

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04870

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Heat tolerance mechanisms in rice spikelet fertility using real-time single pollen omics approaches

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・上級研究員

研究者番号：80450336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：高温に伴う不受精機構を分子レベルで解明するために、高温耐性の異なるイネ2品種を供試し、高温下でピコリットルプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化質量分析法を駆使した1花粉粒代謝産物解析と遺伝子発現解析とを統合したオミクス解析を行った。葯開裂前の1花粉粒においてホスファチジルイノシトール、システイン合成の高温応答に品種間差があることが見出された。高温下での脂肪分解酵素、システイン合成酵素の遺伝子発現にも顕著な変動が認められ、稔実への貢献が示唆されたことから、葯開裂・飛散に先立つ高温下の成熟花粉内でのこれらの代謝維持が、その後稔実率の差として現れる高温耐性の強弱を決定づけると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温暖化の進行に伴い、近年散見される高温不稔の発生頻度の増加により米の大幅な収量不安定化が危惧されており、食糧の安定供給の観点から、早期に高温不稔耐性品種を育成することが必須である。しかしながら、高温不稔を誘導する生理的メカニズムについては依然として不明な点が多く、高温不稔の耐性向上を目指した品種開発には至っていない。本研究は高温処理下のイネ1花粉を対象にした分析により高温下での花粉の機能維持に関する分子メカニズムを明らかにした点で学術的意義は大きく、今後の耐性品種作出が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we examined heat tolerance mechanisms in rice spikelet fertility by using real-time single pollen metabolomics and gene expression analysis. Using picolitre pressure-probe-electrospray-ionization mass spectrometry (picoPPESI-MS) to directly determine the metabolites and microarray analysis in the single mature pollen grains of two cultivars that exhibited different heat tolerance. The metabolome analysis detected varietal differences in phosphatidylinositol (PI) in mature pollen, together with other 106 metabolites including cysteine. Greater PI content was detected in heat-tolerant cultivar pollen regardless of the treatment, but not for heat-susceptible cultivar pollen. Microarray analysis has also suggested the importance of expression of lipolytic enzyme-encoded genes at high temperature. Therefore, we conclude that the observed active synthesis of PI prior to germination may be an important factor for maintaining spikelet fertility under heat conditions.

研究分野：作物生産科学

キーワード：高温不稔 花粉 イネ オミクス解析 プレッシャープローブエレクトロスプレー質量分析 遺伝子組換え

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

今後の温暖化の進行により国内の気候が亜熱帯化すると、高温不稔のリスクが高まる。従って、高温不稔の要因解明と、その基礎知見に基づく品種改良による水稲安定生産は喫緊の課題である。高温不稔の発生要因については、生理学的または形態学的な解析が進んでおり、主に穂孕期と開花時の高温の影響を受けやすく、葯の裂開不良や花粉の飛散不良、充実不足等により不稔になることが報告されている(Satake and Yoshida 1978、松井 2009)。また、高温に加えて多湿も不稔を助長する(Weerakoon et al. 2008)。高温に強いとされる品種でも受粉後の花粉発芽が阻害されると不稔が発生する。更に、高温不稔が発生する条件下の雌蕊に健全な花粉を人工交配させた場合、不稔が発生しなかったことから、不稔要因は主に雄蕊側にあると考えられている(Satake and Yoshida 1978)。そのため、高温下での花粉が受精能力を維持できるかは高温不稔耐性の主要因と考えられる。イネ花粉は直径約 35  $\mu\text{m}$ (Wang et al. 2015)と比較的小さく、これまで1花粉内代謝物質や遺伝子発現の変化を検出することは困難であった。

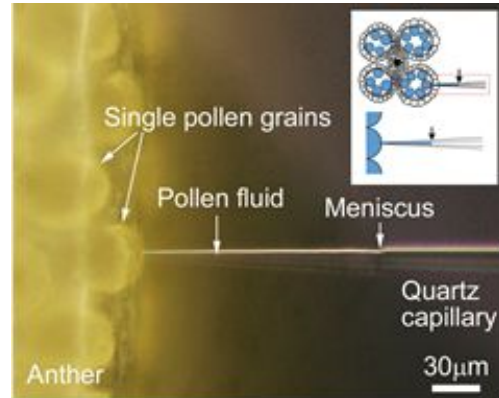


図1. イネ葯中の1花粉を対象にしたリアルタイムオミクス計測時の写真  
写真は葯中にセルプレッシャープローブを挿入しているところ。(Wada et al. 2020)

