

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14537

研究課題名(和文) 気孔開閉を制御する葉肉シグナル分子の同定

研究課題名(英文) Mesophyll signals controlling stomatal behaviour

研究代表者

寺島 一郎 (TERASHIMA, Ichiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：40211388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ツクサの剥離表皮のアポプラストおよび、葉肉のアポプラストが緩衝液に直接接することなく、葉肉シグナルの存在を解析する実験システムを考案した。一つは、剥離表皮の内側同士を合わせたもの、もう一つは、1 cm角の葉片を一定の環境で前処理して表皮を剥離し、暗所においた葉から剥離した表皮を載せて、前処理の効果を比較するというものである。後者のシステムを駆使し、前処理の影響を解析したところ、前処理時に光が存在すると開きやすく、特に青色光成分が存在すると開きやすいこと、前処理の際のCO₂濃度が低いほど開きやすいことが明らかになった。新規のシステムによって、葉肉シグナルの存在を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Transplanting of the isolated epidermis onto the mesophyll is a potent methodology for examination of roles of mesophyll-derived signals in controlling stomatal responses to environmental stimuli. In this study, we devised a new method of transplanting, in which neither the mesophyll apoplast nor the epidermis apoplast directly contact the buffer solution. Utilising this method, we carefully re-examined whether the mesophyll signals play significant roles in stomatal responses to light and/or CO₂ in *Commelina communis*. In this method, epidermal strips were prepared from the dark-treated leaves and immediately transplanted on the mesophyll segments pretreated in the light or dark at 100, 390 or 700 ppm CO₂. We confirmed the presence of mesophyll signals inducing stomatal opening and closure.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：アポプラスト 気孔 葉肉シグナル

1. 研究開始当初の背景

気孔開閉の環境依存性の研究には、ツククサやソラマメの剥離表皮が伝統的に用いられてきた。やがて孔辺細胞のプロトプラストが用いられるようになり、最近ではシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な研究によって次々と気孔の環境応答に重要な因子が同定されている。この分野におけるわが国の研究者の貢献は著しい。一方、葉のガス交換測定を行うと、気孔の開度は光合成と強い相関を示す。したがって、葉肉の光合成が気孔開度に影響を及ぼしていることは明らかである。しかし、そのメカニズムは未だに不明である。

Mottら(2008)は、剥離表皮の気孔は光やCO₂にほとんど応答しないが、表皮を葉肉の上に戻すと無傷葉の気孔と同様の敏感さで光とCO₂に応答するようになることから、葉肉シグナルの存在を主張した。一方、Mottら(2008)の主張とは異なり、剥離表皮の気孔が光やCO₂に応答することが示されてきた。

藤田貴志らが、Mottらの論文の実験条件と得られたデータを詳細に検討し追試した結果、彼らの用いた緩衝液のKCl濃度が高く、表皮が脱水状態になっていたことが疑われた。剥離表皮の気孔は周囲の表皮細胞の収縮により受動的に開口していたため、光やCO₂に応答しなかった可能性が高い。しかし、剥離表皮を用いた実験において、気孔の応答が緩慢であることは多くの研究者が認める事実であり、葉肉に再び載せると気孔の応答が活発になるというMottらの実験系は、葉肉シグナルを研究する実験系として有望である。

そこで、われわれは、この観察システムの改良を手始めに、葉肉シグナルの研究に着手した。大きな進歩は、剥離表皮を緩衝液に浮かべるのではなく、適当な緩衝液を含むゲランガムに載せることで、10時間にもおよぶ剥離表皮気孔の観察が可能となったことである。この実験系を駆使して、葉肉シグナルの存在を示す最初の論文が既に公表されている(Fujita *et al.* 2013 *New Phytol.* 199: 395-406.)。

2. 研究の目的

われわれはMottらの観察システムを改良し、青色光受容体フォトロピンを励起する白色光と励起しない赤色光とを使い、CO₂濃度を操作することにより、ツククサにおける光/低CO₂による気孔開口、および高CO₂における気孔閉鎖には葉肉シグナルが関与していることをすでに明らかにした(Fujita *et al.* 2013)。この研究では、ゲルに用いた緩衝液の濃度には、剥離表皮を緩衝液に浮かべて気孔の応答を検討する場合にはよく用いられてきた濃度(10 mM MES)を採用したが、孔

辺細胞のプロトプラストの研究などに用いられる濃度(〜0.5 mM)に比べると高かった。したがって、2013年の剥離表皮を用いたデータには、強い緩衝液が影響している可能性がある。そこで、本研究では緩衝液の濃度を検討することとした。また、緩衝液がアポプラストに直接接しない状態で、葉肉シグナルの存在を証明する方法を考案した。さらに、気孔開閉に関わる葉肉アポプラスト液の生理学的・化学的性質を精査することを通して、葉肉シグナルの同定を試みた。

