

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15447

研究課題名(和文) 実用的な環境適応植物創生の基盤開発をめざした複合ストレス下の気孔開閉調節系の解析

研究課題名(英文) Analysis of stomatal movement regulation system under multiple stresses for developing practical basis of stress-resistant plant production

研究代表者

齋藤 俊也 (Saito, Shunya)

東北大学・工学研究科・学術研究員

研究者番号：00825226

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)：当初予定していた孔辺細胞プロトプラストを用いたホスホプロテオミクスおよび蛍光プローブを用いた実験は、実験プロトコルの最適化やプローブの実用化が難航を極め断念せざるを得なかった。しかし代替案としての卵母細胞や酵母を用いた実験、さらに共同研究先より共有させていただいた実験データから、SLAC1・KAT1・また他のK⁺チャンネルにおける未知のリン酸化部位が判明した。今後これらの部位に対して電気生理的な解析を行う予定である(SLAC1については既に完了)。さらに、本研究の一環としてSLAC1の活性化因子についても調査した結果、気孔外に発現するにもかかわらず気孔開閉を制御する特殊な因子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回研究成果として同定されたチャンネルのリン酸化部位はいずれもまだ報告例がない部位である。このうちSLAC1に関しては電気生理測定での解析を完了している。過去の報告と照らし合わせると、SLAC1のリン酸化制御は1・2残基によって決まるのではなく、十数個の残基の間でリン酸化が微妙なバランスで行われることによって制御されている可能性が高く、このバランスをどう制御していくかが重要と判明した。KAT1とその他チャンネルについては今後解析を続ける。また「気孔外に発現するにもかかわらず気孔開閉を制御する因子」については、全く新しいアプローチで気孔の開閉を制御する鍵となり得るため、今後の解析が特に重要である。

研究成果の概要(英文)：Our original plan was to carry out phosphoproteomics using guard cell protoplasts (GCPs) and analysis of stress-treated GCPs with a novel fluorescent probe. However, we faced problems with our GCP preparation and stability of our probe. Therefore we had to shift to an alternate plan, and carried out oocyte and yeast experiments instead. By doing these, and with the help of our co-workers, we were able to discover previously unknown phosphorylation sites in SLAC1, KAT1 and other K⁺ channels. We are now beginning to electrophysiologically analyze what function these phosphorylation sites confer to these channels (We already finished the measurement for SLAC1). In addition, we have been in search and investigation for regulatory component of SLAC1 as well. As a result, we discovered a unique regulatory component which regulates stomatal movement but does not reside in guard cell.

研究分野：生物物理化学

キーワード：イオンチャンネル 植物 リン酸化酵素 膜タンパク質 電気生理学 タンパク質修飾 生体内シグナル
分子 質量分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、世界の農地の5分の1が土壌の乾燥や病害の発生に見舞われており、将来的な人口増加に伴う食糧不足に対応するため、作物の乾燥ストレス・病害耐性の向上や生産性の向上が求められている (Qadir et al., 2014)。これを達成するための最重要ターゲットが気孔である。気孔は水分の蒸散やCO₂の取込を担うため、乾燥ストレスへの耐性や温度変化への順応・光合成の効率に大きく影響する。さらに気孔は病原菌の主要な侵入口にもなっており、病害耐性においても重要な役割を持つ。従って気孔の開閉を制御し状況に応じて最適化することが植物の環境ストレス耐性や生産性の向上に向けての大きな一歩となる。

