

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580020
 研究課題名 (和文) 地球温暖化に伴う高夜温による水稻登熟障害の水分生理学的機構解明
 研究課題名 (英文) Effects of high night temperature enhanced by the global warming on the water relations in rice ripening

研究代表者
 森田 敏 (MORITA SATOSHI) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター暖地温暖化研究チーム・上席研究員
 研究者番号：40391453

研究成果の概要：近年温暖化で顕在化している水稻の高温登熟障害の症状の一つである玄米充実不足に関して、高夜温が胚乳細胞の成長を阻害するメカニズムを水分生理・糖代謝の観点から解析した。その結果、高温時間帯の糖供給不足や細胞壁の弛緩阻害が関与していることが強く示唆され、従来の呼吸昂進説と異なるメカニズムが提起された。また、プレッシャープローブ法による水稻の胚乳細胞の膨圧測定は世界で初めての試みであり、胚乳内の膨圧の基礎情報が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：作物学・雑草学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：細胞組織、植物、ストレス、糖、水分生理

1. 研究開始当初の背景

近年の地球温暖化に伴う夏季の高温により、西日本を中心に水稻の玄米品質が悪化している。

特に高温の程度と頻度が高い九州・沖縄地域では、玄米の充実不足（粒表面の溝が深く粒重が小さい）と白濁化が著しく、一等米比率が大幅に低下し農業現場が大きな打撃を受けている（森田 2005）。

今後、温暖化の進行により被害の深刻化が懸念され、被害回避技術の開発が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

これまでに玄米の充実不足に関して、昼よりも夜の高温で胚乳細胞が小さくなり粒重が低下することが明らかになっている（Morita et al. 2005）。しかし、その生理的機構は明らかになっておらず、高温による充実不足を回避する有効な対策技術の確立が困難となっている。

そこで、本研究では、(1) 水稻の胚乳細胞における水ポテンシャルと糖代謝の点から高夜温による細胞拡大の阻害メカニズムを明らかにする。(2) また、高温耐性の品種間差異が(1)で得られたメカニズムに基づいて

いるのか検証する。(3) さらに、これらの知見に基づいて高夜温による粒重低下を回避する栽培条件や育種方向を明確にする。

高夜温による粒重低下の主因には、これまで呼吸昂進による炭水化物不足が挙げられていた(山本 1959)。しかし、高夜温処理を茎葉のみに与えると茎葉乾物重が低下するものの粒重は低下せず、穂のみに与えた場合に粒重が低下すること(森田ら 2004)が明らかになり、高夜温による粒重低下は従来から考えられてきたような呼吸昂進とは別の生理的機構が強く関与して発生している可能性が高い。

「呼吸昂進説」に代わる有力な仮説としては、「水ポテンシャル低下説」が考えられる。その根拠は以下の通りである。(1) 細胞拡大は生理代謝のなかで最も水ストレス感受性が強い現象の一つである(野並 2001)。(2) トマトでは低夜温により夜間の葉からの蒸発が少なくなり、過剰な水分が夜間に果実へ流入することにより細胞が拡大し裂果する現象(Ohta et al. 1997)が知られており、高夜温はこれと逆に水ストレスを誘起し、子実に入水する水を少なくしている可能性がある。

なお、高夜温環境では、光合成をしていない(すなわち炭水化物を新たに同化しない)夜間に、子実で盛んに糖からデンプンを合成している(すなわち糖を必要としている)状況にあり、夜間の子実内糖濃度は低い(未発表)。このことが細胞拡大やデンプン合成を阻害している可能性がある。そこで本研究では、この「糖の転流・代謝ミスマッチ説」についても検証する。

研究代表者は、これまでに胚乳内の特定領域の細胞が高夜温で小さくなることを明らかにしている(Morita et al. 2005)。このため本研究は、研究分担者がすでに確立している世界トップレベルの高精度を誇るプレッシャープローブ(細胞の膨圧計測器)法(Nonami et al. 1987, 野並 2001)により、まさに拡大が阻害されている細胞で水ポテンシャル測定を行う点で独創的である。

また、糖の転流・代謝については、研究分担者が質量分析計により多数の優れた業績(Barboza et al. 2005 他)を出しているほか、研究代表者も 13C の転流実験の実績(Pravat et al. 2004)がある。これらの研究蓄積を活用して、高夜温環境における胚乳における昼夜別の糖代謝の実体を質量分析計により詳細に明らかにすることにより上記の仮説を検証することができる。

