2. 基礎研究から応用展開に向けて (a) 包括的構造生物学基礎研究

ジベレリン受容体のジベレリン識別とエフェクター認識

奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 箱嶋敏雄, 村瀬浩司, 平野良憲

Department of Biology, Duke University Tai-ping SUN

Toshio HAKOSHIMA, Kohji MURASE, Yoshinori HIRANO and Tai-ping SUN:
Gibberellin Perception by the Gibberellin Receptor and its Effector Recognition

Gibberellins control a diverse range of growth and developmental processes in higher plants and have been widely utilized in the agricultural industry. By binding to a nuclear receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), gibberellins regulate gene expression by promoting degradation of the transcriptional regulator DELLA proteins. The precise manner in which GID1 discriminates and becomes activated by bioactive gibberellins for specific binding to DELLA proteins remains unclear. We present the crystal structure of a ternary complex of *Arabidopsis thaliana* GID1A, a bioactive gibberellin and the N-terminal DELLA domain of GAI. In this complex, GID1a occludes gibberellin in a deep binding pocket covered by its N-terminal helical switch region, which in turn interacts with the DELLA domain containing DELLA, VHYNP and LEXLE motifs. Our results establish a structural model of a plant hormone receptor which is distinct from the hormone-perception mechanism and effector recognition of the known auxin receptors.

1. はじめに

植物ホルモンの研究は長い歴史をもつが, その分子の基盤が解明され始めたのは最近のことである. 現在, 7種類の低分子量植物ホルモン(オーキシン, ジベレリン, ジャスモン酸, ブラシノステロイド, アブシシン酸, サイトカイニン, そしてエチレン)が認知されており, 受容体もすでに単離されている.¹⁾ これに, サリチル酸やNO(一酸化窒素), さらに, 最新の知見であるストリゴラクトンを加えると, 10種類ということになる.²⁾ 現代の優れた質量分析などの分析技術と強力な分子遺伝学的な手法を背景に, 今後, さらに新規の植物ホルモンが続々と発見されるかもしれない.

ジベレリン(gibberellin, GA)は, 発芽・生長・開花・結実の促進などの生理作用をもつきわめて重要な植物ホルモンであり, 農業・園芸への応用範囲も広い. 例えば, 種なしブドウは, ジベレリンの結実の促進作用を応用して作られることはよく知られている. また, 戦後(1940~1960年代)の食糧危機を救うために, 品種改良で生み出された半矮性(semi-dwarf, 背丈がやや低い)が穂はほぼ正常)の小麦やトウモロコシあるいはイネは, 倒伏しにくいために風災害に強く, 飛躍的な穀物増産に寄与した. この半矮性は, 実は, ジベレリンの生長作用を抑えた変異体であることが後に判明していた. そのために, 受容体やその制御因子の三次元構造の決定は, 学会・産業界の両者から切望されていた. ちなみに, 戦後食糧危機の回避は, 緑の

革命(green revolution)と呼ばれており, 「奇跡の麦」を作出して先陣を切ったNorman E. Borlaugは「歴史上のどの人物よりも多くの命を救った」として, 1970年にノーベル賞を受けている(残念ながら, この執筆中に亡くなった).

2. ジベレリン経路

2.1 ジベレリンの発見

ジベレリン研究の歴史は100年以上にも及ぶが, その発見は日本の研究者による. イネ馬鹿苗病は, 背が一際高く伸びるが枯死させる稲作の大敵として日本の農民を長年苦しめてきた. 明治初期になると, 植物病理学的な研究が進み, 1897年に堀正太郎(農商務省農事試験場)はカビが原因だと気づく. このカビは長い論争の末, 1931年に, *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wr.と命名された. この間に, 黒沢栄一(台湾総督府農事試験場)によって, このカビの分泌物中にある「毒素」が原因であることが1926年に報告される. この頃から, 天然物化学としての「毒素」本体の化学的研究が進み, 藪田貞治郎(東大農芸化学)が, 1935年に「gibberellin」と呼ぶことを提唱して, 最終的に住木論介(同)らとともに, 1938年に単離(結晶化)される.³⁾ このように, 毒素として研究が開始されたジベレリンであるが, 1950年代になると, 欧米で植物体そのものが生成しているのではないかという報文が続き, 植物ホルモンとしての認識が確定していった.