本研究は、これまで、仮想的に語られていた葉肉シグナルの実体を明らかにすることを目指した。高CO₂条件下で生産性の高い植物を創出する際には、高CO₂下で気孔が閉鎖しないようにする必要がある。したがって、本研究の成果は応用面でもきわめて有用なものとなる。

3. 研究の方法

1) 表皮のアポプラストが直接接する緩衝液のMES濃度の検討

緩衝液を含んだゲランガムを使用して表皮の気孔応答に及ぼす緩衝液濃度を検討した。

気孔のすぐ下には気孔腔がある。この空間は本来空気で満たされているが、緩衝液に表皮を浮かべると緩衝液によって満たされ、気孔の反応性が損なわれる。1%のゲランガムを用いて水ポテンシャルを調整することにより、顕微鏡による開度測定システムの湿室中で、剥離表皮の気孔の挙動を長時間にわたって観察できるようになった。このシステムを使い、剥離表皮の気孔の開閉に及ぼすMES緩衝液(pH6.15)の濃度の影響を調べた。

2) 葉肉シグナルの存在を証明するシステム

緩衝液の影響が非常に強いことが明らかになったので、剥離表皮のアポプラストおよび葉肉のアポプラストが緩衝液に直接作用することがないような実験システムを考案した。一つは、剥離表皮の内側どうしを合わせて、表皮の表面側をゲルに接するようにゲルに載せた。もう一つは、1 cm角の葉片を一定の環境で前処理して表皮を剥離し、暗所においた葉から剥離した表皮を載せ、前処理が新たに葉肉に載せた表皮の気孔に及ぼす効果を比較した。

3) 葉肉シグナルのサイズの推定

2)のシステムの葉肉と表皮との間に一定サイズ以下の分子のみを透過させる透析膜を挟んで、その効果を検討し、葉肉シグナルのサイズを推定した。

4. 研究成果

1) ゲランガム中の MES 緩衝液濃度が剥離表皮の気孔応答に及ぼす影響

1%ゲランガム中の緩衝液として、30 mM KCl と、0.1 mM CaCl₂ を含むものを用いた。MES 緩衝液 (pH 6.15) の濃度を振ったデータを示す (図 1)。390 ppm の CO₂ を含む空気中で、赤色光と青色光 LED を照射し、2 時間後の開度である。気孔開度は著しい濃度依存性を示した。2013 年に公表した論文では、10 mM の緩衝液を用いていたので、剥離表皮のデータに関しては、かなり緩衝液濃度の影響が強いものであったといえよう。アポプラストが直接接する緩衝液濃度は低濃度に抑えるべきである。

2) 葉片の前処理条件によって、移植表皮の気孔の挙動は異なる。

葉片を一定の光/CO₂ 条件に置き、裏側の表皮を剥離し、暗処理した他個体の葉から剥離したばかりの裏側表皮を葉肉に載せ、一定条件下で気孔開度を比較した。一定の条件におくので、十分な時間が経てば、前処理条件にかかわらず、気孔開度はほぼ同じになる。そこで、気孔が開きかける状態で、気孔開度を比較した。前処理の条件によって、気孔の開きは有意に異なった。前処理時に光を照射すると開きやすく、特に青色光が共存する場合に開きやすかった (図 2)。また、前処理の際の CO₂ 濃度が低いほど開きやすかった。

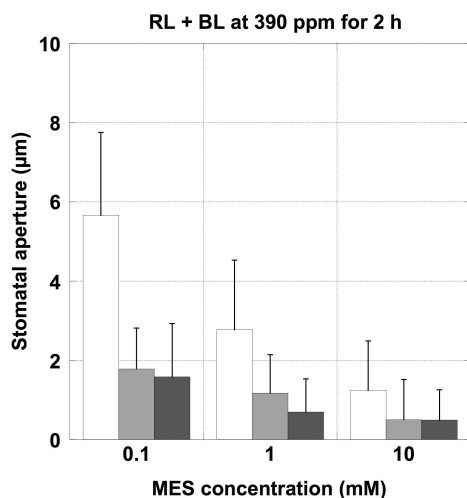


図 1 ゲランガム中の緩衝液の MES 濃度が剥離表皮中の気孔開度に及ぼす影響。

ツククサの剥離表皮を、表面側を下、クチクラ側を上にして緩衝液を含むゲランガム上に置いて、光照射 2 時間後の開度を測定した。棒の色の違いは、3 枚の異なる葉のデータを示す。各棒は、n = 60、平均値 ± SD を示す。

