

気孔開閉と細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構の解明

木下 俊則

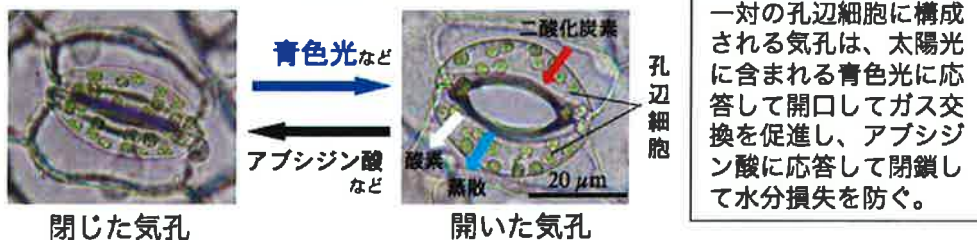
名古屋大学大学院理学研究科

1. 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、変転する環境に应答して開閉を行うことによってガス交換を調節しており、この微少な器官が無ければ陸上植物の生存は不可能に近い。

気孔を構成する一对の孔辺細胞は、太陽光、特にシグナルとして作用する青色光域の光に应答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・アブシジン酸に应答して気孔を閉鎖し、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应答を示すことから、植物の環境应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 (図1)。

図1、ツククサ表皮の気孔の開閉



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。

2. 研究成果

①青色光シグナル伝達機構の解明

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ることが知られているが、自己リン酸化部位とその生理的意義については不明であった。そこで、自己リン酸化部位について質量分析を行い、8カ所の部位を同定した。さらに、これら自己リン酸化されるアミノ酸置換を行った形質転換植物を作製し、植物の青色光应答を解析した結果、キナーゼドメイン中のセリンの自己リン酸化が、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のシグナル伝達に必須であることを証明した。一方、その他の自己リン酸化部位は表現型に対する影響がほとんどみられなかった。

また、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、薬理的に関与が示唆されていたタイプ1プロテイン・ホスファターゼ (PP1ase) が正の制御因子として働くことを分子生物学的手法、細胞生物学的手法を駆使して実証した。

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、葉の重量変動、葉の形状、葉の表面温度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 (図2)。このうち、*ftd1* と名付けた変異体についてマッピングにより原因遺伝子を同定した結果、

図2、単離した気孔開度変異体 (*ftd1*, *ftd2*)



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同定された Mg-キラーゼ H サブユニット (Nature 2006) に新規のミスセンス変異を持っており、気孔の表現形からアブシジン酸受容体が単離された初めての例となった (投稿準備中)。今後は、アブシジン酸プローブを使用して、アブシジン酸の受容部位の同定、*ftd1* の新規のミスセンス変異のアブシジン酸結合能に対する影響を調べ、気孔閉鎖に関与するアブシジン酸受容体の生理機能を確立したい。

葉の形状を指標にしたスクリーニングでは、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、 H^+ -ATPase が常にリン酸化され、活性化された状態であることがわかり、原因遺伝子は気孔開口における抑制因子として機能していた。マッピングの結果、興味深いことに、花芽形成に関わる *ELF3* が原因遺伝子であり、この変異体では抑制因子として機能する *ELF3* 蛋白質が欠損することにより、気孔が顕著に開口していることが明らかになった。さらに、花芽形成において *ELF3* により発現抑制され、フロリゲンの実体とされる *FT* (flowering locus T) の発現が顕著に高まっていること、*FT* の機能欠損変異体 *ft-1* では青色光による気孔開口が抑制されていることを見出し、*FT* が気孔開口において正の制御因子として新規の機能を持つことが示された (図3、投稿準備中)。現在、様々な *FT* 形質転換植物を作製しており、これらを用いて、*FT* の気孔開口への関与を証明する。また、花芽形成において *FT* は葉で発現し、*FT* 蛋白質が維管束を通過して茎頂分裂組織に移動し、様々な遺伝子の発現を誘導することが知られている。そこで、野生株、*db10-2* 変異体や *ft-1* 変異体より単離した孔辺細胞におけるマイクロアレイ解析を行い、孔辺細胞における *FT* の標的遺伝子 (*FRUITFULL*, *APL*, *SEP1*, *SEP2* 等) を明らかにした。今後は、これらの遺伝子の気孔開口における役割について明らかにしたい。

図3、*db10-2* 変異体における葉の形状と気孔開度



(左) フトトロピン2重変異体では、葉は下向きにカールし、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。

