

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02468

研究課題名(和文) フォトトロピンによる気孔開口制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Signaling network of phototropin-mediated stomatal opening

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：気孔は光にตอบสนองして開口し光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進する。青色光受容体キナーゼであるフォトトロピンは、BLUS1キナーゼのリン酸化を介して細胞膜H⁺-ATPaseの活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。本研究では、BLUS1キナーゼの詳細な活性調節機構を明らかにするとともに、光による気孔開口にはBLUS1を介したH⁺-ATPaseの活性化に加え、光合成による葉内CO₂濃度の低下が必須であることを示した。また、フォトトロピンが気孔開口のみならず気孔閉鎖を誘導し、気孔開度を厳密に制御すること示した。さらにオートファジーが活性酸素の恒常性を制御し、気孔開口を支えることを明らかにした。

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光シグナルと光合成による相乗的な気孔開口のメカニズムに加え、フォトトロピンによる気孔閉鎖やオートファジーによる気孔開口制御など、これまで想像されていなかった気孔開閉制御機構の存在を初めて示した。今回見出された新たな気孔開閉制御のメカニズムを分子レベルで解明することで、高い生産性や環境適応能力を備えた農作物の開発に繋がり、将来的に地球規模での環境・食料・エネルギー問題の解決に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Stomata open in response to light, facilitating the uptake of CO₂ for photosynthetic carbon fixation. Phototropins, plant-specific blue light photoreceptor kinases, phosphorylate their substrate BLUS1 kinase, leading to activation of the plasma membrane H⁺-ATPase and stomatal opening. In this study, we revealed the detailed regulatory mechanisms of BLUS1 kinase activity and showed that the decrease of intercellular CO₂ concentration by photosynthesis in addition to the BLUS1-mediated H⁺-ATPase activation is necessary for light-dependent stomatal opening. Furthermore, we showed that phototropins mediate stomatal closure as well as stomatal opening in response to blue light, thereby strictly controlling stomatal aperture. We also found that autophagy sustains light-dependent stomatal opening through regulating ROS homeostasis in guard cells.

研究分野：植物生理学

キーワード：フォトトロピン 気孔 青色光 シグナル伝達 タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

表皮に存在する気孔は、絶えず変動する周囲の環境変化を敏感に感知しその開度を変化させ、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消費など、植物と大気間のガス交換を制御する。気孔を構成する孔辺細胞では、フォトトロピンにより受容された光シグナルは、細胞膜 H^+ -ATPase を活性化させ気孔開口の駆動力を形成する。これまでの研究により、我々はタイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) が上記シグナル伝達を仲介することを明らかにしてきたが (*PNAS* 2006; *Plant Cell Physiol* 2013)、フォトトロピンが H^+ -ATPase の活性化を導くシグナル伝達については、依然として不明な点が多い。

我々は上記シグナル伝達に関わる新奇因子・メカニズム同定を目的として、赤外線サーモグラフィを用いて青色光に応答した気孔開口を視覚的に検出する独自のシステムを構築し、本システムを用いた大規模変異体スクリーニングから、気孔開口の必須因子である「BLUS1」キナーゼを同定した (*Nature Commun* 2013)。さらに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端緒として、BLUS1 がフォトトロピンによって青色光依存的にリン酸化される基質であることを証明し、青色光シグナル伝達の初期過程を初めて示した。

さらに我々は上記のリン酸化プロテオーム解析から、フォトトロピンの第 2 のリン酸化基質として「CBC」キナーゼを発見した (*Nature Commun* 2017)。*cbc* 変異体では青色光による細胞膜 H^+ -ATPase の活性化は正常に起こるものの、気孔開口が阻害される意外な表現型を示した。解析を進めた結果、*cbc* 変異体では気孔閉鎖の鍵因子であるアニオンチャネルが青色光に応じて不活性化されず、膜電位の過分極形成が阻害されることで気孔開口が阻害されることを明らかにした。

従来、青色光による気孔開口はフォトトロピンによる細胞膜 H^+ -ATPase の活性化というシンプルなモデルで説明されてきたが、我々の新たな発見により、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、気孔開口を厳密且つ統合的に制御する新たなモデルが見えてきた。しかし、その分子機構の大部分は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では「シグナル伝達ネットワーク」という新たな視点で孔辺細胞における青色光シグナル伝達を解析し、気孔開口制御に関わる重要因子・メカニズムの解明を通じて、気孔開口の新たなモデルを提示することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、①フォトトロピンのリン酸化基質である BLUS1 が光シグナルを伝達する詳細な分子機構の解明を目的として、シグナル伝達における役割が未解明であった C 末端領域の機能解析を進めた。②赤外線サーモグラフィを用いたスクリーニングによって単離されたシロイヌナズナ突然変異体の機能解析および原因遺伝子同定を通じて、気孔開口制御の新たな重要因子の解明を進めた。

