

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07101

研究課題名(和文) 青色光に依存した気孔開口を仲介するプロテインキナーゼの同定と機能的特徴づけ

研究課題名(英文) Identification and functional characterization of protein kinases mediating blue light-dependent stomatal opening

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：青色光に应答した気孔開口は、気孔孔辺細胞において光受容体であるフォトトロピンがプロトンポンプを活性化し、続いてカリウムイオンの取り込みを促進することにより誘導される。ところが、詳細なシグナル伝達は未解明である。本研究では、フォトトロピンと物理的に相互作用するプロテインキナーゼとしてCIPK23を同定し、気孔開口における機能解析を行った。その結果、CIPK23はプロトンポンプではなく、カリウムイオンチャネルの活性化を仲介することにより気孔開口を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Stomata open in response to blue light, and the opening is mediated by a phototropin-activated proton pump and a consequent potassium uptake in stomatal guard cells. However, signaling for the stomatal opening is not fully understood. In this study, we performed a protein-protein interaction screening and identified CIPK23 as a phototropin interactor. As the results of functional analyses of CIPK23, we found that CIPK23 mediates stomatal opening not through the proton pump activation but through the potassium channel activation in guard cells.

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

植物の表皮に無数に存在する気孔は、太陽光に含まれる青色光に反応して開口し、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基質である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進するため、気孔の機能は植物の生命活動に重要である。

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り細胞体積が増加することにより誘導される(Shimazaki et al., Annu. Rev. Plant Biol. 2007)。気孔孔辺細胞において、青色光はフォトトロピンにより受容され、未知のシグナル伝達を経て標的である細胞膜 H^+ -ATPase をリン酸化により活性化する。この酵素の活性化が、細胞膜の過分極を誘導してカリウムチャンネルを活性化し、カリウムイオンの取り込みを促進して最終的に気孔を開口させる(Shimazaki et al., Annu. Rev. Plant Biol. 2007)。ところが、 H^+ -ATPase をリン酸化して活性化するプロテインキナーゼは未同定である。また、カリウムチャンネル AKT1 は、根では活性化にリン酸化も必要とするため(Li et al., PNAS. 2006; Xu et al., Cell. 2006)、気孔開口においてもカリウムチャンネルの活性化には細胞膜の過分極とリン酸化の両方が必要である可能性が高いと考えられた。ところが、孔辺細胞において、カリウムチャンネルをリン酸化するシグナル伝達はこれまでに全く提唱されていなかった。従って、カリウムチャンネルの活性化を誘導する新たなリン酸化によるシグナル伝達経路の証明と H^+ -ATPase やカリウムチャンネルをリン酸化により活性化するプロテインキナーゼの同定が、気孔開口メカニズム全貌の解明に不可欠である。

申請者はこれまでに、リン酸化反応に着目してフォトトロピン分子の研究を進め、その活性化メカニズムの一端を明らかにした(Inoue et al. PNAS. 2008, Curr. Opin. Plant Biol. 2010, Plant Physiol. 2011)。近年ではフォトトロピンの下流で働くシグナル伝達因子の同定を進めており、最近ではフォトトロ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手法により探索し、CIPK23 を得ていた。これまでの研究により、CIPK23 は根において AKT1 の活性化を介して根の伸長を正に調節し(Li et al., PNAS. 2006; Xu et al., Cell. 2006)、気孔においては乾燥による気孔閉鎖を負に調節すると報告されている(Cheong et al., Plant J. 2007)。ところが、青色光に反応した気孔開口において、CIPK23 が重要な役割をもつのか不明であった。また、CIPK23 の気孔開口シグナル伝達上の具体的機能が明らかでなかった。従って、我々は CIPK23 がフォトトロピンの下流でカリウムチャンネルをリン酸化により活性化し、気孔開口を正に調節するのではないかと予想し、これを検証する実験を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、気孔開口を仲介する青色光受容体フォトトロピンと物理的に相互作用する CIPK23 に関して、気孔開口において詳細な機能解析を行い、CIPK23 が気孔開口を仲介するのか、さらに、シグナル伝達における CIPK23 の機能を分子レベルで明らかにし、気孔開口メカニズムの理解を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CIPK23 とフォトトロピン、BLUS1 とのタンパク質間相互作用の検出