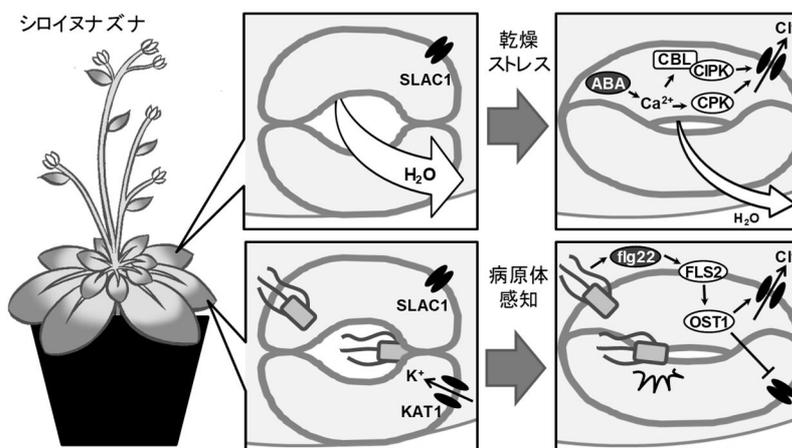


図1 乾燥・病害に対する気孔のキナーゼ-チャネルシグナル応答

イオンチャネル	機能	キナーゼ
SLAC1	気孔閉鎖	CBL1/4/5/9-CIPK11
SLAH3	気孔閉鎖	CBL1/4/5/9-CIPK24, CBL1/5/9-CIPK5
KAT1	気孔開口	CBL1/4/5/9-CIPK11, CBL1/5/9-CIPK17
KAT2	気孔開口	CBL1/5/9-CIPK17

表1 申請者が同定した気孔イオンチャネルの新規制御キナーゼ

気孔の開閉は、孔辺細胞の細胞膜に局在するイオン輸送タンパク質(イオンチャネル)とその活性を調節するリン酸化酵素(キナーゼ)により制御されている。乾燥ストレス下では、Ca²⁺依存型キナーゼCPK6やCa²⁺センサーCBL1とCIPK23キナーゼの複合体が細胞膜のCl⁻チャネルSLAC1やNO₃⁻チャネルSLAH3をリン酸化により活性化し、細胞の浸透圧が調整され気孔が閉鎖する (Mori et al., 2006; Maierhofer et al., 2014)。また、病原菌の接近時にはFLS2キナーゼにより病原体が感知され、OST1キナーゼを経由してSLAC1を活性化すると共に、気孔開口誘導K⁺チャネルKAT1を抑制し、気孔を閉鎖することで病原菌の侵入を防ぐ (Guzel Deger et al., 2015) (図1)。

気孔の開閉に関わる因子は上記以外にも多数報告されている。申請者はこれまでの研究において、気孔のイオンチャネルを制御する新規キナーゼを多数発見してきた (Saito et al., 2018; 申請者博士論文, 表1)。しかし、各種ストレスに応じてこれらのキナーゼがどのように使い分けられているのかは不明である。また、これまでの国内外の研究では乾燥・塩・病害など個別のストレスシグナルの解析が行われてきたが、実際の自然界では植物は様々な要因による複合的なストレスを受けるため、単一のストレスシグナル経路の解析だけでは実用的なストレス耐性植物の創生に至らない点が問題となっている。以上から、研究課題の核心をなす学術的「問い」は次の二点となる。

- (1) 各種ストレスに応じてキナーゼ・チャネルがどう使い分けられているのか？
- (2) 複合ストレス下で気孔はどのように応答するのか？

2. 研究の目的

本研究の目的は以下に提唱する課題を達成することで上記の問いに対する答えを得る。

(1) 本研究の第一段階としてまず、各種ストレス下における気孔のキナーゼ-イオンチャネル間シグナルの全貌の解明を試みる。気孔の開閉制御を行うキナーゼは多数同定されているが、それぞれがどのようなストレスに対応してはたらくのかはほとんど明らかになっていない。また、キナーゼごとにイオンチャネルの認識部位は異なり、どの部位をリン酸化するかによってチャネル活性への影響も異なる。このことから、イオンチャネルのリン酸化部位の使い分けがストレスシグナルの使い分けの最終段階を担っている可能性が大きいと考えた。そこで、ホスホプロテオミクス解析と電気生理測定を用いて、各種ストレス下における孔辺細胞の活性化キナーゼおよびチャネルのリン酸化部位の同定を試みる (図2)。

(2) 次に、様々な複合ストレス下における実際の気孔の応答を解析する。植物体を用いた複合ストレスに対する応答解析は、恒常的なストレス付与が難しく、ストレスの種類や強度の組合せも膨大な数にのぼるため現実的ではない。そこで、プロトプラスト化により単離した孔辺細胞を用いた解析を行う。申請者は現在、東北大学理学部上田研究室との共同研究により、気孔の開鎖度合いに応じて蛍光強度が変化する独自の蛍光プローブを開発中である。このプローブを

用いて、様々な複合ストレスに対する気孔の応答解析を網羅的に行う。さらに(1)で得られた情報をもとにキナーゼ・チャンネルの遺伝子欠損・変異植物を作製し、同様の解析を行う。以上全ての結果をもとに複合ストレスに対する気孔応答の実験にもとづいたデータベースを作製し、実用的なストレス耐性植物創生の基盤を構築する。

