

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251032

研究課題名(和文) 気孔孔辺細胞の青色光情報伝達成分の解明

研究課題名(英文) Studies on blue light signaling in stomatal guard cells

研究代表者

島崎 研一郎 (Shimazaki, Ken-ichiro)

九州大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：00124347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：葉面の熱画像測定により、青色光依存の気孔開口が阻害された変異株を選抜し、その原因遺伝子が細胞膜H⁺-ATPaseのイソ酵素AHA1であることを見いだした。さらに、リン酸化プロテオーム法により孔辺細胞においてフォトトロピンに依存してリン酸化される蛋白質の探索を行い、最も素早くリン酸化される蛋白質を特定した。この酵素はCBC1キナーゼと名付け、そのホモログCBC2と重複して気孔開口を促進する事を示した。この酵素はフォトトロピンによる陰イオンチャネルの阻害を仲介する事を示した。さらに、この酵素が低CO₂に应答して、気孔を開口させる因子である事も示した。

研究成果の概要(英文)：Using thermography of leaf, we isolated the mutants that exhibited the reduction of stomatal opening in response to blue light. We identified the responsible gene as AHA1, an isoform of the H⁺-ATPases in guard cells. We also determined the phosphorylated proteins in guard cells in response to blue light utilizing the phosphoproteome analyses. We selected a rapidly phosphorylated protein in phototropin-dependent manners and identified the protein as MAPKKK, and named it as CBC1. We found that CBC1 and its homolog CBC2 redundantly function to stimulate stomatal opening in response to blue light. We clarified that CBCs mediated the inhibition of S-type anion channels in response to blue light. Such inhibition was required for the full-opening of stomata. We also found that CBCs mediated stomatal opening in response to low concentration of CO₂. CBCs receive signals from both blue light and CO₂, and stimulate photosynthetic CO₂ fixation in plant.

研究分野：植物生理学

キーワード：孔辺細胞 気孔 H⁺-ATPase 二酸化炭素 陰イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

フォトトロピンは、1997年に米国のBriggsらにより発見された2種類の光受容型キナーゼ (phot1 と phot2) で、光屈性、葉緑体運動、気孔開口、葉の平滑化、葉の定位運動など、多様な青色光応答を制御する(Christie 2007)。一方、気孔は微弱な青色光に応答し開口する。米国、ドイツ、申請者らの研究は、1990年までに青色光が孔辺細胞細胞膜を過分極させ K^+ 取り込みを誘発し、気孔開口を引き起こす事を証明した。その後、ドイツのRoelfsemaらは青色光照射による陰イオンチャンネルの阻害を、中国のZhangらは K^+ チャンネルの活性化を、米国のBriggsらは気孔開口に14-3-3タンパク質の寄与を、示した。しかし、これらの研究は散発的であり生化学的証拠が稀薄であった。気孔の青色光による開口機構を長期にわたって研究し、以下の成果を得た。孔辺細胞プロトプラストを大量に調製し、それを用いて、青色光情報が細胞内で増幅され H^+ 放出を誘発し、気孔開口の駆動力となること、この H^+ 放出が細胞膜 H^+ -ATPase によって行われ H^+ -ATPase は C-末のリン酸化に続く 14-3-3 タンパク質の結合により活性化されること、青色光受容体がフォトトロピン(phot1 と phot2)で、その活性化に自己リン酸化が必須であることなどを示した。さらに、フォトトロピンの基質として BLUS1 キナーゼを同定し、BLUS1 が Ser (Ser-348) のリン酸化を受け下流へ情報を伝達することなど、この系の重要成分を発見し、青色光による気孔開口メカニズムの解明を行ってきた。これらの研究は光情報伝達系の理解を大きく進展させるものであったが、その全貌を解明するには至っていない。

