

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04470

研究課題名(和文) 高CO₂環境によるイネの生育抑制の分子基盤の解明と抑制解除技術の開発研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying the growth suppression of rice plants at elevated CO₂ concentrations and development of techniques for releasing the suppression

研究代表者

徳富 光恵(宮尾光恵)(TOKUTOMI, Mitsue)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：70181980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：高CO₂環境は、器官間を移動する長距離シグナルを介して伝えられることがわかっていいる。高CO₂環境を伝達するシグナルの実体とシグナル伝達系を明らかにするため、シグナルの送り手である完全展開葉(P6葉；P0 = 葉原基分化開始)とシグナルの受け手である発達中の葉(P4葉)のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、シグナルとして機能すると予想される低分子量タンパク質とmiRNAを見いだすことができた。一方、糖の添加実験等の結果から、糖は高CO₂環境で過剰に合成された炭素栄養として高CO₂応答に必要であるが、高CO₂環境を伝達するシグナルとしては機能しない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The elevated CO₂ concentrations in the atmosphere are transmitted from leaves exposed to elevated CO₂ to other organs via a long-distance signal. To identify the signal and the signal-transduction system, transcriptomes of the signal sender (fully developed leaves; P6 stage when P0 represents the stage of leaf primordium initiation) and the signal recipient (developing leaves at the P4 stage) were compared. Results suggest some candidate molecules for the signal, namely, a low-molecular-weight protein and some miRNA species. From the effects of sugar feeding to fully developed leaves, it was found that sugars synthesized in leaves exposed to elevated CO₂ could not be the signal but acted as carbon nutrients required for responses to elevated CO₂.

研究分野：植物生理学 植物生化学

キーワード：高CO₂環境 葉の発達段階 C/Nバランス イネ

1. 研究開始当初の背景

CO₂は光合成の基質であり、植物を高CO₂環境で育成すると、生育初期は光合成と成長がともに促進される。しかし、その効果は持続せず、生育後期には光合成がダウンレギュレーションされ(葉面積当たりの窒素含量とRubisco含量が低下)、期待されるほどには植物の生産性は増大しない^{1,2}。また、イネでは個葉の葉面積が縮小することがわかっている²。光合成のダウンレギュレーションと葉面積の縮小を抑制できれば、上昇しつつある大気CO₂濃度下、イネの生産性を高められるものと期待されている。

植物の高CO₂応答は内外の多くの研究者により調べられているが、高CO₂応答の分子メカニズムに関する研究はあまり進んでいない。シロイヌナズナ、インゲン等を用いた解析で、植物の高CO₂応答は器官間を移動する長距離シグナル(long-distance signal)を介して伝えられることがわかっているが³⁻⁵、現象の記載のみでシグナルの実体は未解明のままである。

我々は、イネ(品種:日本晴)の高CO₂応答を詳細に解析し、光合成のダウンレギュレーションは高CO₂自体ではなく窒素欠乏に起因すること、窒素栄養が充分であっても、高CO₂環境では新たに展開する葉の面積が縮小することを見いだした⁶。また、発達中のP4葉とP3葉が高CO₂環境を感知し、葉面積の縮小を引き起こすことを明らかにした(図1)⁶。さらに、葉面積の縮小は短期間の高CO₂処理でも引き起こされることを見いだしており、高CO₂環境シグナルの同定とシグナル伝達系解明のための解析ターゲットと解析のタイミングは既に絞り込まれていた。

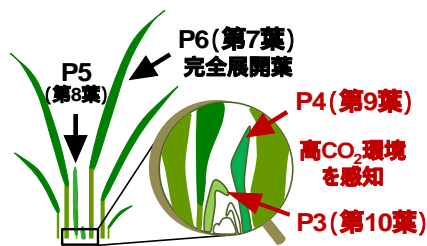


図1. 高CO₂環境を感知するイネ葉の発達ステージ⁶

第7葉が完全展開した時点で高CO₂処理を開始すると、第9葉(処理開始時点の葉の発達段階はP4)以降の葉身が短くなり、第10葉(P3)以降の葉身が狭くなる(P0 = 葉原基分化開始; P6 = 完全展開葉)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高CO₂環境によるイネの生育抑制の分子基盤を明らかにするとともに、生育抑制を解除する技術を開発し、窒素利用効率の向上と生産性増大を図ることである。本研究ではまず、高CO₂環境を伝達するシグナルの実体とシグナル伝達経路を明らかにすることを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) イネの高CO₂処理

