

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2014

課題番号：21227001

研究課題名(和文) 気孔孔辺細胞における光情報のイオン輸送への変換機構

研究課題名(英文) The transduction of light signal to ion transport in stomatal guard cells.

## 研究代表者

島崎 研一郎 (SHIMAZAKI, Ken-ichiro)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00124347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 161,600,000円

研究成果の概要(和文)：孔辺細胞を用いてフォトトロピン依存の気孔開口に関与する蛋白質成分を同定した。ABA情報伝達系で生成される脂溶性フォスファチジン酸(PA)が青色光情報伝達系の蛋白質脱リン酸化酵素1(PP1)を阻害し、PP1がABAと青色光のクロストーク点になる事を示した。次に、フォトトロピン2の自己リン酸化部位がSer-761とSer-762であることを決めた。ついで、熱画像測定により青色光応答の変異体を選抜し、フォトトロピンの基質になる新規キナーゼBLUS1を同定した。さらに、孔辺細胞に発現している11のisogens(AHA1-AHA11)の中でAHA1が気孔開口に重要な役割を果たす事を示した。

研究成果の概要(英文)：We studied phototropin-mediated signaling components in guard cells as a model case for plant light signaling. We showed that phosphatidic acid, a phospholipid second messenger produced by ABA, inhibited protein phosphatase 1 (PP1), a positive regulator of stomatal blue light signaling. The result suggests that PP1 is a crosstalk point between blue light and ABA signaling. We identified autophosphorylation sites in phot2 by mass analysis and showed the phosphorylation of Ser-761 and Ser-763 is required for the signaling. We found a novel protein kinase named BLUS1 as a substrate for phototropins and demonstrated phosphorylation of Ser-348 in response to blue light. We demonstrated that the phosphorylation of Ser-348 is essential for the signaling and that the Ser-348 is directly phosphorylated by phototropins. We showed the expression of 11 isoforms of the H<sup>+</sup>-ATPases in guard cells and identified the isoform responsible for blue light-dependent stomatal opening as AHA1.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔 光情報伝達 フォトトロピン 細胞膜H<sup>+</sup>-ATPase イオン輸送

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは光合成活性を有した孔辺細胞プロトプラストの調製に初めて成功し、青色光が孔辺細胞から $H^+$ を放出させる事を発見した。ほぼ同時に米国とドイツのグループによって青色光によって孔辺細胞細胞膜が過分極すること、過分極によって $K^+$ を取り込む $K^+$ チャネルが細胞膜に存在すること等が証明され、光による気孔開口の筋道が確立された。これらの発見に続いて、申請者らは $H^+$ を放出する実体が細胞膜 $H^+$ -ATPaseであり、この酵素のC-末がリン酸化され14-3-3タンパク質が結合して活性化される事、青色光受容体がフォトトロピンでありphot1とphot2が重複して働く事、下流への情報伝達にフォトトロピンの自己リン酸化が必須である事、さらに、フォトトロピンから細胞膜 $H^+$ -ATPaseへの情報伝達をタイプ1プロテインフォスファターゼ(PP1)が仲介する事等を証明した。しかし、全貌が明らかになったとは言いがたく、光情報伝達系の全貌の理解には遺伝学的、生化学的手法を組み合わせた研究が必要である。

### 2. 研究の目的

気孔は情報としての光に反応して開口する。光は植物にとって最も重要な環境要因でクロロフィルに吸収される光は光合成のエネルギーとして、フィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンなどに受容される光は情報として、植物の生存に不可欠なものである。しかし、光合成系を構成する多くの成分のほぼ全容が解明されたのに比べて、光情報受容系については光受容体が同定されているものの下流まで含めて全貌が明らかになったものは一つもない。孔辺細胞はこれらの光情報受容系のなかで、光受容体としてフォトトロピンが、標的酵素として細胞膜 $H^+$ -ATPaseが同定された稀な例である。本申請は、孔辺細胞をモデル材料として青色光情報の受容・変換・伝達と細胞膜 $H^+$ -ATPaseの活性制御機構を研究し、光情報のイオン輸送活性への変換機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請は、気孔の青色光情報の変換機構、情報伝達体、イオン輸送体の制御機構を解明することを目的とする。そのため、孔辺細胞におけるフォトトロピンの基質、相互作用因子、フォスファターゼ(PP1)の調節サブユニット、基質、未同定の情報伝達体、細胞膜 $H^+$ -ATPaseの制御タンパク質を同定する。用いる手段として、無細胞タンパク質合成システムを利用する相互作用タンパク質の探索法、2次元電気泳動によるリン酸化・脱リン酸化されるタンパク質の同定法、two-hybrid法、質量分析法、さらに、気孔開口の変異株の原因遺伝子同定のためのポジショナルクローニング法がある。これらに加えて、細胞

