

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06292

研究課題名(和文) アブシジン酸による気孔閉鎖における孔辺細胞葉緑体の関与

研究課題名(英文) Role of guard-cell chloroplasts in ABA-dependent stomatal closure

研究代表者

島崎 研一郎 (Shimazaki, Ken-ichiro)

九州大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：00124347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブシジン酸による気孔閉鎖に、孔辺細胞葉緑体の光合成電子伝達系が発生する活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が関与することを、報告した。この電子伝達系のどの成分が関わるかを調べた。電子伝達速度を制御する葉緑体チラコイド膜のK<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(KEA3)に注目した。この輸送体を欠く変異株は、ABAに誘導される活性酸素の発生増大と気孔閉鎖が消失し、一方で、KEA3のK<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送を促進する薬物nigericinは、活性酸素の発生促進と、気孔閉鎖を誘導した。以上の結果は、葉緑体のK<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体がアブシジン酸による気孔閉鎖に関与することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

孔辺細胞葉緑体は、通常、光による気孔開口に関与すると考えられている。しかし、その役割は依然として明確ではない。我々は、この葉緑体がアブシジン酸による気孔閉鎖に関与することを示す報告を行った。これは、これまでになかった新規の考えで、孔辺細胞葉緑体の機能に新たな光を当てたものである。

しかし、その機構については不明の点が多く、上記の報告についても必ずしも認知されているわけではない。今回の研究成果は、そのことを確認するとともに、孔辺細胞葉緑体の新たな役割をより具体的に示すものである。これによって、その機構解明がさらに進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Participation of guard cell chloroplasts in ABA-induced stomatal closure has been shown in the previous report. In this study, we investigated the possible role of K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the thylakoid membranes. We found that the mutants of *kea3* lost production of reactive oxygens(ROS) in guard cells, and that the mutants did not show stomatal closure in response to ABA. Furthermore, we found that a drug nigericin, which stimulates the exchange of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> across the thylakoid membranes, elicited both ROS production and stomatal closure. From the results, we conclude that K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter(KEA3) is involved in the ABA-dependent stomatal closure.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔 アブシジン酸 孔辺細胞葉緑体 気孔閉鎖 活性酸素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

表皮を構成する表皮細胞と孔辺細胞の中で、多くの場合孔辺細胞にのみ葉緑体が存在する。このことから、この葉緑体は気孔開閉に重要な役割を果たしていると考えられ、多くの研究がある。一般的な理解としては、孔辺細胞葉緑体は光により生成した ATP を気孔開口の駆動力を形成する細胞膜  $H^+$ -ATPase に供給し、加えて、気孔開口に必要なリンゴ酸の原料になる澱粉を蓄積している。詰まるところ、孔辺細胞葉緑体は気孔開口に必須の役割を果たしていると考えられている。

それに対して、我々は、表皮に ABA を加えると、孔辺細胞葉緑体の近傍に活性酸素 ( $H_2O_2$ ) を生じることを見出していた。一方、以前の研究から ABA による気孔閉鎖には、細胞膜 NADPH-オキシダーゼが生成する活性酸素が寄与することが示されている。気孔が ABA により閉鎖するためには光によって気孔が開口していることが前提で、光が存在すれば葉緑体の電子伝達系は働いており、この電子伝達系が生成する活性酸素が気孔閉鎖に利用されることは十分予測される。こうして、孔辺細胞葉緑体が生成する活性酸素種 ( $H_2O_2$ ) が気孔閉鎖にも寄与すると考えた。しかし、そのような報告は知られておらず、このことを具体的に示す必要があった。

### 2. 研究の目的

上に述べたように、孔辺細胞葉緑体の気孔閉鎖への関与を示す報告はない。そこで、本研究の目的は、孔辺細胞葉緑体の気孔閉鎖への関与を示すことである。さらに、進んでその機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

材料としては、剥離表皮を用い、表皮の得やすいソラマメ、ツククサ、そして、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた。気孔の開閉は顕微鏡を用いて直接測定し、活性酸素は  $H_2O_2$  と反応する蛍光指示薬、2, 7-dichlorofluorescein diacetate ( $H_2DCFDA$ ) を用いて、レーザ顕微鏡により測定した。また、必要に応じて、シロイヌナズナの関連する酵素の変異株を利用した。そのほか光合成電子伝達を阻害する薬物として、DCMU、DBMIB、さらに、細胞膜 NADPH-オキシダーゼの阻害剤を用いて、これらの反応を抑制することにより、その寄与を推定した。

### 4. 研究成果

まず、光照射条件で(葉緑体が機能している)気孔を開口させておき、アブシジン酸 (ABA) を添加して、気孔が閉鎖することを確認した。同時に、この ABA 添加により活性酸素が発生することを確認した。次に、同様に気孔を開口させておき ABA と共に光合成電子伝達系の阻害剤 DCMU を添加した。その結果、気孔閉鎖と活性酸素の発生が共に阻害された。この結果は、ABA による気孔閉鎖に、光合成電子伝達系が関与し、その働きを止めると気孔が閉鎖しなくなることを示している。さらに、このことを確認するため同じく電子伝達阻害剤 DBMIB を共存させると、ABA による気孔閉鎖と活性酸素の生成が抑制された。以上の結果は、孔辺細胞葉緑体の光合成電子伝達反応が、ABA に誘導される気孔閉鎖に関与することを示している。このような結果はソラマメ、ツククサ、シロイヌナズナに共通に見られ、この結果が妥当で、植物に共通の現象であることを支持している。

