

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370021

研究課題名(和文)

気孔孔辺細胞における青色光シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)

Analysis of blue light signaling pathway in stomatal guard cells

研究代表者：

木下 俊則 (KINOSHITA TOSHINORI)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：50271101

研究成果の概要(和文)：

植物の表皮に存在する気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散、酸素の放出を調節し、陸生植物の生存に必須の働きを担っている。しかしながら、気孔の開口や閉鎖がどのようなシグナル伝達を経て引き起こされているかは、未だ多くの部分が不明のままである。本研究では、青色光による気孔開口に着目して研究を進め、その分子機構の一端を明らかにした。また、この研究過程で気孔閉鎖との関連性、さらに閉鎖に関わる因子を発見し、その機能についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Stomatal pores surrounded by a pair of guard cells in the plant epidermis regulate gas exchange between leaves and the atmosphere. Opening of the stomata allows both CO₂ entry for photosynthesis and the transpiration stream in higher plants. However, the signaling pathways for stomatal opening and closing are largely unknown. In this study, we revealed that signaling components in blue light-induced stomatal opening and abscisic acid-induced stomatal closing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：気孔、青色光、細胞膜プロトンポンプ、アブシジン酸、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

気孔を構成する一対の孔辺細胞は、太陽光、特にシグナルとして作用する青色光域の光に応答して気孔を開かせ、植物と大気間のガス交換を促進し、乾燥ストレスに曝されると、植物ホルモン・アブシジン酸に応答して気孔を閉鎖し、植物体からの水分損失を防いでいる。

青色光は孔辺細胞で発現する青色光受容体フォトトロピンによって受容され、細胞膜プロトンポンプ(H⁺-ATPase)を活性化し、細

胞膜の過分極を引き起こす(Kinoshita et al., Nature 2001)。この過分極に反応して細胞膜のカリウムチャンネルが孔辺細胞内へ大量のカリウムを流入させ、それに伴い水が取り込まれ、気孔開口に至る。これまでの研究により申請者は、青色光により活性化されるプロトンポンプの実体が細胞膜H⁺-ATPaseであり、H⁺-ATPaseはC末端のスレオニン残基のリン酸化とリン酸化C末端への14-3-3蛋白質の結合により活性化されることを明らかにした(Kinoshita and

Shimazaki, EMBO J. 1999, Plant Cell Physiol. 2002)。この酵素により形成されたプロトンの電気化学ポテンシャル勾配は、気孔開口のみならず、細胞膜電位や細胞内外のpHの調節など植物細胞の恒常性維持、そして、2次輸送体を介したショ糖、アミノ酸などの代謝物質やカリウムイオン、硝酸、リン酸などの無機イオンの輸送に利用されているが、その活性調節機構は不明の部分が多かった。申請者の成果は、H⁺-ATPaseの植物細胞内の活性化機構を示した初めての例となったが、これらの活性調節に直接関わるプロテイン・キナーゼやホスファターゼは未だ明らかとなっていない。また、フォトリポピンからH⁺-ATPaseに至る細胞内シグナル伝達についても、未だ不明の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、変転する環境下での植物の生育に重要な役割を担っている気孔孔辺細胞の環境応答のシグナル伝達の詳細な分子機構、特に、フォトリポピンに受容された青色光シグナルがどのようにして細胞膜H⁺-ATPaseの活性化を引き起こしているのか、さらに、気孔開口のみならず、細胞の恒常性維持、様々な物質輸送に関わるマスター酵素、細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構について、生理・生化学的、分子遺伝学的手法を駆使して分子レベルで解明することを目指す。

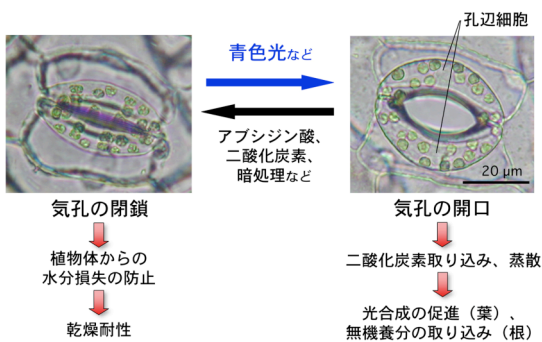


図1、気孔の開口と閉鎖

3. 研究の方法

細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構については、ソラマメ孔辺細胞プロトプラストより単離したマイクロゾーム画分、または、シロイヌナズナの黄化芽生えより単離した細胞膜画分を用いて、H⁺-ATPaseの*in vitro*でのリン酸化反応の解析を行った。

