

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21114006

研究課題名(和文)高CO₂環境がイネの光合成とバイオマス生産に与える影響の解明

研究課題名(英文)Effects of elevated [CO₂] on photosynthesis and biomass production in rice

研究代表者

牧野 周(Makino, Amane)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70181617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,100,000円、(間接経費) 25,530,000円

研究成果の概要(和文)：本新学術領域研究では、イネを中心に、高CO₂下における光合成因子の分子メカニズムの解明と光合成機能の評価、バイオマス生産に与える影響について明らかにすることを目的とした。具体的には、Rubisco量の特異的な増減させた形質転換体イネと葉身特異的デンプン合成欠損変異体イネについて、高CO₂応答の実験を行い、Rubisco量の適量化が異なるCO₂環境に有利・不利を決めていることがわかった。また葉身のデンプン代謝は、高CO₂成育の鍵となっていることもわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the molecular mechanisms of photosynthesis and biomass production in rice under conditions of elevated CO₂ levels. Enhancement and reduction in Rubisco (photosynthetic CO₂ fixation enzyme) content by transformation with a sense or an antisense RBCS construct had an advantage for growth at low and elevated [CO₂] levels, respectively. In addition, analyses with starchless rice mutant indicated that starch metabolisms in leaf blades play an important role in growth and biomass production under elevated [CO₂] levels

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：イネ 光合成 高CO₂ バイオマス

1. 研究開始当初の背景

地球規模での CO₂ の濃度上昇は、作物の生産性にも大きな影響を与える。現在、人類の食糧生産量の 80% が植物に由来(乾物重換算)し、中でもその約半分をイネとコムギが占める。特に、イネは日本やアジアのもっとも重要な作物である。このように、CO₂ 濃度上昇が、主要作物イネの光合成機能、成長、および生産性に与える影響を解明することは、人類の食糧生産と関連してきわめて重要な課題である。

高 CO₂ 環境がイネ生育に与える影響に関しては、(独)東北農業研究センターと(独)農業環境研究所が岩手県雫石町で行った野外圃場による開放系大気 CO₂ 増加(FACE: free air CO₂ enrichment、約 200 ppmv の CO₂ 添加)実験等のすぐれた研究成果により、イネ品種の違いに関係なく 5 から 15% の収量増の効果があることが明らかにされた。収量増の要因は高 CO₂ による光合成機能の増進効果で、栄養生長期の乾物重増加とそれに伴う茎数増加が増収に直接結びついたことがわかった。私達もかつて実験室レベルでの人工気象室を用いた実験により、同様の結果を見出した。しかしながら、高 CO₂ による個葉レベルでの光合成機能の増進がどのように栄養生長期の乾物重増加に繋がり、最終的な収量増にむすびつくのか、その具体的な定量的な因果関係と分子生理的な応答に関しては、明らかになっていない。さらに、200 ppmv の CO₂ 濃度増加は光合成速度を 30% から 50% 上昇させるにもかかわらず、収量増が 5 から 15% レベルに留まっている点である。収穫期の乾物総生産量の増加分が収量の増加分となっていて、高 CO₂ 環境がイネの生育後半の生殖成長期にかけての光合成機能や乾物生産能に抑制的に働くことが見出されている。しかし、その要因は解明されていない。本研究課題では、それらを明かにすべく、イネを中心に高 CO₂ 環境による光合成の分子応答メカニズムについて調べた。

2. 研究の目的

イネを中心に、高 CO₂ 下における光合成に関する生化学因子の分子メカニズムの解明と光合成機能の評価、および C/N バランスと個体内の物質分配を定量解析して、バイオマス生産に与える影響について明らかにすることを目的とした。最終的には、地球規模での CO₂ の濃度上昇に対する主要作物の生産応答の定量評価に活用を考えた。具体的には、Rubisco 量の特異的な増減させた形質転換体イネを用い、Rubisco 量の増減が CO₂ 濃度変化に対する生育の応答に与える影響を解析を行うと同時に、高 CO₂ 環境への適応性を評価した。また、データベース上に登録のある葉身特異的デンプン合成欠損変異体イネについて実験を行なった。特に、後者の変異体に関しては、(独)農業環境研究所の全面協力を頂き、つくばみらい市にある FACE 圃場を

利用して、実験を行なった。

3. 研究の方法

(1) 光合成炭酸固定酵素 Rubisco 量の増減(RBCS [Rubisco 小サブユニット遺伝子]過剰発現イネと抑制発現イネ)と RBCS と *rbcl* (Rubisco 大サブユニット遺伝子) の発現量との関係および ¹⁵N トレーサー法による生合成量の増減を調べた。

(2) 異なる CO₂ 濃度(28 ~ 120 Pa CO₂ 分圧)並びに異なる温度(19 ~ 25 °C)条件での RBCS 過剰発現イネと RBCS 抑制発現イネの栄養成長期までのバイオマス生産量と窒素吸収量を調べた。