さらに、これら3つのスクリーニングにより得られている他の新規気孔開度変異体の原因遺伝子の同定も進め、気孔開閉の分子機構を明らかにしたい。

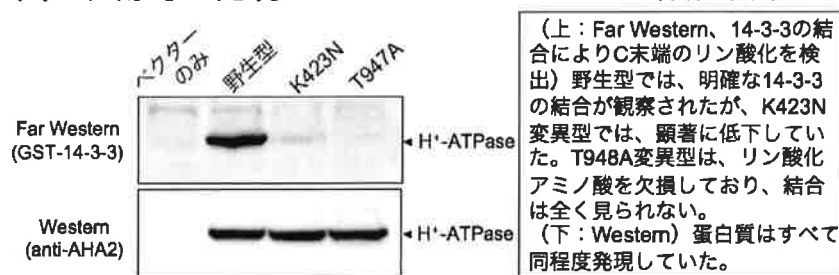
③細胞膜 H^+ -ATPase の活性調節機構

これまでの研究により、細胞膜 H^+ -ATPase の C 末端のリン酸化が必須となっていることが明らか

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明らかとなっておらず、これらの同定を目指して研究を進めてきた。そこで、*in vitro*でのリン酸化反応系を確立し、解析を行った結果、これらプロテイン・キナーゼやホスファターゼはH⁺-ATPaseと同じ細胞膜に存在すること、ホスファターゼの候補としてタイプ2Cが関与していることが明らかとなった。また、H⁺-ATPaseの免疫沈降物中では、少なくとも細胞膜H⁺-ATPaseを脱リン酸化するホスファターゼ活性が存在することから、現在PP2Cの分子種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進めている。

この研究過程において、興味深いことに酵母に植物の細胞膜H⁺-ATPaseを発現させると、細胞膜H⁺-ATPaseは酵母内でC末端のリン酸化が起きており、さらに、H⁺-ATPaseの触媒ドメインに存在するATP結合部位の1つのアミノ酸(423番目のリジン)をアスパラギンに置換するとC末端のリン酸化が見られなくなることを見出した(図4)。この結果は、植物のH⁺-ATPase自身のATP結合部位がC末端のリン酸化に対して重要な役割を果たしていることを示唆しており、今後は、さらに詳細なアミノ酸の部位を特定するとともに、変異H⁺-ATPaseの形質転換植物を作製し、この現象が自己リン酸化によるものなのか、それとも、他のキナーゼが関与しているのかを明らかにする。P型ATPaseは、一般的なATP結合部位であるPループ(Walkerモチーフ)とは異なるKGAPモチーフをATP結合部位とする。本研究により、H⁺-ATPaseのATP結合部位のリン酸化反応への関与が明確となれば、動植物を通じて存在する多様なP型ATPaseに特徴的なKGAPモチーフの新規の働きを提案するものとなる。

図4、酵母に発現させたH⁺-ATPaseのリン酸化状態



(まとめ)

以上の研究の結果より、青色光による気孔開口の青色光受容体であるフォトトロピンのシグナル発信に必須の自己リン酸化部位、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けるタイプ1プロテイン・ホスファターゼ、ELF3、FTの関与、細胞膜H⁺-ATPaseの活性制御に関わるプロテイン・キナーゼやホスファターゼの生化学的特質が明らかとなった。これらの結果は、植物特有の代謝反応である光合成に多大な影響を与える気孔開口の青色光シグナル伝達における新規の知見を提供するとともに、植物における環境応答のモデルケースとしても先導的な結果を提供した。加えて、これまで不明の部分が多かった植物ホルモン・アブシジン酸受容体の気孔孔辺細胞における働きを明確にした。今後もさらに新規突然変異体の原因遺伝子の同定、細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構の解析を進め、気孔開閉の分子機構の全体像を明らかにしていきたい。また、これらの成果をイネなどの主要農作物への応用を視野に入れた研究を進め、農作物による食料生産性の向上、乾燥や塩などのストレス耐性植物の作出にも取り組んでいきたい。

3. 主な論文

- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama K, Doi M, Shimazaki K. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5626-5631. (2008)
- Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K. Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. *Molecular Plant* 1, 15-26. (2008)
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* 58: 219-247. (2007)
- Kong, S-G, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A. The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J.* 51, 862-873. (2007)

- Takahashi Y, Kinoshita T, Shimazaki K. Protein phosphorylation and binding of a 14-3-3 protein in *Vicia* guard cells in response to ABA. **Plant & Cell Physiology** 48: 1182-1191. (2007)
- Takemiya A, Kinoshita T, Asanuma M, Shimazaki K. Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 13549-13554. (2006)
- 木下俊則、島崎研一郎「気孔の開口を駆動する細胞膜 H⁺-ATPase」**蛋白質核酸酵素** 51, 871-876. (2006)

4. 受賞

- 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)