

令和元年9月1日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04444

研究課題名(和文)高温に対する子実成長の低反応性と高炭酸同化機能に着目したイネの高温登熟耐性

研究課題名(英文) High temperature resistance of the grain-filling depending on low grain growth rate and high assimilation in rice

研究代表者

小葉田 亨 (Kobata, Tohru)

島根大学・生物資源科学部・名誉教授

研究者番号：60186723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,430,000円

研究成果の概要(和文)：高温によるイネの収量や品質低下を防ぐための品種特性が求められている。そこで子実成長が高温下でも大きくなりにくい品種があるかどうかを幅広い遺伝的変異を持つ日本と世界のイネコアコレクション品種で探した。高温下で子実成長が小さいと相対的に同化産物供給が不足しにくく、子実のデンプン集積が低下しにくいと予測されたからである。これらの品種の穂を出穂後1～2週間にかけて気温30℃で穂培養を行ったところ、子実の成長速度(籾の充填率)は幅広い変異を示し、さらに幅広い温度条件下や長期のポット栽培でも同様な品種間差が観察された。ショ糖代謝酵素がこのような子実充填速度の違いをもたらしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後も日本のような中緯度地域の稲作地域において温暖化による高温化が進行すると予測される。このような条件下で今後も安定した食料生産を行うためには栽培的対応とともに品種的改良が不可欠である。本研究結果は高温に最も影響されやすい子実成長を維持するための特性としての子実の温度反応性に着目し、品種的多様性とその利用可能性について明らかにすることができた。今後、圃場におけるこれらの性質の再現性の確認、もう一つの体制となりうる同化の維持の特性についてさらに解明することで高温耐性品種の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High temperature resistance in rice grain yield and quality is expected. Cultivars of a less increase in the grain filling under high temperature conditions was selected from rice of the world and Japan rice core collection. The less increase in the grain filling rate was expected to result a high temperature resistance of the grain filling because of relief in a lack of assimilate supply to the grain and keeping starch accumulation in grains. When panicles from these collection cultivars were solution cultured under 30 C, grain filling rate indicated diverse variability. The variability for selected typical cultivars was evidenced under diverse temperature and pot cultivated conditions. Metabolic processes for starch synthesis would relate with the cultivar difference in a response of the grain filling to high temperatures.

研究分野：作物学

キーワード：イネ 高温 登熟 品質 子実増加速度 同化 品種間差 イネコアコレクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、西日本から中部日本にける広い範囲で猛暑日(35 以上)が頻繁に起きている。登熟期のイネがこのような高温を受けると乳白米等の発生によりコメ品質が低下し、また粒の充実不良から減収する。品質劣化はコメ価格の低下をさらに収量低下は生産効率の減少をもたらす、今後の安定的な食糧供給を危うくする。また、近年の高温年における品質低下には不適切な施肥や栽培管理などの温度以外の原因が指摘されている(小葉田ら, 2012)。しかし、今後さらに高温化が進むと栽培法の改善には限界があり、イネへの高温耐性の付与が不可欠になる。近年、高温下で品質低下のしにくい品種が育成されつつあるものの、どのような生理的機構、特性が登熟期におけるイネの高温耐性をもたらすのかは十分明らかになっておらず、更に高温化が進行した場合にどのような特性が有効であるかは不明である。高温登熟耐性に有効な形質を見出すこと、及びその高温耐性の生理的機構を明らかにすることが今後有効な特性を品種に付与するために不可欠である。

### 2. 研究の目的

夏季高温化によるイネの品質および収量低下が今後、我が国でも更に深刻化するものと予測される。今後、高温化が進行すると、イネ品種への高温登熟耐性の付与は不可欠である。これに対し経験的な高温耐性選抜が行われてきた。しかし、その高温耐性の機構や、どのような特性がさらに高温化した場合に有効であるのかは充分明らかにされていない。登熟期の高温は子実の急激な成長促進と登熟期間の短縮化をもたらす、子実への同化産物供給不足や酵素機能阻害が品質や収量を低下させる。そこで本研究は、これまで着目されてこなかった「高温に対するイネ子実の低い成長促進」および「登熟期の高い炭酸同化能力」に着目し、この二つの特性における品種間差の探索、生化学的機構の解明および栽培条件下での高温登熟耐性としての有効性を検証する。

