

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22661

研究課題名（和文）個葉レベルのH<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub>フラックスを制御するコンダクタンスの分子生理学的研究研究課題名（英文）Molecular physiological research on conductance regulating H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> flux in a leaf level

研究代表者

溝上 祐介（Mizokami, Yusuke）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：60756443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：葉におけるCO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>Oのフラックスを詳細に測定する系の確立と、これらフラックスの協調した制御機構の解明を目的として研究を遂行した。C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>フラベリアを用いた研究では、葉の通水性の制御が異なり、様々な環境変化においてC<sub>4</sub>の方がC<sub>3</sub>よりも葉の通水性が低いことが明らかになった。シロイヌナズナのアクアポリン変異体を用いた研究では、アクアポリンの欠損が気孔制御や葉の通水性に影響があることがわかったが、葉の内部のCO<sub>2</sub>拡散には影響がないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸域生態系モデルを精度良く構築するためには、CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>Oフラックスに大きな影響をあたえる植物の蒸散と光合成の環境応答を理解する必要がある。本研究では個葉レベルで詳細にフラックスを解析し、光合成型の違いなどで、CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>Oフラックスバランスが大きく異なることを示した。また、CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>Oフラックスを同時に測定するシステムを構築したことで、今後様々な種の植物を評価できる。これらの成果は、陸域生態系モデルの精度向上とともに、今後の地球環境変化の予測などに役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the regulation mechanisms between CO<sub>2</sub> influx and H<sub>2</sub>O efflux at a leaf level by establishing the system to evaluate CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O flux simultaneously. The different traits of leaf hydraulics were showed between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Flaveria. C<sub>4</sub> Flaveria have lower leaf hydraulic conductance compared to C<sub>3</sub> Flaveria, which can be a reason for C<sub>4</sub> Flaveria having lower stomatal conductance. Evaluation of PIP aquaporin mutants in *Albidopsis thaliana* elucidated that the PIP aquaporin isoforms used in this study play roles in stomatal regulation and leaf hydraulics in response to environmental changes, but no significant influence on CO<sub>2</sub> diffusion inside a leaf.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：光合成 二酸化炭素 気孔 葉の通水性 葉内の二酸化炭素 シロイヌナズナ フラベリア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が陸上で生命活動を営むには、葉からの水の流出(蒸散)と葉への水の供給のバランスを適切に制御し、同時に光合成の基質である  $\text{CO}_2$  を取り込まなくてはならない。前者の葉における水の供給のしやすさを通水コンダクタンス( $K_{\text{leaf}}$ )、後者の大気中から葉内への  $\text{CO}_2$  の拡散のしやすさを気孔コンダクタンス( $g_s$ )、葉内から葉緑体内ストロマまでの  $\text{CO}_2$  の拡散のしやすさを葉肉コンダクタンス( $g_m$ )として表現される。これらのコンダクタンスの協調した制御は、水と  $\text{CO}_2$  のフラックスを制御する上でとても重要である。研究代表者は  $g_s$ 、 $g_m$  が乾燥ストレスや  $\text{CO}_2$  濃度変化に応答し、光合成速度の律速となりうることを研究してきた(\*Mizokami et al. 2015, 2019a, 2019b)。  $g_s$  は  $\text{CO}_2$  の拡散だけでなく蒸散にも影響しているため、環境応答することの生態学的意義は明確である。一方で  $g_m$  は水の拡散には影響しないはずであり、環境応答することの生態学的意義は不明瞭である。  $g_m$  の変化要因として細胞壁の厚さなどの形態的变化、さらに、細胞膜アクアポリン(PIP)の分子種の中の  $\text{CO}_2$  透過型 PIP の発現量や活性制御による変化が報告されている(Flexas et al. 2006, Tornroth-Horsefield et al.2006)。 PIP は孔辺細胞、葉肉組織、維管束組織に発現している。シロイヌナズナでは 13 種類の PIP が報告されており、そのうちの PIP1;2 のみが  $g_m$  に影響を与えると報告されている (Uehlein et al. 2012)。

