

## 気孔細胞に存在する葉緑体の成り立ちとその機能

衞 淳太郎, 小畑 智暉, 宋 普錫  
九州大学 大学院 理学研究院  
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

### A new perspective on the feature and function of guard cell chloroplasts

Juntaro Negi, Tomoki Obata, Boseok Song  
Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University,  
744 Motoooka, Nishi-Ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

Keywords: Arabidopsis, Guard cell chloroplasts, Lipid metabolism, Stomatal movement

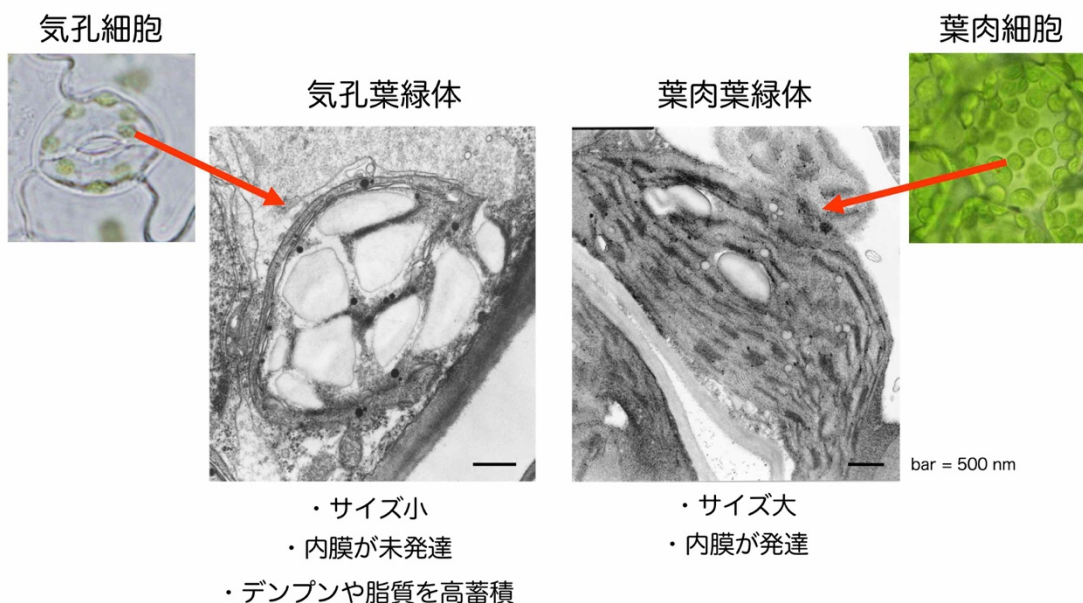
DOI: 10.24480/bsj-review.12a5.00198

#### 1. はじめに

陸上植物は組織・細胞ごとに、それぞれ異なる特徴を持つ葉緑体を保持しており、葉肉細胞の葉緑体は、植物の光合成において中心的な役割を果たしている。一方、植物のガス交換を担う気孔（孔辺）細胞にも葉緑体が存在するが、その機能については1世紀以上、研究者の間で議論されているものの結論が出ておらず (Zeiger *et al.* 2002)、また成り立ちに関しては全くわかっていない。最近、筆者らは気孔細胞の葉緑体が欠失したシロイヌナズナ変異体を単離し、その変異体の解析から、気孔葉緑体はCO<sub>2</sub>や光などの環境情報感知に必須であることを明らかにした (Negi *et al.* 2018)。また気孔葉緑体は葉肉細胞の葉緑体とは異なる独自の脂質代謝バランスを維持しており、そのことが気孔葉緑体の形成に寄与していることを明らかにした。本稿では、これらの研究成果および、これまでに行われてきた気孔葉緑体研究を概説し、なぜ気孔細胞は葉緑体を保持するのか？その生理学的意義について議論する。

