

植物の気孔閉鎖を導くアブシジン酸や二酸化炭素の感知・情報伝達



高橋 洋平

トランスフォーマティブ生命分子研究所 (ITbM)

はじめに

陸上植物は、普遍的に存在する太陽エネルギーと二酸化炭素(CO₂)、水を利用した光合成能力に加え、環境へ鋭敏な応答と適応によって、数億年にわたり地球上に繁栄している。植物は、葉や莖の表面に存在する小さな通気口である気孔を通してCO₂を取り込むと同時に水の蒸散をおこなっている。陸上植物は、水やガスを通しにくいクチクラ層によって地上部を覆われており、気孔は物理的にはごく微細な孔でありながらも、植物と大気とのガス交換の90%以上を占める極めて重要な器官である。ここでは、気孔閉鎖を引き起こす細胞内情報伝達の研究を紹介したい。

気孔を介したCO₂吸収と水分損失

気孔は、光合成に必要となる大気CO₂吸収のほ

とんどを担うが、それと同時に、植物体内からの水分の流出の場でもあり、このことは陸上植物の生理における重要な側面である。一般的な植物では、光合成で一個のCO₂分子を固定する毎に、数百個の水分子を失っていると見積もられ、気孔を介する「CO₂吸収」と「水の損失」は、陸上植物の生活スタイルを規定するジレンマである。

植物は、環境に応じて気孔開度を適切に調節することにより(気孔の開閉：図1)、CO₂吸収と水収支をコントロールして、乾燥といった環境変動に適応してきたと考えられる。静的な印象を持たれやすい植物であるが、気孔の開閉は数分以内に引き起こされる素早い運動である。植物が気孔を閉鎖できなければどうなるであろうか？アブシジン酸(ABA)は、乾燥環境に反応して植物体内で合成されて気孔閉鎖を引き起こす植物ホルモンで

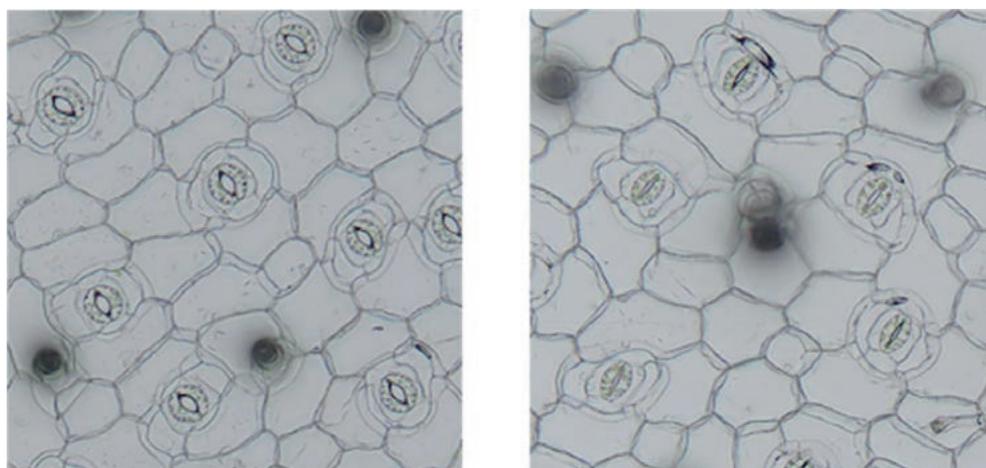


図1 開口した気孔(左)と閉鎖した気孔(右)。写真はツククサの葉の裏側表皮。

あるが、この ABA を合成できない植物は、高湿度条件ではある程度正常に生育するものの、低湿度条件に移されると数分で気孔から急激に水を失い、萎れてしまう。これは、水分環境に応答した気孔制御の重要性を端的に示す。

