

## 論文の内容の要旨

# Physiological analysis of stomatal responses as controlled by the mesophyll

(葉肉組織による気孔開閉制御に関する生理学的解析)

藤田 貴志

### 序論

気孔は一对の孔辺細胞に囲まれた微小な孔であり、葉の表皮において葉内外のガス交換を制御するバルブとして機能する。多くの研究者が、気孔開閉は孔辺細胞の自律的な膨圧運動のみでなく、葉内の葉肉組織にも強く制御されると提唱してきた。しかし、葉肉組織による制御の存在は実証されていなかった。

気孔開度を変化させる環境要因として、CO<sub>2</sub>濃度は重要である。気孔は低CO<sub>2</sub>環境で開き、高CO<sub>2</sub>環境で閉じる。Mottら(2008)はムラサキゴテン (*Tradescantia pallida*) やエンドウ (*Pisum sativum*) の剥離表皮の葉肉組織上への移植実験を行い、CO<sub>2</sub>にほとんど応答しない剥離表皮の気孔が、葉肉組織上では無傷葉の気孔と同様に敏感に開閉することを示した。彼らは、「葉肉細胞で生産される気孔開度調節シグナル(葉肉シグナル)が、葉肉組織から孔辺細胞に移動し、気孔のCO<sub>2</sub>応答を制御する」という仮説を提唱した。しかし、Mottらが観察した剥離表皮の気孔は、観察開始時から開ききっていたので、剥離表皮は非生理的条件下におかれていたはずである。したがって、彼らの実験条件では、気孔開閉に対する葉肉組織の関与を評価する際の前提となる、剥離表皮の応答が評価できていないことになる。

本研究では、ツクサ (*Commelina communis*) を用いて、生理学的条件に近い状態で気孔の応答を解析する実験系を構築した。この実験系を用いて、制御環境下における気孔の挙動を観察し、葉肉組織による気孔開閉制御メカニズムを生理学的に解析した。

## 1. 葉肉組織が気孔開閉におよぼす影響

従来の剥離表皮を緩衝液に浮かべて気孔を観察する方法では、気孔近傍の細胞間隙（気孔腔）が緩衝液で満たされてしまい、気孔の応答が鈍くなる問題があった。緩衝液を含むゲルに試料を載せる新規手法の開発により、気孔腔に空気が満ちた状態を維持でき、長時間の気孔の観察が可能になった。

葉肉組織による気孔開閉制御を確認するために、葉肉組織に接触した表皮と、接触していない表皮の気孔の応答を比較した。

### 【 気孔の観察システム 】

観察試料周囲の CO<sub>2</sub> 濃度・温度・湿度をコントロールできる真鍮製の試料用チェンバーを作製した。このチェンバーの上下はガラス製であり、試料の光応答の誘導と顕微鏡観察を同時に行える。

### 【 手法 】

気孔の観察試料には、葉の切片（葉片）、葉から剥離した背軸側表皮（剥離表皮）、露出させた葉肉に剥離表皮を移植したもの（移植片）を用いた（Fig. 1A）。試料の下方から赤色光、および白色光を照射して、気孔の CO<sub>2</sub> 応答を観察した。試料の孔辺細胞に到達する照射光の光強度と光質を揃えるために、剥離表皮には葉の透過光を照射した。

### 【 結果・考察 】

赤色光下では、低 CO<sub>2</sub>（100 ppm）で、葉片と移植片の気孔が大きく開口した（Fig. 1B-a,e）。一方、剥離表皮の気孔はほとんど開口しなかった（Fig. 1B-b）。赤色光下の気孔開口は孔辺細胞ではなく、葉肉組織に強く依存することが示された。

白色光下では、剥離表皮の気孔も大きく開口した（Fig. 1B-e）。気孔開口には、孔辺細胞の青色光受容体フォトトロピンを介する経路もある（Kinoshita et al. 2001）。白色光下での剥離表皮の気孔開口は、白色光に含まれる青色光によって誘導されたのであろう。

