

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：18KK0425

研究課題名（和文）新奇カルシウムイオンチャネルによる孔辺細胞の環境情報統合機構の解明

研究課題名（英文）Signal integration mechanism mediated by novel types of calcium channels in stomatal guard cells

研究代表者

宗正 晋太郎（Munemasa, Shintaro）

岡山大学・環境生命自然科学学域・准教授

研究者番号：20641442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：気孔開閉運動を制御するシグナル伝達において、孔辺細胞の細胞質カルシウムイオンが重要なセカンドメッセンジャーとして機能している。しかし孔辺細胞細胞質カルシウムイオン濃度を調節する分子機構とその下流で機能するカルシウムイオン感知機構については不明な点が多い。本研究では、気孔開閉運動の制御にかかわる新規のカルシウムイオン輸送体候補因子の機能解析を行い、植物のストレス耐性機構を理解する上で重要な知見を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カルシウムイオンに依存して気孔開閉運動を制御するシグナル伝達機構の一端を明らかにした。本研究の成果は、農作物のストレス耐性改善技術の開発に貢献できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Cytosolic calcium ions function as an important second messenger in guard cell signaling that regulates stomatal movement. However, the molecular mechanism that regulate cytosolic calcium ion concentrations in guard cells and the downstream mechanism responsible for calcium sensing are not yet fully understood. In this study, we analyzed the functions of novel candidate factors for calcium ion transporters involved in the regulation of stomatal movement, providing important insights into the regulatory mechanisms of plant stress tolerances.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔 孔辺細胞 カルシウム イオンチャネル アブシシン酸

1. 研究開始当初の背景

植物の葉の表皮には、一对の孔辺細胞からなる気孔と呼ばれる小孔が存在する。植物は、気孔を介して光合成の材料である二酸化炭素を葉内へと取り込み、同時に蒸散として水分を放出することで土壌中の養分を根から吸収するために必要な駆動力を生み出している。乾燥ストレス下で合成される植物ホルモンであるアブシシン酸は、気孔閉口を誘導することで過度の蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。気孔閉口を誘導する孔辺細胞アブシシン酸シグナル伝達において、孔辺細胞細胞質のカルシウムイオンが重要なセカンドメッセンジャーとして機能することがこれまでの研究で明らかとなっている。アブシシン酸は、孔辺細胞原形質膜に存在するカルシウムイオン輸送体である過分極活性化型カルシウムイオンチャネルを活性化し、孔辺細胞内の細胞質遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$) の上昇を誘導する (引用文献)。この $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇は、気孔閉口のマスターレギュレーターであるS型アニオンチャネルSLAC1の活性化を導くことがわかっている (引用文献、)。しかし孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ を制御するカルシウムイオン輸送体タンパク質をコードする遺伝子は、一部を除いて明らかになってはいない。

2. 研究の目的

モデル植物であるシロイヌナズナを用いたこれまでの研究により、アブシシン酸誘導気孔閉口にかかわるカルシウムイオン輸送体候補因子をいくつか単離している。そのうちの2つである、環状ヌクレオチド作動性イオンチャネルのホモログであるgcCNGCと機能未知の膜タンパク質であるGCMについて機能解析を行い、気孔開閉運動の制御を担う孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 依存性シグナル伝達の分子機構を解明することを本研究の目的とした。本目的を達成するためには、植物細胞を対象にした高度な電気生理学実験手法が要求される。海外共同研究者であるJulian Schroeder博士の研究室に滞在し、実験手法の確立を進めた。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ変異体の気孔表現型解析

gcCNGC やGCM ファミリー遺伝子を破壊したシロイヌナズナ多重遺伝子破壊変異植物体である *gccngc*、*gcm* を作成し、その表現型を解析した。気孔表現型の解析は、顕微鏡による気孔開度測定と、赤外線サーモグラフィーを用いた葉面温度測定により行った。*gccngc* 変異体については、アブシシン酸シグナル伝達のコア因子であるOST1 (引用文献) との多重変異体 *gccngc/ost1* も作成し、解析に用いた。

