34	Transferase family protein.	Os02g0484600	0.40	10.13	0.005
35	Transposase, IS4 family protein.	Os10g0143400	0.41	313.31	0.001
36	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, N-terminal domain containing protein.	Os07g0456500	0.41	11.32	0.021
37	Autophagy protein Apg6 family protein.	Os03g0258500	0.41	30.62	0.008
38	Pectate lyase/Amb allergen family protein.	Os06g0584000	0.42	10.53	0.001
39	OsPK4.	Os01g0206300	0.42	10.04	0.008
40	Lipase, class 3 family protein.	Os01g0900400	0.42	20.02	0.010
41	Hypothetical protein.	Os08g0233500	0.42	10.77	0.003
42	Hypothetical protein.	Os04g0489900	0.42	139.56	0.000
43	Phospholipase D nu-2 (Fragment).	Os02g0120200	0.42	10.37	0.004
44	Cold acclimation protein COR413-TM1.	Os05g0566800	0.42	1970.85	0.002
45	Hypothetical protein.	Os12g0406000	0.43	229.87	0.002
46	Conserved hypothetical protein.	Os02g0253700	0.43	13.04	0.012
47	Starch debranching enzyme.	Os04g0164900	0.43	64.29	0.000
48	Heat shock protein DnaJ family protein.	Os08g0374400	0.44	18.58	0.004
49	Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68) (S-adenosysl-L-methionine:caffeic acid 3-O-methyltransferase) (COMT) (CAOMT).	Os04g0176100	0.44	195.11	0.010
50	miRNA	osa-miR535	0.44	10.48	0.012

遺伝子番号は Rice Annotation Project Database RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) に準じた．*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉鞘のマイクロアレイ解析において，Cyanine-3，Cyanine-5 のシグナル強度の平均値が 10 以上であり，P-value が 0.05 以下である遺伝子の中で発現抑制された上位 50 遺伝子を示す.

考察

高 CO_2 条件下で発現促進される *CRCT* は, イネの栄養器官におけるデンプン合成を制御する重要な遺伝子であることが明らかとなった．デンプンは AGPase が触媒するデンプン合成の基質となる ADP-グルコースの合成, SS による α-1, 4 グルカン鎖の伸長, BE による分枝の過程を経て合成される．その中でも AGPase が触媒するグルコース-1-リン酸と ATP から ADP-グルコースとピロリン酸を生成する反応は律速段階であることが知られている (Ballicora et al., 2004)．これらの酵素に加え，GPT はデンプン合成に必要なグルコース-6-リン酸をプラスチド内に輸送する働きを担っており，デンプン合成に重要なタンパク質である．イネでは，これらのデンプン合成に関わる遺伝子は多重遺伝子族を形成しており，合計で 21 遺伝子あると見積もられている．これらの遺伝子は発現の器官特異性により，2 つのグループに分けることができる．1 つ目は主に胚乳などの貯蔵器官で発現するグループ，2 つ目は主に葉鞘などの栄養器官で発現するグループである (Hirano et al., 2005). これらの遺伝子のうち, *CRCT* が発現制御していた *OsAGPL1*, *OsAGPS1*，*GPT2*，*BEIIa* は栄養器官で主に発現する遺伝子グループに分類される．さらに CRCT はグルコース-1-リン酸を基質とし，α-グルカン鎖の非還元末端の伸長反応を触媒する *Pho1* の発現調節にも関与していると考えられる (図 11，12; Dauvillée et al., 2006; Satoh et al., 2008)．これらのことから，CRCT は主に栄養器官で発現する複数のデンプン合成関連遺伝子の発現を制御することがわかった.

いくつかのデンプン合成関連遺伝子の発現は炭素 (糖) と栄養条件によって調節されることが報告されている．例えば，*AGPase* や *GBSS* の遺伝子発現はスクロースやグルコースによって促進され，硝酸によって抑制される (Akihiro et al., 2005; Dian et al., 2003; Scheible et al., 1997)．本研究において，*CRCT* の発現はグルコースやスクロースなどの糖によって発現が促進され，硝酸アンモニウムにより抑制された (図 3C)．つまり CRCT は, デンプン合成関連遺伝子の C/N 応答に関与していることが示唆された. 一方, *CRCT*形質転換イネの葉鞘ではスクロース含量とデンプン含量にトレードオフの関係が認められた (図 7B)．言い換えると，*CRCT* 高発現形質転換イネではスクロース含量が低いにも関わらず，デンプン合成関連遺伝子の発現が増加し，デンプンが多量に蓄積し

ていた．これらの結果からデンプン合成のシグナル伝達経路の中でも，CRCT は下流に位置していることが示唆される．CRCT は細胞の糖レベルに依存せずに，デンプン蓄積量を制御できることから *CRCT* の発現量はイネのデンプン蓄積において非常に重要な決定因子と言える．

イネの胚乳では，RSR1，FLO2，OsEBP-89，OsbZIP58 のようなデンプン合成の調節因子が特定され，詳細なデンプン合成制御メカニズムが明らかにされつつある (Fu and Xue, 2010; She et al., 2010; Wang et al., 2013; Zhu et al., 2003)．しかしながら，栄養器官におけるデンプン合成調節メカニズムは，ほとんど不明のままであった．シロイヌナズナの葉では，*AGPase L3* (*APL3*) の発現はスクロース特異的に誘導される (Solfanelli et al., 2006)．シロイヌナズナの葉において，ARM repeat タンパク質様のドメイン構造を持つ *Impaired Sucrose- Induction1* (*ISI1*) のノックアウト変異体では *APL3* の発現が減少することが報告されている (Rook et al., 2006)．しかしながら，デンプン含量は必ずしも *ISI1* の発現量と相関していなかった．植物では，ヘキソキナーゼによるグルコースのリン酸化反応が糖シグナル伝達経路に必要であり，ヘキソキナーゼ依存的糖シグナル伝達経路が多くの光合成関連遺伝子の発現調節で中心的な役割を果たすことが提唱されている (Rolland et al., 2001)．しかしながら，*AGPase* の糖による発現誘導はヘキソキナーゼとは別の糖シグナル経路によるものだと考えられている (Xiao et al., 2000)．また，*CRCT* はリン酸化されるが代謝されない糖である 2-デオキシ-グルコースでは発現促進されないこと (杉野，2011) から，*CRCT* の発現はヘキソキナーゼとは別の糖シグナル経路により調節されると考えられる．SnRK1 が介する糖シグナル経路も多くの糖応答性遺伝子の発現を調節する (Baena-González et al., 2007)．しかし SnRK1 は CRCT とは異なり，糖欠乏に応答し，糖の付加や光合成の上昇には抑制的な応答をする．つまり，ヘキソキナーゼや SnRK1 はデンプン合成の調節において中心的な働きはしておらず，CRCT との関係もないと考えられる．よって CRCT はこれまでに報告されていない糖シグナル伝達経路を通して，栄養器官のデンプン合成を調節する重要な因子であると考えられる．

非形質転換イネと *CRCT* 高発現形質転換イネの比較において，最も顕著な形態的な違いは株の開帳性であった (図 4)．株の開帳性はイネの草型を決定する重要な形質の 1 つで，収量にも影響を与える．イネにおいて，*PROG1* や *TAC1* といった株の開帳性に関

係する遺伝子が特定されている (Tan et al., 2008; Yu et al., 2007). PROG1 は Cys2/Hys2 型ジンクフィンガータンパク質で，芝生のように地に張った草型に関係する (Tan et al., 2008). しかし，この形質は明らかに *CRCT* 高発現形質転換イネとは異なる (図 4). 分げつ角度の重要な QTL である *TAC1* は，分げつ角度を正に制御し，他の形質には影響を与えない (Yu et al., 2007). この表現型と株元の不伸長茎部で発現するという器官特異性は *CRCT* と一致している (図 5). つまり，CRCT は TAC1 と相互作用している可能性がある. しかし, *CRCT* の発現レベルは *TAC1* の発現に影響を与えていなかった (図 4C). 本実験で *CRCT* 形質転換イネの作出に用いた日本晴などのコンパクトな草型のイネ品種では，*TAC1* の 4 番目のイントロンの 3'-スプライシングサイトに一塩基置換が起きている．そのため，日本晴などのイネ品種では *TAC1* は機能していない．つまり，CRCT は TAC 1 とは別の機構で株の開帳性を調節していると考えられる．またイネの株の開帳性に関係する QTL 解析から TAC1 の株の開帳性への寄与率は 47.5%であるが，寄与率は低いものの他に 4 つの QTL も同定されている (Li et al., 1999). しかしながら CRCT は第 5 染色体の末端に位置しており，これら 5 つの QTL とは重複していない．これらの遺伝子の他に，*LAZY1* と *LPA1* は，シュートの重力応答に影響を与え，株の開帳性に影響を与えることが報告されている (Li et al., 2007; Yoshihara and Iino, 2007; Wu et al., 2013). LAZY1 はオーキシンの不均等分配を介して重力応答に関わっており，*lazy* 欠損変異体では重力感受性が低下し，株の開帳性が増加することが報告されている (Li et al., 2007; Yoshihara and Iino, 2007). *LPA1* はアミロプラストの沈降速度を調節することでシュートの重力応答性に影響を与え，*lpa1* 欠損変異体でも同様に株の開帳度が増加する (Wu et al., 2013). 重力応答性が減少したこれらの変異体の草型は，葉身や分げつが重力方向に垂れ，散開した草型となる．*CRCT* 高発現形質転換イネの草型はこれらのような重力方向に垂れた草型ではなく，また *CRCT* の発現量は *LAZY1* や *LPA1* といった遺伝子の発現に影響を与えていなかった (図 4C). これらのことから *CRCT* は *LAZY1* や *LPA1* の発現を直接制御していないと考えられた．近年，葉鞘や，重力応答に関わる葉枕でデンプンが蓄積しないイネの *agpl1* 欠損変異体では株の開帳度が増加することが報告された (Okamura et al., 2013). またこの *agpl1* 欠損変異体では茎部の重力応答性が低下することも報告された (Okamura et al，2015). *CRCT* 高発現形質転換イネは *agpl1* 欠損変異

体と対照的に葉鞘や葉枕に多くのデンプンを蓄積していた (図 9B). しかしながら, *agpl1* 欠損変異体と同様に株が開き，重力応答性が低下していた (図 4，13). 一般的にデンプン粒は平衡石として重力応答に関与していると考えられている (Hashiguchi et al., 2013). これらの結果から，葉枕におけるデンプン蓄積の極端な増減はイネの重力応答に影響を与え，株の開帳度が増加すると推察された．しかし，これまでのところ重力応答と株の開帳性を直接結びつける証拠は得られていない．また，シロイヌナズナのデンプン過剰蓄積変異体では重力感受性の上昇が報告されている (Vitha et al., 2007). 一方で, デンプン鞘のデンプン粒が大きくなるシロイヌナズナの *arc6* 変異体では *CRCT* 高発現形質転換イネと同様に重力応答が緩慢になることが報告されている (Yamamoto et al., 2002). デンプンの蓄積と重力応答，そして株の開帳性の関係は今後より詳細な解析を行う必要があるだろう.

高 CO_2 条件下では多くの C_3 植物でデンプン合成に関わる遺伝子の発現促進と，それに伴うデンプン蓄積量の増加が起きる (Ainswarsh and Long, 2005; Fukayama et al., 2009; Leakey et al., 2009a; Leakey et al., 2009b). それらの CO_2 濃度の上昇に応答した転写や代謝の変化は，大部分は *CRCT* の発現変化で説明できる．本研究の結果は，CRCT は高 CO_2 条件に順化するために重要な調節因子であることを示している. また高 CO_2 環境下では籾数が多いタカナリや籾が大きい秋田 63 号といったシンク容量が大きいイネ品種で収量の増加率が高いことが報告されている (Hasegawa et al., 2013). CRCT は葉鞘などの栄養器官のシンク活性を調節することでイネの収量, そして高 CO_2 条件下での栄養生長を決定している可能性も考えられる. よって CRCT は今後，イネの生産性の改良を進めるうえで重要なターゲットとなり得る. さらに CRCT の応用面での利用法で最も注目すべき点は，CRCT は葉鞘や稈などの非可食部のデンプン蓄積を制御できることであり, この性質からバイオ燃料用植物を作出するのに非常に有用な遺伝子であるということである. これまで報告されてきた多くのデンプン過剰蓄積変異体はデンプン分解や分解産物を輸送する輸送体に変異が起こり, デンプンが分解されずに蓄積したものであった (Weise et al., 2011). *CRCT* を高発現することで起こるデンプン蓄積は複数のデンプン合成関連遺伝子の発現が促進されたことによるものである. よって CRCT が介するデンプン合成調節の分子メカニズムの更なる解析や *CRCT* の発現量を最適化することによ

って, 高収量でかつバイオ燃料としても利用できる次世代型のイネの開発が可能となるかもしれない.

摘要

高 CO_2 条件下で発現促進される遺伝子 CO_2 Responsive CCT Protein (CRCT) は光合成産物によって発現誘導されること, 様々な器官の維管束で発現することがわかっているが，その機能の詳細は不明である．本章では CRCT の機能の解明を目的として，*CRCT* の発現解析と *CRCT* 形質転換イネを用いた生理解析を行った.

CRCT-GFP 融合タンパク質を用いた CRCT の細胞内局在性の解析から, CRCT は核に局在すること，また CRCT の C 末端領域に存在する CCT ドメインは核移行性シグナルとして機能することがわかった．リアルタイム PCR 法による発現解析により，*CRCT* の発現は高 CO_2 処理を始めて 2 日目以降から大気条件下に比べ有意に高くなることがわかった．また，*CRCT* の発現は明期の終わりに最も高くなり，暗期の終わりに最も低くなることもわかった. これまでの研究から *CRCT* の発現は糖によって促進されることが報告されていたが, 糖による発現促進効果は窒素によって緩和されることがわかった. 高 CO_2 条件下で植物を育成した場合, 植物種に依らず広く認められる現象の 1 つはデンプン蓄積量の増加である. そこで *CRCT* 形質転換イネの様々な部位のデンプン蓄積量を解析したところ，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘と稈では非形質転換イネに比べ顕著にデンプン蓄積量が増加した．一方で，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉鞘と稈ではほとんどデンプンの蓄積が認められなかった． *CRCT* 形質転換イネの葉鞘における遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により明らかにしたところ, *CRCT* の発現量は *AGPL1*, *AGPS1*, *BEI*, *Pho1* といった複数のデンプン合成関連遺伝子の発現量と相関があることがわかった．これらの結果から，CRCT は光合成産物含量を感知して，葉鞘や稈のデンプン合成を制御する転写因子様タンパク質であることが明らかとなった.

CRCT 形質転換イネの生育は非形質転換イネと大きな差異は認められなかったが, *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネよりも顕著に株が開帳することがわかった．株の開帳性は重力応答との関係が指摘されているため *CRCT* 形質転換イネの重力感受性を解析したところ，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べて重力感受性が低下していた．よって，*CRCT* 高発現形質転換イネでは葉枕にデンプン粒が過剰に蓄積したため重力感受性が低下し，開帳性が増したと考えられた.

第 2 章

高 CO_2 条件下で発現促進される *CRCT* の発現量が高 CO_2 条件下におけるイネの光合成と生育に与える影響の解析

第 1 章により, 高 CO_2 条件下で発現促進される遺伝子 *CRCT* はイネ葉鞘におけるデンプン合成を制御する転写因子様タンパク質であることがわかった．しかしながら，これまでの解析では *CRCT* が高 CO_2 条件下で発現促進される生物学的な意義は解明されていない. そこで本章では *CRCT* 高発現形質転換イネと *CRCT* 発現抑制形質転換イネを大気 CO_2 条件 (38 Pa) と高 CO_2 条件 (100 Pa) で育成し，*CRCT* の発現量が高 CO_2 条件下におけるイネの光合成や生育に与える影響を解析した.

材料と方法

2-1　供試材料

1-2 と同様の方法で *CRCT* 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ，非形質転換イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) を育成した．播種後 12 日目に植物体を 0.15 g N に相当する化成肥料 (N:P:K = 8:8:8)，0.15 g の微量要素，2 g のケイ素 を含む赤玉土 (Green Plan) が満たされた 500 mL プラスティックカップ (アズワン) に移植し，光強度と CO_2 濃度を制御できる人工気象器 (NC-350HC-INSS;日本医科器械製作所) 内で育成した．栽培条件は CO_2 濃度 38 Pa (大気 CO_2 条件) と 100 Pa (高 CO_2 条件) ，明期 14 h で気温 30°C，暗期は 10 h で気温 23°C とし 1 日を通して湿度は 70%に設定した．

2-2　可溶性糖含量とデンプン含量の測定

第 9 葉の葉身展開中の個体の第 7 葉の葉鞘を，新鮮重を測定後サンプリングし，可溶性糖とデンプン含量の測定に用いた．また，第 3-8 葉鞘をサンプリングし，デンプンの蓄積量をヨウ素デンプン反応により解析した．可溶性糖含量とデンプン含量の測定，ヨウ素デンプン反応による葉鞘の染色は 1-5 の方法で行った．

2-3　光合成速度の測定

異なる CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネについて光合成速度の CO_2 濃度依存性を測定した．8.2 葉齢の個体の第 8 葉の葉身について，携帯型光合成測定装置 (LI-6400; LI-COR) を用いてガス交換速度を測定した．測定条件は，基本的には O_2 濃度 21%，葉温 28°C，光量子束密度 1,500 μmol m^{-2} s^{-1}，飽差 (VPDL) 約 1.0 kPa で行った．また CO_2 濃度については，4.5-88 Pa の 9 段階の異なる CO_2 分圧のガスチャンバーに送ることにより光合成速度の測定を行った．なお，CO_2 分圧は高い条件から低い条件に移行する方向で測定を行なった．最大カルボキシレーション速度 (V_{cmax}) の算出は von Caemmerer and Farquhar (1981) のモデル式を用いて算出した．また，最大電子伝達速度 (J_{max}) は Ishikawa et al, (2011) の方法を参考に算出した．

2-4　葉内成分の解析

2-4-1　サンプリング

光合成の測定が終わった個体について，明期の終わりに，第 8 葉葉身を 2 分割し葉面積を測定した後に液体窒素で凍結させ，-80°C で保存した．2 分割した一方の葉身は Rubisco 含量，可溶性タンパク質含量，クロロフィル含量，窒素含量の測定に用いた．また，もう一方の葉身は可溶性糖含量とデンプン含量の測定に用いた．

2-4-2　窒素含量，クロロフィル含量，可溶性タンパク質含量，Rubisco 含量の測定

乳棒と乳鉢を共に冷蔵庫であらかじめ冷却した．乳鉢にタンパク質抽出バッファー (50 mM Na-phosphate, 5 mM dithiothreitol, 5% (w/v) glycerol, pH 7.0) を 2 mL 加え，氷上で乳鉢と乳棒で葉身を磨砕した．そのうち 1 mL を窒素含量の測定，200 μL をクロロフィル含量の測定，残り 800 μL をタンパク質含量と Rubisco 含量の測定に用いた．

2-4-3　窒素含量の測定

磨砕液 1 mL をサリチル酸-硫酸 (6 g のサリチル酸を 180 mL の濃硫酸に溶解) を 1 mL を加えた試験管に入れ，よく混合し，栓をして 1 晩おいた．加熱直前に約 50 mg 無水チオ硫酸ナトリウムを加えて約 10 分間加熱した．冷却し再加熱する直前に冷却した 30% 過酸化水素水を 0.3 mL 加えた．分解液が透明になるまで過酸化水素を入れて加熱する操作を繰り返した．溶液が透明になった後，白煙が発生しない程度の温度で 1 時間加熱した．その後 50°C に設定した乾燥機で 1 晩おいた．

インドフェノール法にてサンプルの窒素濃度を測定した (西川，2011)．島津紫外可視分光光度計 (UV-1800; SHIMADZU) を用いて 625 nm の吸光度を測定した．

2-4-4　クロロフィル含量の測定

磨砕液 200 μL をアセトン 800 μL が入った 1.5 mL チューブに移し，冷暗所で沈殿から完全に色素が抜けるまで保存した．得られた上澄みを用いて 1-4 の方法でクロロフィル含量を測定した．

2-4-5　可溶性タンパク質含量の測定

磨砕液を 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心分離した. 上澄みを新しいチューブに回収し，タンパク質抽出液とした．上澄みの一部を用いて，1-6 の方法により可溶性タンパク質含量を計算した.

2-4-6　Rubisco 含量の測定

Rubisco の定量は[^{14}C]- 2-カルボキシアラビニトール 1、5-ビスリン酸 (CABP) を用いて，Mate et al. (1996) の方法に若干の改良を加えて測定した．1.5 mL チューブに 113 µL の Pre-CABP total buffer (50 mM Bicine-NaOH, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, pH 7.8), 7.8 µL の 250 mM $NaHCO_3$ を加え CABP total buffer とした. ここに 10 µL の 0.4 mM [^{14}C]-CABP, 45 µL のタンパク質抽出液を加え，穏やかに撹拌し室温で 45 分間置いた．その後 25 µL の 20 mg mL^{-1} カゼインと 100 µL の 60% (w/v) PEG4000 を加え，十分に撹拌して氷上に 30 分間置き，Rubisco を沈殿させた．そして，13,000 rpm，4°C で 15 分間遠心分離し沈殿を回収した．その沈殿を 500 µL の緩衝液 (50 mM Biocine-NaOH, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 20% (w/v) PEG4000, pH 7.8)で 3 回洗浄した．1 回目の洗浄の時のみ，超音波洗浄機を用いて沈殿を再懸濁した．得られた沈殿を 200 µL の 0.1N NaOH に溶かし，シンチレーションバイアルに移した．3 mL のシンチレーションカクテル (ACSII; Amersham) を加えて撹拌し一晩置いた．翌日，液体シンチレーション測定装置 (LS-6500; Beckman) で放射活性を測定した.

2-4-7　可溶性糖含量とデンプン含量の解析

可溶性糖含量とデンプン含量の測定を 1-5 と同様の方法で行った.

2-5　透過型電子顕微鏡による葉緑体内のデンプン粒の観察

2-5-1　供試材料

2-1 の方法で育成した 8.6 葉齢期のイネの第 8 葉身を解析に用いた.

2-5-2　サンプルの調整

サンプルの調整や透過型電子顕微鏡を用いた解析は Marutani et al. (2014) の方法により行った. 組織を潰さないように葉身をカミソリで 1 mm^2 ほどの小さい切片に切り分け, 前固定液 (2.5%グルタールアルデヒド，0.1 M Na-phosphate) が入ったバイアルに移し, 10 分間撹拌した. その後前固定液を入れ替え，この操作を 3 回繰り返した. 固定液 (1% 四酸化オスミウム) に移し，4°C で 1 時間置き固定した．蒸留水で良く洗浄した後，固定したサンプルを 50, 70, 90% (v/v) エタノールで 20 分ごと処理し, 最後に 100% (v/v) エタノールで脱水した．脱水後のサンプルをプロピオンオキサイド中に移し，10 分間室温で置いた．さらにプロピオンオキサイド : Spurr 樹脂溶液 (1 : 1, Spurr 1969) に移し，3 時間室温で置いた．その後 Spurr 樹脂に 3 日間，4°C の条件下で浸漬させた．サンプルを鋳型に移し，オーブンで 24 時間 70°C で加温し包埋した.

2-5-3　超薄切片の作製

サンプル樹脂からウルトラミクロトーム (Porter-Blum MT-1 Ultra Microtome; Microtome Service Company) とダイヤモンドナイフ (Diatome) を用いて厚さ 80 nm の超薄切片を作製した．超薄切片は 4%酢酸ウラン水溶液で染色した後，佐藤氏混合鉛液 (Sato et al. 1967) でさらに後染色した.

2-5-4　透過型電子顕微鏡による観察

染色した超薄切片を透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 electron microscope; JEOL) を用いて加速電圧 75 kV の条件で観察した.

2-6　生長解析

播種後 8 日ごとに草丈, 葉齢, 分げつ数を測定した. 播種後 40 日目に葉身, 葉鞘 (茎) , 根にと分けて組織を採取し，80°C で 3 日間乾燥させた．その後，各部位の乾物重を電子天秤 (GX-400; AND) で測定した.

結果

第 1 章の結果より，*CRCT* の発現量はイネ葉鞘のデンプン含量と高い正の相関があることが明らかとなった．しかしながら，その関係に及ぼす高 CO_2 処理の効果は明らかとなっていない．そこでまず初めに，*CRCT* 形質転換イネを大気 CO_2 条件と高 CO_2 条件で育成し，葉鞘の可溶性糖とデンプン含量の解析を行なった (図 14)．大気 CO_2 条件下で育成した場合，*CRCT* 高発現形質転換イネのフルクトース含量は非形質転換イネに比べ有意に減少していた．また，高 CO_2 条件下で育成した場合，*CRCT* 発現抑制形質転換イネのスクロース含量は非形質転換イネに比べ有意に減少した．しかしながら，全体として *CRCT* の発現量は大気 CO_2 条件下で育成した場合も，高 CO_2 条件下で育成した場合も葉鞘の可溶性糖含量に大きな影響及ぼさないことがわかった．一方で，大気 CO_2 条件下で育成した場合も高 CO_2 条件下で育成した場合も，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘のデンプン含量は非形質転換イネに比べ有意に増加し，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは有意に減少した (図 14A)．次に，それぞれの系統の第 3 葉から第 8 葉の葉鞘のデンプン蓄積量をヨウ素デンプン反応により解析した (図 14B). 葉鞘のデンプン蓄積は基部から先端に向かっておこる. 大気 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘では, 葉鞘全体が黒紫色に染色されデンプンが葉鞘全体で蓄積していることがわかった．一方で，*CRCT* 発現抑制イネではほとんど葉鞘が染色されなかった．また，高 CO_2 条件下で育成した場合は, 全ての系統でデンプン蓄積量が大気 CO_2 条件下で育成した場合に比べ高くなったが, デンプン蓄積のパターンは大気 CO_2 条件下で育成した場合と同様であった (図 14B)．以上の結果から，*CRCT* は CO_2 条件に関係なく葉鞘のデンプン蓄積に影響を与えることがわかった.

CRCT 形質転換イネを大気 CO_2 条件下と高 CO_2 条件下で育成し, 葉身の光合成速度を解析した．葉内 CO_2 分圧に対する光合成速度を図 15 に示す．大気 CO_2 条件下で育成した場合は，*CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの光合成速度に差は認められなかった (図 15A)．しかしながら，高 CO_2 条件下で育成した場合は *CRCT* 高発現形質転換イネの光合成速度は非形質転換イネに比べ高く，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低くなった (図 15A). 特に *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ葉内 CO_2 分圧が 20

Pa 以上で光合成速度が高い傾向を示したのに対し, *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは葉内 CO_2 分圧によらず光合成速度が低下していた. それらのデータを用いて, 最大カルボキシレーション速度 (V_{cmax}) と最大電子伝達速度 (J_{max}) を算出した (図 15B). 大気 CO_2 条件下で育成した場合は, *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの V_{max} に差は認められなかったが, 高 CO_2 条件下で育成した場合の *CRCT* 発現抑制形質転換イネの V_{cmax} は非形質転換イネに比べ有意に減少していた (図 15B). また, *CRCT* 高発現形質転換イネの J_{max} は, 高 CO_2 条件下で育成した場合のみ非形質転換イネに比べ高くなった. 一方, *CRCT* 発現抑制形質転換イネの J_{max} は育成した CO_2 条件に関係なく非形質転換イネに比べ減少した. これらの結果により, *CRCT* の発現量は光合成に劇的な影響を与えるわけではないが, 高 CO_2 条件下で育成した場合のみ CO_2 固定や電子伝達系の能力に影響を与えることがわかった.

