

氏 名(本籍)	いま 今	い 井	かず 一	ひろ 洋
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 8 4 7 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 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	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	イネ葉の出葉から老化過程を通しての <i>rbcS</i> , <i>rbcL</i> mRNA 量と ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase / oxygenase 生成 量の関係に窒素供給量の違いが及ぼす影響			
論文審査委員	(主 査)	教 授	前	忠 彦
	(副 査)	教 授	西 尾	剛
		教 授	山 谷	知 行

論文内容要旨

序論

窒素は、植物にとって一般に最も不足しやすい栄養元素であり、その不足は、作物の成長や収量に多大なる影響を及ぼす。多くの C_3 植物において、葉の光合成速度と窒素含量の間には、高い正の相関関係が認められている (Evans 1989)。これは、葉緑体の光合成反応に関わる数多くのタンパク質に多量の窒素が分配されていることに起因する。その中でもっとも多量に存在するタンパク質が ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco, EC 4. 1. 1. 39) である。高等植物における Rubisco は、SSU (small subunit of Rubisco)、LSU (large subunit of Rubisco) の 2 つのサブユニット、それぞれ 8 量体ずつから構成される 16 量体である。SSU、LSU をコードする遺伝子、*rbcS*、*rbcL* 遺伝子は、核ゲノム、葉緑体ゲノムにそれぞれ存在する。葉における Rubisco 量は、光飽和、現大気 CO_2 条件下における光合成の律速因子である (Makino et al. 1985, 1997; Evans 1986)。また、Rubisco は、葉の老化とともに分解され、その窒素は、生長部へと転流されて再利用される。それ故に、葉における Rubisco のターンオーバー、すなわち、生成と分解は、植物における炭素代謝、窒素代謝に深く関与している。

イネにおける Rubisco のターンオーバーは、安定同位体 ^{15}N を用いた実験によって詳細に調べられている (Mae et al. 1983; Makino et al. 1984; Suzuki et al. 2001b)。Makino ら (1984) は、イネを水耕法により育て、その第 12 葉を用いて、葉の出葉から老化過程を通しての培養液窒素濃度と Rubisco 量、Rubisco 生成量、Rubisco 分解量の関係を調べた。その結果、Rubisco 量と Rubisco 生成量は、窒素供給量の上昇と共に増加することを明らかにした。また、Suzuki ら (2001b) は、比較的低窒素濃度の元で生育したイネの第 8 葉を用いて、葉の出葉から老化過程を通して *rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量を調べた。その結果、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量は、相応して変動することを明らかにした。しかしながら、これらの研究において、窒素供給量の違いが、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係に及ぼす影響については、未だ明らかにされていない。

本研究では、第 1 章において、水耕栽培したイネの第 8 葉を材料に、葉の展開中の窒素供給量の違いが *rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量に与える影響を明らかにすることともに、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係が、葉の展開中から葉の老化初期にかけて、どのように変わるのかを明らかにすることを目的とした。また、第 2 章において、イネ葉の老化初期、中期、後期における窒素供給量の違いが *rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることともに、葉の老化とともに *rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係は、どのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。

第 1 章 窒素供給量の違いがイネ葉の出葉から老化初期までの *rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係に及ぼす影響

イネ (*Oryza sativa* L. cv. Notohikari) を水耕栽培法により育てた。主稈第 8 葉身が第 7 葉鞘から出葉してから 2 日間、Rubisco 生成量を算出するための ^{15}N ラベルをすべてのイネに対して行

い、その直後から異なる窒素栄養濃度、すなわち標準濃度 (1 mM N, 0.5 mM NH₄NO₃)、高濃度 (4 mM N, 2.0 mM NH₄NO₃) の培養液に移して老化初期まで栽培を行った。他の栄養元素については、標準濃度と同じ濃度とした。水耕液は、7 日後に同濃度にて更新した。葉の成熟、老化の指標となる葉身全窒素量、クロロフィル量は、葉の展開中に 1 mM N 区、4 mM N 区ともに大きく増加して、1 mM N 区では、葉の完全展開直後に減少を始めていたが、4 mM N 区では 10 日目まで増加していた (Fig. 1)。Rubisco、葉緑体チラコイド膜に存在する light-harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II (LHCII)、coupling factor 1 (CF1) は、1 mM 区では 6 日目、4 mM N 区では 10 日目まで大きく増加して、その後、減少した (Fig. 2)。¹⁵N 分析から求めた 4 日間当たりの Rubisco 生成量の変動を Fig. 3 に示した。Rubisco 生成量は、1 mM N 区、4 mM N 区共に葉の展開中では高い値を示したが、葉の完全展開以降は大きく減少した。

