【解説】

イネも夏バテをする？

遺伝子レベルで明らかとなった猛暑が米の品質に及ぼす影響

山川博幹，羽方 誠

近年の温暖化によって、米の胚乳部分が白濁した乳白米が多発し、全国的に米品質の低下が問題となっている。乳白米は胚乳へのデンプンの蓄積が阻害されて生じると考えられるが、イネゲノム情報を活用した解析から、胚乳デンプンの蓄積が阻害される生理メカニズムが遺伝子レベルで明らかとなりつつある。

イネの高温登熟障害

温暖化の影響でイネの登熟期が高温となり、それに伴う玄米品質の低下が近年問題となっている。イネの登熟適温は20～25℃程度であるが、北日本を除く多くの地域において主要銘柄品種が登熟前期にそれを1～3℃上回る温度に遭遇している（図1-A）。日本稲の登熟は26℃以上の高温で阻害され、玄米品質や粒重の低下をひき起こす。特に、私たちがご飯として食べる胚乳デンプンの蓄積が阻害され、デンプン粒の隙間に空気が残り⁽¹⁾、光が乱反射するため白濁して見える乳白粒（図1-B）が多く発生する⁽²⁾。乳白粒は精米の過程で割れやすいため、それを多く含む米は等級が下がり（被害のない整粒が

70%以下となると2等米となる）、安価で取引され、また産地のイメージが低下することから、乳白粒の低減は生産者にとって喫緊の課題である。2010年は未曾有の猛暑に見舞われ、西日本を中心に1等米比率が低下し、2011年1月末時点の全国比率で61.7%となった。さらに、消費者にとっても、高温条件で登熟した米飯は粘りが少なく（図1-B）⁽³⁾、我が国では好まれない傾向がある。特に、日本酒醸造においては、高温年の酒米は蒸し上げた後に急速に硬くなるため、麹菌による糖化が進まず、酒生産効率が低いことが知られる。この原因も胚乳デンプンを構成するアミロペクチンの質的变化によりデンプンの老化が早まったためと考えられている⁽⁴⁾。

イネはアジア地域を中心に主要な穀類作物で、ゲノムサイズが比較的小さいため、モデル作物となっており、我が国もそのゲノム解析に大いに貢献している。近年のゲノム解析の進展によって、イネの生理反応を包括的に理解することが可能となりつつある。すなわち、3万個程度存在する遺伝子の発現を同時に解析できるマイクロアレイや様々な遺伝子の機能が失われた変異系統など、豊富な遺伝解析材料が利用可能となっている。筆者らのグループでは、これらのイネゲノムツールを活用しながら、登熟期の高温が米の品質を低下させる要因について、遺伝子レベルでの解析を行なっている。本稿では、

Rice Grain Quality Impaired by High Temperature
Hiromoto YAMAKAWA, Makoto HAKATA, (独)農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター北陸研究センター

図1 ■ イネの高温登熟障害

(A) 主要品種の出穂後20日間の平均気温. (B) イネの高温登熟障害. 高温登熟によって生じる乳白部位では、デンプン粒の充実が不足して空隙に空間が残り、光が乱反射するため白濁して見える。高温登熟米では、アミロペクチンの側鎖伸長によって冷飯の硬化が早まる。