光合成速度の測定を行なった葉身を用いて, 窒素, 可溶性タンパク質, Rubisco, クロロフィル含量の解析を行った (図 16A). 大気 CO_2 条件下で育成した場合, *CRCT* 形質転換イネのそれらの含量は非形質転換イネと同程度であった. 高 CO_2 条件下で育成した場合は, それらの含量は非形質転換イネに比べ *CRCT* 形質転換イネでは全般的に減少傾向を示し, その傾向は *CRCT* 高発現形質転換イネに比べ *CRCT* 発現抑制形質転換イネの方が大きかった (図 16A). これらの結果から, *CRCT* の発現レベルは窒素含量, 可溶性タンパク質含量, Rubisco 含量, クロロフィル含量に直接的な影響を与えないが, 高 CO_2 条件で育成した場合は特に *CRCT* の発現レベルが低いとそれらの含量が減少することがわかった. 次に, 葉身の可溶性糖とデンプン含量の測定を行った (図 16B). 大気 CO_2 条件下で育成した場合は, *CRCT* 高発現形質転換イネの可溶性糖含量は非形質転換イネに比べ減少傾向にあったが, デンプン含量に差異は認められなかった. 高 CO_2 条件下で育成した場合に可溶性糖含量の減少傾向は顕著で, *CRCT* 高発現形質転換イネのグルコース, フルクトース, スクロース含量は非形質転換イネに比べ有意に低下していた. *CRCT* 発現抑制形質転換イネにおいても可溶性糖とデンプン含量は, 大気 CO_2 条件下で育成した場合は非形質転換イネとの間に差異は認められなかった. しかしながら, 高 CO_2 条件下で育成した場合は, *CRCT* 発現抑制形質転換イネの光合成産物含量は顕著に非形質転換イネよりも高くなり, 特にグルコース, デンプン含量は有意に増加した (図

16B). さらに透過型電子顕微鏡を用いて，葉緑体内のデンプン粒の蓄積状況を解析した (図 17). 大気条件におけるデンプン粒の蓄積は，系統間で差異は認められなかったが，高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 発現抑制形質転換イネでのみデンプン粒の数の増加が観察された. さらにデンプン粒の葉緑体占有率を解析したところ，予想通り高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 発現抑制形質転換イネの占有率が非形質転換イネに比べ有意に高くなった (図 18). 以上の結果から，大気 CO_2 条件下では *CRCT* の発現量は葉身のデンプン含量に影響を与えないが, 高 CO_2 条件下では葉鞘の場合とは逆に *CRCT* の発現量はデンプン含量と負の相関があることがわかった.

CRCT 形質転換イネを大気 CO_2 条件または高 CO_2 条件で育成し，8 日ごとに草丈，葉齢，分げつ数を解析した (図 19). 育成した CO_2 条件に関わらず，草丈と葉齢は系統間での差異は認められなかった. しかし，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの分げつ数は育成した CO_2 条件に関係なく非形質転換イネよりも増加する傾向があった. また *CRCT* 高発現形質転換イネを高 CO_2 条件下で育成した場合は，播種後 24 日目以降は分げつ数が減少傾向を示した. 次に播種後 40 日目の植物個体を用いて，葉身，葉鞘，根の乾物重を解析した (図 20). 育成した CO_2 条件によらず，*CRCT* 高発現形質転換イネでは全ての部位の乾物重が非形質転換イネに比べて明らかに減少した (図 20). 一方で，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの乾物重は非形質転換イネとの間に差異は認められなかった. 以上の結果から，*CRCT* の発現量はイネの分げつ数や乾物生産に影響を与えることがわかった.

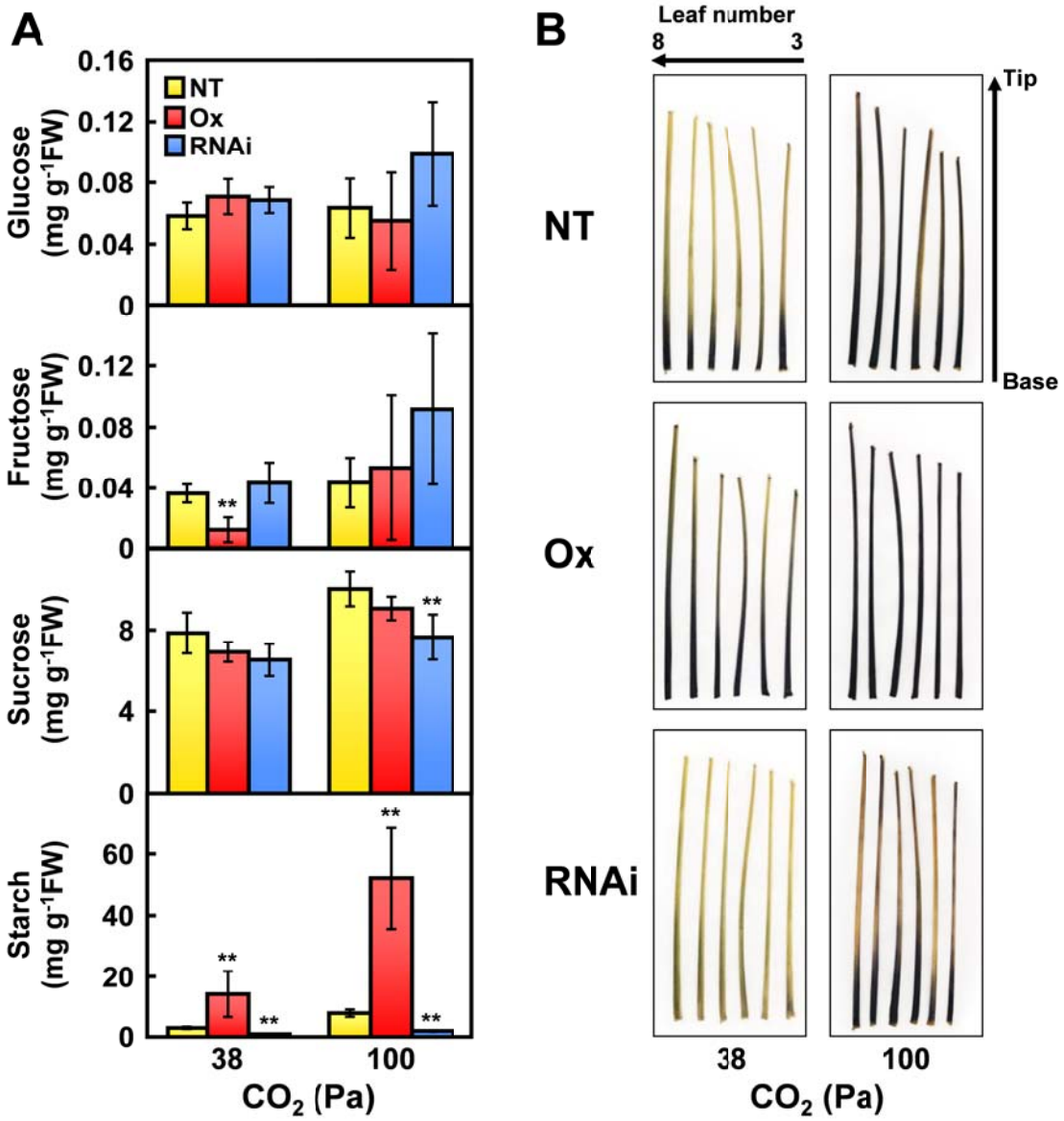


図 14.　高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの葉鞘における可溶性糖含量とデンプン含量．A，イネ葉鞘の可溶性糖とデンプン含量．大気条件下 (38 Pa) または高 CO_2 条件下 (100 Pa) で育成したイネの第 9 葉展開中の個体の第 7 葉の葉鞘を用いて，グルコース，フルクトース，スクロース，デンプン含量を測定した．T 検定により p 値を算出した．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．B，ヨウ素デンプン反応で染色したイネの葉鞘．大気条件下 (38 Pa) または高 CO_2 条件下 (100 Pa) で *CRCT* 形質転換イネを 8.6 葉齢まで育成し，明期の終わりに第 3 葉葉鞘~第 8 葉葉鞘をサンプリングし，ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した．NT, 非形質転換イネ．Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ．RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

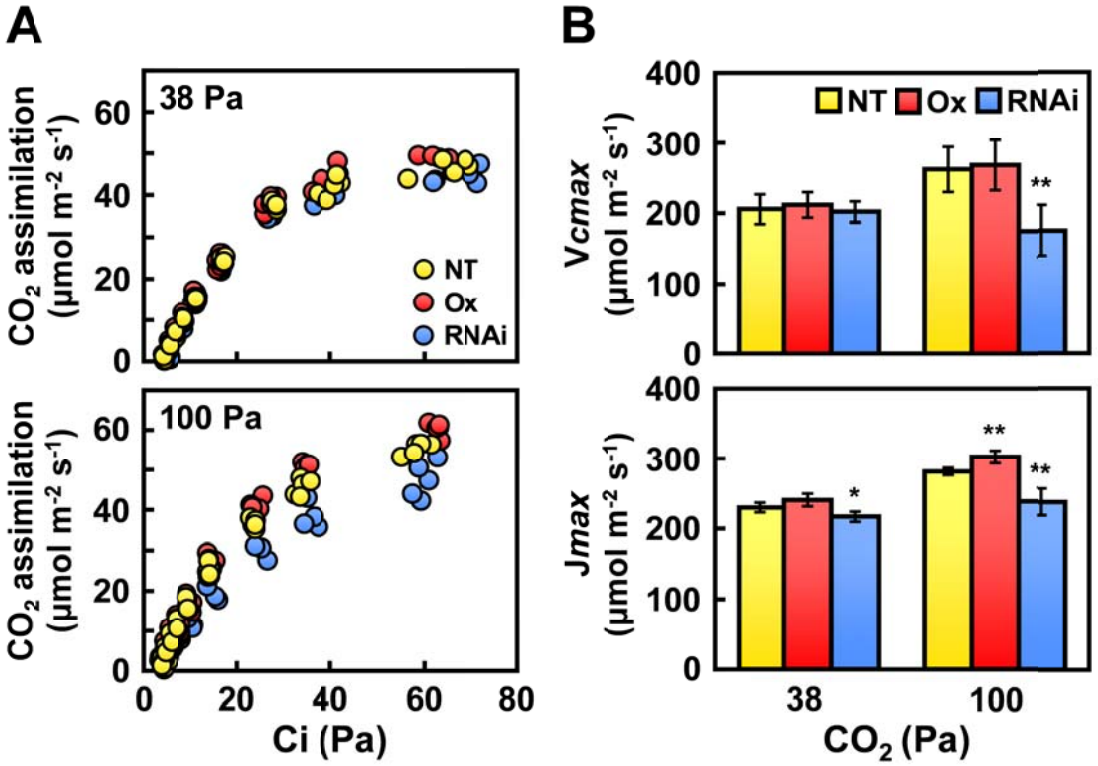


図 15.　*CRCT* 形質転換イネの光合成速度の CO_2 濃度依存性.

A，*CRCT* 形質転換イネの葉内 CO_2 濃度 (Ci) に対する光合成速度．*CRCT* 形質転換イネを大気 CO_2 条件下 (38 Pa) と高 CO_2 条件下 (100 Pa) で育成し，第 9 葉展開中の個体の第 8 葉を用いて光合成速度を測定した．B，最大カルボキシレーション速度 (*Vcmax*) と最大電子伝達活性 (*Jmax*)．A のデータと Ishikawa et al., (2011) において測定されたパラメーターを元に *Vcmax* と *Jmax* を算出した．T 検定により p 値を算出した．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．NT，非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

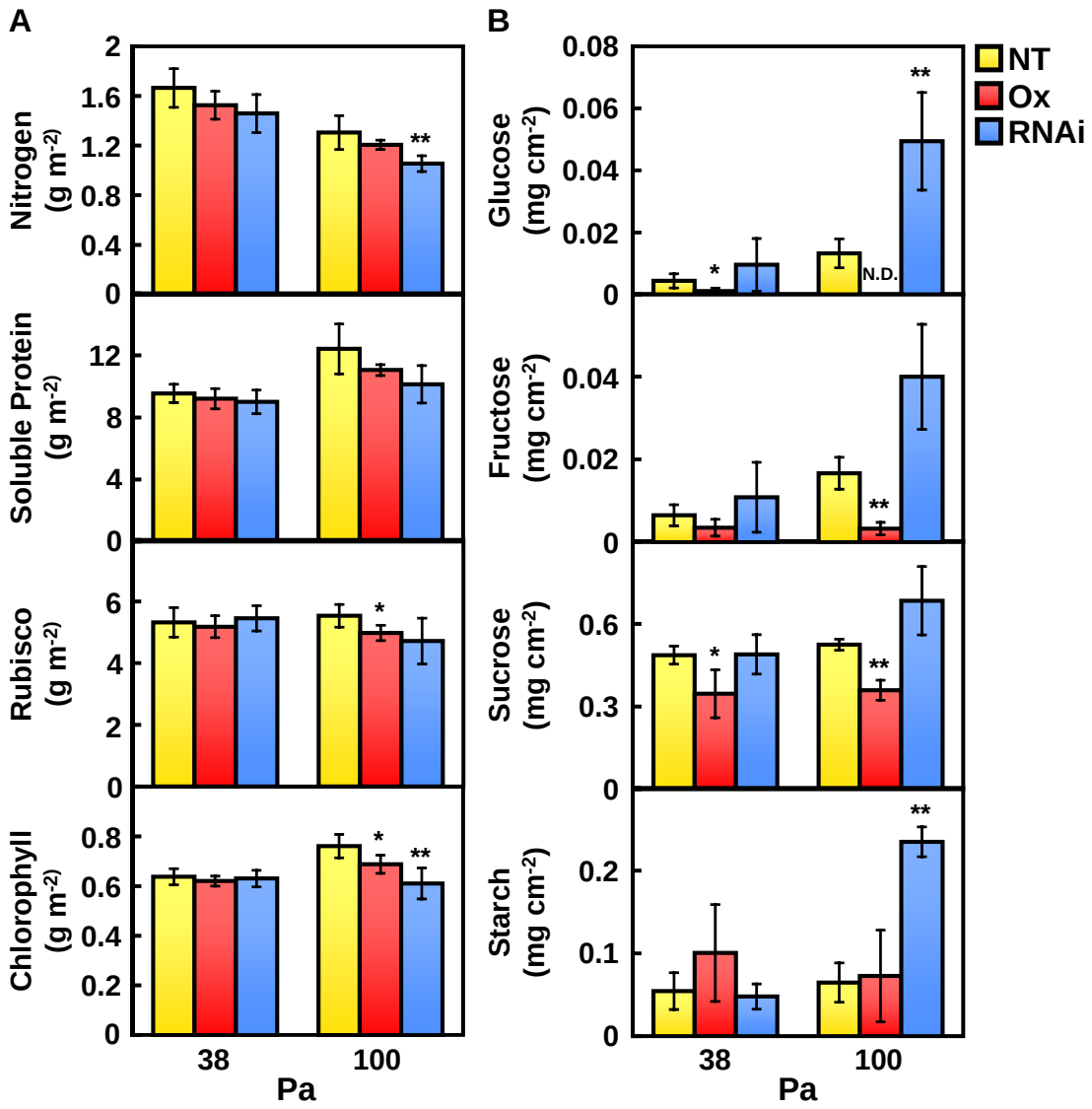


図 16.　*CRCT* 形質転換イネの葉身の葉内成分含量.

A，窒素，可溶性タンパク質，Rubisco，クロロフィル含量．B，グルコース，フルクトース，スクロース, デンプン含量. *CRCT* 形質転換イネを大気 CO_2 条件下 (38 Pa) と高 CO_2 条件下 (100 Pa) で育成し，光合成速度を測定した葉身を明期の終わり頃にサンプリングし解析に用いた．T 検定により p 値を算出した．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．*，**はそれぞれ 5%, 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．NT，非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

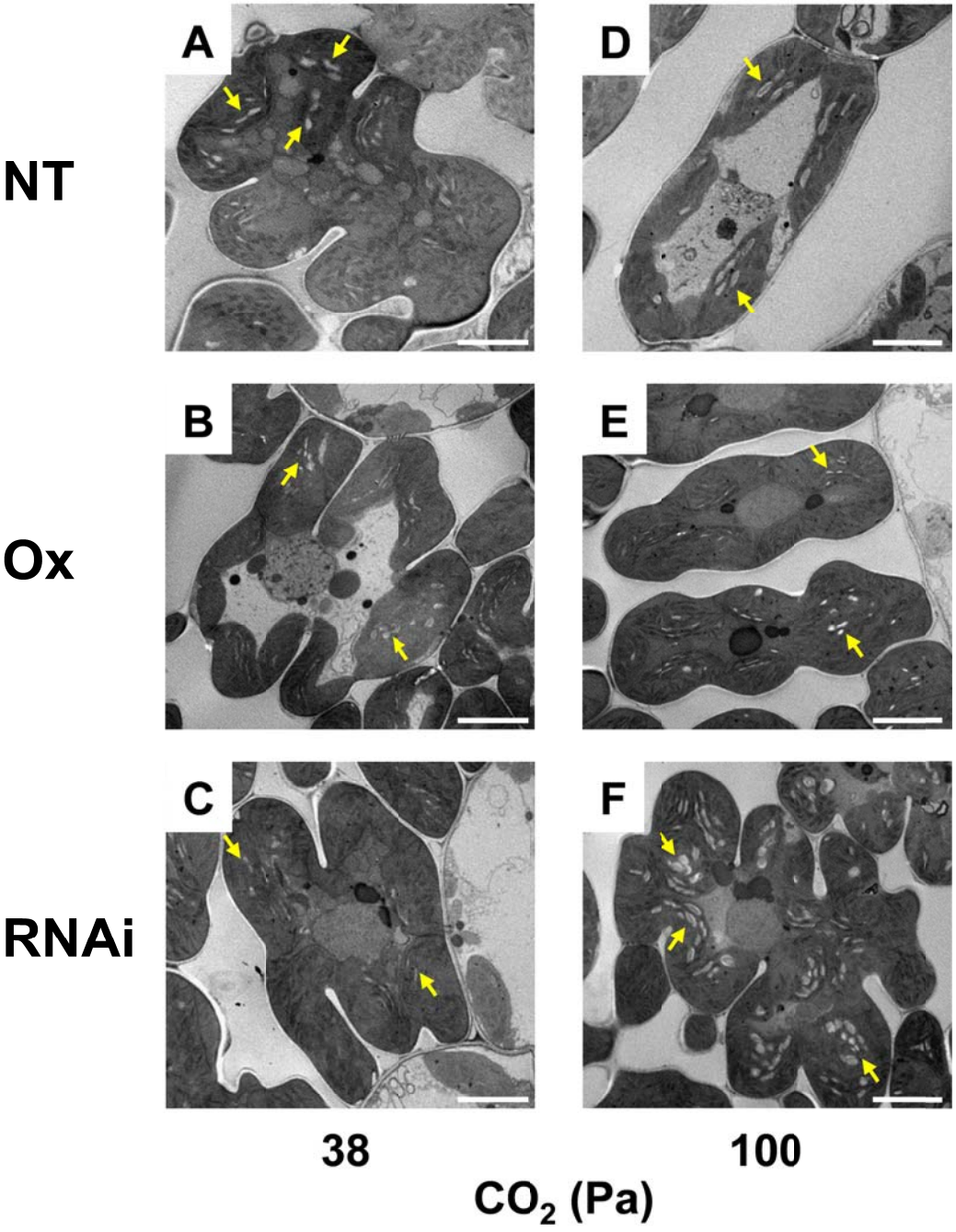


図 17.　透過型電子顕微鏡を用いた *CRCT* 形質転換イネの葉身の葉緑体内のデンプン粒の解析. *CRCT* 形質転換イネを大気 CO_2 条件下 (38 Pa，A-C)，または高 CO_2 条件下 (100 Pa，D-F) で育成し，明期の終わりにサンプリングした．黄色の矢印はデンプン粒を示す．　NT, 非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．　2

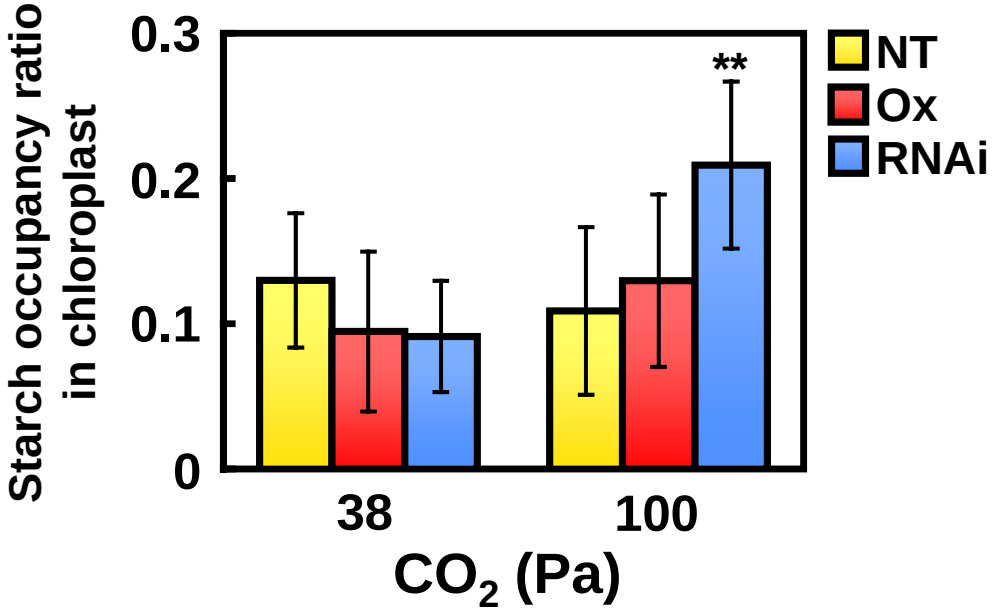


図 18. 葉緑体に占めるデンプン粒の割合.

10 個以上の葉緑体の電子顕微鏡写真から格子法により葉緑体に占めるデンプン粒の割合を算出した. T 検定により p 値を算出した. データは平均値と標準偏差を示す (n≧10). **は 5%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す. NT, 非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

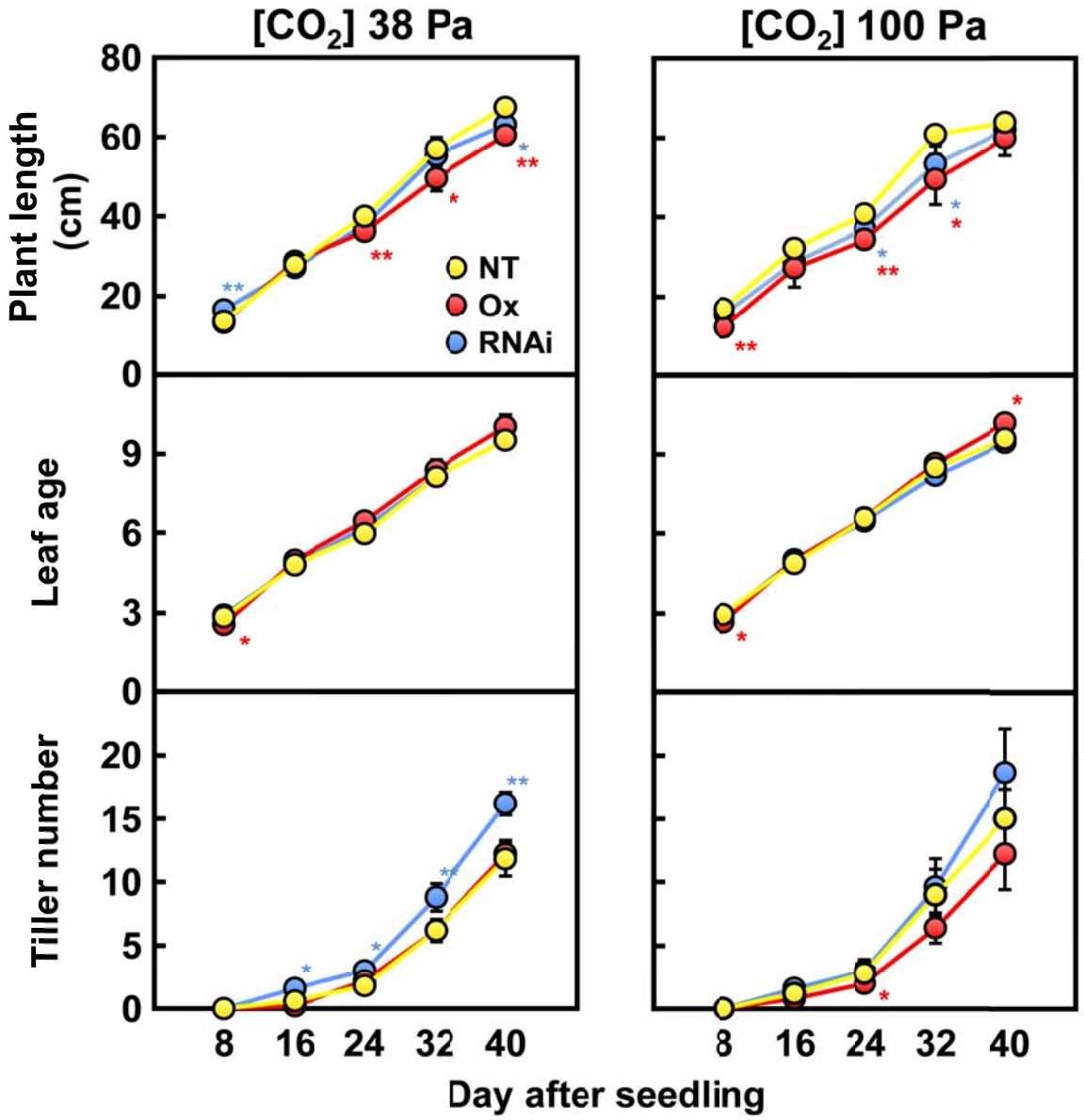


図 19．高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの生育特性.

