

# 高 CO<sub>2</sub> 固定植物の作出に向けた気孔エンジニアリング技術の創出

研究代表者

桧垣 匠 熊本大学国際先端科学技術研究機構 准教授



## 1. 研究の背景と達成目標

近年の大気 CO<sub>2</sub> 濃度の急上昇を軽減すべく、本研究では植物の CO<sub>2</sub> 固定能を向上させる基盤技術の創出を目指した。具体的には、研究代表者らが同定した気孔開閉運動制御因子 PATROL1 の相互作用因子群を明らかにし、遺伝学的改変によって悪環境耐性植物の作出に資する分子実体を同定することを目的とした。

達成目標として、①抗 GFP 抗体を用いて GFP-PATROL1 の共免疫沈降物試料を得て、この試料からペプチドマスフィンガープリンティングによりプロテインスコアの閾値（有意水準 5%）を超えるタンパク質を同定すること、②共焦点レーザー顕微鏡により蛍光タンパク質標識した PATROL1 相互作用因子の細胞内局在を明らかにすること（独立した 2 ライン以上の形質転換植物の作出、50 細胞以上の蛍光画像取得）、③PATROL1 相互作用因子の過剰発現シロイヌナズナ（独立した 2 ライン以上）を作出し、悪環境条件における植物体（野生株と過剰発現株、それぞれ 10 個体以上）の地上部の生重量を計測すること、を設定した。

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ PATROL1 の相互作用因子群の同定に成功した。興味深いことに、相互作用因子群の中に微小管の構成タンパク質であるチューブリン (tubulin) が含まれることが判明し、以降は tubulin を主な解析対象とした。
- ・ GFP-PATROL1 と RFP-tubulin を同時に発現するシロイヌナズナ形質転換体を確立し、共焦点レーザー顕微鏡と画像解析により両者の共局在性を検討したところ、細胞膜直下の微小管と GFP-PATROL1 で標識されるドット状構造が共局在していることが判明した。
- ・ 悪環境条件における GFP-tubulin あるいは RFP-tubulin 発現体の地上部生重量を計測したところ、有意な差は認められなかった。その一方で、薬剤を用いて微小管を破壊した場合に気孔開閉運動が損なわれることが判明し、微小管が PATROL1 依存的な気孔開閉運動に関与していることが明らかとなった。
- ・ 以上の成果は高 CO<sub>2</sub> 固定植物の作出に向けて微小管が改変対象として有望である可能性を示すものである。

## 3. 研究成果

抗 GFP 抗体による共免疫沈降とペプチドマスフィンガープリンティングにより、PATROL1 の相互作用因子群を同定した。興味深いことに、この中に微小管の構成タンパク質である tubulin が含まれることが判明し、以降は tubulin に注目した解析を実施した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP-PATROL1 および RFP-tubulin を同時に発現するシロイヌナズナ子葉の表層部を観察したところ、GFP-PATROL1 で標識されたドット状構造(GFP-PATROL1 ドット)) と RFP-tubulin で標識された表層微小管が部分的に共局在していた (図 1 A)。両者の共局在性は画像解析によって定量的・統計的にも確認された。また、植

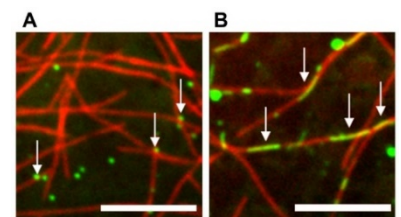


図 1. 通常条件 (A) および塩ストレス条件下 (B) で栽培した子葉表皮細胞における GFP-PATROL1 (緑) と RFP-tubulin (赤) の局在. Bar = 2  $\mu$ m.

物に塩ストレス処理を施したところ、GFP-PATROL1 ドット構造の一部が表層微小管に沿った桿状に変形することも明らかになり (図 1B)、生細胞内において PATROL1 と tubulin が相互作用する可能性が示唆された。次に、乾燥条件あるいは短日条件で栽培した GFP-tubulin および RFP-tubulin 発現体の地上部生重量を計測したところ、野生株と比較して顕著な差は認められなかった。その一方で、tubulin 重合阻害剤である propyzamide を用いて微小管を破壊した場合、乾燥ストレスあるいは暗所処理による気孔閉鎖運動が阻害されること、また気孔開口運動に必須であるプロトンポンプ AHA1 の細胞膜輸送が損なわれることが明らかとなった。以上の成果は、微小管が PATROL1 依存的な気孔開閉運動に関与することを示唆するものである。

#### 4. 今後の展開

従来、植物細胞の細胞膜直下に局在する微小管は細胞壁成分の沈着の制御が主な役割と考えられていたが、本研究によりはじめてプロトンポンプの細胞膜輸送を介した気孔開閉運動にも微小管が寄与することが明らかとなった。微小管の高次構造変化には微小管結合タンパク質の重要性が広く認められている。今後、微小管結合タンパク質が高 CO<sub>2</sub> 固定植物の作出に資す分子標的となるか、実証実験を進めていく必要がある。

#### 5. 発表実績

- Akita K, Higaki T (2019) An induction system for clustered stomata by sugar solution immersion treatment in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Vis Exp* 144: e58951.
- Nagashima A, Higaki T, Koeduka T, Ishigami K, Hosokawa S, Watanabe H, Matsui K, Hasezawa S, Touhara K (2019) Transcriptional regulators involved in responses to volatile organic compounds in plants. *J Biol Chem* 294: 2256-2266. (Cover Page)
- Kimata Y, Kato T, Higaki T, Kurihara D, Yamada T, Segami S, Morita MT, Maeshima M, Hasezawa S, Higashiyama T, Tasaka M, Ueda M (2019) Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of *Arabidopsis* zygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 2338-2343.
- Hirano T, Konno H, Takeda S, Dolan L, Kato M, Aoyama T, Higaki T, Takigawa-Imamura H, Sato MH (2018) PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> mediates root hair shank hardening in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 4: 888?897.
- Takatsuka H, Higaki T, Umeda M (2018) Actin reorganization triggers rapid cell elongation in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 178: 1130-1141.
- Akita K, Hasezawa S, Higaki T (2018) Cortical microtubules and fusicoccin response in clustered stomatal guard cells induced by sucrose solution immersion. *Plant Sig Behav* 13: 1454815.
- Dou L, He K, Higaki T, Wang X, Mao T (2018) Ethylene signaling modulates cortical microtubule reassembly in response to salt stress. *Plant Physiol* 176: 2071-2081.
- Takahashi S, Monda K, Higaki T, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Hasezawa S, Iba K (2017) Differential effects of phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) and 3-Kinase (PI3K) inhibitors on stomatal responses to environmental signals. *Front Plant Sci* 8: 677.
- Higaki T (2017) Quantitative evaluation of cytoskeletal organizations by microscopic image analysis. *Plant Morpho* 29:15-21.
- 桧垣 匠 定量的画像解析に基づく植物細胞骨格の研究 日本植物学会第 81 回大会 東京理科大学野田キャンパス (千葉県野田市) 2017 年 9 月 (日本植物学会奨励賞受賞講演)