2.2 シグナル伝達タンパク質の発見

ジベレリンのシグナル伝達経路の研究での最初のブレ

ークスルーは、ジベレリン応答を負に制御するタンパク質 GAI (GA INSENSITIVE) や RGA (repressor of the *gal-3 mutant*) などの発見である。^{4,5)} これらはN-末端の制御領域に DELLA 配列を共通にもっていたので、DELLA タンパク質と総称されている。さらに、正の制御因子として、プロテアソームタンパク質系のユビキチン化酵素のサブユニットであり、基質タンパク質認識を担う F-box タンパク質 SLY1 (イネでは GID2) が発見される。^{6,7)} そして最後に、核内受容体 GID1 (GA INSENSITIVE DWARF 1) が 2005 年に単離された。⁸⁾

2.3 ジベレリン経路

制御タンパク質が次々に単離されるとともに、ジベレリン経路の詳細な生化学的解析が各国で進展した。その結果、共通の制御モデルが提唱されるようになった。これによると、ジベレリンを感知した GID1 は、DELLA タンパク質に結合する。この結合により、DELLA タンパク質は、ユビキチン化の E3 酵素 (SCF^{SLY1} 複合体) のサブユニットである F-box タンパク質に認識されるようになる。これにより、DELLA タンパク質はユビキチン化されて、プロテアソームにより分解されるので、抑制されていたジベレリン応答が開始する。⁹⁾

3. 構造解析

上述の制御モデルは非常に魅力的ではあるが、分子レベルでは、いくつかの本質的な疑問が残されている。現在、136 種類ものジベレリンが自然界から単離されているが、少数の誘導体のみが生理活性をもつ。そこで、受容体がどのようにして生理活性型ジベレリンを識別して、DELLA タンパク質に特異的に結合できるようになるのか、また、いかにして DELLA タンパク質を認識するのかに焦点を当てて、構造研究を開始した。

3.1 GA と GID1 と DELLA との三者複合体の構造解析

植物の基礎研究上でのモデル植物であるシロイヌナズナは、3 種類のジベレリン受容体 (GID1A, GID1B, GID1C) と 5 種類の DELLA タンパク質をもつ。本研究では、上記の研究目的を一気に達成するために、GA-GID1-DELLA の三者複合体の調製と構造解析に焦点を絞った実験系を構築した。具体的には、ジベレリン存在下で GID1 と DELLA タンパク質を共発現させて、複合体として試料の発現・精製系を作り、ジベレリンは活性型の GA₃ と GA₄ の 2 種類を、GID1 と DELLA タンパク質は上記 3 と 5 種類を組み合わせ、最も高分解能の結晶を与える三者複合体をスクリーニングした。DELLA タンパク質は、DELLA 配列を含む制御領域のみを用いた。最終的に、GID1A と GAI の DELLA 領域で最も高分解能の結晶を得た (図 1)。

SPring-8 の BL41XU で収集した回折データを用いて、SAD 法で 1.8 Å の分解能で構造決定した¹⁰⁾ (図 2)。現在、さらなる高分解能 (1.3 ~ 1.5 Å) で精密化している。

図 1 GA₃-GID1A-GAI 三者複合体の回折像と結晶。(A X-ray diffraction pattern of the GA₃-GID1A-GAI complex crystal.)

図 2 GA₄-GID1A-GAI 三者複合体構造。(The crystal structure of the GA₄-GID1A-GAI complex.)

3.2 ジベレリン受容体の構造

GID1A は、 α/β -フォールドをもつコアドメイン (図 2 の Core 領域) と、特徴的な配列をもつ N-末端領域からなることがわかった。このコア構造は、アミノ酸配列の相同性があるエステラーゼ類と似ており、その深いポケットにジベレリンが結合している。ポケットの入り口は、N-末端領域 (図 2 の N-Ex 領域) が伸びてきて、3 本の α -らせん (図 2 の α_A , α_B , α_C) からなる平らなヘリックスバンドルを形成して蓋をしており、ジベレリン分子は、6 つの水分子とともに、完全にポケット内に閉じこめられる。この蓋の外側の分子表面は、疎水性の残基が露出しており、そこに、GAI の DELLA ドメインが結合する。本研究では、GA₃ と GA₄ のそれぞれの三者複合体の構造を決定したが、両構造は、C α の重ね合わせで根平均二乗変位 (rmsD) が 0.18 Å であり、複合体のタンパク質構造そのものに本質的な違いはない。これは、後述する GA₃ と GA₄ の結合の違いは、DELLA 認識のための相互作用表面の形成には直接影響しないことを意味している。換言すると、GA₃ と GA₄ の生物活性の違いは、それらの GID1 への親和性の差異 (GA₄ の解離定数は 10⁻⁷ M オーダーで、GA₃ は 1 桁弱い) のみ

図3 ジベレリン GA₃ と GA₄ の化学構造と複合体中での立体構造の重ね合わせ。(The chemical structures and superimposed GID1A-bound structures of GA₃ and GA₄.)

