

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05772

研究課題名（和文）気孔の閉口を制御するリンゴ酸輸送体の機能解明と作物の環境適応への応用

研究課題名（英文）Functional analyses of the malate transporters involved in stomatal closure, and application to crops for environmental adaptation.

研究代表者

佐々木 孝行（Sasaki, Takayuki）

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：60362985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：トマトのSIALMT11とシロイヌナズナのAtALMT12に関して、植物における気孔閉口の誘導様式とタンパク質の機能領域について比較解析した。アポプラスト側のリンゴ酸が誘導する気孔閉口に、2つの気孔タイプALMTは関与した。しかし、アブシジン酸を介した気孔閉口への関与は、植物種により異なっていた。一方で、2つの気孔タイプALMTは、電気生理学的性質として一定の膜電位を頂点にした「ベル型」電流・電圧様式を示した。そして、タンパク質のC末端酸性アミノ酸の欠損により、膜電位依存的に電流が増大する様式へと変化したことから、このC末端酸性アミノ酸が膜電位センサーとして機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンゴ酸輸送体ALMTファミリーの生理機能の多様性に着目して、本研究では気孔タイプALMTが関与する、気孔閉口の誘導シグナルにトマトとシロイヌナズナで相同・相違点を見いだした。これは気孔タイプALMTを乾燥耐性の付与、高CO<sub>2</sub>適応に応用する際に有用な情報となる。さらに、気孔タイプALMTタンパク質のC末端酸性アミノ酸が電位センサーとして機能することは、今後ゲノム編集などでC末端側を削除することで、気孔閉口を調節した作物をつくる技術転用への可能性を示した。そして将来的に、気孔タイプALMTの機能制御により、気候変動に耐性を付与した作物をつくり、持続的な作物生産と品質向上への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Two guard-cell-type ALMT genes, SIALMT11 in tomato and AtALMT12 in Arabidopsis, were compared for stomatal closure patterns between tomato and Arabidopsis plants, as well as for functional domain of the transport proteins. Apoplast malate-induced stomatal closure was observed in both plants, while abscisic acid signaling was different in response to stomatal closure. In contrast, two guard-cell-type ALMT proteins possessed an acidic amino acid at the end of the C-terminus and showed a “bell-shaped” current-voltage pattern as an electrophysiological property. However, truncation of the acidic amino acid from the protein revealed a voltage-dependent increase of the currents. These results suggest that C-terminal acidic residue is involved in the voltage sensing of these proteins.

研究分野：植物栄養学および土壌学関連

キーワード：気孔 ALMT輸送体 リンゴ酸 シロイヌナズナ トマト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ALMT タイプ輸送体は、コムギの酸性土壌・アルミニウム耐性遺伝子(aluminum-activated malate transporter 1: ALMT1)として、我々が世界で初めて発見した「リンゴ酸輸送体ファミリー」である。その後の研究から、多くの植物に ALMT 相同遺伝子の存在が明らかとなったが、未だその多くは輸送特性や生理的な役割について解っていない。

気孔の閉口時には、2つのアニオンチャネルの活性化が重要な役割を示す。その一つが、SLAC1 (*Slow Anion Channel associated 1*)である (Negi et al. Nature 2008, Vahisalu et al. Nature 2008)。様々な植物種にある多数の SLAC1 相同タンパク質が研究されており、アニオンの輸送時の活性化に関わるリン酸化部位、そこに関与するリン酸化・脱リン酸化酵素などの修飾因子が明らかになっている。それに対して、気孔タイプ ALMT についての情報は少ない。報告例としては、シロイヌナズナの AtALMT12 の C 末端側のいずれかのドメインにチャネルの膜電位依存部位が推定されていた (Mumm et al. Mol. Plants, 2013)。さらに、シロイヌナズナで ABA シグナル伝達経路の修飾因子の一つである OPEN STOMATA 1 (OST1) と呼ばれる SnRK2 キナーゼが SLAC1 と同様に AtALMT12 をリン酸化することが報告されている (Imes et al. Plant J., 2013)。しかし、AtALMT12 の C 末端側のどこに膜電位依存性ドメインがあるのか、OST1 キナーゼが AtALMT12 のどの部位をリン酸化するか等の詳細は明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、孔辺細胞で発現する気孔タイプ ALMT の輸送機能特性の解明を目的に、トマトの SIALMT11 とシロイヌナズナの AtALMT12 について比較解析した。その特性を応用することで、作物に環境適応能力(乾燥耐性や高 CO<sub>2</sub> 適応)を付与することを最終目標とした。

