

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14758

研究課題名（和文）光合成効率の向上と頑健性強化を両立させたイネ作出への挑戦

研究課題名（英文）Towards a rice plant with improved photosynthetic efficiency and enhanced robustness

研究代表者

菅波 真央（SUGANAMI, MAO）

福島大学・食農学類附属発酵醸造研究所・特任助教

研究者番号：30897492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、光合成効率向上と光合成頑健性を両立させたイネを作出するため、CO<sub>2</sub>同化を担う光合成の律速因子であるRubisco、Rubiscoの活性化を担うRubisco activase (RCA)、そして過剰な電子蓄積除去を担い光合成の安全弁として働くフラボンタンパク質FLVの3つを同時に増強した。その結果、高温条件の現大気条件において、それぞれ単独の増強イネ、Rubisco-RCA同時増強イネよりも更に高いCO<sub>2</sub>固定速度を示すイネの作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに我々が作出した光合成改良イネであるRubisco-RCA同時増強イネが持っていた光化学系Iの脆弱性を克服し、更なる光合成改良に成功した。このことは、学術的な価値にとどまらず、食糧増産という実用面からみても極めて重要な成果である。今後は、作製したRubisco-RCA-FLVイネがどのような環境条件下でその効果を最大化させるか、またはその効果が発揮されない条件を精査していき、更なる光合成改良のターゲットを探索する材料として活用していく予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to produce rice plants with both improved photosynthetic efficiency and photosynthetic robustness, the following three proteins were simultaneously enhanced: Rubisco, the rate-limiting factor of photosynthesis responsible for CO<sub>2</sub> assimilation; Rubisco activase (RCA), the activator of Rubisco; and Flavone protein FLV, which is responsible for removing excess electron accumulation and acts as a safety valve for photosynthesis, were simultaneously enhanced. As a result, we succeeded in producing lines with even higher CO<sub>2</sub> fixation rates under the present atmospheric conditions of high temperatures than the single enhanced rice plants and the simultaneously enhanced Rubisco-RCA rice plants, respectively.

研究分野：植物栄養学

キーワード：イネ 光合成 Rubisco Rubisco activase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

今世紀半ばには世界人口は 100 億人に達すると予想されている。人口増加に伴う食糧需要の増加を支える安定した作物生産基盤の創出は人類に課せられた重要な課題である。太陽光エネルギーを利用し、空気中の二酸化炭素から有機物を生産する光合成は、植物の成長、そして作物生産性に直結する重要な反応であるため、食糧増産の鍵として光合成改良が試みられている。

これまでの生化学的解析により、現大気条件における最大光合成速度は、炭酸固定酵素 Rubisco によって律速されることが示されており、Rubisco は多くの研究者により光合成改良のターゲットとして古くから着目されてきた。我々は、Rubisco の活性化を担う酵素 Rubisco activase (RCA) も光合成能力強化のターゲットとなることを見出し、Rubisco と RCA 量を同時に増強した Rubisco-RCA 同時増強イネを作出し、野生型イネよりも 20%、Rubisco 単独の増強イネより 10%、最大光合成速度を向上させることに成功した。しかしながら、Rubisco-RCA 同時増強イネでは、野生型、Rubisco 増強イネと比較して電子伝達系光化学系 I (PSI) が不活性化されやすいという弱点が存在することを見出していた。様々なストレス要因が存在するフィールド環境では、光合成機能を正常に維持する光合成頑健性も重要であり、PSI 不活性化の要因の解明、および解消する方法の確立が求められた。

### 2. 研究の目的

本研究では光合成効率向上と光合成頑健性を両立させることで、複合的ストレス要因(変動光、乾燥、高温など)が存在するフィールド環境条件における光合成効率の向上を目指すこととした。我々が作出した Rubisco-RCA 同時増強イネは、C3 型光合成を行うイネ科作物の中で、現大気条件における最大光合成速度の向上を世界で初めて成功させた例であり、この光合成効率改良イネをベースとして頑健性も付与することができれば、学術的な価値にとどまらず、食糧増産という実用面から見ても極めて重要である。また、Rubisco-RCA 同時増強イネで見られた PSI 光阻害現象は、炭酸固定反応と電子伝達系が何らかの形でリンクしていることを示唆しており、未知の光合成制御システム解明に向けた重要な知見を提供できると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rubisco-RCA 同時増強イネにおける PSI 不活性化の要因解明 (R3 年度)

