

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891006

研究課題名(和文)スクロース水浸処理による気孔クラスターの形成機構と生理機能

研究課題名(英文)Cell biological studies on stomatal cluster induced by sucrose solution immersion

研究代表者

秋田 佳恵 (Akita, Kae)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：80737122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではスクロース水浸処理を、高効率な気孔クラスター誘導系として利用し、外的要因により気孔分布が変化した葉における孔辺細胞の細胞学的特徴について、スクロース水浸処理の影響を検証しました。その結果、スクロース水浸処理は気孔分布の攪乱により気孔クラスターを形成させますが、孔辺細胞は気孔開閉に関する細胞内構造の特徴を保ち、フシコクシン応答性を有することが示唆されました。

研究成果の概要(英文)：I found that sucrose solution immersion induced abnormally stomata cluster in the cotyledons of Arabidopsis seedlings (Akita et al. 2013). In this study to reveal property of the clustered guard cells cultured in sucrose solution, I focused on intracellular structures in the guard cells. My results suggested that sucrose solution immersion disrupted stomatal distribution pattern but kept characteristics of intracellular structures and fusicoccin response even in clustered guard cells.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：孔辺細胞 気孔クラスター スクロース水浸処理

1. 研究開始当初の背景

気孔は一对の孔辺細胞に挟まれた小孔であり、ガス交換や蒸散を担う重要な器官です。シロイヌナズナを含む多くの植物では気孔同士が隣接しないよう分布しており、この気孔分布の規則は one-cell-spacing rule と呼ばれています (Sachs 1991)。one-cell-spacing rule は孔辺細胞の隣に必ず表皮細胞が位置することを意味しており、両者の細胞間でイオンおよび水が効率的に交換されることで孔辺細胞の体積増減、すなわち気孔開閉が実現すると考えられています。これまでのシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的な研究から、one-cell-spacing rule を確立させる細胞内の制御因子や、隣接細胞間で働くシグナルペプチドの分子機構が明らかにされています。一方、外的要因が気孔分布に及ぼす影響についての知見は乏しいのが現状です。研究代表者は本研究に先立ち、シロイヌナズナの葉において one-cell-spacing rule を破綻させる栽培方法としてスクロース水浸処理を確立しました (Akita et al. 2013)。スクロース水浸処理は、外的要因により気孔クラスターを簡単に形成させることができるため、野生株のみならず、細胞内構造可視化株にも適応可能であり、気孔クラスターを形成する個々の孔辺細胞について、孔辺細胞に特徴的な細胞内構造の詳細な解析を実施できます。

2. 研究の目的

本研究ではスクロース水浸処理を、高効率な気孔クラスター誘導系として利用し、外的要因により気孔分布が変化した葉における孔辺細胞の細胞学的特徴について、スクロース水浸処理の影響を検証しました。

3. 研究の方法

野生株 (Col-0) もしくは微小管、微小管伸長端、葉緑体の可視化株について、滅菌した種子をスクロース水溶液に播種し、14 日間栽培した個体の子葉を、共焦点レーザー顕微鏡もしくは可変角蛍光顕微鏡を用いて撮像しました。気孔開口能の検証においては、気孔開口誘導のためフシコクシンを用いました。

4. 研究成果

スクロース水浸処理による気孔クラスター形成が及ぼす影響を調べるため、孔辺細胞に特徴的な細胞内構造として、腹側 (気孔側) の厚い細胞壁、腹側から背側へと放射状に伸長する表層微小管、葉緑体について着目しました。まず細胞壁について脂質染色試薬 Nile red で標識したところ、スクロース水浸処理した子葉においても、糖処理を行わず水耕栽培した子葉と同様に孔辺細胞の腹側が明瞭に染色されました (図 1)。

また微小管可視化マーカー GFP-tubulin β 発現シロイヌナズナを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、放射状に配向する表層微小管が観察されました (図 2)。さらに微

小管伸長方向を調べるため微小管伸長端マーカー GFP-EB1 発現シロイヌナズナを、可変角蛍光顕微鏡を用いて 30 秒間連続撮像し、GFP-EB1 の局在変化をキモグラフにより解析したところ、スクロース水浸処理区においても概ね腹側から背側に向かう GFP-EB1 コメットが確認されました (図 3)。