2. 研究の目的

以下の各対象を解明する。

- (1) 気孔の青色光応答変異株を多数選抜している。これらの原因遺伝子を同定し、その機能解明を行う。
- (2) リン酸化プロテオーム法により、フォトトロピンに依存してリン酸化されるタンパク質を多数同定している。これらの中から気孔開口に関与する成分を特定し、機能解明を行う。
- (3) BLUS1 と相互作用する4つのキナーゼ (BLUS2s) を得ている。これらの中から BLUS1 キナーゼの基質として働く下流成分 (BLUS2s) を同定し、その機能解明を行う。
- (4) 組換え phot1 と BLUS1 が試験管内で結合し、青色光下で phot1 による BLUS1 のリン酸化を見出している。この反応の詳細を調べ、(3)の結果を取り入れ、phot1-BLUS1-下流成分 (BLUS2s) の再構成を行う。以上の研究により、青色光情報が増幅されイオン輸送の駆動力に変換される機構を解明し、植物における光情報伝達のモデルを提示する。

3. 研究の方法

以下の各方法を用いる。

- (1) 熱画像解析による選抜で取得した気孔の青色光応答変異株の原因遺伝子を、マッピング、あるいは次世代シーケンズにより同定し、機能を解明する(順遺伝学的)。
- (2) リン酸化プロテオーム解析で同定したフォトトロピン依存のリン酸化タンパク質の変異株を取得・作出し、その気孔応答の表現型を調べ、当該タンパク質の機能を解明する(逆遺伝学的)。
- (3) BLUS1 キナーゼと相互作用するタンパク質を two-hybrid 法により得ている。これらのタンパク質の変異株の表現型解析により BLUS1 の下流成分を特定し、その機能を解明する。
- (4) (3) の成果に基づいて “phot1-BLUS1-BLUS2” 複合体を形成させ、初期過程機能を再構成する。

4. 研究成果

(1) 気孔の青色光情報伝達系の研究を進めた。熱画像解析により得られた気孔開口変異体の解析によって、変異の原因が細胞膜 H^+ -ATPase そのものである事を突き止めた。一方、孔辺細胞には細胞膜 H^+ -ATPase のほとんどすべてのイソ酵素 (11 遺伝子) が発現している。遺伝学的解析により、この H^+ -ATPase のなかで AHA1 が主要な働きをしている事を証明した。さらに、この変異体ではミスフォールドした AHA1 蛋白質が分解され、その蛋白質量が低下している事を示した。また、この変異により青色光による気孔開口の阻害に加えて、赤色光による気孔開口も阻害されていた。これまで不明であった赤色光による気孔開口にも細胞膜 H^+ -ATPase が関与する可能性が示唆された。これらの成果をまとめて論文として報告した。

(2) フォトトロピン (phot1, phot2) を介した気孔開口に、陰イオンチャンネルの阻害が必要で、その情報伝達に2つの新規蛋白質キナーゼが関与することを示した。この蛋白質キナーゼが欠失すると青色光による陰イオンチャンネルの阻害が見られなくなる事を電気生理学的手法により示した。さらに、フォトトロピンがこのキナーゼと直接相互作用し、基質としてリン酸化する事を示し、この新規のキナーゼが BLUS1 とは別経路で働くことを示した。

この研究中に、この新規キナーゼが CO_2 による気孔開閉の制御にも関与することを示した。野生株では高 CO_2 にすると気孔が閉鎖し、低 CO_2 では気孔が開口する。しかし、この2つのキナーゼを同時に欠失した変異株では上記の CO_2 応答が消失した。この変異体の表現型は CO_2 による気孔開閉の制御因子として知られる HT1 キナーゼの変異株と酷似しており、新規キナーゼが HT1 の情報伝達系と同じ経路に働く可能性を示している。そこで、HT1 変異体 (*ht1*) とこのキナーゼ変異体を掛

け合わせた3重変異体の表現型を調べた。この3重変異体の表現型は *ht1* とほぼ同じで、新規キナーゼがHT1と同じ経路に存在する事が示された。この新規キナーゼはHT1キナーゼによりリン酸化され、HT1の基質であることを示した。さらに、HT1とこの新規キナーゼはフォトリポピンとHT1の両方に相互作用する事を示した。以上から、この新規キナーゼはCO₂とBlue lightの両方から情報を受容し、気孔開閉を制御していると推定され、CO₂ and Blue light Convergent Kinase (CBC kinase)と命名し、論文発表を行った。

