植物が乾燥ストレスに応答する仕組み： アブシジン酸シグナル伝達の制御機構

東京大学大学院農学生命科学研究科 宮川拓也, 田之倉 優

Takuya MIYAKAWA and Masaru TANOKURA: Mechanistic Basis for Plant Responses to Drought Stress : Regulatory Mechanism of Abscissic Acid Signaling

The phytohormone abscissic acid (ABA) plays a key role in the rapid adaptation of plants to environmental stresses such as drought and high salinity. Accumulated ABA in plant cells promotes stomatal closure in guard cells and transcription of stress-tolerant genes. Our understanding of ABA responses dramatically improved by the discovery of both PYR/PYL/RCAR as a soluble ABA receptor and inhibitory complex of a protein phosphatase PP2C and a protein kinase SnRK2. Moreover, several structural analyses of PYR/PYL/RCAR revealed the mechanistic basis for the regulatory mechanism of ABA signaling, which provides a rational framework for the design of alternative agonists in future.

1. はじめに

植物は生育環境の変化, 病原菌の感染, 害虫による食害や化学物質による汚染などさまざまなストレスにさらされる。根を下ろした土壌から自由に移動することができない植物は, これらのストレスに対してある程度, 適応し耐える能力を備えている。近年, 地球規模での温暖化や異常気象が進み, 砂漠化や農地環境の悪化(干ばつ, 高温傷害, 低温傷害, 塩害など)による作物収量の減少が問題になっており, 植物がもつ環境ストレス耐性機構を解明し, 緑化対策や作物収量増産への技術開発に利用することに期待が集まっている。

乾燥や塩害などによる浸透圧ストレスに対して植物が耐性を獲得するために, アブシジン酸(abscissic acid, ABA)が中心的な役割を果たしている。乾燥・高塩のようなストレス下でABAが細胞内に蓄積することが知られている。ABAの蓄積は, 植物体内の水分が蒸散により失われるのを防ぐ“気孔の閉鎖”と関係することが示唆されてきた。また, 高い浸透圧や脱水状態から植物体を保護する多くの遺伝子の発現制御との関係も示唆されてきた。一方, 植物の発生段階にもABAは深くかかわっている。種子は, 胚の形態形成, 発芽の際の栄養分となる貯蔵物質の蓄積, 水分の9割が放出される脱水の過程を経て完熟し, 休眠状態になる。このため, 種子の成熟と休眠の過程で乾燥耐性機構が働く必要があり, ABAはその中心的な役割を果たしている。

ABAは植物に乾燥耐性を付与する機能をもつことから, 地球規模での農業生産に貢献することが広く認識されており, ABAによる植物の細胞応答の分子機構を理解する多くの研究が試みられてきた。¹⁾ ABAの発見から半世紀の

間にABA応答にかかわる多数の因子が報告されてきたが, ABAとそれらの因子をつなぐ分子機構の解明の糸口はつかめない状況であった。しかし, 2009年にその状況は一変し, ABAシグナル伝達経路は, ABA受容体PYR/PYL/RCAR, タンパク質脱リン酸化酵素PP2C, タンパク質リン酸化酵素SnRK2の3種類の因子がかかわるきわめて洗練された仕組みにより制御されていることが明らかにになった。そして, 構造研究はこのモデルを決定的にし, ABA受容体を介したABAによる巧みな制御機構を明らかにしたのである。²⁾⁴⁾

本稿では, 近年急速に解明されたABAシグナル伝達の制御機構について概説し, ABA応答の調節により植物に乾燥耐性を付与するABAアゴニストの開発に向けた将来の研究展望について述べる。

2. ABA応答の中心的な制御因子の発見

2.1 ABA応答の負の制御因子: PP2C

ABAシグナル伝達経路は, 植物細胞内のABA濃度を感知し遺伝子の転写や気孔の開閉を調節するシグナル分子のカスケードである。この経路を制御する因子の最初の発見は1990年代半ばに遡る。ABAに対して非感受性のシロイヌナズナの遺伝子解析が行われ, 2つの遺伝子の変異に起因することが特定された。⁵⁾⁶⁾ その遺伝子は, タンパク質脱リン酸化酵素 type 2C protein phosphatase (PP2C) をコードしており, *ABA-INSENSITIVE1* (*ABI1*) および *ABI2* と名付けられた。このABA非感受性変異体は *abi1-1*, *abi2-1* としてよく知られている。その後も *ABI1* との配列相同性から *HOMOLOGY TO ABI1* (*HAB1*) と *HAB2* などが次々と同定された。⁷⁾

