

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04386

研究課題名(和文)細胞膜プロトンポンプの多様な生理機能と活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of physiological roles and regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase

研究代表者

木下 俊則 (Kinoshita, Toshinori)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・教授

研究者番号：50271101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、維管束植物における根での無機養分取り込み、篩部でのスクロース取り込み、気孔開口など多くの生理現象において重要な役割を果たしている細胞膜プロトンポンプの解析を進め、その活性調節機構や生理的役割の解明を目的として研究を進めてきた。その結果、陸生植物において光合成に依存した活性化機構が進化的に保存されていること、イネの根の細胞膜プロトンポンプが無機養分であるケイ素により活性化されること、植物ホルモンであるオーキシシンやブラシノステロイドによる細胞膜プロトンポンプの活性機構などが明らかとなり、これまで知られていなかった細胞膜プロトンポンプの多様な活性調節機構や生理的役割の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：The plasma membrane (PM) H⁺-ATPase in plants mediates numerous important physiological processes, such as nutrient uptake in roots, stomatal opening, and phloem loading. However, the molecular and regulatory mechanisms of this enzyme are still unknown. In this study, we investigated the regulatory mechanism and physiological roles of PM H⁺-ATPase in plants and found that PM H⁺-ATPase is regulated in a photosynthesis-dependent manner in *Arabidopsis* and *Klebsormidium*, and that PM H⁺-ATPase in rice roots is activated by one of the nutrient silicon, which has an important role for stress tolerance in rice. Furthermore, we found that plant hormones brassinosteroid and auxin activate PM H⁺-ATPase in etiolated hypocotyl in *Arabidopsis* through their receptors, BRI1 and TIR1, respectively. These results provide important information for understanding the molecular mechanism and physiological role of PM H⁺-ATPase in plant growth.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：植物 細胞膜プロトンポンプ 光合成 養分吸収 植物ホルモン リン酸化

1. 研究開始当初の背景

P型ATPaseに属する細胞膜プロトンポンプ(H⁺-ATPase)は、ATPの加水分解エネルギーを利用し、細胞外へのプロトンの能動輸送を行う一次輸送体である。細胞膜プロトンポンプは、これまで調べられた維管束植物のすべての細胞で発現しており、植物細胞の膜電位の維持、pH調節といった細胞の恒常性の維持や、プロトンの輸送によって形成される細胞膜を挟んだ電気化学的ポテンシャル勾配による様々な二次輸送体と共役した物質輸送などに関与し、維管束植物の根での無機養分取り込み、篩部でのスクロース取り込み、気孔開口など多くの生理現象において重要な役割を果たしている。近年申請者らは、苔類ゼニゴケの葉状体の細胞膜プロトンポンプが光合成に依存して活性化されることを見出した(Okumura et al. *Plant Physiol* 2012)。しかし、そのシグナル伝達や生理的意義は不明である。また、シロイヌナズナの黄化胚軸において、植物ホルモン・オーキシンによる細胞膜プロトンポンプ活性化が伸長促進に必須であることを明らかにしたが(Takahashi et al. *Plant Physiol* 2012)、オーキシンによる細胞膜プロトンポンプ活性が胚軸以外の組織でも行われているかどうか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、陸生植物における細胞膜プロトンポンプの多様な機能と活性制御機構を解明することを目的として、1)ゼニゴケで観察された光合成による細胞膜プロトンポンプ活性化が、進化的にゼニゴケより後から出現した維管束植物においても保存されているかどうか、2)オーキシンによる細胞膜プロトンポンプ活性化の胚軸以外の組織での関与について解析を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、光合成による細胞膜プロトンポンプ活性化について、維管束植物シロイヌナズナと車軸藻植物門クレビスルミディウムを材料として解析を行なった。オーキシンによる細胞膜プロトンポンプ活性化の胚軸以外の組織での関与と他の植物ホルモンによる制御については、シロイヌナズナを材料に、遺伝学的解析、生化学的解析を進めた。

