

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658014

研究課題名(和文) トウモロコシに匹敵する高い光合成速度を示すイネの機能解析とゲノム解析

研究課題名(英文) Functions and genomic analysis of rice having the high rate of leaf photosynthesis comparable to that of maize

研究代表者

平沢 正 (Hirasawa, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30015119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：インド型多収水稻品種タカナリと日本型水稻品種コシヒカリの交雑自殖後代に見出されたC4植物のトウモロコシに匹敵する高い光合成速度を示す2つの系統(高光合成系統)の光合成速度の高い主要な理由は、葉肉伝導度が大きいことにあった。そして、高光合成系統の大きい葉肉伝導度は、小さくかつ有腕突起のよく発達した葉肉細胞と厚い葉肉組織を有していることにあった。タカナリとコシヒカリの染色体断片置換系統群を用いて、コシヒカリ対立遺伝子がタカナリを遺伝背景とするイネの光合成速度を高める領域を第1染色体短腕側、第3染色体長腕側、第7染色体短腕側と長腕側の4ヶ所あることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cause of extremely high values of Pn in the backcrossed inbred lines derived from the indica variety Takanari and the japonica variety Koshihikari. Compared to Takanari, these lines had neither a higher content nor higher activity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) when the leaf nitrogen contents were similar, but they did have high mesophyll conductance with respect to CO2 flux due to their higher density and more highly developed lobes of mesophyll cells. Using 39 lines of Koshihikari chromosome segment substitution in Takanari genetic background, we found four quantitative trait loci for enhancing the rate of leaf photosynthesis of the plants of Takanari genetic background with a Koshihikari allele on chromosome 1, on chromosome 3 and on chromosome 7. We might increase rates of rice-leaf photosynthesis still further by introducing Koshihikari alleles into the plants of Takanari genetic background.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：光合成 気孔伝導度 葉肉伝導度 ゲノム 量的形質遺伝子座 イネ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アジアでは急増する人口増加に見合った食糧を供給するため、わが国では水田の維持と食糧自給率向上のため、イネの収量を飛躍的に高めることが求められている。個体群受光態勢や収穫指数の飛躍的改良は望めないとされている現在、これまでほとんど意識的に改良されてこなかった個葉光合成速度の向上が、収量増加への残された方策の一つとされている。

(2)  $C_4$ 植物は、 $C_3$ 植物に比較して個葉光合成速度が1.5~2倍と著しく高いことによって乾物生産能力が高くなることから、 $C_4$ 植物の光合成の鍵となる遺伝子を $C_3$ 植物であるイネに導入してイネの光合成速度の飛躍的向上を図る研究が行われている。しかし、まだ実現の見通しは立っていない。イネの個葉光合成速度の品種間差は現代の日本型品種内ではほとんどないが、多収性インド型品種は日本型品種に比較して20~30%程度高いことが近年明らかになり、このインド型品種の光合成速度の高い原因が現在解析されている。

(3) 申請者らは個葉光合成速度が高く多収のインド型水稻品種タカナリと日本型品種コシヒカリとの交雑自殖後代約200系統の中から、個葉光合成速度がコシヒカリの約1.6倍、タカナリの約1.2倍と高く、 $C_4$ 植物のトウモロコシに匹敵する高い光合成速度を示す系統を見出した。

## 2. 研究の目的

(1) この著しく高い光合成速度を示す系統の光合成機構を光化学系、炭酸固定系、葉の $CO_2$ 吸収・輸送能に着目して解析し、高い光合成速度を実現している形質を解明する。

(2) 近年急速に進歩したゲノム解析手法を用いて、高い光合成速度を実現する形質に関わる遺伝子座の候補領域を探索し、著しく高

い光合成速度を示すタカナリの準同質遺伝子系統を作出する。

## 3. 研究の方法

(1) コシヒカリ、タカナリおよびコシヒカリとタカナリの交雑後代から選抜した高い光合成速度を示す系統 BTK-a、BTK-b ( $BC_1F_6$  および  $BC_1F_7$ 、コシヒカリ/タカナリ//タカナリ、以下 BTK 系統) およびタカナリを遺伝背景とするコシヒカリ染色体断片置換系統群を東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育センターの水田(多摩川沖積土壌)に生育させた。4葉期の苗を、22.2株/ $m^2$ 、1株1本の密度で移植した。肥料はすべて基肥で堆肥約1.5t/10a、化成肥料をN、 $P_2O_5$ 、 $K_2O$ 各成分で3、6、6kg/10a施用した(うちNの2/3は緩効性肥料(LP50:LP100=1:1)を用いた)。一部の植物は12Lポットにも生育させた。栽植密度は、3株/ポット、1株3本とし、基肥として化成肥料をN、 $P_2O_5$ 、 $K_2O$ 各成分で0.5、1.0、1.0g/ポット施用し、分けつ期と穂ばらみ期にはそれぞれ窒素を成分で0.3、0.7g/ポット施用した。

