

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380013

研究課題名（和文）野生イネとの比較によるイネの光合成を制御する葉の構造的要因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of structural factors regulating photosynthetic traits in rice plants in comparison with wild rice species

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

研究成果の概要（和文）：イネ属植物 21 種 45 系統の光合成速度の変異とそれを制御する葉の構造的要因について解析した。光合成速度には種間により 2.4 倍の変異があり、それには気孔伝導度、気孔のサイズと密度、葉肉細胞層数、比葉重等が関わっていた。イネ属植物は全て C3 型と考えられたが、葉の維管束鞘細胞には少量ながら葉緑体を含み、光合成・光呼吸酵素を蓄積していた。また C3, C4, CAM 植物における光合成細胞の細胞壁の厚さには大きな違いがあり、それには CO₂ の拡散や漏出が密接に関わっていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the variation in photosynthetic rate of leaves and its regulatory structural factors in 45 strains of 21 species in the genus *Oryza*. There was a great variation in photosynthetic rates among the species. This variation was correlated with those in stomatal conductance, stomatal size and density, the number of mesophyll cell layer, and specific leaf weight. Although all the *Oryza* species were considered to be of C3 type, the bundle sheath cells of leaves contained a few chloroplasts and photosynthetic and photorespiratory enzyme proteins. This study also examined cell wall thickness of photosynthetic cells in herbaceous C3, C4, and CAM species and found that the variation in cell wall thickness was closely related to the diffusion of CO₂ to mesophyll cells and the leakage of CO₂ from bundle sheath cells within leaves.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2009年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 2010年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2011年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,100,000 | 4,230,000 | 18,330,000 |

研究分野：植物および作物生理学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：光合成、イネ、野生イネ、葉構造、作物生理、作物形態

1. 研究開始当初の背景

光合成は、作物の物質生産を担う重要な生理機能である。これまで、光合成炭酸固定反応を制御する生理・生化学的機構が活発に研究されてきた。葉においては、大気中の CO₂ はまず気孔から取り込まれ、葉肉の細胞間隙を拡散し、葉肉細胞の細胞壁を通過して葉緑体

に至り固定される。生成された光合成産物は維管束鞘細胞に移動し、維管束を経て葉外へと転流して行く。このように、光合成のプロセスには生理・生化学的要因ばかりでなく、葉の構造的要因も関与しており、最近では葉内における CO₂ ガス拡散に関わる構造的な特性についても盛んに研究されるようにな

った。イネの葉肉組織はコムギ等に比べ緻密な構造をもつ。1960年代に長南らは、イネの一部品種について徒手切片やパラフィン切片を用いて、葉肉の特性化を試みた。しかし、イネにおいて葉の構造特性と光合成特性が相互にどのように関連しているのかは、気孔について報告があるものの、実証的な研究はほとんど行われていない。エポキシ樹脂包埋法を初めとする組織・細胞学的研究法の発達により、現在では準超薄切片を用いてより厳密な解析が可能である。高い光合成効率を持つイネを作出して行くためには、イネにおいてどのような特性が制御要因となっているのかを解明することが必要である。

イネ属(*Oryza*)は野生イネ23種と栽培イネ2種からなり、世界の熱帯・亜熱帯地域に広く分布する。その生育地は、定常的な湿地帯から季節的な乾期を経験する湿地帯、さらには林内まで多様である。このような多様な生態的特性を示す野生イネは遺伝資源として重要であることから、これまでも葉の光合成特性やRubiscoの動的特性が研究されてきた。野生イネがもつ様々な形質をより厳密に比較研究し、有用遺伝子の探索を進め、将来高い光合成能と生産性を有するイネの作出に生かすことが期待される。

過去10年の間に、イネを初めとするC3植物にC4光合成酵素遺伝子を導入して、光合成効率を飛躍的に向上させようとする多くの試みが行われてきた。しかし、単にC4酵素遺伝子を葉肉細胞に高発現させただけでは不十分であり、C4光合成の作動にとって不可欠な2種光合成細胞(葉肉細胞と維管束鞘細胞)の分化を考慮に入れる必要があることが明らかになってきた。このとき、C3、C4光合成型の見地から見たとき、野生イネ等を含むイネ科C3植物には、葉の維管束鞘細胞等の構造的な特性にどの位の変異があるのか、またイネのC4化研究を進めて行く上でどのような植物を用いることが適切であるのか等、検討することが必要である。

2. 研究の目的

光合成は、生理・生化学的特性ばかりでなく、葉の構造学的特性も関わる複雑なプロセスである。イネについては、CO₂の拡散に関わる葉肉組織の構造等、葉の構造学的特性が光合成機能とどのように関係しているのか、実証的な研究はほとんど行われていない。