植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) による気孔閉鎖

ABA は、どのようにして気孔を閉鎖させるのであろうか？気孔開閉は、気孔を構成する一对の孔辺細胞が、膨張あるいは収縮することによって引き起こされる。気孔は、見た目が人間の口とも似ているが、その上下の唇に対応するのが一对の孔辺細胞である。各孔辺細胞の孔側と外周側では細胞壁の厚みが異なっており、孔辺細胞が膨張すると細胞間に隙間が生じることによって「開口」し、逆に収縮するとその隙間が狭まって「閉鎖」する。すなわち ABA は、孔辺細胞の素早い収縮を引き起こすわけであるが、これは ABA 受容体から始まる一連の情報伝達を介してカリウムイオンやリンゴ酸などの溶質とともに水が孔辺細胞外へ流出することによって達成される。この情報伝達経路は長年に渡り研究されており、これまでに多くの突然変異体や重要遺伝子が見つかった。

なかでも最も重要な知見のひとつは、³²P ラベルされた ATP を用いた生化学実験によりもたらされた。ABA はタンパク質リン酸化反応を引き起こすことが遺伝学的・薬理的証拠から示唆されていたが、その主役であるプロテインキナーゼは未知だった。ペンシルベニア州立大学の Sarah M. Assmann のグループは、ソラマメの表皮から高純度の孔辺細胞を大量精製し、ABA 処理前後のサンプルを用いて In-gel kinase assay をおこなった¹⁾。In-gel kinase assay とは、タンパク質を SDS-PAGE で分離後、そのゲルごと [γ -³²P] ATP とインキュベートし、ゲル内のキナーゼ活性をオートラジオグラフィにより可視化する手法である。ゲル作成時にキナーゼの基質を混ぜる場合と混ぜない場合があり、いずれの場合も、キナーゼ活性を持つタンパク質が分子量によって分離さ

れたバンドとなって現れる。研究グループは、ソラマメ孔辺細胞において 48 kDa の未知タンパク質が ABA に依存してキナーゼ活性を示すことを見出した。2000年には、Assmann らがこのソラマメのプロテインキナーゼを質量分析により同定することに成功し、AAPK (ABA-ACTIVATED PROTEIN KINASE) と命名した。その後、シロイヌナズナを用いた順遺伝学的スクリーニングから AAPK のオーソログが見つかり、この遺伝子を欠くと気孔が閉じなくなることからこのシロイヌナズナのキナーゼは OST1 (OPEN STOMATA1 (stomata = 気孔)) と命名された。AAPK/OST1 を含む SnRK2キナーゼ群は、植物のストレス応答を担う重要な遺伝子ファミリーの一つとして広く受け入れられている。

一方、OST1/SnRK2キナーゼの活性化メカニズムについては、自己リン酸化と上流キナーゼによる活性化の両方の可能性が考えられてきたが、筆者らの研究により OST1/SnRK2活性化を担うキナーゼが同定された²⁾。OST1/SnRK2は type2C protein phosphatase (PP2C) によって脱リン酸化されることで阻害されており、この PP2C は ABA とその受容体 PYR/PYLs の結合によって不活性化されることが分かっていた。大腸菌で作成した ABA 受容体 PYR1, PP2C の一種である HAB1, OST1/SnRK2キナーゼの組換えタンパク質を試験管内で混合した後、OST1/SnRK2の活性化状態を in-gel kinase assay で調べたところ、HAB1による OST1/SnRK2の活性阻害は見られたものの、ABA を添加しても OST1/SnRK2キナーゼは再活性化しなかった (図 2 A)。そこで筆者らは、遺伝学的に ABA 情報伝達への関与が報告されていた Raf-like キナーゼの一種³⁾ をさらに添加した。すると、HAB1により不活性化された OST1/SnRK2キナーゼが ABA 添加により再活性化する様子を観察することができた (図 2 B)。この実験は、ABA 初期情報伝達がこれらの 4 種のタンパク質によって構成されていることを示唆する。さらなる解析により、この Raf-like キナーゼは植物の浸透圧ストレス応答にも重要な役割を担うキナーゼ