### 3. 研究の方法

気孔開度の計測は、SIALMT11 遺伝子については、SIALMT11 promoter:: SIALMT11 (全長1661 bp中の500塩基部分)のRNAi用バイナリプラスミドをトマト (Micro-Tom 品種) に形質転換し、発現量が低下した遺伝子発現抑制体を選抜した。シロイヌナズナについては、以前の研究で用いている *atalmt12-1* (Sasaki et al. 2010) の遺伝子発現抑制システムを使用した。これらの植物体から葉を切断し、リンゴ酸またはアブシジン酸を含む処理液に浸けることで、気孔閉口を誘導し、遺伝子発現抑制体と野生株で比較した。

さらに、SIALMT11 および AtALMT12 の輸送活性測定は、アフリカツメガエル卵母細胞に、ALMT 輸送体の cRNA を導入し、輸送体タンパク質を細胞膜に発現させた後に、電気生理学的測定手法 (two-electrode voltage clamp: TEVC 法) により、輸送基質や活性化の特性を比較解析した。輸送体タンパク質のアミノ酸欠損は、PCR または PrimeSTAR Max によるミュータジェネシス法 (タカラバイオ) により作製した。

その他の方法の詳細は Sasaki et al. (Plant, Cell Environ. 2022) に記載している。

### 4. 研究成果

本研究では、16 あるトマト SIALMT 遺伝子のうち、前の科学研究費補助金 (基盤C: 17K07697) で得られていた孔辺細胞で発現する SIALMT11 遺伝子に着目し、シロイヌナズナの気孔閉口に関わる AtALMT12 との比較解析を行い、以下に示す成果を得た。

#### (1) トマトとシロイヌナズナにおける気孔タイプ ALMT が関与する気孔閉口

トマト (Micro-Tom 品種) で, *SIALMT* 遺伝子発現抑制系統を形質転換により作製した. そして, 遺伝子発現が野生株の 1/10 に抑制された 2 つの RNAi 系統を得た. 外液 (アポプラスト側) のリンゴ酸濃度上昇に依存した気孔閉口は, 野生株と比較してトマト RNAi 系統では抑えられた (図 1). 同様にシロイヌナズナでも, *atalmt12-1* 変異体では外液リンゴ酸による気孔閉口が抑制された (Sasaki et al. 2022).

一方, シロイヌナズナではアブシジン酸 (ABA) により気孔閉口が誘導され, *atalmt12-1* 変異体では気孔閉口が抑制されたことから, AtALMT12 が関与する気孔閉口は ABA 応答性を示した (Sasaki et al. 2010). しかし, トマトにおいて, ABA が誘導する気孔閉口は, 野生株と RNAi 系統とで同程度であった (図 1).

以上の結果から, トマトとシロイヌナズナの気孔タイプ ALMT について, アポプラスト側のリンゴ酸濃度上昇による気孔閉口については, 植物種が異なっても類似性を示すが, ABA シグナル伝達経路を介した気孔閉口への関与は植物種間で異なることが示唆された.

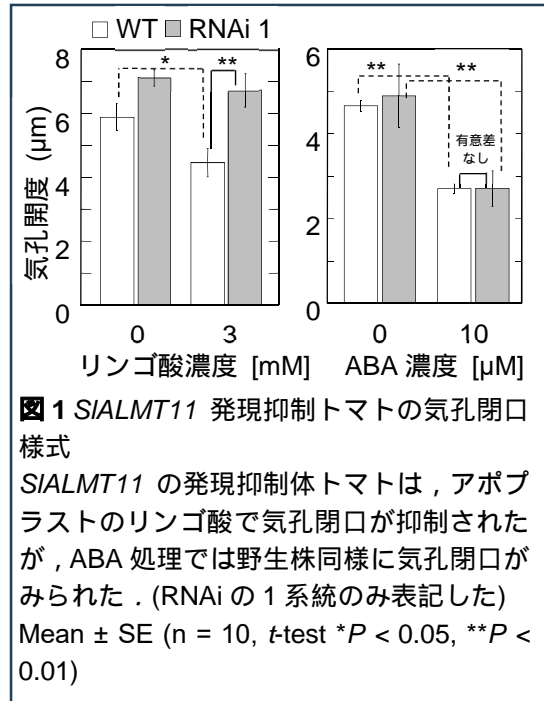


図 1 *SIALMT11* 発現抑制トマトの気孔閉口様式

*SIALMT11* の発現抑制体トマトは, アポプラストのリンゴ酸で気孔閉口が抑制されたが, ABA 処理では野生株同様に気孔閉口がみられた. (RNAi の 1 系統のみ表記した)

## (2) *SIALMT11* および AtALMT12 の電気生理学的な輸送特性

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて, *SIALMT11* と AtALMT12 がもつ輸送特性を電気生理学的に調査した.

### 輸送を活性化する外液の有機酸, および輸送基質

*SIALMT11* と AtALMT12 は共に外液リンゴ酸で活性化され, リンゴ酸を放出する機能を示す. 電気生理学的測定手法では, 外液リンゴ酸で活性化されるリンゴ酸放出に伴う電流パターンは (植物の細胞膜の静止電位付近の) -100 mV 付近の膜電位をピークにした「ベル型」を示した.

