

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380013

研究課題名(和文)リアルタイム *in situ* 細胞計測による水稻胚乳の高温ストレス応答機構の解明研究課題名(英文) Mechanisms of chalky ring formation in rice: Determination of *in situ* cell water relations and metabolic changes in endosperm cells at osmotic adjustment

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：短期の高温乾燥風条件下では、稲体が水ストレス状態となり、浸透調節が起こると同時に、胚乳の外側組織に比べて活発に澱粉集積が起こっている胚乳の内側の細胞層において、リング状の白濁形成に先立って、澱粉合成が一時的に抑制された。しかしながら、高温乾燥風終了後、水分状態の回復に伴い、澱粉代謝も回復したため、結果的に、胚乳断面上にリング状に白濁が形成されるに至った可能性が強く示唆された。さらに、先述の遺伝子発現解析結果から、長期の高温と短期の高温乾燥風とでは白濁に至る機作が異なる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dry wind conditions during the grain-filling stage increase ring-shaped chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.) to deteriorate grain quality. The objective of this study was to understand the physiological cause(s) on chalky ring formation induced by dry wind conditions. Kernel growth was maintained even at short-term moderately low water potential by osmotic adjustment with increased assimilate input. It has been suggested that starch synthesis was partially inhibited, but with little starch degradation. In addition, this short-term dry wind was thought to be different from the response at long-term high temperature conditions. Because the events observed at low water potential preceded the packing of starch granules in cells, we concluded that reduced rates of starch biosynthesis play a central role in the events of cellular metabolism altered at osmotic adjustment in advance of chalky ring formation under short-term dry wind conditions.

研究分野：作物学

キーワード：環境ストレス 細胞生理計測 澱粉代謝

### 1. 研究開始当初の背景

気候変動に伴う登熟期の長期の高温、およびフェーンに伴った短期の高温乾燥風等の環境ストレスにより、水稻の玄米品質が低下しており、その機構解明が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、近年、全国的に発生の認められる高温乾燥風による乳白粒発生に注目した。登熟中期に1日以上比較的短期間の高温乾燥風条件に晒されると稲は水ストレス条件に遭遇する。この時、転流を阻害することなく、胚乳細胞では浸透調節により玄米成長が維持されるものの、澱粉集積が一時的に阻害されることで白濁が形成され、乳白粒が発生することが明らかとなっている。しかしながら、胚乳の白濁推定領域の細胞層で白濁に先立って起こる浸透調節の発現には、澱粉分解が伴っていることも推測されるが、これまで、サイトスペシフィックにかつタイムコースには解析はなされてこなかった。そこで、環境ストレス耐性育種に有用な知見を得るべく、本研究では高温乾燥風処理中の白濁推定部位の胚乳細胞層で起こる代謝変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 人工気象室で短期の高温乾燥環境(および長期の高温環境、後述)を再現し、葉身と穂の水ポテンシャル・葉身光合成速度を計測しながら、セルプレッシャープローブ法を用いて、白濁部分の細胞層を対象に水分状態(膨圧)変化を計測した。膨圧計測は表皮から370-810ミクロンの細胞層(将来白濁化するであろう細胞層)を白濁化に先立って断続計測した。

(2) 浸透調節に関わる代謝変化について、炭素安定同位体解析と質量分析法を組み合わせたトレーサー解析法を本研究に応用することで、高温乾燥条件下で成長する玄米において一旦澱粉粒表面に取り込まれ澱粉粒表面に合成されたブドウ糖分子が分解しているかどうかを検証した。

(3) バイオプシパンチを用いて、高温乾燥風処理によって誘導される白濁化に先立って、白濁推定部位にあたる胚乳の内側組織片と外側の組織片を抽出した。これらを対象に、

定量的PCRにより、遺伝子発現を解析した。さらに、長期の高温条件下に晒したイネ玄米を採取し、澱粉分解に係る遺伝子解析を行うことによって、短期の高温乾燥風の応答と比較した。

表 1. 24, 48, 72hの高温乾燥風処理が登熟歩合、玄米一粒重、リング状乳白粒形成に及ぼす影響。

処理区	登熟歩合	玄米一粒重	玄米外観品質		
			整粒	乳白	他
	%	mg kernel <sup>-1</sup>	%	%	%
対照区	90.2	23.0a	95.0a	1.6c	3.5
24h 処理	84.1	22.5ab	82.9ab	15.3bc	1.8
48h 処理	84.2	21.8ab	69.0bc	29.4ab	1.6
72h 処理	86.8	21.2b	56.2c	41.3a	2.5

### 4. 研究成果

(1) 玄米外観品質については、高温乾燥風処理によって著しく低下した。即ち、高温乾燥風の期間が長くなるにつれ、リング状乳白粒が増大し、整粒歩合が低下した。24時間でも等級を1以上下げ得る品質低下が確認されたことから、出穂後13日目の稲に24時間の高温乾燥風処理を行い、生理解析を行った。

