

<h2 style="margin: 0;">学位論文要旨</h2> <p style="margin: 0;">(Summary of the Doctoral Dissertation)</p>	
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">(Dissertation Title)</p>	<p style="text-align: center;">Studies on Molecular Mechanisms of Light-Induced Stomatal Opening via Phosphorylation of the C-Terminal Auto-Inhibitory Domain of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase</p> <p style="text-align: center;">(細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の C 末端自己阻害ドメインのリン酸化を介した光に応答した気孔開口の分子機構の研究)</p>
<p style="text-align: center;">氏名 (Name)</p>	<p style="text-align: center;">FUJI Saashia</p>
<p>Stomata, tiny pores on leaf surfaces, are crucial for gas exchange between plants and the atmosphere, regulating CO<sub>2</sub> uptake for photosynthesis and transpiration for nutrient delivery. Stomatal opening is triggered by light, involving two distinct mechanisms. The mechanisms: the red light response, where high-intensity red light drives photosynthesis, and the blue light response, where low-intensity blue light acts as a signal. This blue light response is amplified by background red light, resulting in a larger stomatal aperture when both wavelengths are present synergistically. This synergy is partially attributed to the interaction between phototropin-mediated responses and the reduction of intercellular CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>i</sub>) due to photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. Phototropins, plant-specific blue light receptors, consist of LOV domains and a kinase domain. Blue light perception activates the kinase domain, leading to autophosphorylation, a prerequisite for various phototropin-mediated responses, including stomatal opening, phototropism, chloroplast movements, and leaf expansion. Phototropins then phosphorylate downstream substrates to transmit light signals intracellularly. The signals activate plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, a conserved electrogenic pump, creates an electrochemical H<sup>+</sup> gradient for various transport processes. In <i>Arabidopsis thaliana</i>, 11 H<sup>+</sup>-ATPase genes (<i>AHA1-AHA11</i>) have been identified, expressed in various cell types, including guard cells. The H<sup>+</sup>-ATPase has transmembrane segments and cytoplasmic domains responsible for catalytic activity, with a C-terminal autoinhibitory domain. Blue light induces phosphorylation of the penultimate Thr residue and 14-3-3 protein binding, potentially reversing autoinhibition and activating H<sup>+</sup>-ATPase. However, the mechanism by which H<sup>+</sup>-ATPase activation remains unclear.</p> <p>In chapter I, we performed phosphoproteome analysis using Arabidopsis guard cell protoplasts and identified a novel phosphorylation site, Thr-881 of H<sup>+</sup>-ATPase in response to blue light, in addition to the penultimate Thr-948. To study the physiological significance of the phosphorylation of AHA1 at Thr-881 and Thr-948 in stomatal response, we produced transgenic plants expressing each non-phosphorylatable form of AHA1 (T881A and T948A) in <i>aha1-9</i>. Functional analysis revealed that phosphorylation of Thr-881 and Thr-948 are essential for blue light-dependent H<sup>+</sup>-ATPase activation and stomatal opening. Furthermore, the blue light-driven phosphorylation of Thr-881 is dependent on the phosphorylation state of Thr-948. And the H<sup>+</sup>-ATPase full activation requires the phosphorylation of both Thr-881 and Thr-948. Finally, it was discovered that Thr-881 is also phosphorylated in response to red light and it is indicated that photosynthesis-induced phosphorylation of Thr-881 in guard cell activate H<sup>+</sup>-ATPase. This research revealed novel blue light and red light-induced activation mechanisms of H<sup>+</sup>-ATPase.</p>	

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)

(about 800 words)

In chapter II, we investigate the mechanism of these phosphorylations of H<sup>+</sup>-ATPase and conducted a genetic mutant screening using thermal imaging, due to transpiration associated with stomatal opening. We identified a mutant, named G26-51, which showed reduced H<sup>+</sup>-ATPase activation and stomatal opening in response to blue light. In this mutant, phosphorylation of both Thr-881 and Thr-948 in response to blue light was inhibited, and phosphorylation of Thr-948 by fusicoccin, promotes phosphorylation of the penultimate Thr leading to irreversible phosphorylation and subsequent binding to 14-3-3 proteins was also impaired. G26-51 also exhibited reduced guard cell photosynthesis-induced phosphorylation of Thr-881 and stomatal opening, suggesting impairments in the peripheral phosphorylation processes of H<sup>+</sup>-ATPase activation in response to light.