CRCT 形質転換イネを大気 CO_2 条件下 (38 Pa) と高 CO_2 条件下 (100 Pa) で育成し，8 日ごとに草丈，葉齢，分げつ数を解析した．T 検定により p 値を算出した．*，**はそれぞれ 5%，1% 水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．NT，非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

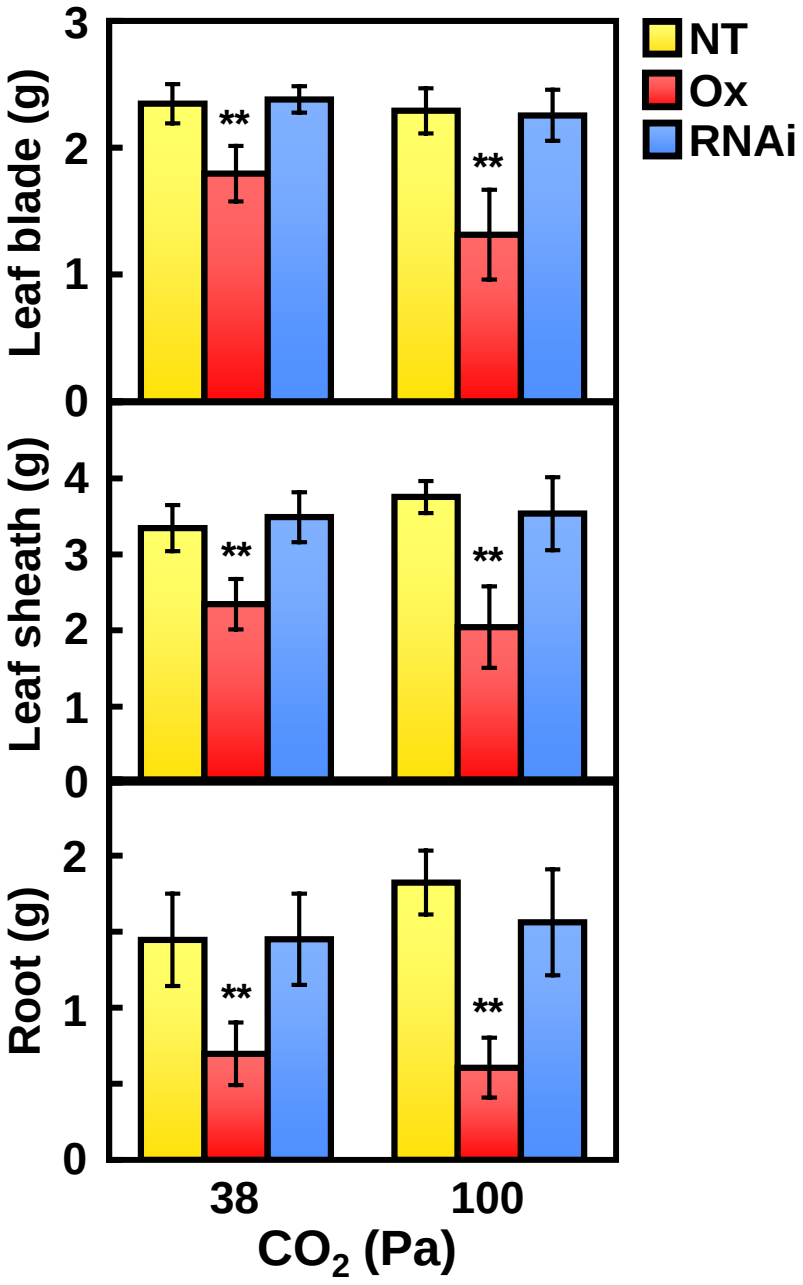


図 20．高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの組織ごとの乾物重．

CRCT 形質転換イネを大気 CO_2 条件下 (38 Pa) と高 CO_2 条件下 (100 Pa) で 40 日間育成し，葉身，葉鞘，根の乾物重を測定した．T 検定により p 値を算出した．**は 1% 水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す. NT, 非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

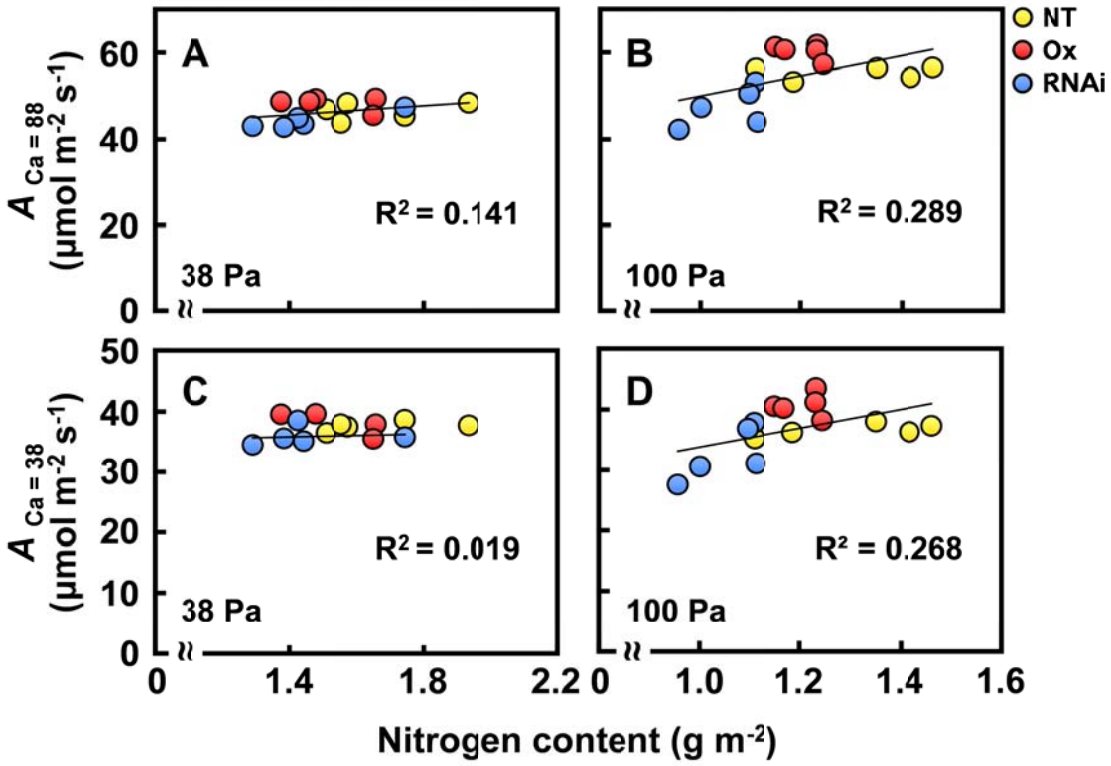


図 21．*CRCT* 形質転換イネの光合成速度と葉内窒素含量の関係．

光合成速度は図 2-2，葉内窒素含量は図 2-3 よりデータを得て，散布グラフとして再プロットした．A ca = 88，A ca = 38 はそれぞれ CO_2 分圧 88 Pa と 38 Pa の時の光合成速度を表す．グラフ内の 38 Pa と 100 Pa はそれぞれ植物体を育成した時の CO_2 分圧を示す． R^2 は決定係数を示す．NT，非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

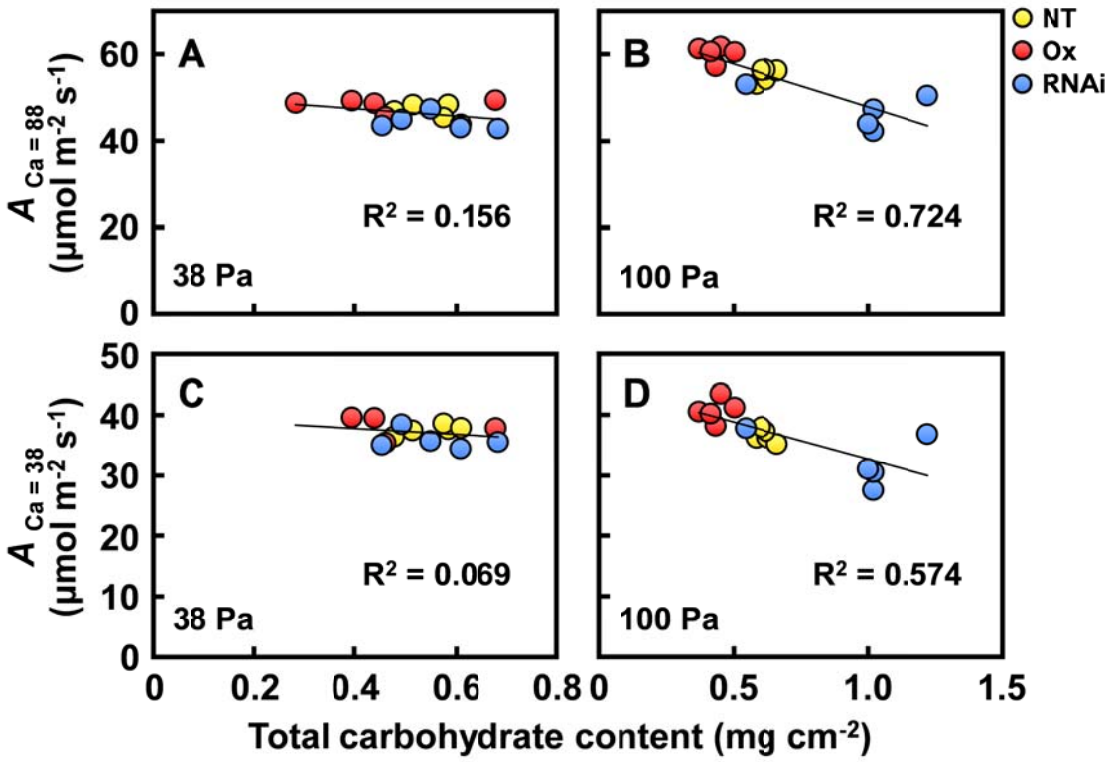


図 22．*CRCT* 形質転換イネの光合成速度と葉内総炭水化物含量の関係．

光合成速度は図 2-2，葉内総炭水化物含量よりデータを得て，散布グラフとして再プロットした．A ca = 88，A ca = 38 はそれぞれ CO_2 分圧 88 Pa と 38 Pa の時の光合成速度を表す．R^2 は決定係数を示す．グラフ内の 38 Pa と 100 Pa はそれぞれ植物体を育成した時の CO_2 分圧を示す. NT，非形質転換イネ; Ox, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

考察

第 2 章では育成する CO_2 条件に関係なく，*CRCT* の発現量は葉鞘のデンプン含量を制御できることを明らかにした (図 14)．しかし，葉身では葉鞘のような *CRCT* の発現量とデンプン含量の正の相関は認められず，*CRCT* 発現抑制形質転換イネを高 CO_2 条件下で育成すると逆に非形質転換イネよりも顕著にデンプン含量が高くなった (図 16B, 17). このことから CRCT のデンプン含量に及ぼす効果は, 葉鞘と葉身で異なることがわかった．さらに *CRCT* 形質転換イネの光合成速度を解析したところ，高 CO_2 条件下で育成した場合は *CRCT* 高発現形質転換イネの光合成速度は非形質転換イネに比べ高い傾向を示し，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低くなった (図 15)．それらのことから CRCT は葉鞘のデンプン蓄積量を制御することによって，葉身の光合成能力を決めるシンク-ソースのバランス調節に働く遺伝子であることがわかった.

上述したように，*CRCT* の発現量は葉鞘のデンプン含量と正の相関がある (図 14)．それとは対照的に，*CRCT* の発現量は葉身のデンプン含量と負の相関が認められた (図 16)．CRCT の葉鞘と葉身のデンプン含量への効果の違いは，葉鞘と葉身のデンプン合成制御メカニズムが異なることに起因すると考えられる. デンプンは AGPase, SS, BE, DBE，Pho1 といった酵素が協調的に働くことによって生合成される (Fujita, 2014)．イネではこれらのデンプン合成関連酵素はジーンファミリーを形成しており, 発現の組織特異性によって分類できる (Ohdan et al., 2005; Hirose et al., 2006)．CRCT はそれらの酵素のうち OsAGPS1, OsAGPL1, BEIIa といった特に葉鞘で発現が高い酵素の発現を制御する (図 11). それらの葉鞘タイプの酵素に加えて, CRCT は胚乳で特に発現が高い BEI, Pho1, PUL といった酵素の発現も葉鞘で制御する(図 11)．一方で，*CRCT* 形質転換イネの葉身を用いたマイクロアレイ解析では，*CRCT* の発現量はデンプン合成関連酵素の発現にほとんど影響を与えなかった (図 6)．しかしながら例外があり，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉身では *OsAGPL1* の発現量が大きく減少していた (図 6). OsAGPL1 は葉鞘のデンプン合成に中心的な役割を担うが, 葉身のデンプン合成にはほとんど寄与していないことが *OsAGPL1* 欠損変異体を用いた解析により報告されている (Okamura et al., 2015). つまり, CRCT は葉鞘のデンプン合成を直接的に制御することができるものの,

葉身のデンプン合成は直接的に制御できないと考えられる．よって，*CRCT* 発現抑制形質転換イネを高 CO_2 条件下で育成した場合，非形質転換イネよりも葉身のデンプン含量が増加したのは，葉鞘においてデンプンが合成できないため，間接的に葉身にデンプンを高蓄積したものと考えられる．

高 CO_2 条件下で育成した場合，*CRCT* 高発現形質転換イネの光合成速度は増加傾向を示し，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの光合成速度は減少傾向を示した (図 15)．イネにおいて，高 CO_2 条件下における光合成のダウンレギュレーションは葉面積あたりの Rubisco 含量の低下を引き起こす窒素含量の低下に起因するものと考えられている (Makino and Mae, 1999)．本研究では，大気 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの窒素含量，Rubisco 含量，光合成速度は非形質転換イネと同程度であった．さらに，杉野 (2011) は *CRCT* 形質転換イネの葉身を用いたマイクロアレイ解析により *CRCT* の発現量は一次代謝に関わる遺伝子の発現に影響を与えないことを報告している．それらのことから，CRCT は直接葉身の窒素や Rubisco といった成分含量に影響を与えないと推察される．しかしながら高 CO_2 条件下で育成する場合，*CRCT* 形質転換イネの窒素含量やクロロフィル含量は非形質転換イネに比べ減少し，特に *CRCT* 発現抑制形質転換イネではその程度が *CRCT* 高発現形質転換イネに比べ大きい (図 16A)．光合成速度と窒素含量の関係を見てみると，それらの間には明確な相関は認められない (図 21)．よって，*CRCT* 形質転換イネで見られた光合成速度の変化は窒素含量の変化によるものではないと考えられる．

高 CO_2 条件下における光合成のダウンレギュレーションのもう一つの原因として，光合成産物の葉身における過剰蓄積が考えられる．葉におけるデンプンの蓄積と光合成速度の減少に相関が認められることがしばしば報告されている (Makino and Mae, 1999)．インゲンにおいては，その光合成速度の低下は窒素含量や Rubisco 含量の低下を伴わず起こることが報告されている (Nakano et al., 2000)．高 CO_2 条件下で植物を育成すると，葉緑体内にデンプン粒の数が増え，粒のサイズも大きくなることでチラコイド膜を物理的に圧迫し，チラコイド膜に何らかの損傷を与えグラナ数の減少が起こることが示唆されている (Teng et al., 2006)．それゆえ，デンプンが蓄積すること自体が光合成速度を減少させる原因ともなり得る．本研究では，光合成速度が減少した高 CO_2 条件下で育成し

た *CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉緑体には多くのデンプン粒が蓄積していた (図 17, 18). さらに高 CO_2 条件下で育成した場合，光合成速度と葉身の非構造性炭水化物含量の間に負の相関が認められた (図 22). つまり，本研究における光合成速度の変化には光合成産物の蓄積が関与している可能性が考えられる. よって CRCT は葉鞘のデンプン合成能力を制御することで間接的に葉身の光合成産物含量に影響を与え, その結果光合成速度に影響を与えているものと結論づけられる.

高 CO_2 条件下では，デンプン含量が増加するのと同様に，生育も旺盛になる (Ainsworth and Long, 2005). 高 CO_2 条件下では，*CRCT* の発現量とデンプン含量が増加するので *CRCT* を高発現することは植物の生育にポジティブな影響を与えることが予想される. しかしながら，*CRCT* 高発現形質転換イネでは育成した CO_2 条件によらず乾物重は非形質転換イネに比べて大きく減少した (図 20). さらに高 CO_2 条件下では分げつ数が増加するが，*CRCT* の発現量と分げつ数には負の相関が認められた (図 19). つまり, 高 CO_2 条件下で起こる生育促進は *CRCT* の発現量が高くなることによるものではないと考えられる. *CRCT* 形質転換イネで見られた乾物重や分げつ数の変化の原因として，2 つの可能性が挙げられる. 1 つ目は，植物の生育とデンプン蓄積の間にはトレードオフの関係があるということである (Sulpice te al., 2009). 葉鞘にデンプンが蓄積しない *agpl1* 変異体では *CRCT* 発現抑制形質転換イネと同様に分げつ数が増加する (Okamura et al., 2015). つまり，本研究で用いた *CRCT* 形質転換イネでは，生育とデンプン蓄積の間で炭素利用の競合が起こっている可能性が考えられる. 2 つ目は，植物ホルモンの影響である. 高 CO_2 条件下で植物を育成すると，光合成産物含量の増加に伴いジベレリンやサイトカイニンといった植物ホルモン含量が増加することが報告されている (Teng et al., 2006). よって *CRCT* 形質転換イネではデンプン蓄積が変化したことでホルモン代謝が変化し，それが乾物重や分げつ数に影響を与えた可能性も考えられる. 一方で, 糖代謝とホルモン代謝はクロスリンクしながら植物の生育に影響を与えることが報告されている (Paparelli et al., 2013). 植物の生育と糖代謝とホルモン代謝はそれぞれ独立したものでなく, 密接に関わるのでそれらの相互作用も詳細に解析されていくべきである.

これまで多くの研究者が遺伝子組み換え植物の作製により光合成能力の改良を試み

てきた (Yamori, 2013). それらの中には光合成能力の改良に成功したという報告はあるものの，実用レベルでの光合成能力の改良は未だ達成されていない．さらにもし光合成速度の大幅な増加に成功したとしても，現状の多くの作物では葉に過剰な光合成産物が蓄積し，高 CO_2 条件下で育成したのと同様に光合成のダウンレギュレーションが起こることが予測されている．本研究では，遺伝子工学的に CRCT を利用することで，葉鞘のシンク能力を高め，高 CO_2 条件下における光合成の改良に成功した (図 14, 15). 植物のシンク能力の改良を行なった研究例は少ないが，スクロース異性体を蓄積できるサトウキビの形質転換体では光合成速度が高くなることが報告されている (Wu et al., 2007). つまりシンク能力の改良は，高 CO_2 条件下で高い光合成速度や収量を示す次世代型作物を開発するための非常に有効なアプローチの 1 つであると言える．生物工学的な CRCT の応用は，CO_2 固定改良の余地を広げ，さらなる食糧増産を可能にするものであろう．

摘要

CRCT は光合成産物のレベルに応答して葉鞘のデンプン蓄積を制御するが，CRCT が高 CO_2 条件下で発現促進される生物的な意義は明らかとなっていない. そこで本章では *CRCT* 形質転換イネを用いて *CRCT* の発現量が高 CO_2 条件下におけるイネの光合成と生育特性に及ぼす効果を解析した.

大気 CO_2 条件下で育成した場合と同様に，高 CO_2 条件下で育成した場合でも *CRCT* 高発現形質転換イネでは葉鞘のデンプン含量が非形質転換イネよりも顕著に高くなり，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低くなった．大気 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの光合成速度は非形質転換イネと同程度であった．しかしながら，高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ光合成速度が増加する傾向があった．一方，高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 発現抑制形質転換イネの光合成速度は非形質転換イネに比べて低下した. 大気 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネでは，葉身の窒素含量，可溶性タンパク質含量，Rubisco 含量，クロロフィル含量は非形質転換イネと差異は認められなかった．しかし，高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 形質転換イネの葉身では，それらの含量は非形質転換イネよりも減少しており，その減少の程度は *CRCT* 発現抑制形質転換イネの方が大きかった. 葉身の可溶性糖含量とデンプン含量は葉鞘の場合とは対照的に， *CRCT* 高発現形質転換イネでは育成した CO_2 条件に関わらず非形質転換イネよりも低下した．一方で，高 CO_2 条件下で育成した *CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉身の光合成産物含量は顕著に非形質転換イネよりも増加しており，葉緑体内に多くのデンプン粒が蓄積していた．*CRCT* 形質転換イネの光合成速度と葉身の窒素含量と光合成産物含量の関係を解析すると, 大気 CO_2 条件下で育成した場合の光合成速度と窒素含量，光合成産物含量の間には相関が認められなかった．一方で，高 CO_2 条件下で *CRCT* 形質転換イネを育成した場合の光合成速度は，窒素含量とは相関が認められなかったが，光合成速度は光合成産物含量とは負の相関が認められた．*CRCT* 形質転換イネの草丈や葉齢は育成した CO_2 条件によらず，非形質転換イネと差異は認められなかった．しかし，分げつ数は *CRCT* 発現抑制形質転換イネで増加傾向を示した．また，育成した CO_2 濃度に関わらず *CRCT* 高発現形質転換イネの乾物重は非形質

転換イネよりも低下し，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの乾物重は非形質転換イネと差がなかった．これらの結果より，*CRCT* の発現量は直接イネの光合成に影響を与えるわけではないことがわかった．しかし，高 CO_2 条件下でイネを育成する場合は CRCT が制御する葉鞘のデンプン合成能力が間接的に葉身の光合成産物含量に影響を与え，光合成速度が変化することが示唆された．

第 3 章

CRCT がデンプン生合成関連酵素の発現と
デンプンの構造に及ぼす効果

第 1 章では，高 CO_2 条件下で発現促進される転写因子様タンパク質 CRCT がイネ葉鞘において *AGPL1*, *AGPS1*, *BEI*, *PUL* や *Pho1* など複数のデンプン合成関連遺伝子の発現調節に関わることを明らかにした. 一方で, 第 2 章では葉鞘の場合とは対照的に, CRCT はイネ葉身におけるデンプン合成にはおおよそ関与しないことも明らかにした. 本章では *CRCT* の発現量が葉鞘や葉身におけるデンプン合成関連酵素の発現に及ぼす効果を Native-PAGE/活性染色法で評価するとともに，デンプンの構造等に及ぼす効果についても解析した.

材料と方法

3-1　供試材料

1-2 の方法で非形質転換イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare), *CRCT* 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネを育成し，7.4 葉齢期の個体の第 7 葉身と第 6 葉鞘をサンプリングし，以下の解析に用いた.

3-2　デンプン合成関連酵素のウエスタンブロット解析

葉鞘と葉身からのタンパク質の抽出は 1-6 の方法により行った．同様に，ウエスタンブロット解析は 1-6 の方法により行った．SSI, SSIVb, ISA1, PUL, BEI, BEIIa, Pho1 に対する特異的抗体は秋田県立大学生物資源科学部藤田直子教授により分譲いただいた.

3-3　イネ栄養器官を用いたデンプン合成関連酵素の Native-PAGE/活性染色解析

3-3-1　ゲルの作成

Native-PAGE/活性染色解析は Asai et al. (2014) の方法で行った．SS の Native-PAGE/活性染色解析の分離ゲルの濃度は 7.5%とし，オイスターグリコーゲン (Type-II; Sigma) を 0.8% (w/v)となるように添加した. DBE の Native-PAGE/活性染色解析の分離ゲルの濃度は 5%とし，ジャガイモのアミロペクチンを 0.4% (w/v) となるように加えた．BE の Native-PAGE/活性染色解析の分離ゲルの濃度は 5%とし，0.1% (w/v) となるようにオイスターグリコーゲン (Type-II; Sigma) を加えた. それぞれの濃縮ゲルの濃度は 3.3%とした.

3-3-2　タンパク質の抽出と電気泳動

冷凍保存していたサンプルを液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて磨砕し，1.5 mL チューブに回収し，サンプルの重さを測定した．葉鞘ではサンプルの 0.5 倍量の抽出バッファー (50 mM imidazol-HCl, 8 mM $MgCl_2$, 12.5% glycerol, 500 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.4)，葉身では 1.5 倍量の抽出バッファーを加えバイオマッシャーでサンプルを磨砕した. 抽出液を 10,000 g で 5 分間遠心分離し, 上澄みを回収してタンパク質抽出液とした.

タンパク質抽出液の半量のサンプルバッファー (0.625 M Tris-HCl, 0.2% bromo phenol blue (BPB), 50% glycerol, pH7.0) を加えよく撹拌した.

SS の Native-PAGE/活性染色解析には 15 µL，DBE の Native-PAGE/活性染色解析には 12 µL，BE の Native-PAGE/活性染色解析には 15 µL のサンプルをそれぞれゲルにアプライした．BPB のラインが濃縮ゲルを通過するまではゲル一枚あたり 8 mA，それ以降は 15 mA で通電した．電気泳動はクロマトチャンバー内 (4°C) で行なった.

3-3-3　Native-PAGE/活性染色解析の染色

SS の Native-PAGE/活性染色解析では BPB が流れ切ってから 45 分後に通電を止めた．洗浄液 (0.5 M citrate-Na, 100 mM bicine, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% glycerol, pH7.5) に入れ 5 分間振盪した．洗浄液を捨て，反応液 (0.5 M Citrate-Na, 100 mM bicine, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glc, 10% glycerol, pH7.5) を加え一晩 30°C で反応させた．翌日反応液を捨て，ヨウ素液 (1%KI, 0.1%I_2) でゲルを染色した.

DBE の Native-PAGE/活性染色解析では BPB がゲルの下端まで流れた後，さらに 30 分間通電しゲルを反応液 (50 m M citrate-Na_2HPO_4, 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.0) に移し 5 分間ゆっくり振盪した. 反応液を捨て, 新しい反応液を入れて 2 時間反応させた．その後，反応液を捨て，ヨウ素液でゲルを染色した.

BE の活性染色解析では BPB がゲルの下端まで流れた直後に通電を止め，ゲルを蒸留水で 5 分間振盪し洗浄した．蒸留水を捨て，反応液 (50 mM Hepes-NaOH, 2.5 mM AMP, 100 mM Glucose-1-phosphate, 71.5 µg Pho a (Phosphorylase a from rabbit muscle; Sigma), pH7.0) を加え，一晩 30°C でゲルを振盪した．翌日に反応液を捨て，ヨウ素液でゲルを染色した.