次に、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量の変動を調べた。RNA の抽出には、葉の一生を通して、81-95% の抽出効率を保てる Suzuki ら (2001a) の方法を用いた。ゲルプロット解析を行い (Fig. 4)、用いたプローブの特異性を確認した後、ドットプロット法によって mRNA 量の定量を行った。内部標準には、RNA には NADH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を用いた。1 mM N 区の *rbcS* mRNA 量は、2 日目以降減少する傾向にあったが、4 mM N 区の *rbcS* mRNA 量は、葉の完全展開、すなわち 6 日目まで増加して、その後、大きく減少した (Fig. 5)。1 mM N 区の *rbcL* mRNA 量は、*rbcS* mRNA と同様に 2 日目以降減少する傾向にあったが、4 mM N 区の *rbcL* mRNA 量は、4 日目、6 日目と徐々に増加して、その後、急激に減少していた (Fig. 5)。*rbcS*、*rbcL* mRNA 量の変動と Rubisco 生成量の変動を比較するため、それぞれ 4 日間当たりの平均値を比較した (Fig. 6)。1 mM N 区では、Rubisco 生成量は、葉の完全展開以降に大きく減少していたが、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量は、葉の完全展開以降も Rubisco 生成量に見られるような大きな減少は見られなかった。この傾向は、4 mM N 区でも同様であった。これらの結果より、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量及び Rubisco 生成量は、窒素供給量の違いに応答して変動すること、また、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係は、葉の展開中と完全展開以降において、異なっていることが明らかとなった。

第 2 章 イネ葉の老化過程における *rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係に窒素供給量の違いが及ぼす影響

第 1 章の結果から、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係は、葉の展開過程と葉の老化過程で異なることが示唆された。そこで、第 2 章では、イネ葉の老化過程において、異なる窒素供給量が *rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量にどのように影響するのか、また、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係は、葉の老化とともにどのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。加えて、老化葉においても窒素が流入すれば Rubisco の生合成は行われる可能性があることから (Mae et al. 1983; Makino et al. 1984)、強制的に窒素が第 8 葉に流入するような切除処理区を設けて、Rubisco 生成量と窒素流入量の関係を調べた。

サンプルは、第 1 章と同様にイネ (*Oryza sativa* L. cv. Notohikari) の主稈第 8 葉身を用いた。第 8 葉身が第 7 葉鞘から出葉してから、第 1 章と同様に Rubisco 生成量、窒素流入量を算出するための ^{15}N ラベルを行い、その後、1 mM N (0.5 mM NH_4NO_3) の水耕液に移して栽培を続けた。老化初期 (第 8 葉の出葉から 6 日目)、老化中期 (14 日目)、老化後期 (22 日目) に 1 mM N 区に加えて 4 mM N (2.0 mM NH_4NO_3) の窒素栄養処理区を設けて栽培をそれぞれ 6 日間行い、1 日おきにサンプリングした。切除処理区は、老化後期に主稈第 8 葉以外の葉と分けつをすべて切除し、4 mM N のもとで栽培した (切除区)。葉身全窒素量、Rubisco 量、LHCII 量、CF1 量は、老化初期、中期、後期のいずれの 4 mM N の窒素栄養処理によって 1 mM N 区よりも増加した (Fig. 7)。また、切除区の葉身全窒素量、Rubisco 量、LHCII 量、CF1 量は、4 mM N 区よりも高い値を維持していた。葉身への窒素流入量は、1 mM N 区では、葉の展開中に高い値を示したが、葉の完全展開以降は、大きく減少した (Fig. 8)。老化初期、中期、後期の 4 mM N 区では、窒素流入量は、1 mM N 区より増加したが、葉の老化とともにその増加量は低くなる傾向にあった。また、切除区の窒素流入量は、4 mM N 区よりも高かった。2 日間あたりの Rubisco 生成量は、1 mM N 区、4 mM N 区、切除区のいずれの区においても、窒素流入量と似た変動が見られた (Fig. 9)。老化後期における窒素流入量と Rubisco 生成量の相関を調べた (Fig. 10)。その結果、2 つの因子の間には、正の相関関係が見られた。この結果から、窒素流入量の増加がある場合、老化葉でも Rubisco 生成量の増加があることが示された。