4. 研究成果

1) 光合成による細胞膜プロトンポンプ活性化機構

シロイヌナズナを用いて、維管束植物においても細胞膜プロトンポンプが光合成に依存してリン酸化・活性化されることを見出した。さらに免疫組織染色によって、この応答が葉肉細胞において起こっていることが明らかになった(図1)。また、糖が蓄積している変異体では暗所においても細胞膜プロトンポンプのリン酸化レベルが高く、糖の合成が損なわれた変異体では光合成に依存した細胞

膜プロトンポンプのリン酸化が抑制されていることが明らかになった(図2)。以上より、糖がシグナル伝達に関わっていることが明らかとなった。これらの結果は国際誌で発表した(Okumura et al. *Plant Physiol* 2016)。また、ゼニゴケのゲノム解析にも参加し、細胞膜プロトンポンプの分析を担当した(Bowman et al. *Cell* 2017)。

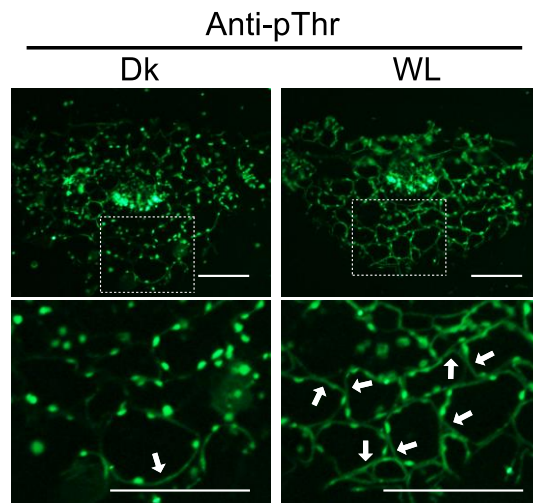


図1 免疫染色法を用いた光合成に依存した細胞膜プロトンポンプのリン酸化の検出。暗順化させたロゼット葉を暗黒下(Dk)、または白色光(50 μmol/m²/s)を1時間照射し、切片を作成した。リン酸化された細胞膜プロトンポンプの検出には anti-pThr 抗体を用いた。破線で囲った蛍光像を拡大して下のパネルに示した。矢印は葉肉細胞の細胞膜を示している。スケールバーは100 μmを表している。

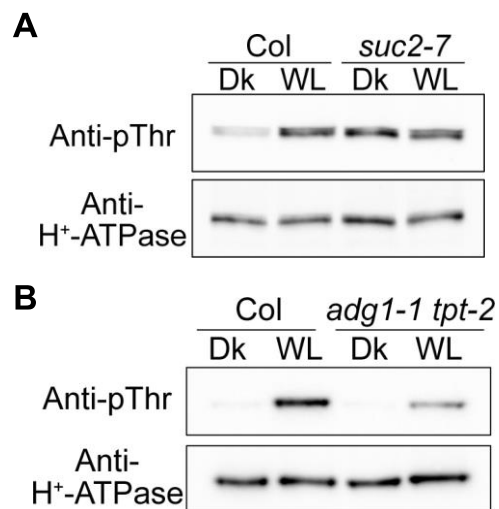


図2 光合成に依存した細胞膜プロトンポンプリン酸化への糖の関与。(A) 糖が高蓄積した変異体(*suc2-7*)における細胞膜プロトンポンプのリン酸化レベル。*suc2-7*の細胞膜プロトンポンプは、暗所においても高いリン酸化レベルを示した。(B) 糖の合成が損なわれた変異体(*adg1-1 tpt-2*)における光合成に依存した細胞膜プロトンポンプのリン酸化

ロトンポンプのリン酸化が抑制されていた。以上の結果から、光合成に依存した細胞膜プロトンポンプのリン酸化による活性化は、維管束植物でも共通した陸上植物に普遍的な応答であり、光合成によって合成された糖によって仲介されていることが明らかになった。