(2) 光合成速度( $P_n$ )および気孔伝導度はLED冷光システム(LI6400-02B, LI-COR)を装着した携帯用光合成蒸散測定装置(LI-6400, LI-COR)を用いた。測定時の同化箱内条件は、 $CO_2$ 濃度を370  $\mu mol mol^{-1}$ 、光強度2,000  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ 、葉-大気飽差1.3~1.6 kPaとした。またポットに生育した植物では測定時の葉温を30℃、圃場に生育した植物では測定時の同化箱内温度を30℃とした。ガス交換速度とクロロフィル蛍光の同時測定には、クロロフィル蛍光ユニット(LI-6400-40, LI-COR)をLI-6400に接続して行った。上述の同化箱内環境下において、定常時の蛍光強度( $F_s$ )および約8,000  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ の飽和光照射時の最大蛍光強度( $F_m'$ )を測定し

た．電子伝達速度 (ETR) は以下の式から求めた．

$$ETR = (F_m' - F_s) / F_m' \times PPFD \times \alpha_{leaf} \quad (1)$$

ここで  $\alpha_{leaf}$  は葉の吸収率， $\alpha$  は PSII の吸光割合であり，Li ら (2009) に従いそれぞれ 0.85, 0.5 とした．葉肉伝導度 ( $g_m$ ) は以下の式から求めた (Harley ら 1992) ．

$$g_m = P_n / (C_i - \{ \Gamma^* [ETR + 8(P_n + Rd)] / [ETR - 4(P_n + Rd)] \}) \quad (2)$$

ミトコンドリア呼吸 (Rd) および Rd が無いときの光合成の  $CO_2$  補償点 ( $\Gamma^*$ ) は Laisk method によって測定した (Brooks and Farquhar 1985) ． $g_m$  は同化箱内  $CO_2$  濃度  $370 \mu mol mol^{-1}$  の条件下で測定した ．

(3) 葉の窒素は  $80^\circ C$  で 72 時間以上通風乾燥後、CN コーダー (MT-700 Mark II, ヤナコ分析工業) で定量した．Rubisco の定量はウサギポリクローナル抗体を用いた単純放射免疫拡散法 (Sugiyama and Hirayama 1983) によって行った ．

(4) Rubisco 活性の測定は液体窒素で凍結させ、液体窒素中で粉碎し、分析まで  $-80^\circ C$  で保存し、Sulpice ら (2007) の方法に従って測定した ．

(5) 葉肉組織の形態は FAA 固定液中で保存した葉を、エタノールで脱水後 GMA-Quetol-523 樹脂 (Quetol 523M, 日新 EM) で包埋し、 $5 \mu m$  厚の横断および縦断切片を滑走式マイクローム (TU-213, 大和光機) で切り出し、1% トルイジンブルーで染色したのち光学顕微鏡で観察した．撮影画像の分析には画像解析ソフトウェア (WinRoof Version 6, 三谷商事) を用いた．葉肉細胞の表面積 ( $S_{mes}$ ) および体積 ( $V_{mes}$ ) は葉肉細胞の両面が水平な円柱状であるとみなして算出した ．

#### 4．研究成果

(1) BTK-a および BTK-b は圃場、ポットのいずれに生育しても、タカナリの光合成速度を 20~25% 上回り、コシヒカリと比較すると 40~50% 高かった．葉内  $CO_2$  濃度 ( $C_i$ ) に対する光合成速度の反応において、低  $C_i$  における初期勾配が BTK 系統はタカナリと比較して大きく、さらに  $CO_2$  飽和時の光合成速度 ( $P_{max}$ ) はタカナリとの差が一層大きくなり、トウモロコシを大きく上回った (図 1) ．

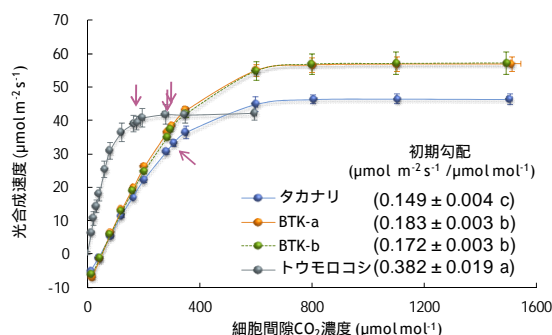


図 1 光合成速度 - 細胞間隙  $CO_2$  濃度曲線 ( $P_n - C_i$  曲線)