Fig. 12 に *rbcS*、*rbcL* mRNA 量の変動を示した。mRNA の定量は、第 1 章と同様に行った (Fig. 11)。1 mM N 区の *rbcS* mRNA 量、*rbcL* mRNA 量は、2 日目以降、減少する傾向を示したが、老化初期、中期、後期の水耕液更新時に若干の増加を示した (Fig. 12)。老化初期、中期、後期の 4 mM N 区の *rbcS* mRNA 量、*rbcL* mRNA 量は、いずれも 4 mM の窒素栄養処理をしてからすみやかに増加して、その後、急激に減少していた。Table 1 に老化初期、中期、後期における *rbcS* mRNA 量または *rbcL* mRNA 量に対する Rubisco 生成量の割合を示した。*rbcS* mRNA 量または *rbcL* mRNA 量に対する Rubisco 生成量の割合は、葉の老化の進行に従って 1 mM N 区、4 mM N 区の両窒素栄養処理区において、共に減少していた。これらの結果から、葉の老化過程においても、窒素供給量の増加により *rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量が増加すること、一方、*rbcS* mRNA 量または *rbcL* mRNA 量に対する Rubisco 生成量の割合は、葉の老化の進行と共に低下することが明らかとなった。

まとめ

本研究で以下のことが明らかとなった。

1. イネ葉の展開中における窒素供給量の違いに応じて、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量は変動する。
2. 葉の老化過程においても窒素供給量の増加によって、*rbcS*、*rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量は、増加する。
3. *rbcS*、*rbcL* mRNA 量に対する Rubisco 生成量の割合は、葉の老化に伴って低下する。

4. 老化葉においても窒素流入量が増加した場合、Rubisco 生成量は増加する。

引用文献

Evans J.R. (1986) *Planta* 167, 351-358.

Evans J.R. (1989) *Oecologia* 78, 9-19.

Mae T., Makino A. & Ohira K. (1983) *Plant & Cell Physiology* 24, 1079-1086.

Makino A., Mae T. & Ohira K. (1984) *Plant & Cell Physiology* 25, 429-437.

Makino A., Mae T. & Ohira K. (1985) *Planta* 166, 414-420.

Makino A., Shimada T., Takumi S., Kaneko K., Matsuoka M., Shimamoto K., Nakano H., Miyao-Tokutomi M., Mae T. & Yamamoto N (1997) *Plant Physiology* 114, 483-491.

Suzuki Y., Makino A. & Mae T. (2001a) *Journal of Experimental Botany* 52, 1575-1579.

Suzuki Y., Makino A. & Mae T. (2001b) *Plant, Cell & Environment* 24, 1353-1360.

原著論文

Imai K., Suzuki Y., Makino A. & Mae T. (2005) Effects of nitrogen nutrition on the relationships between the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs and the amount of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesized in the eighth leaves of rice from emergence through senescence. *Plant, Cell and Environment* 28, 1589-1600.

Imai K., Suzuki Y., Makino A. & Mae T. Effects of nitrogen nutrition during leaf senescence on the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs and their relation to the amount of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesized in leaves of rice. *Plant, Cell and Environment* (submitted).

参考論文

Irving L. J., Imai K., Makino A., Mae T. and Robinson D. (2005) Nitrogen allocation, Rubisco turnover and yield in two barley genotypes. *Journal of experimental botany* (submitted).