PP2Cはその配列的な特徴から10グループに分類され、ABI1などのABA応答にかかわるPP2Cはいずれも同一のグループ(グループA)に属していた。*abi1-1*および*abi2-1*変異体は触媒ドメインの保存されたグリシン残基がアスパラギン酸残基に置換されており、グループA PP2Cに同じ変異を導入することで、植物はさまざまな組織や発生過程でABAに対して非感受性になる。⁸⁾ このため、PP2CはABAシグナル伝達経路を不活性な状態に保つグローバルな負の制御因子であると考えられた。PP2CのABA応答における生理学的な機能は明確であったが、PP2CがABAシグナル伝達経路を負に制御する分子機構は長い間の謎であった。

2.2 ABA応答の正の制御因子：SnRK2

PP2Cの同定によりABA応答機構はリン酸化シグナルカスケードによって制御されていることが示唆され、ABA応答にはたらくタンパク質リン酸化酵素の同定が2000年代になって活発に試みられた。その結果、ABA処理により活性化するSNF1-related protein kinase 2 (SnRK2)が同定された。⁹⁾ SnRK2を過剰発現した植物ではストレス応答遺伝子の発現が亢進されることから、このタンパク質リン酸化酵素はABAシグナル伝達経路を正に制御する因子であると考えられた。

シロイヌナズナでは10種類のSnRK2が存在し、ABAや浸透圧ストレスに対して異なる活性化パターンを示すことで3種類のサブクラスに分類されている。その中でサブクラスIIIにはSRK2D, SRK2E, SRK2Iの3種類が属しており、いずれもABAによって最も強く活性化されることから、ABA応答機構において主要な制御因子であることが示唆された。サブクラスIIIの重要性は、それらをノックアウトした三重変異シロイヌナズナで示されている。^{10),11)} この三重変異体では、ABA応答性遺伝子の発現、気孔の開閉、種子の休眠と発芽などの多くのABA応答が失われ、ABAによって誘導されるタンパク質リン酸化活性も大きく損なわれた。

SnRK2はよく保存されたキナーゼドメインに加えてC末端にドメインI, IIという2つの領域が存在する。ドメインIはSnRK2の3種類のサブクラス間で類似しているが、ドメインIIは酸性パッチと名付けられた領域の特徴により異なっている。サブクラスII, IIIの酸性パッチにはアスパラギン酸残基が多く、サブクラスIにはグルタミン酸残基が多く存在する。サブクラスII, IIIはABAによって活性化されるSnRK2であり、ドメインIIのアスパラギン酸残基の特徴はABA依存的な活性化に必須であることが示されている。¹²⁾

2.3 ABA受容体：PYR/PYL/RCAR

2000年代半ば以降、ABA結合タンパク質としてGタンパク質共役受容体やマグネシウムキレーターゼが報告され、¹³⁾⁻¹⁵⁾ ABA応答で何らかの重要な役割を担っているこ

とが示唆されていた。しかし、ABAシグナル伝達経路の主要な制御因子であるPP2CやSnRK2とのつながりは、現在もいまだ不明確のままであり、ABAからPP2C, SnRK2にいたる経路はきわめて複雑であることが予想されていた。このような混迷する状況の中、2009年に2つのグループにより新たなABA結合タンパク質としてPYR/PYL/RCARが同定され、^{16),17)} ABA応答機構解明の真のブレークスルーとなった。

Parkらは化合物ライブラリーからABAの選択的なアゴニストとしてピラバクチンを同定し、これに対して非感受性となる遺伝子の解析からPYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1) 遺伝子を同定した。¹⁶⁾ 一方、MaらはABA存在下でABI1と相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッド解析でスクリーニングし、REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR1 (RCAR1)を同定した。¹⁷⁾ これらはともにSTART-domain/Bet V allergenスーパーファミリーに属し、同じ遺伝子ファミリーとして14種類(PYR1, PYL1 ~ PYL13またはRCAR1 ~ RCAR14)が同定された。

PYR/PYL/RCARがABA受容体であることを示す重要な知見は、PYR/PYL/RCARがABAを直接結合できるだけでなく、ABAの結合に依存してPP2Cとも結合しその脱リン酸化活性を阻害することであった。これはPYR/PYL/RCARがABA依存的にABAシグナル伝達経路を活性な状態に切り替えることを意味しており、PYR/PYL/RCARが植物のABA受容体であることを明確に示すものであった。

3. ABAシグナル伝達の制御機構

3.1 PP2Cによる負の制御機構

ABA非感受性変異体*abi1-1*ではABAによりSnRK2が活性化されないことから、ABAシグナル伝達経路でPP2CがSnRK2の上流で機能していることが示唆されていた。その後、ツーハイブリッド解析によりABI1とSRK2Eの相互作用が示され、ABAシグナル伝達経路の主要な正と負の制御因子が複合体を形成することが示された。¹²⁾ さらに重要なことに、2009年になってPP2CとSnRK2が複合体を形成する重大な意味が2つのグループの報告により解き明かされた。梅沢らは、PP2CがSnRK2を脱リン酸化することを突き止め、さらにSnRK2の活性化は、複数のセリン/スレオニン残基がABAに応じてリン酸化されることで起こることを明らかにした。¹⁸⁾ 一方、VladらはPP2Cの標的部位がSRK2EのSer175であることを突き止め、これは梅沢らが示したSnRK2の活性化に必要なリン酸化部位であった。¹⁹⁾ これによりSnRK2がPP2Cの標的であり、PP2CがSnRK2の活性を阻害することでABAシグナル伝達経路を負に制御することが明らかとなったのである。

