

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657029

研究課題名（和文）両面葉の気孔の緑色光応答に見られる背腹性：緑色光受容体は何か

研究課題名（英文）Dorsiventrality in stomatal responses to green light in bifacial leaves: Identification of green light receptor

研究代表者

寺島 一郎 (TERASHIMA ICHIRO)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：40211388

研究成果の概要（和文）：気孔応答の背腹性を調べる上で、気孔の環境応答が、気孔孔辺細胞のみの機能によるのか、葉肉の機能も気孔に影響を及ぼすのかは、解いておかなければならない問題である。ツユクサの葉片、剥離表皮、剥離表皮を葉肉に再び載せたもの、をゲル上で長時間観察することができるシステムを構築し、赤色光下の気孔開孔、および高 CO₂ 下の閉口には葉肉組織からのシグナルが関与していることが分かった。赤色光下の開孔への葉肉シグナルには光合成機能が必須、高 CO₂ 下の閉口には光合成が関与しないことも明らかになった。これらの結果は、単色光ごとに葉肉因子の解析が必要であることを示している。

研究成果の概要（英文）： The effects of changes in CO₂ concentration (100 or 700 ppm) on stomatal responses in red or white light were examined microscopically in a leaf segment, an epidermal strip and an epidermal strip placed on a mesophyll segment of *Commelina communis*, all mounted on a buffer-containing gel. In both red and white light, stomata of the leaf segment opened/closed rapidly at low/high CO₂. In red light, epidermal strip stomata barely responded to CO₂. In white light, they opened at low CO₂, but hardly closed at high CO₂. Stomata of the epidermal strip placed on the mesophyll responded in the same manner as those on the leaf segment. We also confirmed that the apoplast transfer of ‘mesophyll signals’ and the stomatal opening at low CO₂ are dependent on photosynthesis, whereas the stomatal closure at high CO₂ is independent of photosynthesis. It is highly possible that production of mesophyll signals in the light depends on the wavelength.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、気孔

1. 研究開始当初の背景

気孔の開閉に関する光生物学は、島崎、木下、射場をはじめとするわが国の研究者が世

界をリードしている分野である。光は光合成経路と非光合成経路を介して気孔の開孔に作用すると考えられている。前者では光合成によるエネルギーや糖類の供給が行われ、後者

では青色光がフォトトロピンに吸収されることにはじまるシグナル伝達経路によって H^+ -ATPase が活性化される。

われわれは、葉の表側と裏側とでは光環境が大きく異なることに注目して、背腹葉の向軸側（表側）と背軸側（裏側）の気孔の光応答性を比較してきた。ヒマワリの葉の向軸側と背軸側から同じ強度の白色光を同時に照射すると、背軸側気孔の方が弱い光で開きはじめる。また、背軸側の気孔は、同じ光量子束密度ならば、白色光よりも、葉を透過した緑色光に敏感に応答して開孔する（Wang et al. 2008）。続いて単色光を用いた研究を進め、光合成をDCMUで阻害しても、青色光は気孔開孔を誘導することを確認し、緑色光は背軸側気孔の開孔を誘導することを発見した。光応答の違いが栽培光環境への馴化である可能性を探るため、展開中の葉を2週間裏返しにしたが、向軸側気孔の緑色光による開孔は誘導できなかった（Wang et al. 2011）。これらは、緑色光受容体が存在すること、向軸側気孔と背軸側気孔に生来的な違いがあること、を示唆している。シロイヌナズナの青色光受容体であるフォトトロピンの二重突然変異体 *phot1phot2*、もうひとつの青色光受容体クリプトクロムの二重変異体 *cry1cry2* を用いた実験では、前者は緑色光への応答を示したが、後者は感受性が著しく減少した。植物の緑色光応答については、多数の論文があるものの、その分子機作は模糊としている（Folta & Maruhnich 2007）。しかし、緑色光応答には、青色受容体と考えられているクリプトクロムが関わっている可能性が高い。