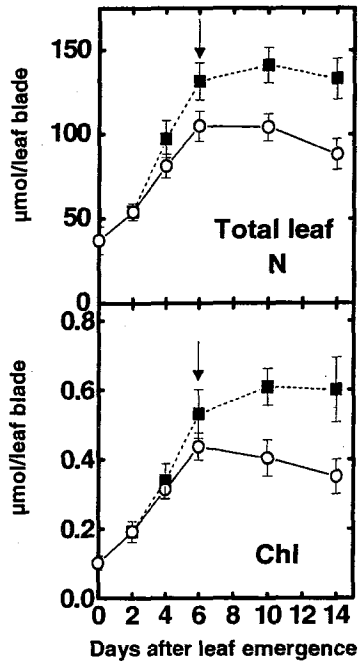


Fig. 1 Changes in the amounts of total leaf N and chlorophyll in the eighth leaf blades of rice from emergence to the early stage of leaf senescence. Data in each graph are means \pm SD (n=4). Plants were grown with two levels of N supply (1 mM-N treatment, \circ and 4 mM-N treatment, \blacksquare) from the second day after leaf emergence. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

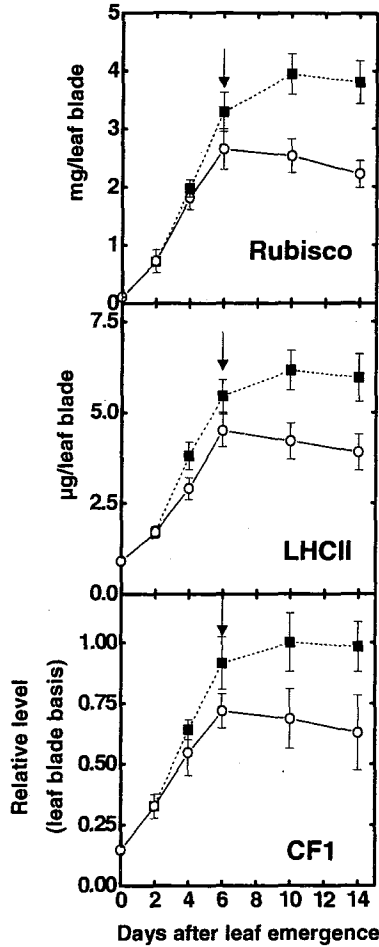


Fig. 2 Changes in the amounts of Rubisco and LHCII and the level of CF1 in the eighth leaf blades of rice from emergence to the early stage of leaf senescence. Data in each graph are means \pm SD (n=4). Plants were grown with two levels of N supply (1 mM-N treatment, \circ and 4 mM-N treatment, \blacksquare) from the second day after leaf emergence. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

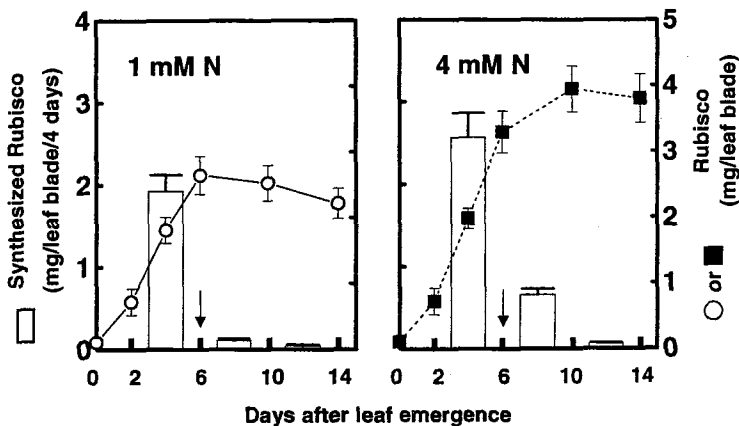


Fig. 3 Changes in the amounts of Rubisco synthesized for each four-day period in the eighth leaf blades of rice grown with two levels of N supply (1 mM N, left panel and 4 mM N, right panel) from emergence to the early stage of leaf senescence. Data are means \pm SD (n=4). N treatments were commenced 2 days after leaf emergence. The line in each graph represents changes in the Rubisco content shown in Fig. 2. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

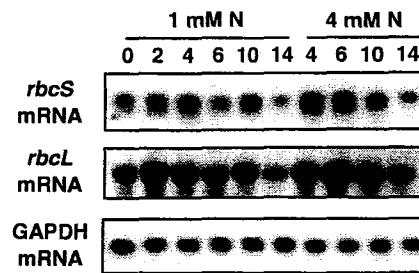


Fig. 4 Gel blot analysis of *rbcS*, *rbcL* and GAPDH mRNAs in the eighth leaf blades of rice from emergence to the early stage of leaf senescence. Total RNA (5 μ g for *rbcS* and *rbcL* mRNAs and 9 μ g for GAPDH mRNA) was subjected to agarose gel electrophoresis. Plants were grown with two levels of N supply (1 mM-N treatment and 4 mM-N treatment). N treatments were commenced 2 days after leaf emergence. The number above each lane represents the day after leaf emergence.

