

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14638

研究課題名(和文) 新たな光呼吸抑制機構の解明と作物光合成能改良への応用

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism to reduce photorespiration and the application to improvement of crop photosynthesis

研究代表者

上野 修 (Ueno, Osamu)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70414886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： シロザを含むアカザ属植物の光合成・光呼吸特性を比較解析した。この結果、アカザ属では従来より知られていたC3型のほか、proto-Kranz型やC3-C4中間型という光呼吸抑制機構が出現していることが初めて明らかとなった。特に、シロザにおける光合成・光呼吸特性は変異に富み、分布地域によっても異なる特性を表すことが見出された。また、シロザにおける光合成・光呼吸特性の発現に生育温度や土壌窒素分が影響することが明らかとなった。このような光呼吸抑制機構はC4光合成の進化の前駆的段階に位置づけられるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)： This study investigated photosynthetic and photorespiratory traits in the genus *Chenopodium* (Chenopodiaceae). It was found that this genus includes proto-Kranz and C3-C4 intermediate types as well as C3 type. It is noteworthy that *C. album* shows a great variation in the photosynthetic type depending on locality. In addition, the expression of photosynthetic and photorespiratory traits in *C. album* was influenced by environmental factors such as growth temperature and soil nitrogen level. It is suggested that the mechanism to reduce photorespiration in *Chenopodium* represents an initial stage to the evolution of C4 plants.

研究分野：植物生産生理学

キーワード：C3植物 C3-C4中間植物 光呼吸 光合成 proto-Kranz植物 アカザ属 葉構造

## 1. 研究開始当初の背景

今世紀の終わりには、世界人口は 100 億人を突破すると予想されている。このため、食料不足の問題が深刻化すると考えられ、作物収量の増大が求められている。また地球温暖化に伴い、気候変動が農業生産に悪影響を及ぼすことが懸念されている。したがって、作物の物質生産の基礎となる光合成能力の向上は農業上最も重要な課題の一つである。

これまでも作物の光合成能力を高めようとする研究が行われてきた。C3 植物では光呼吸活性が高く光合成効率の低下を招くことから、これを抑えることを目指して C3 作物に C4 光合成特性を導入しようとする試みが進められているが、なお解決すべき問題も多く、その実現は容易なことではないと考えられている。

我々は C3、C4 植物の葉の構造・機能特性や生理生態的特性について研究しているが、最近双子葉 C3 植物の葉の比較解析をする中で、アカザ科のシロザ(*Chenopodium alba*)が C4 光合成とは異なる光呼吸抑制機構を持っている可能性を見出した。この植物は基本的には C3 光合成を行っているが、維管束鞘細胞におけるミトコンドリアの発達と、光呼吸回路の CO<sub>2</sub> 放出に関わるグリシンデカルボキシラーゼ(GDC)の局所発現の調節により光呼吸を抑制していると推定される。すなわち、GDC が働く場所を葉の組織の最内部に集中させることにより、光呼吸による CO<sub>2</sub> 放出を極力抑えていると推定される。したがって、いわゆる C3-C4 中間光合成の前駆的な光呼吸抑制機構を持っている可能性が考えられる。また、興味深いことに予備的調査では、光呼吸が高まる高温条件で育成した植物でこの特性はより強く発現した。これらのデータは、シロザでは葉の構造と生化学特性を特殊化させることにより、光呼吸活性を変動させるという新規の特性を獲得していると考えられた。このような特性はこれまで十分に

調査されておらず、C3 植物における新規な光呼吸抑制機構の可能性がある。

## 2. 研究の目的

C3 作物では、固定した炭素の約 30%が光呼吸により失われ、光合成効率が低下する。このとき同時にアンモニア(NH<sub>3</sub>)の放出も起こり、光呼吸は C3 植物の窒素経済にも負の影響を及ぼす。一方、C4 植物では C4 回路の働きにより光呼吸は抑えられ高い光合成効率を示すことから、C3 作物に C4 特性を導入しようとする研究が行われてきたが、成功には至っていない。ところが、我々による最近の調査から、アカザ属 C3 植物のシロザでは C4 回路とは異なった光呼吸抑制機構が出現している可能性が見出された。これには、光合成細胞におけるミトコンドリアの形態分化と光呼吸酵素の組織特異発現が関与していると予想された。

