

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26440150

研究課題名(和文)CAM植物の気孔開口メカニズムの解明

研究課題名(英文)Stomatal response in crassulacean acid metabolism plants

研究代表者

土井 道生(Doi, Michio)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：00167537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベンケイソウ型光合成植物の青色光に応答した気孔開口メカニズムを調べた。C3、C4植物と異なり赤色光に応答した気孔開口はみられなかったが、赤色光照射下で弱い青色光に応答した気孔開口が生葉と表皮断片で観察された。この青色光に依存した気孔開口は低濃度のタンパク質脱リン酸化阻害剤とプロトンポンプ阻害剤により完全に阻害された。さらに青色光とカビ毒フジコッキンに依存した気孔開口に伴い、細胞膜に局在するプロトンポンプのリン酸化・活性化が免疫染色法により確認された。以上の結果はベンケイソウ型植物にもC3、C4植物と同様のメカニズムで青色光に依存した気孔開口メカニズムが機能することを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)： We investigated stomatal blue light (BL) response in obligate crassulacean acid metabolism (CAM) plants, *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana*. The stomatal responses to BL were determined in both intact leaves and detached epidermis using dual-beam protocol to distinguish the BL-dependent stomatal opening from the photosynthesis-dependent stomatal opening. The stomata open in response to BL superimposed on the background red light (RL). The BL-dependent stomatal opening was completely inhibited by both an inhibitor of type 1 protein phosphatase and an inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. A fungous toxin fusicoccin (FC), an activator of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase induced stomatal opening in the dark. BL and FC caused both activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells, and stomatal opening. These results indicate that BL-dependent stomatal opening operates in obligate CAM plants, regardless of the difference in the modes of photosynthesis.

研究分野：植物生理学

キーワード：CAM植物 気孔 青色光応答 C3植物 光合成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 気孔は植物と大気間のガス交換を司る重要な器官であるが、光合成に必要な二酸化炭素を取り込むと同時に、植物体内の水を蒸散により失う。そのため植物は周りの環境に応じて気孔の開度を適切に調節し、水分損失を最低限に抑えつつ、二酸化炭素を取り込む。一般的な陸上植物では、光合成が盛んに行われる光照射下(日中)で気孔は開口し、暗黒下(夜間)で閉鎖する(Schroeder et al, 2001)。これに対し、高温乾燥地域に生育する CAM 植物では、蒸散による過度な水分損失を避けるため、日中に気孔が閉じ、夜間に気孔を開口させることが知られている。ところが、このように一見光に対して真逆の開口応答を示すかのような CAM 植物の気孔開口メカニズムはほとんど解明されておらず、この部分の解明が気孔開口シグナル伝達の一般性と特殊性を理解する上で不可欠である。CAM 植物を用いた気孔応答の研究知見があまりに乏しいため、生理応答の特徴づけを現在の気孔研究の視点と手法をもって、再検証する必要がある。

(2) 光に応答した気孔開口は、気孔孔辺細胞において、光合成に依存した赤色光応答と青色光に依存した青色光応答の両方により達成されるが、開口のシグナル伝達は主に青色光応答の研究により解明が進んだ(Shimazaki et al, *Annu. Rev. Plant Biol.*2007)。孔辺細胞において、青色光はフォトトロピンに受容され、標的である細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase をリン酸化により活性化する。この酵素の活性化が、開口に必要な様々な浸透物質(カリウムイオン、リンゴ酸、塩素イオン等)の取込みを駆動し、最終的に気孔開口を達成させる。ところが、このシグナル伝達は C3 植物の研究結果に基づいており、夜間でも開口する CAM 植物の気孔が同じシグナル伝達を利用しているのか全く不明である。

(3) CAM 植物は C3 植物から進化したため、上記のシグナル伝達要素を有していると予想されるが、気孔応答は全く異なり、概日時計による制御が重要だと考えられている。ところが、CAM 植物の気孔が光応答を示すのか、また、概日時計による開口制御が既存の開口メカニズムを利用しているのか不明である。そこで本研究では、CAM 植物の気孔が光応答性をもつのか明確にし、一般的な陸上植物の気孔開口メカニズムと何が異なるのか、分子レベルで解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

植物表皮に散在する気孔は、開口により光合成に必要な二酸化炭素の取込みを司る生育に重要な器官である。植物の気孔は一般的に光に応答して開口するが、CAM(Crassulacean Acid Metabolism)植物