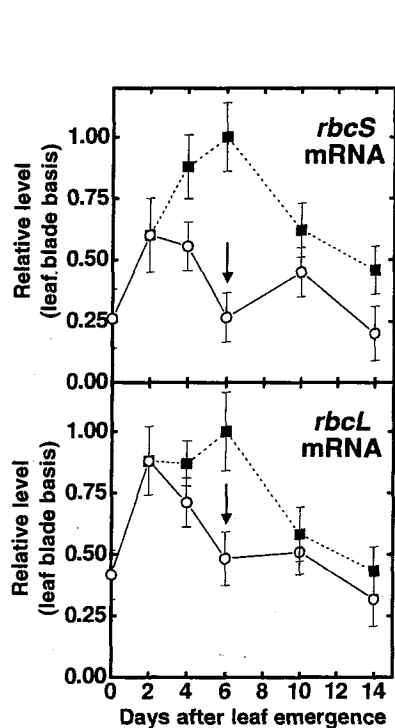


Fig. 5 Changes in the relative levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs in the eighth leaf blades of rice from emergence to the early stage of leaf senescence. Data in each graph are means \pm SD (n=4). Plants were grown with two levels of N supply (1 mM-N treatment, \circ and 4 mM-N treatment, \blacksquare) from the second day after leaf emergence. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

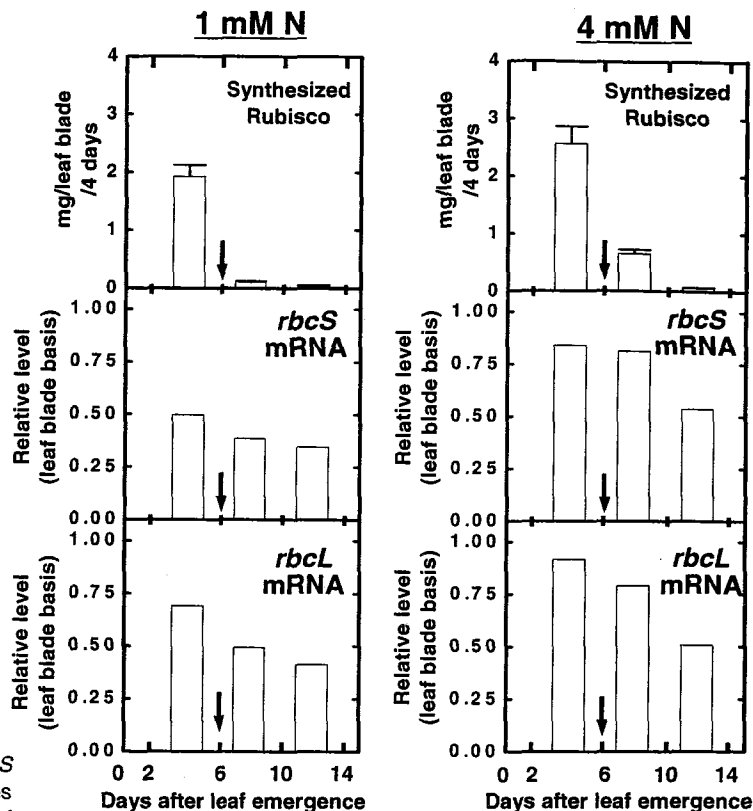


Fig. 6 Comparison between the amount of Rubisco synthesized and the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs for each four-day period. The panels showing the amount of Rubisco synthesized are from Fig. 3 and the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs for 4 days were calculated from the data shown in Fig. 5. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

