

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18556

研究課題名(和文) 気孔葉緑体シグナルの探索および新奇気孔葉緑体形成因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of GLES1 essential for chloroplast development in guard cells

研究代表者

柁宜 淳太郎 (NEGI, JUNTARO)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70529099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：孔辺細胞には葉緑体が存在するが、その機能や形成メカニズムに関しては不明な点が多い。そこで、葉肉細胞の葉緑体は正常だが、孔辺細胞の葉緑体形成に異常をもつ gles1 変異体をシロイヌナズナから単離した。葉緑体を構成する膜脂質は原核型と真核型の2つの脂質代謝経路から合成される。gles1 変異体の原因遺伝子は、葉緑体の包膜に存在し、真核型脂質を葉緑体に取り込む輸送体の一部をコードしていた。また、孔辺細胞は葉肉細胞と比較して原核型の脂質経路が退化しているというユニークな脂質代謝特性を示すことが分かった。これらの結果より、真核型の脂質代謝経路は気孔の葉緑体形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Stomatal guard cells develop unique chloroplasts in land plant species. However, the developmental mechanisms and function of chloroplasts in guard cells remain unclear. In seed plants, chloroplast membrane lipids are synthesized via two pathways: the prokaryotic and the eukaryotic pathways. We gained insight into these pathways by isolating and examining an Arabidopsis mutant, gles1, which has achlorophyllous stomata and impaired stomatal responses to CO₂ and light. The GLES1 gene encodes a putative regulatory component of the trigalactosyldiacylglycerol protein complex that mediates the ER-to-chloroplast lipid transport via the eukaryotic pathway. Lipidomic analysis reveals that in wild type, the prokaryotic pathway is dysfunctional specifically in guard cells, whereas in gles1 guard cells, the eukaryotic pathway is also abrogated. In conclusion, the eukaryotic lipid pathway is essential for guard-cell chloroplasts to develop CO₂ and light signal sensing machinery.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：気孔 葉緑体 脂質

1. 研究開始当初の背景

植物において外部環境とのガス交換の場である気孔は、1対の孔辺細胞によって形成されている。孔辺細胞には葉緑体が存在し、葉肉細胞の葉緑体と比較して、チラコイド膜は少なく、でんぷんを多量に含んでいる特徴を有している。しかし、気孔における葉緑体の機能や意義については不明な点が多い。そこで、研究代表者らは葉肉細胞の葉緑体は正常だが、気孔細胞の葉緑体が欠損したシロイヌナズナ変異体 *gles1* を単離した(図1)。これまでの解析から、*gles1* の気孔において、CO₂ 濃度や光による開閉応答が著しく低下しており、さらに、気孔閉口を引き起こすSタイプ陰イオンチャンネルが不活化されることを明らかにした。また *gles1* 変異体の原因遺伝子は、シロイヌナズナゲノム上1コピーしかない、葉緑体包膜に局在する新規の遺伝子であることがわかった。気孔葉緑体の役割及び形成メカニズムを知る上での一つの手がかりを得たが、気孔の葉緑体がどのように気孔開閉メカニズムに影響を与えているのかわからず、また GLES1 の分子的な機能も謎である。

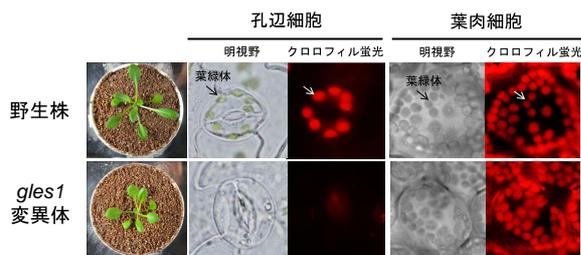


図1 *gles1* 変異は孔辺細胞葉緑体を欠損させる(葉肉細胞葉緑体は正常)

2. 研究の目的

(1) 気孔葉緑体が開閉メカニズムに与える影響を明らかにする。葉緑体はカルシウムをストックし、さらに光合成をすることでATPを生産するオルガネラである。またカルシウムは気孔閉口を引き起こすSタイプ陰イオンチャンネルの活性化にも関わることから、気孔開閉においてシグナル伝達因子となりうる。そこで、CO₂ や光などの環境刺激により、気孔細胞内のカルシウムがどの程度変化するのかを明らかにする。(2) 新規気孔葉緑体形成因子 GLES1 の機能を明らかにする。GLES1 は葉緑体包膜に局在することから、葉