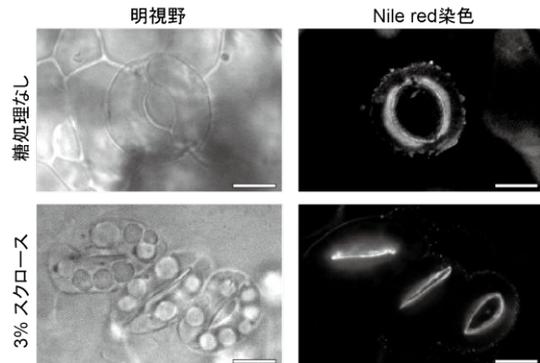


図 1 気孔を取り囲む腹側の厚い細胞壁が Nile red により染色された。Bars = 10 μ m。

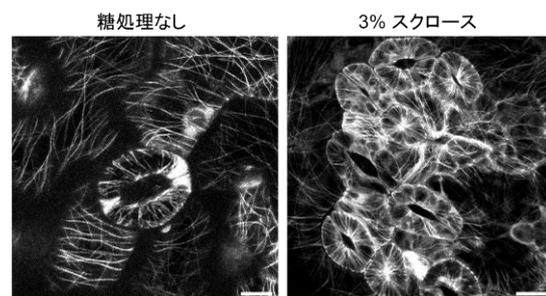


図 2 GFP-tubulin β で可視化された表層微小管は放射状に配向していた。Bars = 10 μ m。

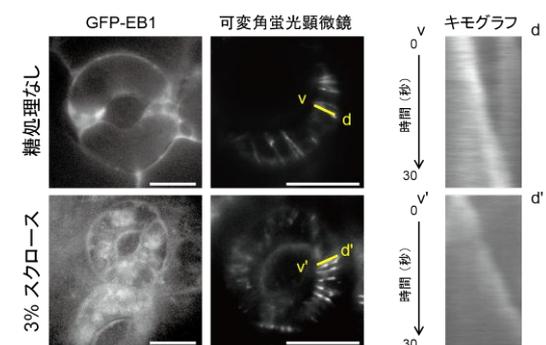


図 3 表層微小管は腹側から背側へと伸長していた。キモグラフは可変角蛍光顕微鏡画像内で指定した、腹側 (v, v') と背側 (d, d') を結ぶ直線上の 30 秒間の蛍光推移を示した。Bars = 10 μ m。

葉緑体マーカー CT-GFP の観察から、スクロース水浸処理は葉緑体を、形態異常を伴って巨大化させることがわかりました (図 4)。

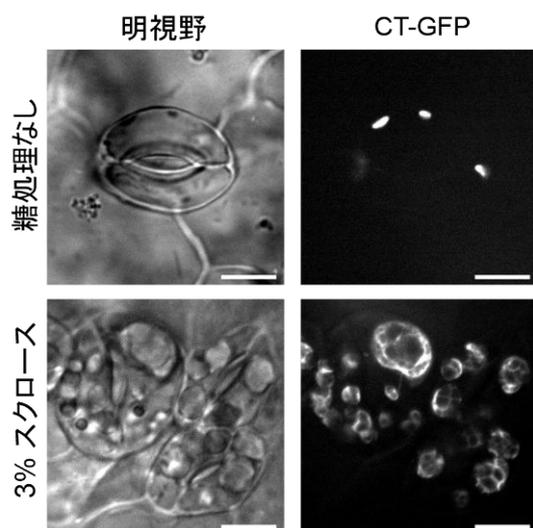


図4 スクロース水浸処理により、葉緑体は形態異常を起こし、巨大化した。Bars = 10 μ m。

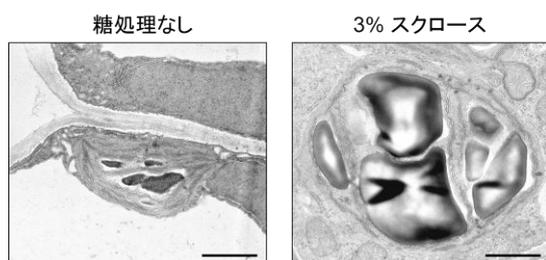


図5 デンプン粒の過剰蓄積が、スクロース水浸処理区における葉緑体は形態異常を引き起こしていた。Bars = 1 μ m。

透過型電子顕微鏡による観察から、スクロース水浸処理した葉では、葉緑体内に巨大なデンプン粒が蓄積されていることが明らかとなりました(図5)。ただしデンプン粒の蓄積は、気孔のクラスター化とは独立して起きた可能性が考えられます。

以上のことから、スクロース水浸処理は気孔分布を乱してクラスター化させますが、気孔クラスターを構成する個々の孔辺細胞については、孔辺細胞に特徴的な細胞内構造を兼ね備えていることが明らかとなりました。

本研究で着目したこれらの細胞内構造は、気孔開閉の実現に必要であることが報告されています。そこで、スクロース水浸処理によりクラスター化した孔辺細胞が気孔開口能を有するかを調べることを目的とし、気孔開口誘導のためフシコクシンを用いました。400 孔辺細胞対の気孔開度を測定した結果、スクロース水浸処理により気孔開度は低下したものの、気孔クラスターを形成していても、フシコクシンにตอบสนองして気孔開度が上昇することがわかりました。以上の結果から、スクロース水浸処理は気孔分布の攪乱により気孔クラスターを形成させますが、孔辺細胞