研究代表者らの所属する農研機構九州沖縄農業研究センター先端的温暖化適応技術開発実験施設内には、世界初となる閉鎖型人工気象室に隣接したピコリットルプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化質量分析装置が整備され、環境条件を変えずに生育する植物の1細胞レベルから水分状態・代謝産物をリアルタイムに分析できる。本システムを使用して、平成27年度科研費挑戦的萌芽研究採択課題「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」において葯の気孔と飽差に注目し、葯・花糸組織の1表皮細胞を対象に水分状態・代謝物質を分析した。これまでに成長中の籾の一部を剥離し、葯壁越しに、セルプレッシャープローブのキャピラリー先端を1花粉に挿入することにより、1花粉中から採取した溶液を対象に代謝産物解析が可能であることを確認した(図1)。更に、高温(34/28)で処理した花粉中にはショ糖やプロリンおよびその結合体が高濃度に存在していることが示唆される予備的データを得た。本研究ではピコリットルプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化質量分析法を駆使し、高温処理中の1花粉内で起こる代謝変化の解析と花粉を対象に行うマイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を融合した斬新なリアルタイムオミクス解析により、花粉が高温時に受精機能を維持させるメカニズムを明らかにする。

### 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、水稲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い。本研究では、高温下における花粉の受精能力の維持に注目し、花粉内の代謝物質と遺伝子発現を融合させたリアルタイムオミクス解析により、関与する代謝経路や遺伝子を明らかにして、高温不稔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)植物材料

人工気象室内で26(昼)/22(夜)条件で栽培した耐性品種N22と感受性品種コシヒカリを使用し、出穂後34(昼)/28(夜)(対照区26/22)で3日間高温処理を行った。

#### (2)メタボローム解析

出穂期高温処理2日目の開花直前の穎花を丁寧に部分剥離した後、成長中の状態で1花粉粒にプレッシャープローブを挿入し、ピコリットルレベルの花粉内溶液を採取した直後、これを水で希釈し、直ちにオービトラップ質量分析計(LC-MS/MS)(Q-Exact ive, Thermo)に導入して1花粉液の全代謝物質をリアルタイムに解析した。

#### (3)マイクロアレイ解析

(1)で栽培した日本晴、N22、コシヒカリを出穂後、高温処理し(または常温処理)、その直後の1個体由来の開花直前の約30穎花から花粉を採取し、Nucleospin RNA XS(Macherey-Nagel) RNA抽出キットを用い、RNAを単離した。Cy3ラベルしたcRNA950ng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) 遺伝子組換え体の作出

マイクロアレイ解析の結果から、高温で遺伝子発現が顕著に変動した遺伝子について、花粉特異的プロモーター(Ribosomal protein S4)に目的遺伝子の cDNA 配列を過剰発現(OX)と発現抑制(RNAi)となるように接続した植物導入用プラスミドベクターを構築し、イネ(日本晴)カルスにアグロバクテリウム法により感染させ、選抜培養により目的の組換え体を作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) 花粉粒の代謝物質の品種間差異

ピコリットルプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化質量分析法により、1花粉粒から107の代謝物質を検出することが出来た。耐性品種 N22 は感受性品種コシヒカリと比較してコハク酸、ペントース、ヘキソース、プロリンおよびその結合体([Proline+Hex-H]<sup>-</sup>、[Proline+Hex2-H]<sup>-</sup>)、グルタチオン、AMP、グリセロール 3 リン酸、ホスファチジルイノシトール、PI(C34:3)、ホスファチジルエタノールアミン、PE(C34:3)、ホスファチジン酸、PA(C34:3)、さらに、殆どの脂肪酸についても高いシグナル強度で検出された(図2)。高温下で分析をすると、代謝産物の高温応答に品種間差が認められた。両品種とも高温下で PA(C34:3)は低下したものの、PI(C34:3)、PE(C34:3)については、N22において高いシグナル強度で検出された。これに対し、コシヒカリでは高温下で PI(C34:3)、PE(C34:3)のシグナル強度は低下した。PE(C36:6)、PI(C36:6)、PE(C36:6)については、シグナル強度はC34:3に比べて低かった。両品種とも高温で殆どの脂肪酸に増加傾向が認められた(図3)。MS/MS解析の結果、PI(C34:3)の組成についてはパルミトリン酸C16:0とリノレン酸C18:3からなることが判明した。さらに、高温下のコシヒカリではシステイン、セリン、スレオニンのシグナル強度の増加傾向が認められた(図3)。