そこで本課題では、1)シロザにおける光呼吸抑制機構のメカニズムを詳細に解明し、2)この機構の発現に環境要因がどのように影響しているのかを明らかにする。さらに、3)他のアカザ属植物についてこの光呼吸抑制機構の出現の実態を網羅的に調査する。4)加えて、イネ科 C3 植物の光合成細胞内におけるミトコンドリアの配置を調査し、光呼吸等により発生した CO<sub>2</sub> の回収機構の存在を検討する。以上の結果を基に、光呼吸制御の視点から C3 作物の光合成効率の向上に活用できる方策を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料

国内に分布するシロザ並びに近縁植物の種子は、福岡市と茨城県つくば市に自生している植物から採集した。また海外に分布するアカザ属植物の種子は、米国農商務省ジーンバンクおよび農林水産省農業生物資源研究所ジーンバンクより提供されたものを使用した。イネ科植物の種子および植物体は主に

国内で採取した種子並びに九州大学農学部  
に自生していた植物を用いた。アカザ属植物  
はポット植とし、夏期にビニルハウス内で育  
成した。また、シロザとキノアを 20°C と 30°C  
の温度条件で窒素施肥量を 2 段階に変えて  
育成し、光合成・光呼吸特性の反応を解析し  
た。

#### (2) 実験方法

葉を細切後、グルタルアルデヒドとオスミ  
ウム酸で固定しエポキシ樹脂に包埋した。こ  
れよりウルトラミクロトームで厚さ 1 ミク  
ロンの葉切片を作成してトルイジンブルー  
で染色後、光学顕微鏡で葉肉細胞と維管束鞘  
細胞の構造を観察した。また、超薄切片を作  
成し、透過型電子顕微鏡でミトコンドリアと  
葉緑体の構造と細胞内における配置パター  
ンを観察した。画像解析ソフト (Image J) を用  
いて細胞およびオルガネラの量的評価を行  
った。

葉片をパラフォルムアルデヒドで固定後  
パラプラストに包埋した。これより厚さ 8 ミ  
クロンの葉切片を作成して、光呼吸酵素 GDC  
と光合成酵素 Rubisco の免疫組織化学的染色  
を行い、葉肉細胞と維管束鞘細胞における両  
酵素タンパク質の蓄積パターンを解析した。  
一方、固定した葉片を Lowicryl K4M 樹脂に  
低温包埋して超薄切片を作成し、ミトコンド  
リアにおける GDC タンパク質の蓄積量を金  
コロイド免疫電子顕微鏡法により解析した。

葉の光合成・光呼吸関連酵素の活性を分光  
光学的手法により測定するとともに、  
Western blot 法により同酵素タンパク質の  
蓄積量を調査し、どのような生化学特性を持  
っているのかを検討した。

光合成ガス交換測定装置(LI-6400)を用い  
て葉の光合成速度、蒸散速度および光呼吸活  
性の指標となる二酸化炭素補償点を測定し  
た。二酸化炭素補償点は外気 CO<sub>2</sub> 濃度を変化  
させたときの光合成速度の応答から算出し  
た。水利用効率の指標となる蒸散効率を光合

成速度を蒸散速度で除することにより算出  
した。また、葉の窒素含量をマイクロケルダ  
ー法で測定して光合成窒素利用効率を算出  
した。さらに、葉の炭素同位体分別比 ( $\delta^{13}\text{C}$   
値)を測定して光合成 CO<sub>2</sub> 固定機構の全体像  
を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アカザ属における光呼吸抑制機構の出現 と進化

