

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658020

研究課題名（和文） イネ開穎時の鱗被の肥大に關与する水と溶質の役割の解明

研究課題名（英文） Roles of water and solutes related to hypertrophy of lodicules at flowering.

研究代表者

小池 説夫 (KOIKE SETSUO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター

生産基盤研究領域・専門員

研究者番号：60355279

研究成果の概要（和文）：イネ開穎時の肥大鱗被での浸透圧を構成する溶質成分は、糖としてフルクトースとグルコース、無機塩としては塩化カリウムが主成分であった。グルコースとフルクトースとも「開穎時」には「開穎前」と比べて4～5倍の含有量の増加が計測された。鱗被可溶性画分のpH5.0およびpH7.0で測定したインベルターゼ活性の変動は、pH5.0での活性がpH7.0での10倍程度高く、開穎時のグルコースとフルクトースの増加は鱗被酸性インベルターゼ活性上昇によると考えた。

研究成果の概要（英文）：Fructose and glucose as sugars and potassium and chloride as major inorganic ions were revealed as major solute components and osmotic substances related to the hypertrophy of lodicules. Fructose and glucose were increased their contents four to five times higher compared with one hour before flowering. Soluble invertase activities measured at pH5.0 were ten times higher than those at pH7.0. Consequently, accumulations of fructose and glucose in the lodicules at flowering might be resulted from acidic invertase activities in the vacuoles of lodicules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・作物生産科学

キーワード：イネ・開穎・鱗被・肥大・溶質・糖・無機塩

1. 研究開始当初の背景

イネの開穎については、「外穎の内側基部に2個ある鱗被は、花卉に相当するもので、これが急に膨張してくる。そのため外穎は外

側に押し倒され、このために内外穎の鉤合が開き、開穎することになる」（星川清親「イネの生長」249頁）と記されているように、鱗被の膨張は開穎に必須の役割を果たすと考

えられ
る。

最近、鱗被の膨張が起こらないイネの例が報告された。開穎しないイネ突然変異体 (*superwoman1-cleistogamy (spw1-cl1s)*; H. Yoshida et al. Plant Biotechnology Journal, 5, 835-846, 2007) では、幼穂形成期間を平均気温24~25℃の温度履歴で生育すると開花間近になっても鱗被が肥大しない形態をとり、開穎しないで受精することが確認された。この開穎しないイネ突然変異体については、開花期の高温障害の回避に有利であることが申請者らにより実証された。

開穎時の鱗被の膨圧と浸透ポテンシャルの変化を測定した報告(平沢ら、日本作物学会記事、68(別1号)、144-145、1999)によれば、生体重の変化から開穎時の鱗被の大きさの急激な変化は鱗被の含水量の変化によると考えられるものの、浸透ポテンシャルの増加程度が鱗被の含水量の増加程度に比較してはるかに小さいことから、鱗被への溶質の蓄積も起こっていると推察される。しかし、鱗被に流入する溶質の特定についてはまだ報告例がない。

開穎しないイネ突然変異体の耐暑性を研究する過程で、飼料米である北陸193号のγ線照射による突然変異体が、幼穂形成期の温度履歴に関係なく閉穎であることが判った。しかし、この変異体の鱗被の形態は先述した *spw1-cl1s* と異なり、通常観察されるような鱗被の形態であるにも関わらず、鱗被の肥大の程度が小さいことが特徴である。恐らく、鱗被への水および溶質の流入が極めて少ないことが閉穎の原因であると推察された。

一方、最近、イネ鱗被で特異的に発現する水輸送に関わる膜タンパク質である液胞膜型アクアポリン遺伝子の存在が明らかとなった(村井麻理ら、第51回日本植物生理学会年

会、ポスターP2C042、2010)。そこで、このアクアポリン遺伝子の発現をRNA干渉

(RNAi)により抑制したイネ転換体を作成できれば、鱗被への水の流入を抑制した材料となり、鱗被への水と溶質との流入を分けて解析できる可能性があった。

これらの背景から、イネ開穎時に鱗被が肥大する際にはまず溶質の流入があり、続いて水の流入があると予想されるが、溶質については解明されていないので、これを特定する。さらに、水の流入を抑制した場合の鱗被の肥大程度を解析するため、鱗被に特異的に発現して水輸送に関与する液胞膜型アクアポリン遺伝子をRNA干渉により抑制した転換体イネを作成し、鱗被に流入する溶質および水について解析する。これらの結果から、鱗被肥大の機作と開穎に果たす機能について解明することに意義があると考えた。