高温登熟障害が発生する生理メカニズムについて、近年明らかとなった知見を述べる。

乳白粒の発生—デンプンの蓄積量の不足

登熟温度の上昇に伴い発生が増加する乳白粒は、胚乳に蓄積されるデンプン粒の形態変化を伴う。常温で登熟した透明な整粒では、胚乳デンプン粒は隣接する粒どうしが密着し多角形の複粒構造をなすが、高温で発生する乳白粒の白濁部分では、デンプン粒の発達が不十分で隙間に空間が残り、球形の単粒構造をとる(図1-B)。これは、デンプンの蓄積が阻害されていると考えられるため、高温がデンプン合成に及ぼす影響が調べられた。米の60～70%を占めるデンプンはグルコースが連結した高分子炭水化物であるが、主に直鎖からなるアミロースと枝分かれ構造を含むアミロペクチンで構成される。登熟期の高温によって、アミロースの合成を担うデンプン粒結合型デンプン合成酵素(granule-bound starch synthase, GBSS)およびアミロペクチンの枝分かれをつくるデンプン分枝酵素(branching enzyme, BE)などのデンプン合成に関わる酵素の活性が低下し^(5,6)、実際にアミロース含量が低下し^(3,5,7)、アミロペクチンの分枝構造が変化することが明らかとなった^(3,8,9)。

1. マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

高温に対する感受性を部位別、登熟時期別に調べたところ、デンプンを盛んに合成している登熟前半の乳熟期の穂が高温に曝されたときに乳白粒が多く発生することが明らかとなったので^(10,11)、この時期の登熟途中の米粒において高温が全遺伝子の発現に及ぼす影響について、マイクロアレイで網羅的に解析するとともに(トランスクリプトーム解析という)、いくつかの遺伝子については定量的RT-PCR法によって発現の経時的な変化が詳細に調べられた⁽³⁾。

まず、高温条件(昼温33℃/夜温28℃)では、平温条件(同25℃/20℃)と比較して種子の登熟自体が早く進行するが、それに伴って多くの遺伝子の発現のタイミングが前倒しになるだけでなく、種子に貯蔵されるデンプンおよびタンパク質の合成・代謝に関わる多くの遺伝子の発現レベルが変化した(図2)。また、熱ストレスに回答するシャペロンタンパク質や酸化還元酵素の遺伝子発現が上昇した。特徴的なこととして、デンプン粒結合型デンプン合成酵素I(GBSSI)やデンプン分枝酵素IIb(BEIIb)などのデンプン合成関連酵素、デンプン合成のための材料ADP-グルコースを産生するADP-グルコースピロホスホリラーゼ(AGPase; AGPS2b, AGPS1, AGPL2)、およびADP-グルコースをデンプン合成・蓄積の場となるアミロプラストへ運び入れる輸送体(BT1-2)

図2 ■ 高温が種子登熟代謝に及ぼす影響

高温によって阻害される酵素・ステップをコバルト色文字・点線矢印で、促進される酵素・ステップを灰色字・太矢印で示す。

の遺伝子の発現が高温条件で 50~70% 程度に低下した。これに対して、デンプンを加水分解する酵素、 α -アミラーゼ (*Amy1A*, *Amy3D*, *Amy3E*) の遺伝子の発現が高温によって 2.2~2.5 倍に上昇した。実際に、高温登熟によって発生した乳白粒の白濁部位に含まれるデンプン粒の表面には小孔が確認されており⁽¹⁾、デンプンの後発的な分解が示唆される。以上のことから、遺伝子の発現レベルでも、高温によってデンプンの合成が抑制され、分解消費が促進されることが明らかとなり、これらが合わさりデンプンの蓄積不足をひき起こしていると推察される。

2. プロテオーム解析

一方、二次元電気泳動を用いてタンパク質レベルでの網羅的解析（プロテオーム解析）も行なわれており、登熟期の高温によって、GBSSI、アレルゲン様タンパク質、タンパク質合成に関わる翻訳伸長因子が減少し、熱ショックタンパク質が増加することが示された⁽¹²⁾。熱ショックタンパク質は酵素などが熱によって変性し失活するのを防ぐと考えられている。また、玄米に蓄積される種子貯蔵タンパク質では、分子量が 13 kD のプロラミンが高温条件下で減少することが明らかとなった^(3,13)。