3-4　栄養器官のデンプンのアミロペクチンの鎖長分布パターンの解析

葉鞘と葉身 (100 mg 以下) を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて磨砕し，5 mL のメタノールで懸濁した．懸濁液をキャップ付きガラス試験管に移し，10 分間煮沸した．放冷した後，2,500 g で 5 分間遠心分離し，上澄みを除いた．沈殿を 90% (v/v) メタノールで 2 回洗浄し，デシケーター中で減圧乾燥させた．沈殿に 250 mM NaOH を 300 µL を

加えて良く撹拌し，5 分間煮沸した．放冷後，懸濁液に酢酸を 9.6 µL，600 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.4) を 100 µL，2% (w/v) アジ化ナトリウム溶液を 15 µL，蒸留水を 1.09 mL, 2 µL のイソアミラーゼ (*Pseudomonas amyloderamosa*; Hayashibara) を加え 37°C で 12 時間反応させた．さらにイソアミラーゼを 4 µL 加え，8 時間以上反応させた後，懸濁液を 20 分間煮沸し遠心分離した．得られた上澄みをイオン交換樹脂 (AG 501-X8(D); Bio-Rad) の入った 1.5 mL チューブに移し，脱塩した．脱塩後のサンプル 50 µL を 1.5 mL チューブにとり，乾燥させた．蛍光色素のラベリングとキャピラリー電気泳動は O'Shea and Morell (1996) の方法と eCAP N-linked oligosaccharide profiling kit と P/ACE MDQ Carbohydrate System (Beckman Coulters, CA, USA) のプロトコールに従い行った．

3-5　走査型電子顕微鏡を用いたデンプン粒の観察

デンプン粒の精製は Lin et al. (2013) の方法に若干の改良を加えて行った．*CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの全ての葉鞘を明期の終わりにサンプリングした．液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて葉鞘を磨砕し，粉末状にした．さらに，粉末状のサンプルにデンプン抽出用バッファー (500 mM MOPS, 5 mM EDTA, 10% (v/v) ethylene glycol, pH 7.5) を加え乳鉢と乳棒で磨砕し，二重にしたミラクロスで濾過した．濾過液を 15,000 g で 10 分間遠心分離し，上澄みを捨てた．沈殿を 1 mL のデンプン抽出用バッファーで懸濁し，9 mL の 95% Parcoll の入った 15 mL の遠心管にゆっくりと加え，15,000 g, 4°C で 45 分間遠心分離した．上澄みを捨て，沈殿を 0.5% (w/v) SDS 溶液で再懸濁し 3,000 g で 10 分間遠心分離した．この洗浄を 4 回繰り返した後，同じ操作を蒸留水でも行った．洗浄後の沈殿はデシケーター内で乾燥させ，-30°C で保存した．

精製したデンプン粒をカーボンテープが貼られたアルミニウムステージの上にできるだけ薄く伸ばし，プラズマコーター (NeoCoater, JEOL) でデンプン粒の表面を白金でコーティングした．走査型電子顕微鏡 (JSM-6010, JEOL) の 2 次電子放電モード，加速電圧 3 kV でサンプルを観察した．

3-5　ゲル濾過クロマトグラフィーによるデンプン構造の解析

イソアミラーゼ処理したデンプンのゲル濾過クロマトグラフィーは Toyosawa et al. (2016) の方法に従い行なった．精製デンプンを 10 mg 取り，蒸留水を 250 μL 加えてよく懸濁した．さらに 2N NaOH を 250 μL 加えて撹拌した後 37°C で 3 時間処理することで糊化させた．蒸留水を 3.65 mL，5N HCl を 83 μL，100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) を 1.5 mL 加えてよく混合し，最後にイソアミラーゼ (*Pseudomonas amyloderamosa*; Hayashibara) を 12 μL 添加し 37°C で一晩反応させた．反応後，5 mL の 100%エタノールを加え，約 50°C でロータリーエバポレーターを用いて乾固させた．乾固させたサンプルに蒸留水 500 μL を加え, サンプルを湿らせた後, 2N NaOH 500 μL を加え 30 分間 4°C で糊化した．サンプルをフィルター (CAT No. SVLP1300; ミリポア) に通した後，示差屈曲検出器 (RI-8020; TOSHO) のサンプルチャージに 5 mL をアプライした．

イソアミラーゼ未処理デンプンのゲル濾過クロマトグラフィーは Utsumi et al. (2003) の方法で行った．精製デンプン 10 mg に蒸留水 1.6 mL と 5N NaOH 0.4 mL を加えて、攪拌し，37°C で 1 時間処理することで糊化させた．その後さらに蒸留水を 4 mL 加えよく撹拌した. サンプルをフィルター (CAT No. SVLP1300; ミリポア) に通した後，5 mL を示差屈曲検出器 (RI-8020; TOSHO) のサンプルチャージにアプライした．Toyopearl HW75 (TOSHO) が充填されたカラムが 2 本, HW65S (Sigma) または HW55S (Sigma) が充填されたカラムが 1 本ずつの合計 4 本のカラム (2.2 mm×30 cm) を直列に連結してサンプルを分離した．溶離液 (0.2% NaOH) を流速 1.0 mL min^{-1} で流した．

3-7　*CRCT* 形質転換イネの胚乳を用いた解析

3-7-1　供試材料

CRCT 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ，非形質転換イネを神戸大学農学部組換え体温室ファイトトロンの自然光室で，2-1 の方法で育成した．開花後 10-15 日目の胚乳を 1.5 mL チューブにサンプリングし，以下の解析に用いた．

3-7-2　Native-PAGE/活性染色解析

胚乳の新鮮重の 4 倍量の抽出バッファーを加え，バイオマッシャーで磨砕した．抽出

液を 10,000 g で 5 分間遠心分離し上澄みを回収し，タンパク質抽出液とした．タンパク質抽出液の半量のサンプルバッファー (0.625 M Tris-HCL, 0.2% BPB, 50% glycerol, pH7.0) を加えよく撹拌した．Native-PAGE/活性染色解析は 3-2 の方法で行った．

3-7-3　胚乳デンプンのアミロペクチンの鎖長分布解析パターンの解析

乾燥種子のもみと胚を除去し，細かく砕いた．アミロペクチンの鎖長分布解析パターンの解析は 3-3 の方法で行った．

3-8　AGPase 変異体を用いた解析

3-8-1　供試材料

東京大学大学院農学研究科青木直大助教より，*OsAGPL1* 欠損変異体 (*agpl1*), *OsAGPL3* 欠損変異体 (*agpl3*)，*OsAGPL1OsAGPL3* 二重欠損変異体 (*agpl1agpl3*) を分譲いただき解析に用いた．植物体は 2-1 の方法で育成した．7.6 葉齢期の個体から第 6 葉鞘をサンプリングした．液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて粉砕し，一部をデンプン含量とスクロース含量の解析，もう一部をデンプン合成関連遺伝子の発現解析に用いた．

3-8-2　デンプン含量とスクロース含量の解析

デンプン含量とスクロース含量の解析は 1-5 の方法で行った．

3-8-3　デンプン合成関連遺伝子の発現解析

遺伝子発現解析は 1-2 の方法で行った．

結果

初めに，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身を用いてウエスタンブロット解析を行い，*CRCT*の発現量がデンプン合成関連酵素の発現に及ぼす効果をタンパク質レベルで解析した (図 23). 葉鞘においては，*CRCT* 高発現形質転換イネでは SSI, ISA1, PUL の発現量が非形質転換イネに比べて増加しており， *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは明らかに減少していた．それらに加え，*CRCT* の発現量は BEI と BEIIa の発現レベルと正の相関が認められた．また，その発現量の変化の程度は BEI の方が BEIIa に比べ大きかった．さらに，Pho1 の発現も *CRCT* の発現量と正の相関があった．一方で葉身においては，ほとんどのデンプン合成関連酵素の発現レベルは*CRCT*の発現量と相関はなかった (図 23)．しかしながら例外として，Pho1 の発現は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ高くなり，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは減少した．

デンプン合成関連酵素はそれぞれ遺伝子ファミリーからなり, 複数の遺伝子によってコードされている．また，それらの遺伝子の発現は器官特異性が非常に高い (Ohdan et al., 2005; Hirose et al., 2006)．*CRCT* の発現量が及ぼすデンプン合成関連酵素への効果をより詳細に明らかにするためには, デンプン合成関連酵素の活性を網羅的に解析することが有効である．その観点から，各アイソザイムの活性バンドが検出できる Native-PAGE/活性染色解析法は非常に有効な解析手法と考えられた．しかしながら，これまでイネにおいては胚乳を用いた Native-PAGE/活性染色解析は行われてきたが, 葉鞘や葉身などの栄養器官を用いた解析例はほとんどない．そこでまず，日本晴の葉鞘と葉身を用いて SS, DBE, BE の Native-PAGE/活性染色解析を行った (図 24)．また，胚乳ではデンプン合成関連酵素の欠損変異体の解析により Native-PAGE/活性染色解析法のバンドが同定されていることから，胚乳をコントロールとして用いた．胚乳を用いた場合と同様に葉鞘と葉身を用いた場合においても，全てのデンプン合成関連酵素の活性を Native-PAGE/活性染色解析で検出することができた (図 24)．また，胚乳と葉鞘や葉身では SS, DBE, BE の活性染色のバンドパターンが明らかに異なっていた．これらの結果から，Native-PAGE/活性染色解析法は *CRCT* の発現量がデンプン合成関連酵素に及ぼす効果のさらなる解析に有力な手法であると考えられた．

次に，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身を用いて SS の Native-PAGE/活性染色解析を行った (図 25). *CRCT* 形質転換イネの葉鞘の SS はコントロールとして用いた胚乳の SSI と同じ移動度のバンド強度が *CRCT* 高発現形質転換イネで非形質転換イネよりも高くなり，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低くなった (図 25A)．一方で，胚乳の SSIIIa と同じ移動度のバンドや，SSIIIa と SSI の中間の移動度のバンドの強度は *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネで明確な差は認められなかった．また，葉身では全ての酵素のバンドパターンにおいて *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの間に差は認められなかった (図 25A)．葉鞘の DBE については， *CRCT* の発現量と胚乳の ISA や Pho1 と移動度が類似したバンド強度に正の相関が認められた (図 26A)．一方，葉身では ISA と同じ移動度のバンド強度には CRCT は影響を及ぼしていなかったが，Pho1 と同じ移動度のバンド強度はウエスタンブロット解析の結果と同様に *CRCT* 高発現形質転換イネで非形質転換イネに比べ高くなった (図 26A). 葉鞘の BE の活性染色解析では胚乳における BEI と同じ移動度のバンド強度が *CRCT* 高発現形質転換イネで非形質転換イネよりも高くなり *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは低くなった (図 26B)．しかしながら，葉身では BE の活性染色パターンに差は認められなかった．これらの結果から，*CRCT* の発現量は遺伝子発現レベルだけではなく，タンパク質レベルもしくは酵素活性レベルでも葉鞘のデンプン合成に影響を与えていることがわかった．

これまでイネでは胚乳デンプンの構造は解析されてきたが，栄養器官はほとんど解析が行われていない．初めに，葉鞘と葉身のデンプンのアミロペクチンの鎖長分布解析を行い，アミロペクチンの特定のグルコースの重合度 (DP) を持つ鎖の割合を明らかにした (図 27)．葉鞘や葉身のデンプンの鎖長分布パターンは胚乳とは異なり， DP が 7 と 12-13 の 2 つのピークがあることが特徴的であった (図 27A)．葉鞘や葉身のアミロペクチンでは DP8-13 の短鎖の割合が胚乳のアミロペクチンに比べ顕著に少なく，DP5-7 と DP14 以上の割合が多くなっていた (図 27B)．また，葉鞘と葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターンを比較すると，DP5-16 の短鎖の割合は葉身のアミロペクチンの方が多かった (図 27B). DP16-30 の中鎖の割合は葉身のアミロペクチンに比べ葉鞘のアミロペクチンの方が多いが，その増加の程度は僅かだった．それらの結果から，組織によってデンプンのアミロペクチンの鎖長分布パターンが異なることがわかった．次に，CRCT

がアミロペクチンの構造に及ぼす効果を解析するため，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身の鎖長分布パターンと非形質転換イネの鎖長分布パターンを比較した (図 28). *CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘から抽出したアミロペクチンの鎖長分布パターンは, 非形質転換イネの鎖長分布パターンに比べ DP5-14 の短鎖の割合が増加し，DP15-35 の中鎖の割合が減少した (図 28A). それとは対照的に，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉鞘のアミロペクチンの鎖長分布パターンは非形質転換イネの鎖長分布パターンに比べ DP5-14 の短鎖の割合が減少し，DP18 以上の中鎖の割合が増加した (図 28A). 一方で，葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターンは *CRCT* 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ，共に DP5-15 の短鎖の割合が非形質転換イネに比べ減少し，DP15 以上の割合が増加した (図 28B). 以上の結果から，*CRCT* の発現量は主に葉鞘のアミロペクチンの短鎖の割合に影響を与えることが，CRCT のアミロペクチンの短鎖の割合に及ぼす効果は葉身では認められないことがわかった.

CRCT の発現量がデンプンの構造に及ぼす効果をより詳細に解析するため，精製した葉鞘のデンプンを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った. 初めに葉鞘のデンプンをイソアミラーゼ処理した後, ゲル濾過クロマトグラフィーを行い CRCT が葉鞘のデンプンのアミロースとアミロペクチンの長鎖と短鎖の割合に与える影響を明らかにした (図 29A). 全面積に対する各画分が占める割合を表 9 に示した. *CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘デンプンは非形質転換イネの葉鞘デンプンに比べ, アミロース及びアミロペクチンの超長鎖 (見かけのアミロース含量) を示す Fraction I の割合が有意に高かった. それに加え，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘のデンプンが Fraction II の割合が有意に低く，アミロペクチンの長鎖に対する短鎖の比率を表す Fraction III/Fraction II の値は非形質転換イネに比べ高い傾向があった (表 9). 次に，イソアミラーゼ未処理のデンプンを NaOH で糊化した後，ゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した (図 29B). この解析ではアミロペクチンの構造を維持したまま解析を行うことで, 分子量が大きいアミロペクチンの割合 (Retention time 140 min)，分子量が中程度のアミロペクチンの割合 (Retention time 170 min)，分子量が小さいアミロペクチンやアミロースの割合 (Retention time 200 min)を検出できる．非形質転換イネの胚乳デンプンでは，分子量の大きいアミロペクチンの割合は分子量が中程度のアミロペクチンの割合よりも多かった．一方，胚

乳のデンプンとは異なり非形質転換イネの葉鞘のデンプンでは, 分子量の大きいアミロペクチンはほとんど検出されず, 大部分は分子量が中程度のアミロペクチンとして検出された．また，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘デンプンの場合も，分子量が中程度のアミロペクチンのみが検出され，その割合は非形質転換イネの場合と同程度であった．よって，*CRCT* の発現量はデンプンのアミロース含量やアミロペクチンの短鎖と長鎖の割合に影響を与えるが, 未分解のアミロペクチン全体の構造には顕著な効果を及ぼさないことがわかった．

デンプン合成酵素の発現レベルの変化はデンプン粒の形状の変化をもたらすことが多数報告されている (Fujita, 2014; Pfister and Zeeman, 2016)．そこで *CRCT* 形質転換イネから葉鞘のデンプンを精製し走査型電子顕微鏡を用いてデンプン粒の形態の観察を行った (図 30)．非形質転換イネの胚乳のデンプン粒は球状ではなく，角がある構造である．しかしながら，非形質転換イネの葉鞘から精製したデンプン粒は球状のものが多く，表面は滑らかであった．*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘から精製したデンプン粒は形態の異常は認められなかったが, 非形質転換イネのデンプン粒と比較して明らかに大きかった．一方で，*CRCT* 発現抑制形質転換イネの葉鞘のデンプン粒はそもそも量が少なくわずかにしか精製できず，精製純度も低かったが，その大きさは非形質転換イネに比べて非常に小さかった. 以上の結果から CRCT は葉鞘のデンプン粒のサイズに影響を与えるが，その外見上の特徴には大きな影響を与えないことがわかった．

これまでの結果から，*CRCT* はイネの栄養器官のデンプン合成の制御に働くことがわかった．さらに，*CRCT* は SSI，PUL，Pho1，BEI といった胚乳でも機能しているデンプン合成関連酵素の発現も制御することができる (図 11)．そこで，*CRCT* の発現量が胚乳のデンプン合成に及ぼす効果についても解析を行った. まず初めに *CRCT* 形質転換イネの登熟期の胚乳を用いて Native-PAGE/活性染色解析を行った (図 31)．SS, DBE, BE などを検出するために 3 種類の Native-PAGE/活性染色解析を行ったが，検出された全ての酵素のバンドパターンは *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの間に違いは認められなかった. さらに *CRCT* 形質転換イネの胚乳デンプンの鎖長分布パターンについても解析した (図 32)．*CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの鎖長分布パターンの間には 0.2%未満のわずかな差しか認められなかった．以上の結果から，*CRCT* は胚乳のデン

プン合成制御に働いていないことがわかった.

これまでに記載した通り，CRCT はイネ葉鞘において複数のデンプン合成関連酵素の発現に大きな影響を与える．しかし大きな疑問として残るのが，*CRCT* 形質転換イネでは，どのようなメカニズムを介して複数のデンプン合成酵素の発現制御を可能にしているのかということである．デンプン合成酵素の基質である ADP-Glc を合成する反応を触媒する AGPase は small subunit と large subunit がそれぞれ 2 つずつからなる 4 量体を形成しており，small subunit には触媒部位があり，large subunit は活性制御に働くことが知られている (Ballicora et al., 2004)．イネには AGPase large subunit のホモログ遺伝子が 4 種類存在し，葉鞘では *AGPL1* が，葉身では *AGPL3* が主に発現している (Hirose et al., 2006)．また，*agpl1* 欠損変異体では葉鞘のデンプン含量が，*agpl3* 欠損変異体では葉身のデンプン含量が，*agpl1agpl3* 二重欠損変異体では葉鞘と葉身のデンプン含量が野生型に比べ大きく低下することが報告されている (Okamura et al., 2013; Okumura et al., 2015). そこで, *CRCT* 発現抑制形質転換イネと, *agpl1* 欠損変異体, *agpl3* 欠損変異体, *agpl1agpl3* 二重欠損変異体の葉鞘を用いて, 葉鞘の光合成産物含量とデンプン合成関連遺伝子の発現解析を行った (図 33)．葉鞘のデンプン含量は予想通り，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ，*agpl1* 欠損変異体，*agpl1agpl3* 二重欠損変異体では非形質転換イネに比べ顕著に減少した (図 33A)．また，それらの系統のスクロース含量は非形質転換イネに比べ増加傾向があった．一方で，葉身のデンプン含量が減少する *agpl3* 欠損変異体では葉鞘のデンプン含量やスクロース含量に変化は見られなかった (図 33A)．次にデンプン合成関連遺伝子の発現を解析したところ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ，*agpl1* 欠損変異体，*agpl1agpl3* 二重欠損変異体では *AGPL1* の発現が非形質転換イネに比べ非常に減少した．しかしながら, 他のデンプン合成関連遺伝子の発現は *CRCT* 発現抑制形質転換イネで有意に減少していたのに対し，*agpl1* 欠損変異体や *agpl1agpl3* 二重欠損変異体では非形質転換イネと同じレベルであった (図 33B)．また，これらの *agpase* 欠損変異体の *CRCT* の発現量は非形質転換イネとの間に差は認められなかった (図 33B). よってこれらの結果から，CRCT の発現抑制は AGPase とその他のデンプン合成関連遺伝子の発現を抑制するが，AGPase の発現抑制がその他の関連遺伝子の発現抑制と連動しているわけではないことがわかった.

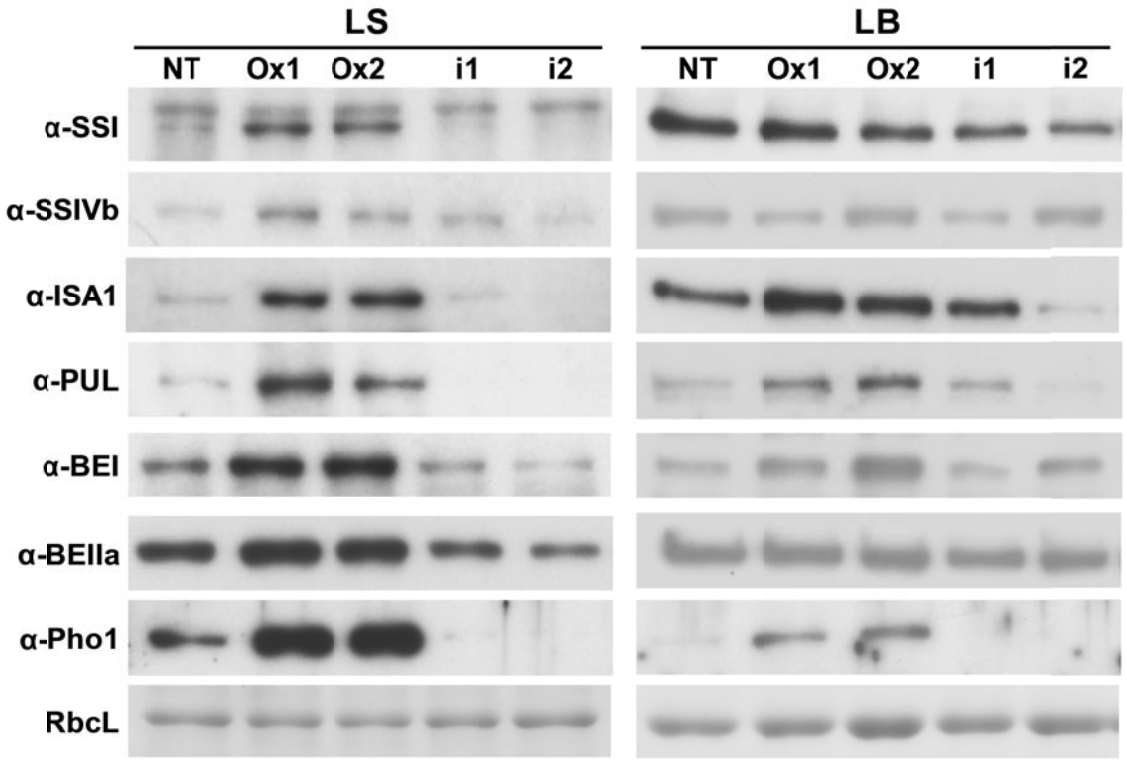


図 23．*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身におけるデンプン合成関連酵素のウエスタンブロット解析.

CRCT 形質転換イネの葉鞘 と葉身からタンパク質を抽出し，デンプン合成関連酵素に特異的な抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った．RbcL は内性コントロールとして SDS-PAGE の結果を示した．NT, 非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1 と i2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ． LS, 葉鞘; LB，葉身.

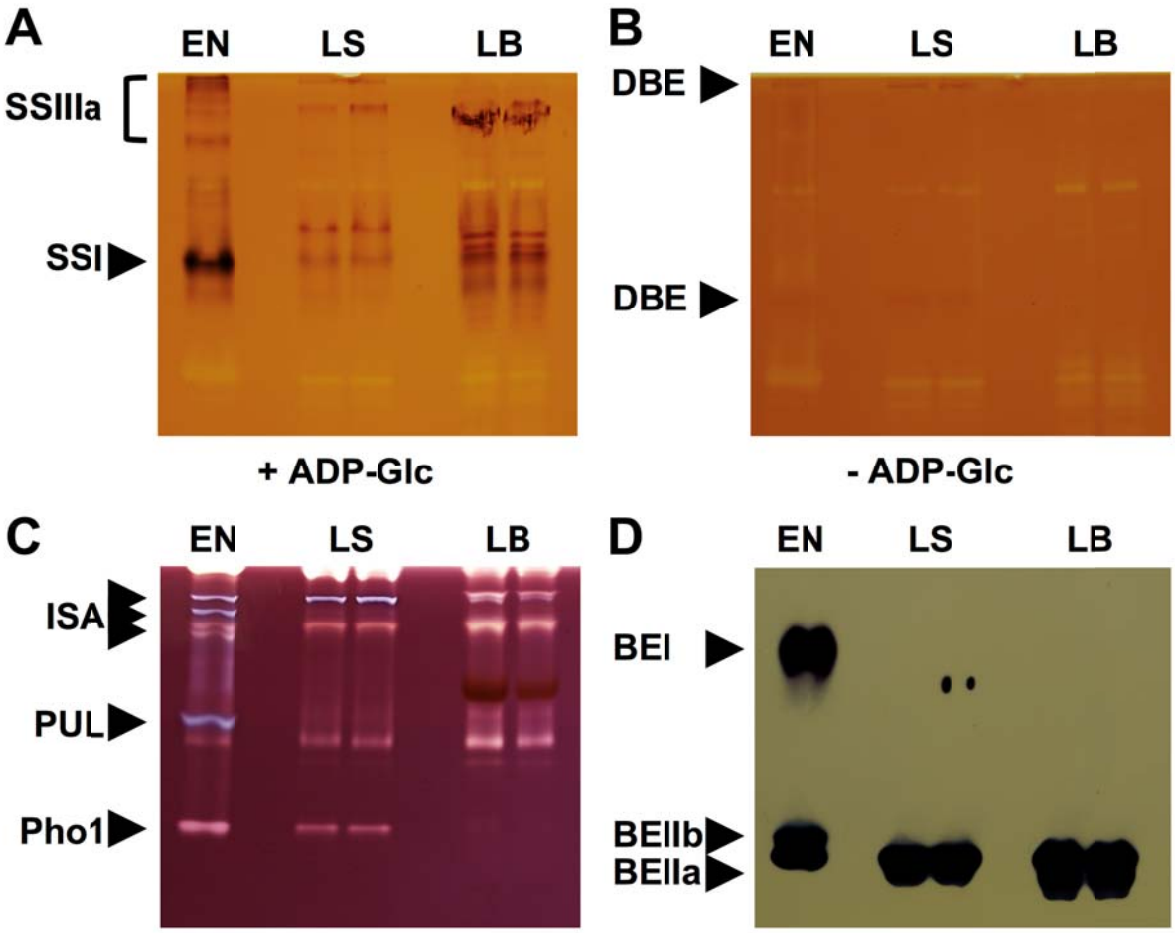


図 24. 日本晴の葉鞘と葉身を用いたデンプン合成関連酵素の Native-PAGE/活性染色解析. A，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (+ADP-Glc，ADP-Glc を加えた場合). B，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (-ADP-Glc，ADP-Glc を加えない場合). SS の Native-PAGE/活性染色解析では SS の活性と DBE の活性がともに黒色のバンドとして検出される．そこで ADP-Glc を加えない場合も解析を行い，SS のバンドと DBE のバンドを区別した. C, DBE の Native-PAGE/活性染色解析. 青色のバンドが DBE を示す. D, BE の Native-PAGE/活性染色解析．黒色のバンドが BE を示す．日本晴の葉鞘と葉身からタンパク質を抽出し，Native-PAGE/活性染色解析を行った．胚乳から得られたタンパク質をコントロールとして用いた．EN，胚乳; LS，葉鞘; LB，葉身.

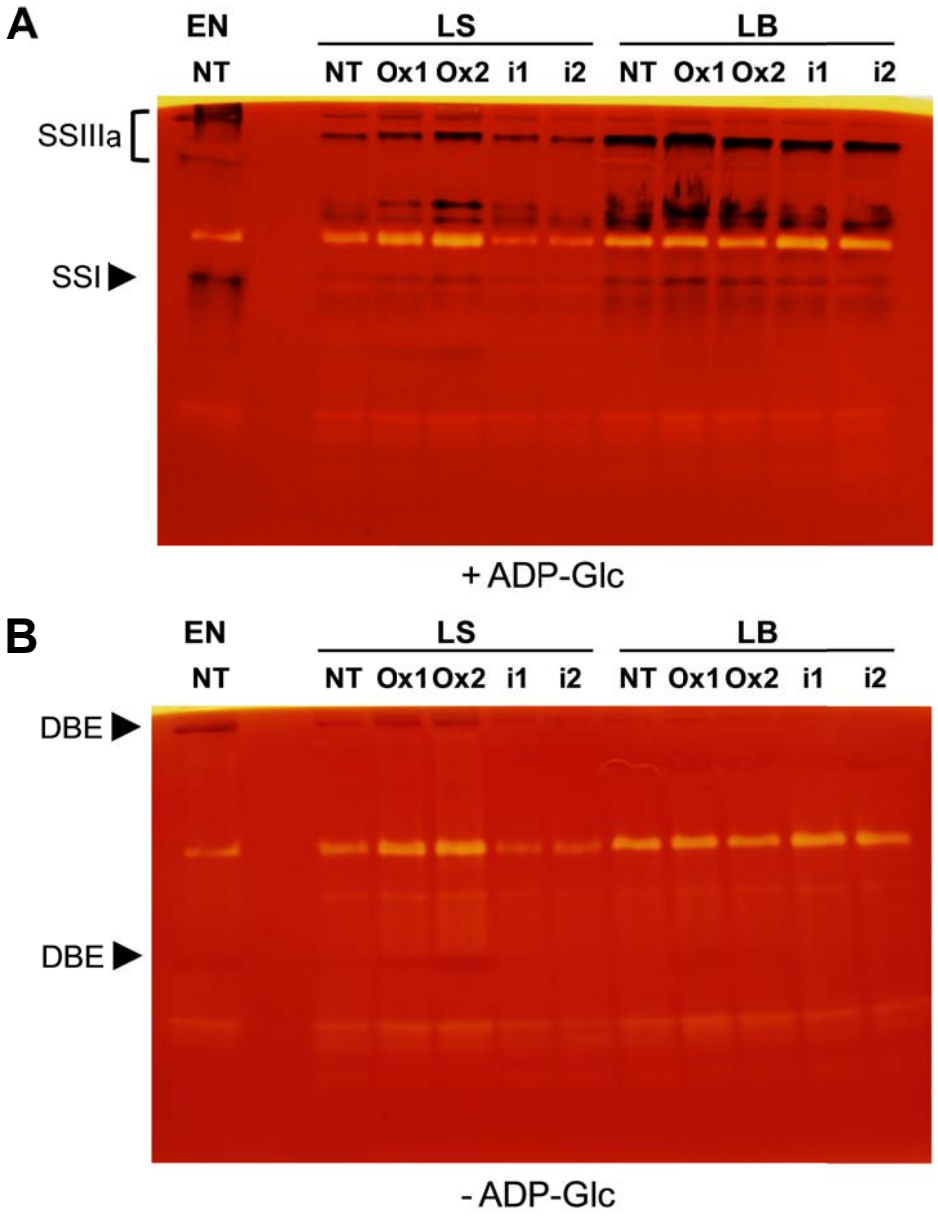


図 25．*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身における SS の活性染色解析.

A，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (+ADP-Glc，ADP-Glc を加える場合)．B，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (-ADP-Glc，ADP-Glc を加えない場合)．*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身から可溶性タンパク質を抽出し，Native-PAGE/活性染色解析を行った．SS の Native-PAGE/活性染色解析では SS の活性と DBE の活性がともに黒色のバンドとして検出される．そこで ADP-Glc を加えない場合も解析を行い，SS のバンドと DBE のバンドを区別した．胚乳から得られたタンパク質をコントロールとして用いた．NT, 非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1 と i2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ． EN，非形質転換イネの胚乳; LS，葉鞘; LB，葉身.