2. 研究の目的

葉の表側と裏側とでは光環境が大きく異なることに注目して、ヒマワリの葉の表側と裏側の気孔の光応答性を比較したところ、裏側の気孔は、光合成の阻害剤DCMU存在下でも緑色光に応答して開孔することが明らかになった。本研究は、この光受容体を同定すること、および、表側気孔と裏側気孔の光環境馴化能力とその限界とを比較することを目的としている。もし、われわれの予備実験が示唆するように、気孔の緑色光／青色光への応答にクリプトクロムが関与するならば、フォトトロピンのみが関与しているとされる従来のスキームを書き換えることになる。

単面葉シャガを用いた馴化実験を行い、気孔の性質に見られる背腹性が生来的なものか馴化によるのかを明らかにすることにも特徴がある。

3. 研究の方法

当初の目的に沿って研究を推進しようとしたが、先行研究（Mott et al. 2008）の検討から、気孔開閉への葉肉の寄与をまず確認する必要があると考えるに至った。また、光受容体が孔辺細胞に存在するとは限らない。葉肉組織に光受容体がある可能性も否定できない。そこでまず、気孔開閉に葉肉組織が影響するかどうかを調べた。

気孔研究のモデル植物ともいえるツクサを用いて、葉片、剥離表皮、剥離表皮を葉肉の上に載せたもの、の気孔応答を観察することにした。また、CAM植物を用いた実験系の開発も試みた。

(1) ゲランガムを用いた観察システムの構築：気孔腔に液体が入ると、気孔の応答が悪くなる。気孔腔内に気体を保ったまま、剥離表皮に水分を供給するためには、適切な硬さのゲルを用いるのがよい。ゲルの濃度や緩衝液の組成などを工夫して、剥離表皮を長時間にわたって観察するシステムを構築した。

(2) 植物材料：温室や恒温室内で、ツクサおよびコダカラベンケイを栽培した。

4. 研究成果

(1) 白色光の影響：ツクサの葉片を、白色光下、100 ppm CO_2 におくと気孔が開孔し、700 ppm CO_2 におくと閉口した。剥離表皮では、100 ppm CO_2 における開孔はおこるが、700 ppm CO_2 における閉口が著しく遅れた。剥離表皮を葉肉の上に載せると、葉片とほぼ等しい応答性を示した。

(2) 赤色光の影響：ツクサの葉片を、赤色光下、100 ppm CO_2 におくと気孔が開孔し、700 ppm CO_2 におくと閉口した。剥離表皮では、100 ppm CO_2 における開孔が起こらないので、700 ppm CO_2 における閉口反応は調べられなかった。剥離表皮を葉肉の上に載せると、葉片とほぼ等しい応答性を示した。

