

環境刺激による気孔開度制御機構の解明に向けて

木下俊則^{1,2}, 富山将和¹

1. 名古屋大学大学院理学研究科

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

2. 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

Toshinori Kinoshita^{1,2}, Masakazu Tomiyama¹

Regulation of stomatal movement in response to environmental stimuli

Key words: *Abscisic acid, Blue light, H⁺-ATPase, Phototropin, Stomata*

1. Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8602 Japan

2. Institute of Transformative Bio-Molecule (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku,

Nagoya, 464-8602 Japan

1. はじめに

陸生植物の表皮に存在する気孔は、1対の孔辺細胞により構成され、その開度を調節することにより、植物と大気間のガス交換を行っている。気孔は、植物が光合成を盛んに行っている太陽光下、特にシグナルとして作用する青色光域の光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取込み、蒸散や酸素の放出などを促進する。蒸散は、強い日差しで上昇した葉温を低下させ、同時に根における水や無機養分の取り込みを促す。一方、植物が乾燥ストレスに曝されると、乾燥ストレスに応答して産出させる植物ホルモンであるアブシジン酸に応答して閉鎖し、植物体からの水分損失を防いでいる(Shimazaki et al. 2007, Kim et al. 2010)。このように気孔孔辺細胞は、陸上植物が生きていく上で不可欠な働きを担うと同時に、環境刺激に対して明確な細胞応答を示すことから、植物の環境応答のモデル細胞としても注目され、盛んに研究されてきた(Murata et al. 2015)。しかしながら、気孔開閉のシグナル伝達の全容は未だ不明の部分が多く、著者らは、そのシグナル伝達機構の解明、さらに気孔開度の植物の環境刺激・ストレス下での役割について研究を進めてきた。本稿では、これまでの研究成果と今後の展開について解説する。

2. 青色光による気孔開口

2-1. 青色光による細胞膜 H⁺-ATPase の活性化

気孔開口は、孔辺細胞へのカリウム取込みと浸透圧増加に伴う孔辺細胞の体積増加により引き起こされる。孔辺細胞は外側に薄い細胞壁、内側（気孔側）に厚い細胞壁をもつ。孔辺細胞の体積が増加すると、孔辺細胞は薄い細胞壁のある外側に膨らみ、内側の厚い細胞壁が互いに離れるようにひっぱられ、孔辺細胞間の孔が開いて気孔が開口する(Willmer and Fricker 1996)（図1）。カリウムの取込みは、孔辺細胞の細胞膜に存在する内向き整流性のカリウムチャネルによって担われており、細胞膜の過分極に応答してカリウム取り込みが行われる。細胞膜の過分極は、同じく細胞膜に存在する起電性のプロトンポンプ、細胞膜 H⁺-ATPase の活性化により引き起こされる。細胞膜 H⁺-ATPase は、動物の

T. Kinoshita & M. Tomiyama-1

Na^+/H^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase らと同じ P 型 ATPase に属し、10 回の膜貫通領域をもつ膜タンパク質である。 H^+ -ATPase に特徴的な領域として C 末端領域に約 110 アミノ酸残基からなる自己阻害ドメインを持つことが知られている (Palmgren 2001)。孔辺細胞における H^+ -ATPase の青色光に依存した活性化は、C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化とリン酸化部位への 14-3-3 タンパク質の結合により引き起こされていることが明らかとなった (Kinoshita and Shimazaki 1999, Kinoshita and Shimazaki 2002)。

