

氏 名(本籍)	な 仲	の 野	ひろ 廣	み 美
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 5 5 1 号			
学位授与年月日	平 成 9 年 10 月 9 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	イネにおけるシンクソース関係による個葉光合成の 制御 —高CO <sub>2</sub> 処理および穂切除処理による解析—			
論文審査委員	(主 査)	教 授	前	忠 彦
		教 授	山 谷	知 行
		教 授	南 澤	究
		助教授	牧 野	周

# 論文内容要旨

## 序論

植物の光合成は、光合成を行う葉、ソース (source)の生産能力のみならず、その産物を消費・蓄積するシンク (sink)側の能力 (消費量)からも制御を受けることが古くから指摘されている (シンク-ソース関係による光合成の制御)。しかし、現在まで、そのメカニズムの本質は明らかにされていない。そこで本研究では、イネをモデル材料として、その制御機構を解明することを目的とした。すなわち、高 CO<sub>2</sub>環境下で生育させた葉や、登熟期における最大のシンク、穂を切除したときの止葉について、光合成速度、光合成機能に関する主要な因子、酵素タンパクの量もしくは活性、葉身 N 量、光合成最終産物 starch/sucrose 含量などを定量的に解析し、その光合成低下の主要因を個葉レベルで特定することを試みた。現在までの光合成の生理、生化学的な知見から、特に光合成 CO<sub>2</sub>固定の初発反応を担う ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco)、集光機能に関するクロロフィル (Chl)、電子伝達系のキーコンポーネントである cytochrome (Cyt) *f*、光合成最終産物 sucrose の合成系のキー酵素である sucrose-phosphate synthase (SPS)を主要な因子、酵素タンパクとして注目した。

## 第1章 高 CO<sub>2</sub>環境下におけるイネ葉の光合成特性

長期間 (週から月の単位)、高 CO<sub>2</sub>環境下で植物を生育させると、葉のポテンシャルの光合成能力が低下することが一般に認められている。これは、高 CO<sub>2</sub>分圧によりソースの光合成が一時的に促進され、その生産量がシンク側の消費量を上回った結果と考えられている。その光合成能力の低下の要因として、Rubisco のタンパク量の減少やその活性の低下が指摘されている。しかし、一方で、その約 8 割が葉緑体に分配されている葉身 N 量の減少もしばしば認められており、Rubisco も含めて光合成に関連した機能タンパクの量的な減少は、単純に葉身 N の減少に起因している可能性も考えられた。そこで本章では、まずそれらの相関解析を行い、光合成低下の主要因を明確にした。次に、炭水化物の蓄積との関係を検討し、最後に高 CO<sub>2</sub>環境下で葉身 N が減少することの意味について考察した。

## 方法

光合成速度は、赤外線 CO<sub>2</sub>ガスアナライザーと鏡面冷却式露点計を併用した開放系の同化箱を用いたガス交換法で測定した。Rubisco 定量は SDS-PAGE-ホルムアミド抽出法 (Makino et al. 1986)、Chl 定量は Arnon (1949)の方法で行った。葉身 N 量は、ケルダール分解-ネスラー法で定量した。また starch 含量は、アルカリ抽出-アミログルコシダーゼ分解-ネルソン・ソモギ法、sucrose 含量は 80% ethanol 可溶性画分について、Jones ら (1977)の方法で測定した。

## 長期的な高 CO<sub>2</sub>処理によるイネ葉の光合成の低下と葉身 N 量の減少

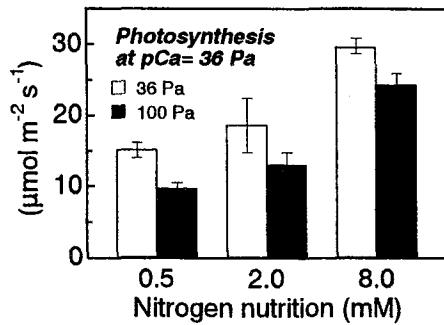


Fig. 1 Rate of photosynthesis at a  $pCa$  of 36 Pa ( $A_{21 pCa = 36 Pa}$ ) in leaves of rice grown hydroponically under two  $CO_2$  partial pressures of 36 (open columns) and 100 (closed columns) Pa  $CO_2$  at N concentrations of 0.5, 2.0 and 8.0 mM. Measurements were made at an irradiance of  $1700 \mu mol quanta m^{-2} s^{-1}$ , a leaf temperature of  $25^\circ C$  and a leaf-to-air vapor pressure difference of 1.0 to 1.2 kPa. The vertical bars indicate SE ( $P < 0.05$ ,  $n = 4-6$ ).