そこで本研究では、1) 栽培イネだけでなく、遺伝的変異が大きいと考えられる野生イネを対象として、葉の構造・機能特性のうち特に構造学的特性に着目して、光合成を制御している要因を検討する。同時に、2) C3、C4、CAM植物種を対象として、葉肉抵抗の構成要因の一つと考えられている光合成細胞の細胞壁の厚さを明らかにする。また、3) イネ

属植物の光合成代謝特性と光合成窒素利用効率を調査する。さらに、4) 野生イネを含むイネ科C3植物の葉における維管束鞘細胞等の構造と機能特性を解析することから、これらC3植物における維管束鞘細胞の変異の実態と機能的役割の一端を明らかにする。

得られる成果は、イネの光合成能の向上を図るための育種目標を明らかにするとともに、将来イネへのC4様光合成特性の導入を進めて行く上で必要となる構造学的知見を提供できるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

イネ属植物21種45系統(品種)をボンソル2号をつめた5Lポットに移植し、夏期にビニルハウス内で育成した。野生イネについては国立遺伝研(野生イネ保存コレクション)より、栽培イネについては農業生物資源研究所より種子の分譲を受けた。1系統当たり4個体を育成し、その中から3個体について実験した。

葉の維管束鞘細胞の特性化については、イネ科C3植物9種をグロースチャンバー(光強度300 μmol m⁻² s⁻¹, 明期/暗期: 25°C/20°C)で育成し実験に用いた。また、光合成細胞の細胞壁の厚さの解析では、野外で育成した植物、あるいは野外に自生している植物の葉を調査した。それらは、イネ科及び双子葉のC3植物19種、C4植物26種、C3-C4中間植物4種、CAM植物7種である。

(2) 実験方法

野生イネについては、8月に出穂前の最上位完全展開葉について光合成ガス交換特性(光合成速度、蒸散速度、気孔伝導度、葉内CO₂濃度)を測定した。測定条件は、光強度1500 μmol m⁻² s⁻¹, 25°C, 湿度60%, CO₂濃度380 μL L⁻¹とした。栽培イネについては止葉下第1葉を測定した。ガス交換測定に用いた葉、あるいは類似した葉齢の葉について比葉重、葉緑素含量、窒素含量、光合成酵素活性、形態学的特性を調査した。

葉の一部をFAA固定液に固定し、抱水クロロール法により組織の透明化を行い、気孔の密度とサイズを測定した。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、葉肉細胞等の構造学的特性を測定した。得られた葉の形態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。

C3、C4、CAM植物の葉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、ダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作成した。切片はクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡下で葉肉細胞と維管束鞘

細胞の細胞壁を撮影し、それをもとに細胞壁の厚さを測定した。また、代表的なイネ科 C3 植物について同様の方法により葉片を Quetol 樹脂に包埋し、葉の横断超薄切片を用いて維管束鞘細胞と葉肉細胞に含まれる葉緑体とミトコンドリアの定量化を行った。さらに、葉肉細胞と維管束鞘細胞の葉緑体とミトコンドリアにおける Rubisco 及びグリシンデカルボキシラーゼ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。

葉から可溶性蛋白質を抽出し、C3, C4 光合成酵素と光呼吸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ミクロケルダール法により測定した。

4. 研究成果

(1) イネ属植物における光合成ガス交換特性と葉の構造的特性との関係

光合成ガス交換特性は 2008~2010 年度の 3 年間測定した。種間・系統間差の傾向は各年度でほぼ同じであったので、ここでは 2010 年度の結果を報告する。測定したイネ属 21 種 45 系統を、*O. sativa* complex の栽培種 (2 種 8 系統)、*O. sativa* complex の野生種 (6 種 11 系統)、*O. officinalis* complex (8 種 18 系統)、*O. ridleyi* complex (2 種 2 系統)、*O. granulata* complex (2 種 3 系統)、*O. brachyantha* (1 種 3 系統) の 6 グループに分けて検討した。

光合成速度は $10.0\sim 24.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を示し、2.4 倍の変異があった。*O. brachyantha* が最も高く、*O. granulata* が最も低かった。栽培イネではタカナリが最も高い値を示した。光合成速度は *O. granulata* complex が他のグループより低いこと以外は、グループ間による差はなかった。気孔伝導度は $0.13\sim 0.38 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を示し、2.9 倍の変異があった。気孔伝導度は *O. sativa* complex の栽培種で高い傾向があり、*O. granulata* complex と *O. ridleyi* complex で低かった。

