

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850233

研究課題名(和文) アブシジン酸誘導気孔閉口に関するカルシウムイオンチャネルの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of calcium channels involved in abscisic acid-induced stomatal closure

研究代表者

宗正 晋太郎 (Munemasa, Shintaro)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：20641442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥ストレスに応答した気孔閉口運動を制御する孔辺細胞アブシジン酸シグナル伝達において、カルシウムイオンは重要なセカンドメッセンジャーとして機能する。我々は、孔辺細胞アブシジン酸シグナル伝達に関するシロイヌナズナのカルシウムセンサータンパク質CPKとカルシウムイオンチャネルGCC1の機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：Guard cell abscisic acid signaling is responsible for drought-triggered stomatal closure response. It has been shown that cytosolic calcium functions as a second messenger in guard cell abscisic acid signaling. We tried to characterize calcium channels and calcium sensor kinases that are involved in guard cell abscisic acid signaling in Arabidopsis.

研究分野：農学

キーワード：アブシジン酸 気孔 孔辺細胞 カルシウム イオンチャネル シグナル伝達 環境ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

植物の葉の表皮には、「気孔」と呼ばれる一組の孔辺細胞から成る小孔が存在する。乾燥ストレス下で合成される植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は、気孔の閉口を誘導する働きを持ち、蒸散作用による水分損失を抑制する。そのため ABA は、植物の乾燥ストレス耐性の極めて重要な調節物質として考えられている。

ABA が孔辺細胞内で誘導する気孔閉口シグナル伝達では、カルシウムイオン (Ca^{2+}) がセカンドメッセンジャーとして機能することが20年以上も前から知られている。ABA は、孔辺細胞原形質膜の Ca^{2+} 輸送体である Ca^{2+} チャネルを活性化し、孔辺細胞内の細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の上昇を誘導する。この $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇は、 Ca^{2+} に依存して活性化する Ca^{2+} センサータンパク質 (タンパク質リン酸化酵素 CPK など) によって感知され、下流のシグナルを順々に活性化していき、最終的に気孔閉口応答を導く。過去の研究は、CPK などの Ca^{2+} センサータンパク質の機能欠損は、孔辺細胞 ABA シグナル伝達に重大な影響を与えることを報告している。そのため、 Ca^{2+} は孔辺細胞 ABA シグナル伝達において極めて重要な働きを担っていることが明らかであるが、現在のところ、孔辺細胞で Ca^{2+} 動員を制御する分子機構、 Ca^{2+} 感知を制御する分子機構は、共にほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、気孔閉口運動を制御する孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} 輸送体そして Ca^{2+} センサータンパク質を探索し、孔辺細胞 ABA シグナル伝達に Ca^{2+} 依存性を付与する分子機構の解明を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} センサータンパク質の同定

Ca^{2+} と結合することで活性化するタンパク質リン酸化酵素である CPK は、気孔閉口で重要な働きを担う陰イオンチャネルである SLAC1 をリン酸化して活性化する。シロイヌナズナのゲノムには、CPK をコードする遺伝子が 34 個存在する。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法によって、SLAC1 を活性化する CPK を選抜する。その後、選抜された CPK に関して遺伝子破壊変異体を作成し、その表現型を気孔の開度測定、およびパッチクランプ法によって観察した。同定した CPK が SLAC1 を直接リン酸化するかどうかの確認は、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイにより行った。

(2) 孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} 輸送体の同定

公開されている遺伝子発現データベース

や論文を参考にして、シロイヌナズナ孔辺細胞に高発現する Ca^{2+} 輸送体ホモログ遺伝子を選抜する。その後、選抜した Ca^{2+} 輸送体に関して、遺伝子破壊変異体を作成し、その表現型を解析した。表現型の解析には、まず ABA 誘導気孔閉口を観察するために気孔開度測定を行った。次にパッチクランプ法により孔辺細胞原形質膜の Ca^{2+} 輸送活性、 Ca^{2+} 検出蛍光タンパク質であるイエローカメレオンを用いたイメージング実験により孔辺細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 変化をリアルタイムで観察した。