3. メタボローム解析

さらに、高温に曝された登熟途中米および完熟玄米について、デンプン合成の前駆物質の糖代謝関連物質の網

羅的定量解析（メタボローム解析）が行なわれた。糖代謝物質の大部分はイオン性であるため、イオン性物質の分解能に優れるキャピラリー電気泳動に質量分析計を接続した CE-MS システムを用いることによって、解糖系や TCA 回路を構成する大部分の糖リン酸および有機酸の他に、アミノ酸やヌクレオチドについても高感度にかつ再現性よく同時定量することが可能である⁽¹⁴⁾。すなわち、キャピラリーの出口が陰極となるように電圧を印加することで、酸性領域で陽イオンとなるアミノ酸を電気泳動によって分離し、TOF-MS により検出・定量し、電圧を逆転することによって、弱塩基性領域で陰イオンとなる糖リン酸、有機酸を電気泳動し TOF-MS による定量を行なう。

本システムによる分析から、高温に曝された登熟途中米および完熟玄米でスクロースやアミノ酸が増加すること、登熟途中米で高温によって糖リン酸、有機酸などの解糖系/TCA 回路構成物質が減少することが明らかとなった（図2）⁽¹⁵⁾。イネの主要な代謝経路については、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) や RiceCyc (<http://www.gamene.org/pathway/ricecyc.html>) のようなデータベースにおいて、各代謝反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の情報が公開されている。CE-MS 解析で明らかとなった代謝物質の変動と、上述のマイクロアレイ解析において明らかとなった関連代謝酵素の遺伝子の発現の変化を統合することによって、次のような代謝的な特徴が明らかとなった（図2）。

登熟期の高温によって、茎葉より転流されてくるスクロースの胚乳細胞への取り込みおよびその後の単糖への変換が阻害され（スクロース輸送体、スクロースシンターゼ、インベルターゼ遺伝子の発現が低下）、またデンプン合成が抑制される（*GBSSI*, *BEI1b*, *AGPase* などのデンプン合成関連遺伝子の発現低下）。これに対して、デンプン分解が促進される（ α -アミラーゼ遺伝子の発現が上昇）。安定同位体標識された $^{13}\text{CO}_2$ を用いた代謝フラックス解析からも、高温によって出穂後の茎葉から登熟途中穎果への同化炭素の転流が阻害され、デンプン蓄積が低下し、スクロースが蓄積することが示された⁽¹⁶⁾。 *AGPase* やスクロース輸送体遺伝子が欠損したイネではデンプン合成が著しく阻害されることから^(17,18)、これらの遺伝子の機能が登熟に必要であることが示唆される。さらに、エネルギー生産に関わる電子伝達系において、エネルギー物質 ATP の生産能力が低下する（チトクローム *c* 酸化/還元酵素、 H^+ 輸送共役 ATPase などのチトクローム呼吸鎖構成要素の遺伝子の発現低下）。実際に高温条件では、登熟途中米に含まれる ATP の量が減少することが示されている⁽¹⁹⁾。デンプンの合成は大量の ATP を必要とするので、上記の変化が複合的に作

用して、デンプンの蓄積が阻害され、乳白粒を生じると考えられる。

一方、窒素代謝については、アミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子群の発現が高温によって低下し、アミノ酸からタンパク質への合成が阻害されており、このことが高温条件で遊離アミノ酸が増加する一因と考えられる⁽¹⁵⁾。その他に、高温下では γ -アミノ酪酸 (GABA) やグルタミン酸が蓄積するが、これらは酸化還元ストレスに応答していると考えられる。高温に曝された登熟途中のヒマワリ種子において、内生 O_2 濃度の低下が報告されている⁽²⁰⁾。高温条件で登熟するイネ種子胚乳においても、無気呼吸に関与するオルタナティブオキシダーゼ (AOX) が誘導されることから、低酸素ストレスが生じていると考えられる。

4. 遺伝解析から予想される乳白粒発生遺伝子

それでは、どの遺伝子が高温登熟条件における乳白粒の発生の原因なのだろうか。これまでに行なわれた変異系統の解析や量的形質遺伝子座 (QTL) 解析などの遺伝解析の結果から、いくつかの候補遺伝子が示唆される。高温で発現が低下する種々の遺伝子のうち、デンプン合