矢印は大気  $CO_2$  濃度条件 ( $370 \mu mol mol^{-1}$ ) での測定を示す ．

(2) BTK 系統の  $P_{max}$  が高い理由を、クロロフィル蛍光測定によって解析した．葉身窒素含量を変化させるため、止葉の展開完了時にタカナリへ窒素を段階的に追肥した．その結果、BTK 系統の ETR は葉身窒素含量に関わらずタカナリと比較して高かった．またプラストキノンの酸化程度を示す光化学消光 (qP) が本系統はタカナリと比較して大きく、酸化型プラストキノンの量子収率 ( $F_v' / F_m'$ )、および非光化学消光 (qN) には違いがなかった．以上の結果から、BTK 系統では PSII それ自体ではなく、PSII より下流における電子伝達活性が高いことが高い ETR をもたらし、高い RuBP 再生速度ひいては高い  $P_{max}$  をもたらしていたものと推察された ．

(3) 大気  $CO_2$  濃度  $370 \mu mol mol^{-1}$  の条件下における光合成速度と光合成速度に関わるパ

ラメータを比較した。施肥窒素量が等しいときでも BTK-a および BTK-b の葉身窒素含量はタカナリに比較して大きく、このことが BTK 系統の高い光合成速度に寄与しているものと推察された。しかし等しい葉身窒素含量で比較したときにも BTK 系統の光合成速度はタカナリに比較してなお約 18% 高く、葉身窒素含量が等しいときにはタカナリと BTK 系統の間の気孔伝導度の違いはなくなることから、この光合成速度の違いには気孔伝導度以外の要因が関わっていることになる。また等しい葉身窒素含量において Pn-Ci 曲線の初期勾配は BTK 系統でタカナリに比較して約 20% 大きかった。葉身 Rubisco 含量と葉身窒素含量の関係にはタカナリと BTK 系統の間で違いは認められず、葉身 Rubisco 含量が等しくても BTK 系統の光合成速度はタカナリに比較して高かった。さらに、Rubisco の活性を *in vitro* で測定したところ、Rubisco 含量に対する Rubisco 全活性および全活性に対する初期活性の割合である Rubisco 活性化率のいずれにも違いは認められなかった。一方、葉肉伝導度は、BTK-a、BTK-b いずれもタカナリに比較して有意に大きかった (図 2)。そして  $C_c$  は  $C_i$  が等しくても BTK 系統はタカナリに比較して有意に大きかった。さらに光合成速度-葉緑体内  $CO_2$  濃度 (Pn-Cc) 曲線の初期勾配には品種・系統間で違いがなかった (図 3)。

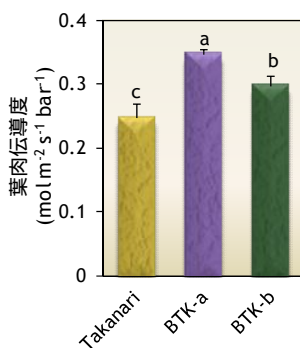


図 2 葉肉伝導度

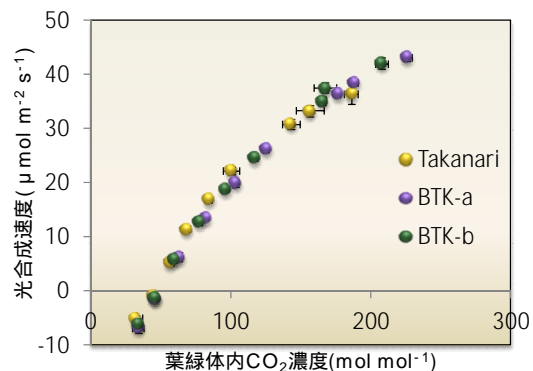


図 3 葉緑体内  $CO_2$  濃度曲線 (Pn -Cc 曲線)

(3) 葉肉伝導度は単位葉面積あたりの気相に面した葉肉細胞表面積 ( $S_{mes} / LA$ ) は BTK-a および BTK-b がタカナリおよびコシヒカリのいずれに比較しても有意に大きかった (図 4)。葉面積当たりの葉肉細胞数は BTK 系統でタカナリやコシヒカリに比較して有意に多かった。このことは、BTK の細胞サイズがコシヒカリと同様小さいこと、および葉肉細胞層がタカナリと同様厚いことによっていた。また BTK 系統の葉肉細胞はタカナリに比較して著しく発達した突起をもっており、コシヒカリの細胞突起も同様に良く発達していた (図 5)。細胞突起が発達することによって、BTK 系統は葉肉細胞一つ当たりの体積 ( $Ave V_{mes}$ ) がタカナリに比較して小さいにも関わらず、細胞一つ当たりの細胞表面積 ( $Ave S_{mes}$ ) はタカナリと比較して有意差がなかった。