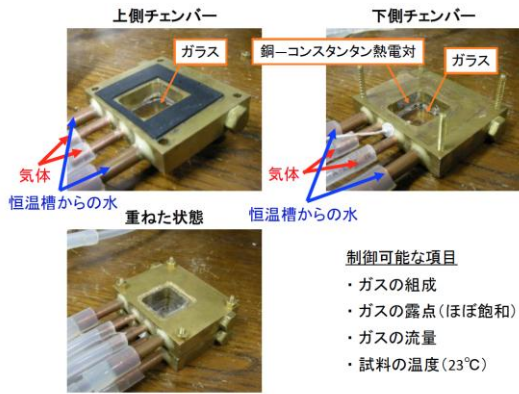


図 1. ガス組成を調節できる気孔観察用チェンバー。これを光学顕微鏡の上にマウントする。

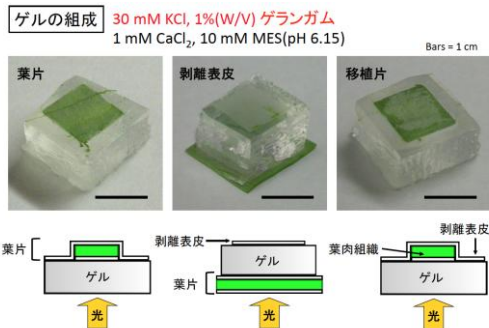


図 2. グランガムを用いた裏側表皮の気孔を観察。葉片や、葉肉に再び剥離表皮を載せる際には、裏側表皮を葉肉よりも大きく切り取り、葉肉を覆った。

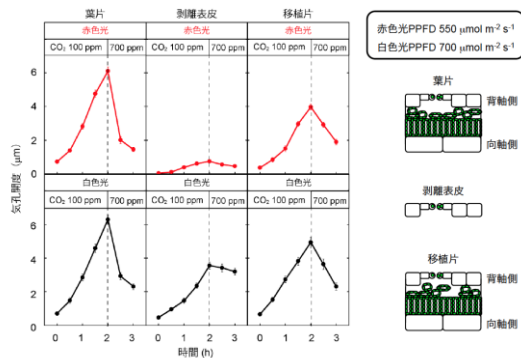
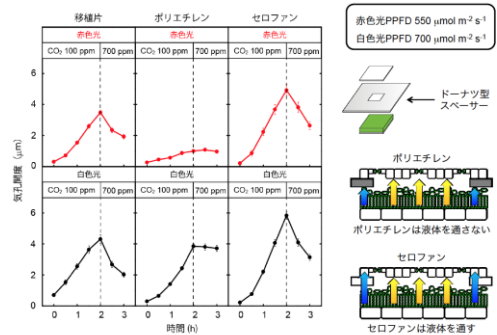


図 3. 実験 (1) および (2) の結果。剥離表皮では赤色光における開孔が見られなかった。また、高 CO₂ 濃度における閉孔が見られなかった。

(3) スペーサー：剥離表皮を葉肉に載せる際、緩衝液につけた 5 mm の径の孔をもつセロファンを挟んだ場合には、気孔は葉片と同

様の反応を示した。5 mm の径の孔をもつポリエチレンのフィルムを挟んだ場合には、気孔は剥離表皮の場合と同様の反応を示した。(1) ~ (3) の結果は葉肉からアポプラスト液相を経由したシグナルが気孔に作用する



ことを強く示唆する。

図 4. 実験 (3) の結果。

(4) DCMU による光合成阻害の効果：DCMU で光合成を阻害すると、赤色光による気孔開孔は見られなくなった。しかし、高 CO₂ による気孔閉口は見られた。したがって、高 CO₂ シグナルは葉肉から発せられるが、光合成は関係していない。

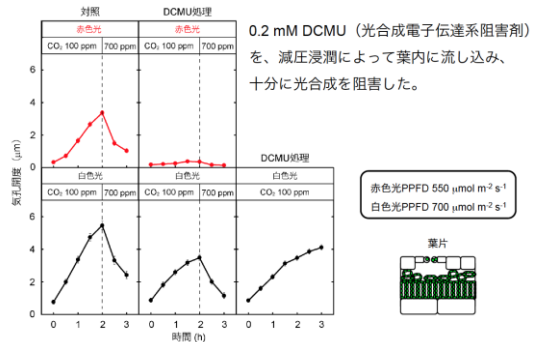


図 5. 実験 (4) の結果。

(5) コダカラベンケイを用いた研究：CAM 植物、コダカラベンケイを用いて同様の実験系を築いた。明期と暗期の表皮の違い。たとえば明期の表皮を暗期の葉肉に載せるなどの実験が可能である。

(6) 葉肉からのシグナルを考慮した気孔コンダクタンスモデルの構築：気孔の環境応答モデルの構築のために、酸素濃度が気孔コンダクタンスに及ぼす影響を解析した。葉肉の電子伝達活性に注目したモデル化を行った。

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 3 件)

