

令和 5 年 6 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：2020～2022

課題番号：20K06703

研究課題名（和文）気孔の開口を駆動する細胞膜プロトンポンプの活性調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the activation mechanism of plasma membrane proton pump in 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・講師

研究者番号：40532693

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）：青色光受容体フォトトロピンは、孔辺細胞において細胞膜プロトンポンプとカリウムチャネルを活性化して気孔開口を誘導する。ところが、これらの開口の鍵酵素の活性化機構は未解明な部分が多かった。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やフォトトロピンの下流でリン酸化されるタンパク質の機能解析を通じ、気孔開口の分子機構の更なる理解を目指した。鍵酵素の活性調節と量の調節において重要な知見を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、青色光受容体フォトトロピンの相互作用因子の機能解析を進めることで、気孔開口の鍵酵素である細胞膜プロトンポンプとカリウムチャネルの新たな制御機構を解明することができた。この成果は、気孔開口のシグナル伝達において新たな構成因子を明らかにし、開口の分子機構の理解に大きく貢献した。また、本研究の成果は将来的に、農業上重要な作物の水利用効率の改善につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The blue-light receptor phototropin activates plasma membrane proton pump and inward-rectifying potassium channels in guard cells to induce stomatal opening. However, the activation mechanisms of these key enzymes for stomatal opening are largely unknown. In this study, we aimed to further understand the molecular mechanism of stomatal opening through the functional analysis of protein kinases that interact with phototropin and of protein that is phosphorylated in phototropin signaling. Our study provided important findings in the regulation of activity and quantity of the key enzymes in stomatal opening.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物 気孔開口 青色光 イオン輸送 プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物体表に無数に存在する気孔は、光合成の基質である CO₂ の取込みや蒸散を介して植物の生長に貢献する重要な器官である。気孔は一对の孔辺細胞に囲まれて形成され、太陽光に含まれる青色光に反応して開口する。我々は長らく気孔開口の分子機構を研究し、その解明を進めてきた。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、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カリウムチャンネルを介したカリウムイオンの取込みを駆動し、最終的に孔辺細胞を膨張させることで気孔開口が誘導される。

このような気孔開口モデルはおよそ 30 年前に提唱されたが、開口の鍵酵素である細胞膜 H⁺-ATPase とカリウムチャンネルがどのように活性化されるのか、肝心の部分が長らく未解明であった。また、孔辺細胞における細胞膜 H⁺-ATPase とカリウムチャンネルの局在調節も気孔開口に重要だと考えられるが、この調節の分子機構も断片的であった。

我々はこれまでに、フォトトロピンと相互作用するプロテインキナーゼとして Phototropin Interacting protein Kinase (PINK)1-3 を、フォトトロピンの下流でリン酸化されるタンパク質として膜輸送に関わる植物シンタキシン SYP132 を同定していた。

2. 研究の目的

本研究では、フォトトロピンと相互作用する 3 つのプロテインキナーゼ PINK1-3 とフォトトロピンの下流でリン酸化される SYP132 に関して詳細な機能解析を行い、細胞膜 H⁺-ATPase とカリウムチャンネルの活性化と細胞膜への局在調節における役割を明らかにし、気孔開口の分子機構をより理解することを目的とした。

3. 研究の方法

フォトトロピンと相互作用する 3 つのプロテインキナーゼは、ALPHA と呼ばれる *in vitro* の相互作用検出法で同定したため、*in vitro* pull-down assay や BiFC など、他の相互作用検出法も用いて結合を再度評価した。また、同様の手法を用いてこれまでに知られている気孔開口調節因子(BLUS1, BHP, PP1s, 細胞膜 H⁺-ATPase)との相互作用も調べ、関係性を明らかにした。また、PINK1-3 の変異株を入手し、フォトトロピン活性、細胞膜 H⁺-ATPase 活性、カリウムチャンネル活性、気孔開度、気孔コンダクタンスの表現型を調べることで、気孔開口シグナル伝達における PINK1-3 の生理・生化学的機能を解明した。

フォトトロピンの下流でリン酸化される SYP132 に関しても、フォトトロピンや細胞膜 H⁺-ATPase と物理的に相互作用するのか *in vivo* immunoprecipitation 法により検証した。また、*syp132* 変異株を入手し、上記と同様に気孔開口に対する詳細な表現型解析を進めた。生体内で SYP132 のどの部位がリン酸化されるか明らかにするため、質量分析によりリン酸化部位を同定した。リン酸化部位にアミノ酸置換を導入した変異型 SYP132 を *syp132* 変異株に発現させ、変異タンパク質のシグナル伝達能を明らかにした。