本申請で対象とする植物としてはシロイヌナズナを用いる。全ゲノムが解読されている・成長が早く複合ストレスに対する網羅的な解析に適している・シロイヌナズナの気孔における CPK・CBL-CIPK などのキナーゼが他の植物種にも広く保存されていることが理由である。

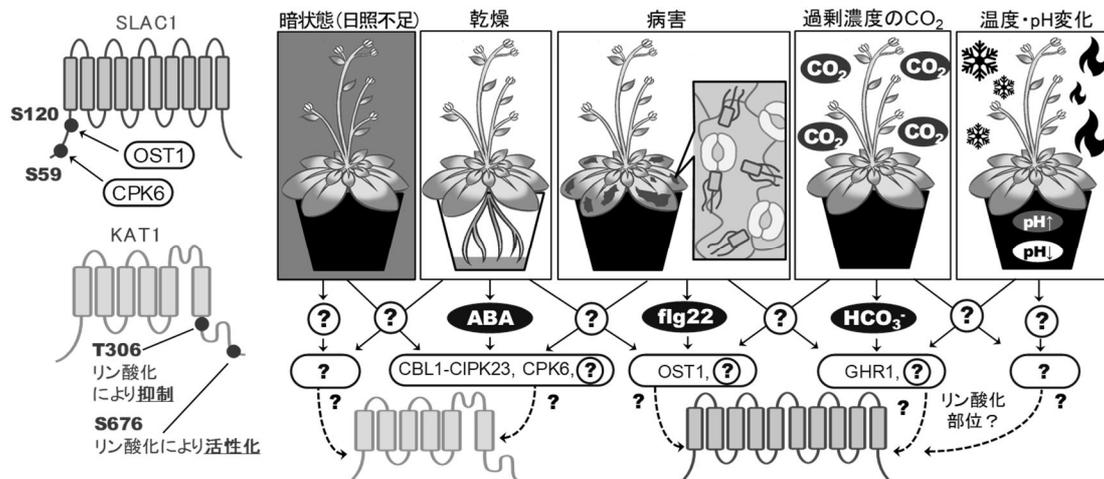


図2 各種ストレスに応じた気孔のキナーゼ・チャンネル間シグナル予想図。?は本研究で解明を試みる

(3)本研究における学術的独自性と創造性は下記の通りとなる。

気孔の各種ストレスシグナル経路はこれまで一部しか解明されていない。本申請における解析によりこれを一挙に解明し、気孔の研究において世界をリードすることが可能である。

本申請で使用する蛍光プローブは申請者らが独自に開発するものであり、他の研究機関にはない独自技術である。これを用いることで、これまで困難であった複合ストレス下における気孔の応答解析を世界に先駆けて行うことが可能である。

本申請において構築するデータベースをもとに、実用的なストレス耐性植物の創生に向けた指針が立てられ、大きなブレークスルーが起ると期待できる。

3. 研究の方法

(1)本研究においてはまず、ホスホプロテオミクス解析による各種ストレスに対応した孔辺細胞キナーゼ・チャンネルリン酸化部位の同定を行う。単離した孔辺細胞プロトプラストに対し、暗所・高温・低温処理や外液への ABA, flg22, NaHCO₃ 添加・pH 変化など、様々な種類の環境ストレスを模した処理を行う。全タンパク質抽出・LC-MS/MS による全リン酸化ペプチド検出の後、データをシロイヌナズナのタンパク質データベースと照合することで、自己リン酸化(活性化)したキナーゼおよびイオンチャンネルのリン酸化部位を同定する(図3)。

(2)次に、電気生理測定によるキナーゼ・チャンネルリン酸化部位の対応関係の解析を行う。(1)のデータをもとに、SLAC1, KAT1 など孔辺細胞チャンネルのリン酸化部位(Ser/Thr)に疑似リン酸化(Ala)変異・脱リン酸化(Asp)変異を加えた変異チャンネルを作製する。この変異チャンネルと各種キナーゼをアフリカツメガエル卵母細胞上に共発現させ、電気生理測定によりキナーゼとチャンネルリン酸化部位の対応関係を解明する(図3)。