本研究の予想される結果として、高夜温による粒重低下の主因が水ストレスあるいは糖の転流・代謝のミスマッチによる胚乳細胞の拡大阻害であることが検証され、高温登熟障害の回避方策として水ストレス耐性の付

与や糖の転流・代謝の改善が重要であることが提起される。このことは、日本の稲作のみならず広く世界の作物生産における高温障害(Peng et al. 2004)の軽減に向けて重要な指針を与えるという点で意義が大きい。

3. 研究の方法

(1) 水稻の胚乳細胞の水ポテンシャル測定法の検討と胚乳細胞の位置と出穂後日数による膨圧変化の検討(2006~2007年)

① 供試材料

水稻品種「ヒノヒカリ」を九州沖縄農業研究センター(筑後市)で1/5000aポットで円形10個体を栽培し、分けつは順次除去し主稈のみを養成した。各穂の出穂時期は、調査時における穂の抽出長から勘案して、6~12時間ごと(朝6時頃、昼12時頃、夕方18時頃、夜0時頃等)に記録した。それぞれのポット内で出穂時期に近い(24時間を目安とした)穂を供試材料として用いた。

② 温度処理

供試材料として選んだ穂(①参照)が出穂後3~4日目に達したポットを順次、自然光型人工気象室に搬入し、成熟期まで温度処理(高夜温区: 昼22℃夜34℃、高昼温区: 昼34℃夜22℃(昼は6時~18時、夜は18時~翌日6時))を行った。

③ プレッシャープローブによる水稻胚乳細胞の膨圧測定条件の検討

温度処理中のポットを室温25℃の実験室に移動し、直ちに玄米側面の籾殻を2mm程度の幅でピンセットを用いて剥いた後、手早く、医療用テープで籾をステンレスあるいはプラスチックの板に固定した。露出した玄米表面が乾燥しないように蒸留水で湿らせたキムワイプを、プレッシャープローブを玄米に刺す直前まで籾全体に被せた。デジタルマ



図1 プレッシャープローブ法による水稻の胚乳細胞の膨圧測定方法

手前はデジタルマイクロ스코プのカメラ、右からキャピラリーを刺している。

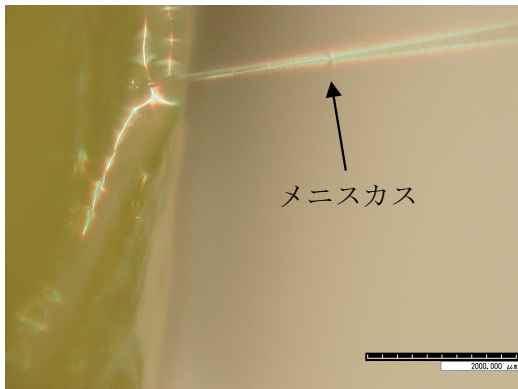


図2 玄米に刺したキャピラリーのメニスカス

イクロスコープ（倍率400倍程度）で玄米を観察しながら、シリコンオイルが充填されたガラス製マイクロキャピラリーを玄米表面に刺した。キャピラリー内に現れたメニスカス（シリコンオイルと細胞溶液の境界）が、キャピラリー内の圧力を上げると細胞側に戻り、下げると細胞から出ることを確認することで、細胞にキャピラリーが隙間なく刺さっていてメニスカスの動きから細胞膨圧を測定できる状態にあることを確認した。その後、キャピラリーを奥に進めて、次の細胞に刺すことで急激に移動したメニスカスを移動前の位置に戻し、そのときの圧力を読み取ることで、細胞膨圧を測定した。

測定時期は、出穂後6日目（温度処理後3日目）以降とし、玄米表面が硬くなりキャピラリーが刺せないなど膨圧測定ができなくなるまで、ほぼ毎日測定を行った。

測定部位は、玄米先端から基部に向かっての距離が300~4900 μm の範囲、玄米表層から内部に向かっての距離が50~1000 μm の範囲とした。表層から測定部位までの距離は、キャピラリー表面についている傷や細胞内容物残渣などの移動距離をディスプレイ上部に設置した目盛から読み取ることで行った。キャピラリーを刺す角度は、図3のように玄米の幅方向に対して直角（厚さ方向）とした。