#### 2. 気孔葉緑体の特徴

ランの一種であるパフィオペディラム (*Paphiopedilum*) を除いて、ほとんどの植物種において気孔細胞には葉緑体が存在する。気孔細胞に含まれる葉緑体の数は植物種によって大きく異なるが、平均10-15個程度である。気孔葉緑体は、葉肉葉緑体と比較して1) サイズが一回り小さく、2) チラコイド膜が発達しておらず、3) デンプンを高蓄積するといった形態的特徴を持つ (図1)。また、気孔葉緑体が示すユニークな性質として、葉肉葉緑体は光が当たるとデンプンを蓄積し、暗闇になると分解するのに対し、気孔葉緑体は暗闇でデンプンを蓄積し、光が当たると分解する (Willmer & Fricker 1996)。また、葉肉葉緑体の集光アンテナタンパク質LHCPIIは光が当たるとリン酸化され、暗闇で脱リン酸化されるが、気孔葉緑体のLHCPIIは真逆の反応を示す (Kinoshita *et al.* 1993)。またCO<sub>2</sub>固定の主要酵素であるルビスコの活性が気孔葉緑体では葉肉葉緑体と比較して低いことが報告されている (Gotow



**図1 気孔葉緑体と葉肉葉緑体の構造的な違い**

シロイヌナズナの気孔葉緑体及び葉肉葉緑体を電子顕微鏡で観察した際の画像。白く抜けている構造体は貯蔵デンプン。図の一部はNegi *et al.* (2018)から転載

*et al.* 1988)。これらの特徴から、気孔葉緑体は葉肉葉緑体とは異なる機能を有し、独自の形成メカニズムが存在すると推察される。これまで、気孔葉緑体は光合成装置としての機能に着目した研究が主におこなわれており、気孔葉緑体は蓄積したデンプンや光合成産物を、リンゴ酸やショ糖に変換することで気孔細胞の浸透圧を上昇させ、気孔開口を促進すると考えられている (Willmer & Fricker 1996, Horrer *et al.* 2016)。また同時に、気孔開口を駆動する細胞膜型 H-ATPase (プロトンポンプ) に ATP を供給し (Tominaga *et al.* 2001)、青色光に対する気孔開口応答にも関与している (Suetsugu *et al.* 2014) と考えられている。このように、気孔葉緑体は気孔の開口に関与していることが示唆されているが、具体的にどのように機能しているのか、また気孔細胞に葉肉葉緑体とは異なる葉緑体がどのように形成されるのかについては不明な点が多いのが現状である。

### 3. 気孔葉緑体の特異的に喪失した変異体の単離

気孔は植物の体表面に分布し、体内と大気環境とをつなぐゲートとして、植物がガス交換をおこなうための必須の器官である。気孔が開くと CO<sub>2</sub> 取り込みが促進され、光合成効率が上昇する一方、水分の喪失や外敵の侵入というリスクを伴う。よって気孔開閉は外部環境に鋭敏に対応し制御されなければならない。そのため、気孔は、CO<sub>2</sub>、光、乾燥ストレス、植物病原菌刺激などの外部環境情報と、全身の代謝バランスなどの生体情報の集積地となっている。植物個体の成長や生存のために最適な体内環境を維持するように、気孔はこれらの情報を統合し、そのガス交換効率を最適化する情報処理システムを備えていると考えられる。筆者らはこの情報処理システムに着目し、これまでに、ハイスループットサーマルイメージングの技法を用いたシロイヌナズナ変異体スクリーニングを精密に制御された CO<sub>2</sub> 環境下で遂行し、気孔の機能、情報制御システムに係る分子素子の探索を精力的に行ってきた (Negi *et al.* 2008, 2013, 2014)。それらの研究の中から、気孔の葉緑体特異的にクロロフィル自家蛍

光が観察されない *gles1* (*green less stomata 1*) 変異体が単離された (Negi *et al.* 2018, 図 2)。電子顕微鏡を用いてプラスチドの状態を観察すると, *gles1* 変異体は, 葉肉細胞の葉緑体は正常であるが, 気孔細胞の葉緑体はチラコイド膜がほとんど観察されず, 気孔細胞特異的に葉緑体を喪失した変異体であることが判明した。気孔における葉緑体の役割を明らかにするために, *gles1* 変異体を用いてさまざまな環境シグナルに対する気孔開閉の応答を調べた結果, *gles1* 変異体では光に対する気孔開口応答が低下していた。また高  $\text{CO}_2$  による気孔閉鎖応答も阻害され, 気孔閉鎖を駆動する S 型陰イオンチャネルの  $\text{CO}_2$  による活性制御が損なわれていた。つまり, 気孔葉緑体は気孔が開く応答のみならず,  $\text{CO}_2$  によって気孔が閉じる反応にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 4. 気孔葉緑体はユニークな脂質代謝バランスを保持している