膜 $H^+$ -ATPase制御機構の解明には生化学的方法を用いる。

### 4. 研究成果

本研究により、以下の成果が得られた。

- 1) 青色光依存の気孔開口の変異株の選抜法を確立した。この方法を用いて多数の変異体を選抜した。その中で特に興味深いものを選び、先行的に解析を行った。選抜された変異株は気孔の青色光応答を完全に欠いており、青色光依存の $H^+$ 放出、 $H^+$ -ATPaseのリン酸化を完全に阻害されていた。原因遺伝子をマッピングにより決定し、これまで機能の不明であったキナーゼ(BLUS1と名付けた)が原因である事を証明した。さらに、このキナーゼはフォトトロピンにより直接リン酸化される事、このリン酸化が下流に情報を伝えるのに必須である事を示した。
- 2) BLUS1がフォトトロピン1の基質である事を示した。さらに、それぞれ全長のフォトトロピン1とBLUS1を試験管内に発現させ、青色光により光強度に依存してBLUS1がリン酸化されること、そのリン酸化がキナーゼ阻害剤で抑制される事など、青色光情報伝達の初期過程の再構成に成功した。また、フォトトロピンのN-末のLOVドメインを除いたC-末キナーゼドメインとBLUS1を発現させると、青色光を照射しなくてもBLUS1がリン酸化される事を示した。
- 3) 気孔が開いたままになる突然変異体を解析して、花芽形成に必須の役割を果たすFT(Flowering locus T)が気孔開口を正に制御する事を見つけた。FTは細胞膜 $H^+$ -ATPaseをリン酸化し、高い活性状態にたもつ働きがある事を示した。このFTによる細胞膜 $H^+$ -ATPaseの活性化に至る過程は、花芽形成に寄与する情報伝達に關与する共通の成分を含んでいた。興味深い発見であり、現在、その生理学的意味を調べている。
- 4) リン酸化部位の質量分析により、フォトトロピン2の活性化に、このキナーゼドメインの2つのセリン残基がリン酸化される事が必要である事を示した。
- 5) 気孔の青色光応答とアブシジン酸の気孔閉鎖系とが相互作用する事を示した。アブシジン酸が、気孔閉鎖の情報伝達に際して生成する脂溶性のフォスファチジン酸が、青色光情報伝達を正に制御する脱リン酸化酵素1の触媒サブユニットを阻害した。また、フォスファチジン酸は、表皮の気孔開口、孔辺細胞プロトプラストからの青色光依存の $H^+$ 放出が阻害する事を示した。
- 6) 気孔の青色光情報伝達を正に制御する脱リン酸化酵素1の調節サブユニットとしてPRSL1(PP1 regulatory

subunit-like protein1)を two-hybrid 法により同定した。この調節サブユニット PRSL1 は触媒サブユニット PP1c に結合し、触媒サブユニットを細胞質に局在させる事を示した。

- 7) 細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase 2 (AHA2) を過剰発現させると、光依存の気孔開口が促進されることを示した。さらに、この過剰発現により、植物の成長を促進する事を証明した。

#### 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 40 件)

Suetsugu N, Takami T, Ebisu Y, Watanabe H, Iiboshi C, Doi M and Shimazaki K., 2014, Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in Arabidopsis., PLOS ONE, 9: e108374, DOI: 10.1371/journal.pone.0108374, 査読有

Wang Y, Noguchi K, Ono N, Inoue S, Terashima I, Kinoshita T., 2014, Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:533-538, DOI: 10.1073/pnas.1305438111, 査読有

