

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891020

研究課題名(和文) 順遺伝学的手法を用いた気孔葉緑体の機能解析及び発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) New insight into the function of the guard cell chloroplast by a genetic approach

研究代表者

衞 淳太郎 (NEGI, JUNTARO)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：70529099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：気孔は一对の孔辺細胞からなり、孔辺細胞には葉緑体が存在する。孔辺細胞における葉緑体の機能については諸説あるが、不明な点が多い。本研究において、孔辺細胞に特徴的な葉緑体の自家蛍光がほとんど観察されない変異体 gles1 をシロイヌナズナから単離した。gles1 の気孔における環境応答を調べた結果、CO₂ 及び光に対する応答性が著しく低下していた。また、gles1 変異により、CO₂ による S 型陰イオンチャネルの活性制御が損なわれることがわかった。孔辺細胞に存在する葉緑体は光による開口応答のみならず、CO₂ による閉鎖メカニズムにおいても重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Guard cell chloroplasts have been proposed to play an important role in the osmoregulatory mechanisms mediating stomatal movements, although their function has been a subject of debate and remains to be confirmed. In this study, I isolated an Arabidopsis gles1 mutant that had non-chlorophyllous stomata. CO₂ and light dependent stomatal responses were severely disturbed in the non-chlorophyllous stomata of the gles1 mutant. Whole-cell patch-clamp experiments indicated that in the mutant guard cells, CO₂ activation of the S-type anion channels was impaired. These results provide direct evidence to support the idea that guard cell chloroplasts are essential for light-induced stomatal opening and CO₂-induced stomatal closure.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：気孔 葉緑体 CO₂ 環境応答 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物において外部環境とのガス交換の場である気孔は、1対の孔辺細胞によって形成されている。研究代表者らはこれまで、気孔のCO₂による開閉応答に着目し、赤外線サーモカメラを使って多数の気孔応答シロイヌナズナ変異体を単離してきた。その中で、気孔の閉口において中心的な役割を果たすS型陰イオンチャネルSLCA1 (Negi et al., *Nature* 2008)や気孔機能形成を統括する植物独自の転写因子SCAP1 (Negi et al., *Current Biology* 2013)など気孔の開閉機能に必須な因子を同定してきた。

孔辺細胞には葉緑体が存在する。気孔における葉緑体の機能については諸説があるが、明確な説明はこれまでになされていない。孔辺細胞の葉緑体は葉肉細胞の葉緑体と比較して、チラコイド膜は少なく、でんぷんを多量に含んでいることから、孔辺細胞の葉緑体は葉肉細胞の葉緑体とは異なる分化制御を受けていると考えられる。しかし、気孔の葉緑体が発生するメカニズムに関してほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では気孔で特徴的な葉緑体に着目し、順遺伝学的手法を使った新しい切り口で、気孔開閉メカニズムにおける葉緑体の役割及び気孔葉緑体がどのように形成されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

気孔の葉緑体形成に異常を持つ変異体をシロイヌナズナから単離し、さまざまな環境シグナルに対する気孔開閉の応答を調べた。具体的には光、アブシジン酸、CO₂濃度に対する気孔開閉応答を測定した。また、孔辺細胞プロトプラストを用いた電気生理的解析により、CO₂及びアブシジン酸処理した際のS型陰イオンチャネルの活性を測定した。さらに、変異体の原因遺伝子をマッピング及びシーケンスにより同定した。GFPマーカータンパク質を用いた解析により、原因遺伝子をコードするタンパク質の細胞内における局在を明らかにした。

4. 研究成果

孔辺細胞において、葉緑体のクロロフィル自家蛍光がほとんど観察されない変異体 *gles1* (*green less stomata 1*) をシロイヌナズナから単離した(図1)。電子顕微鏡を用いて孔辺細胞ならびに葉肉細胞の葉緑体の状態を詳細に調べた結果、変異体の孔辺細胞はプラスチドを持っているが、チラコイド膜がほとんど見られなかった。これに対し、葉肉細胞の葉緑体はチラコイド膜を発達させていた。また *gles1* の孔辺細胞のクロロフィル蛍光を詳細に観察すると、クロロフィル蛍光が全くないもの、かすかにあるもの、野生型程度にあるものの3種類に大別されること

が分かった。その割合を調べるために、孔辺細胞をプロトプラスト化し、セルソーターを用いてクロロフィル蛍光強度を測定した。その結果、変異体においてクロロフィル蛍光が低下している孔辺細胞は、7割以上を占めていることが分かった。これらの解析から、*gles1* 変異体は孔辺細胞に含まれる大半のプラスチドにおいて、葉緑体膜系を特徴づけるチラコイド膜の形成が阻害されていることが明らかになった。

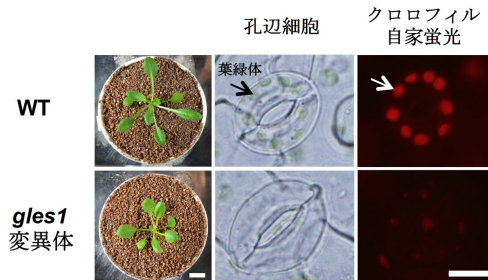


図1 孔辺細胞の葉緑体分化が抑制されている *gles1* 変異体

気孔における葉緑体の役割を明らかにするために、気孔の葉緑体が分化していない *gles1* 変異体を用いてさまざまな環境シグナルに対する気孔開閉の応答を調べた。その結果、変異体におけるCO₂および光に対する応答性が低下していることがわかった。さらに、孔辺細胞プロトプラストを用いた電気生理的解析から、*gles1* 変異により、CO₂によるS型陰イオンチャネルの活性制御が損なわれることがわかった。一方、アブシジン酸による気孔閉鎖応答およびS型陰イオンチャネル活性制御は正常であった。これらの結果は、孔辺細胞に存在する葉緑体は光による開口応答のみならず、CO₂による閉鎖メカニズムにおいても重要な役割を果たしていることを示している。