4. 研究成果

(1) PINK1s は細胞膜 H⁺-ATPase を抑制し青色光に依存した気孔開口を負に制御する

PINK1 は RAF-like kinase family に属する 2 つのホモログ CBC1&2 であった。この遺伝子破壊株をそれぞれ入手し、二重変異株を作成して表現型解析を進めた結果、フォトトロピンが誘導する光屈性、葉緑体光定位運動、葉の平坦化は野生株と変わらず正常に誘導されたが、青色光に依存した気孔開口のみ大きく促進されていた。また、孔辺細胞の細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化も大きく促進されていた。さらに、*in vitro* において CBC1&2 は細胞膜 H^+ -ATPase と物理的に相互作用することが確認された。

これらの結果から、CBC1&2 はフォトトロピンの下流で細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化を抑制し、気孔が青色光で開きすぎないようにしている負の調節因子であることを明らかにした(Hayashi et al., 2020 *Photochemical & Photobiological Sciences*)。

(2) PINK2 はカリウムチャネルを活性化し青色光に依存した気孔開口を正に制御する

PINK2 は SnRK3 family に属する CIPK23 であった。この遺伝子破壊株を入手し表現型解析を進めた結果、光屈性、葉緑体光定位運動、葉の平坦化は野生株と変わらず正常に誘導されたが、青色光に依存した気孔開口が損なわれていた。CIPK23 は phot1 と phot2 とともに相互作用を示したが、フォトトロピンのリン酸化基質ではなかった。面白いことに、孔辺細胞の細胞膜 H^+ -ATPase の活性は野生株と変わらず正常であったが、青色光に応答したカリウムチャネルの活性化が損なわれていた。したがって、CIPK23 は H^+ -ATPase を介さずにカリウムチャネルを活性化することが明らかになった。

これらの結果から、CIPK23 はフォトトロピンの下流でカリウムチャネルを活性化し、青色光に依存した気孔開口を正に調節することを明らかにした(Inoue et al., 2020 *The Plant Journal*)。これまで、孔辺細胞のカリウムチャネルは細胞膜 H^+ -ATPase が生み出す膜電位変化にのみ応答して活性化すると考えられていたが、本研究によりフォトトロピンは細胞膜 H^+ -ATPase を活性化するシグナル伝達に加えて、CIPK23 を介してカリウムチャネルを活性化するシグナル伝達も誘導することを新たに明らかにした。

(3) PINK3 は細胞膜 H^+ -ATPase を活性化し青色光に依存した気孔開口を正に制御する

PINK3 は遺伝的冗長性が高いプロテインキナーゼファミリーに属していた。そのため、薬理的な解析を主に進めた。孔辺細胞では青色光に応答して細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化が誘導されるが、PINK3 の阻害剤が孔辺細胞 H^+ -ATPase のリン酸化と活性を消失させて気孔開口を抑制すること、PINK3 がフォトトロピンや細胞膜 H^+ -ATPase と細胞内で相互作用することを明らかにした。さらに、PINK3 の発現が増加、または減少した形質転換植物を作成し、気孔開口を調べた結果、発現抑制株では気孔開口が抑制され、過剰発現株では促進された。さらに、発現抑制株では細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化が低下していた。

これらの結果から、PINK3 はフォトトロピンの下流で細胞膜 H^+ -ATPase を直接活性化し、青色光に依存した気孔開口を正に調節することを明らかにした。

(4) SYP132 はおそらく細胞膜 H^+ -ATPase の細胞膜への量を調節して気孔開口を正に制御する

我々はこれまでに、SYP132 が青色光に応答してフォトトロピンの下流でリン酸化されること、*syp132* 変異株の気孔が青色光を処理してもほとんど開口を示さないことを見出していた。本研究では、SYP132 がフォトトロピンではなく、細胞膜 H^+ -ATPase と生体内で相互作用することを明らかにした。また、SYP132 の生体内におけるリン酸化部位を同定し、そ

の機能解析を進めた結果、リン酸化部位に Ala を導入した場合 SYP132 のシグナル伝達は正常に誘導されたが、Asp を導入した場合には完全に損なわれることを見出した。