イネ属植物の両面気孔密度は $255\sim 1373 \text{ no. mm}^{-2}$ の変異があり、*O. sativa* complex の栽培種で最も高く、次いで *O. sativa* complex の野生種が高かった。両面平均孔辺細胞長は $19.3\sim 29.6 \mu\text{m}$ の変異があり、*O. officinalis* complex と *O. ridleyi* complex で高かった。気孔密度の向軸/背軸比は *O. brachyantha* が 1 に近かったが、多くは 1 以下であった。孔辺細胞長の向軸/背軸比は *O. brachyantha* が 1 よりも高かったが、多くは 1 前後であった。両面気孔密度と両面平均孔辺細胞長には負の相関 ($r = 0.572^{***}$) があり、栽培イネは気孔密度が高く、孔辺細胞長が小さい傾向があった。イネ属植物を陽性型と陰性型に分けて比較すると、陽性型は陰性型に比べ両面気孔密度が高く、両面平均孔辺細胞長が低かった。イネ属植物を倍数性で比較すると、2 倍体種は 4 倍体種に比べ両面気孔密度が高く、両面平

均孔辺細胞長は低かった。

光合成速度と気孔伝導度の間には正の相関 ($r = 0.635^{***}$) があった。また、光合成速度及び気孔伝導度と総孔辺細胞長 (気孔密度×孔辺細胞長) との間には正の相関があり ($r = 0.534^{***}$, $r = 0.744^{***}$)、単位葉面積当り総孔辺細胞長が大きくなるほど光合成速度と気孔伝導度は高くなる傾向があった。その他、光合成速度は葉緑素含量 ($r = 0.548^{***}$) 及び比葉重 ($r = 0.525^{***}$) とも相関があった。

このようにイネ属全体として見ると、光合成速度の変異には気孔伝導度、気孔のサイズと密度、葉緑素含量、比葉重が関係していることが明らかとなった。栽培イネは野生イネと比較して気孔伝導度や単位葉面積当り総孔辺細胞長が高いことが、高い光合成速度の一因となっていると考えられた。一方、野生イネの中には栽培イネと同程度、あるいはそれ以上の光合成速度を示す種があり、これらは栽培イネよりも気孔伝導度や総孔辺細胞長が低い傾向にあり、気孔を介した CO_2 の取り込み以外にも高い光合成速度に関わる要因があるものと考えられた。

葉の横断・縦断切片を用いて葉肉組織における CO_2 の物理的拡散に関わる構造的パラメータを測定し、光合成速度との関係を検討した。葉厚は *O. sativa* complex の栽培種が他のグループより厚い傾向があった。また、葉肉細胞層数は *O. sativa* complex の栽培種と *O. brachyantha* が他のグループよりも高かった。葉身凹凸率は *O. brachyantha* が最も高く (1.4)、次に *O. sativa* complex の栽培種と野生種が高かった (1.2)。一方、他の 3 グループは 1.0 に近く凹凸の少ない葉をもっていた。葉肉細胞のサイズは *O. officinalis* complex、*O. ridleyi* complex、*O. granulata* complex が大きく、*O. sativa* complex が小さい傾向を示した。細胞間隙率は *O. ridleyi* complex が最も高く (17%)、*O. brachyantha* が最低で (6%)、他のグループは 10~14% であった。Lmes/area (細胞間隙に接した単位葉肉細胞壁長) は *O. sativa* complex の野生種が最も高く、*O. brachyantha* が最も低かった。

このような葉の構造的パラメータのうち、葉肉細胞層数と光合成速度 ($r = 0.647^{***}$)、気孔伝導度、及び葉面積当り総孔辺細胞長 ($r = 0.763^{***}$) との間には正の相関が見られた。一方、光合成速度と細胞間隙率や葉肉細胞のサイズの間には相関は見られなかった。イネ属の 2 倍体種は 4 倍体種に比べ葉肉細胞層数、Lmes/area、葉身凹凸率が高く、葉肉細胞のサイズと細胞間隙率は小さかった。

以上のように、イネ属の中で葉の構造は多様に分化しており、イネ属全体として見ると光合成速度には形態的特性として気孔特性の他、葉肉細胞層数、比葉重が大きく関わっていることが明らかになった。