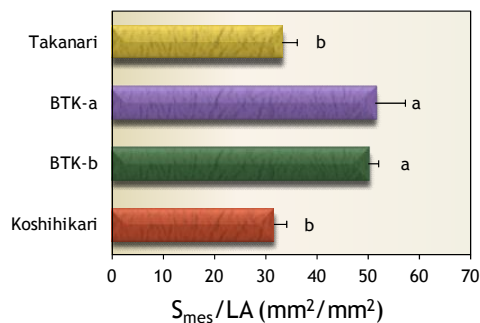


図 4 葉面積当たり葉肉細胞表面積

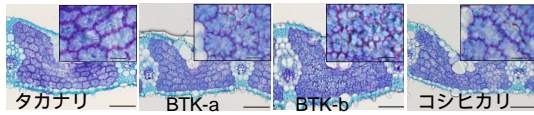


図5 葉の横断面  
外側写真のスケールは 50 μm , 内側写真のスケールは 10 μm を示す .

(4) コシヒカリの対立遺伝子がタカナリ遺伝背景の水稻の光合成速度を増加させる遺伝子座が第1染色体短腕側, 第3染色体長腕側, 第7染色体短腕側と長腕側の4か所に検出された(図6). 見出されたタカナリよりも高い光合成速度を示す準同質遺伝子系統を用いて, 光合成速度を高める遺伝子座を集積する系統の作出を進めている .

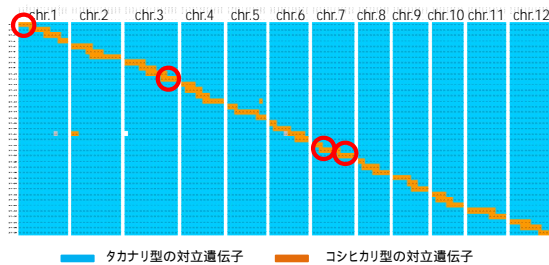


図6 染色体断片置換系統群を用いて見出されたコシヒカリ対立遺伝子がタカナリ遺伝背景イネの光合成速度を高める領域(赤丸部分)

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Adachi S., T. Nakae, M. Uchida, K. Soda, T. Takai, T. Oi, T. Yamamoto, T. Ookawa, H. Miyake, M. Yano and T. Hirasawa 2013. The mesophyll anatomy enhancing CO<sub>2</sub> diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 64:1061-1072 (DOI:10.1093/jxb/ers382) (査読有)

[学会発表](計 6件)

Hirasawa, T., N. Ichihara, T. Nakae, T. Yamamoto, S. Adachi, T. Ookawa, Characterization of QTLs that further

enhance the rate of leaf photosynthesis in a rice variety with the highest recorded rate of photosynthesis, *American Society of Plant Biologists*, 2013年7月20日, Rhode Island .

Adachi S., T. Nakae, M. Uchida, K. Soda, T. Takai, T. Oi, T. Yamamoto, T. Ookawa, H. Miyake, M. Yano and T. Hirasawa 2013. The rice photosynthesis can be greatly improved by facilitating CO<sub>2</sub> diffusion inside leaves with modification of mesophyll anatomy, *American Society of Plant Biologists*, 2013年7月20日, Rhode Island .

市原直登・中江徹・山本敏央・大川泰一郎・平沢正, タカナリを遺伝背景とするとコシヒカリ染色体断片置換系統群を用いて推定した光合成速度を高める量的形質遺伝子座の作用機構, *日本作物学会*, 2013年3月28日, 明治大学生田キャンパス .

落合隆行・安達俊輔・山本敏央・大川泰一郎・平沢正, コシヒカリ/タカナリに由来する高光合成系統にタカナリを交配して得られたF4集団の光合成速度. *日本作物学会関東支部会*, 2012年12月7日, 東京農業大学農学部 .

市原直登・狩又亮治・中江徹・高井俊之・山本敏央・大川泰一郎・矢野昌裕・平沢正, 水稻の個葉光合成速度に関わる遺伝子座の推定-タカナリとコシヒカリの染色体断片置換系統群を用いて-. *日本作物学会関東支部会*, 2012年12月7日, 東京農業大学農学部 .

安達俊輔・中江徹・内田万咲・高井俊之・山本敏央・大川泰一郎・矢野昌裕・平沢正, 多収性インド型品種タカナリと日本型品種コシヒカリの交雑後代に見出されたタカナリを大きく上回る高い光合成速度を示す系統の光合成特性, *日本作物学会第231回講演会* 2011年,

9月2日，山口大学共通教育棟。

6．研究組織

(1) 研究代表者

平沢 正 (HIRASAWA  
TADASHI)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研  
究院)・教授

研究者番号：30015119