(3) RBCS を分子種別に RNAi 法にて発現抑制したイネの作製を行い、それらのイネの異なる CO₂ 濃度での光合成特性およびバイオマス生産量について調べた。

(4) 葉身特異的デンプン合成能欠損イネの異なる CO₂ 濃度での光合成特性とバイオマス生産量について調べ、FACE 圃場実験に供した。

4. 研究成果

(1) RBCS 過剰発現イネと発現抑制イネにおける RBCS と *rbcl* の発現量との関係を調べた結果では、RBCS mRNA 量より、むしろ *rbcl* mRNA 量との間に定量的な相関関係が認められた(図 1)。RBCS 発現量の増減が *rbcl* の発現量を決定し、最終的なタンパク質量は *rbcl* の発現量によって決定されていると判断した(Suzuki and Makino 2012 *Plant Physiol*; Suzuki and Makino 2013 *J Exp Bot*)。

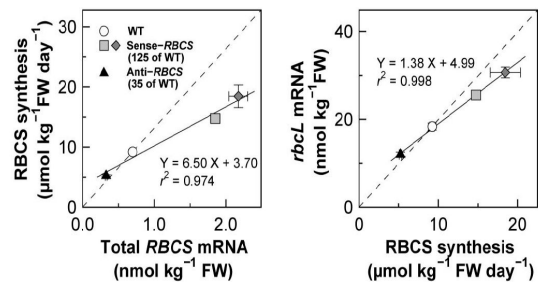


図 1. 展開中のイネ葉身の全 RBCS mRNA 量に対する Rubisco 小サブユニット(RBCS)タンパク質の1日当たりの合成量(左パネル)と RBCS タンパク質の1日当たりの合成量に対する *rbcl* mRNA 量(右パネル)。RBCS タンパク質の生合成量は ¹⁵N トレーサー法を用いて見積もった。

(2) RBCS 過剰発現イネにおいて、栄養成長期までのバイオマス生産に関しては、現在の大気 CO₂ 濃度では、Rubisco 増強分に相当する、バイオマス増産の効果があったことを、以前報告した(ex. Suzuki et al. 2012 *PCE*)。しかしながら、そんな中、バイオマス増産の効果は、低温環境や低 CO₂ 環境では大きいこと、逆に、高 CO₂ では効果がまったく無くなるなど、Rubisco の光合成における律速性と合致することがわかった(図 2)。また、低温や低 CO₂ 環境では、RBCS 過剰発現イネ

において Rubisco タンパク量増加に顕著な効果あることがわかった。さらに、窒素吸収量とバイオマス生産量の関係を調べたところ、Rubisco が過剰生産されることで、植物体の窒素の要求量も増えることがわかった(図 3: Sudo et al. 2014 submitted)。

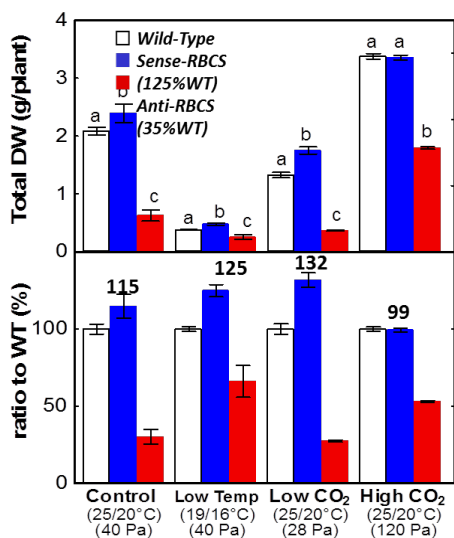


図 2. 低温環境(19/16°C)、低CO₂環境(28 Pa CO₂)、および高CO₂環境(120 Pa CO₂)で生育させたRubisco 過剰発現体(Sense-RBCS, 中央カラム)と発現抑制体(Anti-RBCS, 右カラム)イネの個体乾物量。標準栽培は25/20°C & 40 Pa CO₂。