(3) Ca^{2+} に依存した孔辺細胞 ABA シグナル伝達の *in vitro* 再構成実験

上記(1)、(2)で同定した Ca^{2+} センサータンパク質 CPK と Ca^{2+} 輸送体を、ABA シグナル伝達の初期過程に関わる ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR、2C 型脱リン酸化酵素 PP2C、タンパク質リン酸化酵素 OST1、陰イオンチャネル SLAC1 とともにアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、ABA の受容から $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇、そして下流の SLAC1 チャネル活性化までのシグナル伝達の再構成実験を行った。

4. 研究成果

(1) 孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} センサータンパク質の同定

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法の実験から、孔辺細胞に発現する4つのCPK(CPK5、CPK6、CPK11、CPK23)がSLAC1のリン酸化と活性化に関与することが示唆された。そのため、この4つのCPK遺伝子全てを破壊した4重変異体 *cpk5cpk6cpk11cpk23* を作成し、その表現型解析を行った。変異体では、ABA に依存した気孔閉口が抑制されていた。また、*cpk5cpk6cpk11cpk23* 変異体の孔辺細胞では、ABA 処理によって誘導される SLAC1 の活性化が抑制されていた。さらに孔辺細胞を高 Ca^{2+} 処理し、人為的に孔辺細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を上昇させた時に誘導される SLAC1 活性化も、*cpk5cpk6cpk11cpk23* 変異体では抑制されていた。以上の植物体を用いた結果は、今回同定した4つのCPKが、孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} センサータンパク質であることを示唆している。さらに、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイによっても CPK が SLAC1 を直接リン酸化することが確認された。

(2) 孔辺細胞 ABA シグナル伝達で機能する Ca^{2+} 輸送体の同定

選抜した Ca^{2+} 輸送体の遺伝子破壊変異体を用いて気孔開度測定を行い、ABA 誘導気孔閉口が損なわれている変異体 GCC1 (Guard cell Ca^{2+} Channel 1) を単離した。パッチクランプ法を用いた解析の結果、GCC1 変異体では、ABA に応答した孔辺細胞原形質膜 Ca^{2+} チャネル活性化にも異常が見られた。イエローカメレオンを用いて Ca^{2+} イメージング実験を行っ

た結果、ABA に応答した孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇に GCC1 が実際に関与していることが明らかとなった。

(3) Ca^{2+} に依存した孔辺細胞 ABA シグナル伝達の *in vitro*再構成実験

同定した CPK と GCC1 を、PYR/PYL/RCAR、PP2C、SLAC1 とともにアフリカツメガエル卵母細胞に導入して SLAC1 活性を測定したところ、ABA に応答した SLAC1 陰イオンチャネルの活性化は観察された。しかし、 Ca^{2+} チャネル GCC1 の活性化は観察されなかった。この結果から、GCC1 の活性化には未知の因子が関与していることが示唆された。現在、その探索を進めているところである。

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11件)

Kong D, Hu HC, Okuma E, Lee Y, Lee HS, Munemasa S, Cho D, Pedoeim L, Rodriguez B, Im W, Murara Y, Pei ZM, Kwak JM. L-Met activates Arabidopsis GLR Ca^{2+} channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Reports* **17**: 2553-2561 (2016) (査読有)

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.015

Islam M, Ye W, Matsushima D, Munemasa S, Okuma E, Nakamura Y, Biswas S, Mano J, Murata Y. Reactive Carbonyl Species Mediate Abscisic Acid Signaling in Guard Cells. *Plant and Cell Physiology* **57**: 2552-2563 (2016) (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcw166

Sakouhi L, Rahoui S, Massoud MB, Munemasa S, Ferjani EEE, Murata Y, Chaoui A. Calcium and EGTA alleviate cadmium toxicity in germinating chickpea seeds. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**: 1064-1073 (2016) (査読有)