同様の「ベル型」電流電圧パターンは, フマル酸とクエン酸でもみられた. そして, 外液を塩化ナトリウムや, 硝酸塩, 硫酸塩などの無機イオン, グルコン酸 (モノカルボン酸) にすることで「ベル型」電流パターンのピークを示す膜電位は -60 mV 付近まで上昇し, リンゴ酸放出を示す電流の値は低下した. このことから, 外液にリンゴ酸などの有機酸を添加することで気孔タイプ ALMT の電位依存性が過分極側に変化し, チャンネルの開口が促進されることが明らかとなった.

さらに, 外液のリンゴ酸 (L 体) については, 鏡像異性体の D-リンゴ酸でも同様に活性化を示すが, フマル酸の幾何異性体のマレイン酸ではグルコン酸などと同じであった. 試験に用いた外液 (pH 5.6) では, マレイン酸は分子内水素結合体を示し, 一つのカルボキシル基 (モノカルボン酸様) となる. すなわち, 気孔タイプ ALMT チャンネルの十分な活性化には, 細胞外 (植物のアポプラスト側) にジカルボン酸・トリカルボン酸が必要であることが示された.

そして, 輸送基質については, リンゴ酸以外にフマル酸とコハク酸は放出され, クエン酸は放出されなかった. これより, 気孔タイプ ALMT はジカルボン酸を輸送することが示された.

### リンゴ酸放出に関与する C 末ドメインの同定

前述のように, *SIALMT11*, AtALMT12 共に, 「ベル型」の電流電圧パターンを示す (図 2). しかし, 共にタンパク質の C 末端への GFP 融合, または C 末端側からアルファヘリックス構造までの約 30 アミノ酸配列の欠失 (*SIALMT11* では 33 アミノ酸残基, AtALMT12 では 28 残基) によ

り、「ベル型」パターンの消失，膜電位依存的な電流の増大が観察された。

この2つの気孔タイプALMTのC末領域に共通するアミノ酸として，C末端に酸性アミノ酸残基があった。SIALMT11ではアスパラギン酸(略号：D)，AtALMT12ではグルタミン酸(略号：E)であった。これら2つの気孔タイプALMTと相同性を示す他の31種の植物由来ALMTタンパク質のアミノ酸配列の相同領域を比較しても，1植物由来のALMT以外，30のALMTのC末端に，アスパラギン酸またはグルタミン酸の酸性アミノ酸が保存されていた。

そこで，C末端の酸性アミノ酸を欠失させたSIALMT11  $\Delta$ D536 およびAtALMT12  $\Delta$ E560 について，電気生理的に輸送機能を調べた結果，「ベル型」パターンの消失がみられ，膜電位依存的な電流の増大がみられた(図2)。

これらの結果から，C末端の一つの酸性アミノ酸が

輸送体の膜電位依存性を制御しており，植物の気孔タイプALMTに共通した特徴であることが示唆された。特に，アプラナ科とイネ科の植物の気孔タイプALMTでC末端ドメインが「A-A-E」であった。他の植物でも酸性アミノ酸(D/E)の数個前は，電荷をもたないアラニン(A)やグリシン(G)，セリン(S)，スレオニン(T)であることから，C末端がマイナス電荷を示すことが「ベル型」パターンに必要であると推定された。

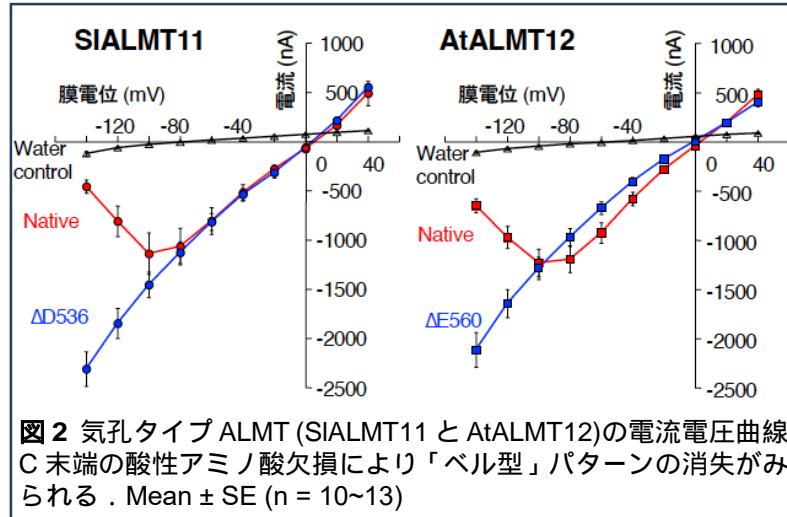


図2 気孔タイプALMT (SIALMT11とAtALMT12)の電流電圧曲線 C末端の酸性アミノ酸欠損により「ベル型」パターンの消失がみられる。Mean  $\pm$  SE (n = 10~13)

