

研究報告書

「葉内 CO₂ 拡散を促進する葉肉組織形態の改良を通じたイネ光合成能力の飛躍的向上」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 安達 俊輔

1. 研究のねらい

世界人口の増加により将来の食料需給が逼迫することが危惧されている。これを緩和するために世界人口の半数が主食とするコメの生産力増加は重要な研究課題とされる。育種家の不断の努力によりこの半世紀の間コメの単位面積当たり収量(以下収量)は飛躍的に増加したが、近年その伸びは鈍化している。従来の育種では光合成産物の収穫部位への分配割合を増加させてきたが、この収量増加率の鈍化はその育種戦略が限界に近づいていることを示している。そのため光合成産物分配の最適化だけでなく、葉における光合成能力を向上させ、光合成産物量そのものを高める育種戦略の構築が強く求められている。

多収性インド型品種タカナリはイネ品種のなかでは最も高い葉の光合成速度($\sim 30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)を示すことがこれまで知られてきた。しかし研究者は、タカナリに比べて光合成速度の低い日本型品種コシヒカリとタカナリの交雑後代の中に、タカナリを大きく上回り($\sim 40 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、C₄植物のトウモロコシに匹敵する高い光合成速度を有するイネ(HP 系統)を見出した。またタカナリは葉の窒素含量と気孔伝導度が高いことでコシヒカリに比して高い光合成速度を示すが、HP 系統はこれらの性質に加え、タカナリに由来する葉の厚い性質とコシヒカリに由来するサイズが小さく突起の発達した細胞形態を併せ持ち、細胞間隙から葉緑体に至る CO₂ の拡散効率すなわち葉肉伝導度が高いことよって高い光合成能力を有していることがわかった。HP 系統の高い光合成能力に関わる遺伝要因やその機能を解明できれば、世界のあらゆるイネの光合成能力の改良に役立つだけでなく、イネ以外の作物の光合成能力および生産性の向上に貢献できる可能性がある。このことは求められる CO₂ の資源化を促進し、地球環境の劇的変化を緩和することにも貢献する。

本研究は、イネの葉の光合成能力の向上に資するため、HP 系統の著しく高い光合成能力を発揮する基礎となる量的形質遺伝子座(QTL)やその原因遺伝子を網羅的に解明する。加え各遺伝子が有する形態的、生理的機能を明らかにする。そして見出した QTL セットを再びタカナリに集積し、HP 系統の高い光合成能力を再構築して本研究手法の有用性を示す。

2. 研究成果

(1) 概要

コシヒカリ/タカナリ由来の解析集団を用いて、光合成速度(葉面積あたり CO₂ 固定速度)を表現型指標とする QTL 解析を行い、HP 系統の高い光合成速度に関与すると考えられるコシヒカリ遺伝子座を計5カ所特定した。さらに5QTL すべての候補領域の絞り込みを進め、0.09～1.80 Mb の区間まで大きく絞り込み、うち1領域は候補遺伝子を15個まで絞り込んだ。これに加え、コシヒカリの光合成速度を高めるインド型遺伝子 *CAR8* を同定し、機能証

明を行った。

コシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高める5つのQTLが有する作用機構を、葉身窒素含量(LNC)、気孔伝導度(gs)、葉肉伝導度(gm)に着目して解析した。その結果、各QTLが有する生理作用はみな同じではなく、各々異なる生理作用を有することが明らかとなった。また一部の系統ではタカナリに比較して葉面積当たり総細胞表面積が大きくなった。

5000以上の個体に対してDNAマーカー選抜を実施し、コシヒカリ型5QTLをタカナリ遺伝背景に集積させた系統のセットを育成した。葉の光合成速度はQTLを積み上げるほど大きくなり、全て集積させた系統ではHP系統とほぼ等しくなった。さらにバイオマス、収量性の評価を通じ、光合成能力と同時にこれら性質を同時に高めることのできる鍵となるQTLがあることを見出した。

