

## 研究

### 気孔の青色光効果と原形質膜のプロトンポンプ

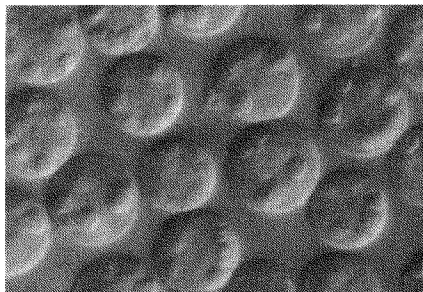
島崎研一郎（九州大学教養部生物学教室）

#### はじめに

気孔開孔は、原形質膜に存在する電位依存性の $K^+$ チャンネルを介した $K^+$ の取り込みにより引き起こされる。 $K^+$ 取り込みの駆動力を生じるのは同じ膜に存在する電位差形成性の $H^+-ATPase$ であり、この酵素が膜電位を過分極（細胞膜の内側がマイナス）させ、その電位に反応して $K^+$ チャンネルが開き $K^+$ の取り込みが起きることになる<sup>1,3,7)</sup>。この機構は根における $K^+$ の取り込みの際にも共通に働いていると考えられている。 $H^+-ATPase$ は根をはじめとした多くの植物組織に存在し、イオンの取り込み、気孔や葉沈の運動、成長などに関与しているが、その活性調節機構は不明の部分が多い<sup>5)</sup>。

気孔は青色光に敏感に反応して開孔する<sup>2)</sup>。青色光は光情報として孔辺細胞原形質膜のプロトンポンプを活性化し、 $K^+$ 取り込みの駆動力を形成することが明らかにされている<sup>1,7)</sup>。我々は、青色光シグナルがどのような機構でプロトンポンプへ伝えられ、どのような機構でポンプを活性化するのかについて研究を行なっている。ここでは、阻害剤を用いた研究から青色光情報伝達系にカルモジュリンやカルモジュリン依存のミオシン軽鎖キナーゼが関与することを示し<sup>8)</sup>、さらに阻害剤の作用点が特異的なものであることを報告する<sup>9)</sup>。

#### 材料と方法



気孔孔辺細胞プロトプラストはソラマメ (*Vicia faba*) 表皮からセルラーゼを用いて単離した<sup>6)</sup>。気孔開度はマルバツユクサ (*Commelina benghalensis*) の表皮を顕微鏡下で観察し対物マイクロメータを用いて測定した<sup>8)</sup>。青色光依存のプロトン放出は孔辺細胞プロトプラスト懸濁液のpH低下をガラスpH電極により測定した<sup>7,8)</sup>。

図1. ソラマメ孔辺細胞プロトプラスト

#### 結果と考察

図1はセルラーゼ処理により単離した孔辺細胞プロトプラストである。この懸濁液に青色光を短時間照射すると(30秒)プロトン放出が起こり約15分ほど続いた。表1にこの青色光依存の $H^+$ 放出量に対する各種プロテインキナーゼ阻害剤の効果を示した。ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤ML-9 (ML-7も同様である)が強い阻害効果を示したが、キナーゼA、キナーゼGの阻害剤H-8、キナーゼCの阻害剤H-7、およびカルモジュリンキナーゼIIの阻害剤KN-62はほとんど阻害効果を示さなかった<sup>8)</sup>。ミオシン軽鎖キナーゼはその活性をカルモジュリンに制御されることから、カルモジュリン拮抗剤の効果を調べた(表2)。期待されるように用いた拮抗剤のすべてが阻害効

果を示した。さらに、これらミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤やカルモジュリン拮抗剤はマ

表1 ソラマメ孔辺細胞プロトプラストからの青色光依存のH<sup>+</sup>放出に対する種々のプロテインキナーゼの効果。

阻害剤	濃度	H <sup>+</sup> 放出
	( $\mu$ M)	nmol H <sup>+</sup> $\mu$ g <sup>-1</sup> protein pulse <sup>-1</sup>
H-8	0	0.331 (100)
	50	0.334 (101)
	200	0.321 (97)
H-7	0	0.301 (100)
	50	0.276 (92)
	200	0.266 (88)
KN-62	0	0.368 (100)
	50	0.360 (98)
ML-9	0	0.619 (100)
	50	0.279 (45)
	100	0.129 (21)

