

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380010

研究課題名(和文) シー4作物における光合成能と窒素利用効率を制御する要因の解明

研究課題名(英文) Regulatory factors of photosynthetic capacity and nitrogen use efficiency in C4 crops

研究代表者

上野 修 (UENO, OSAMU)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70414886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)： トウモロコシとアマランサスの光合成特性と光合成窒素利用効率(PNUE)の品種・種間差を調査し、1.5～2.1倍の変異があることを見出した。また、光合成能力の変異には、気孔伝導度やC4光合成の脱炭酸反応以降の過程が関わっていることを明らかにした。イネ科植物のPNUEはNADP-ME型C4種 > NAD-ME型C4種 = PCK型C4種 > C3種という傾向を示すこと、カヤツリグサ科C3、C4種のPNUEはイネ科植物よりも低いことを見出した。また、ソルガムとキビにおける光合成と葉構造特性の窒素反応を細胞・オルガネラレベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)： This study investigated the variations in photosynthetic traits and photosynthetic nitrogen use efficiency (PNUE) and their regulatory factors in C4 grasses and closely related C4 group. The cultivar and species variations in photosynthetic traits and PNUE were examined for the C4 crops, maize and amaranth. There were variations of 1.5-2.1 times between the minimum and maximum values of photosynthetic rate and PNUE. The stomatal conductance and the decarboxylation of C4 acids and later process in C4 photosynthesis were strongly involved in the variation in photosynthetic rate. In grasses, remarkable difference in PNUE was also found among photosynthetic types; NADP-ME C4 > NAD-ME C4 = PCK C4 > C3 grasses. Irrespective of C3 and C4 species, PNUE of sedges (Cyperaceae) was lower than that of grasses. This study also revealed the nitrogen responses of photosynthetic and structural traits in leaves of the C4 crops, sorghum and millet.

研究分野：植物生産生理学

キーワード：光合成 C4植物 光合成能力 窒素利用効率 イネ科 カヤツリグサ科 C4サブタイプ

1. 研究開始当初の背景

C3 植物は、C4 植物に比べ光合成能が低く物質生産能も低い。このため従来の光合成研究では、イネ等の C3 植物の光合成能を如何に高めるかが課題とされ、光合成能を制御している要因が解析されてきた。一方、C4 作物についてはトウモロコシやサトウキビ等で光合成能の品種間差が調査されてはいるが、この違いを制御している要因の解析については C3 植物と比べはるかに遅れている。C4 植物は一般に光合成能が高いことから、C4 作物の光合成能をさらに高めようという視点からの研究は少ない。しかし、現在 C4 植物は化石エネルギーの枯渇や CO₂ 削減の問題を解決して行く上でエネルギー作物として世界的に注目されており、より高い光合成・物質生産能を発揮する品種の育成が求められている。

C4 植物が高い光合成能を示す主因は、CO₂ 濃縮機構の働きにより維管束鞘細胞 (BSC) 内の CO₂ 濃度が高められ、それにより Rubisco のオキシゲナーゼ活性が抑制され光呼吸が低下するためである。したがって、BSC からの CO₂ 漏出の程度や葉肉細胞 (MC) と BSC で働く C4 回路と C3 回路のバランスの調節が光合成効率を決定する要因ではないかと考えられる。一方 C3 植物では、葉内における CO₂ の拡散に関わる形態的要因も光合成能に影響することが明らかになってきた (Evans et al. 2009)。しかし、C4 植物についてはこの視点からの研究は行われておらず、C4 植物の光合成能を制御している要因を生理生化学的視点ばかりでなく機能形態学的視点から総合的に解析することが必要である。

C4 植物が持つもう一つの農業上有用な形質は、光合成及び物質生産における窒素利用効率が高いことである。現代の農業では、如何に少ないインプット (施肥量など) の下で高い収量をあげるかが重要な課題となる。C4 植物が C3 植物に比べ高い光合成窒素利用効