*gles1* 変異体の原因遺伝子は, 葉緑体包膜上の脂質輸送体 TGD (trigalactosyldiacylglycerol) 複合体のサブユニットの一つである TGD5 をコードしていた。葉緑体膜を構成する脂質は葉緑体形成に必須であり, これらは色素体経路と小胞体経路と呼ばれる 2 つの経路から合成される (Somerville & Browse 1996, Benning *et al.* 2006)。色素体経路は色素体内で脂質合成が完結する経路であるが, 小胞体経路は色素体で合成された脂質が一度色素体から出て, 小胞体を経由して, また色素体に戻る脂質合成経路である (図 3)。TGD 複合体は, 小胞体経路において小胞体から葉緑体への脂質輸送を担っていると考えられている (Roston *et al.* 2012, Fan *et al.* 2015)。この TGD 複合体は気孔細胞, 葉肉細胞の両細胞で発現しており, なぜ *gles1* 変異により気孔細胞のみ葉緑体形成が阻害されたのかは不明であった。その原因を探るべく, 葉肉細胞と気孔細胞の脂質組成の違いを明らかにすることにした。具体的には, 植物の葉から高純度かつ大量の孔辺細胞プロトプラストと葉肉細胞プロトプラストを単離した後, 脂質を抽出し, LC-MS/MS システムにより脂質組成解析をおこなった。その結果, 気孔細胞では, 葉肉細胞と比較して色素体経路由来の脂質が減少しており, 一方で小胞体経路から合成され

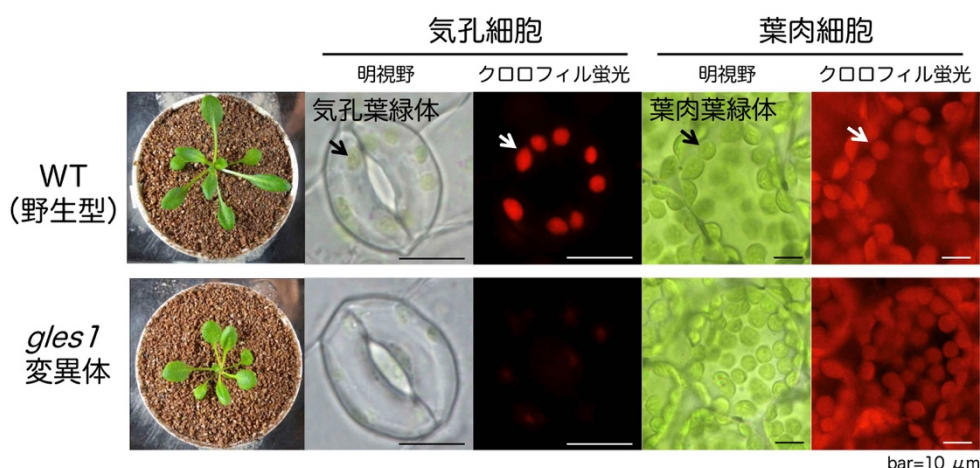


図 2 *gles1* 変異は気孔葉緑体を特異的に欠損させる

野生株の植物では, 気孔細胞、葉肉細胞ともに葉緑体の自家蛍光 (クロロフィル蛍光) が観察されるが, *gles1* 変異体では気孔細胞の葉緑体のみクロロフィル蛍光がほとんど観察されない。図の一部は Negi *et al.* (2018) から転載