(3)次に、蛍光プローブを用いた気孔の複合ストレス応答解析を下記の二段階で行う。

(1)で用いたストレス条件を複数組合せ、それぞれ強度をふって孔辺細胞プロトプラストを処理する。そこに申請者ら独自の蛍光プローブを添

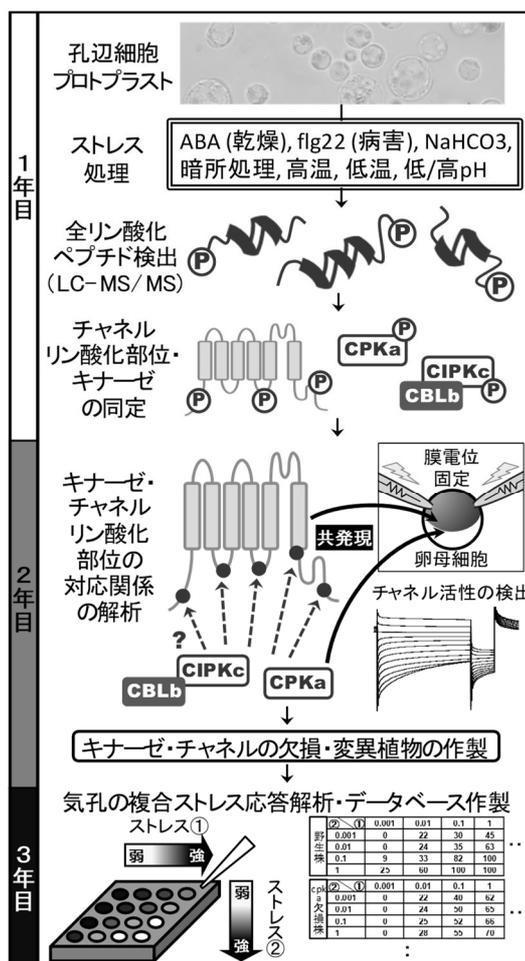


図3 本申請研究のフローチャート

加することで、複合ストレスに対する気孔の応答(開閉)を蛍光強度により評価する。

(1)(2)で得られた情報をもとに、各種ストレスにおいて重要な孔辺細胞キナーゼ・チャネルリン酸化部位に対し、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集(Tsutsui et al., 2017)により遺伝子欠損や疑似リン酸化・脱リン酸化変異を導入した変異体植物を作製する。この変異体植物に対し蛍光プローブによる同様の解析を行い、複合ストレス下における各種キナーゼ・チャネルリン酸化部位の役割を解き明かす(図3)。

(4)以上(1)~(3)の実験データを集約し複合ストレスに対する気孔応答の実験データベースを作製することにより、実用的なストレス耐性植物の創生に向けた基盤を構築する。また、(1)のホスホプロテオミクス解析が成功しなかった場合、代替実験として酵母を用いたキナーゼ・チャネルのスクリーニングを行う。シロイヌナズナのゲノム中には孔辺細胞キナーゼ CPK6 のホモログが 33 種類、CBL1 には 9 種類、CIPK23 には 25 種類存在する(CBL-CIPK の組合せは全部で 260 通り)。申請者は K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- などのチャネルを欠損した酵母に CPK と CBL-CIPK の組合せ全てをそれぞれ発現させた酵母株を現在作製中である。この酵母株に KAT1、SLAC1、SLAH3 などの孔辺細胞チャネルを共発現させ、低 K^+ 、高 Cl^- などの条件で培養することでチャネル・キナーゼの組合せを同定する。さらにチャネルの Ser/Thr 残基に網羅的に疑似リン酸化(Ala)・脱リン酸化(Asp)変異を網羅的に加え、同様の解析を行うことでチャネルのリン酸化部位の同定を行う。

4. 研究成果

(1)当初の研究計画では、ホスホプロテオミクス解析により気孔の全タンパク質のリン酸化解析を行ったうえで電気生理測定によりイオンチャネルとキナーゼの対応関係を割り出す予定であったが、ホスホプロテオミクス解析および蛍光プローブの実用化が難航を極めたことにより当初の計画は断念せざるを得なかった。そのため、ホスホプロテオミクス解析の結果を待たず、まずは既知の気孔チャネル活性化キナーゼに関して、疑似リン酸化・脱リン酸化変異チャネルを用いたリン酸化部位の解析を試みた。しかし、20