図3 ■ 乳白粒の発生への関与が予想される遺伝子

デンプン合成関連遺伝子 (*GBSSI*, *BEI1b*), 糖代謝遺伝子 (*PPDKB*) およびデンプン分解系遺伝子 (α -アミラーゼ遺伝子) は、高温によってそれぞれ発現が低下および上昇する。これらの遺伝子の欠損変異イネおよび過剰発現組換えイネはそれぞれ乳白粒を生じることから、高温条件で引き起こされる遺伝子発現の変化が乳白粒の発生を促すと考えられる。

高温条件では、新しい枝分かれ（側鎖）をつくるデンプン分枝酵素（BE）の発現・活性が低下するが、側鎖を伸長する可溶性デンプン合成酵素（SSS）の発現・活性は比較的安定して存在するため、アミロペクチンの長鎖が相対的に増え、このことが米飯の物性に影響を及ぼしている。

図4 ■ 登熟温度によるアミロペクチン分枝構造の変化と米飯物性の関係

成に関わる *GBSSI* および *BEIIb*、糖代謝に関わるピルビン酸オルソリン酸ジキナーゼ（pyruvate orthophosphate dikinase, *PPDKB*）については、その遺伝子の機能が欠失した変異イネは、登熟温度にかかわらず胚乳が糯あるいは粉質状になった乳白粒を生じる（図3）^(21, 22)。これに対して、高温条件で発現が上昇する遺伝子のうち、デンプン分解酵素 α -アミラーゼ遺伝子（*Amy1A*, *Amy3D*）は、組換え技術を用いて米粒で強発現させると、高温に曝されなくても乳白粒となる⁽²³⁾。高温条件で起こるこれらの遺伝子の発現の変動が協調的に作用して、乳白粒の発生を促していると考えられる。しかし、*BEIIb* や *PPDKB* の機能欠損が胚乳デンプン粒の形態変化をひき起こし乳白粒を生じる分子メカニズムについては不明であり、形態・分子レベルを統合した解析が今後望まれる。また、乳白粒の発生程度にはイネの品種間で明確な違いがあるが、その違いを決めているゲノム染色体領域を明らかにする QTL 解析が行なわれており、実際に *GBSSI*, *BEIIb*, *PPDKB*, *Amy3D* をそれぞれ含む領域に、乳白粒の発生程度を決める QTL が存在することが明らかとなっている⁽²⁴⁾。

米飯の硬化—デンプンの質的变化

高温条件で登熟した米は、炊飯後に硬くなるのが早いことが知られている。炊飯後しばらく放冷した冷飯の硬さは、デンプンを構成する、枝分かれ構造をもつアミロペクチンの枝（側鎖という）の長さに関係がある。すなわち、短い枝（短鎖）が少なく長い枝（長鎖）が多いアミロペクチンからなる米は、デンプンの糊化温度が高く老化が早く⁽²⁵⁾、冷飯が硬くなる⁽²⁶⁾。高温で登熟した米に

含まれるアミロペクチンは長鎖が多く^(3, 8, 9)、筆者らの解析でも、登熟温度を昼温 25℃/夜温 20℃ から 33℃/28℃ へ上昇させることによって、グルコースの重合個数（DP）が 21 以上の長鎖の割合が増加し、DP10～19 の短鎖が減少する（図4）。このことが米飯硬化による食味の低下をひき起こす要因と考えられる。