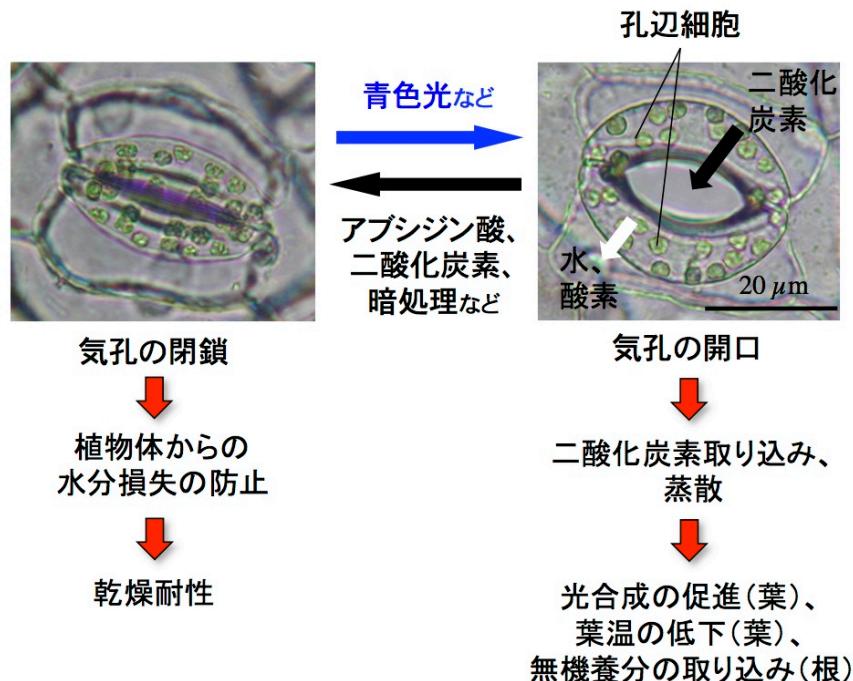


図 1. 植物における気孔の働き

写真はツユクサ表皮の気孔。気孔は一対の孔辺細胞により構成される。孔辺細胞内の緑の粒は葉緑体で、一般に表皮組織では孔辺細胞にのみ葉緑体が存在する。基礎研究によく用いられるシロイヌナズナでは、葉の裏側に 1 mm^2 あたり約 100 個の気孔が存在する。

細胞膜 H^+ -ATPase は、気孔開口のみならず、オーキシンに応答した細胞伸長、篩部伴細胞におけるショ糖取り込みや根における無機養分の取込み、さらに細胞内外の pH 調節や細胞の膜電位維持等において極めて重要な役割を果たしていることから、その活性調節機構については盛んに解析が進められている (Palmgren 2001, Duby and Boutry 2009)。また、活性制御機構としては、上述した C 末端から二番目のスレオニン残基のリン酸化に加え、C 末端におけるその他のいくつかのリン酸化部位が活性に影響を及ぼすことが報告されている (Falhof et al. 2016, Takahashi and Kinoshita 2016)。実際、ソラマメ孔辺細胞の細胞膜 H^+ -ATPase は、青色光に依存してスレオニン残基のみならず、セリン残基もリン酸化されることが見出されており (Kinoshita and Shimazaki 1999)、詳細なリン酸化部位の同定が待たれる。

細胞膜 H^+ -ATPase の C 末端から 2 番目のスレオニン残基のリン酸化に関するプロテインキナーゼ

は未だ同定されていないが、生化学的な実験により細胞膜に存在することが示されている (Svennelid et al. 1999, Hayashi et al. 2010)。一方、リン酸化されたスレオニン残基の脱リン酸化については、*in vitro* での生化学実験により細胞膜に存在するタイプ 2C プロテインホスファターゼ (PP2C) 様活性により引き起こされていることが示された (Hayashi et al. 2010)。さらに最近の研究により、黄化胚軸において、PP2C の D サブファミリーがリン酸化されたスレオニン残基の脱リン酸化に関与することが示された (Spartz et al. 2014)。

2-2. 青色光シグナル伝達機構の分子機構

14-3-3 タンパク質の細胞膜 H⁺-ATPase への結合解析の過程で、青色光に依存して 14-3-3 タンパク質と結合する質量約 125 kDa の新たなタンパク質が、ソラマメ孔辺細胞プロトプラストにおいて見出された (Kinoshita et al. 2003)。さらなる解析の結果、この 125 kDa タンパク質は、細胞膜に局在し、青色光によりリン酸化されることやその質量から、1997 年にシロイスナズナの光屈性の青色光受容体として同定されたフォトトロピン 1 (phot1) のオーソログであることが推察された (Huala et al. 1997)。フォトトロピンは、質量約 125 kDa の細胞膜結合性タンパク質で、N 末端領域に発色団であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) を結合する LOV ドメイン、C 末端領域に典型的なセリン・スレオニンキナーゼドメインを持つ。青色光を受容すると自身のキナーゼドメイン中のアミノ酸を自己リン酸化することにより活性化し、下流ヘシグナルを伝達する (Inoue et al. 2008)。シロイスナズナには phot1 に加え、フォトトロピン 2 (phot2) も存在する。ソラマメのフォトトロピン抗体を用いた解析の結果、14-3-3 タンパク質と結合するソラマメ孔辺細胞の 125 kDa タンパク質は抗体により認識された。さらに、ソラマメの孔辺細胞には 2 つのフォトトロピン (*yfphot1a* と *yfphot1b*) が発現していることが明らかとなり、孔辺細胞では 2 つのフォトトロピンが重複して機能している可能性が示された (Kinoshita et al. 2003)。そこで、2 つのフォトトロピンの二重変異体の作出されたシロイスナズナを用いた表現型解析が行われ、フォトトロピン二重変異体では青色光による気孔開口も細胞膜 H⁺-ATPase の活性化も見られず、phot1 と phot2 が重複して気孔開口の青色光受容体として機能していることが明らかとなった (Kinoshita et al. 2001, Ueno et al. 2005)。

