

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02511

研究課題名（和文）フォトトロピンが制御する光シグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the phototropin-mediated light signaling network

研究代表者

武宮 淳史（Takemiya, Atsushi）

山口大学・大学院創成科学研究科 准教授

研究者番号：80448406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：気孔は陸上植物の表皮に存在する孔であり、光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の吸収を促進する。細胞膜H<sup>+</sup>-ATPaseは細胞内のH<sup>+</sup>を細胞外に汲み出す一次輸送体であり、気孔開口の駆動力を形成する。しかし、その活性制御機構には不明な点が多い。本研究では、H<sup>+</sup>-ATPaseのC末端自己阻害領域内の2カ所のThr残基が青色光に反応してリン酸化されることを見出し、これらのリン酸化がH<sup>+</sup>-ATPaseの活性化と気孔開口に必須であることを明らかにした。さらに上流領域のThr残基は光合成によってもリン酸化され、気孔開口を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで未解明であった細胞膜H<sup>+</sup>-ATPaseの光活性化の仕組みを明らかにし、気孔開口の駆動力形成機構の理解に大きな前進をもたらした。H<sup>+</sup>-ATPaseは植物の生存に必須な一次輸送体であり、孔辺細胞以外の組織・細胞にも発現している。本研究で見出した仕組みを応用しH<sup>+</sup>-ATPaseの活性を人為的に制御することで、植物の成長や光合成を促進する基盤技術の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Stomatal pores surrounded by paired guard cells in the epidermis of terrestrial plants open in response to light, facilitating the uptake of carbon dioxide crucial for photosynthesis. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase acts as a primary transporter that expels H<sup>+</sup> from guard cells, creating a driving force for stomatal opening. However, the mechanism of light activation of H<sup>+</sup>-ATPase is not yet fully understood. In this study, we found that two Thr residues within the C-terminal autoinhibitory domain of H<sup>+</sup>-ATPase are phosphorylated in response to blue light. These phosphorylations are essential for activating H<sup>+</sup>-ATPase and stomatal opening. Furthermore, we showed that the upstream Thr residue is also phosphorylated by photosynthesis in guard cells, further facilitating stomatal opening. This study provides mechanistic insights into H<sup>+</sup>-ATPase activation in guard cells.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔開口 青色光 光合成 フォトトロピン 細胞膜H<sup>+</sup>-ATPase

## 1. 研究開始当初の背景

気孔は一对の孔辺細胞により構成される表皮に存在する孔であり、その開閉を通じて光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散を介した水の損失を制御する陸上植物の生存に必須の構造である。フォトトロピンは緑色植物に特有の青色光受容体キナーゼであり、青色光の受容により活性化すると、細胞内情報伝達を介して細胞膜  $H^+$ -ATPase を活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。しかし、その情報伝達の仕組みについては不明な点が多い。

我々はこれまでにサーマルイメージングを用いた大規模変異体スクリーニングと孔辺細胞を対象としたリン酸化プロテオーム解析により、上記情報伝達の必須因子である BLUS1 を同定し、本因子がフォトトロピンと直接相互作用し光依存的にリン酸化される基質であることを明らかにした (*Nature Commun* 2013, *Plant Cell Physiol* 2016, *J Plant Res* 2016)。BLUS1 は孔辺細胞特異的に発現する因子であり、Ste20 ファミリーに属するプロテインキナーゼをコードする。我々は BLUS1 の C 末端には自身の N 末端のキナーゼドメインを抑制する調節ドメインが存在すること、フォトトロピンによる調節ドメイン内の Ser 残基のリン酸化はこの抑制を解除し、キナーゼ活性を上昇させることを示した (*Plant Cell* 2021)。また、BLUS1 の下流の情報伝達にタイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) が関与し、細胞膜  $H^+$ -ATPase を活性化させることを見出した (*PNAS* 2006, *Plant Cell Physiol* 2013)。さらにフォトトロピンは Raf 型プロテインキナーゼである CBC1 をリン酸化し、気孔閉鎖の鍵因子である S 型アニオンチャネルを不活性化することで、気孔開口を促進することを明らかにした (*Nature Commun* 2017)。