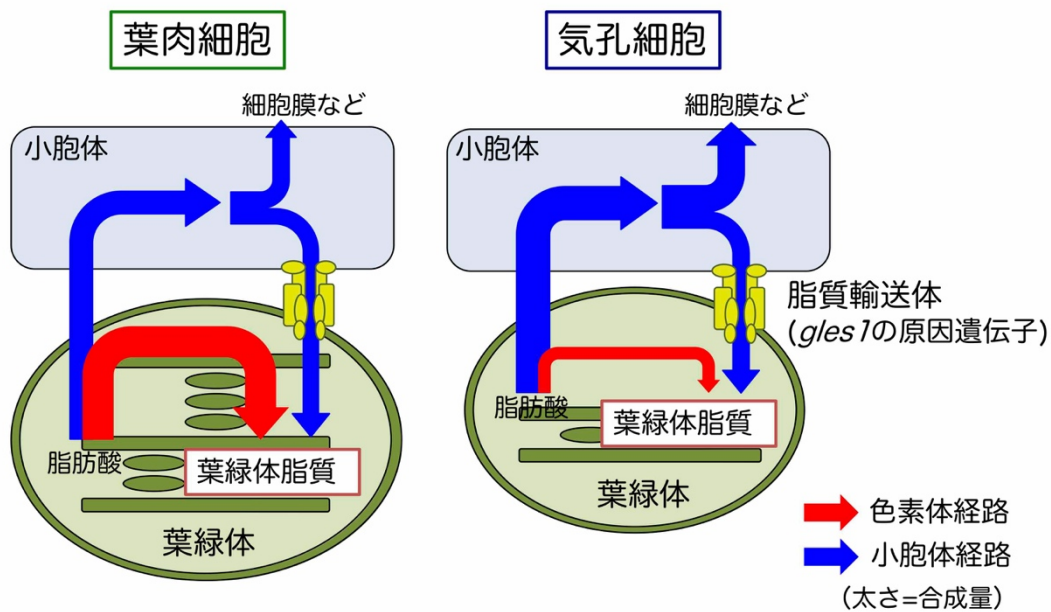


図3 気孔細胞が持つ特徴的な脂質代謝バランス

陸上植物の葉緑体膜脂質は、色素体経路（赤矢印）と小胞体経路（青矢印）の2つの経路から合成される。気孔細胞では葉肉細胞と比較して色素体経路が退化しており、小胞体経路が気孔細胞の葉緑体形成に中心的な役割を果たしている。

る脂質が増加していた（図3）。つまり気孔細胞と葉肉細胞では2つの脂質経路に対するバランスが異なり、気孔細胞では色素体経路が退化しており、その代わりに小胞体経路が中心となって、葉緑体脂質を合成していることが分かった（Negi *et al.* 2018）。したがって、小胞体経路が遮断された *gles1* 変異体では、気孔細胞において葉緑体形成が阻害されたと考えられる。現在のところ、気孔細胞が小胞体経路優位な脂質代謝バランスを保持する生理学的な意味は不明である。小胞体経路から作られる貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールは気孔開口時に分解され、気孔開口に必要な ATP を供給すると報告されている（McLachlan *et al.* 2016）。気孔細胞は小胞体経路への脂質投資を増やすことで、迅速な気孔開閉調節を可能とする細胞内環境を構築しているのかもしれない。また最近、筆者らは気孔細胞の他に根組織でも小胞体経路が優位になっており、*gles1* 変異体では地上部切除により誘導される根の葉緑体形成も阻害されることを見出した（Obata *et al.* 2021）。この結果は、気孔細胞同様、根細胞でも葉緑体形成が小胞体経路から供給される脂質に依存することを示唆している。