白色光下で高 CO<sub>2</sub>（700 ppm）に曝すと、葉片と移植片の気孔は速やかに閉鎖した（Fig. 1B-d,f）。一方、剥離表皮の気孔はほとんど閉鎖しなかった（Fig. 1B-e）。気孔閉鎖においても葉肉組織の関与が示された。

## 2. 葉肉組織による気孔開口制御の再検討

孔辺細胞周囲のアポプラスト環境は気孔開閉に強い影響をおよぼす。前項の実験で用いた剥離表皮は緩衝液を含むゲルに載せたため、葉片を用いた測定と剥離表皮を用いた測定の間で、表皮アポプラスト液組成が異なる。そこで、葉肉組織による気孔開口制御の厳密な再検討を行った。

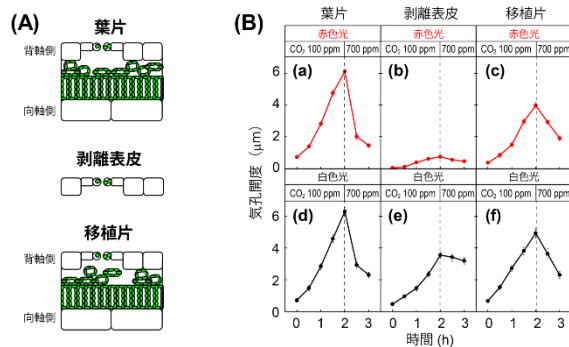


Fig. 1 孔辺細胞と葉肉組織が気孔開閉におよぼす影響

(A) 葉片, 剥離表皮, 移植片の模式図

(B) 葉片, 剥離表皮, 移植片の気孔の CO<sub>2</sub> 応答

低 CO<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> 100 ppm, 高 CO<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> 700 ppm

## 【 手法 】

移植前の葉肉への光照射の有無によって、気孔開口速度が異なるかを解析した。前処理として光照射をした葉片と暗処理した葉片から、背軸側表皮を剥離して、葉肉の切片を作成した。これらの葉肉切片に、暗処理した植物体から剥離した表皮を移植した。表皮のアポプラスト液組成を変化させないように、表皮を剥離して直ちに葉肉切片に載せた。剥離表皮を葉肉に移植した試料に光を照射して気孔開口応答を観察した。

## 【 結果・考察 】

光照射処理した葉肉に載せた表皮の気孔がより速やかに大きく開口した。この結果は、光照射を行った葉肉には気孔開口を促進する効果があることを確実に証明するものである。

### 3. 気孔開閉における光合成の寄与

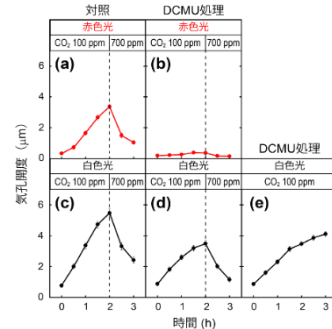
#### 【 手法 】

0.2 mM の光合成電子伝達阻害剤 DCMU 水溶液を減圧浸潤で細胞間隙に満たした後、風乾し、細胞間隙が空気で満たされた状態に戻した。処理葉から葉片を作成し、気孔開閉を観察した。対照葉片としては、0.1% (v/v) DMSO 水溶液で同様の処理を行ったものを用いた。

#### 【 結果・考察 】

DCMU 処理葉片では、低 CO<sub>2</sub> 環境下でも気孔がほとんど開口せず、その変化パターンは赤色光下の剥離表皮の気孔の応答のパターンと似ていた (Figs. 1B-b and 2-b)。低 CO<sub>2</sub> 環境で赤色光によって誘導される気孔開口は、葉肉組織の光合成に強く依存することが明らかになった。

白色光下では、DCMU 処理葉片の気孔が開口した (Fig. 2-d)。この後、高 CO<sub>2</sub> 環境に曝すと、気孔が速やかに閉鎖した (Figs. 2-c,d)。高 CO<sub>2</sub> で誘導される気孔閉鎖は、光合成にほとんど依存しない。

