

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14450

研究課題名(和文) C4光合成における耐冷性機構の探索 熱放散と葉緑体温度の関連性に着目して

研究課題名(英文) Evaluation of potential function of non-photochemical quenching as a heat source to chloroplast under chilling stress

研究代表者

中島 大賢(Nakashima, Taiken)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：70710945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：寒地におけるトウモロコシ栽培では、低温を避けるため早生品種の密植栽培で増収を図っているが、これが倒伏の一因となっている。そこで、耐冷性を備えた晩生品種の育成・利用の可能性を探るため、北海道向けトウモロコシ品種の低温下における光合成特性の品種間変異を調査し、その中から低温耐性・感受性品種を同定した。これらの品種を比較した結果、耐冷性に優れる品種では光合成に関わる内生成分含量に加え、熱放散活性が高いことが明らかとなった。また、熱放散活性が異なる品種を用いて熱放散が葉緑体温度に与える影響についても考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飼料用トウモロコシでは、生育期間の短い早生品種よりも晩生品種の方が収量性や耐倒伏性に優れるが、低温によって栽培期間が制限される寒地では早生品種を密植で栽培することが一般的であり、これが倒伏の一因となっている。そのため、春先の低温に強い晩生品種が育成できれば、雪解け後速やかに播種を行い、生育期間を確保することができる。しかし、温暖な気候に適したトウモロコシは、低温下で光合成能力が著しく低下するため生育が滞る。そこで本研究では、低温下でも高い光合成能力を維持するうえで必要な品種特性を明らかにするため、北海道向け品種の光合成特性の比較を通して耐冷性品種を同定し、その品種特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Short growing season is a major limitation on maize production in high latitude cold regions, leading to high density planting which poses an increased risk of root lodging. In this project, therefore, a comparative study on varietal differences in photosynthetic responses to early stage chilling stress was conducted to seek potential use of late-maturing varieties with improved cold tolerance. Among 18 varieties examined, two hybrids differing in early vigor and photosynthetic traits were identified. Further comparison of these hybrids revealed the importance of higher capacity of non-photochemical quenching (NPQ), as well as of other photosynthetic components. As an additional and potential function of NPQ, effects of heat dissipated through NPQ processes on chloroplast temperature were also evaluated by utilizing a microscope spectroscopy which enables simultaneous monitoring of chlorophyll fluorescence quenching and thermoresponsive fluorescence probe.

研究分野：作物学

キーワード：トウモロコシ 低温ストレス 光合成 熱放散 レーザー誘起蛍光 葉緑体

## 1. 研究開始当初の背景

主要なトウモロコシ生産国における干ばつや世界的な飼料需要の拡大を背景として、トウモロコシの国際取引価格が高騰しており、自給率向上の観点からも、国産トウモロコシの増産が求められている。そのためには、国内のトウモロコシ作付面積の大半を占める北海道における収量の向上および安定化が重要である。

北海道のような寒地では、生育初期および後期の低温により栽培期間が制限されるため、一般に早生品種が利用されている。しかし、早生品種は晩生品種に比べて個体の収量性が低く、密植栽培で増収を図る必要がある、これが倒伏の一因となっている。したがって、低温下でも旺盛な初期生育を示す晩生品種を早期栽培することができれば、倒伏害の軽減と増収の両立が期待できる。そのためには、トウモロコシの初期生育における耐冷性付与が必要となる。

C<sub>4</sub>型光合成を行うトウモロコシなどのC<sub>4</sub>作物では、葉肉細胞と維管束鞘細胞に局在する炭酸固定系酵素の空間的分業により効率的な光合成を行っており、温暖な条件では高い乾物生産性を示す。しかし、低温下では酵素活性が阻害されるため、トウモロコシの光合成能力は著しく低下する。その結果、炭酸固定反応に消費されるべき光エネルギーが余剰となり、葉緑体内で活性酸素種が生成され、これにより葉内では光酸化ストレスが生じ、光合成能が慢性的に低下する。