### 3. 研究の方法

これらの目的を明らかにするために、(1). 多様な遺伝的背景を有するイネコアコレクションにおいて子実成長が最も大きくなる30 における十分な同化産物供給条件下での子実成長速度の品種の多様性の調査、(2). その中で見いだされた子実成長速度が小さい品種における幅広い温度での品種的特性の比較、(3). 高温条件下の登熟期においても品種特性の違いが反映されるかどうか(以上小葉田、氏家)、それらの特性が(4). どのような子実の生化学的な特性に基づくか(三井・小葉田)の研究により明らかにしようとした。それぞれの成果について個別に述べる。

#### (1). 日本イネコアコレクションにおける高温下で低い子実増加を示すイネ品種の選抜

温暖化による気温上昇は今後も西日本を中心に続き、さらにイネ生産が打撃を受けると予測される。幅広い高温で起きる主なイネへの影響は、生産期間短縮による生育不足をもたらす穎花数の低下、登熟不良と品質の低下である。これらに対し、生殖成長後期の高温に対して子実重増加速度が促進されない(小さい)方が子実への同化産物供給不足が生じにくいいため登熟や品質を高める可能性がある。そこで、多様な遺伝的背景を含む日本のイネコアコレクションおよび世界のイネコアコレクションについて、登熟期として高温条件(気温 30 )での穂培養による潜在的子実重増加速度の品種間差を比較しようとした。

2015 年は日本のイネコアコレクションおよび世界のイネコアコレクションの自然日長で出穂した 50 品種および 5 品種とコシヒカリ、タカナリを水田栽培した。出穂約 6 日後の穂首を採取

し、1/2MS 培地に 6%スクロースを加えた培養液に上位から数えて 2 節以下を浸けた。2016 年は 2015 年の結果を受けて選抜した日本のイネコアコレクションおよび世界のイネコアコレクションの自然日長で出穂した 27 品種および 3 品種と高温耐性品種「にこまる」、コシヒカリ、タカナリを水田栽培した。出穂約 7 日後の穂首を採取し、1/2MS 培地に 6%スクロースを加えた培養液に上位から数えて 2 節以下を浸けた。培養液部分は冷蔵庫で 5 に保ち、穂部分は  $30$  ,  $84 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の光を 24 時間照射し、7 日あるいは 8 日間程度培養した。2015、2016 の両年において、培養前後に籾数、籾乾物重を測定した。また、水田で完熟させた穂を採取し、精玄米一粒重、籾殻重を測定した。これらから、籾の充填率（穂当たり粗玄米重/穂当たり潜在収量  $\times 100$ ）を求め比較した。この結果、本研究における潜在的子実重増加速度の指標とした充填率増加速度（充填率/培養日数、 $\% \cdot \text{day}^{-1}$ ）は 2015 年の培養期間中の品種間で  $1.3\text{E}-02 \sim 8.0\%$  と大きく異なり、ジャポニカ品種の JRC35 が最も小さく、トロピカルジャポニカ品種の JRC3 が最も大きかった。また、WRC 品種はすべてコシヒカリよりも充填率増加速度が大きくなった。2016 年の培養期間中の充填率増加速度（充填率/培養日数）は品種間で  $2.4 \sim 7.6\%$  と異なり、ジャポニカ品種の JRC17 が最も小さく、同 JRC51 が最も大きかった。また、2015 年および 2016 年における共通品種で充填率増加速度がコシヒカリよりも小さく、および登熟歩合が 80%以上となった JRC 品種が見られた。

以上より、高温下の子実成長には品種間差があり、高温登熟に有利（充填率増加速度が小さく、登熟歩合が高い）品種として JRC39「白稲（ケモミ）」、JRC27「銀坊主」、JRC52「愛知旭」、JRC45「冷立稲」、JRC30「森田早生」が挙げられると考えられる。今後これらの品種は個体あるいは群落レベルでの再現性の確認及び違いの出る子実の生化学的解析がなされる必要がある。