図4 ジベレリン GA₄ の GID1A ポケットへの結合。(GA₄-binding to the GID1A pocket.)

を反映する。

3.3 ジベレリンの認識

ジベレリン GA₃ と GA₄ との化学構造の違いは、1 位 2 位間の二重結合と 13 位の水酸基の有無であり、特に、前者は環構造を大きくゆがめる。しかし、GID1A に結合した両者は最大限に重なるコンホメーションをとっていた (図 3)。これにより、以下に述べる共通構造部分での相互作用には本質的な差異は生じていないことがわかった。これは、GID1A との相互作用によりジベレリンも誘導適合の構造変化が起きること (GA₃ は単体の構造からずれている) と、ポケット中の水分子がわずかに変位して、構造の違いに適合することにより可能となっている。

ジベレリン分子の疎水的な領域は、隙間なく GID1A の疎水性残基に覆われるとともに、水酸基やラクトン環は GID1A と直接あるいは水分子を介した間接的な水素結合を形成している (図 4)。ジベレリンは、GID1A の疎水性残基の側鎖との相互作用を通して、その環構造の形に至るまで厳密に認識されている。また、ホルモンとしての活

図5 GID1 の N-末端スイッチモデル。(A model of the GID1 N-terminal switch to recognize DELLA proteins for ubiquitylation.)

性に必須であるカルボキシル基は、Ser116, Ser191 などと密な水素結合を形成するとともに、Gly115-Ser116 によって形成されるオキシアニオンホールや Arg244 がカルボキシル基の負電荷を相殺して安定化している。活性に重要な 3 位の水酸基は、Tyr127 との直接的な水素結合、水分子を介した Ser120 や His119 との水素結合によって GID1A との相互作用に寄与している。

シロイヌナズナにおけるジベレリンの代謝経路では 3 位の水酸化は活性型 GA 合成の最終ステップであり、2 位の水酸化、あるいは 7 位カルボキシル基のメチルエステル化によって不活性化される。¹¹⁾ 2 位の水酸基も 7 位のメチルエステルも、それらを受け入れる空間はない。また、7 位の修飾は、電荷の中和とともに水素結合ネットワークの崩壊を誘起するために、きわめて不利である。実際、親和性が 1,000 倍も減弱することが報告されている。

3.4 DELLA の認識

プロテアーゼ感受性実験などから、蓋をしている GID1A の N-末端領域は、ジベレリン非存在下では構造が柔軟であるが、ジベレリン存在下では構造転移してヘリックスバンドルを形成して、ジベレリンの検知と標的タンパク質の認識の両方にかかわることがわかった。これが、ジベレリンの結合が DELLA 認識を誘導する機構である。そこで、この N-末端領域を「スイッチ領域」と呼ぶことにした (図 5)。スイッチ領域は、ポケット側では、前述のとおり疎水性残基によるジベレリン縮合環の特徴的な外形の識別をしているが、外側の表面も疎水的であり、DELLA タンパク質の形成した 3 本の α ラセンのヘリックスバンドル (図 2 の α B, α C, α D) と相互作用している。相互作用の詳細な解析と変異実験から、DELLA タンパク質の認識では、DELLA, LEXLE, VHYNP という 3 つの配列モチーフが GID1A によって読み取られることがわかった。特に、DELLA タンパク質の命名の基となった DELLA 配列は、短い α ラセン (図 2 の α A) を巻いて、らせんの束から親指のように突き出して、Asp28 の形成する直接の水素結合や Leu 残基の疎水的相互作用を介して、GID1A の凹みにはまっていることがわかった (図 6)。保存された

図6 DELLA配列のGID1Aへの結合。(A close-up view of the DELLA motif that binds GID1A.)

