

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14644

研究課題名(和文) 気孔応答に着目したオミクス解析による高温不稔メカニズムの解明

研究課題名(英文) Heat-induced rice spikelet sterility associated with stomatal response

研究代表者

羽方 誠 (Hakata, Makoto)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター 水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：80450336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：開穎時の飽差の変化に伴った葯気孔応答と葯の水分状態に注目して、構築した仮説を検証する。高温処理を行うと、穂の導管の水ポテンシャルに有意な低下が認められた。また、開花期の葯の含水率は高かったものの、花糸では含水率は低下した。網羅的遺伝子発現解析において細胞膜の水透過率の制御に關与するアクアポリンや乾燥・浸透圧ストレス防御に關与するLEAタンパク質等の遺伝子発現の上昇が認められたことから、高温下では、雄蕊(葯・花糸)が水ストレスに陥る可能性が示唆された。更に、高温耐性品種・感受性品種を含む複数品種の顕微鏡観察から、葯表面の気孔密度に品種間差があり、これが稔実率を決定する一要因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we hypothesized that anther stomata perceive changes in vapor pressure deficit (VPD) at flowering to induce favorable anther water status, resulting in an increase in spikelet fertility, even at high temperature. Anthers subjected to high temperature conditions exhibited higher water content than the control, whereas the filaments showed lower water content. Furthermore, panicle xylem water potential declined under high temperature conditions, suggesting that spikelets including anthers were subjected to water deficit. Microarray analysis indicated that the expression of several water stress-associated genes, such as LEA, was up-regulated under high temperature conditions. Furthermore, stomatal density was positively correlated with high temperature-induced spikelet sterility in nine cultivars. Taken together, we conclude that anther stomata play a key role in controlling anther water status and surface temperature in response to the changes in VPD at flowering.

研究分野：作物生産科学

キーワード：高温不稔 水稻 葯 気孔 花糸 マイクロアレイ解析 水分生理 開花期

### 1. 研究開始当初の背景

高温不稔の発生機作の研究は、生理学的または形態学的な見地から解析が進められてきた。要因としては、主に穂ばらみ期と開花時の高温条件下で、葯の裂開不良や花粉の飛散不良、花粉の充実不足が起き、不受精に至ることが知られている (Satake and Yoshida 1978、松井 2009)。また、高温に加えて乾燥や多湿が不稔を助長する (松井 2009、Weerakoon et al. 2008) ことから、開花 (開穎) 時に起こるであろう飽差変動の感受が不稔を解明する糸口になると推測される。今後の温暖化で、国内の気候が亜熱帯化すると、高温不稔のリスクが一層高まる。従って、水稻の安定生産の観点からも、高温不稔の要因解明は喫緊の課題である。過去、葯気孔の存在は報告されていた (e.g., 武岡 2000) が、高温不稔の視点から検討された研究例はなく、開穎時の飽差変動を考慮に入れた高温不稔発生機構は明らかになっていない。

高温不稔の機構を解明する上で、葯の開裂や花粉の飛散を制御する因子の同定は重要である。葯表面には複数の気孔が点在する。葯気孔は虫媒植物では糖の分泌に関与することが知られているが、自家受粉するイネ科植物ではその機能は明らかにはなっていない (Ji et al. 2011)。一般に気孔開閉は葉内外の水蒸気分圧差や導管の水ポテンシャル等に応答する。葯表面は厚いクチクラ層で覆われており、葯表皮細胞からの蒸散が殆どないと考えられることから、葯気孔が開花直後に穎内の水蒸気圧を感知している可能性が高い。稲の開花は 1 時間程度で終了するが、この間に穎の中では同時に花糸が急激に伸長し、葯の開裂が進行して受粉が完了する。