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	富士 彩紗
審 査 委 員	主 査： 武宮 淳史
	副 査： 三角 修己
	副 査： 真野 純一
	副 査： 松井 健二
	副 査： 妻鹿 良亮
論 文 題 目	<p>Studies on Molecular Mechanisms of Light-Induced Stomatal Opening via Phosphorylation of the C-Terminal Auto-Inhibitory Domain of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase (細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の C 末端自己阻害ドメインのリン酸化を介した光に応答した気孔開口の分子機構の研究)</p>
<p><b>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</b></p> <p>本研究では、植物の光による気孔開口の駆動力形成を担う細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の活性制御機構の解明を目的に研究を行い、C 末端の自己阻害領域に存在する 2 カ所の Thr 残基が青色光および光合成に依存してリン酸化されること、これらのリン酸化が H<sup>+</sup>-ATPase の活性化と気孔開口に必須であることを明らかにした。</p> <p>第一章では、青色光に応答した気孔開口に関与する重要因子・メカニズムの同定を目的として、シロイヌナズナの孔辺細胞プロトプラストを用いたリン酸化プロテオーム解析を行い、細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の自己阻害領域内の Thr-881 と Thr-948 が青色光に応答してリン酸化されることを見出した。これらのリン酸化の機能的意義を明らかにするため、Thr-881 と Thr-948 をそれぞれ Ala に置換した非リン酸化体を作製し機能解析を進め、これらの 2 カ所の Thr 残基のリン酸化が青色光による H<sup>+</sup>-ATPase の活性化と気孔開口に必須であることを示した。非リン酸化体を用いた生化学的解析とリン酸化タイムコースの詳細な解析から、青色光に反応してまず Thr-948 がリン酸化されること、このリン酸化に依存して上流の Thr-881 がリン酸化されることを示した。さらに Thr-881 を酸性アミノ酸である Asp に置換した擬似リン酸化体の機能解析から、Thr-881 単独のリン酸化でも H<sup>+</sup>-ATPase を活性化しうるが、完全な活性化には Thr-881 と Thr-948 の両方のリン酸化が必要であることを示した。さらに本研究を進める中で、Thr-881 が青色光のみならず孔辺細胞の光合成に依存してリン酸化されることを見出し、このリン酸化は光合成による気孔開口の素早い誘導に寄与することを示した。以上の研究を通じて、細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase の光活性化の詳細な仕組みを示し、気孔開口の駆動力形成の理解に進展をもたらした。</p>	

第二章では、サーマルイメージングによって単離された気孔開口変異体の機能解析を行い、青色光に応答した Thr-881 と Thr-948 のリン酸化が阻害された変異体を見出した。この変異体では青色光に加えて、光合成に依存した Thr-881 のリン酸化や fusicoccin による Thr-948 のリン酸化が阻害されることを示した。以上の解析から、この変異体では  $H^+$ -ATPase のリン酸化が特異的に阻害されている可能性が示唆され、本変異体の原因遺伝子の同定は、 $H^+$ -ATPase の活性制御機構の理解に更なる進展をもたらすことが期待される。

細胞膜  $H^+$ -ATPase は植物における主要な一次輸送体であり、物質輸送や膜電位、細胞内 pH の制御など、生存に必須の役割をもつ。Thr-881 と Thr-948 は植物の  $H^+$ -ATPase に進化的に高度に保存されており、本研究で見出された 2 カ所の Thr 残基のリン酸化を介した  $H^+$ -ATPase の活性制御機構は、孔辺細胞に限らず、植物の  $H^+$ -ATPase に普遍的な活性制御機構である可能性がある。本知見は、基礎研究に留まらず、 $H^+$ -ATPase の活性を人為的に向上させた作物の開発など、地球規模での食糧問題の解決に貢献することが期待される。

公聴会では、2 カ所の Thr 残基のリン酸化の機能的意義、他の植物種におけるリン酸化の可能性、変異体の原因遺伝子の実体について、応用展開を見据えたメリット・デメリットなど、幅広い観点からの質問を受けた。いずれの質問に対しても発表者からの確かな回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士(生命科学)の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。(関連論文 計 3 編)

- 1) Saashia Fuji, Shota Yamauchi, Naoyuki Sugiyama, Takayuki Kohchi, Ryuichi Nishihama, Ken-ichiro Shimazaki & Atsushi Takemiya, Light-induced stomatal opening requires phosphorylation of the C-terminal auto-inhibitory domain of plasma membrane  $H^+$ -ATPase, *Nature Communications*, 15, 1195, 2024
- 2) Nanaka Murakami, Saashia Fuji, Shota Yamauchi, Sakurako Hosotani, Jun'ichi Mano & Atsushi Takemiya, Reactive Carbonyl Species Inhibit Blue-Light-Dependent Activation of the Plasma Membrane  $H^+$ -ATPase and Stomatal Opening, *Plant Cell Physiology*, 63, 8, 1168-1176, 2022
- 3) Sakurako Hosotani, Shota Yamauchi, Haruki Kobayash, Saashia Fuji, Shigekazu Koya, Ken-ichiro Shimazaki & Atsushi Takemiya, A BLUS1 kinase signal and a decrease in intercellular  $CO_2$  concentration are necessary for stomatal opening in response to blue light, *Plant Cell*, 33, 1813-1827, 2021