

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18643

研究課題名(和文) イネ光合成改良に向けた光合成窒素利用効率のイネ科変異の解明

研究課題名(英文) Natural genetic variation of photosynthetic nitrogen use efficiency for rice improvement

研究代表者

安達 俊輔 (Adachi, Shunsuke)

東京農工大学・グローバルイノベーション研究院・特任助教

研究者番号：30717103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はC3植物の光合成窒素利用効率(PNUE)の自然変異ならびに生理要因の解明を目的とした。C3植物のPNUEには幅広い変異があり、中でもイネ(タカナリ)は窒素含量当たり炭酸固定速度・気孔伝導度が他の植物よりも大きく、このことが高いPNUEに関係していた。また光呼吸放出CO<sub>2</sub>の再固定程度(C\*)は、C3植物種間の差は認められず、窒素含量に強く依存していた。例外的にシロザのみ他種に比較して著しく小さいC\*を示した。以上より、イネはC3植物のなかでは高いPNUEを有する一方、シロザの持つ光呼吸に関わる性質を導入することで、一層のPNUEの向上が期待できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネやその他C3植物のPNUEの変異とその要因となる生理学的特性を解析し、改良すべき重要形質を指摘した。さらに身近な荒地雑草であるシロザが、光呼吸放出CO<sub>2</sub>を効率的に再吸収する機構を有することを本研究が初めて指摘した。本研究成果は、窒素投入量を抑制しつつ生産性を最大化できる作物の育種方針の構築に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at evaluating the genetic diversity of photosynthetic nitrogen use efficiency (PNUE) between C3 plants, and the underlying mechanisms. PNUE greatly differed among C3 plants, and rice (cv. Takanari) had the highest value, which was comparable to that of giant miscanthus, a C4 plant. The difference in PNUE was significantly affected by the difference in carboxylation efficiency (CE) and stomatal conductance (gs), but didn't affected by mesophyll conductance. Takanari rice had greater CE and gs than the other C3 plants, contributing the higher PNUE. No genetic difference in apparent CO<sub>2</sub> compensation point (C\*), a proxy of refixation rate of photorespired CO<sub>2</sub> among C3 plants, except C. album had remarkably low C\* value, suggesting C. album was placed in evolutionary stream to C4 plants. Taken together, Takanari rice has superior characteristics to enhance PNUE, while its PNUE might be able to be enhanced by introducing higher photorespired CO<sub>2</sub> refixation rate.

研究分野：作物学

キーワード：光合成 C3植物 窒素利用効率 葉肉伝導度 光呼吸 葉緑体 C4進化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネはアジアの人々の主食作物である。アジア人口増加に伴って一層の需要増加が予測されており、イネの一層の生産性向上が欠かせない。過去半世紀にわたるイネ収量の増加は、植物体の炭水化物生産能力(ソース能力)の改良ではなく、炭水化物貯蔵能力(シンク能)の増加と窒素肥料の多投入が主な要因となって達成された。しかしこの方向での改良は限界に近いと言われており、一層の収量増加にはシンク能とともにソース能を向上させることが求められる。

ソース能の最も基礎となる過程は葉の光合成である。イネの品種間には葉面積当たり光合成速度(以下光合成速度と記載する)の幅広い変異があり、その生理特性の差異も調べられている(Kanemura et al., 2007; Jahn et al., 2011)。またDNAマーカーを利用した量的形質遺伝子座(QTL)解析によってイネの光合成速度を高める原因遺伝子が複数同定されている(Takai et al. 2013; Adachi et al., 2017)。このようにイネ光合成速度に関わる生理・遺伝的要因の理解は進みつつあるか一方、“イネの光合成が他のC<sub>3</sub>イネ科作物に比べて優れているか否か”については議論がある。イネの光合成速度が他のC<sub>3</sub>一年生作物と比較して高いとされる一方(Evans 1989)、近縁種のコムギと比べると窒素含量当たりの気孔伝導度が劣ることや(Makino et al. 1988)、高バイオマス作物の*Arundo donax*がイネを大きく上回る光合成速度を示すことなども報告されている(和田ら 2013)。このようにイネの光合成の特徴について断片的な知見はあるが、複数のイネ科作物を同時に比較した研究は多くない。また近年では、CO<sub>2</sub>拡散には気孔伝導度に加え葉肉伝導度が重要な役割を果たしていること(Flexas et al., 2012; Adachi et al., 2013)、葉肉細胞における葉緑体の配置が光呼吸で放出されたCO<sub>2</sub>を再度葉緑体に固定させることに関わっており、種間差があることなど(Busch et al., 2013)、植物光合成を制御する新しい視点が報告されている。過去の光合成の比較研究の多くは窒素含量や気孔伝導度のみ着目しており、葉肉伝導度やCO<sub>2</sub>再固定の差異までを総合的に含めた例はこれまでにない。