シロザを含むアカザ属植物 15 種について、  
葉の内部構造と光合成・光呼吸に関わる生理  
生化学的特性を比較解析した。この結果、ア  
カザ属植物では維管束鞘細胞に含まれる葉  
緑体とミトコンドリアの量と細胞内配置に  
連続的な変異があることが明らかとなった。  
このうち 3 種は維管束鞘細胞に葉緑体やミト  
コンドリアをあまり含まない C3 型、4 種は維  
管束鞘細胞内に求心的に配置したオルガネ  
ラを多く持つ proto-Kranz 型、2 種はこれら  
の中間的な特徴を示した。残りの 2 種は維管束  
鞘細胞内に求心的に配置した多量のオルガ  
ネラをもつ C3-C4 中間型であった。CO<sub>2</sub> 補償  
点は葉の内部構造と一致して、C3 型から  
C3-C4 中間型の値まで連続的に低下し、光呼  
吸の抑制が起こった。このようにアカザ属で  
は C3 型のほか proto-Kranz 型や C3-C4 中間  
型を含み、C4 植物の初期進化過程を研究する  
上で価値があることが見出された。

初期の予備的調査では、シロザは基本的  
には C3 型であるが、光呼吸を抑制する独特  
の機構を持っていると考えられたが、属全体  
の光合成・光呼吸特性との比較解析から、C3  
植物から C3-C4 中間植物や C4 植物の進化へ  
の前駆的段階に位置づけられる植物  
(proto-Kranz 型)と結論された。また、シロ  
ザでは同一種内に proto-Kranz 型他、C3-C4  
中間型も含まれており、分布地域によっても  
光合成型が変異していた。

次に、アカザ属の C3 型 3 種、proto-Kranz  
型 2 種、C3-C4 中間型 2 種を用いて、C3 型か

ら C3-C4 中間型光合成の進化における葉の構造的生化学的变化を、電子顕微鏡を用いて詳細に調査した。CO<sub>2</sub> 補償点は C3 型から proto-Kranz 型、さらに C3-C4 中間型へと徐々に低下した。これに伴い、葉肉/維管束鞘組織比と葉肉細胞/維管束鞘細胞のサイズ比も低下した。また、維管束鞘細胞に含まれる葉緑体とミトコンドリアの数、並びにそれらの求心的配置割合は増加した。このとき葉緑体のサイズは変化しなかったが、ミトコンドリアのサイズは増大した。一方、葉肉細胞に含まれる葉緑体とミトコンドリアの数およびサイズは変化しなかったが、ミトコンドリアの細胞内の配置が変化し、徐々に細胞壁側に配置するミトコンドリアの割合が増加した。光呼吸酵素 GDC は、C3 型では主に葉肉細胞に蓄積していたが、proto-Kranz 型では葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方に蓄積し、C3-C4 中間型では維管束鞘細胞のみに局在するように変化した。以上より、アカザ属では C3 型から proto-Kranz 型、C3-C4 中間型へと連続的な構造的生化学的な変化が起こることにより、光呼吸による CO<sub>2</sub> の損失が抑制されるようになると考えられた。

## (2) シロザにおける光呼吸抑制機構の発現に及ぼす環境要因の影響

茨城県つくば市で採種された proto-Kranz 型のシロザと、コントロールとして C3 型のキノアを温度と土壤窒素量を変えて育成し、これらの環境要因が光合成・光呼吸特性の発現に影響するかを検討した。温度条件は低温区を 20°C、高温区を 30°C とし、土壤窒素条件は低窒素区を 0.05 g N/5 L ポット、標準窒素区を 1.0 g N/5 L ポットとして植物を 5 週間育成し、葉の構造と光合成・光呼吸の生理生化学的特性を調査した。シロザでは低温区より高温区で、また標準窒素区より低窒素区で、葉肉細胞に比べ維管束鞘細胞における GDC の蓄積割合が相対的に増加した。同時に CO<sub>2</sub>

補償点が低下することが見出された。一方、キノアではこのような変化が起らず、常に C3 型に典型的な特徴を示すことを確認した。以上より、proto-Kranz 型のシロザでは高温および低窒素環境に生育することにより C3-C4 中間特性の発現が促進され、光呼吸による CO<sub>2</sub> の損失が抑制されるようになることが明らかとなった。この場合、GDC の細胞間での発現は C3-C4 中間植物のように維管束鞘細胞のミトコンドリアに限定されるのではなく、葉肉細胞と維管束鞘細胞の両方に発現しており、相対的に維管束鞘細胞での発現が強まっていた。したがって、両細胞での GDC の量的なバランスが二酸化炭素補償点に影響すると考えられた。