DOI: 10.1007/s00344-016-9605-2

Yin Y, Adachi Y, Nakamura Y, Munemasa S, Mori IC, Murata Y. Involvement of OST1 protein kinase and PYR/PYL/RCAR receptors in methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis guard cells. *Plant and Cell Physiology* **57**: 1779-1790 (2016) (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcw102

Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology* **28**: 154-162 (2015) (査読有, 総説)

DOI: 10.1016/j.pbi.2015.10.010

Murata Y, Mori IC, Munemasa S. Diverse

stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annual Review of Plant Biology* **66**:369-392 (2015) (査読有, 総説)

DOI:

10.1146/annurev-arplant-043014-114707
Waadt R, Manalansan B, Rauniyar N, Munemasa S, Booker MA, Brandt B, Waadt C, Nusinow DA, Kay SA, Kunz HH, Schumacher K, DeLong A, Yates JR 3rd, Schroeder JI. Identification of Open Stomata1-interacting proteins reveals interactions with Sucrose non-fermenting1-Related protein Kinases2 and with type 2A protein phosphatases that function in abscisic acid responses. *Plant Physiology* **169**: 760-779 (2015) (査読有)

DOI: 10.1104/pp.15.00575

*Brandt B, *Munemasa S, Wang C, Nguyen D, Yong T, Yang PG, Poretsky E, Belknap TF, Waadt R, Alemán F, Schroeder JI. Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis guard cells. *eLife* **4**: e03599 (2015) *Co-first authors (査読有)

DOI: 10.7554/eLife.03599

Ye W, Adachi Y, Munemasa S, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. Open Stomata 1 kinase is essential for yeast elicitor-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1239-1248 (2015) (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcv051

Islam MM, Ye W, Matsushima D, Khokon MA, Munemasa S, Nakamura Y, Murata Y. Inhibition by acrolein of light-induced stomatal opening through inhibition of inward-rectifying potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **79**: 59-62 (2015) (査読有)

DOI: 10.1080/09168451.2014.951028

Hossain MA, Ye W, Munemasa S, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y. Cyclic adenosine 5'-diphosphoribose (cADPR) cyclic guanosine 3',5'-monophosphate positively function in Ca^{2+} elevation in methyl jasmonate-induced stomatal closure, cADPR is required for methyl jasmonate-induced ROS accumulation NO production in guard cells. *Plant Biology* **16**: 1140-1144 (2014) (査読有)

DOI: 10.1111/plb.12175

[学会発表](計17件)

宗正晋太郎、長橋大樹、横井隆志、中村宜督、村田芳行. グルタチオンによる孔辺細胞アブシシン酸シグナル伝達制御機構

の解明. **日本農芸化学会2017年度大会** (2017年3月17日~20日、京都女子大学) (口頭発表)

宗正晋太郎、中村宜督、村田芳行. パッチクランプ法によるシロイヌナズナ葉緑体膜イオンチャネル活性の直接測定. **日本農芸化学会中四国支部第47回講演会(例会)** (2017年1月28日、島根大学) (口頭発表)

宗正晋太郎、平尾友加里、田浪かすみ、中村宜督、村田芳行. シロイヌナズナ孔辺細胞におけるジャスモン酸とエチレンのシグナルクロストーク. **日本農芸化学会2016年度大会** (2016年3月27日~30日、札幌コンベンションセンター) (ポスター発表)

Md. Yeasin Prophan, Munemasa S, Nakamura T, Nakamura Y, Murata Y. Salicylic acid signaling in Arabidopsis guard cells. **日本農芸化学会2016年度中四国支部大会(第46回講演会)** (2016年9月15日~16日、高知大学朝倉キャンパス) (口頭発表)

Munemasa S. Guard cell abscisic acid signaling and its interaction with diverse signaling networks. **International Workshop of Plant Membrane Biology 2016** (2016年6月5日~10日、Annapolis, MD, USA) (招待講演)

Sakouhi L, Munemasa S, Ferjani EEL, Murata Y, Chaoui A. AMÉLIORATION DE LA TOLÉRANCE AU CADMIUM DES GERMINATIONS DE POIS CHICHE PAR L'APPLICATION DE. **Le 27ème Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie**. (2016年3月28日~31日、Hôtel Laico Hammamet, Tunisia) (ポスター発表)

