

氏名	MD. SARWAR JAHAN
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3757号
学位授与の日付	平成20年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Roles of glutathione in abscisic acid signaling in guard cells of <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ孔辺細胞のアブシジン酸シグナリングにおけるグルタチオンの役割)
論文審査委員	教授 村田 芳行 准教授 中村 宜督 教授 木村 吉伸

学位論文内容の要旨

Abscisic acid (ABA) induces stomatal closure via a signal cascade which closely involves redox regulation of proteins and low-molecular-weight compounds. Glutathione (GSH), one of the most abundant low molecular-weight thiol compounds maintains redox homeostasis under normal and stressful conditions in plants. In order to clarify whether GSH is involved in the redox regulation of stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*, we studied ABA-induced stomatal closure using the GSH deficient mutants, cadmium-sensitive (*cad2-1*), which is deficient in the first GSH biosynthesis enzyme γ -glutamylcysteine synthetase (ECS) and chlorinal-1 (*chl1-1*), which is defective in light harvesting protein of photosystem II and the GSH-decreasing chemical, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). MCB staining showed that guard cells contained a larger amount of GSH than other cells of leaf. GSH contents in guard cells decrease along with ABA-induced stomatal closure. In wild-type plants, depletion of GSH by CDNB enhanced ABA sensitivity of stomata. In addition, genetical depletion of GSH mutants, i.e. *chl1-1* and *cad2-1*, plants showed higher stomatal closure to ABA than that of wild types. In *cad2-1* and *chl1-1* plants, glutathione monoethyl ester (GSHmee) restored GSH level in guard cells and reduced ABA sensitivity. Depletion or increased of GSH did not significantly increase or decrease the production of reactive oxygen species (ROS). GSH did not affect activation of ICa currents by ABA in wild. These results suggest that GSH could modulate some signaling factors downstream of ROS production in ABA signaling in guard cells.

Isothiocyanates (ITCs), a degradation product of the glucosinolates, which can be generated from leaf epidermis cell walls of *Arabidopsis* plants during wound of leaf tissues by pathogens or anyway. We investigated the function of BITC in guard cells signaling of *Arabidopsis*. Concentration of ITCs (BITC and AITC) at 50 and 100 μ M caused a progressive induction of stomatal closure than that of control plants illuminated without ITCs. Pretreatment of guard cells with 25 μ M diphenylene iodonium (DPI), 100 units/mL catalase, or 100 μ M 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) significantly prevented BITC-induced stomatal closures. BITC increased the production of ROS in guard cells of wild types in a dose-dependent manner. Pretreatment of DPI significantly decreased BITC-induced ROS production and BITC-induced ROS production was impaired in guard cells of *atrbohD/F* plants. BITC-induced increased NO production was largely suppressed by cPTIO. ABA-induced stomatal closure was unchanged in wild types in the presence of BITC. In ABA-deficient mutant *aba2-2*, BITC-induced increases stomatal closure and ROS production in guard cells. BITC decreased GSH levels of guard cells in a dose-dependent manner. Guard cells pretreated with CDNB increased BITC sensitivity and N-AcetylCysteine (NAC) decreased BITC sensitivity of stomata. Our results support that BITC induced stomatal closure via a signaling pathway involving ROS and NO production and redox regulation by BITC, thus interfering with the continuous invasion of insects through the closing of stomatal pores, suggesting the function of BITC on upstream of ROS production in ABA signaling in guard cells.

論文審査結果の要旨

本論文は、高等植物のアブシジン酸誘導気孔閉口機構を解明するために、孔辺細胞のアブシジン酸シグナリングにおけるグルタチオンの役割を明らかにしようとしたものである。

孔辺細胞内のグルタチオン量を測定し、葉肉細胞や他の表皮細胞よりも多量のグルタチオンが孔辺細胞に蓄積していることを明らかにした。

アブシジン酸誘導気孔閉口時のグルタチオン量の経時的变化を調べ、アブシジン酸添加後、気孔口径の減少とともにグルタチオン量が減少した。

次に、CDNB 処理によって孔辺細胞内のグルタチオンを減少させた野生株を用いて、アブシジン酸に対する応答を調べた。CDNB 処理区は、未処理区に比べて、アブシジン酸感受性が上昇していることを明らかにした。

また、孔辺細胞内のグルタチオン集積が低い変異株 *cad2-1* と *chl-1* を用いて、アブシジン酸に対する応答を調べた。両変異株ともに、アブシジン酸に対する応答性が上昇していた。そして、GSHmee 処理によって、これら変異株の孔辺細胞内のグルタチオン量を回復させた場合、野生株と同様のアブシジン酸応答性を示した。

最後に、孔辺細胞内グルタチオンが及ぼす ROS 産生と原形質膜カルシウム（非選択性カチオン）チャンネルの活性化への影響を調べた。どちらへも顕著な影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、グルタチオンが孔辺細胞内のアブシジン酸シグナリングにおいて、ROS 産生や原形質膜カルシウム（非選択性カチオン）チャンネルの活性化よりも下流で機能していることを明らかにした。また、孔辺細胞の酸化還元状態の維持の重要性を明らかにした。気孔開閉運動を通じた耐乾燥性植物の作出・選抜のための重要な知見が得られた。

本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の基礎となるものである。従って、本審査委員会は本論文が博士（学術）の学位論文に値すると判断した。