(2) イネ属植物における葉窒素含量と光合成窒素利用効率の変異

イネ属 21 種 45 系統の葉面積当りの窒素含量は $0.62\sim 1.64\text{ g N m}^{-2}$ を示し、約 2.7 倍の変異があった。葉窒素含量と光合成速度 ($r = 0.716^{***}$)、比葉重 ($r = 0.852^{***}$)、気孔伝導度 ($r = 0.591^{***}$)、葉緑素含量 ($r = 0.706^{***}$) の間には高い正の相関があった。光合成窒素利用効率は最も低い日本晴の $11.8\ \mu\text{mol g}^{-1}\text{ N s}^{-1}$ から最も高い *O. barthii* の $27.8\ \mu\text{mol g}^{-1}\text{ N s}^{-1}$ まで約 2.4 倍の変異があった。またグループ間で比較すると、*O. sativa complex* の野生種と *O. brachyantha* の光合成窒素利用効率は *O. sativa complex* の栽培種よりも有意に高かった。*O. sativa complex* では光合成速度には栽培種と野生種で差がないが、比葉重と葉窒素含量は栽培種が野生種より高い傾向があり、この結果光合成窒素利用効率は栽培種が野生種よりも低くなったと考えられた。

(3) イネ属植物の光合成代謝特性

イネ属植物の光合成代謝特性 (光合成型) を検討するために、18 種のイネ属植物について葉の光合成・光呼吸関連酵素の活性を測定した。いずれの種も C3 光合成酵素の Rubisco と光呼吸酵素のグリコール酸オキシダーゼ、ヒドロキシピルビン酸レダクターゼ、カタラーゼの活性が高いのに対し、C4 光合成酵素の PEP-カルボキシラーゼと C4 酸脱炭酸酵素の NADP-リンゴ酸酵素、NAD-リンゴ酸酵素、PEP-カルボキシキナーゼの活性は低かった。したがって、これらのイネ属植物は C3 型に典型的な光合成・光呼吸酵素活性値を示し、光合成型はいずれも C3 型であり、C3-C4 中間型は存在しないと考えられた。

(4) イネ属植物の葉における葉肉細胞と維管束鞘細胞の分化同調性の検討

イネ属 21 種 25 系統について葉の準超薄切片を作成し、葉肉細胞と維管束鞘細胞の分化同調性を検討した。葉肉細胞と維管束鞘細胞のサイズには正の相関があった。葉肉細胞のサイズと含まれる葉緑体のサイズと個数には正の相関があり、葉肉細胞が大きくなるほど葉緑体のサイズと個数は増加する傾向があった。一方、維管束鞘細胞のサイズと含まれる葉緑体のサイズには有意な相関はなかったが、維管束鞘細胞のサイズと含まれる葉緑体の個数には正の相関があった。また、葉肉細胞と維管束鞘細胞の葉緑体のサイズには有意な相関はなかったが、両細胞の葉緑体の個数には正の相関があった。イネ属の 2 倍体種と 4 倍体種で比較すると、葉肉細胞のサイズや含まれる葉緑体のサイズと個数は 2 倍体種よりも 4 倍体種の方が大きかった。しかし、維管束鞘細胞のサイズや含まれる葉緑

体のサイズと個数には 2 倍体種と 4 倍体種との間で有意差はなかった。

以上の結果より、イネ属全体としては葉肉細胞と維管束鞘細胞の形態分化はある程度同調して制御されているが、維管束鞘細胞の葉緑体のサイズはこれとは異なった制御下にあることが明らかとなった。

(5) イネ科 C3 植物等における維管束鞘細胞の特性化

イネを含む 9 種のイネ科 C3 種について、葉における維管束鞘細胞の機能的意義を電子顕微鏡による構造観察と免疫電子顕微鏡法による光合成・光呼吸酵素蛋白質の蓄積を調査することにより検討した。いずれの種においても維管束鞘細胞に含まれる葉緑体の数は葉肉細胞に比べ少なく (葉肉細胞の 20%~59%)、葉緑体のサイズも小さかった (葉肉細胞の 53%~77%)。ミトコンドリアについても維管束鞘細胞は葉肉細胞に比べ少なく (葉肉細胞の 30%~75%)、サイズも小さかった (葉肉細胞の 46%~85%)。一方、葉緑体における Rubisco 大サブユニット蛋白質の蓄積密度には葉肉細胞と維管束鞘細胞の間で大きな差はなかったが、ミトコンドリアにおける光呼吸酵素のグリシンデカルボキシラーゼ P 蛋白質の蓄積密度は葉肉細胞に比べ維管束鞘細胞で低い傾向を示した (葉肉細胞の 36%~90%)。この結果、イネ科 C3 植物の維管束鞘細胞は小形の葉緑体やミトコンドリアを含み、葉肉細胞のように光合成や光呼吸に関わる酵素蛋白質を蓄積しているが、葉肉細胞に比べその活性ははるかに低いことが明らかとなった。