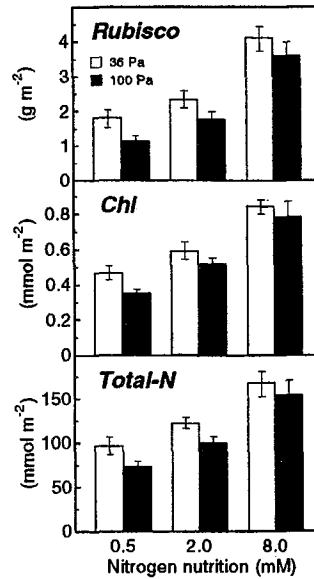
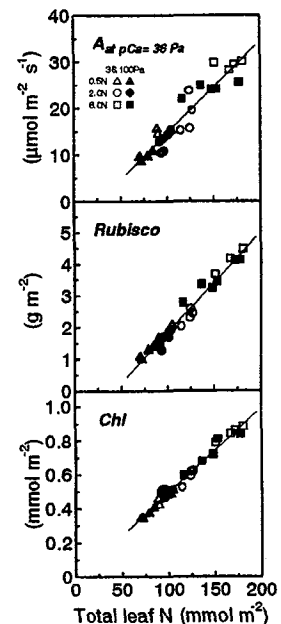


Fig. 2 Rubisco, Chl, and total N contents in leaves of rice. Column symbols are the same as in Figure 1. The vertical bars indicate SE ( $P < 0.05$ ,  $n = 4-6$ ).

100 Pa  $CO_2$  で約 3 週間、生育させたイネ (ノヒカリ) 葉の 36 Pa  $CO_2$  分圧での光合成速度は、36 Pa  $CO_2$  区と比較して有意に減少した (Fig. 1)。Rubisco タンパク量、Chl 量も減少する傾向にあった (Fig. 2)。さらに starch の蓄積も認められ、光合成速度や Rubisco などの減少と相関があった。しかし、同時に葉身 N 量も減少していることに注目し (Fig. 2)、測定した光合成速度、Rubisco、Chl と葉身 N との相関解析を行ったところ、それぞれの関係には両  $CO_2$  分圧区間で差がなかった (Fig. 3)。これらことから、100 Pa  $CO_2$  区の光合成速度、Rubisco タンパク量などの減少は、葉身 N 量の減少ですべて説明でき、starch の蓄積とは直接結びつくものではないことがわかった。と同時に、過去の研究で指摘されていた Rubisco タンパクの減少が他のコンポーネントと比較して特異的なものではないことも明らかとなった。

以上より、高  $CO_2$  処理によりイネ葉の単位葉面積当たりの光合成速度は低下したが、それは葉身 N 量が減少し、それに伴って Rubisco などの光合成機能タンパクも減少したためであると結論した。

Fig. 3 Rate of photosynthesis at a  $pCa$  of 36 Pa ( $A_{21 pCa = 36 Pa}$ ), Rubisco content and Chl content versus total leaf N content. Plants were grown hydroponically under two  $CO_2$  partial pressures of 36 (open symbols) and 100 (closed symbols) Pa  $CO_2$  at N concentrations of 0.5 (triangle), 2.0 (circle) and 8.0 (square) mM. Data are taken from Figs. 1 and 2. Regression analysis was performed using first-order kinetics.