(2) 高温乾燥風の処理期間中、稲体(止葉・穂)は一時的な水分状態低下が起き、また、光合成も低下していたが、粒重には影響は認められなかった(図1, 図2)。また、穂の水分状態は乾燥風処理後6時間目までには-0.6MPaまで低下しており、水分状態は処理終了後翌日までに対照区のレベルまで完全に回復が見られたことから、一時的なストレスが付与されていたことが示唆された。

(3) 高温乾燥風処理時も玄米は成長し(図1)、白濁推定領域の細胞膨圧は一定に維持されていた(図2C)ものの、間接的に求めた浸透ポテンシャル値(図2D)から判断すると、細胞内の浸透圧が有意に高まり、浸透調節を発現させていたことが強く示唆された。また、この時、葉鞘・稈からの転流が促進され、穂・成長中の玄米においては<sup>13</sup>Cの分配率が上昇した。

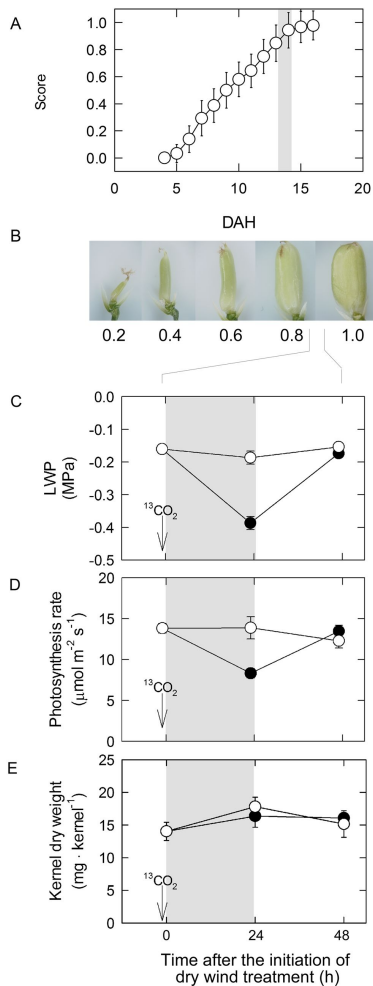


図1. 玄米の成長スコアの変化 (A). 玄米成長度合いとスコアの関係 (B). 高温乾燥風処理中の止葉の水ポテンシャル (C), 光合成速度 (D), 玄米乾物重 (E) の推移. 灰色部分は高温乾燥風処理を示す.

(4) 炭素安定同位体試験から少なくとも 24 時間にわたる高温乾燥風処理中に澱粉分解は有意に起こっていない可能性が示唆された.

(5) 澱粉分解に関与する  $\alpha$ -アミラーゼ,  $\beta$ -アミラーゼ活性をコードする遺伝子の発現解析の結果からも, 澱粉分解が起こっていない可能性が示唆された (図 3). しかしながら, 解析を行った澱粉合成系に関与する大半の遺伝子発現は高温乾燥風条件下で 24 時間目までにダウンレギュレートされていることが明らかとなった (図 3). また, 電子顕微鏡解析の結果からも澱粉粒の発達が悪化していた可能性が支持された.

(6) さらに, 48 時間の高温乾燥風処理を対象に, 将来白濁化する胚乳の内側の細胞層の遺伝子発現を経時的に解析したところ, 高温乾燥風による一時的な水分状態の低下に呼応

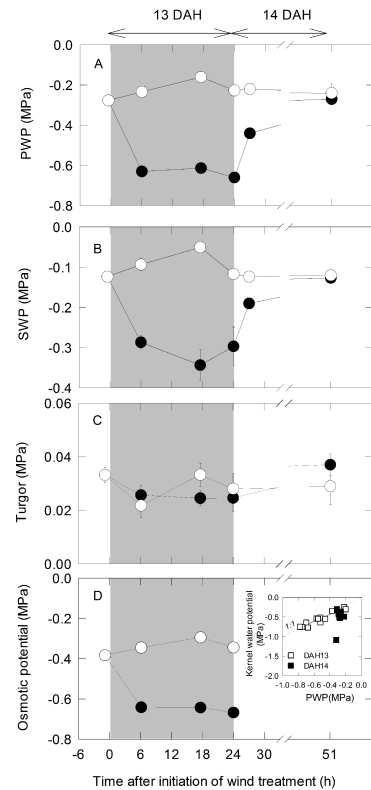


図2. 高温乾燥風処理中の穂 (A), 茎の水ポテンシャル (B), 胚乳細胞膨圧 (C), 間接的に算出した浸透ポテンシャル (D) の推移を示す. 図 D 中の挿入図は穂の水ポテンシャルに対してプロットした玄米の水ポテンシャル. 出穂後 13 日における相関を示す.

して, 澱粉分解に関与する多くの遺伝子の発現は, 処理後すぐに減少し, 24 時間の時点で最低値となり, 処理終了後 4 時間以内に回復する傾向が認められ, 翌日には対照区レベルまで完全に回復した. 澱粉合成酵素 (*SS1*, *SS3a*), ショ糖合成酵素 (*SuSy2*) の遺伝子発現については処理直後 6 時間の間に過渡的な上昇が認められた. 澱粉合成に関与するアミロプラスト局在の酵素遺伝子群 (*AGPL1*, *SS2a*, *BE1*, *ISA1*, *PUL*) の発現は, 細胞質局在の ADP-グルコースピロホスホリラーゼをコードする遺伝子 (*AGPS2b*, *AGPL2*) の発現と比べて, 気温上昇+水分状態変化に対する反応が速い傾向も確認された.