以上の研究により、フォトトロピンは孔辺細胞内で多様な因子をリン酸化し、精巧なシグナル伝達ネットワークを形成することで、気孔開口を統合的に制御することが明らかになってきた。しかし、その分子機構には未知の点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、青色光に応答した気孔開口に関わる新奇因子・メカニズムの解明を進めるとして、フォトトロピンを介した光シグナル伝達ネットワークを解明し、植物における光環境情報の統御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナの孔辺細胞プロトプラストを対象としたリン酸化プロテオミクス質量分析により、青色光に応答してリン酸化レベルが変動する因子の網羅的な解析を行った。同定された因子について、アミノ酸置換体を発現する形質転換体を作製し、リン酸化の機能的意義の解析を行った。

## 4. 研究成果

細胞膜  $H^+$ -ATPase は P 型 ATPase に属する 10 回膜貫通タンパク質であり、その活性は C 末端に存在する自己阻害領域によって制御される。これまでに孔辺細胞では  $H^+$ -ATPase の C 末端から 2 番目の Thr 残基 (Thr-948) が青色光に応答してリン酸化されること、このリン酸化に依存して 14-3-3 タンパク質が結合することが見出されており、この Thr-948 のリン酸化と 14-3-3 タンパク質の結合が  $H^+$ -ATPase の活性化を引き起こす可能性が示唆されてきたが、植物細胞を用いた検証は行われていなかった。

本研究では、青色光に応答した気孔開口に関わる新奇因子・メカニズムの同定に向け、シロイヌナズナの野生株およびフォトトロピン変異体の孔辺細胞プロトプラストを対象としたリン酸化プロテオーム解析を実施し、青色光に応じてリン酸化レベルが変動するタンパク質の同定を行った。その結果、上記の細胞膜  $H^+$ -ATPase の Thr-948 に加えて、その上流の C 末端自己阻害領域に存在する Thr 残基 (Thr-881) が青色光に応答してリン酸化されることを見出した。

これらの 2 カ所の Thr 残基のリン酸化の機能的意義を明らかにするため、孔辺細胞における  $H^+$ -ATPase の主要アイソフォームである AHA1 を欠損する変異体に対して、野生型 AHA1 および Thr-881 と Thr-948 それぞれを Ala に置換した非リン酸化型 AHA1 (T881A, T948A) を発現させた形質転換体を作製した。作製した形質転換体の中から内在性の AHA1 と同程度の発現量を示すラインを選定し、気孔応答を詳細に解析した。野生株では青色光に応答した気孔開口が見られたが、*ahal* 変異体では開口の阻害が見られた。野生型 AHA1 を導入したラインでは気孔開口の回復が見られたが、T881A と T948A を導入したラインでは回復が見られなかった。次に孔辺細胞プロトプラストを単離し青色光に応答した  $H^+$ 放出反応を調べたところ、*ahal* 変異体では野生株と比較して  $H^+$ 放出の阻害が見られたが、野生型 AHA1 を導入したラインでは  $H^+$ 放出の回復が見られた。一方、T881A と T948A を導入したラインでは、 $H^+$ 放出の回復は見られなかった。以上の結果から、青色光による Thr-881 と Thr-948 のリン酸化はともに気孔開口と  $H^+$ -ATPase の活性化に必須であることが示唆された。

次に Thr-881 と Thr-948 のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製し、青色光に応答したリン

酸化反応の詳細な解析を行った。その結果、Thr-881 と Thr-948 のリン酸化は *phot1* と *phot2* により重複して制御されること、これらのリン酸化は BLUS1 と PP1 を介した情報伝達によって仲介されることが分かった。さらに Thr-881 と Thr-948 のリン酸化の関係性を調べるため、それぞれの非リン酸化体における Thr-881 と Thr-948 のリン酸化を調べた。その結果、T881A では青色光に応答した Thr-948 のリン酸化は野生株と同様に見られたが、T948A では Thr-881 のリン酸化が阻害されることが分かった。また、Thr-881 と Thr-948 のリン酸化タイムコースを詳細に調べたところ、青色光に応答してまず Thr-948 がリン酸化され、その後に Thr-881 がリン酸化されることが明らかとなった。これらの結果から、青色光による Thr-881 のリン酸化は Thr-948 のリン酸化に依存することが示唆された。

