

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26711019

研究課題名(和文) 孔辺細胞における青色光情報伝達の初期過程の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a primary step of blue light signaling in guard cells

研究代表者

武宮 淳史 (Takemiya, Atsushi)

山口大学・大学院創成科学研究科 准教授

研究者番号：80448406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：気孔は青色光にตอบสนองして開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進する。孔辺細胞では、青色光シグナルは光受容体キナーゼであるフォトトロピンにより感知され、下流のシグナル伝達を経て細胞膜H⁺-ATPaseを活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。最近、我々は上記シグナル伝達においてフォトトロピンの基質として働くBLUS1キナーゼを同定した。本研究では、フォトトロピンとBLUS1の組換えタンパク質を用いて青色光シグナル伝達の初期過程をin vitroで再現することに成功した。また、フォトトロピンのもうひとつのリン酸化基質としてCBC1キナーゼを同定し、気孔開口の新たな制御機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では青色光シグナル伝達の初期過程を試験管内で再現することに成功した。本研究で確立したアッセイ系は、生命の光情報の変換過程を分子・構造レベルで解明するための有用なツールとなることが期待される。また、本研究ではタンパク質のリン酸化の網羅的な解析により、フォトトロピンの新奇リン酸化基質を同定することに成功し、気孔開口の新たなモデルが見えてきた。今後は上記の解析で見出された他の因子の解析を進めることで、フォトトロピンが制御する光シグナル伝達ネットワークの全貌が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Stomata open in response to blue light, allowing CO₂ uptake for photosynthetic carbon fixation and nutrient uptake via transpiration. Blue light perception by phototropins, light-activated receptor kinases, mediates the activation of plasma membrane H⁺-ATPase, which creates a driving force for stomatal opening. Recently, we have identified a novel protein kinase BLUS1 as a substrate of phototropin kinases in guard cells. In this study, we succeeded in reconstituting a primary step of blue light signaling in vitro using recombinant proteins of phototropins and BLUS1. We further identified a CBC1 kinase as another substrate of phototropin kinases involved in different regulatory mechanisms of stomatal opening.

研究分野：植物生理学

キーワード：青色光 フォトトロピン プロテオーム リン酸化 気孔 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の表皮に存在する気孔は、太陽光に含まれる青色光をシグナルとして感知することで開口し、光合成に必要な二酸化炭素の葉内への取り込みを可能にする。気孔を構成する孔辺細胞では、青色光シグナルは、植物特有の青色光受容体であるフォトトロピンにより感知され、下流の細胞内シグナル伝達を経て、細胞膜 H^+ -ATPase を活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。2001年にフォトトロピンが気孔開口の光受容体であることが証明されて以降（Kinoshita et al. 2001）、フォトトロピンが H^+ -ATPase の活性化を導くシグナル伝達機構の解明が、気孔開口やフォトトロピンシグナル伝達研究の最重要課題となっている。フォトトロピンは光受容に伴い活性化される光受容体キナーゼであることから、何らかに基質をリン酸化することで、下流へとシグナルを伝達すると想像されてきた。しかし、その実体については、いずれのフォトトロピン応答においても不明であった。

このような背景の中、我々は上記の青色光シグナル伝達に関わる新奇重要因子を同定することを目的に、独自に開発した赤外線サーモグラフィによる気孔開口検出システムを用いて、青色光に応答した気孔開口に異常を示す突然変異体の大規模スクリーニングを行った。その結果、気孔開口の必須因子として働く新奇プロテインキナーゼ BLUS1 を発見した（Takemiya et al. 2013）。さらに、孔辺細胞を対象とした生化学的解析から、BLUS1 がフォトトロピンによってリン酸化されること、このリン酸化はシグナル伝達に必要なメカニズムであることを証明し、BLUS1 が長らく不明であったフォトトロピンのリン酸化基質であることを明らかにした。

しかしながら、フォトトロピンが BLUS1 を基質として認識する機構や、リン酸化による BLUS1 の活性制御、BLUS1 が下流へ情報を伝達する機構など、青色光シグナル伝達の初期過程については、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

上記のような研究背景の中、本研究では、生化学や分子生物学の手法に加え、構造生物学の手法を取り入れ、BLUS1 を介した青色光シグナル伝達の初期過程を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下の研究項目①～③を行い、青色光シグナル伝達初期過程の解明を目指した。①まず、フォトトロピンが BLUS1 をリン酸化する過程を詳細に解析するため、シロイヌナズナの phot と BLUS1 の組換えタンパク質を作製し、phot による BLUS1 のリン酸化を *in vitro* で詳細に解析する系を確立する。②つぎに、リン酸化プロテオームやタンパク質間相互作用解析から、BLUS1 下流のシグナル伝達に関与する因子を同定する。③上記の研究成果をもとに、phot、BLUS1、BLUS1 の下流因子を *in vitro* で反応させ、青色光情報伝達の再構築を行う。