窒素欠乏の効果を排除し高CO₂の効果のみを調べるため、窒素充分条件(0.5 g N/plant; 標準窒素量は0.3 g N/plant)で、大気CO₂濃度(400 ppm)と高CO₂濃度(1000 ppm)でイネを土耕栽培した(1/5000a ワグネルポット; 1ポット当たり4個体)。栽培は、CO₂付与装置付きグロースチャンバーで行い、明期14時間、28/23、相対湿度60~70%で栽培した。まず植物を大気CO₂濃度で栽培し、第7葉が完全展開した時点(7.0葉期)で高CO₂処理を開始した。

(2) P4葉(発達中の第9葉)の採取

ワグネルポットから地上部を切り出し、下位葉(第1葉から第6葉)を切り離したのち、第7葉を含む地上部基部(約2 cm)を採取した。採取した基部を固定液(75%エタノール、25%酢酸)に入れ、速やかに脱気し組織を溶液中に沈めた。8個体分の基部(大気CO₂処理、高CO₂処理それぞれ4個)を採取、固定液に浸漬したのち、さらに室温で20-30分間脱気し、4℃で保存した。実体顕微鏡下、固定した基部から第9葉を覆っている葉(第7葉葉鞘と展開中の第8葉)を除去し、第9葉を単離した。単離した第9葉は液体窒素で凍結したのち、-80℃で保存した。

(3) トランスクリプトーム解析

P6葉(第7葉)葉身、および、上記の方法で固定・単離したP4葉(第9葉)より全RNAを抽出し、マイクロアレイ法(Agilent Rice 44K Oligo DNA Microarray)でトランスクリプトームを解析した。低分子量RNAの解析に当たっては、Millerらの方法⁷で低分子量RNA(<200 nt)を含む全RNAを抽出し、RNAseq法(Illumina HiSeq2500)でトランスクリプトームを解析した。高CO₂で発現が大きく変動した遺伝子については、RT-qPCR法で高CO₂処理の効果を確認した。

(4) 葉身へのシグナル候補物質の添加

大気CO₂濃度下で育成したイネを用いた。完全展開した第7葉(7.0-7.2葉期)葉身を先端から5 cm程度で切断し、切断面をシグナル候補物質溶液[5 mM Mes-NaOH, (pH 6.8)を含む]に浸け、2日間溶液を吸引させた。溶液の吸引は、大気CO₂濃度下、上記グロースチャンバーあるいは屋外型グロースチャンバー(自然光条件下)で行った。

4. 研究成果

(1) タカナリの高CO₂応答の解析

インド型イネは日本型とは異なる様々な生理的性質を示すが、多収性のインド型品種であるタカナリは、日本型に比べ、葉身窒素含量が高く、生育後期においても葉身窒素含量が高いまま維持される(大気CO₂条件)⁸。また、タカナリは高CO₂環境でも葉身窒素含

量が低下しない⁹。研究開始時点では、タカナリは日本型イネとは異なる高CO₂応答を示すと予想し、日本晴とタカナリを比較することでイネの高CO₂応答に關与する遺伝子の絞り込みができると期待していた。残念ながら、窒素充足条件では、タカナリは、高CO₂処理でP4葉以降の葉身が短くなり、P3葉以降の葉身が狭くなるという、日本晴とまったく同じ応答を示すことがわかった。以下の実験は日本晴を用いて行った。

高CO₂環境を伝達するシグナルの同定とシグナル伝達経路の解析に当たって、ふたつの異なる方法で研究を進めた。すなわち、1) シグナルの送り手(活発に光合成を行う完全展開葉)とシグナルの受け手(発達中の葉)のトランスクリプトーム解析、および、2) シグナル候補物質の添加実験である。1) に関しては、シグナルの受け手はP4葉とP3葉であることがわかっている。そこでまず、解析のタイミングを決定するため、高CO₂処理時間をどこまで短縮できるか調べた。

(2) 高CO₂処理時間の短縮

高CO₂処理時間を8日間から徐々に短くしていったところ、1日間の高CO₂処理で、連続的な処理同様、葉身長の減少は第9葉で、葉身幅の減少は第10葉で観察された(図2)。イネは暗所では気孔を介したガス交換を行わない(気孔拡散伝導度はほぼゼロ)ことから、実質的に明期14時間の高CO₂処理で葉面積の縮小が引き起こされることがわかった。統計的有意差はなかったが、明期7時間の高CO₂処理でも葉身サイズの変化が認められた。