## (3) イネ科植物の光合成細胞におけるミトコンドリアの配置と CO<sub>2</sub> 損失の抑制

イネ科の C3 植物 10 種と C4 植物 14 種について、葉肉細胞におけるミトコンドリアの細胞内配置を調査した。その結果、C3 植物の葉肉細胞では、ミトコンドリアの 61~92%が光呼吸による CO<sub>2</sub> の損失を抑制するように葉緑体の内側（液胞側）に配置していることが明らかとなった。一方、光呼吸による CO<sub>2</sub> の発生がない C4 植物の葉肉細胞では、ミトコンドリアはこのような配置を示さず、細胞壁に隣接して配置していることを見出した。したがって、C3 植物では活発な光呼吸のため光合成により固定された炭素の一部が葉肉細胞から失われるが、この損失をできるだけ抑えるようにミトコンドリアが葉肉細胞内の葉緑体の内側に配置していると考えられた。ミトコンドリアがこの配置をとることにより、光呼吸により発生した CO<sub>2</sub> が細胞外に出る前に葉緑体の Rubisco により再固定されるものと考えられた。

次に、イネ科の C3 植物の維管束鞘細胞におけるミトコンドリアの配置を調査したところ、維管束鞘細胞に含まれるミトコンドリア

アの62~75%が求心的(細胞の維管束側)に配置していることを見出した。このようなミトコンドリアの配置は、光呼吸により発生したCO<sub>2</sub>が細胞外へ失われることを抑制するものと考えられ、アカザ属で見出されたようなC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型からC<sub>4</sub>型への進化の初期段階に当たるものと推測された。

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)

[雑誌論文](計2件)

1. Hatakeyama Y, Ueno O (2017) Intracellular position of mitochondria in mesophyll cells differs between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses. *Journal of Plant Research* 130: 885-892. DOI: 10.1007/s10265-017-0947-z (査読あり)

2. Hatakeyama Y, Ueno O (2016) Intracellular position of mitochondria and chloroplasts in bundle sheath and mesophyll cells of C<sub>3</sub> grasses in relation to photorespiratory CO<sub>2</sub> loss. *Plant Production Science* 19: 540-551. DOI: org/10.1080/1343943X.2016.1212667 (査読あり)

[学会発表](計7件)

1. 依光由記, 上野修、アカザ属におけるC<sub>3</sub>型からC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間型の進化の間に葉構造と光合成機能はどのように変化したのか。日本作物学会第245回講演会要旨集(宇都宮大学)217、2018年3月29日、宇都宮大学(宇都宮)

2. 依光由記, 畠山友翔, 屋比久貴之, 上野修、アカザ属(*Chenopodium*)における光合成・光呼吸特性の種間および種内変異。日本作物学会第243回講演会要旨集218、2017年3月29日、東京大学(本郷)

3. 大野じえみん, 畠山友翔, 屋比久貴之,

上野修、高温と低窒素土壌環境はシロザにおけるC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>中間光合成特性の発現を促進する。日本作物学会第243回講演会要旨集217、2017年3月29日、東京大学(本郷)

4. Yorimitsu Y, Hatakeyama Y, Yabiku T, Ueno O, Variation in photosynthetic and photorespiratory characteristics in the genus *Chenopodium* (Chenopodeaceae). The 13<sup>th</sup> International Joint Symposium between Korea and Japan, Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, Nov. 3-11, 2016. Hotel Intercity, Korea, p101.

5. 畠山友翔, 上野修、葉肉細胞におけるミトコンドリアの細胞内配置はC<sub>3</sub>植物とC<sub>4</sub>植物で異なる。日本作物学会第242回講演会要旨集44、2016年9月10日、龍谷大学(瀬田)

6. 上野修, 門園彩, 畠山友翔, 屋比久貴之, 永井あかね、シロザの維管束鞘細胞におけるミトコンドリアと光呼吸酵素の集中。日本作物学会第241回講演会要旨集201、2016年3月28日、茨城大学(水戸)

7. 畠山友翔, 上野修、イネ科C<sub>3</sub>植物葉におけるミトコンドリア細胞内配置の電子顕微鏡観察—光呼吸によるCO<sub>2</sub>ロスとの関連から。日本作物学会第240回講演会要旨集109、2015年9月5日、信州大学(長野)

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