及川貴也、石丸泰寛、宗正晋太郎、村田芳行、鷺山研人、浜本晋、魚住信之、吉川信幸、上田実. アメリカネムノキの就眠を制御するK⁺チャネルSPORK2の機能解析. **日本農芸化学会2016年度大会** (2016年3月27日~30日、札幌コンベンションセンター) (ポスター発表)

Munemasa S, Brandt B, Murata Y, Schroeder JI. Ca²⁺ signaling specificity mechanisms in guard cell ABA signal transduction. **第57回日本植物生理学会年会シンポジウム「Abscisic acid signaling: Beyond the discovery of PYR/PYL/RCAR」**(2016年3月18日~20日、岩手大学) (招待講演)

及川貴也、石丸泰寛、宗正晋太郎、村田芳行、鷺山研人、浜本晋、魚住信之、吉川信幸、上田実. 外向き整流性K⁺チャネルSPORK2はアメリカネムノキの就眠運動を制御する. **第57回日本植物生理学会年会** (2016年3月18日~20日、岩手大学) (口頭発表)

横井隆志、宗正晋太郎、中村宜督、森泉、

村田芳行. アブシシン酸誘導気孔閉口に伴う孔辺細胞内グルタチオン減少メカニズムの解明. **日本農芸化学会中四国支部第44回講演会(例会)** (2016年1月23日、岡山県立大学) (口頭発表)

宗正晋太郎、Brandt B、村田芳行、Schroeder JI. 孔辺細胞におけるアブシシン酸シグナル伝達のカルシウム依存性を決定する分子機構の解明. **日本農芸化学会中四国支部第44回講演会(例会)** (2016年1月23日、岡山県立大学) (口頭発表)

米澤杏奈、Mst. Nur-E-Nazmun Nahar、宗正晋太郎、中村宜督、森泉、村田芳行. ヒ酸ストレス下のタバコ培養細胞に対するプロリン処理の影響. **日本農芸化学会中四国支部第44回講演会(例会)** (2016年1月23日、岡山県立大学) (口頭発表)

仙波貴雅、Rayhanur Jannat、宗正晋太郎、中村宜督、森泉、村田芳行. 孔辺細胞における一酸化窒素レベルと活性酸素種レベルの変化がアブシシン酸誘導気孔閉口に与える影響. **日本農芸化学会中四国支部第44回講演会(例会)** (2016年1月23日、岡山県立大学) (口頭発表)

Munemasa S, Brandt B, Wang C, Nguyen D, Schroeder J. Unraveling the molecular mechanism ensuring Ca²⁺ signaling specificity in guard cell ABA signal transduction. **ASPB Plant Biology 2015** (2015年7月26日~30日、Minneapolis, Minnesota) (ポスター発表)

宗正晋太郎. 気孔孔辺細胞におけるアブシシン酸シグナル伝達機構の解明. **日本農芸化学会2015年度大会シンポジウム「生命恒常性の維持に寄与するケミカルリガンド受容機構の新展開」** (2015年3月26日~29日、岡山大学) (招待講演)

Munemasa S. New insights into Ca²⁺-dependent abscisic acid signalling in guard cells. **Plant Calcium Signaling 2014** (2014年6月22日~25日、Münster, Germany) (招待講演)

平尾友加里、宗正晋太郎、中村宜督、村田芳行. シロイヌナズナにおけるジャスモン酸メチル誘導気孔閉口に与えるエチレンの影響. **日本農芸化学会中四国支部第39回講演会** (2014年5月31日、福山大学宮地茂記念館) (口頭発表)

[図書](計1件)

Murata Y, Munemasa S, Mori IC. Regulation of stomatal responses to abiotic and biotic stresses by redox state. **Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses** 331-347 (2016)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗正 晋太郎 (MUNEMASA Shintaro)

岡山大学大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号： 20641442