

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2014

課題番号：21114002

研究課題名(和文)植物におけるCO₂シグナル伝達の分子遺伝学的解析研究課題名(英文)New approaches to the plant CO₂ sensing and signaling

研究代表者

射場 厚(Iba, Koh)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10192501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 96,900,000円

研究成果の概要(和文)：気孔は植物がガス交換を行うための器官である。気孔は、光や湿度、CO₂といった大気成分、エリクター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である。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高度の情報処理システムを備えている。本研究においては、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変異体スクリーニングを精密に制御されたCO₂環境下で遂行し、CO₂シグナル伝達因子HT1、そのエフェクター因子SLAC1、気孔機能化因子SCAP1、気孔応答活性化因子PATROL1などの新規因子の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：CO₂ acts as an environmental signal that regulates stomatal movements. In contrast to our advanced understanding of light and drought stress responses in guard cells, the molecular mechanisms underlying stomatal CO₂ sensing and signaling are largely unknown. Leaf temperature provides a convenient indicator of transpiration, and can be used to detect mutants with altered stomatal control. To identify genes that function in CO₂ responses in guard cells, CO₂ insensitive mutants were isolated through high-throughput leaf thermal imaging. The isolated mutants are categorized into three-groups according to their phenotypes: (1) impaired in stomatal opening under low CO₂ concentrations; (2) impaired in stomatal closing under high CO₂ concentrations; (3) impaired in stomatal development. Characterization of these mutants has begun to yield insights into the mechanisms of stomatal CO₂ responses.

研究分野：生物学

キーワード：CO₂ 高等植物 気孔 シグナル伝達 サーモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

植物は固着生活を営むことから、最初に根づいた土地の環境と栄養条件に生涯にわたって束縛される。また、栄養条件は環境にともなって大きく変動するため、その変動を鋭敏に感知し、物質代謝や遺伝子発現を適切に制御することは、植物が個体機能を維持していくための、きわめて重要な適応応答である。近年では、自然による栄養条件の変動に加え、人類の活動にともなう変動が、植物の生存を脅かす要因として顕在化している。とりわけ、温室効果ガスである CO₂ の大気中濃度は、産業革命以降、かつてないペースで上昇しており (IPCC, 2007)、農業生産や砂漠化、森林植生などに与える影響が強く懸念されている。これまでに、CO₂ 濃度の上昇が植物の生長におよぼす影響を評価する研究は数多く行われてきたが、これらのほとんどは、炭素栄養の根本形態である CO₂ を除く、他の栄養条件が充足していることを暗黙の前提と見なしてきた。また、CO₂ の濃度変化が細胞の応答性や組織の形態に与える影響も、多くの研究において見過ごされている。CO₂ 濃度の上昇は、短期的にバイオマスの増加に寄与するが、炭素栄養の過多により、栄養塩類が相対的に不足すると、やがては物質生産効率が飽和することが示唆されている (Johnson, 2006)。また、CO₂ のゲートである気孔の開鎖と、気孔密度の低下が促されるため (Teng *et al.*, 2006)、長期的には CO₂ の吸収がフィードバック的に制限されることが予想される。しかしながら、植物が環境の CO₂ 濃度を感知し、その情報を気孔開度や形態形成に反映させるメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

研究代表者らは、植物における CO₂ シグナルの感知と情報伝達の分子メカニズムを解明するために、CO₂ の濃度変化に依存した気孔開閉に着目し、それにとまなう葉面温度の微小な変化を検出するためのサーマルイメージング法を開発した。さらに、この手法を用いたスクリーニングにより、CO₂ 濃度に依存した気孔応答に異常を示す、シロイヌナズナの突然変異体を単離する作業に取り組んできた (Hashimoto *et al.*, 2006; Negi *et al.*, 2008)。これまでに得られた変異株の一つ、*ht1* (*high leaf temperature 1*) は、低 CO₂ 環境において高い葉面温度を示す変異体として見出したものである。*ht1* 変異の原因遺伝子を同定したところ、孔辺細胞において特異的に発現するプロテインキナーゼであった。また、この変異体は青色光 (開口シグナル) やアブシジン酸 (閉口シグナル) など、他の気孔開閉シグナルには正常な応答性を示した (Hashimoto *et al.*, 2006)。これらの結果は、HT1 キナーゼが CO₂ に特異的な経路において機能するシグナル伝達因子であることを示している。このように、CO₂ シグナルに依存した気孔開閉を統御するメカニズムについては、その解明に向けた糸口が見出されたものの、現実には 1 つの制御因子が同定されたに過ぎない。また、短期的な CO₂ 応答としての気孔開閉にかかわる制御因子が、気孔密度の変化など、より長期的な CO₂ 応答に関与しているか否かは定かではない。