CIPK23 は、もともと ALPHA という手法を用いた *in vitro* タンパク質間相互作用スクリーニングにより同定された、フォトトロピンと相互作用するプロテインキナーゼである。このため、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。また、近年同定された孔辺細胞内のフォトトロピン基質である BLUS1(Takemiya et al., Nat. Commun. 2013)と CIPK23 の相互作用も調べた。大腸菌を用いて発現・精製した CIPK23、BLUS1、フォトトロピンを用いて、*in vitro* pull down assay を行った。さらに、植物細胞内におけるこれらの相互作用を、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) CIPK23 の気孔開口への関与の証明

CIPK23 が気孔開口を仲介するのか明らかにするため、T-DNA 遺伝子破壊株を入手して気孔開口の表現型を多角的に解析した。まず、ロゼット葉から表皮を単離して青色光を照射し、青色光に依存した気孔開口反応を顕微鏡を用いて直接観察した。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、光合成蒸散測定装置を用いて、生葉に青色光を照射した条件下の気孔コンダクタンスを測定した。これらの実験は、申請者がこれまでに確立した手法を駆使して行った(Inoue et al. PNAS. 2008, Plant Physiol. 2011; Doi et al., Plant Physiol. 2008)。

(3) 孔辺細胞プロトプラストを用いた細胞膜 H^+ -ATPase の活性測定

野生株と *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 の活性化を測定した。青色光照射前後の細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化レベルとプロトン放出反応を測定した。これらを観察することにより、シグナル伝達において CIPK23 が細胞膜 H^+ -ATPase の上流で働いているのかどうか調べた。

(4) 孔辺細胞プロトプラストを用いたカリウムチャンネルの活性測定

CIPK23 は根においてカリウムチャンネル

AKT1 をリン酸化により活性化することが知られている。そこで、*cipk23* 変異株の孔辺細胞プロトプラストを調整し、青色光照射時のカリウムチャネル活性を、パッチクランプ法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) CIPK23 は *in vitro*, *in vivo* 両方においてフォトリピンと相互作用する

In vitro pull down assay の結果、CIPK23 はフォトリピン(phot1 と phot2)と相互作用を示した。この結合には青色光の照射は必要なく、フォトリピンの自己リン酸化とは無関係に相互作用することが示された。また、BiFC assay の結果から、両者が植物細胞内でも相互作用することが示された。

(2) *cipk23* 変異体では青色光による気孔開口が損なわれている

単離表皮を用いた気孔開度測定の結果、*cipk23* 変異体では青色光に反応した気孔開口が大きく損なわれていることが分かった。また、生葉の気孔コンダクタンス測定の結果から、*cipk23* 変異体では青色光を照射した場合のコンダクタンスの上昇が低下していることが明らかになった。これらの結果と対応して、*cipk23* 変異体は生育光条件下で野生株よりも高い葉温を示し、乾燥ストレスにも強い耐性を持っていた。これらすべての結果は、*cipk23* 変異体の気孔開口能力が低いことを示している。

(3) *cipk23* 変異体では孔辺細胞の細胞膜 H⁺-ATPase が正常に活性化される

cipk23 変異体の気孔開口過程がどこで損なわれているのか明らかにするため、変異体の葉から孔辺細胞プロトプラストを単離し、細胞膜 H⁺-ATPase の活性化を調べた。その結果、*cipk23* 変異体においても、細胞膜 H⁺-ATPase は正常に青色光に反応して活性化を示し、H⁺-ATPase までのシグナル伝達には CIPK23 は関与していないことが明らかになった。

(4) *cipk23* 変異体では孔辺細胞のカリウムチャネル活性が低下している

さらに、H⁺-ATPase 以降のシグナル伝達イベントであるカリウムチャネルの活性化を、*cipk23* 変異体の孔辺細胞を用いたパッチクランプ法により調べた。その結果、青色光によるカリウムチャネルの活性化が変異体では抑制されていた。さらに、この表現型は *blus1* 変異体でも同様に観察された。これらの結果から、孔辺細胞のカリウムチャネルは青色光に反応して活性化され、このシグナルを BLUS1 と CIPK23 が担うことが明らかになった。