胞は細胞内構造の特徴を保ち、フシコクシン応答性を有することが示されました。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

Takumi Higaki, Natsumaro Kutsuna, Kae Akita, Hisako Takigawa-Imamura, Kenji Yoshimura, Takashi Miura (2016) A theoretical model of jigsaw-puzzle pattern formation by plant leaf epidermal cells. *PLOS Computational Biology* 12(4):e1004833 査読有 doi: 10.1371/journal.pcbi.1004833

Kae Akita, Megumi Kobayashi, Mayuko Sato, Natsumaro Kutsuna, Takashi Ueda, Kiminori Toyooka, Noriko Nagata, Seiichiro Hasezawa, Takumi Higaki (2016) Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a *trans*-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated *Arabidopsis* leaf epidermal cells. *Protoplasma* published online 査読有 doi: 10.1007/s00709-016-0955-1

Kae Akita, Takumi Higaki, Natsumaro Kutsuna, Seiichiro Hasezawa (2015) Quantitative analysis of microtubule orientation in interdigitated leaf pavement cells. *Plant Signaling & Behavior* 10(5):e1024396 査読有 doi: 10.1080/15592324.2015.1024396

Takumi Higaki, Natsumaro Kutsuna, Kae Akita, Mayuko Sato, Fumie Sawaki, Megumi Kobayashi, Noriko Nagata, Kiminori Toyooka, Seiichiro Hasezawa (2015) Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Scientific Reports* 5:7794 査読有 doi: 10.1038/srep07794

Hatsumi Shiratori-Takano, Kae Akita, Kazune Yamada, Takashi Itoh, Takafumi Sugihara, Teruhiko Beppu, Kenji Ueda (2014) Description of *Symbiobacterium ostreiconchae* sp. nov., *Symbiobacterium turbinis* sp. nov. and *Symbiobacterium terraclitae* sp. nov., isolated from shellfish, emended description of the genus *Symbiobacterium* and proposal of *Symbiobacteriaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology 64(10):
3375-3383 査読有
doi: 10.1099/ijms.0.063750-0

Kae Akita, Seiichiro Hasezawa (2014)
Sugar solution induces clustered lips.
CYTOLOGIA 79(2): 125-126 査読有
doi: 10.1508/cytologia.79.125

Takumi Higaki, Mimi Hashimoto-
Sugimoto, Kae Akita, Koh Iba, Seiichiro
Hasezawa (2014) Dynamics and
environmental responses of PATROL1
in *Arabidopsis* subsidiary cells. *Plant
and Cell Physiology* 55(4):773-780 査読
有
doi: 10.1093/pcp/pct151

〔学会発表〕(計 20 件)

Kae Akita, Takumi Higaki, Seiichiro
Hasezawa Cell biological dissection of
guard cells of clustered stomata induced
by sucrose solution immersion 第 57 回
日本植物生理学会 2016 年 3 月 18 日 ~
2016 年 3 月 20 日 岩手大学上田キャン
パス (岩手県盛岡市)

秋田佳恵、桧垣匠、馳澤盛一郎 スクロ
ース水溶液水浸処理による植物の気孔分
布パターンの攪乱 第 24 回日本バイオイ
メージング学会学術集 2015 年 9 月 26
日 ~ 2015 年 9 月 28 日 東京理科大学葛
飾キャンパス (東京都葛飾区)

秋田佳恵、桧垣匠、馳澤盛一郎 スクロ
ース水溶液水浸処理による気孔クラスタ
ーの形成 第 6 回植物電子顕微鏡若手ワ
ークショップ 2015 年 9 月 25 日 理化
学研究所横浜研究所 (神奈川県横浜市)

Kae Akita, Takumi Higaki, Seiichiro
Hasezawa Intracellular structure
characteristics in clustered guard cells
immersed in sugar solution 第 56 回日
本植物生理学会 2015 年 3 月 16 日 ~
2015 年 3 月 18 日 東京農業大学世田谷
キャンパス (東京都世田谷区)

秋田佳恵、桧垣匠、馳澤盛一郎 スクロ
ース水溶液水浸処理により形成される気
孔クラスタの解析 日本植物学会第 78
回大会 2014 年 9 月 12 日 ~ 2014 年 9 月
14 日 明治大学生田キャンパス (神奈川
県川崎市)

秋田 佳恵 (AKITA KAE)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
特任研究員
研究者番号 : 80737122