気孔開度変異体の解析については、メタンスルホン酸エチル (EMS) 処理によって突然変異を誘発したシロイヌナズナを材料に気孔開度変異体のスクリーニングを行った。単離した突然変異体の原因遺伝子については、マッピング法により原因遺伝子の特定を行った。

免疫組織学的手法によるH⁺-ATPaseのリン

酸化状態の検出には、活性化の際リン酸化されるC末端から2番目のリン酸化スレオニンに特異的な抗体(本研究過程で作成)を用いた。

4. 研究成果

(1) 植物の細胞膜に存在するP型ATPase細胞膜H⁺-ATPaseは、ATPの加水分解エネルギーを利用したプロトンの能動輸送を行うことによって、細胞膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャル勾配を形成し、様々な二次輸送体と共役したイオンや代謝物質の輸送を駆動する植物細胞に必須の一次輸送体である。これまでの当研究室の気孔孔辺細胞を用いた研究により、H⁺-ATPaseの活性化には、C末端から2番目のスレオニンのリン酸化が必須であることが明らかとなっているが、このリン酸化反応を触媒するプロテインキナーゼやホスファターゼの実体やこれらの生化学的性質は未だ明らかとなっていない。

本研究では、ソラマメ孔辺細胞プロトプラストから単離したマイクロゾーム、さらに、シロイヌナズナ黄化芽生えから精製した細胞膜を用いて、*in vitro*リン酸化反応系を確立し、生化学的解析を行った。その結果、キナーゼとホスファターゼがプロトンポンプと共に細胞膜に局在しており、キナーゼは一般的なキナーゼ阻害剤(K-252a)に対して非感受性であり、その活性には細胞膜構造が必要であること、一方、ホスファターゼは、Mg²⁺依存性のタイプ2Cホスファターゼであり、プロトンポンプと複合体を形成していることが明らかとなった(図2)。現在、これらキナーゼやホスファターゼ分子の同定に向け、解析を進めている(Hayashi et al., 2010 Plant Cell Physiol.)。

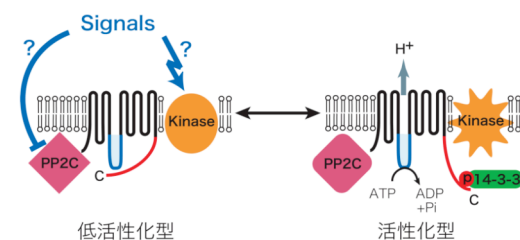


図2、細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構

(2) 気孔開閉のシグナル伝達の分子機構を明らかにすることを目的として、EMS処理したシロイヌナズナを用い、葉の重量変動を指標にした気孔開度変異体のスクリーニングを行った。単離した *rtl* (*rapid transpiration in detached leaves*) 1 変異体は、矮性・ペールグリーンであり、アブシジン酸 (ABA) 存在下でも気孔が開鎖しない ABA 非感受性の表現型を示した(図3)。マッ

ピングによる原因遺伝子の同定の結果、*rt11* 変異体には第5染色体のMg-キラーゼHサブユニット遺伝子 (*CHLH*) にミスセンス変異を引き起こす1塩基置換が存在することが明らかとなった。*CHLH*はクロロフィル生合成に関わる酵素であり、近年、ABAとの結合能からABA受容体としても機能することが報告されている (Nature 2006, Plant Physiol. 2009)。そこで、³H-ABAを用いて結合解析を行ったが、組換え *CHLH* と ABA の特異的な結合は観察されなかった。以上の結果から、*CHLH* が ABA 受容体である可能性は低いものの、気孔の ABA シグナル伝達に何らかの影響を与えていることが示唆された。さらに、ABA シグナル伝達との関連性を探るべく解析を進め、この変異体では、細胞外に高濃度の Ca²⁺ が存在すると ABA による気孔閉鎖が見られることを見出し、*CHLH* が孔辺細胞の Ca²⁺ の濃度調節に関わっていることが示唆された。また、Mg-キラーゼのサブユニットの一つである I サブユニットのノックアウト変異体においても、ABA に対する気孔閉鎖が見られないことを見出し、Mg-キラーゼ複合体が、孔辺細胞の ABA シグナル伝達に影響していることが明らかとなった。本研究結果は、国際誌への投稿を行い、受理された (Tsuchiura et al., J. Plant Res. In press)。現在は、単離したその他の変異体についても解析を進めている。