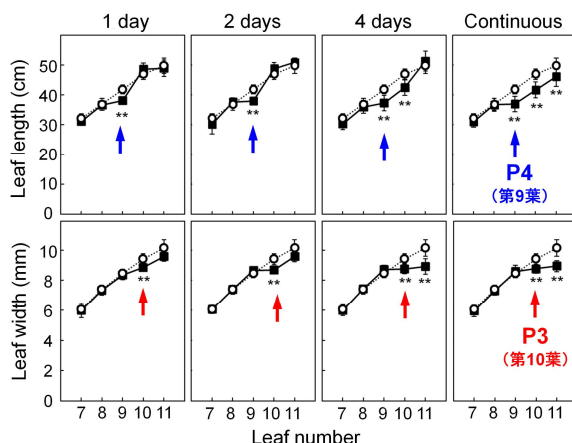


図2. 葉身長と葉身幅に対する短期間の高CO₂処理の効果

第7葉完全展開時に高CO₂処理を開始し、新たに展開した葉の葉身長と葉身幅を順次測定した。1日間、2日間、4日間、および、連続的な高CO₂処理の結果を示す。上図、葉身長；下図、葉身幅。○, 大気CO₂処理；●, 高CO₂処理。

高CO₂処理時間を短くすると、葉身長と葉身幅の減少量がともに小さくなった(図2)。

単子葉植物の葉では、基部から先端に向かって発達ステージが進んでいることから、同じP4葉、P3葉でも、特定のステージの細胞のみが高CO₂環境の影響を受けるものと考えられる。

短期間(1日間、2日間)の高CO₂処理でも、連続処理同様、9葉期以降分けつ数の増大が認められた。

(3) P6葉とP4葉のトランスクリプトーム解析
高CO₂環境を伝達するシグナルは、活発に光合成を行う葉から発達中の葉に送られると考えられる。そこで、完全展開した第7葉(P6葉)をシグナルの送り手として、単離が可能な第9葉(P4葉；高CO₂処理1日後の長さが最大20mm)をシグナルの受け手として解析することとした。明期開始前に高CO₂処理を開始し、明期7時間、明期13.5時間(明期終了30分前)にP6葉とP4葉を採取し、トランスクリプトーム解析を行った。P6葉では約500個、P4葉では約300個の遺伝子の発現が高CO₂処理で変化した[P6葉の場合 fold change (FC) が2以上あるいは0.5以下、P4葉の場合FCが1.7以上あるいは0.58以下、かつ、 $p < 0.05$ (Student's *t* test)]。

糖代謝、糖シグナリング関連遺伝子

高CO₂環境下では、光合成産物であるショ糖やデンプン等の炭水化物が葉に過剰蓄積することから、炭水化物がシグナルとして作用する可能性が考えられる。

P6葉では、高CO₂処理13.5時間後に、糖蓄積シグナルとして働くトレハロース6-リン酸の分解に關与する酵素遺伝子の発現が促進された。P4葉では逆に、これらの遺伝子の発現が抑制されること、細胞壁型インペルターゼの発現が促進されることがわかった。これらの結果は、P6葉ではデンプン合成を抑え光合成産物の転流が促されること、一方P4葉では、転流で供給されるショ糖の取り込みを増やし、デンプン合成が促進される可能性を示している。実際、高CO₂処理13.5時間後の地上部基部(P4葉を含む)では、ショ糖とデンプン含量が増大することが確認された。

また、高CO₂処理により、P4葉でのアブジン酸代謝関連酵素遺伝子の発現が低下される等、P4葉での糖蓄積を裏付ける結果が得られている。

低分子量RNA

高CO₂環境下、P4葉で発現が促進されるmiRNAを複数同定した。そのうち6種類は細胞の伸長や分化の制御に關与することが知られているが、その他は機能未知のmiRNAだった。これらのmiRNAが長距離シグナルとして機能するのか、あるいは、単にP4葉内のシグナル伝達に關与するのか検討中である。

低分子量タンパク質

高CO₂環境下、P6葉で発現が大きく促進されるが、P4葉での発現はほとんど変わらない

低分子量タンパク質遺伝子を見いだした。本タンパク質の機能発現に関与することが知られている物質を葉身に添加すると、第9葉（P4葉）と第10葉（P3葉）の葉身サイズが縮小することがわかった。このことは、本タンパク質が高CO₂環境を伝達するシグナルとして機能する可能性を示している。