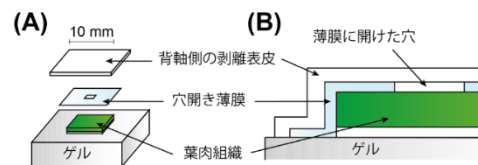


**Fig. 2 光合成阻害時の気孔の応答**  
上段：赤色光下での応答  
下段：白色光下での応答  
光条件・CO<sub>2</sub>濃度条件は Fig. 1 と同じ。

### 4. 葉肉シグナルの移動経路の解析

#### 【 手法 】

剥離表皮と葉肉組織の間に、厚さ 50 μm のポリエチレン製薄膜を挟んだ試料とセロファン製薄膜を挟んだ試料、対照として薄膜を挟まない移植片を用意した (Fig. 3)。薄膜の中央に 4 mm 角の穴を開けた。ポリエチレン製薄膜は水



**Fig. 3 薄膜を挟んだ試料の模式図**  
(A) 葉肉組織、薄膜、剥離表皮の配置順  
(B) 薄膜を挟んだ試料を横から見た図

溶性物質を透過させないが、セロファン製薄膜は水溶性の低分子を透過させる (Fig. 4A)。赤色光ならびに白色光下で、これらの移植片の気孔開閉を解析した。

### 【 結果・考察 】

照射光の光質や CO<sub>2</sub> 濃度にかかわらず、ポリエチレン製薄膜を挟んだ試料の気孔の応答は鈍かった (Fig. 4B-b,e)。

一方、セロファン製薄膜を挟んだ試料の気孔は、対照の移植片の気孔と同様に敏感に開閉した (Fig. 4B-a,c,d,f)。葉肉シグナルはアポプラストを經由して葉肉組織から表皮に移動する水溶性物質であることが示唆された。

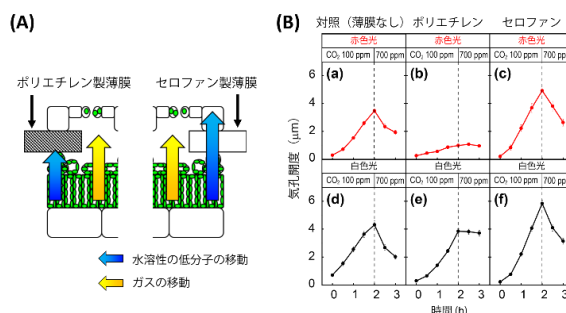


Fig. 4 薄膜を挟んだ試料の気孔開度変化

- (A) ポリエチレン製薄膜は水溶性物質を透過させない。セロファン製薄膜は水溶性の低分子を透過させる。薄膜に開けた穴はガス交換のためである。  
 (B) 上段：赤色光下での応答，下段：白色光下での応答  
 光条件・CO<sub>2</sub>濃度条件は Fig. 1 と同じ。

## 5. 葉肉シグナルの分子量の推定

### 【 手法 】

透過させる物質の分子量上限が異なる 2 種類の透析膜を、剥離表皮と葉肉組織の間に挟んだ試料を作成した (Fig. 3 の薄膜を透析膜に置き換えたもの)。挟み込む透析膜のポアサイズを変えて、葉肉シグナルの分子量を推定した。

### 【 結果・考察 】

気孔開口の抑制は、透過させる物質の分子量上限が 100~500 の透析膜を挟んでも起きなかったため、気孔開口を誘導する葉肉シグナルの分子量は 500 未満であると推定された。一方、気孔閉鎖は上限 500~1,000 の透析膜を挟んだ際には抑制されなかったが、上限 100~500 の透析膜を挟むと抑制された。気孔閉鎖を誘導する葉肉シグナルの分子量は 100~1,000 の範囲にあると推定される。

### まとめと今後の展望

先行研究の実験手法を改良し、また、新たに開発した手法を採用したことで、葉肉組織による気孔開閉制御の確証が得られた。気孔開閉を制御する葉肉シグナルは水溶性物質である。気孔開口を誘導する葉肉シグナルの分子量は 500 未満、気孔閉鎖を誘導する葉肉シグナルの分子量が 100~1,000 の範囲にあると推定された。

葉肉シグナルの推定分子量から、有機酸や植物ホルモンを候補にあげることができる。葉肉アポプラスト液のメタボローム解析やホルモノーム解析によって候補物質を絞り込めると期待する。