- ① Fujita T, Noguchi K, Terashima I (2013)
Aqueous mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytol*, in press. 査読有
- ② Okajima Y, Taneda H, Noguchi K, Terashima I (2012) Optimum leaf size predicted by the leaf energy balance model incorporating dependencies of photosynthesis to light and temperature. *Ecol Res*, 27, 333-346. 査読有
- ③ Wang Y, Noguchi K, Terashima I (2011)
Photosynthesis-dependent and -independent responses of stomata to blue, red and green monochromatic light: Differences between the normally oriented and inverted leaves of sunflower. *Plant Cell Physiol*, 52, 479-489. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Mizokami, Y., Noguchi, K., Terashima, I. "The role of aquaporin (PIP) in ABA mediated decrease in mesophyll conductance" International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, Kurashiki, Japan (26-31 March 2013)
- ② 藤田貴志、柳澤修一、野口 航、寺島一郎 “CE-ME を用いた気孔開閉時の表皮アプラスト液組成の解析” 日本植物生理学会第 54 回大会、岡山 (2013 年 3 月 21 日～23 日)
- ③ 溝上祐介、野口 航、寺島一郎 “アブシジン酸を介した葉肉コンダクタンス低下におけるアクアポリン (PIP) の役割” 日本植物生理学会第 54 回大会、岡山 (2013 年 3 月 21 日～23 日)
- ④ 澁田未央、藤田貴志、野口 航、寺島一郎 “CAM 植物の光による気孔開閉制御” 日本植物生理学会第 54 回大会、岡山 (2013 年 3 月 21 日～23 日)
- ⑤ 藤田貴志、野口 航、寺島一郎 “気孔開度を調節する葉肉アポプラスト液の採取法および成分分析手法の検討” 日本植物学会第 76 回大会、姫路 (2012 年 9 月 15～17 日)

⑥ 岡島有規、種子田春彦、野口 航、寺島一郎 “気孔コンダクタンスの環境応答モデル: Leuning モデルは越えられるか?” 日本植物学会第 76 回大会、姫路 (2012 年 9 月 15～17 日)

⑦ Fujita, T., Noguchi, K., Terashima, I. "Effects of mesophyll apoplastic solution on stomatal responses to CO₂" Stomata 2012 at Manchester Conference Centre, Manchester, UK (2-4 July 2012)

⑧ 藤田貴志、野口 航、寺島一郎 “葉肉アポプラスト液が気孔の CO₂ 応答におよぼす影響” 日本光合成学会大会、横浜 (2012 年 6 月 1 日～2 日)

⑨ 藤田貴志、野口 航、寺島一郎 “葉肉アポプラスト液が気孔の CO₂ 応答におよぼす影響” 日本植物生理学会第 53 回大会、京都 (2012 年 3 月 16 日～18 日)

⑩ 寺島一郎、岡島有規、矢守 航 “地球環境変化にともない Rubisco の最適キネティクスはどう変化するか” 日本植物学会第 75 回大会、駒場 (2011 年 9 月 17～19 日)

⑪ 岡島有規、寺島一郎 “気孔の CO₂ 応答における光合成速度の影響の有無” 日本植物学会第 75 回大会、駒場 (2011 年 9 月 17～19 日)

⑫ 藤田貴志、野口 航、寺島一郎 “気孔の CO₂ 応答における葉肉組織の役割の生理学的解析” 日本植物学会第 75 回大会、駒場 (2011 年 9 月 17～19 日)

⑬ Terashima, I., Okajima, Y., Mizokami, Y., Tazoe, Y., Yamori, W. CO₂ concentration and Rubisco kinetic parameters in the elevated CO₂ world. *Photosynthesis Research for Sustainability-2011*, Crescent Beach Hotel, Baku, Azerbaijan (July 28, 2011) (Invited lecture)

[その他]

ホームページ等
研究室ホームページ
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seitaip/index.html>

新学術領域ホームページ
<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp/shinryoiki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 一郎 (TERASHIMA ICHIRO)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：40211388

(2) 研究分担者

なし