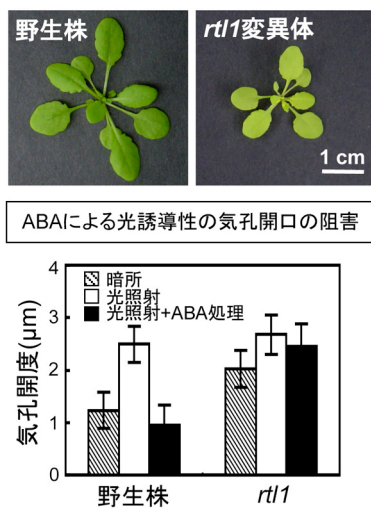


図3、*rt11* 変異体の写真と気孔の表現型

(3) フォトリポシン2重変異体を背景に、突然変異処理を行い、本来閉じている気孔が、顕著に開口した復帰突然変異体のスクリーニングを進め、興味深い突然変異体を複数得た。そのうちのひとつ *scs1* (*suppressor of closed-stomata phenotype in phot1 phot2*) について詳細な解析を進めた。孔辺細胞の細胞膜 H⁺-ATPase の活性状態を調べた結果、この変異体では、常に H⁺-ATPase が活性化状態

にあり、そのため気孔が顕著に開口していることがわかった。マッピングによる原因遺伝子の同定を進めた結果、概日時計の光による同調機構において機能すると考えられている *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* の新奇のミスセンス変異が原因となっていることが明らかとなった。そこで、*scs1-1* 変異体の気孔開度の概日リズムを連続明期下で調べた結果、概日リズムは消失しており、常に気孔が開いた結果を示していた。以上の結果は、気孔開度の概日リズムによる制御には *ELF3* が関与しており、H⁺-ATPase のリン酸化調節を介して行われていることを示している。本研究結果は、国際誌への投稿を行い、現在審査中である。現在は、単離したその他の変異体についても解析を進めている。

(4) 青色光は、孔辺細胞に発現する青色光受容体フォトトロピンに受容され、細胞膜 H⁺-ATPase の C 末端から 2 番目のスレオニンのリン酸化を引き起こすことにより活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。これまで、青色光に依存した H⁺-ATPase のリン酸化は、孔辺細胞プロトプラスト (GCPs) を用いた生化学的解析により行われてきた。しかしながら、生化学実験に用いる GCPs の調整には、大量のロゼット葉 (5,000 枚以上) と長時間の作業時間 (約 8 時間) を要するという問題点があった。そこで本研究では、一枚のロゼット葉より単離した表皮組織を用い、免疫組織染色による孔辺細胞 H⁺-ATPase の検出を試みた。まず、H⁺-ATPase に対する特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、孔辺細胞において強いシグナルが検出された。次に、H⁺-ATPase の C 末端から 2 番目のリン酸化スレオニンを特異的に認識する抗体 (anti-pThr₉₄₇) を用いて検出を行った。その結果、野生株では表皮組織に青色光照射することにより、孔辺細胞 H⁺-ATPase のリン酸化が検出されたが、フォトトロピン2重変異体では全く検出されなかった (図4)。以上の結果は、一枚のロゼット葉由来の表皮組織を用いた免疫組織染色により、青色光・フォトトロピンに依存した孔辺細胞の H⁺-ATPase のリン酸化を検出することが可能であることを示している。また、気孔を閉じさせる植物ホルモン・アブシジン酸による青色光によるリン酸化の阻害効果を調べた結果、興味深いことに、GCP と比べ、表皮組織では 200 倍以上感受性が高いことが明らかとなった。この結果は、表皮組織を用いると、より生理的状态に近い状態で反応の検出を行うことができることを示している。