の気孔は夜間に開口して日中に閉鎖すると言われており、気孔が光応答性をもつのかほとんど明らかでない。そこで本研究では、CAM 植物の気孔応答を生理・生化学的に解析し、気孔が光応答性をもつのか、また、CAM 植物の気孔開口メカニズムが一般的な陸上植物のメカニズムと何が異なるのか解明することを目的とした。さらに、申請者のこれまでの気孔研究における進化系統学的な解析結果と合わせ、気孔の光応答メカニズムの系統的な違いに進化的な考察を加えることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は、CAM 型植物特有の気孔開口応答を特徴づける研究基盤を確立する。具体的には以下の4テーマの研究を進めて CAM 植物の気孔開口メカニズムを解明し、一般的な陸上植物の開口メカニズムと何が異なるのか分子レベルで明らかにした。さらに、気孔の光応答メカニズムの進化系統的な違いに新たな考察を加えた。植物材料として絶対 CAM 植物であるセイロンベンケイソウとコダカラベンケイソウを用いた。

### (2) 主要なテーマと方法

CAM 植物の気孔開口における光応答性：CAM 植物の気孔は夜間に開口し、これには概日時計による制御が重要であると考えられているため、本研究ではまず、連続明条件下で生育させて概日時計の制御を受けない CAM 植物を準備し、気孔開口応答の光応答性を明確にする。予備的な実験により、CAM 植物の気孔が C3 植物と同様の光条件に応答して開口することが分かっている。この実験を赤色光と青色光に分けて単独、及び同時照射を行って気孔開度を測定し、CAM 植物の光による気孔開口応答が他の陸上植物の応答と同じであるのかを明らかにする。本実験は、申請者がこれまでに確立した顕微鏡を用いた気孔開度の直接測定と、光合成蒸散測定装置を用いた気孔コンダクタンス測定の両方により解析する(Doi et al, *J. Exp. Bot.* 2004; Doi et al, *Plant Physiol.* 2008)。

CAM 植物の気孔の光応答における日周性の影響：これまで、CAM 植物の気孔開口は概日時計の制御下にあると考えられていたが、実験において、光応答性も有していることが分かった。そこで、CAM 植物の気孔開口応答の日周性を再検証する。CAM 植物を明暗のサイクルのもとで生育させた個体(日周性の維持)と連続光で生育させた個体(日周性の解消)の気孔コンダクタンスを、一日を通して測定して比較し、概日制御の開口と光応答による開口を特徴づける。これにより、光応答と日周性に、時間依存的な優劣があるのか調べ、光応答と日周性の関係を明確にする。この解析により、日周性を維持した CAM 植物では、光を照射しても開口シグナル伝達が抑

制される、もしくは、暗条件でも開口シグナルが活性化される可能性を検証できる。我々はこれまでに同様の測定を行っており、測定条件はおおむね確立済みである (Gotoh et al. *Photosynth. Res.* 2010)。

既知の気孔開口シグナル伝達成分と CAM 植物の気孔開口との関係：申請者らのこれまでの研究により、C3 植物の気孔では孔辺細胞に光が当たると、細胞膜に局在する青色光受容体フォトリポピンが細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase を活性化し、この酵素が様々な浸透物質 (カリウムイオン、リンゴ酸、塩素イオン等) の取り込みを誘導し、最終的に気孔が開口することを明らかにしている (Shimazaki et al. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007; Inoue et al. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010)。そこで CAM 植物の気孔が開口する条件において、孔辺細胞におけるフォトリポピンと H<sup>+</sup>-ATPase の活性化状態および主要な浸透物質の蓄積を測定する。フォトリポピンと H<sup>+</sup>-ATPase の活性化状態は、ともにリン酸化レベルを測定することにより検出できるため、これまでに井上らが確立した生化学的手法によりこれらを検出する (Inoue et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; Inoue et al. *Plant Physiol.* 2011; Hayashi et al. *Plant Cell Physiol.* 2011)。浸透物質の蓄積については、孔辺細胞の抽出物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけて、カリウムイオン、リンゴ酸、塩素イオンを定量する。これらの測定法も既に確立済みである (Takahashi et al. *Science Signal.* 2013)。これらの開口のシグナル伝達が光開口時と日周性開口時のどちらでも正常に機能しているのか、各々の開口を区別してシグナル伝達を調べ、明確にする。