3.2 ABAシグナル複合体 (ABAシグナロソーム)

2009年の2つの重大な知見は、ABA受容体、PP2C、

図1 ABA シグナル伝達経路の制御機構。(Schematic diagram of the regulatory mechanism of ABA signaling.)
PYR/PYL/RCAR の中で PYR1, PYL1, PYL2 は二量体で存在し, ABA 依存的に PP2C と相互作用する. ABA 非依存的に PP2C と相互作用する PYR/PYL/RCAR も存在する.

SnRK2 の三者が ABA シグナル複合体 (ABA シグナロソーム) を形成し, 二重の阻害機構により ABA シグナル伝達経路を活性化するという明確なモデルを導き出した.²⁰⁾ 図1は ABA シグナル伝達経路の制御機構を示している. 非ストレス条件下でタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C は下流のリン酸化酵素 SnRK2 を脱リン酸化し不活性化している. 一方, 植物に乾燥などのストレスが加わると ABA が細胞内に蓄積し, ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR によって認識される. ABA と結合した PYR/PYL/RCAR は PP2C の脱リン酸化活性を阻害し, SnRK2 は PP2C による負の制御から解除される.

自己リン酸化により活性化した SnRK2 の標的は, AREB/ABF と呼ばれる塩基性ロイシンジッパー転写因子 (basic-domain leucine zipper, bZIP), アニオンチャンネル SLAC1 やカリウムチャンネル KAT1 などである. AREB/ABF は SnRK2 によってリン酸化されることで活性化し, ABRE 配列 (PyACGTGG/TC) に結合して ABA 応答性遺伝子群の転写を促進する.²¹⁾ こうして, 脱水や乾燥に対して耐性を獲得するために必須なタンパク質群が ABA 依存的に発現誘導される. 一方, イオンチャンネルである SLAC1 と KAT1 は孔辺細胞に局在しており, SnRK2 によるリン酸化は SLAC1 の活性化と KAT1 の不活性化を引き起こし, 気孔の閉鎖を誘導する.²²⁾⁻²⁴⁾

3.3 ABA シグナロソームの多様性

ABA シグナロソームは, 少なくとも1つの主要な ABA シグナル伝達経路で核となる制御システムであり, その機構は非常に洗練されたシンプルなものである. しかしながら, ABA シグナロソームには多様性があり, 組織や器官の選択性, 細胞内局在, タンパク質間相互作用の強さなどの違いによって時空間的に制御され, ABA 応答をさまざまに調節していると考えられている.

例えば, サブクラス III SnRK2 の中で, SRK2D と SRK2I

は種子や植物体に発現するが,²⁵⁾ SRK2E は孔辺細胞や維管束組織に強く発現する.²⁶⁾ PYR/PYL/RCAR と PP2C も組織特異的な発現パターンを示す.¹⁶⁾ また, PP2C と SnRK2 は選択的なタンパク質間相互作用を示す.¹⁸⁾ これは一般に細胞内局在によって制限されている. PYR/PYL/RCAR とサブクラス III SnRK2 のすべてのメンバーは細胞質と核の両方に存在しているが, グループ A PP2C の局在はメンバーにより異なる. ABI1 と ABI2 は細胞質と核に局在する一方, AHG1 と AHG3 は核のみに局在している. したがって, ABA シグナロソームは細胞質と核で異なり, 転写因子とイオンチャンネルなどの制御には異なる ABA シグナロソームがかかわるであろう.

さらに ABA に対する PYR/PYL/RCAR の立体選択性や親和性においても違いが見られる. 例えば, PYR1 と PYL1 は ABA の鏡像異性体のうちで (+) ABA のみを認識するが, PYL2 は (+) ABA と (-) ABA の両方を認識する.¹⁶⁾ また, PYL1 と PYL2 は (+) ABA に対して 10^{-5} M 程度の解離定数で結合するが,^{21,4)} PYL9/RCAR1 の (+) ABA に対する結合力はそれよりも1オーダー程度強い.¹⁷⁾ こうした違いも ABA シグナロソームの形成に影響を与え, ABA 応答の精緻な調節に役立っているかもしれない.

4. ABA シグナル伝達の構造基盤

PYR/PYL/RCAR は, リガンドの結合依存的にはほかのタンパク質に結合してその活性を制御する点で, START-domain/Bet V allergen ファミリータンパク質の中では独特な分子機能をもつ. ABA 受容体の報告から間もなく, 筆者らを含む5つのグループが ABA 受容体の結晶構造解析に成功した.^{21-4), 27), 28)} その構造は, ABA を結合していないアポ状態, ABA 結合状態, さらに PP2C を結合した状態であり, ABA シグナル伝達が ABA により切り替わる仕組みを解き明かした.