さらに、この手法をアブシジン酸非感受性変異体 (*abi1-1*, *abi2-1*, *ost1-2*) に適用し、青色光によるリン酸化へのアブシジン酸の阻害を調べた結果、これらの変異体では、阻

害が全く見られないことわかり、アブシジン酸による青色光によるリン酸化の阻害に、PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 を介したシグナル伝達系が関与していることを初めて明らかにした。本研究結果は、国際誌への投稿を行い、受理された (Hayashi et al., *Plant Cell Physiol.* In press)。

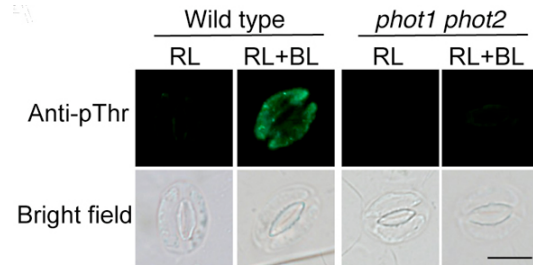


図4、免疫組織学的手法による孔辺細胞の細胞膜 H⁺-ATPase の青色光によるリン酸化。Wild type (野生株) ではリン酸化が検出されるが、*phot1 phot2* (フォトトロピン2重変異体) では全く検出されない。RL: 赤色光照射、RL+BL: 赤色光と青色光の同時照射、Anti-pThr: C末端から2番目のリン酸化スレオニンの特異的抗体、Bright field: 明視野。

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8件)

- ① Hayashi M, Inoue S, Takahashi K, Kinoshita T. (2011) Immunohistochemical Detection of Blue Light-induced Phosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Stomatal Guard Cells. **Plant & Cell Physiology** *in press*
- ② Tsuzuki T, Takahashi K, Inoue S, Okigaki Y, Tomiyama M, Hossain M.A, Shimazaki K, Murata Y, Kinoshita T. (2011) Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*. **J. Plant Research** *in press*
- ③ Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K (2011) Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** *in press*
- ④ Kinoshita T, Hayashi Y. (2011) New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and the plasma membrane H⁺-ATPase. **International Review of Cell and Molecular Biology** *in press*
- ⑤ Hayashi Y, Nakamura S, Takemiya A, Takahashi Y, Shimazaki K, Kinoshita T

(2010) Biochemical characterization of *in vitro* phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant & Cell Physiology** 51, 1186-1196.

- ⑥ Tominaga M, Harada A, Kinoshita T, Shimazaki K (2010) Biochemical characterization of calcineurin B-like-interacting protein kinase in *Vicia* guard cells. **Plant & Cell Physiology** 51, 408-421.
- ⑦ Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama K, Doi M, Shimazaki K. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 5626-5631.
- ⑧ Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K. (2008) Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. **Molecular Plant** 1, 15-26.

[学会発表] (計39件)

- ① Hayashi Y, Nakamura S, Kinoshita T 「Characterization of *in vitro* phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase」 3rd Japan-China Joint Workshop on Plant Nutrition, March 27-29, 2011, Kurashiki, Japan
- ② Tsuzuki T, Takahashi K, Inoue S, Okigaki Y, Kinoshita T 「Characterization of open-stomata mutant *rtll* exhibiting ABA-insensitive phenotype in stomatal guard cells」 3rd Japan-China Joint Workshop on Plant Nutrition, March 27-29, 2011, Kurashiki, Japan
- ③ Inoue S, Kinoshita T 「Isolation and characterization of mutants exhibiting the low activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis* roots」 3rd Japan-China Joint Workshop on Plant Nutrition, March 27-29, 2011, Kurashiki, Japan
- ④ 奥村将樹、井上晋一郎、高橋宏二、石崎公庸、河内孝之、木下俊則「苔類ゼニゴケにおける細胞膜プロトンポンプの構造および機能解析」第52回日本植物生理学会、2011年3月11日、要旨集
- ⑤ 林優紀、木下俊則「細胞膜プロトンポンプの活性制御に関わるプロテインホスファターゼの同定に向けて」第52回日本植物生理学会、2011年3月11日、要旨集
- ⑥ 都築 朋、高橋宏二、井上晋一郎、沖垣友季子、村田芳行、島崎研一郎、木下俊則「アブシジン酸非感受性の新奇気