表2 孔辺細胞プロトプラストからの青色光依存のH<sup>+</sup>放出に対するカルモジュリン拮抗剤の効果。

拮抗剤	濃度	H <sup>+</sup> 放出
		nmol H <sup>+</sup> $\mu$ g <sup>-1</sup> protein pulse <sup>-1</sup>
TFP	0	0.388 (100)
	10	0.376 (97)
	50 ( $\mu$ M)	0.141 (36)
compound 48/80	0	0.393 (100)
	1	0.298 (76)
	5 ( $\mu$ g/ml)	0.117 (30)
Prenylamine	0	0.323 (100)
	50	0.200 (62)
	100 ( $\mu$ M)	0.117 (30)

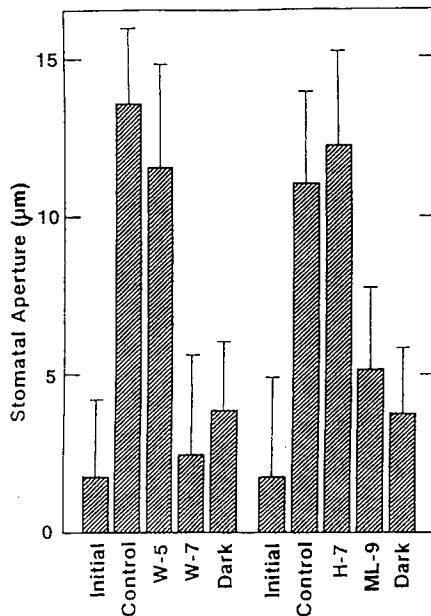


図2. 気孔開孔に対する阻害剤の効果

15分以上連続した(図3 a)。ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤ML-7を添加してくと青色光依存のH<sup>+</sup>放出は強く阻害されている。そこへ、フシコクシンを添加すると対照と同じようにH<sup>+</sup>放出が起こった(図3 b)。この結果は、ML-7は孔辺細胞の

ルバツユクサ表皮における光による気孔開孔を阻害した(図2)。以上の結果は、青色光情報が原形質膜H<sup>+</sup>-ATPaseに伝達される過程にカルモジュリン依存のミオシン軽鎖キナーゼが関与することを示している。阻害剤の効果が非特異的である可能性がある。例えば、用いた阻害剤が本来の阻害作用のほかにH<sup>+</sup>-ATPaseを直接阻害する場合、細胞全体のエネルギー代謝系を攪乱してH<sup>+</sup>-ATPaseの基質となるATP含量を下げるなどがその例である。その点を調べるためH<sup>+</sup>-ATPaseを活性化することが知られているカビ毒フシコクシンを用いた。すなわち、使用した阻害剤が情報伝達系に特異的に作用しているなら、その阻害剤の共存条件でもフシコクシン添加によるプロトン放出や気孔開孔が見られるはずである。対照では青色光短時間照射によりH<sup>+</sup>放出が誘導され約15分後に停止するが、そのあとフシコクシンを添加するとH<sup>+</sup>放出が起こり、

代謝系にはほとんど影響を与えていないことを示している<sup>9)</sup>。カルモジュリン拮抗剤 W-7 により青色光依存のプロトン放出は強く抑えられるが、フシコクシン添加により H<sup>+</sup>放出が起こった。しかし、対照の約 70% に留まった (図 3 c)。この部分的阻害は W-7 がカルモジュリン依存の原形質膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase や液胞のアニオンチャネルなどにも作用し、カルシウムホメオスタシスに一部損傷を与えたためと思われる。

一方、図 4 に示すように、W-7 や ML-7 に阻害された光によるマルバツユクサの気孔開孔はフシコクシン添加により回復した。以上の結果は、ML-7 や W-7 がおもに青色光情報伝達系を阻害することを示している。

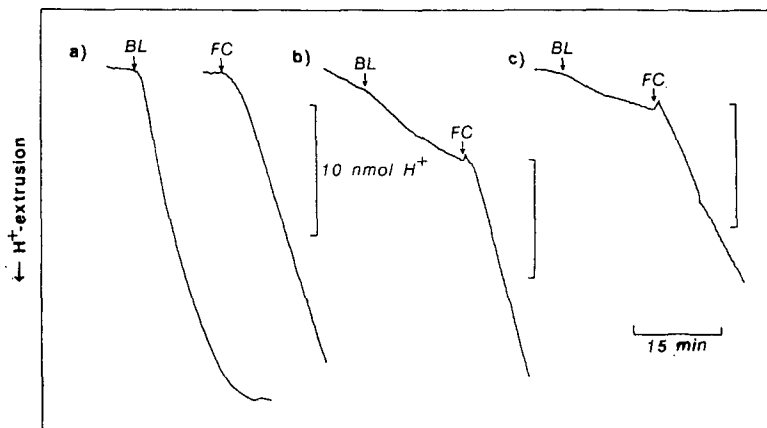
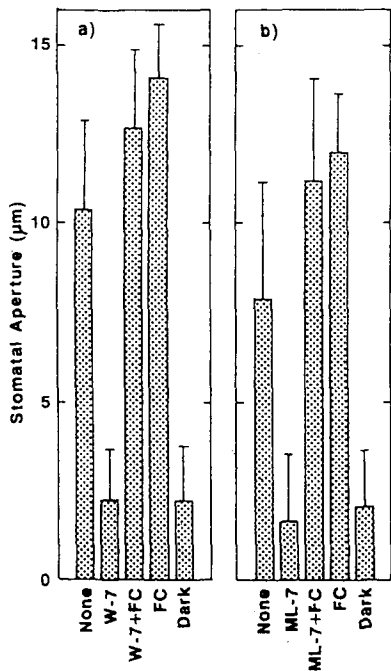