## (2). 穂培養によるイネ子実重増加速度温度反応における品種間差

温暖化による登熟期の気温上昇はイネの収量や品質に打撃を与えると予測され、高温抵抗性品種の作出が期待される。これまでに登熟期の高温は子実重増加速度を高め、高まった子実重増加速度に対する同化産物供給不足が、収量や品質低下のひとつの大きな原因であると見られている。そのため、高温下で子実重増加速度が小さいほど子実生長は高温の影響を受けにくいという仮説が立てられた。そこで、多様な遺伝的背景を含む日本のイネコアコレクション（JRC）50 品種を十分な同化産物供給条件下にある高温条件（気温  $30$  ）で約 1 週間穂培養したところ、子実増加が高いあるいは低い品種が見出された。しかし、これらの品種が幅広い温度条件下でも常に異なる温度反応性を示すのかはわかっていない。そこで本実験では、穂培養下で選抜された登熟速度の異なるこれらのイネ品種が、 $26 \sim 32$  の幅広い温度域でどのような子実増加の品種間差を示すのかを明らかにすることを目的とした。

2016 と 2017 年に穂培養で子実増加が低かった品種、銀坊主（品種番号 JRC27）および愛知旭（JRC52）、高かった品種、山田化（JRC5）および嘉平（JRC11）、対照品種としてコシヒカリを水田栽培し、出穂 6 日後の穂を採取し、止葉及び止葉節以下を切除した。1/2MS 培地に 6%スクロースを加えた培養液に止葉節を浸けて穂を培養した。培養液部分は冷蔵庫で 5 に保ち、穂部分は  $26$  ,  $28$  ,  $30$  ,  $32$  に設定した恒温機内で  $84 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光を 24 時間穂全体に照射し、7 日間培養した。培養期間中の温度はデータロガーで 5 分おきに記録した。培養前後の籾数と籾乾物重を測定した。また、水田で完熟させた穂を採取し、 $1.06$  の比重選による精玄米一粒重、籾殻重、99%アルコール選により受精率を測定した。これらから 1 日当たりの受精籾充填率増加速度（ $\% \text{ day}^{-1}$ ）（ $=$  [穂当たり粗玄米重 / (受精籾数  $\times$  精玄米 1 粒重)  $\times 100$ ] / 培養日数）を求めた。

その結果、受精籾充填率増加速度は両年ともに対照品種コシヒカリよりも山田化、嘉平で幅広

い温度域で高い値を推移し、銀坊主では低い値を、愛知旭では 27.3 以上で低い値を推移した。受精粉充填率増加速度が最大となる平均気温は 28.3 で、どの品種においても 27.6~29.0 の間であった。コシヒカリの受精粉充填率増加速度の最大値は 3.8% day<sup>-1</sup> であったのに対し、山田化と嘉平の最大値はそれぞれ 4.9% day<sup>-1</sup>, 4.3% day<sup>-1</sup> とコシヒカリよりも高く、一方、銀坊主の最大値は 3.2% day<sup>-1</sup> とコシヒカリよりも低く、愛知旭の最大値はコシヒカリと同程度の 3.7% day<sup>-1</sup> であった。

以上より、30 での穂培養で選抜された品種は、26~32 の幅広い温度域でも同傾向の子実増加特性を示したため、穂培養による品種選抜の有効性が示された。穂培養による高温登熟耐性の評価には各品種の受精粉充填率増加速度が最大となる 28 付近が適すと示唆された。今後、これらの品種が実際の圃場における長期間の高温下でも優れた登熟特性を示すかどうかを明らかにする必要がある。