緑体分化に必要な因子を葉緑体内に運ぶ輸送体と関係があるかもしれない。そこで包膜での GLES1 の機能を明らかにし、GLES1 がどのように気孔の葉緑体分化に関わるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 気孔葉緑体がどのように気孔開閉制御に関わっているのか、そのメカニズムは不明である。そこで、孔辺細胞内のカルシウムイオン濃度変化をリアルタイムで可視化する実験系を構築し、気孔葉緑体とカルシウムシグナルの関連を明らかにする。(2) 気孔葉緑体形成因子 GLES1 と協調的に働く相互作用因子を、膜タンパク質用ツーハイブリッドシステムを用いて特定する。

4. 研究成果

(1) CO₂ により誘導される孔辺細胞内のカルシウムイオンの濃度変化をリアルタイムでモニターするため、カルシウムイオンを感知すると蛍光が変わるカルシウムセンサータンパク質 Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6) を野生型及び *gles1* の植物内に発現させた。CO₂ 刺激(HCO₃⁻)により誘導される孔辺細胞内のカルシウムイオンの濃度変化を実際に測定できるのか確認するため、YC3.6 を発現させた野生型の表皮組織に HCO₃⁻ を与え、蛍光顕微鏡でカルシウムイオンの濃度変化を確認した。その結果、HCO₃⁻ を与えることにより孔辺細胞内のカルシウムイオンの濃度が変化し、一過的なピークが生じることを確認することができた。続いて、*gles1* の表皮組織に HCO₃⁻ を与え、野生型と同様の実験を行ったところ、HCO₃⁻ を与えた時に起こる孔辺細胞内のカルシウムイオンの濃度変化頻度は WT と *gles1* との間で、有意な差はなかった。また、HCO₃⁻ を与えた時に生じるカルシウムイオンの濃度の変動率も WT と *gles1* の間に有意な差を示さなかった。これらの事から、気孔の葉緑体はCO₂ により誘導される孔辺細胞内のカルシウムイオンの制御に関与しないことが分かった。(2) 酵母を使った膜タンパク質用ツーハイブリッド法を用いた実験から、GLES1 と相互作用する可能性のある葉緑体局在因子を 13 因子単離した。この中に

は、気孔の CO₂ 応答性に関与するカーボニックアンヒドラーゼが含まれていた。(3) これまで GLES1 は機能未知のタンパク質であったが、近年発表された論文により、葉緑体包膜に存在する脂質輸送体の一部として機能するタンパク質と同一であることが判明した。葉緑体を構成する膜脂質は葉緑体内で作られる原核型経路と、小胞体から前駆体が供給されて合成される真核型経路の2つの経路から合成される(図2)。GLES1 がコードする脂質輸送体は、真核型経路において小胞体から葉緑体への脂質輸送を担っており、気孔葉緑体の成熟化には真核型の脂質輸送が必須であることが明らかになった。また質量分析計を用いた孔辺細胞及び葉肉細胞の脂質プロファイリング解析から、孔辺細胞では葉肉細胞と比較して原核型の脂質代謝経路が発達しておらず、非常にユニークな脂質特性を有していることを発見した(図2)。孔辺細胞の葉緑体では原核型経路が退化した分、気孔の葉緑体形成には真核型経路からの脂質供給が必須であると考えられる。

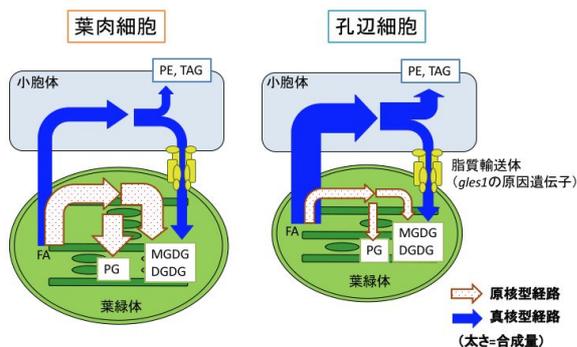


図2 葉肉細胞および気孔細胞における脂質代謝フラックス (気孔細胞は真核型経路に依存している)

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)

Kusumi, K., Hashimura, A., Yamamoto, Y., Negi, J. and Iba, K. (2017) Contribution of the S-type anion channel SLAC1 to stomatal control and its dependence on developmental stage in rice. *Plant Cell Physiol.* 58 (12): 2085-2094. (査読あり)
doi: 10.1093/pcp/pcx142