(2) 詳細

1. HP系統の高い光合成速度を実現するQTLの網羅的同定

HP系統の高い光合成速度に関わるQTLを網羅的に同定するため、大気・光飽和条件における葉面積当たりCO₂同化速度を指標とし、戻し交雑自殖系統群(BILs)計179系統ならびに染色体断片置換系統群(CSSLs)80系統を用いてQTL解析を行った。そしてタカナリに対してコシヒカリ型対立遺伝子が光合成速度を高めるQTLをゲノム上に全5カ所(*qHP1a*, *qHP1b*, *qHP3*, *qHP7a*, *qHP7b*)見出した。一方で有意な遺伝子間相互作用は検出されなかった。これはHP系統の高い光合成速度が、主に各遺伝子の相加的効果によって発揮されていることを示している。各QTLに対してそれぞれ組換え固定系統群を作出して領域の絞り込みを進め、最終的に1.3 Mb (*qHP1a*)、1.8 Mb (*qHP1b*)、0.09 Mb (*qHP3*)、0.9 Mb (*qHP7a*)、1.0 Mb (*qHP7b*)の区間まで遺伝子存在領域を絞り込むことに成功した(図1)。このうち候補領域が最も狭くなった*qHP3*については、その原因候補遺伝子を15個とした。その他のQTL領域についても、一層の絞り込みを行うための組換え固定系統群を作出したところである。

コシヒカリの光合成速度を高めるインド型品種由来の遺伝子、*CAR8*の遺伝子マッピングを終了し、相補性試験を通じて遺伝子機能を証明した。本遺伝子は転写因子HAPサブユニットのひとつOsHAP3をコードしており、さらにイネの開花期に関わる遺伝子*DTH8*と同遺伝子であることが明らかになった。このインド型アレルは126番アミノ酸に終止コドンが挿入されており、不完全なタンパク質が光合成速度の上昇に影響していたと考えられた。

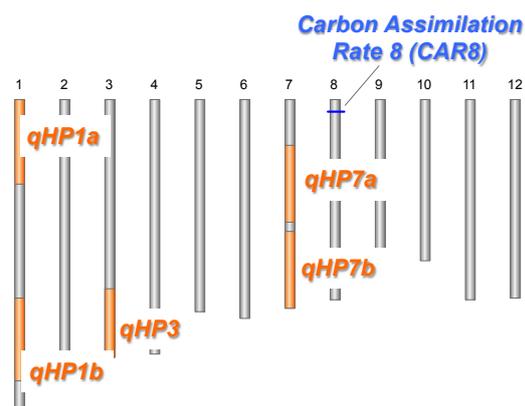


図1 本研究で見出した光合成速度に関わるQTL及び原因遺伝子のゲノム上の位置

2. 各QTLが光合成能力を高める機構の解明

コシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高める5つのQTLについて、光合成速度の向上に関わる生理要因の解析を行った。その結果、各QTLの光合成関連形質に与える作用は皆同一ではなく、*qHP1a*は*gs*と*gm*、*qHP1b*と*qHP3*はLNC、*qHP7a*は*gm*、*qHP7b*はLNCと*gs*をそれぞれ高める効果があることがわかった。Farquhar & von Cammerer (1980)のモデルに基づく解析を通じ、各QTLの効果はそれほど大きくないが、これらのQTLを全て集積することで、HP系統並の光合成速度を発揮出来る可能性を示した。また*qHP7b*は葉の内部の細胞形態に影響を与えないが、*qHP1a*は細胞当たり表面積と葉面積当たり細胞数をわずかに高めることによって、葉面積当たり総細胞表面積を増加することが明らかとなった(図2)。

光合成速度と植物体の発達との関係を調べるため、HP系統と両親品種を水耕栽培して成長解析を実施した。その結果、タカナリやHP系統は根への乾物分配速度が大きいこと、HP系統はタカナリに比べて生育の後半に葉の厚さが大きくなること、バイオマスのさらなる増加には葉への乾物分配速度を高める必要があることなどが明らかになった。

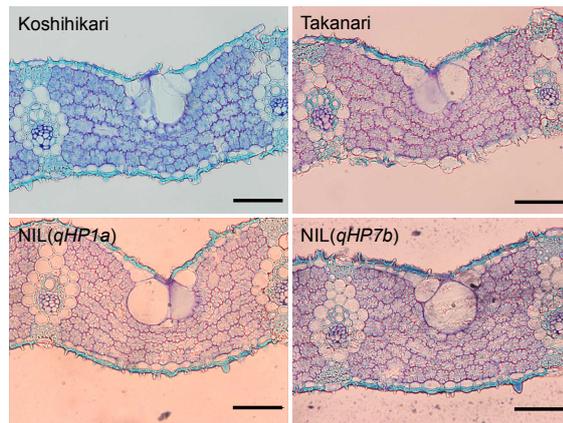


図2 コシヒカリ、タカナリ、準同質系統(NIL)の止葉横断切片の光学顕微鏡写真。写真中のスケールは100μmを示す。これらの細胞数、細胞表面積を画像解析ソフトWinRoof(ser. 6.0, Mitani)で計測した。