データは平均値。±標準誤差(n = 6)。同一アルファベット内ではTurkey-Kramer's HSD検定で有意差なし。

(3) 一方、5種の遺伝子族を構成する RBCS 遺伝子のうち、葉身で特異的に発現する 4 分子種 RBCS を個別に RNAi 法にて発現抑制したイネの作製を行い、それらの解析を進めた(Ogawa et al. 2012 PCE)。いずれの分子種の RNAi 体も、Rubisco 量が 10-30%程度減少した系統が選抜された。それらは、分子種別の遺伝子発現の増減は他の分子種の発現には影響を与えない(相補作用のない)性格のものであることもわかった。また、いずれの RNAi 体も A:Ci 解析(飽和光合成の葉内 CO₂ 分圧変化に対する応答解析)、低 CO₂ では光合成速度を下げたが、高 CO₂ 条件では、逆に光合成速度の促進効果があった。これら系統の遺伝背景を安定させるため、戻し交配を進め、BC₂F₂ 世代に関して、高 CO₂ 条件(120Pa)での生育を検討した。その結果、RBCS3 と RBCS5 の RNAi 系統において、野生型のバイオマス量を有意に上回ることが観察された(Kanno et al. 2014 in preparation)。このように、高 CO₂ 条件では Rubisco による光合成への律速性が失われるので、Rubisco 量を 10 から 30%程度減少させることは、窒素の利用効率向上と言う面から、高 CO₂ 環境で有利であることがわかった。

(4) デンプン合成の鍵酵素、葉身プラスチック型 AGPase (OsAPL1)の欠損イネ(Tos17

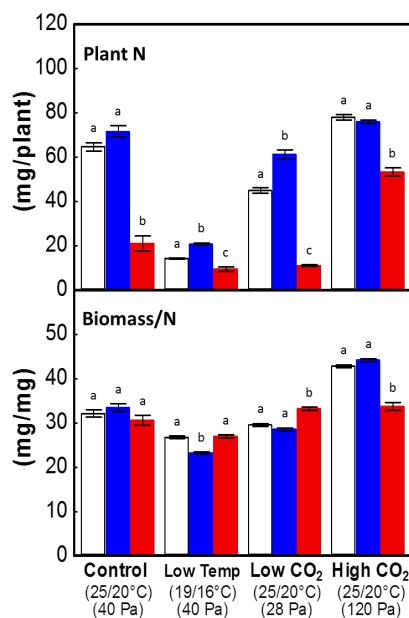


図 3. 63日間、低温環境(19/16°C)、低CO₂環境(28 Pa CO₂)、および高CO₂環境(120 Pa CO₂)で生育させたRubisco過剰発現体(Sense-RBCS, 中央カラム)と発現抑制体(Anti-RBCS, 右カラム)イネの個体吸収窒素量(Plant N)および乾物生産:窒素比(Biomass/N)。標準栽培は25/20°C & 40 Pa CO₂。

データは平均値。±標準誤差(n = 6)。同一アルファベット内ではTurkey-Kramer's HSD検定で有意差なし。

挿入系統)を入手した。培養変異に由来すると思われる生育不良が認められたので、親品種とのバッククロスを2回かけたBC₂F₃個体を作成した。APL1欠損イネのグロースチャンパーでの実験でのバイオマス生産量は、大気CO₂条件で野生型イネ(日本晴)とほぼ同等のバイオマス生産を示しましたが、高CO₂分圧条件では明らかに劣っていた。つくばみらい市でのFACE圃場において、野外実験を行ったところ、同様の結果が得られ、高CO₂濃度区において、APL1欠損イネのバイオマス生産低下とそれに伴う、収量減が認められた。一方、葉面積当たりの光合成速度では、CO₂濃度に関わらず、APL1において低い傾向にあり、特に高CO₂領域で顕著でした。A:Ci解析の結果からは、葉身デンプン合成能力の欠損におけるPi再生産律速による光合成抑制が示唆された。このように、高CO₂条件では、光合成産物としてショ糖蓄積型のイネにおいても、葉身のデンプン代謝が重要な機能を果たしていることが示され、高CO₂条件でのAPL1強化が有効である可能性が考えられた。

4. 主な発表論文等

[雑誌論文](計35件)

以下、20件すべて査読有

Ishida H, Izumi M, Wada S and Makino A (2014) Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (4)