また気孔葉緑体形成の分子メカニズムを明らかにするために、変異体の原因遺伝子をマッピング及びシーケンスにより同定した。*GLS1* はシロイヌナズナゲノム上に1コピーしかない新規の遺伝子であることがわかった。またこの遺伝子のコードするタンパク質は、葉緑体包膜に局在することが示された。気孔葉緑体の役割及び形成メカニズムを知る上で一つの手がかりを得た。今後は気孔の葉緑体がどのように気孔開閉メカニズムに影響を与えているのか、その作用機序及びGLS1の分子的な機能を明らかにしたい。

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6件)

Sho Takahashi, Keina Monda, Juntaro Negi, Fumitaka Konishi, Shinobu Ishikawa, Mimi Hashimoto-Sugimoto, Nobuharu Goto, Koh Iba (2015) Natural Variation in Stomatal Responses to Environmental Changes among *Arabidopsis thaliana* Ecotypes. *PLoS One* 10: e0117449.

Juntaro Negi, Mimi Hashimoto-Sugimoto, Kensuke Kusumi, Koh Iba. (2014) New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiology*. 55:241-250.

橋本美海、祢宜淳太郎、楠見健介、射場 厚 (2013) 気孔の CO₂ 応答 化学と生物 51:831-839.

Takamitsu Kurusu, Katsunori Saito, Sonoko Horikoshi, Shigeru Hanamata, Juntaro Negi, Chikako Yagi, Nobutaka Kitahata, Koh Iba, Kazuyuki Kuchitsu. (2013) An S-Type anion channel SLAC1 Is involved in cryptogam-induced ion fluxes and modulates hypersensitive responses in Tobacco BY-2 cells. *PLoS One* 8: e70623.

Mimi Hashimoto-Sugimoto, Takumi Higaki, Takashi Yaeno, Ayako Nagami, Mari Irie, Miho Fujimi, Megumi Miyamoto, Kae Akita, Juntaro Negi, Ken Shirasu, Seiichiro Hasezawa, Koh Iba (2013) A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nat. Commun.* 4: 2215.

Juntaro Negi, Kosuke Moriwaki, Mineko Konishi, Ryusuke Yokoyama, To shiaki Nakano, Kensuke Kusumi, Mimi Hashimoto-Sugimoto, Julian I. Schroeder, Kazuhiko Nishitani, Shuichi Yanagisawa, Koh Iba (2013) A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 479-484.

[学会発表] (計 9 件)

Juntaro Negi, Kensuke Kusumi, Shintaro Munemasa, Mayumi Fujita, Julian Schroeder, Koh Iba 「CO₂ activation of the guard cell S-type anion channel is impaired in an *Arabidopsis* mutant with non-chlorophyllous stomata」 26th International Conference on Arabidopsis Research, 7/5-9, 2015, Pa

ris, France

Yoshiko Yamamoto, Juntaro Negi, Chun Wang, Julian Schroeder, Koh Iba 「Transmembrane region of the *Arabidopsis* guard cell SLAC1 anion channel involved in stomatal CO₂ response」 26th International Conference on Arabidopsis Research, 7/5-9, 2015, Paris, France

Sakiko Saito, Juntaro Negi, Keina Monda, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Koh Iba 「Isolation and characterization of the suppressor mutants of *ht1-2* in *Arabidopsis*」 26th International Conference on Arabidopsis Research, 7/5-9, 2015, Paris, France

森脇宏介, 祢宜淳太郎, 柳澤修一, 射場 厚 「気孔機能化に関わる SCAP1 遺伝子のプロモーター解析」 第 56 回日本植物生理学会、3/16-18, 2015、東京農業大学 (東京都)

山本禎子、祢宜淳太郎、Wang Cun、Julian Schroeder、磯貝泰弘、射場 厚 「気孔閉鎖を司る陰イオンチャンネル SLAC1 の CO₂ シグナル受容部位は ABA シグナル受容部位とは異なる」 第 78 回日本植物学会、9/12-14, 2014、明治大学 (神奈川県)

岡部誠, 祢宜淳太郎, 中野利彬, 田畑亮, 山口勝司, 重信秀治, 山田昌史, 長谷部光泰, 澤進一郎, 射場 厚 「新規 CO₂ 非感受性変異体 *cdi4* の解析」 第 78 回日本植物学会、9/12-14, 2014、明治大学 (神奈川県)

祢宜淳太郎, 楠見健介, 宗正晋太郎, 藤田麻友美, Julian Schroeder, 射場 厚 「順遺伝子的手法を用いた孔辺細胞特異的葉緑体機能の解析」 第 55 回日本植物生理学会、3/18-20, 2014、富山大学 (富山県)

山本禎子、祢宜淳太郎、磯貝泰弘、射場 厚 「孔辺細胞局在型陰イオンチャンネル SLAC1 の CO₂ による活性化制御」 第 31 回植物分子細胞生物学会、9/10-12, 2013、北海道大学 (北海道)

祢宜淳太郎、森脇宏介、小西美穂子、横山隆亮、中野利彬、楠見健介、橋本美海、西谷和彦、柳澤修一、射場 厚 「気孔にガス交換機能を付与する鍵転写因子 SCAP1」 第 31 回植物分子細胞生物学会、9/10-12, 2013、北海道大学 (北海道)

[その他]

ホームページ

<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

衞 淳太郎 (NEGI JUNTARO)

九州大学・理学研究院・特任助教

研究者番号 : 70529099