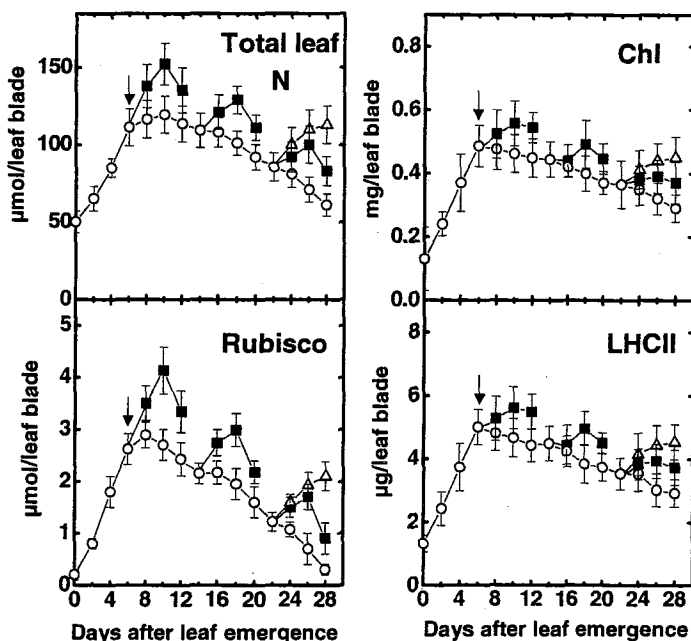


Fig. 7 Changes in the amounts of total leaf N, chlorophyll, Rubisco and LHCII in the eighth leaf blades of rice from emergence through senescence. Rice plants were grown with 1 mM N and 4 mM N supply on the early, middle and late stages of senescence of the eighth leaf blades. The removal treatment was conducted at the late stage (twenty-second day after leaf emergence) of senescence of the eighth leaf blade, in which all leaf blades except the eighth leaf blade on the main stem and all tillers were removed, and the plants were grown with 4 mM N supply. Data in each graph are means \pm SD (n=3). The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded. 1 mM-N treatment (\circ), 4 mM-N treatment (\blacksquare) and removal treatment (\triangle).

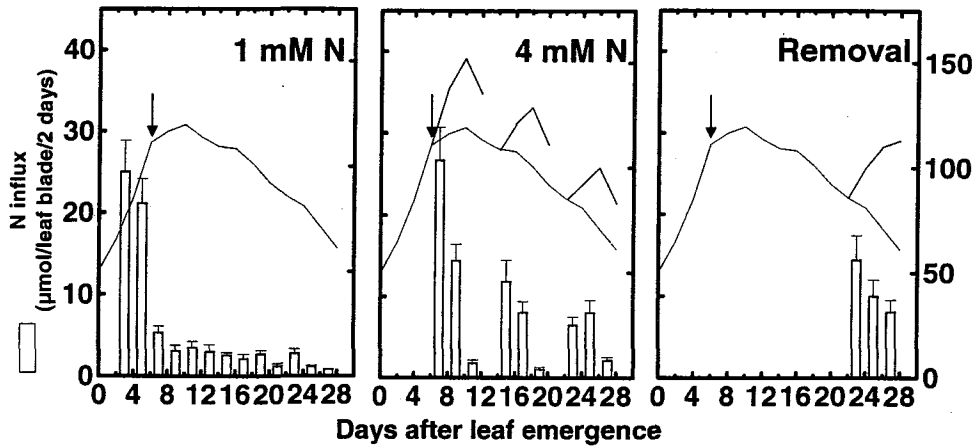


Fig. 8 Changes in the N influx for each two-day period in the eighth leaf blades of rice. Data are means +SD (n=3). The line in each graph represents changes in the total leaf N content shown in Fig. 7. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

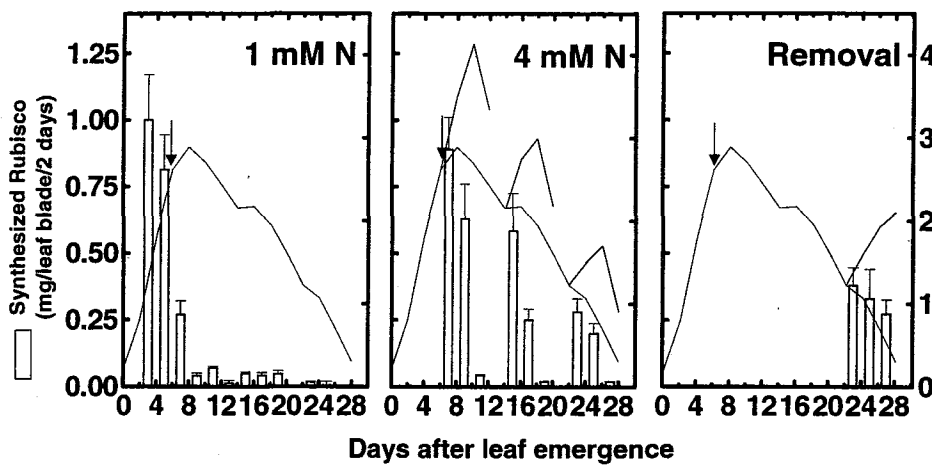


Fig. 9 Changes in the amounts of Rubisco synthesized for each two-day period in the eighth leaf blades of rice. Data are means +SD (n=3). The line in each graph represents changes in the Rubisco content shown in Fig. 7. The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded.