(2) 孔辺細胞原形質膜イオンチャネル活性評価

シロイヌナズナロゼット葉をブレンダーで破碎後、表皮断片をナイロンメッシュで回収した。回収した表皮断片をセルラーゼやマセロザイムを含む酵素液で処理することにより、孔辺細胞プロトプラストを単離した。孔辺細胞プロトプラストを用いて、電気生理学的手法であるホールセルパッチクランプ法による実験を行い、原形質膜イオンチャネルの活性評価を行った。

(3) カルシウムイオン輸送体候補因子の *in vitro* におけるカルシウムイオン輸送活性評価

アフリカツメガエル卵母細胞を異種発現系として用いた二電極膜電位固定法実験により、カルシウムイオン輸送候補因子の活性を *in vitro* で評価した。また、ヒト培養細胞HEK293Tを用いたホールセルパッチクランプ実験による *in vitro* 活性評価も行った。

(4) 孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ イメージング

カルシウム指示蛍光タンパク質であるyellow cameleon 3.6 (YC3.6) を導入したgcCNGC・GCM 遺伝子破壊変異体を作成し、孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ イメージング実験を行った。YC3.6には、核外輸送シグナル配列 (NES: Nuclear Export Signal) を付加したNES-YC3.6 を用いた (引用文献)。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ変異体の気孔表現型解析

気孔表現型の評価実験の結果、*gccngc*変異体では、アブシシン酸などの気孔閉口を誘導する刺激を与えなくとも、恒常的に気孔が閉口しており、乾燥ストレス耐性が向上していることが明らかとなった。また、アブシシン酸シグナル伝達のコア因子であるOST1との多重変異体*gccngc/ost1* を用いた実験の結果、gcCNGCが、OST1とは独立したシグナル伝達で機能している可能性を示唆するデータを得た。*gcm*変異体については、もっとも強い気孔表現型を示す多重変異体ラインを単離することができた。

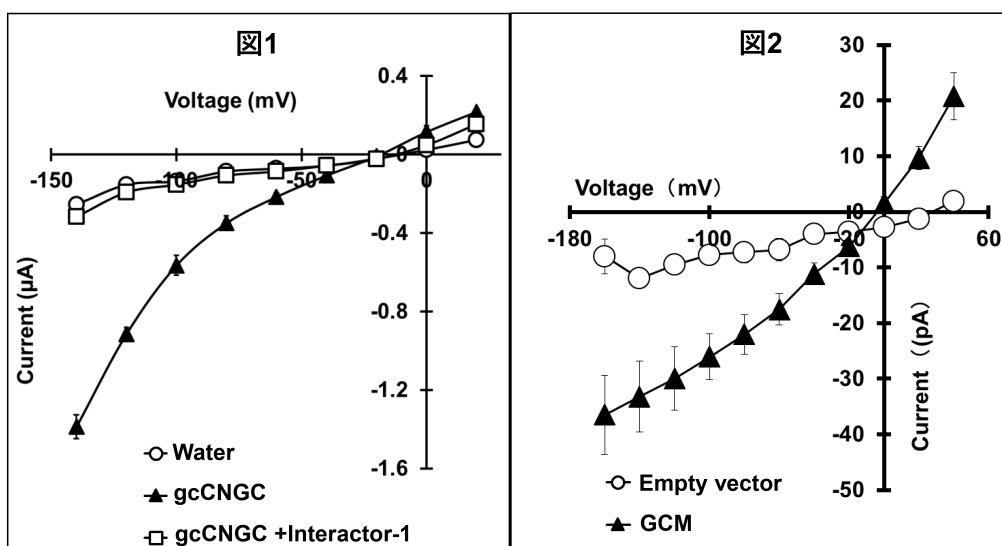
(2) カルシウムイオン輸送体候補因子の*in vitro*におけるカルシウムイオン輸送活性評価