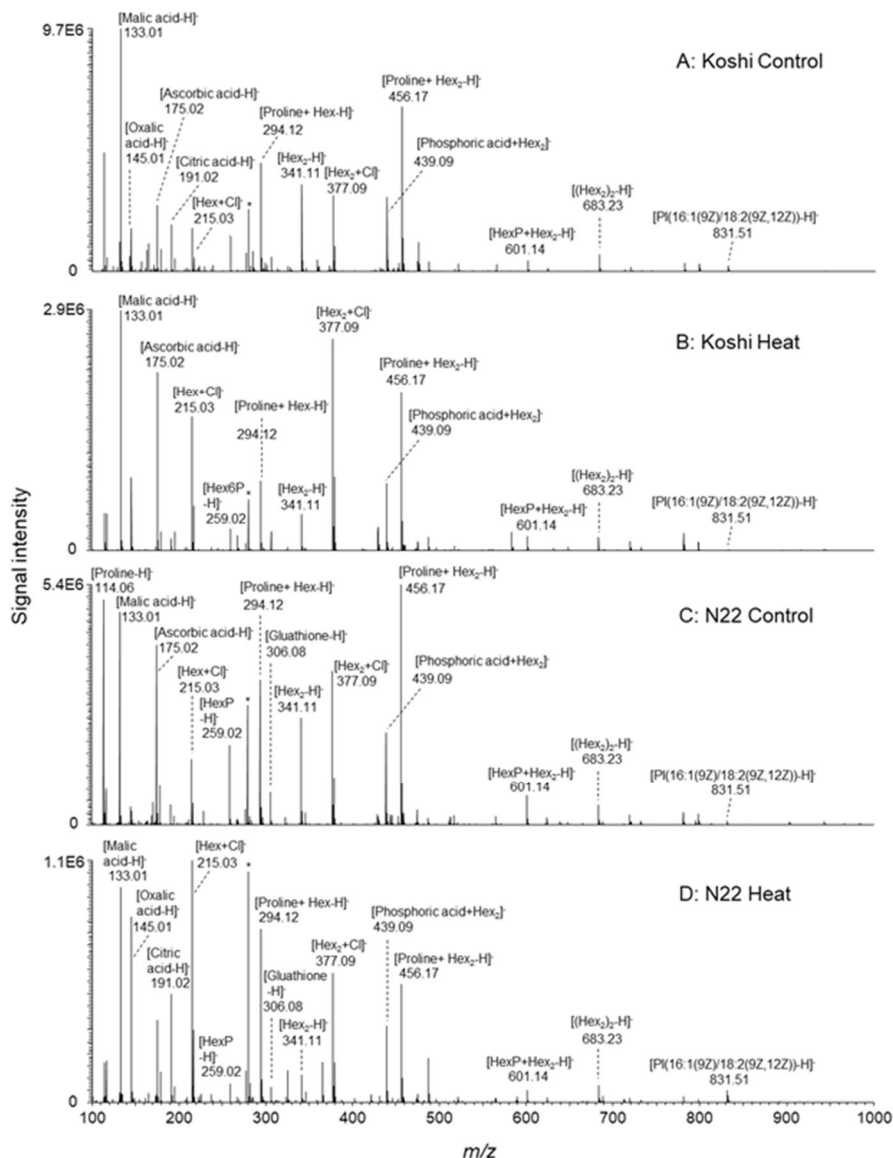


図2. ピコリットルプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化質量分析による代謝物質の検出  
A. コシヒカリ対照, B. コシヒカリ高温処理, C. N22 対照, D. N22 高温処理 (Wada et al. 2020)