4. 研究成果

① phot が BLUS1 をリン酸化する過程を詳細に解析するため、シロイヌナズナの phot1 と BLUS1 の全長タンパク質を大腸菌の系を用いて作製した。次に作製した両タンパク質を ATP 存在下で様々な光条件下で反応させ、BLUS1 のリン酸化をリン酸化特異的抗体（anti-pSer-348）により検出した。その結果、白色光と青色光照射下において、phot1 による BLUS1 のリン酸化を試験管内で再現することに成功した。この *in vitro* アッセイ系を用いて、phot1 による BLUS1 のリン酸化のタイムコース、光強度依存性、阻害剤に対する感受性など、詳細な生化学的解析を行った。その結果、これらの性質はこれまで報告されてきた青色光シグナル伝達や気孔開口など、生体内の反応を十分に説明できることが分かった。以上の結果から、本研究で確立した *in vitro* アッセイ系は青色光シグナル伝達の初期過程の研究において有用なツールとなることが示唆された。これらの結果は国際誌である *Plant Cell Physiol* 誌に報告された（Takemiya et al. 2016）。

②シロイヌナズナのフォトトロピンには phot1 と phot2 の 2 つの分子種が存在し、それらは重複して気孔開口を制御する（Kinoshita et al. 2001）。しかしながら、phot1 と phot2 のシグナル伝達が統合されるメカニズムについては不明であった。そこで、我々が確立した *in vitro* アッセイ系を用いて、phot2 も BLUS1 を直接リン酸化する可能性を検証した。その結果、phot2 も phot1 と同様に青色光に応じて BLUS1 をリン酸化することが明らかとなり、phot1 と phot2 は基質のリン酸化の段階から共通のシグナル伝達を行うことが示された。さらに、phot1 と phot2 を同程度発現する形質転換体を用いて BLUS1 のリン酸化を比較したところ、phot1 の方が phot2 よりも効率的に BLUS1 をリン酸化することが分かった。また、この BLUS1 のリン酸化の程度は下流の H^+ -ATPase の活性化や気孔開口の程度と一致することから、BLUS1 のリン酸化は気孔開口の主要な制限要因である可能性が示唆された。これらの結果は国際誌である *J. Plant Res.* 誌に報告された（Takemiya and Shimazaki, 2016）。

③BLUS1 はフォトトロピンによるリン酸化により活性化され、下流の因子をリン酸化することでシグナルを伝達すると考えられる。BLUS1 下流のシグナル伝達機構を解明するため、孔辺細胞プロトプラストを対象としたリン酸化プロテオーム解析を行い、青色光に応じてリン酸化されるタンパク質を多数同定することに成功した。これらの因子について、シロイヌナズナの機

能欠損変異体入手し気孔開口を測定したところ、応答に異常を示すものが見出された。この因子は MAPKKK に属する新奇のプロテインキナーゼをコードしており、CBC (CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO₂) と名付けた。cbc 変異体における H⁺-ATPase の活性化を調べたところ、意外なことにこの変異体では H⁺-ATPase の活性化は正常であることが分かった。さらに *blus1* 変異体においても CBC のリン酸化は正常に見られたことから、CBC は BLUS1 と異なるシグナル伝達を形成し、H⁺-ATPase の活性化以外の制御を通じて気孔開口を促進することが示唆された。さらなる解析の結果、CBC は気孔閉鎖の鍵因子であるアニオンチャンネルの不活性化に関与すること、青色光シグナル伝達のみならず、CO₂ による気孔開閉のシグナル伝達にも関与することが分かった。さらに我々が確立した *in vitro* アッセイ系を用いた解析から、CBC もフォトトロピンによって直接リン酸化される基質であることが明らかとなり、フォトトロピンは細胞内で多様な基質を同時にリン酸化し、シグナル伝達ネットワークを形成することで、気孔開口を統合的に制御することが示唆された。以上の結果は国際誌である *Nat. Commun.* に報告された (Hiyama et al., 2017)。

今後は上記のリン酸化プロテオームで見出された他の因子の解析を進め、BLUS1 下流のシグナル伝達や、フォトトロピンが制御する光シグナル伝達ネットワークの分子機構を明らかにしていきたい。

[参考文献]