4.1 ABA 受容体のABA 認識機構

ABA 受容体の構造は、7つの β ストランドが逆平行に並んで大きく湾曲した β シートとそれを取り囲む3つの α ヘリックスから構成されていた(図2)。これはファミリータンパク質に共通したヘリックス-グリップフォールドであった。ABA 受容体はほかのファミリータンパク質と同様に分子内部に大きなキャビティをもち、その中に1分子のABAが結合していた。このABAを結合した受容体の構造は、PYR/PYL/RCARのABAに対する高い立体選択性をよく説明し、その結合様式を明らかにした。

ABAはペンタジエン酸部分のアルキル骨格とシクロヘキセン環が構造の大部分を占める疎水的な分子であるが、ペンタジエン酸部分の末端に位置するカルボキシル基や不斉炭素に結合した水酸基が存在する(図3a, b)。この不斉炭素を中心として(+)ABAと(-)ABAの2種類の異性体が存在し、これらはシクロヘキセン環のモノメチル基とジメチル基の位置がちょうど反転した構造関係である(図3a, b)。植物体内で合成されるABAは(+)ABAであ

図2 ABA 受容体PYL1の立体構造。(Structure of ABA receptor PYL1.)

図3 PYL1のABA結合様式。(ABA-binding mode of PYL1.) (a) (+)ABAの構造式。(b) (-)ABAの構造式。アスタリスク(*)は不斉炭素原子を示している。(c) ABA結合キャビティにおける(+)ABAの配置。(+)ABAのシクロヘキセン環を取り囲み(+)ABAの立体選択性を規定する疎水性残基はスティックを覆う球で示している。

り、この異性体のみが植物において生物活性を示すことが知られている。また、PYR/PYL/RCARの多くは、(+)ABAに対して高い親和性を示し、PYR1やPYL1にいたっては(+)ABAのみを結合する高度な立体選択性をもつ^{2),3)}

図3cはPYL1のABAの結合様式を例として示している。PYR/PYL/RCARのABA結合キャビティの底にはABAのカルボキシル基とイオンペアを形成する保存されたリジン残基(PYL1 K86)が位置し、その他の5つの親水性残基が水分子を介してABAの親水基と水素結合ネットワークを形成していた。この水素結合ネットワークにより、キャビティ内でのペンタジエン酸部分と不斉炭素原子の位置が厳密に規定されたと考えられる。ABA結合能は、キャビティ内の親水性残基のアラニン置換によって著しく低下することから、リジン残基や水分子を介した水素結合ネットワーク形成は、PYR/PYL/RCARのABA認識においてきわめて重要である。こうした構造基盤は、PYR/PYL/RCARに共通しており、ABAに対する受容体の高いリガンド選択性に寄与していると考えられる。

一方、ABA結合キャビティを構成するほかのアミノ酸残基は疎水性であり、キャビティの入口付近に位置してシクロヘキセン環を認識していた。この認識残基の配置は、植物ホルモンとして機能する(+)ABAの立体選択的な認識に重要な役割を果たしていた。ABAのシクロヘキセン環には、ジメチル基とモノメチル基が存在し、ABA受容体は(+)ABAのモノメチル基が結合するのに適した狭い疎水性ポケットをもっていた。(-)ABAではこの位置にジメチル基が配置することになり、モノメチル基との接触に適した狭いポケットと立体障害を生じてしまうことが推定されている³⁾。こうした構造基盤によりABA受容体は(+)ABAに対してより高い選択性を示すと考えられる。

4.2 ABA 結合による受容体の構造変化

ABAを結合したPYR/PYL/RCARの結晶構造から、PYR/PYL/RCARは閉じた状態であり、ABAを分子内部に完全に閉じ込めていることが示された²⁾。これは、ABAがキャビティ内に入るためには、何らかの構造変化が生じなければならないことを示唆する。一方、ABA受容体のアポ状態の立体構造から、ABA結合時にキャビティを覆うように配置していた2つの保存されたループが大きくコンフォメーション変化し、PYR/PYL/RCARは開いた状態であることが示された^{3),4),27),28)}

図4はABA結合に伴うPYL1の構造変化を例として示している。 β ストランド3と4をつなぐループ(ゲートループ)では、ABAの結合に伴って保存されたプロリン残基(PYL1 P115)がABA結合キャビティを覆うように変化し、同じく保存されたセリン残基(PYL1 S112)がABAを結合したキャビティから分子の外側に飛び出すように変化していた。一方、 β ストランド5と6をつなぐループ(ラッチループ)では、保存されたヒスチジン残基(PYL1

