

論文内容の要旨

論文題目

Ethylene Inhibits Abscisic Acid - Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*

シロイヌナズナのアブシジン酸による気孔閉鎖に対するエチレンの阻害作用

氏名 田中 洋子

序論

植物は葉の表面に多数存在する気孔を通じて光合成や呼吸に必要なガス交換を行っている。一方で気孔は蒸散流の出口でもあり、水分の放出口でもある。そのため、移動できない植物は光合成が行える条件下では素早く気孔を開口するとともに、夜間など光合成が行えない時や乾燥時には気孔を閉鎖する機構を備えている。特に水分欠乏は植物にとって最大の危機的状況であり、大気中や土壌中の水分の減少が感知されると根や葉で植物ホルモンであるアブシジン酸 (abscisic acid : ABA) の合成が促進され、それが孔辺細胞に到達すると気孔が閉鎖し、蒸散量が抑制される。ABA は気孔閉鎖に関わる最も効果の著しい植物ホルモンであるが、一方、老化や果実の成熟、乾燥や傷害を始めとする広範囲のストレスに応答する植物ホルモンとしてエチレンがある。エチレンは種子発芽において ABA の作用を抑制することが知られているが、乾燥時における ABA との相互作用については拮抗・協調の両説があり、結論は出ていない。そこで本研究ではシロイヌナズナを用いて、気孔閉鎖過程におけるエチレンの効果を表皮切片および植物体の両面から検討した。また、やはり植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンは、気孔において ABA と拮抗することが知られている。これらの植物ホルモ

ンはエチレン合成を誘導することが知られていることから、これらの植物ホルモンの気孔閉鎖における効果がエチレン合成であることを検討した。

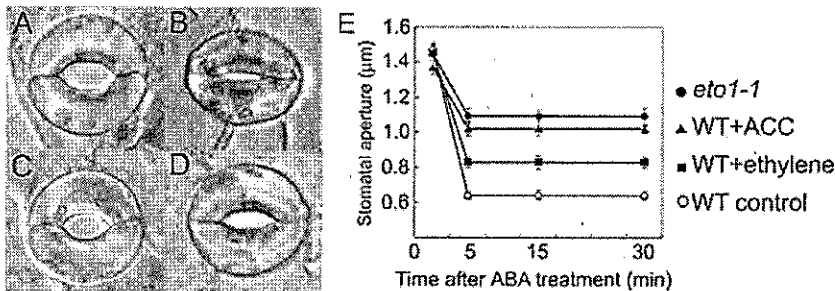


図1. エチレンはABAによる気孔閉鎖を阻害する

- A-B 気孔はABA添加により閉鎖する
- C-D エチレンガス処理によりABA添加でも完全には閉じない
- E エチレン前駆体ACCの添加やエチレン過剰合成変異体 *eto1-1*においても同様の阻害効果が見られる

結果と考察

1. ABAによる気孔閉鎖に対するエチレンの阻害作用

シロイヌナズナのロゼット葉の表皮を剥いて、バッファー上に浮かべ、

白色光照射により気孔を開口させてから(図 1A) ABA を添加すると気孔は閉鎖する (図 1B)。しかし、バッファ中にエチレンガスを溶かすと気孔閉鎖が途中で停止することが観察された(図 1C-D)。この気孔閉鎖の様子を気孔の開き具合 (開口度) を指標にして経時的に観察したところ、ABA 添加により気孔は5分以内に閉鎖