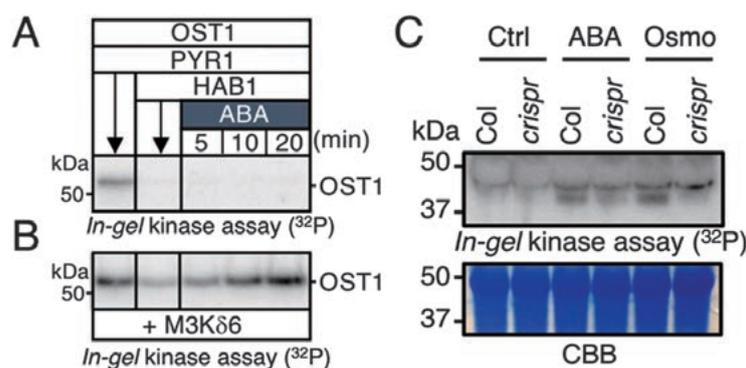


図2 (A) OST1キナーゼ, ABA 受容体 PYR1, PP2C ホスファターゼ HAB1の組み換えタンパク質を試験管内で混合し, さらに ABA を加えて5, 10, 20分後の OST1のキナーゼ活性を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いた in-gel kinase assay で検出した。(B) (A) に Raf-like キナーゼタンパク質 (M3K δ 6) を添加した。試験管内で ABA に応答した OST1活性化が再現された。(C) 3つの Raf-like キナーゼ遺伝子を CRISPR/Cas9で破壊したシロイヌナズナの ABA または浸透圧ストレス (Osm) による OST1/SnRK2キナーゼ活性化。Col は野生型シロイヌナズナを用いたコントロール。

であることが示された (図2C)²⁾。

高 CO₂ 濃度による気孔閉鎖

大気中の CO₂濃度の急激な上昇は, 地球の気候変動にも関連して大きな関心を集めているが, じつは多くの植物種において, 気孔は高濃度 CO₂ に応答して素早く閉鎖することが知られている⁴⁾。しかしながら, 植物がどのように CO₂濃度変化を感知しているのかについては, CO₂センサーの分子実体を含めて, 長らく不明であった。

筆者らは最近, シロイヌナズナの CO₂応答が異常な突然変異体の原因遺伝子として見つかった HT1と MPK4/12という2種類のプロテインキナーゼが, 気孔の CO₂/HCO₃⁻センサーとして機能することを, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用いたタンパク質リン酸化解析などにより証明した⁵⁾。筆者は, HT1キナーゼと MPK4/12キナーゼの組み換えタンパク質を作製し, それぞれのキナーゼ活性を, CO₂/HCO₃⁻を産生する NaHCO₃存在下・非存在下で調べた。その結果, いずれのキナーゼも, 単独では CO₂/HCO₃⁻に関わらず一定のキナーゼ活性を示した (図3A)。その一方で, 二つのキナーゼを試験管内で混合した場合にのみ, HT1のキナーゼ活性が CO₂/HCO₃⁻に依存して阻害されることがわかった (図3B)。

さらに筆者らは, HT1と MPK4/12が, CO₂/HCO₃⁻に依存して互いに結合して複合体を形成することを見つけ, この複合体形成を阻害する HT1の点変異は, CO₂に応答した気孔閉鎖を阻害することを見出した。これらの結果は, HT1と MPK4/12が気孔閉鎖における CO₂センサーの実体であることを示す。さらに詳細な解析により, このセンサーの直下では, CBC1という別のキナーゼが CO₂に依存して制御されていると考えられ, 気孔の CO₂応答を司るキナーゼ情報伝達の存在が見えてきた⁵⁾。

興味深いことに, ABAによって活性化される OST1/SnRK2キナーゼは, CO₂による気孔閉鎖にも必要であることが遺伝学的に示唆されている。しかしながら, in-gel kinase assay⁶⁾ や OST1/SnRK2キナーゼの活性をモニターする FRET センサーの開発⁷⁾ により, CO₂は OST1/SnRK2キナーゼの活性化を介さずに気孔閉鎖を引き起こすことが分かった。つまり, CO₂と ABA は, どちらも同様に気孔閉鎖を引き起こすものの, それぞれ別々の仕組みと両者のクロストークが存在しているようであり, これらを解明するためにはさらなる研究が必要である。