H142) のイミダゾール環がキャビティ内に向けてABAのシクロヘキセン環と接触し、ゲートループとの間で水素結合が形成されていた。この閉じた状態のループは、後述するようにPP2Cとの結合表面を形成する。こうしてPYR/PYL/RCARはABAによりアロステリックに制御され、ループの開閉機構によりABAシグナル伝達経路を切り替えることが明らかとなった。

ABA結合による受容体の構造変化は、二量体の形成においても示されている。⁴⁾例えば、PYL2はアポ状態とABAを結合した状態の両方で二量体を形成している。その相互作用界面はゲートループであり、プロトマーの相対配置がABA結合によるゲートループのコンフォメーション変化によって異なる。二量体形成の機能的な意義は明らかではないが、ゲートループを安定化することに寄与しているよ

うである。

Yinらは二量体の形成界面においてゲートループが固定される理由を次のように指摘している。⁴⁾ゲートループはコンフォメーションの可塑性をもつため、アポ状態のABA受容体が誘導適合(induced fit)によりPP2Cに結合することを妨げ、ABAによる厳密な制御を可能にしているかもしれない。PYR/PYL/RCARの中には、ABA非存在下でもPP2Cと結合するメンバーの存在が指摘されており、^{16),17)}二量体形成との関連性は大変興味深い。こうした受容体の違いもABA応答の精緻な調節に役立っている可能性があり、ABA非依存的なPP2C阻害はABA応答の基底レベルの制御を担っているかもしれない。

4.3 ABA依存的なPP2C阻害機構

ABAシグナル伝達におけるPYR/PYL/RCARの中心的な機能は、ABA依存的にABAシグナル伝達経路の負の制御因子であるPP2Cの脱リン酸化活性を阻害することである。この機構はABA存在下で取得されたPYL1とABI1の複合体およびPYL2とHAB1の複合体の結晶構造解析により明らかとなった。^{2),4)}

図5はABAを結合したPYL1とABI1の複合体構造を例として示している。PP2Cの触媒ドメインは、ABA受容体のゲートループとラッチループで形成された疎水性表面に結合していた。この結合により、ゲートループはPP2Cの活性部位に「栓」をするように入り込み、ABA結合に伴って分子の外側に突き出たセリン残基(PYL1 S112)がPP2Cの触媒残基の1つである保存されたグルタミン酸残基(ABI1 E142)と水素結合を形成していた。PP2Cは非ストレス条件下でSnRK2の自己リン酸化部位を脱リン酸化することにより、その活性を阻害しABAシグナルを負に制御している。ABAが結合したPYL1は、ABI1の触媒部位を直接塞ぐことにより、その脱リン酸化活性を競合的に

図4 ABA結合に伴うPYL1の構造変化。(Structural change of PYL1 upon ABA binding.) アポ状態およびABA結合状態のPYL1の結晶構造を重ね合わせている。ABA結合に伴って矢印の方向に2つのループがコンフォメーション変化を引き起こす。

図5 ABAを結合したPYL1とABI1の複合体構造。(Structure of ABA-bound PYL1 and ABI1 complex.) (a) 複合体の全体構造。ABI1の構造は主鎖のリボンモデル(左)と分子表面(右)で示されている。(b) PYL1とABI1の相互作用の詳細。

阻害することが明らかとなった。

ゲートループのセリン残基 (PYL1 S112) は, PP2C のグリシン残基 (ABI1 G180) と水素結合を形成していた。ABI1 G180D 置換体は ABA 非感受性 *abi1-1* 変異体として知られている。PYL1 と ABI1 の複合体構造は, ABI1 の G180D 変異が立体障害となり, ABA 受容体のゲートループが PP2C の触媒部位に入ることを妨げる作用をよく説明した。こうして, *abi1-1* 変異体は ABA 受容体による制御から外れることにより ABA 非感受性を示すことが明確になったのである。

ゲートループのコンフォメーションは可塑性をもつため, 競合的な阻害メカニズムによって厳密な制御が達成されるには, ゲートループが安定に PP2C の触媒部位に導かれることが重要である。グループ A PP2C は特徴的な β 構造をもち, ABA 受容体との主要な結合表面となっていた。そして, この β 構造上には ABA 受容体のゲートループおよびラッチループを結合するために鍵となる 2 つの残基が存在していた。

ABA を結合した受容体と PP2C の触媒ドメインが結合すると, β 構造上の保存されたトリプトファン残基 (ABI1 W300) のインドール環が ABA 受容体のゲートループとラッチループの間にはまり込み, 水分子を介して ABA および受容体の 2 つのループと水素結合を形成していた。さらに β 構造上の保存されたアルギニン残基 (ABI1 R304) がゲートループのプロリン残基 (PYL1 P115) を上から押さえつけるように接触していた。これらの相互作用により ABA 受容体の 2 つのループはさらに完全に閉じられた状態に安定化され, ゲートループが ABI1 の触媒部位に安定に配向することになると考えられる。