4. 研究成果

① BLUS1 は真核生物に保存された Ste20 ファミリーに属するプロテインキナーゼであり、N 末端側にキナーゼドメインをもち、C 末端側には機能未知の配列をもつ。以前の研究において、我々は青色光によって活性化したフォトトロピンは C 末端領域の 348 番目の Ser 残基を特異的にリン酸化すること、このリン酸化は気孔開口に必須であることを明らかにしたが (*Nature Commun* 2013)、リン酸化の機能的意義を含め、シグナル伝達における C 末端領域の役割については不明であった。

そこで BLUS1 の C 末端領域を末端から 30 アミノ酸ずつ欠損させた様々な断片タンパク質をシロイヌナズナの *blus1* 変異体に導入し、気孔開口が回復するかを調べた。その結果、BLUS1 の C 末端領域には N 末端のキナーゼドメインの働きを抑制する調節ドメインが存在することを見出し、フォトトロピンによるこの領域内の Ser-348 のリン酸化は、キナーゼドメインの抑制の解除に働き、キナーゼドメインを活性化させることを明らかにした。

さらに C 末端の調節ドメインを欠損させ恒常的に活性化した BLUS1 断片タンパク質を発現させたものでは、細胞膜 H^+ -ATPase が青色光によらず常に活性化されているにも関わらず、暗所では気孔開口を示さず、光合成を誘導する強い赤色光を照射することで著しい開口を示すことを見出した。気孔は光に加え CO_2 濃度の変化によっても開閉することが知られており、低 CO_2 濃度に応じて開口し、高 CO_2 濃度に応じて閉鎖する。この形質転換体を用いた詳細な機能解析の結果、光による気孔開口には BLUS1 を介した細胞膜 H^+ -ATPase の活性化に加え、光合成による葉内 CO_2 濃度の低下を介したアニオンチャネルの不活性化が同時に起こることが不可欠であることを示した。

さらに恒常活性化型 BLUS1 を発現させた形質転換体では、青色光に応答した著しい気孔の閉鎖が見られた。この青色光による気孔閉鎖はフォトトロピン変異体背景では見られないことから、フォトトロピンは気孔開口のみならず、気孔閉鎖を誘導することが示唆された。

以上、本研究では BLUS1 を介した詳細なシグナル伝達機構の解明に加え、青色光と光合成による相乗的な気孔開口のメカニズムの一端を明らかにした。さらにフォトトロピンは気孔開口に加え気孔閉鎖を同時に制御し、光照射下で気孔が開き過ぎないようにその開度を厳密に制御することを明らかにした。以上の成果は国際誌である *Plant Cell* 誌に報告し、プレスリリースを行った (Hosotani et al. 2021)。

②赤外線サーモグラフィを用いた大規模変異体スクリーニングにより、青色光による気孔開口が阻害された変異体として *atg2-5* 変異体を単離した。この変異体の詳細な機能解析から、孔辺細胞の活性酸素種 (ROS) 恒常性を司る新奇のメカニズムを明らかにした。

atg2-5 変異体では青色光に応答した H^+ 放出や細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化反応が阻害されており、フォトトロピンと細胞膜 H^+ -ATPase 間のシグナル伝達が阻害されていることが示唆された。そこでマッピングと次世代シーケンスを併用し原因遺伝子同定を進めた結果、この変異体ではオートファジーの必須因子である *ATG2* 遺伝子に 1 塩基の挿入が生じ、機能的なタンパク質が発現していないことを見出した。そこでオートファジーの他の必須因子 (*ATG5*, *ATG7*, *ATG10*, *ATG12*) の変異体を取り寄せ解析を行ったところ、これらの変異体においても気孔開口が損なわれていることを見出した。以上の結果から、オートファジーの不全が気孔開口阻害の原因であることが分かった。

次にオートファジー変異体において気孔開口が阻害される原因についてさらなる解析を進めた結果、これらの変異体では気孔開口を阻害する活性酸素が孔辺細胞内に高蓄積していることを見出した。アンチオキシダントの添加により活性酸素を消去したところ気孔開口が回復したことから、活性酸素の高蓄積が気孔開口阻害の原因であることが分かった。さらにオートファジー変異体では酸化型ペルオキシソームが孔辺細胞内に高蓄積しており、過酸化水素の生成に関わるグリコール酸代謝を阻害すると活性酸素の蓄積が抑えられ気孔開口が回復することが分かった。