3) 葉肉シグナルのサイズの推定

葉肉と剥離表皮の間に、一定のサイズ以上の分子を透過させない透析膜を挟んで、光を照射した。透過することができる分子の最大分子量が 500~1,000 Da と、100~500 Da の透析膜 (品名は MWCO 500- 1,000 D と MWCO 100-500 D) を用いた。どちらの透析膜を用いた場合でも、光照射によって速やかな開口が見られた。一方、100~500 を用いた場合には、高 CO₂ 濃度による閉口が遅れた (図 3)。

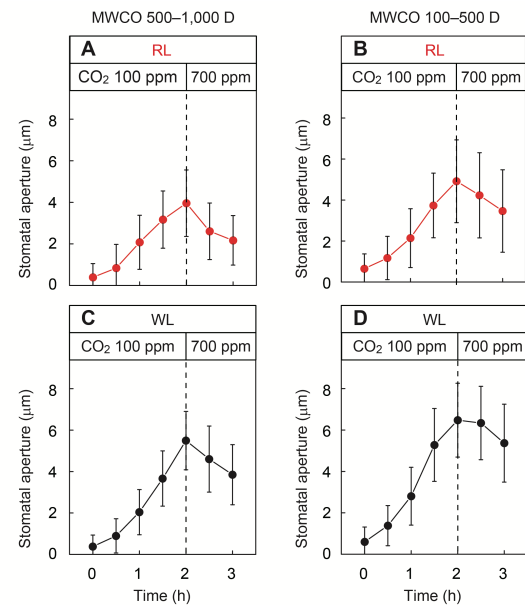
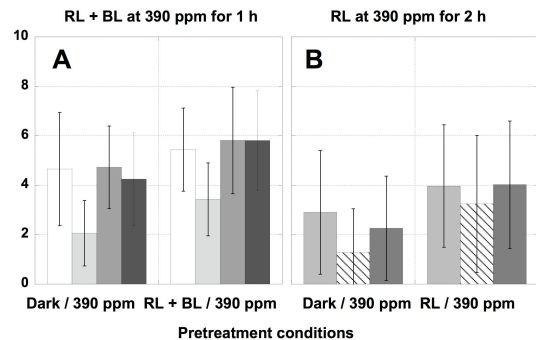


図 2 (上) 前処理時の光の有無が気孔開度に及ぼす影響。

赤色と青色の LED (A)、赤色 LED (B) による光照射前処理を行なった。前処理後に他個体の葉から剥離した表皮を葉肉に載せて、前処理と同じ光処理を行い A は 1 時間後、B は 2 時間後に気孔開度を計測した。異なる色の棒は、異なる葉のデータを示す。(各バーは、n = 60、平均値 ± SD を示す)

図 3 (下) 透析膜を葉肉と剥離表皮の間に挟んだ効果。A、B は赤色光、C、D は青色光成分を含む白色光を用いたデータ。

これらの結果は、低 CO₂ 濃度下で照射した際に見られる開口反応を促進する物質の分子量は 500 Da 以下、また、高 CO₂ 濃度に切り替えた際にはたらく閉口反応を促進する物質の分子量は 100~1,000 Da 以下であることを示している。

これらの一連のデータは、改めて、葉肉シグナルの存在を示すものである。異なる前処理を施した葉片のアポプラスト物質を比較すれば、これらのシグナル分子が同定されるはずである。今後の研究が待たれる。なお、本報告書に示したデータは、報告書執筆時点で投稿済段階のデータである。

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

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Terashima I, Tang YH, Muraoka H (2016) Spatio-temporal variations in photosynthesis. *Journal of Plant Research* 129: 295-298. DOI 10.1007/s10265-016-0814-3 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

寺島一郎 “高 CO₂・高温時代の安定的光合成 C 獲得にむけて” 日本植物学会第 80 回大会 (2016 年 9 月 16~20 日)・沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

〔図書〕(計 2 件)

Lawson T, Terashima I, Fujita T, Wang Y (2017) Co-ordination between photosynthesis and stomatal behavior. In Adams WWIII, Terashima I eds. *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis and Feeding the Plant*, Springer (in press)

Hikosaka, K, Noguchi K, Terashima I (2015) Modelling leaf photosynthesis. In Hikosaka K, Niinemets U, Anten N eds. *Canopy Photosynthesis: From Basics to Applications*, 428 (pp. 61-90), Springer

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔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/inde x.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

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者
藤田 貴志 (FUJITA, Takashi)
東京大学・理学系研究科・博士課程大学院生