葉の水分特性を左右する葉の水供給能力、通水コンダクタンス( $K_{\text{leaf}}$ )は葉からの蒸散速度と密接に連携して制御されている。蒸散と供給のバランスが崩れると、葉は萎れ、過度なストレス下では致命的なダメージを受ける。  $K_{\text{leaf}}$  も光強度や乾燥ストレスなどの環境に応答し、制御されている(Ohtsuka et al. 2017)。さらに  $K_{\text{leaf}}$  も葉脈密度のような形態的变化、また水透過型 PIP により変化することが報告されている(Prado et al. 2013)。葉における水は、導管から葉肉組織、細胞間隙を通り、気孔を介して大気へと拡散する。

これら  $g_m$  と  $K_{\text{leaf}}$  には拡散する分子と方向性は異なるが、拡散経路や変化要因であるアクアポリンという共通項がある。しかし、アクアポリンという共通項に注目し、これらコンダクタンスを同時に同一サンプルで測定した研究例はない。

### 2. 研究の目的

本研究では、  $g_s$ 、 $g_m$ 、 $K_{\text{leaf}}$  の環境応答を個別に解析する従来の研究例とは異なり、葉を水と  $\text{CO}_2$  の交差点であると捉え、包括的に解析した。さらに、これらの共通項である PIP に着目し、分子生理学的な制御機構の解明を目指した。

- 1)  $g_s$ 、 $g_m$ 、 $K_{\text{leaf}}$  を同一の葉で測定する系の確立。
- 2) 蒸散要求量に変化する環境(高 VPD: 高温/低湿度, 低 VPD: 常温/高湿度 条件)において  $g_s$ 、 $g_m$ 、 $K_{\text{leaf}}$  がどのように制御されているかを検証する。
- 3)  $g_s$ 、 $g_m$ 、 $K_{\text{leaf}}$  の変化要因である  $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}_2$  透過性アクアポリンが水と  $\text{CO}_2$  のフラックス制御にどのように関与しているか検討する。コンダクタンスの制御機構を解明することで、陸上植物がどのようにフラックスを制御すれば高い水利用効率を実現できるかを解き明かす。

### 3. 研究の方法

1)  $g_m$  と  $K_{leaf}$  の関係を明確にするために、同一の葉で測定するシステムをガス交換測定器、クロロフィル蛍光測定器、サイクロメーターを用いて確立した。ガス交換測定によって光合成速度と  $g_s$  を測定し、クロロフィル測定器による同時測定から電子伝達速度を求め、 $g_m$  を算出した。測定直後の葉の水ポテンシャルをサイクロメーターで測定することで  $K_{leaf}$  を求めた。これらのシステムの検討にはシロイヌナズナの野生型、C3 フラベリアを用いた。

2) 蒸散要求量を変化させる実験には、シロイヌナズナ野生型と気孔応答性変異体(*ost1*, *slac1-2*)、C3/C4 フラベリアを用いた。シロイヌナズナをそれぞれ低 VPD と高 VPD で育成し、それらの  $g_s$ ,  $g_m$ ,  $K_{leaf}$  を低 VPD と高 VPD 条件で測定した。フラベリアは短期的な低 VPD 環境への  $g_s$ ,  $g_m$ ,  $K_{leaf}$  の応答を測定した。シロイヌナズナでは、葉の浸透ポテンシャルの測定と気孔密度を測定して、長期的な VPD 環境の違いに葉がどのように順化するのかも評価した。

3) 維管束組織に高発現型の PIP アクアポリンの変異体 *pip2;6*, *pip2;1\_2;2* の  $g_s$ ,  $g_m$ ,  $K_{leaf}$  を比較した。また、それらの短期的な低 VPD 応答と ABA 応答を比較して、アクアポリンの役割を検討した。