アミロペクチンの側鎖の構造は、新しい側鎖をつくるデンプン分枝酵素（BE）の働きと、つくられた側鎖を伸長する可溶性デンプン合成酵素（SS）の働きのバランスによって決定される⁽²⁷⁾。登熟期の高温によって、BE 遺伝子、特に短鎖をつくるタイプの *BEIIb* の発現が顕著に低下するが、側鎖の伸長を担う SS 遺伝子（*SSI*, *SSIIa*, *SSIIIa*）の発現は登熟温度による影響を比較的受けにくい（図4）。また、*BEIIb* は反応至適温度が低く、30℃ 以上の高温領域で活性が半減する^(28, 29)。このことから、高温で *BEIIb* 機能が低下すると思われる。このため、相対的に長鎖の多いアミロペクチンになると考えられる。実際に、*BEIIb* 遺伝子の機能を欠失する変異イネの玄米は、DP>19 の長鎖に富み、DP6～16 の短鎖がきわめて少ないアミロペクチンを蓄積し、糊化温度が高い⁽²¹⁾。したがって、*BEIIb* の発現の低下が、高温登熟米の飯の硬化の要因であると考えられる。

今後の展望

上述のように、イネゲノム解析の進展によって、温暖化による玄米品質の低下の生理メカニズムが遺伝子レベルで明らかとなりつつある。しかし、乳白粒の発生は茎葉からの同化産物の供給の不足によって助長されるなど、その発生生理はきわめて複雑である。メカニズムの

全貌を解明し、温暖化でも米の品質が低下しないイネを作出するためには、本研究において同定された鍵となる候補遺伝子について、各遺伝子の機能を欠失あるいは改変したイネを用いて、これまで以上に徹底的な解析が望まれている。

謝辞：本研究は、農林水産省新農業展開ゲノムプロジェクト (IPG-0020) の支援で行なわれた。

文献

- 1) S. Zakaria, T. Matsuda, S. Tajima & Y. Nitta : *Plant Prod. Sci.*, **5**, 160 (2002).
- 2) T. Tashiro & I. F. Wardlaw : *Aust. J. Agric. Res.*, **42**, 485 (1991).
- 3) H. Yamakawa, T. Hirose, M. Kuroda & T. Yamaguchi : *Plant Physiol.*, **144**, 258 (2007).
- 4) M. Okuda : *J. Brew. Soc. Jpn.*, **102**, 510 (2007).
- 5) T. Umemoto & K. Terashima : *Funct. Plant Biol.*, **29**, 1121 (2002).
- 6) H. Jiang, W. Dian & P. Wu : *Phytochemistry*, **63**, 53 (2003).
- 7) M. Asaoka, K. Okuno, K. Hara, M. Oba & H. Fuwa : *Denpun Kagaku*, **36**, 1 (1989).
- 8) M. Asaoka, K. Okuno, Y. Sugimoto, J. Kawakami & H. Fuwa : *Starch*, **36**, 189 (1984).
- 9) T. Umemoto, Y. Nakamura, H. Satoh & K. Terashima : *Starch*, **51**, 58 (1999).
- 10) K. Sato & K. Inaba : *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.*, **42**, 214 (1973).
- 11) S. Morita, H. Shiratsuchi, J. Takanashi & K. Fujita : *Jpn. J. Crop Sci.*, **73**, 77 (2004).
- 12) S. K. Lin, M. C. Chang, Y. G. Tsai & H. S. Lur : *Proteomics*, **5**, 2140 (2005).
- 13) C. J. Lin, C. Y. Li, S. K. Lin, F. H. Yang, J. J. Huang, Y. H. Liu & H. S. Lur : *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 10545 (2010).
- 14) S. Sato, T. Soga, T. Nishioka & M. Tomita : *Plant J.*, **40**, 151 (2004).
- 15) H. Yamakawa & M. Hakata : *Plant Cell Physiol.*, **51**, 795 (2010).
- 16) S. Ito *et al.* : *J. Agron. Crop Sci.*, **195**, 368 (2009).
- 17) Y. Kawagoe, A. Kubo, H. Satoh, F. Takaiwa & Y. Nakamura : *Plant J.*, **42**, 164 (2005).
- 18) G. N. Scofield, T. Hirose, J. A. Gaudron, R. T. Furbank, N. M. Upadhyaya & R. Ohsugi : *Funct. Plant Biol.*, **29**, 815 (2002).
- 19) K. C. She, H. Kusano, M. Yaeshima, T. Sasaki, H. Satoh & H. Shimada : *Plant Biotech.*, **27**, 67 (2010).
- 20) H. Rolletschek, L. Borisjuk, A. Sánchez-García, C. Gotor, L. C. Romero, J. M. Martínez-Rivas & M. Mancha : *J. Exp. Bot.*, **58**, 3171 (2007).
- 21) A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka & H. Satoh : *Plant Physiol.*, **127**, 459 (2001).
- 22) H. G. Kang, S. Park, M. Matsuoka & G. An : *Plant J.*, **42**, 901 (2005).
- 23) S. Asatsuma, C. Sawada, A. Kitajima, T. Asakura & T. Mitsui : *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 187 (2006).
- 24) H. Yamakawa, T. Ebitani & T. Terao : *Breed. Sci.*, **58**, 337 (2008).
- 25) N. Inouchi : *J. Appl. Glycosci.*, **57**, 13 (2010).
- 26) T. Umemoto, N. Aoki & T. Ebitani : *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 213 (2003).
- 27) Y. Nakamura : *Plant Cell Physiol.*, **43**, 718 (2002).
- 28) Y. Takeda, H. P. Guan & J. Preiss : *Carbohydrate Res.*, **240**, 253 (1993).
- 29) T. Ohdan, T. Sawada & Y. Nakamura : *J. Appl. Glycosci.*, **58**, 19 (2011).

