

研究課題別評価書

1. 研究課題名

気孔開閉と細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構の解明

2. 氏名

木下 俊則

3. 研究のねらい

植物は光合成を行うことによって、農作物を提供するのみならず、二酸化炭素を吸収し、酸素を産出して地球環境を整えている。植物の表皮に存在する気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の唯一の取り入れ口で、変化する環境にตอบสนองして開閉を行うことによってガス交換を調節しており、この微小な器官が無ければ陸上植物の生存は不可能に近い。気孔を構成する一対の孔辺細胞は、太陽光、特にシグナルとして作用する青色光域の光にตอบสนองして気孔を開口させ、植物と大気間のガス交換を促進し、乾燥ストレスに曝されると、植物ホルモン・アブシジン酸にตอบสนองして気孔を閉鎖し、植物体からの水分損失を防ぐ。このように気孔は、青色光による開口、アブシジン酸による閉鎖という明確な応答を示すことから、植物の環境応答のシグナル伝達機構の研究材料として大変優れた特質を有している

これまでの研究により、私たちは、青色光による気孔開口では、植物特有の青色光受容体フォトトロピンが青色光受容体として機能しており(Kinoshita et al., Nature 2001, Ueno et al. Plant Cell Physiol. 2005)、フォトトロピンに受容された光シグナルは、細胞内シグナル伝達を経て、細胞膜のプロトンポンプ、細胞膜H⁺-ATPase C末端のスレオニン残基のリン酸化とリン酸化C末端への14-3-3蛋白質の結合により活性化し、気孔開口の駆動力を形成していることを明らかにした(Kinoshita and Shimazaki, EMBO J. 1999, Kinoshita and Shimazaki, Plant Cell Physiol. 2002)。しかしながら、フォトトロピンから細胞膜H⁺-ATPase活性化に至るシグナル伝達の詳細については不明の点が多い。本研究では、気孔開閉のシグナル伝達、特に、フォトトロピンにより受容された光シグナルがどのようにしてH⁺-ATPaseの活性化を引き起こしているのか、さらに、様々な物質輸送に関わる植物のマスター酵素、細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構について、生理・生化学的、分子遺伝学的手法を駆使し、分子レベルで解明することを目的として研究を進めてきた。

4. 研究成果

①青色光シグナル伝達機構の解析

青色光受容体フォトトロピンは青色光を受容すると自己リン酸化し、下流へシグナルを伝え、様々な生理応答を引き起こしていることが知られているが、自己リン酸化部位とその意義については不明であった。そこで、モデル植物であるシロイヌナズナの黄化胚軸からフォトトロピンのアイソフォームの一つである phot1 を免疫沈降により精製し、質量分析による自己リン酸化部位の同定を行った。その結果、8カ所のセリンまたはスレオニンの自己リン酸化部位を同定した。さらに、これら自己リン酸化されるセリンまたはスレオニンをアラニンに置換した形質転換植物を作製し、表現型の観察を行った結果、キナーゼドメイン中の 849 番目と 851 番目のセリンをアラニンに置換した形質転換体においては、気孔開口のみならず、光屈性、葉緑体光定位運動や葉の横伸展が抑制され、これら2つのセリンの自己リン酸化が phot1 のシグナル伝達に必須であることが明らかとなった。一方、他の自己リン酸化部位は phot1 による青色光反応に影響が見られなかった(Inoue et al. PNAS 2008)。

また、これまでの研究により、青色光による気孔開口過程の青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H⁺-ATPaseに至るシグナル伝達において、タイプ1プロテインホスファターゼ(PP1)が正の制御因子として働くことが、阻害剤を用いた薬理学的研究により示されていた(Kinoshita and Shimazaki, Plant Cell Physiol. 1997)。そこで、孔辺細胞に発現するPP1の触媒サブユニットをクローニングし、PP1触媒サブユニットをパーティクルガンによる一過的発現系によりソラマメ孔辺