光合成速度と葉の窒素含量との間には密接な正の相関があり、窒素施肥量の増加は光合成速度の上昇に直結する。しかし、近年のイネ生産量の世界的な増加は窒素施肥量の増加に大きく依存しており、しばしば過剰な窒素施肥によって土壌における硝酸濃度の上昇による地下水や河川の汚染が問題となっている。そのため作物の生産性向上とともに環境負荷の軽減が強く求められており、投入窒素に対する光合成の効率をいかに改良するかが課題となる。C<sub>3</sub>イネ科作物の間には葉の窒素含量あたり光合成速度すなわち光合成窒素利用効率に差異があり(Evans 1989)、これに関わる生理的要因を明らかにすることによって、窒素利用も含めたイネ光合成速度の一層の改良に向けた新たな視点を獲得できると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、イネの光合成窒素利用効率(PNUE)の向上に資するため、多様なイネ科作物種を利用して葉の窒素含量と光合成速度との関係を調査する。さらにPNUEが異なる要因について、これまで一般に注目されてきた気孔伝導度や炭酸固定効率のみならず、高精度な計測法を用いた葉肉伝導度、さらに光呼吸経路で放出されたCO<sub>2</sub>の再固定量、およびこれらに関わる葉の内部の微細構造解析を通じて、イネとその他イネ科C<sub>3</sub>植物の光合成特性の差異を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物の栽培

栽培は2015年および2016年に行った。2015年はC<sub>3</sub>イネ科植物である*Oryza sativa* (cv. Takanari), *Phalaris arundinacea*, *Arundo donax* およびC<sub>4</sub>イネ科植物である*Miscanthus x giganteus*, *Z. mays*, *Echinochloa oryzoides* を用いた。2016年はC<sub>3</sub>植物として*Chenopodium album*, *Arundo donax*, *Capsicum annuum*, *Glycine max*, *Oryza sativa* (cv. Takanari), *Oryza sativa* (cv. Koshihikari) を用いた。両年とも20Lポットに移植した植物を屋外で生育させ、施肥窒素量を4段階に変化させた実験区を設けた。施肥はHoagland水耕液およびMakino水耕液を週に2回施用した。

#### (2) ガス交換測定

葉のCO<sub>2</sub>同化速度と気孔伝導度の測定は携帯型光合成蒸散測定装置(LI-6400; LI-COR社)を用いた。同化箱内測定環境は光強度1,800 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、CO<sub>2</sub>濃度400 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、葉温28℃、飽差1.5~1.8 MPaとした。また光合成速度CO<sub>2</sub>濃度曲線の作成のため、同化箱内CO<sub>2</sub>濃度を変化させたときのCO<sub>2</sub>同化速度を評価した。葉肉伝導度の算出のため、同化箱内の空気を25mlのガラスチューブで回収し、C<sup>12</sup>/C<sup>13</sup>安定同位体比を質量分析計(Isoprime 100, Isoprime社)で測定した。計算はEvans & von Caemmerer (2013)に従って行った。

#### (3) 見かけのCO<sub>2</sub>補償点(C<sub>c</sub>)

光呼吸放出CO<sub>2</sub>の再固定量の指標であるC<sub>c</sub>はWalker et al. (2016)に従って測定した。具体的には光強度を5段階(1200, 500, 375, 250, 150 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)とし、各光段階ごとに同化箱内CO<sub>2</sub>濃度を変えて(100, 85, 75, 65, 55 μmol mol<sup>-1</sup>)CO<sub>2</sub>同化速度を測定し、直線の交点におけるCO<sub>2</sub>濃度をC<sub>c</sub>とした。

