

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840105

研究課題名(和文) 青色光受容体フォトトロピンと結合するプロテインキナーゼの気孔開口における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of protein kinase that interacts with blue light-receptor phototropin in stomatal opening

研究代表者

井上 晋一郎(Inoue, Shin-ichiro)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40532693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物表皮に存在する気孔は、青色光に反応して開口し、光合成や蒸散を調節して成長に貢献する。青色光受容体フォトトロピンは、気孔孔辺細胞においてカリウムの能動輸送を促進することで気孔を開口させるが、詳細なシグナル伝達は未解明である。本研究では、フォトトロピンと相互作用するプロテインキナーゼに着目して気孔開口における機能を解析し、シグナル伝達上の役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Stomata in the plant epidermis open in response to blue light and contribute to plant growth by regulating photosynthesis and transpiration. A blue light-receptor phototropin mediates the stomatal opening via promotion of an active transport of K⁺ in stomatal guard cells. However, signaling for the stomatal opening is not fully understood. In this study, we performed functional analysis of a protein kinase that interacts with phototropin, and characterized roles of the protein kinase in the blue light signaling for stomatal opening.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔 青色光 フォトトロピン プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物体の表皮に存在する気孔は、太陽光に含まれる青色光にตอบสนองして開口し、植物と大気間のガス交換を調節する。植物は気孔を通して光合成のための二酸化炭素を取込み、また、気孔からの蒸散によって根における水やミネラルの吸収を促すため、気孔の機能は植物の生育に重要である。

気孔開口は、気孔を構成する孔辺細胞の青色光シグナル伝達によって誘導される。孔辺細胞に青色光が照射されると、青色光受容体であるフォトリポピンが活性化し、未知のシグナル伝達を介して細胞膜 H⁺-ATPase をリン酸化により活性化する。この酵素の活性化が開口に必要な様々なイオンの取込みを誘導し、気孔開口を達成させる(Shimazaki et al, 2007; Inoue et al., 2010)。ところが、フォトリポピンと細胞膜 H⁺-ATPase をつなぐシグナル伝達の詳細は未同定であり、この未知のシグナル伝達の解明が気孔開口メカニズムの理解には不可欠であった。

私たちはこれまでに、フォトリポピン自身について研究を行い、下流へのシグナル伝達に必要なリン酸化部位を同定し、フォトリポピン分子の活性化メカニズムの一端を明らかにした(Inoue et al. 2008; Inoue et al. 2010; Inoue et al. 2011)。植物細胞内において、フォトリポピンと細胞膜 H⁺-ATPase は同じ複合体に存在することが知られていたため(Kaiserli et al. 2009)、フォトリポピンと細胞膜 H⁺-ATPase をつなぐシグナル伝達因子も同じ複体内に存在すると考えられた。そこで私達はこれまでに、フォトリポピンと物理的に相互作用するプロテインキナーゼを生化学的スクリーニング手法により探索し、二つの phototropin-interacting protein kinase (PIP1 と PIP2) を得ていた。PIP1 は、すでに気孔開閉への関与が示されていた CBL-interacting protein kinase23 (CIPK23)であったが、PIP2 は未報告のプロテインキナーゼであった。これまでの表現型解析から、CIPK23 は気孔閉鎖を負に調節するシグナル伝達因子であると考えられていたが(Cheong et al., 2007)、青色光に依存した気孔開口においてどのような役割をもつのか、シグナル伝達上の機能は不明であった。従って、PIP1(CIPK23)の気孔開口における機能の特徴づけることと、PIP2 の気孔開口における関与を明らかにすることが、気孔開口メカニズムの理解を前進させると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、青色光受容体フォトリポピンと相互作用する二つのプロテインキナーゼ PIP1/CIPK23 と PIP2 に関して、青色光に依存した気孔開口における機能解析を行う。PIP1/CIPK23 と PIP2 が青色光に依存した気孔開口を仲介するのか明確にし、仲介するならばどのように関与するのか、分子

レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PIP1/CIPK23、PIP2 のフォトリポピンとの相互作用の検出

PIP1/CIPK23 は元々、ALPHA スクリーニングを行ってフォトリポピンと物理的に相互作用するプロテインキナーゼとして探索・同定したため、ALPHA 以外の相互作用検出法を用いて相互作用の再現性を確認した。大腸菌を用いて発現・精製した PIP1/CIPK23 とフォトリポピンを用いて、*in vitro* pull down assay を行った。さらに、植物細胞内における相互作用を、タバコ葉への一過的遺伝子発現系を用いた bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assay により調べた。