*gccngc*変異体の孔辺細胞プロトプラストを用いて、ホールセルパッチクランプ法による原形質膜カルシウムイオンチャネルの活性評価を行った。様々なカルシウムイオンチャネル活性化剤を処理して実験を行ったが、*gccngc*変異体の野生株との間に顕著な差は見られなかった。その他のイオンチャネル活性については、現在調査中である。

(3) カルシウムイオン輸送体候補因子の*in vitro*におけるカルシウムイオン輸送活性評価

これまでの研究で単離したgcCNGC やGCMと相互作用する因子を、gcCNGCやGCMとともにアフリカツメガエル卵母細胞に導入し、二電極膜電位固定法によるカルシウムイオン輸送活性の評価を行った。結果、gcCNGCについてはイオン輸送活性を検出することができた。また、gcCNGCの相互因子のうち、gcCNGCの活性を抑制するもの (例: Interactor-1) をいくつか同定することができた (図1)。

GCMについては、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法実験で、イオン輸送活性を検出することはできなかった。しかし、別の発現系としてヒト培養細胞HEK293T を用いた実験系の構築を行い、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行ったところ、イオン輸送活性を検出することができた (図2)。現在、イオン選択性や活性制御タンパク質のスクリーニングなど詳細な解析を進めている。



(4) 孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ イメージング

カルシウム指示蛍光タンパク質であるNES-YC3.6を導入したシロイヌナズナを用いた孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ イメージング実験の結果、*gccngc*変異体では、様々な刺激に応答した孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇に異常が見られた。*gcm*変異体については、上記実験(1)で単離した最も顕著な表現型を示す多重変異体ラインにNES-YC3.6を導入中である。

<引用文献>

McAinsh MR, et al. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* (1990) 343: 186-188.

Negi J, et al. CO_2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* (2008) 452: 483-486.

Vahisalu T, et al. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* (2008) 452: 487-491.

Mustilli AC, et al. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* (2002) 14: 3089-3099.