2) オーキシンによる細胞膜プロトンポンプ活性化

細胞膜プロトンポンプは、根の伸長においても重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、エチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理したシロイヌナズナを細胞膜プロトンポンプ活性を必要とする低 pH における根の伸長を指標にしたスクリーニングを行い、低 pH において極端に根の伸長が抑制される *loph1* 変異体を単離した。次に、*loph1* 変異体の原因遺伝子を同定したところ、オーキシンの取込み輸送体である *AUX1* であることが明らかとなった (図 3)。

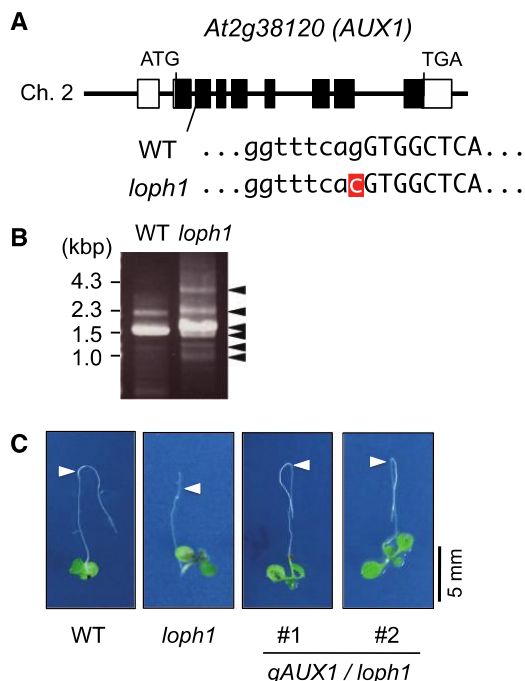


図 3 細胞膜プロトンポンプのリン酸化レベルの低くなった変異体の原因遺伝子の同定。(A) *AUX1* のゲノム構造と塩基置換場所。(B) *AUX1* の mRNA の発現解析。(C) 低 pH における根の伸長。 *AUX1* の変異体である *loph1* は極端に伸長が悪く、野生型 *AUX1* を導入した株では根の伸長が回復した。白矢印は低 pH 条件に移した時の根の先端の位置を示す。

さらに、詳細な解析を行ったところ、*loph1* 変異体の根では、細胞膜プロトンポンプの量には変化が見られないが、リン酸化レベルと活性が低下しており、それが原因で、低 pH において極端に根の伸長が抑制される表現系を示すことが明らかとなり、これまで知られていた胚軸だけでなく、根においてもオーキシンを介して細胞膜プロトンポンプの活

性制御が行われていることが初めて明らかとなった (図 4)。

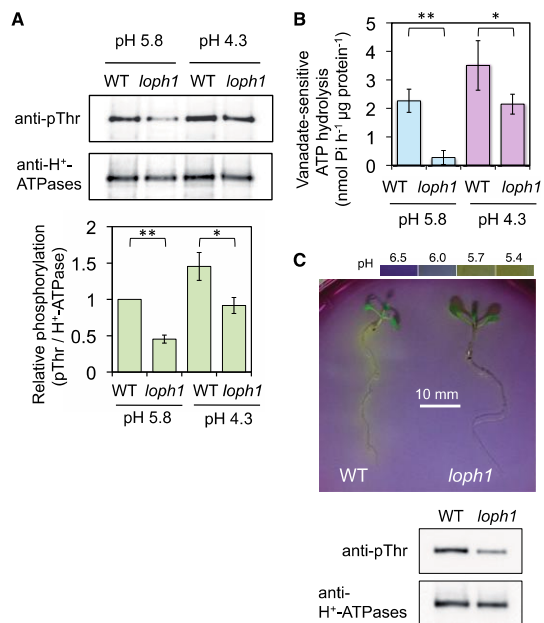


図 4 *loph1* 変異体における細胞膜プロトンポンプ活性。(A) 根における細胞膜プロトンポンプのリン酸化レベル。(B) 根における細胞膜プロトンポンプの ATP 加水分解活性。(C) 根における細胞膜プロトンポンプのプロトン放出活性。

これらの結果は国際誌で発表した (Inoue et al. *Plant Cell Physiol* 2016)。また、この反応に関わるオーキシン受容体の解析を進め、TIR1 が関与することも明らかとなった (Uchida et al. *Nat Cell Biol* 2017)。

