

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248005

研究課題名(和文)非破壊水分状態計測とメタボローム解析の融合による水稻多収の細胞生理要因の解明

研究課題名(英文)Environmental physiology of high-yielding rice cultivars characterized by cell metabolomics and water relations

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・水田作研究領域・首席研究員

研究者番号：40391453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本型とインド型の多収品種の収量構成要素、乾物生産、光合成を比較解析するとともに、新たに考案した動的なメタボローム解析手法(炭素安定同位体解析とオービトラップ質量分析法とを組み合わせたブドウ糖のアイソトピック比の解析)により、茎の澱粉動態の品種間差を解析した。その結果、インド型品種の北陸193号が出穂後に茎から穂へ炭水化物が速やかに転流するのに対して、日本型品種モミロマンでは、出穂後も茎内の澱粉集積が継続しており、出穂後も茎がシンクとして機能していることが強く示唆された。以上のことから日本型多収品種では、茎での炭水化物の子実への分配遅れが収量制限要因になっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new prefixed ^{13}C tracer analysis by combining a mass spectrometry with ^{13}C tracer analysis, together with a partial enzyme degradation method. This method has been applied to the high-yielding rice to study the subspecies difference on carbon transport in the stems of Japonica- and Indica-dominant high-yielding rice cultivars (Momiroman and Hokuriku 193, respectively) developing in field condition. The data showed that there was a clear difference on starch accumulation/degradation durations functioning in the stems as sink among two cultivars. It has been suggested that starch breakdown in Momiroman occur much later than Hokuriku 193, consistent with the observed patterns of non-structural carbohydrate in the stems. We therefore conclude that the observed yield difference among two subspecies might be attributed to the functional and temporal difference of carbohydrate metabolism in stems.

研究分野：作物学

キーワード：食用作物 デンプン代謝 NSC 質量分析 細胞生理

1. 研究開始当初の背景

気候変動の増大に伴い、全国的に水稲収量の不安定化が深刻化していることから、気候変動に連動した高温や高温乾燥風などの環境ストレス下における国内向け食用米である日本型品種の多収化が求められている。

2. 研究の目的

高温耐性品種や多収品種では、穂揃期に茎(葉鞘・稈)内に蓄積する非構造的炭水化物(NSC)量が大きく蓄積されており、NSCが高温等の不良環境下では子実成長の炭素源として利用されることが知られている。また、近年、インド型多収品種では出穂直後から茎内NSCが減少し玄米生長に利用されるのに対して、日本型多収品種では、出穂後1週間を経て茎内NSCが減少し始めることが報告されている。これらの報告を踏まえ、良食味性をもつ日本型品種の不良環境条件下での登熟向上に関して、主に茎における炭水化物分配について、また、日本型品種において発育停止初発生率の高い弱勢穎果(後述)の登熟不良のメカニズムを明らかにすべく、炭素安定同位体を用いたメタボローム解析により、育種的、あるいは栽培的な改善方向を提言する。

3. 研究の方法

(1) 不良環境条件下における転流能力について：ポット稲(日本型品種、コシヒカリ)を供試し、登熟中期に高温乾燥風の不良環境条件を付与した時の、茎から子実への炭素分配を解析した。その中で、炭素安定同位体とオービトラップ質量分析計を組み合わせ、 ^{13}C 標識した稲体において、 ^{13}C グルコースの ^{12}C グルコースに対する比率(アイソトピック比)をオービトラップ質量分析法で計測する分子トレーサー法を新たに考案した。この手法を用いて低水ポテンシャル条件下における子実の澱粉代謝(主に、澱粉分解)について、経時的にアイソトピック比を追跡する動的な解析を行った。

(2) インド型品種(北陸193号)と日本型品種(モミロマン)を圃場で栽培し、移植日

を調節することで出穂日を揃えた。穂揃期・成熟期の乾物生産量、収量を調査し、モミロマンにおける登熟不良要因を解析した。

(3) 茎の炭水化物の集積・分配に関する品種間差の解析：圃場および人工気象室条件下でインド型(「北陸193号」)・日本型(「モミロマン」)多収品種を栽培した。日本型品種特有の出穂後のNSCパターン、即ち、日本型品種の茎から子実へのNSCの集積・分配の遅れが報告されている。この既往の成果に基づくと、茎からの炭水化物の分配の遅れは、出穂後も比較的長期間に渡って茎がシンクとして機能し続けている可能性を示唆している。そこで、この仮説を検証するため、NSC測定、器官レベルの炭素安定同位体実験とともに(1)の分子トレーサー法を応用し、次に述べるように圃場レベルで動的に解析した。