2. 研究の目的

本研究課題では、現状では“点”(すなわち HT1 キナーゼ) でしか捉えられていない、CO₂ シグナルに基づく気孔開閉の制御メカニズムについて、“線”(情報伝達を構成する

因子)、そして“面”(制御因子相互のネットワーク)のレベルに、その知見を拡げること为目标とする。その手段として、生化学的手法により、HT1 キナーゼの標的タンパク質、あるいはCO₂の感知からHT1 キナーゼに至る上流と下流の相互作用因子を探索する。これらの解析から、CO₂ 応答にともなう情報伝達と恒常性制御を担う新規基幹因子の探索を試みる。

植物によるCO₂の吸収と固定化は、すべての生命を支える食糧生産の根源的プロセスであると同時に、地球温暖化問題の深刻性が現実味を帯びて実感され始めている昨今において、温室効果ガスを削減し、持続可能な循環型社会を実現するための、唯一無二の解決手段を提供するものである。換言すれば、このプロセスが破綻したとき、文明社会の持続可能性は潰えることになる。しかしながら、現状においては、CO₂環境の変化が植物の生産性におよぼす影響と、その背景にある植物の生長制御の分子メカニズムは、ほとんど理解されていない。本研究により明らかとなる、CO₂シグナルの感知と情報伝達に関する知見は、環境の高CO₂化にともなう植生の変化を的確に予測し、実効性の高い環境政策を講じるための有力な判断基準となる。

3. 研究の方法

(1) CO₂シグナルに対する短期的応答を欠損した変異体の遺伝学的解析

サーマルイメージング法により単離したCO₂非感受性突然変異体について、原因遺伝子のラフマッピングを行った後、全ゲノムシーケンスを行って、領域内変異部位の同定や候補遺伝子タグラインなどの解析から、原因遺伝子を特定する。さらに、エピスタシス解析

により相補群に分類し、新規遺伝子座の関与が明らかとなった系統については、ポジショナルクローニングを行う。また、遺伝子機能のCO₂シグナルに対する特異性を検証するために、各変異体について、気孔開度やその他の形質における、光やアブシジン酸に対する応答性を解析する。ゲノムシーケンシング、ロックアウト系統のフェノタイプ解析、および遺伝子導入による機能的相補などを通じて、CO₂非感受性突然変異体の原因遺伝子を同定する。以後の解析手法は、推定される遺伝子機能に応じて各様に異なるが、発現の組織特異性、遺伝子産物の細胞内局在および、これらの発現様式におよぼすCO₂濃度の影響については、全遺伝子の共通項目として解析を行なう。

(2) 植物のCO₂応答にともなう恒常性制御の分子遺伝学的解析

CO₂に対する長期的応答として、C/N比をはじめとする生体内の代謝変動に着目し、それぞれの形質に異常をもつ変異体の解析を通じて、CO₂応答にともなう情報伝達と栄養恒常性の制御を担う基幹因子を同定する。SWIR-HSCを用いた生体成分の非侵襲計測システムを構築し、CO₂濃度に依存した代謝変動の可視化により、高CO₂環境における栄養恒常性の制御機構の解明につながる変異体の単離と原因遺伝子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 気孔の機能設計を担う転写因子 (Negi *et al.*, *Curr. Biol.* 23, 479-484, 2013)

表皮細胞系からの気孔分化過程は、動物細胞の筋肉組織や神経組織の分化過程と類似したシステムにより進行することがわかっていたが (Pillitteri & Torii, *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012)、分化過程を終えたばかりの幼少な気孔がどのようなメカニズムで機能化するか、そのプロセスは全く着目されていなかった。気孔としての機能を有するようになるためには、力

学的に開閉が可能な細胞構造形態(非対称な細胞壁の構築)や、細胞内の膨圧調節のための多種多様なイオンチャネル、トランスポーターの配置、そして、様々な環境情報を感知するシグナル伝達系の出現とそれらの伝達系を統合する高次情報処理システムの構築が必要とされるはずである。研究代表者らはサーモグラフィの差分画像解析による変異株スクリーニング法を新たに開発し、完全 CO₂ 非感受性変異体の単離を試みた。その中から得られた変異株の一つ、*scap1* (*stomatal carpenter 1*) では孔辺細胞の奇形が誘発されるとともに、その開閉機能が完全消失する。この変異は気孔機能に必須なイオンチャネルやシグナル受容体などの発現を喪失させ、孔辺細胞の機能的非対称性を作り出す細胞壁修飾酵素群の発現をかく乱させることがわかった。原因遺伝子は、植物特異的な Dof 転写因子であり、その発現は気孔分化過程の終盤の特定の時期に限定されていた。この SCAP1 転写因子は、謂わば気孔の‘口’としての形態形成と開閉機能、そして環境シグナル受容系を一括して統御する‘要’の因子であることが判明した。