## 5. 今後の展望

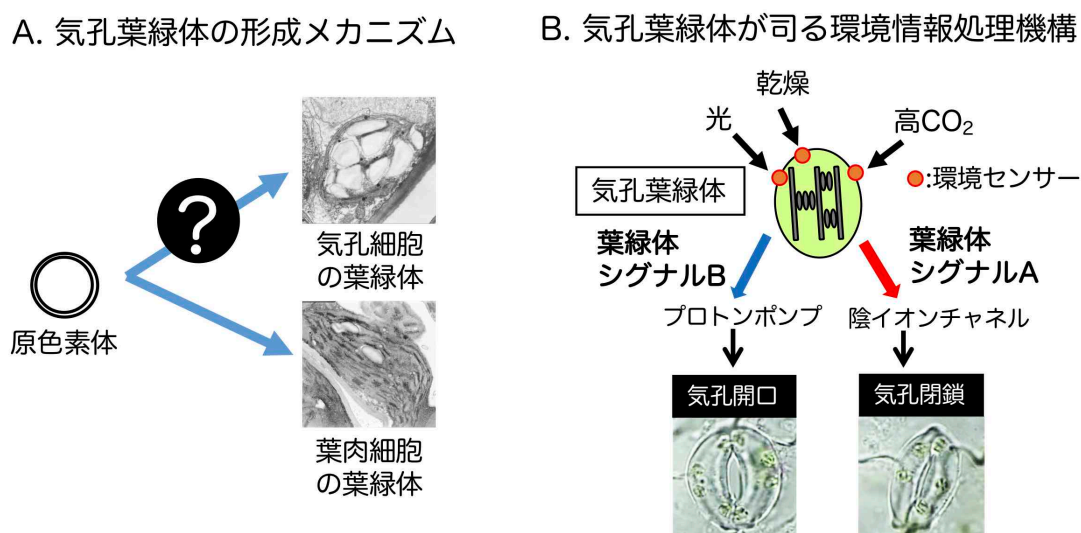
気孔葉緑体は葉肉葉緑体とは異なる独自の脂質代謝バランスを保持しており、また気孔の開閉に必須であることが分かってきた。しかし、このような特殊な気孔葉緑体はどのように形成されるのか、また気孔葉緑体はどのような分子メカニズムで気孔開閉を制御しているのか、大きく2つの謎が残されている。

まず、最初の疑問に関して筆者らは、気孔葉緑体と葉肉葉緑体に違いを生み出す分子的なメカニズムがあるのではないかと予想している（図4A）。そこで、新たな順遺伝学的アプローチから、特殊な機能を持った気孔葉緑体の形成メカニズムの一端を明らかにしようと試み



ている。具体的には、化学変異処理したシロイヌナズナ M2 植物約 1 万個体から、気孔葉緑体のクロロフィル蛍光の有無に着目した目視によるスクリーニングを行い、*gles1* 変異体と同様に気孔細胞特異的に葉緑体形成が阻害された変異体を新たに 4 つ単離し、*achs* (*achlorophyllous stomata*; *achs1-achs4*) と命名した (Song *et al.* 投稿準備中)。これらの変異体はいずれも光や  $\text{CO}_2$  に対する気孔応答性が低下しており、気孔開閉調節における気孔葉緑体の重要性が再確認された。今後、*achs* 変異体の原因遺伝子の機能解析から、気孔葉緑体の分化制御を統括する因子を同定し、気孔細胞と葉肉細胞の葉緑体に違いを生み出す仕組みに迫りたいと考えている。

また、これまで筆者らは気孔葉緑体が気孔閉鎖を駆動する細胞膜型アニオンチャネルの活性制御にも関わることを明らかにした (Negi *et al.* 2018)。この結果は、気孔葉緑体から細胞膜へ何らかの情報伝達があることを示唆している。そこで、2 つ目の疑問に関して筆者らは、気孔葉緑体には光、 $\text{CO}_2$ 、乾燥など各種環境シグナルを感知するセンサーが存在し、これらの情報を統合し、気孔の開閉の要となるイオンチャネルやポンプに未知の葉緑体シグナルを伝えるという仮説をたてている (図 4B)。この可能性を検証するために、筆者らは高純度の無傷気孔葉緑体を大量に単離精製する技法を開発中であり、気孔葉緑体の成り立ちや機能をより深く知る上で有用なツールになると考えられる。



**図 4 気孔葉緑体研究における今後の課題**

気孔葉緑体と葉肉葉緑体の違いを生み出す仕組み(A)、気孔葉緑体が気孔の開閉を制御する分子メカニズム(B)については未解明である。これまでの研究を踏まえて立てた仮説を図示した。気孔葉緑体形成を統括する因子や気孔葉緑体が発信するシグナルが存在するかもしれない。