光酸化ストレスから葉緑体機能を保護する光防御機構の一つに熱放散が挙げられる。葉緑体チラコイド膜中の集光系クロロフィル-タンパク質複合体に含まれるキサントフィルなどのカロテノイド類は、クロロフィルが吸収した余剰な光エネルギーを熱として散逸する過程を助けることで光酸化ストレスを軽減する役割を担う。この熱放散機構により、ストレス下では葉緑体が吸収した光エネルギーの多くが熱として放出されることが知られている。しかし、熱放散によって生じる排熱が葉緑体温度に及ぼす影響についてはほとんど議論されておらず、葉緑体温度を実際に測定した例はない。炭酸固定に関わる鍵酵素が葉緑体内に局在していることを考慮すると、熱放散によって生じる排熱により炭酸固定系酵素の活性が影響を受ける可能性も考えられることから、熱放散と葉緑体温度の関係については検討の余地がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、北海道向けF<sub>1</sub>トウモロコシ品種を圃場条件下で比較することで、耐冷性の品種間変異を明らかにするとともに、早期栽培による晩生品種利用の可能性を検討する。また、供試品種の中から低温下における光合成能力および熱放散活性が異なる品種を選抜し、熱放散機構が葉緑体温度に与える影響を検討する。そのための測定手法を開発することも本研究の目的の一つである。

## 3. 研究の方法

### (1) 初期生育特性の品種間変異の評価および低温耐性・感受性品種の選抜

2019年と2020年に北海道大学北方圏フィールド科学センター内の試験圃場にて、早晩性が異なる北海道向けトウモロコシ品種15品種を圃場条件下で早播し、生育初期の低温下における乾物生産能力および光合成特性を調査した。試験地の慣行播種期は5月上中旬であるが、本試験では4月中下旬に播種し、6月中旬の5-7葉期に光合成ガス交換測定を行った。測定は、最上位完全展開葉を対象に、チャンバー内温度15°C、光合成有効放射1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>および相対湿度55-65%で行った。加えて、2020年には光合成能力が異なる数品種についてのみ、熱放散活性の指標となるクロロフィル蛍光パラメータの非光化学的消光(NPQ: non-photochemical quenching)を測定した。

2カ年の測定結果をもとに、品種間変異を明らかにするとともに、その中から低温下での光合成特性が異なる品種を選抜した。また、全品種を収穫期まで栽培し、耐倒伏性の評価と収量調査を行うことで、北海道における晩生品種利用の可能性を検討した。

### (2) 低温耐性・感受性品種における光合成の低温ストレス応答の比較

圃場試験の結果をもとに選抜した低温耐性・感受性2品種について、ポット条件下で強度の低温ストレスを与え、処理中の光合成特性と処理後の回復過程を調査した。

2020年9月中旬に屋外で5Lポットに植え付け、秋冷に曝すことで低温処理を与えた後、10月下旬には加温したビニルハウスにポットを移動し10日間の回復期間を設けた。調査項目として、葉緑度(SPAD値)および純光合成速度、NPQを低温処理中と処理後5日目および10日目に測定した。また、処理直後と処理後10日目に地上部を刈り取り、器官別乾物重および葉面積についても調査した。

### (3) 熱放散活性が異なる品種における葉緑体温度の計測

葉緑体温度の実測を可能にするため、レーザー誘起蛍光測定装置を構築した(図1)。この手法ではまず、緩衝液中で葉片を破砕して葉緑体を遊離させ、遠心分離後に感温性蛍光プローブ溶液に再懸濁したものを温調ステージ上に置き、試料温度を一定にした。その後、顕微鏡下で直径約10 μmの青色レーザーを葉緑体に照射すると、クロロフィルの自家蛍光と葉緑体周辺の

感温性プローブの蛍光を観察できる (図 2A,B). レーザー照射後の蛍光スペクトルの変化を分光器で 90 秒間経時的にスキャンすることで、クロロフィル蛍光の減衰と葉緑体周辺の温度変化を同時計測した (図 2C). その際、レーザー照射による加熱と熱放散由来の発熱を区別するため、葉緑体温度を測定した後、葉緑体近傍 (図 2A 破線円) についても同様の測定を行い周辺溶液の温度の変化も計測した. 最後に、葉緑体温度から溶液温度を差し引くことで温度差 ( $\Delta T$ ) を求め、葉緑体における発熱の指標とした.