この PP2C が ABA 受容体のゲートループとラッチループをロックする機構は, PYR/PYL/RCAR の ABA に対する親和性が PP2C 存在下で高められることをよく説明する。ABA 受容体の親和性は $10^{-5} \sim 10^{-6}$ M オーダーであるが, ABA 依存的な PP2C 阻害は 10^{-8} M オーダーで起こるのは

このような機構が存在するためである。

5. 選択的アゴニストの作用機序

これまでに知られている合成 ABA アゴニストは ABA 受容体の同定で貢献したピラバクチンである (図 6a)。これは, シロイヌナズナの種子の発芽阻害剤として最初に同定され, その構造は ABA と類似でない。²⁹⁾ ABA はすべての PYR/PYL/RCAR を活性化するパンアゴニストであるが, ピラバクチンのアゴニスト活性は選択的であることが知られている。¹⁶⁾ ピラバクチンは ABA 受容体の中で PYR1 や PYL1 にはアゴニストとして作用し, PYL2 に対してはアンタゴニストとして作用する。こうした ABA 受容体に対する選択性の結果, ピラバクチンの作用は ABA と異なる。ピラバクチンは種子の発芽を完全に抑制するが, 幼苗においては効果がなく ABA 応答性遺伝子はピラバクチン処理でほとんど誘導されない。¹⁶⁾ ABA 受容体に対するピラバクチンの作用機序は, ABA 受容体を選択的に制御するためのアゴニスト開発の観点から大変興味深い。

5.1 PYL1 のピラバクチン結合様式

PYL1 とピラバクチンの複合体の結晶構造が解析され, ピラバクチンは ABA に類似した結合様式で PYL1 に結合していることが明らかとなった。^{30),31)} 図 6b は PYL1 の ABA 結合キャビティにおけるピラバクチンの結合様式である。ピラバクチンのナフタレン環が ABA のシクロヘキセン環と同様に機能し, 特にナフタレン環に結合したブロム基がゲートループとファンデルワールス相互作用を形成することで, ゲートループを閉じた状態に保っていた。また, ピリジン環の窒素原子が ABA のカルボキシル基と類似に機能し, ABA 結合キャビティのリジン残基 (PYL1 K86) と水分子を介して水素結合を形成していた。この窒素原子は, ピラバクチンがアゴニスト活性を示すために必須な要素であることが知られている。ABA 結合キャビティにおいて, リジン残基などの親水性残基との水素結合形成は結合の親和性にとって重要であり, ピリジン環の窒素

図 6 ピラバクチンの選択的アゴニスト・アンタゴニスト活性の構造基盤。(Structural basis for selective agonism or antagonism of pyrabactin.) (a) ピラバクチンの構造。(b) PYL1 とピラバクチンの複合体構造。(c) PYL2 とピラバクチンの複合体構造。

原子の重要性をよく説明していた。

Melcher らはピラバクチンを結合したPYL1とABI1との複合体構造についても調べており、ピラバクチンを結合したPYL1がABI1と複合体を形成し、その活性を阻害する機構を示した。³⁰⁾ それは、ABAを結合したPYL1がABI1を阻害する機構と同じであり、ABI1のトリプトファン残基がPYL1のゲートループをロックし、ゲートループがABI1の触媒部位に入り込んで塞ぐというものであった。

5.2 PYL2のピラバクチン結合様式

図6cはPYL2のABA結合キャビティにおけるピラバクチンの結合様式である。PYL2のピラバクチンの配置は、PYL1の配置とまったく異なっていた。^{30),32)} ピラバクチンのスルホンアミドがABAのカルボキシル基と類似に機能し、結合キャビティ内のリジン残基(PYL2 K64)と水分子を介して水素結合を形成していた。さらに、ピラバクチンのナフタレン環はゲートループから離れて位置しており、ゲートループが開いた状態のままであることが示された。

PYL2において、ABA結合キャビティ内のピラバクチンとゲートループは11 Å以上離れており、ゲートループが閉じたコンフォメーションをとった場合でも5 Å程度の距離がある。一方、PYL1においてはピラバクチンのナフタレン環やABAのシクロヘキセン環との距離は3.4 Åと近くファンデルワールス相互作用の形成に適していた。このことより、ゲートループとリガンドとの距離がゲートループのコンフォメーションを制御するための主要な構造基盤であることが示唆された。これは、PYL2のゲートループのアラニン残基をフェニルアラニン残基に置換したA93F変異体の解析により支持されている。³⁰⁾ PYL2 A93F変異体はゲートループがピラバクチンと接触できることを狙って設計されており、実際にピラバクチンによってPP2C活性を阻害することができる。

5.3 ピラバクチンの活性選択性の構造基盤

PYL1とPYL2の結合キャビティは高い保存性があるにもかかわらず、どうしてピラバクチンが異なる配向で結合し得るのかは、選択的なアゴニスト設計において大変興味深い。これに関して、PYL1とPYL2の構造比較から構造基盤に関する重要な知見が導かれている。^{30),32)}

