

1. 研究題目

CO₂ 濃度上昇に対する気孔応答に関する研究

(Studies on Stomatal Response to Increased Atmospheric CO₂ Concentration)

2. 研究者名

石井龍一 (ISHII Ryuichi)

東京大学大学院農学生命科学研究科教授 (Professor, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo)

島山尚志 (TORIYAMA Shoshi) 論文では武藤尚志 (Muto Shoshi)

名古屋大学生物分子応答研究センター教授 (Professor, Bioscience Center, Nagoya University)

近藤矩朗 (KONDO Noriaki)

東京大学大学院理学系研究科教授 (Professor, Graduate School of Science, University of Tokyo)

3. ENGLISH ABSTRACT

This research project was conducted by three scientists independently for the common target; to elucidate the regulation mechanism of stomatal aperture by elevated CO₂ concentration. Ishii examined the conversion mechanism between C₃ and C₄ type of photosynthetic CO₂ fixation in *Eleocharis baldwinii* which changes its photosynthetic performance when the growth condition is altered from the submerged to the terrestrial, and vice versa. He found elevated CO₂ induced C₃ type photosynthetic characteristics along with submergence conditions. Toriyama found a potential mechanism of stomatal closure with abscisic acid by identifying ABA responsive protein kinase in faba bean guard cells. Moreover, he confirmed for the first time the existence of protein kinase cascade in the guard cells which can be considered to play a key role for the stomatal regulation by CO₂. Kondo established the in vitro experimental system to examine the effects of high CO₂ concentration on the stomatal aperture. With this system he obtained several interesting data, but they do not necessarily meet the past results, particularly for the role of malate in the regulation of stomatal aperture. He is feeling the necessity of further careful experiment for the confirmation of this point.

4-1. 研究目的

近年、大気中の CO₂ 濃度は、1 年間に約 1.5ppm の速度で上昇していると言われている。CO₂ の濃度上昇は、植物の葉の気開度を低下させる。気孔開度の低下は光合成や蒸散速度に影響し、植物の成長や、ひいては植物生産の速度にも影響する。したがって、CO₂ 濃度の上昇に対する気孔開度の応答機構を解明することは、極めて重要であり、多くの植物生理学者が関心を持っている問題である。本研究は、上記 3 人の研究者によって、各々の専門、立場、考え方に則って、独立的に行われたものである。

目的-1 [石井] :

実験材料として、アメリカ合衆国フロリダ半島に自生するカヤツリグサ科の植物, *Eleocharis baldwinii* を使った。この植物は、環境条件によって C3 型の光合成と C4 型の光合成とに相互変換することが知られている。そこで、他の二人の研究者が CO₂ 濃度と気孔開度との関係に商店を絞ったので、石井は、この植物を使い、CO₂ 濃度の変化にともなって光合成の炭素代謝が変化するかどうかを調べることにした。

目的-2 [鳥山] :

植物葉の気孔の開閉は、孔辺細胞内の K イオンや Ca イオンの濃度変化をとまなう。孔辺細胞内のイオン濃度は、イオンチャネルや H-ポンプの働きによって調節されている。最近、これらイオン輸送機構の活性調節に蛋白質のリン酸化-脱リン酸化が関与しているとの報告が相次いでいる。しかし、このことを証明するには、孔辺細胞内にプロテインキナーゼが存在することを実証する必要がある。本研究は、ソラマメ葉の孔辺細胞でプロテインキナーゼの存在を直接示し、活性調節機構を明らかにしようとするものである。

目的-3 [近藤] :

CO₂ 濃度上昇にとまなう植物葉の気孔閉鎖は、植物ホルモンのアブシジン酸が、気孔開度を維持するのに必要な K イオンやリンゴ酸といった浸透圧調節物質を、孔辺細胞から外に出してしまうこと、あるいはリンゴ酸の生合成自身をも阻害することを通じて起こることが示唆されている。本研究では、孔辺細胞の浸透圧調節物質レベルと、有機酸代謝に及ぼす CO₂ 濃度の影響を明らかにすることによって、CO₂ 濃度上昇にとまなう気孔開度減少の機構を明らかにしようとした。

4-2 研究経過

経過-1 [石井] :

当初、石井は、異なる CO₂ 濃度条件下での光合成速度や蒸散速度の測定から、CO₂ 濃度が植物の水利用効率に与える影響を、C3 植物、C4 植物の比較を中心に研究する予定であった。しかし、本研究で使用した *Eleocharis baldwinii* あるいは *E. vivipara* の示す、環境による C3-C4 変換は極めて面白い現象であり、CO₂ 濃度と光合成との関係についての研究としては、優先度が高いという認識を有したため、この植物を使った研究に力をそそぎ、興味ある結果を得ることができた。

経過-2 [鳥山] :

ソラマメ葉の孔辺細胞を使用し、孔辺細胞のイオンチャネル活性に及ぼす種々のシグナル伝達機構を、蛋白質リン酸化の役割に絞って研究した。

経過-3 [近藤] :

ソラマメ葉の剥離表皮から単離孔辺細胞を得、K₂CO₃ による炭酸濃度処理を行って、当初計画した K イオンおよびリンゴ酸の定量を行うとともに、リンゴ酸合成過程を追跡した。

4-3 研究成果

成果-1 [石井] :