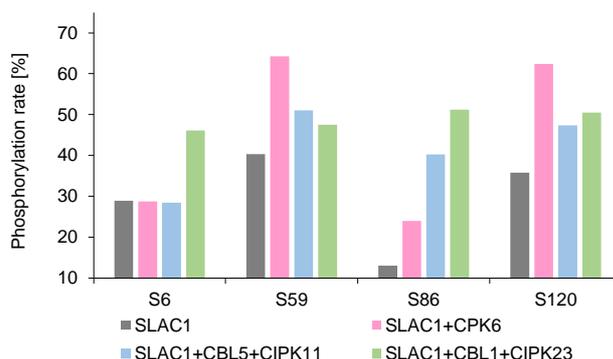


図4 キナーゼの種類による SLAC1 のリン酸化部位の違い

個近くもの候補アミノ酸について本実験を行うもリン酸化部位の特定に至らなかったため、手法を転換し、卵母細胞を利用した LC-MS/MS によるチャネルリン酸化部位の実験系を立ち上げた。気孔アニオンチャネル SLAC1 を活性化する複数のキナーゼに対し、卵母細胞を利用したイオンチャネル精製および LC-MS/MS により SLAC1 のリン酸化部位を同定したところ、当初の予想通りキナーゼの種類によって異なる部位に対するリン酸化が同定された。さらには、SLAC1 の Ser6 と Ser86 がこれまで報告のなかったリン酸化部位として同定された(図4)。これを受け、まずこれらの部位に疑似リン酸化/脱リン酸化変異を加えた SLAC1 の輸送活性をアフリカツメガエル卵母細胞上で測定したが、輸送活性の優位な変化は見られなかった。研究期間中に発表された PNAS 誌の論文 (Deng et al., 2021) の内容を加味すると、どうやら SLAC1 のリン酸化制御は当初予想していたような 1・2 残基のリン酸化/脱リン酸化ではなく、十数個の残基の間でリン酸化が微妙なバランスで行われることによって制御されている可能性が高い、という結論に達した。今後どのようにこのバランスを調整するかが今後の研究の鍵となる。

(2)当初本実験で使用予定であった蛍光プローブに関しては、実験データの不安定性が改善できずいまだ実用化には至っていない。一方、気孔イオンチャネルの阻害剤スクリーニングにより、一般的な植物ホルモンの作用における Ca^{2+} 濃度上昇ピークとは異なる形のピークを誘発する化合物を発見した。この化合物に関しては、近々研究成果を論文として発表する予定である。また、OST1、CPK3/6、CBL など様々な気孔のリン酸化モジュールの遺伝子欠損植物に対しこの化合物を投与すると、気孔応答を示す植物と示さない植物があった。これは即ち、気孔の Ca^{2+} シグナルの種類によって応答する気孔のリン酸化モジュールが異なる可能性があることを意味している。この化合物に特異的なリン酸化モジュールの候補として、CBL5 が特定された。SLAC1 は研究代表者がかねてより SLAC1 の活性化因子として調査を進めていたこともあり、CBL5 について植物体における発現組織・遺伝子欠損株の表現型探索などを詳細に推し進めた。その結果、CBL5 は気孔開閉を制御しているながらも気孔には発現しない異例な因子であることがわかり、重要な研究対象として今後も解析を進める予定である(図5)。