2. 研究の目的

イネの開穎における鱗被の肥大については、水の流入による肥大と同時に溶質の流入による寄与が示唆されていたが、物質的基盤は明らかでなかった。この点をクロマトグラフィ等分離・同定手法を用いて初めて明らかにする。

さらに、鱗被への水の流入の抑制が鱗被の肥大を阻止するのかを解析するために、鱗被で特異的に発現する水の輸送に関わる液胞膜型アクアポリンの機能をRNAiにより遺伝子発現を抑制した転換体を作成できれば、この問題に解答が得られる可能性がある。

これらの解析により、鱗被への水の流入が一元的に重要であるのか、溶質の流入も同時に関わるのか、開穎のためには鱗被はどの程度まで肥大する必要があるのか、という諸点に新たな知見を得られる。と同時に、開花生理に基づいた開花抑制技術は、将来の圃場レ

ベルでの遺伝子導入イネの栽培に際しての花
粉拡散防止や、変動の大きい環境下における
栽培技術に閉花性という形質が利用される学
術的基礎を提供することに繋がる。

3. 研究の方法

鱗被に流入する溶質を特定するために、
「はやゆき」を5千分の1アールポットで円
形20粒播きして人工気象室で生育させ、開穎
時の鱗被を大量に集め、凍結磨砕後水抽出物
を得る。フィルター過後、限外濾過等によ
り濃縮し、液体クロマトグラフィーおよびイ
オンクロマトグラフィーによる分析に供す
る。溶質の候補としては、糖、アミノ酸、有
機酸、無機塩など広く考えられるので、順次
手法を工夫して分析し、特定する。

さらに、水の流入を抑制した場合の鱗被の
肥大程度を解析するため、鱗被で特異的に発
現する液胞膜型アクアポリン遺伝子のRT-PCR
解析を実施し、肥大の少ない鱗被でのアクア
ポリン遺伝子の発現を解析する。鱗被に特異
的に発現して水輸送に関与する液胞膜型アク
アポリン遺伝子をRNA干渉により抑制した転
換体イネを作出し、鱗被に流入する溶質およ
び水について解析する。このために、極早生
品種「はやゆき」でのRNAi転換体の作出を進
め、研究期間内にT2世代転換体の解析を可能
とする。

4. 研究成果

イネ開穎時に鱗被が肥大する際に水と共に
流入する溶質成分を網羅的に解析した。イネ
開穎時に、肥大した鱗被を2,500穎花から集
め、磨砕後遠心分離上清をメンブレン濾過し
た濾液のpH(pH6.7)、Brix(5.9)、浸透圧
(466mOsm/Kg)を測定した後、濾液を適宜希釈
し、クロマトグラフィー解析に供試した。無
機イオンについてはイオンクロマトグラフィ

ーに、糖・有機酸・アミノ酸は適合するカラ
ム装填の高速液体クロマトグラフィーに供試
した。

この結果、糖ではフルクトース・グルコー
ス・リボース等が検出され、スクロースは検
出されなかった。無機塩ではカリウム・マグ
ネシウム・アンモニウム・カルシウム等の陽
イオン、および、塩素・硫酸等の陰イオンが
検出された。有機酸ではリンゴ酸・コハク酸
等が検出されたが、含有量は少なかった。ア
ミノ酸ではグルタミン酸・リジン・アスパラ
ギン酸等が検出されたが、含有量は極めて少
なかった。含有濃度(mM)の高い成分は、フル
クトース(137.2mM)とグルコース(118.9mM)
(第1表)、カリウムイオン(78.2mM)と塩素イ
オン(49.8mM)(第2表)であった。

これらの結果、肥大鱗被での浸透圧を構成
する溶質成分は、糖としてフルクトースとグ
ルコース、無機塩としては塩化カリウムが主
成分であると考えた。イネの鱗被の肥大に関
与する溶質が明らかにされたのは初めてであ
り、植物界でも鱗被組織の溶質成分を網羅的
に明らかにした最初の例となった。

