

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16171

研究課題名(和文) 気孔孔辺細胞における青色光に応答したデンプン分解機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of blue light-dependent starch degradation mechanism in stomatal guard cell

研究代表者

山内 翔太 (Yamauchi, Shota)

山口大学・大学院創成科学研究科・学術研究員

研究者番号：70838052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の表皮に存在する気孔は青色光により開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みをおこなっている。気孔孔辺細胞では青色光/フォトトロピン依存的に葉緑体のデンプンが分解され、気孔開口に必要な有機酸や糖を合成すると考えられてきたが、その詳細は不明である。本研究では青色光/フォトトロピン依存的にリン酸化されるタンパク質に着目し、デンプン分解を制御するBEC1を見出し、リン酸化の意義と情報伝達における位置付けを明らかにした。またこの因子と結合する因子を探索し、複数の候補因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細胞では光合成によりデンプンが蓄積するが、青色光によりデンプンが分解されるのは孔辺細胞のみである。この現象の解明のため、長年に渡り研究が行われたがその実態は不明であった。本研究によりデンプン分解の分子機構が明らかにされることで、デンプン分解の生理学的意義、細胞種特異的応答のメカニズムの理解が深まる。これは植物生理学の分野に格段の進展をもたらすことが期待される。植物は気孔を介して二酸化炭素を取り込み、光合成を可能にする。気孔の開口を人為的に上昇させることで植物の光合成を高め、生産量を高めることが可能である。これは来るべき食料問題を解決する手段の一つになり、社会に大いに貢献する。

研究成果の概要(英文)：Stomata open in response to blue light to absorb CO₂ for photosynthesis. It was considered that organic acid and sugars for stomatal opening are synthesized via blue light/phototropin-dependent guard cell starch degradation. However, detailed mechanism of blue light-dependent starch degradation is unclear.

In this study, we focused on protein that phosphorylated in a phototropin-dependent manner and found BEC1 involved in blue light-dependent starch degradation. We revealed significance of phosphorylation and functional characterization in blue light signaling. Furthermore, we searched protein interacting with BEC1 and found a number of candidate.

研究分野：植物生理学

キーワード：フォトトロピン 気孔開口 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

植物の表皮に存在する気孔は青色光により開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散により水を放出することで根からの養分の取り込みを促進する。気孔の開口は植物の生命活動を支える重要な生理応答である。

気孔は青色光受容体であるフォトトロピンが直下の基質の **BLUS1** をリン酸化することにより細胞膜 **H⁺-ATPase** を活性化させ、細胞膜を過分極させることで気孔開口に必要な浸透物質である **K⁺** の取り込みを促進することで開口する (**Takemiya et al., 2013 Nature Commun.**)。一方、孔辺細胞では葉肉細胞と異なり、青色光によりデンプンが分解される。青色光によりデンプンが分解されることで **K⁺** の対イオンとなるリンゴ酸や浸透物質である糖が合成されることで気孔開口を促進すると考えられてきた。

近年、青色光によるデンプン分解は青色光受容体であるフォトトロピンと **BLUS1** による **H⁺-ATPase** の活性化により制御されることが示された (**Horror et al. 2016, Curr. Biol.**)。しかし、青色光によるデンプン分解の全容は不明であり、その解明には青色光によるデンプン分解に関する因子の同定、機能解析が必要であった

2. 研究の目的

申請者らは青色光によりリン酸化される因子を同定することを目的に、孔辺細胞を材料としたリン酸化プロテオーム解析を行い、複数の青色光依存的にリン酸化されるタンパク質を同定した。上記の解析で得られた **WD40** リピートタンパク質に **BEC1 (BLUE LIGHT E3 COMPONENT1)** と命名した。 **T-DNA** 挿入変異体の表現型を調べたところ、 **bec1** 変異体では青色光による気孔開口とデンプン分解が阻害されていることがわかった。これは当該因子が青色光によるデンプン分解の鍵因子として機能することを示唆する。本研究では **BEC1** がデンプン分解に関与するメカニズム、そのリン酸化の意義、 **BEC1** と相互作用する因子を明らかにすることを目的に研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) **BEC1** のデンプン分解における位置付け

① **BEC1** がデンプン分解に必要な **H⁺-ATPase** の活性化に必要なかを、孔辺細胞プロトプラストを用いた解析により調べた。

BEC1 の抗リン酸化抗体を用いて、 **BEC1** が既知のフォトトロピンシグナルにより制御されるかを調べる。また、 **BEC1** が **H⁺-ATPase** の下流で機能するかを **H⁺-ATPase** の活性化剤であるフジコッキン (**Fc**) に応答して **BEC1** がリン酸化されるかを指標として調べた。