本測定装置を用いて、熱放散活性が異なる P9027 と LG2533 の葉緑体温度の推定を試みた. 測定は、環境制御下で育成した 4 葉期の植物体の最上位完全展開葉を対象に、各品種 5 個体について行い、1 個体あたり 6 葉緑体、計 30 葉緑体について計測した.

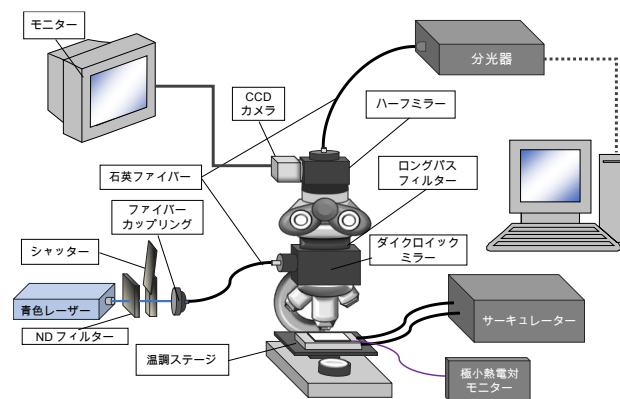


図 1. レーザー誘起蛍光分光装置

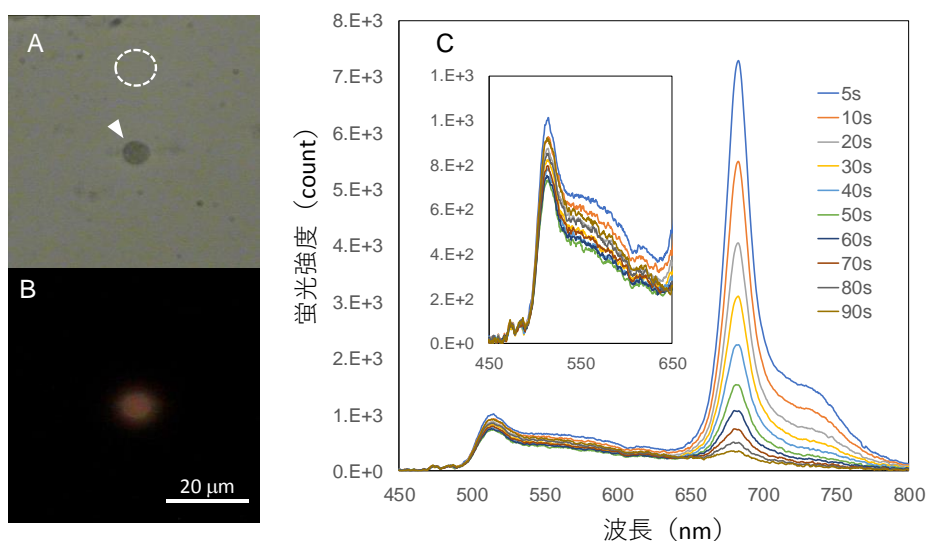


図 2. レーザー照射前の葉緑体 (A), 照射後の葉緑体 (B) および蛍光スペクトルとその経時変化 (C). A) 矢印は測定対象の葉緑体を示し、破線円は基準となる溶液温度を測定した箇所を示す. C) 挿入図は感温性プローブの蛍光スペクトルの拡大図で、凡例はレーザー照射後時間 (秒).

#### 4. 研究成果

(1) 圃場条件下における 2 カ年の品種比較試験の結果、地上部生育および個葉光合成速度には有意な品種間変異が認められた. 光合成速度は、2019 年では  $30\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、2020 年では  $35\sim 41.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  と兩年次で最大 1.2 倍の変異を示した (図 3). 2019 年では、測定日前に低温・強光条件が続いたため、2020 年よりも強い低温ストレスが生じたことが低い光合成速度の原因と考えられる. また、品種によっては年次間で異なる傾向を示したが、兩年次ともに安定して光合成速度が高い品種が見出され、これを耐冷性品種とした (図 3). 同様に、兩年次で低い値を示した品種を低温感受性品種とした. 耐冷性品種とした P9027 と P8025 の 2 品種はいずれも北海道道央地域における普及品種であった.

光合成速度の変異に関わる要因を探るため、これらの品種について葉の内生成分を分析した.