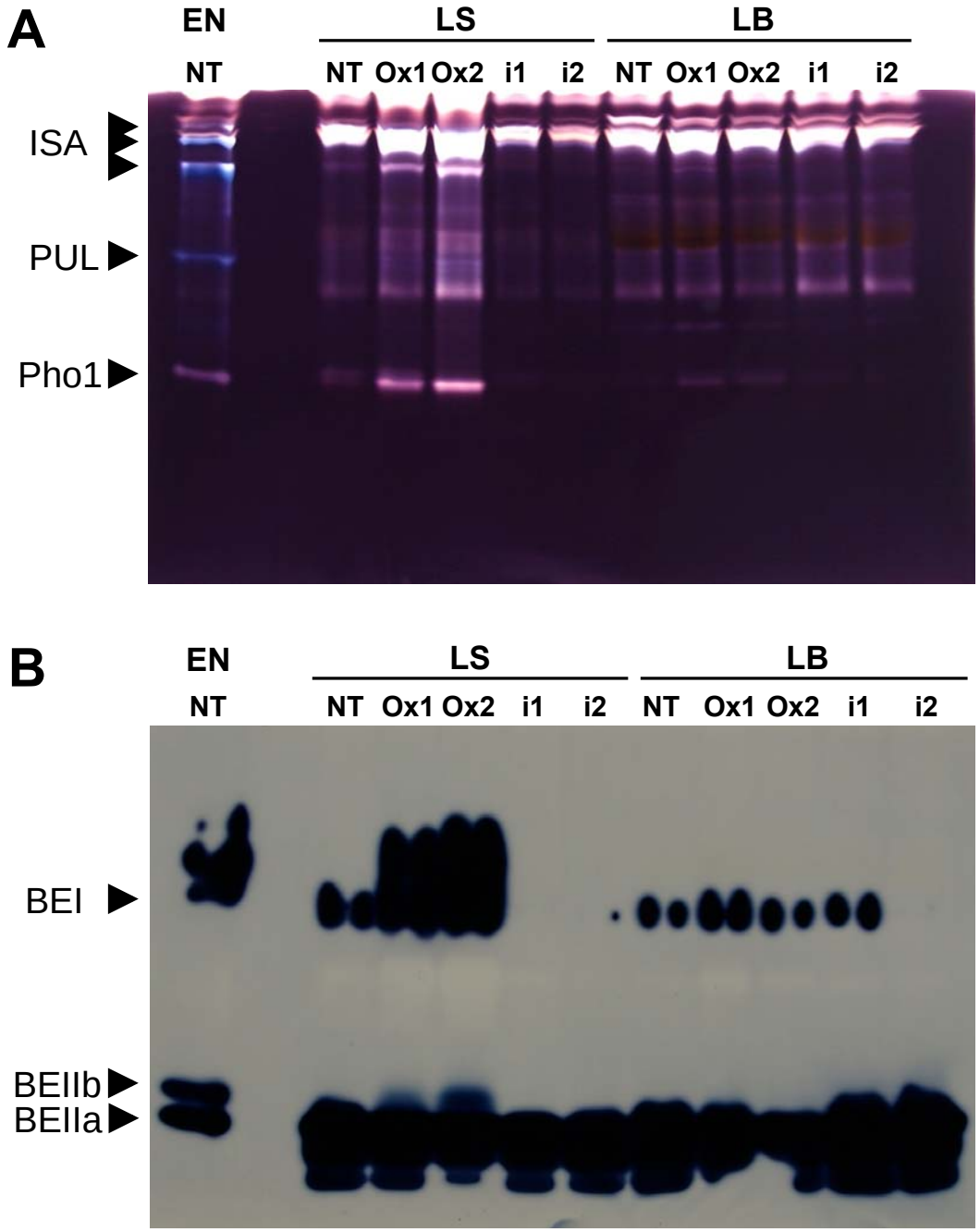


図 26. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身における DBE と BE の活性染色解析.

A, DBE の Native-PAGE/活性染色解析. 青色のバンドが DBE を示す. B, BE の Native-PAGE/活性染色解析. 黒色のバンドが BE を示す. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身から可溶性タンパク質を抽出し, Native-PAGE/活性染色解析を行った. 胚乳はコントロールとして用いた. NT, 非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1 と i2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ. EN, 非形質転換イネの胚乳; LS, 葉鞘; LB, 葉身.

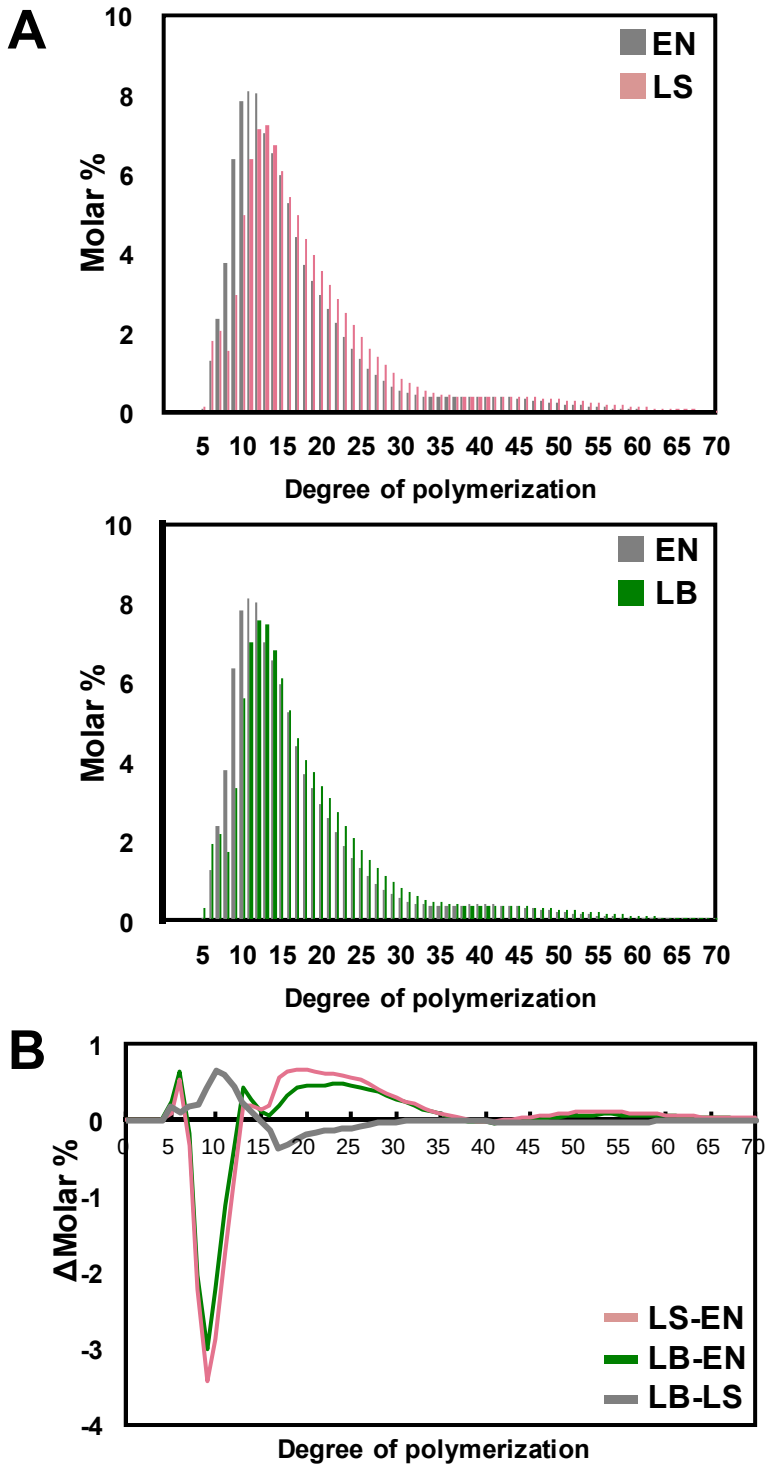


図 27. 葉鞘と葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターンの解析.

A，葉鞘と葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターン．B，各器官間の鎖長分布パターンの差分．日本晴の葉鞘と葉身からデンプンを抽出し，イソアミラーゼで α-1, 6 結合を切断し，キャピラリー電気泳動を行なった．データは 3 反復の平均値を示す．EN, 胚乳; LS, 葉鞘; LB，葉身．LS-EN，葉鞘の鎖長分布パターンの割合から胚乳の鎖長分布パターンの割合を引いた差分．LB-EN，葉身の鎖長分布パターンの割合から胚乳の鎖長分布パターンの割合を引いた差分．LB-LS，葉身の鎖長分布パターンの割合から葉鞘の鎖長分布パターンの割合を引いた差分.

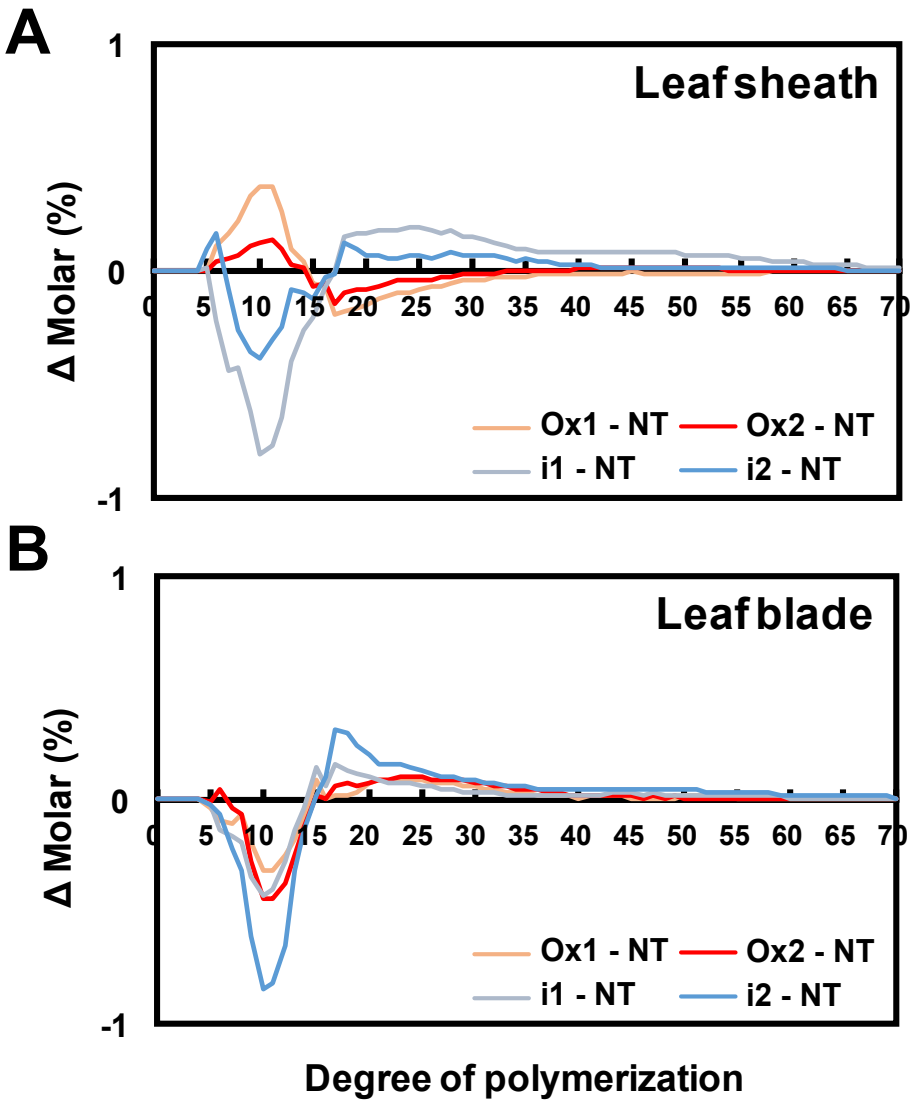


図 28. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターンの解析. A, *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの葉鞘のアミロペクチンの鎖長分布パターンの差分. B, *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの葉身のアミロペクチンの鎖長分布パターンの差分. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身からデンプンを抽出し, イソアミラーゼで α-1, 6 結合を切断し, キャピラリー電気泳動を行なった. データは 3 反復の平均値を示す. NT, 非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1 と i2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ. Ox1, 2-NT, *CRCT* 高発現形質転換イネの鎖長分布パターンの割合から非形質転換イネの鎖長分布パターンの割合を引いた差分. i1, 2-NT, *CRCT* 発現抑制形質転換イネの鎖長分布パターンの割合から非形質転換イネの鎖長分布パターンの割合を引いた差分.

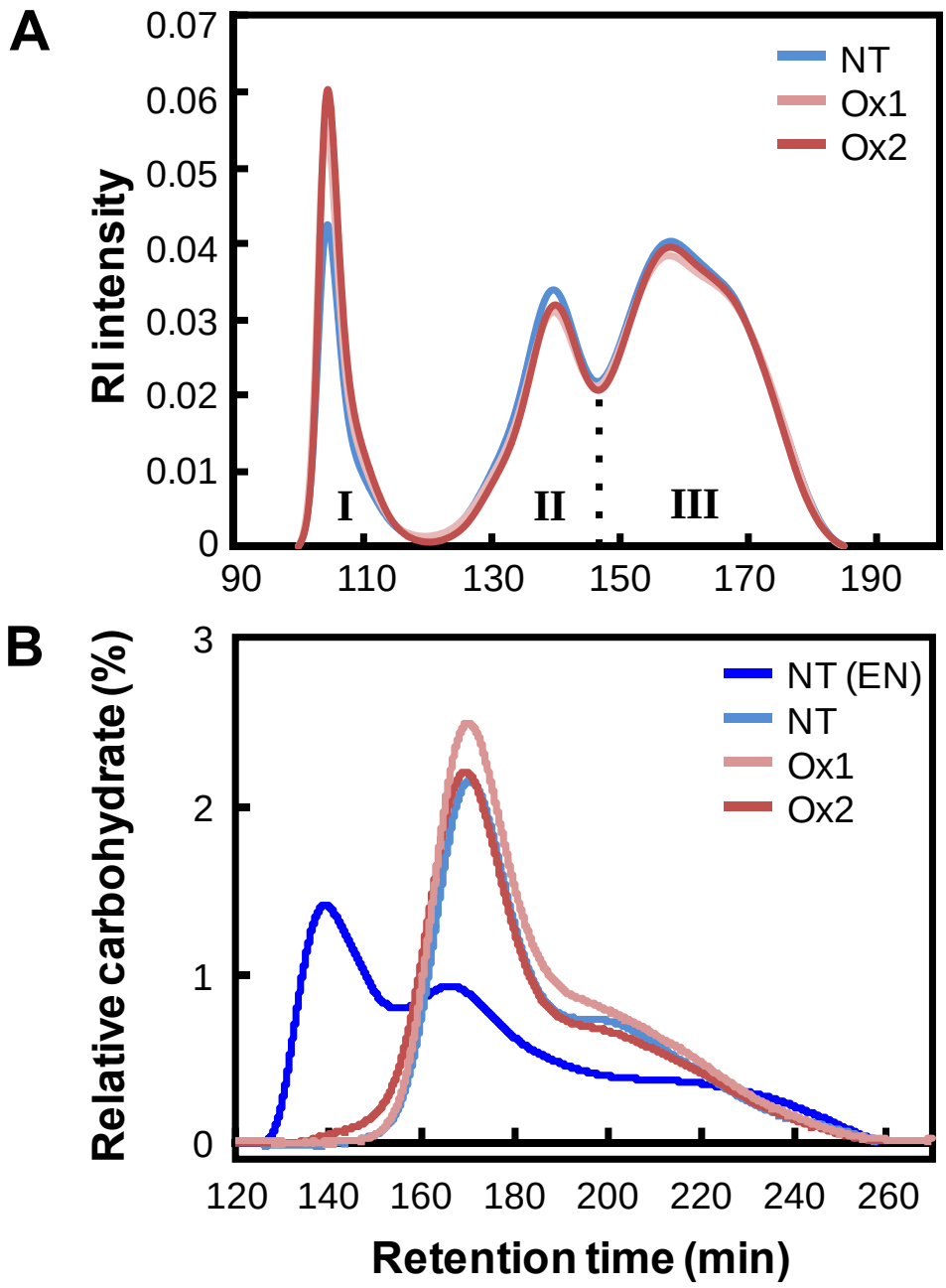


図 29. *CRCT* の高発現が葉鞘のデンプンの構造に及ぼす効果の解析.

A, イソアミラーゼ処理したデンプンを用いたゲル濾過クロマトグラフィー解析. 図中の I, II, III はそれぞれ Fraction I, Fraction II, Fraction III を示す. データは 3 反復の平均値を示す. B, イソアミラーゼ未処理のデンプンを用いたゲル濾過クロマトグラフィー解析. NT, 非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ. EN, 非形質転換イネの胚乳.

表 9. イソアミラーゼ処理を行ったデンプンのゲル濾過クロマトグラフィー解析.

Line	Fraction I (%)	Fraction II (%)	Fraction III (%)	Ratio of III/II[a]
NT	14.51 ± 0.54	26.54 ± 0.31	58.95 ± 0.71	2.23 ± 0.05
Ox1	18.05 ± 0.22*	24.29 ± 0.12*	57.66 ± 0.32	2.37 ± 0.02
Ox2	19.14 ± 0.21*	23.90 ± 0.17*	56.96 ± 0.13	2.38 ± 0.02

それぞれの画分の割合は図 30A より求めた．*は非形質転換イネに比べて 5%水準で有意差があることを示す．±は標準偏差を示す.

a, アミロペクチンの長鎖に対するアミロペクチンの短鎖の割合を示す.

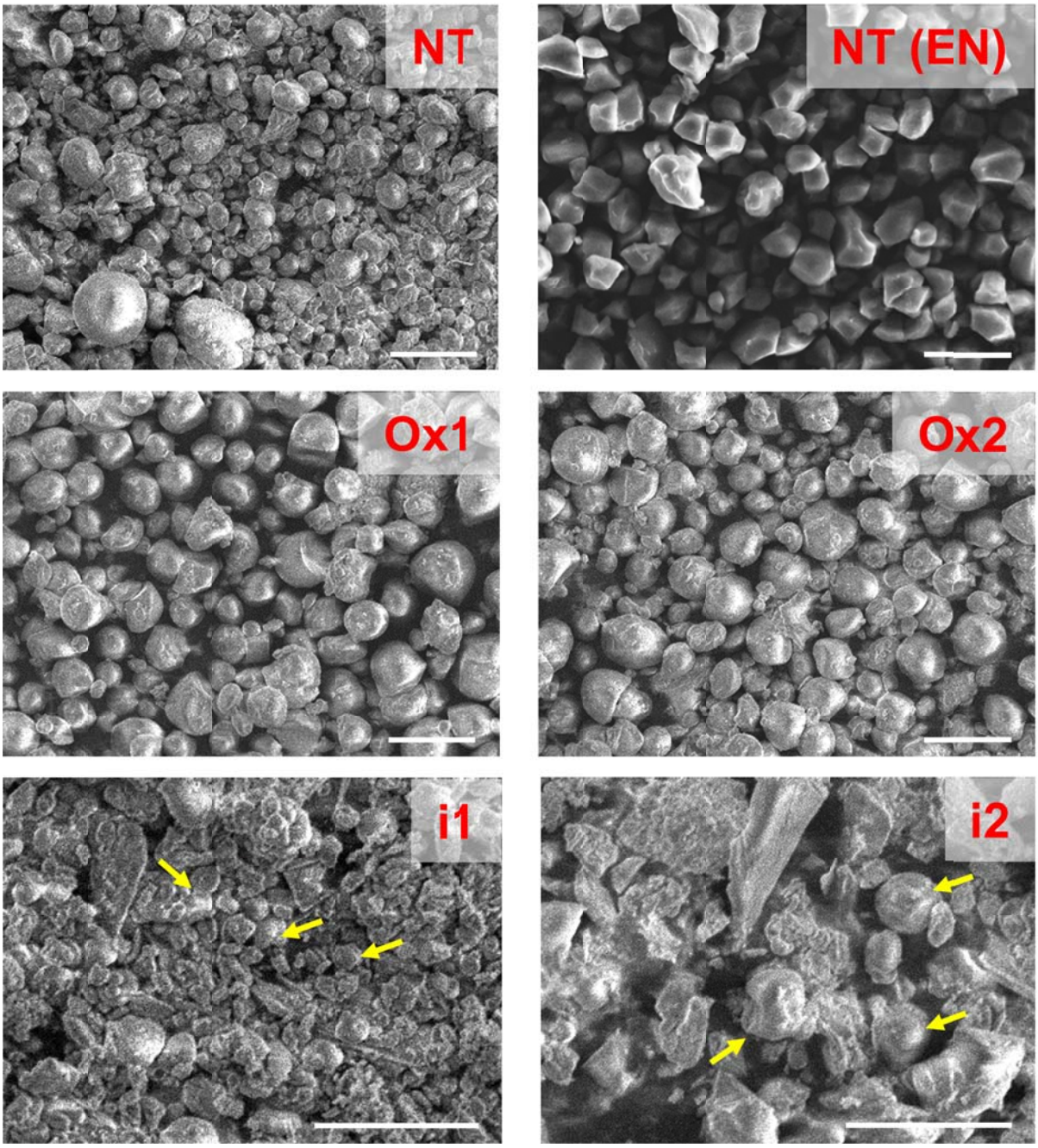


図 30. *CRCT* 形質転換イネの葉鞘のデンプン粒の解析.

CRCT 形質転換イネの葉鞘からデンプン粒を精製し, 走査型電子顕微鏡を用いて解析を行った. 図中の白線は 10 μm を示す. 黄色い矢印は i1, i2 におけるデンプン粒を示す. NT, 非形質転換イネ; NT (EN), 非形質転換イネの胚乳, Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ. i1 と i2; *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

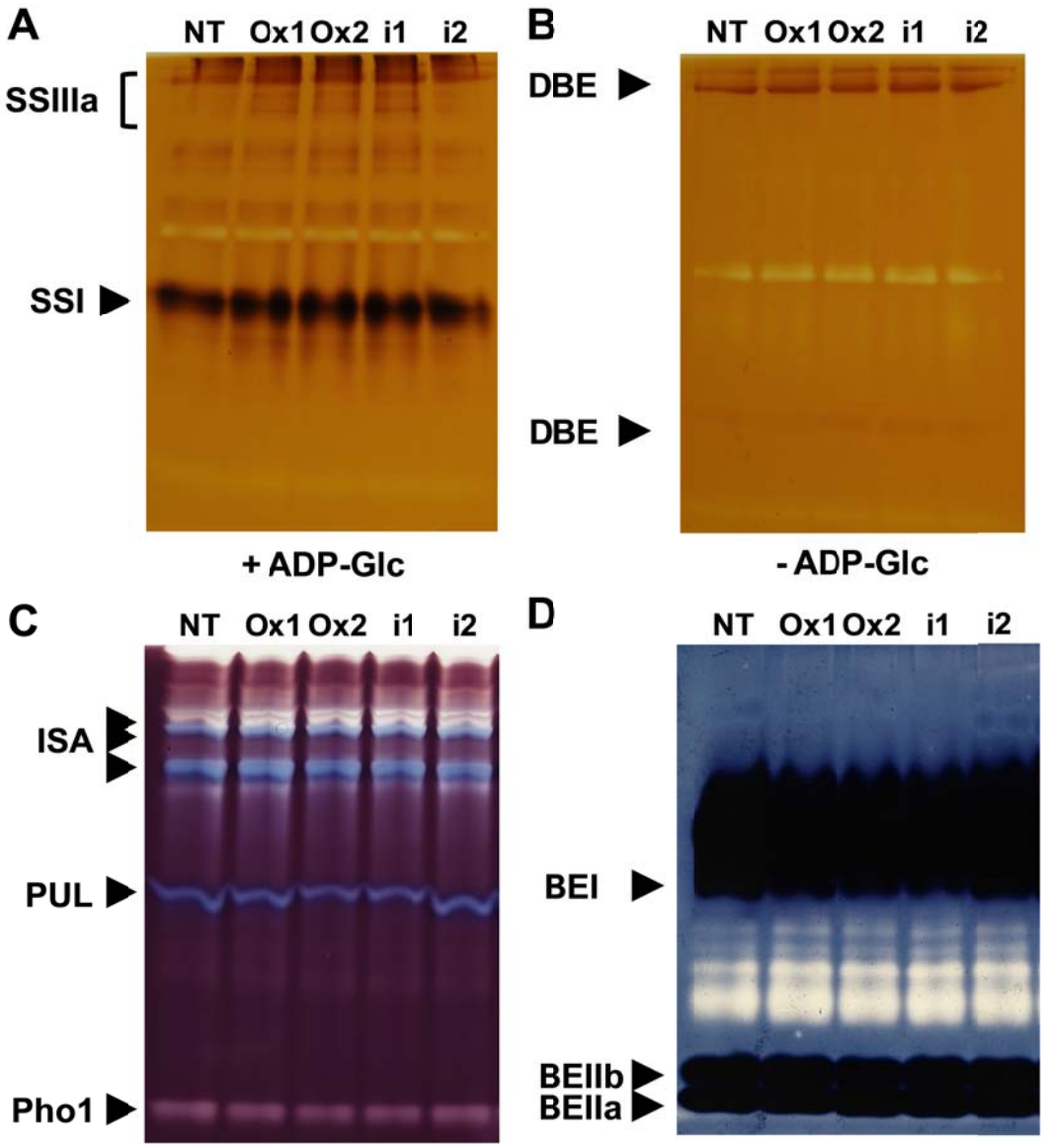


図 31．*CRCT* 形質転換イネの胚乳のデンプン合成関連酵素の Native-PAGE/活性染色解析．A，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (+ADP-Glc，ADP-Glc を加えた場合)．B，SS の Native-PAGE/活性染色解析 (-ADP-Glc，ADP-Glc を加えない場合)．SS の Native-PAGE/活性染色解析では SS の活性と DBE の活性がともに黒色のバンドとして検出される．そこで ADP-Glc を加えない場合も解析を行い，SS のバンドと DBE のバンドを区別した．C，DBE の Native-PAGE/活性染色解析．D，BE の Native-PAGE/活性染色解析．*CRCT* 形質転換イネの胚乳からタンパク質を抽出し，デンプン合成酵素 (A, B)，枝切り酵素 (C)，枝作り酵素 (D) の活性染色解析を行った．NT，非形質転換イネ; Ox1 と Ox2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1 と i2, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

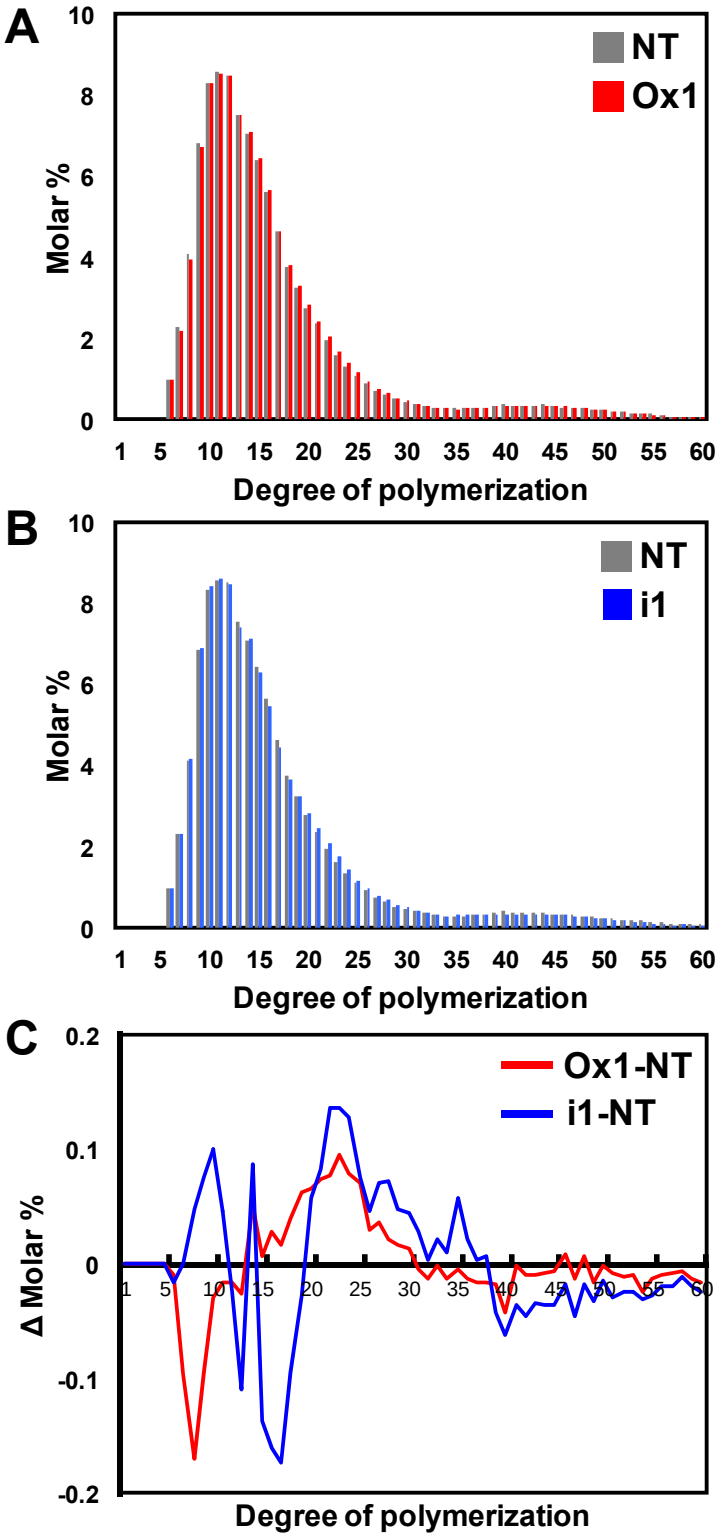


図 32. *CRCT* 形質転換イネの胚乳のデンプンの鎖分布パターン解析.