ピラバクチンを取り囲む残基のほとんどはPYL1とPYL2の間で同じであるが、PYL2における4つのバリン残基(V67, V114, V166, V170)は、PYL1においてはイソロイシン残基やアラニン残基(I89, I137, A190, I194)に置換されていた。この中で、PYL2のV114はピラバクチンのピリジン環と隣接していた(図6c)。この残基をPYL1の対応するイソロイシン残基に置換した場合には、ピリジン環との衝突が起これると予想され、この立体障害によりピラバクチンの配向が変化すると考えられる。

実際にPYL1のI137とPYL2のV114を交換した変異体についてこの効果が実証されている。^{30),32)} PYL1 I137V変

異体ではABA依存的なPP2C阻害は保たれ、ピラバクチンのアゴニスト活性のみが著しく低下した。一方、PYL2 V114I変異体では、ABAと同様にピラバクチンでもPP2Cの活性を阻害するアゴニスト活性が示された。こうして、ABA受容体のキャビティにおける疎水性残基の配置は、ABAに対する立体選択性だけでなく、ピラバクチンによる活性選択性にも影響する。

6. 将来展望：ABA受容体を標的とした乾燥ストレス耐性機構の人為的制御

これまでに述べたABA受容体の構造基盤は、ABAアゴニストを合理的に設計するためのコンセプトを提供している。合成した分子が実用的なABAアゴニストとして機能するためには、ABA受容体のキャビティに高い親和性で結合する必要がある。それと同時に、ABAアゴニストは閉じた状態のゲートループ(特にゲートループ中の保存されたLeu-Pro-Ala配列)と接触するのに十分な疎水性表面を提供する必要がある。実際に、ピラバクチンの構造に基づいたABAアゴニスト設計が試みられており、ピラバクチンのピリジン環を修飾することで、より低濃度でアゴニスト活性を示す化合物が報告されている。³⁰⁾ 今後、同様のコンセプトにより、実用レベルで利用可能なABAアゴニストの取得が期待される。

さらに興味深いことに、ABA結合キャビティの細かな構造の差異を利用することで、さまざまな選択性をもったABAアゴニストの開発が期待される。選択的ABAアゴニストは、発芽や成長過程に影響を与えず、植物体の乾燥ストレス耐性を巧みに制御する可能性を秘めている。これを実現するために、ABA応答の複雑な調節を担うABAシグナロソームの多様性をさらに理解することが今後の重要な課題となる。選択的ABAアゴニストはABAシグナロソームの多様性を研究するための強力なケミカルバイオロジー・ツールとしても役立つであろう。

文 献

- 1) T. Hirayama and K. Shinozaki: *Plant J.* **61**, 1041 (2010).
- 2) K. Miyazono, T. Miyakawa, Y. Sawano, K. Kubota, H. Kang, A. Asano, Y. Miyauchi, M. Takahashi, Y. Zhi, Y. Fujita, T. Yoshida, K. Kodaaira, K. Yamaguchi-Shinozaki and M. Tanokura: *Nature* **462**, 609 (2009).
- 3) K. Melcher, L. Ng, X. E. Zhou, F. Soon, Y. Xu, K. M. Suino-Powell, S. Park, J. J. Weiner, H. Fujii, V. Chinnusamy, A. Kovach, J. Li, Y. Wang, J. Li, F. C. Peterson, D. R. Jensen, E. Yong, B. F. Volkman, S. R. Cutler, J. Zhu and H. E. Xu: *Nature* **462**, 602 (2009).
- 4) P. Yin, H. Fan, Q. Hao, X. Yuan, D. Wu, Y. Pang, C. Yan, W. Li, J. Wang, and N. Yan: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1230 (2009).
- 5) J. Leung, M. Bouvier-Durand, P. C. Morris, D. Guerrier, F. Chefdor and J. Giraudat: *Science* **264**, 1448 (1994).
- 6) K. Meyer, M. P. Leube and E. Grill: *Science* **264**, 1452 (1994).
- 7) A. Saez, N. Apostolova, M. Gonzalez-Guzman, M. P. Gonzalez-Garcia, C. Nicolas, O. Lorenzo and P. L. Rodriguez: *Plant J.* **37**,