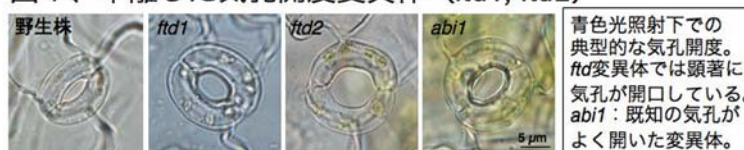
細胞に過剰発現させ、気孔開度の観察を行った。その結果、アミノ酸置換によりホスファターゼ活性をなくした不活性型PP1 触媒サブユニットを孔辺細胞に一過的に過剰発現させると、青色光による気孔開口が阻害されることが明らかとなった。一方、細胞膜H⁺-ATPaseを直接的に活性化するカビ毒素フシコクシンは、不活性型PP1 触媒サブユニットを発現させた孔辺細胞においても気孔開口を引き起こすことから、PP1 が青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H⁺-ATPaseに至る細胞内シグナル伝達においてポジティブレギュレーターとして関与していることが明確となった(Takemiya et al. PNAS 2006)。

②モデル植物シロイヌナズナを用いた気孔開度変異体の単離

気孔開閉のシグナル伝達に関わる未知のシグナル伝達因子を同定するために、気孔開度に依存した葉の重量変動、青色光受容体フォトトロピンが仲介する反応の一つである葉の横伸展等を指標にしたシロイヌナズナの気孔開度変異体のスクリーニングを網羅的に進めてきた。

葉の重量変動を指標にしたスクリーニングでは、これまでに約 1.3 万株のスクリーニングを行い、気孔が閉じている*std*変異体(slow transpiration in detached leaf)2ラインと、気孔が顕著に開口している*ftd*変異体(fast transpiration in detached leaf)2ラインを単離した。このうち、*ftd1*と名付けた変異体は、常に気孔が大きく開口しており、気孔を閉じさせる植物ホルモン・アブシジン酸に対して非感受性に表現型を示す新奇の変異体であった(図1)。そこで、マッピングによる原因遺伝子の同定を進めた結果、アブシジン酸との結合能からアブシジン酸受容体として報告されているMg-キラーゼHサブユニット(Nature 2006)に新奇のミスセンス変異を持っていることが明らかとなり、気孔の表現型からアブシジン酸受容体を単離した初めての例となった(投稿準備中)。

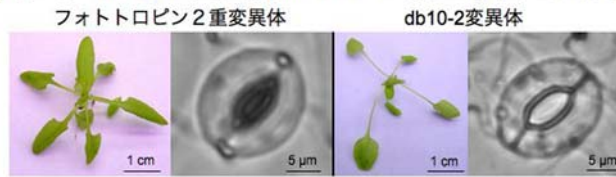
図1、単離した気孔開度変異体 (*ftd1*, *ftd2*)



また、*ftd1* 変異体同様に気孔が顕著に開口した*ftd2* 変異体も新奇の気孔開度変異体と考えられたため、現在マッピングによる原因遺伝子の同定を進めている。これまでのところ、第5染色体の下腕の 80 kbpの範囲に原因遺伝子が座乗していることがわかってきた。この*ftd2* 変異体は、アブシジン酸に応答した気孔閉鎖は見られることから、青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H⁺-ATPaseに至る気孔開口のシグナル伝達における抑制因子の新奇の突然変異体と考えている。

青色光受容体フォトトロピンが仲介する反応の一つである葉の横伸展を指標にしたスクリーニングでは、葉の横伸展と気孔開口に共通した抑制因子が単離されることが推定される。これまでに約 16 万株のスクリーニングを完了し、最終的に20株の気孔が顕著に開口し、葉が平らに伸展した変異体を単離した。これらのうち、*db10-2* と名付けた変異体の孔辺細胞では、細胞膜H⁺-ATPaseが常にリン酸化され活性化された状態にあるため気孔が顕著に開口した表現型を示すことが明らかとなり、原因遺伝子は青色光受容体フォトトロピンから細胞膜H⁺-ATPaseに至る気孔開口のシグナル伝達における抑制因子であると推察された(図2)。そこで、マッピングによる原因遺伝子の同定を進めた結果、興味深いことに、花芽形成の抑制因子として機能することが知られている*ELF3*(*early flowering 3*)が原因遺伝子であることが明らかとなった(投稿準備中)。現在、花芽形成のシグナル伝達に関与する因子の気孔開口のシグナル伝達への関与について解析を進めている。