(2) 青色光に依存した気孔開口における PIP1/CIPK23 と PIP2 の機能的特徴づけ

形質転換植物と特異的阻害剤を用いた気孔開口の解析

PIP1/CIPK23 の T-DNA 遺伝子破壊株を入手して、ロゼット葉の表皮を単離し、青色光に依存した気孔開口を観察した。また、赤外線サーモグラフィーを用いて生葉における蒸散を間接的に測定した。さらに、通常条件下で生育させた植物に水ストレスを与えて乾燥ストレス耐性を観察し、生育条件下の気孔開口具合を観察した。PIP2 に関しては、そのタンパク質をコードする遺伝子が重複して存在したため、過剰発現株を作製して青色光に依存した気孔開口を観察した。また、PIP2 に関しては特異的な阻害剤が入手できたため、野生株の表皮に阻害剤を処理し、気孔開度を観察した。

孔辺細胞プロトプラストを用いた気孔開口シグナル伝達の生理・生化学的解析

上記の *pipk1/cipk23* 変異株から孔辺細胞プロトプラストを調製し、青色光に依存した細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化を測定した。この応答を観察することにより、PIP1 がシグナル伝達において細胞膜 H⁺-ATPase の上流で働いているのかどうか明らかにすることができる。また、CIPK23 は根において内向き整流性 K⁺チャンネルをリン酸化により活性化することが知られているため、*pipk1/cipk23* 変異株の孔辺細胞においても、K⁺チャンネル活性が低下しているかどうかパッチクランプ法を用いて測定した。

PIP2 に関しては、特異的な阻害剤を野生株の孔辺細胞プロトプラストに処理し、細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化を測定した。

4. 研究成果

(1) PIP1/CIPK23、PIP2 のフォトリポピンとの相互作用の検出

ALPHA 以外の相互作用検出法により実験した結果、PIP1/CIPK23 と PIP2 は共に *in vitro* でも *in vivo* でもフォトリポピンと相互作用することが確認された。両キナーゼと

も、フォトリポピンとの相互作用に青色光照射は必要なく、フォトリポピンの活性状態と無関係に細胞内で相互作用していると考えられた。

(2) 青色光に依存した気孔開口における PIPK1/CIPK23 と PIPK2 の機能的特徴づけ

形質転換植物と特異的阻害剤を用いた気孔開口の解析

pipk1/cipk23 変異株を用いた表現型解析の結果、この変異株の気孔は青色光にตอบสนองした気孔開口が著しく損なわれていることが分かった。この結果と対応して、生育条件下の *pipk1/cipk23* 変異株は蒸散が低下したことにより高い葉温を示し、乾燥ストレスにも高い耐性を示した。

PIP2 の過剰発現株の表皮では、暗条件下でも気孔が開くことが明らかとなった。また、PIP2 の阻害剤を野生株の表皮に処理したところ、青色光に依存した気孔開口が完全に消失した。

孔辺細胞プロトプラストを用いた気孔開口シグナル伝達の生理・生化学的解析

pipk1/cipk23 変異株では、青色光に依存した気孔開口が抑制されていたが、孔辺細胞の H⁺-ATPase は青色光にตอบสนองして正常にリン酸化されていた。さらに、パッチクランプ法を用いた実験から、*pipk1/cipk23* 変異株の孔辺細胞では青色光下で K⁺チャンネル活性が低下していることが明らかとなった。従って、PIP1/CIPK23 はフォトリポピンと H⁺-ATPase の間のシグナル伝達を仲介してはならず、H⁺-ATPase の下流で働く K⁺チャンネル活性を青色光にตอบสนองして調節している可能性が明らかとなった。

野生株の孔辺細胞に PIP2 阻害剤を処理したところ、青色光にตอบสนองした H⁺-ATPase のリン酸化が完全に消失した。

以上の結果から、フォトリポピンが細胞膜 H⁺-ATPase を活性化するという既知のシグナル伝達以外にも、フォトリポピンが PIP1/CIPK23 を介して K⁺チャンネルを活性化する新たなシグナル伝達経路の存在が明らかになり、この経路も気孔開口に必要であることが証明された。さらに、PIP2 がフォトリポピンと H⁺-ATPase の間のシグナル伝達を仲介する可能性が示唆された。PIP2 に関しては今後さらなる機能解析を進める必要があるが、本研究の成果は、気孔開口の分子メカニズム全貌の解明に貢献できるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Sakai Y, Inoue S, Harada A, Shimazaki K, Takagi S, Blue-light-induced rapid chloroplast de-anchoring in *Vallisneria* epidermal cells.