以上の結果から、オートファジーは活性酸素が蓄積したペルオキシソームを絶えず監視しそれを速やかに分解することで、孔辺細胞内の活性酸素の恒常性を維持し、気孔開口を支える役割を担うことが明らかとなった。本研究は孔辺細胞における活性酸素の恒常性制御を介した新たな気孔開口の制御機構を解明するとともに、植物におけるペキシソーム (ペルオキシソームの選択的分解) の生理的意義を初めて示した。以上の成果は国際誌である *Proc Natl Acad Sci USA* 誌に報告し、プレスリリースを行った (Yamauchi et al. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

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 -
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 CO2 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 Inoue Shin Ichiro, Kaiserli Eirini, Zhao Xiang, Waksman Thomas, Takemiya Atsushi, Okumura Masaki, Takahashi Hirota, Seki Motoaki, Shinozaki Kazuo, Endo Yaeta, Sawasaki Tatsuya, Kinoshita Toshinori, Zhang Xiao, Christie John M., Shimazaki Ken Ichiro	4. 巻 104
2. 論文標題 CIPK23 regulates blue light dependent stomatal opening in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 679 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.14955	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 該当する
1. 著者名 Flitsch Sabrina, Wang Yizhou, Takemiya Atsushi, Violet-Chabrand Silvere R. M., Klejchov? Martina, Nigro Arianna, Hills Adrian, Lawson Tracy, Blatt Michael R., Santelia Diana	4. 巻 32
2. 論文標題 Guard Cell Starch Degradation Yields Glucose for Rapid Stomatal Opening in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2325 ~ 2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.18.00802	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山内翔太, 真野昌二, 及川和聡, 曳野和美, 手島康介, 木森義隆, 西村幹夫, 島崎研一郎, 武宮 淳史
2. 発表標題 オートファジーは孔辺細胞のROSホメオスタシスを制御することで青色光依存の気孔開口を可能にする
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上奈々香, 真野純一, 武宮淳史
2. 発表標題 活性カルボニル種はROSシグナル伝達を仲介し青色光による気孔開口を阻害する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020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はデンプン分解を誘導し気孔開口を促進させる
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（広島大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上奈々香, 真野純一, 武宮淳史
2. 発表標題 活性カルボニル種（RCS）は青色光による気孔開口を阻害する
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（広島大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富士彩紗, 武宮淳史
2. 発表標題 孔辺細胞において青色光に応じてリン酸化されるプロテインキナーゼの機能解析
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会 (広島大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Takemiya
2. 発表標題 Signaling network of phototropin-regulated stomatal opening
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Takemiya, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Ken-ichiro Shimazaki
2. 発表標題 Molecular mechanism of blue light signaling for stomatal opening
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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 気孔孔辺細胞において青色光にตอบสนองしてリン酸化されるE3ユビキチンリガーゼの機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷桜子、古屋繁一、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 孔辺細胞青色光シグナル伝達におけるBLUS1のC末端領域の機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内翔太、武宮淳史
2. 発表標題 気孔孔辺細胞において青色光依存的にリン酸化される情報伝達因子の機能解析
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（山口大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷桜子、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の必須因子BLUS1のC末端領域の機能解析
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（山口大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎原康太、石川和弥、島崎研一郎、武宮淳史
2. 発表標題 光によらず暗所で気孔が開口するシロイヌナズナG7-9D変異体の表現型解析
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（山口大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林遥貴、武宮淳史
2. 発表標題 青色光特異的な気孔開口に異常を示すシロイヌナズナ突然変異体の単離と機能解析
3. 学会等名 生物系三学会中四国支部会（山口大会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>オートファジーは活性酸素の蓄積を抑え気孔開口を可能にする！ http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/_7735/_7989.html</p> <p>光による気孔開口制御の仕組みを解明 ～高い光合成能力とストレス耐性能力を併せ持つ植物の開発に期待～ http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/_8427/_9082.html</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	山内 翔太 (Yamauchi Shota)		
研究協力者	島崎 研一郎 (Shimazaki Ken-ichiro)		
研究協力者	西村 幹夫 (Nishimura Mikio)		

6. 研究組織（つづき）

	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	真野 昌二 (Mano Shoji)		
研究協力者	及川 和聡 (Oikawa Kazusato)		
研究協力者	手島 康介 (Teshima Kosuke)		

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			
英国	University of Glasgow			
中国	Henan University			