青色光受容体フォトトロピンから細胞膜 H⁺-ATPase の活性化に至るシグナル伝達については未解明の部分が多い。これまでの研究により、このシグナル伝達には、タイプ 1 プロテインホスファターゼ (PP1) がポジティブレギュレーターとして関与することが示唆されている (Takemiya et al. 2006)。また最近、青色光による気孔開口が損なわれた突然変異体の解析により、フォトトロピンと PP1 の間で働くセリン/スレオニン・プロテインキナーゼ BLUE LIGHT SIGNALING1 (BLUS1) が同定された (Takemiya et al. 2013) (図 2)。BLUS1 は、孔辺細胞の青色光シグナル伝達に必須のシグナル因子と考えられ、青色光に依存してフォトトロピンにより孔辺細胞内でリン酸化される。一方で、BLUS1 はフォトトロピンの関わる光屈性、葉緑体光定位運動や葉の平坦化など他の反応には全く影響を与えることから、孔辺細胞特有の青色光シグナル伝達の構成因子と考えられる。また、細胞膜 H⁺-ATPase の細胞膜への局在化を調節する因子として PATROL1 が同定されている (Hashimoto-Sugimoto et al. 2013)。加えて、光周性花成誘導に関与する FLOWERING LOCUS T (FT), TWIN SYSTER OF FT (TSF), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) などの因子が孔辺細胞にも発現しており、光による気孔開口のポジティブレギュレーターとして間接的に関与していることも示されている。

(Kinoshita et al. 2011, Ando et al. 2013, Kimura et al. 2015)。

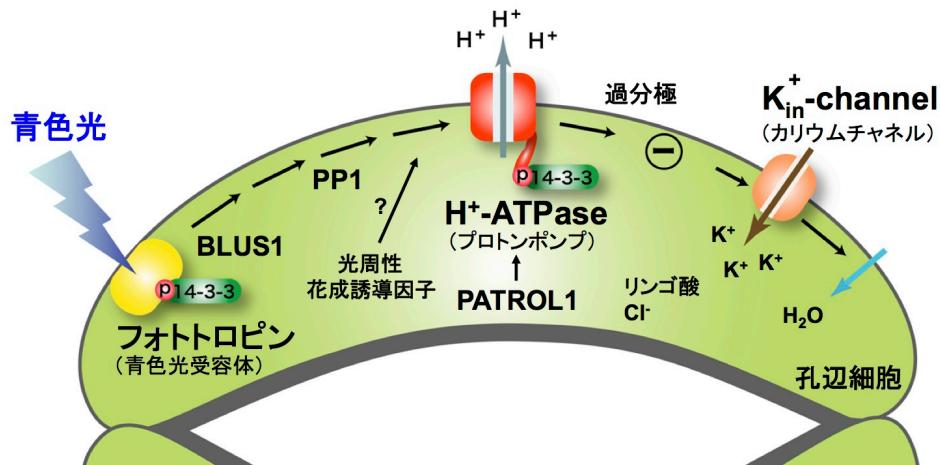


図2. 青色光による気孔開口反応の模式図

BLUS1 : BLUE LIGHT-SIGNALING1, PP1 : タイプ1プロテインホスファターゼ, P : リン酸化

これまで、孔辺細胞の青色光シグナル伝達、特に細胞膜 H⁺-ATPase の活性化機構については、孔辺細胞プロトプラストを用いた生化学的な解析により進められてきた。しかしながら、孔辺細胞プロトプラストを単離するには多くの植物体（シロイヌナズナの場合数千枚のロゼット葉）と長時間の作業（6時間以上）を必要とする。さらに、プロトプラストは等張液に懸濁するため、細胞に浸透圧ストレスや傷害ストレスなどの負荷がかかることが知られている (Leonhardt et al. 2004)。こういった中、私達は、活性化型細胞膜 H⁺-ATPase である C 末端から二番目のリン酸化スレオニン残基を特異的に認識する抗体の作出に成功した (Hayashi et al. 2010)。さらにその抗体を用いた表皮組織における免疫組織染色法を確立することで、シロイヌナズナのロゼット葉1枚～数枚で、気孔孔辺細胞における青色光に依存した細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化を検出することが可能となった (Hayashi et al. 2011)。そこで、この免疫組織染色法を利用し、青色光に依存した細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化が見られない突然変異体の遺伝学的スクリーニングや孔辺細胞の細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化レベルに影響を与える化合物のケミカルスクリーニングに着手し、これまでに幾つかの突然変異体や化合物を単離した。今後は、これら突然変異体の原因遺伝子や化合物の孔辺細胞における標的タンパク質の同定を行い、青色光シグナル伝達における機能を明らかにしていきたい。

2-3. 人為的な気孔開口促進の光合成と生産量への影響

植物が太陽光下で盛んに光合成を行っているとき、多くの二酸化炭素を必要とするが、気孔の孔を通る際に生じる抵抗（気孔抵抗）が二酸化炭素取り込みの主要な制限要因となっており、植物の光合成が制限されていると考えられている (Taiz and Zeiger 2014)。しかし、気孔開度が二酸化炭素取り込みの制限要因であることは実証されていなかった。また、植物の光合成活性をより向上させるためには、気孔の開き具合を大きくし、気孔抵抗を低下させることが解決法として考えられるが、これまでに知られている気孔が大きく開いた既知の突然変異体のほとんどは気孔閉鎖を誘導する植物ホルモン・アブシシン酸関連の変異体であり、それらは乾燥条件下でも気孔を閉じることができないため乾