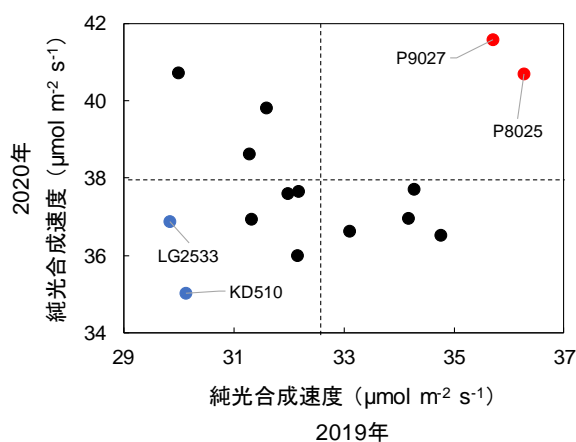


図 3. 2019 年および 2020 年における 5 葉期の純光合成速度. 図中の破線は各年次の全品種平均を示す. 赤色は耐冷性品種、赤色は低温感受性品種を示す. 値は各試験年次の平均値 ( $n=3$ )

その結果、KD510ではクロロフィル含量や可溶性タンパク質含量、および葉身窒素含量が他の3品種に比べて低い値を示したことから、窒素吸収・代謝が初期生育の制限要因となったことが示唆された。耐冷性品種では、全ての測定項目で高い値を示した。一方、LG2533は内生成分含量については耐冷性品種と遜色ないものの、この品種ではNPQが著しく低かった。また、耐倒伏性と収量性についても調査した結果、既存晩生品種の中には現行普及品種を上回る品種もあり、晩生品種利用の可能性と有用性が示唆された。

(2) 圃場試験の結果を踏まえ、光合成特性が顕著に異なるP9027(耐冷性品種)とLG2533(感受性品種)を対象に、強度の低温ストレスに対する光合成応答と処理後の回復過程を調査した。

低温処理中におけるSPAD値は、耐性品種で有意に高いものの、感受性品種でも比較的高い値を示し、処理後5日目には有意差は認められなかった(図4A)。一方、純光合成速度は、両品種で圃場試験の半分以下の低い値を示し、強度の低温ストレスを受けていることが確認できた(図4B)。感受性品種では耐性品種に比べ46%低く、処理後5日目においても有意に低い値を示した。一方で、NPQは常に耐性品種で高く、圃場試験で得られた結果の再現性が得られた(図4C)。低温処理直後の地上部乾物重についても、耐性品種では感受性品種よりも約1.2倍、処理後10日後には1.4倍高い値を示した。これらの結果から、耐冷性品種では低温下での光合成能力の維持だけでなくストレス後の速やかな回復にも優れることが示唆された。

(3) レーザー誘起蛍光分光装置を用い、熱放散活性が異なるP9027とLG2533について葉緑体温度の推定を行った(図5)。レーザー照射後におけるクロロフィル蛍光の減衰過程を品種間で比較すると、減衰速度はP9027で高い傾向にあるが、有意な品種間差異は認められなかった。一方、 $\Delta T$ の推移は、両品種ともレーザー照射後から上昇が認められ、照射開始10秒後にP9027では3°C、LG2533では1.5°C程度と有意な品種間差異を示した。しかし、その後は僅かに低下した後、照射開始50秒頃から再び増加に転じ、最大で4-5°Cに達した。葉緑体間や個体間でのバラツキが大きいため有意差はないものの、熱放散活性が高いP9027で $\Delta T$ が高い傾向を示したことから、熱放散機構が葉緑体温度の上昇に寄与した可能性も考えられる。

一方で、照射直後の温度上昇は熱放散の誘導に必要な時間を考慮すると、レーザー照射の影響によるアーチファクトの可能性もある。現状ではクロスチェックを行うための測定手法がなく、今後さらに検討を重ねる必要がある。