Glu29はGID1Aとの相互作用には関与していなかったが、F-boxタンパク質などとの相互作用に関与するのかもしれない。

3.5 DELLAの変異と半矮性

上記の、3つの配列モチーフは、「奇跡の麦」などの半矮性品種で同定された変異や報告されている変異実験の結果をよく説明する。¹²⁾特に、すでに指摘されていたDELLAやVHYNP配列に加えて、今回の構造解析で初めて明らかになったLE_xLE配列の変異は、半矮性コムギRht-B1bやRht-D1bあるいは半矮性トウモロコシD8-1のGAIでみられている。

4. タンパク質分解による植物ホルモンのシグナル伝達制御

植物ホルモンのシグナル伝達経路には、ジベレリン経路のようにタンパク質の分解が深くかかわっている。ジベレリンに加えて、現在、オーキシシン、ジャスモン酸、ストリゴラクトン、エチレン、アブシシン酸の経路でプロテアソームによる分解が鍵となっていることが明確となっている。これらの中で、特に理解が進んでいるジベレリンとオーキシシンについては、これまでの動物や酵母を中心としたタンパク質分解研究では言及されなかった現象が見つかっている。

4.1 ジベレリン経路：ユビキチン化シャペロン

GID1によるジベレリンの検知は、DELLAタンパク質の認識を誘起して、そのユビキチン化を促進する。この促進メカニズムについては、今の構造データだけではわからないが、DELLAタンパク質のDELLA配列を含むN-末端制御領域(今回の構造解析で共結晶に用いた領域)につ

図7 タンパク質分解シグナルの生成メカニズム。(Creation of an exposed degradation signal in the protein to be degraded.)

いても、GID1のN-末端スイッチ領域と同様に、遊離の状態では柔軟な構造(CDスペクトルデータは100%ランダムコイルを示唆)をとっているが、複合体形成によりヘリックスバンドルを形成することが示唆された。このような構造転移の観測から、GID1の結合によってDELLAタンパク質のN-末端のDELLA配列を含む制御領域のみならず、C-末端側の転写調節ドメイン(GRASドメインと呼ばれる)を含む部分でも構造変化が起きて、F-boxタンパク質であるSLY1に認識されるようになり、ユビキチン化が進行すると推論している。この意味では、GID1は、E3酵素の基質が、E3酵素に特異的に認識されるのを「介在する」役割を果たしていると考えられるので、「ユビキチン化シャペロン」と呼ぶことにした。一般には、E3酵素に認識されるために、分解シグナル(degron)と呼ばれる部位が基質タンパク質の中に生成されるが、これには、リン酸化、分解シグナルを覆っていたサブユニットの解離、ならびに、N-末端の分解によるN-末端分解シグナルの露出の3つの機構が確認されていた(図7)。今回のユビキチン化シャペロンはこれらのいずれの機構とも異なり、機能の概念も、その機能をもつタンパク質も、動物や酵母のこれまでの研究では報告がないが、今後、見つかる可能性もある。このように、急展開しつつある植物由来のシグナル制御タンパク質の研究から新しい一般的な概念が生まれる可能性が高いのではないかと筆者は期待している。

4.2 オーキシシン経路：分子接着剤

ジベレリン受容体は、いわゆる、核内受容体である。一方、オーキシシンやジャスモン酸の受容体は、驚いたことに、F-boxタンパク質そのものであるとされていた。F-boxタンパク質は、基質認識ドメインの構造によって、大きく3つ、WD-40リピートをもつFbwクラス、LRR(Leucine-rich repeat)をもつFblクラス、そしてこれら以外のFbxクラス、に分けられる。オーキシシンやジャスモン酸受容体のF-boxタンパク質はFblクラスであるが、前述の、ジベレリン経路でのSLY1は、Fbxクラスであり、既知のモチーフをもたない。オーキシシン受容体であるTIR1の最近の

構造解析では、オーキシンは、LRRの形成する溝の底にあるポケットの奥に入り込んで、この溝にはまり込む基質であるAux/IAAタンパク質の認識を助けていることがわかった。¹³⁾これは、溝の形状が基質に適合するように、あたかも分子の「接着剤」として機能しているのである。そこで、これを「molecular glue」と呼ぶことが提案されている。一般に、小分子がタンパク質間相互作用などを制御する場合には、タンパク質のコンホメーション変化を誘導するアロステリックエフェクターとして働くことが多いので、オーキシンの場合も、まったく新しい分子機能のからくりの例を示したことになる。ジャスモン酸受容体のF-boxタンパク質は、オーキシン受容体F-boxタンパク質と相同性が顕著なので、きわめて類似した認識機構をもつものと考えてよい。