燥に極端に弱く、表現型が多面的であることから、気孔開度と光合成や生産量との関係を調べるには不向きであった。

そこで私達は、これまでの研究により明らかとなった光による気孔開口反応に関わる主要因子（青色光受容体フォトトロピン、細胞膜 H⁺-ATPase、電位依存性内向き整流 K⁺チャネル、およびFT）をモデル植物シロイヌナズナの孔辺細胞だけに発現量を上昇させ、気孔開口を促進することができるかを調べた。孔辺細胞特異的な発現には、孔辺細胞のみで発現を誘導することができる GCI プロモーターを用いた (Yang et al. 2009)。その結果、気孔開口の駆動力を形成する細胞膜 H⁺-ATPase の孔辺細胞での発現量が約 1.5 倍増加することで、光による気孔の開口が野生株よりも約 25% 大きくなっていた (Wang et al. 2014)。一方、暗条件や気孔を閉じさせる作用のあるアブシシン酸存在下では、H⁺-ATPase 過剰発現株も野生株と同様に気孔が閉鎖しており、光刺激により気孔開口が促進されたときのみ、気孔が大きく開口することが確認された。

そこで、光合成蒸散測定装置を用いて二酸化炭素吸収量（光合成活性）の測定を行った結果、H⁺-ATPase 過剰発現株の生葉では、光強度 200 μmol/m²/s より強い光条件において、二酸化炭素吸収量（光合成活性）が約 15% 増加していた。一方、弱い光条件（光強度 200 μmol/m²/s 以下）では、有意な差は認められなかった。この結果は、植物が光合成を盛んに行っている時に気孔開度が二酸化炭素取り込みの制限要因となることを示している。さらに、植物の生産量について調べたところ、光強度 200 μmol/m²/s の条件において、播種後 25 日目の栄養成長期の植物の地上部の重量は、野生株と比べ、1.4~1.6 倍増加しており、種子を受けた播種後 45 日目の植物の種子や莢を含む花茎の乾燥重量は、約 1.4 倍増加していた（図 3）。しかしながら、光合成活性の結果と一致して、弱い光条件では、生育量に差は見られなかった。

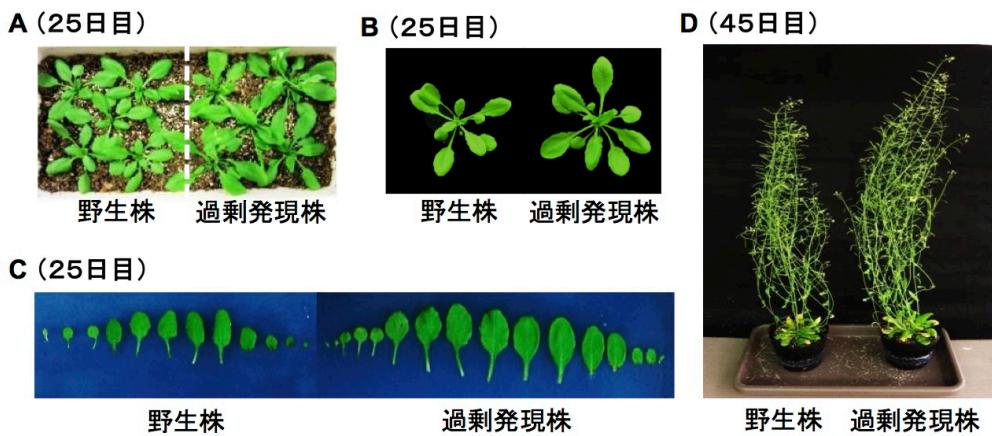


図 3. 孔辺細胞での細胞膜 H⁺-ATPase の過剰発現による植物の成長促進

光強度 200 μmol/m²/s の白色光 (16 時間明期/8 時間暗期) の条件で生育させた播種後 25 日目のシロイヌナズナ (A~C) と播種後 45 日目のシロイヌナズナ (D)。

興味深いことに、活性化型の細胞膜 H⁺-ATPase や FT を過剰発現させた場合は、恒常に気孔が開口した表現型を示したが、水は充分に与えているにも関わらず、生産量は野生株と同じかそれ以下となることが明らかとなった。この結果は、光合成をおこなっていない夜間には、気孔を閉じることが生

産量増加に重要であることを示している。また、青色光受容体フォトトロピンや電位依存性内向き整流 K⁺チャネルの孔辺細胞での過剰発現は、気孔の開口や植物の生産量に影響がなかった。以上の研究により、気孔開口促進には孔辺細胞における細胞膜 H⁺-ATPase の過剰発現が有用であること、さらに気孔開度が光合成と生産量の制限要因となっていることが実証された (Wang et al. 2014)。Hashimoto-Sugimoto ら (2013) は、細胞膜 H⁺-ATPase の細胞膜への局在化を調節する因子 PATROL1 の植物体全体での過剰発現株により気孔開口が促進され、植物の生産量が増加することを報告している。