図2、 db10-2変異体における葉の形状と気孔開度



(左) フォトトロピン2重変異体では、葉は下向きにカーブし、気孔は閉じている。
(右) 単離した変異体では、葉が平らに横伸展し、かつ、気孔が顕著に開口している。

③細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構

これまでの孔辺細胞を用いた研究により、細胞膜H⁺-ATPaseの活性化には、C末端のリン酸化と14-3-3蛋白質の結合が必須であることが明らかとなっているが、このリン酸化反応に関与するプロテインキナーゼやホスファターゼは未だ不明であり、これらの同定を目指して研究を進めてきた。まず、*in vitro*でのリン酸化反応系を確立し、解析を行った結果、ソラマメ孔辺細胞やシロイヌナズナ黄化芽生えにおいて、これらプロテインキナーゼやホスファターゼが、細胞膜H⁺-ATPaseと同じ細胞膜に存在することが明らかとなった。また、プロテインキナーゼは一般的なキナーゼ阻害剤であるk-252aやスタウロスポリンに非感受性であること、ホスファターゼは、タイプ1/2Aホスファターゼの特異的阻害剤であるカリクリンAに非感受性であり、2価カチオンキレーターであるEDTAにより阻害される2価カチオン要求性のタイプ2Cプロテインホスファターゼ(PP2C)が関与していることを明らかにした(投稿準備中)。

次に、PP2Cの同定に向け、PP2C遺伝子の絞り込みを行った。シロイヌナズナには76のPP2C遺伝子が存在するが、孔辺細胞では細胞膜H⁺-ATPaseが他の細胞と比べ20倍程度多く発現していることがわかってきたため、細胞膜H⁺-ATPaseの脱リン酸化に関わるホスファターゼも発現も孔辺細胞に多いと考え、孔辺細胞で発現量の多い5つのPP2Cをマイクロアレイ解析によりピックアップした。現在、これら5つのPP2C遺伝子のクローニングを進めており、今後は、これらPP2Cの細胞膜H⁺-ATPaseに対する脱リン酸化活性を測定し、PP2Cの同定を行う予定である。

また、細胞膜H⁺-ATPaseを免疫沈降すると、キナーゼ活性は失われるが、細胞膜H⁺-ATPaseを脱リン酸化するホスファターゼ活性は保持されていることも明らかとなった。細胞膜H⁺-ATPaseの免疫沈降物の電気泳動による解析の結果、少なくとも9つの共同沈降蛋白質が存在することがわかったため、現在、PP2Cの同定を視野に入れ、細胞膜H⁺-ATPaseと共同沈降する蛋白質の同定を質量分析により進めている。

④気孔孔辺細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

気孔を構成する孔辺細胞は、気孔開閉という特有の細胞応答を行う細胞であり、孔辺細胞で特異的・顕著に発現する遺伝子は、気孔開閉に関与している可能性が高い。実際、これまでに気孔開閉に関与することが明らかとなっている細胞膜H⁺-ATPase、内向き整流性カリウムチャネル、外向き整流性カリウムチャネル、アニオンチャネルなどの遺伝子は、葉肉細胞と比べ孔辺細胞において顕著に発現が高いことが知られている。そこで、孔辺細胞において特異的・顕著に発現する遺伝子を網羅的に同定することを目的として、マイクロアレイ解析とRT-PCR解析を行った。マイクロアレイ解析では、孔辺細胞プロトプラスト(GCP)と葉肉細胞プロトプラスト(MCP)由来のRNAを用いて解析を行い、GCPで特異的・顕著に発現する遺伝子について、GCP、MCPと根由来のRNAを用いたRT-PCRによる確認を行い、RT-PCRにおいてもGCP特異的・顕著に発現することが確認できた遺伝子を候補とした。その結果、マイクロアレイ解析によりこれまでに気孔開閉の関与が知られていない約200の遺伝子がGCPにおいて特異的・顕著に発現することがわかり、現在、候補遺伝子のRT-PCRを順次進めている。これまでのところ、60の候補遺伝子についてRT-PCRを行い、20の遺伝子が、MCPや根にはほとんど発現が見られないが、GCPにおいて発現の見えることを確認している。これら遺伝子の中には、シグナル伝達への関与が推測される蛋白質リン酸化反応に関わる遺伝子や脂質代謝に関わる遺伝