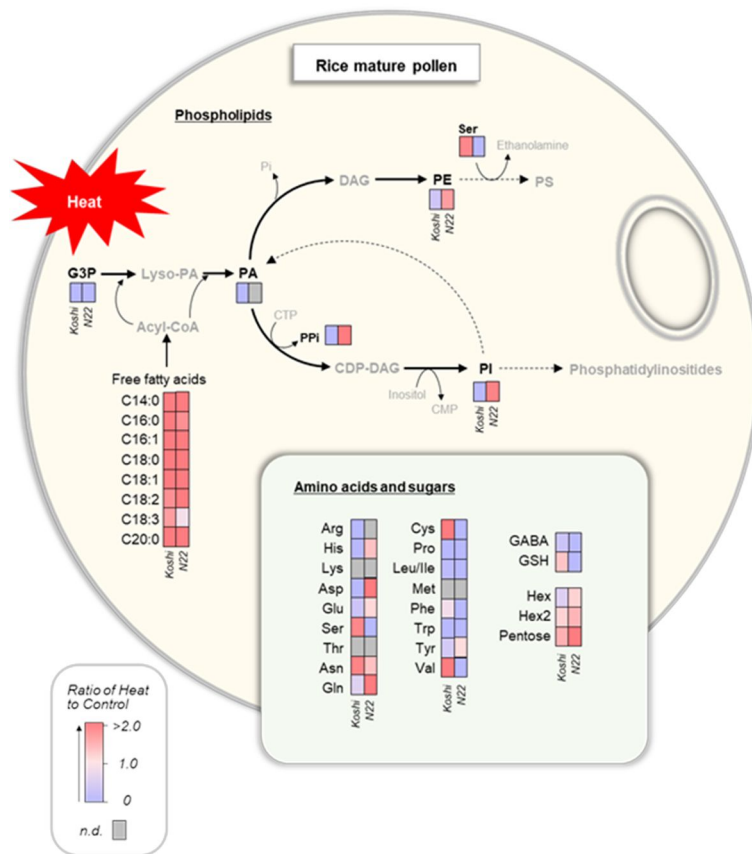


図3. 高温下の花粉内におけるホスファチジルイノシトール代謝 (Wada et al. 2020)

## (2) 花粉内で高温に応答する遺伝子と遺伝子組換えイネの稔実

花粉の遺伝子発現解析については、マイクロアレイ解析により高温下の花粉内で起こるイネ遺伝子の発現変動が認められた。そして、高温不稔への関与が想定される発現が大きく変動した複数の遺伝子を選別した(表1)。その後、各遺伝子を過剰発現および発現抑制する遺伝子組換え体を作成し、稔実率を計測した結果、ベクターコントロール系統と比較し、脂肪分解酵素(Lipolytic enzyme)遺伝子発現抑制系統が116%、システイン合成酵素(Cysteine synthase)遺伝子高発現系統が159%、FKBP12 遺伝子発現抑制系統が136%、Haloacid dehalogenase-like 遺伝子高発現系統が117%、顆粒性澱粉合成酵素1 (Granule-bound starch synthase I) 遺伝子高発現系統が116%、Non-protein coding 配列導入系統では89%となり、Non-protein coding を除く他の5遺伝子についても稔実への関与が示唆された。

表1. マイクロアレイ解析結果

発現変動遺伝子	遺伝子発現量(倍)
FKBP12	17.6 ***
Cysteine synthase	15.4 **
Haloacid dehalogenase-like protein	0.04 **
Non-protein coding	0.10 **
Lipolytic enzyme	0.14 ***
Lipolytic enzyme	0.34 **
Granule-bound starch synthase I	0.34 **

遺伝子発現量は日本晴における対照の発現量に対する高温処理の発現量の割合を示す。

\*\* :  $p < 0.01$ ; \*\*\* :  $p < 0.001$

以上、一連の解析結果から、雌蕊着床後の発芽・花粉管伸長を誘導するシグナル伝達に関わるホスファチジルイノシトールリン酸の基質として知られるホスファチジルイノシトール代謝及びタンパク質合成に必須なシステインの集積パターン等、高温に対する代謝変化に顕著な品種間差が見出された。脂肪分解酵素の抑制やシステイン合成酵素の高発現等の遺伝子発現解析結果はこれらを支持する結果となった。高温で発現が低下した脂肪分解酵素遺伝子は、ホスファチジルイノシトール(グリセロリン脂質)の分解に関与し、高温下でホスファチジルイノシトールの分解を抑制することで、ホスファチジルイノシトールの蓄積の低下を防いでいる可能性が強く示唆された。ホスファチジルイノシトールリン酸は花粉の極性、発芽・花粉管伸長を司るシグナルトランスダクションに関わる物質として知られている。ホスファチジルイノシトールはホスファチジルイノシトールリン酸の基質であり、本研究で開裂前の耐性品種の成熟花粉中で高温処理の有無に関わらず、多く蓄積が認められた結果から、高温下でのホスファチジルイノシトールの合成が耐性品種において高い稔実率をもたらした要因と考えられた。

本研究において、花粉内の代謝物質解析と遺伝子発現解析から、ホスファチジルイノシトール代謝の高温不稔耐性への関与を明らかにした。今後、これらの知見は耐性強化、品種開発につながることを期待出来る。

#### <引用文献>

Satake T and Yoshida S (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. 日作記 78:303-311.