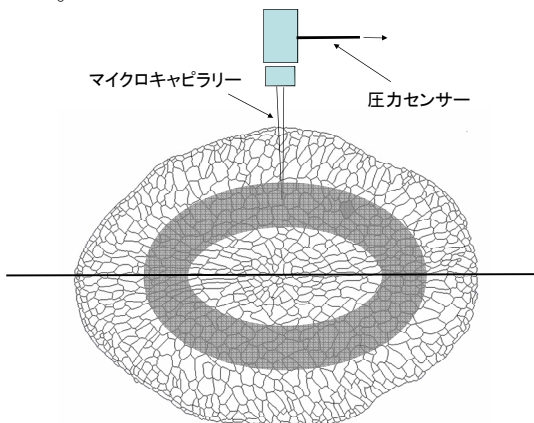


図3 玄米に刺すキャピラリーの角度
図内の細胞は玄米横断面上の胚乳細胞

④プレッシャープローブ法とサイクロメータ法の測定値の比較

③のプレッシャープローブ法による膨圧測定値を、サイクロメータ法による膨圧測定値と比較した。両測定法の供試材料は、出穂後日数や穂内の着粒位置を揃えた。サイクロメータ法において、穂から玄米を取り出す作業は、湿らせた紙を内側に貼った湿度100%のアクリルボックス内で行い、玄米生重を測定後、直ちにサイクロメータのチャンバー内に3~5粒ずつ入れて、恒温箱で愛媛大学に輸送後、マイクロボルトメータで測定した。

(2)高夜温区と高昼温区の胚乳細胞の水ポテンシャルの比較（2007~2008年）

①プレッシャープローブ法による測定

供試材料・温度処理は、(1)①、②と同様とした。プレッシャープローブによる膨圧測定法は基本的には(1)の③に記載した通りとしたが、測定部位を玄米先端から基部に向かって2500 μm （玄米中央）付近、玄米表層から内部に向かっての距離を400~500 μm の深さに限定した。2008年には日内変動を見るために、10~13時、13~17時、22~24時の3つの時間帯にそれぞれ2粒/穂×2反復（人工気象室2台）/区を用いて測定した。

②サイクロメータ法による測定（2006~2008年）

供試材料・温度処理は(2)①、玄米の採取方法や測定方法は(1)④と同様とした。供試材料の出穂後日数と採取時刻は2006年が11~15日目の9時と21時、2007年が7日目18時と8日目6時、2008年が9日目18時と10日目6時とした。

(3)穂培養実験（2007~2008年）

圃場へ移植した「あきさやか」の出穂後10日目の穂を用いて、田中ら（2001）を参考に培養実験を実施した。培養中の穂の環境温度は、(1)②の高夜温条件と同じで、培養液の糖濃度は、昼（22 $^{\circ}\text{C}$ ）40g/L、夜（34 $^{\circ}\text{C}$ ）0g/Lとした場合と、この逆の日変化、すなわち、



図4 穂培養実験状況

昼 (22°C) 0g/L、夜 (34°C) 40g/L とした場合を設定した。1 試験区 5 穂で培養開始後 3 日目 6 時~6 日目 18 時まで 12 時間おきに生穂重を測定した。

4. 研究成果

(1) 水稻の胚乳細胞の水ポテンシャル測定法の検討と胚乳細胞の位置と出穂後日数による膨圧変化の検討 (2006~2007 年)

これまでに水稻の胚乳細胞の膨圧をプレッシャープローブ法で測定した例はなく、本研究は世界で初めての試みと言える。得られた膨圧の値は、マメ科植物の種皮での測定値 (0.1~0.3MPa、Shackel et al. 1998) と同様に、葉に比べて低い値となった。

また、胚乳組織内の位置によって膨圧は大きく異なることがわかった。すなわち、玄米先端から基部に向かって 2500 μm 付近 (玄米中央部) で高く、上下両端で低いこと (図 5)、玄米表層で高く中心部に近くなるほど低く