CAM 植物の気孔開口と概日時計関連遺伝子群の発現の関係：CAM 植物では概日時計の制御により夜間に気孔が開口すると考えられているが、そのメカニズムは不明である。一般的に、植物の概日時計は転写抑制ループにより形成され、時間依存的に発現する時計遺伝子がアウトプット遺伝子の転写量を調整することにより、様々な概日応答を誘導する (Nusinow et al. 2011; Nakamichi et al. 2012)。ところが、CAM 植物の夜間の気孔開口が、概日時計自体の違い、もしくは、アウトプット遺伝子の違いによりもたらされるのかは明らかでない。そこで本研究では、夜間における CAM 植物の孔辺細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、CAM 植物の気孔開口に関与する遺伝子群を明らかにする。CAM 植物はゲノム情報が乏しいため、本研究では次世代シーケンサーを用いたハイスループットな遺伝子発現解析を行う。後藤は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を行っており、この解析を熟知している。

#### 4. 研究成果

(1) C3、C4 植物とは光合成代謝様式が異なり、夜間気孔を開口し昼気孔を閉じる二種類の絶対 CAM (Crassulacean Acid Metabolism) 植物の青色光に依存した気孔開口反応を解析した。その結果自然光条件下で生育させた絶対 CAM 植物は青色光や赤色光単独照射下で気孔は完全に閉じていたが、青色光と赤色光を同時に照射すると開口した。このことは自然光条件下で生育させた CAM 植物が C3、C4 植物と同様青色光に特異的に依存した気孔開口応答を示すことを示す。そこで青色光に応答した気孔開口反応が CAM 植物において機能していることを明らかにするため、自然条件下及び連続白色光照射条件下で生育させた CAM 植物を用い光合成蒸散測定装置と光学顕微鏡による直接的開度測定法により生理・生化学的に解析した。いずれの生育条件下で生育させた CAM 植物も C3、C4 植物と同様に赤色光照射下弱い青色光照射により気孔が開口することが明らかになった。このことは概日時計による調節とは独立した、青色光に依存した気孔開口メカニズムが C3、C4 植物と同様絶対 CAM 植物においても機能していることを示唆する。

(2) 光に依存した気孔開口解析により CAM 植物は C3、C4 植物と同様に赤色光照射下、青色光に特異的に応答して気孔を開口することを植物個体と剥離表皮レベルで明らかにした。またカビ毒フジコッキンにより気孔開口が誘導され、CAM 植物にも青色光に依存した気孔開口メカニズムとプロトンポンプ依存的に気孔を開口するメカニズムが機能することが示唆された。

(3) 表皮断片で観察された青色光に依存した気孔開口は低濃度のプロトンポンプ阻害剤、バナジン酸とプロテインフォスファターゼ阻害剤、トートマイシンで阻害された。これに対しフジコッキンに依存した気孔開口反応はこれらの阻害剤では抑制されなかった。さらにプロトンポンプのリン酸化抗体を利用した免疫染色法により、青色光やフジコッキンに依存して気孔が開口すると同時にプロトンポンプがリン酸化され、活性化されることを確認した。

(4) 以上の結果から CAM 植物は C3、C4 植物と同様な情報伝達系を利用して青色光に依存的に気孔を開口することを明らかにした。本研究では初めて CAM 植物で青色光に依存した気孔開口メカニズムが機能することを明らかにしたが、ポンプの活性化までの一連の情報伝達が孔辺細胞固有の反応であることを確認することが今後期待される。

(5) 浸透物質の同定や概日時計関連遺伝子の発現解析は、解析に必要な十分量の孔辺細胞プロトプラストの調製が進まず、今後の課題として残った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kazuhiro Ishishita, Noriyuki Suetusgu, Yuki Hirose, Takeshi Higa, Michio Doi, Masamitsu Wada, Tomonao Matsushita, Eiji Gotoh, Functional characterization of blue-light-induced responses and PHOTOTROPIN1 gene in *Welwitschia mirabilis*, Journal of Plant Research, 査読有り、129巻、2016年、175-187ページ  
DOI: 10.1007/s10265-016-0790-7

〔学会発表〕(計2件)

後藤栄治、井上晋一郎、大岩本康平、島崎研一郎、土井道生、CAM植物における青色光依存の気孔開口、日本植物学会、2016年9月16日～19日、宜野湾市沖縄コンベンションセンター、沖縄県、宜野湾市

後藤栄治、大岩本康平、北川裕基、井上晋一郎、島崎研一郎、土井道生、CAM植物の気孔開口メカニズム、日本植物生理学会、2015年3月16日～18日、東京農業大学、世田谷キャンパス、東京都、世田谷区

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

土井 道生 (DOI, Michio)  
九州大学・基幹教育院・助教  
研究者番号: 00167537

(2)研究分担者

井上 晋一郎 (INOUE, Shin-ichiro)  
名古屋大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 40532693

後藤 栄治 (GOTOH, Eiji)  
九州大学・農学研究院・助教  
研究者番号: 90614256