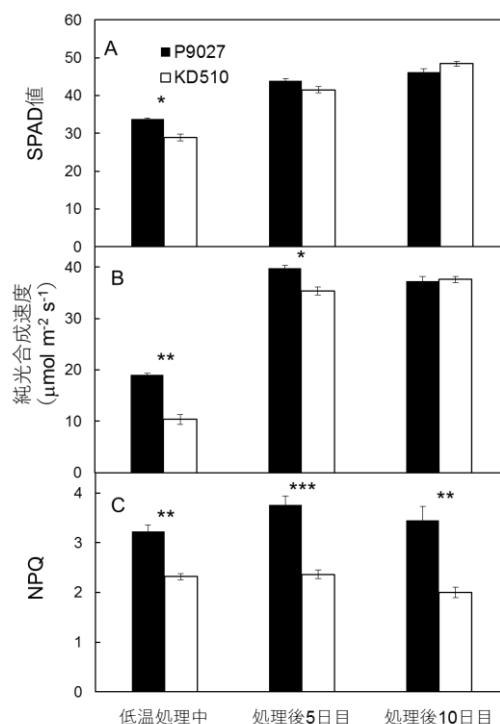


図4. 低温処理中、処理後5日目および10日目における両品種のSPAD値(A)、純光合成速度(B)および非光化学的消光(NPQ; C)。値は平均値±標準誤差(n=4)。\*、\*\*および\*\*\*はt検定においてそれぞれ5%、1%および0.1%水準で有意差があることを示す。

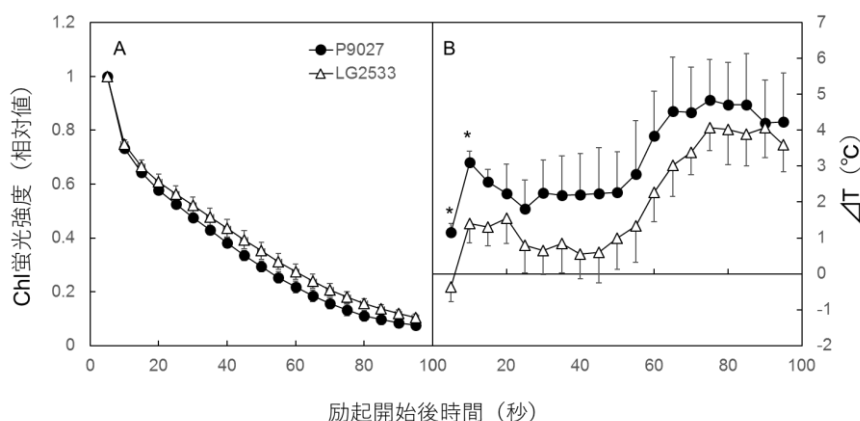


図5. 励起開始後のクロロフィル(Chl)蛍光強度の減衰過程(A)および葉緑体と周辺温度との差( $\Delta T$ ; B)。値は平均値±標準誤差(n=5)。Chl蛍光強度はピーク波長の最大蛍光強度に対する相対値。 $\Delta T$ (°C)=葉緑体温度-周辺温度。\*はt検定において5%水準で有意差があることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kar, S., Zhang, N., Nakashima, T., Villanueva-Morales, A., Stewart, J. R., Sack, J. E., Terajima, Y., Yamada, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Saccharum × Miscanthus intergeneric hybrids (miscanes) exhibit greater chilling tolerance of C4 photosynthesis and postchilling recovery than sugarcane (Saccharum spp. hybrids).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Global Change Biology Bioenergy	6. 最初と最後の頁 1318-1333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gcbb.12632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kar, S., Weng, T., Nakashima, T., Villanueva-Morales, A., Stewart, J. R., Sack, J. E., Terajima, Y., Yamada, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Field performance of Saccharum × Miscanthus intergeneric hybrids (Miscanes) under cool climatic conditions of northern Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioEnergy Research	6. 最初と最後の頁 132-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12155-019-10066-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石山志穂, 山口寛登, 河野龍悟, 松井康眞, 市川伸次, 柏木純一, 中島大賢
2. 発表標題 早晩性の異なるトウモロコシ品種における初期生育特性に関わる要因の解析
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口寛登, 石山志穂, 松井康眞, 市川伸次, 柏木純一, 山田敏彦, 中島大賢
2. 発表標題 子実用トウモロコシにおける早期登熟性の品種間変異に関わる形質の解析
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口寛登, 大木詩生, 岡本達郎, 服部遥子, 市川伸次, 柏木純一, 中島大賢
2. 発表標題 北海道における子実用トウモロコシの増収および耐倒伏性強化に向けた晩生品種利用の検討
3. 学会等名 第247回日本作物学会講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関