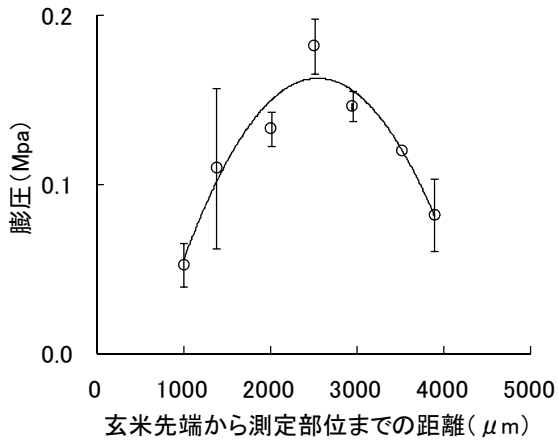


図 5 玄米先端からの距離による膨圧の違い
2007 年、ヒノヒカリ、高夜温区、出穂後 14-17 日、表層から 250-500 μm 。

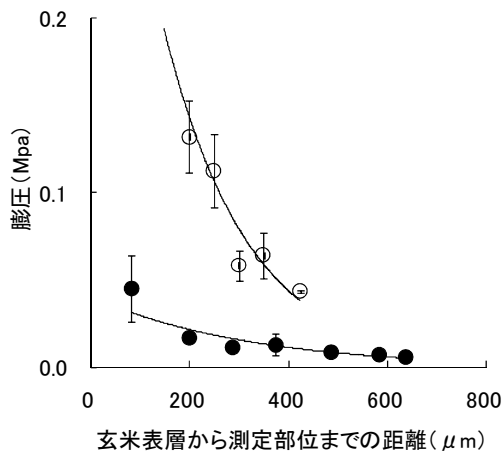


図 6 玄米表層からの距離による膨圧の違い
2007 年、ヒノヒカリ、高昼温区、黒丸が出穂後 7-11 日、白丸が出穂後 14-17 日、玄米先端から 2500-3500 μm 。

なること (図 6) が明らかになった。

さらに、胚乳の膨圧は、出穂後日数が増すにつれて上昇することが明らかになるとともに、昼より夜で高くなる傾向にあることが示唆された (図 7)。

(2) 高夜温区と高昼温区の胚乳細胞の水ポテンシャルの比較 (2007~2008 年)

① プレッシャープローブ法による測定

高夜温区と高昼温区の胚乳細胞の膨圧は、

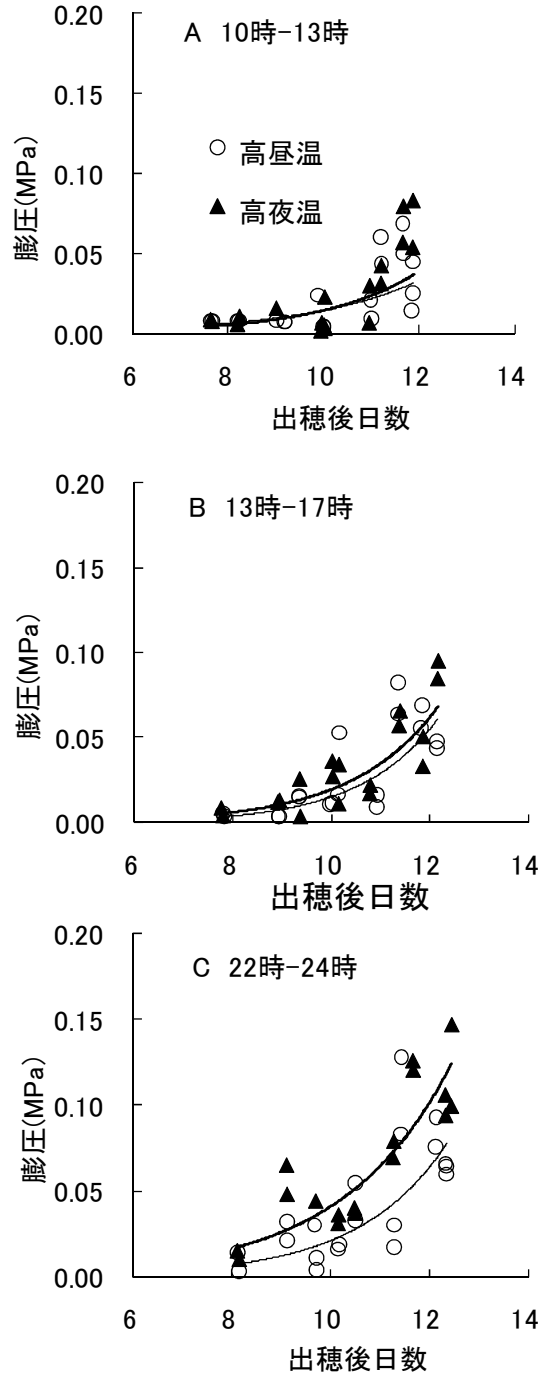


図 7 高夜温区と高昼温区の胚乳細胞における膨圧の玄米生長に伴う推移 (プレッシャープローブ法)
2008 年、ヒノヒカリ

10-13時、13-17時では大差なかったが、22-24時の夜間には高夜温区で高い傾向が認められた(図7)