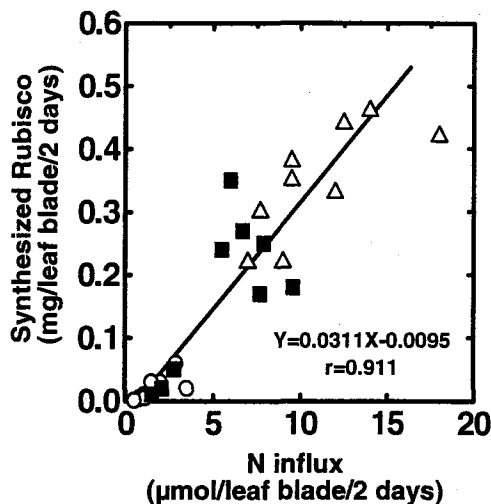


Fig. 10 Synthesized Rubisco versus N influx into the eighth leaf blades of rice at the late stage of senescence of the eighth leaf blade. 1 mM-N treatment (O), 4 mM-N treatment (■) and removal treatment (Δ).

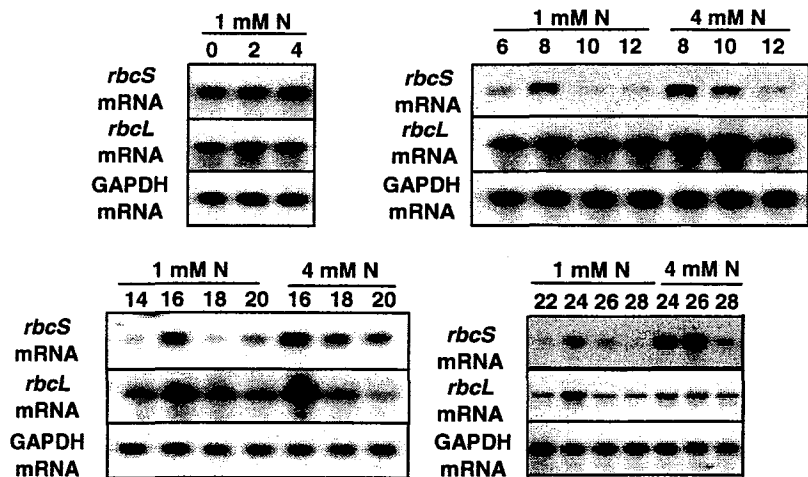


Fig. 11 Gel blot analysis of *rbcS*, *rbcL* and GAPDH mRNAs in the eighth leaf blades of rice from emergence through senescence. Total RNA, 5 μg for *rbcS* mRNA, 2 μg (days 0-4 and 22-28) or 5 μg (days 6-12 and 14-20) for *rbcL* mRNA and 9 μg for GAPDH mRNA, was subjected to agarose gel electrophoresis. The number above each lane represents the day after leaf emergence.

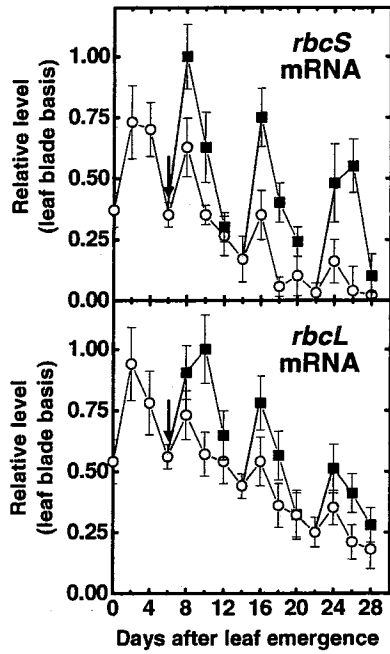


Fig. 12 Changes in the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs in the eighth leaf blades of rice from emergence through senescence. Rice plants were grown with 1 mM N and 4 mM N supply on the early, middle and late stages of senescence of the eighth leaf blades. The removal treatment was conducted on the late stage (twenty-second day after leaf emergence) of senescence of the eighth leaf blade as described in Fig. 7. Data in each graph are means \pm SD ($n=3$). The arrow in each graph indicates the time when the eighth leaf blades had fully expanded. 1 mM-N treatment (O) and 4 mM-N treatment (■).