圃場で栽培した北陸193号・モミロマンにおいて、出穂前10日目(第3節間への同化産物蓄積が活発化する時期)に第2葉に炭素安定同位体を標識・同化させた。同化された ^{13}C が第3節間にNSCの形で蓄積したと想定し、出穂6日目(北陸193号でNSC含量が低下するが、モミロマンでは蓄積が続いている時期)と、出穂16日目(モミロマンでNSC含量が低下し始める時期)の2タイミングで第3節間(同化産物蓄積が最も多い茎)を抽出し、節間から抽出した澱粉画分を42分間にわたって α -グルコシダーゼで部分分解することで澱粉表面からグルコースを遊離させた。42分間中、1分25秒毎に反応溶液を計30画分回収し、各画分中に遊離された ^{13}C 標識されたグルコースのアイソトピック比を計測した。

(4) シンク能力の解析：穂培養法を用い、弱勢穎果の子実成長解析を行うとともに、成長する玄米における胚乳細胞を対象にプレッシャープローブエレクトロスプレーイオン化法により代謝産物解析を行った。

4. 研究成果

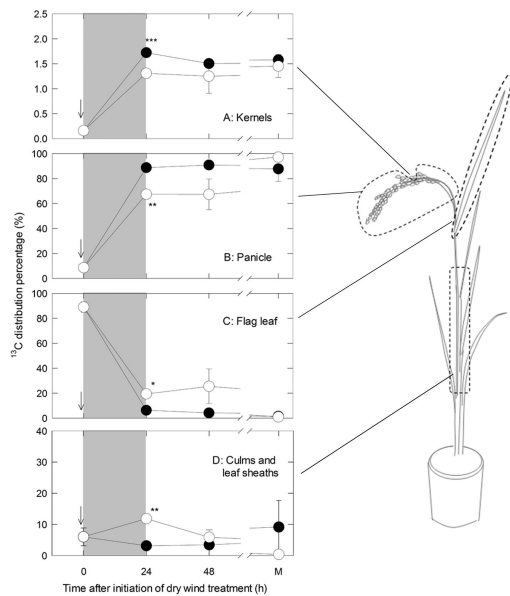


図 1. 高温乾燥風処理中の穂 (A), 成長中の弱勢穎果の玄米 (B), 止葉 (C), 葉鞘・稈 (D) における ^{13}C の分配率を示す。

(1) 高温乾燥風処理中, 稲体の水分状態は大幅に低下し, 光合成も低下していたものの, 炭素安定同位体試験結果から, 高温乾燥ストレス時に葉鞘・稈では ^{13}C の分配率が低下し, 穂・成長中の弱勢穎果では分配率が上昇した (図 1)。動的なトレーサー解析から, 少なくとも 24 時間の高温乾燥風処理では玄米で澱粉分解が有意に起こらなかった (表 1) ことから, 比較的軽度の水ストレス下条件下では浸透調節が発現, 一時的に茎からの転流が上昇し, 穂・玄米への糖流入が促進され, 転流された糖は子実の成長に貢献することが示された。

(2) 2012 年 (平温年), 2013 年 (高温年), 2014 年 (低温年) の 3 年, いずれの年も供試 2 品種の出穂日を ± 1 日以内に揃えた上で品種間差を解析した。モミロマンでは, 全粒数と精玄米千粒重の積で表されるシンク容量が北陸 193 号のそれと比べると高かったものの, 2014 年を除き, 精玄米収量は北陸 193 号に比べ劣り, 充填率はいずれの年も北陸 193 号のそれと比べて有意に低かった。

本試験では, 穂揃期の地上部全乾物重は北陸 193 号とモミロマンの間には有意差がなかった。また, 同じ光条件下で栽培したポット稲において LI-6400 を用いた個葉レベルの光合成速度曲線にも品種間で有意差は認められなかった。以上の結果を踏まえて, 転流能力, シンク能力に注目して品種間差の解析を行った。