A, *CRCT* 高発現形質転換イネの胚乳デンプンの鎖分布パターン. B, *CRCT* 発現抑制形質転換イネの胚乳のデンプンの鎖分布パターン. C, *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの胚乳のデンプンの鎖分布パターンの差分. *CRCT* 形質転換イネの胚乳からデンプンを抽出し, イソアミラーゼで α-1, 6 結合を切断し, キャピラリー電気泳動を行なった. データは 3 反復の平均値を示す. NT, 非形質転換イネ; Ox1, *CRCT* 高発現形質転換イネ; i1, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

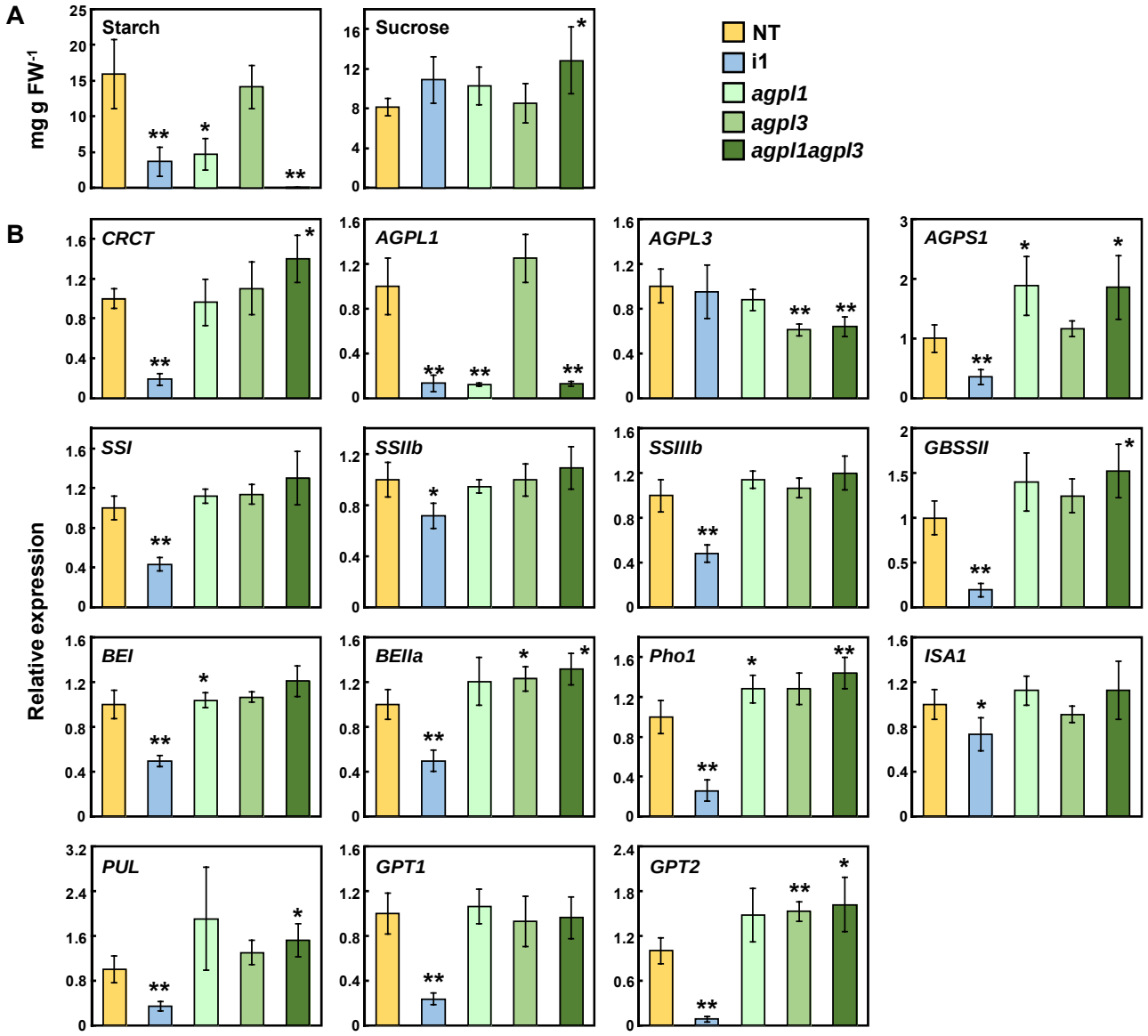


図 33．光合成産物とデンプン合成関連遺伝子の発現量の関係の解析．

A，葉鞘のデンプン含量とスクロース含量．B，葉鞘におけるデンプン合成関連遺伝子の発現量．リアルタイム PCR 法により遺伝子の発現解析を行った．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=4)．NT，非形質転換イネ．i1, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．*agpl1*，*ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit*1 欠損変異体．*agpl3*，*ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit3* 欠損変異体．*agpl1agpl3*，*ADP-グルコースピロホスホリラーゼ large subunit1* と *large subunit3* の二重欠損変異体．

考察

イネにおいて, SS の発現は明確な器官特異性を示し, 胚乳では *SSI*, *SSIIa*, *SSIIIa*, *GBSSI* が，葉鞘や葉身では *SSI*, *SSIIb*, *SSIIIb*, *GBSSII* が主に発現することが報告されている (Ohdan et al., 2005; Hirose et al., 2006)．葉鞘や葉身の SS の Native-PAGE/活性染色解析で検出された 3 本のバンドのうち, 移動度が最も大きいバンドは胚乳の SSI と移動度が同じであることから胚乳の場合と同様に SSI であると考えられる (図 24A)．また，葉鞘や葉身の SS の Native-PAGE/活性染色解析で検出された残り 2 本のバンドは SSIIb と SSIIIb に由来すると考えられるが, バンドを同定するためには今後変異体を用いた解析を行う必要があるだろう．SS の Native-PAGE/活性染色解析では，それぞれの SS のバンド強度から活性の比率を推定できる (Fujita, 2014)．ジャポニカイネの胚乳では，DP6, 7 の短鎖を伸長して DP8-12 の鎖を合成する SSI の活性が全 SS 活性のおよそ 6 割を占めると考えられている (Fujita et al., 2006; Fujita, 2014)．一方，栄養器官の Native-PAGE 活性染色解析により検出された SS のバンド強度は，SSI よりも他の SS のバンドの方が高い傾向があった (図 24A)．つまり栄養器官では，胚乳に比べて全 SS 活性に占める SSI の活性が低いと考えられる．胚乳と栄養器官のアミロペクチンの鎖長分布パターン解析では，胚乳のデンプンの方が栄養器官のデンプンに比べて顕著に短鎖の割合が多いことが明らかとなった (図 27)．胚乳と栄養器官における SSI 活性の違いが栄養器官のデンプンと胚乳のデンプンのアミロペクチンの短鎖の割合に差が生じる原因の 1 つであると考えられる．SSI と同様に，胚乳のアミロペクチンの短鎖の合成に重要な役割を担っているのは BEIIb である．葉鞘や葉身では BEI と BEIIa に由来するバンドは Native-PAGE/活性染色解析で検出されたが，BEIIb に由来するバンドは検出されなかった (図 24D)．胚乳では BEIIb を欠損すると DP17 以下の短鎖が激減することが報告されている (Nishi et al., 2001)．つまり，BEIIb が栄養器官で発現しないことも栄養器官のデンプンと胚乳のデンプンのアミロペクチンの短鎖の割合に差が生じる原因の 1 つであると考えられる．

本研究では胚乳のデンプンに比べ葉鞘や葉身のデンプンはアミロペクチンの短鎖の割合が低下し，長鎖の割合が増加することを明らかにした (図 29)．この傾向はイネの

稈に蓄積するデンプンについても認められている (Matsuki et al., 2010). さらに，稈のデンプンではアミロース含量も胚乳デンプンよりも増加していた (Matsuki et al., 2010). 一般的にアミロース含量やアミロペクチンの長鎖の割合が多いデンプンは分解されにくいことが報告されている (Bird et al., 2004; Regina et al., 2006; Tanadul et al., 2014). 同化デンプンは明期には分解されず, 夜間は細胞内の恒常性を保つためにも徐々に分解される必要があり, 長鎖が多いアミロペクチンの構造や高いアミロース含量がそのようなデンプン分解制御に適している可能性が考えられる. 同化デンプンの分解は胚乳の貯蔵デンプンの分解に比べて高度に制御されており，Glucan, water dikinase (GWD) や Phosphoglucan, water dikinase (PWD) によるグルカン鎖のリン酸化が初発反応である (Streb and Zeeman, 2012; Mahlow et al., 2016). このリン酸化により，アミロペクチンの二重螺旋構造が緩み β-アミラーゼのよる加水分解を受けやすくなる．ジャガイモの GWD は長いグルカン鎖を基質とした場合, 短いグルカン鎖を基質とした場合に比べリン酸化速度が早いことが報告されている (Ritte et al., 2002). つまり，リン酸化による同化デンプンの分解制御にアミロペクチンの鎖長分布パターンが影響を与えている可能性もある．しかしながら，貯蔵デンプンと同化デンプンのアミロペクチンの鎖長分布パターンの違いは植物種によって異なる (Streb and Zeeman, 2014). トウモロコシではイネの場合と対照的に，葉身のデンプンの方が胚乳のデンプに比べ DP5-7 の短鎖の割合が多く，DP15 以上の中長鎖の割合が少ない (Streb and Zeeman, 2014). 同様に，ジャガイモでは葉のデンプンの方が塊茎のデンプンに比べ DP4-8 の短鎖の割合が多く, DP10-20 の中鎖の割合が少ない (Streb and Zeeman, 2014). つまり，アミロペクチンの鎖長分布パターンは栄養器官のデンプン分解制御に影響を及ぼさない可能性も考えられる．一方で，本研究で認められた葉鞘のデンプンや葉身のデンプンで認められたアミロペクチンの鎖長分布パターンに二つのピークがあるという特徴 (図 27) はトウモロコシ, シロイヌナズナ，ジャガイモの葉における同化デンプンでも認められている (Koizumi and Fukuda, 1991; Streb and Zeeman, 2014). 一方で，トウモロコシやコムギの胚乳の貯蔵デンプンのアミロペクチンの鎖長分布パターンはイネ胚乳と同様にピークが 1 つである (Koizumi et al., 1991; Streb and Zeeman, 2014). このように栄養器官のデンプンの構造には植物種に共通した特徴があり，それらの生物学的な意義は今後の研究課題である.

本研究ではイソアミラーゼ処理を行わないデンプンをゲル濾過クロマトグラフィーで解析することにより, 胚乳のデンプンは主に分子量分布が異なる 3 つのピークを持ち, 高分子量のアミロペクチン，中程度の分子量のアミロペクチン，低分子量のアミロペクチンとアミロースに分離される (図 29B). これに対し, 葉鞘のデンプンでは分子量が中程度のアミロペクチンのピークが大きいことを明らかにした (図 29B). これまでの高速ゲル濾過クロマトグラフィー法を用いた解析では胚乳で $B_{2\text{-}3}$ 鎖を合成する SSIIIa や短い枝分かれを合成する BEIIb の変異体の胚乳デンプンでは, 分子量が低下することが報告されている (Fujita et al., 2007; Asai et al., 2014). つまり，クラスター構造の骨格となる B 鎖とクラスター内のアミロペクチンの枝分かれの合成がクラスターの分子量の重要な決定因子であると考えられる. 葉鞘では SSIIIa がほとんど発現していないが，栄養器官では SSIIIa と同様にアミロペクチンの長鎖を合成すると考えられる SSIIIb が発現している．実際に鎖分布解析では，DP40 付近の割合は胚乳のデンプンと同程度であることから，B_{n+1} 鎖は正常に合成されていると推測できる (図 27A). しかしながら SSIIIb については，その機能解析が全く行われておらず今後の解析が必要である．一方，葉鞘では BEIIb が発現しないため DP6-7 の A 鎖の合成が行われず, アミロペクチンの分子量が低下した可能性が考えられる. また，胚乳デンプンの中にはアミロペクチンの分子量が大きいものと小さいものが混在しており (図 29B), それらがどのように合成されているかは不明である. デンプン合成は変異体を用いた解析によりその基礎的なメカニズムは明らかになりつつある. 今後はそれに加えて，デンプンの三次構造の形成メカニズムの解明にも取り組む必要がある.

本研究により CRCT はタンパク質レベルでも SSI, BEI, Pho1, BEIIa, ISA1 といった複数のデンプン合成関連酵素の発現を制御することが明らかになった (図 23, 25, 26). それに加え, *CRCT* の発現量はデンプンの構造にも影響を与えることがわかった (図 28, 29, 表 9). その中で，CRCT はデンプン合成関連酵素の中でもデンプン合成の律速酵素であり葉鞘のデンプン合成に大きな影響を与える *AGPL1* の発現を制御することが明らかとなった．さらに本研究では，*CRCT* 形質転換イネの葉鞘と葉身において *Pho1* の発現量が変化することも明らかとした (図 23, 26A). AGPase を欠損させるとデンプンの蓄積は起こりにくくなるが，イネの葉鞘では AGPase 活性よりも BE 活性の方がデンプン含

量と高い相関関係があることが報告されている (Watanabe et al., 1997). BE はアミロペクチンの枝分かれを作ることが知られているが，近年の研究より Pho1 と相互作用することでデンプン合成の初期過程のプライマー合成においても重要な働きを担っていることが示唆されている (Tetlow et al., 2004; Nakamura et al., 2012). しかし，*pho1* 欠損シロイヌナズナ変異体やアンチセンス法により *Pho1* の発現量が減少した形質転換ジャガイモの葉ではデンプン合成が正常に行われていることから，Pho1 は葉におけるデンプン合成に関与しないと考えられる (Sonnewald et al., 1995; Zeeman et al., 2004). 一方，低温条件下で育成した *pho1* 欠損変異体イネでは胚乳におけるデンプン合成が正常に行われず, 登熟歩合が顕著に低下する (Satoh et al., 2008). それに加え Fettke et al. (2010) は，アンチセンス法により *Pho1* の発現量を減少させた形質転換ジャガイモの塊茎では，デンプンへのグルコース-1-リン酸の取り込みが減少することを報告している．つまり葉とは異なり，イネ胚乳やジャガイモ塊茎では Pho1 がデンプン合成に重要な役割を担っている可能性が考えられる．よって，CRCT は葉鞘のデンプン合成に重要であるが葉身のデンプン合成に影響を与えない AGPL1 や Pho1 の発現を制御するため，葉鞘においてのみデンプン含量に重大な影響を与えると考えられる．

AGPL1, AGPS1, SSI, GBSSII といったデンプン合成関連酵素は高 CO_2 条件下や糖処理を行った際に発現促進されることが報告されている (Dian et al., 2003; Akihiro et al., 2005; Fukayama et al., 2009). SSI はアミロペクチンの短鎖の合成に働くことから，SSI の発現促進はアミロペクチンの短鎖の増加を引き起こすと考えられる．また，AGPase の活性が上昇すると ADP-グルコース含量が増加し，他の SS に比べ ADP-グルコースに対する Km 値が高い GBSS の活性が高まり, アミロース合成が促進される可能性が指摘されている (Clarke et al., 1999; Asai et al., 2014). つまり，高 CO_2 条件のような光合成活性が高いような条件ではデンプンのアミロペクチンの短鎖の割合とアミロース含量が増加すると予想される．CRCT は光合成産物に応答しデンプン合成関連酵素の発現を促進する (第 1 章). また，*CRCT* 高発現形質転換イネでは葉鞘のデンプンのアミロペクチンの短鎖の割合とアミロース含量が非形質転換イネに比べ高くなった (図 28, 29). つまり，*CRCT* 高発現形質転換イネで見られたデンプンの構造の変化は光合成活性が高い時におこる変化である可能性が考えられる．実際に，高 CO_2 条件下でイネを育成すると胚

乳のアミロース含量が増加することが報告されている (Wang et al., 2011). しかしながら，アミロース含量が変化しない品種やアミロース含量が低下した品種もあり，高 CO_2 条件下でのアミロース含量の変化はイネ品種によって異なることが示唆されている (Wang et al., 2011). また，低窒素条件下でイネを育成すると胚乳のアミロペクチンの含量や構造に影響を及ぼさないが，アミロース含量が増加することが報告されている (Thitisaksakul et al., 2012). このように胚乳のデンプン合成は栄養条件や環境条件に影響を受けることは報告されているが, 栄養器官のデンプン合成に及ぼす影響を解析した研究例はほとんどなく，今後解析を行う必要がある.

これまでの結果から *CRCT* の発現量は複数のデンプン合成関連酵素の発現量と高い相関が認められるため，CRCT はデンプン合成関連遺伝子の発現を一括制御する転写因子であると考えられる. しかし，他に 2 つの可能性が考えられる. 1 つ目は ADP-グルコースがデンプン合成関連遺伝子の発現制御のシグナル分子として機能する可能性である. イネの *SSIIIa* 欠損変異体や *BEIIb* 欠損変異体では AGPase 活性が上昇し，また，GBSSI の発現レベルが増加することが報告されており (Asai et al., 2014)，デンプン合成酵素の発現変化は他の酵素の発現に影響を及ぼすことが示唆されている. それに加え，グルコース，スクロース，トレハロース-6-リン酸などの代謝産物がシグナルとなる例が報告されている (Rolland et al., 2006; Paul, 2007). それらのことから，*CRCT* の発現量と発現に相関があるデンプン合成関連遺伝子のうち, デンプン合成の中でも最初の反応を触媒する AGPase によって合成される ADP-グルコースがデンプン合成のシグナル分子として機能する可能性が考えられる. 2 つ目は *CRCT* の発現量が乾物重に影響を与え，その二次的な影響としてデンプン合成関連遺伝子の発現が変化した可能性である. デンプン含量と乾物重には負の相関があることが知られている (Sulpice et al., 2009). 実際に葉鞘にデンプンが高蓄積する *CRCT* 高発現形質転換イネでは乾物重は減少し, 葉鞘にデンプンが蓄積しない *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは分げつ数が増加する (図 19). それに伴いデンプン関連酵素の発現も変化したとも考えられる. しかしながら *agpl1* 変異体と *agpl1agpl3* 二重変異体では，*CRCT* 発現抑制形質転換イネと異なり多くのデンプン合成関連遺伝子の発現は変化しなかった (図 33). それらの変異体ではデンプン合成関連遺伝子は発現しているのにも関わらずデンプン含量が低下していることから，ADP-

グルコース含量も低下していると考えられる．また，それらの *agpase* 変異体では *CRCT* 発現抑制形質転換イネと同様に分げつ数が野生型に比べ増加することが報告されている (Okamura et al., 2015)．よって，ADP-グルコースがデンプン合成のシグナル分子として機能する可能性は低く，乾物生産もデンプン合成関連遺伝子の発現に影響を与えないことが示唆された．つまり，*CRCT* 形質転換イネで見られた葉鞘のデンプン含量の変化は間接的なものではなく，CRCT が直接的にデンプン合成関連遺伝子の発現を制御したものであると結論づけられる．

摘要

CRCT はデンプン合成関連遺伝子の発現を調節することでイネ葉鞘のデンプン合成を制御していることが明らかとなった．しかしながら，CRCT がデンプン自体の構造的な特性に及ぼす効果は明らかとなっていない．本章ではまず，*CRCT* 形質転換イネを用いて，CRCT が栄養器官のデンプン合成関連酵素の発現に与える影響をタンパク質レベルで解析した．そして，CRCT が栄養器官のデンプンの物理化学的な性質に及ぼす効果について解析を行った．

CRCT 形質転換イネを用いて，デンプン合成関連酵素に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なったところ，葉鞘では *CRCT* の発現量と SSI, ISA1, PULL，BEI, BEIIa，Pho1 の発現量に相関が認められた．また，Native-PAGE/活性染色解析で検出したそれらの酵素の活性もおおよそ *CRCT* の発現量との間に相関が認められた．一方葉身では，ほとんどのデンプン合成関連酵素の発現は変化していなかったが， *CRCT* の発現量と Pho1 の発現量の間に相関は認められた．これらの結果から，CRCT は遺伝子発現レベルだけではなくタンパク質レベルにおいても多くのデンプン合成関連酵素の発現に影響を与えることがわかった．

CRCT 形質転換イネの葉鞘と葉身からデンプンを抽出し，アミロペクチンの鎖長分布パターンを解析したところ，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘では DP5-14 の短鎖の割合が増加したのに対し，*CRCT* 発現抑制形質転換イネではそれらの割合が減少した．一方，葉身では *CRCT* の発現量はデンプンの鎖長分布パターンに効果を及ぼさなかった．精製した葉鞘のデンプンを用いてゲル濾過クロマトグラフィー解析を行なったところ，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べアミロース含量が増加することがわかった．しかし，*CRCT* の発現量はアミロペクチンのクラスター構造に大きな影響を与えないこともわかった．葉鞘からデンプン粒を精製し，走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ，*CRCT* 高発現形質転換イネの葉鞘のデンプン粒は非形質転換イネよりもサイズが大きいものの，形状に大きな差異は認められなかった．

CRCT は胚乳で機能している SSI や BEI といった酵素の発現も制御している．そのため，CRCT が胚乳のデンプン合成に及ぼす効果についても解析を行なった．*CRCT* 形質

転換イネの胚乳を用いて，Native-PAGE/活性染色解析と鎖長分布解析を行なったが，それらの結果に非形質転換イネとの差異は認められなかった.

以上の結果より，CRCT は葉鞘において複数のデンプン合成関連酵素の発現を制御し，アミロペクチンの短鎖の割合やアミロース含量に影響を与えることがわかった.

第 4 章

CRCT が稲わらを用いたバイオエタノール生産効率に及ぼす効果

第 1 章により，*CRCT* 高発現形質転換イネは茎葉部に多くのデンプンを蓄積することが明らかとなった．近年，イネの新しい利用法として発酵粗飼料やバイオ燃料が注目されており，*CRCT* 高発現形質転換イネで見られた茎葉部へのデンプンの高蓄積は，それらイネの新しい利用法に非常に重要な形質である．本章では *CRCT* 形質転換イネを用いて，CRCT が稲わらからのバイオエタノール生産効率に及ぼす効果を解析した．

材料と方法

4-1　供試材料

非形質転換イネ，*CRCT* 高発現形質転換イネ，*CRCT* 発現抑制形質転換イネを植物材料として解析に用いた．1-2 と同様の方法でイネを育苗し，4.8 葉齢期の個体を 0.6 g N に相当する化成肥料 (N:P:K = 8:8:8)，0.4 g N の相当する緩効性肥料 (LP70)，0.3 g の微量要素 (ハイグリーン)，4 g のケイ素を含む水田土壌を充填した 1/5000a のワグネルポットに 1 ポットあたり 2 個体移植し，神戸大学農学部組換え体温室ファイトトロンで育成した．移植後 60 日後に生育が悪い個体を間引きし，1 ポットあたり 0.16 g N になるように化成肥料 (N:P:K = 8:8:8) を追肥した．出穂後 50 日目に，穂を収穫し 50°C で 3 日間乾燥させ，収量調査に用いた．収穫後の個体を地際より刈り取り，80°C で 3 日間乾燥させた．乾燥させた稲わらはクラッシャー (ハンマータイプ; 三庄インダストリー) を用いて細かく粉砕し，以下の解析に用いた．

4-2　希硫酸前処理

希硫酸前処理は Teramura et al. (2013) の方法に従って行った．粉砕した稲わら 6 g を 80 mL の 1% (v/v)希硫酸溶液に加え，ホットスターラー (HME-19G-U; Koike Precision Instruments) で 180°C，45 分，200 rpm で撹拌した．前処理後，懸濁液をろ紙 (No.1; ADVANTEC) で濾過し，可溶性画分と酸不溶性画分に分けた．酸不溶性画分は蒸留水で数回洗浄した．洗浄後の酸不溶性画分は乾燥させ，電子天秤 (XS105DU; METTLER TOLEDO) を用いて重量を測定した．可溶性画分は粉末状の水酸化カルシウムを加え pH 5.0 に調整し，糖含量と発酵阻害物質含量の測定に用いた．

4-3　糖含量の測定

糖含量の測定はMatsuda et al. (2011) の方法で行った．可溶性画分と0.1% (w/w) リビトール溶液をそれぞれ1.5 µLずつ1.5 mLチューブにとり遠心乾燥機 (7810010; Labconco) を用いて乾燥させた．沈殿をピリジンに溶解した*O*-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩溶液 (20 mg mL^{-1}) 100 µLで溶かし，30°Cで90分間インキュベートした．その後，50 µLの*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを加え，さらに30°Cで90分間インキュベートした．10 µLのサンプル溶液を用いてガスクロマトグラフィー質量分析器 (GCMS-2010 Plus，Shimadzu) により糖濃度を測定した．キャリアガス

にはヘリウムを用い，インジェクション温度は230°Cとした．オーブン温度は解析を初めて0-2分間は80°C，その後1分間に15°Cのペースで330°Cまで温度を上昇させた．

4-4　発酵阻害物質の測定

発酵阻害物質の解析は Matsuda et al. (2011) の方法で行った．可溶性画分 100 µL にアセトン 900 µL を加えよく撹拌した後，21,880 g で 10 分間遠心分離し，得られた上澄み 10 µL をガスクロマトグラフィー質量分析器 (GCMS-2010 Plus，Shimadzu; カラム，CP-Sil 8CB-MS，Agilent，30 m × 0.25 mm) にかけ，5-HMF 濃度とフルフラール濃度を測定した．キャリアガスにはヘリウムを用い，インジェクション温度は 250°C とした．オーブン温度は解析を初めて 0-5 分間は 50°C，その後 1 分間に 20°C のペースで 280°C まで温度を上昇させた．酢酸濃度とギ酸濃度の分析には同じ装置カラムは DB-FFAP (Agilent, 60 m × 0.25 mm) を用いた．キャリアガスも同様にヘリウムを用い，インジェクション温度は 250°C とした．オーブン温度は解析を始めて 0-5 分間は 100°C，その後 1 分間に 10°C のペースで 230°C まで温度を上昇させた．

4-5　稲わらと酸不溶性画分の組成分析

稲わらと酸不溶性画分の組成分析はアメリカ国立再生可能エネルギー研究所の方法に若干の改良を加え行った (Sluiter et al., 2011; Teramura et al., 2013)．300 mg の乾燥サンプルに 72% (w/w) 濃硫酸を 3 mL 加えて 30°C で 2 時間反応させた．反応液を蒸留水で 4% (w/w) の濃度になるように希釈した後 121°C で 1 時間オートクレーブにかけた．その後，混合液を遠心分離し得られた上澄みを用いて，4-3 の方法でグルコース含量とキシロース含量を求め，その値から稲わら中に含まれるセルロースとヘミセルロースの割合を算出した．稲わら中の酸可溶性リグニンの割合は，酸処理後の上澄みの 240 nm の光学密度を測定し算出した．稲わら中の酸不溶性リグニンの割合は，酸処理後の残渣の乾物重を測定し算出した．

