

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05687
研究課題名：気孔開度調節のシグナル伝達の解明と植物の成長制御

研究代表者氏名（ローマ字）：木下 俊則（KINOSHITA Toshinori）
所属研究機関・部局・職：名古屋大学・トランスフォーメティブ生命分子研究所・教授
研究者番号：50271101

研究の概要：

本研究は、植物の生存・成長に極めて重要な役割を果たしている気孔開・閉のシグナル伝達の分子機構を、研究代表者らのこれまでに培ってきた技術・経験を駆使して明らかにすることを目的とする。さらに、これらの基礎的な研究成果に基づいた植物の成長制御技術の開発にも取り組み、植物の持つ潜在能力（植物ポテンシャル）の解明とそのポテンシャル増強を進める。

研究分野：植物生理学

キーワード：植物、環境応答、シグナル伝達、バイオマス

1. 研究開始当初の背景

青色光による気孔開口については、これまでの研究代表者らの研究により、青色光が孔辺細胞の青色光受容体フォトトロピンを介して、30秒以内に細胞膜プロトンポンプ（ H^+ -ATPase）を、C末端から2番目のスレオニンのリン酸化とリン酸化部位への14-3-3蛋白質の結合により活性化し、内向き整流性 K^+ チャンネルKAT1からの K^+ 取込みを促進し、気孔開口を誘導すること、また青色光シグナル伝達に関与するいくつかの重要因子が明らかとなってきた。しかしながら、気孔開口の青色光シグナル伝達は未だ不明の部分が多い。さらに、研究代表者らは、気孔の植物成長や乾燥耐性における重要性を示すため、これまで基礎研究の成果に基づき、気孔開度を人為的に操作する遺伝子組換えシロイヌナズナの作出に組み込み、孔辺細胞の細胞膜 H^+ -ATPaseのタンパク質量を増やすことで、光による気孔開口と光合成活性が増加し、結果的に地上部バイオマスが30%以上増加することを明らかにし、気孔開度が光合成活性やバイオマス増加の律速となっていることを実証したが、その他の植物において有用な技術であるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

気孔開・閉の分子機構の理解は格段に進んだが、詳細については依然不明の部分が多く、植物の環境応答のモデル細胞である気孔孔辺細胞における全容の解明が待たれる。また、植物における気孔の働きを考慮すると、本研究による成果は、光合成の集大成である農作物による食料生産向上、植物への乾燥などのストレス耐性の付与などの応用においても重要な知見を提供することができ、農学や植物を利用した低炭素社会の発展への貢献が期待される。そこで、本研究では、植物の生存・成長に極めて重要な役割を果たしている気孔開・閉のシグナル伝達の分子機構を、研究代表者らのこれまでに培ってきた技術・経験を生かした生理・生化学的手法やケミカルバイオロジーを駆使して明らかにすることを目的とする。さらに、これらの基礎的な研究成果に基づいた人為的な気孔開度制御技術の開発にも取り組む。

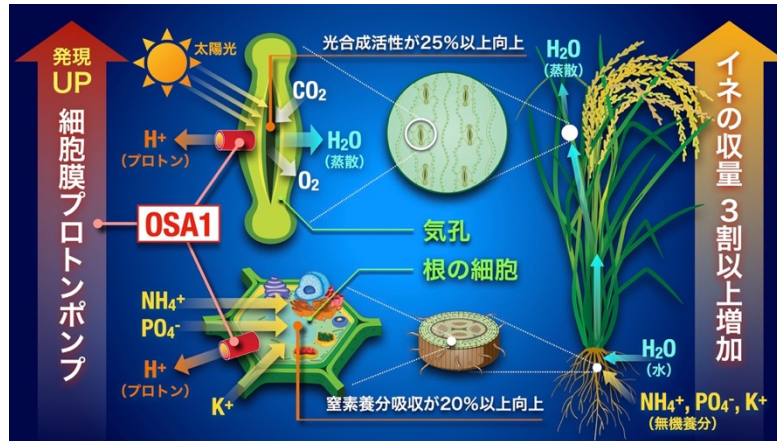
3. 研究の方法

気孔の表現型観察は、蒸散測定装置や赤外線サーモグラフィを用いて、また、気孔開度の測定を行った。ホスホプロテオミクスはシロイヌナズより単離した孔辺細胞プロトプラストを用いて行った。また、気孔孔辺細胞の細胞膜 H^+ -ATPaseのC末端から2番目のスレオニンのリン酸化については、独自に作成した特異的リン酸化抗体を用いて、免疫組織化学染色法やウェスタンブロットにより検出した。

4. これまでの成果

気孔開口の必須酵素である細胞膜 H^+ -ATPaseは、C末端から2番目のスレオニンのリン酸化により活性化されることが明らかとなっているが、リン酸化制御に関わるキナーゼやホスファターゼは明らかとなっていない。これまでの生化学的解析により、タイプ2Cホスファターゼ（PP2C）様の活性が脱リン酸化に関わることがわかってきたため、PP2Cの分子種の同定を進めた結果、PP2C.Dファミリーが重複して機能しており、その中でも孔辺細胞での発現量の多いPP2C.D6とPP2C.D9が主要な役割を果たしていることが明らかとなった。PP2C.D6、D9のシングル変異体では表現型は見られないが、二重変異体では、光による H^+ -ATPaseのリン酸化レベルが高く、気孔開度が大きく、光停止後の脱リン酸化が遅延しており、気孔閉鎖も遅延していた（[1] Plant Physiology 2022）。また、国際共同研究により、植物ホルモン・オーキシ