図 3. 青色光依存のプロトン放出の ML-7, W-7 による阻害とフシコクシンによる回復 (上図)。

図 4. 気孔開孔の W-7, ML-7 による阻害と、フシコクシンによる回復 (左図)。

以上、青色光シグナルがプロトンポンプに伝わる過程にカルモジュリン依存のミオシン軽鎖キナーゼが関与することを示した。しかし、この酵素の存在は植物細胞では知られていない。また、プロトンポンプの活性化機構についても不明の部分が多い。今後、ミオシン軽鎖キナーゼの存在やポンプ活性化機構について生化学的レベルで研究の進展を図りたい。

#### おわりに

孔辺細胞原形質膜 H<sup>+</sup>-ATPase は暗黒下では不活性化状態あるいは活性の低い状態で存在していると推定される。これが青色光受容体に吸収される青色光やクロロフィルに吸収される光により活性化される。つまり、孔辺細胞では光照射により人為的にポンプ活性を調節することができる。この特質を利用することにより、植物界に広く見られる青色光情報伝達系や "master enzyme<sup>5)</sup>" と言われる原形質膜 H<sup>+</sup>-

A T P a s e の活性制御機構を明らかにしたいと願っている。

#### 参考文献

- 1) Assmann, S.M., Simoncini, T. & Schroeder, J.I. (1985) Nature **318**: 285-287.
- 2) Iino, M., Ogawa, T. & Zeiger, E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 8019-8023.
- 3) Schroeder, J.I., Raschke, K. & Neher, E. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 4108-4112.
- 4) Marre, E. (1979) Annu. Rev. Plant Physiol. **30**: 273-278.
- 5) Serrano, R. (1989) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**: 61-94.
- 6) Shimazaki, K., Gotow, K. & Kondo, N. (1982) Plant Cell Physiol. **23**: 871-879.
- 7) Shimazaki, K., Iino, M. & Zeiger, E. (1986) Nature **319**: 324-326.
- 8) Shimazaki, K., Kinoshita, T. & Nishimura, M. (1992) Plant Physiol. **99**: 1416-1421.
- 9) Shimazaki, K., Omasa, K., Kinoshita, T. & Nishimura, M. (1993) Plant Cell Physiol. **34**: 1321-1327.

Blue light response of stomata and plasma membrane proton pump.

Ken-ichiro SHIMAZAKI

---

#### 連載

### 作物の根のつくりとはたらき

#### 0. はじめに

昨年、つくばで開催された根研究会第3回研究集会のもようが「農業共済新聞」に紹介されたことは、すでにご報告したところでありますが、これをきっかりに「農業共済新聞」において作物の根に関する記事を連載する企画について、編集部の下山さんから農業研究センターの小柳さんに打診がありました。この話があったとき、小柳さんは東北大学遺伝生態研究センターへ内地留学中で、協力はしたいが対応が難しいということでしたので、事務局の阿部さん、編集委員の中元さん、および森田が加わって原案を作成し、会員の方々のご協力をお願いしたうえで、この企画に全面的に支援し、今年の初め、10回分の連載が終了しました。今回の記事は判り易く書かれていますので、会員の方々が異なる分野を含めて全体を見渡すのには役に立つのではないかという提案が事務局からありましたので、「農業共済新聞」から転載の許可と執筆者の方々の承諾を頂いたうえで、3回程度に渡って連載することに致しました。

#### 1. 作物栽培と根（「農業共済新聞」1993年8月25日号より転載）

最近、神奈川県の大磯というところに引っ越しした。東京から東海道線で1時間と少し、そこからバスで15分ほど山側に入ったところである。周囲には、まだ畑が多い。長男（小学校1年）の夏休みの自由研究に、近くで栽培されている作物を調べてみると、トウモロ