3. 気孔閉鎖のシグナル伝達

3-1. アブシシン酸による気孔閉鎖

植物が乾燥に曝されると、細胞の水分が欠乏し、浸透圧ストレスを生じる。植物が浸透圧ストレスを受けると植物ホルモンであるアブシシン酸が細胞内に蓄積し、ストレス応答性遺伝子の発現誘導や気孔閉鎖など様々な生理応答が引き起こされ、植物に乾燥耐性が付与される。アブシシン酸による気孔閉鎖は、アブシジン酸の初期シグナル伝達を経て、孔辺細胞の細胞膜に存在する陰イオンチャネルが活性化されることで細胞膜の脱分極が引き起こされ、これに応答して同じく細胞膜に存在する電位依存性の外向き整流性 K⁺チャネルが開口して、孔辺細胞から K⁺が排出されることにより引き起こされる (Kim et al. 2010)。

アブシシン酸シグナル伝達経路の最上流に位置するアブシシン酸受容体は、近年、Pyrabactin Resistance / Pyrabactin Resistance 1-like / Regulatory Component of ABA Receptor (PYR/PYL/RCAR) ファミリーのタンパク質がアブシシン酸受容体として、種子発芽や根の生育の阻害、気孔閉鎖など様々なアブシシン酸応答に関与することが証明された (Park et al. 2009, Nishimura et al. 2010, Cutler et al. 2010)。このファミリーのタンパク質は、孔辺細胞においてアブシシン酸を受容すると、アブシシン酸シグナルの負の制御因子である PP2C の A サブファミリーの ABI1 や ABI2 等と直接結合し、PP2C 活性を抑制する。その結果、アブシシン酸の少ない定常状態では PP2C により抑制されていた OST1 等のサブクラス III の SNF-related kinase 2 (SnRK2) のプロテインキナーゼ活性の抑制が解除される (PYR/PYL/RCARs-PP2Cs-SnRK2s 経路) (Cutler et al. 2010)。活性化された SnRK2 は、陰イオンチャネルの実体と考えられる SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 (SLAC1) を活性化し、Cl⁻等の陰イオンの細胞外への放出を引き起こし、細胞膜の脱分極を誘導する (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008, Geiger et al. 2009, Lee et al. 2009)。また、アブシシン酸は、過分極を引き起こす細胞膜 H⁺-ATPase 活性を同時に阻害することにより、脱分極を促進していることが示されている (Shimazaki et al. 2007, Hayashi et al. 2011)。さらに、気孔開口に関与する内向き整流性 K⁺チャネル遺伝子の転写を制御する bHLH 型転写因子である ABA-responsive kinase substrates (AKSs) が、アブシシン酸に応答して孔辺細胞内でリン酸化され、内向き整流性 K⁺チャネルの転写を阻害することが示された (Takahashi et al. 2013)。このようにアブシシン酸は、気孔閉鎖に関わる因子への働きかけだけでなく、気孔開口に関与する因子の活性や発現量を抑制することで効率的に気孔閉鎖を誘導していると考えられる。

これまでの多くの研究により、孔辺細胞におけるアブシシン酸シグナル伝達経路には、カルシウム、活性酸素種、一酸化窒素、ホスファチジン酸、イノシトール誘導体、スフィンゴ脂質等のセカンドメッセンジャーが関与していることも報告されている (Kim et al. 2010)。また、近年、クロロフィルの

生合成に関与する Mg-キラターゼがアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することが報告されている (Shen et al. 2006, Tsuzuki et al. 2011, Du et al. 2012, Tomiyama et al. 2014)。

3-2. Mg-キラターゼの気孔閉鎖への関与

アブシシン酸に誘導される気孔閉鎖への Mg-キラターゼの影響については、近年複数の報告がなされている。Shen ら (2006) は、アブシシン酸結合タンパク質の解析により、シロイヌナズナの Mg-キラターゼの H サブユニット (CHLH) がアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することを報告した。同じく、Tsuzuki ら (2011) もアブシシン酸非感受性の気孔開度変異体の解析から、CHLH がアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することを報告した。しかしながら、Shen ら (2006) は CHLH がアブシシン酸の受容体であると報告した一方で、オオムギの CHLH はアブシシン酸とは結合せず (Müller and Hansson 2009)，また、シロイヌナズナの CHLH もアブシシン酸との特異的な結合を示さないことが報告されており (Tsuzuki et al. 2011)，CHLH がアブシシン酸の受容体であるかどうかについては議論の余地がある。Tsuzuki ら (2011) は、細胞外のカルシウム濃度を増加させると *chlh* 変異体の気孔におけるアブシシン酸感受性が部分的に回復することを報告しており、CHLH はアブシシン酸シグナル伝達におけるカルシウム・ホメオスタシスに影響している可能性が示唆されている。