単離した光合成関連遺伝子 *CAR8* の詳細な生理解析を行った。本遺伝子の光合成上昇効果は生育の後期に時期特異的に現れること、LNCと

*gs*の両方を高める作用を有することを明らかにし、さらに水分生理実験を通じてこの高い*gs*には高い根の吸水能力が関与することを示した。

3. 光合成QTLの集積を通じたHP系統に匹敵する高い光合成能力を示すイネの再構築

各QTLを有するCSSLsの相互交配ならびに5000を超える個体のDNAマーカータイピングを実施し、タカナリを遺伝背景としてコシヒカリ対立遺伝子が光合成速度を高めるQTLを2~5カ所組み合わせ合わせた集積系統セットを作り上げた。表現型調査の結果、QTLの集積数が多くなるほど光合成速度が上昇し、4~5QTLを集積させた系統ではその光合成速度がHP系統とほぼ等しくなった(図3)。なお相加・相互作用モデル解析による各QTLの光合成速度への相加効果の大きさは、*qHP7b*>*qHP1a*>*qHP1b*=*qHP3*=*qHP7a*の順であった。一方有意に高まる遺伝子間相互作用は認められなかった。以上の結果は、本遺伝子セットを用いることでイネの光合成速度を飛躍的に高められることを示している。さらに育成系統すべてについてバイオマス生産解析、収量解析を2年間実施した。子実収量については、5つのQTLのすべてが収量を高める訳では無かったが、*qHP1a*、*qHP7b*を有する系統は子実収量がタカナリに比較して有意に大きくなり、*qHP1a*+*qHP7b*の集積系統では一層大きくなることを示した。そのためこの2つのQTLは、光合成速度と収量を同時に高める鍵因子であると考えられた。

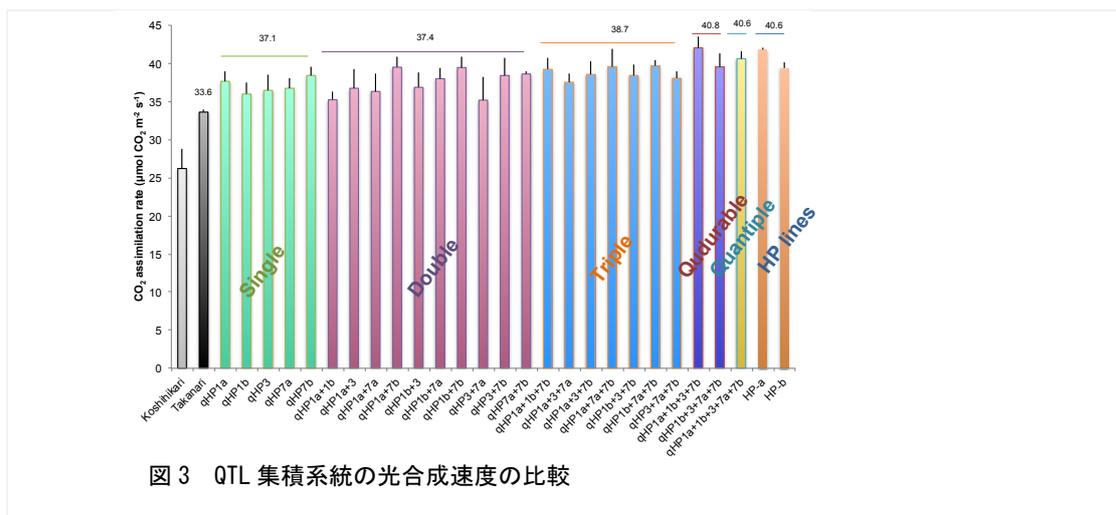


図3 QTL 集積系統の光合成速度の比較

3. 今後の展開

本さがけ研究を通じてイネ光合成速度を飛躍的に改良するための QTL セットを明らかにすることができた。マッピング解析と突然変異体、組換え体、網羅的遺伝子発現解析などを通じ、近い将来これらすべての原因遺伝子を特定する予定である。さらに原因遺伝子が引き起こす分子的、生理的機作を遺伝子ごとに丁寧に解析して明らかにしたいと考えている。この際、本研究で明らかにした各 QTL の生理的解析の知見が役立つ。