率 (PNUE) を示す理由は、CO₂ 濃縮機構を働かせることにより、少ない葉内窒素分で高い光合成能を発揮するためと考えられている。C4 植物は、C4 化合物の脱炭酸機構の違いにより NADP-リンゴ酸酵素 (NADP-ME) 型、NAD-リンゴ酸酵素 (NAD-ME) 型、PEP-カルボキシキナーゼ (PCK) 型という 3 つのサブタイプに分けられるが、これまでのイネ科 C4 植物の解析によれば、NADP-ME 型は NAD-ME 型に比べ PNUE が高いことが報告されている (Ghannoum et al. 2011)。この点は、高い生産性を示すイネ科 C4 作物の多くが NADP-ME 型であることを考えると興味深い。C4 植物における PNUE のグループ間差を明確にするためには、PCK 型やイネ科以外の C4 植物を含めてより包括的な調査が必要である。

C4 サブタイプの間で PNUE の違いが生ずる要因として、BSC からの CO₂ の漏出程度や Rubisco の酵素学的特性の違いが指摘されているが (Ghannoum et al. 2011)、その他光呼吸の抑制程度を初めとした様々な生理生化学的、機能形態学的要因が関わっている可能性がある。C4 植物における PNUE の変異の実態を明らかにし、それを決定している要因を解明することは、低投入持続型農業に適した C4 作物の開発に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

C4 植物は C3 植物に比べ高い光合成能を持ちエネルギー作物として世界的に注目されているが、C4 植物の個葉光合成能力を制御する要因については十分に検討されてはいない。また、もう一つの農業上重要な特性として、C4 植物は C3 植物に比べ高い窒素利用効率を示す。しかし、C4 植物の窒素利用効率に C4 サブタイプや系統によるグループ間差がどの位あるのか、それにどのような要因が関わっているのか不明な点が多い。本研究では、様々な C4 サブタイプや系統に属する C4 植物

について光合成に関わる形態的・生理生化学的特性を比較解析することにより、光合成能とPNUEの変異の実態とその制御要因を検討する。それをもとに、より高い光合成能と窒素利用効率を持つC4作物を作出して行く上で、何が重要となるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

トウモロコシ及びアマランサスにおける光合成特性の品種・種間差に関する研究では、壤土をつめた5Lポットに幼植物を移植し、夏期に野外で育成した。イネ科及びカヤツリグサ科の光合成型によるPNUEの変異についての研究では、施肥窒素条件を2段階(0.2及び0.6gN/5Lポット)設定して、夏期にビニルハウス内で育成した。ソルガムとキビにおける光合成特性と葉構造特性の窒素反応の解析では、窒素条件を4段階(0.05, 0.2, 0.4及び0.6gN/5Lポット)設定し、夏期にビニルハウス内で育成した。いずれの実験でも1系統(種)あるいは1窒素処理区当たり4個体を育成し、その中から生育のそろった3個体を選び実験に用いた。

(2) 実験方法

7月下旬から8月にかけて出穂前の最上位完全展開葉を用いて光合成速度(P_n)、蒸散速度、気孔伝導度、及び葉内 CO_2 濃度を測定した。測定条件は、光強度 $1500\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ 、葉温 $25^\circ C$ 、湿度60%、 CO_2 濃度 $390\ \mu l\ L^{-1}$ とした。ガス交換測定に用いた葉あるいはその下位葉について、比葉面積(SLW)、クロロフィル含量、窒素含量、光合成酵素活性及び形態学的特性を調査した。

葉の一部をFAA固定液で固定し、抱水クロール法により組織の透明化を行い、気孔密度と孔辺細胞長を測定した。また、葉片をグルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定後Quetol樹脂に包埋し、これよりガラスナイフを用いて準超薄切片を作成して、光合成組織

等の構造学的特性を調査した。得られた葉の構造学的パラメータと光合成ガス交換パラメータとの相関を解析した。

ソルガム及びキビの光合成細胞の窒素反応を解析するために、0.05及び0.6gNで育成した植物の葉をQuetol樹脂に包埋し、これよりダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作成した。透過型電子顕微鏡下で光合成細胞を撮影し、それをもとに葉緑体とミトコンドリアのサイズ、細胞壁の厚さを測定した。また、電子顕微鏡下でMCとBSCにおける葉緑体とミトコンドリアの個数、葉緑体グラナの層数、並びに原形質連絡密度を測定した。