RCA の増加割合が異なる 3 系統の RCA 増強イネ、および発現抑制イネを屋内型人工気象室にて水耕法で栽培し、栄養生長期の最上位完全展開葉を対象として光合成生理解析を行った。Dual-PAM を用いて PSII、PSI の光合成パラメーターを調べた。また、60 分間の強光処理 ( $2,000 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の前後で PSII、PSI の最大活性を測定し、強光処理に対する頑健性を評価した。また、過去に作出されている FLV 導入イネと RCA 増強イネを交配させ、RCA-FLV 増強イネを作出した。得られた複数の F1 世代にて、RCA の増加、及び FLV タンパクの発現が確認できた系統を選抜し、F2 世代にて、リアルタイム PCR 法にて、導入遺伝子数の測定を行い、RCA、FLV それぞれの遺伝子がホモ化されている系統を選抜した。

#### (2) Rubisco-RCA 同時増強イネへの FLV 導入 (R3 年度)

FLV 導入イネを Rubisco-RCA 同時増強イネと交配させることで、Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネを作出した。交配系統の選抜は(1)と同様に行った。

#### (3) 栽培室素環境による Rubisco-RCA 同時増強イネの光合成特性 (R4 年度)

Rubisco-RCA 同時増強イネ、およびコントロールとして Rubisco 増強イネ、RCA 増強イネ、野生型イネを(1)と同様に、屋内型人工気象室にて水耕法で栽培した。この時、室素栄養条件を低窒素 (0.5 mM-N)、標準窒素 (2.0 mM-N)、高窒素 (8.0 mM-N) 条件の 3 段階にて栽培し、光合成生理解析を行った。

#### (4) Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネの光合成解析 (R4 年度 ~ R5 年度)

選抜した Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネ、およびコントロールとして Rubisco・RCA 同時増強イネ、Rubisco 増強イネ、野生型イネを(1)と同様に、屋内型人工気象室にて水耕法で栽培し、光合成生理解析を行った。室素栄養条件は標準窒素 (2.0 mM-N) とした。LI-6800 を使用し、ガス交換測定とクロロフィル蛍光測定を同時に行い、光強度、CO<sub>2</sub> 濃度、温度を変更しながら、様々な環境条件における CO<sub>2</sub> 固定速度、PSII パラメーターを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Rubisco-RCA 同時増強イネにおける PSI 不活性化の要因解明

PSI 不活性化現象は Rubisco 増強イネでは全く見られなかったため、RCA 増強によって引き起こされていると予想された。そこで、RCA の増加割合が異なる 3 系統の RCA 増強イネを用いて、RCA 量と PSI 各種パラメーターの関係性を調べたところ、RCA が増加するほど、Y(I) が

向上し、反対に Y(NA) が低下することが確認され、RCA の過剰生産が PSI 電子伝達に影響することを明らかにした(図 1)。また、強光処理に対する PSII, PSI の頑健性を評価したところ、RCA 増加割合が野生型の 2 倍を超えた系統では、PSII, PSI とともに強光ストレスに対して脆弱になっており、その影響は PSII よりも PSI の方が大きいことがわかった。また、RCA 増強イネは強光 ( $1,500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) では  $\text{CO}_2$  固定速度に変化は見られないが、弱光 ( $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) では明確に低下が見られ、通常の栽培条件でも光阻害の影響を受けていることが示唆された。実際、栽培条件においても、RCA 増強イネの PSI 最大活性 (Pm) は低下していた。フラビンタンパク質 FLV は、裸子、シダ、コケ植物において、PSI 内部の電子蓄積除去を担い、P700 酸化に貢献しているが、本来、被子植物であるイネには存在しない。しかし、ヒメツリガネコケ由来の FLV 遺伝子をイネに導入すると、コケ植物同様に P700 酸化を亢進し、フィールド環境を模した変動光環境における光合成頑健性を高めることが報告されている。そこで、RCA 増強イネに FLV 遺伝子を導入した RCA-FLV 増強イネを作出した。RCA-FLV 増強イネは、RCA 増強イネで見られた P700+ の蓄積割合低下、弱光での  $\text{CO}_2$  固定速度の低下、Pm の低下は全て見られなくなり、FLV 導入が RCA 増強によるデメリットを克服する有力手法であることが示された。