### (3). 穂培養下で登熟速度の異なる日本のイネコアコレクション品種は高温下登熟期の子実増加速度も異なるか？

温暖化の影響による気温上昇は今後も西日本を中心に続きイネ品質や収量がさらに打撃を受けると予想される。そのため、高温下での登熟能力の高い品種が選抜、育成される必要がある。高温による登熟阻害や品質低下は、高温による直接的な子実への阻害よりも子実成長の促進と期間短縮に伴う子実への同化産物供給の不足による影響が大きかった。そのため子実の成長速度が高温により大きくなならない品種が同化産物不足が起きにくいために高温耐性を有する可能性がある。日本のイネコアコレクション品種の中に 1 週間 30 下穂培養下における登熟速度が異なる品種が認められた(阿部,2017)。そこで、これらの典型的な品種の相対的子実重増加速度を表す籾の充填率増加速度が登熟期全般に渡る高温条件下でも違いを示すのかどうかを明らかにすることを目的とした。30 下穂培養において籾の充填率増加速度の大きかった品種(JRC5, JRC11) と小さかった品種 (JRC27, JRC39)に、出穂期以降に温度勾配温室 TGC (Temperature gradient chamber) 内で高温を与えた。種子を 4 リットルポットに円形 20 粒播きし、分けつを切除して主茎のみを栽培した。その結果、30 下穂培養の実験において、充填率増加速度の大きかったグループ (JRC5, JRC11) と小さかったグループ (JRC27, JRC39) の受精粉の充填率と積算気温のロジスティック曲線の関係において穂培養下で充填率増加速度の大きかったグループに比べて小さかったグループのグラフの傾きが緩やかであった。従って、高温条件下での充填率増加速度が穂培養下と同じ傾向を示したため、高温抵抗性の素材となる可能性がある。

ただし、群落条件でも同様の違いが再現されるかどうかは今後明らかにする必要がある。さらに、今回の実験は高温条件下で行われたものの、幅広い高温条件下における実験ではない。さらに多様な高温条件の段階的な反応を調査する必要がある。

### (4). 多様な子実充填パターンのイネ品種・系統における代謝プロファイリングと酵素活性の解析

種々のイネ品種・系統において多様な子実充填のパターンが観察されている。子実充填メカニズムを明らかにすることを目的に代謝物プロファイリングや酵素活性などの生化学的解析を行った。メタボローム解析のために試料を破碎後、メタノール及び Milli-Q 水を加え攪拌し、水相を限外ろ過処理 (MILLIPORE, ウルトラフリーMC 遠心式フィルターユニット) を行い、ろ液を LC/CE-Q-TOFMS system (Agilent) を用いて解析する。各プラットフォームで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MassHunter を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、溶出時間 (RT) または泳動時間 (Migration time: MT)、ピーク面積値を得る。検出された

ピークに対して  $m/z$ 、RT、MT の値を基に代謝物質データベースに登録された全物質との照合、検索を行なった。スクロースシンターゼとインベルターゼ活性測定は、それぞれ Baroja-Fernández らの方法 (Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (1) 321-326, 2012) と Barman の方法 ( $\beta$ -Fructofuranosidase (3.2.1.26) in Enzyme Handbook vol.1, pp. 584-585, 1969)を用いた。その結果 28°Cで穂培養したタカナリ、コシヒカリ、JRC5, 11, 52 の子実のメタボローム解析で得られた代謝物の主成分分析により品種・系統によってそれぞれ特徴的なメタボロームを示すことが分かった。得られた代謝物プロファイリングの中でショ糖、グルコース、フルクトースの挙動に注目し、さらに解析を進めた。子実充填速度とショ糖含量の間に負の相関が示唆されたため、ショ糖代謝酵素、スクロースシンターゼとインベルターゼの活性測定を行った。そして、ショ糖含量とインベルターゼ活性との間に正の相関が認められた。これらの結果から、ショ糖代謝酵素が子実充填速度を制御する可能性が推察された。