Journal of Integrative Plant Biology 57: 93-105. (2015). 査読有り

Tomiyama M, Inoue S, Tsuzuki T, Soda M, Morimoto S, Okigaki Y, Ohishi T, Mochizuki N, Takahashi K, Kinoshita T, Mg-chelatase I subunit 1 and Mg-Protoporphyrin IX methyltransferase affect the stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 127: 553-563. (2014). 査読有り

Hayashi Y, Takahashi K, Inoue S, Kinoshita T, Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 55: 845-853. (2014). 査読有り

Wang Y, Noguchi K, Ono N, Inoue S, Terashima I, Kinoshita T, Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 533-538. (2014). 査読有り

Tsuzuki T, Takahashi K, Tomiyama M, Inoue S, Kinoshita T, Overexpression of the Mg-chelatase H subunit in guard cells confers drought tolerance via promotion of stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 4: 440. (2013). 査読有り

Ando E, Onishi M, Wang I, Matsushita T, Watanabe A, Hayashi Y, Fujii M, Ma JF, Inoue S, Kinoshita T, TWIN SISTER of FT, GIGANTEA, and CONSTANS have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 1529-1538. (2013). 査読有り

Harada A, Takemiya A, Inoue S, Sakai T, Shimazaki K, Role of RPT2 in leaf positioning and flattening under various light environments and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant & Cell Physiology* 54: 36-47. (2013). 査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

Shin-ichiro Inoue, New Insight into blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*, 第 56 回 日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月, 東京農業大学

後藤栄治、大岩本康平、北川裕基、井上晋一郎、島崎研一郎、土井道生、CAM 植物における青色光依存の気孔開口、第 56 回 日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月, 東京農業大学

土井彩加、武宮淳史、井上晋一郎、島崎研一郎、フォトリポピンの自己リン酸化の機能的意義の解析、第 56 回 日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月, 東京農業大学

奥野凌輔、井上晋一郎、富山将和、林真妃、木下俊則、*elf3* 変異体を背景植物とした新奇気孔開度変異体のスクリーニング、第 56 回 日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月, 東京農業大学

菊地淳子、井上晋一郎、曾田翠、高橋宏二、木下俊則、シロイヌナズナ気孔開度変異体

scs2、scs3の表現型解析、第56回 日本植物生理学会年会、2015年3月、東京農業大学

Wang Yin、野口航、小野奈津子、井上晋一郎、寺島一郎、木下俊則、気孔開度制御による植物の光合成活性と生産量の促進、第78回 日本植物学会年会、2014年9月、明治大学

Shin-ichiro Inoue, Eirini Kaiserli, Hirotaka Takahashi, Yuta Tomokiyo, Toshinori Kinoshita, John M. Christie, Tatsuya Sawasaki, Ken-ichiro Shimazaki, CIPK23 positively regulates blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*, Gordon research conference "Photosensory Receptors & Signal Transduction", April, 2014, Renaissance Tuscany Il Ciocco

安藤英伍、井上晋一郎、後藤弘爾、木下俊則、光周性経路による気孔開口調節と *TERMINAL FLOWER2* の関与、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

南杏鶴、中村英、高橋大輔、井上晋一郎、高橋宏二、上村松生、木下俊則、細胞膜プロトンポンプの活性化に関わるプロテインキナーゼの解析、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

奥村将樹、井上晋一郎、高橋宏二、木下俊則、光合成に依存した細胞膜プロトンポンプのリン酸化の解析、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

Yin Wang, Ko Noguchi, Natsuko Ono, Shin-ichiro Inoue, Ichiro Terashima, Toshinori Kinoshita, Manipulation of stomatal opening increases photosynthesis and productivity, 第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

林優紀、高橋宏二、井上晋一郎、木下俊則、アブシジン酸によるシロイヌナズナ黄化芽生えの伸長抑制の分子機構、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

富山将和、井上晋一郎、都築朋、曾田翠、沖垣友季子、森本小百合、大石貴矢、高橋宏二、木下俊則、Mg-キラターゼ I サブユニットとMg-プロトポルフィリンIXメチルトランスフェラーゼの気孔開度調節への関与、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

林真妃、井上晋一郎、上野宣久、高橋宏二、木下俊則、孔辺細胞における青色光に依存した細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化に関するプロテインキナーゼの探索、第55回 日本植物生理学会年会、2014年3月、富山大学

小屋翔太、井上晋一郎、高橋宏二、木下俊則、液胞膜リンゴ酸輸送体 ALMT6 の気孔開口における役割、第77回 日本植物学会年会、2013年9月、北海道大学

安藤英伍、大西真人、Wang Yin、松下智直、渡辺藍子、林優紀、井上晋一郎、木下俊則、光周性経路による気孔開度調節、第77回 日本植物学会年会、2013年9月、北海道大学

Wang Yin、小野奈津子、井上晋一郎、木下俊則、細胞膜 H⁺-ATPase を孔辺細胞に過剰発現させた形質転換体の表現型解析、第77回 日本植物学会年会、2013年9月、北海道大学
Shin-ichiro Inoue, Yuta Tomokiyo, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki, Phototropin-dependent phosphorylation of a plasma membrane syntaxin SYP132 in *Arabidopsis*, International Symposium on Plant Photobiology (ISPP) 2013, June, 2013, University of Edinburgh

〔その他〕
ホームページ等
<http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 晋一郎 (INOUE SHIN-ICHIRO)
名古屋大学・理学研究科・助教
研究者番号：40532693