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)

- Toh S, Inoue S, Toda Y, Yuki T, Suzuki K, Hamamoto S, Fukatsu K, Aoki S, Uchida M, Asai E, Uozumi N, Sato A, Kinoshita T. (2018) Identification and characterization of compounds that affect stomatal movements. *Plant & Cell Physiology*, in press, 査読有
- Uchida N, Takahashi K, Iwasaki R, Yamada R, Yoshimura M, Endo TA, Kimura S, Zhang H, Nomoto M, Tada Y, Kinoshita T, Itami K, Hagihara S, Torii KU. (2018) Chemical hijacking of auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair. *Nature Chemical Biology*, 14, 299-305, DOI:10.1038/nchembio.2555, 査読有
- Bowman J.L., Kohchi T, Yamato K.T. et al. Kinoshita T. (58th/113 authors), (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell*, 171, 287-304,

- DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.030, 査読有
- ④ Inoue S, Kinoshita T. (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 174, 531-538, DOI: 10.1104/pp.17.00166, 査読有
- ⑤ Inoue S, Iwashita N, Takahashi Y, Gotoh E, Okuma E, Hayashi M, Tabata R, Takemiya A, Murata Y, Doi M, Kinoshita T., Shimazaki K. (2017) Brassinosteroid involvement in *Arabidopsis thaliana* stomatal opening. *Plant & Cell Physiology*, 58, 1048-1058, DOI: 10.1093/pcp/pcx049, 査読有
- ⑥ Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T. (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Scientific Reports*, 7, 45586, DOI: 10.1038/srep45586, 査読有
- ⑦ Wang Y, Kinoshita T. (2017) Measurement of stomatal conductance in rice. *Bio-protocol*, Vol 7, Iss 8, DOI: 10.21769/BioProtoc.2226, 査読有
- ⑧ Okumura M, Kinoshita T. (2016) Measurement of ATP hydrolytic activity of plasma membrane H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Bio-protocol*, Vol 6, Iss 23, DOI:10.21769/BioProtoc.2044, 査読有
- ⑨ Inoue S, Takahashi K, Okumura-Noda H, Kinoshita T. (2016) Auxin influx carrier AUX1 confers acid resistance for *Arabidopsis* root elongation through the regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant & Cell Physiology*, 57, 2194-2201, DOI: 10.1093/pcp/pcw136, 査読有
- ⑩ Yamauchi S, Takemiya A, Sakamoto T, Kurata T, Kinoshita T., Shimazaki K. (2016) Plasma membrane H⁺-ATPase1 (AHA1) plays a major role in *Arabidopsis thaliana* for stomatal opening in response to blue light. *Plant Physiology*, 171(4):2731-43, DOI:10.1104/pp.16.01581, 査読有
- ⑪ Takahashi K, Kinoshita T. (2016) The regulation of plant cell expansion: Auxin-induced turgor-driven cell elongation. *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells*, 156-173, CRC Press, DOI: 10.1201/b20316, 査読有
- ⑫ Toda Y, Wang Y, Takahashi A, Kawai Y, Tada Y, Yamaji N, Ma JF, Ashikari M, Kinoshita T. (2016) *Oryza sativa* H⁺-ATPase (OSA) is involved in the regulation of dumbbell-shaped guard cells of rice. *Plant & Cell Physiology*, 57, 1220-1230, DOI: 10.1093/pcp/pcw070, 査読有
- ⑬ Okumura M, Inoue S, Kuwata K, Kinoshita T. (2016) Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation. *Plant Physiology*, 171, 580-589, DOI: 10.1104/pp.16.00355, 査読有
- ⑭ Nagatoshi Y, Mitsuda N, Hayashi M, Inoue S, Okuma E, Kubo A, Murata Y, Seo M, Saji H, Kinoshita T., Ohme-Takagi M. (2016) GOLDEN 2-LIKE transcription factors for chloroplast development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 4218-4223, DOI: 10.1073/pnas.1513093113, 査読有
- 他 9 件
- [学会発表] (計 73 件)
- ① 高橋宏二, 打田直行, 萩原伸也, 山田遼太郎, 伊丹健一郎, 鳥居啓子, 木下俊則「改変 TIR1 と合成オーキシシンを用いた bump-and-hole 法によるオーキシシン誘導性胚軸伸長の解析」第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月 28 日-30 日
- ② 木下俊則「気孔開度制御による植物の生育促進と乾燥耐性付与」バイオマスイノベーション研究会 第 43 回研究会、2018 年 3 月 7 日
- ③ Toshinori Kinoshita “Blue light-induced stomatal opening and signaling components in stomatal guard cells” International Symposium on Plant Photobiology 2018, 15-18 January, 2018
- ④ Toshinori Kinoshita “Analysis of signaling pathway in light-induced stomatal opening and manipulation of stomatal aperture” 4th CSRS-ITbM Joint Workshop, 15 January, 2018
- ⑤ Toshinori Kinoshita “Regulation of stomatal movements in response to environmental signals” The 5th International Symposium on Transformative Bio-Molecules 2017 (ISTbM-5)、2017 年 11 月 20-21 日
- ⑥ Toshinori Kinoshita “Blue light-signalling pathway in stomatal guard cells” Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 3-6 November, 2017
- ⑦ Koji Takahashi, Toshinori Kinoshita “Brassinosteroid enhances phosphorylation level of the penultimate residue of plasma membrane H⁺-ATPases” Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 3-6 November, 2017
- ⑧ Toshinori Kinoshita “Regulation of blue light-induced stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase.” IoC-IPMB-ITbM Joint Symposium on New Frontiers by Fusing Chemistry and Biology, 13-14 July, 2017