Table 1. The ratios of the amount of Rubisco synthesized to the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs on the early, middle and late stages of senescence of the eighth leaf blades. The ratio was calculated as the average amount of Rubisco synthesized to the average level of *rbcS* mRNA or *rbcL* mRNA for 4 days after the 1mM-N treatment or the 4 mM-N treatment.

		Early stage of leaf senescence	Middle stage of leaf senescence	Late stage of leaf senescence
Synthesized Rubisco / <i>rbcS</i> mRNA (mg/relative level)	1 mM N	0.36	0.23	0.18
	4 mM N	1.15	0.95	0.43
Synthesized Rubisco / <i>rbcL</i> mRNA (mg/relative level)	1 mM N	0.26	0.10	0.05
	4 mM N	0.93	0.70	0.38

論文審査結果要旨

Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco) は、光合成による CO₂ 同化及び光呼吸の初発反応を触媒し、特異的に多く存在する酵素である。Rubisco に投資される窒素は、成熟したイネ葉においては葉身全窒素のおよそ 30% を占め、その量は光飽和、現大気 CO₂ 分圧下における CO₂ 同化速度の律速要因となっている。Rubisco は、葉の展開過程で急激に増加し展開終了後に最大値に達し、その後の老化過程で減少していき、枯死時には見られなくなる。老化過程で葉において分解された Rubisco の窒素は成長部へと転流され、そこで再利用される。したがって葉の一生における Rubisco の消長は、葉の光合成機能を介して炭素経済と、また窒素利用を介して窒素経済と深く関わっている。葉における Rubisco 含量はその生成と分解のバランスによって決定され、窒素栄養の影響を強く受ける。しかし、異なる窒素栄養レベルのもとで成育したイネ葉の Rubisco が、葉の一生を通してどのような分子的背景のもとで生成されているかについては、十分に解明されていない。

本研究では、第 1 章において、イネを材料に第 8 葉身が出葉してから異なる窒素栄養濃度、1 mM N と 4 mM N の水耕液に移して第 8 葉の老化初期まで栽培を行い、葉の展開中の窒素供給量の違いが *rbcS*, *rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量に与える影響を明らかにすると共に、*rbcS*, *rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係が、葉の展開中から葉の老化初期にかけて、どのように変わるのかを解析した。そして *rbcS*, *rbcL* mRNA 量及び Rubisco 生成量は、窒素供給量の増加に応答して増加すること、*rbcS*, *rbcL* mRNA 量と Rubisco 生成量の関係は、葉の展開中と完全展開以降において、異なっていることを明らかとした。

第 2 章では、イネ葉の老化初期、中期、後期における窒素供給量の違いが、*rbcS*, *rbcL* mRNA 量、Rubisco 生成量、窒素流入量にどのような影響を及ぼすのかについて解析した。また、老化後期における窒素流入量と Rubisco 生成量の関係を調べるため、切除処理区を設け解析した。そして 1) 葉身全窒素量、Rubisco 量、窒素流入量、Rubisco 生成量、*rbcS*, *rbcL* mRNA 量は、老化初期、中期、後期のいずれの時期においても窒素供給量の増加によって増加すること、2) 老化後期に第 8 葉以外を切除して葉への窒素流入量を強制的に増加させた場合も Rubisco 量は増加し、老化期を通して窒素流入量と Rubisco 生成量の間に正の相関関係が認められること、3) *rbcS* mRNA 量または *rbcL* mRNA 量に対する Rubisco 生成量の割合は、葉の老化の進行に従って減少していくこと、4) Rubisco 生成量は窒素の葉への流入量により支配されること等を明らかとした。

以上の知見は、葉における Rubisco の生成と窒素栄養の関係の分子的背景を、葉の一生を通して明らかにしたのものとして高く評価され、審査員一同は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。