子に加え、機能未知の遺伝子が含まれている。

今後は、これら遺伝子のノックアウト株や発現抑制株の表現型を観察し、気孔開閉に関与する遺伝子を同定したい。また、今回孔辺細胞で特異的に発現することが明らかとなった遺伝子は、様々な発現量で孔辺細胞に発現しているため、これらのプロモーターは、今後、孔辺細胞特異的に目的遺伝子を発現する研究に有用であると考えている。

5. 自己評価

本研究では、「気孔開閉と細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構の解明」を目的として進めてきたが、変異体のスクリーニングにより、気孔開口に関わる新奇変異体と気孔閉鎖に関わる新奇変異体の両者を複数単離し、気孔開閉の分子機構の解明に大きく貢献することができたと考えている。また、青色光受容体フォトロピンの青色光反応の詳細な分子機構を明らかにし、さらに、シグナル伝達の過程に関与する因子を同定し、青色光シグナル伝達の分子機構を部分的に明確にすることができた。細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構については、活性調節に関わる因子の生化学的性質を明らかにした。以上の研究により、当初の目的に対する多くの知見が得られたと考えている。これらの中には、論文として成果を公表できたものと投稿準備中のものが含まれるが、投稿準備中の研究に関しては、出来るだけ早く公表できるようにしたい。

6. 研究総括の見解

気孔の開閉に至る青色光受容体フォトロピンからのシグナル伝達機構を詳細に解析し、気孔開閉と細胞膜プロトンATPアーゼ (H⁺-ATPase)の関係、変異体を使って明らかにした。目的とした、気孔開閉の分子機構の解明、H⁺-ATPaseの活性調節機構については、達成できたと考えられる。新規因子の同定、機能解明など高い成果を挙げ、この領域の研究をリードしていると認められる。今後、立てた仮説の実証を進め気孔開閉の全体像を明らかにし、さらに食糧生産性の向上、新しい農作物の作出に関する研究も行って欲しい。

7. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takemiya A, Kinoshita T, Asanuma M, Shimazaki K. (2006) Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 13549–13554.
2. Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama K, Doi M, Shimazaki K. (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105, 5626–5631.

(2) 特許

なし

(3) 受賞

1. 平成 19 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2007 年 4 月 17 日)

(4) 総説

1. Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. **Annual Review of Plant Biology** 58, 219–247.

(5) 招待講演

1. 木下俊則「気孔開閉のシグナル伝達機構の解析」特定領域研究 LOV 光受容体による植物の運動制御機構 第 2 回若手ワークショップ、2008 年 12 月 18 日、京都

(6)学会発表

1. 木下俊則、小野奈津子、井上晋一郎、島崎研一郎「青色光受容体フォトロピン 2 重変異体からの気孔開度変異体の単離」日本植物生理学会、2008 年 3 月 20 日、札幌
2. Toshinori Kinoshita「Stomatal opening and regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase」2008 Japan-Switzerland Workshop, Oct. 8, 2008, Nara Japan
3. 木下俊則、島崎研一郎「青色光による気孔開口と細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構」日本植物学会第 72 回大会シンポジウム、2008 年 9 月 25 日、高知

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

1. Takahashi Y, Kinoshita T, Shimazaki K. (2007) Protein phosphorylation and binding of a 14-3-3 protein in *Vicia* guard cells in response to ABA. **Plant & Cell Physiology** 48, 1182-1191.
2. Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K. (2008) Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. **Molecular Plant** 1, 15-26.