葉から可溶性蛋白質を抽出し、C3,C4光合成酵素の活性を分光光学的方法により測定した。葉の窒素含量はセミマイクロケルダール法により測定した。また、葉の炭素同位体分別値の測定は外部の業者に委託した。

4. 研究成果

(1) NADP-ME型C4作物トウモロコシにおける光合成能とPNUEの品種間差

トウモロコシ23系統とその野生種のテオシント4種について P_n を測定し、1.5倍の変異($32\sim 47\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)があることを明らかにした。この P_n の変異には気孔伝導度、クロロフィル含量、葉内窒素含量が制御要因として関わっていた。また、 P_n と光合成酵素のRubisco、NADP-ME、PCKの活性との間には有意な正の相関があり、C4光合成の脱炭酸反応以降の過程が P_n を制御していると考えられた。トウモロコシのPNUEは他のイネ科C4植物より高く品種・種間差は1.7倍($510\sim 862\ \mu mol\ mol^{-1}\ N\ s^{-1}$)であった。

(2) NAD-ME型C4作物アマランサスにおける光合成能とPNUEの種間差

アマランサス属12種20系統について P_n を測定し、2.1倍の変異($20\sim 41\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)があることを見出した。また、 P_n と気孔伝導度及びRubisco活性の間には高い正の相関が

あることを明らかにした。一方、PNUE は 1.8 倍の変異($260\sim 458 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$)を示した。イネ科植物と比較すると、アマランサスの PNUE はイネ科 NADP-ME 型 C4 植物よりは低く、イネ科 NAD-ME 型 C4 植物に近い値を示すことを明らかにした。

(3) イネ科 C3,C4 種における PNUE 等の比較

イネ科 C4 植物の NADP-ME 型 4 種, NAD-ME 型 6 種、PCK 型 6 種および C3 植物 6 種を異なる土壌窒素条件で育成して、ガス交換特性や PNUE を調査した。Pn と蒸散効率は C4 種が C3 種よりも高かったが、C4 種のサブタイプ間には差はなかった。Pn と気孔伝導度との間には全グループで正の相関が見られたが、Pn と SLW の間にはどのグループでも有意な相関は見られなかった。一方、Pn と葉内窒素含量との間には全グループで正の相関が見られ、それらの近似直線の傾きはグループ間で異なった。PNUE は NADP-ME 型 C4 種 > NAD-ME 型 C4 種 = PCK 型 C4 種 > C3 種という傾向を示し、土壌窒素条件が変わっても変化しなかった。

(4) カヤツリグサ科 C3,C4 種における PNUE 等の比較

カヤツリグサ科の C3 植物 7 種、NADP-ME 型 C4 植物 5 種についてガス交換特性と PNUE を調査し、イネ科植物の結果と比較した。カヤツリグサ科の Pn は C4 種が C3 種よりも高かったが、イネ科 C3,C4 種に比べるといずれも低かった。カヤツリグサ科の気孔伝導度は一般に低く C3 種と C4 種の間で差はなかったが、葉内窒素含量は C4 種が C3 種よりも低かった。PNUE はイネ科 C4 種 > カヤツリグサ科 C4 種 = イネ科 C3 種 > カヤツリグサ科 C3 種という傾向を示した。したがって、カヤツリグサ科でも C4 種は C3 種に比べ高い光合成能力や PNUE を示すが、イネ科に比べ

れば全体として低いと考えられた。

(5) NADP-ME 型 C4 作物ソルガムの葉の構造と機能特性に及ぼす窒素の影響

異なる窒素施肥量で育成したソルガムの葉では、葉内窒素含量と光合成ガス交換特性及びクロロフィル蛍光特性の間にいずれも高い相関があることを見出した。また、Pn と SLW との間にも正の相関が見られた。PNUE は窒素施肥量が少なくなるほど高くなった。施肥窒素量の低下に対し、Rubisco 活性よりも PEPC 活性の低下率が高いことが認められた。一方、葉の光合成細胞は標準窒素区に比べ低窒素区で小型化した。MC と BSC の断面積比、含まれる葉緑体の量比には両窒素区の間で大きな違いはなかった。低窒素区では葉緑体が小型化するとともに、BSC 葉緑体に多量のデンプン粒が蓄積した。低窒素区では光合成細胞の細胞壁が厚くなり、特にこれは BSC で著しく、BSC 内からの CO_2 の漏れを抑制する意義を持つものと考えられた。また、低窒素区の葉では MC と BSC 間の原形質連絡密度の低下が起こることを明らかにした。

