

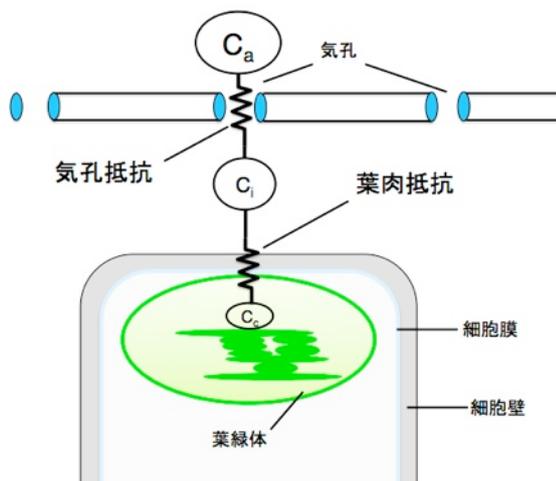
## 研究紹介

葉肉コンダクタンス低下へのABAの関与<sup>§</sup><sup>1</sup>東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻<sup>2</sup>独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター溝上 祐介<sup>1,\*</sup> 小嶋 美紀子<sup>2</sup> 榊原 均<sup>2</sup> 野口 航<sup>1</sup> 寺島 一郎<sup>1</sup>

光合成の基質であるCO<sub>2</sub>は、大気中から葉緑体内ストロマまで拡散する。このCO<sub>2</sub>拡散経路には直列する二つの拡散抵抗が存在する。実際には、拡散抵抗の逆数、気孔コンダクタンス ( $g_s$ )、葉肉コンダクタンス ( $g_m$ ) が、CO<sub>2</sub>の拡散しやすさをあらわす指標として用いられている。葉肉コンダクタンス ( $g_m$ ) は、 $g_s$ とともに乾燥ストレス時に低下するという報告が多い。そこで、*Nicotiana plumbaginifolia*のABA合成経路変異体 (*aba1*) を用いて、乾燥ストレス時に生産される植物ホルモン、アブシジン酸 (ABA) が $g_m$ 低下に関与をするかを検証した。*aba1*では、土壤乾燥時にも $g_s$ や $g_m$ が低下しなかった。また、この変異体の葉に葉柄を介してABAを与えると、 $g_s$ と $g_m$ がともに低下した。これらの結果は、 $g_m$ の低下にもABAが関与していることを示している。

## 1. はじめに

C3植物では、光合成の基質であるCO<sub>2</sub>は、大気中から葉緑体内ストロマまで拡散し、Rubiscoによって固定される。この拡散経路には二つの大きな抵抗が存在する。気孔抵抗と葉肉抵抗である (図1)。それぞれの逆数は、気孔コンダクタンス ( $g_s$ )、葉肉コンダクタンス ( $g_m$ ) とよばれ、CO<sub>2</sub>の通りやすさを表す指標として用いられている。光合成速度を決めているのは、葉緑体内のCO<sub>2</sub>濃度 ( $C_c$ ) であり、大気中のCO<sub>2</sub>濃度 ( $C_a$ ) よりもかなり低い。

図1 葉内のCO<sub>2</sub>拡散経路

$C_a$ : 大気中のCO<sub>2</sub>濃度、 $C_i$ : 細胞間隙のCO<sub>2</sub>濃度、 $C_c$ : 葉緑体の中のCO<sub>2</sub>濃度

乾燥ストレス時に気孔は閉鎖し、蒸散による水の損失を防ぐ。気孔が閉鎖するので、 $g_s$ は低下する。これにともない $g_m$ も低下する。しかし、その意義やメカニズムは分かっていない<sup>1)</sup>。そこで、本研究では、乾燥ストレス時に多く生産され、気孔を閉鎖させることが知られている植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) に注目し、タバコのABA合成経路変異体を用いて、 $g_m$ の低下へのABAの関与を検証した。

2. 乾燥ストレスによる $g_m$ の低下

ポット栽培した*Nicotiana plumbaginifolia*の野生型 (WT) とABA合成経路変異体 (*aba1*) への灌水を停止することで、土壤乾燥ストレスをかけた。土壤含水率 (SWC) を乾燥ストレスの指標とし、土壤含水率が100%のときと40 ± 4%のときに、光合成速度 ( $A$ )、 $g_s$ 、 $g_m$ を測定した。 $A$ と $g_s$ の測定には、ガス交換法を用いて、 $g_m$ の測定には現在もっとも信頼性が高いとされる、炭素安定同位体/ガス交換同時測定法を用いた。また、近年指摘された<sup>2)</sup>、光呼吸による $g_m$ 測定への