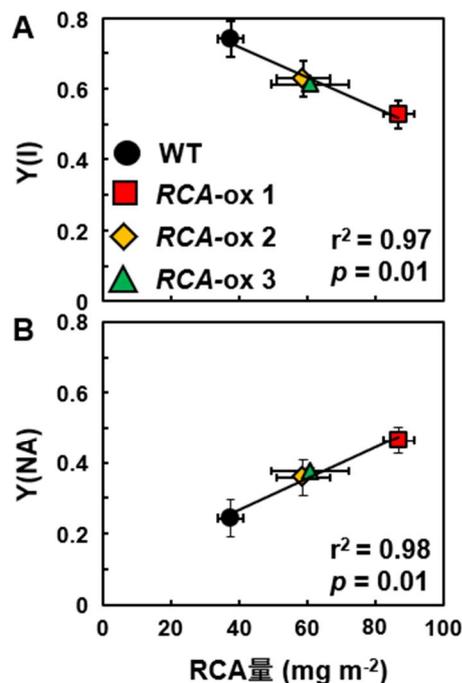


図1.野生型およびRCA-ox植物におけるRCAS含量と光合成電子輸送パラメータの関係。Y(I)、Y(NA)は光強度  $100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件で測定した。データは  $\text{means} \pm \text{SD}$  ( $n = 3-7$ ) で示した。

#### (2) 栽培室素環境による Rubisco-RCA 同時増強イネの光合成特性

Rubisco-RCA 同時増強イネの光合成速度は、高窒素条件では野生型イネより光合成速度が上がることはなく、むしろ低下する傾向が見られた。一方、低窒素条件では顕著に向上しており、34 の高温条件では  $\text{CO}_2$  濃度 40Pa の大気圧条件にて、20%以上の  $\text{CO}_2$  固定速度の向上が見られた。このことから、低窒素条件になるほど光合成能力向上の効果が大きいことが明らかとなった。

#### (3) Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネの光合成解析

作出した Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネの PSII, PSI の光合成パラメータを調べたところ、Rubisco-RCA 同時増強イネは P700+ の蓄積割合が低下している一方で、Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネは野生型イネ、Rubisco 増強イネと同程度であった。また、強光の連続照射に対する光阻害耐性においても、野生型イネ、Rubisco 過剰発現イネと同程度であり、RCA 増強に由来する PSI 脆弱性は解消されていることが分かった。次に 25 における異なる  $\text{CO}_2$  濃度における  $\text{CO}_2$  固定速度を調べたところ、Rubisco-RCA-FLV 三重増強イネは野生型イネと比べて、低  $\text{CO}_2$  条件においてわずかに向上する傾向が見られた。一方、より夏場の圃場環境に近く、光合成がより Rubisco によって強く律速される 35 の高温条件では、顕著な光合成速度の向上が見られ、Rubisco 増強イネ、Rubisco-RCA 同時増強イネよりさらに高い光合成速度を示した(図 2A, B)。これはクロロフィル蛍光測定により調べた光化学系 II 電子伝達速度でも同様の傾向が確認された(図 2C)。よって、Rubisco-RCA-FLV の三重増強は、光合成効率向上と光合成頑健性を両立させる有力な手法であることが示された。

#### (4) その他

また、作物生産性改良のために、公共データベース情報を利用することで、少ない労力で育種利用可能な QTL を探索する手法の開発や、自然突然変異体から全ゲノムシーケンスだけで原因遺伝子を同定する手法の開発なども実施した。今後は、本研究成果とこれらの自然変異を利用する手法を組み合わせることで、作物生産性を高める育種基盤を構築していく予定である。