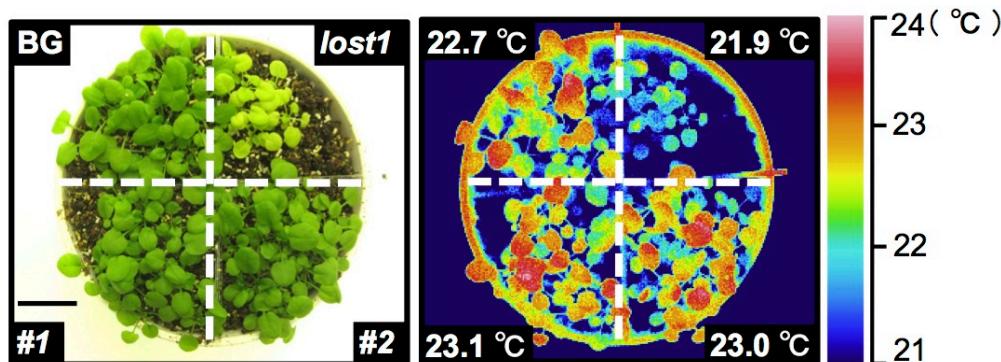


図 4. 赤外線サーモグラフィを用いたスクリーニングによって単離された気孔開度変異体 *low temperature with open-stomata 1 (lost1)* の明視野画像（左）と対応する熱画像（右）

lost1 変異体は恒常に気孔が開口しており、背景植物 (BG) と比べて葉面温度が低下している。#1 と #2 は野生型 *CHLI1* 遺伝子を *lost1* 変異体に形質転換した相補株 *pCHLI1::gCHLI1/lost1* の独立した 2 系統。相補株では、葉が緑色になり、葉面温度も背景植物と同程度にまで回復していることから、クロロフィル生合成と気孔開度の表現型がともに相補されたことがわかる。図中の温度は各系統の典型的な葉面温度を、スケールバーは 2 cm を示している。

興味深いことに、Tomiyama ら (2014) は、赤外線サーモグラフィにより単離した気孔開度変異体の解析から、Mg-キラターゼの I1 サブユニット (CHLI1) がアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することを報告した (図 4)。Mg-キラターゼはクロロフィル生合成に関わる酵素であり、CHLH と CHLI に CHLD を加えた 3 つのサブユニットからなる複合体を形成して働く (Bollivar 2006, Masuda 2008)。従ってこれまでの知見は、Mg-キラターゼやそれが関わるクロロフィル生合成がアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することを示唆している。

加えて、Tomiyama ら (2014) は、クロロフィル生合成経路において Mg-キラターゼの次の反応を触媒する酵素 Mg-プロトポルフィリン IX メチルトランスフェラーゼ (CHLM) の変異体の解析を行い、*chl*m 変異体の気孔ではアブシシン酸に対して非感受性を示すことから、CHLM が Mg-キラターゼと同じくアブシシン酸による気孔閉鎖に関与することを初めて明らかにした。さらに Tomiyama ら (2014) は、クロロフィル生合成と前駆体を共有するヘム生合成に関わる変異体の解析を進め、ヘム生合成に関わる酵素である GUN2 や GUN3 の変異体の気孔もアブシシン酸に対する感受性が低下していることを示した。これらの結果は、クロロフィルやヘムの生合成を含むテトラピロール生合成がアブシシン酸による気孔閉鎖に関与する可能性を新たに示唆するものであり、今後、分子機構の解明が待たれる。一方で、GUN2 と GUN3 については、それらの変異体の気孔では正常なアブシシン酸感受性を示すとする報告 (Shen et al. 2006) や、GUN2 の変異体の気孔応答はむしろアブシシン酸高感受性を示すという報告もあり (Xie et al. 2016)，これらの結果も考慮した慎重な解析が求められる。

3-3. 気孔閉鎖促進による植物へ乾燥耐性付与

土壤水分が不足してくると、気孔は植物体内で合成された植物ホルモン・アブシシン酸に応答してすばやく閉鎖し、植物体からの水分損失を防ぐ。アブシシン酸のシグナル伝達が異常になった突然変異体やアブシシン酸生合成能を欠いた突然変異体は、乾燥条件下でも気孔を閉じることができず、すぐに萎れる。Tsuzuki ら (2013) は、アブシシン酸による気孔閉鎖に影響を与える CHLH のシロイヌナズナの孔辺細胞における発現量を調節した形質転換体を作出し、気孔の表現型の観察を行った。その結果、RNAi により CHLH の発現量が低下するとアブシシン酸に対する感受性が低下し、一方、過剰発現により CHLH の発現量を増加させると、野生株では部分的にしか気孔閉鎖を誘導しない $1 \mu\text{M}$ アブシシン酸によっても有意に気孔閉鎖が促進され、アブシシン酸に対する感受性が増加することが示された。