- 512–521. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.009
- . Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada H, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N and Kuchitsu K (2014) *OsATG7* is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 10: 878-888. doi: 10.4161/auto.28279
- . Suzuki Y and Makino A (2013) Translational down-regulation of *RBCL* is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. *J Exp. Bot.* 64: 1145-1152. doi: 10.1093/jxb/ers398
- . Hasegawa T, Sakai H, Tokida T, Nakamura H, Zhu C, Usui Y, Yoshimoto M, Fukuoka M, Wakatsuki H, Katayanagi N, Matsunami T, Kaneta Y, Sato T, Takakai F, Sameshima R, Okada M, Mae T and Makino A (2013) Rice cultivar responses to elevated CO₂ at two free-air CO₂ enrichment (FACE) sites in Japan. *Func. Plant Biol.* 40: 148-159. doi: org/10.1071/fp12357
- . Ono Y, Wada S, Izumi M, Makino A and Ishida H (2013) Evidence for contribution of autophagy to Rubisco degradation during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Environ.* 36: 1147-1159. doi: 10.1111/pce.12049
- . Izumi M, Hidema J, Makino A and Ishida H (2013) Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis* *Plant Physiol.* 161 (4): 1682-1693. doi: 10.1104/pp.113.215632
- . Ogawa S, Suzuki Y, Yoshizawa R, Kanno K and Makino A (2012) Effect of individual suppression of *RBCS* multigene family on Rubisco contents in rice leaves. *Plant Cell Environ.* 35, 546-553. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02434.x
- . Izumi M, Tsunoda H, Suzuki Y, Makino A and Ishida H (2012) *RBCS1A* and *RBCS3B*, two major members within the *Arabidopsis* *RBCS* multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *J. Exp. Bot.* 63, 2159-2170. doi: 10.1093/jxb/ers434
- . Suzuki Y, Fujimori T, Kanno K, Sasaki A, Ohashi Y and Makino A (2012) Metabolome analysis of photosynthesis and the related primary metabolites in the leaves of transgenic rice plants with increased or decreased Rubisco content. *Plant Cell Environ* 35: 1369-1379. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02434.x
- . Yamori W, Matsumoto C, Fukayama H and Makino A (2012) Rubisco activase is a key regulator of non steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *Plant J* 71: 871-880. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05041.x
- . Suzuki Y and Makino A (2012) Availability of Rubisco small subunit up-regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Physiol.* 160: 533-540. Doi: 10.1104/pp.112.201459
- . Nishikawa Y, Yamamoto H, Okegawa Y, Wada S, Sato N, Taira Y, Sugimoto K, Makino A and Shikanai T (2012) PGR 5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice. *Plant Cell Physiol.* 53: 2117-2126. doi: 10.1093/pcp/pcs153
- . Miyake C, Suzuki Y, Yamamoto H, Amako K and Makino A (2012) O₂-enhanced induction of photosynthesis in rice leaves: The Mehler-ascorbate peroxidase (MAP) pathway drives cyclic electron flow within PSII and cyclic electron flow around PSI. *Soil Sci. Plant Nutr.* 58 (6) 718-727. doi: 10.1080/00380768.2012.736078
- . Makino A (2011) Photosynthesis, grain yield and N utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* 155 : 125-129. doi: 10.1104/pp.110.165076
- Seneweera S, Makino A, Hirotsu N, Norton R, Suzuki Y (2011) New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves. *Environ. Exp. Bot.* 71: 128-136. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.11.002
- . Yamori W, Nagai T and Makino A (2011) The rate-limiting step for CO₂ assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C₃ crop species. *Plant Cell Environ.* 34: 764-777. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02280.x
- . Izawa T, Mihara M, Suzuki Y, Gupta M, Itoh H, Nagano A, Motoyama R, Sawada Y, Yano M, Yokota Hirai M, Makino A and Nagamura Y (2011) *Os-GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell* 23, 1741-1755. doi: 10.1105/tpc.111.083238
- . Yamori W, Sakata N, Suzuki Y, Shikanai T and Makino A (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth under low temperature in rice. *Plant J.* 68, 966-976. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04747.x
- Suzuki Y, Kihara-Doi T, Kawazu T, Miyake C and Makino A (2010) Differences in Rubisco content and its synthesis and degradation in leaves at different positions in *Eucalyptus globulus* seedlings. *Plant Cell Environ.* 33,

1314-1323. doi:
10.1111/j.1365-3040.2010.02149.x

Kanno K and Makino A (2010) Increased grain yield and biomass allocation in rice under cool night temperature. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 412-417. doi: 10.1111/j.1747-0765.2010.00473.x

〔学会発表〕(計 65 件)

Makino A: Rubisco, nitrogen and plant growth in rice. JST-CREST International Symposium on Productivity Improvement of Plants: From Model to Crop Plants, Nara, Japan, January 10, 2014

Makino A: Rubisco and nitrogen relationships in rice leaves. The 16th international Congress on Photosynthesis Research, St. Louis, MI, USA, August 11-16, 2013

牧野 周、作物の光合成能力の改善は可能か？これからの挑戦、第 4 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム、2013 年 6 月 1 日、名古屋

Makino A: Source/sink improvement in rice: Rubisco as a target for enhancing N-use efficiency. The 13th Chinese Crop Physiology Academic Conference (International Symposium) Yandzhou, Jiangsu, China, September 20-22, 2012

牧野 周、高 CO₂ 環境と C₃ 光合成の窒素利用、第 3 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム、2012 年 6 月 1 日、横浜

牧野 周、イネの窒素栄養生理と生産性、第 57 回日本土壌肥料学会、2011 年 8 月 10 日、つくば

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究代表者所属研究室 WEBSITE

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/syokuei/index-j.htm>

↓

本新学術領域研究 WEBSITE

<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp/shinryoiki/index.html>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 周 (MAKINO, AMANE)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70181617

(2) 研究分担者

鈴木 雄二 (SUZUKI, YUJI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80374974