ンのシグナル伝達の上流に関わると想定していたキナーゼ TMK1, TMK4 の二重変異体の表現型解析を進めたところ、オーキシンに依存した細胞伸長が抑制されていると同時に、葉や根の細胞膜 H^+ -ATPase の C 末端から 2 番目のスレオニンのリン酸化レベルと活性が低下していることを見出した。そこで、*in vitro* のリン酸化反応を行なったところ、驚くべきことに TMK により直接リン酸化されることが明らかとなった。これらの結果は、1971 年に「オーキシンによる酸成長仮説」が提唱されて以来、50 年以上不明であった細胞膜 H^+ -ATPase の活性化に関わる C 末端のリン酸化を触媒するキナーゼを同定した成果として、[3] Nature 2021、[4] Nature 2021 に掲載された。



実用的な植物（イネ、ポプラ）を用いた「ポンプ植物」の解析を進め、イネの細胞膜 H^+ -ATPase の発現を植物体全体で高めることで、気孔開口と光合成が促進され、同時に、根におけるアンモニウムやリン、カリウムなどの養分吸収が高まること、また、4ヶ所の野圃場における実証実験を行い、野外においても、 H^+ -ATPase の発現を高めたイネでは、収量が 30% 以上高まることを明らかにした。また、アンモニウム施肥量を変える圃場実験も実施し、 H^+ -ATPase の発現を高めたイネでは、アンモニウム施肥量を半分に減らしても、通常アンモニウム量の野生株より依然収量が大きいことが明らかとなり、 CO_2 削減や食糧増産だけでなく、環境汚染の世界的な問題となっている土壌肥料削減にも繋がる技術として期待される成果となった ([6] Nature Communications 2021)。この成果は、多くのメディアで取り上げられ、農林水産省 2021 年農業技術 10 大ニュースにも選出された。さらに、木本であるポプラにおいても、孔辺細胞の H^+ -ATPase の発現を高めることで、光合成や成長速度が促進されることを証明した ([5] Frontier in Plant Science 2021)。

5. 今後の計画

同定した PP2C.Ds はどのように孔辺細胞内で活性制御されているのか、また、葉や根の細胞膜 H^+ -ATPase のキナーゼとして同定した TMKs の孔辺細胞の H^+ -ATPase への関与を明らかにする。さらに、気孔開度に影響を与える網羅的化合物スクリーニング（約 3 万化合物）により同定した気孔開口を抑制する 247 化合物、促進する 5 化合物について解析をさらに進める。また、遺伝子組換え技術に頼らない「ポンプ植物」の確立を目指し、ゲノム編集や化合物を用いた研究を進める。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

主な成果を示す。

1. Akiyama M, Sugimoto H, Inoue S, Takahashi Y, Hayashi M, Hayashi Y, Mizutani M, Ogawa T, Kinoshita D, Ando E, Park M, Gray WM, *Kinoshita T (2022) Type 2C protein phosphatase clade D family members dephosphorylate guard cell plasma membrane H^+ -ATPase. **Plant Physiology** in press.
2. Hayashi Y, *Takahashi Y, Fukatsu K, Tada Y, Takahashi K, Kuwata K, Suzuki T, *Kinoshita T (2021) Identification of abscisic acid-dependent phosphorylated basic helix-loop-helix transcription factors in guard cells of *Vicia faba* by mass spectrometry. **Frontiers in Plant Science** 12:735271.
3. Lin W, Zhou X, Tang W, Takahashi K, Pan X, Dai J, Ren H, Zhu X, Pan S, Zheng H, Gray WM, Xu T, Kinoshita T, *Yang Z (2021) TMK-based cell surface auxin signaling activates cell wall acidification in Arabidopsis. **Nature** 599: 278-282.
4. Li L, Verstraeten I, Roosjen M, Takahashi K, Rodriguez L, Merrin J, Chen J, Shabala L, Smet W, Hong Ren H, Vanneste S, Shabala S, De Rybel B, Weijers D, Kinoshita T, Gray WM, *Friml J (2021) Cell surface and intracellular auxin signalling for H^+ fluxes in root growth. **Nature** 599: 273-277.
5. *Toh S, Takata N, Ando E, Toda Y, Wang Y, Hayashi Y, Mitsuda N, Nagano S, Taniguchi T, *Kinoshita T (2021) Overexpression of plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells enhances light-induced stomatal opening, photosynthesis, and plant Growth in Hybrid Aspen. **Frontiers in Plant Science** 12: 766037. (IF 5.753)
6. Zhang M, Wang Y, Chen X, Xu F, Ding M, Ye W, Kawai Y, Toda Y, Hayashi Y, Suzuki T, Zeng H, Xiao L, Xiao X, Xu J, Guo S, Yan F, Shen Q, Xu G, *Kinoshita T, *Zhu Y (2021) Plasma membrane H^+ -ATPase overexpression increases rice yield via simultaneous enhancement of nutrient uptake and photosynthesis. **Nature Communications**, 12, 735.

7. ホームページ等

<http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/index.html>