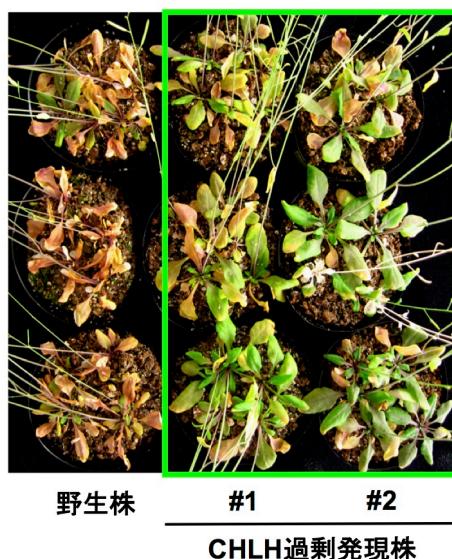


図 5、CHLH 過剰発現による植物への乾燥耐性の付与

通常条件下で 3 週間生育後、18 日間水やりを停止した時の植物体の写真。#1 と #2 は独立した CHLH 過剰発現株。

そこで、CHLH 過剰発現株における乾燥耐性が調べた結果、通常、野生株では枯死してしまう乾燥条件下においても、CHLH 過剰発現株では依然葉が緑で成長していた（図 5）。以上の結果は、孔辺細胞のアブシシン酸に対する感受性を高めることで、植物の乾燥耐性が向上することを初めて実証し、CHLH を孔辺細胞に過剰発現させることが有用であることを示している。

4. 植物の環境応答の統合的解析

気孔孔辺細胞は周囲の様々な環境刺激に敏感に応答して気孔開度を調節するが、これまでもっぱら、単離した孔辺細胞を用いて細胞内における一過的なシグナル伝達（局所的・自律的応答）の解析に主眼が置かれてきた。しかしながら、本来植物は周囲の様々な環境刺激を全身で受容し、それらの情報を、長距離シグナル伝達を介して各組織や細胞に伝え、また何らかの形でそれらの情報を記憶することで、巧みに環境応答を行っていると考えられる。気孔孔辺細胞における例としては、土壤の窒素やリン含量が低下すると気孔コンダクタンスが低下し、再添加すると気孔コンダクタンスが回復することが報告されている（Carvajal et al. 1996）。これには、維管束を介した根から孔辺細胞への長距離シグナル伝達が行われていると考えられるが、その分子機構は全く不明である。また、一度乾燥ストレスを与えた植物では気孔閉鎖が促進されるが、水分状態を戻してもすぐに気孔開度は回復しない。さらに、このような植物では、2 度目の乾燥ストレスに対してより敏感に応答することが知られており、孔辺細胞は一度目の乾燥ストレスを何らかの形で記憶する機構を備えていると考えられる。Virlouvet ら（2014）は、サブクラス III の SnRK2 のプロテインキナーゼである SnRK2.2 と SnRK2.3 がこの記憶に重要な役割を果たしていることを報告しているが、具体的な分子機構は明らかとなっていない。今後は、これまでの局所的・自律的応答の解析のみならず、上述したような長距離シグナル伝達や環境刺激の記憶の関与の可能性を含めた統合的な視点から解析を進めることにより、ダイナミックな植物の環境応答の全容が明らかになると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「植物の環境突破力」、及び「環境記憶統合」の支援を得て遂行した。

5. 引用文献

- Ando, E., Ohnishi, M., Wang, Y., Matsushita, T., Watanabe, A., Hayashi, Y., Fujii, M., Ma, J.F., Inoue, S., & Kinoshita, T. 2013. *TWIN SISTER OF FT, GIGANTEA, and CONSTANS* have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 162: 1529-1538.
- Bollivar, D.W. 2006. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 90: 173–194.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.P., & Abrams, S.R. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 651-679.
- Carvajal, M., Cooke, D.T., & Clarkson, D.T. 1996. Responses of wheat plants to nutrient deprivation

- may involve the regulation of water-channel function. *Planta* 199: 372–381.
- Du, S.Y., Zhang, X.F., Lu, Z., Xin, Q., Wu, Z., Jiang, T., Lu, Y., Wang, X.F., & Zhang, D.P. 2012. Roles of the different components of magnesium chelatase in abscisic acid signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 80: 519–537.
- Duby, G., & Boutry, M. 2009. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Arch.* 457: 645–655.
- Falhof, J., Pedersen, J.T., Fuglsang, A.T., & Palmgren, M. 2016. Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of Plant Physiology. *Mol. Plant* in press.
- Virlouvet, L., & Fromm, M. 2014. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytol.* 205: 596–607.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A., Romeis, T., & Hedrich, R. 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 21425–21430.
- Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M., Fujimi, M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasegawa, S., & Iba, K. 2013. A Munc13-like protein in Arabidopsis mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nat. commun.* 4: 2215.
- Hayashi, M., Inoue, S., Takahashi, K., & Kinoshita, T. 2011. Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* 52: 1238–1248.
- Hayashi, Y., Nakamura, S., Takemiya, A., Takahashi, Y., Shimazaki, K., & Kinoshita, T. 2010. Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol.* 51: 1186–1196.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., & Briggs, W.R. 1997. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120–2123.
- Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., & Shinozaki, K. 2008. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5626–5631.
- Kim, T.H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J.I. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 561–591.
- Kimura, Y., Aoki, S., Ando, E., Kitatsuji, A., Watanabe, A., Ohnishi, M., Takahashi, K., Inoue, S., Nakamichi, N., Tamada, Y., Kinoshita, T. 2015. A flowering integrator, SOC1, affects stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56: 640–649.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., & Shimazaki, K. 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656–660.
- Kinoshita, T., Emi, T., Tomonaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., & Shimazaki, K. 2003. Blue light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal

- guard cells of broad bean. *Plant Physiol.* 133: 1453-1463.
- Kinoshita, T., Ono, N., Hayashi, Y., Morimoto, S., Nakamura, S., Soda, M., Kato, Y., Ohnishi, M., Nakano, T., Inoue, S., & Shimazaki, K. 2011. *FLOWERING LOCUS T* regulates stomatal opening. *Curr. Biol.* 21: 1232-1238.
- Kinoshita, T., & Shimazaki, K. 1999. Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18: 5548-5558.
- Kinoshita, T., & Shimazaki, K. 2002. Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol.* 43: 1359.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., & Luan, S. 2009. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 21419-21424.
- Legnaioli, T., Cuevas, J., & Mas, P. 2009. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J.* 28: 3745-3757.
- Leonhardt, N., Kwak, J. M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., & Schroeder, J.I. 2004. Microarray expression analyses of arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C Mutant. *Plant Cell* 16: 596-615.
- Masuda, T. 2008. Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls. *Photosynth. Res.* 96: 121-143.
- Müller, A.H., & Hansson, M. 2009. The barley magnesium chelatase 150-kD subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol.* 150: 157-166.
- Murata, Y., Mori, I.C., & Munemasa, S. 2015. Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 369-392.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., & Iba, K. 2008. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., & Schroeder, J.I. 2010. PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J.* 61: 290-299.
- Palmgren, M.G. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu J.K., Schroeder J.I., Volkman, B.F., & Cutler, S.R. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071.
- Shen, Y., Wang, X., Wu, F., Du, S., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X., Peng, C., Yu, X., Zhu, S., Fan, R., Xu, Y., & Zhang, D. 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443:

823–826.

- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., & Kinoshita T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 219-247.
- Spartz. A.K., Ren. H., Park. M.Y., Grandt. K.N., Lee. S.H., Murphy. A.S., Sussman. M.R., Overvoorde. P.J., & Gray W.M. 2014. SAUR Inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2129–2142.
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oecking, C., & Sommarin, M. 1999. Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11: 2379-2391.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (eds.) 2014. “Plant Physiology and Development,” 6th Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Takahashi, K., & Kinoshita, T. 2016. The regulation of plant cell expansion—auxin-induced turgor-driven cell elongation. Rose, R.J. (ed.) *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells*. in press. CRC press
- Takahashi, Y., Ebisu, Y., Kinoshita, T., Doi, M., Okuma, E., Murata, Y., & Shimazaki, K. 2013. bHLH transcription factors that facilitate K⁺ uptake during stomatal opening are repressed by abscisic acid through phosphorylation. *Sci. Sig.* 6: ra48.
- 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.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J.M., & Shimazaki, K. 2013. Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* 4: 2094.
- Tomiyama, M., Inoue, S., Tsuzuki, T., Soda, M., Morimoto, S., Okigaki, Y., Ohishi, T., Mochizuki, N., Takahashi, K., & Kinoshita, T. 2014. Mg-chelatase I subunit 1 and Mg-Protoporphyrin IX methyltransferase affect the stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 127: 553-563.
- Tsuzuki, T., Takahashi, K., Inoue, S., Okigaki, Y., Tomiyama, M., Hossain, M.A., Shimazaki, K., Murata, Y., & Kinoshita, T. 2011. Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 124: 527-538.
- Tsuzuki, T., Takahashi, K., Tomiyama, M., Inoue, S., & Kinoshita, T. 2013. Overexpression of the Mg-chelatase H subunit in guard cells confers drought tolerance via promotion of stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 4: 440.
- Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T., & Shimazaki, K. 2005. Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* 46: 955-963.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.F., Nishimura, N., Chan, W.Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J.I., & Kangasjärvi, J. 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452, 487-491.

- Virlouvet, L., & Fromm, M. 2015. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytol.* 205: 596–607.
- Wang, Y., Noguchi, K., Ono, N., Inoue, S., Terashima, I., & Kinoshita, T. 2014. Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 533-538.
- Willmer, C., & Fricker, M. 1996. "Stomata" 2nd edition, Springer.
- Xie, Y., Mao, Y., Duan, X., Zhou, H., Lai, D., Zhang, Y., Shen, W. 2016. Arabidopsis *HY1*-modulated stomatal movement: An integrative hub is functionally associated with *ABI4* in dehydration-induced ABA responsiveness. *Plant Physiol.* 170: 1699-1713.
- Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R.S., & Schroeder, J.I. 2008. Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Method* 4: 6.