② **BEC1** によるデンプン分解と **BLUS1** による **H⁺-ATPase** によるデンプン分解の関係を調べるために **blus1 bec1** 二重変異体を作成し、デンプン分解の表現型を調べる。

(2) **BEC1** のリン酸化の意義の解明

bec1 変異体に野生型 **BEC1**、リン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化体を形質転換し、青色光による気孔開口とデンプン分解の表現型を調べることで **BEC1** のリン酸化の意義を調べた。

(3) **BEC1** と相互作用する因子の同定

BEC1 をリン酸化するキナーゼや下流の情報伝達因子を同定することを目的にした共同免疫沈降解析を行なった。 **3xFLAG BEC1** を過剰発現した形質転換体より孔辺細胞プロトプラストを調整し、 **FLAG** 抗体を用いた免疫沈降を行い、 **MS** 解析により沈降産物を同定した。

(4) 青色光による **H⁺-ATPase** の活性化が阻害される変異体の解析

以前の研究により赤外線サーモグラフィを用いた変異体スクリーニングを行い、当該の変異体を複数入手した。デンプン分解には **H⁺-ATPase** の活性化が必須であるため、この変異体の原因遺伝子の解明はデンプン分解メカニズムの解明に重要である。この変異体の原因遺伝子を解明と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) **BEC1** のデンプン分解における位置付け

① **bec1** 変異体より孔辺細胞を単離し、青色光による **H⁺-ATPase** の活性化を調べた。その結果、 **bec1** 変異体では青色光による **H⁺** の放出、活性化に必要な **H⁺-ATPase** のリン酸化は正常であった。これは **BEC1** が **H⁺-ATPase** の活性化には関与しないことを示唆する。

BEC1 がフォトトロピンからどのような情報伝達を受け取るかを調べるため、抗リン酸化抗体を用いてフォトトロピン情報伝達の変異体における **BEC1** のリン酸化を調べた。フォト

ロピン変異体では **BEC1** の青色光によるリン酸化は起こらなかった。意外なことに、**BEC1** は既知のフォトトロピンの基質である **BLUS1**、**CBC1** の変異体で正常にリン酸化された。これは **BEC1** が未同定の基質を介してフォトトロピンの情報を受け取ることを示唆する。次に **BEC1** が **H⁺-ATPase** の下流でデンプン分解を制御する可能性を検証した。**H⁺-ATPase** 活性化剤 **Fc** によるデンプン分解を調べたところ、*bec1* 変異体でも野生型と同様にデンプンが分解されることがわかった。さらに、抗リン酸化抗体を用いて **BEC1** のリン酸化を調べた。その結果、**H⁺-ATPase** は **Fc** によりリン酸化されたが、**BEC1** はされなかった。これらの結果は **BEC1** が **H⁺-ATPase** の下流では機能しないことを示唆する。以上の結果より **BEC1** は既知のデンプン分解とは全く別のメカニズムを介してデンプン分解を制御することが示唆された。これらの結果について学会にて報告した。

②上記の解析により **BLUS1** による **H⁺-ATPase** の活性化と **BEC1** による情報伝達は独立していることがわかった。これらの関係を調べるために、*blus1 bec1* 二重変異体を作成し、デンプン分解を調べた。デンプン分解に関与するアミラーゼを欠く変異体では孔辺細胞葉緑体に過剰にデンプンが蓄積する(Horrer et al, *Curr Biol.* 2016)。二重変異体でも同様の表現型を示すことが考えられたが、予想と反して二重変異体の表現型は *blus1, bec1* 変異体と同様であった。これは2つの情報伝達が協調してデンプン分解を制御することを示唆する。

以上のことから従来考えられてきたようにデンプン分解は **BLUS1** による **H⁺-ATPase** の活性化のみに制御されず、**BLUS1** と **BEC1** の2つの情報伝達により厳密に制御されることが示唆された。今後は **Fc** を用いて **H⁺-ATPase** を光によらず活性化させ、**BLUS1** と **BEC1** のシグナルが片方しか流れていない状況と両方が流れている状況をそれぞれの変異体で再現し、デンプン分解に両者のシグナルが必要であるかを検証する。