### 個体レベルでの N 分配の変化と葉身 N の減少

個体内の N 分配について調べると、高  $CO_2$  処理により葉身への N 分配量が減少する傾向にあるのに、逆に葉鞘へは増加する傾向にあった (Fig. 4)。従って、個葉レベルで認められた葉身 N 量の減少は、個体レベルでの各器官への N 分配量が変化した結果と考えられた。すなわち、高  $CO_2$  環境下でイネはソース器官である葉身そのものへの N 投資を減らし、個体レベルで光合成を抑制している可能性が考えられた。

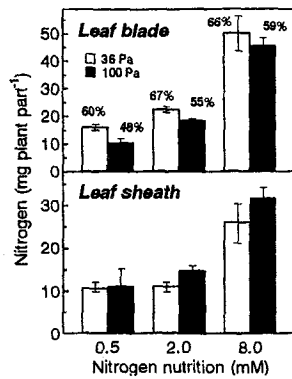


Fig. 4 Total N content in leaf blades and leaf sheaths of rice plants on the 70th day after germination. Column symbols are the same as in Figure 1. The percentage value above each column in the top panel shows the ratio of leaf blade-N to above ground-N. The vertical bars indicate SE ( $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

## 第2章 穂切除のイネ止葉の光合成に及ぼす影響

本章では、イネの登熟期において最大のシンクである穂を切除した場合、その登熟に密接に関わる止葉の光合成がどのような影響を受けるのかを調べた。ダイズなどの植物では、子実(さや)を切除すると、葉に starch や sucrose が著しく蓄積し、光合成速度が低下することが報告されている。それらの光合成低下の要因としては、Rubisco タンパクの量的な減少や *in vivo* での活性化率の低下が指摘されている。本章では、Farquhar らの  $C_3$  型光合成の生化学的モデルをもとに、低  $CO_2$  分圧として葉内  $CO_2$  分圧 ( $pCi$ ) が 15 Pa の光合成速度を Rubisco の *in vivo* での能力の指標として、60 Pa 以上の光合成速度をその他の光合成の律速因子の能力の指標として解析した。

### 方法

方法は第1章と同様である。ただし、Cyt *f* 定量は特異抗体を用いたロケット免疫電気泳動法で行い、SPS 活性の測定は Huber ら (1989) の方法に従った。

### 穂切除によるイネ止葉の老化抑制と光合成

穂切除区の 36 Pa  $CO_2$  分圧での光合成速度は、実験期間中、対照区に比べ常に高く推移した (Fig. 5)。同時に、Rubisco などの光合成機能タンパクもすべて高く維持された。次に、それらの *in vivo* でのダウンレギュレーションについて検討した。両区の Rubisco 量と  $pCi = 15$  Pa での光合成速度、Cyt *f* 量および SPS 活性と  $pCi > 60$  Pa での光合成速度との相関解析を行ったが、穂切除区の光合成速度も調べた光合成機能タンパクの量や活性で定量的に説明できた (Fig. 6)。このことから、調べた光合成機能タンパクは、すべて穂切除区においても不活性化されることなく、対照区と同様に機能していることが推察された。以上のことから、イネにおいては穂切除により止葉の光合成は一切抑制されないと結論した。

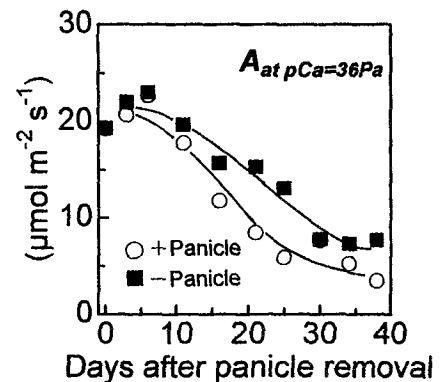


Fig. 5 Changes in the rate of photosynthesis at a  $pCa$  of 36 Pa ( $A_{at pCa=36 Pa}$ ) in flag leaves of rice with (open circles) and without (closed squares) panicles after anthesis. Plants were hydroponically grown at an N concentration of 2.0 mM. Measurements were made at an irradiance of  $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a leaf temperature of  $25^\circ\text{C}$ .