Thr-881 のリン酸化が  $H^+$ -ATPase の活性を上昇させるかを確かめるため、Thr-881 を酸性アミノ酸である Asp に置換した擬似リン酸化体 (T881D) を *ahal* 変異体背景に導入した形質転換体を作製した。興味深いことに、T881D を発現するラインでは暗所でも気孔の開口が見られ、青色光を照射すると野生株よりも大きな開口を示した。さらにミクロソーム膜を単離し ATP 加水分解活性を測定したところ、T881D 導入ラインでは野生株よりも高い活性が見られた。T881D ラインで見られた青色光による気孔開口が Thr-948 のリン酸化に依存したものであるかを調べるため、T881D に加えて T948A 変異を導入した変異型 AHA1 を *ahal* に発現させ、 $H^+$ 放出を測定した。その結果、T881D ラインでは青色光に応答した  $H^+$ 放出が見られたが、T881D T948A ラインでは  $H^+$ 放出の阻害が見られた。以上の結果から、Thr-881 の単独のリン酸化でも  $H^+$ -ATPase を活性化できるが、完全な活性化には Thr-881 と Thr-948 の両方のリン酸化が必要であることが示唆された。

意外なことに、Thr-881 は青色光のみならず、孔辺細胞の光合成に依存してリン酸化されることを見出した。暗処理した孔辺細胞に光合成を誘導する赤色光を照射すると、Thr-881 のリン酸化が見られたが、Thr-948 のリン酸化は見られなかった。この赤色光による Thr-881 のリン酸化は、光合成の電子伝達阻害剤である DCMU を処理した孔辺細胞では見られなかった。また、赤色光による Thr-881 のリン酸化はフォトトロピン変異体や *blus1* 変異体でも見られたことから、このリン酸化は青色光とは独立の情報伝達によって誘導されることが示唆された。T881A を発現するラインでは、野生株と比べて赤色光による気孔開口の遅延が見られたことから、赤色光による Thr-881 のリン酸化は光合成による気孔開口を促進することが示唆された。

以上本研究では、青色光と光合成情報伝達による細胞膜  $H^+$ -ATPase の光活性化の仕組みを明らかにし、気孔開口の駆動力形成機構の理解に前進をもたらした。 $H^+$ -ATPase は植物の生存に必須の一次輸送体であり、本研究で見出した仕組みを応用し  $H^+$ -ATPase の活性を人為的に高めることで、植物の成長を促進する新たな基盤技術の創出に繋がることを期待される。以上の成果は国際誌である *Nature Communications* 誌に報告し、プレスリリースを行った (Fuji et al. 2024)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uemoto Kyohei, Mori Fumito, Yamauchi Shota, Kubota Akane, Takahashi Nozomu, Egashira Haruki, Kunimoto Yumi, Araki Takashi, Takemiya Atsushi, Ito Hiroshi, Endo Motomu	4. 巻 64
2. 論文標題 Root PRR7 Improves the Accuracy of the Shoot Circadian Clock through Nutrient Transport	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 352 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad003	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 Oikawa K, Goto-Yamada S, Hayashi Y, Takahashi, Kimori, Shibata M, Yoshimoto K, Takemiya A, Kondo M, Hikino K, Kato A, Shimoda K, Ueda H, Uemura M, Numata K, Ohsumi Y, Hara-Nishimura I, Mano S, Yamada K, Nishimura M	4. 巻 13
2. 論文標題 Pexophagy suppresses ROS-induced damage in leaf cells under high-intensity light	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7493-7493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35138-z	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 Murakami Nanaka, Fuji Saashia, Yamauchi Shota, Hosotani Sakurako, Mano Jun'ichi, Takemiya Atsushi	4. 巻 63
2. 論文標題 Reactive Carbonyl Species Inhibit Blue-Light-Dependent Activation of the Plasma Membrane H <sup>+</sup> -ATPase and Stomatal Opening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1168 ~ 1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac094	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 Hosotani Sakurako, Yamauchi Shota, Kobayashi Haruki, Fuji Saashia, Koya Shigekazu, Shimazaki Ken-ichiro, Takemiya Atsushi	4. 巻 33
2. 論文標題 A BLUS1 kinase signal and a decrease in intercellular CO <sub>2</sub> 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 1813 ~ 1827
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 Fuji Saashia, Yamauchi Shota, Sugiyama Naoyuki, Kohchi Takayuki, Nishihama Ryuichi, Shimazaki Ken-ichiro, Takemiya Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Light-induced stomatal opening requires phosphorylation of the C-terminal autoinhibitory domain of plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-45236-9	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 山内 翔太、武宮 淳史	4. 巻 7
2. 論文標題 オートファジーは孔辺細胞のROS恒常性を制御し気孔開口を可能にする	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 801-805
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 -