- 354 (2004).
- 8) T. Hirayama and K. Shinozaki: *Trends Plant Sci.* **12**, 343 (2007).
 - 9) J. Li, X. Wang, M. B. Watson and S. M. Assmann: *Science* **287**, 300 (2000).
 - 10) H. Fujii and J. Zhu: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8380 (2009).
 - 11) Y. Fujita, K. Nakashima, T. Yoshida, T. Katagiri, S. Kidokoro, N. Kanamori, T. Umezawa, M. Fujita, K. Maruyama, K. Ishiyama, M. Kobayashi, S. Nakasone, K. Yamada, T. Ito, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki: *Plant Cell Physiol* **50**, 2123 (2009).
 - 12) R. Yoshida, T. Umezawa, T. Mizoguchi, S. Takahashi, F. Takahashi and K. Shinozaki: *J. Biol. Chem.* **281**, 5310 (2006).
 - 13) X. Liu, Y. Yue, B. Li, Y. Nie, W. Li, W. Wu and L. Ma: *Science* **315**, 1712 (2007).
 - 14) S. Pandey, D. C. Nelson and S. M. Assman: *Cell* **136**, 136 (2009).
 - 15) Y. Shen, X. Wang, F. Wu, S. Du, Z. Cao, Y. Shang, X. Wang, C. Peng, X. Yu, S. Zhu, R. Fan, Y. Xu and D. Zhang: *Nature* **443**, 823 (2006).
 - 16) S. Park, P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman and S. R. Cutler: *Science* **324**, 1068 (2009).
 - 17) Y. Ma, I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann and E. Grill: *Science* **324**, 1064 (2009).
 - 18) T. Umezawa, N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama and K. Shinozaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17588 (2009).
 - 19) F. Vlad, S. Rubio, A. Rodrigues, C. Sirichandra, C. Belin, N. Robert, J. Leung, P. L. Rodriguez, C. Lauriere and S. Merlot: *Plant Cell* **21**, 3170 (2009).
 - 20) T. Umezawa, K. Nakashima, T. Miyakawa, T. Kuromori, M. Tanokura, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki: *Plant Cell Physiol* **51**, 1821 (2010).
 - 21) T. Furihata, K. Maruyama, Y. Fujita, T. Umezawa, R. Yoshida, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1988 (2006).
 - 22) D. Geiger, S. Scherzer, P. Mumm, A. Stange, I. Marten, H. Bauer, P. Ache, S. Matschi, A. Liese, K. A. Al-Rasheid, T. Romeis and R. Hedrich: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21425 (2009).
 - 23) S. C. Lee, W. Lan, B. B. Buchanan and S. Luan: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21419 (2009).
 - 24) A. Sato, Y. Sato, Y. Fukao, M. Fujiwara, T. Umezawa, K. Shinozaki, T. Hibi, M. Taniguchi, H. Miyake, D. Goto and N. Uozumi: *Biochem. J.* **424**, 439 (2009).
 - 25) H. Fujii, P. E. Verslues and J. Zhu: *Plant Cell* **19**, 485 (2007).
 - 26) A. Mustilli, S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi and J. Giraudat: *Plant Cell* **14**, 3089 (2002).
 - 27) N. Nishimura, K. Hitomi, A. S. Arvai, R. P. Rambo, C. Hitomi, S. R. Cutler, J. I. Schroeder and E. D. Getzoff: *Science* **326**, 1373 (2009).
 - 28) J. Santiago, F. Dupeux, A. Round, R. Antoni, S. Park, M. Jamin, S. R. Cutler, P. L. Rodriguez and J. A. Márquez: *Nature* **462**, 665 (2009).
 - 29) Y. Zhao, T. F. Chow, R. S. Puckrin, S. E. Alfred, A. K. Korir, C. K. Larive and S. R. Cutler: *Nat. Chem. Biol.* **3**, 716 (2007).
 - 30) K. Melcher, Y. Xu, L. Ng, X. E. Zhou, F. Soon, V. Chinnusamy, K. M. Suino-Powell, A. Kovach, F. S. Tham, S. R. Cutler, J. Li, E. Yong, J. Zhu and H. E. Xu: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1102 (2010).
 - 31) Q. Hao, P. Yin, C. Yan, X. Yuan, W. Li, Z. Zhang, L. Liu, J. Wang and N. Yan: *J. Biol. Chem.* **285**, 28946 (2010).
 - 32) X. Yuan, P. Yin, Q. Hao, C. Yan, J. Wang and N. Yan: *J. Biol. Chem.* **285**, 28953 (2010).

プロフィール

宮川拓也 Takuya MIYAKAWA
 東京大学大学院農学生命科学研究科
 Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
 University of Tokyo
 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
 e-mail: atmiya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴：東京大学大学院農学生命科学研究科応
 用生命化学専攻博士課程 2007 年 3 月修了, 博士
 (農学)
 専門分野：構造生物学, タンパク質工学
 現在の研究テーマ：植物のストレス応答制御タン
 パク質の構造・機能解析

田之倉 優 Masaru TANOKURA
 東京大学大学院農学生命科学研究科
 Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
 University of Tokyo
 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
 e-mail: amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴：東京大学大学院理学系研究科生物化学
 専攻博士課程 1979 年 3 月修了, 理学博士
 専門分野：構造生物学, タンパク質工学
 現在の研究テーマ：産業利用を目指したタンパク
 質の構造機能解析
 趣味：植物栽培