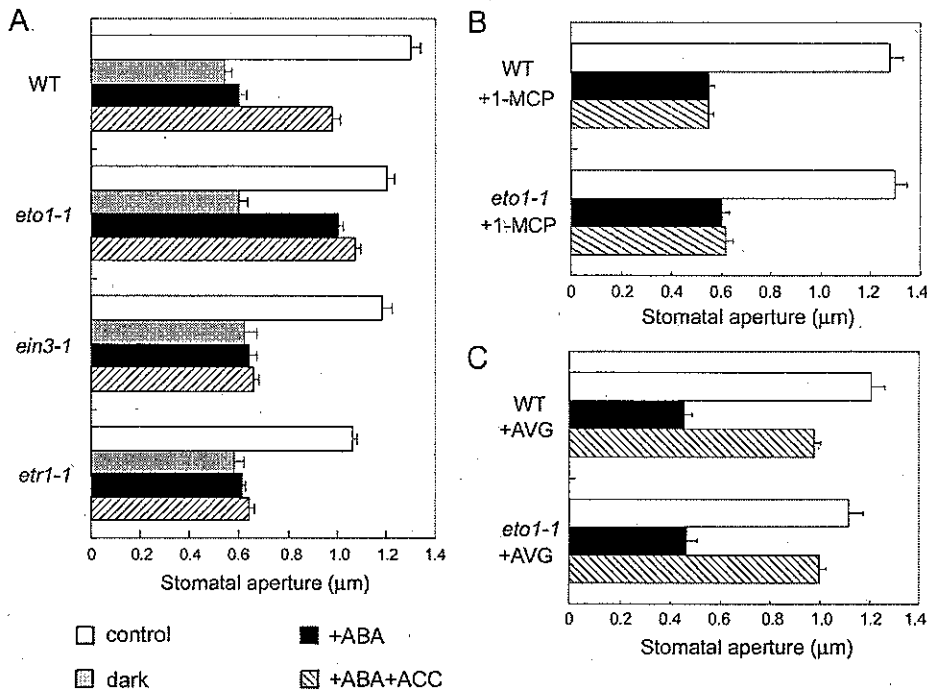


図 2. エチレンがABAによる気孔閉鎖を阻害するのは植物がエチレンシグナルを伝達できる場合に限られる

- A エチレンシグナルを伝達できない変異体 *ein3-1*, *etr1-1* では ACC を添加した場合でも ABA による気孔閉鎖が起こる
- B エチレンシグナルレセプター阻害剤 1-MCP 処理によりエチレン過剰合成株 *eto1-1* においても ABA により気孔が閉じ、ACC による阻害効果が見られない
- C エチレン合成阻害剤 AVG 処理により *eto1-1* においても ABA により気孔が閉じるが、外生の ACC により ABA の効果が阻害される

したが、エチレンガスで処理すると最初の5分間で開口度は低下するものの、ABAのみを加えた時に比べ、開口度は高く保たれた。同様の ABA に対する阻害効果はエチレン前駆体である 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACC) を野生型(WT)に添加した場合および、エチレン過剰合成変異体 *eto1-1* においても見られた(図 1E)。 *eto1-1* は暗条件では WT と同様に気孔が閉鎖したことから(図 2A)、過剰のエチレンが ABA の気孔閉鎖を阻害している可能性が示唆された。このエチレンの ABA に対する効果は、エチレンシグナルを伝達できない変異体

ein3-1, *etr1-1* を用いた場合(図 2A)や、エチレンレセプター阻害剤である 1-MCP 処理(図 2B)により抑制された。またエチレン合成阻害剤である AVG を処理すると *eto1-1* においても ABA による気孔閉鎖が見られたことから、ABA による気孔閉鎖に対するエチレンの阻害効果が確認された(図 2C)。

この阻害効果は孔辺細胞で特異的に発現する ABA 誘導遺伝子 *RAB18* の発現量が、ACC 添加により有意に減少したこと、また、*eto1-1* では WT と比べて全体的に減少していたことから示唆された(図 3)。

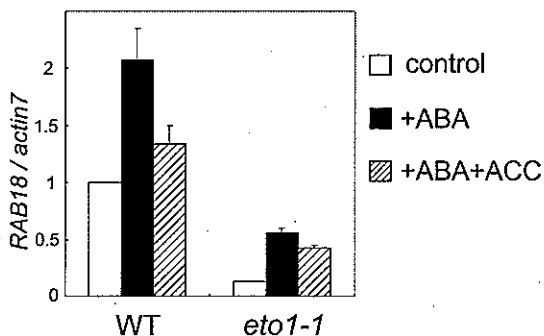


図 3. ABA 応答遺伝子 *RAB18* の発現量
RAB18 の発現量は ACC により減少する

気孔におけるエチレンと ABA の拮抗作用は植物体においても以下の実験から確かめられた。ABA を植物体の根から吸わせると、地上部の葉の気孔は閉鎖するが、*eto1-1* やエチレンガスで処理した WT の植物体では気孔閉鎖の抑制が見られた。また、ABA は乾燥ストレス時に増大することが知られているので、植物体の地上部を根から切り離し、根からの水分供給を断つことで乾燥ストレス状態に置いたところ、地上部での

RAB18 の発現量が増大し、気孔が開鎖した。しかし *eto1-1* やエチレンガスを処理した植物体の葉では気孔の開鎖に遅れが見られた。さらに、気孔開鎖の遅れは乾燥ストレス時の蒸散量の比較からも確認された。根元切断後の地上部の生重量の変化を測定したところ、WT に比べ *eto1-1* やエチレンガスを処理した WT の植物体