Krebs M, et al. FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of Ca^{2+} dynamics. *Plant J* (2012) 69: 181-192.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 13件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mimata Yoshiharu, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 236
2. 論文標題 Extracellular malate induces stomatal closure via direct activation of guard cell anion channel SLAC1 and stimulation of Ca ²⁺ signalling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 852 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mimata Yoshiharu, Munemasa Shintaro, Akter Fahmida, Jahan Israt, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Malate induces stomatal closure via a receptor-like kinase GHR1- and reactive oxygen species-dependent pathway in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Akter Fahmida, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Negative regulation of salicylic acid-induced stomatal closure by glutathione in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1378 ~ 1382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu Zunyong, Hou Shuguo, Rodrigues Olivier, Wang Ping, Luo Dexian, Munemasa Shintaro, Lei Jiabin, Liu Jun, Ortiz-Morea Fausto Andres, Wang Xin, Nomura Kinya, Yin Chuanchun, Wang Hongbo, Zhang Wei, Zhu-Salzman Keyan, He Sheng Yang, He Ping, Shan Libo	4. 巻 605
2. 論文標題 Phytocytokine signalling reopens stomata in plant immunity and water loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 332 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04684-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tahjib-UI-Arif Md, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Modulation of frequency and height of cytosolic calcium spikes by plasma membrane anion channels in guard cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2003 ~ 2010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakouhi Lamia, Kharbech Oussama, Massoud Marouane Ben, Gharsallah Charfeddine, Hassine Sihem Ben, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Chaoui Abdelilah	4. 巻 258
2. 論文標題 Calcium and ethylene glycol tetraacetic acid mitigate toxicity and alteration of gene expression associated with cadmium stress in chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) shoots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 849 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-020-01605-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Waadt Rainer, Sella Charles A., Hsu Po-Kai, Takahashi Yohei, Munemasa Shintaro, Schroeder Julian I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Plant hormone regulation of abiotic stress responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-022-00479-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakouhi Lamia, Kharbech Oussama, Massoud Marouane Ben, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Chaoui Abdelilah	4. 巻 41
2. 論文標題 Oxalic Acid Mitigates Cadmium Toxicity in <i>Cicer arietinum</i> L. Germinating Seeds by Maintaining the Cellular Redox Homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Growth Regulation	6. 最初と最後の頁 697 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00344-021-10334-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Schulze Sebastian, Dubeaux Guillaume, Ceciliato Paulo H. O., Munemasa Shintaro, Nuhkat Maris, Yarmolinsky Dmitry, Aguilar Jaimee, Diaz Renee, Azoulay Shemer Tamar, Steinhorst Leonie, Offenborn Jan Niklas, Kudla Jorg, Kollist Hannes, Schroeder Julian I.	4. 巻 229
2. 論文標題 A role for calcium dependent protein kinases in differential CO ₂ and ABA controlled stomatal closing and low CO ₂ induced stomatal opening in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2765 ~ 2779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jannat Rayhanur, Senba Takanori, Muroyama Daichi, Uraji Misugi, Hossain Mohammad Anowar, Islam Mohammad Muzahidul, Nakamura Yoshimasa, Munemasa Shintaro, Mori Izumi C, Murata Yoshiyuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Interaction of intracellular hydrogen peroxide accumulation with nitric oxide production in abscisic acid signaling in guard cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1418 ~ 1426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1743168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rhaman Mohammad Saidur, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 The Myrosinases TGG1 and TGG2 Function Redundantly in Reactive Carbonyl Species Signaling in Arabidopsis Guard Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 967 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ye Wenxiu, Munemasa Shintaro, Shinya Tomonori, Wu Wei, Ma Tao, Lu Jiang, Kinoshita Toshinori, Kaku Hanae, Shibuya Naoto, Murata Yoshiyuki	4. 巻 117
2. 論文標題 Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20932 ~ 20942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1922319117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Afrin Sonya, Okuma Eiji, Tahjib-UI-Arif Md, Jahan Md Sarwar, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Stomatal response to isothiocyanates in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 6921 ~ 6931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Yohei, Zhang Jingbo, Hsu Po-Kai, Ceciliato Paulo H. O., Zhang Li, Dubeaux Guillaume, Munemasa Shintaro, Ge Chennan, Zhao Yunde, Hauser Felix, Schroeder Julian I.	4. 巻 11
2. 論文標題 MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13875-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Munemasa Shintaro, Hirao Yukari, Tanami Kasumi, Mimata Yoshiharu, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Ethylene Inhibits Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure by Modulating Guard Cell Slow-Type Anion Channel Activity via the OPEN STOMATA 1/SnRK2.6 Kinase-Independent Pathway in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2263 ~ 2271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Islam Md. Moshui, Ye Wenxiu, Matsushima Daiki, Rhaman Mohammad Saidur, Munemasa Shintaro, Okuma Eiji, Nakamura Yoshimasa, Biswas Md. Sanaulah, Mano Jun'ichi, Murata Yoshiyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species Function as Signal Mediators Downstream of H ₂ O ₂ Production and Regulate [Ca ²⁺] _{cyt} Elevation in ABA Signal Pathway in Arabidopsis Guard Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 リンゴ酸誘導気孔閉口のシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 リンゴ酸が誘導する気孔閉口のシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 一次代謝物リンゴ酸による気孔開閉制御の分子機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第 56 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 一次代謝物リンゴ酸が誘導する気孔閉口の分子機構の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会第63回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 気孔開度の調節にかかわる孔辺細胞カルシウムイオンチャネルの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第54回講演会(例会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗正晋太郎, 村田芳行
2. 発表標題 孔辺細胞原形質膜イオンチャネルの活性制御機構
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会 シンポジウム 気孔応答研究の最前線 - 分子から個体まで - (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
シュレーダー ジュリアン (Schroeder Julian)	カリフォルニア大学サンディエゴ校・School of Biological Sciences・Distinguished Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California, San Diego	Texas A&M University	Duke University	
チュニジア	University of Carthage			
中国	Shanghai Jiao Tong University	Shandong Jianzhu University	Shandong University	
バングラデシュ	Bangladesh Agricultural University			
ドイツ	University of Munster			