

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 植物ホルモン・アブシジン酸に応答した気孔閉鎖のシグナル伝達機構の解析

氏 名 都築 朋

論 文 内 容 の 要 旨

植物の表皮に存在する気孔は、その開度を調節することにより、植物と大気間のガス交換を行っている。気孔は一对の孔辺細胞で構成され、青色光に応じて開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや、蒸散等のガス交換を促進する。一方、植物が乾燥ストレスに曝されると、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) に応答して気孔が閉鎖し、植物体からの水分損失を防ぐ。

これまでに、気孔開閉のシグナル伝達機構を解明するため、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、気孔開度変異体のスクリーニングが行われてきた。本研究では、単離された変異体の一つである、*rtl* (*rapid transpiration in detached leaves*) 1 について解析を進めた。*rtl* 変異体は、切り取った葉の重量減少が野生株に比べて著しいことから単離された変異体であり、その植物体は矮性でペールグリーンの表現型を示す。生育条件下の気孔開度は野生株とほとんど差はないものの、気孔閉鎖を誘導する ABA を 20 μ M 処理しても気孔が閉鎖しない ABA 非感受性の表現型を示す。原因遺伝子同定を進めたところ、*rtl* 変異体には第 5 染色体の Mg-キラターゼ H サブユニット (*CHLH*) 遺伝子にミスセンス変異 (L690F) を引き起こす 1 塩基置換 (C2068T) が存在することが明らかとなった。そこで野生型ゲノム *CHLH* を *rtl* 変異体に導入したところ、*rtl* 変異体の表現型が相補された。さらに、*CHLH* の発現抑制株 (*CHLH* RNAi) を作製し、解析を行ったところ、*rtl* 変異体と同様、矮性・ペールグリーンであり、ABA に応答した気孔の閉鎖がみられなかった。これらの結果から、*rtl* 変異体の原因遺伝子が *CHLH* であることが明らかとなった。

CHLH は、クロロフィル生合成に関わる酵素、Mg-キラターゼを構成するサブユニットの一つであり、近年、ABA との結合能から ABA 受容体としても機能し、種子発芽や根伸長、気孔閉鎖等様々な ABA 応答に関与することが報告されている。そこでまず、*CHLH* が ABA 受容体として機能しているかどうか確認するため、³H-ABA を用いて結合解析を行ったが、組換え *CHLH* と ABA の特異的な結合は観察されなかった。さらに、*rtl* 変異体は種子発芽や根伸長において正常な ABA 応答を示した。これらの結果から、*CHLH* は ABA 受容体ではないものの、気孔孔辺細胞特異的に ABA シグナル伝達経路に関わっていると考えられた。

孔辺細胞における ABA シグナル伝達経路では、Ca²⁺がセカンドメッセンジャーとして機能しており、Ca²⁺処理で気孔閉鎖を誘導することが報告されている。そこで、*rtl* 変異体の気孔に Ca²⁺処理を行ったところ、ABA による気孔閉鎖が誘導されることを見出した。この結果は、*CHLH* が孔辺細胞において

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を介して、ABA シグナル伝達経路に関与していることを示唆している。また、孔辺細胞における ABA 応答としては、気孔閉鎖以外に ABA 応答性遺伝子発現の変動や AKSs (ABA-responsive kinase substrates)タンパク質のリン酸化も知られているが、*rtll* 変異体の孔辺細胞はいずれも正常な ABA 応答を示した。一方、ABA は気孔閉鎖を誘導するだけでなく、孔辺細胞細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化による活性化を阻害して青色光に応答した気孔の開口を抑制し、効率的に気孔の閉鎖を促進することがこれまでの研究で明らかになっている。そこで、*rtll* 変異体の H^+ -ATPase のリン酸化が ABA によって阻害されるかどうか調べたところ、この変異体では、ABA が存在しているにもかかわらず、青色光による H^+ -ATPase のリン酸化が抑制されず、CHLH が ABA に応答した H^+ -ATPase の活性化阻害に関与していることが示された。

次に、孔辺細胞を含む表皮において CHLH を過剰発現させた植物の表現型解析を行った。この *CHLH* 過剰発現体 (*CER6::CHLH-GFP*) は、生育条件下でも気孔が閉じ気味であり、気孔閉鎖において ABA 高感受性を示した。そこで、乾燥ストレス耐性を解析したところ、野生株がほとんど枯死する条件でも、*CHLH* 過剰発現体は生存できることが確認された。この結果は、孔辺細胞における CHLH の発現量を増加させることで、植物に乾燥耐性を付与できることを示している。

ところで、クロロフィル生合成においては、Mg-キラターゼは D、H、I 各サブユニットの複合体で機能する。そこで、サブユニットの一つである I サブユニット (*CHLI*) のノックアウト変異体の気孔開度への ABA の効果を解析したところ、*rtll* と同様 ABA 非感受性を示したことから、CHLH は CHLI とともに Mg-キラターゼ複合体として、孔辺細胞の ABA シグナル伝達に影響を与えている可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究ではまず、CHLH が ABA 受容体としてではなく、細胞内 Ca^{2+} 変動を介して、孔辺細胞特異的に ABA シグナル伝達経路に関与していることを明らかにした。また、CHLH は ABA による気孔閉鎖だけでなく、細胞膜 H^+ -ATPase の脱リン酸化を介した気孔開口の阻害にも関与しており、さらには、CHLI を含めた Mg-キラターゼの複合体が孔辺細胞における ABA シグナル伝達経路に関与していることを示した。本研究により、ABA シグナル伝達機構における CHLH の役割を明確にすることができた。さらに、*CHLH* を孔辺細胞に過剰発現させることで気孔閉鎖を促進し、植物に乾燥耐性を付与することに成功し、今後、乾燥耐性作物の作出など、応用面への活用も期待される。