Takemiya A., Sugiyama, N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie J. and Shimazaki K., 2013, Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening., Nat. Commun., 4:2094, DOI: 10.1038/ncomms3094, 査読有

Takemiya A., Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C and Shimazaki K., 2013, Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening., Plant Cell Physiol., 54: 24-35., DOI:10.1093/pcp/pcs073, 査読有

Harada A, Takemiya A., Inoue S, Sakai T and Shimazaki K., 2013, Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1., Plant Cell Physiol., 54:36-47, DOI:10.1093/pcp/pcs094, 査読有

Dermarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch M, Bergmann, Christie J, Shimazaki K., Tokutomi S and Fankhauser C, 2012, Phytochrome kinase substrate 4 is phosphorylated by the phototropin1 photoreceptor., EMBO J., 31: 3457-3467, DOI:10.1038/enboj.2012.186, 査読有

Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T. and Shimazaki K., 2011, Functional analysis of the activation loop of phototropin 2 in Arabidopsis., Plant Physiol., 156:117-128, DOI:10.1104/pp.111.175943, 査読有

Kinoshita T., Ono N, Hayashi Y, Morimoto S, Nakamura S, Soda M, Kato Y, Ohnishi M, Nakano T, Inoue S and Shimazaki K., 2011, FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening., Current Biology, 21:1232-1238, DOI:101016/j.cub.2011.06.025, 査読有

Inoue S, Takemiya A., Shimazaki K., 2010, Phototropin signaling and stomatal opening as a model case., Current Opinion in Plant Biology, 13 (5) : 587-593, DOI:10.1016/j.pbi.2010.09.002, 査読無

Takemiya A., and Shimazaki K., 2010, Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1., Plant Physiol., 153: 1555-1562, DOI:10.1104/pp.110.155689, 査読有

[学会発表](計 182 件)

島崎研一郎 「Identification of Signaling Components in Blue Light Response of Stomata.」 The 16th international congress on photobiology, 2014 年 9 月 11 日、Cordoba(Argentina)

島崎研一郎 「A primary step for phototropin signaling in stomatal guard cells.」 Gordon Research Conferences, 2014 年 4 月 7 日、Lucca(Italy)

木下俊則 「Molecular mechanisms of light-induced stomatal opening and auxin-induced cell elongation」 The 1st International Symposium on Transformative Bio-Molecules 2013、

2013年4月18日、Noyori Conference Hall, Nagoya University(愛知県・名古屋市)

島崎研一郎 「Phototropin-mediated stomatal opening in higher plants」 The 6th ASIA & OCEANIA CONFERENCE PHOTOBIOLOGY、2013年11月10日、Sydney(Australia)

島崎研一郎 「Stomatal opening in response to blue light and signaling of Arabidopsis」 The 2013 International Symposium on Plant Photobiology(ISPP2013)、2013年6月5日、Edinburgh(Scotland)

島崎研一郎 「Blue light-induced stomatal movement and signaling」 International Workshop on Plant Membrane Biology XVI2013(IWPMB)、2013年3月28日、倉敷芸文館(岡山県・倉敷市)

木下俊則 「Regulation of stomatal opening by photoperiodic components」 International Workshop on Plant Membrane Biology XVI (IWPMB2013)、2013年3月29日、倉敷芸文館(岡山県・倉敷市)

島崎研一郎 「Blue light signaling in stomatal guard cells」第10回国際植物分子生物学会議、2012年10月24日、Jeju(Korea)

木下俊則 「FLOWERING LOCUS T AND PHOTOPERIODIC PATHWAY REGULATE STOMATAL OPENING」 The 23rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR)、2012年7月3日～2012年7月7日、Vienna(Austria)

島崎研一郎 「Signaling in stomatal guard cells in response to blue light」 The 29th New Phytologist Symposium Stomata 2012、2012年7月2日、Manchester(UK)

木下俊則 「Regulation of stomatal opening by FT and photoperiodic pathway」 The 29th New Phytologist Symposium Stomata 2012、2012年7月2日～2012年7月4日、Manchester(UK)

島崎研一郎 「Light regulation of stomatal opening and its inhibition by abscisic acid」 The 1st international Symposium on Plant