- ⑨ 高橋宏二、南杏鶴、木下俊則「ブラシノステロイドによるシロイヌナズナの胚軸伸長誘導」第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 16 日-18 日
- ⑩ Maki Hayashi, Shin-ichiro Inoue, Yoshihisa Ueno, Toshinori Kinoshita “A protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening” 第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 16 日-18 日
- ⑪ Eigo Ando, Toshinori Kinoshita “Immunohistochemical screening for blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells” 第 58 回日本植物生理学会、2017 年 3 月 16 日-18 日
- ⑫ Masaki Okumura, Shin-ichiro Inoue, Keiko Kuwata, Toshinori Kinoshita “Photosynthesis-dependent activation of the plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation” Cold Spring Harbor Asia meeting in 2016 ‘Latest advances in plant development and environmental response’, 29 November – 2 December, 2016
- ⑬ Masakazu Tomiyama, Akihiro Nomura, Takamasa Suzuki, Tetsuya Higashiyama, Toshinori Kinoshita “Involvement of chloroplast protein ClpC1/HSP93-V in regulation of stomatal aperture in Arabidopsis thaliana” Cold Spring Harbor Asia meeting in 2016 ‘Latest advances in plant development and environmental response’, 29 November – 2 December, 2016
- ⑭ Toshinori Kinoshita “Regulation of stomatal aperture by genetic and chemical approaches” 2016 ITbM-IoC Joint Workshop on Biomolecules and Materials, 16-17 November, 2016
- ⑮ Toshinori Kinoshita, Masaki Okumura, Yosuke Toda, Koji Takahashi “Regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase in response to physiological signals” Agriculture Resources and Environment: Science and Technology, 21-24 May, 2016
- ⑯ Toshinori Kinoshita “Manipulation of stomatal aperture by genetic and chemical approaches” Syngenta-ITbM, Nagoya University meeting, 21 April, 2016
- ⑰ 奥村将樹、井上晋一郎、桑田啓子、木下俊則「Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation in Arabidopsis」、第 57 回日本植物生理学会、2016 年 3 月 18 日-20 日
- ⑱ 木下俊則「気孔開閉のシグナル伝達と気孔開度制御」、植物科学シンポジウム 2015「ラボとフィールドを結ぶ植物科学」、2015 年 12 月 2 日
- ⑲ Toshinori Kinoshita “Blue light-induced stomatal opening and manipulation of stomatal aperture”, Seminar, Institute of Plant and Microbial Biology, 23 Nov, 2015
- ⑳ Toshinori Kinoshita “Signaling pathway for blue light-induced stomatal opening and manipulation of stomatal opening”, Biological Workshop on Cs Bioremediation, 15th Oct, 2015
- 21 木下俊則「環境刺激による気孔開度制御機構の解明に向けて」、第 79 回日本植物学会、2015 年 9 月 6 日～9 月 8 日
- 22 木下俊則「Enhancement of photosynthesis and plant growth by manipulation of stomatal aperture」、第 33 回日本植物細胞分子生物学会（東京）大会・シンポジウム、2015 年 8 月 12 日
- 23 Koji Takahashi, Koichi Hori, Kunika Ohtaka, Hiroyuki Ohta, Toshinori Kinoshita “Plasma Membrane H⁺-ATPase in the Charophytic Alga” Plant Biology 2015, July 26-30, 2015
- 24 Hodaka Sugimoto, Yohei Takahashi, Yuki Hayashi, Koji Takahashi, Shinichiro Inoue, Mee Park, William Gray, Toshinori Kinoshita “Possible Involvement of PP2C-D for Dephosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cells of Arabidopsis Thaliana” Plant Biology 2015, July 26-30, 2015
- 25 Toshinori Kinoshita “Stomatal function and regulation”, International Workshop on Plant Ionics and Nutrient Use Efficiency, 12-14 May, 2015
- 他 48 件
- 〔図書〕（計 11 件）
- ① 木下俊則、高橋宏二（2017）「水と植物細胞」テイツ/ザイガー植物生理学・発生学 原著第 6 版（講談社サイエンティフィック）第 3 章、85-99.
- ② 木下俊則、高橋宏二（2017）「植物における水収支」テイツ/ザイガー植物生理学・発生学 原著第 6 版（講談社サイエンティフィック）第 4 章、101-119.
- ③ 木下俊則（2016）「細胞膜」植物学の百科事典（丸善出版）392-393.
- ④ 木下俊則（2016）「生体膜輸送系」植物学の百科事典（丸善出版）404-407.
- ⑤ 木下俊則、富山将和（2016）「環境刺激による気孔開度制御機構の解明に向けて」BSJ-Review 7, 97-109.
- ⑥ 木下俊則（2016）「気孔の光開口運動における光シグナル伝達」光と生命の事典（朝倉書店）140-141.
- ⑦ 萩原伸也、吉村柁彦、土屋雄一朗、木下