光合成 QTL のうち qHP1a、qHP7b は、最終目標である収量性の向上に寄与する可能性が示唆された。そのためこの2つの QTL は特に重要性の高いターゲット領域であり、その特定に優先して取り組むことになる。qHP1a と qHP7b を集積させた系統ではタカナリに比較して高い収量を示しており、品種育成試験を経た上で実用品種化できるものと考えている。

本研究成果は具体的品種育成という直接的応用だけでなく、原因遺伝子の解明を通じてイネ光合成速度の自然変異制御機構の理解、光合成システムの制御機構など、育種学、植物生理学に対して新たな知見を提供できる。そして得られた遺伝子情報はイネやその他作物の生産性向上を目指した育種戦略構築の足がかりになる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究に対する支援によって、光合成測定評価装置や研究に遂行な消耗品類の購入ならびに研究支援者を雇用することができた。これにより多数個体の DNA マーカー解析や表現型調査等、時間、労力、資金を要する実験を、短期間の間に一気に進めることができた。その結果、イネ光合成速度の飛躍的向上に関わる重要な遺伝領域を網羅的に同定し、一部の原因遺伝子の特定、それら生理的メカニズムや生産性への寄与を明らかにすることができた。一方、当初注目していた葉の内部細胞形態の遺伝的制御機構の解明は、安定的スクリーニング手法の開発に至らず、その実態に十分迫ることができなかった。今後の課題と考えている。本研究で見出したイネ光合成速度の飛躍的改良につながる遺伝領域は、近いうちに原因遺伝子が特定され、将来的な作物育種戦略の構築に重要な役割を果たす。また、本研究で育成した生産性を増加させるイネは、実用品種として登録できるものと考えている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

高い光合成能力を持つC4植物のシステムを導入せずに、C3植物であるイネの光合成能力を飛躍的に向上させることを目指し、安達氏は本研究で特に葉の内部のCO₂拡散に着目して研究を進めた。その結果、C4植物であるトウモロコシに匹敵する高い光合成速度をもたらす遺伝子座(QTL)を5か所特定し、DNAマーカー選抜により高い光合成能力を持つイネを再構築することに成功した。しかし、当初目的である葉肉組織形態の遺伝的制御機構については十分な解明に至っていない。QTL内に存在する原因遺伝子の特定にはまだしばらく時間がかかりそうだが、ぜひ突き止めてもらいたい。そのためには、葉肉細胞の形態、光合成の生理学などに優れた研究者との多方面の共同研究がきわめて有効であり、さきがけ研究終了後も本テーマの完成に向けて努力されることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Adachi S, Baptista LZ, Sueyoshi T, Murata K, Yamamoto T, Ebitani T, Ookawa T, Hirasawa T. (2014). Introgression of two chromosome regions for leaf photosynthesis from an *indica* rice into the genetic background of a *japonica* rice. *Journal of Experimental Botany*, 65(8): 2049–2056.
2. Adachi S, Yoshikawa K, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Ookawa T, Yamamoto T, Sage RF, Hirasawa T, Yonemaru J. Fine mapping and physiological aspects of *Carbon Assimilation Rate 8*, a quantitative trait locus for rate of flag leaf photosynthesis in rice. *Frontiers in Plant Science* 8:60.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

- ・日本作物学会第19回研究奨励賞受賞「水稻の個葉光合成速度の品種間差に関わる形質のゲノム解析」2015年3月
- ・日本作物学会第13回論文賞 Tanaka Y, Kumagai E, Tazoe Y, Adachi S, Homma K. (2014) Leaf photosynthesis and its genetic improvement from the perspective of energy flow and CO₂ diffusion. *Plant. Prod. Sci.* 17(2): 111–123.

主要学会発表

- ・Adachi S, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Hirasawa T, Yamamoto T, Yonemaru J. 「CARBON ASSIMILATION RATE 8, a gene identical to *DTH8/Ghd8* responsible for heading date, pleiotropically increases the rate of leaf photosynthesis in rice」『11th

International Symposium on Rice Functional Genomics』p.43, New Delhi, India (2013/11/22) .