### 4. 研究成果

1)  $g_m$  は従来の蛍光法で測定可能であるが、葉面積の小さいシロイヌナズナなどは、測定精度を上げるために蛍光法と A-Ci カーブフィッティング法を合わせた方法で評価する必要があった。通常ガス交換測定器のチャンバーサイズ(6cm<sup>2</sup>以上)であれば、サイクロメーターでの葉の水ポテンシャル測定に必要なリーフディスク(最小直径 7 mm)を十分に確保でき、精度の良い測定が可能であった。また、リーフディスクを液体窒素で凍結、融解することでサイクロメーターによる葉の浸透ポテンシャルが測定可能になった。これらにより、同一の葉を用いて、 $K_{leaf}$  を含めた葉の水分特性を  $g_m$ ,  $g_s$  とともに測定できる系が確立された。

2) 高 VPD 環境で生育したシロイヌナズナは、低 VPD 環境で生育したものに比べて、 $g_s$  に差はなく、高い  $K_{leaf}$ 、低い  $g_m$  であることがわかった。気孔応答性変異体でも野生型と同様の応答を示すことから、気孔の応答ではなく、葉の内部での水の供給( $K_{leaf}$ )とそれとともに  $CO_2$  吸収( $g_m$ )の変化で、 $H_2O/CO_2$  フラックスバランスを調節していることが示唆された。短期的な VPD 変化には、 $g_s$  と  $g_m$  は応答したが、 $K_{leaf}$  はほとんど応答しなかった。短期的な VPD 変化には、葉の内部での水の供給ではなく、気孔による短期的な  $H_2O/CO_2$  フラックスバランスの調整が必要であることが示唆された。気孔応答性変異体 *ost1* は常に野生型よりも高い  $g_s$  と低い水ポテンシャルであるが、 $g_m$  は同程度であった。気孔による  $H_2O/CO_2$  フラックスバランスの調整ができないと、葉の水ポテンシャルは低下するが、葉内での  $CO_2$  フラックスには影響がないことが分かった。

3) 上記の結果を踏まえて、葉内での  $H_2O/CO_2$  フラックスバランスを調節している要因の候補である PIP アクアポリンの変異体の VPD 応答を解析した。*pip2;1\_2;2* は野生型に比べて常に  $K_{leaf}$  が低く、主に葉内での水の供給に関わっていることが分かったが、*pip2;6* は野生型と変わらなかった。また、短期的な VPD 変化に野生型の  $g_s$  は応答するが、*pip2;1\_2;2*, *pip2;6* ともに応答しなかった。また、 $g_m$  にはこれら遺伝子型間で差はなかった。水透過型チャンネルと考えられる PIP2;1, PIP2;2, PIP2;6 はそれぞれ気孔開閉( $g_s$ )による  $H_2O/CO_2$  フラックスバランスの制御と葉内の水の

供給( $K_{\text{leaf}}$ )変化による  $\text{H}_2\text{O}$  フラックスを制御する役割であり、葉内の  $\text{CO}_2$  フラックスを制御する要因ではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Flexas Jaume, Clemente-Moreno Maria J, Bota Josefina, Brodribb Tim J, Gago Jorge, Mizokami Yusuke, Nadal Miquel, Perera-Castro Alicia V, Roig-Oliver Margalida, Sugiura Daisuke, Xiong Dongliang, Carriqui Marc	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell wall thickness and composition are involved in photosynthetic limitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	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） 10.1093/jxb/erab144	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝上祐介, 吉野英舜, 野口 航
2. 発表標題 葉のCO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> Oフラックス制御におけるPIPアクアポリンの役割の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝上祐介, 松原広夢, 金田ひなた, 野口 航
2. 発表標題 林床植物における土壌呼吸由来CO <sub>2</sub> の光合成への利用
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井菜々咲, 野口 航, 溝上 祐介
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける暗所の気孔コンダクタンスと葉の水分特性の関係の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年～2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------