本研究の成果は、気孔開口メカニズムにおいて、青色光によるカリウムチャネルの活性化という新たなシグナル伝達経路の存在を

示し、さらに、このシグナル伝達を仲介する分子として CIPK23 を明らかにした。これらは、気孔開口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 10 件)

Peterson J, Inoue S, Kelly SM, Sullivan S, Kinoshita T, Christie JM (2017) Functional characterization of a constitutively active kinase variant of Arabidopsis phototropin 1. *Journal of Biological Chemistry* 292: 13843-13852. 査読有り

Inoue S, Kinoshita T (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* 174: 531-538. 査読有り

Inoue S, Iwashita N, Takahashi Y, Gotoh E, Okuma E, Hayashi M, Tabata R, Takemiya A, Murata Y, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K (2017) Brassinosteroid involvement in *Arabidopsis thaliana* stomatal opening. *Plant & Cell Physiology* 58: 1048-1058. 査読有り

Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T (2017) A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening. *Scientific Reports* 7: 45586. 査読有り

Inoue S, Takahashi K, Okumura-Noda H, Kinoshita T (2016) Auxin influx carrier AUX1 confers acid resistance for Arabidopsis root elongation through the regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant & Cell Physiology* 57: 2194-2201. 査読有り

Okumura M, Inoue S, Kuwata K, Kinoshita T (2016) Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation. *Plant Physiology* 171: 580-589. 査読有り

Nagatoshi Y, Mitsuda N, Hayashi M, Inoue S, Okuma E, Kubo A, Murata Y, Seo M, Saji H, Kinoshita T, Ohme-Takagi M (2016) GOLDEN 2-LIKE transcription factors for chloroplast development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 4218-4223. 査読有り

Kimura Y, Aoki S, Ando E, Kitatsuji A, Watanabe A, Ohnishi M, Takahashi K, Inoue S, Nakamichi N, Tamada Y, Kinoshita T (2015) A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 56: 640-649. 査読有り

Sakai Y, Inoue S, Harada A, Shimazaki K, Takagi S (2015) Blue-light-induced rapid chloroplast de-anchoring in *Vallisneria* epidermal cells. *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 93-105. 査読有り

Sakai Y, Inoue S, Takagi S (2015) *In vitro* phosphorylation assay of putative blue-light receptor phototropins using microsomal and plasma-membrane fractions prepared from *Vallisneria* leaves. *Bio-protocol* 5: iss21. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

井上晋一郎、友清雄大、林真妃、奥村将樹、岡島公司、堀江智明、木下俊則、島崎研一郎、A plasma membrane syntaxin SYP132 regulates blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*、第 59 回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター、2018 年 3 月

Maki Hayashi, Shin-ichiro Inoue, Yoshihisa Ueno, Toshinori Kinoshita, A Raf-like kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening, International Symposium on Plant Photobiology, January, 2018, Kunibiki Messe, Matsue, Japan

Shin-ichiro Inoue, Yuta Tomokiyo, Maki Hayashi, Masaki Okumura, Koji Okajima, Tomoaki Horie, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki, A plasma membrane syntaxin regulates blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*, International Symposium on Plant Photobiology, January, 2018, Kunibiki Messe, Matsue, Japan

林真妃、井上晋一郎、上野宣久、河内孝之、木下俊則、A protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening、第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学、2017 年 3 月

中根功多朗、奥村将樹、楊為雄、井上晋一郎、石崎公庸、河内孝之、木下俊則、ゼニゴケにおける細胞膜 H⁺-ATPase の生理機能の解析、第 58 回日本植物生理学会年会、鹿児島大学、2017 年 3 月

後藤栄治、井上晋一郎、大岩本康平、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、日本植物学会年会、宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月

井上晋一郎、Eirini Kaiserli、高橋宏隆、澤崎達也、木下俊則、John M. Christie、Xiao Zhang、武宮淳史、島崎研一郎、Identification and functional analyses of the protein kinase that interacts with blue light-receptor phototropins in *Arabidopsis*、第 57 回日本植物生理学会年会、岩手大学、2016 年 3 月

〔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・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40532693

(2)研究協力者

林 真妃 (HAYASHI, Maki)

奥村 将樹 (OKUMURA, Masaki)