(4) 葉身へのシグナル候補物質の添加実験

高CO₂環境下、光合成が活発に行われる葉で過剰蓄積する炭水化物が長距離シグナルとして機能するのか、糖の添加実験で検証した。具体的には、完全展開した第7葉葉身の先端を切断し、切断面からさまざまな溶液を吸引させ、葉身長と葉身幅が変化するか調べた。

糖の添加実験に先立って、葉身先端から吸引させた溶液がどの組織まで到達するのか、青色色素プロモフェノールブルー（BPB；0.1%）を用いて調べた。2日間BPB溶液を吸引させると、第7葉の葉身と葉鞘、地上部基部、さらに展開中の第8葉先端までBPBが移動することがわかった。地上部基部の切片の顕微鏡観察により、BPBは節網維管束を経由して展開中の第8葉に運ばれることがわかった。また、茎頂分裂組織に近い部位ではアポプラスティックに（細胞間隙を介して）BPBが移動する可能性が示された。

2日間の糖溶液の吸引で葉身長と葉身幅が減少したが、その様相は高CO₂処理と大きく異なっていた（図3）。添加した糖によって効果は異なったが、高CO₂処理とは逆に、葉身長の減少より葉身幅の減少が早く起こる傾向が認められた。また、短期間の高CO₂処理と比べ、糖添加による葉身サイズの減少量は小さいが、高CO₂処理と同程度に分げつ数が増大することがわかった。これらの結果は、糖自体が高CO₂環境の長距離シグナルとして働くのではなく、過剰な炭素栄養として

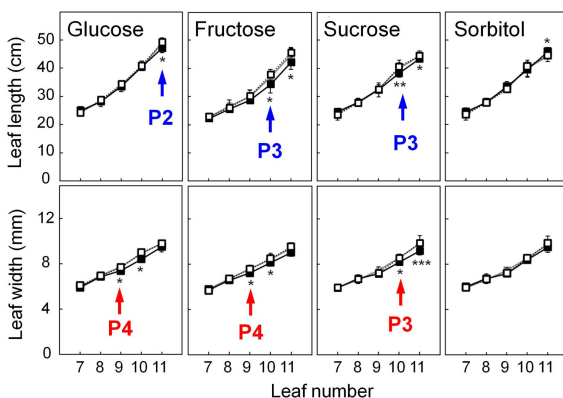


図3．葉身長と葉身幅に対する糖添加の効果
第7葉葉身先端から糖溶液を2日間吸引させたのち、新たに展開した葉の葉身長と葉身幅を順次測定した。糖溶液の濃度は5 mM。浸透圧の対照実験としてソルビトールを吸引させた。上図、葉身長；下図、葉身幅。○、対照（MESバッファーを添加）；●、糖を添加。

作用し葉身サイズの変化を引き起こす可能性を示している。

(5) 高CO₂環境を伝達するシグナルの検討

葉身に過剰蓄積した糖あるいは糖蓄積シグナルであるトレハロース 6-リン酸が、高CO₂環境を伝達するシグナルとして機能すると予想していた。しかしながら、糖の添加実験の結果から、糖は高CO₂環境下で過剰に合成された炭素栄養として葉面積の縮小を引き起こすが、高CO₂環境を伝達するシグナルのものではない可能性が示された。

一方、P6葉とP4葉のトランスクリプトーム解析から、低分子量タンパク質やmiRNAが高CO₂環境を伝達するシグナルとして機能する可能性が示された。研究期間内に検証実験を行うことはできなかったが、今後も研究を継続して行い、高CO₂環境シグナルとシグナル伝達系を明らかにしていく予定である。