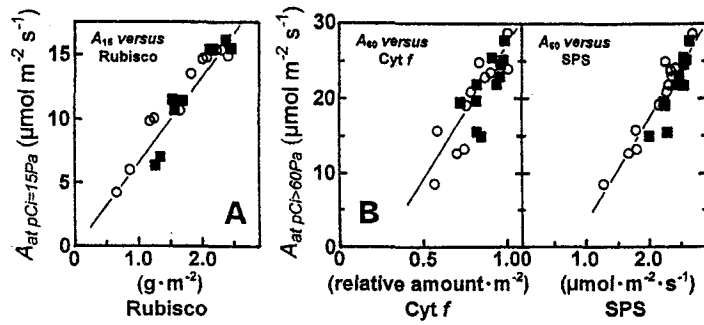


Fig. 6 Rate of photosynthesis at a  $p_{Ci}$  of 15 Pa ( $A_{15}$ ,  $p_{Ci} = 15$  Pa) versus Rubisco content (left panel, A) and rate of photosynthesis at a  $p_{Ci}$  above 60 Pa ( $A_{60}$ ,  $p_{Ci} > 60$ ) versus Cyt  $f$  content and SPS activity (right panels, B). Symbols are the same as in Fig. 5. Photosynthetic measurements were made at an irradiance of  $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a leaf temperature of  $25^\circ\text{C}$ . Regression analysis was performed using first-order kinetics.

### 穂を切除しても止葉の光合成が抑制されない理由

穂切除により、葉身と葉鞘には共に starch が蓄積したが、葉鞘での蓄積量は葉身に比べて5倍ほど大きかった。従って、葉鞘が余剰となった光合成産物の一時的なプール器官として働いた可能性が考えられた。このことから、穂切除により余剰となった光合成産物は葉鞘に蓄積し、葉身にはあまり蓄積しないために、その光合成が抑制されなかった可能性が考えられた。

### 第3章 シンク-ソース関係による光合成制御の植物種間差

イネにおいては、高  $\text{CO}_2$  処理および穂切除処理により、光合成の特定の機能因子へのダウンレギュレーションは生じなかった。このような結果が、イネ特有のものであるのかどうかを検証するために、インゲン (テンドーグリーン) を対照材料として、同様の実験を行った。

### インゲンにおける高 $\text{CO}_2$ 処理およびさや切除処理の個葉光合成への影響

高  $\text{CO}_2$  処理により、インゲン葉の光合成速度はイネと同様に低下した。しかし、インゲンの場合は、葉身 N 量はほとんど変化しておらず、葉身 N 量の変動から光合成の低下を説明できなかった (Fig. 7)。また、Rubisco タンパクの特異的な減少が認められ、それと光合成低下には相関があった (Fig. 7)。一方、さや切除処理においては、光合成機能に関する主な酵素タンパクはイネと同じように高く維持されているにも関わらず、 $p_{Ci} = 15$  Pa での光合成速度はやや低下する傾向にあった (Fig. 8)。このように、各処理による個葉光合成の応答は両植物間で異なっていた。

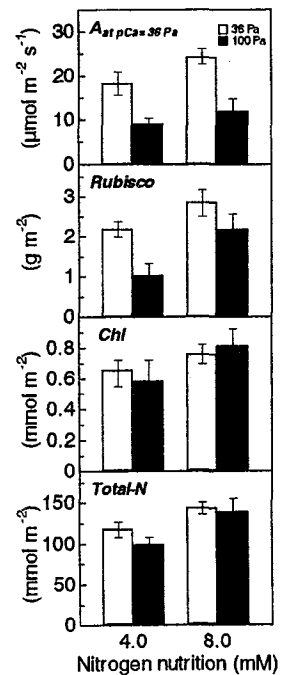
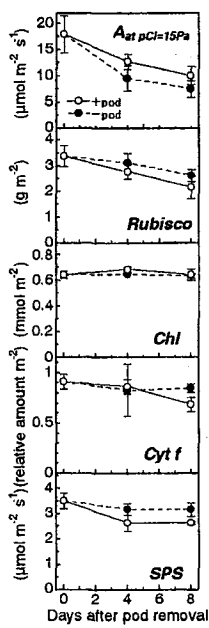


Fig. 7 Rate of photosynthesis at a  $p_{Ca}$  of 36 Pa ( $A_{15}$ ,  $p_{Ca} = 36$  Pa), Rubisco, Chl, Cyt  $f$  and total leaf N contents in leaves of bean grown hydroponically under two  $\text{CO}_2$  partial pressures of 36 (open columns) and 100 (closed columns) Pa  $\text{CO}_2$  at N concentrations of 4.0 and 8.0 mM. Photosynthetic measurements were made at an irradiance of  $1700 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a leaf temperature of  $26^\circ\text{C}$ . The vertical bars indicate SE ( $P < 0.05$ ,  $n = 3-4$ ).