稲わら中のデンプンの組成分析では，75 mg の乾燥サンプルに 0.5 M NaOH を 750 µL 加え室温で 20 分間反応させデンプンを糊化した．遠心分離して上澄みを回収し，0.5 M 酢酸溶液を加えて pH 5 に合わせ，蒸留水で全量を 7.5 mL とした．サンプル液 100 µL に酵素液 (8 unit α-amylase, 13 units glucoamylase, 0.5M 酢酸ナトリウム緩衝液) を 100 µL 加えて 50° C で 1 時間反応させた．グルコース含量を 4-3 の方法で測定し，その値から稲わら中のデンプンの割合を算出した．

また，希硫酸前処理後の酸不溶性画分についても同様に組成分析を行った．

4-6　酵素糖化率の解析

セルラーゼ (Cellic CTec2; Novoenzymes) を 6.6 filter paper units g-dry weight^{-1} となるように加えた酵素糖化反応液 (0.3 M クエン酸緩衝液，テトラサイクリン (40 μg mL^{-1})，シクロヘキシミド (30 μg mL^{-1})) に乾燥させた酸不溶性画分 80 mg を加え，反応条件 50°C, 72 時間, 120 rpm の条件に設定したパーソナル有機合成装置 (PPS-2000; Tokyo Rikakikai) を用いて糖化反応を行った．72 時間後，サンプルを氷上に置き酵素糖化反応を止め，21,880 g，4°C で 10 分間遠心分離した．得られた上澄みを用いて 4-3 の方法でグルコース濃度を解析し，糖化効率を算出した．

4-7　収量調査

乾燥させた稲わらの重量を測定した．遅れ穂を除いた穂数を測定した後，脱穀し全籾数を測定した．籾をエタノールで予浸した後，密度比 1.06 の NaCl 溶液で塩水選を行った．完全沈降した籾を蒸留水で洗い，再度 50°C で 3 日間乾燥させた後，完全沈降した籾数を測定し登熟歩合を求めた．さらに籾摺りをした後，玄米千粒重を測定した．1 個体当りの収量は，穂数，一穂頴花数，登熟歩合，玄米千粒重から算出した．

結果

初めに，*CRCT* 形質転換イネの稲わらを用いて希硫酸前処理を行い，酸可溶性画分のグルコース濃度，キシロース濃度と酸不溶性画分の残渣の割合を解析した (図 34)．可溶性画分のグルコース濃度は，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ顕著に高く，非形質転換イネでは 7.5 g L^{-1} だったのに対し，*CRCT* 高発現形質転換イネでは 17.8 - 21.8 g L^{-1} と非形質転換イネのおよそ 2.5 - 3 倍だった (図 34A)．一方で，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは可溶性画分のグルコース濃度が有意に減少し，4.4 g L^{-1} だった．グルコース濃度とは対照的に，可溶性画分のキシロース濃度は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ有意に減少した (図 34B)．また，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ希硫酸前処理後の残渣が顕著に減少したが，*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは非形質転換イネと比べて差異は認められなかった (図 34C). 可溶性画分のグルコース濃度と酸不溶性残渣の重量の関係を調べると, それらの間には高い負の相関が認められた (図 35)．これらの結果から，*CRCT* の発現量は可溶性画分のグルコース濃度に最も大きな影響を与えることがわかった．

希硫酸処理による前処理はその副産物として, その後の発酵過程を阻害する発酵阻害物質を生成してしまうことが報告されている (Teramoto et al., 2008)．そこで発酵阻害物質であるフルフラール，ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) ，酢酸，ギ酸の濃度を可溶性画分について解析した (図 36)．フルフラールと 5-HMF の濃度については，*CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの間に差は認められなかった．酢酸濃度は *CRCT* 発現抑制形質転換イネで非形質転換イネに比べ有意に減少した. 一方, ギ酸濃度は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ顕著に増加した. 以上の結果より, *CRCT* の発現量は可溶性画分の発酵阻害物質である酢酸とギ酸の濃度に影響を与えることがわかった．

可溶性画分のグルコース濃度は，稲わらの構成成分，特にデンプンの割合によって決定されること報告されている (Teramura et al., 2013)．そこで，*CRCT* 形質転換イネの稲わらの構成成分の組成を解析した (表 10)．第 1 章での結果から予想される通り，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ稲わら中のデンプンの割合が有意に高かった．デンプンの割合とは対照的に，ヘミセルロースと酸不溶性リグニンの割合は *CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ有意に減少した．一方 *CRCT* 発現抑制形質転換イネでは，非形質転換イネに比べデンプンの割合は減少し，ヘミセルロー

スと酸不溶性リグニンの割合が増加した. これらのことから CRCT は稲わらのデンプンの割合のみならず, ヘミセルロースやリグニンといった細胞壁の構成成分の割合にも影響を与えることがわかった.

酸不溶性画分をセルラーゼ処理し，糖化効率を解析した (図 37). *CRCT* 形質転換イネの糖化効率は非形質転換イネに比べ大きな差異は認められなかった. 酸不溶性画分残渣の組成を解析すると, 非形質転換イネと *CRCT* 形質転換イネの間に差異は認められなかった (表 11). よって, *CRCT* の発現量は酸不溶性残渣の組成には影響を与えないことから，糖化効率にも影響を与えないことがわかった.

バイオエタノール生産には，バイオマスの大きさも重要な形質となる．そこで *CRCT* 形質転換イネの稲わらの乾物重と収量についても解析を行った (表 12). *CRCT* 高発現形質転換イネの稲わらの乾物重は, 非形質転換イネに比べ顕著に増加した. 一方, *CRCT* 高発現形質転換イネでは, 登熟歩合や千粒重が大きく減少したために収量も大きく低下した. 第 2 章では *CRCT* 高発現形質転換イネの乾物重は非形質転換イネの乾物重に比べ大きく低下していた (図 20). これらの結果の差異は，生育条件の違いによるものと考えられる．*CRCT* 発現抑制形質転換イネでは稲わらの乾物重は非形質転換イネと変わらず，収量にも差異は認められなかった．また，それぞれの画分で得られるグルコース量と, 稲わらの乾物重から植物体 1 個体当たりから得られるグルコース収量を計算すると, 非形質転換イネではおよそ 10.9 g plant^{-1}，*CRCT* 高発現形質転換イネではおよそ 20.2 - 25.5 g plant^{-1}，*CRCT* 発現抑制形質転換イネではおよそ 7.8 g plant^{-1} と見積もられた．よって，CRCT の利用について考えた場合，発現抑制するよりも高発現した方がバイオマス生産に大きな効果をもたらすことがわかった.

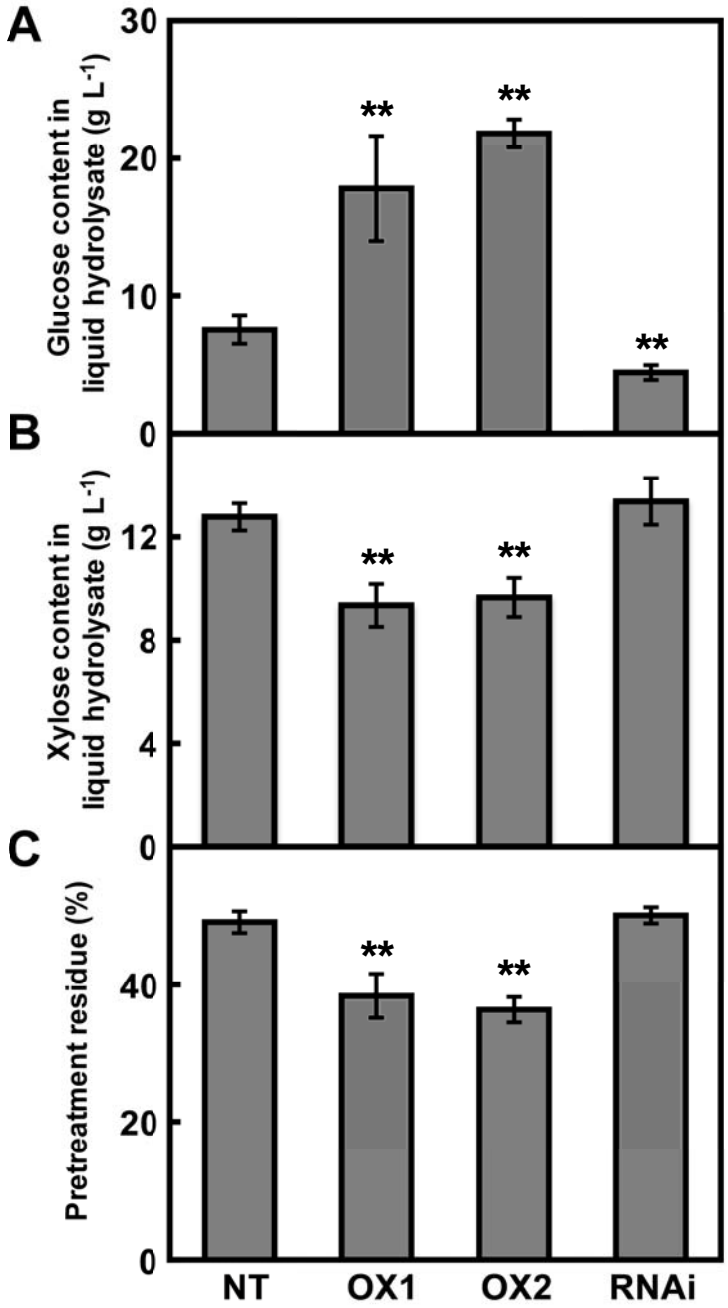


図 34．バイオマス原料としての *CRCT* 形質転換イネの特性．

A，希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース含量．B，希硫酸処理後の可溶性画分のキシロース含量．C，酸不溶性残渣の割合．稲わら 6 g を希硫酸処理した後の可溶性画分についてはグルコース含量とキシロース含量を解析した．酸不溶性残渣の割合は希硫酸処理後の残渣を乾燥させた後，重量を測定した．**は 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

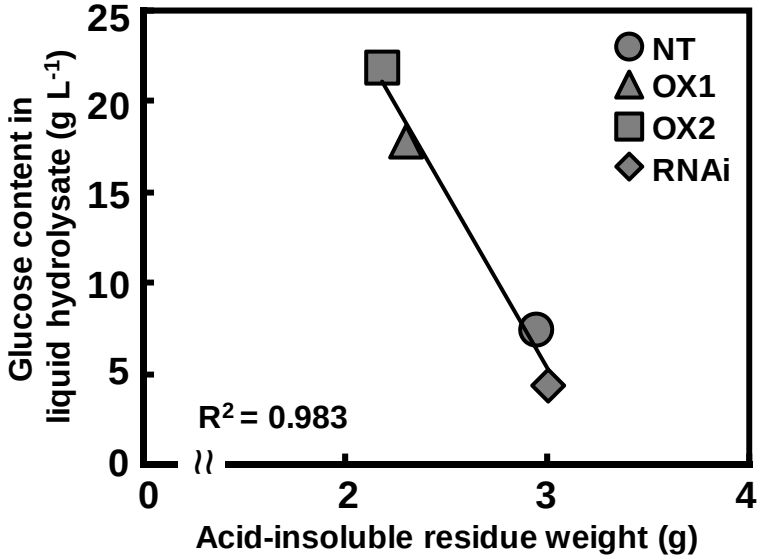


図 35. 希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース含量と酸不溶性残渣の重量の関係. R^2 は決定係数を示す. NT, 非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

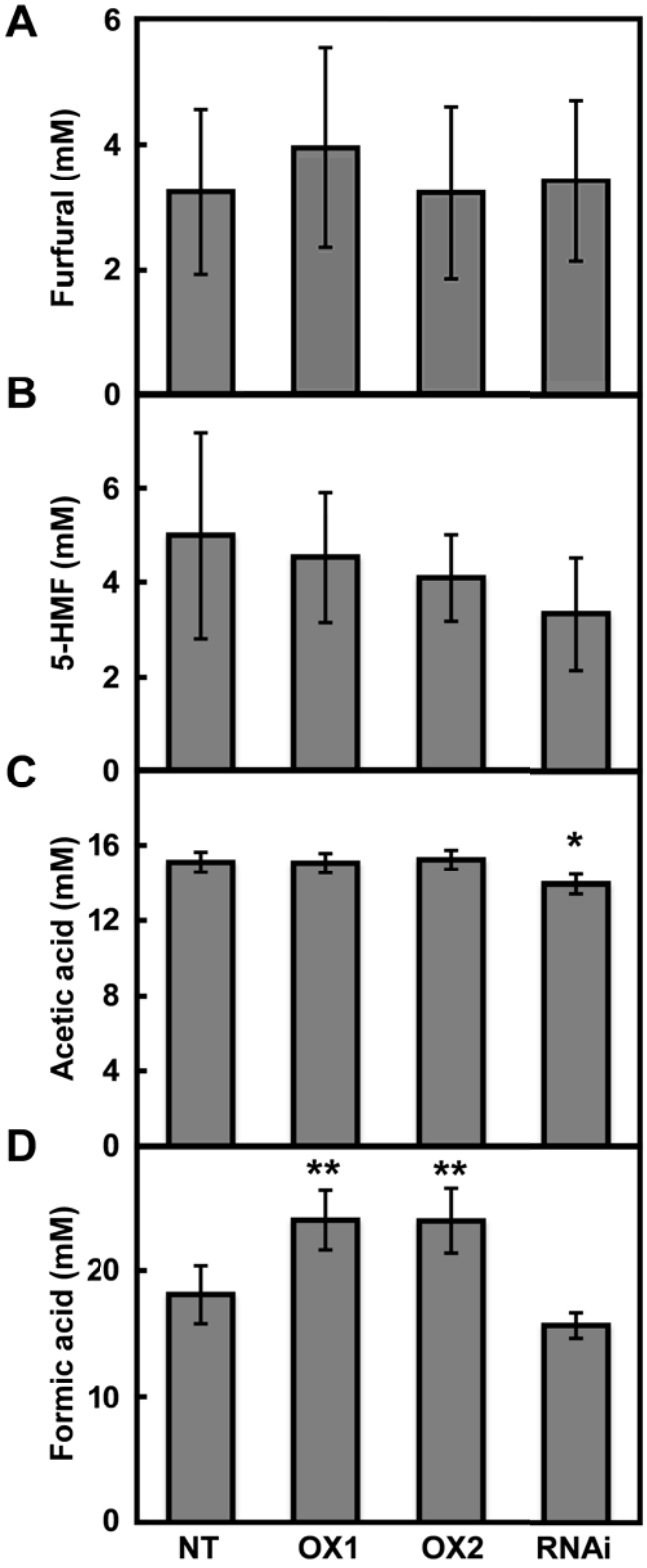


図 36．可溶性画分中に含まれる発酵阻害物質の濃度．

A，フルフラール濃度．B，ヒドロキシメチルフルフラール濃度．C，酢酸濃度．D，ギ酸濃度．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5)．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ．

表 10. 稲わらの構成成分の組成.

	Glucan (%)	Starch (%)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Acid-insoluble lignin (%)	Acid-soluble lignin (%)	Total (%)
NT	35.2 ± 1.5	3.4 ± 0.4	31.8 ± 1.5	12.3 ± 0.4	19.9 ± 0.2	17.3 ± 0.5	84.6 ± 1.6
OX1	40.1 ± 1.9**	6.8 ± 1.2**	33.4 ± 1.1	10.2 ± 0.9**	15.7 ± 1.7**	17.2 ± 0.4	83.3 ± 2.4
OX2	46.2 ± 4.3**	7.3 ± 0.8**	38.9 ± 4.4*	10.7 ± 0.9*	13.3 ± 0.8**	17.4 ± 0.3	87.6 ± 2.5
RNAi	30.8 ± 2.4*	1.2 ± 0.3**	29.6 ± 2.6	14.6 ± 1.3**	24.0 ± 1.9*	16.8 ± 0.2	86.2 ± 2.8

Glucan は Starch と Cellulose の合計を，Total は全ての成分の合計を示す．*，**はそれぞれ 5%，1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．± は標準偏差を示す．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2，*CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

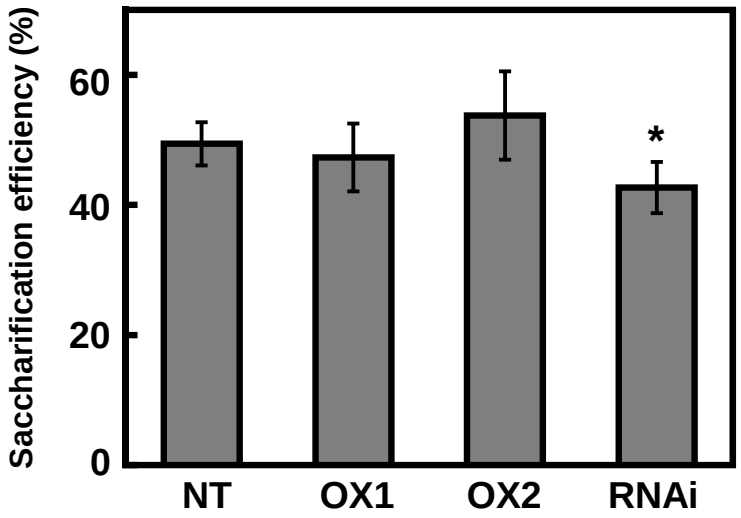


図 37．酸不溶性画分の糖化効率.

酸不溶性画分をセルラーゼ処理し，セルロースが分解される割合を求めた．*はそれぞれ5%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．データは平均値と標準偏差を示す (n=5). NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

表 11. 希硫酸処理後の酸不溶性画分の組成.

	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Acid-insoluble lignin (%)	Acid-soluble lignin (%)	Total (%)
NT	52.5 ± 1.8	1.6 ± 0.4	27.8 ± 0.3	7.2 ± 0.4	89.0 ± 1.7
OX1	51.2 ± 2.5	1.1 ± 0.4	29.2 ± 1.1	7.3 ± 0.4	88.8 ± 2.5
OX2	50.2 ± 5.5	1.3 ± 0.4	27.6 ± 0.5	7.4 ± 0.3	86.5 ± 5.7
RNAi	52.0 ± 1.6	1.7 ± 0.3	26.9 ± 0.5*	7.7 ± 0.2	88.3 ± 1.3

Total は全ての成分の合計を示す．*は 5%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す．± は標準偏差を示す．NT，非形質転換イネ; OX1 と OX2，*CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi，*CRCT* 発現抑制形質転換イネ.

表 12.　*CRCT* 形質転換イネの稲わらの乾物重と収量構成要素.

	稲わら乾物重 (g)	収量 (g plant^{-1})	穂数	1 穂穎花数	登熟歩合 (%)	千粒重 (mg)
NT	47.7 ± 3.9	25.2 ± 2.3	20.2 ± 3.1	66.3 ± 6.2	83.7 ± 4.3	22.8 ± 0.2
OX1	61.3 ± 3.2**	14.3 ± 0.5**	20.0 ± 1.6	61.5 ± 3.4	63.5 ± 2.5**	18.5 ± 0.4**
OX2	64.9 ± 6.8**	10.8 ± 4.3**	19.0 ± 2.0	56.8 ± 5.0*	52.7 ± 16.2*	18.6 ± 1.2**
RNAi	46.3 ± 2.3	23.5 ± 0.9	24.8 ± 2.0*	58.8 ± 5.8	77.3 ± 4.2	21.1 ± 0.2**

*, **はそれぞれ 5%, 1%水準で非形質転換イネとの間に有意差があることを示す. ± は標準偏差を示す. NT, 非形質転換イネ; OX1 と OX2, *CRCT* 高発現形質転換イネ; RNAi, *CRCT* 発現抑制形質

考察

これまでに, 稲わらをバイオマス原料として希硫酸処理法を前処理として用いた研究例がいくつか報告されている．台湾の栽培イネを用いた解析では，希硫酸処理後の可溶性画分に稲わら 100 g あたり 8.5 g のグルコースが得られることが報告されている (Hsu et al., 2010)．また日本の栽培イネ 13 品種を用いた解析では，可溶性画分のグルコース収量は品種によって異なり，稲わら 100 g あたり 5.0 - 24.5 g のグルコースが得られたことが報告されている (Teramura et al., 2013)．さらに Goda et al. (2016) は，栽培イネ 208 品種を用いて希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース濃度を解析し, 飼料用イネ品種である「たちすずか」のグルコース収量が最も高く，稲わら 100 g あたり 23 g のグルコースが得られることを報告している．本研究では，稲わら 6 g を 80 mL の 1% (v/v) 希硫酸で前処理し，可溶性画分のグルコース濃度を解析した (図 34A)．そこから稲わら 100 g あたりの可溶性画分のグルコース収量を算出すると, 非形質転換イネでは稲わら 100 g あたり 10 g のグルコースが，*CRCT* 高発現形質転換イネでは稲わら 100 g あたり 23.7 - 29.1 g のグルコースが得られることとなる．つまり，*CRCT* を高発現すると非形質転換イネよりも 2-3 倍のグルコースを得ることができ，さらにそれは多くの栽培イネ品種よりも高いグルコース収量であることがわかった.

希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース濃度は稲わらのデンプン含量と高い正の相関があることが報告されている (Teramura et al., 2013)．*CRCT* 高発現形質転換イネの稲わらのデンプンの割合は非形質転換イネよりも 2 - 3 倍に増加していた (表 10)．よって *CRCT* 高発現形質転換イネでは稲わらのデンプンの割合が増加したため，可溶性画分のグルコース収量が増加したと考えられる．さらに，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べ稲わら乾物重が増加した (表 12)．つまり，*CRCT* を遺伝子工学的に高発現することは，デンプンが高蓄積するだけでなく，バイオマスも大きくなるためグルコース収量を高める非常に効果的な手段と言える．しかしながら，希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース収量は, 栽培環境にも大きな影響を受けることが報告されている (Goda et al., 2016)．*CRCT* を高発現する効果を検証するためには，圃場試験を行うなど実際の栽培環境を想定した解析が必要だろう.

可溶性画分のグルコース収量の増加とは対照的に，*CRCT* 形質転換イネでは酸不溶性画分 (セルロース) の糖化効率は非形質転換イネと同程度であった (図 37). 希硫酸処理後の酸不溶性残渣の組成はイネ品種によって大きな差異がないことが報告されている

(Teramura et al., 2015). 本研究においても，*CRCT* 形質転換イネの酸不溶性残渣の組成は非形質転換イネと差異が認められなかった (表 11). つまり，*CRCT* の発現量は酸不溶性残渣の組成に影響を与えないため，糖化効率には効果がなかったものと考えられる．

希硫酸処理では，発酵阻害物質が生成される問題がある (Teramoto et al., 2008). Teramura et al. (2015) の報告によると，発酵阻害物質である 5-HMF はデンプンやセルロースに由来するグルコースが分解されることで生成され，フルフラールはヘミセルロース由来のキシロースが分解されることで生成される．さらにそれらが分解され，ギ酸となることも報告されている．本研究では，デンプンが高蓄積している *CRCT* 高発現形質転換イネを希硫酸処理すると，顕著にギ酸濃度が非形質転換イネよりも高くなることがわかった (図 36). これはデンプンの加水分解により生成されるグルコース量が *CRCT* 高発現形質転換イネで多いため，その分解物であるギ酸が多くなったことが原因だと考えられる．希硫酸で前処理を行う上で発酵阻害物質の生成は避けられない．この問題を解決するためには，発酵阻害物質に抵抗性を持った酵母 (Zaldivar et al., 2001; Hasunuma et el., 2011) やナノ濾過膜による発酵阻害物質の分離 (Weng et al., 2010; He et al., 2012) などの技術開発が必要となると考えられる．

バイオエタノール生産用の作物として，重要な条件の 1 つは食糧生産と競合しないことである．これまでの解析から，栽培イネ品種で高いグルコース収量を得る品種として，「たちすずか」や「リーフスター」が報告されている (Teramura et al., 2013; Goda et al., 2016). これらの品種の特徴として茎部に多くの光合成産物を蓄積するが，残念ながら子実収量が低いという欠点がある (Ookawa et al., 2010; Matsushita et al., 2011). つまり，これらの品種を食用品種に変わり栽培すると食糧生産量の減少が起こる．また本研究によりバイオエタノール生産への有効性が示された *CRCT* 高発現形質転換イネでも，非形質転換イネに比べ子実収量が大きく低下した (表 12). この原因は，*CRCT* 高発現形質転換イネは恒常的に発現するアクチンプロモーターを用いて *CRCT* を高発現しているため，穂が形成される穂ばらみ期や種子が発達する登熟期にも茎葉部でのデンプン蓄積が盛んに起こり，穂の形成や登熟と茎葉部のデンプン合成との間で光合成産物の競合が起きたためと考えられる．しかし，この競合を回避する方法がいくつか考えられる．1 つは *CRCT* を高発現させるのに利用するプロモーターの選択である．例えば，登熟期後期から発現するプロモーターを利用すると，穂の形成や種子の登熟には影響を与えず，茎葉部のデンプン蓄積量が高められる可能性が考えられる．もう 1 つは光合成産物を供給するソース能力の改良である．茎葉部のデンプン合成，穂の形成，種子の登熟は全て

光合成産物を競合するシンクとなっており, それらの内どれかが低下するということは光合成産物の供給量が需要量に比べ低いからであると考えられる. シンク能力以上の光合成産物を供給することができれば, 収量と茎葉部の高いデンプン蓄積量の 2 つの形質を両立できるイネ品種を開発できる可能性がある.

摘要

イネの新しい利用法として，発酵粗飼料やバイオ燃料が注目されている．本研究でこれまでに解析に用いてきた *CRCT* 高発現形質転換イネは茎葉部に多くのデンプンを蓄積することから，遺伝子工学的な CRCT の改良は，それらのイネの新しい利用法に有効であると考えられる．そこで本章では *CRCT* 形質転換イネを用いて，CRCT が稲わらを用いたバイオエタノール生産効率に及ぼす効果について解析を行った．

希硫酸処理後の可溶性画分のグルコース濃度は，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べて顕著に増加した．一方，キシロース濃度や酸不溶性残渣は *CRCT* 高発現形質転換イネで減少した．可溶性画分に含まれる発酵阻害物質であるギ酸の濃度は，非形質転換イネに比べ *CRCT* 高発現形質転換イネで高くなった．しかし，他の発酵阻害物質であるフルフラール，5-HMF，酢酸の濃度は非形質転換イネと差異は認められなかった．*CRCT* 形質転換イネの稲わらの構成成分の組成を解析したところ，*CRCT* 高発現形質転換イネでは非形質転換イネに比べて顕著にデンプンの割合が増加していたが，ヘミセルロースと酸不溶性リグニンの割合は減少した．可溶性画分のグルコースは主にデンプンに由来することが知られており，*CRCT* 高発現形質転換イネでは稲わら中のデンプンの割合が増加したため，可溶性画分のグルコース濃度が増加したと考えられた．セルラーゼ処理により，酸不溶性残渣中のセルロースの糖化効率を解析したところ，*CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネの間に差異は認められなかった．また，酸不溶性残渣の組成についても *CRCT* 形質転換イネと非形質転換イネで差異は認められなかった．つまり，*CRCT* の発現量は酸不溶性残渣の組成に影響を及ぼさないため，糖化効率にも影響を及ぼさなかったものと考えられた．*CRCT* 高発現形質転換イネでは稲わらの乾物重が非形質転換イネよりも増加していた．よって，*CRCT* を高発現することは，稲わらを用いたバイオエタノール生産効率を大きく高めるための有効な方法であることが明らかとなった．

謝辞

本研究は, 著者が神戸大学大学院農学研究科博士課程在学中に, 同大学農学研究科 深山浩准教授の指導のもとに行ったものである.