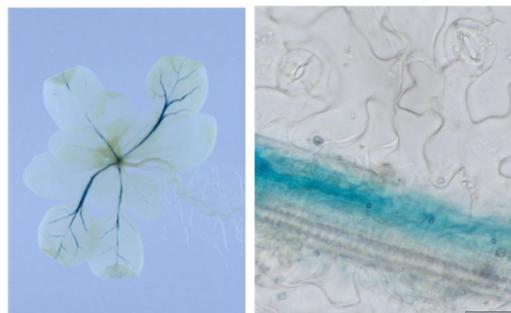


図5 CBL5 の発現組織

(3)(1)で記載した通りホスホプロテオミクス解析を断念したため、代替実験である酵母・大腸菌を用いたキナーゼ・チャンネルのスクリーニングを実施した。K⁺チャンネル欠損酵母(もしくは大腸菌)に KAT1・KAT2・GORK 等の気孔の開閉に関わるチャンネルを含む Shaker 型 K⁺チャンネルをそれぞれ導入し、これら導入株に各 CBL-CIPK の組み合わせを共発現させ、様々な K⁺濃度の培地での生育を比較した。その結果、いくつかの CBL-CIPK の組み合わせで K⁺チャンネルが特異的に機能調節されることが分かった。また、大腸菌実験においてのみであるが、これまで輸送活性が確認されておらず他の K⁺チャンネルの制御サブユニットと考えられていた K⁺チャンネルが輸送活性を示すようなデータが得られた。さらに、Shaker 型 K⁺チャンネルの中でこれまで機能が一切不明だった K⁺チャンネルが特定の CBL-CIPK の組み合わせで輸送活性を示すことも確認した。これらの研究成果については、今後 1~2 年以内の論文の投稿を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchiyama T., Saito S., Yamanashi T., Kato M., Takebayashi K., Hamamoto S., Tsujii M., Takagi T., Nagata N., Ikeda H., Kikunaga H., Suda T., Toyama S., Miwa M., Matsuyama S., Seo M., Horie T., Kuromori T., Yamagami M., Ishimaru Y., Uozumi N.	4. 巻 9
2. 論文標題 The HKT1 Na ⁺ transporter protects plant fertility by decreasing Na ⁺ content in stamen filaments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadg5495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adg5495	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 齋藤俊也、魚住信之	4. 巻 7
2. 論文標題 植物イオン輸送体の活性を調節する脂質修飾酵素	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 982-984
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 Taro Yamanashi, Takeshi Uchiyama, Shunya Saito, Taiki Higashi, Hayato Ikeda, Hidetoshi Kikunaga, Mutsumi Yamagami, Yasuhiro Ishimaru and Nobuyuki Uozumi	4. 巻 2
2. 論文標題 Potassium transporter KUP9 participates in K ⁺ distribution in roots and leaves under low K ⁺ stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stress Biology	6. 最初と最後の頁 52(1-11)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44154-022-00074-x	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 Sato Kanane, Saito Shunya, Endo Kohsuke, Kono Masaru, Kakei Taishin, Taketa Haruka, Kato Megumi, Hamamoto Shin, Grenzi Matteo, Costa Alex, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Ishimaru Yasuhiro, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Green Tea Catechins, (-) Catechin Gallate, and (-) Gallicocatechin Gallate are Potent Inhibitors of ABA Induced Stomatal Closure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2201403 ~ 2201403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202201403	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 齋藤俊也、魚住信之	4. 巻 54
2. 論文標題 植物の脂質修飾型キナーゼによるCa ²⁺ シグナリング制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 338-342
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 Saito Shunya, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00044	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 齋藤 俊也、石丸 泰寛、魚住 信之	4. 巻 92
2. 論文標題 4. カリウムの輸送とその制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壤肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 99~107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.92.2_99	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kanane Sato, Shunya Saito, Kohsuke Endo, Masaru Kono, Taishin Kakei, Haruka Taketa, Megumi Kato, Shin Hamamoto, Matteo Grenzi, Alex Costa, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yasuhiro Ishimaru & Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 (-)-Catechin Gallate and (-)-Gallocatechin Gallate, Components of Green Tea, are Potent Inhibitors of ABA-Induced Stomatal Closure
3. 学会等名 Plant Calcium Signaling Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunya Saito, Kanane Sato, Kohsuke Endo, Kyota Suzuki, Masaru Kono, Taishin Kakei, Haruka Taketa, Megumi Kato, Shin Hamamoto, Matteo Grenzi, Alex Costa, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Mieko Arisawa, Yasuhiro Ishimaru & Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Arabidopsis K+ channel inhibitors for unraveling details of stress signaling mechanism.
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taro Yamanashi, Takeshi Uchiyama, Shunya Saito, Taiki Higashi, Hayato Ikeda, Hidetoshi Kikunaga, Mutsumi Yamagami, Yasuhiro Ishimaru, Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 Arabidopsis KUP9 is Important for the Translocation of K+ in Roots and Shoots
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Uchiyama, Shunya Saito, Taro Yamanashi, Megumi Kato, Masaru Tsujii, Hayato Ikeda, Hidetoshi Kikunaga, Toshimi Suda, Sho Toyama, Misako Miwa, Shigeo Matsuyama, Yasuhiro Ishimaru, Nobuyuki Uozumi
2. 発表標題 The Role of AthKT1 in Removing Na from Flowers
3. 学会等名 International Workshop on Plant Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2023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			
イタリア	ミラノ大学			
ドイツ	ミュンスター大学			
スペイン	ムルシア大学	セピリア大学		