葉緑体は光合成をおこなう細胞小器官として認知されているが、これまでの研究に鑑みると、気孔葉緑体は単なる光合成装置ではなく、環境を感知し指示を出す、いわば司令塔として機能するのではないかと考えられる (本シンポジウム企画で提案されたオルガネラとその外側との積極的な関わりの一例)。気孔は葉肉細胞の光合成に必要な  $\text{CO}_2$  の取り込みを担うバルブである。葉肉葉緑体の  $\text{CO}_2$  要求性にすばやく答えるため、気孔葉緑体には環境変化を感知する役割が付与され、光合成に最適な開度調節を実現しているのかもしれない。今後、気

孔葉緑体が担う環境情報処理システムを分子解明することで、なぜ気孔細胞は葉緑体を保持するのか？植物科学の長年の謎に決着をつけることができると期待される。

## 謝辞

九州大学理学研究院の射場教授をはじめ、カリフォルニア大学 SD 校の Schroeder 教授、岡山大学農学部宗正准教授に感謝申し上げます。本研究は、内藤記念科学奨励金、住友財団基礎科学研究助成、日本学術振興会・科学研究費補助金 基盤研究 C (18K06293)、特別研究員奨励費 (20J13660) の支援を受けた。

## 引用文献

- Benning, C., Xu, C., & Awai, K. 2006. Non-vesicular and vesicular lipid trafficking involving plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 241–247.
- Fan, J., Zhai, Z., Yan, C., & Xu, C. 2015. *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell* 27: 2941–2955.
- Gotow, K., Taylor, S., & Zeiger, E. 1988. Photosynthetic carbon fixation in guard cell protoplasts of *Vicia faba*: evidence from radiolabel experiments. *Plant Physiol.* 86: 700–705.
- Horrer, D., Flütsch, S., Pazmino, D., Matthews, J.S., Thalmann, M., Nigro, A., Leonhardt, N., Lawson, T., & Santelia, D. 2016. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening. *Curr. Biol.* 26: 362–70.
- Kinoshita, T., Shimazaki, K., & Nishimura, M. 1993. Phosphorylation and dephosphorylation of guard-cell proteins from *Vicia faba* L. in response to light and dark. *Plant Physiol.* 102: 917–923.
- McLachlan, D.H., Lan, J., Geilfus, C.M., Dodd, A.N., Larson, T., Baker, A., Hōrak, H., Kollist, H., He, Z., Graham, I., et al. 2016. The breakdown of stored triacylglycerols is required during light-induced stomatal opening. *Curr. Biol.* 26: 707–712.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., & Iba, K. 2008. CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483–486.
- Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J.I., Nishitani, K., Yanagisawa, S. et al. 2013. A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 479–484.
- Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Kusumi, K., & Iba, K. 2014. New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 55:241–250.
- Negi, J., Munemasa, S., Song, B., Tadakuma, R., Fujita, M., Azoulay-Shemer, T., Engineer, C.B., Kusumi, K., Nishida, I., Schroeder, J.I. et al. 2018. Eukaryotic lipid metabolic pathway is essential for functional chloroplasts and CO<sub>2</sub> and light responses in *Arabidopsis* guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115: 9038–9043.

- Obata, T., Kobayashi, K., Tadakuma, R., Akasaka, T., Iba, K., & Negi, J. 2021. The endoplasmic reticulum pathway for membrane lipid synthesis has a significant contribution toward shoot-removal-induced root chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab009>
- Roston, R.L., Gao, J., Murcha, M.W., Whelan, J., & Benning, C. 2012. TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 287: 21406–21415.
- Somerville, C., & Browse, J. 1996. Dissecting desaturation: Plants prove advantageous. *Trends Cell Biol.* 6: 148–153.
- Suetsugu, N., Takami, T., Ebisu, Y., Watanabe, H., Iiboshi, C., Doi, M., & Shimazaki, K. 2014. Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9: e108374.
- Tominaga, M., Kinoshita, T., & Shimazaki, K. 2001. Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H<sup>+</sup> pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant Cell Physiol.* 42: 795–802.
- Willmer, C.M., & Fricker, M.D. 1996. *Stomata* 2nd edition-Chapman & Hall, London.
- Zeiger, E., Talbott, L.D, Frechilla, S., Srivastava, A., & Zhu, J. 2002. The guard cell chloroplast: A perspective for the twenty-first century. *New Phytol.* 153:415–424.