#### 4. 研究の成果

以上から、幅広い遺伝的変異を持つ日本と世界のイネコアコレクション品種において 30 の穂培養条件下で子実の成長速度(籾の充填率)は幅広い変異を示し、さらに日本のイネコアコレクション品種で幅広い温度域や長期のポット栽培でも同様な品種間差が観察された。ショ糖代謝酵素の発現の違いがこのような子実充填速度の違いをもたらしている可能性がある。これらの品種の高温条件下での子実成長特性の有効性についてはさらに圃場条件での検証が待たれる。本研究結果は高温に最も影響されやすい子実成長を維持するための特性としての子実の温度反応性に着目し、品種的多様性とその利用可能性について明らかにすることができた。今後、圃場におけるこれらの性質の再現性の確認、もう一つの耐性をもたらす同化維持の特性の解明を行うことにより高温耐性品種の開発につながる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Kobata T., Palta J. A., Tomoyuki T. Masao O., Miki M., Koc M. and Barutcular C. 2018. Responses of grain filling in spring wheat and temperate-zone rice to temperature: Similarities and differences. *Field Crops Research* 215: 187-199.
2. Kobata T., Koc M. and Barutcular C., Tanno K. and Inagaki M. 2018. Harvest index is a critical factor influencing the grain yield of diverse wheat species under rain-fed conditions in the Mediterranean zone of southeastern Turkey and northern Syria. *Plant Production Science* 21; 71-82.
3. Inomata, T., Baslam, M., Masui, T., Kosu T., Takamatsu T., Kaneko K., Pozueta-Romero J. and Mitsui T. 2018. Proteomics Analysis Reveals Non-Controlled Activation of Photosynthesis and Protein Synthesis in a Rice *npp1* Mutant under High Temperature and Elevated CO<sub>2</sub> Conditions, *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 2655.
4. Mitsui T., Ochiai A., Yamakawa H., Kaneko K., Kitajima-Koga A., Basla M And Novel M. 2018. Novel molecular and cell biological insights into function of rice  $\alpha$ -amylase, *Amylase*. 2:30-38.
5. Kobata, T., Ishi, H. and Iwasaki, H. 2017. A Reduction in spikelet number and fertility causes yield vulnerability in high-yielding rice. *Agromomy Journal*. 109: 175-184.
6. Mitsui T., Yamakawa H. and Kobata T. 2016. Molecular physiological aspects of chalking mechanism in rice grains under high-temperature stress, *Plant Production Science* : 19, 22-29.
7. Kaneko K., Takamatsu T., Inomata T. Oikawa K., Itoh K., Hirose K., Amano M., Nishimura S., Toyooka K., Matsuoka K., Pozueta-Romero J., and Mitsui T. 2016., N-glycomic and microscopic subcellular localization analyses of NPP1, 2 and 6 strongly indicate that trans-Golgi compartments

participate in the Golgi-to-plastid traffic of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases in rice, *Plant and Cell Physiology* 57: 1610-1628.

8. 三ツ井敏明 2016.、高温登熟による米白濁化の分子生理機構、*化学と生物* 54: 254-259.

〔学会発表〕(計6件)

1. 西岡 幹人・本塚 伊織・氏家 和広・小葉田 亨. 2019. 穂培養下で登熟速度の異なる日本のイネコアコレクション品種における高温下登熟速度の違いの検証 .日本作物学会第244回講演会.
2. 三ツ井敏明 2019. イネにおける澱粉代謝関連酵素の応用分子細胞生物学的研究、平成30年度 日本応用糖質科学会北海道支部 シンポジウム.
3. 三ツ井敏明 2018. イネにおける澱粉代謝関連酵素の応用分子細胞生物学的研究、平成30年度大会(第67回)日本応用糖質科学会全員集会、2018
4. Kobata T., Yoshida H., Masiko U., Honda T, Ishi H. and Iwasaki, H. 2017. What factors reduce the yield potentiality in high-yielding rice? 9<sup>th</sup> Asian Crop Science Association, Korea.
5. Mitsui T. 2017. Rice  $\alpha$ -Amylase Involved in Grain Chalking under Heat Stress, Green for Good IV: Biotechnology of Plant Products.
6. Mitsui T. 2017. , Rice transmembrane nine protein 1 is involved in membrane trafficking through secretory pathway to plastid, *Plant Biology*.

〔図書〕(計2件)

1. Meddich A., El-Mokhtar M. A., Bourzik W., Mitsui T., Baslam M. And Hafidi M.. Root Biology Chapter9: Optimizing growth and tolerance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) to drought, salinity and vascular fusarium-induced wilt (*Fusarium oxysporum*) by application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). Springer. 2018. 20
2. 三ツ井敏明・金古堅太郎・白矢武士、「米の外観品質・食味 - 最新研究と改善技術 - 」第15章 高温耐性イネの開発戦略 - 澱粉代謝関連酵素の細胞分子生物学の視点から -、養賢堂、2018、14

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：氏家 和広

ローマ字氏名： (UJIIE, Kazuhiro)

所属研究機関名：島根大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号：60465276

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：三ツ井 敏明

ローマ字氏名： (MITSUI, Toshiaki)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号：70183960