高橋 将、門田 慧奈、祢宜 淳太郎、射場 厚 (2017) サーマルイメージング法による気孔 CO₂ 応答解析から見出された新たな植物環境応答機構 光合成研究 27(2): 84-93. (査読あり)

Takahashi, S., Monda, K., Higaki, T., Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Hasezawa, S. and Iba, K. (2017) Differential effects of phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) and 3-kinase (PI3K) inhibitors on stomatal responses to environmental signals. *Front. Plant Sci.* 8: 677. (査読あり)

doi: 10.3389/fpls.2017.00677

Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Monda, K., Higaki, T., Isogai, Y., Nakano, T., Hasezawa, S. and Iba, K. (2016) Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt stomatal responses to CO₂ in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 67: 3251-3261. (査読あり)

doi: 10.1093/jxb/erw134

Monda, K., Araki, H., Kuhara, S., Ishigaki, G., Akashi, R., Negi, J., Kojima M., Sakakibara, H., Takahashi, S.,

Hashimoto-Sugimoto, M., Goto, N. and Iba, K. (2016) Enhanced stomatal conductance by a spontaneous *Arabidopsis* tetraploid, Me-0, results from increased stomatal size and greater stomatal aperture. *Plant Physiol.* 170: 1435-1444. (査読あり)

doi: 10.1104/pp.15.01450

Yamamoto, Y., Negi, J., Wang, C., Isogai, Y., Schroeder, J.I. and Iba, K. (2016) The transmembrane region of guard cell SLAC1 channels perceives CO₂ signals via an ABA-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 557-567. (査読あり)

doi: 10.1105/tpc.15.00583

Engineer, C., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Rappel, W-J., Iba, K. and Schroeder, J. (2016) CO₂ sensing and stomatal conductance regulation: advances and open questions. *Trends Plant Sci.* 21: 16-30. (査読あり) doi: 10.1016/j.tplants.2015.08.014

[学会発表](計8件)

祢宜 淳太郎、宋 普錫、多田隈 遼亮、宗正 晋太郎、藤田 麻友美、楠見 健介、Julian Schroeder、射場 厚 「真核型の脂質代謝経路は気孔の葉緑体形成および

CO₂ 応答に必須である」第 59 回日本植物生理学会、3/28-30、2018、札幌コンベンションセンター（北海道）

祢冢 淳太郎、宋 普錫、多田隈 遼亮、宗正 晋太郎、藤田 麻友美、楠見 健介、Julian Schroeder、射場 厚「気孔の葉緑体形成には真核型経路による脂質合成が必須である」第 81 回日本植物学会、9/8-10、2017、東京理科大学（千葉県）

多田隈 遼亮、宋 普錫、楠見 健介、西田 生郎、射場 厚、祢冢 淳太郎「孔辺細胞と葉肉細胞の脂質組成の違い」第 35 回日本植物細胞分子生物学会、8/29-31、2017、大宮（埼玉県）

祢冢 淳太郎「炭素栄養シグナルとしての CO₂ による気孔制御」(招待講演) 第 58 回日本植物生理学会、3/16-18、2017、鹿児島大学（鹿児島県）

祢冢 淳太郎、小野 勇兵、岡部 誠、星野 奈摘、西田 生郎、射場 厚「孔辺細胞におけるフォスファチジルエタノールアミン合成酵素 PECT1 の役割」第 34 回日本植物細胞分子生物学会、9/1-3、2016、信州大学（長野県）

Juntaro Negi, Makoto Okabe, Yuhei Ono, Natsumi Hoshino, Ikuo Nishida, Koh Iba「A rate-limiting enzyme in phosphatidylethanolamine biosynthesis, PECT1, is involved in the stomatal regulation in *Arabidopsis*」27th International Conference on Arabidopsis Research, 6/29-7/3, 2016, Gyeongju, Korea

祢冢 淳太郎、岡部 誠、小野 勇兵、星野 奈摘、西田 生郎、射場 厚「フォスファチジルエタノールアミン合成酵素 PECT1 は気孔開閉応答に関与する」第 57 回日本植物生理学会、3/18-20、2016、岩手大学（盛岡）

祢冢 淳太郎「気孔の環境応答及び形成の分子機構の解明」(招待講演) 第 33 回日本植物細胞分子生物学会、8/10-12、2015、東京大学（東京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plant/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

祢冢 淳太郎 (NEGI JUNTARO)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70529099