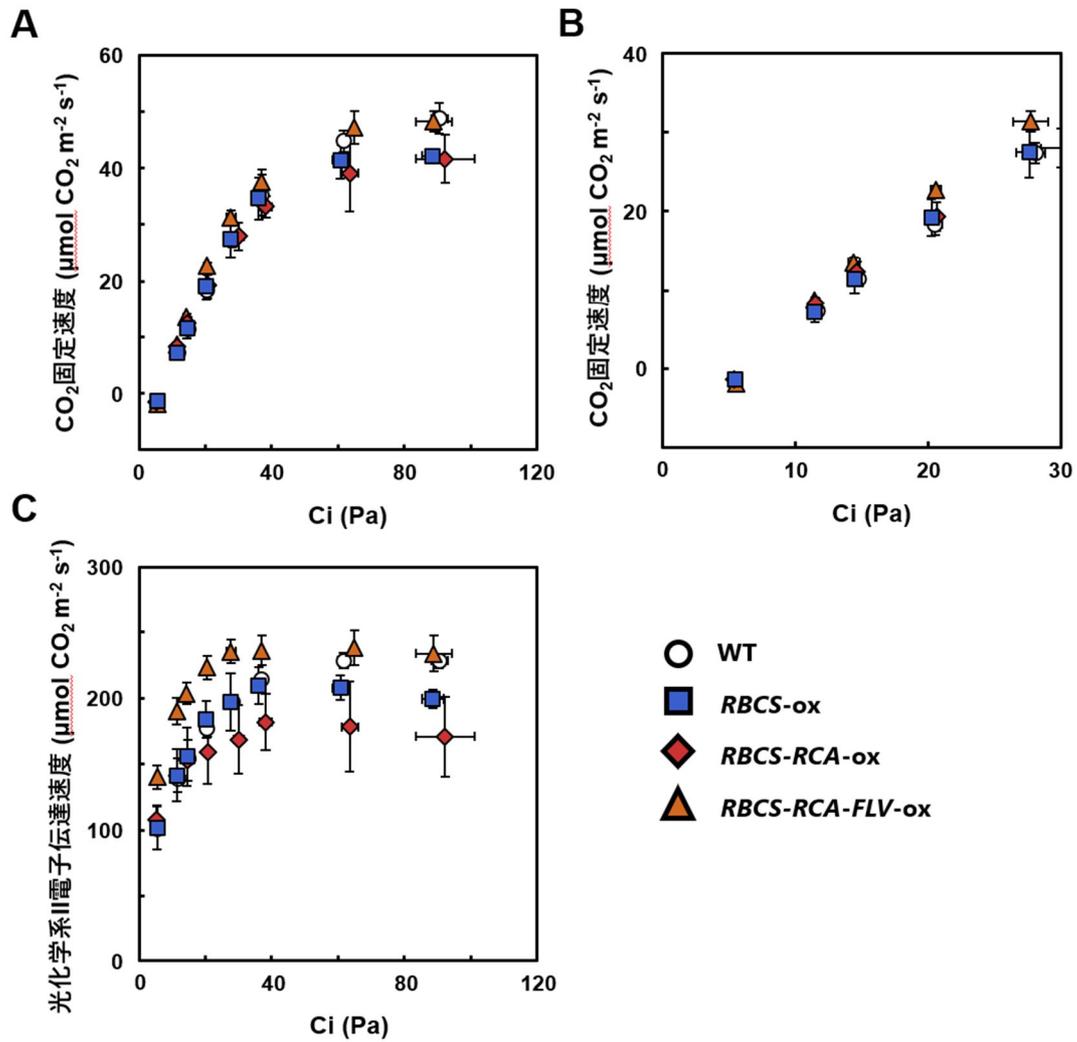


図2 Rubisco-RCA-FLV三重増強イネ (*RBCS-RCA-FLV-ox*) の異なるCO<sub>2</sub>濃度における (A, B) CO<sub>2</sub> 同化速度、(C) 光化学系II電子伝達速度。(B) は(A) の低CO<sub>2</sub>の部分を拡大したものである。対象として野生型(WT)、Rubisco増強イネ(*RBCS-ox*)、Rubisco-RCA同時増強イネ (*RBCS-RCA-ox*) を用いた。測定は強光(1,500  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )、葉温35°Cで行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suganami Mao, Kojima Soichi, Wang Fanmiao, Yoshida Hideki, Miura Kotaro, Morinaka Yoichi, Watanabe Masao, Matsuda Tsukasa, Yamamoto Eiji, Matsuoka Makoto	4. 巻 191
2. 論文標題 Effective use of legacy data in a genome-wide association studies improves the credibility of quantitative trait loci detection in rice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1561 ~ 1573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiad018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoon Dong Kyung, Suganami Mao, Ishiyama Keiki, Kagawa Takaaki, Tanaka Marin, Nagao Rina, Takagi Daisuke, Ishida Hiroyuki, Suzuki Yuji, Mae Tadahiko, Makino Amane, Obara Mitsuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 The gs3 allele from a large grain rice cultivar, Akita 63, increases yield and improves nitrogen use efficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 菅波真央	4. 巻 6
2. 論文標題 イネの光合成能力強化に向けた戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 527-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Daisuke, Ishiyama Keiki, Suganami Mao, Ushijima Tomokazu, Fujii Takeshi, Tazoe Youshi, Kawasaki Michio, Noguchi Ko, Makino Amane	4. 巻 11
2. 論文標題 Manganese toxicity disrupts indole acetic acid homeostasis and suppresses the CO2 assimilation reaction in rice leaves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00370-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suganami Mao, Konno So, Maruhashi Ryo, Takagi Daisuke, Tazoe Youshi, Wada Shinya, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu, Ishida Hiroyuki, Suzuki Yuji, Makino Amane	4. 巻 73
2. 論文標題 Expression of flavodiiron protein rescues defects in electron transport around PSI resulting from overproduction of Rubisco activase in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2589 ~ 2600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erac035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yuji, Ishiyama Keiki, Yoon Dong-Kyung, Takegahara-Tamakawa Yuki, Kondo Eri, Suganami Mao, Wada Shinya, Miyake Chikahiro, Makino Amane	4. 巻 188