(2) **BEC1** のリン酸化の意義の解明

bec1 変異体に野生型の **BEC1** 遺伝子もしくはリン酸化部位を置換した非リン酸化体を形質転換した。これらの表現型解析をおこなったところ、野生型 **BEC1** は気孔開口、デンプン分解の表現型を相補したが、非リン酸化体では相補しなかった。これは **BEC1** のリン酸化が気孔開口、デンプン分解に重要であることを示唆する。この結果について学会にて報告した。

(3) **BEC1** と相互作用する因子の同定

BEC1 はフォトトロピンのシグナルを受け取るが、既知因子の **BLUS1** や **CBC1** によりリン酸化されない可能性が示唆された。これは未知のキナーゼがフォトトロピンのシグナルを **BEC1** に仲介することを示唆する。そこで **BEC1** と相互作用する因子を同定することを目的に **3xFLAG** 融合 **BEC1** を発現する植物から孔辺細胞を単離し、**FLAG** 抗体で免疫沈降し、**MS** 解析を行った。その結果、多数の **BEC1** と複合体を形成するキナーゼを見出した。今後はこれらのキナーゼと **BEC1** を大腸菌にて作製し、*in vitro kinase assay* により **BEC1** のリン酸化を調べ、**T-DNA** 挿入変異体の解析を進める予定である。

(4) 青色光による **H⁺-ATPase** の活性化が阻害される変異体の解析

赤外線サーモグラフィを用いた変異体スクリーニングにより青色光による気孔開口を探索した。その結果、目的の変異体を多数入手した。この中に含まれるデンプン分解に必須な **H⁺-ATPase** の活性化が阻害される変異体に着目して、解析を行った。原因遺伝子を同定した結果、意外なことにオートファジーの必須因子の **ATG2** であることがわかった。詳細な解析の結果、*atg2* 変異体ではオートファジーの欠損により異常なペルオキシソームが蓄積し、**H⁺-ATPase** の活性化を阻害する活性酸素種が孔辺細胞に蓄積することで気孔開口が阻害されることがわかった。この結果について内容をまとめて国際誌に発表した。

引用文献

Atsushi Takemiya, Naoyuki Sugiyama, Hiroshi Fujimoto, Toshifumi Tsutsumi, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Yasuomi Tada, John M Christie, Ken-ichiro Shimazaki
“Phosphorylation of **BLUS1** kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening”
Nature Commun. 2013 ;4 :2094

Daniel Horrer, Sabrina Flutsch, Diana Pazmino, Jack S.A. Matthews, Matthias Thalmann, Arianna Nigro, Nathalie Leonhardt, Tracy Lawson, and Diana Santelia
“Blue Light Induces a Distinct Starch Degradation Pathway in Guard Cells for Stomatal Opening”
Curr Biol. 2016 Feb 8;26(3):362-70.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hosotani Sakurako, Yamauchi Shota, Kobayashi Haruki, Fuji Saashia, Koya Shigekazu, Shimazaki Ken-ichiro, Takemiya Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 A BLUS1 kinase signal and a decrease in intercellular CO ₂ concentration are necessary for stomatal opening in response to blue light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	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） 10.1093/plcell/koab067	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 -

1. 著者名 Yamauchi Shota, Mano Shoji, Oikawa Kazusato, Hikino Kazumi, Teshima Kosuke M., Kimori Yoshitaka, Nishimura Mikio, Shimazaki Ken-ichiro, Takemiya Atsushi	4. 巻 116
2. 論文標題 Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 19187 ~ 19192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1910886116	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内翔太、杉山直幸、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 青色光によるBEC1 のリン酸化は孔辺細胞のデンプン分解を誘導し気孔開口を促進する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細谷桜子、山内翔太、小林遥貴、富士彩紗、古屋繁一、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 青色光による気孔開口にはBLUS1 を介したH ⁺ -ATPase の活性化と光合成による葉内CO ₂ 濃度の低下 が必要である
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富士彩紗, 田原京佳, 山内翔太, 細谷桜子, 岡島公司, 島崎研一郎, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光による気孔開口におけるBLUS1 キナーゼドメインの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内翔太、杉山直幸、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 E3ユビキチンリガーゼBEC1はデンブンを分解を誘導し気孔開口を促進させる
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会 広島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Yamauchi, Shoji Mano, Kazusato Oikawa, Kazumi Hikino, Kousuke M. Teshima, Yoshitaka Kimori, Mikio Nishimura, Ken-ichro Shimazaki, Atsushi Takemiya
2. 発表標題 Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that essential for blue light-dependent stomatal opening
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内翔太
2. 発表標題 気孔孔辺細胞における青色光依存のデンブンを分解の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 山口大学研究拠点群形成プロジェクト 若手の会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------