プロフィール

佐藤 克明 (Katsuaki Sato) <略歴> 1996年北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了(理博)／1997年東京大学医科学研究所細胞プロセッシング寄付研究部門助手／2001年鹿児島大学医学部医動物学講座講師／2003年同大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻感染防御学講座免疫病態制御学講師／2004年(独)理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター樹状細胞機能研究チーム・チームリーダー、現在にいたる。この間、1996年カナダ The John P. Roberts 医学研究所 Autoimmunity Group ポスドク<研究テーマと抱負>樹状細胞による免疫応答制御機構の解明<趣味>読書と温泉

高野 義孝 (Yoshitaka Takano) <略歴> 1993年京都大学農学部農林生物学科卒業／1997年同大学大学院農学研究科助手／2005年同講師／2008年同准教授、現在にいたる。この間、2000～2001年米国

ノースカロライナ州立大学在外研究員。1998年農博(京都大学)<研究テーマと抱負>植物-病原糸状菌間の相互作用研究。植物と病原菌の壮絶な闘いを分子レベルで理解し、植物保護につなげたい<趣味>読書、映画鑑賞

田代 晃子 (Akiko Tashiro) <略歴> 2006年共立女子大学家政学部食物栄養学科卒業(管理栄養士)／2008年同大学大学院家政学研究科博士前期課程修了

谷米(長谷川)温子 (Atsuko Hasegawa-Tanigome) <略歴> 2004年共立女子大学家政学部食物栄養学科卒業(管理栄養士)／2006年同大学大学院家政学研究科博士前期課程修了／2009年同博士後期課程修了／同年日本大学短期大学部応用化学科助手／2010年同大学生物資源科学部食品ビジネス学科助手、現在にいたる<研究テーマと抱負>嚥下困難者用食品に関する食品

物性の研究<趣味>スポーツ観戦

土岐 精一 (Seiichi Toki) <略歴> 1983年東北大学農学部農学科卒業／1989年同大学大学院農学研究科博士課程後期3年修了(農博)／同年日本学術振興会特別研究員／1990年北海道大学理学部植物学科助手／1994年農林水産省農業生物資源研究所主任研究官／2006年(独)農業生物資源研究所遺伝子組換え技術研究ユニット長／2008年横浜市立大学木原生物学研究所植物分子育種学部門客員教授／2011年(独)農業生物資源研究所ゲノム機能改変研究ユニット長、現在にいたる。この間、1997～99年スイス Friedrich Miescher Institute 博士研究員<研究テーマと抱負>植物の分子育種技術の開発、植物のDNA修復機構の解析<趣味>スキー、釣り、散歩