(2) 気孔開閉の新メカニズムの発見 (Hashimoto *et al.*, *Nature Commun.* 4, 2215, 2013)

気孔開度は、常に成長・生存に最適な状態を保つように調節されている。上記スクリーニングで得られた CO₂ 感応異常変異株の一つ、*patroll* (*proton ATPase translocation control 1*) の解析から、気孔開閉制御の新メカニズムを発見した。*patroll* 変異体において低 CO₂、光による気孔開口反応は低下しており、野生株よりも成長が遅い。*patroll* の原因遺伝子は動物の神経細胞で神経伝達物質の分泌に関わる Munc13 の機能を司る MUN ドメインをもつ。PATROL1 因子は、光や乾燥などの環境変化にあわせて、孔辺細胞膜近傍と細胞質

区画との間を数十秒のオーダーで移動する。この因子の挙動はプロトンポンプ (AHA1) の細胞内から細胞膜上への定置移動、あるいはその逆の離散移動と一致していた。このような観察から、PATROL1 が AHA1 を必要とされる時に細胞膜に並べたり、逆に必要でなくなった場合には回収したりする機能をもっていることが推測された。例えば、光環境では光合成を行うために積極的に CO₂ を取り入れたいために気孔は大きく開く。その場合には、PATROL1 が AHA1 を短時間のうちに細胞膜に配置させる。一方、乾燥などによって体内からの水分の放出を防がなければならない場合には、AHA1 をその一部を残して細胞膜から撤収する。従来の孔辺細胞におけるプロトンポンプの研究は、プロトンポンプ自体の活性化メカニズムや活性化のためのシグナル伝達系に集中している。しかし、今回発見されたような気孔開閉調節機構の報告例はこれまでになく、さらに、その機構の鍵を握っている因子が動物の神経情報伝達の‘要’となるような因子であったことは、植物と動物の進化の過程でどのような経緯があったのかを考えるうえでも興味深い。ちなみに、*PATROL1* を過剰発現させた植物体では、気孔の環境応答性が高まり、光合成効率が向上することによってバイオマス生産が促進された。*PATROL1* 過剰発現体は、高 CO₂、暗条件、乾燥などの多重環境情報を迅速・精確に処理し、それに基づいた気孔応答を行うことができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計23件)

Takahashi, S., Monda, K., Negi, J., Konishi, F., Ishikawa, S., Hashimoto-Sugimoto, M., Goto, N. and Iba, K. (2015) Natural Variation in Stomatal Responses to Environmental Changes among *Arabidopsis thaliana* Ecotypes. *PLoS*

One 10: e0117449. doi:
10.1371/journal.pone.0117449

Kusumi, K. and Iba, K. (2014) Establishment of the chloroplast genetic system in rice during early leaf development and at low temperatures. *Front. Plant Sci.* 5: 386. doi:
10.3389/fpls.2014.00386

Kai, H. and Iba, K. (2014) Temperature Stress in Plants. *In: eLS.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
doi: 10.1002/9780470015902.a0001320.pub2

Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Kusumi, K. and Iba, K. (2014) New Approaches to the Biology of Stomatal Guard Cells. *Plant Cell Physiol.* 55: 241-250. doi: 10.1093/pcp/pct145

Higaki, T., Hashimoto-Sugimoto, M., Akita, K., Iba, K., and Hasezawa, S. (2014) Dynamics and environmental responses of PATROL1 in Arabidopsis subsidiary cells. *Plant Cell Physiol.* 55: 773-780. doi: 10.1093/pcp/pct151

Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J.I., Nishitani, K., Yanagisawa, S. and Iba, K. (2013) A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23: 479-484.

Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M., Fujimi M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasezawa, S. and Iba, K. (2013) A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses *Nature Commun.* 4:2215 doi: 10.1038/ncomms3215.

Kurusu, T., Saito, K., Horikoshi, S., Hanamata, S., Negi, J., Yagi, C., Kitahata, N.,

Iba, K. and Kuchitsu, K. (2013) An S-Type Anion Channel SLAC1 Is Involved in Cryptogein-Induced Ion Fluxes and Modulates Hypersensitive Responses in Tobacco BY-2 Cells. *PLoS One* 8(8): e70623.
doi:10.1371/journal.pone.0070623.

橋本(杉本) 美海、祢宜 淳太郎、楠見 健介、射場 厚 (2013) 気孔の CO₂ 応答 化学と生物 51(12): 831-839.

Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H. and Schroeder, J.I. (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 10593-10598.

Kai, H., Hirashima, K., Matsuda, O., Ikegami, H., Winkelmann, T., Nakahara T. and Iba, K. (2012) Thermotolerant cyclamen with reduced acrolein and methyl vinyl ketone. *J. Exp. Bot.* 63 (11): 4143-4150.

Kusumi, K., Hirotsuka, S., Kumamaru, T. and Iba, K. (2012) Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J. Exp. Bot.* 63: 5635-5644.

Monda, K., Negi, J., Iio, A., Kusumi, K., Kojima, M., Hashimoto, M., Sakakibara, H. and Iba, K. (2011) Environmental regulation of stomatal response in the *Arabidopsis* Cvi-0 ecotype. *Planta* 234: 555-563.

〔学会発表〕(計 8 1 件)

Kensuke Kusumi, Koh Iba. Modulation and maintenance of chloroplast genetic system during early leaf development and at low

temperatures in rice. Japanese-Finnish Seminar
2014 "Design of Superior Machinery of Light
Energy Conversion in Photosynthetic
Organisms 2014.10.12 Jozankei, Hokkaido

Keina Monda, Juntaro Negi, Genki Ishigaki,
Hiromitsu Araki, Sho Takahashi, Mimi
Hashimoto-Sugimoto, Satoru Kuhara, Ryo
Akashi, Nobuharu Goto, Koh Iba.

Environmental Responses of An Arabidopsis
Ecotype, Me-0, with Giant Stomata The 25th
International Conference on *Arabidopsis*
Research July 29, 2014, University of British
Columbia, Vancouver, Canada.

Sho Takahashi, Keina Monda, Juntaro Negi,
Fumitaka Konishi, Shinobu Ishikawa, Mimi
Hashimoto-Sugimoto, Nobuharu Goto, Koh
Iba. Diversity of Stomatal Responses to
Different Environmental Conditions in
Arabidopsis thaliana Ecotypes The 25th
International Conference on *Arabidopsis*
Research July 29, 2014, University of British
Columbia, Vancouver, Canada.

Mimi Hashimoto-Sugimoto, Takumi Higaki,
Takashi Yaeno, Kae Akita, Juntaro Negi, Ken
Shirasu, Seiichiro Hasezawa, Koh Iba. An
Arabidopsis Munc13-like protein, PATROL1,
mediates H⁺-ATPase translocation that
promotes stomatal opening IWPMB 2013
26-31 March 2013, Kurashiki, Japan

Juntaro Negi, Kosuke Moriwaki, Mineko
Konishi, Ryusuke Yokoyama, Toshiaki
Nakano, Kensuke Kusumi, Mimi
Hashimoto-Sugimoto, Kazuhiko Nishitani,
Shuichi Yanagisawa, Koh Iba. SCAP1, a
master regulator of the development of
functional stomata in Arabidopsis IWPMB
2013 26-31 March 2013, Kurashiki, Japan

Keina Monda, Juntaro Negi, Nobuharu Goto,

Koh Iba. Stomatal features and responses to
environmental signals in the *Arabidopsis* Me-0
ecotype The 23rd International Conference on
Arabidopsis Research 3-7 July 2012, Hofburg
Imperial Palace in Vienna, Austria

Keina Monda, Juntaro Negi, Atsuhiko Iio,
Kensuke Kusumi, Mikiko Kojima, Mimi
Hashimoto, Hitoshi Sakakibara, Koh Iba.
Environmental regulation of stomatal response
in Arabidopsis Cvi-0 ecotype 18th International
Botanical Congress 23-30 July 2011 The
Melbourne Convention & Exhibition Centre,
Melbourne, Australia

Koh Iba. Isolation and characterization of
Arabidopsis CO₂ response mutants by thermal
imaging. Keystone symposia 2011.1.17-1.22
Keystone, Colorado

Koh Iba. Analysis of Arabidopsis CO₂
response mutants by thermal imaging (Plenary
lecture) 21st International Conference on
Arabidopsis Research Pacifico Yokohama
2010.6.8.

Mimi Hashimoto-Sugimoto, Ayako Nagami,
Mari Irie, Koh Iba. Characterization of an
Arabidopsis novel CO₂ insensitive mutant *high*
leaf temperature 2 21st international conference
on Arabidopsis research June 6-10, 2010
Pacifico Yokohama

〔その他〕
ホームページ
<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp/Index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

射場 厚 (IBA, Koh)

九州大学 大学院・理学研究院・教授

研究者番号 : 1 0 1 9 2 5 0 1