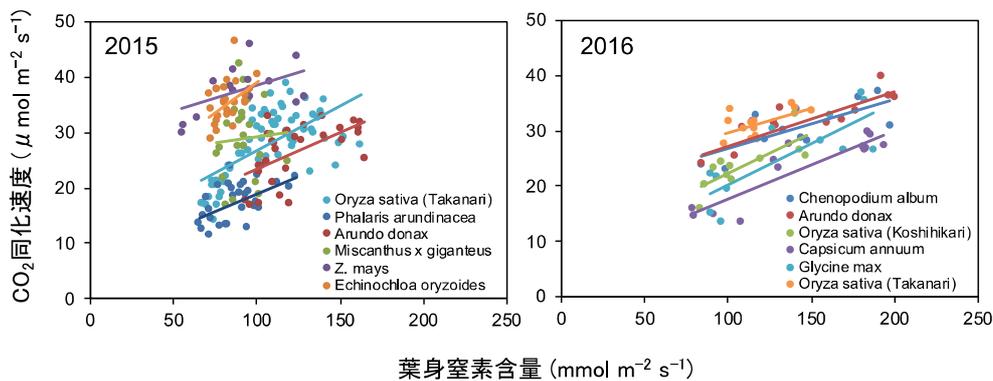
#### (4) 葉内組織の微細構造観察

光合成測定が完了した葉をグルタルアルデヒド・ホルムアルデヒド固定液で固定し、オスミウム固定および脱水の後、エポキシ樹脂 (Low Viscosity Resin, Agr Scientific) で包埋した。超薄切片作成後、電子顕微鏡観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) C<sub>3</sub> 植物の光合成窒素利用効率の変異とその要因

2015 年の試験においては、複数の C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> イネ科植物を対象に光合成速度と窒素含量との関係を解析した (第 1 図)。過去の報告同様 (Sage et al. 1987)、C<sub>4</sub> 植物は C<sub>3</sub> 植物に比較して光合成窒素利用効率 (PNUE、CO<sub>2</sub> 同化速度/葉窒素含量) が大きい傾向があった。一方で C<sub>3</sub> 植物の間でも 2 倍程度の PNUE の変異が認められた。C<sub>3</sub> 植物の中でイネ (タカナリ) は最も高い PNUE を示し、その値は C<sub>4</sub> 植物である *Miscanthus x giganteus* にも近い値となった。より多様な植物種の PNUE を比較する狙いから、2016 年試験においては C<sub>3</sub> イネ科植物に C<sub>3</sub> 双子葉植物を加えて解析を行った。ここでもイネ (タカナリ) の PNUE は他の植物に比較して最も高く、イネは多くの C<sub>3</sub> 植物種に比較して高い光合成効率を有するとして過去の報告と一致した (Evans, 1989)。

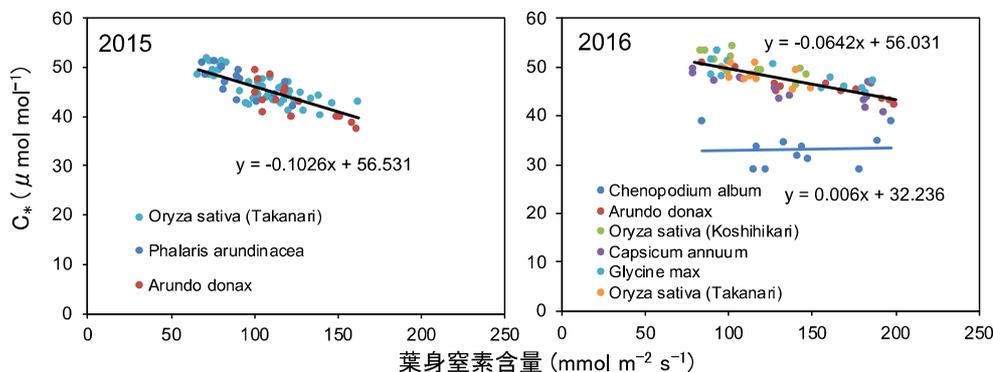


第 1 図 葉の CO<sub>2</sub> 同化速度と窒素含量との関係

次に 2016 年のデータに基づいて PNUE の差異をもたらす生理的要因の解析を行った。葉内の光合成活性の指標として炭酸固定速度 (CO<sub>2</sub> 同化速度-CO<sub>2</sub> 濃度曲線の初期勾配)、大気から葉緑体に至る CO<sub>2</sub> 拡散の指標として気孔伝導度および葉肉伝導度を測定した。重回帰分析の結果、PNUE の差異は炭酸固定速度と気孔伝導度と密接な関係が認められる一方、葉肉伝導度との有意な関係は認められなかった。またイネ (タカナリ) は他の植物に比較して窒素含量あたりの炭酸固定速度ならびに気孔伝導度が高く、このことが高い PNUE に関わるものと考えられた。一方 *C. album* はタカナリを超える窒素含量あたり気孔伝導度を示した。

