

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19087

研究課題名（和文）植物における代謝とストレス応答の調和の取れた成長を可能にする新たなシグナル分子

研究課題名（英文）Novel signal molecule that regulates both metabolism and stress response in plants

研究代表者

村田 芳行（Murata, Yoshiyuki）

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：70263621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：気孔の開閉は、植物が陸上で生育する上で極めて重要である。その運動は、植物ホルモンによって制御されているが、リンゴ酸によっても制御されています。本研究では、リンゴ酸が誘導する気孔閉口における原形質膜アニオンチャンネルSLAC1の細胞外リンゴ酸感知機構の完全解明を進めた。リンゴ酸が直接SLAC1を活性化していることを明らかにした。また、リンゴ酸は、孔辺細胞内のカルシウム濃度上昇を引き起こし、カルシウム依存性の信号伝達経路を活性化することを明らかにした。これらの結果から、これら両方の経路を介して、気孔閉口を誘導していることを示す知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンゴ酸による植物の成長制御に関する知見を得ることができた。よって、作物のストレス耐性やストレス応答の化学的制御を可能にし、農業分野への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Stomatal movement is critical for plants and is regulated by malate as well as by plant hormones. We investigated the regulation by malate of SLAC1, whose activation is essential for stomatal closure.

This study demonstrated that malate activate SLAC1 directly and indirectly (through signal transduction in guard cells), leading to stomatal closure. Moreover, we identified the regulatory domain in SLAC1.

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔 孔辺細胞 リンゴ酸 イオンチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

葉の表皮に存在する気孔は、一对の孔辺細胞からなる小孔であり、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや蒸散による水分放出を調節する重要な場所である。植物は、周囲の環境の変化に迅速に対応するために、気孔の開度を厳密に調節するシグナル伝達機構を有している。植物が高二酸化炭素や乾燥などの環境刺激を受けると、様々な代謝経路の中間体であるリンゴ酸が孔辺細胞アポプラスト空間に蓄積することが知られている。申請者はモデル植物であるシロイヌナズナを用いたこれまでの研究から、リンゴ酸が、気孔閉口を誘導する働きを持つことを明らかにした。またリンゴ酸による気孔閉口の調節機構の解析を進めた結果、細胞外のリンゴ酸が孔辺細胞原形質膜陰イオンチャンネル SLAC1 を直接活性化することがわかった。この結果は、SLAC1 が細胞外リンゴ酸を認識する受容体としての機能することを示唆している。

## 2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究から、以下に示すことが明らかとなっている。本研究の目的は、SLAC1 陰イオンチャンネルによるリンゴ酸感知機構とその生理学的役割を明らかにすることで、植物におけるリンゴ酸の「代謝とストレス応答の調和の取れた成長を可能にする新たなシグナル分子」としての機能を解明することである。

## 3. 研究の方法

- ・ SLAC1 のリンゴ酸感知に関わる領域は、特定の細胞外ループドメインに存在する。
  - ・ シロイヌナズナには SLAC1 ファミリーをコードする遺伝子は 4 つ存在するが、その全てがリンゴ酸受容体として機能するわけではない。
- 以上の結果をもとに以下の実験を計画した。

### (1) SLAC1 の細胞外リンゴ酸感知機構の完全解明

シロイヌナズナには SLAC1 ファミリーをコードする遺伝子は 4 つあるが、その全てがリンゴ酸受容体として機能するわけではない。リンゴ酸感知能を持たない SLAC1 ホモログと SLAC1 の細胞外ループドメインの配列比較により、SLAC1 のリンゴ酸感知にかかわると予想されるにドメインをすでに絞りこんでいる。この情報に基づいてリンゴ酸感知能を持つ SLAC1 と感知能を持たない SLAC1 ホモログのキメラを作成し、細胞外ループドメインのどのアミノ酸がリンゴ酸の感知に関わっているのかを明らかにする。解析に利用するキメラ SLAC1 の作成はすでに終了している。

### (2) SLAC1 のリンゴ酸受容体としての生理学的役割の解明

SLAC1 はアブシジン酸 (ABA) や CO<sub>2</sub> に応答した気孔閉口にも必須の因子である。上記実験 (1) の結果をもとに、細胞外ループドメインへ点変異を導入してリンゴ酸感知能は欠損しているが、ABA や CO<sub>2</sub> 応答は維持した変異 SLAC1 (malate-insensitive SLAC1: miSLAC1) を作成する。miSLAC1 を SLAC1 欠損変異植物体に導入して、その遺伝子組み換え植物体の表現型を解析することでリンゴ酸受容体としての SLAC1 の生理学的役割を明らかにする。