研究代表者らはこの葯気孔が穎内の飽差の変化を感知すると推測した。「常温下では開花に伴う飽差の上昇を気孔が感知し、閉鎖することで葯内の細胞水分状態が最適な状態に維持され、葯の開裂・花粉飛散により、受精が成立する。一方、高温環境下では、飽差がさらに上昇することにより、気孔がすぐに閉鎖せず、一過的に維持されたままととなり、導管の水ポテンシャルが有意に低下すると考えられる。そのため、導管の水ポテンシャル低下に伴い、葯・花粉細胞がストレス (高温 + 水の複合ストレス) にさらされ、葯開裂・花粉の飛散や稔性効率が低下して不稔リスクが高まる」と仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証し、高温がもたらす雄性不稔のメカニズムの解明に繋げる。

### 2. 研究の目的

近年、地球温暖化による作物への影響が顕在化している。今後確実に地球温暖化が進行し、水稻収量を左右する高温不稔問題に直面することが危惧されるが、高温不稔の起こるメカニズムは不明な点が多く残されている。本研究では、過去注目されてこなかった飽差の感知器官と推測される葯先端部の気孔開

閉に注目し、新たな仮説を構築した。これを検証することで、メカニズムの解明を進め、高温耐性品種作出の加速化に貢献する。

### 3. 研究の方法

#### (1) イネの生育と高温処理

イネは播種後、人工気象室内でメタルハライドランプ照明下にて 26・13 時間明期、22・11 時間暗期で、人工気象室内に設置した水循環機能を有した人工水田に付属する高さ調整機能を付加したポット (直径 7cm、高さ 30cm) に 1 個体移植し、主稈以外分げつを切除して、出穂期まで生育させた。出穂後、ポットの高さを穂先が水面からの高さ 70cm で一定になるように調整し、35・13 時間明期、29・11 時間暗期、湿度 60% の条件で 3 日間高温処理を行った (図 1)。その後、26/22 の条件で登熟させ、稔実率を調査した。

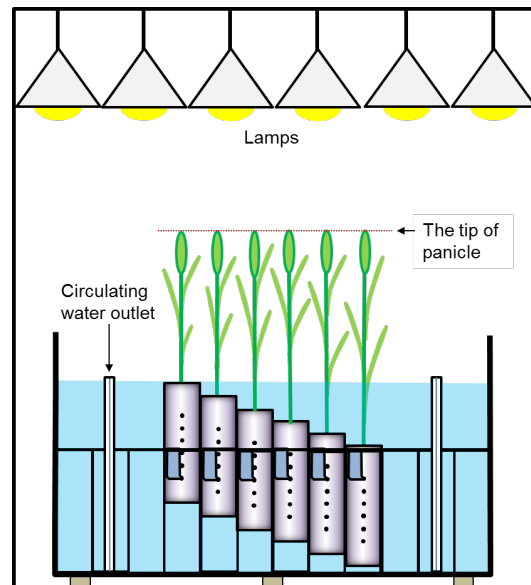


図 1 高温不稔検定システムの構築

光源と穂の距離を一定に保ち、水循環機能を持たせた高温不稔検定装置。Hakata et al. (2017a)

#### (2) 水分状態計測

含水量は高温処理 3 日目の開花始・終の各小穂から葯と花糸を取出し、超マイクロ天秤 (MSU3.6P-000-DM、Sartorius) にて生重量を秤量後、105・5 時間乾燥させ、乾燥重量を秤量し、含水率を求めた。

穂の導管水ポテンシャルは高温処理 3 日目の開花初期、開花後期の穂を穂首から切除後、プレッシャーチャンバー (Pump-up chamber, PMS Instrument Company, Oregon, USA) に納めて測定した。

雄蕊の膨圧はセルプレッシャープローブを葯柱表皮から差し込み、導管柔細胞層の膨圧を測定した。

#### (3) マイクロアレイ解析

高温処理 (または常温処理) 後の 1 個体由来の約 20 穎花から葯・花糸を採取した。花

糸は Nucleospin RNA XS(Macherey-Nagel)、薬は RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN) の各 RNA 抽出キットを用い、RNA を単離した。Cy3 ラベルした cRNA1300ng(花糸)、1650ng(薬) を 44K Oligo-DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies) に添加し、ハイブリダイズしたシグナル強度を、アレイスキャナーでスキャンし、発現解析を行った。