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜った神戸大学大学院農学研究科 深山浩准教授に謹んで感謝の意を表します. また, この研究を行う機会を与えて下さり, 終始御指導と貴重な御助言を賜りました神戸大学大学院農学研究科 三十尾修司教授ならびに東哲司教授に感謝の意を表します. 御指導と御助言を賜りました神戸大学大学院農学研究科 畠中知子准教授ならびに笹山大輔助教に心より感謝の意を表します. さらに, 本研究の随行ならびに本論文の執筆に御助言と御指導を賜った秋田県立大学生物資源科学部 藤田直子教授, クロフツ尚子氏, 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 近藤昭彦教授, 寺村浩特命助教, 神戸大学大学院工学研究科 荻野千秋准教授, 神戸大学大学院農学研究科 池田健一准教授, 井上加奈子博士研究員 (現大阪大学超高圧電子顕微鏡センター特任研究員) に深く感謝の意を表します.

マイクロアレイ解析において実験補助と実験の場を提供して頂いた独立行政法人農業生物資源研究所の長村吉晃博士, 本山立子氏に厚く感謝いたします. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) より, タンパク質の同定を行って頂いた神戸大学研究基盤センター 宮本昌明准教授, 日下部良子博士に厚く感謝いたします. デンプン粒の観察を行うのにあたり, 実験方法を教えていただき, また器具を貸して頂いた神戸大学大学院 農学研究科育種学研究室 石川亮助教に厚く感謝いたします. 供試材料を提供していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 青木直大助教に深く感謝申し上げます.

最後に多くの励ましをくださり, 惜しむことなくご助力くださった資源植物生産学研究室ならびに熱帯有用植物学研究室の諸先輩および学生諸兄に深く御礼申し上げます.

引用文献

Ainsworth, E.A. and Long, S.P. (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO_2 enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO_2. *New Phytol.* 165: 351-372.

Akihiro, T., Mizuno, K. and Fujimura, T. (2005) Gene Expression of ADP-glucose Pyrophosphorylase and Starch Contents in Rice Cultured Cells are Cooperatively regulated by Sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol.* 46: 937-946.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101: 4851-4861.

Asai, H., Abe, N., Matsushima, R., Crofts. N., Oitome, N.F., Nakamura, Y. and Fujita, N. (2014) Deficiencies in both starch synthase IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIa-inactive japonica rice seeds. *J. Exp. Bot.* 65: 5497-5507.

Baena-González, E. and Sheen, J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 13: 474-482.

Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M. and Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature* 448: 938-943.

Baker, J.T., Allen Jr, L.H., Boote, K.J. and Pickering, N.B. (1996) Assessment of rice response to global climate change: CO_2 and temperature. In Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems. Edited by Koch, G.W. and Mooney, H.A. pp. 265-282. *Academic Press, San Diego*.

Balat, M., Balat, H. and Oz, C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34: 551-573.

Ballicora, M.A., Iglesias, A.A. and Preiss, J. (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth. Res.* 79: 1-24.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K. and Pandey, A. (2010) Bioethanol production from rice straw: an overview. *Bioresour. Technol.* 101: 4767-4774.

Bird, A.R., Flory, C., Davies, D.A., Usher, S. and Topping, D.L. (2004) A novel barley cultivar (Himalaya 292) with a specific gene mutation in starch synthase IIa raises large bowel starch and short-chain fatty acids in rats. *J. Nutr.* 134: 831–835.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Cheng, W., Sakai, H., Yagi, K. and Hasegawa, T. (2009) Interactions of elevated [CO_2] and night temperature on rice growth and yield. *Agric. For. Meteorol.* 149: 51-58.

Cho, J.I., Ryoo, N., Eom, J.S., Lee, D.W., Kim, H.B., Jeong, S.W., Lee, Y.H., Kwon, Y.K., Cho, M.H., Bhoo, S.H., Hahn, T.R., Park, Y.I., Hwang, I., Sheen, J. and Jeon, J.S. (2009) Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiol.* 149: 745-759.

Clarke, B.R., Denyer, K., Jenner, C.F. and Smith, A.M. (1999) The relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5'-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos. *Planta* 209: 324-329.

Cook, J.H. and Yoshida, S. (1972) Accumulation of ^{14}C-labelled carbohydrate before flowering and its subsequent redistribution and respiration in the rice plant. *Proc. Crop Sci. Soc.* 41: 226-234.

Dauvillée, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, JP., Colleoni, C., Hicks, G., Wattebled, F., Deschamps, P., Hulst, C., Lienard, L., Cournac, L., Putaux, J.L., Dupeyre, D. and Ball, S.G. (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii. Plant J.* 48: 274-285.

Dian, W., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F. and Wu, P. (2003) Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta* 218: 261-268.

D'Hulst, C., Wattebled, F. and Szydlowski, N. (2015) Starch biosynthesis in leaves and its regulation. In: Nakamura Y, ed. Starch. Japan: Springer, pp. 211-237.

Ferrario-Méry, S., Bouvet, M., Leleu, O., Savino, G., Hodges, M. and Meyer, C. (2005) Physiological characterization of Arabidopsis mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII. *Planta* 223: 28-39.

Fettke, J., Albrecht, T., Hejazi, M., Mahlow, S., Nakamura, Y. and Steup, M. (2010) Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by potato (*Solanum tuburosum*) tuber parenchyma cells and con- verted to reserve starch granules. *New Phytol.* 185: 663-675.

French, D. (1972) Fine structure of starch and its relationship to the organaization of starch granules. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 19: 8-25.

Fu, C., Mielenz, J.R., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C.Y., Rodriguez, M.Jr., Chen, F., Foston, M., Ragauskas, A., Bouton, J., Dixon, R.A. and Wang, Z.Y. (2011) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 3803-3808.

Fu, F.F. and Xue, H.W. (2010) Coexpression analysis identifies Rice Starch Regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator. *Plant Physiol.* 154: 927-938.

Fujita, N. (2014) Starch biosynthesis in rice endosperm. *AGri-Biosci. Monographs.* 4:1-18.

Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H. and Nakamura, Y. (2006) Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.* 140: 1070-1084.

Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J.H., Jane, J.L., Miyao, A., Hirochika, H. and Nakamura, Y. (2007) Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice: the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol.* 144: 2009-2023.

Fukayama, H., Fukuda, T., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Sakai, H., Cheng, W., Hasegawa, T. and Miyao, M. (2009) Rice plant response to long term CO_2 enrichment: Gene expression profiling. *Plant Sci.* 177: 203-210.

Fukayama, H., Sugino, M., Fukuda, T., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Okada, M., Sameshima, R., Hatanaka, T., Misoo, S., Hasegawa, T. and Miyao, M. (2011) Gene expression profiling of rice grown in free air CO_2 enrichment (FACE) and elevated soil temperature. *Field Crops Res.* 121: 195-199.

Gendron, J.M., Pruneda-Paz, J.L., Doherty, C.J., Gross, A.M., Kang, S.E. and Kay, S.A. (2012) *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 3167-3172.

Goda, T., Teramura, H., Suehiro, M., Kanamaru, K., Kawaguchi, H., Ogino, C., Kondo, A. and Yamasaki M. (2016) Natural variation in the glucose content of dilute sulfuric acid-pretreated rice straw liquid hydrolysates: implications for bioethanol production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 863-869.

Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M. and Zhang, Y. (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54: 467-475.

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. and Makino, A. (2013) Rice cultivar responses to elevated CO_2 at two free-air CO_2 enrichment (FACE) sites in Japan. *Func. Plant Biol.*40: 148-159.

Hashiguchi, Y., Tasaka, M. and Morita, M.T. (2013) Mechanism of higher plant gravity sensing.

Amer. J. Bot. 100: 91-100.

Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J. and Kondo, A. (2011) Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 10: 2.

He, Y., Bagley, D.M., Leung, K.T., Liss, S.N. and Liao, B.Q. (2012) Recent advances in membrane technologies for biorefining and bioenergy production. *Biotechnol. Adv.* 30: 817-858.

Hirano, T., Saito, Y., Ushimaru, H. and Michiyama, Y. (2005) The effect of the amount of nitrogen fertilizer on starch metabolism in leaf sheath of japonica and indica rice varieties during the heading period. *Plant Prod. Sci.* 8: 122-130

Hirose, T., Ohdan, T., Nakamura, Y. and Terao, T. (2006) Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during heading period. *Physiol. Plant.* 128: 425-435.

Hizukuri, S. (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* 147: 342-347.

Hizukuri, S. (1995) Starch, Analytical Aspects In Carbohydrates in Food, (ed. Eliasson, A.-E.), Edited by Marcel Dekker, pp.347-429

Hsieh, M.H., Lam, H.M., Van de loo, F.J. and Coruzzi, G. (1998) A PII-like protein in Arabidopsis: Putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13965-13970.

Hsu, T.C., Guo, G.L., Chen, W.H. and Hwang, W.S. (2010) Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 101: 4907-4913.

Imai, K. (1995) Physiological response of rice to carbon dioxide, temperature and nutrients. In Climate Change and Rice. Edited by Peng, S., Ingram, K.T., Neve, H.U. and Ziska, L.H. pp. 253-257. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Ishikawa, R., Ohnishi, T., Kinoshita, Y., Eiguchi, M., Kurata, N. and Kinoshita, T. (2011) Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65: 798-806.

Ishikawa, C., Hatanaka, T., Misoo, S., Miyake, C. and Fukayama, H. (2011) Functional incorporation of sorghum small subunit increases the catalytic turnover rate of Rubisco in transgenic rice. *Plant Physiol.* 156: 1603-1611.

Jang, J.C. and Sheen, J. (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell.* 6: 1665-1679.

Jang, J.C., and Sheen, J. (1997). Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2: 208-214.

Kaczorowski, K.A. and Quail, P.H. (2003) Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the

circadian clock. *Plant Cell.* 15: 2654-2665.

Kang, J. and Turano, F.J. (2003) The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6872-6877.

Kim, S. and Dale, B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 26: 361-375.

Koizumi, K. and Fukuda, M. (1991) Estimation of the distributions of chain length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A.* 585: 233-238.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Leakey, A.D., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., Rogers, A., Long, S.P. and Ort, D.R. (2009a) Elevated CO_2 effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J. Exp. Bot.* 60: 2859-2876.

Leakey, A.D., Xu, F., Gillespie, K.M., McGrath, J.M., Ainsworth, E.A. and Ort, D.R. (2009b) Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 3597-3602.

Li, P., Wang, Y., Qian, Q., Fu, Z., Wang, M., Zeng, D., Li, B., Wang, X. and Li, J. (2007) *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. *Cell Res.* 17: 402-410.

Li, Z., Paterson, A.H., Pinson, S.R.M. and Stansel, J.W. (1999) RFLP facilitated analysis of tiller and leaf angles in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica.* 109: 79-84.

Lin, Q., Facon, M., Putaux, J.L., Dinges, J.R., Wattebled, F., D'Hulst, C., Hennen-Bierwagen, T.A. and Myers, A.M. (2013) Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf. *New Phytol.* 200: 1009-1021

Ma, L., Xue, N., Fu, X., Zhang, H. and Li, G. (2016) *Arabidopsis thaliana* FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYLS3(FHY3) and FAR-RED-IMPAIRED RESPONSE1 (FAR1) modulatestarch synthesis in response to light and sugar. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.14300.

Mahlow, S., Orzechowski, S. and Fettke, J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 73: 2753-2764.

Makino, A. and Mae, T. (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO_2. *Plant Cell Physiol.* 40: 999-1006.

Martin, T., Oswald, O. and Graham, I.A. (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid

mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128: 472-481.

Marutani, Y., Yamauchi, Y., Miyoshi, A., Inoue, K., Ikeda, K., Mizutani, M. and Sugimoto, Y. (2014) Regulation of Photochemical Energy Transfer Accompanied by Structural Changes in Thylakoid Membranes of Heat-Stressed Wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 23042-23058.

Mate, C.J., von Caemmerer, S., Evans, J.R., Hudson, G.S. and Andrews, T.J. (1996) The relationship between CO_2-assimilation rate, Rubisco carbamylation and Rubisco activase content in activase-deficient transgenic tobacco suggests a simple model of activase action. *Planta* 198: 604-613.

Matsuda, F., Yamasaki, M., Hasunuma, T., Ogino, C. and Kondo, A. (2011) Variation in biomass properties among rice diverse cultivars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1603-1605.

Matsuki, J., Park, J.Y., Shiroma, R., Arai-Sanoh, Y., Ida, M., Kondo, M., Motobayashi, K. and Tokuyasu, K. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1645-1651.

Matsuoka, M. and Numazawa, T. (1991) *CIS*-acting elements in the pyruvate, orthophosphate dikinase gene from maize. *Mol. Gen. Genet.* 228: 143-152.

Matsushita, K., Iida, S., Ideta, O., Sunohara, Y., Maeda, H., Tamura, Y., Kouno, S. and Takakuwa, M. (2011) 'Tachisuzuka', a new rice cultivar with high straw yield and high sugar content for whole-crop silage use. *Breed. Sci.* 61: 86-92.

Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G., Baek, D., Koo, Y.D., Jin, J.B., Bressan, R.A., Yun, D.J. and Hasegawa, P.M. (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7760-7765.

Nakamura, Y., Francisco, P.B., Hosaka, Y., Sato, A., Sawada, T., Kubo, A. and Fujita, N. (2005) Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties. *Plant Mol. Biol.* 58: 213-227.

Nakamura, Y., Ono, M., Utsumi, C. and Steup, M. (2012) Functional interaction between plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice during the synthesis of branched maltodextrins. *Plant Cell Physiol.* 53: 869-878.

Nakano, H., Makino, A. and Mae, T. (1997) The Effect of elevated partial pressures of CO_2 on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol.* 115: 191-198.

Nakano, H., Muramatsu, S., Makino, A. and Mae, T. (2000) Relationship between the suppression of photosynthesis and starch accumulation in the pod-removed bean. *Aust. J.*

Plant Physiol. 27: 167-173.

Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N. and Satoh, H. (2001) Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.* 127: 459-472.

Ohdan, T., Francisco, P.B., Jr., Sawada, T., Hirose, T., Terao, T., Satoh, H., et al. (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J. Exp. Bot.* 56: 3229-3244.

Okamura, M., Hirose, T., Hashida, Y., Yamagishi, T., Ohsugi, R. and Aoki, N. (2013) Starch reduction in rice stems due to a lack of *OsAGPL1* or *OsAPL3* decreases grain yield under low irradiance during ripening and modifies plant architecture. *Funct. Plant Biol*. 40: 1137-1146.

Okamura, M., Hirose, T., Hashida, Y., Ohsugi, R. and Aoki, N. (2015) Suppression of starch synthesis in rice stems splays tiller angle due to gravitropic insensitivity but does not affect yield. *Funct. Plant Biol.* 42: 31-41.

Oliveira, I.C. and Coruzzi, G.M. (1999) Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 121: 301-309.

Ookawa, T., Inoue, K., Matsuoka, M., Ebitani, T., Takarada, T., Yamamoto, T., Ueda, T., Yokoyama, T., Sugiyama, C., Nakaba, S., Funada, R., Kato, H., Kanekatsu, M., Toyota, K., Motobayashi, T., Vazirzanjani, M., Tojo, S. and Hirasawa, T. (2014) Increased lodging resistance in long-culm, low-lignin *gh2* rice for improved feed and bioenergy production. *Sci. Rep.* 4:6567

Ookawa, T., Yasuda, K., Kato, H., Sakai, M., Seto, M., Sunaga, K., Motobayashi, T., Tojo, S. and Hirasawa, T. (2010) Biomass production and lodging resistance in 'Leaf Star', a new long-culm rice forage cultivar. *Plant Prod. Sci.* 13: 58-66.

Oswald, O., Martin, T., Dominy, P.J. and Graham, I.A. (2001) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2047-2052.

O'Shea, M.G. and Morell, M.K. (1996) High resolution slab gel electrophoresis of 8-amino-1,3, 6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) tagged oligosaccharides using a DNA sequencer. *Electrophoresis* 17: 681-688.

Paparelli, E., Parlanti, S., Gonzali, S., Novi, G., Mariotti, L., Ceccarelli, N., van Dongen, J.T., Kölling, K., Zeeman, S.C. and Perata, P. (2013) Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell.* 10: 3760-3769.

Paul, M. (2007) Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 303-309.

Pfister, B. and Zeeman, S.C. (2016) Formation of starch in plant cells. *Cell Mol. Life Sci.* 73:

2781-2807.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedelmann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 975: 384-394.

Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. and Coupland, G. (1995) The *CONSTANS* gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847-857.

Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. (2006) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3546-3551.

Ritte, G., Lloyd, J.R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J. and Steup, M. (2002) The starch related R1 protein is an a-glucan, water dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7166-7171.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.

Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26: 310-317.

Rook, F., Corke, F., Baier, M., Holman, R., May, A.G. and Bevan, M.W. (2006) Impaired sucrose induction1 encodes a conserved plant-specific protein that couples carbohydrate availability to gene expression and plant growth. *Plant J.* 46: 1045-1058.

Rowland-Bamford, A.J., Baker, J.T., Allen, L.H., Jr. and Bowes, G. (1991) Acclimation of rice to changing atmospheric carbon dioxide concentration. *Plant Cell Environ.* 14: 577-583.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2012) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15: 2122-2133.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. and Quackenbush, J. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques.* 34: 374-378.

Sage, R.F., Sharkey, T.D. and Seemann, J.R. (1989) Acclimation of photosynthesis to elevated CO_2 in five C_3 species. *Plant Physiol.* 89: 590-596.

Santelia, D. and Zeeman, S.C. (2011) Progress in Arabidopsis starch research and potential

biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 271-280.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. and Aikat, S. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew. Energy.* 37: 19-27.

Sato, T. (1967) A modified method for lead staining of thin sections. *J. Electron. Microsc.* 16: 133.

Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Sonoda, Y., Katoh, E., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Goto, D.B., Ikeda, A. and Yamaguch, J. (2009) CNI1/ATL31, a RING-type ubiquitin ligase that functions in the carbon/nitrogen response for growth phase transition in Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 60: 852-864.

Satoh, H., Shibahara, K., Tokunaga, T., Nishi, A., Tasaki, M., Hwang, S.K., Okita, T.W., Kaneko, N., Fujita, N., Yoshida, M., Hosaka, Y., Sato, A., Utsumi, Y., Ohdan, T. and Nakamura, Y. (2008) Mutation of the plastidial α-Glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell.* 20: 1833-1849.

Satoh, H., Nishi, A., Yamashita, K., Takemoto, Y., Tanaka, Y., Hosaka, Y., Sakurai, A., Fujita, N. and Nakamura, Y. (2003) Starch branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol.* 133:1111-1121.

Scheible, W.R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M. and Stitt, M. (1997) Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell.* 5: 783-798.

Sharkey, T.D. (1985) Photosynthesis in intact leaves of C_3 plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot. Rev.* 51: 53-105.

She, K.C., Kusano, H., Koizumi, K., Yamakawa, H., Hakata, M., Imamura, T., Fukuda, M., Naito, N., Tsurumaki, Y., Yaeshima, M., Tsuge, T., Matsumoto, K., Kudoh, M., Itoh, E., Kikuchi, S., Kishimoto, N., Yazaki, J., Ando, T., Yano, M., Aoyama, T., Sasaki, T., Satoh, H. and Shimada, H. (2010) A novel factor FLOURY ENDOSPERM2 is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell.* 22: 3280-3294.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D. (2011) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Golden: Natl. Renew Energy Lab*.

Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. and Perata, P. (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140: 637-646.

Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B. and Steup, M. (1995) A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol.*

27: 567-576.

Spurr, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct.* Res. 26: 31-43.

Stitt, M. and Krapp, A. (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22: 583-621.

Stitt, M. and Zeeman, S.C. (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 282-292.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768-771.

Streb, S. and Zeeman, S.C. (2014) Replacement of the endogenous starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 of Arabidopsis with the rice orthologs reveals a degree of functional conservation during starch synthesis. *PLoS ONE.* 9: e92174.

Sulpice, R., Pyl, E.T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M.C., von Korff, M., Steinhauser, M.C., Keurentjes, J.J., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A.R., Altmann, T. and Stitt, M. (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10348-10353.

Suzuki, Y., Arae, T., Green, P.J., Yamaguchi, J. and Chiba, Y. (2015) AtCCR4a andAtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of Granule-bound starch synthase 1 transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56: 863-874.

Sáncheza, O.J. and Cardonaa, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270-5295.

Tan, L., Li, X., Liu, F., Sun, X., Li, C., Zhu, Z., Fu, Y., Cai, H., Wang, X., Xie, D. and Sun, C. (2008) Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. *Nat. Genet.* 40: 1360-1364.

Tanadul, O., Vandergheynst, J.S., Beckles, D.M., Powell, A.L.T. and Labavitch, J.M. (2014) The impact of elevated CO_2 concentration on the quality of algal starch as a potential biofuel feedstock. *Biotechnol. Bioeng.* 111: 1323-1331.

Teng, M.N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y., and Lin, J. (2006) Elevated CO_2 induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana. New Phytol*. 172: 92-103.

Teramura, H., Oshima, T., Matsuda, F., Sasaki, K., Ogino, C., Yamazaki, M. and Kondo, A.

(2013) Glucose content in the liquid hydrolysate after dilute acid pretreatment is affected by the starch content in rice straw. *Bioresour. Technol.* 149: 520-24.

Teramura, H., Sasaki, K., Oshima, T., Aikawa, S., Matsuda, F., Okamoto, M., Shirai, T., Kawaguchi, H., Ogino, C., Yamasaki, M., Kikuchi, J. and Kondo, A. (2015) Changes in lignin and polysaccharide components in 13 cultivars of rice straw following dilute acid pretreatment as studied by solution-state 2D ^{1}H-^{13}C NMR. *PLoS ONE*. 10: e0128417.

Teramura, H., Sasaki, K., Oshima, T., Matsuda, F., Okamoto, M., Shirai, T., Kawaguchi, H., Ogino, C., Hirano, K., Sazuka, T., Kitano, H., Kikuchi, J. and Kondo, A. (2016) Organosolv pretreatment of sorghum bagasse using a low concentration of hydrophobic solvents such as 1-butanol or 1-pentanol. *Biotechnol. Biofuels* 9: 27.

Teramoto, Y., Lee, S.H. and Endo, T. (2008) Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresour. Technol.* 99: 8856-8863.

Terashima, I., Yanagisawa, S. and Sakakibara H. (2014) Plant responses to CO_2: background and perspectives. *Plant Cell Physiol.* 55: 237-240.

Tetlow, I.J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C.G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., MOrell, M.K. and Emes, M.J. (2004) Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* 16: 694-708.

Thitisaksakul, M., Jiménez, R.C., Arias, M.C. and Beckles, D.M. (2012) E□ects of environmental factors on cere al starch biosynthesis and composition. *J. Cereal Sci.* 56: 67-80.

Tiwari, S.B., Shen, Y., Chang, H.C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S.F., McPartland, M., Hymus, G.J., Adam, L., Marion, C., Belachew, A., Repetti, P.P., Reuber, T.L. and Ratcliffe, O.J. (2010) The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique *cis*-element. *New Phytol.* 187: 57-66.

Toyosawa, Y., Kawagoe, Y., Matsushima, R., Crofts, N., Ogawa, M., Fukuda, M., Kumamaru, T., Okazaki, Y., Kusano, M., Saito, K., Toyooka, K., Sato, M., Ai, Y., Jane, J.L., Nakamura, Y. and Fujita, N. (2016) Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm. *Plant Physiol.* 170: 12550-12570.

Usuda, H. and Shimogawara, K. (1998) The Effects of Increased Atmospheric Carbon Dioxide on Growth, Carbohydrates, and Photosynthesis in Radish, *Raphanus sativus*. *Plant Cell Physiol.* 39: 1-7.

Utsumi, Y., Glover, D.V., Inouchi, N. and Fuwa, H. (2003) Structural and Physicochemical

Properties of Endosperm Starches of Double- and Triple-mutants Containing the *Amylose-extender* Gene in the Inbred Oh43 Maize Bacground. *J. Applied Glycosci.* 50: 295-296.

Vermerris, W., Saballos, A., Ejeta, G., Mosier, N.S., Ladisch, M.R. and Carpita, N.C. (2007) Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. *Crop Sci.* 47: S142–S153.

Vitha S, Yang M, Sack FD and Kiss JZ (2007) GRAVITROPISM IN THE STARCH EXCESS MUTANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA*. *Am. J. Bot.* 94: 590-598.

Wang, J.C., Xu, H., Zhu, Y., Liu, Q.Q. and Cai, X.L. (2013) OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. *J. Exp. Bot.* 64: 3453-3466.

Wang, Y., Frei, M., Song, Q. and Yang, L. (2011) The impact of atmospheric CO_2 concentration enrichment on rice quality - A research review. *Acta Ecol. Sin.* 31: 277-282.

Wang, Z., Wu, Z., Xing, Y., Zheng, F., Gao, J. and Hong, M. (1990) Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucl. Acids Res.* 18: 5898.

Watanabe, Y., Nakamura, Y. and Ishii, R. (1997) Relationship between starch accumulation and activities of the related enzymes in the leaf sheath as a temporary sink organ in rice (*Oryza sativa*). *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 563-569.

Weise, S.E., van Wijk, K.J. and Sharkey, T.D. (2011) The role of transitory starch in C_3, CAM, and C_4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. *J. Exp. Bot.* 62: 3109-3118.

Weng, Y.H., Wei, H.J., Tsai, T.Y., Lin, T.H., Wei, T.Y., Guo, G.L. and Huang C.P. (2010) Separation of furans and carboxylic acids from sugars in dilute acid rice straw hydrolysates by nanofiltration. *Bioresour. Technol.* 101: 4889-4894.

Wu, X., Tang, D., Li, M., Wang, K. and Cheng, Z. (2013) Loose Plant Architecture1, an INDETERMINATE DOMAIN Protein Involved in Shoot Gravitropism, Regulates Plant Architecture in rice. *Plant Physiol.* 161: 317-329.

Wu, L. and Birch, R.G. (2007) Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol. J.* 5: 109-117.

Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.C. (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44: 451-461.

Yamamoto, K., Pyke, K.A. and Kiss, J.Z. (2002) Reduced gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls, but not roots, of *Arabidopsis* mutants with large plastids. *Physiol. Plant* 114: 627-636.

Yamori, W. (2013) Improving photosynthesis to increase food and fuel production by biotechnological strategies in crops. *J. Plant Biochem. Physiol.* 1: 113.

Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H. and Miwa, T. (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7833-7838.

Yoshihara, T. and Iino, M. (2007) Identification of the gravitropism-related rice gene *LAZY1* and elucidation of *LAZY1*-dependent and -independent gravity signaling pathways. *Plant Cell Physiol.* 48: 678-688.

Yu, B., Lin, Z., Li, H., Li, X., Li, J., Wang, Y., Zhang, X., Zhu, Z., Zhai, W., Wang, X., Xie, D. and Sun, C. (2007) *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. *Plant J.* 52: 891-898.

Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34.

Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A.M. and Smith, S.M. (2004) The role of plastidial α-glucan phosphorylase in starch degradation and tolerance of abiotic stress in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* 135: 849-858.

Zhang, Y.C., Yu, Y., Wang, C.Y., Li, Z.Y., Liu, Q., Xu, J., Liao, J.Y., Wang, X.J., Qu, L.H., Chen, F., Xin, P., Yan, C., Chu, J., Li, H.Q.and Chen, Y.Q. (2013) Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat. Biotechnol.* 9: 848-52.

Zhu, Y., Cai, X.L., Wang, Z.Y. and Hong, M.M. (2003) An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the rice Wx gene. *J. Biol. Chem.* 278: 47803-47811.

von Caemmerer S. and Farquhar G.D. (1981) Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

杉野充保 (2009) 高CO_2条件で育成したイネの遺伝子発現変化に関係するシグナル因子に関する研究　神戸大学農学部学位論文

杉野充保 (2011) イネ葉の高CO_2処理で発現誘導されるOsCCT1の機能解析　神戸大学大学院農学研究科修士学位論文

西川薫 (2010) Rubisco activaseを高発現する形質転換イネの生理特性に関する研究　神戸大学大学院農学研究科修士学位論文