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

Wang S, Wang D, Wu Q, Gao K, Wang Z and Wu Z (2015) 3D imaging of a rice pollen grain using transmission X-ray microscopy. J. of Synchrotron Rad. 22:1091-1095.

Wada H, Hatakeyama Y, Nakashima T, Nonami H, Erra-Balsells R, Hakata M, Nakata K, Hiraoka K, Onda Y, Nakano H (2020) On-site single pollen metabolomics reveals varietal differences in phosphatidylinositol synthesis under heat stress conditions in rice. Sci. Rep. 10:2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wada H, Hatakeyama Y, Nakashima T, Nonami H, Erra-Balsells R, Hakata M, Nakata K, Hiraoka K, Onda Y, Nakano H	4. 巻 10
2. 論文標題 On-site single pollen metabolomics reveals varietal differences in phosphatidylinositol synthesis under heat stress conditions in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58869-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hakata M, Wada H, Masumoto-Kubo C, Tanaka R, Sato H, Morita S	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of a new heat tolerance assay system for rice spikelet sterility	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13007-017-0185-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 羽方誠
2. 発表標題 水稻高温不稔耐性評価システムの構築と高温不稔に関する遺伝要因の解明
3. 学会等名 日本育種学会第13回九州沖縄地区談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakata M, Wada H, Masumoto-Kubo C, Tanaka R, Sato H, Morita S, Nakano H
2. 発表標題 Development of a heat tolerance assay system for rice spikelet sterility in phytotrons
3. 学会等名 The 18th Asian Agricultural Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakata M
2. 発表標題 Development of a heat tolerance assay for rice spikelet sterility in phytotrons
3. 学会等名 NARO-FFTC-MARCO Symposium 2018: Climate Smart Agriculture for the Small-Scale Farmers in the Asian and Pacific Region (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada H, Nonami H, Nakata K, Nakashima T, Hatakeyama Y, Nakano H, Onda Y, Hiraoka K, Hakata M, Morita S
2. 発表標題 Development of the on-site Live cell metabolomics performable in controlled environment
3. 学会等名 Society for Experimental Biology 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wada H, Nakashima T, Hakata M, Hatakeyama Y, Nakata K, Nonami H, Erra-Balsells R, Hiraoka K, Nakano H
2. 発表標題 Phosphoinositides in rice pollen grains associated with spikelet fertility
3. 学会等名 2017 CIGR World Workshop in Matsuyama (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田博史
2. 発表標題 制御環境下の細胞生理学的アプローチによる水稲高温障害の研究展望
3. 学会等名 日本農業気象学会2018年全国大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田博史
2. 発表標題 気候変動下における水稲の安定生産に向けて - 高温障害対策を中心とする研究開発と今後の課題 -
3. 学会等名 日本農業気象学会75周年記念大会公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田博史, 羽方誠, 中野洋, 野並浩, 森田敏
2. 発表標題 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稲高温障害研究への応用
3. 学会等名 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シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Wada H, Hakata M, Nonami H, Nakano H, Morita S
2. 発表標題 Mechanisms of foehn-induced chalky ring formation in rice: Use of the on-site cell-specific analytical method and practical applications
3. 学会等名 IRRI-JIRCAS-NARO Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wada H	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 15
3. 書名 New approaches combined with environmental control for enhancing heat-tolerant rice breeding in Japan. In: Iizumi T., Hirata R., Matsuda R. (eds) Adaptation to climate change in agriculture.	

〔産業財産権〕



〔その他〕

羽方誠, 和田博史, 増本(久保)千都, 田中良, 佐藤宏之, 森田敏, 中野洋 (2018) 水稻の開花期における高温不稔耐性を再現良く評価できるシステム, 農研機構九州沖縄農業研究センター2017年研究成果情報  
[www.naro.affrc.go.jp/karc/prefectural\\_results/files/29\\_1\\_11.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/karc/prefectural_results/files/29_1_11.pdf)

Wada H (2019) New approaches combined with environmental control for promoting heat tolerant rice breeding. ViPS seminar, Helsinki University, August 28, 2019

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 博史  (Wada Hiroshi)  (40533146)	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・上級研究員    (82111)	