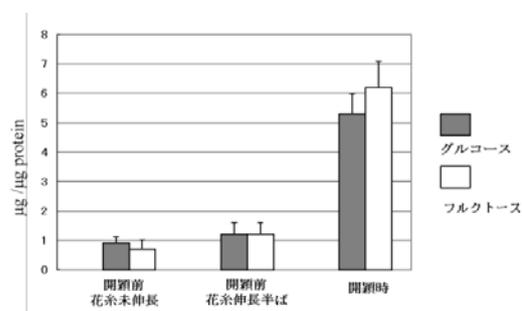
第1表 糖濃度(mM)

フルトコース	137.2
グルコース	118.9
リボース	0.93
マルトース	0.14
ガラクトース	0.08
マンノース	0.08
セロビオース	0.04
キシロース	0.03
イソマルトース	0.02

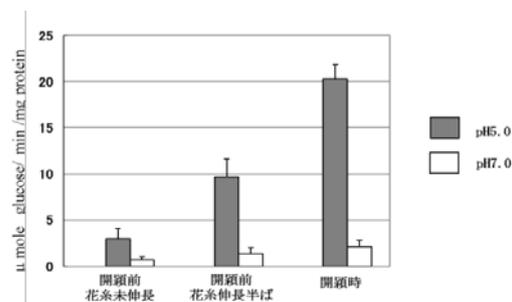
第2表 無機塩濃度 (mM)

カリウム	78.2
マグネシウム	9.6
アンモニウム	4.8
カルシウム	4.2
ナトリウム	0.7
塩素	49.8
リン酸	5.0
硫酸	1.3
シュウ酸	0.9
硝酸	0.3

続いて、開穎前後の鱗被含有のグルコースとフルクトースの経時的変動を解析した。開穎 2 時間前の葯が穎花基部にある状態を「開穎前・花糸未伸長」、開穎 1 時間前の葯が穎花中央にある状態を「開穎前・花糸伸長半ば」、および「開穎時」に分類し、鱗被を採取し分析した。グルコースとフルクトースとも「開穎時」には「開穎前・花糸伸長半ば」と比べて 4~5 倍の含有量の増加が計測された(第 1 図)。これらの糖含量の増加に関わる酵素活性としてインベルターゼ活性を測定した。鱗被を摩擦遠心分離して得た可溶性画分の pH5.0 および pH7.0 で測定したインベルターゼ活性の変動は、pH5.0 での活性が pH7.0 での 10 倍程度高かった(第 2 図)。測定値は、7 回の実験の平均値で示した。不溶性画分の懸濁液については、pH5.0 および pH7.0 におけるインベルターゼ活性は検出されなかったことから細胞壁インベルターゼの関与はないと考えた。これらの結果から、開穎時のグルコースとフルクトースの増加は鱗被酸性インベルターゼ活性上昇によると考えた。



第1図 開穎前後の鱗被含有グルコースとフルクトースの変動 (bar:SE, n=7)



第2図 開穎前後のpH5.0およびpH7.0での鱗被インベルターゼ活性の変動 (bar:SE, n=7)

一方、イネ鱗被で特異的に発現する水輸送に関わる膜タンパク質である液胞膜型アクアポリン遺伝子の発現をRNA干渉 (RNAi) により抑制したイネ転換体作出を試みた。互いに逆向きの、液胞膜型アクアポリン遺伝子の3'側配列307bpでイネアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子イントロンの配列を挟み込んで、2本鎖RNAを生じることによりアクアポリン遺伝子の発現抑制を狙ったものであるが、目的としたRNA干渉を実現した個体は得られなかった。PCRによる解析でもアクアポリン遺伝子発現は抑制されていなかった。

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)

[学会発表] (計2件)

- (1) 小池説夫、青木和彦、渡辺江利子、山口知哉、林高見 開花期イネ鱗被抽出液の溶質成分 日本作物学会第233回講演会、2012年3月30日、東京農工大学 (東京都府中市)
- (2) 小池説夫、青木和彦、渡辺江利子、山口知哉、林高見 イネ鱗被溶質および酵素活性の開穎前後の変動 日本作物学会第234回講演会、2012年9月11日、東北大学 (仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 説夫 (KOIKE SETSUO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・専門員

研究者番号：60355279

(2) 研究分担者

林 高見 (HAYASHI TAKAMI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター生産基盤研究領域・主任研究員

研究者番号：00355281