Environmental Sensing、2012年3月21日、東大寺カルチャーセンター(奈良県・奈良市)

木下俊則 「Regulation of stomatal opening by FT」 International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change"、2011年12月9日、倉敷市芸文館(岡山県・倉敷市)

島崎研一郎 「Stomata sense light environment and optimize photosynthesis in higher plants」 JAPANESE - FINNISH Seminar 2010 on Future prospects of photosynthetic organisms : from genomes to environment、2011年3月1日～5日、岡山県イザルホテル(岡山県・岡山市)

木下俊則 「Genetic analysis of regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in stomatal guard cells」 International Workshop on Plant Membrane Biology XV、2010年9月19日～9月24日、Adelaide(Australia)

島崎研一郎 「C0379 PROTEIN PHOSPHATASE 1 REGULATES STOMATAL MOVEMENTS BY INTEGRATING ABA AND BLUE LIGHT SIGNALING IN GUARD CELLS」 20th International Conference on Plant Growth Substances、2010年6月26日～7月4日、Tarragona(Spain)

島崎研一郎 「Stomatal opening mediated by phototropins」 Memorial Symposium for the 25<sup>th</sup> International Prize for Biology、2009年12月2日、京都大学(京都府・京都市)

木下俊則 「Isolation of the suppressor mutants of closed stomata phenotype in *phot1 phot2* double mutant」 Plant Biology 2009、2009年7月19日、Honolulu(USA)

島崎研一郎 「Type 1 protein phosphatase is a crosstalk point between phototropin and abscisic acid signaling in guard cells」 15<sup>th</sup> International Congress on Photobiology、2009年6月23日、Düsseldorf(Germany)

[図書](計3件)

木下俊則、Wang Yin、NTS、光合成研究と産業応用最前線「気孔開度調節によ

る光合成と植物の生産量の促進」、2014、  
第4章 第2節, pp.147-156

木下俊則、講談社、高校生物解説書「気  
孔の開閉」2014、pp.50-51

木下俊則、Wang Yin、名古屋大学理学部・  
大学院理学研究科広報誌、理フィロソフ  
ィア「植物の成長を促す気孔に日の光を」  
2014、No.26, pp.14-15

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
その他（プレスリリース）

JST サイエンスニュース「世界初！植物  
の気孔を制御する」、2014年2月19日  
毎日新聞夕刊、『植物の気孔広げ光合成促  
進 名大研究所成功、収穫増、CO2 削減  
に期待』、2013年12月28日

朝日新聞夕刊、『気孔ガバツ、収量アッ  
プ 名大、植物成長早める手法開発』、  
2013年12月24日

日本経済新聞夕刊、『「気孔」広げて光合  
成を促進 名大、植物の生産量増加』、  
2013年12月24日

日経バイオテクアカデミック版、『九州大  
学、青色光に応答して気孔開口を可能す  
るタンパク質を発見』、2013年7月2日  
九州大学、『青色光に応答して気孔開口を  
可能にするタンパク質を発見』、2013年6  
月27日

Yahoo ニュース「名大、植物ホルモン『オ  
ーキシン』が植物細胞を伸長させるメカ  
ニズムを解明、2012年4月19日(木)20  
時10分配信

[http://www.excite.co.jp/News/it\\_biz/  
20120419/Cobs\\_ie\\_201204\\_post-222.htm](http://www.excite.co.jp/News/it_biz/20120419/Cobs_ie_201204_post-222.htm)

l

ホームページ

九州大学 細胞機能学講座 島崎研究室  
[http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/s  
himazaki/](http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/s_himazaki/)

名古屋大学 植物生理学グループ

[http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/ind  
ex.html](http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 研一郎 (SHIMAZAKI, Ken-ichiro)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：00124347

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

武宮 淳史 (TAKEMIYA, Atsushi)  
九州大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：80448406

(4) 連携研究者

井上晋一郎 (INOUE, Shin-ichiro)  
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員  
研究者番号：40532693  
(H21年度のみ連携研究者)

(5) 連携研究者

高橋洋平 (TAKAHASHI, Yohei)  
九州大学・大学院理学研究院・学術研究員  
研究者番号：80592964  
(H22年度より連携研究者)