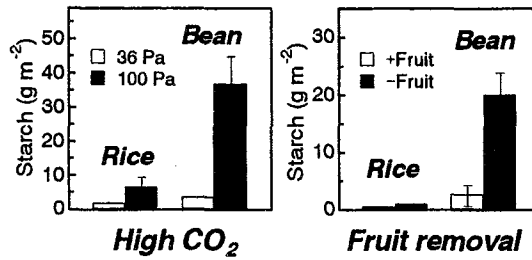
### インゲン葉には多量の starch が蓄積する

イネとインゲンのシンク制限による個葉光合成の応答が異なる原因については、現在の段階ではよくわかっていない。しかし、強いてあげるなら、両者の starch の蓄積の違いにその原因の可能性を考えている。インゲン葉においては、starch の著しい蓄積が認められていた (Fig. 9)。このインゲンにおいて starch の蓄積が大きい理由は、イネの葉鞘に代わる器官が存在しないことと関連があ



**Fig. 8** Changes in the rate of photosynthesis at a  $p\text{Ci}$  of 15 Pa ( $A_{at\ pCi=15Pa}$ ), Rubisco, Chl and Cyt *f* contents and SPS activity in leaves of bean with (open circle) and without (closed circle) pod. Plants were hydroponically grown at an N concentration of 4.0 mM. Photosynthetic measurements were made at an irradiance of  $1700\ \mu\text{mol quanta m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  and a leaf temperature of  $26^\circ\text{C}$ . The bars on the symbols indicate SE ( $p < 0.05$ ,  $n = 3-4$ )

と思われる。つまり、インゲンにはイネの葉鞘に相当する一時的な光合成産物のプール器官が存在しないため、光合成産物が余剰となった場合、それが光合成器官である葉に蓄積するのであろう。そして、イネではインゲンのような starch の著しい蓄積がその葉身に生じないために、個葉レベルでは光合成に影響が現れなかったのかも知れない。



**Fig. 9** Starch contents in leaves of rice and bean plants grown under two  $\text{CO}_2$  partial pressures of 36 (open columns) and 100 (closed columns) Pa  $\text{CO}_2$  and starch contents in leaves of rice and bean plants with fruit (open columns) and without fruit (closed columns). Rice and bean plants were grown at N concentrations of 2.0 mM and 4.0 mM, respectively. Data (right panel) are taken from the flag leaves of rice and the 4th center leaves of bean on the 11th and 12th day after fruit removal, respectively. The vertical bars indicate SE ( $P < 0.05$ ,  $n = 3-5$ ).

## 総合考察

本研究では、イネにおけるシンクソース関係による光合成の制御機構を明らかにすることを目的とし、高  $\text{CO}_2$  処理、穂切除処理によるイネ個葉光合成への影響を調べ、その光合成の低下の要因を特定することを試みた。その結果、高  $\text{CO}_2$  処理によるイネ葉の光合成の低下は、葉身 N 量が減少し、それに伴い光合成機能因子が減少したためであった。葉身 N 量の減少は、個体レベルで評価すると各器官への N の分配量が変化した結果であった。一方、穂を切除した場合、イネ止葉の光合成はなんら抑制されることはなかった。その理由として、イネには葉鞘という光合成産物の一時的なプール器官が存在することが考えられた。以上のことから、イネは、個体内でのシンクソース関係の変化に対して、特定の酵素やタンパク質の量的な調整や活性制御といった生化学的レベルでソースの光合成を制御するというよりは、むしろ個体レベルで応答することが明らかとなった。

原著論文

**Nakano, H.**, Makino, A. and Mae, T. (1995) Effects of panicle removal on the photosynthetic characteristics of the flag leaf of rice plants during the ripening stage. *Plant Cell Physiol.*, **36**: 653-659

**Nakano, H.**, Makino, A. and Mae, T. (1997) The effect of elevated partial pressures of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity nitrogen content in rice leaves. *Plant Physiol.* in press.