<sup>§</sup> 第3回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: y-mzkm@biol.s.u-tokyo.ac.jp

アーティファクトを避けるために、空気中のO<sub>2</sub>濃度を1%程度に抑えて測定した。野生型では、乾燥ストレス時にA、g<sub>s</sub>、g<sub>m</sub>が低下した。一方で、*aba1*では乾燥ストレス時でも、A、g<sub>s</sub>、g<sub>m</sub>の低下はみられなかった(図2)。WTのSWCが100%から40% ± 4%に低下するにともない、C<sub>c</sub>は212 μmol mol<sup>-1</sup> airから155 μmol mol<sup>-1</sup> air程度まで低下した。一方で、*aba1*のC<sub>c</sub>は220 μmol mol<sup>-1</sup> airから215 μmol mol<sup>-1</sup> airとほとんど変化しなかった。測定後に葉を速やかにサンプリングし、各種の植物ホルモンを分析した結果、ABA含量にのみ、顕著な変化がみられた。SWCが100%から40 ± 4%に低下したとき、ABA含量は、WTでは10倍程度増加したが、*aba1*ではほとんど変化しなかった(図3)。乾燥ストレス時にABAが生産され、ABAにตอบสนองして、g<sub>s</sub>だけでなくg<sub>m</sub>も低下することが強く示唆された。

### 3. ABA濃度依存性

次に、ABAがg<sub>m</sub>の低下に関わっていることを確認するために、ABA溶液(10 μM、1 μM)を外部から与える実験を行った。より生理的条件に近づけるために人工木部液<sup>3)</sup>にABAを溶かし、水切りした葉柄から与えた。ABA溶液添加の2時間後にA、g<sub>s</sub>、g<sub>m</sub>を測定した結果、WT、*aba1*ともにABA添加後にA、g<sub>s</sub>、g<sub>m</sub>が顕著に低下した(図4)。g<sub>m</sub>の低下はABA濃度に依存した。C<sub>c</sub>は1 μM、10 μMのABAを与えたとき、WTではそれぞれ123 μmol mol<sup>-1</sup> air、92 μmol mol<sup>-1</sup> air、*aba1*では132 μmol mol<sup>-1</sup> air、109 μmol mol<sup>-1</sup> airまで低下した。土壌乾燥ストレスときと比較すると、1 μMのABA溶液を添加した時の方が、C<sub>c</sub>の低下は著しかった。実際の植物体内では、ABAはより低い濃度で作用していると考えられる。これらの結果は、乾燥

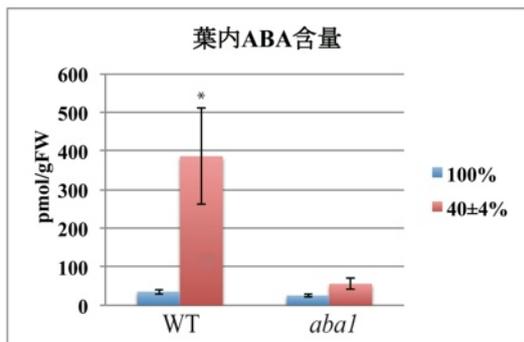


図3 乾燥ストレス時の葉内ABA含量

土壌含水率 (SWC) が100% (青)、40 ± 4% (赤) のとき、野生型 (WT) と変異体 (*aba1*) のABA含量を生重量あたりで示した。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差 (n = 5) を示す。\*はP < 0.05の有意差を示す。