- 孔開度変異体 *rtll* の解析」第 52 回日本植物生理学会、2011 年 3 月 11 日、要旨集
- ⑦ 井上晋一郎、木下俊則「シロイヌナズナの根において細胞膜プロトンポンプ活性が低下した突然変異株の単離」第 52 回日本植物生理学会、2011 年 3 月 11 日、要旨集
- ⑧ 林真妃、井上晋一郎、高橋宏二、木下俊則「免疫組織染色による青色光に依存した孔辺細胞細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化の検出」第 52 回日本植物生理学会、2011 年 3 月 11 日、要旨集
- ⑨ 高橋宏二、木下俊則「オーキシンによるシロイヌナズナ胚軸伸長促進機構の解析」第 52 回日本植物生理学会、2011 年 3 月 11 日、要旨集
- ⑩ Kinoshita T, Ono N, Hayashi Y, Soda M, Nakamura S, Nakano T, Inoue S, and Shimazaki K 「Genetic analysis of regulation of the plasma membrane H^+ -ATPase in stomatal guard cells」International Workshop on Plant Membrane Biology XV, September 19-24, 2010, Adelaide, Australia
- ⑪ Hayashi Y, Nakamura S, Kinoshita T. 「Possible involvement of type 2C protein phosphatase to dephosphorylation of the H^+ -ATPase」International Workshop on Plant Membrane Biology XV, September 19-24, 2010, Adelaide, Australia
- ⑫ Nakamura S, Hayashi Y, Kinoshita T 「Characterization of *in vitro* phosphorylation of the plasma membrane H^+ -ATPase」International Workshop on Plant Membrane Biology XV, September 19-24, 2010, Adelaide, Australia
- ⑬ 木下俊則「青色光による気孔開口のシグナル伝達系の解析」第 82 回日本生化学会シンポジウム、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ⑭ Kinoshita T, Sayuri Morimoto, Natsuko Ono, Midori Soda, Yuhki Hayashi, Suguru Nakamura, Takeshi Nakano, Shin-ichiro Inoue, Ken-ichiro Shimazaki 「Isolation of the suppressor mutants of closed stomata phenotype in *phot1 phot2* double mutant」Plant Biology 2009, July 18-22, 2009, Honolulu, USA
- ⑮ 木下俊則「新奇気孔開度変異体の単離と原因遺伝子の機能解析」植物の成長とストレス ワークショップ 2009 年 7 月 13-14 日、倉敷
- ⑯ 木下俊則、森本小百合、小野奈津子、井上晋一郎、中野雄司、島崎研一郎「気孔開度変異体 *scs1* の原因遺伝子同定と機能解析」第 50 回日本植物生理学会 2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑰ 木下俊則「シロイヌナズナの気孔開度変異体単離の試み」特定領域研-LOV 光受容体による植物の運動制御機構-第 2 回若手ワークショップ、2009 年 1 月 17 日-18 日、京都
- ⑱ Kinoshita T 「Stomatal opening and regulation of the plasma membrane H^+ -ATPase」2008 Japan-Switzerland Workshop, Oct. 8, 2008, Nara Japan
- ⑲ 木下俊則、島崎研一郎「青色光による気孔開口と細胞膜 H^+ -ATPase の活性調節機構」日本植物学会第 7 2 回大会、2008 年 9 月 25 日、高知
- ⑳ 木下俊則「気孔孔辺細胞における青色光シグナル伝達系の解析」第 8 回日本光合成公開シンポジウム、2008 年 5 月 30 日、名古屋
- 〔図書〕(計 1 件)
- ① 木下俊則「第 3 章 光による制御」ベシックマスター植物生理学(オーム社・塩井祐三、井上弘、近藤矩朗共編) 59-80 頁、2009 年
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ等
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/%7eplant4/plant4.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 木下 俊則 (KINOSHITA TOSHINORI)
 名古屋大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号: 50271101