(6) NAD-ME 型 C4 作物キビの葉の構造と機能特性に及ぼす窒素の影響

異なる窒素施肥量で育成したキビの葉では、葉内窒素含量と光合成ガス交換特性の間に高い正の相関があることを確認した。キビでも施肥窒素量が低下するほど PNUE は高くなり、Rubisco 活性よりも PEPC 活性をより強く抑制することが認められた。細胞当りの葉緑体数は BSC でのみ減少し、MC では変化はなかった。両細胞の葉緑体サイズは低窒素区で著しく減少したが、葉緑体のグラナ層数は BSC では変化がなく、MC では低窒素区で幾分上昇した。また、BSC 葉緑体にデンプン粒の蓄積が起こった。細胞当りのミトコンドリア数は MC に比べ BSC でより大きく減少したが、ミトコンドリアのサイズは両細胞ともに

窒素条件による差はなかった。細胞壁は低窒素区で厚くなったが、特に BSC で顕著であった。また、葉の炭素同位体分別比は低窒素区で上昇し、BSC 細胞壁の肥厚による CO₂ 漏出の低下との関連が考えられた。BSC の原形質連絡数は低窒素区で減少傾向を示した。

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)

[学会発表](計 12 件)

屋比久貴之、上野修、トウモロコシとその野生種における光合成能および資源利用効率の変異とその制御要因. 日本作物学会第 239 回講演会要旨集 75、2015 年 3 月 27 日、日本大学(藤沢)

戸川由子、上野修、イネ科 C₄ 植物における光合成に関わる資源利用効率の生化学的サブタイプによる比較. 日本作物学会第 239 回講演会要旨集 209、2015 年 3 月 27 日、日本大学(藤沢)

久富浩誠、上野修、イネ科 NAD-ME 型 C₄ 植物キビの葉構造と光合成特性に及ぼす窒素の影響. 日本作物学会第 239 回講演会要旨集 211、2015 年 3 月 27 日、日本大学(藤沢)

Yabiku T, Ueno O, Variation in photosynthetic rate and its regulatory factors in Japanese cultivars of maize. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2015, Tottri, Japan.

Togawa Y, Ueno O, Variation in photosynthetic nitrogen use efficiency and transpiration efficiency of C₃ and C₄ grasses with special reference to C₄ subtypes. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in

Asia, 2014, Chuncheon, Korea, p129.

牧野雄太郎、上野修、ソルガム(C₄)の葉の構造・機能特性に及ぼす窒素の影響. 1. 光合成特性について. 日本作物学会紀事 82 (別号 1)、372-373、2013 年 3 月 28 日、明治大学(川崎)

牧野雄太郎、上野修、ソルガム(C₄)の葉の構造・機能特性に及ぼす窒素の影響. 2. 葉肉細胞と維管束鞘細胞の構造について. 日本作物学会紀事 82 (別号 1)、212-213、2013 年 3 月 28 日、明治大学(川崎)

堤伸子、遠矢みゆき、中島大賢、上野修、アマランサス属(NAD-ME 型 C₄)における光合成能の種間差とその制御要因の検討. 日本作物学会紀事 82 (別号 1)、374-375、2013 年 3 月 28 日、明治大学(川崎)

Makino Y, Ueno O (2012) Nitrogen responses of photosynthetic characteristics in C₃ and C₄ grasses. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2012, Korea.

[図書](計 1 件)

上野修、農文協、作物の光合成、平沢正、大杉立(編)作物の生産生理入門、(印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 修 (UENO OSAMU)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：70414886