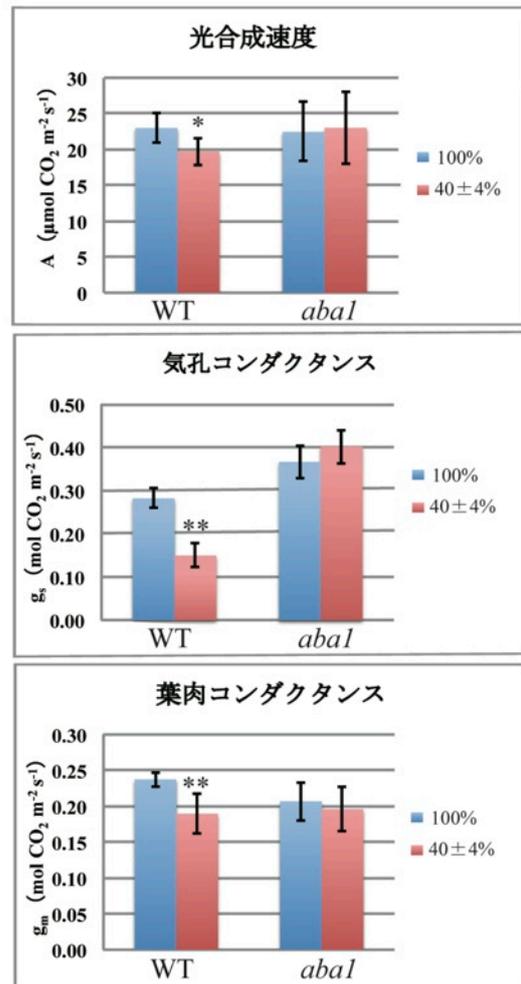


図2 乾燥ストレス時の光合成速度 (A)、気孔コンダクタンス (g<sub>s</sub>)、葉肉コンダクタンス (g<sub>m</sub>) の変化。土壌含水率 (SWC) が100% (青)、40 ± 4% (赤) のとき、390 μmol mol<sup>-1</sup> air CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>、光強度800 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、葉温25°Cで測定を行った。エラーバーは、平均値 ± 標準偏差 (n = 5 ~ 8) を示す。\*はP < 0.05の有意差、\*\*はP < 0.01の有意差を示す。

ストレス時のg<sub>m</sub>の低下にABAが関与することをさらに強く支持する。一方、乾燥ストレス時には木部液のpHが上昇し、気孔のABAへの応答性が変化するという報告もある<sup>3)</sup>。本研究では、pH5.8の人工木部液を用いた。g<sub>m</sub>のABAへの応答性についても、pHの変化を考慮に入れて、さらに慎重に議論する必要がある。

### 4. おわりに

これまで、さまざまな環境変化にg<sub>s</sub>とg<sub>m</sub>が同じように応答するという報告が多い。そこで、気孔閉鎖によ

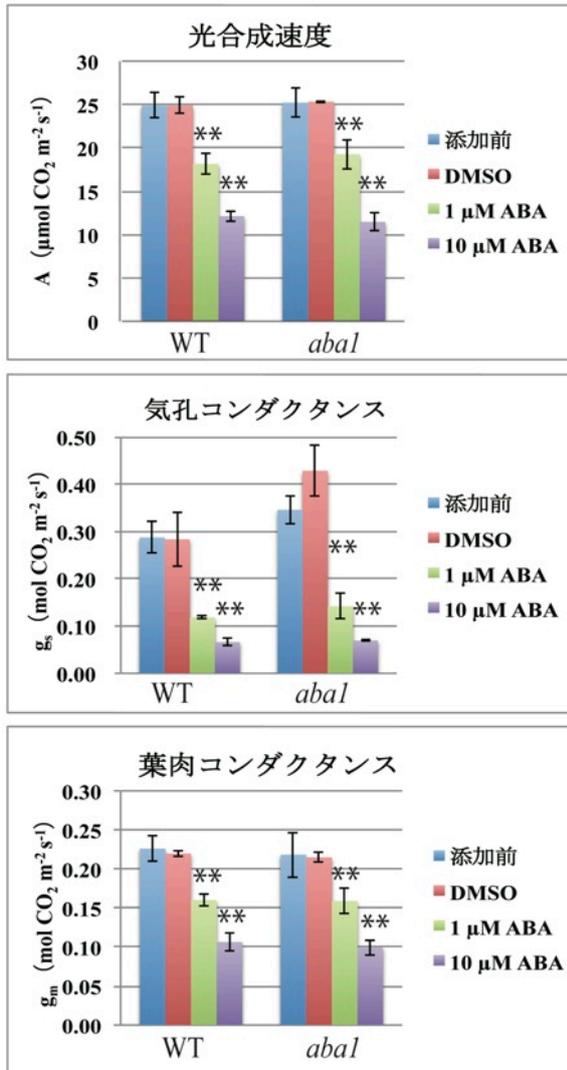


図4 ABAを添加した前後の光合成速度 (A)、気孔コンダクタンス ( $g_s$ )、葉肉コンダクタンス ( $g_m$ ) の変化  
 ABA添加前 (青)、10  $\mu\text{M}$  DMSO添加後 (赤)、1  $\mu\text{M}$  ABA添加後 (緑)、10  $\mu\text{M}$  ABA添加後 (紫) に、390  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  air  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$ 、光強度800  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、葉温25°Cで測定を行った。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) を示す。\*\*は  $P < 0.01$  の有意差を示す。

る  $g_m$  への影響が議論されてきた。気孔の閉鎖が  $g_m$  の低下へ影響している可能性は、二つ考えられる。一つ目は、気孔の閉鎖により光呼吸の影響が増大することである。本研究では、1%  $\text{O}_2$  下で測定したことにより影響を抑えられている。二つ目は、気孔の閉鎖により、 $C_i$  が低下することである。低い  $C_i$  条件では  $g_m$  の増加が報告されており、結果は一致しないために、ここでは考えにくい。