また、アブラナ科の C3 植物のナタネ、ダイコンと C3-C4 中間植物の *Brassica gravinae*、*Diplotaxis tenuifolia* についても葉肉細胞と維管束鞘細胞の葉緑体における Rubisco 大サブユニット蛋白質の蓄積を比較解析し、維管束鞘細胞の葉緑体は葉肉細胞の葉緑体に比べ蓄積密度が低いこと (葉肉細胞の 67%~85%) を明らかにした。

(6) C3, C4 及び CAM 植物における光合成細胞の細胞壁の厚さの比較

イネ科・双子葉植物ともに葉肉細胞の細胞壁は C3 植物が C4 植物よりも厚く (C4 植物の 1.5 倍)、反対に維管束鞘細胞の細胞壁は C4 植物が C3 植物よりも厚かった (C3 植物の 2.6 倍)。また、C3-C4 中間植物の細胞壁は C3 植物に近い値を示した。このことから、C4 植物では葉肉細胞は細胞間隙の CO₂ の取り込みに有利な構造を持っているが、維管束鞘細胞は脱炭酸反応により生じた CO₂ が細胞外へ漏出しないように抑制する構造を持っているものと考えられた。一方、CAM 植物の葉肉細胞は C3, C4 植物の葉肉細胞に比べ

はるかに厚い細胞壁を持ち(3.7~5.7倍)、C4植物の維管束鞘細胞の厚さに匹敵することが明らかになった。このことから、CAM植物はCO₂の取り込み易さを犠牲にして、葉内部からの水分の蒸発を抑える方向に進化した可能性が考えられた。

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 Ueno, O. (2011) Structural and biochemical characterization of the C3-C4 intermediate *Brassica gravinae* and relatives, with particular reference to cellular distribution of Rubisco. *J. Exp. Bot.* 62: 5347-5355, DOI: 10.1093/jxb/err187, 査読あり
- ② 上野修 (2010) 植物における太陽エネルギーの蓄積-光合成のメカニズム、日本エネルギー学会誌 89、60-66、査読なし

[学会発表] (計13件)

- ① 塩田拓之、立場真衣、上野修、イネ属(*Oryza*)植物における光合成能と葉身窒素含量の関係-特に光合成窒素利用効率の変異について、日本作物学会紀事 81 (別1号)、302-303、2012年3月29日、東京農工大
- ② 塩田拓之、立場真衣、上野修、イネ属(*Oryza*)植物の葉における気孔特性の変異、日本作物学会紀事 80 (別1号)、350-351、2011年3月30日、東京農大
- ③ 塩田拓之、立場真衣、上野修、イネ属(*Oryza*)植物における光合成能と気孔特性の関係、日本作物学会紀事 80 (別1号)、120-121、2011年3月30日、東京農大
- ④ 立場真衣、塩田拓之、上野修、CO₂拡散との関連から見たイネ属(*Oryza*)植物における葉構造の特性化、日本作物学会紀事 80 (別1号)、342-343、2011年3月30日、東京農大
- ⑤ 立場真衣、塩田拓之、上野修、イネ属(*Oryza*)植物における葉肉細胞と維管束鞘細胞の分化同調性の検討、日本作物学会紀事 80 (別1号)、344-345、2011年3月30日、東京農大
- ⑥ 上野修、C3、C4及びCAM植物における葉肉細胞と維管束鞘細胞の細胞壁の厚さの変異-野外で成長した植物の比較、日本作物学会紀事 79 (別1号)、330-331、2010年3月30日、宇都宮大
- ⑦ 上野修、葉肉抵抗とCO₂の漏出との関連から見たC3、C4およびCAM植物における光合成細胞壁の厚さの比較、日本作物学会紀事 78 (別2号)、260-261、2009年9月29日、静岡県コンベンションセンター
- ⑧ 黒岩大俊、千徳直樹、荒木卓哉、上野修、

イネ属植物における葉の構造と機能の多様性-光合成ガス交換特性について、日本作物学会紀事 78 (別1号)、228-229、2009年3月27日、つくば国際会議場

[図書] (計3件)

- ① 上野修、養賢堂、水生植物の光合成、坂上潤一ほか(編)湿地環境と作物、2010、pp 49-56
- ② 上野修、農文教、光合成のメカニズム (2)炭酸固定反応、日本作物学会(編)、作物学用語解説集、2010、pp 152-153
- ③ 上野修、日本作物学会事務取扱所、免疫電子顕微鏡法の実際、前田英三ほか(編)作物の形態研究法: ミクロからマクロまで、2008、pp 26-28

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

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

(2)研究分担者

千徳 直樹 (SENTOKU NAOKI)

農業生物資源研究所・光環境応答研究ユニ

ット・主任研究員

研究者番号: 10370660