

気孔の二酸化炭素認識に関わるアクアポリン遺伝子の解析

Aquaporin Gene Involving CO₂ Response in Stomata

森 泉

岡山大学資源植物科学研究所 助教

Izumi C. Mori

Institute of Plant Science and Resource,

Okayama University

Assistant Professor

研究の大要

光合成による二酸化炭素固定化能は、気孔を構成する孔辺細胞の葉内二酸化炭素濃度感知と密接な関係がある。しかしながら、気孔の二酸化炭素感度を決定する機構は不明である。アクアポリンは水や二酸化炭素等の非極性低分子化合物を透過するタンパク質である。アクアポリンは気孔の運動および二酸化炭素感度の決定に関与していると予想されているが、これを証明した研究はない。本研究ではアクアポリンに注目し、孔辺細胞における二酸化炭素輸送機構を解明し、気孔の二酸化炭素感受性への関与の証明を試みる。この成果はビニールハウスや都市緑化樹木などの高二酸化炭素条件で生育する樹木の育種や選定に役立つ。

Assimilation of carbon dioxide (CO₂) is associated with physiology of stomata that take up CO₂ from atmosphere. Stomata aperture opens upon sensing low internal CO₂ concentration to supply CO₂ to photosynthetic cells. However, CO₂ sensing mechanism of stomata remains unknown. Aquaporin is a protein that permeates non-polar low-molecular-weight compounds and supposed to involved in stomatal movement and CO₂ sensitivity. In this study I analyzes CO₂ transport mechanism in guard cells and involvement of aquaporin in CO₂ sensitivity.

1. 研究目的

光合成器官への CO₂ の供給において、気孔抵抗は重要な律速段階である。すなわち、気孔の開度が様々な環境要因により変化することによって、ある環境条件における CO₂ の取り込み速度が律速される。気孔の開閉運動は孔辺細胞で機能する水チャネル（アクアポリン）およびイオンチャネルによる水とイオンの輸送が中心的な役割を果たしており、これらチャネルの活性調節が植物の CO₂ 固定速度に大きく影響する。また、CO₂ そのものを透過する水チャネルも知られており、気孔の CO₂ 感知機構と関連があると考えられている。本研究では植物の CO₂ 取り込み能を高めるために重要な水チャネル（アクアポリン）およびイオン輸送体を同定し、生理学的／生化学的にその性質を調べることを目的とした。

2. 研究経過

シロイヌナズナ孔辺細胞を単離し、mRNA の発現解析を行った。これにより、細胞膜型アクアポリン遺伝子4つおよびリンゴ酸輸送型アニオンチャネル遺伝子1つが特徴的に孔辺細胞で発現していることを明らかにした（図1）。次に、同定した輸送体遺伝子領域に DNA を挿入することにより

遺伝子を破壊した植物株を確立した。

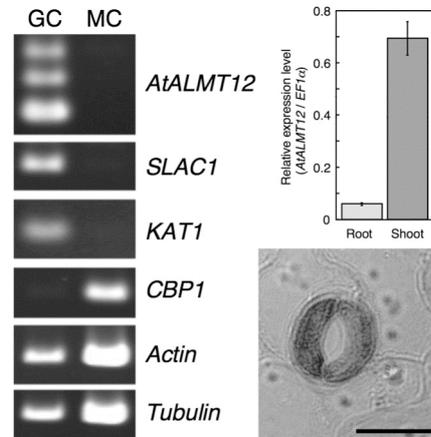


図1. 孔辺細胞で発現するリンゴ酸輸送型アニオンチャネルAtALMT12の発現解析. GC, 孔辺細胞; MC, 葉肉細胞. 左下はプロモーターGUSアッセイ

遺伝子破壊株の気孔閉口を測定し、該当遺伝子が気孔閉口に決定的な影響を示すかどうかを調べた。リンゴ酸型アニオンチャネル *AtALMT12* 破壊株において、気孔閉口運動に欠損が見られたことから、電気生理学的および分子遺伝学的に詳細な解析を行い、この遺伝子が気孔閉口運動に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

3. 研究成果

3-1. アクアポリン遺伝子破壊株の解析

アクアポリン遺伝子を破壊した植物株では気孔運動に顕著な異常が見られなかった（図2）。これは遺伝子の機能が重複しているためであると考えられる。研究期間終了までに遺伝子の二重変異体を作成したが、詳細な生理解析までには至っていない。植物

の成長に顕著な影響が見られていないことから、現在さらに三重変異体の作出を進めている。

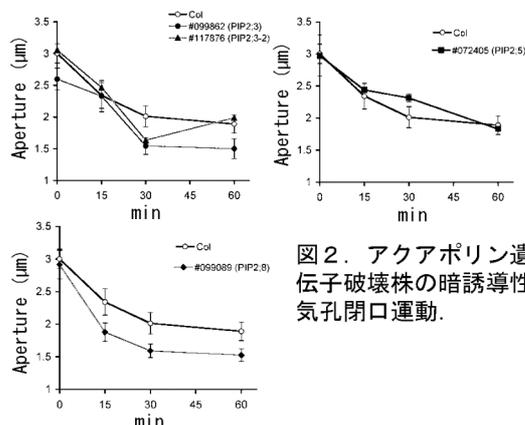


図2. アクアポリン遺伝子破壊株の暗誘導性気孔閉口運動。

3-2. リンゴ酸透過型アニオンチャネルの分子生理学的解析

シロイヌナズナのゲノムにはリンゴ酸透過型アニオンチャネルの類似遺伝子が13あることが知られている。ところが、気孔で特異的に発現する類似遺伝子はALMT12のみであった。この遺伝子の破壊株の生理学的な解析を行った(図3)。破壊株ではアブシジン酸、暗所およびカルシウム刺激による気孔閉口が見られなかった。蒸散速度が野生型と比べて速く、また時間経過による蒸散速度の低下が見られなかった。さらに、非常に萎れやすい特徴を持っていることも明らかにされた。一方気孔開口には顕著な影響は見られなかった。これらのことから、ALMT12遺伝子が気孔閉口に重要であ