一方, 透明化した玄米の外側の組織でも, 澱粉合成に関与する遺伝子の発現は, 高温乾燥条件下で同様に抑制された. 胚乳細胞へのショ糖輸送に関わるトランスポーターをコードする遺伝子 (*SUT1*) や, 澱粉合成の基質 ADP-グルコースをアミロプラストに輸送するトランスポーターをコードする遺伝子 (*BTI-2*) の発現については, 外側の組織と比

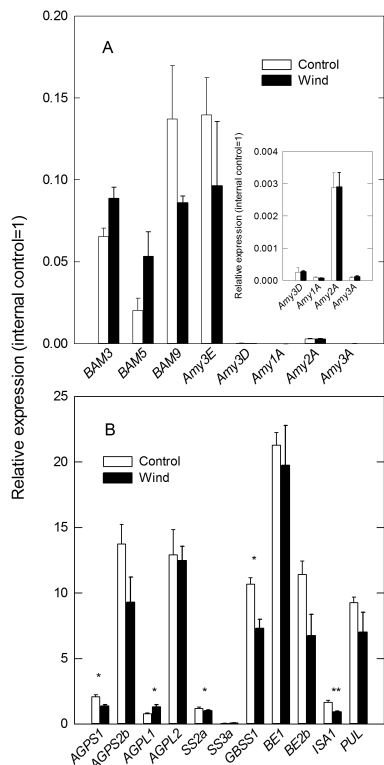


図 3 . 高温乾燥風処理後 24 時間の $\alpha$ -アミラーゼを含むデンプン分解 ( A )・澱粉合成 ( B )代謝にかかわる遺伝子発現を示す .Amy1A:  $\alpha$ -アミラーゼ 1A, Amy2A:  $\alpha$ -アミラーゼ 2A, Amy3A:  $\alpha$ -アミラーゼ 3A, Amy3D:  $\alpha$ -アミラーゼ 3D, Amy3E:  $\alpha$ -アミラーゼ 3E, BAM3:  $\alpha$ -アミラーゼ 3, BAM5:  $\alpha$ -アミラーゼ 5, BAM9:  $\alpha$ -アミラーゼ 9, AGPS1: ADP-グルコースピロホスホリラーゼ スモールサブユニット 1, AGPS2a: ADP-グルコースピロホスホリラーゼ スモールサブユニット 2a, AGPS2b: ADP-グルコースピロホスホリラーゼ スモールサブユニット 2b, AGPL1: ADP-グルコースピロホスホリラーゼ ラージサブユニット 1, AGPL2: ADP-グルコースピロホスホリラーゼ ラージサブユニット 2, SS3a: デンプン合成酵素 IIa, SS3b: デンプン合成酵素 IIIa, GBSS1: 澱粉粒結合性デンプン合成酵素 1, BE1: 澱粉分枝酵素 1, BE2b: 澱粉分枝酵素 2b, ISA1: イソアミラーゼ 1, PUL: プルランナーゼ.

べ、玄米内側でやや強く抑制されていた。絶対定量による測定から、この時期、外側よりも内側の組織で澱粉合成に関わる遺伝子の発現量が高かったことは、内側組織で澱粉集積が活発に進行していることを示唆しており、このことは、既知の澱粉集積パターンに符合する結果であった。

玄米一粒レベルでの解析結果と比較すると、白濁推定領域に限定した解析では、解析した一部 ( 6 遺伝子 ) を除いてほとんどの遺伝子の発現が水ストレス下でダウンリギュレートされるものの、発現レベルの低下程度は玄米単位で検出される発現量の約半分程度と

低かった。また、*SS3a*, *SuSy2*, *SuSy4* の 3 つの遺伝子の発現が玄米単位の分析で認められた傾向と逆転していた。胚乳の内外を分割した遺伝子発現解析から、玄米の内側組織と外側組織とで遺伝子応答に違いがあることが示唆された。なお、2 週間に及ぶ長期の高温によって発生した乳白粒において  $\alpha$ -アミラーゼの発現が増大しており、既往の成果に一致する傾向が確認された。

## 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 4 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.

森田敏 (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( 招

待講演). 慶北大学校 (大韓民国, 大邱広域市). 4月17日

Wada H, Gholipour Y, Masumoto-Kubo C, Nonami H, Tanaka F, Erra-Balsells R, Tsutsumi K, Morita S (2013) Chalky Formation in Rice Endosperms under Foehn-induced Dry Wind Condition: Relationship between Sugar Transport, Osmotic Adjustment, and Carbohydrate Metabolism. Third International Congress on Plant Vascular Meeting, July 26-30, 2013, Helsinki, Finland, P2-12: 70.

〔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

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

(2) 研究分担者

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