#### (4)メタボローム解析

高温処理 (または常温処理) 2 日目の開花直前の穎花を丁寧に部分剥離した後、高湿度条件下でセルプレッシャープローブを穎花内の薬壁と花糸内に挿入して、細胞液を採取した後、前処理なく、オービトラップ質量分析計 (LC-MS/MS) (Q-Exact ive, Thermo) に導入して代謝物質を解析した。

#### (5)薬気孔の顕微鏡観察

開花直前の穎花を EAA 溶液 (エタノール : 酢酸、3:1、v/v) で固定し、50%エタノールから 100%エタノールまで溶液を段階的に置換・脱水後、透明化させ、穎花から薬をスライドガラス上に取り出し、顕微鏡 (DM2500, Leica) 観察した。

### 4. 研究成果

#### (1)室内型高温不稔検定システムの構築

イネの高温不稔研究を進める上で、イネを安定的に高温処理し、再現良く不稔を発生させるシステムを構築する必要があった。人工気象室を使って行う場合、ランプの熱そのものが熱源となり、穂温を上昇させる可能性が想定された。そのため、ランプと穂までの距離を個体・品種間で一定にする必要があった。研究代表者らは、人工水田に 3cm ごとに 15cm まで高さを調節出来る専用ポットを作成し、出穂時に、個体間の穂の高さを水田面から 70cm に合わせて出穂日から 3 日間高温処理を行った (図 1)。また、その時の穂温測定のため熱電対を穎花内に挿入し穎花 (初内) 温度をモニターした。その結果、35・13 時間明期/29・11 時間暗期の処理条件下で、耐性品種を含む供試 4 品種において、品種間差異が最大になることを見出した (図 2)。また、この方法で穎花温度に品種間差が認められなかったことから、熱光源の影響を排除した、高精度なグロースチャンバー高温不稔処理システムを構築することができたと考えられた。

#### (2)薬気孔数と高温不稔耐性との相関

薬表皮に存在する気孔に注目して以下の顕微鏡観察を行った。人工気象室内で開花直前の穎花を開き開度を固定した状態でデジタルマイクロスコープをセットし薬に存在する気孔観察を試みたところ、薬の気孔は隣り合う薬柱間の谷間に沿って、薬表皮の上部から下部に渡って、縦 (あるいは長軸) 方向に走行する維管束に添って広く分布して

いた。しかしながら、この形態的な特徴と既存のデジタルマイクロスコープの持つ焦点深度の限界から、提案した半非破壊状態での薬気孔開度の連続観察は既存の技術では困難であると考えられた。そこで、固定組織を対象に薬気孔を顕微鏡観察した結果、耐性品種である N22 (図 3A) には感受性品種コシヒカリ (図 3B) に比較して多くの気孔が存在することが明らかになった。そして、これらの品種を含む 9 品種の薬気孔数と高温不稔耐性には  $r = 0.90$ ,  $p < 0.01$  の高い相関を見出した。

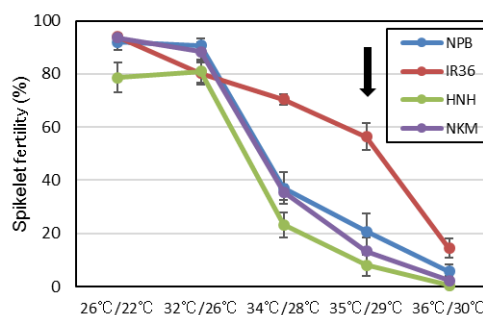


図 2 高温処理条件の検討

32 /26 から 36 /30 (26 /22 :対照条件) の高温条件にて、耐性品種 : IR36、感受性品種 : にこまる (NKM)、ヒノヒカリ (HNH)、中間耐性 : 日本晴 (NPB) の稔実率を比較した。エラーバーは標準誤差を、矢印は高温不稔耐性の品種間差異が最大になった条件を示す (n=3-10)。Hakata et al. (2017a)