ることが証明された。

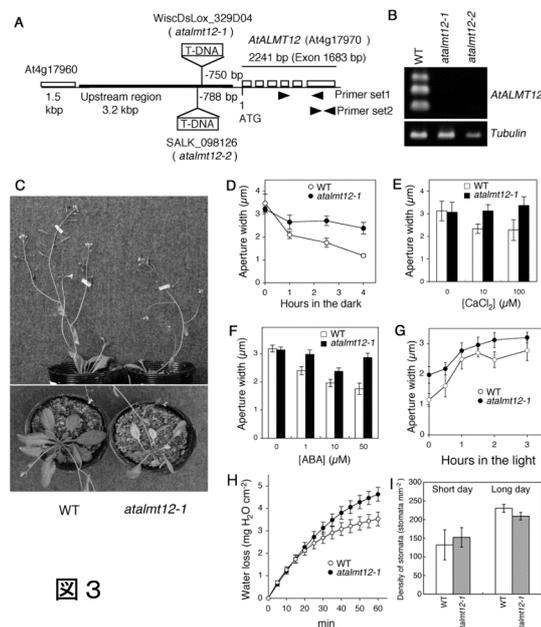


図3

3-3. ALMT12の電気生理学的解析

リンゴ酸透過型アニオンチャネルは名前とは裏腹に、様々なアニオンを透過し、リンゴ酸を透過しない分子種も存在し、機能に多様性があることが知られている。

カエル卵母細胞にALMT12遺伝子を発現させ、電気生理学的特徴を調べることによりALMT12の機能を推定した(図4)。その結果、硝酸、塩酸等の1価のアニオンを選択的に透過するチャネルであることが明らかにされた。

このことから、ALMT12は気孔閉口時に孔辺細胞が収縮するが、このときの水および塩類の放出を司るアニオンチャネルの実体であることが示唆された。この遺伝子の機能が低下する

と、気孔が常に開き気味となり、光合成活性が高まる可能性が考えられるが、本研究の期間内では光合成活性の向上を実証までは至らなかった。

った。結果に示さなかったが、アクアポリンによる CO_2 透過性を評価するための新しい実験系はほぼ確立できたが、上述の理由によりさらに研究を進めるには至らなかった。

気孔の水輸送にはそれと同時に塩類の輸送が必須であり、現在部分的にしか理解されていないアニオンチャンネルに注目し、閉口して研究を進めた。その結果リンゴ酸透過型アニオンチャンネルが極めて孔辺細胞に特異的に発現していることが本研究中に明らかとなり、この解析を精力的に行った。その結果、新規の気孔閉口に関与するアニオンチャンネルの性質を明らかにするに至った。

これまでの成果では CO_2 との関連を詳細に検討するには至らなかったため、今後この点に注目して解析を継続し、 CO_2 吸収とこれらチャンネルの関連をさらに明らかにしていく。

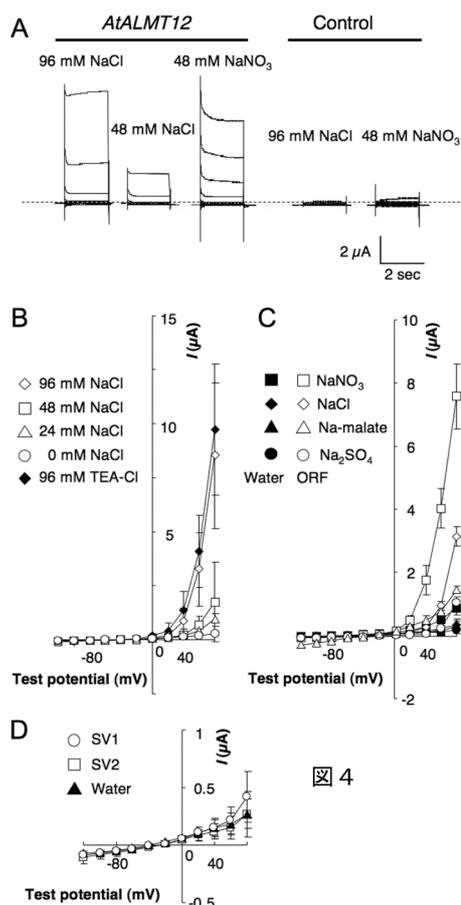


図 4

4. 今後の課題と発展

本研究では、アクアポリンの1遺伝子欠損により顕著な気孔運動の欠損が見られなかったことから、研究が難航した。順次多重変異体を作成するためには二-三ヶ月を要し、アクアポリンの解析は1年間では間に合わな

5. 発表論文リスト

Sasaki, T., Mori, I.C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y. and Yamamoto Y. (2010) Closing plant stomata requires a homolog of an Aluminum-Activated malate Transporter. *Plant Cell Physiol.* **51**, 354-365.