引用文献

- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A. and Donald, O.R. (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 591-628
- Makino, A. and Mae, T. (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant Cell Physiol.* 40: 999-1006
- Sims, D.A., Luo, Y. and Seemann, J.R. (1998a) Importance of leaf versus whole plant CO₂ environment for photosynthetic acclimation. *Plant Cell Environ.* 21: 1189-1196
- Lake, J.A., Woodward, F.I. and Quick, W.P. (2002) Long-distance CO₂ signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 183-193
- Araya, T., Noguchi, K. and Terashima, I. (2008) Manipulation of light and CO₂ environments of the primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) affects photosynthesis in both the primary and the first trifoliolate leaves: involvement of systemic regulation. *Plant Cell Environ.* 31: 50-61
- Tsutsumi, K., Konno, M., Miyazawa, S.-I. and Miyao, M. (2014) Sites of action of elevated CO₂ on leaf development in rice: Discrimination between the effects of elevated CO₂ and nitrogen deficiency. *Plant Cell Physiol.* 55: 258-268
- Miller, D.F.B. et al. (2013) A new method for stranded whole transcriptome RNA-seq. *Methods* 63: 126-134
- Adachi, S., Nakae, T., Uchida, M., Soda, K., Takai, T., Oi, T., Yamamoto, T., Ookawa, T., Miyake, H., Yano, M. and Hirasawa, T. (2013) The mesophyll anatomy enhancing CO₂ diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 64:1061-107
- Chen, C.P., Sakai, H., Tokida, T., Usui, Y., Nakamura, H. and Hasegawa, T. (2014) Do the rich always become richer? Characterizing the

leaf physiological response of the high-yielding rice cultivar Takanari to free-air CO₂ enrichment, *Plant Cell Physiol.* 55:381-391

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4件)

Miyazawa, S.-I., Nishiguchi, M., Futamura, N., Yukawa, T., Miyao, M., Maruyama, T.M. and Kawahara, T. (2018) Low assimilation efficiency of photorespiratory ammonia in conifer leaves. *J. Plant Res.*, in press, 査読有り

<https://link.springer.com/journal/10265>

Ohashi, M., Ishiyama, K., Kojima, S., Konishi, N., Sasaki, K., Miyao, M., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2018) Outgrowth of rice tillers requires availability of glutamine in the basal portions of hoots. *Rice* 11:31 査読有り
DOI:10.1186/s12284-018-0225-2

Muramatsu, M., Suzuki, R., Yamazaki, T. and Miyao, M. (2015) Comparison of plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases from rice: Identification of two plant-specific regulatory regions of the allosteric enzyme. *Plant Cell Physiol.* 56: 468-480 査読有り
DOI:10.1093/pcp/pcu189

Fukayama, H., Masumoto, C., Taniguchi, Y., Baba-Kasai, A., Katoha, Y., Ohkawa, H. and Miyao, M. (2015) Characterization and expression analyses of two plastidic enolase genes in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79: 402-409 査読有り
DOI:10.1080/09168451.2014.980219

[学会発表](計9件)

Miyao-Tokutomi, M. (2018) Selection of rice cultivars showing different nitrogen responses from NIAS core collections and their transcriptomic comparison. 第59回日本植物生理学会年会

金容賢 (2018) イネにおけるトレハロース代謝関連遺伝子の発現に対する高CO₂の効果:成熟葉と未熟葉の比較. 第59回日本植物生理学会年会

植田佳明 (2017) 栄養素の取り込みを指標としたイネの窒素・リン飢餓応答性の品種間差の解析. 日本土壌肥料学会 2017年度仙台大会

大橋美和 (2017) サイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 を欠損したイネ変異体の分けつ減少はアスパラギンよりもグルタミンの利用可能量の減少に起因する. 第58回日本植物生理学会年会

植田佳明 (2017) イネ品種間で見られる窒素飢餓応答とリン酸飢餓応答の多様性のリン酸取り込みを指標とした評価. 第58回日本植物生理学会年会

菅野圭一 (2017) 水田で栽培したイネ品種の窒素栄養状態と葉温の相関. 第58回日本植物生理学会年会

宮尾光恵 (2016) イネ根におけるアンモニア同化:土耕と水耕の比較. 第2回植物の栄養研究会

Kim, Y. (2016) Survey of signaling molecules that transduce elevated CO₂ environments in rice plants: effects of soluble sugar addition on leaf blade size. 第57回日本植物生理学会年会

Miyazawa, S.-I. (2016) Chloroplastic glutamine synthetase (GS2), a crucial enzyme for photorespiration, is absent in needle-leaved tree species. 第57回日本植物生理学会年会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳富 光恵 (宮尾 光恵) (TOKUTOMI, Mitsue)

東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70181980

(2) 研究協力者

金 容賢 (KIM, Yonghyun)

東北大学・大学院農学研究科・研究支援者
研究者番号: なし

井上 雅恵 (今野 雅恵) (INOUE, Masae)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・博士
研究員

研究者番号: 60459732