- ・Adachi S, Kondo K, Tanabata T, Yamamoto T. 「Does increased stomatal density enhance the rate of leaf photosynthesis in rice? 」『Gordon Research Conference, CO2 Assimilation in Plants: Genome to Biome』(June 2014)
- ・Adachi S, Ochiai T, Ao R, Takai T, Kondo M, Yamamoto T, Hirasawa T. 「Research to dramatically improve rice leaf photosynthesis with marker assisted selection International」『Plant & Animal Genome XXIII 』 January 10–14, 2015 – San Diego, CA, USA P0497
- ・Adachi S, Yoshikawa K, Yamanouchi U, Tanabata T, Sun J, Yamamoto T, Sage R, Hirasawa T, Yonemaru J: Map-based cloning of Carbon Assimilation Rate 8 that increases CO2 assimilation rate in rice . European Networks Conference on Algal and Plant Photosynthesis 2016, 26th April – 29th April 2016, Qawra, Malta
- ・Adachi S, Ao R, Nakanishi A, Kojima Y, Ookawa T, Hirasawa T, Sage R: Improving Rice Photosynthesis by QTL Screening: Developmental Aspects. 37th New Phytologist Symposium, Plant developmental evolution, Beijing, China 15 – 19 May 2016
- ・Adachi S, Furukawa K, Ootsuka C, Ao R, Nakanishi A, Kojima Y, Ookawa T, Takai T, Hirasawa T. Evaluation of photosynthetic properties of NIL(*GPS*) under the different nitrogen application rates in rice, 14th International Symposium of Rice Functional Genomics, Montpellier, France, 26–29 September

学会活動等

- ・The 2015 Tokyo Whole Plant Photosynthesis Workshop 「Genetic analysis for leaf photosynthesis in rice」を主催 (2015年5月東京農工大学)
- ・日本作物学会若手・男女共同参画ワーキンググループ委員として学会における若手や女性の研究活動の活発化への取り組みを実施し、さらに第241回日本作物学会講演会においてミニシンポジウム「水稻の多収育種について考えるー1.5t/10a超の多収実現のためにー」を主催(2016年3月茨城大学)

招待講演

- ・瀋陽農業大学(中国)2013年12月. Genetic improvement of leaf photosynthesis by utilizing the natural genetic variation in rice.
- ・国際農林水産業研究センター 作物・土壌勉強会. 2014年9月. 自然変異を活用したイネ光合成速度の遺伝的改良
- ・岩手生物工学研究所 公開セミナー 2015年8月. イネ個葉光合成能力に関わる遺伝・生理的要因の解明
- ・中国科学アカデミー 植物科学研究所(中国) 2016年5月. Rice photosynthesis
- ・東北大学植物栄養学研究室非公開セミナー 2016年5月. Rice photosynthesis

公募研究事業への応募

- ・戦略的イノベーション創造プログラム (次世代農林水産業創造技術)(2)画期的な商品の提供を実現する新たな育種・植物保護技術 ①新たな育種体系の確立 iii) ゲノム編集技術等を用いた画期的な農水産物の開発 2014年12月～2019年3月
- ・科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)(若手研究(B)) イネ光合成改良に向け



た光合成窒素利用効率のイネ科変異の解明 2016年4月～2019年3月 4,290,000円
・科学技術振興機構 CREST「野外環境と超並列高度制御環境の統合モデリングによる頑
健性限界の解明と応用（代表 永野惇）」齊藤チーム研究協力者 2015年12月～2021
年3月

著書

- ・安達俊輔・山本敏央 2014 光合成研究と産業応用最前線 第1編 光合成の基礎研究
第6章第2節 作物の光合成速度を向上させる自然変異遺伝子の解明 191-202 NTS
Inc. 2014/12/15
- ・Yamori W, Irving LJ, Adachi S, Busch FA. 2016. Strategies for optimizing photosynthesis
with biotechnology to improve crop yield. 797-815. Pessarakli M. ed. *Handbook of
Photosynthesis, Third Edition*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- ・Sage R, Adachi S, Hirasawa. T. Improving photosynthesis in rice: from small steps to giant
leaps. Sasaki T. ed. *Achieving Sustainable Cultivation of Rice*. Burleigh Dodds Science
Publishing. In press.