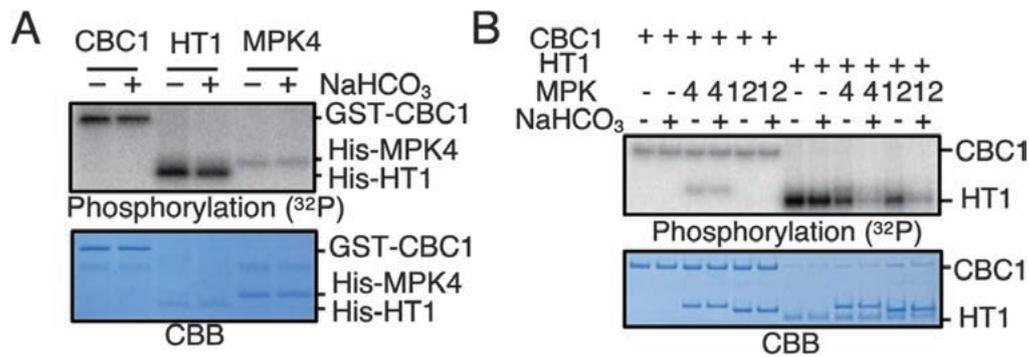


図3 (A)シロイヌナズナのMPK4やHT1組み換えタンパク質のキナーゼ活性と、それに対するNaHCO₃の影響を、[γ -³²P] ATPを用いた試験管内リン酸化反応により調べた。(B)HT1とMPK4、またはHT1とMPK12を混合したときのNaHCO₃の効果。MPK4またはMPK12存在下で、HT1キナーゼ活性がNaHCO₃に反応して阻害された(右側6レーン)。MPK4やMPK12は、別のキナーゼであるCBC1には影響しない(左側6レーン)。

おわりに

地上の変わりやすい水分環境に応じて植物がABAを合成して気孔を閉鎖させ、積極的な水分保持を図ることは、直感的にも理解しやすい。一方で、植物を取り囲む大気中のCO₂濃度は、大半の陸上植物の一生を通してほぼ一定であろう。ではなぜ植物の気孔はCO₂濃度を感知する必要があるのだろうか？じつは、植物の葉の内部では、外部の光環境に応じて、CO₂濃度がダイナミックに変動していることが報告されている。すなわち、光照射下で光合成が活発に稼働している時には、CO₂が消費されて葉内CO₂濃度は低くなる。逆に、夜間は光合成が止まり、葉内CO₂濃度は上昇する。このようにして、陸上植物は、CO₂濃度を自らの光合成状態の指標のひとつとして利用しており、これを感知して気孔を開閉することにより、CO₂と水の収支を効率化しているのではないかと考えられる。大気CO₂濃度の急激な上昇や気候変動が喫緊の課題となっている現在、植物の気孔開閉を司る細胞内情報伝達メカニズムを明らかにする研究は、農業などの応用面においても重要であろう。

謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、JSPS海外特別研究員制度とJST さきがけ(JPMJPR21D8)によっ

てサポートされた。名古屋大学の王愛里さん(博士前期課程2年)に原稿チェックとご意見をいただいた。

参考文献

- 1) Li, J. & Assmann, S. M. An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *Plant Cell* **8**, 2359-2368, doi:10.1105/tpc.8.12.2359 (1996).
- 2) Takahashi, Y. *et al.* MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nat Commun* **11**, 12, doi:10.1038/s41467-019-13875-y (2020).
- 3) Hauser, F. *et al.* A genomic-scale artificial microRNA library as a tool to investigate the functionally redundant gene space in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 2848-2863, doi:10.1105/tpc.113.11.2805 (2013).
- 4) Heath, O. V. Control of stomatal movement by a reduction in the normal carbon dioxide content of the air. *Nature* **161**, 179-181, doi:10.1038/161179a0 (1948).
- 5) Takahashi, Y. *et al.* Stomatal CO₂/bicarbonate sensor consists of two interacting protein

- kinases, Raf-like HT1 and non-kinase-activity requiring MPK12/MPK4. *Sci Adv* **8**, eabq6161, doi:10.1126/sciadv.abq6161 (2022).
- 6) Hsu, P. K. *et al.* Abscisic acid-independent stomatal CO₂ signal transduction pathway and convergence of CO₂ and ABA signaling downstream of OST1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E9971-E9980, doi:10.1073/pnas.1809204115 (2018).
- 7) Zhang, L. *et al.* FRET kinase sensor development reveals SnRK2/OST1 activation by ABA but not by MeJA and high CO₂ during stomatal closure. *Elife* **9**, doi:10.7554/eLife.56351 (2020).