- ① Toshinori Kinoshita, Michio Doi, Noriyuki Suetsugu, Takatoshi Kagawa, Masamitsu Wada, Ken-ichiro Shimazaki (2001) *phot1* and *phot2* mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656–660.
- ② Atsushi Takemiya, Naoyuki Sugiyama, Hiroshi Fujimoto, Toshifumi Tsutsumi, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Yasuomi Tada, John M. Christie, Ken-ichiro Shimazaki (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* 4, 2094.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Asami Hiyama, Atsushi Takemiya, Shintaro Munemasa, Eiji Okuma, Naoyuki Sugiyama, Yasuomi Tada, Yoshiyuki Murata, Ken-ichiro Shimazaki (2017) Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nat. Commun.* 8, 1284. 査読有り
- ② Shin-ichiro Inoue, Nozomi Iwashita, Yohei Takahashi, Eiji Gotoh, Eiji Okuma, Maki Hayashi, Ryohei Tabata, Atsushi Takemiya, Yoshiyuki Murata, Michio Doi, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki (2017) Brassinosteroid Involvement in Arabidopsis thaliana Stomatal Opening. *Plant Cell Physiol.* 58, 1048-1048. 査読有り
- ③ Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki (2016) Arabidopsis *phot1* and *phot2* phosphorylate BLUS1 kinase with different properties in stomatal opening. *J. Plant Res.* 129, 167-174. 査読有り
- ④ Atsushi Takemiya, Ayaka Doi, Sayumi Yoshida, Koji Okajima, Satoru Tokutomi, Ken-ichiro Shimazaki (2016) Reconstitution of an initial step of phototropin signaling in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 57, 152-159. 査読有り
- ⑤ Stuart Sullivan, Atsushi Takemiya, Eros Kharshiing, Catherine Cloix, Ken-ichiro Shimazaki, John M. Christie (2016) Functional characterization of Arabidopsis phototropin 1 in the hypocotyl apex. *Plant J.* 88, 907-920. 査読有り
- ⑥ Noriyuki Suetsugu, Atsushi Takemiya, Sam-Geun Kong, Takeshi Higa, Aino Komatsu, Ken-ichiro Shimazaki, Takayuki Kohchi, and Masamitsu Wada (2016) RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 10424-10429. 査読有り
- ⑦ Shota Yamauchi, Atsushi Takemiya, Tomoaki Sakamoto, Tetsuya Kurata, Toshifumi Tsutsumi, Toshinori Kinoshita, Ken-ichiro Shimazaki (2016) The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. *Plant Physiol.* 171, 2731-2743. 査読有り

[学会発表] (計 29 件)

- ① Atsushi Takemiya, Signaling network of phototropin-regulated stomatal opening, Japan-Taiwan Plant Biology, 2019
- ② Atsushi Takemiya, Shota Yamauchi, Asami Hiyama, Ken-ichiro Shimazaki, Molecular mechanism of blue light signaling for stomatal opening, Japan-Finland Seminar, 2018
- ③ Atsushi Takemiya, Asami Hiyama, Ken-ichiro Shimazaki, Early phototropin signaling in blue light-dependent stomatal opening, International Symposium on Plant Photobiology, 2018
- ④ 武宮淳史, 青色光に応答した気孔開口のシグナル伝達機構, 三学会合同福岡例会, 2016
- ⑤ 武宮淳史, 青色光に応答した気孔開口の情報伝達機構, 日本植物学会第 78 回大会, 2016
- ⑥ 武宮淳史, 島崎研一郎, *phot1* と *phot2* による BLUS1 のリン酸化能の違いが気孔開口の

- 光応答性を制御する、第 57 回日本植物生理学会年会、2016
- ⑦ 武宮淳史、土井彩加、吉田早祐美、岡島公司、徳富哲、島崎研一郎、青色光に依存した気孔開口におけるフォトトロピンシグナル伝達初期課程の in vitro 再構築、第 56 回日本植物生理学会年会、2015
 - ⑧ Atsushi Takemiya, Ken-ichiro Shimazaki, Molecular mechanism of blue light signaling for stomatal opening、The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing、2015
 - ⑨ Atsushi Takemiya, Haruka Sawa, Ken-ichiro Shimazaki, BLUS1 is a phototropin kinase substrate and mediates blue light signaling for stomatal opening、Gordon Research Conferences、2014
 - ⑩ Atsushi Takemiya、Blue light signaling for stomatal opening、日本植物学会第 78 回大会、2014
 - ⑪ 武宮淳史、青色光に応答した気孔開口の情報伝達機構、第 18 回日本光生物学協会年会、2014
他 18 件

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.yamaguchi-u.ac.jp/ja/sci/stafflist/bio/take.pcs>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。