(3) 気孔の初期光情報は、青色光受容体フォトリポピンとその直下の蛋白質キナーゼBLUS1(Blue Light Signaling)が基質としてリン酸化され、下流へ伝達されることを以前の研究により証明した。これまで、光情報伝達に関する再構成実験は行われた例がなく、将来詳細な情報伝達を調べる目的で、再構成を目的に実験を行った。その為に、この2つの蛋白質を大腸菌に発現させ組み換え蛋白質を得た。これらを試験管内で混合し、青色光を照射することによってBLUS1がリン酸化される事を証明した。赤色光や暗の中ではBLUS1のリン酸化は認められず、青色光が必要である事を示し、論文として報告した。

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7件)

Hiyama A, Takemiya A, Munemasa S, Okuma E, Sugiyama N, Tada Y, Murata Y and Shimazaki K (2017) Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. Nat. Comm. 18:1284 DOI 10.1038/s41467-017-01237-5 (査読有)

Takahashi Y, Ebisu Y. and Shimazaki K. (2017) Reconstitution of abscisic acid signaling from the receptor to DNA via bHLH transcription factors. Plant Physiol. 174: 815-822. doi/10.1104/pp.16.01825 (査読有)

Inoue S, Iwashita N, Takahashi Y, Gotoh E, Okuma E, Hayashi M, Tabata R, Takemiya A, Doi M, Murata Y, Kinoshita T. and Shimazaki K. (2017) Brassinosteroid involvement in Arabidopsis thaliana stomatal opening. Plant Cell Physiol. 58: 1048-1057. doi:10.1093/pcp/pcp049 (査読有)

Suetsugu N, Takemiya A, Kong S-M, Higa T, Komatsu A, Shimazaki K, Kohchi T and Wada M (2016) RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants. PNAS 113: 10424-10429 (査読有)

Yamauchi S, Takemiya A, Sakamoto T, Kurata T, Tsutsumi T, Kinoshita T and Shimazaki K (2016) The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. Plant Physiol. 171: 2731-2743. Doi/10.1104/pp.16.01581 (査読有)

Takemiya A, Doi A, Yoshida S, Okajima K, Tokutomi S and Shimazaki K (2016) Reconstitution of an initial step of phototropin signaling in stomatal guard cells. Plant Cell Physiol. 57: 152-159. doi:10.1093/pcp/pcv180 (査読有)

Doi M, Kitagawa Y and Shimazaki K (2015) Blue light response is present in early vascular plants. Plant Physiol. 169: 1205-1213. doi/10.1104/pp.15.00134 (査読有)

[学会発表](計5件)

樋山麻美、武宮淳史、杉山直之、宗正晋太郎、大熊英二、村田芳行、島崎研一郎 孔辺細胞のCBCキナーゼはフォトリポピンに依存して陰イオンチャネルの活性を抑える。日本植物生理学会(2017年~2018年)

樋山麻美、武宮淳史、杉山直之、多田安臣、島崎研一郎 CBCキナーゼは青色光とCO₂シグナルを統合し光照射下での気孔開口に寄与する。日本植物生理学会(2017年~2018年)

A. Hiyama, A. Takemiya, N. Sugiyama, Y. Tada & K. Shimazaki CBC kinases converge blue light and CO₂ signals for stomatal opening under the light International Symposium of Plant Photobiology, 2018(国際学会)(2017年~2018年)

山内翔太、武宮淳史、倉田哲也、坂本智昭、堤俊文、木下俊則、島崎研一郎 AHA1(Arabidopsis H⁺-ATPase)は気孔の青色光応答において主要な分子種として機能する。日本植物学会 第80回大会(2016年~2017年)

樋山麻美、宗正晋太郎、大熊英治、武宮
淳史、杉山直幸、多田安臣、村田芳行、
島崎研一郎
青色光によるアニオンチャネルの不活
性化には新規キナーゼが関与している。
日本植物学会 第80回大会(2016年～
2017年)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
島崎 研一郎 (Shimazaki, Ken-ichiro)
九州大学・理学研究院・名誉教授
研究者番号：00124347

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()