5. おわりに

ジベレリンの研究が、優れた日本の研究者らを巻き込んだ長い歴史をもつことを冒頭で触れたが、化学の視点からの研究は、上述の藪田教授・住木教授に始まる。この潮流は脈々と受け継がれて、幾多の研究者を輩出して、ジベレリン研究のみならず、日本の天然化学や生理活性物質の化学、植物化学(phytochemistry)を世界に冠たるものとして支えてきた。ちなみに、住木教授のお弟子さんには後継者である田村三郎教授がおられるが、そのお弟子さんが、実は、奈良先端大の現学長である。そのような因果があってジベレリン受容体とその標的であるDEL-LAタンパク質の構造研究を始めたが、幸いにも、その成果は強いインパクトをもって受け入れられた。原論文を執筆するにあたって、先人たちが著した旧仮名遣いの原論文を読む機会があった。例えば、本総説でも引用した文献³⁾もその1つであり、当時、世界でよく引用されていた論文の1つである。*Nature*の原論文でも、敬意をもって引用したが、editorに最後のページがぬけていると言われた。何のことはない、これはたかだか10行程度の速報(今では、学会の短い要旨のようなもの)で、1ページにも満たない。米国や英国の研究者たちは、このような日本の原論文をかき集めて、翻訳させて、当時、むさぼるように読んでいたのかと思うと、ジベレリン研究の日本のオリジナリティーと、学問の重厚さ、先人たちの探求心の強さを肌で感じて、感慨深い。

文 献

- 1) A. Santner and M. Estelle: *Nature* **459**, 1071 (2009).
- 2) M. Umehara, *et al.*: *Nature* **455**, 195 (2008).
- 3) T. Yabuta and Y. Sumiki: *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **14**, 1526 (1938).

- 4) J. Peng, P. Carol, D. E. Richards, K. E. King, R. J. Cowling, G. P. Murphy and N. P. Harber: *Genes Dev.* **11**, 3194 (1997).
- 5) A. L. Silverstone, C. N. Ciampaglio and T. -p. Sun: *Plant Cell* **10**, 155 (1998).
- 6) K. M. McGinnis, S. G. Thomas, J. D. Soule, L. C. Strader, J. M. Zale, T. -p. Sun and C. M. Steber: *Plant Cell* **15**, 1120 (2003).
- 7) A. Sasaki, H. Itoh, K. Gomi, M. Ueguchi-Tanaka, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D. -H. Jeong, G. An, H. Kitano, M. Ashikari and M. Matsuoka: *Science* **299**, 1896 (2003).
- 8) M. Ueguchi-Tanaka, M. Ashikari, M. Nakajima, H. Itoh, E. Katoh, M. Kobayashi, T. Y. Chow, Y. I. Hsing H. Kitano, I. Yamaguchi and M. Matsuoka: *Nature* **437**, 693 (2005).
- 9) J. Griffiths, K. Murase, I. Rieu, R. Zentella, Z. -L. Zhang, S. J. Powers, F. Gong, A. L. Phillips, P. Hedden, T. -p. Sun and S. G. Thomas: *Plant Cell* **18**, 3399 (2006).
- 10) K. Murase, Y. Hirano. T. -p. Sun and T. Hakoshima: *Nature* **456**, 459 (2008).
- 11) S. Yamaguchi: *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 225 (2008).
- 12) J. Peng, *et al.*: *Nature* **400**, 256 (1999).
- 13) X. Tan, L. I. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C. V. Robinson, M. Estelle and N. Zheng: *Nature* **446**, 640 (2007).

プロフィール

箱嶋敏雄 Toshio HAKOSHIMA
奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科
Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan
e-mail: hakosima@bs.naist.jp
最終学歴：大阪大学大学院薬学研究科
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：受容体・シグナル伝達タンパク質の構造と機能、構造植物学

村瀬浩司 Kohji MURASE
奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科
Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan
専門分野：植物学

平野良憲 Yoshinori HIRANO
奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科
Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan
専門分野：構造生物学

Tai-ping SUN
デューク大学生物学部
Department of Biology, Duke University
Durham, North Carolina 27708, USA
専門分野：plant biology, gibberellin pathway