光呼吸は光合成酵素 Rubisco によって大気中の O<sub>2</sub> を同化し、その代謝過程で CO<sub>2</sub> を放出するが、その一部を植物は葉緑体によって補足し、光合成に再利用する (Busch et al. 2013)。この光呼吸放出 CO<sub>2</sub> 再固定量 (C\*) と葉の窒素含量との関係を調べた (第 2 図)。その結果、両年とも C\* は葉身窒素含量と密接な負の相関を示したことに加え、*C. album* を除く全ての種の C\* データが一本の回帰直線上に位置した。また回帰直線の y 切片は 56.0~56.5 μmol mol<sup>-1</sup> となり、これは Rubisco の specificity から算出された理論的 CO<sub>2</sub> 補償点と一致していた (Busch et al. 2013)。すなわち、光呼吸放出 CO<sub>2</sub> の再固定速度は葉の窒素含量に強く依存しており、種間差は小さいと結論された。窒素含量と葉緑体サイズは密接に関わることが知られていることから、C\* の窒素依存性には葉緑体サイズが関係すると推察された。

以上の結果より、C<sub>3</sub> 植物の PNUE の変異は、主に炭酸固定速度と気孔伝導度の差異に依存していること、イネは C<sub>3</sub> 植物の中でも特に高い PNUE を有することを明らかにした。

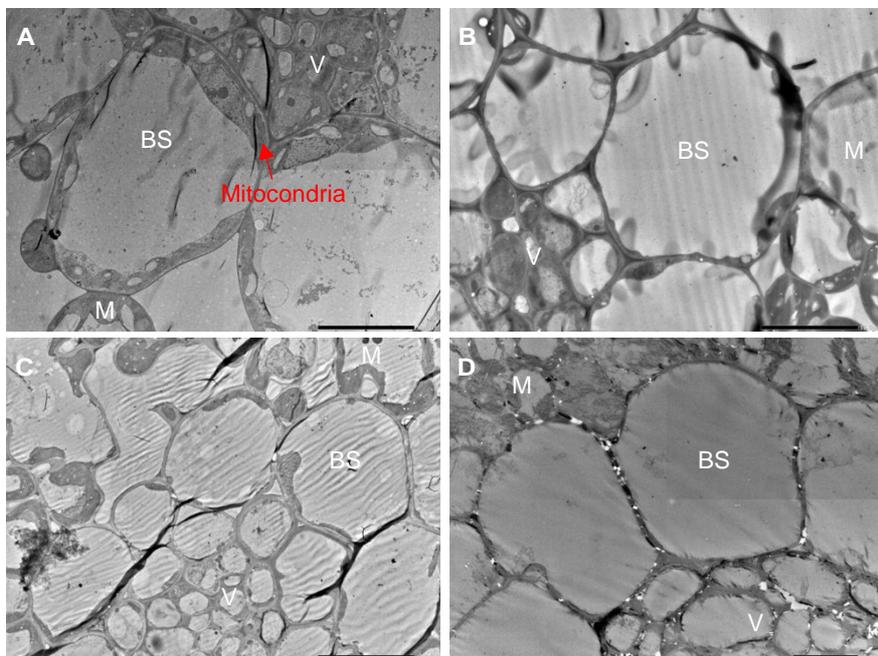


第 2 図 見かけの CO<sub>2</sub> 補償点 (C\*) と葉身窒素含量との関係

## (2) *C. album* の特性

興味深い事に、*C. album* は他の  $C_3$  植物に比較して著しく小さい  $C^*$  を示し、窒素に対する応答性も認められなかった。電子顕微鏡によって *C. album* を含む数種の植物の細胞形態を評価したところ、他の  $C_3$  植物種の維管束鞘細胞には葉緑体などの細胞内小器官がほぼ存在しないのに対し、*C. album* の維管束鞘細胞内には発達した葉緑体とミトコンドリアが認められた (第3図)。またミトコンドリアは葉肉細胞と対極である維管束側に配列していた。これらの特徴的な細胞内小器官の配置が、維管束鞘細胞内における光呼吸放出  $CO_2$  の再固定量の高さに関わっていると考えられた。このことは維管束鞘細胞内における Glycine decarboxylase complex 発現が大きい結果からも支持された。この特徴的な細胞内小器官の配置は、過去の報告では葉肉細胞から維管束鞘細胞へのグリシン輸送と維管束鞘細胞内での  $CO_2$  再固定を促進すると考えられ、 $C_3$  から  $C_4$  光合成への進化過程において生じると予測されている (Sage et al., 2013)。そのような中間的植物はこれまで *Flaveria* 属、*Alternanthera* 属などいくつかのグループで見つかり、*C. album* も  $C_3$ - $C_4$  中間種であると言える。*C. album* はこれまで広く  $C_3$  植物であると考えられてきた。すなわち身近な植物のなかにも未確認の中間的植物は数多く存在する可能性がある。