(3) 転流能力について

茎内非構造化炭水化物 (NSC) の動態パターン解析: 圃場・ポット稲において, 既報に類似する品種間差を確認した。即ち, 北陸 193 号では出穂前 10 日目に NSC のピークがあり, 出穂後 3 日目までに減少傾向に転じたが, モミロマンでは出穂後 7~10 日目以降に低下する傾向が確認された。

表 1. 登熟中期のポット稲に不良環境条件 (高温乾燥) を 24 h 処理した際の成長中の弱勢穎果澱粉画分中のブドウ糖分子 (^{13}C -labeled sodiated glucose) のアイソトピック比 (%). アイソトピック比は $m/z = 203$ に対する $m/z = 204$ で算出。

処理区	アイソトピック比 (%)
対照区	6.64 \pm 0.05
24h 処理	6.54 \pm 0.04
P 値	0.08

炭素安定同位体解析: ^{13}C 標識法を用いて先述の仮説を検証した。ポット稲を供試し, 出穂前 10 日目に止葉に ^{13}C 標識し, その後の器官内の ^{13}C 分布を調査した。このステージにおいて, 標識後のモミロマンの茎 (特に第 2, 第 3 節間) で ^{13}C の分配率が有意に上昇したが, 穂および強勢穎果への ^{13}C の蓄積は北陸 193 号のそれに劣っていたことから, 仮説が支持された。

トレーサー解析により, NSC の動態を明らかにすべく, 分子レベルで仮説検証した。その結果, 北陸 193 号の茎では出穂後 6 日目には累積反応時間が 27 分を過ぎてもアイソトピック比が高く保持されていたのに対し, モミロマンでは累積反応時間 27 分以上を経過すると, アイソトピック比が有意に低下した。このことは, 出穂前 10 日目~出穂後 6 日目に至る間に, 北陸 193 号では, モミロマンと比べて, 澱粉のより内層に ^{13}C 標識されたグルコースを多く合成していたことを示唆しており, 出穂後 6 日目には 2 品種間で, デンプン含量に差はあるものの, 澱粉のサイズ分布に品種間差が見られなかったことを踏まえると, 北陸 193 号では, この間澱粉合成が活発に進行していたことが示唆された。一方, 出穂後 16 日目になると, アイソトピック比に逆転現象がみられた。即ち, 北陸 193 号茎では酵素処理開始直後 12 分にかけて, モミロマン茎と比較して有意な低下が確認され

た。換言すると、出穂後 16 日目の北陸 193 号の澱粉内の ^{13}C 標識されたグルコースは澱粉の比較的外側の層に多く含まれていた。反対にモミロマンでは、澱粉の表層から内層にかけて ^{13}C 標識されたグルコースが多く含まれていた。以上から、北陸 193 号の茎では、出穂後 10 日目以降には澱粉分解が活発に進んでいたのに対し、モミロマンでは澱粉分解が何らかの理由で滞っており、少なくとも出穂後 16 日目まではシンクとして機能し続ける可能性が示唆された。

(4) シンクの能力について

穂培養実験：ポットで生育させた北陸 193 号とモミロマンにおいて出穂後 5 日目および 10 日目（モミロマンにおいて茎の NSC 含量の低下が始まっていない時期）に稈を単離し、穂首節間より下、約 11.5cm の位置で第一節間を切除し、切除した第一節間より上部を 4% ショ糖の液体培地 30mL 中に浸漬することで、玄米生長が誘導されるかを調査した。その結果、炭素源として供与した 4% のショ糖処理区において 2 品種とも顕著な穂の新鮮重、乾物重の増大が確認された。さらに、モミロマンにおける乾物重の増加は北陸 193 号と有意差がなかったことから、モミロマンの弱勢穎果でも吸水伸長・乾物集積による玄米成長の促進効果が確認された。