2. 論文標題 Suppression of chloroplast triose phosphate isomerase evokes inorganic phosphate-limited photosynthesis in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1550 ~ 1562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suganami Mao, Yoshida Hideki, Yoshida Shinya, Kawamura Mayuko, Koketsu Eriko, Matsuoka Makoto, Kojima Soichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Redefining awn development in rice through the breeding history of Japanese awn reduction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1370956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2024.1370956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suganami Mao, Kojima Soichi, Yoshida Hideki, Mori Masaki, Kawamura Mayuko, Koketsu Eriko, Matsuoka Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Low mutation rate of spontaneous mutants enables detection of causative genes by comparing whole genome sequences	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1366413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2024.1366413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅波 眞央, 高橋 秀和, 吉田 英樹, 二瓶 直登, 石川 大太郎, 牧 雅康, 佐藤 郁恵, 吉田 晋弥, 小島 創一, 渡辺 正夫, 松田 幹, 松岡 信
2. 発表標題 日本のダイズ品種を中心としたGWAS解析集団の構築
3. 学会等名 第254回日本作物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二瓶 直登, 菅波 眞央, 佐藤 郁恵, 松田 幹, 松岡 信
2. 発表標題 GWAS解析集団を用いたダイズのイオノーム解析
3. 学会等名 第254回日本作物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 洋司, 渡邊 芳倫, 二瓶 直登, 菅波 眞央, 菅野 昭裕, 藤田 良男, 渡辺 雅彦, 佐々木 正博
2. 発表標題 高品質・良食味米を安定生産する福島県大玉村における同一水田産米の微細構造の特徴
3. 学会等名 第254回日本作物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原風輝, 二瓶直登, 福島敦史, 鈴木健大, 清水昌平, 菊地淳, 松本朋子, 成川恵, 菅波眞央, 宮沢佳恵, 市橋泰範
2. 発表標題 農業生態系のマルチオミクス解析による生育と品質のトレードオフの解消
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅波真央, 小島創一, Wang Fanmiao, 吉田英樹, 三浦孝太郎, 森中洋一, 渡辺正夫, 山本英司, 松岡信
2. 発表標題 イネにおけるQTL検出の信頼性向上に向けたレガシーデータのGWASへの有効利用
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新田洋司, 二瓶直登, 渡邊芳倫, 菅波真央, 渋谷允, 佐々木康平, 川本朋彦
2. 発表標題 秋田県産「サキホコレ」炊飯米における 微細構造の特徴
3. 学会等名 日本作物学会東北支部会第65回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suganami Mao, Konno So, Maruhashi Ryo, Takagi Daisuke, Tazoe Youshi, Wada Shinya, Yamamoto Hiroshi, Shikanai Toshiharu, Ishida Hiroyuki, Suzuki Yuji, Makino Amane
2. 発表標題 Introduction of flavodiiron protein rescues defects in electron transport around PSI due to overproduction of Rubisco activase in rice
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅波真央, 小島創一, 吉田英樹, Fanmiao Wang, 森中洋一, 渡辺正夫, 松田幹, 松岡信
2. 発表標題 ゲノム育種の加速化に有効なレガシーデータを活用したGWAS
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

品種改良に重要な遺伝子座探索の効率化に成功！ 温故知新 -先人の調査データを現代の育種に活かす-  
<https://www.fukushima-u.ac.jp/news/Files/2023/03/171-02.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------