### (3) 孔辺細胞アポプラストのリンゴ酸濃度変化を調節する分子機構解明

孔辺細胞アポプラスト空間のリンゴ酸の供給源として、孔辺細胞自身が排出する場合と葉肉細胞が排出したものが蒸散流によって孔辺細胞に届く場合の2パターンが考えられる。孔辺細胞や葉肉細胞で発現するリンゴ酸排出輸送体タンパク質がすでにいくつか同定されている。それらリンゴ酸輸送体遺伝子破壊変異体のアポプラストのリンゴ酸量を、LC-MSを用いて測定することで、様々な環境刺激にตอบสนองして孔辺細胞アポプラスト空間にリンゴ酸を供給する分子機構を解明する。

## 4. 研究成果

### 【結果】

SLAC1 S型アニオンチャンネルはリンゴ酸による気孔閉鎖に必須である

- ・外因性リンゴ酸は10 mMで有意に気孔閉鎖を誘導したが、10 mM未満では有意ではなかった。
- ・EC50は4.3 mMであった。
- ・リンゴ酸による気孔閉鎖は、slac1-1変異体およびslac1-3変異体では阻害されたが、slah3変異体では阻害されなかった。
- ・slac1変異体をSLAC1で相補すると、リンゴ酸に対する気孔反応は回復した。
- ・slac1変異体とは対照的に、孔辺細胞のR型アニオンチャンネルをコードする遺伝子QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL1 (QUAC1) (ALMT12としても知られる)の変異体は、リンゴ酸による気孔閉鎖を障害しなかった。

SLAH3やALMT12/QUAC1ではなく、SLAC1がリンゴ酸による気孔閉鎖に関与していることを示唆している。

- ・SLAC1のS59とS120のリン酸化部位を置換した変異体(SLAC1 S59A/S120A)を発現するslac1-1変異体では、リンゴ酸による気孔閉鎖が観察されなかった。

リンゴ酸による気孔閉鎖にはSLAC1のリン酸化が必要であることが示唆された。

リンゴ酸はシロイヌナズナの孔辺細胞においてS型アニオンチャンネルを活性化する

- ・リンゴ酸処理は野生型孔辺細胞プロトプラストではS型アニオン電流を有意に増加させたが、slac1-1孔辺細胞プロトプラストでは増加しなかった。

リンゴ酸はSLAC1を活性化することが示唆された。

アフリカツメガエル卵母細胞において、リンゴ酸はOST1またはCPK6キナーゼの存在下でSLAC1を活性化する

- ・何も導入していない卵母細胞(水)またはSLAC1を導入した卵母細胞では、リンゴ酸を添加してもアニオン電流は有意に増加しなかった。
- ・OST1およびCPK6と共にSLAC1を発現させた卵母細胞の負電流は、-160 mVでSLAC1のみを発現する卵母細胞の負電流と比べてそれぞれ有意に大きかった。
- ・SLAC1とOST1の両方を発現している卵母細胞では-160 mVでSLAC1電流を有意に増加させ、SLAC1とCPK6の両方を発現している卵母細胞でも有意に増加させた。

リンゴ酸によるSLAC1の直接活性化にはOST1またはCPK6によるSLAC1のリン酸化が必要であることが明らかになった。

リンゴ酸はキナーゼを介さずにSLAC1の構成的活性変異体を直接活性化する

- ・SLAC1F450AまたはSLAC1T513Dを発現している卵母細胞におけるSLAC1電流は、SLAC1を発現している卵母細胞における電流よりも有意に大きかった。

(注: SLAC1F450A は、野生型の SLAC1 の 450 位がフェニルアラニンからアラニンへと置換された変異体であり、アニオンゲートに相当すると考えられるフェニルアラニン残基を欠いている。)

(注: SLAC1 T513D は、513 スレオニンがアスパラギン酸に置換されることで常にリン酸化されているような状態にある変異体である。)

・リンゴ酸を作用させると、SLAC1F450A を発現している卵母細胞と SLAC1T513D を発現している卵母細胞で、-160 mV での SLAC1 電流がそれぞれ有意に増加した。