シンク器官におけるオンサイト細胞代謝産物解析：プレッシャープローブエレクトロスプレー法を用い、Gholipour らの手法により、成長中の弱勢穎果の胚乳細胞を対象に代謝産物解析を行った。胚乳組織で最も細胞拡大する細胞層にキャピラリーを挿入し、その細胞から採取した細胞溶液中に含まれる代謝産物を解析した。膨圧計測後、細胞溶液を採取して、質量分析計に導入すると、エンジンオイル由来のバックグランドイオンの質量電荷比域が分析対象物の質量電荷比と重なることから、バックグランドイオンを除去し、感度を向上させる必要性が生じた。

そこで、従来法である Gholipour らのデザイン（導線をキャピラリー先端の表面に設置し、キャピラリー外から印加電圧を付与するイオン化法）を改良し、i) キャピラリーホルダー内にチタン線を埋設する方式を採用することで、電圧を直接細胞溶液に印加すると

ともに、ii) イオン化効率を向上させるため、Gholipour らの用いたモリブデンイオンの混入したエンジンオイルに替え、イオン液体を採用した。そこで、シンク器官のモデルとしてトマト果実表皮に局在するトライコーム細胞を対象に、イオン化法を改良した。その結果、キャピラリー内の電気伝導度が大幅に増大し、従来法に比べてポジティブモードで 5000-162000 倍に、ネガティブモードで 4000-20000 倍まで感度向上を達成した。

以上の結果を総合すると、日本型多収品種では弱勢穎果の玄米成長阻害に起因した登熟歩合の低下が収量制限要因になっている可能性が高いことが示唆された。日本型多収品種、モミロマンの第 3 節間では出穂前に NSC 蓄積がインド型多収品種の北陸 193 号と比較して少なく、茎内の澱粉集積が緩慢に進行する可能性が示唆された。また、炭素安定同位体を用いた動的なメタボローム解析から、モミロマンの茎では出穂後も長期間に渡って茎がシンクとして機能し続けている可能性が強く示唆された。さらに、短期の水ストレス条件下では浸透調節を介して一時的に茎からの転流が上昇し、子実の成長に貢献する可能性があることも示唆された。穂培養実験からは、日本型であっても茎からの転流が開始すれば、成長する潜在能力を持つ可能性が推測された。シンク細胞の代謝解析では、プレッシャープローブエレクトロスプレー法を改良し、シンク器官の一細胞でオンサイトにかつ高感度な分析を実証した。

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）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wada H, Masumoto-Kubo C, Gholipour Y, Nonami H, Tanaka F, Erra-Balsells R, Tsutsumi K, Hiraoka K, Morita S (2014) Rice chalky ring formation caused by temporal reduction in starch biosynthesis during osmotic adjustment under foehn-induced dry wind. *PLoS ONE* 9(10): e110374. doi:10.1371/journal.pone.0110374 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

Nakashima T, Wada H, Morita S, Takemori N, Takemori A, Erra-Balsells R, Hiraoka K, Nonami H (2015) Pressure Probe Electrospray Ionization for one cell metabolite/protein analyses. The 63th Annual Conference on Mass Spectrometry in Japan, The mass Spectrometry of Science in Japan, June 17-19, Tsukuba, Japan

Nakashima T, Kasuga J, Wada H, Morita S, Erra-balsells R, Hiraoka K, Gholipour Y, Nonami H (2014) Comparative metabolite profiling of intact tomato trichomes at single-cell resolution using pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. The 62th Annual Conference on Mass Spectrometry in Japan, The mass Spectrometry of Science in Japan, May 14-16, Osaka, Japan, 1P-35.

Morita S. (2014) Improve rice productivity and quality in response to climate change in Japan. The proceeding of “Improve crop productivity response to climate change” The 2014 annual meeting of the Korean society of crop science, p8-10, April 17, Daegu, Korea.

〔図書〕(計 1 件)

和田博史 (2013) 米の外観品質・食味研究の最前線[22] フェーンによる乳白粒発生メカニズム：新たな水分状態計測手法の活用による機構解明 . 農業および園芸, 養賢堂, 88(2), 242-251

〔産業財産権〕

出願状況 (なし)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (なし)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

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・水田作研究領域・上席研究員

研究者番号 : 40391453

(2)研究分担者

野並 浩 (HIROSHI NONAMI)

国立大学法人 愛媛大学・農学部・教授
研究者番号 : 00211467

和田 博史 (WADA HIROSHI)

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・水田作研究領域・主任研究員

研究者番号 : 40533146