[学会発表] 計20件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 武宮淳史
2. 発表標題 光に応答した気孔開口の分子機構
3. 学会等名 第14回中国地域育種談話会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武宮淳史
2. 発表標題 光環境レジリエンスを支えるフォトリッピングナル伝達ネットワーク
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富士彩紗, 山内翔太, 杉山直幸, 西浜竜一, 島崎研一郎, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した細胞膜H <sup>+</sup> -ATPaseの2つの部位のリン酸化は気孔開口に必須である
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山内翔太, 杉山直幸, 児玉豊, Luca Distefano, 野元美佳, 多田安臣, Diana Santelia, 島崎研一郎, 武宮淳史
2. 発表標題 WDRは孔辺細胞葉緑体のデンブンを介して気孔開口を促進する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下昂太, 三枝瑞季, 山内翔太, 武宮淳史, 梅澤泰史
2. 発表標題 シロイヌナズナ孔辺細胞におけるSnRK2基質のリン酸化プロテオーム解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高瀬緋奈乃, 神山佳明, 山下昂太, 富士彩紗, 杉本穂高, 高橋宏二, 武宮淳史, 木下俊則, 梅澤泰史
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるグループC-Raf 型プロテインキナーゼのシグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白川一, 小黒友輝, 菅野茂夫, 山岡尚平, 相良真由, 谷田舞, 松本紘弥, 熊石妃恵, 吉田颯馬, 渡邊むつみ, 峠隆之, 鈴木孝征, 市橋泰範, 武宮淳史, 山口 暢俊, 河内孝之, 伊藤寿朗
2. 発表標題 保存されたFAMA-WSBモジュールの転用によるアプラナ目生体防御系の進化
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田原京佳, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した気孔開口におけるBLUS1結合因子の機能解析
3. 学会等名 第77回中国四国植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した気孔開口の分子機構に関する研究
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田原京佳, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した気孔開口におけるBLUS1結合因子の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本理緒, 藤井量子, 三藤有紗, 武宮淳史
2. 発表標題 Artificial microRNA によるフォトトロピン応答の新奇因子の探索
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武宮淳史
2. 発表標題 気孔孔辺細胞における光シグナル伝達ネットワーク
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 生田大貴, 山内翔太, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答したデンブンを介した気孔開口の分子機構の解明
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 富士彩紗, 山内翔太, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した細胞膜H <sup>+</sup> -ATPaseの活性化が阻害された突然変異体の単離と機能解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 富士彩紗, 山内翔太, 杉山直幸, 西浜竜一, 河内孝之, 島崎研一郎, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光による気孔開口の駆動力を形成する細胞膜H <sup>+</sup> -ATPaseの新奇活性制御機構
3. 学会等名 第79回中国四国植物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今岡もも, 武宮淳史
2. 発表標題 青色光に応答した気孔開口における裸子植物のBLUS1様遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第79回中国四国植物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shota Yamauchi, Naoyuki Sugiyama, Yutaka Kodama, Luca Distefano, Haruki Fujii, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Kazuhiro Hotta, Diana Santelia, Ken-ichiro Shimazaki, Atsushi Takemiya
2. 発表標題 Phosphorylation of WD-repeat protein WDR by phototropins is essential for starch degradation to promote stomatal opening
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saashia Fuji, Shota Yamauchi, Naoyuki Sugiyama, Takayuki Kohchi, Ryuichi Nishihama, Ken-ichiro Shimazaki, Atsushi Takemiya
2. 発表標題 Phosphorylation of two Thr residues in the C-terminal auto-inhibitory domain of plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase is crucial for light-induced stomatal opening
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kyoka Thahara, Atsushi Takemiya
2. 発表標題 Functional analysis of BLUS1-interacting proteins in blue light-dependent stomatal opening
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (TJPB2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saashia Fuji, Shota Yamauchi, Naoyuki Sugiyama, Kohchi Takayuki, Ryuichi Nishihama, Ken-ichiro Shimazaki, Atsushi Takemiya
2. 発表標題 A novel activation mechanism of plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase via phosphorylation within its C-terminal auto-inhibitory domain to open stomata by light
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2023 (TJPB2023)
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		
スイス	ETH Zurich		