アポプラストのリンゴ酸上昇による気孔閉口の誘導には，高CO<sub>2</sub>条件が関与すると言われていいる。そのため今後は，高CO<sub>2</sub>条件，アポプラストのリンゴ酸，気孔タイプALMTとの関係を詳細に解析する。また，シロイヌナズナとトマトの気孔タイプALMTではABA応答性の気孔閉口の様式が異なっていた。なぜ，トマトSIALMT11はABAに応答しないのか。そのメカニズムの解明と関与するABAシグナル伝達の修飾因子の同定を試みる。そして，気孔タイプALMTの「ベル型」パターンは，気孔閉口だけでなく，気孔開口時の孔辺細胞膜の過分極時に不活性化するための役割をもつことが予想される。その「ベル型」パターンの維持にC末端の酸性アミノ酸が関与することが示唆された。今後は，このC末端酸性アミノ酸を欠損させて気孔開口の調節が可能となるのか，解析を進める。

このように，多くの植物種に気孔タイプのALMTが保存されていると推測されることから，これらの機能を調節することで気孔開度の調節を行い，環境ストレス条件下において作物の生産性の向上につなげる応用に研究を発展させる。

#### 参考文献

Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant Cell Physiol.* 51, 354-365 (2010)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Tsuchiya Yoshiyuki, Nakamura Takuji, Izumi Yohei, Okazaki Keiki, Shinano Takuro, Kubo Yasutaka, Katsuhara Maki, Sasaki Takayuki, Yamamoto Yoko	4. 巻 62
2. 論文標題 Physiological Role of Aerobic Fermentation Constitutively Expressed in an Aluminum-Tolerant Cell Line of Tobacco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1460 ~ 1477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab098	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 佐々木孝行	4. 巻 57
2. 論文標題 植物特異的なリンゴ酸輸送体の解析と作物生産性の向上を目指して	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Sasaki Takayuki, Ariyoshi Michiyo, Yamamoto Yoko, Mori Izumi C.	4. 巻 45
2. 論文標題 Functional roles of ALMT type anion channels in malate induced stomatal closure in tomato and Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 2337 ~ 2350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14373	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木孝行・有吉美智代・山本洋子・森泉
2. 発表標題 植物の気孔で発現するリンゴ酸輸送体の特徴
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 (岡山)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋善幸・佐々木孝行・且原真木・山本洋子
2. 発表標題 タバコ培養細胞を用いたアルミニウム耐性における硝酸還元酵素の関わり
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（岡山）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口文香・吉井健祐・丸山隼人・佐々木孝行・西田翔・和崎淳・信濃卓郎・渡部敏裕
2. 発表標題 アルミニウム集積植物 <i>Melastoma marabathricum</i> におけるMATE遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（岡山）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木孝行・有吉美智代・山本洋子・森泉
2. 発表標題 気孔ALMTチャネルの輸送制御メカニズム
3. 学会等名 日本植物学会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木孝行・有吉美智代・山本洋子・森泉
2. 発表標題 トマトとシロイヌナズナのALMT輸送体による気孔閉口制御機構の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木孝行・有吉美智代・山本洋子・森泉
2. 発表標題 ALMT リンゴ酸輸送体による気孔閉口メカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物生理学会（つくば）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 銀叶・佐々木孝行・中村宜督・宗正晋太郎・村田芳行・森泉
2. 発表標題 ジャスモン酸メチル誘導性気孔閉口へのPYL5 およびPYL8 ABA 受容体の関与
3. 学会等名 日本植物生理学会（つくば）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋智子・丸山隼人・氷見英子・山本洋子・佐々木孝行
2. 発表標題 コムギの根端におけるTaALMT1輸送体タンパク質の安定的発現機構の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂口文香・丸山隼人・佐々木孝行・西田 翔・和崎 淳・信濃卓郎・渡部敏裕
2. 発表標題 アルミニウム集積植物メラストーマにおけるFRD3タイプMATEのアルミニウム輸送への関与
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Sasaki
2. 発表標題 Functional diversity of ALMT-type malate transporters in tomato
3. 学会等名 18th Japan Solanaceae Consortium Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 孝行・山本 洋子・森 泉
2. 発表標題 気孔タイプALMTの輸送機能の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会 (仙台)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 資源植物科学研究所 植物分子生理学グループ ホームページ  <a href="https://www.rib.okayama-u.ac.jp/Plant_Mol_Physiol/index-j.html">https://www.rib.okayama-u.ac.jp/Plant_Mol_Physiol/index-j.html</a></p>
---

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
研究協力者	森 泉  (Mori Izumi)  (40379805)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授    (15301)	

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