- 俊則、伊丹健一郎 (2016) 「魔女の雑草の呪いを解く分子」 化学、71, 35-39.
- ⑧ Wang Yin、木下俊則 (2015) 「気孔調節による植物の CO2 コンダクタンス制御」 光合成研究 第25巻 第3号 (通巻74号), 194-201.
- ⑨ 木下俊則 (2015) 「未来をつなぐ風」 実験医学 33, 2670-2671.
- ⑩ 木下俊則 (2015) 「生き残りのための環境突破力」 理フィロソフィア (名古屋大学理学部・大学院理学研究科広報誌) No. 29, 8-11.
- ⑪ 木下俊則 (2015) 「環境変動に対する気孔開閉制御」 化学と生物 53, 608-613.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：植物気孔開口調節剤
発明者：木下俊則、井上心平、戸田陽介、佐藤綾人、青木沙也、藤茂雄
権利者：名古屋大学
種類：PCT
番号：PCT/JP2017/034287
出願年月日：2017年9月22日
国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 俊則 (KINOSHITA, Toshinori)
名古屋大学・理学研究科 (WPI)・教授
研究者番号：50271101

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

河内 孝之 (KOHCHI Takayuki)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：40202056

石崎 公庸 (ISHIZAKI Kimitsune)
神戸大学・理学 (系) 研究科・准教授
研究者番号：00452293

太田 啓之 (OHTA Hiroyuki)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号：20233140

(4)研究協力者
なし