これらの結果から、SYP132 は青色光に依存した気孔開口に必要な正の調節因子であるが、青色光による SYP132 のリン酸化はその活性を抑制する負の調節機能があることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1. Akiyama M, Sugimoto H, Inoue S, Takahashi Y, Hayashi M, Hayashi Y, Mizutani M, Ogawa T, Kinoshita D, Ando E, Park M, Gray WM, Kinoshita T	4. 巻 188
2. 論文標題 Type 2C protein phosphatase clade D family members dephosphorylate guard cell plasma membrane H ⁺ -ATPase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2228-2240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab571	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 該当する
1. 著者名 1. Inoue S, Kaiserli E, Zhao X, Waksman T, Takemiya A, Okumura M, Takahashi H, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T, Kinoshita T, Zhang X, Christie JM, Shimazaki K	4. 巻 104
2. 論文標題 CIPK23 regulates blue light-dependent stomatal opening in Arabidopsis thaliana.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayashi Maki, Sugimoto Hodaka, Takahashi Hirotsuka, Seki Motoaki, Shinozaki Kazuo, Sawasaki Tatsuya, Kinoshita Toshinori, Inoue Shin-ichiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Raf-like kinases CBC1 and CBC2 negatively regulate stomatal opening by negatively regulating plasma membrane H ⁺ -ATPase phosphorylation in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 88 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9PP00329K	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 Ishishita Kazuhiro, Higa Takeshi, Tanaka Hidekazu, Inoue Shin-ichiro, Chung Aeri, Ushijima Tomokazu, Matsushita Tomonao, Kinoshita Toshinori, Nakai Masato, Wada Masamitsu, Suetsugu Noriyuki, Gotoh Eiji	4. 巻 183
2. 論文標題 Phototropin2 Contributes to the Chloroplast Avoidance Response at the Chloroplast-Plasma Membrane Interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 304 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00059	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 Inoue Shin ichiro, Hayashi Maki, Huang Sheng, Yokosho Kengo, Gotoh Eiji, Ikematsu Shuka, Okumura Masaki, Suzuki Takamasa, Kamura Takumi, Kinoshita Toshinori, Ma Jian Feng	4. 巻 236
2. 論文標題 A tonoplast localized magnesium transporter is crucial for stomatal opening in Arabidopsis under high Mg ²⁺ conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 864 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18410	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井上晋一郎、横正健剛、吉成晃、林真妃、後藤栄治、馬建鋒、木下俊則
2. 発表標題 植物のMgホメオスタシスを維持を調節するシグナル伝達機構の解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 晋一郎、林 真妃、黄 勝、横正 健剛、後藤 栄治、池松 朱夏、奥村 将樹、鈴木 孝征、木下 俊則、馬 建鋒
2. 発表標題 新奇液胞膜型マグネシウム輸送体の気孔開口への関与
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin-ichiro Inoue
2. 発表標題 Plant photoreceptor phototropin signaling and stomatal opening as a model case.
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会 シンポジウム「Diversity of photobiology; from molecules to organisms」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保裕亮、三島梨愛、木下俊則、井上晋一郎
2. 発表標題 ダイズにおける青色光によって誘導される葉の運動の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上晋一郎、林真妃、黄勝、横正健剛、後藤栄治、池松朱夏、奥村将樹、鈴木孝征、木下俊則、馬建鋒
2. 発表標題 新奇液胞膜型マグネシウム輸送体の気孔開口への関与
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島梨愛、久保裕亮、酒井達也、木下俊則、壽崎拓哉、井上晋一郎
2. 発表標題 青色光に応答したミヤコグサの葉の運動
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保裕亮、三島梨愛、木下俊則、井上晋一郎
2. 発表標題 光に応答したダイズの葉の運動解析
3. 学会等名 日本植物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上晋一郎、林真妃、奥村将樹、後藤栄治、横正健剛、馬建鋒、木下俊則
2. 発表標題 植物の光合成と蒸散を調節するMgホメオスタシス維持機構
3. 学会等名 日本土壤肥料学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	木下 俊則 (Kinoshita Toshinori)		
研究協力者	澤崎 達也 (Sawasaki Tatsuya)		
研究協力者	高橋 宏隆 (Takahashi Hirotaka)		
研究協力者	篠崎 一雄 (Shinozaki Kazuo)		
研究協力者	関 原明 (Sekimotoaki)		

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	林 真妃 (Hayashi Maki)		
研究協力者	奥村 将樹 (Okumura Masaki)		
研究協力者	後藤 栄治 (Gotoh Eiji)		
研究協力者	武宮 淳史 (Takemiya Atsushi)		
研究協力者	島崎 研一郎 (Shimazaki Ken-ichiro)		

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			
デンマーク	University of Copenhagen			
英国	University of Glasgow			
中国	Henan University			
米国	University of Minnesota			