ところで、これまでの研究に基づくと、ABA 添加によって細胞膜の NADPH-オキシダーゼが生成する活性酸素により、気孔閉鎖が誘導されるとされている。そこで、この酵素の関与と今回の葉緑体の発生する活性酸素の関係を調べた。そのために、NADPH-オキシダーゼのサブユニットの変異体、*atrboh D/F* を用いた。この変異体は NADPH-オキシダーゼを欠いている。この変異体においても、ABA に誘導される活性酸素発生が起こり、部分的に気孔閉鎖も認められた。さらに、野生株に NADPH-オキシダーゼの阻害剤を加えても、気孔閉鎖が有意に認められた。以上の結果は、ABA による気孔閉鎖が、孔辺細胞葉緑体の光合成電子伝達系と細胞膜 NADPH-オキシダーゼとの共同により引き起こされていることを示している。

上に述べた結果により、孔辺細胞葉緑体の光合成電子伝達反応が ABA による気孔閉鎖に寄与することが示された。次の問題としては、光合成電子伝達のどの成分がこのような応答に関与するかが問題になる。活性酸素は葉緑体の光化学系 I の還元側に生ずる可能性が高く、そのことを前提に次の実験を行った。

まず、光化学系 I の還元側に活性酸素が大量に発生するためには電子伝達速度の増大が必要であろう。おそらく、電子伝達反応速度を制御している成分の関与が推定される。そこで、葉緑体のチラコイド膜に存在し、 $K^+$ と  $H^+$ の交換輸送を行う  $K^+/H^+$ 交換輸送体 (KEA3) に着目した。

この交換輸送体はチラコイド膜を介して形成される  $H^+$  勾配 (チラコイド膜内の  $H^+$  濃度が高い) を、 $K^+$  との交換輸送により解消させることにより、電子伝達速度を上昇させる。

以下の結果得られた。この研究には変異株が入手できるシロイヌナズナを用い、その KEA3 の変異株、*kea3-1* と *kea3-2* を対象にした。まず、これらの変異体では ABA による気孔閉鎖が強く抑制された。しかし、この変異株でも外から  $H_2O_2$  を加えると気孔が閉鎖した。この結果は、これらの変異体は気孔を閉鎖する能力を保持しており、ABA による気孔閉鎖が抑制されたのは、KEA3 交換輸送体の働きが欠損したためであると結論できる。これらの変異体において気孔の数は野生型と差がなかった。

さらに、この変異株では ABA を加えた際の活性酸素の発生が強く抑えられていた。次に、これらの植物の変異体の乾燥耐性を調べた。野生型では水分が不足すると ABA が合成され、気孔が閉鎖する。しかし、同様の乾燥ストレスを与えても *kea3-1* と *kea3-2* 変異体は、気孔を閉じることができず、水分を消失し、長期の乾燥ストレスでは成長が大きく抑制された。

次に、チラコイド膜の  $K^+/H^+$  交換輸送を促進する薬物、nigericin (この薬物は KEA3 の機能を代替できる) を用いて交換輸送の促進と、それによる電子伝達促進の効果を調べた。その結果、この薬物の濃度に依存して気孔閉鎖が引き起こされ、DCMU を共存させると気孔閉鎖が阻害された。この結果は、気孔閉鎖が光合成電子伝達系の促進によって生ずる活性酸素に起因することを支持している。また、この nigericin の作用は *kea3-1* と *kea3-2* 変異体においても野生型と同様に観察された。このことは、*kea3-1* と *kea3-2* 変異体が気孔閉鎖能を保持しており、気孔閉鎖能を失ったために、閉鎖しなくなったわけではないことを示している。さらに、nigericin 添加により、孔辺細胞葉緑体で  $H_2O_2$  の生成が増大した。

以上を総合して、光合成電子伝達の促進が  $H_2O_2$  の生成を促進し、その制御を KEA3 が担っていることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Naotaka, Onjo Michio, Sonoike Kintake, Shimazaki Ken ichiro, Iwai Sumio	4. 巻 176
2. 論文標題 Chloroplast K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> EXCHANGE ANTIporter 3 modulates abscisic acid induced reactive oxygen species generation in guard cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppl.14136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumio Iwai, Sho Ogata, Naotaka Yamada, Michio Onjo, Kintake Sonoike, Ken-ichiro Shimazaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Guard cell photosynthesis is crucial in abscisic acid-induced stomatal closure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 直隆、岩井 純夫、緒方 翔、新北 大樹、遠城 道雄、園池 公毅、島崎 研一郎
2. 発表標題 アブシジン酸誘導性気孔閉鎖における光合成電子伝達系の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 栄治 (Gotoh Eiji) (90614256)	九州大学・農学研究院・准教授  (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------