・SLAC1T513D を発現している卵母細胞における負電流はリンゴ酸を添加したバス溶液で灌流すると瞬時に増加し、リンゴ酸を洗い流すと灌流前の値に戻った。

リンゴ酸はリン酸化 SLAC1 を直接活性化することが示唆された。

細胞外リンゴ酸は、アフリカツメガエル卵母細胞において濃度依存的に SLAC1 の恒常的活性変異体を活性化する

・外因性リンゴ酸は SLAC1T513D を発現している卵母細胞において、5 mM より高濃度では SLAC1 電流を有意に増加させたが、5 mM より低濃度では増加させなかった。

・EC50 は 8.2 mM であり、-160 mV での傾き  $S$  は 2.3 であった。

リンゴ酸は SLAC1 のアロステリック活性化因子であることが示された。

細胞内リンゴ酸は SLAC1 に直接作用しない

・キナーゼを含まない SLAC1T513D を発現している卵母細胞では、SLAC1 電流は 1 mM でも 10 mM でもリンゴ酸の注入によって増加しなかった。

細胞内リンゴ酸ではなく細胞外リンゴ酸が SLAC1 活性を直接調節することを示唆している。

リンゴ酸は孔辺細胞における  $Ca^{2+}$  シグナル伝達を刺激する

・細胞質  $Ca^{2+}$  キレーターである BAPTA-AM で処理するとリンゴ酸誘導性気孔閉鎖は完全に抑制された。

リンゴ酸誘導性気孔閉鎖には  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の増加が必要であることが示唆された。

・入浴液の灌流では孔辺細胞の  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の増加は見られなかったが、測定開始 5 分後時点でリンゴ酸を添加すると  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の増加が見られた。

リンゴ酸による気孔閉鎖は  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の上昇を伴っており、細胞外のリンゴ酸が孔辺細胞の  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  上昇を引き起こすシグナル伝達の引き金になっていることが示唆された。

リンゴ酸シグナル伝達はグルタミン酸受容体に依存しない

・植物 GLR のブロッカーである DNQX はリンゴ酸による気孔閉鎖を阻害しなかった。

・GLR アゴニストのグルタミン酸またはメチオニンによって誘導された気孔閉鎖は、DNQX 処理によって阻害された。

・リンゴ酸で誘導された気孔閉鎖とグルタミン酸で誘導された気孔閉鎖は、細胞外  $Ca^{2+}$  キレーター剤 BAPTA と非選択的  $Ca^{2+}$  チャネルブロッカー  $La^{3+}$  で障害された。

・SLAC1T513D を発現している卵母細胞では、グルタミン酸の外部添加によっても負電流は増加しなかった。

シロイヌナズナの孔辺細胞では、リンゴ酸による  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の上昇は、GLR 以外の原形質膜  $Ca^{2+}$  チャネルの活性化が原因であることが示唆された。

#### 【考察】

・細胞外のリンゴ酸は、シロイヌナズナの気孔運動を制御する SLAC1 の潜在的なりガンドとして機能していることが示唆された。

・第 2 の経路として、細胞質  $Ca^{2+}$  とそれによって活性化するタンパク質キナーゼを介した SLAC1 の活性化経路が想定される。

- ・ 上記2つの経路を介してリンゴ酸はSLAC1を効率的に活性化しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mimata Yoshiharu, Munemasa Shintaro, Akter Fahmida, Jahan Israt, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Malate induces stomatal closure <i>via</i> a receptor-like kinase GHR1- and reactive oxygen species-dependent pathway in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac122	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 該当する

1. 著者名 Mimata Yoshiharu, Munemasa Shintaro, Nakamura Toshiyuki, Nakamura Yoshimasa, Murata Yoshiyuki	4. 巻 236
2. 論文標題 Extracellular malate induces stomatal closure <i>via</i> direct activation of guard cell anion channel <i>SLAC1</i> and stimulation of $Ca^{2+}$ signalling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 852 ~ 863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18400	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 リンゴ酸誘導気孔閉口のシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 リンゴ酸が誘導する気孔閉口のシグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度西日本・中四国・関西支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 一次代謝物リンゴ酸による気孔開閉制御の分子機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第 56 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
2. 発表標題 一次代謝物リンゴ酸が誘導する気孔閉口の分子機構の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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 分担者	宗正 晋太郎  (Munemasa Shintaro)  (20641442)	岡山大学・環境生命自然科学学域・准教授    (15301)	

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		
バングラデシュ	バングラデシュ農科大学		