Eleocharis baldwinii を陸生条件下（陸生型）と水生条件下（水生型）で生育させた結果、陸

生型は形態的にもクランツ構造を示し、炭酸固定初期産物や炭酸固定酵素についても、水生型に比べ、より C4 的な傾向を示した。この植物を高い CO₂ 濃度下で生育させた場合、炭酸固定初期産物としては C3 化合物が多くなり、PEP カルボキシラゼ活性は低下し、水生型の特色が強まった。このように、CO₂ 濃度の増加と沈水という条件とは、植物の葉の光合成的炭素代謝を C3 的に向かわせる効果を有することが分かった。

成果-2 [鳥山] :

孔辺細胞プロトプラストを ABA 処理すると、48kDa にプロテインキナーゼの活性バンドが検出された。このキナーゼを ABR キナーゼ (ABA responsive protein kinase) と名づけた。ABR キナーゼの活性化は、プロテインキナーゼ阻害剤、スタウロスポリンと K-252a に寄って抑制された。このことから、ABR キナーゼをリン酸化して活性化するプロテインキナーゼが存在することが分かり、プロテインキナーゼの存在を実証した。さらに、ABA 処理による気孔の閉口もスタウロスポリンと K-252a によって抑制されたことから ABR キナーゼと、これを活性化するキナーゼが ABA の受容から気孔の閉口に至るシグナル伝達系のプロテインキナーゼカスケードを構成していることを示唆した。さらに、ABR キナーゼの活性化に、細胞外からの Ca²⁺ の流入が必要であることから、カルモデュリン類似ドメインプロテインキナーゼが、このカスケード上流で機能している可能性も示唆された。

結果-3 [近藤] :

液相中でも 0.5mM の K₂CO₃ によって約 30% 気孔開度減少がみられたが、ABA による相乗効果は認められなかった。また、K₂CO₃ 処理は、リンゴ酸含量を約 15% 減少させたが、K イオンの含量にはほとんど影響を与えず、従来の説とやや異なる結果を示した。さらに、K₂CO₃ 処理による 14CO₂ の取り込みと各画分への取り込みのパターンを調べた結果、CO₂ 濃度は有機酸代謝に大きな影響を与えることが明らかになり、高濃度の CO₂ がリンゴ酸の生合成に阻害的に働くことも明らかにされた。

4-4 今後の課題と発展

課題-1 [石井] :

この植物を材料に、C3-C4 の相互変換機構を明らかにしていきたい。さらに、C4 植物における効率的な光合成の発現は、クランツ構造という形態の発現が先行し、それに誘導されて生化学的諸特製が発現するのか、あるいはその逆で、生化学的な形質の発現が先行し、形態的諸特性の発現はそれに誘導されるのかという植物生理学的な面についても検討していきたい。しかし、最大の関心は、今後の CO₂ 濃度上昇を考えた時、CO₂ の上昇が気孔に対してはこう、光合成の代謝に対してはこう、というように、CO₂ の影響を整理して調べることである。

課題-2 [鳥山] :

本研究では、生化学的解析が極めて困難な孔辺細胞について、プロテインキナーゼカスケードの存在と構成要素の一部を初めて明らかにした。今後、これをきっかけに孔辺細胞のシグナル伝達系の解明が進むと期待され、さらに、プロテインキナーゼやその標的蛋白質も同定されると考えられ、この方面の研究を続けていくつもりである。

課題-3 [近藤] :

本研究によって、液相中で CO₂ 濃度と気孔開度との関係が調べられるようになり、いわば in

in vitro の実験系を確立することができた。この研究から、リンゴ酸の気孔開度制御における役割についてますます多くの疑問点が生じてきた。今後この点についての研究を進めたい。

4-5 発表論文リスト

論文-1 [石井] :

1. Uchino, A., M. Samejima, R. Ishii and O. Ueno (1996) Photosynthetic carbon metabolism in an amphibious sedge, *Eleocharis baldwinii* (Torr.) Chapman : Modified expression of C4 characteristics under submerged aquatic conditions. *Plant Cell Physiol.* 36 : 229-238.
2. Uchino, A., H. Sasaki and R. Ishii (1996) Photosynthetic gas exchange characteristics of *Eleocharis vivipara* and *E. baldwinii*, amphibious sedge plants of Cyperaceae. In *Crop Research in Asia : Achievements and Perspective* (Ed.) Ishii, R. and T. Horie, Crop Science Society of Japan, pp. 564-565.
3. Uchino, A., M. Samejima and R. Ishii Anatomy and photosynthetic carbon metabolism in the transitional plant between two life forms of an amphibious sedge, *Eleocharis vivipara* Link under differential CO₂ conditions. (in preparation)
4. Uchino, A., K. Nemoto, R. Ishii, M. Samejima and M. Matsuoka Interrelation between morphogenesis of Kranz anatomy and expression of CO₂ fixation enzyme genes in *Eleocharis vivipara*. (in preparation)

論文-2 [鳥山] :

1. Muto, S. and C. Mori (1995) Abscisic acid activated protein kinases in *Vicia faba* guard cells : Their implication in Ca²⁺-independent stomata closure in response to abscisic acid. Abstract of 10th International Workshop on Plant Membrane Biology.
2. Mori, C. and S. Muto ABA activates a 48kDa protein kinase in guard cell protoplasts. (Submitted)
3. 武藤尚志 第二メッセンジャー-「植物のシグナル伝達」、東京化学同人 (印刷中)

論文-3 [近藤] :

本研究で新しい事実を見つけていますが、まだ確認の実験が必要と考えますので、論文発表まで、あと1年ほど必要です。