参考論文

Makino, A., **Nakano, H.** and Mae, T. (1994a) Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, cytochrome *f*, and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiol.*, **105**: 173-179

Makino, A., **Nakano, H.** and Mae, T. (1994b) Effects of growth temperature on the responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport components, and sucrose synthesis enzymes to leaf nitrogen in rice, and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiol.*, **105**: 1231-1238

Makino, A., Harada, M., Sato, T., **Nakano, H.** and Mae, T. (1997) Plant growth and nitrogen allocation in rice under CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiol.* in press.

Makino, A., **Nakano, H.**, Kaneko, K., Mae, T., Shimada, T., Takumi, S., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Miyao-Tokutomi, M. and Yamamoto, N. (1997) Rubisco content and nitrogen allocation in rice leaves under CO<sub>2</sub> enrichment. Optimization of Rubisco content by 'antisense' *rbcS*. *Develop. Plant Soil Sci.* in press.

Makino, A., Sato, T., **Nakano, H.** and Mae, T. (1997) Leaf photosynthesis, plant growth and nitrogen allocation in rice under different irradiances. *Planta* in press.

Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., **Nakano, H.**, Miyao-Tokutomi, M., Mae, T. and Yamamoto, N. (1997) Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by 'antisense' *rbcS* lead to a higher nitrogen-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO<sub>2</sub> and light in rice plants? *Plant Physiol.* in press.

## 論文審査結果要旨

21世紀において人口の爆発的増加が予想されている。とくにコメを主要なカロリー源とするアジアにおいてその増加が著しいとされており、コメの大幅な増収が緊急の課題となっている。このような現実を背景に、本論文は、イネの物質生産の基盤を構築する個葉光合成に注目し、多収との関係で問題となるソースシンク関係について生理、生化学的な立場から定量的な解析を試みたもので、世界的にみても過去に例が見られないものである。

序論では、本研究を行うに至った背景、今日までに知られている知見のレビュー、明らかにすべき問題点が整理され明快に述べられている。

第一章では、イネを高CO<sub>2</sub>下で栽培し、この間に発達したイネ葉の光合成がどのような影響を受けるかについて調べている。単位葉面積当たりの光合成能力は明らかに高CO<sub>2</sub>下で生育した葉で低下することが認められ、その要因が探られた。その結果、光合成能力の低下は、光合成のkey enzymeであるRubiscoの活性化率の低下や特定の光合成関連因子のダウンレギュレーション等によるのではなく、単純に光合成器官への窒素分配量の減少によることが明らかにされている。

第二章では、穂切除の影響が検討されている。その結果、穂の切除により、一時的に糖、デンプンが葉身に蓄積されることがみられるもののその量は光合成を阻害するほどではなく、光合成能力-光合成主要因子間の関係は、穂を切除してないイネと全く変わらないことが明らかとされている。さらにその要因が探られ、イネには、穂以外にも、潜在的なシンクとなる葉鞘、茎、根、新分けつ等が多々あることがその要因であるとしている。

第三章では、インゲンとイネを比較し、シンクソース関係には植物種間差があり、インゲンではイネと違って、さや切除により、糖、デンプンが葉身に多量に蓄積すると共に葉身窒素に対するRubiscoの割合も低下することが示されている。

総合論議では以上の結果に基づき、イネの個葉光合成の高CO<sub>2</sub>環境への応答は、個体内（器官間）における窒素分配において葉身への分配を減らすことでシンクソース間のバランスを保っていること、イネには、潜在的なシンクが多数存在することなどから糖やデンプンの蓄積による光合成のダウンレギュレーションは受けにくいことが論議されている。

以上、本論文はイネの個葉光合成に対する高CO<sub>2</sub>環境、穂切除の影響を定量的に生理生化学的立場から解析したもので、生産性に関わる生理・生化学の発展に対する貢献が顕著であり、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。