②サイクロメータ法による測定(2006~2008年)

①のプレッシャープローブ法による測定結果と同様に、夕方~夜になると高夜温区では高昼温区より膨圧が高まる傾向が認められた(図8)が、その絶対値はプレッシャープローブ法よりも高い値となった。これは、サイクロメータ法では玄米表層に近い組織の高い膨圧(図6)が反映されているためと考えられた。なお、高夜温区の夕方~夜の膨圧の上昇には浸透ポテンシャルの低下が伴っていることが認められた(図8)。このことは、高夜温区では、昼の低温により胚乳でのデンプン合成速度や呼吸速度が低下して、糖濃度が高まったことを示唆しているが、夜間、高温になっても膨圧が高いことから、細胞壁の弛緩が阻害されることで胚乳細胞の伸長が滞っている可能性が示唆された。

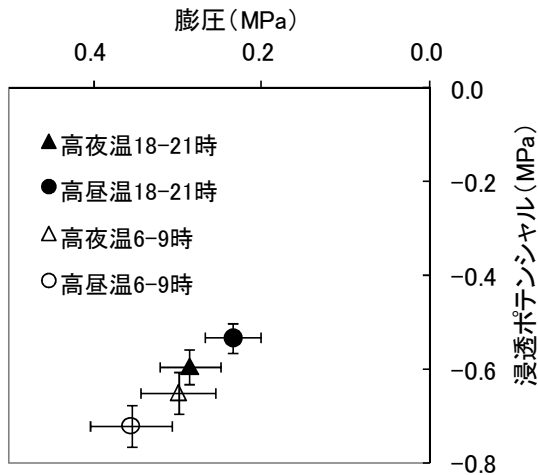


図8 高夜温区と高昼温区の胚乳細胞における膨圧と浸透圧(サイクロメータ法) ヒノヒカリ、出穂後9-15日、3年間の平均

表1 各試験区における胚乳細胞の膨圧、浸透ポテンシャル、水ポテンシャルおよび成長に伴う水ポテンシャル勾配

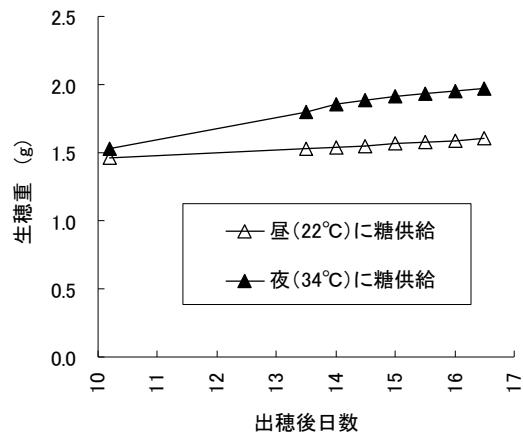
試験区・時間帯	膨圧	浸透ポテンシャル	水ポテンシャル	成長に伴う
				水ポテンシャル勾配
(MPa)				
高夜温区・18-21時	0.076	-0.595	-0.518	0.478
高昼温区・18-21時	0.047	-0.532	-0.486	0.446
高夜温区・6-9時	0.032	-0.650	-0.619	0.579
高昼温区・6-9時	0.026	-0.719	-0.693	0.653

膨圧はプレッシャープローブ法、浸透ポテンシャルはサイクロメータ法による測定値。水ポテンシャルは両者の和。成長に伴う水ポテンシャル勾配は、成長部位(胚乳細胞)水ポテンシャルと水源(根圏)の水ポテンシャルとの差。

一方、サイクロメータ法による浸透ポテンシャルと、プレッシャープローブ法による膨圧から水ポテンシャルおよび成長に伴う水ポテンシャルを算出したところ、高夜温区では成長に伴う水ポテンシャル勾配の最大値が0.579と、高昼温区の最大値0.653より小さいことが示された(表1)。このことは、高夜温区では浸透ポテンシャルの低下(糖濃度の上昇)が不十分であることも胚乳細胞の成長阻害の要因になっている可能性を示唆している。