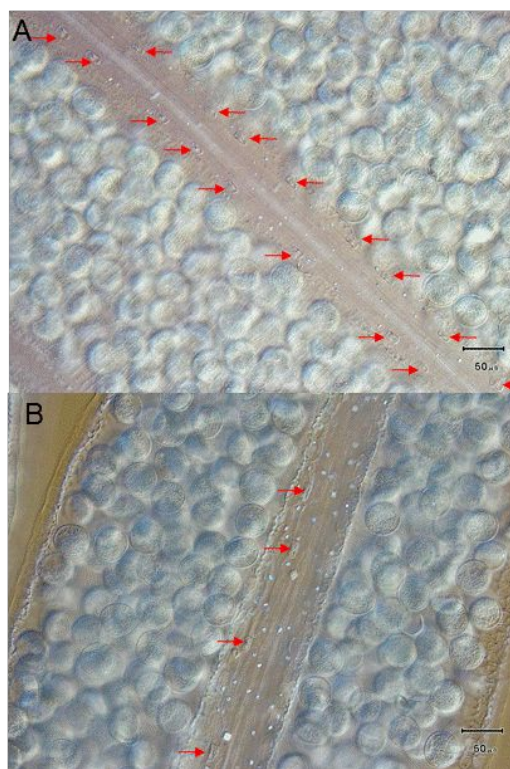


図 3 薬気孔顕微鏡観察

A. 透明化させた N22 の薬中央部の画像。B. コシヒカリの薬中央部。矢印は気孔を示す。



(3)高温に伴った葯と花系の水分状態変化  
超マイクロ天秤を用いて、高温及び常温条件下で処理した小穂から葯と花系を抽出し、開花前後の葯・花系の含水率を測定した。その結果、高温処理では葯で含水率は高めに(図4A)、花系では含水率は低く推移していた(図4B)。また、高温条件下で穂の導管の水ポテンシャルに有意な低下が認められ(図4C)、仮説を支持する結果となった。小穂内の葯へは花系を通じて穂首維管束から導管が連続的に繋がっていることから、先述のように、高温下の葯や花系では水ストレスに陥っていた可能性が強く示唆された。

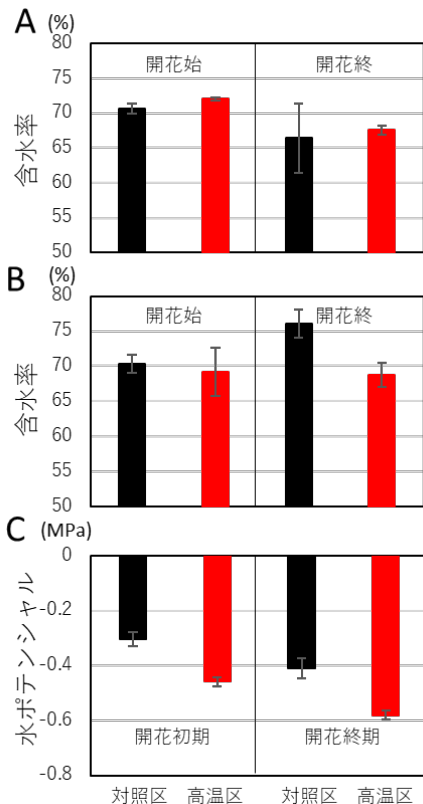


図4 各処理区における開花始・終の水分状態  
A. 葯の含水率。B. 花系の含水率。C. 穂の水ポテンシャルの推移。エラーバーは標準誤差を表す(n=3-7)。

(4)オミクス解析で判明したストレス関連遺伝子の関与

高温処理後の葯および花系の遺伝子発現プロファイルを44Kマイクロアレイ解析によって調べた。その結果、両組織において、数多くの熱ショックプロテイン遺伝子群が高発現していることが判明した。その他、品種により反応性の違いはあるものの、発現の変動した遺伝子が多く検知された。特に葯で、ABAの誘導や、乾燥・浸透圧ストレスの防御に関係する、LEAグループ遺伝子の多くが特に感受性品種コシヒカリで発現を上昇(3-240倍)させていた。また、ABA-induced plasma membrane タンパク質遺伝子も約200倍の上昇が見られた。また細胞膜の水透過率の制御に関与するAquaporin遺伝子は、耐性