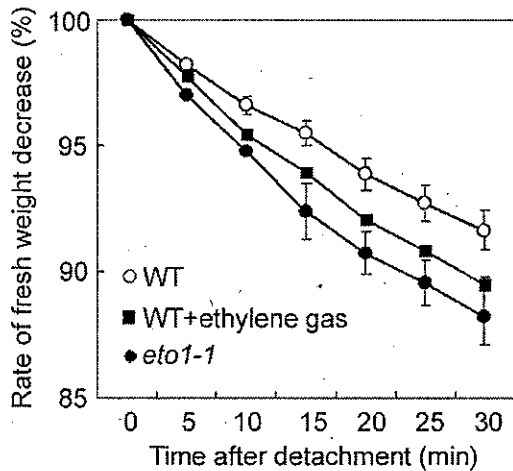


図4. 乾燥ストレス時の生重量変化

eto1-1 やエチレンガス処理したWTにおいては乾燥ストレス時の地上部生重量の減少割合が大きい

オーキシンは気孔における ABA の閉鎖作用を阻害することが知られている。本研究でも、サイトカイニン的一种である Benzyladenine (BA) とオーキシンの一种である Naphthaleneacetic Acid (NAA) は ABA による気孔閉鎖を抑制することが確認された(図 5A)。一方、サイトカイニンとオーキシンはともにエチレンの合成を誘導することが知られていることから、エチレンシグナル伝達変異体 *ein3-1* や (図 5B)、エチレン合成阻害剤を処理した表皮切片を用いて BA と NAA の効果を調べたところ、これらの ABA の気孔閉鎖に対する阻害効果が見られなくなった(図 5C)。このことから、気孔閉鎖における ABA に対するサイトカイニンとオーキシンの阻害作用はエチレンの合成を介したものである事が示唆された。

3. 孔辺細胞の液胞の体積変化から推測される ABA の作用に対するエチレンの阻害ポイント

気孔の開閉には気孔を取り囲む一對の孔辺細胞の形態変化が関わっている。そこで、気孔閉鎖時の孔辺細胞の体積変化を調べるために、細胞壁

では生重量の減少が大きかったことから、これらの場合には過剰なエチレンが気孔閉鎖を遅らせ、蒸散量を増大させたと考えられる(図 4)。

2. 気孔におけるサイトカイニンおよびオーキシンの相互作用

エチレンとは別の植物ホルモンであるサイトカイニンと

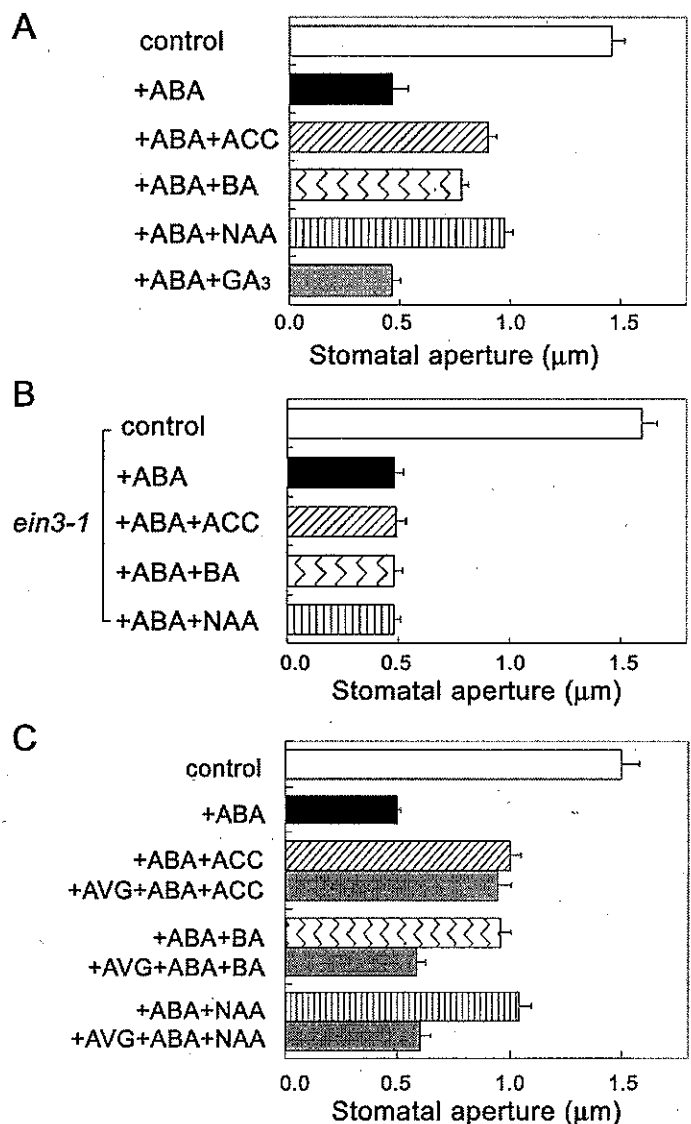


図5. サイトカイニンとオーキシンはエチレン合成を介してABAの気孔閉鎖を阻害する

- A ACC, BA, NAAはABAの気孔閉鎖を阻害する
- B エチレンを伝達できない変異体 *ein3-1* (B)及び
- C エチレン合成阻害剤AVG処理 (C)ではABAの気孔閉鎖に対するACC, BA, NAAによる阻害は見られない