(3)穂培養実験(2007~2008年)

高夜温区の胚乳における浸透ポテンシャルが低くなる理由としては、夜の光合成していない時間帯に玄米でデンプン合成を行っており、胚乳細胞内の糖濃度が低下することが考えられる。そこで、夜間に培養液の糖濃度を高めることで穂重の上昇が認められるかを検討した。その結果、高温の時間帯と糖濃度を高くする時間帯が一致することで穂重増加速度が上昇することが認められ(図9)、仮説が正しい可能性が高まった



第9図 穂培養実験において培養液にショ糖を加える時間帯の温度の違いが穂重増加に及ぼす影響 あきさやか、2007年

以上のように、本研究では近年温暖化で顕在化している水稻の高温登熟障害の症状の一つである玄米充実不足に関して、高夜温が特異的に胚乳細胞の成長を阻害するメカニズムを水分生理・糖代謝の観点から解析した。その結果、高温時間帯の糖供給不足や細胞壁の弛緩阻害が関与していることが強く示唆され、従来の呼吸昂進説と異なるメカニズムが提起された。これらの成果は、学術的にもまた対策技術開発の方向性にも強いインパクトを与えるものである。今後、これらの結果をさらに補強する研究を進めるとともに、品種や栽培法の開発に結びつけることが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①森田敏、高温登熟障害の克服に向けて、日本作物学会紀事、77巻1号P1-12、2008年、査読有

②Yousef Gholipour, Hiroshi Nonami, Rosa Erra-Balsells, In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix, Analytical Biochemistry, 383, 159-167, 2008, 査読有

③Yousef Gholipour, Hiroshi Nonami, and Rosa Erra-Balsells, Application of Pressure Probe and UV-MALDI-TOF MS for Direct Analysis of Plant Underivatized Carbohydrates in Subpicoliter Single-Cell Cytoplasm Extract, Journal of American Society for Mass Spectrometry, 19, 1841-1848, 2008, 査読有

④森田敏、近年の九州における水稻品質低下の実態と要因および対策について、中国・四国の農業気象、第21巻P118-119、2008年、査読無

⑤森田敏、水稻の作柄・品質低下に及ぼす温暖化の影響と対策、農林水産技術研究ジャーナル、第31巻第5号P14-19、2008年、査読無

[学会発表] (計7件)

①森田敏・中野洋・北川寿・高橋幹・和田博史、水稻生育後期の少量継続的な窒素施肥が穂揃期の茎のNSCと登熟に及ぼす効果、日本作物学会第228回講演会、2009年3月28日、つくば国際会議場(つくば市)

②森田敏、棚田米の稔りが良いのはなぜか?、第14回全国棚田サミット第4分科会、2008年10月17日、富貴屋旅館(雲仙市)

③森田敏・田村克徳・中野洋・北川寿・坂井真・高橋幹、高温耐性水稻品種「にこまる」の良好な登熟には穂揃期の茎のNSCが多いことが貢献している、日本作物学会第227回講演会、2008年9月25日、神戸大学

④森田敏・米丸淳一・藪押睦幸・田之頭拓・大田雄二・若松謙一・北川寿・中野洋、南九州における2007年産早期水稻の乳白粒発生要因～乳白粒断面の白濁リングの画像解析による考察～、日本作物学会第227回講演会、2008年9月25日、神戸大学

⑤Satoshi Morita, Recent progress in the prevention of high-temperature damage during rice grain ripening, Crop Science

Seminar in East Asia 2008: Recent Progress in the Improvement of Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice, 2008年7月8日、筑波農林研究交流センター(つくば市)

⑥森田敏・野並浩、高夜温が玄米成長を抑制するメカニズム～胚乳細胞の膨圧に注目した解析～、日本作物学会第225回講演会、2008年3月28日、農林水産技術会議事務局筑波事務所(つくば市)

⑦森田敏、2007年を含む最近の九州産水稻の作柄・収量低下の実態と要因、日本作物学会第225回講演会、2008年3月28日、農林水産技術会議事務局筑波事務所(つくば市)

[その他]

ホームページ

<http://konarc.naro.affrc.go.jp/topics/ondanka/ondanka1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 敏 (MORITA SATOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター暖地温暖化研究チーム・上席研究員

研究者番号：40391453

(2) 研究分担者

野並 浩 (NONAMI HIROSHI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：00211467

(3) 連携研究者