これまで、ABAが  $g_m$  へ与える影響の詳細な研究はなかったため、その作用機構は不明である。現在までに、plasma membrane intrinsic protein (PIP) アクア

ポリンの一種である  $\text{CO}_2$  透過性アクアポリン (cooporin)、carbonic anhydrase (CA)、細胞壁の厚さ、葉緑体が細胞間隙に面している面積 ( $S_c$ ) などが  $g_m$  を変化させる要因として報告されてきた<sup>4-6)</sup>。 *N. plumbaginifolia* の葉では、 $g_m$  は1時間以内でABAに应答する (Mizokami et al., unpublished data)。  $g_s$  と  $g_m$  のどちらの应答が早い、本研究では明らかにできなかったが、 $\text{CO}_2$  濃度変化に対する应答では、 $g_m$  の方が早いという報告もある<sup>7)</sup>。このような  $g_m$  の早い应答には cooporin と CA の関与が考えられる (図5)。特に、cooporin は乾燥ストレス時のリン酸化、脱リン酸化による活性制御、また ABA 添加による mRNA 量の変化が報告されており、比較的早い应答が考えられる。しかし、図5に示すように cooporin は PIP1 と PIP2 に分けられており、どちらが  $\text{CO}_2$  を通すかについては、現在も議論が続いている。また、CA の触媒作用は、pH に依存するため、早い应答性をもつと考えられるが、 $g_m$  と関連した研究はほとんどない。今後、ABA がどのように、これらの  $g_m$  変化要因に関わっているのかを明らかにする。

謝辞

本研究を行うにあたり、*N. plumbaginifolia aba1* の種子を分与して下さった、理化学研究所瀬尾光範ユニットリーダー、作製者である INRA の Elena Marin 博士に感謝いたします。また、本研究は文部科学省最先端研究基盤事業「植物科学最先端研究拠点ネットワーク」の支援を受けて、行われました。

Received March 15, 2013, Accepted March 28, 2013, Published April 30, 2013

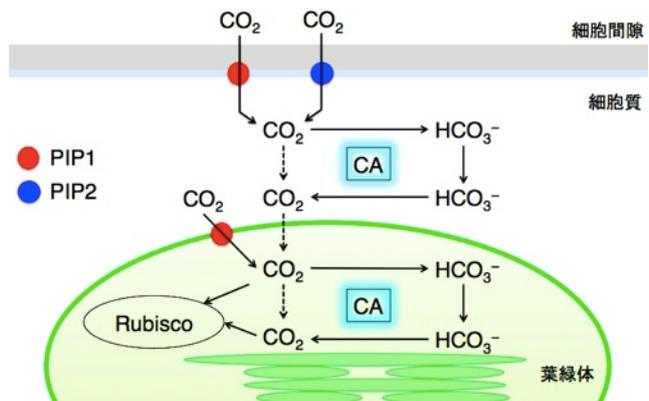


図5 葉肉組織における cooporin (PIP1, PIP2) と carbonic anhydrase (CA) の  $\text{CO}_2$  拡散への寄与に関する作業仮説

### 参考文献

1. Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Diaz-Espejo, A., Galmes, J., and Medrano, H. (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ.* 31, 602-621.
2. Tholen, D., Ethier, G., Genty, B., Pepin, S., and Zhu, X.-G. (2012) Variable mesophyll conductance revisited: theoretical background and experimental implications. *Plant Cell Environ.* 35, 2087-2103.
3. Wilkinson, S., and Davies, W. J. (1997) Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113, 359-573.
4. Terashima, I., Hanba, Y. T., Tholen, D., and Niinemets, U. (2011) Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. *Plant Physiol.* 155, 108-116.
5. Price, D., von Caemmerer S., Evans J. R., Yu J. W., Lloyd, J., Oja, V., Kell, P., Harrison, K., Gallagher, A., and Badger M. (1994) Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. *Planta.* 193, 331-340.
6. Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H., and Kaldenhoff, R. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*. *Plant J.* 48, 427-439.
7. Tazoe, Y., von Caemmerer S., Estavillo, G. M., and Evans, J. R. (2011) Using tunable diode laser spectroscopy to measure carbon isotope discrimination and mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> diffusion dynamically at different CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Cell Environ.* 34, 580-591.

## Possible involvement of abscisic acid in regulation of mesophyll conductance

Yusuke Mizokami<sup>1,\*</sup>, Mikiko Kojima<sup>2</sup>, Hitoshi Sakakibara<sup>2</sup>,  
Ko Noguchi<sup>1</sup>, Ichiro Terashima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Plant Productivity Systems Research Group, RIKEN Plant Science Center