を取り除いた孔辺細胞のプロトプラスト (GCP) を調製した。ABA 添加により GCP の直径は減少したことから、気孔閉鎖時には孔辺細胞の体積が減少することが示唆されたが(図 6A)、ABA のこの作用は ACC、BA、NAA によって抑制された。しかしこれらの阻害作用はエチレンシグナル伝達変異体 *ein3-1* や (図 6B)、エチ

レン合成阻害剤を処理すると (図 6C) 見られなくなることから、BA および NAA の効果は GCP においてもエチレン経路であることが示唆された。一方、成熟した孔辺細胞においては、液胞がその体積の大部分を占めていることから、気孔閉鎖時における孔辺細胞の液胞体積の変動を観察した。GFP と液胞膜タンパク質の一つである AtVam3p との融合タンパク質を発現することで、液胞膜を可視化したシロイヌナズナの形質転換体を用いた観察から、ABA 添加により気孔を閉鎖させると液胞体積も減少することがわかった。しかし、液胞の体積減少は ACC 添加によって抑制されたことから (図 7A)、エチレンは液胞からの水分流出を抑制することで ABA による気孔閉鎖を抑制している可能性が考えられた。

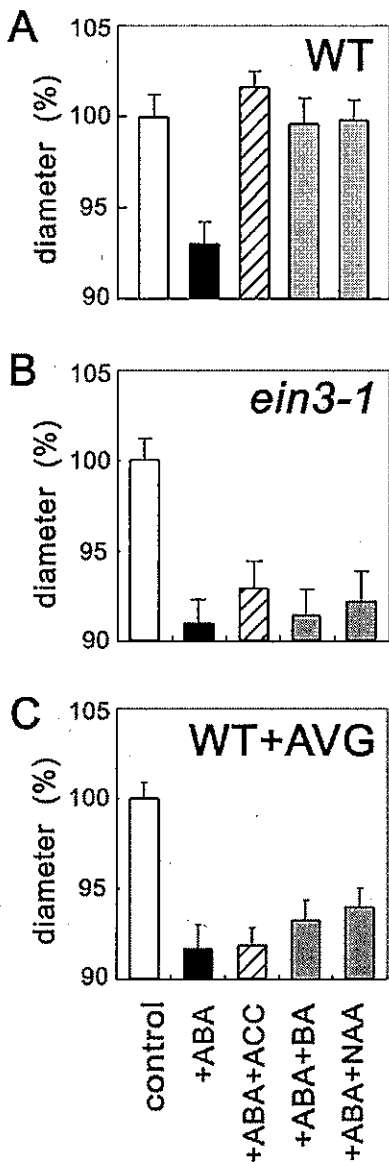


図6. エチレンはABAによる液胞からの水分流出を抑制している

- A プロトプラストの外直径の変化において ACC, BA, NAA は ABA の効果を抑制する
- B エチレンを伝達できない変異体 *ein3-1* (B) 及び
- C エチレン合成阻害剤 AVG 処理 (C) では ABA の浸透圧調節に対する ACC, BA, NAA による阻害は見られない

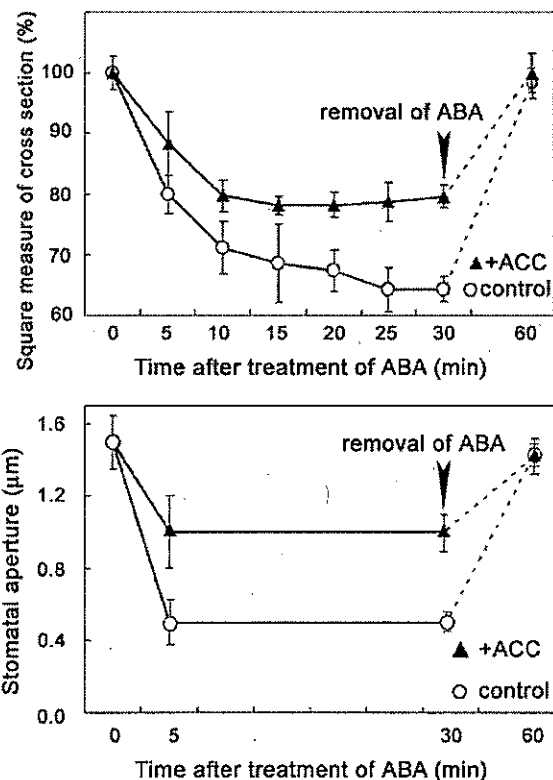


図7. エチレンは液胞からの水分流出を抑制することで ABA による気孔閉鎖を抑制している

- A ACC により ABA による液胞断面積の減少が抑制された
- B ABA による気孔閉鎖は液胞断面積の減少に先行する