以上の結果より、*C. album* の光呼吸放出  $CO_2$  の再固定量は  $C_3$  植物を大きく上回り、 $C_3$ - $C_4$  進化の中間的特徴を有する種であると考えられた。この性質をイネ (タカナリ) に導入することで、一層の PNUE の向上が期待される。



第3図 葉内の微細構造の比較

電子顕微鏡を用いて撮影した。*C. album* (A), *G. max* (B), *O. sativa* (Takanari) (C), *A. donux* (D). BS: 維管束鞘細胞、M: 葉肉細胞、V: 維管束組織を示す。赤矢印の付近に、ミトコンドリアが帯状に多数配置されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 安達俊輔・寺崎千鶴 (2019) 「作物の光合成速度の改良を目的とする自然変異アレルの特定と利用」光合成研究 29:41-53 (査読あり)
2. Sage RF, Monson RK, Ehleringer JR, Adachi S, Pearcy RW. Some Like It Hot: The Physiological Ecology of  $C_4$  Plant Evolution. *Oecologia*, 2018, 187: 941-966. 10.1007/s00442-018-4191-6 (査読あり)
3. He W, Adachi S, Sage RF, Ookawa T, Hirasawa T. (2017) Leaf photosynthetic rate and mesophyll cell anatomy changes during ontogenesis in backcrossed *indica* × *japonica* rice inbred lines. *Photosynthetic Research* 134: 27-38. 10.1007/s11120-017-0403-x (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 中西愛・窪田光・大川泰一郎・平沢正・安達俊輔・Rowan F. Sage 葉身窒素含量が  $C_3$  植物の光呼吸放出  $CO_2$  再固定量に及ぼす影響 日本作物学会第 247 回講演会 筑波大学 2019 年 3 月 28

日-29日

2. 安達俊輔 「将来の作物における光合成・エネルギー分配の最適化」 科学技術振興機構/CRDS  
植物-農業ワークショップ高温・高CO<sub>2</sub>でも環境負荷の少ない農業を実現する基盤研究 2018/11/27
3. Shunsuke Adachi, Rowan F. Sage, Ai Nakanishi, Hikaru Kubota, Kasumi Suzuki, Tadashi Hirasawa.  
Leaf Nitrogen Effects on Refixation of Photorespired CO<sub>2</sub> in C<sub>3</sub> plants. American Society of Plant Biologist meeting 2018.
4. 安達俊輔 「自然変異を利用した光合成速度・窒素利用効率向上の展望と課題」 第9回日本光合成学会シンポジウム 光合成と窒素と作物生産 東北大学農学部 2018年5月26日
5. 安達俊輔. Rowan F. Sage. 光合成進化の理解に向けた *Flaveria linearis complex* におけるCO<sub>2</sub>補償点の遺伝的差異. 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月27日-29日
6. Ai Nakanishi, Shunsuke Adachi, Hikaru Kubota, Kasumi Suzuki, Taiichiro Ookawa, Tadashi Hirasawa, Rowan F. Sage. Nitrogen response of re-assimilation of photorespiratory CO<sub>2</sub> in C<sub>3</sub> plants. 第58回日本植物生理学会年会 2017.3. 16-18

〔図書〕(計1件)

1. Sage R. F., Adachi Shunsuke, Hirasawa Tadashi (2017) Improving photosynthesis in rice: from small steps to giant leaps. Achieving Sustainable Cultivation of Rice, Burleigh Dodds Science Publishing pp77-1077. 10.19103/AS.2016.0003.04

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：Rowan F. Sage, Tammy L. Sage, 寺島一郎

ローマ字氏名： Rowan F. Sage, Tammy L. Sage, Ichiro Terashima

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。