品種N22で顕著に発現が上昇(24倍)していた。更に、過剰発現をさせると不稔の発生が増加するとの報告があるジャスモン酸関連転写因子であるTIFY遺伝子群(Hakata et al. (2017b))の多くの遺伝子の発現が上昇していることが判明した(最大のOsTIFY10cにおいて、日本晴の葯で7.4倍、花系で4.6倍)。

葯及び花系を対象にしたメタボローム解析からは、器官別の代謝産物の差異が確認された。高温下の葯壁では糖・プロリン等の代謝産物が集積することを確認できたものの、葯壁を対象にした分析では処理間差を認めるには至らなかった。しかしながら、細胞レベルの代謝産物解析法を用いて行った、成長中の葯内の花粉1細胞において代謝産物解析が可能であり、品種間差を検出できる可能性が示唆された。1花粉細胞の高温応答に着目した細胞レベルの研究については、平成28年度採択の基盤研究(B)「1花粉細胞におけるリアルタイムオミクス解析による高温不稔回避機構の解明」で別途進行中である。

以上、一連の解析結果から、開花時の常温区で起こる葯内の細胞水分状態変化の様相とは異なり、高温条件下では葯・花系が水ストレスに陥り、水ストレス条件下で代謝変化が起きていることが示唆された。さらに、葯気孔は葯の水分状態の制御因子として関与し、葯表面の気孔数の多少が不稔耐性に強く関与することが示唆された。

#### <引用文献>

Satake T. and S. Yoshida (1978) High temperature-induced sterility in indica rice at flowering. Jpn J Crop Sci. 47:6-17.

松井 勤(2009) 開花期の高温によるイネ (*Oryza sativa* L.) の不稔. 日記 78:303-311.

Weerakoon W.M.W., A. Maruyama and K. Ohba (2008) Impact of humidity on temperature-induced grain sterility in rice (*Oryza sativa* L.). J Agron Crop Sci. 194:135-140.

武岡 洋治 (2000) 環境ストレスと生殖戦略-イネ科小穂の形態変化-. 農文協

Ji X., B. Dong and B. Shiran et al. (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. Plant Physiol. 156:647-662.

Hakata M., H. Wada, C. Masumoto-Kubo et al. (2017a) Development of a new heat tolerance assay system for rice spikelet sterility. Plant Methods 13:34.

Hakata M., M. Muramatsu, H. Nakamura et al. (2017b) Overexpression of TIFY genes promotes plant growth in rice through jasmonate signaling. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81: 906-913.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hakata M., H. Wada, C. Masumoto-Kubo, R. Tanaka, H. Sato and S. Morita (2017) Development of a new heat tolerance assay system for rice spikelet sterility. *Plant Methods* 13:34. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

和田 博史, 羽方 誠, 中野 洋, 野並 浩, 森田 敏. フェーンに伴うリング状乳白粒の発生機構 - オンサイト・セルスペシフィック解析による水稻高温障害研究への応用 -. 日本農業気象学会九州支部・日本生物環境工学会九州支部合同大会 2016.11.25 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

Wada H., M. Hakata, H. Nonami, H. Nakano and S. Morita. Mechanisms of foehn-induced rice chalky ring formation in rice: Use of the on-site cell-specific analytical method and practical applications. IRRI-JIRCAS-NARO Joint Symposium "Towards Achieving Sustainable Rice Production in Asia". 2016.9.7 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

羽方 誠, 和田 博史, 増本 (久保) 千都, 田中 良, 佐藤 宏之, 森田 敏. イネ高温不稔に關与する遺伝要因の探索. 日本育種学会 2015.9.12 新潟大学 (新潟県・新潟市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

羽方 誠 (HAKATA, Makoto)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター 水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：8 0 4 5 0 3 3 6

##### (2) 研究分担者

和田 博史 (WADA, Hiroshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター 水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：4 0 5 3 3 1 4 6